



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109311943 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201780033784.X

E·马尔 赵倩 孙力强

(22)申请日 2017.04.03

D·R·兰勒 P·M·斯科拉

(30)优先权数据

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
代理人 陈桢

62/318,417 2016.04.05 US

15/475,227 2017.03.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 7/54(2006.01)

2018.11.30

C07K 7/64(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61P 35/00(2006.01)

PCT/US2017/025677 2017.04.03

A61P 31/00(2006.01)

A61K 38/12(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/176608 EN 2017.10.12

(71)申请人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72)发明人 M·M·米勒 M·P·艾伦 李玲

权利要求书6页 说明书118页

M·S·鲍舍 E·P·吉利斯

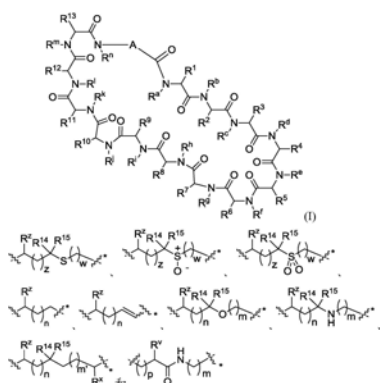
序列表3页

(54)发明名称

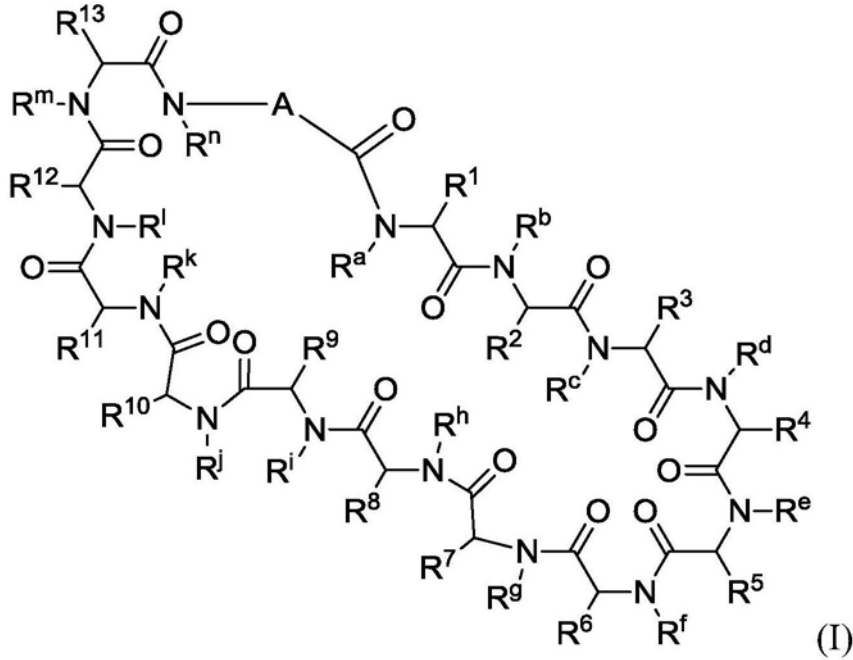
PD-1/PD-L1及CD80/PD-L1蛋白质/蛋白质相  
互作用的大环抑制剂

(57)摘要

本申请提供新颖的大环肽,其抑制PD-1/PD-L1及PD-L1/CD80蛋白质/蛋白质相互作用且因此可用于改善多种疾病,包括癌症及感染性疾病。

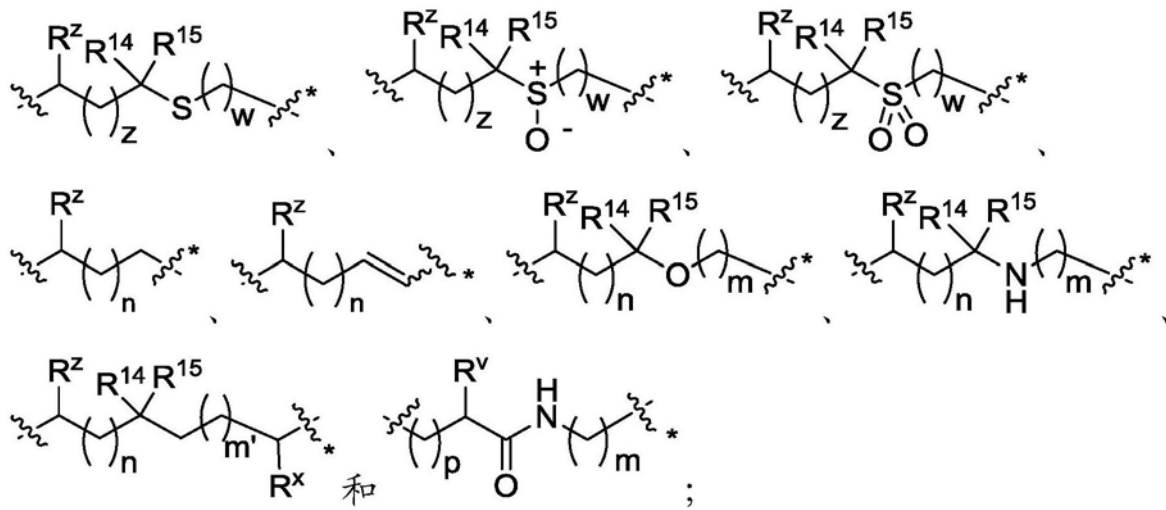


1. 式 (I) 化合物或其药用盐:



其中

A选自键、



其中

$\sim^*$  表示与羰基的连接点且  $\sim^{\wedge}$  表示与氮原子的连接点;

z为0、1或2;

w为1或2;

n为0或1;

m为1或2;

$m'$  为0或1;



p为0、1或2;

$R^x$ 选自氢、氨基、羟基及甲基;

$R^{14}$ 及 $R^{15}$ 独立选自氢及甲基;及

$R^z$ 选自氢及 $-C(O)NHR^{16}$ ;其中 $R^{16}$ 选自氢、 $-CHR^{17}C(O)NH_2$ 、 $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NH_2$ 及 $-CHR^{17}C(O)NHCHR^{18}C(O)NHCH_2C(O)NH_2$ ;其中 $R^{17}$ 选自氢及 $-CH_2OH$ 且其中 $R^{18}$ 选自氢及甲基;

$R^v$ 为氢或天然氨基酸侧链;

\*表示与羰基的连接点且表示与氮原子的连接点;

$R^c$ 、 $R^f$ 、 $R^h$ 、 $R^i$ 、 $R^m$ 及 $R^n$ 为氢;

$R^a$ 、 $R^e$ 、 $R^j$ 及 $R^k$ 各自独立选自氢及甲基;

$R^{10}$ 为吡啶基 $C_1$ - $C_3$ 烷基,其中该吡啶基部分任选经一个选自以下的基团取代: $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基羰基、 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基羰基 $C_1$ - $C_3$ 烷基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基) $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、芳基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、芳基 $C_1$ - $C_3$ 烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、 $C_3$ - $C_6$ 环烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、 $C_3$ - $C_6$ 环烷基 $C_1$ - $C_3$ 烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、氰基、卤代 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、卤代 $C_1$ - $C_3$ 烷基、杂芳基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、杂芳基 $C_1$ - $C_3$ 烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、 $-NR^{p9}$ 、 $(NR^{p9})C_1$ - $C_3$ 烷基及四唑基 $C_1$ - $C_3$ 烷基,或经两个选自以下的基团取代: $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基羰基、 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基羰基 $C_1$ - $C_3$ 烷基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基) $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、芳基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、芳基 $C_1$ - $C_3$ 烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、羧基、羧基 $C_1$ - $C_3$ 烷基、氰基、 $C_3$ - $C_6$ 环烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、 $C_3$ - $C_6$ 环烷基 $C_1$ - $C_3$ 烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、卤素、卤代 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、卤代 $C_1$ - $C_3$ 烷基、杂芳基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、杂芳基 $C_1$ - $C_3$ 烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、羟基、 $-NR^{p9}$ 、 $(NR^{p9})C_1$ - $C_3$ 烷基、四唑基、四唑基 $C_1$ - $C_3$ 烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基及卤素的基团取代;或

$R^{10}$ 为氮杂吡啶基 $C_1$ - $C_3$ 烷基,其中该氮杂吡啶基 $C_1$ - $C_3$ 烷基的氮杂吡啶基部分经一个或两个独立选自以下的其它基团取代: $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基羰基、 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基羰基 $C_1$ - $C_3$ 烷基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基) $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、芳基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、芳基 $C_1$ - $C_3$ 烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、羧基、羧基 $C_1$ - $C_3$ 烷基、氰基、 $C_3$ - $C_6$ 环烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、 $C_3$ - $C_6$ 环烷基 $C_1$ - $C_3$ 烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、卤素、卤代 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、卤代 $C_1$ - $C_3$ 烷基、杂芳基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、杂芳基 $C_1$ - $C_3$ 烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、羟基、 $-NR^{p9}$ 、 $(NR^{p9})C_1$ - $C_3$ 烷基、四唑基、四唑基 $C_1$ - $C_3$ 烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基及卤素的基团取代;或

$R^{10}$ 为 $-(CH_2)_nQ'$ ,其中 $n$ 为1-3且 $Q'$ 为含有一个、两个、三个或四个氮原子的5,6稠合饱和或不饱和环系,其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代: $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基羰基、 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基羰基 $C_1$ - $C_3$ 烷基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基) $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、芳基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、芳基 $C_1$ - $C_3$ 烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、羧基、羧基 $C_1$ - $C_3$ 烷基、氰基、 $C_3$ - $C_6$ 环烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、 $C_3$ - $C_6$ 环烷基 $C_1$ - $C_3$ 烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、卤素、卤代 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、卤代 $C_1$ - $C_3$ 烷基、杂芳基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、杂芳基 $C_1$ - $C_3$ 烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、羟基、 $-NR^{p9}$ 、 $(NR^{p9})C_1$ - $C_3$ 烷基、四唑基、四唑基 $C_1$ - $C_3$ 烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基及卤素的基团取代;其条件为 $Q'$ 不为氮杂吡啶基或吡啶基;或

$R^{10}$ 为 $-(CH_2)_nZ'$ ,其中 $n$ 为1-3且 $Z'$ 为含有一个、两个、三个或四个氮原子的6,6稠合饱和或不饱和环系,其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代: $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基羰基、 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基羰基 $C_1$ - $C_3$ 烷基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基) $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、芳基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、芳基 $C_1$ - $C_3$ 烷基 $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、羧基、羧基 $C_1$ - $C_3$ 烷基、氰

基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、卤素、卤代C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、卤代C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、杂芳基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、杂芳基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羟基、-NR<sup>p</sup>R<sup>q</sup>、(NR<sup>p</sup>R<sup>q</sup>)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、四唑基、四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及卤素的基团取代;

R<sup>p</sup>及R<sup>q</sup>独立选自氢及C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;

R<sup>13</sup>选自天然氨基酸侧链、非天然氨基酸侧链及-(C(R<sup>17a</sup>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-X-R<sup>30</sup>、-C(R<sup>17a</sup>)<sub>2</sub>C(O)N(R<sup>16a</sup>)C(R<sup>17a</sup>)<sub>2</sub>-X'-R<sup>31</sup>、-C(R<sup>17a</sup>)<sub>2</sub>[C(O)N(R<sup>16a</sup>)C(R<sup>17a</sup>)<sub>2</sub>]<sub>w</sub>-X-R<sup>31</sup>、-(C(R<sup>17a</sup>)(R<sup>17</sup>)C(O)NR<sup>16a</sup>)<sub>n</sub>'-H及-(C(R<sup>17a</sup>)(R<sup>17</sup>)C(O)NR<sup>16a</sup>)<sub>m</sub>'-C(R<sup>17a</sup>)(R<sup>17</sup>)-CO<sub>2</sub>H;

w' 为2或3;

n' 为1-6;

m' 为0-5;

X为具有1至172个原子的链,其中所述原子选自碳及氧且其中该链可含有一个、两个、三个或四个选自-NHC(O)NH-及-C(O)NH-的基团嵌入其中;且其中该链任选经一至六个独立选自-CO<sub>2</sub>H、-C(O)NH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>及-(CH<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H的基团取代;

X' 为具有1至172个原子的链,其中所述原子选自碳及氧且其中该链可含有一个、两个、三个或四个选自-NHC(O)NH-及-C(O)NH-的基团嵌入其中;且其中该链任选经一至六个独立选自-CO<sub>2</sub>H、-C(O)NH<sub>2</sub>及-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H的基团取代,其条件为X' 不为未经取代的PEG;

R<sup>30</sup>选自-CO<sub>2</sub>H、-C(O)NR<sup>w</sup>R<sup>x</sup>及-CH<sub>3</sub>,其中R<sup>w</sup>及R<sup>x</sup>独立选自氢及C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基,其条件为当X全部为碳时,R<sup>30</sup>不为-CH<sub>3</sub>;

R<sup>31</sup>为-CO<sub>2</sub>H、-C(O)NR<sup>w</sup>R<sup>x</sup>、-CH<sub>3</sub>、alexa-5-SDP及生物素;

各R<sup>17a</sup>独立选自氢、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、-CH<sub>2</sub>OH、-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H、-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H;

各R<sup>17</sup>独立选自氢、-CH<sub>3</sub>、(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>N<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>NH<sub>2</sub>、-X-R<sup>31</sup>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>CO<sub>2</sub>H、-CH<sub>2</sub>OH、CH<sub>2</sub>C≡CH及-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-三唑基-X-R<sup>35</sup>,其中z为1-6且R<sup>35</sup>选自-CO<sub>2</sub>H、-C(O)NR<sup>w</sup>R<sup>x</sup>、CH<sub>3</sub>、生物素、-2-氟吡啶、-C

(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)O-维生素E、-C(O)O-维生素E及 其条件为至少

一个R<sup>17</sup>不为氢、-CH<sub>3</sub>或-CH<sub>2</sub>OH;

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>11</sup>及R<sup>12</sup>独立选自天然氨基酸侧链及非天然氨基酸侧链或如下所述与相应邻位R基团一起形成环;

R<sup>e</sup>及R<sup>k</sup>可各与相应邻位R基团及与它们连接的原子一起形成选自氮杂环丁烷、吡咯烷、吗啉、哌啶、哌嗪及四氢噻唑的环;其中各环任选经一至四个独立选自氨基、氰基、甲基、卤素及羟基的基团取代;

R<sup>b</sup>为甲基或R<sup>b</sup>和R<sup>2</sup>及与它们连接的原子一起形成选自氮杂环丁烷、吡咯烷、吗啉、哌啶、哌嗪及四氢噻唑的环;其中各环任选经一至四个独立选自氨基、氰基、甲基、卤素及羟基的基团取代;

R<sup>d</sup>为氢或甲基或R<sup>d</sup>和R<sup>4</sup>及与它们连接的原子一起可形成选自氮杂环丁烷、吡咯烷、吗啉、哌啶、哌嗪及四氢噻唑的环;其中各环任选经一至四个独立选自氨基、氰基、甲基、卤素、羟基及苯基的基团取代;

$R^8$ 为氢或甲基或 $R^8$ 和 $R^7$ 及与它们连接的原子一起可形成选自氮杂环丁烷、吡咯烷、吗啉、哌啶、哌嗪及四氢噻唑的环；其中各环任选经一至四个独立选自以下的基团取代：氨基、任选经卤素取代的苄基、苄基氧基、氰基、环己基、甲基、卤素、羟基、任选经甲氧基取代的异噻啉基氧基、任选经卤素取代的噻啉基氧基及四唑基；且其中该吡咯烷及该哌啶环任选与环己基、苯基或吡啶基稠合；及

$R^1$ 为甲基或 $R^1$ 和 $R^{12}$ 及与它们连接的原子一起形成选自氮杂环丁烷及吡咯烷的环，其中各环任选经一至四个独立选自氨基、氰基、甲基、卤素及羟基的基团取代。

2. 权利要求1的化合物或其药用盐，其中 $R^{13}$ 为天然氨基酸侧链或非天然氨基酸侧链。

3. 权利要求2的化合物或其药用盐，其中

$R^{10}$ 为吡啶基 $C_1$ - $C_3$ 烷基，其中该吡啶基部分任选经一个选自以下的基团取代： $(C_1$ - $C_6$ 烷基) $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、氰基及四唑基 $C_1$ - $C_3$ 烷基，或经两个选自以下的基团取代： $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基) $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、羧基、羧基 $C_1$ - $C_3$ 烷基、卤素、羟基、四唑基、四唑基 $C_1$ - $C_3$ 烷基及苯基，其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基及卤素的基团取代；或

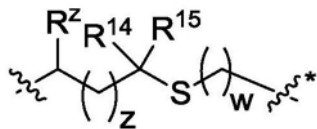
$R^{10}$ 为氮杂吡啶基 $C_1$ - $C_3$ 烷基，其中该氮杂吡啶基 $C_1$ - $C_3$ 烷基的氮杂吡啶基部分经羧基 $C_1$ - $C_3$ 烷基及任选的一个或两个选自以下的其它基团取代：

$C_1$ - $C_6$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_6$ 烷基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基) $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、羧基、氰基、卤素、羟基、四唑基、四唑基 $C_1$ - $C_3$ 烷基及苯基，其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基及卤素的基团取代；或

$R^{10}$ 为 $-(CH_2)_nQ'$ ，其中 $n$ 为1-3且 $Q'$ 为含有两个、三个或四个氮原子的5,6稠合饱和或不饱和环系，其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代： $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_6$ 烷基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基) $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、羧基、羧基 $C_1$ - $C_3$ 烷基、氰基、卤素、羟基、氧代、四唑基、四唑基 $C_1$ - $C_3$ 烷基及苯基，其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基及卤素的基团取代；其条件为 $Q'$ 不为氮杂吡啶基或吡啶基；或

$R^{10}$ 为 $-(CH_2)_nZ'$ ，其中 $n$ 为1-3且 $Z'$ 为含有一个、两个、三个或四个氮原子的6,6稠合饱和或不饱和环系，其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代： $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_6$ 烷基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基) $S(O)_2NHC(O)C_1$ - $C_3$ 烷基、羧基、羧基 $C_1$ - $C_3$ 烷基、氰基、卤素、羟基、四唑基、四唑基 $C_1$ - $C_3$ 烷基及苯基，其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基及卤素的基团取代。

4. 权利要求3的化合物或其药用盐，其中A为



5. 权利要求4的化合物或其药用盐，其中

$w$ 为1；

$z$ 为0；及

$R^Z$ 为 $-C(O)NHR^{16}$ ；其中 $R^{16}$ 选自氢及 $-CHR^{17}C(O)NH_2$ ，其中 $R^{17}$ 为氢。

6. 权利要求5的化合物或其药用盐，其中

$R^d$ 和 $R^4$ 及与它们连接的原子一起形成吡咯烷环；

$R^8$ 和 $R^7$ 及与它们连接的原子一起形成吡咯烷环,其中该环任选经一个羟基取代;及  
 $R^k$ 为甲基。

7. 权利要求6的化合物或其治疗上可接受的盐,其中

$R^a$ 、 $R^e$ 及 $R^j$ 为氢;

$R^b$ 及 $R^2$ 各为甲基或 $R^b$ 和 $R^2$ 及与它们连接的原子一起形成哌啶环;

$R^l$ 为甲基;

$R^n$ 为氢;

$R^1$ 为苯基甲基,其中该苯基任选经一个选自 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、卤素及羟基的基团取代;

$R^3$ 选自 $-CH_2C(O)NH_2$ 及 $-CH_2CO_2H$ ;

$R^5$ 选自 $-CH_2$ (咪唑基)、 $-CH_2NH_2$ 及 $-CH_2CH_2CO_2H$ ;

$R^6$ 选自 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 、 $-(CH_2)_4NH_2$ 及 $(CH_2)_2C(O)NH_2$ ;

$R^8$ 为 $-CH_2$ (吡啶基);

$R^9$ 选自 $-(CH_2)_2NH_2$ 及 $CH_2OH$ ;

$R^{10}$ 为 $-CH_2$ (吡啶基),其中该吡啶基部分任选经一个选自 $-CH_2C(O)NHS(O)_2CH_3$ 、氰基及 $-CH_2$ (四唑基)的基团取代或经两个选自 $-OCH_3$ 、 $-CO_2H$ 及 $-CH_2CO_2H$ 的基团取代;或

$R^{10}$ 为 $-CH_2$ (氮杂吡啶基),其中该氮杂吡啶基 $C_1$ - $C_3$ 烷基的氮杂吡啶基部分经 $-CH_2CO_2H$ 取代;或

$R^{10}$ 为 $-(CH_2)_nQ'$ ,其中 $n$ 为1且 $Q'$ 为含有两个或三个氮原子的5,6稠合饱和或不饱和环系,其中该环系任选经一个或两个选自 $-CH_3$ 、 $-CH_2CO_2H$ 及氧代的基团取代;其条件为 $Q'$ 不为氮杂吡啶基或吡啶基;或

$R^{10}$ 为 $-(CH_2)_nZ'$ ,其中 $n$ 为1且 $Z'$ 为含有一个氮原子的6,6稠合饱和或不饱和环系;

$R^{11}$ 及 $R^{12}$ 为 $-(CH_2)_3CH_3$ ;及

$R^{13}$ 选自甲基、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 及 $-(CH_2)_3NHC(NH)NH_2$ 。

8. 一种化合物或其药用盐,所述化合物选自:

实施例0001、实施例1254、实施例1271、实施例1284、实施例1286、实施例1287、实施例1288、实施例1001、实施例1002、实施例1003、实施例1004、实施例1005、实施例1006、实施例1007、实施例1009、实施例1010、实施例1011、实施例1012、实施例1013、实施例1014、实施例1015、实施例1016、实施例1017、实施例1018、实施例1019、实施例1020、实施例10001、实施例10002、实施例10003、实施例10500、实施例10501、实施例10502、实施例10503、实施例10504、实施例10505和实施例10506。

9. 在有此需要的受试者中增强、刺激和/或提高免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给药治疗有效量的权利要求1的化合物或其治疗上可接受的盐。

10. 在有此需要的受试者中抑制癌症细胞生长、增殖或转移的方法,所述方法包括向所述受试者给药治疗有效量的权利要求1的化合物或其治疗上可接受的盐。

11. 权利要求10的方法,其中所述癌症选自黑色素瘤、肾细胞癌、鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)、非鳞状NSCLC、结肠直肠癌、去势抗性前列腺癌、卵巢癌、胃癌、肝细胞癌、胰腺癌、头颈鳞状细胞癌、食道癌、胃肠道癌及乳腺癌及血液学恶性疾病。

12. 在有此需要的受试者中治疗感染性疾病的方法,所述方法包括向所述受试者给药治疗有效量的权利要求1的化合物或其治疗上可接受的盐。

13. 权利要求12的方法,其中所述感染性疾病由病毒引起。

14. 在有此需要的受试者中治疗败血症性休克的方法,所述方法包括向所述受试者给药治疗有效量的权利要求1的化合物或其治疗上可接受的盐。

15. 在受试者中对PD-L1与PD-1和/或CD80的相互作用进行阻断的方法,所述方法包括向所述受试者给药治疗有效量的权利要求1的化合物或其治疗上可接受的盐。

## PD-1/PD-L1及CD80/PD-L1蛋白质/蛋白质相互作用的大环抑制剂

[0001] 对相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2017年3月31日提交的美国非临时专利申请15/475,227的权益,而美国非临时专利申请15/475,227要求2016年4月5日提交的美国临时专利申请62/318,417的权益,将其全文以引用的方式并入本申请中。

[0003] 本申请提供新颖的大环肽,其抑制PD-1/PD-L1及CD80/PD-L1蛋白质/蛋白质相互作用且因此可用于改善多种疾病,包括癌症及感染性疾病。

[0004] 蛋白质程序化死亡1 (PD-1) 为CD28受体家族中的抑制性成员,而CD28受体家族亦包括CD28、CTLA-4、ICOS及BTLA。PD-1表达在活化的B细胞、T细胞及骨髓细胞上 (Agata等人,同上;Okazaki等人,Curr.Opin.Immunol.,14:779-782 (2002);Bennett等人,J.Immunol.,170:711-718 (2003))。

[0005] PD-1蛋白为55kDa I型跨膜蛋白,其为Ig基因超家族的一部分 (Agata等人,Int.Immunol.,8:765-772 (1996))。PD-1含有膜近端免疫受体酪氨酸抑制性基序 (ITIM) 及膜远端基于酪氨酸的转换基序 (ITSM) (Thomas,M.L.,J.Exp.Med.,181:1953-1956 (1995);Vivier,E.等人,Immunol.Today,18:286-291 (1997))。PD-1虽然在结构上类似于CTLA-4,但是缺少就CD80CD86 (B7-2) 结合而言关键的MYPPY基序。已鉴别出PD-1的两种配体即PD-L1 (B7-H1) 及PD-L2 (b7-DC)。已证实表达PD-1的T细胞的活化在与表达PD-L1或PD-L2的细胞相互作用时下调 (Freeman等人,J.Exp.Med.,192:1027-1034 (2000);Latchman等人,Nat.Immunol.,2:261-268 (2001);Carter等人,Eur.J.Immunol.,32:634-643 (2002))。PD-L1和PD-L2都为结合至PD-1但不结合至其它CD28家族成员的B7蛋白质家族成员。PD-L1配体在多种人类癌症中是富含的 (Dong等人,Nat.Med.,8:787-789 (2002))。PD-1与PD-L1之间的相互作用使肿瘤浸润淋巴细胞、由T细胞受体介导的增殖及癌细胞的免疫逃脱得以减少 (Dong等人,J.Mol.Med.,81:281-287 (2003);Blank等人,Cancer Immunol.Immunother.,54:307-314 (2005);Konishi等人,Clin.Cancer Res.,10:5094-5100 (2004))。免疫抑制可通过抑制PD-1与PD-L1的局部相互作用来逆转且所述作用当PD-1与PD-L2的相互作用亦被阻断时为相加性的 (Iwai等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,99:12293-12297 (2002);Brown等人,J.Immunol.,170:1257-1266 (2003))。

[0006] 亦已证实PD-L1与CD80相互作用 (Butte MJ等人,Immunity;27:111-122 (2007))。已证实表达免疫细胞上的PD-L1/CD80相互作用为抑制性相互作用。已证实阻断该相互作用可消除该抑制性相互作用 (Paterson AM等人,J Immunol.,187:1097-1105 (2011);Yang J等人,J Immunol.Aug 1;187 (3):1113-9 (2011))。

[0007] 当表达PD-1的T细胞接触表达其配体的细胞时,响应于抗原性刺激的功能活性 (包括增殖、细胞因子分泌及细胞毒性) 是降低的。PD-1/PD-L1或PD-L2相互作用在感染或肿瘤消退期间或在自身耐受性发展期间使免疫应答下调 (Keir,M.E.等人,Annu.Rev.Immunol.,26:Epub (2008))。长期抗原刺激例如在肿瘤疾病或长期感染期间发生的长期抗原刺激使T细胞表达提高水平的PD-1且就针对长期抗原的活性而言是功能异常的 (综述在Kim等人,

Curr.Opin.Imm. (2010) 中)。这称为“T细胞耗竭”。B细胞亦呈现PD-1/PD配体抑制及“耗竭”。

[0008] 已证实使用针对PD-L1的抗体阻断PD-1/PD-L1连接可修复及增强多个系统中的T细胞活化。晚期癌症患者受益于用针对PD-L1的单克隆抗体实施的疗法 (Brahmer等人, New Engl. J. Med. (2012))。肿瘤及长期感染的临床前动物模型已证实通过单克隆抗体阻断PD-1/PD-L1途径可增强免疫应答且使肿瘤得以抗拒或使感染得以控制。利用PD-1/PD-L1阻断的抗肿瘤免疫疗法可增强对组织学上不同的多种肿瘤的治疗性免疫应答 (Dong, H. 等人, “B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity”, J. Mol. Med., 81 (5) : 281-287 (2003) ; Dong, H. 等人, “Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion”, Nat. Med., 8 (8) : 793-800 (2002))。

[0009] 干扰PD-1/PD-L1相互作用可在具有长期感染的系统中增强T细胞活性。阻断PD-L1可在具有慢性淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒感染的小鼠中改善病毒清除率及修复免疫性 (Barber, D.L. 等人, “Restoring function in exhausted CD8T cells during chronic viral infection”, Nature, 439 (7077) : 682-687 (2006))。感染有HIV-1的人源化小鼠显示出针对病毒血症的保护作用增强及CD4+T细胞的病毒排除 (Palmer等人, J. Immunol. (2013))。经由针对PD-L1的单克隆抗体阻断PD-1/PD-L1可修复来自以下患者的T细胞的体外抗原特异性功能: HIV患者 (Day, Nature (2006) ; Petrovas, J. Exp. Med. (2006) ; Trautman, Nature Med. (2006) ; D’ Souza, J. Immunol. (2007) ; Zhang, Blood (2007) ; Kaufmann, Nature Imm. (2007) ; Kasu, J. Immunol. (2010) ; Porichis, Blood (2011))、HCV患者 (Golden-Mason, J. Virol. (2007) ; Jeung, J. Leuk. Biol. (2007) ; Urbani, J. Hepatol. (2008) ; Nakamoto, PLoS Path. (2009) ; Nakamoto, Gastroenterology (2008)) 及HBV患者 (Boni, J. Virol. (2007) ; Fiscaro, Gastro. (2010) ; Fiscaro等人, Gastroenterology (2012) ; Boni等人, Gastro. (2012) ; Penna等人, J. Hep. (2012) ; Raziorrough, Hepatology (2009) ; Liang, World J. Gastro. (2010) ; Zhang, Gastro. (2008))。

[0010] 亦已证实阻断PD-L1/CD80相互作用可刺激免疫性 (Yang J. 等人, J Immunol. Aug 1; 187 (3) : 1113-9 (2011))。已证实由于阻断PD-L1/CD80相互作用而引起的免疫刺激可经由与进一步阻断PD-1/PD-L1或PD-1/PD-L2相互作用组合来增强。

[0011] 免疫细胞表型的变化被假设为败血症性休克中的一个重要因素 (Hotchkiss等人, Nat. Rev. Immunol. (2013))。这些变化包括PD-1及PD-L1的水平提高 (Guignant等人, Crit. Care (2011))。来自其中PD-1及PD-L1水平提高的败血症性休克患者的细胞展现出T细胞凋亡的水平提高。针对PD-L1的抗体可降低免疫细胞凋亡的水平 (Zhang等人, Crit. Care (2011))。另外, 缺乏PD-1表达的小鼠对败血症性休克症状的耐受性比野生型小鼠高 (Yang J. 等人, J Immunol. Aug 1; 187 (3) : 1113-9 (2011))。研究已证实使用抗体阻断PD-L1相互作用可抑制不适当的免疫应答且改善疾病迹象。

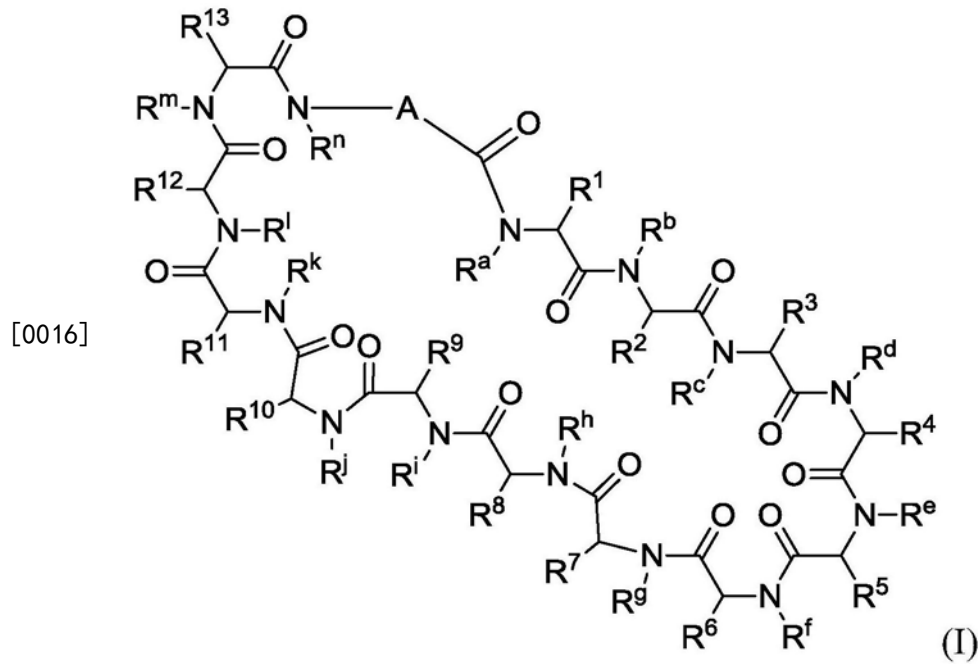
[0012] 除增强对长期抗原的免疫应答外, 亦已证实阻断PD-1/PD-L1途径可增强对疫苗接种的响应, 包括长期感染背景下的治疗性疫苗接种 (Ha, S. J. 等人, “Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection”, J. Exp. Med., 205 (3) : 543-555 (2008) ; Finnefrock, A.C. 等人, “PD-1 blockade in rhesus macaques: impact on chronic infection and prophylactic

vaccination”, J. Immunol., 182 (2) : 980-987 (2009); Song, M.-Y. 等人, “Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8+t-cell responses by soluble PD-1”, J. Immunother., 34 (3) : 297-306 (2011)。

[0013] 本申请所述分子在生物化学和基于细胞的实验系统中均显示出阻断PD-L1与PD-1相互作用的能力。这些结果与用于在癌症或长期感染中增强免疫性的治疗性给药潜力(包括治疗性疫苗)一致。

[0014] 本申请所述大环肽能够抑制PD-L1与PD-1及与CD80的相互作用。这些化合物已显示出高效结合至PD-L1, 阻断PD-L1与PD-1或CD80的相互作用且能够促进T细胞功能活性增强, 从而使其成为候选物用于胃肠外、经口、经肺、经鼻、口腔及持续释放制剂。

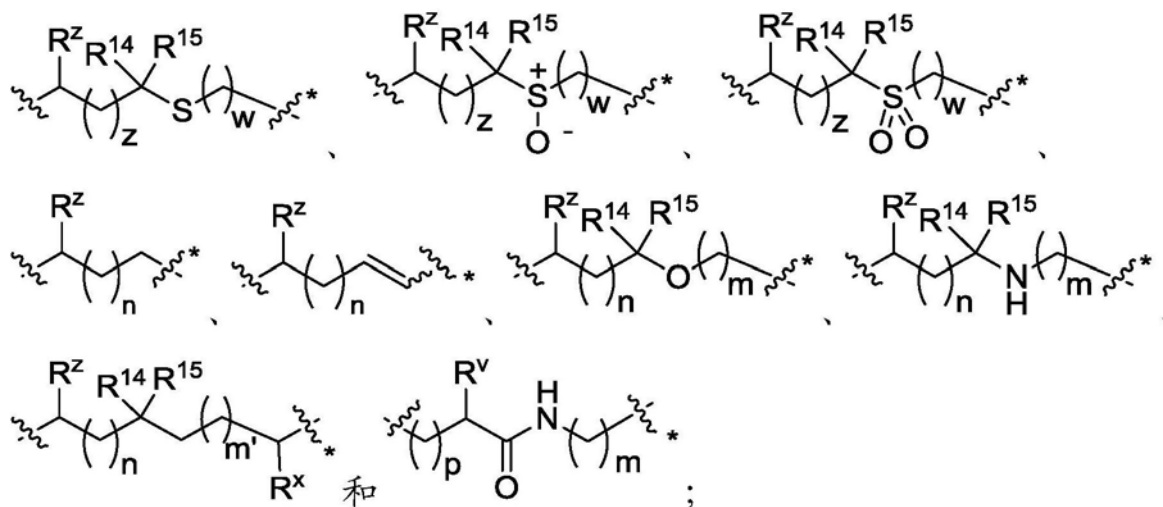
[0015] 在第一个方面, 本申请提供式 (I) 化合物或其药用盐:



[0017] 其中

[0018] A选自键、

[0019]



[0020] 其中

- [0021] \* 表示与羰基的连接点且  表示与氮原子的连接点；
- [0022] z为0、1或2；
- [0023] w为1或2；
- [0024] n为0或1；
- [0025] m为1或2；
- [0026] m' 为0或1；
- [0027] p为0、1或2；
- [0028] R<sup>x</sup>选自氢、氨基、羟基及甲基；
- [0029] R<sup>14</sup>及R<sup>15</sup>独立选自氢及甲基；及
- [0030] R<sup>2</sup>选自氢及-C(O)NHR<sup>16</sup>；其中R<sup>16</sup>选自氢、-CHR<sup>17</sup>C(O)NH<sub>2</sub>、-CHR<sup>17</sup>C(O)NHCHR<sup>18</sup>C(O)NH<sub>2</sub>及-CHR<sup>17</sup>C(O)NHCHR<sup>18</sup>C(O)NHCH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>；其中R<sup>17</sup>选自氢及-CH<sub>2</sub>OH且其中R<sup>18</sup>选自氢及甲基；
- [0031] R<sup>v</sup>为氢或天然氨基酸侧链；
- [0032] \* 表示与羰基的连接点且  表示与氮原子的连接点；
- [0033] R<sup>c</sup>、R<sup>f</sup>、R<sup>h</sup>、R<sup>i</sup>、R<sup>m</sup>及R<sup>n</sup>为氢；
- [0034] R<sup>a</sup>、R<sup>e</sup>、R<sup>j</sup>及R<sup>k</sup>各自独立选自氢及甲基；
- [0035] R<sup>10</sup>为吡啶基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基，其中该吡啶基部分任选经一个选自以下的基团取代：C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基羰基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基羰基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、芳基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、芳基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、氰基、卤代C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、卤代C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、杂芳基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、杂芳基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、-NR<sup>PR<sup>q</sup></sup>、(NR<sup>PR<sup>q</sup></sup>)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基，或经两个选自以下的基团取代：C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基羰基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基羰基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、芳基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、芳基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羧基、羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、氰基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、卤素、卤代C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、卤代C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、杂芳基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、杂芳基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羟基、-NR<sup>PR<sup>q</sup></sup>、(NR<sup>PR<sup>q</sup></sup>)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、四唑基、四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及苯基，其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及卤素的基团取代；或
- [0036] R<sup>10</sup>为氮杂吡啶基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基，其中该氮杂吡啶基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基的氮杂吡啶基部分经一个或两个独立选自以下的其它基团取代：C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基羰基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基羰基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、芳基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、芳基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羧基、羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、氰基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、卤素、卤代C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、卤代C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、杂芳基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、杂芳基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羟基、-NR<sup>PR<sup>q</sup></sup>、(NR<sup>PR<sup>q</sup></sup>)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、四唑基、四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及苯基，其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及卤素的基团取代；或
- [0037] R<sup>10</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q'，其中n为1-3且Q'为含有一个、两个、三个或四个氮原子的5,6稠合饱和或不饱和环系，其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代：C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基羰基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基羰基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>

烷基、芳基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、芳基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羧基、羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、氰基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、卤素、卤代C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、卤代C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、杂芳基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、杂芳基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羟基、-NR<sup>p</sup>R<sup>q</sup>、(NR<sup>p</sup>R<sup>q</sup>)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、四唑基、四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及苯基，其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及卤素的基团取代；其条件为Q'不为氮杂吡啶基或吡啶基；或

[0038] R<sup>10</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Z'，其中n为1-3且Z'为含有一个、两个、三个或四个氮原子的6,6稠合饱和或不饱和环系，其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代：C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基羰基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基羰基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、芳基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、芳基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羧基、羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、氰基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、卤素、卤代C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、卤代C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、杂芳基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、杂芳基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羟基、-NR<sup>p</sup>R<sup>q</sup>、(NR<sup>p</sup>R<sup>q</sup>)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、四唑基、四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及苯基，其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及卤素的基团取代；

[0039] R<sup>p</sup>及R<sup>q</sup>独立选自氢及C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基；

[0040] R<sup>13</sup>选自天然氨基酸侧链、非天然氨基酸侧链及-(C(R<sup>17a</sup>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-X-R<sup>30</sup>、-C(R<sup>17a</sup>)<sub>2</sub>C(O)N(R<sup>16a</sup>)C(R<sup>17a</sup>)<sub>2</sub>-X'-R<sup>31</sup>、-C(R<sup>17a</sup>)<sub>2</sub>[C(O)N(R<sup>16a</sup>)C(R<sup>17a</sup>)<sub>2</sub>]<sub>w</sub>'-X-R<sup>31</sup>、-(C(R<sup>17a</sup>)(R<sup>17</sup>)C(O)NR<sup>16a</sup>)<sub>n</sub>'-H及-(C(R<sup>17a</sup>)(R<sup>17</sup>)C(O)NR<sup>16a</sup>)<sub>m</sub>'-C(R<sup>17a</sup>)(R<sup>17</sup>)-CO<sub>2</sub>H；

[0041] w'为2或3；

[0042] n'为1-6；

[0043] m'为0-5；

[0044] X为具有1至172个原子的链，其中所述原子选自碳及氧且其中该链可含有一个、两个、三个或四个选自-NHC(O)NH-及-C(O)NH-的基团嵌入其中；且其中该链任选经一至六个独立选自-CO<sub>2</sub>H、-C(O)NH<sub>2</sub>、-CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>及-(CH<sub>2</sub>)CO<sub>2</sub>H的基团取代；

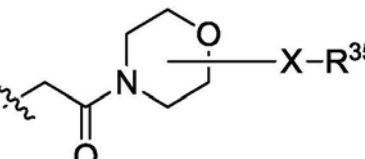
[0045] X'为具有1至172个原子的链，其中所述原子选自碳及氧且其中该链可含有一个、两个、三个或四个选自-NHC(O)NH-及-C(O)NH-的基团嵌入其中；且其中该链任选经一至六个独立选自-CO<sub>2</sub>H、-C(O)NH<sub>2</sub>及-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H的基团取代，其条件为X'不为未经取代的PEG；

[0046] R<sup>30</sup>选自-CO<sub>2</sub>H、-C(O)NR<sup>w</sup>R<sup>x</sup>及-CH<sub>3</sub>，其中R<sup>w</sup>及R<sup>x</sup>独立选自氢及C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基，其条件为当X全部为碳时，R<sup>30</sup>不为-CH<sub>3</sub>；

[0047] R<sup>31</sup>为-CO<sub>2</sub>H、-C(O)NR<sup>w</sup>R<sup>x</sup>、-CH<sub>3</sub>、alexa-5-SDP及生物素；

[0048] 各R<sup>17a</sup>独立选自氢、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、-CH<sub>2</sub>OH、-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H、-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H；

[0049] 各R<sup>17</sup>独立选自氢、-CH<sub>3</sub>、(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>N<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>NH<sub>2</sub>、-X-R<sup>31</sup>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>CO<sub>2</sub>H、-CH<sub>2</sub>OH、CH<sub>2</sub>C≡CH及-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-三唑基-X-R<sup>35</sup>，其中z为1-6且R<sup>35</sup>选自-CO<sub>2</sub>H、-C(O)NR<sup>w</sup>R<sup>x</sup>、CH<sub>3</sub>、生物素、-2-氟吡

啶、-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(O)O-维生素E、-C(O)O-维生素E及 其条件

为至少一个R<sup>17</sup>不为氢、-CH<sub>3</sub>或-CH<sub>2</sub>OH；

[0050]  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、 $R^9$ 、 $R^{11}$ 及 $R^{12}$ 独立选自天然氨基酸侧链及非天然氨基酸侧链或如下所述与相应邻位R基团一起形成环；

[0051]  $R^e$ 及 $R^k$ 可各与相应邻位R基团及与它们连接的原子一起形成选自氮杂环丁烷、吡咯烷、吗啉、哌啶、哌嗪及四氢噻唑的环；其中各环任选经一至四个独立选自氨基、氰基、甲基、卤素及羟基的基团取代；

[0052]  $R^b$ 为甲基或 $R^b$ 和 $R^2$ 及与它们连接的原子一起形成选自氮杂环丁烷、吡咯烷、吗啉、哌啶、哌嗪及四氢噻唑的环；其中各环任选经一至四个独立选自氨基、氰基、甲基、卤素及羟基的基团取代；

[0053]  $R^d$ 为氢或甲基或 $R^d$ 和 $R^4$ 及与它们连接的原子一起可形成选自氮杂环丁烷、吡咯烷、吗啉、哌啶、哌嗪及四氢噻唑的环；其中各环任选经一至四个独立选自氨基、氰基、甲基、卤素、羟基及苯基的基团取代；

[0054]  $R^g$ 为氢或甲基或 $R^g$ 和 $R^7$ 及与它们连接的原子一起可形成选自氮杂环丁烷、吡咯烷、吗啉、哌啶、哌嗪及四氢噻唑的环；其中各环任选经一至四个独立选自以下的基团取代：氨基、任选经卤素取代的苄基、苄基氧基、氰基、环己基、甲基、卤素、羟基、任选经甲氧基取代的异喹啉基氧基、任选经卤素取代的喹啉基氧基及四唑基；且其中该吡咯烷及该哌啶环任选与环己基、苯基或吡啶基稠合；及

[0055]  $R^l$ 为甲基或 $R^l$ 和 $R^{12}$ 及与它们连接的原子一起形成选自氮杂环丁烷及吡咯烷的环，其中各环任选经一至四个独立选自氨基、氰基、甲基、卤素及羟基的基团取代。

[0056] 在第一个实施方案中，本申请提供式(I)化合物或其药用盐，其中 $R^{13}$ 为天然氨基酸侧链或非天然氨基酸侧链。

[0057] 在第二个实施方案中，本申请提供式(I)化合物或其药用盐，其中

[0058]  $R^{13}$ 为天然氨基酸侧链或非天然氨基酸侧链；及

[0059]  $R^{10}$ 为吡啶基 $C_1$ - $C_3$ 烷基，其中该吡啶基部分任选经一个选自以下的基团取代： $(C_1$ - $C_6$ 烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O) $C_1$ - $C_3$ 烷基、 $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、氰基及四唑基 $C_1$ - $C_3$ 烷基，或经两个选自以下的基团取代： $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O) $C_1$ - $C_3$ 烷基、羧基、羧基 $C_1$ - $C_3$ 烷基、卤素、羟基、四唑基、四唑基 $C_1$ - $C_3$ 烷基及苯基，其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基及卤素的基团取代；或

[0060]  $R^{10}$ 为氮杂吡啶基 $C_1$ - $C_3$ 烷基，其中该氮杂吡啶基 $C_1$ - $C_3$ 烷基的氮杂吡啶基部分经羧基 $C_1$ - $C_3$ 烷基及任选的一个或两个选自以下的其它基团取代： $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_6$ 烷基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O) $C_1$ - $C_3$ 烷基、羧基、氰基、卤素、羟基、四唑基、四唑基 $C_1$ - $C_3$ 烷基及苯基，其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基及卤素的基团取代；或

[0061]  $R^{10}$ 为 $-(CH_2)_nQ'$ ，其中n为1-3且 $Q'$ 为含有两个、三个或四个氮原子的5,6稠合饱和或不饱和环系，其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代： $C_1$ - $C_6$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_6$ 烷基、 $(C_1$ - $C_6$ 烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O) $C_1$ - $C_3$ 烷基、羧基、羧基 $C_1$ - $C_3$ 烷基、氰基、卤素、羟基、氧代、四唑基、四唑基 $C_1$ - $C_3$ 烷基及苯基，其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1$ - $C_3$ 烷氧基、 $C_1$ - $C_3$ 烷基及卤素的基团取代；其条件为 $Q'$ 不为氮杂吡啶基或吡啶基；或

[0062]  $R^{10}$ 为 $-(CH_2)_nZ'$ ，其中n为1-3且 $Z'$ 为含有一个、两个、三个或四个氮原子的6,6稠合饱和或不饱和环系，其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代： $C_1$ - $C_6$ 烷氧

基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基) S(O)<sub>2</sub>NHC(O) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羧基、羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、氰基、卤素、羟基、四唑基、四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及卤素的基团取代。

[0063] 在第三个实施方案中,本申请提供式(I)化合物或其药用盐,其中

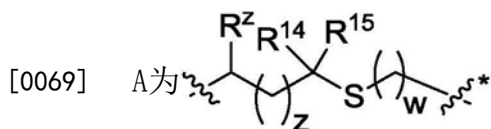
[0064] R<sup>13</sup>为天然氨基酸侧链或非天然氨基酸侧链;

[0065] R<sup>10</sup>为咪唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基,其中该咪唑基部分任选经一个选自以下的基团取代:(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基) S(O)<sub>2</sub>NHC(O) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、氰基及四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基,或经两个选自以下的基团取代:C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基) S(O)<sub>2</sub>NHC(O) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羧基、羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、卤素、羟基、四唑基、四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及卤素的基团取代;或

[0066] R<sup>10</sup>为氮杂咪唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基,其中该氮杂咪唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基的氮杂咪唑基部分经羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及任选的一个或两个选自以下的其它基团取代:C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基) S(O)<sub>2</sub>NHC(O) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羧基、氰基、卤素、羟基、四唑基、四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及卤素的基团取代;或

[0067] R<sup>10</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q',其中n为1-3且Q'为含有两个、三个或四个氮原子的5,6稠合饱和或不饱和环系,其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代:C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基) S(O)<sub>2</sub>NHC(O) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羧基、羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、氰基、卤素、羟基、氧代、四唑基、四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及卤素的基团取代;其条件为Q'不为氮杂咪唑基或咪唑基;或

[0068] R<sup>10</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Z',其中n为1-3且Z'为含有一个、两个、三个或四个氮原子的6,6稠合饱和或不饱和环系,其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代:C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基) S(O)<sub>2</sub>NHC(O) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羧基、羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、氰基、卤素、羟基、四唑基、四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及卤素的基团取代;及



[0070] 在第四个实施方案中,本申请提供式(I)化合物或其药用盐,其中

[0071] R<sup>13</sup>为天然氨基酸侧链或非天然氨基酸侧链;

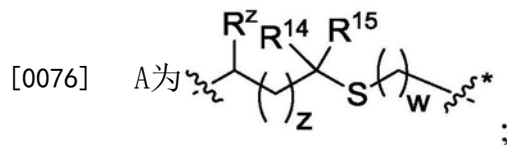
[0072] R<sup>10</sup>为咪唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基,其中该咪唑基部分任选经一个选自以下的基团取代:(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基) S(O)<sub>2</sub>NHC(O) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、氰基及四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基,或经两个选自以下的基团取代:C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基) S(O)<sub>2</sub>NHC(O) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羧基、羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、卤素、羟基、四唑基、四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及卤素的基团取代;或

[0073] R<sup>10</sup>为氮杂咪唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基,其中该氮杂咪唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基的氮杂咪唑基部分经羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及任选的一个或两个选自以下的其它基团取代:C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基) S(O)<sub>2</sub>NHC(O) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羧基、氰基、卤素、羟基、四唑基、四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及卤素的基团取

代;或

[0074]  $R^{10}$ 为 $-(CH_2)_nQ'$ ,其中 $n$ 为1-3且 $Q'$ 为含有两个、三个或四个氮原子的5,6稠合饱和或不饱和环系,其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代: $C_1-C_6$ 烷氧基、 $C_1-C_6$ 烷基、 $(C_1-C_6$ 烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O) $C_1-C_3$ 烷基、羧基、羧基 $C_1-C_3$ 烷基、氰基、卤素、羟基、氧代、四唑基、四唑基 $C_1-C_3$ 烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1-C_3$ 烷氧基、 $C_1-C_3$ 烷基及卤素的基团取代;其条件为 $Q'$ 不为氮杂吡啶基或吡啶基;或

[0075]  $R^{10}$ 为 $-(CH_2)_nZ'$ ,其中 $n$ 为1-3且 $Z'$ 为含有一个、两个、三个或四个氮原子的6,6稠合饱和或不饱和环系,其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代: $C_1-C_6$ 烷氧基、 $C_1-C_6$ 烷基、 $(C_1-C_6$ 烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O) $C_1-C_3$ 烷基、羧基、羧基 $C_1-C_3$ 烷基、氰基、卤素、羟基、四唑基、四唑基 $C_1-C_3$ 烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1-C_3$ 烷氧基、 $C_1-C_3$ 烷基及卤素的基团取代;



[0077]  $w$ 为1;

[0078]  $z$ 为0;及

[0079]  $R^z$ 为 $-C(O)NHR^{16}$ ;其中 $R^{16}$ 选自氢及 $-CHR^{17}C(O)NH_2$ ,其中 $R^{17}$ 为氢。

[0080] 在第五个实施方案中,本申请提供式(I)化合物或其药用盐,其中

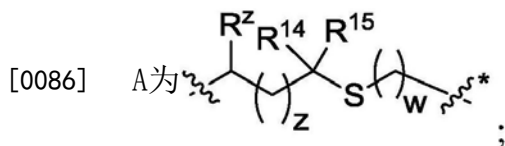
[0081]  $R^{13}$ 为天然氨基酸侧链或非天然氨基酸侧链;

[0082]  $R^{10}$ 为吡啶基 $C_1-C_3$ 烷基,其中该吡啶基部分任选经一个选自以下的基团取代: $(C_1-C_6$ 烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O) $C_1-C_3$ 烷基、 $C_1-C_6$ 烷氧基、氰基及四唑基 $C_1-C_3$ 烷基,或经两个选自以下的基团取代: $C_1-C_6$ 烷氧基、 $C_1-C_3$ 烷基、 $(C_1-C_6$ 烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O) $C_1-C_3$ 烷基、羧基、羧基 $C_1-C_3$ 烷基、卤素、羟基、四唑基、四唑基 $C_1-C_3$ 烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1-C_3$ 烷氧基、 $C_1-C_3$ 烷基及卤素的基团取代;或

[0083]  $R^{10}$ 为氮杂吡啶基 $C_1-C_3$ 烷基,其中该氮杂吡啶基 $C_1-C_3$ 烷基的氮杂吡啶基部分经羧基 $C_1-C_3$ 烷基及任选的一个或两个选自以下的其它基团取代: $C_1-C_6$ 烷氧基、 $C_1-C_6$ 烷基、 $(C_1-C_6$ 烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O) $C_1-C_3$ 烷基、羧基、氰基、卤素、羟基、四唑基、四唑基 $C_1-C_3$ 烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1-C_3$ 烷氧基、 $C_1-C_3$ 烷基及卤素的基团取代;或

[0084]  $R^{10}$ 为 $-(CH_2)_nQ'$ ,其中 $n$ 为1-3且 $Q'$ 为含有两个、三个或四个氮原子的5,6稠合饱和或不饱和环系,其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代: $C_1-C_6$ 烷氧基、 $C_1-C_6$ 烷基、 $(C_1-C_6$ 烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O) $C_1-C_3$ 烷基、羧基、羧基 $C_1-C_3$ 烷基、氰基、卤素、羟基、氧代、四唑基、四唑基 $C_1-C_3$ 烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1-C_3$ 烷氧基、 $C_1-C_3$ 烷基及卤素的基团取代;其条件为 $Q'$ 不为氮杂吡啶基或吡啶基;或

