

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/365 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580022812.5

[43] 公开日 2007年6月13日

[11] 公开号 CN 1980657A

[22] 申请日 2005.5.2

[21] 申请号 200580022812.5

[30] 优先权

[32] 2004.5.5 [33] US [31] 60/568,348

[86] 国际申请 PCT/US2005/014698 2005.5.2

[87] 国际公布 WO2005/107742 英 2005.11.17

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.5

[71] 申请人 耶鲁大学

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 吕皓燮 大卫·J·奥斯丁 李凌
郑永齐

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 张平元 赵仁临

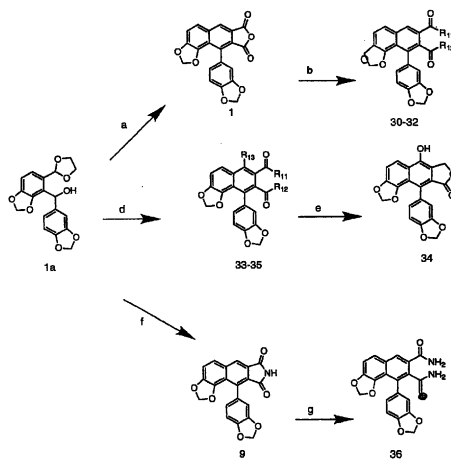
权利要求书 11 页 说明书 57 页 附图 10 页

[54] 发明名称

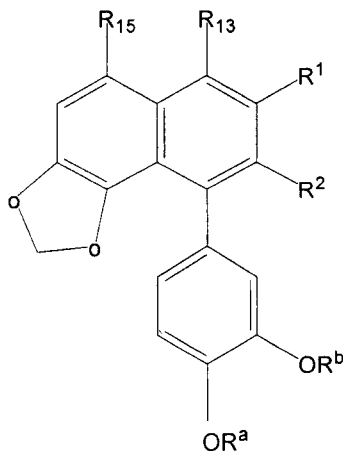
新颖的抗病毒赛菊宁黄质类似物

[57] 摘要

本发明涉及新颖的抗病毒赛菊宁黄质类似物。这些化合物具体可以单独或者与其它药物组合用于治疗肝 DNA 病毒、黄病毒、疱疹病毒和人免疫缺陷病毒。此外，根据本发明的化合物可用于预防或减少出现继发于病毒感染的肿瘤以及继发于病毒感染的其它感染或疾病状态的可能性。



1. 下式分离的化合物或者它们的端基异构体、可药用盐、溶剂化物、或其多晶型物:

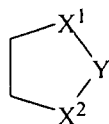


I

其中 R^1 和 R^2 独立地是 C_1 - C_6 烷基、 $COO-Na^+$ 、



$-C-R_1$ 、 $-(CH_2)_n$ 芳基、 $-(CH_2)_nZ-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-(CH_2)_nZ-(CH_2)_n$ 芳基，其中每个基团可以任选被一个或多个卤素、OH、COOH、 C_1 - C_3 烷基或 CN 取代，或者 R^1 和 R^2 独立地是 $-(CH_2)_nNR^3R^4$ 基团，或者 R^1 和 R^2 与相邻的苯环一起形成根据下式结构 Ia 的 5-或 6-元杂环:



其中 Y 是 O、 $N-R^{6a}$ 基团或 $-N(R^7)-N(R^8)$ -基团;

X^1 和 X^2 独立地是 CH_2 或 $C=O$ 基团;

R_1 是 OH、 $-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-(CH_2)_n$ 芳基、 $-(CH_2)_nZ-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-(CH_2)_nZ-(CH_2)_n$ 芳基，其中每个基团可以任选被一个或多个卤素、OH、COOH、 C_1 - C_3 烷基或 CN 取代，或者

其中 R_1 是 $-(CH_2)_nNR^5R^6$ 基团;

R^3 和 R^4 独立地选自 H、 $-(C_1-C_6)$ 烷基或

O

||

-C-R₂基团, 其中 R₂ 是 H、-(C₁-C₆)烷基、-(CH₂)_n芳基、-(CH₂)_jO-(C₁-C₆)烷基或-(CH₂)_jO-(CH₂)_n芳基;

R⁵ 和 R⁶ 独立地选自 H、-(C₁-C₄)烷基、-(CH₂)_n芳基、-(CH₂)_jO-(C₁-C₆)烷基或-(CH₂)_jO-(CH₂)_n芳基;

R^{6a} 是 H、任选被羟基或芳氧基取代的 C₁-C₆烷基、-OR⁹ 或 N-R¹⁰;

R⁷、R⁸ 和 R⁹ 独立地是 H 或可任选被羟基取代的 C₁-C₆烷基;

R¹⁰ 是 H、-(C₁-C₆)烷基或-C(=O)(C₁-C₆)烷基;

Z 是 O 或 NH;

R₁₃ 是 H、OH、-O(C₁-C₄)烷基、(C₁-C₄)烷基;

R₁₅ 是 H、OH、-O(C₁-C₄)烷基、(C₁-C₄)烷基、F、Cl、Br 或 I;

R^a 和 R^b 独立地是-(C₁-C₆)烷基、或者一起形成-(CH₂)_k-基团;

j 是 1、2、3、4 或 5;

k 是 1 或 2; 以及

n 是 0、1、2、3、4 或 5;

条件是, 当 Y 是 O 时, R₁₅ 是 Cl、Br 或 I, 以及当 R¹ 和 R² 是 COOH 时, R₁₅ 是 Cl 或 I。

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中

R¹ 和 R² 独立地是 C₁-C₆烷基和

O

||

-C-R₁,

其中 R₁ 是 OH、-(CH₂)_nZ-(C₁-C₆)烷基、-(CH₂)_nZ-(CH₂)_n芳基,

其中每个基团可以任选被一个或多个卤素、OH、COOH、C₁-C₃烷基或 CN 取代;

Z 是 O 或 NH;

n 是 0、1、2、3、4 或 5;

R^a 和 R^b 独立地是-O(C₁-C₆)烷基、或者一起形成-(CH₂)_k-基团;

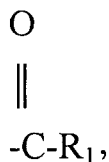
j 是 1、2、3、4 或 5;

k 是 1 或 2; 以及

R_{13} 和 R_{15} 是 H。

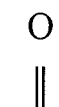
3. 根据权利要求 1 的化合物, 其中

R^1 和 R^2 是



其中 R_1 是 OH、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}^3\text{R}^4$ 基团, 其中 n 是 0、1、2、3、4 或 5;

R^3 和 R^4 独立地选自 H、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ 烷基或



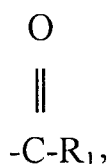
$-\text{C}-\text{R}_2$ 基团, 其中 R_2 是 H、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ 烷基、 $-(\text{CH}_2)_n$ 芳基、 $-(\text{CH}_2)_j\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ 烷基或 $-(\text{CH}_2)_j\text{O}-(\text{CH}_2)_n$ 芳基;

R^a 和 R^b 独立地是 $-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ 烷基;

R_{13} 和 R_{15} 是 H。

4. 根据权利要求 1 的化合物, 其中

R^1 和 R^2 是

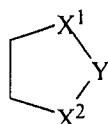


其中 R_1 是 OH、 NH_2 、 $-(\text{CH}_2)_n\text{Z}-(\text{C}_1-\text{C}_6)$ 烷基, 其中 Z 是 O 以及 n 是 0、1、2、3、4 或 5;

R^a 和 R^b 一起形成 $-(\text{CH}_2)_k-$ 基团, 其中 k 是 1 或 2;

R_{13} 和 R_{15} 是 H。

5. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 R^1 和 R^2 与相邻的苯环一起形成根据下式结构的 5-或 6-元杂环:



其中 Y 是 O、 $\text{N}-\text{R}^{6a}$ 基团或 $-\text{N}(\text{R}^7)-\text{N}(\text{R}^8)-$ 基团;

X^1 和 X^2 独立地是 CH_2 或 $\text{C}=\text{O}$ 基团;

R^{6a} 是 H、任选被羟基取代的 C_1-C_6 烷基、 $-\text{OR}^9$ 或 $\text{N}-\text{R}^{10}$;

R^7 、 R^8 和 R^9 独立地是H或可任选被羟基取代的 C_1 - C_6 烷基;

R^{10} 是H、 $-(C_1-C_6)$ 烷基或 $-C(=O)(C_1-C_6)$ 烷基;

R_{13} 和 R_{15} 是H;

R^a 和 R^b 独立地是 $-(C_1-C_6)$ 烷基, 或者一起形成 $-(CH_2)_k$ -基团;

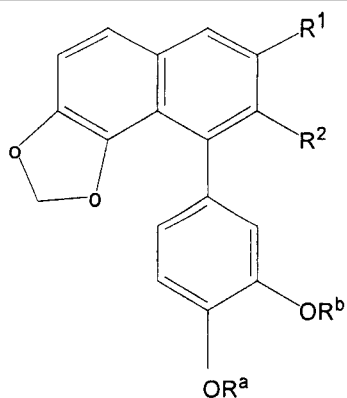
k是1或2。

6. 权利要求1的化合物, 其选自: 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-苄基氧基甲基-萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸苄基酯; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-苄基氧基甲基-萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸3-苄基氧基-丙基酯; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-甲基-萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸3-羟基-丙基酯; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-苄基氧基甲基-萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸(3-苄基氧基-丙基)-酰胺; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7,9-二酮; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-氨基甲酰基-萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-8-羧酸; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-(3-苄基氧基-丙基)-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7,9-二酮; 10-(3,4-二甲氧基-苯基)-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7,9-二酮; 7-氨基甲酰基-9-(3,4-二甲氧基-苯基)-萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-8-羧酸; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7,8-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-9-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-甲基-7,8-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-9-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-甲基-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-(3-苄基氧基-丙基)-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-(3-羟基-丙基)-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7-酮; 10-(3,4-二甲氧基-苯基)-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-甲氧基-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-9-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-羟基-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7,9-二酮; N-(10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7,9-二氧代-7,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-8-基)-乙酰胺; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-甲基氨基甲酰基-萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-8-羧酸;

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-二甲基氨基甲酰基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-8-羧酸; N-(10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-氧代-7,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-8-基)-乙酰胺; N-(10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-9-氧代-7,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-8-基)-乙酰胺; 11-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8,9-二氮杂-环戊二烯并[*a*]蒽-7,10-二酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-(3-羟基-丙基)-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7,9-二酮; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7,8-二羧酸二甲酯; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-6-羟基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7,8-二羧酸二乙酯; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-6-甲氧基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7,8-二羧酸二乙酯; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7,8-二羧酸二酰胺; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-氯-9*H*-呋喃并[3',4':6,7]萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-溴-9*H*-呋喃并[3',4':6,7]萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-碘代-9*H*-呋喃并[3',4':6,7]萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-溴-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7-酮; 11-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-氯-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8,9-二氮杂-环戊二烯并[*a*]蒽-7,10-二酮; 11-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-溴-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8,9-二氮杂-环戊二烯并[*a*]蒽-7,10-二酮; 11-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-碘代-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8,9-二氮杂-环戊二烯并[*a*]蒽-7,10-二酮; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-氯-8-羟甲基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸单钠盐。

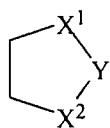
7. 根据权利要求 1 的化合物, 所述化合物选自: 10-(3,4-二甲氧基-苯基)-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7-酮或者 N-(10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-氧代-7,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-8-基)-乙酰胺(26)、N-(10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-9-氧代-7,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-8-基)-乙酰胺。

8. 具有下式结构的分离和纯化的化合物:



II

其中 R^1 和 R^2 与相邻的苯环一起形成根据下式结构 Ia 的 5-或 6-元杂环:



其中 Y 是 $N-R^{6a}$ 基团;

X^1 和 X^2 独立地是 CH_2 或 $C=O$ 基团;

R^{6a} 是 H、任选被羟基取代的 C_1-C_6 烷基、 $-OR^9$ 或 $N-R^{10}$;

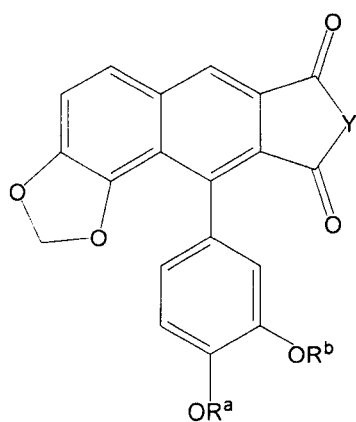
R^{10} 是 H、 $-(C_1-C_6)$ 烷基或 $-C(=O)(C_1-C_6)$ 烷基;

R^a 和 R^b 独立地是 $-(C_1-C_6)$ 烷基, 或者一起形成 $-(CH_2)_k$ -基团;

k 是 1 或 2。

9. 制备权利要求 8 的化合物的方法, 所述方法包括

(a) 将具有式 III 的化合物与还原剂反应,



III

其中 Y 是 $N-R^{6a}$ 基团;

R^{6a} 是 H、任选被羟基取代的 C_1-C_6 烷基、 $-OR^9$ 或 $N-R^{10}$;

R^9 是 H 或任选被羟基取代的 C_1-C_6 烷基;

R^{10} 是 H、 $-(C_1-C_6)$ 烷基或 $-C(=O)(C_1-C_6)$ 烷基;

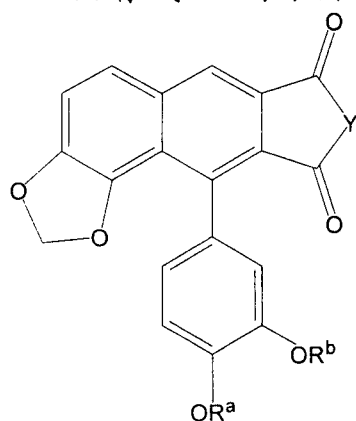
R^a 和 R^b 独立地是 $-(C_1-C_6)$ 烷基, 或者一起形成 $-(CH_2)_k$ -基团;

k 是 1 或 2;

然后

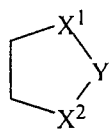
(b) 分离权利要求 8 的化合物。

10. 具有式 III 的分离的化合物:



III

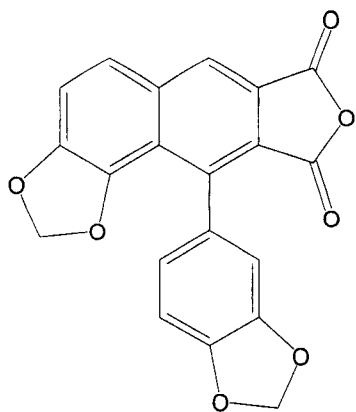
其中 R^1 和 R^2 与相邻的苯环一起形成根据下式结构 Ia 的 5-或 6-元杂环:



其中 Y 是 $N-R^{6a}$ 基团; R^{6a} 是 H、任选被羟基取代的 C_1-C_6 烷基、 $-OR^9$ 或 $N-R^{10}$; R^9 是 H 或任选被羟基取代的 C_1-C_6 烷基; R^{10} 是 H、 $-(C_1-C_6)$ 烷基或 $-C(=O)(C_1-C_6)$ 烷基; R^a 和 R^b 独立地是 $-(C_1-C_6)$ 烷基, 或者一起形成 $-(CH_2)_k$ -基团; k 是 1 或 2。

11. 根据权利要求 10 的化合物, 其中 R^a 和 R^b 一起形成 $-(CH_2)_k$ -基团, 以及 Y 是 NHAc。

12. 制备权利要求 11 的化合物的方法, 所述方法包括将式 IV 化合物



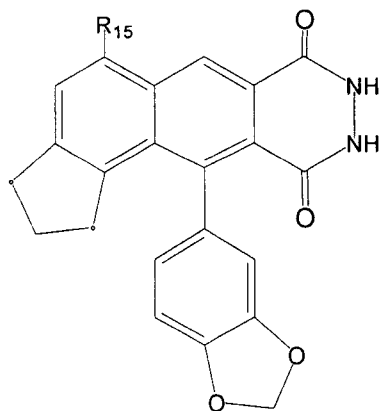
IV

与水合肼反应得到所述化合物。

13. 根据权利要求 12 的化合物, 其中 Y 是 N-R^{6a} 基团;
R^{6a} 是 H、任选被羟基或者芳氧基取代的 C₁-C₆ 烷基;
R^a 和 R^b 形成-(CH₂)_k-基团; k 是 1。

14. 根据权利要求 13 的方法, 其中所述化合物通过将羟基缩醛与马来酰亚胺进行狄尔斯-阿尔德反应得到酰亚胺后, 再将所述酰亚胺还原而得到。

15. 具有下式结构的分离的化合物



V

其中 R₁₅ 是 H、Br 或 I。

16. 制备权利要求 15 的化合物的方法, 所述方法包括将式 III 化合物还原得到其中 R₁₅ 是 H 的 V, 然后任选将所述化合物卤化。

17. 组合物, 其中含有权利要求 1 的化合物和载体。

18. 根据权利要求 17 的组合物, 其中还含有其它的抗病毒化合物。

19. 用于治疗病毒感染的药物组合物, 其中含有抗病毒有效量的权利要求 1-8、10-11 和 15 的化合物和可药用载体、添加剂或赋型剂以及任选的

至少一种其它抗病毒剂。

20. 抑制病毒在感染所述病毒的宿主细胞中复制的方法，所述病毒选自肝 DNA 病毒、黄病毒、疱疹病毒和人免疫缺陷病毒，所述方法包括向所述宿主细胞给药调节所述复制有效量的权利要求 1-8、10-11 和 15 的化合物。

21. 根据权利要求 20 的方法，其中所述病毒是肝 DNA 病毒。

22. 根据权利要求 21 的方法，其中所述肝 DNA 病毒是乙型肝炎病毒。

23. 根据权利要求 20 的方法，其中所述病毒是 3TC 耐受性 HBV。

24. 根据权利要求 20 的方法，其中所述病毒是黄病毒。

25. 根据权利要求 24 的方法，其中所述黄病毒是丙型肝炎病毒。

26. 根据权利要求 20 的方法，其中所述疱疹病毒是 1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、EPSTEIN BARR 病毒和巨细胞病毒。

27. 抑制病毒在感染所述病毒的宿主细胞中复制的方法，所述病毒选自肝 DNA 病毒、黄病毒和疱疹病毒，所述方法包括向所述宿主细胞给药抑制所述复制有效量的权利要求 21 的组合物。

28. 预防、降低需要的哺乳动物中出现病毒感染可能性或治疗病毒感染的方法，所述病毒选自肝 DNA 病毒、黄病毒和疱疹病毒，所述方法包括向所述哺乳动物给药有效预防或治疗所述病毒感染用量的权利要求 1 的化合物。

29. 预防、降低需要的哺乳动物中出现病毒感染可能性或治疗病毒感染的方法，所述病毒选自肝 DNA 病毒、黄病毒和疱疹病毒，所述方法包括向所述哺乳动物给药有效预防或治疗所述病毒感染用量的权利要求 17 的组合物。

30. 根据权利要求 29 的方法，其中所述哺乳动物是人患者。

31. 预防或降低患者出现继发于肝 DNA 病毒或疱疹病毒感染的肿瘤的可能性的方法，所述方法包括向所述患者给药有效预防所述肿瘤用量的权利要求 1-8、10-11 和 15 中任意一项的化合物。

32. 预防或降低患者出现继发于肝 DNA 病毒或疱疹病毒感染的肿瘤的可能性的方法，所述方法包括向所述患者给药有效预防所述肿瘤用量的权利要求 17 的组合物。

33. 根据权利要求 31 或 32 的方法，其中所述患者是人。

34. 根据权利要求 1-8、10-11 和 15 中任意一项的化合物在制备用于抑

制病毒在宿主细胞中复制的药物中的用途，所述病毒选自肝 DNA 病毒、黄病毒、疱疹病毒和人免疫缺陷病毒。

35. 根据权利要求 34 的用途，其中所述病毒是肝 DNA 病毒。

36. 根据权利要求 35 的用途，其中所述肝 DNA 病毒是乙型肝炎病毒。

37. 根据权利要求 36 的用途，其中所述病毒是 3TC 耐受性乙型肝炎病毒。

38. 根据权利要求 34 的用途，其中所述病毒是黄病毒。

39. 根据权利要求 38 的用途，其中所述黄病毒是丙型肝炎病毒。

40. 根据权利要求 34 的用途，其中所述疱疹病毒是 1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、EPSTEIN BARR 病毒和巨细胞病毒。

41. 有效量的根据权利要求 21 的组合物在制备用于抑制病毒在宿主细胞中复制的药物中的用途，所述病毒选自肝 DNA 病毒、黄病毒、疱疹病毒和人免疫缺陷病毒。

42. 根据权利要求 1 的化合物在制备用于需要的哺乳动物中预防、降低出现病毒感染可能性或治疗病毒感染的药物中的用途，所述病毒选自肝 DNA 病毒、黄病毒、疱疹病毒和人免疫缺陷病毒。

43. 根据权利要求 17 的化合物在制备用于需要的哺乳动物中预防、降低出现病毒感染可能性或治疗病毒感染的药物中的用途，所述病毒选自肝 DNA 病毒、黄病毒、疱疹病毒和人免疫缺陷病毒。

44. 根据权利要求 42 或 43 的方法，其中所述哺乳动物是人患者。

45. 根据权利要求 1 的化合物在制备用于预防或降低患者出现继发于肝 DNA 病毒或疱疹病毒的肿瘤的可能性的药物中的用途。

46. 根据权利要求 17 的化合物在制备用于预防或降低患者出现继发于肝 DNA 病毒或疱疹病毒的肿瘤的可能性的药物中的用途。

47. 根据权利要求 42-46 中任意一项的用途，其中所述病毒是肝 DNA 病毒。

48. 根据权利要求 42-46 中任意一项的用途，其中所述肝 DNA 病毒是乙型肝炎病毒。

49. 根据权利要求 42-46 中任意一项的用途，其中所述病毒是 3TC 耐受性 HBV。

50. 根据权利要求 42-46 中任意一项的用途，其中所述病毒是黄病毒。

51. 根据权利要求 42-46 中任意一项的用途，其中所述黄病毒是丙型肝炎病毒。

52. 根据权利要求 42-46 中任意一项的用途，其中所述疱疹病毒是 1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、EPSTEIN BARR 病毒和巨细胞病毒。

53. 根据权利要求 19 的化合物，其中所述其它的抗病毒剂选自：AZT、ddC、ddI、d4T、3TC、delvaridine、奈韦拉平、和 efavirenz 沙奎那韦、利托那韦、茚地那韦、奈非那韦、氨泼那韦及其混合物。

新颖的抗病毒赛菊宁黄质类似物

发明领域

本发明涉及新颖的抗病毒赛菊宁黄质类似物。这些化合物具体可以单独或者与其它药物组合用于治疗肝 DNA 病毒(hepadnavirus)、黄病毒(flavivirus)、疱疹病毒(herpesviruses)和人免疫缺陷病毒。此外,根据本发明的化合物可用于预防继发于病毒感染的肿瘤以及继发于病毒感染的其它感染或疾病状态。

相关申请和支持

本申请要求享受登记于 2004 年 5 月 5 日的临时申请号 US60/568,348 的优先权权益,在此将其全部内容引入作为参考。

发明背景

肝 DNA 病毒

肝 DNA 病毒科是具有引起人乙型肝炎的核心 DNA 的包膜动物病毒科。肝 DNA 病毒科与人甲型肝炎(单链 RNA 肠道病毒)、人丙型肝炎(单链 RNA 病毒的 Flaviridae 科)、或人丁型肝炎(需要乙型肝炎病毒(HBV)复制的闭环反义 RNA 伴随病毒," δ 病毒")无关。除了人和猿乙型肝炎之外,肝 DNA 病毒科还包括其它物种例如旱獭、鸭、松鼠、和苍鹭肝炎病毒。

HBV 基因组由 3.2 kb 具有四个编码病毒 DNA 聚合酶、病毒核心抗原(HbcAg)、病毒表面抗原和 X 抗原的重叠读框的部分双链环状 DNA 组成(Seeger, C.和 Mason, 2000, *Microbiol Mol Biol Rev.* 64 (1): 51-68; Tiollais 等人, 1985, *Nature* 317 (6037): 489-495)。合成了四个 HBV 转录物: 3.5kb、2.4kb、2.1kb 和 0.7kb。HBV RNA 的合成是在前基因组/preC、S1、S2、X 启动子和增强子 I、II 的控制之下的(De Clercq, 1999, *Int J Antimicrob Agents.* 12(2): 81-95)。

3.5kb mRNA 具有逆转录模板作用,另外还可以编码 HBV DNA 聚合酶和核心抗原(Summers 等人, 1982, *Cell* 29 (2): 403-415, Weimer 等人, 1987, *J*

Viol. 61 (10): 3109–3113)。

乙型肝炎病毒感染是世界范围内的主要健康难题。据保守估计慢性感染乙型肝炎病毒(HBV)的人数超过 3 亿(Fu 等人, 2000, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3402-3407)。与具有短潜伏期的甲型肝炎病毒(传染性肝炎病毒)相反, 这是一种具有长潜伏期(大约 50-160 天)的病毒疾病。这种病毒通常通过注射感染血液或血液衍生物或者仅仅是使用被污染的针头、刺血针或其它装置而被转移。在临床和病理学上, 这种疾病类似于甲型病毒性肝炎; 但却没有交叉保护免疫性。HBV 是急性和慢性肝炎的致病因子。全球有超过 3 亿人口是慢性 HBV 携带者。一般来说, 人宿主并没有意识到被感染, 而 HBV 感染可以导致急性肝炎和肝损伤、腹痛、黄疸和某些酶的血液浓度升高。另外, HBV 可形成肝细胞癌, 且作为导致人癌症的因素而言, 仅次于烟草。目前尚不了解 HBV 诱发癌症的机理, 不过已经推定它可以直接引起肿瘤发展或通过慢性炎症、肝硬变和与感染相关的细胞再生而间接引起肿瘤形成。注射后在血清中可以发现病毒抗原(HB_sAg)。

