

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610153710.3

[51] Int. Cl.

*C07K 5/02 (2006.01)*  
*C07K 7/02 (2006.01)*  
*C07K 5/062 (2006.01)*  
*C07K 5/065 (2006.01)*  
*C07K 5/087 (2006.01)*  
*C07K 5/107 (2006.01)*

[43] 公开日 2007年3月28日

[11] 公开号 CN 1935833A

[51] Int. Cl. (续)

*C07K 7/06 (2006.01)*  
*C07K 14/18 (2006.01)*  
*A61K 38/05 (2006.01)*  
*A61K 38/07 (2006.01)*  
*A61K 38/08 (2006.01)*  
*A61P 31/14 (2006.01)*

[22] 申请日 2001.4.17

[21] 申请号 200610153710.3

分案原申请号 01810566.1

[30] 优先权

[32] 2000.4.19 [33] US [31] 60/198204

[71] 申请人 先灵公司

地址 美国新泽西州凯尼尔沃斯盖洛平希尔路2000号

[72] 发明人 S·文卡特拉曼 K·X·陈

A·阿拉萨潘 F·G·恩约罗格

V·M·基里亚瓦拉布汉 覃天佑

B·A·麦克基特里克

A·J·普伦盖 V·S·马迪森

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李炳爰

权利要求书 18 页 说明书 188 页

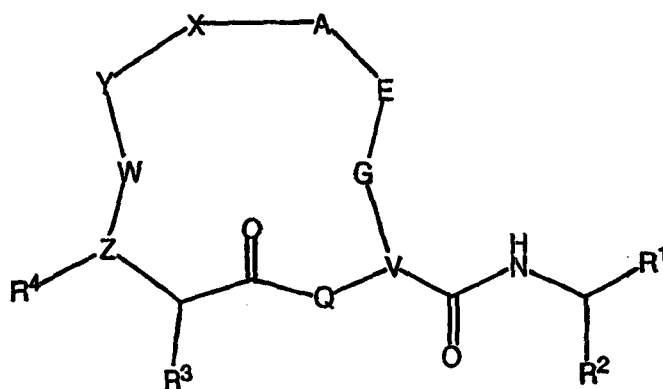
[54] 发明名称

含有烷基和芳基丙氨酸 P2 部分的丙型肝炎病毒的大环 NS3 - 丝氨酸蛋白酶抑制剂

[57] 摘要

本发明公开了新的具有 HCV 蛋白酶抑制活性的大环化合物以及制备这些化合物的方法。在另一实施方案中,本发明公开了包括所述大环化合物的药用组合物以及使用它们治疗与 HCV 蛋白酶有关疾病的方法。

1. 一种大环化合物，包括所述化合物的对映异构体、立体异构体、旋转异构体和互变异构体以及具有式 I 所示通用结构的所述化合物的药学上可接受的盐或溶剂合物：



式 I

其中：

- E、X 和 Y 可以独立存在或不存在，如果存在则独立选自以下部分：烷基、芳基、烷基-芳基、杂烷基、杂芳基、芳基-杂芳基、烷基-杂芳基、环烷基、烷基醚、烷基-芳基醚、芳基醚、烷基氨基、芳基氨基、烷基-芳基氨基、烷基酰胺、烷基-芳基酰胺、芳基酰胺、烷基磺酰胺、烷基-芳基磺酰胺、芳基磺酰胺、芳基脒、氨基甲酸烷基酯、氨基甲酸烷基-芳基酯、氨基甲酸芳基酯、杂烷基磺酰基、杂芳基磺酰基、烷基氨基羰基、芳基氨基羰基、杂芳基氨基羰基或它们的组合，条件是 E、X 和 Y 还可以任选由下述部分取代：芳族、烷基、烷基-芳基、杂烷基、芳基-杂芳基、烷基-杂芳基、环烷基、烷基醚、烷基-芳基醚、烷基砜、烷基-芳基砜、烷基酰胺、烷基-芳基酰胺、烷基磺酰胺、烷基胺、烷基-芳基胺、烷基-芳基磺酰胺、烷基脒、烷基-芳基脒、氨基甲酸烷基酯、氨基甲酸烷基-芳基酯、卤素、羟基氨基；

- 20  $R^1 = COR^5$  或  $B(OR)_2$ ，其中  $R^5 = H, OH, OR^8, NR^9N^{10}, CF_3, C_2F_5, C_3F_7, CF_2R^6, R^6, COR^7$ ，其中  $R^7 = H, OH, OR^8, CHR^9R^{10}$  或  $NR^9R^{10}$ ，其中  $R^6, R^8, R^9$  和  $R^{10}$  独立选自：H、烷基、芳基、杂烷基、

杂芳基、环烷基、芳基烷基、杂芳基烷基、 $\text{CH}(\text{R}^1)\text{COOR}^{11}$ 、 $\text{CH}(\text{R}^1)\text{CONR}^{12}\text{R}^{13}$ 、 $\text{CH}(\text{R}^1)\text{CONHCH}(\text{R}^2)\text{COOR}^{11}$ 、 $\text{CH}(\text{R}^1)\text{CONHCH}(\text{R}^2)\text{CONR}^{12}\text{R}^{13}$ 、 $\text{CH}(\text{R}^1)\text{CONHCH}(\text{R}^2)\text{R}'$ 、 $\text{CH}(\text{R}^1)\text{CONHCH}(\text{R}^2)\text{CONHCH}(\text{R}^3)\text{COOR}^{11}$ 、 $\text{CH}(\text{R}^1)\text{CONHCH}(\text{R}^2)\text{CONHCH}(\text{R}^3)\text{CONR}^{12}\text{R}^{13}$ 、 $\text{CH}(\text{R}^1)\text{CONHCH}(\text{R}^2)\text{CONHCH}(\text{R}^3)\text{CONHCH}(\text{R}^4)\text{COOR}^{11}$ 、 $\text{CH}(\text{R}^1)\text{CONHCH}(\text{R}^2)\text{CONHCH}(\text{R}^3)\text{CONHCH}(\text{R}^4)\text{CONR}^{12}\text{R}^{13}$ 、 $\text{CH}(\text{R}^1)\text{CONHCH}(\text{R}^2)\text{CONHCH}(\text{R}^3)\text{CONHCH}(\text{R}^4)\text{CONHCH}(\text{R}^5)\text{COOR}^{11}$ 、 $\text{CH}(\text{R}^1)\text{CONHCH}(\text{R}^2)\text{CONHCH}(\text{R}^3)\text{CONHCH}(\text{R}^4)\text{CONHCH}(\text{R}^5)\text{CONR}^{12}\text{R}^{13}$ ，其中  $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^{11}$ 、 $\text{R}^{12}$ 、 $\text{R}^{13}$  和  $\text{R}'$  独立选自：H、烷基、芳基、杂烷基、杂芳基、环烷基、烷基-芳基、烷基-杂芳基、芳基-烷基和杂芳烷基；

Z 选自 O、N 或 CH；

W 可以存在或不存在，并且如果 W 存在，则 W 选自 C=O、C=S、 $\text{SO}_2$  或 C=NR；

15 Q 是  $(\text{NR})_p$ 、O、S、 $\text{CH}_2$ 、CHR、CRR' 或朝向 V 的双键；

A 是 O、 $\text{CH}_2$ 、 $(\text{CHR})_p$ 、 $(\text{CHR-CHR}')_p$ 、 $(\text{CRR}')_p$ 、NR、S、 $\text{SO}_2$ 、C=O 或键；

G 是  $(\text{CH}_2)_p$ 、 $(\text{CHR})_p$ 、 $(\text{CRR}')_p$ 、NR、O、S、 $\text{SO}_2$ 、 $\text{S}(\text{O})_2\text{NH}$ 、C=O 或朝向 E 或 V 的双键；

20 V 是 CH、CR 或 N；

p 是数字 0-6；和

R、R'、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$  和  $\text{R}^4$  独立选自：H；C1-C10 烷基；C2-C10 链烯基；C3-C8 环烷基；C3-C8 杂环烷基、芳基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、酰氨基、酯、羧酸、氨基甲酸酯、脲、酮、醛、氰基、硝基；杂芳基；烷基-芳基；烷基杂芳基；(环烷基)烷基和(杂环烷基)烷基，其中所述环烷基由 3-8 个碳原子、0-6 个氧原子、氮原子、硫原子或磷原子组成，所述烷基由 1-6 个碳原子组成；所述烷基、杂烷基、链烯基、杂链烯基、芳基、杂芳基、环烷基和杂环烷基部分可以任选

被取代, 所述术语“被取代”指由一个或多个选自下述的部分任选和合适取代: 烷基、链烯基、炔基、芳基、芳烷基、环烷基、杂环、卤素、羟基、硫代、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、酰氨基、酯、羧酸、氨基甲酸酯、脲、酮、醛、氰基、硝基、磺酰胺、亚砷、

5 砷、磺酰脲、酰肼、异羟肟酸酯和硫脲;

其中烷基, 包括烷氧基的烷基部分, 指通过从具有 1-8 个碳原子的直链或支链饱和烃中除去一个原子而衍生的一价基团;

芳基指具有 6-14 个碳原子并且具有至少一个苯型环的碳环基团, 所述碳环基团的所有可取代的芳族碳原子都作为可能的附着点;

10 芳烷基指含有通过低级烷基连接的芳基的部分;

烷基芳基指含有通过芳基连接的低级烷基的部分;

环烷基指具有 3-8 个碳原子的任选取代的饱和碳环;

卤素指氟、氯、溴和碘; 及

15 杂芳基指环状有机基团, 其具有至少一个中断碳环结构的 O、S 和/或 N 原子并且具有足够数目的离域 $\pi$ 电子以提供芳香性, 所述芳族杂环基团具有 2-14 个碳原子。

2. 权利要求 1 的化合物, 其中芳基指苯基、1-萘基、2-萘基和茚满基。

20 3. 权利要求 1 的化合物, 其中环烷基指具有 5 或 6 个碳原子的任选取代的饱和碳环。

4. 权利要求 1 的化合物, 其中所述杂芳基的芳族杂环基团具有 4 或 5 个碳原子。

25 5. 权利要求 1 的化合物, 其中所述杂芳基是 2-、3-或 4-吡啶基、2-或 3-咪唑基、2-或 3-噻吩基、2-、4-或 5-噻唑基、2-或 4-咪唑基、2-、4-或 5-嘧啶基、2-吡嗪基、或 3-或 4-哒嗪基。

6. 权利要求 1 的化合物, 其中  $R^1 = COR^5$  并且  $R^5$  是 H、OH、 $COOR^8$  或者  $CONR^9R^{10}$ 。

7. 权利要求 6 的化合物, 其中  $R^1 = COCONR^9R^{10}$  并且  $R^9$  是 H,

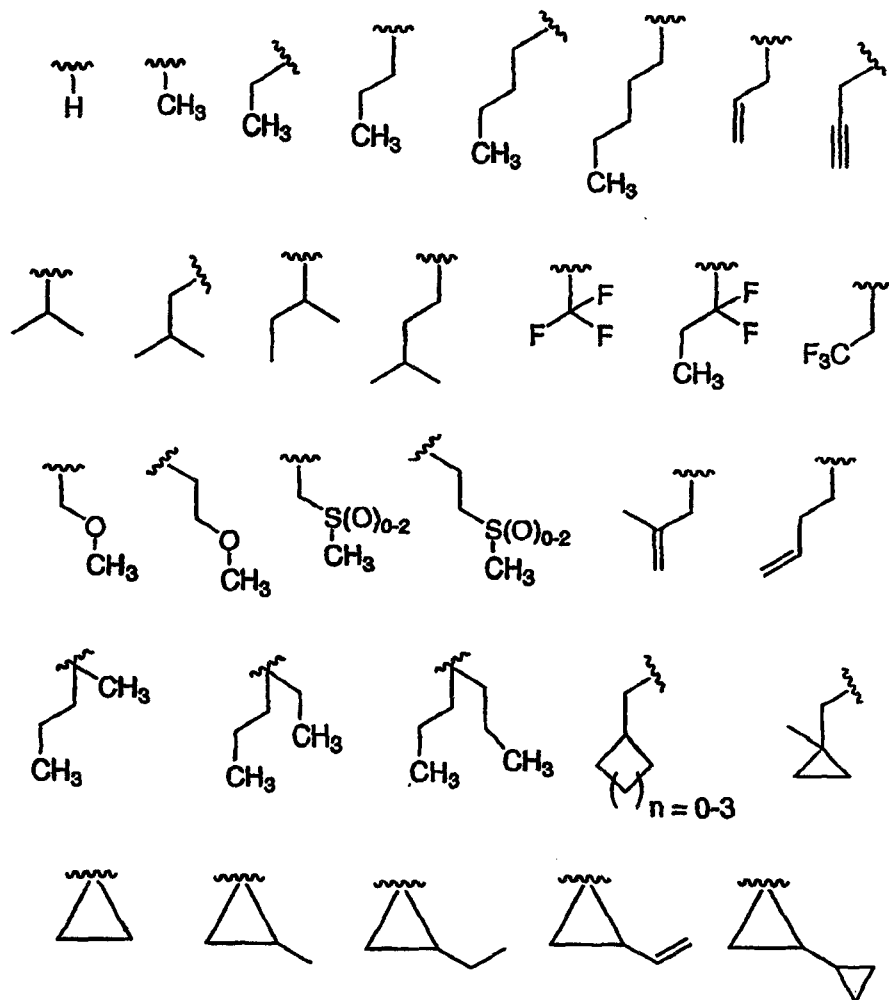
$R^{10}$  是 H、 $CH(R^{1'})COOR^{11}$ 、 $CH(R^{1'})CONR^{12}R^{13}$ 、 $CH(R^{1'})CONHCH(R^{2'})COOR^{11}$ 、 $CH(R^{1'})CONHCH(R^{2'})CONR^{12}R^{13}$  或  $CH(R^{1'})CONHCH(R^{2'})(R')$ 。

8. 权利要求 7 的化合物，其中  $R^{10} = CH(R^{1'})CONHCH(R^{2'})COO$   
5  $R^{11}$ 、 $CH(R^{1'})CONHCH(R^{2'})CONR^{12}R^{13}$  或  $CH(R^{1'})CONHCH(R^{2'})(R')$ ，  
其中  $R^{1'}$  是 H 或烷基， $R^{2'}$  选自苯基、取代的苯基、杂原子取代的苯基、  
苯硫基、环己基、环戊基、环丙基、哌啶基、吡啶基和 2-茚满基。

9. 权利要求 8 的化合物，其中  $R^{1'}$  是 H。

10. 权利要求 9 的化合物，其中  $R^{2'} =$  苯基、苯硫基、环己基、2-  
10 茚满基、环戊基、吡啶基、苯基(4-HNSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)， $R^{11}$  是 H 或叔丁基，  
 $R^{12}$  和  $R^{13}$  是甲基， $R'$  是羟基甲基或叔丁氧基甲基。

11. 权利要求1的化合物, 其中  $R^2$  选自以下部分:



12. 权利要求11的化合物, 其中  $R^1 = COR^5$ ,  $R^5$  是 H、OH、 $COOR^8$  或  $CONR^9R^{10}$ 。

5 13. 权利要求12的化合物, 其中 V 是 CH。

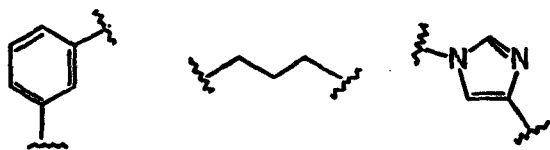
14. 权利要求13的化合物, 其中 Q 是 NR 或 O。

15. 权利要求14的化合物, 其中 G 是  $CH_2$ 。

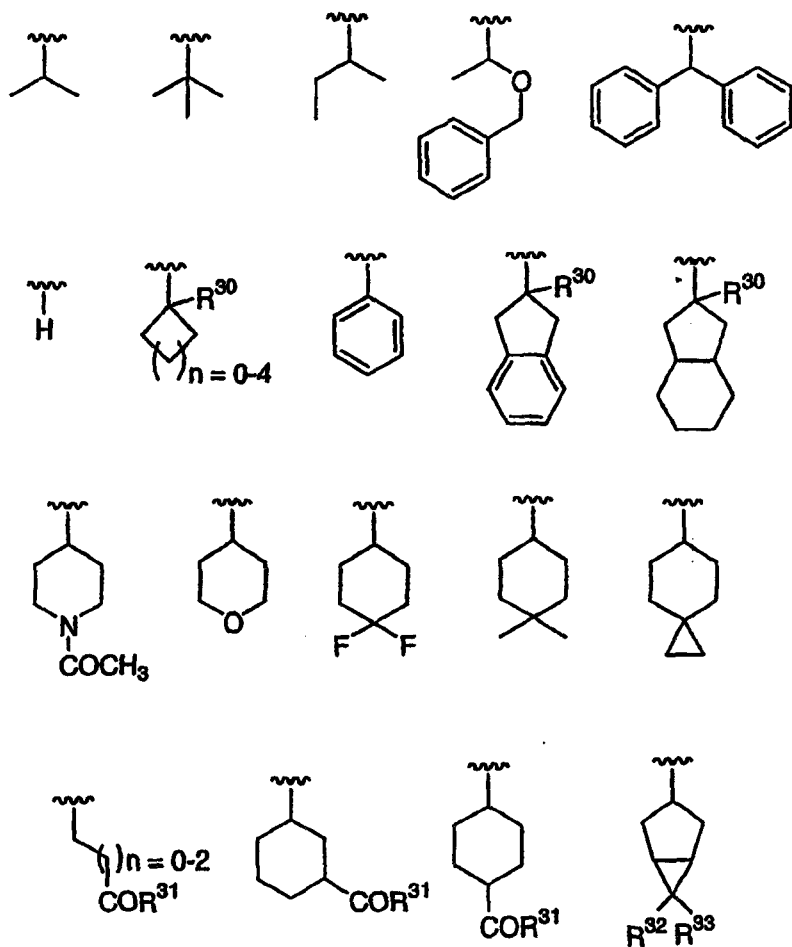
16. 权利要求15的化合物, 其中 A 是 O、NR、 $CH=CH$  或  $CH_2$ 。

17. 权利要求16的化合物, 其中 E 是烷基、芳基、杂烷基、杂芳基、烷基、芳基或环烷基。

18. 权利要求17的化合物, 其中E选自以下部分:



19. 权利要求18的化合物, 其中R<sup>3</sup>选自以下部分:



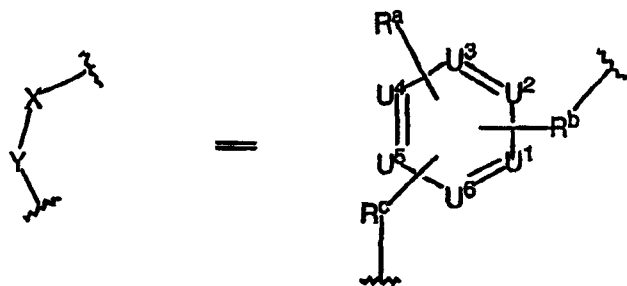
- 5 其中 R<sup>30</sup> = H、CH<sub>3</sub> 或其它烷基;  
 R<sup>31</sup> = OH、O-烷基、NH<sub>2</sub>、N-烷基; 和  
 R<sup>32</sup> 和 R<sup>33</sup> 可以相同或不同, 并独立选自 H、F、Cl、Br 和 CH<sub>3</sub>。

20. 权利要求19的化合物, 其中 Z = N, R<sup>4</sup> = H。

21. 权利要求20的化合物, 其中 W 是 C=O。

- 10 22. 权利要求21的化合物, 其中 X-Y 部分选自 C1-C10 烷基、烷基、环烷基、杂烷基、芳基烷基、芳基、杂芳基和烷基芳基。

23. 权利要求 22 的化合物, 其中:



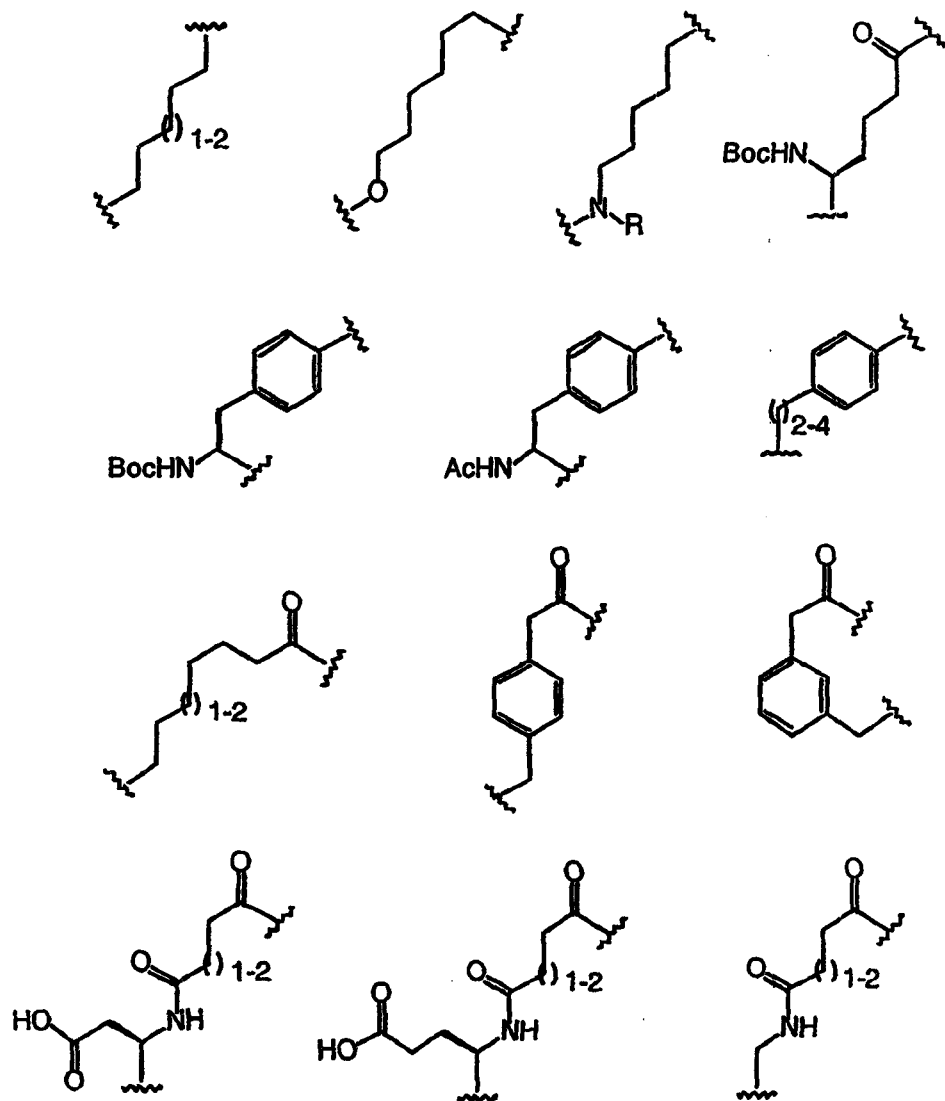
其中  $R^b$  直接连接到 A 并且  $R^c$  直接连接到 W; 所述部分  $U^1$ 、 $U^2$ 、 $U^3$ 、 $U^4$ 、 $U^5$  和  $U^6$  形成六元碳环或者带有一个或多个杂原子的五元或六元环;

$R^a = \text{H}$ 、烷基、烷氧基、羟基、烷硫基、卤素、硝基、氰基、羧酸、酯、酰胺、氨基、腈或  $\text{CF}_3$ ;

$R^b$  是键、 $\text{C}_1\text{-C}_6$  烷基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$  链烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$  炔基、O、S、 $\text{SO}_2$ 、NH、O(烷基)、S(烷基)、 $\text{SO}_2$ (烷基)或 N(烷基); 和

$R^c$  是键、 $\text{C}_1\text{-C}_6$  烷基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$  链烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$  炔基、O、S、 $\text{SO}_2$ 、NH、O(烷基)、S(烷基)、 $\text{SO}_2$ (烷基)、N(烷基)或者  $\text{CH}_2$  连接到芳环的  $\text{CH}_2\text{-N}$ (烷基)。

24. 权利要求 22 的化合物，其中所述 X-Y 部分选自以下结构：



25. 一种包括作为活性成分的权利要求 1 化合物的药用组合物。

26. 权利要求 25 的药用组合物在治疗与丙型肝炎病毒有关的疾病  
5 中的用途。

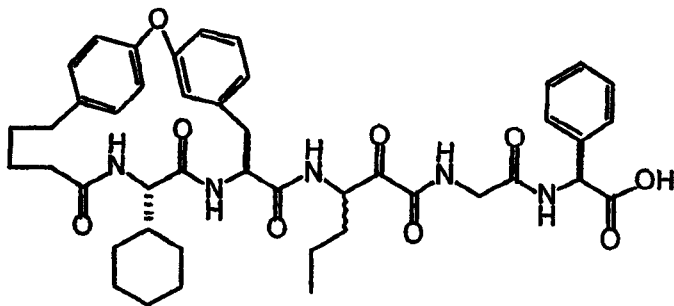
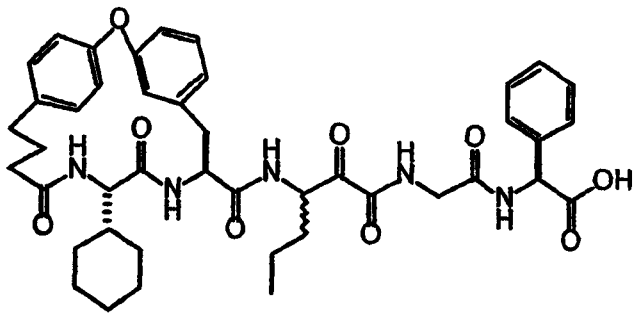
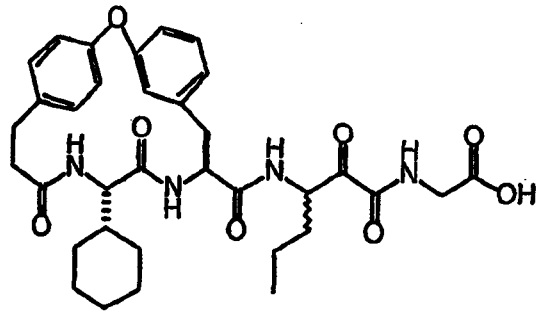
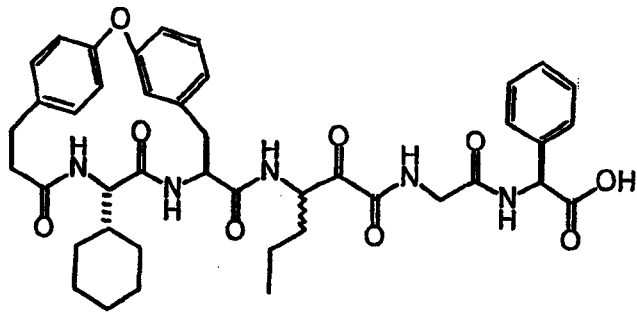
27. 权利要求 25 的药用组合物，它还包括药学上可接受的载体。

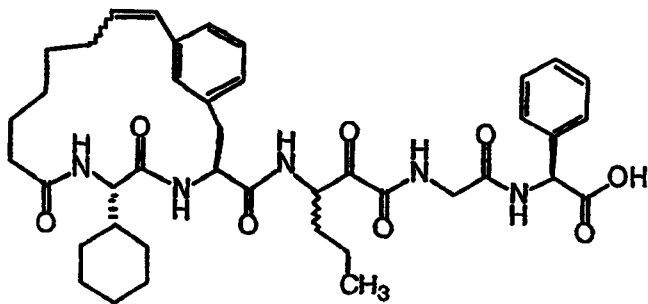
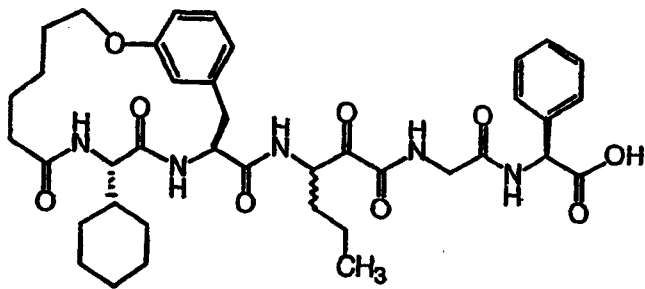
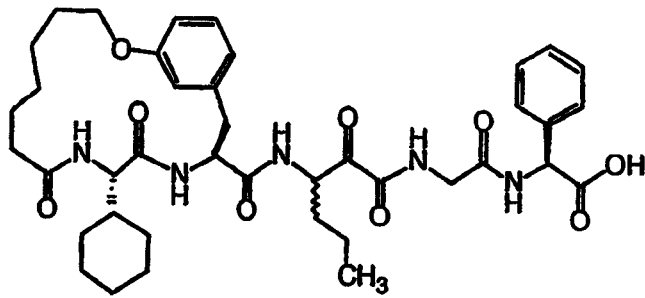
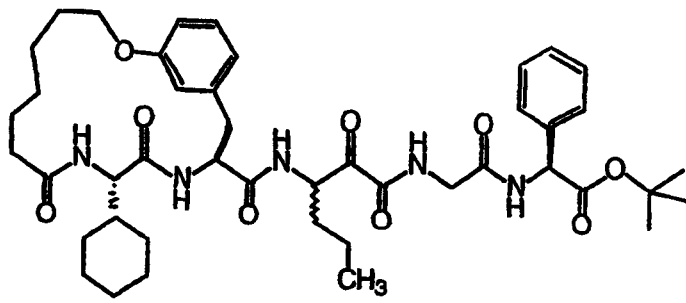
28. 一种治疗与 HCV 蛋白酶有关的疾病的方法，所述方法包括给予需要此治疗的患者一种药用组合物，该组合物包括治疗有效量的权利要求 1 的化合物。

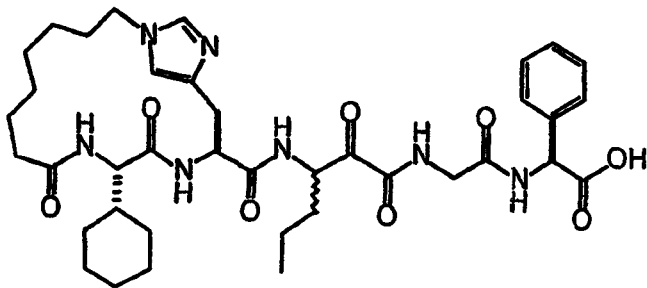
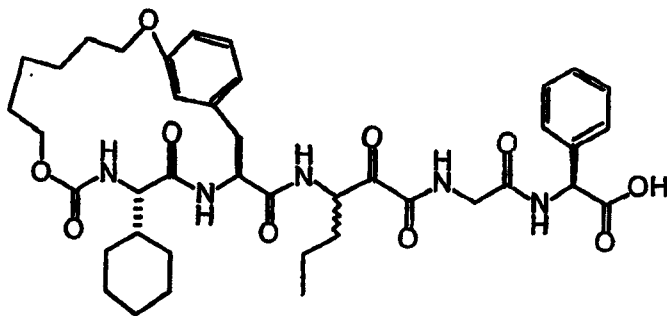
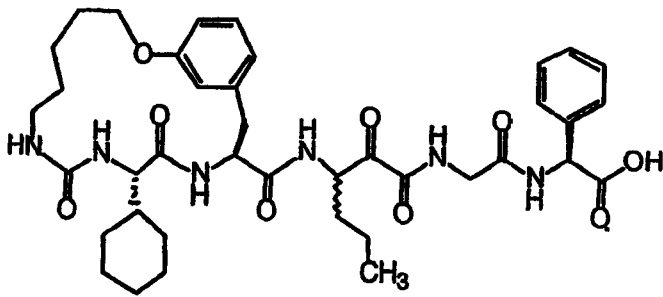
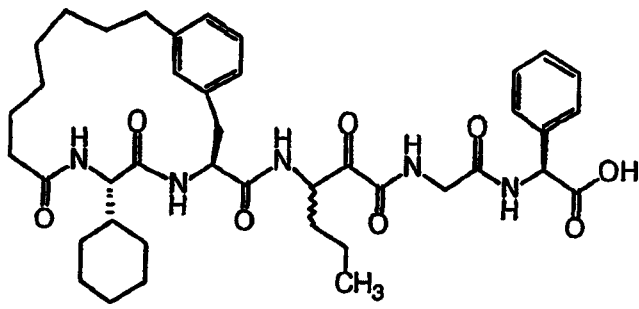
29. 权利要求 1 的化合物在生产治疗与 HCV 蛋白酶有关疾病的  
10 药物中的用途。

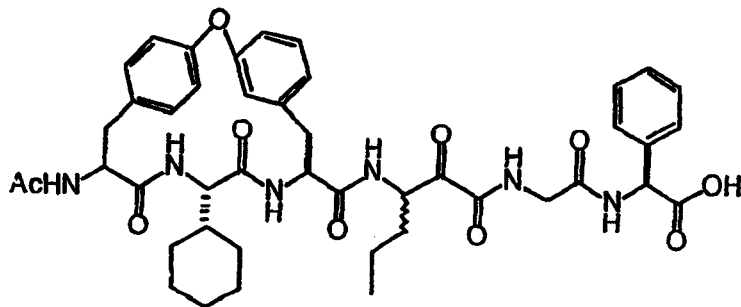
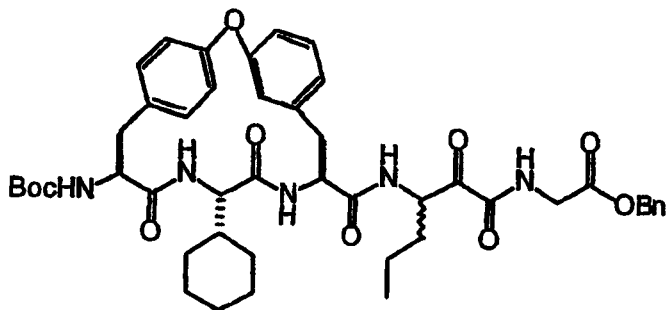
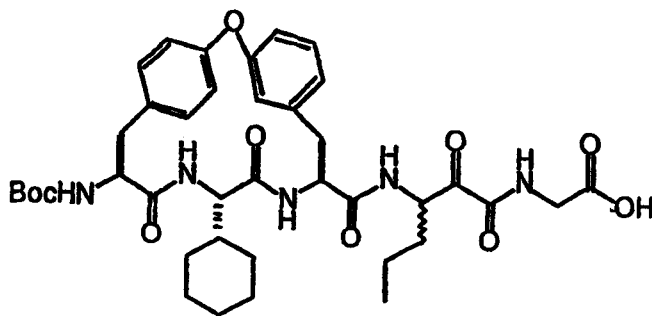
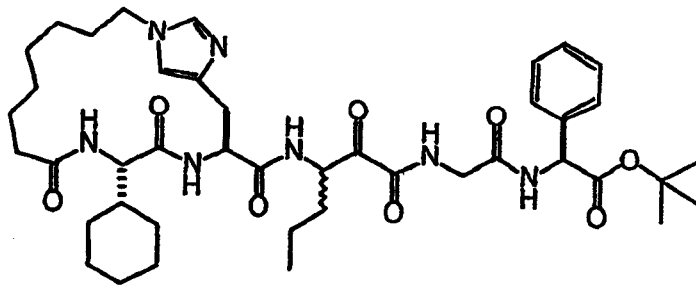
30. 一种制备用于治疗与HCV蛋白酶有关疾病的药用组合物的方法，所述方法包括使权利要求1的化合物和药学上可接受的载体密切接触。

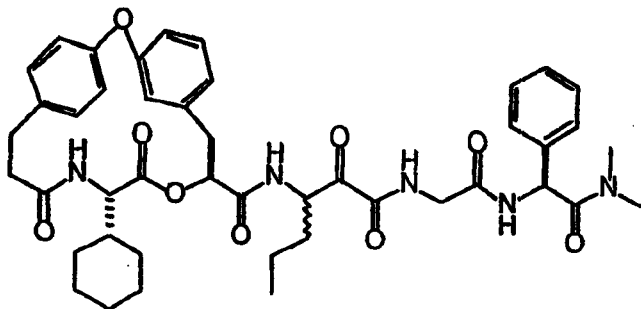
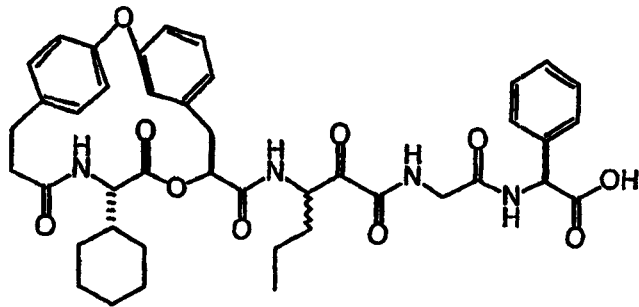
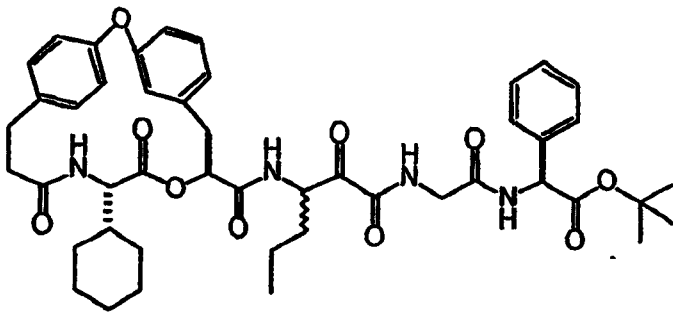
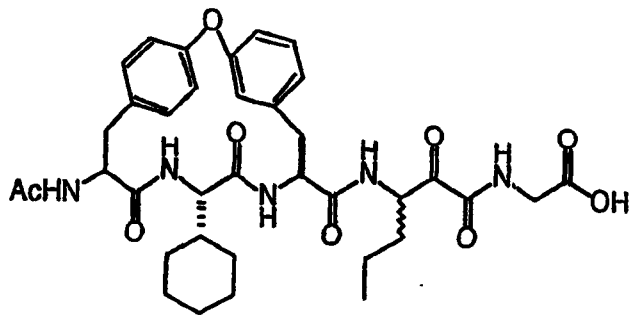
5 31. 一种表现出HCV蛋白酶抑制活性的化合物，包括所述化合物的对映异构体、立体异构体、旋转异构体和互变异构体，以及所述化合物的药学上可接受的盐或溶剂合物，所述化合物选自具有下示结构的化合物：

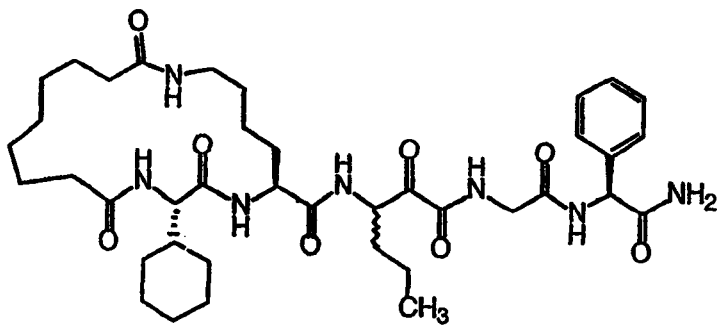
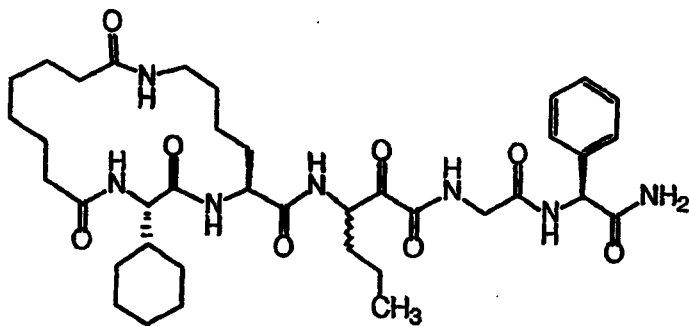
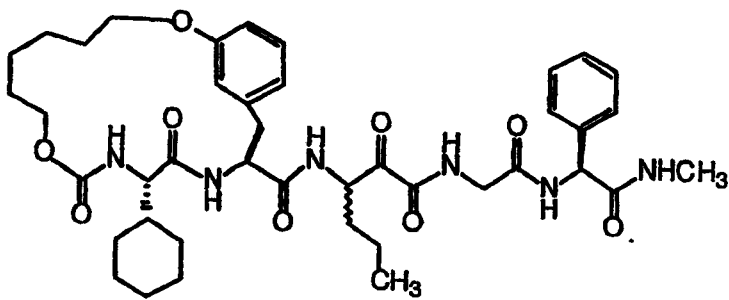
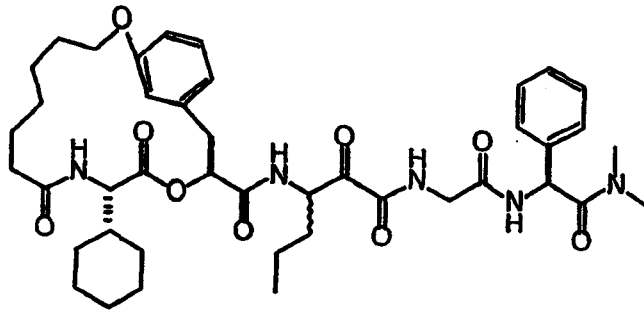


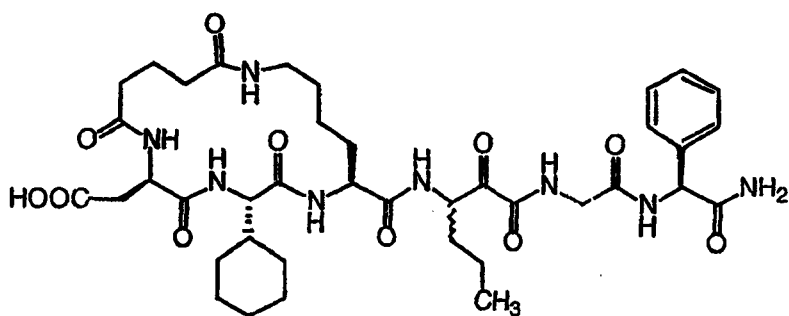
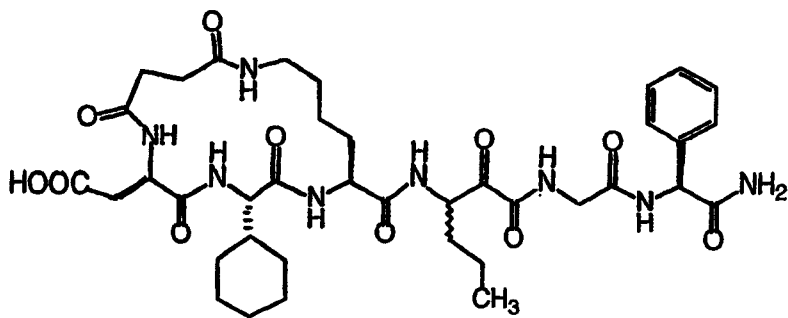
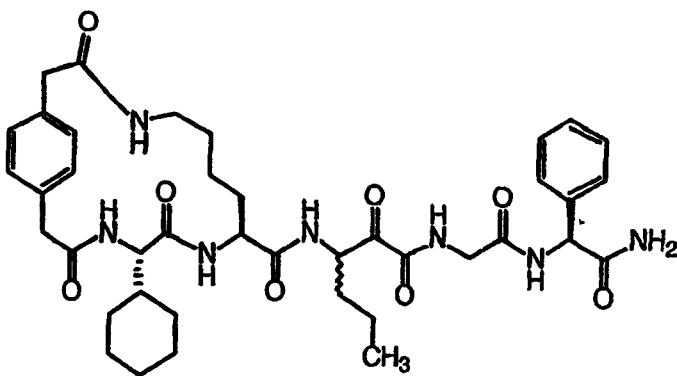
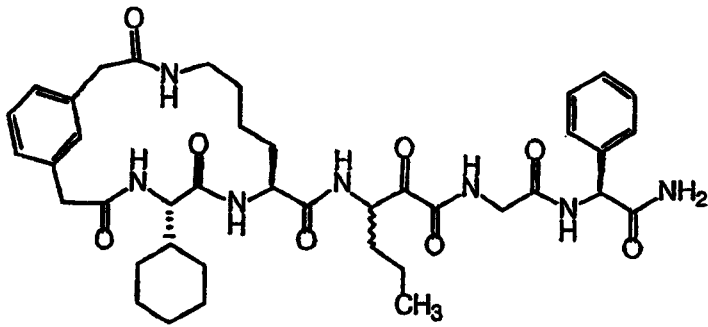


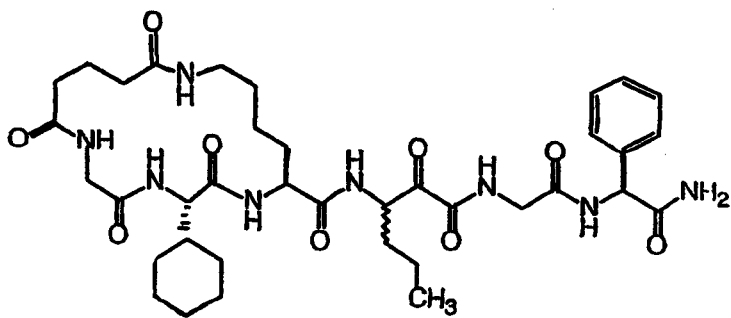
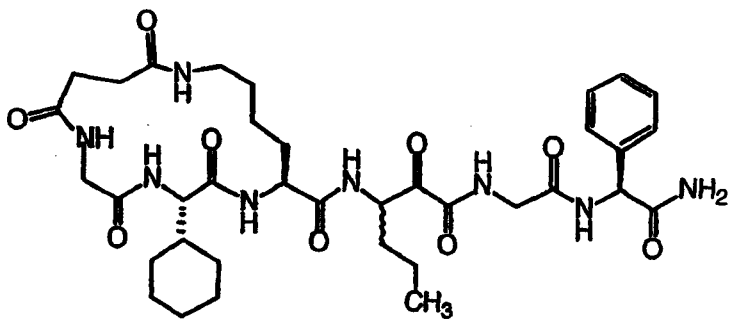
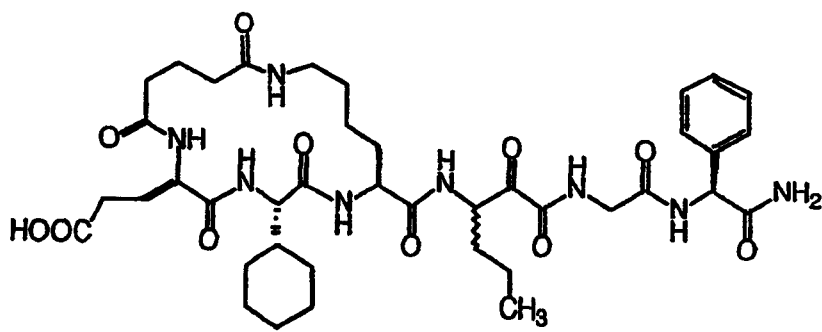
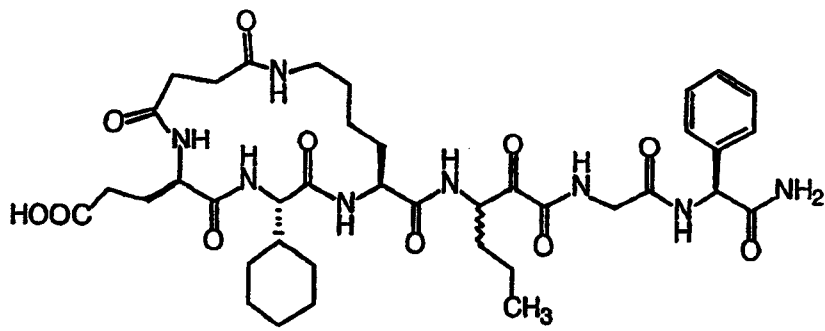












32. 一种用于治疗与 HCV 蛋白酶有关疾病的药用组合物, 所述组合物包括治疗有效量的一种或多种权利要求 31 的化合物和药学上可接受的载体。

5

## 含有烷基和芳基丙氨酸 P2 部分的 丙型肝炎病毒的大环 NS3-丝氨酸蛋白酶抑制剂

本申请是申请日为 2001 年 4 月 17 日、发明名称为“含有烷基和芳基丙氨酸 P2 部分的丙型肝炎病毒的大环 NS3-丝氨酸蛋白酶抑制剂”的 PCT/US01/12530 的发明专利申请的分案申请，原申请的中国专利申请号为 01810566.1。

本发明涉及新的丙型肝炎病毒(“HCV”)蛋白酶抑制剂，包含一种或多种这样的抑制剂的药用组合物、制备这样的抑制剂的方法和使用这样的抑制剂治疗丙型肝炎和相关疾病的方法。本发明尤其公开了作为 HCV NS3/NS4a 丝氨酸蛋白酶抑制剂的新的环状化合物。本文公开的内容与 2000 年 4 月 5 日提交的待审专利申请顺序号\_\_的内容有关。

### 发明背景

丙型肝炎病毒(HCV)为一种(+)-有义单链 RNA 病毒，它作为主要病原体涉及非甲非乙型肝炎(NANBH)，尤其是与血液相关的 NANBH (BB-NANBH) (参见国际专利申请公布号 WO 89/04669 和欧洲专利申请公布号 EP 381 216)。NANBH 区别于其它类型的病毒诱发的肝病，例如甲型肝炎病毒(HAV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丁型肝炎病毒(HDV)、巨细胞病毒(CMV)和埃-巴二氏病毒(EBV)，也区别于其它形式的肝病，例如酒精中毒和原发性胆汁性肝硬化。

最近，多肽加工和病毒复制所必需的 HCV 蛋白酶已被鉴定，克隆和表达(参见例如美国专利号 5,712,145)。这种约 3000 个氨基酸的多蛋白含有自氨基末端至羧基末端的核壳蛋白(C)、包膜蛋白(E1 和 E2)以及几种非结构蛋白(NS1、2、3、4a、5a 和 5b)。NS3 为约 68 kda 的蛋白，由 HCV 基因组的约 1893 个核苷酸编码，并且具有 2 个不同的结构域：(a)由约 200 个 N-末端氨基酸组成的丝氨酸蛋白酶结构域；和 (b)在蛋白 C-末端的 RNA 依赖性 ATP 酶结构域。由于蛋白质序列、整体三维结构和催化机制的相似性，NS3 蛋白酶被认为是胰凝乳蛋白酶

家族的一个成员。其它类似胰凝乳蛋白酶的酶为弹性蛋白酶、Xa 因子、凝血酶、胰蛋白酶、血纤蛋白溶酶、尿激酶、tPA 和 PSA。HCV NS3 丝氨酸蛋白酶担负在 NS3/NS4a、NS4a/NS4b、NS4b/NS5a 和 NS5a/NS5b 接点的多肽(多蛋白)的蛋白酶解,因此在病毒复制期间负责生成四种病毒蛋白。HCV NS3 丝氨酸蛋白酶已被作为抗病毒化学治疗学的具有吸引力的靶标。

已经测定 NS4a 蛋白(约 6 kda 的多肽)为 NS3 的丝氨酸蛋白酶活性的辅因子。经 NS3/NS4a 丝氨酸蛋白酶进行的 NS3/NS4a 接点的自动切割在分子内(即顺式)发生,同时其它的切割位点在分子间(即反式)进行。

HCV 蛋白酶的天然切割位点的分析揭示在 P1 存在半胱氨酸,在 P1' 存在丝氨酸,并且这些残基在 NS4a/NS4b、NS4b/NS5a 和 NS5a/NS5b 接点中严格保守。NS3/NS4a 接点在 P1 包含苏氨酸,在 P1' 包含丝氨酸。假设 NS3/NS4a 上的 Cys → Thr 取代以解释该接点需要顺式而不是反式加工。参见例如 Pizzi 等(1994) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 91: 888-892, Failla 等(1996) Folding & Design 1: 35-42。NS3/NS4a 切割位点也比其它的位点更耐受诱变。参见例如 Kollykhalov 等(1994) J. Virol. 68: 7525-7533。也已发现切割位点的上游区域的酸性残基需要有效的切割。参见例如 Komoda 等(1994) J. Virol. 68:7351-7357。

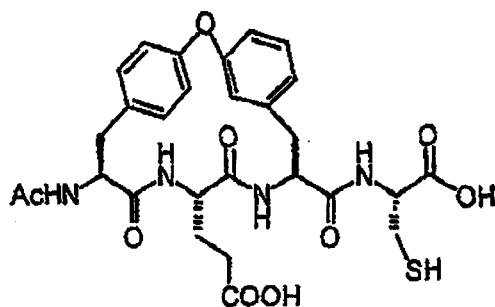
已报道的 HCV 蛋白酶抑制剂包括抗氧化剂(参见国际专利申请公布号 WO 98/14181)、某些肽类和肽类似物(参见国际专利申请公布号 WO 98/17679, Landro 等(1997) Biochem. 36: 9340-9348, Ingallinella 等(1998) Biochem. 37: 8906-8914, Llinàs-Brunet 等(1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8: 1713-1718)、基于 70-氨基酸多肽水蛭蛋白酶抑制剂 c 的抑制剂(Martin 等(1998) Biochem. 37: 11459-11468, 选自人胰分泌型胰蛋白酶抑制剂(hPSTI-C3)和小体所有组成成分(minibody repertoires) (MBip)的抑制剂亲和性(Dimasi 等(1997) J. Virol. 71: 7461-7469), cV<sub>H</sub>E2 (“camelized” 变体结构域抗体片段)(Martin 等(1997) Protein Eng.

10: 607-614)和 $\alpha$ 1-抗胰凝乳蛋白酶(ACT) (Elzouki 等)(1997) *J. Hepat.* 27: 42-28)。设计用来选择性破坏丙型肝炎病毒RNA的核酶最近已被公开(参见 *BioWorld Today* 9(217): 4(1998年11月10日))。

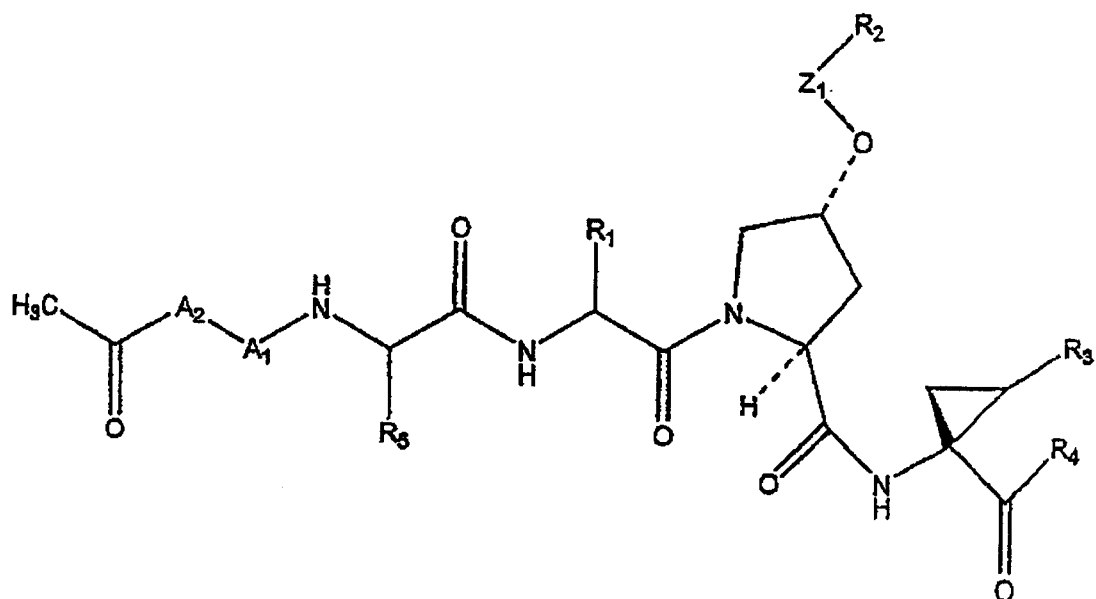
也参考1998年4月30日公开的PCT公布号WO 98/17679 (Vertex  
5 Pharmaceuticals Incorporated)、1998年5月28日公开的WO 98/22496 (F. Hoffmann-La Roche AG)和1999年2月18日公开的WO 99/07734 (Boehringer Ingelheim Canada Ltd)。

HCV已参与肝硬变且参与诱导肝细胞癌。目前患有HCV感染的患者预后是很差的。由于缺乏与HCV感染有关的免疫或者缓解,HCV  
10 感染比起其它形式的肝炎更难以治疗。目前数据表明硬变诊断后四年的生存率小于50%。据诊断患有定位可切除肝细胞癌的患者具有10-30%的五年生存率,而那些患有定位不可切除肝细胞癌的患者具有小于1%的五年生存率。

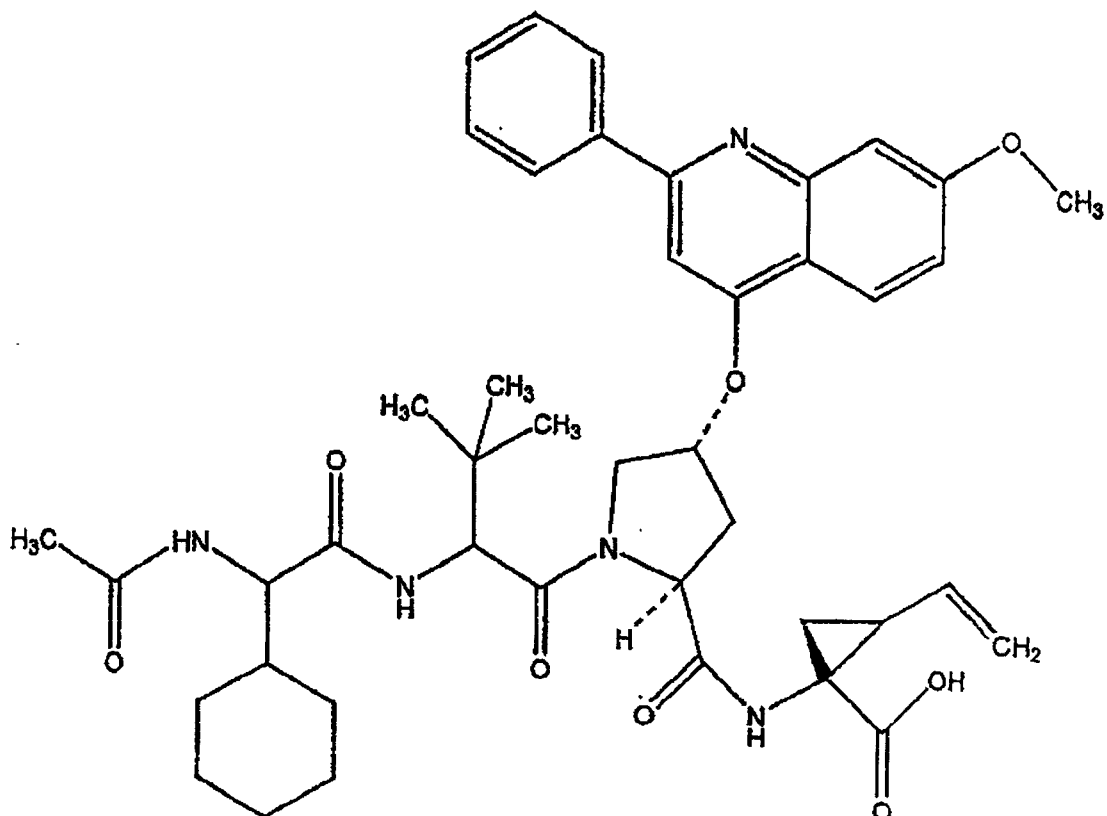
参考A. Marchetti等 *Synlett*, S1, 1000-1002 (1999), 其描述HCV  
15 NS3蛋白酶抑制剂的二环类似物的合成。其中所公开的化合物具有以下结构:



也参考 WO 00/09558(受让人: Boehringer Ingelheim Limited; 2000年2月24日公开), 它公开了下式的肽衍生物:



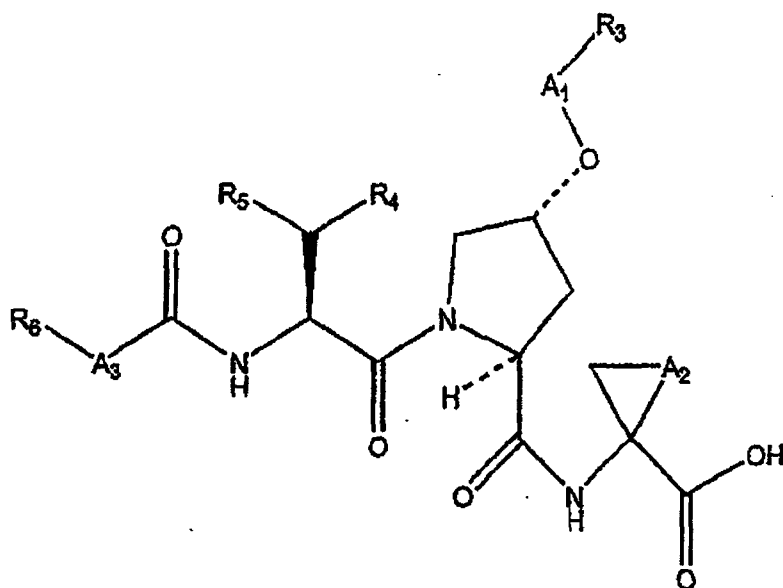
其中各元素在此定义。该系列的示例性化合物为:



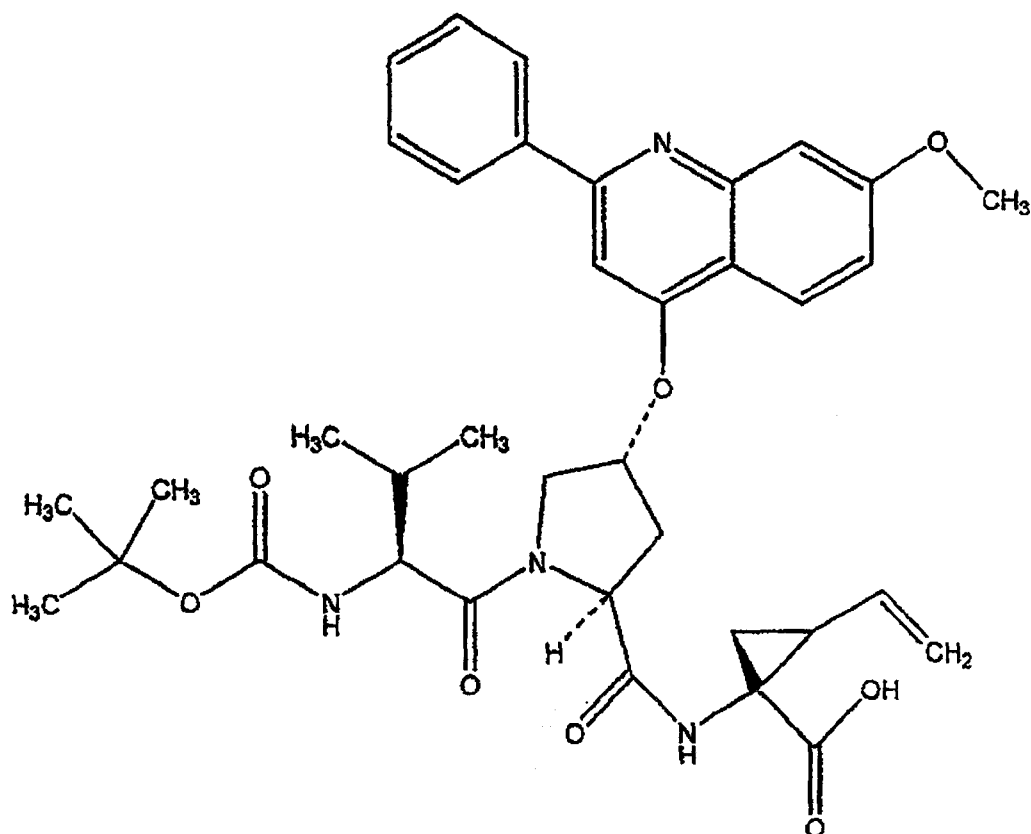
5

也参考 WO 00/09543(受让人: Boehringer Ingelheim Limited; 2000

年2月24日公开), 它公开了下式的肽衍生物:



其中各元素在此定义。该系列的示例性化合物为:



- 5 丙型肝炎的目前疗法包括干扰素- $\alpha$  (INF $\alpha$ )以及用利巴韦林和干扰素进行的联合疗法。参见例如, Beremguer 等(1998) *Proc. Assoc. Am.*

Physicians 110(2):98-112。这些疗法的持续应答率低且多发生副作用。参见例如, Hoofnagle 等(1997) N. Engl. J. Med. 336: 347。目前, 没有疫苗可用于 HCV 感染。

2000 年 4 月 5 日提交的待审专利申请, 顺序号\_\_\_\_\_, 公开了某些作为 HCV 蛋白酶的抑制剂的大环化合物以及含有所述化合物的药用组合物。

丙型肝炎病毒感染需要新的治疗和疗法。因此, 本发明一个目的是提供用于治疗或者预防或者改善丙型肝炎的一种或多种症状的化合物。

在此另一个目的是提供治疗或者预防或者改善丙型肝炎的一种或多种症状的方法。

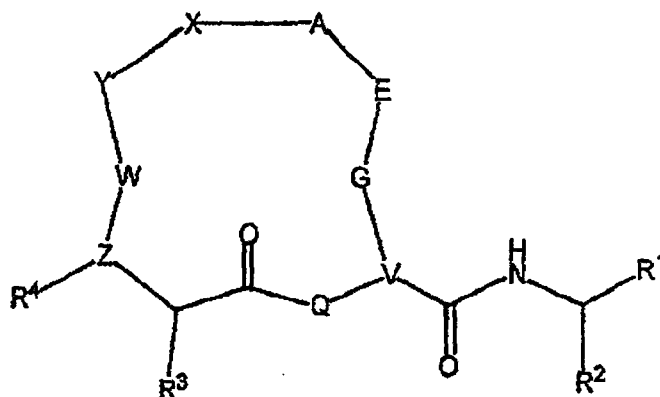
本发明另一个目的是提供使用在此提供的化合物来调节丝氨酸蛋白酶, 特别是 HCV NS3/NS4a 丝氨酸蛋白酶活性的方法。

在此另一个目的是提供使用在此提供的化合物来调节 HCV 多肽的加工的方法。

### 发明概述

在本发明的许多实施方案中, 提供一类新的大环 HCV 蛋白酶抑制剂, 包含一种或多种所述化合物的药用组合物、制备包含一种或多种这样的化合物的药用制剂的方法、以及治疗、预防或者改善丙型肝炎的一种或多种症状的方法。也提供调节 HCV 多肽与 HCV 蛋白酶相互作用的方法。在此提供的化合物中, 优选抑制 HCV NS3/NS4a 丝氨酸蛋白酶活性的化合物。本发明公开的化合物一般含有大约四个或更多个氨基酸残基以及少于大约十二个氨基酸残基。

在本发明的主要实施方案中，本发明提供式 I 的大环化合物：



式 I

其中：

E、X 和 Y 可以独立存在或不存在，如果存在则独立选自以下部分：  
 5 烷基、芳基、烷基-芳基、杂烷基、杂芳基、芳基-杂芳基、烷基-杂芳基、环烷基、烷基醚、烷基-芳基醚、芳基醚、烷基氨基、芳基氨基、烷基-芳基氨基、烷基硫醚、烷基-芳基硫醚、芳基硫醚、烷基砜、烷基-芳基砜、芳基砜、烷基-烷基亚砜、烷基-芳基亚砜、烷基酰胺、烷基-芳基酰胺、芳基酰胺、烷基磺酰胺、烷基-芳基磺酰胺、芳基磺酰胺、烷基脲、烷基-芳基脲、芳基脲、氨基甲酸烷基酯、氨基甲酸烷基-芳基酯、氨基甲酸芳基酯、烷基酰肼、烷基-芳基酰肼、烷基羟酰胺、烷基-芳基羟酰胺、烷基磺酰基、芳基磺酰基、杂烷基磺酰基、杂芳基磺酰基、烷基羰基、芳基羰基、杂烷基羰基、杂芳基羰基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、杂芳氧基羰基、烷基氨基羰基、芳基氨基羰基、杂芳基氨基羰基或它们的组合，条件是 E、X 和 Y 又可以任选由下述  
 10 部分取代：芳族、烷基、烷基-芳基、杂烷基、芳基-杂芳基、烷基-杂芳基、环烷基、烷基醚、烷基-芳基醚、烷基硫醚、烷基-芳基硫醚、烷基砜、烷基-芳基砜、烷基酰胺、烷基-芳基酰胺、烷基磺酰胺、烷基胺、烷基-芳基胺、烷基-芳基磺酰胺、烷基脲、烷基-芳基脲、氨基甲酸烷基酯、氨基甲酸烷基-芳基酯、卤素、羟基氨基、胍基甲酸烷基酯、胍基甲酸芳基酯；  
 15  
 20

$R^1 = COR^5$  或  $B(OR)_2$ ，其中  $R^5 = H, OH, OR^8, NR^9N^{10}, CF_3,$

- $C_2F_5$ 、 $C_3F_7$ 、 $CF_2R^6$ 、 $R^6$ 、 $COR^7$ ，其中  $R^7 = H$ 、 $OH$ 、 $OR^8$ 、 $CHR^9R^{10}$  或  $NR^9R^{10}$ ，其中  $R^6$ 、 $R^8$ 、 $R^9$  和  $R^{10}$  独立选自： $H$ 、烷基、芳基、杂烷基、杂芳基、环烷基、环烷基、芳基烷基、杂芳基烷基、 $CH(R^1)COOR^{11}$ 、 $CH(R^1)CONR^{12}R^{13}$ 、 $CH(R^1)CONHCH(R^2)COOR^{11}$ 、  
 5  $CH(R^1)CONHCH(R^2)CONR^{12}R^{13}$ 、 $CH(R^1)CONHCH(R^2)R^7$ 、 $CH(R^1)CONHCH(R^2)CONHCH(R^3)COO R^{11}$ 、 $CH(R^1)CONHCH(R^2)CONHCH(R^3)CONR^{12}R^{13}$ 、 $CH(R^1)CONHCH(R^2)CONHCH(R^3)CONHCH(R^4)COOR^{11}$ 、 $CH(R^1)CONHCH(R^2)CONHCH(R^3)CONHCH(R^4)CONR^{12}R^{13}$ 、  
 10  $CH(R^1)CONHCH(R^2)CONHCH(R^3)CONHCH(R^4)CONHCH(R^5)COO R^{11}$ 、 $CH(R^1)CONHCH(R^2)CONHCH(R^3)CONHCH(R^4)CONHCH(R^5)CONR^{12}R^{13}$ ，其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^{11}$ 、 $R^{12}$ 、 $R^{13}$  和  $R^7$  独立选自： $H$ 、烷基、芳基、杂烷基、杂芳基、环烷基、烷基-芳基、烷基-杂芳基、芳基-烷基和杂芳烷基；  
 15  $Z$  选自  $O$ 、 $N$  或  $CH$ ；  
 $W$  可以存在或不存在，并且如果  $W$  存在，则  $W$  选自  $C=O$ 、 $C=S$ 、 $SO_2$  或  $C=NR$ ；  
 $Q$  是  $(NR)_p$ 、 $O$ 、 $S$ 、 $CH_2$ 、 $CHR$ 、 $CRR'$  或朝向  $V$  的双键；  
 $A$  是  $O$ 、 $CH_2$ 、 $(CHR)_p$ 、 $(CHR-CHR')_p$ 、 $(CRR')_p$ 、 $NR$ 、 $S$ 、 $SO_2$ 、  
 20  $C=O$  或键；  
 $G$  是  $(CH_2)_p$ 、 $(CHR)_p$ 、 $(CRR')_p$ 、 $NR$ 、 $O$ 、 $S$ 、 $SO_2$ 、 $S(O)_2NH$ 、 $C=O$  或朝向  $E$  或  $V$  的双键；  
 $V$  是  $CH$ 、 $CR$  或  $N$ ；  
 $p$  是数字 0-6；和  
 25  $R$ 、 $R'$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  和  $R^4$  独立选自： $H$ ； $C1-C10$  烷基； $C2-C10$  链烯基； $C3-C8$  环烷基； $C3-C8$  杂环烷基、芳基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、酰氨基、酯、羧酸、氨基甲酸酯、脲、酮、醛、氰基、硝基；杂芳基；烷基-芳基；烷基杂芳基；(环烷基)烷基和(杂环烷基)

烷基，其中所述环烷基由 3-8 个碳原子、0-6 个氧原子、氮原子、硫原子或磷原子组成，所述烷基由 1-6 个碳原子组成；所述烷基、杂烷基、链烯基、杂链烯基、芳基、杂芳基、环烷基和杂环烷基部分可以任选被取代，所述术语“被取代”指由一个或多个选自下述的部分任选和合适取代：烷基、链烯基、炔基、芳基、芳烷基、环烷基、杂环、卤素、羟基、硫代、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、氨基、酰氨基、酯、羧酸、氨基甲酸酯、脲、酮、醛、氰基、硝基、磺酰胺、亚砷、砷、磺酰脲、酰肼和异羟肟酸酯和硫脲。

5

除了另有定义外，本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员通常所理解的相同的意义。因此，例如术语烷基（包括烷氧基的烷基部分）指通过从具有 1-8 个、优选 1-6 个碳原子的直链或支链饱和烃中除去一个原子而衍生的一价基团；

10

芳基—代表具有 6-14 个碳原子并且具有至少一个苯型环的碳环基团，所述碳环基团的所有可取代的芳族碳原子都作为可能的附着点。优选的芳基包括苯基、1-萘基、2-萘基和茚满基，特别是苯基和取代的苯基；

15

芳烷基—代表含有通过低级烷基连接的芳基的部分；

烷基芳基—代表含有通过芳基连接的低级烷基的部分；

环烷基—代表具有 3-8 个、优选 5 或 6 个碳原子、任选取代的饱和和碳环；

20

杂环—除了以下定义的杂芳基外，代表具有至少一个中断碳环结构的 O、S 和/或 N 原子的饱和与不饱和环状有机基团，所述碳环结构由一个或多个环组成，其中每一个环是 5、6 或 7 元环并且可具有或不具有缺乏离域 $\pi$ 电子的双键，所述环结构具有 2-8 个、优选 3-6 个碳原子，例如 2-或 3-吡啶基、2-或 3-咪唑基、2-或 3-吗啉基、或 2-或 3-硫代吗啉基；

25

卤素—代表氟、氯、溴和碘；

杂芳基—代表环状有机基团，其具有至少一个中断碳环结构的

O、S 和/或 N 原子并且具有足够数目的离域 $\pi$ 电子以提供芳香性，所述芳族杂环基团具有 2-14、优选 4 或 5 个碳原子，例如 2-、3-或 4-吡啶基、2-或 3-咪唑基、2-或 3-噻吩基、2-、4-或 5-噻唑基、2-或 4-咪唑基、2-、4-或 5-嘧啶基、2-吡嗪基、或 3-或 4-哒嗪基等。优选的杂芳基是 2-、3-和 4-吡啶基；这些杂芳基也可以被任选取代。

本发明也包括式 I 化合物的互变异构体、旋转异构体、对映异构体和其它光学异构体以及其药学上可接受的盐和溶剂合物。

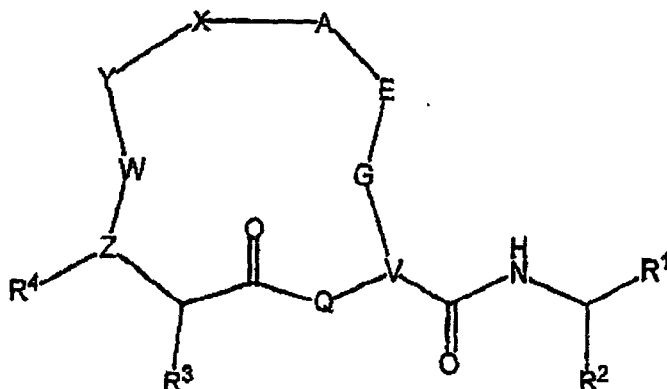
本发明的另一特点是含有作为活性成分的式 I 化合物(或它的盐、溶剂合物或异构体)与药学上可接受的载体或赋形剂的药用组合物。

本发明也提供制备式 I 化合物的方法以及治疗疾病如 HCV 和相关疾病的方法。所述治疗方法包括给予患有所述一种或多种疾病的患者治疗有效量的式 I 化合物或含有式 I 化合物的药用组合物。

也公开了式 I 化合物在制备用于治疗 HCV 和相关疾病的药物中的用途。

### 优选实施方案详述

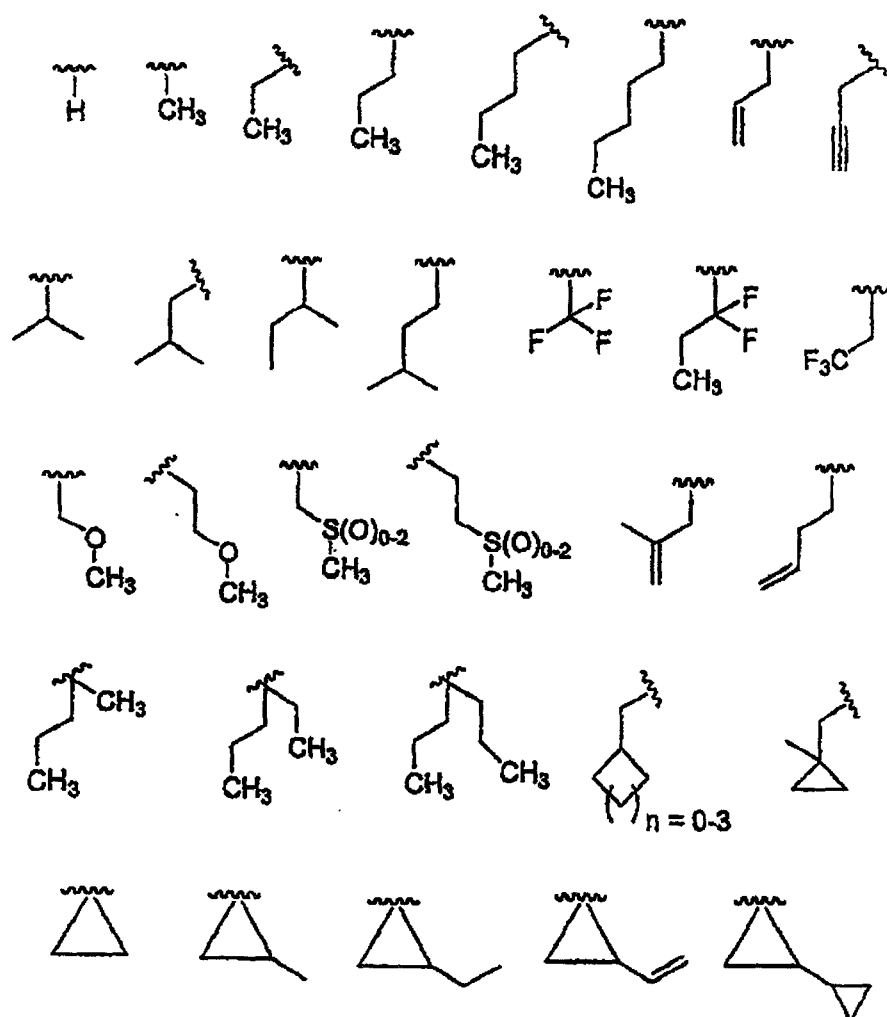
在一个实施方案中，本发明公开了作为 HCV 蛋白酶、特别是 HCV NS3/NS4a 丝氨酸蛋白酶抑制剂的式 I 化合物：



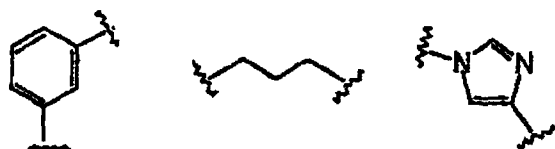
其中各部分如上所定义。一些优选的实施方案包括、但不限于上述通式 I 中各官能度的下述定义；对于相同和附加官能度的其它所需定义

可以在结构和本申请的权利要求中发现，其也在本发明的预期之中。

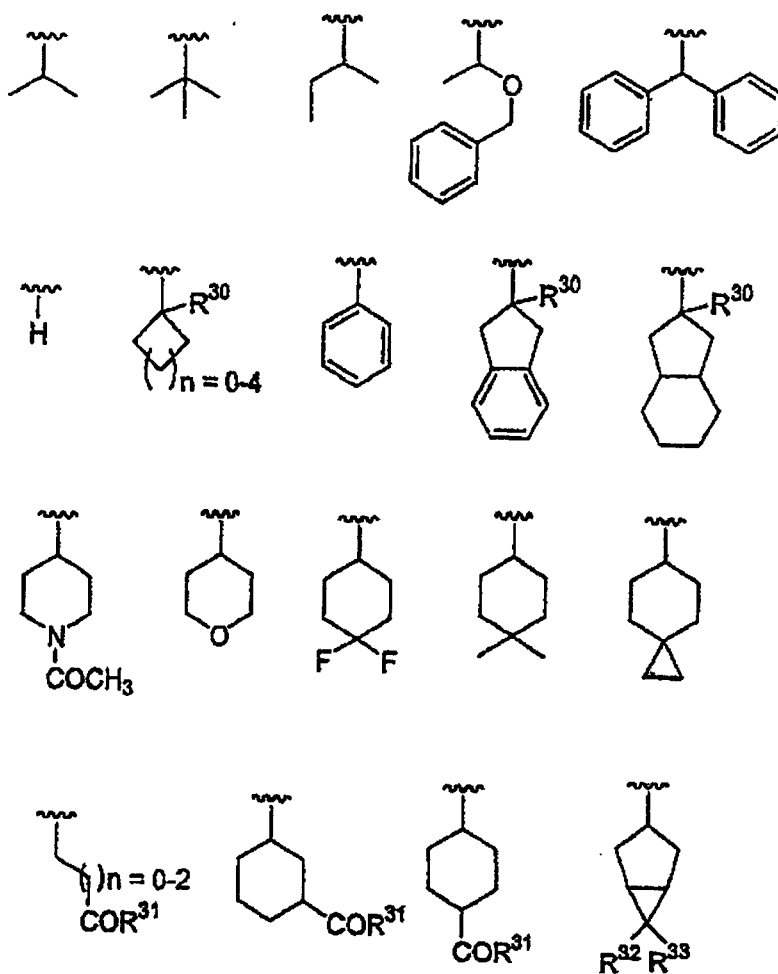
在优选的实施方案中，式I中的R<sup>2</sup>可以选自以下部分：



5 E可以是取代或未取代的烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂芳基或取代或未取代的环烷基，E的优选代表是：



$R^3$  的优选实施方案包括以下部分:

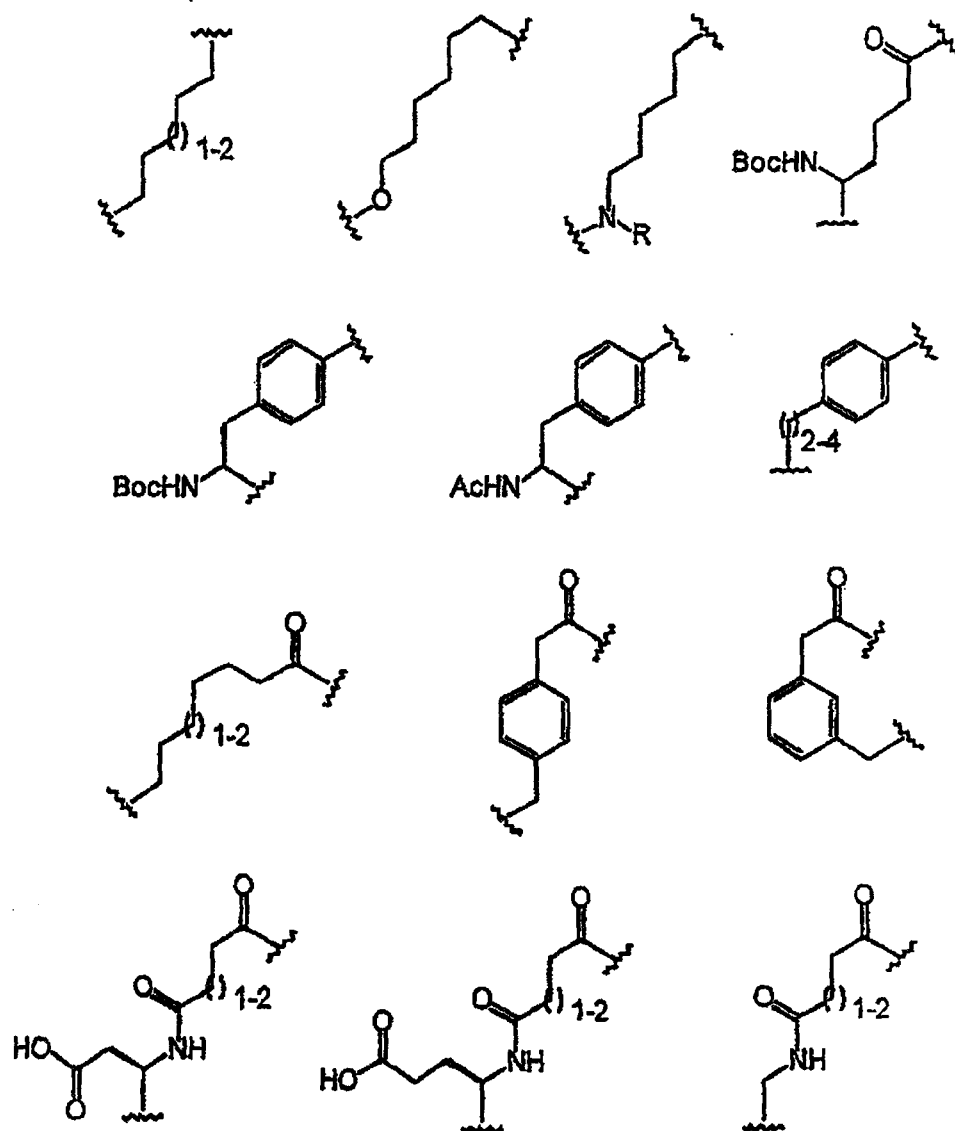


其中  $R^{30} = \text{H}$ 、 $\text{CH}_3$  或其它烷基;

$R^{31} = \text{OH}$ 、 $\text{O}$ -烷基、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{N}$ -烷基; 和

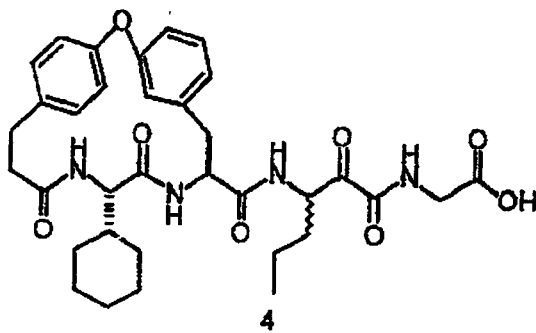
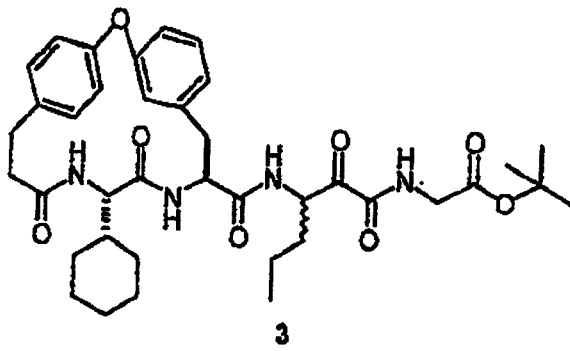
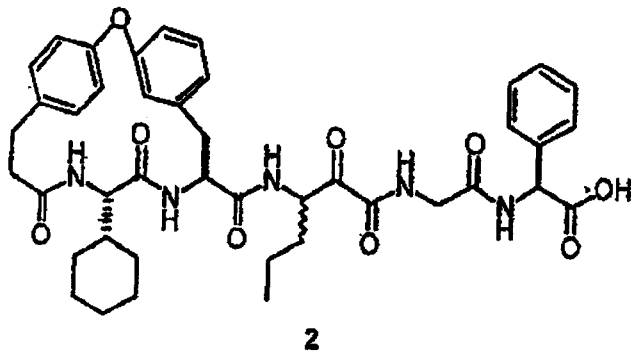
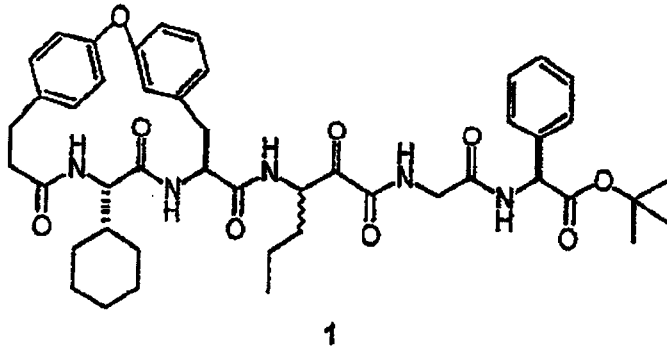
5  $R^{32}$  和  $R^{33}$  可以相同或不同, 并且独立选自  $\text{H}$ 、 $\text{F}$ 、 $\text{Cl}$ 、 $\text{Br}$  和  $\text{CH}_3$ .