[0085]  $R^{10}$ 为 $-(CH_2)_nZ'$ ,其中 $n$ 为1-3且 $Z'$ 为含有一个、两个、三个或四个氮原子的6,6稠合饱和或不饱和环系,其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代: $C_1-C_6$ 烷氧基、 $C_1-C_6$ 烷基、 $(C_1-C_6$ 烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O) $C_1-C_3$ 烷基、羧基、羧基 $C_1-C_3$ 烷基、氰基、卤素、羟基、四唑基、四唑基 $C_1-C_3$ 烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $C_1-C_3$ 烷氧基、 $C_1-C_3$ 烷基及卤素的基团取代;



[0087] w为1;

[0088] z为0;

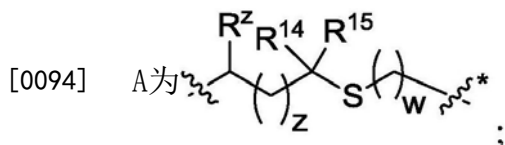
[0089] R<sup>z</sup>为-C(O)NHR<sup>16</sup>;其中R<sup>16</sup>选自氢及-CHR<sup>17</sup>C(O)NH<sub>2</sub>,其中R<sup>17</sup>为氢;

[0090] R<sup>d</sup>和R<sup>4</sup>及与它们连接的原子一起形成吡咯烷环;

[0091] R<sup>e</sup>和R<sup>7</sup>及与它们连接的原子一起形成吡咯烷环,其中该环任选经一个羟基取代;及

[0092] R<sup>k</sup>为甲基。

[0093] 在第六个实施方案中,本申请提供式(I)化合物或其药用盐,其中



[0095] w为1;

[0096] z为0;

[0097] R<sup>z</sup>为-C(O)NHR<sup>16</sup>;其中R<sup>16</sup>选自氢及-CHR<sup>17</sup>C(O)NH<sub>2</sub>,其中R<sup>17</sup>为氢;

[0098] R<sup>d</sup>和R<sup>4</sup>及与它们连接的原子一起形成吡咯烷环;

[0099] R<sup>e</sup>和R<sup>7</sup>及与它们连接的原子一起形成吡咯烷环,其中该环任选经一个羟基取代;及

[0100] R<sup>k</sup>为甲基;

[0101] R<sup>a</sup>、R<sup>e</sup>及R<sup>j</sup>为氢;

[0102] R<sup>b</sup>及R<sup>2</sup>各为甲基或R<sup>b</sup>和R<sup>2</sup>及与它们连接的原子一起形成哌啶环;

[0103] R<sup>l</sup>为甲基;

[0104] R<sup>n</sup>为氢;

[0105] R<sup>1</sup>为苯基甲基,其中该苯基任选经一个选自C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、卤素及羟基的基团取代;

[0106] R<sup>3</sup>选自-CH<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>及-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H;

[0107] R<sup>5</sup>选自-CH<sub>2</sub>(咪唑基)、-CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>及-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H;

[0108] R<sup>6</sup>选自-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>及(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)NH<sub>2</sub>;

[0109] R<sup>8</sup>为-CH<sub>2</sub>(吡啶基);

[0110] R<sup>9</sup>选自-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>及CH<sub>2</sub>OH;

[0111] R<sup>10</sup>为-CH<sub>2</sub>(吡啶基),其中该吡啶基部分任选经一个选自-CH<sub>2</sub>C(O)NHS(O)<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、氰基及-CH<sub>2</sub>(四唑基)的基团取代或经两个选自-OCH<sub>3</sub>、-CO<sub>2</sub>H及-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H的基团取代;或

[0112] R<sup>10</sup>为-CH<sub>2</sub>(氮杂吡啶基),其中该氮杂吡啶基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基的氮杂吡啶基部分经-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H取代;或

[0113] R<sup>10</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q',其中n为1且Q'为含有两个或三个氮原子的5,6稠合饱和或不饱和环系,其中该环系任选经一个或两个选自-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H及氧代的基团取代;其条件为Q'不为氮杂吡啶基或吡啶基;或

[0114] R<sup>10</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Z',其中n为1且Z'为含有一个氮原子的6,6稠合饱和或不饱和环系;

[0115] R<sup>11</sup>及R<sup>12</sup>为-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>;及

[0116]  $R^{13}$ 选自甲基、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 及 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$ 。

[0117] 在第二个方面,本申请提供在有此需要的受试者中增强、刺激和/或提高免疫应答的方法,该方法包括向该受试者给药治疗有效量的式(I)化合物或其治疗上可接受的盐。在第二个方面的第一个实施方案中,该方法进一步包括在给药式(I)化合物或其治疗上可接受的盐之前、之后或同时给药额外的药剂。在第二个方面的第二个实施方案中,该额外的药剂为抗微生物剂、抗病毒剂、细胞毒性剂和/或免疫应答调节剂。在第二个方面的第三个实施方案中,该额外的药剂为HDAC抑制剂。在第二个方面的第四个实施方案中,该额外的药剂为TLR7和/或TLR8激动剂。

[0118] 在第三个方面,本申请提供在有此需要的受试者中抑制癌细胞生长、增殖或转移的方法,该方法包括向该受试者给药治疗有效量的式(I)化合物或其治疗上可接受的盐。在第三个方面的第一个实施方案中,该癌症选自黑色素瘤、肾细胞癌、鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)、非鳞状NSCLC、结肠直肠癌、去势抗性前列腺癌、卵巢癌、胃癌、肝细胞癌、胰腺癌、头颈鳞状细胞癌、食道癌、胃肠道癌及乳腺癌及血液学恶性疾病。

[0119] 在第四个方面,本申请提供在有此需要的受试者中治疗感染性疾病的方法,该方法包括向该受试者给药治疗有效量的式(I)化合物或其治疗上可接受的盐。在第四个方面的第一个实施方案中,该感染性疾病由病毒引起。在第四个方面的第二个实施方案中,该病毒选自HIV、甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、疱疹病毒及流感。

[0120] 在第五个方面,本申请提供在有此需要的受试者中治疗败血症性休克的方法,该方法包括向该受试者给药治疗有效量的式(I)化合物或其治疗上可接受的盐。

[0121] 在第六个方面,本申请提供在受试者中阻断PD-L1与PD-1和/或CD80的相互作用的方法,该方法包括向该受试者给药治疗有效量的式(I)化合物或其治疗上可接受的盐。

[0122] 在其中R侧链为经甲基取代的环的一部分的式(I)化合物中,应理解该甲基可在环的任何可取代的碳原子(包括作为大环母体结构的一部分的碳)上。

[0123] 在式(I)化合物中,优选的 $R^1$ 侧链为苯丙氨酸、酪氨酸、3-噻吩-2-基、4-甲基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、3-甲氧基苯丙氨酸、异色氨酸、3-甲基苯丙氨酸、1-萘基丙氨酸、3,4-二氟苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、3,4-二甲氧基苯丙氨酸、3,4-二氯苯丙氨酸、4-二氟甲基苯丙氨酸、2-甲基苯丙氨酸、2-萘基丙氨酸、色氨酸、4-吡啶基、4-溴苯丙氨酸、3-吡啶基、4-三氟甲基苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、4-甲氧基苯丙氨酸、联苯丙氨酸及3-氯苯丙氨酸及2,4-二氨基丁烷。

[0124] 在其中 $R^2$ 不为环的一部分的式(I)化合物中,优选的 $R^2$ 侧链为丙氨酸、丝氨酸及甘氨酸。

[0125] 在式(I)化合物中,优选的 $R^3$ 侧链为天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、组氨酸、苏氨酸、亮氨酸、丙氨酸、2,3-二氨基丙烷及2,4-二氨基丁烷。

[0126] 在其中 $R^4$ 不为环的一部分的式(I)化合物中,优选的 $R^4$ 侧链为缬氨酸、丙氨酸、异亮氨酸及甘氨酸。

[0127] 在式(I)化合物中,优选的 $R^5$ 侧链为氨基甲烷、谷氨酸、组氨酸、天冬酰胺、2,3-二氨基丙烷、丝氨酸、甘氨酸、2,4-二氨基丁烷、苏氨酸、丙氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、丙氨酸及3-噻唑基丙氨酸。

[0128] 在式(I)化合物中,优选的 $R^6$ 侧链为亮氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰

胺、丝氨酸、赖氨酸、3-环己烷、苏氨酸、鸟氨酸、2,4-二氨基丁烷、丙氨酸、精氨酸及鸟氨酸(COCH<sub>3</sub>)。

[0129] 在其中R<sup>7</sup>不为环的一部分的式(I)化合物中,优选的R<sup>7</sup>侧链为甘氨酸、2,4-二氨基丁烷、丝氨酸、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、组氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸及2,4-二氨基丁烷(C(O)环丁烷)。

[0130] 在式(I)化合物中,优选的R<sup>8</sup>侧链为色氨酸及1,2-苯并异噻唑啉基丙氨酸。

[0131] 在式(I)化合物中,优选的R<sup>9</sup>侧链为丝氨酸、氨基乙烷、组氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、2,4-二丁基胺、苏氨酸、甘氨酸、谷氨酸、缬氨酸、2,3-二氨基丙烷、精氨酸、天冬氨酸及酪氨酸。

[0132] 在式(I)化合物中,应理解R<sup>10</sup>侧链可经由环中任何可取代的碳或氮原子连接。

[0133] 在式(I)化合物中,优选的R<sup>11</sup>侧链为正亮氨酸、亮氨酸、天冬酰胺、苯丙氨酸、甲硫氨酸、乙氧基甲烷、丙氨酸、色氨酸、异亮氨酸、苯基丙烷、谷氨酸、己烷及庚烷。

[0134] 在其中R<sup>12</sup>不为环的一部分的式(I)化合物中,优选的R<sup>12</sup>侧链为正亮氨酸、丙氨酸、乙氧基甲烷、甲硫氨酸、丝氨酸、苯丙氨酸、甲氧基乙烷、亮氨酸、色氨酸、异亮氨酸、谷氨酸、己烷、庚烷及甘氨酸。

[0135] 在式(I)化合物中,优选的R<sup>13</sup>侧链为精氨酸、鸟氨酸、丙氨酸、2,4-二氨基丁烷、2,3-二氨基丙烷、亮氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、赖氨酸、苏氨酸、环丙基甲烷、甘氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、组氨酸及2-氨基丁烷。

[0136] 本申请已发现特异性结合至PD-L1且能够抑制PD-L1与PD-1及CD80相互作用的肽。这些大环肽展现出体外免疫调节功效,从而使其成为用于治疗多种疾病(包括癌症及感染性疾病)的治疗性候选物。

[0137] 术语“特异性结合”是指蛋白质与结合分子(例如化合物或配体)之间的相互作用。所述相互作用取决于结合分子所识别的蛋白质的特定结构(即酶结合位点、抗原决定簇或表位)的存在。例如,若化合物特异性结合至蛋白质结合位点“A”,则化合物在含有包含结合位点A的蛋白质及特异性结合至蛋白质结合位点A的标记肽的反应混合物中的存在将使结合至蛋白质的标记肽的量降低。相反地,化合物非特异性结合至蛋白质不会使标记肽发生浓度依赖性置换而与蛋白质分开。

[0138] 本申请意欲包括存在于本申请化合物中的原子的所有同位素。同位素包括原子序数相同但质量数不同的那些原子。例如但不限于此,氢的同位素包括氘及氚。碳的同位素包括<sup>13</sup>C及<sup>14</sup>C。本申请经同位素标记的化合物通常可通过本领域技术人员已知的常规技术或通过本申请所述那些方法类似的方法使用经同位素标记的适当试剂代替在其它情况下使用的未经标记的试剂来制备。这些化合物可具有多种潜在用途例如在确定生物活性中作为标准品及试剂。在同位素是稳定的情况下,这些化合物可具有有利地修改生物学、药理学或药物代谢动力学性质的潜力。

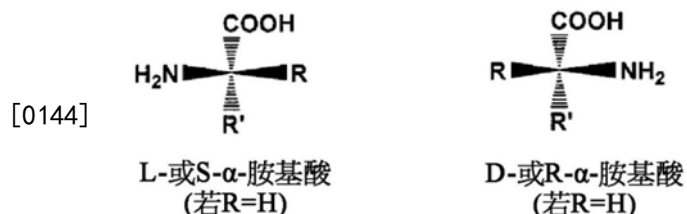
[0139] 本申请所述主题的另一个方面为所述肽作为经放射性标记的配体在开发配体结合测定或监测体内吸收、代谢、分布、受体结合或占领或化合物处置中的用途。例如,本申请所述大环肽可使用放射性同位素<sup>125</sup>I制备且所得经放射性标记的肽可用于开发结合测定或代谢研究。可选择地且出于相同目的,本申请所述大环肽可通过催化氙化使用本领域技术人员已知的方法而转化为经放射性标记的形式。

[0140] 本申请大环肽亦可通过使用本领域技术人员已知的方法添加放射性示踪剂而用作PET成像剂。

[0141] 优选的肽包括本申请提供的至少一种大环肽且这些肽可包含在药物组合物及组合中。

[0142] 除非在特定情况下另有限制,否则本申请提供但不限于此的定义适用于本说明书通篇使用的术语。

[0143] 氨基酸及肽化学领域技术人员知道氨基酸包括由以下通式结构表示的化合物:



[0145] 其中R及R' 如本申请所述。

[0146] 除非另有说明,否则本申请单独或作为另一个基团的一部分使用的术语“氨基酸”包括但不限于连接至同一个碳(称为“α”碳)的氨基及羧基,其中R和/或R' 可为天然或非天然侧链,包括氢。“α”碳的绝对“S”构型通常称为“L”或“天然”构型。在R和R' 取代基均为氢的情况下,氨基酸为甘氨酸且不具有手性。

[0147] 本申请使用的术语“天然的氨基酸侧链”及“天然存在的氨基酸侧链”是指任何天然存在的通常呈S构型的氨基酸(即L-氨基酸)(即丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸及缬氨酸)的侧链。

[0148] 本申请使用的术语“非天然的氨基酸侧链”及“非天然存在的氨基酸侧链”是指任何天然存在的通常呈R构型的氨基酸(即D-氨基酸)的侧链或是指除天然存在的呈R或S构型的氨基酸侧链(即分别为D-或L-氨基酸)外的基团,其选自:

[0149] C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub>烯基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基羰基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基硫基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、酰氨基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、氨基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、苯并噻唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、苯并噻吩基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、苄基氧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>环烷基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、二苯基甲基、呋喃基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、咪唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、萘基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、吡啶基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、噻唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、噻吩基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基;

[0150] 氮杂吡啶基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基,其中该氮杂吡啶基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基的氮杂吡啶基部分任选经一个或两个独立选自以下的取代基取代:C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羧基、羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、氰基、卤素、羟基、四唑基、四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及卤素的基团取代;

[0151] 联苯基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基,其中该联苯基任选经甲基取代;

[0152] -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>Q',其中n为1-3且Q' 为含有两个、三个或四个氮原子的5,6稠合饱和或不饱和和环系,其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代:C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)S(O)<sub>2</sub>NHC(O)C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、(C<sub>1</sub>-6烷基)磺酰氨基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、羧基、羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、氰基、卤素、羟基、四唑基、四唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及苯基,其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基及卤素的基团取代;其条件为Q' 不为氮杂吡啶基或

吡啶基；

[0153]  $-(\text{CH}_2)_n\text{Z}'$ ，其中 $n$ 为1-3且 $\text{Z}'$ 为含有一个、两个、三个或四个氮原子的6,6稠合饱和或不饱和环系，其中该环系任选经一个、两个或三个选自以下的基团取代： $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ 烷氧基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ 烷基、 $(\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ 烷基) $\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基、羧基、羧基 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基、氰基、卤素、羟基、四唑基、四唑基 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基及苯基，其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷氧基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基及卤素的基团取代；

[0154] 杂环基，其任选经一个、两个、三个、四个或五个独立选自以下的基团取代： $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ 烷氧基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ 烷基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基磺酰基氨基、酰氨基、氨基、氨基 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基、氨基磺酰基、羧基、氰基、卤素、卤代 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基、羟基、 $-\text{NC}(\text{NH}_2)_2$ 、硝基及 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ ；

[0155] 吡啶基 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基，其中该吡啶基部分任选经一个或两个选自以下的基团取代： $(\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ 烷基) $\text{S}(\text{O})_2\text{NHC}(\text{O})\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ 烷氧基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基、羧基、羧基 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基、氰基、卤素、羟基、四唑基、四唑基 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基及苯基，其中该苯基进一步任选经一个、两个或三个独立选自 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷氧基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基及卤素的基团取代；

[0156] 苯基，其任选经一个、两个、三个、四个或五个独立选自以下的基团取代： $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ 烷氧基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ 烷基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基磺酰基氨基、酰氨基、氨基、氨基 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基、氨基磺酰基、羧基、氰基、卤素、卤代 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基、羟基、 $-\text{NC}(\text{NH}_2)_2$ 、硝基及 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ ；

[0157]  $\text{NR}^a\text{R}^b$  ( $\text{C}_1$ - $\text{C}_7$ 烷基)，其中 $\text{R}^a$ 及 $\text{R}^b$ 独立选自氢、 $\text{C}_2$ - $\text{C}_4$ 烯基氧基羰基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基羰基、 $\text{C}_3$ - $\text{C}_6$ 环烷基羰基、呋喃基羰基及苯基羰基；当烷基连接基含有多于一个碳时，另一个 $\text{NR}^a\text{R}^b$ 基团可在链上；

[0158]  $\text{NR}^c\text{R}^d$ 羰基 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基，其中 $\text{R}^c$ 及 $\text{R}^d$ 独立选自氢、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基及三苯基甲基；

[0159] 苯基 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基，其中该苯基部分任选经一个、两个、三个、四个或五个独立选自以下的基团取代： $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ 烷氧基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ 烷基、 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基磺酰基氨基、酰氨基、氨基、氨基 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基、氨基磺酰基、羧基、氰基、卤素、卤代 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基、羟基、 $-\text{NC}(\text{NH}_2)_2$ 、硝基及 $-\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ ；及

[0160] 苯氧基 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基，其中该苯基任选经 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基取代。

[0161] 本申请使用的术语“ $\text{C}_2$ - $\text{C}_4$ 烯基”是指含有至少一个碳碳双键的具有两至四个碳原子的直链或支链基团。

[0162] 本申请使用的术语“ $\text{C}_2$ - $\text{C}_7$ 烯基”是指含有至少一个碳碳双键的具有两至七个碳原子的直链或支链基团。

[0163] 本申请使用的术语“ $\text{C}_2$ - $\text{C}_4$ 烯基氧基”是指经由氧原子连接至母体分子部分的 $\text{C}_2$ - $\text{C}_4$ 烯基。

[0164] 本申请使用的术语“ $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷氧基”是指经由氧原子连接至母体分子部分的 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基。

[0165] 本申请使用的术语“ $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ 烷氧基”是指经由氧原子连接至母体分子部分的 $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ 烷基。

[0166] 本申请使用的术语“ $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ 烷氧基”是指经由氧原子连接至母体分子部分的 $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ 烷基。

[0167] 本申请使用的术语“ $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷氧基 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基”是指经由 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷基连接至母体分子部分的 $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$ 烷氧基。

[0168] 本申请使用的术语“ $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$ 烷氧基羰基”是指经由羰基连接至母体分子部分的 $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$

烷氧基。

[0169] 本申请使用的术语“C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基羰基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经由C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基连接至母体分子部分的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基羰基。

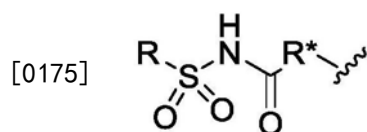
[0170] 本申请使用的术语“C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指衍生自含有一至三个碳原子的直链或支链饱和和烃的基团。

[0171] 本申请使用的术语“C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基”是指衍生自含有一至四个碳原子的直链或支链饱和和烃的基团。

[0172] 本申请使用的术语“C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基”是指衍生自含有一至六个碳原子的直链或支链饱和和烃的基团。

[0173] 本申请使用的术语“C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基羰基”是指经由羰基连接至母体分子部分的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基。

[0174] 本申请使用的术语“(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)S(O)<sub>2</sub>NH(C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基)”是指：



[0176] 其中R为C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基，R\*为C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基且 $\sim$ 表示与母体分子部分的连接点。

[0177] 本申请使用的术语“C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基硫基”是指经由硫原子连接至母体分子部分的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基。

[0178] 本申请使用的术语“C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基硫基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经由C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基连接至母体分子部分的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基硫基。

[0179] 本申请使用的术语“C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基磺酰基”是指经由磺酰基连接至母体分子部分的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基。

[0180] 本申请使用的术语“C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基磺酰基氨基”是指经由氨基连接至母体分子部分的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基磺酰基。

[0181] 本申请使用的术语“酰氨基”是指-C(O)NH<sub>2</sub>。

[0182] 本申请使用的术语“酰氨基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经由C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基连接至母体分子部分的酰氨基。

[0183] 本申请使用的术语“氨基”是指-NH<sub>2</sub>。

[0184] 本申请使用的术语“氨基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经由C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基连接至母体分子部分的氨基。

[0185] 本申请使用的术语“氨基磺酰基”是指经由磺酰基连接至母体分子部分的氨基。

[0186] 本申请使用的术语“芳基”是指苯基或双环稠合环系，其中所述环中的一个或两个为苯基。双环稠合环系由苯基与四至六元芳族或非芳族碳环稠合构成。本申请芳基可经由该基团中任何可取代的碳原子连接至母体分子部分。芳基的代表性实例包括但不限于茛萘基、茛萘基、萘基、苯基及四氢萘基。本申请芳基任选经一个、两个、三个、四个或五个独立选自以下的取代基取代：C<sub>1</sub>-<sub>3</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-<sub>3</sub>烷基、氰基、卤素、卤代C<sub>1</sub>-<sub>3</sub>烷氧基、卤代C<sub>1</sub>-<sub>3</sub>烷基及羟基。

[0187] 本申请使用的术语“芳基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经由C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基连接至母体分子部分的芳基。

- [0188] 本申请使用的术语“氮杂吡啶基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经由C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基连接至母体分子的氮杂吡啶基。氮杂吡啶基可经由该基团中任何可取代的原子连接至烷基部分。
- [0189] 本申请使用的术语“苯并噻唑基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经由C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基连接至母体分子的苯并噻唑基。苯并噻唑基可经由该基团中任何可取代的原子连接至烷基部分。
- [0190] 本申请使用的术语“苯并噻吩基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经由C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基连接至母体分子的苯并噻吩基。苯并噻吩基可经由该基团中任何可取代的原子连接至烷基部分。
- [0191] 本申请使用的术语“苄基氧基”是指经由氧原子连接至母体分子部分的苄基。
- [0192] 本申请使用的术语“苄基氧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经由C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基连接至母体分子部分的苄基氧基。
- [0193] 本申请使用的术语“联苯基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经由C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基连接至母体分子部分的联苯基团。联苯基团可经由该基团中任何可取代的原子连接至烷基部分。
- [0194] 本申请使用的术语“羰基”是指-C(=O)-。
- [0195] 本申请使用的术语“羧基”是指-CO<sub>2</sub>H。
- [0196] 本申请使用的术语“羧基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经由C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基连接至母体分子部分的羧基。
- [0197] 本申请使用的术语“氰基”是指-CN。
- [0198] 本申请使用的术语“C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>环烷基”是指具有三至十四个碳原子及零个杂原子的饱和单环状、双环状或三环状烃环体系。双环状及三环状环可为稠合、螺环或桥联的。环烷基的代表性实例包括但不限于环丙基、环戊基、双环[3.1.1]庚基及金刚烷基。
- [0199] 本申请使用的术语“C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>环烷基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经由C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基连接至母体分子部分的C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>环烷基。
- [0200] 本申请使用的术语“C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>环烷基羰基”是指经由羰基连接至母体分子部分的C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub>环烷基。
- [0201] 本申请使用的术语“C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基”是指具有三至六个碳原子及零个杂原子的饱和单环状烃环体系。
- [0202] 本申请使用的术语“C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经由C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基连接至母体分子部分的C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基。
- [0203] 本申请使用的术语“C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基羰基”是指经由羰基连接至母体分子部分的C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基。
- [0204] 本申请使用的术语“呋喃基C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经由C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基连接至母体分子部分的呋喃基。呋喃基可经由该基团中任何可取代的原子连接至烷基部分。
- [0205] 本申请使用的术语“呋喃基羰基”是指经由羰基连接至母体分子部分的呋喃基。
- [0206] 本申请使用的术语“卤代”及“卤素”是指F、Cl、Br或I。
- [0207] 本申请使用的术语“卤代C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基”是指经一、两或三个卤素原子取代的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷氧基。
- [0208] 本申请使用的术语“卤代C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基”是指经一、两或三个卤素原子取代的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基。
- [0209] 本申请使用的术语“卤代甲基”是指经一、两或三个卤素原子取代的甲基。
- [0210] 本申请使用的术语“杂芳基”是指其中至少一个原子选自N、O及S且其余原子为碳

的芳族五元或六元环。术语“杂芳基”亦包括其中杂芳基环与含有零个、一个或两个选自N、O及S的额外杂原子的四元至六元芳族或非芳族环稠合的双环体系。杂芳基经由该基团中任何可取代的碳或氮原子连接至母体分子部分。杂芳基的代表性实例包括但不限于苯并噁二唑基、苯并噁唑基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、呋喃基、咪唑基、吡唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、吡嗪基、吡啶基、吡咯基、喹啉基、噻唑基、噻吩并吡啶基、噻吩基、三唑基、噻二唑基及三嗪基。本申请杂芳基可任选经一个、两个、三个、四个或五个独立选自以下的取代基取代： $C_1$ - $3$ 烷氧基、 $C_1$ - $3$ 烷基、氰基、卤素、卤代 $C_1$ - $3$ 烷氧基、卤代 $C_1$ - $3$ 烷基及羟基。

[0211] 本申请使用的术语“杂芳基 $C_1$ - $3$ 烷基”是指经由 $C_1$ - $3$ 烷基连接至母体分子部分的杂芳基。

[0212] 本申请使用的术语“杂环基”是指含有一、两或三个独立选自氮、氧及硫的杂原子的五、六或七元环。五元环具有零至两个双键，而六及七元环具有零至三个双键。术语“杂环基”亦包括其中杂环基环稠合至四至六元芳族或非芳族碳环状环或另一个单环状杂环基的双环状基团。本申请杂环基经由该基团中的碳原子连接至母体分子部分。杂环基的实例包括但不限于苯并噻吩基、呋喃基、咪唑基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、吡嗪基、吡啶基、吡咯基、喹啉基、噻唑基、噻吩并吡啶基、噻吩基、三唑基、噻二唑基及三嗪基。本申请杂环基可任选经一个、两个、三个、四个或五个独立选自以下的取代基取代： $C_1$ - $3$ 烷氧基、 $C_1$ - $3$ 烷基、氰基、卤素、卤代 $C_1$ - $3$ 烷氧基、卤代 $C_1$ - $3$ 烷基及羟基。

[0213] 本申请使用的术语“羟基”是指-OH。

[0214] 本申请使用的术语“咪唑基 $C_1$ - $3$ 烷基”是指经由 $C_1$ - $3$ 烷基连接至母体分子部分的咪唑基。咪唑基可经由该基团中任何可取代的原子连接至烷基部分。

[0215] 本申请使用的术语“吡啶基 $C_1$ - $3$ 烷基”是指经由 $C_1$ - $3$ 烷基连接至母体分子部分的吡啶基。吡啶基可经由该基团中任何可取代的原子连接至烷基部分。

[0216] 本申请使用的术语“萘基 $C_1$ - $3$ 烷基”是指经由 $C_1$ - $3$ 烷基连接至母体分子部分的萘基。萘基可经由该基团中任何可取代的原子连接至烷基部分。

[0217] 本申请使用的术语“硝基”是指-NO<sub>2</sub>。

[0218] 本申请使用的术语“NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>”是指经由氮原子连接至母体分子部分的两个基团即R<sup>a</sup>及R<sup>b</sup>。R<sup>a</sup>及R<sup>b</sup>独立选自氢、 $C_2$ - $4$ 烯基氧基羰基、 $C_1$ - $3$ 烷基羰基、 $C_3$ - $6$ 环烷基羰基、呋喃基羰基及苯基羰基。

[0219] 本申请使用的术语“NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>( $C_1$ - $3$ )烷基”是指经由 $C_1$ - $3$ 烷基连接至母体分子部分的NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>基团。

[0220] 本申请使用的术语“NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>”是指经由氮原子连接至母体分子部分的两个基团即R<sup>c</sup>及R<sup>d</sup>。R<sup>c</sup>及R<sup>d</sup>独立选自氢、 $C_1$ - $3$ 烷基及三苯基甲基。

[0221] 本申请使用的术语“NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>羰基”是指经由羰基连接至母体分子部分的NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>基团。

[0222] 本申请使用的术语“NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>羰基 $C_1$ - $3$ 烷基”是指经由 $C_1$ - $3$ 烷基连接至母体分子部分的NR<sup>c</sup>R<sup>d</sup>羰基。

[0223] 本申请使用的术语“苯氧基”是指经由氧原子连接至母体分子部分的苯基。

[0224] 本申请使用的术语“苯氧基 $C_1$ - $3$ 烷基”是指经由 $C_1$ - $3$ 烷基连接至母体分子部分的苯氧基。

[0225] 本申请使用的术语“苯基 $C_1$ - $3$ 烷基”是指经由 $C_1$ - $3$ 烷基连接至母体分子部分的苯

基。

[0226] 本申请使用的术语“苯基羰基”是指经由羰基连接至母体分子部分的苯基。

[0227] 本申请使用的术语“吡啶基 $C_1-C_3$ 烷基”是指经由 $C_1-C_3$ 烷基连接至母体分子部分的吡啶基。吡啶基可经由该基团中任何可取代的原子连接至烷基部分。

[0228] 本申请使用的术语“硫基”是指-S-。

[0229] 本申请使用的术语“磺酰基”是指-SO<sub>2</sub>-。

[0230] 本申请使用的术语“四唑基 $C_1-C_3$ 烷基”是指经由 $C_1-C_3$ 烷基连接至母体分子部分的四唑基。四唑基可经由该基团中任何可取代的原子连接至烷基部分。

[0231] 本申请使用的术语“噻唑基 $C_1-C_3$ 烷基”是指经由 $C_1-C_3$ 烷基连接至母体分子部分的噻唑基。噻唑基可经由该基团中任何可取代的原子连接至烷基部分。

[0232] 本申请使用的术语“噻吩基 $C_1-C_3$ 烷基”是指经由 $C_1-C_3$ 烷基连接至母体分子部分的噻吩基。噻吩基可经由该基团中任何可取代的原子连接至烷基部分。

[0233] 术语“治疗”是指：(i) 防止可能易患疾病、病症和/或病状但尚未确诊患病的患者发生疾病、病症或病状；(ii) 抑制疾病、病症或病状即阻止其发展；及(iii) 缓解疾病、病症或病状即促使疾病、病症和/或病状和/或与疾病、病症和/或病状相关的症状消退。

[0234] 大环肽与PD-L1的结合可例如通过以下方法测量，所述方法为例如均相时间分辨荧光(HTRF)、表面等离子共振(SPR)、等温滴定量热法(ITC)、核磁共振谱(NMR)等。另外，大环肽与在细胞表面上表达的PD-L1的结合可如本申请所述在细胞结合测定中测量。

[0235] 给药本申请所述治疗剂包括但不限于给药治疗有效量的治疗剂。本申请使用的术语“治疗有效量”是指但不限于治疗剂用于对可通过给药本申请所述PD-1/PD-L1结合抑制剂的组合物来治疗的病状进行治疗或预防的量。该量为足以展现出可检测的治疗或预防或改善作用的量。该作用可包括例如但不限于治疗或预防本申请所列病状。针对受试者的准确有效量将取决于受试者的身材及健康状况、所治疗的病状的性质及程度、主治医师的建议及所选用于给药的治疗剂或治疗剂组合。因此，预先指定确切有效量不是有用的。

[0236] 在另一个方面，本申请涉及使用本申请大环肽在受试者中抑制肿瘤细胞生长的方法。如本申请所示，本申请大环肽能够结合至PD-L1，断开PD-L1与PD-1之间的相互作用，与已知阻断与PD-1相互作用的抗PD-1单克隆抗体竞争结合PD-L1，增强CMV特异性T细胞IFN $\gamma$ 分泌及增强HIV特异性T细胞IFN $\gamma$ 分泌。因此，本申请大环肽可用于调节免疫应答、治疗疾病例如癌症或感染性疾病、刺激保护性自身免疫应答或刺激抗原特异性免疫应答(例如通过将PD-L1阻断肽与所关注的抗原共同给药)。

[0237] 为了较容易地理解本申请，首先定义某些术语。其它定义参见详细描述。

[0238] 术语“程序化死亡配体1”、“程序化细胞死亡配体1”、“蛋白质PD-L1”、“PD-L1”、“PDL1”、“PDCDL1”、“hPD-L1”、“hPD-LI”、“CD274”及“B7-H1”可互换使用且包括人PD-L1的变体、同工型、物种同源物及与PD-L1具有至少一个共同表位的类似物。完整的PD-L1序列可参见GENBANK<sup>®</sup>登记号NP\_054862。

[0239] 术语“程序化死亡1”、“程序化细胞死亡1”、“蛋白质PD-1”、“PD-1”、“PD1”、“PDCD1”、“hPD-1”及“hPD-I”可互换使用且包括人PD-1的变体、同工型、物种同源物及与PD-1具有至少一个共同表位的类似物。完整的PD-1序列可参见GENBANK<sup>®</sup>登记号U64863。

[0240] 术语“细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4”、“CTLA-4”、“CTLA4”、“CTLA-4抗原”及“CD152”(参见例如Murata, Am. J. Pathol., 155:453-460 (1999))可互换使用且包括人CTLA-4的变异体、同工型、物种同源物及与CTLA-4具有至少一个共同表位的类似物(参见例如Balzano, Int. J. Cancer Suppl., 7:28-32 (1992))。完整的CTLA-4核酸序列可参见GENBANK®登记号L15006。

[0241] 术语“免疫应答”是指例如淋巴细胞、抗原呈递细胞、吞噬细胞、粒细胞及上述细胞或肝脏所产生的可溶性大分子(包括大环肽、细胞因子及补体)的作用,所述作用对侵入性病原体、感染有病原体的细胞或组织、癌细胞或自身免疫或病理性炎症情况下的正常人体细胞或组织产生选择性损伤、破坏或将其从人体中清除。

[0242] 本申请使用的“不良事件”(AE)为与使用医学处置相关的任何不利且通常不预期甚至不合需要的迹象(包括异常实验室发现)、症状或疾病。例如,不良事件可能与免疫系统应答于处置而活化或免疫系统细胞(例如T细胞)应答于处置而扩增相关。医学处置可具有一个或多个相关AE且各AE可具有相同或不同的严重程度。提及能够“改变不良事件”的方法意指处置方案降低与使用不同处置方案相关的一个或多个AE的发生率和/或严重程度。

[0243] 本申请使用的“过度增殖性疾病”是指其中细胞生长增加超过正常水准的病状。例如,过度增殖性疾病或病症包括恶性疾病(例如食道癌、结肠癌、胆管癌)及非恶性疾病(例如动脉粥样硬化、良性增生及良性前列腺肥大)。

[0244] 本申请使用的“约”或“基本上包含”意指如本领域技术人员所确定,特定值在可接受的误差范围内,其将部分地依赖于该值如何测量或确定即测量系统的局限性。例如,“约”或“基本上包含”可意指根据本领域实践在一个或超过一个标准差内。可选择地,“约”或“基本上包含”可意指至多20%的范围。另外,尤其就生物系统或方法而言,所述术语可意指值的至多一个数量级或至多5倍。当本申请及权利要求书提供特定值时,除非另有说明,否则“约”或“基本上包含”的含义应推定在该特定值的可接受的误差范围内。

[0245] 除非另有说明,否则本申请所述任何浓度范围、百分比范围、比例范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任何整数值及(适当时)其分数(例如整数的十分之一及百分之一)。

[0246] 竞争测定

[0247] 本申请亦涉及能够以至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%及至少约100%与参照品抗PD-L1抗体(MDX-1105)竞争结合的大环肽。这些大环肽可与本申请所述一种或多种大环肽共有结构同源性,包括突变体、保守性取代、功能性取代及缺失形式,条件为其特异性结合至PD-L1。例如,若大环肽实质上结合至PD-L1的与参照品抗PD-L1抗体相同的区域,则大环肽所结合的PD-L1表位应至少与抗PD-L1单克隆抗体所结合的PD-L1表位重叠。重叠区范围可为一个氨基酸残基至几百个氨基酸残基。大环肽然后应与抗PD-L1单克隆抗体竞争和/或阻断抗PD-L1单克隆抗体结合至PD-L1且由此减少抗PD-L1单克隆抗体结合至PD-L1,在竞争测定中优选使结合减少至少约50%。

[0248] 可作为参照品抗体用于竞争测定目的的抗PD-L1抗体在本领域中已知。例如,可使用以下代表性抗PD-L1抗体:MDX-1105 (BMS); L01X-C (Serono)、L1X3 (Serono)、MSB-0010718C (Serono)及PD-L1前驱抗体(CytomX)及在共同拥有的W02007/005874中公开的PD-

L1抗体。

[0249] 可作为参照品抗体用于竞争测定目的的抗PD-1抗体在本领域中已知。例如,可使用以下代表性抗PD-1抗体:尼沃单抗(BMS);17D8、2D3、4H1、4A11、7D3及5F4,其各自公开于共同拥有的美国专利8,008,449(BMS)中;MK-3475(Merck)(其公开于美国专利8,168,757中);及在美国专利7,488,802中公开的抗体。

[0250] 药物组合物

[0251] 在另一个方面,本申请提供组合物例如药物组合物,其含有与药用载体配制在一起的本申请大环肽之一或其组合。这些组合物可包含本申请大环肽之一或其组合(例如两种或更多种不同的本申请大环肽)或免疫缀合物或双特异性分子。例如,本申请药物组合物可包含结合至靶标抗原上的不同表位或具有互补活性的大环肽(或免疫缀合物或双特异性分子)的组合。

[0252] 本申请药物组合物亦可按组合疗法(即与其它药剂组合)给药。例如,组合疗法可包括大环肽与至少一种其它抗炎或免疫抑制剂的组合。可按组合疗法使用的治疗剂的实例更详细地描述在本申请大环肽的用途章节中。

[0253] 本申请使用的“药用载体”包括生理学上相容的任何及所有溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌剂及抗真菌剂、等张剂及吸收延迟剂等。优选地,载体适于静脉内、肌内、皮下、胃肠外、脊髓或表皮给药(例如通过注射或输注)。视给药途径而定,活性化合物(即大环肽、免疫缀合物或双特异性分子)可用保护化合物免受酸及可使化合物失活的其它自然条件的作用的材料包衣。

[0254] 本申请药物化合物可包括一种或多种药用盐。“药用盐”或“治疗上可接受的盐”是指保留母体化合物的所需生物活性且不产生任何非所需毒理学效应的盐(参见例如Berge, S.M.等人, J.Pharm.Sci., 66:1-19(1977))。这些盐的实例包括酸加成盐及碱加成盐。酸加成盐包括衍生自以下的那些酸加成盐:非毒性无机酸,例如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等;及非毒性有机酸,例如脂族单及二羧酸、经苯基取代的烷酸、羟基烷酸、芳族酸、脂族及芳族磺酸等。碱加成盐包括衍生自以下的那些碱加成盐:碱土金属,例如钠、钾、镁、钙等;及非毒性有机胺,例如N,N'-二苄基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等。

[0255] 本申请药物组合物亦可包含药用抗氧化剂。药用抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 $\alpha$ -生育酚等;及(3)金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0256] 可用于本申请药物组合物的适宜水性及非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇(例如丙三醇、丙二醇、聚乙二醇等)及其适宜混合物;植物油,例如橄榄油;及注射用有机酯,例如油酸乙酯。适当流动性可例如通过使用包衣材料(例如卵磷脂)、在分散液的情况下通过维持所需粒度及通过使用表面活性剂来维持。

[0257] 这些组合物亦可含有辅料例如防腐剂、湿润剂、乳化剂及分散剂。防止微生物存在可通过上述灭菌程序及通过包含各种抗细菌剂及抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等)来确保。组合物亦可需要包含等张剂例如糖、氯化钠等。另外,注射用药物

形式可通过包含延迟吸收剂(例如单硬脂酸铝及明胶)来实现延长吸收。

[0258] 药用载体包括无菌水溶液或分散液及可供临时制备无菌注射用溶液或分散液的无菌粉末。这些介质及试剂用于药物活性物质的用途在本领域中已知。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,否则涵盖其用于本申请药物组合物的用途。补充性活性化合物亦可并入组合物中。

[0259] 治疗性组合物典型地必须在制造及储存条件下无菌且稳定。组合物可配制成溶液、微乳液、脂质体或适于高药物浓度的其它有序结构。载体可为溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如丙三醇、丙二醇及液体聚乙二醇等)及其适宜混合物。适当流动性可例如通过使用包衣材料(例如卵磷脂)、在分散液的情况下通过维持所需粒度及通过使用表面活性剂来维持。在很多情况下,组合物将优选包含等张剂例如糖、多元醇(例如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化钠。注射用组合物可通过将延迟吸收剂(例如单硬脂酸盐及明胶)包含于组合物中来实现延长吸收。

[0260] 无菌注射用溶液可如下制备:根据需要所需量的活性化合物并入具有上述成分之一或其组合的适当溶剂中,然后进行无菌微过滤。通常,分散液如下制备:将活性化合物并入含有碱性分散介质及选自上述成分的其它所需成分的无菌媒剂中。就用于制备无菌注射用溶液的无菌粉末而言,优选的制备方法为真空干燥及冷冻干燥(冻干),其自活性成分及任何其它所需成分的先前无菌过滤溶液产生其粉末。

[0261] 可与载体物质组合以产生单一剂型的活性成分的量将根据所治疗的受试者及特定给药模式而变化。可与载体物质组合以产生单一剂型的活性成分的量通常为产生疗效的组合物的量。通常,以百分之一百计,该量的范围将为约0.01%至约99%活性成分,优选约0.1%至约70%,最优选约1%至约30%活性成分,其与药用载体组合。

[0262] 调整给药方案以提供最佳的所需应答(例如治疗性应答)。例如,可给药单次推注,可随时间给药若干分次剂量或可根据治疗情形的急迫性指示按比例降低或提高剂量。将胃肠外组合物配制成易于给药及给药一致性的单位剂型为特别有利的。本申请使用的单位剂型是指适于所治疗的受试者的呈单一剂型的物理上离散的单元;每个单元含有经计算可产生所需疗效的预定量的活性化合物及所需药物载体。本申请单位剂型的规模决定且直接依赖于(a)活性化合物的独特特性及欲实现的特定疗效及(b)混配上述活性化合物的技术中对个体治疗敏感性的固有限制。

[0263] 对于给药大环肽,剂量范围为每公斤宿主体重约0.0001mg至100mg且更通常为每公斤宿主体重0.01mg至5mg。例如,剂量可为每公斤体重0.3mg、每公斤体重1mg、每公斤体重3mg、每公斤体重5mg或每公斤体重10mg或在每公斤体重1mg至10mg范围内。示例性治疗方案需要每日一次、每日两次、每周两次、每周三次、每周一次,每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每3个月一次或每3个月至6个月一次给药。本申请大环肽的优选给药方案包括经由静脉内给药每公斤体重1mg或每公斤体重3mg,其中大环使用以下给药时程之一给予:(i)每四周给药六次,然后每三个月;(ii)每三周;(iii)每公斤体重3mg一次,然后每三周每公斤体重1mg。

[0264] 在一些方法中,具有不同结合特异性的两种或更多种大环肽同时给药,在该情况下各化合物的给药剂量在指定范围内。化合物通常在多种场合下给药。单次给药之间的间隔时间可为例如每周、每月、每三个月或每年。根据测量患者中针对靶抗原的大环肽的血液

水平所指示,间隔时间亦可为不规则的。在一些方法中,调整剂量以实现约1-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及在一些方法中约25-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的血浆浓度。

[0265] 可选择地,大环肽可按持续释放型制剂形式给药,在该情况下需要较小的给药频率。给药剂量及频率可视治疗是预防性还是治疗性而变化。在预防性应用中,相对低的剂量在长的时段内以相对不频繁的间隔时间给药。一些患者在其余生持续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要以相对短的间隔时间给药相对高的剂量直至疾病进展降低或终止且优选直至患者显示出疾病症状的部分或完全改善。然后可将预防性方案给予患者。

[0266] 本申请药物组合物中活性成分的实际剂量水平可变化以得到针对特定患者、组合物及给药模式可有效实现所需治疗应答而不会使患者中毒的活性成分的量。所选剂量水平将视多种药物动力学因素而定,包括所用本申请特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性;给药途径;给药时间;所用特定化合物的排泄速率;治疗持续时间;与所用特定组合物联用的其它药物、化合物和/或物质;所治疗的患者的年龄、性别、体重、病状、一般健康状况及先前医药史;及医药领域中已知的类似因素。

[0267] 本申请大环肽的“治疗有效剂量”优选使疾病症状的严重程度降低,使无疾病症状的时段的频率及持续时间增加或预防因罹患疾病所致的损害或失能。例如,对于治疗肿瘤,相对于未经治疗的受试者,“治疗有效剂量”优选使细胞生长或肿瘤生长抑制至少约20%,更优选抑制至少约40%,甚至更优选抑制至少约60%且仍然更优选抑制至少约80%。化合物抑制肿瘤生长和/或HIV的能力可用预测人类肿瘤功效或病毒功效的动物模型系统评估。可选择地,组合物的该特性可通过检查化合物抑制能力例如体外抑制通过本领域技术人员已知的测定来评估。治疗有效量的治疗性化合物可减小肿瘤尺寸,降低病毒负荷或以其它方式改善受试者的症状。本领域技术人员能够根据例如以下因素来确定这些量:受试者身材、受试者症状的严重程度及所选的特定组合物或给药途径。

[0268] 在另一个方面,本申请提供分装部分的药物试剂盒,其包含本申请所述大环肽及其它免疫调节剂。试剂盒亦可进一步包含用于治疗过度增殖性疾病(例如本申请所述癌症)和/或抗病毒疾病的说明书。

[0269] 本申请组合物可经由一种或多种给药途径使用本领域已知的多种方法中的一种或多种给药。如本领域技术人员将认识到的那样,给药途径和/或模式将视所需结果而变化。用于本申请大环肽的优选给药途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊髓或其它胃肠外给药途径例如注射或输注。本申请使用的短语“胃肠外给药”意指除经肠及局部给药外的一般通过注射的给药模式且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊髓内、硬膜外及胸骨内注射及输注。

[0270] 可选择地,本申请大环肽可经由非胃肠外途径给药,例如局部、表皮或粘膜给药途径,例如鼻内、经口、阴道、直肠、舌下或局部。

[0271] 活性化合物可用使化合物不会快速释放的载体制备,例如控制释放型制剂,包括植入物、经皮贴片及微囊化递送系统。可使用生物可降解的生物相容的聚合物例如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。用于制备这些制剂的许多方法已获专利或为本领域技术人员所知。参见例如Robinson, J.R. 编辑, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York (1978)。

[0272] 治疗性组合物可用本领域已知的医药装置给药。例如,在优选实施方案中,本申请治疗性组合物可用无针皮下注射装置给药,例如美国专利5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824或4,596,556所公开的装置。可用于本申请的已知植入物及模块的实例包括:美国专利4,487,603,其公开以受控速率分配药物的植入用微输注泵;美国专利4,486,194,其公开经由皮肤给药药物的治疗装置;美国专利4,447,233,其公开以准确输注速率递送药物的药物输注泵;美国专利4,447,224,其公开用于连续递送药物的变流植入用输注装置;美国专利4,439,196,其公开具有多个腔室的渗透性药物递送系统;及美国专利4,475,196,其公开渗透性药物递送系统。这些专利以引用的方式并入本申请中。许多其它此类植入物、递送系统及模块已为本领域技术人员所知。

[0273] 在某些实施方案中,本申请大环肽可经配制以确保适当的体内分布。例如,血脑屏障(BBB)排斥许多高度亲水性化合物。为了确保本申请治疗性化合物通过BBB(需要时),其可配制成例如脂质体。制备脂质体的方法参见例如美国专利4,522,811、5,374,548及5,399,331。脂质体可包含选择性输送至特定细胞或器官内从而增强靶向药物递送的一种或多种部分(参见例如Ranade,V.V.,*J.Clin.Pharmacol.*,29:685(1989))。示例性靶向部分包括叶酸或生物素(参见例如颁予Low等人的美国专利5,416,016);甘露糖苷(Umezawa等人,*Biochem.Biophys.Res.Commun.*,153:1038(1988));大环肽(Bloeman,P.G.等人,*FEBS Lett.*,357:140(1995);Owais,M.等人,*Antimicrob.Agents Chemother.*,39:180(1995));表面活性剂蛋白质A受体(Briscoe等人,*Am.J.Physiol.*,1233:134(1995));p120(Schreier等人,*J.Biol.Chem.*,269:9090(1994));亦参见Keinanen,K.等人,*FEBS Lett.*,346:123(1994);Killion,J.J.等人,*Immunomethods* 4:273(1994)。

[0274] 本申请用途及方法

[0275] 本申请大环肽、组合物及方法具有许多体外及体内效用,包括例如检测PD-L1或通过阻断PD-L1来增强免疫应答。例如,这些分子可体外或离体给药于培养基中的细胞或例如体内给药于人类受试者以在多种情况下增强免疫性。因此,在一个方面,本申请提供调节受试者中的免疫应答的方法,其包括向该受试者给药本申请大环肽以调节该受试者中的免疫应答。优选增强、刺激或上调应答。在其它方面,所述大环肽可具有抗食蟹猴、抗小鼠和/或抗土拨鼠结合及治疗活性。

[0276] 本申请使用的术语“受试者”意欲包括人类及非人类动物。非人类动物包括所有脊椎动物,例如哺乳动物及非哺乳动物,例如非人类灵长类动物、绵羊、犬、猫、牛、马、小鸡、土拨鼠、两栖动物及爬行动物,但是哺乳动物是优选的,例如非人类灵长类动物、绵羊、犬、猫、牛及马。优选的受试者包括需要增强免疫应答的人类患者。所述方法尤其适于治疗患有可通过增强由T细胞介导的免疫应答来治疗的病症的人类患者。在特定实施方案中,所述方法尤其适于体内治疗癌细胞。为了实现免疫性的抗原特异性增强,所述大环肽可与所关注的抗原一起给药。当针对PD-L1的大环肽与另一种药剂一起给药时,这两者可依次或同时给药。

[0277] 本申请进一步提供检测样品中人类、土拨鼠、食蟹猴和/或小鼠PD-L1抗原的存在或测量人类、土拨鼠、食蟹猴和/或小鼠PD-L1抗原的量的方法,其包括使样品及对照样品与特异性结合至人类、土拨鼠、食蟹猴和/或小鼠PD-L1的参照品大环肽在允许所述大环肽与人类、土拨鼠、食蟹猴和/或小鼠PD-L1形成复合物的条件下接触。然后检测复合物的形成,

其中与对照样品相比,在样品之间形成复合物的差异表明在样品中存在人类、土拨鼠、食蟹猴和/或小鼠PD-L1抗原。

[0278] 若与CD28、ICOS及CTLA-4相比,本申请大环肽特异性结合PD-L1,则本申请大环肽可用于特异性检测细胞表面上的PD-L1表达且还可经由免疫亲和性纯化用于纯化PD-L1。

[0279] 癌症

[0280] 通过大环肽阻断PD-1可增强患者中针对癌细胞的免疫应答。PD-1的配体即PD-L1不表达于正常人类细胞中,但是在多种人类癌症中为富含的(Dong等人,Nat.Med.,8:787-789(2002))。PD-1与PD-L1之间的相互作用减少了肿瘤浸润淋巴细胞,减少了由T细胞受体介导的增殖及癌细胞的免疫逃避(Dong等人,J.Mol.Med.,81:281-287(2003);Blank等人,Cancer Immunol.Immunother.,54:307-314(2005);Konishi等人,Clin.Cancer Res.,10:5094-5100(2004))。免疫抑制可通过抑制PD-1与PD-L1的局部相互作用来逆转且所述作用当PD-1与PD-L2的相互作用亦被阻断时为相加性的(Iwai等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,99:12293-12297(2002);Brown等人,J.Immunol.,170:1257-1266(2003))。虽然先前研究已证实通过抑制PD-1与PD-L1的相互作用可修复T细胞增殖,但是阻断PD-1/PD-L1相互作用对癌症肿瘤生长的体内直接作用尚无报道。在一个方面,本申请涉及使用大环肽体内治疗受试者从而抑制癌症肿瘤生长。大环肽可单独使用以抑制癌症肿瘤生长。可选择地,大环肽可如下所述与其它免疫原性药剂、标准癌症疗法或其它大环肽联用。

[0281] 因此,在一个实施方案中,本申请提供在受试者中抑制肿瘤细胞生长的方法,其包括向所述受试者给药治疗有效量的大环肽。

[0282] 可使用本申请大环肽抑制生长的优选癌症包括对免疫疗法典型地有应答的癌症。所治疗的优选癌症的非限制性实例包括黑色素瘤(例如转移性恶性黑色素瘤)、肾细胞癌(例如透明细胞癌)、前列腺癌(例如激素难治性前列腺癌及去势抗性前列腺癌)、乳腺癌、结肠直肠癌及肺癌(例如鳞状及非鳞状非小细胞肺癌)。另外,本申请包括可使用本申请大环肽抑制生长的难治性或复发性恶性疾病。

[0283] 可使用本申请方法治疗的其它癌症的实例包括骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、肛区癌症、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病(包括急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、儿童期实体肿瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)赘生物、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西氏肉瘤、表皮样癌症、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、由环境诱发的癌症(包括由石棉诱发的那些癌症)及所述癌症的组合。本申请亦可用于治疗转移性癌症尤其是表达PD-L1的转移性癌症(Iwai等人,Int.Immunol.,17:133-144(2005))。

[0284] 针对PD-L1的大环肽可任选与免疫原性药剂组合,例如癌细胞、经纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白质、肽及碳水化合物分子)、细胞及经编码免疫刺激性细胞因子的基因转染的细胞(He等人,J.Immunol.,173:4919-4928(2004))。可使用的肿瘤疫苗的非限制性实例包括黑色素瘤抗原的肽例如gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶的肽或经转染以表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞(下文进一步论述)。

