



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00806046.0

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1177861C

[22] 申请日 2000.4.3 [21] 申请号 00806046.0
 [30] 优先权
 [32] 1999. 4. 6 [33] US [31] 60/128,011
 [86] 国际申请 PCT/CA2000/000353 2000. 4. 3
 [87] 国际公布 WO2000/059929 英 2000. 10. 12
 [85] 进入国家阶段日期 2001. 10. 8
 [71] 专利权人 贝林格尔·英格海姆加拿大有限公司
 地址 加拿大魁北克
 [72] 发明人 尤拉·S·桑特里佐斯
 戴尔·R·卡梅伦
 安妮·玛丽·福彻 埃莉斯·吉罗

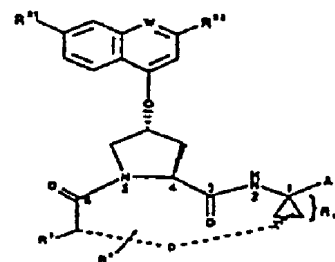
纳撒利·古德鲁 特迪·哈尔莫斯
 蒙西·利纳斯-布鲁内特
 审查员 吴文英
 [74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 代理人 范明娥

权利要求书 26 页 说明书 109 页

[54] 发明名称 可有效对抗 C 型肝炎病毒的巨环肽
 [57] 摘要

本发明包括式 I 的巨环化合物，其在体外和细胞测定中，对抗 C 型肝炎病毒的 NS3 蛋白酶。其中 W 为 CH 或 N，R²¹ 为 H、卤素、C₁₋₆ 烷基、环烷基、卤代烷基、C₁₋₆ 烷氧基、环烷氧基、羟基或 N(R²³)₂，其中每个 R²³ 分别为 H、C₁₋₆ 烷基或环烷基、且 R²² 为 H、卤素、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₆ 环烷基、C₁₋₆ 卤代烷基、C₁₋₆ 硫烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₃₋₆ 环烷氧基、C₂₋₇ 烷氧烷基、C₃₋₆ 环烷基、C_{6或10} 芳基或 Het，其中 Het 为五-、六-或七-员饱和或不饱和的杂环，它含有一至四个选自氮、氧和硫的杂原子；所述以 R²⁴ 取代该环烷基、芳基或 Het，其中 R²⁴ 为 H、C₁₋₆ 烷基、C₃₋₆ 环烷基、C₁₋₆ 烷氧基、C₃₋₆ 环烷氧基、NO₂、N(R²⁵)₂、NH-C(O)-R²⁵；或 NH-C(O)-NH-R²⁵，其中每个 R²⁵ 分别为 H、C₁₋₆ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基；或 R²⁴ 为 NH-C(O)-OR²⁶，其中 R²⁶ 为 C₁₋₆ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基；R³ 为烷基、NH₂ 或式 -NH-R³¹ 的基团，其中 R³¹ 为 C_{6或10} 芳基、杂芳基、-C(O)-R³²、-C(O)-OR³² 或

-C(O)-NHR³²，其中 R³² 为 C₁₋₆ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基；D 为 5 至 10 个原子的饱和和不饱和的亚烷基链，可视需要含有一至三个杂原子，分别选自 O、S 或 N-R⁴¹，其中 R⁴¹ 为 H、C₁₋₆ 烷基、环烷基或 -C(O)-R⁴²，其中 R⁴² 为 C₁₋₆ 烷基、环烷基或 C_{6或10} 芳基；R⁴ 为 H 或是在该链 D 中的任一个碳原子上的一至三个取代基，该取代基分别选自 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 卤代烷基、C₁₋₆ 烷氧基、羟基、卤素、氨基、桥氧基、硫代或 C₁₋₆ 硫烷基，且 A 为式 -C(O)-NH-R⁵ 的酰胺，其中 R⁵ 选自：C₁₋₈ 烷基、C₃₋₆ 环烷基、C_{6或10} 芳基或 C₇₋₁₆ 芳烷基；或 A 为羧酸或其



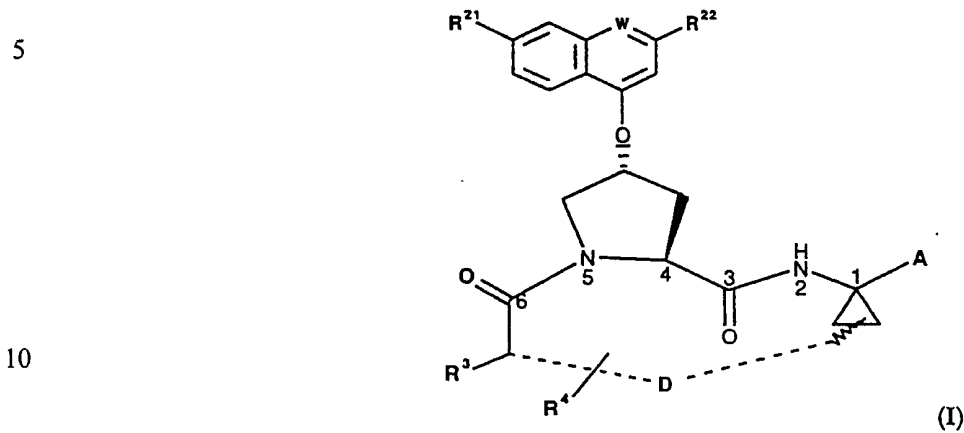
(1)

4
7
2
-
1
8
-
I
S
S
N



权 利 要 求 书

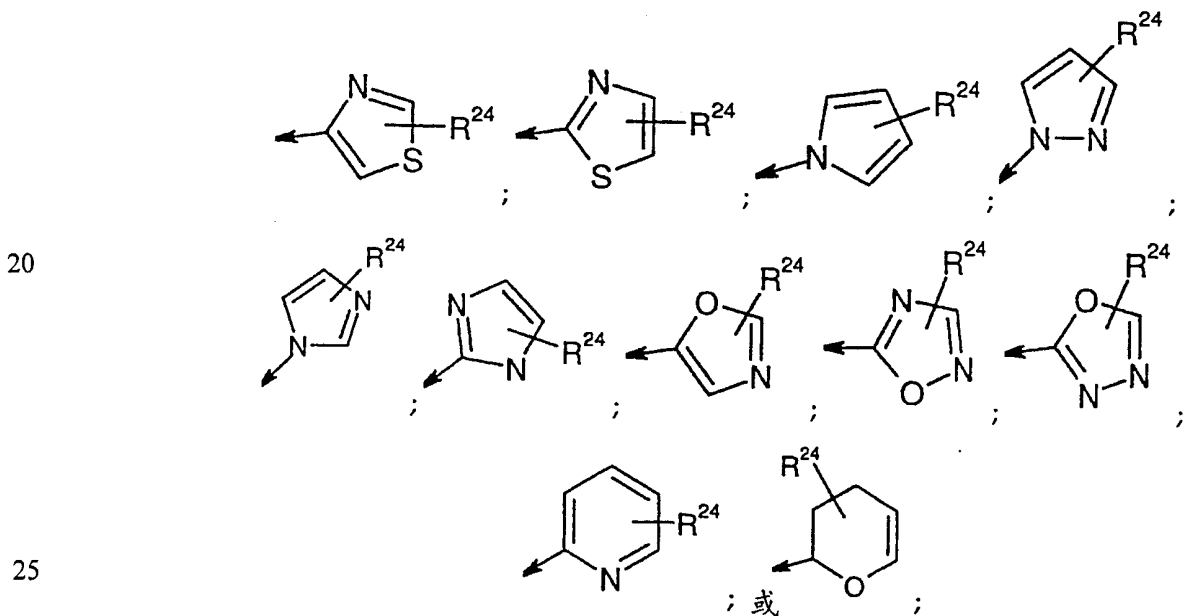
1. 一种式(I)化合物:



其中 W 为 N;

R^{21} 为 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、羟基、氯或 $N(R^{23})_2$, 其中 R^{23} 为 H 或 C_{1-6} 烷基;

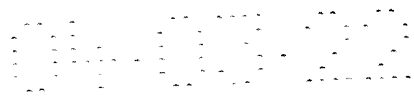
15 R^{22} 为 H、 C_{1-6} 硫烷基、 C_{1-6} 烷氧基、苯基或选自以下的 Het:



其中 R^{24} 为 H、 C_{1-6} 烷基、 $NH-R^{25}$ 、 $NH-C(O)-R^{25}$ 、 $NH-C(O)-NH-R^{25}$, 其中每个 R^{25} 分别为 H、 C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基;

或 $NH-C(O)-OR^{26}$, 其中 R^{26} 为 C_{1-6} 烷基;

30 R^3 为式 $NH-C(O)-R^{32}$ 的酰胺、或式 $NH-C(O)-NH-R^{32}$ 的脲, 或式 $NH-C(O)-OR^{32}$ 的氨基甲酸酯, 其中 R^{32} 为 C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基;

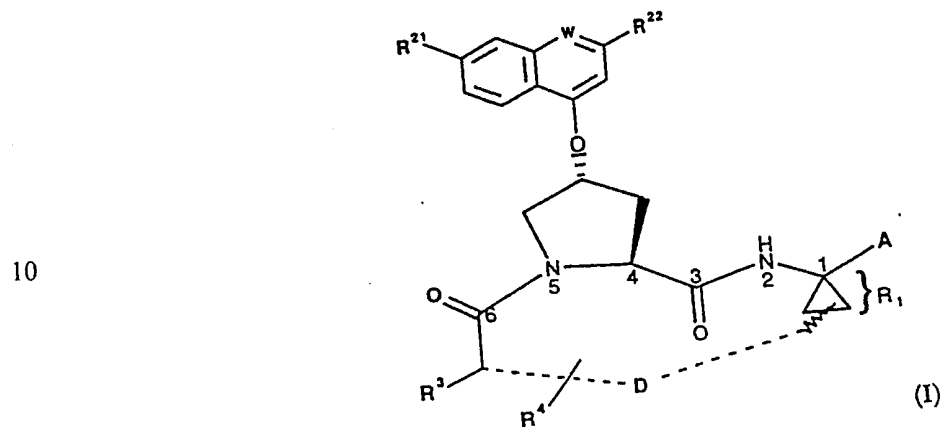


D为6至8个原子的饱和或不饱和的亚烷基链，任选地含有一或两个杂原子，分别选自O、S或N-R⁴¹，其中R⁴¹为H、C₁₋₆烷基或C₂₋₇酰基；

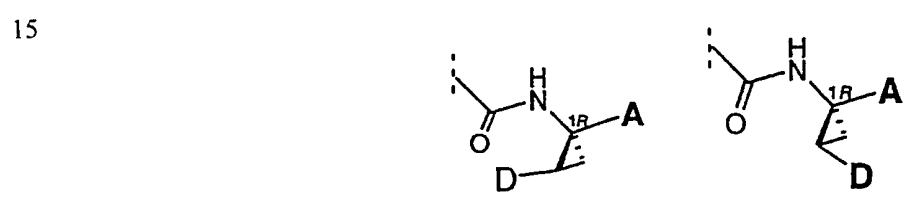
R⁴为H或C₁₋₆烷基；且

A为羧酸或其在药学上可接受的盐或酯。

5 2. 根据权利要求1的式I化合物，



其中该R¹部分选自2种不同的非对映异构体，以结构(i)和(ii)表示：

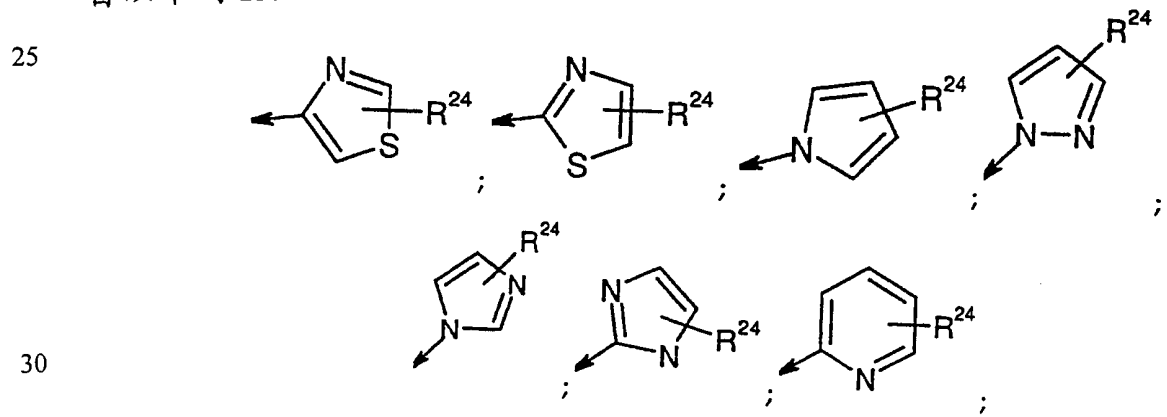


D与酰胺同侧(i) 或 D与A同侧(ii)。

20 3. 根据权利要求2的式I化合物，其中D与A同侧连接，如同由结构(ii)表示的。

4. 根据权利要求1的式I化合物，其中R²¹为H或C₁₋₆烷氧基。

5. 根据权利要求1的式I化合物，其中R²²为C₁₋₄烷氧基、苯基，或选自以下的Het:



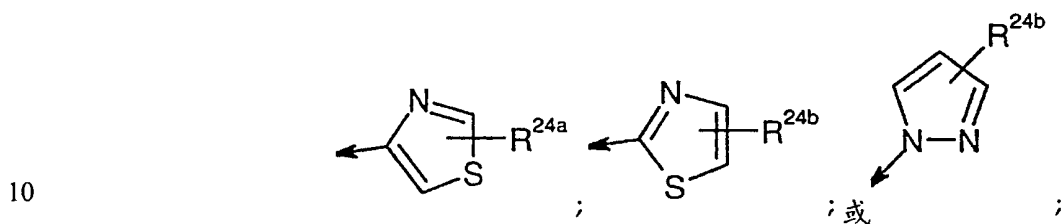
其中 R^{24} 为 H、 C_{1-6} 烷基、 $NH-R^{25}$ 或 $NH-C(O)-R^{25}$;

其中每个 R^{25} 分别为 C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基,

或 $NH-C(O)-OR^{26}$, 其中 R^{26} 如权利要求 1 中的定义。

5 6. 根据权利要求 5 的式 I 化合物, 其中 R^{21} 为甲氧基。

7. 根据权利要求 6 的式 I 化合物, 其中 R^{22} 为乙氧基或选自以下的 Het:



其中 R^{24a} 为 $NH-R^{25}$ 或 $NH-C(O)-R^{25}$, 其中 R^{25} 为 C_{1-6} 烷基;

或 R^{24a} 为 $NH-C(O)-OR^{26}$, 其中 R^{26} 为 C_{1-6} 烷基, 且

R^{24b} 为 H 或 C_{1-6} 烷基。

15 8. 根据权利要求 1 的式 I 化合物, 其中 R^3 为脲或氨基甲酸酯, 其中 R^{32} 为 C_{1-6} 烷基或 C_{4-6} 环烷基。

9. 根据权利要求 8 的式 I 化合物, 其中 R^3 为氨基甲酸酯, 且 R^{32} 为叔丁基、环丁基或环戊基。

20 10. 根据权利要求 1 的式 I 化合物, 其中 D 可视需要含有一个选自 NH 或 $N-C_{2-7}$ 酰基的杂原子。

11. 根据权利要求 10 的化合物, 其中该杂原子选自: NH 或 N(Ac)。

12. 根据权利要求 10 的化合物, 其中该 D 链含有 7 个原子。

13. 根据权利要求 12 的化合物, 其中该杂原子位于该 D 链的 10 位置处。

25 14. 根据权利要求 10 的化合物, 其中该 D 链是饱和的。

15. 根据权利要求 1 的式 I 化合物, 其中 D 为 6 至 8 个原子的饱和或不饱和的亚烷基链, 可视需要含有一个选自 O 或 S 的杂原子。

16. 根据权利要求 15 的化合物, 其中该 D 链含有 7 个原子。

17. 根据权利要求 16 的化合物, 其中该杂原子位于该 D 链的位置 9 处。

30 18. 根据权利要求 17 的化合物, 其中该 D 链在位置 8 处以 R^4 取代, 其中 R^4 为 H 或 C_{1-6} 烷基。



19. 根据权利要求 18 的化合物, 其中该 R^4 为 H 或甲基。
20. 根据权利要求 19 的化合物, 其中该 R^4 为 H 或 8-(S)-Me。
21. 根据权利要求 20 的化合物, 其中该 D 链是饱和的。
22. 根据权利要求 16 的化合物, 其中该 D 链在位置 11, 12 处含有一个
5 双键。
23. 根据权利要求 22 的化合物, 其中该双键为反式。
24. 根据权利要求 1 的式 I 化合物, 其中 D 为 6 至 8 个原子的饱和或不饱和的全碳亚烷基链。
25. 根据权利要求 24 的式 I 化合物, 其中该 D 链含有 7 个原子。
- 10 26. 根据权利要求 25 的式 I 化合物, 其中该 D 链为饱和的。
27. 根据权利要求 26 的化合物, 其中以 R^4 取代该 D 链, 其中 R^4 为 H、氧代、羟基、烷氧基或烷基。
28. 根据权利要求 27 的化合物, 其中该 R^4 为 H 或 C_{1-6} 烷基。
29. 根据权利要求 28 的化合物, 其中该 R^4 为 H 或甲基。
- 15 30. 根据权利要求 29 的化合物, 其中该 R^4 为 H 或 10-(S)-Me。
31. 根据权利要求 25 的式 I 化合物, 其中 D 含有一个双键。
32. 根据权利要求 31 的式 I 化合物, 其中该双键在该 D 链的位置 13, 14 处。
33. 根据权利要求 32 的式 I 化合物, 其中该双键为顺式。
- 20 34. 根据权利要求 33 的化合物, 其中以 R^4 取代该 D 链, 其中 R^4 为 H、氧代、羟基、 C_{1-6} 烷氧基或 C_{1-6} 烷基。
35. 根据权利要求 34 的化合物, 其中该 R^4 为 H 或 C_{1-6} 烷基。
36. 根据权利要求 35 的化合物, 其中该 R^4 为 H 或甲基。
37. 根据权利要求 36 的化合物, 其中该 R^4 为 H 或 10-(S)-Me。
- 25 38. 根据权利要求 1 的式 I 化合物, 其中 A 为羧酸。
39. 根据权利要求 1 的式 I 化合物, 其中
W 为 N:
 R^3 为式-NH-C(O)-NHR³² 或 NH-C(O)-OR³² 的基团, 其中 R^{32} 为 C_{1-4} 烷基或 C_{4-6} 环烷基;
- 30 D 为 6 至 8 个原子的饱和或不饱和的亚烷基链, 连接到 R^1 与 A 同侧, 可视需要含有一或两个杂原子, 分别选自 O、S 或 N- R^{41} , 其中 R^{41} 为 H 或

C₂₋₇ 酰基;

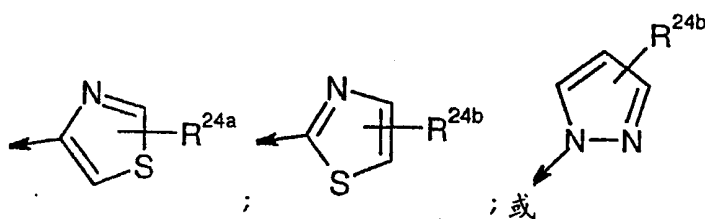
R⁴ 为 H 或一~三个取代基, 分别选自羟基或 C₁₋₆ 烷基; 且

A 为羧酸, 或其在药学上可接受的盐或酯。

40. 根据权利要求 39 的式 I 化合物, 其中

R²¹ 为 H 或甲氧基;

R²² 为 C₁₋₆ 烷基或选自以下的 Het:



其中 R^{24a} 为 H、C₁₋₆ 烷基、NH-R²⁵、NH-C(O)-R²⁵ 或 NH-C(O)-NH-R²⁵,

其中 R²⁵ 为 H、C₁₋₆ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基;

或 R^{24a} 为 NH-C(O)-OR²⁶, 其中 R²⁶ 为 C₁₋₆ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基; 且

R^{24b} 为 H 或 C₁₋₆ 烷基;

R³ 为式-N-C(O)-NHR³² 的脲, 或式 N-C(O)-OR³² 的氨基甲酸酯, 其中 R³² 为 C₁₋₆ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基;

D 为 7 个原子的亚烷基链, 可视需要在位置 11, 12 或 13, 14 处含有一个双键;

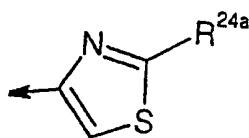
该 D 链可视需要含有一个杂原子, 分别选自 O、S、NH、N(Me) 或 N(Ac);

且

R⁴ 为 H 或 C₁₋₆ 烷基。

41. 根据权利要求 40 的式 I 化合物, 其中 R²¹ 为甲氧基, 且 R²² 为乙氧

基或

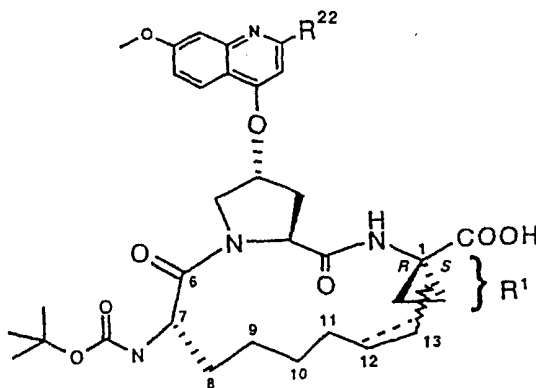


其中 R^{24a} 为 NH-(C₁₋₄ 烷基)、NH-C(O)-(C₁₋₄ 烷基)、NH-C(O)-O-(C₁₋₄ 烷基) 或 NH-C(O)-NH-(C₁₋₄ 烷基);

D 为 C₇ 全碳链，饱和的或在位置 13, 14 处含有一个顺式双键。

42. 一种下式化合物:

5



10

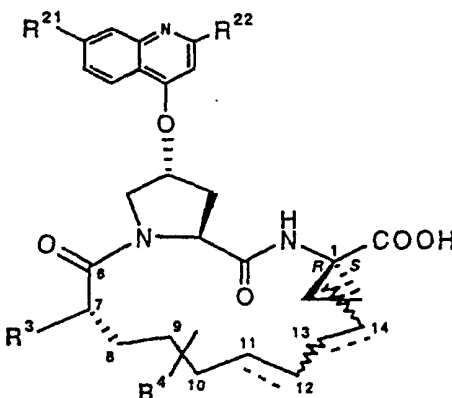
它含有在 R¹ 的单一立体异构体，其中所述双键，D-R¹ 键立体化学和 R²² 限定如下:

化合物 #	双键	D-R ¹ 键立体化学	R ²² :
101	12,13-反式	1R,D 与酰胺同侧	苯基
102	无	1R,D 与酸同侧	苯基
和 103	无	1R,D 与酰胺同侧	苯基

15

43. 一种下式化合物:

20



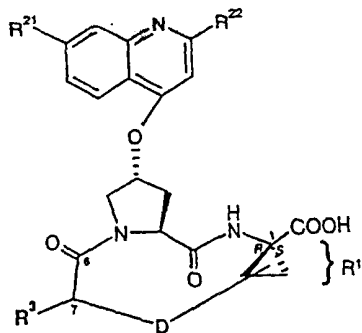
25

它含有在 R¹ 的单一立体异构体，其中 R³、R⁴，所述双键位置、D-R¹ 键立体化学、R²¹ 和 R²² 都限定如下:

化合物#	R ³ :	R ⁴ :	双键	D-R ¹ 键 立体化学	R ²¹ :	R ²² :
202	NH-Boc	H	11,12- 反式	1R 或 1S, D 与酸同侧	H	H;
203	NH-乙酰基	H	11,12- 反式	1R 或 1S, D 与酸同侧	H	H;
205	NH-Boc	11-OH 12-OH 顺式	无	1R 或 1S, D 与酸同侧	H	H;
206	NH-Boc	H	13,14- 顺式	1R,D 与酸同侧	H	H;
207	NH-Boc	H	13,14- 顺式	1R,D 与酸同侧	OMe	H;
208	NH-Boc	H	13,14- 顺式	1R,D 与酸同侧	OMe	苯基
209	NH-C(O)- NH-tBu	H	13,14- 顺式	1R,D 与酸同侧	OMe	苯基
210	NH-Boc	H	13,14- 顺式	1S,D 与酸同侧	OMe	苯基
211	NH ₂	H	13,14- 顺式	1R,D 与酸同侧	OMe	苯基
213	OH(一个 异构物)	H	13,14- 顺式	1R,D 与酸同侧	OMe	H;
214	NH-Boc	10-氧代	13,14- 顺式	1R,D 与酸同侧	OMe	苯基
215	NH-Boc	H	无	1R,D 与酸同侧	OMe	苯基
217	NH-Boc	10-OH(混 合的非对 映体)	13,14- 顺式	1R,D 与酸同侧	OMe	苯基
218	NH-Boc	10-氧代	13,14- 顺式	1R,D 与酰胺同侧	OMe	苯基
219	NH-Ac	H	无	1R,D 与酸同侧	OMe	苯基
和 220	NH-Boc	H	13,14- 顺式	1R,D 与酰胺同侧	OMe	

44. 一种下式化合物:

5



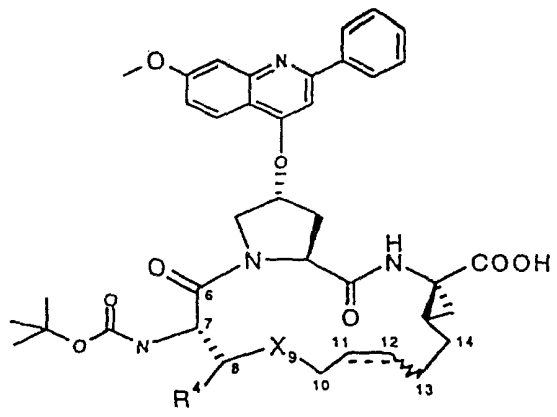
它含有在 R^1 的单立体异构体, 其中 R^3 、D、D- R^1 键立体化学、 R^{21} 和 R^{22} 限定如下:

化合物 #	R^3 :	- D -:	D- R^1 键立体化学:	R^{21} :	R^{22} :
301	NH-Boc		1R 或 1S, D 与酸同侧	H	H;
302	NH-Boc		1R,D 与 酰胺同侧	OMe	Ph;
303	NH-Boc		1R,D 与酰胺 同侧	OMe	Ph;
304	NH-Boc		1R,D 与酸同侧	OMe	Ph;
305	HO		1R,D 与酸同侧	OMe	Ph;
306	NH-Boc		1R,D 与 酰胺同侧	OMe	Ph;
307	NH-Boc		1R,D 与酸 同侧	OMe	
和 308	NH-Ac		1R,D 与酸同侧	OMe	OEt.

30

45. 一种下式化合物:

5



其中，所述 D-R¹ 键是与酸同侧，R⁴、X₉ 和所述 11, 12 双键限定如下：

10

15

20

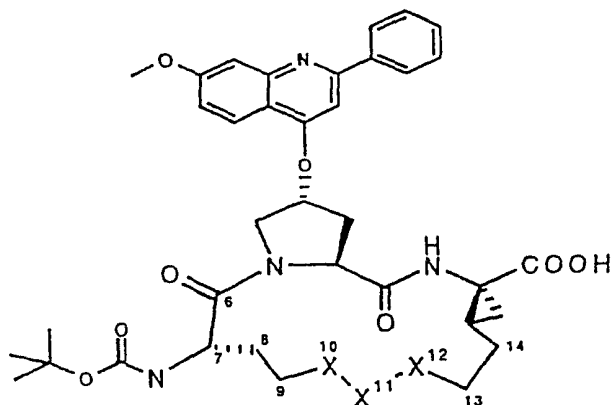
25

30

化合物 #	R ⁴ :	X ₉ :	11, 12 双键
401	H	CH ₂	反式
402	H	CH ₂	顺式
403	H	O	反式
404	Me	O	反式
405	Me	O	反式
406	H	O	无
407	Me	O	无
408	Me	O	无
409	Me	O	顺式
410	Me	S	反式
411	Me	S	顺式
和 412	8-(Me) ₂	9-S	顺式

46. 一种下式化合物:

5



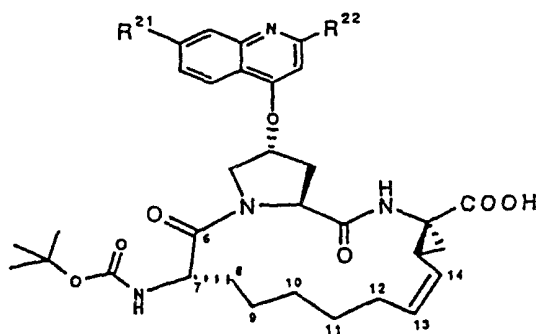
10

其中, 所述 D-R¹ 键是与酸同侧, X₁₀、X₁₁ 和 X₁₂ 限定如下:

化合物 #	X ₁₀ :	X ₁₁ :	X ₁₂ :
501	CH ₂	O	CH ₂
502	CH ₂	CH ₂	CH ₂
503	CH ₂	CH ₂	NH
504	CH ₂	CH ₂	N(Me)
505	CH ₂	CH ₂	N(CO)Me
506	CH ₂	CH ₂	N(CO)Ph
507	NH	CH ₂	CH ₂
和 508	N(CO)Me	CH ₂	CH ₂

47. 一种下式化合物:

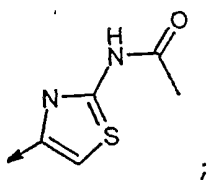
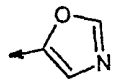
15



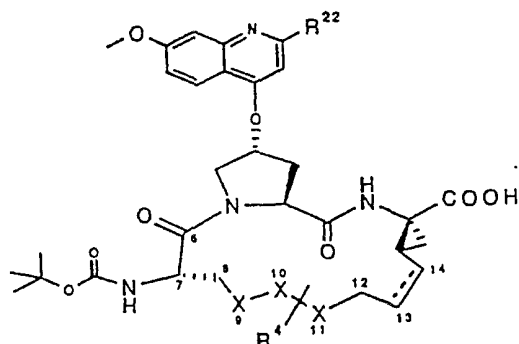
20

其中所述 D-R¹ 键是与酸同侧, R²¹ 和 R²² 限定如下:

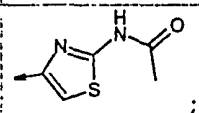
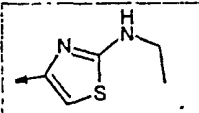
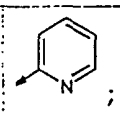
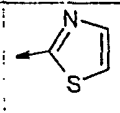
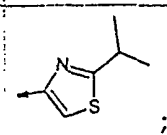
化合物 #	R ²¹ :	R ²² :

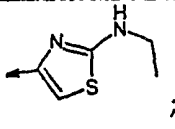
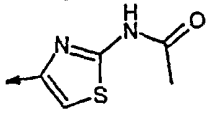
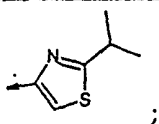
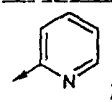
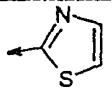
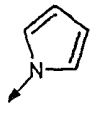
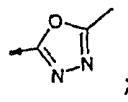
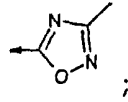
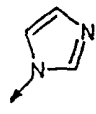
601	N(Me) ₂	
602	OH	(CF ₃)
和 603	OMe	

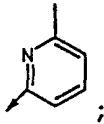
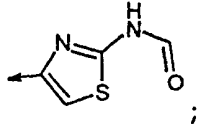
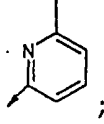
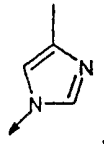
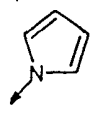
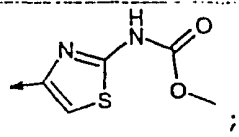
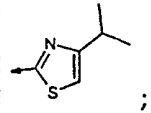
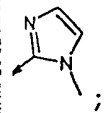
48. 一种下式化合物:

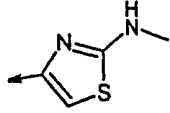
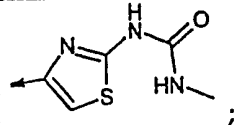
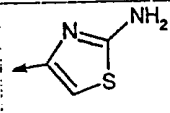
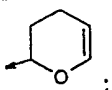
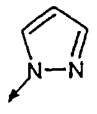
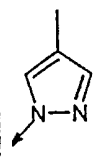
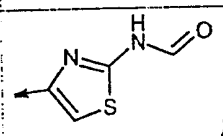
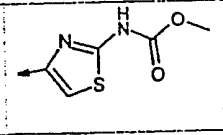
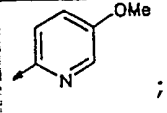
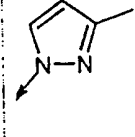


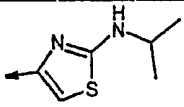
其中所述 D-R¹ 键是与酸同侧, R⁴、X₉、X₁₀、X₁₁、所述 13, 14 双键和 R²² 限定如下:

化合物 #	R ⁴ :	X ₉ ; X ₁₀ 或 X ₁₁ :	13,14 双键 ¹	R ²² :
701	H	11-O	顺式	苯基
702	H	CH ₂	顺式	
703	H	CH ₂	无	
704	H	CH ₂	顺式	
705	H	CH ₂	顺式	
707	H	CH ₂	顺式	

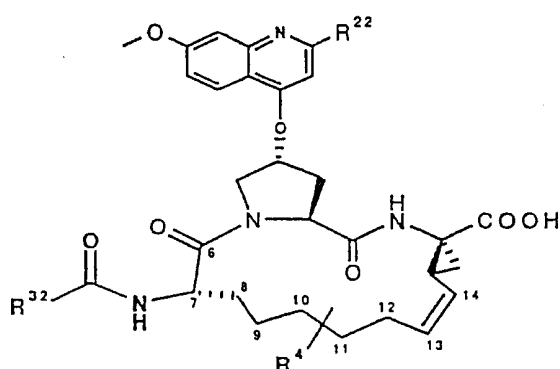
化合物#	R ⁴ :	X ₉ ; X ₁₀ 或 X ₁₁ :	13,14 双键 :	R ²² :
708	H	CH ₂	顺式	 ;
709	H	CH ₂	无	 ;
710	H	CH ₂	无	 ;
711	H	CH ₂	无	 ;
712	H	CH ₂	顺式	-OEt;
713	H	CH ₂	无	 ;
714	H	CH ₂	无	-OEt;
715	H	CH ₂	顺式	 ;
716	H	CH ₂	顺式	 ;
717	H	CH ₂	顺式	 ;
718	H	CH ₂	顺式	 ;

化合物#	R ⁴ :	X ₉ ; X ₁₀ 或 X ₁₁ :	13,14 双键	R ²² :
719	H	CH ₂	顺式	 ;
720	H	CH ₂	无	 ;
721	H	CH ₂	无	 ;
722	H	CH ₂	顺式	 ;
723	H	CH ₂	无	 ;
724	H	CH ₂	无	 ;
725	H	CH ₂	顺式	 ;
726	H	CH ₂	顺式	 ;
727	H	CH ₂	顺式	-CH ₂ -OMe;
728	H	CH ₂	顺式	Me;

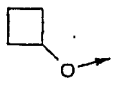
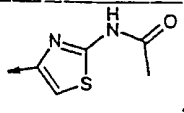
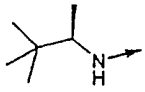
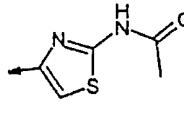
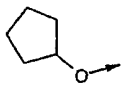
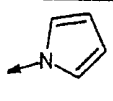
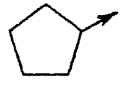
化合物#	R ⁴ :	X ₉ ; X ₁₀ 或 X ₁₁ :	13,14 双键	R ²² :
729	H	CH ₂	顺式	 ;
730	H	CH ₂	无	 ;
731	H	CH ₂	顺式	 ;
732	H	CH ₂	顺式	 ;
733	H	CH ₂	顺式	 ;
734	H	CH ₂	顺式	 ;
735	H	CH ₂	顺式	 ;
736	H	CH ₂	顺式	 ;
737	H	CH ₂	顺式	 ;
738	H	CH ₂	顺式	 ;

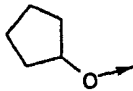
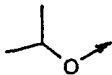
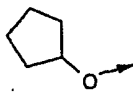
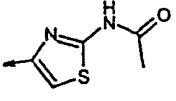
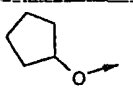
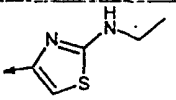
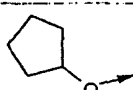
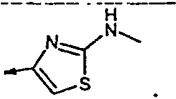
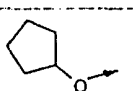
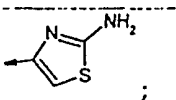

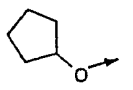
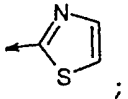
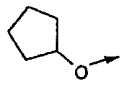
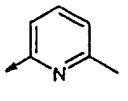
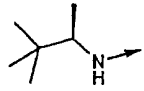
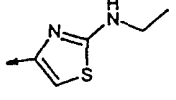
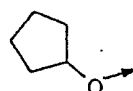
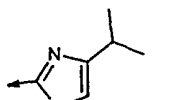
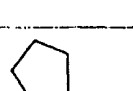
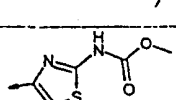
化合物#	R ⁴ :	X ₉ ; X ₁₀ ⁱ 或 X ₁₁ ⁱ	13,14 双键	R ²² :
739	10-(R) Me	CH ₂	无	Ph;
740	10-(S) Me	CH ₂	无	Ph;
和 741	H	CH ₂	顺式	

49. 一种下式化合物:



其中所述 D-R¹ 键与酸同侧, 所述 13, 14 双键是顺式, R³²、R⁴ 和 R²² 限定如下:

化合物 #	R ³² :	R ⁴ :	R ²² :
801		H	 ;
803	<i>n</i> -Pr	H	OEt;
804		H	 ;
805		H	 ;
806		H	OEt;

化合物#	R ³² :	R ⁴ :	R ²² :
807		H	OEt;
808		H	OEt;
809		H	 ;
810		H	 ;
811		H	 ;
812		H	 ;
813		H	OEt;
814		H	 ;
815		H	 ;
816		H	 ;
817		H	 ;
818		H	 ;

5

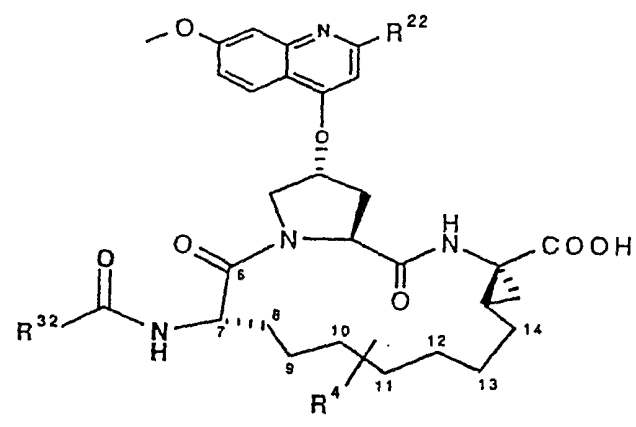
10

15

化合物#	R ³² :	R ⁴ :	R ²² :
819		H	
820		H	
821		H	
822		H	
823		H	
and 824		10-(R) Me	OEt.