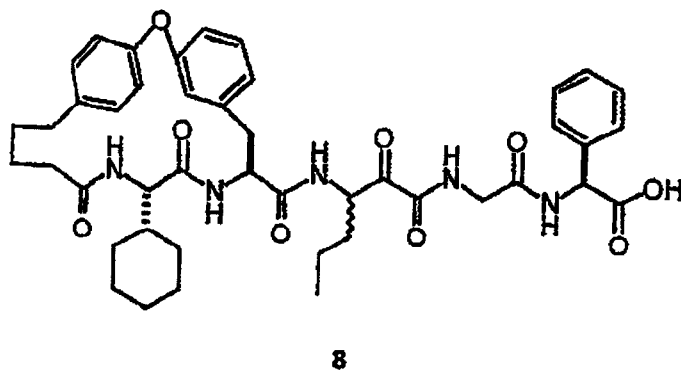
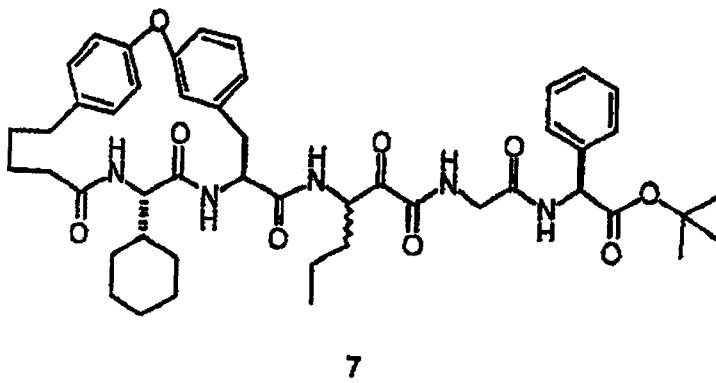
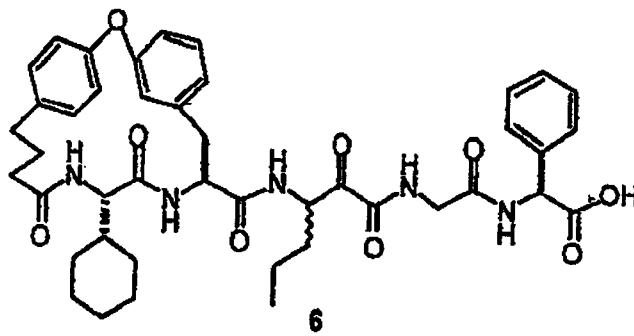
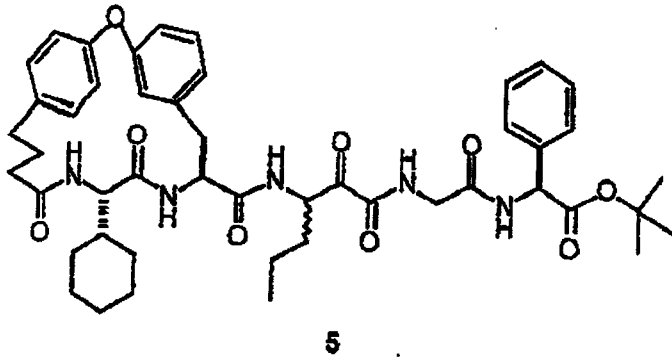
X-Y 部分的优选实施方案是以下结构:

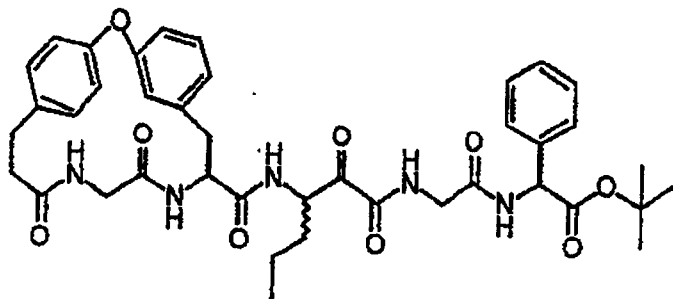


在本申请的权利要求部分注释了式 I 所示化合物的上述各种定义的几种附加和进一步的改进。它们也由在说明书和权利要求中列出的多种化合物代表。认为这些改进、定义和限定代表了本申请的全部发明。

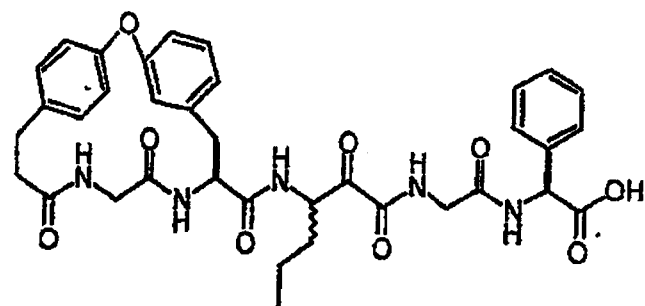
下面列出了显示出良好 HCV 蛋白酶抑制活性的本发明的代表化合物:



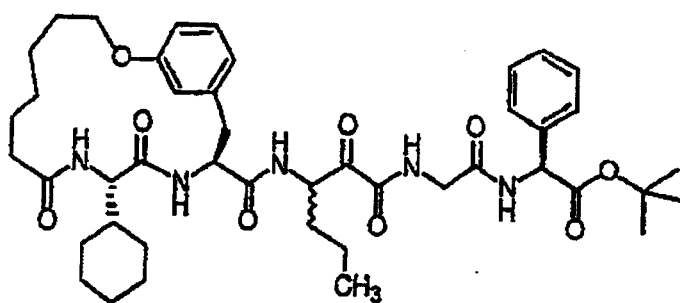




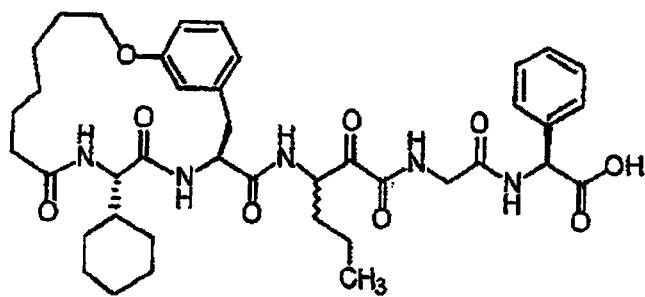
9



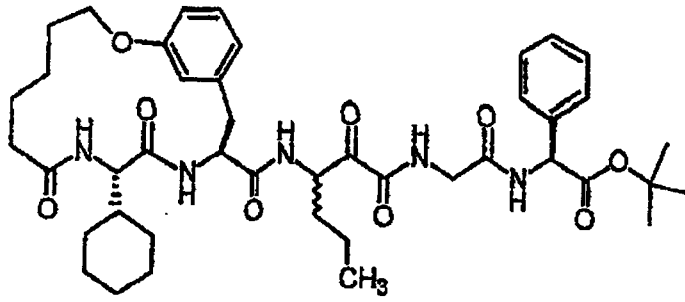
10



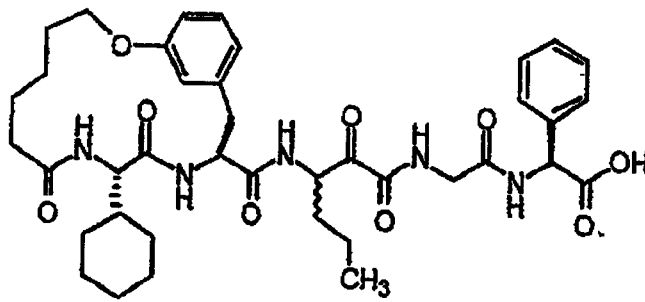
11



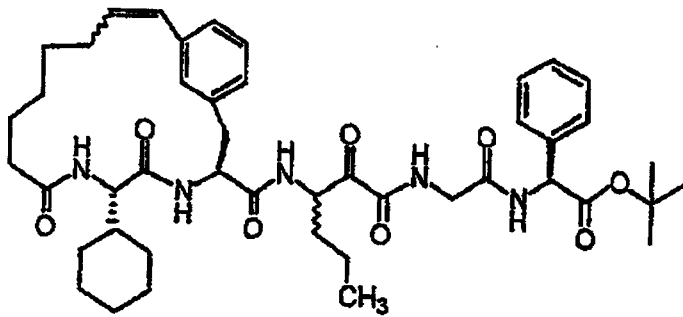
12



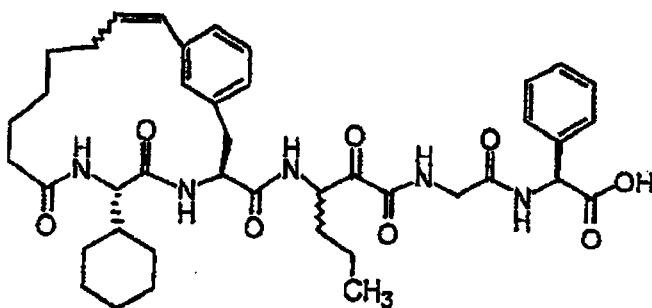
13



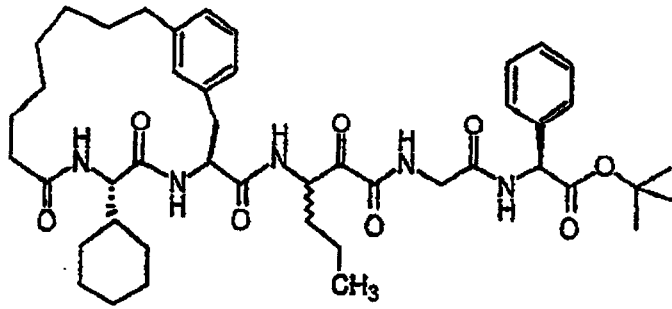
14



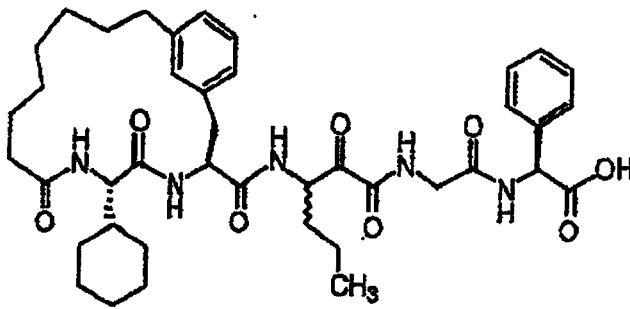
15



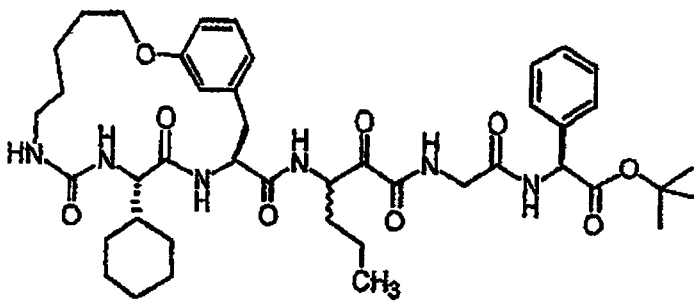
16



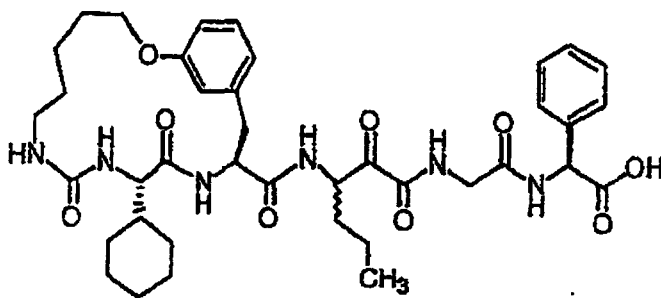
17



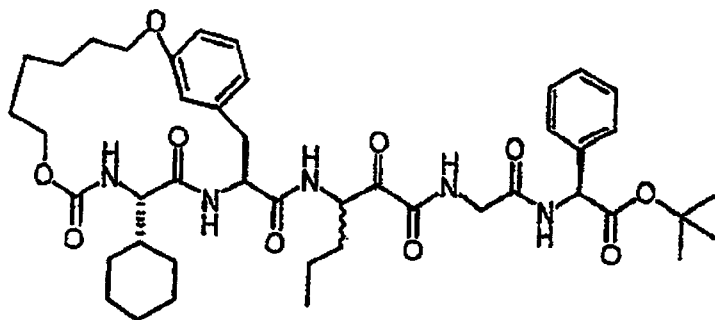
18



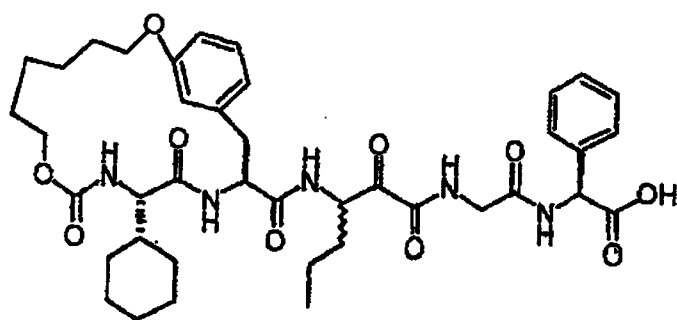
19



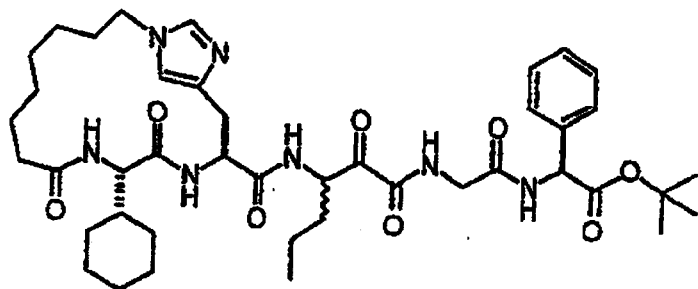
20



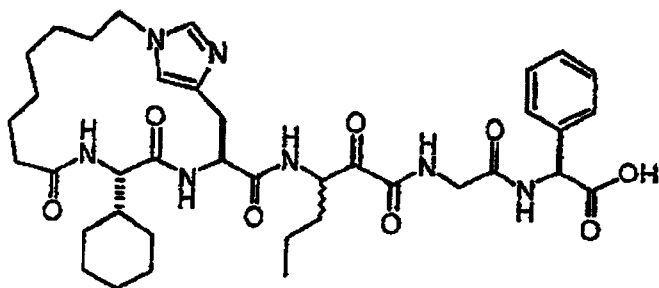
21



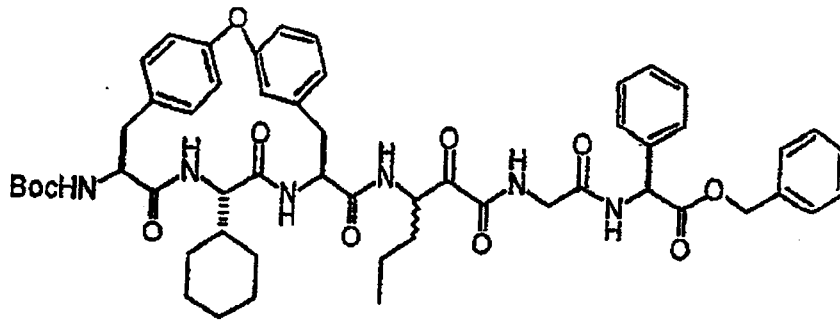
22



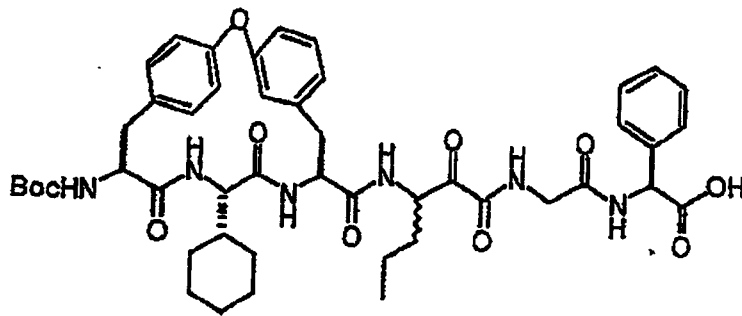
23



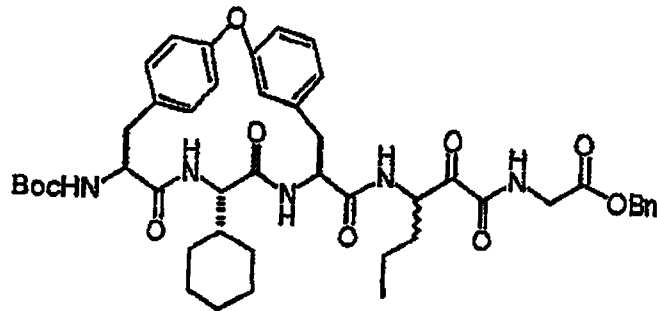
24



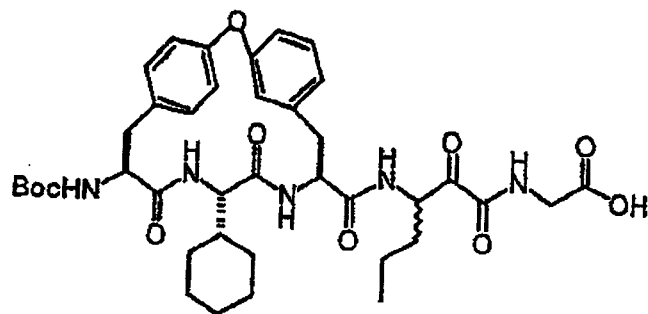
25



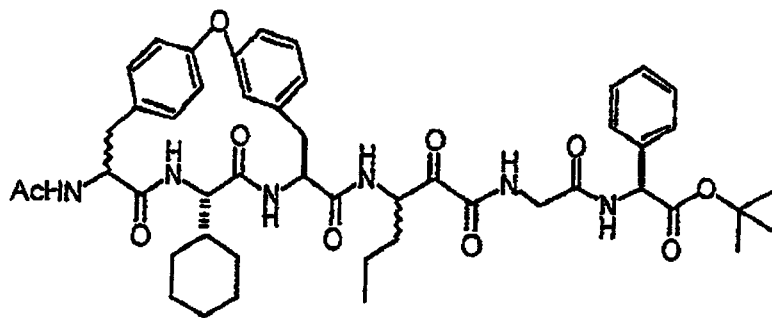
26



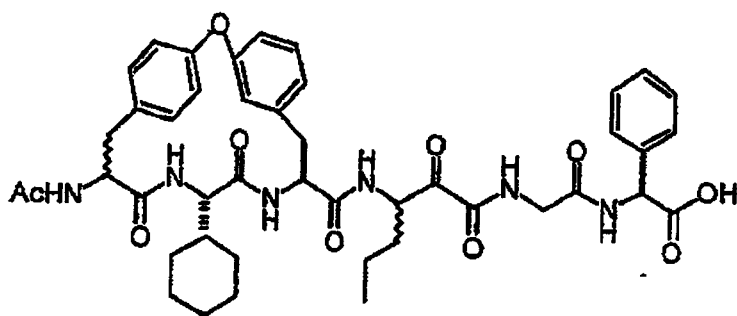
27



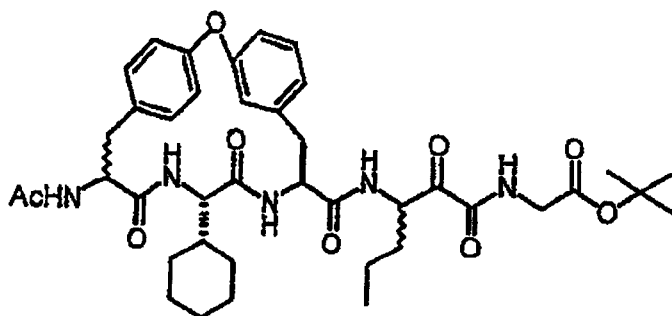
28



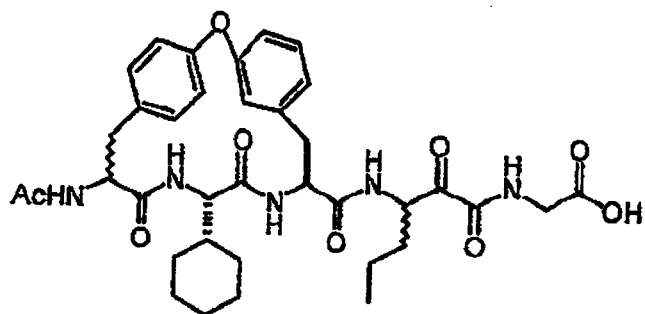
29



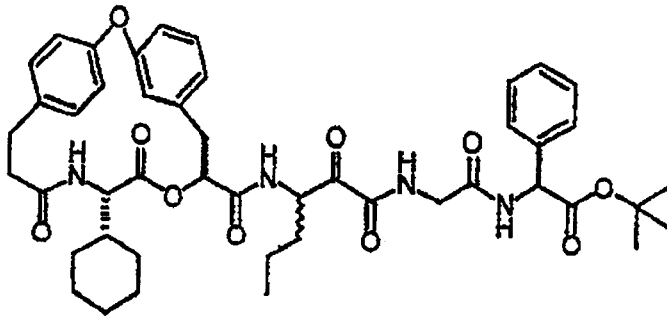
30



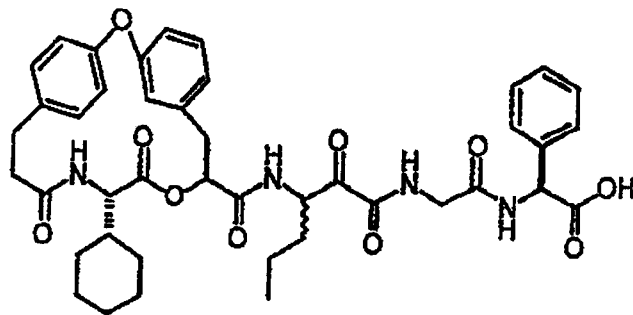
31



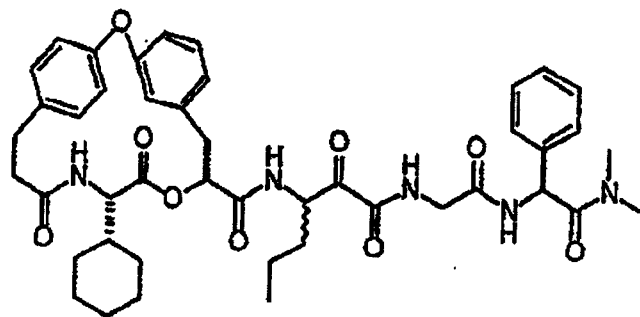
32



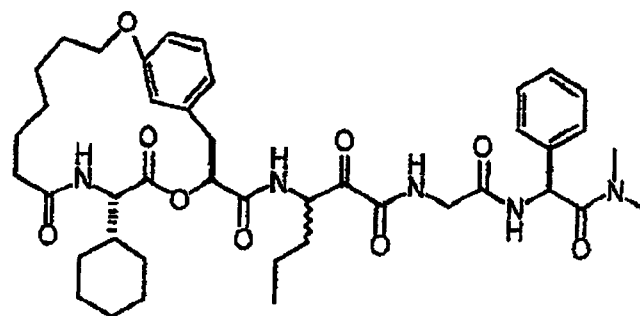
33



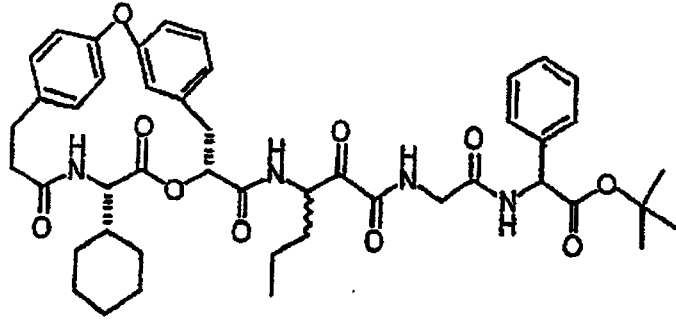
34



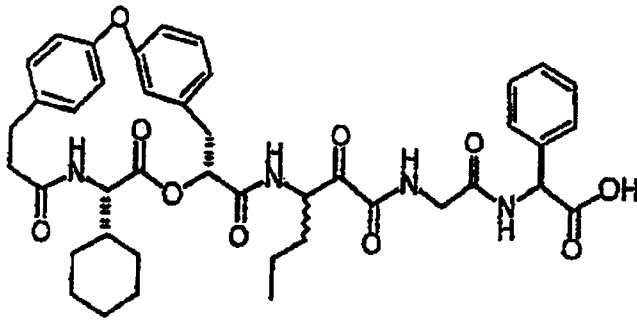
35



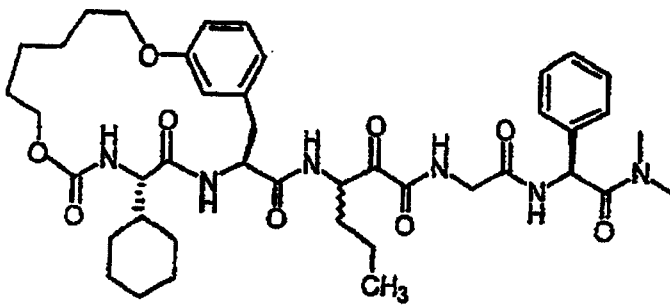
36



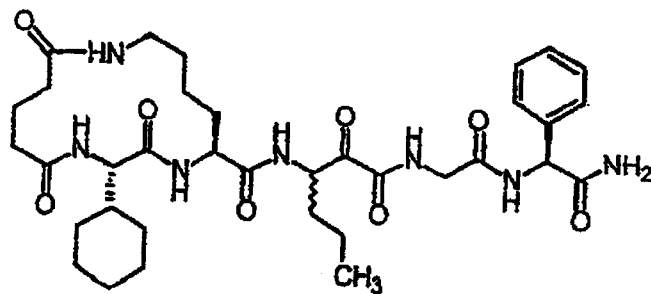
37



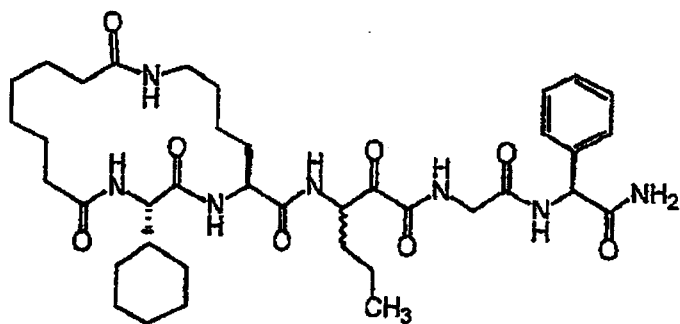
38



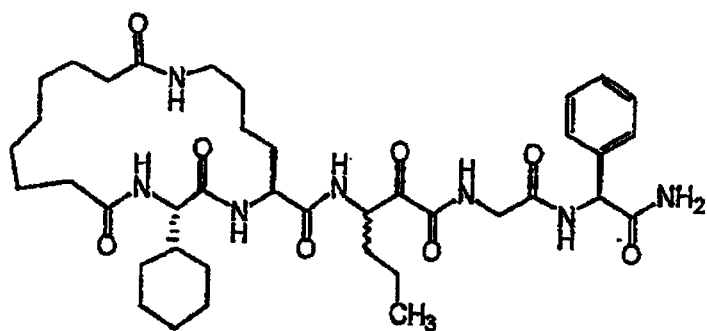
39



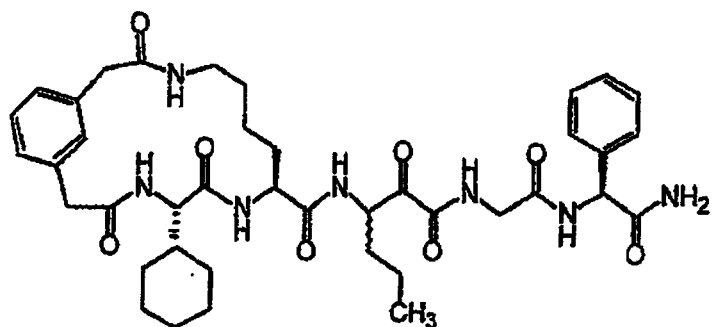
40



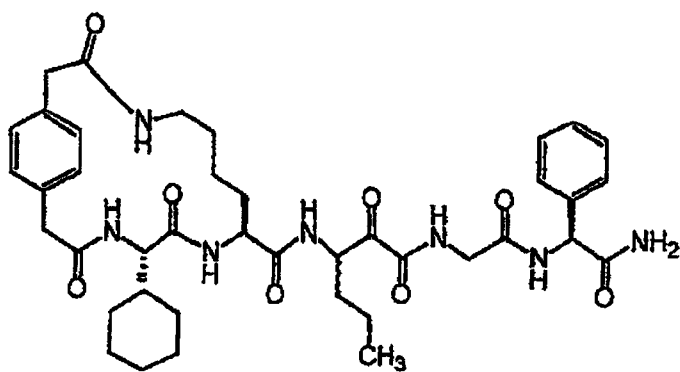
41



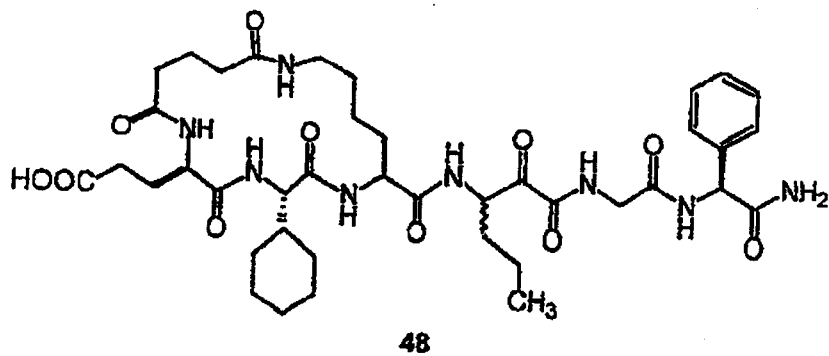
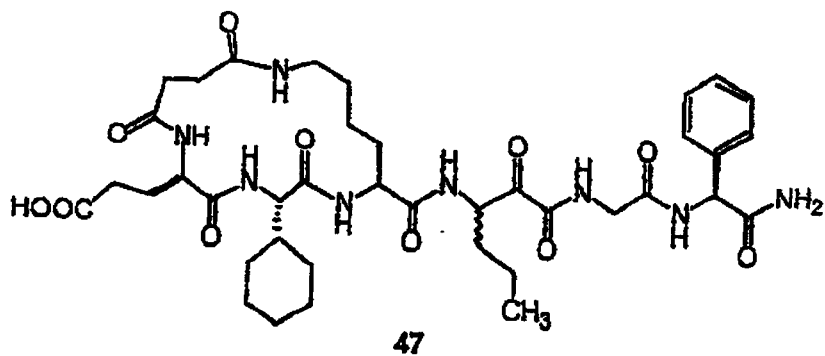
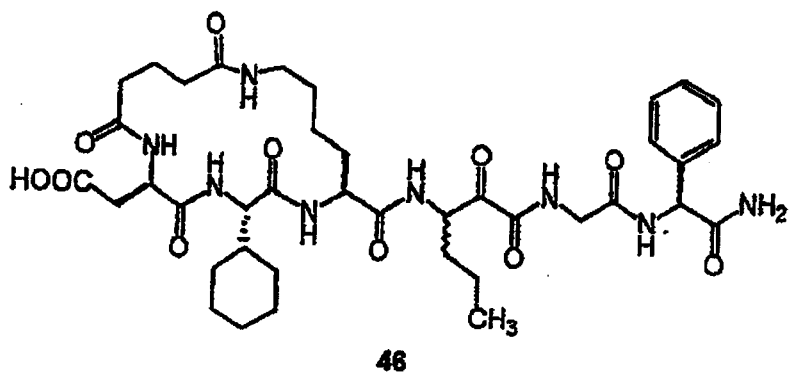
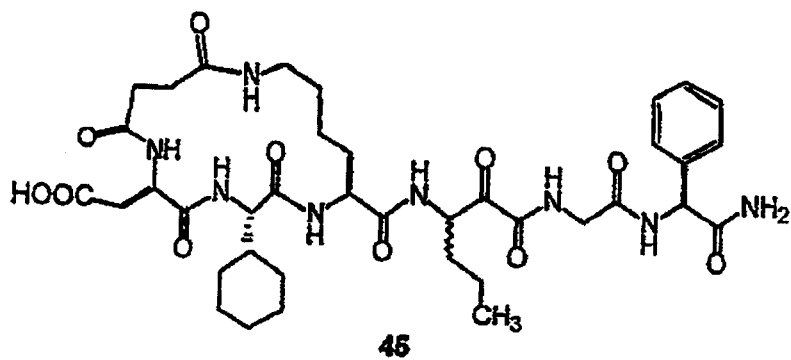
42

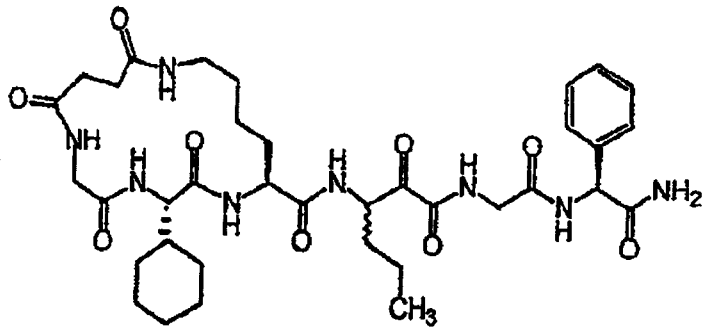


43

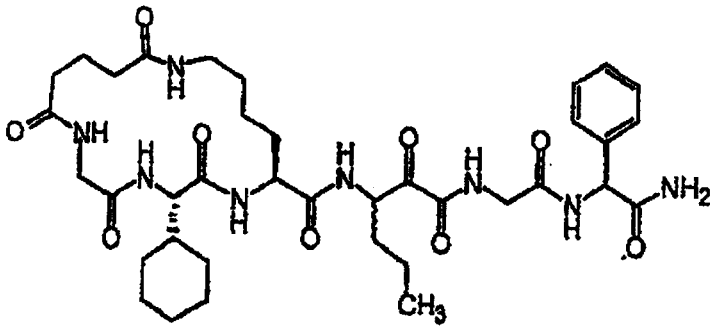


44

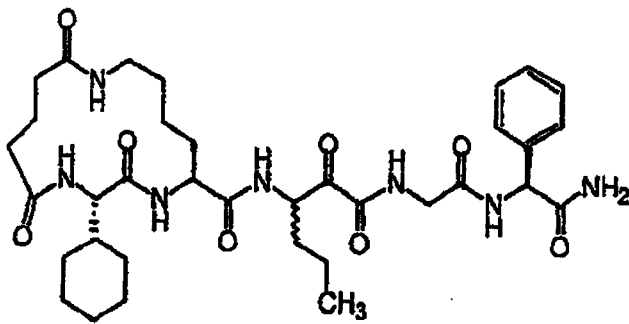




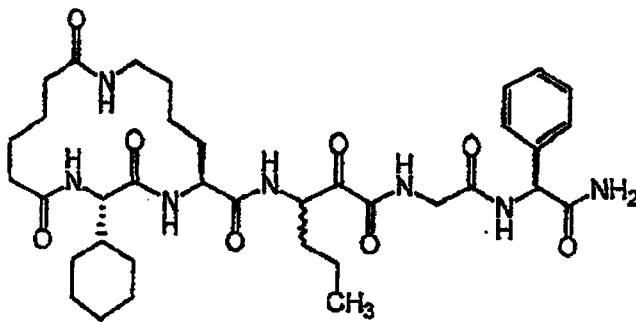
49



50



51



52

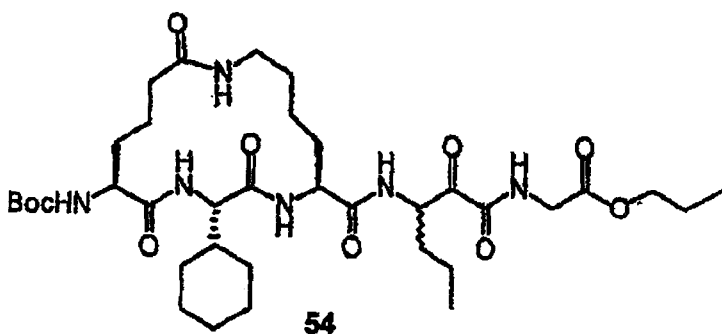
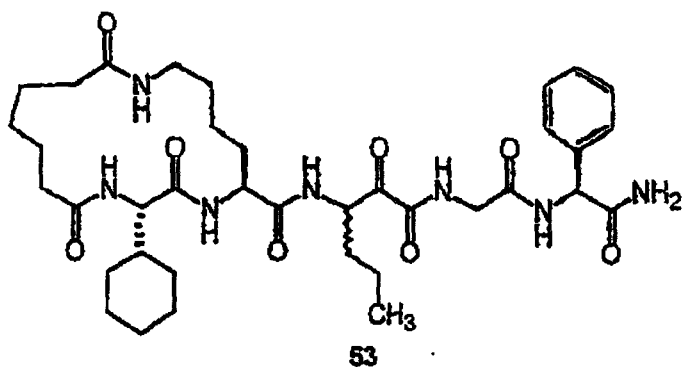


表1中列出了一些化合物的活性(以纳摩尔(nM)表示 $K_i$ 值的范围)。表1中的实施例号指在本申请后面部分的实施例部分中的各结构式的编号。

5

表1: HCV蛋白酶连续测试结果

实施例号	$K_i$ * nM
1	B
2	A
3	B
4	B
5	B
6	A
7	B
8	A
9	B

---

10	B
11	B
12	A
13	B
14	B
15	B
16	A
17	B
18	A
19	B
20	A
21	B
22	A
23	B
24	B
25	B
26	B
27	B
28	B
29	B
30	A
31	B
32	B
33	B
34	B
35	B
36	B
37	B
38	B
39	A

40	B
41	A
42	B
43	A
44	A
45	B
46	B
47	B
48	B
49	B
50	B
51	B
52	A
53	A
54	B

HCV 连续测试  $K_i^*$  范围:

类别 A = 0.001-1.0  $\mu\text{M}$ , 类别 B = 1.1-100  $\mu\text{M}$

5 在本部分的较后部分叙述了一些合成本发明的各类化合物的方法, 并且也用示意图描述, 之后描述说明性的例子。

10 根据结构, 本发明的化合物可以与有机或无机酸、或有机或无机碱形成药学上可接受的盐。用于形成这些盐的合适的酸的实例有盐酸、硫酸、磷酸、乙酸、柠檬酸、草酸、丙二酸、水杨酸、苹果酸、富马酸、琥珀酸、抗坏血酸、马来酸、甲磺酸和其它本领域技术人员已知的无机酸和羧酸。对于与碱的盐的形成来说, 合适的碱有例如 NaOH、KOH、 $\text{NH}_4\text{OH}$ 、氢氧化四烷基铵等。

在另一个实施方案中, 本发明提供含上述发明的大环化合物作为活性成分的药用组合物。通常所述药用组合物还含有药学上可接受的载体稀释剂、赋形剂或载体(本文中将它们共同称为载体材料)。由于

它们的 HCV 抑制活性，这些药用组合物在治疗丙型肝炎和相关疾病时有效。

在还一个实施方案中，本发明公开了制备含本发明大环化合物作为活性成分的药用组合物的方法。在本发明的药用组合物和方法中，  
5 活性成分一般与适合的根据计划的给药形式而选择的载体材料混合给予，包括：例如口服片剂、胶囊剂(固体填充、半固体填充或液体填充)、用于构成的散剂、口服凝胶剂、酞剂、可分散颗粒剂、糖浆剂、混悬剂等，并符合常规制药实践。例如，对于片剂或胶囊形式的口服制剂来说，所述活性药物成分可以与任何口服无毒性药学上可接受的  
10 惰性载体如乳糖、淀粉、蔗糖、纤维素、硬脂酸镁、磷酸二钙、硫酸钙、滑石、甘露醇、乙醇(液体形式)等结合。而且，当要求或需要时，在所述混合物中也可以掺入合适的粘合剂、润滑剂、崩解剂和着色剂。散剂和片剂可以包含大约 5-95%的本发明组合物。合适的粘合剂包括淀粉、明胶、天然糖类、玉米增甜剂、天然和合成树胶如阿拉伯  
15 胶、藻酸钠、羧甲基纤维素、聚乙二醇和蜡。在润滑剂中可被提及用于这些剂型的有硼酸、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。崩解剂包括淀粉、甲基纤维素、瓜耳胶等。

当合适时也可以包括甜味剂、矫味剂和防腐剂。以下将更详细地叙述在以上所提及的一些术语，即崩解剂、稀释剂、润滑剂、粘合剂  
20 等。

另外，可以以持续释放形式制备本发明的组合物，以便提供任何一种或多种组分或活性成分的速率控制释放，从而得到最佳治疗效果，即 HCV 抑制活性等。用于持续释放的合适的剂型包括多层片或胶囊，所述多层片含有不同崩解速率的层或控释聚合物基质(浸渍有  
25 活性组分并以片剂形式成型)，所述胶囊含有这种浸透或包囊的多孔聚合物基质。

液体形式制剂包括溶液、悬浮液和乳剂。可被提及的例子有用于肠胃外注射的水或水-丙二醇溶液或向口服溶液、悬浮液和乳剂中添加

增甜剂和遮光剂(pacifiers)。液体形式的制剂也可以包括用于鼻内给药的溶液。

适合用于吸入的气雾剂制剂可以包括溶液和粉末形式的固体，它们可以与药学上可接受的载体如惰性压缩气体如氮气混合。

5 为了制备栓剂，首先熔融低熔点的蜡例如脂肪酸甘油酯如可可脂的混合物，通过搅拌或类似的混合使活性成分均匀地分散到其中。然后将熔融均一的混合物倒入大小合适的模具中，冷却并从而固化。

也可包括临用前转变为用于口服或肠胃外给药的液体形式制剂的固体形式的制剂。这样的液体形式包括溶液、悬浮液和乳液。

10 本发明的化合物也可以经皮传递。经皮化合物可以制备成乳膏、洗剂、气溶胶和/或乳剂并可以包括在经皮贴剂的基质中或者包含在如对该目的领域是便利的贮库型中。

优选所述化合物通过口服给药。

15 药物制剂优选以单位剂量形式存在。在这样的形式中，制剂可分为包含适量活性成分的合适大小的单位剂量，例如达到所需目的的有效量。

20 按照具体的应用，本发明活性组合物在制剂的单位剂量中的量通常可以在约1.0毫克-1,000毫克，优选约1.0-950毫克，更优选约1.0-500毫克之间变化或者调整，一般为约1-250毫克。所使用的实际剂量可依患者的年龄、性别、体重和待治疗疾病的严重性而变化。这样的技术是本领域技术人员熟知的。

25 通常，包含活性成分的人口服剂型可每天给药1或2次。给药量和次数应根据主治医师的判断调节。口服给药的一般推荐每天剂量方案可以以单次或分开的剂量，在每天约1.0毫克-1,000毫克的范围内变化。

以下描述一些有用的术语：

胶囊剂—指由甲基纤维素、聚乙烯醇或变性明胶或淀粉制成以贮藏或容纳包含活性成分的组合物特殊容器或者包封物。硬壳胶囊

一般由相对高的明胶强度骨架和猪皮肤明胶的掺合物制成。胶囊本身可包含小量的染料、不透明剂、增塑剂和防腐剂。

片剂—指包含与合适的稀释剂一起的活性成分的压制或模压固体剂型。通过压制混合物或经湿法制粒、干法制粒或者紧压法得到的颗粒，可制备片剂。

口服凝胶剂—指分散或溶于亲水性半固体基质中的活性成分。

用于构成的粉末指包含活性成分和能够悬浮在水或剂型中的适宜稀释剂的粉末掺合物。

稀释剂—指通常构成组合物或者剂型的主要部分的物质。合适的稀释剂包括糖类，如乳糖、蔗糖、甘露糖醇和山梨醇；衍生于小麦、玉米、大米和马铃薯的淀粉；以及纤维素例如微晶纤维素。组合物中稀释剂的量可在总组合物的约 10-90%重量，优选约 25-75%重量，更优选约 30-60%重量，甚至更优选在约 12-60%重量的范围内。

崩解剂—指加入到组合物中以帮助其分裂(崩解)并释放出药物的物质。合适的崩解剂包括淀粉；“冷水可溶的”变性淀粉例如羧甲基淀粉钠；天然和合成胶类如槐树豆胶(locust bean)、梧桐胶、瓜尔胶、西黄蓍胶和琼脂；纤维素衍生物如甲基纤维素和羧甲基纤维素钠；微晶纤维素和交联微晶纤维素如交联羧甲基纤维素钠；藻酸盐如藻酸和藻酸钠；粘土如膨润土；以及泡腾混合物。组合物中崩解剂的量可在组合物的约 2-15%重量，更优选约 4-10%重量的范围内。

粘合剂—指使粉末粘合或者“胶着”在一起并通过使它们形成颗粒粘聚，因此在制剂中用作“粘合剂”的物质。粘合剂可增加已在稀释剂或者增量剂中可以得到的粘聚的强度。合适的粘合剂包括糖类如蔗糖；衍生于小麦、玉米、大米和马铃薯的淀粉；天然胶类如阿拉伯胶、明胶和西黄蓍胶；海藻衍生物如藻酸、藻酸钠和藻酸钙铵；纤维素材料如甲基纤维素和羧甲基纤维素钠和羟丙基甲基纤维素；聚乙烯吡咯烷酮；以及无机物例如硅酸铝镁。组合物中粘合剂的量可在组合物的约 2-20%重量，更优选约 3-10%重量，甚至更优选约 3-6%重量的

范围内。

5 润滑剂—指加入到剂型中以便在其被压制后通过减少摩擦或磨损确保片剂、颗粒剂等自模具或者冲模中脱出的物质。合适的润滑剂包括金属硬脂酸盐如硬脂酸镁、硬脂酸钙或硬脂酸钾；硬脂酸；高熔点蜡；以及水溶性润滑剂如氯化钠、苯甲酸钠、乙酸钠、油酸钠、聚乙二醇和 d,l-亮氨酸。压制前通常在很后的步骤中加入润滑剂，因为它们必须存在于颗粒的表面并介于它们与压片机的各部分之间。组合物中润滑剂的量可在组合物的约 0.2-5%重量，优选约 0.5-2%，更优选在约 0.3-1.5%重量的范围内。

10 助流剂—防止结块并改善颗粒的流动性质以使流动平滑和均匀的物质。合适的助流剂包括二氧化硅和滑石粉。组合物中助流剂的量可在总组合物的约 0.1%-5%重量，优选约 0.5-2%重量的范围内。

15 着色剂—向组合物或者剂型提供着色的赋形剂。这样的赋形剂可包括食品级染料和吸附到合适的吸附剂例如粘土或氧化铝上的食品级染料。着色剂的量可在组合物的约 0.1-5%重量，优选约 0.1-1%重量之间变化。

生物利用度—指与标准物或者对照物比较，活性药物成分或者治疗部分自给药剂型吸收进入到全身循环中的速率和程度。

20 制备片剂的常规方法是已知的。这样的方法包括干法例如直接压制和经过紧压法产生的颗粒的压制，或者湿法或其它的特殊方法。制备其它给药形式例如胶囊剂、栓剂等的常规方法也是人们熟知的。

本发明的另一个实施方案公开以上公开的药用组合物用于治疗疾病例如丙型肝炎等的用途。方法包括给予患有这样一种或多种疾病和需要这样治疗的患者治疗有效量的本发明药用组合物。

25 如早先说明的那样，本发明也包括所述化合物的互变异构体、对映体和其它的立体异构体。因此，如本领域技术人员已知的那样，一些本发明化合物可以异构体形式存在。这样的变体包括在本发明的范围内。

5 本发明另一个实施方案公开制备在此公开的大环化合物的方法。通过本领域已知的几种技术可制备所述化合物。在以下反应方案中概述代表性的示例方法。应当理解虽然以下示例的方案叙述主要衍生自在 P2 位上的间-酪氨酸或赖氨酸的大环化合物的制备，但任何天然和非天然氨基酸的合适的取代将导致形成所需的基于这些取代的大环化合物。

以下是在叙述方案、制备和实施例中所使用的缩写：

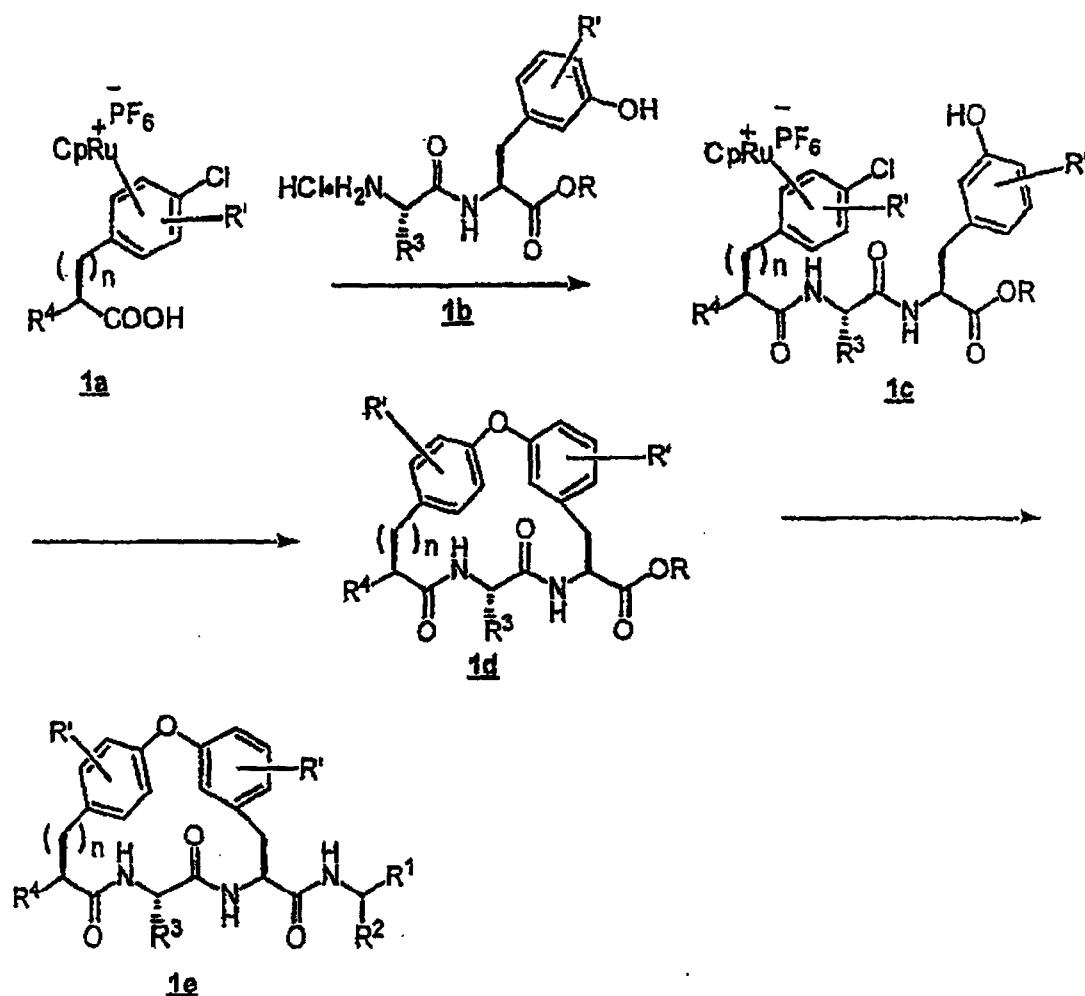
THF	四氢呋喃
DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺
EtOAc	乙酸乙酯
AcOH	乙酸
HOObt	3-羟基-1,2,3-苯并三嗪-4(3 <i>H</i> )-酮
EDCI	1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐
NMM	<i>N</i> -甲基吗啉
ADDP	1,1'-(偶氮二羰基)二哌啶
DEAD	偶氮二羧酸二乙基酯
MeOH	甲醇
EtOH	乙醇
Et <sub>2</sub> O	乙醚
Bn	苄基
Boc	叔丁氧羰基
Cbz	苄氧羰基
Cp	环戊基二烯基
Ts	对甲苯磺酰基
Me	甲基
HATU	六氟磷酸 O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)- <i>N,N,N',N'</i> -四甲基脲鎓(uronium)
Chg	环己基甘氨酸

Tyr	酪氨酸
G	甘油
TG	硫甘油
alloc	烯丙氧羰基
Fmoc	9-芴基甲氧羰基
Dde	N-1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代亚环己-1-基)乙基
tBu	叔丁基
equiv	当量
rel. int	相对强度
aq	含水的
rt	室温
satd	饱和的
Hex	己烷
NBA	硝基苯甲酸
PyBrOP	六氟磷酸三(吡咯烷基)溴代磷
DMSO	二甲亚砜
TFA	三氟乙酸
HOBt	羟基苯并三唑
Hünigs base	二异丙基乙胺
BOP	六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基三(二甲基氨基)磷
LDA	二异丙基氨基化锂
Ph <sub>3</sub> P	三苯膦
LAH	氢化铝锂
DMAP	4-二甲基氨基吡啶
DCC	二环己基碳二亚胺
MCPBA	间氯过苯甲酸
BINAP	2,2'-双(二苯基膦基)-1,1'-联萘酚
MeCN	乙腈

Pr	丙基
Ac	乙酰基
Ph	苯基

合成本发明化合物的一般方案: 在以下方案中 n 是数字 1-6.

方案 1:

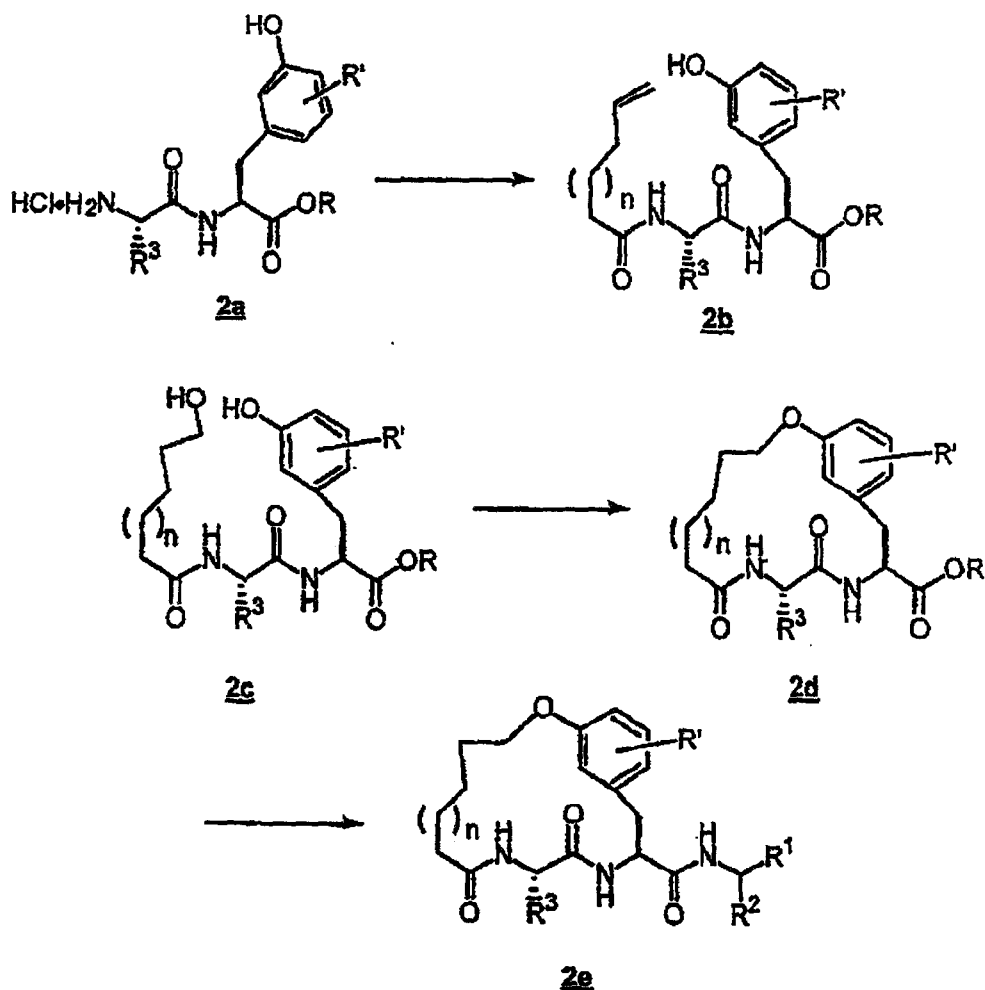


5

由使用 NMM、HOBt 和 EDCI 将 **1a** 与二肽 **1b** 偶合得到中间体 **1c** 开始合成 **1e** 型化合物, 其中  $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}'$  如上所定义,  $\text{R}^4$  是酰胺、氨基甲酸酯或氢, R 是烷基、芳基或芳基烷基。经  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  在 DMF 中处理该中间体 **1c**, 随后光解得到化合物 **1d**。将大环酯 **1d** 水解并与合适的胺中间体偶合生成 **1e** 型化合物。

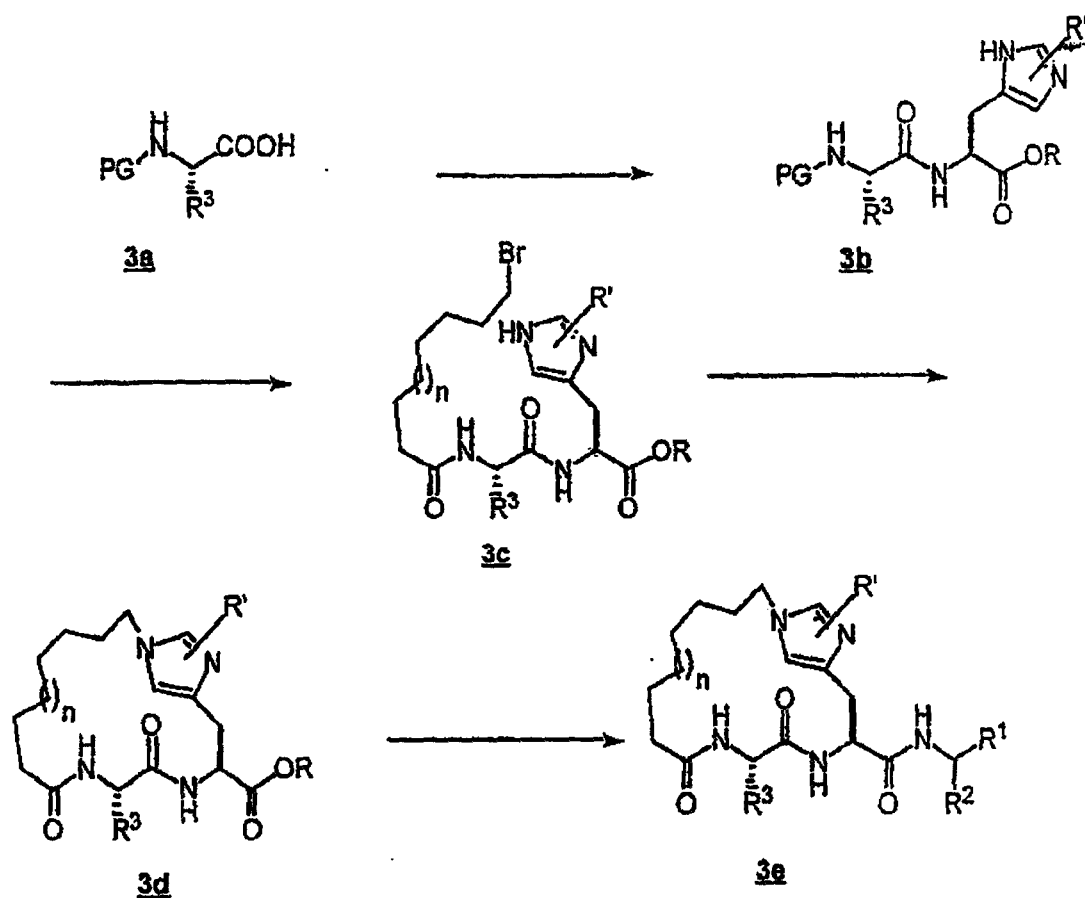
10

## 方案 2:

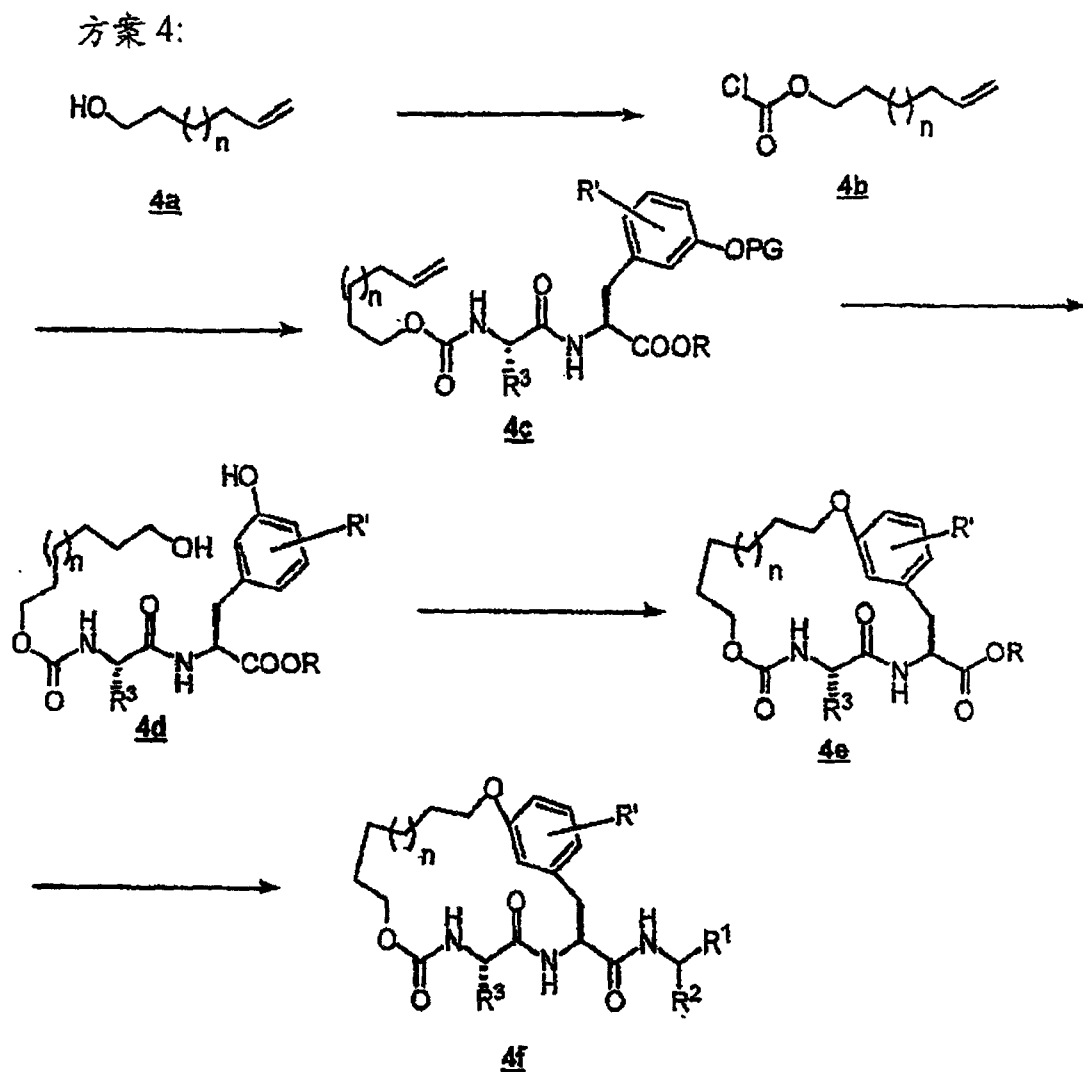


在方案 2 中概括式 **2e** 化合物的制备，其中  $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$  和  $n$  如上所定义， $\text{R}'$  是烷基、杂烷基( $\text{OR}''$ 、 $\text{SR}'''$ 、 $\text{NR}''\text{R}'''$ ，其中  $\text{R}''$  和  $\text{R}'''$  是烷基)、在氧原子的邻、间或对位的卤素取代基， $\text{R}$  是烷基、芳基或烷基芳基， $n$  是 0-5。在 HOObt、EDCI·HCl 和 NMM 存在下，将间-酪氨酸-二肽 **2a** 偶合成链烯基羧酸。将得到的产物硼氢化得到化合物 **2c**。在 Mitsunobu 条件下通过使用三苯膦和 ADDP 完成大环化(Mitsunobu 反应由 D.L.Hughes 在 Org. Reactions, 42 (1992) 335, John Wiley & Sons, New York, L. Paquette, ed. 中阐述)。用氢氧化锂将所述酯水解为酸后，将其偶合成胺中间体而得到 **2e**。

## 方案 3:

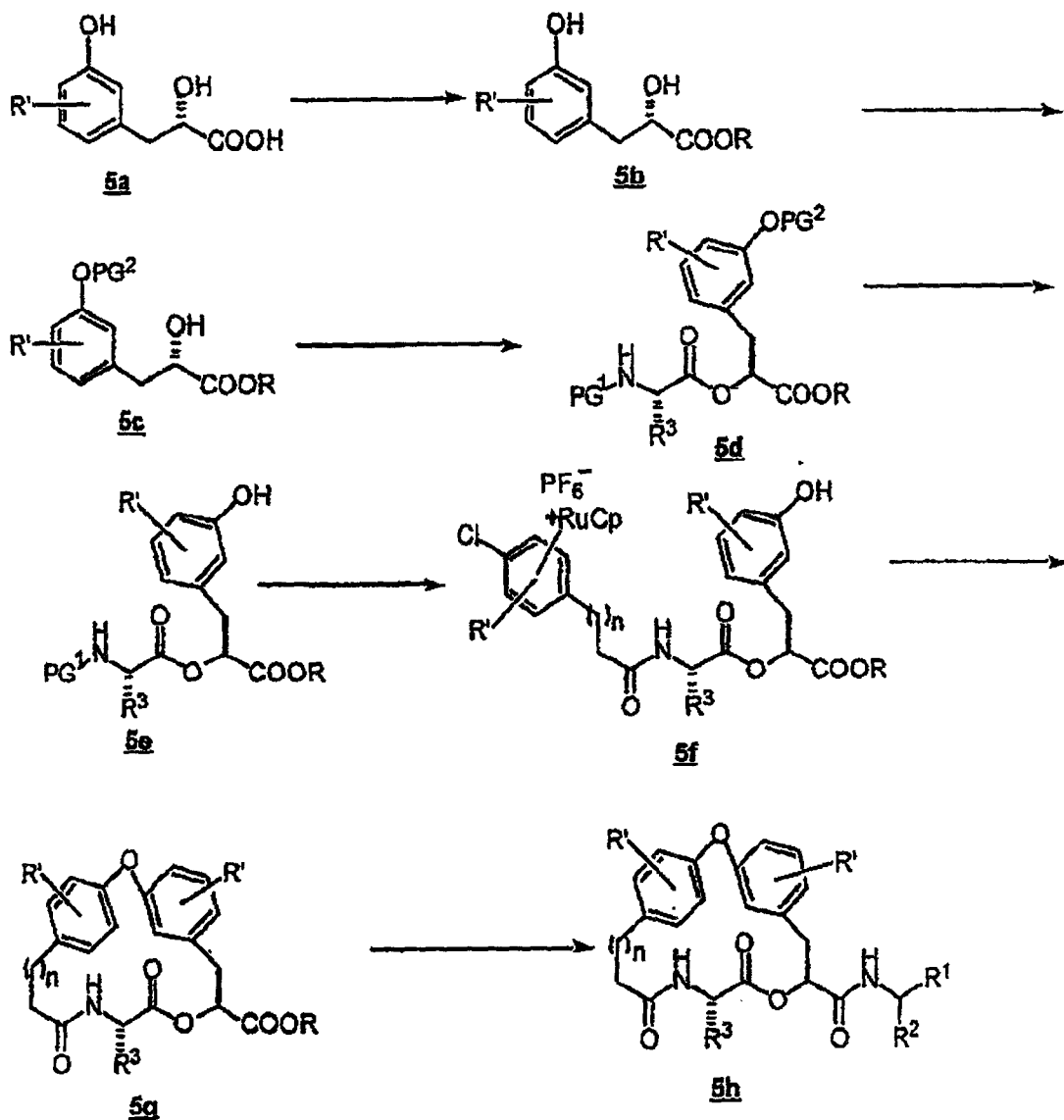


在方案 3 中概括式 **3e** 化合物的制备, 其中 R', R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R 和 n 如在方案 1 中所定义并且 PG 是 Cbz、Boc 或 alloc。用 DCC 将化合物 **3a** 与取代的组氨酸衍生物偶合。将化合物 **3b** 脱保护并再用 ω-溴代酸处理得到 **3c** 型化合物。在沸腾的甲基乙烯基酮中用 NaI 和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 完成 **3c** 的环化得到 **3d**。通过酯的水解以及随后与合适的胺中间体偶合将化合物 **3d** 转变为 **3e** 型化合物。