[0285] 在人类中已证实一些肿瘤例如黑色素瘤具有免疫原性。可预见的是,通过PD-L1阻断而提高T细胞活化的阈值,由此预期活化宿主中的肿瘤应答。

[0286] PD-L1阻断当与疫苗接种方案组合时可能最有效。已设计出许多针对肿瘤的实验性疫苗接种策略(参见Rosenberg,S.,*Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring:60-62 (2000); Logothetis,C.,*ASCO Educational Book Spring*:300-302 (2000); Khayat,D.,*ASCO Educational Book Spring*:414-428 (2000); Foon,K.,*ASCO Educational Book Spring*:730-738 (2000); 亦参见Restifo,N.等人,*Cancer Vaccines*,第61章,第3023-3043页,DeVita,V.等人编辑,*Cancer:Principles and Practice of Oncology*,第5版(1997))。在这些策略之一中,使用自体或同种异体肿瘤细胞制备疫苗。已证实当肿瘤细胞经转导以表达GM-CSF时,这些细胞疫苗最有效。对于肿瘤疫苗接种,已证实GM-CSF为抗原呈递的强活化剂(Dranoff等人,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,90:3539-3543 (1993))。

[0287] 对各种肿瘤中的基因表达及大规模基因表达模式的研究已产生关于所谓的肿瘤特异性抗原的定义(Rosenberg,S.A.,*Immunity*,10:281-287 (1999))。在很多情况下,这些肿瘤特异性抗原为表达于肿瘤及肿瘤所来源的细胞中的分化抗原,例如黑色素细胞抗原gp100、MAGE抗原及Trp-2。更重要的是,可证实许多这些抗原为发现于宿主中的肿瘤特异性T细胞的靶标。PD-L1阻断可与肿瘤中所表达的许多重组蛋白质和/或肽联用以产生针对这些蛋白质的免疫应答。这些蛋白质通常被免疫系统识别为自身抗原且因此对其具有耐受性。肿瘤抗原亦可包括蛋白质端粒酶,其为合成染色体端粒所必需的且表达于超过85%的人类癌症及仅有限的体细胞组织中(Kim,N.等人,*Science*,266:2011-2013 (1994))。(这些体细胞组织可通过各种方式加以保护以防免疫攻击)。由于改变蛋白质序列或在两个无关序列之间产生融合蛋白(即费城染色体中的bcr-abl)的体细胞突变或来自B细胞肿瘤的受试者基因型,肿瘤抗原亦可为表达于癌细胞中的“新抗原”。

[0288] 其它肿瘤疫苗可包括来自牵涉人类癌症的病毒的蛋白质,例如人类乳头状瘤病毒(HPV)、肝炎病毒(HBV及HCV)及卡波西氏疱疹肉瘤病毒(KHSV)。可与PD-L1阻断联用的另一种形式的肿瘤特异性抗原为自肿瘤组织自身分离的纯化热休克蛋白(HSP)。这些热休克蛋白含有来自肿瘤细胞的蛋白质的片段且这些HSP高效递送至抗原呈递细胞以引发肿瘤免疫(Suot,R.等人,*Science*,269:1585-1588 (1995); Tamura,Y.等人,*Science*,278:117-120 (1997))。

[0289] 树突状细胞(DC)为可用于致敏抗原特异性应答的强抗原呈递细胞。DC可离体产生且装载有各种蛋白质及肽抗原及肿瘤细胞提取物(Nestle,F.等人,*Nat.Med.*,4:328-332 (1998))。DC亦可通过遗传方式转导,从而亦表达这些肿瘤抗原。DC亦已直接融合至肿瘤细胞用于免疫目的(Kugler,A.等人,*Nat.Med.*,6:332-336 (2000))。DC免疫作为疫苗接种方法可有效地与PD-L1阻断组合以活化更强的抗肿瘤应答。

[0290] PD-L1阻断亦可与标准癌症疗法组合。PD-L1阻断可有效地与化学治疗方案组合。在这些情况下可降低化学治疗剂的给药剂量(Mokyr,M.等人,*Cancer Res.*,58:5301-5304 (1998))。上述组合的一个实例为大环肽与达卡巴嗪组合用于治疗黑色素瘤。上述组合的另一个实例为大环肽与白介素-2(IL-2)组合用于治疗黑色素瘤。PD-L1阻断与化学疗法联用的科学原理为作为大部分化学治疗性化合物的细胞毒性作用后果的细胞死亡应使肿瘤抗

原在抗原呈递途径中的水平提高。可与PD-L1阻断经由细胞死亡产生协同作用的其它组合疗法为放射、手术及激素去除。这些方案各自在宿主中产生肿瘤抗原来源。血管生成抑制剂亦可与PD-L1阻断组合。对血管生成的抑制引起肿瘤细胞死亡,从而可将肿瘤抗原馈入宿主抗原呈递途径中。

[0291] PD-L1阻断性大环肽亦可与使表达Fc $\alpha$ 或Fc $\gamma$ 受体的效应细胞靶向肿瘤细胞的双特异性大环肽联用(参见例如美国专利5,922,845及5,837,243)。双特异性大环肽可用于靶向两种不同的抗原。例如,抗Fc受体/抗肿瘤抗原(例如Her-2/neu)双特异性大环肽已用于使巨噬细胞靶向肿瘤部位。上述靶向可更有效地活化肿瘤特异性应答。使用PD-L1阻断可增强这些应答的T细胞臂。可选择地,可通过使用结合至肿瘤抗原及树突状细胞特异性细胞表面标志物的双特异性大环肽将抗原直接递送至DC。

[0292] 肿瘤通过很多种机制逃避宿主免疫监视。通过使肿瘤所表达且具有免疫抑制性的蛋白质不活化可战胜许多这些机制。这些尤其包括TGF- $\beta$  (Kehrl, J. 等人, *J. Exp. Med.*, 163: 1037-1050 (1986))、IL-10 (Howard, M. 等人, *Immunology Today*, 13: 198-200 (1992))及Fas配体 (Hahne, M. 等人, *Science*, 274: 1363-1365 (1996))。针对这些实体中的每种的大环肽可与抗PD-L1联用以抵消免疫抑制剂的作用且促成宿主的肿瘤免疫应答。

[0293] 可用于活化宿主免疫应答性的其它大环肽可与抗PD-L1联用。这些包括树突状细胞表面上的活化DC功能及抗原呈递的分子。抗CD40大环肽能够有效地代替T细胞辅助活性 (Ridge, J. 等人, *Nature*, 393: 474-478 (1998))且可与PD-1抗体联用 (Ito, N. 等人, *Immunobiology*, 201 (5): 527-540 (2000))。活化针对例如以下的T细胞共刺激分子的大环肽亦可使T细胞活化水平提高: CTLA-4 (例如美国专利5,811,097)、OX-40 (Weinberg, A. 等人, *Immunol.*, 164: 2160-2169 (2000))、4-1BB (Melero, I. 等人, *Nat. Med.*, 3: 682-685 (1997))及ICOS (Hutloff, A. 等人, *Nature*, 397: 262-266 (1999))。

[0294] 骨髓移植当前用于治疗多种造血源性肿瘤。虽然移植物抗宿主疾病为上述治疗的后果,但是可自移植物抗肿瘤应答得到治疗益处。PD-L1阻断可用于提高供者所植入的肿瘤特异性T细胞的有效性。

[0295] 亦存在若干种实验性治疗方案,其涉及离体活化及扩增抗原特异性T细胞且将这些细胞继承性转移至受者中以使抗原特异性T细胞针对肿瘤 (Greenberg, R. 等人, *Science*, 285: 546-551 (1999))。这些方法亦可用于活化针对感染剂(例如CMV)的T细胞应答。在大环肽存在下的离体活化作用预期可提高继承性转移的T细胞的频率及活性。

[0296] 感染性疾病

[0297] 本申请其它方法用于治疗已暴露于特定毒素或病原体的患者。因此,本申请另一个方面提供在受试者中治疗感染性疾病的方法,其包括向该受试者给药本申请大环肽以在该受试者中治疗感染性疾病。

[0298] 类似于上述对肿瘤的应用,PD-L1阻断可单独使用或作为辅助与疫苗联用以刺激针对病原体、毒素及自身抗原的免疫应答。上述治疗措施尤其可适用的病原体的实例包括当前无有效疫苗的病原体或常规疫苗不完全有效的病原体。这些包括但不限于HIV、肝炎(甲型、乙型及丙型)、流感、疱疹、贾第虫属、疟疾 (Butler, N.S. 等人, *Nature Immunology*, 13: 188-195 (2012); Hafalla, J.C.R. 等人, *PLoS Pathogens*, 2012年2月2日)、利什曼虫属、金黄色葡萄球菌、绿脓假单胞菌。PD-L1阻断对于HIV等在感染过程中呈递改变的抗原的病

原体所建立的感染特别有用。这些新颖的表位在抗人PD-L1给药时被识别为外来的,从而激发不会因PD-L1的负信号而衰减的强T细胞应答。

[0299] 可由本申请方法治疗的致感染性病原性病毒的一些实例包括HIV、肝炎(甲型、乙型及丙型)、疱疹病毒(例如VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II及CMV、埃-巴二氏病毒)、腺病毒、流感病毒、黄病毒、埃可病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒、呼吸道合胞体病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、麻疹病毒、风疹病毒、细小病毒、痘苗病毒、HTLV病毒、登革热病毒、乳头瘤病毒、软疣病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、JC病毒及虫媒病毒性脑炎病毒。

[0300] 可由本申请方法治疗的致感染性病原性细菌的一些实例包括衣原体、立克次体细菌、分枝杆菌、葡萄球菌、链球菌、肺炎双球菌、脑膜炎双球菌及淋球菌、克雷伯氏菌、变形杆菌、沙雷氏菌、假单胞菌、军团菌、白喉、沙门氏菌、杆菌、霍乱、破伤风、肉毒中毒、炭疽、鼠疫、钩端螺旋体病及莱姆病细菌。

[0301] 可由本申请方法治疗的致感染性病原性真菌的一些实例包括念珠菌属(白色念珠菌、克鲁斯氏念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌等)、新型隐球菌、曲霉属(烟曲霉、黑曲霉等)、毛霉菌属(白霉属、犁头霉属、根霉属)、申克氏孢子丝菌、皮炎芽生菌、巴西副球孢子菌、粗球孢子菌及荚膜组织胞浆菌。

[0302] 可由本申请方法治疗的致感染性病原性寄生虫的一些实例包括痢疾内变形虫、结肠小袋纤毛虫、福氏耐格里变形虫、棘阿米巴属种、蓝氏梨形鞭毛虫、隐孢子虫属种、卡氏肺囊虫、间日疟原虫、微小巴贝虫、布鲁氏锥虫、克氏锥虫、杜氏利什曼虫、冈氏弓形虫及巴西日圆线虫。

[0303] 在所有上述方法中,PD-L1阻断可与其它形式的免疫疗法组合,例如细胞因子疗法(例如干扰素、靶向VEGF活性或VEGF受体GM-CSF、G-CSF、IL-2的药剂)或使肿瘤抗原呈递增强的双特异性抗体疗法(参见例如Holliger, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993); Poljak, Structure, 2:1121-1123 (1994))。

[0304] 自身免疫应答

[0305] 大环肽可激发且扩增自身免疫应答。实际上,使用肿瘤细胞及肽疫苗诱导抗肿瘤应答揭示许多抗肿瘤应答涉及抗自身反应性(在经抗CTLA-4+GM-CSF改造的B16黑色素瘤中观测到脱色素(van Elsas等人,同上);在接种Trp-2的小鼠中观测到脱色素(Overwijk, W.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:2982-2987 (1999)); TRAMP肿瘤细胞疫苗引起自身免疫前列腺炎(Hurwitz, A., 同上(2000));黑色素瘤肽抗原疫苗接种及在人类临床试验中观测到白斑病(Rosenberg, S.A.等人, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol., 19(1):81-84 (1996))。

[0306] 因此,可考虑将抗PD-L1阻断与各种自身蛋白质联用以设计出有效产生针对这些自身蛋白质的免疫应答以治疗疾病的疫苗接种方案。例如,阿兹海默氏病牵涉淀粉样蛋白沉积物中的A $\beta$ 肽于脑中的不当积聚;针对淀粉样蛋白的抗体应答能够清除这些淀粉样蛋白沉积物(Schenk等人, Nature, 400:173-177 (1999))。

[0307] 其它自身蛋白质亦可用作治疗过敏症及哮喘的靶标例如IgE及治疗类风湿性关节炎的靶标例如TNF $\alpha$ 。最后可使用本申请所述大环诱导针对各种激素的抗体应答。中和针对生殖性激素的抗体应答可用于避孕。中和针对特定肿瘤生长所必需的激素及其它可溶性因子的抗体应答亦可视为可能的疫苗接种靶标。

[0308] 如上所述使用抗PD-L1大环的类似方法可用于诱导治疗性自身免疫应答以治疗具有其它自身抗原例如包括阿兹海默氏病中的AB在内的淀粉样蛋白沉积物、细胞因子例如TNF $\alpha$ 及IgE不当积聚的患者。

#### [0309] 疫苗

[0310] 大环肽可通过将抗PD-1大环与所关注的抗原(例如疫苗)共同给药而用于刺激抗原特异性免疫应答。因此,在另一个方面,本申请提供增强受试者中针对抗原的免疫应答的方法,其包括向该受试者给药:(i) 抗原;及(ii) 抗PD-1大环,从而增强该受试者中针对抗原的免疫应答。抗原可为例如肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原或来自病原体的抗原。这些抗原的非限制性实例包括上述那些,例如上述肿瘤抗原(或肿瘤疫苗)或来自上述病毒、细菌或其它病原体的抗原。

[0311] 体内及体外给药本申请组合物(例如大环肽、多特异性及双特异性分子及免疫缀合物)的适合途径在本领域中已知且可由本领域技术人员选择。例如,组合物可通过注射给药(例如静脉内或皮下)。所用分子的适合剂量将视受试者的年龄及体重及组合物的浓度和/或配方而定。

[0312] 如上所述,本申请大环肽可与一种或多种其它治疗剂(例如细胞毒性剂、放射毒性剂或免疫抑制剂)共同给药。肽可连接至药剂(呈免疫复合物形式)或可与药剂分开给药。在后者情况下(分开给药),肽可在药剂之前、之后或并行给药或可与其它已知疗法(例如抗癌疗法例如放射)共同给药。这些治疗剂尤其包括抗增生性药剂例如多柔比星(阿霉素)、顺铂、硫酸博莱霉素、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、达卡巴嗪及环磷酰胺/羟脲,其自身仅在对患者有毒性或亚毒性的水平有效。顺铂每四周一次静脉内给药100mg/剂量,而阿霉素每21天一次静脉内给药60-75mg/mL剂量。本申请大环肽与化学治疗剂的共同给药提供了经由对人类肿瘤细胞产生细胞毒性作用的不同机制发挥作用的两种抗癌剂。上述共同给药可解决由于抗药性的发展或肿瘤细胞抗原性的变化使其对肽无反应而引起的问题。

[0313] 包含本申请组合物(例如大环肽、双特异性或多特异性分子或免疫缀合物)及使用说明书的试剂盒亦在本申请范围内。试剂盒可进一步含有至少一种其它试剂或本申请一种或多种其它大环肽(例如具有互补活性的结合至PD-L1抗原中与大环不同的表位的人类抗体)。试剂盒典型地包括指明试剂盒的内含物的指定用途的标签。术语“标签”包括任何书面或记录材料,其提供于试剂盒上或与试剂盒一起提供或以其它方式附于试剂盒。

#### [0314] 组合疗法

[0315] 本申请大环肽与另一种PD-L1拮抗剂和/或其它免疫调节剂的组合可用于增强针对过度增殖性疾病的免疫应答。例如,这些分子可体外或离体给药于所培养的细胞或例如体内给药于人类受试者以在多种情况下增强免疫性。因此,在一个方面,本申请提供调节受试者中的免疫应答的方法,其包括向该受试者给药本申请大环肽以调节该受试者中的免疫应答。优选增强、刺激或上调应答。在另一个实施方案中,本申请提供用免疫刺激性治疗剂改变与治疗过度增殖性疾病相关的不良事件的方法,其包括向受试者给药本申请大环肽及亚治疗剂量的其它免疫调节剂。

[0316] 大环肽阻断PD-L1可增强患者中针对癌细胞的免疫应答。可使用本申请大环肽抑制生长的癌症包括对免疫疗法典型地有应答的癌症。可用本申请组合疗法治疗的癌症的代表性实例包括黑色素瘤(例如转移性恶性黑色素瘤)、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌及肺

癌。可使用本申请方法治疗的其它癌症的实例包括骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内恶性黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌症、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病(包括急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴母细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、儿童期实体肿瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)赘生物、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西氏肉瘤、表皮样癌症、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、由环境诱发的癌症(包括由石棉诱发的那些癌症)及所述癌症的组合。本申请亦可用于治疗转移性癌症。

[0317] 在某些实施方案中,含有至少一种本申请所述大环肽的治疗剂组合可按于药用载体中的单一组合物形式并行给药或按其中各药剂可依序给药的不同组合物形式并行给药。例如,第二免疫调节剂及本申请大环肽可依序给药,例如首先给药第二免疫调节剂且其次给药大环肽或首先给药大环肽且其次给药第二免疫调节剂。另外,若超过一个剂量的组合疗法依序给药,则依序给药的次序可颠倒或在每个给药时间点保持相同次序,依序给药可与并行给药组合或其任何组合。例如,第二免疫调节剂和大环肽的首次给药可为并行的,第二次给药可为依序的,其中首先给药第二免疫调节剂且其次给药大环肽且第三次给药可为依序的,其中首先给药大环肽且其次给药第二免疫调节剂等。另一种代表性给药方案可包括首先给药大环肽且其次给药第二免疫调节剂的首次依序给药且后续给药可为并行的。

[0318] 大环肽与第二免疫调节剂的组合可任选进一步与免疫原性药剂组合,例如癌细胞、经纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白质、肽及碳水化合物分子)、细胞及经编码免疫刺激性细胞因子的基因转染的细胞(He等人, *J. Immunol.*, 173:4919-4928 (2004))。可使用的肿瘤疫苗的非限制性实例包括黑色素瘤抗原的肽例如gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶的肽或经转染以表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞(下文进一步论述)。

[0319] 所组合的PD-L1大环肽与第二免疫调节剂可进一步与疫苗接种方案组合。已设计出许多针对肿瘤的实验性疫苗接种策略(参见Rosenberg, S., *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring:60-62 (2000); Logothetis, C., *ASCO Educational Book Spring*:300-302 (2000); Khayat, D., *ASCO Educational Book Spring*:414-428 (2000); Foon, K., *ASCO Educational Book Spring*:730-738 (2000); 亦参见Restifo等人, *Cancer Vaccines*, 第61章, 第3023-3043页, DeVita等人编辑, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 第5版(1997))。在这些策略之一中,使用自体或同种异体肿瘤细胞制备疫苗。已证实当肿瘤细胞经转导以表达GM-CSF时,这些细胞疫苗最有效。对于肿瘤疫苗接种已证实GM-CSF为抗原呈递的强活化剂(Dranoff等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3539-3543 (1993))。

[0320] 对各种肿瘤中的基因表达及大规模基因表达模式的研究已产生关于所谓的肿瘤特异性抗原的定义(Rosenberg, S. A., *Immunity*, 10:281-287 (1999))。在很多情况下,这些肿瘤特异性抗原为表达于肿瘤及肿瘤所来源的细胞中的分化抗原,例如黑色素细胞抗原gp100、MAGE抗原及Trp-2。更重要的是,可证实许多这些抗原为发现于宿主中的肿瘤特异性T细胞的靶标。在某些实施方案中,所组合的PD-L1大环肽与第二免疫调节剂可与肿瘤中所表达的许多重组蛋白质和/或肽联用以产生针对这些蛋白质的免疫应答。这些蛋白质通常

被免疫系统识别为自身抗原且因此对其耐受。肿瘤抗原亦可包括蛋白质端粒酶,其为合成染色体端粒所必需的且表达于超过85%的人类癌症及仅有限数目的体细胞组织中(Kim等人, *Science*, 266:2011-2013 (1994))。(这些体细胞组织可通过各种方式加以保护以防免疫攻击)。由于改变蛋白质序列或在两个无关序列之间产生融合蛋白(即费城染色体中的bcr-abl)的体细胞突变或来自B细胞肿瘤的受试者基因型,肿瘤抗原亦可为表达于癌细胞中的“新抗原”。

[0321] 其它肿瘤疫苗可包括牵涉人类癌症的病毒的蛋白质,例如人类乳头状瘤病毒(HPV)、肝炎病毒(HBV及HCV)及卡波西氏疱疹肉瘤病毒(KHSV)。可与PD-L1大环肽阻断联用的另一种形式的肿瘤特异性抗原为自肿瘤组织自身分离的纯化热休克蛋白(HSP)。这些热休克蛋白含有来自肿瘤细胞的蛋白质的片段且这些HSP高效递送至抗原呈递细胞以引发肿瘤免疫(Suot等人, *Science*, 269:1585-1588 (1995); Tamura等人, *Science*, 278:117-120 (1997))。

[0322] 树突状细胞(DC)为可用于致敏抗原特异性应答的强抗原呈递细胞。DC可离体产生且装载各种蛋白质及肽抗原及肿瘤细胞提取物(Nestle等人, *Nat. Med.*, 4:328-332 (1998))。DC亦可通过遗传方式转导,从而亦表达这些肿瘤抗原。DC亦已直接融合至肿瘤细胞用于免疫目的(Kugler等人, *Nat. Med.*, 6:332-336 (2000))。DC免疫作为疫苗接种方法可有效地进一步与所组合的抗PD-L1大环肽及第二免疫调节剂组合以活化更强的抗肿瘤应答。

[0323] 所组合的抗PD-L1大环肽与其它免疫调节剂亦可进一步与标准癌症治疗组合。例如,大环肽与第二免疫调节剂的组合可有效地与化学治疗方案组合。在这些情况下,如就大环肽与第二免疫调节剂的组合所观测到的那样,可降低与本申请组合一起给药的其它化学治疗剂的剂量(Mokyr等人, *Cancer Res.*, 58:5301-5304 (1998))。上述组合的一个实例为大环肽与第二免疫调节剂的组合进一步与达卡巴嗪组合用于治疗黑色素瘤。另一个实例为大环肽与第二免疫调节剂的组合进一步与白介素-2(IL-2)组合用于治疗黑色素瘤。PD-L1大环肽及其它免疫调节剂与化学疗法联用的科学原理为作为大部分化学治疗性化合物的细胞毒性作用后果的细胞死亡应使肿瘤抗原在抗原呈递途径中的水平提高。可与所组合的抗PD-L1大环肽及其它免疫调节剂经由细胞死亡产生协同作用的其它组合疗法包括放射、手术及激素去除。这些方案各自在宿主中产生肿瘤抗原来源。血管生成抑制剂亦可与所组合的PD-L1及第二免疫调节剂组合。对血管生成的抑制引起肿瘤细胞死亡,从而亦可将肿瘤抗原来源馈入宿主抗原呈递途径中。

[0324] PD-L1与其它免疫调节剂的组合亦可与使表达Fc $\alpha$ 或Fc $\gamma$ 受体的效应细胞靶向肿瘤细胞的双特异性大环肽联用(参见例如美国专利5,922,845及5,837,243)。双特异性大环肽可用于靶向两种不同的抗原。例如,抗Fc受体/抗肿瘤抗原(例如Her-2/neu)双特异性大环肽已用于使巨噬细胞靶向肿瘤部位。上述靶向可更有效地活化肿瘤特异性应答。使用所组合的PD-L1与第二免疫调节剂可增强这些应答的T细胞臂。可选择地,可通过使用结合至肿瘤抗原及树突状细胞特异性细胞表面标志物的双特异性大环肽将抗原直接递送至DC。

[0325] 在另一个实施方案中,大环肽与第二免疫调节剂的组合可与抗赘生性大环药剂联用,例如RITUXAN<sup>®</sup>(利妥昔单抗)、HERCEPTIN<sup>®</sup>(曲妥珠单抗)、BEXXAR<sup>®</sup>(托西莫单抗)、ZEVALIN<sup>®</sup>(替伊莫单抗)、CAMPATH<sup>®</sup>(阿来组单抗)、Lymphocide(依帕珠单

抗)、AVASTIN<sup>®</sup>(贝伐株单抗)及TARCEVA<sup>®</sup>(埃罗替尼)等。例如且不希望受理论束缚,用抗癌抗体或与毒素缀合的抗癌抗体进行的治疗可引起癌细胞(例如肿瘤细胞)死亡,其可强化第二免疫调节剂靶标或PD-L1所介导的免疫应答。在一个示例性实施方案中,对过度增殖性疾病(例如癌症肿瘤)的治疗可包括抗癌抗体与大环肽及第二免疫调节剂的组合(并行或依序或其任何组合),其可强化宿主的抗肿瘤免疫应答。

[0326] 肿瘤通过很多种机制逃避宿主免疫监视。使肿瘤所表达且具有免疫抑制性的蛋白质失活可战胜许多这些机制。这些尤其包括TGF- $\beta$ (Kehrl, J.等人, *J. Exp. Med.*, 163:1037-1050 (1986))、IL-10(Howard, M.等人, *Immunology Today*, 13:198-200 (1992))及Fas配体(Hahne, M.等人, *Science*, 274:1363-1365 (1996))。在另一个实施方案中,针对这些实体中的每种的抗体可进一步与大环肽及其它免疫调节剂组合以抵消免疫抑制剂的作用且促成宿主的抗肿瘤免疫应答。

[0327] 可用于活化宿主免疫应答性的其它药剂可进一步与本申请大环肽联用。这些包括树突状细胞表面上活化DC功能及抗原呈递的分子。抗CD40大环肽能够有效地代替T细胞辅助活性(Ridge, J.等人, *Nature*, 393:474-478 (1998))且可与单独或与抗CTLA-4组合的本申请大环肽联用(Ito, N.等人, *Immunobiology*, 201 (5):527-540 (2000))。活化针对例如以下的T细胞共刺激分子的大环肽亦可使T细胞活化水平提高:OX-40(Weinberg, A.等人, *Immunol.*, 164:2160-2169 (2000))、4-1BB(Melero, I.等人, *Nat. Med.*, 3:682-685 (1997))及ICOS(Hutloff, A.等人, *Nature*, 397:262-266 (1999))。

[0328] 骨髓移植当前用于治疗多种造血源性肿瘤。虽然移植物抗宿主疾病为上述治疗的后果,但是可自移植物抗肿瘤应答得到治疗益处。单独或其它免疫调节剂组合的本申请大环肽可用于提高供者所植入的肿瘤特异性T细胞的有效性。

[0329] 亦存在若干种实验性治疗方案,其涉及离体活化及扩增抗原特异性T细胞且将这些细胞继承性转移至受者中以使抗原特异性T细胞针对肿瘤(Greenberg, R.等人, *Science*, 285:546-551 (1999))。这些方法亦可用于活化针对感染剂(例如CMV)的T细胞应答。在单独或其它免疫调节剂组合的本申请大环肽存在下的离体活化预期可提高继承性转移的T细胞的频率及活性。

[0330] 在某些实施方案中,本申请提供改变与用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病相关的不良事件的方法,其包括向受试者给药本申请大环肽与亚治疗剂量的其它免疫调节剂的组合。例如,本申请方法提供通过给药非吸收性类固醇至患者来降低免疫刺激性治疗抗体所引起的结肠炎或腹泻的方法。因为将接受免疫刺激性治疗抗体的任何患者处于发生上述治疗所引起的结肠炎或腹泻的风险中,所以上述整个患者群体适于根据本申请方法的疗法。虽然已给药类固醇以治疗炎性肠病(IBD)及预防IBD恶化,但是其尚未用于在尚未诊断有IBD的患者中预防(降低发病率)IBD。与类固醇甚至是非吸收性类固醇相关的显著副作用已妨碍预防性使用。

[0331] 在其它实施方案中,单独或其它免疫调节剂组合的本申请大环肽可进一步与任何非吸收性类固醇联用。本申请使用的“非吸收性类固醇”为展现出明显首过代谢的糖皮质激素,其在肝脏代谢后的生物利用度较低即小于约20%。在本申请一个实施方案中,非吸收性类固醇为布地奈德。布地奈德为局部发挥作用的糖皮质激素,其在经口给药后发生主要由肝脏进行的明显代谢。ENTOCORT<sup>®</sup>EC(Astra-Zeneca)为pH及时间依赖性口服布地

奈德制剂,其经开发可最佳化药物递送至回肠及整个结肠。ENTOCORT<sup>®</sup>EC在美国已获准用于治疗牵涉回肠和/或升结肠的轻度至中度克罗恩氏病。ENTOCORT<sup>®</sup>EC用于治疗克罗恩氏病的一般口服剂量为每日6mg至9mg。ENTOCORT<sup>®</sup>EC在吸收前释放于肠中且保留于肠粘膜中。ENTOCORT<sup>®</sup>EC一旦通过肠粘膜靶标组织,就通过肝脏中的细胞色素P450系统发生明显代谢而产生糖皮质激素活性可忽略的代谢物。因此,生物利用度较低(约10%)。与首过代谢较不明显的其它糖皮质激素相比,布地奈德的较低生物利用度使治疗比提高。与全身性发挥作用的皮质类固醇相比,布地奈德产生的不良作用较少,包括较小的下丘脑-垂体抑制。然而,长期给药ENTOCORT<sup>®</sup>EC可产生全身性糖皮质激素作用例如肾上腺皮质高能症及肾上腺抑制。参见Physicians' DeskReference Supplement,第58版,608-610(2004)。

[0332] 在其它实施方案中,PD-L1与其它免疫调节剂及非吸收性类固醇的组合可进一步与水杨酸组合。水杨酸包括5-ASA药剂例如:柳氮磺胺吡啶(AZULFIDINE<sup>®</sup>,Pharmacia&Upjohn);奥色拉秦(DIPENTUM<sup>®</sup>,Pharmacia&UpJohn);巴柳氮(COLAZAL<sup>®</sup>,Salix Pharmaceuticals,Inc.);及美沙拉嗪(ASACOL<sup>®</sup>,Procter&Gamble Pharmaceuticals;PENTASA<sup>®</sup>,Shire US;CANASA<sup>®</sup>,Axcan Scandipharm,Inc.;ROWASA<sup>®</sup>,Solvay)。

[0333] 剂量及制剂

[0334] 适合的式I肽或更具体为本申请所述大环肽可按单独化合物和/或与可接受的载体混合的药物制剂形式给药于患者以治疗糖尿病及其它相关疾病。糖尿病治疗领域技术人员可容易地确定化合物向需要上述治疗的哺乳动物(包括人类)给药的剂量及途径。给药途径可包括但不限于经口、口内、直肠、经皮、颊内、鼻内、经肺、皮下、肌内、皮内、舌下、结肠内、眼内、静脉内或经肠给药。化合物根据给药途径基于可接受的药学实践来配制(Fingl等人,The Pharmacological Basis of Therapeutics,第1章,第1页(1975);Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Co.,Easton,PA(1990))。

[0335] 本申请所述药用肽组合物可按多种剂型给药,例如片剂、胶囊(其各自包括持续释放型或定时释放型制剂)、丸剂、散剂、颗粒剂、酏剂、原位凝胶剂、微球剂、结晶复合物、脂质体、微乳剂、酏剂、混悬剂、糖浆剂、气溶胶喷雾剂及乳液。本申请所述组合物亦可按经口、静脉内(推注或输注)、腹膜内、皮下、经皮或肌内形式给药,其均使用药学领域技术人员已知的剂型。组合物可单独给药,但是通常将与药物载体一起给药,所述药物载体根据所选给药途径及标准药学实践来选择。

[0336] 本申请所述组合物的给药方案当然将视已知因素而变化,例如特定药剂的药效学特征及其给药模式及途径;接受者的物种、年龄、性别、健康、医学状况及体重;症状的性质及程度;并行疗法的种类;治疗频率;给药途径;患者的肾脏及肝脏功能;及所需的作用。医师或兽医可确定及开具预防、对抗或阻止病症进展所必需的药物有效量。

[0337] 作为一般指导,活性成分当用于指定作用时的每日口服剂量将为每公斤体重约0.001mg至1000mg,优选每日每公斤体重约0.01mg至100mg且最优选每日约0.6至20mg/kg。活性成分当用于指定作用时的静脉内每日剂量在恒速输注期间将为每公斤体重0.001ng/min至100.0ng/min。上述恒速静脉内输注优选可按每公斤体重0.01ng/min至50ng/min的速率且最优选按每公斤体重0.01ng/min至10.0mg/min的速率给药。本申请所述组合物可按单

一每日剂量给药或每日总剂量可按每日两次、三次或四次的分份剂量给药。本申请所述组合物亦可通过储库式制剂给药,所述储库式制剂将允许药物按需在数日/数周/数月时段内持续释放。

[0338] 本申请所述组合物可按鼻内形式经由局部使用适合的鼻内媒剂来给药或经由透皮途径使用透皮皮肤贴剂来给药。当以透皮递送系统形式给药时,给药在整个给药方案中当然将为连续而非间歇的。

[0339] 组合物典型地以与适合的药物稀释剂、赋形剂或载体(本申请统称为药物载体)的混合物形式给药,其根据所预期的给药形式即口服片剂、胶囊、酏剂、用或不用推进剂产生的气溶胶喷雾剂及糖浆剂适当选择且符合常规药学实践。

[0340] 例如,就以片剂或胶囊形式经口给药而言,活性药物组分可与口服无毒药用惰性载体组合,例如但不限于乳糖、淀粉、蔗糖、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、磷酸二钙、硫酸钙、甘露糖醇及山梨糖醇;就以液体形式经口给药而言,口服药物组分可与任何口服无毒药用惰性载体组合,例如但不限于乙醇、丙三醇及水。另外,当需要或必需时,亦可将适合的粘合剂、滑润剂、崩解剂及着色剂并入混合物中。适合的粘合剂包括但不限于淀粉、明胶、天然糖(例如但不限于葡萄糖或 $\beta$ -乳糖、玉米甜味剂)、天然及合成胶(例如阿拉伯胶、黄耆胶或海藻酸钠)、羧甲基纤维素、聚乙二醇及蜡。在这些剂型中使用的滑润剂包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠及氯化钠。崩解剂包括但不限于淀粉、甲基纤维素、琼脂、膨润土及黄胞胶。

[0341] 本申请所述组合物亦可按混合胶束或脂质体递送系统形式给药,例如单层小囊泡、单层大囊泡及多层囊泡。脂质体可由多种磷脂例如胆固醇、十八烷基胺或磷脂酰胆碱形成。可添加渗透增强剂以增强药物吸收。

[0342] 由于已知前药可增强药物的多种所需品质(即溶解性、生物利用度、制造性等),因此本申请所述化合物可按前药形式递送。因此,本申请所述主题意欲涵盖本申请所要求保护的化合物的前药、递送其的方法及含有其的组合物。

[0343] 本申请所述组合物亦可与作为靶向性药物载体的可溶性聚合物偶联。上述聚合物可包括聚乙烯吡咯烷酮、吡喃共聚物、聚羟基丙基-甲基丙烯酸胺-苯酚、聚羟基乙基天冬酰胺苯酚或经棕榈酰基取代的聚氧化乙烯-聚赖氨酸。另外,本申请所述组合物可与适用于实现药物控制释放的一类生物降解性聚合物组合,例如聚乳酸、聚乙醇酸、聚乳酸与聚乙醇酸的共聚物、聚 $\epsilon$ 己内酯、聚羟基丁酸、聚原酸酯、聚缩醛、聚二氢吡喃、聚氰基丙烯酸酯及水凝胶的交联或两性嵌段共聚物。

[0344] 适于给药的剂型(药物组合物)在每个剂量单位中可含有约0.01毫克至约500毫克活性成分。在这些药物组合物中,活性成分按组合物的总重量计通常将以约0.5-95重量%的量存在。

[0345] 明胶胶囊可含有活性成分及粉末状载体例如乳糖、淀粉、纤维素衍生物、硬脂酸镁及硬脂酸。类似的稀释剂可用于制备压制片剂。片剂与胶囊均可制备为持续释放型产品以使药物在数小时内连续释放。压制片剂可包有糖衣或包有薄膜衣以遮蔽任何不愉快的味道且保护片剂以免接触空气或包有肠溶衣以在胃肠道中选择性崩解。

[0346] 口服液体剂型可含有着色剂及矫味剂以增加患者接受性。

[0347] 通常,水、适合的油、盐水、右旋糖(葡萄糖)水溶液及相关糖溶液及二醇例如丙二

醇或聚乙二醇为适于胃肠外溶液的载体。用于胃肠外给药的溶液优选含有活性成分的水溶性盐、适合的稳定剂及必要时的缓冲物质。单独或组合的抗氧化剂例如亚硫酸氢钠、亚硫酸钠或抗坏血酸为适合的稳定剂。亦使用柠檬酸及其盐及EDTA钠。另外，胃肠外溶液可含有防腐剂例如苯扎氯铵、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯及氯丁醇。

[0348] 适合的药物载体参见Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, Mack Publishing Company (1995) (本领域标准参考教科书)。

[0349] 可用于给药本申请所述化合物的代表性药物剂型可说明如下:

[0350] 胶囊

[0351] 大量单位胶囊可如下制备: 向标准两段式硬明胶胶囊中填充100毫克粉末状活性成分、150毫克乳糖、50毫克纤维素及6毫克硬脂酸镁。

[0352] 软明胶胶囊

[0353] 可制备活性成分于可消化的油例如大豆油、棉籽油或橄榄油中的混合物且借助正排量泵注入到明胶中以形成含有100毫克活性成分的软明胶胶囊。胶囊应洗涤且干燥。

[0354] 片剂

[0355] 片剂可通过常规程序制备, 从而使单位剂量为例如100毫克活性成分、0.2毫克胶体二氧化硅、5毫克硬脂酸镁、275毫克微晶纤维素、11毫克淀粉及98.8毫克乳糖。可涂覆适当的包衣以增强适口性或延迟吸收。

[0356] 注射剂

[0357] 本申请所述肽组合物的注射剂可或可不需要使用赋形剂例如已由监管机构批准的那些赋形剂。这些赋形剂包括但不限于溶剂及共溶剂、增溶剂、乳化剂或增稠剂、螯合剂、抗氧化剂及还原剂、抗微生物防腐剂、缓冲剂及pH调节剂、增容剂、保护剂及张力调节剂及特殊添加剂。注射剂必须无菌无热原且在溶液情况下不含颗粒物质。

[0358] 适于注射给药的胃肠外组合物可如下制备: 将例如1.5重量%活性成分在可或可不含共溶剂或其它赋形剂的药用缓冲液中搅拌。溶液应用氯化钠实现等张性且灭菌。

[0359] 混悬液

[0360] 水性混悬液可根据口服和/或胃肠外给药来制备, 从而使例如每5mL含有100mg细粉状活性成分、20mg羧甲基纤维素钠、5mg苯甲酸钠、1.0g山梨糖醇溶液(U.S.P.)及0.025mL香草精或其它适口矫味剂。

[0361] 生物降解性微粒

[0362] 适于注射给药的持续释放型胃肠外组合物可例如如下制备: 将适合的生物降解性聚合物溶解于溶剂中, 将待并入的活性剂添加至聚合物溶液中且从基质中除去溶剂, 从而形成活性剂遍布在基质中的聚合物基质。

[0363] 本领域技术人员知晓在本申请中且尤其在以下说明性实施例中使用的缩写。所使用的一些缩写如下: HOBt表示羟基苯并三唑; HOAt表示1-羟基-7-氮杂苯并三唑; DIC表示N,N'-二异丙基碳二亚胺; BOP表示六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基三(二甲基氨基)磷; PyBOP表示六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基三吡咯烷子基磷; HCTU表示六氟磷酸1-[二(二甲基氨基)亚甲基]-5-氯-1H-苯并三唑鎓3-氧化物; HATU表示六氟磷酸1-[二(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物; TFA表示三氟乙酸; TIS表示三异丙基硅烷; DMSO表示二甲基亚砷; MeCN或ACN或AcCN表示乙腈; DMF表示N,N-二甲基甲酰胺; DCM表示二氯甲烷;

DIPEA或DIEA表示二异丙基乙基胺;Et<sub>2</sub>O表示乙醚;MeOH表示甲醇;rt表示室温;h表示小时;min表示分钟;且iPr表示异丙基。

#### [0364] 肽合成

[0365] 本文关于本申请的描述应根据化学键合定律及原理来理解。应理解本申请涵盖的化合物为适当地稳定以用作药剂的那些化合物。本领域技术人员基于化学键合及稳定性的一般原理将知晓哪些化合物可为稳定的及可不为稳定的。

[0366] 可采用多种本领域已知的方法进行本申请大环肽的化学合成,包括经由肽片段的构形辅助再连接、克隆或合成肽片段的酶连接及化学连接的逐步固相合成、半合成。合成本申请所述大环肽及其类似物的优选方法为使用各种固相技术的化学合成,例如参见Chan, W.C.等人编辑,Fmoc Solid Phase Synthesis, Oxford University Press, Oxford (2000); Barany, G.等人, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, 第2卷: "Special Methods in Peptide Synthesis, Part A", 第3-284页, Gross, E.等人编辑, Academic Press, New York (1980); 及 Stewart, J.M.等人, Solid-Phase Peptide Synthesis, 第2版, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984)。优选的策略基于Fmoc基团(9-芴基甲基氧基羰基)暂时保护 $\alpha$ -氨基与叔丁基暂时保护氨基酸侧链的组合(参见例如Atherton, E.等人, "The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group", The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, 第9卷: "Special Methods in Peptide Synthesis, Part C", 第1-38页, Udenfriend, S.等人编辑, Academic Press, San Diego (1987))。

[0367] 可自肽的C末端开始以逐步方式在不溶性聚合物载体(亦称为“树脂”)上合成肽。合成开始于肽的C末端氨基酸经由形成酰胺键或酯键而附接至树脂。这使所得肽最终分别以C末端酰胺或羧酸形式释放。

[0368] 合成使用的C末端氨基酸及所有其它氨基酸的 $\alpha$ -氨基及侧链官能团(若存在)必需得到有差别的保护,从而在合成期间可选择性地除去 $\alpha$ -氨基保护基。氨基酸的偶联如下进行:将其羧基活化成活性酯且使其与附接至树脂的N末端氨基酸的未阻断的 $\alpha$ -氨基反应。依序重复进行 $\alpha$ -氨基脱保护及偶联直至组装成整个肽序列。然后在侧链官能团脱保护的伴随下,通常在限制副反应的适当清除剂存在下,使肽自树脂释放。所得肽最后通过反相HPLC纯化。

[0369] 作为最终肽所需的前体的肽基树脂的合成使用商购的交联聚苯乙烯聚合物树脂(Novabiochem, San Diego, CA; Applied Biosystems, Foster City, CA)。对于C末端羧酰胺, 优选的固体载体为: 4-(2', 4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基甲基)-苯氧基乙酰基-对甲基二苯胺树脂(Rink酰胺MBHA树脂); 9-Fmoc-氨基-夹氧杂蒽-3-基氧基-Merrifield树脂(Sieber酰胺树脂); 4-(9-Fmoc)氨基甲基-3, 5-二甲氧基苯氧基)戊酰基-氨基甲基-Merrifield树脂(PAL树脂)。第一个及后续氨基酸的偶联可分别使用由DIC/HOBt、HBTU/HOBt、BOP、PyBOP产生或由DIC/6-Cl-HOBt、HCTU、DIC/HOAt或HATU产生的HOBt、6-Cl-HOBt或HOAt活性酯来完成。对于经保护的肽片段, 优选的固体载体为: 2-氯三苯甲基氯化物树脂及9-Fmoc-氨基-夹氧杂蒽-3-基氧基-Merrifield树脂(Sieber酰胺树脂)。将第一个氨基酸装载至2-氯三苯甲基氯化物树脂上通过使经Fmoc保护的氨基酸与树脂在二氯甲烷及DIEA中反应而最佳实现。必要时可添加少量DMF以促进氨基酸溶解。

[0370] 合成本申请所述肽类似物可使用单通道或多通道肽合成仪进行, 例如CEM

Liberty微波合成仪或Protein Technologies, Inc. Prelude (6通道) 或Symphony (12通道) 合成仪。

[0371] 用于各个肽的肽基树脂前体可使用任何标准程序来裂解及脱保护(参见例如King, D.S.等人, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 36:255-266 (1990))。所需方法为在水及TIS存在下使用TFA作为清除剂。典型地, 将肽基树脂在TFA/水/TIS (94:3:3, v:v:v; 1mL/100mg肽基树脂) 中在室温搅拌2至6小时。然后滤去废树脂且将TFA溶液减压浓缩或干燥。所得粗肽析出且用Et<sub>2</sub>O洗涤或直接重新溶解于DMSO或50%乙酸水溶液中以通过制备型HPLC纯化。

[0372] 具有所需纯度的肽可通过使用制备型HPLC进行纯化(例如在Waters 4000型或Shimadzu LC-8A型液相色谱仪上) 来得到。将粗肽的溶液注入YMCS50DS (20×100mm) 柱中且用MeCN/水(均经0.1% TFA缓冲) 的线性梯度以14至20mL/min的流速洗脱, 其中洗脱液根据220nm的UV吸收度监测。经纯化的肽的结构可通过电喷雾MS分析来确认。

[0373] 以下分析方案及合成方法属于实施例1253至1288:

[0374] 分析数据:

[0375] 质谱: “ESI-MS (+)” 表示以正离子模式进行的电喷雾离子化质谱; “ESI-MS (-)” 表示以负离子模式进行的电喷雾离子化质谱; “ESI-HRMS (+)” 表示以正离子模式进行的高分辨率电喷雾离子化质谱; “ESI-HRMS (-)” 表示以负离子模式进行的高分辨率电喷雾离子化质谱。所检测到的质量报道在“m/z” 单位名称后。准确质量大于1000的化合物常常以双电荷或三电荷离子形式检测到。

[0376] 分析型LCMS条件A:

[0377] 柱: BEH C18, 2.1×50mm, 1.7μm颗粒; 流动相A: 水+0.05% TFA; 流动相B: 乙腈+0.05% TFA; 温度: 50℃; 梯度: 经2分钟2%B至98%B, 接着在98%B保持0.5分钟; 流速: 0.8mL/min; 检测: UV 220nm。

[0378] 分析型LCMS条件B:

[0379] 柱: BEH C18, 2.1×50mm, 1.7μm颗粒; 流动相A: 5:95乙腈:水+0.05% TFA; 流动相B: 95:5乙腈:水+0.05% TFA; 温度: 50℃; 梯度: 经3分钟0-100%B, 接着在100%B保持0.75分钟; 流速: 1.11mL/min。

[0380] 分析型LCMS条件C:

[0381] 柱: BEH C18, 2.1×50mm, 1.7μm颗粒; 流动相A: 水+0.2% 甲酸及0.01% TFA; 流动相B: 乙腈+0.2% 甲酸及0.01% TFA; 温度: 50℃; 梯度: 经2分钟2%B至80%B, 经0.1分钟80%B至98%B, 接着在98%B保持0.5分钟; 流速: 0.8mL/min; 检测: UV 220nm。

[0382] 分析型LCMS条件D:

[0383] 柱: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1×50mm, 1.7μm颗粒; 流动相A: 5:95乙腈:水+10mM乙酸铵; 流动相B: 95:5乙腈:水+10mM乙酸铵; 温度: 50℃; 梯度: 经3分钟0-100%B, 接着在100%B保持0.75分钟; 流速: 1.11mL/min; 检测: UV 220nm。

[0384] 分析型LCMS条件E:

[0385] 柱: Waters Acquity UPLC BEH C18, 2.1×50mm, 1.7μm颗粒; 流动相A: 5:95乙腈:水+0.1% 三氟乙酸; 流动相B: 95:5乙腈:水+0.1% 三氟乙酸; 温度: 50℃; 梯度: 经3分钟0-100%B, 接着在100%B保持0.75分钟; 流速: 1.11mL/min; 检测: UV 220nm。

[0386] 分析型LCMS条件F:

[0387] 柱:Waters Xbridge C18,2.1×50mm;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;温度:35℃;梯度:经4分钟0-100%B,接着在100%B保持1分钟;流速:4mL/min;检测:UV 220nm。

[0388] 分析型LCMS条件G:

[0389] Finnigan LTQ质谱仪;柱:Phenomenex Jupiter C4,1×50mm;流动相A:1%甲酸/水;流动相B:0.1%甲酸/乙腈;温度:30℃;梯度:在1%B保持1分钟,经3分钟1-95%B,接着在95%B保持3分钟;流速:0.15mL/min。

[0390] 分析型LCMS条件H:

[0391] 柱:Waters BEH C18,2.0×50mm,1.7μm颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;温度:50℃;梯度:经3分钟0-100%B,接着在100%B保持0.5分钟;流速:1.0mL/min;检测:UV 220nm。

[0392] 分析型LCMS条件I:

[0393] 柱:Waters BEH C18,2.0×50mm,1.7μm颗粒;流动相A:5:95甲醇:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5甲醇:水+10mM乙酸铵;温度:50℃;梯度:经3分钟0-100%B,接着在100%B保持0.5分钟;流速:0.5mL/min;检测:UV 220nm。

[0394] 分析型HPLC条件A:

[0395] 柱:YMC Pack ODS-AQ 3μm 150×4.6mm;流动相A:水+0.1%TFA;流动相B:乙腈+0.1%TFA;温度:60℃;梯度:经25分钟35%B至80%B;流速:1mL/min;检测:UV 217nm。

[0396] 分析型HPLC条件B:

[0397] 柱:YMC Pack ODS-AQ 3μm 150×4.6mm;流动相A:水+0.1%TFA;流动相B:乙腈+0.1%TFA;温度:60℃;梯度:经25分钟25%B至75%B;流速:1mL/min;检测:UV 217nm。

[0398] 分析型HPLC条件C:

[0399] 柱:YMC Pack ODS-AQ 3μm 150×4.6mm;流动相A:水+0.1%TFA;流动相B:乙腈+0.1%TFA;温度:60℃;梯度:经25分钟20%B至70%B;流速:1mL/min;检测:UV 217nm。

[0400] 分析型HPLC条件D:

[0401] 柱:YMC Pack ODS-AQ 3μm 150×4.6mm;流动相A:水+0.1%TFA;流动相B:乙腈+0.1%TFA;温度:60℃;梯度:经25分钟15%B至65%B;流速:1mL/min;检测:UV 217nm。

[0402] 分析型HPLC条件E:

[0403] 柱:YMC Pack ODS-AQ 3μm 150×4.6mm;流动相A:水+0.1%TFA;流动相B:乙腈+0.1%TFA;温度:60℃;梯度:经20分钟25%B至60%B;流速:1.25mL/min;检测:UV 217nm。

[0404] 分析型HPLC条件F:

[0405] 柱:YMC Pack ODS-AQ 3μm 150×4.6mm;流动相A:水+0.1%TFA;流动相B:乙腈+0.1%TFA;温度:60℃;梯度:经20分钟25%B至65%B;流速:1.25mL/min;检测:UV 217nm。

[0406] 分析型HPLC条件G

[0407] 柱:Sunfire C18 3.5μm,3.0×150mm;流动相A:5:95乙腈:水+0.05%三氟乙酸;流动相B:95:5乙腈:水+0.05%三氟乙酸;温度:50℃;梯度:经12分钟10-100%B,接着在100%B保持3分钟;流速:1mL/min;检测:UV220nm。

[0408] 分析型HPLC条件H

[0409] 柱:Xbridge Phenyl 3.5×150mm,流动相A:5:95乙腈:水+0.05%三氟乙酸;流动相B:95:5乙腈:水+0.05%三氟乙酸;温度:50℃;梯度:经12分钟10-100%B,接着在100%B保持3分钟;流速:1mL/min;检测:UV 220nm。

[0410] 分析型HPLC条件I:

[0411] 柱:Phenomenex Luna 5 $\mu$ C18 (2) 150×4.6mm;流动相A:水+0.1%三氟乙酸,流动相B:乙腈+0.1%三氟乙酸,梯度:经20分钟5-100%B,接着在100%B保持5分钟;流速:1mL/min;检测:UV 220nm。

[0412] 分析型HPLC条件J:

[0413] 柱:Phenomenex Luna 5 $\mu$ C18 (2) 150×4.6mm;流动相A:水+0.1%三氟乙酸,流动相B:乙腈+0.1%三氟乙酸,梯度:经20分钟10-100%B,接着在100%B保持5分钟;流速:1mL/min;检测:UV 220nm。

[0414] 通用程序:

[0415] Prelude方法A:

[0416] 所有操作在Prelude肽合成仪(Protein Technologies)上自动进行。除非指出,否则所有程序在装有底部玻璃料的10或45mL聚丙烯管中进行。管经由管的底部及顶部连接至Prelude肽合成仪。DMF及DCM可经由管的顶部添加,其均等地沿着管的侧壁冲下。其余试剂经由管的底部添加且向上穿过玻璃料以接触树脂。所有溶液经由管的底部除去。“周期性搅动”描述了经由底部玻璃料的短暂氮气脉冲;脉冲持续约5秒且每30秒进行一次。通常不使用制备超过三周的氨基酸溶液。DMF=二甲基甲酰胺;DIC=N,N'-二异丙基碳二亚胺;HOAt=1-羟基-7-氮杂苯并三唑;Sieber=Fmoc-氨基-夹氧杂蒽-3-基氧基,其中“3-基氧基”描述了与聚苯乙烯树脂连接的位置及类型。所用树脂为具有Sieber连接基(在氮处经Fmoc保护)的Merrifield聚合物(聚苯乙烯);100-200目,1%DVB,0.71mmol/g载量。所用常见氨基酸如下所列,其中侧链保护基示于括号内。

[0417] Fmoc-Ala-OH;Fmoc-Arg (Pbf) -OH;Fmoc-Asn (Trt) -OH;Fmoc-Asp (OtBu) -OH;Fmoc-Bzt-OH;Fmoc-Cys (Trt) -OH;Fmoc-Dab (Boc) -OH;Fmoc-Dap (Boc) -OH;Fmoc-Gln (Trt) -OH;Fmoc-Gly-OH;Fmoc-His (Trt) -OH;Fmoc-Hyp (tBu) -OH;Fmoc-Ile-OH;Fmoc-Leu-OH;Fmoc-Lys (Boc) -OH;Fmoc-Nle-OH;Fmoc-Met-OH;Fmoc-[N-Me]Ala-OH;Fmoc-[N-Me]Nle-OH;Fmoc-Phe-OH;Fmoc-Pro-OH;Fmoc-Sar-OH;Fmoc-Ser (tBu) -OH;Fmoc-Thr (tBu) -OH;Fmoc-Trp (Boc) -OH;Fmoc-Tyr (tBu) -OH;Fmoc-Val-OH。