50. 一种下式化合物:

20



25

其中所述 D-R¹ 键与酸同侧, R³²、R⁴ 和 R²² 限定如下:

化合物#	R ³² :	R ⁴ :	R ²² :
901		H	OEt;
902		H	;
903		H	;
904		H	;
905		H	;
906		H	;
907		H	;
908		H	;
909		H	;

5

10

15

Cpd #	R ³² :	R ⁴ :	R ²² :
910		H	
911		H	
912		H	
913		H	
914		H	
915		H	
and 916		10 (R) Me	OEt.

51. 权利要求 1 的式 I 化合物在制备通过将该病毒暴露在对 C 型肝炎病毒 NS3 蛋白酶的抑制量的权利要求 1 的式 I 化合物之下而抑制 C 型肝炎病毒复制的药物组合物中的用途。

52. 一种药物组合物，包括具有抗-C 型肝炎病毒有效量的权利要求 1 的式 I 化合物，或其在治疗上可接受的盐或酯，与在药学上可接受的载体介质或助剂混合。

53. 根据权利要求 52 的药物组合物，还包括另外的免疫调节剂。

54. 根据权利要求 53 的药物组合物，其中所述另外的免疫调节剂选自 α -、 β -和 δ -干扰素。

55. 根据权利要求 52 的药物组合物，还包括抗病毒制剂。

56. 根据权利要求 55 的药物组合物，其中所述抗病毒制剂选自：三氮唑核苷 ribavirin 和金刚胺。

57. 根据权利要求 52 的药物组合物，还包括其他的 HCV 蛋白酶抑制

剂。

58. 根据权利要求 52 的药物组合物，还包括在 HCV 生活循环中的其他标的抑制剂。

59. 根据权利要求 52 的药物组合物的用途，其用于制造供治疗哺乳动物的 C 型肝炎病毒感染

60. 根据权利要求 58 的药物组合物，其中所述抑制剂选自解旋酶，聚合酶和金属蛋白酶。

61. 根据权利要求 54 的药物组合物，其中所述免疫调制剂是 α 干扰素。

62. 根据权利要求 54 的药物组合物，它还含有一种抗病毒剂。

63. 根据权利要求 62 的药物组合物，其中所述抗病毒剂是三氮唑核苷。

64. 根据权利要求 61 的药物组合物，它还含有一种抗病毒剂。

65. 根据权利要求 64 的药物组合物，其中所述抗病毒剂是三氮唑核苷。

66. 根据权利要求 54 的药物组合物的应用，它用于制备治疗哺乳动物的丙型肝炎病毒感染的药品。

67. 根据权利要求 56 的药物组合物的应用，它用于制备治疗哺乳动物的丙型肝炎病毒感染的药品。

68. 根据权利要求 57 的药物组合物的应用，它用于制备治疗哺乳动物的丙型肝炎病毒感染的药品。

69. 根据权利要求 58 的药物组合物的应用，它用于制备治疗哺乳动物的丙型肝炎病毒感染的药品。

70. 根据权利要求 61 的药物组合物的应用，它用于制备治疗哺乳动物的丙型肝炎病毒感染的药品。

71. 根据权利要求 62 的药物组合物的应用，它用于制备治疗哺乳动物的丙型肝炎病毒感染的药品。

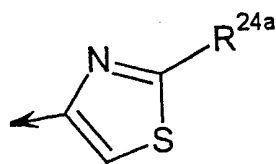
72. 根据权利要求 63 的药物组合物的应用，它用于制备治疗哺乳动物的丙型肝炎病毒感染的药品。

73. 根据权利要求 64 的药物组合物的应用，它用于制备治疗哺乳动物的丙型肝炎病毒感染的药品。

74. 根据权利要求 65 的药物组合物的应用，它用于制备治疗哺乳动物的丙型肝炎病毒感染的药品。

75. 根据权利要求 40 的化合物，其中 R^3 是 $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{OR}^{32}$ ，其中 R^{32}

是 C₁₋₄ 烷基或 C₄₋₆ 环烷基; D 是 C₇ 全碳链, 饱和或在 13, 14 位置上含一个顺式双键, R²² 是



5

其中 R^{24a} 是 NH-(C₁₋₄ 烷基); NH-(C₃₋₆ 环烷基); NH-C(O)-(C₁₋₄ 烷基); NH-C(O)-O-(C₁₋₄ 烷基); 或 NH-C(O)-NH-(C₁₋₄ 烷基)。

76. 根据权利要求 43 的化合物 208。
- 10 77. 根据权利要求 43 的化合物 209。
78. 根据权利要求 43 的化合物 214。
79. 根据权利要求 43 的化合物 217。
80. 根据权利要求 45 的化合物 408。
81. 根据权利要求 46 的化合物 508。
- 15 82. 根据权利要求 47 的化合物 601。
83. 根据权利要求 47 的化合物 603。
84. 根据权利要求 48 的化合物 702。
85. 根据权利要求 48 的化合物 703。
86. 根据权利要求 48 的化合物 709。
- 20 87. 根据权利要求 48 的化合物 714。
88. 根据权利要求 48 的化合物 715。
89. 根据权利要求 48 的化合物 719。
90. 根据权利要求 48 的化合物 725。
91. 根据权利要求 48 的化合物 736。
- 25 92. 根据权利要求 48 的化合物 738。
93. 根据权利要求 49 的化合物 801。
94. 根据权利要求 49 的化合物 809。
95. 根据权利要求 49 的化合物 810。
96. 根据权利要求 49 的化合物 811。
- 30 97. 根据权利要求 49 的化合物 812。
98. 根据权利要求 49 的化合物 814。

99. 根据权利要求 49 的化合物 818。
100. 根据权利要求 49 的化合物 819。
101. 根据权利要求 49 的化合物 821。
102. 根据权利要求 49 的化合物 822。
- 5 103. 根据权利要求 49 的化合物 823。
104. 根据权利要求 50 的化合物 904。
105. 根据权利要求 50 的化合物 909。
106. 根据权利要求 50 的化合物 914。
107. 根据权利要求 50 的化合物 916。
- 10 108. 一种药物组合物，它含有抗丙型肝炎病毒有效量的权利要求 76 ~ 107 中任一项的式 I 化合物或其药物上可接受的盐或酯，与一种药物上有接受的载体介质或助剂相混合。
109. 根据权利要求 108 的药物组合物，它还含有另外的免疫调制剂。
110. 根据权利要求 109 的药物组合物，其中所述另外的免疫调制剂包
15 括 α -、 β -、和 δ -干扰素。
111. 根据权利要求 110 的药物组合物，其中所述另外的免疫调制剂是 α -干扰素。
112. 根据权利要求 108 的药物组合物，它还含有一种抗病毒剂。
113. 根据权利要求 112 的药物组合物，其中所述抗病毒剂是三氮唑核
20 苷。
114. 根据权利要求 110 的药物组合物，它还含有一种抗病毒剂。
115. 根据权利要求 114 的药物组合物，其中所述抗病毒剂是三氮唑核
苷。
116. 根据权利要求 111 的药物组合物，它还含有一种抗病毒剂。
- 25 117. 根据权利要求 116 的药物组合物，其中所述抗病毒剂是三氮唑核
苷。
118. 根据权利要求 108 的药物组合物，还含有另一 HCV 蛋白酶的抑
制剂。
119. 根据权利要求 108 的药物组合物，还含有在 HCV 生命循环中另
30 一目的物的抑制剂。
120. 根据权利要求 119 的药物组合物，其中所述抑制剂选自解旋酶、

聚合酶和金属蛋白酶。

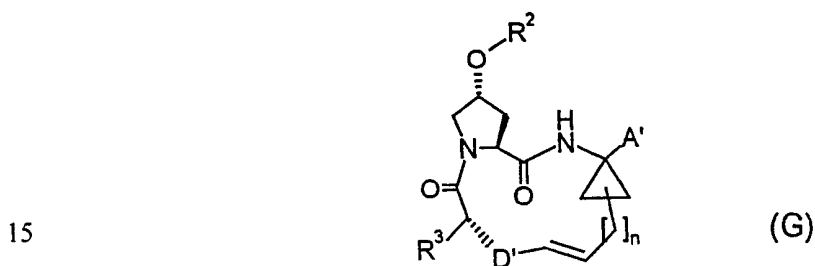
121. 根据权利要求 108 的药物组合物的应用, 它用于制备治疗哺乳动物中丙型肝炎病毒感染用的药品。

5 122. 根据权利要求 111 的药物组合物的应用, 它用于制备治疗哺乳动物中丙型肝炎病毒感染用的药品。

123. 根据权利要求 113 的药物组合物的应用, 它用于制备治疗哺乳动物中丙型肝炎病毒感染用的药品。

124. 根据权利要求 117 的药物组合物的应用, 它用于制备治疗哺乳动物中丙型肝炎病毒感染用的药品。

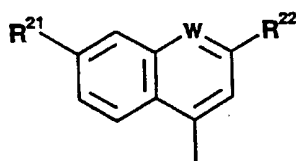
10 125. 具有下式(G)的化合物:



其中,

R^3 如权利要求 1 中所定义;

20 R^2 部分是



其中 W、 R^{21} 和 R^{22} 如权利要求 1 所定义; A' 是已保护的羧酸;

25 n 是 0 或 2, 而且

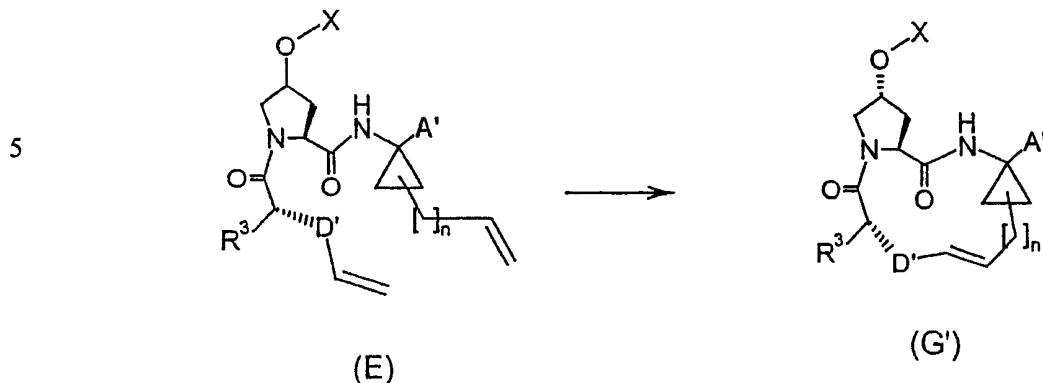
(1) 当 n 是 0, D' 是 5-原子饱和的亚烷链, 必要时含有 1~3 个分别选自 O、S、或 $N-R^{41}$ 中的杂原子;

(2) 当 n 是 2, D' 是 3-原子饱和的亚烷链, 必要时含有 1~3 个分别选自 O、S、或 $N-R^{41}$ 中的杂原子;

30 以及 R^{41} 如权利要求 1 中所定义。

126. 根据权利要求 125 的式(G)化合物的制备方法, 该法包括通过在有

过渡金属基催化剂存在下使式(E)化合物反应而引起式(E)化合物的环封闭以制得式(G')化合物:



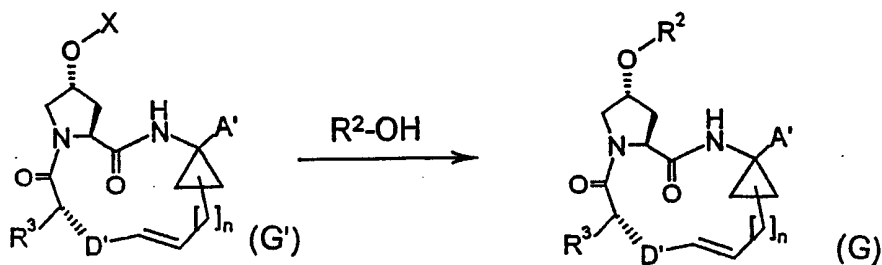
10 其中, X 是 PG 或 R²;

PG 是保护基;

而 R²、R³、D'、n 和 A' 如权利要求 125 中所定义;

而当 X 是 PG, 则式(G')化合物脱保护并再与 R²-OH 化合物反应以制取式(G)化合物:

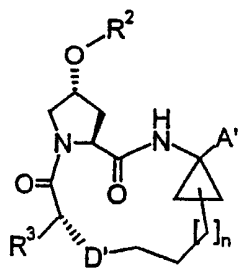
15



其中, R²、R³、D'、n 和 A' 如权利要求 125 所定义。

127. 具有以下式(H)的化合物:

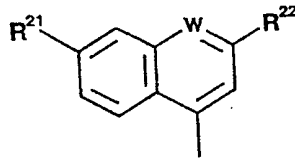
25



30

其中 R³ 如权利要求 1 所定义;

R² 部分是



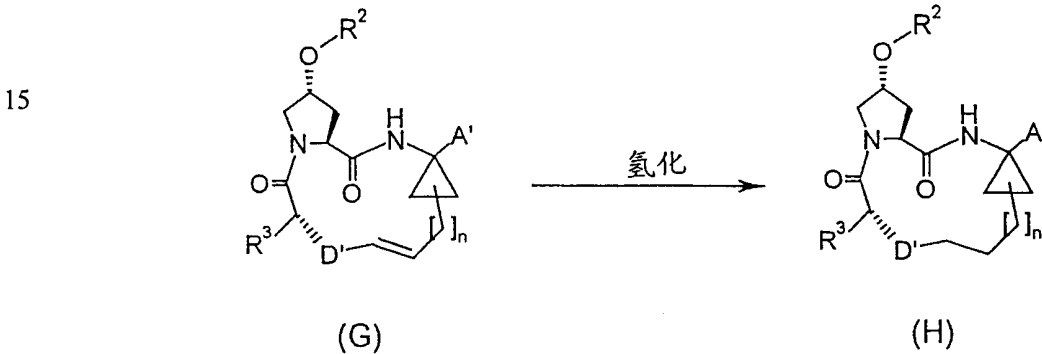
5 其中 W、R²¹ 和 R²² 如权利要求 1 所定义；A' 是已保护的羧酸；
n 是 0 或 2；而且

(1) 当 n 是 0，D' 是 5-原子饱和的亚烷链，必要时含有 1~3 个分别选自 O、S、或 N-R⁴¹ 中的杂原子；

10 (2) 当 n 是 2，D' 是 3-原子饱和的亚烷链，必要时含有 1~3 个分别选自 O、S、或 N-R⁴¹ 的杂原子；

R⁴¹ 如权利要求 1 中所定义。

128. 根据权利要求 127 的式(H)的化合物的制备方法，该方法包括使式 (G) 化合物进行氢化：



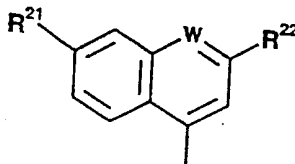
20 其中 R²、R³、D'、n 和 A' 如权利要求 127 中所定义。

129. 具有以下式(L)的化合物：



其中，R³ 如权利要求 1 中所定义；

R² 部分是



说明书

可有效对抗 C 型肝炎 病毒的巨环肽

5

发明领域

本发明是关于治疗 C 型肝炎病毒(HCV)感染的化合物、组合物、这类化合物的制剂，以及方法。特别是，本发明提供新颖的肽类似物、含有这类类似物的药物组合物，以及使用这些类似物治疗 HCV 感染的方法。

发明的背景

C 型肝炎病毒(HCV)是遍及全世界的输血后和社会-后天性非-A 非-B 型肝炎的主要病原。估计全世界超过 1 亿 7 千万的人被该病毒感染。高百分比的带源者变成慢性感染，且有许多进展至慢性肝病，所谓的慢性 C 型肝炎。这群转而成为一严重肝病的高危险群，如肝硬化、肝细胞癌，及导致死亡的最终的肝病。

尚未彻底阐明 HCV 形成病毒持久性并引起高比率的慢性肝病的机制。不知道 HCV 如何与宿主的免疫系统相互作用并回避它。此外，也未建立细胞和体液的免疫反应在对抗 HCV 感染和疾病的保护作用中所起的作用。已有报导预防与输血有关的病毒性肝炎的免疫球蛋白，然而，疾病控制中心 (Center for Disease Control) 目前并不建议适合该目的的免疫球蛋白治疗。缺乏有效的保护性免疫反应，阻碍了疫苗或适当的接触后的预防措施的发展，所以在短期内，希望坚定地寄托在抗病毒的干涉上。

为了确认能够在患有慢性 C 型肝炎的患者中，有效地治疗 HCV 感染的药制剂，已经进行了各种临床的研究。这些研究涉及单独和与其他的抗病毒制剂混合使用的干扰素- α 。这类研究表明，相当多的参与者对该治疗没有反应，且产生有利反应的那些，发现大部分在终止治疗后有复发。

直到数年前，干扰素(IFN)是唯一证实有利并核准在临床上用于慢性 C 型肝炎患者的有用治疗。然而，持续的反应率低，且干扰素治疗也引起严重

的副作用(也就是视网膜病变、甲状腺炎、急性胰腺炎、抑郁),减少受治疗的患者的生活品质。最初对于对单独干扰素无反应的患者,核准干扰素与三唑核苷(ribavirin)的组合。目前已经核准供先天患者使用,且目前被选定在HCV治疗中的黄金标准。然而,使用该组合治疗并未减轻由IFN引起的副作用。

因此,需要发展可用来治疗HCV感染,并克服现有药物治疗的限制的有效的抗病毒制剂。

HCV是在黄热病毒科中有被膜的正股RNA病毒。单股的HCV RNA基因的长度约为9500个核苷酸,并具有单一的可读框(ORF),编码一个约3000个氨基酸的单独的大多蛋白。在被感染的细胞中,该多蛋白在多处被细胞和病毒的蛋白酶切开,产生结构和非-结构(NS)的蛋白质。在HCV的情况中,通过两个病毒的蛋白酶完成成熟非结构蛋白质(NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B)的产生。第一个,到现在为止尚未完全地表征,在NS2-NS3接合处切开;第二个包含在NS3的N-终端区内的丝氨酸蛋白酶(下面称为NS3蛋白酶),并以顺式,在NS3-NS4A切割位置,和反式,剩下的NS4A-NS4B、NS4B-NS5A、NS5A-NS5B位置,调节NS3下游所有后续的切开作用。NS4A蛋白质似乎担任多种功能,作为NS3蛋白酶的辅因子,并可能有助于NS3和其他病毒复制酶(replicase)成份在膜上定位。NS3蛋白质与NS4A的复合物形成,似乎对于使事件进行是必要的,在所有的位置上促进了蛋白水解的效力。NS3蛋白质也显示出核苷三磷酸酶和RNA解旋酶的活性。NS5B是RNA-依赖性RNA聚合酶,它涉及HCV的复制。

专利申请案 WO 97/06804 描述核苷类似物胞嘧啶-1,3-噁噻烷(oxathiolane)(亦称为3TC)的(-)对映体,具有对抗HCV的活性。虽然在先前对抗HIV和HBV的临床试验中报导该化合物是安全的,但在临床上尚未证实对HCV具有活性,且尚未报导其对抗病毒的作用机制。

发展抗病毒制剂的一般策略为使复制病毒所必需的病毒编码的酶失活。

在这种性情下,极为努力地发现抑制HCV的NS3蛋白酶或RNA解旋酶的化合物,导致下列的发现:

美国专利5,633,388描述了具有对抗HCV的活性的杂环-取代的羧酰胺和类似物。这些化合物针对病毒的NS3蛋白质的解旋酶活性,但尚未报导临

床测试。

已经由 Chu 等人(Tet. Lett., (1996), 7229-7232)报导了菲醌具有在体外对抗 HCV NS3 蛋白酶的活性。但并未报导该化合物的进一步的发展。

5 在第九次抗病毒研究的国际会议(Ninth International Conference on Antiviral Research), Urabandai, Fukyshima, 日本(1996)(Antiviral Research, (1996), 30, 1, A23(摘要 19))中提供的论文, 报导噻唑烷衍生物是 HCV 蛋白酶的抑制剂。

10 几个研究已经报导了抑制其他丝氨酸蛋白酶的化合物, 如人类白血球弹性蛋白酶。在 WO 95/33764(Hoechst Marion Roussel, 1995)中报导了一组这些化合物。在该申请案中公开的肽为吗啉基羧基-苯甲酰基-肽类似物, 其在结构上与本发明的肽不同。

得自 Vertex Pharmaceuticals Inc.的 WO 98/17679 公开了丝氨酸蛋白酶的抑制剂, 特别是对 C 型肝炎病毒 NS3 蛋白酶的抑制剂。

15 Hoffman LaRoche(WO 98/22496 ;美国专利 5, 866, 684 和美国专利 6, 018, 020)亦已经报导了六肽, 它可用于作为治疗 HCV 感染的抗病毒剂的蛋白酶抑制剂。

Steinkuhler 等人和 Ingallinella 等人已经发表了对 NS4A-4B 产物的抑制作用(Biochemistry(1998), 37, 8899-8905 和 8906-8914)。

20 Schering Corporation 的 WO 97/43310 揭示了具有对抗 HCV NS3 蛋白酶的活性的 20 和 21 个氨基酸的肽序列。

Emory University 的 WO 98/46597 揭示了在体外具有对抗丝氨酸蛋白酶的活性的肽和肽类似物。

Peptide Therapeutics Limited 的 WO 98/46630 揭示缩肽(depsipeptide)基质抑制了 HCV NS3 蛋白酶。

25 最后, 美国专利 5, 869, 253 揭示抑制 HCV NS3 蛋白酶的酶促 PNA 分子。

上述的现有专利申请案中, 没有任何一个提出环肽具有对抗 C 型肝炎病毒 NS3 蛋白酶的活性和选择性。

30 WO 99/07733、WO 99/07734、WO 00/09543 和 WO 00/09558 揭示抑制 NS3 蛋白酶的六至四-肽和三肽类似物。然而, 这些公开内容并未提出或引导设计出本发明的巨环类似物。

Institute de Recherche di Biologia Moleculare(IRBM)在 1999 年 8 月 5 日发表的 WO 99/38888, 揭示 HCV NS3 蛋白酶的小肽抑制剂。在该公开内容中并没有提出或指出本发明的肽的环状性质。此外, 该 PCT 申请案在本发明的优先日期之后发表。

5 IRBM 的 WO 99/64442 也在本发明的优先日期之后发表, 揭示在 PI 处带有酮酸的低聚肽。

Vertex Pharmaceuticals(在 1999 年 10 月 7 日发表)的 WO 99/50230, 也在本发明的优先日期之后发表。甚至以后, 该出版物并未轻微地暗示本发明的任何环肽。

10 本发明的一个优点为其提供的巨环肽, 可抑制 C 型肝炎病毒的 NS3 蛋白酶。

本发明的一个观点的另一个优点, 在于这些肽特异性地抑制 NS3 蛋白酶, 且对其他的丝氨酸蛋白酶, 如人类白细胞弹性蛋白酶(HLE)、猪胰腺弹性蛋白酶(PPE)或牛胰腺凝乳蛋白酶, 或半胱氨酸蛋白酶, 如人类肝脏组织蛋白酶 B(Cat B), 并未显示明显的抑制活性的事实。

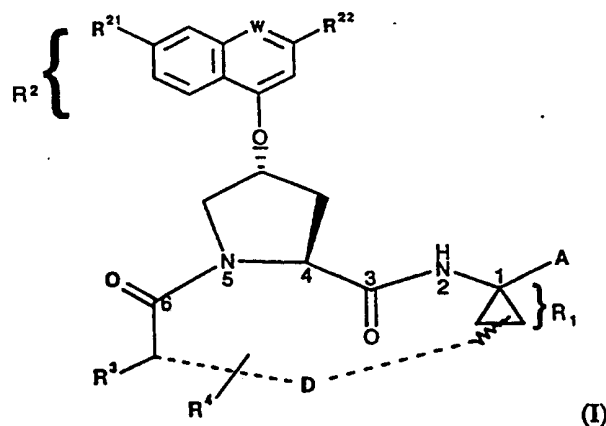
本发明的另一个优点为其提供了低分子量的小肽, 它能够透过细胞膜, 并在细胞培养中抑制 NS3 蛋白酶的活性。

此外, 本发明化合物的再一个优点, 在于在临床分离物中发现其在两种主要的基因型中是有活性的(1a&1b)的事实, 强烈地提出这些化合物将具有
20 对抗所有目前已知的 HCV 基因型的活性。

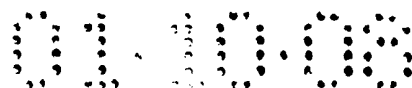
发明概述

包含在本发明范围内的式(I)化合物:

25



30



其中 W 为 CH 或 N,

R^{21} 为 H、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-6} 环烷氧基、羟基或 $N(R^{23})_2$, 其中每个 R^{23} 分别为 H、 C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷氧基;

5 且

R^{22} 为 H、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基; C_{1-6} 卤代烷基、 C_{1-6} 硫烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-6} 环烷氧基、 C_{2-7} 烷氧烷基、 C_{3-6} 环烷基、 $C_{6 \text{ 或 } 10}$ 芳基或 Het, 其中 Het 为五-、六-或七-员、饱和或不饱和的杂环, 含有一至四个选自氮、氧和硫的杂原子;

10 以 R^{24} 取代该环烷基、芳基或 Het,

其中 R^{24} 为 H、卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-6} 环烷氧基、 NO_2 、 $N(R^{25})_2$ 、 $NH-C(O)-R^{25}$; 或 $NH-C(O)-NH-R^{25}$,

其中每个 R^{25} 分别为 H、 C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基;

或 R^{24} 为 $NH-C(O)-OR^{26}$, 其中 R^{26} 为 C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基;

15 R^3 为羟基、 NH_2 或式 $-NH-R^{31}$ 的基团, 其中 R^{31} 为 C_6 或 C_{10} 芳基、杂芳基、 $-C(O)-R^{32}$ 、 $-C(O)-OR^{32}$ 或 $-C(O)-NHR^{32}$,

其中 R^{32} 为 C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基;

D 为 5 至 10 个原子的饱和或不饱和的亚烷基链, 可视需要含有一至三个杂原子, 分别选自 O、S 或 $N-R^{41}$, 其中 R^{41} 为 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基或

20 $C(O)-R^{42}$, 其中 R^{42} 为 C_{1-6} 烷基、 C_{3-6} 环烷基或 $C_{6 \text{ 或 } 10}$ 芳基;

R^4 为 H 或是在该链 D 的任一个碳原子上的一至三个取代基, 该取代基分别选自 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤烷基、 C_{1-6} 烷氧基、羟基、卤素、氨基、桥氧基、硫代或 C_{1-6} 硫烷基,

且 A 为式 $-C(O)-NH-R^5$ 的酰胺, 其中 R^5 选自 C_{1-8} 烷基、 C_{3-6} 环烷基、 $C_{6 \text{ 或 } 10}$ 芳基或 C_{7-16} 芳烷基;

25 或 A 为羧酸或其在药物上可接受的盐或酯。

包含有效对抗-C 型肝炎病毒含量的式 I 化合物, 或其在治疗上可接受的盐或酯, 与在药学上可接受的载剂介质或助剂混合的药物组合物, 都包含在本发明的范围内。

30 本发明的一项重要方面, 涉及在哺乳动物中, 通过对该哺乳动物给予有效对抗-C 型肝炎病毒的含量的式 I 化合物, 或其在治疗上可接受的盐或酯,

或上述组合物，以治疗 C 型肝炎感染的方法。

另一项重要方面，涉及通过使病毒暴露在抑制 C 型肝炎 NS3 蛋白酶的含量的式 I 化合物，或其在治疗上可接受的盐或酯，如上述的组合物之下，以抑制 C 型肝炎病毒复制的方法。

5 其他的方面则涉及在哺乳动物中，通过对其给予有效对抗 C 型肝炎病毒的含量的式 I 化合物，或其在治疗上可接受的盐或酯的组合，来治疗 C 型肝炎病毒感染的方法。根据一个具体实施方案，本发明的药物组合物包括另外的免疫调节剂。另外的免疫调节剂的实例包括但不限于 α -、 β -和 δ -干扰素。

10 根据另一个具体实施方案，本发明的药物组合物也可另外包括抗病毒剂。抗病毒剂的实例包括三唑核苷和金刚胺。

根据另一个具体实施方案，本发明的药物组合物可另外包括其他的 HCV 蛋白酶抑制剂。

15 根据另一具体实施方案，本发明的药物组合物可另外包括对 HCV 生活循环中其他标靶的抑制剂，像是解旋酶、聚合酶、金属蛋白酶或 IRES。

优选的实施方案的详细说明

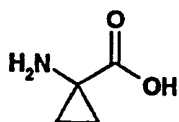
定义

20 当用于本文中时，除非另行提及，均适用下列的定义：

关于实例，其中使用(R)或(S)以指示取代基的绝对构型，例如式 I 化合物的 R^4 ，在整个化合物的前后关联中都表示，并非在单独取代基的前后关联中表示。

25 在本文中使用“P1、P2、P3 等等”标识时，意指从肽类似物的 C-终端开始，并朝向 N-终端延伸的氨基酸残基的位置(也就是说，P1 代表从 C-终端开始的第 1 个位置，P2：从 C-终端开始的第 2 个位置，等等)(参见 Berger A. & Schechter I., Transactions of the Royal Society London series B257, 249-264(1970))。

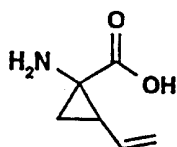
30 当在本文中使用“1-氨基环丙基-羧酸”(ACCA)一词时，意指式：



的化合物。

当在本文中使用“乙烯基-ACCA”一词时，意指式：

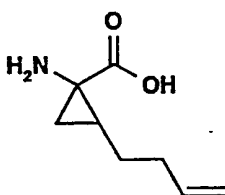
5



的化合物。

当在本文中使用“同-烯丙基-ACCA”一词时，意指式：

10



的化合物。

15 当在本文中使用“卤素”一词时，意指选自溴、氯、氟或碘的卤素取代基。

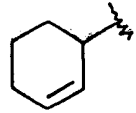
本文中所使用的“C₁₋₆ 卤烷基”一词，在本文中单独或与其他取代基混合使用时，意指非环状的、直链或支链的烷基取代基，含有1至6个碳原子，具有一或多个选自溴、氯、氟或碘的卤素取代的氢。

20 本文中所使用的“C₁₋₆ 硫烷基”一词，在本文中单独或与其他取代基混合使用时，意指非环状的、直链或支链的烷基取代基，含有硫醇基团，像如是硫丙基。

25 本文中所使用的“C₁₋₆ 烷基”或“(低碳)烷基”一词，单独或与其他取代基混合使用时，意指非环状的、直链或支链的烷基取代基，含有1至6个碳原子，并包括例如甲基、乙基、丙基、丁基、己基、1-甲乙基、1-甲丙基、2-甲丙基、1,1-二甲乙基。

本文中所使用的“C₃₋₆ 环烷基”一词，单独或与其他取代基混合使用时，意指环烷基取代基，含有3至6个碳原子，并包括环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

30 “不饱和的环烷基”一词包括例如取代基环己烯基：



本文中所使用的“饱和或不饱和的亚烷基”一词时，意指通过从饱和或不饱和的直链或支链的脂族烃的每一端中，移除一个氢原子而衍生的二价烷基取代基，并包括例如-CH₂CH₂C(CH₃)₂CH₂CH₂-、-CH₂CH₂CH=CHCH₂CH₂-或-CH₂C=CCH₂CH₂-。该烷基链可视需要含有杂原子，如氧(例如 CH₃-CH₂-O-CH₂-)。

本文中所使用的“C₁₋₆ 烷氧基”一词时，单独或与其他取代基混合使用时，意指取代基-O-C₁₋₆ 烷基，其中该烷基如同上文定义，含有高达 6 个碳原子。烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、1-甲乙氧基、丁氧基和 1,1-二甲乙氧基。后者的取代通常称为叔-丁氧基。

本文中所使用的“C₃₋₆ 环烷氧基”一词时，单独或与其他取代基混合使用时，意指取代基，含有 3 到 6 个碳原子的-O-C₃₋₆ 环烷基。

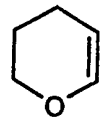
本文中所使用的“C₁₋₆ 烷氧烷基”一词时，意指取代基 C₁₋₆ 烷基-O-C₁₋₆ 烷基，其中该烷基如同上文的定义，含有高达 6 个碳原子。如甲氧甲基意指-CH₂-O-CH₃。

本文中所使用的“C₂₋₇ 酰基”一词时，单独或与其他取代基混合使用时，意指通过羰基基团连接的 C₁₋₆ 烷基，如-C(O)-C₁₋₆ 烷基。

本文中所使用的“C₆ 或 C₁₀ 芳基”一词时，单独或与其他取代基混合使用时，意指含有 6 个碳原子的芳香族单环系统，或含有 10 个碳原子的芳香族双环系统。例如，芳基包括苯基或萘基-环系统。

本文中所使用的“C₇₋₁₆ 芳烷基”一词时，单独或与其他取代基混合使用时，意指通过烷基基团连接上文定义的芳基，其中该烷基如同上文的定义，含有 1 至 6 个碳原子。芳烷基包括例如苄基和丁苯基。

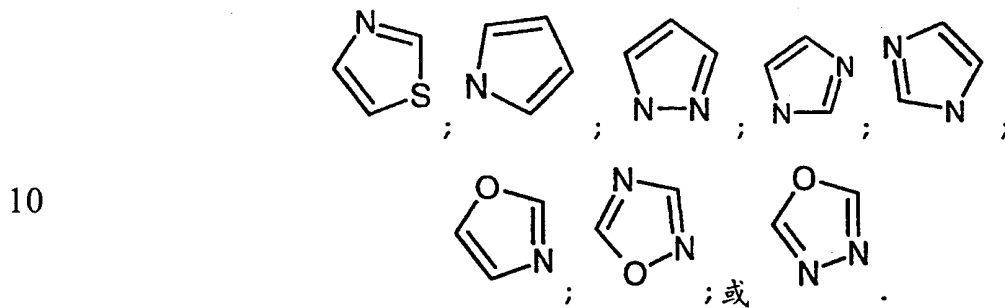
本文中所使用的“Het”一词时，单独或与其他取代基混合使用时，意指通过从含有一至四个选自氮、氧和硫的杂原子的五-、六-或七-员饱和或不饱和(包括芳香族)的杂环中，移除氢而衍生的单价取代基。适当的杂环的实例包括：四氢呋喃、噻吩、二氮杂萘、异噁唑、吡啶、二噁烷、吗啉、噻啶或