迄今为止最好的保护措施是接种疫苗。已经通过基因工程开发出了人血清衍生的疫苗。尽管已经发现疫苗是有效的, 但是只能从慢性携带者中有限地提供人血清以及漫长和昂贵的纯化过程阻碍了疫苗的生产。此外, 每批疫苗都必须在黑猩猩中进行试验以确保安全性。另外, 疫苗对于已经感染了病毒的患者并没有帮助。

已经付出了很大努力以开发出用于乙型肝炎的临床有益疗法, 但是它们均只是获得了有限的成功。例如, 已经证实干扰素和几种核苷类似物具有相对低的乙型肝炎治愈率, 且它们通常产生严重的副作用。IFN- α 治疗具有非常有限的效力, 且患者表现出不确定的副作用(De Clercq, 1999, *Int J Antimicrob Agents.* 12(2): 81-95), 使得部分患者不能忍受。拉米夫定(也被称作 3TC)和阿德福韦(Chang 等人, 1992. *J. Biol. Chem.* 267:13938-13942; Doong 等人 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 8495-8499)以及阿德福韦 dipivoxil(Angus 等人, 2003, *Gastroenterology* 125: 292-297)是靶向作用于 HBV DNA 聚合酶的非常有效的 HBV 抑制剂。2',3'-双脱氧胞苷(ddC)对中枢和外周神经系统显示出很高的毒性。发现另一种核苷类似物 ara-AMP 可短暂抑制 HBV 感染, 但同时也显示出极强的毒性。

环戊基嘌呤衍生物也表现出抗病毒活性。用于制备这类组合物的方法已

经公开在美国专利 4,999,428 和 5,015,739 号中。另外, Onishi 等在美国专利 5,777,116 号中公开了制备包括含有黄嘌呤-9-基的环戊烷衍生物的方法。

Schinazi 等人等在美国专利 5,684,010 号中制备了表现出选择性抗乙型肝炎活性的对映体纯的 β -D-二氧戊环核苷类。另外, Lin 等在美国专利 5,830,881 号中公开了含有具有 L-构型而非通常的 D-构型的呋喃核糖基部分的某些双脱氧核苷类似物表现出有效的病毒复制抑制作用。然而, 与其它核苷类似物不同的是, 这些类似物对宿主细胞例如动物或人细胞显示出很低的毒性。

Hostetler 在美国专利 5,817,638 号中制备了例如 2',3'-双脱氧胞苷的核苷类似物, 它们通过戊糖基的 5'磷酸酯与指定的脂质例如二油酰基磷脂酰胆碱连接。这种亲脂特性为其相对于单独使用核苷类似物而言提供了优势, 使得可以将它们合并入脂质体的层状结构中。这种形式保证了它们被潜伏了乙型肝炎病毒的肝细胞所吸收。

Holly 等人等在美国专利 5,142,051 号、5,641,763 号和 5,869,467 号中公开了制备嘧啶和嘌呤碱的 N-(2-磷酸基甲氧基乙基)和 N-(3-羟基-2-磷酸甲氧基丙基)衍生物的方法。这些化合物还可以包括黄嘌呤-9-基。这些化合物被看作是其中核苷糖基被携带有羟基的取代碳链替代的非环状核苷类似物。

尽管并没有具体针对乙型肝炎病毒对上述由 Holly 等人开发的化合物进行测定, 但是它们显示出抗其它 DNA 病毒例如疱疹病毒的体外抗病毒活性。显示出抗乙型肝炎病毒活性的其它类似物包括在美国专利 5,726,174 和 5,837,871 号中描述的磷酸甲氧甲基嘌呤和嘧啶衍生物。

另一方面, Chang 等人等在美国专利 5,929,038 号中开发出为环烯醚萜甙元化合物的抗-HBV 化合物, 它由衍生自药用植物、且为单萜化合物的前体环烯醚萜甙制备得到。除了抑制 HBV DNA 合成以外, 这些化合物还可以保护肝由于例如四氯化碳中毒而诱发肝损伤。

过去已经将诸如(-)-(2R,5S)-1-[2-(羟甲基)氧硫杂环戊(oxathiolan)-5-基]胞嘧啶(3TC)、9-[2-(磷酸基甲氧基)乙基]腺嘌呤(PMEA)和 9-[4-羟基-3-(羟甲基)丁-1-基]鸟嘌呤(PCV)的抗-HBV 核苷类似物应用于临床试验中。然而, 某些 HBV 感染患者在用 3TC 或 PCV 治疗一段时间后通常会出现 HBV 复发; 这种复发是因为出现病毒耐受性而引起的。另外, 例如 3TC-耐性 HBV 对其它抗-HBV 核苷类似物也开始具有了交叉耐受性。

因此,核苷类似物治疗的一个主要问题在于出现 HBV 耐药性变异(Fu 等人, 1999, *Biochem Pharmacol.* 57 (12): 1351-1359; Leung 等人, 2001, *Hepatology.* 33 (6): 1527-1532; Liaw 等人, 2000, *Gastroenterology.* 119(1): 172-180)。对于使用拉米夫定治疗的患者而言,假如长期使用拉米夫定治疗的话,据显示耐药性由第 1 年 14%分别提高到第 3 年和第 5 年的 57%和 70% (Liaw 等人, 2003, *J Gastroenterol Hepatol.* 18: 239-245)。随着对有效的抗耐药性 HBV 抗病毒剂的深入研究,已经开发出某些核苷类似物,目前正在进行治疗 3TC-耐受性 HBV 感染的临床评价(Mutimer, 2001, *J. Clin. Virol.* 21: 239-242; Levine 等人, 2002, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2525-2532)。尽管阿德福韦是最近被 FDA 批准的新药,但是 Angus 等人报道指出它在 HBV 聚合酶中出现了新的突变,导致对抗病毒治疗出现 HBV 耐受性(Angus 等人, 2003, *Gastroenterology* 125 (2): 292-297)。

RNAi 和核酶也被用于下调 HBV RNA 和核心蛋白表达(McCaffrey 等人, 2003, *Nature Biotechnol.* 21 (6): 639-644; Shlomai 等人, 2003, *Hepatology.* 37 (4): 764-770 以及 Morrissey 等人, 2002, *J Viral Hepat.* 9 (6): 411-418)。HBV 核心蛋白是 HBV 的主要衣壳蛋白。其磷酸化形式对于前基因组 RNA 包装可能是重要的,而其天然形式对病毒 DNA 的复制很重要(Lan 等人, 1999, *Virology.* 259 (2): 342-348)。核心蛋白还具有 HBV 前基因组/preC 启动子的转录激活因子功能(Kwon 等人, 2002, *Biochem Cell Biol.* 80 (4): 445-455)。Butz 等人开发出一种肽适体,它能够与核心蛋白结合并干扰衣壳形成(Butz 等人, 2001, *Oncogene* 20(45): 6579-6586)。Deres 等人(Deres 等人, 2003, *Science.* 299 (5608): 893-896)发现了 HBV 核衣壳成熟的非核苷抑制剂。这两份研究都证实,抑制 HBV 复制可以通过干扰核心蛋白和衣壳成熟的装配来实现。McCaffrey 和 Shlomai 还独立地发现经由 siRNA 的 HBV DNA 抑制作用直接作用于核心基因(McCaffrey 等人, 2003, *Nature Biotechnol.* 21 (6): 639-644; Shlomai 等人, 2003, *Hepatology.* 37 (4): 764-770)。它们靶向作用于相同核心基因区域中的不同序列,从而不同程度地抑制 HBV 复制。然而,建立 RNAi 作为可行的治疗手段,需要解决下面几个主要问题: RNAi 抑制作用的持久性、有效的递送系统、病毒抵抗力(Gitlin 等人, 2003, *J Virol.* 77 (13): 7159-7165)以及 RNAi 的稳定化。

黄病毒

黄病毒属于披膜病毒科中的黄病毒属。根据病毒分类学，大约存在 50 种病毒，包括丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎病毒、西尼罗病毒及相关黄病毒。将属于黄病毒属的病毒简称为黄病毒。将属于黄病毒属的病毒简称为黄病毒。

黄病毒是感染性疾病的致病因素，并且主要出现在东亚、东南亚和南亚以及非洲，当然在世界其它地方也有发现。日本脑炎病毒是日本脑炎(JE)的病原体。JE 的死亡率相当高，并且这种疾病可带来严重的后遗症。尽管是在日本发现，但是这种疾病已经蔓延至亚洲的其它地方，且目前发现其主要出现在日本以外，主要是南亚和东南亚。

黄热病是由黄热病病毒(YFV)引起的热带蚊媒病毒，具有通过埃及伊蚊传播的都市形式、以及来自不同趋血蚊属蚊科乔木状哺乳动物的乡村、热带丛林或森林形式。黄热病在临床上的特征在于出现发烧、稀脉、蛋白尿、黄疸、和面部充血以及出血，特别是咯血(“黑色呕吐物”)。它在大约 5-10%的病例中具有致命性。

日本脑炎病毒(“JEV”)是日本脑炎(JE)的致病因素。JE 是日本、苏联(西伯利亚)以及亚洲其它地方的流行性脑炎或脑脊髓炎。JE 的死亡率相当高，并且这种疾病可带来严重的后遗症。尽管是在日本发现，但是这种疾病已经蔓延至亚洲的其它地方，且目前发现其主要出现在日本以外，主要是南亚和东南亚。

西尼罗病毒是西尼罗热的致病因素，西尼罗热疾病的特征在于出现头疼、发烧、masculopapular rash、肌痛、淋巴结病和白细胞减少。这种病毒通过鸟类病原体库中的库蚊属传播。

登革热是热带和亚热带区域出现的由登革热病毒引起的流行性疾病，登革热病毒是一种引起出血热综合症的虫酶病毒。公认其严重程度分为四级：*I*级：发烧和全身性症状；*II*级：*I*级加自发性出血(皮肤、龈或胃肠道)；*III*级：*II*级加焦虑和循环衰竭；*IV*级：深度休克。该疾病是通过伊蚊属的蚊子传播的(一般是 *A. aegypti*l, 但通常是 *A. albopictus*)。另外还称作 Aden、bouquet、breakbone、dandy、date、登革热(出血性)或 polka、太阳热、失枕发烧、猩红热或发疹性关节炎。“出血性登革热”是更致命的登革热流行形式，其最近几年出现在太平洋区域的多次流行性爆发中。

登革病毒感染是热带国家、尤其是东南亚和西太平洋国家中的主要社会健康难题，不过在美洲也发现了登革病毒。正如登革病毒通过埃及伊蚊的蚊子传播给人那样，那么并不令人意外的是热带和亚热带国家、特别是东南亚的那些国家非常流行登革病毒。

对于公共卫生官员来说主要关心和正在增加的难题是由登革病毒感染所产生的严重并发症的出现。登革出血热(DHF)和休克综合征(DSS)是与预先存在对异源登革病毒血清型的免疫性存在相关的临床结果。登革出血热的最初特征在于持续约 3-5 天的不严重的发热病。患者在退热期可以恶化成下一步的带有出血紊乱的综合征和通常伴有内部出血和休克的血管通透性增加。自从 50 年代首先在泰国确认以来，据报导在 150 万之多的住院儿童中有 33,000 人死于这种综合征。DHF/DSS 由此在南亚持续发生。在许多热带或接近热带的国家包括古巴、缅甸、印度尼西亚、印度、马尔代夫、斯里兰卡和南太平洋岛国中也发现了 DHF/DSS。登革热暴发通常与蚊子载体、特别是埃及伊蚊的密度有关。

可以将登革病毒分成 4 种血清型，它们在抗原上彼此很相似，但是区别在于被一种血清型感染后足以引起仅部分交叉保护性。这类由一种血清型导致的感染由此不会对其它血清型产生长期免疫。迄今为止用于预防登革病毒感染的疫苗方法仍然不成功。

本说明书通篇中使用的术语“丙型肝炎病毒”或(HCV)是指作为非甲、非乙型肝炎的致病因素的肝炎病毒。处于急性期的上述疾病往往比乙型肝炎更加温和，但是更高比例的上述感染会转变为慢性。在临床上，它通过一整套定义明确的患者症状来进行诊断，包括黄疸、肝触痛和丙氨酸氨基转移酶和天冬氨酸氨基转移酶的血清水平升高。

HCV 是含有大约为 9.4 kb 的正义单链 RNA 基因组的包膜病毒。该病毒基因组由 5'未翻译区域(UTR)、编码大约 3011 个氨基酸的多蛋白前体的长开放阅读框架、以及短链 3' UTR 组成。5' UTR 是 HCV 基因组的最保守部分，对于多蛋白转移的启动和控制很重要。HCV 基因组的转移通过被称作内部核糖体进入的依赖于帽的机理启动。该机理包括核糖体与被称作内核糖体进入位点(IRES)的 RNA 序列相结合。最近已经测定，RNA 假结结构是 UCV IRES 的重要结构单元。病毒结构蛋白包括核壳体核心蛋白(C)和 2 个包膜糖蛋白 E1 和 E2。HCV 还编码两种蛋白酶：通过 NS2-NS3 区域编码的依赖于

锌的金属蛋白酶和编码于 NS3 区域的丝氨酸蛋白酶。这些蛋白酶要求将前体多蛋白的特异性区域裂解成成熟肽。非结构性蛋白 5, NS5B 的羧基部分含有依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶。对于其余非结构性蛋白 NS4A 和 NS4B、以及 NS5A (非结构性蛋白 5 的氨基末端)的功能仍然不清楚。

Colacino 等在美国专利 5,821,242 号和 5,891,874 号中已经开发了一系列苯并咪唑化合物,它们可通过干扰病毒复制复合体的结构和功能来抑制诸如丙型肝炎病毒这样的其它黄病毒中的复制。

利巴韦林(1-β-D-呋核亚硝脒基-1,1,2,4-三唑-3-羧酰胺)在结构上与鸟苷相似,具有抗多种 DNA 和 RNA 病毒包括黄病毒科的体外活性(Davis, 2000, Gastroenterology 118: S104-S114)。利巴韦林在 40%的患者中将血清氨基转移酶水平降至正常,但是它不能降低 HCV-RNA 的血清水平(Davis, 2000, Gastroenterology 118: S104-S114)。因此,单独使用利巴韦林在降低病毒 RNA 水平方面不是有效的。此外,利巴韦林还具有显著的毒性反应,已知它可以诱导贫血。

干扰素(IFNs)是可以商购得到的近十年来用于治疗慢性肝炎的化合物。IFNs 是由响应病毒感染的免疫细胞产生的糖蛋白。IFNs 可以抑制很多病毒包括 HCV 的病毒性复制,当单独使用其治疗丙型肝炎感染时,IFN 可以将血清 HCV-RNA 抑制至不能检测到的水平。此外,IFN 可以使血清氨基转移酶水平正常化。然而遗憾的是,IFN 的效果是短暂性的,在临床感染 HCV 的仅 8%-9%患者中才观察到持久性抑制作用(Davis, 2000, Gastroenterology 118: S104-S114)。

很多专利公开了使用干扰素基础疗法治疗 HCV。例如,美国专利 5,980,884 号公开了使用交感干扰素再治疗罹患 HCV 的患者的方法。美国专利 5,942,223 号公开了使用绵羊和牛干扰素-tau 的抗 HCV 治疗。美国专利 5,928,636 号公开了使用白介素-12 和干扰素 α 的组合疗法治疗感染性疾病包括 HCV。美国专利 5,908,621 号公开了使用聚乙二醇改性干扰素治疗 HCV。美国专利 5,849,696 号公开了使用单独或者与干扰素组合的胸腺素治疗 HCV。美国专利 5,830,455 号公开了使用干扰素和自由基清除剂的组合 HCV 疗法。美国专利 5,738,845 号公开了使用人干扰素 tau 蛋白治疗 HCV。治疗 HCV 的其它干扰素基础治疗公开于美国专利 5,676,942、5,372,808 和 5,849,696 中。

美国 FDA 已经批准可以使用 Schering 的利巴韦林产品 Rebetol 胶囊同时组合 Schering 的 α 干扰素治疗慢性 HCV 感染。Hoffman La Roche 正在销售的利巴韦林商品名为 CoPegus, 其也可以组合干扰素用于治疗 HCV。

还尝试过其它途径, 可参见 Bymock 等人在 *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 11: 2; 79-95 (2000) 中的综述。下面综述了部分更新近的尝试途径。

具体地说, 公开了一种治疗人以及其它宿主动物中丙型肝炎感染 (2004/0006007) 和黄病毒和瘟病毒的方法, 所述方法包括给药有效量的生物活性 1'、2'、或 3'-支链 β -D 或 β -L 核苷或其可药用盐或前药, 它们可以单独或组合给药, 并且可任选在可药用的载体中。WO 01/96353 公开了治疗 HBV 的 2'-脱氧- β -L-核苷的 3'-前药。美国专利 4,957,924 公开了不同的治疗用阿昔洛韦酯。公开了使用某些核苷类似物治疗丙型肝炎病毒的其它专利申请包括: WO 01/32153、WO 01/60315、WO 02/057425、WO 02/057287、WO 02/18404。美国专利 6,323,180 号和美国专利公开 2004/0033959 号公开了使用病毒蛋白酶抑制剂抑制 HCV 的复制。

疱疹病毒

疱疹病毒包括单纯疱疹病毒 1 和 2 型 (HSV-1 和 HSV-2)、人巨细胞病毒 (HCMV)、Epstein-Barr 病毒 (EBV) 和马科疱疹病毒 1 和 4 (EHV-1 和 EHV-4)。疱疹病毒包括双链 DNA 病毒的大家族。它们还是男性最常见病毒性疾病的来源。已经发现感染人群中出现了八种疱疹病毒: 单纯疱疹病毒 1 和 2 型 (HSV-1 和 HSV-2)、水痘-带状疱疹病毒 (VZV)、人巨细胞病毒 (HCMV)、Epstein-Barr 病毒 (EBV)、和人疱疹病毒 6、7、和 8 (HHV-6、HHV-7、和 (HHV-8)。

HSV-1 和 HSV-2 分别在口唇和生殖器引起疱疹性病变。有时它们还会引起眼睛和脑炎感染。HCMV 在婴儿中可能引起婴儿生理缺陷, 在缺乏免疫力的患者中可能引起各种疾病, 例如视网膜炎、肺炎、和胃肠道疾病。VZV 是水痘和带状疱疹的致病因素。EBV 在缺乏免疫力的患者中引起传染性单核细胞增多症, 还可能引发淋巴瘤。其还与 Burkitt's 淋巴瘤、鼻咽癌核何杰金病有关。HHV-6 是蔷薇疹的致病因素, 因而可能与多发性硬化症和慢性疲乏综合症有关。与 HHV-7 相关的疾病尚不清楚, 但是它可能涉及蔷薇疹的某些情形。HHV-8 与 Kaposi's 肉瘤、体腔基质淋巴瘤、和多发性骨髓瘤有关。

由 HSV 引起的感染可以使用药物阿昔洛韦、核苷类似物进行治疗。阿昔洛韦对人宿主而言相对没有毒性,这是因为它不会给目标病毒蛋白的哺乳动物同系物带来不利影响。然而,尚未发现可用于治疗所有疱疹病毒的类似低毒性的方案。尽管 HCMV 可以通过使用药物 gancyclovir (Coen 等人, 1992, *Seminars in Virology: Antiviral therapies*, Saunders Scientific Publications 3: 3-12)进行治疗,但是该药物的应用受到其毒性反应、低生物利用度以及出现药物耐受性变异的限制。

还尝试了其它的治疗方法。其中包括噁嗪并喹诺酮(US2002/0103170)、吡咯并喹诺酮(US2002/0055636)和芳香族丙咪脞(US2003/0203969)。

HIV

人免疫缺陷病毒("HIV")是获得性免疫缺陷综合症("AIDS")的致病因素,获得性免疫缺陷综合症这种疾病其特征在于免疫系统、特别是 CD4+T-细胞被破坏,容易出现随机感染、以及其前兆即 AIDS 相关综合症("ARC"), AIDS 相关综合症这种综合症其特征在于出现诸如持续性全身淋巴结病、发烧和体重减轻的症状。

美国食品和药品监督管理局(FDA)已经批准了很多用于治疗 HIV 感染的药物。其中包括逆转录酶抑制剂(包括核苷和非核苷类似物),该抑制剂阻断可以病毒自身拷贝的早期。包括在这类药物中的有 AZT (也被称作齐多夫定或 ZDV)、ddC (扎西他滨)、ddI (双脱氧肌苷)、d4T (司他夫定)、3TC (拉米夫定)、地拉韦啉(Rescriptor)、奈韦拉平(维乐命)、和 efavirenz (Sustiva)。第二类药物称作蛋白酶抑制剂,其在自身生命周期的晚期阻断病毒的复制,也被批准用于治疗 AIDS,其中包括 Invirase (沙奎那韦)、诺韦(利托那韦)、Crixivan (茚地那韦)、Viracept (奈非那韦)、和 Agenerase (amprenivir)。

在很多患者中证实组合疗法在减少病毒和抑制出现耐受性方面非常有效。在组合疗法被广泛使用的美国,与 HIV 相关的死亡人口数量得到降低 (Palella 等人, 1998, *N. Engl. J. Med.* 338: 853)。

然而,并不是所有的患者都有响应,大多数患者使用上述治疗并不成功。事实上,大约 30-50%的患者使用组合疗法组后并不成功。在大多数病例中出现治疗失败是由于出现病毒耐受性而引起的。在合并有高病毒突变率的感染期间,病毒耐受性反过来由快速翻转的 HIV-1 引起。在这样的情况下,由

药物效能不够、复杂药物方案的差的顺应性以及与内在的药理学屏障接触引起的不完全病毒抑制为出现耐受性提供了场所。

芳基萘木聚糖内酯

芳基萘木聚糖内酯是在植物中发现的天然产物，其中很多具有不同的生理活性，例如磷酸二酯酶抑制(Ukita 等人, 1999, *J. Med. Chem.* 42: 1293-1305)、白三烯生物合成抑制(Thérien 等人, 1993, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3: 2063-2066)和降血脂(Iwasaki 等人, 1995, *Chem. Pharm. Bull.* 43: 1701-1705)、抗肿瘤(Ward 等人, 1997, *Nat. Prod. Rep.* 14: 43-74)和抗病毒活性(Cow 等人, 2000, *Can. J. Chem.* 78: 553-561, Charlton 等人, 1998, *J. Nat. Prod.* 61: 1447-1451)。赛菊宁黄质是由 *Heliopsis scabra* Dunal (菊科)的根(Burden 等人, 1968, *Tetrahedron Lett.* 1035-1039)和 *Taiwania cryptomerioides* Hayata (杉科)的全草(He 等人, 1997, *J. Nat. Prod.* 60: 38-40)分离得到的芳基萘木聚糖内酯，其合成可以通过分子间或分子内狄尔斯-阿尔德反应(Holmes 等人, 1971, *J. Chem. Soc. (C)* 2091-2094; Stevenson 等人, 1989, *J. Nat. Prod.* 52: 367-375; Charlton 等人, 1996, *J. Org. Chem.* 61: 3452-3457)和 benzannulation 反应(Mizufune 等人, 2001, *Tetrahedron Lett.* 42: -439)完成。

美国专利 6,306,899 号公开了赛菊宁黄质及其某些类似物可以降低 HBV 的 RNA 水平和抗原表达，同时在细胞培养模型中选择性地抑制 HBV 复制。该类化合物在抗 HBV 化学治疗中具有独特的性质。因此，感兴趣地合成了更多的赛菊宁黄质类似物以研究它们的构效关系，从而开发出更具选择性的强效抗病毒剂。

发明目的

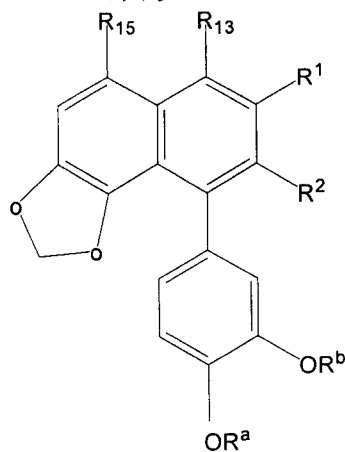
本发明目的在于提供治疗和/或预防哺乳动物中肝 DNA 病毒、黄病毒、疱疹病毒、人免疫缺陷病毒感染以及相关病况和/或疾病状态的化合物、药物包括组合物(例如药物组合物)以及治疗和/或预防哺乳动物中肝 DNA 病毒、黄病毒、疱疹病毒、人免疫缺陷病毒感染以及相关病况和/或疾病状态的方法。

在一些实施方案中，本发明的另一目的在于提供预防哺乳动物中形成肝 DNA 病毒、黄病毒、疱疹病毒或人免疫缺陷病毒相关肿瘤的方法，其中该哺乳动物与所述病毒接触或者感染有所述病毒。本发明另一目的在于提供治

疗 3TC (L(-)SddC)耐受性 HBV 感染的方法。

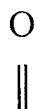
发明概述

本发明涉及下式的分离化合物，或者它们的端基异构体(anomer)、可药用盐、溶剂化物、或其多晶型物：



I

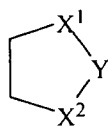
其中 R^1 和 R^2 独立地是 C_1 - C_6 烷基、 $COO-Na^+$ 、



$-C-R_1$ 、 $-(CH_2)_n$ 芳基、 $-(CH_2)_nZ-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-(CH_2)_nZ-(CH_2)_n$ 芳基，其中每个基团可以任选被一个或多个卤素、OH、COOH、 C_1 - C_3 烷基或 CN 取代，