[0418] “Prelude方法A”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至树脂的Sieber连接基的量来确定。该规模相当于约140mg上述Sieber-Merrifield树脂。所有程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。在氨基酸偶联前,所有肽合成顺序始于以下称为“树脂溶胀程序”的树脂溶胀程序。氨基酸与伯胺N末端的偶联使用下述“单一偶联程序”。Fmoc-N-甲基氨基酸的偶联及与仲胺N末端的偶联使用下述“仲胺偶联程序”。氯乙酰基与胺N末端的偶联参见下文详述的“氯乙酰氯偶联程序”或“氯乙酸偶联程序”。

[0419] 树脂溶胀程序:

[0420] 向40mL聚丙烯固相反应容器中添加Merrifield:Sieber树脂(140mg,0.100mmol)。树脂如下洗涤三次:向反应容器中添加DMF(5.0mL)及DCM(5.0mL),接着经由使氮气自反应

容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动10分钟,随后排出溶剂。

[0421] 单一偶联程序:

[0422] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物60秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸及HOAt的溶液 (0.2M于DMF中, 5.0mL, 10eq), 接着添加DIC (0.2M于DMF中, 5.0mL, 10eq)。周期性搅动混合物60分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加乙酸酐:DIEA:DMF的溶液 (10:1:89v/v/v, 5.0mL)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0423] 仲胺偶联程序:

[0424] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物60秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸及HOAt的溶液 (0.2M于DMF中, 5.0mL, 5eq), 接着添加DIC (0.2M于DMF中, 5.0mL, 5eq)。周期性搅动混合物300分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加乙酸酐:DIEA:DMF的溶液 (10:1:89v/v/v, 5.0mL)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0425] 氯乙酰氯偶联程序:

[0426] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加3.0mL DIPEA (4.0mmol, 0.699mL, 40eq) 及氯乙酰氯 (2.0mmol, 0.160mL, 20eq) 于DMF中的溶液。周期性搅动混合物12-18小时,接着排出溶液。树脂如下连续洗涤三次:对于每次洗涤,将DMF (4.0mL) 添加至容器的顶部且周期性搅动所得混合物90秒,随后排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,将DCM (4.0mL) 添加至容器的顶部且周期性搅动所得混合物90秒,随后排出溶液。

[0427] Prelude方法B:

[0428] 所有操作在Prelude肽合成仪 (Protein Technologies) 上自动进行。所有程序在装有底部玻璃料的10或45mL聚丙烯管中进行。DMF及DCM可经由管的顶部添加,其均等地沿着管的侧壁冲下。其余试剂经由管的底部添加且向上穿过玻璃料以接触树脂。所有溶液经

由管的底部除去。“周期性搅动”描述了经由底部玻璃料的短暂氮气脉冲；脉冲持续约5秒且每30秒进行一次。通常不使用制备超过三周的氨基酸溶液。DMF=二甲基甲酰胺；HCTU=2-(6-氯-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲脒鎓；DIPEA=二异丙基乙基胺；Sieber=Fmoc-氨基-夹氧杂蒽-3-基氧基，其中“3-基氧基”描述了与聚苯乙烯树脂连接的位置及类型。所用树脂为具有Sieber连接基(在氮处经Fmoc保护)的Merrifield聚合物(聚苯乙烯)；100-200目，1%DVB，0.71mmol/g载量。所用常见氨基酸如下所列，其中侧链保护基示于括号内。

[0429] Fmoc-Ala-OH；Fmoc-Arg (Pbf) -OH；Fmoc-Asn (Trt) -OH；Fmoc-Asp (OtBu) -OH；Fmoc-Bzt-OH；Fmoc-Cys (Trt) -OH；Fmoc-Dab (Boc) -OH；Fmoc-Dap (Boc) -OH；Fmoc-Gln (Trt) -OH；Fmoc-Gly-OH；Fmoc-His (Trt) -OH；Fmoc-Hyp (tBu) -OH；Fmoc-Ile-OH；Fmoc-Leu-OH；Fmoc-Lys (Boc) -OH；Fmoc-Nle-OH；Fmoc-Met-OH；Fmoc-[N-Me]Ala-OH；Fmoc-[N-Me]Nle-OH；Fmoc-Phe-OH；Fmoc-Pro-OH；Fmoc-Sar-OH；Fmoc-Ser (tBu) -OH；Fmoc-Thr (tBu) -OH；Fmoc-Trp (Boc) -OH；Fmoc-Tyr (tBu) -OH；Fmoc-Val-OH。

[0430] “Prelude方法B”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验，其中该规模通过结合至树脂的Sieber连接基的量来确定。该规模相当于约140mg上述Sieber-Merrifield树脂。所有程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。在氨基酸偶联前，所有肽合成顺序始于以下称为“树脂溶胀程序”的树脂溶胀程序。氨基酸与伯胺N末端的偶联使用下述“单一偶联程序”。氨基酸与仲胺N末端的偶联使用下述“仲胺偶联程序”。氯乙酰基与胺N末端的偶联参见下文详述的“氯乙酰氯偶联程序”或“氯乙酸偶联程序”。

[0431] 树脂溶胀程序：

[0432] 向40mL聚丙烯固相反应容器中添加Merrifield:Sieber树脂(140mg, 0.100mmol)。树脂如下洗涤(溶胀)三次：向反应容器中添加DMF(5.0mL)及DCM(5.0mL)，接着经由使氮气自反应容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动10分钟，随后经由玻璃料排出溶剂。

[0433] 单一偶联程序：

[0434] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次：对于每次洗涤，经由容器的顶部添加DMF(4.0mL)且周期性搅动所得混合物60秒，随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 5.0mL, 10eq)，接着添加HCTU(0.2M于DMF中, 5.0mL, 10eq)且最后添加DIPEA(0.8M于DMF中, 2.5mL, 20eq)。周期性搅动混合物30分钟，随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤四次：对于每次洗涤，经由容器的顶部添加DMF(4.0mL)且周期性搅动所得混合物30秒，随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加乙酸酐:DIEA:DMF的溶液(10:1:89v/v/v, 5.0mL)。将混合物周期性搅动10分钟，随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次：对于每次洗涤，经由容器的顶部添加DMF(4.0mL)且周期性搅动所得混合物90秒，随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0435] 双重偶联程序：

[0436] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次：对

于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物60秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸 (0.2M于DMF中,5.0mL,10eq),接着添加HCTU (0.2M于DMF中,5.0mL,10eq) 且最后添加DIPEA (0.8M于DMF中,2.5mL,20eq)。周期性搅动混合物15分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂用DMF (4.0mL) 经由容器的顶部连续洗涤3次且周期性搅动所得混合物60秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸 (0.2M于DMF中,5.0mL,10eq),接着添加HCTU (0.2M于DMF中,5.0mL,10eq) 且最后添加DIPEA (0.8M于DMF中,2.5mL,20eq)。周期性搅动混合物15分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0437] 仲胺偶联程序:

[0438] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v,5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v,5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸 (0.2M于DMF中,2.5mL,10eq),接着添加HCTU (0.2M于DMF中,2.5mL,10eq) 且最后添加NMM (0.8M于DMF中,1.5mL,12eq)。周期性搅动混合物12小时,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0439] 氯乙酰氯偶联程序A:

[0440] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v,5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v,5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加3.0mL DIPEA (4.0mmol,0.699mL,40eq) 及氯乙酰氯 (2.0mmol,0.160mL,20eq) 于DMF中的溶液。周期性搅动混合物12-18小时,接着经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤三次:对于每次洗涤,将DMF (4.0mL) 添加至容器的顶部且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,将CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0mL) 添加至容器的顶部且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。

[0441] 氯乙酸偶联程序B:

[0442] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v,5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v,5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加DMF (2.0mL)、氯乙酸 (1.2mmol,113mg,12eq) 及N,N'-二异丙基碳二亚胺 (1.2mmol,0.187mL,12eq)。周期性搅动混合物12-18小时,接着经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤三次:对于每次洗涤,将DMF (4.0mL) 添加至容器的顶部且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,

将CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0mL)添加至容器的顶部且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。

[0443] Prelude方法C:

[0444] 所有操作在Prelude肽合成仪 (Protein Technologies) 上自动进行。除非指出,否则所有程序在装有底部玻璃料的10或45mL聚丙烯管中进行。管经由管的底部及顶部连接至Prelude肽合成仪。DMF及DCM可经由管的顶部添加,其均等地沿着管的侧壁冲下。其余试剂经由管的底部添加且向上穿过玻璃料以接触树脂。所有溶液经由管的底部除去。“周期性搅动”描述了经由底部玻璃料的短暂氮气脉冲;脉冲持续约5秒且每30秒进行一次。通常不使用制备超过三周的氨基酸溶液。HATU溶液在制备后5天内使用。DMF=二甲基甲酰胺;HCTU=2-(6-氯-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲脒鎓;HATU=六氟磷酸1-[二(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物;DIPEA=二异丙基乙基胺;Sieber=Fmoc-氨基-夹氧杂蒽-3-基氧基,其中“3-基氧基”描述了与聚苯乙烯树脂连接的位置及类型。所用树脂为具有Sieber连接基(在氮处经Fmoc保护)的Merrifield聚合物(聚苯乙烯);100-200目,1%DVB,0.71mmol/g载量。所用常见氨基酸如下所列,其中侧链保护基示于括号内。

[0445] Fmoc-Ala-OH;Fmoc-Arg (Pbf) -OH;Fmoc-Asn (Trt) -OH;Fmoc-Asp (OtBu) -OH;Fmoc-Bzt-OH;Fmoc-Cys (Trt) -OH;Fmoc-Dab (Boc) -OH;Fmoc-Dap (Boc) -OH;Fmoc-Gln (Trt) -OH;Fmoc-Gly-OH;Fmoc-His (Trt) -OH;Fmoc-Hyp (tBu) -OH;Fmoc-Ile-OH;Fmoc-Leu-OH;Fmoc-Lys (Boc) -OH;Fmoc-Nle-OH;Fmoc-Met-OH;Fmoc-[N-Me]Ala-OH;Fmoc-[N-Me]Nle-OH;Fmoc-Phe-OH;Fmoc-Pro-OH;Fmoc-Sar-OH;Fmoc-Ser (tBu) -OH;Fmoc-Thr (tBu) -OH;Fmoc-Trp (Boc) -OH;Fmoc-Tyr (tBu) -OH;Fmoc-Val-OH。

[0446] “Prelude方法C”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至树脂的Sieber连接基的量来确定。该规模相当于约140mg上述Sieber-Merrifield树脂。所有程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。在氨基酸偶联前,所有肽合成顺序始于以下称为“树脂溶胀程序”的树脂溶胀程序。氨基酸与伯胺N末端的偶联使用下述“单一偶联程序”。氨基酸与仲胺N末端的偶联使用下述“仲胺偶联程序”。对树脂的最终洗涤使用下述“最终洗涤程序”。

[0447] 树脂溶胀程序:

[0448] 向40mL聚丙烯固相反应容器中添加Merrifield:Sieber树脂(140mg,0.100mmol)。树脂如下洗涤(溶胀)三次:向反应容器中添加DMF(5.0mL)及DCM(5.0mL),接着经由使氮气自反应容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出溶剂。

[0449] 单一偶联程序:

[0450] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v,5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v,5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF(4.0mL)且周期性搅动所得混合物60秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中,5.0mL,10eq),接着添加HATU(0.2M于DMF中,5.0mL,10eq)且最后添加DIPEA(0.8M于DMF中,2.5mL,20eq)。周期性搅动混合物60分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的

顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加乙酸酐:DIEA:DMF的溶液 (10:1:89v/v/v, 5.0mL)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0451] 仲胺偶联程序:

[0452] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸 (0.2M于DMF中, 2.5mL, 5eq), 接着添加HATU (0.2M于DMF中, 2.5mL, 5eq) 且最后添加DIPEA (0.8M于DMF中, 1.5mL, 12eq)。周期性搅动混合物300分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下洗涤两次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸 (0.2M于DMF中, 2.5mL, 5eq), 接着添加HATU (0.2M于DMF中, 2.5mL, 5eq) 且最后添加DIPEA (0.8M于DMF中, 1.5mL, 12eq)。周期性搅动混合物300分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下洗涤两次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加乙酸酐:DIEA:DMF的溶液 (10:1:89v/v/v, 5.0mL)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0453] 定制氨基酸偶联程序:

[0454] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸 (0.2M于DMF中, 0.5至2.5mL, 1至5eq), 接着添加HATU (0.2M于DMF中, 0.5至2.5mL, 1至5eq) 且最后添加DIPEA (0.8M于DMF中, 0.5至1.5mL, 4至12eq)。周期性搅动混合物60分钟至600分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下洗涤两次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (2.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加乙酸酐:DIEA:DMF的溶液 (10:1:89v/v/v, 5.0mL)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0455] 最终洗涤程序:

[0456] 树脂如下连续洗涤两次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DCM (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0457] 氯乙酸偶联程序:

[0458] 注意手动步骤。向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。将混合物在室温震荡5分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且搅动所得混合物,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加DMF (2.0mL)、氯乙酸 (1.2mmol, 113mg, 12eq) 及N,N'-二异丙基碳二亚胺 (1.2mmol, 0.187mL, 12eq)。将混合物在室温震荡12-18小时,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤三次:对于每次洗涤,将DMF (4.0mL) 添加至容器的顶部且搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,将CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.0mL) 添加至容器的顶部且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。

[0459] Prelude方法D:

[0460] 所有操作在Prelude肽合成仪 (Protein Technologies) 上自动进行。除非指出,否则所有程序在装有底部玻璃料的10或45mL聚丙烯管中进行。管经由管的底部及顶部连接至Prelude肽合成仪。DMF及DCM可经由管的顶部添加,其均等地沿着管的侧壁冲下。其余试剂经由管的底部添加且向上穿过玻璃料以接触树脂。所有溶液经由管的底部除去。“周期性搅动”描述了经由底部玻璃料的短暂氮气脉冲;脉冲持续约5秒且每30秒进行一次。通常不使用制备超过三周的氨基酸溶液。HATU溶液在制备后5天内使用。DMF=二甲基甲酰胺;HCTU=2-(6-氯-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲脲鎓;HATU=六氟磷酸1-[二(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物;DIPEA=二异丙基乙基胺;Sieber=Fmoc-氨基-夹氧杂蒽-3-基氧基,其中“3-基氧基”描述了与聚苯乙烯树脂连接的位置及类型。所用树脂为具有Sieber连接基(在氮处经Fmoc保护)的Merrifield聚合物(聚苯乙烯);100-200目,1%DVB,0.71mmol/g载量。所用常见氨基酸如下所列,其中侧链保护基示于括号内。

[0461] Fmoc-Ala-OH;Fmoc-Arg (Pbf)-OH;Fmoc-Asn (Trt)-OH;Fmoc-Asp (OtBu)-OH;Fmoc-Bzt-OH;Fmoc-Cys (Trt)-OH;Fmoc-Dab (Boc)-OH;Fmoc-Dap (Boc)-OH;Fmoc-Gln (Trt)-OH;Fmoc-Gly-OH;Fmoc-His (Trt)-OH;Fmoc-Hyp (tBu)-OH;Fmoc-Ile-OH;Fmoc-Leu-OH;Fmoc-Lys (Boc)-OH;Fmoc-Nle-OH;Fmoc-Met-OH;Fmoc-[N-Me]Ala-OH;Fmoc-[N-Me]Nle-OH;Fmoc-Phe-OH;Fmoc-Pro-OH;Fmoc-Sar-OH;Fmoc-Ser (tBu)-OH;Fmoc-Thr (tBu)-OH;Fmoc-Trp (Boc)-OH;Fmoc-Tyr (tBu)-OH;Fmoc-Val-OH。

[0462] “Prelude方法D”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至树脂的Sieber连接基的量来确定。该规模相当于约140mg上述Sieber-Merrifield树脂。所有程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。在氨基酸偶联前,所有肽合成顺序始于以下称为“树脂溶胀程序”的树脂溶胀程序。氨基酸与伯胺N末端的偶联使用下述“单一偶联程序”。氨基酸与仲胺N末端的偶联使用下述“仲胺偶联程序”。对树脂的最终洗涤使用下述“最终洗涤程序”。

[0463] 树脂溶胀程序:

[0464] 向40mL聚丙烯固相反应容器中添加Merrifield:Sieber树脂 (140mg, 0.100mmol)。树脂如下洗涤(溶胀)三次:向反应容器中添加DMF (5.0mL) 及DCM (5.0mL),接着经由使氮气自反应容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出溶剂。

[0465] 单一偶联程序:

[0466] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物60秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸 (0.2M于DMF中, 1.25mL, 2.5eq), 接着添加HATU (0.2M于DMF中, 1.25mL, 2.5eq) 且最后添加DIPEA (0.8M于DMF中, 0.75mL, 5eq)。周期性搅动混合物30分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加乙酸酐:DIEA:DMF的溶液 (10:1:89v/v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物15分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0467] 仲胺偶联程序:

[0468] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸 (0.2M于DMF中, 1.25mL, 2.5eq), 接着添加HATU (0.2M于DMF中, 1.25mL, 2.5eq) 且最后添加DIPEA (0.8M于DMF中, 0.75mL, 5eq)。周期性搅动混合物30分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下洗涤两次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸 (0.2M于DMF中, 1.25mL, 2.5eq), 接着添加HATU (0.2M于DMF中, 1.25mL, 2.5eq) 且最后添加DIPEA (0.8M于DMF中, 0.75mL, 5eq)。周期性搅动混合物30分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下洗涤两次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加乙酸酐:DIEA:DMF的溶液 (10:1:89v/v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物15分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下洗涤两次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加乙酸酐:DIEA:DMF的溶液 (10:1:89v/v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物15分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0469] 最终洗涤程序:

[0470] 树脂如下连续洗涤两次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DCM (4.0mL) 且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0471] 氯乙酸偶联程序:

[0472] 注意手动步骤。向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 5.0mL)。将混合物在室温震荡5分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五

次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (4.0mL) 且搅动所得混合物,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加DMF (2.0mL)、氯乙酸 (1.2mmol, 113mg, 12eq) 及N,N'-二异丙基碳二亚胺 (1.2mmol, 0.187mL, 12eq)。将混合物在室温震荡12-18小时,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤三次:对于每次洗涤,将DMF (4.0mL) 添加至容器的顶部且搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,将CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.0mL) 添加至容器的顶部且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。

[0473] CEM方法A:

[0474] 所有操作在CEM Liberty微波肽合成仪 (CEM Corporation) 上自动进行。除非指出,否则所有程序在装有底部玻璃料的与CEM Discovery微波单元连接的30或125mL聚丙烯管中进行。管经由管的底部及顶部连接至CEMLiberty合成仪。DMF及DCM可经由管的顶部及底部添加,其均等地沿着管的侧壁冲下。除了自顶部转移树脂时,所有溶液经由管的底部除去。“周期性鼓泡”描述了经由底部玻璃料的短暂氮气鼓泡。通常不使用制备超过三周的氨基酸溶液。HATU溶液在制备后5天内使用。DMF=二甲基甲酰胺;HCTU=2-(6-氯-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲脲鎓;HATU=六氟磷酸1-[二(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物;DIPEA=二异丙基乙基胺;Sieber=Fmoc-氨基-夹氧杂蒽-3-基氧基,其中“3-基氧基”描述了与聚苯乙烯树脂连接的位置及类型。所用树脂为具有Sieber连接基(在氮处经Fmoc保护)的Merrifield聚合物(聚苯乙烯);100-200目,1%DVB,0.71mmol/g载量。可在合成中使用其它常见树脂例如Rink、ChloroTrityl或其它酸敏感性连接基,除非在具体实施例中另有指出,否则使用Sieber酰胺树脂。所用常见氨基酸如下所列,其中侧链保护基示于括号内。

[0475] Fmoc-Ala-OH;Fmoc-Arg (Pbf) -OH;Fmoc-Asn (Trt) -OH;Fmoc-Asp (OtBu) -OH;Fmoc-Bzt-OH;Fmoc-Cys (Trt) -OH;Fmoc-Dab (Boc) -OH;Fmoc-Dap (Boc) -OH;Fmoc-Gln (Trt) -OH;Fmoc-Gly-OH;Fmoc-His (Trt) -OH;Fmoc-Hyp (tBu) -OH;Fmoc-Ile-OH;Fmoc-Leu-OH;Fmoc-Lys (Boc) -OH;Fmoc-Nle-OH;Fmoc-Met-OH;Fmoc-[N-Me]Ala-OH;Fmoc-[N-Me]Nle-OH;Fmoc-Orn (Boc) -OH;Fmoc-Phe-OH;Fmoc-Pro-OH;Fmoc-Sar-OH;Fmoc-Ser (tBu) -OH;Fmoc-Thr (tBu) -OH;Fmoc-Trp (Boc) -OH;Fmoc-Tyr (tBu) -OH;Fmoc-Val-OH。

[0476] “CEM方法A”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至树脂的Sieber连接基的量来确定。该规模相当于约140mg上述Sieber-Merrifield树脂。所有程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。在氨基酸偶联前,所有肽合成顺序始于以下称为“树脂溶胀程序”的树脂溶胀程序。氨基酸与伯胺N末端的偶联使用下述“单一偶联程序”。氨基酸与仲胺N末端的偶联使用下述“仲胺偶联程序”。氯乙酰基与胺N末端的偶联参见上文详述的“氯乙酰氯偶联程序”或“氯乙酸偶联程序”。

[0477] 树脂溶胀程序:

[0478] 向50mL聚丙烯锥形管中添加Merrifield:Sieber树脂(140mg,0.100mmol)。随后将DMF (7mL) 添加至管中,接着添加DCM (7mL)。接着将树脂自容器的顶部转移至反应容器。将程序再重复两次。添加DMF (7mL),接着添加DCM (7mL)。经由使氮气自反应容器的底部鼓泡使树脂溶胀15分钟,随后经由玻璃料排出溶剂。

[0479] 标准偶联程序:

[0480] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF的溶液(20:80v/v,

5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF的溶液(20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤三次:用DMF(7mL)自顶部洗涤,接着用DMF(7mL)自底部洗涤且最后用DMF(7mL)自顶部洗涤。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 2.5mL, 5eq)、HATU(0.5M于DMF中, 1.0mL, 5eq)及DIPEA(2M于NMP中, 0.5mL, 10eq)。除了在50℃偶联的Fmoc-Cys(Trt)-OH及Fmoc-His(Trt)-OH,所有氨基酸的混合物通过在75℃将氮气鼓泡5分钟来混合,经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤三次:用DMF(7mL)自顶部洗涤,接着用DMF(7mL)自底部洗涤且最后用DMF(7mL)自顶部洗涤。向反应容器中添加乙酸酐:DIEA:DMF的溶液(10:1:89v/v/v, 5.0mL)。将混合物在65℃周期性鼓泡2分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤三次:用DMF(7mL)自顶部洗涤,接着用DMF(7mL)自底部洗涤且最后用DMF(7mL)自顶部洗涤。所得树脂直接用于下一步。

[0481] 双重偶联程序:

[0482] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF的溶液(20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF的溶液(20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤三次:用DMF(7mL)自顶部洗涤,接着用DMF(7mL)自底部洗涤且最后用DMF(7mL)自顶部洗涤。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 2.5mL, 5eq)、HATU(0.5M于DMF中, 1.0mL, 5eq)及DIPEA(2M于NMP中, 0.5mL, 10eq)。除了在50℃偶联的Fmoc-Cys(Trt)-OH及Fmoc-His(Trt)-OH,所有氨基酸的混合物通过在75℃将氮气鼓泡5分钟来混合,经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤三次:用DMF(7mL)自顶部洗涤,接着用DMF(7mL)自底部洗涤且最后用DMF(7mL)自顶部洗涤。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 2.5mL, 5eq)、HATU(0.5M于DMF中, 1.0mL, 5eq)及DIPEA(2M于NMP中, 0.5mL, 10eq)。除了在50℃偶联的Fmoc-Cys(Trt)-OH及Fmoc-His(Trt)-OH,所有氨基酸的混合物通过在75℃将氮气鼓泡5分钟来混合,经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤三次:用DMF(7mL)自顶部洗涤,接着用DMF(7mL)自底部洗涤且最后用DMF(7mL)自顶部洗涤。向反应容器中添加乙酸酐:DIEA:DMF的溶液(10:1:89v/v/v, 5.0mL)。将混合物在65℃周期性鼓泡2分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤三次:用DMF(7mL)自顶部洗涤,接着用DMF(7mL)自底部洗涤且最后用DMF(7mL)自顶部洗涤。所得树脂直接用于下一步。

[0483] 仲胺偶联程序:

[0484] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加5%哌啶及0.1M HOBt于DMF(7mL)中的溶液。将混合物在75℃周期性搅动3分钟且随后排出溶液。将该程序再重复一次。树脂如下连续洗涤三次:用DMF(7mL)自顶部洗涤,接着用DMF(7mL)自底部洗涤且最后用DMF(7mL)自顶部洗涤。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 2.5mL, 5eq)、HCTU(0.5M于DMF中, 1.0mL, 5eq)及DIPEA(2M于NMP中, 0.5mL, 10eq)。所有氨基酸的混合物通过在75℃将氮气鼓泡5分钟来混合(就Fmoc-Cys(Trt)-OH及Fmoc-His(Trt)-OH而言为50℃),接着在不加热的情况下混合6小时。在排出后,树脂如下连续洗涤三次:用DMF(7mL)自顶部洗涤,接着用DMF(7mL)自底部洗涤且最后用DMF(7mL)自顶部洗涤。向反应容器中添加乙酸酐:DIEA:DMF的溶液(10:1:89v/v/v, 5.0mL)。将混合物在65℃周期性鼓泡2分钟,随后排出溶液。树脂如下连续洗涤三次:用DMF(7mL)自顶部洗涤,接着用DMF(7mL)自底部洗涤且最后用DMF(7mL)

自顶部洗涤。所得树脂直接用于下一步。

[0485] 定制氨基酸偶联程序：

[0486] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶：DMF的溶液(20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶：DMF的溶液(20:80v/v, 5.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤三次：用DMF(7mL)自顶部洗涤，接着用DMF(7mL)自底部洗涤且最后用DMF(7mL)自顶部洗涤。向反应容器中添加含有HATU(2.5eq至10eq)的氨基酸溶液(1.25mL至5mL, 2.5eq至10eq)且最后添加DIPEA(2M于NMP中, 0.5mL至1mL, 20eq)。混合物通过在25°C至75°C将氮气鼓泡5分钟至2小时来混合，随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤三次：用DMF(7mL)自顶部洗涤，接着用DMF(7mL)自底部洗涤且最后用DMF(7mL)自顶部洗涤。向反应容器中添加乙酸酐：DIEA：DMF的溶液(10:1:89v/v/v, 5.0mL)。将混合物在65°C周期性鼓泡2分钟，随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤三次：用DMF(7mL)自顶部洗涤，接着用DMF(7mL)自底部洗涤且最后用DMF(7mL)自顶部洗涤。所得树脂直接用于下一步。

[0487] Symphony方法A：

[0488] 所有操作在Symphony肽合成仪(Protein Technologies)上自动进行。除非指出，否则所有程序在装有底部玻璃料的Symphony聚丙烯管中进行。管经由管的底部及顶部连接至Symphony肽合成仪。所有溶剂、DMF、DCM、氨基酸及试剂经由管的底部添加且向上穿过玻璃料以接触树脂。所有溶液经由管的底部除去。“周期性搅动”描述了经由底部玻璃料的短暂氮气脉冲；脉冲持续约5秒且每15秒进行一次。通常不使用制备超过三周的氨基酸溶液。HATU溶液在制备后5天内使用。DMF=二甲基甲酰胺；HCTU=2-(6-氯-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲脲鎓；HATU=六氟磷酸1-[二(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物；NMM=N-甲基吗啉；DIPEA=二异丙基乙基胺；Sieber=Fmoc-氨基-夹氧杂蒽-3-基氧基，其中“3-基氧基”描述了与聚苯乙烯树脂连接的位置及类型。所用树脂为具有Sieber连接基(在氮处经Fmoc保护)的Merrifield聚合物(聚苯乙烯)；100-200目，1% DVB, 0.71mmol/g载量。其它常见酸敏感性树脂亦可用于合成，例如Rink或官能化氯三苯甲基树脂。所用常见氨基酸如下所列，其中侧链保护基示于括号内。

[0489] Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH。

[0490] “Symphony方法A”的程序描述了以0.050mmol规模进行的实验，其中该规模通过结合至树脂的Sieber连接基的量来确定。该规模相当于约70mg上述Sieber-Merrifield树脂。所有程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.050mmol规模。在氨基酸偶联前，所有肽合成顺序始于以下称为“溶胀程序”的树脂溶胀程序。氨基酸与伯胺N末端的偶联使用下述“标准偶联程序”。氨基酸与仲胺N末端的偶联使用“双重偶联”，定制氨基酸通过手动Blank添加即下述氨基酸“Blank偶联”来偶联。

[0491] 溶胀程序：

[0492] 向Symphony聚丙烯固相反应容器中添加Merrifield:Sieber树脂(70mg, 0.050mmol)。树脂如下洗涤(溶胀)三次:向反应容器中添加DMF(2.5mL),接着经由使氮气自反应容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出溶剂。向反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v, 2.5mL)。周期性搅动混合物2.5分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤六次:对于每次洗涤,经由容器的底部添加DMF(2.5mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq),接着添加HATU(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq)且最后添加NMM(0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂用经由容器的底部添加的DMF(6.25mL)洗涤且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq),接着添加HATU(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq)且最后添加NMM(0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下洗涤三次:向反应容器中添加DMF(2.5mL),接着经由使氮气自反应容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动30秒,随后经由玻璃料排出溶剂。所得树脂直接用于下一步。

[0493] 标准偶联程序:

[0494] 树脂如下洗涤三次:向反应容器中添加DMF(2.5mL),接着经由使氮气自反应容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动30秒,随后经由玻璃料排出溶剂。向反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v, 2.5mL)。周期性搅动混合物2.5分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下洗涤六次:对于每次洗涤,经由容器的底部添加DMF(2.5mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq),接着添加HATU(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq)且最后添加NMM(0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂用经由容器的底部添加的DMF(6.25mL)洗涤且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq),接着添加HATU(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq)且最后添加NMM(0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤三次:对于每次洗涤,经由容器的底部添加DMF(2.5mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0495] 仲胺偶联程序:

[0496] 树脂如下洗涤三次:向反应容器中添加DMF(2.5mL),接着经由使氮气自反应容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动30秒,随后经由玻璃料排出溶剂。向反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v, 2.5mL)。周期性搅动混合物2.5分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下洗涤六次:对于每次洗涤,经由容器的底部添加DMF(2.5mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq),接着添加HATU(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq)且最后添加NMM(0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。周期性搅动混合物300分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂用经由容器的底部添加的DMF(6.25mL)洗涤且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq),接着添加HATU(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq)且最后添加NMM(0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。周期性搅动混合物300分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤三次:对于每次洗涤,经由容器的底部添加DMF(2.5mL)且周期性搅

动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0497] 定制氨基酸偶联程序:

[0498] 树脂如下洗涤三次:向反应容器中添加DMF (2.5mL),接着经由使氮气自反应容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动30秒,随后经由玻璃料排出溶剂。向反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 2.5mL)。周期性搅动混合物2.5分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下洗涤6次:对于每次洗涤,经由容器的底部添加DMF (2.5mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。通过Symphony软件暂停合成以将定制氨基酸 (0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq) 手动添加至反应容器中,随后重启自动化以添加HATU (0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq)且最后添加NMM (0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。周期性搅动混合物300分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下洗涤六次:经由容器的底部添加DMF (2.5mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/DMF (v/v/v 1:1:3, 2.5mL),将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤三次:对于每次洗涤,经由容器的底部添加DMF (2.5mL)且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0499] Symphony方法B:

[0500] 所有操作在Symphony肽合成仪 (Protein Technologies) 上自动进行。除非指出,否则所有程序在装有底部玻璃料的Symphony聚丙烯管中进行。管经由管的底部及顶部连接至Symphony肽合成仪。所有溶剂、DMF、DCM、氨基酸及试剂经由管的底部添加且向上穿过玻璃料以接触树脂。所有溶液经由管的底部除去。“周期性搅动”描述了经由底部玻璃料的短暂氮气脉冲;脉冲持续约5秒且每15秒进行一次。通常不使用制备超过三周的氨基酸溶液。HATU溶液在制备后5天内使用。DMF=二甲基甲酰胺;HCTU=2-(6-氯-1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲脒鎓;HATU=六氟磷酸1-[二(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物;NMM=N-甲基吗啉;DIPEA=二异丙基乙基胺;Sieber=Fmoc-氨基-夹氧杂蒽-3-基氧基,其中“3-基氧基”描述了与聚苯乙烯树脂连接的位置及类型。所用树脂为具有Sieber连接基(在氮处经Fmoc保护)的Merrifield聚合物(聚苯乙烯);100-200目,1% DVB,0.71mmol/g载量。其它常见酸敏感性树脂亦可用于合成,例如Rink或官能化氯三苯甲基树脂。所用常见氨基酸如下所列,其中侧链保护基示于括号内。

[0501] Fmoc-Ala-OH;Fmoc-Arg (Pbf)-OH;Fmoc-Asn (Trt)-OH;Fmoc-Asp (OtBu)-OH;Fmoc-Bzt-OH;Fmoc-Cys (Trt)-OH;Fmoc-Dab (Boc)-OH;Fmoc-Dap (Boc)-OH;Fmoc-Gln (Trt)-OH;Fmoc-Gly-OH;Fmoc-His (Trt)-OH;Fmoc-Hyp (tBu)-OH;Fmoc-Ile-OH;Fmoc-Leu-OH;Fmoc-Lys (Boc)-OH;Fmoc-Nle-OH;Fmoc-Met-OH;Fmoc-[N-Me]Ala-OH;Fmoc-[N-Me]Nle-OH;Fmoc-Phe-OH;Fmoc-Pro-OH;Fmoc-Sar-OH;Fmoc-Ser (tBu)-OH;Fmoc-Thr (tBu)-OH;Fmoc-Trp (Boc)-OH;Fmoc-Tyr (tBu)-OH;Fmoc-Val-OH。

[0502] “Symphony方法B”的程序描述了以0.050mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至树脂的Sieber连接基的量来确定。该规模相当于约70mg上述Sieber-Merrifield树脂。所有程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.050mmol规模。在氨基酸偶联前,所有肽合成顺序始于以下称为“溶胀程序”的树脂溶胀程序。氨基酸与伯胺N末端的偶联使用下述“标准偶联程序”。氨基酸与仲胺N末端的偶联使用“仲胺偶联程序B”,定制氨基酸通过手动Blank添加即下述氨基酸“定制氨基酸偶联程序”来偶联且氯乙酸酐使用下述

“最终封端程序”添加至序列的最终位置。

[0503] 溶胀程序:

[0504] 向Symphony聚丙烯固相反应容器中添加Merrifield:Sieber树脂(70mg, 0.050mmol)。树脂如下洗涤(溶胀)三次:向反应容器中添加DMF(2.5mL),接着经由使氮气自反应容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出溶剂。向反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v, 2.5mL)。周期性搅动混合物2.5分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤六次:对于每次洗涤,经由容器的底部添加DMF(2.5mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq),接着添加HATU(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq)且最后添加NMM(0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂用经由容器的底部添加的DMF(6.25mL)洗涤且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq),接着添加HATU(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq)且最后添加NMM(0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下洗涤三次:向反应容器中添加DMF(2.5mL),接着经由使氮气自反应容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动30秒,随后经由玻璃料排出溶剂。所得树脂直接用于下一步。

[0505] 标准偶联程序:

[0506] 树脂如下洗涤三次:向反应容器中添加DMF(2.5mL),接着经由使氮气自反应容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动30秒,随后经由玻璃料排出溶剂。向反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v, 2.5mL)。周期性搅动混合物2.5分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下洗涤六次:对于每次洗涤,经由容器的底部添加DMF(2.5mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq),接着添加HATU(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq)且最后添加NMM(0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。周期性搅动混合物15分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下洗涤六次:经由容器的底部添加DMF(2.5mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/DMF(v/v/v 1:1:3 2.5mL),将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤六次:对于每次洗涤,经由容器的底部添加DMF(2.5mL)且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0507] 仲胺偶联程序:

[0508] 树脂如下洗涤三次:向反应容器中添加DMF(2.5mL),接着经由使氮气自反应容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动30秒,随后经由玻璃料排出溶剂。向反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v, 2.5mL)。周期性搅动混合物2.5分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下洗涤六次:对于每次洗涤,经由容器的底部添加DMF(2.5mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq),接着添加HATU(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq)且最后添加NMM(0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。周期性搅动混合物15分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂用经由容器的底部添加的DMF(6.25mL)洗涤且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq),接着添加HATU(0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq)且最后添加NMM(0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。周期性搅动混合物15分钟,随后经由玻璃料排出反应

溶液。树脂如下连续洗涤三次：对于每次洗涤，经由容器的底部添加DMF (2.5mL) 且周期性搅动所得混合物30秒，随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/DMF (v/v/v 1:1:3 2.5mL)，将混合物周期性搅动10分钟，随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤六次：对于每次洗涤，经由容器的底部添加DMF (2.5mL) 且周期性搅动所得混合物90秒，随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0509] 定制氨基酸偶联程序：

[0510] 树脂如下洗涤三次：向反应容器中添加DMF (2.5mL)，接着经由使氮气自反应容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动30秒，随后经由玻璃料排出溶剂。向反应容器中添加哌啶：DMF (20:80v/v, 2.5mL)。周期性搅动混合物2.5分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下洗涤六次：对于每次洗涤，经由容器的底部添加DMF (2.5mL) 且周期性搅动所得混合物30秒，随后经由玻璃料排出溶液。将系统暂停以将定制氨基酸 (0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq) 手动添加至反应容器中，随后重启自动化以向反应容器中添加HATU (0.2M于DMF中, 1.25mL, 5eq) 且最后添加NMM (0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。周期性搅动混合物15分钟，随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下洗涤六次：经由容器的底部添加DMF (2.5mL) 且周期性搅动所得混合物30秒，随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/DMF (v/v/v 1:1:32.5mL)，将混合物周期性搅动10分钟，随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤六次：对于每次洗涤，经由容器的底部添加DMF (2.5mL) 且周期性搅动所得混合物90秒，随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0511] 最终封端程序：

[0512] 树脂如下洗涤三次：向反应容器中添加DMF (2.5mL)，接着经由使氮气自反应容器的底部鼓泡将混合物周期性搅动30秒，随后经由玻璃料排出溶剂。向反应容器中添加哌啶：DMF (20:80v/v, 2.5mL)。周期性搅动混合物2.5分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下洗涤六次：对于每次洗涤，经由容器的底部添加DMF (2.5mL) 且周期性搅动所得混合物30秒，随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加NMM (0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)，接着添加氯乙酸酐 (0.4M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。周期性搅动混合物15分钟，随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂用经由容器的底部添加的DMF (6.25mL) 洗涤且周期性搅动所得混合物30秒，随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加NMM (0.8M于DMF中, 1.25mL, 10eq)，接着添加氯乙酸酐 (0.4M于DMF中, 1.25mL, 10eq)。周期性搅动混合物15分钟，随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下洗涤六次：经由容器的底部添加DMF (2.5mL) 且周期性搅动所得混合物30秒，随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加Ac<sub>2</sub>O/DIPEA/DMF (v/v/v 1:1:3 2.5mL)，将混合物周期性搅动10分钟，随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤六次：对于每次洗涤，经由容器的底部添加DMF (2.5mL) 且周期性搅动所得混合物30秒，随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次：对于每次洗涤，经由容器的底部添加DCM (2.5mL) 且周期性搅动所得混合物30秒，随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂随后用氮气气流干燥10分钟。

[0513] 整体脱保护方法A：

[0514] 除非另外指出，否则手动进行所有操作。“整体脱保护方法A”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验，其中该规模通过结合至树脂的Sieber连接基的量来确定。程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。使用三氟乙酸：水：三异丙基硅烷：二硫苏糖醇 (92.5:2.5:2.5:2.5v:v:v:w) 制备“脱保护溶液”。树脂自反应容器

取出且转移至装有玻璃料的25mL注射器中。向注射器中添加“脱保护溶液”(5.0mL)。将混合物在震荡器中混合85分钟。将溶液过滤,浓缩且稀释于乙醚(30mL)中。将析出的固体离心3分钟。倾析上清溶液且将固体重新悬浮于乙醚(25mL)中。将悬浮液离心3分钟。倾析上清液且将剩余固体悬浮于乙醚(25mL)中。将悬浮液离心3分钟。倾析上清液且将剩余固体在高真空下干燥。获得呈白色至灰白色固体状的粗肽。

[0515] 整体脱保护方法B:

[0516] 除非另外指出,否则手动进行所有操作。“整体脱保护方法B”的程序描述了以0.04mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至树脂的Sieber连接基的量来确定。程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.04mmol规模。使用三氟乙酸:三异丙基硅烷(96:4;v:v)制备“脱保护溶液”。树脂自反应容器取出且转移至装有玻璃料的10mL注射器中。向注射器中添加“脱保护溶液”(2.0-3.0mL)。将混合物在震荡器中混合1小时或1.5小时。将溶液过滤,用脱保护溶液(0.5mL)洗涤,浓缩且稀释于乙醚(30mL)中。将析出的固体离心3分钟。倾析上清溶液且将固体重新悬浮于乙醚(25mL)中。将悬浮液离心3分钟。倾析上清液且将剩余固体悬浮于乙醚(25mL)中。将悬浮液离心3分钟。倾析上清液且将剩余固体在高真空下干燥。获得呈白色至灰白色固体状的粗肽。

[0517] 整体脱保护方法C:

[0518] 除非另外指出,否则手动进行所有操作。“整体脱保护方法C”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至树脂的Sieber连接基的量来确定。程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。使用三氟乙酸:三异丙基硅烷:二硫苏糖醇(95:2.5:2.5v:v:w)制备“脱保护溶液”。树脂自反应容器取出且转移至Bio-Rad管中。向Bio-Rad管中添加“脱保护溶液”(4.0mL)。将混合物在震荡器中混合60分钟。将溶液过滤且稀释于乙醚(30mL)中。将析出的固体离心3分钟。倾析上清溶液且将固体重新悬浮于乙醚(25mL)中。将悬浮液离心3分钟。倾析上清液且将剩余固体悬浮于乙醚(25mL)中。将悬浮液离心3分钟。倾析上清液且将剩余固体在高真空下干燥。获得呈白色至灰白色固体状的粗肽。

[0519] 整体脱保护方法D:

[0520] 除非另外指出,否则手动进行所有操作。“整体脱保护方法B”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至树脂的Sieber连接基的量来确定。程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。使用三氟乙酸:三异丙基硅烷:二硫苏糖醇(94:3:3v:v:w)制备“脱保护溶液”。树脂自反应容器取出且转移至装有玻璃料的25mL注射器中。向注射器中添加“脱保护溶液”(5.0mL)。将混合物在震荡器中混合5分钟。将溶液过滤且稀释于乙醚(30mL)中。将析出的固体离心3分钟。倾析上清溶液且将固体重新悬浮于乙醚(25mL)中。将悬浮液离心3分钟。倾析上清液且将剩余固体悬浮于乙醚(25mL)中。将悬浮液离心3分钟。倾析上清液且将剩余固体在高真空下干燥。获得呈白色至灰白色固体状的粗肽。

[0521] 整体脱保护方法E:

[0522] 除非另外指出,否则手动进行所有操作。“整体脱保护方法E”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至树脂的FmocGly-C1Trt连接基的量来确定。程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。使用三氟乙

酸:三异丙基硅烷:二硫苏糖醇(95:2.5:2.5v:v:w)制备“脱保护溶液”。树脂自反应容器取出且转移至Bio-Rad管中。向Bio-Rad管中添加“脱保护溶液”(2.0mL)。将混合物在震荡器中混合3分钟。将溶液过滤且收集于离心管中。向Bio-Rad管中添加“脱保护溶液”(2.0mL)。将混合物在震荡器中混合3分钟。将溶液过滤且收集于离心管中。向Bio-Rad管中添加“脱保护溶液”(2.0mL)。将混合物在震荡器中混合3分钟。将溶液过滤且收集于离心管中。使离心管中的溶液静置60分钟。随后用乙醚(30mL)稀释所收集的溶液且形成析出物。将析出的固体离心3分钟。倾析上清溶液且将固体重新悬浮于乙醚(25mL)中。将悬浮液离心3分钟。倾析上清液且将剩余固体悬浮于乙醚(25mL)中。将悬浮液离心3分钟。倾析上清液且将剩余固体在高真空下干燥。获得呈白色至灰白色固体状的粗肽。

[0523] 整体脱保护方法F:

[0524] 除非另外指出,否则手动进行所有操作。“整体脱保护方法F”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至树脂的Rink连接基的量来确定。程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。使用三氟乙酸:三异丙基硅烷:二硫苏糖醇(95:2.5:2.5v:v:w)制备“脱保护溶液”。树脂自反应容器取出且转移至6ml Bio-Rad管中。向Bio-Rad管中添加“脱保护溶液”(4.0mL)。将混合物在震荡器中混合90分钟。将溶液过滤且稀释于乙醚(30mL)中。将析出的固体离心3分钟。倾析上清溶液且将固体重新悬浮于乙醚(25mL)中。将悬浮液离心3分钟。倾析上清液且将剩余固体悬浮于乙醚(25mL)中。将悬浮液离心3分钟。倾析上清液且将剩余固体在高真空下干燥。获得呈白色至灰白色固体状的粗肽。

[0525] 环化方法A:

[0526] 除非另外指出,否则手动进行所有操作。“环化方法A”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至用于生成肽的树脂的Sieber连接基的量来确定。该规模不是基于直接确定程序所使用的肽的量。程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。将粗肽固体溶解于乙腈:8M胍/50mM TRIS水溶液(1:3)(pH 8.6)(7mL:18mL或类似比例)的溶液中且随后按需使用NaOH水溶液(1.0M)调节溶液至pH=8.5-9.0。溶液接着使用震荡器混合12-18小时。浓缩反应溶液且随后将残余物溶解于乙腈:水中。对该溶液进行反相HPLC纯化,得到所需环状肽。

[0527] 环化方法C:

[0528] 除非另外指出,否则手动进行所有操作。“环化方法C”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至用于生成肽的树脂的Sieber连接基的量来确定。该规模不是基于直接确定程序所使用的肽的量。程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。将粗肽固体溶解于乙腈:0.1M碳酸氢铵水性缓冲液(11mL:24mL或类似比例)的溶液中且随后使用NaOH水溶液(1.0M)将溶液小心地调节至pH=8.5-9.0。溶液接着使用震荡器混合12-18小时。浓缩反应溶液且随后将残余物溶解于乙腈:水中。对该溶液进行反相HPLC纯化,得到所需环状肽。

[0529] 环化方法D:

[0530] 除非另外指出,否则手动进行所有操作。“环化方法D”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至用于生成肽的树脂的Sieber连接基的量来确定。该规模不是基于直接确定程序所使用的肽的量。程序可通过以所述规模的倍数调整所述体

积而放大超过0.100mmol规模。将粗肽固体溶解于乙腈:0.1M碳酸氢铵水性缓冲液(11mL:24mL)的溶液中且随后使用NaOH水溶液(1.0M)将溶液小心地调节至pH=8.5-9.0。随后溶液在搅拌下混合12-18小时。浓缩反应溶液且随后将残余物溶解于乙腈:水中。对该溶液进行反相HPLC纯化,得到所需环状肽。

[0531] 环化方法E:

[0532] 除非另外指出,否则手动进行所有操作。“环化方法E”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至用于生成肽的树脂的Sieber连接基的量来确定。该规模不是基于直接确定程序所使用的肽的量。程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。将粗肽固体溶解于6M盐酸胍缓冲水溶液(15mL)中,随后溶液在搅拌下混合12-18小时。浓缩反应溶液且将15mL DMSO添加至残余物中,得到浆液,将其过滤。对该过滤的溶液进行反相HPLC纯化,得到所需环状肽。

[0533] 手动偶联程序A:

[0534] 向含有来自先前步骤的树脂的Bio-Rad反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v, 5.0mL)。周期性震荡混合物5分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤五次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF(4.0mL)且震荡所得混合物60秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(1.2-10当量)(典型为(0.2M于DMF中,2.5mL,5eq)),随后添加HATU(1.2-10当量)(典型为(0.2M于DMF中,2.5mL,5eq))且最后添加DIPEA(2.4-20当量)(典型为(0.8M于DMF中,1.25mL,10eq))。将混合物震荡60分钟至18小时,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF(4.0mL)且震荡所得混合物60秒,随后经由玻璃料排出溶液。

[0535] 树脂上N-甲基化方法A(Turner, R.A.; Hauksson, N.E.; Gipe, J.H.; Lokey, R.S. *Org. Lett.* 2013, 15 (19), 5012-5015):

[0536] 除非指出,否则手动进行所有操作。“树脂上N-甲基化方法A”的程序描述了以0.100mmol规模进行的实验,其中该规模通过结合至用于生成肽的树脂的Sieber连接基的量来确定。该规模不是基于直接确定程序所使用的肽的量。程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。

[0537] 将树脂转移至25mL烧结注射器中。向树脂中添加哌啶:DMF(20:80v/v, 5.0mL)。震荡混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂用DMF(4.0mL)洗涤3次。向反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v, 4.0mL)。震荡混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂先后用DMF(4.0mL)洗涤三次且用DCM(4.0mL)洗涤三次。将树脂悬浮于DMF(2.0mL)及三氟乙酸乙酯(0.119mL, 1.00mmol)、1,8-二氮杂二环[5.4.0]十一碳-7-烯(0.181mL, 1.20mmol)中。将混合物置于震荡器上60分钟。经由玻璃料排出溶液。树脂先后用DMF(4.0mL)洗涤三次且用DCM(4.0mL)洗涤三次。

[0538] 树脂用无水THF(2.0mL)洗涤三次以除去任何残余水。在经烘箱干燥的4.0mL小瓶中添加THF(1.0mL)及无水4Å分子筛(20mg)上的三苯基膦(131mg, 0.500mmol)。将溶液转移至树脂且缓慢添加偶氮二甲酸二异丙酯(0.097mL, 0.5mmol)。搅拌树脂15分钟。经由玻璃料排出溶液且树脂用无水THF(2.0mL)洗涤三次以除去任何残余水。在经烘箱干燥的4.0mL小瓶中添加THF(1.0mL)、无水4Å分子筛(20mg)上的三苯基膦(131mg, 0.500mmol)。将溶液转移至树脂且缓慢添加偶氮二甲酸二异丙酯(0.097mL, 0.5mmol)。搅拌树脂15分钟。经由玻璃

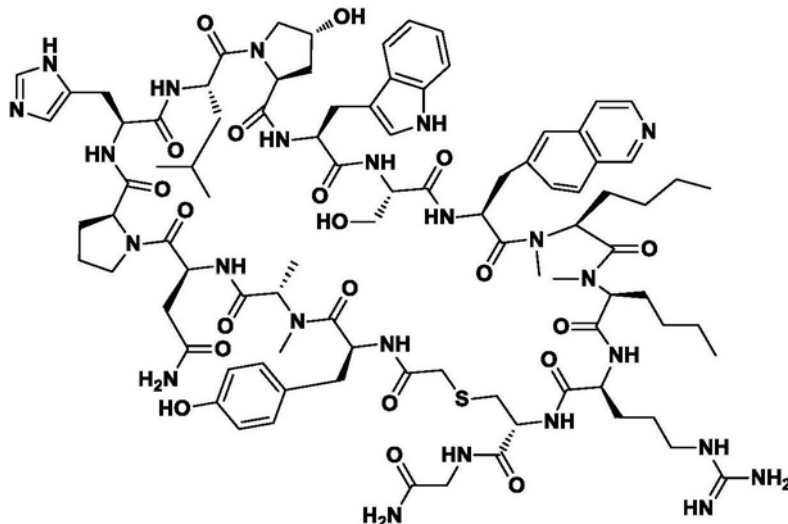
料排出溶液。树脂先后用DMF (4.0mL) 洗涤三次且用DCM (4.0mL) 洗涤三次。将树脂悬浮于乙醇 (1.0mL) 及THF (1.0mL) 中且添加硼氢化钠 (37.8mg, 1.000mmol)。将混合物搅拌30分钟且排出。树脂先后用DMF (4.0mL) 洗涤三次且用DCM (4.0mL) 洗涤三次。

[0539] 微裂解A:

[0540] 向<10mg的小份树脂样品中添加2滴TIS及1mL三氟乙酸, 在室温震荡。1小时后, 取出小份等分试样且用0.5mL乙腈稀释, 过滤且通过LC-MS分析。

[0541] 实施例0001的制备

[0542]



[0543] 实施例0001在Rink酰胺树脂上使用以下合成顺序制备:

[0544] “Symphony方法B:树脂溶胀程序”,

[0545] Fmoc-甘氨酸-OH:“Symphony方法B:标准偶联程序”,

[0546] Fmoc-胱氨酸 (Trt)-OH:“Symphony方法B:标准偶联程序”,

[0547] Fmoc-精氨酸 (Pfp)-OH:“Symphony方法B:仲胺偶联程序”,

[0548] Fmoc-N-甲基正亮氨酸:“Symphony方法B:仲胺偶联程序”,

[0549] Fmoc-N-甲基正亮氨酸:“Symphony方法B:仲胺偶联程序”,

[0550] (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(异喹啉-7-基)丙酸:“手动偶联程序A”,

[0551] Fmoc-丝氨酸 (OtBu)-OH:“Symphony方法B:标准偶联程序”,

[0552] Fmoc-色氨酸 (Boc)-OH:“Symphony方法B:标准偶联程序”,

[0553] Fmoc-反式-羟脯氨酸 (tBu)-OH:“Symphony方法B:标准偶联程序”,

[0554] Fmoc-亮氨酸-OH:“Symphony方法B:仲胺偶联程序”,

[0555] Fmoc-组氨酸-OH:“Symphony方法B:标准偶联程序”,

[0556] Fmoc-脯氨酸-OH:“Symphony方法B:标准偶联程序”,

[0557] Fmoc-天冬酰胺-OH:“Symphony方法B:仲胺偶联程序”,

[0558] Fmoc-N-甲基-丙氨酸-OH:“Symphony方法B:标准偶联程序”,

[0559] Fmoc-酪氨酸 (OtBu)-OH:“Symphony方法B:仲胺偶联程序”,

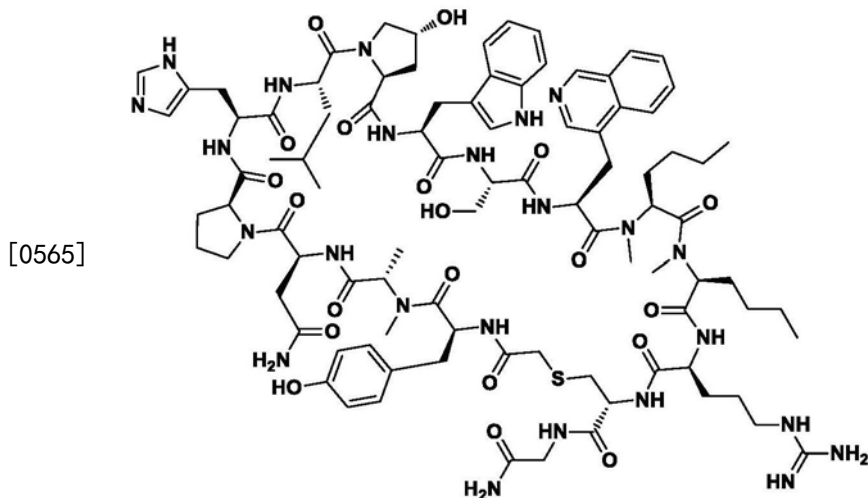
[0560] “Symphony方法B:最终封端程序”,

[0561] “整体脱保护方法D”,

[0562] “环化方法D”。

[0563] 粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化:柱:Waters XBridge C18,19×250mm,5 μm颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;梯度:经25分钟10-65%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化:柱:XBridge C18,19×250mm,5 μm颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+0.1%三氟乙酸;流动相B:95:5乙腈:水+0.1%三氟乙酸;梯度:经25分钟0-50%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为1.2mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为93%。分析型LCMS条件D:保留时间=1.32min;ESI-MS(+) m/z 961.8 (M+2H)。分析型LCMS条件E:保留时间=1.10min;ESI-MS(+) m/z 961.7 (M+2H)。ESI-HRMS(+) m/z:计算值:962.9380 (M+2H);实验值:962.9370 (M+2H)。