- 5 从 **4a** 型化合物开始制备 **4f** 型化合物，其中  $R^3$ 、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R$ 、 $n$  和 PG 如在方案 1 中所定义。通过用光气处理将 **4a** 的醇转变为 **4b**。通过与 alloc 保护的 **1b** 和  $\text{Et}_3\text{N}$  偶合，将 **4b** 转变为 **4c**。用  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  将 **4c** 的 alloc 基团脱保护得到 **4d**，将其在 Mitsunobu 条件下进行环化得到 **4e**。水解 **4e** 的酯并再用  $\text{EDCI}$ 、 $\text{HOObt}$  与胺偶合得到 **4f** 型化合物。

## 方案 5:



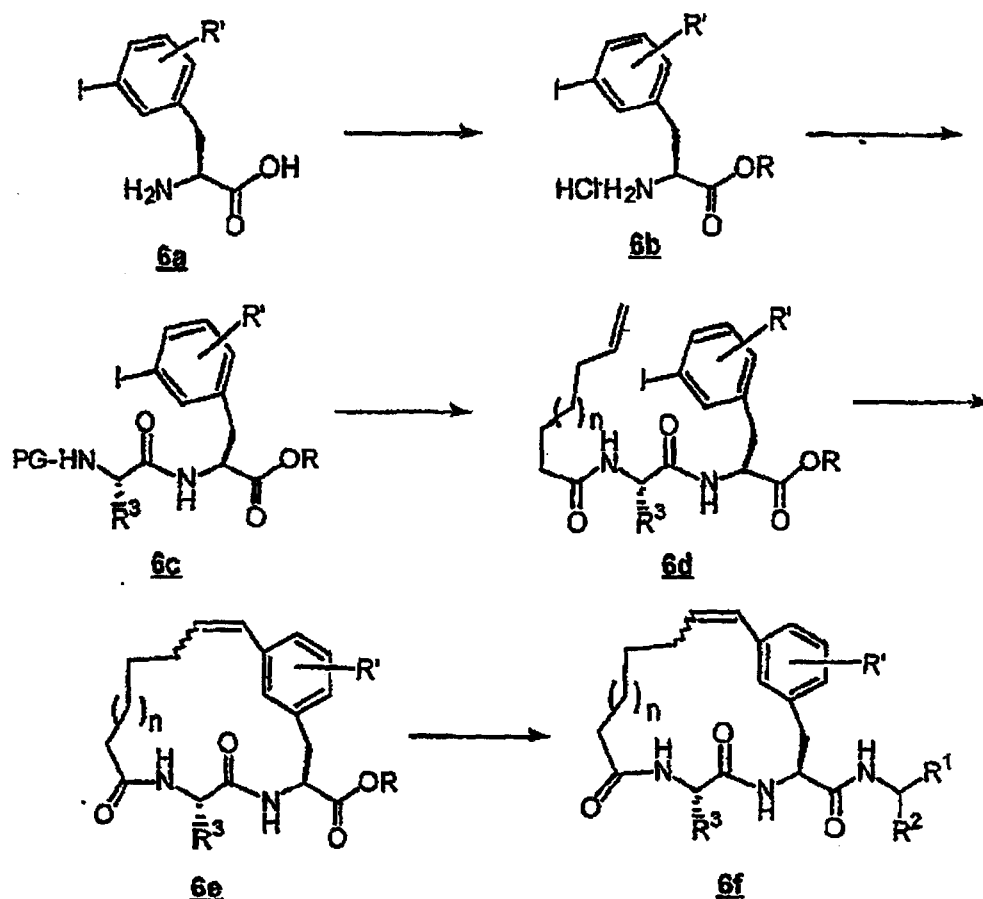
由已知的化合物 **5a** 开始制备 **5h** 型化合物, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R'$ 、 $PG$  和  $n$  如在方案 1-3 中所定义并且  $PG^1$  是 Cbz 或 Boc,  $PG^2$  是 alloc. 通过与 ROH 和 TsOH 一起回流, 将酸 **5a** 转变为酯。通过用 alloc-氯化物和三乙胺处理, 使 **5b** 的酚氧转变为 alloc 基团而得到 **5c**。通过使用 DCC 和 HOBT 与保护的环己基甘氨酸偶合, 将 **5c** 的仲醇转变为 **5d** 型化合物。使用  $Pd(Ph_3P)_4$  和双甲酮, 使 **5d** 化合物的 alloc 基团脱保护。将 **5e** 脱保护并用 EDCl、HOBT 和合适的活化钌络合物处理, 得到式 **5f** 的化合物。通过使用  $Cs_2CO_3$  并接着光解除去钌, 将 **5f** 型化合物转

5

10

变为式 **5g** 的环状化合物。水解 **5g** 的酯基并与胺中间体偶合得到 **5h** 型化合物。

方案 6:



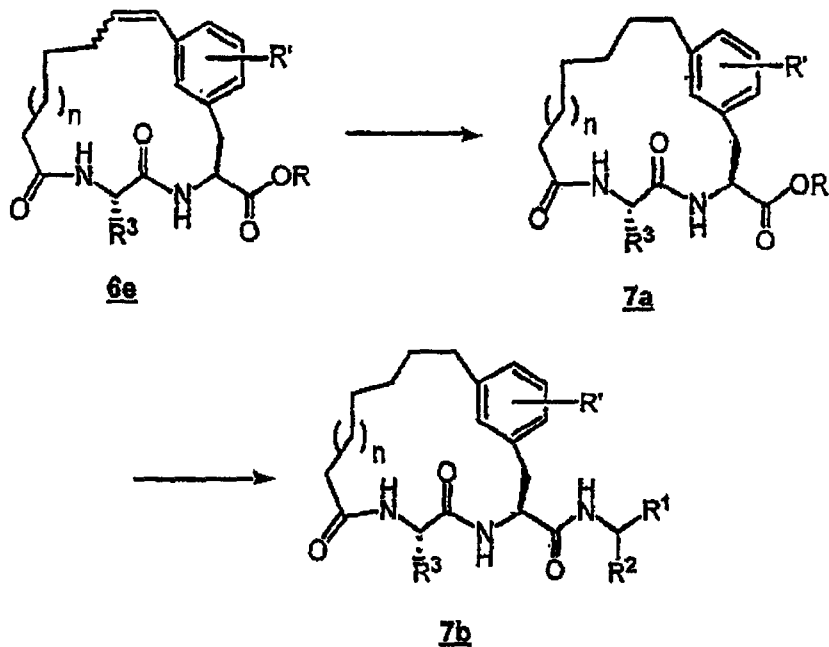
5

在方案 6 中概括式 **6f** 化合物的制备, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  如上所定义,  $R'$  是烷基、杂烷基( $OR''$ 、 $SR'''$ 、 $NR''R'''$ , 其中  $R''$  和  $R'''$  是烷基)、在邻、间或对位的卤素取代基,  $R$  是烷基、芳基或烷基芳基,  $PG$  是 Cbz 或 Boc,  $n$  是 0-5。在常规酯化条件( $ROH$ 、 $HCl$ )下, 将间碘代苯基甘氨酸 **6a** 转变为它的酯。然后在  $HOObt$ 、 $EDCl \cdot HCl$  和  $NMM$  存在下将所述产物偶合成 N-保护的氨基酸。脱保护后, 再将得到的胺偶合成末端链烯基羧酸而得到产物 **6d**。使用钯催化剂的分子内 Heck 反应提供了所需的大环化合物 **6e** ( $R.F. Heck, Org. React., 27 (1989) 345-390$  详细说明了 Heck 反应)。用氢氧化锂将所述酯水解为酸后, 将其偶合

10

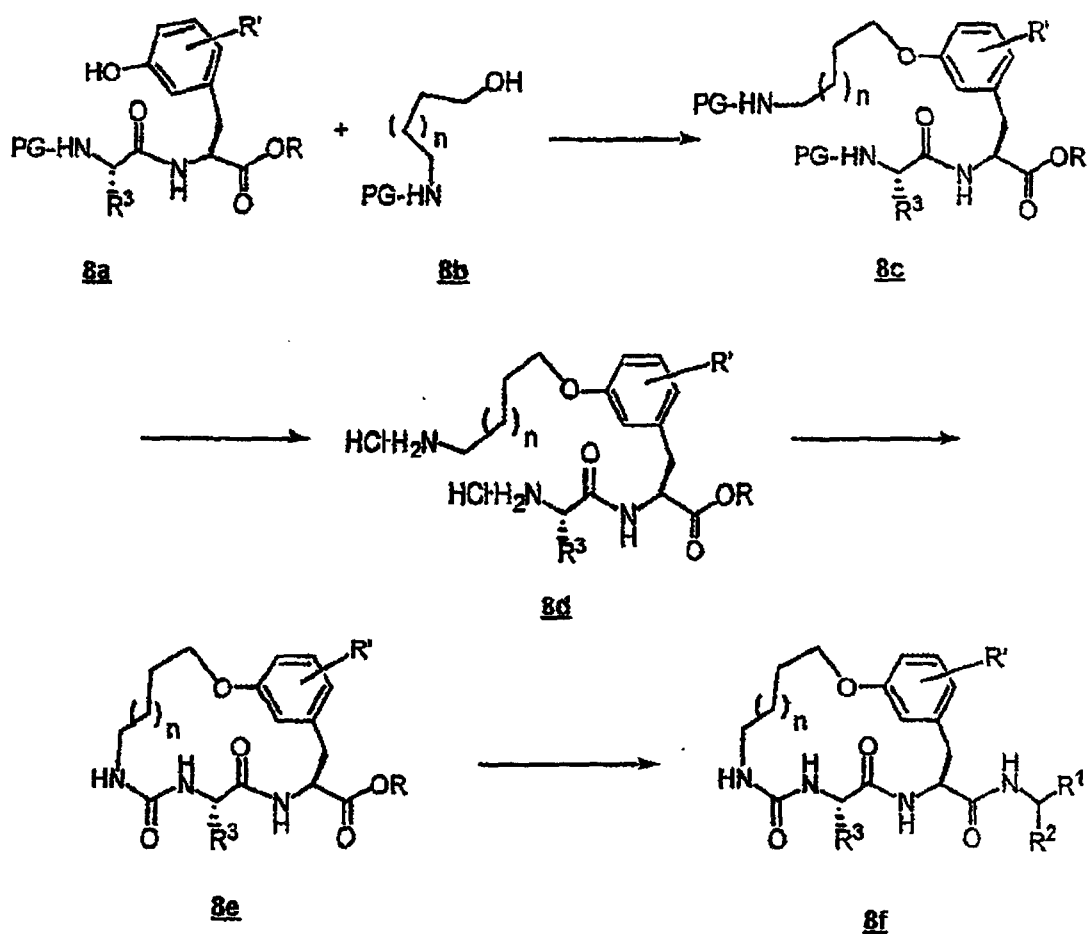
成胺中间体而得到 **6f**。

方案 7:



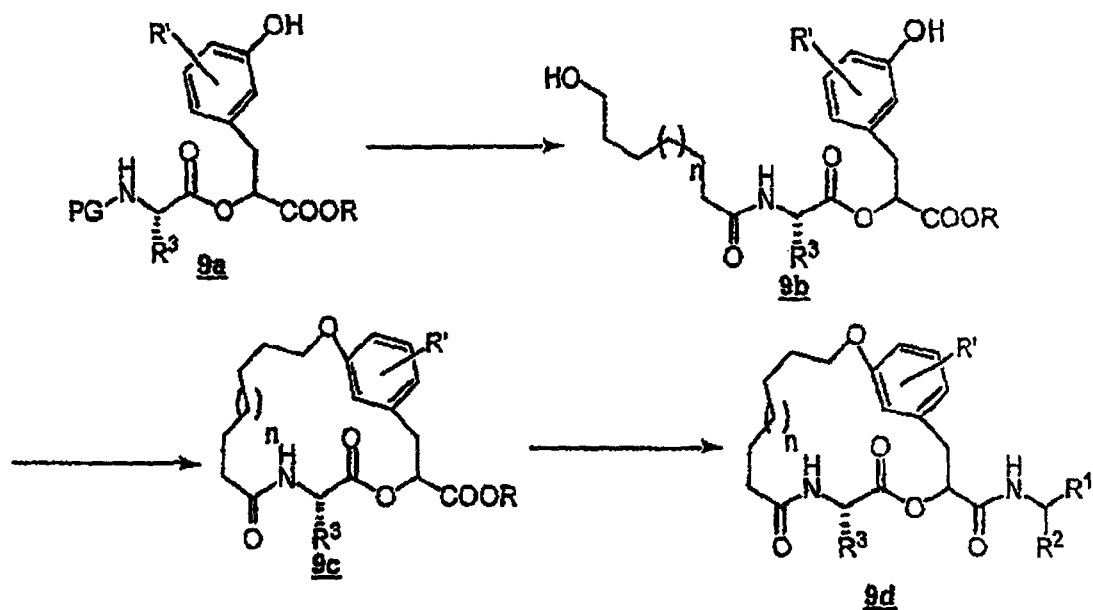
- 5 在方案 7 中概括式 **7b** 化合物的制备, 其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  如上所定义,  $R'$  是烷基、杂烷基( $OR''$ 、 $SR'''$ 、 $NR''R'''$ , 其中  $R''$  和  $R'''$  是烷基)、在邻、间或对位的卤素取代基,  $R$  是烷基、芳基或烷基芳基,  $n$  是 0-5。氢化 **6e** 的双键得到大环 **7a**。将该酯水解为酸并接着与胺中间体偶合得到 **7b**。

方案 8:



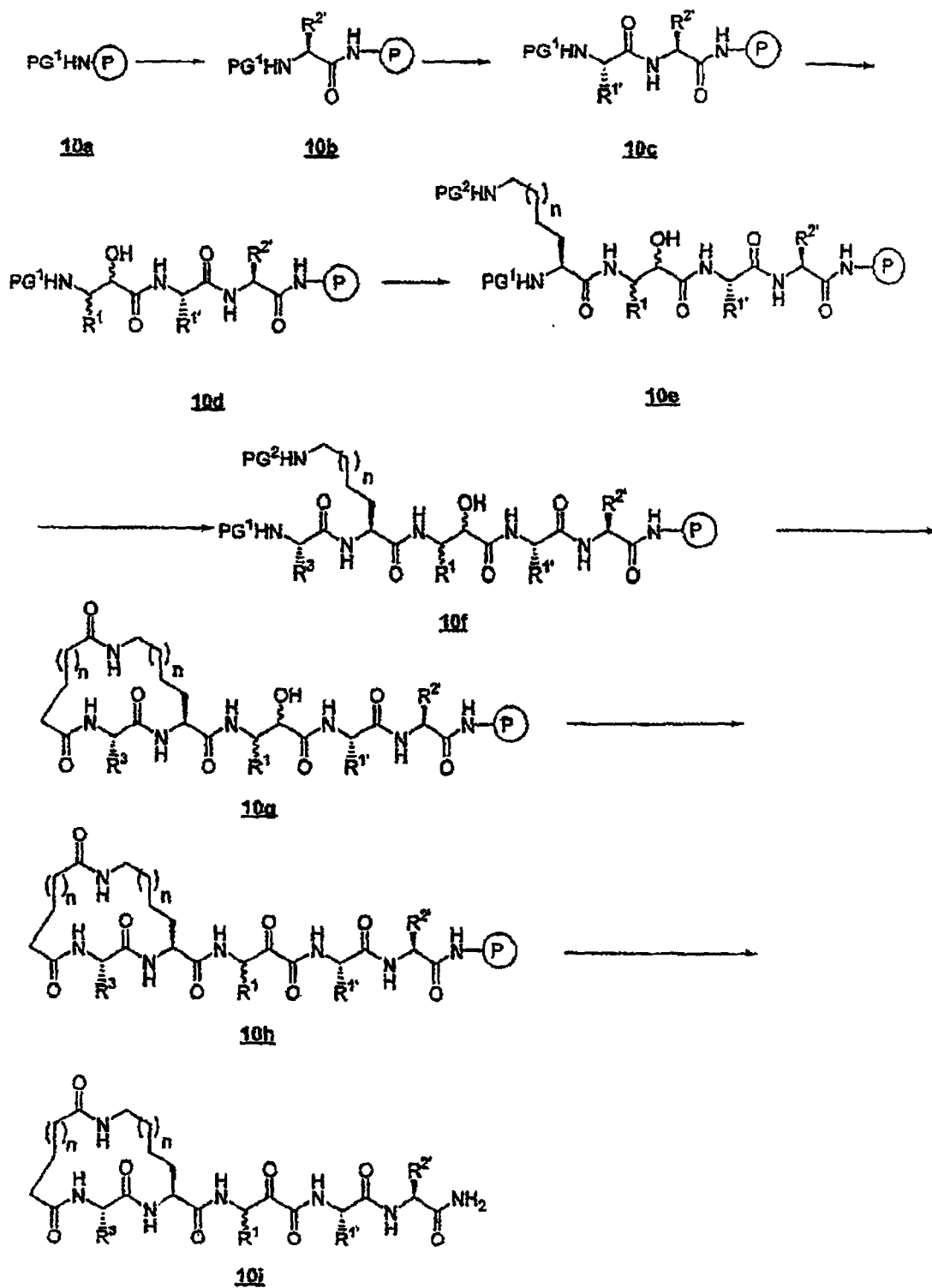
在方案 8 中概括式 **8f** 化合物的制备，其中  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  如上所定义， $R'$  是烷基、杂烷基(OR<sup>''</sup>、SR<sup>'''</sup>、NR<sup>''</sup>R<sup>'''</sup>，其中  $R''$  和  $R'''$  是烷基)、在氧原子的邻、间或对位的卤素取代基， $R$  是烷基、芳基或烷基芳基，PG 是 Boc， $n$  是 0-5。在 Mitsunobu 条件(三苯膦和 ADDP)下，将间-酪氨酸-二肽 **8a** 偶合成末端 N-保护的氨基醇 **8b**。除去保护基团得到二胺盐酸盐 **8d**。通过使用光气或羰基二咪唑形成脲键完成大环化。然后用氢氧化锂将得到的酯水解成酸并接着偶合成胺中间体，得到所需的产物 **8f**。

## 方案 9:



5 通过在二噁烷中用 HCl 将 **9a** 脱保护并用 EDCl、HOObt 与  $\omega$ -羟基  
 5 羧酸偶合开始合成 **9d** 型化合物，其中取代基  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R'$ 、 $R$  和  
 PG 如在方案 1 中所定义，得到 **9b** 型化合物。用 Ph<sub>3</sub>P、ADDP 将 **9b**  
 型化合物进一步环化生成 **9c** 型化合物。将环状化合物 **9c** 脱保护并与  
 合适的胺中间体偶合生成 **9d** 型化合物。

## 方案 10:



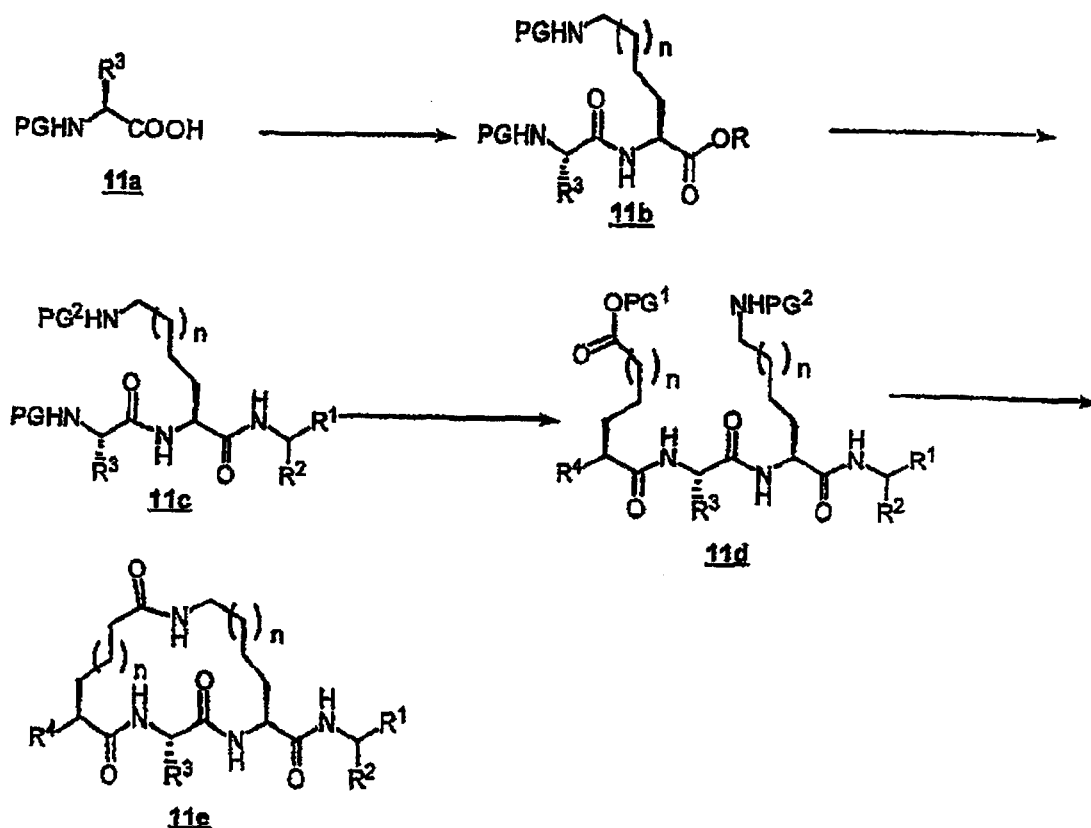
合成 **10i** 型化合物, 其中  $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^3$  如在方案 1 中所定义,  $\text{PG}^1$  和  $\text{PG}^2$  定义为保护基团, 即 Fmoc 和 Dde。P 定义为固定所述化合物的聚合物载体,  $n$  是数字 1-6。用于 **10i** 型分子合成的工艺是使用 Fmoc

5

5 保护基团的标准固相肽合成法。首先通过哌啶处理将 Fmoc 保护的 Sasarin 树脂 **10a** 脱保护, 随后用 HATU 与 Fmoc 保护的氨基酸偶合, 得到 **10b** 型化合物。除去 **10b** 的保护基团并用 HATU 与氨基酸偶合得到 **10c**。经哌啶处理将附载于聚合物的 **10c** 脱保护并与羧基偶合得到 **10d** 型的羧基酰胺。使 **10d** 的保护基团开裂并用 HATU 与保护的赖氨酸衍生物偶合, 得到 **10e** 型化合物。再一次将 **10e** 的保护基脱保护并与 Fmoc 保护的氨基酸偶合, 得到 **10f** 型化合物。除去保护基团 PG<sup>1</sup> 和 PG<sup>2</sup> 并用二酸和 HATU 环化得到大环 **10g**。用 Dess-Martin 试剂将 **10g** 化合物氧化, 最后用 TFA 从树脂中开裂得到 **10i** 化合物。

10

方案 11:



15 从保护的酸 **11a** 开始合成 **11e** 型化合物, 其中 R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup> 和 n 如在方案 1 中所定义, PG<sup>2</sup> 是 Cbz, PG<sup>1</sup> 是 Bn, PG 是 Boc。通过用 EDCI、HOObt 工艺与赖氨酸衍生物偶合将 **11a** 转变为 **11b** 型化合

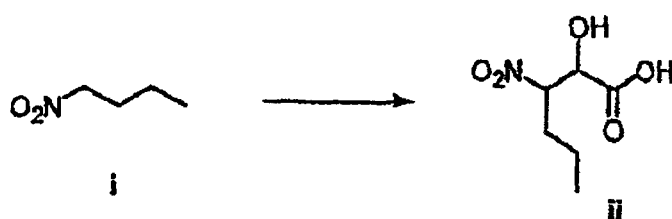
物。用  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  水解 **11b** 的酯基团，随后与合适的胺中间体偶合得到 **11c** 化合物。再在二噁烷中用  $\text{HCl}$  处理并用  $\text{EDCl}$ 、 $\text{HOObt}$  与赖氨酸中间体偶合，形成 **11d** 型化合物。将 **11d** 化合物脱保护并用  $\text{EDCl}$ 、 $\text{HOObt}$  环化形成 **11e** 型化合物。

5

中间体的制备:

中间体 A:

步骤 1:



10

在  $0^\circ\text{C}$ - $5^\circ\text{C}$  下，用 2 小时向搅拌的 1-硝基丁烷(16.5 g, 0.16 mol)和二羧乙酸在  $\text{H}_2\text{O}$  (28.1 g, 0.305 mol)和  $\text{MeOH}$  (122 mL)中的溶液中滴加入三乙胺(93 mL, 0.667 mol)。将该溶液加温至室温，搅拌过夜并浓缩至干燥得到油状物。然后将该油状物溶于  $\text{H}_2\text{O}$  中并用 10 %  $\text{HCl}$  酸化至  $\text{pH} = 1$ ，随后用  $\text{EtOAc}$  萃取。用盐水洗涤合并的有机溶液，经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥，过滤并浓缩至干燥，得到产物 **ii** (28.1 g, 产率 99 %)。

15

步骤 2:



20

向搅拌的原料 **ii** (240 g, 1.35 mol)的乙酸(1.25 L)溶液中加入 10 %  $\text{Pd/C}$  (37 g)。将得到的溶液在 59 psi 下氢化 3 小时，然后在 60 psi 下氢化过夜。然后将乙酸蒸发并与甲苯共沸 3 次，之后用  $\text{MeOH}$  和乙醚研磨。将该溶液过滤并与甲苯共沸两次，得到为灰白色固体的 **iii**(131 g,

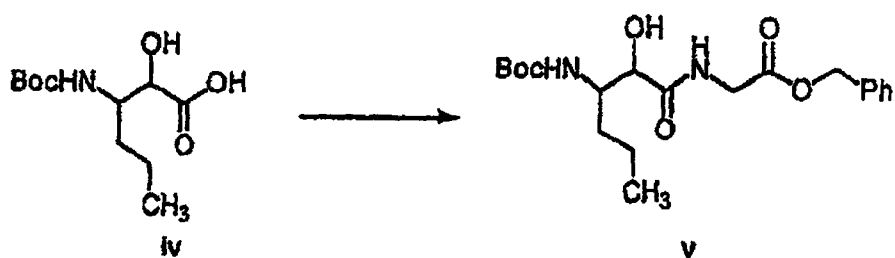
0.891 mol, 66 %).

步骤 3:



5 在 0℃下, 向搅拌的氨基酸 iii (2.0 g, 0.136 mmol) 在二噁烷(10 mL) 和 H<sub>2</sub>O (5 mL) 中的溶液中加入 1 N NaOH 溶液(4.3 mL, 14.0 mmol)。将得到的溶液搅拌 10 分钟, 随后加入二碳酸二叔丁酯(0.110 g, 14.0 mmol) 并在 0℃下搅拌 15 分钟。然后将该溶液加温至室温, 搅拌 45 分钟并保存在冰箱中过夜, 浓缩至干燥得到粗制物。向该粗制物在 EtOAc(100 mL) 和冰中的溶液中加入 KHSO<sub>4</sub>(3.36 g) 和 H<sub>2</sub>O (32 mL) 并搅拌 4-6 分钟。然后分离有机层并将含水层用 EtOAc 萃取两次, 用水、盐水洗涤合并的有机层, 经 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并浓缩至干燥, 得到为澄清的树胶状物的产物 iv (3.0 g, 产率 89 %)。

步骤 4:

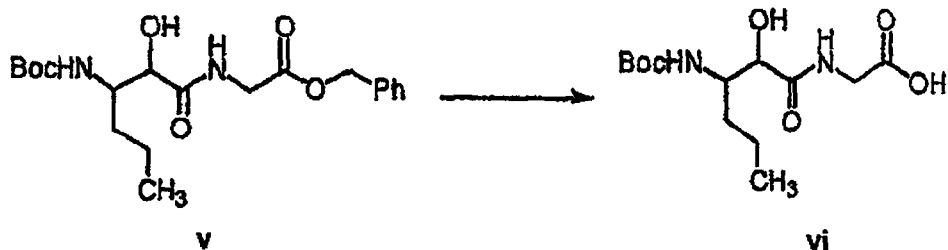


15 在 -20℃下, 向搅拌的 iv (3.00 g, 12.0 mmol) 在 DMF(15 mL) 和 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) 中的溶液中加入 HOObt (1.97 g, 12.0 mmol)、N-甲基吗啉(4.0 mL, 36.0 mmol) 和 EDCl (2.79 g, 14.5 mmol) 并搅拌 10 分钟, 随后加入 HCl · H<sub>2</sub>N-Gly-OBn (2.56 g, 13.0 mmol)。将得到的溶液在 -20℃ 下搅拌 2 小时然后保存在冰箱中过夜并浓缩至干燥, 随后用 EtOAc (150 mL) 稀释。然后将所述 EtOAc 溶液用饱和 NaHCO<sub>3</sub>、H<sub>2</sub>O、5 %

20

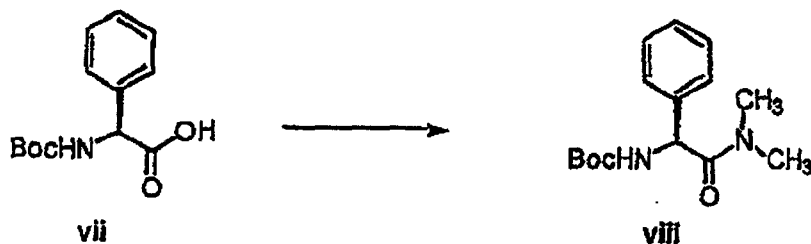
H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>、盐水洗涤两次，经 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥，过滤并浓缩至干燥，得到产物 **v** (4.5 g, 94%)。LRMS  $m/z$  MH<sup>+</sup> = 395.1。

步骤 5:



5 将原料 **v** (7.00 g, 17.8 mmol) 的无水乙醇(300 mL)溶液在室温、氢气气氛、Pd-C (300 mg, 10%) 的存在下搅拌。该反应过程经 tlc 监测。2 小时后，将该混合物通过硅藻土垫过滤并将得到的溶液在真空中浓缩，得到产物 **vi** (5.40 g, 定量)。LRMS  $m/z$  MH<sup>+</sup> = 305.1。

步骤 6:

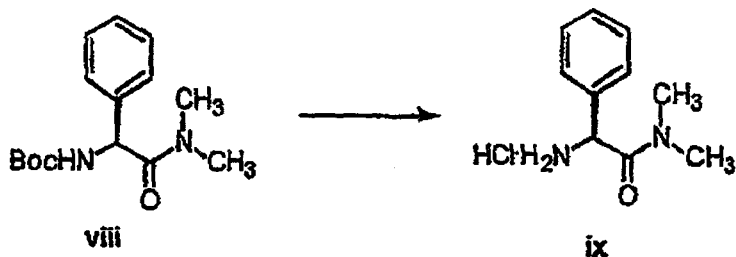


10

在 -20℃ 下，向二甲基胺盐酸盐(1.61 g, 19.7 mmol)、N-Boc-苯基甘氨酸 (4.50 g, 17.9 mmol)、HOObt (3.07 g, 18.8 mmol) 和 EDCI (4.12 g, 21.5 mmol) 在无水 DMF (200 mL) 和 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL) 中的溶液中加入 NMM (5.90 mL, 53.7 mmol)。在此温度下搅拌 30 分钟后，将该反应混合物保存在冰箱中过夜(18 小时)。然后将其加热至室温并加入 EtOAc (450 mL)、盐水(100 mL)和 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (100 mL)。分离各层后将该有机溶液用 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (100 mL)、饱和碳酸氢钠水溶液(2 x 150 mL)、水(150 mL)和盐水(150 mL)洗涤，干燥(MgSO<sub>4</sub>)，过滤并在真空中浓缩得到粗制产物 **viii** (4.86 g)，为白色固体，其没有进一步纯化而使用。

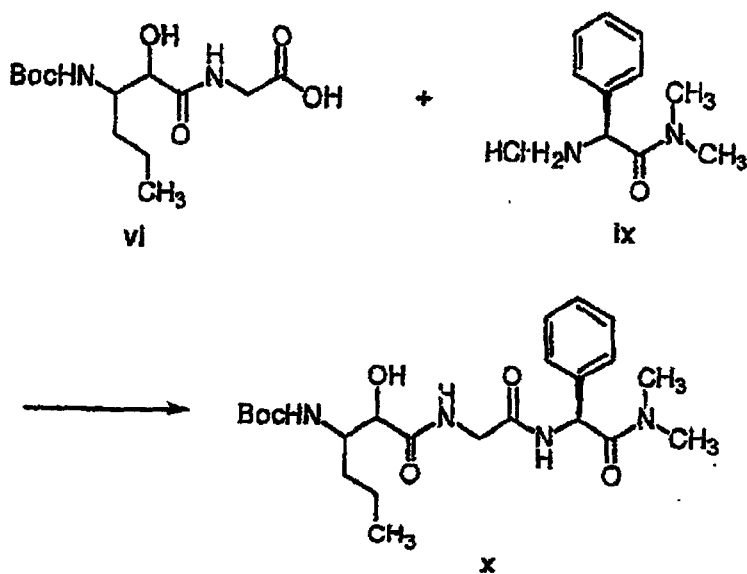
20

步骤 7:



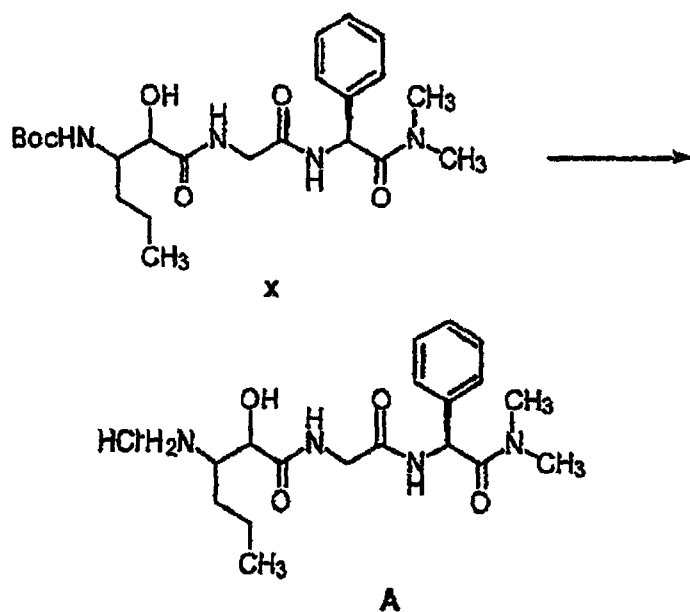
5 将 N-Boc-苯基甘氨酸二甲基酰胺 **viii** (4.70 g, 粗产物)溶于 4N HCl (60 mL, 240 mmol)中并将得到的溶液在室温下搅拌。该反应过程经 TLC 监测。4 小时后, 将该溶液在真空中浓缩, 得到为白色固体的 **ix**, 其没有进一步纯化而用在以下反应中。LRMS  $m/z$   $MH^+ = 179.0$ 。

步骤 8:



10 根据在步骤 4 中所述的偶合步骤制备所需的化合物 **x**。LRMS  $m/z$   $MH^+ = 465.1$ 。

步骤 9:



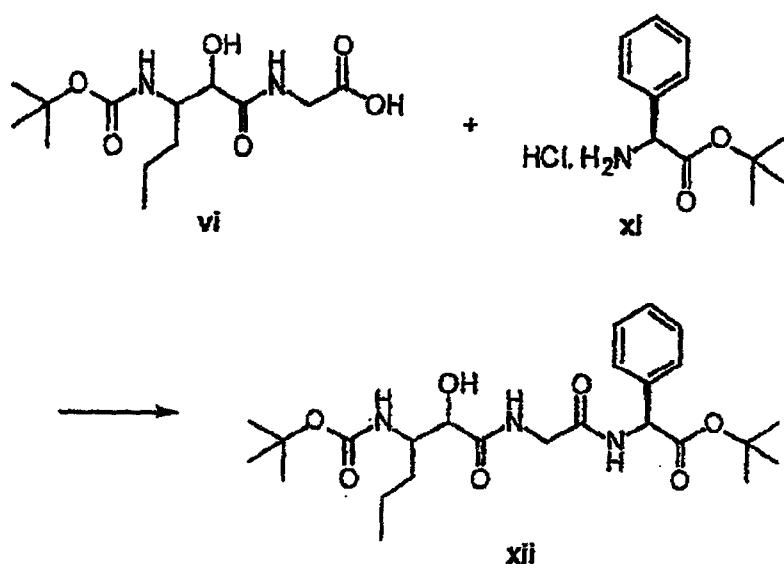
根据在步骤 7 中所述的步骤, 从三肽 x 制备所需的中间体 A。

LRMS  $m/z$   $MH^+ = 365.1$ .

5

中间体 B:

步骤 1:

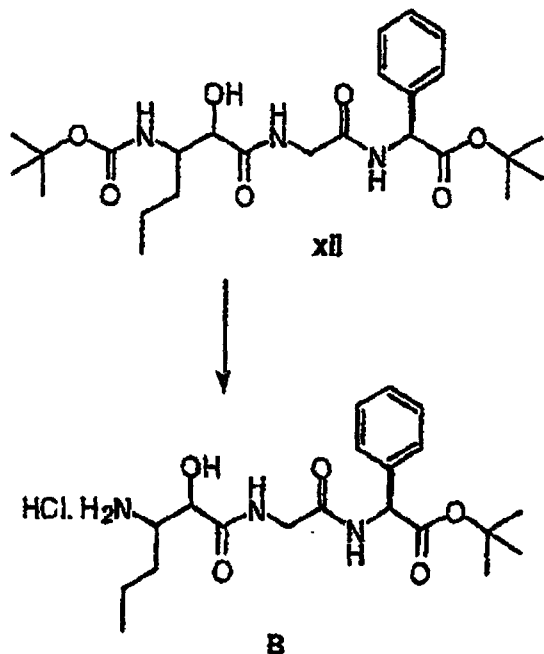


使用可买到的 xi 作为偶合配偶体通过中间体 A、步骤 8 所述的步骤得到所需产物 xii。将该粗制物充分纯化以便进一步研究。用 97/3

10

二氯甲烷/MeOH 经快速层析将部分产品纯化。HRMS (FAB) 对于  $C_{25}H_{40}N_3O_7$  的计算值: 494.2866 (M+H)<sup>+</sup>。实测值: 494.2863。

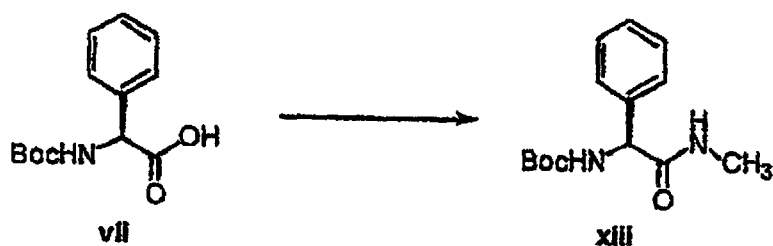
步骤 2:



- 5 通过中间体 A 步骤 7 所述的步骤得到所需产物 B。该粗制物没有进一步纯化而使用。

中间体 C:

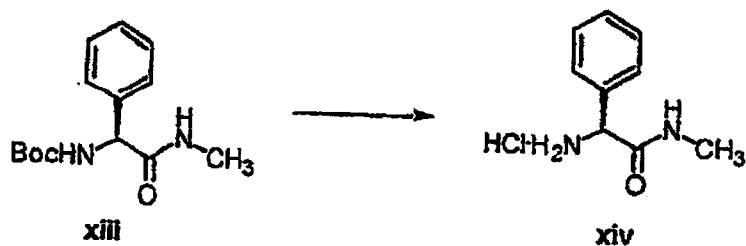
步骤 1:



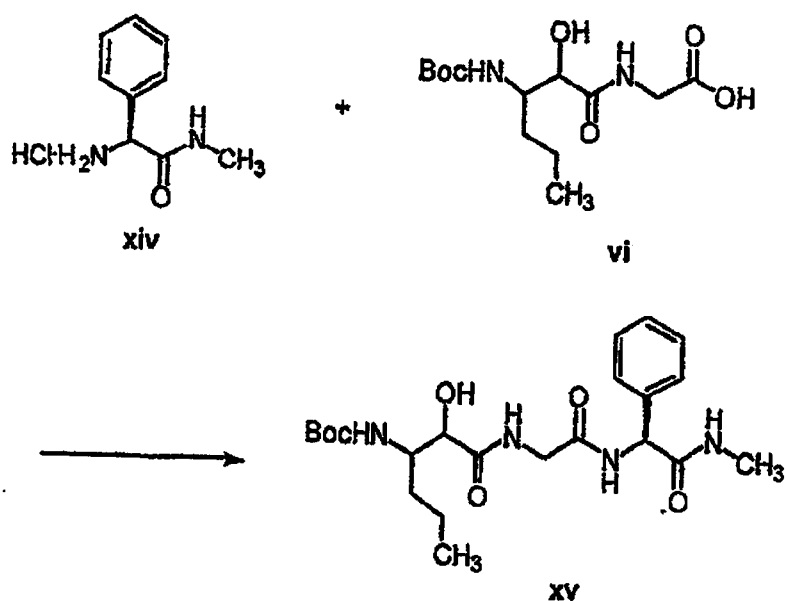
10

根据在中间体 A 步骤 6 中所述的偶合步骤制备所需化合物 xiii。

步骤 2:

根据在中间体 A 步骤 7 中所述的步骤制备所需化合物 **xiv**。

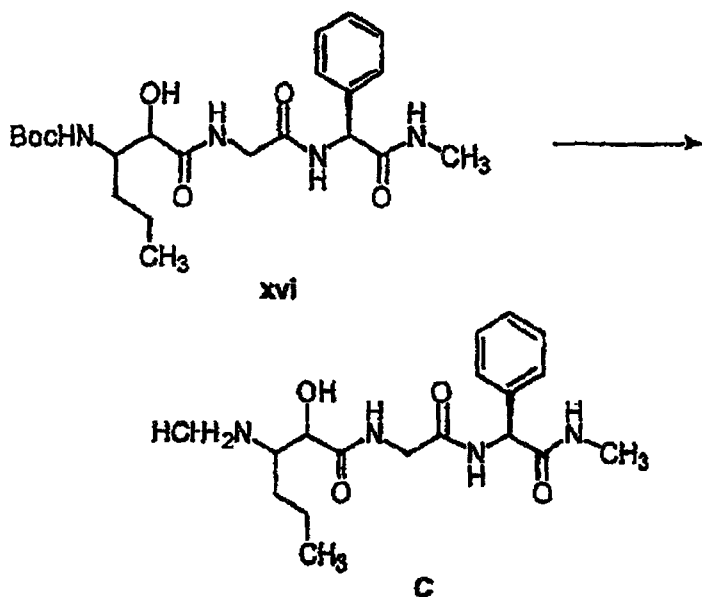
步骤 3:



5

根据在中间体 A 步骤 6 中所述的偶合步骤制备所需化合物 **xv**。  
LRMS  $m/z$   $MH^+ = 451.1$ .

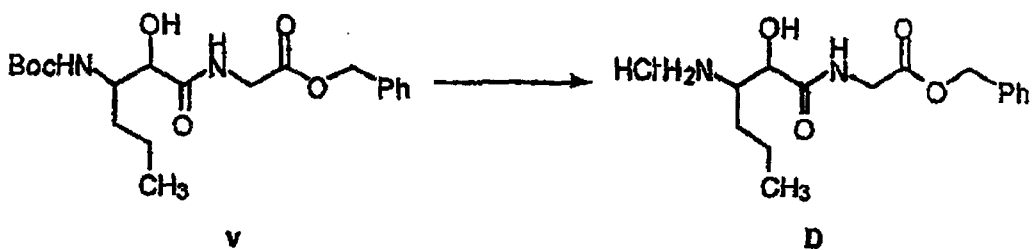
步骤 4:



根据在中间体 A 步骤 7 中所述的步骤制备所需中间体 C。LRMS  $m/z$   $MH^+ = 351.1$ 。其没有进一步纯化而使用。

5

中间体 D:

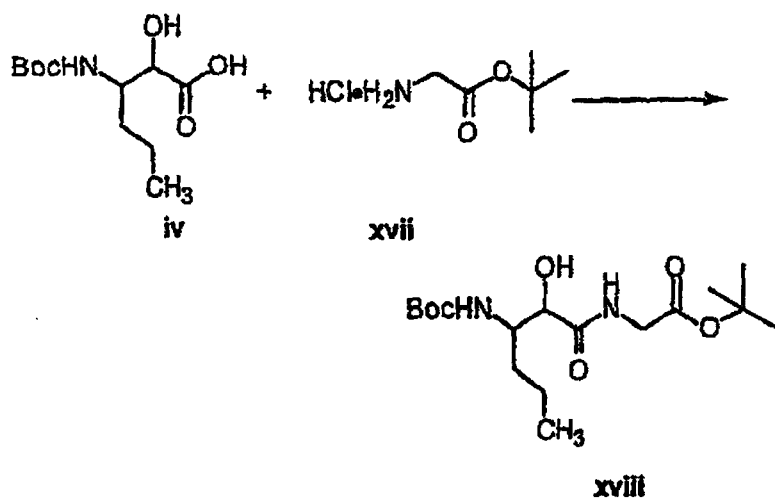


根据在中间体 A 步骤 7 中所述的步骤，由化合物 **v** 制备所需的中间体 **D**。其没有进一步纯化而使用。

10

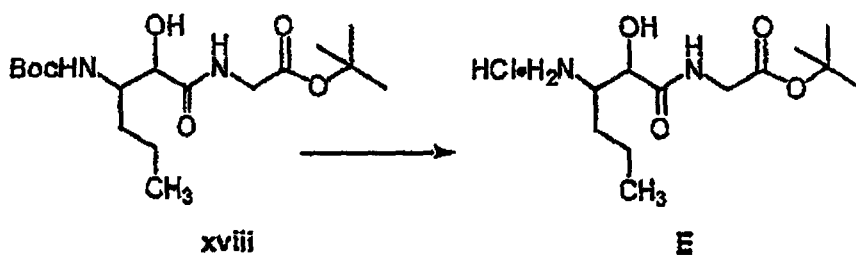
中间体 E:

步骤 1:



5 用可买到的 xvii 作为偶合配偶体, 通过中间体 A 步骤 8 所述的步骤得到所需的产物 xviii。将该粗制物充分纯化以便进一步研究。

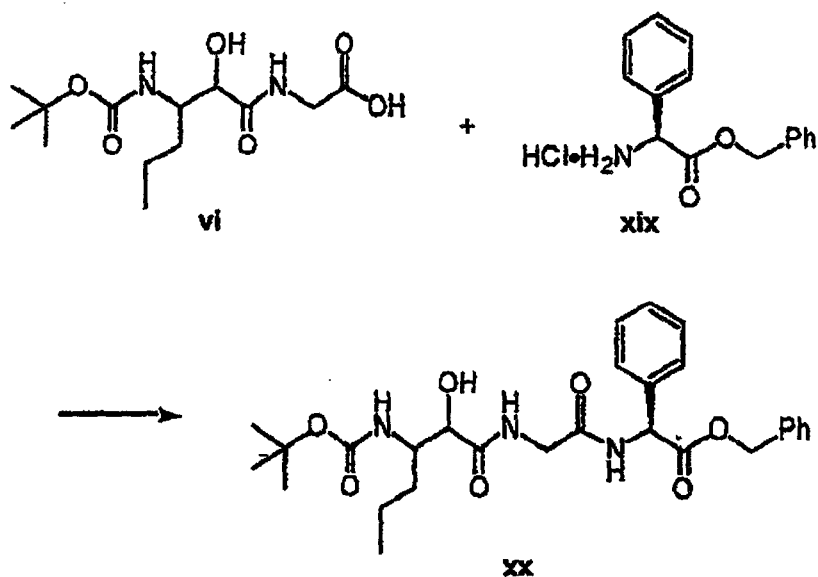
步骤 2:



通过中间体 A 步骤 7 所述的步骤得到所需的产物 E。该粗制物没有进一步纯化而使用。

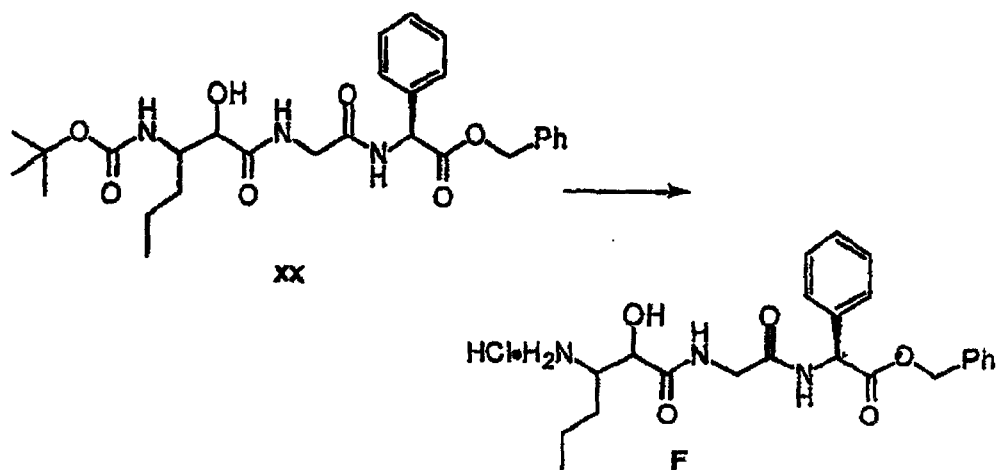
中间体 F:

步骤 1:



5 用可买到的 **xix** 作为偶合配偶体，通过中间体 A 步骤 4 所述的步骤得到所需的产物 **xx**。将该粗制物充分纯化以便进一步研究。

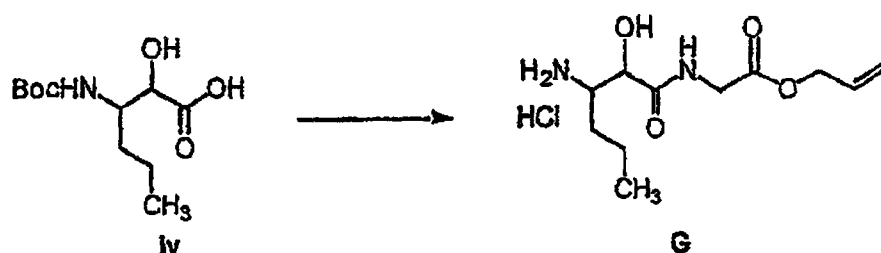
步骤 2:



通过中间体 D 中所述的步骤得到所需的产物 F。

中间体 G:

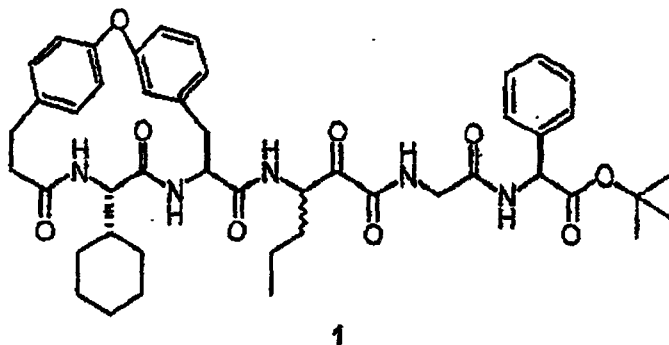
步骤 1:



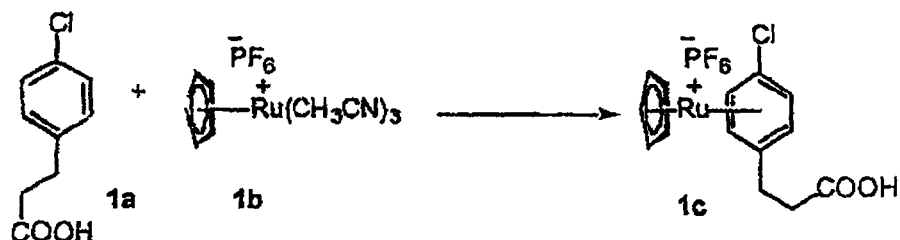
5 用烯丙基甘氨酸作为偶合配偶体, 通过中间体 A 步骤 4 所述的步骤得到所需的产物 G。将该粗制物充分纯化。将该粗制产物用 4N HCl/二噁烷处理并在室温下搅拌 50 分钟。将该反应混合物浓缩至干燥, 得到中间体 G, 其没有进一步纯化而使用。

### 实施例

10 实施例 1: 式 1 化合物的制备:



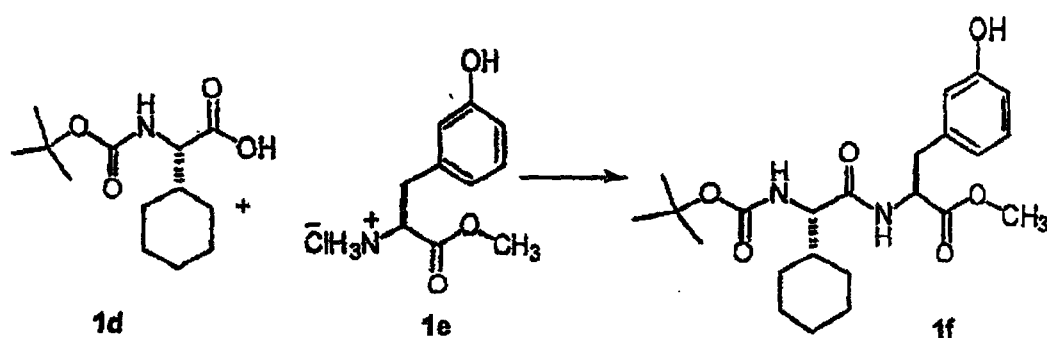
步骤 A:



15 将 1a 的 4-氯代丙酸(2.0 g, 10.8 mmol)在二氯乙烷(200 mL)中的溶液用  $\text{CpRu}(\text{CH}_3\text{CN})_3\text{PF}_6$  (4.7 g, 10.8 mmol, 1.0 当量)处理并在回流下加

热 2 小时。当产物 **1c** 的无色晶体沉淀析出时将该反应混合物冷却至室温。滤出所述晶体并用 1:1 Et<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 的混合物洗涤，在真空中干燥。该无色晶体(3.3 g)为分析纯。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>C(O)CD<sub>3</sub>, 400 MHz, ppm, δ, J) 6.77 (d, 2H, J = 7.0 Hz), 6.53 (d, 2H, J = 7 Hz), 5.64 (s, 5H), 2.87 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.74 (t, 2H, J = 7.0 Hz); MS: (电喷雾, m/z 相对强度): 350.9 (C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>ClRu<sup>+</sup>, M<sup>+</sup>, 100); 对于 C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>ClF<sub>6</sub>O<sub>2</sub>PRu 的 CHN 计算值 C = 33.92%, H = 2.85%, Cl = 7.15%, P = 6.25% 实测值: C = 34.04%, H = 3.04%, Cl = 7.09%, P = 5.71%。

步骤 B:

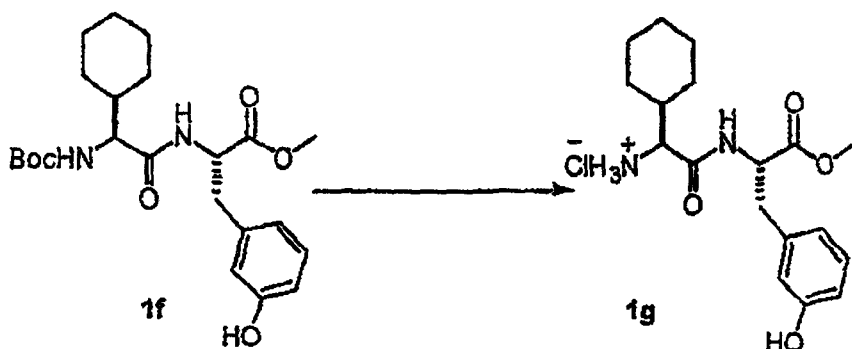


10

将 Boc-环己基甘氨酸一水合物 **1d** (6.17 g, 24.00 mmol) 在无水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50.0 mL) 中的溶液用 4-甲基吗啉(2.64 g, 26.0 mmol, 1.1 当量) 处理并冷却至 -10℃。向该混合物中加入氯甲酸异丁基酯(3.62 g, 3.5 mL, 1.1 当量) 并将该白色悬浮液搅拌直至浴温为 -5℃。在一个单独的烧杯中将间-酪氨酸甲基酯盐酸盐(6.5 g, 26.5 mmol, 1.1 当量) 溶于 DMF (30 mL) 中并用 4-甲基吗啉(2.64 g, 26.0 mmol, 1.1 当量) 处理, 在室温下搅拌 15 分钟。将该混合物加入到所述反应物中, 同时伴有 CO<sub>2</sub> 放出。将该反应混合物在室温下搅拌 1 小时并用 1M HCl 水溶液(100 mL) 稀释。用乙酸乙酯(3 x 200 mL) 萃取含水层并用 1 M HCl (1 x 100 mL)、NaOH 水溶液(1 x 100 mL)、盐水(1 x 100 mL) 萃取合并的有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 在真空中浓缩并经层析(SiO<sub>2</sub>, EtOAc/己烷 3/7) 纯化, 得到 5.3 g (53%) 偶合化合物 **1f**, 为无色泡沫。

20

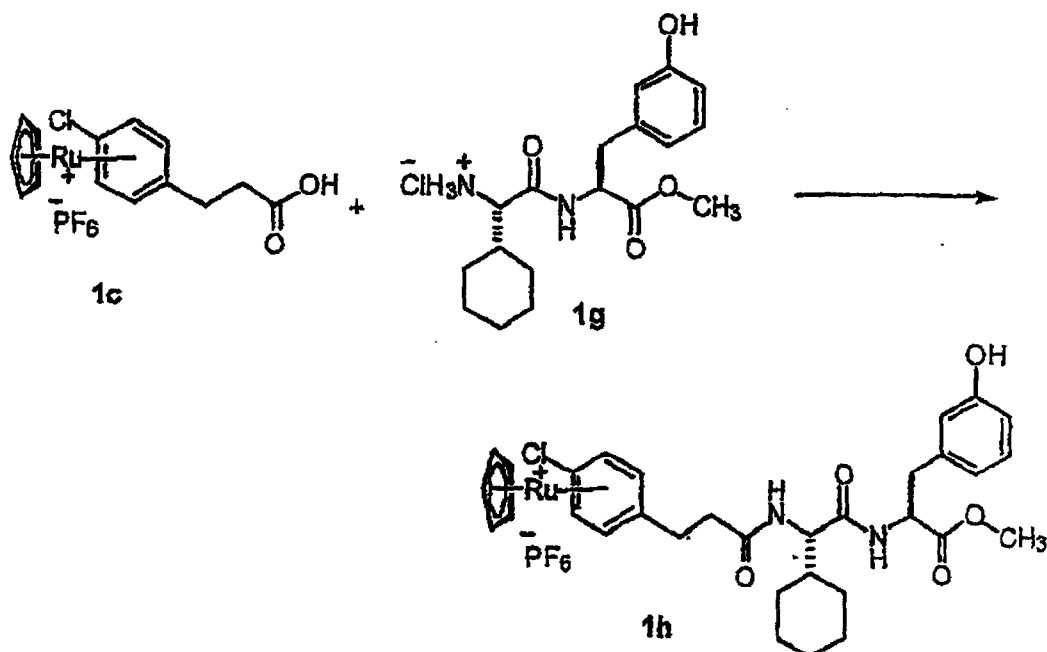
## 步骤 C:



将 1f (10 g, 23.04 mmol) 的溶液溶于 HCl (在二噁烷中的 4M 溶液, 100 mL) 中并在室温下搅拌 2-4 小时。将反应混合物在真空中浓缩并将固体重悬浮在乙醚中。将其过滤并将固体用乙醚洗涤, 干燥得到无色固体 1g (8.2 g, 96%) <sup>1</sup>H NMR (d<sub>4</sub>-CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, δ, ppm) 7.09 (t, 1H, J = 8.0 Hz), 6.71-6.36 (m, 3H), 4.69 (dd, 1H, J = 6.0 Hz, 3.2 Hz), 3.69 (s, 3H), 3.66 (d, 1H, J = 5.2 Hz), 3.15-3.10 (dd, 1H, J = 5.6 Hz, 4.0 Hz), 1.87-1.69 (m, 6H), 1.32-1.10 (m, 5H).

10

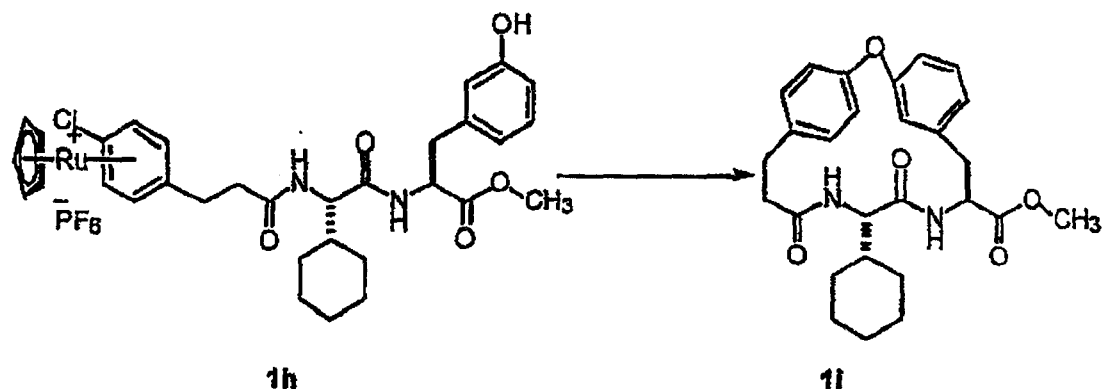
## 步骤 D:



将六氟磷酸(η-茂) [η<sup>6</sup>-(4-氯代苯基)]合钌基丙酸(cyclopentadiene-η<sup>6</sup>-4-chlorophenylpropionic acid-ruthenium hexanesafluorophosphate) 1c

(2.0 g, 4.0 mmol)的 DMF (20 mL)溶液用 HOBt (810 mg, 6.0 mmol, 1.5 当量)和 Hünigs base (2.6 g, 16.0 mmol, 4.0 当量)处理。将该反应混合物冷却至 0°C 并用 EDCI · HCl (888 mg, 5.0 mmol, 1.25 当量)处理。将该反应混合物在 0°C 下搅拌 30 分钟并将胺盐 **1g** (1.48 g, 4.0 mmol)加入到该混合物中, 在室温下搅拌 12 小时。将所述反应混合物在真空中浓缩并用 H<sub>2</sub>O (200 mL)稀释残余物, 萃取进 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 100 mL)中。将合并的有机层用 HCl 水溶液(1 x 100 mL)、NaHCO<sub>3</sub> (1 x 100 mL)、盐水(1 x 100 mL)萃取并干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤, 在真空中浓缩, 并且棕色固体 **1h** 没有进行任何进一步纯化而用于环化作用。

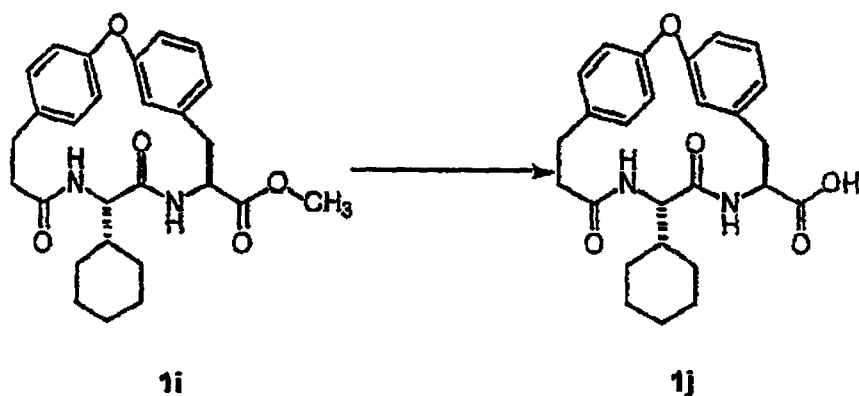
10 步骤 E:



将( $\eta$ -茂) · [ $\eta^6$ -(4-氯代苯基)]合钌基丙酸(cyclopentadiene- $\eta^6$ -ruthenium-4-chlorophenylpropionic acid)-环己基甘氨酸-间酪氨酸-OCH<sub>3</sub> **1h** (1.47 g, 粗制)在无水 DMF (150 mL)中的溶液用 Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.40 g, 7.37 mmol, 5.0 当量)处理并通过将干 N<sub>2</sub> 通入所述反应混合物中鼓泡进行脱气。将该反应混合物在室温下搅拌 16 小时并蒸馏除去过量的 DMF。将残余物溶于 H<sub>2</sub>O (200 mL)并用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 100 mL)萃取。用盐水(100 mL)萃取合并的有机层, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤, 在真空中浓缩, 所述残余物没有进一步纯化而用于钌的光解解络。

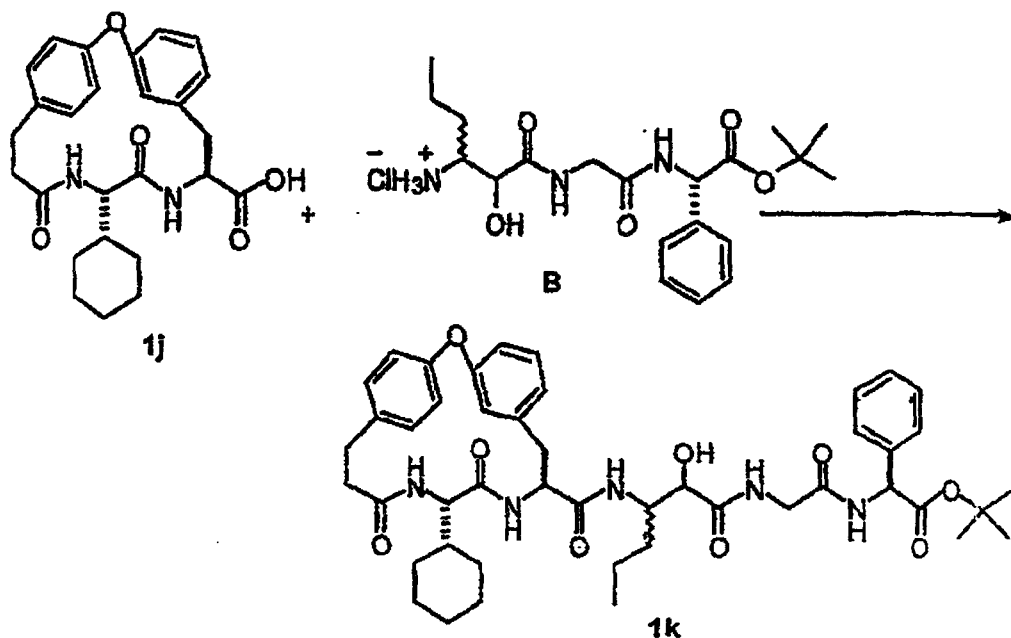
20 将粗制钌络合物溶于乙腈(35 mL)中, 脱气并在 Raynot ( $\lambda = 350$  nm)中光解 48 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物经层析(SiO<sub>2</sub>, EtOAc/己烷 7:3)纯化, 得到 360 mg (52 %)无色固体 **1i**。

步骤 F:



5 将二苯基醚 **1i** (300 mg, 0.65 mmol) 在  $\text{CH}_3\text{OH}$  (10 mL)、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) 和  $\text{H}_2\text{O}$  (5 mL) 中的溶液用  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (90 mg, 2.2 mmol, 3.4 当量) 处理并在室温下搅拌 2 小时。将该反应混合物用  $\text{HCl}$  水溶液 (6 M) 酸化并萃取到  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 30 mL) 中。干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 合并的有机层, 过滤并在真空中浓缩得到无色酸 **1j** (200 mg, 66%)。

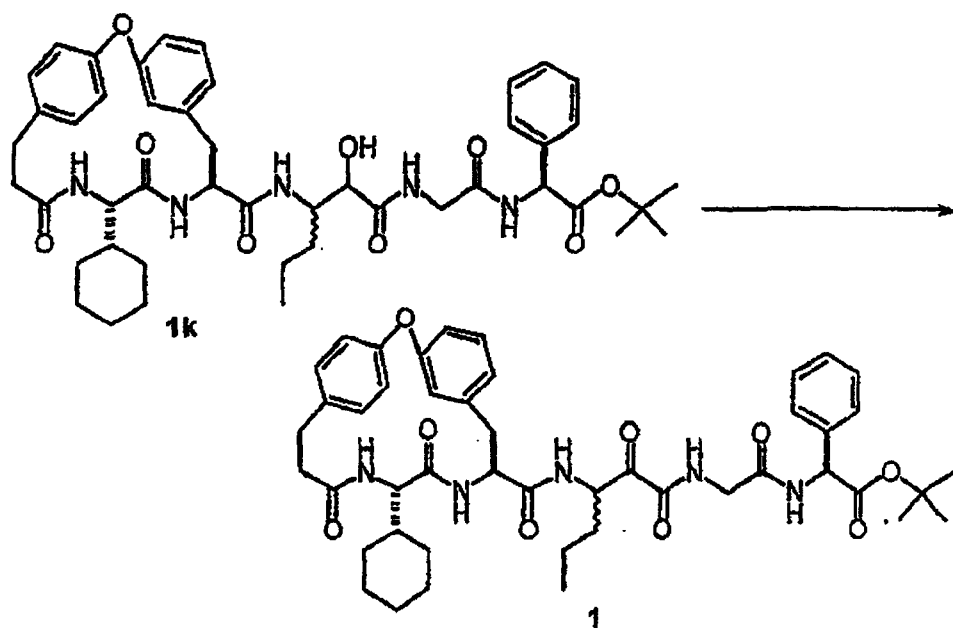
步骤 G:



10 将酸 **1j** (100 mg, 0.22 mmol) 在无水  $\text{DMF}$  (2.5 mL) 中的溶液用  $\text{HOObt}$  (45 mg, 0.33 mmol) 和 Hünigs base (141 mg, 1.1 mmol, 5.0 当量) 处理。将该反应混合物冷却至  $0^\circ\text{C}$  并用  $\text{EDCl}$  (63 mg, 0.33 mmol, 1.5 当

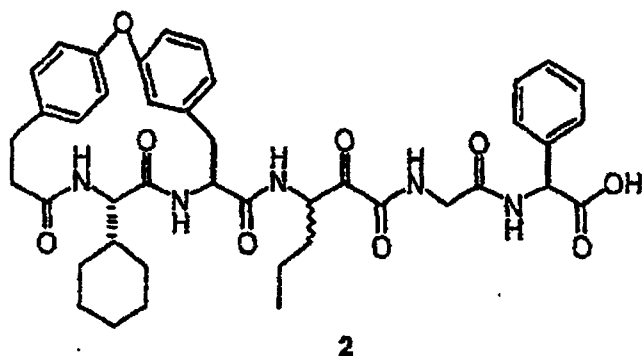
量)处理, 搅拌 20 分钟。将反应混合物用胺 B (118 mg, 0.27 mmol, 1.22 当量)处理并在室温下搅拌 12 小时。在真空中浓缩该反应混合物并用 H<sub>2</sub>O (30 mL)稀释。用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL)和 EtOAc (3 x 50 mL)萃取含水层。用 HCl 水溶液(2 M)、NaOH 水溶液(2 M)萃取合并的有机层, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤, 在真空中浓缩得到无色固体 1k (79 mg), 其用于氧化。MS: (电喷雾, m/z 相对强度): 826 [(M+1)<sup>+</sup>, 100], 494 (20), 94 (30)。

步骤 H:

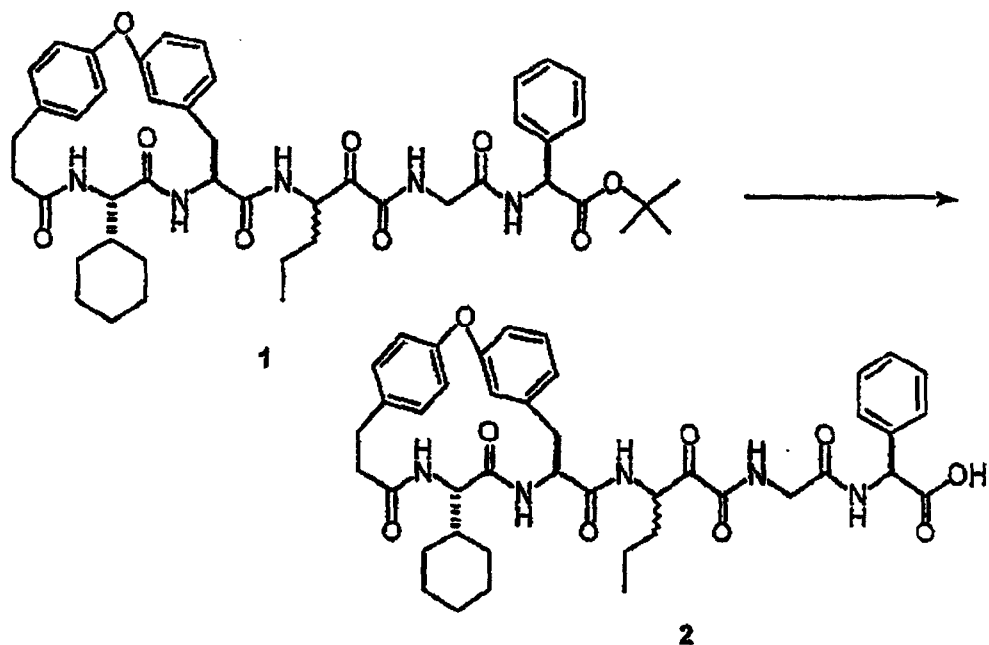


10 将羟基酰胺 1k (130 mg, 0.16 mmol)的 DMF (2.0 mL)溶液用 Dess-Martin 试剂(130 mg, 0.32 mmol, 2.0 当量)处理。将该反应混合物在室温下搅拌 2 小时并将该混合物在真空中浓缩。将残余物经层析(SiO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 1:49)纯化, 得到氧化的产物 1 (55 mg, 42 %), 为无色固体。MS: (电喷雾, m/z 相对强度): 858 [(M+CH<sub>3</sub>OH+1)<sup>+</sup>, 100], 824 [(M+1)<sup>+</sup>, 63]。

## 实施例 2: 式 2 化合物的制备:

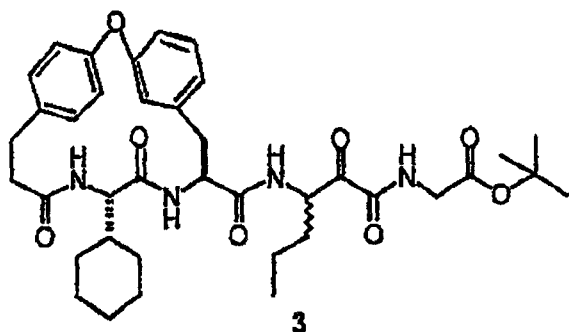


## 步骤 A:

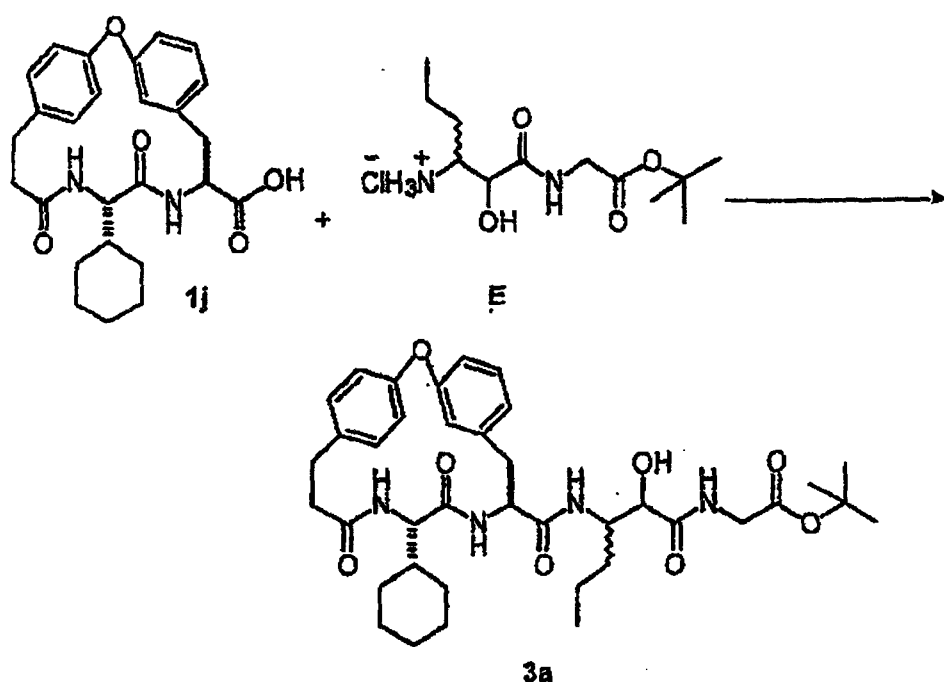


- 5 将叔丁基酯 1 (50.0 mg, 60.0  $\mu\text{mol}$ ) 的溶液用 TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1, 4 mL) 处理并在室温下搅拌 2 小时。使所述酯相对于基线消失, 之后进行 TLC ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:24)。脱保护完成后将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物用庚烷(4.0 mL)反复处理并浓缩, 得到白色固体 2 (49 mg, 100%)。MS: (电喷雾,  $m/z$  相对强度): 768  $[(M+1)^+, 100]$ 。

实施例 3: 式 3 化合物的制备:



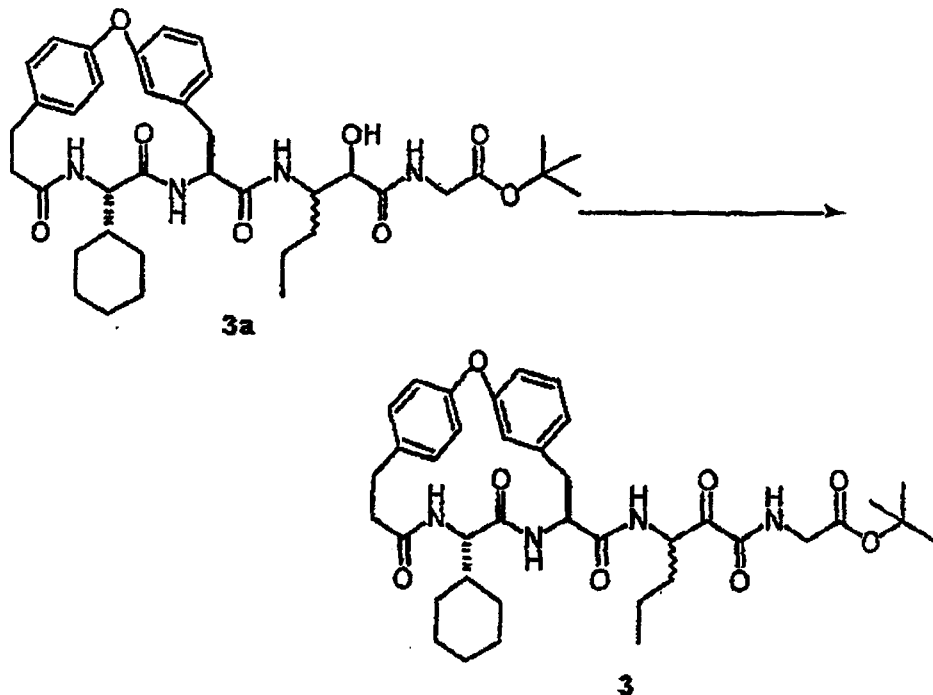
步骤 A:



- 5 将酸 1j (100 mg, 0.22 mmol) 在无水 DMF (2.5 mL) 中的溶液用 HOOBt (45 mg, 0.33 mmol) 和 Hünigs base (141 mg, 1.1 mmol, 5.0 当量) 处理。将该反应混合物冷却至 0°C 并用 EDCI (63 mg, 0.33 mmol, 1.5 当量) 处理, 搅拌 20 分钟。将反应混合物用胺 E (79 mg, 0.27 mmol, 1.22 当量) 处理并在室温下搅拌 12 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并用 H<sub>2</sub>O (30 mL) 稀释。用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL) 萃取含水层。用 HCl 水溶液 (1 M, 30 mL)、NaOH 水溶液 (1M, 30 mL) 萃取合并的有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤, 在真空中浓缩, 得到无色固体 3a (58 mg), 其用于氧
- 10

化。MS:(电喷雾,  $m/z$  相对强度): 693  $[(M+1)^+]$ , 100], 637 (41), 494 (55), 394 (51), 338 (13)。

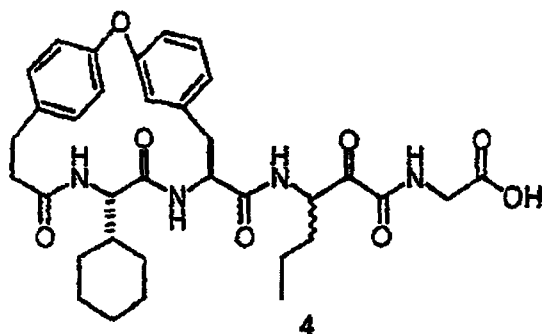
步骤 B:



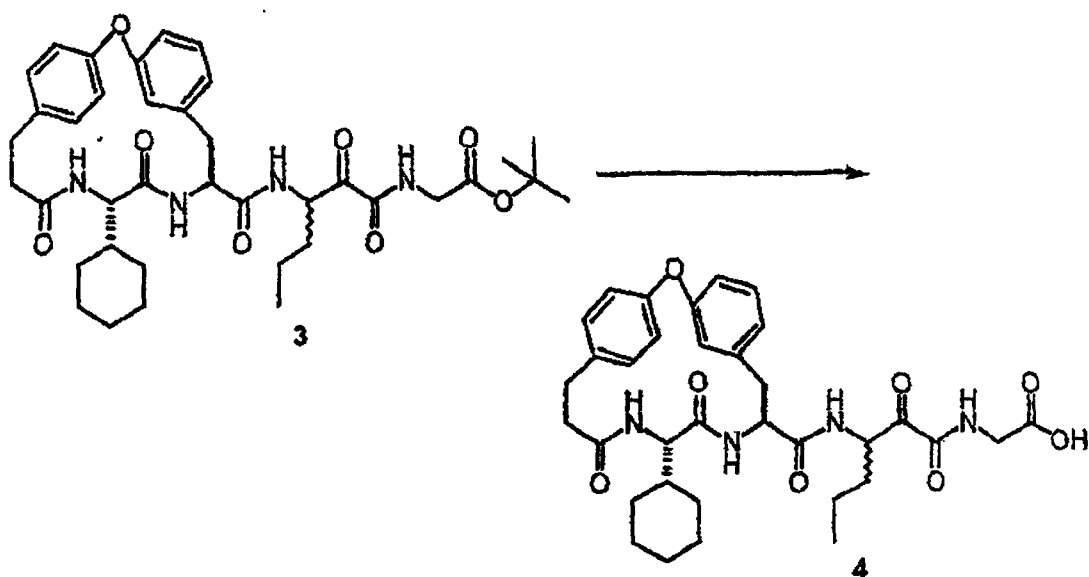
- 5 将醇 3a (95 mg, 0.14 mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.0 mL) 溶液用 Dess-Martin 试剂 (116 mg, 0.28 mmol, 2.0 当量) 处理。将该反应混合物在室温下搅拌 2 小时并将该混合物在真空中浓缩。将残余物经层析 ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1: 32) 纯化, 得到氧化的产物 3 (47 mg, 42%), 为无色固体。MS:(电喷雾,  $m/z$  相对强度): 691  $(M+1)^+$ 。

10

实施例 4: 式 4 化合物的制备:



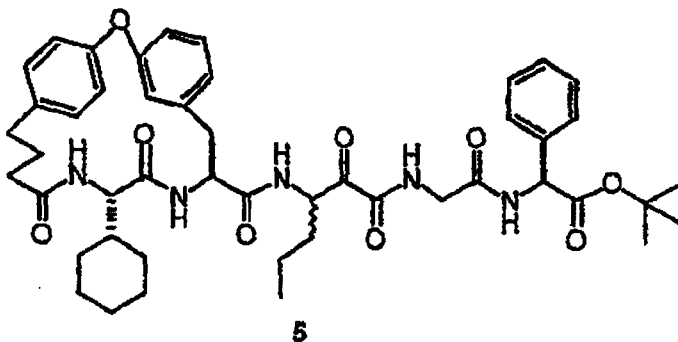
## 步骤 A:



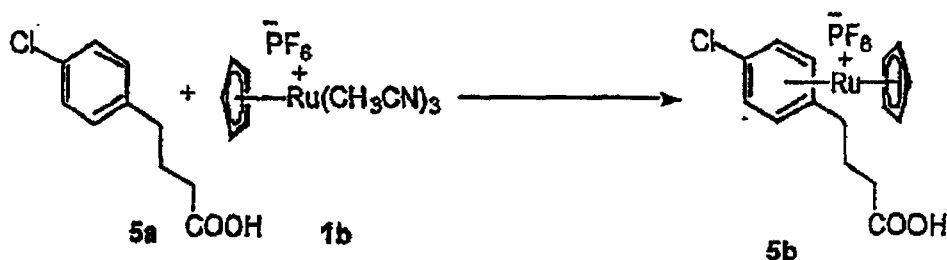
将叔丁基酯3 (47.0 mg, 68.0  $\mu\text{mol}$ )的溶液用HCl (4M 二噁烷, 5 mL)处理并在室温下搅拌 25 小时。使所述酯相对于基线消失, 之后进行  
5 TLC ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:24)。脱保护完成后将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物用庚烷(5.0 mL)反复处理并浓缩, 得到白色固体4 (43 mg, 100%)。MS: (电喷雾,  $m/z$  相对强度): 635  $[(M+1)^+$ , 100], 465 (62), 336 (62)。

10

## 实施例 5: 式 5 化合物的制备:

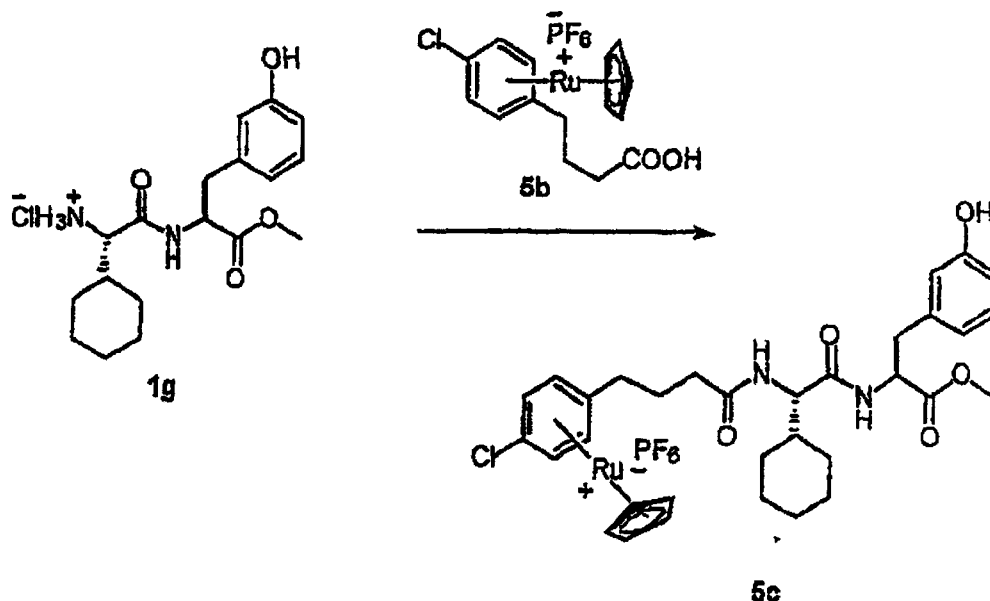


## 步骤 A:



5 将4-氯代丁酸 **5a** (3.0 g, 15.10 mmol)的二氯乙烷(200 mL)溶液用 CpRu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>3</sub>PF<sub>6</sub> **1b** (6.6 g, 15.10 mmol, 1.0 当量)处理并在回流下加热 2.5 小时。将该反应混合物冷却至 0℃并过滤。在真空中浓缩滤液并溶于 CH<sub>3</sub>CN(10 mL)中,用大量过量的 Et<sub>2</sub>O 处理。经萘析乙醚将分离出的树脂状物分离并将残余物溶于 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:1, 100 mL)中,在真空中浓缩得到 **5b**,为可以固化的棕色树脂状物(3.5 g, 46%)。

## 步骤 B:



10

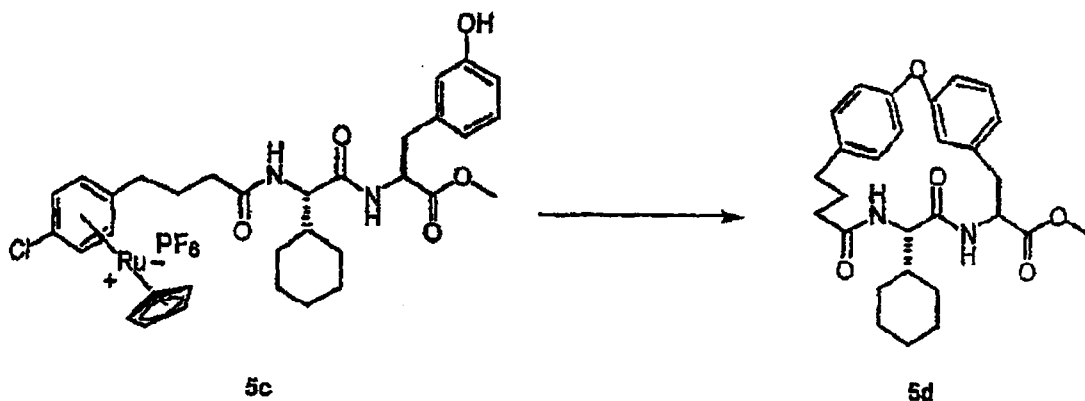
15

将羧酸 **5b** (3.12 g, 5.95 mmol)在无水 DMF (20 mL)中的溶液用 Hünigs base (3.07 g, 24.0 mmol, 4.0 当量, 4.4 mL)和 HOBT (1.2 g, 8.93 mmol, 1.5 当量)处理。将反应混合物冷却至 0℃并用 EDCI (1.35 g, 7.43 mmol, 1.25 当量)处理,搅拌 1 小时。向所述反应混合物中加入胺盐酸盐 **1g** (2.65 g, 7.14 mmol, 1.2 当量)并将反应混合物在室温下搅拌 12 小

时。蒸馏出 DMF 并将残余物用水稀释，用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  萃取含水层。用  $\text{NaHCO}_3$  水溶液、 $\text{HCl}$  水溶液、盐水萃取合并的有机层，干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )，过滤，在真空中浓缩，将没有进一步纯化的粗制产物 **5c** (4.3 g)用于环化作用。 $^1\text{H NMR}$  ( $d_4\text{-CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz,  $\delta$ , ppm) 7.35 (t, 1H), 6.72-6.60 (m, 5H), 6.33-6.20 (dd, 2H), 5.51 (s, 5H), 4.19 (d, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.19-2.83 (m, 2H), 2.51-2.40 (m, 2H), 2.40-2.25 (m, 2H), 1.99-1.59 (m, 8H), 1.35-0.98 (m, 5H); MS: (FAB, NBA-G/TG-DMSO, m/z 相对强度): 695.3 ( $[\text{M-PF}_6]^+$ , 100), 232 (20), 171 (30); HRMS 对于  $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_5\text{ClRu}^+$  ( $\text{M-PF}_6$ ) $^+$  的计算值 695.1832; 实测值 695.1845。

10

步骤 C:



15

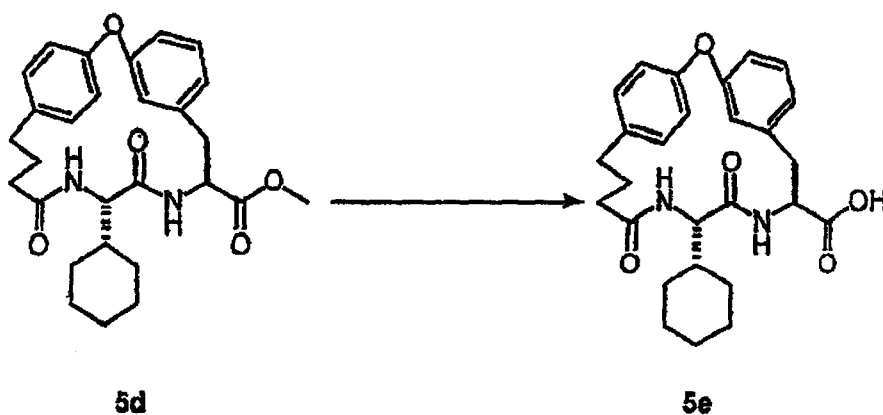
将氯代化合物 **5c** (3.0 g, 3.6 mmol)在无水 DMF (300 mL)中的溶液用干燥  $\text{N}_2$  和  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (5.2 g, 16 mmol, 4.0 当量)脱气并在室温下搅拌 16 小时。馏出溶剂 DMF 并将残余物用水稀释，用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 100 mL)萃取。干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )合并的有机层，过滤，在真空中浓缩并在真空下干燥过夜。它没有进一步纯化而用于光解除去 Ru。MS FAB (NBA-G/TG-DMSO 695) ( $[\text{M-PF}_6]^+$ , 100)。

20

将来自上述步骤的环化化合物溶于  $\text{CH}_3\text{CN}$  (35 mL)中并在 Raynot ( $\lambda = 350 \text{ nm}$ )中光解 48 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物经层析( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/己烷 1:1)纯化，得到褐色固体 **5d** (600 mg, 34%)。  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz,  $\delta$ , ppm) 7.58 (d, 1H,  $J = 7.6 \text{ Hz}$ ), 7.14 (t, 1H,  $J = 8.0 \text{ Hz}$ ), 6.94 (d, 2H,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ ), 6.87 (dd, 1H,  $J = 2.4, 5.6 \text{ Hz}$ ),

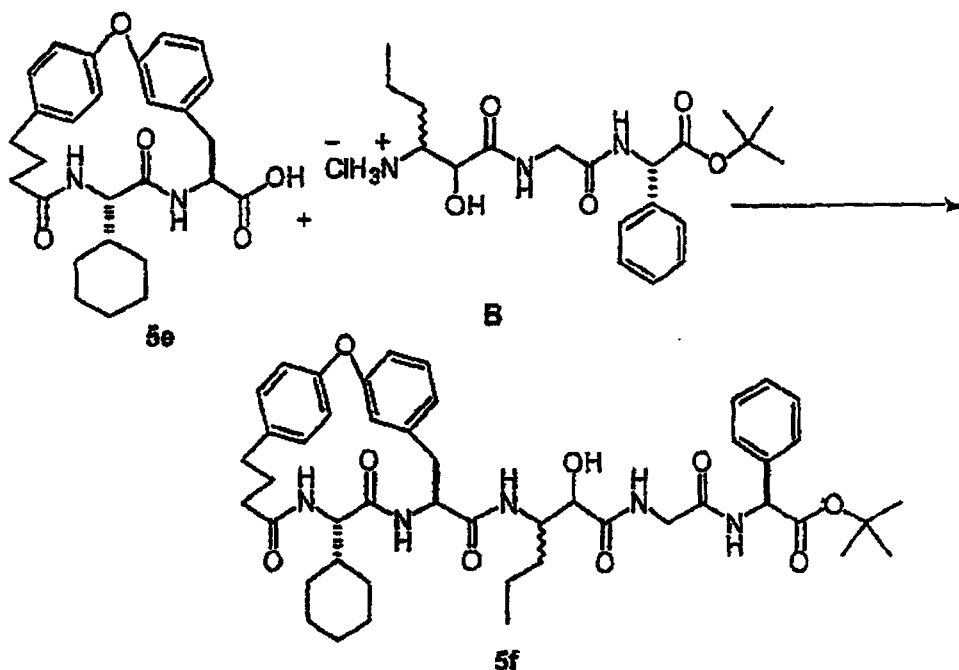
6.73 (d, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 6.59 (s, 1H), 6.57 (s, 2H), 6.39 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 4.51 (dt, 1H,  $J = 2.8, 8.0$  Hz), 3.80-3.62 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.05-3.00 (dd, 1H,  $J = 2.8, 11.6$  Hz), 2.85 (dd, 1H,  $J = 8.4, 6.0$  Hz), 2.76-2.72 (m, 1H), 2.36-2.19 (m, 3H), 2.02 (dd, 1H,  $J = 6.4, 9.2$  Hz), 1.8-1.73 (m, 1H), 1.61-1.34 (m, 7H), 1.41-0.71 (m, 7H). MS (FAB, NBA-G/TG-DMSO,  $m/z$  相对强度): 493  $[(M+1)^+]$ , 100], 465 (20), 232 (30), 171 (40); HRMS 对于  $C_{29}H_{37}N_2O_5$   $(M+1)^+$  的计算值: 493.2702; 实测值 493.2699。

步骤 D:



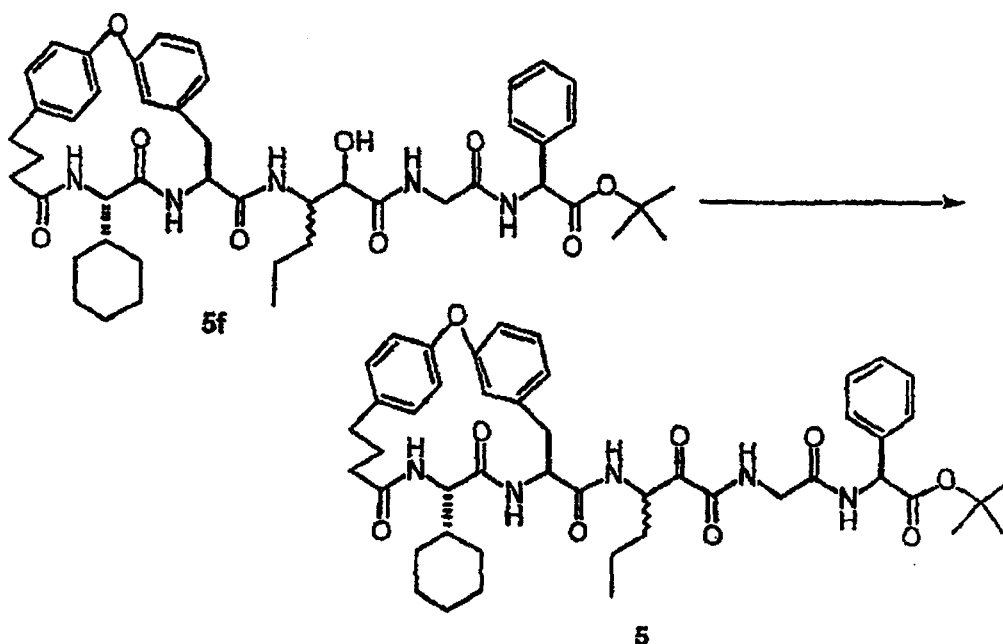
10 将醚 **5d** (200 mg, 0.42 mmol) 在  $CH_3OH$  (5 mL)、 $CH_2Cl_2$  (10 mL) 和  $H_2O$  (0.5 mL) 中的溶液用  $LiOH \cdot H_2O$  (18 mg, 0.44 mmol, 1.1 当量) 处理并在室温下搅拌 12 小时。将该反应混合物用  $HCl$  水溶液 (12 N, 1 mL) 酸化并在真空中浓缩, 得到酸 **5e**, 其没有进一步纯化直接用于偶合作用。

步骤 E:



将酸 **5e** 的无水 DMF (5.0 mL) 溶液用 HOOBt (103 mg, 0.63 mmol, 1.5 当量)、Hünigs base (216 mg, 1.68 mmol, 4.0 当量) 和胺 **B** (270 mg, 0.63 mmol, 1.47 当量) 处理。将该反应混合物冷却至 0℃ 并用 EDCI (101 mg, 0.52 mmol, 1.25 当量) 处理, 在室温下搅拌 12 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并用 H<sub>2</sub>O (30 mL) 稀释。将含水层用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL) 和 EtOAc (3 x 50 mL) 萃取。用 HCl 水溶液 (2M)、NaOH 水溶液 (2M) 萃取合并的有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤, 在真空中浓缩得到无色固体 **5f** (177 mg), 其用于氧化作用。MS: (电喷雾, m/z 相对强度): 840 [(M+1)<sup>+</sup>, 100], 394 (100)。

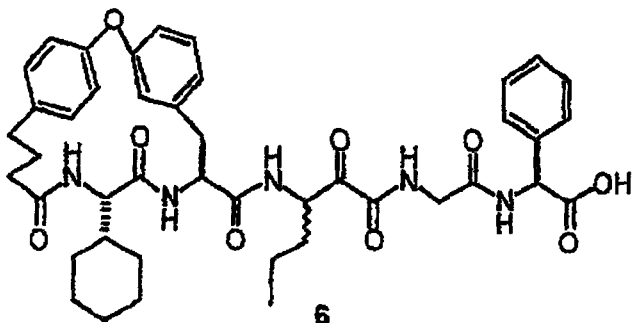
步骤 F:



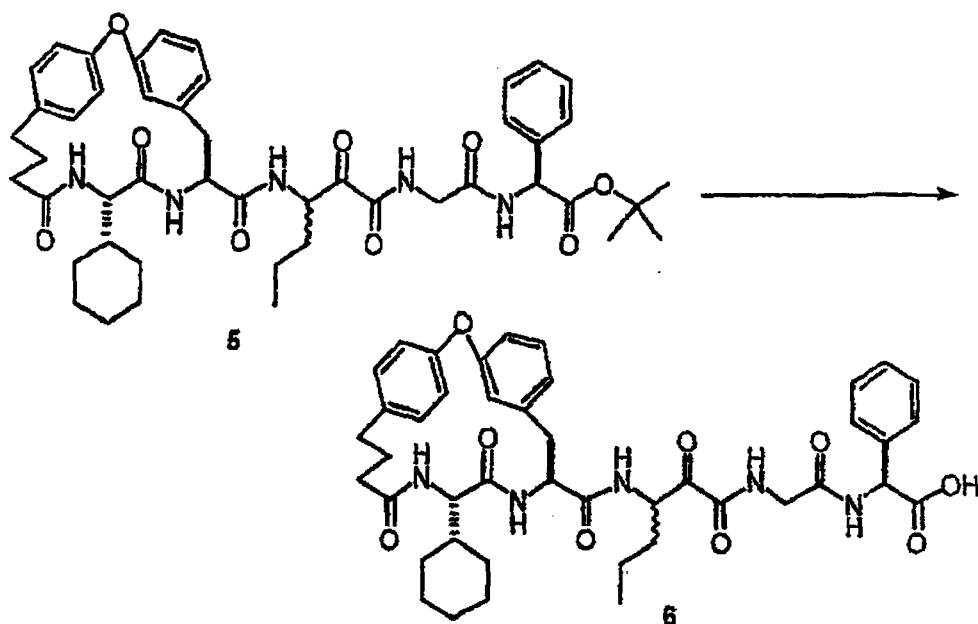
5 将醇 **5f** (177 mg, 0.21 mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10.0 mL) 溶液用 Dess-Martin 试剂 (178 mg, 0.42 mmol, 2.0 当量) 处理。将该反应混合物在室温下搅拌 3 小时并将该混合物在真空中浓缩。将残余物经层析 ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:49) 纯化, 得到氧化的产物 **5** (23 mg, 13%), 为无色固体。MS: (电喷雾,  $m/z$  相对强度): 870  $[(M+\text{CH}_3\text{OH}+1)^+]$ , 50], 838  $[(M+1)^+]$ , 100].

10

实施例 6: 式 6 化合物的制备:

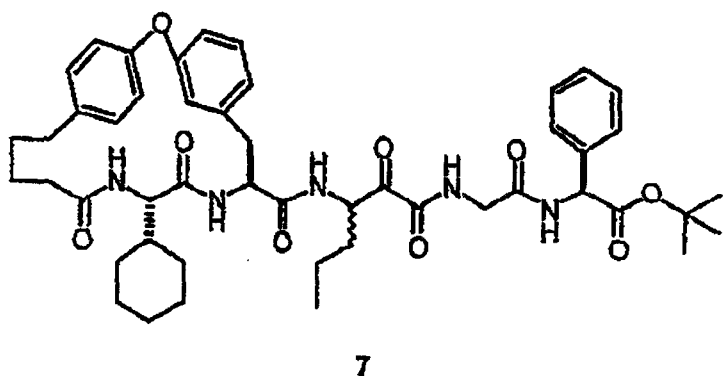


步骤 A:



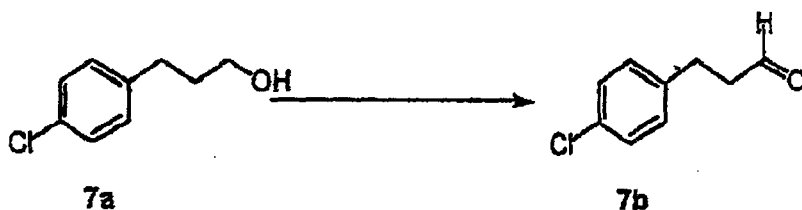
5 将叔丁基酯 5 (50.0 mg, 60.0  $\mu\text{mol}$ ) 的溶液用 TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1, 4 mL) 处理并在室温下搅拌 7 小时。使所述酯相对于基线消失, 之后进行 TLC ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:24)。完成脱保护后将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物用庚烷 (4.0 mL) 反复处理并浓缩, 得到白色固体 6 (14 mg, 100%)。MS: (电喷雾,  $m/z$  相对强度): 782  $[(M+1)^+, 100]$ 。

实施例 7: 式 7 化合物的制备:



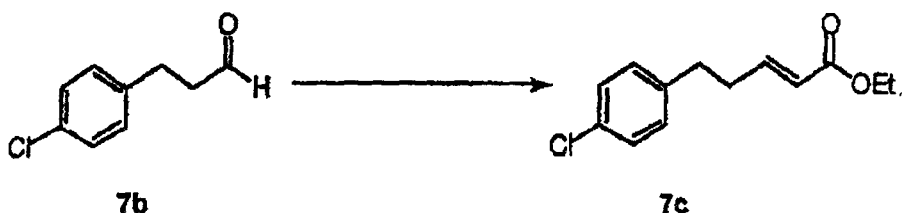
10

## 步骤 A:



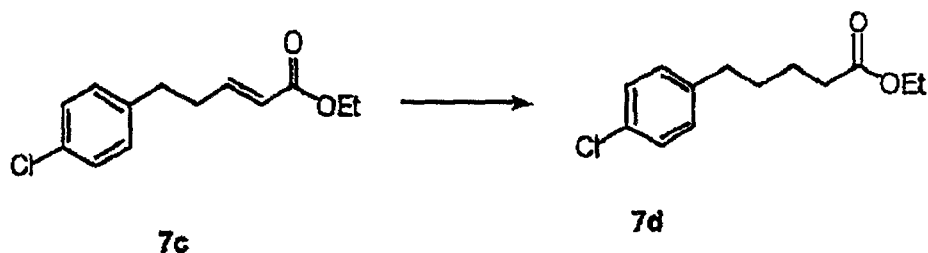
将醇 **7a** (9.2 g, 54.1 mmol) 的无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 mL) 溶液用 DMSO (35 mL) 和  $\text{Et}_3\text{N}$  (16.4 g, 16.3 mmol, 23.4 mL) 处理。将该反应混合物冷却至  $0^\circ\text{C}$  并用溶于 DMSO (30 mL) 中的  $\text{Py} \cdot \text{SO}_3$  (12.9 g, 81.2 mmol, 1.50 当量) 处理。将该反应混合物在  $0^\circ\text{C}$  下搅拌 0.5 小时并在室温下搅拌 6 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并用  $\text{Et}_2\text{O}$  (100 mL) 和  $\text{H}_2\text{O}$  (200 mL) 稀释。分离各层并用  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x 100 mL) 萃取含水层。用  $\text{HCl}$  (2M, 3 x 100 mL)、盐水 (1 x 100 mL) 萃取合并的有机层, 在真空中浓缩并经层析 ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{EtOAc}$ /己烷 1:7) 纯化, 得到醛 **7b**, 其放置后固化为蜡状固体 (7.1 g, 77%)。对于  $\text{C}_9\text{H}_9\text{ClO}$  的 CHN 计算值: C = 64.11%, H = 5.38%; 实测值: C = 64.08%, H = 5.30%。

## 步骤 B:



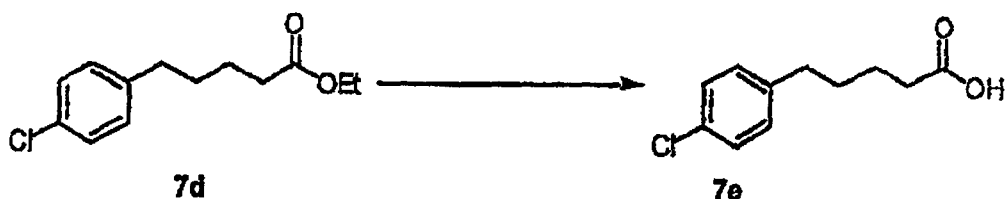
在  $0^\circ\text{C}$  下, 将 thiethylphosponoacetate (6.72 g, 30 mmol, 1.2 当量) 的无水 THF (100 mL) 溶液用  $\text{NaH}$  (60% 分散体, 1.5 g, 35 mmol, 1.4 当量) 处理。将该反应混合物在  $25^\circ\text{C}$  下搅拌 1 小时直至不再放出  $\text{H}_2$ 。加入醛 **7b** (4.2 g, 25.0 mmol) 的无水 THF (5.0 mL) 溶液并将该反应混合物搅拌 36 小时。将反应混合物用  $\text{H}_2\text{O}$  (100 mL) 稀释并用  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x 70 mL) 萃取。干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ) 合并的有机层, 过滤, 在真空中浓缩并层析, 得到  $\alpha,\beta$ -不饱和酯 **7c** (4.2 g, 71%), 其用于还原作用。

## 步骤 C:



5 将 $\alpha,\beta$ -不饱和酯 7c (4.2 g, 8.0 mmol)的 EtOAc (50 mL)溶液用 Pd/C (10% w/w, 500 mg)处理并在 50 psi 下氢化 12 小时。将该反应混合物通过硅藻土塞子过滤并在真空中浓缩滤液, 得到还原的化合物 7d (3.9 g, 93 %).

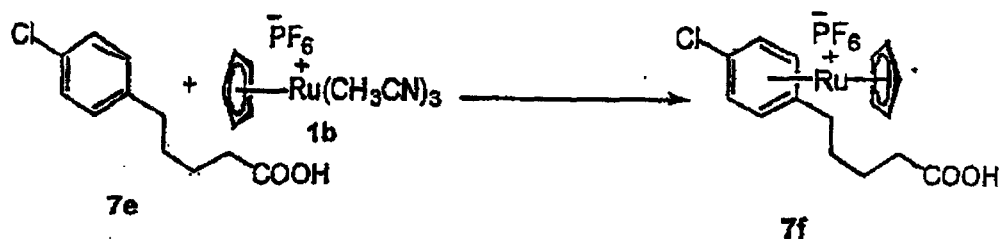
## 步骤 D:



10 将所述酯 7d (3.9 g, 16.2 mmol)的  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1:0.1, 110 mL)溶液用  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (1.2 g, 30 mmol, 2.0 当量)处理并在室温下搅拌 5 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物用  $\text{H}_2\text{O}$  (100 mL)稀释, 萃取进  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x 50 mL)中。将含水层酸化至  $\text{pH} \sim 1$  (13 M HCl)并用  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x 100 mL)萃取混浊的含水层。干燥( $\text{MgSO}_4$ )合并的有机层, 过滤并在真空中浓缩, 得到无色固体 7e (3.1 g, 96 %)。对于  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{ClO}_2$  的 CHN 计算值: C = 62.12%, H = 6.16%; 实测值: C = 62.27%, H = 6.23%。

15

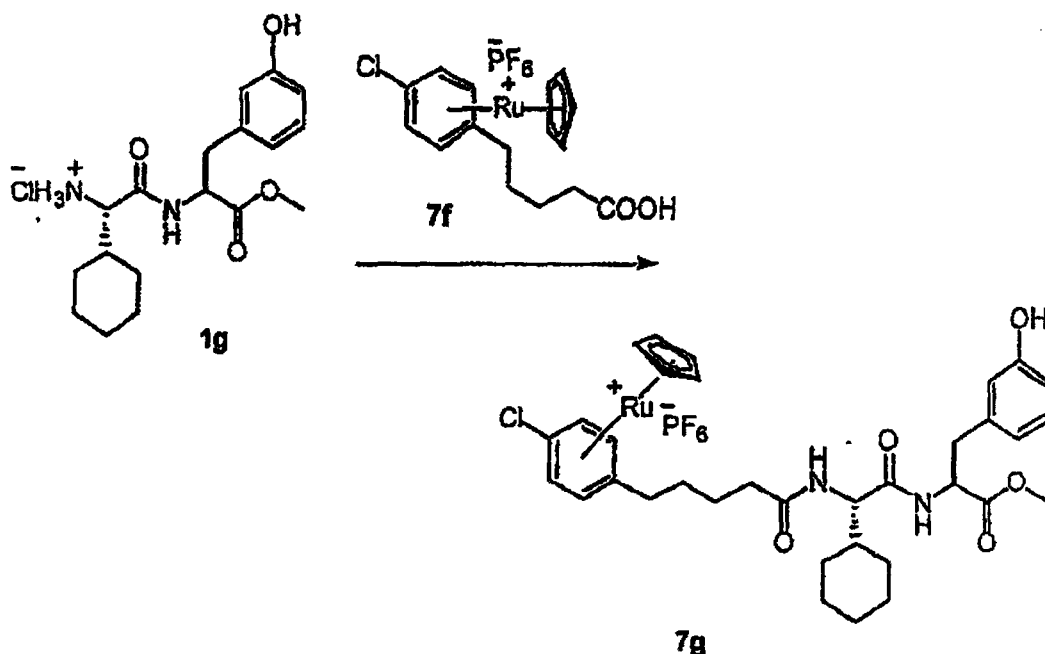
## 步骤 E:



5 将4-氯代苯基戊酸 7e (3.0 g, 14.15 mmol)的二氯乙烷(150 mL)溶液用 CpRu (CH<sub>3</sub>CN)<sub>3</sub>PF<sub>6</sub> 1b (6.75 g, 15.10 mmol, 1.0 当量)处理并在回流下加热 2.5 小时。将该反应混合物冷却至 0℃并过滤。在真空中浓缩滤液并溶于 CH<sub>3</sub>CN (20 mL)中,用大量过量的 Et<sub>2</sub>O 处理。经透析乙醚将分离出的树脂状物分离并将残余物溶于 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:1, 100 mL)中,在真空中浓缩得到 7f, 为棕色树脂状物,其可以固化(4.36 g, 58 %)。MS: (电喷雾, m/z 相对强度): 379 [(M-PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>, 100]。

10

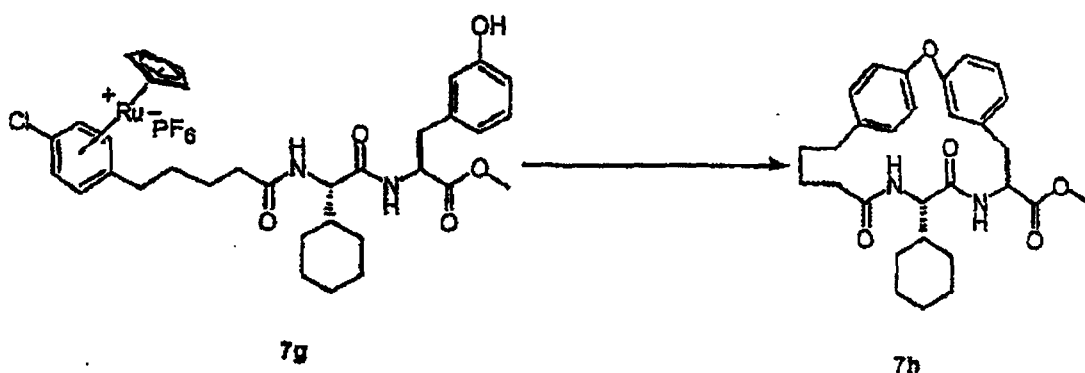
## 步骤 F:



将羧酸 7f (3.12 g, 5.95 mmol)的无水 DMF (20 mL)溶液用 Hünigs base (3.07 g, 24.0 mmol, 4.0 当量, 4.4 mL)和 HOBt (1.2 g, 8.93 mmol, 1.5 当量)处理。将反应混合物冷却至 0℃并用 EDCl (1.35 g, 7.43 mmol, 1.25

当量)处理并搅拌1小时。向所述反应混合物中加入胺盐酸盐 **1g** (2.65 g, 7.14 mmol, 1.2 当量)并将反应混合物在室温下搅拌 12 小时。蒸馏出 DMF 并将残余物用水稀释, 用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 萃取含水层。用 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液、HCl 水溶液、盐水萃取合并的有机层, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤, 在真空中浓缩, 所述粗制产物 **7g** (4.3 g)没有纯化用于进一步的环化作用。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>4</sub>-CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, δ, ppm) 7.35 (t, 1H), 6.72-6.60 (m, 5H), 6.33-6.20 (dd, 2H), 5.51 (s, 5H), 4.19 (d, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.19-2.83 (m, 2H), 2.51-2.40 (m, 2H), 2.40-2.25 (m, 2H), 1.99-1.59 (m, 8H), 1.35-0.98 (m, 5H); MS (FAB, NBA-G/TG-DMSO, m/z 相对强度): 695.3 [(M-PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>, 100], 232 (20), 171 (30); HRMS 对于 C<sub>34</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>ClRu<sup>+</sup> (M-PF<sub>6</sub>) 的计算值 695.1832; 实测值 695.1845。

步骤 G:



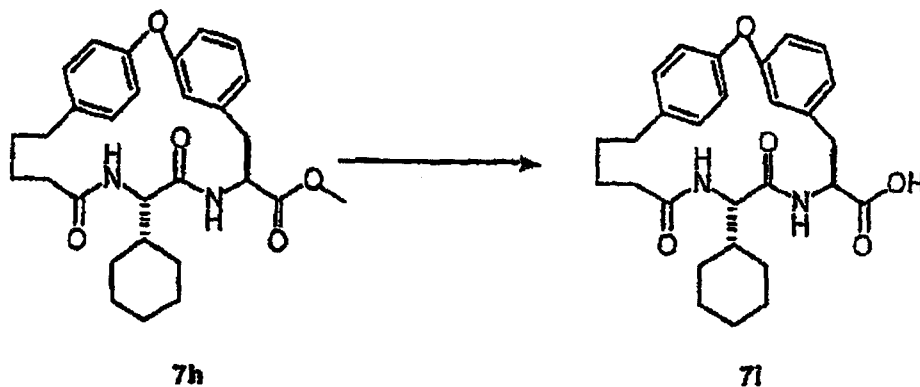
用干燥 N<sub>2</sub> 和 Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5.2 g, 16 mmol, 4.0 当量)将氯代化合物 **7g** (3.0 g, 3.6 mmol)的无水 DMF (300 mL)溶液脱气并在室温下搅拌 16 小时。馏出溶剂 DMF 并将残余物用水稀释, 用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 100 mL)萃取。干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)合并的有机层, 过滤, 在真空中浓缩并在真空中干燥过夜。它没有进一步纯化而用于光解除去 Ru。MS FAB (NBA-G/TG-DMSO) 695 [(M-PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>, 100]。

将来自上述步骤的环化化合物溶于 CH<sub>3</sub>CN (35 mL)中并在 Raynot (λ = 350 nm)中光解 48 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物经层析(SiO<sub>2</sub>, EtOAc/己烷 1:1)纯化, 得到褐色固体 **7h** (600 mg, 34

5 %).  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz,  $\delta$ , ppm) 7.58 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.14 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 6.94 (d, 2H,  $J = 8.4$  Hz), 6.87 (dd, 1H,  $J = 2.4, 5.6$  Hz), 6.73 (d, 1H,  $J = 7.2$  Hz), 6.59 (s, 1H), 6.57 (s, 2H), 6.39 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 4.51 (dt, 1H,  $J = 2.8, 8.0$  Hz), 3.80-3.62 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.05-3.00 (dd, 1H,  $J = 2.8, 11.6$  Hz), 2.85 (dd, 1H,  $J = 8.4, 6.0$  Hz), 2.76-2.72 (m, 1H), 2.36-2.19 (m, 3H), 2.02 (dd, 1H,  $J = 6.4, 9.2$  Hz), 1.8-1.73 (m, 1H), 1.61-1.34 (m, 7H), 1.41-0.71 (m, 7H). MS (FAB, NBA-G/TG-DMSO,  $m/z$  相对强度): 493  $[(M+1)^+]$ , 100], 465 (20), 232 (30), 171 (40); HRMS 对于  $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_5$   $(M+1)^+$  的计算值: 493.2702; 实测值: 493.2699.

10

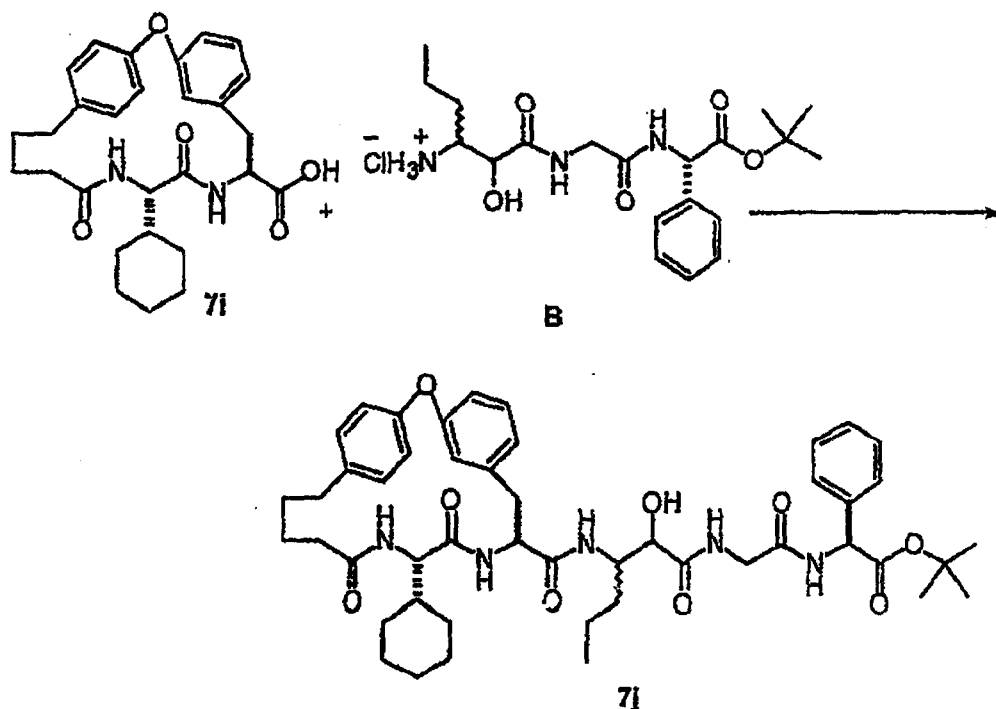
步骤 H:



15

将醚 7h (220 mg, 0.46 mmol) 在  $\text{CH}_3\text{OH}$  (3.0 mL)、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) 和  $\text{H}_2\text{O}$  (0.5 mL) 中的溶液用  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (18 mg, 0.44 mmol, 1.1 当量) 处理并在室温下搅拌 12 小时。将该反应混合物用  $\text{HCl}$  水溶液 (13 M, 1 mL) 酸化并在真空中浓缩, 得到酸 7i, 其没有进一步纯化直接用于偶合作用。

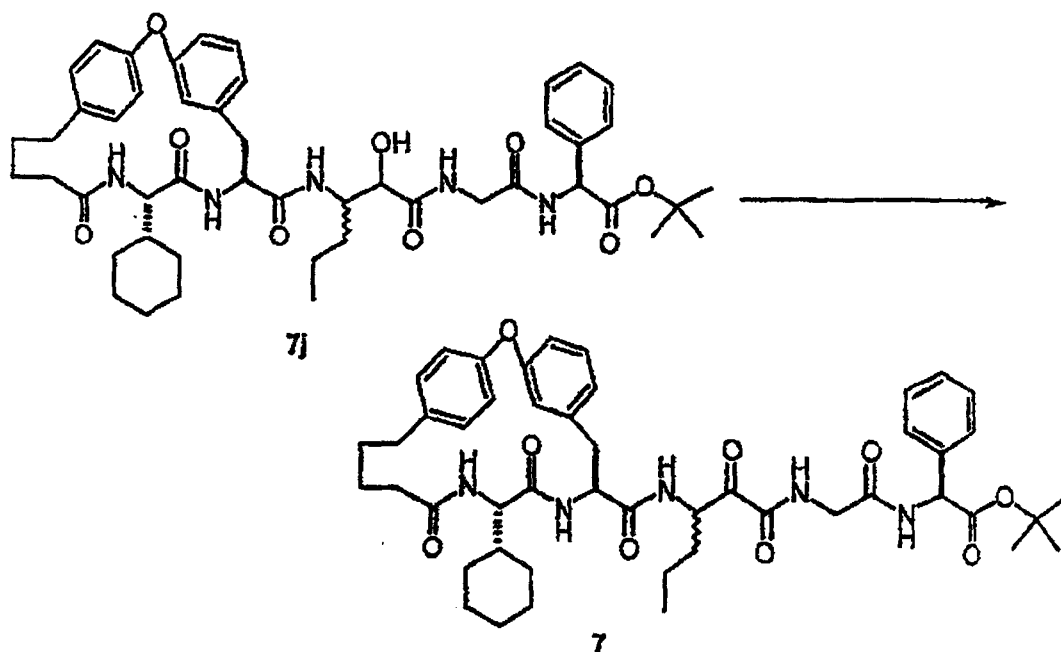
## 步骤 I:



5 将酸 7i 的无水 DMF (3.0 mL) 溶液用 HOOBt (94 mg, 0.75 mmol, 1.6 当量)、Hünigs base (237 mg, 1.84 mmol, 4.0 当量) 和胺 B (246 mg, 0.58 mmol, 1.47 当量) 处理。将该反应混合物冷却至 0°C 并用 EDCI (110 mg, 0.58 mmol, 1.25 当量) 处理, 在 0°C 下搅拌 25 分钟、12 小时。将该反

10 应混合物在真空中浓缩并用 H<sub>2</sub>O (30 mL) 稀释。用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL) 萃取合并的含水层。用 HCl 水溶液 (1M, 60 mL)、NaOH 水溶液 (60 mL) 萃取有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤, 在真空中浓缩得到无色固体 7j (230 mg), 其用于氧化作用。MS: (电喷雾, m/z 相对强度): 854 [(M+1)<sup>+</sup>, 100], 479 (70), 327 (50), 271.1 (100)。

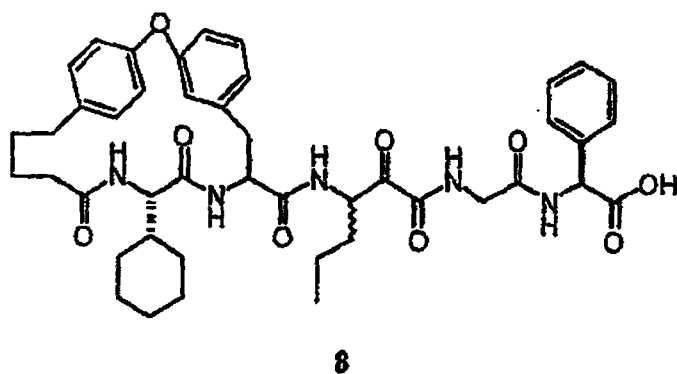
步骤 J:



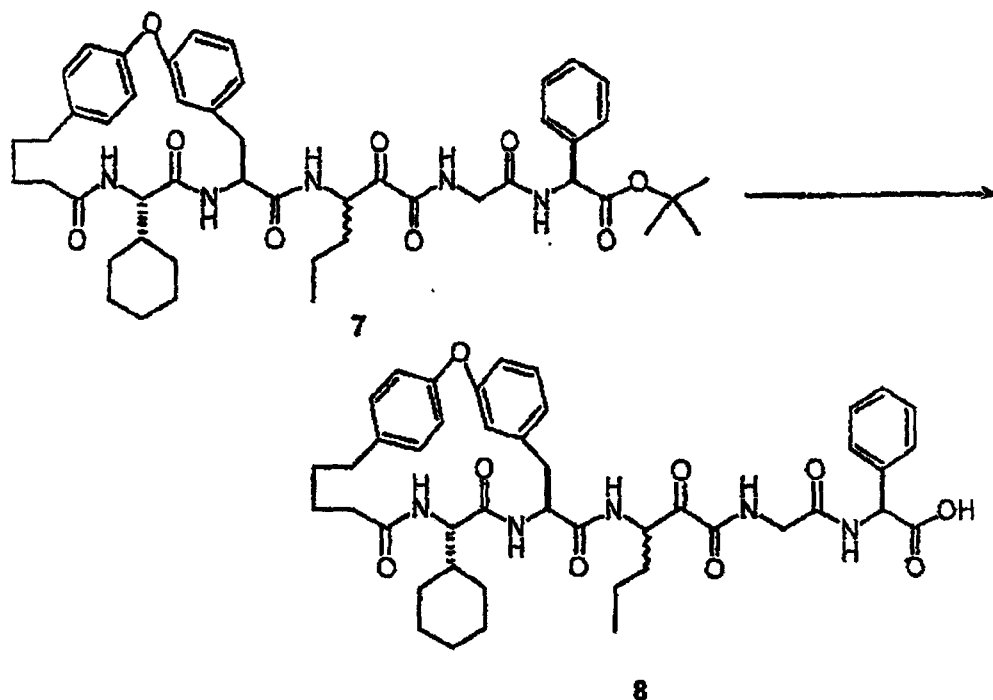
将醇 7j (220 mg, 0.26 mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3.0 mL) 溶液用 Dess-Martin 试剂 (218 mg, 0.51 mmol, 2.0 当量) 处理。将该反应混合物在室温下搅拌并将该混合物在真空中浓缩。将残余物经层析 ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:24) 纯化, 得到氧化产物 7 (23 mg, 13%), 为无色固体。MS: (FAB,  $m/z$  相对强度): 852  $[(M+1)^+$ , 43], 796 (100), 768 (20), 461 (20), 433 (50), 405 (50), 336 (30), 294 (50)。

10

实施例 8: 式 8 化合物的制备:



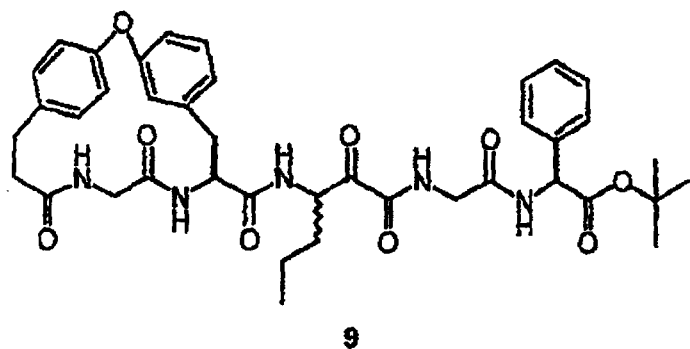
步骤 A:



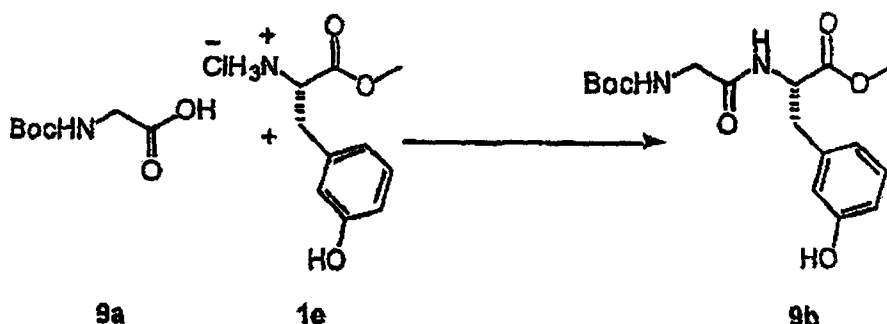
将叔丁基酯 7 (32.0 mg, 37.0  $\mu\text{mol}$ ) 的溶液用 TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1, 5.0 mL) 处理并在室温下搅拌 4 小时。使所述酯相对于基线消失, 之后进行 TLC ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:24)。完成脱保护后将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物用庚烷/ $\text{CH}_3\text{OH}$  (4.0 mL) 反复处理并浓缩, 得到褐色固体 8 (29.0 mg, 100 %)。MS: (电喷雾,  $m/z$  相对强度): 796 [(M+1)<sup>+</sup>, 100]。

10

实施例 9: 式 9 化合物的制备:

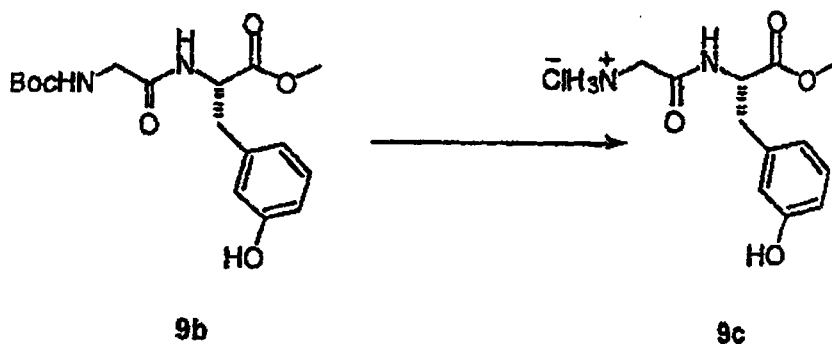


## 步骤 A:



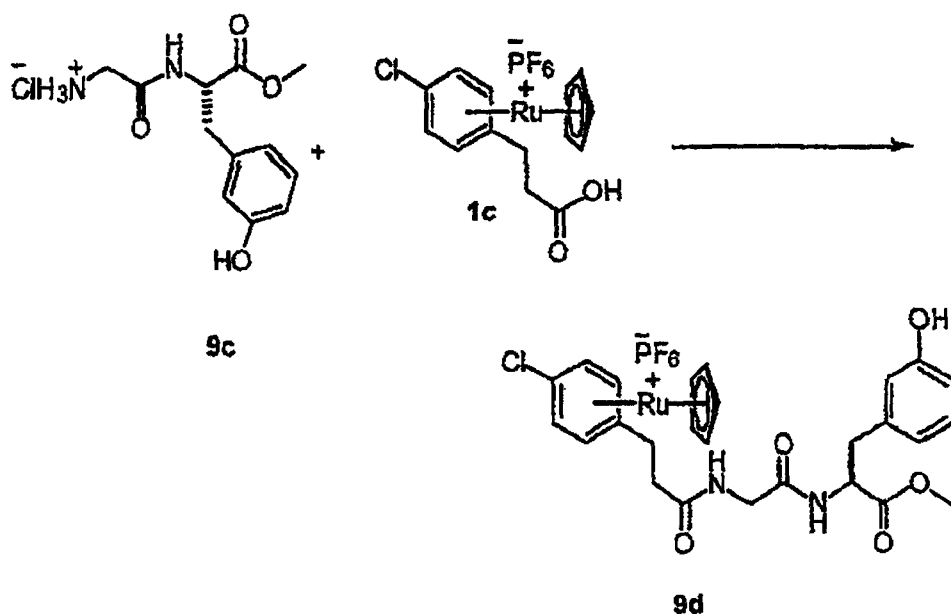
将 Boc-甘氨酸 9a (1.75 g, 10.0 mmol) 的无水 DMF (50 mL) 溶液用 HOOBt (2.65 g, 15 mmol, 1.5 当量) 和 EDCI (2.86 g, 15.0 mmol, 1.5 当量) 处理。将该反应混合物用 Hünigs base (5.16 g, 40 mmol, 4.0 当量, 7.3 mL) 处理。将该反应混合物搅拌 1 小时并加入间酪氨酸-OCH<sub>3</sub>·HCl 1e (2.5 g, 11.5 mmol, 1.1 当量), 在 25℃ 下搅拌 12 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物用 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液稀释, 萃取到 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中。浓缩合并的有机层并将残余物经层析(SiO<sub>2</sub>, EtOAc/乙烷 1:1) 纯化, 得到无色固体 9b (3.4 g, 90%)。

## 步骤 B:



将 9b (4.6 g, 13.06 mmol) 的 HCl (在二噁烷中的 4M 溶液, 50 mL) 溶液在室温下搅拌 3 小时。将反应混合物在真空中浓缩并将残余物在高真空中干燥, 得到为细粉末的 9c, 其用于下一步骤中。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz, δ, ppm) 8.67 (d, 1H, *J* = 7.9 Hz), 7.10-7.07 (m, 1H), 6.68-6.64 (m, 2H), 4.75-4.70 (m, 1H), 3.75-3.61 (m, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.10 (dd, 1H, *J* = 5.2, 8.5 Hz), 2.90 (dd, 1H, *J* = 8.8 Hz, 5.0 Hz)。

## 步骤 C:

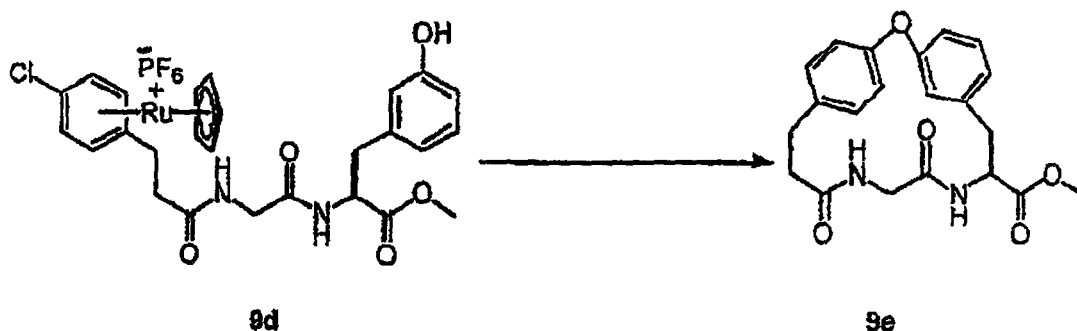


将[CpRu( $\eta^6$ -4-氯代苯基丙酸)]PF<sub>6</sub> 1c (3.0 g, 46.01 mmol)的无水 DMF (60 mL)溶液用 HOBT (1.3 g, 9.16 mmol, 1.5 当量)和 Hünigs base (3.22 g, 4.60 mL, 25.0 mmol, 4.0 当量)处理。将该反应混合物冷却至 0

5 °C并用 EDCl (1.75 g, 9.16 mmol, 1.5 当量)处理。将该反应混合物在 0 °C下搅拌 30 分钟并加入甘氨酸铵盐 9c (1.75 g, 6.06 mmol, 1.0 当量)。将该反应混合物在室温下搅拌 12 并在真空中蒸馏出 DMF。将残余物用 HCl 水溶液(1 M, 100 mL)稀释并萃取入 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 100 mL)。将合

10 并的有机层用 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液(1 x 100 mL)、盐水(50 mL)萃取, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤, 在真空中浓缩, 得到棕色固体 9d (1.5 g, 34 %), 其用于环化作用。MS: (电喷雾, m/z 相对强度): 585 [(M-PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>, 100], 459 (30), 373 (30), 198 (20)。

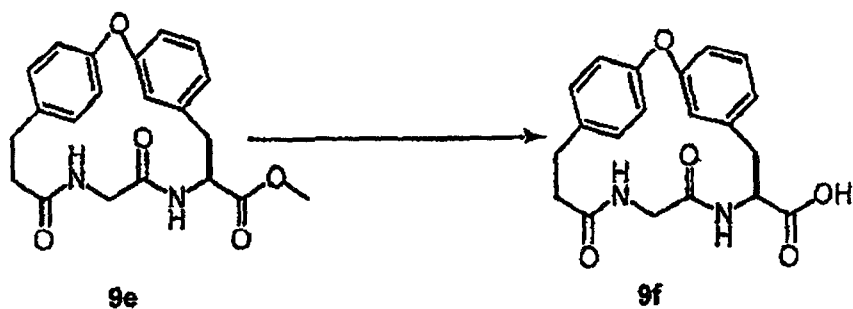
步骤 D:



在室温下用干燥  $N_2$  将钌络合物 **9d** (1.5 g, 2.05 mmol) 的无水 DMF (100 mL) 溶液脱气并加入  $Cs_2CO_3$  (5.0 g, 15 mmol, 7.5 当量), 在室温下  
 5 搅拌 12 小时。蒸馏除去溶剂 DMF 并将残余物用水 (100 mL) 稀释, 用  $CH_2Cl_2$  (3 x 100 mL) 萃取。用盐水 (100 mL) 萃取合并的有机层, 干燥 ( $Na_2SO_4$ ), 过滤, 在真空中浓缩并在真空中干燥过夜。它没有进一步纯化而用于光解除去 Ru。

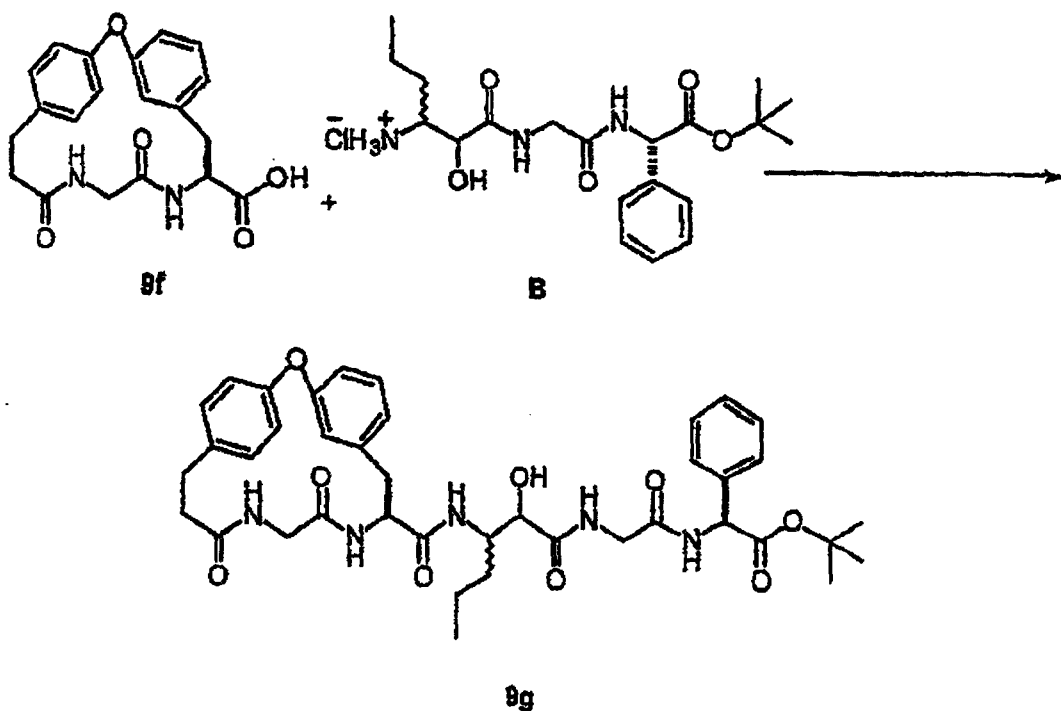
将来自上述步骤的环化化合物溶于  $CH_3CN$  (30 mL) 中并过滤到石英管中。将该溶液脱气并在 Raynot ( $\lambda = 350$  nm) 中光解 48 小时。将该  
 10 反应混合物在真空中浓缩并将残余物经层析 ( $SiO_2$ , EtOAc) 纯化, 得到褐色固体 **9e** (230 mg, 30%)。 $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz,  $\delta$ , ppm) 7.23-7.18 (m, 2H), 7.09-7.01 (m, 3H), 6.76 (dd, 1H,  $J = 2.4, 8.8$  Hz), 6.66 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 6.47 (d, 1H,  $J = 5.6$  Hz), 6.17 (s, 1H), 5.64 (s, 1H), 4.69  
 15 (q, 1H,  $J = 4.4$  Hz), 3.77 (s, 3H), 3.68-3.51 (m, 2H), 3.35 (dd, 1H,  $J = 4.0, 10.8$  Hz), 3.05 (dd, 1H,  $J = 5.2, 9.2$  Hz), 2.96-2.92 (m, 2H), 2.61-2.56 (m, 1H), 2.30-2.29 (m, 1H);  $^{13}C$  NMR: ( $CDCl_3$ , 100 MHz,  $\delta$  ppm) 172.3, 171.4, 168.1, 159.9, 155.4, 137.6, 136.4, 131.0, 130.0, 129.5, 123.3, 122.4, 121.0, 117.7, 117.1, 53.6, 53.0, 43.6, 39.9, 36.1, 32.3。MS (电喷雾,  $m/z$   
 20 相对强度): 383 [ $(M+1)^+$ , 100], 279 (20)。

## 步骤 E:



5 在室温下将环状化合物 **9e** (150 mg, 0.4 mmol) 在 THF (4.0 mL)、 $H_2O$  (4.0 mL) 中的溶液与  $LiOH \cdot H_2O$  (41.0 mg, 1.0 mmol, 2.5 当量) 一起搅拌 3 小时。将该反应混合物用浓 HCl (2.0 mL) 酸化并在真空中浓缩。在真空中干燥固体 **9f** 并且没有进一步纯化而将其用于进一步的偶合作用。

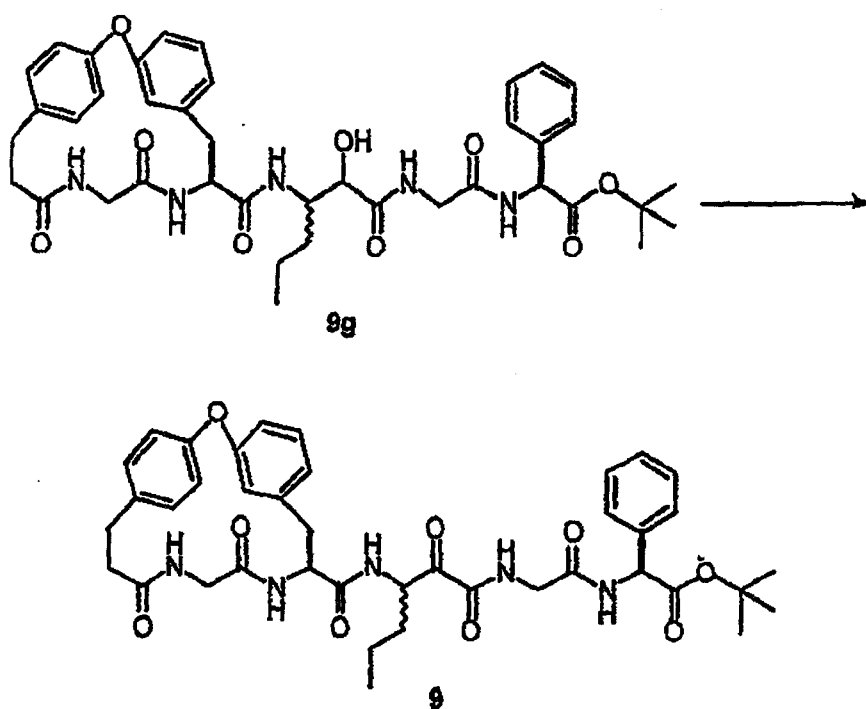
## 步骤 F:



10 将水解的酸 **9f** 在无水的 DMF (4.0 mL) 和  $CH_2Cl_2$  (4.0 mL) 中的溶液用 HOObt (103 mg, 0.58 mmol, 1.5 当量) 处理并冷却至  $0^\circ C$ , 加入 Hünig's base (206 mg, 1.60 mmol, 4.0 当量, 295  $\mu L$ )。向该混合物中加入 EDCI

(112 mg, 0.58 mmol, 1.5 当量)并将该反应混合物在 0℃ 下搅拌 0.5 小时, 用胺盐酸盐 **B** (206 mg, 0.48 mmol, 1.2 当量)处理。将该反应混合物贮存在冰箱中 48 小时并在真空中浓缩除去 DMF 和 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>。将残余物用 HCl 水溶液(2M)稀释并用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(3 x 50 mL)萃取。将合并的有机层用 HCl 水溶液(1M, 3 x 50 mL)、NaOH 水溶液 (2M)、盐水(100 mL)萃取, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)并在真空中浓缩。不经进一步纯化而将残余物 **9g** (200 mg)氧化。

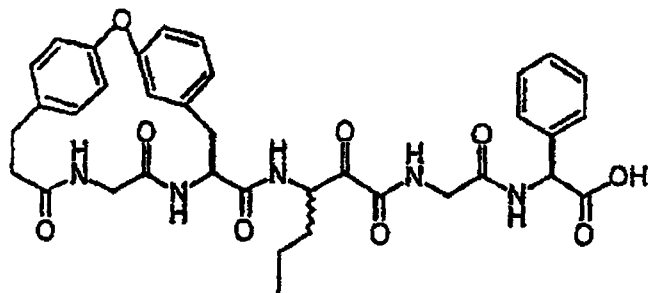
步骤 G:



10 将醇 **9g** (200 mg, 0.27 mmol)的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.0 mL)溶液用 Dess-Martin 试剂(342 mg, 0.81 mmol, 3.0 当量)处理。将该反应混合物在室温下搅拌 3 小时并用 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液和 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 水溶液稀释。将该反应混合物在室温下搅拌 20 分钟并将该反应混合物用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL)萃取。用盐水(50 mL)萃取合并的有机层, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤, 在真空中浓缩, 将残余物经层析(SiO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>OH (2M NH<sub>3</sub>)/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:19)纯化, 得到酮酰胺 **9** (100 mg, 50 %), 为无色固体。MS: (电喷雾, *m/z* 相对强度): 742 ([M+1]<sup>+</sup>, 100), 686 (80)。

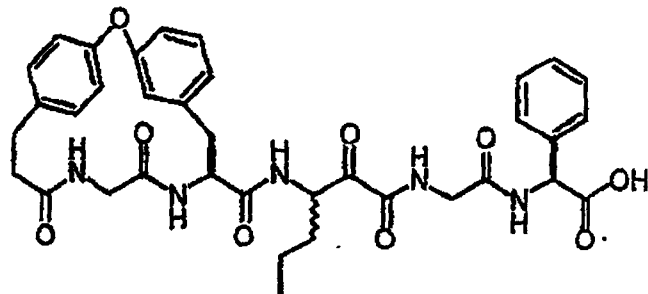
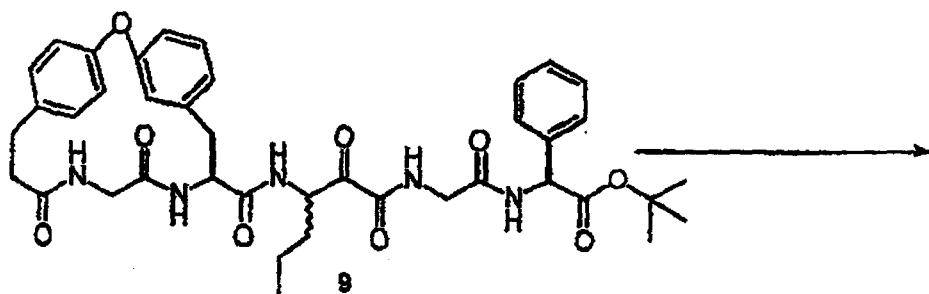
15

### 实施例 10: 式 I0 化合物的制备



10

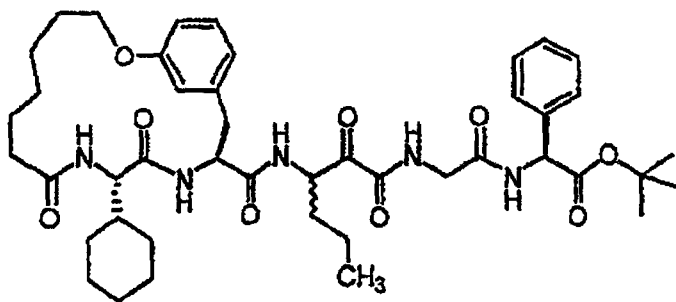
#### 步骤 A:



10

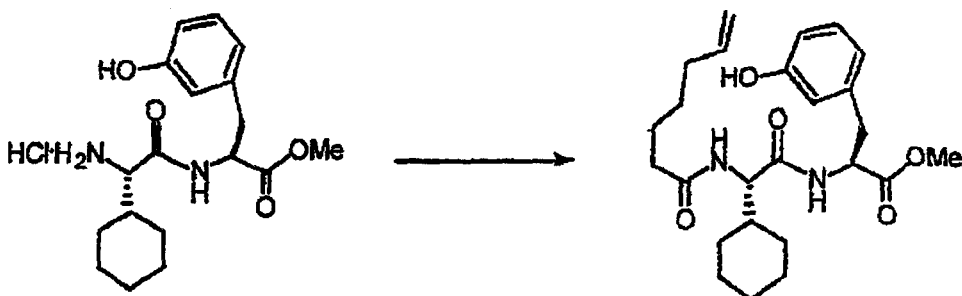
- 5 将叔丁基酯 9 (100 mg, 0.13 mmol) 的无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4.0 mL) 溶液用 TFA (4.0 mL) 处理并在室温下搅拌 5 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物反复溶解于甲苯/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中并在真空中浓缩数次, 得到细的无色固体 10。MS: (FAB, NBA/DMSO,  $m/z$  相对强度): 686  $[(M+1)^+$ , 40], 460 (20), 307 (100), 289 (60); HRMS 对于  $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_9$   $(M+1)^+$  的计算值: 686.2825; 实测值: 686.2840。
- 10

## 实施例 11: 式 11 化合物的制备



11

## 步骤 A:



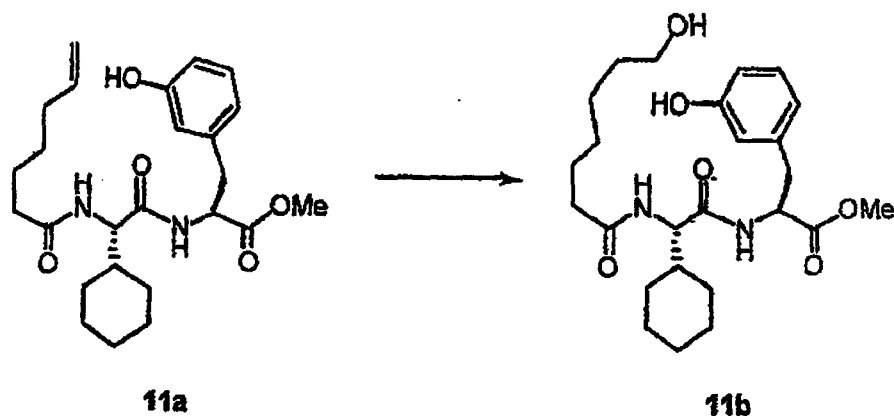
1g

11a

- 5 在 $-20^{\circ}\text{C}$ 下, 向胺盐酸盐 **1g** (1.20 g, 3.23 mmol)、6-庚烯酸(0.610 g, 4.68 mmol)、HOObt (0.765 g, 4.69 mmol)和 EDCl (1.07 g, 5.58 mmol)在无水 DMF (50 mL)和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL)中的溶液中加入 NMM (1.55 mL, 14.1 mmol)。在此温度下搅拌 30 分钟后, 将该反应混合物保存在冰箱中 18 小时。然后将其温热至室温。加入 EtOAc (150 mL)、盐水(50 mL)
- 10 和 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (50 mL)。分层后, 将该有机溶液用 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (80 mL)、饱和碳酸氢钠水溶液(2 x 80 mL)、水(80 mL)和盐水(80 mL)洗涤, 用硫酸镁干燥, 过滤并在真空中浓缩。快速层析(2-5% MeOH- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), 得到 **11a** (1.46 g, 3.28 mmol, 定量), 为白色固体。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO)  $\delta$  9.25 (s, 1H), 8.31 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.70 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 7.05-7.01 (m, 1H), 6.62-6.58 (m, 3H), 5.82-5.72 (m, 1H), 5.02-4.91 (m, 1H), 4.43-4.38 (m, 1H), 4.23-4.19 (m, 1H), 3.55 (s, 3H), 2.93-2.80 (m, 2H), 2.51-1.97 (m, 2H), 1.66-0.86 (m, 15H);  $^{13}\text{C}$  NMR: ( $\text{d}_6$ -DMSO, 125
- 15

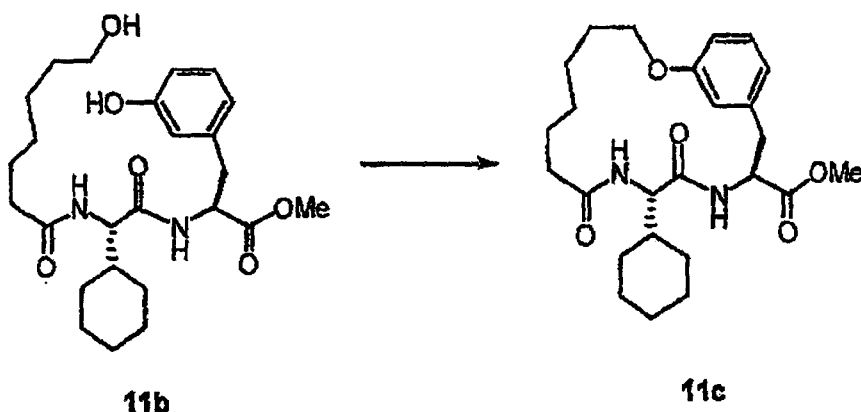
MHz),  $\delta$  171.9, 171.8, 171.1, 157.2, 138.6, 138.4, 129.1, 119.5, 115.8, 114.6, 113.5, 56.5, 53.5, 51.6, 36.5, 34.8, 32.8, 29.0, 28.0, 27.8, 25.8, 25.5, 24.8; HRMS,  $m/z$  445.2683 (对于  $C_{25}H_{36}N_2O_5$  的计算值: 445.2702, 误差: 4 ppm).