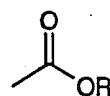
30

“Het”一词也包括上文的定义的，与一或多个可以是杂环或任何其他环的其他环稠合的杂环。一个这类的实例包括噻唑并[4,5-b]-吡啶。

5 虽然通常包括在“Het”一词之下，但在本文中所使用的“杂芳基”一词时，精确地定义为不饱和的杂环，其双键形成芳族系统。适当的杂芳族系统的实例包括：噻啉、吡啶、吡啶、



15 本文中所使用的“在药理学上可接受的酯”一词，单独或与其他取代基混合使用时，意指式 I 化合物的酯，其中该分子的任何羧基官能基，优选的是羧基终端，被烷氧羰基官能置换：



20 其中该酯的 R 部分是选自烷基(如甲基、乙基、正-丙基、叔-丁基、正-丁基); 烷氧烷基(如甲氧甲基); 烷氧酰基(如乙酰氧基甲基); 芳烷基(如苄基); 芳氧烷基(如苯氧甲基); 芳基(如苯基)，可视需要以卤素、 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 烷氧基取代。在 Design of produrgs, Bundgaard, H.Ed. Elsevier(1985)中发现其他适当的前药酯，将其列入本文以作参考。这类在药理学上可接受的酯类，通常在注射到哺乳动物体内时，在体内被水解，并转化成式 I 化合物的酸形式。

25 关于上述的酯类，除非另行指定，任何存在的烷基部分均有利地含有 1 至 6 个碳原子，特别是 1 至 6 个碳原子。任何存在于这类酯类中的芳基部分，均有利地包括苯基基团。

特别是该酯可以是 C_{1-16} 烷基酯、未经取代的苄基酯，或以至少一个卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、硝基或三氟甲基取代的苄基酯。

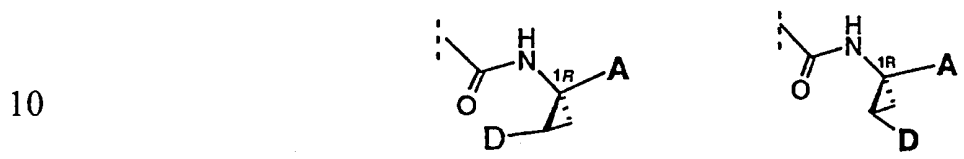
30 本文中所使用的“在药理学上可接受的盐”一词时，包括由在药理学上可接受的碱类衍生的那些。适当的碱的实例包括胆碱、乙醇胺和乙二胺。也企图

将 Na⁺、K⁺和 Ca⁺⁺盐类包括在本发明的范围内(亦参见 Pharmaceutical salts, Birge, S.M. 等人, J. Pharm. Sci., (1977), 66, 1-19, 列入于本文以作为参考)。

优选的方案

R¹:

5 本发明的优选方案包括上述的式 I 化合物, 其中 R¹ 部分选自 2 个不同的非对映异构体, 其中具有 R 构型的 1-碳中心, 具有以结构(i)和(ii)表示的构型:

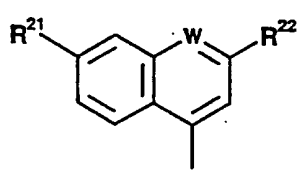


D 与酰胺同侧(i) 或 D 与 A 同侧(ii)。

更优选的是, 以结构(ii)表示的以与 A 同侧的构型连接 R¹ 的连结基 D。

R²:

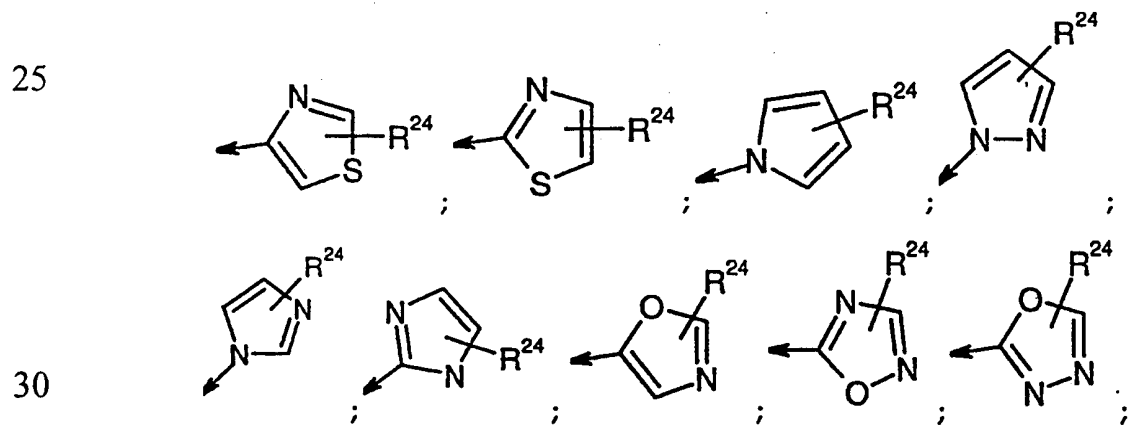
15 本发明的优选方案包括上述的式 I 化合物, 其中 R² 部分为:

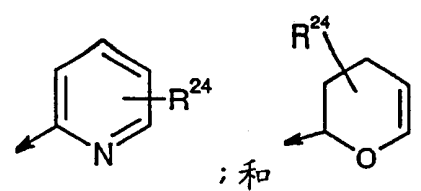


其中 W 优选是 N。

20 优选的是, R²¹ 为 H、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷氧基、羟基、氯或 N(R²³)₂, 其中 R²³ 优选是 H 或 C₁₋₆ 烷基。更优选的是, R²¹ 为 H 或 C₁₋₆ 烷氧基。最佳的是 R²¹ 为甲氧基。

优选的是, R²² 为 H、C₁₋₆ 硫烷基、C₁₋₆ 烷氧基、苯基或选自下列的 Het:

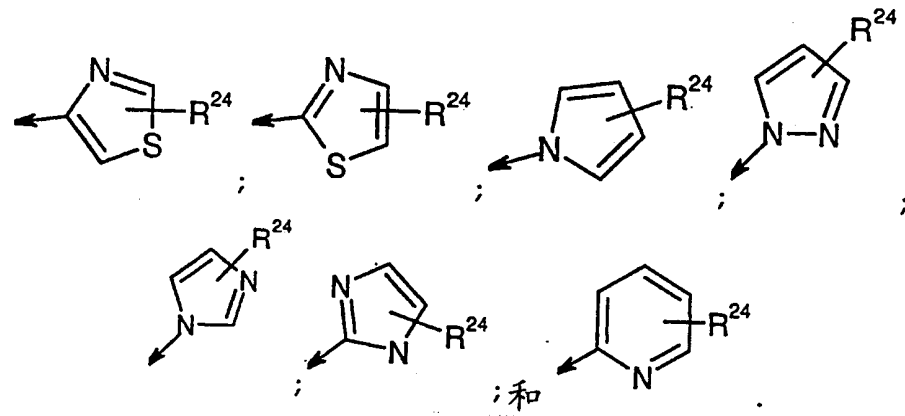




的 Het。

5 优选的是, R^{24} 为 H、 C_{1-6} 烷基、 $NH-R^{25}$ 、 $NH-C(O)-R^{25}$ 或 $NH-C(O)-NH-R^{25}$ 或 $NH-C(O)-OR^{26}$ 。

更优选的是, R^{22} 为 C_{1-4} 烷氧基、苯基, 或选自以下的 Het:

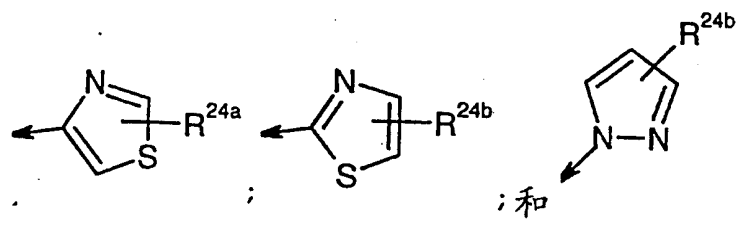


10

15

更优选的是, R^{24} 为 H、 C_{1-6} 烷基、 $NH-R^{25}$ 、 $NH-C(O)-R^{25}$ 或 $NH-C(O)-OR^{26}$ 。

最优选的是, R^{22} 为乙氧基或选自以下的 Het,



20

最佳的是, R^{24a} 为 $NH-R^{25}$ 、 $NH-C(O)-R^{25}$ 或 $NH-C(O)-OR^{26}$ 。最佳的是, R^{24b} 为 H 或 C_{1-6} 烷基。

25

优选的是每个 R^{25} 分别为 H、 C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基。更优选的是, R^{25} 为 C_{1-6} 烷基或 C_{3-6} 环烷基。更佳的是 R^{25} 为 C_{1-6} 烷基。优选的是, R^{26} 为 C_{1-6} 烷基。

R^3 :

30

本发明的优选方案包括如上述的式 I 化合物, 其中 R^3 部分优选是式 $NH-C(O)-R^{32}$ 的酰胺、式 $NH-C(O)-NH-R^{32}$ 的脲, 或式 $NH-C(O)-OR^{32}$ 的氨基甲酸酯。更佳的是 R^3 为氨基甲酸酯或脲。最佳的是 R^3 为氨基甲酸酯。优选

的是 R³² 为 C₁₋₆ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基。更优选的是 R³² 为 C₁₋₆ 烷基或 C₄₋₆ 环烷基。最佳的是 R³² 为叔-丁基、环丁基或环戊基。

D:

5 本发明的优选的方案包括式 I 化合物，其中交联剂 D 为 6 至 8 个原子的饱和或不饱和的亚烷基链。更佳的是，连结基 D 为 7 个原子的链。

较优选的是，D 链含有一或两个选自：O、S、NH、N-C₁₋₆ 烷基或 N-C₂₋₇ 酰基的杂原子。更优选的是，D 链可视需要含有一个选自：NH 或 N-C₂₋₇ 酰基的杂原子，最佳的是 N(Ac)，并位在该链的原子 10 处。最好是该链含有饱和的氮原子。

10 另外，D 含有一个选自 O 或 S 的杂原子。优选的是，当 D 的长度为 7 个原子时，该 O 或 S 原子位在该链的位置 9 处。较优选的是以 R⁴ 取代该链，其中 R⁴ 为 H 或 C₁₋₆ 烷基。更优选的是，R⁴ 为 H 或甲基。最佳的是 R⁴ 为 H 或 8-(S)-Me。再更佳的是，D 为饱和的。或者，D 在位置 11、12 处含有一个双键。优选的是，该双键为反式的。

15 另外，D 为所有的碳均饱和的或不饱和的亚烷基链。在这种情况下，D 优选是饱和的，且长度为 7 个原子。较佳的是，以 R⁴ 取代 D，其中 R⁴ 为 H、桥氧基、硫代、羟基、硫烷基、烷氧基或烷基。较优选的是，R⁴ 为 H 或 C₁₋₆ 烷基。最佳的是，R⁴ 为 H 或甲基。R⁴ 最好是 H 或 10-(S)-Me。

20 另外，D 为含有一个双键的所有的碳亚烷基链，且长度为 7 个原子。较优选的是该双键系位在该链的位置 13、14 处。最优选的是，该双键为顺式的。优选的是，以 R⁴ 取代 D 链，其中 R⁴ 为 H、桥氧基、羟基、烷氧基或烷基。更优选的是，R⁴ 为 H 或 C₁₋₆ 烷基。更优选的是，R⁴ 为 H 或甲基。最佳的是，R⁴ 为 H 或 10-(S)-Me。

A:

25 本发明的优选方案包括上述的式 I 化合物，其中 A 为羧酸。

特定的具体方案：

本发明的优选方案包括上述的式 I 化合物，其中 R² 为喹啉取代基(也就是 W 为 N)；

30 R³ 为式-NH-C(O)-NHR³² 或-NH-C(O)-OR³² 的基团，其中 R³² 为 C₁₋₄ 烷基或 C₄₋₆ 环烷基；

D 为 6 至 8 个原子的饱和或不饱和的亚烷基链，以与 A 同侧的构型与 R¹ 连

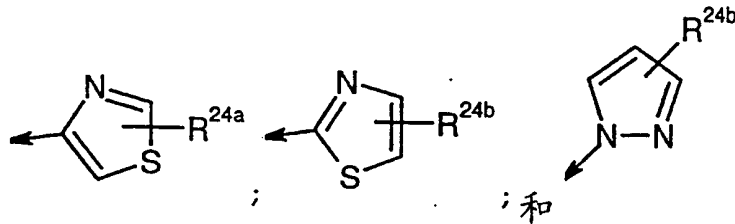
接，可视需要含有一或两个，分别选自 O、S 或 N-R⁴¹ 的杂原子，其中 R⁴¹ 为 C₂₋₇ 酰基；

R⁴ 为 H 或一至三个分别选自羟基或 C₁₋₆ 烷基的取代基；且

A 为羧酸或其在药学上可接受的盐或酯。

5 更佳的是其中 R¹ 如同上文的定义；R²¹ 为 H 或甲氧基；

R²² 为 C₁₋₆ 烷氧基，或选自以下的 Het；



10

其中 R^{24a} 为 H、C₁₋₆ 烷基、NH-R²⁵、NH-C(O)-R²⁵、NH-C(O)-NH-R²⁵，

其中 R²⁵ 为 H、C₁₋₆ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基；

或 R^{24a} 为 NH-C(O)-OR²⁶，其中 R²⁶ 为 C₁₋₆ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基；

且 R^{24b} 为 H 或 C₁₋₆ 烷基；

15 R³ 为式 NH-C(O)-NHR³² 的脲，或式 NH-C(O)-OR³² 的氨基甲酸酯，其中 R³²

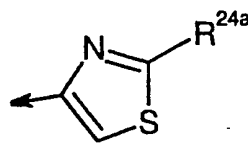
为 C₁₋₆ 烷基或 C₃₋₆ 环烷基；

D 为 C7-原子的饱和或不饱和的亚烷基链，可视需要在位置 11、12 或 13、14 处含有一个双键；

该 D 链可视需要含有一个选自 O、S、NH、N(Me) 或 N(Ac) 的杂原子；且

20 R⁴ 为 H 或 C₁₋₆ 烷基。

最佳的是，其中 R²¹ 为甲氧基，且 R²² 为乙氧基或：



25 其中 R^{24a} 为 NH-(C₁₋₄ 烷基)、NH-C(O)-(C₁₋₄ 烷基) 或 NH-C(O)-O-(C₁₋₄ 烷基)；

且

D 为饱和的，或在位置 13、14 处含有一个顺式双键的式 I 化合物。

最后，所有在表 1 至 9 中提供的式 I 化合物，均包含在本发明的范围内。

30 本发明的药物组合物可口服、非经肠胃或通过植入的储存器投药。口服投药或通过注射投药是优选的。本发明的药物组合物可含有任何传统上无毒性的在药学上可接受的载剂、助剂或赋形剂。在一些情况下，可利用在药学

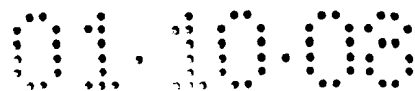
上可接受的酸、碱或缓冲溶液来调节调配物的 pH 值，以便促进调配化合物或其递送形式的稳定性。本文中所用的肠胃外一词，包括皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内和病灶内注射或输液技术。

5 药物组合物可以是无菌的注射用制品的形式，例如无菌的注射用水性或油性的悬浮液。可根据本领域的已知技术，使用适当的分散剂或湿润剂(如吐温 80)和悬浮剂来调配该悬浮液。

10 本发明的药物组合物可以以任何口服可接受的剂型口服投药，包括但不限于胶囊、片剂和水性悬浮液和溶液。在口服使用的片剂的情况下，常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常也加入润滑剂、如硬脂酸镁。对以胶囊形式口服投药，有用的稀释剂包括乳糖和脱水的玉米淀粉。当以水性悬浮液口服时，将活性成分与乳化剂和悬浮剂混合。如果需要，可加入一些甜味剂及/或香料及/或着色剂。

15 可供上文提及的调配物和组合物使用的其他适当的赋形剂或载体，可在标准药理学教科书中找到，例如在“Remington's Pharmaceutical Sciences”，第 19 版，Mack Publishing Company, Easton, Penn., 1995 中。为了预防和治疗 HCV 引起的疾病，在单一治疗中，在本文中描述的蛋白酶抑制剂化合物，在约 0.01 到约 100 毫克/公斤体重每天之间的剂量范围是有用的，优选的是在约 0.5 到约 75 毫克/公斤体重每天之间。通常，本发明的药物组合物将每天给药约 1 到约 5 次，或另外以连续的输液。这类投药可用作慢性或急性的治疗。可与载体物质混合，产生单一剂量形式的活性成分的含量，可根据待处理的宿主和给药的特定模式而改变。代表性的制剂将含有约 5% 到约 95% 活性成分(重量/重量)。优选的是，这类制剂含有约 20% 到约 80% 的活性化合物。

25 熟悉本领域者将理解可能需要比上文提及的量更低或更高的剂量。对任何特定患者的特定剂量和处理方式将依据各种因素而定，包括所使用的特定化合物的活性、年龄、体重、一般的健康状态、性别、饮食、投药的时间、排泄的速率、药物的组合、感染的严重性和过程、患者对感染的倾向，以及处理医师的判断。一般而言，以实质上低于该肽的最佳剂量的小剂量开始治疗。随后通过少量的增加而增加剂量，直到在该情况下达到最佳的效果为止。一般而言，要求以通常足以产生有效的抗病毒结果，但不引起任何有害或不副作用的浓度含量来投予该化合物。



当本发明的组合物包括式 I 化合物与一或多种另外的治疗或预防剂组合时, 该化合物与另外的制剂的存在量应该以约 10 至 100% 之间的剂量含量提供, 更优选的是约 10 到 80% 的剂量, 通常以单次治疗法投予。

5 当将这些化合物或其在药学上可接受的盐类与在药学上可接受的载体一起调配时, 可将所得的组合物在活体内投予哺乳动物, 像是人类, 以便抑制 HCV NS3 蛋白酶, 或治疗或预防 HCV 病毒感染。也可使用本发明化合物与下列制剂混合, 来完成这类治疗, 包括但不限于: 免疫调节剂, 如 α -、 β -或 δ -干扰素; 其他的抗病毒制剂, 如三唑核苷、金刚胺; 其他的 HCV NS3 蛋白酶抑制剂; 对在 HCV 生活循环中其他标的抑制剂, 如解旋酶、聚合酶、
10 金属蛋白酶, 或内部的核糖体进入位点(IRES); 或其组合物。可将另外的制剂与本发明化合物混合, 以产生单一的剂量形式。另外, 也可将这类另外的制剂可分别投予哺乳动物, 成为多个剂量形式的一部分。因此, 本发明其他的具体方案提供一种在哺乳动物中, 通过投予式 I 化合物, 其中取代基如同上文定义, 来抑制 HCV NS3 蛋白酶活性的方法。

15 在优选的具体方案中, 这些方法在哺乳动物中有用于降低 HCV NS3 蛋白酶活性。如果药物组合物仅包括作为活性成分的本发明化合物, 这类方法可另外包括对该哺乳动物投予选自免疫调节剂、抗病毒剂、HCV 蛋白酶抑制剂、或对在 HCV 生活循环中的其他标的, 像是解旋酶、聚合酶、金属蛋白酶中一个制剂的抑制剂的步骤。可在投予本发明组合物之前、同时或之后,
20 将这类另外的制剂投予哺乳动物。

在另外的优选方案中, 这些方法在哺乳动物中有用于抑制病毒复制。这类方法可用于治疗或预防 HCV 疾病。如果药物组合物仅包括本发明化合物作为活性成分, 这类方法可能另外地包括对该哺乳动物投予选自免疫调节剂、抗病毒剂、HCV 蛋白酶抑制剂, 或对在 HCV 生活循环中其他标的抑制剂的制剂的步骤。可在投予本发明的组合物之前、同时或之后, 将这类另外的制剂投予哺乳动物。
25

上述化合物也可用于作为实验室试剂。申请者第一次提供具有低分子量的化合物, 其对 HCV NS3 蛋白酶具有高活性和特异性。一些本发明的化合物, 对于提供用于设计病毒复制测定、动物测定系统的批准, 以及进一步增
30 进 HCV 疾病机制的知识的结构生物学研究的研究工具是有帮助的。

本发明化合物也可用来处理或预防病毒污染的物质, 并藉此降低实验室

或医疗人员，或与这类物质(例如血液、组织、外科器械和衣服、实验室设备和衣服，以及血液收集或输血的装置和材料)接触的患者被病毒感染的风险。方法学。

在 WO 00/09543 和 WO 00/09558 中公开数种方式以完成式 I 化合物的非环状中间物的合成。

根据在流程 I、II 和 III 中说明的普通程序来合成本发明化合物(其中 PG 为适当的保护基)。[在所有下文提供的流程中，D' 具有与 D 相同的定义，但较短，为 2 至 5 个原子]。

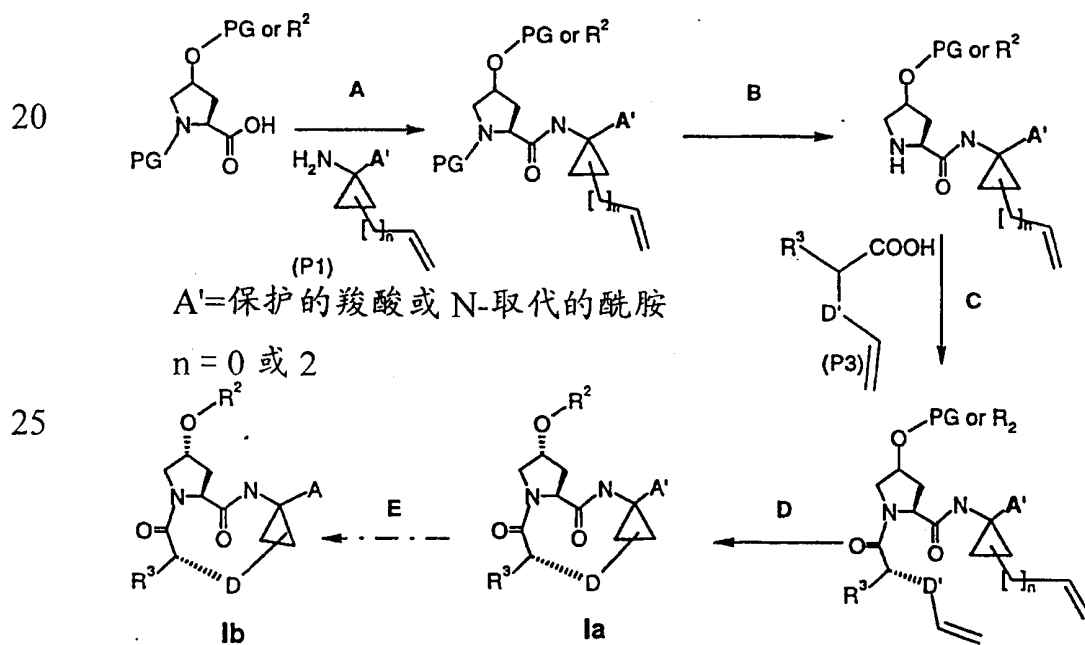
当本发明包含其中 A 为 N-取代的酰胺的式 I 化合物时，乙烯基-ACCA 或同-烯丙基 ACCA(R¹) 在偶联至 P2 之前，先偶联至适当的胺。熟悉本技术者将理解这类偶联。熟悉本技术者将承认这类酰胺(A)并未被保护，但带有任何如上文定义的有关取代基 R⁵。

通过烯置换作用(流程 I)，或在连结剂中含有氮原子时，通过还原性胺化作用(流程 II)，或通过肽键结形成(流程 III)，来完成闭环反应(巨环化作用)。

在下文中提供这些方法的细节：

A. 通过烯置换作用的巨环化作用

流程 I



30 D=饱和的 D=不饱和的

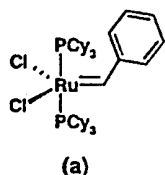
流程 I:

熟悉本技术者可轻易地认出数种可完成偶联序列的方法。从 4-(S)-羟基脯氨酸开始，可在巨环化作用之前或之后，通过由 Mitsunobu 反应而在 4-羟基处加入取代基(如同在 Mitsunobu Synthesis 1981, January, 1-28 ; Rano 等人 Tet. Lett. 1994, 36, 377-3792 ; Krchnak 等人 Tet. Lett. 1995, 36, 6193-6196 中的描述)。另外，也可利用必需的 4-(R)-羟基-取代的脯氨酸进行组合，如在 WO 00/09543 & WO 00/09558 的普通程序中揭示的(参见下文关于这些片段的具体实例)。

步骤 A、B、C: 简言之，可通过已熟知的肽偶合技术和在 WO 00/09543 & WO 00/09558 中共同揭示的，将 P1、P2 和 P3 部分连接。

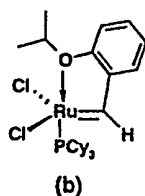
10 步骤 D: 可通过烯烃置换作用，使用以 Ru-基的催化剂，如由 Miller, S.J.; Blackwell, H.E.; Grubbs, R.H. J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 9606-9614(a); Kingsbury, J.S.; Harrity, J.P.A.; Boniatebus, P.J.; Hoveyda, A.H. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121 791-799(b)和 Huang, J.; Stevens, E.D.; Nolan, S.P.; Petersen, J.L.; J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 2674-2678(c)所报导的催化剂，来完成巨环的形成。也将认识该反应可使用含有其他过渡金属，如 Mo 的催化剂。

20



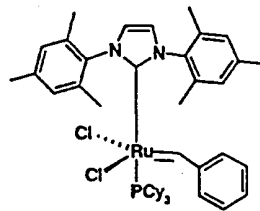
(a)

格鲁伯斯(Grubbs')
催化剂



(b)

哈维达(Hoveyda's)
催化剂



(c)

诺兰(Nolan's)
催化剂

步骤 E: 视需要，通过本技术中已熟知的标准氢化法来还原双键。当 A' 为保护的羧酸时，也可适当地将其脱保护。

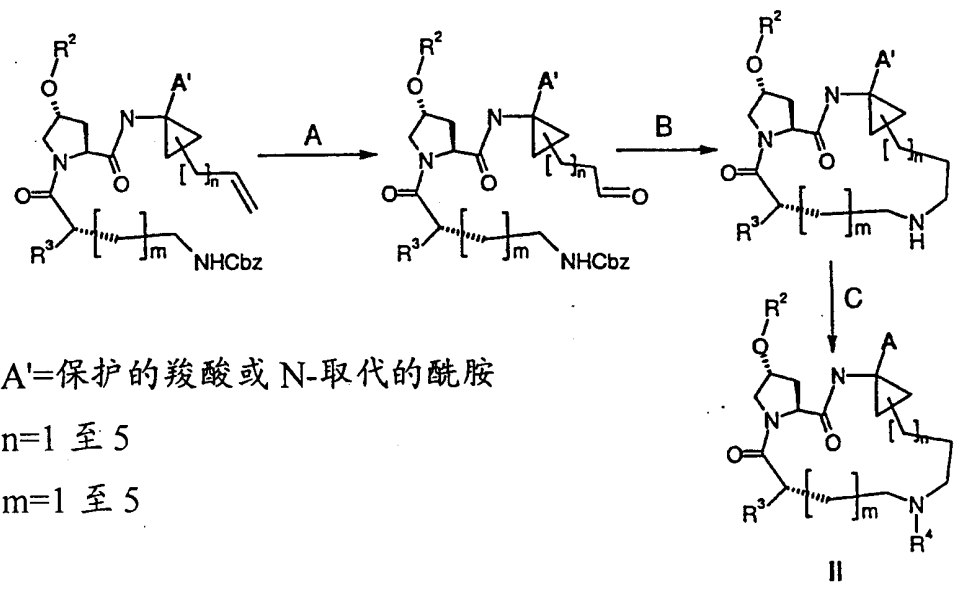
25 B. 通过还原性胺化作用的巨环化作用(连结剂含有 N)

当连结剂含有氮原子时，可通过如同流程 II 中所示的还原性胺化作用，得到巨环化作用，获得通用结构 II 的抑制剂。

30

流程 II

5



10

A'=保护的羧酸或 N-取代的酰胺
 n=1 至 5
 m=1 至 5

15

步骤 A: 在布朗(Brown's)程序后双键的硼氢化反应(H.C. Brown 和 B.C. Subba Rao, J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 6434-6437), 接着是所得醇的氧化作用(例如通过 Dess-Martin Periodinate, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 7277-7287)得到相对应的醛。

20

步骤 B: 在酸存在下的氢化作用, 导致除去氨基保护基, 接着通过还原性胺化作用的巨环化作用。在本合成中使用的 P3 单位, 轻易地从各种氨基酸中获得, 如赖氨酸、鸟氨酸、谷氨酸胺(在霍夫曼(Hofmann)反应之后: Ber. 1881, 14, 2725)及其他; 这些合成的修改是本技术中已熟知的方法。

25

步骤 C: 可视需要使用本技术中已熟知的方法, 利用烷基卤将在连结剂 D 中的仲胺(在步骤 D 之后形成)烷基化, 或利用烷基或芳基酰基氯将其乙酰基化, 获得通用结构 II 的抑制剂。当 A'为保护的羧酸时, 也可适当地将其脱保护。

C. 通过内酰胺形成的巨环化作用

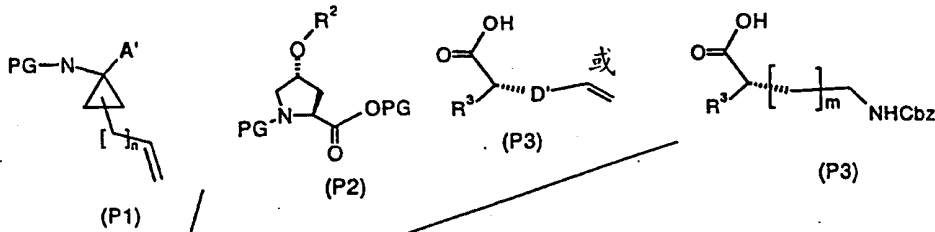
30

另外, 也明白具有通用结构 I 和 II 的这些巨环化合物, 可利用其他方式合成。例如, 可先使 P1 和 P3 与连结基 D 连接, 然后与 P2 偶联, 且该巨环化反应以两种可能的方式形成内酰胺, 将由熟悉本技术者认可并如在方案 III

中所示。

流程 III

5



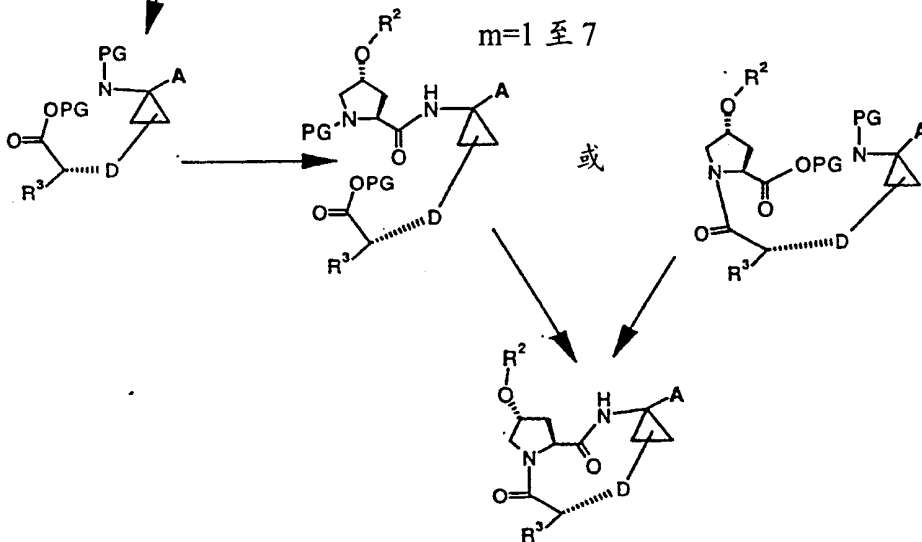
10

A'=保护的羧酸或 N-取代的酰胺

n=0 至 2

m=1 至 7

15



20

P1 的合成

带有通用结构 I 和 II 的抑制的合成，需要相同的 P1 片段：

- 25 a) 乙烯基 ACCA, 在 WO 00/09543 & WO 00/09558 中描述其合成和解离, 或
b) 同烯丙基 ACCA(实施例 1, 化合物 1f)。

P2 的合成

在 WO 00/09543 & WO 00/09558 中描述了使用一些 P2 片段来合成式 I 化合物。

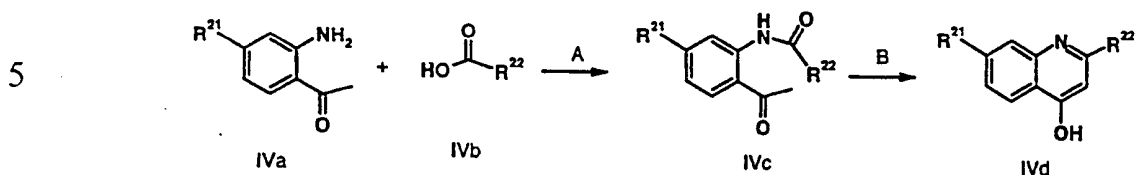
30

如下合成其他的 P2 片段：

- a. 合成 2-“Het”-4-羟基-7-甲氧基喹啉衍生物

(i)得自相应的“Het”羧酸 IVb 的途径

流程 IV



10 根据在 Li 等人 J. Med. Chem. 1994, 34, 3400-3407 中的修改程序, 来完成合成作用。按照 Brown 等人 J. Med. Chem. 1989, 32, 807-826 的描述, 来制备其中 R²¹=OMe 的中间物 IVa(实施例 7, 化合物 7b)。

15 步骤 A: 在碱性的条件下, 利用 POCl₃ 活化羧酸盐基团, 将中间物 IVa 与杂环羧酸 IVb 偶联。抑制剂的制备, 是使用各种具有通用结构 IVb 的羧酸; 这些是可购得的, 按照在流程 V、VI 和 VII 中所示进行合成, 或使用在特定实例中描述的方法个别合成的。

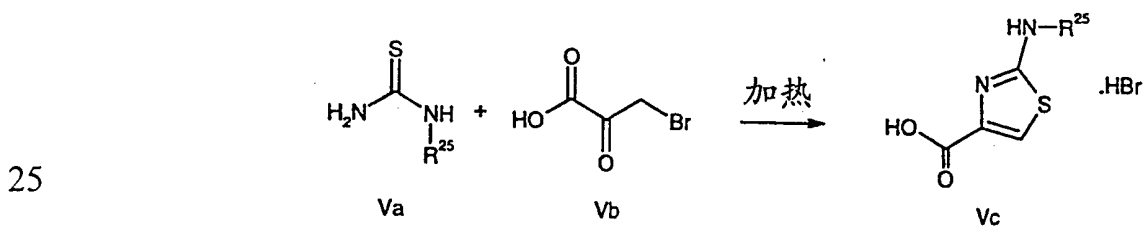
步骤 B: 闭环, 接着在碱性的条件下进行脱水, 以获得通用结构 IVd 的喹啉。

(i.a.)合成通式 IVb 的“Het”-羧酸

合成 2-(取代的)-氨基-4-羧基-氨基噻唑衍生物(Vc)

20 使用由 Berdikhina 等人 Chem. Heterocycl. Compd. (Engl. Transl.)1991, 4 427-433 中描述的修改程序。

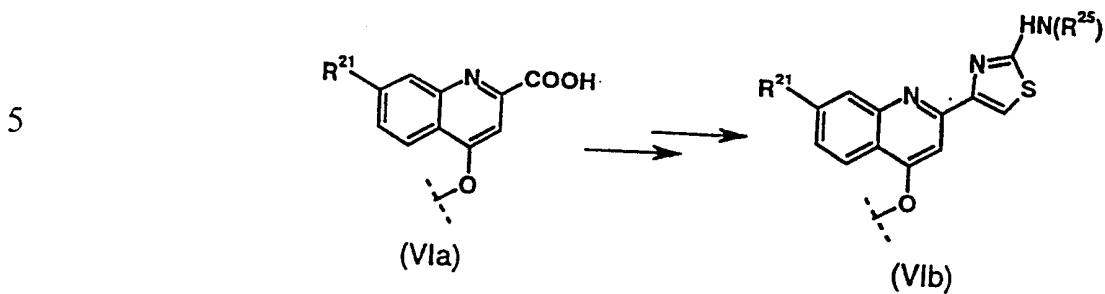
流程 V



30 使用在流程 V 中概述的普通合成方法, 使用带有不同的烷基取代基(R²⁵=烷基基团)的硫脲(Va)和 3-溴丙酮酸, 来制造通用结构 Vc 的化合物, 各种 2-烷基氨基噻唑基-4-羧酸。这类型的缩合反应是本技术中已熟知的。另外, 如在流程 VI 中所示, 根据: Unangst, P.C.; Connor, D.T.J. Heterocycl. Chem. 29, 5, 1992, 1097-1100 的程序, 从相应的 2-羧基衍生物来合成含有 2-氨基-取代的-

