



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101133060 B

(45) 授权公告日 2013.06.05

(21) 申请号 200680006916.1

代理人 沙永生

(22) 申请日 2006.05.04

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

0509223.4 2005.05.05 GB

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 295/18 (2006.01)

C07D 217/12 (2006.01)

C07D 333/62 (2006.01)

A61K 31/4045 (2006.01)

A61K 31/4353 (2006.01)

A61K 31/4965 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.09.03

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2006/001605 2006.05.04

(87) PCT申请的公布数据

W02006/117549 EN 2006.11.09

(73) 专利权人 色品疗法有限公司

地址 英国牛津郡

(72) 发明人 A·H·戴维森 S·R·佩特尔

F·A·马塞 S·J·戴维斯

A·H·德吕蒙 D·F·C·莫法特

K·W·J·贝克 A·D·G·唐纳尔德

(56) 对比文件

WO 03066579 A2, 2003.08.14,

CN 1450991 A, 2003.10.22,

WO 2005037272 A1, 2005.04.28,

Russell L. Wolz. A kinetic comparison of the homologous proteases astacin and meprin A1. Archives biochemistry and biophysics. 1994,

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

司 31100

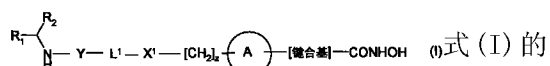
审查员 金英

权利要求书2页 说明书123页

(54) 发明名称

酶抑制剂

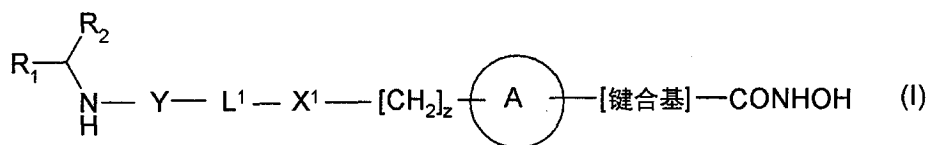
(57) 摘要



化合物是组蛋白脱乙酰酶活性的抑制剂,并可用于治疗例如癌症,其中, $R_1$ 是羧酸基(-COOH)或是可被一种或多种细胞内羧酸酯酶水解成羧酸基的酯基; $R_2$ 是天然或非天然 $\alpha$ 氨基酸的侧链; $Y$ 是键、-C(=O)-、-S(=O)<sub>2</sub>-、-C(=O)O-、-C(=O)NR<sub>3</sub>-、-C(=S)-NR<sub>3</sub>-、-C(=NH)NR<sub>3</sub>或-S(=O)<sub>2</sub>NR<sub>3</sub>-,其中 $R_3$ 是氢或任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基; $L^1$ 是式-(Alk<sup>1</sup>)<sub>m</sub>(Q)<sub>n</sub>(Alk<sup>2</sup>)<sub>p</sub>-的二价基团,其中, $m$ 、 $n$ 和 $p$ 独立为0或1, $Q$ 是:(i)具有5-13个环成员的任选取代的二价单环或双环碳环或杂环基团,或(ii),当 $m$ 和 $p$ 都是0时是式-X<sup>2</sup>-Q<sup>1</sup>-或-Q<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-的二价基团,其中X<sup>2</sup>是-O-,S-或NR<sup>A</sup>-,其中R<sup>A</sup>是氢或任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基,Q<sup>1</sup>是具有5-13个环

成员的任选取代的二价单环或双环碳环或杂环基团,Alk<sup>1</sup>和Alk<sup>2</sup>独立代表任选取代的二价C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>环烷基,或任选取代的直链或支链的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>亚烯基或C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>亚炔基,所述基团可任选含有或终止于醚(-O-)、硫醚(-S-)或氨基(-NR<sup>A</sup>-)连接,其中,R<sup>A</sup>是氢或任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基;X<sup>1</sup>代表键;-C(=O)-;或-S(=O)<sub>2</sub>-;NR<sub>4</sub>C(=O)-、-C(=O)NR<sub>4</sub>-、-NR<sub>4</sub>C(=O)NR<sub>5</sub>-、-NR<sub>4</sub>S(=O)<sub>2</sub>-或-S(=O)<sub>2</sub>NR<sub>4</sub>-,其中R<sub>4</sub>和R<sub>5</sub>独立为氢或任选取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基; $z$ 是0或1;A代表任选取代的单环、二环或三环碳环或杂环系统,其中,基团R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>NH-Y-L<sup>1</sup>-X<sup>1</sup>-[CH<sub>2</sub>]<sub>z</sub>-和HONHCO-[键合基]-结合于不同的环原子;和-[键合基]-代表连接A中的环原子与异羟肟酸基CONHOH的二价键合基,该键合基的长度,即从连接A的环原子的最后一个原子到连接异羟肟酸基的最后一个原子的长度,等于含有3-10个碳原子的无支链饱和烃链的长度。

1. 式 (I) 的化合物或其盐：



其中，

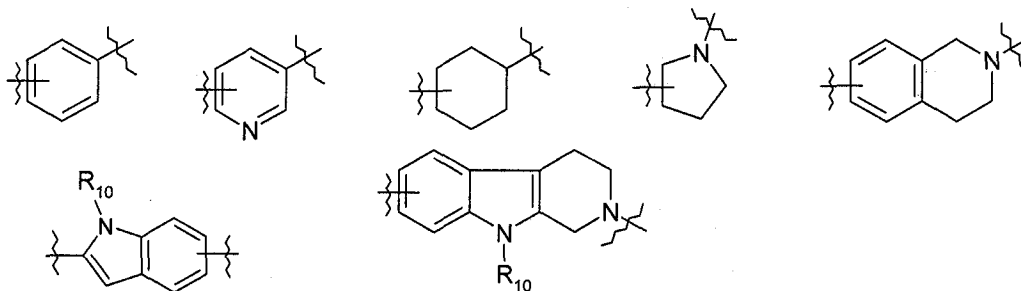
$R_1$  是可被一种或多种细胞内羧酸酯酶水解成羧酸基的通式为  $-(C=O)OR_9$  的酯基，其中  $R_9$  是环戊基或乙基；

$R_2$  是氢， $C_1$ - $C_6$  烷基，苯基，苄基，苯基乙基，2-、3- 或 4- 羟基苄基，环己基，叔丁氧基甲基或  $CH_3-S-CH_2CH_2-$ ；

基团  $-Y-L^1-X^1-[CH_2]_z-$  选自  $-C(=O)-$ ， $-S(O)_2-$ ， $-C(=O)CH_2O-$ ， $-CH_2-$ ， $-CH_2CH_2-$ ， $-CH_2CH_2O-$ ， $CH_2CH_2CH_2O-$ ， $-C(=O)NHCH_2-$ ， $-C(=O)CH_2CH_2CH_2O-$ ， $-C(=O)OCH_2-$ ， $-C(=O)CH_2CH_2-$ ， $-C(=O)CH_2-$ ；

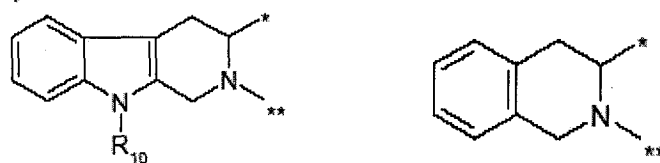
A 是以下取代的环体系 (i) 或 (ii) 之一，所述环任选地被甲氧基取代；

(i)



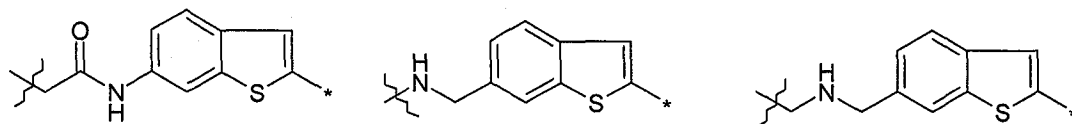
其中， $R_{10}$  是氢或  $C_1$ - $C_6$  烷基，显示为连接到固定原子的被波浪线贯穿的键连接化合物 (I) 中的键合基，而显示为浮动的另一个键将所示的环系统中任何方便的环原子连接到  $R_1R_2CHNHYL^1X^1[CH_2]_z$  基团；或

(ii)



其中显示为连接到固定原子的用 \* 标记的键连接到基团  $R_1R_2CHNHYL^1X^1[CH_2]_z$ ，显示为连接到固定原子的用 \*\* 标记的键连接到键合基；

$-[\text{键合基}]$  代表以下二价基团中的一个：



$-(C=O)-(CH_2)_6-^*$        $-NH(C=O)-(CH_2)_6-^*$        $-(C=O)-NH-(CH_2)_5-^*$        $-(C=O)-NH-(CH_2)_6-^*$

其中用 \* 标记的键连接到异羟肟酸的碳原子上。

2. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于,基团  $-Y-L^1-X^1-[CH_2]_z-$  是  $-CH_2-$ 、 $-C(=O)-CH_2-$ 、 $-C(=O)-CH_2O-$  或  $-C(=O)-NH-CH_2-$ 。

3. 如权利要求 1 所述的化合物,其特征在于, $R_2$  是苯基、苄基、苯基乙基、叔丁氧基甲基或异丁基。

4. 一种化合物,所述化合物选自下组:

(S)-3-叔丁氧基-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-丙酸环戊酯;

(S)-3-叔丁氧基-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-丙酸;

(S)-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-苯基-乙酸环戊酯;

(S)-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-苯基-乙酸;

(S)-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-苯基-乙酸环戊酯;

(S)-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-苯基-乙酸;

(S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-4-甲基-戊酸环戊酯;或

(S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-4-甲基-戊酸。

5. 一种药物组合物,所述药物组合物含有如权利要求 1 所述的化合物以及药学上可接受的载体。

6. 如权利要求 1 所述的式 (I) 的化合物在制备治疗细胞增殖疾病、聚谷氨酰胺病、神经变性疾病、自身免疫性疾病、炎性疾病、器官移植排斥、糖尿病、血液学疾病和感染的组合物中的用途。

7. 如权利要求 6 所述的用途,用于治疗癌细胞增殖、亨廷顿病或阿耳茨海默病。

8. 如权利要求 6 所述的用途,用于治疗类风湿性关节炎。

9. 如权利要求 5 所述的药物组合物,所述药物组合物适合局部给药,且在如权利要求 1-4 中任一项所述的化合物中, $R_2$  通过亚甲基  $-CH_2-$  连接到碳原子上。

## 酶抑制剂

[0001] 本发明涉及抑制组蛋白脱乙酰酶家族成员的化合物以及该化合物在治疗包括癌症在内的细胞增殖疾病、聚谷氨酰胺病如亨廷顿病、神经变性疾病如阿耳茨海默病、自身免疫性疾病如类风湿性关节炎和器官移植排斥、糖尿病、血液学疾病、炎症性疾病、心血管疾病、动脉粥样硬化以及感染的炎症后遗症中的应用。

[0002] 发明背景

[0003] 在真核细胞中, DNA 被组蛋白包裹以形成染色质。大约 150 个 DNA 碱基对在组蛋白八聚体(组蛋白 2A、2B、3 和 4 各两个)周围被包裹两次从而形成染色质的基本单位—核小体。染色质的有序结构需要被修饰以转录相关基因。转录调节是分化、增殖和凋亡的关键,因此被密切控制。对染色质结构改变的控制(以及因此对转录的控制)受组蛋白的共价修饰调节,最显著的是 N-末端尾巴。对氨基酸侧链的共价修饰(例如甲基化、乙酰化、磷酸化和泛素化)是由酶介导的(有关组蛋白的修饰以及它们在转录调节中的作用的综述可在 Berger SL 2001 *Oncogene* 20,3007-3013 中找到;参见 Grunstein, M 1997 *Nature* 389, 349-352; Wolffe AP 1996 *Science* 272,371-372;以及 Wade PA 等,1997 *Trends Biochem Sci* 22,128-132,其中回顾了组蛋白的乙酰化和转录)。

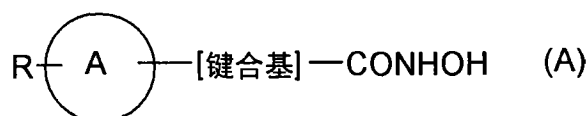
[0004] 组蛋白的乙酰化与具有转录活性的染色质区域有关,而具有低乙酰化水平的核小体通常是转录沉默的。组蛋白的乙酰化状态受两类活性相对的酶控制:组蛋白乙酰转移酶(HAT)和组蛋白脱乙酰酶(HDAC)。在转化的细胞中,据信 HDAC 的不适当的表达导致肿瘤抑制因子沉默(关于 HDAC 在肿瘤发生中的作用的综述,可参见 Gray SG 和 Teh BT 2001 *Curr Mol Med* 1,401-429)。该文献中已经描述了 HDAC 酶抑制剂并显示它可诱导某些基因的转录再激活,从而导致抑制癌细胞增殖、诱导凋亡和抑制肿瘤在动物中生长(相关综述,可参见 Kelly, WK 等,2002 *Expert Opin Investig Drugs* 11,1695-1713)。这种发现提示,HDAC 抑制剂有治疗癌症等增殖性疾病的治疗潜能(Kramer, OH 等,2001 *Trends Endocrinol* 12, 294-300, Vigushin DM 和 Coombes RC 2002 *Anticancer Drugs* 13,1-13)。

[0005] 此外,还提到异常的 HDAC 活性或组蛋白乙酰化与以下疾病和紊乱有关:聚谷氨酰胺病如亨廷顿病(Hughes RE 2002 *Curr Biol* 12, R141-R143; McCampbell A 等, 2001 *Proc Soc Natl Acad Sci* 98,15179-15184; Hockly E 等,2003 *Proc Soc Natl Acad Sci* 100,2041-2046),其它神经变性疾病如阿耳茨海默病(Hempen B 和 Brion JP 1996, *J Neuropathol Exp Neurol* 55,964-972),自身免疫性疾病和器官移植排斥(Skov S 等,2003 *Blood* 101,1430-1438; Mishra N 等,2003 *J Clin Invest* 111,539-552),糖尿病(Mosley AL 和 Ozcan S 2003 *J Biol Chem* 278,19660-19666)和糖尿病并发症,感染(包括原生动感染(Darkin-Rattray, SJ 等,1996 *Proc Soc Natl Acad Sci* 93,13143-13147))和血液学疾病包括地中海贫血(Witt O 等,2003 *Blood* 101,2001-2007)。这些文献中的观察结果提示,抑制 HDAC 对于这些疾病以及其它相关疾病应具有治疗益处。

[0006] 已经提出过许多类型的 HDAC 抑制剂化合物,这些化合物中的一些目前正在接受关于治疗癌症的临床评价。例如,以下专利申请公开了这种化合物:

[0007] US 5,369,108 和 WO WO 03/076395 WO 04/110989

- [0008] 01/18171 WO 03/076400 WO 04/092115  
 [0009] US 4, 254, 220 WO 03/076401 WO 04/0224991  
 [0010] WO 01/70675 WO 03/076421 WO 05/014588  
 [0011] WO 01/38322 WO 03/076430 WO 05/018578  
 [0012] WO 02/30879 WO 03/076422 WO 05/019174  
 [0013] WO 02/26703 WO 03/082288 WO 05/004861  
 [0014] WO 02/059947 WO 03/087057 WO 05/007091  
 [0015] WO 02/26696 WO 03/092686 WO 05/030704  
 [0016] WO 03/082288 WO 03/066579 WO 05/013958  
 [0017] WO 02/22577 WO 03/011851 WO 05/028447  
 [0018] WO 03/075929 WO 04/013130 WO 05/026907  
 [0019] 本领域抑制的 HDAC 抑制剂中有许多具有式 (A) 所示的结构模板：  
 [0020]



[0021] 其中,环 A 是具有任选的取代基 R 的碳环或杂环系统,[键合基(linker)]是各种类型的键合基。异羟肟酸(hydroxamate)基团作为金属连接基团,与 HDAC 酶活性位点上的金属离子相互作用,其位于折叠的酶结构内的袋的基部。环或环系统 A 位于含有金属离子的袋内或入口上,而-[键合基]-基团深入到该袋中以使 A 与结合异羟肟酸基的金属相连。在本领域中,环或环系统 A 有时被非正式地称为抑制剂的“头部基团(head group)”,在本文中有时也这样。

[0022] 使用前药来增强到靶器官和组织的递送或克服母体药物较差的药代动力学特性是一种熟知的药物化学方法。给予酯类前药,例如可在体内被血清羧酸酯酶水解成活性母体酸的酯,能使母体酸的血清水平高于给予酸本身。

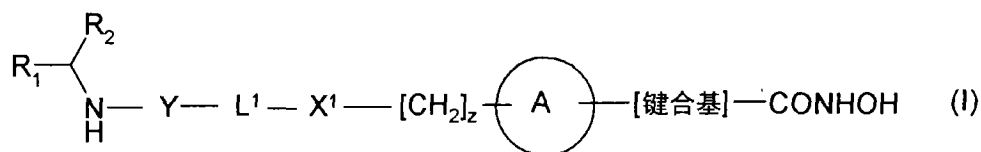
[0023] 发明简述

[0024] 本发明基于以下发现,即将  $\alpha$  氨基酸酯基团引入上述 HDAC 抑制剂分子模板 (A) 有助于药剂透过细胞膜,从而使细胞内羧酸酯酶活性水解酯以释放母体酸。酸在带有电荷时不容易被转运出细胞,从而会累积而提高活性 HDAC 抑制剂的细胞内浓度。这导致作用潜能提高且持续时间增加。因此,本发明提供了一类以具有  $\alpha$  氨基酸酯部分为结构特征的化合物, $\alpha$  氨基酸酯部分是共价连接到 HDAC 抑制剂分子模板的细胞内羧酸酯酶(文中也称为“酯酶基序”)的底物,并提供了相应的去酯化的母体酸,这种化合物具有药物用途,可用于治疗诸如癌症等受益于在细胞内抑制 HDAC 的疾病。

[0025] 发明详述

[0026] 根据本发明,提供了一种式 (I) 的化合物其盐、N-氧化物、水合物或溶剂合物：

[0027]



[0028] 其中,

[0029]  $R_1$  是羧酸基 ( $-\text{COOH}$ ) 或是可被一种或多种细胞内羧酸酯酶水解成羧酸基的酯基;

[0030]  $R_2$  是天然或非天然  $\alpha$  氨基酸的侧链;

[0031]  $Y$  是键、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_3-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})-\text{NR}_3$ 、 $-\text{C}(=\text{NH})\text{NR}_3$  或  $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}_3-$ , 其中  $R_3$  是氢或任选取代的  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  烷基;

[0032]  $L^1$  是式  $-(\text{Alk}^1)_m(\text{Q})_n(\text{Alk}^2)_p-$  的二价基团, 其中,

[0033]  $m$ 、 $n$  和  $p$  独立为 0 或 1,

[0034]  $Q$  是: (i) 具有 5-13 个环成员的任选取代的二价单环或双环碳环或杂环基团,

[0035] 或 (ii), 当  $m$  和  $p$  都是 0 时是式  $-\text{X}^2-\text{Q}^1-$  或  $-\text{Q}^1-\text{X}^2-$  的二价基团, 其中  $\text{X}^2$  是  $-\text{O}-$ ,

[0036]  $\text{S}-$  或  $\text{NR}^A-$ , 其中  $\text{R}^A$  是氢或任选取代的  $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$  烷基,  $\text{Q}^1$  是具有 5-13 个环成员的任选取代的二价单环或双环碳环或杂环基团,

[0037]  $\text{Alk}^1$  和  $\text{Alk}^2$  独立代表任选取代的二价  $\text{C}_3$ - $\text{C}_7$  环烷基, 或任选取代的直链或支链的  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  亚烷基、 $\text{C}_2$ - $\text{C}_6$  亚烯基或  $\text{C}_2$ - $\text{C}_6$  亚炔基, 所述基团可任选含有或终止于醚 ( $-\text{O}-$ )、硫醚 ( $-\text{S}-$ ) 或氨基 ( $-\text{NR}^A-$ ) 连接, 其中,  $\text{R}^A$  是氢或任选取代的  $\text{C}_1$ - $\text{C}_3$  烷基;

[0038]  $\text{X}^1$  代表键;  $-\text{C}(=\text{O})$ ; 或  $-\text{S}(=\text{O})_2-$ ;  $-\text{NR}_4\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_4-$ 、 $-\text{NR}_4\text{C}(=\text{O})\text{NR}_5-$ 、 $-\text{NR}_4\text{S}(=\text{O})_2-$  或  $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}_4-$ , 其中  $\text{R}_4$  和  $\text{R}_5$  独立为氢或任选取代的  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  烷基;

[0039]  $z$  是 0 或 1;

[0040]  $A$  代表任选取代的单环、二环或三环碳环或杂环环系统, 其中, 基团  $\text{R}_1\text{R}_2\text{NH}-\text{Y}-\text{L}^1-\text{X}^1-[\text{CH}_2]_z-$  和  $\text{HONHCO}-[\text{键合基}]-$  结合于不同的环原子; 和

[0041]  $-\text{[键合基]}-$  代表连接  $A$  中的环原子与异羟肟酸基  $\text{CONHOH}$  的二价键合基, 该键合基的长度, 即从连接  $A$  的环原子的最后一个原子到连接异羟肟酸基的最后一个原子的长度, 等于含有 3-10 个碳原子的无支链饱和烃链的长度。

[0042] 尽管上面的定义可能包括高分子量的分子, 但根据药物化学实践的一般原则, 优选本发明涉及的化合物的分子量应不超过 600。

[0043] 在另一个广义方面, 本发明提供了上面定义的式 (I) 的化合物或其  $\text{N}$ -氧化物、盐、水合物或溶剂合物在制备用于抑制 HDAC 酶活性的组合物中的应用。

[0044] 本发明涉及的化合物可用于在体外或体内抑制 HDAC 活性, 尤其是 HDAC1 活性。

[0045] 在本发明的一个方面, 本发明的化合物可用于制备用来治疗以下疾病的组合物: 细胞增殖疾病如癌细胞增殖、聚谷氨酰胺病如亨廷顿病、神经变性疾病如阿耳茨海默病、自身免疫性疾病如类风湿性关节炎、器官移植排斥、糖尿病、血液学疾病、感染 (包括但不限于原生动物和真菌感染)、炎性疾病、以及包括动脉粥样硬化在内的心血管疾病。

[0046] 另一方面, 本发明提供了一种治疗上述疾病类型的方法, 所述方法包括给予患有这种疾病的对象有效量的如上文所定义的式 (I) 的化合物。

[0047] 术语“酯”或“酯化的羧基”表示基团  $\text{R}_9\text{O}(\text{C}=\text{O})-$ , 其中  $\text{R}_9$  是从理论上说衍生自醇  $\text{R}_9\text{OH}$  的酯的特征性基团。

[0048] 文中, 术语“ $(\text{C}_a-\text{C}_b)$  烷基”, 其中  $a$  和  $b$  是整数, 表示含有  $a-b$  个碳原子的直链或支链烷基。因此, 例如当  $a$  是 1 而  $b$  是 6 时, 该术语包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基和正己基。

[0049] 文中, 术语“二价  $(\text{C}_a-\text{C}_b)$  亚烷基”, 其中  $a$  和  $b$  是整数, 表示含有  $a-b$  个碳原子和两

个不饱和和化学价的饱和烃链。

[0050] 文中,术语“(C<sub>a</sub>-C<sub>b</sub>) 烯基”,其中 a 和 b 是整数,表示含有 a-b 个碳原子并具有至少一个合适的 E 或 Z 立体化学的双键的直链或支链烯基部分。该术语包括,例如,乙烯基、烯丙基、1- 和 2- 丁烯基和 2- 甲基 -2- 丙烯基。

[0051] 文中,术语“二价 (C<sub>a</sub>-C<sub>b</sub>) 亚烯基”表示含有 a-b 个碳原子、至少一个双键和两个不饱和和化学价的烃链。

[0052] 文中,术语“C<sub>a</sub>-C<sub>b</sub> 炔基”,其中 a 和 b 是整数,表示含有 2-6 个碳原子且还含有一个三键的直链或支链炔基。该术语将包括,例如,乙炔基、1- 丙炔基、1- 和 2- 丁炔基、2- 甲基 -2- 丙炔基、2- 戊炔基、3- 戊炔基、4- 戊炔基、2- 己炔基、3- 己炔基、4- 己炔基和 5- 己炔基。

[0053] 文中,术语“二价 (C<sub>a</sub>-C<sub>b</sub>) 亚炔基”,其中 a 和 b 是整数,表示含有 2-6 个碳原子和至少一个三键的二价烃链。

[0054] 文中,术语“碳环”指含有最多达 16 个环原子且所有环原子均为碳原子的单环、二环或三环基团,并包括芳基和环烷基。

[0055] 文中,术语“环烷基”指含有 3-8 个碳原子的单环的饱和碳环基团,该术语包括,例如,环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0056] 文中,非限制性术语“芳基”指单环、二环或三环的碳环芳香基团,并包括含有两个通过共价键直接相连的单环碳环芳香环的基团。这种基团的例子有苯基、联苯基和萘基。

[0057] 文中,非限制性术语“杂芳基”指含有一个或多个选自 S、N 或 O 的杂原子的单环、二环或三环芳香基团,并包括含有通过共价键直接相连的两个此类单环或者一个此类单环和一个单环芳基环的基团。这种基团的例子有噻吩基、苯并噻吩基、呋喃基、苯并呋喃基、吡咯基、咪唑基、苯并咪唑基、噻唑基、苯并噻唑基、异噻唑基、苯并异噻唑基、吡唑基、噁唑基、苯并噁唑基、异噁唑基、苯并异噁唑基、异噻唑基、三唑基、苯并三唑基、噻二唑基、噁二唑基、吡啶基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、吡啶基和吡唑基。

[0058] 文中,非限制性术语“杂环基”或“杂环”包括上面定义的“杂芳基”,其非芳香含义包括含有一个或多个选自 S、N 或 O 的杂原子的单环、二环或三环非芳香基团,并包括由含有一个或多个这种杂原子的单环非芳香基团构成的基团,所述单环非芳香基团共价连接到另一个此类基团或连接到单环碳环基团。这种基团的例子有吡咯基、呋喃基、噻吩基、哌啶基、咪唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、噻二唑基、吡唑基、吡啶基、吡咯烷基、嘧啶基、吗啉基、哌嗪基、吡啶基、吗啉基、苯并呋喃基、吡喃基、异噁唑基、苯并咪唑基、亚甲基二氧苯基、亚乙基二氧苯基、马来酰亚胺基 (maleimido) 和琥珀酰亚胺基。

[0059] 除非当其出现时文中另有说明,术语“取代的”用于本文所述的任何部分时表示被最多 4 个相容的取代基取代,各取代基独立为,例如,(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷基,(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷氧基,羟基,羧基 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷基,巯基,巯基 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷基,(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷硫基,苯基,卤素 (包括氟、溴和氯),三氟甲基,三氟甲氧基,硝基,腈 (-CN),氧代,-COOH,-COOR<sup>A</sup>,-COR<sup>A</sup>,-SO<sub>2</sub>R<sup>A</sup>,-CONH<sub>2</sub>,-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>,-CONHR<sup>A</sup>,-SO<sub>2</sub>NHR<sup>A</sup>,-CONR<sup>A</sup>R<sup>B</sup>,-SO<sub>2</sub>NR<sup>A</sup>R<sup>B</sup>,-NH<sub>2</sub>,-NHR<sup>A</sup>,-NR<sup>A</sup>R<sup>B</sup>,-OCONH<sub>2</sub>,-OCONHR<sup>A</sup>,-OCONR<sup>A</sup>R<sup>B</sup>,-NHCOR<sup>A</sup>,-NHCOOR<sup>A</sup>,-NR<sup>B</sup>COOR<sup>A</sup>,-NHSO<sub>2</sub>OR<sup>A</sup>,-NR<sup>B</sup>SO<sub>2</sub>OR<sup>A</sup>,-NHCONH<sub>2</sub>,-NR<sup>A</sup>CONH<sub>2</sub>,-NHCONHR<sup>B</sup>,-NR<sup>A</sup>CONHR<sup>B</sup>,-NHCONR<sup>A</sup>R<sup>B</sup>或 -NR<sup>A</sup>CONR<sup>A</sup>R<sup>B</sup>,其中,R<sup>A</sup>和 R<sup>B</sup>独立为 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 烷基,(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) 环烷基,苯基或

含有 5 或 6 个环原子的单环杂芳基。“任选的取代基”可以是上述取代基之一。

[0060] 术语“天然或非天然  $\alpha$ -氨基酸的侧链”表示式  $\text{NH}_2\text{-CH(R}^1\text{)-COOH}$  所示天然或非天然氨基酸的  $\text{R}^1$  基团。

[0061] 天然  $\alpha$ -氨基酸的侧链的例子包括丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、胱氨酸、谷氨酸、组氨酸、5-羟基赖氨酸、4-羟基脯氨酸、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、缬氨酸、 $\alpha$ -氨基己二酸、 $\alpha$ -氨基-正丁酸、3,4-二羟基苯丙氨酸、高丝氨酸、 $\alpha$ -甲基丝氨酸、鸟氨酸、2-哌啶酸和甲状腺素的侧链。

[0062] 在其特征性侧链中含有功能性取代基如氨基、羧基、羟基、巯基、胍基、咪唑基或吡啶基的天然  $\alpha$ -氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、色氨酸、组氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和半胱氨酸。在本发明的化合物中，当  $\text{R}_2$  是上述侧链之一时，则所述功能性取代基可任选被保护。

[0063] 术语“保护的”当用于天然  $\alpha$ -氨基酸侧链中的功能性取代基时表示衍生这种取代基使其基本失去功能。例如，羧基可被酯化（例如  $\text{C}_1\text{-C}_6$  烷基酯），氨基可被转化成酰胺（例如作为  $\text{NHCOC}_1\text{-C}_6$  烷基酰胺）或氨基甲酸酯（例如作为  $\text{NHC(=O)OC}_1\text{-C}_6$  烷基或  $\text{NHC(=O)OCH}_2\text{Ph}$  氨基甲酸酯），羟基可被转化成醚（例如  $\text{OC}_1\text{-C}_6$  烷基或  $\text{O(C}_1\text{-C}_6\text{ 烷基) 苯基醚}$ ）或酯（例如  $\text{OC(=O)C}_1\text{-C}_6$  烷基酯），硫醇基团可被转化成硫醚（例如叔丁基或苄基硫醚）或硫代酸酯（thioester）（例如  $\text{SC(=O)C}_1\text{-C}_6$  烷基硫代酸酯）。

[0064] 非天然  $\alpha$ -氨基酸的侧链的例子包括下文在讨论用于本发明化合物的合适的  $\text{R}_2$  基团时提到的那些。

[0065] 文中，术语“盐”包括碱加成盐、酸加成盐和季盐（quaternary salt）。酸性的本发明的化合物可与碱、有机碱形成盐，包括药学上可接受的盐，所述碱例如碱金属的氢氧化物如氢氧化钠和氢氧化钾；碱土金属的氢氧化物如氢氧化钙、氢氧化钡和氢氧化镁；所述有机碱例如 N-甲基-D-葡萄糖胺、胆碱三（羟甲基）氨基-甲烷、L-精氨酸、L-赖氨酸、N-乙基哌啶、二苄基胺等。那些碱性的化合物 (I) 可与无机酸和有机酸形成盐，包括药学上可接受的盐，所述无机酸例如氢卤酸如盐酸或氢溴酸、硫酸、硝酸或磷酸等，所述有机酸例如乙酸、酒石酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、苹果酸、水杨酸、柠檬酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、苯甲酸、苯磺酸、谷氨酸、乳酸和扁桃酸等。

[0066] 由于存在不对称碳原子，含有一个或多个实际的或潜在的手性中心的本发明的化合物可作为许多在各手性中心上具有 R 或 S 立体化学的非对映异构体存在。本发明包括所有这些非对映异构体和它们的混合物。

[0067] 如上所述，本发明的酯是它们将被细胞内羧酸酯酶转化成的相应羧酸的主要前药。然而，只要它们还未被水解，所述酯本身就具有 HDAC 抑制活性。本发明的化合物不仅包括酯，还包括相应的羧酸水解产物。

[0068] 异羟肟酸基团  $\text{-C(=O)NHOH}$

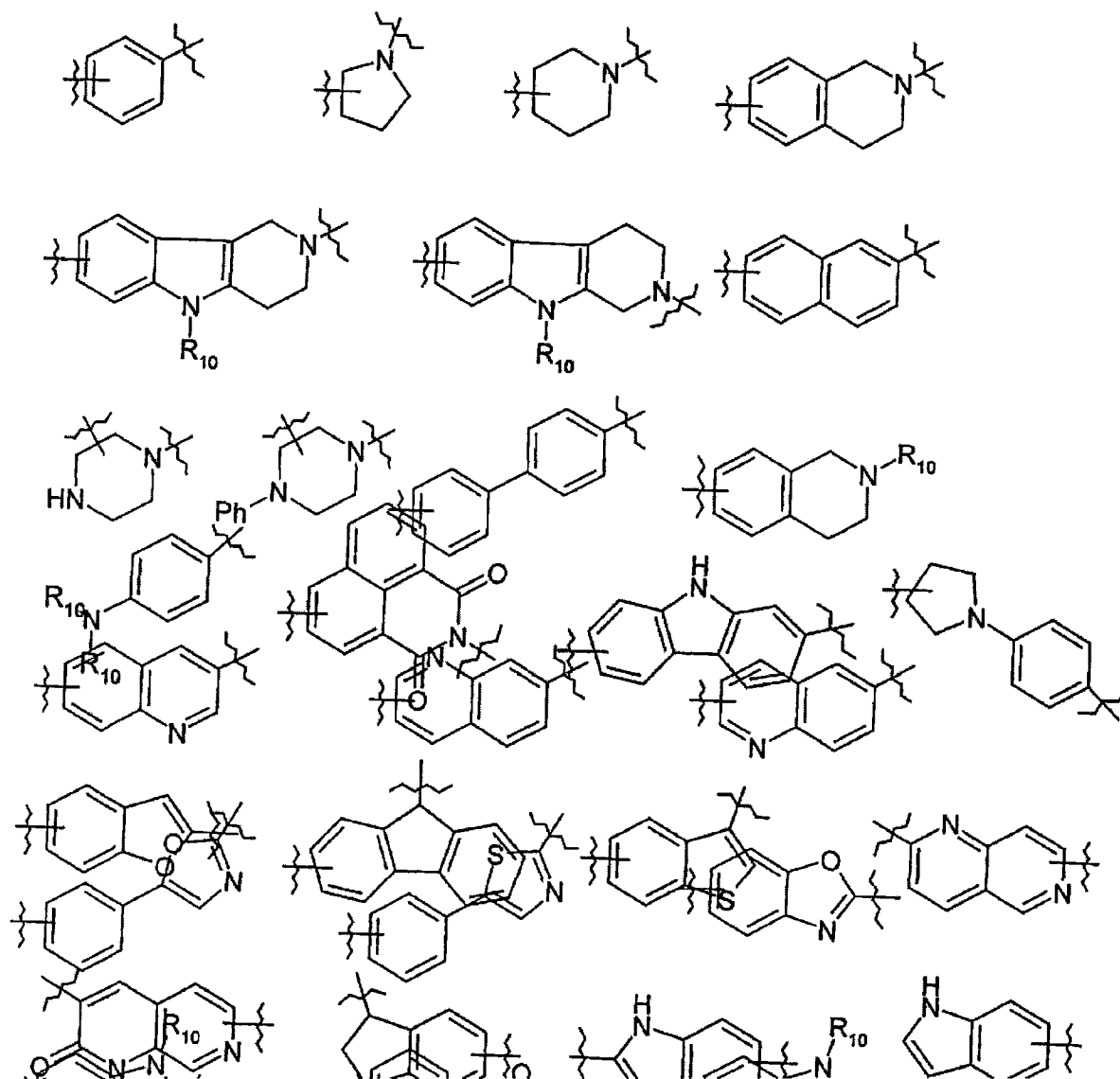
[0069] 在本发明的化合物中，异羟肟酸基团作为金属连接基团，与 HDAC 酶活性位点上的金属离子相互作用，其位于折叠的酶结构内的袋的基部。

[0070] 环或环系统 A

[0071] 环或环系统 A 是任选被取代的单环、二环或三环碳环或杂环系统。在本发明的

化合物中,当结合到 HDAC 酶的活性位点时,环或环系统 A 位于含有金属离子的袋内或入口处,而  $-\{\text{键合基}\}-$  基团深入到该袋中以使 A 与结合异羟肟酸基的金属相连。在本领域中,环或环系统 A 有时被非正式地称为抑制剂的“头部基团”。环系统 A 的例子包括以下这些:

[0072]



[0073] 其中 R<sub>10</sub> 是氢或任选取代的 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 烷基,被波浪线贯穿的键连接化合物 (I) 中的键合基,而化合物 (I) 中的基团 R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>CHNHYL<sup>1</sup>X<sup>1</sup>[CH<sub>2</sub>]<sub>z</sub> 与所示环系统中任何方便的环原子相连。

[0074]  $-\{\text{键合基}\}-$  基团

[0075]  $-\{\text{键合基}\}-$  代表连接 A 中的环原子与异羟肟酸基 CONHOH 的二价键合基,该键合基的长度,即从连接 A 的环原子的最后一个原子到连接异羟肟酸基的最后一个原子的长度,等于含有 3-10 个碳原子的无支链饱和烃链的长度。含有 3 个碳原子的无支链饱和烃链的长度约为 2.5 埃,含有 10 个碳原子的无支链饱和链烃的长度约为 11.3 埃。任何给定的  $-\{\text{键合基}\}-$  的长度可根据文献中的原子半径和键长数据来确定,或者可用 DS ViewerPro (Accelrys, Inc) 等化学结构建模软件来确定。 $-\{\text{键合基}\}-$  的规定长度反映了头部基团 A 可位于酶活性位点上的含有金属离子的袋入口处或该袋内这一事实,因此与袋的深度松散相关。在多数情况下,键合基的长度将等于有 4-9 个碳原子,例如 5、6 或 7 个碳

原子的无支链饱和烃链的长度。具体通用类型的-[键合基]-是下述“1型”、“2型”和“3型”键合基。

**[0076] 1型键合基**

**[0077]** 在这种类型中, -[键合基]- 代表式为  $-(\text{CH}_2)_x-\text{Z}-\text{L}^2-$  的二价基团, 其中

**[0078]**  $x$  是 0 或 1;

**[0079]**  $\text{Z}$  是键、 $-\text{NR}_3-$ 、 $-\text{NR}_3\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_3-$ 、 $-\text{NR}_4\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_3-$ 、 $-\text{C}(=\text{S})-\text{NR}_3-$ 、 $-\text{C}(=\text{N})-\text{NR}_3-$ 、 $-\text{NR}_3\text{S}(=\text{O})_2-$  或  $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NR}_3-$ , 其中  $\text{R}_3$  是氢或  $\text{C}_1-\text{C}_6$  烷基;  $-\text{C}(=\text{O})$ ; 或  $-\text{S}(=\text{O})_2-$ ; 和

**[0080]**  $\text{L}^2$  代表任选取代的直链或支链的  $\text{C}_4-\text{C}_7$  亚烷基、 $\text{C}_4-\text{C}_6$  亚烯基或  $\text{C}_4-\text{C}_6$  亚炔基, 所述基团任选含有或终止于醚 ( $-\text{O}-$ )、硫醚 ( $-\text{S}-$ ) 或氨基 ( $-\text{NR}^A-$ ) 连接, 其中,  $\text{R}^A$  是氢或任选取代的  $\text{C}_1-\text{C}_3$  烷基。

**[0081]** 在这种类型的键合基的一个亚类中, 在任何相容的组合中,  $x$  是 0;  $\text{Z}$  是  $-\text{NH}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})-$  或  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$  和  $\text{L}^2$  是  $-(\text{CH}_2)_5-$ 、 $-(\text{CH}_2)_6-$  或  $-(\text{CH}_2)_7-$ 。

**[0082] 2型键合基**

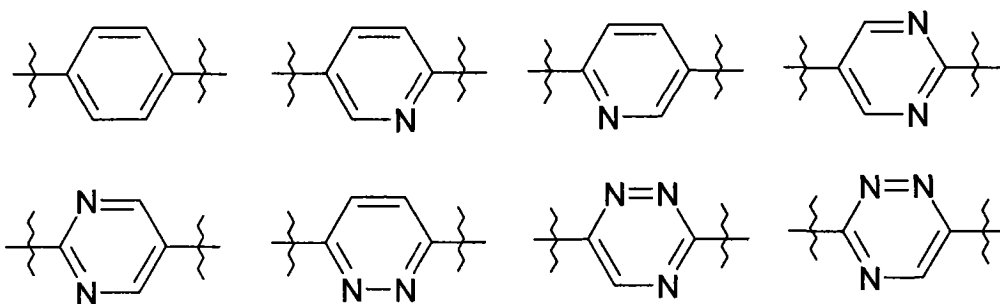
**[0083]** 在这种类型中, -[键合基]- 代表式为  $-(\text{CH}_2)_x-\text{L}^3-\text{Ar}^1-\text{L}^4-$  的二价基团, 其中  $x$  是 0 或 1;

**[0084]**  $\text{L}^3$  是  $\text{Z}$  或  $\text{L}^2$  或  $\text{Z}-\text{L}^2$ , 其中,  $\text{Z}$  如对 1 型键合基的定义,  $\text{L}^2$  是键或任选取代的二价  $\text{C}_1-\text{C}_3$  亚烷基;

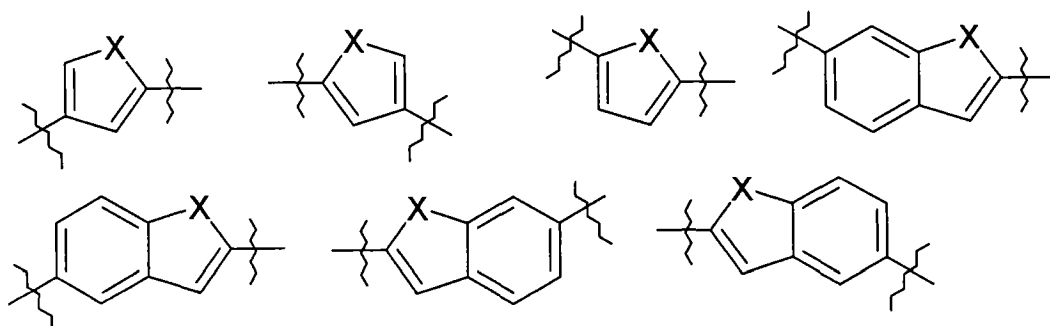
**[0085]**  $\text{Ar}^1$  是二价苯基或具有 5-13 个环成员的二价单环或二环杂芳基, 和  $\text{L}^4$  是键或任选取代的  $-\text{CH}_2-$  或  $-\text{CH}=\text{CH}-$ 。

**[0086]** 在这种类型的键合基的一个亚类中, 在任何相容的组合中,  $x$  是 0 或 1;  $\text{L}^3$  是  $\text{Z}$  或  $\text{Z}-\text{L}^2$ , 其中  $\text{Z}$  是  $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NHS}(=\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}-$  或  $-\text{S}(=\text{O})_2-$ ;  $\text{L}^2$  是  $-\text{CH}_2-$  或  $-\text{CH}=\text{CH}-$ ; 和  $\text{Ar}^1$  是选自下组的二价基团:

**[0087]**



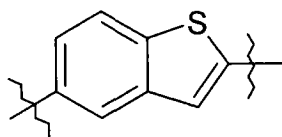
**[0088]**



**[0089]** 其中,  $\text{X}$  是 O、S 或 NH。

[0090] 在上述  $\text{Ar}^1$  基团中, 一个具体的例子是苯并 [b] 噻吩 -6- 基

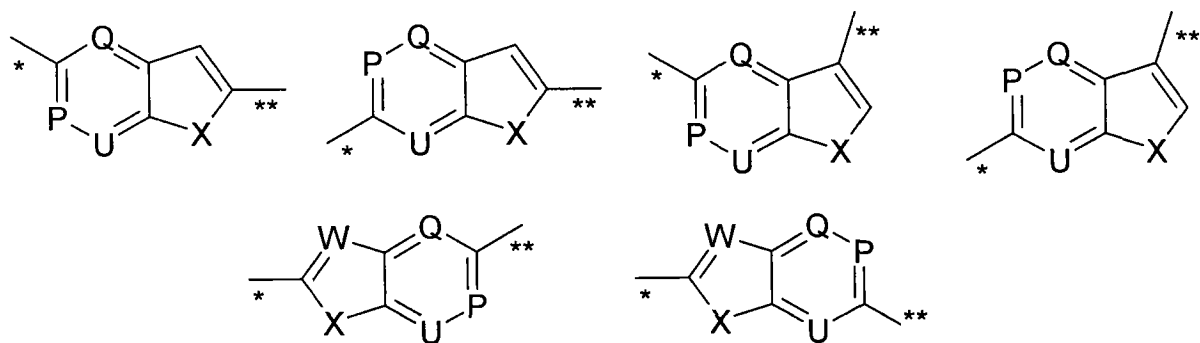
[0091]



[0092] 在这种类型的键合基的一个亚类中, 在任何相容的组合中,  $x$  是 0;  $L^3$  是  $L^2$ , 其中  $L^2$  是可任选含有醚 ( $-\text{O}-$ )、硫醚 ( $-\text{S}-$ ) 或氨基 ( $-\text{NR}^A-$ ) 连接的直链  $\text{C}_3-\text{C}_5$  亚烷基, 其中,  $\text{R}^A$  是氢或任选取代的  $\text{C}_1-\text{C}_3$  烷基, 例如羟乙基;  $\text{Ar}^1$  是选自上段所列基团的二价基团。

[0093] 在这种类型的另一个亚类中,  $x$  是 0,  $L^3$  和  $L^4$  是键,  $\text{Ar}^1$  是二价苯基或含有 9-13 个环成员的二价二环杂芳基, 例如可选自下组:

[0094]



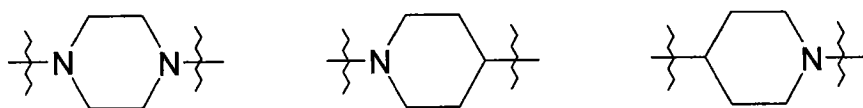
[0095] 其中,  $X$  选自 O、S 或 NH, P、Q 和 U 独立选自 N 和 CH; 用 \*\* 标记的键连接到 CONHOH 基团; 用 \* 标记的键连接到环或环系统 A。

[0096] 3 型键合基

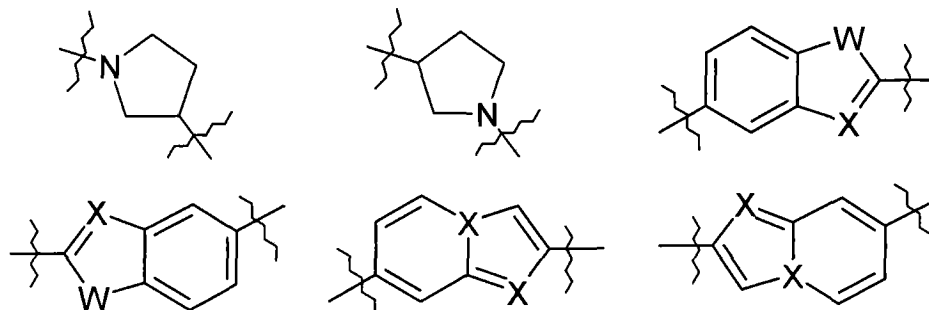
[0097] 在这种类型中,  $-\text{[键合基]}-$  代表式为  $-(\text{CH}_2)_x-\text{L}^3-\text{B}-\text{Ar}^1-\text{L}^4-$  的二价基团, 其中  $x$ 、 $\text{Ar}^1$ ,  $L^3$  和  $L^4$  如上文对 2 型键合基的讨论; B 是单环或二环杂环系统。

[0098] 在这种类型的键合基的一个亚类中, B 是以下基团之一:

[0099]



[0100]



[0101] 其中,  $X$  是 N, W 是 NH、O 或 S。

[0102] 酯基  $\text{R}_1$

[0103] 酯基  $\text{R}_1$  必须是本发明化合物中被一种或多种细胞内羧酸酯酶水解成羧酸基的基团。能够将本发明化合物的酯基水解成相应的酸的细胞内羧酸酯酶包括三种已知的人类的

酶的同种型 hCE-1、hCE-2 和 hCE-3。尽管这些酶被认为是主要的酶,但其它的酶如联苯基水解酶(BPH)也具有水解酯的作用。通常,如果羧酸酯酶将游离的氨基酸酯水解成母体酸,由于下述 hCE-2 和 hCE-3 针对的是 N- 羰基,则当共价结合到 HDAC 抑制剂时羧酸酯酶也会水解酯基序(ester motif)。因此,本文描述的破细胞测定法(broken cell assay)提供了一种直接、快速且简便的首次筛选具有所需水解曲线的酯的方法。当将用这种方法选出的酯基序通过选择性结合化学结合到调节物时可采用相同的羧酸酯酶测定法再次测定,以证实它仍旧是该背景下的羧酸酯酶底物。

[0104] 为被细胞内羧酸酯酶水解,特定的酯基  $R_1$  的例子包括式  $-(C=O)OR_9$  的基团,其中,  $R_9$  是:(i)  $R_7R_8CH-$ , 其中,  $R_7$  是任选取代的  $(C_1-C_3)$  烷基  $-(Z^1)_a-(C_1-C_3)$  烷基-或  $(C_2-C_3)$  烯基  $-(Z^1)_a-(C_1-C_3)$  烷基-, 其中  $a$  是 0 或 1,  $Z^1$  是  $-O-$ 、 $-S-$  或  $-NH-$ ,  $R_8$  是氢或  $(C_1-C_3)$  烷基-, 或者  $R_7$  和  $R_8$  与它们所结合的碳原子一起形成任选取代的  $C_3-C_7$  环烷基环或任选取代的 5 或 6 个环原子的杂环;或(ii)任选取代的苯基或含有 5 或 6 个环原子的单环杂环。在这些种类中,  $R_9$  可以是,例如,甲基,乙基,正或异丙基,正或仲丁基,环己基,烯丙基,苯基,苄基,2-、3-或 4-吡啶基甲基,N-甲基哌啶-4-基,四氢呋喃-3-基或甲氧基乙基。目前优选  $R_9$  是环戊基。

[0105] 已知巨噬细胞通过释放细胞因子,尤其是  $TNF\alpha$  和  $IL-1$  而在炎症性疾病中发挥关键作用(van Roon 等, Arthritis and Rheumatism, 2003, 1229-1238)。在类风湿性关节炎中,它们是维持关节炎症和关节破坏的主要贡献者。巨噬细胞也参与肿瘤的生长和发展(Naldini 和 Carraro, Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005, 3-8)。因此,选择性靶向巨噬细胞增殖的试剂对于治疗癌症和自身免疫性疾病很有价值。预计靶向特定细胞类型能降低副作用。发明人已经发现了将 HDAC 抑制剂靶向巨噬细胞的方法,该方法基于以下发现,即酯酶基序连接 HDAC 抑制剂的方式决定了它是否被水解,因此是否在不同细胞类型中累积。具体地说,已经发现巨噬细胞含有人羧酸酯酶 hCE-1 而其它细胞类型不含有。在通式(I)中,当酯酶基序  $R_1R_2CHNH-$  的氮不直接连接到羰基  $-(C(=O)-)$  时,即当 Y 不是  $-C(=O)$ 、 $-C(=O)O-$  或  $-C(=O)NR_3-$  基团时,该酯将仅被 hCE-1 水解,因此 HDAC 抑制剂将仅在巨噬细胞中累积。文中,除非具体提到“单核细胞”或“单核细胞”,术语巨噬细胞将用来表示巨噬细胞(包括肿瘤相关的巨噬细胞)和/或单核细胞。

[0106] 氨基酸侧链  $R_2$

[0107] 当需要使酯基  $R_1$  被细胞内羧酸酯酶水解时,不要求侧链基团  $R_2$  是相同的。

[0108] 氨基酸侧链的例子包括:

[0109]  $C_1-C_6$  烷基,苯基,2-、3-或 4-羟基苯基,2-、3-或 4-甲氧基苯基,2-、3-或 4-吡啶基甲基、苄基、苯基乙基,2-、3-或 4-羟基苄基,2-、3-或 4-苄氧基苄基,2-、3-或 4- $C_1-C_6$  烷氧基苄基,以及苄氧基  $(C_1-C_6)$  烷基-基团;

[0110] 天然  $\alpha$  氨基酸的特征性基团,其中的任何官能团可被保护;

[0111] 基团  $-[Alk]_nR_6$ , 其中, Alk 是任选被一个或多个  $-O-$  或  $-S-$  原子或  $-N(R_7)-$  基团[其中,  $R_7$  是氢原子或  $(C_1-C_6)$  烷基]打断的  $(C_1-C_6)$  烷基或  $(C_2-C_6)$  烯基或,  $n$  是 0 或 1,  $R_6$  是任选取代的环烷基或环烯基;

[0112] 在苯环中被式  $-OCH_2COR_8$  的基团取代的苄基,其中  $R_8$  是羟基、氨基、 $(C_1-C_6)$  烷氧基、苯基  $(C_1-C_6)$  烷氧基、 $(C_1-C_6)$  烷基氨基、二  $((C_1-C_6)$  烷基)氨基、苯基  $(C_1-C_6)$  烷基氨基、氨

基酸或酰基卤的残基、酯或其酰胺衍生物,所述残基通过酰胺键连接,所述氨基酸选自甘氨酸、 $\alpha$  或  $\beta$  丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、谷氨酸或天冬氨酸;

[0113] 在杂环中未被取代或被以下基团单-或二-取代的杂环 ( $C_1-C_6$ ) 烷基:卤素、硝基、羧基、( $C_1-C_6$ ) 烷氧基、氰基、( $C_1-C_6$ ) 烷酰基、三氟甲基 ( $C_1-C_6$ ) 烷基、羟基、甲酰、氨基、( $C_1-C_6$ ) 烷基氨基、二- ( $C_1-C_6$ ) 烷基氨基、巯基、( $C_1-C_6$ ) 烷硫基、羟基 ( $C_1-C_6$ ) 烷基、巯基 ( $C_1-C_6$ ) 烷基或 ( $C_1-C_6$ ) 烷基苯基甲基;和

[0114] 基团  $-CR_aR_bR_c$ , 其中:

[0115]  $R_a$ 、 $R_b$  和  $R_c$  各自独立为氢、( $C_1-C_6$ ) 烷基、( $C_2-C_6$ ) 烯基、( $C_2-C_6$ ) 炔基、苯基 ( $C_1-C_6$ ) 烷基、( $C_3-C_8$ ) 环烷基;或

[0116]  $R_c$  是氢,  $R_a$  和  $R_b$  独立为苯基或杂芳基,如吡啶基;或

[0117]  $R_c$  是氢、( $C_1-C_6$ ) 烷基、( $C_2-C_6$ ) 烯基、( $C_2-C_6$ ) 炔基、苯基 ( $C_1-C_6$ ) 烷基或 ( $C_3-C_8$ ) 环烷基,  $R_a$  和  $R_b$  与它们所结合的碳原子一起形成 3-8 元环烷基或 5-6 元杂环;或

[0118]  $R_a$ 、 $R_b$  和  $R_c$  与它们所结合的碳原子一起形成三环(例如金刚烷基);或  $R_a$  和  $R_b$  各自独立为 ( $C_1-C_6$ ) 烷基、( $C_2-C_6$ ) 烯基、( $C_2-C_6$ ) 炔基、苯基 ( $C_1-C_6$ ) 烷基、或是除氢之外的如下文对  $R_c$  定义的基团,或者  $R_a$  和  $R_b$  与它们所结合的碳原子一起形成环烷基或杂环,且  $R_c$  是氢、-OH、-SH、卤素、-CN、-CO<sub>2</sub>H、( $C_1-C_4$ ) 全氟烷基、-CH<sub>2</sub>OH、-CO<sub>2</sub>( $C_1-C_6$ ) 烷基、-O( $C_1-C_6$ ) 烷基、-O( $C_2-C_6$ ) 烯基、-S( $C_1-C_6$ ) 烷基、-SO( $C_1-C_6$ ) 烷基、-SO<sub>2</sub>( $C_1-C_6$ ) 烷基、-S( $C_2-C_6$ ) 烯基、-SO( $C_2-C_6$ ) 烯基、-SO<sub>2</sub>( $C_2-C_6$ ) 烯基或基团 -Q-W, 其中, Q 代表键或 -O-、-S-、-SO- 或 -SO<sub>2</sub>-, W 代表苯基、苯基烷基、( $C_3-C_8$ ) 环烷基、( $C_3-C_8$ ) 环烷基烷基、( $C_4-C_8$ ) 环烯基、( $C_4-C_8$ ) 环烯基烷基、杂芳基或杂芳基烷基,基团 W 可任选被一个或多个独立选自下组的取代基取代:羟基、卤素、-CN、-CO<sub>2</sub>H、-CO<sub>2</sub>( $C_1-C_6$ ) 烷基、-CONH<sub>2</sub>、-CONH( $C_1-C_6$ ) 烷基、-CONH( $C_1-C_6$ ) 烷基)<sub>2</sub>、-CHO、-CH<sub>2</sub>OH、( $C_1-C_4$ ) 全氟烷基、-O( $C_1-C_6$ ) 烷基、-S( $C_1-C_6$ ) 烷基、-SO( $C_1-C_6$ ) 烷基、-SO<sub>2</sub>( $C_1-C_6$ ) 烷基、-NO<sub>2</sub>、-NH<sub>2</sub>、-NH( $C_1-C_6$ ) 烷基、-N(( $C_1-C_6$ ) 烷基)<sub>2</sub>、-NHCO( $C_1-C_6$ ) 烷基、( $C_1-C_6$ ) 烷基、( $C_2-C_6$ ) 烯基、( $C_2-C_6$ ) 炔基、( $C_3-C_8$ ) 环烷基、( $C_4-C_8$ ) 环烯基、苯基或苄基。

[0119] 具体的  $R_2$  基团的例子包括氢(甘氨酸“侧链”)、苄基、苯基、环己基甲基、环己基、吡啶-3-基甲基、叔丁氧基甲基、异丁基、仲丁基、叔丁基、1-苄硫基-1-甲基乙基、1-甲硫基-1-甲基乙基、1-巯基-1-甲基乙基和苯基乙基。目前优选的  $R_2$  基团包括苯基、苄基和异丁基。

[0120] 对于要全身给予的本发明的化合物,优选被羧酸酯酶断裂的速率慢的酯,因为这种酯不易于被系统前代谢。因此它们完整到达其靶组织的能力增强了,且所述酯可在靶组织的细胞内被转化成酸产物。然而,对于局部给药而言,此时酯被直接施加于靶组织或通过例如吸入直接到达靶组织,通常需要这种酯被酯酶快速断裂,以使全身暴露和随后不希望的副作用最小。在本发明的化合物中,如果邻近  $\alpha$  氨基酸酯  $\alpha$  碳原子的碳原子被单取代,即  $R_2$  是  $CH_2R^z$  ( $R^z$  为单取代基),则与上述碳原子如果被二取代或三取代(例如  $R_2$  是苯基或环己基的情况)相比,这种酯趋于更快被断裂。

[0121] 基团  $-y-L^1-X^1[CH_2]_z-$

[0122] 该基团(或键)来自于选择用来偶联氨基酸酯基序  $R_1CH(R_2)NH-$  与抑制剂的头部基团 A 的特定化学方法。显然,用于该偶联的化学方法可以非常多,因此  $Y$ 、 $L^1$ 、 $X^1$  和  $z$  可以

有许多组合。然而,如上所述,当抑制剂结合到 HDAC 酶的活性位点时,头部基团 A 位于该酶含有金属离子的袋的顶部或之内,因此,将氨基酸酯基序与头部基团连接时,头部基团通常向离开袋的方向延伸,从而最小化或避免了对抑制剂模板 A-[键合基]-CONHOH 的结合模式的干扰。因此,构成氨基酸酯基序与头部基团 A 之间的连接化学的变量的精确组合将通常与作为一个整体的化合物的结合模式无关。另一方面,在一些情况下,连接化学选择与位于含有金属离子的袋顶部或邻近该袋的酶采取其它结合相互作用,从而增强了结合。