5 步骤 B:



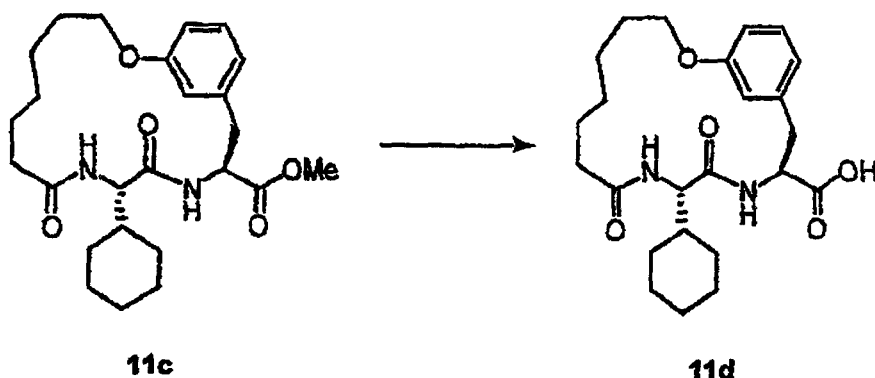
在氮气氛、0℃下,小心地向 11a (1.46 g, 3.28 mmol) 的无水 THF (60 mL) 溶液中加入硼烷-THF 溶液 (12 mL, 1.0 M, 12 mmol)。将得到的溶液在 0℃、氮气氛下搅拌 1 小时 40 分钟。然后加入乙醇 (4 mL) 和 pH 7 缓冲液 (8 mL), 随后加入 30 %  $H_2O_2$  水溶液 (7.5 mL)。在 0℃ 下搅拌 20 分钟后, 将其加温至室温并搅拌 2 小时。加入 EtOAc (200 mL) 和盐水 (100 mL) 并分离各层。用 EtOAc (2 x 150 mL) 萃取含水溶液。用硫酸镁干燥合并的有机溶液, 过滤并在真空中浓缩。快速层析 (2-5 % MeOH- $CH_2Cl_2$ ), 得到 11b (1.05 g, 2.18 mmol, 68 %), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $d_6$ -DMSO)  $\delta$  9.25 (s, 1H), 8.30 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 7.68 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 7.05-7.01 (m, 1H), 6.62-6.58 (m, 3H), 4.43-4.18 (m, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.37-3.33 (m, 2H), 2.93-2.80 (m, 2H), 2.20-2.03 (m, 2H), 1.66-0.87 (m, 19H); <sup>13</sup>C NMR ( $d_6$ -DMSO, 125 MHz),  $\delta$  172.1, 171.8, 171.2, 157.2, 138.4, 129.1, 119.5, 115.8, 113.5, 60.7, 56.5, 53.5, 51.7, 36.5, 35.1, 32.6, 32.4, 29.0, 28.5, 28.0, 25.8, 25.6, 25.4, 25.2; HRMS,  $m/z$  463.2813 (对于  $C_{25}H_{36}N_2O_5$  的计算值: 463.2808, 误差: 1 ppm)。

步骤 C:



在 0℃ 向酚醇 **11b** (1.00 g, 2.16 mmol) 和三正丁基膦 (1.10 mL, 4.28 mmol) 在无水 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) 和 THF (40 mL) 中的溶液中加入 ADDP (1.08 g, 4.28 mmol)。在 0℃ 下搅拌 1 小时后，将该溶液加温至室温并在氮气氛围下搅拌 3 小时。TLC 指示原料完全消耗。在真空中除去溶剂后，将残余物经快速层析 (0-3 % MeOH 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液) 部分纯化，得到大环化合物 **11c** (650 mg, 1.46 mmol, 68 %)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) δ 8.58 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.18-7.14 (m, 1H), 6.76-6.65 (m, 3H), 4.77-4.71 (m, 1H), 4.32 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.97-3.93 (m, 1H), 3.82-3.78 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.18-3.14 (m, 1H), 2.98-2.92 (m, 2H), 2.32-2.25 (m, 1H), 2.02-2.01 (m, 1H), 1.99-0.87 (m, 19H); <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 125 MHz), δ 172.1, 171.6, 171.4, 160.1, 158.8, 139.0, 129.1, 121.1, 113.0, 111.9, 66.4, 56.1, 52.0, 50.1, 40.6, 34.9, 34.2, 28.7, 28.3, 26.8, 26.3, 25.9, 25.5, 25.2, 24.2; HRMS, *m/z* 445.2685 (对于 C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的计算值: 445.2702, 误差: 4 ppm)。

## 步骤 D:



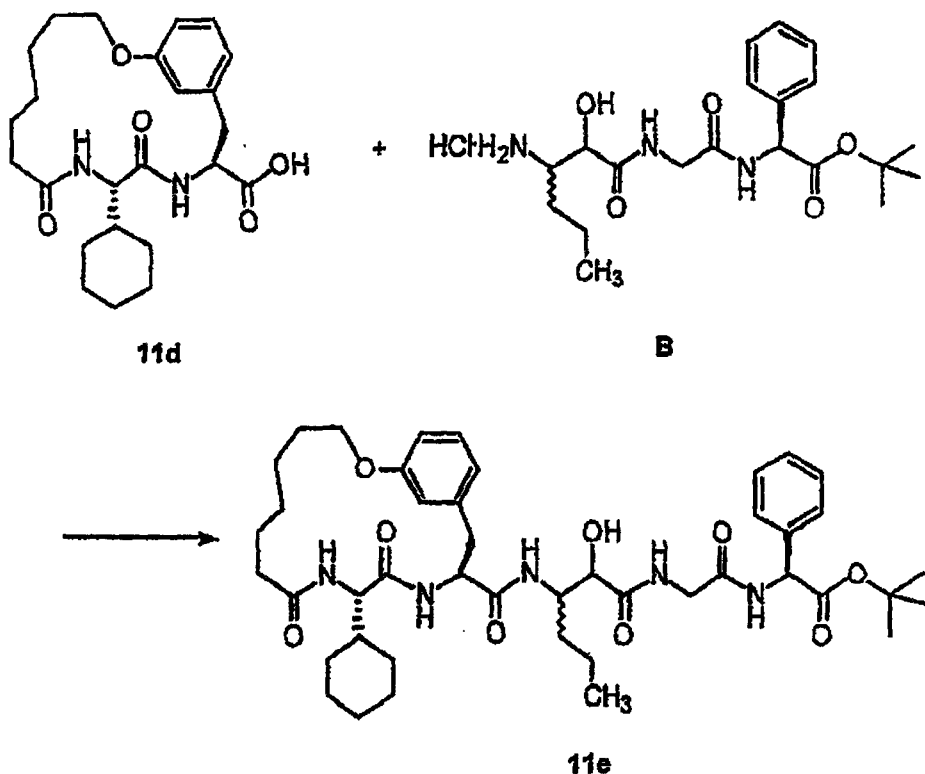
在室温下, 将氢氧化锂水溶液(70 mg, 15 mL H<sub>2</sub>O, 2.92 mmol)加入到甲基酯 **11c** (330 mg, 0.742 mmol) 在 THF (20 mL) 和乙醇(10 mL) 中的溶液中。将该混合物在室温下搅拌 3 小时。由 TLC 监测该反应过程。

5 将该溶液在真空中浓缩后, 加入 EtOAc (100 mL)、6 N HCl 溶液(10 mL) 和水(50 mL) 并分离各层。用 EtOAc (2 x 80 mL) 萃取含水溶液。合并有机溶液、经硫酸镁干燥, 过滤并在真空中浓缩, 得到 **11d** (260 mg, 0.604 mmol, 81 %), 为白色固体。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) δ 8.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.17-7.13 (m, 1H), 6.77-6.66 (m, 3H), 4.67-4.62 (m, 1H), 4.32-4.28 (m, 1H), 3.98-3.93 (m, 1H), 3.81-3.75 (m, 1H), 3.17-3.13 (m, 1H), 2.97-2.90 (m, 1H), 2.32-2.26 (m, 1H), 2.01-1.97 (m, 1H), 1.67-0.85 (m, 19H); <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 125 MHz), δ 173.2, 171.6, 171.3, 158.8, 139.3, 129.0, 121.1, 113.1, 111.9, 66.4, 56.1,

10 50.8, 35.1, 34.3, 28.8, 28.3, 26.9, 26.3, 25.9, 25.6, 25.5, 25.2, 24.2; HRMS, *m/z* 431.2564 (对于 C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 的计算值: 431.2546, 误差: 4 ppm)。

15

## 步骤 E:

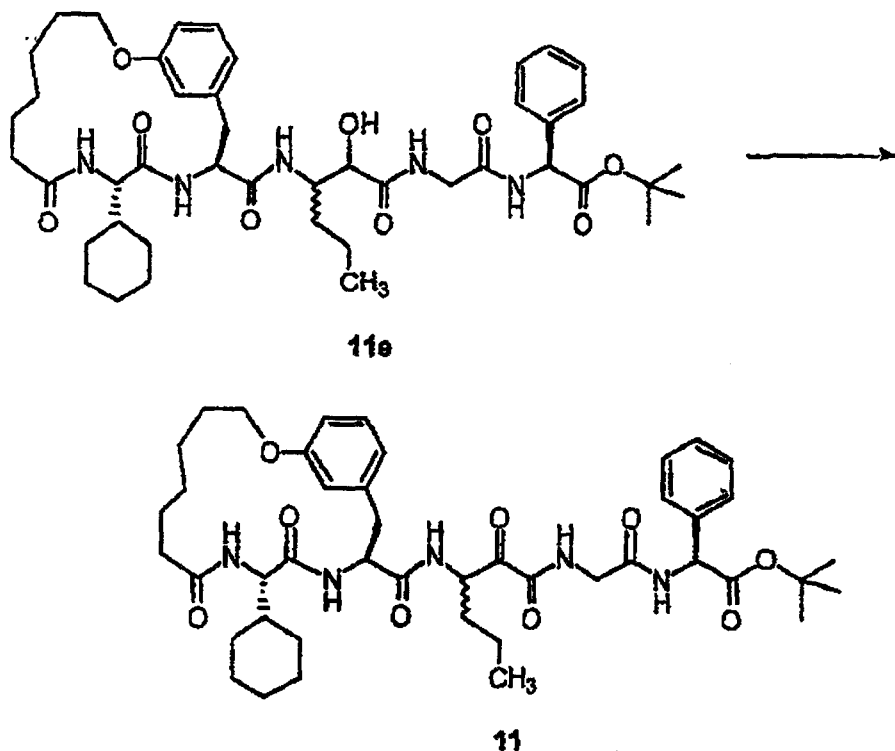


在 $-20^{\circ}\text{C}$ 下，向酸 **11d** (0.140 g, 0.325 mmol)、胺 **B** (0.140 g, 0.325 mmol)、HOObt (56 mg, 0.343 mmol)和EDCl (75 mg, 0.391 mmol)在无

5 水DMF (40 mL)和 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL)中的溶液中加入NMM (0.107 mL, 0.973 mmol)。在此温度下搅拌30分钟后，将该反应混合物保存在冰箱中18小时。然后加入EtOAc、盐水和5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ 。用5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ 、饱和碳酸氢钠水溶液、水和盐水顺序洗涤分离的有机溶液，经硫酸镁干燥，过滤并在真空中浓缩。快速层析(2-5% MeOH- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )得到

10 **11e**，为非对映异构体的混合物(0.170 g, 0.211 mmol, 65%)，为白色固体，其没有进一步纯化而用于下一步反应中。

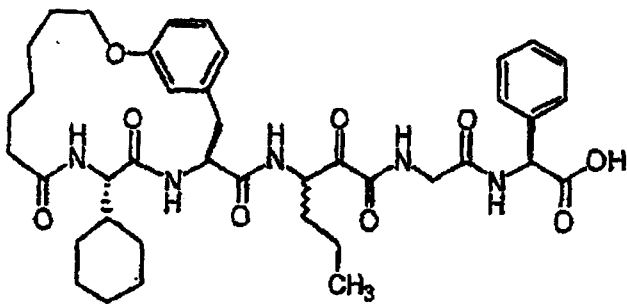
步骤 F:



在室温下,向羟基酰胺 11e (0.29 g, 0.36 mmol)和 Dess-Martin 试剂 (0.45 g, 1.06 mmol)的混合物中加入无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (60 mL)、DMF (3 mL) 和 DMSO (3 mL)。将得到的溶液在室温下剧烈搅拌 2.5 小时。加入多量的 Dess-Martin 试剂 (300 mg, 0.71 mmol)并将该反应混合物再搅拌 1 小时。加入饱和碳酸氢钠水溶液和亚硫酸氢钠溶液(各 40 mL)并将该混合物剧烈搅拌 10 分钟, 然后加入 EtOAc (200 mL)和水(30 mL)并分离各层。用 5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  溶液(2 x 100 mL)和饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液(100 mL)洗涤有机溶液, 经硫酸镁干燥, 过滤并在真空中浓缩。快速层析(1-5% MeOH- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )得到 11 (100 mg, 0.124 mmol, 35%), 为白色固体。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO)  $\delta$  8.79-8.69 (m, 2H), 8.36-8.16 (m, 2H), 7.72-7.68 (m, 1H), 7.42-7.33 (m, 5H), 7.17-7.13 (m, 1H), 6.77-6.63 (m, 3H), 5.30-5.27 (m, 1H), 5.09-5.04 (m, 1H), 4.85-4.76 (m, 1H), 4.29-4.25 (m, 1H), 3.98-3.74 (m, 1H), 3.02-2.85 (m, 2H), 2.32-2.27 (m, 1H), 2.04-1.96 (m, 1H), 1.72-0.81 (m, 35H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 125 MHz),  $\delta$  196.5, 196.2, 171.65, 171.61, 171.5, 171.14, 171.07, 169.4, 167.6, 160.7,

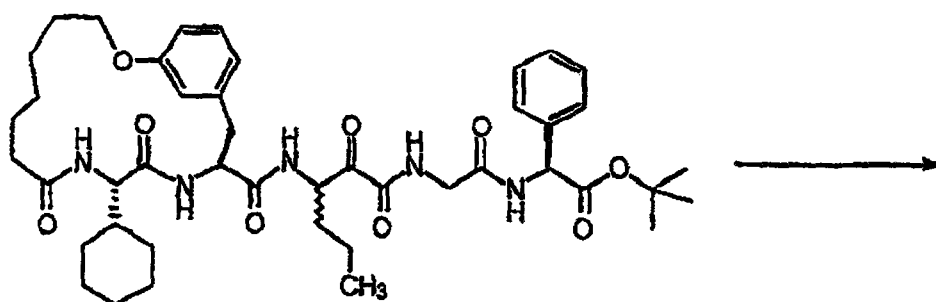
158.84, 158.79, 139.5, 139.3, 136.6, 136.5, 128.92, 128.90, 128.7, 128.6, 128.1, 127.7, 127.4, 124.9, 121.34, 121.28, 113.1, 112.9, 112.0, 111.9, 81.3, 66.34, 66.30, 56.92, 56.87, 56.3, 56.2, 53.4, 53.3, 51.5, 50.9, 41.5, 41.4, 40.8, 40.7, 36.6, 36.1, 34.4, 34.3, 31.8, 31.6, 30.4, 29.1, 28.9, 28.4, 5 28.3, 27.5, 26.8, 26.21, 26.17, 25.9, 25.59, 25.55, 25.0, 24.2, 18.74, 18.66, 13.5, 13.4; HRMS,  $m/z$  804.4542 (对于  $C_{25}H_{36}N_2O_5$  的计算值: 804.4548, 误差: 1 ppm).

### 实施例 12: 式 12 化合物的制备

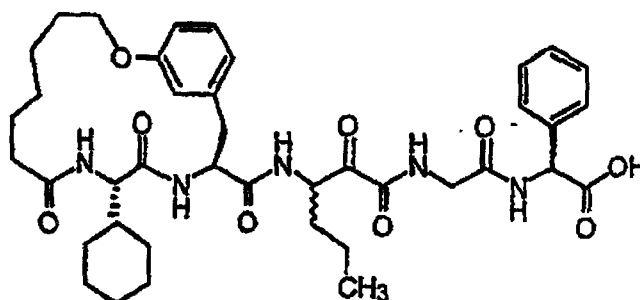


12

步骤 A:



11



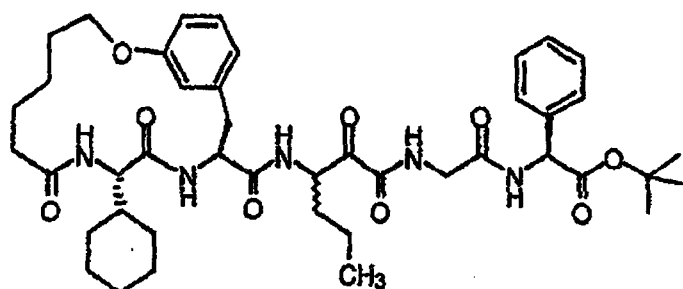
12

将叔丁基酯 11 (56.8 mg, 0.0706 mmol)在三氟乙酸(15 mL)和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (15 mL)中的溶液在室温下搅拌 4 小时。在真空中除去挥发性物  
 5 后,将残余物溶于 50 % MeOH- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL)中并在真空中浓缩至干燥,得到灰白色固体 12 (50 mg, 0.0669 mmol, 95 %).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO)  $\delta$  8.75-8.71 (m, 2H), 8.36-8.16 (m, 2H), 7.72-7.69 (m, 1H), 7.39-7.31 (m, 5H), 7.17-7.13 (m, 1H), 6.76-6.63 (m, 3H), 5.37-5.35 (m, 1H), 5.07-5.04 (m, 1H), 4.85-4.76 (m, 1H), 4.29-4.25 (m, 1H), 3.97-3.74  
 10 (m, 4H), 3.02-2.86 (m, 2H), 2.32-2.26 (m, 1H), 2.01-1.97 (m, 1H), 1.70-0.82 (m, 26H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO, 125 MHz),  $\delta$  196.5, 196.2, 171.63, 171.59, 171.52, 171.48, 171.1, 171.06, 167.4, 160.6, 158.82, 158.78, 153.4, 139.4, 137.1, 137.0, 128.91, 128.88, 128.7, 128.65, 128.61, 128.5, 128.43, 128.39, 128.33, 128.32, 128.14, 128.12, 128.0, 127.7, 128.7,  
 15 127.63, 127.59, 127.5, 127.4, 126.8, 121.3, 115.9, 113.1, 112.9, 112.8, 112.0, 111.9, 111.88, 66.33, 66.29, 56.3, 56.2, 56.17, 53.34, 53.31, 53.27, 51.1, 50.9, 41.5, 40.84, 40.77, 40.7, 40.6, 40.56, 40.53, 40.5, 38.7, 38.6,

38.56, 38.53, 36.6, 36.1, 34.4, 34.3, 31.8, 31.6, 29.4, 29.1, 29.0, e28.9, 28.4, 28.3, 28.2, 26.9, 26.8, 26.79, 26.20, 26.16, 25.88, 25.86, 25.79, 25.75, 25.71, 25.66, 25.57, 25.54, 25.4, 25.0, 24.2, 18.7, 18.6, 13.5, 13.4; HRMS,  $m/z$  748.3947 (对于  $C_{25}H_{36}N_2O_5$  的计算值: 748.3922, 误差: 3 ppm).

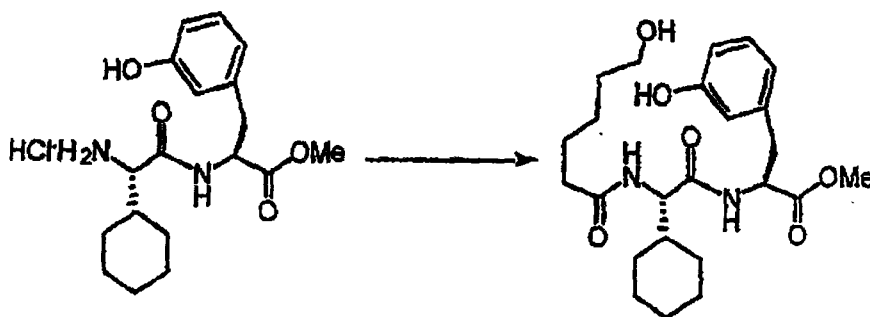
5

### 实施例 13: 式 13 化合物的制备



13

#### 步骤 A:



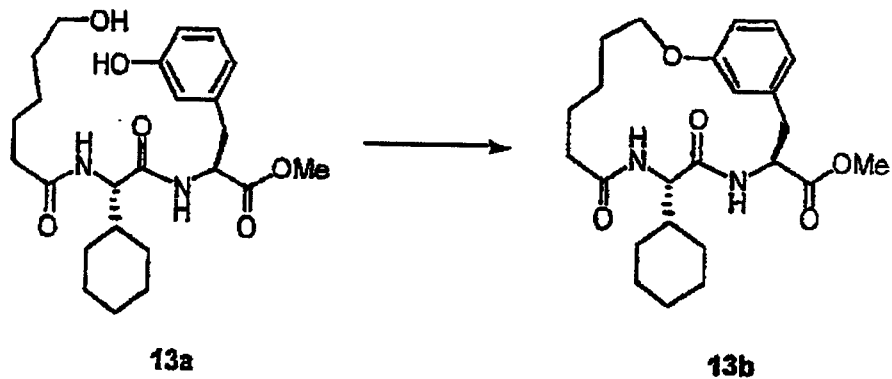
1g

13a

10

除了用 6-羟基己酸代替 6-庚烯酸(39%)外, 根据实施例 11、步骤 A的方法制备所需的化合物 13a。

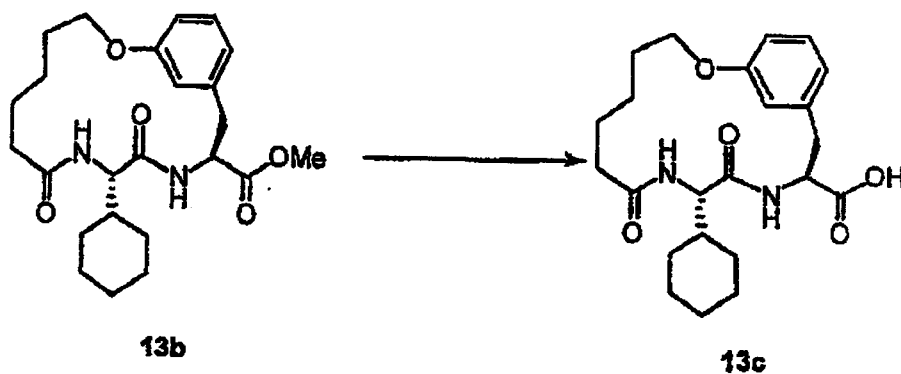
步骤 B:



根据实施例 11、步骤 C 的方法由 13a 制备所需的化合物 13b，产率 74%。

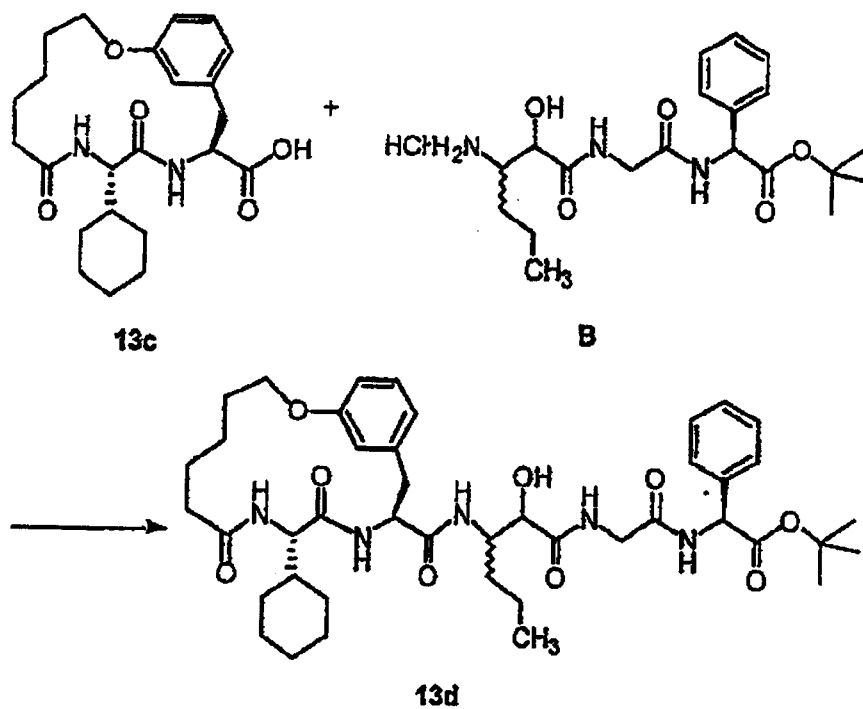
5

步骤 C:



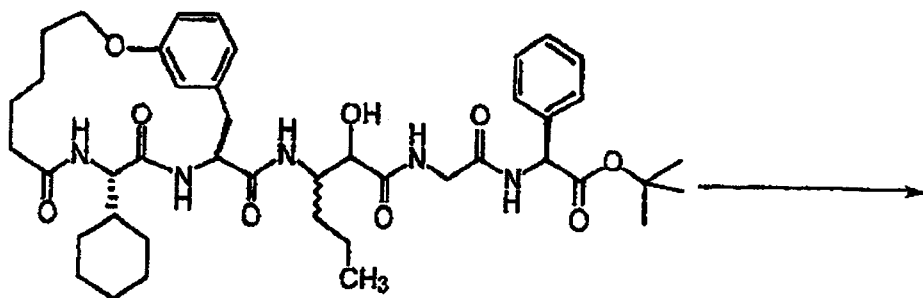
根据实施例 11、步骤 D 的方法，由相应的甲基酯 13b 制备所需的大环酸 13c，产率 88%，为白色固体。

步骤 D:

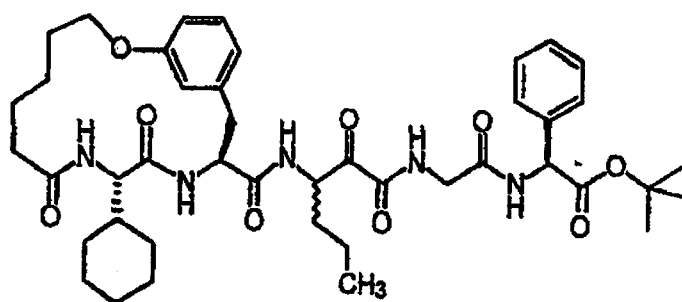


根据实施例 11、步骤 E 的方法，由 13c 和 B 制备所需的化合物 13d，产率 48%。

步骤 E:



13d

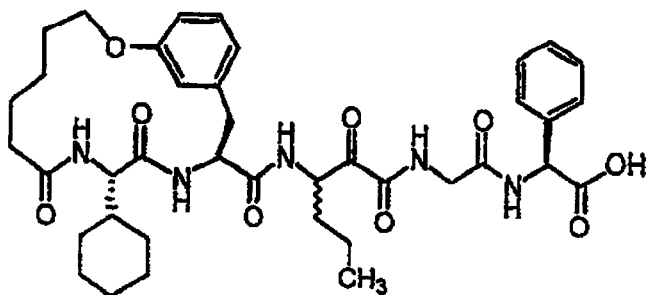


13

根据实施例 11、步骤 F 的方法，由 13d 制备所需的化合物 13，产率 70%。

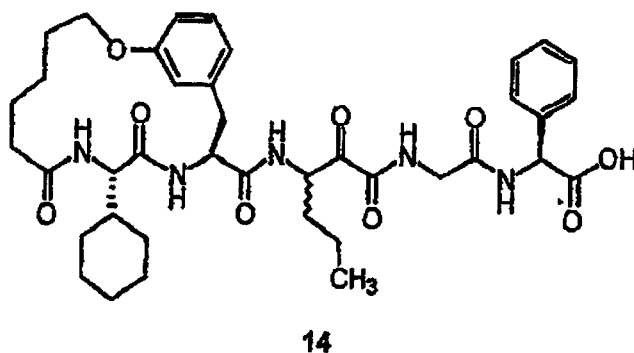
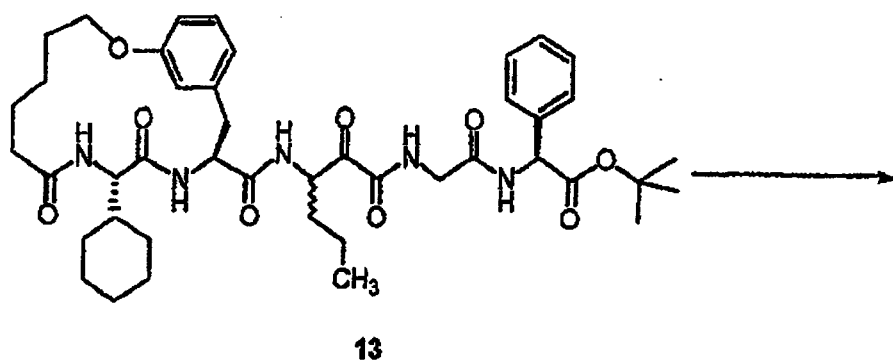
5

实施例 14: 式 14 化合物的制备



14

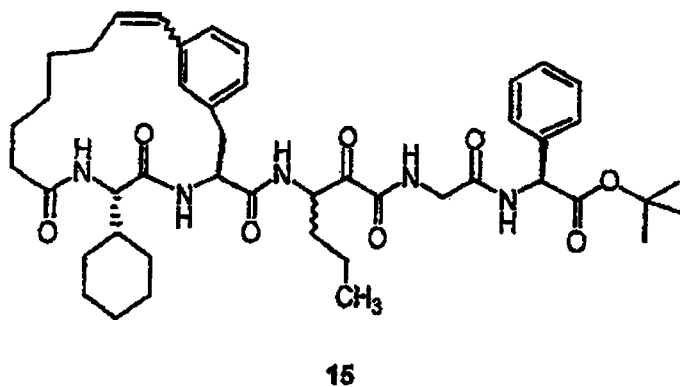
步骤 A:



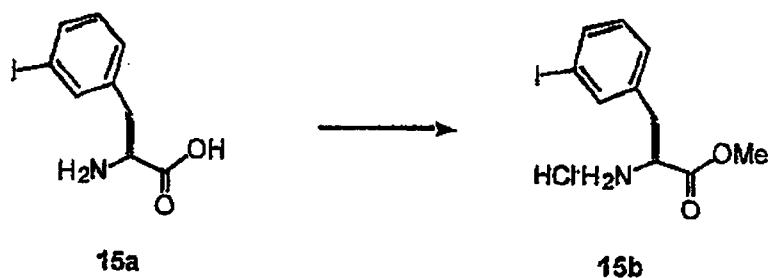
根据实施例 12、步骤 A的方法，以定量的产率由 13 制备所需的化合物 14。

5

实施例 15: 式 15 化合物的制备

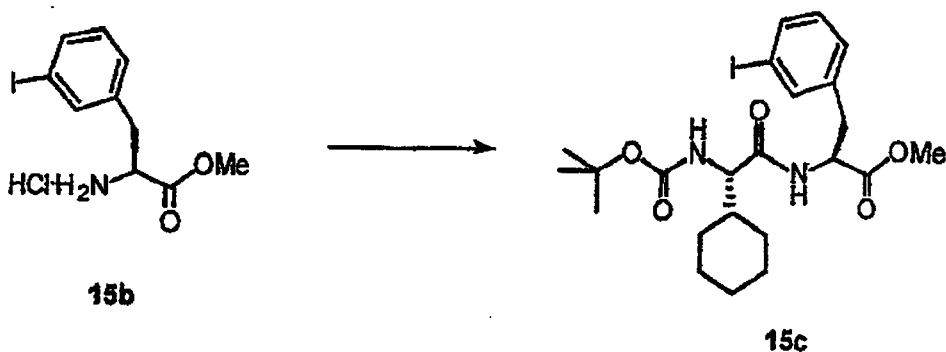


步骤 A:



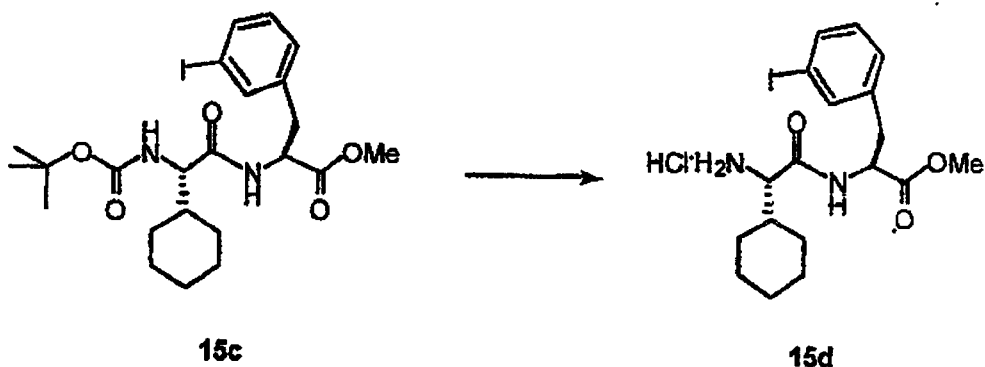
5 将 3-碘代-苯基丙氨酸(analine) 15a (2.50 g, 8.59 mmol)和浓盐酸(2 mL, 24 mmol)的甲醇溶液加热至回流 18 小时。在真空中除去溶剂, 得到白色固体 15b, 其没有进一步纯化而用于步骤 B 中。

步骤 B:



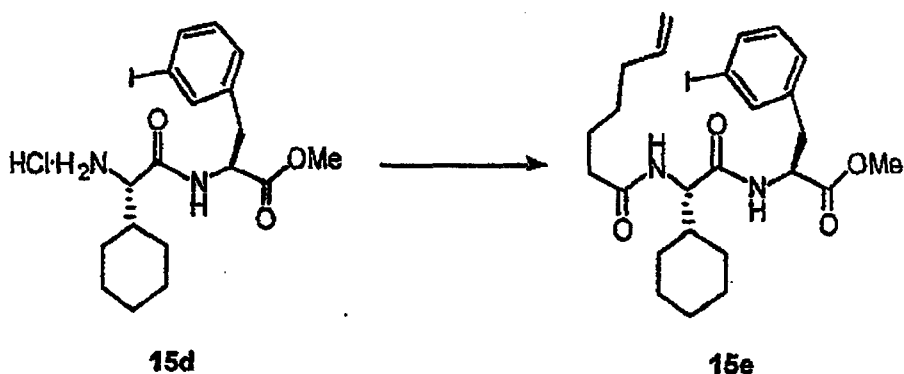
10 根据实施例 11、步骤 A 的方法, 由 15b 制备所需的化合物 15c, 产率 84 %。其没有进一步纯化而用于下一反应中。

步骤 C:



根据实施例 11、步骤 A 的方法, 由 15c 制备所需的化合物 15d(定量)。其没有进一步纯化用于下一反应中。

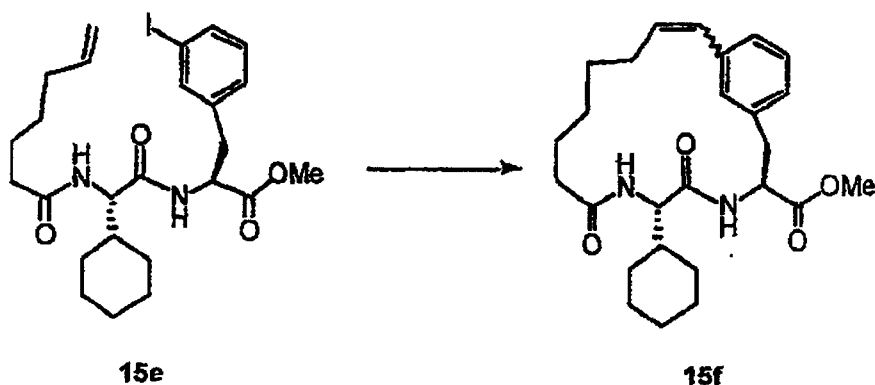
## 步骤 D:



根据实施例 11、步骤 A 的方法，由 **15d** 制备所需的化合物 **15e**，产率 68%。其没有进一步纯化用于下一反应中。

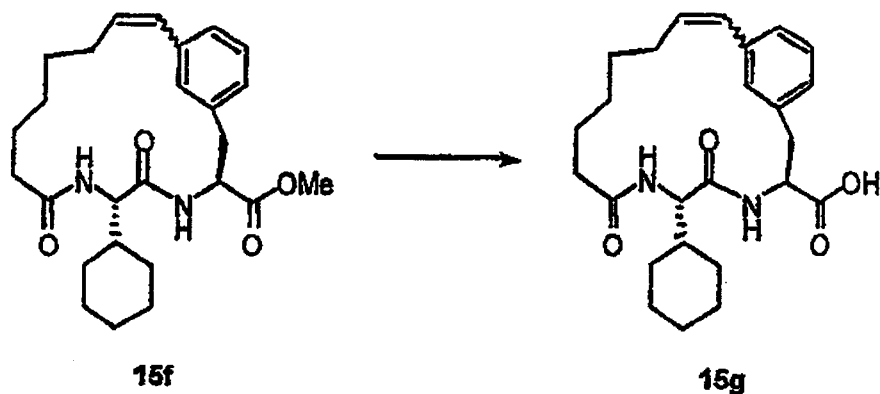
5

## 步骤 E:



10 将装在厚壁管中的 **15e** (1.16 g, 2.04 mmol)、三乙胺(2.90 mL, 20.6 mmol)在无水的乙腈(25 mL)和 DMF (20 mL)中的溶液经氩气起泡 5 分钟。在室温下向该溶液中快速加入四(三苯膦)钯(0) (235 mg, 0.203 mmol)。将该管用 Teflon 螺旋盖密封并在油浴中加热至 85-90°C。搅拌 3 小时后，将其冷却至室温，小心打开并倒在 EtOAc (100 mL)上。将该溶液用 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (4 x 50 mL)和水(50 mL)洗涤。经硫酸镁干燥有机层，过滤并在真空中浓缩。快速层析(1-4% MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)，得到大环化合物 **15f** (330 mg, 0.749 mmol, 37%)。

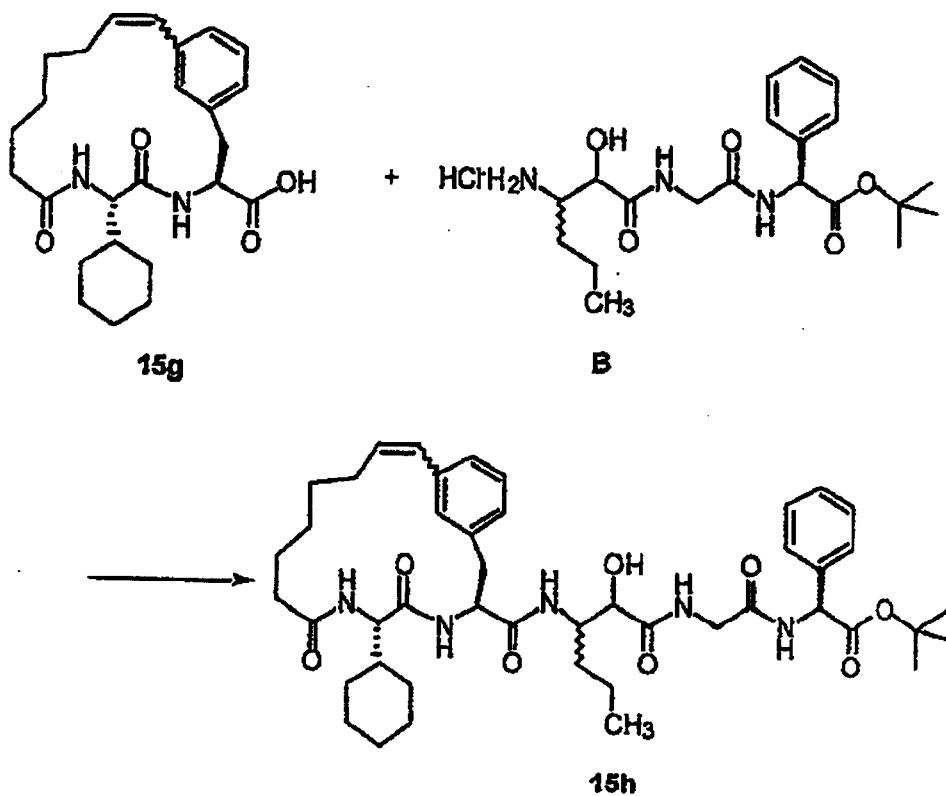
步骤 F:



根据实施例 11、步骤 D 的方法，由 **15f** 定量制备所需的化合物 **15g**。其没有进一步纯化用于下一反应中。

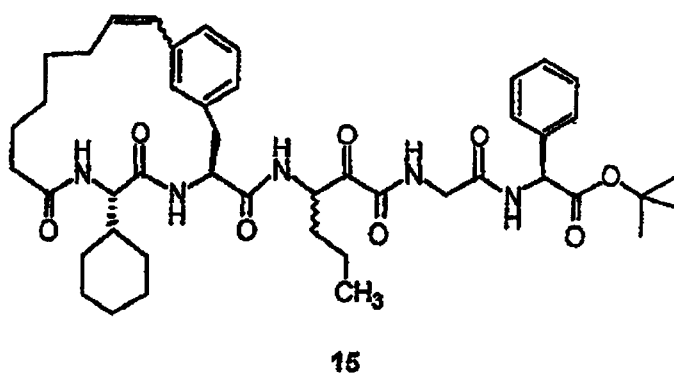
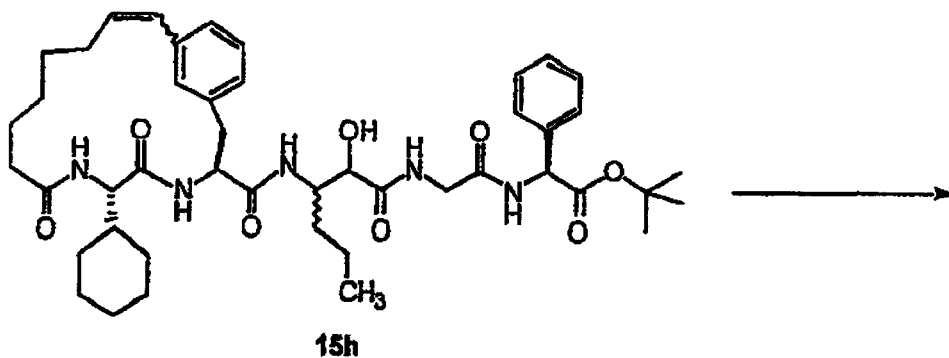
5

步骤 G:



根据实施例 11、步骤 F 的方法，由 **15g** 制备所需的化合物 **15h**，产率为 77%。其没有进一步纯化用于下一反应中。

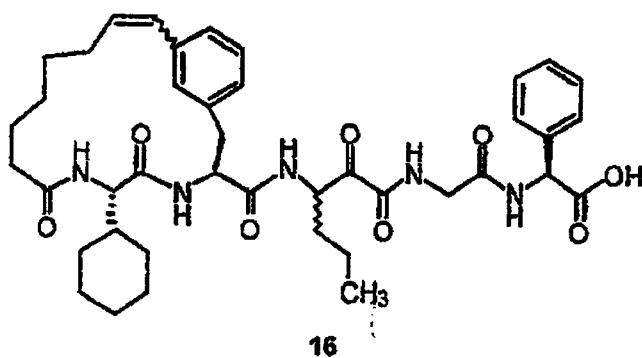
## 步骤 H:



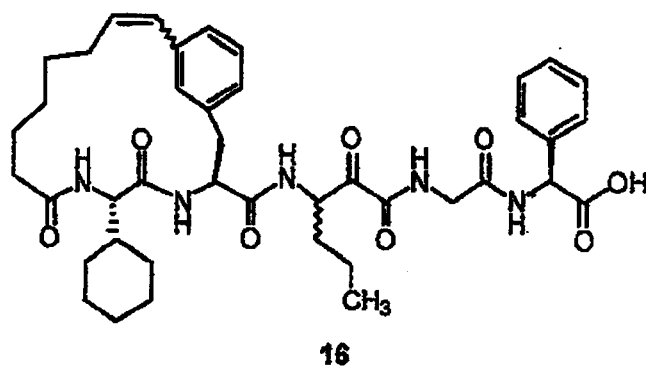
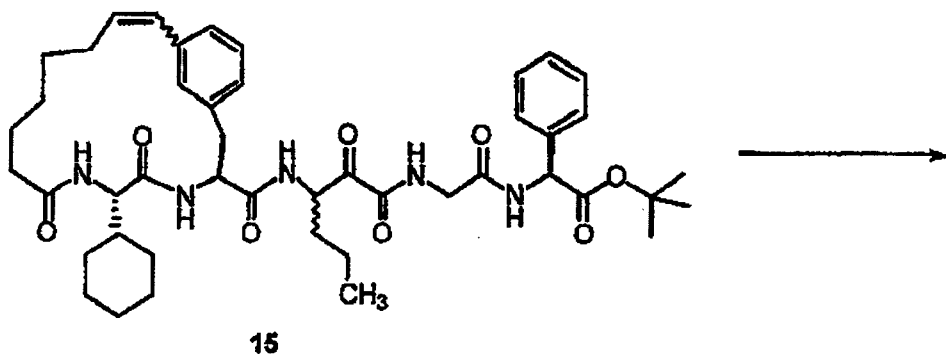
根据实施例 1、步骤 H的方法，由 15h 制备所需的化合物 15，产率为 55%。

5

## 实施例 16: 式 16 化合物的制备



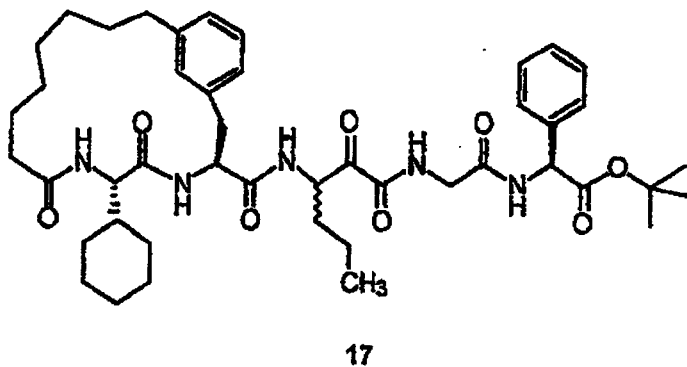
步骤 A:



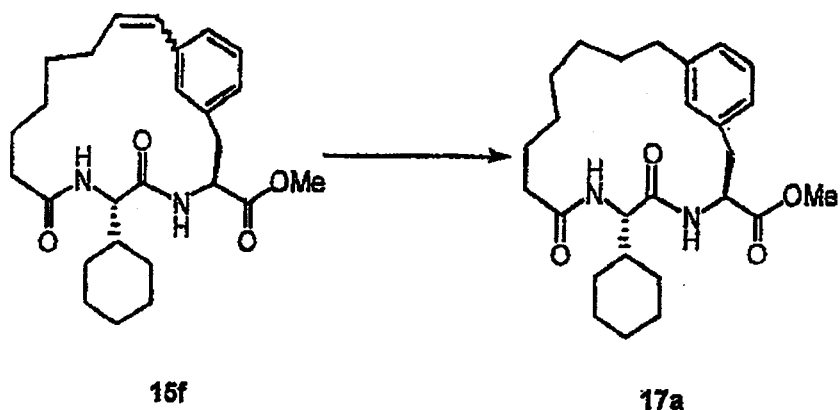
根据实施例 12、步骤 A 的方法，由 15 定量制备所需的化合物 16。

5

实施例 17: 式 17 化合物的制备

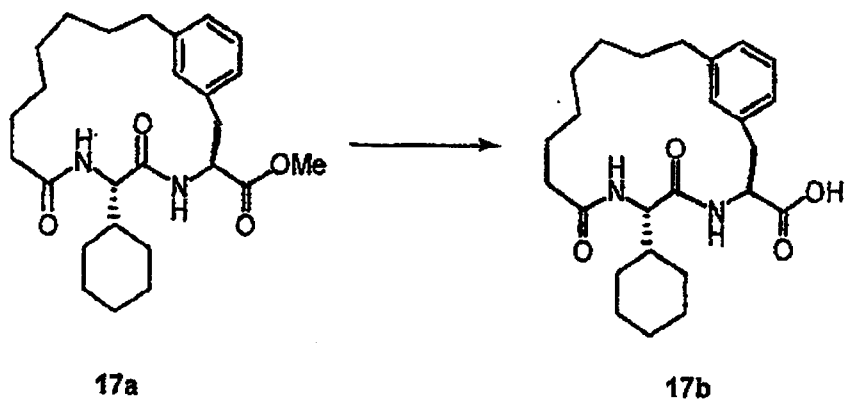


## 步骤 A:



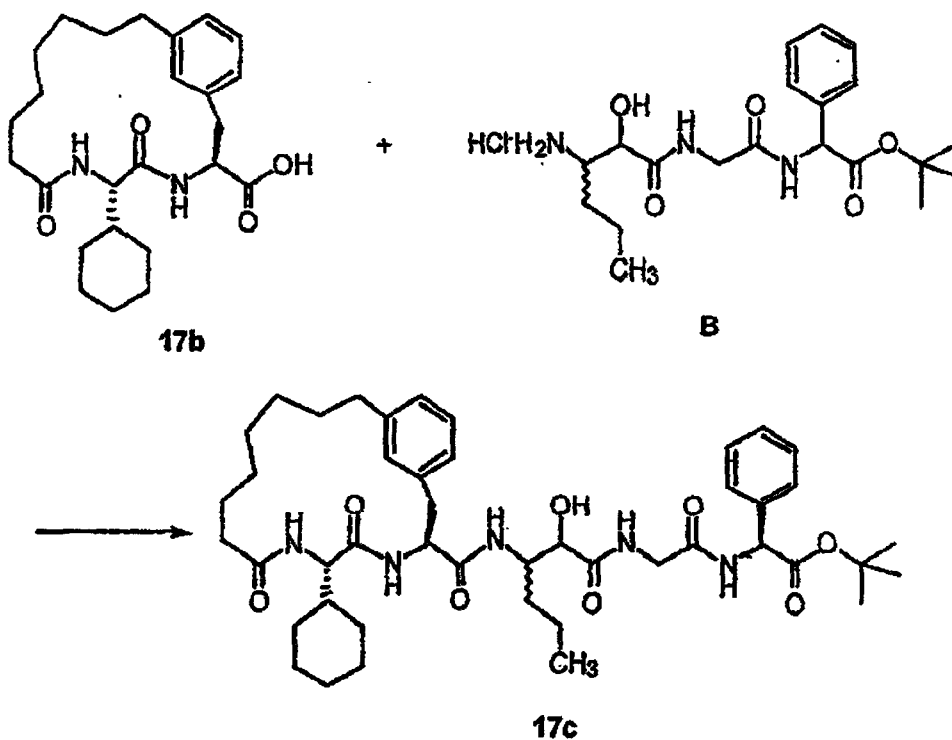
5 向 15f (150 mg, 0.340 mmol) 在 EtOH (10 mL) 和 EtOAc (5 mL) 中的溶液中加入 10 % 披钨碳 (20 mg)。将该悬浮液在氢气下搅拌 8 小时，在此期间用 TLC 监测反应过程。通过硅藻土垫过滤后，在真空中除去溶剂，得到产物，为白色固体 17a (150 mg, 0.339 mmol, 定量)。其没有进一步纯化用于下一反应中。

## 步骤 B:



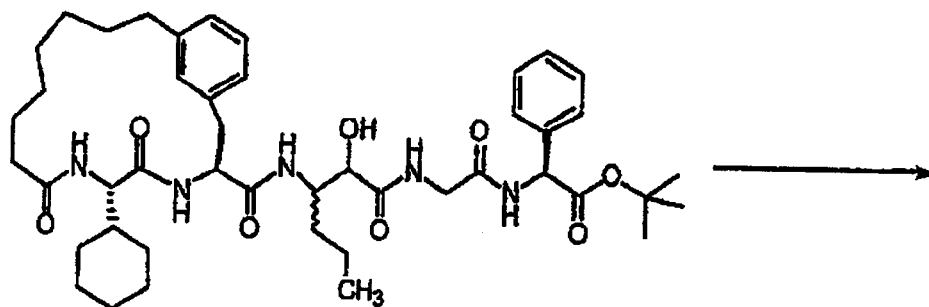
10 根据实施例 11、步骤 D 的方法，由 17a 制备所需的化合物 17b。其没有进一步纯化用于下一反应中。

步骤 C:

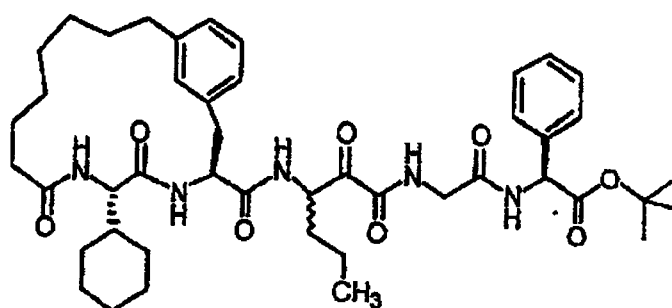


根据实施例 11、步骤 E 的方法，由 17b 制备所需的化合物 17c，产率为 73% (步骤 B 和 C)。其没有进一步纯化用于下一反应中。

步骤 D:



17c

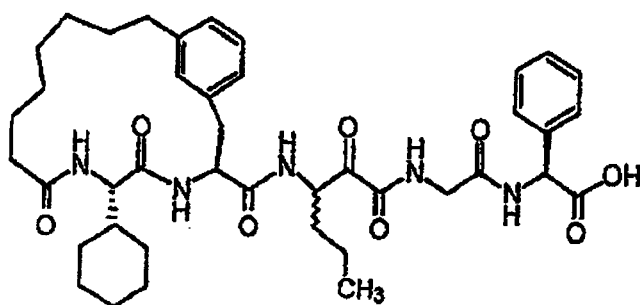


17

根据实施例 11、步骤 F 的方法，由 17c 制备所需的化合物 17，产率为 46 %。

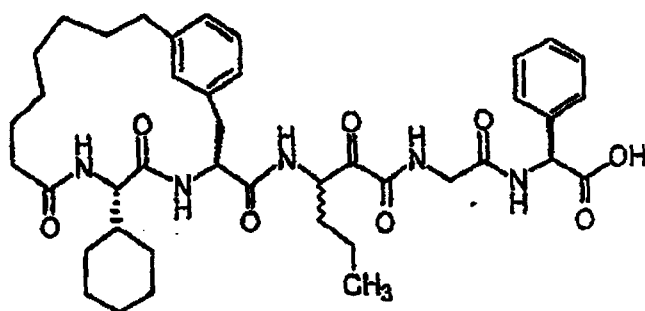
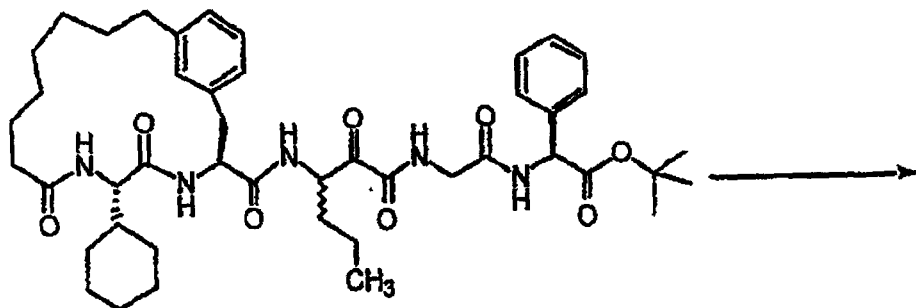
5

实施例 18: 式 18 化合物的制备



18

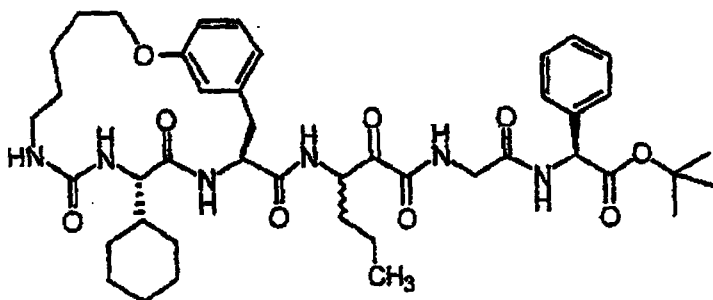
步骤 A:



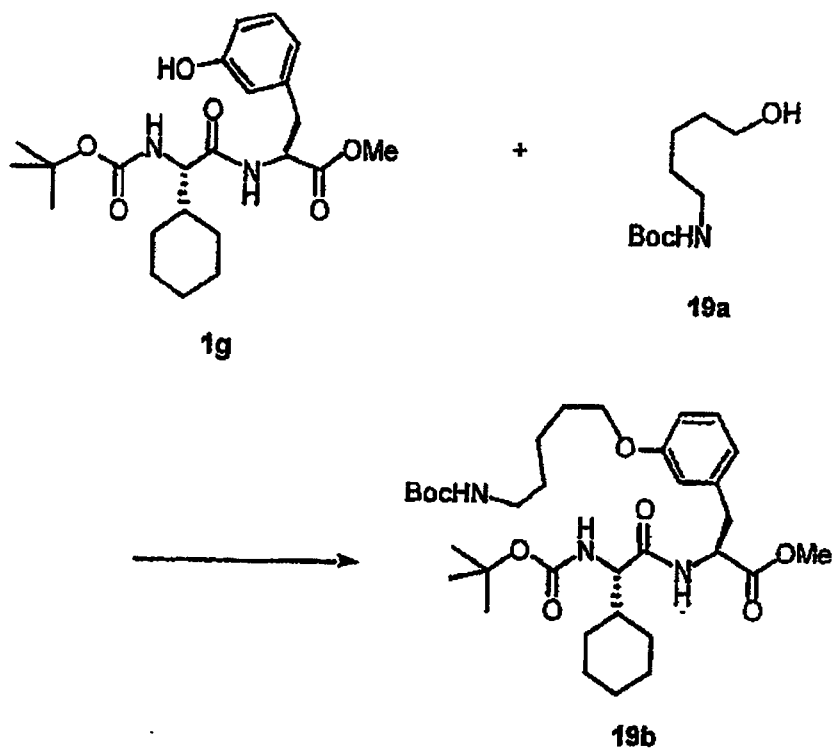
根据实施例 12、步骤 A 的方法，由 17 定量制备所需的化合物 18。

5

实施例 19: 式 19 化合物的制备



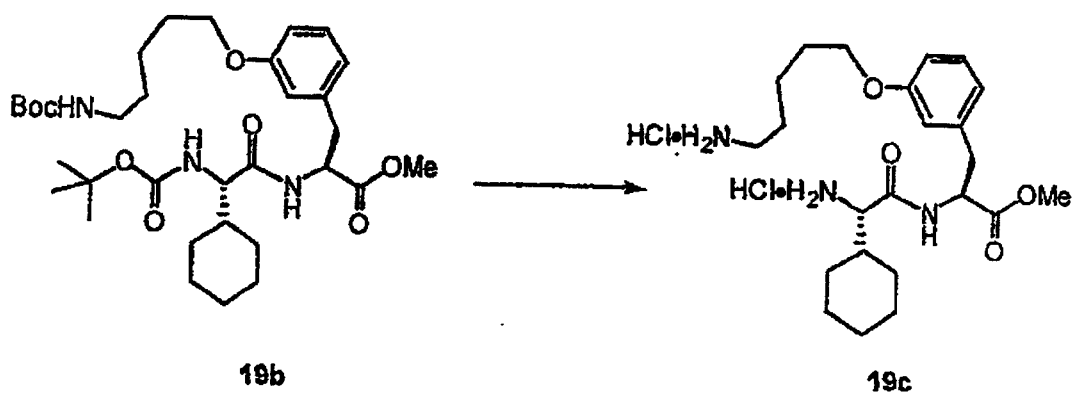
步骤 A:



根据实施例 11、步骤 C的方法，由 1g 和 19a 制备所需的化合物 19b，产率为 64%。

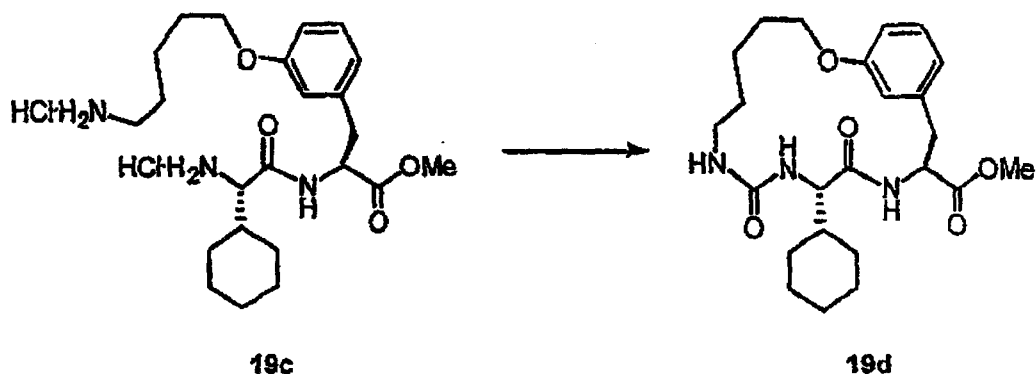
5

步骤 B:



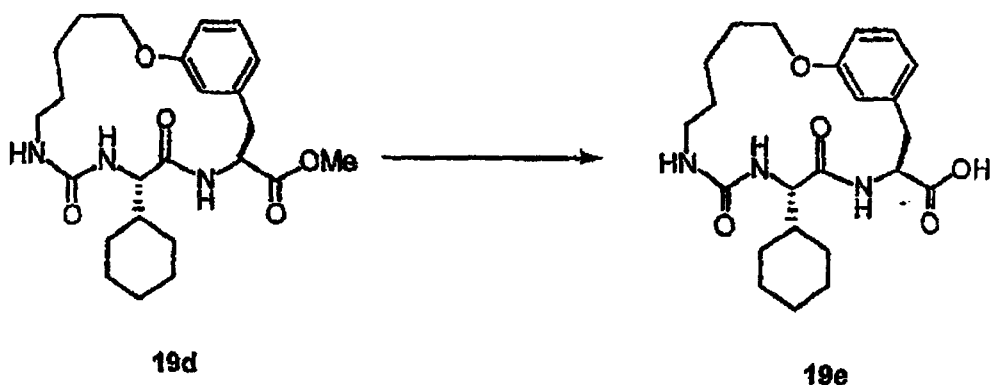
根据实施例 1、步骤 C的方法，由 19b 制备所需的化合物 19c。其没有进一步纯化而用于下一反应中。

## 步骤 C:



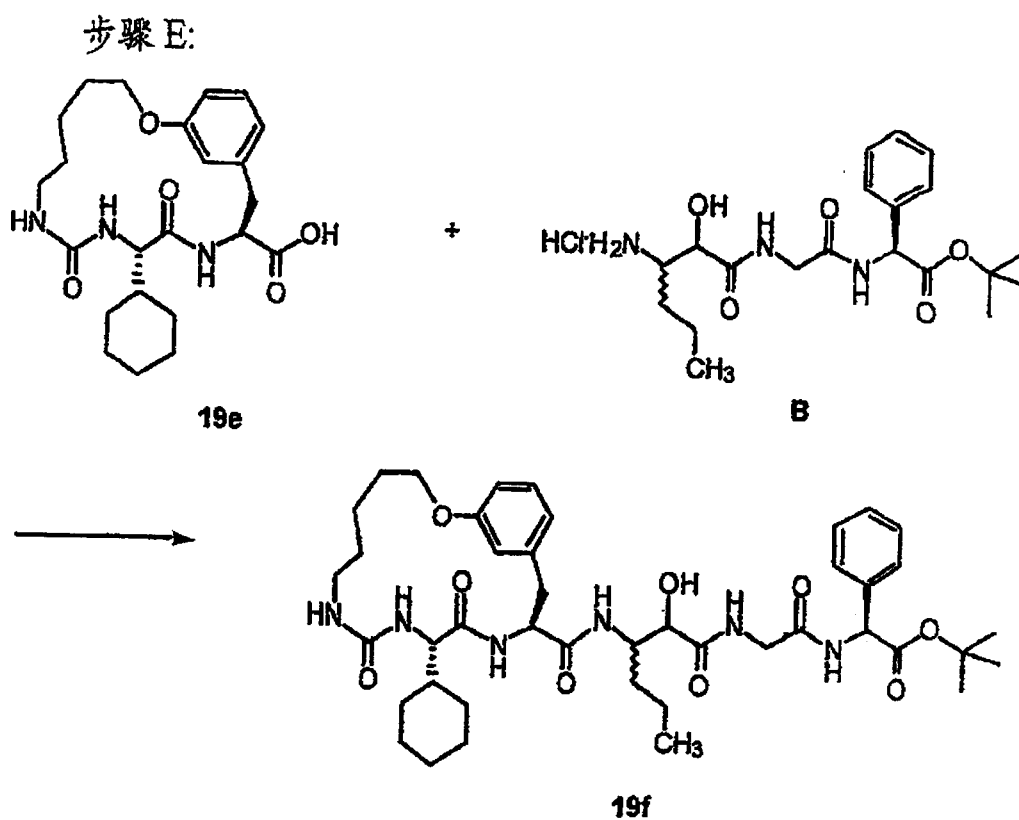
5 在室温下, 向二胺盐 19c (75 mg, 1.52 mmol) 和羰基二咪唑 (260 mg, 1.60 mmol) 在乙腈 (400 mL) 中的悬浮液中加入三乙胺 (0.26 mL, 1.85 mmol)。将该混合物搅拌 3 天。在真空中除去溶剂。将残余物溶于 EtOAc/THF (100/50 mL) 中并将该溶液用 5%  $H_3PO_4$  洗涤, 经硫酸镁干燥, 过滤并在真空中浓缩。快速层析 (2-10% MeOH- $CH_2Cl_2$ ), 得到 19d (290 mg, 0.651 mmol, 43%), 为白色固体。

## 步骤 D:



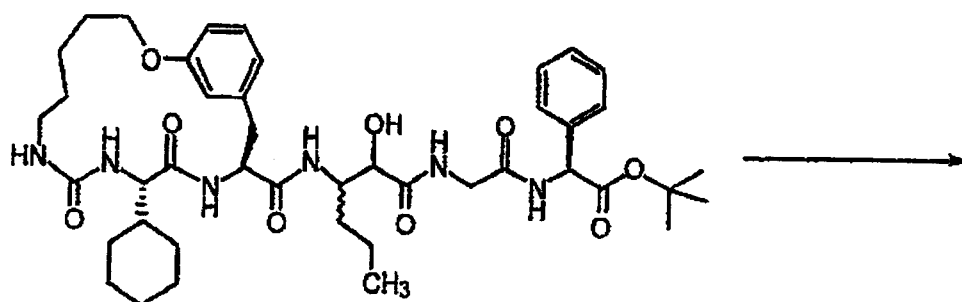
10

根据实施例 11、步骤 D 的方法, 由 19d 制备所需的化合物 19e, 产率为 97%。其没有进一步纯化而用于下一反应中。

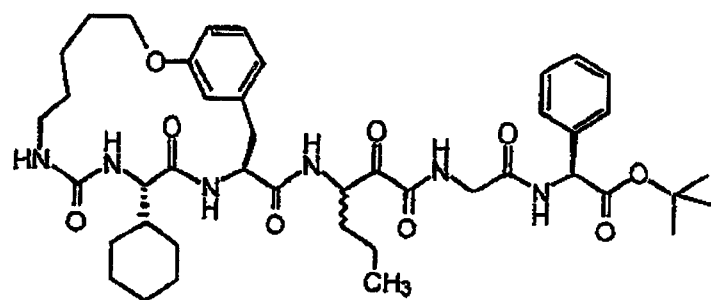


根据实施例 11、步骤 E的方法，由 19e 和 B 制备所需的化合物 19f，产率为 66%。

步骤 F:



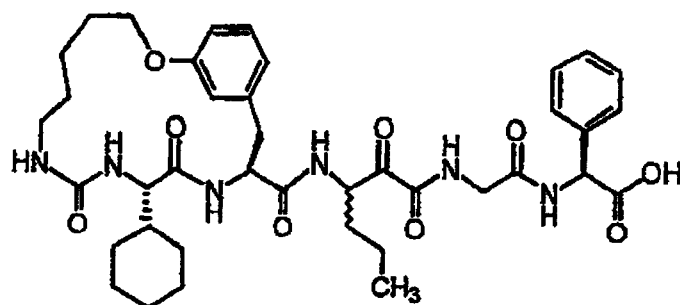
19f



19

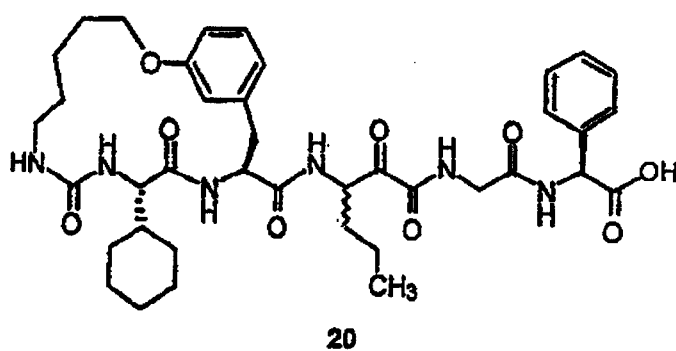
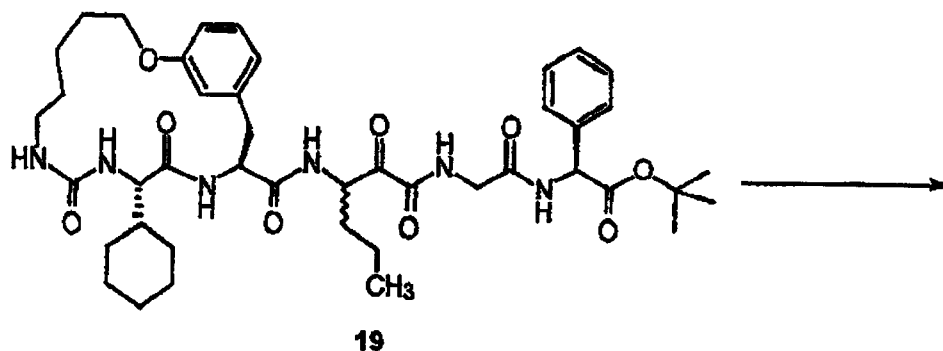
根据实施例 11、步骤 F的方法，由 **19f** 制备所需的化合物 **19**，产率为 66%。将两种产物经快速层析(0-5% MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)部分分离。

实施例 20: 式 20 化合物的制备



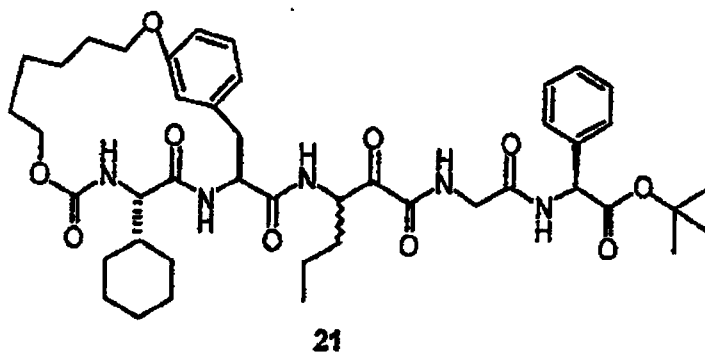
20

步骤 A:

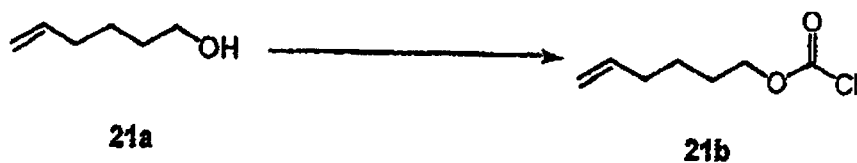


根据实施例 12、步骤 A 的方法，由 **19** 制备所需的化合物 **20**。

**实施例 21: 式 21 化合物的制备**

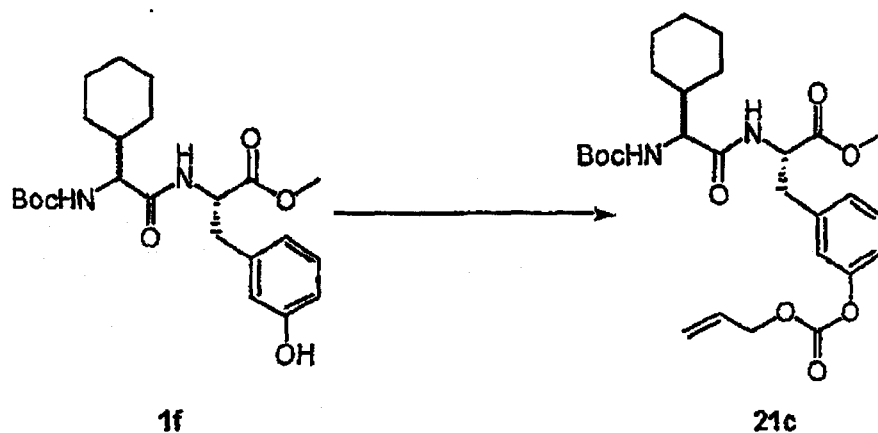


步骤 A:



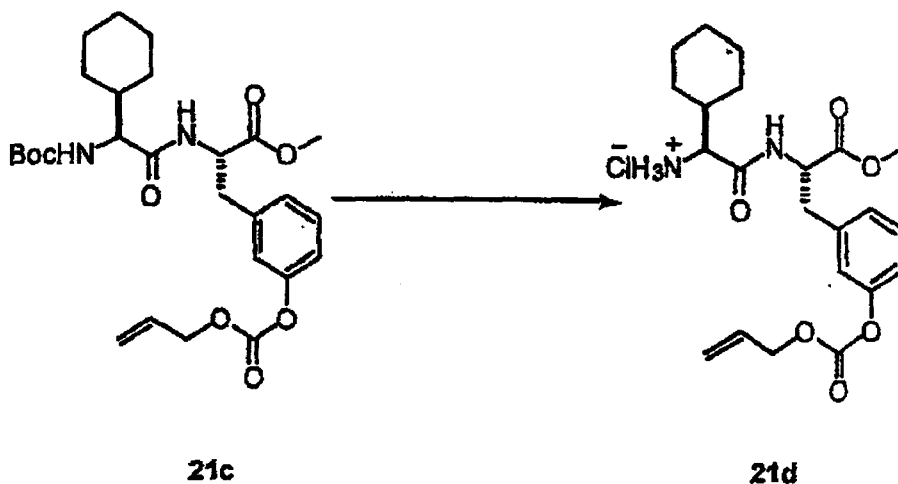
将 5-己烯-1-醇 **21a** (10 g, 50 mmol) 的乙醚(100 mL)溶液用三乙胺(10.1 g, 100 mmol, 2.0 当量)处理并冷却至 0°C。滴加入光气的苯溶液(20%, 100 mL, 20 g, 200 mmol, 4.0 当量)并将该反应混合物在室温下搅拌 12 小时。过滤分离出的三乙胺盐酸盐并在真空中浓缩滤液。残余物 **21b** 没有纯化直接用于进一步的研究。

步骤 B:



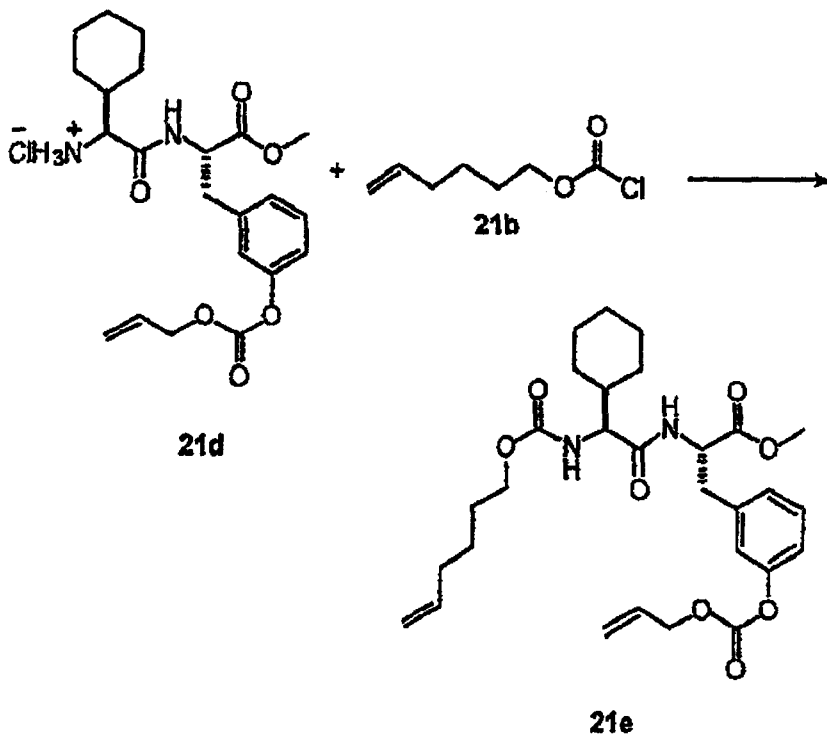
将 **1f** (8.0 g, 18.43 mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL) 溶液用三乙胺(2.43 g, 24.0 mmol, 1.3 当量)处理。将该反应混合物冷却至 -78°C 并滴加入氯甲酸烯丙基酯(2.9 g, 24 mmol, 1.3 当量)。将该反应混合物在室温下搅拌 12 小时并将该反应混合物用  $\text{H}_2\text{O}$  (100 mL) 和 HCl 水溶液(2M, 200 mL) 稀释。用 EtOAc (3 x 200 mL) 萃取含水层。用盐水萃取合并的 EtOAc 层, 干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 过滤并在真空中浓缩, 残余物 **21c** 直接用于 Boc 脱保护。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CHCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$ , ppm) 7.29 (t, 1H,  $J = 6.0$  Hz), 7.06-6.98 (m, 3H), 6.41 (d, 1H,  $J = 5.4$  Hz), 6.05-5.95 (m, 1H), 5.42 (dd, 1H,  $J = 1.2, 13.2$ ), 5.31 (dd, 1H,  $J = 1.2, 13.2$ ), 5.10 (d, 1H,  $J = 6.6$  Hz), 4.91-4.87 (q, 1H), 4.74 (d, 1H,  $J = 4.5$  Hz), 3.95-3.92 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.12 (d, 1H,  $J = 4.2$  Hz), 1.81-1.51 (m, 6H), 1.43 (s, 9H), 1.21-0.91 (m, 6H)。