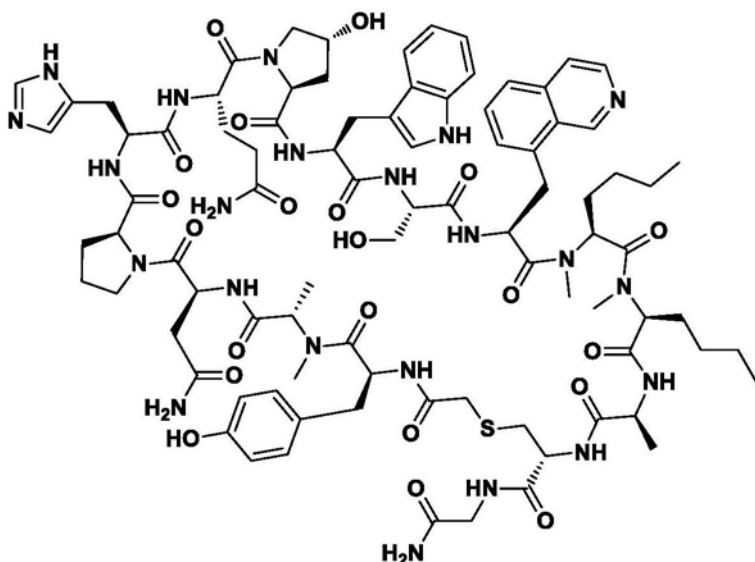
[0564] 实施例1254的制备



[0566] 实施例1254按照针对实施例0001的制备所描述的由以下通用程序构成的通用合成顺序来制备:“Symphony方法B:树脂溶胀程序”、“Symphony方法B:标准偶联程序”、“Symphony方法B:仲胺偶联程序”、“手动偶联程序A”、“Symphony方法B:最终封端程序”、“整体脱保护方法D”及“环化方法D”。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化:柱:Waters XBridge C18,19×250mm,5 μm颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+0.1%三氟乙酸;流动相B:95:5乙腈:水+0.1%三氟乙酸;梯度:经25分钟0-50%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为3.1mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为99%。分析型LCMS条件D:保留时间=1.39min;ESI-MS(+) m/z 961.8 (M+2H)。分析型LCMS条件E:保留时间=1.13min;ESI-MS(+) m/z 962.5 (M+2H)。

[0567] 实施例1271的制备

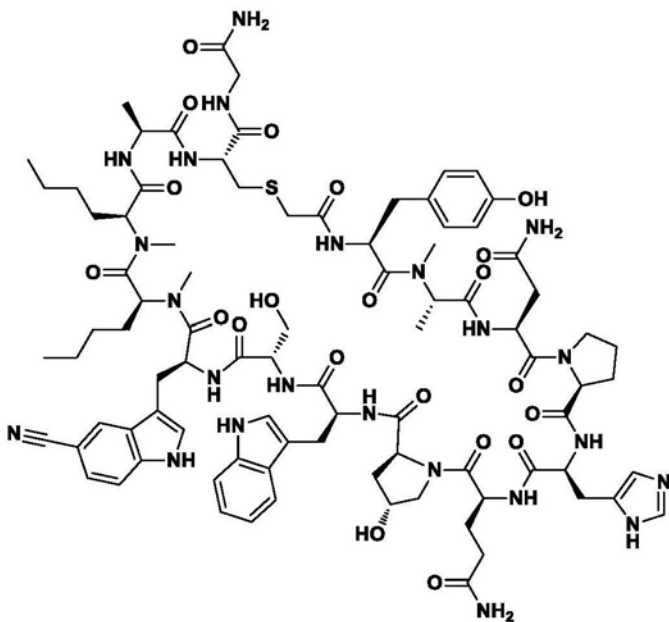
[0568]



[0569] 实施例1271按照针对实施例0001的制备所描述的由以下通用程序构成的通用合成顺序来制备：“Symphony方法B:树脂溶胀程序”、“Symphony方法B:标准偶联程序”、“Symphony方法B:仲胺偶联程序”、“手动偶联程序A”、“Symphony方法B:最终封端程序”、“整体脱保护方法F”及“环化方法D”。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化:柱:XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒;流动相A:5:95甲醇:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5甲醇:水+10mM乙酸铵;梯度:经30分钟40-80%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为14.8mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为100%。分析型LCMS条件H:保留时间=1.48min;ESI-MS(+) m/z 926.9 (M+2H)。分析型LCMS条件I:保留时间=2.96min;ESI-MS(+) m/z 926.9 (M+2H)。ESI-HRMS(+) m/z:计算值:926.4354 (M+2H);实验值:926.4331 (M+2H)。

[0570] 实施例1284的制备

[0571]

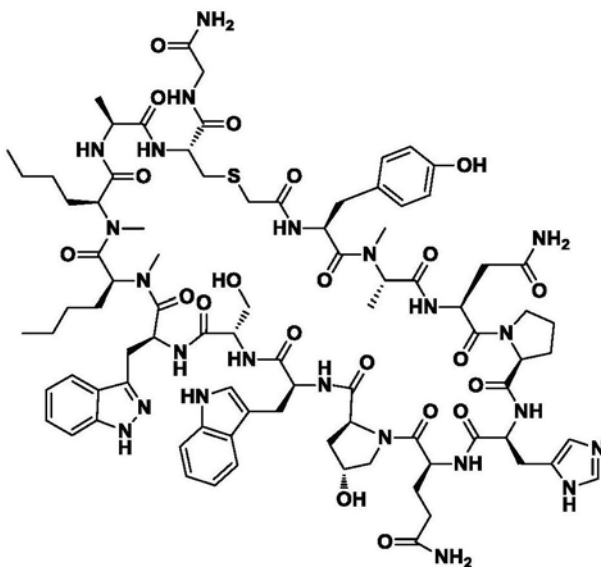


[0572] 实施例1284按照针对实施例0001的制备所描述的由以下通用程序构成的通用合成顺序来制备：“Symphony方法B:树脂溶胀程序”、“Symphony方法B:标准偶联程序”、

“Symphony方法B:仲胺偶联程序”、“手动偶联程序A”、“Symphony方法B:最终封端程序”、“整体脱保护方法F”及“环化方法D”。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化:柱:XBridge C18,19×200mm,5 $\mu$ m颗粒;流动相A:5:95甲醇:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5甲醇:水+10mM乙酸铵;梯度:经30分钟40-80%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化:柱:XBridge C18,19×200mm,5 $\mu$ m颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;梯度:经30分钟10-50%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为0.9mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为90%。分析型LCMS条件H:保留时间=1.53min;ESI-MS(+)m/z 934.3(M+2H)。分析型LCMS条件I:保留时间=2.57min;ESI-MS(+)m/z 933.7(M+2H)。ESI-HRMS(+)m/z:计算值:932.9330(M+2H);实验值:932.9313(M+2H)。

[0573] 实施例1286的制备

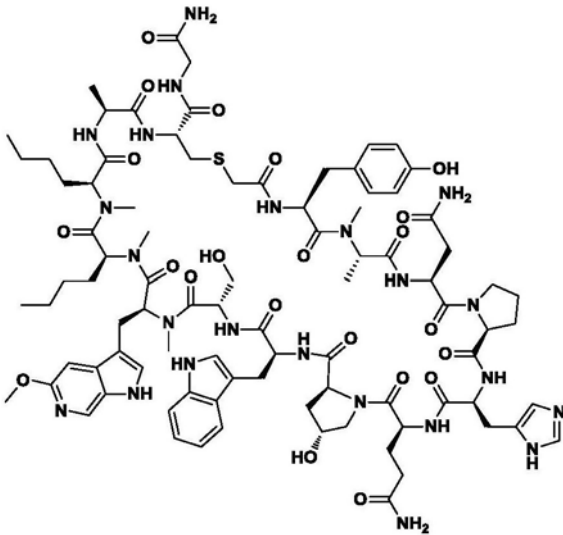
[0574]



[0575] 实施例1286按照针对实施例0001的制备所描述的由以下通用程序构成的通用合成顺序来制备:“Symphony方法B:树脂溶胀程序”、“Symphony方法B:标准偶联程序”、“Symphony方法B:仲胺偶联程序”、“手动偶联程序A”、“Symphony方法B:最终封端程序”、“整体脱保护方法F”及“环化方法D”。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化:柱:XBridge C18,19×200mm,5 $\mu$ m颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;梯度:经30分钟5-45%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为1.8mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为97%。分析型LCMS条件H:保留时间=1.45min;ESI-MS(+)m/z 921.5(M+2H)。分析型LCMS条件I:保留时间=2.59min;ESI-MS(+)m/z 921.4(M+2H)。ESI-HRMS(+)m/z:计算值:920.9330(M+2H);实验值:920.9320(M+2H)。

[0576] 实施例1287的制备

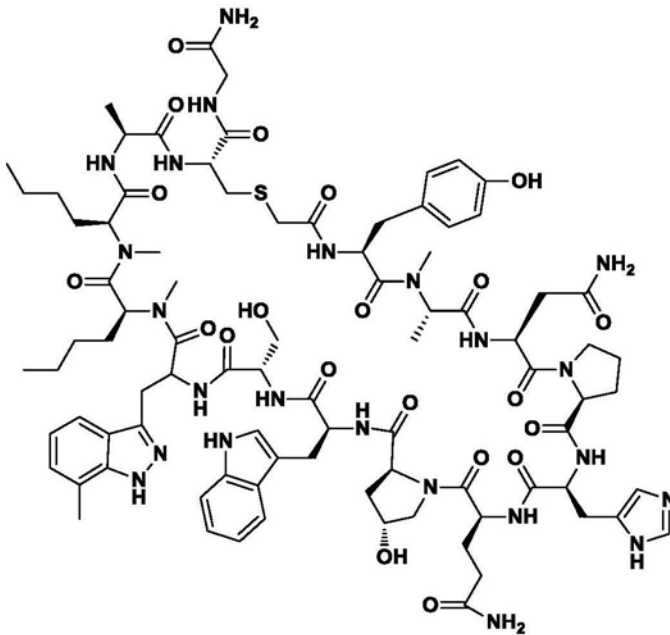
[0577]



[0578] 实施例1287按照针对实施例0001的制备所描述的由以下通用程序构成的通用合成顺序来制备：“Symphony方法B：树脂溶胀程序”、“Symphony方法B：标准偶联程序”、“Symphony方法B：仲胺偶联程序”、“手动偶联程序A”、“Symphony方法B：最终封端程序”、“整体脱保护方法F”及“环化方法D”。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5：95甲醇：水+10mM乙酸铵；流动相B：95：5甲醇：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟45-85%B,随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5：95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95：5乙腈：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟10-50%B,随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为0.7mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为81%。分析型LCMS条件H：保留时间=1.66min；ESI-MS (+) m/z 942.7 (M+2H)。分析型LCMS条件I：保留时间=2.80min；ESI-MS (+) m/z 943.6 (M+2H)。

[0579] 实施例1288的制备

[0580]



[0581] 实施例1288按照针对实施例0001的制备所描述的由以下通用程序构成的通用合

成顺序来制备：“Symphony方法B：树脂溶胀程序”、“Symphony方法B：标准偶联程序”、“Symphony方法B：仲胺偶联程序”、“Symphony方法B：定制氨基酸偶联程序”、“Symphony方法B：最终封端程序”、“整体脱保护方法F”及“环化方法D”。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95甲醇：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5甲醇：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟40–80%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为14.0mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为100%。分析型LCMS条件H：保留时间=1.45min；ESI-MS(+) m/z 928.2 (M+2H)。分析型LCMS条件I：保留时间=2.07min；ESI-MS(+) m/z 928.2 (M+2H)。ESI-HRMS(+) m/z：计算值：927.9409 (M+2H)；实验值：927.9381 (M+2H)。

[0582] 以下分析方案及合成方法属于实施例1001至10505。

[0583] 分析型LCMS条件A：

[0584] 柱：Waters BEH C18, 2.1×50mm, 1.7 $\mu$ m颗粒；流动相A：水+0.05%TFA；流动相B：乙腈+0.05%TFA；温度：40℃；梯度：经2分钟2%B至98%B, 随后在98%B保持0.5分钟；流速：0.8mL/min；检测：UV 220nm。

[0585] 分析型LCMS条件B：

[0586] 柱：Phenomenex Luna C18 2.0×30mm 3 $\mu$ m颗粒；流动相A：水+0.05%乙酸铵；流动相B：乙腈+0.05%乙酸铵；温度：40℃；梯度：经2分钟0%B至100%B, 随后在100%B保持1分钟；流速：1.0mL/min；检测：UV 220nm。

[0587] 分析型LCMS条件C：

[0588] 柱：Waters BEH C18, 2.1×50mm, 1.7 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；温度：70℃；梯度：0%B, 经3分钟0–100%B, 随后在100%B保持2.0分钟；流速：0.75mL/min；检测：UV 220nm。

[0589] 分析型LCMS条件D：

[0590] 柱：Waters CSH C18, 2.1×50mm, 1.7 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+三氟乙酸；流动相B：95:5乙腈：水+三氟乙酸；温度：70℃；梯度：0%B, 经3分钟0–100%B, 随后在100%B保持2.0分钟；流速：0.75mL/min；检测：UV 220nm。

[0591] 分析型LCMS条件E：

[0592] 柱：Waters CSH C18, 2.1×50mm, 1.7 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+0.05%三氟乙酸；流动相B：95:5乙腈：水+0.05%三氟乙酸；温度：70℃；梯度：经3分钟0–100%B, 随后在100%B保持2.0分钟；流速：0.75mL/min；检测：UV 220nm。

[0593] 通用程序：

[0594] Prelude方法A：

[0595] 所有操作在Prelude肽合成仪 (Protein Technologies) 上自动进行。除非指出，否则所有程序在装有底部玻璃料的10mL聚丙烯管中进行。管经由管的底部及顶部连接至Prelude肽合成仪。DMF及DCM经由管的顶部添加，其均等地沿着管的侧壁冲下。其余试剂经由管的底部添加且向上穿过玻璃料以接触树脂。所有溶液经由管的底部除去。“周期性搅动”描述了经由底部玻璃料的短暂氮气脉冲；脉冲持续约5秒且每30秒进行一次。不使用制备超过两周的氨基酸溶液。HATU溶液在制备后5天内使用。DMF=二甲基甲酰胺；HATU=六氟磷酸1-[二(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物；DIPEA=二异

丙基乙基胺;所用树脂为用Rink连接基官能化的Merrifield聚合物(聚苯乙烯);100-200目,1%DVB,0.53mmol/g载量。所用常见氨基酸如下所列,其中侧链保护基示于括号内。Fmoc-Asn(Trt)-OH;Fmoc-Asp(OtBu)-OH;Fmoc-Dab(Boc)-OH;Fmoc-Dap(Boc)-OH;Fmoc-Gln(Trt)-OH;Fmoc-Gly-OH;Fmoc-His(Trt)-OH;Fmoc-Hyp(tBu)-OH;Fmoc-Leu-OH;Fmoc-Lys(Boc)-OH;Fmoc-Nle-OH;Fmoc-[N-Me]Ala-OH;Fmoc-[N-Me]Nle-OH;Fmoc-Pro-OH;Fmoc-Trp(Boc)-OH;Fmoc-Tyr(tBu)-OH。

[0596] “Prelude方法A”的程序描述了以0.050mmol规模进行的实验,其中该规模通过初始树脂负载步骤所使用的氨基酸的量来确定。该规模使用96mg上述Rink酰胺-Merrifield树脂。所有程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.050mmol规模。氨基酸与伯胺N末端的偶联使用下述“单一偶联程序”。氨基酸与仲胺N末端的偶联使用下述“双重偶联程序”。氯乙酸与胺N末端的偶联参见下文详述的“氯乙酸偶联程序”。

[0597] 树脂溶胀程序:

[0598] 重复三次:向含有树脂的反应容器中添加DMF(1.0mL)。将混合物周期性搅动10分钟且随后经由玻璃料排出溶液。

[0599] 单一偶联程序:

[0600] 向含有树脂的反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v,1.0mL)。周期性搅动混合物4分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v,1.0mL)。周期性搅动混合物4分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤六次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF(1.0mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中,0.5mL,2eq),随后添加HATU(0.2M于DMF中,0.5mL,2eq)且最后添加DIPEA(0.8M于DMF中,0.3mL,4eq)。周期性搅动混合物15分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF(1.0mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加乙酸酐于DMF中的溶液(1M,0.8mL),接着添加DIPEA(0.8M,0.3mL)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF(1.0mL)且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0601] 单一偶联程序-30分钟:

[0602] 除在添加DIPEA后周期性搅动混合物30分钟而非15分钟外,该方法与“单一偶联程序”相同。

[0603] 双重偶联程序:

[0604] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v,1.0mL)。周期性搅动混合物4分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v,1.0mL)。周期性搅动混合物4分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤六次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF(1.0mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中,0.5mL,2eq),随后添加HATU(0.2M于DMF中,0.5mL,2eq)且最后添加DIPEA(0.8M于DMF中,0.3mL,4eq)。周期性搅动混合物15分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下洗涤两次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF(1.0mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加

加氨基酸(0.2M于DMF中,0.5mL,2eq),随后添加HATU(0.2M于DMF中,0.5mL,2eq)且最后添加DIPEA(0.8M于DMF中,0.3mL,4eq)。周期性搅动混合物15分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下洗涤两次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF(1.0mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加乙酸酐于DMF中的溶液(1M,0.8mL),接着添加DIPEA(0.8M,0.3mL)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF(1.0mL)且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0605] 氯乙酸偶联程序:

[0606] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v,1.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v,1.0mL)。周期性搅动混合物3分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤六次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF(1.0mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氯乙酸(0.2M,0.5mL)、HATU(0.2M,0.5mL,2eq.),随后添加DIPEA(0.8M于DMF中,0.3mL,4eq.)。周期性搅动混合物30分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤三次:对于每次洗涤,将DMF(2.0mL)添加至容器的顶部且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,将CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(2.0mL)添加至容器的顶部且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。将所得树脂置于氮气气流下8分钟。

[0607] Symphony方法A:

[0608] Symphony X肽合成仪(Protein Technologies)代替Prelude肽合成仪用于所有程序且所有试剂经由反应容器的顶部添加。Symphony X合成仪以1.0mmol或更大规模进行反应。因此,以下程序描述了规模为1.0mmol的合成。

[0609] 树脂溶胀程序:

[0610] 重复三次:向含有树脂的反应容器中添加DMF(2.0mL)。将混合物周期性搅动10分钟且随后经由玻璃料排出溶液。

[0611] 单一偶联程序:

[0612] 向含有树脂的反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v,2.0mL)。周期性搅动混合物4分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF(20:80v/v,2.0mL)。周期性搅动混合物4分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF(2.0mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸(0.2M于DMF中,1.0mL,2eq),接着添加HATU(0.2M于DMF中,1.0mL,2eq)且最后添加DIPEA(0.4M于DMF中,1.0mL,4eq)。周期性搅动混合物15分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF(2.0mL)且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加乙酸酐溶液(2.0mL)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤三次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF(2.0mL)且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0613] 单一偶联程序-30分钟:

[0614] 除在添加DIPEA后周期性搅动混合物30分钟而非15分钟外,该方法与“单一偶联程

序”相同。

[0615] 双重偶联程序:

[0616] 向含有树脂的反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 2.0mL)。周期性搅动混合物4分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 2.0mL)。周期性搅动混合物4分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (2.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸 (0.2M于DMF中, 1.0mL, 2eq), 接着添加HATU (0.2M于DMF中, 1.0mL, 2eq) 且最后添加DIPEA (0.4M于DMF中, 1.0mL, 4eq)。周期性搅动混合物15分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤两次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (2.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加氨基酸 (0.2M于DMF中, 1.0mL, 2eq), 接着添加HATU (0.2M于DMF中, 1.0mL, 2eq) 且最后添加DIPEA (0.4M于DMF中, 1.0mL, 4eq)。周期性搅动混合物15分钟,随后经由玻璃料排出反应溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (2.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加乙酸酐溶液 (2.0mL)。将混合物周期性搅动10分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤三次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (2.0mL) 且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。所得树脂直接用于下一步。

[0617] 氯乙酰氯偶联程序:

[0618] 向含有来自先前步骤的树脂的反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 2.0mL)。周期性搅动混合物4分钟且随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中添加哌啶:DMF (20:80v/v, 2.0mL)。周期性搅动混合物4分钟且随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,经由容器的顶部添加DMF (2.0mL) 且周期性搅动所得混合物30秒,随后经由玻璃料排出溶液。向反应容器中先后添加氯乙酸 (0.2M, 1.0mL)、HATU (0.2M, 1.0mL, 2eq.) 和 DIPEA (0.4M于DMF中, 1.0mL, 4eq.)。周期性搅动混合物30分钟,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤三次:对于每次洗涤,将DMF (2.0mL) 添加至容器的顶部且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。树脂如下连续洗涤四次:对于每次洗涤,将CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.0mL) 添加至容器的顶部且周期性搅动所得混合物90秒,随后经由玻璃料排出溶液。将所得树脂置于氮气气流下5分钟。

[0619] 整体脱保护方法A:

[0620] 除非指出,否则手动进行所有操作。“整体脱保护方法A”的程序描述了以0.050mmol规模进行的实验,其中该规模通过理论上结合至树脂的初始装载的氨基酸的规模来确定。程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.050mmol规模。“脱保护溶液”通过将三氟乙酸 (22mL)、水 (1.25mL)、DTT (250mg) 及三异丙基硅烷 (0.5mL) 合并于40mL玻璃小瓶中来制备。树脂自反应容器取出且转移至4mL玻璃小瓶中。向小瓶中先后添加树脂和“脱保护溶液” (1.0mL)。将混合物在震荡器中剧烈混合 (约500RPM持续40分钟)。经由0.2微米针筒过滤器过滤混合物且用TFA (1.0mL) 萃取固体。向装有合并的滤液的24mL试管中添加Et<sub>2</sub>O (15mL)。将混合物剧烈混合,此时析出大量白色固体。将混合物离心5分钟,随后倾析溶液与固体分离且弃去。将固体悬浮于Et<sub>2</sub>O (20mL) 中;随后将混合物离心5分钟;且倾析溶液与固体分离且弃去,得到呈白色至灰白色固体状的粗肽。

[0621] 环化方法A:

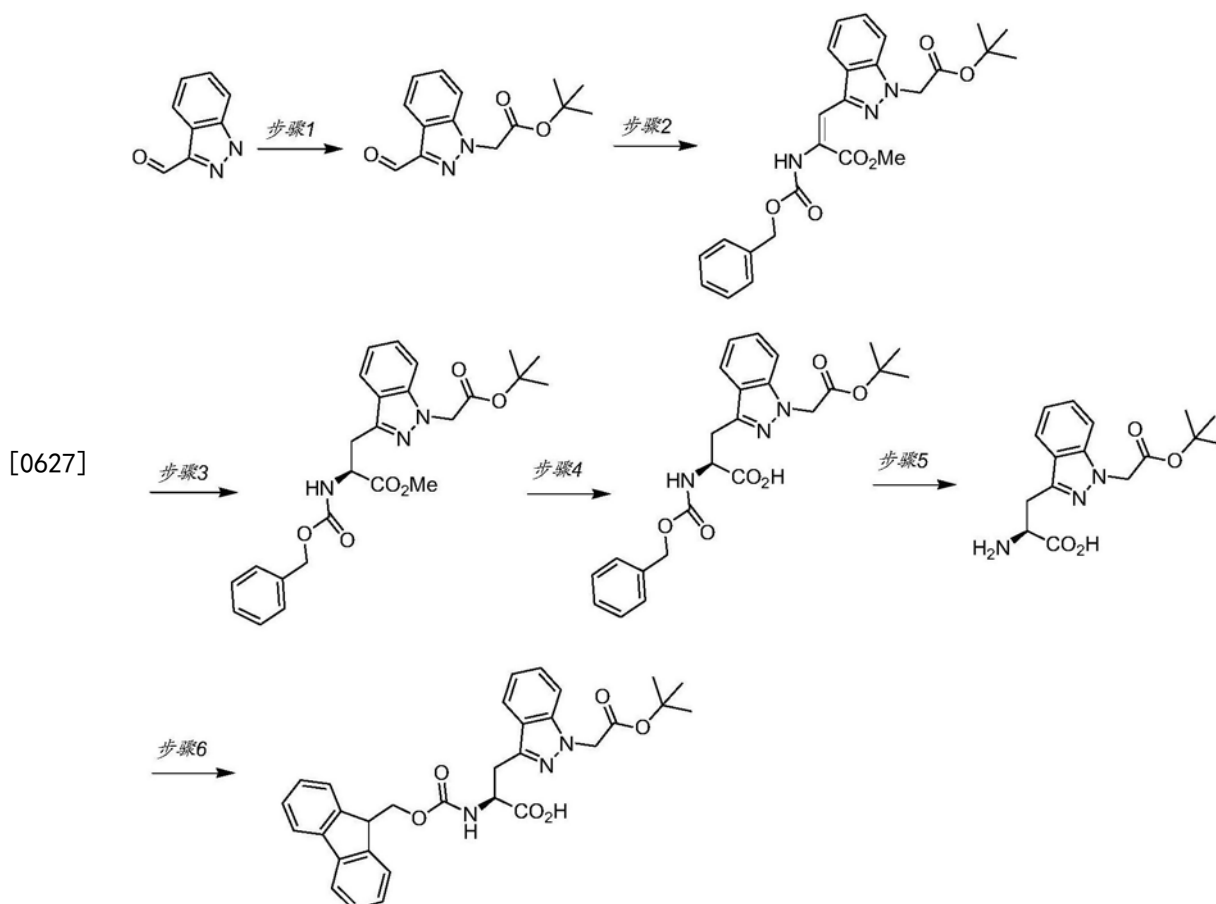
[0622] 除非指出, 否则手动进行所有操作。“环化方法A”的程序描述了以0.050mmol规模进行的实验, 其中该规模通过理论上结合至用于生成肽的树脂的初始氨基酸的量来确定。该规模不是基于直接确定程序所使用的肽的量。程序可通过以所述规模的倍数调整所述体积而放大超过0.100mmol规模。将粗肽固体溶解于MeCN:0.2M碳酸氢铵水溶液(1:1)中至总体积为18-22mL。目标pH为8.5-9.0。随后使溶液在不搅拌的情况下静置12-18小时。反应溶液在不加热的情况下经由离心浓缩而浓缩过夜且随后将残余物溶解于DMSO:MeOH(1mL:1mL)中。对该溶液进行反相HPLC纯化, 得到所需环状肽。

[0623] 通用合成顺序A:

[0624] “通用合成顺序A”描述了用于得到本申请所述环状肽的程序的通用顺序。出于该通用程序的目的, “Symphony方法A”的程序与“Prelude方法A”的程序可互换。向10mL聚丙烯固相反应容器中添加Rink酰胺-Merrifield树脂(96mg)且将反应容器置于Prelude肽合成仪上。随后在Prelude上依序进行一系列氨基酸偶联: 若与树脂结合的肽的N末端为伯胺, 则遵循“Prelude方法A: 单一偶联程序”; 若与树脂结合的肽的N末端为仲胺, 则遵循“Prelude方法A: 双重偶联程序”; 或若所偶联的AA并入在AA10位置处, 则遵循“单一偶联程序-30分钟”。遵循“Prelude方法A: 氯乙酸偶联程序”; 随后遵循“整体脱保护方法A”; 随后遵循“环化方法A”。

[0625] (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡唑-3-基)丙酸的制备

[0626] 流程:



## [0628] 步骤1:

[0629] 向1H-吡啶-3-甲醛 (3g, 20.53mmol) 及碳酸铯 (7.36g, 22.58mmol) 于DMF (82ml) 中的0℃溶液中添加2-溴乙酸叔丁酯 (3.29ml, 22.58mmol) 且通过自冰浴取出而使其升温至室温。搅拌反应物2小时。将反应物倾倒入水 (500mL) 上且添加Et<sub>2</sub>O (200mL)。将产物萃取于Et<sub>2</sub>O层中。分离各层且水相用Et<sub>2</sub>O (100mL) 萃取第二次。合并的Et<sub>2</sub>O层先后用水和盐水洗涤2次。收集有机层, 经硫酸钠干燥且真空浓缩。粗物质通过快速硅胶色谱使用0-30% EtOAc/己烷的梯度纯化。收集产物级份且真空除去溶剂, 得到2-(3-甲酰基-1H-吡啶-1-基) 乙酸叔丁酯 (5.23g, 98%)。ESI-MS (+) m/z 205.1 (M+1-tBu)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ 10.28 (s, 1H), 8.35 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.56-7.49 (m, 1H), 7.45-7.36 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 1.48 (s, 9H)。

## [0630] 步骤2:

[0631] 将(±)-2-苄基氧基羰基氨基-2-(二甲氧基膦酰基) 乙酸甲酯 (7.32g, 22.10mmol) 溶解于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50mL) 中且在氮气下搅拌。向该溶液中添加DBU (3.33mL, 22.10mmol) 且搅拌混合物10分钟, 接着经15-20分钟逐滴添加2-(3-甲酰基-1H-吡啶-1-基) 乙酸叔丁酯 (5.23g, 20.09mmol) 于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50mL) 中的溶液。在室温继续搅拌16小时。真空浓缩反应混合物。残余物用EtOAc稀释且先后用5% 柠檬酸水溶液和盐水洗涤, 接着经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤且蒸发。粗物质通过快速硅胶色谱使用0-50% EtOAc/己烷的梯度纯化。收集产物级份且真空除去溶剂, 得到(E)-2-(((苄基氧基) 羰基) 氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基) 丙烯酸甲酯 (7.4g, 79%)。ESI-MS (+) m/z 466.0 (M+1)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ 9.21 (s, 1H), 7.82 (d, J=8.3Hz, 1H), 7.52-7.23 (m, 8H), 6.90 (s, 1H), 5.23 (s, 2H), 5.08 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 1.44 (s, 9H)。

## [0632] 步骤3:

[0633] 在帕尔瓶中将(Z)-2-(((苄基氧基) 羰基) 氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基) 丙烯酸甲酯 (7.4g, 15.90mmol) 溶解于MeOH (80mL) 及苯 (80mL) 中。使氮气鼓泡通过溶液15分钟, 接着添加(+)-1,2-二((2S,5S)-2,5-二乙基磷杂环戊-1-基) 苯(环辛二烯) 三氟甲磺酸铯(I) (0.115g, 0.159mmol) 且置于氢气气氛 (60psi) 下3天。反应物经由硅藻土(Celite<sup>®</sup>) 过滤且真空浓缩。粗物质通过快速硅胶色谱使用0-50% EtOAc/己烷的梯度纯化。收集产物级份且真空除去溶剂, 得到(S)-2-(((苄基氧基) 羰基) 氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基) 丙酸甲酯 (7.43g, 100%)。ESI-MS (+) m/z 468.0 (M+1)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ 7.64 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.44-7.26 (m, 7H), 7.15 (t, J=7.5Hz, 1H), 5.87 (d, J=7.8Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.99 (s, 2H), 4.90-4.80 (m, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.63-3.55 (m, 1H), 3.46 (dd, J=14.8, 4.8Hz, 1H), 1.42 (s, 9H)。

## [0634] 步骤4:

[0635] 将氢氧化锂 (1.142g, 47.7mmol) 于水 (39.7ml) 中的溶液添加至(S)-2-(((苄基氧基) 羰基) 氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基) 丙酸甲酯 (7.43g, 15.89mmol) 于THF (39.7ml) 中的溶液中。在室温搅拌反应物30分钟。将EtOAc添加至反应物中且用1N HCl使pH成酸性。收集有机相, 经硫酸钠干燥且真空浓缩。粗物质通过快速色谱使用0-10% MeOH/DCM+0.1% AcOH纯化。收集产物级份且真空除去溶剂, 得到(S)-2-(((苄基氧基) 羰基) 氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基) 丙酸 (3.9g, 54%)。ESI-MS (+) m/z 454.0 (M+1)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.73 (br. s., 1H), 7.77 (d, J=

8.3Hz, 1H), 7.56-7.50 (m, 2H), 7.40-7.24 (m, 5H), 7.14-7.08 (m, 1H), 5.15 (s, 2H), 5.00-4.89 (m, 2H), 4.42 (td, J=8.6, 5.1Hz, 1H), 3.39-3.24 (m, 2H), 1.37 (s, 9H)。

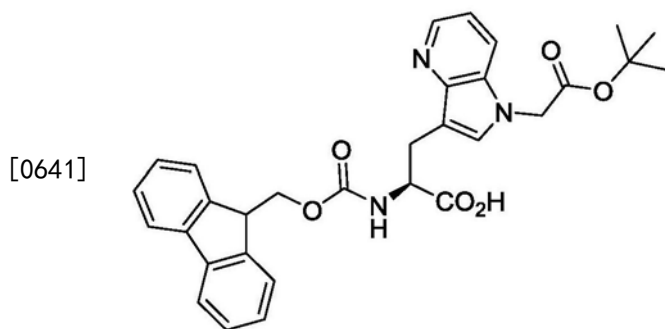
[0636] 步骤5:

[0637] 将(S)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基)丙酸(3.88g, 8.56mmol)溶解于MeOH(80ml)/苯(20mL)中且置于氮气气氛下。在剧烈搅拌下将Pd-C(0.455g, 0.428mmol)添加至溶液中。将反应物置于氢气气氛下且搅拌16小时。反应物经由硅藻土(Celite<sup>®</sup>)过滤且真空浓缩,得到(S)-2-氨基-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基)丙酸(2.74g, 100%),其按原样用于步骤6。ESI-MS(+) m/z 320.1 (M+H)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.78 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.54 (d, J=8.5Hz, 1H), 7.38 (ddd, J=8.3, 7.0, 1.0Hz, 1H), 7.13 (t, J=7.2Hz, 1H), 5.23-5.10 (m, 2H), 3.58 (dd, J=9.0, 4.0Hz, 1H), 3.49 (dd, J=15.6, 4.0Hz, 1H), 3.28 (br. s., 2H), 3.17 (dd, J=15.7, 8.9Hz, 1H), 1.41 (s, 9H)。

[0638] 步骤6:

[0639] 将(S)-2-氨基-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基)丙酸(2.74g, 8.58mmol)溶解于THF(34.3ml)中,接着添加水(34.3ml)。随后添加碳酸氢钠(1.442g, 17.16mmol),接着添加碳酸(9H-芴-9-基)甲酯(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)酯(2.89g, 8.58mmol)。搅拌反应物2小时。真空除去大部分THF,随后添加EtOAc。混合物用1N HCl酸化至pH 7且用EtOAc萃取。收集有机层,经硫酸钠干燥且真空浓缩,得到(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基)丙酸(4.9g, 105%),其按原样使用。ESI-MS(+) m/z 542.1 (M+H)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.87 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.82 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.70 (d, J=8.3Hz, 1H), 7.64 (t, J=8.2Hz, 2H), 7.52 (d, J=8.3Hz, 1H), 7.43-7.34 (m, 3H), 7.32-7.23 (m, 2H), 7.10 (t, J=7.4Hz, 1H), 5.15 (s, 2H), 4.42 (td, J=8.8, 5.0Hz, 1H), 4.20-4.11 (m, 3H), 3.42-3.25 (m, 2H), 1.36 (s, 9H)。

[0640] (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-3-基)丙酸的制备

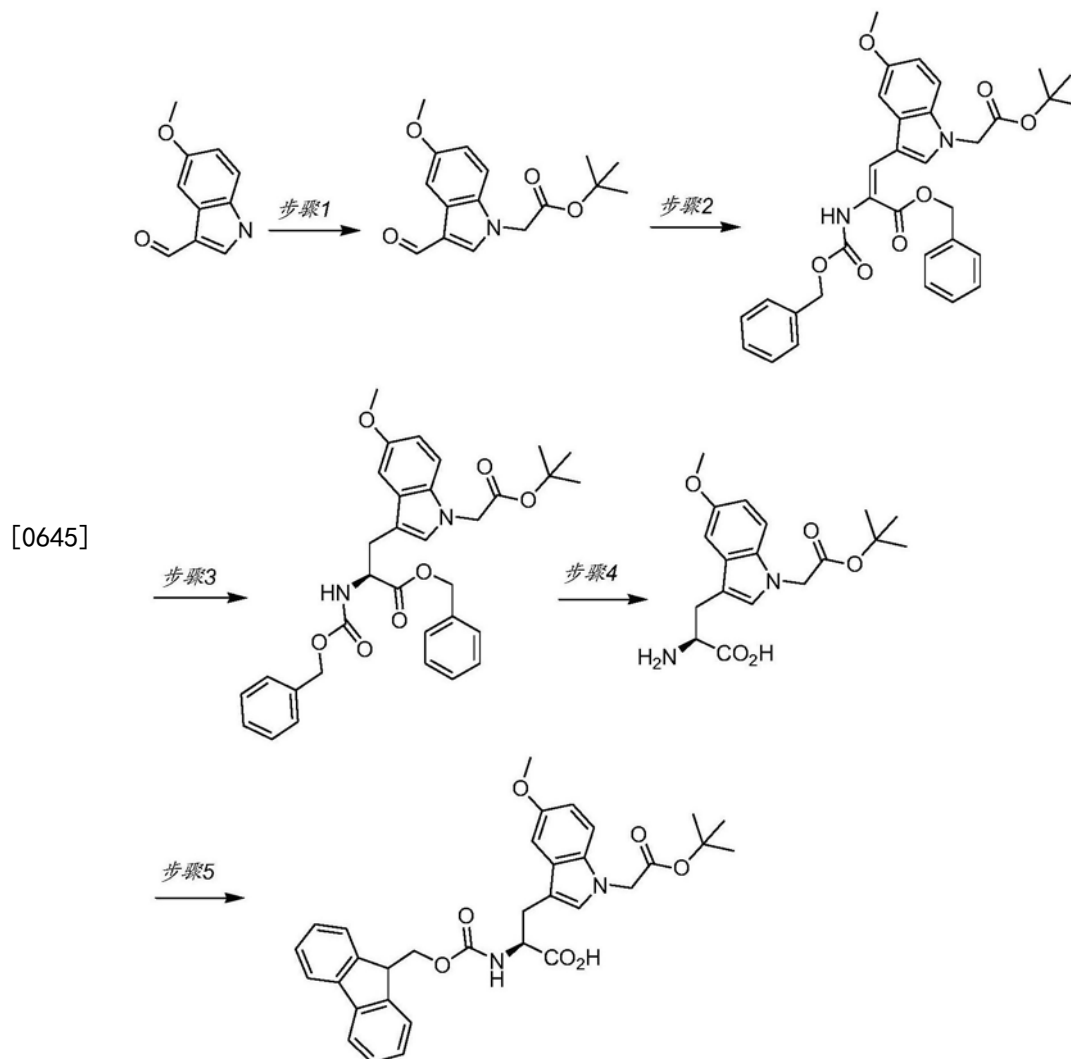


[0642] (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-3-基)丙酸通过与(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基)丙酸相同的方法制备,但是具有以下修改:在步骤1中使用1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-3-甲醛代替1H-吡啶-3-甲醛作为原料。步骤4中甲酯的水解在0℃进行20分钟而非在室温进行30分钟。ESI-MS(+) m/z 542.2 (M+H)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ8.34 (dd, J=4.8, 1.3Hz, 1H), 8.23 (d, J=7.5Hz, 1H), 7.89 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.81 (dd, J=8.5, 1.3Hz, 1H), 7.65 (t, J=8.4Hz, 2H), 7.46 (s, 1H), 7.44-7.37

(m, 2H), 7.29 (dtd, J=10.9, 7.4, 0.9Hz, 2H), 7.19 (dd, J=8.3, 4.5Hz, 1H), 5.06-4.92 (m, 2H), 4.37-4.30 (m, 1H), 4.23-4.14 (m, 3H), 3.28 (dd, J=14.7, 4.1Hz, 1H), 3.09 (dd, J=14.6, 9.0Hz, 1H), 1.38 (s, 9H)。

[0643] (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-5-甲氧基-1H-吡啶-3-基)丙酸的制备

[0644] 流程:



[0646] 步骤1:

[0647] 向5-甲氧基-1H-吡啶-3-甲醛 (1.5g, 8.56mmol) 及碳酸铯 (3.07g, 9.42mmol) 于DMF (34.2ml) 中的0℃溶液中添加2-溴乙酸叔丁酯 (1.373ml, 9.42mmol) 且通过自冰浴取出而使其升温至室温。搅拌反应物2小时。将反应物倾倒入水上且添加Et<sub>2</sub>O。将产物萃取于Et<sub>2</sub>O层中。分离各层且水相用Et<sub>2</sub>O萃取第二次。合并的Et<sub>2</sub>O层先后用水和盐水洗涤两次。收集有机层, 经硫酸钠干燥且真空浓缩, 得到2-(3-(5-甲氧基-1H-吡啶-1-基)乙酸叔丁酯 (2.1g, 85%), 其按原样用于下一步。ESI-MS (+) m/z 290.1 (M+H)。

[0648] 步骤2:

[0649] 将2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-2-(二甲氧基膦酰基)乙酸苄酯 (1.55g, 3.8mmol) 溶解于DCM (11.52mL) 中且在氮气下搅拌。向该溶液中添加DBU (0.573mL, 3.80mmol) 且搅拌

混合物10分钟,接着经15-20分钟逐滴添加2-(3-甲酰基-5-甲氧基-1H-吡啶-1-基)乙酸叔丁酯(1.0g,3.46mmol)于DCM(11.52mL)中的溶液。在室温继续搅拌16小时。真空浓缩反应混合物。残余物用EtOAc稀释且先后用5%柠檬酸水溶液和盐水洗涤,接着经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤且蒸发。粗物质通过快速色谱使用20-70%EtOAc/己烷的梯度纯化。收集产物级份且真空除去溶剂,得到(E)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-5-甲氧基-1H-吡啶-3-基)丙烯酸苄酯(1.6g,80%)。ESI-MS(+)*m/z* 571.2 (M+H)。

[0650] 步骤3:

[0651] 将(Z)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-5-甲氧基-1H-吡啶-3-基)丙烯酸苄酯(700mg,1.227mmol)溶解于MeOH(12ml)中,用(+)-1,2-二((2S,5S)-2,5-二乙基磷杂环戊-1-基)苯(环辛二烯)三氟甲磺酸铯(I)(8.86mg,0.012mmol)处理且置于氢气气氛(60psi)下3天。反应物经由硅藻土(Celite<sup>®</sup>)过滤,真空浓缩,得到(S)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-5-甲氧基-1H-吡啶-3-基)丙酸苄酯(702mg,100%),其按原样用于下一步。ESI-MS(+)*m/z* 573.2 (M+H)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.87(d,J=7.8Hz,1H),7.38-7.13(m,11H),7.10-7.02(m,2H),6.77(dd,J=8.8,2.3Hz,1H),5.13-5.04(m,2H),5.04-4.94(m,2H),4.86(s,2H),4.32(td,J=8.3,5.8Hz,1H),3.72(s,3H),1.39(s,9H)。

[0652] 步骤4:

[0653] 将(S)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-5-甲氧基-1H-吡啶-3-基)丙酸苄酯(700mg,1.222mmol)溶解于MeOH(12ml)中且置于氮气气氛下。在剧烈搅拌下将Pd-C(65.0mg,0.061mmol)添加至溶液中。将反应物置于氢气气氛下且搅拌16小时。反应物经由硅藻土(Celite<sup>®</sup>)过滤且真空浓缩,得到(S)-2-氨基-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-5-甲氧基-1H-吡啶-3-基)丙酸(426mg,100%),其按原样用于步骤5。ESI-MS(+)*m/z* 349.1 (M+H)。

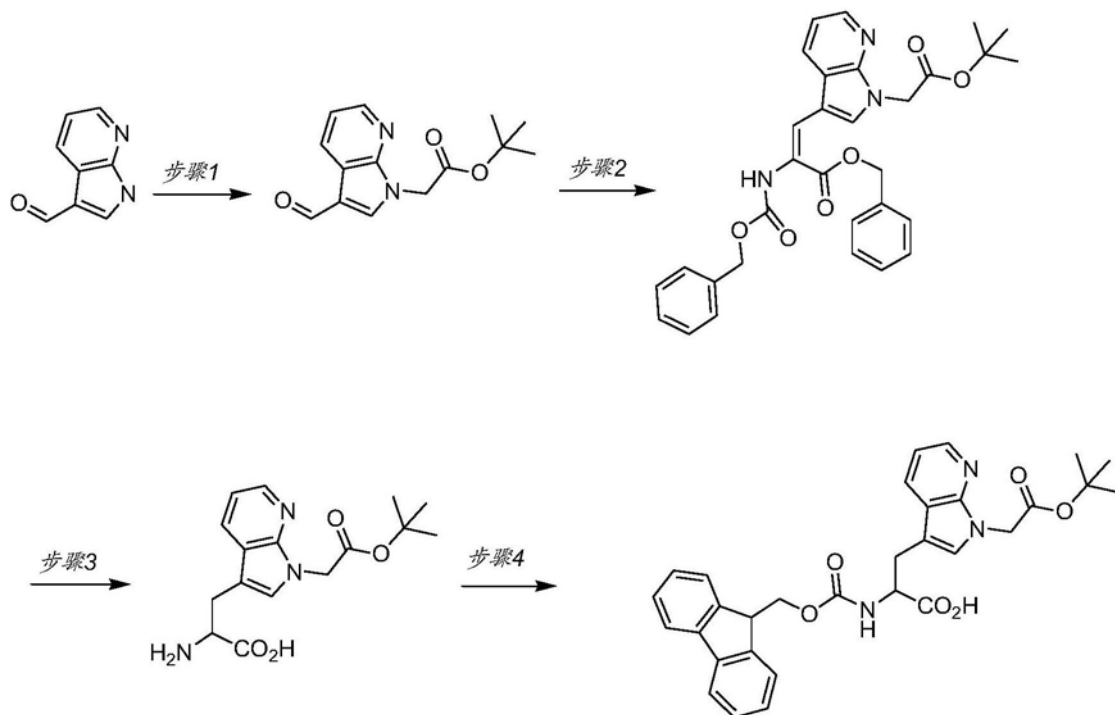
[0654] 步骤5:

[0655] 将(S)-2-氨基-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-5-甲氧基-1H-吡啶-3-基)丙酸(426mg,1.223mmol)溶解于THF(5ml)中,接着添加水(5.00ml)。随后添加碳酸氢钠(205mg,2.446mmol),接着添加碳酸(9H-苻-9-基)甲酯(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯(412mg,1.223mmol)。搅拌反应物2小时。真空除去大部分THF,随后添加Et<sub>2</sub>O。弃去有机层且再次用Et<sub>2</sub>O洗涤水层。收集水相,用1N HCl酸化且用EtOAc萃取。收集有机层,经硫酸钠干燥且真空浓缩,得到粗产物,其未经进一步纯化。获得LC/MS及NMR证实。ESI-MS(+)*m/z* 571.1 (M+H)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ12.71(br.s.,1H),7.88(d,J=7.5Hz,2H),7.72(d,J=8.3Hz,1H),7.66(t,J=8.3Hz,2H),7.40(td,J=7.1,4.1Hz,2H),7.33-7.23(m,2H),7.17(d,J=8.8Hz,1H),7.13-7.08(m,2H),6.76(dd,J=8.8,2.3Hz,1H),4.85(s,2H),4.24-4.14(m,3H),3.76(s,3H),3.14(dd,J=14.4,4.4Hz,1H),2.99(dd,J=14.8,9.8Hz,1H),1.38(s,9H)。

[0656] 2-(((9H-苻-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)丙酸的制备

[0657] 流程:

[0658]



[0659] 步骤1:

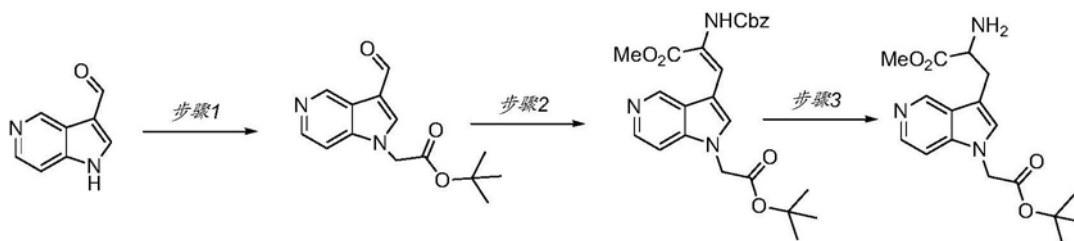
[0660] 向1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-甲醛(1.5g, 10.26mmol)及碳酸铯(3.68g, 11.29mmol)于DMF(41.1ml)中的0℃溶液中添加2-溴乙酸叔丁酯(1.646ml, 11.29mmol)且通过自冰浴取出而使其升温至室温。搅拌反应物2小时。将反应物倾倒入水上且添加Et<sub>2</sub>O。将产物萃取于Et<sub>2</sub>O层中。分离各层且水相用Et<sub>2</sub>O萃取第二次。合并的Et<sub>2</sub>O层先后用水和盐水洗涤2次。收集有机层,经硫酸钠干燥且真空浓缩,得到2-(3-(3-甲酰基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-1-基)乙酸叔丁酯(2.3g, 86%),其按原样用于下一步。ESI-MS(+) m/z 205.1 (M+1-tBu)。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ10.02 (s, 1H), 8.58 (dd, J=7.8, 1.5Hz, 1H), 8.42 (dd, J=4.8, 1.5Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.31-7.28 (m, 1H), 5.05 (s, 2H), 1.49 (s, 9H)。

[0661] 步骤2:

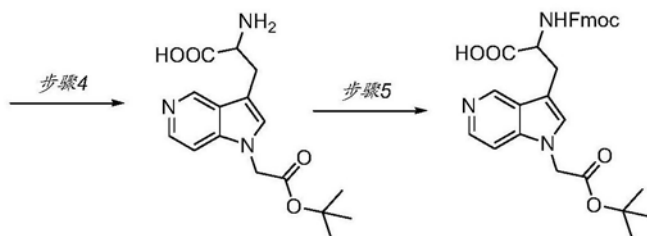
[0662] 将2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-2-(二甲氧基磷酰基)乙酸苄酯(2.348g, 5.76mmol)溶解于DCM(12mL)中且在氮气下搅拌。向该溶液中添加DBU(0.637ml, 4.23mmol)且搅拌混合物10分钟,接着逐滴添加2-(3-(3-甲酰基-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-1-基)乙酸叔丁酯(1g, 3.84mmol)于DCM(12mL)中的溶液。在室温继续搅拌16小时。真空浓缩反应混合物。残余物用EtOAc稀释且用5%柠檬酸水溶液及盐水洗涤,接着经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤且蒸发。粗物质通过快速色谱使用0-10%MeOH/DCM的梯度纯化。收集产物级份且真空除去溶剂,得到(E)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-3-基)丙烯酸苄酯1.54g(74%)。

[0663] 2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-3-基)丙酸的制备

[0664] 流程:



[0665]



[0666] 步骤1:

[0667] 向1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-3-甲醛(0.95g, 6.50mmol)及碳酸铯(2.330g, 7.15mmol)于DMF(26.0mL)中的0℃溶液中添加2-溴乙酸叔丁酯(1.042ml, 7.15mmol)。通过自冰浴取出而使混合物升温至室温。搅拌反应物2小时。将反应物倾倒入冰水(100mL)及EtOAc(50mL)混合物上。将产物萃取于EtOAc中。分离各层且水相用EtOAc(2×50mL)萃取第二次。合并的EtOAc层用盐水洗涤。收集有机层,经硫酸钠干燥且真空浓缩。粗产物通过硅胶色谱纯化,得到2-(3-(甲酰基-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-1-基)乙酸叔丁酯(1.24g, 73%)作为澄清产物。ESI-MS(-):MS m/z 259.1。

[0668] 步骤2:

[0669] 将(±)-2-苄基氧基羰基氨基-2-(二甲氧基膦酰基)乙酸甲酯(1.596g, 4.82mmol)溶解于15mL DCM中且在氮气下在0℃搅拌5分钟。向该溶液中添加DBU(0.726ml, 4.82mmol),接着经10分钟逐滴添加2-(3-(甲酰基-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-1-基)乙酸叔丁酯(1.14g, 4.38mmol)于DCM(15mL)中的溶液。在室温搅拌混合物过夜。反应混合物用EtOAc稀释且先后用5%柠檬酸水溶液和盐水洗涤,收集有机层,经硫酸钠干燥且真空浓缩。粗产物通过硅胶色谱纯化,得到作为产物的(E)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-3-基)丙烯酸甲酯(1.0g, 49%)。ESI-MS(+):MS m/z 466.0。

[0670] 步骤3:

[0671] 向(E)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-3-基)丙烯酸甲酯(1.0g, 2.15mmol)于甲醇(20mL)中的溶液中添加Pd/C(0.5g)。反应在55psi进行2天。过滤Pd/C且用甲醇及DCM洗涤。浓缩溶剂,得到作为粗产物的2-氨基-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-3-基)丙酸甲酯(0.54g, 75%),其直接用于下一步。ESI-MS(+):MS m/z 334.1。