噻唑衍生物的 P2 片段。

流程 VI

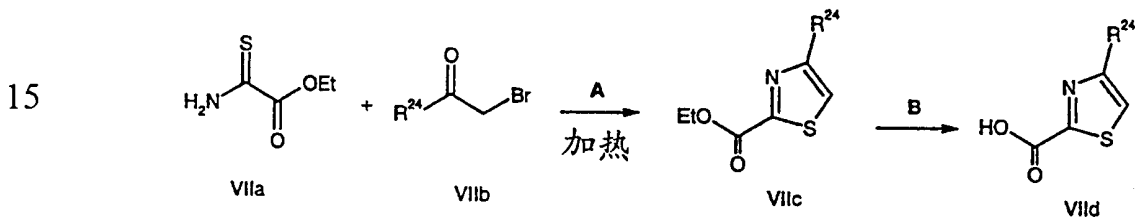


该方法的实例描述在 WO 00/09543 & WO 00/09558 中。

10 合成 2-羧基-4-取代的氨基噻唑衍生物 VIId

使用在流程 VII 中概述的普通合成方法，来制造通用结构 VIId 的化合物，各种 4-烷基噻唑基-2-羧酸。

流程 VII

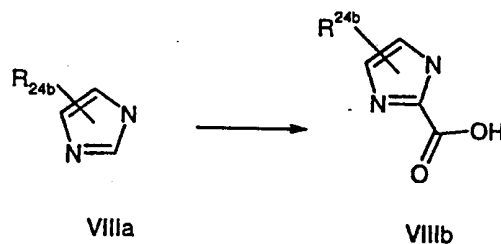


20 使用 Janusz 等人 J.Med. Chem. 1998, 41, 3515-3529 描述的程序，并具有如下描述的修改：硫代草胺酸(thiooxamate)乙酯(VIIa)与具有通用结构 VIIb(R²⁴=烷基基团)的不同的 β-溴酮反应，形成通用结构 VIIc 的噻唑羧酸。这类型的缩合反应是本技术中已熟知的。

合成 2-羧基-(取代的)-咪唑衍生物(VIIIb)

使用在流程 VIII 中概述的普通合成方法，来制造通用结构 VIIIb 的化合物，各种 4-烷基咪唑基-2-羧酸。

25 流程 VIII



使用由 Baird 等人 J.Amer. Chem. Soc. 1996, 118, 6141-6146 描述的程

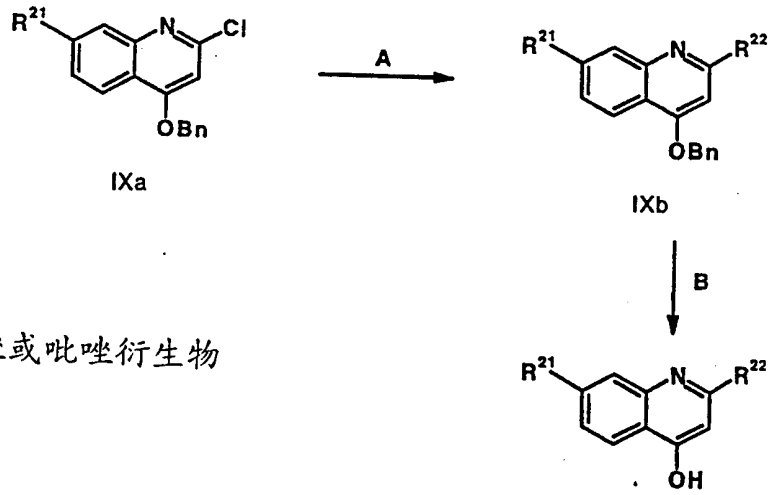
序：利用强酸(例如 nBuLi)将烷基咪唑脱质子，然后与 CO₂ 反应，形成羧酸 VIIIb。该类型的缩合反应为本技术中已熟知的。

b. 合成 4-羟基-7-甲氧基-2-(咪唑基或吡唑基)喹啉

使用在方案 IX 中概述的方法，来制备在 C2 处具有咪唑或吡唑部分的 4-

5 羟基-7-R²¹ 喹啉基。

流程 IX



10

R²² = 咪唑或吡唑衍生物

15

在实例 6 中详细描述关键中间物(其中 R²¹=OMe)的 4-苄氧基-2-氯-7-甲氧基喹啉 IXa 的合成(化合物 6e)。

步骤 A：在高温下，可使用各种咪唑、烷基取代的咪唑、吡唑或烷基取代的吡唑来置换化合物 IXa 中的 2-氯部分，得到通用结构 IXb 的化合物。

步骤 B：当通过标准氢化法从喹啉的 4-羟基部分除去苄基保护基时，获得通用结构 IXc 的喹啉衍生物。

20

P3 的合成

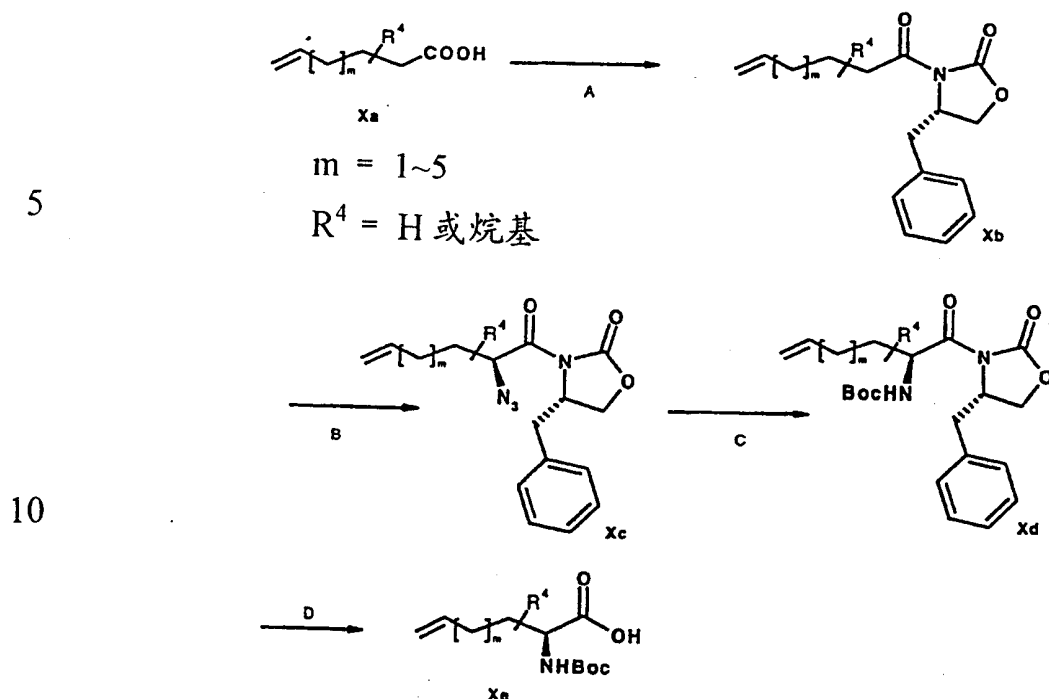
通过烯烃置换作用，合成含有延伸巨环化作用的适当 D 连结基的各种 P3 片段。通常依据下述的普通流程(流程 X、XI & XII)合成含有可供置换作用的终端烯烃的 P3 单位。

25

合成 A 类型的连结剂

用于制造连结剂的普通合成作用，完全以碳为基础(无杂原子)(流程 X)。

流程 X



根据 Evans 等人 J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 4011-4030 的程序来进行合成。

起始的羧酸(Xa)是可购得的, 或可通过熟悉本领域的技术人员已知的文献程序来制备。

步骤 A: 以新戊酰氯活化羧酸 Xa, 然后依据已熟知的化学方法(查阅: D. J. Ager 等人 Aldrichimica Acta 1997, 30, 3-11, 以及在本文中的参考文献), 与 Evens' 的手性辅助剂 4(S)-4-(苯甲基)-2-噁唑烷酮的阴离子反应, 得到通用结构 Xb 的化合物。

步骤 B: 在碱的存在下, 如 KHMDS, 利用三苯基叠氮化物(trizylazide)使手性酰亚胺烯醇盐发生立体选择性的 α -叠氮化作用, 这样将形成带有通用结构 Xb 的化合物, 该作用也是本技术中已熟知的(查阅: D. J. Ager 等人 Aldrichimica Acta 1997, 30, 3-11, 以及在本文中的参考文献)。

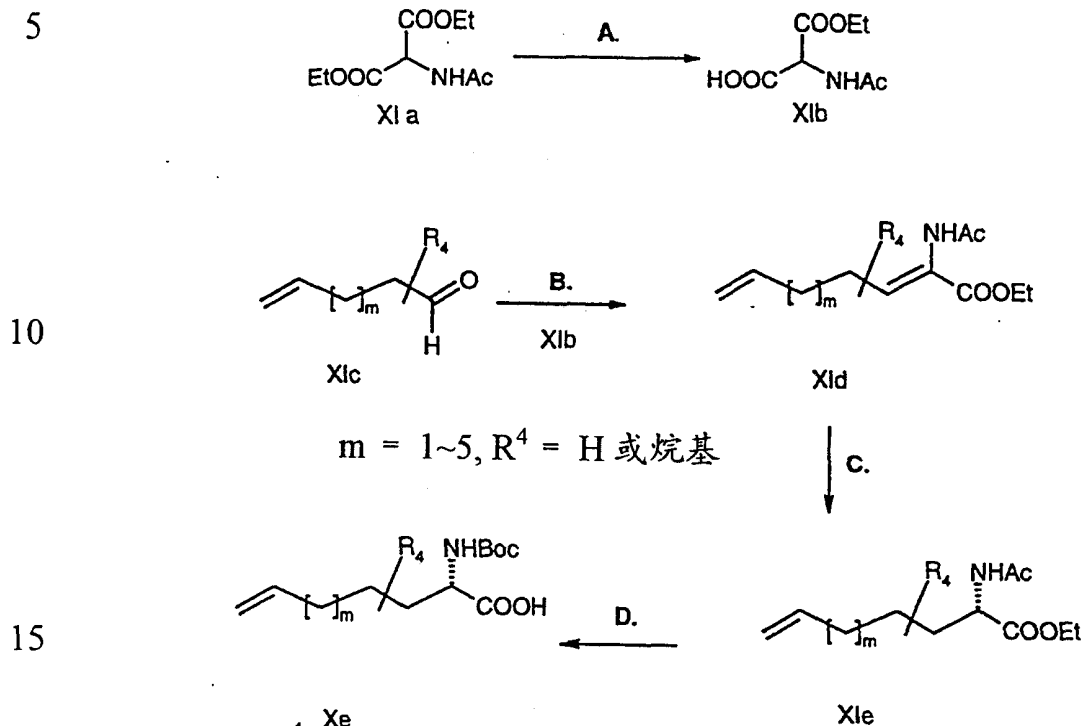
步骤 C: α -叠氮化物的还原作用, 通过 SnCl_2 催化, 接着是胺的保护作用, 形成其胺基甲酸叔-丁酯, 得到具有通用结构 Xc 的中间物。这些反应也是本技术中已熟知的。

步骤 D: 最后, 在碱性条件下将手性辅助剂水解, 如 H_2O_2 与 LiOH 的混合物, 产生具有通用结构 Xe 的氨基酸类型的连结剂。

另外, 也可依据在流程 XI 中所说明的, 由 M.J. Burk 等人 J. Am. Chem.

Soc. 1998, 120, 657-663 描述的程序, 合成具有相同的通用结构 Xe 的 P3 部分。这些化合物随着连结剂而在亚甲基(-CH₂-)单位的数目(m=1 至 5), 以及在 R⁴ 处的烷基基团的取代作用而有所改变, 但不含有杂原子。

流程 XI



步骤 A: 在碱性的条件下, 通过标准酯水解作用, 从可购得的 2-乙酰胺丙二酸二乙酯来制备单酸化合物 XIb。

20 步骤 B: 在诸如吡啶之类的碱和乙酸酐的存在下, 在通用结构 XIc 的醛和化合物 XIb 之间的诺文葛耳型的缩合作用, 导致形成烯酰胺中间物 XIId, 其在如所示的新形成的双键周围, 具有 Z 立体化学。

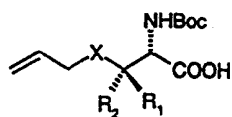
步骤 C: 使用 Burk's 法, 完成烯酰胺中间物 XIId 至氨基酸中间物 XIE 的区域选择性和对映选择性的催化性氢化作用。

25 步骤 D: 利用在醋酸根基团之前, 加入氨基甲酸叔-丁酯取代基, 将乙酰胺衍生物 XIE 的氮进行-保护, 并在标准碱性条件下水解该乙基酯, 获得通用结构 XIf 的 P3 部分。

合成 B 类型的连结剂

B 类型的连结剂的通用结构

30



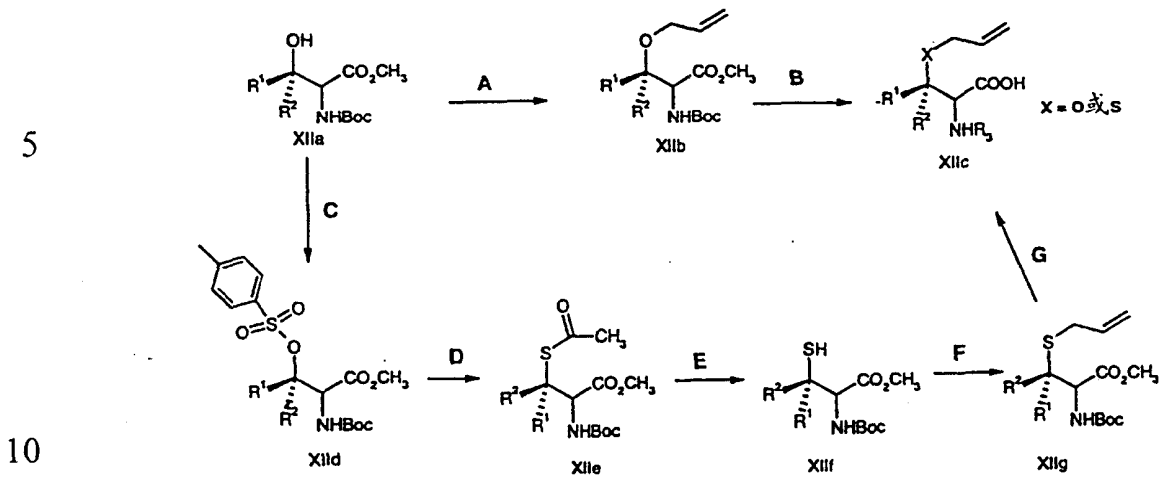
X=O 或 S

R¹=H 或 CH₃

R²=H 或 CH₃

这普通合成法用于制造含有氧或硫的连结剂。

流程 XII



$R^1 = H$ 或 CH_3

$R^2 = H$ 或 CH_3 , 但不是 $R^1 = R^2 = CH_3$

15 步骤 A: 利用烯丙基碘, 在 Ag_2O 的存在下, 将适当经保护的氨基酸, 如 Boc-(L)-丝氨酸甲基酯、Boc-(L)-苏氨酸甲基酯或 Boc-(L)-别苏氨酸甲基酯烷基化, 得到甲基酯 XIIb。

步骤 B: 在标准碱性条件下甲基酯进行水解作用, 产生通用结构 XIIc 的醚-型连结剂($X=O$)。

20 步骤 C: 从相同的起始氨基酸 XIIa 来制备硫类似物(如以前适当地加以保护), 并使用本技术中已熟知的标准方法, 将其羟基基团转变为良好的离去基(如甲苯磺酸盐中间物 XIIId)。

步骤 D: 接着以硫代乙酸盐的阴离子置换甲苯磺酸基部分, 通过转化 β -碳的手性中心, 导致硫酯中间物 XIIe 的形成。

25 步骤 E: 在缓和的碱性条件下, 使硫酯部分进行水解作用, 产生游离的硫醇 XIIIf。

步骤 F: 在碱性条件下, 利用烯丙基碘易于进行硫醇部分的烷基化作用。

步骤 G: 最后, 在使用标准步骤的甲基酯的水解作用后, 获得硫化物类似物 XIIc($X=S$)。

R^3 片段的合成

30 在 WO 00/09543 中揭示了合成其中 R^3 为 $NH-RR^{31}$ 的片段的实例。

实施例

通过下列不受限制的实例，更详细地说明本发明。其他特定的合成或离析的方法，可在 WO 00/09543 & WO 00/09558 中找到。

- 5 以摄氏度数提供温度。除非另行陈述，溶液百分比表示重量对体积的关系，且溶液比例表示体积对体积的关系。在 Bruker 400MHz 的分光计上记录核磁共振(NMR)光谱；以百万分之一(ppm)报告化学位移(δ)，并参考内部的氘化溶剂。除非另行指定，以其 TFA 盐的 DMSO-d₆ 记录所有最终化合物(抑制剂)的 NMR 光谱。根据 Still's 急骤色层技术(W.C.Still 等人, J. Org. Chem.,
- 10 1978, 43, 2923)，在硅胶(SiO₂)上进行急骤柱色层法。

在实施例中所使用的缩写包括 Bn: 苄基; Boc: 叔-丁氧羰基 [Me₃COC(O)]; BSA: 牛血清白蛋白; Cbz: 苄氧羰基; CHAPS: 3-[(3-胆酰氨基丙基)-二甲基氨(ammonio)]-1-丙烷磺酸盐; DBU: 1, 8-二氮二环[5.4.0]十一碳-7-烯; CH₂Cl₂=CDM; 二氯甲烷; DEAD; 偶氮二羧基二乙酯; DIAD: 偶氮二羧酸二异丙酯; DIPEA: 二异丙基乙胺; DMAP: 二甲氨基吡啶; DCC: 1, 3-二环己基碳化二亚胺; DME: 1, 2-二甲氧基乙烷; DMF: 二甲基甲酰胺; DMSO: 二甲亚砷; DTT: 二硫苏糖醇或苏-1, 4-二巯基-2, 3-丁二醇; DPPA: 二苄基磷酰基叠氮化物; EDTA 乙二氮四乙酸; Et: 乙基; EtOH: 乙醇; EtOAc: 醋酸乙酯; Et₂O: 二乙醚; ESMS: 电喷雾质谱分析; HATU: O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1, 1, 3, 3-四甲基铍六氟磷酸盐; HPLC: 高效液体色层法; MS: 质谱分析; MALDI-TOF: 矩阵参考的激光吸收离子化(Matrix Assisted Laser Disorption Ionization)作用-飞行时间; FAB: 快速原子撞击; LAH: 氢化铝锂; Me: 甲基; MeOH: 甲醇; MES: (2-[N-吗啉]乙烷-磺酸); NaHMDS: 双(三甲基硅烷基)酰胺化钠; NMM: N-甲基吗啉; NMMO: N-甲基吗啉氧化物; NMP: N-甲基吡咯烷; Pr: 丙基; Succ: 3-羧基丙酰基; PNA: 4-硝苯氨基或对-硝基苯氨; TBAF: 氟化四-正-丁基铵; TBME: 叔-丁基-甲基醚; tBuOK: 叔-丁醇钾; TBTU: 2-(1H-苯并三唑-1-基)-1, 1, 3, 3-四甲基铍四氟硼酸盐; TCEP: 三(2-羧乙基)膦盐酸盐; TFA: 三氟乙酸盐; THF: 四氢呋喃; TIS: 三异丙基硅烷; TLC: 薄层层析法; TMSE: 三甲基硅烷基乙基; Tris/HCl: 三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐。

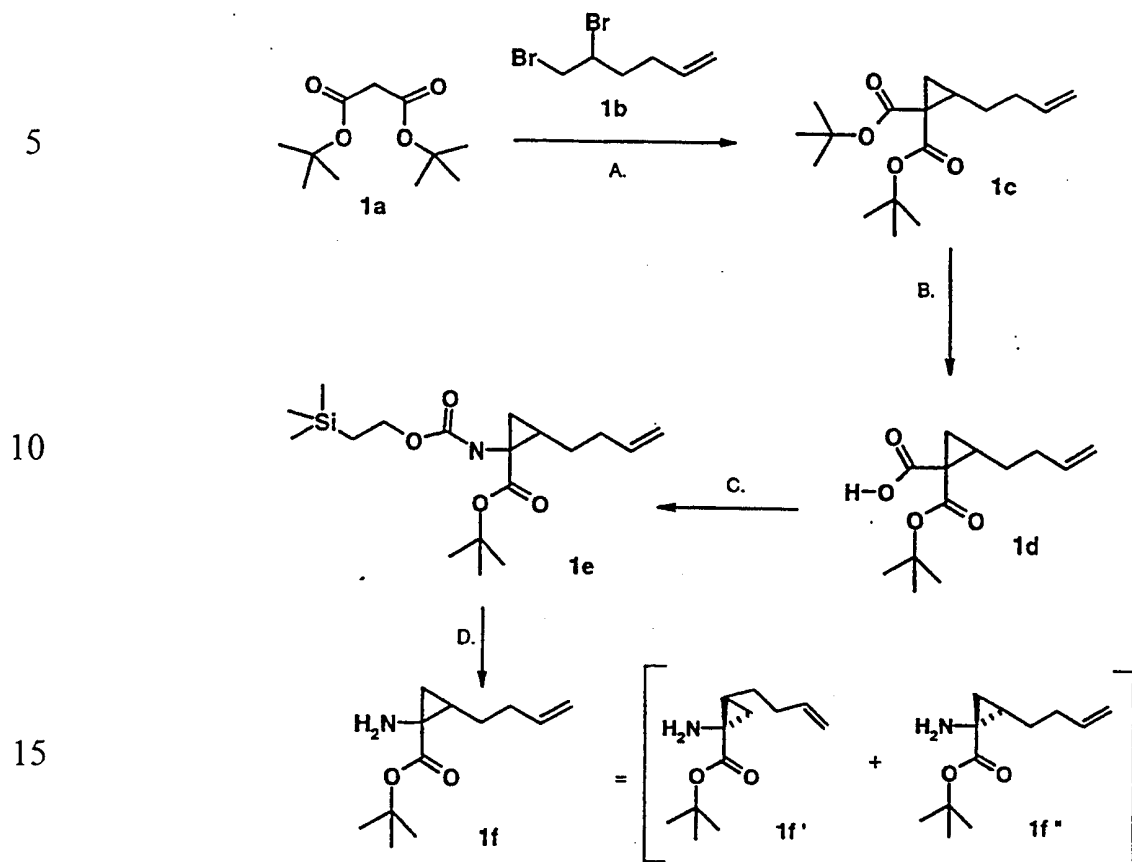
25

30

P1 部分

实施例 1

合成羧酸叔-丁基-(1R, 2R)/(1S, 2S)-1-氨基-2-同烯丙基环丙酯(1f):



A. 相继将 1,2-二溴-5-己烯(1b, 8.10 克, 33.46 毫摩尔)和丙二酸二-叔-丁酯(1a, 4.82 克, 22.30 毫摩尔)加至在 50% NaOH 水溶液(50 毫升)中的氯化苄基三乙铵(5.08 克, 22.3 毫摩尔)的悬浮液中。在室温下剧烈地搅拌该混合物 16 小时, 然后以 H₂O 稀释并以 CH₂Cl₂(3 × 50 毫升)萃取。进一步以 H₂O(2 × 50 毫升)、盐水/H₂O(2/1, 2 × 50 毫升)冲洗有机层, 并以 MgSO₄ 干燥并蒸发。通过急骤柱色层法在硅胶上纯化粗制的残余物, 使用 3 至 5% 在己烷中的 EtOAc 作为洗脱液, 获得 38% 的化合物 1c(2.48 克)。

25 ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 1.19(bd, J=7.9Hz, 2H), 1.25-1.33(m, 1H), 1.46(s, 9H), 1.48(s, 9H), 1.47-1.60(m, 1H), 1.75-1.82(m, 1H), 2.14-2.22(m, 2H), 4.93-5.50(m, 2H), 4.96(dm, J=10.2Hz, 1H), 5.18(dm, J=17.2Hz, 1H)。

ES(+)-MS m/z 297(M+H)⁺。

B. 在 0℃ 下, 将 H₂O(203 微升, 11.27 毫摩尔)加至在无水二乙醚(150 毫升)中的叔-丁醇钾(5.75 克, 51.25 毫摩尔)的悬浮液中, 并在 0℃ 下搅拌该反应混合物 10 分钟。加入化合物 1c 的醚溶液(2.48 克在 10 毫升二乙醚中, 10.25

毫摩尔), 并在室温下搅拌该混合物 5 小时。以冰冷的 H_2O 稀释该混合物, 并以二乙醚萃取(3×200 毫升)。以冰冷的 10% 柠檬酸水溶液将水层酸化至 $\text{pH}_{3.5-4}$, 并再度以 EtOAc (3×200 毫升) 萃取。以 H_2O (2×100 毫升) 和盐水 (100 毫升) 冲洗 EtOAc 层, 再以 MgSO_4 干燥并蒸发, 基于回收的起始物质的含量, 得到产量 85% 的化合物 1d。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 1.51(s, 9H), 1.64-1.68(m, 1H), 1.68-1.75(m, 1H), 1.77-1.88(m, 1H), 1.96-2.01(m, 1H), 2.03-2.22(m, 3H), 5.01(dm, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 5.03(dm, $J=14.9\text{Hz}$, 1H), 5.72-5.83(m, 1H)。

ES(+) MS m/z 241($\text{M}+\text{H}$) $^+$ 。

10 C. 将 Et_3N (800 微升, 5.68 毫摩尔) 加至在无水苯中的酸 1d 的溶液 (1.14 克在 25 毫升苯中, 4.74 毫摩尔) 中, 接着加入二苯基磷酰基叠氮化物 (1.13 毫升, 5.21 毫摩尔), 并将该混合物加热至回流 3.5 小时。接着, 加入三甲基硅烷基乙醇 (1.36 毫升, 9.48 毫摩尔), 并在回流下再继续搅拌 4 小时。将该混合物冷却至室温, 蒸发至其原始体积的一半, 以二乙醚 (30 毫升) 稀释, 并以 5% 的 NaHCO_3 水溶液 (2×30 毫升)、盐水 (50 毫升) 冲洗, 再以 MgSO_4 干燥并蒸发。在硅胶上色层分离残余的油, 使用 10% 在己烷中的 EtOAc 作为洗脱液, 得到产量 88% 纯的化合物 1e (1.49 克)。

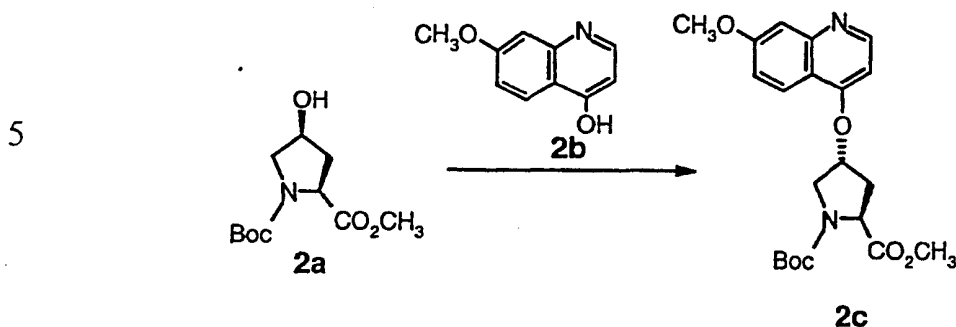
15 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 0.03(s, 9H), 0.91-0.99(m, 2H), 1.18-1.29(m, 2H), 1.45(bs, 11H), 1.56-1.72(m, 2H), 2.02-2.18(m, 2H), 4.12(t, $J=8.3\text{Hz}$, 2H), 4.93(dm, $J=10.2\text{Hz}$, 1H), 4.98(dm, $J=17.2\text{Hz}$, 1H), 5.07(bs, 1H), 5.71-5.83(m, 1H)。

20 D. 将 $t\text{-Bu}_4\text{NF}$ (6.7 毫升在 THF 中的 1M 溶液, 6.7 毫摩尔) 加至环丙基衍生物 1e 的溶液 (1.19 克, 3.35 毫摩尔, 在 30 毫升 THF 中) 中, 并先在室温下搅拌该混合物 16 小时, 并接着加热以回流 15 分钟。在低压之下小心地蒸发溶剂 (因为游离胺 1f 的高挥发性, 在溶剂的蒸发期间应该谨慎小心)。将粗制的残余物再溶解于 EtOAc (100 毫升) 中, 并以 H_2O (2×50 毫升)、盐水 (50 毫升) 冲洗, 再以 MgSO_4 干燥, 并再度小心地蒸发溶剂。使用粗产物 1f (为两种对映体 1f' 和 1f'' 的混合物) 与 P2 脯氨酸衍生物偶联, 不需进一步纯化。在该阶段, 使用急骤色层法, 可易于完成在 P1 处具有想要的立体化学的 P1P2 片段的分离 (实例 21, 片段 21b)。

30 P2 部分

实施例 2

合成 Boc-4(R)-[(7-甲氧基-4-喹啉基)氧基]脯氨酸(2c):

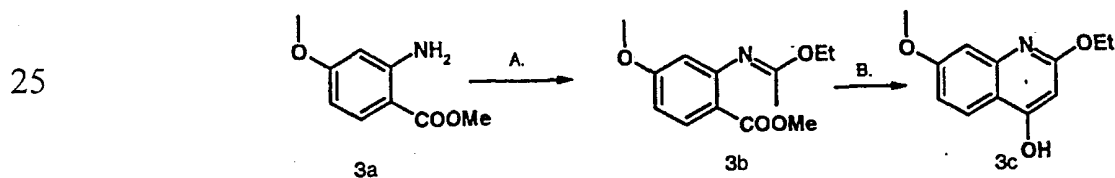


根据 Chun, M.W.; Olmstead, K.K.; Choi, Y.S.; Lee, C.O.; Lee, C.-K.; Kim, J.H.;
 10 Lee, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 7, 789 描述的方法制备 4-羟基-7-甲氧基
 喹啉(2b)。在 N₂ 下, 将在无水 THF 中的化合物 2b(1.88 克, 10.73 毫摩尔)和
 DEAD(3.4 毫升, 21.46 毫摩尔)的溶液, 加至 0℃、在无水 THF(160 毫升)中
 的经保护的顺-羟基脯氨酸 2a(2.63 克, 10.73 毫摩尔)和三苯膦(5.63 克, 21.46
 毫摩尔)的搅拌溶液中。容许将该反应混合物加温至室温, 并搅拌 14 小时。
 15 然后蒸发 THF, 并在使用 5% 在 EtOAc 中的 MeOH 作为洗脱液的急骤柱色层
 法后, 分离纯的产物 2c, 产量 35%(1.5 克)。

¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 1.44(s, 9H), 1.65(2, 1H), 2.34-2.43(m, 1H), 2.63-
 2.76(m, 1H), 3.78(s, 3H), 3.75-3.85 & 3.89-3.99(2m, 1H, 2 个螺旋异构体),
 3.95(s, 3H), 4.51 & 4.60(2t, J=8Hz, 1H, 2 个螺旋异构体), 5.15(bs, 1H), 6.53-
 20 6.59(m, 1H), 7.12-7.18(dd, J=8.9 & 2.2Hz, 1H), 7.36(d, J=2.6Hz, 1H), 8.03(bd,
 J=9.2Hz, 1H), 8.65(bs, J=5.1Hz, 1H)。

实例 3

合成 2-乙氧基-4-羟基-7-甲氧基喹啉基(3c)



按照在 Katz 等人, *J. Org. Chem.*, 1953, 18, 1380-1400 中的描述, 进行对
 -甲氧基氨基苯甲酯 3a 的合成。

30 喹啉衍生物 3c 的普通合成法, 是修饰 Baccar 等人 *Indian Journal of
 Chemistry*, 1995, Sat. B, 330-332 的程序。

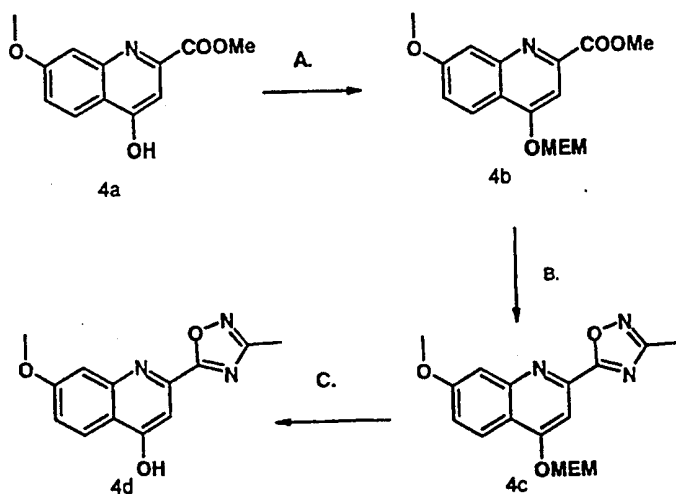
A. 将对-甲氧基氨基苄酯甲酯 3a(3.069 克, 16.96 毫摩尔)溶解于原乙酸三乙酯 (4.7 毫升, 25.4 毫摩尔)中, 然后加入无水的 HCl 溶液(4N/二噁烷, 50 微升, 0.6 毫摩尔)。将所得的混合物加热回流 19 小时。然后在真空下蒸发挥发物, 得到产物 3b(4.92 克, 琥珀色的油, 定量产量), 这样便可使用在下一个步骤中。

5 B. 在-78℃在氮气下, 将 LiHMDS(1M/THF, 22 毫升, 1.3 当量)加至在 THF(34 毫升)中的基质 3b(16.96 毫摩尔)的溶液中。在加入之后不久便移开冷温浴, 并将该混合物置于周围温度空气下搅拌 1 小时, 随后加入其他部分的 LiHMDS(16 毫升)。然后搅拌所得的混合物, 直到由 TLC(100% EtOAc, 酰亚胺酸盐(imidate) $R_f=0.7$, 产物 $R_f=0.2$)得知起始物质完全消失为止(1 小时)。然后加入 HCl(4N/二噁烷, 10 毫升), 并在真空下浓缩该混合物。从 EtOAc(10 毫升)与 NaH_2PO_4 水溶液(1M, 10 毫升)的混合物中, 将所得糊状物研制, 并以声波震荡。形成丰富的沉淀物, 通过过滤收集, 以水冲洗并脱水, 得到灰色固体状的所要求的产物 3c(3.117 克, 2 个步骤产量 84%, 由 HPLC 得知纯度 >99%)。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 7.88(d, $J=8.9\text{Hz}$, 1H), 6.98(br. s, 1H), 6.89(br. d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 5.94(br. s, 1H), 4.30(br. s, 2H), 3.84(s, 3H), 1.34(t, $J=7.0\text{Hz}$, 3H)。

实施例 4

20 合成 4-羟基-7-甲氧基-2-(3-甲基-1,2,4-噁二唑-5-基)喹啉基(4d)



25 30 A. 在氮气下, 将 NaH(60% 在矿物油中, 190 毫克, 4.98 毫摩尔)加至在 DMF(10 毫升)中的 2-甲氧基甲酰基-4-羟基-7-甲氧基喹啉 4a(其制备方法描述在 WO

00/09543 和 WO 00/09558 中)(1 克, 4.29 毫摩尔)的溶液中。在周围温度下搅拌所得的混合物 1 小时, 然后逐滴加入 MEM 氯化物(455 微升, 4.98 毫摩尔), 并在周围温度下再搅拌所得的混合物 19.5 小时。以 EtOAc(100 毫升)稀释该反应混合物, 以 H₂O(50 毫升)、盐水(50 毫升)冲洗, 用 MgSO₄ 干燥, 在真空下浓缩, 得到粗制反应分离物(1.37 克)。通过急骤柱色层法纯化, 得到无色油状的产物 4b(1.04 克, 75% 产量)。