[0123] 还应当注意,当氨基酸酯基序与头部基团之间的键不是细胞内肽酶活性(这种活性可导致从分子中切割下氨基酸)的底物时,上述氨基酸酯基序的益处(易于进入细胞、在细胞内被羧酸酯酶水解、以及在细胞内累积活性羧酸水解产物)最大。当然,也可将该化合物与破裂的细胞内容物一起孵育并分析任何此类切割来方便地测量对细胞内肽酶的稳定性。

[0124] 当头脑中有了上述一般概念时,接下来就可以考虑构成基团  $-y-L^1-X^1-[CH_2]_z-$  的各种变量:

[0125] z 可以是 0 或 1,因此头部基团 A 上可任选连接有亚甲基;

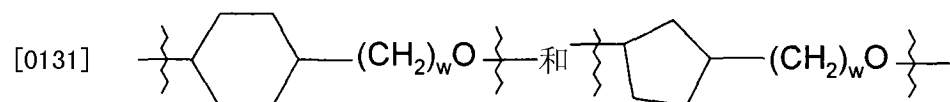
[0126] 当不需要巨噬细胞选择性时,特别优选的 Y 的例子包括  $-(C=O)-$ 、 $-(C=O)NH-$  和  $-(C=O)O-$ ;当需要巨噬细胞选择性时,Y 的任何其它选择,包括 Y 是键的情况,都是合适的。

[0127] 在基团  $L^1$  中,当  $A1k^1$  和  $A1k^2$  基团存在时,其例子包括  $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ 、 $-CH=CHCH_2-$ 、 $-CH_2CH=CH-$ 、 $CH_2CH=CHCH_2-$ 、 $-C\equiv C-$ 、 $-C\equiv CCH_2-$ 、 $CH_2C\equiv C-$  和  $CH_2C\equiv CCH_2-$ 。 $A1k^1$  和  $A1k^2$  的其它例子包括  $-CH_2W-$ 、 $-CH_2CH_2W-$ 、 $-CH_2CH_2WCH_2-$ 、 $-CH_2CH_2WCH(CH_3)-$ 、 $-CH_2WCH_2CH_2-$ 、 $-CH_2WCH_2CH_2WCH_2-$  和  $-WCH_2CH_2-$ ,其中 W 是  $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 、 $-N(CH_3)-$  或  $-CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)CH_2-$ 。 $A1k^1$  和  $A1k^2$  进一步的例子包括二价环丙基、环戊基和环己基。

[0128] 在  $L^1$  中,当 n 是 0 时,所述基团是烃链(任选被取代,且可能含有醚、硫醚或氨基连接)。目前优选  $L^1$  中没有任选的取代基。当 m 和 p 都是 0 时, $L^1$  是含有 5-13 个环原子的二价单环或双环碳环或杂环基团(任选被取代)。当 n 是 1 且 m 和 p 中至少有一个是 1 时, $L^1$  是二价基团,包括一条或多条烃链以及含有 5-13 个环原子的单环或双环碳环或杂环基团(任选被取代)。当 Q 存在时它可以是,例如,二价苯基、萘基、环丙基、环戊基或环己基,或是含有 5-13 个环成员的单环或二环杂环基团,如哌啶基、哌嗪基、吡咯基、吡啶基、噻吩基或吡咯基,但目前优选 1,4-亚苯基。

[0129] 具体地说,在本发明的一些实施方案中, $L^1$ 、m 和 p 可以是 0 而 n 为 1。在其它实施方案中,n 和 p 可以是 0 而 m 为 1。在其它实施方案中,m、n 和 p 可以都是 0。再在其它实施方案中,m 可以是 0,n 可以是 1,而 Q 为单环杂环基团,且 p 可以是 0 或 1。 $A1k^1$  和  $A1k^2$  当存在时可以选自  $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$  和  $-CH_2CH_2CH_2-$ ,而 Q 可以是 1,4-亚苯基。

[0130] 基团  $-Y-L^1-X^1-[CH_2]_z-$  的具体例子包括  $-C(=O)-$  和  $-C(=O)NH-$ 、以及  $-(CH_2)_v-$ 、 $-(CH_2)_vO-$ 、 $-C(=O)-(CH_2)_v-$ 、 $-C(=O)-(CH_2)_vO-$ 、 $-C(=O)-NH-(CH_2)_w-$ 、 $-C(=O)-NH-(CH_2)_wO-$

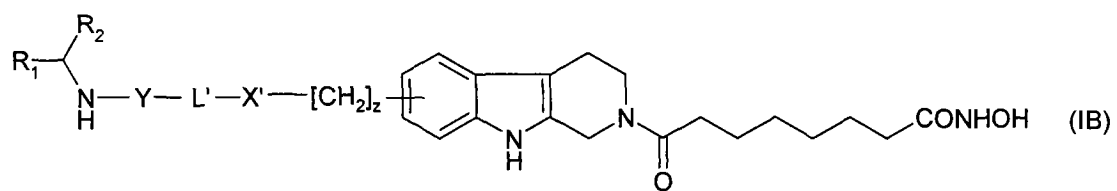
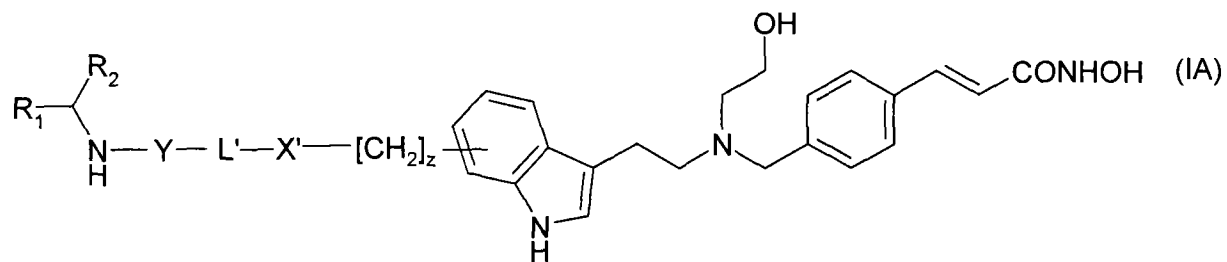


[0132] 其中, v 是 1、2、3 或 4, w 是 1、2 或 3, 如  $-CH_2-$ 、 $-CH_2O-$ 、 $-C(=O)-CH_2-$ 、 $-C(=$

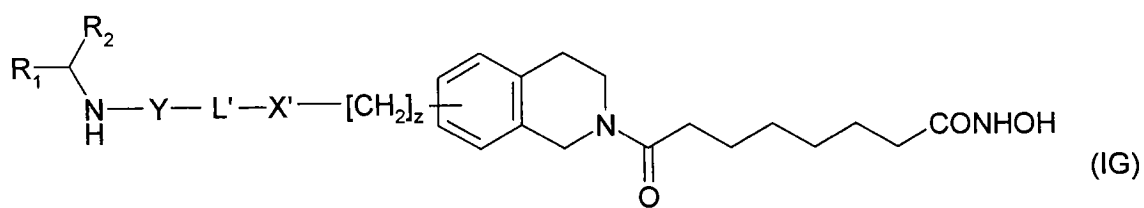
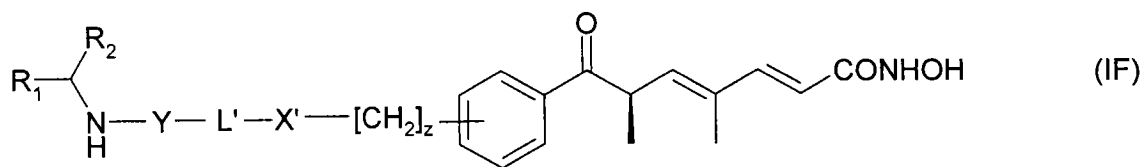
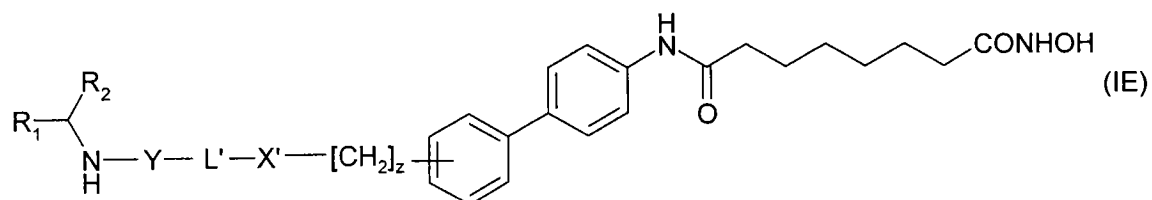
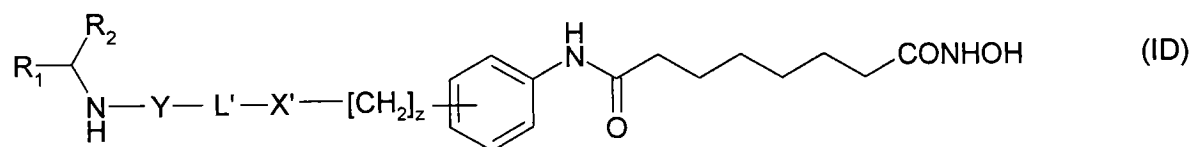
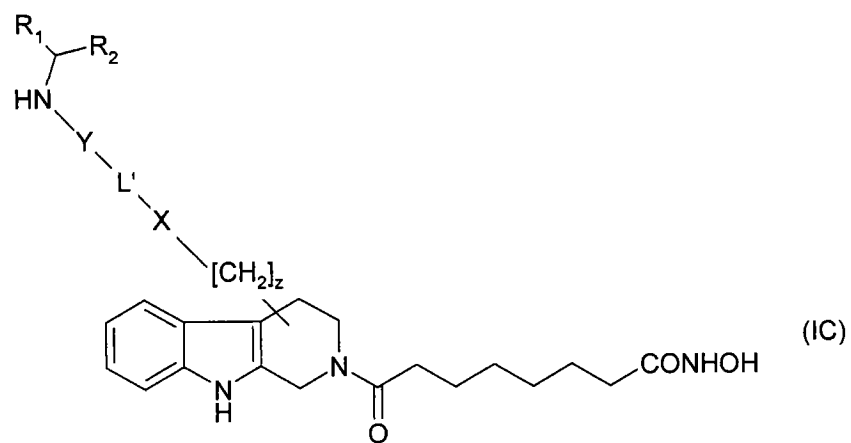
0)  $-\text{CH}_2\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-$  和  $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{O}-$ 。

[0133] 本发明化合物特定亚组的例子包括式 (IA)–(IM) 所示的那些：

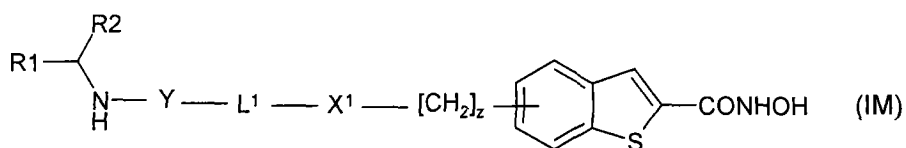
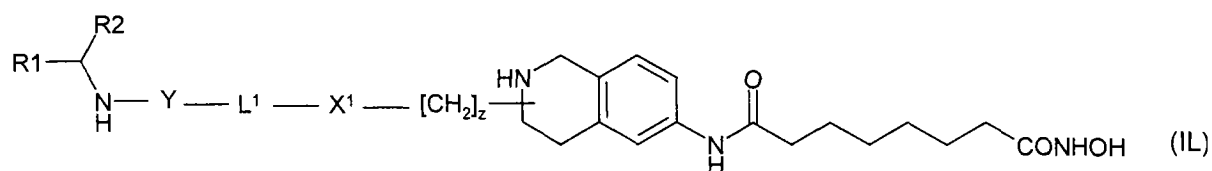
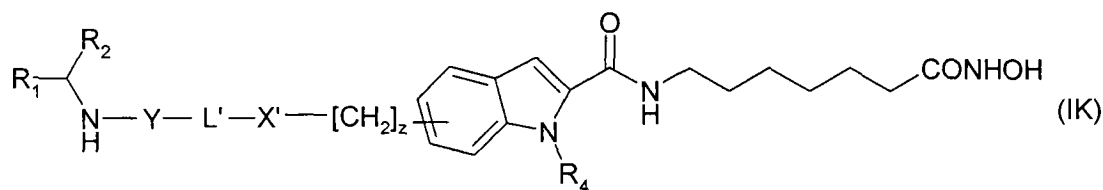
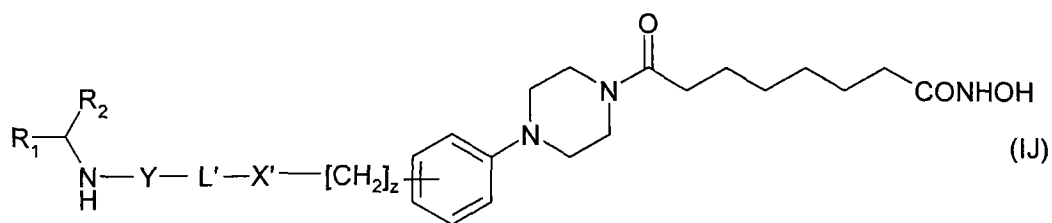
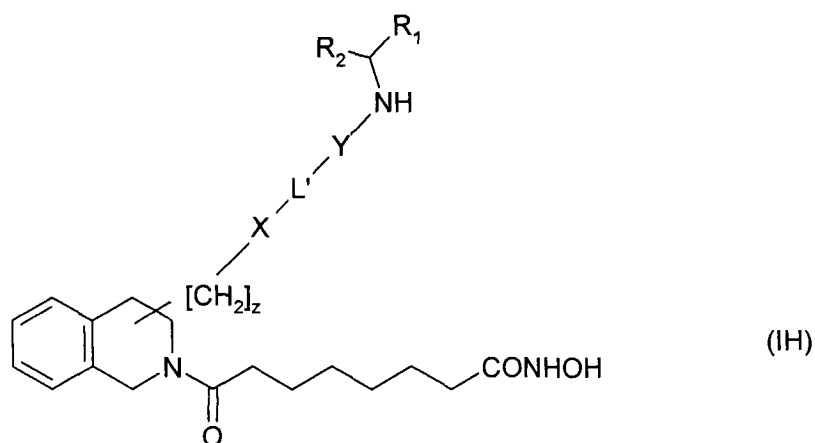
[0134]



[0135]



[0136]



[0137] 其中,  $z$ 、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $L^1$  以及  $X^1$  和  $Y$  如上述有关式 (I) 的定义, 包括其优选条件。

[0138] 具体的本发明化合物的例子包括以下这些:

[0139] (S)-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-苯基-乙酸环戊酯

[0140] (S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-4-苯基-丁酸环戊酯

[0141] (S)-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-苯基-乙酸环戊酯

[0142] (S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-4-甲基-戊酸环戊酯

[0143] (S)-{2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基]-乙基氨基}-苯基-乙酸环戊酯

[0144] (S)-2-{3-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯氧基]-丙基氨基}-3-苯基-丙

酸环戊酯

[0145] (S)-2-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-3-(4-羟基-苯基)-丙酸环戊酯

[0146] (S)-3-叔丁氧基-2-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-丙酸环戊酯

[0147] (S)-1-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基)-吡咯烷-2-羧酸环戊酯

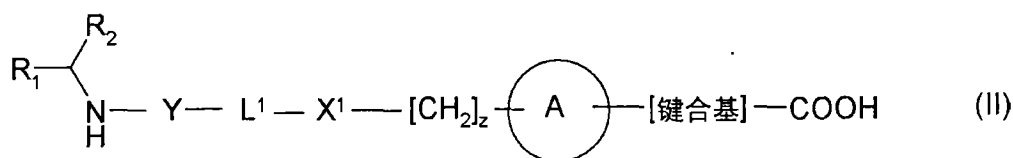
[0148] (S)-2-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-丙酸环戊酯

[0149] (4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-乙酸环戊酯

[0150] 例如,可通过下述方法和这里的实施例中描述的方法制备本发明的化合物。

[0151] 例如,本发明的化合物可从相应的相应的羧酸(II)制备,

[0152]



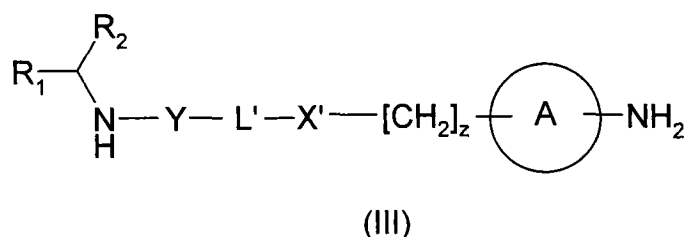
[0153] 方法是将其活化衍生物如酰基氯与羟胺或保护的羟胺反应。

[0154] 或者,N-或O-保护的或N,O-双保护的所需化合物(I)的前体可被去保护。在这种方法的一种有用的版本中,O-保护由树脂载体提供,可通过例如酸性水解从树脂载体上切下所需的异羟肟酸(I)。

[0155] 本发明的羧基保护的化合物(II)的衍生物,或O-连接的树脂-支持的化合物(II)的衍生物可用文献中所述的方法合成,按照所需化合物的具体结构进行选择。那种情况下,上述专利公开提供了关于合成与本发明的那些HDAC抑制剂结构类似的HDAC抑制剂的信息。

[0156] 在一种适用于化合物(I)的方法中,其中Z是亚磺酰氨基-NHSO<sub>2</sub>-,可使胺(III)

[0157]

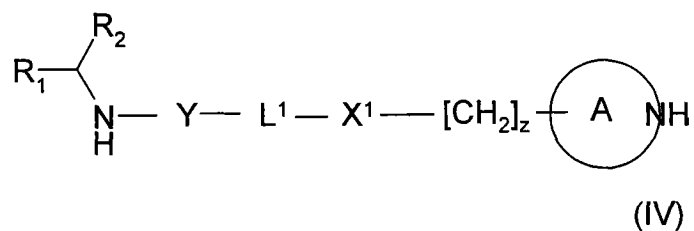


[0158] 与活化衍生物,例如磺酸HOSO<sub>2</sub>-L<sup>2</sup>-Z<sup>2</sup>的酰基氯反应,其中,Z<sup>2</sup>是保护的羧基,如可切割的酯或O-连接的树脂-支持的异羟肟酸基。

[0159] 在另一种适用于化合物(I)的方法中,Z是酰胺基-NHC(=O)-,可在存在碳二亚胺偶联剂时使胺(III)与羧酸HOC(=O)-L-Z<sup>2</sup>反应,Z<sup>2</sup>如上一段中的定义。

[0160] 对于环或环系统A通过环氮原子连接到-键合基-CONHOH部分且Z是-(C=O)-或-SO<sub>2</sub>-的化合物(I),可使合适的N-杂环(IV)

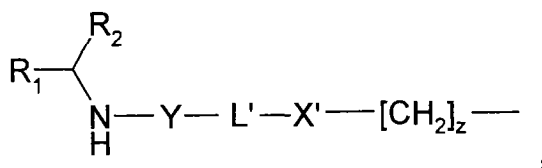
[0161]



[0162] 与相应的羧酸或磺酸（即  $\text{HOC-L}^2\text{-Z}^2$  或  $\text{HOSO}_2\text{-L}^2\text{-Z}^2$ ，其中， $\text{Z}^2$  如上文的定义）反应，所述羧酸或磺酸可作为其活化衍生物如氯化物或在存在碳二亚胺偶联剂时反应。

[0163] 为进一步阐述文献方法在合成上述式 (I) 范围内的化合物中的应用, 提供了以下反应方案 1-6。在这些方案中, 基团 R 代表本发明化合物中存在的基团

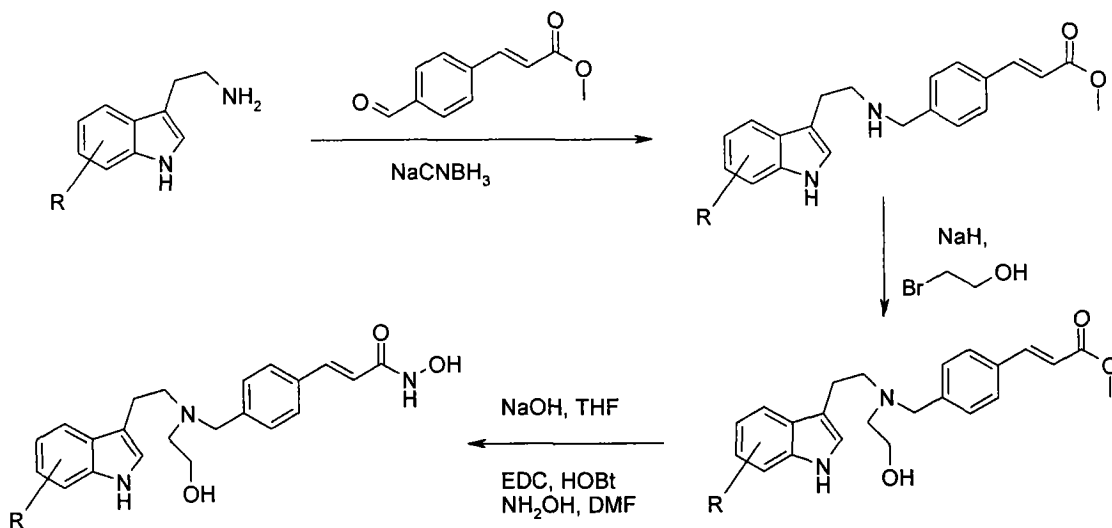
[0164]



[0165] 或代表可用文献方法构建该基团的官能团。

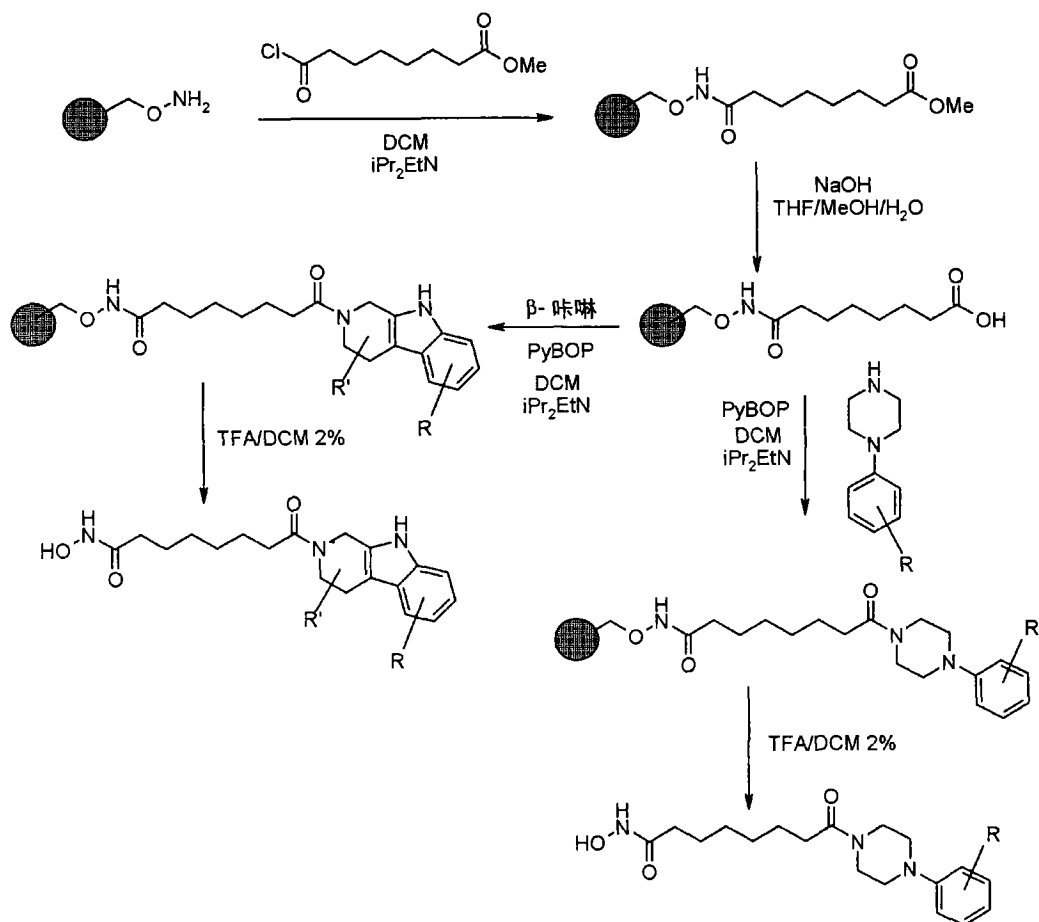
[0166] 还在这些方法中,符号代表固相树脂载体。

[0167]



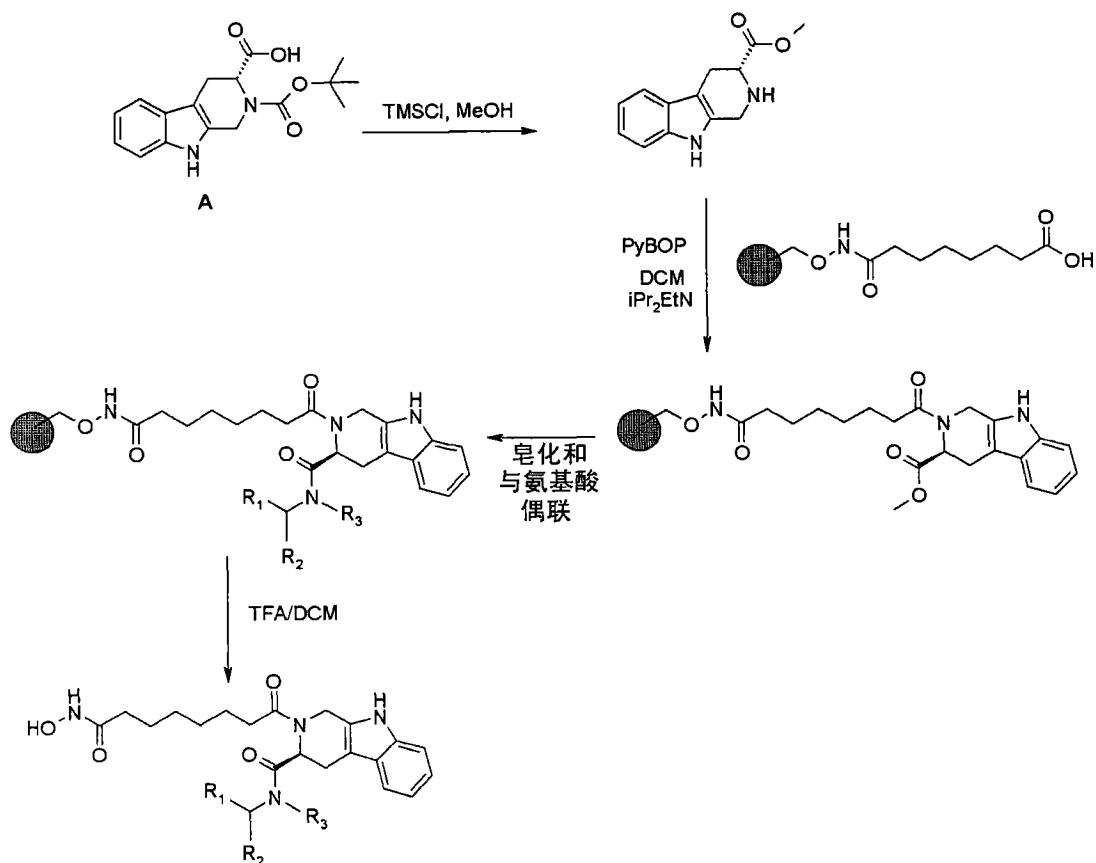
[0168] 方案 1

[0169]



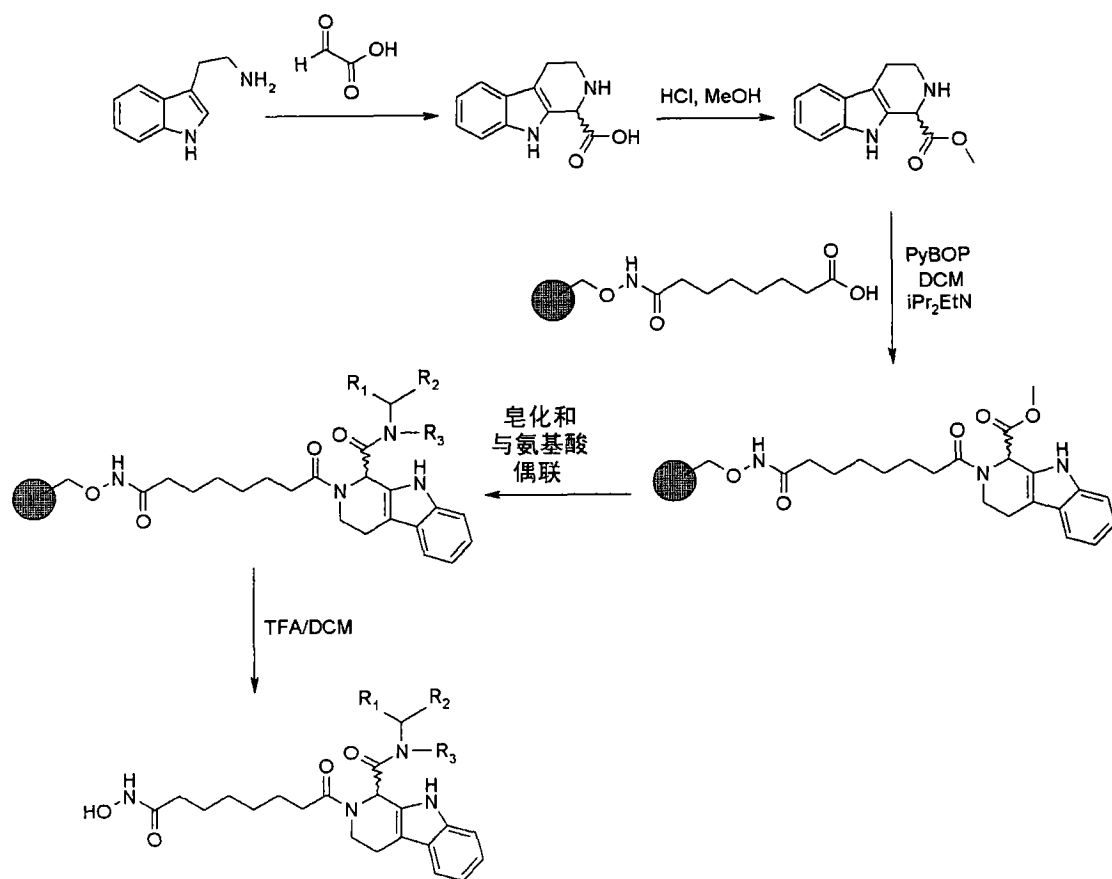
[0170] 方案 2

[0171]



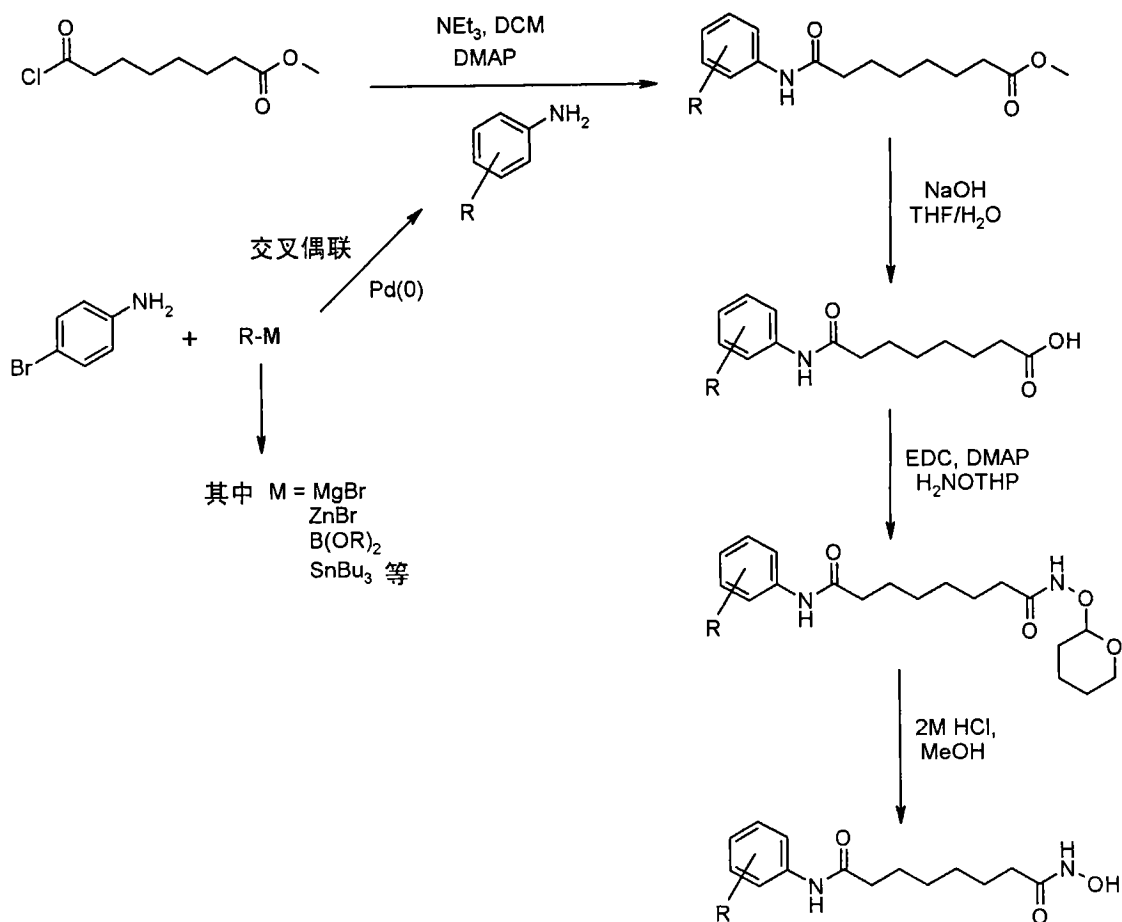
[0172] 方案 3

[0173]



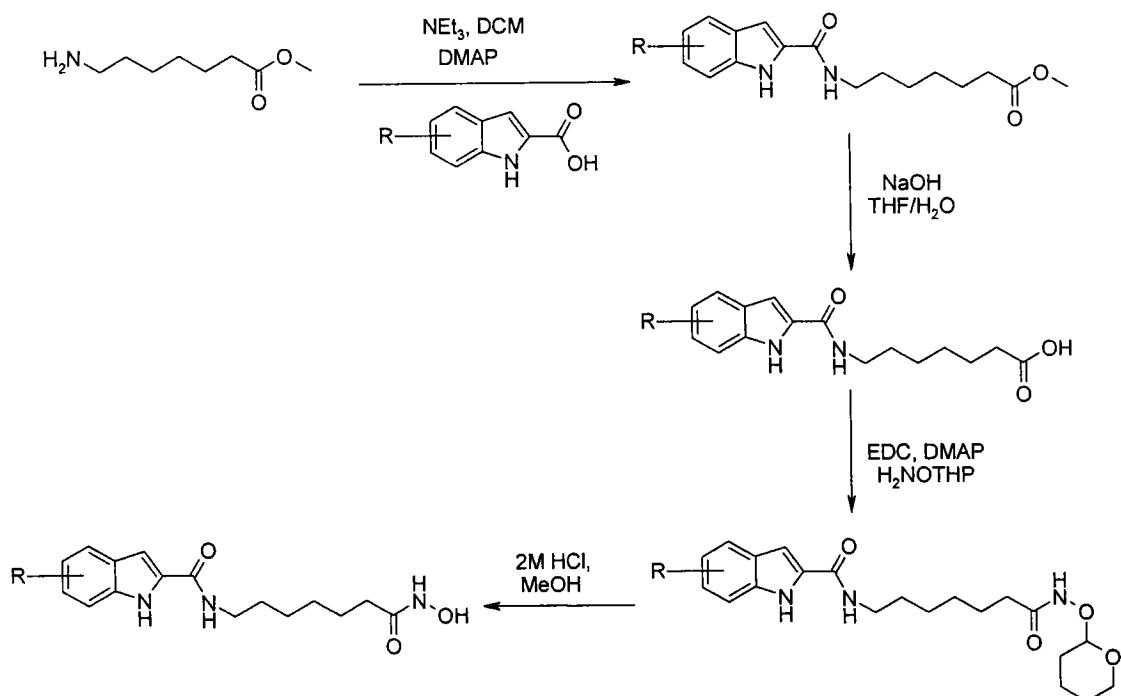
[0174] 方案 4

[0175]



[0176] 方案 5

[0177]



[0178] 方案 6

[0179] 如上所述,本发明涉及的化合物是 HDAC 抑制剂,因此可用于治疗人类和其它哺乳动物的细胞增殖疾病,如癌症。

[0180] 应理解,用于任何特定患者的具体剂量水平将取决于各种因素,其中包括采用的具体化合物的活性、年龄、体重、一般健康、性别、饮食、给药次数、给药途径、排泄率、药物组合以及接受治疗的特定疾病的严重性。最佳剂量水平和给药频率将由临床试验确定。

[0181] 本发明涉及的化合物可被制成通过任何与其药代动力学特性一致的途径给予。可口服给予的组合物的形式可以是片剂,胶囊,粉末,颗粒,锭剂,液体或凝胶制品如口服、局部或无菌肠胃外溶液或悬浮液。供口服给药的片剂或胶囊可采用单位剂型,并可含有常规赋形剂,如粘合剂,例如糖浆、阿拉伯胶、明胶、山梨糖醇、黄蓍胶或聚乙烯吡咯烷酮;填料,例如乳糖、蔗糖、玉米淀粉、磷酸钙、山梨糖醇或甘氨酸;压片润滑剂,例如硬脂酸镁、滑石、聚乙二醇或二氧化硅;崩解剂,例如马铃薯淀粉,或可接受的润湿剂如月桂基硫酸钠。可按照常规制药实践中熟知的方法将片剂包衣。口服液体制剂的形式可以是,例如,水性或油性悬浮液、溶液、乳剂、糖浆剂或酏剂,或者可呈现为在使用前用水或其它合适载体重建的干燥产品。这种液体制剂可含有常规的添加剂,如悬浮剂,例如山梨糖醇、糖浆、甲基纤维素、葡萄糖浆、明胶、氢化食用脂肪;乳化剂,例如卵磷脂、去水山梨糖醇单油酸酯或阿拉伯胶;非水性载体(可包括食用油),例如杏仁油、分馏椰子油、油性酯如甘油、丙二醇或乙醇;防腐剂,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸,需要的话还可含有常规的调味剂或着色剂。

[0182] 当局部施用于皮肤时,可将药物制成霜剂、洗剂或软膏剂。可用于药物的霜剂或软膏剂配方是本领域熟知的常规配方,例如标准药物教科书如《英国药典》(British Pharmacopoeia)中描述的配方。

[0183] 为通过吸入局部施用,可将药物制成通过气雾剂递送,例如通过压力驱动的喷射雾化器或超声雾化器,或者优选通过推进剂驱动的计量式气雾剂或者不采用推进剂给予微粉化粉末,例如吸入剂胶囊或其它“干粉”递送系统。这种吸入配方中可含有赋形剂,例如推进剂(例如,在计量式气雾剂中为 Frigen)、表面活性物质、乳化剂、稳定剂、防腐剂、调味剂和填料(例如,在干粉吸入器中为乳糖)。为了吸入,大量装置都是适用的,这些装置能产生最佳粒度的气溶胶并采用适合患者的吸入技术给予。除了采用适配器(间隔物(spacer)、扩展器)和梨形容器(例如 Nebulator<sup>®</sup>、Volumatic<sup>®</sup>)以及发射吹入喷雾的自动装置(Autohaler<sup>®</sup>),为给予经过计量的气溶胶,尤其是采用干粉吸入器时,许多技术方案是适用的(例如, Diskhaler<sup>®</sup>、Rotadisk<sup>®</sup>、Turbohaler<sup>®</sup>或者例如欧洲专利申请 EP 0505321 中描述的吸入器)。

[0184] 为局部施用于眼睛,可用合适的水性或非水性无菌载体将药物制成溶液或悬浮液。也可含有添加剂,例如,缓冲剂,如偏亚硫酸氢钠或依地酸二钠;防腐剂,包括杀菌剂和杀真菌剂如醋酸苯汞或硝酸苯汞、苯扎氯铵或氯己定;以及增稠剂,如羟丙甲纤维素。

[0185] 也可采用无菌介质肠胃外给予活性成分。根据所用载体和浓度,药物可悬浮于或溶于载体中。有利地,佐剂如局部麻醉剂、防腐剂和缓冲剂也可溶于载体。

[0186] 以下实施例例举了本发明的具体化合物的制备及其 HDAC 抑制特性:在这些实施例中:

[0187] 市售试剂和溶剂(HPLC 级)无需进一步纯化即可使用。

[0188] 微波照射用 CEM Discover 聚焦微波反应器进行。

[0189] 用无加热的 GeneVac Series I 或具有 30°C VacRamp 的 Genevac Series II 或 Buchi 旋转式蒸发仪除去溶剂。

[0190] 用获自 Silicycle 的粒度为 40–63  $\mu\text{m}$  (230–400 目) 的硅胶通过快速层析柱纯化化合物。用制备型 HPLC 纯化化合物是在 Gilson 系统上进行的, 采用反相 ThermoHypersil-Keystone Hyperprep HS C18 柱 (12  $\mu\text{m}$ , 100 $\times$ 21.2mm), 9.5 分钟 20–100% B 梯度 (A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA), 流速 = 30ml/min, 加样溶剂 2 : 1 DMSO : 乙腈 (1.6ml), 在 215nm UV 检测。

[0191] 在氘化溶剂中用 Bruker 400MHz AV 光谱仪记录  $^1\text{H}$  NMR 谱。化学位移 ( $\delta$ ) 用百万分之一份 (ppm) 表示。用 Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck) 板进行薄层层析 (TLC) 分析并用紫外光显色。

[0192] 分析型 HPLCMS 在 Agilent HP1100、Waters 600 或 Waters 1525 LC 系统上进行, 采用反相 Hypersil BDS C18 柱 (5  $\mu\text{m}$ , 2.1 $\times$ 50mm), 2.10 分钟 0–95% B 梯度 (A = 水 / 0.1% TFA, B = 乙腈 / 0.1% TFA), 流速 = 1.0ml/min。用 Gilson G1315A 二极管阵列检测器、G1214A 单波长 UV 检测器、Waters 2487 双波长 UV 检测器、Waters 2488 双波长 UV 检测器或 Waters 2996 二极管阵列 UV 检测器记录 215nm 的 UV 光谱。用具有 Z-喷射界面的 Micromass LCT 或者具有 Z-喷射或 MUX 界面的 Micromass LCT 以每秒扫描 2 次或每 1.2 秒扫描 1 次的采样速率获得 m/z 150–850 之间的质谱。数据用 OpenLynx 和 OpenLynx Browser 软件积分和报告。

[0193] 采用以下缩写:

[0194] MeOH = 甲醇

[0195] EtOH = 乙醇

[0196] EtOAc = 乙酸乙酯

[0197] Boc = 叔丁氧基羰基

[0198] Cbz = 苄氧羰基 (carbobenzyloxy)

[0199] DCM = 二氯甲烷

[0200] DCE = 二氯乙烷

[0201] DMF = 二甲基甲酰胺

[0202] DMSO = 二甲亚砜

[0203] TFA = 三氟乙酸

[0204] THF = 四氢呋喃

[0205] Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> = 碳酸钠

[0206] HCl = 盐酸

[0207] DIPEA = 二异丙基乙胺

[0208] NaH = 氢化钠

[0209] NaOH = 氢氧化钠

[0210] NaHCO<sub>3</sub> = 碳酸氢钠

[0211] Pd/C = 碳载钯

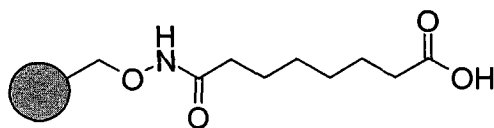
[0212] TBME = 叔丁基甲基醚

[0213] DMAP = 4-二甲基氨基吡啶

- [0214]  $N_2$  = 氮气
- [0215] PyBop = 苯并三唑-1-基-氧-三-吡咯烷-磷鎓六氟磷酸盐
- [0216]  $Na_2SO_4$  = 硫酸钠
- [0217]  $Et_3N$  = 三乙胺
- [0218]  $NH_3$  = 氨
- [0219] TMSCl = 三甲基氯硅烷
- [0220]  $NH_4Cl$  = 氯化铵
- [0221]  $LiAlH_4$  = 氢化铝锂
- [0222] pyBrOP = 溴代-三-吡咯烷磷鎓六氟磷酸盐
- [0223]  $MgSO_4$  = 硫酸镁
- [0224]  $MnO_2$  = 二氧化锰
- [0225]  $nBuLi$  = 正丁基锂
- [0226]  $CO_2$  = 二氧化碳
- [0227] EDCI = N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐
- [0228]  $Et_2O$  = 二乙醚
- [0229]  $LiOH$  = 氢氧化锂
- [0230] HOBt = 1-羟基苯并三唑
- [0231] DIAD = 偶氮二羧酸二异丙酯
- [0232] HATU = O-(7-氮杂苯并三唑-1-基-N,N',N'-四甲基脲鎓 (uronium) 六氟磷酸盐
- [0233] ELS = 蒸发光散射
- [0234] TLC = 薄层层析
- [0235] ml = 毫升
- [0236] g = 克
- [0237] mg = 毫克
- [0238] mol = 摩尔
- [0239] mmol = 毫摩尔
- [0240] eq = 摩尔当量
- [0241] LCMS = 高效液相色谱 / 质谱
- [0242] NMR = 核磁共振
- [0243] r. t. = 室温
- [0244] 树脂化学的标准洗涤过程
- [0245] 树脂按以下顺序洗涤 :DMF, MeOH, DMF, MeOH, DCM, MeOH, DCM, MeOH  $\times$  2, TBME  $\times$  2。
- [0246] 树脂的测试切除
- [0247] 室温下将少量功能化的羟胺 2-氯三苯甲基树脂 (约 0.3ml 反应混合物, 约 10mg 树脂) 用 2% TFA/DCM (0.5ml) 处理 10 分钟。过滤树脂, 滤液通过氮气气流吹扫浓缩。获得残余物的 LCMS。
- [0248] (注意 :对于功能化的羟胺 Wang 树脂的测试切除采用 50% TFA/DCM 进行)。

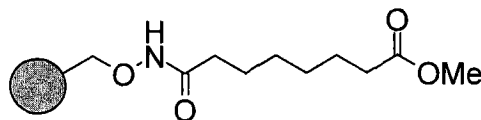
[0249] 制备辛酸衍生的羟胺 2- 氯三苯甲基树脂

[0250]



[0251] 阶段 1- 固定到 2- 氯三苯甲基 -O-NH<sub>2</sub> 树脂

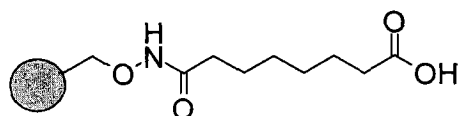
[0252]



[0253] 在装有 2- 氯三苯甲基 -O-NH<sub>2</sub> 树脂 (6g, 以 1.14mmol/g 加载, 6.84mmol) 和 DCM (60ml) 的圆底烧瓶中加入二异丙基乙胺 (5.30, 41.0mmol, 6eq)。边定轨振荡 (orbital shaking) 边在反应混合物中缓慢加入 8- 氯 -8- 氧代辛酸甲酯 (4.2g, 20.5mmol, 3eq), 再将反应混合物振荡 48 小时。将树脂过滤, 并用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。LCMS 纯度通过 ELS 检测测定, 100%,  $m/z$  204  $[M^+ + H]^+$ 。

[0254] 阶段 2- 皂化

[0255]



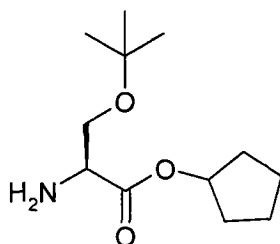
[0256] 在装有阶段 1 的树脂 (4g, 以 1.14mmol/g 加载, 4.56mmol) 的圆底烧瓶中加入 THF (16ml) 和 MeOH (16ml)。在反应物中加入 NaOH (0.91g, 22.8mmol, 5eq) 的水 (16ml) 溶液。将反应混合物振荡 48 小时。将树脂过滤并用水  $\times 2$  和 MeOH  $\times 2$  洗涤, 然后用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。LCMS 纯度通过 ELS 检测测定, 100%  $m/z$  190  $[M^+ + H]^+$ 。

[0257] 制备环戊酯

[0258] 该酯按照以下方法之一制备。

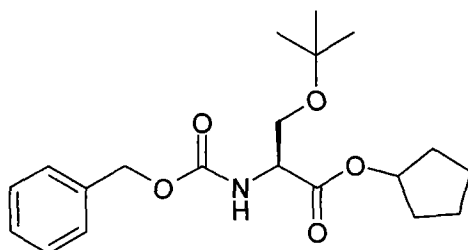
[0259] 方法 A- 合成 (S)-2- 苄氧基羰基氨基 -3- 叔丁氧基 - 丙酸环戊酯

[0260]



[0261] 阶段 1 : (S)-2- 苄氧基羰基氨基 -3- 叔丁氧基 - 丙酸环戊酯

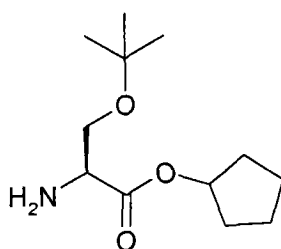
[0262]



[0263] 将 (S)-2- 苄氧基羰基氨基 -3- 叔丁氧基 - 丙酸 (4g, 0.014mol) 溶于 DMF (40ml)。加入环戊醇 (2.54ml, 0.027mol) 和二甲基氨基吡啶 (0.165g, 0.014mol)。溶液用冰浴冷却至 0℃ 并在其中加入 N-(3- 二甲基氨基丙基) -N'- 乙基碳二亚胺盐酸盐 (2.73g, 0.014mol, 1.05eq.)。混合物在 0℃ 搅拌 10 分钟, 然后使其回复室温并再搅拌 18 小时。在反应混合物中加入水 (20-30ml), 然后加入 EtOAc (40ml)。分离各层, 含水层用 EtOAc (15ml) 重新萃取。合并的有机层用水 (4×20ml) 洗涤, 干燥 (MgSO<sub>4</sub>), 并在真空下除去溶剂以得到残余物。通过柱层析 (1 : 1 EtOAc/ 庚烷) 纯化得到无色油状产物 (3.82g, 78% 产率)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ : 1.15 (9H, s, CH<sub>3</sub>×3), 1.50-1.90 (8H, m, CH<sub>2</sub>×4), 3.57 (1H, dd, J = 7.4, 1.2Hz, CH), 3.85 (1H, dd, J = 7.4, 1.2Hz, CH), 4.45 (1H, m, CH), 5.15 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 5.25 (1H, m, CH), 5.65 (1H, d, CH, J = 7.6Hz), 7.30-7.50 (5H, m, ArH×5)。

[0264] 阶段 2 : (S)-2- 氨基 -3- 叔丁氧基丙酸环戊酯

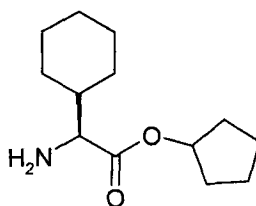
[0265]



[0266] 将 (S)-2- 苄氧基羰基氨基 -3- 叔丁氧基 - 丙酸环戊酯 (3.82g, 0.011mol) 溶于 EtOH (50ml)。在溶液中小心加入 20 重量% 氢氧化钡 (湿)。将系统排空并在氢气氛下放置 4 小时。将系统排空并通过硅藻土滤去残余的钡。硅藻土用 EtOH (3×5ml) 充分洗涤。在真空下除去滤液的溶剂以得到无色油状产物 (2.41g, 100% 产率)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ : 1.15 (9H, s, CH<sub>3</sub>×3), 1.50-1.90 (10H, m, CH<sub>2</sub>×4, NH<sub>2</sub>), 3.50-3.70 (3H, m, CH<sub>2</sub>, CH), 5.22 (1H, s, CH)。

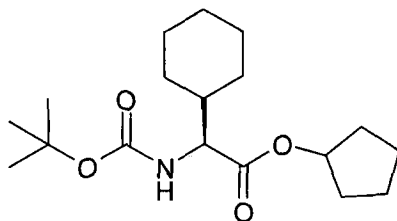
[0267] 方法 B- 合成 (S)- 氨基 - 环己基 - 乙酸环戊酯

[0268]



[0269] 阶段 1 : (S)- 叔丁氧基羰基氨基 - 环己基 - 乙酸环戊酯

[0270]

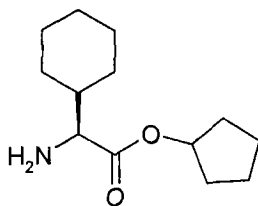


[0271] 该物质用与 (S)-2- 苄氧基羰基氨基 -3- 叔丁氧基 - 丙酸环戊酯 (方法 A, 阶段 1) 相同的方法但从 (S)- 叔丁氧基羰基氨基 - 环己基乙酸制备。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ : 1.00-1.40 (10H, m, CH×10), 1.45 (9H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.60-2.00 (8H, m, 4×CH<sub>2</sub>), 4.15 (1H, m,

CH), 5.05 (1H, d, NH,  $J = 7.6\text{Hz}$ ), 5.25 (1H, m, CH)。

[0272] 阶段 2 : (S)-氨基-环己基-乙酸环戊酯

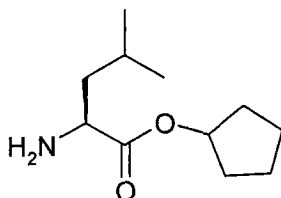
[0273]



[0274] 0℃下将 (S)-叔丁氧基羰基氨基-环己基-乙酸环戊酯 (1.17g, 3.60mmol) 溶于 TFA/DCM 混合物 (1 : 1, 10ml)。将溶液搅拌 90 分钟, 在真空下除去溶剂。残余物与 DCM/庚烷混合物共沸 (2x) 以得到胶状物。将胶状物重溶于 DCM (10ml) 并用饱和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (3×10ml) 洗涤, 干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ) 并过滤。在真空下除去滤液的溶剂以得到油状产物 (0.780g, 78% 产率)。 $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  : 1.00–1.40 (10H, m,  $\text{CH} \times 10$ ), 1.50–2.00 (8H, m,  $\text{CH} \times 8$ ), 3.25 (1H, d, CH,  $J = 7.2\text{Hz}$ ), 5.20 (1H, m, CH)。

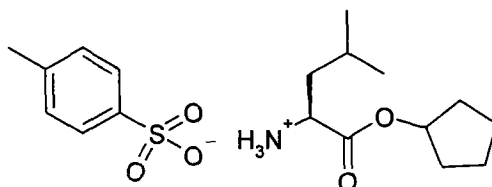
[0275] 方法 C-合成 (S)-2-氨基-4-甲基-戊酸环戊酯

[0276]



[0277] 阶段 1 : (S)-2-氨基-4-甲基-戊酸环戊酯甲苯-4-磺酸

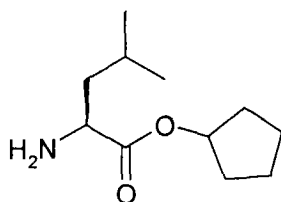
[0278]



[0279] 在 (S)-亮氨酸 (15g, 0.11mol) 的环己烷 (400ml) 悬浮液中加入环戊醇 (103.78ml, 1.14mmol) 和对甲苯磺酸 (23.93g, 0.13mol)。将悬浮液加热回流以有效溶剂化。将溶液回流 16 小时后将其冷却以得到白色悬浮液。将庚烷 (500ml) 加入混合物并过滤悬浮液以得到白色固体状产物 (35g, 85% 产率)。 $^1\text{H}$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.01 (6H, t,  $\text{CH}_3 \times 2$ ,  $J = 5.8\text{Hz}$ ), 1.54–2.03 (11H, m,  $11 \times \text{CH}$ ), 2.39 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 3.96 (1H, t, CH,  $J = 6.5\text{Hz}$ ), 5.26–5.36 (1H, m, CH), 7.25 (2H, d,  $\text{ArH} \times 2$ ,  $J = 7.9\text{Hz}$ ), 7.72 (2H, d,  $\text{ArH} \times 2$ ,  $J = 8.3\text{Hz}$ )。

[0280] 阶段 2 : 合成 (S)-2-氨基-4-甲基-戊酸环戊酯

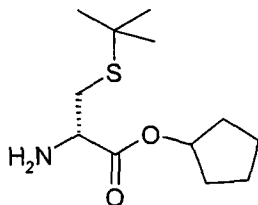
[0281]



[0282] (S)-2-氨基-4-甲基-戊酸环戊酯甲苯-4-磺酸 (2.57g, 0.013mol) 的 DCM(5ml) 溶液用饱和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 ( $2 \times 3\text{ml}$ ) 洗涤。合并的含水层用 DCM( $3 \times 4\text{ml}$ ) 回萃。将合并的有机层干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ) 并在真空下除去溶剂以得到无色油状物 (1.10g, 80% 产率)。 $^1\text{H}$  NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 0.90(6H, t,  $\text{CH}_3 \times 2$ ,  $J = 6.4\text{Hz}$ ), 1.23-1.94(11H, m,  $5 \times \text{CH}_2$ , CH), 3.38(1H, dd, CH,  $J = 8.4, 5.9\text{Hz}$ ), 5.11-5.22(1H, m, CH)。

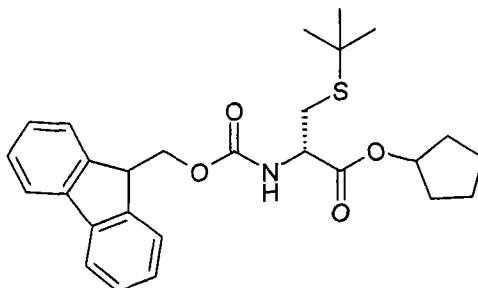
[0283] 方法 D- 合成 (S)-2-氨基-3-叔丁硫基 (butylsulfanyl)- 丙酸环戊酯

[0284]



[0285] 阶段 1 : (S)-3-叔丁硫基-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-丙酸环戊酯

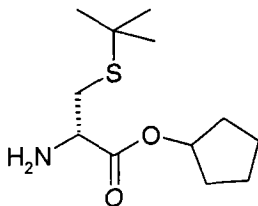
[0286]



[0287] 该物质用与 (S)-2-苄氧基羰基氨基-3-叔丁氧基-丙酸环戊酯 (方法 A, 阶段 1) 相同的方法但从 (S)-3-叔丁硫基-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-丙酸制备。 $^1\text{H}$  NMR(300MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 1.30(9H, s,  $(\text{CH}_3)_3$ ), 1.55-1.95(8H, m,  $\text{CH}_2 \times 4$ ), 3.05(2H, d,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 4.8\text{Hz}$ ), 4.20-4.30(1H, m, CH), 4.40(2H, d,  $\text{CH}_2$ ,  $J = 7.5\text{Hz}$ ), 4.65(1H, m, CH), 5.25(1H, m, CH), 5.70(1H, d, NH,  $J = 7.8\text{Hz}$ ), 7.30-7.50(4H, m,  $\text{ArH} \times 4$ ), 7.65(2H, d,  $J = 7.5\text{Hz}$ ,  $\text{ArH} \times 2$ ), 7.80(2H, d,  $J = 7.5\text{Hz}$ ,  $\text{ArH} \times 2$ )。

[0288] 阶段 2 : (S)-2-氨基-3-叔丁硫基-丙酸环戊酯

[0289]