或者 R^1 和 R^2 独立地是 $-(CH_2)_nNR^3R^4$ 基团，

或者 R^1 和 R^2 与相邻的苯环一起形成根据下式结构的 5-或 6-元杂环：



Ia

其中 Y 是 O、 $N-R^{6a}$ 基团或 $-N(R^7)-N(R^8)$ -基团；

X^1 和 X^2 独立地是 CH_2 或 $C=O$ 基团；

R_1 是 OH、 $-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-(CH_2)_n$ 芳基、 $-(CH_2)_nZ-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-(CH_2)_nZ-(CH_2)_n$ 芳基，其中每个基团可以任选被一个或多个卤素、OH、COOH、 C_1 - C_3 烷基或 CN 取代，或者其中 R_1 是 $-(CH_2)_nNR^5R^6$ 基团；

R^3 和 R^4 独立地选自 H、 $-(C_1-C_6)$ 烷基或

O

||

-C-R₂基团, 其中 R₂ 是 H、-(C₁-C₆)烷基、-(CH₂)_n芳基、-(CH₂)_jO-(C₁-C₆)烷基或-(CH₂)_jO-(CH₂)_n芳基;

R⁵和 R⁶独立地选自 H、-(C₁-C₄)烷基、-(CH₂)_n芳基、-(CH₂)_jO-(C₁-C₆)烷基或-(CH₂)_jO-(CH₂)_n芳基;

R^{6a}是 H、任选被羟基或芳氧基取代的 C₁-C₆烷基、-OR⁹或 N-R¹⁰;

R⁷、R⁸、和 R⁹独立地是 H 或可任选被羟基取代的 C₁-C₆烷基;

R¹⁰是 H、-(C₁-C₆)烷基或-C(=O)(C₁-C₆)烷基;

Z 是 O 或 NH;

R₁₃是 H、OH、-O(C₁-C₄)烷基、(C₁-C₄)烷基;

R₁₅是 H、OH、-O(C₁-C₄)烷基、(C₁-C₄)烷基、F、Cl、Br 或 I;

R^a和 R^b独立地是-(C₁-C₆)烷基、或者一起形成-(CH₂)_k-基团;

j 是 1、2、3、4 或 5;

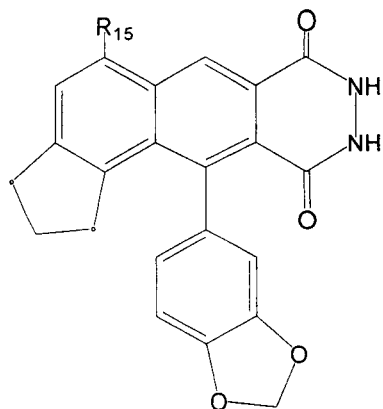
k 是 1 或 2; 以及

n 是 0、1、2、3、4 或 5;

条件是, 当 Y 是 O 时, R₁₅ 是 Cl、Br 或 I, 以及当 R¹和 R²是 COOH 时, R₁₅ 是 Cl、或 I。

本发明进一步涉及含有上述化合物的组合物。所述组合物可以是用作抗病毒剂的药物组合物, 因而含有抗病毒有效量的本发明化合物。本发明的组合物可以进一步含有其它抗病毒剂。

本发明的化合物和组合物可用于制备调节病毒复制和/或预防和/或治疗病毒感染的药物。在具体实施方案中, 所述病毒是肝 DNA 病毒、黄病毒、或疱疹病毒。在另一实施方案中, 所述病毒是人免疫缺陷病毒, 尤其是其中该化合物具有下式结构时;



V

其中 R_{15} 是 H、OH、 $-O(C_1-C_4)$ 烷基、 (C_1-C_4) 烷基、F、Cl、Br 或 I，更优选是 H、Br 或 I。

因此，本发明还涉及调节病毒在被所述病毒感染的宿主细胞中的复制的方法，所述方法包括向所述宿主细胞给药调节该复制有效量的本发明化合物或组合物，以及预防和/或治疗有该需要的哺乳动物中病毒感染的方法，所述方法包括向所述哺乳动物给药预防或治疗所述病毒感染有效量的本发明化合物。

本发明还涉及预防继发于乙型肝炎或丙型肝炎病毒感染的肝癌或者继发于疱疹病毒感染的肿瘤例如 Burkitt's 淋巴瘤、鼻咽癌、何杰金病、Kaposi's 肉瘤、体腔基质淋巴瘤(body cavity based lymphomas)、和多发性骨髓瘤的方法。在相关方面，本发明涉及这些化合物用于制备作为抗病毒剂、特别是用于预防或抑制肝 DNA 病毒、黄病毒和/或疱疹病毒感染的药物的用途。

附图简述

图 1A-E 示出了合成本发明化合物的化学流程图。

图 1A 示出了化合物 **1a** 和 **1-8** 的合成流程图。**6**: $R_3 = O$, $R_4 = Bn$, $R_5 = CH_2OBn$; **7**: $R_3 = O$, $R_4 = H$, $R_5 = CH_3$; **8**: $R_3 = NH$, $R_4 = Bn$, $R_5 = CH_2Obn$ 。

试剂和条件: (a) $HO(CH_2)_2OH$, $p-TsOH$, 苯, 回流; (b) $n-BuLi$, 胡椒醛, THF, $-78^\circ C$ 至室温; (c) 马来酸酐, AcOH, AC_2O , CH_2Cl_2 , $140^\circ C$, 24h; (d) $NaBH_4$, THF, $0^\circ C$, 1h, 然后 10% HCl; (e) NaOH 的 MeOH 水溶液, $70^\circ C$, 1 h; (f) BnBr, KOH, $140^\circ C$, 3 h; (g) NaOH 的 MeOH 溶液: H_2O (4:1), $70^\circ C$ 12h; (h) $HO(CH_2)_3OBn$ (**6**)或者 $H_2N(CH_2)_3OBn$ (**8**), DCC, DMAP (**6**)或者 1-HOBt (**8**) CH_2Cl_2 , $0^\circ C$ 至室温, 4-18 h; (i) Pd/C, THF, H_2 , 室温, 14h。

图 1B 示出了化合物 **1a** 和 **1b** 和 **9-21** 的合成流程图。 **1a**: $R_6, R_7 = -CH_2-$; **1b**: $R_6 = R_7 = CH_3$; **9**: $R_6, R_7 = -CH_2-$, $R_8 = H$; **10**: $R_6, R_7 = -CH_2-$, $R_8 = (CH_2)_3OBn$; **11**: $R_6, R_7 = -CH_3$, $R_8 = H$; **12**: $R_6, R_7 = -CH_2-$, $R_{11} = NH_2$; **13**: $R_6, R_7 = -CH_2-$, $R_{11} = NHCH_3$; **14**: $R_6, R_7 = -CH_2-$, $R_{11} = N(CH_3)_2$; **15**: $R_6 = R_7 = -CH_3$, $R_{11} = NH_2$; **16**: $R_6, R_7 = -CH_2-$, $R_8 = H$, $R_9 = CH_2$, $R_{10} = CO$; **17**: $R_6, R_7 = -CH_2-$, $R_8 = CH_3$, $R_9 = CH_2$, $R_{10} = CO$; **18**: $R_6, R_7 = -CH_2-$, $R_8 = H$, $R_9 = CO$, $R_{10} = CH_2$; **19**: $R_6, R_7 = -CH_2-$, $R_8 = CH_3$, $R_9 = CO$, $R_{10} = CH_2$; **20**: $R_6, R_7 = -CH_2-$, $R_8 = (CH_2)_3OH$, $R_9 = CO$, $R_{10} = CH_2$; **21**: $R_6, R_7 = -CH_3$, $R_8 = H$, $R_9 = CO$, $R_{10} = CH_2$ 。

试剂和条件: (a) $HO(CH_2)_2OH$, p -TsOH, 苯, 回流; (b) n -BuLi, 胡椒碱(**9** 和 **12**)或 3,4-二甲氧基苯甲醛(**11** 和 **15**), THF, $-78^\circ C$ 至室温; (c) 马来酰亚胺, AcOH, Ac_2O , CH_2Cl_2 , $140^\circ C$, 24h; (d) $HO(CH_2)_3OBn$, PPh_3 , DEAD, THF, $0^\circ C$ 至室温, 30 h; (e) KOH 的 DMSO 溶液, MeI, 室温, 24h; (f) Zn 的 AcOH 溶液, $100^\circ C$, 48h (**16** 和 **18** 由 **9** 制备; **20** 由 **10** 制备; **22** 由 **11** 制备); (g) KOH 的 DMSO 溶液, MeI, 室温, 1h; (h) Pd/C, THF, H_2 , 室温 20h。

图 1C 示出了化合物 **24-28** 的合成流程图。 **26**: $R_9 = CO$, $R_{10} = CH_2$; **27**: $R_9 = CH_2$, $R_{10} = CO$ 。

试剂和条件: (a) $NH_2OH \cdot HCl$, $N(Et)_3$, EtOH, 回流, 12h; (b) $NH_2NH_2 \cdot H_2O$, AcOH, 回流, 24h; (c) Zn 的 AcOH 溶液, $100^\circ C$, 5h; (d) $H_2N(CH_2)_3OH$, 甲苯, 回流, 3h。

图 1D 示出了化合物 **1, 9, 30-36** 的合成流程图。 **30**: $R_{11} = OMe$, $R_{12} = OMe$; **31**: $R_{11} = OH$, $R_{12} = OMe$; **31**: $R_{11} = OH$, $R_{12} = OH$; **33**: $R_{11} = OEt$, $R_{12} = OEt$, $R_{13} = OH$; **35**: $R_{11} = OEt$, $R_{12} = OEt$, $R_{13} = OMe$ 。

试剂和条件: (a) 马来酸酐, AcOH, Ac_2O , CH_2Cl_2 , $140^\circ C$, 24h; (b) $TMSCHN_2$, MeOH; THF (1:2), 室温, 12h; (c) KOH 的 MeOH 溶液, 回流, 2-24h; (d) DEADC, AcOH, CH_2Cl_2 , $140^\circ C$, 24h; (e) LAH, THF, $0^\circ C$ 至室温, 2h; (f) 马来酰亚胺, AcOH, Ac_2O , CH_2Cl_2 , $140^\circ C$, 24h; (g) NH_4OH , THF, $40^\circ C$, 72h。

图 1E 示出了化合物 **37-46** 的合成流程图。 **2**: $R_{10} = CH_2$, $R_{14} = O$; **18**: $R_{10} = CH_2$, $R_{14} = NH$; **28**: $R_{10} = CO$, $R_{14} = NHNH$; **37**: $R_{10} = CH_2$, $R_{14} = O$, $R_{15} = Cl$; **38**: $R_{10} = CH_2$, $R_{14} = O$, $R_{15} = Br$; **39**: $R_{10} = CH_2$, $R_{14} = O$, $R_{15} = I$; **40**: $R_{10} = CH_2$, $R_{14} = NH$, $R_{15} = Br$; **41**: $R_{10} = CO$, $R_{14} = NHNH$, $R_{15} = Cl$; **42**: $R_{10} = CO$, $R_{14} = NHNH$, $R_{15} = Br$; **43**:

$R_{10} = \text{CO}$, $R_{14} = \text{NHNH}$, $R_{15} = \text{I}$; **44**: $R_{15} = \text{Cl}$; **45**: $R_{15} = \text{Br}$; **46**: $R_{15} = \text{I}$ 。

试剂和条件: (a) *N*-氯代琥珀酰亚胺(**37**和**41**)或*N*-溴代琥珀酰亚胺(**38**和**42**)或*N*-碘代琥珀酰亚胺(**39**和**43**), CH_3CN 或THF, 浓 H_2O_4 (催化剂), 室温或回流, 20–48 h (**37–39**由**18**制备, **41–43**由**28**制备); (b) NaOH的MeOH水溶液, 70°C , 1–3 h (由**37–39**制备)。

图2示出了赛菊宁黄质(A)和**22**(B)的HBV复制抑制作用。在使用不同浓度的赛菊宁黄质和**22**治疗6天后, 对由HepG2.2.15细胞分离出来的细胞内DNA进行Southern blot杂交分析。检测到其整合和复制的HBV DNA型, 并且如图所示。每个浓度做两份。将各个浓度的平均值在图上描点。所有条带使用分子动力学光密度计(Molecular Dynamics Densitometer)量化, 通过整合带强度标准化。

图3示出了赛菊宁黄质和**22**还具有抗拉米夫定耐受性HBV的抗-HBV活性。将W10(A)和DM2(B)细胞用这两种药物和拉米夫定治疗6天。收集培养基, 处理后进行实时PCR。全部数值通过测量 β -肌动蛋白水平标准化。误差带代表标准水平。

图4示出了HBV 3.5kb、2.4/2.1kb转录物通过赛菊宁黄质(A)和**22**(B)也有所降低。该图示出了对使用不同浓度的赛菊宁黄质和**22**进行治疗的HepG2.2.15细胞中的细胞总RNA进行了Northern blot杂交。每个浓度做两份。(B)中的最后两条泳道是拉米夫定对照。

图5通过对使用赛菊宁黄质(A)和**22**(B)治疗6天的HepG2.2.215细胞进行Western blot进行分析, 示出了HepG2.2.215细胞中赛菊宁黄质(A)和**22**(B)治疗减少了HBV核心蛋白表达, 同时使用抗HBV核心抗体。

图6示出了赛菊宁黄质和**22**的结构。

定义

下面的定义适用于本说明书全文, 以对本发明进行说明。

本文所使用的术语学仅仅是为了描述特定的实施方案, 并不意味着限制, 因为本发明范围只受附录权利要求书的限制。

在给出数值范围时, 应该理解每个指定数值除非另有明确说明包括其下限的十分之一单位、该范围的上限和下限之间以及该范围内的任意其它指定数值或中间值均落入本发明中。可以被独立包括在更小范围内的上述小范围

的上限和下限同样落入本发明中。当所指范围包括界限值中的一个或两个时，排除包括在上述范围内的其余范围同样被包括在本发明中。

除非另有定义，本文中所使用的所有科技术语具有本发明所述领域普通技术人员通常理解的含义。尽管与本文所述方法和物质类似或等价的方法和物质也可以用于本发明实践和测试中，但是在这里仍然对其优选方法和物质进行描述。

需要指出的是，在本文以及附录权利要求书中单数形式"a"、和"the"包括复数形式，除非上下文中另有明确描述。

术语“化合物”是指本文所公开的任何特定的化合物。在上下文中，该术语通常是指单个化合物，但是在某些情形下也可以指所公开化合物的立体异构体和其它位置异构体和/或旋光异构体(包括外消旋混合物)。本发明化合物包括本发明化合物的所有相对立体异构体(例如顺式和反式异构体)和旋光异构体(例如R和S对映体)、以及这类异构体的外消旋、非对映异构体和其它混合物，如果适用的话，还包括本发明化合物的所有多晶型物。

本文所使用的“分离的”是指从其原始环境中除去的物质，即“通过人工”从其天然状态中分离出来的物质。本文所使用的“分离的”化合物是指基本上不含其它化合物的化合物，例如所需化合物重量为至少大约90%纯度，优选所需化合物重量为大约95%纯度，更优选所需化合物重量为至少大约97-98%，甚至更优选所需化合物重量为大约99+%。根据本发明的纯化合物区别于在其天然状态下发现的化合物，例如为通过肝组织生物合成的代谢产物。纯化合物包括由植物或其它组织分离得到的、同时为递送治疗病毒所需活性化合物的形式的天然产物。

术语“可药用盐”在说明书全文中用于描述本文所述本发明化合物的盐形式，它们用来增加所述化合物在患者胃肠道胃液中的溶解度以便促进所述化合物的溶出度和生物利用度。可药用盐包括来源于可药用无机或有机碱和酸的盐。合适的盐包括那些来源于碱金属诸如钾和钠的盐、碱土金属诸如钙、镁的盐和铵盐以及大量其它药物领域中众所周知的酸的盐。特别优选钠和钾盐作为羧酸的中和盐。

术语“可药用衍生物”在说明书全文中用于描述任意的可药用前体药物形式(诸如酯或其它前药基)，在对患者给药时，它们可直接或间接提供本发明化合物或本发明化合物的活性代谢物。

本文所使用的术语“化合物”是指本文所公开的任何具体化合物。在上下文中，该术语通常是指单个化合物，但是在某些情形下也可以指所公开化合物的立体异构体和/或旋光异构体(包括外消旋混合物)。

术语“芳基”通常是用于描述被取代或未被取代的单价芳香自由基，其具有单环(如苯基)或多个稠环(例如萘基)。

术语“调节”是指改变例如生物事件如病毒复制的数量或速率。

术语“C₁₋₆烷基”表示具有1-6个碳原子的直链或支链饱和烃链。C₁₋₆烷基包括但并不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、正己基、异己基、4-甲基戊基、新戊基、2,2-二甲基丙基等。

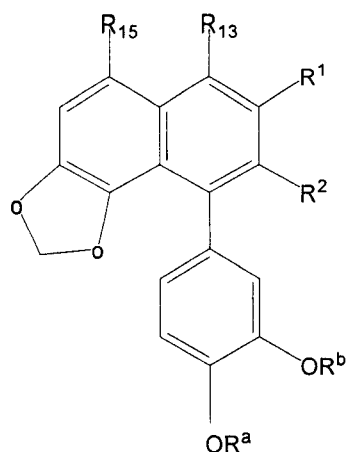
术语“酰基”在说明书全文中用于描述含有C₁-C₂₀直链、支链、芳香或环状烷基(例如环戊基、环己基)链的位于核苷类似物5'位上(即二氧戊环基部分的游离羟基位置上)的基团。位于本发明化合物不同位置上的酰基与通常与之结合的羟基结合形成酯，在给药后所述酯可以裂解产生游离羟基。本发明的酰基由下式结构所示：



其中R是C₁-C₂₀直链、支链、芳香或环状烷基链、烷氧烷基、芳氧烷基例如苯氧甲基、芳基、烷氧基。优选的酰基是其中R是C₁-C₇的酰基。本发明的酰基还包括例如来源于苯甲酸和相关酸类、3-氯苯甲酸、琥珀酸、癸酸和己酸、月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸和油酸以及大量包括甲磺酰基(mesylate)在内的酰基。本领域技术人员应该理解，这些酰基在本发明中具有合成目标药物化合物或者作为本发明核苷的前体药物的用途。

发明详述

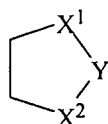
本发明化合物具有下式：

**I**

其中 R^1 和 R^2 独立地是 C_1 - C_6 烷基、 $COO-Na^+$ 、



$-C-R_1$ 、 $-(CH_2)_n$ 芳基、 $-(CH_2)_nZ-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-(CH_2)_nZ-(CH_2)_n$ 芳基，其中每个基团可以任选被一个或多个卤素、OH、COOH、 C_1 - C_3 烷基或 CN 取代，或者 R^1 和 R^2 独立地是 $-(CH_2)_nNR^3R^4$ 基团，或者 R^1 和 R^2 与相邻的苯环一起形成根据下式结构的 5-或 6-元杂环：

**Ia**

其中 Y 是 O、 $N-R^{6a}$ 基团或 $-N(R^7)-N(R^8)$ -基团；

X^1 和 X^2 独立地是 CH_2 或 $C=O$ 基团；

R_1 是 OH、 $-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-(CH_2)_n$ 芳基、 $-(CH_2)_nZ-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-(CH_2)_nZ-(CH_2)_n$ 芳基，其中每个基团可以任选被一个或多个卤素、OH、COOH、 C_1 - C_3 烷基或 CN 取代，或者 R_1 是 $-(CH_2)_nNR^5R^6$ 基团；

R^3 和 R^4 独立地选自 H、 $-(C_1-C_6)$ 烷基或



$-C-R_2$ 基团，其中 R_2 是 H、 $-(C_1-C_6)$ 烷基、 $-(CH_2)_n$ 芳基、 $-(CH_2)_jO-(C_1-C_6)$ 烷基或 $-(CH_2)_jO-(CH_2)_n$ 芳基；

R^5 和 R^6 独立地选自 H、 $-(C_1-C_4)$ 烷基、 $-(CH_2)_n$ 芳基、 $-(CH_2)_jO-(C_1-C_6)$ 烷基或

$-(\text{CH}_2)_j\text{O}-(\text{CH}_2)_n$ 芳基;

R^{6a} 是 H、任选被羟基或芳氧基取代的 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $-\text{OR}^9$ 或 N-R^{10} ;

R^7 、 R^8 、和 R^9 独立地是 H 或可任选被羟基取代的 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基;

R^{10} 是 H、 $-(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基或 $-\text{C}(=\text{O})(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基;

Z 是 O 或 NH;

R_{13} 是 H、OH、 $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 烷基、 $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 烷基;

R_{15} 是 H、OH、 $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 烷基、 $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ 烷基、F、Cl、Br 或 I;

R^a 和 R^b 独立地是 $-(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基、或者一起形成 $-(\text{CH}_2)_k$ -基团;

j 是 1、2、3、4 或 5;

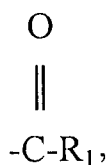
k 是 1 或 2; 以及

n 是 0、1、2、3、4 或 5;

条件是, 当 Y 是 O 时, R_{15} 是 Cl、Br 或 I, 以及当 R^1 和 R^2 是 COOH 时, R_{15} 是 Cl、或 I,

或者它们的端基异构体、可药用盐、溶剂化物、或其多晶型物。

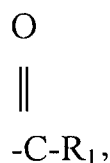
在一具体实施方案中, R^1 和 R^2 独立地是 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基和



其中 R_1 是 OH、 $-(\text{CH}_2)_n\text{Z}-(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基、 $-(\text{CH}_2)_n\text{Z}-(\text{CH}_2)_n$ 芳基,

其中每个基团可以任选被一个或多个卤素、OH、COOH、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基或 CN 取代, Z 是 O 或 NH, n 是 0、1、2、3、4 或 5, R^a 和 R^b 独立地是 $-\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基、或者一起形成 $-(\text{CH}_2)_k$ -基团; j 是 1、2、3、4 或 5, k 是 1 或 2; 以及 R_{13} 和 R_{15} 是 H。

在另一实施方案中, R^1 和 R^2 是

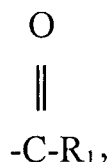


其中 R_1 是 OH、 $-(\text{CH}_2)_n\text{NR}^3\text{R}^4$ 基团, 其中 n 是 0、1、2、3、4 或 5, 以及 R^3 和 R^4 独立地选自 H、 $-(\text{C}_1\text{-C}_6)$ 烷基或



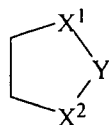
-C-R₂基团, 其中 R₂ 是 H、-(C₁-C₆)烷基、-(CH₂)_n芳基、-(CH₂)_jO-(C₁-C₆)烷基或-(CH₂)_jO-(CH₂)_n芳基; R^a和 R^b独立地是-(C₁-C₆)烷基; 以及 R₁₃和 R₁₅是 H。

在又一实施方案中, R¹和 R²是



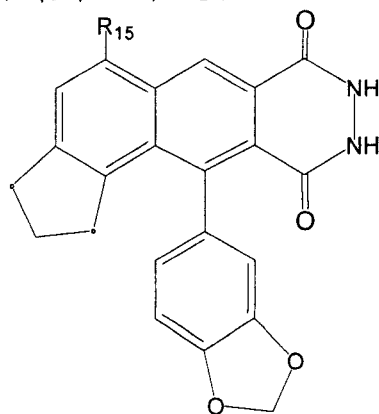
其中 R₁ 是 OH、NH₂、-(CH₂)_nZ-(C₁-C₆)烷基, 其中 Z 是 O 以及 n 是 0、1、2、3、4 或 5; R^a和 R^b一起形成-(CH₂)_k-基团, 其中 k 是 1 或 2; 以及 R₁₃和 R₁₅是 H。

在又一实施方案中, R¹和 R²与相邻的苯环一起形成根据下式结构的 5-或 6-元杂环:



其中 Y 是 O、N-R^{6a}基团或-N(R⁷)-N(R⁸)-基团; X¹和 X²独立地是 CH₂或 C=O 基团; R^{6a}是 H、任选被羟基取代的 C₁-C₆烷基、-OR⁹或 N-R¹⁰; R⁷、R⁸、和 R⁹独立地是 H 或可任选被羟基取代的 C₁-C₆烷基; R¹⁰是 H、-(C₁-C₆)烷基或 -C(=O)(C₁-C₆)烷基; R₁₃和 R₁₅是 H; R^a和 R^b独立地是-(C₁-C₆)烷基, 或者一起形成-(CH₂)_k-基团, 其中 k 是 1 或 2。

在另一实施方案中, 本发明化合物具有下式:



V

在更具体的实施方案中,所述化合物可以选自至少一种下述化合物: 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-苄基氧基甲基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸苄基酯; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-苄基氧基甲基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯(dioxole)-7-羧酸 3-苄基氧基-丙基酯; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-甲基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸 3-羟基-丙基酯; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-苄基氧基甲基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸(3-苄基氧基-丙基)-酰胺; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并(dicyclopenta)[*a,g*]萘-7,9-二酮; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-氨基甲酰基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-8-羧酸; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-(3-苄基氧基-丙基)-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7,9-二酮; 10-(3,4-二甲氧基-苯基)-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7,9-二酮; 7-氨基甲酰基-9-(3,4-二甲氧基-苯基)-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-8-羧酸; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-甲基氨基甲酰基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-8-羧酸; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-二甲基氨基甲酰基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-8-羧酸; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7,8-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-9-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-甲基-7,8-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-9-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-甲基-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-(3-苄基氧基-丙基)-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-(3-羟基-丙基)-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7-酮; 10-(3,4-二甲氧基-苯基)-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-甲氧基-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-9-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-羟基-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7,9-二酮; N-(10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7,9-二氧代-7,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-8-基)-乙酰胺(25); N-(10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-氧代-7,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-8-基)-乙酰胺; N-(10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-9-氧代-7,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-8-基)-乙酰胺; 11-苯并[1,3]间二氧