10 B. 将 THF(3 毫升)加至新近活化的 4A 分子筛(500 毫克)和乙酰氨基脒(248 毫克, 3.35 毫摩尔)的混合物中。在氮气和周围温度下, 搅拌所得的混合物 15 分钟, 然后分批加入 NaH(60% 在矿物油中, 124 毫克, 3.24 毫摩尔)。在周围温度下搅拌所得的悬浮液 1 小时。然后加入在 THF(5 毫升)中的酯 4b(500 毫克, 1.56 毫摩尔)的溶液。将所得的混合物加热回流 1 小时, 然后在硅藻土上过滤, 以 EtOAc 冲洗(3 份 20 毫升), 并在真空下浓缩。通过急骤柱色层法(100% EtOAc), 纯化所得的粗制混合物, 得到白色固体状的产物 4c(352 毫克, 65% 产量)。

15 C. 将 HCl 水溶液(1N, 1 毫升)加至在 THF(4 毫升)中的 MEM 醚 4c(170 毫克, 0.493 毫摩尔)中。在周围温度下搅拌所得的混合物 1 小时, 然后以 NaH₂PO₄ 水溶液(1M, 50 毫升)稀释。过滤所形成的固体, 与 EtOAc 一起研制, 过滤并干燥后得到白色固体状的想要产物(4d)(90 毫克, 71% 产量)。

MS(ES⁺)₂58(M+1), (ES⁻)₂56(M-1)。

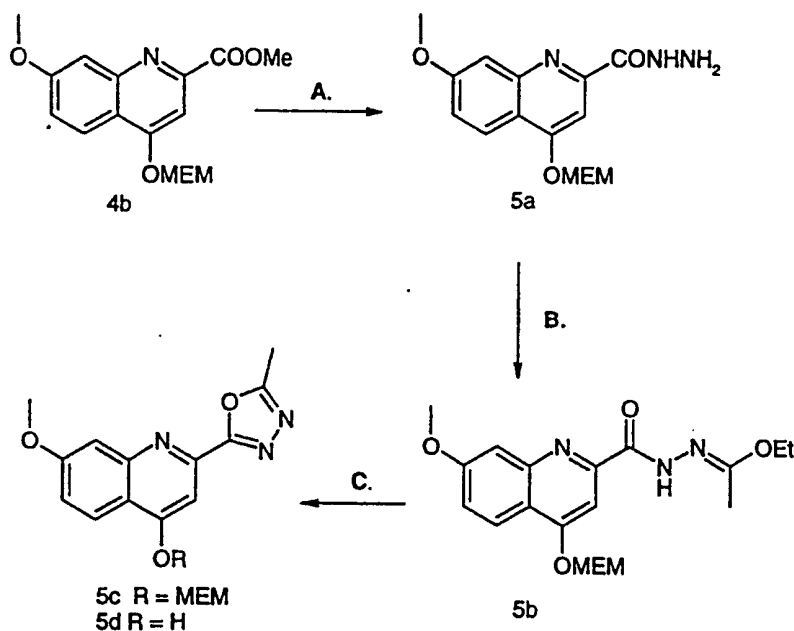
20 ¹H NMR(400MHz, DMSO-d) δ (ppm): 8.03(d, J=9.2Hz, 1H), 7.38(d, J=2.2Hz, 1H), 7.06(d, J=8.6Hz, 1H), 6.85(br. s, 1H), 3.88(s, 3H), 2.64(s, 3H)。

实施例 5

合成 4-羟基-7-甲氧基-2-(5-甲基-1, 3, 4-噁二唑-5-基)喹啉(5e)

25

30



5

10

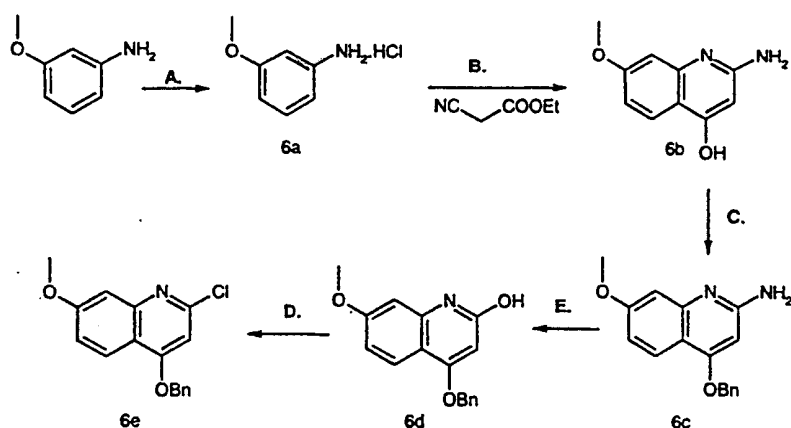
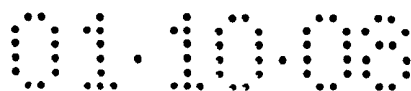
A. 将无水的肼(57 微升, 1.8 毫摩尔)加至在乙醇(5 毫升)中的基质 4b(465 毫克, 1.45 毫摩尔)中。将所得的溶液加热回流 4 小时, 然后在真空下浓缩, 得到黄色固体状的产物 5a(704 毫克, 定量的粗产量), 这样便可在下一个步骤中使用。

15 B. 在氮气下, 将在原乙酸三乙酯(5 毫升)中的化合物 5a(假设为 1.45 毫摩尔)加热至 100-110 $^{\circ}\text{C}$ 。然后以 EtOAc(100 毫升)稀释所得的混合物, 以饱和 NaHCO₃ 水溶液(50 毫升)、盐水(50 毫升)冲洗, 利用 MgSO₄ 脱水, 在真空下浓缩, 并通过急骤柱色层法纯化(100% EtOAc)。获得黄色油状的化合物 5b(359 毫克, 两个步骤的产量为 61%)。MS(ES⁺)392(m+1), (ES⁻)390(m-1)。

20 C. 在高度真空下将化合物 5b(333 毫克, 0.852 毫摩尔)加热至 140 $^{\circ}\text{C}$ 8.5 小时, 并通过急骤柱色层法纯化(100% EtOAc), 得到 5b(116 毫克, 35%, R_f0.5)和 5c(138 毫克, 修正的产量 72%, R_f0.3)的混合物。将 HCl 水溶液(1N, 1 毫升)加至化合物 5c(138 毫克, 0.4 毫摩尔)的 THF(4 毫升)溶液中, 并搅拌所得的混合物直到完全为止(30 分钟)。在真空下蒸发 THF, 并加入 NaH₂PO₄ 水溶液(1M, 2 毫升)。以声波震荡所得的悬浮液, 过滤并在高度真空下使固体脱水, 得到灰色固体状的想要产物 5d(75 毫克, 73%)。MS(ES⁺)₂58(m+1), (ES⁻)₂56(m-1)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d): δ 8.03(d, J=9.2Hz, 1H), 7.39(d, J=2.2Hz, 1H), 7.06(br. d, J=8.6Hz, 1H), 6.85(br. s, 1H), 3.88(s, 3H), 2.46(s, 3H)。

30 实施例 6

合成 4-苄氧基-2-(氯)-7-甲氧喹啉(6e)



5

A. 将在二噁烷(80 毫升)中的可购得的间-氨基苯甲醚(25 克, 0.20 摩尔)冷却至 0℃, 并加入无水的 HCl(4N/二噁烷, 75 毫升, 0.30 摩尔)。然后加入 Et₂O(500 毫升), 并持续搅拌 1 小时。然后过滤灰色的固体, 并在真空下干燥, 得到盐 6a(31.88 克, 98% 产量)。

B. 在该盐中加入氰基乙酸乙酯(21.3 毫升, 0.20 毫摩尔), 并在装有蒸馏头和收集烧瓶的烧瓶中, 将该混合物加热至 280 - 300℃。收集产生的乙醇以监视反应的进程。在收集 9 毫升乙醇时(理论上的含量为 11.7 毫升), 停止加热, 将反应混合物冷却至室温, 以水(200 毫升)-EtOAc(200 毫升)稀释, 然后搅拌并加入 NaH₂PO₄ 水溶液(300 毫升)。在再搅拌 1 小时后, 过滤并干燥, 获得黄色固体状的 6b(19.06 克, 84.5% 纯度, 大约 50% 产量), 这样就可下一个反应中使用。

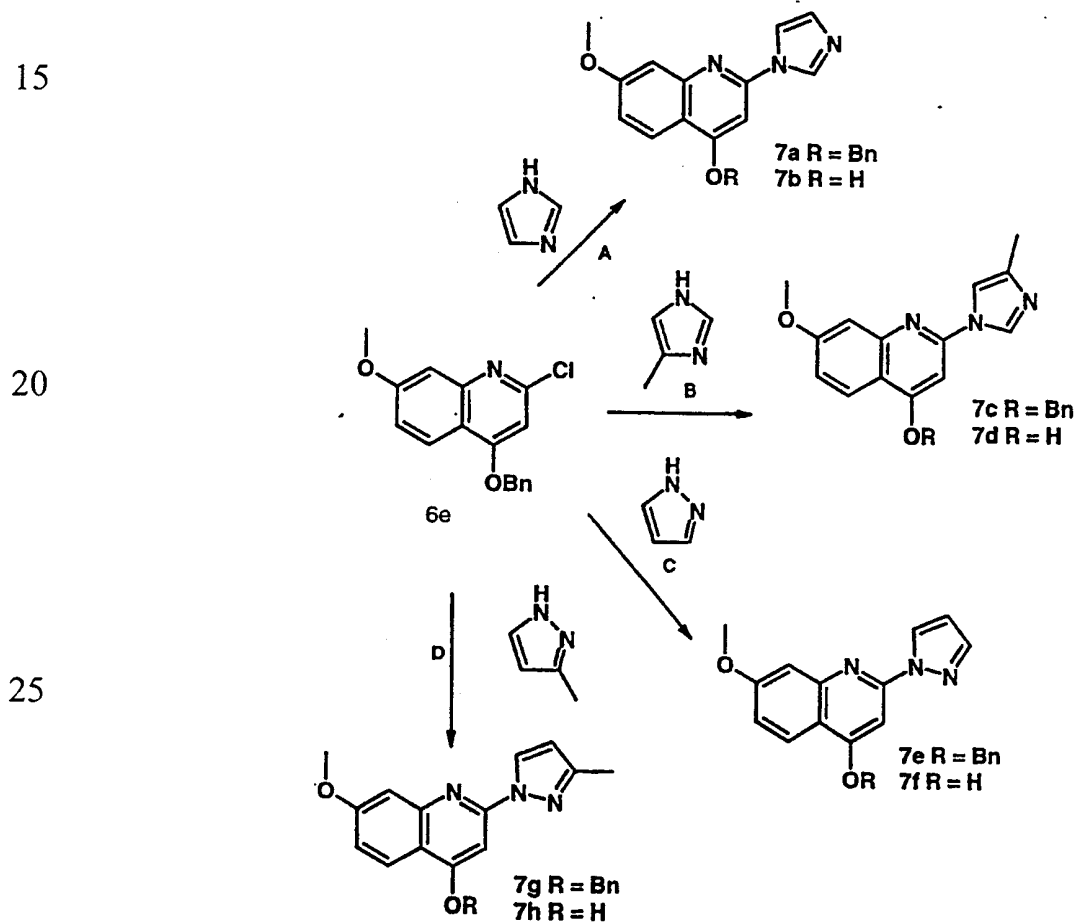
C. 将在 0℃, 在 DMF(100 毫升)中的化合物 6b(11.0 克, 57.8 毫摩尔)加至 NaH(60% 在矿物油中, 2.78 克, 115.6 毫摩尔)中。然后移开冰浴, 并在周围温度下搅拌该混合物 1 小时, 然后加入苄基溴(7.6 毫升, 63.6 毫摩尔), 并搅拌该反应混合物 16 小时。然后以 EtOAc(220 毫升)-己烷(220 毫升)稀释该溶液, 并过滤所形成的固体, 与饱和 NaHCO₃ 水溶液(110 毫升)一起研制, 以水、己烷-EtOAc(1:1 的比例, 100 毫升)冲洗, 并在高度真空下干燥。这样获得黄色固体状的产物 6c(5.6 克, 91% 纯度, 35% 产量)。将亚硝酸异戊酯(3.8 毫升, 28.6 毫摩尔)加至在醋酸(21 毫升)中的化合物 6c(2.67 克, 9.52 毫摩尔)中, 并在周围温度下搅拌所得的混合物, 并通过 HPLC 监测。在 2 小时后加入更多的亚硝酸异戊酯(1.3 毫升, 9.52 毫摩尔), 并在 90 小时内保持搅拌该混合物(HPLC 81% 产物, 3% 基质)。在所得的悬浮液中加入水(100 毫升), 然后过滤。在高度真空下使所收集的棕色固体干燥, 得到产物 6d(2.35 克, 92% 纯度, 72% 产量)。

D. 在化合物 6d(1.5 克, 4.39 毫摩尔)中加入磷酸氯(13 毫升, 141 毫摩尔), 并将所得的混合物加热回流 1 小时, 然后以 EtOAc(150 毫升)稀释, 并在 0 °C 下慢慢地以 NaOH 水溶液(1N, 150 毫升)使其骤冷至 pH9。分离出两层, 并利用 MgSO₄ 使有机层干燥, 并在真空下浓缩, 得到棕色的固体, 通过急骤柱色层法纯化(15% EtOAc/己烷)。获得黄色固体状的产物 6e(819 毫克, 纯度 > 9%, 62% 产量)。

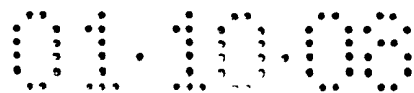
¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ 8.07(d, J=9.2Hz, 1H), 7.50-7.40(m, 5H), 7.29(d, J=2.5Hz, 1H), 7.12(dd, J=9.2, 2.5Hz, 1H), 6.73(s, 1H), 5.26(s, 2H), 3.92(s, 3H)。

10 实施例 7

合成 4-羟基-2-(1-咪唑基)-7-甲氧基喹啉(7b); 4-羟基-2-(4-甲基-1-咪唑基)-7-甲氧基喹啉(7d); 4-羟基-7-甲氧基-2-(1-吡唑基)喹啉(7f); 以及 4-羟基-2-(3-甲基-1-吡唑基)-7-甲氧基喹啉(7h)。



30 A. 将化合物 6e(423 毫克, 1.41 毫摩尔)和咪唑(400 毫克, 5.88 毫摩尔)加热至 110 °C 20 小时。以 EtOAc 稀释该混合物, 然后以水和盐水冲洗, 用 MgSO₄



干燥, 在减低的压力下浓缩, 得到黄色固状的化合物 7a(422 毫克, 96% 纯度, 90% 产量)。吹扫在乙醇(5 毫升)和 THF(5 毫升)的混合物中的化合物 7a(319 毫克, 0.963 毫莫耳)与 Pd(5% /C, 64 毫克), 并放在一大气压的氢气下。在周围温度下搅拌 7.5 小时后, 过滤该反应混合物, 以氯仿-甲醇混合物冲洗并浓缩后, 得到黄色固状的 7b(130 毫克, 97.7% 纯度, 56% 产量)。

MS(ES⁺)242(m+1), (ES⁻)₂40(m-1)。

¹H NMR(400MHz, DMSO-d): δ 8.51(s, 1H), 8.03(d, J=8.9Hz, 1H), 7.93(s, 1H), 7.23(d, J=1.9Hz, 1H), 7.15(s, 1H), 7.12(dd, J=9.2, 2.2Hz, 1H), 6.92(br. s, 1H), 3.91(s, 3H)。

10 B. 将化合物 6e(251 毫克, 0.837 毫摩尔)和 4-甲基咪唑(344 毫克, 4.19 毫摩尔)加热至 110°C 20 小时。然后以 EtOAc 稀释该混合物, 以水和盐水冲洗, 用 MgSO₄ 干燥, 并在减压下浓缩, 得到分别含有 4-甲基和 5-甲基咪唑基异构物的 10:1 混合物的粗产物。通过急骤柱层法(100% EtOAc), 从含有 4-和 5-甲基咪唑基异构物的第二个更具极性的馏份(76 毫克, 23% 产量)中分离出主要假设想要的异构物 11c, 白色固体(166 毫克, 99% 纯度, 57% 产量)。

15 吹扫在乙醇(2.4 毫升)和 THF(5 毫升)的混合物中的化合物 7c(163 毫克, 0.472 毫摩尔)和 Pd(5% /C, 33 毫克), 并放置在一大气压的氢气下。在周围温度下搅拌 18 小时之后, 过滤该反应混合物, 以氯仿-甲醇混合物冲洗, 并浓缩后得到白色固体的 7d(118 毫克, 99% 纯度, 98% 产量)。

20 ¹H NMR(400MHz, DMSO-d): δ 8.42(br. s, 1H), 8.01(d, J=9.2Hz, 1H), 7.64(br. s, 1H), 7.21(br. s, 1H), 7.10(d, J=8.9Hz, 1H), 6.89(br. s, 1H), 3.90(s, 3H), 2.20(s, 3H)。

C. 将化合物 6e(184 毫克, 0.614 毫摩尔)和吡唑(209 毫克, 3.07 毫摩尔)在 110 °C 加热 17 小时。然后以 EtOAc 稀释该混合物, 并以 NaOH 水溶液(1N)和盐水冲洗, 用 MgSO₄ 干燥, 在减压下浓缩, 得到粗产物, 通过急骤柱层法纯化(2:1 己烷-EtOAc), 得到淡黄色固体状的 7e(103 毫克, 50% 产量)。吹扫在乙醇(2 毫升)和 THF(2 毫升)中的化合物 7e(103 毫克, 0.311 毫摩尔)和 Pd(5% /C, 20 毫克), 并放置在一大气压的氢气下。在周围温度下搅拌 5.5 小时后, 过滤该反应混合物, 以氯仿-甲醇混合物冲洗, 并浓缩得到黄色固体状的 7f(77

25 毫克, 99% 纯度, 99% 产量)。MS(ES⁺)242(m+1), (ES⁻)₂40(m-1)。

30 ¹H NMR(400MHz, DMSO-d): δ 8.82(d, J=2.5Hz, 1H), 8.31(s, 1H), 8.00(d,

J=8.9Hz, 1H), 7.83(br. s, 1H), 7.43(br. s, 1H), 7.24(br. s, 1H), 7.10(d, J=8.6Hz, 1H), 6.59(br. s, 1H), 3.90(s, 3H)。

D. 将化合物 6e(217 毫克, 0.724 毫摩尔)和 4-甲基咪唑(594 毫克, 7.24 毫摩尔)在 110℃加热 23 小时。显示该混合物为脱苄基的化合物 7h 和苄基化的化合物 7g 的 1:1 混合物, 然后以 EtOAc(2-3 毫升)稀释, 并过滤后得到纯的脱苄基化的白色固体状的产物 7h(111 毫克, 95% 纯度, 54% 产量)。

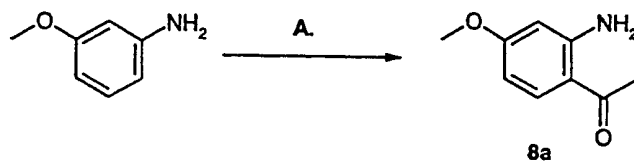
¹H NMR(400MHz, DMSO-d): δ 8.58(d, J=2.6Hz, 1H), 7.98(d, J=9.2Hz, 1H), 7.25(br. s, 1H), 7.20(s, 1H), 7.04(br. d, J=9.2Hz, 1H), 6.38(s, 1H), 3.89(s, 3H), 2.30(s, 3H)。

10 实施例 8

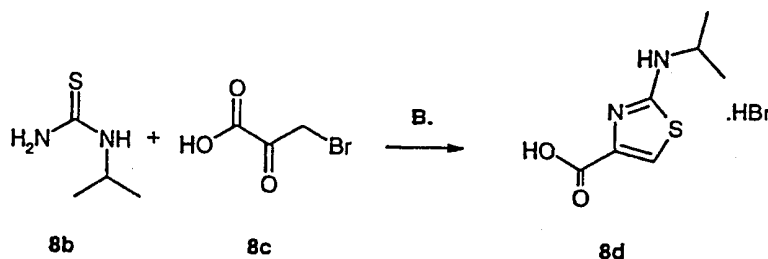
合成 4-羟基-7-甲氧基-2-[4-(2-异丙氨基噻唑基)]喹啉(8f)

注意: [使用相同的合成流程, 其中通过其他的烷基硫脲以置换化合物 8b, 制造各种 2-烷基氨基噻唑基取代基]。

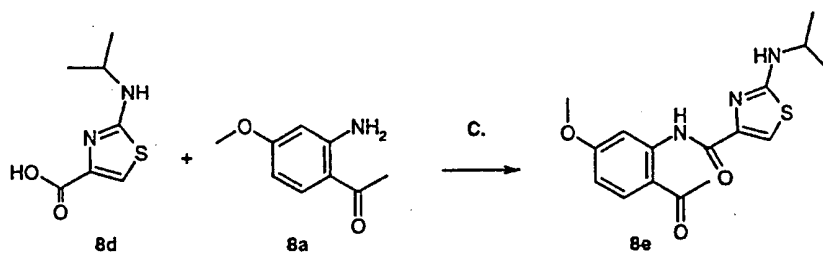
15



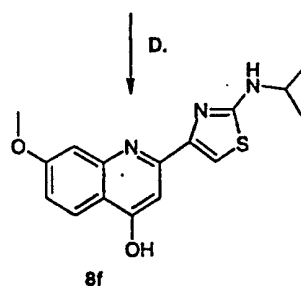
20



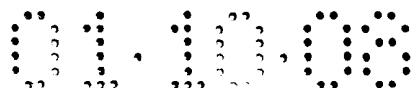
25



30



A. 用于转化间-氨基苯甲醚为 8a 的方案, 与文献: E.J. Brown 等人 J.Med.



Chem. 1989, 32, 807-826 中描述的相同。然而, 修改纯化程序, 以避免通过色层法纯化。利用 MgSO_4 、活性炭和 5% 重量/重量(基于预期的质量)硅胶的混合物来处理含有想要产物的 EtOAc 相。在硅藻土上过滤之后, 将产物与乙醚一起研制。获得纯度 > 99% 的淡棕色固体状的化合物 8a(通过 HPLC 证

5 实)。

B. 将在二噁烷(300 毫升, 0.1M)中的异丙基硫脲(8b, 3.55 克, 30 毫摩尔)和 3-溴丙酮酸(8c, 5 克, 1 当量)的悬浮液加热至 80°C 。当到达 80°C 时, 该溶液变成澄清的, 并不久便沉淀出白色固体状的产物。在加热 2 小时后, 将该溶液冷却至室温, 并过滤白色的沉淀物, 得到高纯度的化合物 8d(> 98%, 由 NMR 证实其纯度)和 94% 的产量(7.51 克)。

10

C. 将在吡啶(150 毫升, 0.12M)中的羧酸 8d(4.85 克, 18.2 毫摩尔)和苯胺衍生物 8a(3 克, 1 当量)的混合物冷却至 -30°C (在冷却时, 澄清溶液中部分变成悬浮液)。在 5 分钟内慢慢地加入磷酸氯(3.56 毫升, 2.1 当量)。在 -30°C 下搅拌该反应物 1 小时, 移开冰浴并容许该反应混合物回温至室温。在 1.5 小时

15

后, 将该反应混合物倒入冰中, 利用 3N NaOH 水溶液将 pH 值调整到 11, 以 CH_2Cl_2 萃取, 再以 MgSO_4 干燥, 过滤并在真空下浓缩。然后通过急骤色层法纯化灰色的固体(45% 在己烷中的 EtOAc), 得到产量 73% 的淡黄色固体状的化合物 8e(6.07 克)。

D. 将在无水 tBuOH(40 毫升, 0.14M, 从 Mg 金属蒸馏)中的 tBuOK(2.42 克, 21.6 毫摩尔)的溶液加热回流。在 5 分钟内分批加入化合物 8e(1.8 克, 5.4 毫摩尔), 并在回流下再搅拌所形成的暗红色溶液 20 分钟(通过 HPLC 监测反应的完成)。将该混合物冷却至室温, 并加入 HCl(4N 在二噁烷中, 1.5 当量)。然后在真空下浓缩该混合物, 以确保除去所有的 HCl 和二噁烷, 并将产物再溶解于 CH_2Cl_2 中两次, 在真空下干烧, 最后获得灰色固体状的化合物 8f 的 HCl 盐(1.62 克, 由 HPLC 得知纯度为 93%)。然后将产物倒入磷酸缓冲溶液(1N NaH_2PO_4 , pH= \sim 4.5)中, 并以声波震荡。过滤灰色固体, 并在真空下干燥, 得到灰色固体状的化合物 8f(1.38 克, 81% 产量)(由 HPLC 得知纯度为 91%)。

20

25

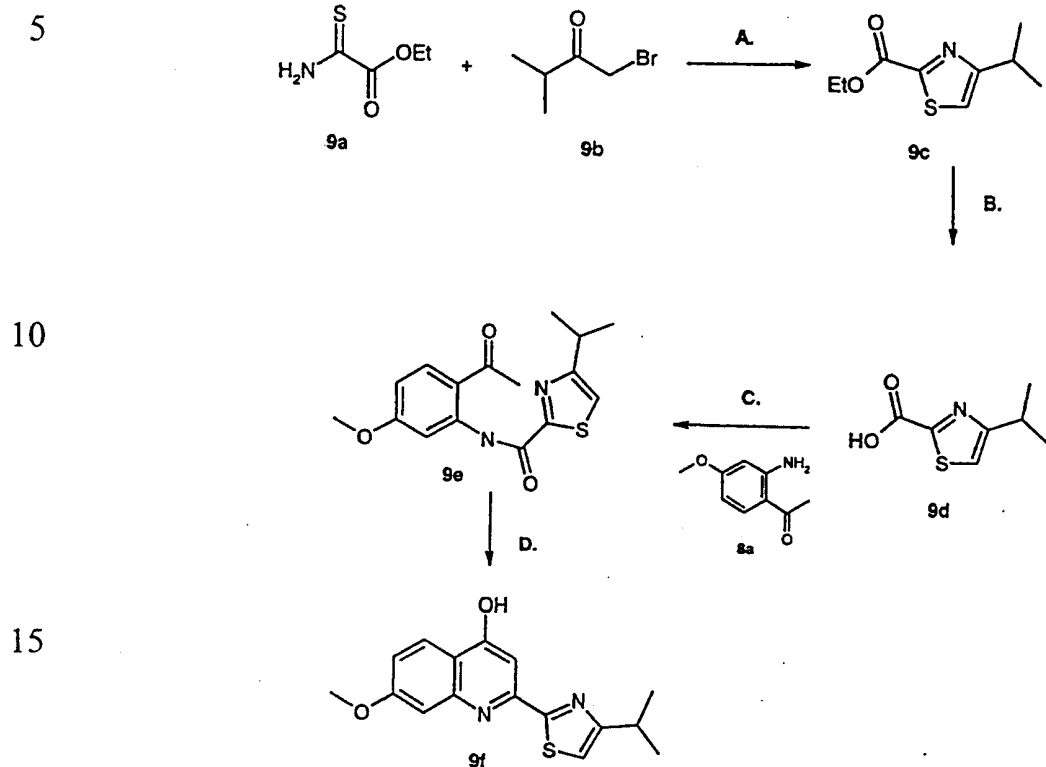
^1H NMR(400MHz, DMSO): δ 8.27(s, 1H), 8.12(d, 1H, J=9.2Hz), 7.97(br. s, 1H), 7.94(s, 1H), 7.43(s, 1H), 7.24(dd, 1H, J=9.2, 2.2Hz), 3.97(m, 1H), 3.94(s, 3H), 1.24(d, 2H, J=6.4Hz)。

30

实施例 9

合成 4-羟基-7-甲氧基-2-[2-(4-异丙基噻唑基)]喹啉(9f)

注：使用同样的合成流程，其中，9b 化合物用其它 2-溴酮代替而制备各种 2-(4-烷基)-噻唑取代基。



A. 将 Br_2 (4.79ml, 93mmol, 1 当量)在 45 分钟期间，在 30°C 滴加到在 MeOH(100ml)中的 3-甲基-丁-2-酮(8 克, 93mmol)。在室温搅拌所得混合物 90 分钟。加入戊烷并用 5% NaHCO_3 水溶液洗涤该溶液，有机相在无水 NaSO_4 上干燥，过滤并真空下浓缩，所得粗制黄色油，化合物 9b，可不用纯化而用于下一步骤。将硫代羧酸乙酯(9a, 1.8g, 13.5mmol)和溴酮衍生物 9b(13.5mmol)在 70°C 搅拌 15 小时。然后真空下浓缩并接着通过急骤柱层法纯化，使用 15% 在己烷中的 EtOAc 作为洗脱液，得到化合物 9c(740 毫克, 28% 产量)。

B. 在室温下以 $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (148 毫克, 3.5 毫摩尔, 1 当量)处理在 THF/MeOH/ H_2O (3:1:1 的比例, 13 毫升)中的化合物 9c(700 毫克, 3.5 毫摩尔)的溶液 5 小时。然后以 0.1N HCl 将 pH 值调到 6，并在真空下浓缩该混合物至干燥，得到 13d，其可直接使用在下一个步骤，不需进一步纯化。

C. 将在吡啶(30 毫升)中的 4-甲氧基-2-氨基-乙酰苯(中间物 8a, 570 毫克, 3.45 毫摩尔)和羧酸衍生物 9d(590 毫克, 3.45 毫摩尔, 1 当量)的溶液冷却至 -20°C 。

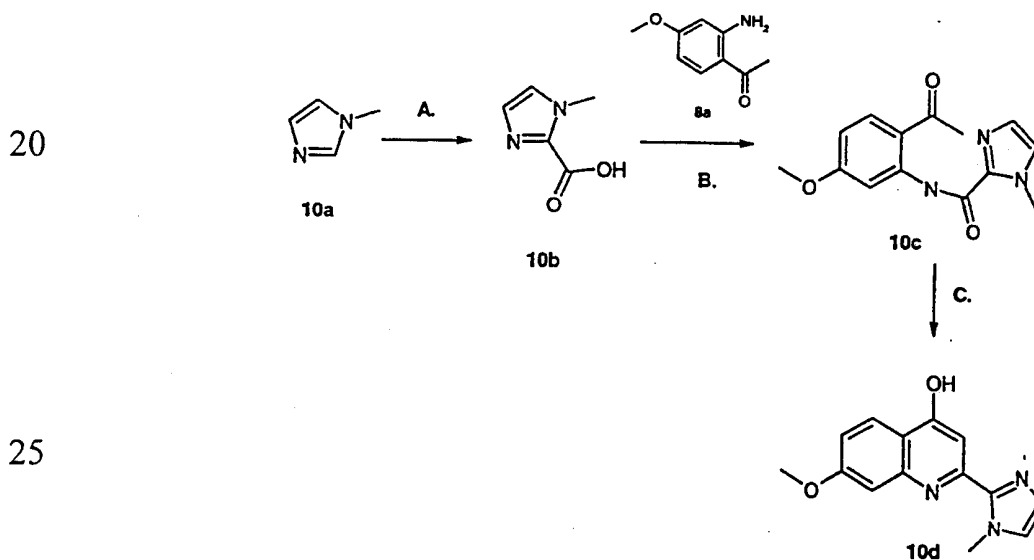
然后在 5 分钟内滴加 POCl_3 (0.35 毫升, 3.79 毫摩尔, 1.1 当量)。在 -10°C 下搅拌所得溶液 2 小时。利用加入另外的 H_2O 使该反应骤冷, 并在真空下浓缩该混合物。将残余物倒入饱和的 NaHCO_3 水溶液中, 并以 EtOAc 萃取。将有机层以 MgSO_4 干燥, 过滤并在真空下浓缩。通过急骤柱色层法纯化粗产物, 使用 25% 在己烷中的 EtOAc 作为洗脱液, 得到白色固体状的化合物 9e (740 毫克, 67% 产量)。

D. 将 tBuOH (518 毫克, 2.1 当量) 加至在无水的 tBuOK (11 毫升) 中的化合物 9e (700 毫克, 2.2 毫摩尔) 的悬浮液中。将所得的混合物加热至 75°C 7.5 小时, 然后将该溶液冷却至室温, 并加入 HCl (4N, HCl , 在二噁烷中, 2.5 毫升) 酸化。在真空下浓缩该混合物, 并将所得的残余物倒入 1N NaH_2PO_4 的溶液并过滤。然后将固体物质与少量的 EtOAc 一起研制, 过滤并在真空下脱水, 得到淡灰色固体状的化合物 9f (270 毫克, 41% 产量)。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6): δ 8.00(br. s, 1H), 7.60(br. s, 1H), 7.51(br. s, 1H), 7.43(br. s, 1H), 7.29(br. s, 1H), 7.14(br. s, 1H), 6.95(br. s, 1H), 3.90(s, 3H), 3.15(m, 1H), 1.33(d, $J=5.4\text{Hz}$, 6H)。

实施例 10

合成 4-羟基-2-(1-甲基-2-咪唑基)-7-甲氧基喹啉(10d)



A. 将在 100 毫升 THF 中的 N-甲基咪唑 10a (5 克, 61 毫摩尔) 的溶液冷却至 -78°C 。在 15 分钟内逐滴加入 $n\text{-BuLi}$ (24.4 毫升的 2.5M/ Et_2O 溶液, 1 当量)。在 -78°C 下搅拌所得的混合物 90 分钟, 然后分批倒在过量的固体 CO_2 上。搅拌该不均匀的混合物 2 小时, 并容许其达到室温。加入 1N HCl 至 pH5, 分

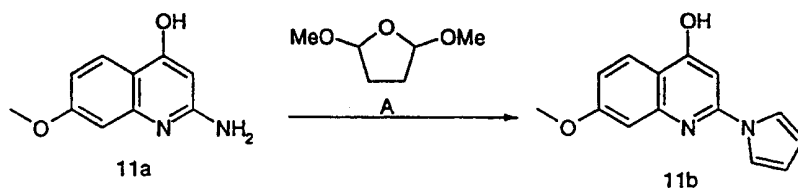
离出水层并冷冻干燥。以 EtOAc 萃取这样获得的残余物(除去盐类), 干燥 (Na₂SO₄), 过滤并在低压下浓缩。获得 6.2 克(80% 产量)的白色固体 10b。

- B. 将在吡啶(10 毫升)中的 4-甲氧基-2-氨基-乙酰苯 8a(394 毫克, 2.39 毫摩尔)和羧酸衍生物 10b(301 毫克, 1 当量)的溶液冷却至 -20℃。在 5 分钟内逐滴加入 POCl₃(244 微升, 1.1 当量)。在 -10℃ 下搅拌所得的溶液 2.5 小时。然后加入水, 并在减压下浓缩该混合物。将残余物倒入饱和的 NaHCO₃ 溶液中, 并以 EtOAc 萃取。将有机相干燥(MgSO₄), 过滤并在减压下浓缩。通过色层法纯化产物, 使用硅胶(25% EtOAc/Hex), 得到 530 毫克的淡黄色固体 10c(81% 产量)。
- 10 C. 将 tBuOK(431 毫克, 2.1 当量)加至在 8 毫升 tBuOH 中的基质 10c(500 毫克, 1.8 毫摩尔)的悬浮液中。然后将所得的混合物在 75℃ 加热 7 小时, 容许该溶液到达室温过夜, 并加入 2.5 毫升 HCl(4N/二噁烷)。在减压下浓缩该混合物, 并以 EtOAc 稀释所得的残余物。加入 1N NaOH, 直到 pH 值为 7。分离有机相, 并干燥(MgSO₄)和过滤, 在减压下浓缩, 得到 145 毫克淡灰色固体状的 10d(31% 产量)。¹H NMR(400MHz, DMSO-d): δ 7.99(d, J=8.9Hz, 1H), 7.49(s, 1H), 7.37(s, 1H), 7.18(s, 1H), 6.92(d, J=8.9Hz, 1H), 6.31(s, 1H), 3.87(s, 3H), 3.84(s, 3H)。

实施例 11

合成 4-羟基-2-(1-吡咯基)-7-甲氧基喹啉(11b)