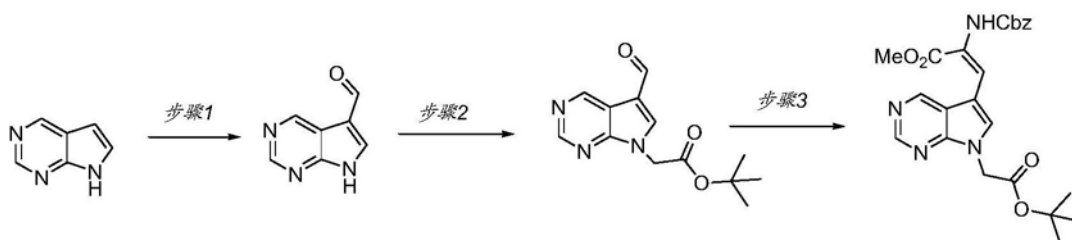
[0672] 步骤4及5:

[0673] 向2-氨基-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-3-基)丙酸甲酯(0.54g, 1.62mmol)于THF/H<sub>2</sub>O(1:1, 10mL)中的溶液中添加LiOH(116mg, 4.86mmol)。在室温搅拌混合物9分钟。通过添加1N HCl溶液将混合物调节至pH=7。随后将碳酸氢钠(408mg, 4.86mmol)及Fmoc-OSU(546mg, 1.620mmol)添加至混合物中。搅拌所得混合物2小时。添加5%柠檬酸以调节pH=7且水相用乙酸乙酯萃取,经硫酸钠干燥且真空浓缩。粗产物

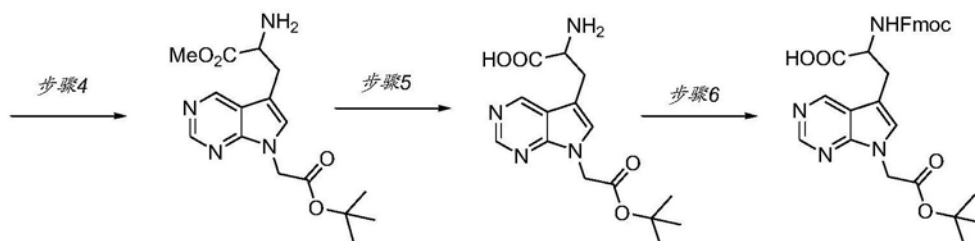
通过硅胶色谱纯化,得到作为产物的2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯并[3,2-c]吡啶-3-基)丙酸(250mg,28.5%)。ESI-MS(+):MS  $m/z$  542.2。<sup>1</sup>H NMR(甲醇-d<sub>4</sub>) $\delta$ 9.17(s,1H),8.28(d,J=6.3Hz,1H),7.82(t,J=6.8Hz,3H),7.58(d,J=7.3Hz,1H),7.62(d,J=7.3Hz,1H),7.21-7.49(m,6H),7.11-7.19(m,1H),4.98-5.13(m,2H),4.20-4.43(m,3H),4.08-4.20(m,1H),3.47-3.45(m,2H),1.35-1.54(s,9H)。

[0674] 2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(7-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)丙酸的制备

[0675] 流程:



[0676]



[0677] 步骤1:

[0678] 在氮气下向7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶(6g,50.4mmol)及六甲胺四胺(10.59g,76mmol)中添加乙酸(20.00mL)及水(40mL)。将反应混合物加热至回流且搅拌8小时。将反应混合物冷却至室温,随后过滤固体。固体用乙醚洗涤3次。干燥固体,得到作为所需产物的7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-甲醛(5.6g,76%)。ESI-MS(+):MS  $m/z$  148.1。<sup>1</sup>H NMR(甲醇-d<sub>4</sub>) $\delta$ :10.00(s,1H),9.43(s,1H),8.91(s,1H),8.40(s,1H)。

[0679] 步骤2:

[0680] 向7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-甲醛(5.41g,36.8mmol)及碳酸铯(13.18g,40.4mmol)于DMF(147ml)中的0℃溶液中添加2-溴乙酸叔丁酯(5.90ml,40.4mmol)。通过自冰浴取出而使混合物升温至室温。搅拌反应物2小时。将反应物倾倒入冰水(500mL)及EtOAc(300mL)混合物上。将产物萃取于EtOAc中。分离各层且水相用EtOAc(2×150mL)萃取第二次。合并的EtOAc层用盐水洗涤。收集有机层,经硫酸钠干燥且真空浓缩。粗产物通过硅胶色谱纯化,得到作为澄清产物的2-(5-甲酰基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)乙酸叔丁酯(6.60g,69%)。ESI-MS(-):MS  $m/z$  262.0。

[0681] 步骤3:

[0682] 将(±)-2-苄基氧基羰基氨基-2-(二甲氧基磷酰基)乙酸甲酯(9.07g,27.4mmol)溶解于70mL DCM中且在氮气下在0℃搅拌5分钟。向该溶液中添加DBU(4.17ml,27.4mmol),接着经10分钟逐滴添加2-(5-甲酰基-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-7-基)乙酸叔丁酯(6.50g,24.88mmol)于DCM(50mL)中的溶液。在室温搅拌混合物过夜。反应混合物用EtOAc稀释且先

后用5%柠檬酸水溶液/1N NaOH pH=4溶液和盐水洗涤,收集有机层,经硫酸钠干燥且真空浓缩。粗产物通过硅胶色谱纯化,得到作为产物的(E)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(7-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)丙烯酸甲酯(11.55g,100%)。ESI-MS(+):MS m/z 467.0。

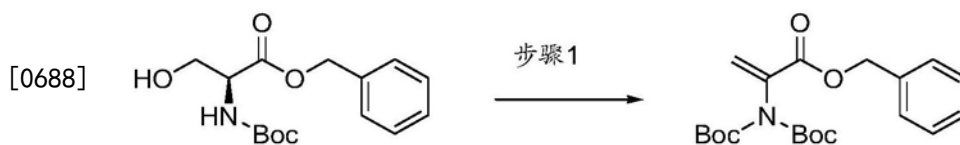
[0683] 步骤4:

[0684] 向(E)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(7-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)丙烯酸甲酯(5.3g,11.36mmol)于甲醇(40mL)中的溶液中添加Pd/C(1.2g)。反应在55psi进行2天。过滤Pd/C且用甲醇及DCM洗涤。浓缩溶剂,得到作为产物的3.0g(79%)2-氨基-3-(7-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)丙酸甲酯。ESI-MS(+):MS m/z 335.1。

[0685] 步骤5及6:

[0686] 向2-氨基-3-(7-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)丙酸甲酯(2.8g,8.37mmol)于THF/H<sub>2</sub>O(1:1,40mL)中的溶液中添加LiOH(0.60g,25.1mmol)。在室温搅拌混合物8分钟。通过添加1N HCl溶液将混合物调节至pH=7。随后将碳酸氢钠(2.11g,25.1mmol)及FMOC-OSU(2.82g,8.37mmol)添加至混合物中。搅拌所得混合物2小时。添加5%柠檬酸以调节pH=7且水相用乙酸乙酯萃取,经硫酸钠干燥且真空浓缩。粗产物通过硅胶色谱纯化,得到作为产物的2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(7-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-5-基)丙酸(1.2g,26.4%)。ESI-MS(+):MS m/z 543.1。<sup>1</sup>H NMR(甲醇-d<sub>4</sub>) δ:8.75(s,1H),7.79(d,J=7.5Hz,2H),7.60(t,J=7.4Hz,1H),7.20-7.45(m,7H),4.95(s,2H),4.57(d,J=8.3Hz,1H),4.23-4.38(m,2H),3.36-3.46(m,1H),2.70(s,2H),2.34(s,2H),1.35-1.50(s,9H)。

[0687] 2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}丙-2-烯酸苄酯的制备

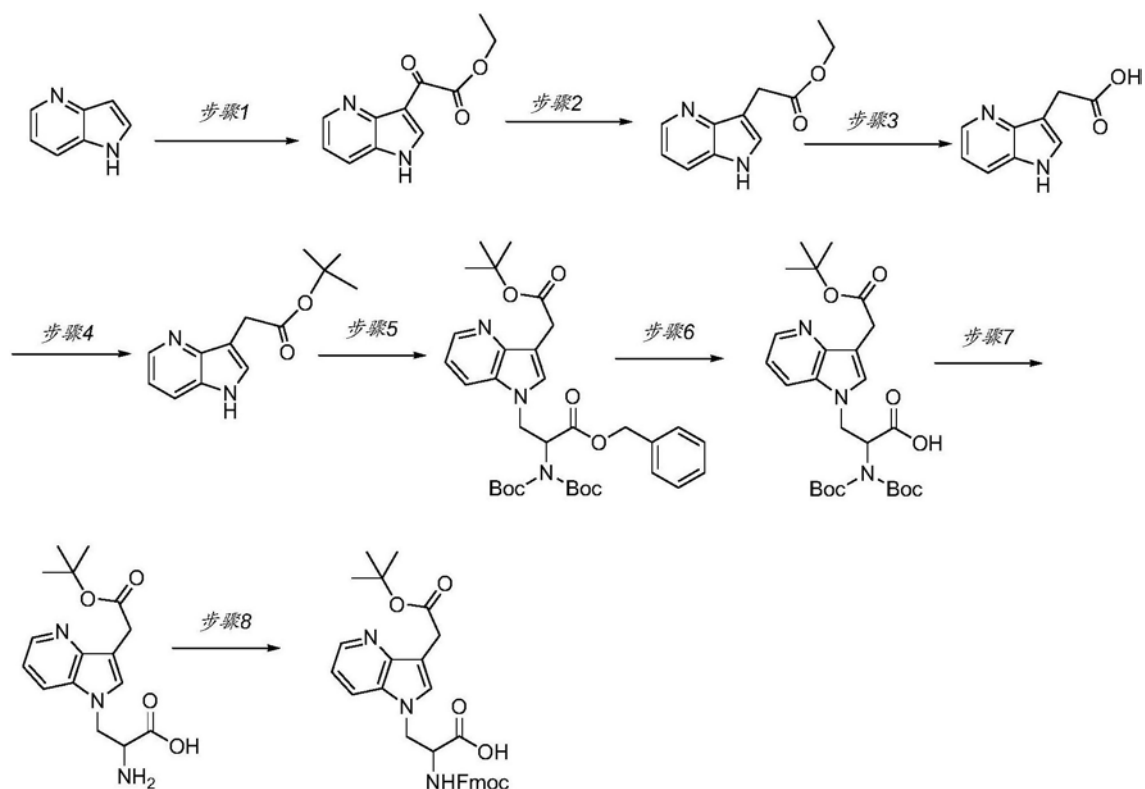


[0689] 在室温向(S)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)-3-羟基丙酸苄酯(5.0g,17mmol)及一缩二碳酸二叔丁酯(9.6g,44mmol)于乙腈(20mL)中的溶液中添加DMAP(0.21g,1.7mmol)。搅拌溶液18小时且随后减压浓缩。将残余物溶解于乙醚中,依次用1M硫酸氢钾水溶液(2×)、饱和碳酸氢钠水溶液、盐水洗涤,随后经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤且蒸发挥发物,得到呈白色固体状的最终产物2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}丙-2-烯酸苄酯(6.0g,16mmol,94%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,氯仿-d) δ7.41-7.37(m,4H),7.35-7.31(m,1H),6.45-6.34(m,1H),5.70(s,1H),5.26(s,2H),1.43(s,18H)。

[0690] 2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-1-基)丙酸的制备

[0691] 流程:

[0692]



[0693] 步骤1:

[0694] 在0℃在氩气气氛下将氮杂吲哚(2.0g, 16.93mmol)添加至含氯化铝(11.29g, 85mmol)的无水二氯甲烷(85mL)中。在0℃保持30分钟后,将混合物升温至室温且逐滴添加氯氧代乙酸乙酯(11.56g, 85mmol)。剧烈搅拌反应混合物过夜,随后小心地添加冰。先后用4N NaOH和冷的饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液调节pH至7。产物用DCM萃取3次,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤且浓缩,得到呈黄色油状残余物形式的2-氧代-2-(1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-3-基)乙酸乙酯。用冷的石油醚洗涤后,获得呈淡黄色粉末状的标题化合物(280mg, 7.6%)。ESI-MS(-):MS m/z 217.1。

[0695] 步骤2:

[0696] 向TFA(2mL)及三乙基硅烷(0.4mL)的混合物中添加2-氧代-2-(1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-3-基)乙酸乙酯(280mg, 1.28mmol)。将混合物在55℃加热16小时。冷却至室温后,除去溶剂且先后添加饱和NaHCO<sub>3</sub>和DCM。收集有机层,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤且浓缩,得到作为粗产物的2-(1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-3-基)乙酸乙酯。ESI-MS(-):MS m/z 203.1。

[0697] 步骤3:

[0698] 在室温将步骤2粗物质2-(1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-3-基)乙酸乙酯及LiOH(165mg, 6.90mmol)搅拌于THF/H<sub>2</sub>O(5mL, 1:1)中1小时。在0℃添加1M HCl以调节pH至5。除去溶剂且残余物用甲醇洗涤,过滤,干燥有机层并浓缩,得到作为粗产物的2-(1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-3-基)乙酸。ESI-MS(+):MS m/z 177.1。

[0699] 步骤4:

[0700] 向2-(1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-3-基)乙酸(375mg, 2.129mmol)于DCM(7.0mL)及乙酸叔丁酯(3.0mL)中的溶液中逐滴添加过氯酸(0.274mL, 3.19mmol)。在室温搅拌所得溶液3

小时。过滤浅棕色固体且用DCM洗涤。浓缩DCM层。随后添加水及EtOAc。使用EtOAc萃取产物两次。有机层用饱和NaHCO<sub>3</sub>洗涤2次,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,浓缩,得到作为产物的2-(1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-3-基)乙酸叔丁酯(100mg,20%)。该物质直接用于下一步反应。ESI-MS(-):MS m/z 231.1。

[0701] 步骤5:

[0702] 将碳酸钾(357mg,2.58mmol)添加至2-(1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-3-基)乙酸叔丁酯(100mg,0.431mmol)及2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}丙-2-烯酸苄酯(162mg,0.431mmol)于乙腈(5mL)中的溶液中。将反应混合物加热至50℃过夜。反应物用EtOAc及水稀释。有机层用盐水洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤且蒸发,得到粗产物。粗产物经由硅胶色谱纯化,得到呈白色固体状的2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}-3-{3-[2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基]-1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-1-基}丙酸苄酯(100mg,38%)。ESI-MS(+):MS m/z 610.3。

[0703] 步骤6:

[0704] 在室温使氢气缓慢鼓泡通过来自步骤5的2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}-3-{3-[2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基]-1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-1-基}丙酸苄酯(100mg,0.164mmol)及Pd-C(4.36mg,4.10μmol)于MeOH(5mL)中的溶液6小时。反应混合物经由硅藻土(Celite<sup>®</sup>)过滤且蒸发,得到2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}-3-{3-[2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基]-1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-1-基}丙酸(80mg,94%),其未经纯化即用于下一步。ESI-MS(+):MS m/z 520.4。

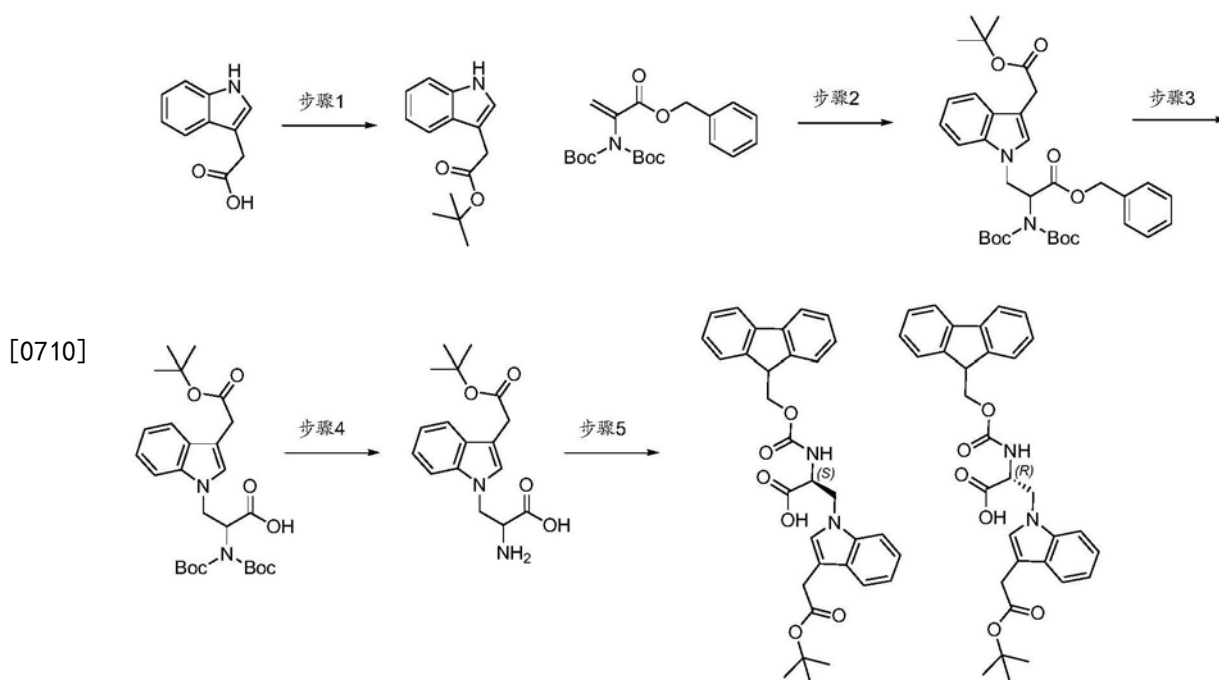
[0705] 步骤7:

[0706] 将含4M HCl的二噁烷(2mL)添加至来自步骤6的2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}-3-{3-[2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基]-1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-1-基}丙酸中。搅拌混合物30分钟,随后浓缩,得到作为粗产物的2-氨基-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-1-基)丙酸。ESI-MS(+):MS m/z 320.1。

[0707] 步骤8:

[0708] 将碳酸氢钠(67.1mg,0.8mmol)及FMOC-OSU(53.9mg,0.160mmol)添加至2-氨基-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-1-基)丙酸(51mg,0.16mmol)于THF/水(4mL,1:1)中的溶液中。搅拌所得混合物2小时。添加5%柠檬酸以调节pH=7且水相用乙酸乙酯萃取,经硫酸钠干燥且真空浓缩。粗产物通过硅胶色谱纯化,得到作为产物的2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡咯并[3,2-b]吡啶-1-基)丙酸(10.7mg,12%)。ESI-MS(+):MS m/z 542.2。

[0709] (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸及(R)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸的制备



[0711] 步骤1:

[0712] 向2-(1H-吲哚-3-基)乙酸(500mg, 2.85mmol)于DCM(25mL)及THF(2mL)中的溶液中添加2,2,2-三氯亚氨基乙酸叔丁酯(2.041mL, 11.42mmol)。在室温搅拌反应物18小时。蒸发反应挥发物且在硅胶上纯化粗物质(40g柱, 5-50%EtOAc:Hex), 得到呈黄色油状的产物2-(1H-吲哚-3-基)乙酸叔丁酯(200mg, 0.865mmol, 30.3%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ 7.55(dt, J=8.0, 1.0Hz, 1H), 7.36(dt, J=8.2, 0.8Hz, 1H), 7.15(s, 1H), 7.12(td, J=7.6, 1.1Hz, 1H), 7.05-7.01(m, 1H), 3.67(d, J=0.8Hz, 2H), 1.46(s, 9H)。

[0713] 步骤2:

[0714] 向2-(1H-吲哚-3-基)乙酸叔丁酯(0.57g, 2.5mmol)及2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}丙-2-烯酸苄酯(0.85g, 2.2mmol)于乙腈(15mL)中的溶液中添加碳酸钾(1.9g, 13mmol)。在室温搅拌反应物18小时。在室温搅拌后, 尚未发生反应。随后将反应物加热至50℃且保持24小时。将反应物冷却, 用EtOAc稀释且用水洗涤。有机层用盐水洗涤; 收集; 经MgSO<sub>4</sub>干燥; 过滤且蒸发, 得到粗产物。粗产物经由硅胶纯化(40g柱, 5-40%EtOAc:Hex), 得到呈透明油状的2-(二(((2-甲基-2-丙基)氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-((2-甲基-2-丙基)氧基)-2-氧代乙基)-1H-吲哚-1-基)丙酸苄酯(830mg, 1.4mmol, 61%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, 氯仿-d) δ 7.59(d, J=7.9Hz, 1H), 7.41-7.38(m, 6H), 7.33-7.30(m, 1H), 7.19(td, J=7.6, 1.0Hz, 1H), 7.13-7.08(m, 1H), 7.05(s, 1H), 5.28-5.19(m, 3H), 4.87(dd, J=15.1, 4.7Hz, 1H), 3.68-3.55(m, 2H), 1.47(s, 9H), 1.43(s, 9H), 1.28(s, 9H)。分析条件A: 保留时间=1.69min; ESI-MS(+)*m/z* 631.3(M+Na)。

[0715] 步骤3:

[0716] 使氢气缓慢鼓泡通过2-(二(((2-甲基-2-丙基)氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-((2-甲基-2-丙基)氧基)-2-氧代乙基)-1H-吲哚-1-基)丙酸苄酯(830mg, 1.4mmol)及Pd-C(36mg, 0.034mmol)于MeOH(10mL)中的溶液且随后在室温在氢气正压下保持2天。反应物经由尼龙玻璃料过滤器过滤且蒸发挥发物, 得到呈透明油状的2-(二(((2-甲基-2-丙基)氧

基)羰基)氨基)-3-(3-(2-((2-甲基-2-丙基)氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸(700mg,1.4mmol,100%产率)。分析条件A:保留时间=1.46min;ESI-MS(+) $m/z$  541.3(M+Na)。

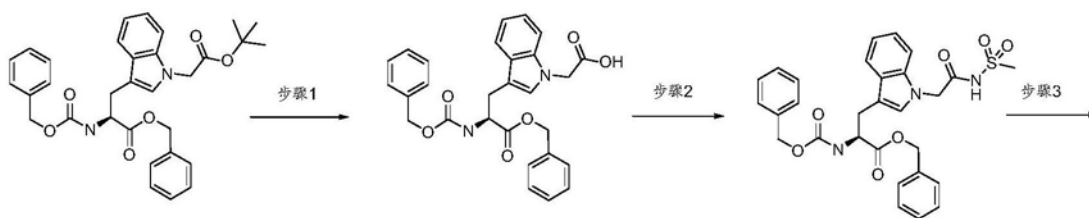
[0717] 步骤4:

[0718] 在氮气正压向下向HCl于二噁烷中的0℃溶液(4M,5.0ml)中添加2-(二((2-甲基-2-丙基)氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-((2-甲基-2-丙基)氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸(700mg,1.4mmol)。移开冰浴且在室温搅拌反应物30分钟。在不加热的情况下减压蒸发反应挥发物,得到呈粘性油状的2-氨基-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸盐(480mg,1.4mmol,100%产率)。分析条件A:保留时间=0.91min;ESI-MS(+) $m/z$  262.95(M-叔丁基)。

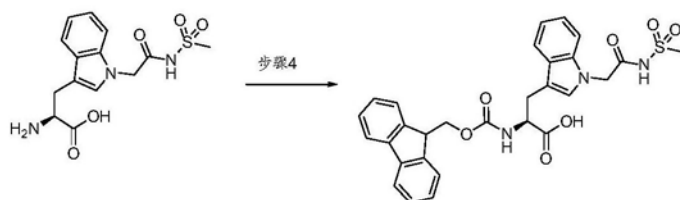
[0719] 步骤5:

[0720] 向2-氨基-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸盐(480mg,1.4mmol)及碳酸氢钠(570mg,6.8mmol)于丙酮(5.00mL)及水(10mL)中的溶液中添加碳酸(9H-芴-9-基)甲酯(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯(460mg,1.4mmol)。搅拌反应物18小时。反应物在剧烈搅拌下用HCl水溶液(1.0M)缓慢酸化至pH 5。用DCM分离反应溶液。有机层先后用水和盐水洗涤。收集有机层;经MgSO<sub>4</sub>干燥且减压浓缩,得到粗产物。在硅胶上纯化粗物质(40g柱,20-80%EtOAc:Hex),得到呈白色泡沫状的产物。对纯化的物质进行SFC用于手性分离。来自SFC的第一洗脱峰为(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸(90mg,0.166mmol,12.28%产率)。第2洗脱峰为(R)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸(88mg,0.16mmol,12%产率)。分析条件A:保留时间=1.44min;ESI-MS(+) $m/z$  563.1(M+Na)。

[0721] (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(甲基磺酰氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基)丙酸的制备



[0722]



[0723] 步骤1:

[0724] 向(S)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基)丙酸苄酯(1.2g,2.2mmol)溶解于DCM(10mL)中的溶液中添加TFA(10mL)。在室温搅拌反应物1小时。蒸发反应挥发物且置于高真空下过夜,得到产物(S)-2-(3-(3-(苄基氧基)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-氧代丙基)-1H-吡啶-1-基)乙酸(1.0g,2.1mmol,93%

产率)。分析条件A:保留时间=1.25min;ESI-MS (+) m/z 509.2 (M+Na)。

[0725] 步骤2:

[0726] 向(S)-2-(3-(3-(苄基氧基)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-氧代丙基)-1H-吡啶-1-基)乙酸(1.01g, 2.076mmol)溶解于无水DCM(20mL)中的溶液中添加甲磺酰胺(0.197g, 2.076mmol)、EDC(0.438g, 2.284mmol)及DMAP(0.279g, 2.284mmol)。在室温搅拌反应物4天。溶液先后用HCl水溶液(1M)和盐水洗涤;收集;经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤且减压蒸发,得到粗物质(S)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(甲基磺酰氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基)丙酸苄酯(900mg, 1.6mmol, 77%产率)。分析条件A:保留时间=1.79min;ESI-MS (+) m/z 586.1 (M+Na)。

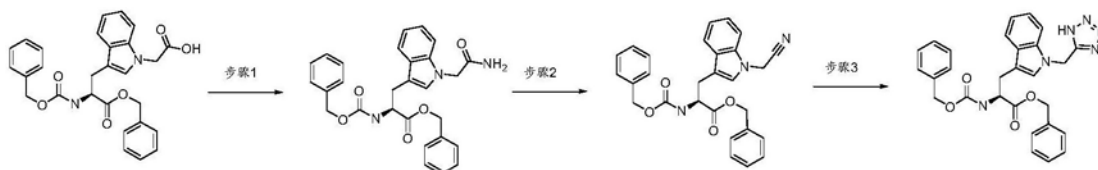
[0727] 步骤3:

[0728] 使氢气鼓泡通过(S)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(甲基磺酰氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基)丙酸苄酯(896mg, 1.590mmol)及Pd-C(169mg, 0.159mmol)于MeOH(20mL)中的溶液5分钟。随后将反应物在氢气正压下保持2小时。使氮气鼓泡通过反应物且随后经由尼龙玻璃料过滤器过滤。减压蒸发挥发物,得到呈粘性油状的产物(S)-2-氨基-3-(1-(2-(甲基磺酰氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基)丙酸(424mg, 1.25mmol, 79%产率)。分析条件A:保留时间=0.87min;ESI-MS (+) m/z 340 (M+H)。

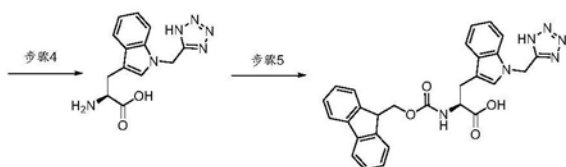
[0729] 步骤4:

[0730] 向(S)-2-氨基-3-(1-(2-(甲基磺酰氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基)丙酸(424mg, 1.249mmol)及碳酸氢钠(525mg, 6.25mmol)于丙酮(8.00mL)及水(8mL)中的溶液中添加碳酸(9H-芴-9-基)甲酯(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯(421mg, 1.249mmol)。搅拌反应物18小时。反应物在剧烈搅拌下用HCl水溶液(1M)缓慢酸化至pH 5。水层用25ml EtOAc分离。有机层先后用水和盐水洗涤。收集有机层,经MgSO<sub>4</sub>干燥且减压蒸发挥发物。粗物质经由反相色谱(流动相A:5%乙腈、95%水、10mM乙酸铵;流动相B:95%乙腈、5%水、10mM乙酸铵;经20倍柱体积10%B-50%B)纯化,得到呈灰白色固体状的产物(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(甲基磺酰氨基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-3-基)丙酸(330mg, 0.59mmol, 47%产率)。分析条件B:保留时间=1.14min;ESI-MS (+) m/z 561.9 (M+H)。

[0731] (S)-3-(1-((1H-四唑-5-基)甲基)-1H-吡啶-3-基)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)丙酸的制备



[0732]



[0733] 步骤1:

[0734] 向(S)-2-(3-(3-(苄基氧基)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-氧代丙基)-1H-吡

咪-1-基)乙酸(0.897g,1.844mmol)的溶液中添加CDI(0.389g,2.397mmol)且搅拌反应物3小时。随后添加氢氧化铵(0.287mL,7.37mmol)且再搅拌反应物3小时。反应物用DCM(50mL)稀释且用HCl水溶液(1M)洗涤。有机层用盐水洗涤;收集;经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤且蒸发,得到粗产物(S)-3-(1-(2-氨基-2-氧代乙基)-1H-咪唑-3-基)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)丙酸苄酯(865mg,1.782mmol,97%产率),其按原样用于下一步反应。分析条件A:保留时间=1.14min;ESI-MS(+)*m/z* 561.9(M+H)。

[0735] 步骤2:

[0736] 在室温向(S)-3-(1-(2-氨基-2-氧代乙基)-1H-咪唑-3-基)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)丙酸苄酯(865mg,1.782mmol)于DMF(12mL)中的溶液中添加2,4,6-三氯-1,3,5-三嗪(164mg,0.891mmol)。搅拌反应物18小时。再添加1当量所述三嗪且在2小时后LCMS显示完全进展成产物。反应物用EtOAc稀释且用水洗涤。有机层用盐水洗涤;收集;经MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤且蒸发。粗产物在硅胶上纯化(40g柱,10-50%EtOAc:Hex),得到呈浅棕色泡沫状的产物(S)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(1-(氰基甲基)-1H-咪唑-3-基)丙酸苄酯(600mg,1.28mmol,72%产率)。分析条件A:保留时间=1.33min;ESI-MS(+)*m/z* 490.2(M+Na)。

[0737] 步骤3:

[0738] 向(S)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(1-(氰基甲基)-1H-咪唑-3-基)丙酸苄酯(300mg,0.642mmol)于水(2.0ml)及2-丙醇(1.0ml)中的溶液中添加叠氮化钠(83mg,1.283mmol)及溴化锌(II)(72.3mg,0.321mmol)且加热至90℃。加热反应物且搅拌18小时。反应物冷却后,先后添加HCl水溶液(1M,10mL)和EtOAc(50mL)。有机层用盐水洗涤;收集;经MgSO<sub>4</sub>干燥;过滤且蒸发,得到粗物质(S)-3-(1-((1H-四唑-5-基)甲基)-1H-咪唑-3-基)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)丙酸苄酯(328mg,0.6mmol,100%产率)。分析条件A:保留时间=1.23min;ESI-MS(+)*m/z* 533.3(M+Na)。

[0739] 步骤4:

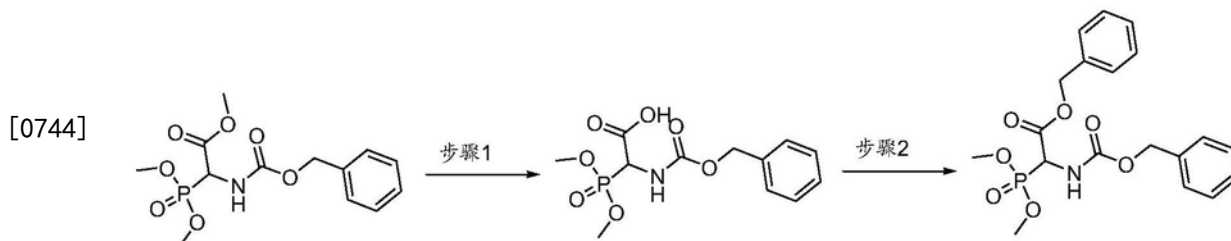
[0740] 使氢气鼓泡通过(S)-3-(1-((1H-四唑-5-基)甲基)-1H-咪唑-3-基)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)丙酸苄酯(160mg,0.31mmol)及Pd-C(33mg,0.03mmol)于MeOH(5mL)中的溶液5分钟。随后将反应物在搅拌下在氢气正压下保持2天。反应物经由尼龙玻璃料过滤器过滤且减压蒸发。产物(S)-3-(1-((1H-四唑-5-基)甲基)-1H-咪唑-3-基)-2-氨基丙酸(89mg,0.311mmol,100%产率)直接用于下一步。分析条件A:保留时间=0.7min;ESI-MS(+)*m/z* 287(M+H)。

[0741] 步骤5:

[0742] 向(S)-3-(1-((1H-四唑-5-基)甲基)-1H-咪唑-3-基)-2-氨基丙酸(89mg,0.31mmol)及碳酸氢钠(130mg,1.6mmol)于丙酮(2.0mL)及水(4.0mL)中的溶液中添加碳酸(9H-芴-9-基)甲酯(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯(110mg,0.31mmol)。搅拌反应物18小时。反应物在剧烈搅拌下用HCl水溶液(1M)缓慢酸化至pH5。反应物用DCM分离。有机层先后用水和盐水洗涤。收集有机层;经MgSO<sub>4</sub>干燥且减压蒸发挥发物,得到粗产物。粗物质在制备型HPLC上纯化(SunFirePrep C18 30×100柱尺寸;经15分钟梯度10-100%95:5CH<sub>3</sub>CN:水+0.1%TFA缓冲液),得到呈白色固体状的产物(S)-3-(1-((1H-四唑-5-基)甲基)-1H-咪唑-3-基)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)丙酸(104mg,0.205mmol,65.8%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,甲醇-d<sub>4</sub>) $\delta$ 7.77(d,J=7.4Hz,2H),7.66-7.63(m,1H),7.59(dd,J=7.4,3.2Hz,

1H), 7.40-7.34 (m, 3H), 7.33 (d, J=8.2Hz, 2H), 7.29-7.21 (m, 3H), 7.20-7.15 (m, 2H), 7.11-7.06 (m, 1H), 5.70-5.62 (m, 2H), 4.57-4.51 (m, 1H), 4.36-4.19 (m, 2H), 4.17-4.10 (m, 1H), 3.37 (dd, J=14.7, 4.9Hz, 1H), 3.23-3.10 (m, 1H)。分析条件A: 保留时间=1.14min; ESI-MS (+) m/z 509.1 (M+H)。

[0743] 2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-2-(二甲氧基磷酰基)乙酸苄酯的制备



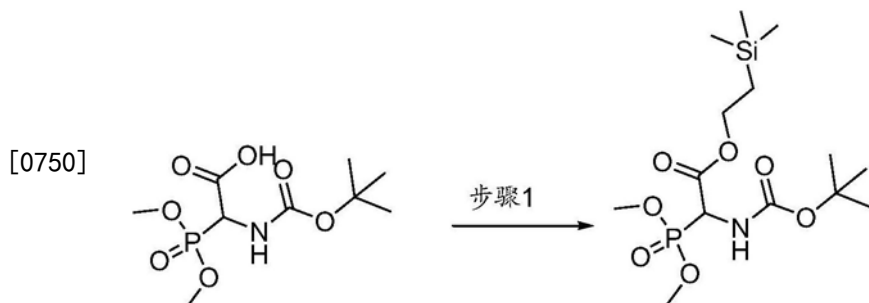
[0745] 步骤1:

[0746] 向2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-2-(二甲氧基磷酰基)乙酸甲酯(10g, 30mmol)于THF (50mL)及MeOH (50mL)中的溶液中缓慢逐滴添加氢氧化锂单水合物水溶液(18mL, 2.0M)。在室温搅拌反应物1小时。反应物用HCl水溶液(1.0M)酸化且用EtOAc萃取。有机层用盐水洗涤;经MgSO<sub>4</sub>干燥;过滤且蒸发,得到粗物质2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-2-(二甲氧基磷酰基)乙酸(8.0g, 25mmol, 84%产率)。分析条件A: 保留时间=1.06min; ESI-MS (+) m/z 339.8 (M+Na)。

[0747] 步骤2:

[0748] 向2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-2-(二甲氧基磷酰基)乙酸(8.0g, 25mmol)及DBU (3.8mL, 25mmol)于乙腈(17mL)中的溶液中添加(溴甲基)苯(3.15mL, 26.5mmol)。在室温搅拌反应物18小时。反应物用水稀释且用EtOAc萃取。有机层用盐水洗涤;经MgSO<sub>4</sub>干燥;过滤且蒸发,得到粗产物。粗产物在硅胶上纯化(80g柱, 0-100%EtOAc:Hex),得到呈白色固体状的产物2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-2-(二甲氧基磷酰基)乙酸苄酯(4.5g, 11mmol, 44%产率)。<sup>1</sup>HNMR (500MHz, 氯仿-d) δ7.47-7.32 (m, 10H), 5.64 (d, J=7.9Hz, 1H), 5.33 (d, J=12.1Hz, 1H), 5.24 (d, J=12.1Hz, 1H), 5.21-5.11 (m, 2H), 5.04-4.94 (m, 1H), 3.79-3.67 (m, 6H)。分析条件A: 保留时间=1.39min; ESI-MS (+) m/z 430.0 (M+Na)。

[0749] 2-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(二甲氧基磷酰基)乙酸2-(三甲基硅烷基)乙酯的制备

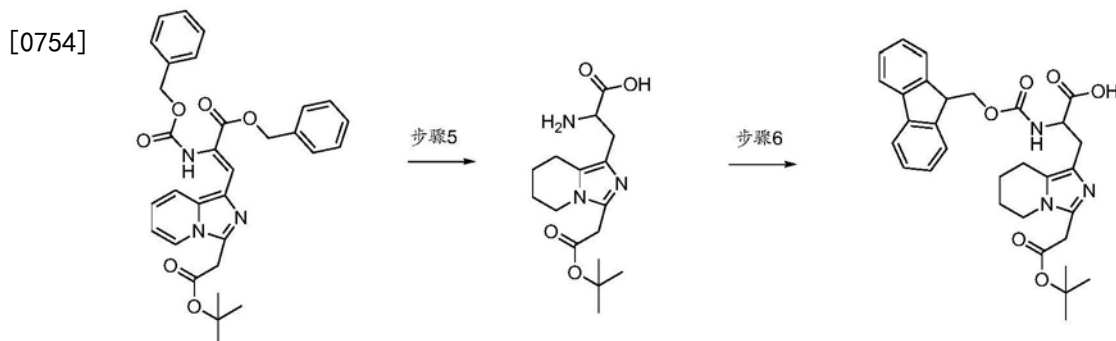
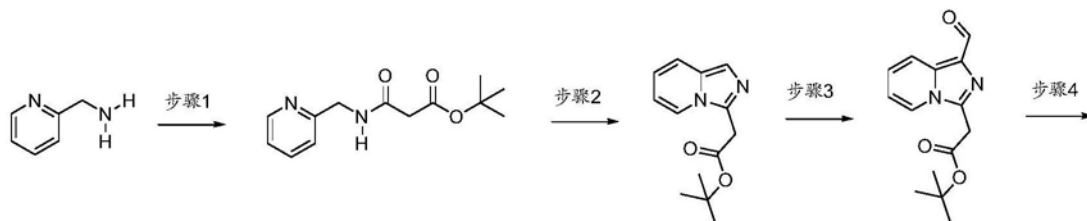


[0751] 步骤1:

[0752] 向2-(((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(二甲氧基磷酰基)乙酸(3.44g, 12.15mmol)悬浮于DCM(100mL)中的溶液中先后添加DMAP(0.148g, 1.215mmol)和2-(三甲基硅烷基)乙醇(1.741mL, 12.15mmol)及N1-((乙基亚氨基)亚甲基)-N3,N3-二甲基丙烷-1,3-二胺盐酸盐

(2.79g, 14.58mmol)。在室温搅拌反应物2小时。有机层先后用HCl (1M) 和盐水洗涤。收集有机层, 经MgSO<sub>4</sub>干燥, 过滤且蒸发挥发物, 得到呈透明油状的产物2-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(二甲氧基磷酰基)乙酸2-(三甲基硅烷基)乙酯(4.4g, 11.47mmol, 94%产率)。<sup>1</sup>HNMR (500MHz, 氯仿-d) δ4.94-4.78 (m, 1H), 4.39-4.25 (m, 2H), 3.84 (d, J=4.9Hz, 3H), 3.86 (d, J=5.0Hz, 3H), 1.48 (s, 9H), 1.15-1.05 (m, 2H), 0.09-0.06 (m, 9H)。

[0753] 2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-5,6,7,8-四氢咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)丙酸的制备



[0755] 步骤1:

[0756] 向3-(叔丁氧基)-3-氧代丙酸(0.7mL, 4.6mmol)、吡啶-2-基甲胺(0.48mL, 4.6mmol)及EDC(0.98g, 5.1mmol)的溶液中添加DMAP(0.62g, 5.1mmol)。在室温搅拌反应物2小时。减压蒸发溶剂且随后用EtOAc稀释。有机层用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤且随后用盐水洗涤; 收集; 经MgSO<sub>4</sub>干燥, 过滤且蒸发, 得到粗产物。粗产物经由硅胶纯化(40g柱, 0-5% MeOH:DCM), 得到呈黄色油状的产物3-氧代-3-((吡啶-2-基甲基)氨基)丙酸叔丁酯(830mg, 3.3mmol, 72%产率)。分析条件A: 保留时间=0.882min; ESI-MS (+) m/z 251.2 (M+H)。

[0757] 步骤2:

[0758] 在0℃向3-氧代-3-((吡啶-2-基甲基)氨基)丙酸叔丁酯(2g, 8.0mmol)及吡啶(3.9mL, 48mmol)于DCM(53mL)中的溶液中添加POCl<sub>3</sub>(0.90mL, 9.6mmol)且使其升温至室温。搅拌反应物1小时。将反应物质转移至分液漏斗中且用饱和碳酸钠水溶液洗涤。有机层用盐水洗涤; 收集; 经MgSO<sub>4</sub>干燥; 过滤且蒸发, 得到粗产物2-(咪唑并[1,5-a]吡啶-3-基)乙酸叔丁酯(1.8g, 7.8mmol, 97%产率)。分析条件A: 保留时间=0.942min; ESI-MS (+) m/z 233.2 (M+H)。

[0759] 步骤3:

[0760] 在0℃向DMF(0.40mL, 5.2mmol)及吡啶(2.1mL, 26mmol)于DCM(29mL)中的溶液中添加POCl<sub>3</sub>(0.50mL, 5.2mmol)且搅拌5分钟。2-(咪唑并[1,5-a]吡啶-3-基)乙酸叔丁酯(1.0g, 4.3mmol)随后以于DCM(5.0mL)中的溶液形式添加且使其升温至室温。搅拌反应物18小时。反应物随后添加饱和碳酸钠水溶液且剧烈搅拌10分钟。随后分离两相混合物且有机层用盐

水洗涤;收集;经MgSO<sub>4</sub>干燥;过滤且蒸发挥发物,得到粗物质。粗物质在硅胶上纯化(80g柱, 20-80%EtOAc:Hex),得到呈棕色片状固体状的纯产物2-(1-甲酰基咪唑并[1,5-a]吡啶-3-基)乙酸叔丁酯(876mg, 3.37mmol, 78%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ9.97(s, 1H), 8.41(d, J=7.1Hz, 1H), 8.25(dt, J=9.1, 1.1Hz, 1H), 7.47(ddd, J=9.1, 6.7, 0.9Hz, 1H), 7.13(td, J=6.9, 1.1Hz, 1H), 4.24(s, 2H), 1.49-1.38(m, 9H)。分析条件A:保留时间=2.1min; ESI-MS(+) m/z 261(M+H)。

[0761] 步骤4:

[0762] 在氮气气氛下向2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-2-(二甲氧基磷酰基)乙酸苄酯(850mg, 2.1mmol)于DCM(15mL)中的溶液中缓慢添加DBU(0.29mL, 1.9mmol)。10分钟后,将2-(1-甲酰基咪唑并[1,5-a]吡啶-3-基)乙酸叔丁酯(450mg, 1.729mmol)于2mL DCM中缓慢添加至反应混合物中。搅拌反应物18小时。蒸发反应物且通过硅胶色谱纯化(80g柱, 20-50%EtOAc:Hex),得到呈透明油状的产物(Z)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)丙烯酸苄酯(800mg, 1.5mmol, 85%产率)。分析条件A:保留时间=1.49min; ESI-MS(+) m/z 542.5(M+H)。

[0763] 步骤5:

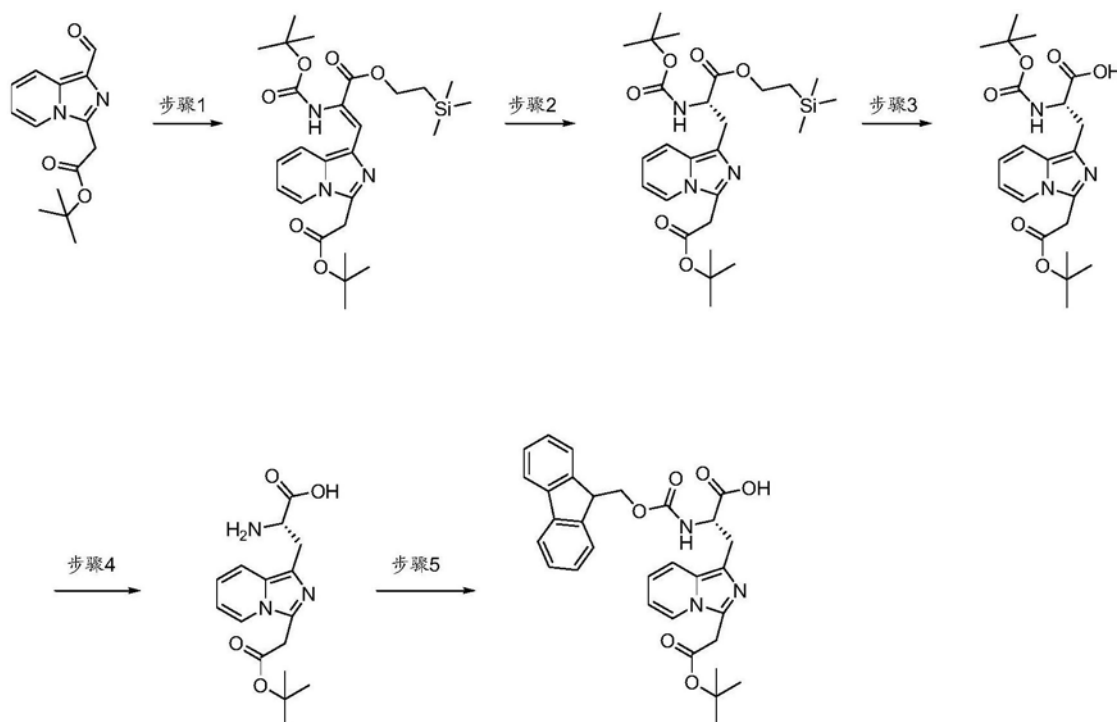
[0764] 在室温使氮气鼓泡通过(Z)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)丙烯酸苄酯(400mg, 0.739mmol)于MeOH(10mL)中的溶液5分钟。随后添加Pd-C(79mg, 0.074mmol)且接着用氢气鼓泡反应溶液5分钟,随后在搅拌下在氢气正压下保持2小时。反应物经由尼龙玻璃料过滤器过滤且蒸发挥发物,得到产物2-氨基-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-5,6,7,8-四氢咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)丙酸(239mg, 0.739mmol, 100%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ3.96-3.82(m, 2H), 3.82-3.69(m, 1H), 2.94-2.83(m, 1H), 2.82-2.63(m, 2H), 2.02-1.92(m, 2H), 1.87-1.79(m, 2H), 1.51-1.45(m, 9H)。分析条件A:保留时间=0.747min; ESI-MS(+) m/z 324.2(M+H)。

[0765] 步骤6:

[0766] 向2-氨基-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-5,6,7,8-四氢咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)丙酸(240mg, 0.74mmol)及碳酸氢钠(310mg, 3.7mmol)于丙酮(5mL)及水(5mL)中的溶液中添加碳酸(9H-芴-9-基)甲酯(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯(250mg, 0.740mmol)。搅拌反应物18小时。反应物在剧烈搅拌下用HCl水溶液(1.0M)缓慢酸化至pH 5。反应物用25mL EtOAc分离。有机层先后用水和盐水洗涤。收集有机层;经MgSO<sub>4</sub>干燥;过滤且减压蒸发挥发物,得到粗产物。粗物质经由反相色谱纯化(55g柱, 10-100%CH<sub>3</sub>CN:水+0.1%TFA),得到呈白色固体状的产物2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-5,6,7,8-四氢咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)丙酸(300mg, 0.55mmol, 74%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ7.86-7.77(m, 2H), 7.71-7.61(m, 2H), 7.45-7.37(m, 2H), 7.37-7.29(m, 2H), 4.40-4.17(m, 5H), 4.00(t, J=6.0Hz, 3H), 3.21-3.07(m, 1H), 2.96(dd, J=15.0, 8.4Hz, 1H), 2.80-2.72(m, 2H), 2.06-1.87(m, 2H), 1.87-1.75(m, 2H), 1.51-1.40(m, 9H)。分析条件A:保留时间=1.13min; ESI-MS(+) m/z 546.4(M+H)。

[0767] (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)丙酸的制备

[0768]



[0769] 步骤1:

[0770] 在氮气气氛下向2-((叔丁氧基羰基)氨基)-2-(二甲氧基膦酰基)乙酸2-(三甲基硅烷基)乙酯(4.75g, 12.4mmol)于DCM(25mL)中的溶液中缓慢添加DBU(1.9mL, 12.3mmol)。10分钟后,将含2-(1-甲酰基咪唑并[1,5-a]吡啶-3-基)乙酸叔丁酯(1.00g, 3.84mmol)的DCM(5mL)缓慢添加至反应混合物中。搅拌反应物18小时。蒸发反应挥发物且通过硅胶色谱纯化粗物质(80g柱, 20-50%EtOAc:Hex),得到呈透明油状的产物(Z)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙烯酸2-(三甲基硅烷基)乙酯(1.39g, 2.30mmol, 70%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ8.13(d, J=7.1Hz, 1H), 7.74(dt, J=9.2, 1.1Hz, 1H), 7.06(s, 1H), 7.02(ddd, J=9.3, 6.5, 0.8Hz, 1H), 6.87-6.79(m, 1H), 4.43-4.29(m, 2H), 4.17(s, 2H), 1.52-1.48(m, 9H), 1.46(s, 9H), 1.17-1.10(m, 2H), 0.13-0.09(m, 9H)。分析条件F:保留时间=2.24min;ESI-MS(+)m/z 518.4(M+H)。

[0771] 步骤2:

[0772] (Z)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙烯酸2-(三甲基硅烷基)乙酯(1.40g, 2.69mmol)于四氢呋喃(30mL)中的溶液用(+)-1,2-二((2s,5s)-2,5-二乙基磷杂环戊-1-基)苯(环辛二烯)三氟甲磺酸铯(i)(0.06g, 0.081mmol)处理且在帕尔高压容器中置于氢气气氛(20巴)下。搅拌反应物72小时。蒸发反应挥发物且在硅胶上纯化粗物质(80g柱, 5-40%EtOAc:Hex),得到呈淡橙色泡沫状的产物(S)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸2-(三甲基硅烷基)乙酯(380mg, 0.729mmol, 27%产率)。分析条件F:保留时间=1.64min;ESI-MS(+)m/z 520.5(M+H)。

[0773] 步骤3:

[0774] 在室温向(S)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸2-(三甲基硅烷基)乙酯(240mg, 0.462mmol)于THF(4mL)中的溶

液中添加四正丁基氟化铵 (0.460mL, 0.462mmol) 且搅拌1小时。随后蒸发反应挥发物且用 EtOAc (10mL) 稀释。有机层随后经MgSO<sub>4</sub>干燥, 经由尼龙玻璃料过滤器过滤且减压蒸发挥发物。随后将残余物置于高真空下30分钟, 得到产物 (S)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸 (194mg, 0.462mmol, 100%产率), 其为深橙色残余物。分析条件A: 保留时间=0.93min; ESI-MS (+) m/z 420.2 (M+H)。

[0775] 步骤4:

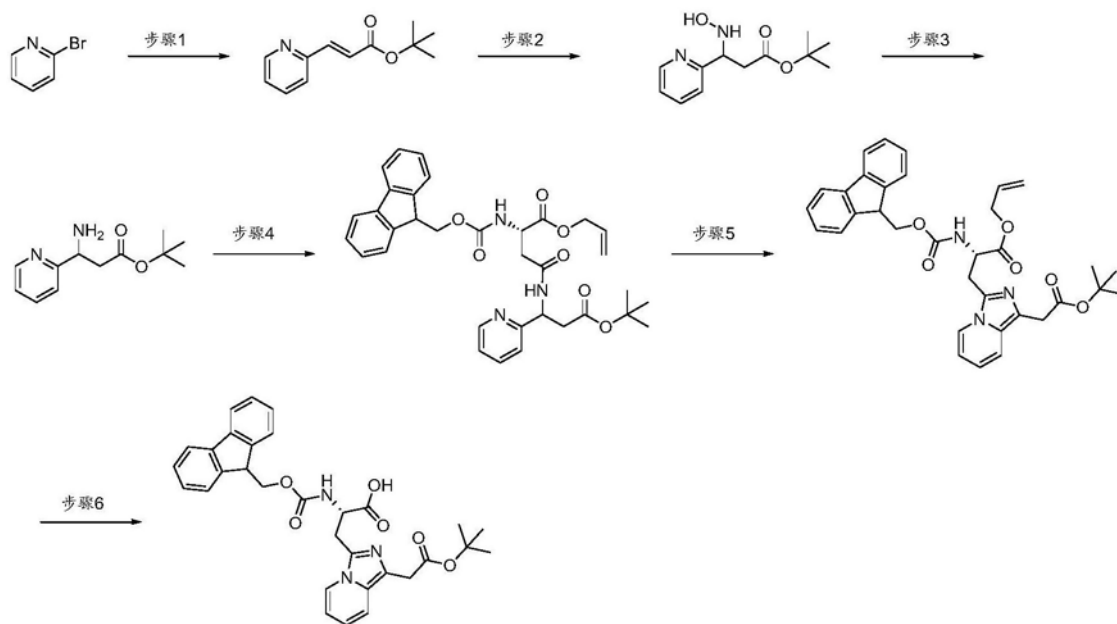
[0776] 在氮气正压下向含有 (S)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)-2-((叔丁氧基羰基)氨基)丙酸 (194mg, 0.462mmol) 的小瓶中添加HCl (1.2mL, 4M于二噁烷中) 且在室温搅拌1小时。随后在室温减压蒸发反应挥发物, 得到呈粘性泡沫状的产物 (S)-2-氨基-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)丙酸盐 (165mg, 0.464mmol, 100%产率)。分析条件F: 保留时间=0.96min; ESI-MS (+) m/z 320.1 (M+H)。