杂环戊烯-5-基-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8,9-二氮杂-环戊二烯并[a]蒽-7,10-二酮;
10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-(3-羟基-丙基)-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环
戊二烯并[a,g]萘-7,9-二酮; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-萘并[1,2-d][1,3]
间二氧杂环戊烯-7,8-二羧酸二甲酯; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-6-羟基
-萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-7,8-二羧酸二乙酯; 9-苯并[1,3]间二氧杂环
戊烯-5-基-6-甲氧基-萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-7,8-二羧酸二乙酯; 9-
苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-7,8-二羧酸
二酰胺; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-氯-9*H*-呋喃并[3',4':6,7]萘并
[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-7-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-溴-9*H*-
呋喃并[3',4':6,7]萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-7-酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂
环戊烯-5-基-5-碘代-9*H*-呋喃并[3',4':6,7]萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-7-
酮; 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-溴-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环
戊二烯并[a,g]萘-7-酮; 11-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-氯-8,9-二氢-1,3-
二氧杂-8,9-二氮杂-环戊二烯并(cyclopenta)[a]蒽-7,10-二酮; 11-苯并[1,3]间二
氧杂环戊烯-5-基-5-溴-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8,9-二氮杂-环戊二烯并[a]蒽
-7,10-二酮; 11-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-碘代-8,9-二氢-1,3-二氧杂
-8,9-二氮杂-环戊二烯并[a]蒽-7,10-二酮; 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-
氯-8-羟甲基-萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸单钠盐; 9-苯并[1,3]间二
氧杂环戊烯-5-基-8-羟甲基-5-碘代-萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸
单钠盐。

在更具体的实施方案中,所述化合物是 10-(3,4-二甲氧基-苯基)-8,9-二氢
-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7-酮和 N-(10-苯并[1,3]间二氧杂环
戊烯-5-基-7-氧代-7,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-8-基)-乙
酰胺(26)、N-(10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-9-氧代-7,9-二氢-1,3-二氧杂
-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-8-基)-乙酰胺。

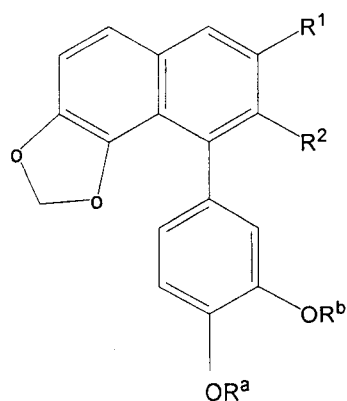
合成

在本发明各种组合物的化学合成过程中,本领域普通技术人员不需经过
度试验即可实现本发明。具体地说,为了在萘基或苯环所需位置上引入特定
的取代基,根据本发明的具体教导以及芳族化学的一般规则,本领域普通技
术人员明白需要完成哪些不同步骤。这些步骤是本领域众所周知的。此外,

"保护"官能基团例如羟基或氨基等,除此以外,以及"脱保护"上述相同官能基团所采取的化学步骤在具体的合成情形下也应当被认为是适宜的。许多保护基团可用于本发明中。对于向羟基上引入任意一个或多个酰基,可以使用本领域普通技术人员熟知的标准技术。本发明化合物的其它前药形式也可以通过本领域熟知的方法进行合成。

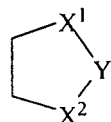
一般举例来说,本发明化合物通常可以按照图 1A、1B、1C 和 1D 的流程图合成,如果需要的话可以对其进行本领域普通技术人员所熟知的修饰。本发明的式 I 和 II 化合物可以有利地按照图 1A-1D 所示的流程图合成,如果需要的话还可以对其它流程图进行类似的修饰。式 III 和 IV 化合物可以有利地按照图 1B 所示的流程图合成,如果需要的话也可以进行类似的修饰。式 V 化合物可以有利地按照图 1C 所示的流程图合成,如果需要的话也可以进行类似的修饰。

在具体实施方案中,本发明化合物具有下式



(II)

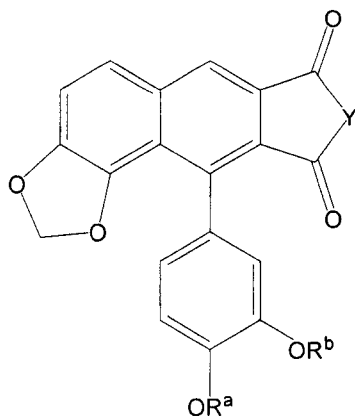
其中 R^1 和 R^2 与相邻的苯环一起形成根据结构 Ia 的 5-或 6-元杂环:



其中 Y 是 N- R^{6a} 基团; R^{6a} 是 H、任选被羟基取代的 C_1 - C_6 烷基、 $-OR^9$ 或 N- R^{10} ; R^9 是 H 或可任选被羟基取代的 C_1 - C_6 烷基; R^{10} 是 H、 $-(C_1-C_6)$ 烷基或 $-C(=O)(C_1-C_6)$ 烷基; X^1 和 X^2 独立地是 CH_2 或 $C=O$ 基团; R^a 和 R^b 独立地是 $-(C_1-C_6)$ 烷基, 或者一起形成 $-(CH_2)_k$ -基团; k 是 1 或 2。

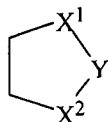
化合物 II 可以通过将具有下式的化合物与还原剂($0^\circ C$ 的硼氢化钠)反应

制备得到,



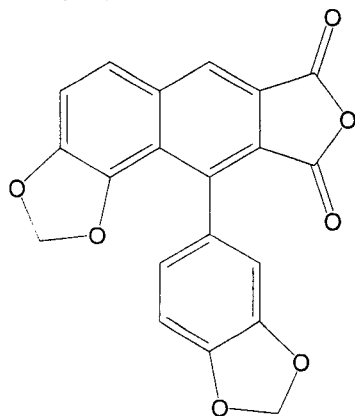
III

其中 R^1 和 R^2 与相邻的苯环一起形成根据结构 Ia 的 5-或 6-元杂环:



其中 Y 是 $N-R^{6a}$ 基团; R^{6a} 是 H、任选被羟基取代的 C_1-C_6 烷基、 $-OR^9$ 或 $N-R^{10}$; R^9 是 H 或任选被羟基取代的 C_1-C_6 烷基; R^{10} 是 H、 $-(C_1-C_6)$ 烷基或 $-C(=O)(C_1-C_6)$ 烷基; R^a 和 R^b 独立地是 $-(C_1-C_6)$ 烷基, 或者一起形成 $-(CH_2)_k$ -基团; k 是 1 或 2。式 II 化合物可以采用本领域已知的步骤分离, 包括但并不限于柱色谱法、沉淀法、固体结晶法, 或者当所述衍生物为油状物时, 采用蒸馏法或分子真空蒸馏法。

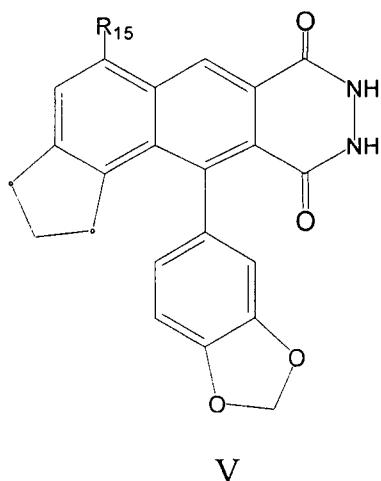
在具体实施方案中, R^a 和 R^b 一起形成 $-(CH_2)_k$ -基团, 以及 Y 是 NHAc。该化合物可以通过将化合物(IV)与水合肼在乙酸中和回流条件下反应 24 小时制备得到。



IV

在另一实施方案中，Y 是 N-R^{6a} 基团；R^{6a} 是 H、任选被羟基或者芳氧基取代的 C₁-C₆ 烷基；R^a 和 R^b 形成 -(CH₂)_k-基团；k 是 1。该化合物可以通过将羟基缩醛与马来酰亚胺进行狄尔斯-阿尔德反应得到酰亚胺后，再将所述酰亚胺还原而制备得到。

在又一实施方案中，本发明化合物具有下式



其中 R₁₅ 是 H、I 和 Br。该化合物可以按照图 1C 的流程图，通过将式 IV 化合物与水合肼在乙酸中和回流条件下反应 24 小时制备得到。然后将所得到的化合物用锌在乙酸中处理，得到式 V 的重排和脱乙酰化产物。如果 R₁₅ 是卤代的(例如 Br 或 I)，则按照流程图 1E，该化合物可使用 N-卤代琥珀酰亚胺的乙腈或 THF 溶液和酸催化剂回流 24-48 小时，由式 V 的重排和脱乙酰化产物制备得到。

组合物及用途

本发明的化合物尤其可应用于抵抗受肝 DNA 病毒例如乙型肝炎病毒 (HBV)，黄病毒包括但并不限于丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎和西尼罗病毒，疱疹病毒包括但并不限于 1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、Epstein Barr 病毒、巨细胞病毒，人免疫缺陷病毒(例如 HIV-1 或 HIV-2)折磨的动物、特别是人的病毒感染及其并发症。本发明化合物尤其可应用于治疗或预防 3TC-耐受性病毒感染(例如 3TC 耐受性 HBV)。本发明化合物作为治疗剂对抗许多疾病状态提供了巨大潜能，目前对这些疾病几乎还没有有效的疗法可以选择。本发明化合物可以单独或者与其它活性剂或其它治疗方法组合使用。

本发明还涉及调节肝 DNA 病毒例如乙型肝炎病毒(HBV), 黄病毒包括但并不限于丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎和西尼罗病毒, 疱疹病毒包括但并不限于 1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、EPSTEIN BARR 病毒、巨细胞病毒, 人免疫缺陷病毒(例如 HIV-1 或 HIV-2)的复制或生长的方法, 所述方法包括将所述病毒接触抑制有效用量或浓度的至少一种所公开的核苷类似物。该方法可用于对照试验, 诸如用于测定相关抗病毒化合物的活性以及用于测定患者的病毒感染对本发明化合物之一的敏感性。

在相关方面, 本发明涉及治疗或预防(即减少感染的可能性)肝 DNA 病毒例如乙型肝炎病毒(HBV), 黄病毒包括但并不限于丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎和西尼罗病毒, 疱疹病毒包括但并不限于 1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、EPSTEIN BARR 病毒、巨细胞病毒, 人免疫缺陷病毒(例如 HIV-1 或 HIV-2)的方法, 所述方法包括在待治疗的患者中给药抗病毒有效量的一种或多种本发明的化合物以抑制该病毒的生长或复制。在本发明的优选方法方面, 本发明的组合物可用于预防或延迟肝 DNA 病毒例如乙型肝炎病毒(HBV), 黄病毒包括但并不限于丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎和西尼罗病毒, 疱疹病毒包括但并不限于 1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、EPSTEIN BARR 病毒、巨细胞病毒, 人免疫缺陷病毒(例如 HIV-1 或 HIV-2)感染或者相关病症或病毒并发症在患者中发作, 尤其包括已经感染过 HBV 或 HCV 的患者中的肝癌。

基于上述新化合物的组合物、特别是药物组合物中含有一种或多种用于治疗病毒、通常是肝 DNA 病毒例如乙型肝炎病毒(HBV), 黄病毒包括但并不限于丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎和西尼罗病毒, 疱疹病毒包括但并不限于 1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、EPSTEIN BARR 病毒、巨细胞病毒, 人免疫缺陷病毒(例如 HIV-1 或 HIV-2)的治疗有效量的上述化合物, 任选组合有可药用添加剂、载体或赋型剂。

药物剂型形式的本发明化合物还可以用作抑制肝 DNA 病毒例如乙型肝炎病毒(HBV), 黄病毒包括但并不限于丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎和西尼罗病毒, 疱疹病毒包括但并不限于 1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、EPSTEIN BARR 病毒、巨细胞病毒, 人免疫缺陷病毒(例如 HIV-1 或 HIV-2)的生长或复制的预防剂。所述预防剂尤其适宜

为抗病毒剂。在某些药物剂型中，优选可以促进溶出、吸收和生物利用的本发明化合物的前药形式例如酰化形式。

尽管不受任何理论的限制，但是据信本发明的化合物可以通过其减少病毒 RNA 的能力而具有抗病毒活性，这将导致病毒 RNA、病毒基因表达减少、以及抗原表达和病毒复制减少。令人意外的是，已证实本发明化合物对肝 DNA 病毒例如乙型肝炎病毒(HBV)，黄病毒包括但并不限于丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎和西尼罗病毒，疱疹病毒包括但并不限于 1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、EPSTEIN BARR 病毒、巨细胞病毒，人免疫缺陷病毒(例如 HIV-1 或 HIV-2)具有异常的活性。

与仅仅抑制病毒 DNA 合成的其它核苷类似物相反，本发明化合物在病毒周期的早期阶段抑制病毒，在该病毒周期中，病毒通过 3.5kb 前基因组 RNA 的逆转录以及病毒 DNA 表达细胞中的病毒基因表达来复制。该化合物优选可以减少细胞中的病毒 RNA；因而同样可以减少病毒基因表达和复制。

优选以药物剂型的形式使用本发明化合物。在本发明的药物方面，优选将本发明化合物与可药用载体一起配制。一般来说，优选以口服给药方式给药药物组合物，不过某些制剂也可以通过非肠道、静脉、肌内、经皮、口含、皮下、栓剂或其它途径给药。优选以无菌盐水的形式给药静脉和肌内制剂。当然，本领域技术人员可以在本说明书的教导范围内改变这些制剂，以便提供大量用于特定给药途径且不会使本发明的组合物不稳定或损害其治疗活性的制剂。特别地，例如使本发明化合物更易溶于水或其它载体的修饰方案可以通过本领域技术人员进行适当的微小修饰(成盐、酯化等)而方便地实现。本领域普通技术人员还可以改变给药途径和具体化合物的剂量方式，以便维持本发明化合物的药代动力学特性而在患者体内获得最大的有益作用。

在某些药物剂型中，优选化合物的前体药物形式，尤其包括本发明化合物的酰化(乙酰化或其它)和醚衍生物以及各种可药用盐形式。本领域技术人员应该知道如何将本发明化合物修饰成前体药物形式，以有利于将活性化合物递送至宿主生物体或患者中的靶向部位。如果合适的话，本领域技术人员还可利用前体药物形式的有利药代动力学参数，将本发明化合物递送至宿主生物体或患者中的靶向部位，从而最大程度地实现所述化合物的预期作用。

本发明治疗活性制剂中所包含的化合物用量为有效治疗感染或病症的用量；在优选的实施方案中，为有效治疗肝 DNA 病毒例如乙型肝炎病毒

(HBV), 黄病毒包括但并不限于丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎和西尼罗病毒, 疱疹病毒包括但并不限于 1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、EPSTEIN BARR 病毒、巨细胞病毒, 人免疫缺陷病毒(例如 HIV-1 或 HIV-2)感染的用量。一般来说, 药物剂型中本发明化合物的治疗有效量通常在大约 0.1 mg/kg 至大约 100 mg/kg 或以上、更优选稍低于大约 1 mg/kg 至大约 50 mg/kg 患者体重或略高的范围内, 这取决于所使用的化合物、所治疗的疾病或感染以及给药途径。就 HBV 或 HCV 感染而言, 所给药的活性化合物用量的优选范围在大约 0.5 mg/kg 至大约 25 mg/kg 患者体重的范围内, 这取决于活性剂在患者体内的药代动力学特性。上述剂量范围通常在患者体内可产生大约 0.05 至大约 100 微克/cc 血液的活性化合物有效血药浓度。为了实现本发明目的, 本发明组合物的预防有效量落入上述针对治疗有效量所述的浓度范围内, 并且通常与治疗有效量相同。

活性化合物在药物组合物中的浓度取决于药物的吸收、分布、失活和排泄率以及其它本领域技术人员所公知的因素。应注意剂量值也可以根据所缓解疾病的严重程度来改变。进一步应该理解的是, 对于任何特定的受治疗者来说, 应当根据个体需要以及给予和指导组合物给药的职业人员的判断, 随时调整具体的剂量方案; 本文所列举的浓度范围仅仅是示例性的, 而并不意味着对所要求保护的组合物范围或实践构成限制。活性成分可以一次给药, 也可以分成若干小剂量在不同的时间间隔内给药。

还可以将活性化合物或其可药用盐与不影响所需作用的其它活性物质混合, 或者与补充所需作用的物质诸如其它抗病毒药或根据所需目标或疗法不同而选择的抗菌素、抗真菌药、抗炎药混合。

活性化合物的给药可以在连续给药(静脉滴注)至每日数次口服给药(例如每日 4 次(Q.I.D))的范围内, 并且可以包括口服、局部、非肠道、肌肉、静脉、皮下、经皮(可以包括透皮促进剂)、口含和栓剂给药以及其它给药途径。还可以将肠溶衣口服片剂用于促进来自口服给药途径的化合物的生物利用度。最有效的剂型取决于所选择的特定活性剂的药代动力学特性以及患者体内疾病的严重程度。口服剂型因给药容易以及预期具有满意的患者顺应性而特别优选。

为了制备本发明的药物组合物, 优选将治疗有效量的一种或多种本发明化合物与可药用载体按照用于制备药剂的常规药物配制技术进行充分混合。

可以根据给药例如口服或非肠道所需的制剂形式,采用各种形式的载体。在制备口服剂型的药物组合物时,可以使用任意常用的药用介质。因此,对于诸如混悬剂、酞剂和溶液剂的口服液体制剂来说,可以使用包括水、乙二醇、油、醇类、调味剂、防腐剂、着色剂等在内的适宜载体和添加剂。对于诸如粉剂、片剂、胶囊剂的固体口服制剂和对于诸如栓剂的固体制剂来说,可以使用包括淀粉、诸如右旋糖、甘露糖醇、乳糖的糖载体和相关载体、稀释剂、成粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等在内的适宜载体和添加剂。如果需要的话,可以使用标准技术将片剂或胶囊剂配制成肠衣片剂或缓慢释放剂。这些剂型的应用可以明显提高所述化合物在患者体内的生物利用度。

对于非肠道制剂来说,尽管也可以含有其它组分包括那些辅助分散的物质,但是载体通常包括无菌水或氯化钠水溶液。当然,如果使用无菌水并维持无菌的话,那么也必须将组合物和载体进行灭菌。也可以制备注射用混悬剂,其中可以使用适宜的液体载体、悬浮剂等。

通过制备可药用载体的常规方法也可以制备得到脂质体混悬剂(包括靶向至病毒抗原的脂质体)。这对于递送游离核苷类、酰基核苷类或本发明核苷化合物的磷酸酯前体药物形式来说是适宜的。

优选地,为了治疗、预防或延迟本发明所述病毒感染的发作,所述组合物可以以用量为大约 250 微克至大约 500 mg 或更多的口服剂型给药,每天至少给药一次、优选每天给药最高达 4 次。本发明化合物优选以口服方式给药,不过也可以经非肠道、局部或通过栓剂形式给药。

本发明化合物因其对宿主细胞的低毒性而可以被有利地以预防方式使用,从而预防或降低感染的可能性或者肝 DNA 病毒例如乙型肝炎病毒(HBV)、黄病毒包括但并不限于丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎和西尼罗病毒、疱疹病毒包括但并不限于 1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、EPSTEIN BARR 病毒、巨细胞病毒和人免疫缺陷病毒(例如 HIV-1 或 HIV-2)复制、感染和/或生长的继发影响。该方法尤其适用于预防具有 HBV (例如肝癌)或 HCV (例如肝癌)、EPSTEIN BARR 病毒(例如 Burkitt's 淋巴瘤)和 HHV-8 感染(例如肉瘤或淋巴瘤)的患者中的肿瘤。在本发明上述方面,本发明的组合物被用于预防患者体内的肝 DNA 病毒例如乙型肝炎病毒(HBV),黄病毒包括但并不限于丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎和西尼罗病毒,疱疹病毒包括但并不限于 1 型单纯疱

疹病毒、2型单纯疱疹病毒、EPSTEIN BARR 病毒、巨细胞病毒，人免疫缺陷病毒(例如 HIV-1 或 HIV-2)感染或者相关疾病例如肝癌或 Burkitt's 淋巴瘤，或者降低患者出现上述情形的可能性，或者延迟上述情形的发作。所述预防方法包括向有该治疗需要的患者或者可能发展成肝 DNA 病毒例如乙型肝炎病毒(HBV)，黄病毒包括但并不限于丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎和西尼罗病毒，疱疹病毒包括但并不限于 1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、EPSTEIN BARR 病毒、巨细胞病毒，人免疫缺陷病毒(例如 HIV-1 或 HIV-2)感染或者相关症状或疾病的患者，给药有效缓解、预防或延迟病毒感染发作的用量的本发明化合物。在本发明的预防治疗中，优选所用的抗病毒化合物应是低毒性的，且优选对患者是无毒性的。在本发明该方面，特别优选所用的化合物应最大限度地对病毒有效，且应表现出对患者的最低程度的毒性。就本发明化合物而言，可以在与预防剂相同的治疗剂量范围内(即对口服剂型而言，大约 250 微克至大约 500 mg 或更多，每天 1-4 次)给药，从而预防病毒感染的增殖、或延迟表现出自身临床症状的病毒感染

此外，可以将本发明化合物单独或者与包括本发明其它化合物在内的其它药物组合给药。本发明某些化合物可以通过降低其它化合物的代谢、分解代谢或失活而有效地提高本发明某些活性剂的生物活性，且这样的话可以为上述所需作用进行共同给药。

如上所述，可以将本发明化合物单独或者与其它药物组合给药，其中所述的其它药物尤其包括本发明其它化合物或另外公开的可用于治疗肝 DNA 病毒例如乙型肝炎病毒(HBV)，黄病毒包括但并不限于丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎和西尼罗病毒，疱疹病毒包括但并不限于 1 型单纯疱疹病毒、2 型单纯疱疹病毒、EPSTEIN BARR 病毒、巨细胞病毒，人免疫缺陷病毒(例如 HIV-1 或 HIV-2)的化合物，诸如公开在下述美国专利中的相关化合物和组合物，在此将这些文献引入本文作为参考：美国专利号 5,922,757、5,830,894、5,821,242、5,610,054、5,532,215、5,491,135、5,179,084、4,902,720、4,898,888、4,880,784、5,929,038、5,922,857、5,914,400、4,922,711、5,922,694、5,916,589、5,912,356、5,912,265、5,905,070、5,982,060、5,892,052、5,892,025、5,883,116、5,883,113、5,883,098、5,880,141、5,880,106、5,876,984、5,874,413、5,869,522、5,863,921、5,863,918、5,863,905、5,861,403、

5,852,027、5,849,800、5,849,696、5,847,172、5,627,160、5,561,120、5,631,239、5,830,898、5,827,727、5,830,881、5,837,871、4,999,428、5,015,739、5,777,116、5,684,010、5,830,881、5,726,174、5,832,872、5,929,038、5,980,884、5,891,874、4,957,924、6,323,180, 除了别的以外。可以将上述参考专利中公开的化合物与本发明化合物组合使用, 以获得抗各种病毒包括乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎、西尼罗病毒和相关黄病毒感染的叠加活性或治疗曲线, 在某些情形中, 与本发明化合物组合使用还可以获得协同作用。优选用于本发明的次级或另外的化合物是那些不是通过与本发明化合物相同的机理抑制乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒、登革热病毒、日本脑炎、西尼罗病毒和相关黄病毒感染的化合物。

实施例

赛菊宁黄质类似物的合成

合成流程图如图 1A-1E 所示。

如图 1A 所示, 赛菊宁黄质(2)采用文献(Charlton 等人, 1996, *J. Org. Chem.* 61: 3452-3457)中描述的方法合成, 用碱水解后, 用碱氢氧化物和苄基溴的混合物酯化, 得到化合物 4。化合物 4 的苄基酯基团通过碱水解裂解, 得到相应的羧酸, 将其与 3-苄基氧基-1-丙醇通过使用 1,3-二环己基碳二亚胺(DCC)和 4-二甲氨基吡啶(DMAP)偶联, 得到化合物 6。类似地, 将化合物 5 与 3-(苄基氧基)丙基胺在 DCC 和 1-羟基苯并三唑水合物(1-HOBt)的存在下在 CH_2Cl_2 中偶联, 得到化合物 8。

被认为分别以酰亚胺/亚氨(imidol)互变异构混合物形式存在的环状酰亚胺 9 和 11 通过羟基缩醛与马来酰亚胺的狄尔斯-阿尔德反应如图 1B 所示制备。在上述狄尔斯-阿尔德反应过程中还形成酰亚胺 9 和 11 的酸水解产物。内酰胺 16 和 18, 和 22 通过将酰亚胺 9 和 11 用锌粉在冰醋酸中选择性还原而制备。将化合物 12、16 和 18 与碘甲烷在 KOH/DMSO 中反应, 得到其 *N*-甲基化产物 13 和 14、17 和 19。类似地, 将酰亚胺 9 与三甲基甲硅烷基重氮甲烷(TMSCHN_2)反应, 得到其 *O*-甲基化产物 23。

将苄基氧基烷基醇与酰亚胺 9 在重氮二羧酸二乙酯(DEAD)和三苯基膦(PPh_3)存在下在 THF 中进行 Mitsunobu 反应, 得到 *N*-(苄基氧基烷基)酰亚胺