## 步骤 C:



5 将 **21c** (1.5 g) 的 HCl (4M, 在二噁烷中, 100 mL) 溶液在室温下搅拌 3 小时。原料消失后进行 TLC, 并且一旦原料消失则将该反应混合物在真空中浓缩, 将残余物 **21d** 在泵中干燥。其没有进一步纯化而用于偶合作用。

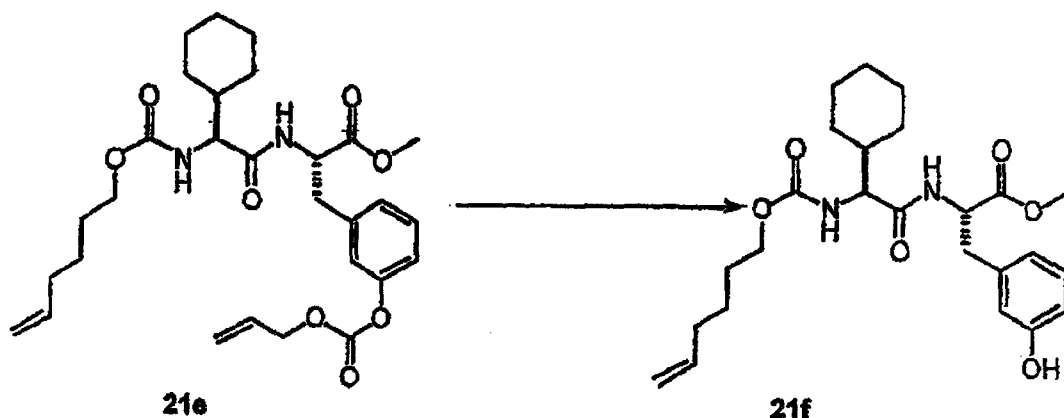
## 步骤 D:



将胺盐酸盐 **21d** (4.0 g, 8.9 mmol) 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) 溶液用三乙胺

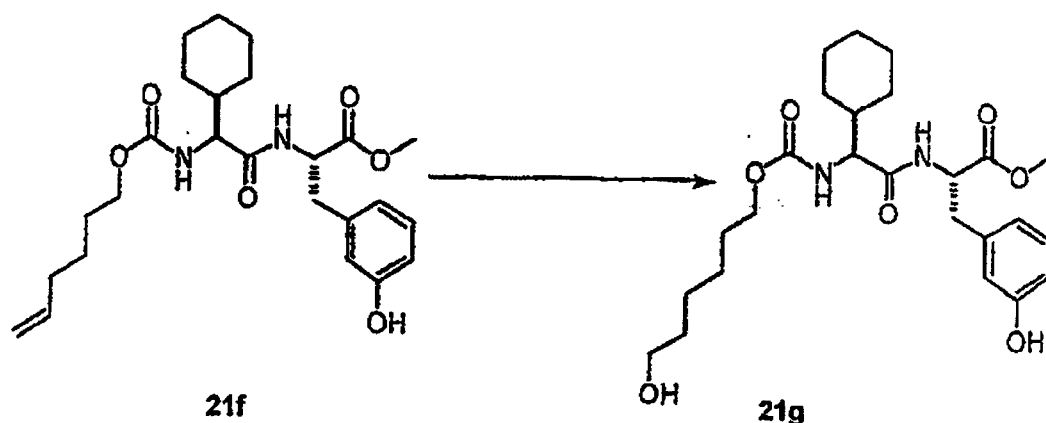
(2.73 g, 27 mmol, 3.0 当量, 3.8 mL)处理并冷却至-78℃。滴加入氯甲酸酯 **21b** (2.3 g, 13.3 mmol, 1.5 当量)的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL)溶液。将该反应混合物在室温下搅拌过夜并用 HCl 水溶液(1M, 150 mL)稀释。用 EtOAc (3 x 100 mL)萃取含水层。将合并的乙酸乙酯层用 H<sub>2</sub>O (100 mL)、盐水 (100 mL)萃取, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并在真空中浓缩, 将残余物经层析(SiO<sub>2</sub>, EtOAc/己烷 3:7)纯化, 得到 **21e**, 为无色固体(5 g, 80%)。

步骤 E:



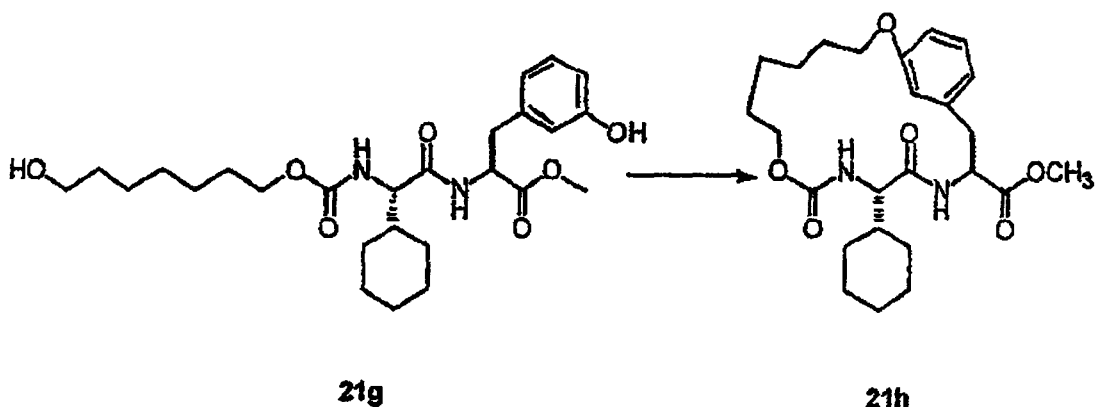
在 0℃下, 将 alloc-保护的化合物 **21e** (4.0 g, 7.2 mmol)的无水 THF (60.0 mL)溶液用双甲酮(dimedione) (2.01 g, 14.4 mmol, 2.0 当量)、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (830 mg, 0.71 mmol, 10 mol %)处理并在室温下搅拌 1 小时。将该反应混合物在真空中浓缩, 将残余物经层析(SiO<sub>2</sub>, EtOAc/己烷, 3:7)纯化, 得到脱保护的醇 **21f**, 为无色固体(2.7 g, 79%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, δ ppm) 7.44 (bs, 1H), 7.09 (s, 1H, *J* = 6.0 Hz), 6.75-6.72 (m, 2H), 6.58-6.48 (m, 2H), 5.81-5.71 (m, 1H), 5.55 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 4.98 (ddd, 1H, *J* = 1.5, 1.2, 9 Hz), 4.92 (dd, 1H, *J* = 4.5, 0.9 Hz), 4.88-4.83 (m, 1H), 4.12-3.97 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.09-2.98 (m, 2H), 2.08-2.03 (m, 2H), 1.722-1.40 (m, 10H), 1.24-0.94 (m, 5H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, δ) 171.6, 157.3, 156.6, 138.3, 136.6, 129.8, 123.5, 120.6, 117.0, 114.9, 114.6, 65.7, 60.1, 53.2, 52.5, 40.4, 37.1, 33.3, 29.6, 28.6, 28.3, 26.0, 25.9, 25.1; 对于 C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> 的 CHN 计算值: C = 65.20 %, H = 7.88 %, N = 6.08 %; 实测值: C = 64.90 %, H = 7.98 %, N = 6.01%。

## 步骤 F:



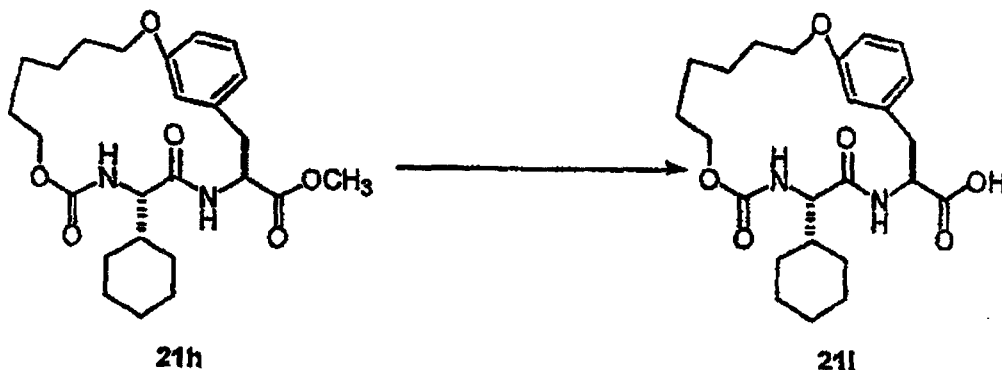
将烯 **21f** (650 mg, 1.4 mmol) 的无水 THF (5.2 mL) 溶液冷却至 0℃ 并用  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$  (在 THF 中的 1M 溶液, 4.2 mL, 4.2 mmol, 3.0 当量) 处理。将该反应混合物在室温下搅拌 2 小时并小心加入 EtOH (2.0 mL), 同时有氢气放出。在氢气完全放出后, 将该反应混合物用 pH 7 缓冲液处理并在 0℃ 下用  $\text{H}_2\text{O}_2$  水溶液 (30%, 5.0 mL) 处理。除去冰浴并将该混合物在室温下搅拌 3-4 小时。将该反应混合物用 EtOAc (3 x 100 mL) 萃取。用  $\text{H}_2\text{O}$ 、盐水萃取合并的有机层, 干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ), 过滤, 在真空中浓缩并将残余物经层析 ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/己烷, 3:7) 纯化, 得到硼氢化的产物, 为无色固体 **21g** (400 mg, 60%)  $[\alpha]_D^{25}$  86.4 (c 0.3  $\text{CHCl}_3$ , 25℃);  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz,  $\delta$ ) 7.26 (s, 1H), 7.08 (t, 1H,  $J = 5.7$  Hz), 6.83 (d, 1H,  $J = 6.0$  Hz), 6.71 (dd, 1H,  $J = 1.2, 4.5$  Hz), 6.57 (bs, 1H), 6.54 (d, 1H,  $J = 5.7$  Hz), 5.68 (d, 1H,  $J = 6.9$  Hz), 4.85 (dq, 1H,  $J = 4.2, 1.8$  Hz), 4.05-3.97 (m, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.60 (t, 2H,  $J = 4.8$  Hz), 3.08-2.97 (m, 2H), 1.77-1.53 (m, 10H), 1.42, 1.25 (m, 4H), 1.24-0.92 (m, 5H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz,  $\delta$ ) 171.8, 171.8, 157.6, 156.9, 136.9, 130.0, 120.8, 117.0, 114.8, 65.7, 62.7, 60.3, 53.3, 52.7, 40.5, 37.4, 32.5, 29.7, 29.0, 28.8, 26.2, 26.0, 25.6, 25.4, MS (FAB, NBA/DMSO,  $m/z$ , 相对强度) 479 ( $[\text{M}+1]^+$ , 100), 296 (40), 196 (25), 156 (25), 136 (25), 112 (20)。HRMS 对于  $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_7$  ( $\text{M}+1$ ) $^+$  的计算值: 479.2760; 实测值: 479.2757。

## 步骤 G:



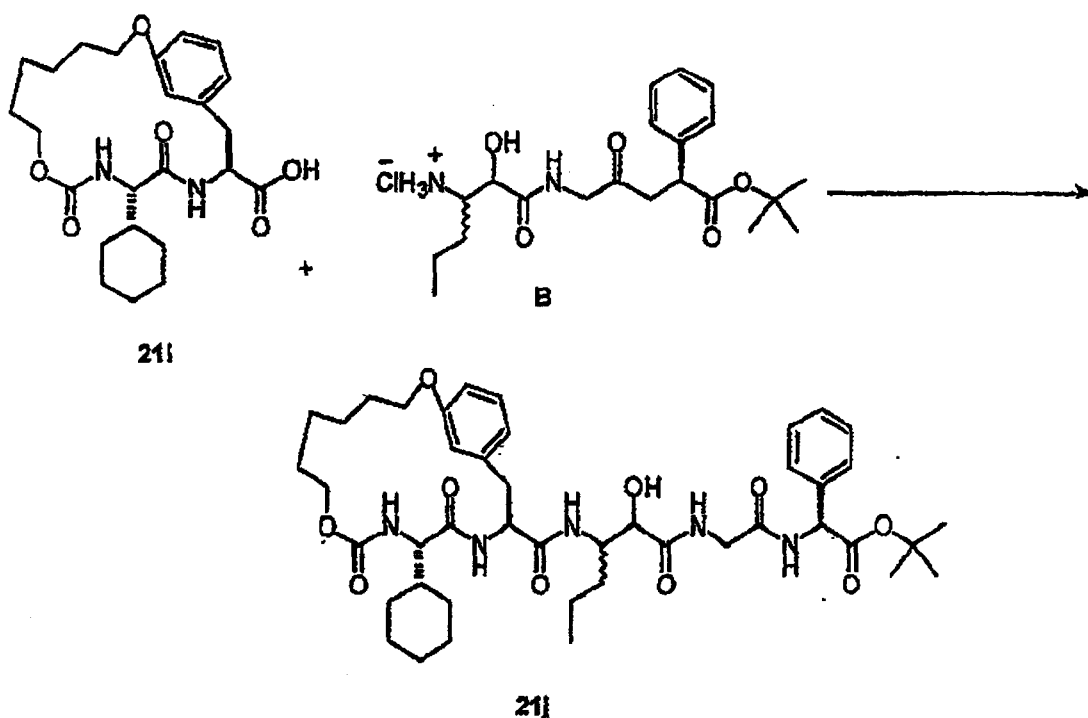
将  $\text{PPh}_3$  (385 mg, 1.47 mmol, 1.75 当量) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) 溶液用化合物 **21g** (400 mg, 0.84 mmol) 处理并冷却至  $0^\circ\text{C}$ 。滴加入 DEAD (220 mg, 1.26 mmol, 1.5 当量) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) 溶液并在室温下搅拌 3 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物经层析 ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/乙烷 1:9) 纯化, 得到环状产物 **21h**, 为无色固体 (110 mg, 25%)。

## 步骤 H:



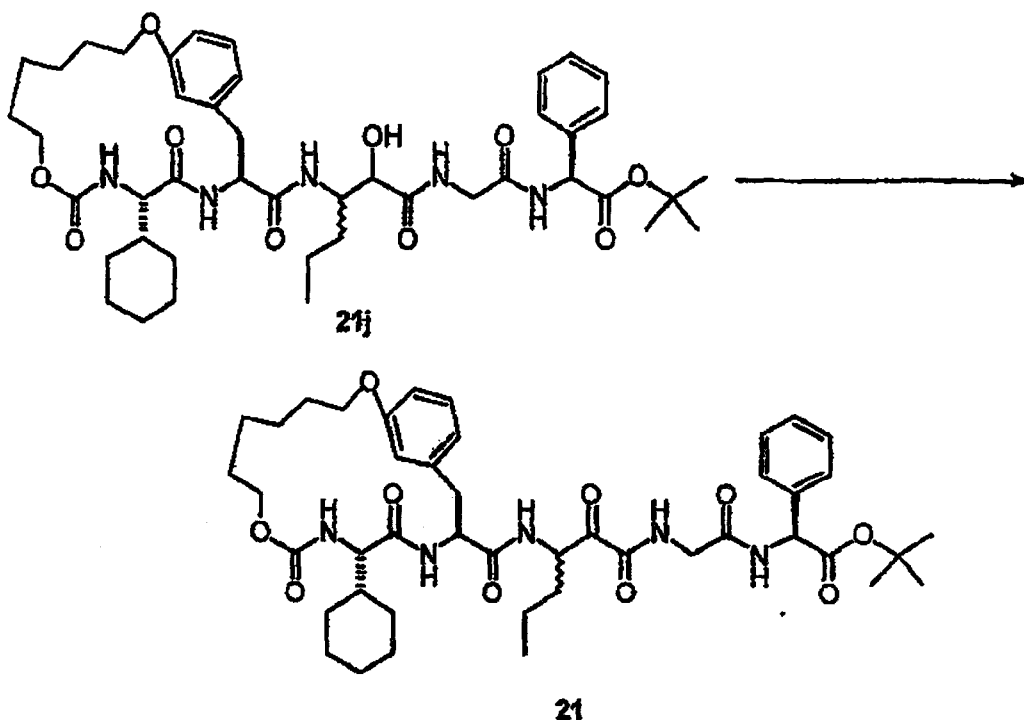
10 将环状氨基甲酸酯 **21h** (200 mg, 0.44 mmol) 在二噁烷 (30 mL)、 $\text{CH}_3\text{OH}$  (20 mL) 和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) 中的溶液用  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (80 mg, 2.0 mmol, 4.5 当量) 处理并在室温下搅拌 4 小时。将该反应物在真空中浓缩并用  $\text{HCl}$  (在二噁烷中的 4M 溶液, 10 mL) 稀释。经冷冻干燥机除去水, 得到直接用于偶合作用的晶体酸 **21i**。

步骤 I:



将水解的酸 21i (210 mg, 0.47 mmol) 在无水 DMF (5.0 mL) 和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.0 mL) 中的溶液用 HOObt (125 mg, 0.70 mmol, 1.5 当量) 处理并冷却至  $0^\circ\text{C}$ , 加入 Hünigs base (258 mg, 2.0 mmol, 4.0 当量, 369  $\mu\text{L}$ ), 向该混合物中加入 EDCI (134 mg, 0.70 mmol, 1.5 当量) 并将该反应混合物在  $0^\circ\text{C}$  下搅拌 0.5 小时, 用胺盐酸盐 B (253 mg, 0.58 mmol, 1.25 当量) 处理。将该反应混合物贮存在冰箱中 24 小时并在真空中浓缩以除去 DMF 和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 。将残余物用 HCl 水溶液 (2M, 30 mL) 稀释并用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 mL) 萃取。用 HCl 水溶液 (2M, 30 mL)、NaOH 水溶液 (1M)、盐水 (2 x 50 mL) 萃取合并的有机层, 干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ) 并在真空中浓缩。将没有进一步纯化的残余物 21j (220 mg) 氧化。

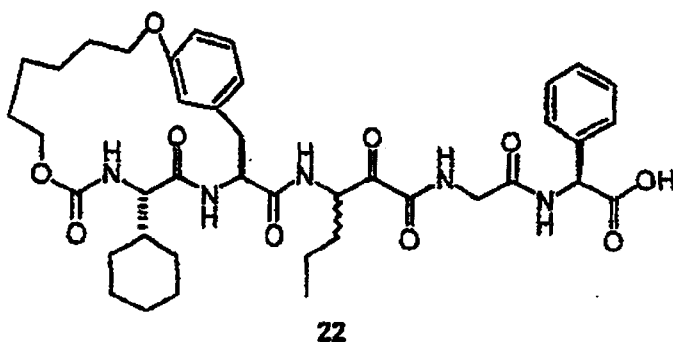
步骤 J:



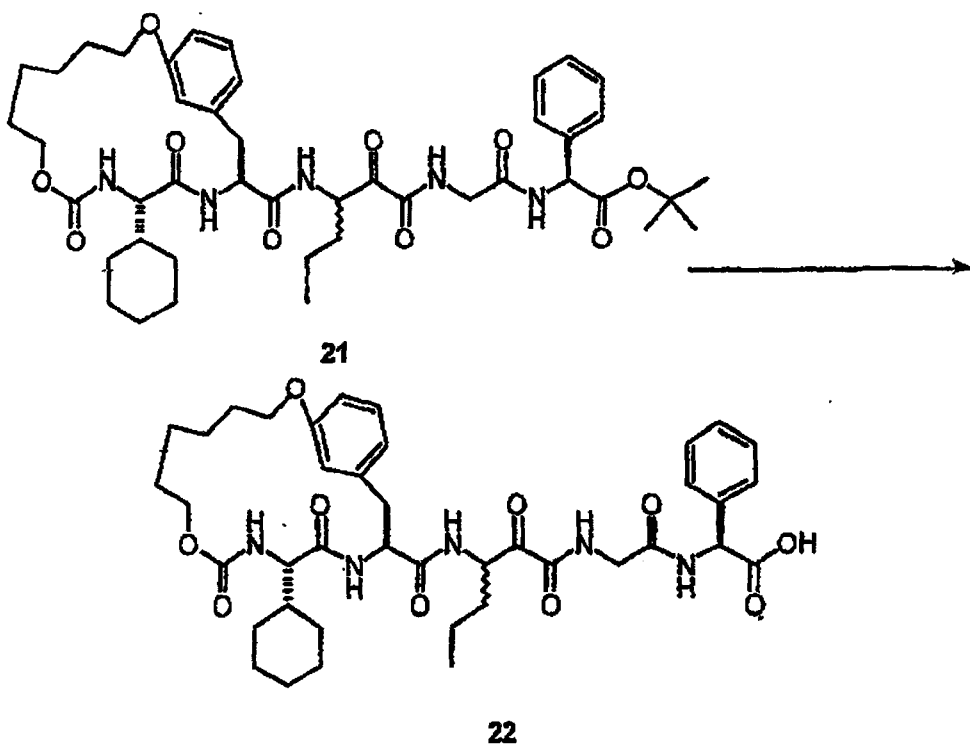
将醇 21j (220 mg, 0.26 mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.0 mL) 溶液用 Dess-Martin 试剂 (200 mg, 0.47 mmol, 1.8 当量) 处理。将该反应混合物在室温下搅拌 1 小时并用  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (15 mL) 和  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  水溶液 (15 mL) 稀释。将该反应混合物在室温下搅拌 20 分钟并用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 30$  mL) 萃取反应混合物。用  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液萃取合并的有机层，干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )，过滤，在真空中浓缩并将残余物经层析 ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$  (2M  $\text{NH}_3$ )/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:20) 纯化，得到酮酰胺 21 (60 mg, 27%)，为无色固体。

10

### 实施例 22: 式 22 化合物的制备

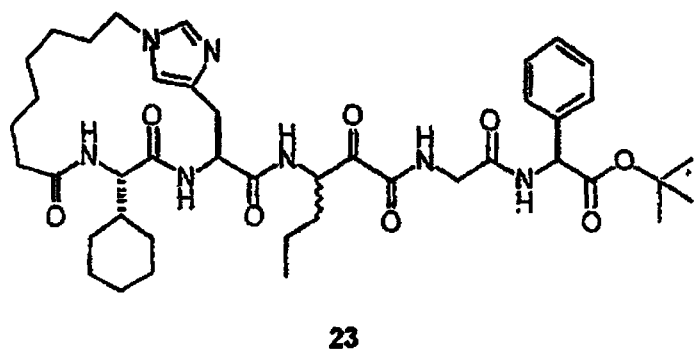


步骤 A:

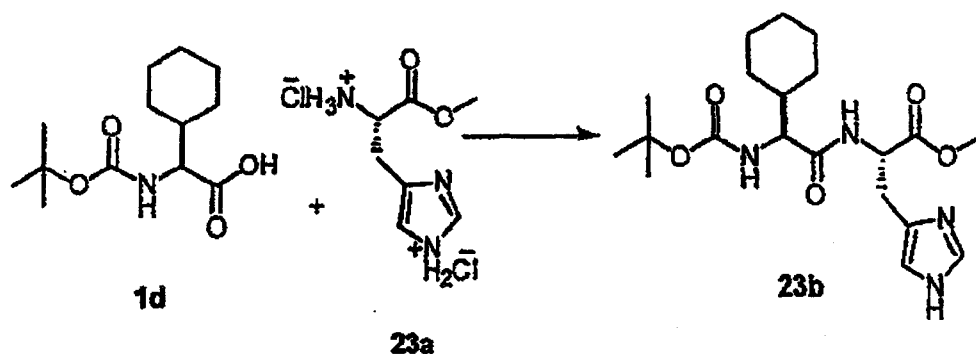


5 将叔丁基酯 21 (50 mg, 0.059 mmol) 的无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.0 mL) 溶液用 TFA (2.0 mL) 处理并在室温下搅拌 4 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物反复溶于庚烷/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中, 在真空中浓缩数次, 得到细的褐色固体 22 (47 mg), 将其在真空中干燥。

实施例 23: 式 23 化合物的制备

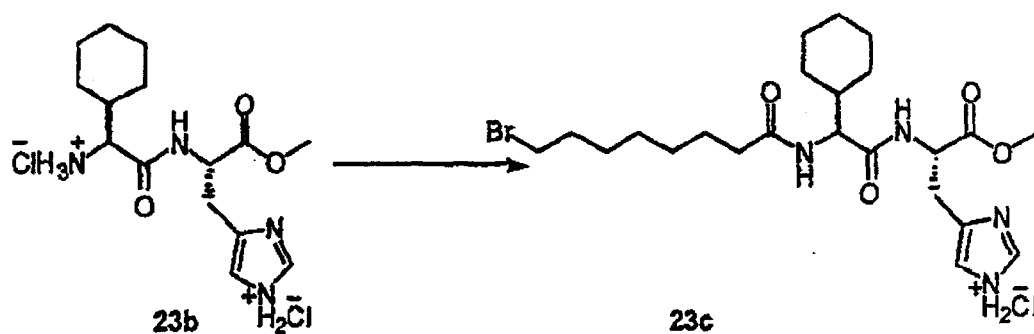


## 步骤 A:



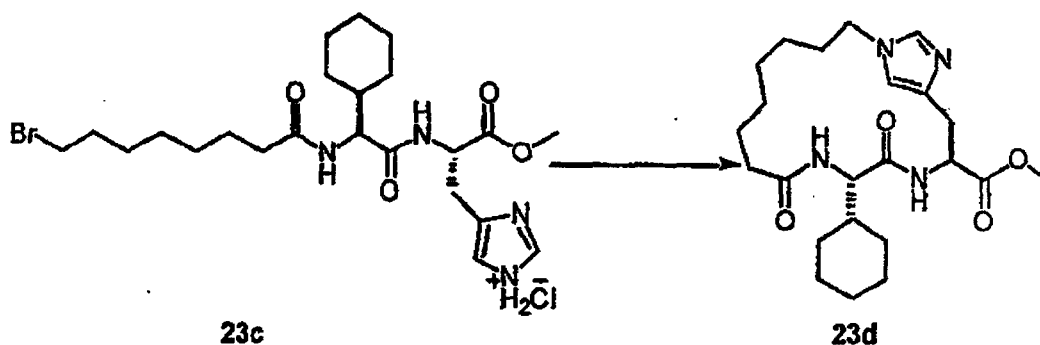
将酸 **1d** (255 mg, 1.0 mmol) 的 DMF (2.0 mL) 溶液用 HOBT (202 mg, 1.5 当量) 和 Hünigs base (517 mg, 4.0 mmol, 4.0 当量, 738  $\mu$ L) 处理。将该反应混合物冷却至 0 $^{\circ}$ C 并用 DCC (258 mg, 1.25 mmol, 1.25 当量) 处理。将该混合物搅拌 1 小时后, 加入组氨酸-OCH<sub>3</sub> · 2HCl **23a** (242.0 mg, 1.0 mmol) 并在室温下搅拌过夜。将该反应混合物在真空中浓缩并萃取入 EtOAc (3 x 50 mL) 和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (50 mL)。在真空中浓缩合并的有机层并将残余物经层析 (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:19) 纯化, 得到二肽 **23b**, 为无色固体 (380 mg, 93%)。<sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 400 MHz,  $\delta$ , ppm) 8.17 (d, 1H,  $J$  = 7.2 Hz), 7.48 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 6.57 (bs, 1H), 5.54 (d, 1H,  $J$  = 7.6 Hz), 4.47 (q, 1H,  $J$  = 7.2 Hz), 3.79 (t, 1H,  $J$  = 8.4 Hz), 3.55 (s, 3H), 3.36-3.20 (m, 2H), 2.94-2.82 (m, 2H), 1.70-1.47 (bm, 6H), 1.35 (s, 9H), 1.46-0.85 (m, 5H); <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO, 100 MHz,  $\delta$  ppm) 172.5, 171.9, 157.3, 155.9, 135.4, 78.6, 59.5, 52.9, 52.3, 34.1, 29.6, 28.9, 28.6, 26.5, 26.3, 26.0, 25.2; FAB MS: (NBA-G/TG-DMSO,  $m/z$  相对强度) 409 [(M+1)<sup>+</sup>, 100], 353 (10), 170 (20); HRMS 对于 C<sub>20</sub>H<sub>33</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> 的计算值: 409.2451; 实测值: 409.2466; 对于 C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> 的 CHN 计算值: C = 58.81 %, H = 7.90 %, N = 13.72 %; 实测值: C = 58.70 %, H = 7.78 %, N = 13.43 %。

## 步骤 B:



将 $\omega$ -溴代庚烯酸(223 mg, 1.0 mmol)的DMF (3.0 mL)溶液用脱保护的胺盐酸盐 **23b** (380 mg, 1.0 mmol, 1.0 当量)处理并加入 Hünigs base (387 mg, 3.0 mmol, 3.0 当量)。将该反应混合物用 PyBroP (465 mg, 1.0 mmol)处理并在室温下搅拌 3 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物经层析( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1:19)纯化, 得到无色固体(220 mg, 50 %)。MS (FAB) 515.2  $[(\text{M}+1)^+$ , 100], 513.2  $[(\text{M}+1)^+$ , 95], 469 (60), 433 (20), 170 (40)。HRMS 对于  $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{BrN}_4\text{O}_4$  的计算值: 513.2076, 实测值: 513.2073。

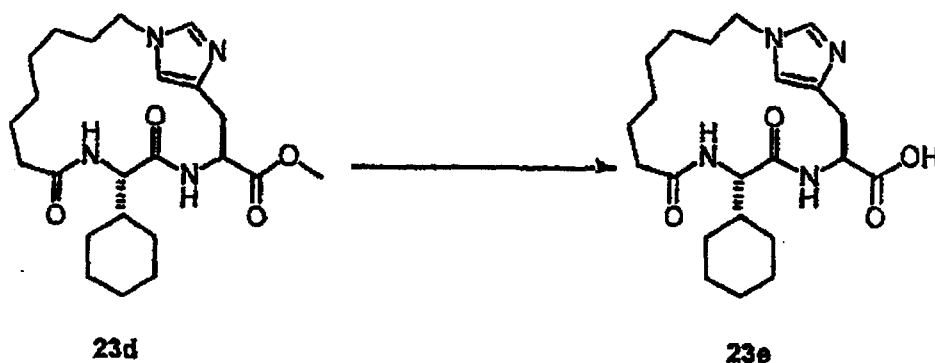
## 步骤 C:



将溴代化合物 **23c** (100 mg, 0.23 mmol)的 2-丁酮(4.0 mL)溶液用  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (31.0 mg, 0.29 mmol, 1.25 当量)和  $\text{LiI}$  (50 mg, 0.37 mmol, 1.3 当量)处理并在回流下加热 24 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物用水稀释。将残余物用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 30 mL)萃取。干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )合并的有机层并经层析( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:19)纯化, 得到环化的化合物 **23d** (25 mg, 31 %);  $R_f$ : 0.68 (2M  $\text{NH}_3$ , 在  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:19

中);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz,  $\delta$ , ppm) 8.17 (d, 1H,  $J = 8.8$  Hz), 7.33 (s, 1H), 6.48 (d, 1H,  $J = 8.4$  Hz), 4.90-4.85 (m, 1H), 4.26 (t, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 3.82-3.74 (m, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.16-3.11 (m, 2H), 2.91-2.84 (m, 1H), 2.30-2.01 (m, 2H), 1.65-1.59 (m, 11H), 1.18-0.96 (m, 11H);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz,  $\delta$  ppm) 172.8, 172.4, 171.9, 138.2, 136.8, 57.6, 52.5, 51.7, 46.6, 41.6, 36.0, 30.9, 29.5, 28.8, 27.3, 26.7, 26.4, 26.3, 26.2, 25.2, 24.8; MS: (电喷雾,  $m/z$  相对强度) 433.1  $[(\text{M}+1)^+$ , 100]; HRMS 对于  $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{N}_4\text{O}_4$  的计算值: 433.2815; 实测值: 433.2822.

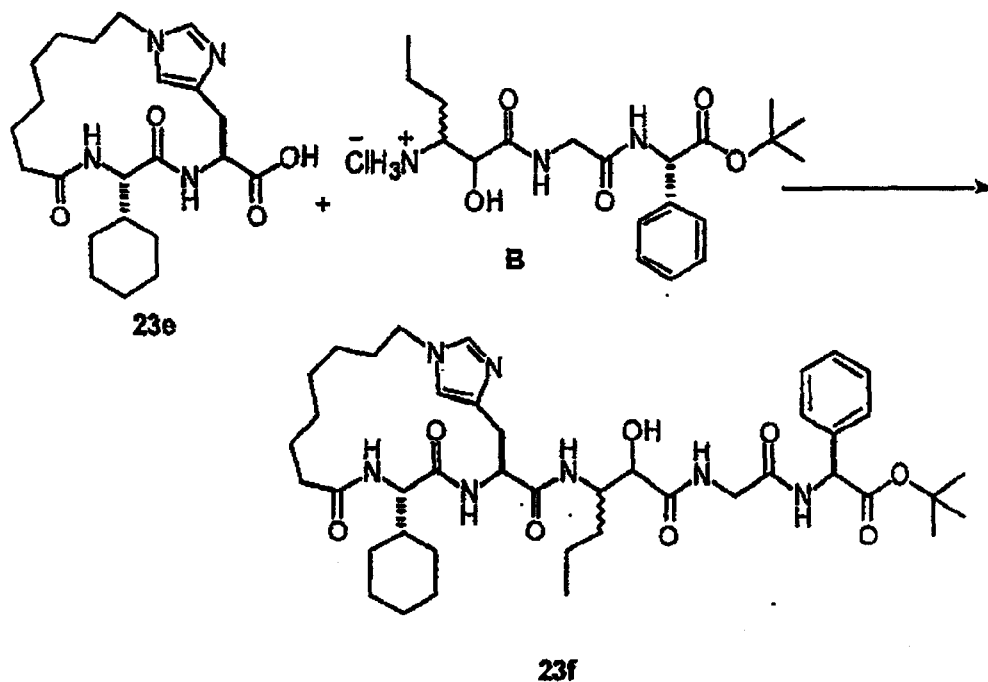
步骤 D:



10

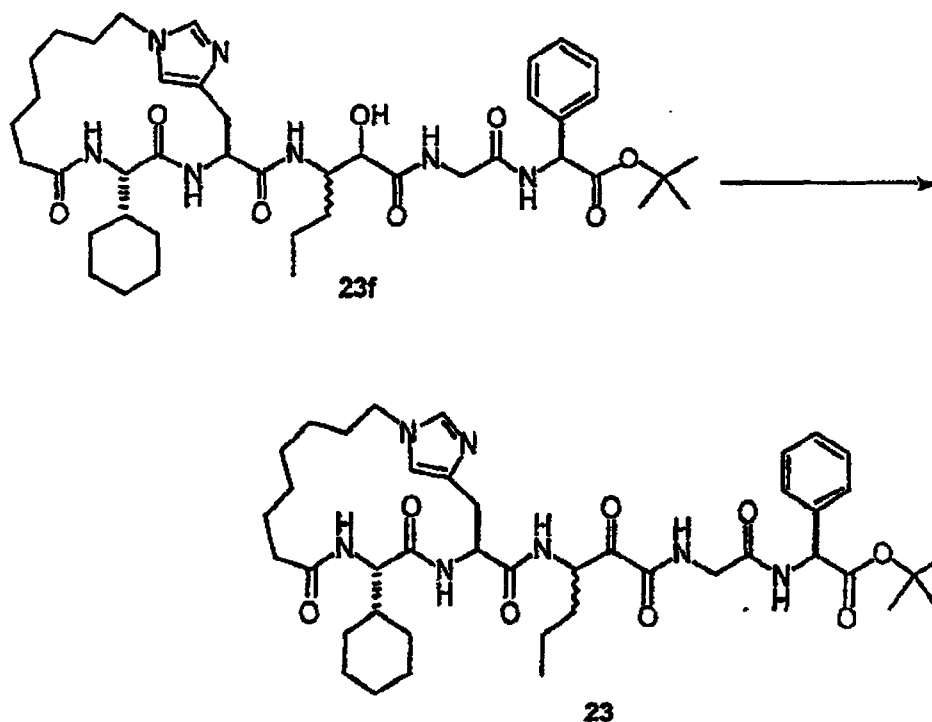
将甲基酯 **23d** (200 mg, 0.46 mmol) 在  $\text{CH}_3\text{OH}$  (5.0 mL) 和  $\text{H}_2\text{O}$  (0.5 mL) 中的溶液用  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (30 mg, 0.75 mmol, 1.6 当量) 处理。将该反应混合物在室温下搅拌 15 小时并在真空中浓缩, 在泵中干燥得到水解的化合物 **23e**, 其直接用于偶合作用。

## 步骤 E:



将酸 **23e** 在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3.0 mL) 和 DMF (5.0 mL) 中的溶液用 HOObt (115 mg, 0.70 mmol, 1.50 当量) 和 EDCI (113 mg, 0.60 mmol, 1.25 当量) 处理。然后将该反应混合物用  $\text{Et}_3\text{N}$  (190 mg, 1.88 mmol, 271  $\mu\text{L}$ , 4.0 当量) 和胺盐酸盐 **B** (201 mg, 0.5 mmol, 1.1 当量) 处理。将该反应混合物在室温下搅拌 13 小时并用  $\text{H}_2\text{O}$  稀释。用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 mL) 萃取含水层并将合并的有机层用 NaOH 水溶液 (1 M, 50 mL) 萃取, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。过滤干燥的有机层并在真空中浓缩, 得到无色残余物 **23f** (442 mg), 将其在真空中干燥并直接用于进一步的氧化作用。MS: (电喷雾,  $m/z$  相对强度): 794  $[(M+1)^+, 100]$ 。

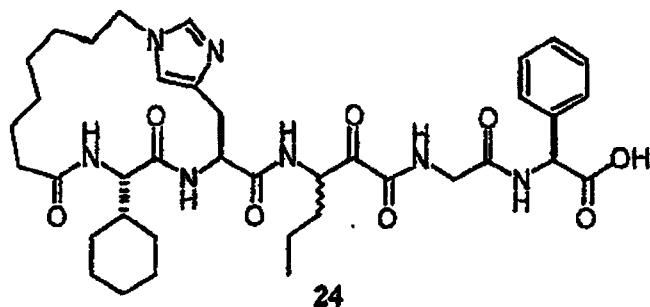
## 步骤 F:



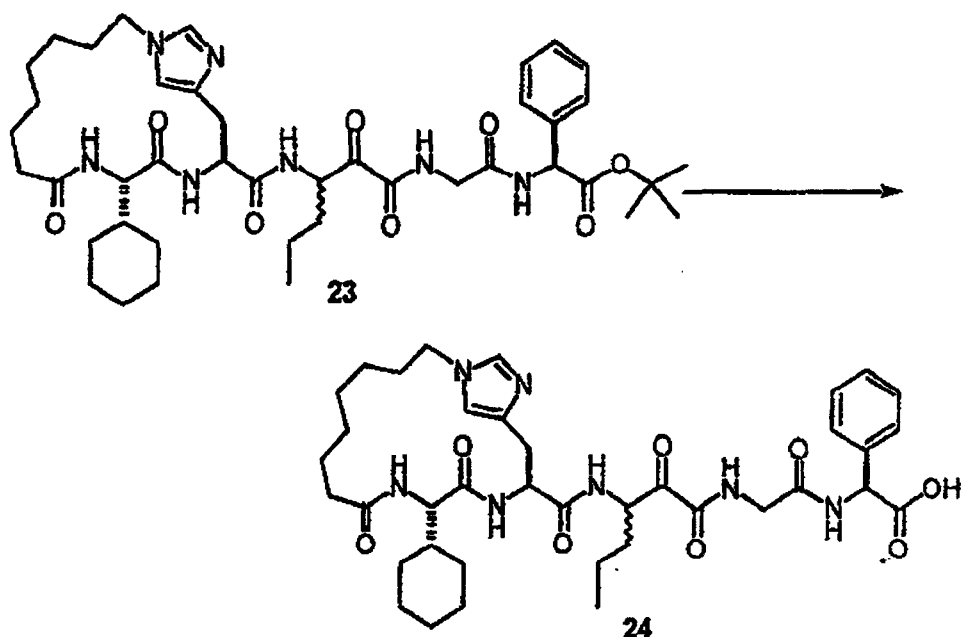
将羟基酰胺 **23f** (50 mg, 0.064 mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3.0 mL) 溶液用 Dess-Martin 试剂 (53 mg, 0.13 mmol, 2.0 当量) 处理并在室温下搅拌 3 小时。将该反应混合物用饱和  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  水溶液 (20 mL) 稀释并在室温下搅拌 15 分钟。用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 30 mL) 萃取含水层。干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 有机层, 5 过滤, 在真空中浓缩并经层析 ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1:15) 纯化, 得到酮酰胺 **23** (20 mg, 40 %); MS: (FAB, NBA-G/TG-DMSO,  $m/z$  相对强度): 824  $[(\text{M}+\text{CH}_3\text{OH})^+]$ , 100, 792  $[(\text{M}+1)^+]$ , 60, 447 (20); HRMS 对于  $\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{N}_7\text{O}_8$   $(\text{M}+1)^+$  的计算值: 792.4660; 实测值: 792.4659。

10

实施例 24: 式 24 化合物的制备:

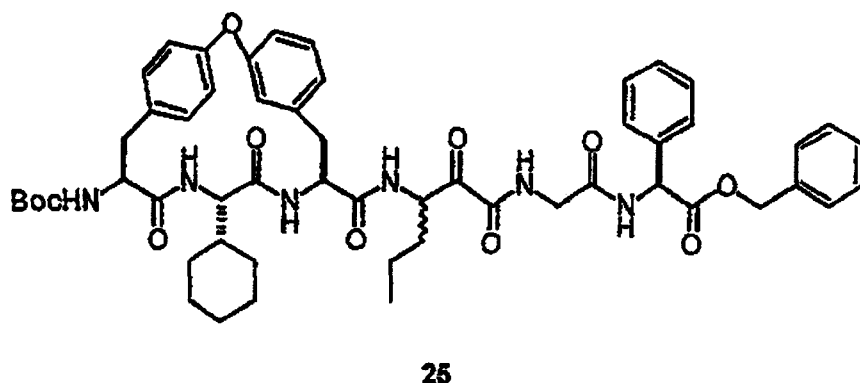


步骤 A:

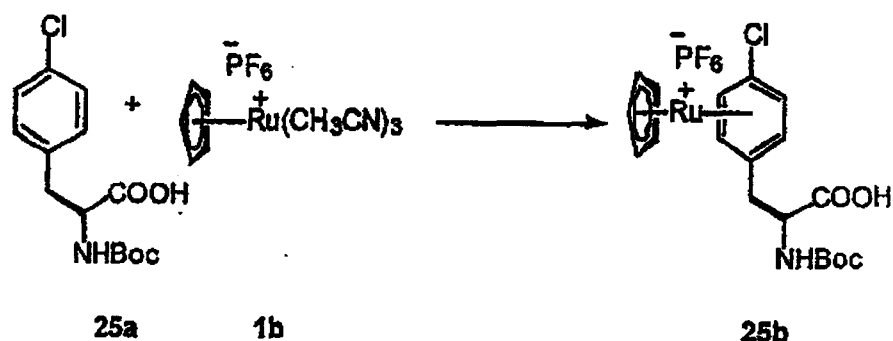


- 5            将叔丁基酯 **23** (17 mg, 21.5  $\mu\text{mol}$ ) 的无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.0 mL) 溶液用 TFA (2.0 mL) 处理并在室温下搅拌 8 小时。使所述酯相对于基线消失，之后进行 TLC ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:19)。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物反复溶于  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{庚烷}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中，在真空中浓缩数次得到
- 10            **24**，为细的无色固体 (7 mg)。MS: (电喷雾,  $m/z$  相对强度): 768  $[(\text{M}+\text{CH}_3\text{OH})^+, 100]$ , 736  $[(\text{M}+1)^+, 60]$ , 46 (10)。

实施例 25: 式 25 化合物的制备:

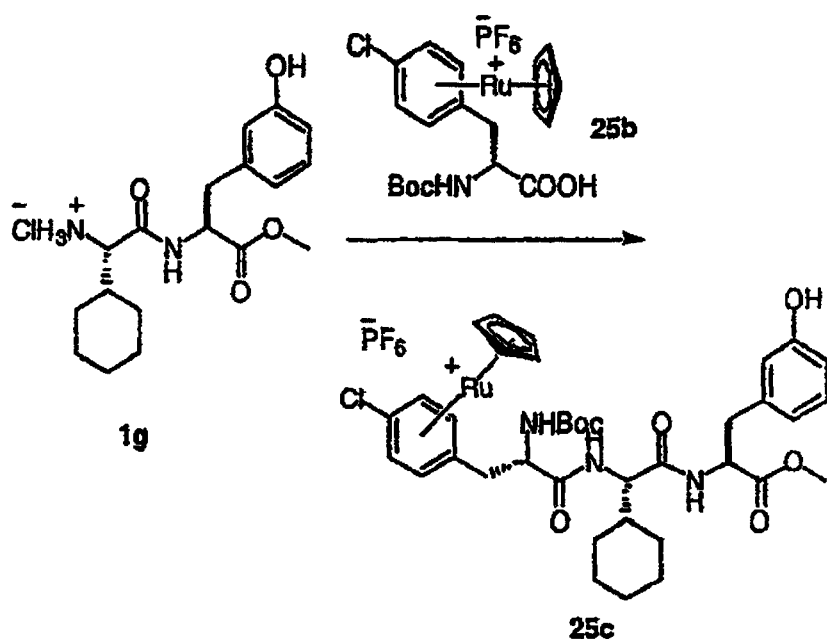


步骤 A:



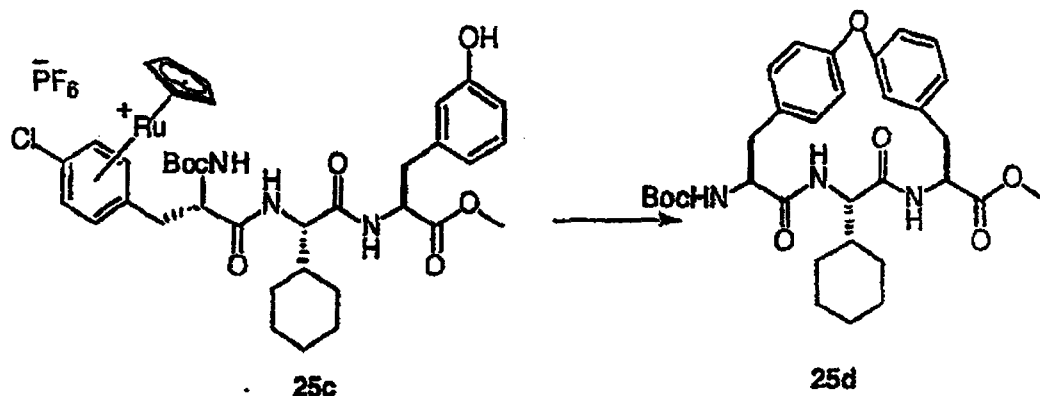
- 5 将 Boc-4-氯代苯基丙氨酸 **25a** (523 mg, 1.75 mmol) 的二氯乙烷 (37 mL) 溶液用  $\text{CpRu}(\text{CH}_3\text{CN})_3\text{PF}_6$  **1b** (760 mg, 1.75 mmol, 1.0 当量) 处理并在回流下加热 2 小时。将该反应混合物冷却至  $0^\circ\text{C}$  并过滤。在真空中浓缩滤液并溶于最少量的  $\text{CH}_3\text{CN}$  中, 用大量过量的  $\text{Et}_2\text{O}$  处理。将分离出的固体分离并溶于  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1, 50 mL) 中, 在真空中浓缩
- 10 得到 **25b**, 为棕色泡沫 (640 mg, 69%)。

## 步骤 B:



将羧酸 **25b** (2.4 g, 3.80 mmol) 的无水 DMF (15 mL) 溶液用 Hünigs base (1.64 g, 12.64 mmol, 4.0 当量, 2.9 mL) 和 HOBt (661 mg, 4.38 mmol, 1.5 当量) 处理。将该反应混合物冷却至 0°C 并用 EDCl (699 mg, 3.95 mmol, 1.25 当量) 处理, 搅拌 15 分钟。向该反应混合物中加入胺盐酸盐 **1g** (1.50 g, 4.00 mmol, 1.2 当量) 并将反应混合物在室温下搅拌 12 小时。蒸馏出 DMF 并将残余物用水 (30 mL) 稀释, 用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL) 萃取含水层。用 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (30 mL)、HCl 水溶液 (30 mL)、盐水萃取合并的有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并在真空中浓缩, 将粗制产物 **25c** (2.5 g, 69%) 不经纯化用于进一步的环化作用。

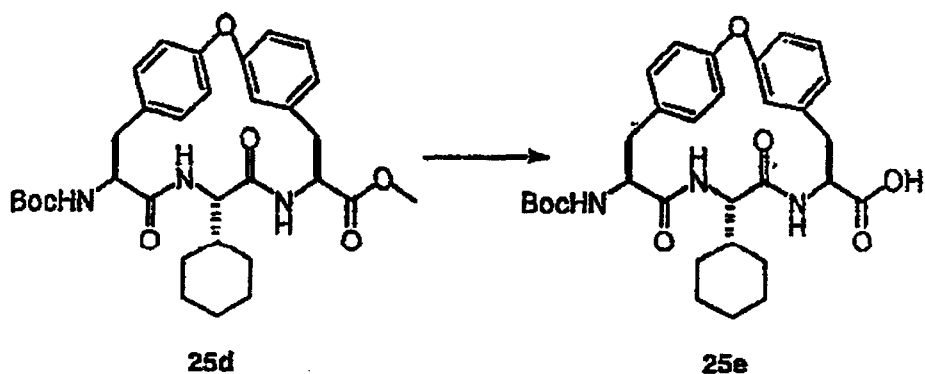
## 步骤 C:



用干燥的  $N_2$  将化合物 **25c** (100 mg, 0.11 mmol) 的无水 DMF (10 mL) 溶液脱气并用  $CS_2CO_3$  (170 mg, 0.5 mmol, 5.0 当量) 处理, 在室温下搅拌 12 小时。蒸馏出溶剂 DMF 并将残余物用水 (35 mL) 稀释, 用  $CH_2Cl_2$  (3 x 100 mL) 萃取。干燥 ( $Na_2SO_4$ ) 合并的有机层, 过滤, 在真空中浓缩并在真空中干燥过夜。其没有进一步纯化而用于光解除去 Ru。

将得自以上步骤的环化化合物溶于  $CH_3CN$  中并在 Raynot ( $\lambda = 350$  nm) 中光解 48 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物经层析 ( $SiO_2$ , EtOAc/己烷 2:1) 纯化, 得到 **25d**, 为褐色固体 (29 mg, 46 %); MS (FAB, NBA-G/TG-DMSO,  $m/z$  相对强度): 580  $[(M+1)^+$ , 80], 524 (100), 418 (40), 462 (30), 452 (20), 313 (60), 253 (20)。

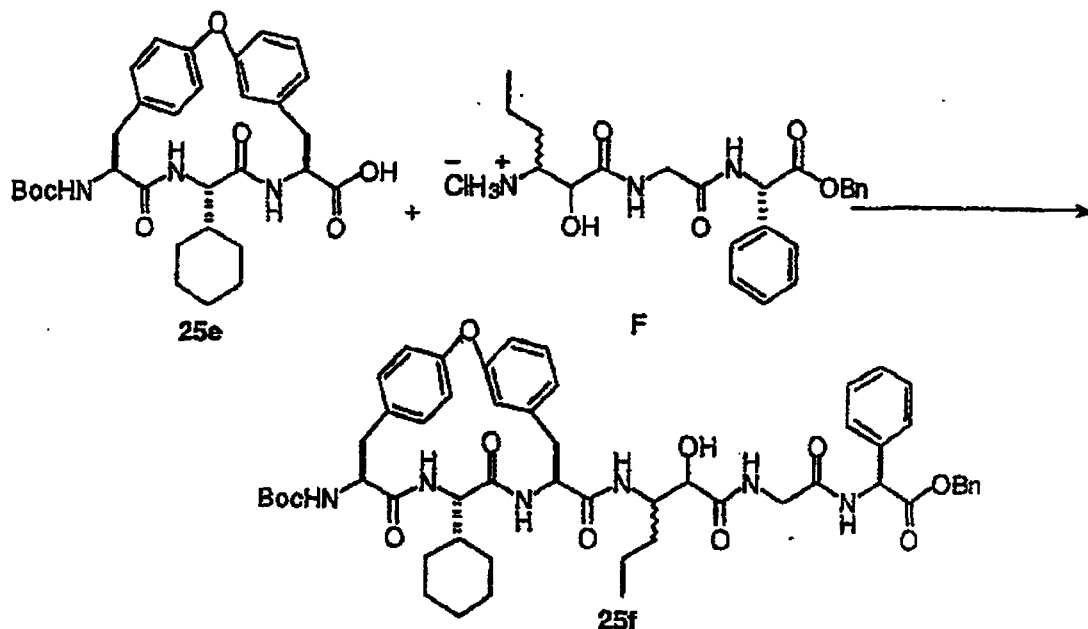
## 步骤 D:



将酯 **25d** (150 mg, 0.26 mmol) 在 THF (3 mL)、 $CH_3OH$  (3.0 mL) 和  $H_2O$  (3.0 mL) 中的溶液用  $LiOH \cdot H_2O$  (18 mg, 0.43 mmol, 1.65 当量) 处

理并在室温下搅拌 35 分钟。将该反应混合物用浓 HCl (13M, 1 mL) 酸化并萃取进  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 mL) 中。干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 合并的有机层, 过滤并在真空中浓缩得到酸 **25e**, 其没有进一步纯化直接用于偶合作用。

步骤 E:

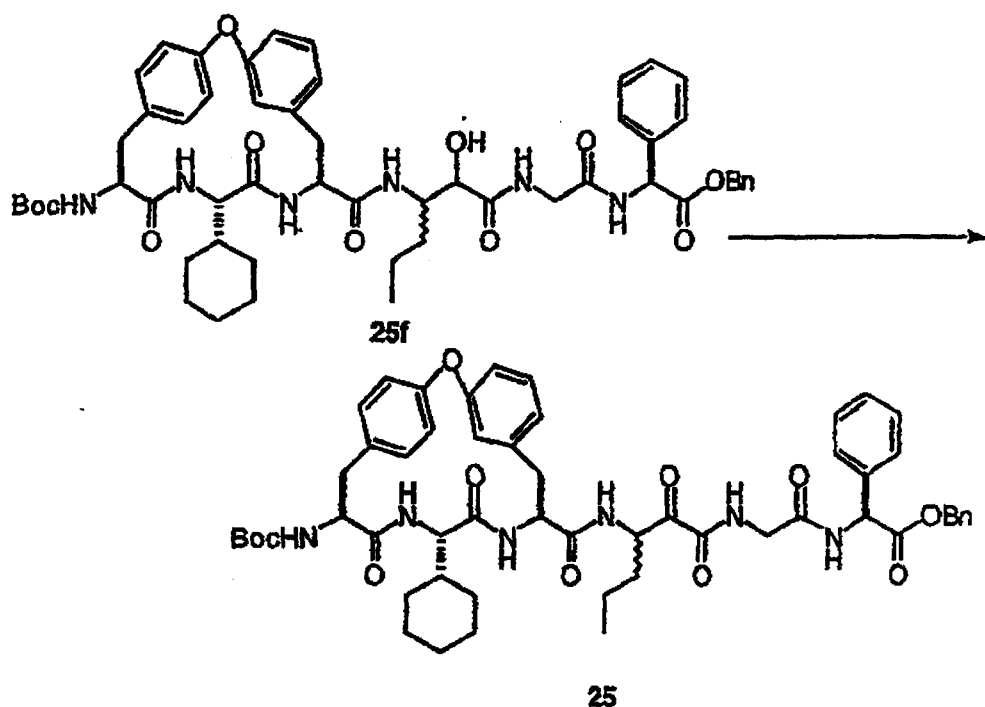


5

将酸 **25e** (150 mg, 0.27 mmol) 的无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.0 mL) 溶液用 HOBT (62 mg, 0.40 mmol) 和 Hünigs base (139 mg, 1.1 mmol, 4.0 当量) 处理。将该反应混合物冷却至  $0^\circ\text{C}$  并用 EDCI (53 mg, 0.34 mmol, 1.25 当量) 处理, 搅拌 30 分钟。将该反应混合物用胺 **F** (88 mg, 0.29 mmol, 1.22 当量) 处理并贮存在冰箱中 12 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并用  $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL) 稀释。用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 mL) 萃取含水层。用 HCl 水溶液 (1M, 3 x 20 mL)、NaOH 水溶液 (1M, 3 x 20 mL) 萃取合并的有机层, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 过滤并在真空中浓缩得到无色固体 **25f** (138 mg), 将其用于氧化作用。

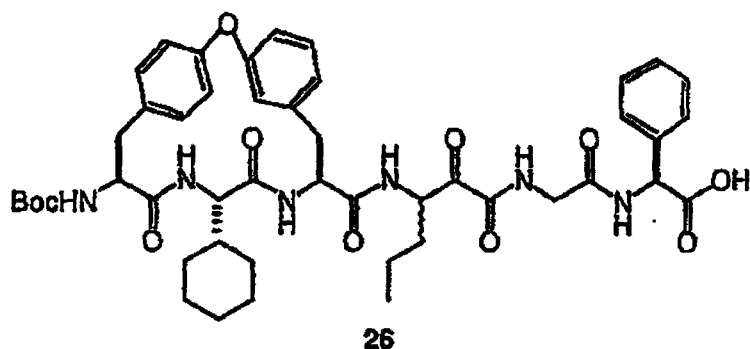
10

步骤 F:

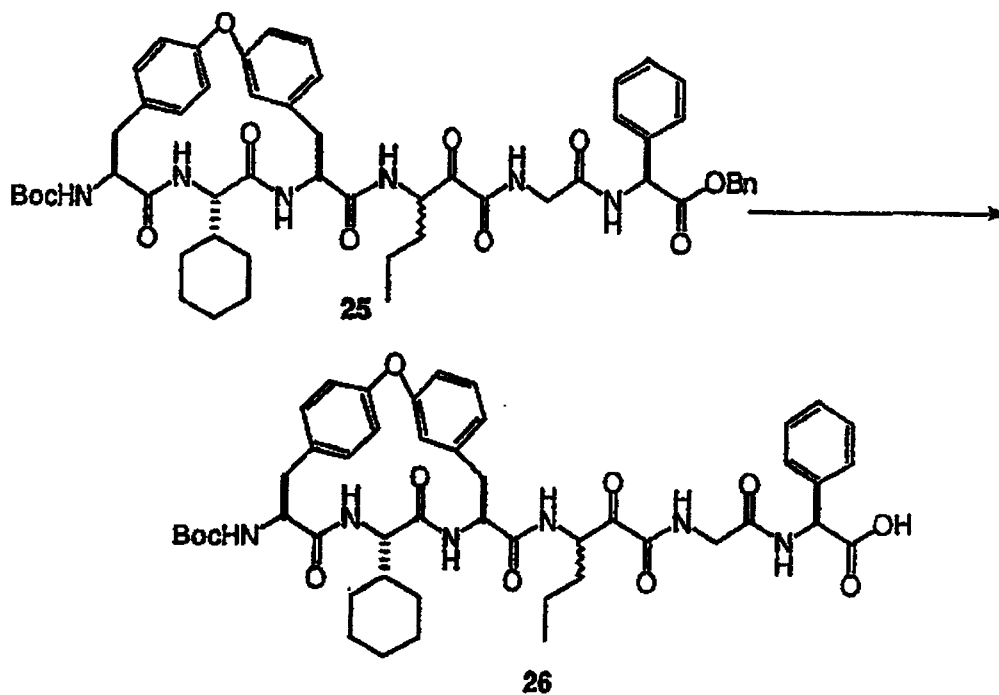


将醇 25f (140 mg, 0.143 mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : THF (1:1, 5.0 mL) 溶液用 Dess-Martin 试剂 (121 mg, 0.42 mmol, 3.0 当量) 处理。将该反应混合物在室温下搅拌 2 小时并将该混合物在真空中浓缩。将残余物经层析 ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:32) 纯化, 得到氧化产物 25 (57 mg, 41%), 为无色固体。

实施例 26: 式 26 化合物的制备:

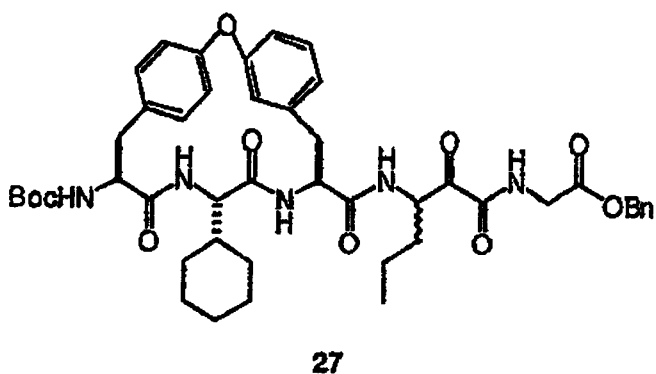


步骤 A:

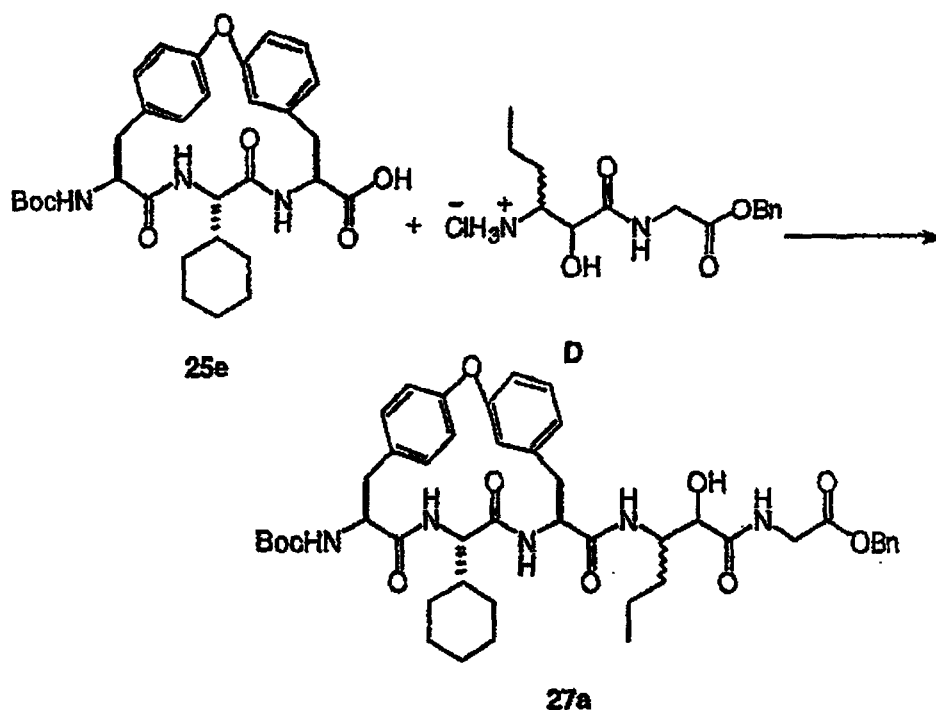


5 将苄基酯 **25** (30 mg, 38.0  $\mu\text{mol}$ ) 的  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{THF}$  (1:1, 4.0 mL) 溶液用 Pd/C (20 mg, 10 %) 处理并将氢气通入其起泡。加入一滴乙酸以加速还原作用。将该反应混合物通过硅藻土塞过滤并在真空中浓缩滤液。没有进一步纯化而对残余物 **26** 进行分析。

实施例 27: 式 27 化合物的制备:



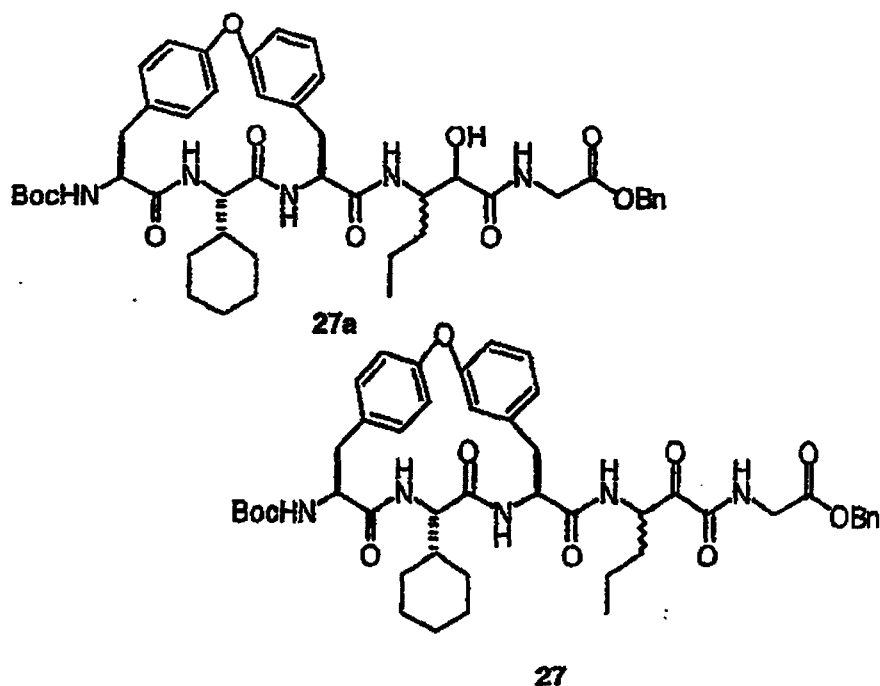
步骤 A:



5 将酸 **25e** (100 mg, 0.17 mmol) 的无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  溶液用 HOObt (41 mg, 0.26 mmol) 和 Hünigs base (91 mg, 0.70 mmol, 4.0 当量) 处理。将该反应混合物冷却至  $0^\circ\text{C}$  并用 EDCI (35 mg, 0.22 mmol, 1.25 当量) 处理, 搅拌 30 分钟。将该反应混合物用胺 **D** (71 mg, 0.22 mmol, 1.22 当量) 处理并贮存在冰箱中 12 小时。将反应混合物在真空中浓缩并用  $\text{H}_2\text{O}$  (30 mL) 稀释。用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 30 mL) 萃取含水层。用 HCl 水溶液 (1M, 30 mL)、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液 (1M, 30 mL) 萃取有机层, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 过滤并在真空中浓缩得到 **27a** 无色固体 (119 mg), 其用于氧化作用。MS (FAB), 842 [(M+1), 100], 765 (20), 735 (10), 657 (20), 575 (10), 492 (10), 464 (20), 446 (30)。HRMS 对于  $\text{C}_{46}\text{H}_{60}\text{N}_5\text{O}_{10}$  (M+1)<sup>+</sup> 的计算值: 842.4339; 实测值: 842.4336。

10

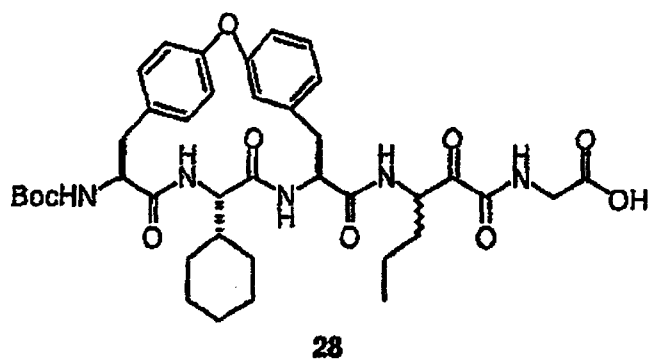
步骤 B:



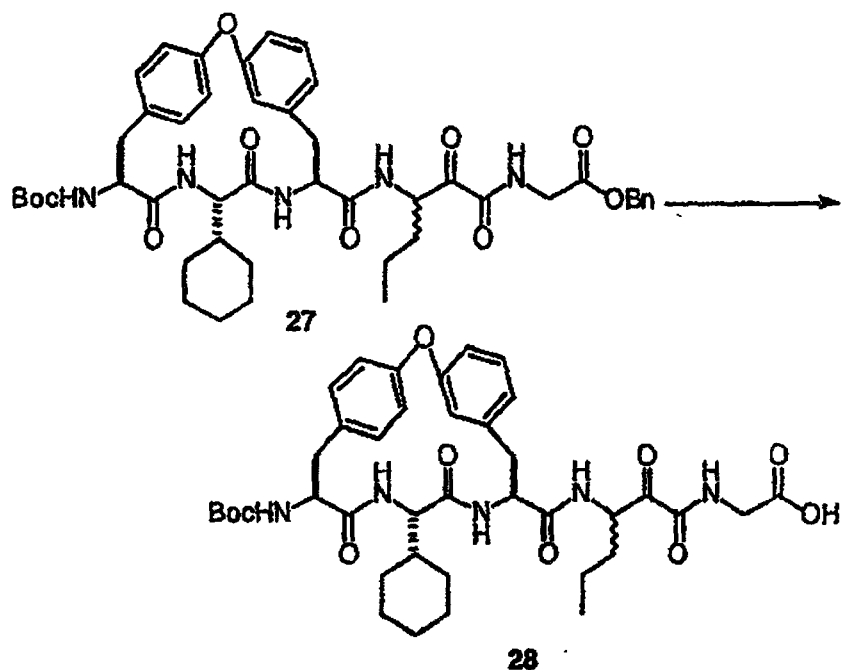
将醇 **27a** (120 mg, 0.143 mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : THF (1:1, 3.0 mL) 溶液用 Dess-Martin 试剂 (180 mg, 0.42 mmol, 3.0 当量) 处理。将该反应混合物在室温下搅拌 2 小时并将混合物在真空中浓缩。将残余物经层析 ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:32) 纯化, 得到氧化产物 **27**, 为无色固体。MS (FAB, NBA-G/TG-DMSO,  $m/z$  相对强度), 840  $[(M+1)^+$ , 50]。HRMS 对于  $\text{C}_{46}\text{H}_{58}\text{N}_5\text{O}_{10}$   $(M+1)^+$  的计算值: 840.4184; 实测值: 840.4199。

10

实施例 28: 式 28 化合物的制备:

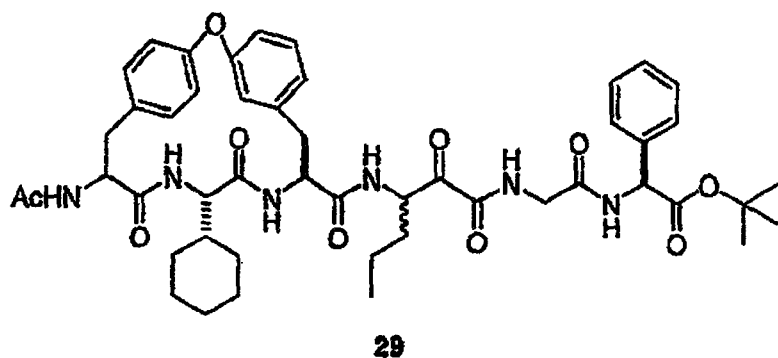


## 步骤 A:

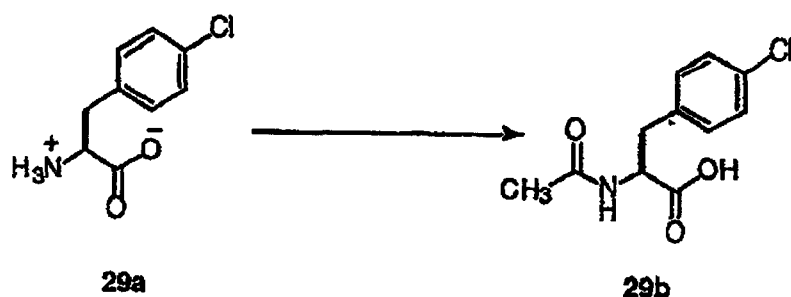


5 将苄基酯 27 (40 mg, 47.0  $\mu\text{mol}$ )的  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{THF}(1:1, 6.0 \text{ mL})$ 溶液用  $\text{Pd}/\text{C}$  (30 mg, 10%)处理并将氢气通入其起泡。加入一滴乙酸以加速还原作用。将该反应混合物通过硅藻土塞过滤并在真空中浓缩滤液得到 28。

## 实施例 29: 式 29 化合物的制备:

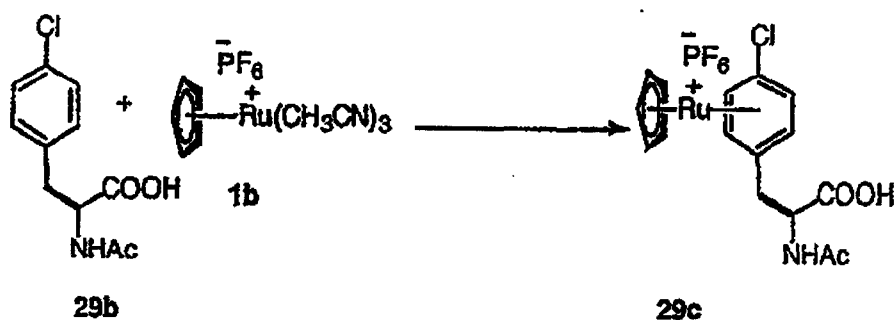


## 步骤 A:



将4-氯代苯基丙氨酸 **29a** (1.5 g, 7.5 mmol) 在 THF (20 mL) 和 H<sub>2</sub>O (20 mL) 中的溶液用 NaOH (900 mg, 22.5 mmol, 3.0 当量) 处理并冷却至 0℃。滴加入乙酰氯(707 mg, 9.00 mmol, 1.25 mmol) 的 THF (10 mL) 溶液并将反应混合物在室温下搅拌过夜。将该反应混合物用 HCl 水溶液 (1M, 10 mL) 酸化并用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL) 萃取。干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 合并的有机层, 过滤并在真空中浓缩得到 **29b**, 其没有纯化用于下一步骤中。

## 步骤 B:

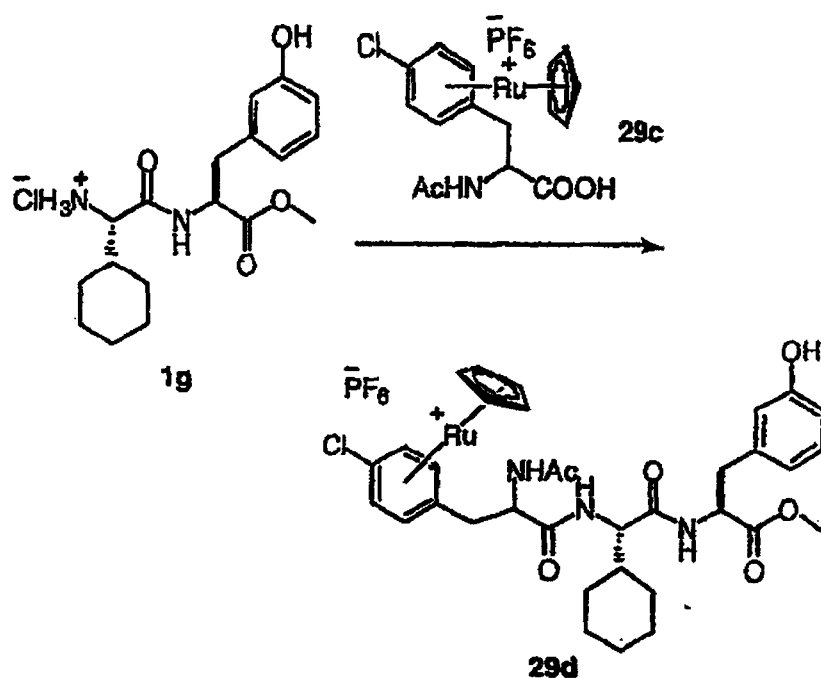


10

将 N-乙酰基-4-氯代苯基丙氨酸 **29b** (1.39 g, 5.75 mmol) 的二氯乙烷(118 mL) 溶液用 CpRu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>3</sub>PF<sub>6</sub> **1b** (2.5 g, 5.8 mmol, 1.0 当量) 处理并在回流下加热 2 小时。将该反应混合物冷却至 0℃ 并过滤。在真空中浓缩滤液并溶于 CH<sub>3</sub>CN(15 mL) 中, 用 Et<sub>2</sub>O(150 mL) 处理。经液析所述醚将分离出的树脂状物分离并将残余物溶于 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:1, 50 mL) 中, 在真空中浓缩得到 **29c**, 为棕色泡沫(2.2 g, 69%)。MS: (电喷雾, m/z 相对强度): 408 [(M-PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>, 100]。

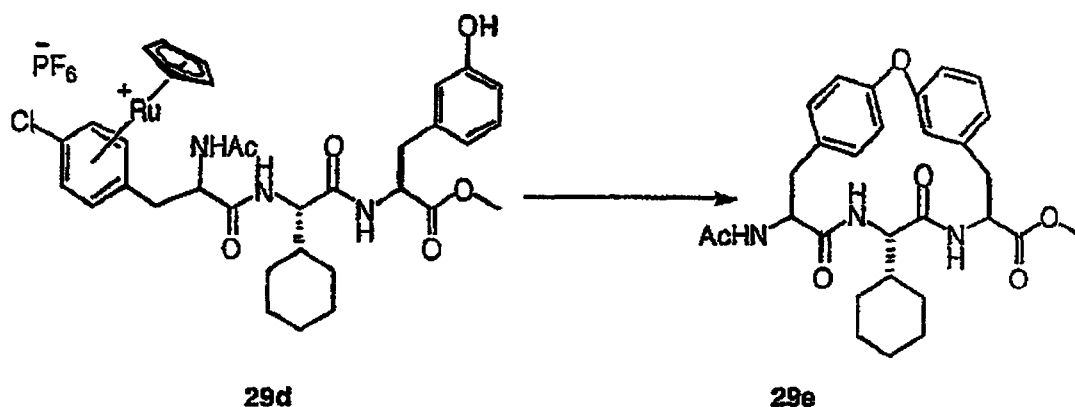
15

## 步骤 C:



将羧酸 **29c** (2.0 g, 4.00 mmol) 的无水 DMF (20 mL) 溶液用 Hünigs base (2.06 g, 16.0 mmol, 4.0 当量, 2.9 mL) 和 HOBt (810 mg, 6.0 mmol, 1.5 当量) 处理。将该反应混合物冷却至 0℃ 然后用 EDCl (888 mg, 5.0 mmol, 1.25 当量) 处理并搅拌 0.5 小时。向该反应混合物中加入胺盐酸盐 **1g** (1.48 g, 7.14 mmol, 1.2 当量) 并将该反应混合物在室温下搅拌 12 小时。蒸馏出 DMF 并将残余物用水稀释, 将含水层用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 100 mL) 萃取。用 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (200 mL)、HCl 水溶液 (100 mL)、盐水萃取合并的有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并在真空中浓缩, 将粗制产物 **29d** (1.2 g, 38 %) 不经进一步纯化用于环化作用。