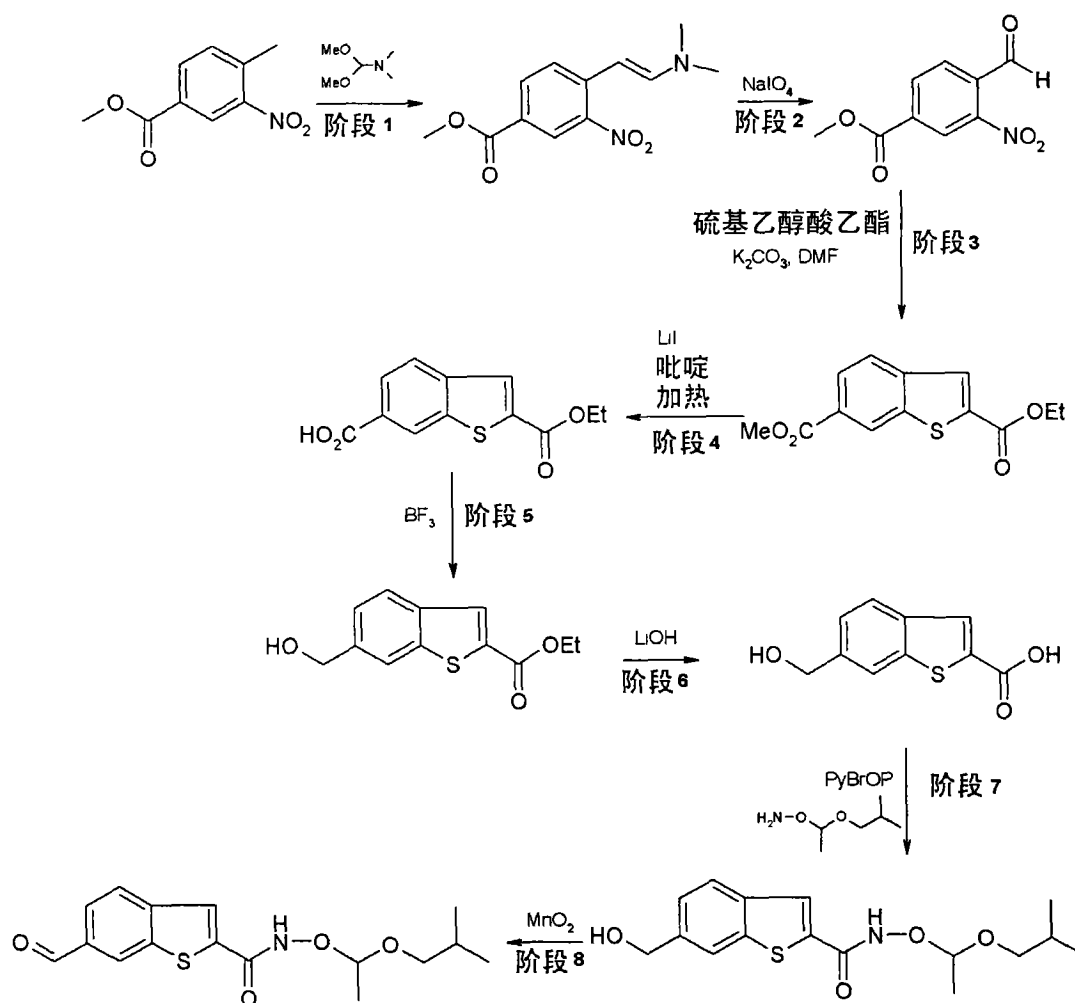


[0290]  $0^\circ\text{C}$  下将 (S)-3-叔丁硫基-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-丙酸环戊酯 (1.63g, 3.50mmol) 溶于  $\text{CH}_3\text{CN}$ (25ml)。在此溶液中加入哌啶 (21ml)。搅拌 30 分钟后在真空下除去溶剂以得到残余物。通过柱层析 ( $\text{EtOAc}$  洗脱液) 纯化得到无色油状产物 (628mg, 73% 产率)。 $^1\text{H}$  NMR(300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 1.30(9H, s,  $(\text{CH}_3)_3$ ), 1.55-1.95(8H, m,  $\text{CH}_2 \times 4$ ), 2.75(1H, dd, CH,  $J = 7.2, 12.3\text{Hz}$ ), 2.95(1H, dd, CH,  $J = 4.8, 12.3\text{Hz}$ ), 5.25(1H, m, CH)。

[0291] 按照上述方法 A 将以下 N-Cbz 保护的氨基酸转化成环戊酯

[0292] (S)-2-苄氧基羰基氨基-琥珀酸 4-叔丁酯

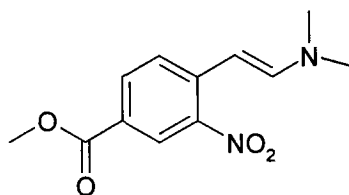
- [0293] (S)-2-苄氧基羰基氨基-琥珀酸(succinamic acid)
- [0294] (S)-2-苄氧基羰基氨基-4-氨甲酰基-丁酸
- [0295] (S)-2-苄氧基羰基氨基-3-(4-叔丁氧基-苯基)-丙酸
- [0296] (S)-2-苄氧基羰基氨基-3-羟基-丁酸
- [0297] (S)-2-苄氧基羰基氨基-3,3-二甲基-丁酸
- [0298] (S)-2-苄氧基羰基氨基-3-(1H-咪唑-2-基)-丙酸
- [0299] (S)-2-苄氧基羰基氨基-6-叔丁氧基羰基氨基-己酸
- [0300] 按照上述方法 B 将以下 N-Boc 保护的氨基酸转化成环戊酯
- [0301] 叔丁氧基羰基氨基-乙酸
- [0302] (S)-2-叔丁氧基羰基氨基-3-甲基-戊酸
- [0303] (S)-吡咯烷-1,2-二羧酸 1-叔丁酯
- [0304] (S)-2-叔丁氧基羰基氨基-3-甲基-丁酸
- [0305] (S)-2-叔丁氧基羰基氨基-4-甲硫基(methylsulfanyl)-丁酸
- [0306] 按照上述方法 C 将以下游离氨基酸转化成环戊酯
- [0307] (S)-氨基-苯基-乙酸
- [0308] (S)-2-氨基-3-苯基-丙酸
- [0309] (S)-2-氨基-丙酸
- [0310] (S)-2-氨基-4-甲基-戊酸
- [0311] 制备 6-甲酰-苯并[b]噻吩-2-羧酸(1-异丁氧基-乙氧基)酰胺
- [0312] 合成显示在下面的方案 7 中。
- [0313] 与该途径有关的其它文献参考可在 Tetrahedron Letters, 35, 2, 219-222 和 W005/034880 中找到。
- [0314]



[0315] 方案 7

[0316] 阶段 1 :4-(2-二甲基氨基-乙烯基)-3-硝基苯甲酸甲酯

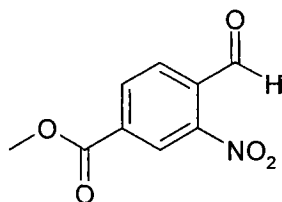
[0317]



[0318] 将 4-甲基-3-硝基苯甲酸甲酯 (5g, 25.6mmol) 溶于 DMF (25mL, 5 体积) 并在其中加入 N,N-二甲基甲酰胺二甲基缩醛 (4.4mL, 33.3mmol)。混合物在 140℃ 搅拌 3 小时。将所得深红色溶液冷却并真空浓缩。残余物与甲醇一起研磨并过滤。滤液用甲醇洗涤并在烧结漏斗 (sinter) 上干燥以得到 4-(2-二甲基氨基-乙烯基)-3-硝基苯甲酸甲酯 (5.2g, 80%)。 $^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO),  $\delta$ : 2.98 (6H, s,  $2 \times \text{CH}_3$ ), 3.87 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ), 5.58 (1H, m, CH), 7.72-7.83 (3H, m, ArH), 8.32 (1H, m, CH)。

[0319] 阶段 2 :4-甲酰-3-硝基苯甲酸甲酯

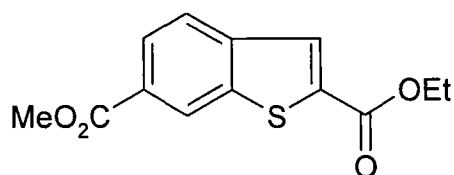
[0320]



[0321] 在烯胺 (5g, 20.0mmol) 的 THF (50mL, 10 体积) 和水 (50mL, 10 体积) 溶液中加入高碘酸钠 (12.8g, 60.0mmol) 并将混合物搅拌 2 小时。将混合物过滤, 所得固体用 EtOAc (500mL) 洗涤。将有机层分离, 用  $\text{NaHCO}_3$  (3×100mL) 洗涤并干燥 ( $\text{MgSO}_4$ )。真空浓缩得到 4-甲酰-3-硝基苯甲酸甲酯 (3.9g, 93%)。LCMS  $m/z$  210  $[\text{M}^+\text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$ NMR (300MHz, DMSO),  $\delta$ : 3.96 (3H, s, OMe), 8.01 (1H, d, ArH), 8.39 (1H, d, ArH), 8.54 (1H, s, ArH), 10.31 (1H, s, CHO)。

[0322] 阶段 3: 苯并 [b] 噻吩 -2,6- 二羧酸 2- 乙酯 6- 甲酯

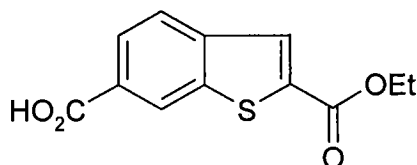
[0323]



[0324] 将 4-甲酰-3-硝基苯甲酸甲酯 (3.9g, 18.7mmol)、巯基-乙酸乙酯 (2.2mL, 20.4mmol) 和  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (3.3g, 24mmol) 的 DMF (40mL, 10 体积) 的混合物在 50℃ 加热过夜。冷却至室温后将混合物倒入冰冷的水 (250mL) 中并将所得混合物搅拌 40 分钟。形成的固体通过过滤分离, 用水 (4×50mL) 洗涤并真空干燥以得到标题化合物 (3.9g, 80%)。LCMS  $m/z$  265  $[\text{M}^+\text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.40 (3H, tJ = 6.8Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3.95 (3H, s, OMe), 4.40 (2H, qJ = 7.2Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7.88 (1H, dJ = 8.0Hz, ArH), 7.97–8.09 (2H, m, ArH), 8.56 (1H, s, ArH)。

[0325] 阶段 4: 苯并 [b] 噻吩 -2,6- 二羧酸 2- 乙酯

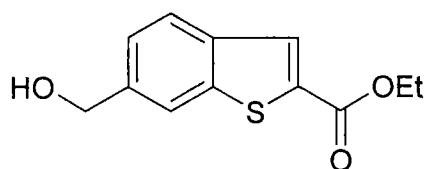
[0326]



[0327] 将苯并 [b] 噻吩 -2,6- 二羧酸 2- 乙酯 6- 甲酯 (3.9g, 14.77mmol) 和碘化锂 (10g, 74.6mmol) 的无水吡啶 (30mL, 9 体积) 混合物搅拌回流 16 小时。冷却至室温后将混合物加入 (以熔化物形式或切碎的形式) 冰冷的 2N HCl (200mL) 中。形成的固体通过过滤分离并用水 (3×50mL) 洗涤。产物通过从甲醇中重结晶纯化以得到标题化合物 (1.8g, 49%)。LCMS  $m/z$  251  $[\text{M}^+\text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (300MHz, DMSO),  $\delta$ : 1.35 (3H, tJ = 6.9Hz,  $\text{CH}_3$ ), 4.38 (2H, qJ = 7.1Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7.99 (1H, dJ = 8.3Hz, ArH), 8.12 (1H, dJ = 8.3Hz, ArH), 8.27 (1H, s, ArH), 8.70 (1H, s, ArH)。

[0328] 阶段 5: 6- 羟甲基 - 苯并 [b] 噻吩 -2- 羧酸乙酯

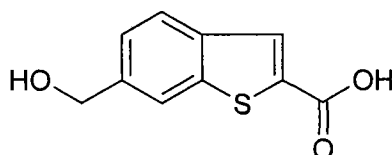
[0329]



[0330] 将苯并[b]噻吩-2,6-二羧酸2-乙酯(1.6g, 6.4mmol)的无水THF(40mL, 25体积)溶液冷却至0℃。在其中缓慢加入BH<sub>3</sub>(1M, 用THF配制, 30mL, 30.0mmol)。使反应物回复至室温并搅拌3小时。然后将溶液冷却至0℃并用1N HCl(7.5mL)淬灭(quench)。将反应混合物真空浓缩以除去所有THF, 所得固体通过过滤分离并真空干燥以得到6-羟甲基-苯并[b]噻吩-2-羧酸乙酯(1.3g, 87%)。LCMS m/z 237[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR(300MHz, DMSO), δ: 1.34(3H, t, J = 6.9Hz, CH<sub>3</sub>), 4.35(2H, q, J = 7.1Hz, CH<sub>2</sub>), 4.65(2H, s, CH<sub>2</sub>), 6.53(1H, brs, OH), 7.42(1H, d, J = 9.4 Hz), 7.98(3H, m, ArH), 8.18(1H, s, ArH)。

[0331] 阶段6: 6-羟甲基-苯并[b]噻吩-2-羧酸

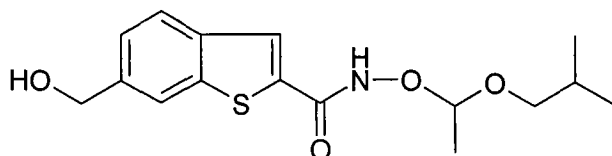
[0332]



[0333] 将6-羟甲基-苯并[b]噻吩-2-羧酸乙酯(2.4g, 9.6mmol, 1eq)溶于THF(10mL, 4体积)并加入(10mL)和LiOH(0.69g, 28.8mmol)。反应混合物在50℃搅拌3小时, 然后浓缩至干并无需纯化用于下一步骤。

[0334] 阶段7: 6-羟甲基-苯并[b]噻吩-2-羧酸(1-异丁氧基-乙氧基)酰胺

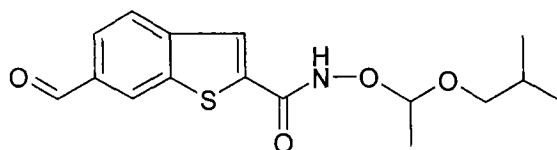
[0335]



[0336] 在6-羟甲基-苯并[b]噻吩-2-羧酸(1.76g, 8.4mmol, 1eq)的DMF溶液中加入PyBrOP(4.3g, 9.2mmol)、O-(异丁氧基-乙基)-羟胺(11.5mL, 84.0mmol)(通过W00160785所述方法制备)和DIPEA(2.9mL, 16.7mmol)。反应混合物在室温搅拌2小时, 然后用水(40mL)和EtOAc(40mL)稀释。将有机层分离, 用盐水(50mL)洗涤并浓缩。残余物通过硅胶层析纯化, 用EtOAc/庚烷(1:1)洗脱以得到标题化合物(1.8g, 两个步骤的产率为67%)。LCMS m/z 322[M<sup>+</sup>-H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR(300MHz, MeOD), δ: 0.83(6H, d, J = 6.6Hz, 2×CH<sub>3</sub>), 1.32(3H, d, J = 5.9Hz, CH<sub>3</sub>), 1.75(1H, m, CH), 3.38(2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.63(2H, s, CH<sub>2</sub>), 4.95(1H, m, CH), 7.32(1H, d, J = 8.2Hz, ArH), 7.77(3H, m, ArH)。

[0337] 阶段8: 6-甲酰-苯并[b]噻吩-2-羧酸(1-异丁氧基-乙氧基)酰胺

[0338]

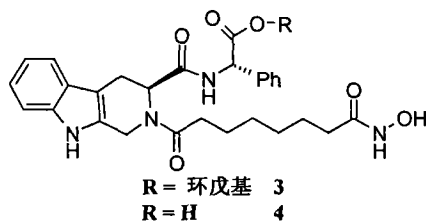
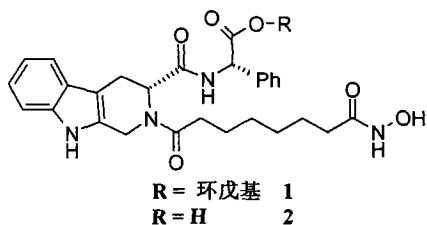


[0339] 在6-羟甲基-苯并[b]噻吩-2-羧酸(1-异丁氧基-乙氧基)酰胺(600mg, 1.86mmol)的DCM(3mL)溶液中加入MnO<sub>2</sub>(2.1g, 24.1mmol)。将混合物室温搅拌30分钟然

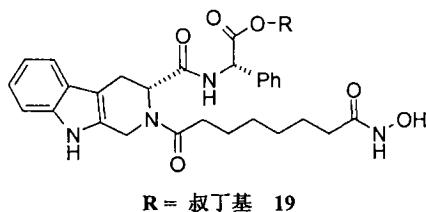
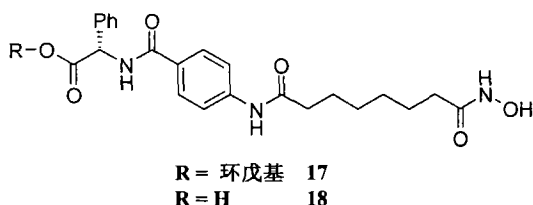
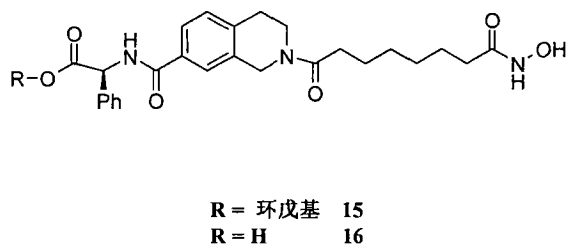
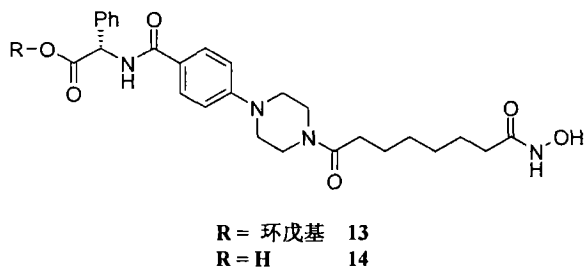
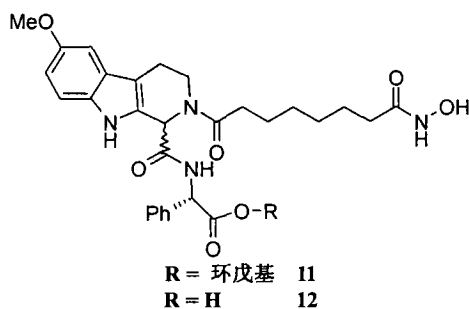
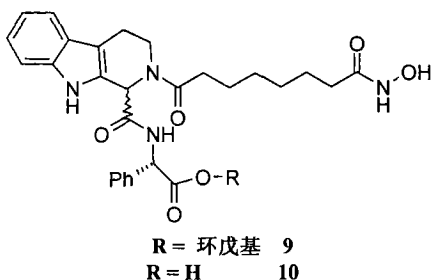
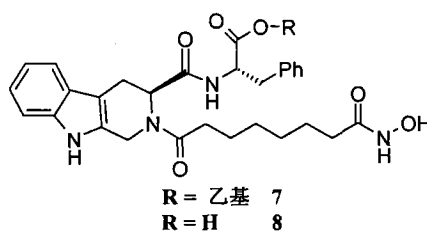
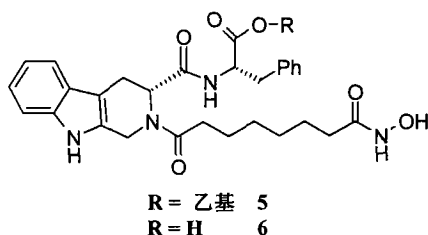
后通过硅藻土过滤。将滤液浓缩以得到标题化合物 (435mg, 82%)。LCMS  $m/z$  320  $[M^+ - H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300 MHz, MeOD),  $\delta$ : 0.94 (6H, dJ = 6.7Hz,  $2 \times CH_3$ ), 1.45 (3H, dJ = 5.3Hz,  $CH_3$ ), 1.87 (1H, m, CH), 3.40 (2H, m,  $CH_2$ ), 5.08 (1H, ddJ = 5.2, 10.6Hz, CH), 7.89–8.0 (3H, m, ArH), 8.55 (1H, s, ArH), 10.11 (1H, s, CHO)。

[0340] 合成图 1 的化合物, 以化合物 (1) 和化合物 (2) 为例

[0341]



[0342]

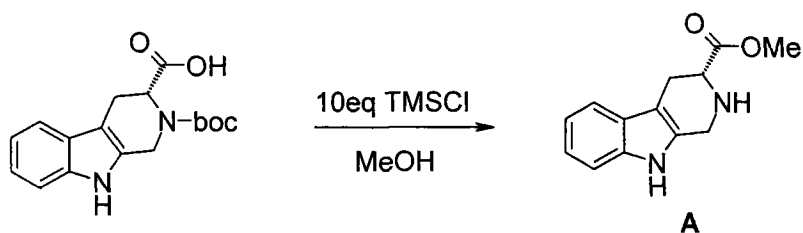


[0343] 图 1

[0344] 制备结构单元 A-G

[0345] 结构单元 A 和 B

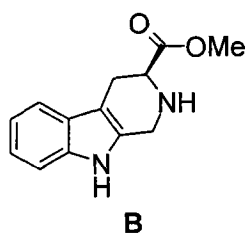
[0346]



[0347] 将 N-Boc-D-四氢-β-咔啉-3-羧酸 (5.0g, 15.8mmol) 和 TMSCl (20ml, 158mmol) 的 MeOH (50ml) 溶液加热回流 2 小时。将反应混合物蒸发至干以得到 (R)-2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-3-羧酸甲酯 (结构单元 A)。LCMS 纯度 100 %。m/z 231[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, 461[2M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。结构单元 A 无需进一步纯化即可使用。

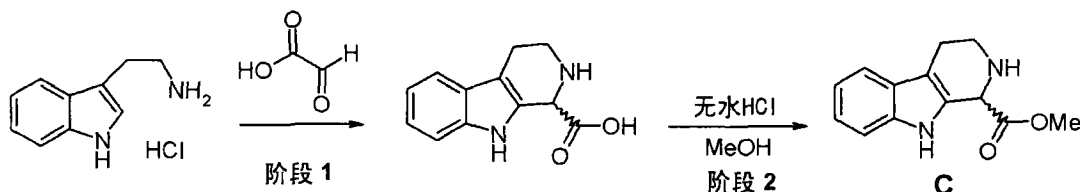
[0348] 用 N-boc-L-四氢-β-咔啉-3-羧酸通过与结构单元 A 相同的方法获得 (S)-2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-3-羧酸甲酯 (结构单元 B)。

[0349]



[0350] 结构单元 C

[0351]

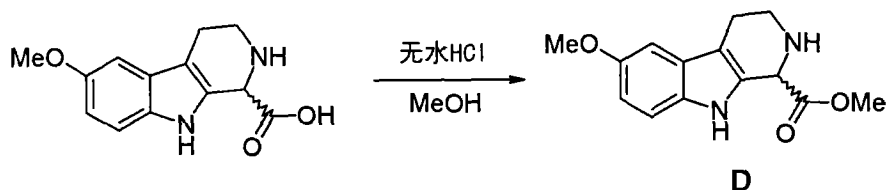


[0352] 阶段 1: 边搅拌边将乙醛酸单水合物 (1.51g, 16.4mmol) 的水 (10ml) 溶液逐滴加入盐酸色胺 (3.0g, 15.3mmol) 的水 (200ml) 溶液。加入 KOH (0.827g, 14.7mmol) 的水 (10ml) 溶液。将反应混合物室温搅拌 1 小时, 之后发生随时间沉淀。减压过滤后收集四氢-β-咔啉-1-羧酸并用水洗涤。产量为 1.9g (58%) ; m/z 217[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。

[0353] 阶段 2: 四氢-β-咔啉-1-羧酸 (7.4g) 的 MeOH (250ml) 溶液用 HCl 气体饱和 20 分钟。反应混合物在室温温和搅拌 18 小时, 观察到约 80% 转化。反应混合物用 HCl 气体再次处理并再搅拌 18 小时。反应完成后真空浓缩混合物以得到 2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-1-羧酸甲酯 (结构单元 C), LCMS 纯度 95%, m/z 231[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。产物无需进一步纯化即可使用。

[0354] 结构单元 D

[0355]

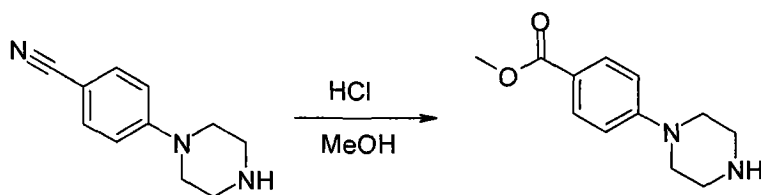


[0356] 采用结构单元 C 所用的方法将 6-甲氧基-四氢-β-咔啉-1-羧酸酯化得到 6-甲

氧基-2,3,4,9-四氢-1H- $\beta$ -咔啉-1-羧酸甲酯(结构单元D)。结构单元D:LCMS 纯度 98%,  $m/z$  261  $[M^+ + H]^+$ 。结构单元D无需进一步纯化即可使用。

[0357] 结构单元E

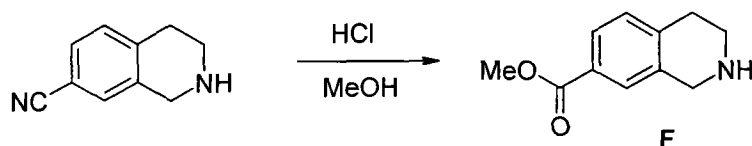
[0358]



[0359] 4-哌嗪-1-基-苄腈(1.5g, 8.0mmol)的MeOH(150ml)溶液用HCl气体饱和。加入水(0.17ml)并将混合物加热回流18小时。将反应混合物冷却至室温并用HCl气体再次饱和。再回流24小时。将混合物减压浓缩得到4-哌嗪-1-基-苯甲酸甲酯(结构单元E)。LCMS 纯度 90%,  $m/z$  221  $[M^+ + H]^+$ 。结构单元E无需进一步纯化即可使用。

[0360] 结构单元F

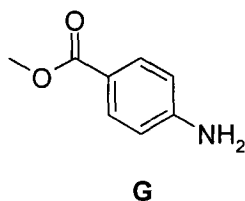
[0361]



[0362] 按照与结构单元E相同的方法制备1,2,3,4-四氢-异喹啉-7-羧酸甲酯(结构单元F)。LCMS 纯度 89%。 $m/z$  193  $[M^+ + H]^+$ 。该产物无需进一步纯化即可使用。

[0363] 结构单元G

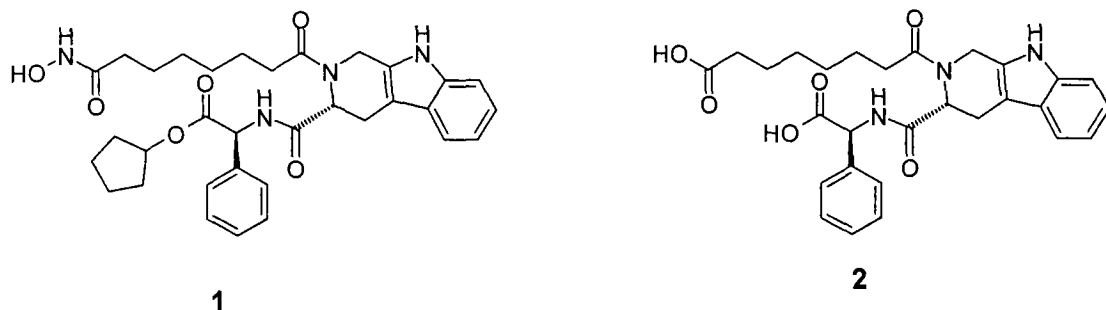
[0364]



[0365] 4-氨基-苯甲酸甲酯(结构单元G)是市售的

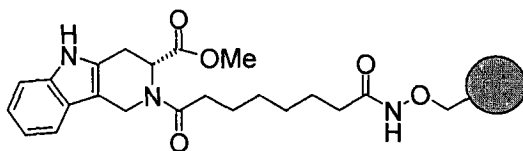
[0366] 合成化合物(1)和化合物(2)

[0367]



[0368] 阶段1:与结构单元偶联

[0369]

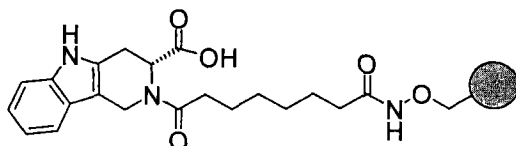


[0370] 在无水 DCM(50ml) 中溶胀用辛二酸衍生的羟胺 2- 氯三苯甲基树脂 (4.6g, 以 1.14mmol/g 加载, 5.24mmol)。加入结构单元 A (4.76g, 15.72mmol), 然后加入 pyBOP (8.18g, 15.72mmol, 3eq) 和 DIPEA (6.77g, 52.4mmol, 10eq)。将反应物振荡 18 小时, 过滤, 并用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0371] 注意:对于结构单元G,采用上述条件偶联得到约10%的转化。因此采用另一种条件:将阶段2的树脂(1.0g,以1.14mmol/g加载)在无水DCM(100ml)中溶胀。0℃时在氮气下加入1-氯-N,N-2-三甲基丙烯胺(Ghosez试剂)<sup>1</sup>(7.53ml,57.0mmol,50eq)。使混合物回复室温并温和振荡1-2小时。在20分钟内分批加入苯胺结构单元G(8.6g,57.0mmol,50eq)。加入Et<sub>3</sub>N(8.0ml,57.0mmol,50eq)。将混合物振荡18小时。测试切除后的LCMS显示有70%转化,m/z 323[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>,645[2M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。将树脂过滤,并用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0372] 阶段 2:皂化

[0373]

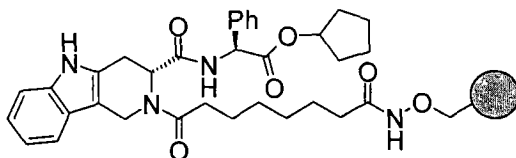


[0374] 将阶段 1 的树脂 (4.8g, 以 1.14mmol/g 加载, 5.47mmol) 悬浮于 MeOH(17.5ml) 和 THF(17.5ml)。加入 NaOH(1.1g, 27.5mmol, 5eq) 的水 (17.5ml) 溶液。将混合物振荡 18 小时。测试切除后的 LCMS 证实反应完全,  $m/z$  388  $[M^+ + H]^+$ , 775  $[2M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤并用水  $\times 2$  和 MeOH  $\times 2$  洗涤, 然后用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0375] 注意:对于结构单元 E,皂化用 10eq. 2.7M NaOH 进行并振荡 72 小时。

[0376] 阶段 3:与 L-苯基甘氨酸环戊酯偶联

[0377]



[0378] 将阶段 2 的树脂 (2.4g, 以 1.14mmol/g 加载, 2.7mmol) 悬浮于无水 DCM (30ml)。加入 L- 苯基甘氨酸环戊酯甲苯磺酸盐 (tosyl salt) (3.2g, 8.1mmol, 3eq), 然后加入 pyBOP (4.2g, 8.1mmol, 3eq) 和 DIPEA (3.5g, 27.0mmol, 10eq)。将混合物振荡 18 小时。测试切除后的 LCMS (即用标准洗涤过程洗涤少量树脂, 干燥, 并在 2% TFA/DCM 中切除。将树脂滤出并浓缩至干。获得 LCMS) 证实反应完全,  $m/z$  589 $[M^+ + H]^+$ 。将所有树脂样品过滤, 并用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

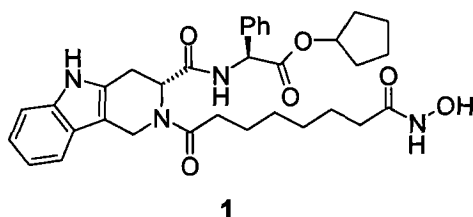
[0379] 注意：

[0380] 对于化合物 5-8, 采用 L- 苯丙氨酸乙酯 (3eq)。

[0381] 对于化合物 19, 采用 L-苯基甘氨酸叔丁酯 (3eq)。

[0382] 阶段 4:(S)-{[(R)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-3-羰基]-氨基}-苯基-乙酸环戊酯 (1)

[0383]

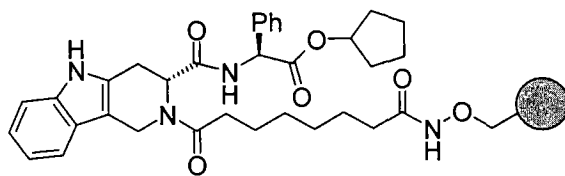


[0384] 将阶段 3 的树脂 (1.0g, 以 1.14mmol/g 加载) 在 2% TFA/DCM(10ml) 中温和振荡 20 分钟。将树脂过滤。收集滤液并在室温下减压蒸发。树脂用 2% TFA/DCM(10ml) 重新处理, 20 分钟后过滤。将合并的滤液在室温下减压蒸发至干, 残余物 (约 300mg) 通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (1),  $m/z$  589  $[M^+ + H]^+$ ;  $^1H$  NMR(400MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 1.3-1.7(16H, m,  $CH_2$ ), 2.1-2.3(2H, m,  $CH_2$ ), 2.5(2H, m,  $CH_2$ ), 3.0-3.5(2H, m,  $CH_2$ ), 4.5-4.8(2H, m,  $CH_2$ ), 5.1(1H, m,  $CO_2CH$ ), 5.2(1H, dd,  $CH_2CHNCO$ ), 5.5-5.9(1H, d,  $CONHCHPh$ ), 7.0-7.5(9H, m, Ar)。

[0385] 相应的羧酸通过以下过程获得

[0386] 阶段 5:皂化

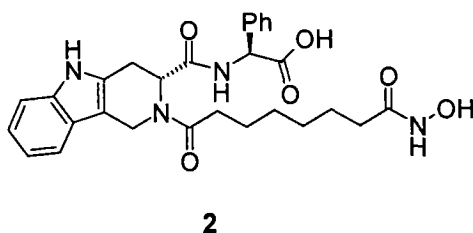
[0387]



[0388] 将阶段 3 的树脂 (1.0g, 以 1.14mmol/g 加载) 悬浮于 MeOH(4ml) 和 THF(4ml)。加入 NaOH(0.23g, 5.7mmol) 的水 (4ml) 溶液。将混合物振荡 18 小时。测试切除后的 LCMS 证实反应完全,  $m/z$  521  $[M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤并用水  $\times 2$  和 MeOH  $\times 2$  洗涤, 然后通过标准洗涤过程洗涤。树脂在真空下干燥。

[0389] 阶段 6:(S)-{[(R)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-3-羰基]-氨基}-苯基-乙酸 (2)

[0390]



[0391] 阶段 5 的树脂 (1.0g, 以 1.14mmol/g 加载) 用阶段 6 所述方法切割得到化合物 (2),  $m/z$  521  $[M^+ + H]^+$ ;  $^1H$  NMR(400MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : 1.3-1.5(4H,  $2 \times CH_2$ ), 1.6-1.8(4H,  $2 \times CH_2$ ), 2.1-2.2(2H, m,  $CH_2$ ), 2.4-2.7(2H, m,  $CH_2$ ), 3.0-3.2(1H, m), 3.5(1H, m), 4.55(m), 4.9(m), 5.1-5.35(2H, m), (2H, m,  $CH_2NCO$ ), 5.75-5.8(1H,  $2 \times d$ ,  $NHCHPh$ ), 7.0-7.5(9H, m, Ar), 7.6(d), 7.7(d), 8.35(d), 8.95(s), 9.05(s)。

[0392] 以下化合物按照为化合物 (1) 和化合物 (2) 描述的方法制备

[0393] (S)-{[(S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-3-羰基]-氨基}-苯基-乙酸

基]-氨基}-苯基-乙酸环戊酯(3)

[0394] 使用结构单元 B

[0395] LCMS 纯度 98 %,  $m/z$  589  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$  :1.20-1.40 (8H, m,  $4 \times CH_2$ ), 1.40-1.80 (8H, m,  $4 \times CH_2$ ), 2.10 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.45 (2H, m,  $CH_2$ ), 5.0 (2H, m,  $CH_2$  与  $D_2O$  峰重叠), 5.25-5.45 (2H, m,  $2 \times CH$ ), 5.50 (1H, s,  $CONHCHPh$ ), 7.00-7.50 (9H, m, Ar)。

[0396] (S)-{[(S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H- $\beta$ -咔啉-3-羰基]-氨基}-苯基-乙酸(4)

[0397] 使用结构单元 B

[0398] LCMS 纯度 100 %,  $m/z$  521  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$  1.30-1.50 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.55-1.80 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.15 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.60 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.00-3.25 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.40-3.55 (2H, m,  $CH_2$ ), 5.20-5.30 (1H, m,  $CHCON$ ), 5.35 (1H, s,  $NHCHPh$ ), 7.05-7.50 (9H, m, Ar)。

[0399] (S)-2-{[(R)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H- $\beta$ -咔啉-3-羰基]-氨基}-3-苯基-丙酸乙酯(5)

[0400] 使用结构单元 A

[0401] LCMS 纯度 100 %  $m/z$  563  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$  1.00 (3H, t,  $CH_3$ ), 1.20-1.24 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.50-1.70 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.00 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.30-2.50 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.80-3.00 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.05 (2H, q,  $CO_2CH_2$ ), 4.35-4.50 (1H, m, CH), 4.80-5.05 (2H, m,  $CH_2$ ), 5.40 (1H, s,  $NHPhCO$ ), 6.80-7.30 (9H, m, Ar)。

[0402] (S)-2-{[(R)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H- $\beta$ -咔啉-3-羰基]-氨基}-3-苯基-丙酸(6)

[0403] 使用结构单元 A

[0404] LCMS 纯度 100 %,  $m/z$  534  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$  1.30-1.50 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.60-1.80 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.15 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.50 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.00 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.20 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.30-4.80 (2H, m,  $CH_2$ ), 5.15 (1H, m, CH), 6.90-7.50 (9H, m, Ar)。

[0405] (S)-2-{[(S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H- $\beta$ -咔啉-3-羰基]-氨基}-3-苯基-丙酸乙酯(7)

[0406] 使用结构单元 B

[0407] LCMS 纯度 100 %,  $m/z$  563  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$  1.00 (3H, t,  $CH_3$ ), 1.30-1.50 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.60-1.70 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.10 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.30-2.65 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.95-3.20 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.45 (1H, m, CH), 4.05 (2H, q,  $CO_2CH_2$ ), 4.35-4.50 (1H, m, CH), 4.80-5.05 (2H, m,  $CH_2$ ), 5.50 (1H, s,  $NHPhCO$ ), 6.90-7.50 (9H, m, Ar)。

[0408] (S)-2-{[(S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H- $\beta$ -咔啉-3-羰基]-氨基}-3-苯基-丙酸(8)

[0409] 使用结构单元 B

[0410] LCMS 纯度 100 %,  $m/z$  534  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$  1.30-1.50 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.60-1.80 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.15 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.50 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.95-3.15 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.20-3.50 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.30-4.50 (2H, m,  $2 \times CH$ ), 4.80-5.20 (2H, m,  $CH_2$ ), 6.90-7.50 (9H, m, Ar)。

[0411] (S)-{[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H-β-咪啉-1-羰基]-氨基}-苯基-乙酸环戊酯 (9)

[0412] 使用结构单元 C

[0413] LCMS 纯度 100 %,  $m/z$  589  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  1.30-1.80 (16H, m,  $8 \times CH_2$ ), 2.15 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.45-2.70 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.95 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.55 (1H, m, CH), 4.35 (1H, m, CH), 5.15 (1H, m,  $CO_2CH$ ), 5.45 (1H, m, CH), 6.20 (1H, d,  $PhCHNH$ ) 7.00-7.80 (9H, m, Ar), 8.80-9.20 (1H, 宽峰 m,  $CHNHOH$ )。

[0414] (S)-{[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H-β-咪啉-1-羰基]-氨基}-苯基-乙酸 (10)

[0415] 使用结构单元 C

[0416] LCMS 纯度 100 %,  $m/z$  521  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$  1.30-1.50 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.60-1.80 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.15 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.50-2.65 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.95 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.70 (1H, dd, CH), 4.30 (1H, dd, CH), 5.50 (1H, m, CH), 6.10 和 6.20 (各 0.5H, s,  $PhCHNH$ ) 7.00-7.50 (9H, m, Ar)。

[0417] (S)-{[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-6-甲氧基-2,3,4,9-四氢-1H-β-咪啉-1-羰基]-氨基}-苯基-乙酸环戊酯 (11)

[0418] 使用结构单元 D

[0419] LCMS 纯度 100 %,  $m/z$  619  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  1.30-1.80 (16H, m,  $8 \times CH_2$ ), 2.15 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.50-2.65 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.85 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.70 (1H, dd, CH), 3.80 (3H, s, OMe), 4.30 (1H, dd, CH), 5.20 (1H, m,  $CO_2CH$ ), 5.30-5.50 (1H, m, CH), 6.15-6.20 (1H, d,  $PhCHNH$ ) 6.80-7.80 (8H, m, Ar), 8.80-9.00 (1H, m,  $CONHOH$ )。

[0420] (S)-{[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-6-甲氧基-2,3,4,9-四氢-1H-β-咪啉-1-羰基]-氨基}-苯基-乙酸 (12)

[0421] 使用结构单元 D

[0422] LCMS 纯度 100 %,  $m/z$  551  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1HNMR$ (400MHz, MeOD),  $\delta$  1.30-1.60 (8H, m,  $4 \times CH_2$ ), 2.05 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.50-2.65 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.80 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.55 (1H, dd, CH), 3.70 (3H, s, OMe), 4.30 (1H, dd, CH), 5.30-5.50 (1H, m, CH), 5.90-6.10 (各 0.5 H, s,  $PhCHNH$ ), 6.65 (1H, m, Ar), 6.80 (1H, m, Ar), 7.10 (1H, m, Ar), 7.35 (5H, m, Ar)。

[0423] (S)-{[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-6-甲氧基-2,3,4,9-四氢-1H-β-咪啉-1-羰基]-氨基}-苯基-乙酸环戊酯 (13)

[0424] 使用结构单元 E

[0425] LCMS 纯度 95 %,  $m/z$  579  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  1.40-1.90 (16H, m,  $8 \times CH_2$ ), 2.15 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.45 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.40 (4H, m,  $2 \times CH_2N$ ), 3.60-3.80 (4H, m,  $2 \times CH_2N$ ), 5.30 (1H, m,  $CO_2CH$ ), 5.70 (1H, d,  $PhCHNH$ ), 6.90 (2H, d, Ar), 7.30-7.50 (6H, m, Ar), 7.80 (2H, d, Ar)。

[0426] (S)-{[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-6-甲氧基-2,3,4,9-四氢-1H-β-咪啉-1-羰基]-氨基}-苯基-乙酸 (14)

[0427] 使用结构单元 E

[0428] LCMS 纯度 100 %,  $m/z$  511  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$  1.30 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ),

1. 50 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2. 00 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ), 2. 35 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ), 3. 30 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2\text{N}$ ), 3. 70 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2\text{N}$ ), 5. 55 (1H, s,  $\text{PhCHNH}$ ), 6. 90 (2H, d, Ar), 7. 30 (3H, m, Ar), 7. 40 (2H, m, Ar), 7. 70 (2H, d, Ar)。

[0429] (S)-{[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-7-羰基]-氨基}-苯基-乙酸环戊酯 (15)

[0430] 使用结构单元 F

[0431] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  550  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  1. 30-1. 80 (16H, m,  $8 \times \text{CH}_2$ ), 2. 15 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 2. 45 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 2. 95 (2H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3. 70-3. 90 (2H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 4. 60-4. 70 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 5. 25 (1H, m,  $\text{CO}_2\text{CH}$ ), 5. 70 (1H, m,  $\text{PhCHNH}$ ), 7. 20-7. 70 (8H, m, Ar)。

[0432] (S)-{[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-7-羰基]-氨基}-苯基-乙酸 (16)

[0433] 使用结构单元 F

[0434] LCMS 纯度 87%,  $m/z$  482  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$  1. 30-1. 50 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 1. 60-1. 70 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2. 15 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 2. 50 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 2. 95 (2H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3. 70 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 4. 80 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 5. 70 (1H, s,  $\text{PhCHNH}$ ), 7. 20-7. 80 (8H, m, Ar)。

[0435] (S)-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯甲酰氨基]-苯基-乙酸环戊酯 (17)

[0436] 使用结构单元 G

[0437] LCMS 纯度 94%,  $m/z$  510  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$  1. 30-1. 80 (16H, m,  $8 \times \text{CH}_2$ ), 2. 00-2. 20 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 5. 10-5. 30 (1H, m,  $\text{CO}_2\text{CH}$ ), 5. 70 (1H, m,  $\text{PhCHNH}$ ), 7. 30-7. 80 (9H, m, Ar)。

[0438] (S)-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯甲酰氨基]-苯基-乙酸 (18)

[0439] 使用结构单元 G

[0440] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  442  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$  1. 30-1. 40 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 1. 50-1. 70 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2. 20 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ), 2. 35 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ), 5. 70 (1H, s,  $\text{PhCHNH}$ ), 7. 25-7. 40 (3H, m, Ar), 7. 50 (2H, d, Ar), 7. 65 (2H, d, Ar), 7. 80 (2H, d, Ar)。

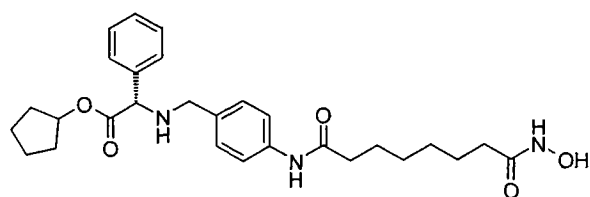
[0441] (S)-{[(R)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H- $\beta$ -咔啉-3-羰基]-氨基}-苯基-乙酸叔丁酯 (19)

[0442] 使用结构单元 A

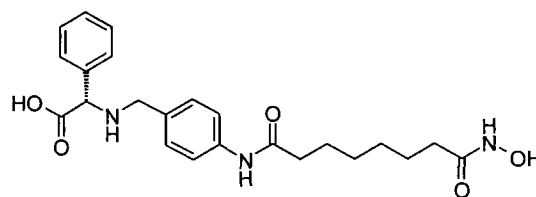
[0443] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  577  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  1. 20-1. 40 (17H, m,  $4 \times \text{CH}_2$  和  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2. 10 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 2. 45 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3. 15-3. 60 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 4. 75 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 5. 35 (2H, m,  $\text{PhCHNH}$  和  $\text{CH}$ ), 6. 90-7. 50 (9H, m, Ar)。

[0444] 合成化合物 (20) 和化合物 (21)

[0445]



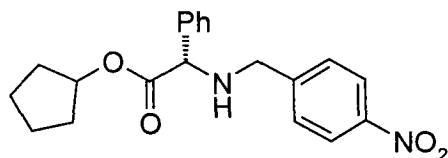
20



21

[0446] 阶段 1 : (S)-(4-硝基-苄基氨基)-苯基-乙酸环戊酯

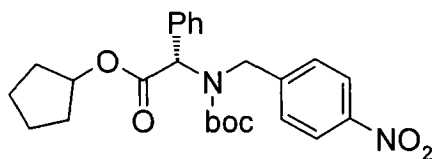
[0447]



[0448] 将 DMF (250ml) 中的 4-硝基苄基溴化物 (15g, 69.4mmol)、L-苯基甘氨酸环戊酯甲磺酸盐 (27.1g, 60.4mmol) 和碳酸钾 (19.6g, 138.8mmol) 的混合物室温搅拌 18 小时。反应混合物用 EtOAc (300ml) 稀释并用水 (3×200ml) 洗涤。将 EtOAc 层分离, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 过滤并浓缩至干得到橙色油状物。分离出 21 克粗产物。LCMS 纯度 81%,  $m/z$  355  $[\text{M}^+\text{H}]^+$ 。该产物无需进一步纯化即可使用。

[0449] 阶段 2 : (S)-[叔丁氧基羰基-(4-硝基-苄基)-氨基]-苯基-乙酸环戊酯

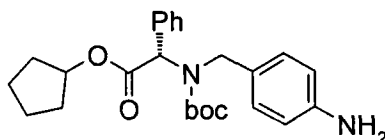
[0450]



[0451] 在阶段 1 的产物 (15g, 42.37mmol) 的 THF (150ml) 溶液中加入  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (6.9g, 50.8mmol), 然后加入二碳酸二叔丁酯 (22.2g, 101.7mmol)。加入水 (150ml) 并将反应物室温搅拌 36 小时。将反应混合物蒸发至干。将残余物重溶于 EtOAc (300ml), 用 0.1M HCl (150ml)、饱和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液和水 (150ml) 依次洗涤。将 EtOAc 层干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 过滤并浓缩至干得到黄色油状物。通过柱层析 (10% EtOAc/己烷) 纯化后获得澄清的黄色油状产物 (12g, 62% 产率)。LCMS 纯度 95%,  $m/z$  455  $[\text{M}^+\text{H}]^+$ , 496  $[\text{M}^+\text{H}+41]^+$ 。

[0452] 阶段 3 : (S)-[ (4-氨基-苄基)-叔丁氧基羰基-氨基]-苯基-乙酸环戊酯

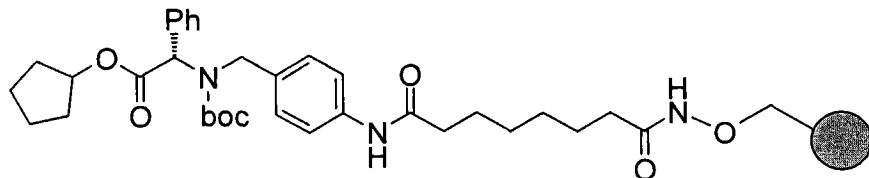
[0453]



[0454] 将 EtOAc (350ml) 中的阶段 2 的产物 (12g, 26.4mmol) 和 10% Pd/C (2.0g) 的混合物在室温下氢化 18 小时。通过硅藻土垫滤去 Pd/C 催化剂。将滤液减压浓缩以得到白色固体 (10.1g, 90% 产率)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  425  $[\text{M}^+\text{H}]^+$ , 466  $[\text{M}^+\text{H}+41]^+$ 。

[0455] 阶段 4 : 偶联阶段 3 的苯胺

[0456]

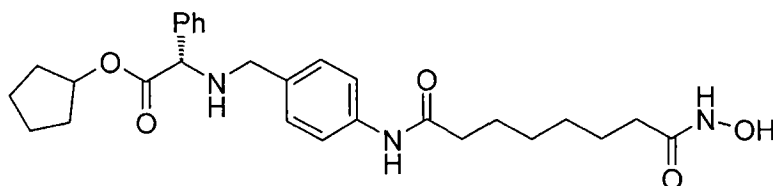


[0457] 将用辛酸衍生的羟胺 2-氯三苯甲基树脂 (1.0g, 以 0.94mmol/g 加载) 在无水 DCM (100ml) 中溶胀。0℃时在氮气下加入 1-氯-N,N-2-三甲基丙烯胺 (Ghosez 试剂) 1 (0.373ml, 2.82mmol, 3eq)。使混合物回复室温并温和振荡 1-2 小时。在 20 分钟内分批加入阶段 3 的苯胺 (1.2g, 2.82mmol, 3eq)。加入  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.53ml, 3.76mmol, 4eq)。将混合物振荡 1 小时。测试切除后的 LCMS 显示有 70% 转化,  $m/z$  596  $[\text{M}^+\text{H}]^+$ 。将树脂过滤, 并用

标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0458] 阶段 5 : (S)-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-苯基-乙酸环戊酯 (20)

[0459]

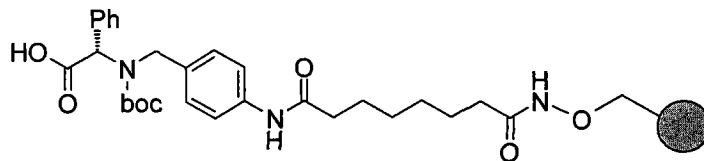


20

[0460] 将阶段 4 的树脂 (1.5g, 以 0.94mmol/g 加载) 在 2% TFA/DCM(10ml) 中温和振荡 20 分钟。将树脂过滤。收集滤液并在室温下减压蒸发。树脂用 2% TFA/DCM(10ml) 重新处理, 20 分钟后过滤。合并的滤液在室温下减压蒸发至干以得到残余物。使该残余物在 20% TFA/DCM 中静置 40 分钟。再在室温下减压蒸发至干后, 残余物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (20), 其为 TFA 盐, LCMS 纯度 95%,  $m/z$  496  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, DMSO),  $\delta$  : 1.30-1.50 (6H, m,  $3 \times CH_2$ ), 1.50-1.70 (8H, m,  $4 \times CH_2$ ), 1.80 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.10 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.45 (2H, t,  $CH_2$ ), 4.1 (2H, dd,  $CH_2NH$ ), 5.25 (1H, m,  $CHOC(=O)$ ), 5.35 (1H, m,  $OC(=O)CHPh$ ), 7.45 (2H, d, Ar), 7.60 (5H, m, Ar), 7.80 (2H, d, Ar), 10.00-10.10 (2H, br s), 10.50 (1H, s)。

[0461] 阶段 6 : 环戊酯的皂化

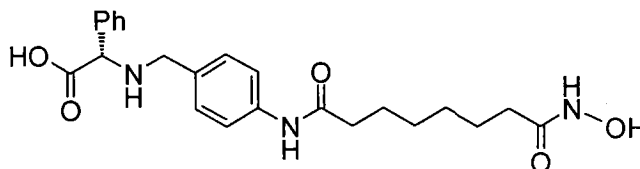
[0462]



[0463] 将阶段 4 的树脂 (2.5g, 以 0.94mmol/g 加载, 2.35mmol) 悬浮于 MeOH(8.7ml) 和 THF(8.7ml)。加入 2.7N NaOH 水溶液 (8.8ml, 10eq, 23.5mmol)。将混合物振荡 36 小时。测试切除后的 LCMS 证实反应完全,  $m/z$  528  $[M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤并用水  $\times 2$  和 MeOH  $\times 2$  洗涤, 然后通过标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0464] 阶段 7 : (S)-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-苯基-乙酸 (21)

[0465]

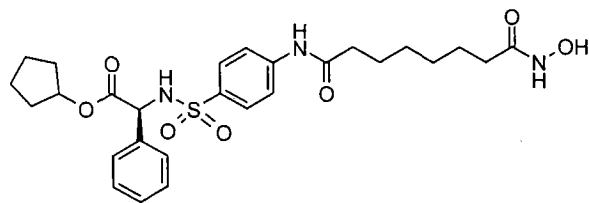


21

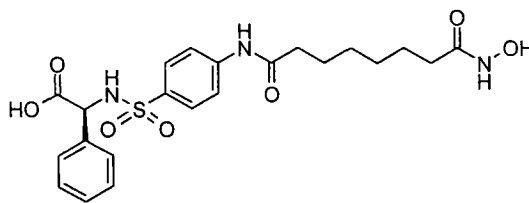
[0466] 将阶段 6 的树脂 (2.5g, 以 0.94mmol/g 加载, 2.35mmol) 切除并用阶段 5 中列出的过程进行 boc 去保护。粗产物 (0.40g) 通过制备型 HPLC 纯化得到化合物 (21), 其为 TFA 盐。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  428  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz,  $CD_3OD$ ),  $\delta$  : 1.30 (4H,  $2 \times CH_2$ ), 1.55 (4H,  $2 \times CH_2$ ), 2.00 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.30 (2H, t,  $CH_2$ ), 3.90 (1H, s,  $NHCH_2$ ), 4.05 (2H, dd,  $NHCH_2$ ), 4.95 (1H, s,  $CHPh$ ), 7.35 (2H, d, Ar), 7.40 (5H, m, Ar), 7.55 (2H, d, Ar)。

[0467] 合成化合物 (22) 和化合物 (23)

[0468]



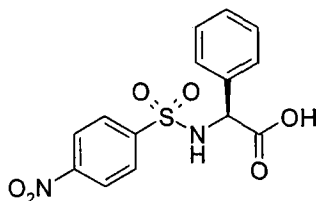
22



23

[0469] 阶段 1 : (S)-(4-硝基-苯磺酰基氨基)-苯基-乙酸

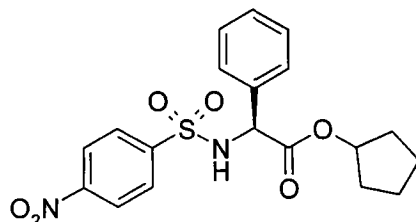
[0470]



[0471] 0℃下,在L-苯基甘氨酸(0.227g,1.5mmol)的水(5ml)和二噁烷(5ml)溶液中加入三乙胺(0.42ml,3.0mmol),然后缓慢加入4-硝基苯磺酰氯(0.5g,2.3mmol)的二噁烷(5ml)溶液。搅拌45分钟后将反应混合物蒸发至干,重溶于EtOAc并用饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液(2×20ml)和水(10ml)洗涤。EtOAc层用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并蒸发至干。LCMS纯度75%,(未观察到分子离子)产量为0.58g,(76%)。该材料无需任何纯化即可使用。

[0472] 阶段 2 : (S)-(4-硝基-苯磺酰基氨基)-苯基-乙酸环戊酯

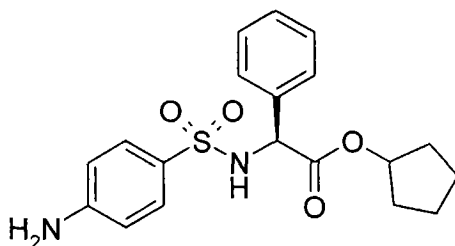
[0473]



[0474] 0℃时在阶段1的酸(4.32g,12.8mmol)的环戊醇(60ml)溶液中缓慢加入亚硫酸氯(9.3ml,128mmol)。搅拌反应混合物并在70℃加热回流2小时。在真空下蒸发除去过量亚硫酸氯,将反应混合物萃入EtOAc,用饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液洗涤并用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并蒸发至干。用DCM进行快速柱层析纯化得到所需产物(3.6g,70%产率)。LCMS纯度为100%,(未观察到分子离子)。

[0475] 阶段 3 : (S)-(4-氨基-苯磺酰基氨基)-苯基-乙酸环戊酯

[0476]

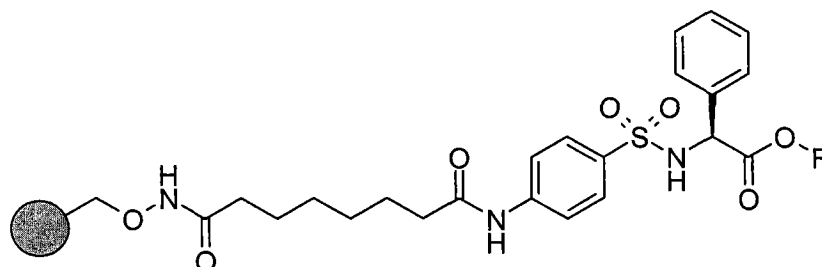


[0477] 室温下,将EtOAc(350ml)中的(S)-(4-硝基-苯磺酰基氨基)-苯基-乙酸环戊酯(5.29g,13.1mmol)和10%Pd/C(5.0g)的混合物在气球压力(balloon pressure)下氢化

24 小时。通过硅藻土垫滤去 Pd/C 催化剂。将滤液减压浓缩以得到所需产物 (4.54g, 92% 产率)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  375  $[M^+ + H]^+$ 。

[0478] 阶段 4: 偶联苯胺 (aniline)

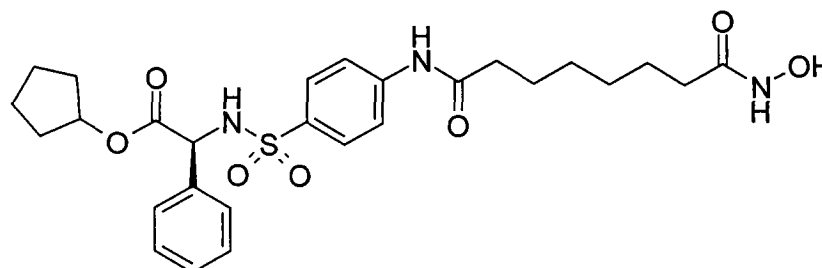
[0479]