10, 将其用锌粉在乙酸中选择性还原, 得到相应的内酰胺 20。化合物 20 用 Pd/C 在氢气氛下脱苄基化, 得到 *N*-(羟基烷基)内酰胺 21。

N-羟基酰亚胺 24 和 *N*-(羟基烷基)酰亚胺 29 通过将酸酐 1 分别与相应的羟基胺和羟基烷基胺如图 1C 所示合成。酸酐 1 与水合肼在冰醋酸中反应, 得到 *N*-乙酰亚胺酰亚胺(*N*-acetoimidoimide)25, 将其通过用锌粉在乙酸中反应, 转化为环状酰肼产物 28 以及内酰胺 26 和 27。

将酸酐 1 与 TMSCHN₂ 在甲醇 THF 溶液中反应, 得到双酯 30, 其用 KOH 的 MeOH 溶液水解得到化合物 31 和 32 (图 1D)。该羟基缩醛 1a 与乙炔二羧酸二乙酯(DEADC)进行狄尔斯-阿尔德加成, 得到化合物 33, 将其通过用氢氧化铝锂(LAH)还原, 转化为内酯 34。酰亚胺 9 向二酰胺 36 的转化使用浓氢氧化铵和 THF 的混合物在 40°C 下进行。

将化合物 2、18 和 28 用 *N*-卤代琥珀酰亚胺在催化用量的浓硫酸存在下处理, 得到相应的化合物 37-43, 将其在 C-5 位上选择性卤代(图 1D)。该 5-卤代内酯 37-39 用 NaOH 的 MeOH 溶液水解, 得到化合物 44-46。

试验

一般方法

所有溶剂和试剂由商业供应商获得, 使用时不再纯化。除非另有描述, 反应在排除湿气后的氮气氛下进行。所有的反应混合物使用磁力搅拌, 通过使用来自 J. T. Baker 的 Si250F 预涂板(0.25 mm)的 TLC 监测。快速柱色谱法是在来自 ICN SiliTech (ICN Biomedicals GmbH)的 32-63 D 60 Å 硅胶上进行。熔点使用电热毛细管熔点仪测量, 未校正, ¹H NMR 光谱使用 Bruker AM-400 (400 MHz)或 GE QE-plus 300 (300 MHz)谱仪记录。化学位移(δ)以百万分之几(ppm)表达, 使用氯仿-*d* (δ 7.24 ppm)或 DMSO-*d*₆ (2.50 ppm), 将信号报道为 s (单峰)、d (双峰)、t (三重峰)、q (四重峰)、m (多重峰)、或 br s (宽单峰)。所有偶联常数以 Hz 表示。质谱在 University of Illinois 的 Mass Spectrometry Laboratory 完成。

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-9*H*-咪唑并[3',4':6,7]萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-酮(2)

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-咪唑并[3',4':6,7]萘并[1,2-*d*][1,3]间二

氧杂环戊烯-7,9-二酮(1)采用文献(Charlton, J. L.; Oleschuk, C. J.; Chee, G. L. Hindered rotation in aryl-naphthalene lignans. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3452-3457)中描述的方法合成。将化合物 1 (1.90 g, 5.25 mmol)的无水 THF (100 mL)溶液在 0°C 下逐滴加入至硼氢化钠(218 mg, 5.8 mmol)的无水 THF (100 mL)混合物中。将该混合物在室温下搅拌 1 小时, 然后使用 10% HCl 水溶液酸化至 pH 1-2。搅拌 1 小时后, 混合物用乙醚萃取(3 × 100 mL), 真空浓缩, 使用 CHCl₃ 色谱分离得到为浅黄色粉末的内酯 2 (1.44 g, 79%)。mp 242-244°C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.56 (s, 1H, H4), 7.93 (d, 1H, H5, *J* = 8.4 Hz), 7.50 (d, 1H, H6, *J* = 8.4 Hz), 7.01 (d, 1H, H2', *J* = 1.5 Hz), 6.95 (d, 1H, H5', *J* = 8.1 Hz), 6.87 (dd, 1H, H6', *J* = 1.5, 8.1 Hz), 6.08 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, Δδ = 15.6 Hz, *J* = 0.9 Hz), 5.99 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, Δδ = 6.0 Hz, *J* = 0.9 Hz), 5.28 (s, 2H, 内酯-CH₂-); MS (FAB, 正离子) *m/z* 349 [M + H]⁺。

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-羟基甲基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸单钠盐(3)

将 1 N NaOH 水溶液(2.9 mL)加入至 2 (100 mg, 0.29 mmol)的 MeOH (10 mL)溶液中。混合物在 70°C 下搅拌 1 小时。蒸发除去溶剂得到粗产物, 将其通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 CH₂Cl₂/MeOH (3:1, v/v), 得到为白色粉末的 3 (110 mg, 98%)。mp 128-130°C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.16 (s, 1H, H4), 7.52 (d, 1H, H5, *J* = 8.7 Hz), 7.24 (d, 1H, H6, *J* = 8.7 Hz), 6.88 (d, 1H, H5', *J* = 8.4 Hz), 6.73 (s, 1H, H2'), 6.64 (d, 1H, H6', *J* = 8.4 Hz), 6.05 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, Δδ = 18.9 Hz), 5.79 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, Δδ = 8.4 Hz), 4.16 (s, 2H, 2-CH₂OH)。

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-苄基氧基甲基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸苄基酯(4)

将 3 (78 mg, 0.2 mmol)和苄基溴(0.38 mL, 3.2 mmol)的混合物、以及粉状 KOH (168 mg)在 140°C 下加热 3 小时, 然后冷却至室温。混合物用水(100 mL)稀释, EtOAc(3 × 100 mL)萃取。萃取液用水(3 × 100 mL)洗涤, MgSO₄ 干燥并真空浓缩。残余物使用 CH₂Cl₂ 通过硅胶柱色谱法纯化, 得到为无色液体的 4 (56 mg, 51%)。 ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.27 (s, 1H, H4), 7.51 (d, 1H, H5, *J* = 8.4 Hz), 7.23-7.44 (m, 10H, 2 × OCH₂Ph), 7.22 (d, 1H, H6, *J* = 8.4 Hz), 6.82 (d, 1H,

H5', $J = 7.8$ Hz), 6.77 (d, 1H, H2', $J = 1.5$ Hz), 6.71 (dd, 1H, H6', $J = 1.5, 7.8$ Hz), 6.05 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 10.2$ Hz, $J = 1.2$ Hz), 5.84 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 4.8$ Hz, $J = 1.2$ Hz), 5.34 (s, 2H, 3-COOCH₂Ph), 4.67 (s, 2H, 2-CH₂OCH₂Ph), 4.32 (s, 2H, 2-CH₂OBn); MS (EI) m/z 546 [M]⁺.

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-苄基氧基甲基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸(5)

将 4 (56 mg, 0.1 mmol)和 NaOH (16 mg, 0.4 mmol)在 MeOH/H₂O (4:1, 2 mL)中的溶液在 70°C 下加热 12 小时。蒸发除去溶剂至干, 残余物溶解于水中。水溶液用 10% HCl 水溶液酸化至 pH 1-2, 用乙醚萃取(3 × 50 mL)。萃取液用水和盐水洗涤, MgSO₄ 干燥。蒸发除去溶剂, 得到为白色粉末的 5 (32 mg, 70%)。mp 219-221 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.27 (s, 1H, H4), 7.70 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.38 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 7.17-7.25 (m, 5H, OCH₂Ph), 6.89 (d, 1H, H5', $J = 8.1$ Hz), 6.79 (d, 1H, H2', $J = 1.5$ Hz), 6.65 (dd, 1H, H6', $J = 1.5, 8.1$ Hz), 6.06 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 18.0$ Hz, $J = 0.6$ Hz), 5.85 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 9.3$ Hz, $J = 0.9$ Hz), 4.53 (s, 2H, 2-CH₂OCH₂Ph), 4.24 (s, 2H, 2-CH₂OBn); MS (FAB, 正离子) m/z 457 [M + H]⁺.

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-苄基氧基甲基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸 3-苄基氧基-丙基酯(6)

将化合物 5 (54.8 mg, 0.12 mmol)的 CH₂Cl₂ (2 mL)溶液在 0°C 下逐滴加入至搅拌的 3-苄基氧基-1-丙醇(16.6 mg, 0.1 mmol)、1,3-二环己基碳二亚胺(31 mg, 0.15 mmol)和 4-二甲氨基吡啶(14.6 mg, 0.12 mmol)在无水的 CH₂Cl₂ (1 mL)中的溶液中。混合物在室温下搅拌 4 小时, 然后真空浓缩。残余物通过硅胶色谱法分离, 使用 CH₂Cl₂/MeOH (50:1, v/v), 得到为黄色液体的 6 (61.2 mg, 84%)。 ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.16 (s, 1H, H4), 7.47 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.20-7.45 (m, 11H, H6 + 2 × OCH₂Ph), 6.82 (d, 1H, H5', $J = 7.8$ Hz), 6.76 (d, 1H, H2', $J = 1.5$ Hz), 6.70 (dd, 1H, H6', $J = 1.5, 7.8$ Hz), 6.06 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 9.9$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 5.84 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 4.5$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 4.65 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.53 (s, 2H, OCH₂Ph), 4.42 (t, 2H, 3-COOCH₂(CH₂)₂OBn, $J = 6.3$ Hz), 4.35 (s, 2H, 2-CH₂OBn), 3.62 (t, 2H,

3-COO(CH₂)₂CH₂OBn, $J = 6.3$ Hz), 2.06 (五重峰, 2H, 3-COOCH₂CH₂CH₂OBn, $J = 6.3$ Hz); MS (EI) m/z 604 [M]⁺.

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-甲基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸 3-羟基-丙基酯(7)

将 **6** (48 mg, 0.079 mmol)和 10% Pd/C (12 mg)在无水 THF (5 mL)中的混合物在室温和 1 atm 氢气下搅拌 14 小时。混合物过滤后, 滤液减压蒸发。残余物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 CH₂Cl₂/MeOH (40:1, v/v), 得到为黄色油状物的 **7** (30 mg, 93%)。¹H NMR (CDCl₃) δ 8.32 (s, 1H, H4), 7.50 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.18 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.87 (d, 1H, H5', $J = 7.8$ Hz), 6.72 (d, 1H, H2', $J = 1.5$ Hz), 6.68 (dd, 1H, H6', $J = 1.5, 7.8$ Hz), 6.05 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 9.6$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 5.83 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 1.5$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 4.54 (t, 2H, 3-COOCH₂(CH₂)₂OH, $J = 6.3$ Hz), 3.83 (t, 2H, 3-COO(CH₂)₂CH₂OH, $J = 6.3$ Hz), 2.34 (s, 3H, 2-CH₃), 2.06 (五重峰, 2H, 3-COOCH₂CH₂CH₂OH, $J = 6.3$ Hz); MS (EI) m/z 408 [M]⁺.

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-苄基氧基甲基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸(3-苄基氧基-丙基)-酰胺(8)

将分成小份的 60% 氢氧化钠在矿物油(4 g, 0.1 mol)中的分散体在室温下加入至搅拌的 3-氨基-1-丙醇(7.51 g, 0.1 mol)的 THF (150 mL)溶液中。混合物在氮气氛下搅拌 30 分钟, 加入苄基溴(11.9 mL, 0.1 mol)。混合物在室温下搅拌 10 小时, 然后真空浓缩。残余物在 1 N HCl 水溶液和 CH₂Cl₂ 之间分配。水层用 10% NaOH 水溶液调节至 pH 10, 用 CH₂Cl₂ 萃取(3 × 100 mL)。萃取液用 MgSO₄ 干燥并真空浓缩。残余物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 CH₂Cl₂/MeOH (3:1 ~ 2:1, v/v), 得到为黄色油状物的 3-(苄基氧基)丙基胺(1.37 g, 8.3%)。将 1,3-二环己基碳二亚胺(14.4 mg, 0.07 mmol)的 CH₂Cl₂ (2 mL)溶液在 0°C 下逐滴加入至 **5** (32 mg, 0.07 mmol)和 3-(苄基氧基)丙基胺(11.6 mg, 0.07 mmol)、以及 1-羟基苯并三唑水合物(9.5 mg, 0.07 mmol)在 CH₂Cl₂ (5 mL)中的混合物中。反应混合物在室温下搅拌 18 小时, 真空浓缩。残余物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 CH₂Cl₂/MeOH (30:1, v/v), 得到为浅黄色液体的 **8** (36 mg, 85%)。¹H NMR (CDCl₃) δ 8.05 (s, 1H, H4), 7.44 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz),

7.19-7.28 (m, 11H, H6 + 2 × OCH₂Ph), 6.78-6.82 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.06 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 6.9$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 5.84 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 4.2$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 4.45 (s, 4H, 2 × OCH₂Ph), 4.38 (s, 2H, 2-CH₂OBn), 3.55 (m, 4H, 3-CONHCH₂CH₂CH₂OBn), 1.87 (五重峰, 2H, 3-CONHCH₂CH₂CH₂OBn, $J = 6.3$ Hz); MS (FAB, 正离子) m/z 604 [M + H]⁺.

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7,9-二酮(9)和 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-氨基甲酰基-萘并[1,2-d][1,3]间二氧杂环戊烯-8-羧酸(12)

将羟基缩醛 1a (7.34 g, 21.3 mmol)、马来酰亚胺(2.07 g, 21.3 mmol)、乙酸酐(7 mL)、CH₂Cl₂ (7 mL)、和冰醋酸(3 mL)在 140°C 下加热 24 小时。冷却后的混合物用 CH₂Cl₂ (100 mL)稀释, 5% NaHCO₃ 溶液(3 × 100 mL)洗涤, MgSO₄ 干燥并真空浓缩。粗产物经硅胶柱色谱法纯化, 使用 CH₂Cl₂/丙酮(30:1 ~ 3:1, v/v), 得到两级分。第一级分用 CH₂Cl₂/丙酮(30:1, v/v)洗脱, 得到黄色固体, 然后将其由丙酮重结晶得到酰亚胺 9 (1.33 g, 17%)。mp 306-308 °C; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.61 (s, 1H, H4), 7.98 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.62 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.93 (d, 1H, H2', $J = 1.5$ Hz), 6.92 (d, 1H, H5', $J = 7.8$ Hz), 6.79 (dd, 1H, H6', $J = 1.5, 7.8$ Hz), 6.09 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 5.7$ Hz), 5.99 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 4.5$ Hz); MS (FAB, 正离子) m/z 362 [M + H]⁺.

第二级分用 CH₂Cl₂/丙酮(3:1, v/v)洗脱得到浅黄色固体(12, 1.66 g, 21%), 鉴定其为酰亚胺 9 的酸水解产物。mp 207-209 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.31 (s, 1H, H4), 7.62 (s, 1H, 2-COOH), 7.60 (d, 1H, H5, $J = 8.4$ Hz), 7.27 (d, 1H, H6, $J = 8.4$ Hz), 6.87-6.92 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.03 (s, 2H, 3',4'-OCH₂O-), 5.97 (s, 2H, 7,8-OCH₂O-); MS (FAB, 正离子) m/z 336 [M - CONH₂ + H]⁺.

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-(3-苄基氧基-丙基)-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7,9-二酮(10)

将偶氮二羧酸二乙酯(52 mg, 0.3 mmol)在无水的 THF (3 mL)中的溶液在 0°C 下、在 30 分钟内逐滴加入至搅拌的 9 (108 mg, 0.3 mmol)、3-苄基氧基-1-丙醇(50 mg, 0.3 mmol)、和三苯基膦(79 mg, 0.3 mmol)在无水的 THF (6 mL)中的

溶液中。将该混合物在室温下搅拌 30 小时，然后减压浓缩。残余物通过硅胶柱色谱法纯化，用正己烷/EtOAc (2:1, v/v)洗脱得到为黄色粉末的 **10** (56 mg, 37%)。mp 153-155°C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.24 (s, 1H, H4), 7.66 (d, 1H, H5, $J = 8.4$ Hz), 7.35 (d, 1H, H6, $J = 8.4$ Hz), 7.24-7.26 (m, 5H, OCH_2Ph), 6.78-6.91 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.07 (AB, 2H, 3',4'- OCH_2O -, $\Delta\delta = 15.3$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 5.95 (AB, 2H, 7,8- OCH_2O -, $\Delta\delta = 5.4$ Hz, $J = 1.2$ Hz), 4.45 (s, 2H, OCH_2Ph), 3.80 (t, 2H, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{OBn}$, $J = 6.0$ Hz), 3.54 (t, 2H, $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OBn}$, $J = 6.0$ Hz), 2.01 (五重峰, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OBn}$, $J = 6.0$ Hz); MS (EI) m/z 509 $[\text{M}]^+$ 。

10-(3,4-二甲氧基-苯基)-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7,9-二酮(**11**)和 7-氨基甲酰基-9-(3,4-二甲氧基-苯基)-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-8-羧酸(**15**)

将胡椒醛的缩醛(2.25 g, 11.6 mmol)在氮气氛下溶解于无水 THF (40 mL)中，冷却至 -78°C ，然后在 30 分钟内逐滴加入正丁基锂(1.6 M 的己烷溶液, 7.98 mL, 12.8 mmol)。混合物搅拌 15 分钟后，在 0°C 下搅拌 20 分钟。混合物再次冷却至 -78°C ，然后逐滴加入 3,4-二甲氧基苯甲醛(1.93 g, 11.6 mmol)的 THF (15 mL)溶液。搅拌 20 分钟后，溶液逐渐温热至室温，继续搅拌 1.5 小时，接着加入水(100 mL)。所得到的混合物用乙醚(3×100 mL)萃取， MgSO_4 干燥并浓缩，得到粗羟基缩醛 **1b** (4.18 g)。该粗产物直接用于接下来的反应中不再纯化。

将羟基缩醛 **1b** (4.18 g, 11.6 mmol)、马来酰亚胺(1.13 g, 11.6 mmol)、乙酸酐(4 mL)、 CH_2Cl_2 (4 mL)和冰醋酸(1.8 mL)在 140°C 下加热 24 小时。冷却后的混合物用 CH_2Cl_2 (100 mL)稀释，5% NaHCO_3 溶液(3×100 mL)洗涤， MgSO_4 干燥并真空浓缩。粗产物经硅胶柱色谱法纯化，使用 CH_2Cl_2 /丙酮(30:1 ~ 3:1, v/v)，得到两级分。第一级分用 CH_2Cl_2 /丙酮(30:1, v/v)洗脱得到黄色固体，然后将其由丙酮重结晶得到酰亚胺 **11** (800 mg, 18%)。mp 288-290°C; $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ 8.60 (s, 1H, H4), 7.98 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.62 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.88-6.96 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 5.98 (AB, 2H, 7,8- OCH_2O -, $\Delta\delta = 3.3$ Hz), 3.81, 3.68 (均为 s, $2 \times 3\text{H}$, 3'- OCH_3 + 4'- OCH_3); MS (FAB, 正离子) m/z 378 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

第二级分用 CH_2Cl_2 /丙酮(3:1, v/v)洗脱得到白色固体(**15**, 213 mg, 5%)，鉴

定其为酰亚胺 **11** 的酸水解产物。mp 240-242°C; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 8.42 (s, 1H, H4), 7.70 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.41 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.96-7.00 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 5.98 (s, 2H, 7,8-OCH₂O-), 3.79, 3.74 (均为 s, $2 \times 3\text{H}$, 3'-OCH₃ + 4'-OCH₃); MS (FAB, 正离子) m/z 352 [M - CONH₂ + H]⁺。

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-甲基氨基甲酰基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-8-羧酸(**13**)和 9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-二甲基氨基甲酰基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-8-羧酸(**14**)

将粉状 KOH (64 mg, 1.1 mmol) 加入至 DMSO (3 mL) 中。搅拌 5 分钟后, 加入化合物 **12** (108 mg, 0.28 mmol), 然后立即加入碘甲烷 (0.035 mL, 0.57 mmol)。将该混合物搅拌 24 小时, 倾入水 (30 mL) 中, 然后用 CH₂Cl₂ (3 \times 30 mL) 萃取。合并的有机萃取液用水 (5 \times 30 mL) 洗涤, MgSO₄ 干燥并真空浓缩。所得到的产物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 CH₂Cl₂/丙酮 (10:1, v/v), 得到分别为浅黄色粉末的 **13** (20 mg, 18%) 和为浅黄色油状物的 **14** (80 mg, 71%)。 **13**: mp 223-225°C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃) δ 8.26 (s, 1H, H4), 7.60 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.57 (s, 1H, 2-COOH), 7.25 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.87-6.92 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.04 (s, 2H, 3',4'-OCH₂O-), 5.97 (s, 2H, 7,8-OCH₂O-), 3.07 (d, 3H, 3-CONHCH₃, $J = 4.8$ Hz)。 **14**: $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃) δ 7.85 (s, 1H, H4), 7.52 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.32 (s, 1H, 2-COOH), 7.25 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.86-6.92 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.03 (s, 2H, 3',4'-OCH₂O-), 5.95 (s, 2H, 7,8-OCH₂O-), 3.12 (s, 6H, 3-CON(CH₃)₂)。

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7,8-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-9-酮(**16**)和 10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7-酮(**18**)

将化合物 **9** (181 mg, 0.5 mmol) 溶解于冰醋酸 (5 mL) 中, 向其中加入刚活化的锌粉 (328 mg), 然后在 100°C 油浴中加热 48 小时。将不溶性固体滤除后, 使用旋转蒸发器除去大部分乙酸。所得到的残余物使用 10% NaOH 水溶液中中和至 pH 7, 然后用 CHCl₃ (3 \times 100 mL) 萃取。萃取液用水洗涤, MgSO₄ 干燥并真空浓缩。粗产物通过硅胶柱色谱法纯化, 用 CH₂Cl₂/丙酮 (3:1 ~ 2:1, v/v) 洗脱得到两级分。第一级分(次要)和第二级分(主要)分别得到为浅黄色固体

的反内酰胺(retro-lactam)**16** (12 mg, 7%)和内酰胺 **18** (56 mg, 32%)。 **16**: mp 267-269°C; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 8.48 (s, 1H, NH), 7.99 (s, 1H, H4), 7.64 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.42 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.83 (d, 1H, H5', $J = 7.8$ Hz), 6.80 (d, 1H, H2', $J = 1.5$ Hz), 6.66 (dd, 1H, H6', $J = 1.5, 7.8$ Hz), 6.04 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 3.9$ Hz), 5.86 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 5.4$ Hz), 4.38 (br s, 2H, 内酰胺-CH₂-); MS (FAB, 正离子) m/z 348 [M + H]⁺. **18**: mp 252-254 °C; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ 8.59 (s, 1H, NH), 8.27 (s, 1H, H4), 7.83 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.41 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.98 (s, 1H, H2'), 6.94 (d, 1H, H5', $J = 7.8$ Hz), 6.84 (d, 1H, H6', $J = 7.8$ Hz), 6.07 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 14.4$ Hz), 5.93 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 6.0$ Hz), 4.17 (br s, 2H, 内酰胺-CH₂-); MS (FAB, 正离子) m/z 348 [M + H]⁺.

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-甲基-7,8-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-9-酮(**17**)

将粉状 KOH (11.2 mg, 0.2 mmol)加入至 DMSO (1 mL)中。搅拌 5 分钟后, 加入化合物 **16** (18 mg, 0.05 mmol), 接着立即加入碘甲烷(0.006 mL, 0.1 mmol)。混合物搅拌 1 小时后, 倾入水(15 mL)中, 然后用 CH₂Cl₂(3 × 20 mL)酸化。合并的有机萃取液用水(5 × 20 mL)洗涤, MgSO₄干燥并真空浓缩。残余物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 CH₂Cl₂/丙酮(10:1, v/v), 得到为浅黄色粉末的 **17** (12 mg, 66%)。mp 242-244°C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl₃) δ 7.79 (s, 1H, H4), 7.50 (d, 1H, H5, $J = 8.4$ Hz), 7.29 (d, 1H, H6, $J = 8.4$ Hz), 6.83-6.88 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.04 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 21.6$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 5.89 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 2.4$ Hz), 4.46 (s, 2H, 内酰胺-CH₂), 3.14 (s, 3H, NCH₃); MS (FAB, 正离子) m/z 362 [M + H]⁺.

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-甲基-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7-酮(**19**)

将粉状 KOH (11.2 mg, 0.2 mmol)加入至 DMSO (1 mL)中。搅拌 5 分钟后, 加入化合物 **18** (18 mg, 0.05 mmol), 接着立即加入碘甲烷(0.006 mL, 0.1 mmol)。混合物搅拌 1 小时后倾入水(15 mL)中, 然后用 CH₂Cl₂(3 × 20 mL)萃取。合并的有机萃取液用水(5 × 20 mL)洗涤, MgSO₄干燥并真空浓缩。残

余物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{丙酮}(10:1, v/v)$, 得到为浅黄色粉末的 **19** (12 mg, 66%). mp 234-236°C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.30 (s, 1H, H4), 7.66 (d, 1H, H5, $J = 8.4$ Hz), 7.26 (d, 1H, H6, $J = 8.4$ Hz), 6.81-6.91 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.06 (AB, 2H, 3',4'- OCH_2O -, $\Delta\delta = 8.4$ Hz, $J = 1.2$ hz), 5.92 (AB, 2H, 7,8- OCH_2O -, $\Delta\delta = 7.8$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 4.26 (q, 2H, 内酰胺- CH_2 -, $J = 6.3$ Hz), 3.18 (s, 3H, NCH_3); MS (EI) m/z 361 $[\text{M}]^+$.