20

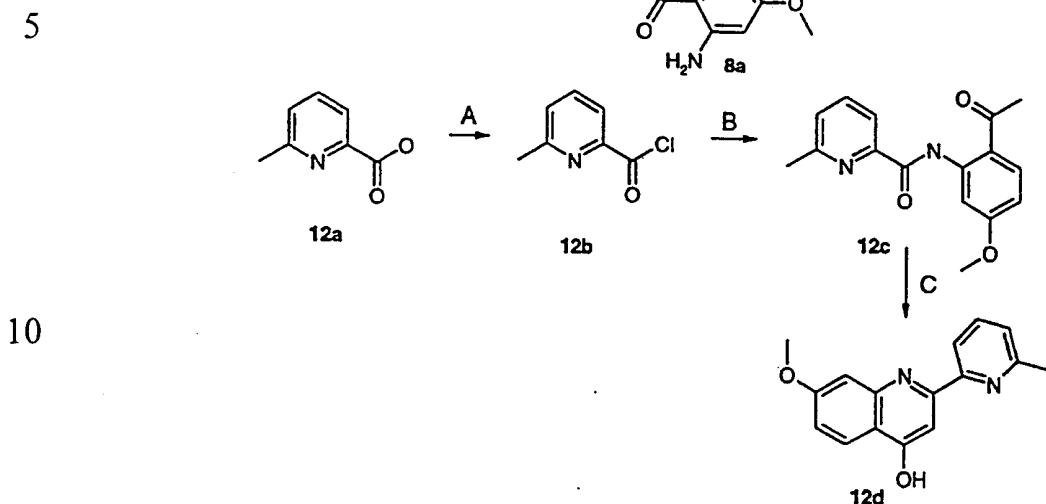


- A. 使在冰醋酸中的基质 11a(在乙醇-THF 中用 5% Pd/C 氢解苄基之后, 从化合物 6c 中获得)(1 克, 5.25 毫摩尔)和 2,5-二甲氧基四氢呋喃(0.68 毫升, 1 当量)的溶液回流 4.5 小时, 并容许达到室温。然后在低压下浓缩该混合物。以甲醇稀释残余物, 并加入 NaOH(水溶液)1N, 直到 pH 为 7。通过色层析法纯化产物, 使用硅胶(3% MeOH/CH₂Cl₂, 将残余物先吸附在硅胶上)。获得 140 毫克(13% 产量)白色固体状的 11b。
- 30 ¹H NMR(400MHz, DMSO-d): δ 7.98(d, J=9.2Hz, 1H), 7.64(s, 2H), 7.18(d, J=2.5Hz, 1H), 7.05(br. d, J=7.9Hz, 1H), 6.88(br. s, 1H), 6.32(s, 2H), 3.90(s,

3H)。

实施例 12

合成 4-羟基-7-甲氧基-2-(6-甲基-2-吡啶基)喹啉(12d)



A. 在苯(5 毫升)中回流 6-甲基吡啶甲酸 12a(411 毫克, 3.0 毫摩尔)和
15 SOCl_2 (0.520 毫升, 7.2 毫摩尔, 2.4 当量)2 小时。在真空下从该反应混合物
中除去溶剂和过量的 SOCl_2 , 并将残余物与戊烷一起研制。滤掉所形成的固
体物质, 并浓缩滤液, 得到酰基氯 12b(500 毫克, 2.6 毫摩尔)。

B. 将在 CH_2Cl_2 (10 毫升)中的苯胺 8a(344 毫克, 2.08 毫摩尔)、DIPEA(1.45
毫升, 8.35 毫摩尔)和 DMAP(61 毫克, 0.5 毫摩尔)的溶液, 加至 0°C 下在
20 CH_2Cl_2 (5 毫升)中的粗制酰基氯 12b 的溶液中。在室温下搅拌该反应混合物
16 小时。在真空下除去挥发性的成分, 将残余物溶解于 EtOAc 中, 并以 5
% NaHCO_3 (2x)、 H_2O 和盐水冲洗该溶液。然后将有机层, 以 MgSO_4 干燥,
并在真空下浓缩。通过急骤柱色谱法纯化该混合物, 使用 EtOAc/己烷(1:2)
作为洗脱液, 得到酰胺 12c(490 毫克, 82%)。

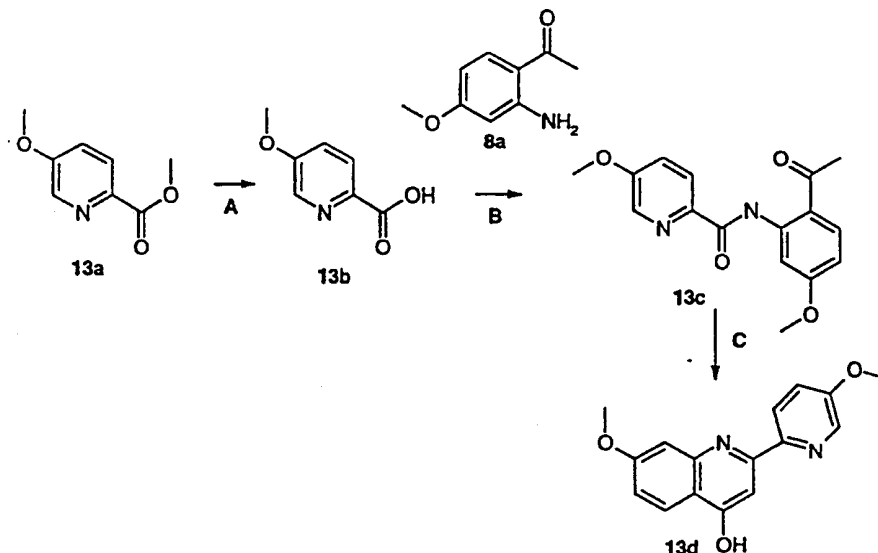
25 C. 将 tBuOK(410 毫克, 3.43 毫摩尔)加至在 t-BuOH(10 毫升)中的酰胺 12c(490
毫克, 1.71 毫摩尔)的悬浮液中, 并在 75°C 下搅拌该混合物 6 小时, 然后在
室温下搅拌 16 小时。然后将该混合物倒入磷酸缓冲溶液(175 毫升, $\text{pH}=7$)
中, 并搅拌 30 分钟。将固体与醋酸乙酯一起研制两次。以盐水冲洗有机相,
以 MgSO_4 脱水, 并在真空下浓缩。将所得的固体与 EtOAc 一起研制, 得到
30 喹啉衍生物 12d(263 毫克, 58%)。 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz})$: δ 2.68(s, 3H),
3.94(s, 3H), 6.85-6.88(2d, $J=8.6\&9.5\text{Hz}$, 2H), 6.94(dd, $J=8.9\&2.2\text{Hz}$, 1H),

7.27(dd, J=6.7&1.9Hz, 1H), 7.73-7.79(m, 2H), 8.28(d, J=8.9Hz, 1H), 10.3(br. s, 1H)。

实施例 13

合成 4-羟基-7-甲氧基-2-(5-甲氧基-2-吡啶基)喹啉(13d)

5



10

15 A. 将 NaOH(2M, 4.70 毫升)加至在 MeOH 中的化合物 13a(623 毫克, 3.73 毫摩尔)的溶液中, 并在室温下搅拌该混合物 2 小时。然后以 HCl(6N, 2.2 毫升)酸化该溶液, 并浓缩后得到化合物 13b, 其直接使用在下一个步骤, 不需纯化。

20 B. 将苯胺 8a(500 毫克, 3.03 毫摩尔)加至在吡啶(25 毫升)中的粗制化合物 13b(大约 3.73 毫摩尔)的溶液中, 并在加入 POCl₃(0.35 毫升, 3.73 毫摩尔)之前, 将该溶液冷却至-25℃。在-10℃下搅拌该反应混合物 1 小时, 然后在 0℃下搅拌 2 小时。然后将该混合物倒入 H₂O 中, 并以 EtOAc 萃取(2-3x)。以 5% NaHCO₃ 和盐水冲洗合并的有机层, 以 MgSO₄ 干燥, 并在真空下浓缩。通过急骤柱色谱法纯化粗制的物质, 使用 EtOAc/己烷(1:2)作为洗脱液, 得到
25 酰胺 13c(617 毫克, 55%)。

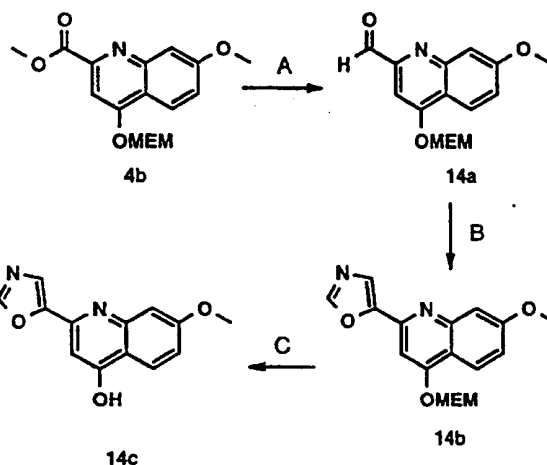
C. 将 tBuOK(490 毫克, 4.11 毫摩尔)加至在无水 t-BuOH(10 毫升)中的酰胺 13c(617 毫克, 2.05 毫摩尔)的悬浮液中, 并在 75℃下搅拌该混合物 6 小时, 然后在室温下 16 小时。将该反应混合物倒入磷酸缓冲溶液(175 毫升, pH=7)中, 并搅拌 30 分钟。过滤所形成的固体物质, 并与 EtOAc 一起研制, 得到
30 喹啉衍生物 13d(250 毫克, 43%)。¹H NMR(DMSO, 400MHz): δ 3.86(s, 3H), 3.94(s, 3H), 6.72(bs, 1H), 6.91(dd, J=8.9&1.9Hz, 1H), 7.54(d, J=1.9Hz, 1H),

7.60(dd, J=8.9&2.9Hz, 1H), 7.97(d, J=8.9Hz, 1H), 8.21(d, J=8.6Hz, 1H), 8.48(d, J=1.9Hz, 1H)。

实施例 14

合成 4-羟基-7-甲氧基-2-(噁唑-5-基)喹啉(14c)：

5



10

- 15 A. 将得自实施例 4 的经保护的喹啉衍生物 4b(3.8 克, 11.8 毫摩尔)溶解于 CH_2Cl_2 (60 毫升)中, 并在于 15 分钟内极慢地加入氢化二异丁基铝(7.9 毫升, 1 当量, 1.5M 在甲苯中)之前, 冷却至 -78°C 。在搅拌 80 分钟之后, 加入另外量的 DIBAL(5.5 毫升, 0.7 当量, 1.5M 在甲苯中)。在 -78°C 下再搅拌 2 小时后, 在 -78°C 下用甲醇(4 毫升)小心地使该反应骤冷, 然后倒入罗谢尔(Rochelle)
- 20 盐(1N 酒石酸 K-Na)的水溶液中。将粘稠的糊状物与 CH_2Cl_2 (300 毫升)一起搅拌 2 小时, 直到澄清为止。分离相, 并将有机相干燥(MgSO_4), 过滤并浓缩后得到白色的固体。通过急骤柱色层法纯化(SiO_2 , 230-400 目), 利用 50% EtOAc/己烷, 得到白色固体状的醛 14a(2.5 克, 73%)。
- 25 B. 将甲苯磺酰基甲基异氰酸(66 毫克, 0.34 毫摩尔)加至在 MeOH(7 毫升)中的 K_2CO_3 (48 毫克, 0.34 毫摩尔)搅拌的悬浮液中。反应混合物在 80°C 加热 16 小时并在真空下浓缩至干。通过急骤色层法(SiO_2 , 230-400 目)纯化, 得到所要求的噁唑 14b(0.089g, 80%)MS:331.0(M+H)⁺。
- 30 C. 将 MEM 保护的氢醌 14b 溶于 THF(3ml)并用 HCl 水溶液(1N, 1ml)处理。反应物在真空下浓缩到干燥前在室温下搅拌 30 分钟。残留物用磷酸盐缓冲液(3ml, 1N 溶液, pH4.5)处理, 并在产物过滤前搅拌, 用蒸馏水洗涤并在高真空下干燥过夜(60°C , 16 小时)。得到棕黄色固体的所要求的羟基喹啉 14c。

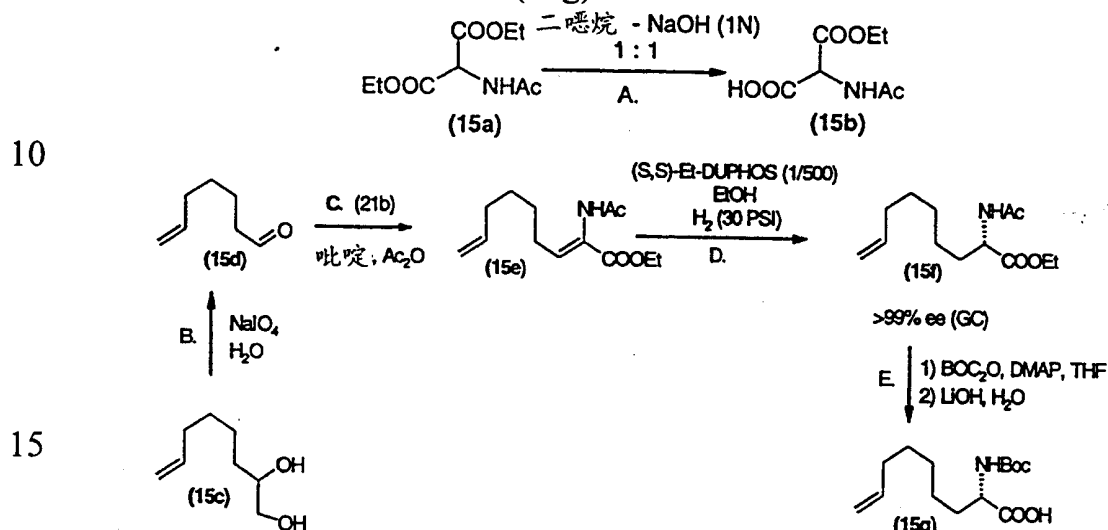
(0.065g, 100%) MS: 242.9(M+H)。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 8.65(s, 1H), 8.02(bs, 1H), 7.97(d, $J=8.9\text{Hz}$, 1H), 7.19(s, 1H), 6.93(d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 6.42(bs, 1H), 3.87(s, 3H), ES(+) MS : m/z 242.9(M+H) $^+$

5 肽连接剂部分(P3)

实施例 15

(2S)-N-Boc-氨基-壬-8-烯酸(15g)



A. 在 30 至 45 分钟内, 将氢氧化钠水溶液(1M, 1 当量, 460 毫升)逐滴加至在二噁烷(500 毫升)中的可购得的 2-乙酰氨基丙二酸乙二酯 15a(100 克, 0.46 摩尔)的溶液中。持续搅拌所得的混合物 16.5 小时, 然后在真空中蒸发二噁烷, 并以三份 300 毫升醋酸乙酯萃取水溶液, 并以浓 HCl 酸化至 pH1。静置该溶液, 使其在冰水浴中形成结晶。在少量结晶出现之后, 以声波震荡该混合物, 并出现丰富的沉淀物。过滤并在真空下浓缩, 得到白色固体状的化合物 15b(62.52 克, 72%)产量。

20

B. 在 20 分钟的期间内, 将过碘酸钠的水溶液(40.7 克, 0.190 摩尔, 1.1 当量, 在 475 毫升 H_2O 中)加至在 1 升圆底烧瓶中的以磁力搅拌的可购得的 7-辛烯-1,2-二醇 15c(25 克, 0.173 摩尔)和 H_2O (100 毫升)的乳液中(轻微放热的)。在室温下再搅拌所得的混合物 1 小时(通过 TLC 证实反应完成)。然后将该混合物倒入分液漏斗中, 并从有机层中分离出水层。以 NaCl 饱和水溶液, 再从有机部分中倒出并分离。合并两个有机份, 利用硫酸钠干燥, 并在棉塞上过滤(在巴斯德吸液管中), 得到化合物 15d(15.135 克, 无色的油, 78% 产量)。

25

30

以 CH_2Cl_2 萃取水溶液, 用无水的 MgSO_4 干燥, 并在真空下浓缩(不需加热, 庚醛沸点 153°C), 得到另外的化合物 15d(1.957 克, 无色的油, 10% 产量)。

总产量 88%。

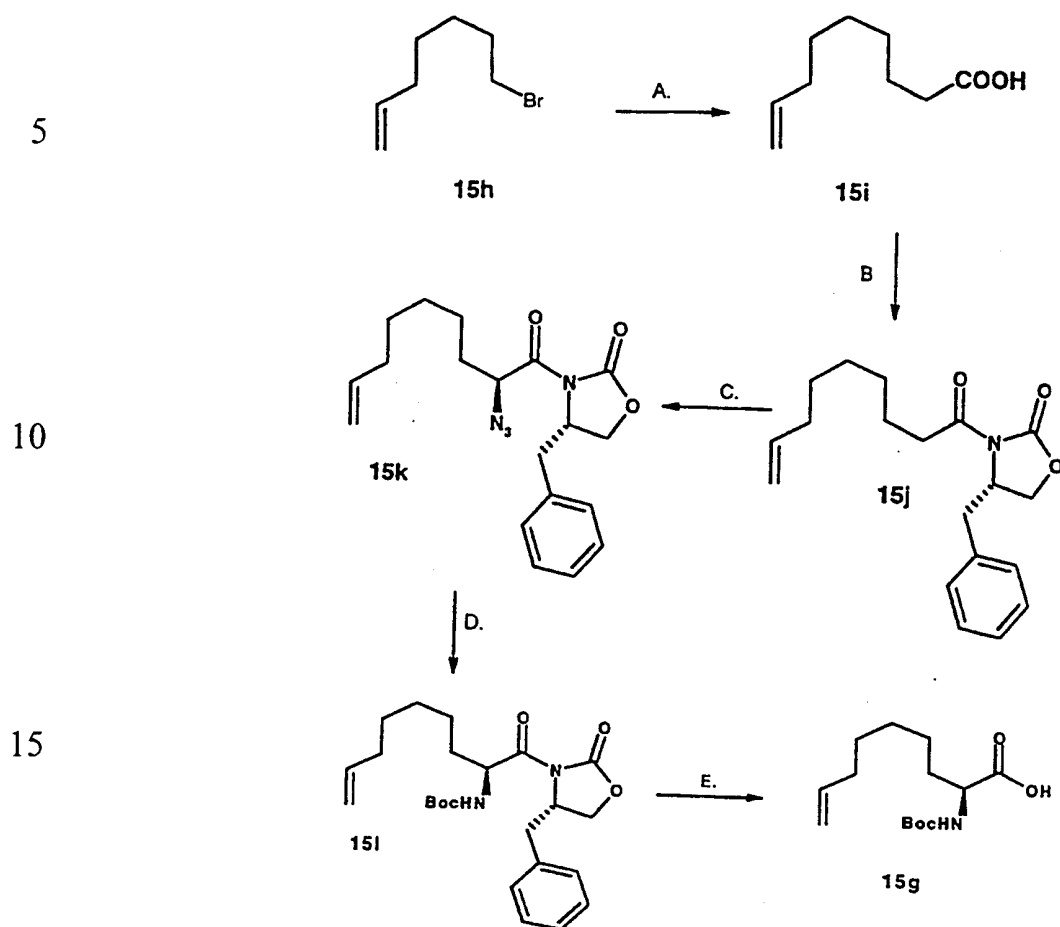
C. 在 1 分钟内，在固体 2-乙酰氨基丙二酸乙酯 15b(7.57 克，40 毫摩尔)中加入在吡啶(32 毫升，10 当量)中的 6-庚醛 15d(4.48 克，40 毫摩尔)溶液。在 10 °C 浴中冷却所得的溶液，并在 4 分钟内加入乙酸酐(12 毫升，3.2 当量)。在室
5 温下搅拌所得的有机溶液，并加入另一部分的 2-乙酰氨基丙二酸乙酯 15b(2.27 克)。在室温下再搅拌所得的混合物 11 小时。然后加入冰(60 毫升)，并搅拌该溶液 1.5 小时，然后以 250 毫升的水稀释该混合物，并以两份乙醚萃取。以 1NHCl、饱和的 NaHCO₃ 冲洗醚的溶液，以 Na₂SO₄ 干燥，浓缩，并通过急骤色层法纯化(EtOAc 40%/己烷)，得到淡黄色油状的化合物 15e(4.8
10 克，50 产量)。

D. 将(S, S)-Et-DUPHOS Rh(COD)OTf(51 毫克，S/C=496)加至在无水乙醇(70 毫升)中的脱气的(使氩气鼓泡 30 分钟)2-乙酰氨基-2, 8-壬二烯酸 Z-乙酯 15e(8.38 克，35 毫摩尔)的溶液中。将该混合物放在 30 磅/平方英寸的氢气下(在 4 次真空-H₂ 循环后)，并在帕尔(Parr)震荡器上搅拌 2 小时。将所得的混
15 合物蒸发至干，获得粗制的化合物 15f，将其使用在下一个步骤中，不需纯化。

E. 将 Boc₂O(13.2 克，2 当量)和 DMAP(740 毫克，0.2 当量)加至在 THF(100 毫升)中的粗制的 2-乙酰氨基-8-壬烯酸(S)-乙酯 15f(7.3 克，30.3 毫摩尔)的溶液中，并将该反应混合物加热回流 2.5 小时。接着，蒸发大部分的 THF 溶剂，
20 以 CH₂Cl₂ 稀释粗混合物，并以 1N HCl 冲洗，以便除去 DMAP。进一步以饱和 NaHCO₃ 水溶液萃取有机层，用无水的 Na₂SO₄ 干燥，并在真空下浓缩。然后以 THF(50 毫升)和水(30 毫升)稀释粗产物，加入 LiOH·H₂O(2.54 克，2 当量)，并在室温下搅拌所得的混合物 25 小时(通过 TLC 证实水解作用的完成)。在真空下浓缩该反应混合物，除去大部分的 THF 溶剂，并以 CH₂Cl₂ 稀
25 释。以 1N HCl 冲洗所得的溶液，用无水的 Na₂SO₄ 干燥，并在真空下浓缩。为了除去少量的不纯物和过量的 Boc₂O，通过急骤色层法纯化粗产物(使用从 100% 己烷-100% EtOAc 的溶液梯度作为洗脱液)。获得淡黄色油状的高纯度的标题化合物 15g(5.82 克，71% 产量)。¹H NMR(DMSO, 400MHz): δ 7.01(d, J=8Hz, 1H), 5.79(tdd, Jt=6.7Hz, Jd=17.0, 10.2Hz, 1H), 5.00(md, Jd=17.0Hz, 1H),
30 4.93(md, Jd=10.2Hz, 1H), 3.83(m, 1H), 2.00(q, J=6.9Hz, 2H), 1.65-1.5(m, 2H), 1.38(s, 9H), 1.35-1.21(m, 6H)。

实施例 15A

另一种(2S)-N-Boc-氨基壬-8-烯酸的合成方法(15g):



20 A. 在 15 分钟的期间内, 将 8-溴-1-辛烯(15h, 2.52 毫升, 15 毫摩尔)逐滴加至在含有二溴乙烷(0.1 毫升)的无水 THF(30 毫升)中的细细切开的 Mg 带(0.55 克, 22.5 毫摩尔)搅拌的悬浮液中[该反应为轻微放热的]。在 30 分钟后, 将该混合物加热至 38℃ 1 小时, 然后在通过插管将其加至过量的固体 CO₂ 之前, 冷却至 -78℃。以二乙醚(100 毫升)稀释该混合物, 并以盐水(2×50 毫升)冲洗该溶液, 以 MgSO₄ 干燥并蒸发。获得粗制的油, 通过色层法在硅胶上纯

25 化, 使用 15% 在己烷中的 EtOAc 作为洗脱液, 得到产量 62% 的化合物 15i(1.44 克)。

¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 1.31-1.42(m, 6H), 1.60-1.69(m, 2H), 2.02-2.09(m, 2H), 2.35(t, J=8.3Hz, 2H), 4.99(dm, J=10.0Hz, 1H), 5.04(dm, J=17.0Hz, 1H), 5.75-5.86(m, 1H)。

30 B. 将新近蒸馏的 Et₃N(1.6 毫升, 11.3 毫摩尔)和新戊酰基氯(1.18 毫升, 9.58 毫摩尔)通过注射器在无水的条件下加至在 -78℃, 在无水 THF(70 毫升)中的

羧酸 15i(1.36 克, 8.7 毫摩尔)的剧烈搅拌的溶液中。在-78℃下搅拌该混合物 15 分钟, 然后在 0℃下搅拌 45 分钟。再将该混合物冷却至-78℃, 然后通过套管送至-78℃、在 THF 中的 4(S)-4-(苯甲基)-2-咪唑烷酮锂盐的无水溶液中, 咪唑烷酮试剂的锂盐是先通过将 n-BuLi(2.00M 在己烷中, 7.85 毫升, 15.7 毫摩尔)慢慢地加至在-78℃, 在 THF 中的咪唑烷酮(2.78 克, 15.7 毫摩尔)的 THF(20 毫升)溶液中来制备。在-78℃下搅拌该反应混合物 15 分钟, 然后在室温下搅拌 1.5 小时。最后, 用硫酸氢钠的水溶液(100 毫升 1M)使其骤冷, 并蒸发 THF 至其原始体积的 3/4。以 EtOAc(2×150 毫升)萃取残余物, 并以 5% NaHCO₃(3×50 毫升)、盐水(2×50 毫升)冲洗混合的有机层, 以 MgSO₄ 干燥并蒸发。在硅胶上层析所得的粗制的油, 使用 15% 在己烷中的 EtOAc, 得到产量 68% 的化合物 15j(1.88 克)。

¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 1.35-1.47(m, 6H), 1.67-1.74(m, 2H), 2.02-2.09(m, 2H), 2.65(dd, J=13.4&9.9Hz, 1H), 2.84-3.02(m, 2H), 3.31(dd, J=13.4&3.2Hz, 1H), 4.13-4.22(m, 2H), 4.62-4.71(m, 1H), 4.93(d, J=10.2Hz, 1H), 5.00(dd, J=17.2&1.6Hz, 1H), 5.75-5.84(m, 1H), 7.18-7.38(m, 5H)。

C. 将在-78℃, 在无水 THF(40 毫升)中的酸衍生物 15j(3.25 克, 10.30 毫摩尔)的溶液以插管注入-78℃, 在无水 THF(50 毫升)中的 KHMDS(0.8M THF, 22 毫升, 17.5 毫摩尔)搅拌的溶液中。在-78℃下搅拌该混合物 45 分钟。将-78℃, 在无水 THF(40 毫升)中的三苯基叠氮化物(trizylazide)(3.67 克, 11.85 毫摩尔)的溶液加至该混合物中。在-78℃下搅拌该混合物 3 分钟, 然后以醋酸(5 毫升)使其骤冷。接着, 在室温下搅拌 1 小时 45 分钟, 最后在 40℃下搅拌 15 分钟。蒸发大部分的 THF。将残余物溶解于 EtOAc(100 毫升)中, 以 H₂O(50 毫升)、5% NaHCO₃(3×50 毫升)和盐水(50 毫升)冲洗有机溶液, (MgSO₄)并蒸发。在硅胶上层析所获得的油, 使用己烷/CH₂Cl₂(1/1)作为洗脱液, 得到化合物 15k(2.47 克, 产量 67%)。

¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 1.32-1.45(m, 6H), 1.45-1.6(m, 1H), 1.75-1.88(2, 2H, 旋转异构物), 2.01-2.11(m, 2H), 2.82-2.87(m, 1H), 3.33(dd, J=13.4&3.2Hz, 1H), 4.10-4.28(m, 2H), 4.62-4.72(m, 1H), 4.90-5.05(m, 3H), 5.73-5.88(m, 1H), 7.17-7.38(m, 5H)。

D. 将在无水 MeOH(20 毫升)中, 0℃的叠氮化物 15k(2.45 克, 6.9 毫摩尔)的溶液, 以插管注入在无水 MeOH(80 毫升)中的无水 SnCl₂(2.61 克, 13.8 毫摩

尔)的搅拌的溶液中。在室温下搅拌该混合物 4 小时。蒸发 MeOH, 并将所获得的泡沫状物质溶解于二噁烷/H₂O(100 微升/20 微升)中, 并以 Boc₂O(3.0 克, 13.8 毫摩尔)和 NaHCO₃(2.89 克, 34.5 毫摩尔)处理(如有需要以较多的 NaHCO₃ 将 pH 值调整到 8), 并在室温下搅拌该混合物 16 小时。蒸发二噁烷的部分(~50%), 并以 EtOAc 萃取残余物两次。以盐水(2×50 毫升)冲洗有机溶液, 干燥并蒸发。在硅胶上层析所得的残余物, 使用 20-25% 在己烷中的 EtOAc 作为洗脱液, 得到化合物 151(1.75 克, 产量 60%)。

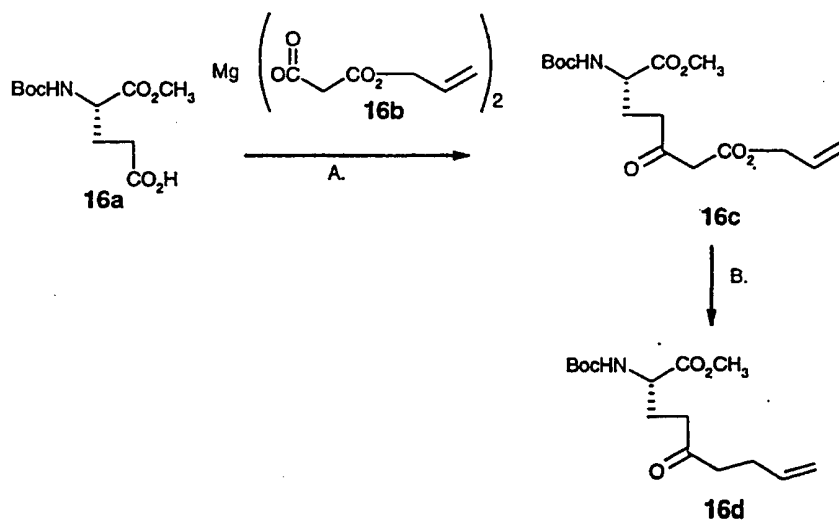
¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 1.27-1.53(m, 6H), 1.46(s, 9H), 1.80(m, 1H), 2.00-2.08(m, 1H), 2.80(t, J=12.1Hz, 1H), 3.34(d, 14.3Hz, 1H), 4.17-4.23(m, 2H), 4.60-4.66(m, 1H), 4.93(d, J=10.2Hz, 1H), 5.05(dd, J=17.2&1.9Hz, 1H), 5.13(bs, 1H), 5.38-5.43(m, 1H), 5.74-5.84(m, 1H), 7.22-7.36(m, 5H)。

E. 将 H₂O₂(30% 体积/重量, 2.05 毫升, 16.2 毫摩尔)和 LiOH·H₂O(0.34 克, 8.1 毫摩尔)加至 90℃, 在 THF/H₂O(75 毫升/15 毫升)中的 N-Boc 衍生物 151(1.74 克, 4.04 毫摩尔)的搅拌的溶液中, 并在 0℃ 下搅拌该溶液 1 小时。

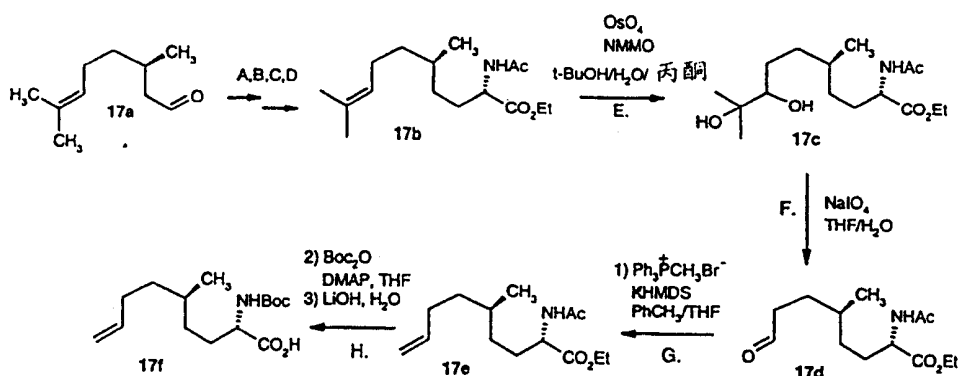
以 Na₂SO₃(2.24 克, H₂O 在中, 15 毫升, 17.8 毫摩尔)使该反应骤冷。利用 10% 柠檬酸水溶液将 pH 值调整到 4-5, 并以 EtOAc 稀释该混合物。以 EtOAc 再萃取水溶液部分一次, 并以盐水冲洗有机溶液两次, 干燥并蒸发。在硅胶上层析残余物, 使用 20% 在 EtOAc 中的己烷作为洗脱液, 得到游离的羧酸 15g(0.76 克, 产量 70%)。该化合物在各方面与在实施例 15 中所获得的相同。

实施例 16

合成(2S)-N-Boc-氨基-5-氧代-壬-8-烯酸甲酯(16d):



5



10 A, B, C, D 首先依据与上面在实例 15 中, 有关将醛 15d 转化为氨基酸中间物 15f 所述相同的合成步骤, 将可购得的(R)-(+)-香茅醛 17a 转化为氨基酸衍生物 17b。

E. 将化合物 17b(0.675 克, 5.6 毫摩尔)溶解于 tBuOH/丙酮/H₂O(1:1:1, 18 毫升)的混合物中, 并放在冰浴(0℃)中。相继加入 NMMO(0.789 克, 6.74 毫摩尔, 1.2 当量)和 OsO₄(2.5 重量/重量, 在 tBuOH 中, 0.7 毫升, 0.067 毫摩尔, 0.012 当量), 并在室温下搅拌该反应混合物 4 小时。通过在真空下蒸发除去大部分的丙酮, 然后以 EtOAc 萃取该混合物。以 H₂O 和盐水进一步冲洗有机层, 以无水的 MgSO₄ 干燥, 并蒸发至干。在使用 1% 在 EtOAc 中的 EtOH 作为洗脱液的急骤柱色层法后, 获得高纯度的二元醇 17c, 产量为 77%(0.575 克)。

F. 在 0℃ 下将 NaIO₄(0.48 克, 2.25 毫摩尔, 1.3 当量)加至在 THF/H₂O(1:1, 20 毫升)中的二元醇 17c(0.575 克, 1.73 毫摩尔)的溶液中, 并在室温下搅拌该反应混合物 3.5 小时。接着通过在真空下蒸发除去大部分的 THF 溶剂, 并以 EtOAc(2 × 100 毫升)萃取剩下的混合物。以 5% 柠檬酸水溶液(2 × 20 毫升)、5% NaHCO₃ 水溶液(20 毫升)和盐水(2 × 50 毫升)进一步冲洗混合的有机层, 然后将 EtOAc 溶液以无水的 MgSO₄ 干燥, 并在真空下蒸发至干。该醛中间物 17d(0.47 克粗产物)可直接使用在下一个步骤中, 不需进一步纯化。

G. 将 KHMDS(0.5M 在甲苯中, 5.2 毫升, 2.6 毫摩尔)加至在无水甲苯(15 毫升)中的 Ph₃PCH₂Br(925 毫克, 2.6 毫摩尔)的溶液中, 并在室温、N₂ 下搅拌所形成的黄色悬浮液 30 分钟。在这段期间之后, 首先将该悬浮液冷却至 0℃, 通过注射器加入醛 17d(0.47 克, 1.73 毫摩尔, 溶解于 15 毫升无水的 THF 中),

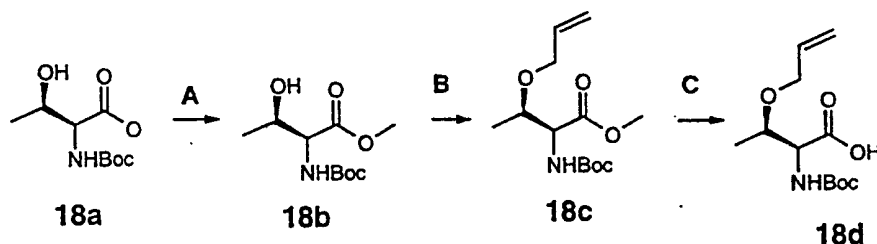
并容许将该混合物加温至室温。在室温下搅拌 1 小时之后，通过真空蒸发除去大部分的 THF，将 EtOAc(100 毫升)加至该混合物中，并以 H₂O(30 毫升)、5 % NaHCO₃ 水溶液(30 毫升)和盐水(30 毫升)冲洗有机层。然后将该 EtOAc 溶液以无水的 MgSO₄ 干燥，并在真空下蒸发至干，在通过急骤柱层法在硅胶上纯化，使用己烷：EtOAc(3:2)作为洗脱液后，分离出纯的化合物 17e，后两个步骤的产量为 63 % (0.29 克)。

乙基酯的水解作用，并同时以 N-乙酰基保护基交换在中间物中的 Boc，得到化合物 17f，是使用与将化合物 15f 转变为 15g 所报导的相同的程序来完成(17f, 310 毫克，定量的)。¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 0.88(d, J=6.4Hz, 3H), 1.18-1.28(m, 2H), 1.35-1.48(m, 3H), 1.45(s, 9H), 1.64-1.74(m, 1H), 1.81-1.89(m, 1H), 1.94-2.12(m, 2H), 4.28(bd, J=~3.2Hz, 1H), 4.83(dm, J=11.1Hz, 1H), 5.00(dm, J=16.8Hz, 1H), 5.74-5.84(m, 1H)。