[0480] 将用辛酸衍生的羟胺 2-氯三苯甲基树脂 (0.39g, 以 1.14 mmol/g 加载) 在无水 DCM (25ml) 中溶胀, 并于 0°C 在氮气下逐滴加入 1-氯-N,N,2-三甲基丙烯胺 (0.175ml, 1.33mmol)。将反应混合物振荡 1.5 小时。加入阶段 3 的苯胺 (0.5g, 1.33mmol) 的 DCM (25ml) 溶液, 然后加入三乙胺 (0.25ml, 1.76mmol)。将反应混合物再振荡 10 分钟。测试切除后的 LCMS 显示 61% 转化,  $m/z$  546  $[M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤, 并用标准洗涤过程洗涤。树脂在真空下干燥并用于下一步骤。

[0481] 阶段 5: (S)-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯磺酰基氨基]-苯基-乙酸环戊酯 (22)

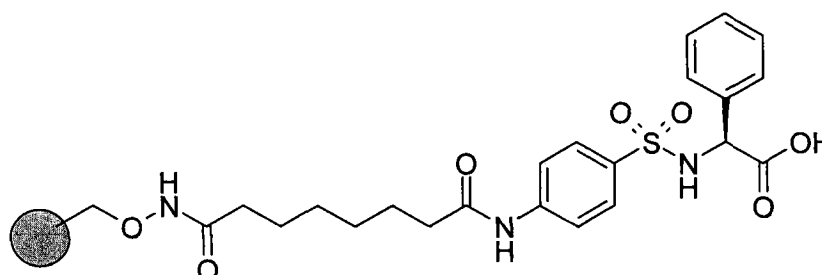
[0482]



[0483] 将阶段 4 的树脂 (1.12g, 以 1.14mmol/g 加载) 在 2% TFA/DCM (10ml) 中温和振荡 20 分钟。将树脂过滤。收集滤液并在室温下减压蒸发。树脂用 2% TFA/DCM (10ml) 重新处理, 20 分钟后过滤。合并的滤液在室温下减压蒸发至干以得到残余物。残余物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (22)。LCMS 纯度 93%,  $m/z$  546  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1\text{H NMR}$  (400MHz, DMSO),  $\delta$ : 1.20-1.68 (16H, m,  $8 \times \text{CH}_2$ ), 1.93 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ), 2.33 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ), 4.80 (1H, m,  $\text{CHOCO}$ ), 4.81 (1H, d,  $\text{OCOCHPh}$ ), 7.27 (5H, m, Ar), 7.65 (2H, d, Ar), 7.71 (2H, d, Ar), 8.67 (1H, br s), 8.75 (1H, d), 10.24 (1H, s), 10.34 (1H, s)。

[0484] 阶段 6: 环戊酯的皂化

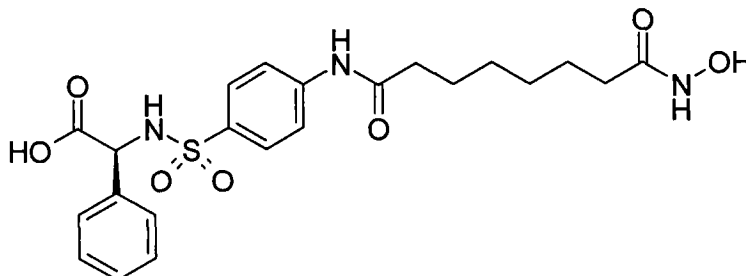
[0485]



[0486] 将阶段 4 的树脂 (1.2g, 以 1.14mmol/g 加载) 悬浮于 THF (8ml) 和甲醇 (8ml) 并加入 2.7M 氢氧化钠 (5.1ml, 13.68mmol)。将混合物振荡 48 小时。测试切除后的 LCMS 证实反应完全,  $m/z$  478  $[M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤并用水  $\times 2$  和 MeOH  $\times 2$  洗涤, 然后通过标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0487] 阶段 7 : (S)-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯磺酰基氨基]-苯基-乙酸 (23)

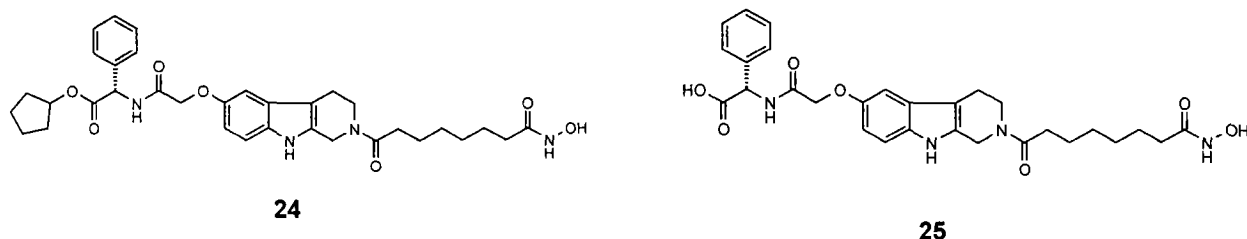
[0488]



[0489] 将阶段 6 的树脂 (1.2g, 以 1.14mmol/g 加载) 在 2% TFA/DCM (10ml) 中温和振荡 20 分钟。将树脂过滤。收集滤液并在室温下减压蒸发。树脂用 2% TFA/DCM (10ml) 重新处理, 20 分钟后过滤。合并的滤液在室温下减压蒸发至干以得到残余物。残余物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (23)。LCMS 纯度 91%,  $m/z$  478  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1\text{H NMR}$  (400MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.44 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 1.62-1.74 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.12 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ), 2.34 (1H, m,  $\text{OCOCHPh}$ ), 2.41 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ), 7.25 (5H, m, Ar), 7.69 (2H, d, Ar), 7.72 (2H, d, Ar)。

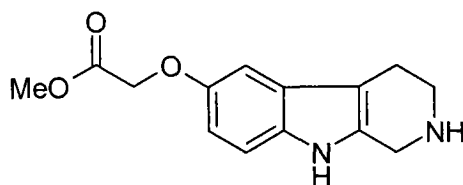
[0490] 合成化合物 (24) 和化合物 (25)

[0491]



[0492] 阶段 1 : (2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-6-基氧基)-乙酸甲酯

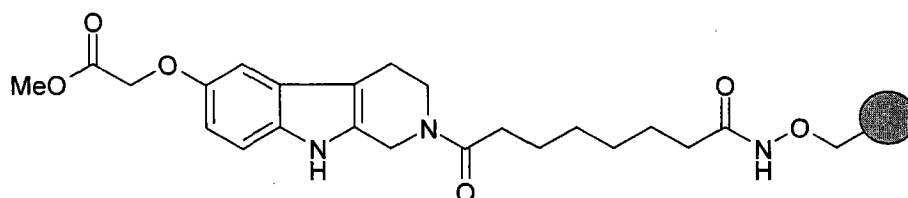
[0493]



[0494] 将 5-羧基甲氧基色胺 (1.24g, 4.56mmol)、36% 甲醛水溶液和 MeOH (25ml) 的混合物加热回流 1.5 小时。将反应混合物蒸发至干。依次加入 MeOH (50ml) 和 TMSCl (1.24ml)。继续回流 1 小时。将反应混合物蒸发至干并不经纯化用于下面的阶段。

[0495] 阶段 2 : 酰胺化

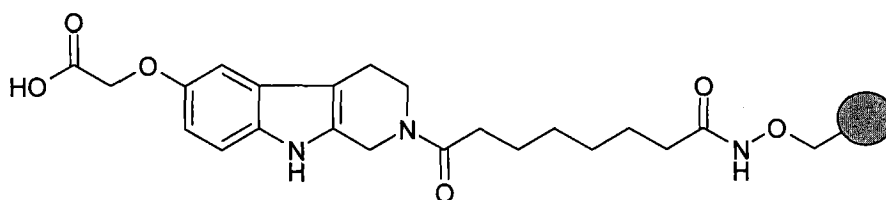
[0496]



[0497] 将用辛二酸衍生的羟胺 2-氯三苯甲基树脂 (2.0g, 以 1.14mmol/g 加载, 2.28mmol) 悬浮于 DCM (40ml)。加入 pyBOP (3.56g), 然后加入阶段 1 的胺 (4.56mmol) 的 DCM 溶液 (40ml) 和 DIPEA (3.9ml, 22.8mmol)。将反应物室温振荡 18 小时。测试切除后的 LCMS 证实反应完全。将树脂过滤, 用标准洗涤过程洗涤并充分干燥。

[0498] 阶段 3: 甲酯的皂化

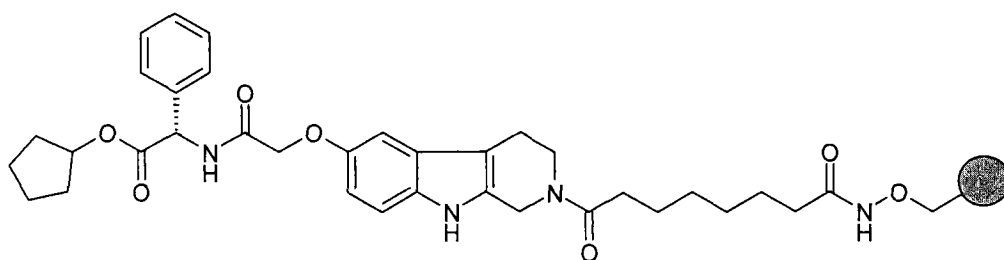
[0499]



[0500] 将阶段 2 的树脂 (2.0g, 1.14mmol/g, 2.28mmol) 悬浮于 THF (10ml) 和 MeOH (10ml) 的混合物。在 5 分钟内加入 1.4M NaOH (10ml)。将混合物振荡 18 小时。测试切除后的 LCMS 证实反应完全。将树脂过滤, 并用标准洗涤过程洗涤。

[0501] 阶段 4: 与 L-苯基甘氨酸环戊酯偶联

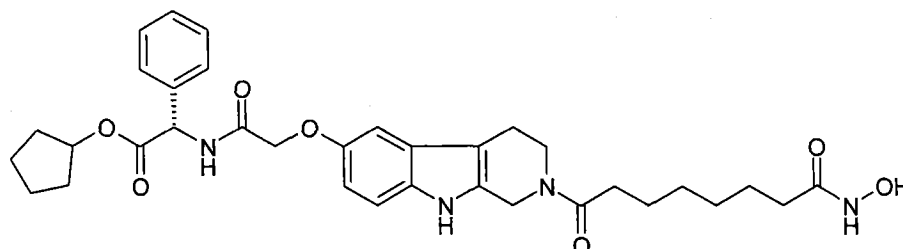
[0502]



[0503] 将阶段 3 的树脂 (2.0g, 以 1.14mmol/g 加载, 2.28mmol) 悬浮于 DCM (30ml)。加入 pyBOP (3.56g, 6.84mmol), 然后加入 L-苯基甘氨酸环戊酯 (2.59g, 6.84mmol) 和 DIPEA (3.9ml, 22.8mmol)。将混合物振荡 18 小时。测试切除后的 LCMS 证实反应完全。将树脂过滤, 用标准洗涤过程洗涤并真空干燥。

[0504] 阶段 5: (S)-{2-[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-6-基氧基]-乙酰氨基}-苯基-乙酸环戊酯 (24)

[0505]

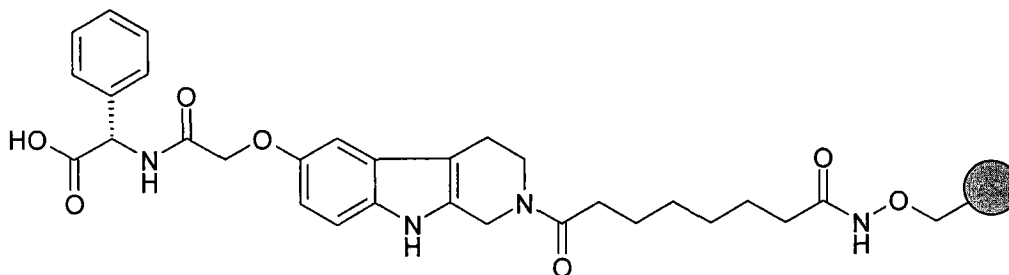


[0506] 用 2% TFA/DCM (3×10ml) 切除阶段 4 的树脂 (0.8g, 以 1.14mmol/g 加载, 0.91mmol)。滤液在室温下减压蒸发至干以得到油状残余物 (200mg), 该物质通过制备型

HPLC纯化以得到化合物(24),其为TFA盐。LCMS纯度95%, $m/z$  619 $[M^++H]^+$ , $^1H$  NMR(400MHz, DMSO),  $\delta$ : 1.05-1.66(16H, m,  $8\times CH_2$ ), 1.79(2H, m,  $CH_2$ ), 2.16-2.31(2H, m, 2.41-2.56(2H, m,  $CH_2$ ), 3.60(2H, m,  $CH_2$ ), 4.42(2H, s,  $CH_2$ ), 4.49(2H, s,  $CH_2$ ), 4.93(1H, m,  $CHOCO$ ), 5.28(1H, m,  $OCOCHPh$ ), 6.59(1H, d, Ar), 6.65(1H, s, Ar), 7.04(1H, d, Ar), 7.21(5H, m, Ar), 8.57(1H, m), 10.17(1H, s), 10.58(1H, s, Ar)。

[0507] 阶段6:环戊酯的皂化

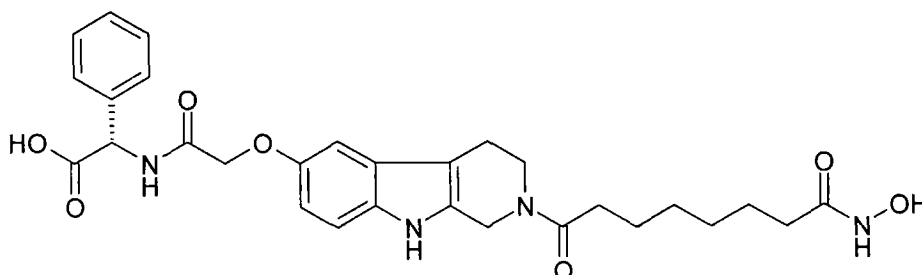
[0508]



[0509] 阶段4的树脂(1.0g,以1.14mmol/g加载,1.14mmol)按照阶段3中描述的过程皂化。

[0510] 阶段7:(S)-{2-[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H- $\beta$ -咔啉-6-基氧基]-乙酰氨基}-苯基-乙酸环戊酯(25)

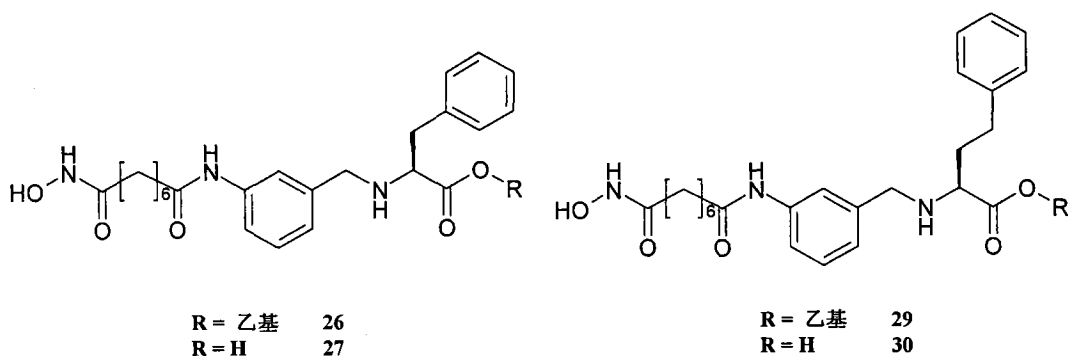
[0511]



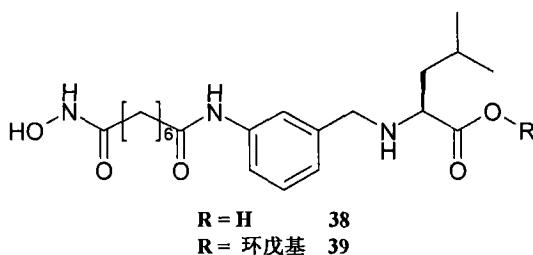
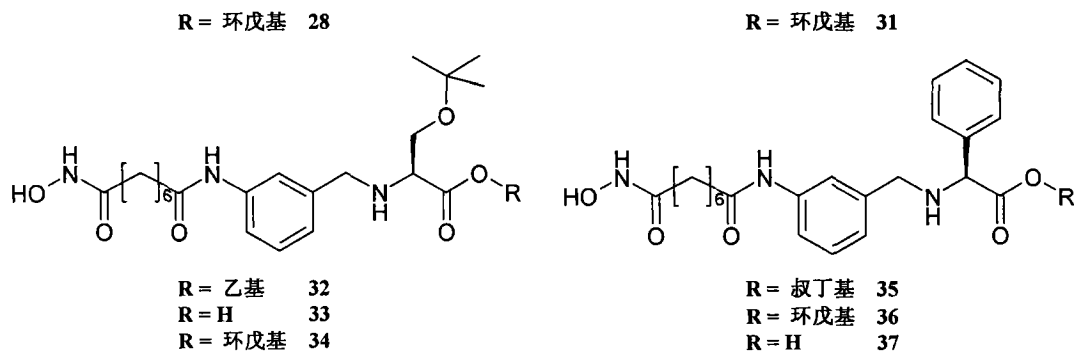
[0512] 将阶段6的树脂(1.0g,以1.14mmol/g加载,1.14mmol)切除并用阶段5中详细描述的过程纯化。化合物(25):LCMS纯度97%, $m/z$  551 $[M^++H]^+$ , $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.33-1.49(4H, m,  $2\times CH_2$ ), 1.58-1.75(4H, m,  $2\times CH_2$ ), 2.06-2.17(2H, m,  $CH_2$ ), 2.51-2.60(2H, m,  $CH_2$ ), 2.70-2.83(2H, m,  $CH_2$ ), 3.85-3.96(2H, m,  $CH_2$ ), 4.61(2H, m,  $CH_2$ ), 4.78(2H, m,  $CH_2$ ), 5.56(1H, s,  $OCOCHPh$ ), 6.89(1H, m, Ar), 7.00(1H, s, Ar), 7.26(1H, m, Ar), 7.35(5H, m, Ar)。

[0513] 合成图2的化合物,以化合物(26)和化合物(27)为例

[0514]



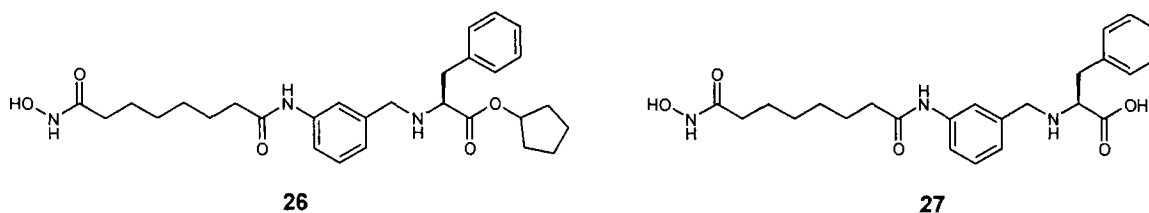
[0515]



[0516] 图 2

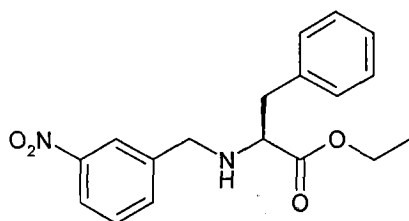
[0517] 合成化合物 (26) 和化合物 (27)

[0518]



[0519] 阶段 1 : (S)-2-(3-硝基-苄基氨基)-3-苯基-丙酸乙酯

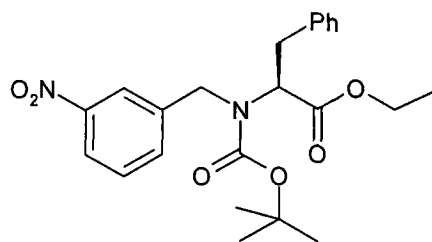
[0520]



[0521] 将 3-硝基苄基溴化物 (10.0g, 46mmol) 溶于 DMF (180ml) 并加入碳酸钾 (12.7g, 92mmol) 和 L-苯丙氨酸乙酯盐酸 (10.6g, 46mmol)。将反应物室温搅拌 17 小时, 然后蒸发至干。将残余物重溶于 EtOAc (150ml), 并用水 (3×80ml) 洗涤, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并浓缩

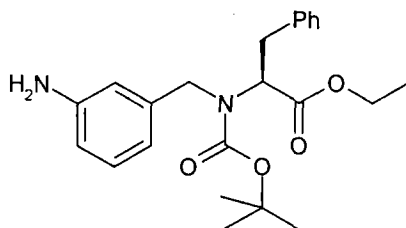
至干。通过快速柱层析 (30% EtOAc/ 己烷) 纯化后获得产物 (3.7g, 24% 产率)。LCMS 纯度 86%,  $m/z$  329  $[M^+ + H]^+$ 。

[0522] 阶段 2 : (S)-2-[叔丁氧基羰基-(3-硝基-苄基)-氨基]-3-苯基-丙酸乙酯  
[0523]



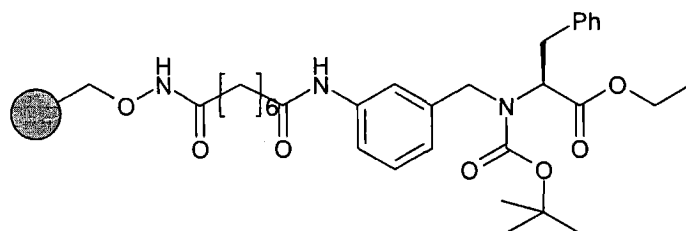
[0524] 将阶段 1 的胺 (13.4g, 40.9mmol) 溶于 THF (250ml), 然后加入碳酸钾 (8.46g, 61.4mmol) 和水 (150ml)。加入二碳酸二叔丁酯 (35.6, 163mmol) 并将反应混合物在 50°C 加热 18 小时。在所得混合物中加入 DCM, 用 0.1M HCl (150ml)、饱和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液和水 (150ml) 连续洗涤。将 DCM 层干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 过滤并浓缩至干。通过快速柱层析 (5% EtOAc/ 己烷) 纯化后将产物分离 (9.4g, 54% 产率)。LCMS 纯度 95%,  $m/z$  428  $[M^+ + H]^+$ 。

[0525] 阶段 3 : (S)-2-[3-氨基-苄基]-叔丁氧基羰基-氨基]-3-苯基-丙酸乙酯  
[0526]



[0527] 将阶段 2 的氨基甲酸酯 (4.92g, 11.5mmol) 溶于 EtOAc (150ml), 然后加入 Pd/C (10% 湿 (wet)) 催化剂 (0.8g) 并于室温在气球压力下氢化 18 小时。将反应混合物通过硅藻土垫过滤并蒸发至干以得到红色固体 (4.0g, 89% 产率)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  399  $[M^+ + H]^+$ 。

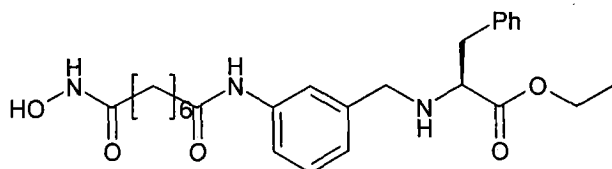
[0528] 阶段 4 : 偶联到树脂  
[0529]



[0530] 将用辛二酸衍生的羟胺 2-氯三苯甲基树脂 (0.39g, 以 0.83mmol/g 加载) 在 DMF (15ml) 中溶胀并加入 PyBOP (1.36g, 2.61mmol), 接着加入 DIPEA (1.5ml, 8.7mmol)。将阶段 3 的苯胺 (1.04g, 2.61mmol) 溶于 DCM (15ml) 并加到反应混合物中。将反应物室温振荡 24 小时。测试切除后的 LCMS 显示 86% 转化,  $m/z$  570  $[M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤, 并用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0531] 阶段 5 : (S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-3-苯基-丙酸乙酯 (26)

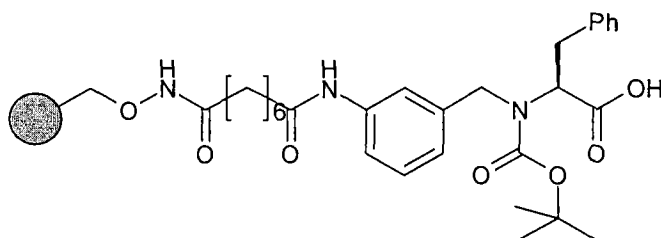
[0532]



[0533] 阶段 4 的树脂 (1.3g, 以 0.83mmol/g 加载) 在 2% TFA/DCM(10ml) 中温和振荡 20 分钟。将树脂过滤。滤液在室温下减压蒸发。树脂用 2% TFA/DCM(10ml) 重新处理, 20 分钟后过滤。合并的滤液在室温下减压蒸发至干以得到油状残余物。使残余物在 20% TFA/DCM 中静置 40 分钟。同样在室温下减压蒸发至干后, 将粗产物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (26)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  470  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.08(3H, t,  $CH_3$ ), 1.35-1.45(4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.60-1.80(4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.10(2H, t,  $CH_2$ ), 2.40(2H, t,  $CH_2$ ), 3.13(1H, dd,  $PhCHH$ ), 3.40(1H, dd,  $PhCHH$ ), 4.11(2H, q,  $CH_2CH_3$ ), 4.14-4.22(3H, m), 7.20-7.48(8H, m, Ar), 7.92(1H, s, Ar)。

[0534] 阶段 6: 皂化

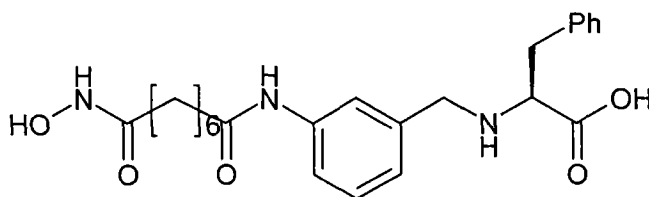
[0535]



[0536] 将阶段 4 的树脂 (1.4g, 以 0.83mmol/g 加载) 悬浮于 THF(8.6ml) 和甲醇 (8.6ml) 并加入 1.4M 氢氧化钠溶液 (8.6ml, 5.98mmol)。将混合物振荡 24 小时, 然后测试切除显示 83% 转化成所需的酸,  $m/z$  541  $[M^+ + H]$  将树脂过滤并用水  $\times 2$  和 MeOH  $\times 2$  洗涤, 然后通过标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0537] 阶段 7: (S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-3-苯基-丙酸 (27)

[0538]



[0539] 将阶段 6 的树脂 (1.44g, 以 0.83mmol/g 加载) 在 2% TFA/DCM(10ml) 中温和振荡 20 分钟。将树脂过滤。滤液在室温下减压蒸发。树脂用 2% TFA/DCM(10ml) 重新处理, 20 分钟后过滤。合并的滤液在室温下减压蒸发至干以得到油状残余物。使残余物在 20% TFA/DCM 中静置 40 分钟。在室温下减压蒸发至干后, 将粗产物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (27)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  442  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.35-1.48(4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.60-1.78(4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.10(2H, t,  $CH_2$ ), 2.40(2H, t,  $CH_2$ ), 3.20(1H, dd,  $PhCHH$ ), 3.28(1H, dd,  $PhCHH$ ), 3.90(1H, t,  $OCOCH$ ), 4.14(2H, m), 7.15(1H, d, Ar), 7.26(6H, m, Ar), 7.51(1H, d, Ar), 7.73(1Hs, Ar)。

[0540] 以下化合物按照为化合物 (26) 和化合物 (27) 描述的方法制备

[0541] (S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-3-苯基-丙酸环戊酯 (28)

[0542] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  510 $[M^+H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.00–1.61 (16H, m,  $8 \times CH_2$ ), 1.90 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.20 (2H, d,  $CH_2$ ), 2.90 (1H, dd, PhCHH), 3.20 (1H, dd, PhCHH), 4.00–4.11 (3H, m), 4.91 (1H, m), 7.00–7.25 (8H, m, Ar), 7.75 (1H, s, Ar)。

[0543] (S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-4-苯基-丁酸乙酯 (29)

[0544] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  484 $[M^+H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.23–1.29 (7H, m,  $CH_3$ ,  $2 \times CH_2$ ), 1.53 (2H, t,  $CH_2$ ), 1.62 (2H, t,  $CH_2$ ), 1.99 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.11–2.16 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.28 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.53–2.61 (1H, m, CH), 2.65–2.76 (1H, m, CH), 3.80–3.90, (1H, m,  $CHCO_2Et$ ), 4.05 (2H, s,  $CH_2$ ), 4.21 (2H, q,  $CH_2$ ), 7.05–7.15 (4H, m, Ar), 7.15–7.22 (2H, m, Ar), 7.25–7.39 (2H, m, Ar), 7.75 (1H, s, Ar)。

[0545] (S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-4-苯基-丁酸 (30)

[0546] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  456 $[M^+H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.27–1.32 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.53 (2H, t,  $CH_2$ ), 1.62 (2H, t,  $CH_2$ ), 1.99 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.11–2.16 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.29 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.57–2.64 (1H, m, CH), 2.69–2.77 (1H, m, CH), 3.84–3.87 (1H, m,  $CHCO_2H$ ), 4.12 (2H, q,  $CH_2$ ), 7.09–7.11 (4H, m, Ar), 7.16–7.20 (2H, m, Ar), 7.27–7.35 (2H, m, Ar), 7.78 (1H, s, Ar)。

[0547] (S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-4-苯基-丁酸环戊酯 (31)

[0548] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  524 $[M^+H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400 MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.20–1.35 (4H, m), 1.45–1.62 (10H, m), 1.85 (2H, m), 2.00 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.10 (2H, m), 2.28 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.55 (1H, m), 2.68 (1H, m), 3.88 (1H, t,  $OCOCHNH$ ), 4.11 (2H, s,  $CH_2Ph$ ), 5.24 (1H, m), 7.02–7.12 (4H, m, Ar), 7.18 (2H, m, Ar), 7.30 (2H, m, Ar), 7.80 (1H, s, Ar)。

[0549] (S)-3-叔丁氧基-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-丙酸乙酯 (32)

[0550] LCMS 纯度 90%,  $m/z$  466 $[M^+H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.25 (9H, s,  $C(CH_3)_3$ ), 1.35 (3H, t,  $CH_2CHH_3$ ), 1.35–1.45 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.62–1.76 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.12 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.40 (2H, t,  $CH_2$ ), 3.89 (1H, m), 3.98 (1H, m), 4.20–4.40 (5H, m), 7.25 (1H, d, Ar), 7.39–7.50 (2H, m, Ar), 7.90 (1H, s, Ar)。

[0551] (S)-3-叔丁氧基-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-丙酸 (33)

[0552] LCMS 纯度 86%,  $m/z$  438 $[M^+H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.20 (9H, s,  $C(CH_3)_3$ ), 1.38 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.57–1.75 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.10 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.39 (2H, t,  $CH_2$ ), 3.78–3.85 (3H, m), 4.26 (2H, s,  $CH_2Ph$ ), 7.21 (1H, d, Ar), 7.39 (1H, t, Ar), 7.50 (1H, d, Ar), 7.80 (1H, s, Ar)。

[0553] (S)-3-叔丁氧基-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-丙酸环戊酯 (34)

[0554] LCMS 纯度 94%,  $m/z$  506 $[M^+H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.25 (9H, s,  $C(CH_3)_3$ ), 1.33–1.50 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.60–2.00 (12H, m), 2.13 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.42 (2H, t,  $CH_2$ ), 3.83–4.00 (2H, m), 4.18 (1H, m), 4.28 (2H, s,  $CH_2Ph$ ), 5.35 (1H, m), 7.25 (1H, m, Ar), 7.45 (2H, m, Ar), 7.90 (1H, s, Ar)。

[0555] (S)-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-苯基-乙酸叔丁酯 (35)

[0556] LCMS 纯度 97%,  $m/z$  484 $[M^+H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.130 (13H, m,  $2 \times CH_2$ ,

$C(CH_3)_3$ ), 1.45–1.65 (4H, m,  $CH_2 \times 2$ ), 1.93–2.05 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.20–2.40 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.99 (2H, q,  $CH_2$ ), 4.65–4.95 (1H, m, CH, 掩蔽的信号) 7.05 (1H, d, Ar), 7.25–7.33 (2H, m, Ar), 7.35–7.50 (5H, m, Ar), 7.75 (1H, s, Ar)。

[0557] (S)-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-苯基-乙酸环戊酯 (36)

[0558] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  496  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.30–1.70 (16H, m,  $8 \times CH_2$ ), 2.00 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.30 (2H, t,  $CH_2$ ), 4.05 (2H, dd,  $CH_2NH$ ), 5.00 (1H, m,  $OCOCHPh$ ), 5.15 (1H, m,  $CHOCO$ ), 7.05 (1H, m, Ar), 7.30 (2H, m, Ar), 7.40 (5H, m, Ar), 7.75 (1H, m, Ar)。

[0559] (S)-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-苯基-乙酸 (37)

[0560] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  428  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.20–1.35 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.50–1.65 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.00 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.30 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.00 (2H, dd,  $CH_2NH$ ), 4.90 (1H, m,  $OCOCHPh$ ), 7.05 (1H, m, Ar), 7.25–7.50 (7H, m, Ar), 7.70 (1H, m, Ar)。

[0561] (S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-4-甲基-戊酸 (38)

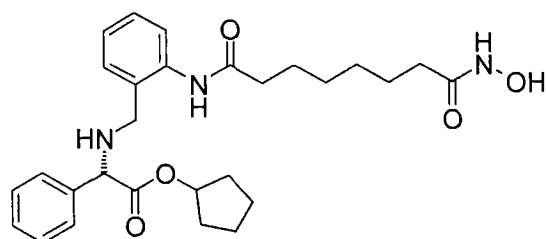
[0562] LCMS 纯度 91%,  $m/z$  408  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 0.78 (3H, d,  $J = 6.6$ Hz,  $CH_3$ ), 0.84Hz (3H, d,  $J = 6.6$ Hz,  $CH_3$ ), 1.26–1.40 (6H, m, 烷基), 1.49–1.70 (5H, m,  $CH + 2 \times CH_2$ ), 1.95 (2H, t,  $J = 7.32$ ,  $CH_2$ ), 2.25 (2H, t,  $J = 7.36$ ,  $CH_2$ ), 3.00 (1H, t,  $J = 6.88$ Hz,  $NHCHCO$ ), 3.42 (1H, d,  $J = 12.7$ Hz, CH), 3.68 (1H, d,  $J = 12.5$ Hz, CH), 7.00 (1H, d,  $J = 7.6$ Hz, Ar), 7.15 (1H, t,  $J = 7.8$ Hz, Ar), 7.30 (1H, s, Ar), 7.47 (1H, br d, Ar)

[0563] (S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-4-甲基-戊酸环戊酯 (39)

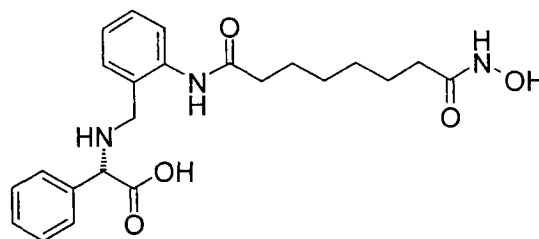
[0564] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  476  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 0.85–0.95 (6H,  $2 \times$  d,  $2 \times CH_3$ ), 1.30 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.50–1.70 (13H, m, 烷基), 1.75 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.00 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.30 (2H, t,  $CH_2$ ), 3.90 (1H,  $NHCHCO$ ), 4.10 (2H, q,  $CH_2$ ), 5.25, (1H, m, CH), 7.10 (1H, d, Ar), 7.30 (2H, m), 7.80 (1H, s, Ar)

[0565] 合成化合物 (40) 和化合物 (41)

[0566]



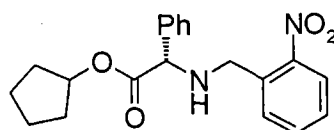
40



41

[0567] 阶段 1: (S)-(2-硝基-苄基氨基)-苯基-乙酸环戊酯

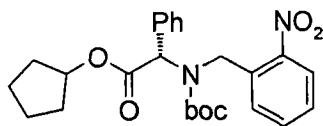
[0568]



[0569] 将 DMF (300ml) 中的 2-硝基苄基溴化物 (15g, 69.4mmol)、L-苯基甘氨酸环戊酯甲磺酸盐 (27.2g, 69.4mmol) 和碳酸钾 (19.2g, 138.8mmol) 的混合物室温搅拌 18 小时。反应混合物用 EtOAc (300ml) 稀释并用水 ( $3 \times 200$ ml) 洗涤。将 EtOAc 层分离, 干燥 ( $Na_2SO_4$ ),

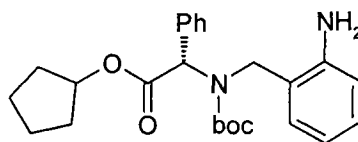
过滤并浓缩至干得到橙色油状物。分离出 24 克粗产物。LCMS 纯度 81%,  $m/z$  355  $[M^+ + H]^+$ 。该产物无需进一步纯化即可使用

[0570] 阶段 2 : (S)-[叔丁氧基羰基-(2-硝基-苄基)-氨基]-苯基-乙酸环戊酯  
[0571]



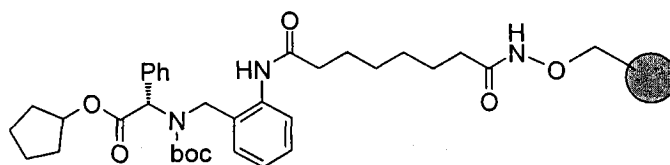
[0572] 在 (S)-(2-硝基-苄基氨基)-苯基-乙酸环戊酯 (24.4g, 69.1mmol) 的 THF (150ml) 溶液中加入  $K_2CO_3$  (7.6g, 69.1mmol), 然后加入二碳酸二叔丁酯 (30.1g, 138.1mmol)。加水 (150ml), 再加入二碳酸二叔丁酯 (45.1g, 206.6mmol), 并将反应物室温搅拌 8 天。将反应混合物蒸发至干。残余物重溶于 EtOAc (300ml), 用 0.1M HCl (150ml)、饱和  $NaHCO_3$  水溶液和水 (150ml) 洗涤。将 EtOAc 层干燥 ( $Na_2SO_4$ ), 过滤并浓缩至干得到黄色油状物。通过柱层析 (20% EtOAc/己烷) 纯化后获得澄清的黄色油状产物 (15g, 48% 产率)。

[0573] 阶段 3 : (S)-[ (2-氨基-苄基)-叔丁氧基羰基-氨基]-苯基-乙酸环戊酯  
[0574]



[0575] 室温下, 将 EtOAc (130ml) 中的阶段 2 的氨基甲酸酯 (4.44g, 9.78mmol) 和 10% Pd/C (0.7g) 的混合物在气球压力下氢化 18 小时。通过硅藻土垫滤去 Pd/C 催化剂。将滤液减压浓缩以得到白色固体 (4.25g)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  425  $[M^+ + H]^+$ ,

[0576] 阶段 4 : 偶联阶段 3 的苯胺  
[0577]

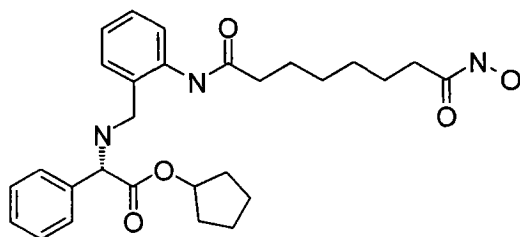


[0578] 将用辛酸衍生的羟胺 2-氯三苯甲基树脂 (1.6g, 以 0.83mmol/g 加载) 在无水 DCM (100ml) 中溶胀。0 °C 在氮气下加入 1-氯-N,N-2-三甲基丙烯胺 (Ghosez 试剂)<sup>1</sup> (0.56ml, 3.3mmol, 3eq)。使混合物回复室温并温和振荡 1-2 小时。在 20 分钟内分批加入阶段 3 的苯胺 (1.4g, 3.3mmol, 3eq)。加入  $Et_3N$  (0.76ml, 4.4mmol, 4eq)。将混合物振荡 1 小时。测试切除后的 LCMS 显示有 97% 转化,  $m/z$  596  $[M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤, 并用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0579] 1. Ghosez 等, J. C. S. Chem. Comm., 1979, 1180。

[0580] 阶段 5 : (S)-[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-苯基-乙酸环戊酯 (40)

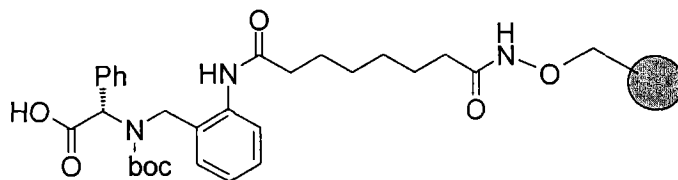
[0581]



[0582] 将阶段 4 的树脂 (1.34g, 以 0.83mmol/g 加载) 在 2% TFA/DCM(10ml) 中温和振荡 20 分钟。将树脂过滤。收集滤液并在室温下减压蒸发。树脂用 2% TFA/DCM(10ml) 重新处理, 20 分钟后过滤。合并的滤液在室温下减压蒸发至干以得到残余物。使残余物在 20% TFA/DCM 中静置 40 分钟。同样在室温下减压蒸发至干后, 将粗产物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 40, 其为 TFA 盐, LCMS 纯度 100%,  $m/z$  496  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.40-2.00 (16H, m,  $8 \times CH_2$ ), 2.15 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.45 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.95 (1H, d,  $CH_2NH$ ), 4.20 (1H, d,  $CH_2NH$ ), 5.20 (1H, m,  $OCOCHPh$ ), 5.35 (1H, m,  $CHOCO$ ), 7.25 (1H, m, Ar), 7.40 (1H, m, Ar), 7.50-7.60 (7H, m, Ar)。

[0583] 阶段 6 : 皂化

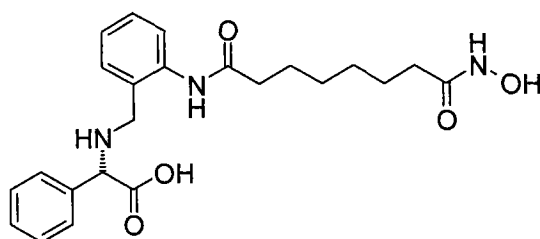
[0584]



[0585] 将阶段 4 的树脂 (2.0g, 以 0.83mmol/g 加载, 2.35mmol) 悬浮于 MeOH(6.1) 和 THF(6.1ml)。加入 2.7N NaOH(水溶液, 6.1ml)。将混合物振荡 5 天。测试切除后的 LCMS 证实反应完全,  $m/z$  528  $[M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤并用水  $\times 2$  和 MeOH  $\times 2$  洗涤, 然后通过标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0586] 阶段 7 : (S)-[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-苯基-乙酸化合物 (41)

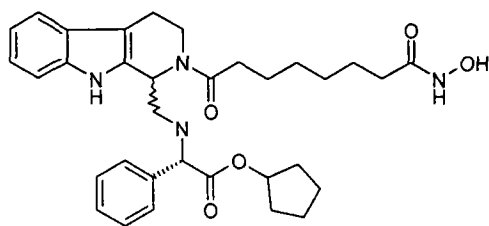
[0587]



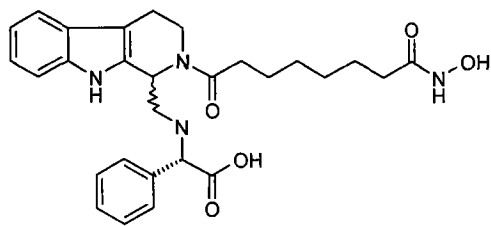
[0588] 将阶段 6 的树脂 (2.0g, 以 0.83mmol/g 加载) 切除并用阶段 5 中列出的方法进行 boc 去保护。粗产物通过制备型 HPLC 纯化得到化合物 (41), 其为 TFA 盐。LCMS 纯度 98%,  $m/z$  428  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.25-1.35 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.50-1.65 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.00 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.30 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.80 (1H, d,  $CH_2NH$ ), 4.10 (1H, d,  $CH_2NH$ ), 5.00 (1H, m,  $OCOCHPh$ ), 7.10 (1H, m, Ar), 7.30 (1H, m, Ar), 7.40-7.50 (7H, m, Ar)。

[0589] 合成化合物 (42) 和化合物 (43)

[0590]



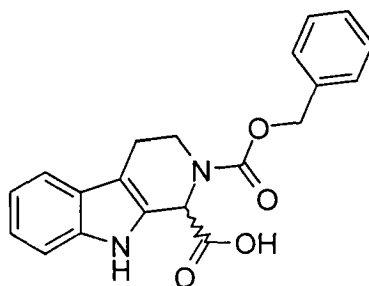
42



43

[0591] 阶段 1 : 1,3,4,9-四氢-β-咔啉-1,2-二羧酸 2-苄基酯

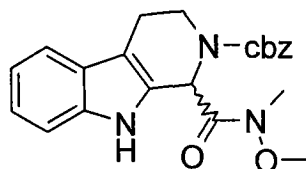
[0592]



[0593] 将 1,2,3,4-四氢-β-咔啉-1-羧酸 (5g, 23.1mmol) 在二噁烷 (25ml) 和 2M NaOH (23ml, 46mmol) 中的溶液冷却至 0℃。缓慢加入氯甲酸苄酯 (3.95ml, 27mmol)。室温搅拌 1 小时后再加入氯甲酸苄酯 (1.4ml, 9.5mmol)。2.5 小时后用醚洗涤反应混合物。将含水层酸化至 pH2 并用 DCM 萃取, 干燥 (MgSO<sub>4</sub>), 过滤并蒸发至干, 得到第一批黄色固体, 其 LCMS 纯度为 79%, m/z 351 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。最初的一批无需进一步纯化即可使用。将醚层浓缩后获得第二批材料从而得到进一步的粗产物。该粗材料通过快速层析纯化, 用 DCM 到 20% 2M 甲醇 NH<sub>3</sub>/80% DCM 洗脱, 得到进一步的 Cbz-保护的化合物 (产率 49%), 其 LCMS 纯度为 82%, m/z 351 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。

[0594] 阶段 2 : 1-(甲氧基-甲基-氨甲酰基)-1,3,4,9-四氢-β-咔啉-2-羧酸苄基酯

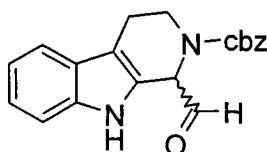
[0595]



[0596] 将 1,3,4,9-四氢-β-咔啉-1,2-二羧酸 2-苄基酯 (3g, 8.4mmol) 溶于无水 DCM (30ml) 并加入三乙胺 (5.22ml, 37.8mmol)。在此溶液中加入 HOBT (2.848g, 21.4mmol)、EDCI (4.08g, 21.4mmol) 和 N, O-二甲基羟胺盐酸盐 (1.86g, 19.1mmol)。室温搅拌 2 小时后将反应混合物蒸发至干, 重溶于 EtOAc 并用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液 (2×100ml) 和水 (50ml) 洗涤。将 EtOAc 层干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并蒸发至干。通过柱层析纯化, 用 DCM 到 3% 甲醇 /DCM 洗脱, 得到所需的 Weinreb 酰胺 (产率 40%)。LCMS 纯度 85%, m/z 394 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。

[0597] 阶段 3 : 1-甲酰-1,3,4,9-四氢-β-咔啉-2-羧酸苄基酯

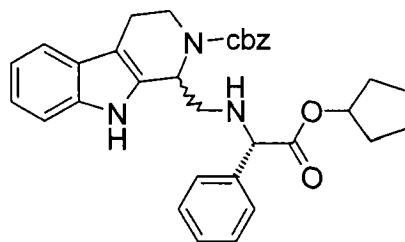
[0598]



[0599] 氮气下将 1,3,4,9-四氢-β-咔啉-1,2-二羧酸 2-苄基酯 (3.7mg, 9.4mmol) 的 THF (100ml) 溶液冷却至 -78℃。在 2 小时内加入 1.5M DIBAL 的甲苯溶液 (31.2ml, 47mmol)。搅拌 4 小时后用甲醇和水淬灭反应混合物, 萃入 EtOAc 并用稀 HCl 水溶液洗涤。有机层用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并蒸发至干。LCMS 纯度 50%, m/z 335[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。该材料无需进一步纯化便可用于下一阶段。

[0600] 阶段 4: 1-[[[(S)-环戊氧基羰基-苄基-甲基]-氨基]-甲基]-1,3,4,9-四氢-β-咔啉-2-羧酸苄基酯

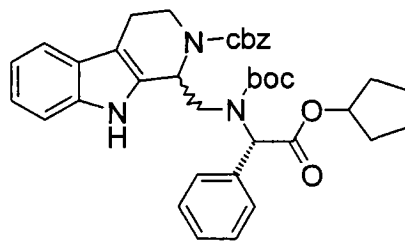
[0601]



[0602] 将 IPA (100ml) 中的 1-甲酰-1,3,4,9-四氢-β-咔啉-2-羧酸苄基酯 (1g, 3mmol)、乙酸钠 (0.68g, 87.4mmol)、L-苯基甘氨酸环戊酯甲苯磺酸盐 (1.16g, 3mmol)、氰基硼氢化钠 (0.26g, 4.2mmol) 和分子筛的混合物室温搅拌 1 小时。将反应混合物蒸发至干, 重溶于 EtOAc 并依次用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液和盐水洗涤。将 EtOAc 层用 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并蒸发至干。LCMS 纯度为 39%, m/z 538[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。粗材料无需进一步纯化便可用于下一阶段。

[0603] 阶段 5: 1-[[叔丁氧基羰基-[(S)-环戊氧基羰基-苄基-甲基]-氨基]-甲基]-1,3,4,9-四氢-β-咔啉-2-羧酸苄基酯

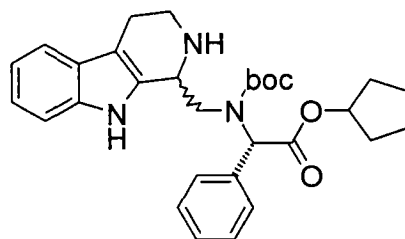
[0604]



[0605] 边搅拌边在阶段 4 的胺 (1.08g, 2.0mmol) 的 THF (20ml) 溶液中加入碳酸钾 (0.42g, 3.0mmol) 和二碳酸二叔丁酯 (1.75g, 8.0mmol)。将反应混合物在 50℃ 搅拌 96 小时, 冷却至室温, 用 DCM (50ml) 稀释并用 0.1M HCl 溶液 (25ml)、饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液 (2×25ml) 和水 (15ml) 洗涤。将 DCM 层用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并蒸发至干。用 10% EtOAc/庚烷通过柱层析纯化得到产物 (0.89g 70% 产率)。LCMS 纯度为 79%, m/z 638[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。

[0606] 阶段 6: (S)-[叔丁氧基羰基-(2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-1-基甲基)-氨基]-苄基-乙酸环戊酯

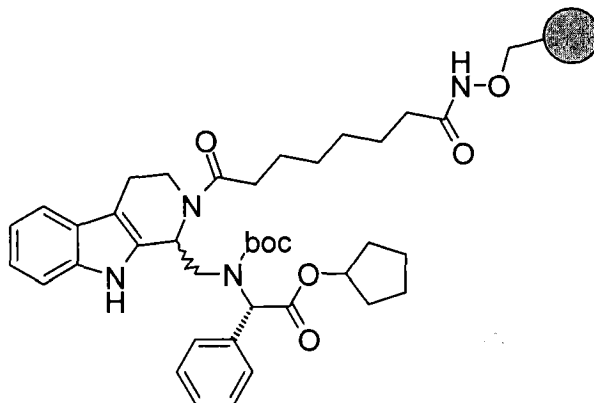
[0607]



[0608] 氢气下,在存在 10% Pd/C(0.4g) 时将阶段 5 的二氨基甲酸酯 (0.5g,0.78mmol) 的乙醇 (40ml) 溶液在气球压力下搅拌 2 小时。将反应混合物通过硅藻土垫过滤并蒸发至干得到所需产物 (0.35g,90%),91% 纯度 (LCMS),  $m/z$  504  $[M^+ + H]^+$ 。

[0609] 阶段 7:偶联阶段 6 的胺

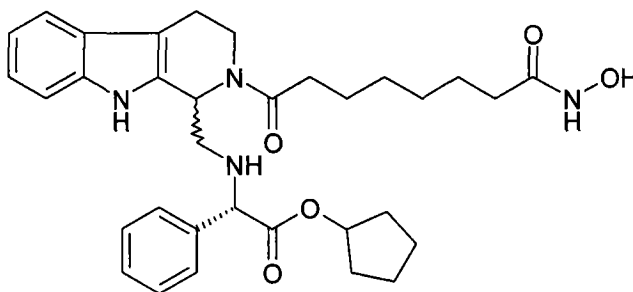
[0610]



[0611] 将用辛酸衍生的羟胺 2-氯三苯甲基树脂 (703mg, 以 0.83mmol/g 加载) 在 DCM(12ml) 中溶胀。加入 PyBOP(912mg, 1.75mmol), 然后加入阶段 6 的胺 (325mg, 0.64mmol) 和 DIPEA(1.01ml, 5.8mmol)。将反应混合物振荡 18 小时。测试切除后材料的 LCMS 显示 80% 转化。  $m/z$  675  $[M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤,并用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0612] 阶段 8: (S)-{[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-1-基甲基]-氨基}-苯基-乙酸环戊酯 (42)

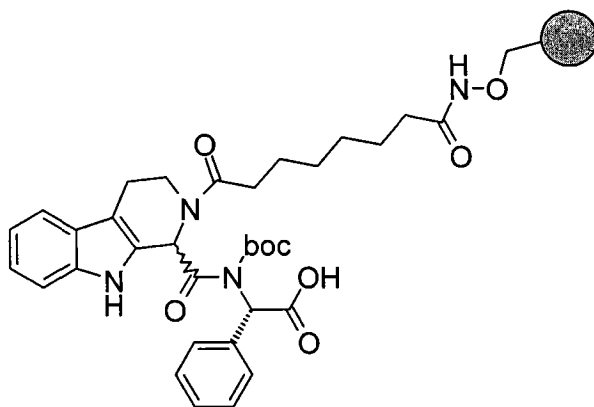
[0613]



[0614] 将阶段 7 的树脂 (135mg, 以 0.83mmol/g 加载) 在 2% TFA/DCM(10ml) 中温和振荡 20 分钟。将树脂过滤。滤液在室温下减压蒸发。树脂用 2% TFA/DCM(10ml) 重新处理,20 分钟后过滤。合并的滤液在室温下减压蒸发至干以得到油状残余物。使残余物在 20% TFA/DCM 中静置 40 分钟。同样在室温下减压蒸发至干后,将粗产物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (42), 其为 TFA 盐, LCMS 纯度 91%,  $m/z$  575  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.30-1.70 (16H, m,  $8 \times CH_2$ ), 2.00 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.50 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.75 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.30-3.50 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.15 (1H, m,  $CH_2CH$ ), 4.80 (2H, m,  $CH_2NH$ , 掩蔽的信号), 5.25 (1H, m,  $CHOCO$ ), 6.00 (1H, m,  $OCOCHPh$ ), 6.90 (1H, m, Ar), 7.00 (1H, m, Ar), 7.20 (1H, m, Ar), 7.30 (1H, m, Ar), 7.45 (5H, m, Ar)。

[0615] 阶段 9:环戊酯的皂化

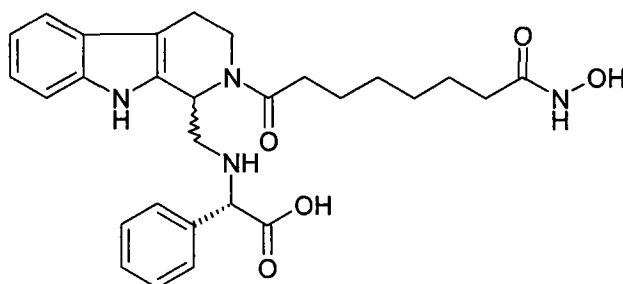
[0616]



[0617] 将阶段 7 的树脂 (395mg, 以 0.83mmol/g 加载) 悬浮于 THF (1.5ml) 和甲醇 (1.5ml) 并加入 1.4M 氢氧化钠水溶液 (1.17ml, 1.6mmol)。将混合物振荡 8 天。测试切除显示 86% 转化成酸,  $m/z$  607  $[M^+ + H]$ 。将树脂过滤并用水  $\times 2$  和 MeOH  $\times 2$  洗涤, 然后通过标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0618] 阶段 10 : (S)-{[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H- $\beta$ -咔啉-1-基甲基]-氨基}-苯基-乙酸 (43)

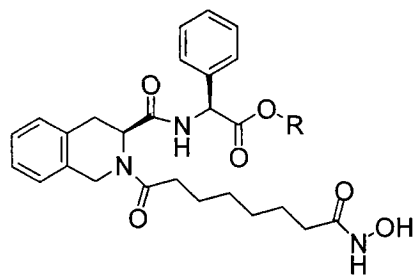
[0619]



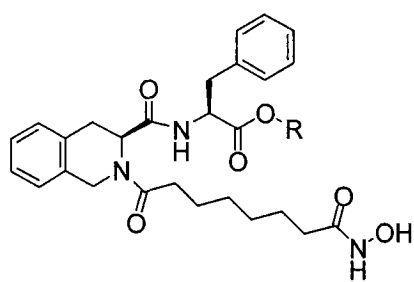
[0620] 将阶段 9 的树脂 (100mg, 以 0.83mmol/g 加载) 切除并用为化合物 (42) 列出的过程进行 boc 去保护。通过制备型 HPLC 纯化得到化合物 (43), 其为 TFA 盐, LCMS 纯度 96%,  $m/z$  507  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.25-1.40 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.50-1.65 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.00 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.50 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.70 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.40 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.15 (1H, m,  $CH_2CH$ ), 4.80 (2H, m,  $CH_2NH$ , 掩蔽的信号), 6.00 (1H, m,  $OCOCHPh$ ), 6.90 (1H, m, Ar), 7.00 (1H, m, Ar), 7.20 (1H, m, Ar), 7.30-7.50 (6H, m, Ar)。

[0621] 合成图 3 的化合物, 以化合物 (44) 和化合物 (45) 为例

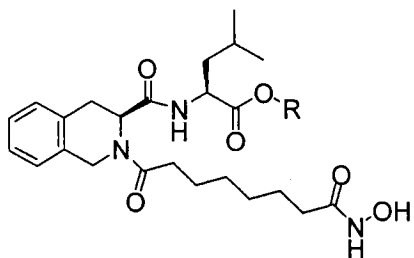
[0622]



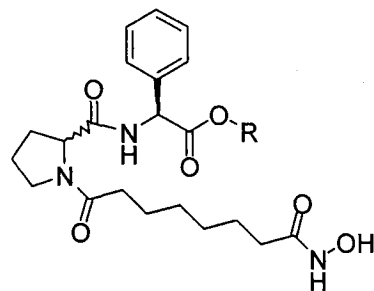
R = 环戊基 44  
R = H 45  
R = Et 46



R = 乙基 47  
R = 环戊基 48  
R = H 49

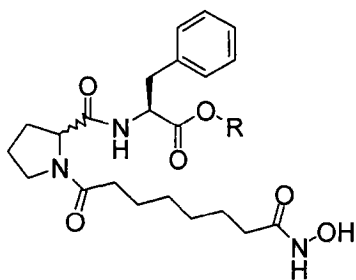


R = 乙基 50  
R = 环戊基 51  
R = H 52

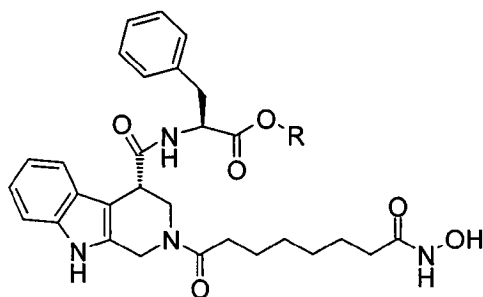


R = 环戊基 53  
R = H 54

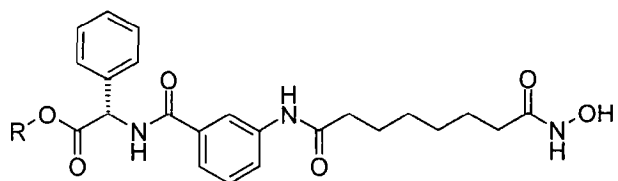
[0623]