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-(3-苄基氧基-丙基)-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7-酮(**20**)

将化合物 **10** (40 mg, 0.08 mmol)溶解于冰醋酸(3 mL)中, 向其中加入刚活化的锌粉(206 mg), 然后在 100°C 油浴中加热 48 小时。将不溶性固体滤除后, 使用旋转蒸发仪除去大部分乙酸。所得到的残余物用 10% NaOH 水溶液中和至 pH 7, 然后用 $\text{CHCl}_3(3 \times 50 \text{ mL})$ 萃取。合并的有机萃取液用水($2 \times 100 \text{ mL}$)洗涤, MgSO_4 干燥并真空浓缩。将粗产物用色谱法分离, 使用正己烷/EtOAc (2:1 ~ 1:1, v/v), 得到为黄色油状物的 **20** (26 mg, 66%)。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.30 (s, 1H, H4), 7.66 (d, 1H, H5, $J = 8.4$ Hz), 7.28 (d, 1H, H6, $J = 8.4$ Hz), 7.25 (br s, 5H, OCH_2Ph), 6.77-6.90 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.06 (AB, 2H, 3',4'- OCH_2O -, $\Delta\delta = 9.6$ Hz, $J = 1.2$ hz), 5.92 (AB, 2H, 7,8- OCH_2O -, $\Delta\delta = 4.8$ Hz, $J = 1.2$ hz), 4.47 (s, 2H, OCH_2Ph), 4.25 (q, 2H, q, 内酰胺- CH_2 -, $J = 6.6$ Hz), 3.73 (t, 2H, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{OBn}$, $J = 6.0$ Hz), 3.56 (t, 2H, $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OBn}$, $J = 6.0$ Hz), 1.98 (五重峰, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OBn}$, $J = 6.0$ Hz); MS (EI) m/z 495 $[\text{M}]^+$.

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-(3-羟基-丙基)-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7-酮(**21**)

将 **20** (16 mg, 0.032 mmol)和 10% Pd/C (4 mg)在无水 THF (3 mL)中的混合物在室温和 1 atm 氢气下搅拌 20 小时。通过过滤除去 Pd/C, 减压蒸发除去溶剂。残余物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{丙酮}(3:1 \sim 2:1, v/v)$, 得到为白色固体的 **21** (9 mg, 69%)。 mp 213-215°C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.31 (s, 1H, H4), 7.67 (d, 1H, H5, $J = 8.4$ Hz), 7.28 (d, 1H, H6, $J = 8.4$ Hz), 6.82-6.92 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.07 (AB, 2H, 3',4'- OCH_2O -, $\Delta\delta = 8.7$ Hz, $J = 1.2$ hz), 5.93 (AB, 2H, 7,8- OCH_2O -, $\Delta\delta = 4.8$ Hz, $J = 1.2$ hz), 4.28 (q, 2H, 内酰胺- CH_2 -,

$J = 4.8$ Hz), 3.77 (t, 2H, $\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, $J = 4.8$ Hz), 3.59 (t, 2H, $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OH}$, $J = 4.8$ Hz), 2.65 (br s, 1H, OH), 1.81 (五重峰, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $J = 4.8$ Hz); MS (EI) m/z 405 $[\text{M}]^+$.

10-(3,4-二甲氧基-苯基)-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7-酮(22)

将化合物 11 (400 mg, 1.06 mmol)溶解于冰醋酸(10 mL)中,向其中加入刚活化的锌粉(695 mg),然后在 100°C 油浴中加热 48 小时。将不溶性固体滤除后,使用旋转蒸发器除去大部分乙酸。所得到的残余物用 10% NaOH 水溶液中和至 pH 7,然后用 CHCl_3 (3 × 100 mL)萃取。萃取液用水洗涤, MgSO_4 干燥并真空浓缩。粗产物通过硅胶柱色谱法纯化,用 CH_2Cl_2 /丙酮(3:1 ~ 2:1, v/v)洗脱得到为浅黄色固体的 22 (95 mg, 25%)。mp 258°C (分解); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.36 (s, 1H, H4), 7.69 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.29 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.86-6.95 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 5.90 (s, 2H, 7,8- OCH_2O -), 4.35 (q, 2H, 内酰胺- CH_2 -, $J = 22.8$ Hz), 3.99, 3.88 (均为 s, 2 × 3H, 3'- OCH_3 + 4'- OCH_3); MS (FAB, 正离子) m/z 364 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-甲氧基-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-9-酮(23)

将化合物 9 (29 mg, 0.08 mmol)溶解于 MeOH (3 mL)和 THF (6 mL)的混合物中。向该溶液中加入三甲基甲硅烷基重氮甲烷(2 M 的己烷溶液, 0.2 mL, 0.4 mmol)。混合物在室温下搅拌 18 小时,然后真空浓缩。粗产物通过硅胶柱色谱法纯化,使用 CH_2Cl_2 /MeOH (30:1, v/v), 得到为黄色粉末的 23 (22 mg, 73%)。mp 306-308 °C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.27 (s, 1H, H4), 7.67 (d, 1H, H5, $J = 8.4$ Hz), 7.35 (d, 1H, H6, $J = 8.4$ Hz), 6.83-6.92 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.07 (AB, 2H, 3',4'- OCH_2O -, $\Delta\delta = 15.6$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 5.96 (AB, 2H, 7,8- OCH_2O -, $\Delta\delta = 4.2$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 3.15 (s, 3H, OCH_3); MS (EI) m/z 375 $[\text{M}]^+$.

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-羟基-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[a,g]萘-7,9-二酮(24)

将羟基胺盐酸盐(20.9 mg, 0.3 mmol)和三乙胺(0.04 mL, 0.3 mmol)溶解于

EtOH (30 mL)中。搅拌 10 分钟后, 加入酸酐 **1** (109 mg, 0.3 mmol)。将混合物回流过夜, 然后真空浓缩。所得到的产物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 CH₂Cl₂/丙酮(2:1, v/v), 得到为黄色粉末的 **24** (16 mg, 15%)。mp 255°C (分解); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 10.78 (s, 1H, OH), 8.40 (s, 1H, H4), 7.89 (d, 1H, H5, *J* = 8.7 Hz), 7.54 (d, 1H, H6, *J* = 8.7 Hz), 6.94 (s, 1H, H2'), 6.90 (d, 1H, H5', *J* = 7.8 Hz), 6.79 (d, 1H, H6', *J* = 7.8 Hz), 6.08 (s, 2H, 3',4'-OCH₂O-), 5.96 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, Δδ = 5.7 Hz); MS (FAB, 正离子) *m/z* 378 [M + H]⁺。

N-(10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7,9-二氧代-7,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-8-基)-乙酰胺(**25**)

将酸酐 **1** (145 mg, 0.4 mmol)的冰醋酸(10 mL)溶液与水合肼(0.023 mL, 0.48 mmol)在氮气氛下回流 24 小时, 冷却后倾入冰水中。所得到的沉淀物过滤后, 减压干燥。残余物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 CH₂Cl₂/MeOH (30:1 ~ 20:1, v/v), 得到为黄色固体的 **25** (143 mg, 86%)。mp 281-283°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.34 (s, 1H, H4), 7.69 (d, 1H, H5, *J* = 8.7 Hz), 7.46 (s, 1H, NHAc), 7.38 (d, 1H, H6, *J* = 8.7 Hz), 6.84-6.87 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.06 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, Δδ = 16.5 Hz, *J* = 1.5 Hz), 5.98 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, Δδ = 5.4 Hz, *J* = 1.2 Hz), 2.17 (s, 3H, NHCOCH₃); MS (EI) *m/z* 418 [M]⁺。

N-(10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-7-氧代-7,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-8-基)-乙酰胺(**26**)、N-(10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-9-氧代-7,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-8-基)-乙酰胺(**27**)和 11-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8,9-二氮杂-环戊二烯并[*a*]萘-7,10-二酮(**28**)

将化合物 **25** (113 mg, 0.27 mmol)溶解于冰醋酸(2 mL)中, 向其中加入刚活化的锌粉(196 mg), 然后在 100°C 油浴中加热 5 小时。将不溶性固体滤除后, 使用旋转蒸发器除去大部分乙酸。所得到的残余物用 10% NaOH 水溶液中和至 pH 7, 然后用 CHCl₃(3 × 100 mL)萃取。萃取液用水洗涤, MgSO₄ 干燥并真空浓缩。残余物通过硅胶色谱法纯化, 使用 CH₂Cl₂/丙酮(7:1 ~ 1:1, v/v), 分别得到内酰胺 **26** (52 mg, 48%, 浅黄色粉末)、反(retro)-内酰胺 **27** (16 mg, 15%, 黄色粉末)、以及肼基(hydrazino)化合物 **28** (20 mg, 20%, 黄色粉

末)。 **26**: mp 274-276°C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.51 (s, 1H, *NHAc*), 8.34 (s, 1H, H4), 7.64 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.28 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.78-6.89 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.06 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 11.1$ Hz, $J = 1.2$ Hz), 5.94 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 5.1$ Hz, $J = 1.2$ Hz), 4.54 (m, 2H, 内酰胺-CH₂-), 2.14 (s, 3H, *NHCOCH*₃); MS (EI) m/z 404 [M]⁺. **27**: mp 278-280 °C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.44 (s, 1H, *NHAc*), 7.79 (s, 1H, H4), 7.50 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.30 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.74-6.84 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.02 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 18.3$ Hz, $J = 0.9$ Hz), 5.89 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 1.2$ Hz), 4.72 (s, 2H, 内酰胺-CH₂-), 1.99 (s, 3H, *NHCOCH*₃); MS (EI) m/z 404 [M]⁺. **28**: mp 318-320 °C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 9.71(s, 1H, NH), 8.98 (s, 1H, NH), 7.93 (s, 1H, H4), 7.81 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.43 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.93 (d, 1H, H5', $J = 7.8$ Hz), 6.86 (d, 1H, H2', $J = 1.2$ Hz), 6.82 (dd, 1H, H6', $J = 1.2, 7.8$ Hz), 6.11 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 9.4$ Hz, $J = 1.2$ Hz), 5.97 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 6.3$ Hz, $J = 1.2$ Hz); MS (EI) m/z 376 [M]⁺.

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-(3-羟基-丙基)-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7,9-二酮(**29**)

将3-氨基-1-丙醇(27 mg, 0.36 mmol)的甲苯(5 mL)溶液在0°C下逐滴加入至酸酐 **1** (109 mg, 0.3 mmol)的甲苯(40 mL)的搅拌溶液中。混合物在室温下搅拌1小时,然后在Dean-Stark分水器(trap)中加热3小时。停止蒸馏水后,冷却反应混合物,连续用水(2 × 50 mL)、5% NaHCO₃水溶液(2 × 50 mL)、和水(2 × 50 mL)洗涤,再用MgSO₄干燥。真空除去溶剂,所得到的产物通过硅胶柱色谱法纯化,使用CH₂Cl₂/丙酮(3:1 ~ 1:1, v/v),得到为浅黄色粉末的**29** (10 mg, 11%)。 mp 150-152°C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.27 (s, 1H, H4), 7.56 (d, 1H, H5, $J = 8.4$ Hz), 7.26 (d, 1H, H6, $J = 8.4$ Hz), 6.86-6.91 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.04 (s, 2H, 3',4'-OCH₂O-), 5.97 (s, 2H, 7,8-OCH₂O-), 3.69-3.76 (m, 4H, NCH₂CH₂CH₂OH), 1.83 (m, 2H, NCH₂CH₂CH₂OH)。

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7,8-二羧酸二甲基酯(**30**)

将化合物 **1** (108.6 mg, 0.3 mmol)溶解于MeOH (4 mL)和THF (8 mL)的混

合物中。向溶液中加入三甲基甲硅烷基重氮甲烷(2 M的己烷溶液, 1.0 mL, 2.0 mmol)。混合物在室温下搅拌 12 小时, 然后真空浓缩。残余物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用正己烷/EtOAc (2:1, v/v), 得到为浅黄色粉末的 **30** (67 mg, 55%)。mp 157-159°C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.53 (s, 1H, H4), 7.58 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.27 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.79-6.82 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.03 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 10.2$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 5.89 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 7.2$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 3.94, 3.66 (均为 s, 2 × 3H, 2 × OCH₃); MS (EI) m/z 408 $[\text{M}]^+$ 。

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7,8-二羧酸 8-甲基酯(**31**)

将化合物 **30** (20 mg, 0.05 mmol)与 1 M KOH 的 MeOH (10 mL)溶液回流 2 小时。溶液冷却后, 减压除去溶剂。残留的固体溶解于水(10 mL)中, 然后使用 10% HCl 水溶液酸化至 pH 1-2。通过过滤收集沉淀, 用水洗涤, 并干燥。产物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (20:1 ~ 10:1, v/v)得到为浅黄色粉末的 **31** (11 mg, 56%)。mp 273-275°C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8.54 (s, 1H, H4), 7.49 (d, 1H, H5, $J = 8.1$ Hz), 7.20 (d, 1H, H6, $J = 8.1$ Hz), 6.76-6.82 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.03 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 11.1$ Hz), 5.88 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 7.2$ Hz), 3.62 (s, 3H, OCH₃); MS (FAB, 正离子) m/z 395 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7,8-二羧酸(**32**)

将化合物 **30** (20 mg, 0.05 mmol)与 1 M KOH 的 MeOH (10 mL)溶液回流 24 小时。反应完毕后, 按照分离 **31** 所述的方法操作, 得到残余物, 将其通过硅胶柱色谱法纯化。用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (2:1, v/v)作为洗脱液洗脱, 得到为黄色粉末的 **32** (12 mg, 63%)。mp 253°C (分解); $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ 8.25 (s, 1H, H4), 7.53 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.24 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.72-6.82 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 5.99 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 18.9$ Hz), 5.81 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 6.0$ Hz); MS (FAB, 正离子) m/z 381 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 。

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-6-羟基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7,8-二羧酸二乙酯(33)

将羟基缩醛 **1a** (3.44 g, 10 mmol)、乙炔二羧酸二乙酯(1.70 g, 10 mmol)、CH₂Cl₂ (4.5 mL)和冰醋酸(3 mL)在 140°C 下加热 24 小时。冷却后的混合物用 CH₂Cl₂ 稀释(100 mL), 5% NaHCO₃ 溶液洗涤(3 × 100 mL), MgSO₄ 干燥并真空浓缩。残余物通过硅胶色谱法分离, 使用正己烷/EtOAc/三乙胺(3:1:0.1, v/v/v), 接着再由乙醚结晶, 得到为白色粉末的 **33** (741 mg, 16%)。mp 192-194°C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 12.76 (s, 1H, 4OH), 8.15 (d, 1H, H5, *J* = 8.7 Hz), 7.21 (d, 1H, H6, *J* = 8.7 Hz), 6.77-6.81 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.01 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, Δδ = 13.5 Hz, *J* = 1.5 Hz), 5.86 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, Δδ = 5.7 Hz, *J* = 1.5 Hz), 4.41, 4.01 (均为 q, 2 × 2H, 2 × OCH₂CH₃, *J* = 7.2 Hz), 1.37, 1.06 (均为 t, 2 × 3H, 2 × OCH₂CH₃, *J* = 7.2 Hz); MS (EI) *m/z* 452 [M]⁺。

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-6-羟基-7*H*-呋喃并[3',4':6,7]萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-9-酮(34)

在 0°C 下, 将 **33** (45.2 mg, 0.1 mmol) 的 THF (1 mL) 溶液逐滴加至氢化铝锂(7.6 mg, 0.2 mmol) 的 THF (1 mL) 悬浮液中。混合物在室温下搅拌 2 小时后, 用饱和 Na₂SO₄ 水溶液猝灭, 然后用 CHCl₃ (2 × 30 mL) 萃取。蒸发除去有机溶剂后, 残余物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 CH₂Cl₂/MeOH (20:1, v/v), 得到为黄色粉末的 **34** (36 mg, 99%)。mp 257°C (分解); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 10.67 (s, 1H, 4OH), 7.94 (d, 1H, H5, *J* = 9.0 Hz), 7.44 (d, 1H, H6, *J* = 9.0 Hz), 6.84 (d, 1H, H5', *J* = 8.1 Hz), 6.79 (d, 1H, H2', *J* = 1.5 Hz), 6.66 (dd, 1H, H6', *J* = 1.5, 8.1 Hz), 6.04 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, Δδ = 6.0 Hz, *J* = 0.6 Hz), 5.88 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, Δδ = 6.3 Hz, *J* = 0.9 Hz), 5.32 (s, 2H, 内酯-CH₂-); MS (FAB, 正离子) *m/z* 365 [M + H]⁺。

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-6-甲氧基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7,8-二羧酸二乙酯(35)

将化合物 **33** (95 mg, 0.21 mmol) 溶解于 MeOH (3 mL) 和 THF (6 mL) 的混合物中。向溶液中加入(三甲基甲硅烷基)重氮甲烷(2 M 的己烷溶液, 0.6 mL, 1.2 mmol)。混合物在室温下搅拌 12 小时, 然后真空浓缩。粗产物通过硅胶

柱色谱法纯化, 使用 CH_2Cl_2 洗脱得到为黄色油状物的 **35** (97 mg, 99%)。 ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.86 (d, 1H, H5, $J = 8.7$ Hz), 7.26 (d, 1H, H6, $J = 8.7$ Hz), 6.75-6.82 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.00 (AB, 2H, 3',4'- OCH_2O -, $\Delta\delta = 11.7$ Hz, $J = 1.2$ Hz), 5.87 (AB, 2H, 7,8- OCH_2O -, $\Delta\delta = 9.0$ Hz, $J = 1.2$ Hz), 4.39 (q, 2H, OCH_2CH_3 , $J = 7.2$ Hz), 4.06 (s, 3H, 4- OCH_3), 4.03 (q, 2H, OCH_2CH_3 , $J = 7.2$ Hz), 1.38, 1.04 (均为 t, $2 \times 3\text{H}$, $2 \times \text{OCH}_2\text{CH}_3$, $J = 7.2$ Hz); MS (EI) m/z 466 [M] $^+$ 。

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7,8-二羧酸二酰胺(**36**)

将化合物 **9** (72 mg, 0.2 mmol) 加入至浓氢氧化铵(2 mL)和 THF (2 mL) 的混合物中。悬浮液在 40°C 下搅拌 72 小时, 然后真空浓缩。粗产物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (4:1 ~ 1:1, v/v), 得到为浅黄色粉末的 **36** (23 mg, 30%)。mp 298°C (分解); ^1H NMR (CD_3OD) δ 8.18 (s, 1H, H4), 7.55 (d, 1H, H5, $J = 8.4$ Hz), 7.21 (d, 1H, H6, $J = 8.4$ Hz), 6.72-6.86 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 5.93 (AB, 2H, 3',4'- OCH_2O -, $\Delta\delta = 13.2$ Hz, $J = 0.9$ Hz), 5.80 (AB, 2H, 7,8- OCH_2O -, $\Delta\delta = 7.2$ Hz, $J = 0.9$ Hz); MS (FAB, 正离子) m/z 402 [$\text{M} + \text{H} + \text{Na}$] $^+$ 。

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-氯-9*H*-咪喃并[3',4':6,7]萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-酮(**37**)

将搅拌的 **2** (104 mg, 0.3 mmol)、*N*-氯代琥珀酰亚胺(80 mg, 0.6 mmol)和浓 H_2SO_4 (10 μL) 的 THF (5 mL) 溶液加热回流 24 小时, 然后用 CHCl_3 (50 mL) 稀释。反应混合物用 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液(50 mL)和水(2×50 mL)洗涤, MgSO_4 干燥并真空浓缩。产物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 CHCl_3 洗脱得到为褐色固体的 **37** (56 mg, 49%)。mp 267°C (分解); ^1H NMR (CDCl_3) δ 8.91 (s, 1H, H4), 7.47 (s, 1H, H6), 6.76-6.91 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.08 (AB, 2H, 3',4'- OCH_2O -, $\Delta\delta = 8.7$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 5.97 (AB, 2H, 7,8- OCH_2O -, $\Delta\delta = 8.7$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 5.22 (q, 2H, 内酯- CH_2 -, $J = 8.7$ Hz); MS (EI) m/z 384 [$\text{M} + 2$] $^+$, 382 [M] $^+$ 。

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-溴-9*H*-咪喃并[3',4':6,7]萘并

[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-酮(38)

将 *N*-溴代琥珀酰亚胺(10.7 mg, 0.06 mmol)和浓 H₂SO₄ (5 μL)加入至 **2** (15.4 mg, 0.044 mmol)的 THF (1 mL)溶液中。溶液在室温下搅拌 20 小时, 然后用 EtOAc (30 mL)稀释。按照与分离 **37** 相同的操作和纯化步骤, 得到为浅黄色粉末的 **38** (12 mg, 64%)。mp 256°C (分解); ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.89 (s, 1H, H4), 7.65 (s, 1H, H6), 6.76-6.91 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.08 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, Δδ = 8.7 Hz, *J* = 1.5 Hz), 5.97 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, Δδ = 7.8 Hz, *J* = 1.5 Hz), 5.22 (q, 2H, 内酯-CH₂-, *J* = 8.4 Hz); MS (EI) *m/z* 428 [M + 2]⁺, 426 [M]⁺。

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-碘代-9*H*-呋喃并[3',4':6,7]萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-酮(39)

将 *N*-碘代琥珀酰亚胺(13.6 mg, 0.06 mmol)和浓 H₂SO₄ (5 μL)加入至 **2** (14 mg, 0.04 mmol)的乙腈(1 mL)溶液中。混合物在室温下搅拌 36 小时, 减压浓缩后, 用乙醚(30 mL)稀释。按照与分离 **37** 相同的操作和纯化步骤, 得到为黄色粉末的 **39** (10.5 mg, 55%)。mp 255°C (分解); ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.78 (s, 1H, H4), 7.93 (s, 1H, H6), 6.75-6.90 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.08 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, Δδ = 8.7 Hz, *J* = 1.5 Hz), 5.97 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, Δδ = 7.8 Hz, *J* = 1.5 Hz), 5.23 (q, 2H, 内酯-CH₂-, *J* = 8.7 Hz); MS (EI) *m/z* 474 [M]⁺。

10-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-溴-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8-氮杂-二环戊二烯并[*a,g*]萘-7-酮(40)

将 *N*-溴代琥珀酰亚胺(11 mg, 0.06 mmol)和浓 H₂SO₄ (10 μL)加入至 **18** (14 mg, 0.04 mmol)的 THF (5 mL)溶液中。溶液在室温下搅拌 24 小时, 然后用 EtOAc(30 mL)稀释。反应完毕后, 按照与分离 **37** 相同的操作得到残余物, 将其通过硅胶柱色谱法纯化。使用 CH₂Cl₂/丙酮(10:1-5:1, v/v)作为洗脱液洗脱得到为浅褐色固体的 **40** (12 mg, 70%)。mp 285°C (分解); ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.81 (s, 1H, H4), 7.63 (s, 1H, H6), 6.77-6.91 (m, 3H, H2' + H5' + H6'), 6.07 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, Δδ = 7.5 Hz, *J* = 1.2hz), 5.93 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, Δδ = 6.0 Hz, *J* = 1.2hz), 4.34 (m, 2H, 内酰胺-CH₂-); MS (FAB, 正离子) *m/z* 428 [M + 2]⁺, 426 [M]⁺。

11-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-氯-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8,9-二氮杂-环戊二烯并[a]蒽-7,10-二酮(41)

将 *N*-氯代琥珀酰亚胺(28 mg, 0.21 mmol)和浓 H₂SO₄ (10 μL)加入至 **28** (39.5 mg, 0.11 mmol)的 THF (1 mL)溶液中。溶液在室温下搅拌 48 小时, 然后用 EtOAc(30 mL)稀释。反应完毕后, 按照与分离 **37** 所述的操作得到残余物, 将其通过硅胶柱色谱法纯化。使用 CH₂Cl₂/丙酮(10:1, v/v)作为洗脱液洗脱, 得到为黄色粉末的 **41** (15.6 mg, 35%)。mp 316°C (分解); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 12.58 (s, 1H, NH), 9.10 (s, 1H, NH), 8.01 (s, 1H, H4), 7.73 (s, 1H, H6), 7.04 (d, 1H, H5', *J* = 7.8 Hz), 7.03 (d, 1H, H2', *J* = 1.5 Hz), 6.86 (dd, 1H, H6', *J* = 1.5, 7.8 Hz), 6.14 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, Δδ = 23.1 Hz), 6.05 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, Δδ = 12.2Hz); MS (EI) *m/z* 396 [M - NH₂ + 2]⁺, 394 [M - NH₂]⁺。

11-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-溴-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8,9-二氮杂-环戊二烯并[a]蒽-7,10-二酮(42)

将 *N*-溴代琥珀酰亚胺(9.4 mg, 0.053 mmol)和浓 H₂SO₄ (5 μL)加入至 **28** (13 mg, 0.035 mmol)的 THF (1 mL)溶液中。溶液在室温下搅拌 48 小时, 然后用 EtOAc(20 mL)稀释。按照与分离 **41** 相同的操作和纯化步骤, 得到为黄色粉末的 **42** (9 mg, 57%)。mp 310°C (分解); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 12.54 (s, 1H, NH), 9.04 (s, 1H, NH), 8.13 (s, 1H, H4), 7.69 (s, 1H, H6), 7.00 (d, 1H, H5', *J* = 7.8 Hz), 6.99 (d, 1H, H2', *J* = 1.5 Hz), 6.82 (dd, 1H, H6', *J* = 1.5, 7.8 Hz), 6.11 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, Δδ = 17.4 Hz, *J* = 0.6 Hz), 6.02 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, Δδ = 9.3 Hz, *J* = 0.9 Hz); MS (FAB, 正离子) *m/z* 441 [M - NH₂ + H + 2]⁺, 439 [M - NH₂ + H]⁺。

11-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-碘代-8,9-二氢-1,3-二氧杂-8,9-二氮杂-环戊二烯并[a]蒽-7,10-二酮(43)

将 *N*-碘代琥珀酰亚胺(11.9 mg, 0.053 mmol)和浓 H₂SO₄ (5 μL)加入至 **28** (13.3 mg, 0.035 mmol)的乙腈(1 mL)溶液中。将溶液在室温下搅拌 48 小时, 然后用 EtOAc(20 mL)稀释。按照与分离 **41** 相同的操作和纯化步骤, 得到为褐色固体的 **43** (9 mg, 51%)。mp 300°C (分解); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 12.59 (s,

1H, NH), 9.10 (s, 1H, NH), 8.38 (s, 1H, H4), 7.79 (s, 1H, H6), 7.10 (d, 1H, H5', $J = 7.8$ Hz), 7.09 (d, 1H, H2', $J = 1.7$ Hz), 6.92 (dd, 1H, H6', $J = 1.7, 7.8$ Hz), 6.22 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 22.8$ Hz, $J = 0.7$ Hz), 6.10 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 13.5$ Hz, $J = 0.9$ Hz); MS (EI) m/z 486 [M - NH₂]⁺.