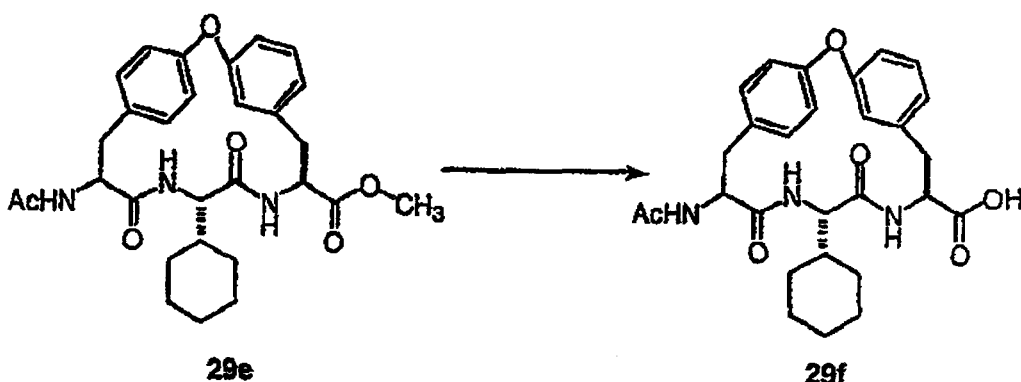
## 步骤 D:



用干燥  $N_2$  将氯代化合物 **29d** (1.2 g, 1.5 mmol) 的无水 DMF (120 mL) 溶液脱气并用  $CS_2CO_3$  (2.4 g, 7.4 mmol, 5.0 当量) 处理, 在室温下搅拌 23 小时。蒸馏出溶剂 DMF 并将残余物用水 (300 mL) 稀释, 用丙腈 (3 x 100 mL) 萃取。干燥 ( $Na_2SO_4$ ) 合并的有机层, 过滤并在真空中浓缩, 在真空中干燥过夜。其没有进一步纯化用于光解除去 Ru。

将来自以上步骤的环化化合物溶于  $CH_3CN$  (40 mL) 中并在 Raynot ( $\lambda = 350$  nm) 中光解 48 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物经层析 ( $SiO_2$ , EtOAc/己烷 4:1) 纯化, 得到褐色固体 **29e** (240 mg, 38%)。MS (FAB, NBA-G/TG-DMSO,  $m/z$  相对强度), 522 [(M+1)<sup>+</sup>, 100]。

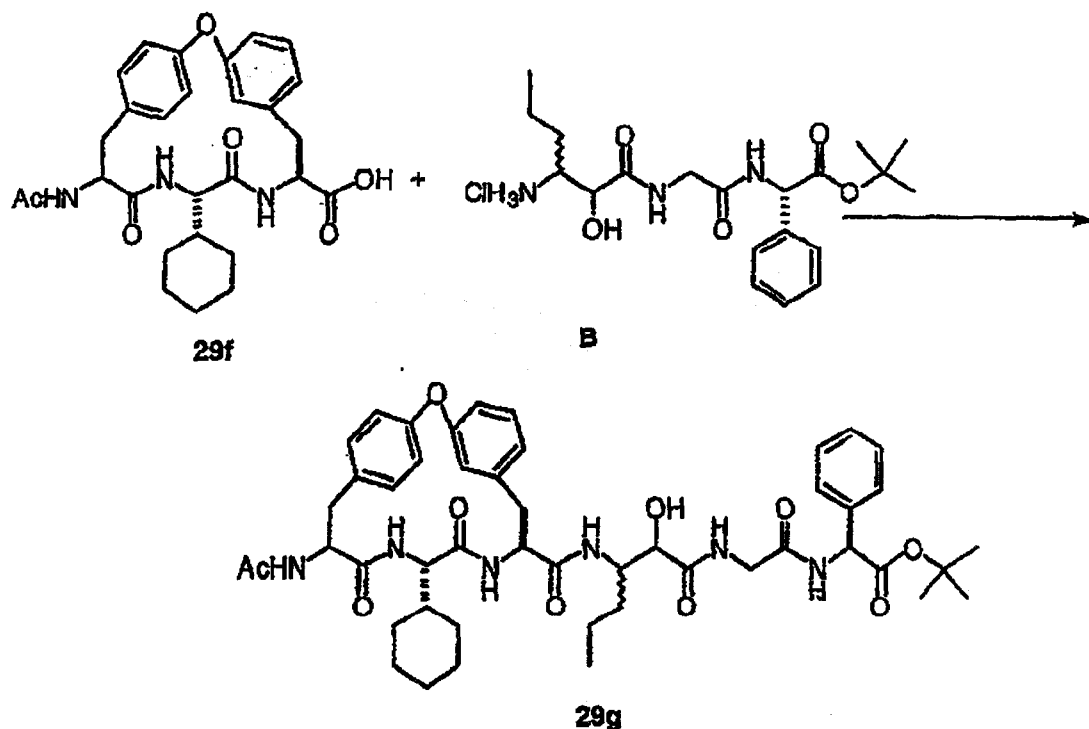
## 步骤 E:



将酯 **29e** (200 mg, 0.42 mmol) 在  $CH_3OH$  (5 mL)、 $CH_2Cl_2$  (13 mL) 和  $H_2O$  (2.0 mL) 中的溶液用  $LiOH \cdot H_2O$  (41 mg, 1.0 mmol, 2.4 当量) 处理并在室温下搅拌 3 小时。将该反应混合物用 HCl 水溶液 (13M, 1 mL)

酸化并萃取进  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 mL) 和 EtOAc (3 x 50 mL) 中, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 合并的有机层, 过滤并在真空中浓缩得到酸 **29f** (178 mg), 其没有进一步纯化直接用于偶合作用。

步骤 F:

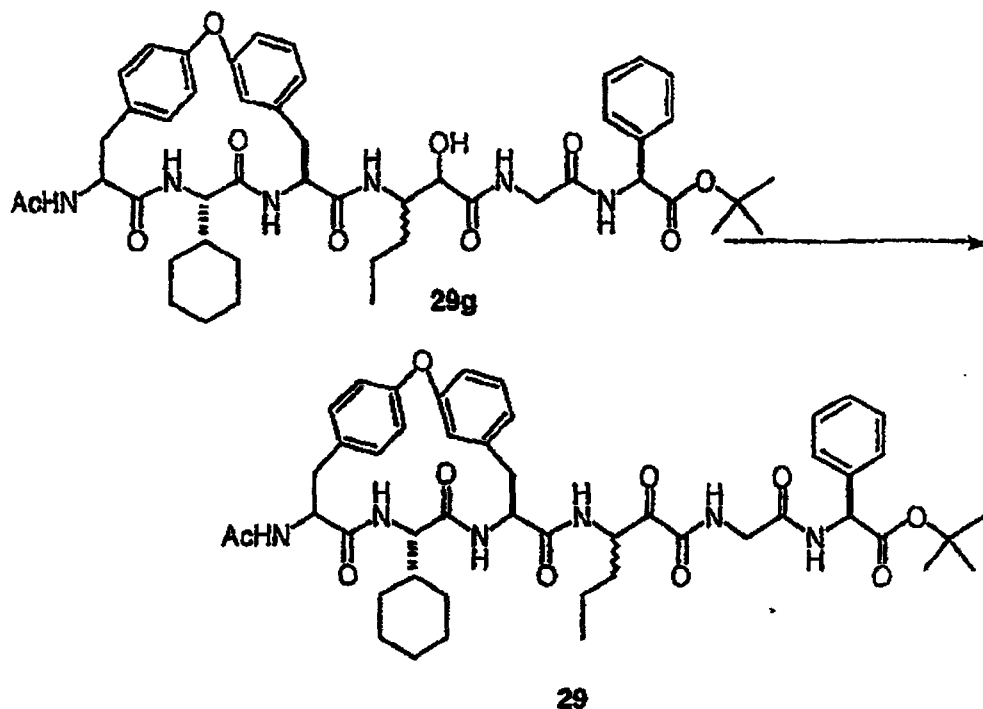


5

将酸 **29f** (90 mg, 0.18 mmol) 的无水 DMF (1.0 mL) 溶液用 HOBt (45 mg, 0.33 mmol, 1.6 当量)、Hünigs base (142 mg, 1.1 mmol, 5.0 当量) 和胺 **B** (118 mg, 0.28 mmol, 1.47 当量) 处理。将该反应混合物冷却至  $0^\circ\text{C}$  并用 EDCl (63 mg, 0.33 mmol, 1.6 当量) 处理并在  $0^\circ\text{C}$  下搅拌 20 分钟、12 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并用  $\text{H}_2\text{O}$  (30 mL) 稀释。用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 30 mL) 和 EtOAc (3 x 30 mL) 萃取合并的含水层。用 NaOH 水溶液 (2 M, 30 mL) 萃取有机层, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 过滤并在真空中浓缩, 得到无色固体 **29g** (50 mg, 32%), 将其用于氧化作用。MS: (电喷雾,  $m/z$  相对强度): 883  $[(M+1)^+$ , 100], 522 (30), 394 (60)。

10

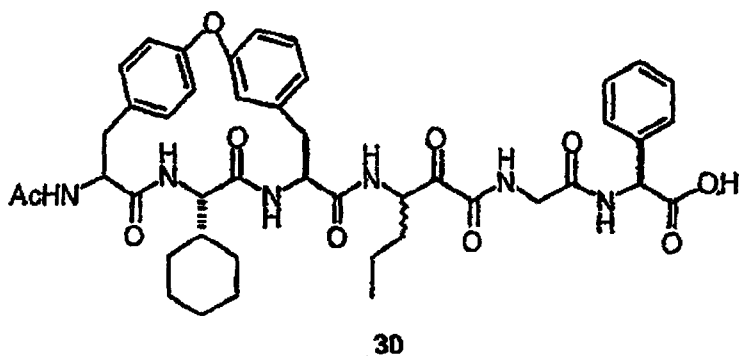
## 步骤 G:

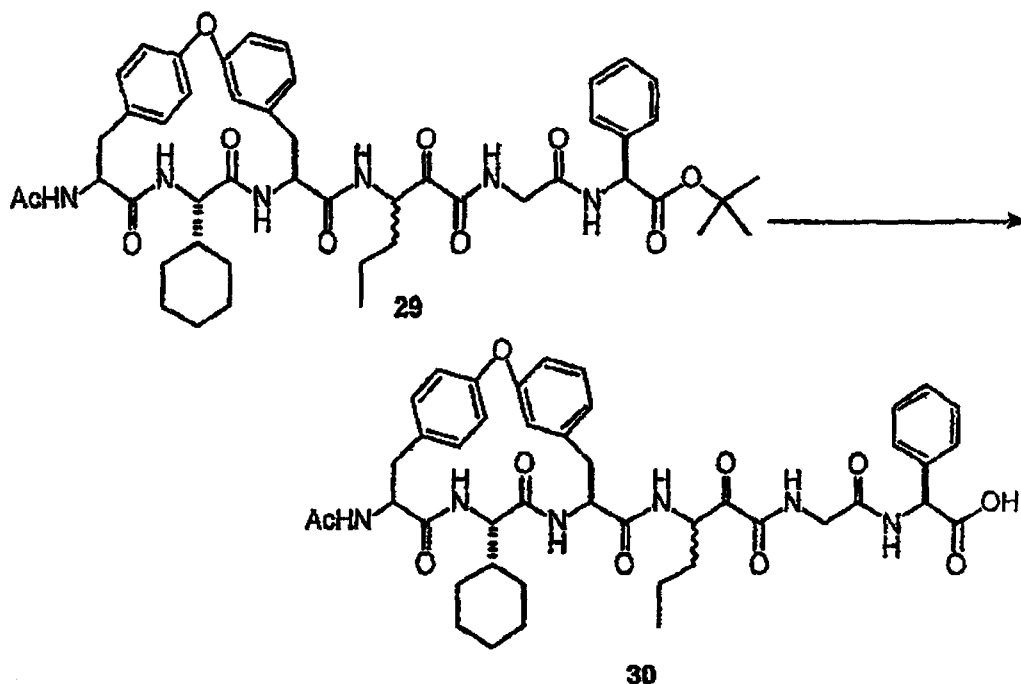


将醇 29g (50 mg, 60.0  $\mu\text{mol}$ )的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2.0 mL)悬浮液用 Dess-Martin 试剂(40 mg, 0.94 mmol, 2.0 当量)处理。将该反应混合物在室温下搅拌 3 小时并将混合物在真空中浓缩。将残余物经层析( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:32)纯化, 得到氧化产物 29 (41 mg, 80%), 为无色固体。MS: (FAB,  $m/z$ , 相对强度): 881  $[(M+1)^+$ , 100], 825 (170), 248 (100)。

10

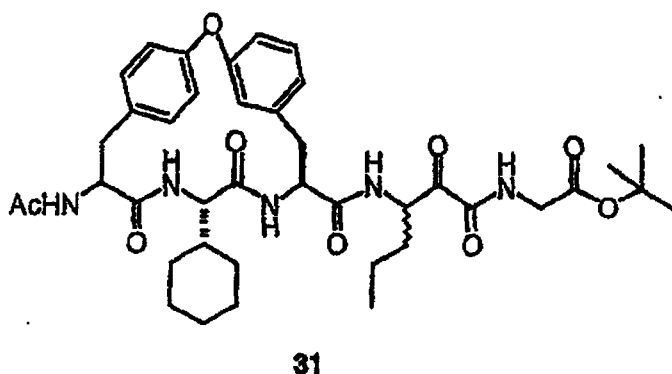
## 实施例 30: 式 30 化合物的制备:



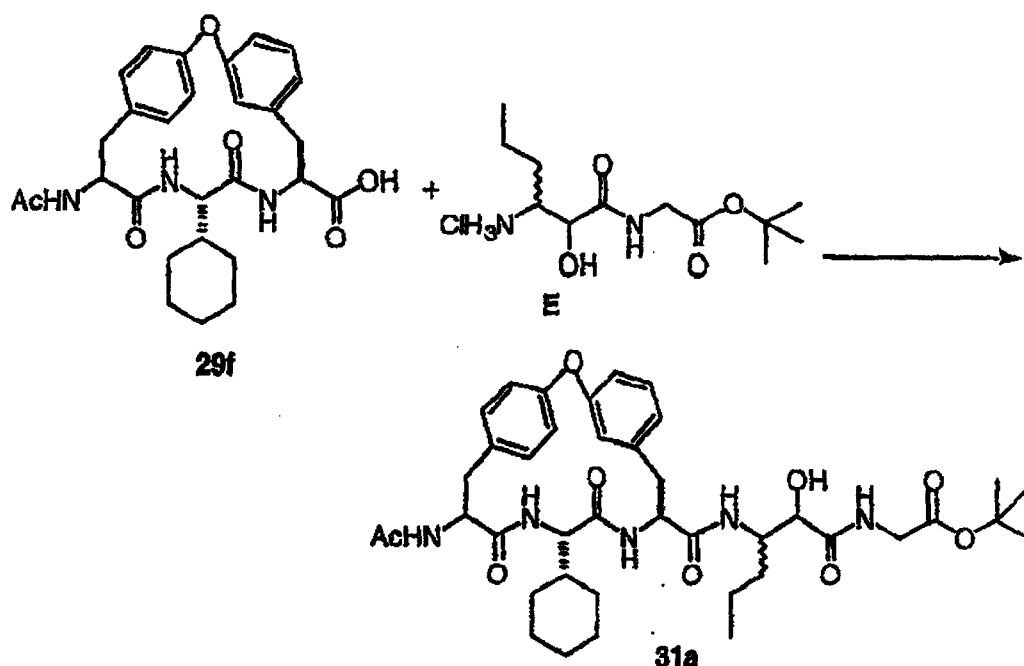


5 将叔丁基酯 **29** (23.0 mg, 26.0  $\mu\text{mol}$ ) 的溶液用 TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1, 2.0 mL) 处理并在室温下搅拌 4 小时。使所述酯相对于基线消失, 之后进行 TLC ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:24)。完成脱保护后, 将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物反复用庚烷/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4.0 mL) 处理, 浓缩得到褐色固体 **30** (13.0 mg, 100 %)。MS: (电喷雾,  $m/z$  相对强度): 825 [(M+1)<sup>+</sup>, 100]。

#### 实施例 31: 式 31 化合物的制备:

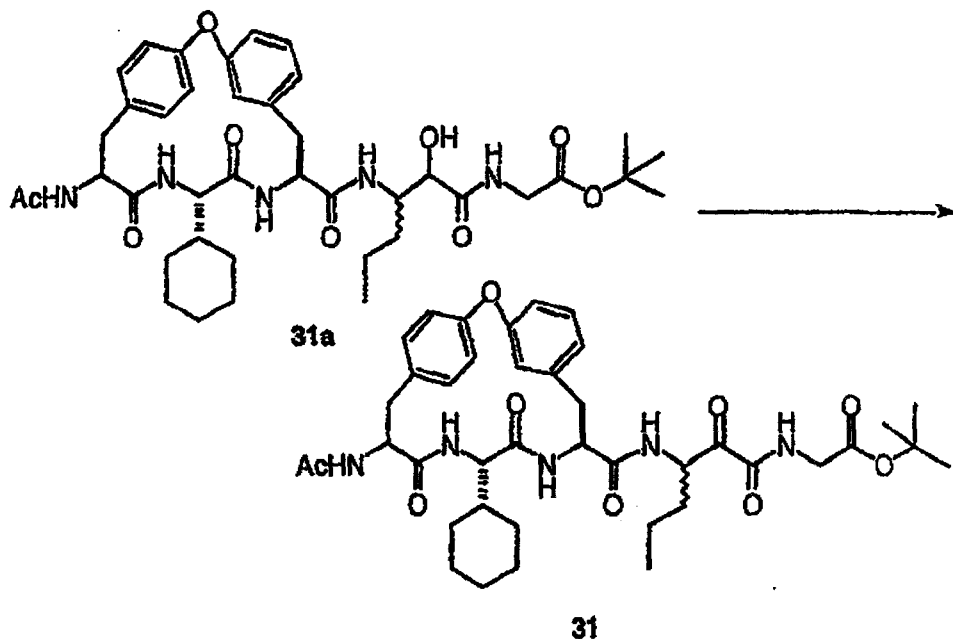


步骤 A:



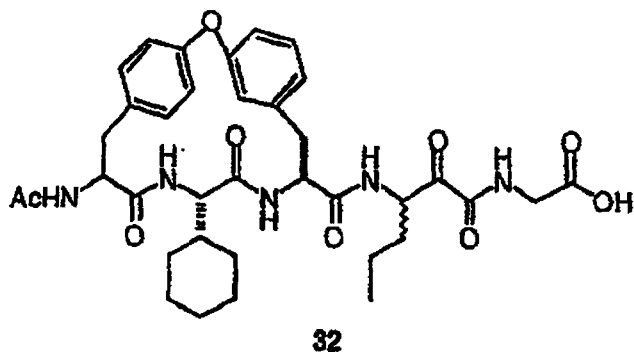
将酸 29f (150 mg, 0.29 mmol) 在无水 DMF (4.0 mL)、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3.0 mL) 中的溶液用 HOBT (58 mg, 0.44 mmol) 和 Hünigs base (149 mg, 1.1 mmol, 4.0 当量) 处理。将该反应混合物冷却至 0℃ 并用 EDCl (82 mg, 0.44 mmol, 1.5 当量) 处理, 搅拌 30 分钟。将该反应混合物用胺 E (88 mg, 0.29 mmol, 1.22 当量) 处理并在室温下搅拌 12 小时。将反应混合物在真空中浓缩并用 H<sub>2</sub>O (30 mL) 稀释。用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL) 萃取含水层。用 HCl 水溶液 (1 M, 3 x 20 mL)、NaOH 水溶液 (1M, 3 x 20 mL) 萃取合并的有机层, 干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并在真空中浓缩, 得到无色固体 31a (56 mg), 其用于氧化作用。MS: (电喷雾, *m/z* 相对强度): 750 [(M+1)<sup>+</sup>, 20], 663 (10), 522 (10), 416 (20), 247 (30)。

步骤 B:

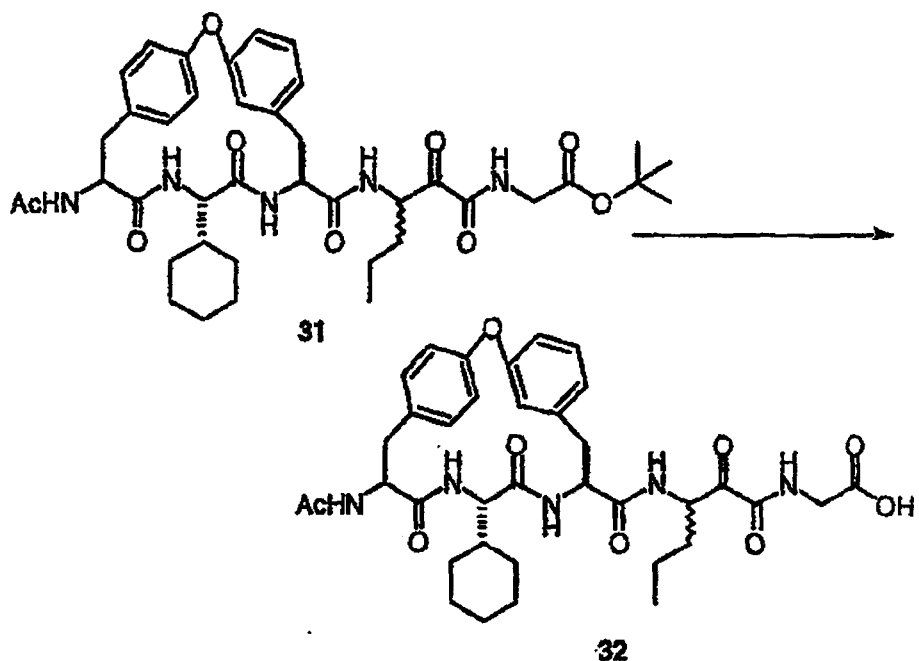


将醇 31a (56 mg, 75  $\mu\text{mol}$ )的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5.0 mL)溶液用 Dess-Martin 试剂(93 mg, 0.22 mmol, 3.0 当量)处理。将该反应混合物在室温下搅拌 4 小时并将混合物在真空中浓缩。将残余物经层析( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:19)纯化, 得到氧化产物 31 (34 mg, 60%), 为无色固体。MS: (电喷雾,  $m/z$  相对强度): 748  $[(M+1)^+]$ , 35], 692 (5), 279 (100)。

实施例 32: 式 32 化合物的制备:

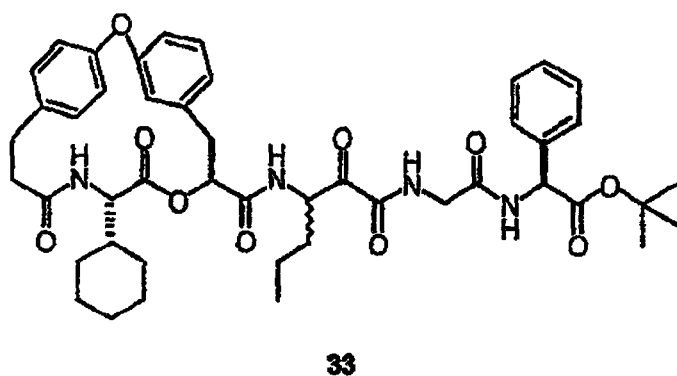


步骤 A:



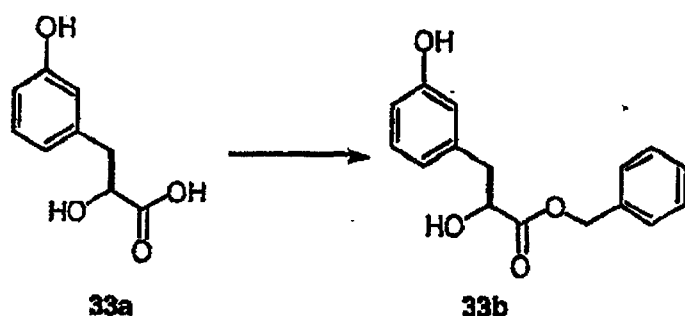
5 将叔丁基酯 **31** 的溶液用 TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1, 4.0 mL) 处理并在室温下搅拌 4 小时。使所述酯相对于基线消失，之后进行 TLC (CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:24)。完成脱保护后，将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物反复用庚烷/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4.0 mL) 处理，浓缩得到 **32**，为褐色固体。

实施例 33: 式 **33** 化合物的制备:



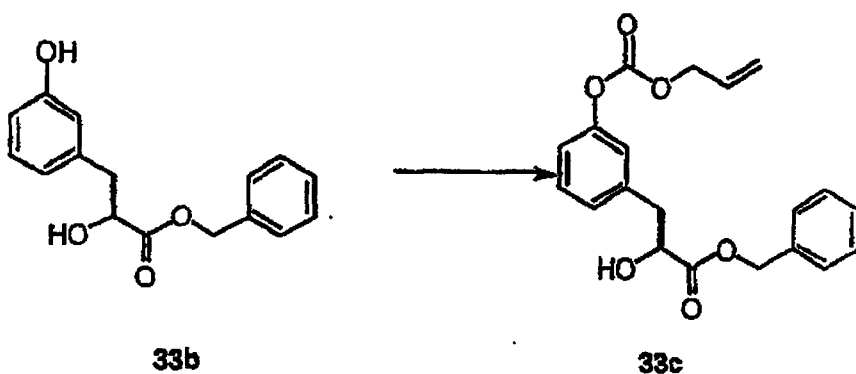
10

## 步骤 A:



将酸 **33a** (4.5 g, 25.0 mmol) 在二噁烷(30 mL)和苯(80 mL)中的溶液用 BnOH (8.0 g, 74 mmol, 3.0 当量) 和 TsOH · H<sub>2</sub>O (713 mg, 3.75 mmol, 10 mol %) 处理。当用迪安-斯达克装置分离水时, 将该反应混合物在回流下加热 5 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物经层析 (SiO<sub>2</sub>, EtOAc/己烷 3:7) 纯化, 得到苄基酯 **33b**, 为无色油状物(4.2 g, 62 %); *R<sub>f</sub>*: 0.22 (EtOAc/己烷 3:7); <sup>13</sup>C NMR (CH<sub>3</sub>OD, 75 MHz, δ): 175.1, 158.2, 139.7, 130.3, 129.5, 129.3, 121.7, 117.4, 114.6, 73.1, 67.6, 41.6; MS (FAB, G/TG-DMSO, *m/z*, 相对强度): 351 ([M+DMSO]<sup>+</sup>, 70), 273 ([M+1]<sup>+</sup>, 100), 255 (20), 227 (30), 181 (40); HRMS: 对于 C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub> (M+1)<sup>+</sup> 的计算值: 272.1049; 实测值: 272.1054。

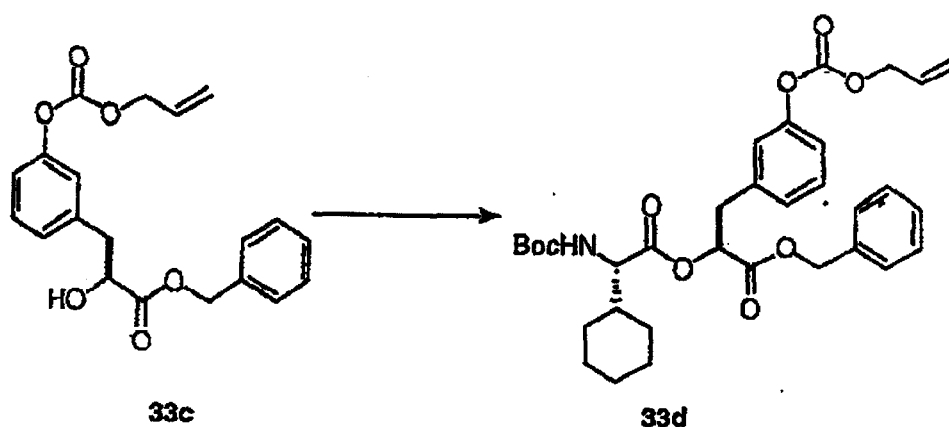
## 步骤 B:



将苄基酯 **33b** (3.8 g, 12.9 mmol) 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(100 mL) 溶液用 Et<sub>3</sub>N (1.55 g, 15.4 mmol, 2.2 mL, 1.1 当量) 处理, 冷却至 -78 °C (2-PrOH, 干冰) 并滴加入氯甲酸烯丙基酯(1.84 g, 15.36 mmol, 1.1 当量) 的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10

mL)溶液。将该反应混合物加温至室温并用 HCl 水溶液(1 M, 100 mL)稀释。用 EtOAc (3 x 100 mL)萃取反应混合物。用 HCl 水溶液(100 mL, 1M)、盐水(100 mL)洗涤合并的有机层, 干燥(MgSO<sub>4</sub>), 在真空中浓缩得到 **33c**, 其没有进一步纯化用于下一步骤中。R<sub>f</sub>: 0.43 (EtOAc/Hex 7:13); <sup>13</sup>C NMR (CH<sub>3</sub>OD, 75 MHz, δ): 174.8, 162.5, 155.0, 152.5, 140.3, 137.1, 132.8, 130.3, 129.6, 129.5, 129.4, 123.2, 120.3, 119.4, 72.7, 70.1, 67.7, 41.2, 29.9.

步骤 C:

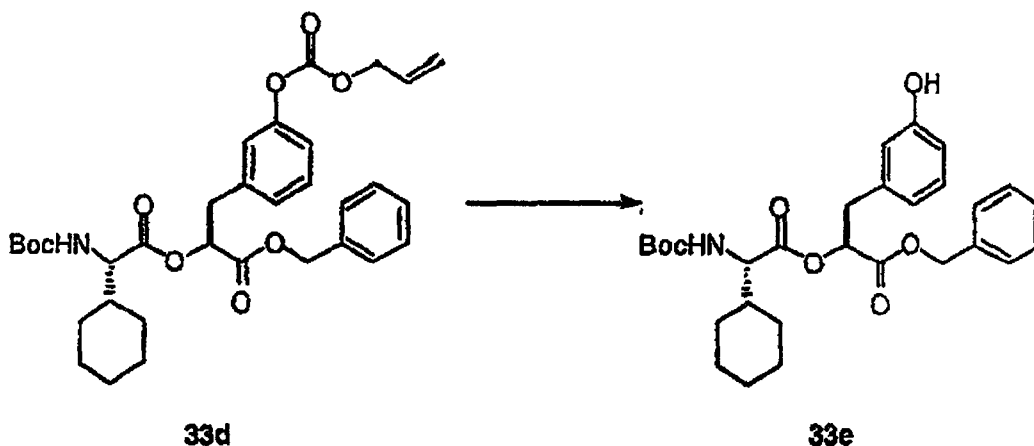


10 将 Boc-环己基甘氨酸一水合物 **1d** (6.02 g, 23.4 mmol, 2.0 当量)的溶液溶于 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中并干燥(MgSO<sub>4</sub>)。将该混合物过滤并将残余物与甲苯一起共沸干燥。将残余物溶于 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中并用 HOBT(4.73 g, 35.1 mmol, 2.9 当量)、EDCI (6.7 g, 35.1 mmol, 2.9 当量)和 Hünigs base (8.31 g, 64.3 mmol, 11 mL)处理。将其在室温下搅拌 30 分钟, 加入 alloc 保护的醇 **33c** (4.3 g, 12.04 mmol)。将该反应混合物在室温下搅拌 36 小时并用 HCl 水溶液(1 M, 100 mL)稀释, 用 EtOAc (3 x 100 mL)萃取。用 NaOH 水溶液(1 M, 100 mL)、盐水(100 mL)萃取合并的有机层, 干燥, 在真空中浓缩并经层析(SiO<sub>2</sub>, EtOAc/Hex 1:4)纯化, 得到缩肽(depsipeptide) **33d** (7.1 g, 100 %). R<sub>f</sub>: 0.18 (EtOAc/Hex 1:4); HRMS: 对于 C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>7</sub> (M-Boc)<sup>+</sup>的计算值: 496.2335; 实测值: 496.2333.

15

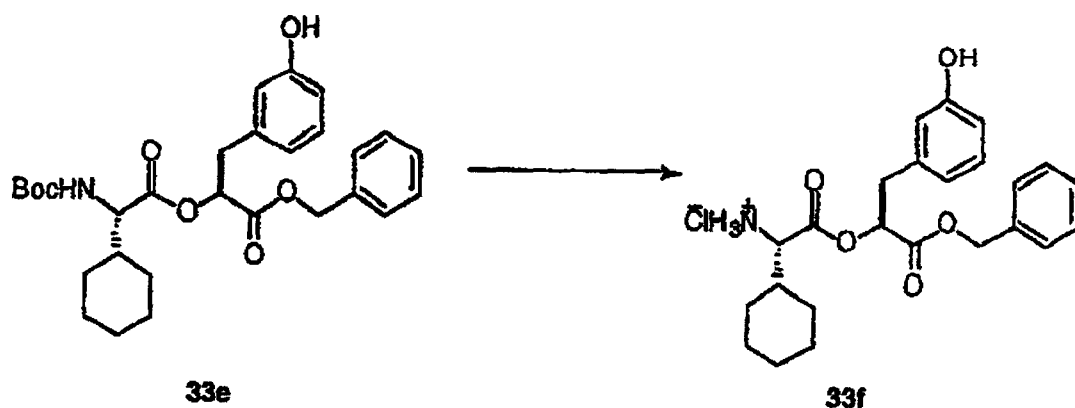
20

## 步骤 D:



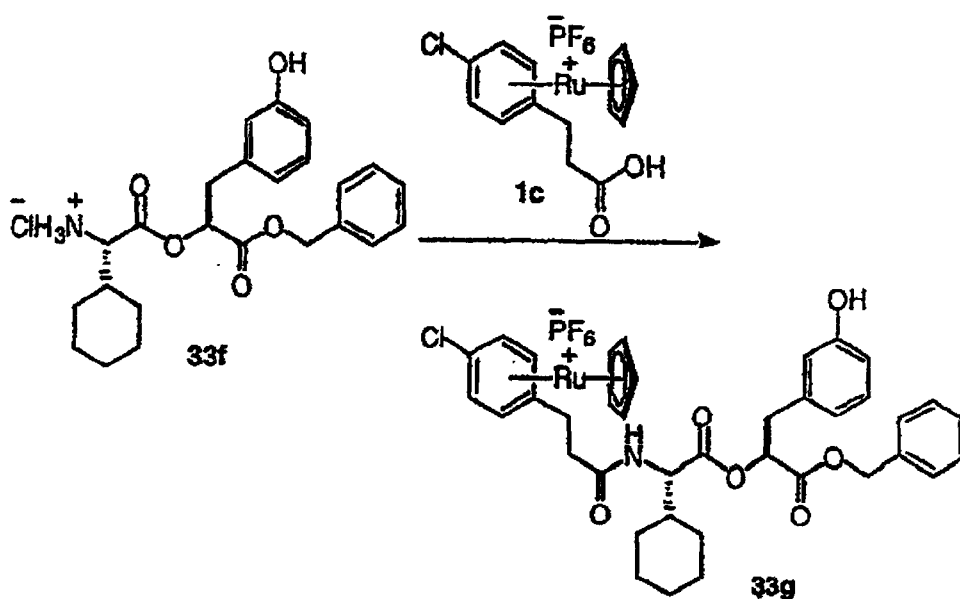
将 alloc-保护的缩肽 **33d** (7.8 g, 13.0 mmol) 的无水 THF (200 mL) 溶液在氮气氛下用双甲酮(3.27 g, 23.4 mmol, 2.0 当量)和 Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> (780 mg, 0.67 mmol, 5 mol %) 处理。将该反应混合物在室温下搅拌 1 小时并在反应物消失后进行 TLC(EtOAc/Hex 1:4)。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物经层析(SiO<sub>2</sub>, EtOAc/己烷 1:4)纯化, 得到酚 **33e** (5.2 g, 78 %), 为无色泡沫状物。R<sub>f</sub>: 0.52 (EtOAc/己烷 3:7); <sup>1</sup>H NMR (d<sub>4</sub>-CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz, δ): 7.4-7.19 (m, 5H), 7.15-6.99 (m, 1H), 6.68-6.55 (m, 4H), 5.43-5.01 (m, 3H), 4.6 (bs, 2H), 4.11-4.00 (m, 1H), 3.18-2.91 (m, 2H), 1.80-1.55 (bs, 6H), 1.39 (s, 9H), 1.21-0.89 (m, 6H); <sup>13</sup>C NMR (CH<sub>3</sub>OD, 75 MHz, δ, 非对映异构体的混合物) 171.6, 169.4, 169.3, 161.1, 157.1, 157.0, 137.2, 136.9, 135.4, 135.3, 129.2, 129.1, 128.2, 128.2, 128.0, 120.3, 120.1, 116.0, 115.9, 113.6, 94.8, 79.3, 73.6, 73.5, 66.7, 66.6, 58.6, 58.5, 40.0, 39.9, 36.8, 29.1, 27.7, 27.3, 25.5。MS (电喷雾, m/z, 相对强度) 1023 ([2M+1]<sup>+</sup>, 20); 512 ([M+1]<sup>+</sup>, 20), 412 ([M-Boc]<sup>+</sup>, 100), 202 (40) HRMS 对于 C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>5</sub> (M-Boc)<sup>+</sup> 的计算值: 412.2123; 实测值: 412.2119。

## 步骤 E:



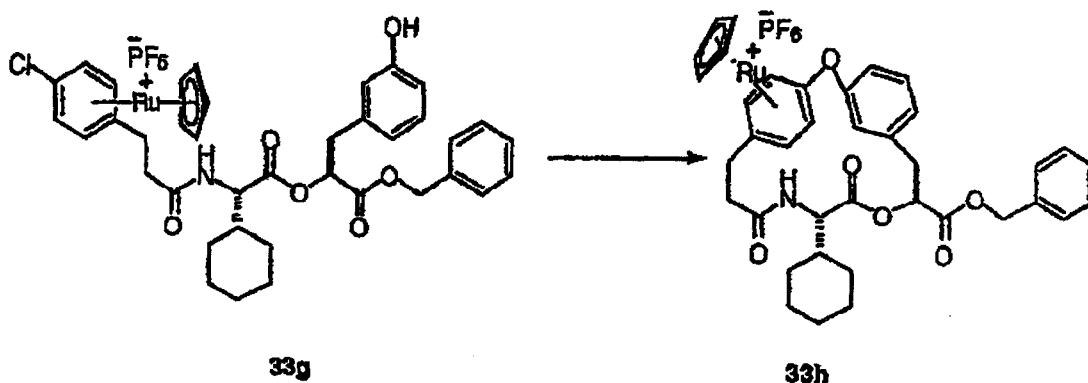
将 Boc-保护的胺 **33e** (5.2 g, 10.7 mmol) 的溶液与 HCl (4M, 二噁烷, 200 mL, 800 mmol, 80 当量) 一起搅拌直至经 TLC (EtOAc/Hex 3:7) 指示原料相对于基线消失。将该反应混合物在真空中浓缩并在高真空中干燥, 残余物 **33f** 直接用于下一步骤中。<sup>1</sup>H NMR ( $d_4$ -CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz,  $\delta$ ): 7.40-3.23 (m, 5H), 7.07 (q, 1H,  $J = 13$  Hz), 6.77-6.6 (m, 3H), 5.33-5.41 (m, 1H), 5.3-5.05 (2AB, 2H), 3.99-3.85 (m, 1H), 3.35-2.2 (m, 2H), 2.00-1.5 (m, 5H), 1.50-0.80 (m, 6H); MS: (FAB, G/TG-DMSO,  $m/z$ , 相对强度): 412 ( $[M+1]^+$ , 100); HRMS: 对于 C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>5</sub> M<sup>+</sup> 的计算值: 412.2123; 实测值: 412.2139。

## 步骤 F:



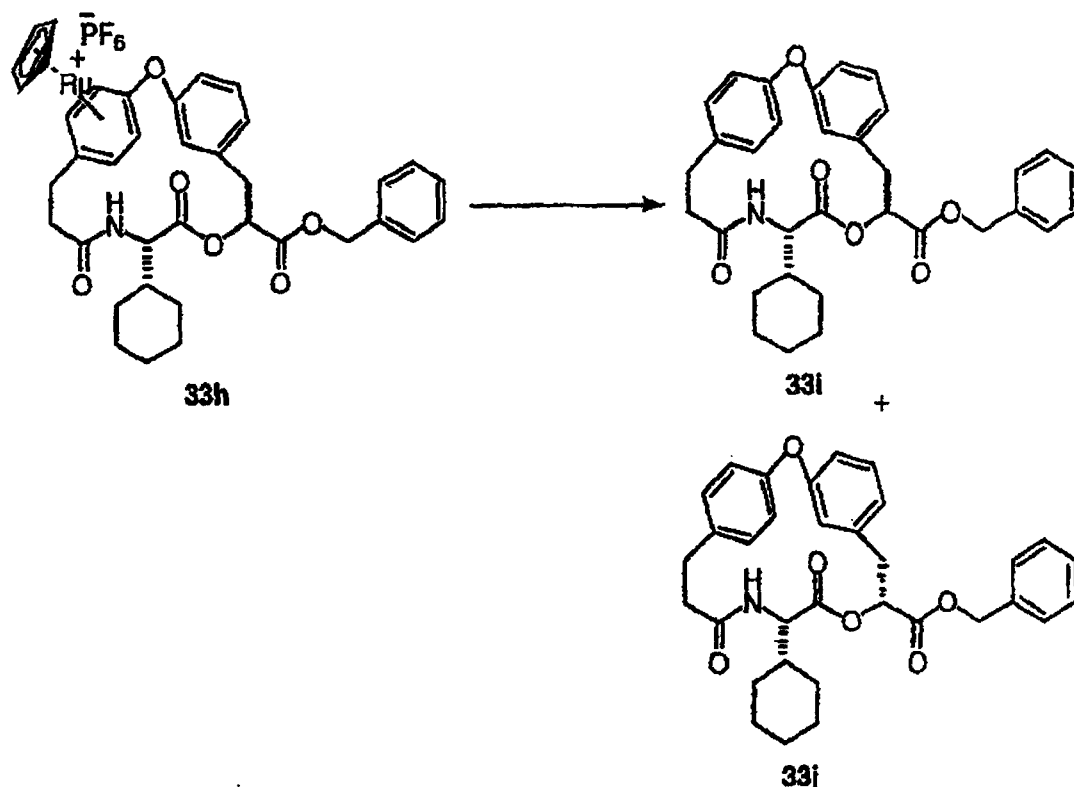
将[CpRu( $\eta^6$ -4-氯代苯基丙酸)]PF<sub>6</sub> 1c (2.0 g, 4.03 mmol)的无水 DMF (20 mL)溶液用 HOBt (835 mg, 6.0 mmol, 1.5 当量)和 Hünigs base (2.06 g, 2.95 mL, 16 mmol, 4.0 当量)处理。将该反应混合物冷却至 0°C 并用 EDCI (1.15 g, 6.0 mmol, 1.5 当量)处理。将该反应混合物在 0°C 下  
 5 搅拌 30 分钟。将胺盐酸盐加入到在无水 DMF (10 mL)中的 33f (1.8 g, 4.03 mmol, 1.0 当量)中。将该反应混合物在室温下搅拌 12 小时并真空蒸馏出 DMF。将残余物用 HCl 水溶液(1 M, 100 mL)稀释并萃取到 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 100 mL)中。用 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液(3 x 50 mL)、盐水(100 mL)萃取合并的有机层, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并在真空中浓缩得到棕色固  
 10 体 33g (3.5 g), 其用于环化作用。MS: (电喷雾, *m/z*, 相对强度): 743 [(M-PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>, 100], 304 (60); HRMS: 对于 C<sub>38</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>6</sub>Cl<sup>102</sup>Ru (M-PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>的计算值: 744.1666; 实测值: 744.1694。

步骤 G:



15 将 $\eta^6$ -钌络合物 33g (3.5 g, 3.93 mmol)的无水 DMF (300 mL)溶液用干燥的氮气脱气并用 Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6.5 g, 19.95 mmol, 5.0 当量)处理, 在室温下搅拌 16 小时。将该反应混合物在真空中浓缩以除去 DMF, 用 H<sub>2</sub>O (100 mL)稀释残余物。将该反应混合物用 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 100 mL)萃取。用盐水萃取合并的 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 层, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 过滤并在真空中浓缩得  
 20 到 33h, 其直接用于光解作用。MS: (电喷雾, *m/z*, 相对强度): 708 [(M-PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>, 100]; HRMS: 对于 C<sub>38</sub>H<sub>40</sub>NO<sub>6</sub>O<sub>2</sub>Ru (M-PF<sub>6</sub>)<sup>+</sup>的计算值: 708.1892; 实测值: 708.1918。

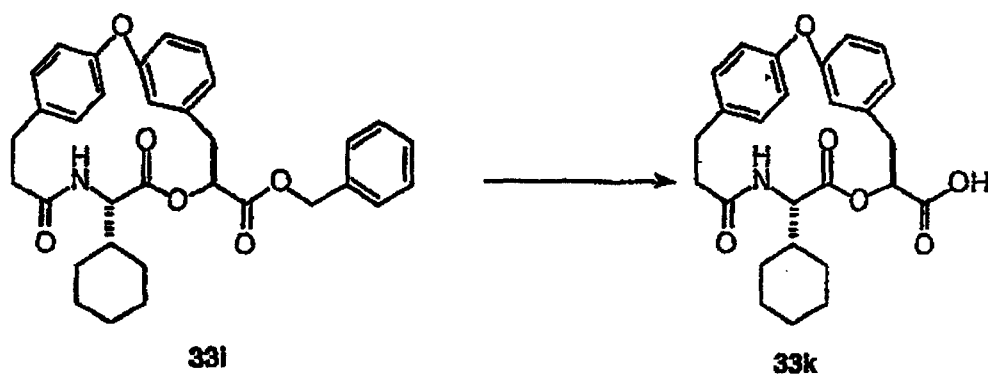
步骤 H:



将环化的钌络合物 **33h** (3.5 g, 3.9 mmol) 的  $\text{CH}_3\text{CN}$  (60 mL) 溶液脱气并在石英管中在  $\lambda = 350 \text{ nm}$  下、分两批光解，各进行 48 小时。将所述反应混合物集中在一起并经层析 ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$  9/1) 纯化，得到环状缩肽，为非对映异构体的混合物 (700 mg, 34%)。将这些非对映异构体经层析 (己烷/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$  6:3:1) 分离，得到两种非对映异构体 **33i** (370 mg, 18%) 和 **33j** (216 mg, 11%)，为无色固体。  $R_f$  0.28 (己烷: EtOAc 3:2);  $[\alpha]_D = 25$  (c 0.15,  $\text{CHCl}_3$ ,  $20^\circ\text{C}$ ): IR (纯的,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3329 (w), 2960 (m), 2926 (s), 2854 (s), 1745 (s), 1680 (m), 1589 (m), 1506 (m), 1446 (m), 1365 (w), 1259 (s), 1099 (m), 1030 (s), 800 (s), 752 (m), 698 (w), 619 (w);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz,  $\delta$ ): 7.36-7.23 (m, 5H), 7.18-6.99 (m, 4H), 6.81 (d, 1H,  $J = 7.5 \text{ Hz}$ ), 6.74 (dd, 1H,  $J = 2.7, 5.7 \text{ Hz}$ ), 6.30 (s, 1H), 5.75 (d, 1H,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ ), 5.61 (dd, 1H,  $J = 2.4 \text{ Hz}, 5.4 \text{ Hz}$ ), 5.18, 5.14 (AB, 2H,  $J = 12.3 \text{ Hz}$ ), 4.23 (dd, 1H,  $J = 4.2 \text{ Hz}, 3.3 \text{ Hz}$ ), 3.26-3.01 (m, 2H), 2.98-2.85 (m, 2H), 2.68-2.64 (m, 1H), 2.38-2.34 (m, 1H), 1.96-1.51 (m, 6H),

1.51-0.96 (m, 5H);  $^{13}\text{C}$  NMR: ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz,  $\delta$ , ppm) 177.3, 171.1, 168.7, 159.8, 155.3, 138.6, 135.4, 134.9, 131.2, 129.7, 129.2, 128.7, 126.6, 126.1, 123.3, 120.8, 120.8, 117.5, 114.2, 71.8, 57.5, 56.9, 41.5, 39.0, 35.7, 32.6, 31.3, 29.0, 27.6, 26.0, 25.9. FAB (NBA/DMSO,  $m/e$ , 相对强度):  
 5 542  $[(\text{M}+1)^+$ , 100], 514 (15), 450 (5), 307 (8), 232 (5), 154.1 (17), 136 (14); HRMS: 对于  $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{NO}_6(\text{M}+1)^+$  的计算值 542.2543; 实测值: 542.2541; 对于  $\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{NO}_6 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$  的 CHN 计算值: C 71.98%, H 6.59%, N 2.54%; 实测值: C 72.56%, H 7.05%, N 2.63 %.

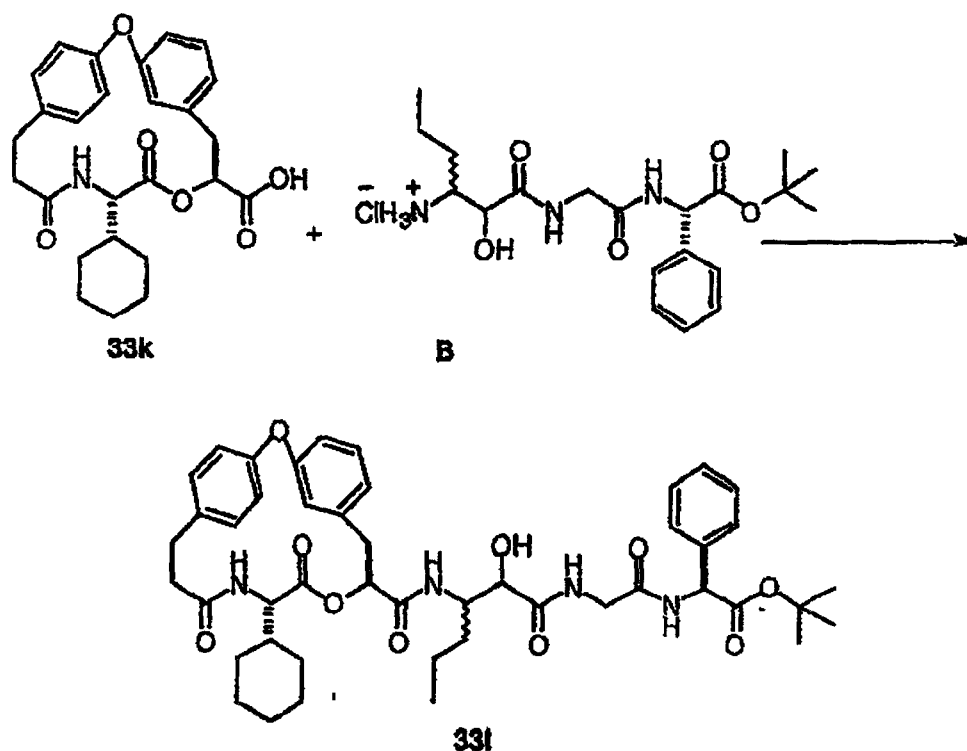
步骤 I:



10

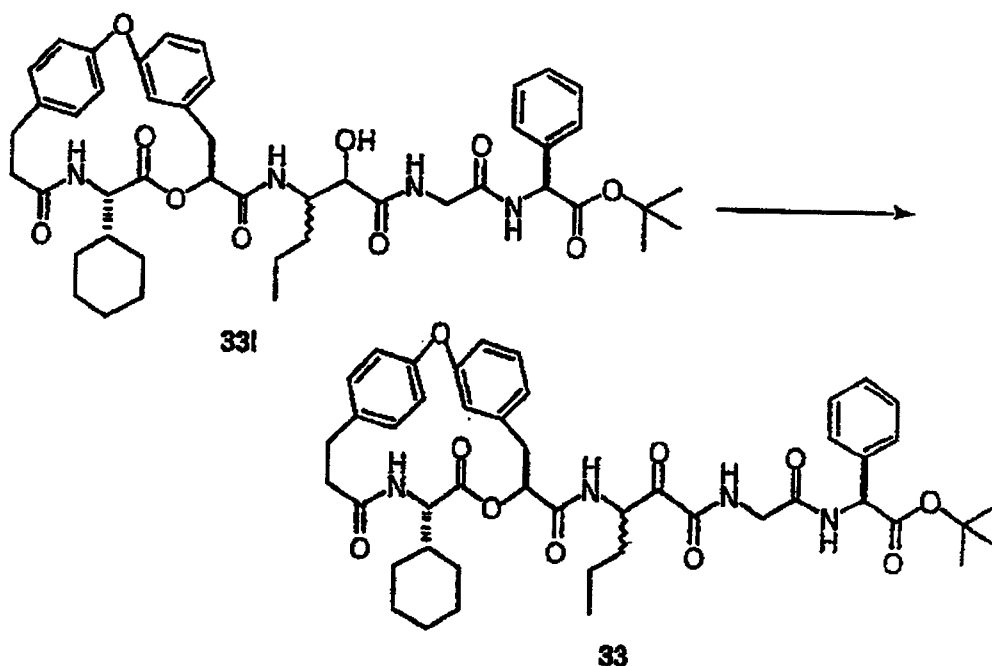
将苄基酯 **33i** (360 mg, 0.66 mmol) 的  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{EtOAc}$  (1:1, 50 mL) 溶液用  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  处理并氢化(50 psi)12 小时。将该反应混合物通过硅藻土塞过滤并将滤饼用  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1, 50 mL) 冲洗。在真空中浓缩滤液, 将残余物 **33k** (330 mg) 不经纯化用于偶合作用。  $R_f$ : 0.58  
 15 ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:19); MS: (电喷雾,  $m/z$ , 相对强度): 827.2  $[(\text{M}+1)^+$ , 100], 694 (20), 539 (40), 466 (10), 174 (70); HRMS: 对于  $\text{C}_{46}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_{10}(\text{M}+1)^+$  的计算值: 827.4231; 实测值: 827.4215.

步骤 J:



将酸 **33k** (165 mg, 0.31 mmol) 在无水的 DMF (5.0 mL) 和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.0 mL) 中的溶液用 HOBt (83 mg, 0.46 mmol, 1.5 当量) 处理并冷却至  $0^\circ\text{C}$ ,  
5 加入 Hünig's base (159 mg, 1.23 mmol, 4.0 当量, 229  $\mu\text{L}$ )。向该混合物中加入 EDCI (89 mg, 0.47 mmol, 1.5 当量) 并将该反应混合物在  $0^\circ\text{C}$  下搅拌 1 小时, 用胺盐酸盐 **B** (159 mg, 0.372 mmol, 1.2 当量) 处理。将该反应混合物在室温下搅拌 48 小时并在真空中浓缩以除去 DMF 和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 。将残余物用水稀释并用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 mL) 萃取。用 HCl 水溶液 (1M, 3 X 50 mL)、NaOH 水溶液 (1M, 3 x 50 mL) 和盐水 (100 mL) 萃取合并的有机层并在真空中浓缩。不经进一步纯化而将残余物 **33l** 氧化。  
10

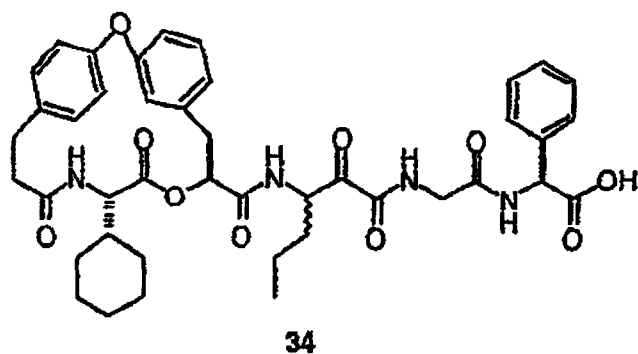
步骤 K:



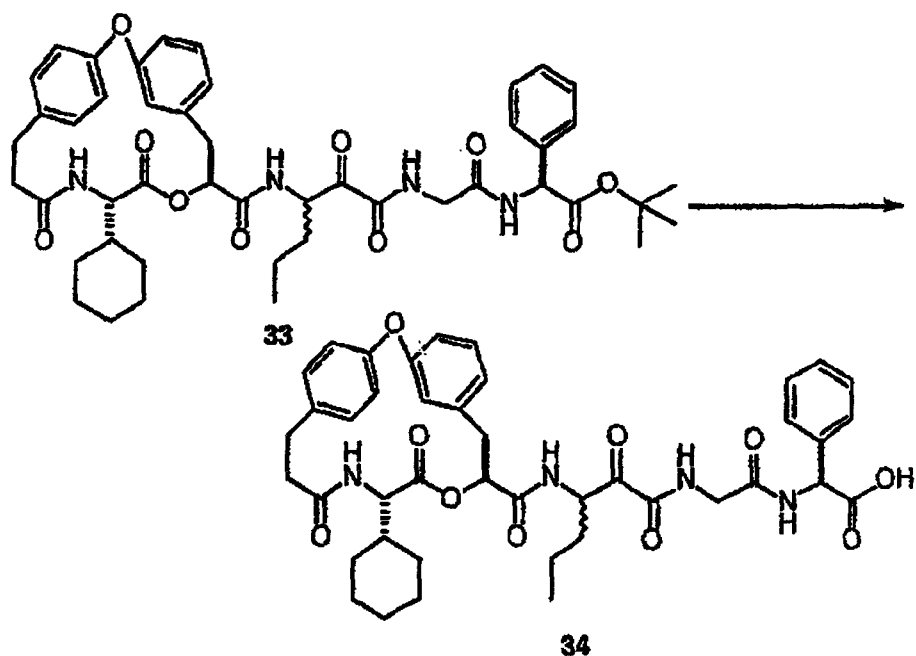
5 将醇 **33I** (330 mg, 0.4 mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.0 mL) 溶液用 Dess-Martin 试剂 (424 mg, 1.00 mmol, 2.5 当量) 处理。将该反应混合物在室温下搅拌 1 小时并用  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (50 mL) 和  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  水溶液 (50 mL) 稀释。将该反应混合物在室温下搅拌 20 分钟并用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 mL) 萃取反应混合物。用盐水 (50 mL) 萃取合并的有机层, 干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 过滤, 在真空中浓缩并将残余物经层析 ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/乙烷 1:1) 纯化, 得到酰胺 **33** (180 mg, 55%), 为无色固体。R<sub>f</sub>: 0.63 ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:19);

10 MS: (电喷雾,  $m/z$ , 相对强度): 857.2 ( $[\text{M}+\text{CH}_3\text{OH}]^+$ , 40), 825.2 ( $[\text{M}+1]^+$ , 100)。

实施例 34: 式 34 化合物的制备:



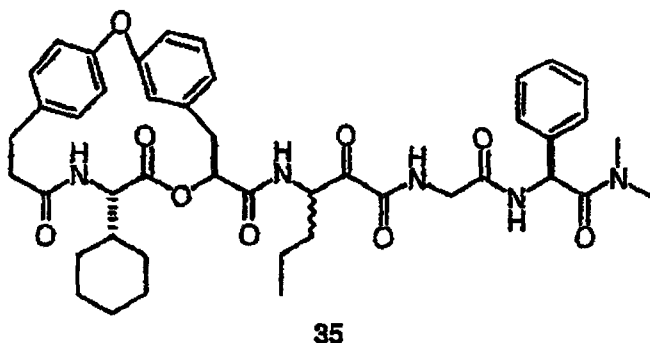
步骤 A:



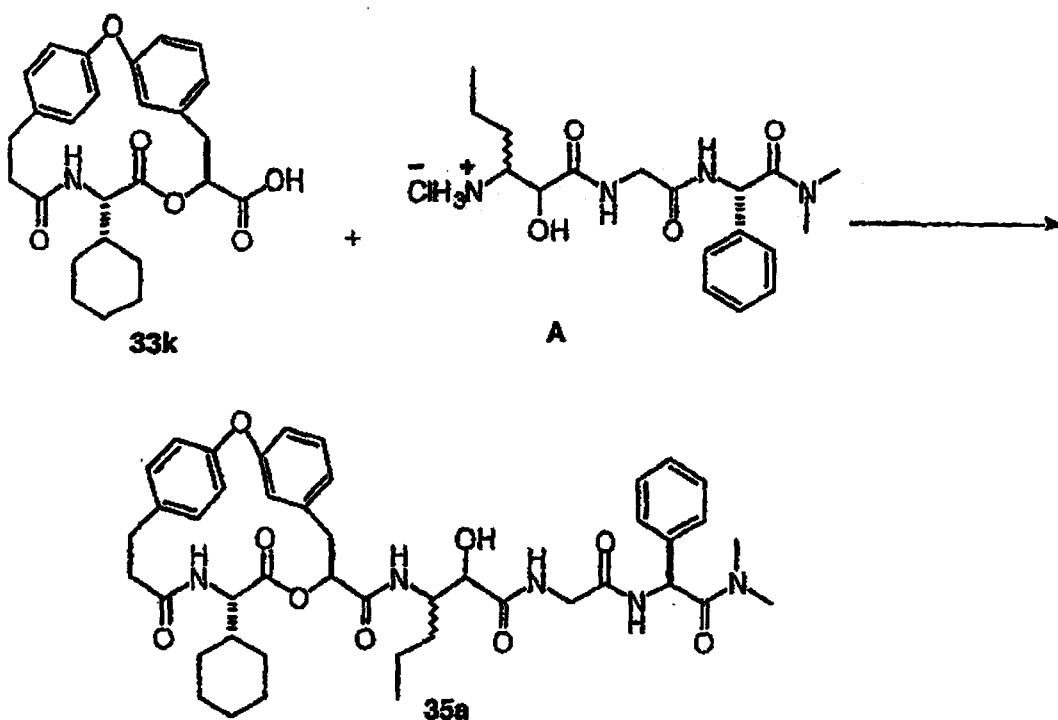
- 5 将氧化的缩肽 **33** (160 mg, 0.2 mmol) 的无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.0 mL) 溶液用 TFA (5.0 mL) 处理并在室温下搅拌 7 小时。将该反应混合物在真空中浓缩并将残余物反复溶于  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /乙烷(1:1:1) 中并在真空中浓缩数次, 得到褐色固体 **34** (133 mg, 86%), 将其在真空中干燥。MS: (电喷雾,  $m/z$ , 相对强度): 769.2  $[(M+1)^+$ , 100], 481 (5), 269 (25), 191 (90)。

10

实施例 35: 式 35 化合物的制备:



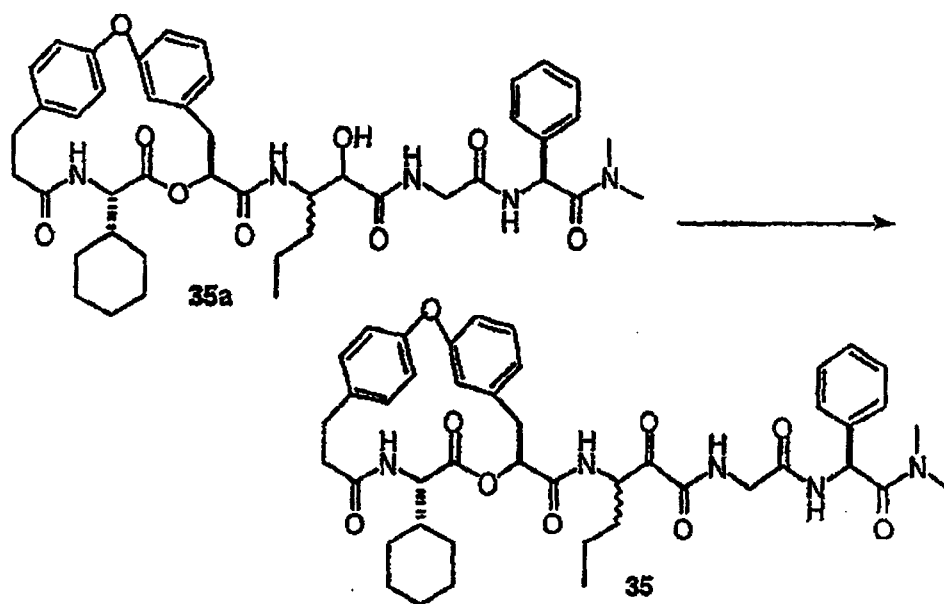
步骤 A:



- 5 将酸 33k (165 mg, 0.31 mmol) 在无水 DMF (5.0 mL) 和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.0 mL) 中的溶液用 HOBt (83 mg, 0.46 mmol, 1.5 当量) 处理并冷却至  $0^\circ\text{C}$ , 加入 Hünigs base (159 mg, 1.23 mmol, 4.0 当量, 229  $\mu\text{L}$ )。向所述混合物中加入 EDCI (89 mg, 0.47 mmol, 1.5 当量) 并将该反应混合物在  $0^\circ\text{C}$  下搅拌 1 小时, 用胺盐酸盐 A (159 mg, 0.372 mmol, 1.2 当量) 处理。将该
- 10 反应混合物在室温下搅拌 48 小时并在真空中浓缩以除去 DMF 和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 。将残余物用水稀释并用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 mL) 萃取。用 HCl 水溶

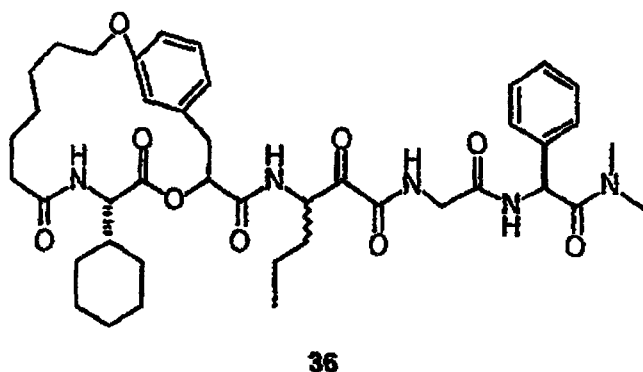
液(1M, 3 x 50 mL)、NaOH水溶液(1 M, 3 x 50 mL)、盐水(100 mL)萃取合并的有机层并在真空中浓缩。不经进一步纯化将残余物 **35a** 氧化。MS: (电喷雾,  $m/z$ , 相对强度): 798.2  $[(M+1)^+$ , 30], 479 (10), 391 (20), 180 (100)。

5 步骤 B:



10 将醇 **35a** (190 mg, 0.24 mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) 溶液用 Dess-Martin 试剂(423 mg, 1.0 mmol, 4.0 当量)处理并在室温下搅拌 1 小时。将该反应混合物用  $\text{NaHCO}_3$  水溶液(50 mL)稀释并萃取到  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 mL) 中。用饱和  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  水溶液、盐水(3 x 50 mL)萃取合并的有机层, 干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 过滤, 在真空中浓缩并经层析( $\text{SiO}_2$ , 丙酮/己烷 3:7- > 1:1) 纯化, 得到氧化的产物 **35** (163 mg, 86%), 为无色固体。MS: (电喷雾,  $m/z$ , 相对强度): 796  $[(M+1)^+$ , 100], 508 (20), 269 (20)。

实施例 36: 式 36 化合物的制备:



步骤 A:



5            在 0℃ 下, 将  $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$  (1M, 在 THF 中, 100 mmol, 100 mL, 3.0 当量) 的溶液滴加入到烯(5.0 g, 35 mmol)的 THF (100 mL) 溶液中并搅拌 1 小时。将该反应混合物用乙醇(20 mL)处理。当不再放出氢气后, 将反应混合物用 pH 7 缓冲液(100 mL)和  $\text{H}_2\text{O}_2$ (30 体积, 100 mL)处理。将该反应混合物在室温下搅拌 4 小时并用 HCl 水溶液(100 mL)猝灭。用

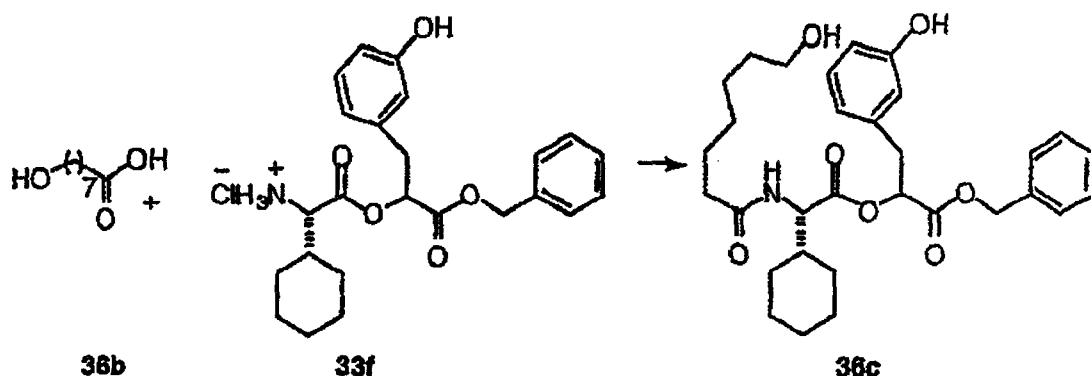
10  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x 100 mL) 萃取含水层。将合并的醚层用 NaOH 水溶液(1M, 100 mL)、盐水(100 mL)萃取, 干燥( $\text{MgSO}_4$ ), 过滤, 在真空中浓缩并经层析( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{EtOAc}$ /乙烷 2/3)纯化, 得到为无色液体的醇(2.9 g, 52%)。

将羟基化酯的 THF/ $\text{H}_2\text{O}$ / $\text{CH}_3\text{OH}$  (100 mL, 1:1:1) 溶液用  $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (2.1 g, 51.2 mmol, 3.0 当量) 处理并在室温下搅拌 3 天。将该反应混合物在真空中浓缩并将含水层用乙醚(2 x 40 mL)萃取。将含水层酸化至 pH ~ 1 并萃取到  $\text{EtOAc}$  (3 x 50 mL) 中。用盐水(100 mL)萃取合并的有机层, 干燥( $\text{MgSO}_4$ ), 过滤, 在真空中浓缩并将残余物 **36b** 用于步骤 B 中的偶合作用。 $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) 3.53 (t, 2H,  $J = 6.6$  Hz), 2.72 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 1.59 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz), 1.5 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz), 1.38-1.33 (m, 6H)。

15

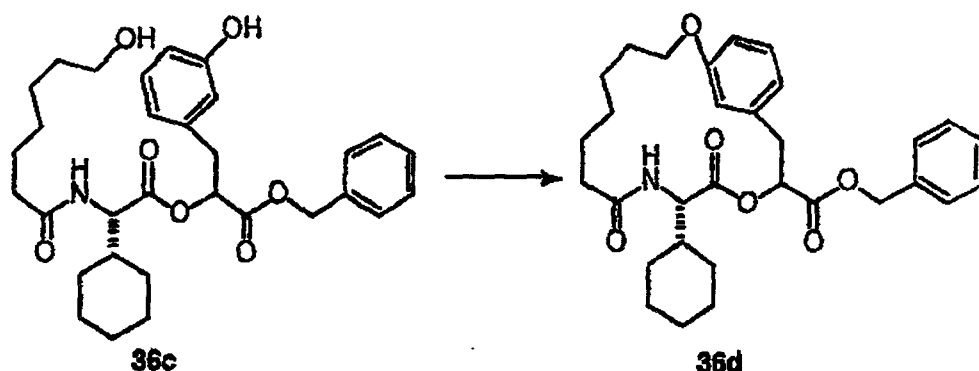
20

## 步骤 B:



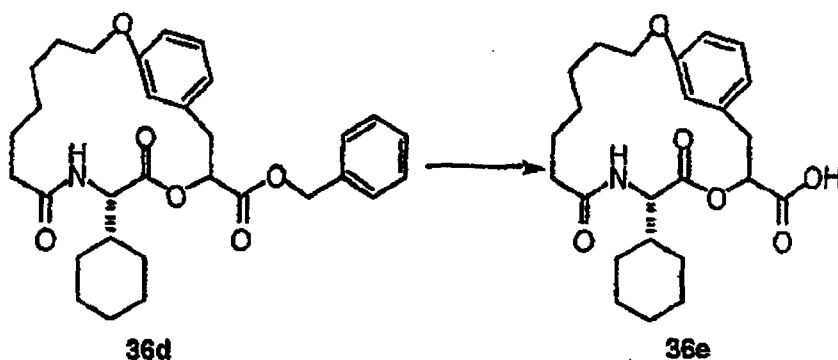
将 $\omega$ -羟基庚酸 **36b** (1.01 g, 6.93 mmol)的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 mL)溶液用 Hünigs base (1.97 g, 15.24 mmol, 2.2 当量, 2.81 mL)和胺盐酸盐 **33f** (3.1 g, 6.93 mmol, 1.0 当量)处理。将所述反应混合物冷却至  $0^\circ\text{C}$  并用 PyBrOP (3.22 g, 6.93 mmol, 1.0 当量)处理。将反应混合物在室温下搅拌过夜并将反应混合物在真空中浓缩。将残余物经层析(EtOAc/己烷 1:1)纯化, 得到缩肽 **36c** (2.5 g, 66%), 为无色粘性油状物。 $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz,  $\delta$ , ppm): 8.07 (t, 1H), 7.33-7.21 (m, 4H), 7.09-7.02 (m, 1H), 6.67-6.63 (m, 3H), 5.25-5.06 (m, 1H), 5.08 (q, 2H,  $J = 7.5$  Hz), 4.36-4.33 (m, 1H), 3.51 (dd, 2H,  $J = 5.4$  Hz, 0.9 Hz), 3.11-2.96 (m, 2H), 2.22-2.17 (m, 1H), 1.99-0.90 (m, 14H)。  $^{13}\text{C}$  NMR: ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz,  $\delta$ , ppm, 非对映异构体的混合物) 172.1, 172.0, 171.8, 171.1, 170.9, 169.5, 169.3, 157.1, 157.0, 137.3, 137.0, 135.3, 135.2, 129.2, 129.1, 128.2, 128.0, 127.9, 120.3, 120.0, 116.0, 115.9, 113.6, 94.8, 73.6, 73.4, 66.8, 66.7, 60.2, 57.3, 39.6, 36.7, 28.9, 28.0, 25.6, 20.9, 19.5, 13; MS (FAB, NBA DMSO,  $m/z$ , 相对强度): 562 [ $(\text{M}+\text{Na})^+$ , 20], 540 [ $(\text{M}+1)^+$ , 100], 412 (15), 240 (50), 112 (80)。

## 步骤 C:



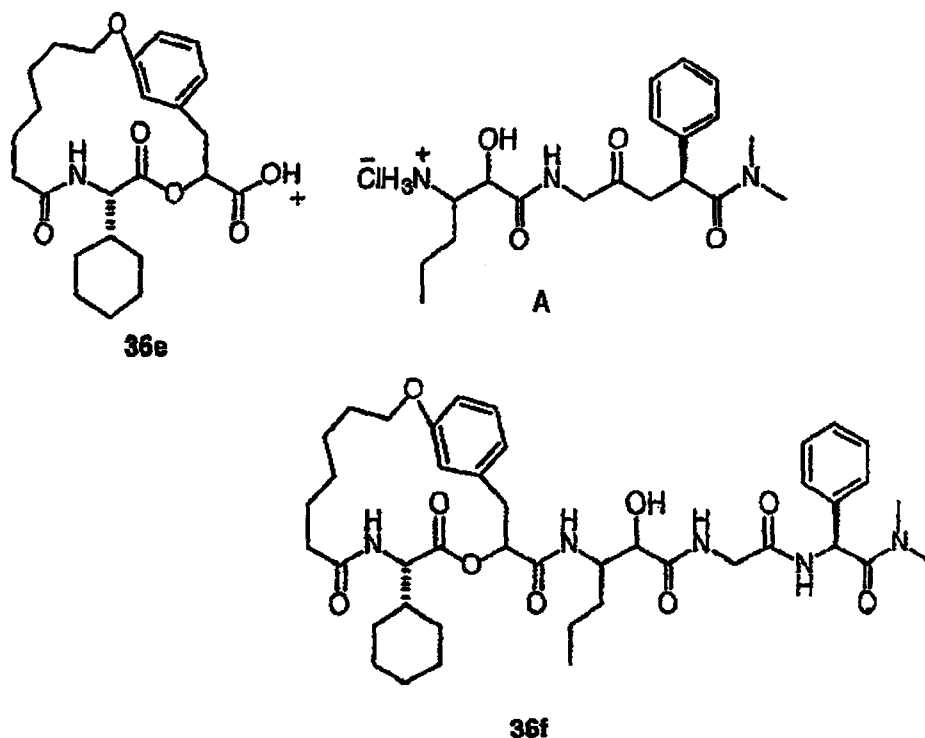
在氮气氛下，将醇 **36c** (2.5 g, 4.63 mmol) 的无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) 溶液用三苯膦(2.67 g, 10.2 mmol, 2.2 当量)处理并冷却至  $0^\circ\text{C}$ 。将该反应混合物用 DEAD (1.61 g, 9.26 mmol, 2.0 当量)在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) 中处理。将反应混合物加温至室温并搅拌 2 小时。将其在真空中浓缩并经层析( $\text{Et}_2\text{O}/\text{Hex}$  1:3)纯化得到环状产物 **36d** (530 mg, 21 %), 为无色固体。MS: (FAB, NBA, DMSO,  $m/z$ , 相对强度): 522  $[(\text{M}+1)^+]$ , 100], 494 (60), 268 (20), 222 (20); HRMS 对于  $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{NO}_6$   $(\text{M}+1)^+$  的计算值: 522.2856; 实测值: 522.2864。

## 步骤 D:



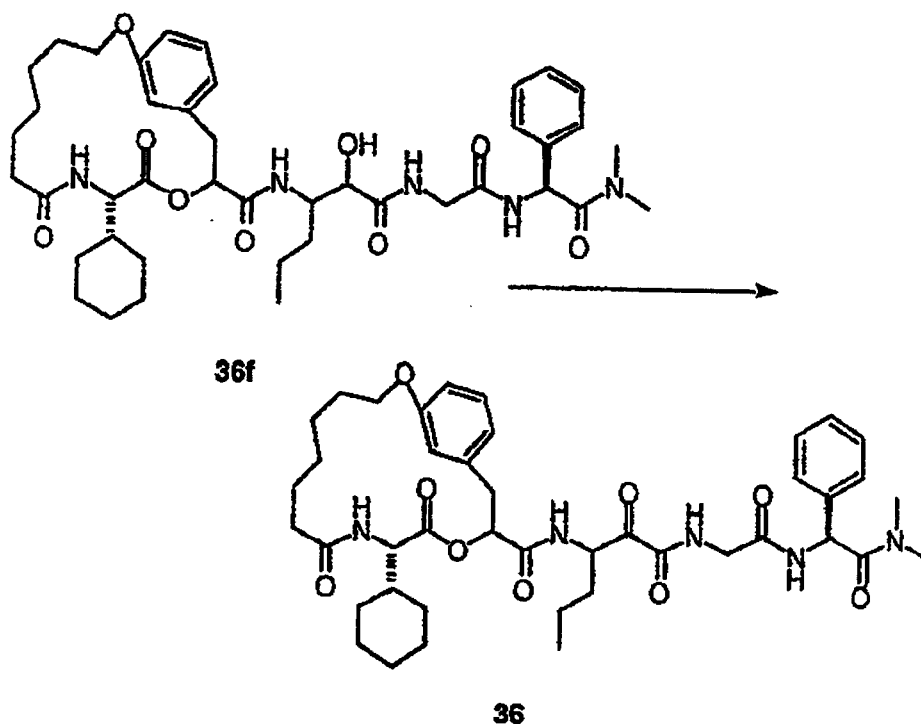
将苄基酯(242 mg, 0.47 mmol)的甲醇(30 mL)溶液用 Pd/C (10%重量)处理并在 Parr 上、40 psi 下氢化 14 小时。将该反应混合物通过硅藻土垫过滤并在真空中浓缩滤液，得到无色固体 **36e** (181 mg, 93 %), 其用于偶合作用。