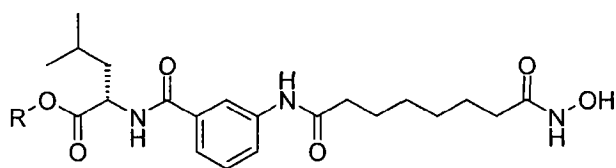
R = 乙基 55  
R = 环戊基 56  
R = H 57



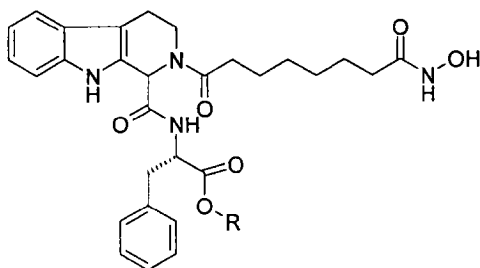
R = 乙基 58  
R = H 59



R = 环戊基 60  
R = H 61



R = 环戊基 62  
R = H 63



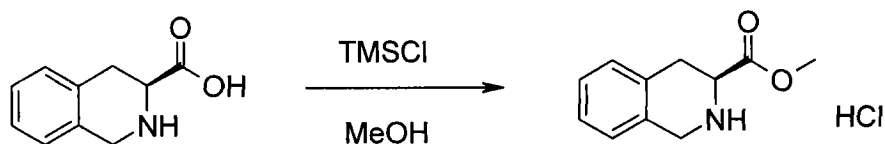
R = 环戊基 64  
R = H 65

[0624] 图 3

[0625] 制备结构单元 H-L

[0626] 结构单元 H

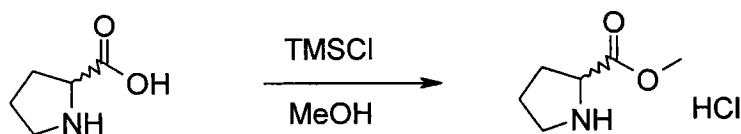
[0627]



[0628] 将 (S)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸 (10g, 56mmol)、TMSCl (39ml, 310mmol) 和甲醇 (500ml) 一起回流 (在 70℃) 2 小时。将反应混合物蒸发至干, LCMS 分析表明 100% 转化成 (S)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羧酸甲酯,  $m/z$  192  $[M^+ + H]^+$ 。

[0629] 结构单元 I

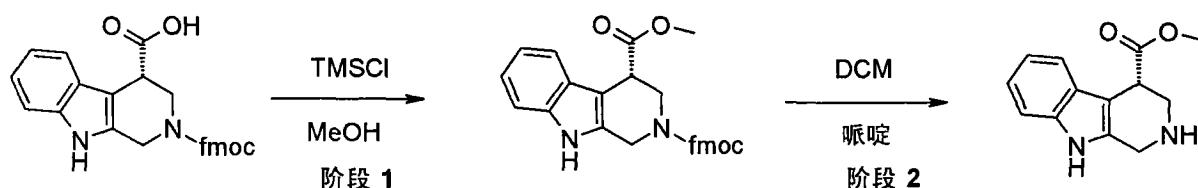
[0630]



[0631] 将 DL-脯氨酸 (10g, 87mmol)、TMSCl (51ml, 430mmol) 和甲醇 (500ml) 一起回流 2 小时 (在 70℃)。将反应混合物蒸发至干, LCMS 分析显示 100% 转化成所需产物吡咯烷-2-羧酸甲酯,  $m/z$  130  $[M^+ + H]^+$ 。

[0632] 结构单元 J

[0633]

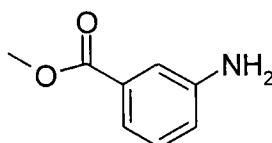


[0634] 阶段 1 和 2

[0635] 将 (R)-2-Fmoc-1,2,3,4-四氢去甲哈尔满 (norharmane)-3-羧酸 (2.0g, 9.25mmol) 加入 TMSCl (6ml, 47.17mmol) 的甲醇 (100ml) 溶液并加热回流 2 小时。将反应混合物蒸发至干以得到 1.7g 产物 (LCMS 显示 100% 转化,  $m/z$  453  $[M^+ + H]^+$ )。用 20% 哌啶的 DCM 溶液 (100ml) 处理阶段 1 的酯 (1.7g) 30 分钟以有效除去 fmoc。将粗制反应混合物蒸发至干, 溶于 DCM 并用饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液洗涤。将 DCM 层分离, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 过滤并浓缩至干。用 3% MeOH/DCM 通过柱层析纯化以得到 (S)-2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-4-羧酸甲酯。LCMS 100%,  $m/z$  231  $[M^+ + H]^+$ 。

[0636] 结构单元 K

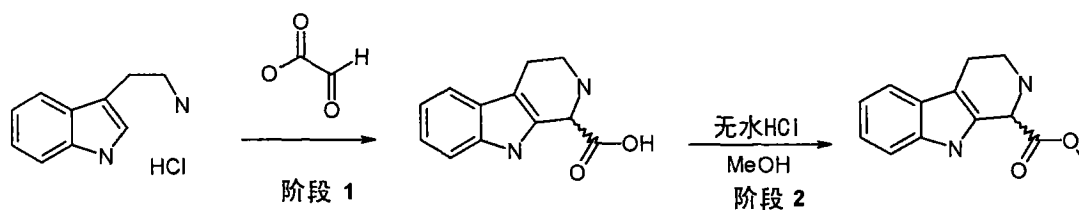
[0637]



[0638] 3-氨基苯甲酸甲酯获自市售原料

[0639] 结构单元 L

[0640]



[0641] 阶段 1

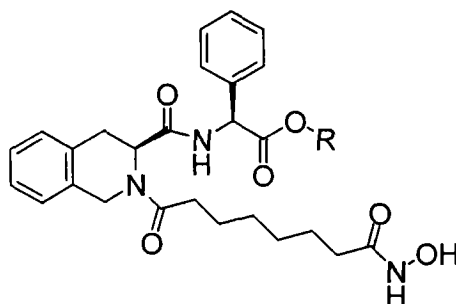
[0642] 边搅拌边在盐酸色胺 (3.0g, 15.3mmol) 的水 (200ml) 溶液中加入乙醛酸单水合物 (1.51g, 16.4mmol) 的水 (10ml) 溶液。加入 KOH (0.827g, 14.7mmol) 的水 (10ml) 溶液。将反应混合物室温搅拌 1 小时, 之后发生随时间沉淀。减压过滤后收集白色沉淀并用水洗涤以得到 2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-1-羧酸, 产量为 1.9g (58%) ;  $m/z$  217  $[M^+ + H]^+$ 。

[0643] 阶段 2

[0644] 1,2,3,4-四氢-β-咔啉-1-羧酸 (7.4g) 的 MeOH (250ml) 溶液用 HCl 气体饱和 20 分钟。将反应混合物在室温温和搅拌 18 小时。反应混合物再用 HCl 气体处理并再搅拌 18 小时。反应完成后将混合物真空浓缩以得到结构单元 L, LCMS 纯度 95%,  $m/z$  231  $[M^+ + H]^+$ 。产物 (2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-1-羧酸甲酯) 无需进一步纯化即可使用。

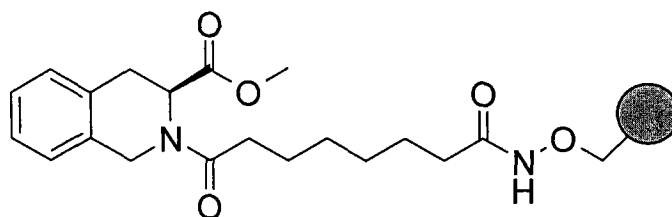
[0645] 合成图 3 列出的化合物, 以化合物 (44, R = 环戊基) 和化合物 (45, R = H) 为例

[0646]



[0647] 阶段 1 : 将胺加载到树脂上

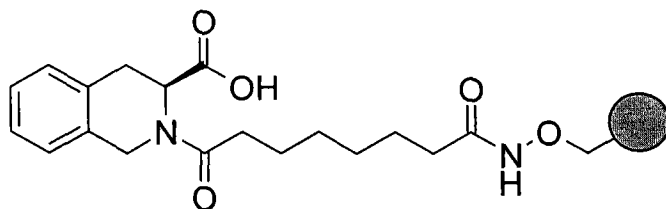
[0648]



[0649] 将用辛酸衍生的羟胺 2-氯三苯甲基树脂 (6.6g, 以 0.83mmol/g 加载) 在无 DCM (65ml) 中溶胀。加入 PyBOP (8.6g, 16.43mmol)、胺结构单元 A (3.7g, 16.43mmol) 和 DIPEA (9.5ml, 58.4mmol)。将反应物室温振荡 24 小时。测试切除材料的 LCMS 显示反应完全。将树脂过滤, 并用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0650] 阶段 2 : 甲酯的皂化

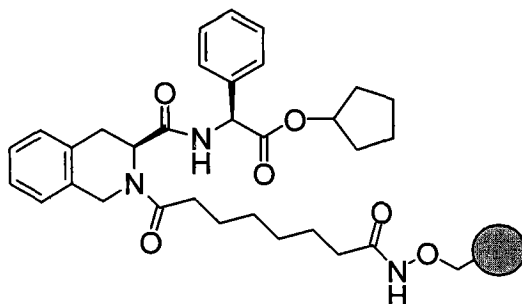
[0651]



[0652] 将结合树脂的阶段 1 的酯 (6.95g, 以 0.83mmol/g 加载) 悬浮于 THF (25ml) 和甲醇 (25ml)。加入 1.4M 的氢氧化钠水溶液 (25ml)。将混合物振荡 48 小时, 24 小时后再加入氢氧化钠 (25ml)。测试切除材料的 LCMS 显示 65% 转化成酸。m/z 349 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。将树脂过滤并用水 ×2 和 MeOH ×2 洗涤, 然后通过标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0653] 阶段 3 : 与 L-苯基甘氨酸环戊酯偶联

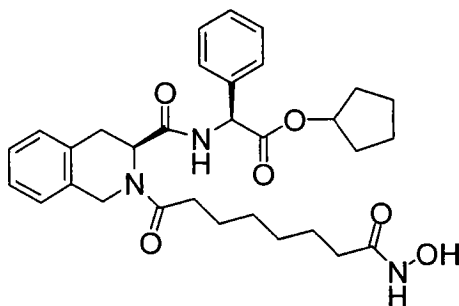
[0654]



[0655] 在无水 DCM (25ml) 中溶胀结合树脂的阶段 2 的羧酸 (2.2g, 以 0.83mmol/g 加载)。加入 PyBOP (2.85g, 5.48mmol)、L-苯基甘氨酸环戊酯甲苯磺酸盐 (2.14g, 5.48mmol) 和 DIPEA (3.17ml, 18.3mmol)。将混合物室温振荡 24 小时。测试切除后的 LCMS 显示 52% 转化, m/z 550 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。将树脂过滤并用标准洗涤过程洗涤。树脂在真空下干燥。

[0656] 阶段 4 : (S)-[ (S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羧基]-氨基-苯基-乙酸环戊酯 (44)

[0657]

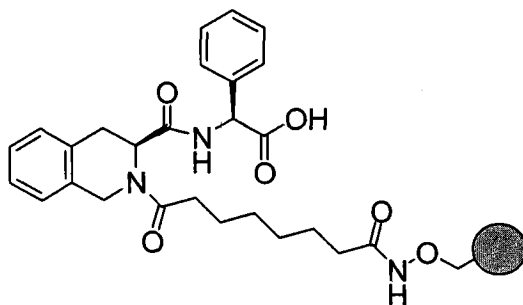


44

[0658] 将阶段 3 的树脂 (2.2g, 以 0.83mmol/g 加载) 在 2% TFA/DCM (10ml) 中温和振荡 20 分钟。将树脂过滤。收集滤液并在室温下减压蒸发。树脂用 2% TFA/DCM (10ml) 重新处理, 20 分钟后过滤。合并的滤液在室温下减压蒸发至干以得到残余物。残余物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (44), 其为 TFA 盐。LCMS 纯度 95%, m/z 550 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, MeOD), δ : 1.12-1.75 (16H, m, 8 × CH<sub>2</sub>), 1.92-2.02 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.09-2.30 (1H, m), 2.48 (1H, m), 3.10 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.58-4.66 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.82 (1H, m), 5.04 (1H, m), 5.20 (1H, s, OCOCHPh), 6.95-7.20 (9H, m, Ar)。

[0659] 阶段 5 : 环戊酯的皂化

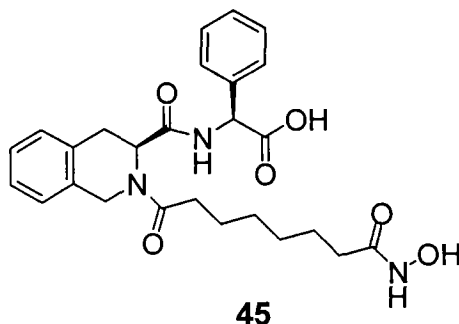
[0660]



[0661] 将阶段 3 的树脂 (1.3g, 1.13mmol) 悬浮于 THF (4.6ml) 和甲醇 (4.6ml)。加入 1.4M 的氢氧化钠水溶液 (4.6ml)。将混合物振荡 24 小时。测试切除材料的 LCMS 证实转化成所需的酸。将树脂过滤并用水  $\times 2$  和 MeOH  $\times 2$  洗涤, 然后通过标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0662] 阶段 6 : (S)-{[(S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羰基]-氨基}-苯基-乙酸 (45)

[0663]



[0664] 将阶段 5 的树脂 (1.3g, 以 0.83mmol/g 加载) 在 2% TFA/DCM (10ml) 中温和振荡 20 分钟。将树脂过滤。收集滤液并在室温下减压蒸发。树脂用 2% TFA/DCM (10ml) 重新处理, 20 分钟后过滤。合并的滤液在室温下减压蒸发至干以得到残余物。残余物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (45)。LCMS 纯度 96%,  $m/z$  482  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$ NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.12-1.38 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.45-1.61 (4H, m,  $CH_2$ ), 1.98 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.10-2.58 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.04-3.20 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.48-4.65 (2H, m), 4.85 (1H, m), 5.20 (1H, m), 6.92-7.25 (9H, m, Ar)。

[0665] 以下化合物按照为化合物 (44) 和化合物 (45) 描述的方法制备

[0666] (S)-{[(S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羰基]-氨基}-苯基-乙酸乙酯 (46)

[0667] 使用结构单元 H

[0668] LCMS 纯度 97%,  $m/z$  510  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.19 (3H, t,  $CH_3$ ), 1.32-1.48 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.54-1.73 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.02-2.15 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.50-2.70 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.10-3.30 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.10 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.70 (2H, m), 4.95 (1H, m), 5.35 (1H, s,  $OCOCH_2Ph$ ), 7.10-7.40 (9H, m, Ar)。

[0669] (S)-2-{[(S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羰基]-氨基}-3-苯基-丙酸乙酯 (47)

[0670] 使用结构单元 H

[0671] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  524  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.20 (3H, m,

CH<sub>3</sub>), 1.30-1.49 (4H, m, 2×CH<sub>2</sub>), 1.55-1.70 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 2.10 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.60 (2H, m), 2.88-3.25 (4H, m), 4.08-4.20 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.45-4.62 (2H, m), 4.75 (1H, m), 5.03 (1H, m), 7.09-7.32 (9H, m, Ar)。

[0672] (S)-2-{[(S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羰基]-氨基}-3-苯基-丙酸 (48)

[0673] 使用结构单元 H

[0674] LCMS 纯度 100%, m/z 564[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR(400MHz, MeOD), δ :1.25-1.85 (16H, m, 8×CH<sub>2</sub>), 2.10 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.55 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 2.85-3.20 (4H, m), 4.40-4.60 (2H, m), 4.75 (1H, m), 4.95-5.15 (2H, m), 7.05-7.30 (9H, m, Ar)。

[0675] (S)-2-{[(S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羰基]-氨基}-3-苯基-丙酸 (49)

[0676] 使用结构单元 H

[0677] LCMS 纯度 100%, m/z 496[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR(400MHz, MeOD), δ :1.10-1.31 (4H, m, 2×CH<sub>2</sub>), 1.40-1.55 (4H, m, 2×CH<sub>2</sub>), 1.98 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.43 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.75-3.10 (4H, m), 4.30-4.75 (3H, m), 4.90 (1H, m), 6.90-7.15 (9H, m, Ar)。

[0678] (S)-2-{[(S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羰基]-氨基}-4-甲基-戊酸乙酯 (50)

[0679] 使用结构单元 H

[0680] LCMS 纯度 98%, m/z 490[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR(400MHz, MeOD), δ :0.60 (1H, m, CH), 0.70-0.85 (6H, m, 2×CH<sub>3</sub>), 1.25 (3H, t, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.38-1.65 (10H, m, 5×CH<sub>2</sub>), 2.10 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.60 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.20 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.10 (2H, q, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.35 (1H, m, CH), 4.70-4.80 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.95 (1H, m, CH), 7.23-7.25 (4H, m, Ar)。

[0681] (S)-2-{[(S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羰基]-氨基}-4-甲基-戊酸环戊酯 (51)

[0682] 使用结构单元 H

[0683] LCMS 纯度 96%, m/z 530[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR(400MHz, MeOD), δ :0.75 (3H, d, CH<sub>3</sub>), 0.88 (3H, d, CH<sub>3</sub>), 1.30-1.90 (19H, m), 2.10 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 2.60 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.15-3.30 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.30 (1H, m), 4.65-4.85 (2H, m), 4.95 (1H, m), 5.10 (1H, m), 7.15-7.28 (4H, m, Ar)。

[0684] (S)-2-{[(S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羰基]-氨基}-4-甲基-戊酸乙酯 (52)

[0685] 使用结构单元 H

[0686] LCMS 纯度 100%, m/z 462[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR(400MHz, MeOD), δ :0.60 (1H, m, CH), 0.70-0.85 (6H, m, 2×CH<sub>3</sub>), 1.38-1.65 (10H, m, 5×CH<sub>2</sub>), 2.10 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.40-2.60 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.20 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.35 (1H, m, CH), 4.70-4.80 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.95 (1H, m, CH, 掩蔽的信号), 7.23-7.25 (4H, m, Ar)。

[0687] (S)-{[1-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-吡咯烷-2-羰基]-氨基}-苯基-乙酸环戊酯 (53)

[0688] 使用结构单元 I

[0689] LCMS 纯度 100%, m/z 488[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR(400MHz, MeOD), δ :1.30-2.45 (24H, m),

3. 50-3. 70 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4. 55 (1H, m, CH), 5. 18 (1H, m, CH), 5. 40 (1H, m, CH), 7. 40 (5H, m, Ar)。

[0690] (S)-{[1-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-吡咯烷-2-羰基]-氨基}-苯基-乙酸 (54)

[0691] 使用结构单元 I

[0692] LCMS 纯度 90 %, m/z 420[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, MeOD), δ :1. 20-1. 20 (4H, m, 2×CH<sub>2</sub>), 1. 45-1. 56 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 1. 75-2. 35 (8H, m), 3. 35-3. 60 (2H, m), 4. 45 (1H, m), 5. 35 (1H, m), 7. 18-7. 35 (5H, m, Ar)。

[0693] (S)-2-{[1-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-吡咯烷-2-羰基]-氨基}-3-苯基-丙酸乙酯 (55)

[0694] 使用结构单元 I

[0695] LCMS 纯度 100 %, m/z 462[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, MeOD), δ :1. 20-2. 20 (19H, m), 2. 94-3. 20 (2 H, m, CH<sub>2</sub>Ph), 3. 48-3. 69 (2H, m, CH<sub>2</sub>N), 4. 10-4. 25 (2H, m, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4. 33-4. 49 (1H, m), 4. 60-4. 79 (1H, m), 7. 20-7. 35 (5H, m, Ar)。

[0696] (S)-2-{[1-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-吡咯烷-2-羰基]-氨基}-3-苯基-丙酸环戊酯 (56)

[0697] 使用结构单元 I

[0698] LCMS 纯度 100 %, m/z 502[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, MeOD), δ :1. 27-2. 23 (22H, m, 11×CH<sub>2</sub>), 2. 35 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2. 97-3. 27 (2H, m, CH<sub>2</sub>Ph), 3. 53-3. 63 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4. 35-4. 45 (1H, m, CH), 4. 60-4. 70 (1H, m, CHCH<sub>2</sub>Ph), 5. 10-5. 20 (1H, m, CHOCO), 7. 23-7. 30 (5H, m, Ar)。

[0699] (S)-2-{[1-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-吡咯烷-2-羰基]-氨基}-3-苯基-丙酸 (57)

[0700] 使用结构单元 I

[0701] LCMS 纯度 90 %, m/z 434[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (400MHz, MeOD), δ :1. 30-1. 41 (4H, m, 2×CH<sub>2</sub>), 1. 55-1. 69 (4H, m, 2×CH<sub>2</sub>), 1. 80-1. 90 (8H, m), 2. 91-3. 26 (2H, m), 3. 45-3. 70 (2H, m), 4. 40 (1H, m), 4. 72 (1H, m), 7. 16-7. 30 (5H, m, Ar)。

[0702] (S)-2-{[(S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-4-羰基]-氨基}-3-苯基-丙酸环戊酯 (58)

[0703] 使用结构单元 J

[0704] LCMS 纯度为 100 %, m/z 563[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (400MHz MeOD), δ :1. 10-1. 30 (3H, m, CH<sub>3</sub>), 1. 35-1. 80 (8H, m, 4×CH<sub>2</sub>), 2. 15 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2. 4-2. 65 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2. 95-3. 20 (3H, m), 4. 0-4. 2 (2H, m, CH<sub>2</sub>O), 4. 3-5. 0 (4H, m 掩蔽的信号), 5. 05-5. 20 (1H, m, CHOCO), 6. 90-7. 50 (9H, m, Ar)。

[0705] (S)-2-{[(S)-2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H-β-咔啉-4-羰基]-氨基}-3-苯基-丙酸 (59)

[0706] 使用结构单元 J

[0707] LCMS 纯度为 100 %, m/z 535[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (400MHz MeOD), δ :1. 20-1. 40 (4H, m, 2×CH<sub>2</sub>), 1. 45-1. 65 (4H, m, 2×CH<sub>2</sub>), 1. 90-2. 10 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2. 30-2. 50 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2. 70-3. 15 (3H, m), 4. 2-4. 9 (4H, m 掩蔽的信号), 5. 00 (1H, m, CHOCO), 6. 75-7. 40 (9H, m, Ar)

[0708] (S)-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯甲酰氨基]-苯基-乙酸环戊酯 (60)

[0709] 使用结构单元 K

[0710] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  510  $[M^+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.28 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.40–1.80 (12H, m,  $6 \times CH_2$ ), 1.98 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.27 (2H, t,  $CH_2$ ), 5.12 (1H, m), 5.50 (1H, s,  $OCOCHPh$ ), 7.21–7.32 (4H, m, Ar), 7.36 (2H, m, Ar), 7.45 (1H, d, Ar), 7.61 (1H, d, Ar), 7.90 (1H, s, Ar)。

[0711] (S)-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯甲酰氨基]-苯基-乙酸 (61)

[0712] 使用结构单元 K

[0713] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  442  $[M^+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.21–1.34 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.48–1.63 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.98 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.26 (2H, t,  $CH_2$ ), 5.55 (1H, s,  $OCOCHPh$ ), 7.20–7.32 (4H, m, Ar), 7.40 (2H, d, Ar), 7.48 (1H, d, Ar), 7.64 (1H, d, Ar), 7.89 (1H, s, Ar)。

[0714] (S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯甲酰氨基]-4-甲基-戊酸环戊酯 (62)

[0715] 使用结构单元 K

[0716] LCMS 纯度 93%,  $m/z$  490  $[M^+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 0.84 (3H, d,  $CH(CH_3)$ ), 0.88 (3H, d,  $CH(CH_3)$ ), 1.20–1.40 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.40–1.85 (15H, m,  $6 \times CH_2$ ,  $CH(CH_3)_2$ ,  $CH_2CH(CH_3)_2$ ), 2.00 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.25 (2H, t,  $CH_2$ ), 4.45 (1H, m,  $OCOCHCH_2$ ), 5.10 (1H, m,  $CHOCO$ ), 7.25 (1H, mAr), 7.40 (1H, d, Ar), 7.60 (1H, d, Ar), 7.90 (1H, s, Ar)。

[0717] (S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯甲酰氨基]-4-甲基-戊酸 (63)

[0718] 使用结构单元 K

[0719] LCMS 纯度 97%,  $m/z$  422  $[M^+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.03 (3H, d,  $CH(CH_3)$ ), 1.06 (3H, d,  $CH(CH_3)$ ), 1.40–1.55 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.65–1.95 (7H, m,  $2 \times CH_2$ ,  $CH(CH_3)_2$ ,  $CH_2CH(CH_3)_2$ ), 2.15 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.45 (2H, t,  $CH_2$ ), 4.70 (1H, m,  $OCOCHCH_2$ ), 7.45 (1H, m, Ar), 7.60 (1H, d, Ar), 7.80 (1H, d, Ar), 8.05 (1H, s, Ar)。

[0720] (S)-2-[[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H- $\beta$ -咔啉-1-羰基]-氨基]-3-苯基-丙酸环戊酯 (64)

[0721] 使用结构单元 L

[0722] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  603  $[M^+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.18–1.71 (16H, m,  $8 \times CH_2$ ), 2.00 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.45 (2H, m), 2.70 (2H, m), 2.90–3.11 (2H, m), 3.40 (1H, m), 4.10 (1H, m), 4.50 (1H, m), 5.00 (1H, m), 5.95 (1H, m), 6.90–7.11 (7H, m, Ar), 7.25 (1H, d, Ar), 7.34 (1H, d, Ar)。

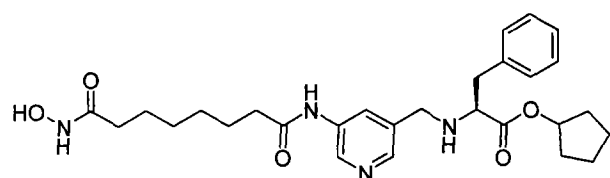
[0723] (S)-2-[[2-(7-羟基氨甲酰基-庚酰)-2,3,4,9-四氢-1H- $\beta$ -咔啉-1-羰基]-氨基]-3-苯基-丙酸 (65)

[0724] 使用结构单元 L

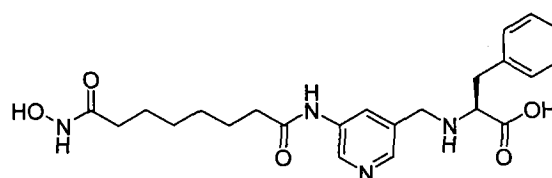
[0725] LCMS 纯度 91%,  $m/z$  535  $[M^+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD)  $\delta$ : 1.15–1.32 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.40–1.60 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.98 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.41 (2H, m), 2.69 (2H, m), 2.90–3.11 (2H, m), 3.30 (1H, m), 4.06 (1H, m), 4.60 (1H, m), 5.92 (1H, m), 6.84 (7H, m, Ar), 7.20 (1H, d, Ar), 7.31 (1H, d, Ar)。

[0726] 合成化合物 (66) 和化合物 (67)

[0727]



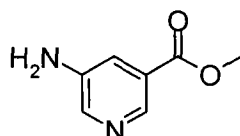
66



67

[0728] 阶段 1 :5-氨基-烟酸甲酯

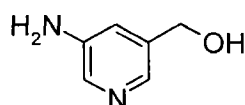
[0729]



[0730] 将 5-氨基烟酸 (1g, 7.2mmol) 悬浮于甲醇 (100ml) 并在 0℃ 时逐滴加入亚硫酸氯 (4.22ml, 57.9mmol)。将反应混合物室温搅拌 18 小时。将反应混合物蒸发至干, 将所得黄色油状物重溶于甲醇 / 乙醚 (1 : 1), 并通过过滤收集所得黄色晶体 (盐酸盐), 产量为 1.2g (85%)。LCMS 纯度 91%,  $m/z$  153  $[M^+ + H]^+$

[0731] 阶段 2 : (5-氨基-吡啶-3-基)-甲醇

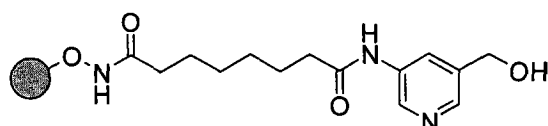
[0732]



[0733] 将 5-氨基-烟酸甲酯 (5.7g, 30.2mmol) 溶于 THF (150ml) 并在 0℃ 下缓慢加入  $LiAlH_4$  (1M 的 THF 溶液, 133ml, 133mmol)。将反应混合物室温搅拌 21 小时。淬灭反应混合物, 用稀 HCl 酸化至 pH3, 并用固体  $Na_2CO_3$  碱化 (pH8)。减压除去溶剂。残余物通过硅胶过滤, 用 20% MeOH/DCM 洗脱得到 3.8g 产物, (100%) LCMS 纯度为 97%,  $m/z$  125  $[M^+ + H]^+$ , 通过 ELS 测定。

[0734] 阶段 3 : 将阶段 2 的酸偶联到树脂上

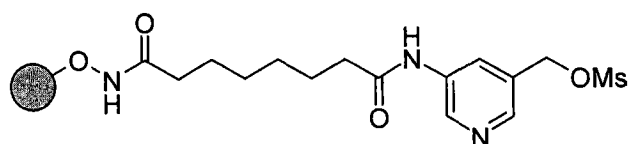
[0735]



[0736] 将用辛二酸衍生的羟胺 2-氯三苯甲基树脂 (0.49g, 0.86mmol/g, 0.42mmol) 在无水 DCM (6ml) 中溶胀并加入 PyBOP (0.67g, 1.3mmol)。将阶段 2 的苯胺 (0.16g, 1.3mmol) 加入 DMF (6ml), 随后加入 DIPEA (0.75ml, 4.2mmol)。测试切除后的 LCMS 显示 27% 转化,  $m/z$  296  $[M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤, 并用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0737] 阶段 4 : 甲磺酰化

[0738]

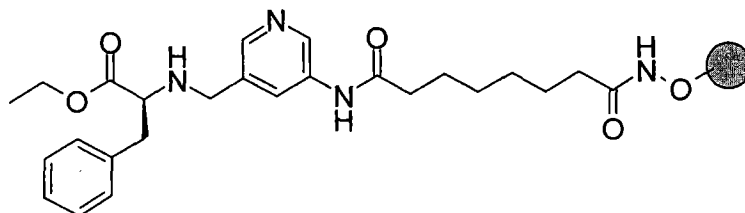


[0739] 将结合树脂的阶段 3 的醇 (1.8g, 1.57mmol) 在无水 DCM (30ml) 中溶胀并在 0℃ 下加入 DIPEA (1.62ml, 9.42mmol), 然后加入甲磺酰氯 (0.23ml, 3.14mmol)。将反应混合物在

0℃振荡 30 分钟。测试切除后的 LCMS 显示 21%转化,  $m/z$  374  $[M^+ + H]^+$ , 并有 9%通过用氯化物取代甲磺酸酯衍生得到的副产物,  $m/z$  314  $[M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤, 并用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0740] 阶段 5 : 用 L- 苯丙氨酸乙酯取代甲磺酸酯

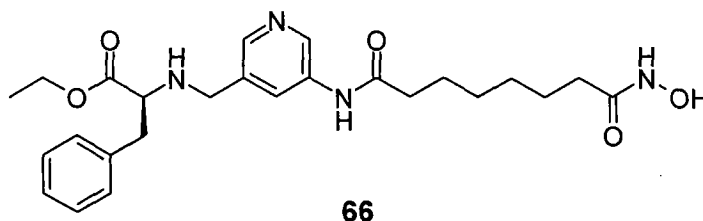
[0741]



[0742] 将结合树脂的阶段 4 的产物 (0.5g, 0.43mmol) 在无水 DMF (4ml) 中溶胀并加入碘化钠 (0.05g, 10% 重量 / 体积)。加入 L- 苯丙氨酸乙酯盐酸盐 (0.3g, 1.29mmol) 的无水 DMF (4ml) 溶液, 然后加入 DIPEA (0.75ml, 4.3mmol)。振荡 3 小时后, 测试切除材料的 LCMS 显示 35%转化,  $m/z$  471  $[M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤, 并用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0743] 阶段 6 : (S)-2-[[5-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-吡啶-3-基甲基]-氨基]-3-苯基-丙酸乙酯 (66)

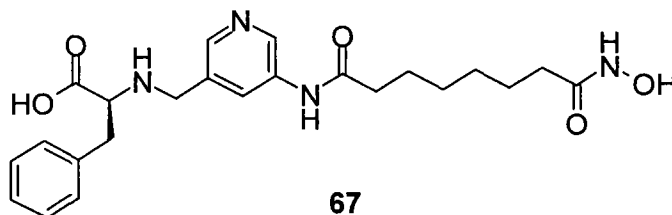
[0744]



[0745] 阶段 5 的树脂 (2g, 以 0.87mmol/g 加载) 在 2% TFA/DCM (20ml) 中温和振荡 20 分钟。将树脂过滤。收集滤液并在室温下减压蒸发。树脂用 2% TFA/DCM (10ml) 重新处理, 10 分钟后过滤。合并的滤液在室温下减压蒸发至干以得到粗产物。粗产物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (66), 其为 TFA 盐。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  471  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.10 (3H, t,  $CO_2CH_2CH_3$ ), 1.31-1.50 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.58-1.80 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.05-2.15 (1H, m, CH), 2.24-2.38 (1H, m, CH), 2.45 (2H, t,  $CH_2$ ), 3.10-3.20 (1H, m, CH), 3.38-3.49 (1H, m, CH), 4.12 (2H, q,  $CH_2$ ), 4.35 (3H, m,  $CH_2$ , CH), 7.20-7.40 (5H, m, Ar), 8.30-9.00 (3H, m, Ar)。

[0746] 阶段 7 : (S)-2-[[5-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-吡啶-3-基甲基]-氨基]-3-苯基-丙酸 (67)

[0747]

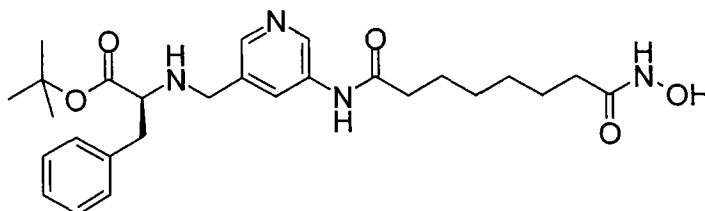


[0748] 在阶段 6 的产物 (30mg, 以 1.8mmol/g 加载) 的 THF (1ml) 溶液中加入 1.4M 氢氧化钠 (1ml)。将反应混合物搅拌 30 分钟。LCMS 显示 75%转化,  $m/z$  442  $[M^+ + H]^+$ 。将反应混合

物蒸发至干并通过制备型 HPLC 纯化以得到所需化合物, 其为 TFA 盐, 化合物 (67)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  443  $[M^+ + H]^+$ 。 $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.30 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.50-1.70 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.00 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.30 (2H, t,  $CH_2$ ), 3.20 (2H, m,  $CH_2Ph$ , 掩蔽的信号), 4.20 (3H, m), 7.20 (5H, m, Ar), 8.30 (1H, br s, Ar), 8.40 (1H, s, Ar), 8.65 (1H, br s, Ar)。

[0749] 合成化合物 (68)

[0750]

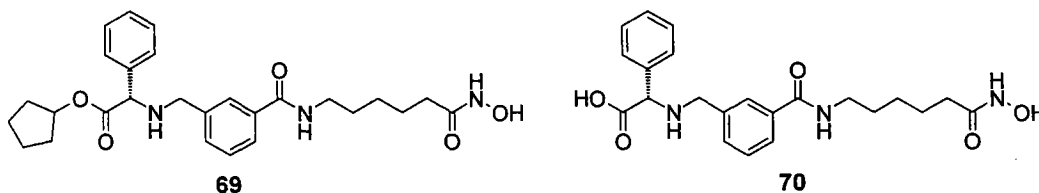


68

[0751] (S)-2-([5-(7-羟基氨基甲酰基-庚酰氨基)-吡啶-3-基甲基]-氨基)-3-苯基-丙酸叔丁酯 (68) 使用所列出的用来制备化合物 (66) 的步骤进行制备: LCMS 纯度 100%,  $m/z$  499  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.20 (9H, s,  $C(CH_3)_3$ ), 1.25-1.35 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.49-1.65 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.00 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.35 (3H, t,  $CH_2$ ), 3.00 (1H, m), 3.32 (1H, m), 4.15-4.30 (3H, m), 7.15-7.30 (5H, m, Ar), 8.30 (1H, br s, Ar), 8.45 (1H, s, Ar), 8.65 (1H, br s, Ar)。

[0752] 合成化合物 (69) 和化合物 (70)

[0753]

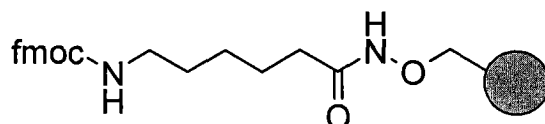


69

70

[0754] 阶段 1: 将 Fmoc 氨基己酸加载到树脂上

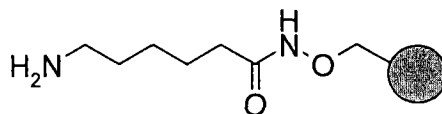
[0755]



[0756] 在羟胺 2-氯三苯甲基树脂 (2.5g, 以 0.94mmol/g 加载) 和无水 DCM (10ml) 的混合物中加入 1,3-二异丙基碳二亚胺 (1.1ml, 7.05mmol) 和 6-(Fmoc-氨基)己酸 (2.5g, 7.05mmol) 的无水 DCM (10ml) 溶液。加入 DMF (5ml) 并在室温振荡反应物 1 小时。测试切除显示 96% 转化成所需产物。将树脂过滤, 并用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0757] 阶段 2: Fmoc 去保护

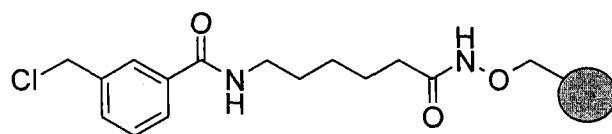
[0758]



[0759] 将阶段 1 的 Fmoc 保护的胺树脂 (2.0g, 以 0.94mmol/g 加载) 溶于 20% 的哌啶的 DMF (25ml, 过量) 溶液并室温振荡 30 分钟。测试切除, LCMS 显示完全转化, 100% (ELS 检测)。将树脂过滤, 用标准洗涤过程洗涤并真空干燥。

[0760] 阶段 3:偶联反应

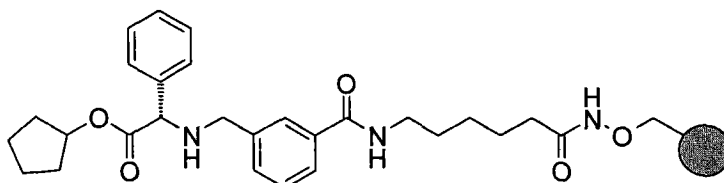
[0761]



[0762] 在结合树脂的阶段 2 的胺 (2.0g, 以 0.94mmol/g 加载) 的无水 DCM(10ml) 和 DMF(10ml) 溶液中加入 DIC(0.71ml, 5.64mmol) 和 3-(氯甲基)苯甲酸 (0.96g, 5.64mmol)。将混合物振荡 1 小时, 然后测试切除, LCMS 显示 49% 转化,  $m/z$  219  $[M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤, 并用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0763] 阶段 4:用 L-苯基甘氨酸环戊酯取代氯化物

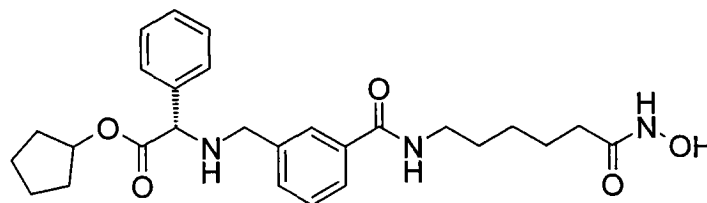
[0764]



[0765] 在结合树脂的阶段 3 的氯化物 (0.5g, 0.47mmol) 的无水 DMF(5ml) 溶液中加入 L-苯基甘氨酸环戊酯甲磺酸盐 (0.57g, 1.41mmol)、DIPEA(0.24ml, 1.41mmol) 和催化量的碘化钠。反应混合物在 60℃ 加热 1 小时。测试切除后的 LCMS 显示 45% 转化,  $m/z$  482  $[M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤, 并用标准洗涤过程洗涤。真空干燥树脂。

[0766] 阶段 5:(S)-[3-(5-羟基氨甲酰基-戊基氨甲酰基)-苄基氨基]-苯基-乙酸环戊酯 (69)

[0767]

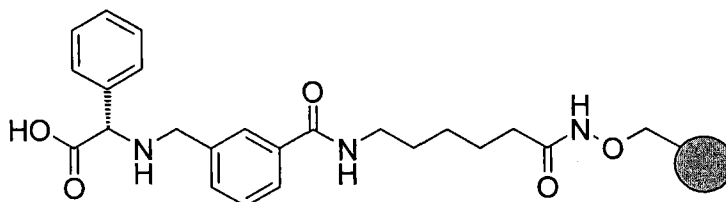


69

[0768] 将阶段 4 的树脂 (1.0g, 以 0.94mmol/g 加载) 在 2% TFA/DCM(10ml) 中温和振荡 20 分钟。将树脂过滤。收集滤液并在室温下减压蒸发。树脂用 2% TFA/DCM(10ml) 重新处理, 20 分钟后过滤。合并的滤液在室温下减压蒸发至干以得到残余物。残余物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (69)。LCMS 纯度 89%,  $m/z$  482  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1\text{H NMR}$  (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.24-1.82 (14H, m,  $7 \times \text{CH}_2$ ), 2.03 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ), 3.30 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ), 4.08 (1H, d,  $\text{CHHPh}$ ), 2.20 (1H, d,  $\text{CHHPh}$ ), 5.09 (1H, s,  $\text{OCOCHPh}$ ), 5.18 (1H, m,  $\text{CHOCO}$ ), 7.39-7.54 (7H, m, Ar), 7.77 (2H, m, Ar)。

[0769] 阶段 6:环戊酯的皂化

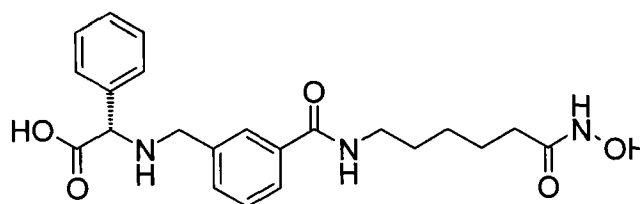
[0770]



[0771] 将阶段 4 的树脂 (1.35g, 以 0.94mmol/g 加载) 悬浮于 THF (4.7ml) 和 甲醇 (4.7ml)。加入 1.4M 氢氧化钠 (9.4ml, 12.66mmol)。将混合物振荡 48 小时。测试切除后的 LCMS 显示 49% 转化成酸,  $m/z$  414  $[M^+ + H]^+$ 。将树脂过滤并用水  $\times 2$  和 MeOH  $\times 2$  洗涤, 然后通过标准洗涤过程洗涤。树脂在真空下干燥

[0772] 阶段 7 : (S)-[3-(5-羟基氨甲酰基-戊基氨甲酰基)-苄基氨基]-苯基-乙酸 (70)

[0773]

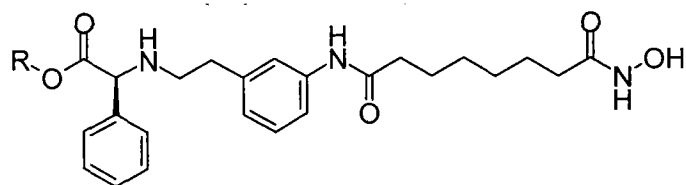


70

[0774] 将阶段 6 的树脂 (1.35g, 以 0.94mmol/g 加载) 在 2% TFA/DCM (10ml) 中温和振荡 20 分钟。将树脂过滤。收集滤液并在室温下减压蒸发。树脂用 2% TFA/DCM (10ml) 重新处理, 20 分钟后过滤。合并的滤液在室温下减压蒸发至干以得到残余物。残余物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (70)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  414  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.30 (2H, m,  $CH_2$ ), 1.57 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.20 (2H, t,  $CH_2$ ), 3.30 (2H, t,  $CH_2$ ), 4.05 (1H, d,  $CHHPh$ ), 4.18 (1H, d,  $CHHPh$ ), 4.90 (1H, s,  $OCOCHPh$ ), 7.35-7.52 (7H, m, Ar), 7.78 (2H, m, Ar)。

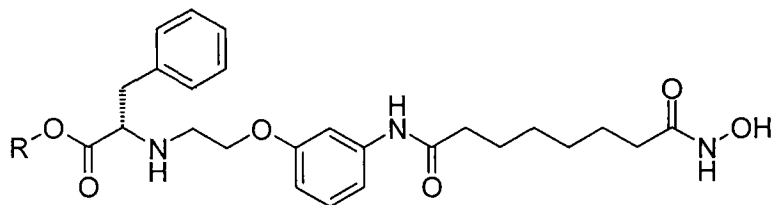
[0775] 合成图 4 的化合物, 以化合物 (71) 和化合物 (72) 为例

[0776]



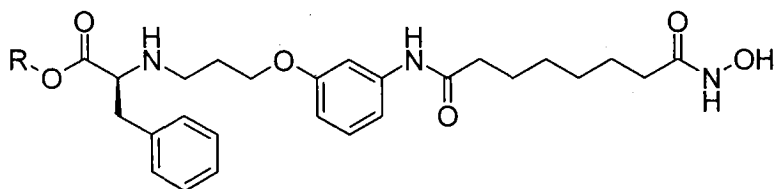
**R = 环戊基 71**

**R = H 72**



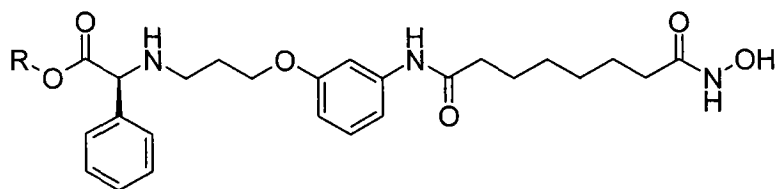
**R = 环戊基 73**

**R = H 74**



**R = 环戊基 75**

**R = H 76**



**R = 环戊基 77**

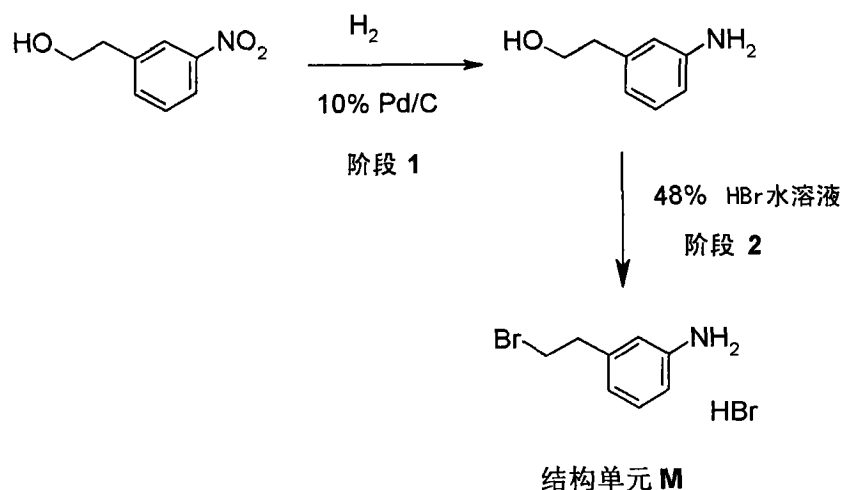
**R = H 78**

[0777] 图 4

[0778] 制备结构单元 M, N, O

[0779] 结构单元 M

[0780]



[0781] 阶段 1 :2-(3-氨基-苯基)-乙醇

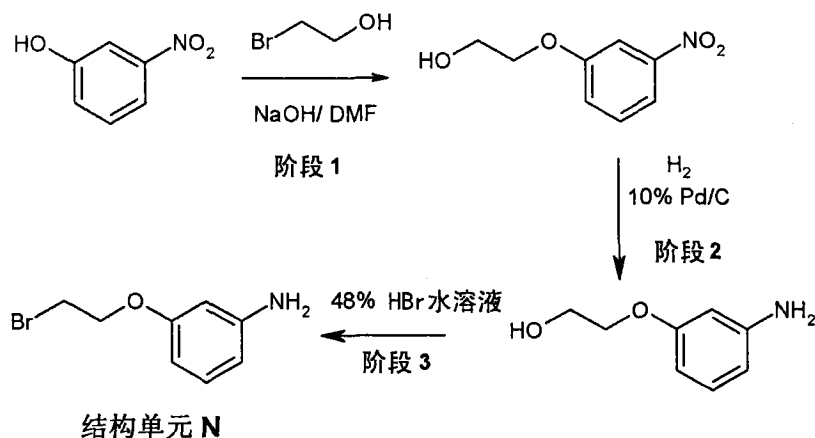
[0782] 将硝基苯乙醇 (8.0g, 0.047mol) 和 10% Pd/C (0.6g) 的乙醇 (100ml) 混合物在氢气下 (气球压力) 搅拌 18 小时。将反应混合物通过硅藻土垫过滤并除去 Pd/C 催化剂。将滤液减压浓缩以得到淡棕色固体 6.1g (95% 产率)。LCMS 纯度 98%,  $m/z$  138  $[M+H]^+$ 。

[0783] 阶段 2 :3-(2-溴-乙基)-苯胺

[0784] 将 2-(3-氨基-苯基)-乙醇 (2.0g) 在 48% 的 HBr 水溶液 (20ml) 中的溶液于 90℃ 加热 18 小时。将混合物冷却至室温, 并通过过滤收集形成的沉淀。真空干燥固体得到结构单元 M, 1.8g (61% 产率)。LCMS 纯度 90%,  $m/z$  200/202  $[M+H]^+$ 。

[0785] 结构单元 N

[0786]



[0787] 阶段 1 :2-(3-硝基-苯氧基)-乙醇

[0788] 在 3-硝基苯酚 (10g, 71.9mmol) 的 DMF (40ml) 溶液中加入加入 NaOH 颗粒 (3.16g, 79.1mmol) 和 2-溴乙醇 (5.6ml, 79.1mmol)。反应混合物于 60℃ 加热 18 小时。LCMS 显示 65% 转化成所需产物。反应混合物用水 (10ml) 稀释并用 2M HCl 慢慢中和。反应混合物用 EtOAc (50ml) 萃取并用水 (50ml) 洗涤。将 EtOAc 层干燥 ( $Na_2SO_4$ ), 过滤并蒸发至干。快速柱层析纯化, 用 30% EtOAc/ 庚烷洗脱, 得到所需产物 (8.2g, 62% 产率)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  184  $[M+H]^+$ 。

[0789] 阶段 2 :2-(3-氨基-苯氧基)-乙醇

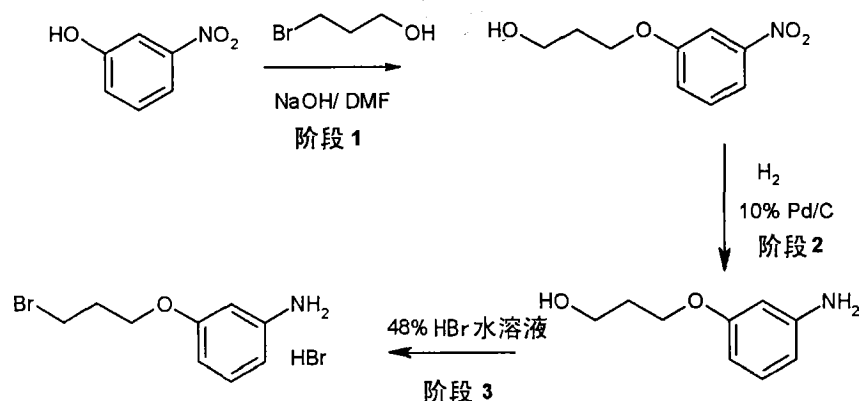
[0790] 还原反应按照对于结构单元 M 列出的过程进行。

[0791] 阶段 3 :3-(2-溴-乙氧基)-苯胺

[0792] 溴化反应按照对于结构单元 M 列出的过程进行。

[0793] 结构单元 O

[0794]

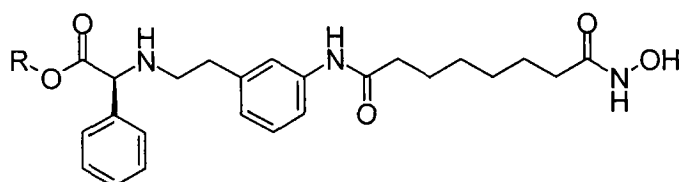


### 结构单元 O

[0795] 结构单元 O 按照对结构单元 G 的描述用 3-溴-1-丙醇代替 2-溴乙醇进行制备。

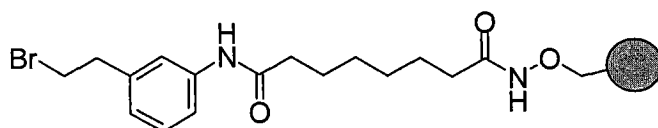
[0796] 合成图 4 的化合物,以化合物 (71, R = 环戊基) 和化合物 (72, R = H) 为例

[0797]



[0798] 阶段 1:将苯胺衍生物偶联到羧酸官能化的树脂

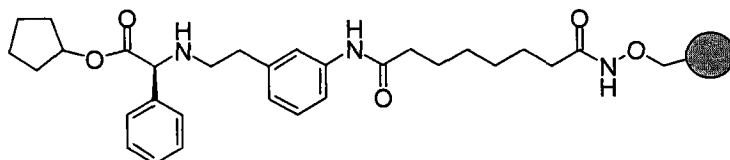
[0799]



[0800] 在用辛酸衍生的羟胺 2-氯三苯甲基树脂 (1.0g, 0.94mmol, 以 0.94mmol/g 加载) 的 DCM/DMF (10ml/10ml) 悬浮液中加入 DIPEA (1.75ml), 然后加入结构单元 M (0.8g, 2.82mmol)。加入 PyBrOP (0.53g, 3.76mmol) 并将悬浮液振荡 18 小时。树脂用标准洗涤过程洗涤并充分干燥。

[0801] 阶段 2:用 L-苯基甘氨酸环戊酯取代溴化物

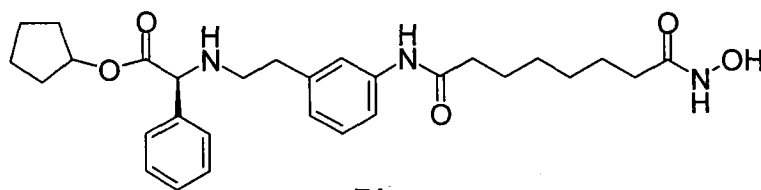
[0802]



[0803] 在瓶中的阶段 1 的树脂 (0.4g, 0.38mmol) 的 DMF (4ml) 的悬浮液中加入 L-苯基甘氨酸环戊酯甲磺酸盐 (0.44g, 1.12mmol) 和 DIPEA (0.67ml, 3.76mmol), 然后加入 NaI (50mg)。使反应物在 65℃ 静置 8 小时。用标准洗涤过程充分洗涤树脂。

[0804] 阶段 3: (S)-{2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯基]-乙基氨基}-苯基-乙酸环戊酯 (71)

[0805]

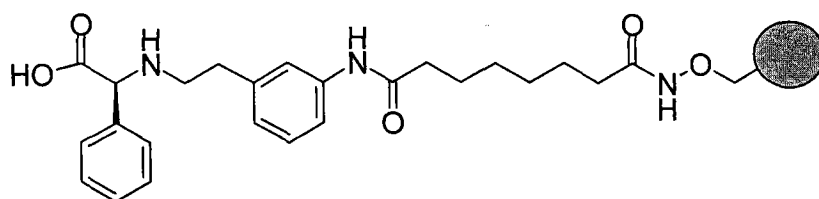


71

[0806] 用 2% TFA/DCM(10ml×3) 切除阶段 2 的树脂。将滤液浓缩至干并通过制备型 HPLC 纯化残余物以得到化合物 (71), 其为 TFA 盐。产量为 21mg( 总共 11% ), LCMS 纯度 99%,  $m/z$  510  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.35–1.95(16H,  $m$ ,  $8 \times CH_2$ ), 2.10(2H, t,  $CH_2$ ), 2.38(2H, t,  $CH_2$ ), 2.91–3.29(4H, m), 5.18(1H, s,  $OCOC\text{HPh}$ ), 5.32(1H, m,  $CHOCO$ ), 6.98(1H, m, Ar), 7.30(2H, m, Ar), 7.47–7.56(5H, m, Ar), 7.62(1H, s, Ar)。

[0807] 阶段 4: 皂化

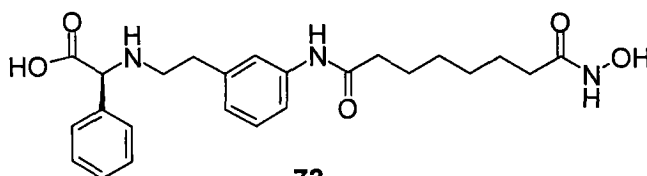
[0808]



[0809] 将阶段 2 的树脂 (1.2g, 1.12mmol) 悬浮于 THF/MeOH(12ml/12ml)。加入 2.7MNaOH 溶液并将混合物室温振荡 18 小时。反应完成后充分洗涤树脂 (标准洗涤过程)。

[0810] 阶段 5: (S)-{2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯基]-乙基氨基}-苯基-乙酸 (72)

[0811]



72

[0812] 用 2% TFA/DCM(10ml×3) 切除阶段 4 的树脂 (0.8g, 0.76mmol)。将滤液浓缩至干并通过制备型 HPLC 纯化残余物以得到化合物 (72), 其为 TFA 盐, 产量为 40mg( 总共 10% )。LCMS 纯度为 100%,  $m/z$  442  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz MeOD),  $\delta$ : 1.20–1.35(4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.45–1.70(4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.95(2H, t,  $CH_2$ ), 2.25(2H, t,  $CH_2$ ), 2.80–3.20(4H, m,  $CH_2NH$ ,  $CH_2Ph$ ), 5.00(1H, s,  $CHCOOH$ ), 6.85(1H, m, Ar), 7.15(2H, m, Ar), 7.40(5H, s, Ar), 7.50(1H, s, Ar)。

[0813] 以下化合物按照关于化合物 (71) 和化合物 (72) 描述的方法制备

[0814] (S)-2-{2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯氧基]-乙基氨基}-3-苯基-丙酸环戊酯 (73)

[0815] 采用结构单元 N

[0816] LCMS 纯度 94%,  $m/z$  540  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.26–1.82(16H, m,  $8 \times CH_2$ ), 2.11(2H, t,  $CH_2$ ), 2.39(2H, t,  $CH_2$ ), 3.15(1H, dd,  $CHHPh$ ), 3.44(1H, dd,  $CHHPh$ ), 3.56(2H, m,  $CH_2$ ), 4.30(2H, t,  $CH_2$ ), 4.40(1H, m), 5.13(1H, m,  $CHOCO$ ), 6.76(1H, d, Ar), 7.00(1H, d, Ar), 7.24–7.41(6H, m, Ar), 7.57(1H, s, Ar)。

[0817] (S)-2-{2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯氧基]-乙基氨基}-3-苯基-丙酸(74)

[0818] 采用结构单元 N

[0819] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  472 $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.35-1.46(4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.61-1.77(4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.11(2H, t,  $CH_2$ ), 2.40(2H, t,  $CH_2$ ), 3.28-3.40(2H, m,  $CH_2$ , 掩蔽的信号), 3.53(2H, t,  $CH_2$ ), 4.29(2H, t,  $CH_2$ ), 4.38(1H, t,  $OCOCHCH_2$ ), 6.75(1H, d, Ar), 7.00(1H, d, Ar), 7.25(1H, t, Ar), 7.30-7.41(5H, m, Ar), 7.53(1H, s, Ar)。

[0820] (S)-2-{3-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯氧基]-丙基氨基}-3-苯基-丙酸环戊酯(75)