实施例 18

合成 N-Boc-O-烯丙基-(L)-苏氨酸(18d)

15



20 A. 在 0℃ 下将 Boc-(L)-苏氨酸 18a(500 毫克，2.28 毫摩尔)部分地溶解于 CH₂Cl₂/MeOH(分别为 8 毫升/0.5 毫升)中。慢慢地加入在二乙醚中的重氮甲烷的溶液，直到保留黄色为止，表示过量重氮甲烷的出现。蒸发溶剂时，获得混浊白色油状的粗制的甲基酯 18b(0.534 克)。

B. 然后将中间物 18b(311 毫克，1.33 毫摩尔)溶解于无水的二乙醚(8 毫升)中，加入 Ag₂O(341 毫克，1.47 毫摩尔)和新活化的 4Å 分子筛(1 克)。最后，在反应烧瓶中加入烯丙基碘(134 微升，1.47 毫摩尔)，并在回流下搅拌该混合物。在 20 小时和 30 小时之后，加入两份另外的烯丙基碘(每次 45 微升，0.50 毫摩尔)，并继续搅拌，总共 36 小时。然后通过硅藻土过滤该混合物，并通过急骤柱层法在硅胶上纯化，使用 EtOAc/己烷(1:4)作为洗脱液，得到 73 毫克(27% 产量)澄清油状的化合物 18c。

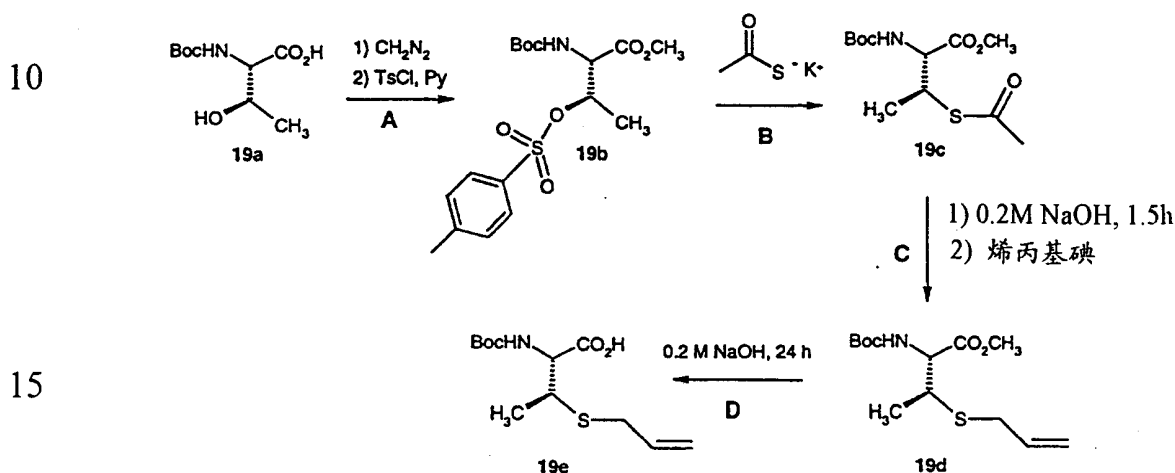
¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 1.21(d, J=6.0Hz, 3H), 1.45(s, 9H), 3.75(s, 3H),

3.82-3.87(m, 1H), 3.99-4.07(m, 2H), 4.29(dd, J=9.5&2.5Hz, 1H), 5.14(dm, J=10.5Hz, 1H), 5.21(dm, J=17.2Hz, 1H), 5.75-5.84(m, 1H)。

C. 将酯化合物 18c(99 毫克, 0.362 毫摩尔)溶解于 THF/MeOH/H₂O(2:1:1, 4 毫升)混合物中, 并加入 LiOH·H₂O(61 毫克, 1.45 毫摩尔)。在室温下搅拌该溶液 2 小时, 然后在真空下除去溶剂前, 以 1N HCl 酸化至 pH~3。使用如此所得的油, 化合物 18d 以合成巨环抑制剂。

实施例 19

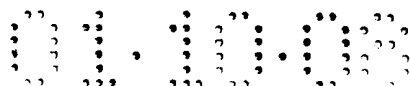
合成(2S, 3S)-N-Boc-2-氨基-3-(巯基烯丙基)丁酸(19e)



A. 将化合物 19a(9.1 毫摩尔)溶解于吡啶(5 毫升)中, 并在冰浴中将该溶液冷却至 0℃, 分成小部分加入甲苯磺酰氯(2.3 克, 11.8 毫摩尔, 1.3 当量), 并在室温下搅拌该反应混合物 24 小时。在这段期间之后, 使该反应混合物分布在二乙醚(300 毫升)和 H₂O(100 毫升)之间。进一步以 0.2M HCl(6×100 毫升)和盐水(100 毫升)冲洗醚层, 以无水的 MgSO₄ 干燥, 过滤并在真空下浓缩至干。通过急骤柱层析法纯化粗制的物质, 使用己烷/EtOAc(梯度从 8:2 到 7:3 的比例)作为洗脱液, 导致分离甲苯磺酰基衍生物 19b, 产量 85%(3.05 克)。

25 B. 将硫代乙酸钾(365 毫克, 3.2 毫摩尔, 1.6 当量)加至在无水 DMF(2.5 毫升)中的中间物 19b(7.75 毫克, 2 毫摩尔)的溶液中, 并在室温下搅拌该混合物 24 小时。然后在真空下蒸发大部分的 DMF, 并使剩下的混合物分布在 EtOAc 和 H₂O 之间。再以 EtOAc 萃取水层, 以盐水冲洗合并的有机层, 以无水的 MgSO₄ 干燥, 并蒸发至干。通过急骤柱层析法纯化粗制的物质, 使用己烷/EtOAc(4:1 的比例)作为洗脱液, 导致分离化合物 19c, 产量 80%(465 毫克)。

30 C. 将 0.2M NaOH(2.4 毫升)的水溶液加至在 H₂O/EtOH(3:5 比例, 8 毫升)中



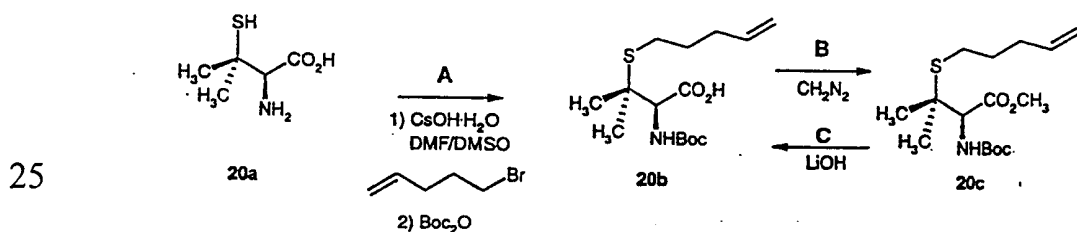
的硫酯 19c(465 毫克)的溶液中,并在室温下搅拌该混合物 1.5 小时。然后加入烯丙基碘(0.292 毫升, 3.2 毫摩尔, 2 当量),并在室温下持续搅拌另外的 30 分钟。将该反应混合物浓缩至其原始体积的一半,然后以 EtOAc 萃取。以冷却的 0.5N HCl 水溶液将液层酸化至 pH \approx 3,并以 EtOAc 反萃取。以盐水冲洗混合的有机层,以无水的 MgSO₄ 干燥,并在真空下蒸发至干。该粗反应混合物含有至少四种产物:在硅胶上,通过使用己烷/EtOAc(梯度从 9:1 到 3:1 的比例)的急骤柱色层法后,分离出全部的产物。极性最低的化合物的结构(TLC R_f=0.68,在己烷/EtOAc 4:1 中),符合想要的产物 19d(83 毫克, 18% 产量)。

5
10 ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 1.24(d, J=7Hz, 3H), 1.46(s, 9H), 3.13-3.19(m, 2H), 3.24-3.29(m, 1H), 3.77(s, 3H), 4.50(dd, J=8.6&3.8Hz, 1H), 5.12(d, J=12.4Hz, 1H), 5.15(dd, J=18.4&1.3Hz, 1H), 5.22(bd, J=7.6Hz, 1H), 5.75-5.85(m, 1H)。

15 D. 在室温下将在 MeOH/H₂O(3:1, 4 毫升)中的甲基酯 19d(83 毫克, 0.287 毫摩尔)的溶液与 NaOH 水溶液(0.2N, 1.3 毫升, 0.26 毫摩尔)混合 24 小时,并在 40 $^{\circ}$ C 下 1 小时。以冷却的 HCl 水溶液(0.5N HCl, 在 0 $^{\circ}$ C 下, pH=4-5)将该反应混合物酸化,在真空下除去 MeOH,并以 EtOAc 萃取剩下的含水混合物。将有机溶液以 MgSO₄ 干燥,并蒸发至干,以获得化合物 19e。最后使用化合物 19e 来合成抑制剂,不需任何进一步的纯化作用。

20 实施例 20

(S)-N-Boc-2-氨基-3-甲基-3-(1-巯基-4-丁烯基)丁酸(20c)



30 A. 将 L-青霉胺 20a(448 毫克, 3 毫摩尔)溶解于 DMF/DMSO(5:1 比例, 6 毫升)中,加入 4-溴戊烯(0.46 毫升, 4.5 毫摩尔, 1.5 当量)和 CsOH \cdot H₂O(1.0 克, 6 毫升, 2 当量),并在室温下搅拌该反应混合物。在 24 小时之后,将 Boc₂O(820 毫克, 3.75 毫摩尔, 1.25 当量)加至该混合物中,并再继续搅拌 12 小时。接

着在真空下除去 DMF，以冷却的 0.5N HCl 水溶液稀释剩下的混合物，调整到 pH=4-5，然后以 EtOAc(2×50 毫升)萃取。以盐水(2x)冲洗有机层，以无水的 MgSO₄ 干燥，并蒸发至干，得到粗制的羧酸 20b。

5 B. 进行 20b 的纯化作用是困难的，因此首先以重氮甲烷处理粗产物，形成相应的甲基酯 20c，然后通过急骤柱色层法纯化，使用己烷/EtOAc(9:1)作为洗脱液，获得 190 毫克(20% 产量)纯的甲基酯 20c。

¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ 1.35(s, 3H), 1.37(s, 3H), 1.44(s, 9H), 1.59-1.67(m, 2H), 2.11-2.17(m, 2H), 2.51-2.60(m, 2H), 3.74(s, 3H), 4.29(d, J=8.6Hz, 1H), 4.98(dm, J=10.5Hz, 1H), 5.03(dm, J=19Hz, 1H), 5.35(bd, J=7Hz, 1H), 5.72-

10 5.83(m, 1H)。

C. 接着将酯溶解于 THF/MeOH/H₂O(2:2:1, 5 毫升)中，加入 LiOH·H₂O(50 毫克, 2.0 毫摩尔, 2 当量)，并在 40℃ 下搅拌该反应混合物 4 小时，将酯 20c 水解回到酸 20b。以 0.5N HCl 将该反应混合物酸化至 pH=4-5，蒸发 THF 和 MeOH 至干，并以 EtOAc 萃取剩下的含水溶液。将 EtOAc 层以无水的 MgSO₄ 干燥，并蒸发至干，得到化合物 20b，将其使用在后续的巨环抑制剂合成作用中，不需进一步纯化。

非环状的二肽和三肽中间物

在溶液中进行的偶联反应的普通程序，及其特定的实例描述在 WO 00/09543 和 WO 00/09558 中。

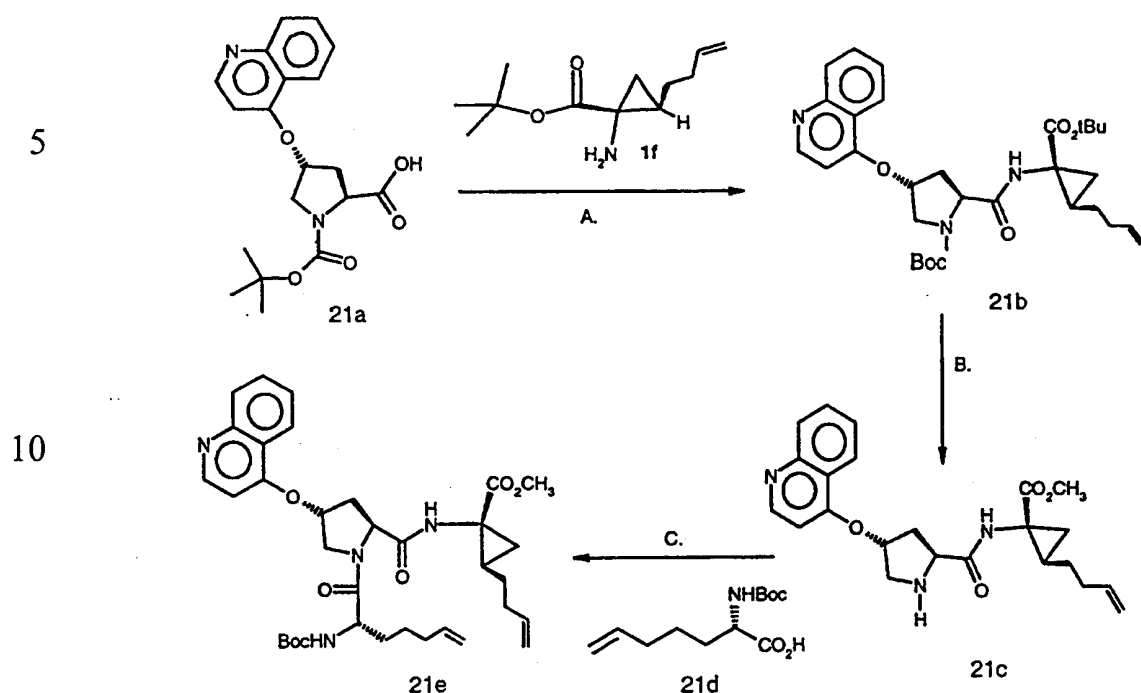
20 已经使用这些程序来合成中间物二肽 26c、30a 和三肽 23a、24a、31a、32a 和 33a。

实施例 21

合成非环状三肽 21e

25

30



- 15 A. 将 NMM(1.21 毫升, 10.05 毫摩尔)和 HATU(1.53 毫升, 4.02 毫摩尔)相继加至在 CH_2Cl_2 (10 毫升)中的脯氨酸衍生物 21a(从可购得的 Boc-4(R)-羟基脯氨酸和 4-氯-喹啉, 按照在 WO 00/09543 和 WO 00/09558 中的描述来制备)(1.32 克, 3.68 毫摩尔)和粗制同烯丙基 ACCA1f(~ 3.35 毫摩尔)的溶液中, 并在室温下搅拌该悬浮液 18 小时。在这段期间之后, 蒸发溶剂, 并将粗制的反应混合物再溶解于 EtOAc(30 毫升)中。以 5% NaHCO_3 水溶液(2×10 毫升)、盐水(10 毫升)冲洗该溶液, 以 MgSO_4 干燥并蒸发之。通过色层法在硅胶上纯化粗产物, 使用 8% 在 EtOAc 中的二乙醚作洗脱液, 得到想要的化合物 21b 的非对映异构物, 产量 20%(未定出绝对立体化学)。

25 $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz})$: δ 0.93&1.01(t, $J=8.3\text{Hz}$, 1H, 比例 3:7 的旋转异构物), 1.14-1.35(m, 2H), 1.44(s, 9H), 1.45(s, 9H), 1.50-1.82(m, 4H), 2.08-2.24(m, 2H), 2.32(bs 0.7H), 2.63(bs, 0.75H), 2.93(bs, 0.75H), 3.16(m, 0.25H), 3.77(bs, 1.5H), 3.88(bs, 0.5H), 4.4-4.55(m, 1H), 4.98(d, $J=10.2\text{Hz}$, 1H), 5.03(dd, $J=17.2\&1.6\text{Hz}$, 1H), 5.24(bs, 1H), 5.75-5.88(m, 1H), 6.57&6.78(2bs, 1H, 2 个旋转异构物), 7.42-7.58(m, 3H), 7.63-7.73(m, 2H), 8.04(d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 8.11(d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 8.74(d, $J=5.1\text{Hz}$, 1H)。

30

B. 将 HCl 在二噁烷中的溶液(4M, 4 毫升)加至在无水 CH_2Cl_2 中的二肽

21b(137 毫克, 0.248 毫摩尔)的溶液中, 并在室温下搅拌该混合物 1.5 小时。然后蒸发溶剂, 并在高度真空下使残余物干燥, 得到游离的氨基酸。将该混合物溶解于二乙醚/MeOH(3 微升/2 微升)中, 并以溶解于二乙醚中稍微过量的重氮甲烷处理。在 30 分钟之后, 利用加入 HCl(4M 在二噁烷中)破坏过量的重氮甲烷, 并将该混合物蒸发至干, 得到化合物 21c 的 HCl 盐, 它可在下一个步骤中使用, 不需任何纯化。

5 C. 将(2S)-N-Boc-氨基-庚-6-烯酸 21d(0.151 克, 0.62 毫摩尔)、NMM(210 微升, 1.91 毫摩尔)和 HATU(0.236 克, 0.62 毫摩尔)相继加至在 CH₂Cl₂(25 毫升)中的粗制的二肽 21c(0.23 克, 0.48 毫摩尔)搅拌的悬浮液中, 并在室温下搅拌该混合物 16 小时(如有需要, 在 1 小时后用 NNM 将 pH 值调整到~8)。蒸发 CH₂Cl₂, 将残余物溶解于 EtOAc(50 毫升)中, 并以 5% NaHCO₃(2×20 毫升)、

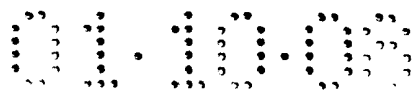
10 盐水(2×20 毫升)冲洗有机溶液, 干燥并蒸发。通过在硅胶上层析所获得的粗产物(50 毫升, 2% EtOH/EtOAc), 得到化合物 21e(0.139 克, 产量 46%)。¹H NMR(CDCl₃, 400MHz, 6:1 的比例的旋转异构物)主要的旋转异构物的化学位移 δ 1.21-1.27(m, 1H), 1.36(s, 9H), 1.45-1.81(4m, 7H), 2.20-2.22(m, 4H), 2.28-2.37(m, 1H), 2.90-2.99(m, 1H), 3.66(s, 3H), 3.94-3.98(m, 1H), 4.29(bd J=9.9Hz, 1H, 4.46-4.50(m, 1H), 4.81(dd, J=8.3&5.4Hz, 1H), 4.92-5.06(m, 4H), 5.16(d, J=8.3Hz, 1H), 5.37(m, 1H), 5.70-5.84(m, 2H), 6.82(d, J=5.1Hz, 1H), 7.47-7.55(m, 2H), 7.71(dt, J=7.0&1.3Hz, 1H), 8.03(d, J=8.6Hz, 1H), 8.17(d, J=8.0Hz, 1H), 8.78(d, J=5.1Hz, 1H)。

巨环的肽类

实施例 22

通过烯炔复分解作用的巨环化作用的一般程序

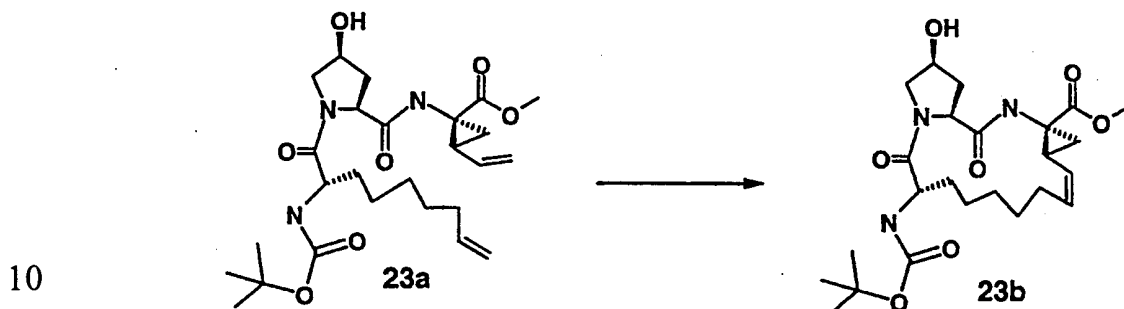
25 在所有情况下, 以 0.01M 的浓度将三肽二烯溶解在 CH₂Cl₂ 中, 并通过氩气鼓泡将该溶液脱氧后(体积 500 毫升大约 1 小时)。加入催化剂的溶液(5-30 摩尔%, 溶解于少量的脱气的 CH₂Cl₂ 中), 并使该反应混合物回流, 直到通过 TLC 和 HPLC 指出所有的起始物质均转化为产物为止。接着将粗制反应混合物浓缩至近干, 并通过硅胶短垫塞过滤, 先以 CH₂Cl₂ 洗脱, 除去大部分催化剂, 然后以 EtOAc 洗脱, 以洗脱全部的巨环产物(们)(大部分时候是单一的非对映异构体)。通过手性 HPLC, 在 CHIRALCEL OJ-R 柱(购自 Chiral Technologies Inc., 0.46 φ × 15cm)上, 在 205 毫微米处使用 70% H₂O+0.06%



TFA-30% CH₃CN+0.06% TFA 的恒溶剂混合物，分析得自每个反应的粗产物。通过 ¹H, COSY, TOCSY 和 ROESY NMR 数据，可完全定出主要巨环产物的特征，以便证实其结构和立体化学。

实施例 23

5 合成巨环的中间物(23b)

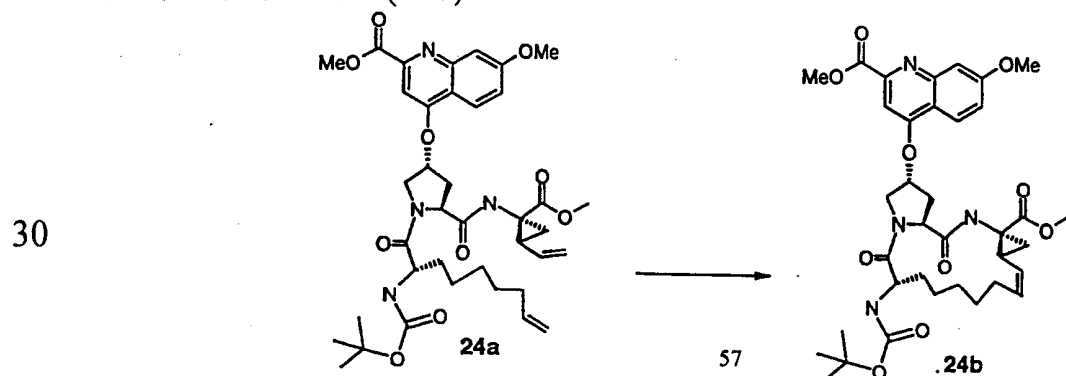


通过使 Ar 鼓泡 2 小时，将在无水 CH₂Cl₂(800 毫升，Aldrich-无水的)中的二烯 23a(4.0 克，7.88 毫摩尔)的溶液脱氧后。加入固体状的哈维达氏(Hoveyda's)催化剂(262 毫克，0.434 毫摩尔，5.5 摩尔%)，并在 Ar 气球形瓶下回流。在 28 小时后，蒸发红-橙色的溶液，成为非晶形的固体，然后通过急骤柱色层法在硅胶上纯化。最初的溶剂系统为 10% 在 CH₂Cl₂ 中的 EtOAc。一旦从该柱中洗脱催化剂，便将溶剂改为纯的 EtOAc。从其颜色证明从柱中洗脱的催化剂。分离出无色泡沫体的巨环产物 23b，将其再溶解于 CH₂Cl₂/己烷(~1:2)中。蒸发溶剂，得到白色的粉末(3.362 克，89% 产量)。

20 ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 1.20-1.50(m, 6H), 1.43(s, 9H), 1.53(dd, J=9.5&5.4, 1H), 1.61-1.70(m, 1H), 1.76-1.90(m, 2H), 2.05-2.26(m, 4H), 2.45(d, J=14.3, 1H), 3.67(s, 3H), 3.71(d, J=11.1, 1H), 3.90(dd, J=11.1&4.3, 1H), 4.43-4.53(m, 2H), 4.76(d, J=8.6, 1H), 4.86(bd, J=9.8, 1H), 5.20-5.23(m, 2H), 5.57(dt, J=7.0&9.8, 1H), 7.32(bs, 1H)。

25 实施例 24

合成巨环的中间物(24b)



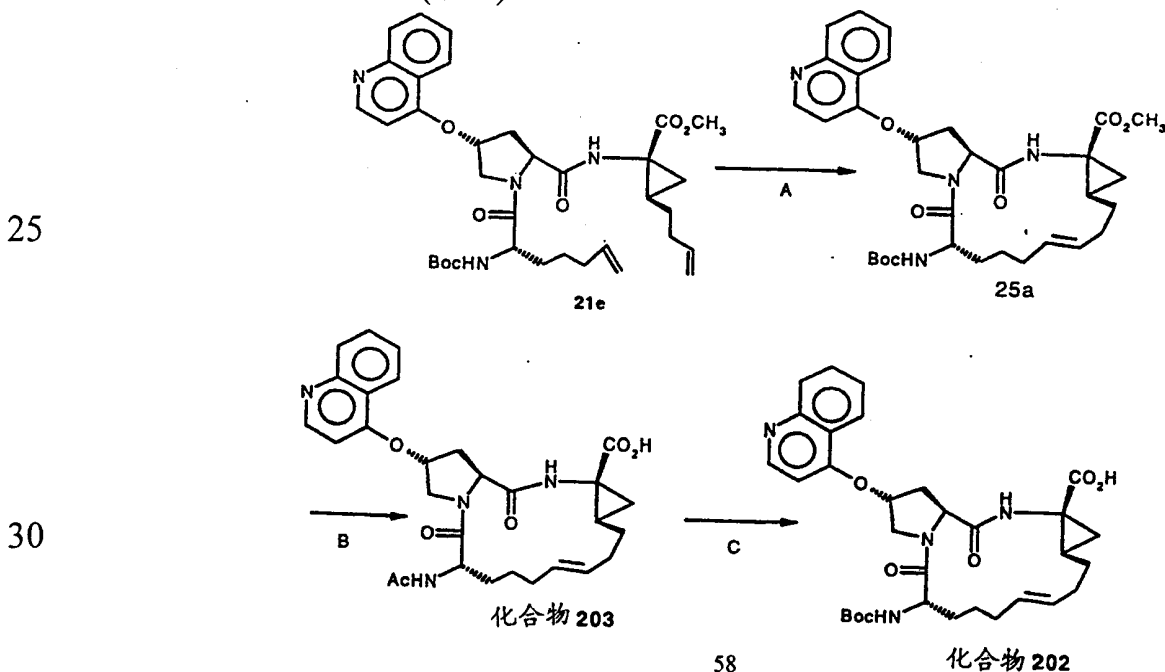
通过 Ar 鼓泡 2 小时，将在无水 CH_2Cl_2 (600 毫升，无水的) 中的二烯 24a (2.76 克，3.82 毫摩尔) 的溶液脱氧。经插管加入在无水并脱气的 CH_2Cl_2 (8 毫升) 中的哈维达催化剂 (117 毫克，0.19 毫摩尔，0.05 当量) 的溶液，并在 Ar 气球形瓶下，回流搅拌该反应。在 20 小时之后，该反应混合物大约完成 50 %，在此时加入第二份催化剂 (117 毫克)，并再继续搅拌 16 小时。然后将该溶液浓缩至约 100 毫升，施加到硅胶垫 (6 × 10 公分) 的上方，并先通过以 CH_2Cl_2 洗脱回收催化剂。利用 3 % 在 EtOAc 中的 MeOH 将化合物 26b 洗出硅胶垫，并通过急骤柱色层法再纯化，使用 EtOAc/己烷 (2:1)，获得 70 % 产量的稍带橄榄色的白色固体 (1.85 克，由 HPLC 得知纯度为 94 %)。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.69 (s, 1H), 8.13 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.50-7.44 (m, 2H), 7.17 (dd, $J=9.2, 2.2\text{Hz}$, 1H), 7.04 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 5.60-5.56 (m, 1H), 5.52 (dd, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 5.25 (dd, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 4.59 (d, $J=11\text{Hz}$, 1H), 4.44 (dd, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 4.05-3.98 (m, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.89-3.82 (m, 1H), 3.55 (s, 3H), 2.64-2.53 (m, 1H), 2.46 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 2.40-2.31 (m, 1H), 2.21 (dd, $J=8.9\text{Hz}$, 1H), 1.78-1.65 (m, 2H), 1.55 (dd, $J=4.8\text{Hz}$, 1H), 1.485 (dd, $J=4.8\text{Hz}$, 1H), 1.41-1.30 (m, 7H), 1.16 (s, 9H)。

MS: es^- : 795.4 (M+H) $^-$ 。

20 实施例 25

合成化合物 202 & 203 (表 2)



A. 在回流下, 使用在 CH_2Cl_2 (毫升) 中的催化含量的双-(三环己基磷)二氯甲基苯钨 IV(格鲁布斯催化剂, 上述)(52 毫克, 0.064 毫摩尔), 将二烯化合物 21e(0.130 克, 0.205 毫摩尔) 环化 2 小时, 在硅胶上层析(50 毫升, 3%

5 EtOH/EtOAc) 后, 得到化合物 25a(60.1 毫克, 产量 48%)。

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3, 400\text{MHz})$: δ 1.22-1.30(m, 2H), 1.35(2, 9H), 1.44-2.35(m, 13H), 3.07-3.14&31.6-3.24(2m, 1H, 比例 1:3 的旋转异构物), 3.69(s, 3H), 3.96-4.04(m, 1H), 4.42-4.50(m, 1H), 4.95-5.04(m, 1H), 5.05-5.15(m, 1H), 5.20-5.30(m, 1H), 5.55-5.65(m, 1H), 6.75-6.79(2d, $J=5.4\text{Hz}$, 1H, 比例 1:3 的旋转异构物), 7.36(s, 1H), 7.46-7.50(m, 1H), 8.03(d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 8.13 & 8.17(2d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H, 比例 1:3 的旋转异构物), 8.77(d, $J=5.1\text{Hz}$, 1H)。

B. 用在 THF/MeOH/ H_2O (4 毫升/2 毫升/2 毫升) 中的 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8.7 毫克, 0.206 毫摩尔) 将巨环化合物 25a(0.0156 克, 0.026 毫摩尔) 的酯部分水解。通过 C18 反相 HPLC, 在 Whatman(Partisil 10, ODS3)50/2.4cm 的柱上, 使用从 5% CH_3CN 水溶液到 100% CH_3CN 的溶剂梯度纯化粗产物, 获得非晶形的白色固体的纯化合物 202(11.8 毫克)。

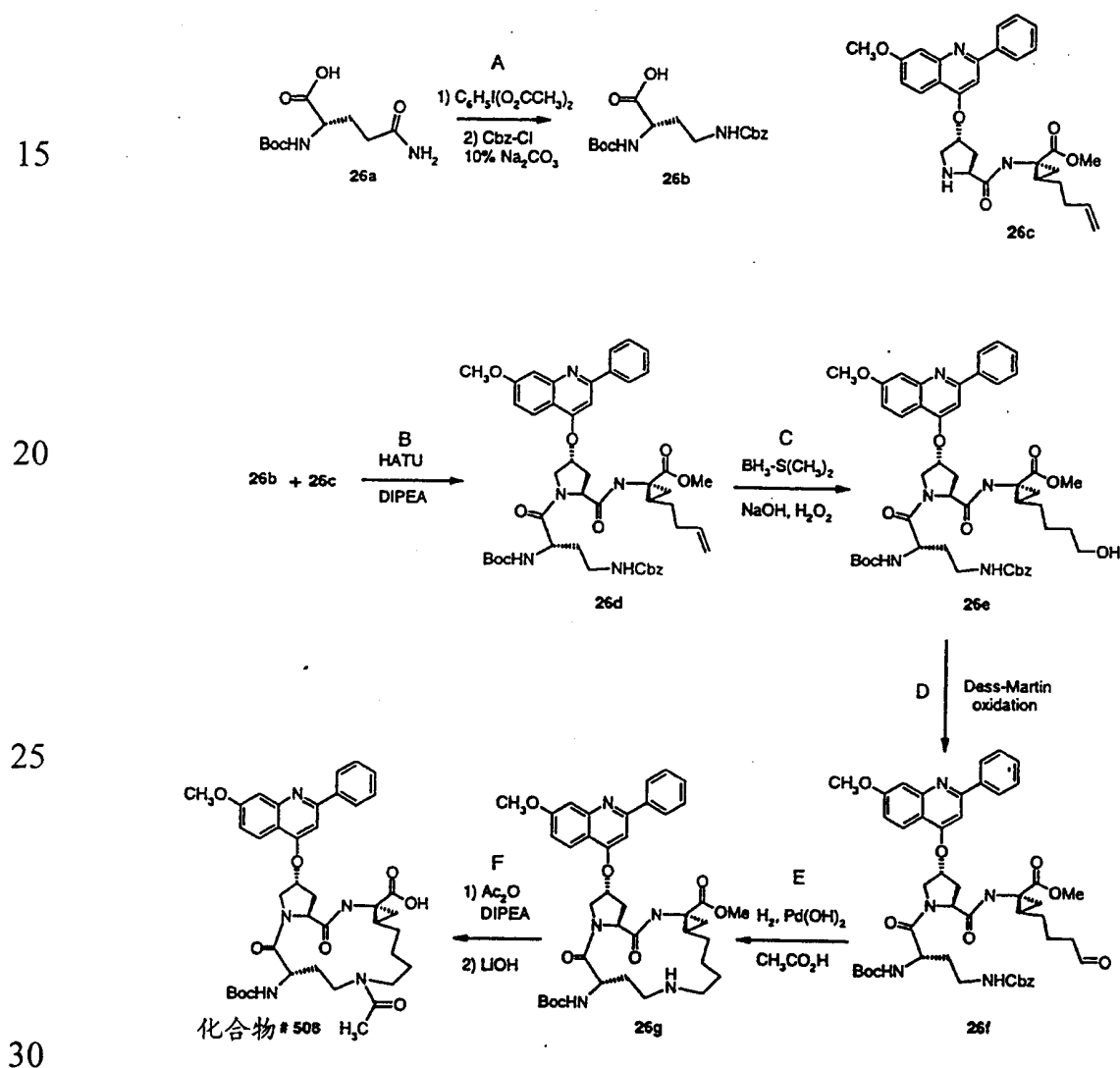
$^1\text{H NMR}(\text{DMSO}, 400\text{MHz})$: δ 1.12(s, 9H), 1.20-1.24(m, 2H), 1.32-1.40(m, 3H), 1.58-1.62(m, 2H), 1.68-1.78(m, 3H), 1.95-2.02(m, 1H), 2.08-2.18(m, 2H), 2.42-2.59(m, 2H), 3.97-4.00(bd, $J=9.8\text{Hz}$, 2H), 4.47(t, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 4.58(d, $J=11.8\text{Hz}$, 1H), 5.22-5.29(m, 1H), 5.46-5.54(m, 1H), 5.66(s, 1H), 7.12(d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 7.49(d, $J=3.5\text{Hz}$, 1H), 7.68(dd, $J=7.3\text{Hz}$, 1H), 7.98(dd, $J=7.0\text{Hz}$, 1H), 8.08(d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 8.21(s, 1H), 8.35(d, $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 9.08(d, $J=5\text{Hz}$, 1H)。

C. 在 4M HCl/二噁烷(5 毫升) 的存在下, 搅拌在无水 CH_2Cl_2 (1 毫升) 中的巨环化合物 25a(20 毫克, 0.033 毫摩尔) 1 小时。蒸发该混合物。并小心地干燥。将残余物再溶解于 CH_2Cl_2 /DMF(3 毫升/1 毫升) 中, 并以 NMM(14.5 微升, 0.132 毫摩尔) 和醋酸酐(7.0 微升, 0.073 毫摩尔) 处理, 并在室温下搅拌 14 小时。蒸发该混合物, 并在高度真空下干燥。然后将残余物溶解于 THF/MeOH/ H_2O (4 毫升/2 毫升/2 毫升) 的混合物中, 并与 $\text{LiOH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11 毫克, 0.264 毫摩尔) 一起搅拌过夜。在利用 1N 冰冷的 HCl 酸化至 pH=3 后分离残余物, 通过 C18 反相 HPLC 纯化, 使用从 0-40% CH_3CN 水溶液(0.06