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-氯-8-羟甲基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸单钠盐(44)

将 1 N NaOH 水溶液(1.56 mL)加入至 37 (57 mg, 0.15 mmol)的 MeOH (25 mL)溶液中。混合物在 70°C 下加热 1 小时。蒸发除去溶剂得到粗产物, 将其通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 CH₂Cl₂/MeOH (3:1, v/v), 得到为白色粉末的 44 (55 mg, 87%)。mp 220°C (分解); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.39 (s, 1H, H4), 7.54 (s, 1H, H6), 6.89 (d, 1H, H5', $J = 8.7$ Hz), 6.73 (d, 1H, H2', $J = 1.5$ Hz), 6.63 (dd, 1H, H6', $J = 1.5, 8.7$ Hz), 6.05 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 18.9$ Hz), 5.81 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 8.1$ Hz), 4.12 (s, 2H, 2-CH₂OH); MS (FAB, 正离子) m/z 425 [M + H + 2]⁺, 423 [M + H]⁺.

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-5-溴-8-羟甲基-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸单钠盐(45)

按照类似于 44 所述的方法, 完成 38 (65 mg, 0.15 mmol)至 45 的转化。所得到的残余物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 CH₂Cl₂/MeOH (3:1, v/v), 得到为黄色粉末的 45 (64 mg, 91%)。mp 205°C (分解); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 8.29 (s, 1H, H4), 7.69 (s, 1H, H6), 6.88 (d, 1H, H5', $J = 7.8$ Hz), 6.72 (d, 1H, H2', $J = 1.5$ Hz), 6.62 (dd, 1H, H6', $J = 1.5, 7.8$ Hz), 6.05 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 18.6$ Hz), 5.81 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 8.4$ Hz), 4.13 (s, 2H, 2-CH₂OH); MS (FAB, 正离子) m/z 469 [M + H + 2]⁺, 467 [M + H]⁺.

9-苯并[1,3]间二氧杂环戊烯-5-基-8-羟甲基-5-碘代-萘并[1,2-*d*][1,3]间二氧杂环戊烯-7-羧酸单钠盐(46)

按照类似于 44 所述的方法, 完成 39 (64 mg, 0.135 mmol)向 46 的转化。所得到的残余物通过硅胶柱色谱法纯化, 使用 CH₂Cl₂/MeOH (3:1, v/v), 得到为浅黄色粉末的 46 (62 mg, 89%)。mp 212°C (分解); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ

8.27 (s, 1H, H4), 7.86 (s, 1H, H6), 6.88 (d, 1H, H5', $J = 7.8$ Hz), 6.71 (d, 1H, H2', $J = 1.2$ Hz), 6.62 (dd, 1H, H6', $J = 1.2, 7.8$ Hz), 6.04 (AB, 2H, 3',4'-OCH₂O-, $\Delta\delta = 18.3$ Hz), 5.79 (AB, 2H, 7,8-OCH₂O-, $\Delta\delta = 8.4$ Hz), 4.13 (s, 2H, 2-CH₂OH); MS (FAB, 正离子) m/z 515 [M + H]⁺.

抗病毒作用

试验

体外抗病毒测定

按照先前报道过的方法完成 HBV (Doong 等人, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 8495-8499)、HSV-1 (Bastow 等人, 1983, *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 914-917)、HSV-2 (Bastow 等人, 1983, *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 914-917)、EBV (Yao 等人, 1993, *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1420-1425)、CMV (Andreoni 等人, 2002, *J. Med. Virol.* 67:33-40)和 HIV (Mellors 等人, 1992, *Mol. Pharmacol.* 41: 446-451)的抗病毒测定。在 Huh-Luc/neo 细胞系中测定抗-HCV 活性。将细胞种在 48 孔板中生长至汇合。向培养基(DMEM, 10% dFBS)中加入不同浓度的药物, 培养 3 天。在处理 3 天结束时, 除去培养基, 加入 50 μ l 被动性裂解缓冲液(passive lysis buffer)(Promega)。细胞裂解物在室温下振摇 15 分钟。将 30 μ l/孔细胞裂解物转移至另外的 96 孔板中, 向板中加入 100 μ l/孔荧光素酶活性测定底物, 立即通过光度计(Amersham)读取。

采用 Southern blot 测量化合物对 HBV DNA 的作用。用 Dneasy Tissue 试剂盒(Oiagen Inc. Valencia, CA.)从细胞中提取的总 DNA, 在 0.8%琼脂糖凝胶上分离。将分离后的 DNA 转移至 Hybond-N+膜(Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ.)。对病毒 DNA 复制的抑制作用通过将药物处理组的复制 HBV DNA 与未处理培养物进行对照而评价, 使用带有 [α -³²P] dCTP 标记的全 HBV DNA 探针的膜杂交, 接着进行放射自显影术。在分子动力学光密度计(Molecular Dynamics Densitometer)(Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ.)上, 使用 ImageQuANT 图像分析软件完成定量光密度测定。使用整合 HBV 基因组作为内对照以使 DNA 荷载量标准化。使用 Northern blot 杂交测定化合物对 HBV RNA 的作用。使用 Rneasy 试剂盒(Qiagen Inc. Valencia, CA.)从细胞中提取细胞内总 RNA。用 1.2%甲醛琼脂糖凝胶分离

RNA, 然后转移至 Hybond-N+膜(Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ.)。将膜与上述相同探针在 65°C 下杂交, 接着进行放射自显影术。使用 GAPDH RNA 水平作为内对照以使 RNA 荷载量标准化。HBV 核心蛋白表达的减少通过 western blot 评价。HepG2.2.12 细胞的细胞粗提取物在 12% SDS-PAGE 凝胶上分离并转移至硝酸纤维素膜上(Bio-rad Laboratories, Hercules, CA.)。加入抗 HBV 核心抗体(DAKO Corp. Carpinteria, CA.)和抗兔 IgG 二抗(Sigma. St. Louis, MO.)。使用肌动蛋白水平作为内对照。

细胞培养

Hep.G2.2.15 是稳定转染有 HBV 基因组(ayw 毒株)的肝毒细胞瘤细胞系 (hepatoblastoma cell line)(Sells 等人, 1987, *Proc Natl Acad Sci USA*. 84 (4): 1005-1009)。将 W10 即 HepG2 细胞系用 adr HBV 毒株(Fu 等人, 2000, *Antimicrob Agents Chemother* 44 (12): 3402-3407; Fu 等人, 1999, *Biochem Pharmacol*. 57 (12): 1351-1359)。利用这些细胞系评价赛菊宁黄质和 22 的抗病毒活性。在 6 天长的培养物中测量在含有 10%胎牛血清(FBS)的 Earle's 盐最低必需培养基(MEME)中的药物的不同浓度。药物在培养基中放置 3 天, 然后除去培养基, 加入含有相同浓度的药物的新鲜培养基。在另一个 3 小时结束时, 收集培养基和细胞, 测得 HBV 复制水平。拉米夫定耐受性细胞系 DM2 (Fu 等人, 2000, *Antimicrob Agents Chemother* 44 (12): 3402-3407)也是一种稳定转染有 HBV 基因组(adr 毒株)的肝毒细胞瘤细胞系, 其中含有 L526M/M550V 双重突变(double mutation)。DM2 的培养条件与 HepG2.2.15 相同。

细胞毒性测定

按照先前报道过的方法测量测试化合物对 MT-2 (Mellors 等人, 1992 *Mol. Pharmacol*. 41: 446-451)和 CEM (Grove 等人, 1995, *Cancer Res*. 55: 3008-3011)细胞的毒性反应。将 Hepg2 细胞以 10^4 细胞/ml/孔的密度种在 24 孔板中, 在 37°C 和 5% CO₂ 下用补充有 10% FBS 的 MEME 培养。在培养次日加入不同浓度的各种测试化合物, 细胞继续培养 3 天。在培养结束时, 除去培养基, 向各孔中加入 0.5 ml 的 0.5%亚甲蓝的 50%乙醇(v/v)溶液, 在室温下保持 30-60 分钟。除去亚甲蓝; 孔板用水洗涤, 然后风干。干燥后, 加

入 1%十二烷基肌氨酸钠以裂解被着色的细胞层。使用微板测定仪(microplate reader)(Molecular Devices Corp. Sunnyvale, CA)在 595 nm 测定吸光度。按照先前报道过的方法计算对 CEM 细胞的毒性反应(Grove 等人, 1995, *Cancer Res.* 55 (14): 3008-3011)。

赛菊宁黄质和 22 对 wt HBV 细胞系 W10 和拉米夫定耐受性细胞系 DM2 的作用

使用定量实时 PCR 测量在有或没有药物处理的 DM2 细胞培养基中的细胞外 HBV 拷贝数。药物处理方案与前面描述的相同, 只是将细胞种在 96 孔板上。处理 6 天后, 将 100 μ l 培养基/样品转移至薄壁 96 孔 PCR 板中。向培养基中加入 8 μ l 的 2.2 mg/ml 链霉蛋白酶(Sigma. St. Louis, MO.), 在 37°C 下培养 1.5 小时。每孔加入 1 单位 Dnase I (Roche Applied Science. Indianapolis, IN.), 在 37°C 下, 再培养 1 小时。培养基在 95°C 下培养 5 分钟后, 将 3 μ l 样品加入至 50 μ l 实时 PCR 反应中。实时 PCR 中使用的引物和探针序列为: 正义引物 5'- attcctatgggagtgggc - 3'; 反义引物 5' - gaggtaaaaagggactcaag - 3'; 探针 5' ctgccattgttcagtggttcgggcag - 3' (Cy5 标记的)。50 μ l 的 PCR 反应中的组分为 25 μ l 的 SuperMix UDG (Invitrogen life technologies. Carlsbad, CA.), 300 nM 的正义和反义引物、100 nM 探针(Biosearch technologies, Inc. Novato, CA.)以及 H₂O。PCR 使用 iCycler (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA.)按照下述方案完成: 50°C 持续 2 分钟, 95°C 持续 8.5 分钟, 95°C 下的 40 个循环持续 15 秒钟, 以及 56°C 持续 1 分钟。通过将样品量与各组操作中生成的标准曲线相对照, 从而测得拷贝数的量化水平。样品量使用 β -肌动蛋白作为内对照而标准化。

结果和讨论

体外研究

体外研究的结果汇总在表 1 中。

表 1. 赛菊宁黄质及其类似物的抗病毒活性

| 化合物 | 抗病毒活性 (EC ₅₀ , μM) | | | | | | | 细胞毒性 (ID ₅₀ , μM) | |
|-----------------|----------------------------------|------------------|-------|-------|-----|------|------------------|---------------------------------|------|
| | HBV | HCV ^a | HSV-1 | HSV-2 | EBV | CMV | HIV ^b | MT-2 | CEM |
| 1 | >10 | >10 | >50 | >50 | >20 | 17.6 | >100 | >100 | >50 |
| 2 | 1.0 | 3(64) | 2 | 35 | >20 | 7.3 | >2.5(T) | 2.5 | 31 |
| 3 | 3.4 | 10(25) | 9 | 25 | >20 | 2.5 | >10(T) | 10 | 30 |
| 4 | >10 | 10(71) | >50 | >50 | >20 | - | >100 | >100 | >50 |
| 5 | >10 | >10 | >25 | >25 | >20 | - | >48(T) | 48 | >50 |
| 6 | >10 | 10(55) | >50 | >50 | >20 | - | >100 | >100 | >50 |
| 7 | >23 | >10 | >25 | >25 | >15 | - | >10(T) | 10 | 46 |
| 8 | >10 | >10 | >25 | >25 | >15 | 3.7 | >100 | >100 | 10 |
| 9 ^d | - | - | - | - | - | - | - | N-D | N-D |
| 10 | >10 | 10(62) | >50 | >50 | >5 | - | >100 | >100 | >100 |
| 11 ^d | - | - | - | - | - | - | - | N-D | N-D |
| 12 | 0.8 | 3(58) | 0.15 | <0.1 | 9 | 0.45 | >5(T) | 5 | 8.4 |
| 13 | >20 | >10 | 12 | >25 | >20 | - | >26(T) | 26 | 29 |
| 14 | >10 | >10 | >50 | >50 | >20 | - | >70(T) | 70 | 76 |
| 15 | 0.8 | 3(64) | 0.8 | >3 | >20 | - | >10(T) | 10 | 3 |
| 16 | >10 | >10 | >50 | >50 | >20 | - | >100 | >100 | 90 |
| 17 | >10 | 3(29) | 14 | 14 | >20 | - | >26(T) | 26 | 27 |
| 18 | 0.08 | 1(55) | 0.29 | 0.16 | 11 | - | >4(T) | 4 | 4.5 |
| 19 | 1.6 | >3 | 0.67 | 1 | >20 | - | >8(T) | 8 | 6 |
| 20 | >20 | 10(85) | 13 | >20 | >20 | - | >28(T) | 28 | 67 |
| 21 | >20 | 10(58) | 5 | 7 | >20 | - | 5 | 22 | 22 |
| 22 | 0.9 | 3(80) | 0.6 | 0.5 | >20 | - | >16(T) | 16 | 5 |
| 23 | >10 | >10 | >50 | >50 | >20 | - | >100 | >100 | >100 |
| 24 | >5 | >10 | >30 | >30 | >5 | 4.1 | >16(T) | 16 | 17 |
| 25 | >10 | >10 | >40 | >40 | >20 | - | >100 | >100 | 93 |
| 26 | 1 | >10 | 5 | 10 | 13 | - | >7(T) | 7 | 40 |

| | | | | | | | | | |
|-----|------|----------------|-----|-----|-----|-----|--------|------|------|
| 27 | >20 | 10(25) | 17 | 40 | >20 | - | >25(T) | 25 | 32 |
| 28 | 0.03 | 10(74) | 1.4 | 1.4 | >25 | - | 15(T) | 16 | 50 |
| 29 | >5 | >10 | >30 | >30 | >5 | 8.1 | >22(T) | 22 | 27 |
| 30 | >20 | 10(93) | >50 | >50 | >20 | - | >28(T) | 28 | 50 |
| 31 | >20 | >10 | >50 | >50 | >20 | - | >90(T) | 90 | 74 |
| 32 | >20 | >10 | >50 | >50 | >20 | - | >100 | >100 | >100 |
| 33 | >10 | 10(62) | >50 | >50 | >10 | - | >15(T) | 15 | 39 |
| 34 | >10 | >10 | 23 | 28 | >10 | - | >13(T) | 13 | 31 |
| 35 | >20 | 10(60) | >50 | >50 | >20 | - | >24(T) | 24 | >100 |
| 36 | >20 | >10 | >50 | >50 | >20 | - | >100 | >100 | >100 |
| 37 | >10 | >10 | 23 | >25 | >20 | 8.8 | >50(T) | 50 | 27 |
| 38 | >60 | >10 | >50 | >50 | >15 | - | >100 | >100 | 100 |
| 39 | >40 | >10 | >25 | >25 | >10 | - | >80(T) | 80 | 70 |
| 40 | >20 | 10(32) | 6.5 | >20 | >20 | - | >54(T) | 54 | 38 |
| 41 | >10 | 10(60) | 7 | >40 | >20 | - | >30(T) | 30 | >100 |
| 42 | >20 | 3(45) | 16 | >20 | >20 | - | 6 | >100 | 28 |
| 43 | >10 | 10(52) | >40 | >40 | >20 | - | 2 | 35 | 40 |
| 44 | >10 | >10 | >50 | >50 | >20 | >20 | >60(T) | 60 | >100 |
| 45 | >10 | - | >50 | >50 | >20 | >20 | >50(T) | 50 | 46.5 |
| 46 | >18 | 10(36) | >50 | >50 | >20 | >20 | >80(T) | 80 | >100 |
| ACV | - | - | 8 | 21 | - | - | - | N-D | N-D |
| 3TC | 0.02 | - | - | - | 0.4 | - | - | N-D | N-D |
| ddC | - | - | - | - | - | - | 0.8 | 70 | 5 |
| 干扰素 | - | 10u/ml (90) | - | - | - | - | - | N-D | N-D |

^a 括号中的数值表示抑制百分比。^b (T)表示毒性^d低溶解度。

内酰胺 **18** 和赛菊宁黄质(**2**)的环状酰肼(cyclic hydrazide)**28** 衍生物具有显著的体外抗 HBV 活性(分别为 $EC_{50} = 0.08$ 和 $0.03 \mu M$)，同时化合物 **18** 显示出最强效的抗-HCV 活性(在 $1.0 \mu M$ 下具有 55%抑制作用)。化合物 **12** 作为环状酰亚胺**9**的酸水解产物在抗 HBV 方面比赛菊宁黄质更有效($EC_{50} = 0.8$

μM)。在化合物 **12** 和 **18** 的 C 环上含有二甲氧基而不是亚甲二氧基的化合物 **15** 和 **22** 显示出强烈的抗 HCV 活性(在 $3.0 \mu\text{M}$ 下分别具有 64 和 80% 抑制作用)和抗 HBV 活性(分别为 $\text{EC}_{50} = 0.8$ 和 $0.9 \mu\text{M}$)。最有效的抗 HSV 化合物是 **12** 和 **18**, 它们显示出显著的 HSV-1 (分别为 $\text{EC}_{50} = 0.15$ 和 $0.29 \mu\text{M}$)和 HSV-2 (分别为 $\text{EC}_{50} < 0.1$ 和 $0.16 \mu\text{M}$)抑制作用。发现化合物 **12** 具有抗 HSV-1 ($\text{EC}_{50} = 0.15 \mu\text{M}$)、HSV-2 ($\text{EC}_{50} < 0.1 \mu\text{M}$)、EBV ($\text{EC}_{50} = 9.0 \mu\text{M}$)、和 CMV ($\text{EC}_{50} = 0.45 \mu\text{M}$)的广谱抗病毒活性。其分别比对照药物无环鸟苷(acyclovir) ($\text{EC}_{50} = 21 \mu\text{M}$)抗 HSV-1 和 HSV-2 更有效大约 140 和 210 倍。环状酰胺 **28** 及其溴化产物 **42** 显示出中等强度的抗 HIV 活性(分别为 $\text{EC}_{50} = 2.7$ 和 $2.5 \mu\text{M}$)。

化合物 **12** 作为环状酰胺 **9** 的酸水解产物具有强烈的抗 HBV 和 CMV 以及 HSV 的抗病毒活性。还原酰胺 **9** 得到内酰胺 **18** 和反-内酰胺 **16**。内酰胺 **18** 比化合物 **12** 抗 HBV 和 HCV 更有效, 与化合物 **12** 抗 HSV 同样有效。相反, 反-内酰胺 **16** 根本没有活性。该发现表明内酰胺 **18** 中的“上方”羰基是具有抗病毒活性的重要特征。

环状酰胺 **28** 在测试的赛菊宁黄质类似物中显示出最强的抗-HBV 活性。此外, 化合物 **28** 具有中等强度的抗 HIV 活性。

赛菊宁黄质和 **22** 的抗 HBV 活性

评价了赛菊宁黄质和 **22** 对 HepG2.2.15 细胞中的 HBV DNA 的作用, 该 HepG2.2.15 细胞稳定转染有 HBV 基因组。赛菊宁黄质和 **22** 的结构如图 6 所示。将细胞用不同浓度的药物处理 6 天。HBV DNA 抑制作用的结果如图 2 所示。细胞中的 HBV 复制中间体的水平根据 HBV 复制中间体与整合的 HBV 基因组的比例进行预测。将抗病毒活性表示为未处理对照数值的百分数。赛菊宁黄质和 **22** 的 EC_{50} 分别为接近 1 和 $0.08 \mu\text{M}$ (参见表 2)。

表 2. 赛菊宁黄质、**22** 和拉米夫定对于不同 HBV 毒株的 EC_{50} 和 IC_{50}

| 化合物 | EC_{50} (Mm) | | IC_{50} (μM) | | |
|-----------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|---------|-------|
| | wt ^a (adr) ^b | L526M/M550V(adr) ^c | wt(ayw) ^d | CEM | HepG2 |
| 赛菊宁黄质 | 0.4±0.1 | 0.1±0.2 | 1±0.2 | 32±1.4 | 6±1.2 |
| 22 | 0.004±0.002 | 0.0003±0.0001 | 0.08±0.01 | 3.6±1.2 | 2±0.3 |
| 拉米夫定 | 0.02±0.03 | >3 | 0.05±0.03 | >100 | >100 |

^a 野生型。^b 在 W10 细胞中测量抗 HBV 活性。^c 在 DM2 细胞中测量抗 HBV 活性。^d 在 HepG2 细胞中测量抗 HBV 活性。

结果表明, 赛菊宁黄质及其衍生物具有非常强的抗 HBV 活性。

细胞毒性

赛菊宁黄质和 **22** 抑制 50% 细胞生长的浓度(IC₅₀)分别为 6 μM 和 2 μM (表 2)。然而在 CEM 细胞中, 赛菊宁黄质具有更低的毒性, IC₅₀ 为 32 μM。**22** 对于 HepG2 和 CEM 细胞的细胞毒性相似。

拉米夫定耐受性 HBV 对赛菊宁黄质易感

使用 W10 和 DM2 细胞(Fu 等人, 2000, *Antimicrob Agents Chemother* 44 (12): 3402-3407)评价这两种化合物对于 wt HBV (adr 毒株)及其拉米夫定耐受性 HBV 的作用。W10 是稳定转染有 HBV 基因组的野生型(wt) adr 毒株的 HepG2 细胞系, 是亚洲最常见的一种细胞系。DM2 是稳定转染有在 DNA 聚合酶区域含有 L526M/M550V 双重突变的 HBV adr 毒株的 HepG2 细胞系。将这两种细胞系用不同浓度的赛菊宁黄质和 **22** 进行处理。处理 6 天后, 使用实时 PCR 测量分泌在培养基中的 HBV DNA 含量(图 3)。同时将使用拉米夫定处理的细胞作为对照。将由 Southern blot 杂交分析得到的细胞内 HBV DNA 水平结果与实时 PCR 得到的结果进行对照, 证实实时 PCR 方法是有效的, 该实时 PCR 是在有或没有使用拉米夫定处理下, 测量 HepG2.2.15 培养基中的 HBV DNA 的拷贝。通过两种方法预测得到的 EC₅₀ 值是一致的。感兴趣的是, 赛菊宁黄质和 **22**、特别是 **22** 在抗拉米夫定耐受性 HBV 方面具有比抗 wt 毒株更高的抑制作用。赛菊宁黄质抗 wt adr 和 L526M/M550V HBV 的 EC₅₀ 分别为 0.4 μM 和 0.1 μM, 而 **22** 抗 adr 和 adr L526M/M550V HBV 的 EC₅₀ 分别为 0.004 μM 和 0.0003 μM。

赛菊宁黄质和 **22** 减少 HBV mRNA

由于赛菊宁黄质及其衍生物是唯一一类具有抗 HBV 活性的化合物, 因此通过首先评价其对 HBV mRNA 的作用分析了其 HBV 抑制作用的机理。将 HepG2.2.15 细胞用两种药物处理 6 天, 然后在细胞总 RNA 上使用 HBV 特异性[α-³²P] dCTP 标记探针进行 Northern blot 分析。图 4 示出了细胞使用

赛菊宁黄质和 22 进行处理的结果。两种化合物均以依赖于剂量的方式减少了 3.5kb、2.4/2.1kb HBV 转录物，对 3.5kb 转录物的 EC₅₀ 分别为 0.09 μM 和 1μM。拉米夫定对 HBV RNA 水平没有影响。

赛菊宁黄质和 22 抑制 HepG2.2.15 细胞中的 HBV 病毒蛋白表达

由于 3.5kb HBV 转录物在使用药物处理后减少，因此预测这类化合物还可能影响病毒蛋白表达。将 HepG2.2.15 细胞用赛菊宁黄质和 22 处理 6 天。使用抗 HBV 核心蛋白抗体进行 Western blot 分析，以观察上述药物是否可以抑制核心蛋白在细胞中的表达。如图 5 所示，核心蛋白表达按照依赖于剂量的方式降低。拉米夫定对于 HBV 核心蛋白表达没有影响。

本文所描述的本发明和请求保护的范围并不受本文所公开的具体实施方案的限制，这是因为这些实施方案应当被理解为对本发明几个方面的示例性说明。任何与其等同的实施方案均落入本发明范围之内。实际上根据前面的描述，那些除了本文所示出和描述的内容之外的其它各种改进对于本领域技术人员而言将是显而易见的。这些改进同样落入所附的权利要求书的范围之内。