[0821] 采用结构单元 O

[0822] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  554 $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.29-1.87(16H, m,  $8 \times CH_2$ ), 2.10(2H, t,  $CH_2$ ), 2.21(2H, m,  $CH_2$ ), 2.37(2H, t,  $CH_2$ ), 3.12(1H, dd,  $CHHPh$ ), 3.25-3.43(3H, m,  $CHHPh$ ,  $CH_2$ ), 4.11(2H, t,  $CH_2$ ), 4.33(1H, m,  $OCOCHCH_2$ ), 5.18(1H, m,  $CHOCO$ ), 6.78(1H, d, Ar), 7.00(1H, d, Ar), 7.22(1H, t, Ar), 7.24-7.39(5H, m, Ar), 7.44(1H, s, Ar)。

[0823] (S)-2-{3-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯氧基]-丙基氨基}-3-苯基-丙酸(76)

[0824] 采用结构单元 O

[0825] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  486 $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.34-1.47(4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.60-1.75(4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.10(2H, t,  $CH_2$ ), 2.19(2H, m,  $CH_2$ ), 2.38(2H, t,  $CH_2$ ), 3.25-3.40(4H, m,  $2 \times CH_2$ , 掩蔽的信号), 4.09(2H, t,  $CH_2$ ), 4.35(1H,  $OCOCHCH_2$ ), 6.75(1H, d, Ar), 6.98(1H, d, Ar), 7.20(1H, t, Ar), 7.28-7.39(5H, m, Ar), 7.41(1H, s, Ar)。

[0826] (S)-{3-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯氧基]-丙基氨基}-苯基-乙酸环戊酯(77)

[0827] 采用结构单元 O

[0828] LCMS 纯度为 100%,  $m/z$  540 $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400 MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.20-1.50(8H, m,  $4 \times CH_2$ ), 1.50-1.80(8H, m,  $4 \times CH_2$ ), 1.80-1.90(2H, m,  $NHCH_2CH_2$ ), 2.00(2H, t,  $CH_2$ ), 2.25(2H, t,  $CH_2$ ), 2.55-2.70(2H, m,  $NHCH_2$ ), 3.90(2H, t,  $CH_2CH_2O$ ), 4.25(1H, s,  $OCOCHPh$ ), 5.05(1H, m,  $CHOCO$ ), 6.55(1H, m, Ar), 6.95(1H, m, Ar), 7.00-7.10(1H, m, Ar), 6.15-6.35(6H, m, Ar)

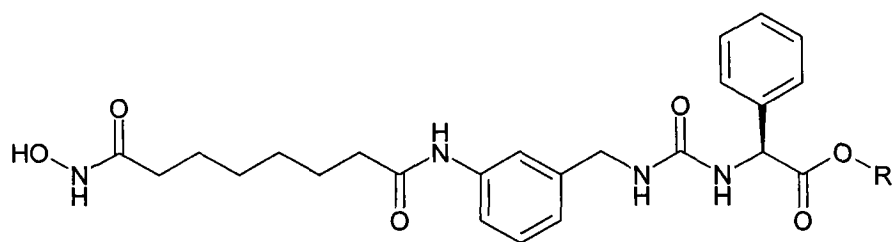
[0829] (S)-{3-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯氧基]-丙基氨基}-苯基-乙酸环戊酯(78)

[0830] 采用结构单元 O

[0831] LCMS 纯度为 100%,  $m/z$  472 $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, DMSO),  $\delta$ : 1.20-1.40(4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.45-1.65(4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.90(2H, m,  $NHCH_2CH_2$ ), 2.00-2.20(2H, m,  $CH_2$ ), 2.20-2.35(2H, m,  $CH_2$ ), 2.80-3.10(2H, m,  $NHCH_2$  掩蔽的信号), 3.90-4.00(2H, m,  $CH_2CH_2O$ ), 4.60-4.85(1H, br s,  $OCOCHPh$ ), 6.55(1H, d, Ar), 7.05(1H, d, Ar), 7.15(1H, m, Ar), 7.30-7.60(6H, m, Ar), 8.50-8.85(1H, br s), 9.85(1H, s), 10.35(1H, s)。

[0832] 合成图 5 的化合物, 以化合物 79 和化合物 80 为例

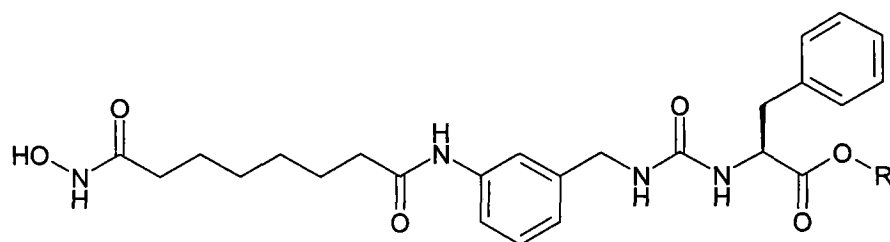
[0833]



**R = 环戊基 79**

**R = H 80**

[0834]



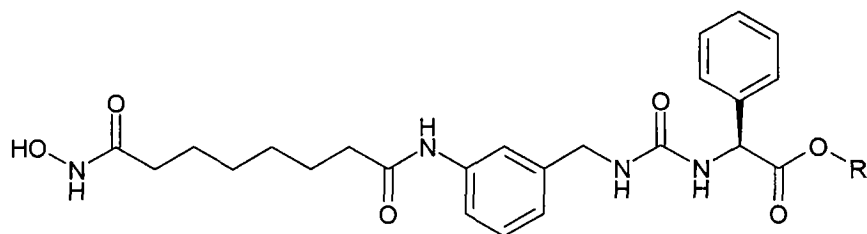
**R = 环戊基 81**

**R = H 82**

[0835] 图 5

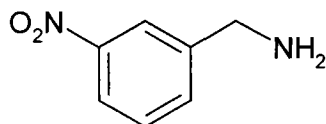
[0836] 合成化合物 79 (R = 环戊基) 和化合物 80 (R = H)

[0837]



[0838] 阶段 1 : 3-硝基 - 苄胺

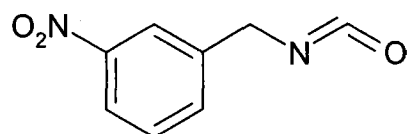
[0839]



[0840] 将 3-硝基苄基溴化物 (10g, 46.3mmol) 溶于乙醇 (200ml) 并于室温搅拌。在 30 分钟内于反应物中逐滴加入浓氨水 (200ml) 的乙醇 (300ml) 溶液。将反应物室温搅拌 18 小时, 然后蒸发至干。在残余物中加入水 (350ml), 溶液用 EtOAc (2×200ml) 洗涤。含水层用 1M NaOH 碱化并用 EtOAc (2×200ml) 萃取。将碱性层的有机萃取物合并, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并蒸发至干。所得产物为橙色油状物 (4.6g, 65% 产率)。LCMS 纯度 100%, m/z 153 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。

[0841] 阶段 2 : 1-异氰酸甲酯基 - 3-硝基 - 苯

[0842]

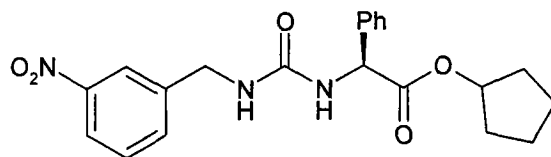


[0843] 在氮气下将 3-硝基 - 苄胺 (2.3g, 15.1mmol) 溶于无水二噁烷 (50ml)。加入双光气 (2.2ml, 18.2mmol), 有沉淀形成, 该沉淀在加热至 75℃ 时溶解。将反应物在 75℃ 搅拌 3

小时,冷却并蒸发至干,得到 3.4g 粗材料,该材料无需进一步纯化即可用于下一步骤。

[0844] 阶段 3:(S)-[3-(3-硝基-苄基)-脲基]-苯基-乙酸环戊酯

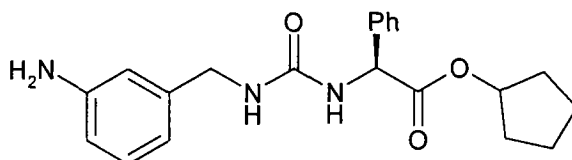
[0845]



[0846] 将 L-苯基甘氨酸环戊酯甲磺酸盐 (7.47g, 19.1mmol) 溶于 DMF (70ml)。加入三乙胺 (5.8ml, 42.0mmol) 并将混合物冷却至 0℃。氮气下,在反应混合物中缓慢加入 1-异氰酸甲酯基-3-硝基-苄溶液 (3.4g, 19.1mmol, 溶于 30ml DMF)。继续搅拌 18 小时使反应物回复室温。混合物用水 (200ml) 稀释并用 EtOAc (2×200ml) 萃取。有机萃取物用水 (3×100ml) 和盐水 (100ml) 洗涤,干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并蒸发至干。粗制的脲通过柱层析 (1% MeOH/DCM) 纯化以得到淡黄色油状物 (4.6g, 65%产率)。LCMS 纯度 85%, m/z 398 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。

[0847] 阶段 4:(S)-[3-(3-氨基-苄基)-脲基]-苯基-乙酸环戊酯

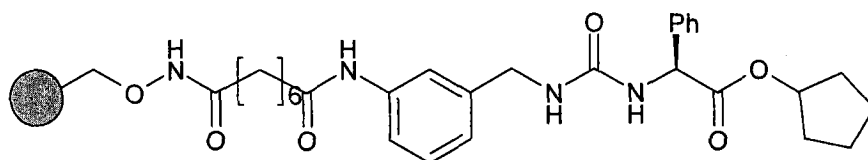
[0848]



[0849] 将 (S)-[3-(3-硝基-苄基)-脲基]-苯基-乙酸环戊酯 (3.6g, 9.0mmol) 溶于乙醇 (50ml), 加入 Pd/C (10%, 湿重) 催化剂 (100mg), 混合物在氢气 (气球压力) 下搅拌 18 小时。将反应混合物通过硅藻土塞过滤并蒸发至干以得到紫色油状物 (2.34g, 71%产率)。LCMS 纯度 90%, m/z 368 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。

[0850] 阶段 5:偶联到树脂

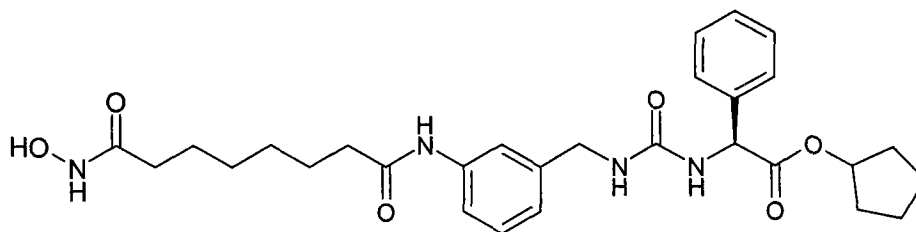
[0851]



[0852] 将用辛酸衍生的羟胺 2-氯三苯甲基树脂 (1.5g, 以 0.94mmol/g 加载) 在 DMF (15ml) 中溶胀, 加入 PyBOP (2.2g, 4.23mmol) 和 DIPEA (2.4ml, 14.1mmol)。将阶段 4 的苯胺 (1.3g, 3.53mmol) 溶于 DCM (15ml) 并加入反应混合物中。反应物在室温下振荡 42 小时, 然后进行标准树脂洗涤步骤和干燥。

[0853] 阶段 6:(S)-{3-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基]-脲基}-苯基-乙酸环戊酯 (79)

[0854]

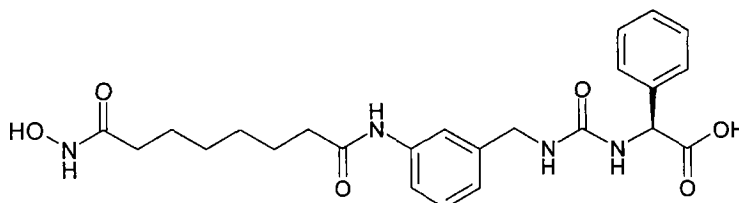


79

[0855] 将阶段 5 的结合树脂的环戊酯 (1.75g) 与 2% TFA/DCM(15ml) 一起振荡 10 分钟, 然后过滤树脂并在室温下减压蒸发溶剂。重复该过程 (3 次), 合并的粗产物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (79)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  539  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.34-1.90 (16H, m,  $8 \times CH_2$ ), 2.11 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.38 (2H, t,  $CH_2$ ), 4.30 (2H, s,  $CH_2$ ), 5.18 (1H, m,  $CHOCO$ ), 5.30 (1H, s,  $OCOCHPh$ ), 7.05 (1H, d, Ar), 7.26 (1H, t, Ar), 7.34-7.40 (5H, m, Ar), 7.47 (2H, m, Ar)。

[0856] 阶段 7 : (S)-{3-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基]-脲基}-苯基-乙酸 (80)

[0857]



80

[0858] 将化合物 (79) (75mg) 溶于 THF(1ml) 并加入 2MNaOH(水溶液, 1ml)。反应物室温搅拌 2 小时。在氮气气流下除去 THF, 含水层 (约 1ml) 通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (80)。LCMS 纯度 99%,  $m/z$  471  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.20-1.35 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.45-1.65 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.00 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.25 (2H, t,  $CH_2$ ), 4.20 (2H, s,  $CH_2NH$ ), 5.25 (1H, s,  $CHPh$ ), 6.90 (1H, d, Ar), 7.10 (1H, t, Ar), 7.15-7.40 (7H, m, Ar)。

[0859] 以下化合物按照为化合物 (79) 和化合物 (80) 描述的方法制备

[0860] (S)-2-{3-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基]-脲基}-3-苯基-丙酸环戊酯 (81)

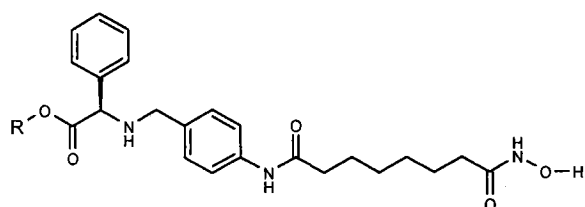
[0861] LCMS 纯度 95%,  $m/z$  553  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.20-1.40 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.40-1.80 (12H, m,  $6 \times CH_2$ ), 2.00 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.25 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.90 (2H, m,  $CHCH_2Ph$ ), 4.15 (2H, s,  $CH_2NH$ ), 4.40 (1H, m,  $OCOCHCH_2$ ), 5.00 (1H, m,  $CHOCO$ ), 6.85 (1H, d, Ar), 7.00-7.25 (6H, m, Ar), 7.35 (2H, br s, Ar)。

[0862] (S)-2-{3-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基]-脲基}-3-苯基-丙酸 (82)

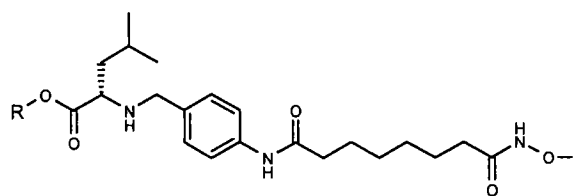
[0863] LCMS 纯度 94%,  $m/z$  485  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.30-1.50 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.60-1.80 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.10 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.35 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.95-3.25 (2H, m,  $CHCH_2Ph$ ), 4.25 (2H, s,  $CH_2NH$ ), 4.60 (1H, m,  $OCOCHCH_2$ ), 7.00 (1H, d, Ar), 7.15-7.35 (6H, m, Ar), 7.45 (2H, m, Ar)

[0864] 合成图 6 所示的化合物, 以化合物 (83) 和化合物 (84) 为例

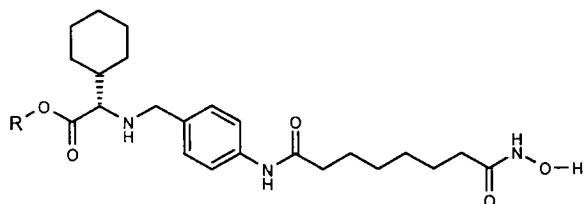
[0865]



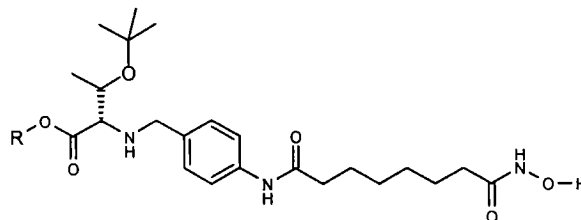
R = 环戊基 83  
R = H 84



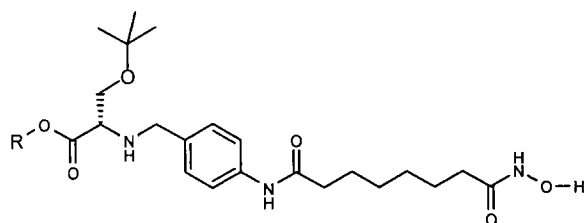
R = 环戊基 85



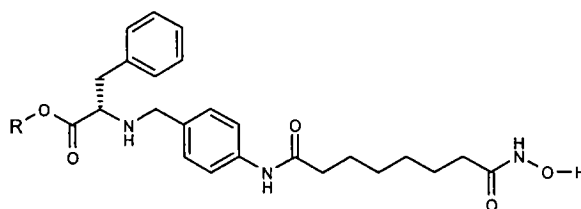
R = 环己基 86  
R = H 87



R = 1-甲氧基-2-甲基丙基 88



R = 1-甲氧基-2-甲基丙基 89  
R = H 90

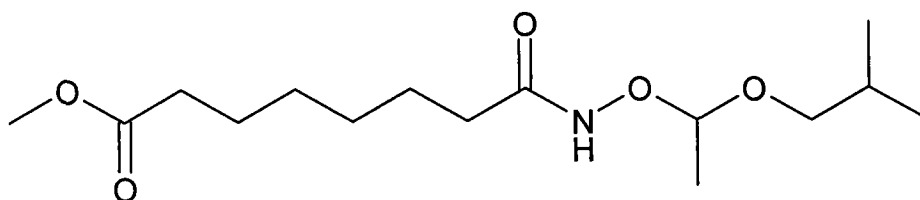


R = 1-苯基乙基 91

[0866] 图 6

[0867] 阶段 1 : 7-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-庚酸甲酯

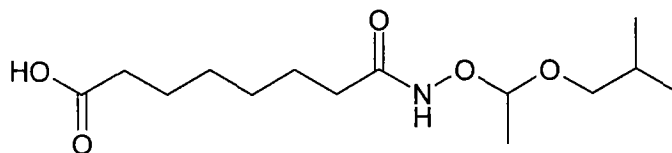
[0868]



[0869] 将辛二酸一甲酯 (25.0g, 13.3mmol, 1.0eq) 溶于 THF (300mL) 和 DCM (300mL)。边搅拌边在溶液中加入 EDC·HCl (25.46g, 13.3mmol, 1.0eq), 然后加入 HOBt (17.95g, 13.3mmol, 1.0eq) 和三乙胺 (48.5mL, 34.5mmol, 2.6eq)。在粘性溶液中加入 O-(1-异丁氧基-乙基)-羟胺 (21.9mL, 15.9mmol, 1.2eq) 并将反应物在室温搅拌过夜。将反应混合物真空浓缩, 加入 DCM (350mL) 并用水 (250mL) 和盐水 (200mL) 洗涤。将有机层分离, 干燥 (MgSO<sub>4</sub>), 过滤并真空浓缩。所得产物为白色固体 (36.6g, 91% 产率) LCMS 纯度 88%, m/z 302 (M<sup>+</sup>+H)<sup>+</sup>。该物质无需进一步纯化便可用于下一步骤。

[0870] 阶段 2 : 7-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-庚酸

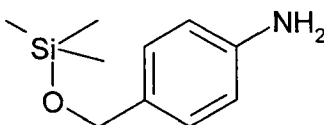
[0871]



[0872] 50℃时,在存在氢氧化锂 (8.68g,36.2mmol,3.0eq) 时将 7-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-庚酸甲酯 (36.6g,12.1mmol,1.0eq) 在 THF(200mL) 和水 (200mL) 中搅拌 3 小时。在真空下蒸发掉 THF 并在混合物中加入水 (100mL) 和乙酸乙酯 (200mL)。加入 1N HCl 将混合物小心酸化至 pH3。分离有机相,含水层用乙酸乙酯 (150mL) 重新萃取。将有机相合并,干燥 (MgSO<sub>4</sub>),过滤并真空浓缩。所得产物为白色固体 (29.0g,83%产率), m/z 288[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>,该产物无需进一步纯化便可用于阶段 4。

[0873] 阶段 3:4-三甲基甲硅烷氧基甲基-苯胺

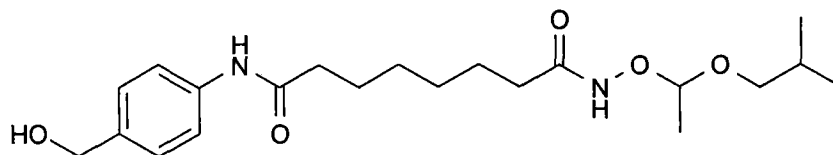
[0874]



[0875] 边搅拌边在 4-氨基苄醇 (16.0g,13.0mmol,1.0eq) 的 THF(400mL) 溶液中加入三乙胺 (18.9mL,13.6mmol,1.05eq), 然后加入三甲基氯硅烷 (17.2mL,13.6mmol,1.05eq)。室温氮气下搅拌反应混合物过夜。在真空下蒸发 THF 并将混合物在乙酸乙酯 (300mL) 和水 (300mL) 之间分配。分离有机相,含水层用乙酸乙酯 (2×100mL) 重新萃取。合并的有机相用盐水 (2×150mL) 洗涤,干燥 (MgSO<sub>4</sub>),过滤并真空浓缩。所得产物为黄色油状物 (24.0g,95%产率),该产物无需进一步纯化便可用于阶段 4。

[0876] 阶段 4:辛二酸 (Octanedioic acid) (4-羟甲基-苯基)-酰胺 (1-异丁氧基乙氧基)-酰胺

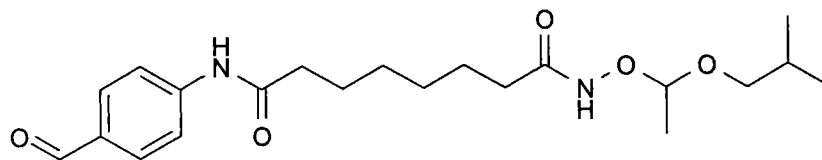
[0877]



[0878] 在 DMF(140mL) 中一起搅拌 7-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-庚酸 (5.0g,1.72mmol,1.0eq) 和 4-三甲基甲硅烷氧基甲基-苯胺 (3.38g,1.72mmol,1.0eq)。在混合物中加入 PyBroP(10.5g,2.25mmol,1.3eq) 和 DiPEA(3.9mL,2.25mmol,1.3eq)。室温下在氮气下搅拌反应物过夜。加入乙酸乙酯 (200mL) 和水 (200mL)。将水相分离并用乙酸乙酯 (2×100mL) 重新萃取。合并的有机相用水 (2×50mL) 和盐水 (50mL) 洗涤,然后干燥 (MgSO<sub>4</sub>),过滤并真空浓缩。将粗产物溶于最小量的乙酸乙酯并通过二氧化硅垫纯化。产物通过二氧化硅用乙酸乙酯洗涤,并收集在 100mL 的锥形瓶中,直到 LCMS 分析显示洗脱终止。纯化得到黄色油状物 (3.59g,53%产率)。LCMS 纯度 61%, m/z 417[M<sup>+</sup>+Na]<sup>+</sup>

[0879] 阶段 5:辛二酸 (4-甲酰-苯基)-酰胺 (1-异丁氧基-乙氧基)-酰胺

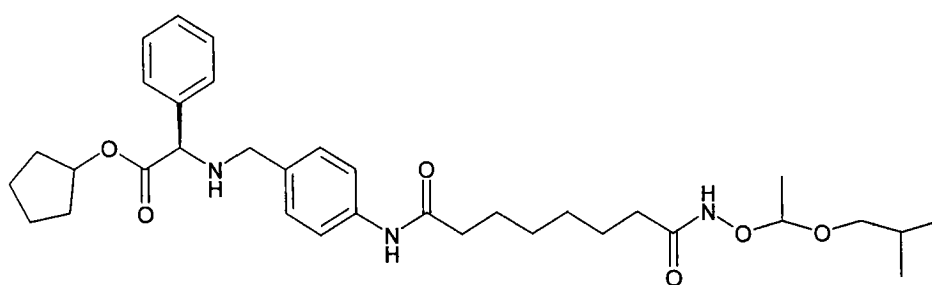
[0880]



[0881] 将辛二酸 (4- 羟甲基 - 苯基) - 酰胺 (1- 异丁氧基 乙氧基) - 酰胺 (100mg, 0.025mmol, 1.0eq) 溶于 DCM (5mL)。在反应混合物中加入  $\text{MnO}_2$  (286mg, 0.33mmol, 13.0eq) 并室温搅拌 1.5 小时。将反应混合物通过硅藻土过滤并用 DCM 洗涤, 然后蒸发溶剂以得到黄色油状物 (78.6mg, 79% 产率) LCMS 纯度 53%,  $m/z$  415  $[\text{M}^+ + \text{Na}]^+$ 。产物无需进一步纯化便可用于下面的步骤。

[0882] 阶段 6 : (R) - {4 - [7 - (1 - 异丁氧基 - 乙氧基氨基甲酰基) - 庚酰氨基] - 苄基氨基} - 苯基 - 乙酸环戊酯

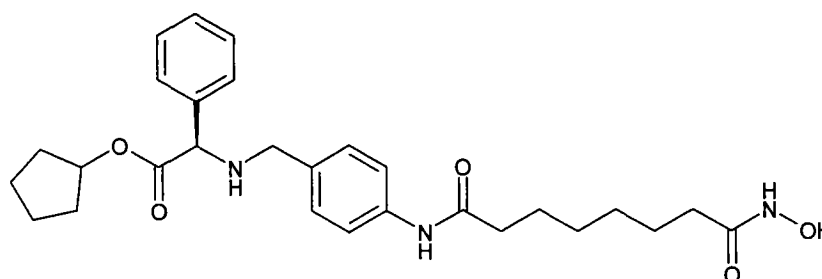
[0883]



[0884] 将辛二酸 (4 - 甲酰 - 苯基) - 酰胺 (1- 异丁氧基 - 乙氧基) - 酰胺 (276mg, 0.70mmol, 1.0eq) 和 D- 苯基甘氨酸环戊酯 (170mg, 0.77mmol, 1.1eq) 在 DCE (15mL) 中搅拌 10 分钟。加入乙酸 (65  $\mu\text{L}$ ) 并搅拌 2 分钟。加入三乙酰氧基硼氢化钠 (448mg, 0.21mmol, 3.0eq) 并将反应混合物在氮气下室温搅拌 1 小时。加入碳酸氢钠以淬灭反应。然后加入 DCM 并分离有机相。含水层用 DCM 重新萃取, 将有机层合并, 干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ), 过滤并真空浓缩以得到粗产物 (100mg, 24%), LCMS 纯度 94.0%,  $m/z$  496  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$ , 该产物无需进一步纯化便可使用。

[0885] 步骤 7 : (R) - [4 - (7 - 羟基氨基甲酰基 - 庚酰氨基) - 苄基氨基] - 苯基 - 乙酸环戊酯 (83)

[0886]



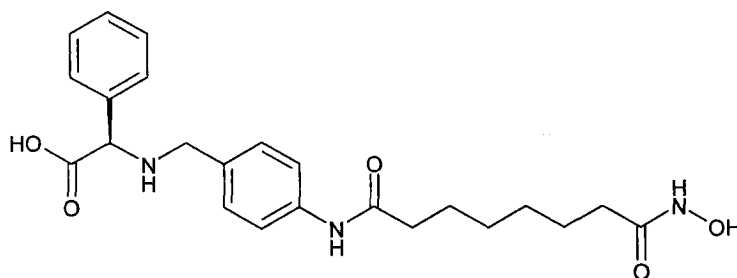
83

[0887] 将 (R) - {4 - [7 - (1 - 异丁氧基 - 乙氧基氨基甲酰基) - 庚酰氨基] - 苄基氨基} - 苯基 - 乙酸环戊酯 (50mg, 0.08mmol, 1eq) 溶于 DCM (0.5mL) 并与 4M HCl 一起在二噁烷 (0.2mL) 中搅拌 30 分钟。将所得盐浓缩, 溶于甲醇并通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (83)。LCMS 纯度 94%,  $m/z$  496  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.41-1.95 (16H, m,  $8 \times \text{CH}_2$ ), 2.15-2.17 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 2.40 (2H, t,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 4.16 (2H, q,  $J = 13.5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 5.12 (1H, s, CH), 5.27-5.30 (1H, m, CH), 7.40 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, Ar-H), 7.50-7.56 (5H,

m, Ar-H), 7.67 (2H, d, J = 8.7Hz, Ar-H)。

[0888] 阶段 8 : (R)-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-苯基-乙酸 (84)

[0889]



84

[0890] 在 CHR-003644 (50mg, 0.008mmol, 1.0eq) 的 THF (2mL) 和水 (2mL) 的溶液中加入 LiOH (8.0mg, 0.033mmol, 4.0eq)。反应物在氮气下于 40℃ 搅拌过夜。在真空下蒸发 THF, 所得水性反应溶剂用乙酸乙酯洗涤。将溶液酸化至 pH3 并真空浓缩产物。将所得盐溶于甲醇并通过制备型 HPLC 纯化产物以得到化合物 (84)。LCMS 纯度 97%, m/z 428 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (300MHz, MeOD), δ : 1.39-1.41 (4H, m, 2×CH<sub>2</sub>), 1.62-1.74 (4H, m, 2×CH<sub>2</sub>), 2.13-2.15 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.40 (2H, t, J = 7.5 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.14 (2H, q, J = 12.9 Hz, CH<sub>2</sub>), 5.06 (1H, s, CH), 7.39 (2H, d, J = 8.4Hz, Ar-H), 7.54 (5H, s, Ar-H), 7.67 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H)

[0891] 以下化合物按照与化合物 (83) 和化合物 (84) 类似的方法采用合适的中间体制备。

[0892] (S)-2-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-4-甲基-戊酸环戊酯 (85)

[0893] LCMS 纯度 97%, m/z 476 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (300MHz, MeOD), δ : 0.98-1.03 (6H, m, 2×CH<sub>3</sub>), 1.41-1.42 (4H, m, 2×CH<sub>2</sub>), 1.71-1.96 (14H, m, 7×CH<sub>2</sub>), 2.10-2.15 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.40 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.96-4.01 (1H, m, CH), 4.15-4.26 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.81 (1H, s, CH), 5.31-5.34 (1H, m, CH), 7.44 (2H, d, J = 8.7Hz, Ar-H), 7.70 (2H, d, J = 8.7Hz, Ar-H)

[0894] (S)-环己基-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-乙酸 (87)

[0895] LCMS 纯度 95%, m/z 434 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (300MHz, MeOD), δ : 1.23-1.96 (18H, m, 9×CH<sub>2</sub>), 2.10-2.15 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.39 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.71 (1H, m, CH), 4.12 (2H, q, J = 7.2Hz, CH<sub>2</sub>), 4.80 (1H, s, CH), 7.43 (2H, d, J = 8.4 Hz, Ar-H), 7.68 (2H, d, J = 8.7Hz, Ar-H)

[0896] (S)-3-叔丁氧基-2-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-丁酸环戊酯 (88)

[0897] LCMS 纯度 83%, m/z 520 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (300MHz, MeOD), δ : 1.19 (9H, s, 3×CH<sub>3</sub>), 1.29 (3H, d, J = 7.8Hz, CH<sub>3</sub>), 1.37-1.41 (4H, m, CH<sub>2</sub>), 1.64-1.89 (12H, m, CH<sub>2</sub>), 2.09-2.15 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.40 (2H, t, J = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.36-3.37 (1H, m, CH), 3.70-3.71 (1H, m, CH), 4.24-4.27 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 5.17-5.19 (1H, m, CH), 7.42 (2H, d, J = 6.9 Hz, Ar-H), 7.68 (2H, d, J = 8.4 Hz, Ar-H)

[0898] (S)-3-叔丁氧基-2-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-丙酸环戊酯 (89)

[0899] LCMS 纯度 95%, m/z 506 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (300MHz, MeOD), δ : 1.23 (9H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.36-2.09 (16H, m, 8×CH<sub>2</sub>), 1.66 (2H, t, J = 7.7Hz, CH<sub>2</sub>), 1.75 (2H, t, J = 7.4Hz, CH<sub>2</sub>),

2.11 (2H, t,  $J = 7.4$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2.40 (2H, t,  $J = 7.3$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.92 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 4.16 (1H, m, CH), 4.26 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 5.32 (1H, m, CH), 7.45 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, ArH), 7.67 (2H, dd,  $J = 3.2, 8.3$  Hz, ArH)。

[0900] (S)-3-叔丁氧基-2-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-丙酸 (90)

[0901] LCMS 纯度 95%,  $m/z$  438  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.25 (9H, s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.39-1.42 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 1.62-1.69 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 2.08-2.17 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 2.40 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.85-3.96 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 4.01-4.04 (1H, m, CH), 4.26 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 7.46 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, Ar-H), 7.68 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, Ar-H)

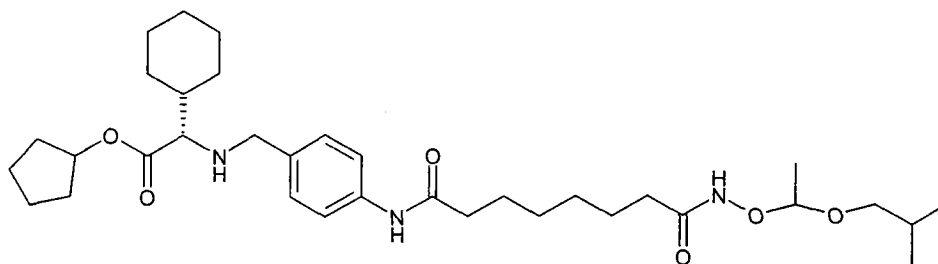
[0902] (S)-2-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-3-苯基-丙酸环戊酯 (91)

[0903] LCMS 纯度 95%,  $m/z$  510  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.17-2.43 (22H, m,  $11 \times \text{CH}_2$ ), 4.19-4.30 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 5.08 (1H, s, CH), 5.20-5.26 (1H, m, CH), 7.24-7.71 (9H, m, Ar-H)

[0904] 化合物 (86) 用另一种方法制备, 改变的条件在下面详述

[0905] 步骤 6b: (S)-环己基-{4-[7-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-庚酰氨基]-苄基氨基}-乙酸环戊酯

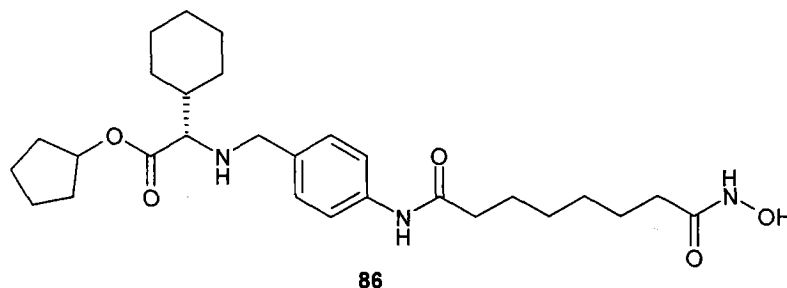
[0906]



[0907] 将辛酸 (4-甲酰-苯基)-酰胺 (1-异丁氧基-乙氧基)-酰胺 (220mg, 0.056mmol, 1.0eq) 和 L-环己基-甘氨酸环戊酯 (138.9mg, 0.062mmol, 1.1eq) 在甲醇 (8mL) 中室温搅拌过夜。加入氢硼化钠 (31.8mg, 0.084mmol, 1.5eq) 并将反应混合物搅拌 15 分钟。将反应混合物转移到冰浴中并加入 2 滴氢氧化钠 (2M)。加入二乙醚并分离有机相。含水层用二乙醚重新萃取, 将有机层合并并用盐水洗涤。然后将有机相干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ), 过滤并真空浓缩以得到粗材料, 该材料无需进一步纯化便可用于下一步骤。

[0908] 步骤 7b: (S)-环己基-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄基氨基]-乙酸环戊酯 (86)

[0909]

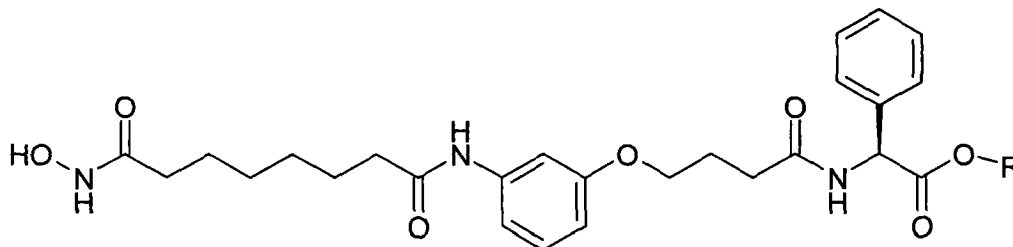


[0910] 将步骤 6b (50mg, 0.083mmol, 1eq) 的材料溶于 DCM/ 甲醇 (2mL : 2mL) 并与 TFA (1.0mL) 一起搅拌 2 小时。将所得盐浓缩, 溶于甲醇并通过制备型 HPLC 纯化以得到化合

物 (86)。LCMS 纯度 100%， $m/z$  502  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.28-1.98 (26H, m,  $13 \times CH^2$ ), 2.10-2.15 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.40 (2H, t,  $J = 7.8Hz$ ,  $CH_2$ ), 3.81 (1H, d,  $J = 3.9Hz$ , CH), 4.21 (2H, m,  $CH_2$ ), 5.01 (1H, s, CH), 5.23-5.25 (1H, m, CH), 7.43 (2H, d,  $J = 8.4Hz$ , Ar-H), 7.68 (2H, d,  $J = 8.7Hz$ , Ar-H)

[0911] 合成 92 和 93

[0912]

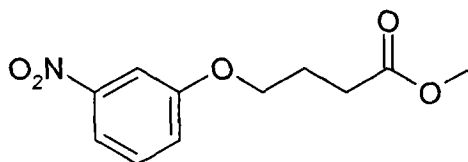


**R = 环戊基 92**

**R = H 93**

[0913] 阶段 1 : 4-(3-硝基-苯氧基)-丁酸甲酯

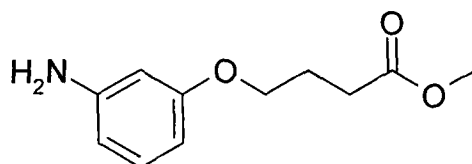
[0914]



[0915] 在 3-硝基苯酚 (8.35g, 60mmol) 的 DMF (50ml) 溶液中加入  $K_2CO_3$  (16.56g, 120mmol) 和 1,4-溴代丁酸甲酯 (11.95g, 66mmol)。将反应物室温搅拌 16 小时。用乙酸乙酯和水稀释反应物。将有机相分离并用水 ( $2 \times 200ml$ ) 洗涤。有机相用  $Na_2SO_4$  干燥并真空浓缩。通过层析 (乙酸乙酯: 庚烷, 1 : 9) 分离所需的醚, 其为淡黄色固体 (12.2g, 85% 产率)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  240  $[M^+ + H]^+$ 。

[0916] 阶段 2 : 4-(3-氨基-苯氧基)-丁酸甲酯

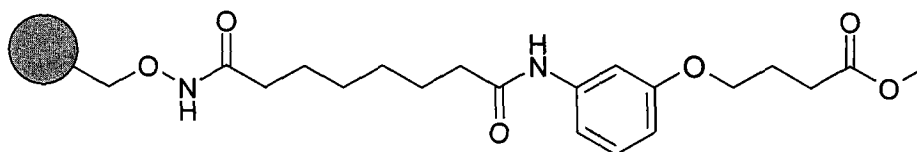
[0917]



[0918] 将阶段 1 的硝基酯 (250mg, 1mmol) 溶于乙醇 (3ml)。加入 Pd/ 碳 (40mg) 并将反应物在氢气 (气球压力) 下搅拌 16 小时。将反应混合物通过硅藻土过滤。硅藻土垫用乙醇洗涤并将合并的有机馏分真空浓缩以得到橙色油状的所需产物 (210mg, 100% 产率)。LCMS 纯度 89%,  $m/z$  210  $[M^+ + H]^+$ 。苯胺无需进一步纯化便可用于下一阶段。

[0919] 阶段 3 : 偶联到树脂

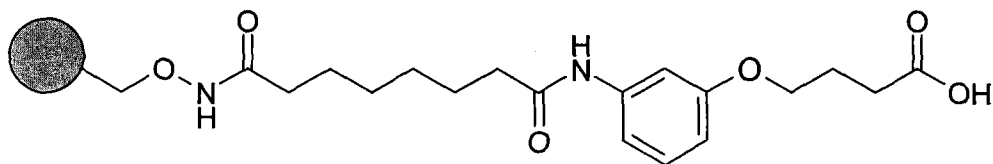
[0920]



[0921] 将辛酸衍生的羟胺 2-氯三苯甲基树脂 (8g, 7.52mmol, 以 0.94mmol/g 加载) 在 DCM/DMF (80ml/80ml) 中溶胀。在烧瓶中加入 PyBOP (11.8g, 22.6mmol) 和二异丙基乙胺 (13.1ml, 75.2mmol), 然后加入 4-(3-氨基-苯氧基)-丁酸甲酯 (4.73g, 22.6mmol)。将反应物室温振荡 72 小时然后进行标准洗涤和干燥。

[0922] 阶段 4: 酯水解

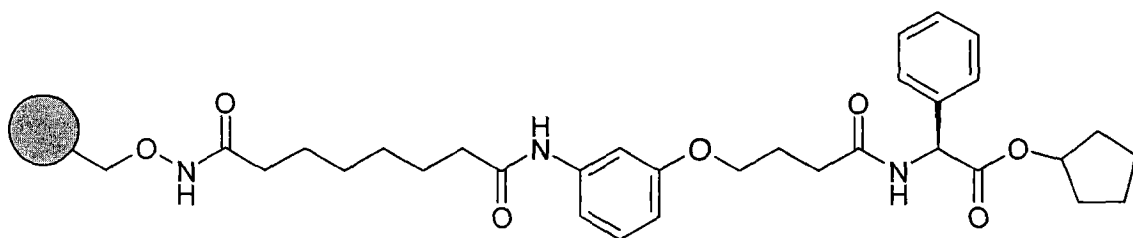
[0923]



[0924] 将阶段 3 的树脂 (9.5g) 悬浮于 THF/MeOH (34ml/34ml)。加入 NaOH (1.4M, 水溶液, 34ml) 并将反应物室温振荡 16 小时。树脂用标准洗涤过程洗涤, 然后空气干燥。

[0925] 阶段 5: 偶联氨基酸酯

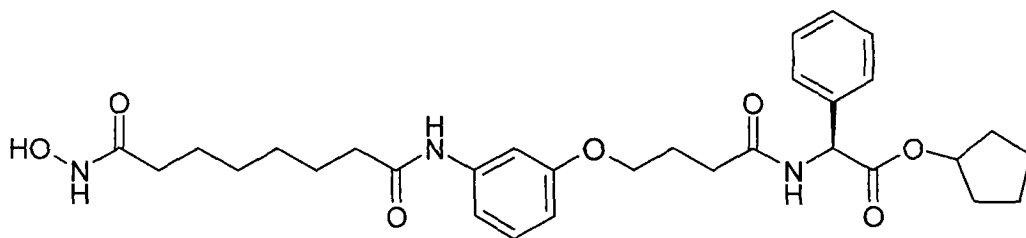
[0926]



[0927] 将阶段 4 的树脂 (2.1g) 悬浮于 DCM/DMF (20ml/20ml)。依次加入 PyBOP (3.1g, 5.92mmol)、N-苯基甘氨酸环戊酯 (2.4g, 5.92mmol) 和二异丙基乙胺 (3.4ml, 19.7mmol) 并将反应物室温振荡 72 小时。对树脂进行标准洗涤并干燥。

[0928] 阶段 6: (S)-{4-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯氧基]-丁酰氨基}-苯基-乙酸环戊酯 (92)

[0929]

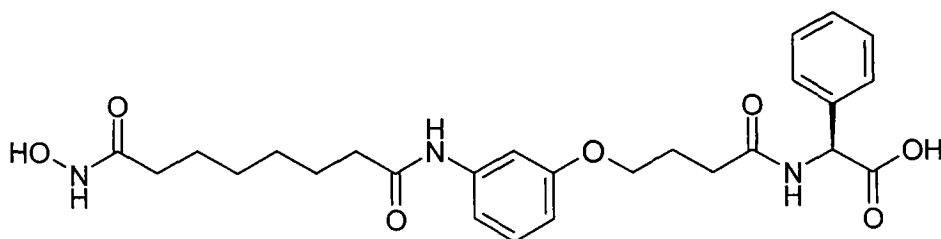


## 92

[0930] 将阶段 5 的结合树脂的环戊酯 (1.1g) 与 2% TFA/DCM (10ml) 一起振荡 10 分钟, 然后过滤树脂并在室温减压蒸发溶剂。重复该过程 (3 次), 合并的粗产物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (92) (114mg)。LCMS 纯度 99%,  $m/z$  568  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.40 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.45-1.90 (13H, m, 烷基), 2.10 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.40 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.50 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.00 (2H, m,  $CH_2$ ), 5.15 (1H, m, ), 5.40 (1H, s,  $NHCHCO$ ), 6.65 (1H, m, Ar), 7.15 (1H, m, Ar), 7.20 (1H, t, Ar), 7.30 (1H, s, Ar), 7.40 (5H, s, Ar)。

[0931] 阶段 7: (S)-{4-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯氧基]-丁酰氨基}-苯基-乙酸 (93)

[0932]

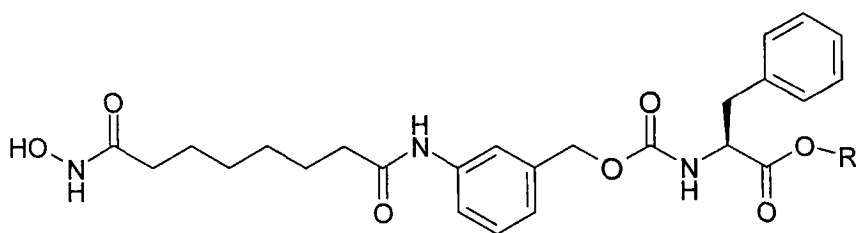


93

[0933] 将阶段 6 环戊酯树脂 (500mg) 悬浮于 THF (15ml)。在悬浮液加入 NaOH (1.4M 水溶液, 1.6ml) 并将反应物室温振荡 16 小时。除去滤液, 将树脂洗涤并干燥, 然后切除。与 2% TFA/DCM (5ml) 一起振荡 10 分钟以进行有效切除, 然后过滤树脂并在室温减压蒸发溶剂。重复该过程 (3 次), 合并的粗产物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (93) (62mg)。LCMS 纯度 99%,  $m/z$  500  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.40 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.60–1.80 (4H, m, 烷基), 2.10 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 2.40 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.50 (2H, t,  $CH_2$ ), 4.00 (2H, m,  $CH_2$ ), 5.45 (1H, s,  $NHCHCO$ ), 6.65 (1H, d, Ar), 7.10 (1H, m, Ar), 7.20 (1H, t, Ar), 7.25 (1H, s, Ar), 7.30–7.45 (5H, m, Ar)。

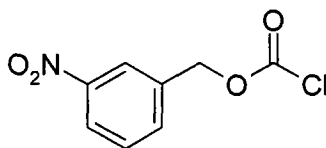
[0934] 合成 94 和 95

[0935]

**R = 环戊基 94****R = H 95**

[0936] 阶段 1: 形成氯甲酸 3-硝基-苄基酯

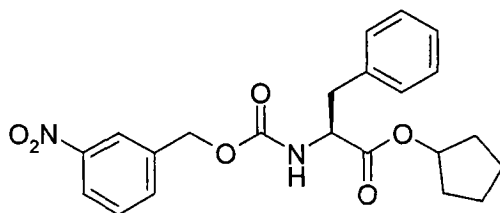
[0937]



[0938] 在 3-硝基苄醇 (10g, 65mmol) 的二噁烷 (无水, 100ml) 溶液中加入氯甲酸三氯甲酯 (9.47ml, 78mmol)。反应物在氮气下于 75°C 加热 16 小时。蒸发溶剂, 将残余物重悬于二噁烷并蒸发。重复该过程 (3 次)。粗制氯甲酸酯无需进一步纯化便可用于下一阶段。

[0939] 阶段 2: (S)-2-(3-硝基-苄氧基羰基氨基)-3-苯基-丙酸环戊酯

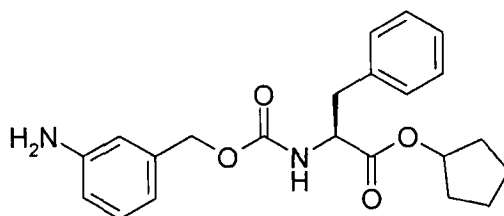
[0940]



[0941] 将 L-Phe- 环戊酯的 TsOH 盐 (9.42g, 23mmol) 悬浮于 DCM(40ml)。加入三乙胺 (6.5ml, 47mmol) 并将反应物室温搅拌 5 分钟。将溶于 DCM(10ml) 的阶段 1 的氯甲酸酯 (5g, 23mmol) 逐滴加入反应混合物并冷却 (冰浴)。将反应物室温搅拌 16 小时。除去溶剂并将残余物溶于 EtOAc(100ml), 用水 (50ml×3) 洗涤并干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 然后真空浓缩。粗材料通过层析 (EtOAc : 庚烷, 1 : 9) 纯化以得到所需的氨基甲酸酯 (6.4g, 67% 产率)。m/z 413  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$

[0942] 阶段 3 : (S)-2-(3-氨基-苄氧基羰基氨基)-3-苯基-丙酸环戊酯

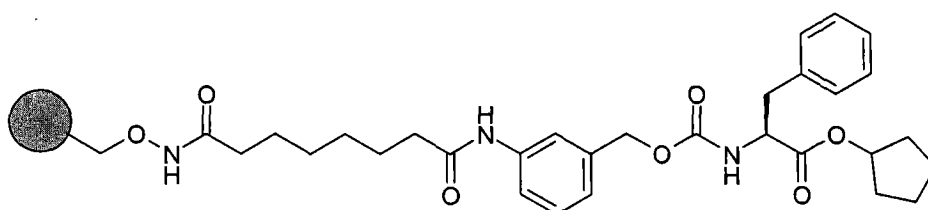
[0943]



[0944] 将阶段 2 的硝基氨基甲酸酯 (6.4g, 15.5mmol) 溶于乙醇 (64ml)。加入二水合氯化锡 (17.5g, 77mmol) 然后将反应物室温搅拌 16 小时。将溶剂蒸发并将残余物溶于 EtOAc (60ml)。加入饱和酒石酸钠钾溶液 (60ml), 然后加入加入饱和碳酸氢钠溶液 (120ml)。将此双相溶液搅拌 15 分钟。分离有机层并用 EtOAc (60ml×1) 萃取水相。将有机层合并, 干燥并蒸发溶剂以得到粗产物, 粗产物通过层析 (EtOAc : 庚烷 1 : 3 → 1 : 1) 纯化。分离所需产物 (3.5g, 59% 产率)。LCMS 纯度 100%, m/z 383  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$ 。

[0945] 阶段 4 : 偶联到树脂

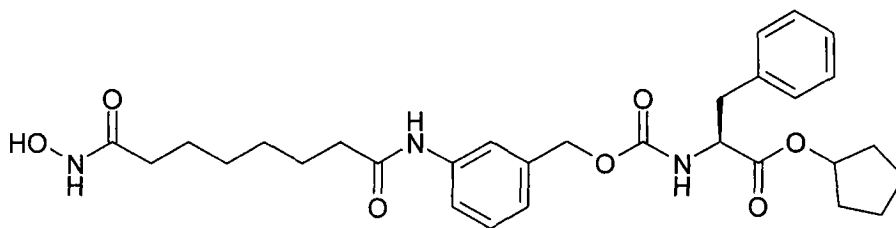
[0946]



[0947] 将辛酸衍生的羟胺 2-氯三苯甲基树脂 (2.0g, 1.88mmol, 以 0.94mmol/g 加载) 在 DMF (20ml) 中溶胀。加入 PyBOP (2.93g, 5.64mmol) 和二异丙基乙胺 (3.25ml, 18.8mmol)。加入溶于 DCM (20ml) 的阶段 3 的苯胺基氨基甲酸酯 (1.8g, 4.7mmol) 并将反应物振荡 4 天, 然后除去滤液, 对树脂进行标准洗涤并空气干燥。

[0948] 阶段 5 : (S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄氧基羰基氨基]-3-苯基-丙酸环戊酯 (94)

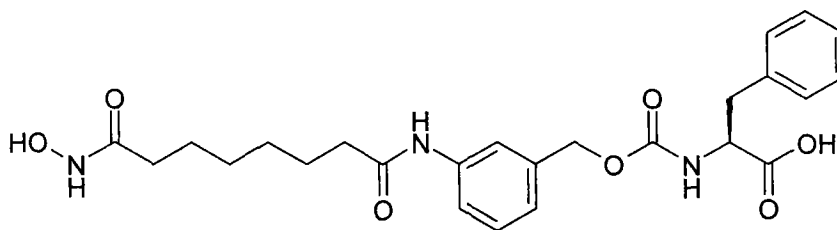
[0949]

**94**

[0950] 将阶段 4 的结合树脂的环戊酯 (2g) 在 2% TFA/DCM(15ml) 中振荡 10 分钟, 然后过滤树脂并在室温下减压蒸发溶剂。重复该过程 (3 次), 合并的粗产物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (94)。LCMS 纯度 95%,  $m/z$  554  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.30 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.40-1.90 (13H, m, 烷基), 2.00 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.30 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.90 (2H, ddd,  $CH_2$ ), 3.80 (1H, m), 4.25 (1H, dd,  $NHCHCO$ ), 4.90 (2H, s,  $CH_2$ ), 5.05 (1H, m), 5.35 (1H, m), 6.95 (1H, d, Ar), 7.05-7.25 (6H, m, Ar), 7.35-7.75 (2 H, m, Ar)。

[0951] 阶段 6: (S)-2-[3-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苄氧基羰基氨基]-3-苯基-丙酸 (95)

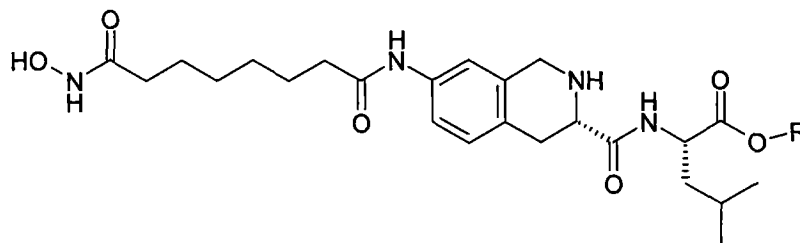
[0952]

**95**

[0953] 将化合物 (94) (100mg, 0.18mmol) 溶于 THF(1ml) 并加入 2M NaOH(1ml)。将反应瓶振荡 4 小时, 然后用氮气气流除去 THF。水性残余物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (95) (62mg)。LCMS 纯度 95%,  $m/z$  486  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.35 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.55-1.75 (4H, m, 烷基), 2.10 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.35 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.95 (2H, dd, CH), 3.20 (1H, dd, CH), 4.45 (1H, dd,  $NHCHCO$ ), 5.00 (2H, s,  $CH_2$ ), 7.05 (1H, d, Ar), 7.20-7.35 (6H, m, Ar), 7.55 (2H, m, Ar)。

[0954] 合成化合物 (96) 和化合物 (97)

[0955]

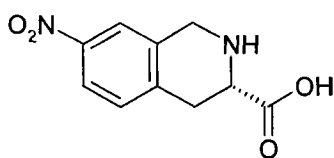


**R = 环戊基 96**

**R = H 97**

[0956] 阶段 1: (S)-7-硝基-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羧酸

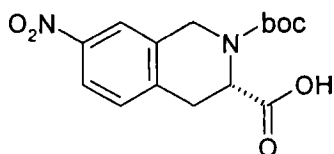
[0957]



[0958] 按照 Tett Letts 42,2001,3507 的描述制备。

[0959] 阶段 2 : (S)-7-硝基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2,3-二羧酸-2-叔丁酯

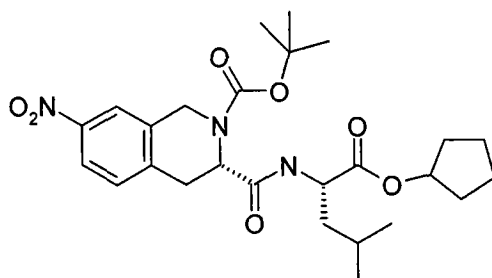
[0960]



[0961] 将 (S)-7-硝基-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羧酸 (7g, 31.5mmol) 溶于 THF : 水 (1 : 1, 350ml)。加入  $K_2CO_3$  (5.2g, 37mmol), 然后加入 boc 酸酐 (13.7g, 63mmol) 并将溶液在 40℃ 加热 1 小时。通过蒸发除去 THF, 将含水层调至 pH = 7, 然后用 EtOAc 萃取。有机层用 0.1M HCl (×3) 洗涤并用  $Na_2SO_4$  干燥, 然后真空浓缩。柱层析 (EtOAc : 庚烷 2 : 3 → EtOAc) 后得到所需 N-保护的产物 (7.5g, 74%), LCMS 纯度 92%, 未观察到分子离子

[0962] 阶段 3 : (S)-3-((S)-1-环戊氧基羰基-3-甲基-丁基氨甲酰基)-7-硝基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-羧酸叔丁酯

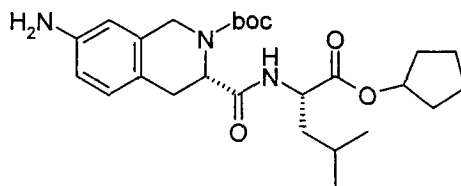
[0963]



[0964] 将 (S)-7-硝基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2,3-二羧酸-2-叔丁酯 (2.5g, 7.76mmol) 溶于 DCM (100ml)。加入 HOBt (1.16g, 8.53mmol), 加入 L-亮氨酸环戊酯 (3.19g, 8.53mmol), 然后加入三乙胺 (2.38ml, 17.1mmol)。加入 EDCI·HCl (1.46g, 8.5mmol) 并将反应物室温搅拌 16 小时。在反应物中加入 DCM (100ml), 有机层用水 (3×300ml) 洗涤, 用  $Na_2SO_4$  干燥并在真空下除去溶剂。粗产物通过层析 (EtOAc : 庚烷 1 : 2 → EtOAc) 纯化以得到所需产物 3.14g (82% 产率), LCMS 纯度 100%,  $m/z$  504  $[M^+ + H]^+$

[0965] 阶段 4 : (S)-7-氨基-3-((S)-1-环戊氧基羰基-3-甲基-丁基氨甲酰基)-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-羧酸叔丁酯

[0966]

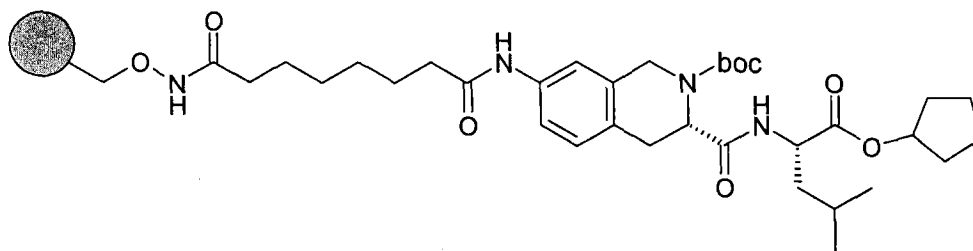


[0967] 将 (S)-3-((S)-1-环戊氧基羰基-3-甲基-丁基氨甲酰基)-7-硝基-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-羧酸叔丁酯 (3.14g, 6.24mmol) 和 Pd/碳 (0.4g) 悬浮于 EtOAc (20ml)。