## 步骤 E:



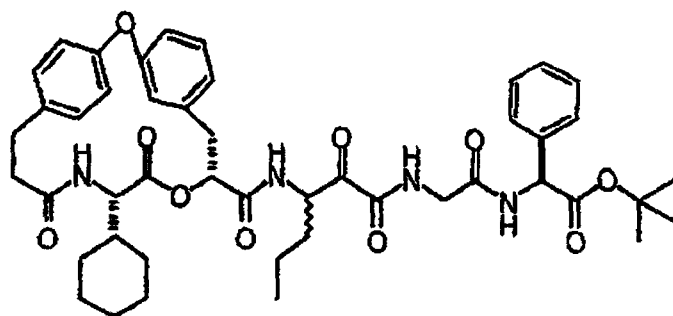
将水解的酸 **36e** (167 mg, 0.39 mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4.0 mL) 溶液用 HOObt (95 mg, 0.58 mmol, 1.5 当量) 处理并冷却至  $0^\circ\text{C}$ ，加入 Hünigs base (202 mg, 1.56 mmol, 4.0 当量, 288  $\mu\text{L}$ )。向该混合物中加入 EDCI (111 mg, 0.58 mmol, 1.5 当量)，将反应混合物在  $0^\circ\text{C}$  下搅拌 0.5 小时，并用胺盐酸盐 (186 mg, 0.47 mmol, 1.20 当量) 处理。将该反应混合物在冰箱中贮存 24 小时并在真空中浓缩以除去 DMF 和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 。将残余物用 HCl 水溶液 (2M, 30 mL) 稀释并用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 mL) 萃取。用 HCl 水溶液 (2M, 30 mL)、NaOH 水溶液 (1M)、盐水 (2 x 50 mL) 萃取合并的有机层，干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ) 并在真空中浓缩。不经进一步纯化而将残余物 **36f** (100 mg) 氧化。HRMS 对于  $\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{N}_5\text{O}_9(\text{M}+1)^+$  的计算值: 778.4391; 实测值: 778.4399。

步骤 F:



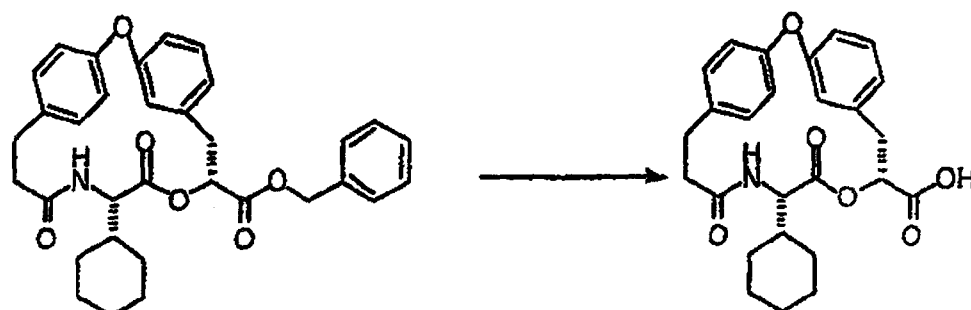
将醇 **36f** (100 mg, 0.13 mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.0 mL) 溶液用 Dess-Martin 试剂 (100 mg, 0.23 mmol, 1.8 当量) 处理。将反应混合物在室温下搅拌 2 小时并用  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (15 mL) 和  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  水溶液 (15 mL) 稀释。将反应混合物在真空中浓缩并将残余物经层析 ( $\text{SiO}_2$ , 丙酮/己烷 3:7) 纯化, 得到酮酰胺 **36** (61 mg, 61%), 为无色固体。MS (FAB, NBA/DMSO,  $m/z$  相对强度): 776  $[(M+1)^+$ , 100], 731 (10), 598 (25), 570 (15), 485 (20), 358 (20), 247 (50)。

## 实施例 37: 式 37 化合物的制备:



37

## 步骤 A:

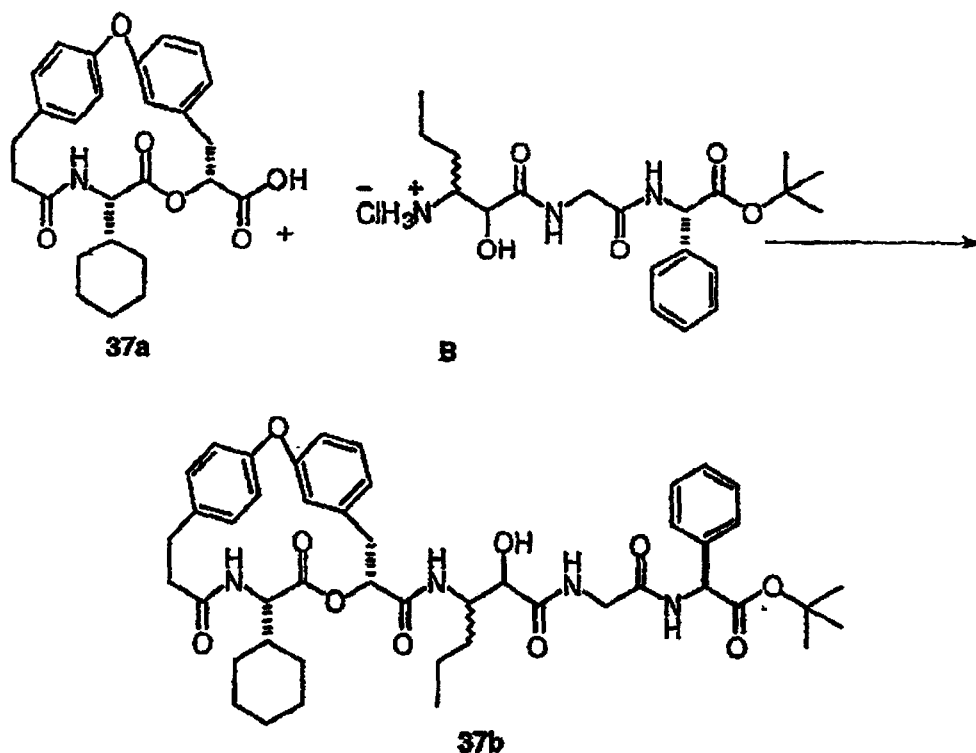


33j

37a

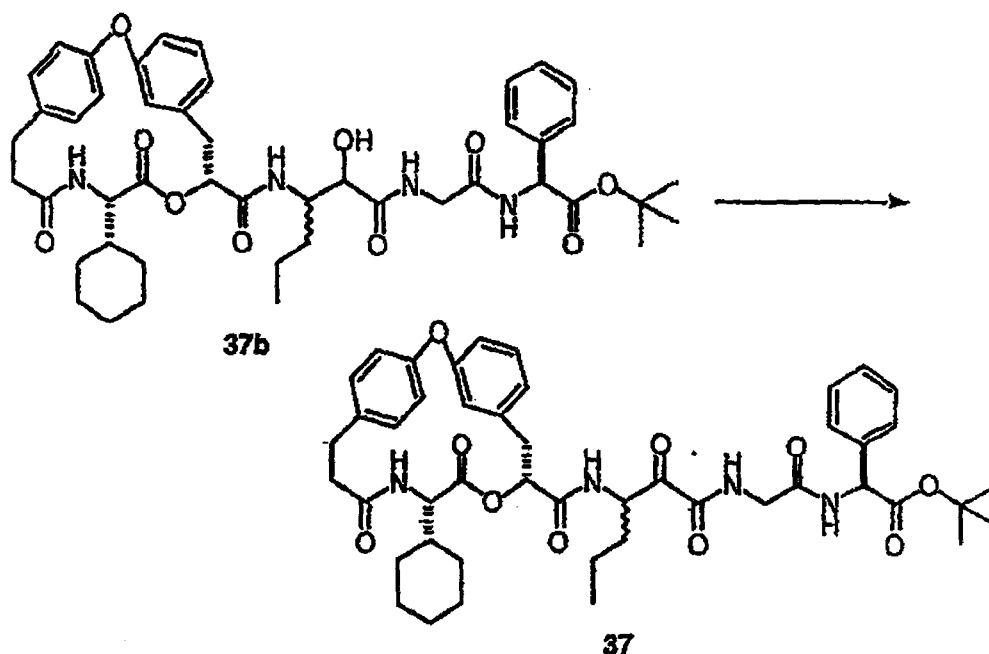
- 5 将苄基酯 **33j** (230 mg, 0.42 mmol) 的  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{EtOAc}$  (1:1, 50 mL) 溶液用  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  处理并氢化(50 psi)12 小时。将该反应混合物通过硅藻土塞过滤并将滤饼用  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1, 50 mL) 冲洗。将该反应混合物在真空中浓缩, 不经纯化而将残余物 **37a** (177 mg, 93 %) 用于偶合作用。

## 步骤 B:



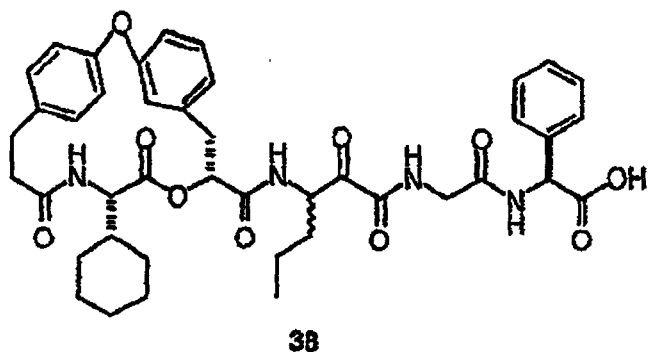
将酸 **37a** (177 mg, 0.33 mmol) 在无水的 DMF (5.0 mL) 和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.0 mL) 中的溶液用 HOBt (88 mg, 0.49 mmol, 1.5 当量) 处理并冷却至  $0^\circ\text{C}$ ,  
 5 加入 Hünigs base (175 mg, 1.35 mmol, 4.0 当量, 251  $\mu\text{L}$ )。向该混合物中加入 EDCl (95 mg, 0.49 mmol, 1.5 当量) 并将反应混合物在  $0^\circ\text{C}$  下搅拌 1 小时, 用胺盐酸盐 **B** (170 mg, 0.39 mmol, 1.2 当量) 处理。将该反应混合物在室温下搅拌 48 小时并在真空中浓缩以除去 DMF 和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 。将残余物用水稀释并用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 mL) 萃取。用 NaOH 水溶液 (1M, 2 X 50 mL)、盐水 (100 mL) 萃取合并的有机层并在真空中浓缩。不经进一步纯化而将残余物 **37b** (315 mg) 氧化。

步骤 C:

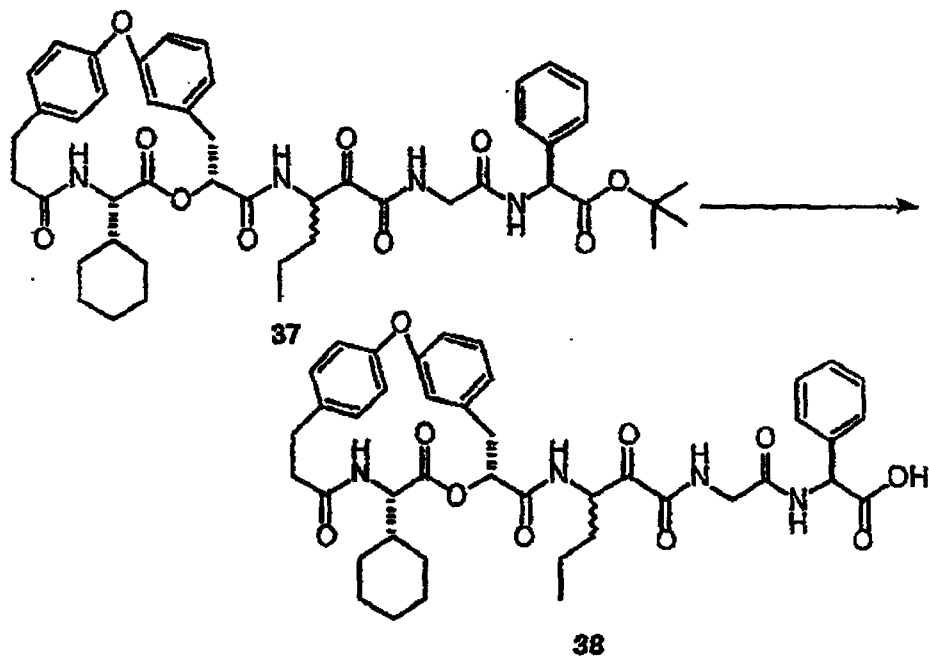


将醇 **37b** (315 mg, 0.4 mmol) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.0 mL) 溶液用 Dess-Martin 试剂 (424 mg, 1.00 mmol, 2.5 当量) 处理。将反应混合物在室温下搅拌 1 小时并用  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (50 mL) 和  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  水溶液 (50 mL) 稀释。将该反应混合物在室温下搅拌 20 分钟并将反应混合物用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 50 mL) 萃取。用盐水萃取合并的有机层，干燥 ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )，过滤，在真空中浓缩并将残余物经层析 ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/己烷 1:1) 纯化，得到酮酰胺 **37** (210 mg, 66%)，为无色固体。  $R_f$ : 0.63 ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:19); MS: (电喷雾,  $m/z$  相对强度): 857 ( $[\text{M}+\text{CH}_3\text{OH}]^+$ , 33), 825 ( $[\text{M}+1]^+$ , 40), 191 (100)。

## 实施例 38: 式 38 化合物的制备:

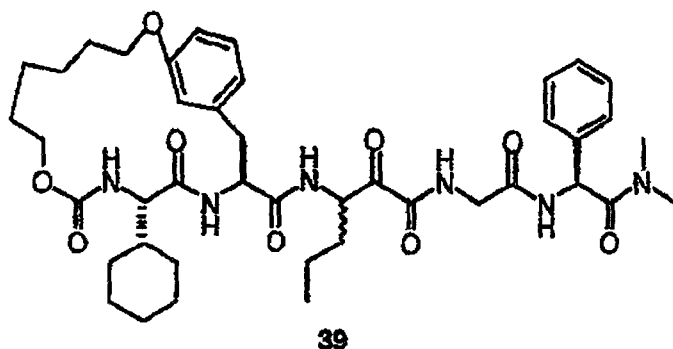


## 步骤 A:

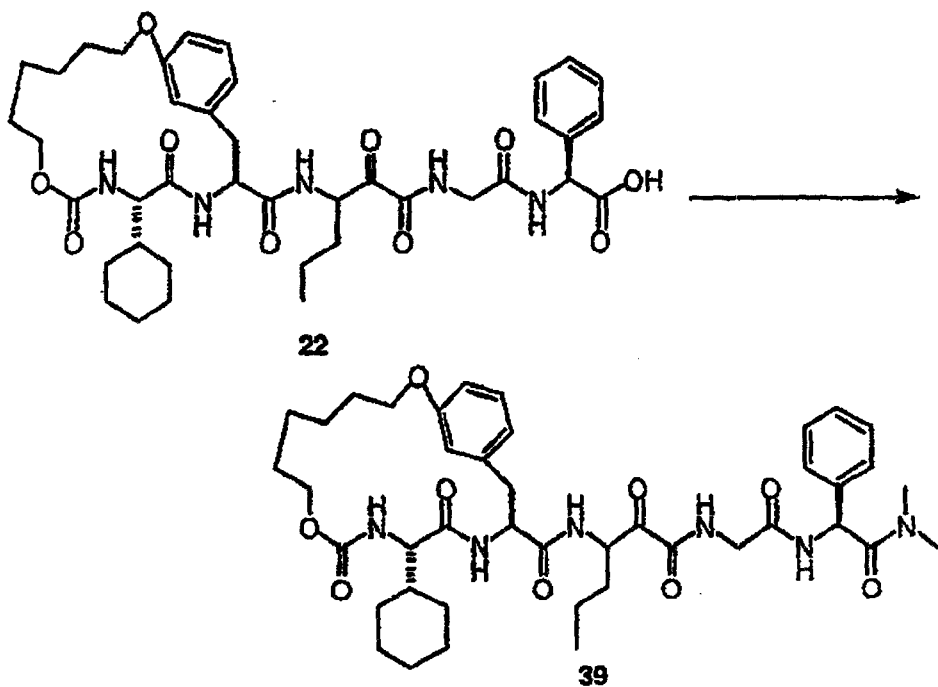


- 5 将氧化的缩肽 37 (200 mg, 0.24 mmol) 的无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5.0 mL) 溶液用 TFA (5.0 mL) 处理并在室温下搅拌 7 小时。将反应混合物在真空中浓缩并将残余物反复溶于  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{己烷}$  (1:1:1) 中, 在真空中浓缩数次, 得到褐色固体 38 (130 mg, 87%), 将其在真空中干燥。MS: (电喷雾,  $m/z$  相对强度): 769 ( $[\text{M}+1]^+$ , 45), 294 (45), 191 (100)。

实施例 39: 式 39 化合物的制备:

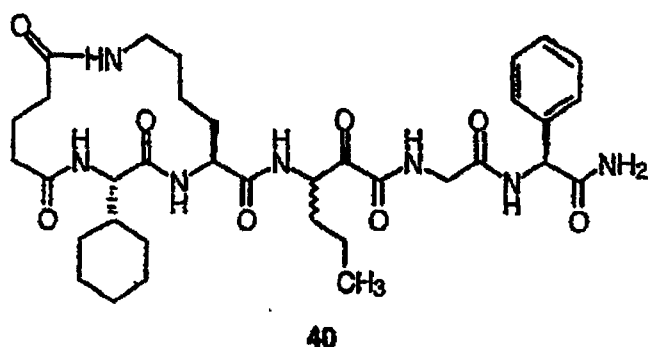


步骤 A:



- 5 将酸 **22** (40 mg, 0.06 mmol) 在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.5 mL) 和 DMF (0.5 mL) 中的溶液冷却至  $0^\circ\text{C}$  并用  $\text{Me}_2\text{NH} \cdot \text{HCl}$  (15 mg, 0.18 mmol, 3.0 当量) 和 Hünigs base (31 mg, 0.24 mmol, 44  $\mu\text{L}$ , 4.0 当量) 处理。然后将反应混合物用 PyBrOP (55 mg, 0.12 mmol, 2.0 当量) 处理并贮存在冰箱中 12 小时。将该黄色反应混合物在真空中浓缩并将残余物经层析 ( $\text{SiO}_2$ , EtOAc/己烷梯度 3:2  $\rightarrow$  1:0) 纯化, 得到不纯的产物, 将其用 (丙酮/己烷 1:6) 再纯化一次得到二甲基酰胺 **39**, 为无色固体 (14 mg, 35%)。MS: (电喷雾,  $m/z$  相对强度): 791  $[(\text{M}+1)^+$ , 50], 391 (40), 276 (50), 176 (100)。
- 10

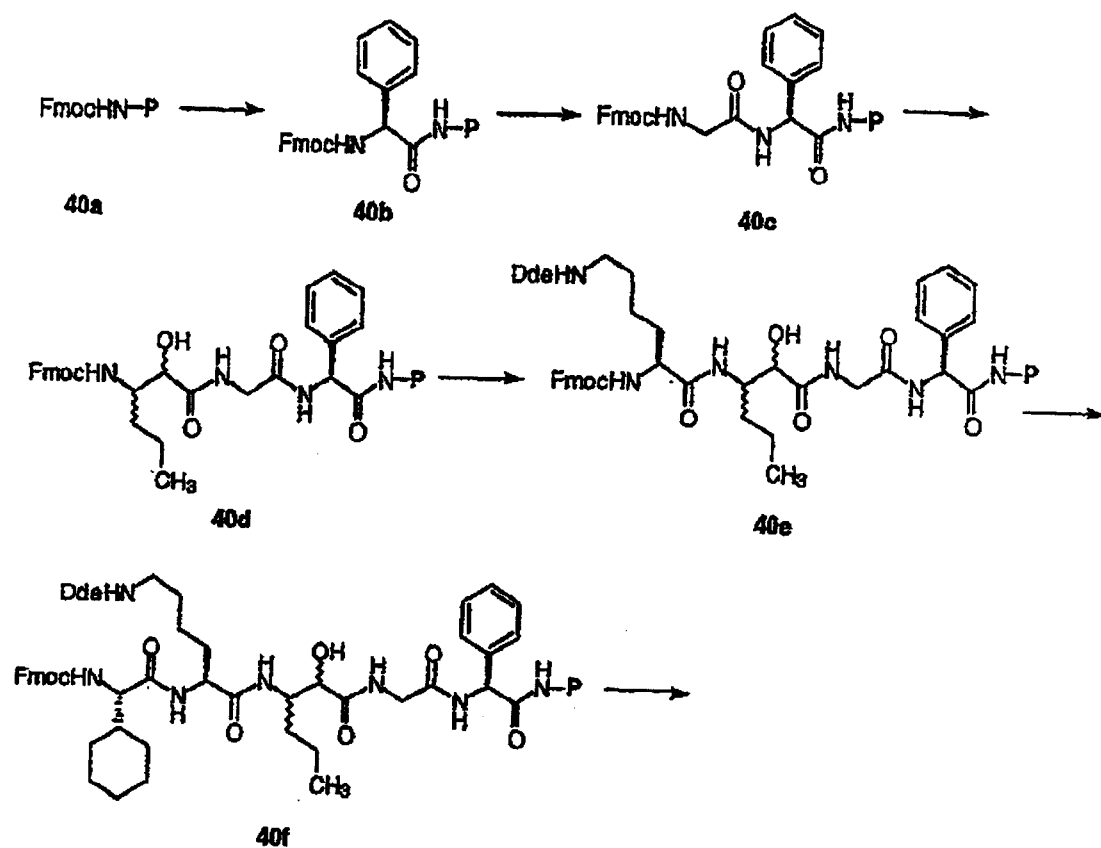
## 实施例 40: 式 40 化合物的制备:

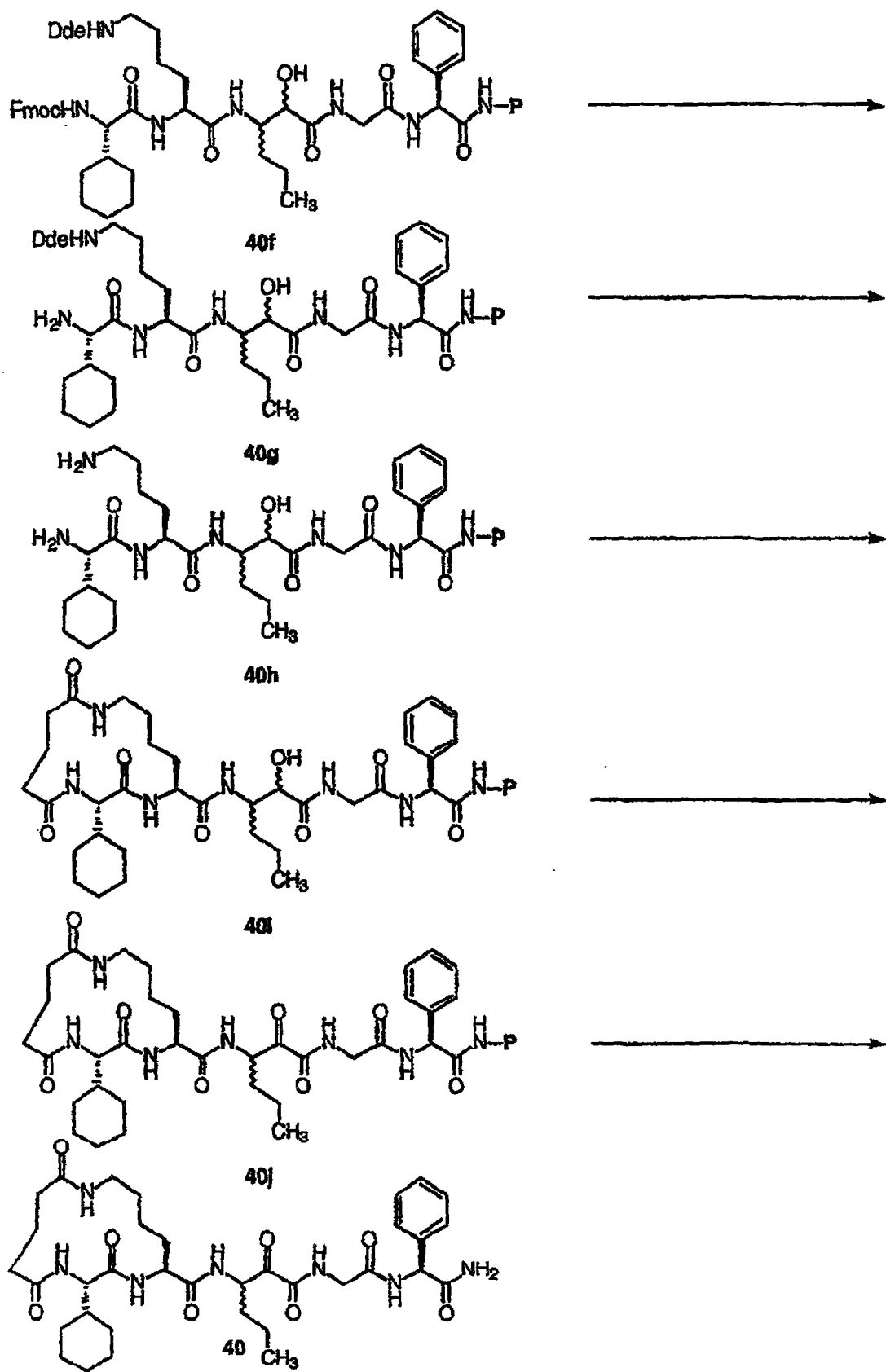


用于固相偶合反应的一般步骤:

5 在由底部安装有聚丙烯玻璃料的聚丙烯注射器筒构成的反应容器中进行合成。在标准固相技术下将 Fmoc-保护的氨基酸偶合。在每一个反应容器中装载 100 mg 起始 Fmoc-Sieber 树脂(大约 0.035 mmol)。将所述树脂用 2 mL 份的 DMF 洗涤(2 次)。通过用 2 mL 哌啶的 DMF 溶液(20% v/v)处理 20 分钟除去 Fmoc 保护基团。用 2 mL 份的 DMF 洗涤所述树脂(4 次)。用 0.12 mmol Fmoc-氨基酸、0.12 mmol HATU 和 0.24 mmol DIPEA 在 DMF(2 mL)中进行偶合。振荡 2 小时后，  
10 对所述反应容器进行排液并将树脂用 2 mL 份的 DMF 洗涤(4 次)。用下面的 Fmoc-氨基酸或封端基团重复偶合循环。

## 方案 10:

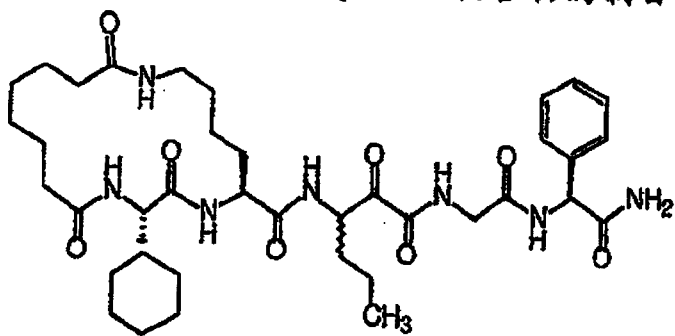




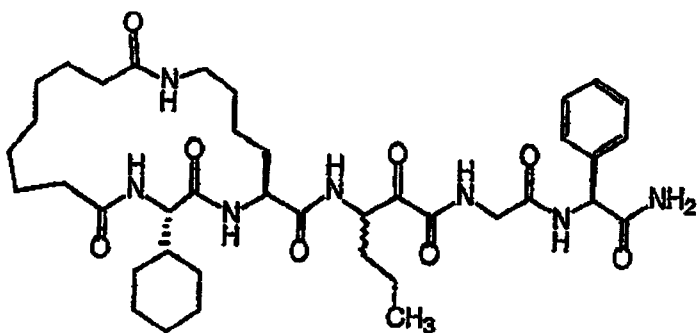
将 Fmoc-Sieber 树脂 40a (0.035 mmol) 用 2 mL 吡啶的 DMF 溶液(20 % v/v)处理 20 分钟, 随后用 2 mL 份的 DMF 洗涤(4 次)。将 DMF (2 mL) 加入到该树脂中, 随后加入 Fmoc-苯基甘氨酸(0.12 mmol)、HATU (0.12 mmol) 和 DIPEA (0.24 mmol)。在室温下振荡 2 小时后, 将所述树脂用 2 mL 份的 DMF 洗涤(4 次), 得到结合树脂的化合物 40b。将结合树脂的化合物 40b 用 2 mL 吡啶的 DMF 溶液(20% v/v)处理 20 分钟。随后用 2 mL 份的 DMF 洗涤(4 次)。将 DMF (2 mL) 加入到该树脂中, 随后加入 Fmoc-甘氨酸(0.12 mmol)、HATU (0.12 mmol) 和 DIPEA (0.24 mmol)。在室温下振荡 2 小时后, 将所述树脂用 2 mL 份的 DMF 洗涤(4 次)得到结合树脂的化合物 40c。将结合树脂的化合物 40c 用 2 mL 吡啶的 DMF 溶液(20% v/v)处理 20 分钟, 随后用 2 mL 份的 DMF 洗涤(4 次)。将 DMF (2 mL) 加入到该树脂中, 随后加入 N-Fmoc-丙基异丝氨酸(0.12 mmol)、HATU (0.12 mmol) 和 DIPEA (0.24 mmol)。在室温下振荡 2 小时后, 将所述树脂用 2 mL 份的 DMF 洗涤(4 次)得到结合树脂的化合物 40d。将结合树脂的化合物 40d 用 2 mL 吡啶的 DMF 溶液(20% v/v)处理 20 分钟, 随后用 2 mL 份的 DMF 洗涤(4 次)。将 DMF (2 mL) 加入到该树脂中, 随后加入 Fmoc-赖氨酸(Dde)(0.12 mmol)、HATU (0.12 mmol) 和 DIPEA (0.24 mmol)。在室温下振荡 2 小时后, 将所述树脂用 2 mL 份的 DMF 洗涤(4 次)得到结合树脂的化合物 40e。将结合树脂的化合物 40e 用 2 mL 吡啶的 DMF 溶液(20 % v/v)处理 20 分钟, 随后用 2 mL 份的 DMF 洗涤(4 次)。将 DMF (2 mL) 加入到该树脂中, 随后加入 Fmoc-环己基甘氨酸(0.12 mmol)、HATU (0.12 mmol) 和 DIPEA (0.24 mmol)。在室温下振荡 2 小时后, 将所述树脂用 2 mL 份的 DMF 洗涤(4 次)得到结合树脂的化合物 40f。将结合树脂的化合物 40f 用 2 mL 吡啶的 DMF 溶液(20% v/v)处理 20 分钟。用 2 mL 份的 DMF 洗涤所述树脂(4 次)得到结合树脂的化合物 40g。将结合树脂的化合物 40g 用 2 mL 份的 DMF 溶液(2 % v/v)处理 5 分钟(3 次)。将该树脂用 2 mL 份的 DMF 洗涤(4 次)得到结合树脂的化合物 40h。在室温下将结合树

脂的化合物 40h 用在 2 mL DMF 中的 0.035 mmol 戊二酸、0.07 mmol HATU 和 0.14 mmol DIPEA 处理 16 小时。将该树脂用 2 mL 份的 DMF(4 次)、THF (4 次)和 DCM(4 次)洗涤得到结合树脂的化合物 40i。在室温下将结合树脂的化合物 40i 用 0.14 mmol Dess-Martin periodinane 和 0.14 mmol t-BuOH 在 2 mL DCM 中的溶液处理 4 小时。将该树脂用 2 mL 份 iPrOH 在 DCM 中的溶液(20% v/v)、THF、THF 的水溶液(50% v/v) (4 次)、THF(4 次)和 DCM(4 次)洗涤得到结合树脂的化合物 40j。将结合树脂的化合物 40j 用 4 mL TFA 的 DCM 溶液(2% v/v)处理 5 分钟。将滤液加入到 1 mL 的 AcOH 中并将该溶液经真空离心浓缩，得到化合物 40 (0.0117 g, 产率 48%)。MS (LCMS-电喷雾) 698.2 MH<sup>+</sup>。

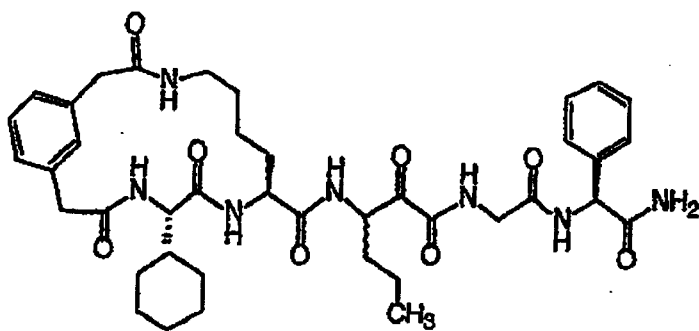
## 实施例 41-53: 式 41-53 化合物的制备:



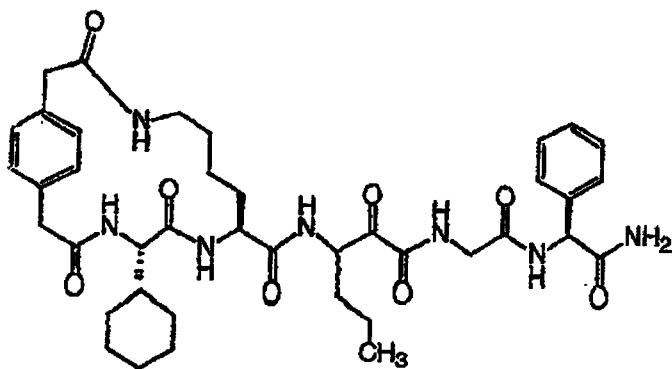
41



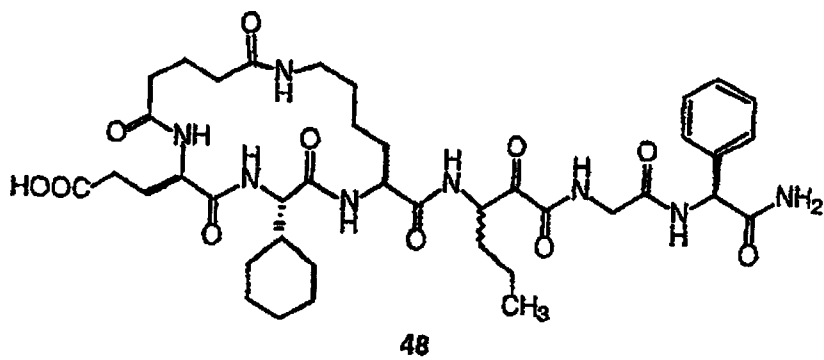
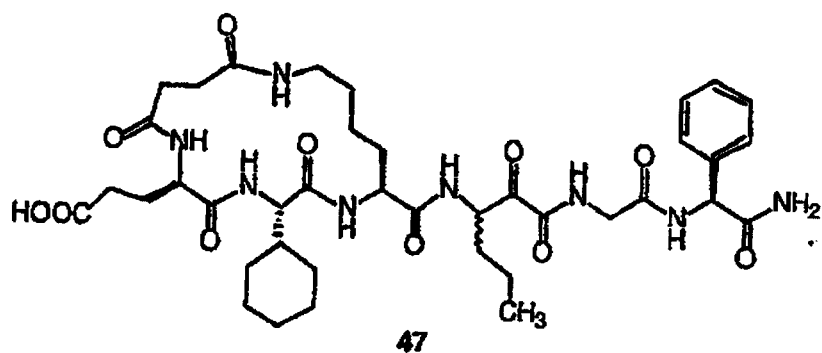
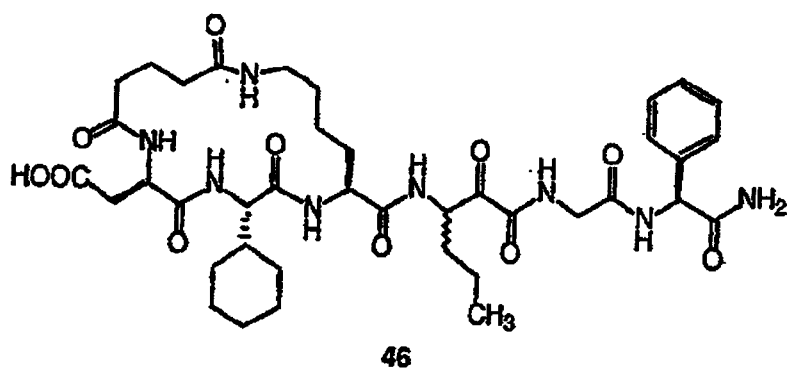
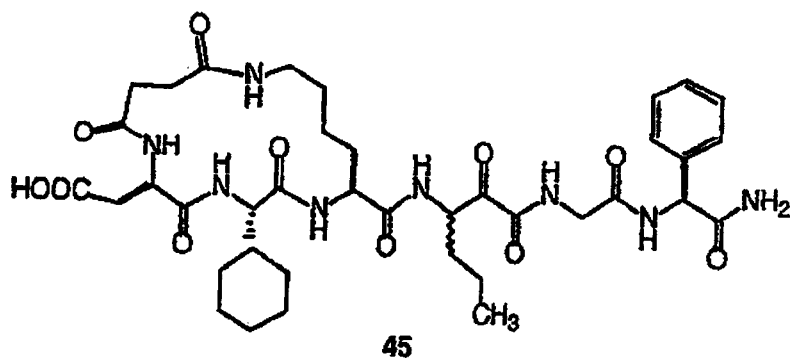
42

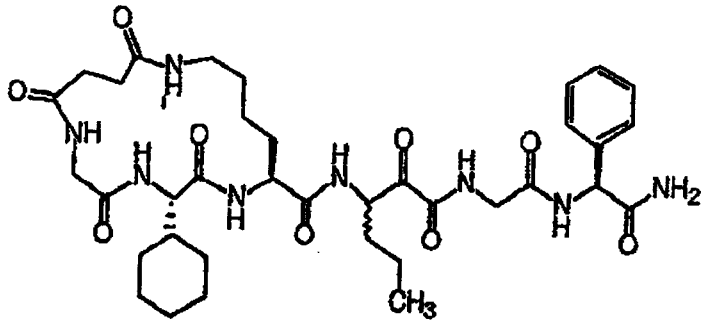


43

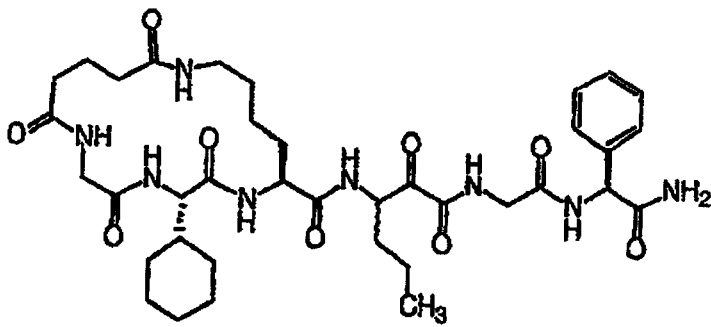


44

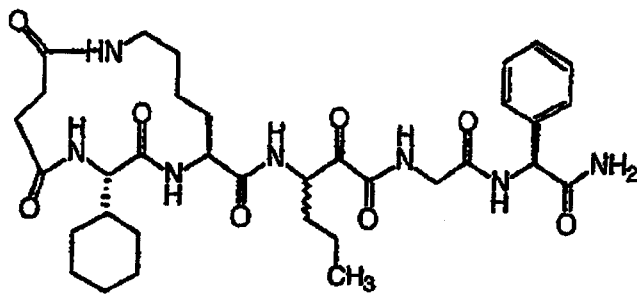




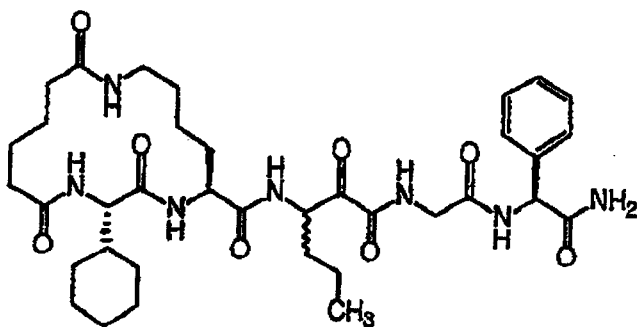
49



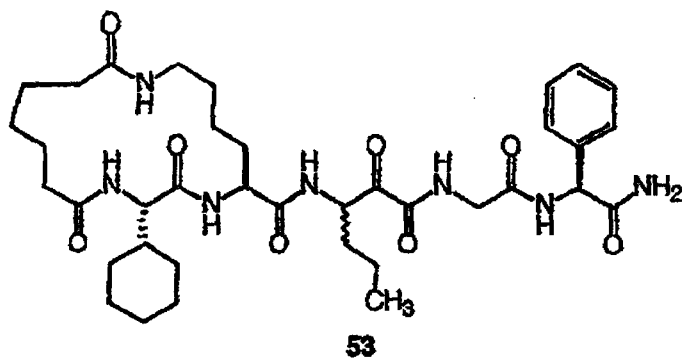
50



51

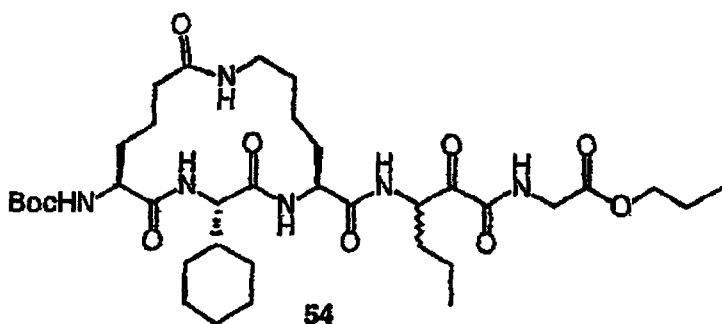


52



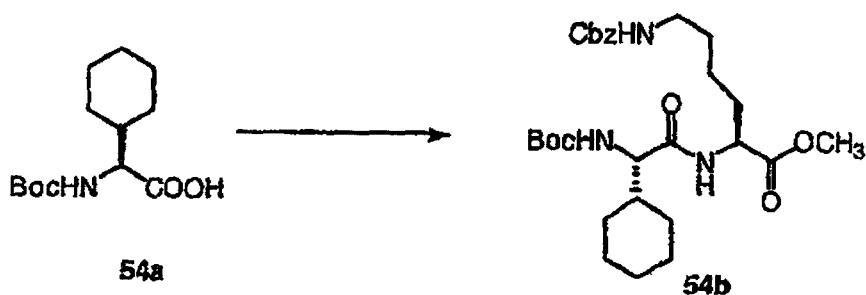
使用与实施例 40 的合成所示相似的固相法，合成化合物 41-53。

**实施例 54: 式 54 化合物的制备:**



5

步骤 A:

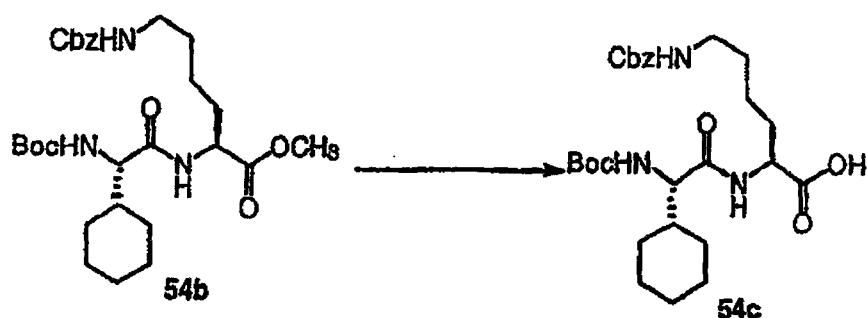


10

向搅拌的 Boc-环己基甘氨酸-OH (2.33 g, 9.07 mmol) 在 DMF (20 mL) 和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) 中的溶液中加入 HOBT (1.48 g, 9.07 mmol)、EDCI (1.91 g, 9.97 mmol) 和 NMM (2.99 mL, 27.2 mmol)。将该溶液在  $-20^\circ\text{C}$  下搅拌 10 分钟，随后加入 H-Lys(Z)-OMe·HCl 并在  $-20^\circ\text{C}$  下搅拌半小时，保存在冰箱中过夜。然后将该溶液浓缩至干燥，之后用 EtOAc、饱和  $\text{NaHCO}_3$  萃取。用  $\text{H}_2\text{O}$ 、盐水洗涤合并的有机层，经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥并浓

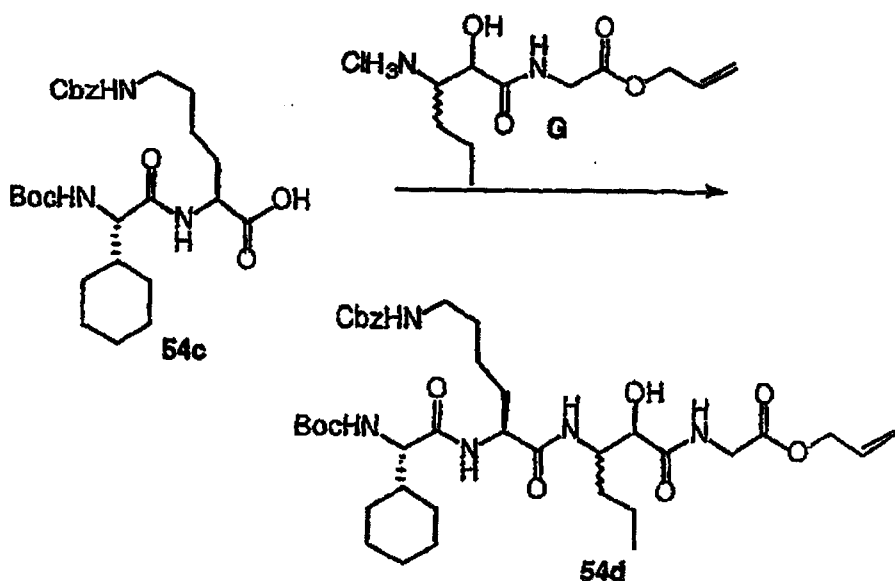
缩至干燥, 得到白色固体(4.83 g,  $MH^+ = 534.1$ )。

步骤 B:



5 向搅拌的 **54b** (4.86 g, 8.76 mmol) 在 MeOH (10 mL) 和 H<sub>2</sub>O (7 mL) 中的溶液中加入 LiOH (70 mg, 11.4 mmol)。形成白色沉淀并将该溶液在室温下搅拌过夜, 然后浓缩至干燥。然后将该粗制物分配在 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 和水之间。分离有机层并用盐水洗涤, 经 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并浓缩至干燥, 得到 **54c** (4.55 g,  $MH^+ = 520.1$ )。

步骤 C:

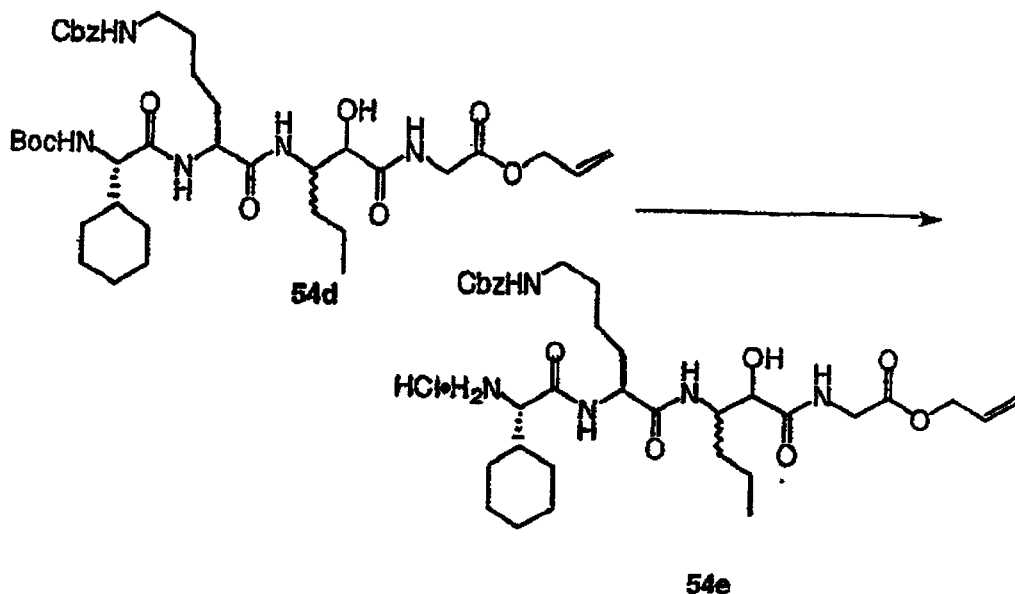


10

在 -20℃ 下, 向搅拌的 **54c** (4.3 g, 8.27 mmol) 在 DMF (40 mL) 和 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) 中的冷溶液中加入 HOBT (1.35 g, 8.27 mmol)、EDCI (1.74 g, 9.1 mmol) 和 NMM (2.73 mL, 8.27 mmol)。将得到的溶液在 -20℃ 下搅拌 10 分钟, 随后加入胺 **G** (2.32 g, 8.27 mmol) 并在 -20℃ 下搅拌

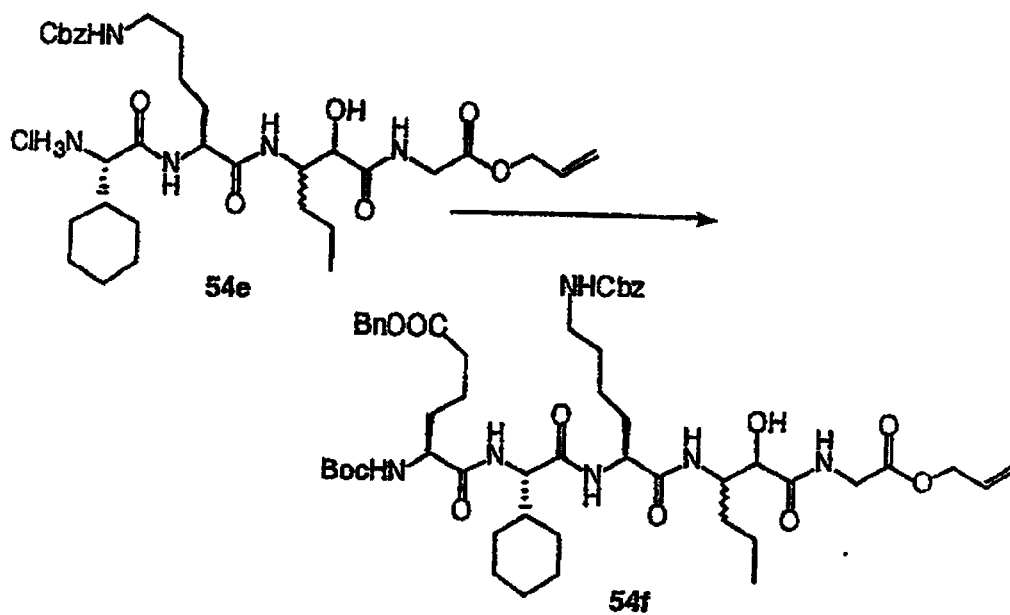
半小时, 保存在冰箱中过夜。按照步骤 A 的后处理步骤得到 **54d** (6.21 g,  $MH^+ = 746.2$ )。

步骤 D:



5 将 **54d** (6.16 g, 8.26 mmol) 的 4N HCl/二噁烷(40 mL)溶液在室温下搅拌 1 小时并浓缩至干燥, 得到粗制产物 **54e** (5.70 g, 产率 100%,  $MH^+ = 646.3$ )。

步骤 E:

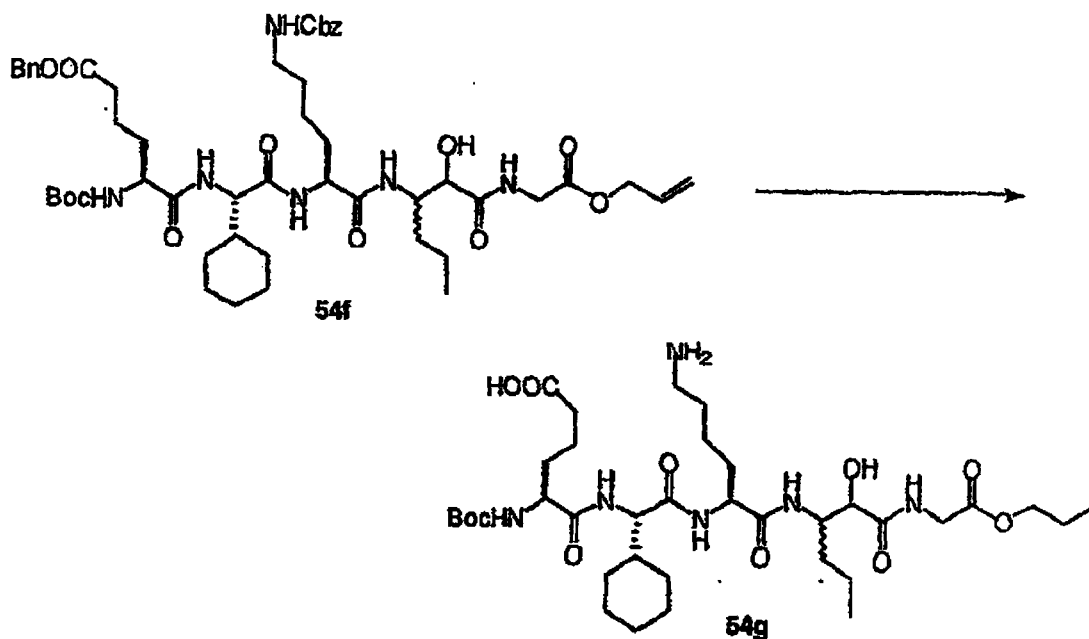


10

在 -20 °C 下, 向搅拌的 Boc-Glu(OBn)-OH 在 DMF (25 mL) 和 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

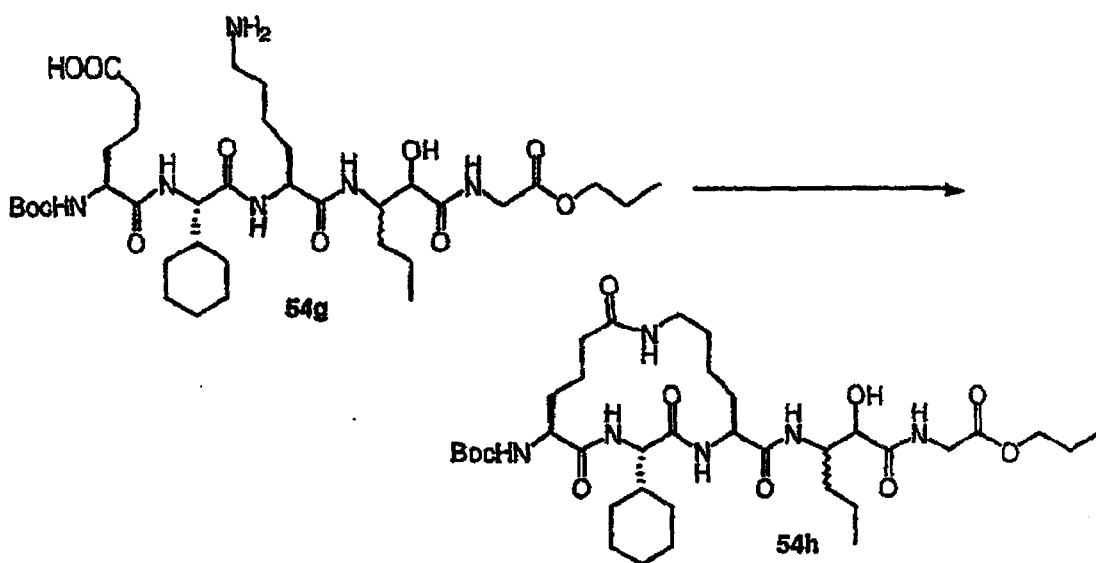
(25 mL)中的冷溶液中加入 HOBT (1.29 g, 7.92 mmol)、EDCI (1.66 g, 8.71 mmol)和 NMM (2.61 mL, 23.7 mmol)。将得到的溶液在-20℃下搅拌10分钟, 随后加入 54e (5.4 g, 7.916 mmol)并在-20℃下搅拌半小时, 保存在冰箱中过夜。按照步骤 A 的后处理步骤得到粗制产物(7.14 g, 产率 93.5 %)。

步骤 F:



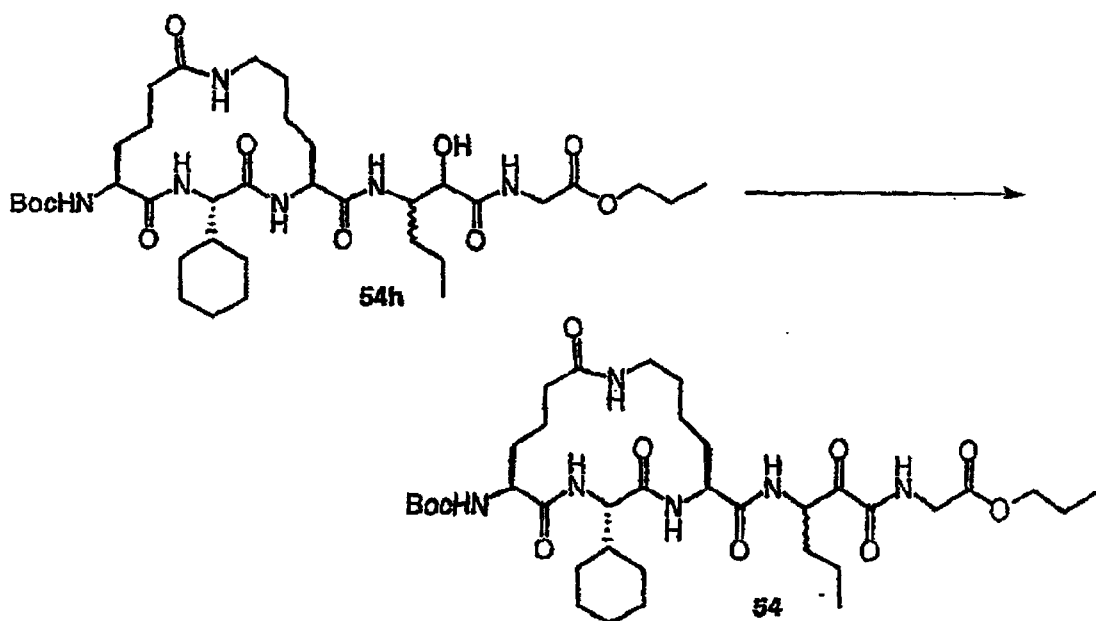
向搅拌的 54f (6.9 g, 7.15 mmol)的无水 EtOH (350 mL)溶液中加入在 50% H<sub>2</sub>O (w/w)中的 10% Pd/C (2.8 g)。将得到的溶液用 H<sub>2</sub> 净化并在 H<sub>2</sub> 氛下搅拌过夜。然后将该溶液通过硅藻土过滤并用 EtOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 洗涤滤液, 然后浓缩至干燥, 得到白色固体(1.44 g)。将该固体用 25% H<sub>2</sub>O/MeOH 洗涤并过滤通过烧结的漏斗, 然后冷冻并冻干得到 54g (4.12 g, 产率 77.5 %, MH<sup>+</sup> = 743.2)。

## 步骤 G:



在 $-20^{\circ}\text{C}$ 下，向搅拌的 **54g** (0.5 g, 6.7 mmol) 在 DMF (50 mL) 和  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) 中的冷溶液中加入 HOBT (0.219 g, 1.34 mmol)、EDCI (0.271 g, 1.41 mmol) 和 NMM (0.296 mL, 2.69 mmol)。将得到的溶液在  $-20^{\circ}\text{C}$  下搅拌 25 分钟，然后保存在冰箱中过夜。将该溶液浓缩至干燥，随后用 EtOAc、饱和  $\text{NaHCO}_3$  萃取。然后将合并的有机层浓缩至干燥，得到 **54h** (254 mg,  $\text{MH}^+ = 725.2$ )。

## 步骤 H:



向搅拌的 **54h** (0.2 g, 0.27 mmol) 的无水  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) 溶液中加入 Dess-Martin periodinane (0.234 g, 0.55 mmol)。将得到的溶液在室温下搅拌 1 小时。用半小时向该溶液中滴加入  $\text{H}_2\text{O}$  (0.010 mL) 的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) 溶液并再剧烈搅拌 2 小时。然后将该溶液与 50%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ /50% 饱和  $\text{NaHCO}_3$  一起搅拌半小时。分离有机层并用水、盐水洗涤, 经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 过滤, 浓缩至干燥并在硅胶上经柱层析纯化, 用 10%  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  洗脱, 得到 **54** (17 mg, 62%,  $\text{MH}^+ = 723.2$ )。

### HCV 蛋白酶抑制活性试验

10 分光光度试验: 按照由 R. Zhang 等, *Analytical Biochemistry*, 270 (1999) 268-275 描述的方法(其公开通过引用结合到本文中), 对本发明化合物进行 HCV 丝氨酸蛋白酶的分光光度试验。基于显色酯底物的蛋白酶解试验适用于 HCV NS3 蛋白酶活性的连续监测。底物衍生于 NS5A-NS5B 接合序列(Ac-DTEDVVX(Nva), 其中 X = A 或者 P) 的 P 侧, 其 C-末端羧基用 4 种不同的显色醇(3-或 4-硝基苯酚、7-羟基-4-甲基香豆素或 4-苯基偶氮苯酚) 中的一种酯化。下面提出这些新的分光光度酯底物的合成、表征以及应用于高通量筛选和 HCV NS3 蛋白酶抑制剂的详细的动力学评价。

### 20 材料与方法:

材料: 用于与试验有关的缓冲液的化学试剂得自 Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri)。用于肽合成的试剂得自 Aldrich Chemicals, Novabiochem (San Diego, California)、Applied Biosystems (Foster City, California) 和 Perseptive Biosystems (Framingham, Massachusetts)。肽由人工合成或者在型号 431A 的自动 ABI 合成仪(得自 Applied Biosystems) 上合成。型号 LAMBDA 12 的 UV/VIS 分光计得自 Perkin Elmer (Norwalk, Connecticut) 和 96 孔 UV 板得自 Corning (Corning, New York)。预温热封闭剂得自 USA Scientific (Ocala, Florida)

和 96 孔板旋涡仪得自 Labline Instruments (Melrose Park, Illinois)。具有单色光源的 Spectramax Plus 微量滴定板读数器得自 Molecular Devices (Sunnyvale, California)。

5 酶制备: 通过采用先前公开的方法(D. L. Sali 等, *Biochemistry*, 37 (1998) 3392-3401)制备重组异源二聚体(heterodimeric)的 HCV NS3/NS4A 蛋白酶(株 1a)。使用先前经氨基酸分析定量的重组 HCV 蛋白酶标准物, 通过 Biorad 染色法测定蛋白浓度。试验开始前, 采用 Biorad Bio-Spin P-6 预装柱, 将酶储备缓冲液(50 mM 磷酸钠 pH 8.0, 300 mM NaCl, 10%甘油, 0.05%十二烷基麦芽糖苷和 10 mM DTT)交换为试验缓冲液  
10 (25 mM MOPS pH 6.5, 300 mM NaCl, 10%甘油, 0.05%十二烷基麦芽糖苷, 5  $\mu$ M EDTA 和 5  $\mu$ M DTT)。

底物合成和纯化: 如由 R. Zhang 等(出处同上)报道的那样进行底物的合成并且使用标准方法(K. Barlos 等, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 37 (1991), 513-520), 通过将 Fmoc-Nva-OH 固定到 2-氯三苯甲基氯树脂上  
15 启动。随后, 或者人工或者在型号 431 的自动 ABI 肽合成仪上, 采用 Fmoc 化学装配肽。或者通过在二氯甲烷(DCM)中的 10%乙酸(HOAc)和 10%三氟乙醇(TFE)30 分钟, 或者通过在 DCM 中的 2%三氟乙酸(TFA)10 分钟, 自树脂裂解 N-乙酰化和充分保护的肽片段。共沸蒸发(或者经  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液反复提取)合并的滤液和 DCM 洗液, 除去在裂解中所用的酸。经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥 DCM 相并且蒸发。  
20

采用标准酸-醇偶合方法(K. Holmber 等, *Acta Chem. Scand.*, B33 (1979), 410-412)装配酯底物。将肽片段溶于无水吡啶(30-60 mg/ml)中, 向其中加入 10 摩尔等价物的发色团和催化量(0.1 eq.)的对甲苯磺酸(pTSA)。加入二环己基碳二亚胺(DCC, 3 eq.)以启动偶合反应。经  
25 HPLC 监测产物形成并发现反应在室温下 12-72 小时后完成。真空蒸发吡啶溶剂并经用甲苯共沸蒸发进一步除去。用 95%在 DCM 中的 TFA 将肽酯脱保护 2 小时并用无水乙醚提取 3 次以除去过量的发色团。经反相 HPLC 在 C3 或 C8 柱上纯化脱保护的底物, 用 30%-60%

乙腈(使用 6 个柱体积)梯度洗脱。HPLC 纯化后总收率为约 20-30%。经电喷雾离子质谱证实分子量。在干燥下,以干燥粉末形式贮存底物。

底物和产物的波谱: 在 pH 6.5 的试验缓冲液中得到底物和相应显色团产物的波谱。采用多倍稀释,在最佳脱峰波长下,1-cm 比色杯(340 nm 对 3-Np 和 HMC, 370 nm 对 PAP 和 400 nm 对 4-Np)中测定消光系数。最佳脱峰波长定义为在底物与产物之间产生吸收度最大相对差异的波长(产物 OD-底物 OD/底物 OD)。

蛋白酶试验: 在 96 孔微量滴定板中,采用 200  $\mu$ l 反应混合物在 30

10  $^{\circ}$ C 下进行 HCV 蛋白酶试验。使试验缓冲液条件(25 mM MOPS pH 6.5, 300 mM NaCl, 10%甘油, 0.05%十二烷基麦芽糖苷、5  $\mu$ M EDTA 和 5  $\mu$ M DTT)对 NS3/NS4A 异源二聚体最佳化(D. L. Sali 等, 出处同上)。通常,将 150  $\mu$ l 缓冲液、底物和抑制剂的混合物加入到各孔(DMSO 最终浓度, 4% v/v)中并且在 30 $^{\circ}$ C 下预孵育约 3 分钟。然后将 50  $\mu$ l

15 在试验缓冲液中预温热的蛋白酶(12 nM, 30 $^{\circ}$ C)用于启动所述反应(最终体积 200  $\mu$ l)。采用配有单色光源的 Spectromax Plus 微量滴定板读数器(通过利用截断滤膜的板读数器可得到可以接受的结果),在试验全程(60 分钟)监测板在合适的波长(对于 3-Np 和 HMC 为 340 nm, 对于 PAP 为 370 nm, 对于 4-Np 为 400 nm)下吸光度的变化。在合适的

20 波长下监测 Nva 与发色团之间的酯键的蛋白酶剪切,相对于作为非酶促水解的对照的无酶空白。于 30 倍底物浓度范围(~6-200  $\mu$ M)内进行底物动力学参数的评价。采用线性回归测定最初速度,并且采用非线性回归分析(Mac Curve Fit 1.1, K. Raner),通过将数据拟合到 Michaelis-Menten 方程式中获得动力学常数。假设酶完全活化,以计算转化数( $K_{cat}$ )。

抑制剂和灭活剂的评价: 按照竞争抑制作用动力学的重排 Michaelis-Menten 方程式  $v_0/v_i = 1 + [I]_0 / (K_i(1 + [S]_0/K_m))$  (其中  $v_0$  为未抑制的初始速度,  $v_i$  为在任何给出的抑制剂浓度( $[I]_0$ )下,在抑制剂存在下的初始速

度, 且 $[S]_0$ 为所使用的底物浓度), 通过  $v_0/v_i$  对抑制剂浓度( $[I]_0$ )作图, 在固定的酶和底物的浓度下, 可实验测定竞争性抑制剂 Ac-D-(D-Gla)-L-1-(Cha)-C-OH (27)、Ac-DTEDVVA(Nva)-OH 和 Ac-DTEDVVP(Nva)-OH 的抑制常数( $K_i$ )。采用线性回归拟合所得数据, 并将所得到的斜率  $1/(K_i(1+[S]_0/K_m))$  用于计算  $K_i$  值。

在以上提及的表 1 中给出了所得到的本发明各大环化合物的  $K_i$  值, 其中按  $K_i$  值的范围的顺序排列化合物。从这些试验结果, 技术人员应该意识到本发明化合物作为 NS3-丝氨酸蛋白酶抑制剂具有优良的用途。

10

细胞生物测定方法: 按照由 S. Agrawal 等, “Development and Characterization of Hepatitis C Virus Serine Protease Cell-based Trans-Cleavage Assay” (丙型肝炎病毒丝氨酸蛋白酶细胞-基反式切割测定法的开发和鉴定), Hepatology Supplement to Volume 30 (No. 4, 第 2 部分, 1999 年 10 月), Abstract No. 615 (Proceedings of AASLD 50<sup>th</sup> Annual Meeting, Dallas, Texas, 1999 年 11 月 5-9 日)(其公开通过引用结合到本文中)描述的方法, 对本发明化合物进行 HCV 丝氨酸蛋白酶的细胞生物测定。在用质粒(表达包含 NS5A/5B 切割识别序列的报道蛋白底物)和 1BNS4A<sub>21-32</sub>GS-GSNS<sub>3-81</sub>I17K 表达载体以及作为控制细胞毒性的内标蛋白的 YFPn1 共转染的 Hela/Huh7 细胞中进行所述测定。通过全细胞溶胞产物的 SDS-PAGE 随后通过采用针对报道底物的单克隆抗体的蛋白质印迹检测, 测量蛋白酶活性。通过在磷光成像仪上扫描免疫印迹进行底物切割的定量。

25

### 材料:

#### 质粒 DNAs

**pBFP-5A/5B-GFP**: 表达所述底物的报道基因编码融合蛋白, 后者包括被衍生于 NS5A/5B 切割识别序列的 25 个氨基酸分开的 N' 末端蓝色

荧光蛋白(BFP)结构域和 C'末端绿色荧光蛋白(GFP)结构域。当经合适波长的 UV 光激发时, GFP 和 BFP 均为分别发射绿光或蓝光的基本上均匀的自动荧光蛋白。在 GFP 的发色团中的四个氨基酸取代改变发射波长并把蛋白转变为 BFP。

- 5 采用识别两种蛋白的单克隆抗体, 通过免疫学方法在细胞溶胞产物中可检测底物和得到的 GFP 和 BFP 产物。

10 BFP-5A/5B-GFP 报道基因包含 BFP 和 GFP 自动荧光蛋白编码序列(Quantum Biotechnologies, Inc., Montreal, Canada), 所述序列被 NS5A/5B 切割识别序列分开, 在 pQB125 克隆载体(Quantum Biotechnologies, Inc.)的 Nhe I 和 Bam HI 限制性内切核酸酶位点之间被克隆。融合蛋白的表达处于 CMV IE 启动子-增强子的控制下。载体的牛生长激素 p(A)序列向 mRNA 提供多腺苷酸化信号。NS5A/5B 切割序列为: SSGADTEDVVCCSMSYTWGALVTP。用 DNA 测序来证实克隆。

- 15 **P1BOO2: 1bNS4A21-32GS-GS NS 3-81 I17K:** 将亚型 1b 蛋白酶克隆为在载体 pCIneo 中的 CMV 启动子后的 XbaI/NotI 片段。

**YFPn1:** YFPn1 购自 CLONTECH (Palo Alto, California)。将第三种质粒加入到转染提供控制细胞毒性的内标蛋白且不影响蛋白酶切割的百分率。

- 20 在合适的抗生物素选择下, 于 LB 培养基中, 在 DH5  $\alpha$  细胞(得自 Life Technologies)中维持和繁殖质粒 DNAs, 并且采用 QIAfilter Plasmid Kits (Qiagen, Valencia, California)纯化。

#### 细胞培养:

- 25 在补充有 10%胎牛血清(FCS)、2 mM 谷氨酰胺和 100 u/ml 青霉素-链霉素(BioWhittaker)、2% NaHCO<sub>3</sub> 的 Eagle 氏极限必需培养基(EMEM; BioWhittaker, Walkersville, Maryland)中维持和繁殖 **Hela** 细胞。

在补充有 10%胎牛血清(FCS)、100 u/ml 青霉素-链霉素(BioWhittaker)

和 5 ml NEAA (100x; BioWhittaker)/L 的 Dulbecco 改进的 Eagle 氏培养基(DMEM; BioWhittaker)中维持和繁殖 Huh7 细胞。

### SOP 方法

#### 5 转染前一天:

以  $6 \times 10^4$  细胞/孔的密度将 Hela 细胞接种在 24 孔板(Falcon 3047 板)中并于  $37^\circ\text{C}$  下在 5%  $\text{CO}_2$  孵育器中生长过夜。

#### 转染当天:

- 10 将质粒 DNAs 在不含有核酸酶的水中稀释至最终浓度  $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Promega, Madison, Wisconsin, 分类号 P119C)。合并  $0.75 \mu\text{g}$  BFP-5A/5B-GFP 并与  $0.175 \mu\text{g}$  PIB002 (0.23X)和  $0.02 \mu\text{g}$  的 YFPn1 混合。用不含有 FBS、谷氨酰胺和抗生素的 EMEM 使 DNAs 的最终体积达到  $60 \mu\text{l}$ 。按  $5 \mu\text{l}$  体积/ $\mu\text{g}$  总 DNA 的比例加入 SuperFect
- 15 Reagent (Qiagen, 目录号 301305), 并在室温下将混合物涡旋约 10 秒钟且孵育 10 分钟以形成复合物。

- 当形成复合物时, 吸出细胞培养板中的生长培养基, 并用 1 ml 不含有  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  的 PBS (BioWhittaker)洗涤细胞 1 次。将  $350 \mu\text{l}$  EMEM (补充有合适的补充物-完全培养基)加入到包含转染复合物的
- 20 试管中并将混合物上下吸打 2-3 次。将全部体积转移至 24 孔培养板的一个孔中。在  $37^\circ\text{C}$  下和 5%  $\text{CO}_2$  中, 将 Hela 细胞与转染复合物孵育约 3 小时。通过吸出从细胞中除去包含转染复合物的培养基。

- 在约 1 ml PBS 中洗涤细胞一次, 将 PBS 吸出, 加入  $495 \mu\text{l}$  完全 EMEM 随后加入  $5 \mu\text{l}$  化合物/孔。在  $37^\circ\text{C}$  下和 5%  $\text{CO}_2$  中, 将细胞孵
- 25 育 22-24 hr。

### 细胞溶胞产物的制备

自每孔吸出培养基并用 DPBS 洗涤 1 次。将细胞收获在  $100 \mu\text{l}$

的 1x Tris-SDS-BME 样品缓冲液(OWL 分离系统, Portsmouth, New Hampshire, 编号 ER33)中, 并且转移至微量离心管中。然后, 将其煮沸 3-5 分钟以裂解细胞。在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶上以 10  $\mu$ l/孔进行加样。在 10 cm x 10 cm 12.5% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Owl Scientific, 编号 OG-0125B)上, 在 tris-甘氨酸-SDS 缓冲液(Owl Scientific)中, 于 30 mamp 下经电泳将溶胞产物分离。使用前, 将 PVDF 膜(Immobilon-P; 45  $\mu$ m 孔径; Millipore, Bedford, Massachusetts)在 100%甲醇中浸泡 10 秒钟, 然后将印迹置于蒸馏水中。采用半-干燥电印迹仪在每块凝胶 108 mamp 下 90 分钟将蛋白转移至 PVDF 滤膜(0.45  $\mu$ m, Millipore)。

经 ECF 蛋白质印迹的蛋白的检测(Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England), 目录号 RPN 5780)。在冰箱中, 于 2-4 $^{\circ}$ C 下, 通过在 ~ 10 ml 的包含 0.05%吐温 20、pH 7.4 的 PBS(Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, 目录号 3563)中的 5%封闭剂(得自试剂盒), 将 PVDF 滤膜封闭过夜。次日, 用包含 0.05%吐温 20 的 TPBS 洗涤缓冲液短暂冲洗膜两次, 然后在包含 0.05%吐温 20、pH 7.4 的 PBS 中洗涤三次, 每次 5 分钟。在包含 0.05%吐温 20、pH 7.4 的 PBS 中, 将膜在 12 ml 抗-GFP 单克隆抗体的 1:3000 稀释液中孵育 30 分钟(Clontech, Palo Alto, California), 而在同时加入 1% BSA (牛白蛋白, 得自 Sigma 的目录号 A-2153)以减少背景。用 TPBS 短暂洗涤膜两次, 然后在 TPBS 洗涤缓冲液中洗涤三次, 每次 5 分钟。将膜在 12 ml 在 TPBS 中的 1:600 稀释抗荧光素-连接的抗小鼠 Ig 中孵育 30 分钟。用 TPBS 短暂洗涤膜两次, 然后在 TPBS 洗涤缓冲液洗涤三次, 5 分钟。为用 ECF 底物放大信号, 将膜在 10 ml 的 1:2500 抗荧光素碱性磷酸酶缀合物中孵育 30 分钟。用 TPBS 短暂冲洗膜两次, 然后在 TPBS 洗涤缓冲液中冲洗三次, 5 分钟。按照制造商的说明书(等分试样和冷冻), 制备 ECF 底物溶液, 将膜孵育 2-3 分钟, 排出过量的试剂, 然后用滤纸吸干, 风干 9-10 分

钟，然后扫描。

5 **扫描膜：**将印迹放在 Storm 860 磷光成像仪的玻璃上。设立蓝色化学发光，200 像素大小，700 PMT 电压。在 ImageQuant 中打开文件并通过产生围绕代表底物(S)、产物(P)和内部对照物(IC)的条带的正方形定量化。底物的切割百分率可作为  $P/(S+P) \times 100$  测量。与包括在每个印迹上的药物对照品的重复试验相比，测量由药物引起的切割的抑制作用。在 Excel 中建立报告。一些化合物的结果如下：

实施例 36 的化合物： $EC_{50} = 9 \mu\text{m}$

10

实施例 35 的化合物： $EC_{50} = 20 \mu\text{m}$

根据这些试验结果，本领域技术人员应该意识到本发明化合物作为 NS3-丝氨酸蛋白酶抑制剂具有优良的用途。