[0777] 步骤5:

[0778] 将碳酸(9H-芴-9-基)甲酯(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯 (203mg, 0.603mmol) 添加至 (S)-2-氨基-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)丙酸盐 (195mg, 0.548mmol) 及碳酸氢钠 (230mg, 2.74mmol) 于丙酮 (3mL) 及水 (3mL) 中的溶液中且在室温搅拌1小时。反应物用HCl (1M) 中和以达到pH5-6。经中和的溶液随后用EtOAc及水稀释。有机层用盐水洗涤; 收集; 经MgSO<sub>4</sub>干燥; 过滤且蒸发挥发物, 得到粗物质。粗物质在制备型HPLC上纯化 (SunFire Prep C18 30×100柱尺寸; 经15分钟梯度10-100% 95:5CH<sub>3</sub>CN:水+0.1% TFA缓冲液), 得到呈棕色泡沫状的纯产物 (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-1-基)丙酸 (165mg, 0.305mmol, 55.6%产率)。分析条件A: 保留时间=1.09min; ESI-MS (+) m/z 542.3 (M+H)。

[0779] (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-3-基)丙酸的制备

[0780]



[0781] 步骤1:

[0782] 向2-溴吡啶(2.50ml, 25.3mmol)、丙烯酸叔丁酯(18.4ml, 127mmol)、1,4-二氮杂二环[2.2.2]辛烷(0.114g, 1.013mmol)、碳酸钾(3.50g, 25.3mmol)及四丁基溴化铵(8.16g, 25.3mmol)于经脱气的DMF(100ml)中的溶液中添加乙酸钡(II)(0.114g, 0.506mmol)且在压力容器加热至120℃并搅拌14小时。14小时后,将反应物冷却,倒入水(100ml)中且用EtOAc(100ml)萃取。有机层用水、盐水洗涤;收集;经MgSO<sub>4</sub>干燥;过滤且蒸发挥发物,得到粗产物。粗产物经由硅胶色谱纯化(120g柱, 5-25%EtOAc:Hex),得到呈棕色油状的产物(E)-3-(吡啶-2-基)丙烯酸叔丁酯(1.5g, 7.31mmol, 28.9%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, 氯仿-d) δ 8.69-8.59(m, 1H), 7.76-7.68(m, 1H), 7.65-7.55(m, 1H), 7.47-7.40(m, 1H), 7.27(ddd, J=7.6, 4.8, 1.1Hz, 1H), 6.85(d, J=15.8Hz, 1H), 1.60-1.50(m, 9H)。分析条件A:保留时间=1.02min;ESI-MS(+) m/z 206.1(M+H)。

[0783] 步骤2:

[0784] 向(E)-3-(吡啶-2-基)丙烯酸叔丁酯(1.00g, 4.87mmol)于1,4-二噁烷(35mL)中的溶液中先后添加羟胺(50%于水中, 3.22g, 48.7mmol)和四正丁基硫酸铵(50%于水中, 0.06g, 0.049mmol)。搅拌反应物4天。反应物随后用EtOAc稀释且用水洗涤。有机层随后用盐水洗涤;收集;经MgSO<sub>4</sub>干燥;过滤且蒸发挥发物,得到产物3-(羟基氨基)-3-(吡啶-2-基)丙酸叔丁酯(1.10g, 4.62mmol, 95%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ 8.58-8.41(m, 1H), 7.82(td, J=7.7, 1.7Hz, 1H), 7.52(d, J=7.9Hz, 1H), 7.33(ddd, J=7.5, 5.0, 1.3Hz, 1H), 4.43(t, J=7.1Hz, 1H), 2.85-2.67(m, 2H), 1.38(s, 9H)。分析条件A:保留时间=0.80min;ESI-MS(+) m/z 239.2(M+H)。

[0785] 步骤3:

[0786] 向冷却至0℃的3-(羟基氨基)-3-(吡啶-2-基)丙酸叔丁酯(500mg, 2.10mmol)于乙酸(5mL)中的溶液中添加锌(500mg, 7.65mmol)。随后将反应物升温至室温且搅拌3小时。反应浆液用MeOH(5mL)稀释且经由尼龙玻璃料过滤器过滤。减压蒸发溶剂,随后与甲苯(20mL × 3)共沸(3次),得到粘性残余物。将粘性残余物置于高真空下24小时,得到呈白色泡沫状的产物3-氨基-3-(吡啶-2-基)丙酸叔丁酯(466mg, 2.096mmol, 100%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ 8.63(d, J=4.9Hz, 1H), 8.11-8.05(m, 1H), 7.65(d, J=8.0Hz, 1H), 7.60-7.55(m, 1H), 4.69(dd, J=7.7, 4.7Hz, 1H), 3.02-2.83(m, 2H), 1.48-1.43(m, 9H)。分析条件A:保留时间=1.10min;ESI-MS(+) m/z 223.1(M+H)。

[0787] 步骤4:

[0788] 向(S)-3-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(烯丙基氧基)-4-氧代丁酸(740mg, 1.87mmol)于DCM(15mL)中的溶液中先后添加HATU(712mg, 1.871mmol)和许尼希碱(1.634mL, 9.36mmol)且在室温搅拌20分钟。随后添加3-氨基-3-(吡啶-2-基)丙酸叔丁酯(416mg, 1.871mmol)且在室温搅拌1小时。反应物随后用水及DCM稀释。有机层用盐水洗涤;收集;经MgSO<sub>4</sub>干燥;过滤且蒸发,得到粗物质。粗物质经由硅胶纯化(40g柱, 10-70%EtOAc:Hex),得到呈浅棕色油状的产物(2S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-((3-(叔丁氧基)-3-氧代-1-(吡啶-2-基)丙基)氨基)-4-氧代丁酸烯丙酯(263mg, 0.439mmol, 23.43%产率)。分析条件A:保留时间=1.22min;ESI-MS(+) m/z 600.3(M+H)。

[0789] 步骤5:

[0790] 在0℃在1打兰小瓶中向(2S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-((3-(叔

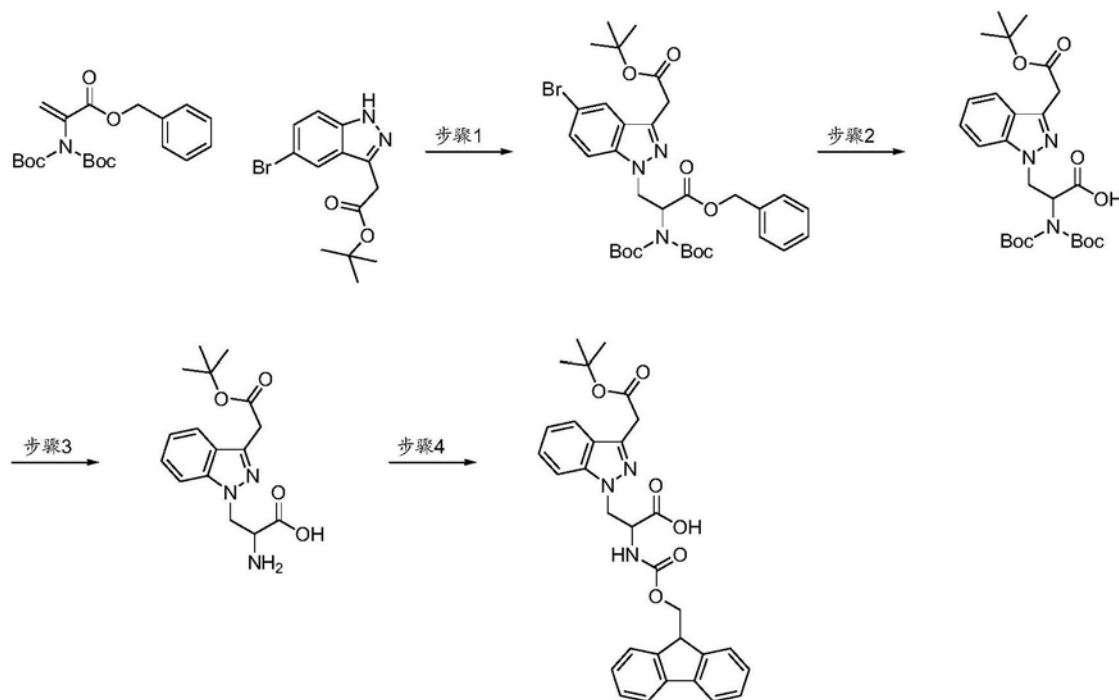
丁氧基)-3-氧代-1-(吡啶-2-基)丙基)氨基)-4-氧代丁酸烯丙酯(263mg,0.439mmol)及吡啶(0.210mL,2.63mmol)于DCM(3.00mL)中的溶液中添加POCl<sub>3</sub>(0.05mL,0.526mmol),使其升温至室温且随后搅拌18小时。搅拌18小时后,反应物用DCM稀释且用饱和碳酸钠水溶液洗涤。有机层随后用盐水洗涤;收集;经MgSO<sub>4</sub>干燥;过滤且蒸发挥发物,得到粗产物。粗产物经由硅胶色谱纯化(40g柱,10-60%EtOAc:Hex),得到呈浅棕色泡沫状的产物(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-3-基)丙酸烯丙酯(136mg,0.234mmol,53.3%产率)。分析条件A:保留时间=1.20min;ESI-MS(+)*m/z* 582.3(M+H)。

[0791] 步骤6:

[0792] 在0℃向(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-3-基)丙酸烯丙酯(136mg,0.234mmol)于THF(5mL)中的溶液中先后添加N-甲基苯胺(0.130mL,1.17mmol)和Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub>(27.0mg,0.023mmol)。随后使反应物升温至室温且搅拌1小时。蒸发反应挥发物,得到粗物质。粗物质经由制备型HPLC纯化(SunFire Prep C18 30×100柱尺寸;经15分钟梯度10-100%95:5CH<sub>3</sub>CN:水+0.1%TFA缓冲液),得到呈白色泡沫状的产物(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)咪唑并[1,5-a]吡啶-3-基)丙酸(105mg,0.194mmol,83%产率)。

[0793] 2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吲唑-1-基)丙酸的制备

[0794]



[0795] 步骤1:

[0796] 向2-(5-溴-1H-吲唑-3-基)乙酸叔丁酯(500mg,1.6mmol)及2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}丙-2-烯酸苄酯(640mg,1.7mmol)于乙腈(10mL)中的溶液中添加碳酸钾(1.3g,9.6mmol)。在室温搅拌反应物18小时。反应物用EtOAc稀释且用水洗涤。有机层用盐水洗涤;收集;经MgSO<sub>4</sub>干燥;过滤且蒸发挥发物,得到粗产物。粗产物经由反相色谱纯化(55g柱,5-

100%CH<sub>3</sub>CN:水+01.%TFA),得到呈白色固体状的2-(((2-甲基-2-丙基)氧基)羰基)氨基)-3-(5-溴-3-(2-((2-甲基-2-丙基)氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸苄酯(1.12g,1.626mmol,101%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,甲醇-d<sub>4</sub>) δ7.98-7.90(m,1H),7.49(dd,J=8.9,1.8Hz,1H),7.43-7.33(m,6H),5.49(t,J=7.2Hz,1H),5.26(d,J=2.7Hz,2H),5.04(d,J=7.1Hz,2H),3.93-3.82(m,2H),1.48-1.45(m,9H),1.31-1.27(m,18H)。分析条件A:保留时间=1.84min;ESI-MS(+)*m/z*712.2(M+Na)。

[0797] 步骤2:

[0798] 使氢气鼓泡通过2-(((2-甲基-2-丙基)氧基)羰基)氨基)-3-(5-溴-3-(2-((2-甲基-2-丙基)氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸苄酯(1.0g,1.5mmol)及Pd-C(0.16g,0.15mmol)于MeOH(20mL)中的溶液5分钟。随后将反应物在搅拌下在氢气正压下保持2小时。使氮气鼓泡通过反应物且随后浆液经由尼龙玻璃料过滤器过滤。减压蒸发挥发物,得到呈粘性油状的2-(((2-甲基-2-丙基)氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-((2-甲基-2-丙基)氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸(0.76g,1.5mmol,100%产率)。分析条件A:保留时间=1.63min;ESI-MS(+)*m/z*542.2(M+Na)。

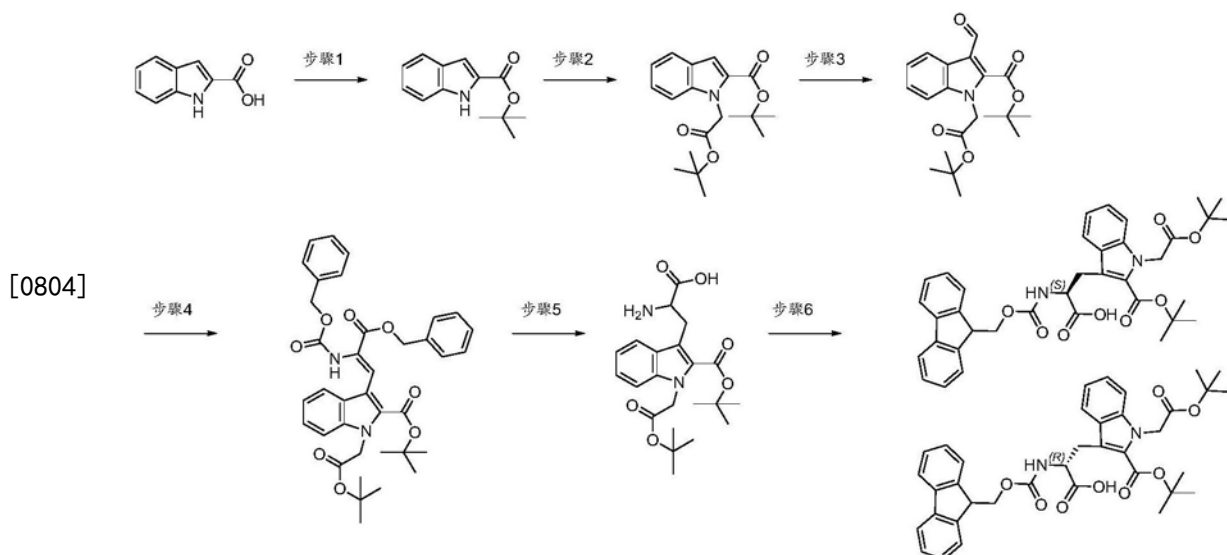
[0799] 步骤3:

[0800] 将含HCl的二噁烷(5.0ml,4.0M)添加至2-(((2-甲基-2-丙基)氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-((2-甲基-2-丙基)氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸(781mg,1.503mmol)中且在0℃搅拌30分钟,随后升温至室温并搅拌30分钟。在不加热的情况下减压蒸发反应挥发物,得到呈白色固体状的2-氨基-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸盐(540mg,1.5mmol,100%产率)。分析条件A:保留时间=1.18min;ESI-MS(+)*m/z*320(M+H)。

[0801] 步骤4:

[0802] 向2-氨基-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸盐(540mg,1.5mmol)及碳酸氢钠(630mg,7.5mmol)于丙酮(10mL)及水(10mL)中的溶液中添加碳酸(9H-芴-9-基)甲酯(2,5-二氧化吡咯烷-1-基)酯(510mg,1.5mmol)。在室温搅拌反应物18小时。反应物在剧烈搅拌下用HCl水溶液(1.0M)缓慢酸化至pH 5。水层用25ml EtOAc分离。有机层先后用水和盐水洗涤。收集有机层;经MgSO<sub>4</sub>干燥且减压蒸发挥发物,得到粗产物。粗物质经由制备型HPLC纯化(10-100%CH<sub>3</sub>CN:水+0.1%TFA),得到呈灰白色固体状的纯产物2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-1-基)丙酸(131mg,0.242mmol,16.1%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,甲醇-d<sub>4</sub>) δ7.79(d,J=7.4Hz,2H),7.71(d,J=8.2Hz,1H),7.58-7.50(m,3H),7.41-7.34(m,3H),7.26(q,J=7.4Hz,2H),7.13(t,J=7.5Hz,1H),4.85-4.81(m,2H),4.79-4.68(m,1H),4.17(dd,J=7.3,1.7Hz,2H),4.08(d,J=7.3Hz,1H),3.92(s,2H),1.46-1.39(m,9H)。分析条件A:保留时间=1.75min;ESI-MS(+)*m/z*542.1(M+H)。

[0803] (S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-2-(叔丁氧基羰基)-1H-吡啶-3-基)丙酸及(R)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-2-(叔丁氧基羰基)-1H-吡啶-3-基)丙酸的制备



[0805] 步骤1:

[0806] 向1H-吲哚-2-甲酸(2.0g, 12.4mmol)于DCM(50mL)中的0℃溶液中添加2,2,2-三氯亚氨代乙酸叔丁酯(2.4mL, 13.7mmol)且在0℃搅拌30分钟,随后升温至室温。搅拌反应物18小时。过滤反应物且减压蒸发挥发物,得到粗物质,其经由硅胶纯化(40g柱, 5-40%EtOAc:Hex),得到呈透明油状的1H-吲哚-2-甲酸叔丁酯(2.2g, 9.9mmol, 80%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, 氯仿-d) δ8.90(br. s., 1H), 7.70(dd, J=8.0, 0.9Hz, 1H), 7.44(dd, J=8.4, 0.9Hz, 1H), 7.33(ddd, J=8.2, 7.1, 1.1Hz, 1H), 7.19-7.13(m, 2H), 1.65(s, 9H)。

[0807] 步骤2:

[0808] 向2-溴乙酸叔丁酯(0.85mL, 5.8mmol)及1H-吲哚-2-甲酸叔丁酯(1.2g, 5.3mmol)的溶液中添加碳酸铯(1.9g, 5.8mmol)。在室温搅拌反应物18小时。反应物用水稀释且用EtOAc萃取。有机层先后用水和盐水洗涤;收集;经MgSO<sub>4</sub>干燥;过滤且蒸发挥发物,得到粗产物。在硅胶色谱上纯化粗产物(40g柱, 10-60%EtOAc:Hex),得到呈浅黄色油状的1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吲哚-2-甲酸叔丁酯(1.7g, 5.2mmol, 97%产率)。分析条件A:保留时间=1.54min;ESI-MS(+) m/z 332.0(M+H)。

[0809] 步骤3:

[0810] 在室温向1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吲哚-2-甲酸叔丁酯(1.7g, 5.2mmol)于DCM(50mL)及DMF(0.80mL, 10mmol)中的搅拌溶液中添加POCl<sub>3</sub>(0.96mL, 10mmol)且随后平缓回流1小时。随后将反应物冷却至室温。蒸发反应挥发物且粗物质在硅胶上纯化(40g柱, 5-40%EtOAc:Hex),得到呈淡黄色固体状的1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-3-甲酰基-1H-吲哚-2-甲酸叔丁酯(1.0g, 2.8mmol, 54%产率)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, 氯仿-d) δ10.70(s, 1H), 8.55(d, J=8.0Hz, 1H), 7.47-7.42(m, 1H), 7.40-7.37(m, 1H), 7.37-7.33(m, 1H), 5.23(s, 2H), 1.68(s, 9H), 1.51-1.44(m, 9H)。分析条件A:保留时间=1.43min;ESI-MS(+) m/z 248(M-两个叔丁基)。

[0811] 步骤4:

[0812] 在氮气气氛下向2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-2-(二甲氧基磷酰基)乙酸苄酯(1.2g, 3.0mmol)于DCM(20mL)中的溶液中缓慢添加DBU(0.42mL, 2.8mmol)。10分钟后,将含1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-3-甲酰基-1H-吲哚-2-甲酸叔丁酯(900mg, 2.5mmol)的DCM

(2mL) 缓慢添加至反应混合物中。搅拌反应物2天。随后蒸发反应挥发物且在硅胶上纯化粗物质(80g柱, 0-25% EtOAc:Hex), 得到呈透明油状的(Z)-3-(3-(苄基氧基)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)-1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酸叔丁酯(680mg, 1.1mmol, 43%产率)。分析条件A: 保留时间=1.61min; ESI-MS(+) m/z 663.2 (M+Na)。

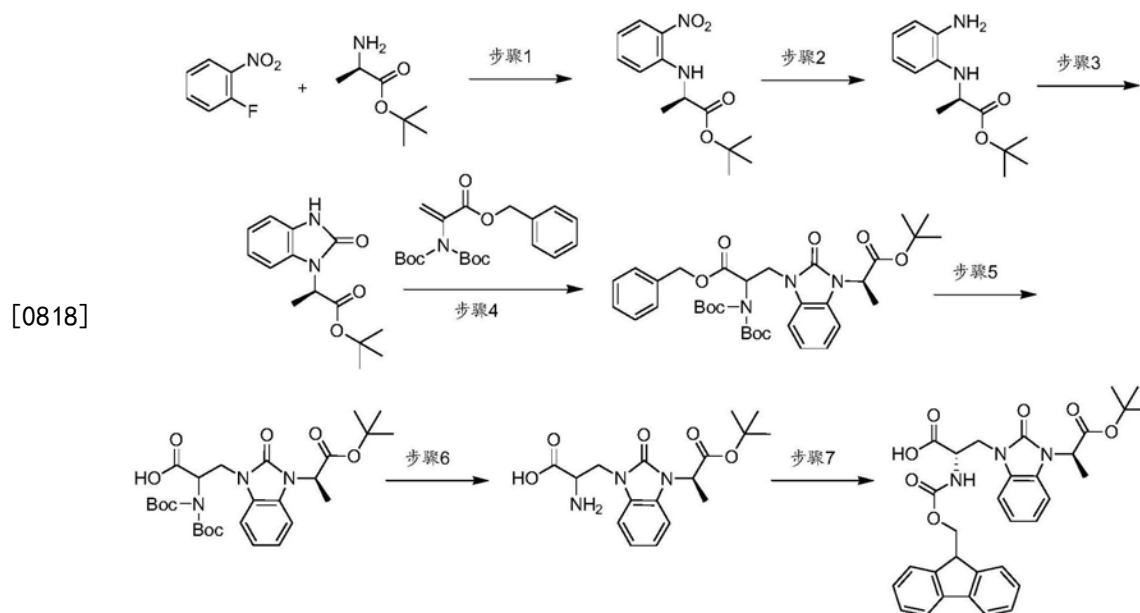
[0813] 步骤5:

[0814] 使氢气缓慢鼓泡通过(Z)-3-(3-(苄基氧基)-2-(((苄基氧基)羰基)氨基)-3-氧代丙-1-烯-1-基)-1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-1H-吡啶-2-甲酸叔丁酯(680mg, 1.1mmol) 及Pd-C(28mg, 0.027mmol)于MeOH(10mL)中的溶液且在室温搅拌2天。反应浆液经由尼龙玻璃料过滤器过滤且蒸发挥发物, 得到粗产物2-氨基-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-2-(叔丁氧基羰基)-1H-吡啶-3-基)丙酸(440mg, 1.1mmol, 99%产率)。分析条件A: 保留时间=1.04min; ESI-MS(+) m/z 419.3 (M+H)。

[0815] 步骤6:

[0816] 向2-氨基-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-2-(叔丁氧基羰基)-1H-吡啶-3-基)丙酸(440mg, 1.1mmol) 及碳酸氢钠(450mg, 5.3mmol)于丙酮(5.00mL)及水(10mL)中的溶液中添加碳酸(9H-芴-9-基)甲酯(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯(358mg, 1.061mmol)。搅拌反应物18小时。反应物在剧烈搅拌下用HCl水溶液(1.0M)缓慢酸化至pH 5。经酸化的溶液随后用DCM分离。有机层先后用水和盐水洗涤。收集有机层; 经MgSO<sub>4</sub>干燥且减压蒸发挥发物, 得到粗产物。在硅胶上纯化粗物质(40g柱, 20-80% EtOAc:Hex), 得到呈白色泡沫状的产物。物质经由SFC手性纯化组进一步纯化, 得到呈白色泡沫状的产物(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-2-(叔丁氧基羰基)-1H-吡啶-3-基)丙酸(100mg, 0.156mmol, 14.71%产率)及(R)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(1-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-2-(叔丁氧基羰基)-1H-吡啶-3-基)丙酸(98mg, 0.153mmol, 14.42%产率)。分析条件A: 保留时间=1.53min; ESI-MS(+) m/z 663.2 (M+Na)。

[0817] (R)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-((R)-1-(叔丁氧基)-1-氧代丙-2-基)-2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙酸的制备



[0819] 步骤1:

[0820] 向配备有搅拌棒的40mL小瓶中装入(R)-2-氨基丙酸叔丁酯单盐酸盐(2.0g, 11mmol)、1-氟-2-硝基苯(1.553g, 11.01mmol)、碳酸钾(3.04g, 22.0mmol)及DMF(30mL)。将小瓶置于70℃加热套中18小时。将反应混合物转移至500mL分液漏斗中且用水(100mL)稀释。混合物用EtOAc(2×100mL)萃取。合并的有机物先后用水(100mL)和盐水(75mL)洗涤;经MgSO<sub>4</sub>干燥;过滤;随后真空浓缩。将所得残余物溶解于最少的丙酮中且随后真空浓缩于硅藻土(Celite<sup>®</sup>)上。对所得粉末进行硅胶色谱(40g柱,己烷:EtOAc 100:0→90:10),得到呈橙色油状的(R)-2-((2-硝苯基)氨基)丙酸叔丁酯(2.359g, 80%)。

[0821] 步骤2:

[0822] 向配备有搅拌棒且装有(R)-2-((2-硝苯基)氨基)丙酸叔丁酯(2.359g, 8.86mmol)的100mL圆底烧瓶中添加MeOH(40mL)及钯/碳(Degussa型号E101NE/W, 10%Pd干基, 约50wt%水, 0.471g, 0.221mmol)。烧瓶用橡胶隔膜密封且混合物用氮气冲洗15分钟,随后混合物用氢气冲洗5分钟。在氢气气囊压力下搅拌混合物16小时。混合物经由硅藻土(Celite<sup>®</sup>)过滤且用MeOH提取过滤垫。真空浓缩合并的滤液且对所得残余物进行硅胶色谱(25gInterchim 25微米柱,己烷:EtOAc 100:0→50:50),得到呈红色液体状的(R)-2-((2-氨基苯基)氨基)丙酸叔丁酯(1.100g, 53%)。<sup>13</sup>C NMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ173.86, 135.61, 134.82, 119.89, 119.25, 116.36, 113.07, 80.95, 52.65, 27.59, 18.73。

[0823] 步骤3:

[0824] 向配备有搅拌棒且装有(R)-2-((2-氨基苯基)氨基)丙酸叔丁酯(1.100g, 4.66mmol)的50mL烧瓶中分别添加THF(25mL)、DIPEA(3.00mL, 17.5mmol)及1,1'-羰基二咪唑(2.83g, 17.5mmol)。密封小瓶且在室温搅拌溶液2小时。将反应溶液转移至250mL分液漏斗中且用Et<sub>2</sub>O(75mL)稀释,随后用HCl水溶液(1M, 50mL)洗涤。有机相先后用水(50mL)和盐水(50mL)洗涤;经MgSO<sub>4</sub>干燥;过滤;随后真空浓缩于硅藻土(Celite<sup>®</sup>)上。对所得粉末进行硅胶色谱(40g SiO<sub>2</sub>柱,己烷:EtOAc 90:10→50:50),得到呈灰白色固体泡沫状的(R)-2-(2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙酸叔丁酯(828.1mg, 68%)。<sup>1</sup>H NMR(500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ9.09(br.s., 1H), 7.13-7.03(m, 3H), 7.02-6.95(m, 1H), 5.19(q, J=7.4Hz, 1H), 1.70(d, J=7.4Hz, 3H), 1.41(s, 9H)。

[0825] 步骤4:

[0826] 向配备有搅拌棒的40mL小瓶中添加2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}丙-2-烯酸苄酯(1.192g, 3.16mmol)、(R)-2-(2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙酸叔丁酯(828.1mg, 3.16mmol)及MeCN(15mL)。向溶液中添加碳酸钾(2.618g, 18.94mmol)。将小瓶封盖且在搅拌下置于60℃加热套中2小时。过滤反应混合物且真空浓缩滤液。将所得残余物溶解于丙酮中且随后真空浓缩于硅藻土(Celite<sup>®</sup>)上。对所得粉末进行SiO<sub>2</sub>色谱(80g硅胶柱,己烷:EtOAc 100:0→50:50),得到呈无色固体泡沫状的2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}-3-{3-[ (2R)-1-(叔丁氧基)-1-氧代丙-2-基]-2-氧代-2,3-二氢-1H-1,3-苯并二咪唑-1-基}丙酸苄酯(比例为1:1的非对映异构体, 1.841g, 91%)。

[0827] 步骤5:

[0828] 向配备有搅拌棒且装有含2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}-3-{3-[ (2R)-1-(叔丁氧

基)-1-氧代丙-2-基]-2-氧代-2,3-二氢-1H-1,3-苯并二唑-1-基}丙酸苄酯(920.3mg, 1.439mmol)的MeOH(20mL)的100mL圆底烧瓶中添加钯/碳(Degussa型号E101NE/W,10%Pd干基,约50wt%水,153mg,0.072mmol)。烧瓶用橡胶隔膜封盖。溶液用氮气冲洗15分钟,随后溶液用氢气冲洗5分钟。随后将系统置于氢气气囊压力下同时搅拌混合物1.5小时。溶液用氮气冲洗15分钟,随后经由硅藻土(Celite<sup>®</sup>)过滤。用MeOH提取滤饼且真空浓缩合并的滤液,得到呈无色固体泡沫状的2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}-3-{3-[(2R)-1-(叔丁氧基)-1-氧代丙-2-基]-2-氧代-2,3-二氢-1H-1,3-苯并二唑-1-基}丙酸(比例为1:1的非对映异构体,791mg,100%)。

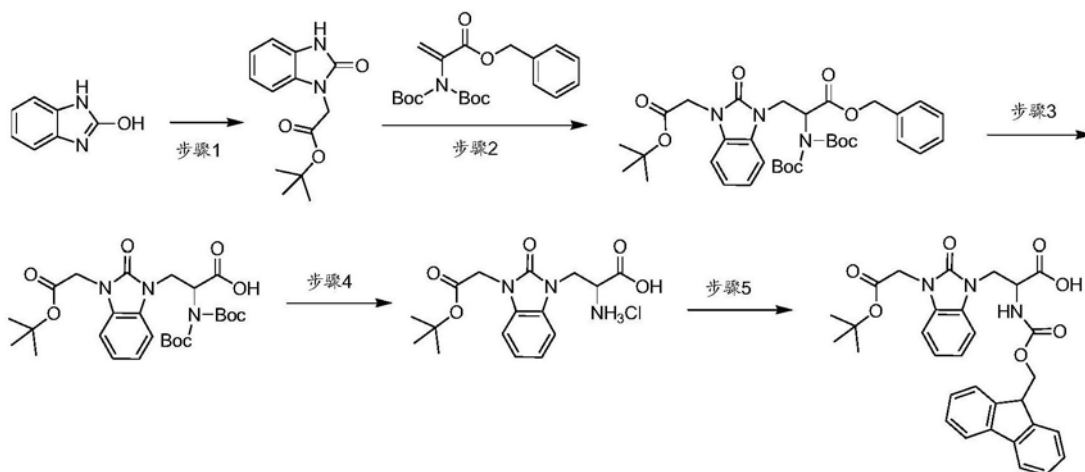
[0829] 步骤6:

[0830] 向装有2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}-3-{3-[(2R)-1-(叔丁氧基)-1-氧代丙-2-基]-2-氧代-2,3-二氢-1H-1,3-苯并二唑-1-基}丙酸(0.791g,1.44mmol)且用0°C浴冷却的100mL圆底烧瓶中添加HCl于二噁烷中的0°C溶液(5mL,4M,20mmol)。在0°C搅拌溶液1小时且随后真空浓缩并分析发现部分转化成所需产物。将含有固体的100mL圆底烧瓶放回至0°C浴中且向烧瓶中添加HCl于二噁烷中的0°C溶液(5mL,4M,20mmol)。在0°C搅拌溶液1.5小时且随后真空浓缩,得到呈白色固体状的粗物质2-氨基-3-(3-((R)-1-(叔丁氧基)-1-氧代丙-2-基)-2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙酸盐,其全部用于下一步。

[0831] 步骤7:

[0832] 向2-氨基-3-(3-((R)-1-(叔丁氧基)-1-氧代丙-2-基)-2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙酸(1.439mmol)于水(12mL)及丙酮(6mL)中的溶液中先后添加碳酸氢钠(604mg,7.20mmol)和碳酸(9H-芴-9-基)甲酯(2,5-二氧代吡咯烷-1-基)酯(485mg,1.44mmol)。搅拌溶液过夜(18小时)。将反应混合物真空浓缩于硅藻土(Celite<sup>®</sup>)上且对所得粉末进行C18色谱(柱=55g Interchim Puriflash C18-HP 30微米;溶剂A=0.1%TFA/水;溶剂B=0.1%TFA/乙腈;梯度=经15倍柱体积15%B至80%B)。合并含有产物的级份且真空浓缩以除去挥发物并得到水溶液,将其与EtOAc一起转移至125mL分液漏斗中。用盐水(10mL)进一步稀释混合物。用EtOAc(2×50mL)萃取混合物。合并的有机物用盐水(25mL)洗涤;经MgSO<sub>4</sub>干燥;过滤;随后真空浓缩,得到呈非对映异构体的混合物形式的黄色固体泡沫产物(468.2mg)。如下对一部分物质进行SFC纯化:柱=Chiralpak AD-H制备型柱,30×250mm,5μm;流动相=20%MeOH/CO<sub>2</sub>,150巴;温度=35°C;流速=70.0mL/min,持续19min;UV监测在220nm进行;注射=0.25mL约30mg/mL于2:1MeOH:CHCl<sub>3</sub>中的溶液(通过堆叠注射纯化~246mg)。收集在7.63min处的峰,得到(S)-2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-((R)-1-(叔丁氧基)-1-氧代丙-2-基)-2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙酸。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,CD<sub>3</sub>OD) δ7.78(d,J=7.5Hz,2H),7.57(d,J=7.5Hz,2H),7.37(t,J=7.4Hz,2H),7.32-7.22(m,3H),7.13-7.03(m,3H),5.09(q,J=7.3Hz,1H),4.68(d,J=4.3Hz,1H),4.47-4.38(m,1H),4.27(dd,J=14.7,8.9Hz,1H),4.17-4.11(m,2H),4.10-4.03(m,1H),1.59(d,J=7.3Hz,3H),1.36(s,9H)。

[0833] 2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-(2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基)-2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并[d]咪唑-1-基)丙酸的制备



[0834]

[0835] 步骤1:

[0836] 向装有Schlenk接头且置于氮气气氛下的干燥250mL圆底烧瓶中添加DMF (60mL)、1H-苯并[d]咪唑-2-醇 (6.93g, 51.7mmol) 及2-溴乙酸叔丁酯 (9.6g, 49.2mmol)。将溶液冷却至0°C。向溶液中添加氢化钠 (60%w/w于油中的分散液, 2.264g, 56.6mmol)。在0°C (t=0) 搅拌混合物1小时。向溶液中添加饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液 (60mL)。混合物变得极稠且无法搅拌。将混合物短暂升温至室温, 随后使用水 (250mL) 将混合物转移至1L分液漏斗中。用EtOAc (400mL) 萃取混合物且有机相经MgSO<sub>4</sub>干燥; 过滤, 随后真空浓缩。将残余物溶解于最少的丙酮中且随后真空浓缩于硅藻土(Celite<sup>®</sup>)上。对该粉末进行SiO<sub>2</sub>色谱 (己烷:EtOAc 100:0→0:100, 产物为第二主洗脱峰), 得到呈淡黄色固体状的2-(2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并[d]咪唑-1-基) 乙酸叔丁酯 (3.301g, 27%)。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.60 (br. s., 1H), 7.12-7.04 (m, 3H), 6.92-6.86 (m, 1H), 4.53 (s, 2H), 1.47 (s, 9H)。

[0837] 步骤2:

[0838] 向配备有搅拌棒的40mL小瓶中添加2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}丙-2-烯酸苄酯 (1.382g, 3.66mmol)、2-(2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并[d]咪唑-1-基) 乙酸叔丁酯 (1.00g, 4.03mmol) 及MeCN (18mL)。向溶液中添加碳酸钾 (3.04g, 22.0mmol)。将小瓶封盖且在搅拌下置于50°C加热套中2小时。反应混合物经由硅藻土(Celite<sup>®</sup>)过滤且用MeCN (20mL) 提取滤饼。真空浓缩滤液且将残余物溶解于最少的丙酮中并随后真空浓缩于硅藻土(Celite<sup>®</sup>)上。对所得粉末进行SiO<sub>2</sub>色谱 (80g硅胶柱, 己烷:EtOAc 100:0→50:50), 得到呈黄色油状的2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}-3-{3-[2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基]-2-氧代-2,3-二氢-1H-1,3-苯并二唑-1-基} 丙酸苄酯 (2.167g, 95%产率)。<sup>1</sup>H NMR (500MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.38-7.29 (m, 5H), 7.06-7.01 (m, 2H), 7.00-6.95 (m, 1H), 6.85-6.80 (m, 1H), 5.47 (dd, J=9.8, 4.3Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 4.66-4.49 (m, 3H), 4.40 (d, J=17.7Hz, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.31 (s, 18H)。

[0839] 步骤3:

[0840] 向配备有搅拌棒且装有含2-{二[(叔丁氧基)羰基]氨基}-3-{3-[2-(叔丁氧基)-2-氧代乙基]-2-氧代-2,3-二氢-1H-1,3-苯并二唑-1-基} 丙酸苄酯 (1.083g, 1.731mmol) 的甲醇 (20mL) 的100mL圆底烧瓶中添加钯/碳 (Degussa型号E101NE/W, 10%Pd干基, 约50wt%水, 0.184g, 0.087mmol)。烧瓶用橡胶隔膜封盖。溶液用氮气冲洗15分钟, 随后溶液用氢气冲洗5分钟。随后将系统置于氢气气囊压力下同时搅拌混合物2小时。溶液用氮气冲洗15分钟,



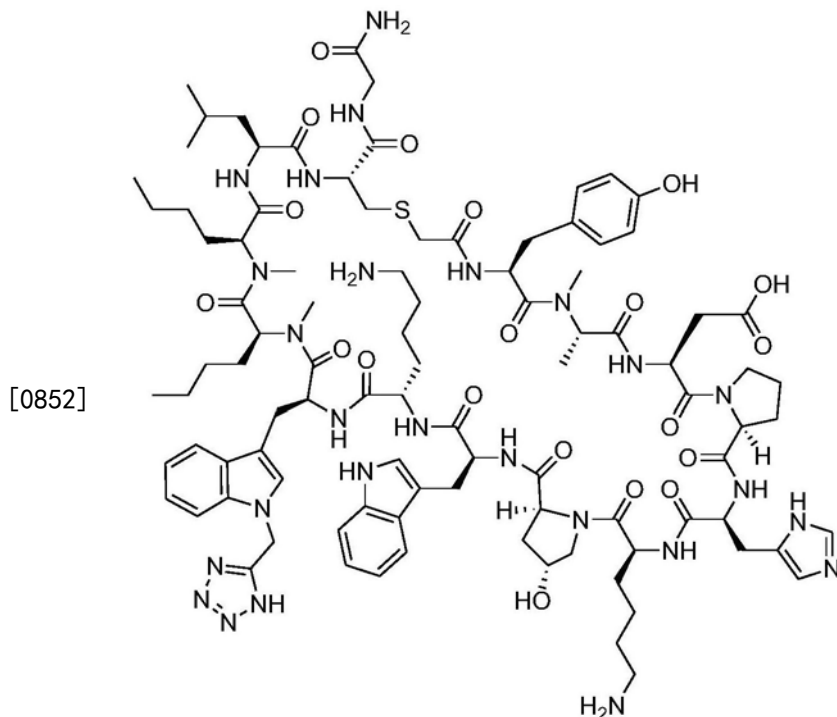
[0847] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1001。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95甲醇：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5甲醇：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟45-85%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为8.5mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为100%。

[0848] 分析条件C：保留时间=1.59min；ESI-MS (+) m/z 983.1 (M+2H)。

[0849] 分析条件D：保留时间=1.32min；ESI-MS (+) m/z 983.0 (M+2H)。

[0850] ESI-HRMS (+) m/z：计算值：982.4750；实验值：982.4796。

[0851] 实施例1002的制备



实施例1002

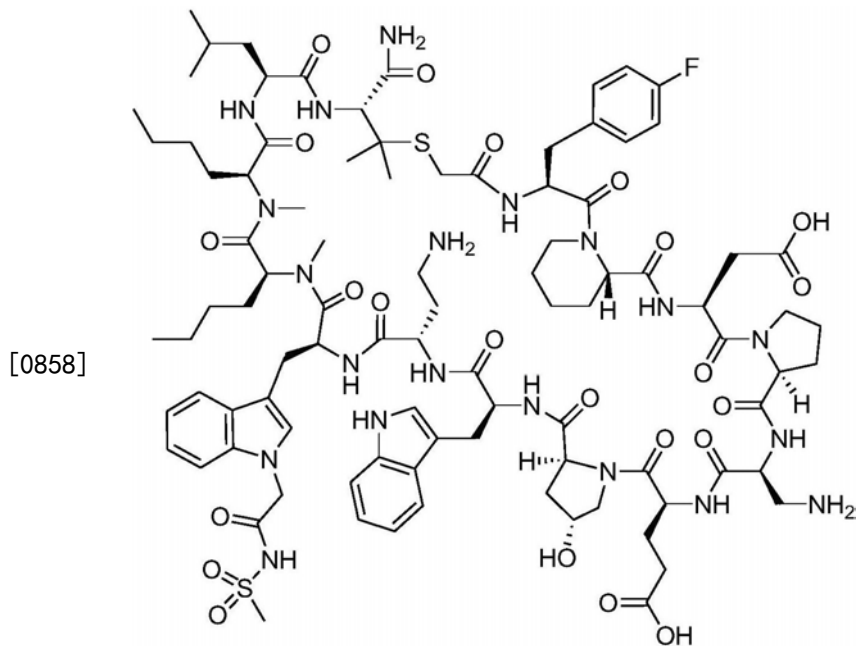
[0853] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1002。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95甲醇：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5甲醇：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟40-80%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟15-55%B, 随后在100%B保持3分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为2.1mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为100%。

[0854] 分析条件C：保留时间=1.45min；ESI-MS (+) m/z 1003.2 (M+2H)。

[0855] 分析条件D：保留时间=1.17min；ESI-MS (+) m/z 1004.1 (M+2H)。

[0856] ESI-HRMS (+) m/z：计算值：1003.5145；实验值：1003.5111

[0857] 实施例1003的制备



#### 实施例1003

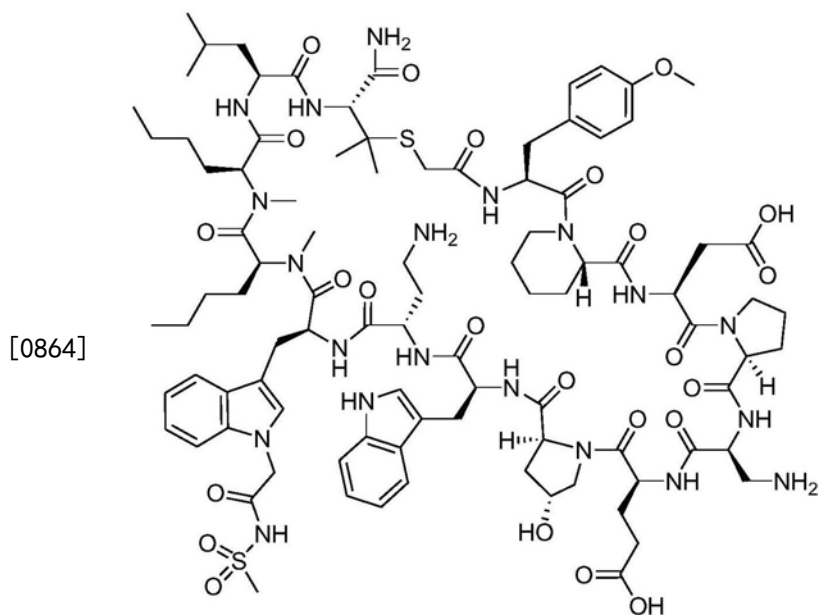
[0859] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1003。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟10–50%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为7.0mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为96%。

[0860] 分析条件C：保留时间=1.76min；ESI-MS (+) m/z 1979.0 (M+H)。

[0861] 分析条件D：保留时间=1.63min；ESI-MS (+) m/z 991.2 (M+2H)。

[0862] ESI-HRMS (+) m/z：计算值：990.4633；实验值：990.4601。

[0863] 实施例1004的制备



#### 实施例1004

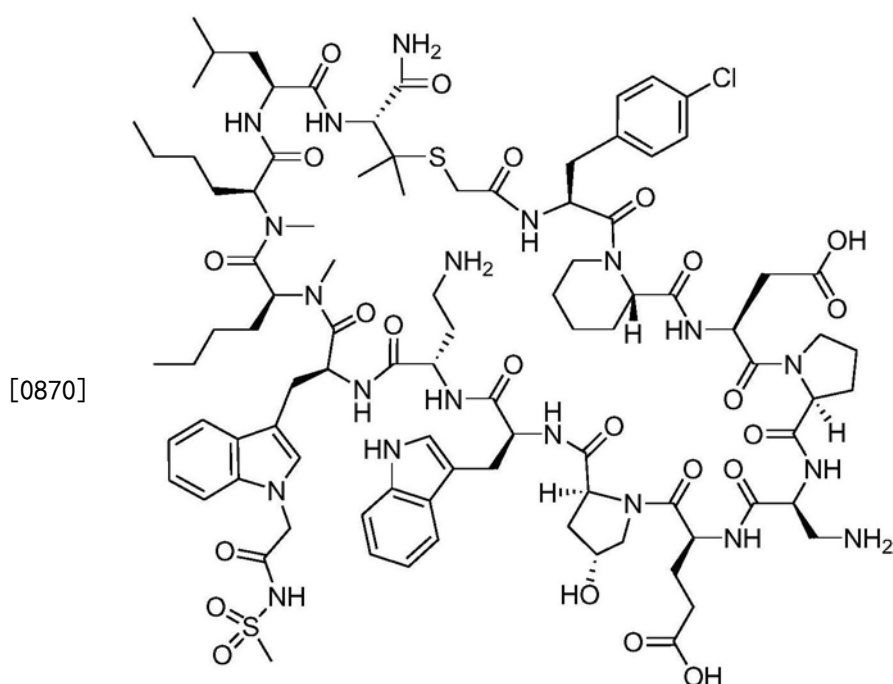
[0865] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1004。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化:柱:XBridge C18,19×200mm,5 $\mu$ m颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;梯度:经30分钟10-50%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化:柱:Waters CSH C18,19×200mm,5 $\mu$ m颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+0.1%三氟乙酸;流动相B:95:5乙腈:水+0.1%三氟乙酸;梯度:经30分钟12-52%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为7.3mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为100%。

[0866] 分析条件C:保留时间=1.33min;ESI-MS(+)m/z 996.6 (M+2H)。

[0867] 分析条件D:保留时间=1.62min;ESI-MS(+)m/z 996.5 (M+2H)。

[0868] ESI-HRMS(+)m/z:计算值:996.4733;实验值:996.4698。

[0869] 实施例1005的制备



实施例1005

[0871] 实施例1005

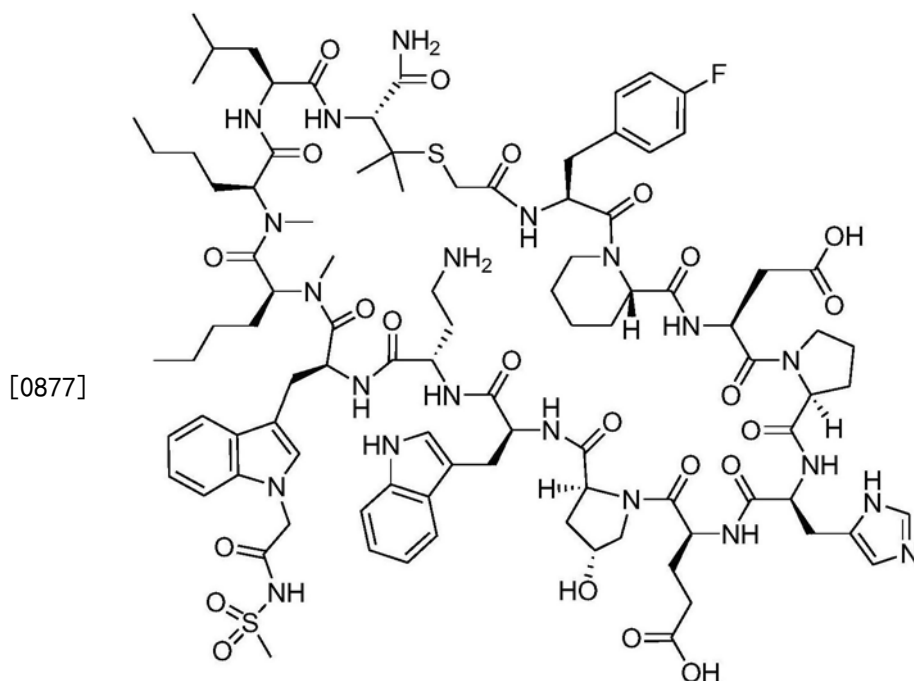
[0872] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1005。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化:柱:XBridge C18,19×200mm,5 $\mu$ m颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;梯度:经30分钟15-55%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化:柱:Waters CSH C18,19×200mm,5 $\mu$ m颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+0.1%三氟乙酸;流动相B:95:5乙腈:水+0.1%三氟乙酸;梯度:经30分钟12-52%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为7.0mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为98%。

[0873] 分析条件C:保留时间=1.82min;ESI-MS(+)m/z 999.1 (M+2H)。

[0874] 分析条件D:保留时间=1.67min;ESI-MS(+)m/z 999.6 (M+2H)。

[0875] ESI-HRMS (+) m/z: 计算值: 998.4486; 实验值: 998.4448。

[0876] 实施例1006的制备



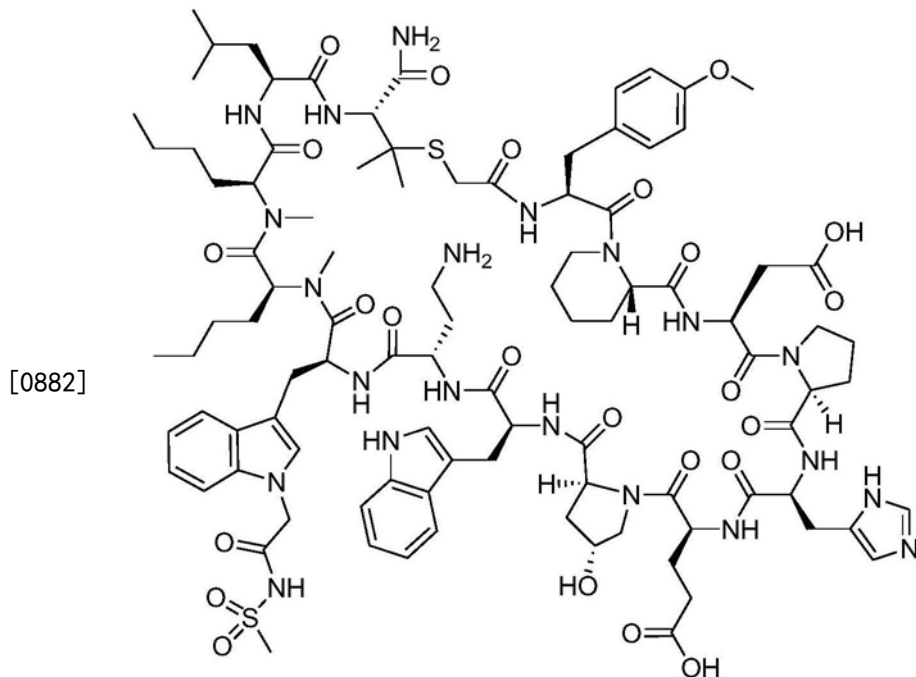
实施例1006

[0878] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1006。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化:柱:XBridge C18, 19×200mm, 5μm颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;梯度:经30分钟8-48%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化:柱:Waters CSH C18, 19×200mm, 5μm颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+0.1%三氟乙酸;流动相B:95:5乙腈:水+0.1%三氟乙酸;梯度:经30分钟12-52%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为4.8mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为99%。

[0879] 分析条件C:保留时间=1.72min;ESI-MS (+) m/z 1016.6 (M+2H)。

[0880] 分析条件D:保留时间=1.62min;ESI-MS (+) m/z 1015.9 (M+2H)。

[0881] 实施例1007的制备



#### 实施例1007

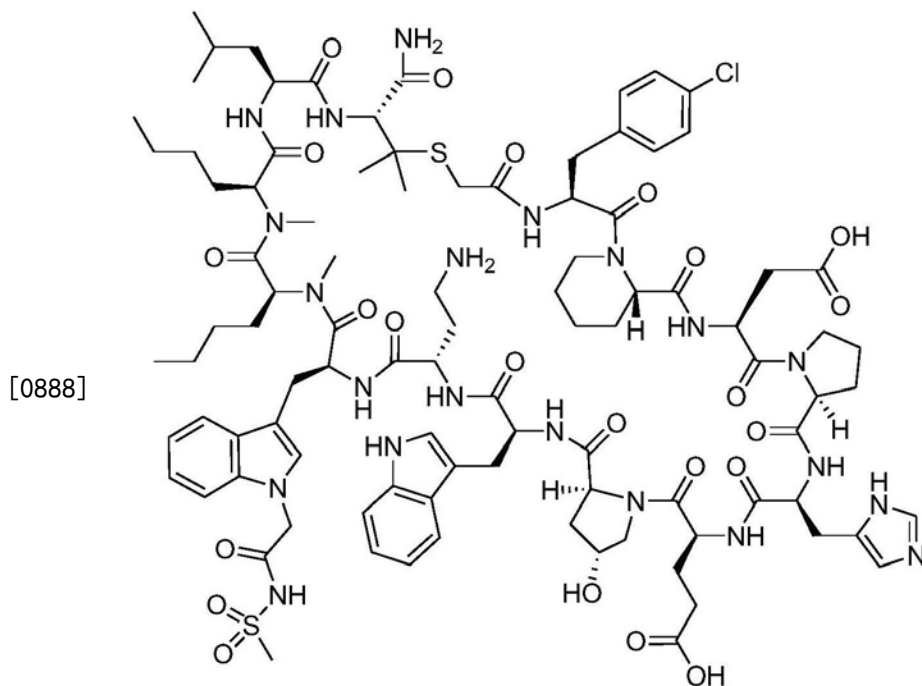
[0883] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1007。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱:waters xbridge c-18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵；流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵；梯度:经30分钟10-50%B,随后在100%B保持5分钟；流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化：柱:Waters CSH C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A:5:95乙腈:水+0.1%三氟乙酸；流动相B:95:5乙腈:水+0.1%三氟乙酸；梯度:经30分钟8-48%B,随后在100%B保持5分钟；流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为6.6mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为96%。