将反应物在氢气（气球压力）下搅拌 16 小时。溶液通过硅藻土垫过滤并除去溶剂。粗产物（3.04g）无需进一步纯化便可用于下一步骤。LCMS 纯度 83%， $m/z$  474 $[M^+ + H]^+$

[0968] 阶段 5：偶联到树脂

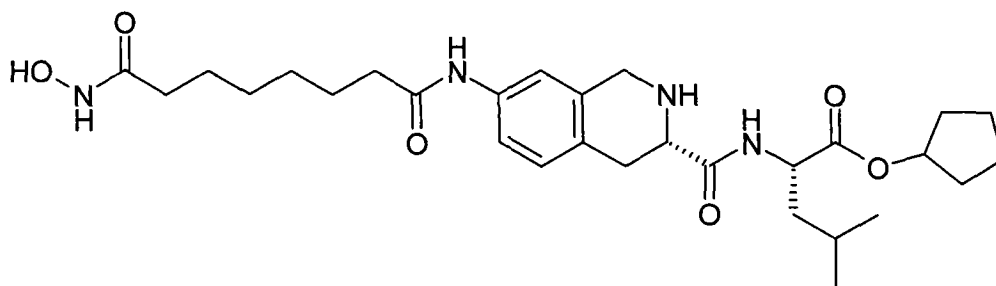
[0969]



[0970] 将辛酸衍生的羟胺 2-氯三苯甲基树脂（2.2g，以 0.94mmol/g 加载）在 DCM/DMF（1 : 1, 80ml）中溶胀。加入 PyBOP（3.20g, 6.15mmol）和二异丙基乙胺（3.54ml, 20.7mmol）。加入溶解在 DMF（40ml）的阶段 3 的苯胺基酰胺（3.04g, 6.43mmol）并将反应物振荡 3 天，然后除去滤液，对树脂进行标准洗涤并空气干燥。

[0971] 阶段 6：(S)-2-{[(S)-7-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羰基]-氨基}-4-甲基-戊酸环戊酯 (96)

[0972]

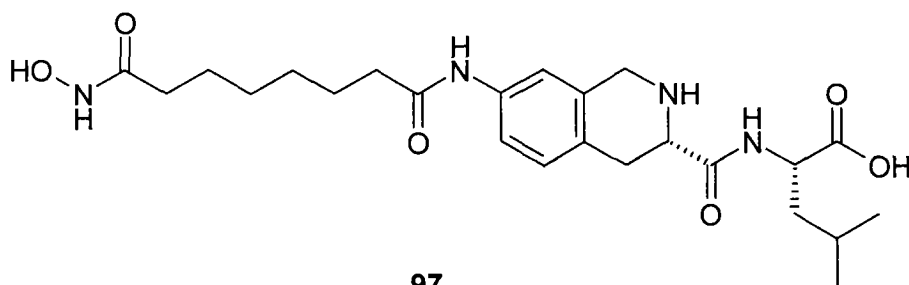


96

[0973] 将阶段 5 的结合树脂的环戊酯（600mg）与 2% TFA/DCM（8ml）一起振荡 30 分钟，然后滤去树脂并在室温减压蒸发溶剂。粗产物通过制备型 HPLC 纯化以得到 (S)-2-{[(S)-7-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羰基]-氨基}-4-甲基-戊酸环戊酯（17.5mg）。除了切除树脂外，还除去 boc 基团。LCMS 纯度 98%， $m/z$  545 $[M^+ + H]^+$ ， $^1H$  NMR（400MHz, MeOD）， $\delta$  : 0.85-0.88（6H, 2 $\times$  d,  $J$  = 6.4Hz,  $J$  = 6.5Hz, 2 $\times$  CH<sub>3</sub>），1.30（4H, m, 烷基），1.50-1.65（13H, m, 烷基），1.80（2H, m, CH<sub>2</sub>），1.95（2H, t, CH<sub>2</sub>），2.25（2H, t, CH<sub>2</sub>），3.00（1H, m, CH），3.25（1H, m, CH），4.10（1H, m, CH），4.25（2H, s, CH<sub>2</sub>），4.29（1H, m, CH），5.10（1H, m, CH），7.11（1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, Ar），7.25（1H, d,  $J$  = 8.3Hz, Ar），7.55（2H, m, Ar）。

[0974] 阶段 7：(S)-2-{[(S)-7-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-1,2,3,4-四氢-异喹啉-3-羰基]-氨基}-4-甲基-戊酸 (96)

[0975]

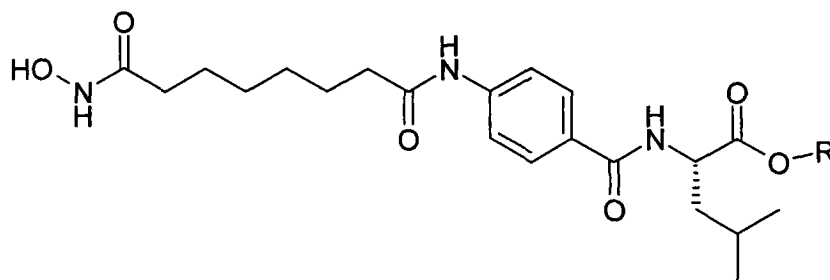


97

[0976] 将阶段 5 的环戊酯树脂 (1.55g) 悬浮于 THF/MeOH(10ml/10ml)。在悬浮液中加入 NaOH(1.4M 水溶液, 5ml) 并将反应物室温振荡 16 小时。除去滤液, 将树脂洗涤 (标准洗涤) 并干燥, 然后切除。与 2% TFA/DCM(8ml) 一起振荡 30 分钟以进行有效切除 (600mg 树脂), 然后过滤树脂并在室温减压蒸发溶剂。粗产物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (97) (73.4mg)。除了切除树脂外, 还除去 boc 基团。LCMS 纯度 96%,  $m/z$  477  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 0.98-1.02(6H, 2 $\times$ d,  $J$  = 6Hz,  $J$  = 6.1Hz, 2 $\times$ CH<sub>3</sub>), 1.40(4H, m, 烷基), 1.60-1.80(7H, m, 烷基), 2.10(2H, t,  $J$  = 7.4Hz, CH<sub>2</sub>), 2.39(2H, t, 7.6Hz, CH<sub>2</sub>), 3.15(1H, dd,  $J$  = 12.5 Hz,  $J$  = 16.6Hz, CH), 3.45(1H, dd,  $J$  = 4.9Hz,  $J$  = 17Hz, CH), 4.00(1H, s, CH), 4.20(1H, dd,  $J$  = 4.7Hz,  $J$  = 12.2Hz, CH), 4.40(2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.55(1H, dd,  $J$  = 4.7Hz,  $J$  = 10Hz, CH), 7.25(1H, d,  $J$  = 8.4Hz, Ar), 7.25(1H, d,  $J$  = 8Hz, Ar), 7.55(1H,  $J$  = 7Hz, Ar)。

[0977] 合成化合物 (98) 和化合物 (99)

[0978]

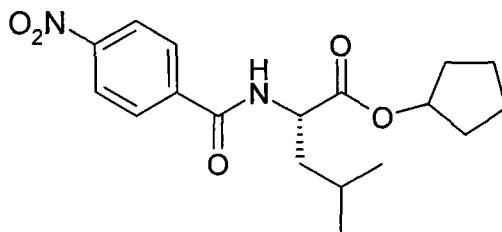


**R = 环戊基 98**

**R = H 99**

[0979] 阶段 1 : (S)-4-甲基-2-(4-硝基-苯甲酰氨基)-戊酸环戊酯

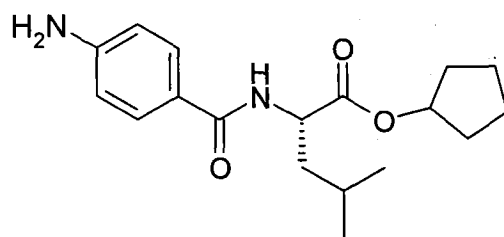
[0980]



[0981] 将 L-亮氨酸环戊酯的 TsOH 盐 (7.98g, 21.51mmol) 溶于 THF(40ml) 并加入三乙胺 (6ml, 21.5mmol)。分批加入 4-硝基苯甲酰氯 (4g, 21.5mmol) 并用冰浴冷却。将反应物室温搅拌 16 小时然后蒸发至干。将残余物溶于 DCM(100ml) 并用饱和碳酸氢钠 (3 $\times$ 100ml)、1M HCl(3 $\times$ 100ml) 和盐水洗涤, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 并在真空下除去溶剂以得到 5.25g 所需产物 (70% 产率), 该产物无需进一步纯化便可用于下一步骤, LCMS 纯度 100%,  $m/z$  349  $[M^+ + H]^+$

[0982] 阶段 2 : (S)-2-(4-氨基-苯甲酰氨基)-4-甲基-戊酸环戊酯

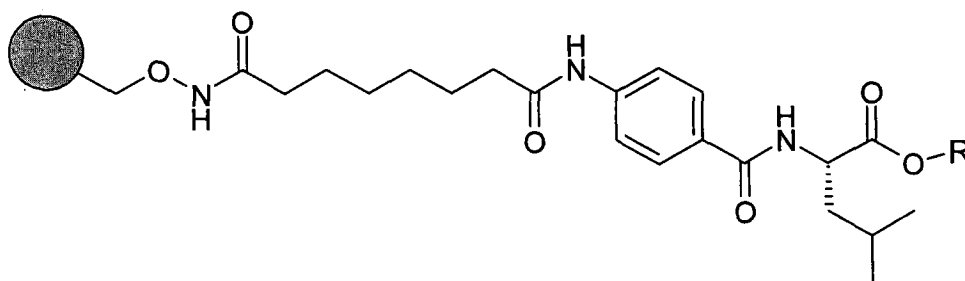
[0983]



[0984] 将阶段 1 的硝基酰胺 (5.25g, 15.1mmol) 溶于乙醇 (100ml)。加入 Pd/碳 (200mg) 并将反应物在氢气 (气球压力) 下室温搅拌 16 小时。将反应混合物通过硅藻土过滤并蒸发以得到 3.9g 所需的胺酰胺 (amine amide) (81% 产率), 该物质无需进一步纯化便可用于下一步骤, LCMS 纯度 100%,  $m/z$  319  $[M^+ + H]^+$

[0985] 阶段 3 : 偶联到树脂

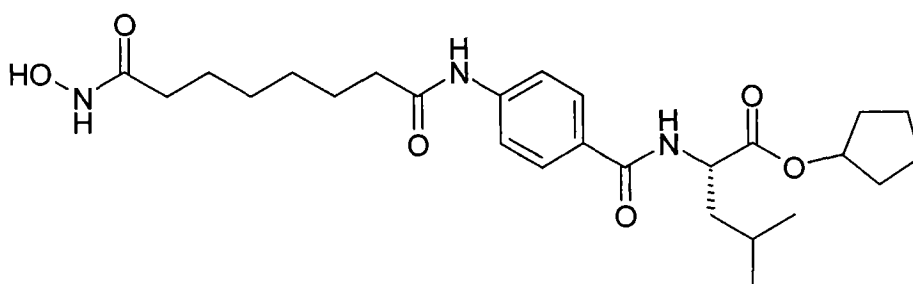
[0986]



[0987] 将辛二酸衍生的 Wang 羟胺树脂 (1.6g, 以 1.8mmol/g 加载) 在 DCM (无水, 20ml) 中溶胀。逐滴加入 1-氯-N,N-2-三甲基丙烯胺 (1.15ml, 8.64mmol), 然后室温振荡 1 小时。加入 (S)-2-(4-氨基-苯甲酰氨基)-4-甲基-戊酸环戊酯 (2.75g, 8.64mmol) 和三乙胺 (2.4ml, 17.63mmol) 并将反应物室温振荡 16 小时。将树脂洗涤 (标准洗涤) 并空气干燥。

[0988] 阶段 4 : (S)-2-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯甲酰氨基]-4-甲基-戊酸环戊酯 (98)

[0989]

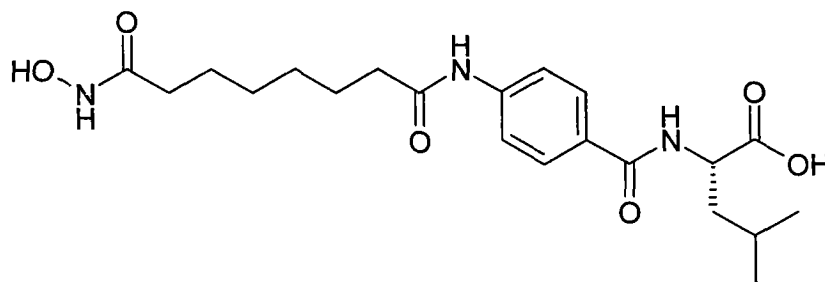


98

[0990] 将阶段 3 的结合树脂的环戊酯与 2% TFA/DCM (10ml) 一起振荡 10 分钟, 然后过滤树脂并于室温减压蒸发溶剂。重复该过程 (3 次), 合并的粗产物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (98) (36mg)。LCMS 纯度 91%,  $m/z$  490  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$  : 0.80-0.95 (6H, 2 $\times$ CH<sub>3</sub>), 1.25 (4H, m, 烷基), 1.40-1.85 (15H, m, 烷基), 2.00 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 2.30 (2H, t, CH<sub>2</sub>), 4.45 (1H, m, CH), 5.05 (1H, m, CH), 7.60 (2H, d, Ar), 7.75 (2H, d, Ar)。

[0991] 阶段 5 : (S)-2-[4-(7-羟基氨甲酰基-庚酰氨基)-苯甲酰氨基]-4-甲基-戊酸环戊酯 (99)

[0992]

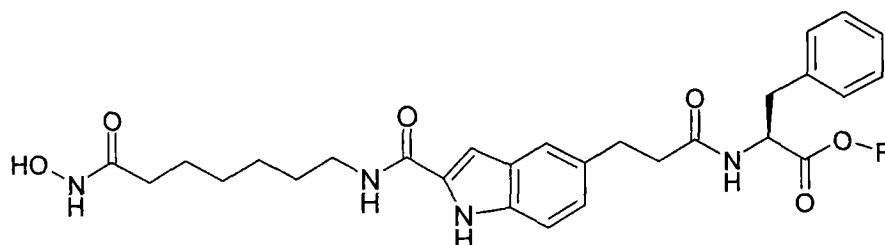


99

[0993] 将化合物 (98) (21mg, 0.043mmol) 溶于 THF (1ml) 并加入 2M NaOH (1ml)。将反应瓶振荡 16 小时, 然后在溶液表面用氮气吹扫以除去 THF。水性残余物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (99) (5.2mg)。LCMS 纯度 92%,  $m/z$  422  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 0.95-1.05 (6H, m,  $2 \times CH_3$ ), 1.30-1.50 (4H, m, 烷基), 1.55-1.85 (7H, m, 烷基), 2.10 (2H, t,  $CH_2$ ), 2.40 (2H, t,  $CH_2$ ), 4.65 (1H, m, CH), 7.65 (2H, d, Ar), 7.80 (2H, d, Ar)。

[0994] 合成化合物 (100) 和化合物 (101)

[0995]

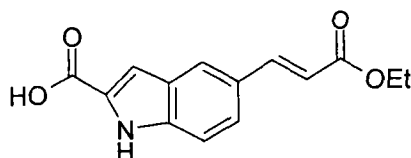


**R = 环戊基 100**

**R = H 101**

[0996] 阶段 1: 5-((E)-2-乙氧基羰基-乙烯基)-1H-吲哚-2-羧酸

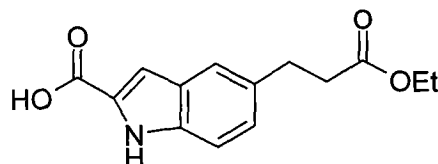
[0997]



[0998] 在微波试管中加入 5-溴吲哚-2-羧酸 (400mg, 1.66mmol) 和三-0-甲基膦 (96mg, 0.32mmol)。加入丙烯酸乙酯 (0.56ml, 5.6mmol)、 $Et_3N$  (0.92ml, 6.6mmol)、乙腈 (2.5ml) 和  $Pd(OAc)_2$  (40mg, 0.18mmol)。反应物放置在 150W、90°C 的 CEM 微波中处理 30 分钟, 斜坡时间 (ramp time) 为 5 分钟。加入 EtOAc 并通过硅藻土过滤反应混合物。硅藻土垫用 DCM 洗涤, 除去合并的有机组分以得到黄色固体。将该固体重溶于 DCM 并用饱和碳酸氢钠萃取。含水层用 DCM 和二乙醚洗涤。水性碱性层用 2M HCl 酸化 ( $pH = 5$ ) 并将产物萃取入 EtOAc。除去溶剂以得到所需产物 (370mg, 86% 产率)。LCMS 纯度 86%,  $m/z$  260  $[M^+ + H]^+$

[0999] 阶段 2: 5-((E)-2-乙氧基羰基-乙烯基)-1H-吲哚-2-羧酸

[1000]

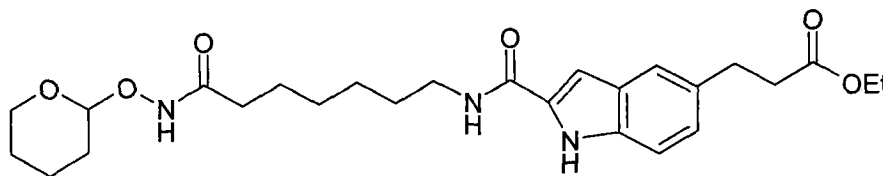


95

[1001] 将 5-((E)-2-乙氧基羰基-乙烯基)-1H-吡啶-2-羧酸 (430mg, 1.66mmol) 溶于 EtOAc (100ml)。加入 Pd/ 碳 (100mg) 并将反应物在氢气 (气球压力) 下搅拌 18 小时。将反应混合物通过硅藻土垫过滤并用 EtOAc 洗涤。除去溶剂以得到所需产物, 该产物无需进一步纯化便可用于下一步骤 (0.47g)。LCMS 纯度 92%,  $m/z$  262  $[M^+ + H]^+$

[1002] 阶段 3 : 3-{2-[6-(四氢-吡喃-2-基氧基氨甲酰基)-己基氨甲酰基]-1H-吡啶-5-基}-丙酸乙酯

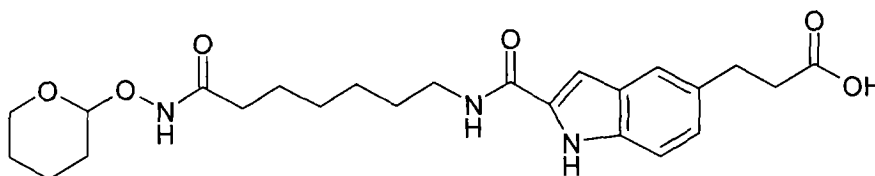
[1003]



[1004] 将 5-((E)-2-乙氧基羰基-乙烯基)-1H-吡啶-2-羧酸 (0.427g, 1.6mmol) 溶于无水 DMF (20ml)。加入 EDCI·HCl (0.38g, 2mmol)、Et<sub>3</sub>N (0.59ml, 4.3mmol)、HOBT (0.27g, 2mmol) 和 7-氨基庚酸 (四氢吡喃-2-基氧基) 酰胺\* (0.4g, 1.6mmol, 溶于 20ml 无水 DMF) 并将反应物在氮气下室温搅拌 16 小时。加入水, 将反应混合物酸化至 pH = 6-7 (10% 柠檬酸) 并用 DCM 萃取。有机层用 10% 柠檬酸和饱和碳酸氢钠 (×2) 洗涤。溶剂在真空下除去以得到粗产物, 粗产物通过层析 (EtOAc : 己烷 1 : 2 → EtOAc) 纯化以得到黄色固体状的所需产物 (550mg, 69% 产率)。LCMS 纯度 93%,  $m/z$  488  $[M^+ + H]^+$

[1005] 阶段 4 : 3-{2-[6-(四氢-吡喃-2-基氧基氨甲酰基)-己基氨甲酰基]-1H-吡啶-5-基}-丙酸

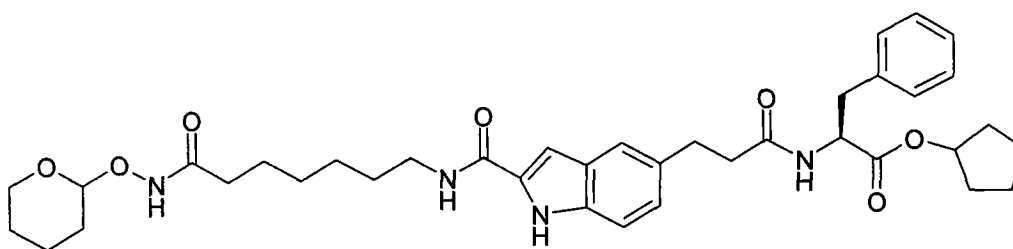
[1006]



[1007] 将 3-{2-[6-(四氢-吡喃-2-基氧基氨甲酰基)-己基氨甲酰基]-1H-吡啶-5-基}-丙酸乙酯 (550mg, 1.13mmol) 溶于 THF/ 甲醇 (50ml/25ml)。加入 1.4 M NaOH 溶液 (50ml) 并将反应物室温搅拌 4 小时。将溶剂减少至约 50% 体积, 加入 1M HCl 使 pH 为 6-7。混合物用 DCM 萃取并用 EtOAc 进一步萃取。合并的有机层用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥并在真空下除去溶剂以得到 357mg 黄色粉末状的所需产物 (69% 产率), 该产物无需进一步纯化便可用于下一步骤。LCMS 纯度 94%,  $m/z$  460  $[M^+ + H]^+$

[1008] 阶段 5 : (S)-3-苯基-2-(3-{2-[6-(四氢-吡喃-2-基氧基氨甲酰基)-己基-氨甲酰基]-1H-吡啶-5-基}-丙酰氨基)-丙酸环戊酯

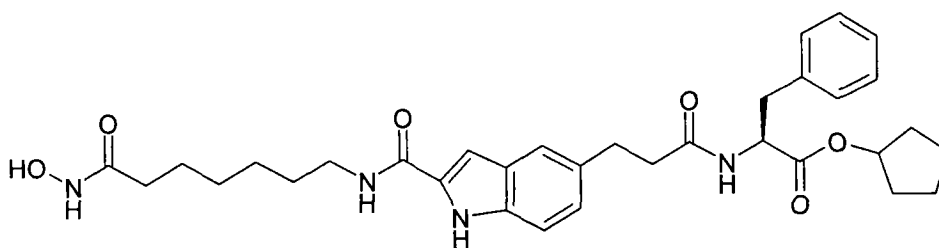
[1009]



[1010] 将 3-{2-[6-(四氢-吡喃-2-基氧基氨甲酰基)-己基氨甲酰基]-1H-吡啶-5-基}-丙酸 (0.357g, 0.78mmol) 溶于 DCM/DMF (20ml/20ml)。加入 EDCI·HCl (0.163g, 0.86mmol)、三乙胺 (0.24ml, 1.7mmol)、HOBT (0.116g, 0.88mmol) 和 L-苯丙氨酸环戊酯的 TsOH 盐 (0.346g, 0.88mmol), 并将反应混合物在氮气下室温搅拌 16 小时。减小溶剂体积 (约 10ml), 加入 DCM 并用水 (×3) 洗涤有机层。将有机层干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 并除去溶剂以得到所需产物 (500mg, 95% 产率), 该产物无需进一步纯化即可使用。LCMS 纯度 77%,  $m/z$  675  $[\text{M}^+\text{H}]^+$

[1011] 阶段 6: (S)-2-{3-[2-(6-羟基氨甲酰基-己基氨甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-丙酰氨基}-3-苯基-丙酸环戊酯 (100)

[1012]

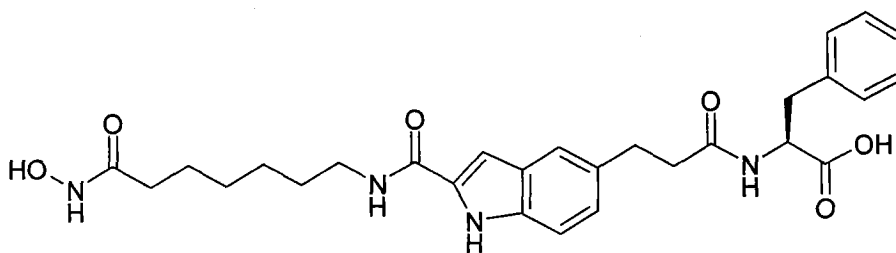


100

[1013] 将 (S)-3-苯基-2-(3-{2-[6-(四氢-吡喃-2-基氧基氨甲酰基)-己基-氨甲酰基]-1H-吡啶-5-基}-丙酰氨基)-丙酸环戊酯 (200mg, 0.297mmol) 在 TFA/DCM/MeOH (1.5ml/15ml/15ml) 中室温搅拌 3.5 小时。再加入 TFA (0.3ml) 并将反应物再搅拌 30 分钟。将溶液真空浓缩, 重悬于 DCM 并除去溶剂 (×3)。粗材料通过制备型 HPLC 纯化以得到纯的化合物 (100) (19.3mg), LCMS 纯度 100%,  $m/z$  591  $[\text{M}^+\text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.27-1.70 (16H, m, 烷基), 1.97 (2H, t,  $\text{CH}_2$ ), 2.40 (2H, t,  $J = 7.84\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 2.76-2.85 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 3.25 (2H, t,  $J = 7\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 4.41 (1H, m,  $\text{NHCH}_2\text{CO}$ ), 4.95 (1H, m, CH), 6.85 (1H, s, CH), 6.95 (3H, m, Ar), 7.05 (3H, m, Ar), 7.20-7.26 (2H, s+d,  $J = 8.5\text{Hz}$ , Ar)

[1014] 阶段 7: (S)-2-{3-[2-(6-羟基氨甲酰基-己基氨甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-丙酰氨基}-3-苯基-丙酸 (101)

[1015]



101

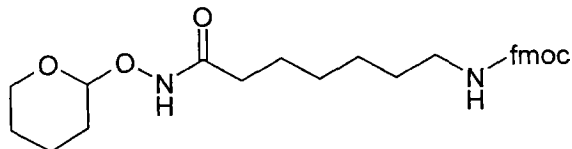
[1016] 将化合物 (100) (80mg, 0.14mmol) 溶于 THF/MeOH (1ml/0.5ml) 并加入 1.4M NaOH (0.5ml)。将反应物室温搅拌 2 小时。在溶液表面用氮气气流吹扫以除去 THF, 残余物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (101) (34.9mg), LCMS 纯度 95%,  $m/z$  523  $[\text{M}^+\text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.35-1.50 (4H, m, 烷基), 1.60-1.75 (4H, m, 烷基), 2.15 (2H, brt,  $\text{CH}_2$ ), 2.55 (2H, brt,  $\text{CH}_2$ ), 2.95 (3H, m,  $\text{CH} + \text{CH}_2$ ), 3.10 (1H, dd, CH), 4.65, (1H, m,  $\text{NHCH}_2\text{CO}$ ),

7.00-7.15 (7H, m, Ar), 7.35-7.41 (2H, m, Ar)

[1017] \* 制备 7-氨基庚酸(四氢吡喃-2-基氧基)酰胺

[1018] 阶段 1: 6-(四氢-吡喃-2-基氧基氨基甲酰基)-己基]-氨基甲酸 9H-芴-9-基甲酯

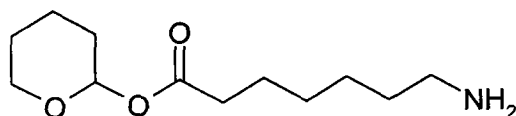
[1019]



[1020] 在 7-(9H-芴-9-基氧基羰基氨基)庚酸 (1g, 2.72mmol) 的无水 DCM/THF (15ml/15ml) 溶液中加入 EDCI·HCl (627mg, 3.27mmol)、HOBt (442mg, 3.27mmol) 和 O-(四氢-吡喃-2-基)-羟胺 (383mg, 3.27mmol) 并在氮气下搅拌 48 小时。加入 EDCI·HCl (260mg, 1.36mmol)、HOBt (184mg, 1.36mmol) 和 O-(四氢-吡喃-2-基)-羟胺 (159mg, 1.36mmol) 并将反应物继续搅拌 24 小时。反应混合物用稀 DCM (100ml)、水 (3×100ml) 和盐水 (100ml) 洗涤, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并真空浓缩。通过层析 (MeOH : DCM 2 : 98) 纯化得到白色固体 (1.03g, 81%)。

[1021] 阶段 2: 7-氨基-庚酸四氢-吡喃-2-基酯

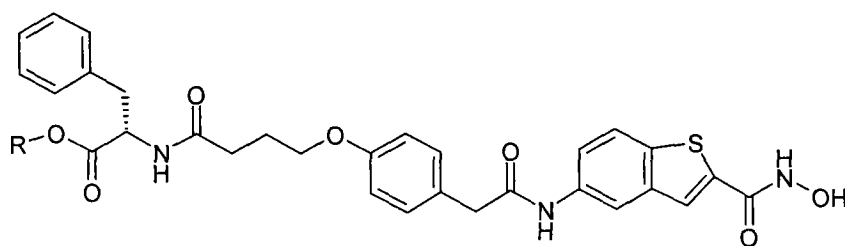
[1022]



[1023] 将 6-(四氢-吡喃-2-基氧基氨基甲酰基)-己基]-氨基甲酸 9H-芴-9-基甲酯 (300mg, 0.644mmol) 溶于 20% 哌啶 / DCM (30ml) 并将反应物搅拌 0.5 小时。将反应物蒸发至干, 重溶于 DCM 并蒸发 (×3)。层析 (MeOH : DCM : NH<sub>3</sub>) 后得到 120mg 所需产物。LCMS 纯度 98%, m/z 245 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。

[1024] 合成化合物 (102) 和化合物 (103)

[1025]

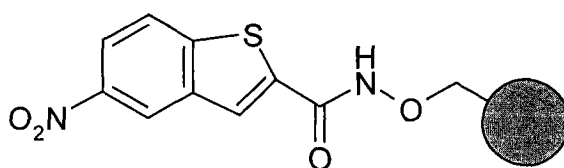


R = 环戊基 102

R = H 103

[1026] 阶段 1: 加载树脂

[1027]

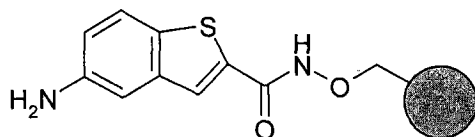


[1028] 将 Wang 羟胺树脂 (3.72g, 1.8mmol/g) 在 DMF (50ml) 中溶胀。加入 HATU (7.5g,

19.7mmol)、5-硝基-1-苯并噻吩-2-羧酸(3g, 13.45mmol, 溶于150ml DMF)和二异丙基乙胺(4.65ml, 26.7mmol)并将树脂室温振荡4天。将树脂过滤,用标准洗涤过程洗涤并空气干燥。

[1029] 阶段2:还原硝基

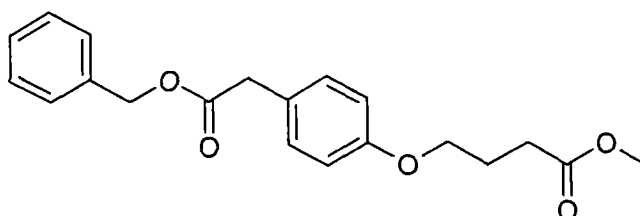
[1030]



[1031] 将阶段1的树脂(4.9g, 1.8mmol/g)在DMF(200ml)中溶胀并加入二水合氯化锡(19.9g, 88mmol)。将反应物室温振荡16小时。将树脂过滤,用标准洗涤过程洗涤并空气干燥。

[1032] 阶段3:4-(4-苄氧基羧基甲基-苯氧基)-丁酸甲酯

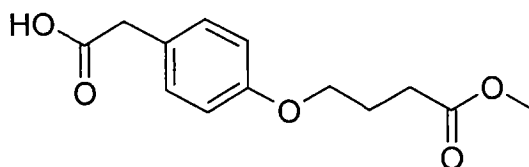
[1033]



[1034] 将4-羟基苯基乙酸苄酯(9g, 37mmol)溶于DMF(300ml)。加入粉末氢氧化钠(2.23g, 56mmol)和4-溴丁酸甲酯(6.4ml, 56mmol)并将反应物在60℃加热16小时。在冷却的反应混合物中加入水并用1M HCl酸化该溶液(pH = 5/6)。含水层用EtOAc萃取,有机层用水(×2)洗涤,用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并蒸发至干。层析(EtOAc:庚烷1:2)后获得所需的二酯(9.56g, 75%)LCMS纯度90%, m/z 343[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。

[1035] 阶段4:4-(4-羧甲基-苯氧基)-丁酸甲酯

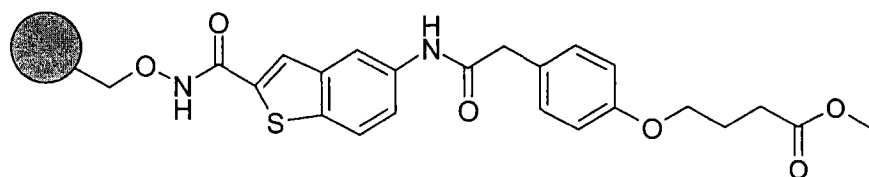
[1036]



[1037] 将4-(4-苄氧基羧基甲基-苯氧基)-丁酸甲酯(1.4g, 4.09mmol)溶于EtOAc(60ml)。加入Pd/碳(100mg)并将反应物在氢气(气球压力)下室温搅拌16小时。将反应混合物通过硅藻土垫过滤,垫子用EtOAc洗涤。将滤液蒸发至干以得到白色固体(1.03g, 100%产率)。LCMS纯度93%, m/z 253[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。

[1038] 阶段5:偶联到树脂

[1039]

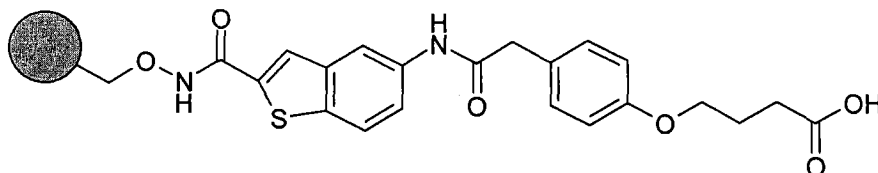


[1040] 将阶段2的树脂(0.18g, 1.8mmol/g)在DMF(5ml)中溶胀。加入HATU(0.37g,

0.96mmol)、4-(4-羧甲基-苯氧基)-丁酸甲酯(0.247g,0.96mmol,溶于10ml DMF)和二异丙胺(0.56ml,3.3mmol)并将反应物室温振荡16小时。过滤反应物,树脂用标准洗涤过程洗涤并空气干燥。

[1041] 阶段6:酯水解

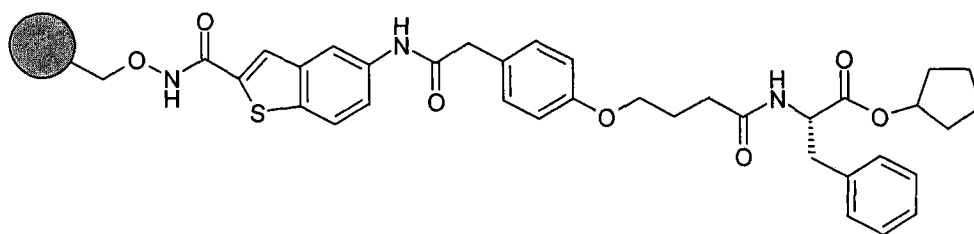
[1042]



[1043] 将阶段5的甲酯(280mg,1.8mmol/g)溶于THF/MeOH(4ml/4ml)并加入1.4MNaOH(8ml)。将反应物室温振荡16小时。将树脂过滤,用标准洗涤过程洗涤并空气干燥。

[1044] 阶段7:氨基酸偶联

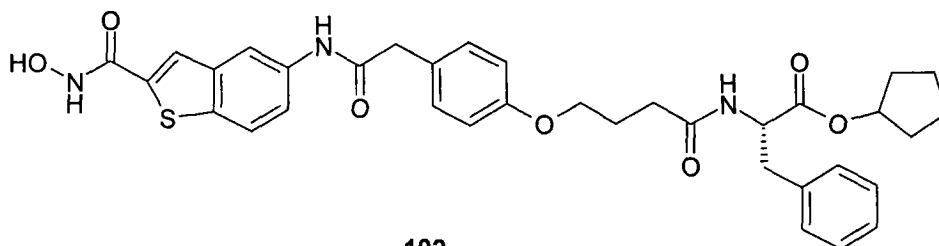
[1045]



[1046] 将阶段6的树脂(1.6g,1.8mmol/g)在无水DMF(120ml)中溶胀。加入HATU(3.3g,8.6mmol)、L-苯丙氨酸环戊酯的TsOH盐(3.4g,8.6mmol)和二异丙胺(5ml,2.9mmol)并将反应物室温振荡16小时。过滤反应物,树脂用标准洗涤过程洗涤并空气干燥。

[1047] 阶段8:(S)-2-(4-{4-[ (2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-5-基氨甲酰基)-甲基]-苯氧基}-丁酰氨基)-3-苯基-丙酸环戊酯(102)

[1048]

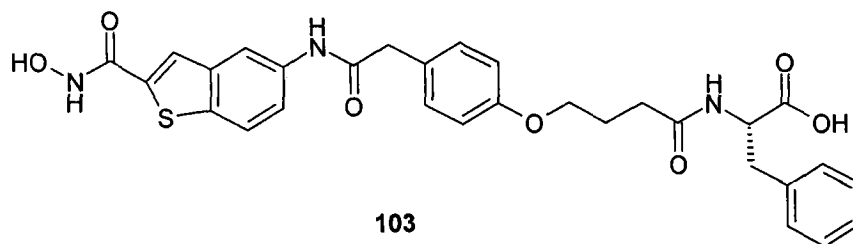


102

[1049] 将阶段7的结合树脂的环戊酯与2%TFA/DCM(10ml)一起振荡10分钟,然后滤去树脂并在室温下减压蒸发溶剂。重复该过程(3次),合并的粗产物通过制备型HPLC纯化以得到化合物(102)(22.5mg)。LCMS纯度99%, $m/z$  644 $[M^+H]^+$ , $^1H$  NMR(400MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.45-1.80(6H, m, 烷基), 1.95(2H, pent,  $CH_2$ ), 2.34(2H, t,  $J = 7.3$ Hz,  $CH_2$ ), 2.90(1H, dd, CH), 3.04(1H, dd, CH), 3.62(2H, s,  $CH_2$ ), 3.86, (2H, m,  $CH_2$ ), 4.55(1H, m,  $NHCHCO$ ), 5.07(1H, br s, CH), 6.83(2H, d,  $J = 8.3$ Hz, Ar), 7.14-7.18(5H, m, Ar), 7.25(2H, d,  $J = 8$ Hz, Ar), 7.47(1H, d,  $J = 9$ Hz, Ar), 7.73(1H, s, Ar), 7.81(1H, d,  $J = 8.8$ Hz), 8.25(1H, s, Ar)

[1050] 阶段9:(S)-2-(4-{4-[ (2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-5-基氨甲酰基)-甲基]-苯氧基}-丁酰氨基)-3-苯基-丙酸(103)

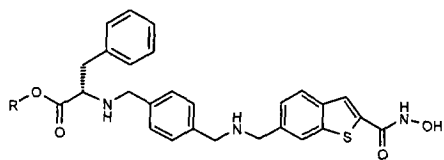
[1051]



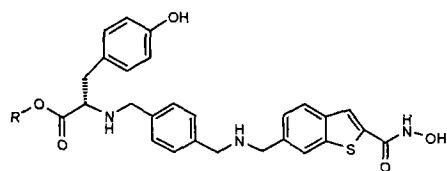
[1052] 将阶段 7 环戊酯树脂 (200mg) 在 THF/MeOH(2ml/2ml) 中溶胀并加入 1.4M NaOH(2ml)。将反应物室温振荡 16 小时。将树脂过滤并用标准洗涤过程洗涤。将结合树脂的羧酸与 2% TFA/DCM(3ml) 一起振荡 10 分钟,然后滤去树脂并在室温下减压蒸发溶剂。重复该过程 (3 次),合并的粗产物通过制备型 HPLC 纯化以得到化合物 (103) (33.7mg)。LCMS 纯度 88%,  $m/z$  576  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(400MHz,  $d_6$ -DMSO),  $\delta$  :1.93 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.30 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.91 (1H, dd,  $J = 9.9Hz$ ,  $J = 13.8Hz$ , CH), 3.13 (1H, dd,  $J = 4.8Hz$ ,  $J = 13.9Hz$ , CH), 3.67 (2H, s,  $CH_2$ ), 3.91, (2H, m,  $CH_2$ ), 4.50 (1H, m,  $NHCHCO$ ), 6.92 (2H, d,  $J = 8.7 Hz$ , Ar), 7.24-7.34 (7H, m, Ar), 7.61 (1H, m), 7.92 (1H, br s, Ar), 8.00 (1H, d,  $J = 8.8Hz$ , Ar), 8.31 (1H, d,  $J = 8.1Hz$ , Ar), 8.39 (1H, s), 9.36 (1H, br s), 10.36 (1H, s), 11.52 (1H, s), 12.76 (1H, brs)

[1053] 合成图 7 的化合物,以化合物 (104) 和化合物 (105) 为例

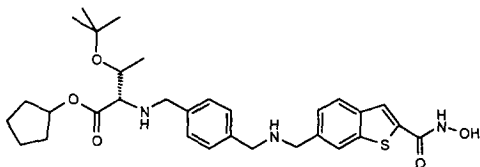
[1054]



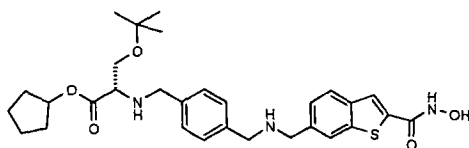
R = 环戊基 104  
R = H 105



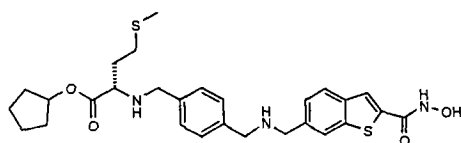
R = 环戊基 106  
R = H 107



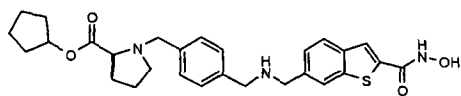
108



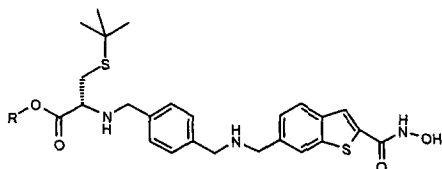
109



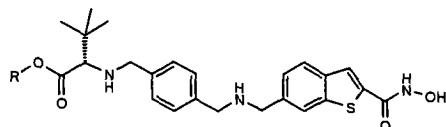
110



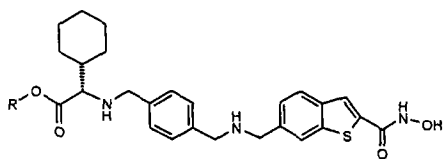
R = 环戊基 111  
R = H 112



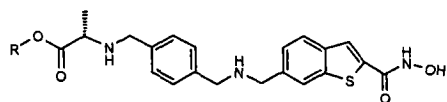
R = 环戊基 113  
R = H 114



115

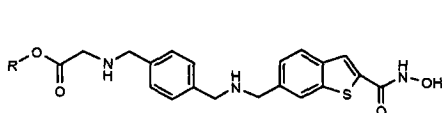


R = 环戊基 116  
R = H 117

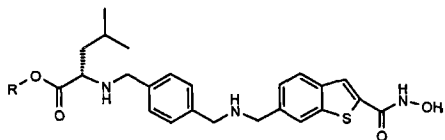


R = 环戊基 118  
R = H 119

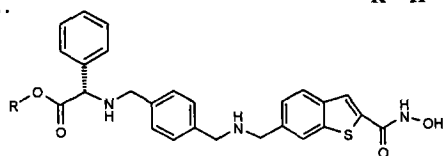
[1055]



R = 环戊基 120  
R = H 121



R = 环戊基 122  
R = H 123

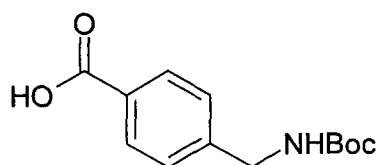


R = 环戊基 124  
R = H 125

[1056] 图 7

[1057] 步骤 1 :4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基)-苯甲酸

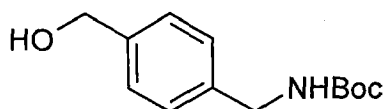
[1058]



[1059] 将 4-氨基甲基苄醇 (1.0g, 6.60mmol) 在 THF (10mL) 和水 (10mL) 的混合物中调成浆液。加入饱和碳酸氢钠溶液直到溶液的 pH 值 > pH9。将混合物冷却至 0℃ 并加入二碳酸二叔丁酯 (2.89g, 13.23mmol)。将反应物搅拌过夜然后在真空下除去 THF。含水混合物用 EtOAc (20mL) 萃取, 然后加入 1N HCl 酸化至 pH3。再用 EtOAc (2×10mL) 萃取, 将有机层合并, 干燥 (MgSO<sub>4</sub>) 并蒸发至干以得到所需产物 (1.60g, 97%)。m/z 252 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>

[1060] 步骤 2: (4-羟甲基-苄基)-氨基甲酸叔丁酯

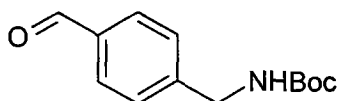
[1061]



[1062] 将 LiAlH<sub>4</sub> (227mg, 5.97mmol) 在 THF (5mL) 和二噁烷 (5mL) 的混合物中调成浆液并在氮气下冷却至 0℃。将 4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基)-苯甲酸溶于 THF (5mL) 和二噁烷 (5mL) 的混合物并用 15 分钟逐滴加入到所述的已冷却的溶液中。使反应混合物回复室温并搅拌 16 小时。在反应混合物中加水 (1mL), 然后通过硅藻土过滤。将滤液蒸发至干并使残余物在 EtOAc (25mL) 和水 (25mL) 之间分配。含水层用 EtOAc (2×25mL) 萃取, 将有机层合并, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并蒸发至干以得到所需产物 (460mg, 100%)。m/z 260 [M<sup>+</sup>+Na]<sup>+</sup>

[1063] 步骤 3: (4-甲酰-苄基)-氨基甲酸叔丁酯

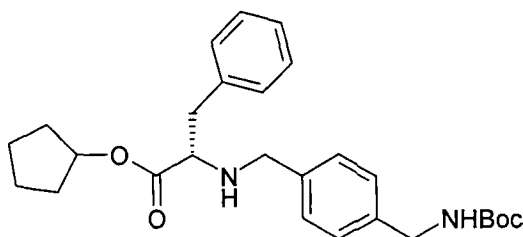
[1064]



[1065] 将 (4-羟甲基-苄基)-氨基甲酸叔丁酯 (480mg, 0.71mmol) 溶于 DCM (3mL) 并冷却至 -78℃ (干冰/丙酮)。将 Dess-Martin 氧化剂 (Dess-Martin periodinane) (331mg, 0.78mmol) 加入反应物中, 使其回复室温并搅拌 3 小时。加入饱和碳酸氢钠和亚硫酸钠的 1:1 溶液 (20mL) 并将反应混合物剧烈搅拌 15 分钟。将有机层分离, 用饱和碳酸氢钠 (10mL) 洗涤, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并蒸发至干以得到所需化合物 (480mg, 100%)。m/z 258 [M<sup>+</sup>+Na]<sup>+</sup>

[1066] 步骤 4: (S)-2-[4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基)-苄基氨基]-3-苯基-丙酸环戊酯

[1067]

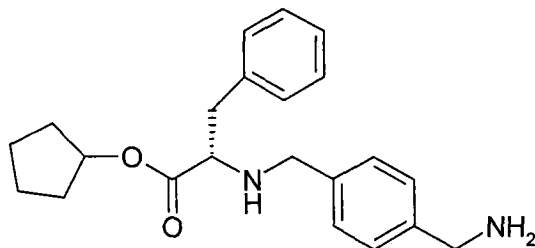


[1068] 将 (4-甲酰-苄基)-氨基甲酸叔丁酯 (200mg, 0.85mmol) 溶于 DCE (10mL) 并在其中加入苯丙氨酸环戊酯 (214mg, 0.94mmol)。将反应物室温搅拌 15 分钟。加入三乙酰氧基

硼氢化钠 (538mg, 2.55mmol) 和乙酸 (60 $\mu$ L) 并将反应物再搅拌 1 小时。加入饱和碳酸氢钠 (10ml) 并用 DCM(20mL) 稀释该溶液。将有机层分离并浓缩以得到所需产物, 该产物无需进一步纯化便可用于下一步骤。m/z 453[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>

[1069] 步骤 5 : (S)-2-(4-氨基甲基-苄基氨基)-3-苯基-丙酸环戊酯

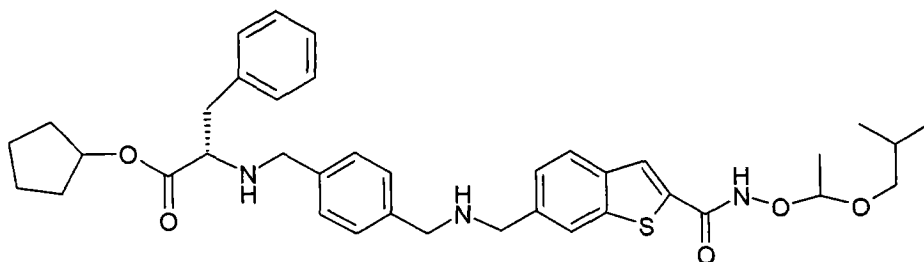
[1070]



[1071] 用 4M HCl 的二噁烷 (1mL, 0.25mmol) 溶液处理 (S)-2-[4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基)-苄基氨基]-3-苯基-丙酸环戊酯并室温搅拌 1 小时。将混合物蒸发至干并在 EtOAc (20mL) 和水 (20mL) 之间分配。在含水层中加入饱和碳酸氢钠 (20mL) 然后用 EtOAc (3 $\times$ 20mL) 萃取。将有机层合并, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并蒸发至干以得到所需产物 (263mg, 2 个步骤 79%)。m/z 353[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>

[1072] 步骤 6 : (S)-2-[4-({[2-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-甲基)-苄基氨基]-3-苯基-丙酸环戊酯

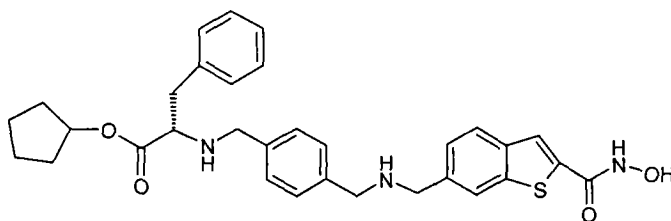
[1073]



[1074] 在氮气下将 6-甲酰-苯并[b]噻吩-2-羧酸 (1-异丁氧基-乙氧基) 酰胺 (方案 7) (220mg, 0.68mmol) 和 (S)-2-(4-氨基甲基-苄基氨基)-3-苯基-丙酸环戊酯 (263mg, 0.75mmol) 溶于 DCE (10mL)。加入三乙酰氧基硼氢化钠 (430mg, 2.04mmol) 和乙酸 (50  $\mu$  L) 并将反应物室温搅拌 3 小时。加入碳酸氢钠 (20mL) 并用二氯甲烷 (3 $\times$ 50mL) 萃取反应混合物。将有机层合并并浓缩。残余物通过柱层析 (50% -100% EtOAc/ 庚烷) 纯化以得到保护的化合物 (80mg, 21%)。m/z 658[M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>

[1075] 步骤 7 : (S)-2-(4-({[2-(羟基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-甲基)-苄基氨基)-3-苯基-丙酸环戊酯 (104)

[1076]



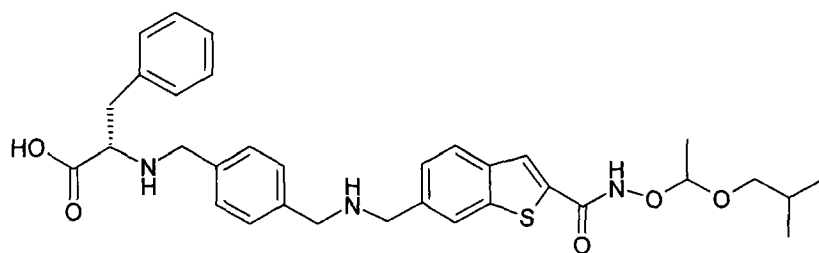
104

[1077] 将 (S)-2-[4-({[2-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲

基]-氨基}-甲基)-苄基氨基]-3-苯基-丙酸环戊酯溶于 DCM(2mL) 和 MeOH(2mL) 并用 TFA(1mL) 处理。将混合物室温搅拌 1 小时,然后浓缩至干并加入 DCM(5mL) 和庚烷 (5mL)。混合物蒸发至干。该过程重复三次以得到油状化合物 (104) (20mg, 59%)。LCMS 纯度 95%,  $m/z$  558  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(300MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.25-1.91 (8H, m, 4xCH<sub>2</sub>), 3.12-3.47 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.26 (1H, m, CH), 4.33 (2H, d,  $J = 5.5$  Hz, CH<sub>2</sub>), 4.36 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 4.43 (1H, s, CH<sub>2</sub>), 5.16 (1H, s, CH), 5.13 (1H, m, CH), 7.25-7.37 (6H, m, ArH), 7.54-7.63 (4H, m, ArH), 7.94 (2H, m, ArH), 8.09 (1H, s, ArH)。

[1078] 步骤 8: (S)-2-[4-({[2-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-甲基)-苄基氨基]-3-苯基-丙酸

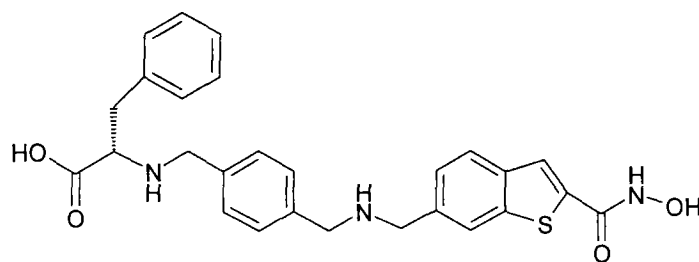
[1079]



[1080] 将 (S)-2-[4-({[2-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-甲基)-苄基氨基]-3-苯基-丙酸环戊酯 (40mg, 0.06mmol) 溶于 THF(2mL) 和水 (2mL)。加入 LiOH(8mg, 0.30mmol) 并将反应混合物在 50°C 加热 36 小时。蒸发除去 THF, 将残余物在水 (10mL) 和 EtOAc(10mL) 之间分配。分离含水层并加入 1M HCl 将 pH 调至 3。用 EtOAc (3×20mL) 萃取, 将有机层合并并蒸发至干。

[1081] 步骤 9: (S)-2-(4-{[(2-羟基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-甲基)-苄基氨基)-3-苯基-丙酸 (105)

[1082]



105

[1083] 将 (S)-2-[4-({[2-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-甲基)-苄基氨基]-3-苯基-丙酸溶于 MeOH(2mL) 和 THF(2mL)。在混合物中加入 TFA(1mL) 并室温搅拌 1 小时。将反应混合物浓缩至干并加入 DCM(5mL) 和庚烷 (5mL)。将混合物蒸发至干。该过程重复三次以得到粉红色固体状的化合物 (105) (17mg, 57%)。LCMS 纯度 90%,  $m/z$  490  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR(300MHz, MeOD),  $\delta$ : 3.33 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 4.19 (1H, m, CH<sub>2</sub>), 4.29 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 4.35 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 4.42 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 7.29-7.39 (5H, m, ArH), 7.54-7.72 (5H, m, ArH), 7.88 (1H, s, ArH), 8.00 (1H, d  $J = 8.0$  Hz, ArH), 8.08 (1H, s, ArH)

[1084] 以下化合物按照为化合物 (104) 和化合物 (105) 描述的方法制备

[1085] (S)-2-(4-{[(2-羟基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-甲基)-苄基氨基)-3-(4-羟基-苯基)-丙酸环戊酯 (106)

[1086] LCMS 纯度 98%,  $m/z$  574  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.30–1.87 (8H, m,  $4 \times CH_2$ ), 2.97–3.35 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.17 (1H, m, CH), 4.31 (2H, d,  $J = 5.4$  Hz,  $CH_2$ ), 4.36 (2H, s,  $CH_2$ ), 4.42 (2H, s,  $CH_2$ ), 5.11–5.16 (1H, m, CH), 6.77 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, Ar-H), 7.06 (2H, d,  $J = 8.4$  Hz, Ar-H), 7.54–7.65 (5H, m, Ar-H), 7.87 (1H, s, Ar-H), 7.99 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, Ar-H), 8.08 (1H, s, Ar-H)

[1087] (S)-2-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-3-(4-羟基-苯基)-丙酸 (107)

[1088] LCMS 纯度 90%,  $m/z$  505  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$ : 3.09–3.27 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.03 (1H, m, CH), 4.24 (2H, s,  $CH_2$ ), 4.34 (2H, s,  $CH_2$ ), 4.42 (2H, s,  $CH_2$ ), 6.76 (2H, d,  $J = 8.3$  Hz, Ar-H), 7.11 (2H, d,  $J = 8.5$  Hz, Ar-H), 7.56–7.59 (5H, m, Ar-H), 7.89 (1H, s, Ar-H), 8.02 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, Ar-H), 8.08 (1H, s, Ar-H)

[1089] (S)-3-叔丁氧基-2-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-丁酸环戊酯 (108)

[1090] LCMS 纯度 99%,  $m/z$  568  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.20 (9H, s,  $3 \times CH_3$ ), 1.29 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz,  $CH_3$ ), 1.67–1.94 (8H, m,  $4 \times CH_2$ ), 3.75 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz, CH), 4.29–4.32 (1H, m, CH), 4.36 (4H, d,  $J = 2.4$  Hz,  $2 \times CH_2$ ), 4.43 (2H, s,  $CH_2$ ), 5.22–5.25 (1H, m, CH), 7.54–7.65 (5H, m, Ar-H), 7.88 (1H, s, Ar-H), 8.01 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, Ar-H), 8.08 (1H, s, Ar-H)

[1091] (S)-3-叔丁氧基-2-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-丙酸环戊酯 (109)

[1092] LCMS 纯度 95%,  $m/z$  554  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.23 (9H, s,  $3 \times CH_3$ ), 1.67–1.98 (8H, m,  $4 \times CH_2$ ), 3.87–3.98 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.19–4.22 (1H, m, CH), 4.34–4.36 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 4.42 (2H, s,  $CH_2$ ), 5.31–5.35 (1H, m, CH), 7.54–7.62 (5H, m, Ar-H), 7.87 (1H, s, Ar-H), 8.00 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, Ar-H), 8.08 (1H, s, Ar-H)

[1093] (S)-2-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-4-甲硫基-丁酸环戊酯 (110)

[1094] LCMS 纯度 90%,  $m/z$  541  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.70–1.98 (8H, m,  $4 \times CH_2$ ), 2.11 (3H, s,  $CH_3$ ), 2.17–2.34 (2H, m,  $CH_2$ ), 2.54–2.73 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.19–4.23 (1H, m, CH), 4.27–4.42 (6H, m,  $3 \times CH_2$ ), 5.35–5.39 (1H, m, CH), 7.54–7.63 (5H, m, Ar-H), 7.87 (1H, s, Ar-H), 7.97–8.00 (1H, m, Ar-H), 8.08 (1H, s, Ar-H)

[1095] (s)-1-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基)-吡咯烷-2-羧酸环戊酯 (111)

[1096] LCMS 纯度 96%,  $m/z$  508  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.66–2.29 (12H, m,  $6 \times CH_2$ ), 3.59–3.67 (2H, m,  $CH_2$ ), 4.38–4.46 (6H, m,  $3 \times CH_2$ ), 4.62 (1H, d,  $J = 12.3$  Hz, CH), 5.21 (1H, m, CH), 7.61–7.68 (5H, m, Ar-H), 7.88 (1H, s, Ar-H), 8.00–8.02 (1H, m, Ar-H), 8.13 (1H, s, Ar-H)