在此将本文所引用的各种参考文献的全部内容引入作为参考。

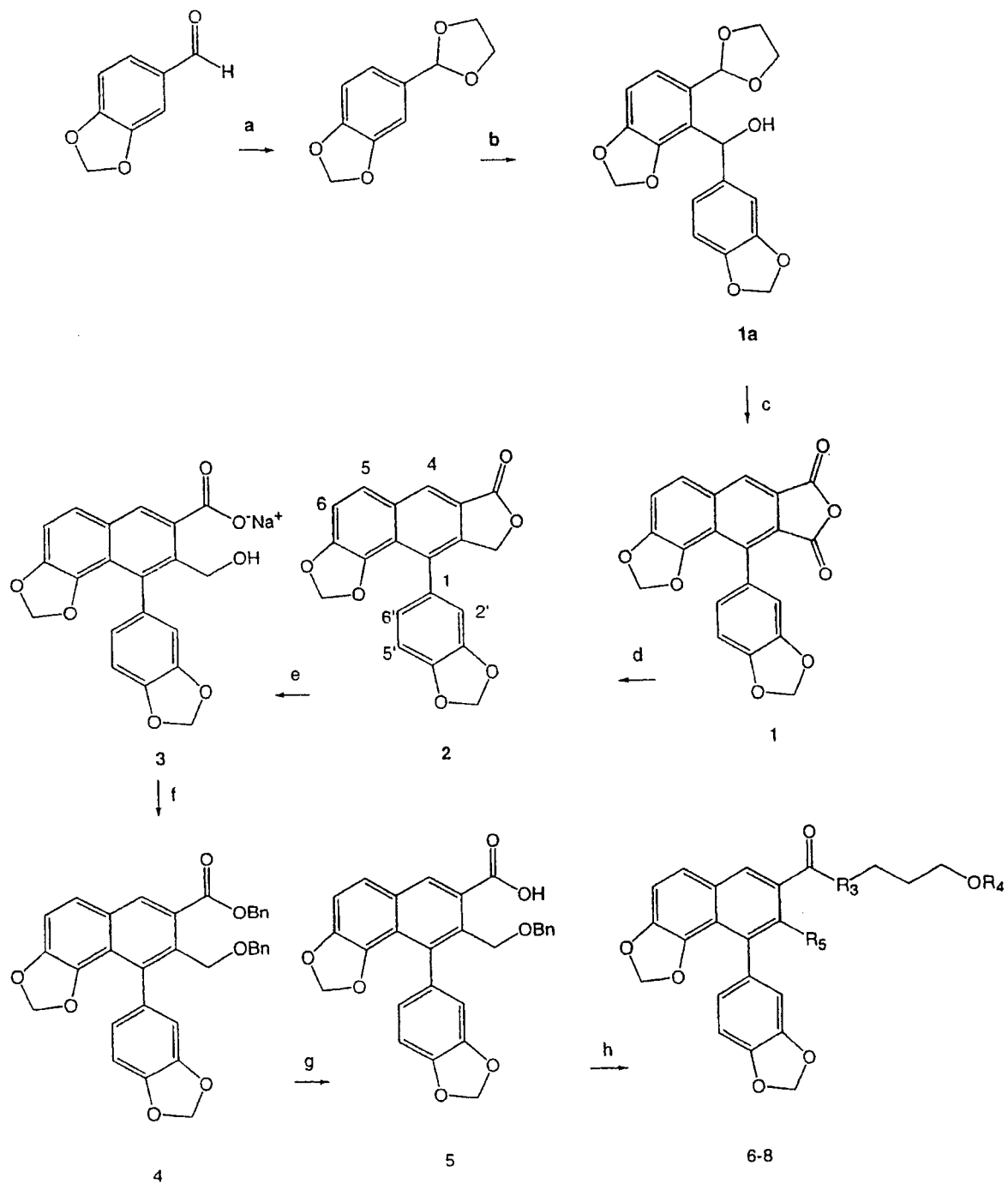


图 1A

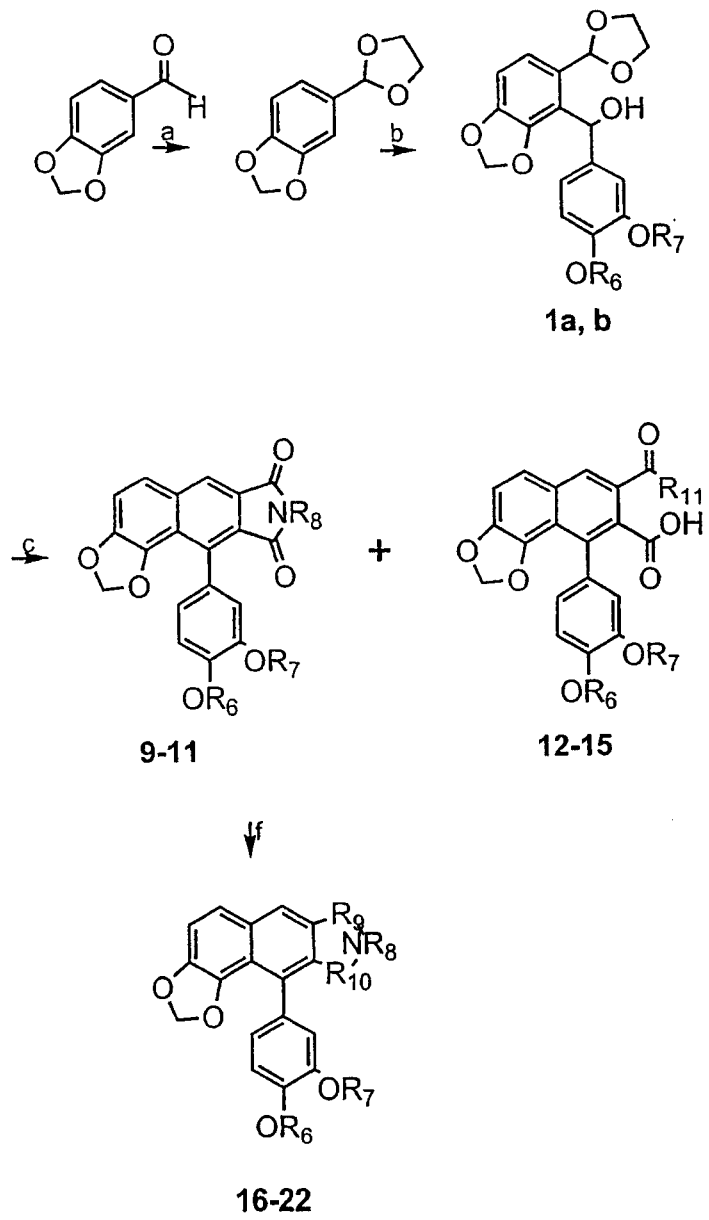


图 1B

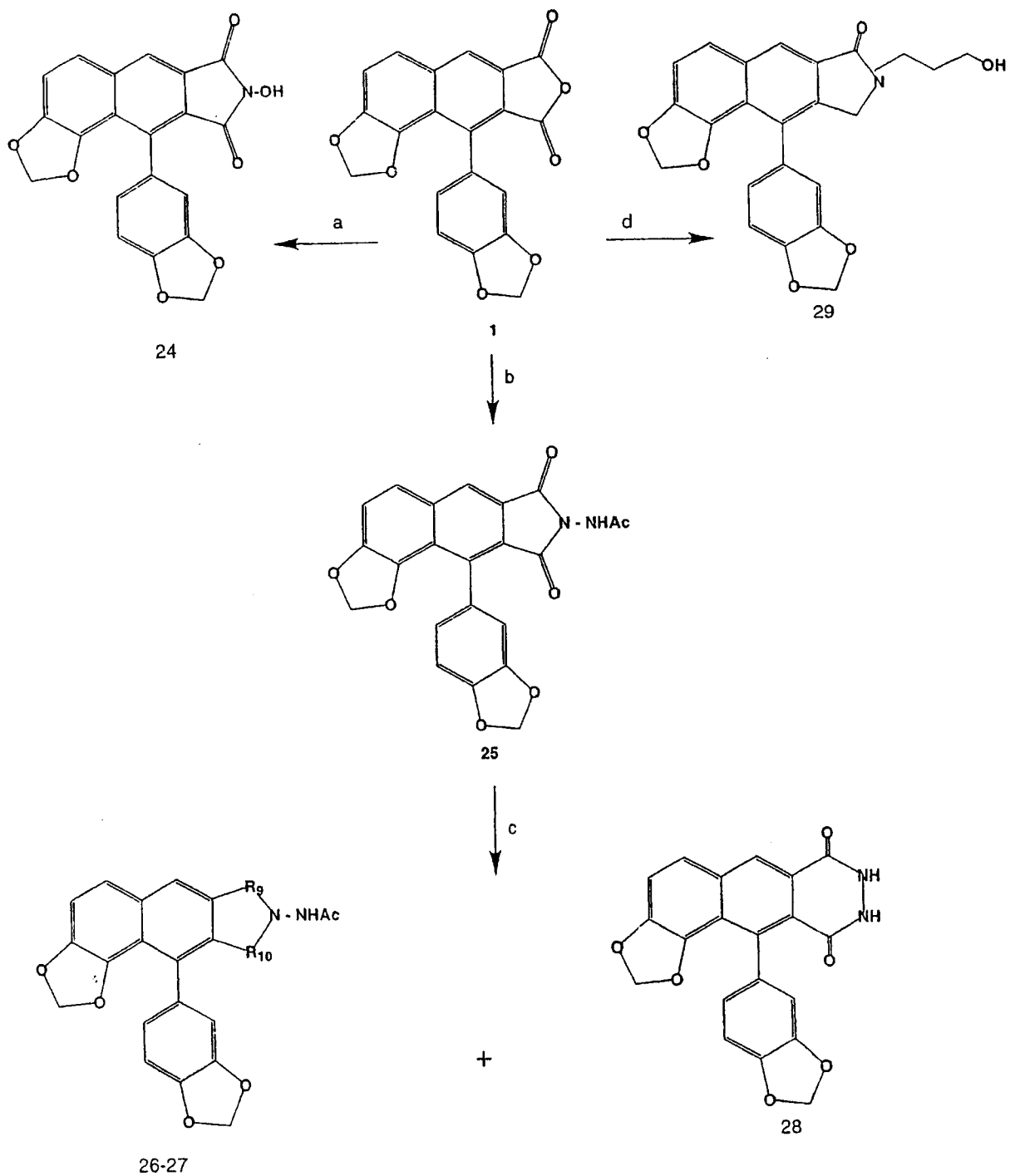


图 1C

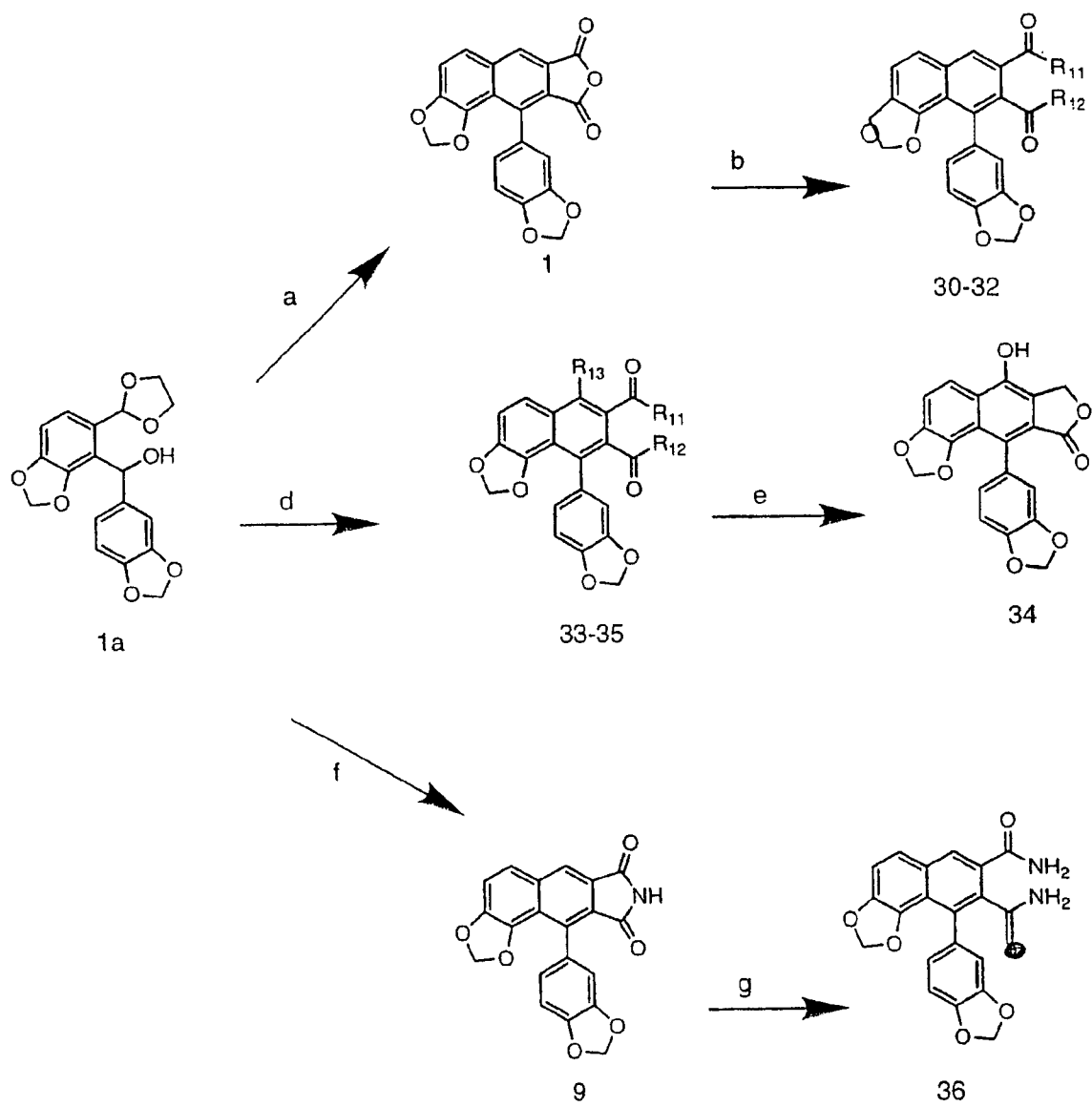


图 1D

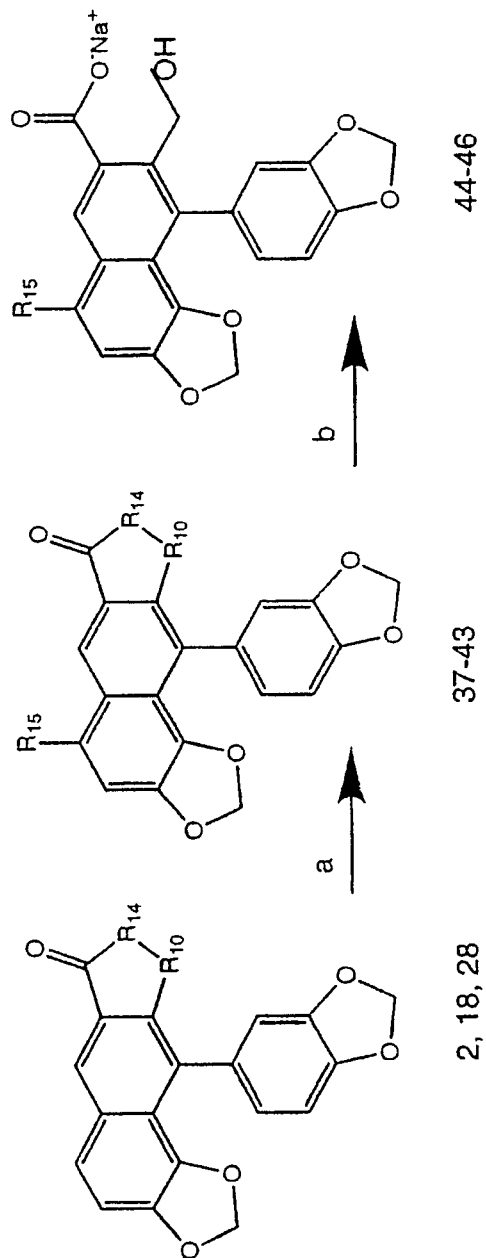


图 1E

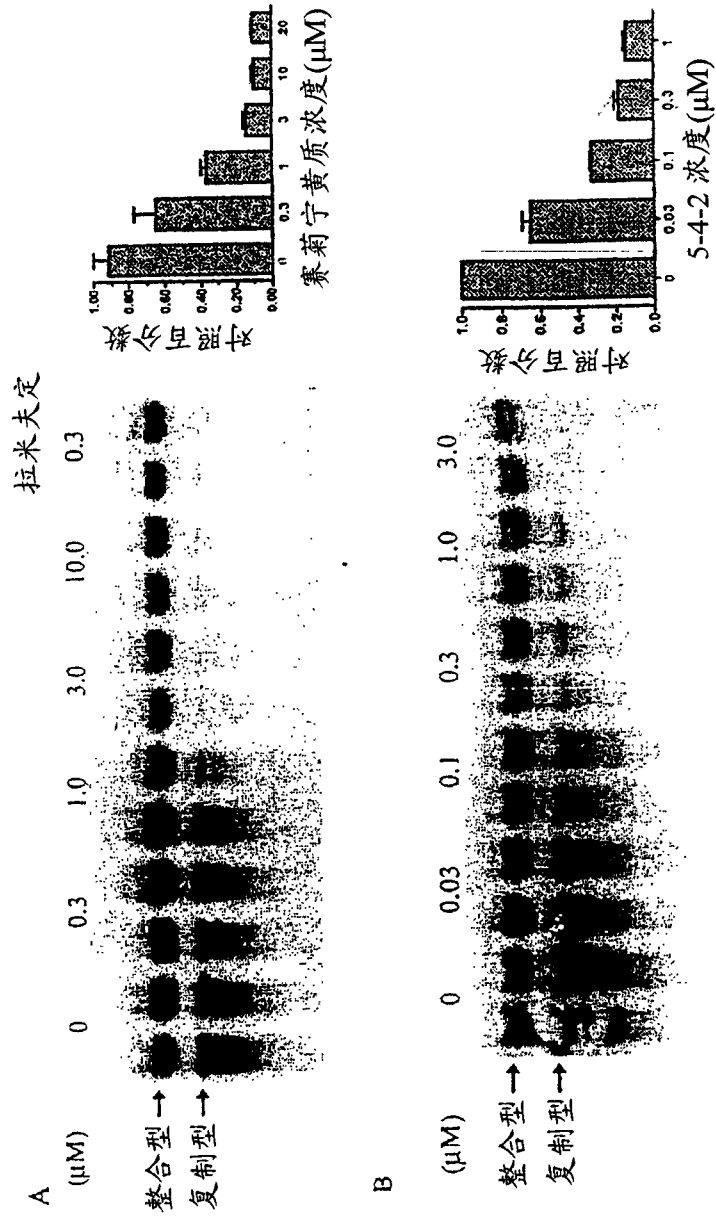


图 2

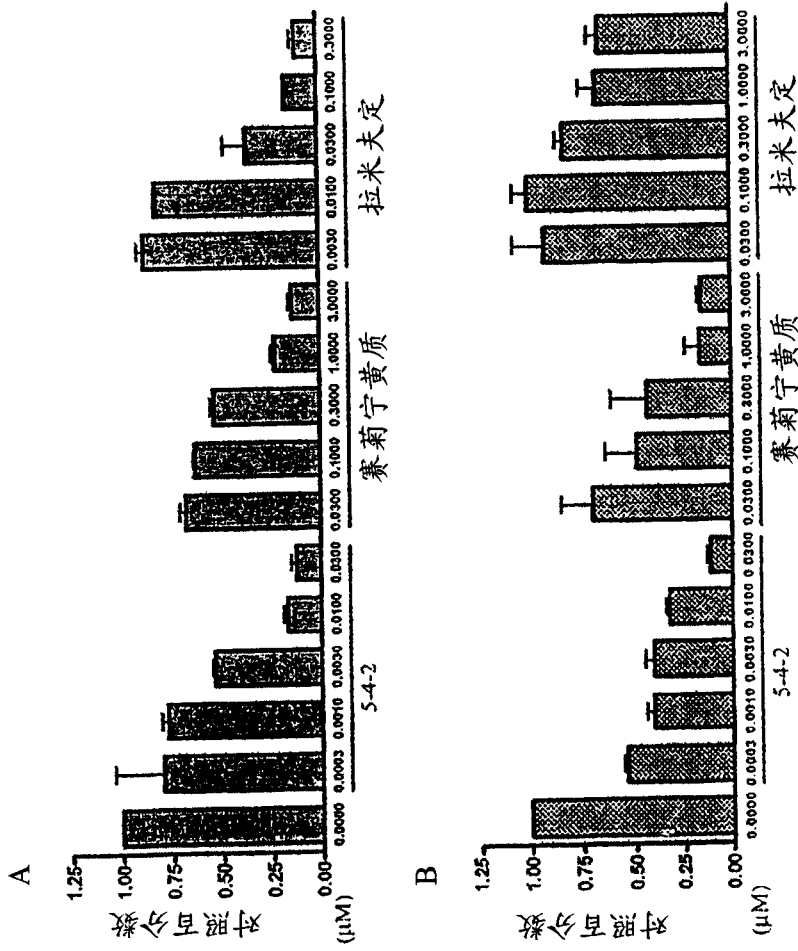


图 3

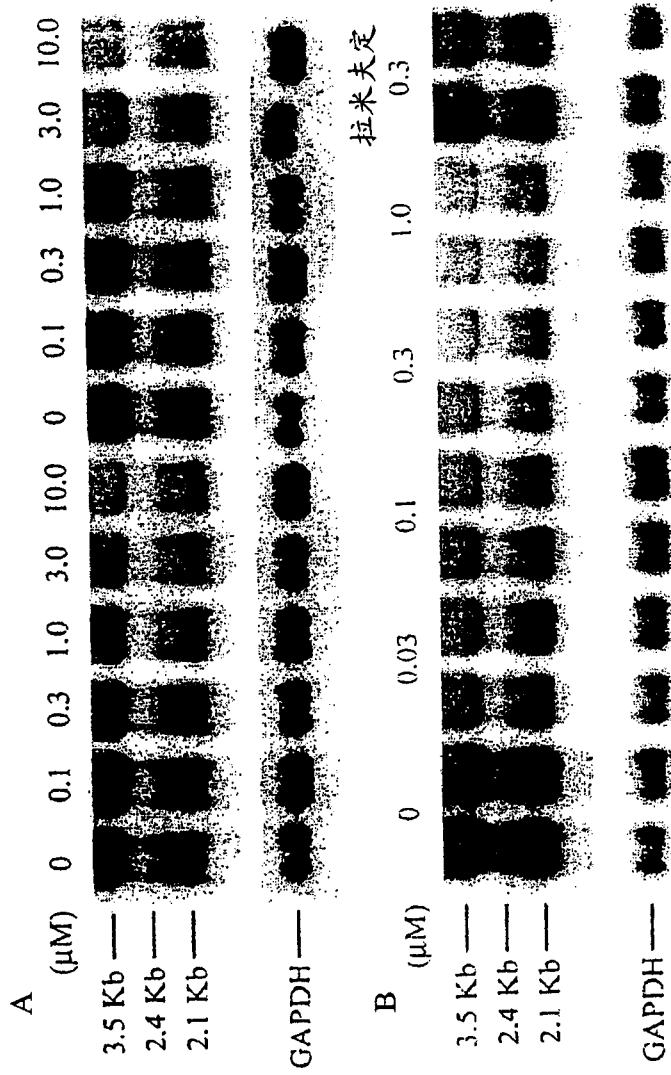


图 4

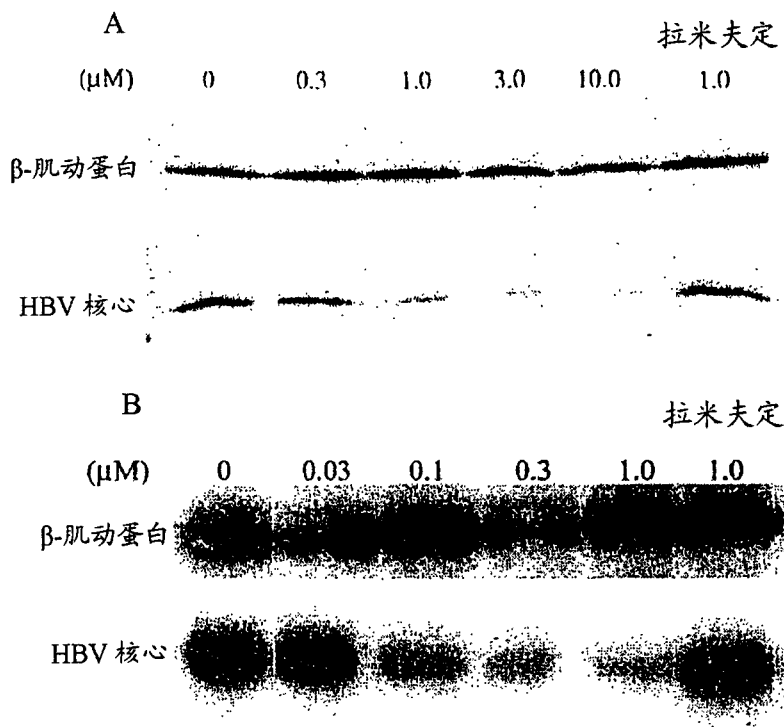
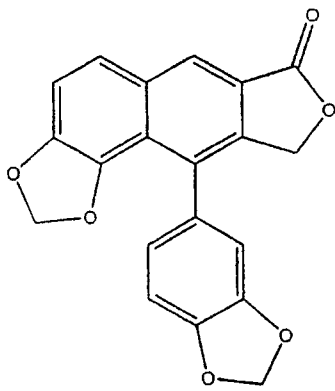
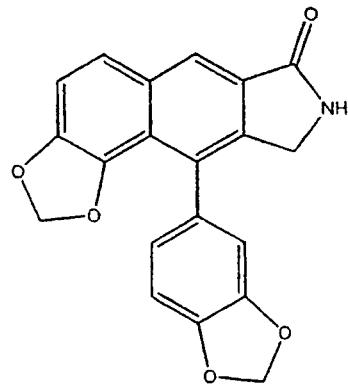


图 5



赛菊宁黄质



22

图 6