[0884] 分析条件C:保留时间=1.58min;ESI-MS(+)m/z 1022.5 (M+2H)。

[0885] 分析条件D:保留时间=1.56min;ESI-MS(+)m/z 1022.3 (M+2H)。

[0886] ESI-HRMS(+)m/z:计算值:1021.9788;实验值:1021.9747。

[0887] 实施例1008的制备



#### 实施例1008

[0889] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1008。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟12-52%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化：柱：Waters CSH C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+0.1%三氟乙酸；流动相B：95:5乙腈：水+0.1%三氟乙酸；梯度：经30分钟12-52%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为3.5mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为98%。

[0890] 分析条件C：保留时间=1.75min；ESI-MS (+) m/z 1024.8 (M+2H)。

[0891] 分析条件D：保留时间=1.98min；ESI-MS (+) m/z 1024.7 (M+2H)。

[0892] ESI-HRMS (+) m/z：计算值：1023.9540；实验值：1023.9506。

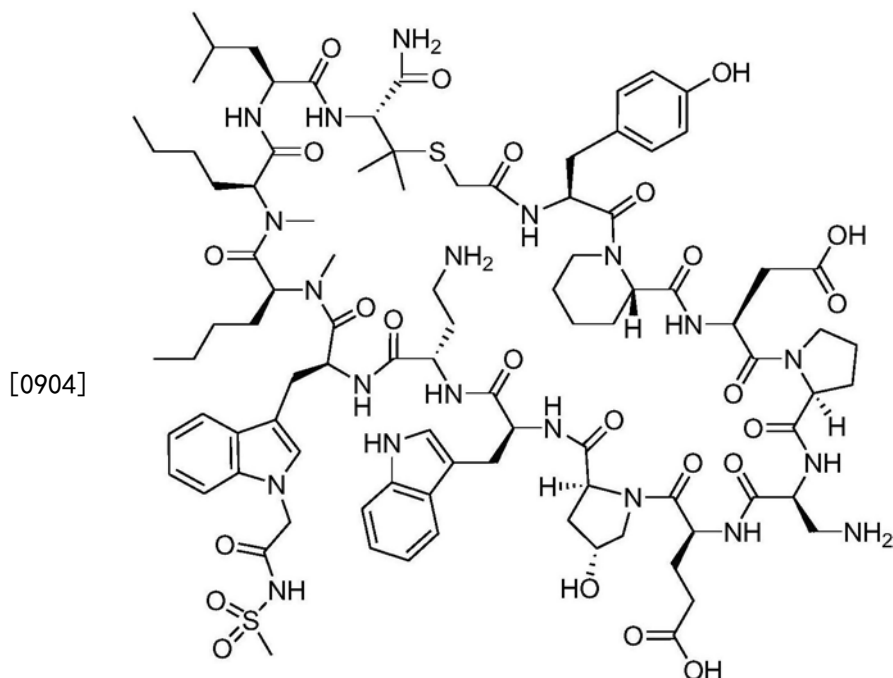
[0893] 实施例1009的制备



[0901] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1010。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化:柱:XBridge C18,19×200mm,5μm颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;梯度:经30分钟10-50%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化:柱:XBridge C18,19×200mm,5μm颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+0.1%三氟乙酸;流动相B:95:5乙腈:水+0.1%三氟乙酸;梯度:经30分钟15-55%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化:柱:XBridge C18,19×mm,5μm颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;梯度:经35分钟5-45%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为2.0mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为93%。

[0902] 分析条件C:保留时间=1.54min;ESI-MS(+)m/z 1015.6 (M+2H)。

[0903] 实施例1011的制备



#### 实施例1011

[0905] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1011。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化:柱:XBridge C18,19×200mm,5μm颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;梯度:经30分钟10-50%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化:柱:XBridge C18,19×200mm,5μm颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+0.1%三氟乙酸;流动相B:95:5乙腈:水+0.1%三氟乙酸;梯度:经30分钟15-55%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化:柱:XBridge C18,19×200mm,5μm颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;梯度:经30分钟10-100%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为

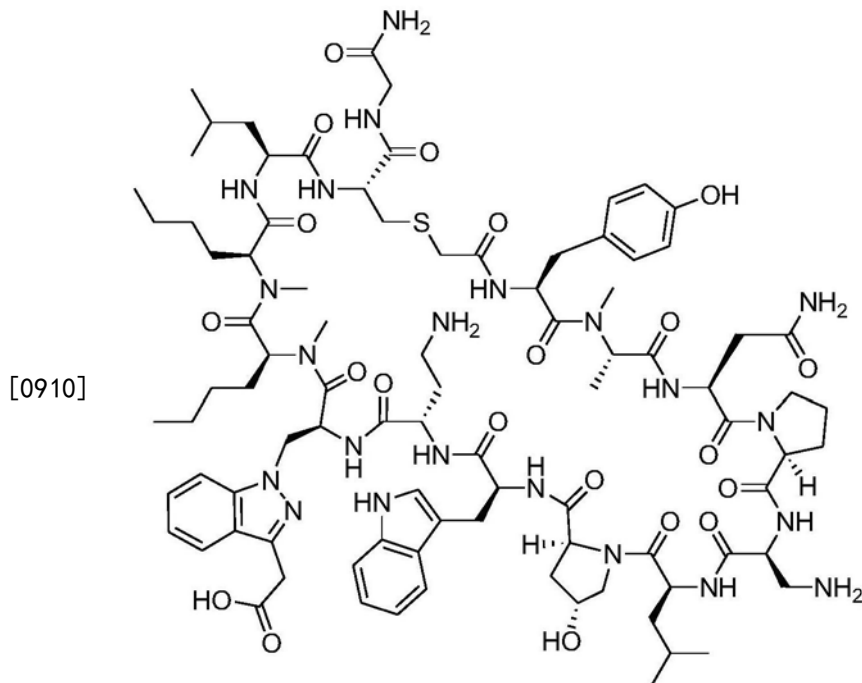
2.0mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为94%。

[0906] 分析条件C:保留时间=1.52min;ESI-MS(+) m/z 989.7 (M+2H)。

[0907] 分析条件D:保留时间=1.43min;ESI-MS(+) m/z 1975.9 (M-H)。

[0908] ESI-HRMS(+) m/z:计算值:989.4655;实验值:989.4619。

[0909] 实施例1012的制备



#### 实施例1012

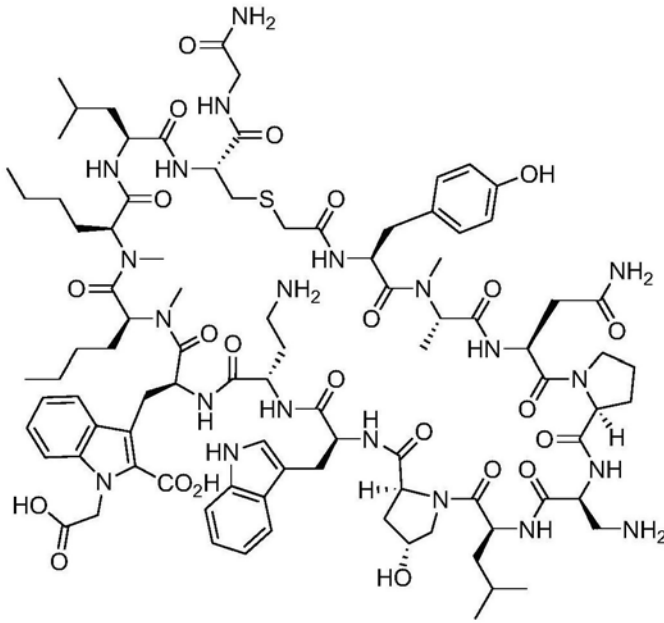
[0911] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1012。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化:柱:XBridge C18,19×200mm,5μm颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;梯度:经30分钟2-42%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为9.8mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为97%。

[0912] 分析条件C:保留时间=1.56min;ESI-MS(+) m/z 944.5 (M+2H)。

[0913] 分析条件D:保留时间=1.38min;ESI-MS(+) m/z 944.6 (M+2H)。

[0914] 实施例1013的制备

[0915]



实施例1013

[0916] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1013。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×mm, 5μm颗粒；流动相A：5:95甲醇：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5甲醇：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟50-90%B,随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为22.5mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为98%。

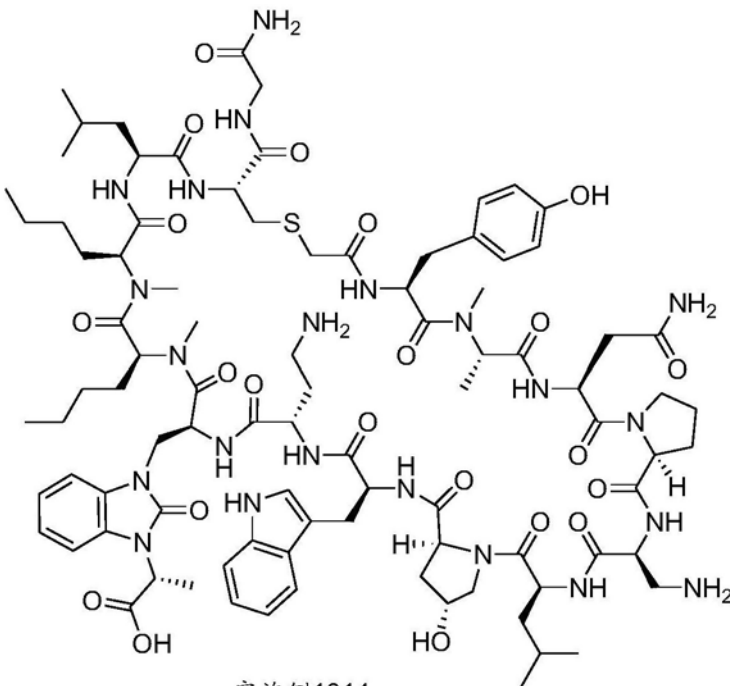
[0917] 分析条件C：保留时间=1.63min；ESI-MS(+) m/z 966.0 (M+2H)。

[0918] 分析条件D：保留时间=1.53min；ESI-MS(+) m/z 967.2 (M+2H)。

[0919] ESI-HRMS(+) m/z：计算值：965.9796；实验值：965.9790。

[0920] 实施例1014的制备

[0921]



实施例1014

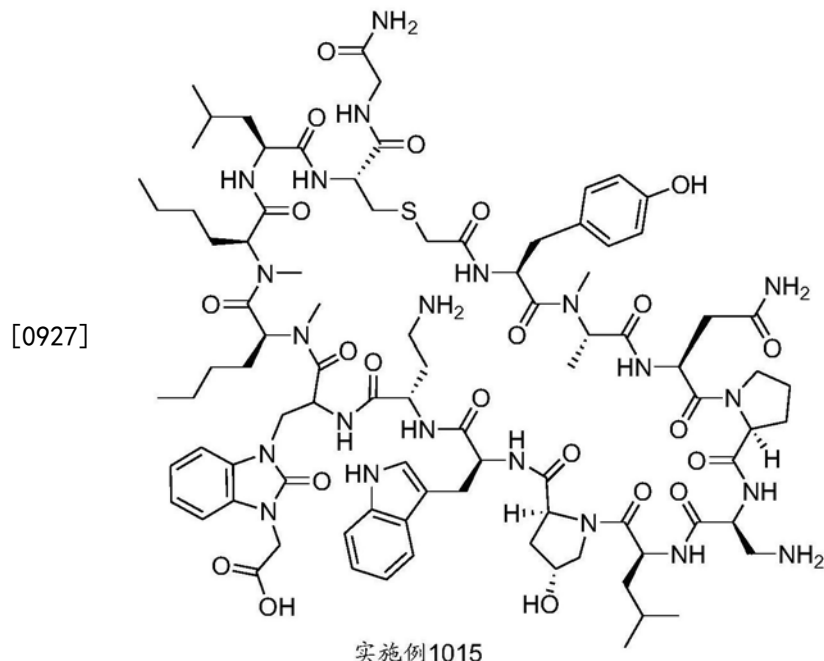
[0922] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1014。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+0.1%三氟乙酸；流动相B：95:5乙腈：水+0.1%三氟乙酸；梯度：经30分钟8-48%B, 随后在100%B保持3分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为3.3mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为96%。

[0923] 分析条件C：保留时间=1.59min；ESI-MS (+) m/z 960.6 (M+2H)。

[0924] 分析条件D：保留时间=1.39min；ESI-MS (+) m/z 959.2 (M+2H)。

[0925] ESI-HRMS (+) m/z：计算值：959.4879；实验值：959.4848。

[0926] 实施例1015的制备



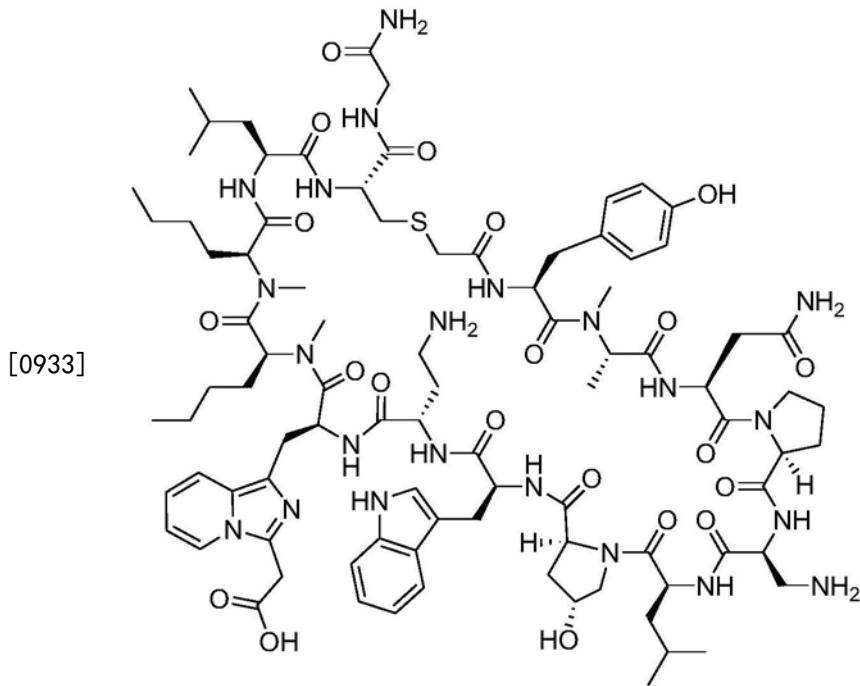
[0928] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1015。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟8-48%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为43.1mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为96%。

[0929] 分析条件C：保留时间=1.56min；ESI-MS (+) m/z 1901.9 (M-H)。

[0930] 分析条件D：保留时间=1.31min；ESI-MS (+) m/z 952.3 (M+2H)。

[0931] ESI-HRMS (+) m/z：计算值：952.4798；实验值：952.4758

[0932] 实施例1016的制备



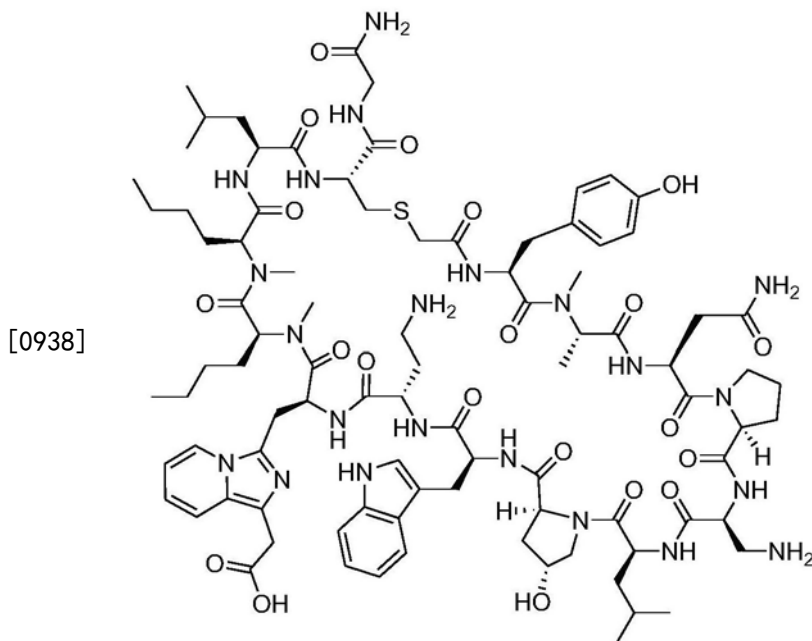
实施例1016

[0934] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1016。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟8-48%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为10.3mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为98%。

[0935] 分析条件C：保留时间=1.52min；ESI-MS(+) m/z 945.1 (M+2H)。

[0936] 分析条件D：保留时间=1.36min；ESI-MS(+) m/z 945.0 (M+2H)。

[0937] 实施例1017的制备



实施例1017

[0939] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1017。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯

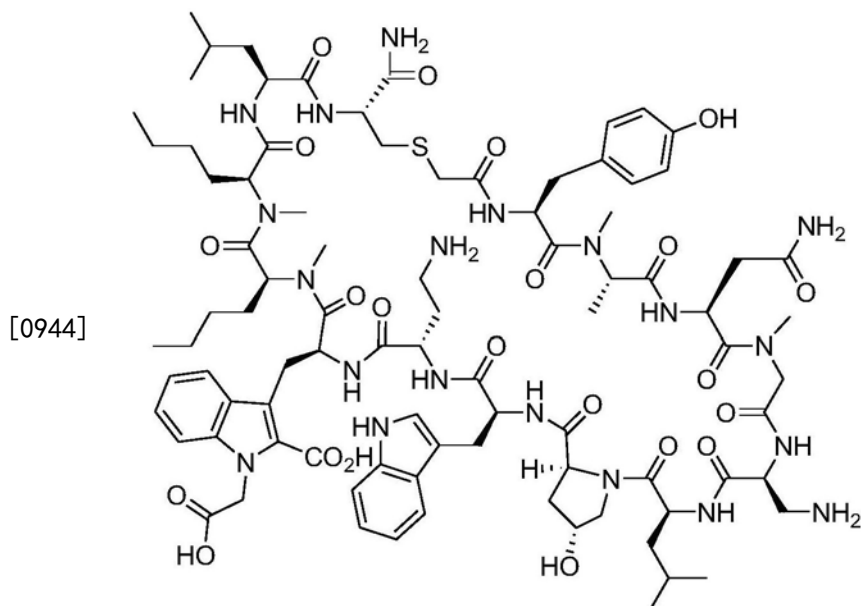
化:柱:XBridge C18,19×200mm,5 $\mu$ m颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;梯度:经30分钟10-50%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为6.9mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为97%。使用两种分析型LC/MS注射以确定最终纯度。注射1条件:柱:Waters BEH C18,2.1×50mm,1.7 $\mu$ m粒子;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;温度:70℃;梯度:经3分钟0-100%B,随后在100%B保持2.0分钟;流速:0.75mL/min;检测:UV 220nm。注射2条件:柱:Waters CSH C18,2.1×50mm,1.7 $\mu$ m粒子;流动相A:5:95乙腈:水+0.1%三氟乙酸;流动相B:95:5乙腈:水+0.1%三氟乙酸;温度:70℃;梯度:经3分钟0-100%B,随后在100%B保持2.0分钟;流速:0.75mL/min;检测:UV 220nm。

[0940] 分析条件C:保留时间=1.56min;ESI-MS(+)m/z 945.1(M+2H)。

[0941] 分析条件D:保留时间=1.23min;ESI-MS(+)m/z 944.4(M+2H)。

[0942] ESI-HRMS(+)m/z:计算值:944.4824;实验值:944.4783。

[0943] 实施例1018的制备



实施例1018

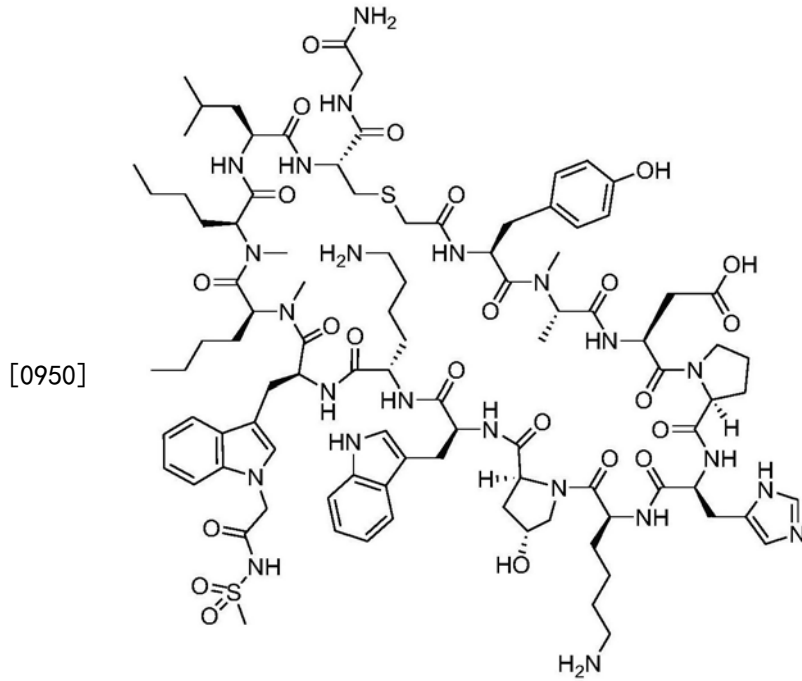
[0945] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1018。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化:柱:XBridge C18,19×200mm,5 $\mu$ m颗粒;流动相A:5:95甲醇:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5甲醇:水+10mM乙酸铵;梯度:经30分钟45-85%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为14.8mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为100%。

[0946] 分析条件C:保留时间=1.54min;ESI-MS(+)m/z 925.0(M+2H)。

[0947] 分析条件D:保留时间=1.38min;ESI-MS(+)m/z 925.2(M+2H)。

[0948] ESI-HRMS(+)m/z:计算值:924.4611;实验值:924.4596。

[0949] 实施例1019的制备



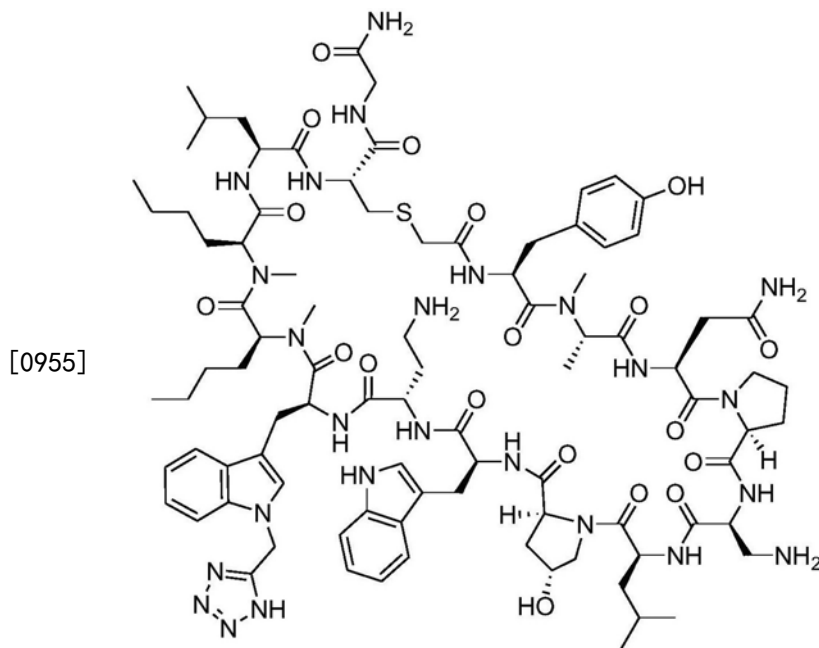
实施例1019

[0951] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1019。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×mm, 5μm颗粒；流动相A：5：95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95：5乙腈：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟15–55%B,随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为3.6mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为97%。

[0952] 分析条件C：保留时间=1.46min；ESI-MS(+) m/z 687.3 (M+3H)。

[0953] 分析条件D：保留时间=1.17min；ESI-MS(+) m/z 687.4 (M+3H)。

[0954] 实施例1020的制备



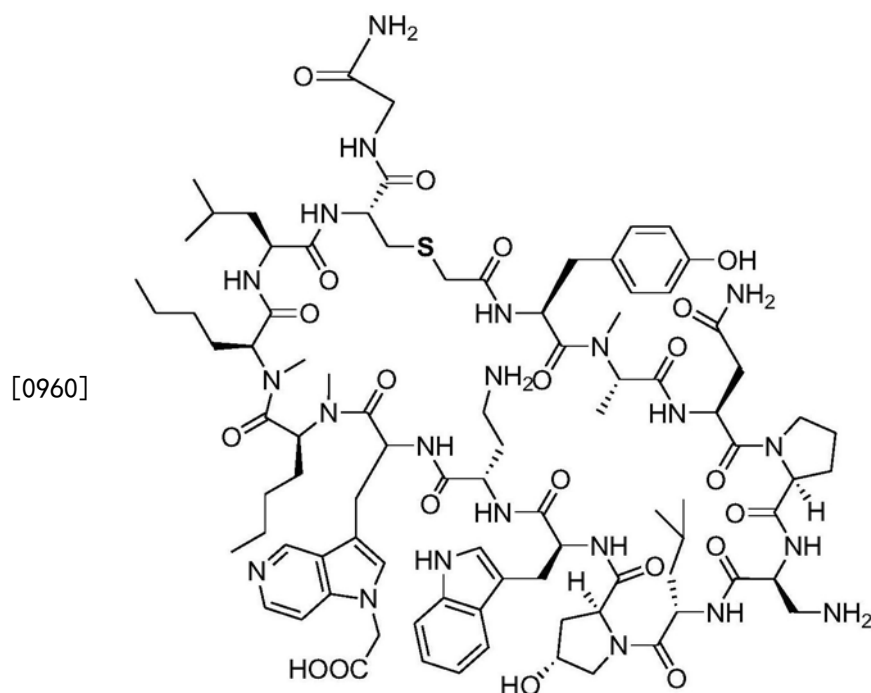
实施例1020

[0956] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例1020。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化:柱:XBridge C18,19×200mm,5 $\mu$ m颗粒;流动相A:5:95甲醇:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5甲醇:水+10mM乙酸铵;梯度:经30分钟45-85%B,随后在100%B保持5分钟;流速:20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为8.5mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为100%。

[0957] 分析条件C:保留时间=1.56min;ESI-MS(+)m/z 956.2(M+2H)。

[0958] 分析条件D:保留时间=1.31min;ESI-MS(+)m/z 957.1(M+2H)。

[0959] 实施例10001的制备



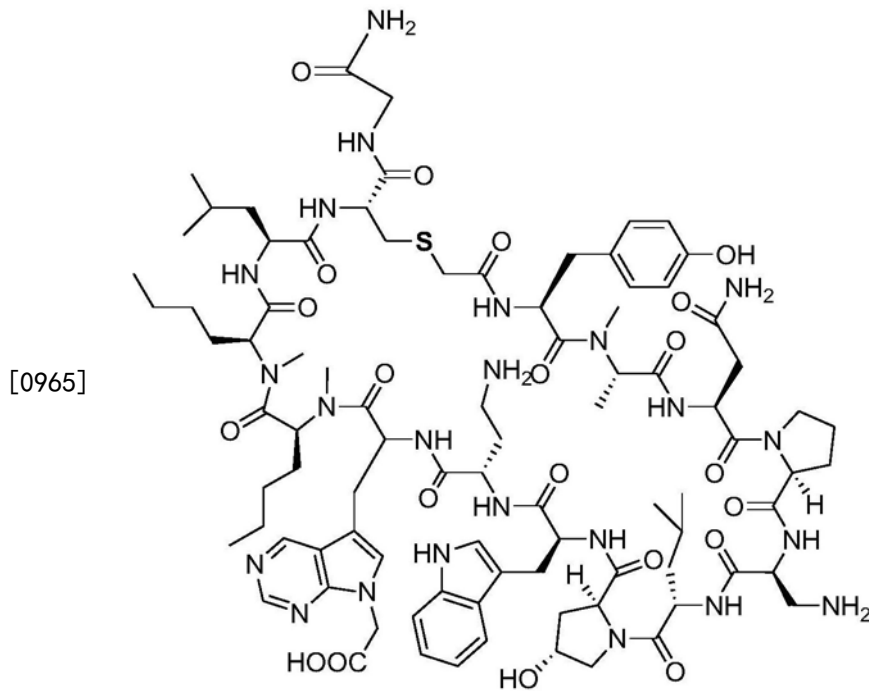
实施例10001

[0961] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例10001。实施例10001的粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化:分析型LCMS条件C:柱:Waters BEH C18,2.1×50mm,1.7 $\mu$ m颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+10mM乙酸铵;流动相B:95:5乙腈:水+10mM乙酸铵;温度:70 $^{\circ}$ C;梯度:0%B,经3分钟0-100%B,随后在100%B保持2.0分钟;流速:0.75mL/min;检测:UV 220nm。分析型LCMS条件D:柱:Waters CSH C18,2.1×50mm,1.7 $\mu$ m颗粒;流动相A:5:95乙腈:水+三氟乙酸;流动相B:95:5乙腈:水+三氟乙酸;温度:70 $^{\circ}$ C;梯度:0%B,经3分钟0-100%B,随后在100%B保持2.0分钟;流速:0.75mL/min;检测:UV 220nm。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为26.9mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为93%。

[0962] 分析条件C:保留时间=1.40min;ESI-MS(+)m/z 944.60(M+2H)。

[0963] 分析条件D:保留时间=1.12min;ESI-MS(+)m/z 944.80(M+2H)。

[0964] 实施例10002的制备



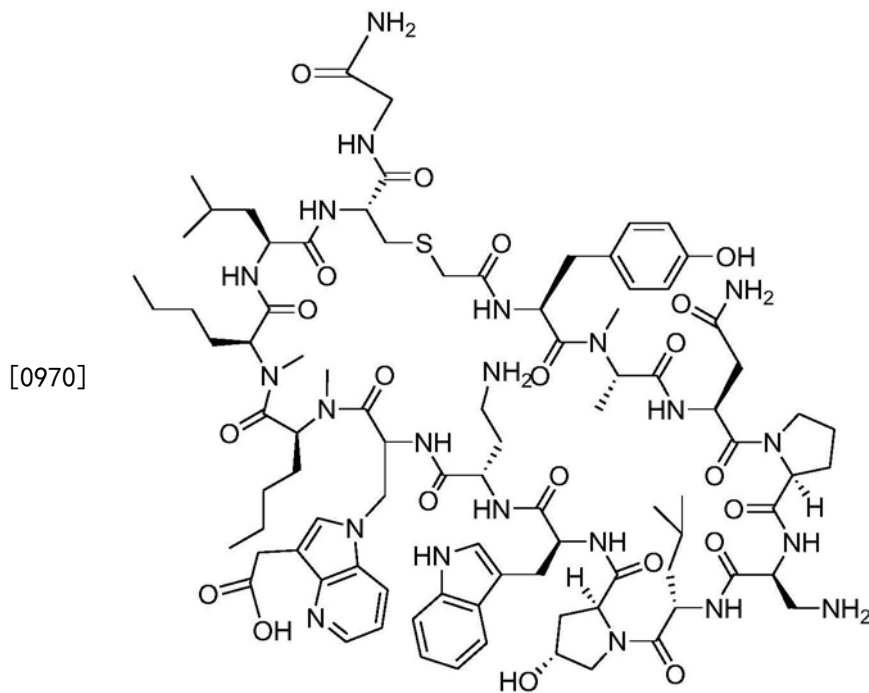
#### 实施例10002

[0966] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例10002。实施例10002的粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：分析型LCMS条件C：柱：Waters BEH C18, 2.1×50mm, 1.7μm颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；温度：70℃；梯度：0%B, 经3分钟0-100%B, 随后在100%B保持2.0分钟；流速：0.75mL/min；检测：UV 220nm。分析型LCMS条件D：柱：Waters CSH C18, 2.1×50mm, 1.7μm颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+三氟乙酸；流动相B：95:5乙腈：水+三氟乙酸；温度：70℃；梯度：0%B, 经3分钟0-100%B, 随后在100%B保持2.0分钟；流速：0.75mL/min；检测：UV 220nm。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为22.6mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为98%。

[0967] 分析条件C：保留时间=1.44min；ESI-MS(+) m/z 945.30 (M+2H)。

[0968] 分析条件D：保留时间=1.15min；ESI-MS(+) m/z 945.25 (M+2H)。

[0969] 实施例10003的制备



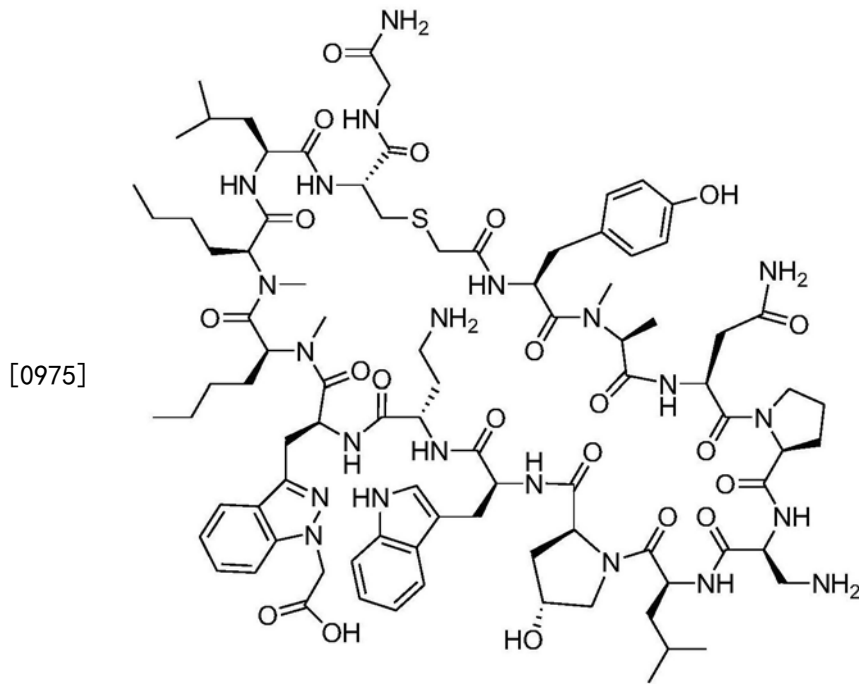
实施例10003

[0971] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例10003。实施例10003的粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：分析型LCMS条件C：柱：Waters BEH C18, 2.1×50mm, 1.7μm颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；温度：70℃；梯度：0%B, 经3分钟0-100%B, 随后在100%B保持2.0分钟；流速：0.75mL/min；检测：UV 220nm。分析型LCMS条件D：柱：Waters CSH C18, 2.1×50mm, 1.7μm颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+三氟乙酸；流动相B：95:5乙腈：水+三氟乙酸；温度：70℃；梯度：0%B, 经3分钟0-100%B, 随后在100%B保持2.0分钟；流速：0.75mL/min；检测：UV 220nm。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为1.2mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为94%。

[0972] 分析条件C：保留时间=1.48min；ESI-MS (+) m/z 944.70 (M+2H)。

[0973] 分析条件D：保留时间=1.26min；ESI-MS (+) m/z 944.45 (M+2H)。

[0974] 实施例10500的制备



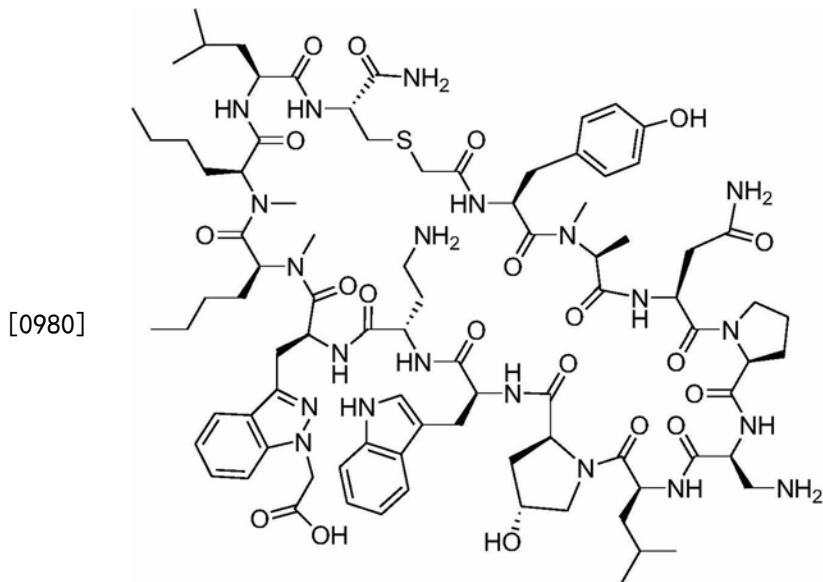
#### 实施例10500

[0976] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例10500。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟8-48%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化：柱：Waters CSH C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+0.1%三氟乙酸；流动相B：95:5乙腈：水+0.1%三氟乙酸；梯度：经15分钟10-70%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为20.0mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为91%。

[0977] 分析条件C：保留时间=1.66min；ESI-MS (+) m/z 944.3 (M+2H)。

[0978] 分析条件E：保留时间=1.40min；ESI-MS (+) m/z 944.2 (M+2H)。

[0979] 实施例10501的制备



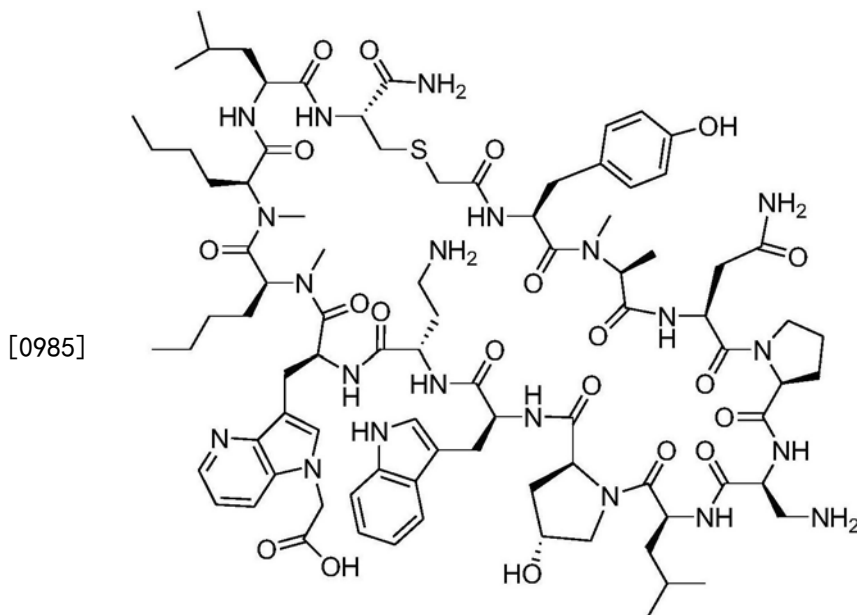
#### 实施例10501

[0981] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例10501。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟8-48%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化：柱：Waters CSH C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+0.1%三氟乙酸；流动相B：95:5乙腈：水+0.1%三氟乙酸；梯度：经15分钟0-70%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为21.1mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为92%。

[0982] 分析条件C：保留时间=1.70min；ESI-MS (+) m/z 916.0 (M+2H)。

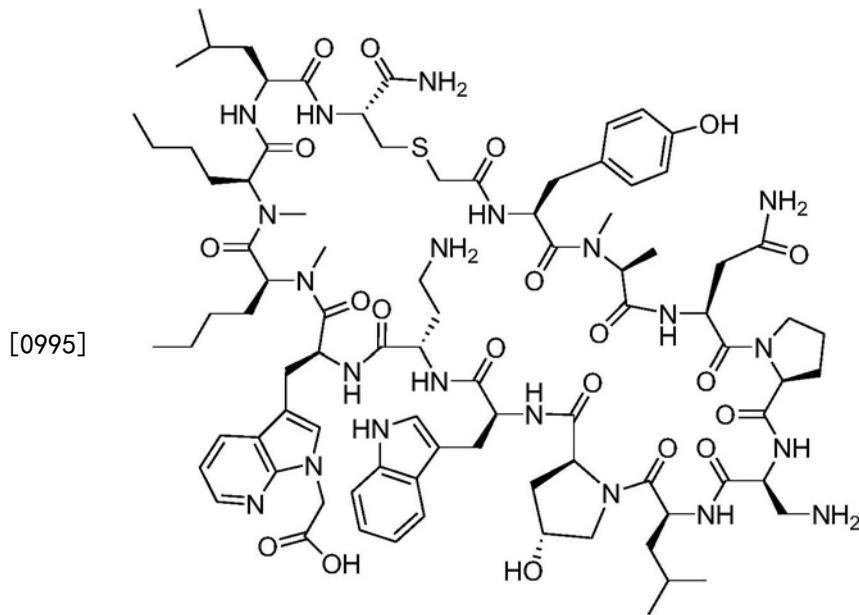
[0983] 分析条件E：保留时间=1.37min；ESI-MS (+) m/z 916.0 (M+2H)。

[0984] 实施例10502的制备



#### 实施例10502





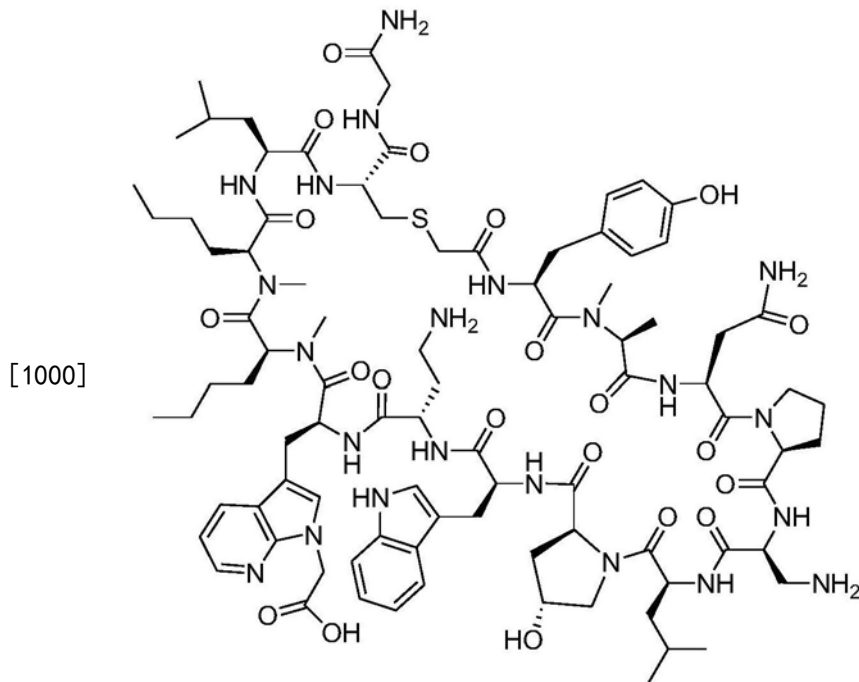
#### 实施例10504

[0996] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例10504。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；梯度：经40分钟2-42%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化：柱：Waters CSH C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+0.1%三氟乙酸；流动相B：95:5乙腈：水+0.1%三氟乙酸；梯度：经30分钟5-45%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化：柱：Waters CSH C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+0.1%三氟乙酸；流动相B：95:5乙腈：水+0.1%三氟乙酸；梯度：经10分钟10-100%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为6.5mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为97%。

[0997] 分析条件C：保留时间=1.57min；ESI-MS(+) m/z 916.0 (M+2H)。

[0998] 分析条件E：保留时间=1.32min；ESI-MS(+) m/z 915.9 (M+2H)。

[0999] 实施例10505的制备



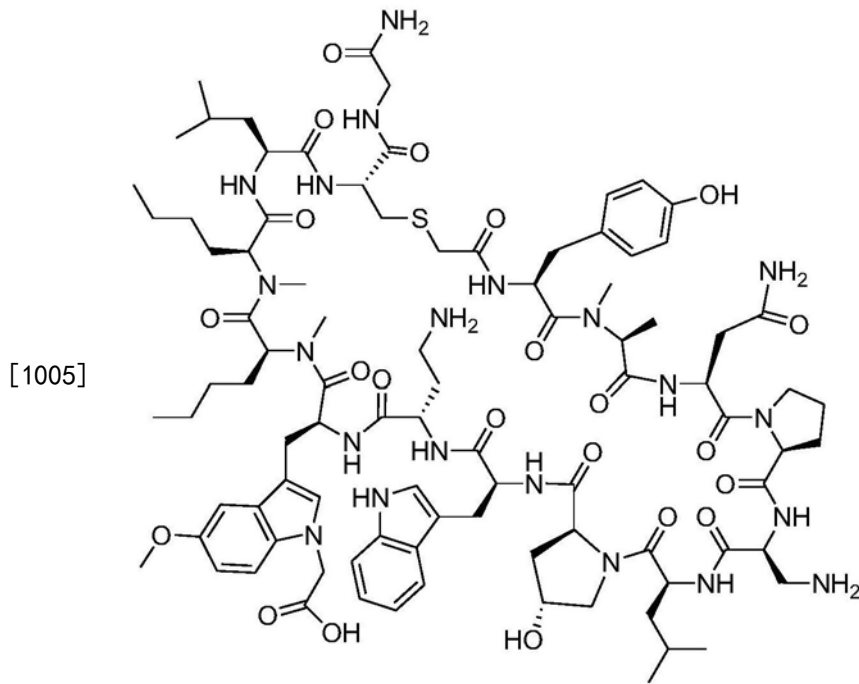
#### 实施例10505

[1001] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例10505。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；梯度：经40分钟2-42%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化：柱：Waters CSH C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+0.1%三氟乙酸；流动相B：95:5乙腈：水+0.1%三氟乙酸；梯度：经30分钟5-45%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5 $\mu$ m颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；梯度：经15分钟10-100%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为7.4mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为96%。

[1002] 分析条件C：保留时间=1.53min；ESI-MS (+) m/z 944.1 (M+2H)。

[1003] 分析条件E：保留时间=1.29min；ESI-MS (+) m/z 944.4 (M+2H)。

[1004] 实施例10506的制备



#### 实施例10506

[1006] 遵循“通用合成顺序A”制备实施例10506。粗物质经由制备型LC/MS以如下条件纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5μm颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；梯度：经30分钟8-48%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5μm颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+0.1%三氟乙酸；流动相B：95:5乙腈：水+0.1%三氟乙酸；梯度：经30分钟10-50%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化：柱：Waters CSH C18, 19×200mm, 5μm颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+0.1%三氟乙酸；流动相B：95:5乙腈：水+0.1%三氟乙酸；梯度：经30分钟5-45%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。物质经由制备型LC/MS以如下条件进一步纯化：柱：XBridge C18, 19×200mm, 5μm颗粒；流动相A：5:95乙腈：水+10mM乙酸铵；流动相B：95:5乙腈：水+10mM乙酸铵；梯度：经10分钟10-100%B, 随后在100%B保持5分钟；流速：20mL/min。合并含有所需产物的级份且经由离心蒸发干燥。产物产量为9.3mg且其通过LCMS分析所估计的纯度为100%。

[1007] 分析条件C：保留时间=1.57min；ESI-MS(+) m/z 959.2 (M+2H)。

[1008] 分析条件E：保留时间=1.35min；ESI-MS(+) m/z 959.3 (M+2H)。

[1009] 使用均质时间分辨荧光 (HTRF) 结合测定对大环肽与PD-1竞争结合至PD-L1的能力进行测试的方法

[1010] 使用PD-1/PD-L1均质时间分辨荧光 (HTRF) 结合测定研究本申请大环肽结合至PD-L1的能力。

[1011] 方法

[1012] 可溶性PD-1结合至可溶性PD-L1的均质时间分辨荧光 (HTRF) 测定。可溶性PD-1及可溶性PD-L1是指具有羧基端截短的蛋白质，所述羧基端截短移除跨膜区且融合至异源序

列且具体融合至人免疫球蛋白G序列(Ig)的Fc部分或六聚组氨酸表位标签(His)。所有结合研究均在HTRF测定缓冲液中进行,其由补充有0.1% (w/v) 牛血清白蛋白及0.05% (v/v) 吐温-20的dPBS构成。对于PD-1-Ig/PD-L1-His结合测定,将抑制剂与PD-L1-His (10nM最终浓度) 在4 $\mu$ l测定缓冲液中预培养15分钟,然后添加含有PD-1-Ig (20nM最终浓度) 的1 $\mu$ l测定缓冲液且再培养15分钟。使用来自人类、食蟹猴、小鼠或其它物种的PD-L1融合蛋白。使用经销穴状化合物标记的抗Ig单克隆抗体 (1nM最终浓度) 及经别藻蓝蛋白 (APC) 标记的抗His单克隆抗体 (20nM最终浓度) 进行HTRF检测。将抗体在HTRF检测缓冲液中稀释且将5 $\mu$ l分配在结合反应混合物的顶部上。使反应混合物平衡30分钟且使用EnVision荧光计得到信号 (665nm/620nm比例)。在PD-1-Ig/PD-L2-His (分别为20nM及5nM)、CD80-His/PD-L1-Ig (分别为100nM及10nM) 及CD80-His/CTLA4-Ig (分别为10nM及5nM) 之间进行额外的结合测定。如下进行在生物素化化合物71与人PD-L1-His之间的结合/竞争研究。将大环肽抑制剂与PD-L1-His (10nM最终浓度) 一起在4 $\mu$ l测定缓冲液中预培养60分钟,然后添加含有生物素化化合物71 (0.5nM最终浓度) 的1 $\mu$ l测定缓冲液。使结合平衡30分钟,然后添加含有经销穴状化合物标记的链霉亲和素 (2.5pM最终浓度) 及经APC标记的抗His (20nM最终浓度) 的5 $\mu$ l HTRF缓冲液。使反应混合物平衡30分钟且使用EnVision荧光计得到信号 (665nm/620nm比例)。

[1013] 重组蛋白。使具有C末端人Ig表位标签的经羧基截短的人PD-1 (氨基酸25-167) [hPD-1 (25-167)-3S-Ig] 及具有C末端His表位标签的人PD-L1 (氨基酸18-239) [hPD-L1 (19-239)-烟草叶脉斑纹病毒蛋白酶裂解位点 (TVMV)-His] 表达在HEK293T细胞中且依次通过重组蛋白A亲和性色谱及尺寸排阻色谱纯化。人PD-L2-His (Sino Biologicals)、CD80-His (Sino Biologicals)、CTLA4-Ig (RnD Systems) 均经由商业来源得到。

[1014] 重组人PD-1-Ig的序列

[1015] hPD1 (25-167)-3S-Ig

	1	LDSPDRPWNP	PTFSPALLVV	TEGDNATFTC	SFSNTSESFV	LNWYRMSPSN
	51	QTDKLAAPFE	DRSQPGQDCR	FRVTQLPNGR	DFHMSVVRAR	RNDSGTYLCG
	101	AISLAPKAQI	KESLRAELRV	TERRAEVPTA	HPSPSPRPAG	QFQGSPPGGG
[1016]	151	GREPKSSDKT	HTSPSPAPE	LLGGSSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV
	201	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW
	251	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	SRDELTKNQV
	301	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD
	351	KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKLSLSL	SPGK	

[1017] (SEQ ID NO:1)

[1018] 重组人PD-L1-TVMV-His (PD-L1-His) 的序列

[1019] hPDL1 (19-239)-TVMV-His

	1	FTVTVPKDLY	VVEYGSNMTI	ECKFPVEKQL	DLAALIVYWE	MEDKNIIQFV
	51	HGEEDLKVQH	SSYRQRARLL	KDQLSLGNAA	LQITDVKLQD	AGVYRCMISY
[1020]	101	GGADYKRITV	KVNAPYNKIN	QRILVVDPVT	SEHELTCQAE	GYPKAEVIWT
	151	SSDHQVLSGK	TTTTNSKREE	KLFNVTSTLR	INTTTNEIFY	CTFRRLDPEE
	201	NHTAELVIPE	LPLAHPNER	TGSSETVRFQ	GHHHHHH	

[1021] (SEQ ID NO:2)

[1022] 结果显示在表1中。如所示那样,本申请大环肽对PD-1-Ig结合至PD-L1-TVMV-His (PD-L1-His) 的活性显示出强抑制作用。范围如下:A=>1 $\mu$ M;B=0.10-0.99 $\mu$ M;C=0.01-0.099 $\mu$ M;D=0.001-0.0099 $\mu$ M。

[1023] 表1

[1024]

实施例编号	HTRF IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
实施例 0001	B
实施例 1254	C
实施例 1271	C
实施例 1284	B
实施例 1286	B
实施例 1287	C
实施例 1288	7.14
实施例 1000	C
实施例 1001	0.004
实施例 1002	D
实施例 1003	D
实施例 1004	D
实施例 1005	D
实施例 1006	D
实施例 1007	D

	实施例 1008	D
	实施例 1009	C
	实施例 1010	D
	实施例 1011	D
	实施例 1012	C
	实施例 1013	C
	实施例 1014	D
	实施例 1015	D
	实施例 1016	D
	实施例 1017	D
	实施例 1018	C
[1025]	实施例 1019	D
	实施例 1020	A
	实施例 10001	C
	实施例 10002	B
	实施例 10003	B
	实施例 10500	D
	实施例 10501	D
	实施例 10502	0.013
	实施例 10503	D
	实施例 10504	D
	实施例 10505	C
	实施例 10506	D

[1026] 本领域技术人员将明白本申请不限于前述说明性实施例且其可在不脱离本申请本质属性的情况下以其它特定形式体现。因此,实施例的所有方面应视为说明性而非限制性,参考所附权利要求书而非前述实施例且因此本申请意欲涵盖属于权利要求书的等效形式的含义及范围内的所有改变。

## 序列表

<110> 百时美施贵宝公司

<120> PD-1/PD-L1及CD80/PD-L1蛋白质/蛋白质相互作用的大环抑制剂

<130> 12735-W0-PCT

<150> US 62/318,417

<151> 2016-04-05

<150> US 15/475,227

<151> 2017-03-31

<160> 2

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 384

<212> PRT

<213> 人类(Homo sapiens)

<400> 1

```

Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala
1           5           10           15
Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe
           20           25           30
Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro
           35           40           45
Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln
           50           55           60
Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg
65           70           75           80
Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr
           85           90           95
Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu
           100          105          110
Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro
           115          120          125
Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Gly
           130          135          140
Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Arg Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
145          150          155          160
His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser
           165          170          175
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

```