[1097] (s)-1-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基)-吡咯烷-2-羧酸 (112)

[1098] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  440  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.96–2.09 (2H, m,

CH<sub>2</sub>), 2.14-2.23 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.52-2.65 (1H, m, CH<sub>2</sub>), 3.56-3.67 (1H, m, CH<sub>2</sub>), 4.19-4.25 (1H, m, CH), 4.36-4.57 (6H, m, 3×CH<sub>2</sub>), 7.55-7.64 (5H, m, Ar-H), 7.88 (1H, s, Ar-H), 7.99-8.01 (1H, m, Ar-H), 8.09 (1H, s, Ar-H)

[1099] (R)-3-叔丁硫基-2-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-丙酸环戊酯 (113)

[1100] LCMS 纯度 97%, m/z 570 [M+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (300MHz, MeOD), δ : 1.36 (9H, s), 1.79 (8H, m), 3.16 (2H, d, 5.3Hz), 4.25 (2H, t, J = 5.6Hz), 4.31 (2H, s), 4.36 (2H, s), 4.42 (2H, s), 5.34 (1H, m), 7.56 (1H, d, J = 8.1Hz), 7.62 (4H, s), 7.89 (1H, s), 8.09 (1H, s), 8.51 (1H, d, J = 8.1Hz),

[1101] (R)-3-叔丁硫基-2-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-丙酸 (114)

[1102] LCMS 纯度 97%, m/z 502 [M]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (300MHz, MeOD), δ : 1.35 (9H, s, 3×CH<sub>3</sub>), 3.09 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.22 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.83 (1H, t, J = 8.8 Hz, CH), 4.34 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 4.42 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 7.57 (1H, d, J = 10.0Hz, ArH), 7.62 (4H, s, ArH×4), 7.89 (1H, s, ArH), 8.02 (1H, d, J = 8.1Hz, ArH), 8.09 (1H, s, ArH)。

[1103] (S)-2-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-3,3-二甲基-丁酸环戊酯 (115)

[1104] LCMS 纯度 94%, m/z 546 [M+Na]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (300MHz, MeOD), δ : 1.08 (9H, s, 3×CH<sub>3</sub>), 1.80 (8H, m, 4×CH<sub>2</sub>), 3.49 (1H, s, CH), 4.29 (2H, d, J = 13.5Hz, CH<sub>2</sub>), 4.29 (2H, d, J = 13.5Hz, CH<sub>2</sub>), 4.36 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 4.44 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 5.19 (1H, t, J = 5.7Hz), 7.59 (5H, m, ArH×5), 7.88 (1H, ArH), 8.00 (1H, d, J = 8.3Hz), 8.09 (1H, s, ArH)。

[1105] (S)-环己基-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-乙酸环戊酯 (116)

[1106] LCMS 纯度 100%, m/z 550 [M+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD), δ : 0.86-1.95 (18H, m, 9×CH<sub>2</sub>), 3.73 (1H, m, CH), 4.11 (1H, d J = 5.7 Hz, CH), 4.19 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 4.26 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 4.36 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 7.53 (5H, m, ArH), 7.77 (1H, s, CH), 7.82 (1H, dJ = 11.6 Hz, ArH), 8.02 (1H, s, ArH)

[1107] (S)-环己基-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-乙酸 (117)

[1108] LCMS 纯度 100%, m/z 482 [M+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (300MHz, MeOD), δ : 0.72-1.60 (10H, m, 9×CH<sub>2</sub>), 3.89 (1H, m, CH), 4.11 (3H, m, CH), 4.23 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 4.31 (2H, s, CH<sub>2</sub>), 7.48 (5H, m, ArH), 7.76 (1H, s, CH), 7.88 (1H, dJ = 11.6Hz, ArH), 7.98 (1H, s, ArH)。

[1109] (S)-2-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-4-甲基-戊酸环戊酯 (122)

[1110] LCMS 纯度 94%, m/z 524 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (300MHz, MeOD), δ : 1.01 (6H, s, 2×CH<sub>3</sub>), 1.28 (1H, m, CH), 1.56-1.95 (10H, m, 4×CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>), 4.00-4.43 (6H, m, 3×CH<sub>2</sub>), 4.88 (1H, m, CH), 5.36 (1H, br s, CH), 7.47-7.62 (5H, m, ArH), 7.94 (2H, t, ArH), 8.08 (1H, s, ArH)。

[1111] (S)-2-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-4-甲基-戊酸 (123)

[1112] LCMS 纯度 98%,  $m/z$  456  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.00 (6H, m,  $2 \times CH_3$ ), 1.86 (2H, m,  $CH_2$ ), 3.86 (1H, m, CH), 4.29 (2H, s,  $CH_2$ ), 4.36 (2H, s,  $CH_2$ ), 4.43 (2H, s,  $CH_2$ ), 7.56 (1H, m, ArH), 7.89 (1H, s, CH), 8.02 (1H, d  $J = 8.2$ Hz, ArH), 8.09 (1H, s, ArH)。

[1113] (s)-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-苯基-乙酸环戊酯 (124)

[1114] LCMS 纯度 90%,  $m/z$  544  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.31-1.91 (10H, m,  $4 \times CH_2$ ,  $CH_2$ ), 4.22 (2H, dd  $J = 13.1$ Hz,  $CH_2$ ), 4.35 (2H, s,  $CH_2$ ), 4.42 (1H, s,  $CH_2$ ), 5.16 (1H, s, CH), 5.30 (1H, m, CH), 7.47-7.62 (9H, m, ArH), 7.94 (2H, m, ArH), 8.08 (1H, s, ArH)。

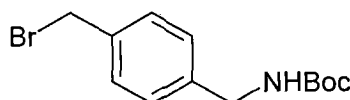
[1115] (S)-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-苯基-乙酸 (125)

[1116] LCMS 纯度 100%,  $m/z$  476  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$ : 4.08-4.24 (3H, m, CH,  $CH_2$ ), 4.35 (2H, s,  $CH_2$ ), 4.43 (1H, s,  $CH_2$ ), 7.46-7.75 (10H, m, ArH), 7.89 (1H, s, ArH), 8.01 (1H, d  $J = 7.9$ Hz, ArH), 8.09 (1H, s, ArH)

[1117] 以下化合物按照为化合物 (104) 和化合物 (105) 描述的方法制备, 步骤 3 和 4 采用下述可替换方法

[1118] 步骤 3b: (4-溴甲基-苄基)-氨基甲酸叔丁酯

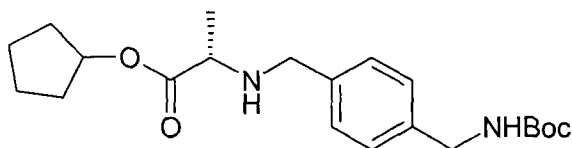
[1119]



[1120] 将 N-溴琥珀酰亚胺 (5.13g, 28.8mmol) 溶于 DCM (80mL) 并冷却至 0°C。制备三苯基膦 (7.18g, 27.0mmol) 的 DCM (20mL) 溶液并将其加入所述已冷却的溶液中, 然后加入吡啶 (1.0mL, 1.26mmol)。将步骤 2 的材料 (2.14g, 9.0mmol) 溶于 DCM (20mL) 并加入, 然后使反应物回复室温并搅拌 16 小时。浓缩混合物, 残余物通过柱层析 (50% / 50% EtOAc / 庚烷) 纯化以得到所需化合物 (864mg, 32%)。  $m/z$  301  $[M^+ + Na]^+$

[1121] 步骤 4b: (S)-2-[4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基)-苄基氨基]-丙酸环戊酯

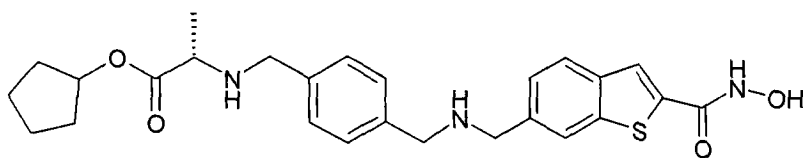
[1122]



[1123] 将 L-丙氨酸环戊酯 (463mg, 1.41mmol) 溶于 DMF (9mL) 并在其中加入 DIPEA (0.74mL, 4.24mmol)。将混合物室温搅拌 15 分钟, 然后用 1 小时逐滴加入步骤 3b 所得材料 (212mg, 0.706mmol) 的 DMF (5mL) 溶液。然后室温搅拌反应物 16 小时, 之后用水 (50mL) 和 EtOAc (50mL) 稀释。有机层用盐水 ( $2 \times 50$ mL) 洗涤, 干燥并浓缩以得到粗材料 (0.26g, 100%), 其无需进一步纯化便可用于下一步骤。  $m/z$  377  $[M^+ + Na]^+$

[1124] 步骤 5-9 如对化合物 (104) 和化合物 (105) 的描述

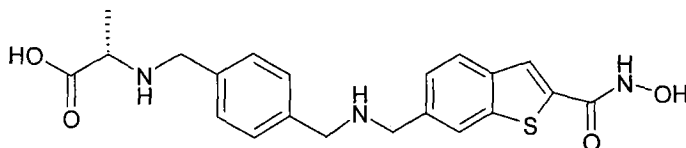
[1125]



[1126] (S)-2-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-丙酸环戊酯 (118)

[1127] LCMS 纯度 95 %,  $m/z$  482  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.61 (3H, d,  $J$  = 7.2Hz,  $CH_3$ ), 1.71-1.97 (8H, m,  $4 \times CH_2$ ), 4.13 (1H, q,  $J$  = 7.2Hz, CH), 4.30 (2H, s,  $CH_2$ ), 4.36 (2H, s,  $CH_2$ ), 4.43 (2H, s,  $CH_2$ ), 5.33-5.36 (1H, m, CH), 7.54-7.63 (5H, m, Ar-H), 7.88 (1H, s, Ar-H), 8.00 (1H, d,  $J$  = 8.1Hz, Ar-H), 8.08 (1H, s, Ar-H)

[1128]



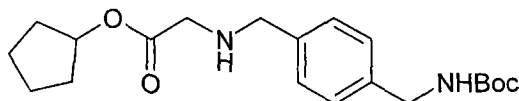
[1129] (s)-2-(4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基)-苄基氨基)-丙酸(119)

[1130] LCMS 纯度 95 %,  $m/z$  414  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.64 (3H, d,  $J$  = 7.1Hz,  $CH_3$ ), 4.06-4.14 (1H, m, CH), 4.31 (2H, s,  $CH_2$ ), 4.36 (2H, s,  $CH_2$ ), 4.43 (2H, s,  $CH_2$ ), 7.55-7.63 (5H, m, Ar-H), 7.88 (1H, s, Ar-H), 8.00 (1H, d,  $J$  = 8.1Hz, Ar-H), 8.09 (1H, s, Ar-H)

[1131] 以下化合物按照为化合物 (118) 和化合物 (119) 描述的过程制备, 包括以下替换/ 额外步骤:

[1132] 步骤 4b:[4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基)-苄基氨基]-乙酸环戊酯

[1133]

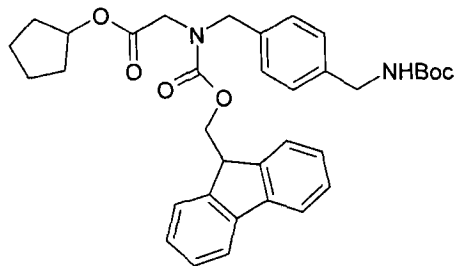


[1134] 过程如步骤 4a(采用环戊酯的 HCl 盐)

[1135] 产物:  $m/z$  363  $[M^+ + H]^+$

[1136] 步骤 4c: [[4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基)-苄基]-(9H-芴-9-基甲氧基-羰基)-氨基]-乙酸环戊酯

[1137]

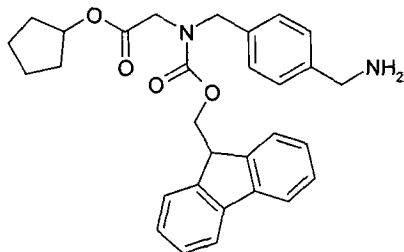


[1138] 在[4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基)-苄基氨基]-乙酸环戊酯(0.2g,0.55mmol)和1MNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(1.1mL,1.1mmol)的DCM(2mL)溶液中边搅拌和冰浴冷却边缓慢加入氯甲酸9-苄基甲基酯(0.14g,0.55mmol)的二噁烷(1.4mL)溶液。将混合物在冰浴中搅拌4小时并在室

温搅拌过夜。将混合物倒入水 (90mL) 中并用二乙醚萃取。将有机萃取物合并,干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ) 并蒸发至干以得到所需产物 (0.32g, 100%)。  $m/z$  607  $[\text{M}^+ + \text{Na}]^+$

[1139] 步骤 5a: [(4-氨基甲基-苄基)-(9H-芴-9-基甲氧基羰基)-氨基]-乙酸环戊酯

[1140]

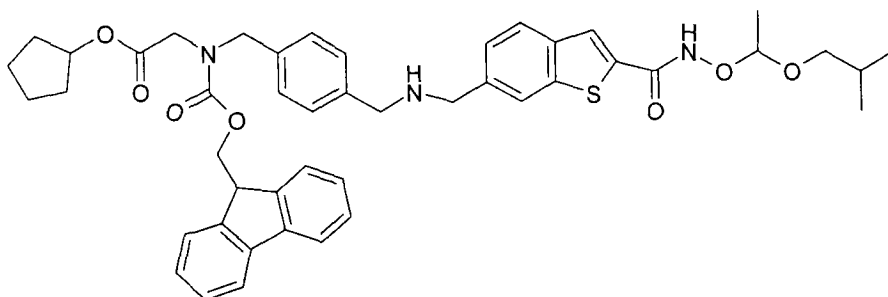


[1141] 过程如步骤 5 中所述。

[1142] 产物  $m/z$  485  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$

[1143] 步骤 6a: {(9H-芴-9-基甲氧基羰基)-[4-({[2-(1-异丁氧基-乙氧基氨基甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-甲基)-苄基]-氨基}-乙酸环戊酯

[1144]

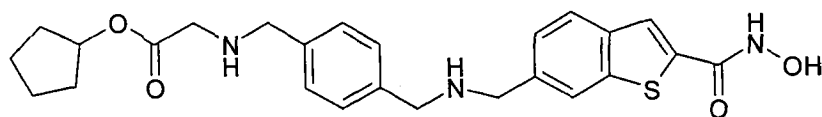


[1145] 过程如步骤 6 中所述。

[1146] 产物  $m/z$  790  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$

[1147] 步骤 7a: (4-{{[2-(羟基氨基甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-甲基}-苄基氨基)-乙酸环戊酯 (120)

[1148]

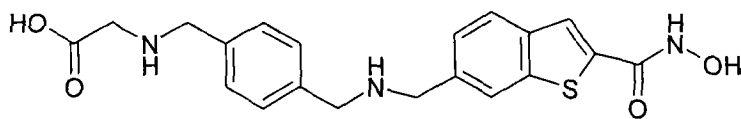


120

[1149] 将 {(9H-芴-9-基甲氧基羰基)-[4-({[2-(1-异丁氧基-乙氧基氨基甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-甲基)-苄基]-氨基}-乙酸环戊酯 (0.11g, 0.14mmol) 溶于乙腈 (3mL) 并在其中加入哌啶 (1.5mL)。将所得混合物室温搅拌 1 小时。将溶剂蒸发至干并将产物分成 2 份。对于其中 1 份将环戊酯水解,而将另一份溶于 DCM (1.5mL) 并与 4M HCl 的二噁烷 (1.0mL) 溶液一起搅拌 2 小时。将溶剂蒸发至干,产物通过制备型 HPLC 纯化以得到所需产物,其为 TFA 盐。LCMS 纯度 99%,  $m/z$  468  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$ ,  $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{MeOD}$ ),  $\delta$ : 8.09 (1H, s, ArH), 8.00 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz, ArH), 7.88 (1H, s, ArH), 7.54-7.65 (5H, m, ArH), 5.31-5.35 (1H, m, CH), 4.43 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 4.35 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 4.31 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 3.96 (2H, s,  $\text{CH}_2$ ), 1.65-1.93 (8H, m,  $4 \times \text{CH}_2$ )

[1150] 步骤 9a : 4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并[b]噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基-苄基氨基)-乙酸 (121)

[1151]



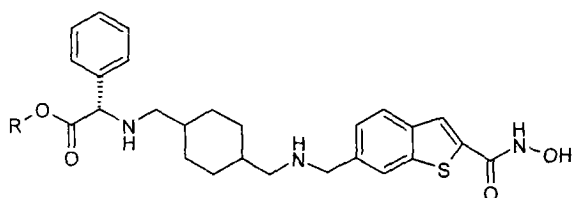
121

[1152] 过程如步骤 9 中所述。

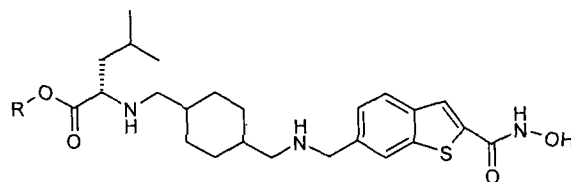
[1153] LCMS 纯度 99%,  $m/z$  400  $[M+H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$  : 8.09 (1H, s, ArH), 8.00 (1H, d,  $J = 8.3$ Hz, ArH), 7.89 (1H, s, ArH), 7.54-7.62 (5H, m, ArH), 4.43 (2H, s,  $CH_2$ ), 4.35 (2H, s,  $CH_2$ ), 4.32 (2H, s,  $CH_2$ ), 3.93 (2H, s,  $CH_2$ )

[1154] 合成图 8 的化合物, 以化合物 (126) 和化合物 (127) 为例

[1155]



R = 环戊基 126  
R = H 127

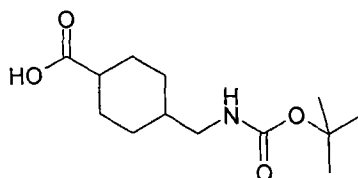


R = 环戊基 128  
R = H 129

[1156] 图 8

[1157] 阶段 1 : 4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基-环己烷羧酸

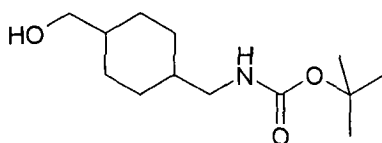
[1158]



[1159] 将溶于 40ml 二噁烷和 40ml 水的反-4-(氨基甲基)环己烷羧酸 (1g, 6.4mmol) 和氢氧化钠 (256mg, 6.4mmol) 的溶液边搅拌边在冰水浴中冷却。加入二碳酸二叔丁酯 (1.39g, 6.4mmol) 并将混合物室温搅拌 5 小时, 然后静置过夜。将溶液真空浓缩并用 2N HCl 酸化至 pH2。酸化的含水层用 EtOAc 萃取 3 次。将有机层合并并用盐水洗涤。有机层通过硫酸镁干燥并蒸发至干。所得产物为白色固体 (1.1g, 64% 产率)。 $^1H$  NMR (300MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  : 0.86-1.07 (2H, m,  $CH_2$ ), 1.34-1.53 (1H, m, boc 和  $CH_2$ ), 1.84 (2H, dd,  $J = 13.0, 2.3$ Hz,  $CH_2$ ), 2.05 (2H, dd,  $CH_2$ ), 2.18-2.35 (1H, m,  $CHCH_2$ ), 2.99 (2H, t,  $J = 6.3$ Hz,  $CH_2NH$ ), 4.59 (1H, br. s,  $CHCOOH$ ), 11.0 (1H, br. s, COOH)。

[1160] 阶段 2 : (4-羟甲基-环己基甲基)-氨基甲酸叔丁酯

[1161]

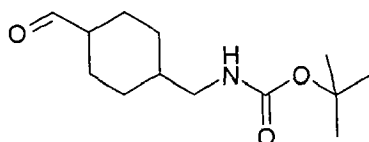


[1162] 将氢化铝锂 (465mg, 12.2mmol) 悬浮于无水 THF (10ml) 并在氮气下冷却至 0℃。

缓慢加入 4-(叔丁氧基-羰基-氨基-甲基-环己烷羧酸 (1.1g, 4.1mmol) 的 THF 和二噁烷 (10ml, 1 : 1) 溶液并将混合物室温搅拌过夜。逐滴加入水以猝灭过量的氢化铝锂。过滤并用 THF (10ml) 和 MeOH (10ml) 洗涤滤饼。真空浓缩滤液并用 1N HCl 酸化至 pH2。水层用 EtOAc 萃取两次。有机层通过硫酸镁干燥, 过滤并蒸发至干以得到 964mg 产物 (97% 产率)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  : 0.81-1.08 (4H, m, 2 $\times$ CH<sub>2</sub>), 1.33-1.60 (10H, m, boc 和 CH), 1.82 (4H, d, J = 5.7Hz, 2 $\times$ CH<sub>2</sub>), 2.98 (2H, t, J = 6.4Hz, CH<sub>2</sub>NH), 3.46 (2H, d, J = 6.4 Hz, CH<sub>2</sub>OH), 4.60 (1H, br. s, CH)

[1163] 阶段 3 : (4-甲酰-环己基甲基)-氨基甲酸叔丁酯

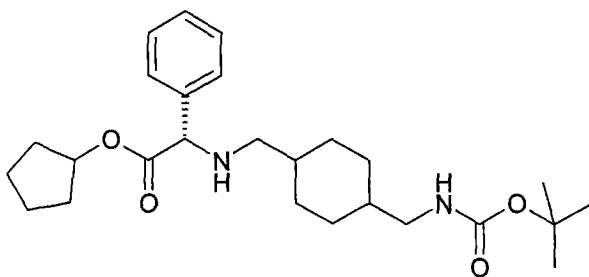
[1164]



[1165] 将 (4-羟甲基-环己基甲基)-氨基甲酸叔丁酯 (965mg, 4.0mmol) 溶于 DCM (20ml) 并冷却至 -78°C。将 Dess Martin 试剂 (2.52g, 6.0mmol) 溶于 DCM (30ml) 并缓慢加入阶段 2 的醇的溶液中。然后将反应混合物室温搅拌 3 小时。将所得溶液倒入饱和的 NaHCO<sub>3</sub> 和 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶液 (1 : 1, 100ml) 同时剧烈搅拌。将有机层分离并用盐水洗涤, 用硫酸镁干燥并蒸发至干以得到产物 (786mg, 82% 产率)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  : 0.83-1.01 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.15-1.24 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.34 (9H, s, Boc), 1.75-1.88 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.90-2.00 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 2.05-2.18 (1H, m, CH), 2.93 (2H, t, J = 6.4Hz, CH<sub>2</sub>NH), 4.53 (1H, br. s, CHCHO), 9.55 (1H, s, CHO)

[1166] 阶段 4 : (S)-{[4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基)-环己基甲基]-氨基}-苯基-乙酸环戊酯

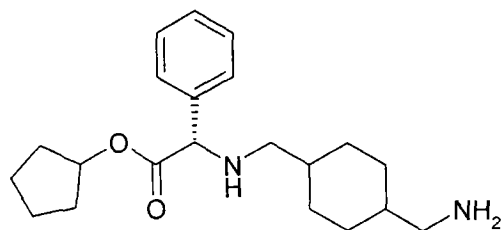
[1167]



[1168] 将 (4-甲酰-环己基甲基)-氨基甲酸叔丁酯 (390mg, 1.6mmol) 和 (S)-氨基-苯基-乙酸环戊酯 (394mg, 1.8mmol) 在 DCE (6ml) 中室温搅拌 25 分钟。加入乙酸 (9.6ul, 0.16mmol) 和三乙酰氧基硼氢化钠 (1.0g, 4.8mmol) 并将所得混合物在室温下搅拌 1 小时 30 分钟。加入 DCM (10ml) 和饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液 (10ml) 并分离各相。含水相用 EtOAc (2 $\times$ 10ml) 萃取, 有机相通过硫酸镁干燥, 过滤并蒸发至干。粗产物通过柱层析 (8 : 2 庚烷 /EtOAc) 纯化以得到 223mg 纯的胺 (31% 产率)。LCMS 纯度 100%, m/z 445 [M<sup>+</sup>+H]<sup>+</sup>。

[1169] 阶段 5 : (S)-[4-氨基甲基-环己基甲基]-氨基]-苯基-乙酸环戊酯

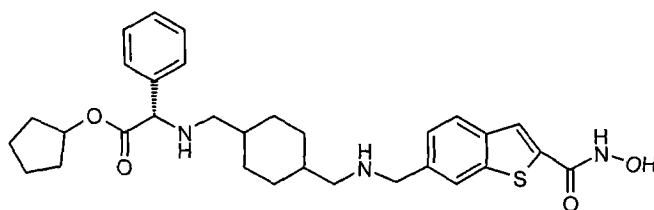
[1170]



[1171] 将 (S)-[4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基)-环己基甲基]-氨基-苯基-乙酸环戊酯 (223mg, 0.5mmol) 在 DCM(4ml) 中搅拌, 加入 TFA(1ml) 并将混合物室温搅拌 2 小时。将溶液真空浓缩, 溶解在 DCM 中, 用饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液洗涤 2 次并用饱和盐水溶液洗涤 1 次。有机相通过硫酸镁干燥, 过滤并蒸发以得到所需的胺, 其为黄色油状物 (130mg, 75% 产率)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  345  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$ 。

[1172] 阶段 6 : (S)-[4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并 [b] 噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基]-环己基甲基)-氨基]-苯基-乙酸环戊酯 (126)

[1173]

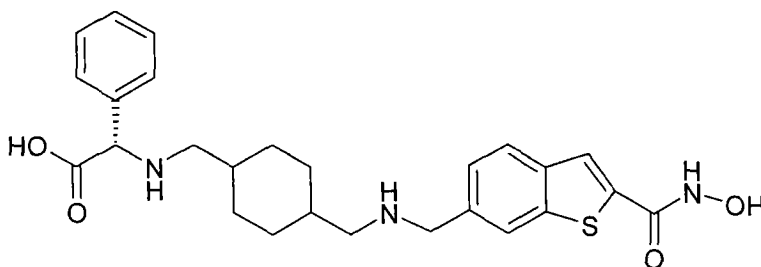


126

[1174] 将阶段 5 的胺 (130mg, 0.38mmol) 与 6-甲酰-苯并 [b] 噻吩-2-羧酸 (1-异丁氧基-乙氧基) 酰胺 (方案 7) (110mg, 0.34mmol) 的 DCE 溶液一起室温搅拌 30 分钟。加入乙酸 (2.1ul, 0.03mmol) 和三乙酰氧基硼氢化钠 (218mg, 1.0mmol), 所得混合物室温搅拌过夜。将混合物真空浓缩, 溶解在 EtOAc 中, 用饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液 (10ml) 和盐水 (10ml) 洗涤。有机相通过硫酸镁干燥, 过滤并蒸发至干。粗产物 (167mg) 通过制备型 HPLC 纯化以得到淡粉色固体状的化合物 (126)。LCMS 纯度 86%,  $m/z$  550  $[\text{M}^+ + \text{H}]^+$ , 约 10% 羧酸。 $^1\text{H}$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$  : 1.08 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2$ ), 1.76 (14H, m,  $6 \times \text{CH}_2$  和  $2 \times \text{CH}$ ), 2.81 (4H, m,  $2 \times \text{CH}_2\text{NH}$ ), 4.35 (2H, s,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 5.12 (1H, s,  $\text{CHNH}$ ), 5.30 (1H, m, OCH), 7.51 (6H, m, Ar), 7.85 (1H, s, Ar), 7.96 (1H, d, Ar), 8.08 (1H, s, Ar)。

[1175] 合成 ((S)-[4-[(2-羟基氨甲酰基-苯并 [b] 噻吩-6-基甲基)-氨基]-甲基]-环己基甲基)-氨基]-苯基-乙酸 (127)

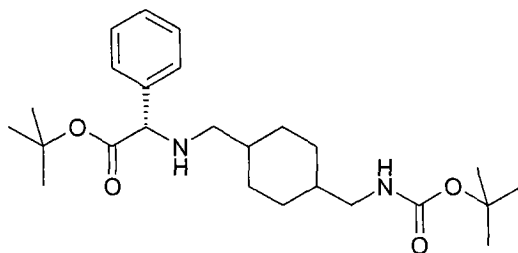
[1176]



127

[1177] 阶段 1 : (S)-[4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基)-环己基甲基]-氨基-苯基-乙酸叔丁酯

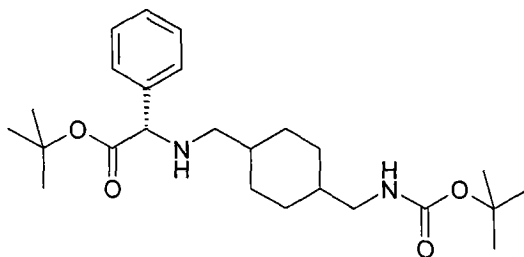
[1178]



[1179] 将 (4-甲酰-环己基甲基)-氨基甲酸叔丁酯 (899mg, 3.7mmol) 和 (S)-叔丁基苯基甘氨酸酯 (850mg, 4.1mmol) 在 DCE (20ml) 中搅拌 30 分钟。加入乙酸 (20 $\mu$ l, 0.37mmol) 和三乙酰氧基硼氢化钠 (2.37g, 11.1mmol) 并将反应混合物室温搅拌 3 小时。加入 DCM (10ml) 和饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液 (20ml) 并将各相分离。水相用 EtOAc (20ml) 萃取。有机相通过硫酸镁干燥, 过滤并真空浓缩。粗产物 (2.4g) 用柱层析 (7 : 3 庚烷 / EtOAc) 纯化以得到所需产物 (385mg, 24% 产率)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  433 [ $\text{M}^+ + \text{H}$ ] $^+$ 。

[1180] 阶段 2 : (S)-{[4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基)-环己基甲基]-氨基}-苯基-乙酸叔丁酯

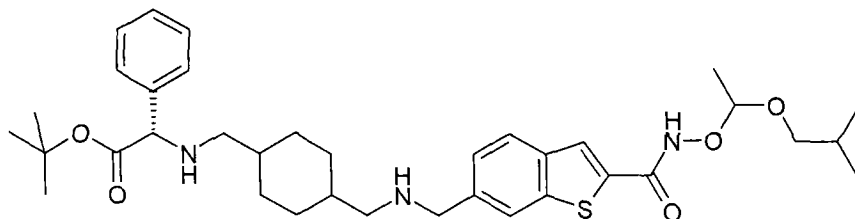
[1181]



[1182] 将 (S)-{[4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基)-环己基甲基]-氨基}-苯基-乙酸叔丁酯 (385mg, 0.9mmol) 在 DCM (5ml) 中搅拌, 加入 TFA (2ml) 并将混合物室温搅拌 30 分钟。将溶液真空浓缩, 溶解在 EtOAc (5ml) 中, 用  $\text{NaHCO}_3$  饱和溶液 (2 $\times$  5ml) 洗涤两次并用饱和盐水溶液 (5ml) 洗涤 1 次。有机相通过硫酸镁干燥, 过滤并蒸发以得到所需胺, 其为黄色油状物 (290mg, 97% 产率)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  333 [ $\text{M}^+ + \text{H}$ ] $^+$ 。

[1183] 阶段 3 : (S)-{[4-([2-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基)-甲基]-环己基甲基]-氨基}-苯基-乙酸叔丁酯

[1184]

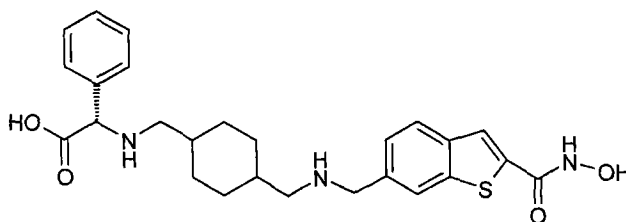


[1185] 将 (S)-{[4-(叔丁氧基羰基氨基-甲基)-环己基甲基]-氨基}-苯基-乙酸叔丁酯 (290mg, 0.9mmol) 和 6-甲酰-苯并[b]噻吩-2-羧酸 (1-异丁氧基-乙氧基) 酰胺 (方案 7) (255mg, 0.8mmol) 在 DCE (8ml) 中搅拌 30 分钟。加入乙酸 (4 $\mu$ l, 0.08mmol) 和三乙酰氧基硼氢化钠 (504mg, 2.4mmol) 并将反应混合物室温搅拌 1 小时 30 分钟。加入 DCM (5ml) 和  $\text{NaHCO}_3$  饱和溶液 (10ml) 并分离各相。水相用 EtOAc (15ml) 萃取。有机相通过硫酸镁干燥, 过滤并真空浓缩。粗产物 (543mg) 用柱层析 (5-10% 的 MeOH 的 DCM 溶液) 纯化以得到

所需的纯产物 (172mg, 34% 产率)。LCMS 纯度 100%,  $m/z$  638  $[M^+ + H]^+$ 。

[1186] 阶段 4: (S)-{[4-({[2-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-甲基)-环己基甲基]-氨基}-苯基-乙酸叔丁酯 (127)

[1187]



127

[1188] 将 (S)-{[4-({[2-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-甲基)-环己基甲基]-氨基}-苯基-乙酸叔丁酯 (172mg, 0.27mmol) 在 4M HCl 的二噁烷溶液 (2ml) 中室温搅拌 30 分钟。将溶液蒸发至干以得到化合物 (127), 其为米色固体 (123mg, 95% 产率)。LCMS 纯度 98%,  $m/z$  482  $[M^+ + H]^+$ 。 $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.10 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.80 (6H, m,  $2 \times CH_2$  and  $2 \times CH$ ), 2.88 (2H, dd,  $CH_2NH$ ), 2.94 (2H, d,  $CH_2NH$ ), 4.36 (2H, s,  $CH_2NH$ ), 5.07 (1H, s, CH), 7.53 (6H, m, Ar), 7.87 (1H, s, Ar), 7.97 (1H, d, Ar), 8.12 (1H, s, Ar)。

[1189] 以下化合物按照为化合物 (126) 和化合物 (127) 描述的方法制备

[1190] (S)-2-[4-({[2-(羟基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-甲基)-环己基甲基]-氨基]-4-甲基-戊酸环戊酯 (128)

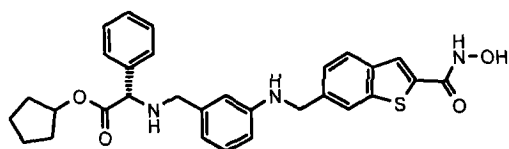
[1191] LCMS 纯度 86%,  $m/z$  530  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$ : 0.99 (6H, t,  $J = 6Hz$ ,  $2 \times CH_3$ ), 1.11 (4H, t,  $J = 8.1Hz$ ,  $2 \times CH_2$ ), 1.76 (20H, m,  $2 \times CH$  和  $9 \times CH_2$ ), 2.80 (1H, m, CH), 2.97 (4H, m,  $2 \times CH_2NH$ ), 3.95 (1H, m, CH), 4.35 (2H, s,  $CH_2NH$ ), 5.32 (1H, m, OCH), 7.54 (1H, d,  $J = 6Hz$ , Ar), 7.84 (1H, s, Ar), 7.94 (1H, d,  $J = 9Hz$ , Ar), 8.08 (1H, s, Ar)。

[1192] (S)-2-[4-({[2-(羟基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-甲基)-环己基甲基]-氨基]-4-甲基-戊酸 (129)

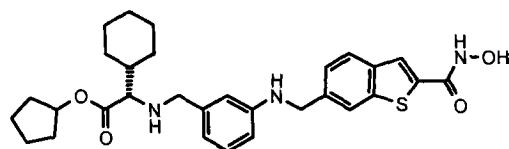
[1193] LCMS 纯度 95%,  $m/z$  462  $[M^+ + H]^+$ ,  $^1H$  NMR (300MHz, MeOD),  $\delta$ : 1.00 (6H, t,  $J = 6.3Hz$ ,  $2 \times CH_3$ ), 1.10 (4H, m,  $2 \times CH_2$ ), 1.85 (8H, m,  $2 \times CH$  和  $3 \times CH_2$ ), 2.94 (4H, m,  $2 \times CH_2NH$ ), 3.91 (1H, m,  $CHNH$ ), 4.36 (2H, s,  $CH_2NH$ ), 7.54 (1H, d,  $J = 7.8Hz$ , Ar), 7.85 (1H, s, Ar), 7.95 (1H, d,  $J = 8.1Hz$ , Ar), 8.08 (1H, s)。

[1194] 合成图 9 的化合物, 以化合物 (130) 为例

[1195]

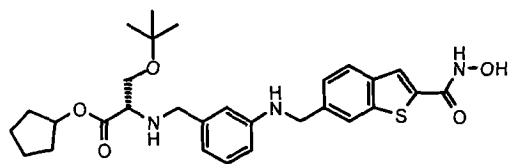


130

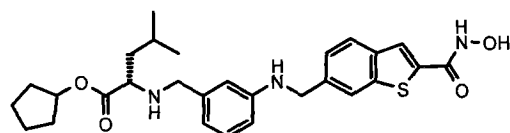


131

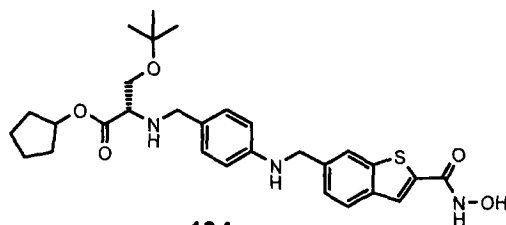
[1196]



132



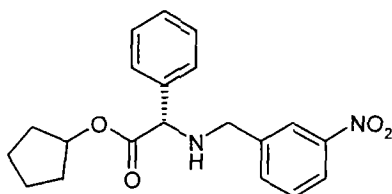
133



134

[1197] 阶段 1 : (S)-[(3-硝基-苄基)-氨基]-苯基-乙酸环戊酯

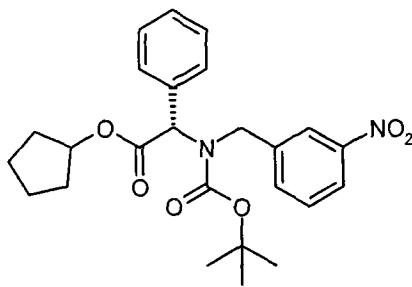
[1198]



[1199] 在苯基甘氨酸环戊酯对甲苯磺酸盐 (3.08g, 7.8mmol) 的 DCE (120ml) 溶液中加入 3-硝基苯甲醛 (1.01g, 6.7mmol), 然后加入三乙酰氧基硼氢化钠 (3.03g)。将混合物搅拌 3.5 小时, 然后加入饱和碳酸氢钠溶液 (200ml) 进行淬灭。产物用 DCM (250ml) 萃取, 将有机萃取物干燥 ( $\text{MgSO}_4$ )。产物无需进一步纯化即可进行下面的步骤。

[1200] 阶段 2 : (S)-[(3-硝基-苄基)-叔丁氧基羰基-氨基]-苯基-乙酸环戊酯

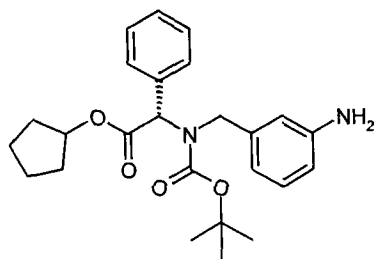
[1201]



[1202] 在 DCM (50ml) 中的 (S)-[(3-硝基-苄基)-氨基]-苯基-乙酸环戊酯的粗制混合物中加入二碳酸二叔丁酯 (3.38g, 15.6mmol)。混合物在 50℃ 加热过夜, 然后冷却至室温。然后加入 N,N,N',-三甲基乙二胺 (2ml) 并将混合物搅拌 2 小时。然后将混合物倒入乙酸乙酯 (150ml) 并用 1M HCl (3×50ml) 洗涤, 干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ) 并浓缩以得到所需的无色油状产物 (1.509g, 42% 产率)。LCMS 纯度 98%,  $m/z$  477 ( $\text{M}+\text{Na}^+$ )。 $^1\text{H}$  NMR (300MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO),  $\delta$ : 7.97 (1H, dd,  $J = 2.1, 9\text{Hz}$ ), 7.15-7.45 (8H, m), 5.60-6.00 (1H, m), 5.20-5.35 (1H, m), 4.65-4.82 (1H, m), 4.21 (1H, d,  $J = 16\text{Hz}$ ), 1.30-1.95 (17H, m)

[1203] 阶段 3 : (S)-[(3-氨基-苄基)-叔丁氧基羰基-氨基]-苯基-乙酸环戊酯

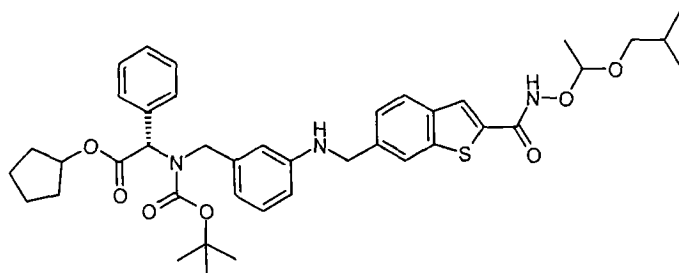
[1204]



[1205] 在 (S)-[3-(3-硝基-苄基)-叔丁氧基羰基-氨基]-苯基-乙酸环戊酯 (1.509g, 3.32mmol) 的乙醇 (10ml) 溶液中加入碳载钯 (10%, 0.38g, 0.36mmol)。将烧瓶排空并重新填满氢气。将混合物搅拌过夜, 然后通过硅藻土过滤, 用乙醇 (150ml) 洗涤并浓缩以得到所需无色油状产物 (1.351g, 96% 产率)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 7.19-7.42 (5H, m), 6.97 (1H, t, J = 7.5Hz), 6.46 (2H, dd, J = 8.1, 16.5Hz), 6.29 (1H, br s), 5.58 (1H, br s), 5.29 (1H, br s), 4.69 (1H, br s), 4.00 (1H, d, J = 15.9Hz), 3.74 (1H, q, J = 6.9Hz), 3.51 (2H, br s), 1.20-2.00 (17H, m)

[1206] 阶段 4: (S)-[叔丁氧基羰基-(3-{[2-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-苯并[b]-噻吩-6-基甲基]-氨基}-苄基)-氨基]-苯基-乙酸环戊酯

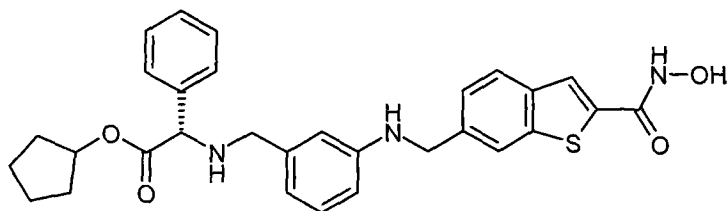
[1207]



[1208] 在 (S)-[3-(氨基-苄基)-叔丁氧基羰基-氨基]-苯基-乙酸环戊酯 (0.317g, 0.75mmol) 中加入 6-甲酰-苯并[b]噻吩-2-羧酸 (1-异丁氧基-乙氧基)-酰胺 (方案 7) (0.210g, 0.65mmol) 的 DCE (8ml) 溶液。加入 2 滴冰醋酸, 然后加入三乙酰氧基硼氢化钠 (0.170g, 0.8mmol)。将混合物搅拌 2 小时然后倒入 DCM (150ml)。溶液用饱和碳酸氢钠 (50ml) 洗涤, 然后干燥 (MgSO<sub>4</sub>), 浓缩并通过快速柱层析纯化以得到所需淡黄色泡沫状的产物 (0.346g, 73% 产率)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ : 8.35-8.43 (1H, m), 7.56-8.05 (2H, m), 7.01-7.41 (8H, m), 6.90-7.01 (1H, m), 6.42 (1H, dd, J = 2.6, 7.9Hz), 5.25-5.31 (1H, m), 5.12 (1H, q, J = 5.2 Hz), 4.40 (1H, d, J = 5.4Hz), 4.00 (1H, dd, J = 3.1, 15.8Hz), 3.60-3.70 (1H, m), 3.35-3.40 (1H, m), 1.33-1.94 (21H, m), 0.98 (3H, d, J = 6.6Hz), 0.97 (3H, d, J = 6.6Hz)

[1209] 阶段 5: (S)-{3-[2-(羟基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-苄基-氨基}-苯基-乙酸环戊酯 (130)

[1210]



130

[1211] 在(S)-[叔丁氧基羰基-(3-{[2-(1-异丁氧基-乙氧基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-苄基)-氨基]-苯基-乙酸环戊酯(0.100g,0.14mmol)的DCM/MeOH(1ml:1ml)溶液中加入TFA(8ml)。将溶液搅拌2小时,然后用DCM(200ml)稀释。溶液用饱和碳酸氢钠(100ml)洗涤。将溶液干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ),浓缩并通过反相HPLC纯化以得到所需产物(8.1mg,11%产率)。LCMS纯度98%, $m/z$  531( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ 300MHz,DMSO, $\delta$ :1.26-1.85(8H,m),3.47(2H,s),4.21(1H,s),4.38(2H,d,J 5.8Hz),5.02-5.07(1H,m),6.32(1H,t,J 6.0Hz),6.45(2H,d,J 7.9Hz),6.57(1H,s),6.97(1H,t,J 7.8Hz),7.23-7.35(5H,m),7.42(1H,dd,J 1.2,8.3Hz),7.84(1H,s),7.87(1H,s),7.93(1H,s),9.23(1H,br s),11.4(1H,br s)

[1212] 以下化合物按照为化合物(130)描述的过程制备

[1213] (S)-{3-[2-(羟基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-苄基氨基}-环己基-乙酸环戊酯(131)

[1214] LCMS纯度>98%, $m/z$  536.25( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , $^1\text{H}$  NMR(300MHz,d6-DMSO), $\delta$ :0.7-1.25(8H,m),1.50-1.95(14H,m),3.69(1H,br s),3.98(2H,br s),4.43(2H,br s),5.14(1H,t,J 5.4Hz),6.60-6.71(2H,m),7.05-7.28(3H,m),7.43(1H,d,J 8.5Hz),7.83-7.98(2H,m),9.25(1H,br s),11.45(1H,br s)

[1215] (S)-3-叔丁氧基-2-{3-[2-(羟基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-苄基氨基}-丙酸环戊酯(132)

[1216] LCMS纯度>98%, $m/z$  540.25( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , $^1\text{H}$  NMR(300MHz,d6-DMSO), $\delta$ :1.05(9H,s),1.50-1.78(8H,m),3.15-3.67(5H,m),4.38(2H,d,J 5.8Hz),5.05-5.15(1H,m),6.31(1H,t,J 5.9Hz),6.40-6.48(2H,m),6.56(1H,s),6.96(1H,t,J 7.8Hz),7.42(1H,d,J 8.2Hz),7.87(1H,s),7.93(1H,s),9.24(1H,br s),11.43(1H,br s)

[1217] (S)-2-{3-[2-(羟基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-苄基氨基}-4-甲基-戊酸环戊酯(133)

[1218] LCMS纯度98%, $m/z$  510.25( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , $^1\text{H}$  NMR(300MHz,d6-DMSO), $\delta$ :0.87(6H,d,J 6.4Hz),1.50-1.94(10H,m),3.57-4.20(3H,m),4.44(2H,s),5.20(1H,t,J 5.8Hz),6.58-6.74(3H,m),7.11(1H,t,J 7.7Hz),7.43(1H,d,J 8.3Hz),7.85-7.96(3H,m),9.38(2H,br s),11.46(1H,br s)

[1219] (S)-3-叔丁氧基-2-{4-[2-(羟基氨甲酰基)-苯并[b]噻吩-6-基甲基]-氨基}-苄基氨基}-丙酸环戊酯(134)

[1220] LCMS纯度98%, $m/z$  540.25( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ , $^1\text{H}$  NMR(300MHz,d4-MeOD), $\delta$ :7.64-7.77(2H,m),7.28(1H,d,J = 7.2Hz),6.99(2H,d,J = 6.6Hz),6.53(2H,d,J = 6.6Hz),5.06-5.08(1H,m),4.35(2H,s),3.40-3.75(5H,m),1.50-1.82(8H,m),1.04(9H,s)

[1221] 测量生物学活性

[1222] 组蛋白脱乙酰基酶活性

[1223] 用购自 Biomol 的 HDAC 荧光活性试验测量化合物抑制组蛋白脱乙酰基酶活性的能力。简言之,在存在或不存在抑制剂时将 Fluor de Lys<sup>TM</sup> 底物(一种  $\epsilon$ -氨基被乙酰化的赖氨酸)与具有组蛋白脱乙酰基酶活性的原料(HeLa 细胞核提取物)一起孵育。底物的脱乙酰化使底物对 Fluor de Lys<sup>TM</sup> 显影剂敏感从而产生荧光。因此,将底物与具有 HDAC 活性的原料一起孵育导致信号增强,而当存在 HDAC 抑制剂时信号减弱。

[1224] 数据表达为占不存在抑制剂时测得的对照的百分比,所有样品要减去背景信号,如下所示:

[1225]  $\% \text{活性} = ((S^i - B) / (S^o - B)) \times 100$

[1226] 其中,  $S^i$  是存在底物、酶和抑制剂时的信号,  $S^o$  是存在底物、酶和载体时的信号,其中的抑制剂是被溶解的,而 B 是不存在酶时测得的背景信号。

[1227] 确定 IC<sub>50</sub> 值时采用 Graphpad Prism 软件,将 8 个数据点的结果拟合到具有可变斜率的 S 形剂量反应曲线方程(%活性与化合物浓度的对数),然后通过非线性回归分析确定 IC<sub>50</sub> 值。

[1228] 利用 HeLa 细胞粗制核提取物的组蛋白脱乙酰基酶活性进行筛选。购自 4C(Seneffe,Belgium) 的制品是从收获自指数生长期的 HeLa 细胞制备的。按照 Dignam JD 1983Nucl. Acid. Res. 11,1475-1489 制备核提取物,在液氮中急冻并储存于 -80℃。最终的缓冲液组成为 20mM Hepes、100mM KCl、0.2mM EDTA、0.5mM DTT、0.2mMPMSF 和 20% (v/v) 甘油。

[1229] IC<sub>50</sub> 结果被归入 3 个范围之一,如下:

[1230] 范围 A:IC<sub>50</sub> < 100nM,

[1231] 范围 B:IC<sub>50</sub> 从 101nM 到 1000nM;

[1232] 范围 C:IC<sub>50</sub> > 1001nM。

[1233] NT = 未检测

[1234] 实施例的化合物在该试验中的测试结果给在下面的表 2 的第二列中。

[1235] 细胞抑制试验

[1236] 收获生长在对数期的相应的癌细胞系(HeLa、U937 和 HUT) 并以 1000 细胞/孔(最终体积为 200 $\mu$ l) 接种到 96 孔组织培养板上。细胞生长 24 小时后用化合物(最终浓度为 20 $\mu$ M) 处理细胞。然后再将平板孵育 72 小时,之后按照 Skehan 1990 J Natl Canc Inst82, 1107-1112 进行磺基罗丹明 B(SRB) 细胞存活试验。

[1237] 数据表达为不存在抑制剂时测得的对照的抑制百分数,如下所示:

[1238]  $\% \text{抑制} = 100 - ((S^i / S^o) \times 100)$

[1239] 其中,  $S^i$  是存在抑制剂时的信号,  $S^o$  是存在 DMSO 时的信号。

[1240] 确定 IC<sub>50</sub> 值时采用 Graphpad Prism 软件,将 8 个数据点的结果拟合到具有可变斜率的 S 形剂量反应曲线方程(%活性与化合物浓度的对数),然后通过非线性回归分析确定 IC<sub>50</sub> 值。

[1241] IC<sub>50</sub> 结果被归入 3 个范围之一,如下:

[1242] 范围 A:IC<sub>50</sub> < 330nM,

[1243] 范围 B:IC<sub>50</sub> 从 330nM 到 3300nM;

[1244] 范围 C :IC<sub>50</sub> > 3301nM。

[1245] NT = 未检测

[1246] 实施例的化合物在该试验中的测试结果给在下面的表 2 的第 3-5 列中。

[1247] 表 2

[1248]

| 实施例编号 | HDAC 活性 | HeLa | U937 | HUT |
|-------|---------|------|------|-----|
| 1     | B       | C    | B    | B   |
| 2     | B       | C    | B    | B   |
| 3     | C       | C    | B    | C   |
| 4     | B       | C    | C    | C   |
| 5     | B       | B    | B    | B   |
| 6     | A       | C    | C    | C   |
| 7     | B       | C    | B    | B   |
| 8     | B       | C    | C    | C   |
| 9     | B       | B    | B    | B   |
| 10    | A       | C    | C    | C   |
| 11    | B       | B    | B    | B   |
| 12    | B       | C    | C    | C   |
| 13    | B       | C    | B    | B   |
| 14    | B       | C    | C    | C   |
| 15    | C       | C    | B    | B   |
| 16    | C       | C    | C    | C   |
| 17    | B       | C    | B    | B   |
| 18    | B       | C    | C    | C   |
| 19    | B       | B    | B    | B   |

|    |   |    |    |    |
|----|---|----|----|----|
| 20 | B | B  | A  | B  |
| 21 | B | C  | C  | C  |
| 22 | B | B  | B  | B  |
| 23 | B | C  | C  | C  |
| 24 | B | C  | C  | B  |
| 25 | B | C  | C  | C  |
| 26 | A | B  | B  | B  |
| 27 | B | C  | NT | NT |
| 28 | B | B  | B  | B  |
| 29 | B | B  | B  | B  |
| 30 | B | C  | NT | NT |
| 31 | B | B  | A  | B  |
| 32 | A | B  | NT | B  |
| 33 | B | C  | NT | NT |
| 34 | B | B  | A  | B  |
| 35 | B | B  | B  | B  |
| 36 | A | B  | A  | B  |
| 37 | B | C  | C  | C  |
| 38 | B | NT | NT | NT |
| 39 | B | NT | A  | B  |
| 40 | C | C  | C  | C  |
| 41 | C | C  | C  | C  |
| 42 | C | B  | B  | B  |
| 43 | B | C  | C  | C  |

|    |   |    |    |    |
|----|---|----|----|----|
| 44 | B | C  | B  | B  |
| 45 | C | C  | NT | NT |
| 46 | C | C  | B  | B  |
| 47 | B | C  | B  | B  |
| 48 | C | C  | B  | B  |
| 49 | B | C  | NT | NT |
| 50 | C | C  | B  | B  |
| 51 | B | C  | B  | B  |
| 52 | C | C  | NT | NT |
| 53 | C | C  | C  | C  |
| 54 | C | C  | NT | NT |
| 55 | C | C  | C  | C  |
| 56 | C | C  | C  | C  |
| 57 | C | C  | NT | NT |
| 58 | B | B  | B  | B  |
| 59 | A | C  | NT | NT |
| 60 | B | B  | B  | B  |
| 61 | B | C  | NT | NT |
| 62 | B | C  | C  | B  |
| 63 | B | NT | NT | NT |
| 64 | B | B  | NT | B  |
| 65 | A | C  | NT | NT |
| 66 | B | C  | C  | C  |
| 67 | B | C  | NT | NT |

|    |   |    |    |    |
|----|---|----|----|----|
| 68 | B | C  | B  | B  |
| 69 | B | B  | NT | B  |
| 70 | B | C  | NT | NT |
| 71 | A | B  | A  | B  |
| 72 | A | NT | NT | NT |
| 73 | A | B  | A  | B  |
| 74 | B | NT | NT | NT |
| 75 | A | B  | A  | A  |
| 76 | A | NT | NT | NT |
| 77 | A | B  | A  | A  |
| 78 | A | NT | NT | NT |
| 79 | A | NT | C  | C  |
| 80 | B | NT | NT | NT |
| 81 | A | C  | C  | B  |
| 82 | B | NT | NT | NT |
| 83 | B | B  | B  | B  |
| 84 | B | NT | NT | NT |
| 85 | B | C  | A  | B  |
| 86 | B | C  | A  | B  |
| 87 | A | NT | NT | NT |
| 88 | B | B  | A  | B  |
| 89 | B | C  | A  | B  |
| 90 | B | NT | NT | NT |
| 91 | B | C  | B  | B  |

|     |    |    |    |    |
|-----|----|----|----|----|
| 92  | A  | B  | B  | B  |
| 93  | A  | NT | NT | NT |
| 94  | B  | NT | B  | B  |
| 95  | B  | NT | NT | NT |
| 96  | B  | C  | B  | B  |
| 97  | B  | NT | NT | NT |
| 98  | B  | B  | B  | B  |
| 99  | C  | NT | NT | NT |
| 100 | A  | C  | B  | B  |
| 101 | A  | NT | NT | NT |
| 102 | B  | C  | B  | C  |
| 103 | A  | NT | NT | NT |
| 104 | B  | B  | A  | B  |
| 105 | A  | NT | NT | NT |
| 106 | A  | B  | A  | A  |
| 107 | NT | NT | NT | NT |
| 108 | B  | B  | B  | B  |
| 109 | A  | B  | A  | B  |
| 110 | A  | B  | A  | A  |
| 111 | A  | A  | A  | A  |
| 112 | B  | NT | NT | NT |
| 113 | B  | B  | B  | B  |
| 114 | B  | NT | NT | NT |
| 115 | B  | B  | B  | B  |

|     |   |    |    |    |
|-----|---|----|----|----|
| 116 | B | C  | B  | C  |
| 117 | A | NT | NT | NT |
| 118 | A | A  | A  | A  |
| 119 | A | NT | NT | NT |
| 120 | A | NT | A  | A  |
| 121 | A | NT | NT | NT |
| 122 | A | B  | A  | B  |
| 123 | A | NT | NT | NT |
| 124 | B | B  | A  | B  |
| 125 | A | NT | NT | NT |
| 126 | B | NT | A  | C  |
| 127 | B | NT | NT | NT |
| 128 | B | B  | A  | A  |
| 129 | B | NT | NT | NT |
| 130 | C | C  | B  | C  |
| 131 | C | C  | B  | C  |
| 132 | B | C  | B  | B  |
| 133 | B | B  | B  | C  |
| 134 | B | NT | B  | C  |

[1249] 破碎细胞羧酸酯酶试验

[1250] 制备细胞提取物

[1251] U937 或 Hct116 肿瘤细胞 (约  $10^9$ , 用 4 倍体积的 Dulbeccos PBS (约 1 升) 洗涤并在 4℃ 以 160g 离心 10 分钟使其沉淀)。重复两次, 然后在 25℃ 将最终的细胞沉淀物重悬于 35ml 冷的匀浆缓冲液 (Trizma 10mM、NaCl 130mM、CaCl<sub>2</sub> 0.5mM PH7.0)。通过氮气气蚀制备匀浆 (700psi, 50 分钟, 4℃)。将匀浆保持在冰上并用设计的抑制剂混合物补足以得到以下最终浓度

[1252] 亮肽素 1  $\mu$  M

[1253] 抑肽酶 0.1  $\mu$  M

[1254] E648  $\mu$  M

[1255] 胃酶抑素 1.5  $\mu$  M

[1256] 苯丁抑制素 162  $\mu$  M

[1257] 胰凝乳蛋白酶抑制剂 33  $\mu$  M

[1258] 将细胞匀浆在 360rpm 离心 10 分钟以使其澄清,所得上清液被用作酯酶活性来源并可储存于  $-80^{\circ}\text{C}$  直至使用。

[1259] 测量酯的切除

[1260] 用这种细胞提取物可测量酯变为相应的羧酸的水解作用。为达到这种效果,将细胞提取物(约 30 $\mu$ g/0.5ml 总测试体积)在 Tris-HCl 25mM、125mM NaCl、缓冲液( $25^{\circ}\text{C}$  时 PH 为 7.5)中于  $37^{\circ}\text{C}$  孵育。在 0 时刻加入最终浓度为 2.5  $\mu$  M 的相应的酯(底物)并将样品在  $37^{\circ}\text{C}$  孵育适当时间(通常为 0 或 80 分钟)。加入 3 倍体积的乙腈终止反应。对于 0 时刻样品,在加入酯化合物之前加入乙腈。12000g 离心 5 分钟后,在室温下通过 LCMS(SciexAPI3000,HP1100 二元泵,CTC PAL)分析母体酯及其相应的羧酸。采用的色谱条件基于 AceCN(75 $\times$ 2.1mm)柱和流动相,流动相为 5-95%乙腈水溶液/0.1%甲酸。