% TFA)的溶剂梯度, 以便分离非晶形白色固体的纯化合物 203(12 毫克)。
 $^1\text{H NMR}$ (50mM Na_2PO_4 缓冲溶液, pH=6.0, 600MHz): δ 1.22-1.27(m, 2H),
 1.38-1.43(m, 2H), 1.58-1.64(m, 2H), 1.67-1.76(m, 2H), 1.77-1.84(m, 1H),
 1.92-1.99(m, 1H), 2.22-2.08(m, 1H), 2.12-2.27(m, 1H), 2.22-2.27(m, 1H),
 5 2.60-2.67(m, 1H, Pro- β'), 2.83-2.89(m, 1H, Pro- β), 4.32(dd, $J=12.1\&3.5\text{Hz}$,
 1H, Pro- δ'), 4.41(dd, $J=12.1\&7.3\text{Hz}$, 1H), 4.56(bd, $J=8.0\text{Hz}$, 1H, Pro- δ),
 4.62(dd, $J=8.9\text{Hz}$, 1H, Pro- α), 5.40-5.46(m, 1H), 5.55-5.61(m, 1H), 5.73(bs, 1H,
 Pro- γ), 7.41(d, $J=6.3\text{Hz}$, 1H), 7.64(bs, 1H, Acca-NH), 7.80(dd, $J=7.9\text{Hz}$, 1H),
 8.03(dd, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 8.07(d, $J=9.5\text{Hz}$, 1H), 8.16(d, $J=7\text{Hz}$, 1H, AcNH), 8.36(d,
 10 $J=8.3\text{Hz}$, 1H), 8.90(d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H)。

实施例 26

合成化合物 508(表 5)



A. 在 16°C 下搅拌在 $\text{EtOAc}/\text{CH}_3/\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (2:2:1, 60 毫升)中的 Boc-保护的 L-

谷氨酰胺 26a(4.93 克, 20 毫摩尔)二乙酸碘苯酯(7.73 克, 24 毫摩尔 1.2 当量)的溶液 1 小时, 并在 20℃ 下搅拌 3 小时。然后以 H₂O(20 毫升)稀释该反应混合物, 在真空下除去 EtOAc 和 CH₃CN 溶剂, 并以二乙醚(3×50 毫升)和 EtOAc(50 毫升)萃取剩下的含水混合物, 以便除去大部分的杂质。然后将水层(含有胺中间物)浓缩至干, 将剩下的物质再溶解于 10% Na₂CO₃(30 毫升)中, 在冰浴中冷却至 0℃, 并慢慢地加入(~10 分钟)氯甲酸苄酯(3.3 毫升, 20.4 毫摩尔, 1.02 当量)二噁烷(40 毫升)的溶液。在 0℃ 下搅拌该反应混合物 1 小时, 并在室温下搅拌 2 小时。然后以 H₂O(50 毫升)稀释该混合物, 以冷的(~5℃)二乙醚(3×50 毫升)萃取, 以 4N HCl 酸化至 pH=3-4, 并以 EtOAc(3×50 毫升)萃取。将合并的有机层以无水的 MgSO₄ 干燥, 并在真空下蒸发至干。通过急骤柱色层法纯化粗制的物质, 使用 EtOAc/己烷/AcOH(7:2.9:0.1), 获得总产量 43% 的化合物 26b(3.04 克)。

5

B. 将二肽中间物 26c(250 毫克, 0.41 毫摩尔)、化合物 26b(171 毫克, 0.49 毫摩尔, 1.2 当量)和 HATU(185 毫克, 0.49 毫摩尔, 1.2 当量)溶解于 CH₂Cl₂(6 毫升)中, 并加入 DIPEA(0.29 毫升, 1.62 毫摩尔, 4 当量)。在室温下搅拌该反应混合物 14 小时, 然后在真空下蒸发 CH₂Cl₂, 并将粗制的物质再溶解于 EtOAc 中。以 5% NaHCO₃ 水溶液和盐水冲洗该 EtOAc 溶液, 以无水 MgSO₄ 干燥, 并蒸发至干。在通过急骤柱色层法纯化粗制物质, 使用 EtOAc/己烷(4:1)作为脱液后, 获得 98% 产量的化合物 26d(338 毫克)。

15

C. 将在 THF(5 毫升)中的化合物 26d(335 毫克, 0.394 毫摩尔)的溶液冷却至 0℃, 并加入在二甲硫中的 BH₃ 的溶液(0.12 毫升的 10M 溶液, 1.2 毫摩尔, 3 当量)。容许该反应混合物加温至室温, 并搅拌 1 小时。然后再将其冷却至 0℃, 之后在 15 分钟的期间内, 慢慢地加入 NaOH 的水溶液(0.8 毫升的 2.5M 溶液, 1.97 毫摩尔, 5 当量), 接着慢慢地(~15 分钟)加入 H₂O₂ 的水溶液(0.8 毫升的 8.8M 溶液, 6.9 毫摩尔, 17.5 当量)。容许将该反应混合物加温至室温, 并搅拌 1 小时。在这段期间后, 将该反应混合物酸化至 pH~4, 以便使过量的 BH₃ 骤冷, 然后加入 NaHCO₃ 水溶液, 调整到 pH=9-10, 在真空下除去 THF, 并使粗制的物质分布在 H₂O₂ 和 EtOAc 之间。以 EtOAc 再萃取水层, 以盐水冲洗合并的有机层, 以无水的 MgSO₄ 干燥, 并在在真空下蒸发至干。

25

30 通过急骤柱色层法纯化粗制的物质, 使用 EtOAc/己烷/NH₄OH(8:2:0.5)作为洗脱液, 得到产量 57% 的纯化合物 26e(192 毫克)。

D. 将迪斯-马丁(Dess-Martin)高碘酸盐(195 毫克, 97%, 0.33 毫摩尔, 1.5 当量)加至在 CH_2Cl_2 (8 毫升)中的化合物 26e 的溶液中, 并在室温下搅拌该反应混合物 1.5 小时。利用加入 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液(3 毫升的 5% 溶液)使该反应骤冷, 然后加入饱和的 NaHCO_3 水溶液(5 毫升), 并在室温下搅拌该混合物 15 分钟。

5 最后, 以 EtOAc 萃取该反应粗产物, 以 5% NaHCO_3 水溶液和盐水冲洗有机层, 以无水的 MgSO_4 脱水, 并在真空下蒸发, 得到 188 毫克醛 28f, 将其使用在下一个步骤中, 不需进一步纯化。

E. 在 H_2 下, 在大气压下, 搅拌在乙醇(5 毫升)中的化合物 26f(188 毫克, 0.22 毫摩尔)、 $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (38 微升)和 $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (25 毫克)的溶液至室温 16 小时。在这段期间后, 在烧瓶中加入更多的 H_2 气体、 $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (180 毫克)和 $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ (154 微升), 并再继续搅拌 24 小时。然后过滤该混合物, 并将溶剂蒸发至干, 通过急骤柱色谱法纯化粗制的巨环产物, 使用 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ (10:2:1), 获得~30% 产量的化合物 26g(48 毫克)。

10

F. 在室温下搅拌在 CH_2Cl_2 (5 毫升)中的化合物 26g(22 毫克, 0.031 毫摩尔)、DIPEA(27 微升, 0.155 毫摩尔, 5 当量)和醋酸酐(8.7 微升, 0.093 毫摩尔, 3 当量)的混合物 16 小时。然后在真空下除去 CH_2Cl_2 , 加入 $\text{THF}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (2:2:1, 5 毫升)和 $\text{LiOH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (13 毫克, 0.31 毫摩尔, 10 当量)的混合物, 并容许该水解反应在室温下进行 68 小时, 并在 50°C 下 2 小时。然后酸化该反应混合物($\text{pH} \approx 4$), 并通过反相 HPLC 纯化, 获得终产物 508(~6 毫克, 最后两个步骤产量为~26%)。

15

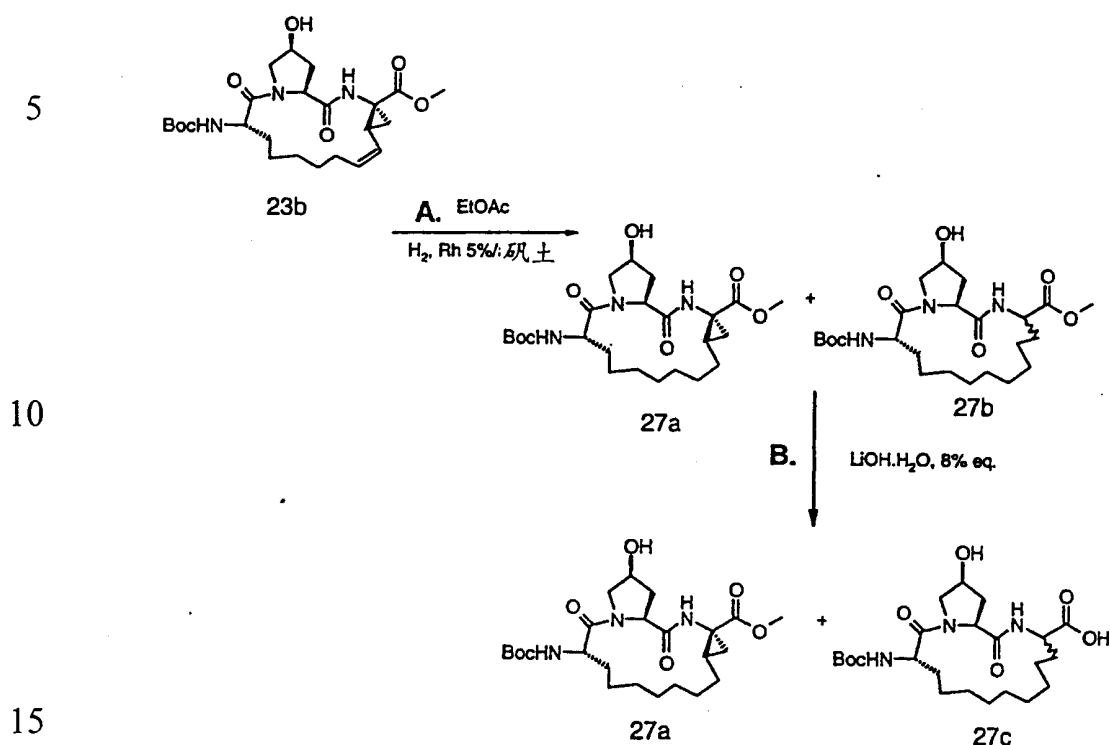
20

508 的 $^1\text{H NMR}$ (DMSO, 400MHz)(通过 COSY、TOCSY 和 ROESY NMR 数据证实为旋转异构物的混合物): δ 1.18(s, 9H), 1.09-1.85(重叠的 m, 11H), 1.95(s, 3H), 2.30(m, 1H), 2.63(m, 1H), 3.18-4.14(重叠的 m, 6H), 3.96(m, 3H), 4.44(m, 1H), 4.62&4.69(2d, $J=11.8\text{Hz}$, 1H, 旋转异构物), 5.82(bs, 1H), 7.20(m, 2H), 7.53(bs, 1H), 7.67(bs, 4H), 8.19(bs, 3H), 8.61(s, 1H)。

25

实施例 27

合成饱和的巨环中间物(27a)



A. 将不饱和的巨环中间物 23b(3.50 克, 7.30 毫摩尔)溶解于 EtOAc(30 毫升)中, 并加入 700 毫克(20% 重量/重量)5% 在矾土上的 Rh。在大气压和室温下, 在 H₂ 气下搅拌该混合物 1.5 小时。在这期间之后, HPLC 分析证实起始物质完全转变为两种产物, 想要的产物 27a 和次要的产物(总质量的 8%), 稍后证实其为化合物 27b, 由环丙烷环的打开而形成。过滤该反应混合物, 并浓缩后, 得到淡绿色的固体(3.47 克)。将该固体与 EtOH 共同蒸发两次, 除去所有的 EtOAc(EtOAc 的存在会干扰下一个步骤)。通过层析法证明分离化合物 27a 和 27b, 是非常困难的, 因此设计另一种基于个别的甲基酯部分的水解作用的相对比率的方法。

B. 将化合物 27a 和 27b 的粗制混合物(3.47 克)溶解于 THF:MeOH(1:1, 20 毫升)中, 加入 LiOH·H₂O 的水溶液(24 毫克在 5 毫升 H₂O 中, 8% 当量), 并在室温下搅拌该反应混合物 16 小时(通过 HPLC 证实副产物 27b 完全水解成其对应的酸 27c)。在真空下浓缩该反应混合物, 以便除去大部分的 THF 和 MeOH, 并分布在 H₂O(100 毫升)和 EtOAc(300 毫升)之间, 以 0.5N NaOH(3 × 100 毫升)、盐水(100 毫升)、10% 柠檬酸水溶液(2 × 100 毫升)、盐水(100

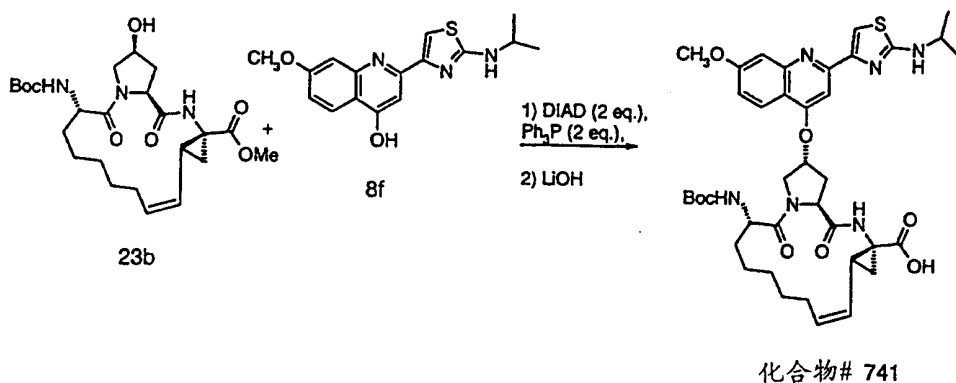
毫升)冲洗有机层, 以无水的 $MgSO_4$ 干燥, 过滤并浓缩至干。获得淡绿色泡沫体的高纯度的想要产物 27a(通过 HPLC 得知 $> 90\%$), 在两个步骤中的总产量为 93% (3.28 克)。

1H NMR(400MHz, $CDCl_3$): δ 1.1-1.38(m, 13H), 1.42(s, 9H), 1.51-1.57(m, 1H), 1.63-1.67(dd, $J=8.0\&5.1$ Hz, 1H), 1.81-1.87(m, 1H), 1.92-1.99(m, 1H), 2.02-2.08(m, 1H), 2.62(d, $J=14$ Hz, 1H), 3.4(d, $J=8.3$ Hz, 1H), 3.65(s, 3H), 4.01(dd, $J=10.8\&4.1$ Hz, 1H), 4.42-4.48(m, 1H), 4.51-4.55(m, 1H), 4.87(d, $J=8.6$ Hz, 1H), 5.14(d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.97(br s, 1H)。

实施例 28

10 合成化合物 # 741(表 7)

15



通过 Mitsunobu 反应, 使喹啉衍生物 8f 连接到预先-形成的巨环化合物 23b 上。使喹啉衍生物 8f(30 毫克, 0.095 毫摩尔)溶解于 THF 中, 然后加入巨环 23b(45.6 毫克, 1 当量)和 PPh_3 (49.8 毫克, 2 当量)。将所得的混合物冷却至 $0^\circ C$ 。然后逐滴加入 DIAD(37.4 微升, 2 当量)。在 $0^\circ C$ 下搅拌该溶液 1 小时, 然后在室温下搅拌过夜。然后以 EtOAc(15 毫升)稀释该混合物, 以饱和的 $NaHCO_3$ 溶液(15 毫升)冲洗, 接着以盐水冲洗。用 $MgSO_4$ 干燥该溶液, 25 过滤并在真空中浓缩。获得 202 毫克黄色的油。通过急骤层析法在硅胶上纯化产物(100% EtOAc)。在纯化后, 该产物仍含有 DIAD 副产物。所得的产物含有 55% 重量/重量的想要产物, 所以宣布产量为 62%。

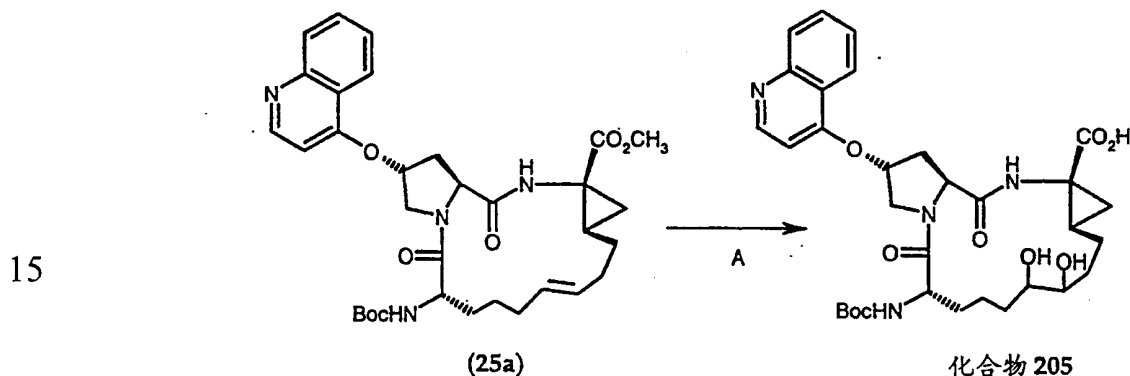
将酯中间物(46 毫克, 0.06 毫摩尔)溶解于 THF/MeOH/ H_2O 的混合物(2:1:1, 2 毫升)中, 加入 $LiOH \cdot H_2O$ (20 毫克, 0.48 毫摩尔), 并在室温下搅拌 30 该溶液。在 16 小时后, 通过 HPLC 分析该反应混合物, 指出水解作用已经完成。在真空下除去有机溶剂, 并将剩下的粗制物质溶解于 DMSO 中, 通过

C18 反相 HPLC 纯化，得到纯的抑制剂 741。

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO-d): δ (ppm): 8.67(s, 1H), 8.29-8.14(m, 2H), 8.08-7.97(m, 1H), 7.91-7.78(m, 1H), 7.74(s, 1H), 7.31-7.20(m, 1H), 7.10(d, J=5.7Hz, 1H), 5.82-5.71(m, 1H), 5.58-5.47(m, 1H), 5.32-5.23(m, 1H), 4.74-4.64(m, 1H), 4.55-4.47(m, 1H), 4.23-4.06(m, 1H), 4.04-3.94(m, 1H), 3.97(s, 3H), 3.92-3.85(m, 1H), 2.70-2.55(m, 2H), 2.53-2.36(m, 2H), 2.20-2.09(m, 1H), 1.80-1.62(m, 2H), 1.56-1.43(m, 2H), 1.27(d, J=3.2Hz, 3H), 1.25(d, J=2.9Hz, 3H), 1.12(s, 9H)。MS:763.1(M+1), 761.1(M-1)。

实施例 29

10 合成化合物 205(表 2)



在 $^{\circ}\text{C}$ 下，将在叔-丁醇中的 OsO_4 的溶液(0.36 毫升的 35% 重量/体积, 0.035 毫摩尔)加至在叔-丁醇/ H_2O (1.5 毫升/1.5 毫升)中的巨环化合物 25a(21 毫克, 0.035 毫摩尔)的溶液中，并在室温下搅拌该混合物 1 小时。以 EtOAc(20 毫升)稀释该混合物，并以 5% NaHCO_3 水溶液(2×10 毫升)、盐水(2×10 毫升)冲洗有机溶液，脱水并蒸发至干。将粗制的化合物溶解于 THF/MeOH/ H_2O (3 毫升/1.5 毫升/1.5 毫升)中，并在 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (13 毫克, 0.28 毫摩尔)的存在下搅拌 16 小时。以 0.5N 冰冷的 HCl 将该混合物酸化至 pH₄，蒸发并通过 C18 反相 HPLC 纯化，使用从 H_2O (0.06% TFA)至 40% CH_3CN 水溶液(0.06% TFA)的溶剂梯度。分离出高纯度，非晶形白色固体的顺式二元醇 205。

25

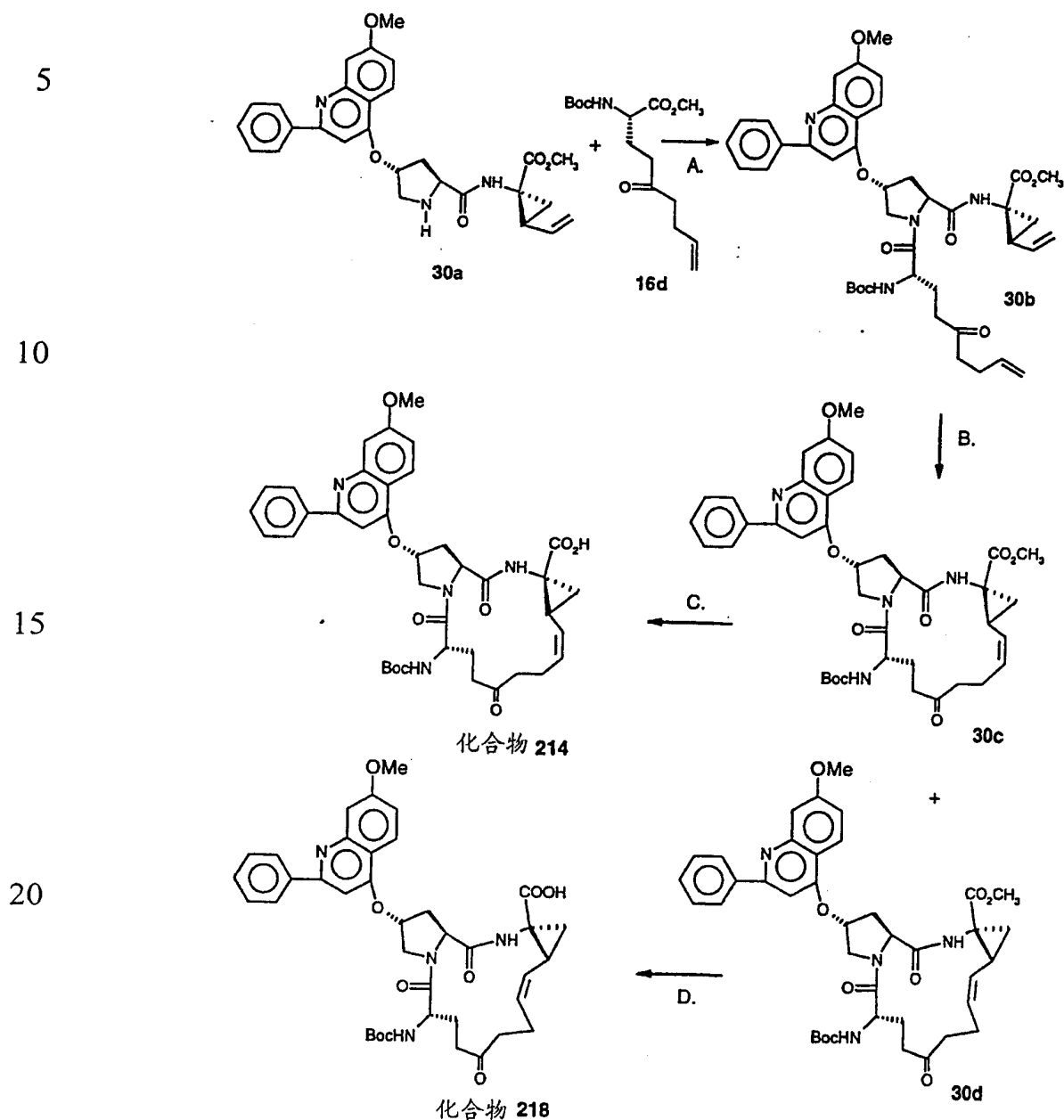
化合物#205: $^1\text{H NMR}$ (DMSO, 400MHz): δ 1.01(s, 9H), 1.06-1.30(m, 9H), 1.48-1.68(m, 3H), 1.78-1.88(m, 1H), \approx 2.2-2.5(2m, 2H), 3.78-3.82(m, 1H), 3.86-3.90(m, 1H), 4.39(t, J=8.9Hz, 1H), 4.61(d, J=11.4Hz, 1H), 5.60(bs, 1H, Pro- γ), 7.03(d, J=6.0Hz, 1H), 7.40(bs, 1H), 7.58-7.62(m, 1H), 7.87-7.91(m, 1H), 8.00(d, J=8.3Hz, 1H), 8.24(d, J=8.6Hz, 1H), 8.60(s, 1H), 8.99(bs, 1H)。

30

EMS(负离子化模式): m/z 625(M-H)⁻.

实施例 30

合成化合物 214&218(表 2)



- 25 A. 在 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (50 毫克, 1.2 毫摩尔) 的存在下, 在室温下搅拌在 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5 毫升/2 毫升) 中的酮-壬烯酸酯 16d (0.180 克, 0.6 毫摩尔) 的溶液 1 小时。以 0.5N 冰冷的 HCl 将该溶液酸化至 pH6, 并蒸发大部分的 MeOH。然后将残余物溶解于 EtOAc (30 毫升) 中, 并以 0.5N 冰冷的 HCl (10 毫升), 盐水 (10 毫升) 冲洗该溶液, 干燥并蒸发。然后将粗制的是残余物再溶解于
- 30 CH_2Cl_2 (10 毫升) 中, 并在 16 小时的期间, 在室温下, 在 HATU (233 毫克, 0.612 毫摩尔) 和 DIPEA (420 微升, 2.4 毫摩尔) 的存在下, 与 P1-P2 片段

30a(0.337 克, 0.6 毫摩尔)反应。在硅胶层上层析该反应混合物, 使用 EtOAc/己烷(1/1)作为洗脱液, 分离出纯的化合物 30b(0.370 克, 产量 83%, 通过 HPLC 得知纯度 > 95%)。

¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 1.41(s, 9H), 1.45-1.54(m, 1H), 1.58-1.62(m, 1H), 1.73-1.77(m, 1H), 1.86-1.91(m, 1H), 2.16(dd, J=17.8&8.6Hz, 1H), 2.26-2.43(2m, 2H), 2.46-2.58(m, 2H), 2.64-2.81(m, 1H), 2.85-2.92&2.95-3.03(2m, 1H, 1:3 的比例的旋转异构物), 3.67(s, 3H), 3.95(s, 3H), 4.10-4.18(m, 1H), 4.20-4.30(m, 1H), 4.40-4.55(m, 1H), 4.80-4.88(m, 1H), 4.92-5.10(m, 2H), 5.14(dd, J=10.2 & 1.6Hz, 1H), 5.24-5.38(m, 4H), 5.42-5.54(m, 1H), 5.68-5.86(m, 2H), 7.04-7.14(m, 2H), 7.42-7.64(m, 5H), 7.92-8.12(m, 3H)。

B. 在 2 小时的期间内, 在回流下, 在 CH₂Cl₂(从 CaH₂ 蒸馏, 并以氩气脱气 30 分钟)中的双-(三环己基膦)二氯甲基苯钨 IV(催化剂(0.125 毫克, 0.15 毫摩尔)的存在下, 将二烯 30b(0.370 克, 0.49 毫摩尔)环化。在硅胶上使用 EtOAc/己烷(3/1)的急骤柱色层法后, 获得立体异构物的混合物形式的化合物(30c 和 30d, 1:1 的比例), 产量 35%(0.124 克)。

混合物 30c&30d 的 ¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 1.44(s, 4H), 1.37(s, 4H), 1.60(m, 2H), 1.83(m, 0.5H), 2.01(m, 1H), 2.09(m, 1H), 2.42(m, 5H), 2.73(m, 2H), 3.26(m, 0.5H), 3.69(s, 1.5H), 3.76(s, 1.5H), 3.96(s, 3H), 4.10(m, 1H), 4.24(m, 0.5H), 4.10(m, 0.5H), 4.58(m, 1H), 4.73(m, 1H), 4.89(m, 0.5H), 4.97(m, 0.5H), 5.30(m, 0.5H), 5.44(m, 2H), 5.64(m, 1H), 7.1-7.0(m, 3H), 7.47(m, 4H), 8.08-7.98(m, 3H)。

C, D. 在室温下, 在 16 小时的期间, 在有 LiOH · H₂O(11 毫克, 0.246 毫摩尔)的 HTF/MeOH/H₂O(1 毫升/0.5 毫升/0.5 毫升)中进行甲基酯 30c 和 30d(24 毫克, 0.033 毫摩尔)的水解作用。在这段期间后, 将该反应混合物酸化至 pH4-5, 并在 C18 反相 HPLC 柱上层析, 使用从 H₂O(0.06% TFA)至 50%的 CH₃CN 水溶液(0.06% TFA)的溶剂梯度。以高纯度(通过 HPLC 得知纯度为 94%)从两种化合物的混合物中, 分离出想要的化合物 214 和 218, 产量 15%(3 毫克)。

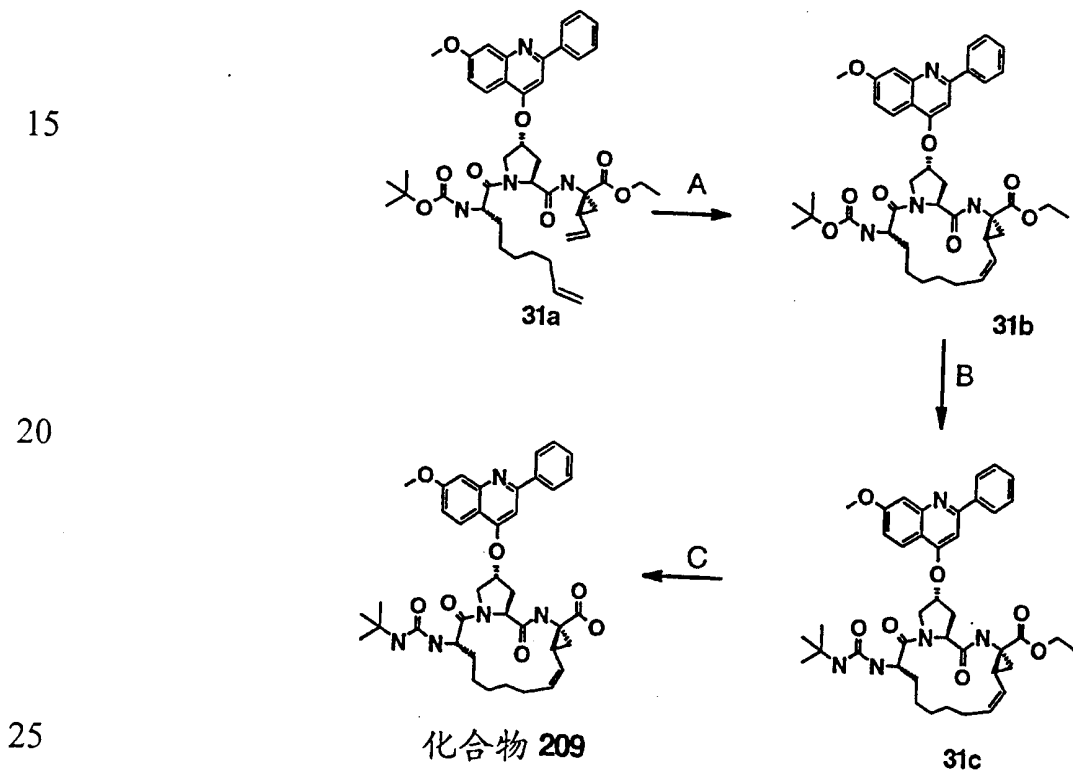
化合物 214: ¹H NMR(DMSO, 400MHz): δ 1.15(s, 9H), 1.48-1.54(m, 2H), 1.65-1.74(m, 1H), 1.77-1.85(m, 1H), 2.12-2.25(m, 4H), 2.27-2.34(m, 1H), 2.61-2.68(m, 1H), 2.87(bt, J=11.5Hz, 1H), 3.92(dd, J=9.2&1.5Hz, 1H, Pro-

δ), 3.97(s, 3H, -OCH₃), 4.14-4.20(m, 1H), 4.52(t, J=7.8Hz, 1H, Pro- α), 4.66(d, J=11.8Hz, 1H, Pro- δ), 5.45(t, J=9.9Hz, 1H), 5.51-5.58(m, 1H), 5.82(bs, 1H, Pro- γ), 7.09(d, J=6.0Hz, 1H, BocNH), 7.26(bs, 1H), 7.53(s, 1H), 7.67(bs, 3H), 8.16(d, J=2Hz, 1H), 8.18(s, 1H), 8.83(s, 1H, ACCA-NH)。

- 5 化合物 218: ¹H NMR(DMSO, 400MHz): δ 1.06-1.10(m, 1H), 1.18(s, 9H), 1.52-1.55(m, 1H), 1.62-1.80(m, 1H), 2.10-2.68(重叠的, 9H), 3.90(bd, J=8.3Hz, 1H), 3.96(s, 3H, OCH₃), 4.20-4.27(m, 1H), 4.58-4.63(m, 1H, Pro- δ), 4.66(dd, J=8.3Hz, 1H, Pro- α), 4.88(dd, J=10.2Hz, 1H), 5.18-5.26(m, 1H), 5.73-5.79(m, 1H, Pro- γ), 7.01(d, J=6.4Hz, 1H), 7.23(bs, 1H), 7.50(bs, 1H), 7.66(bs, 3H), 8.20(bs, 2H), 8.53(s, 1H)。

实施例 31

合成化合物 209(表 2)



- A. 将二烯 31a(249 毫克, 0.330 毫摩尔)溶解于 30 毫升无水的 CH₂Cl₂ 中, 并用氢气将该溶液脱气 15 分钟。将催化剂双-(三环己基膦)二氯甲基苯钨 IV(82 毫克, 0.100 毫摩尔)溶解于 3 毫升无水并脱气的 CH₂Cl₂ 中, 并加至该二烯的溶液中。在 N₂ 下使该反应混合物回流 2 小时。浓缩该溶液, 并通过急骤柱色层法纯化, 获得棕色固体的化合物 31b, 产量 71%(171 毫克)。

¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 1.22-1.44(m, 10H), 1.42(s, 9H), 1.66-1.74(m,

1H), 1.87-1.97(m, 2H), 2.13-2.38(m, 3H), 2.32-2.39(m, 1H), 3.08-3.16(m, 1H), 3.41(s, 3H), 4.07-4.22(m, 3H), 4.28-4.34(m, 1H), 4.58-4.64(m, 1H), 4.95-4.99(m, 1H), 5.22-5.29(m, 2H), 5.38-5.43(m, 1H), 5.48-5.56(m, 1H), 7.00-7.12(m, 3H), 7.43-7.55(m, 4H), 7.97-8.11(m, 3H)。

5 ES(+)^{MS}: m/z 727.4(M+H)⁺。

B. 在 HCl 的溶液(1 毫升在二噁烷中的 4N)中, 搅拌化合物 31b(0.117 毫摩尔)30 分钟, 并浓缩至干。将固体溶解于 CH₂Cl₂(2 毫升)中, 相继加入 Et₃N(82 微升, 0.585 毫摩尔)和异氰酸叔-丁酯(35 毫克, 0.351 毫摩尔)。在室温下搅拌 20 小时后, 将该混合物浓缩至干, 并将粗制的化合物 31c 用于最后的水解步骤, 不需进一步纯化。

10

D. 将化合物 31c(85 毫克, 0.117 毫摩尔)溶解于 THF/MeOH/H₂O(2 毫升/1 毫升/1 毫升)中, 加入 LiOH·H₂O(39 毫克, 0.936 毫摩尔), 并在室温下搅拌该溶液 20 小时。在这期间后, 加入醋酸(1 毫升), 并浓缩该溶液以除去 MeOH 和 THF。在通过 C18 反相 HPLC 纯化粗制品后, 分离出纯的化合物 209(25 毫克, ~31 产量)。

15

¹H NMR(MDMSO, 400MHz): δ 1.04(s, 9H), 1.15-1.24(m, 2H), 1.30-1.40(m, 5H), 1.44-1.51(m, 2H), 1.54-1.68(m, 1H), 1.75-1.88(m, 1H), 2.18(dd, J=17.2&8.5Hz, 1H), 2.32-2.45(m, 1H, Pro-β), 2.54-2.62(m, 1H), 2.65-2.68(m, 1H, Pro-β), 3.91(dd, J=11.1&3.5Hz, 1H, Pro-δ), 3.96(s, 3H, -OCH₃), 4.17-4.23(m, 1H), 4.47(dd, J=8.6, 1H, Pro-α), 4.67(bd, J=7.9Hz, 1H, Pro-δ), 5.30(dd, J=9.5Hz, 1H), 5.52(bdd, J=19&8.3, 1H), 5.68(s, 1H), 5.78(bs, 1H, Pro-γ), 5.94(bs, 1H), 7.21(bs, 1H), 7.51(bs, 1H), 7.66(bs, 4H), 8.19(s, 2H), 8.40(d, J=7Hz, 1H), 8.61(s, 1H, ACCA-NH)。

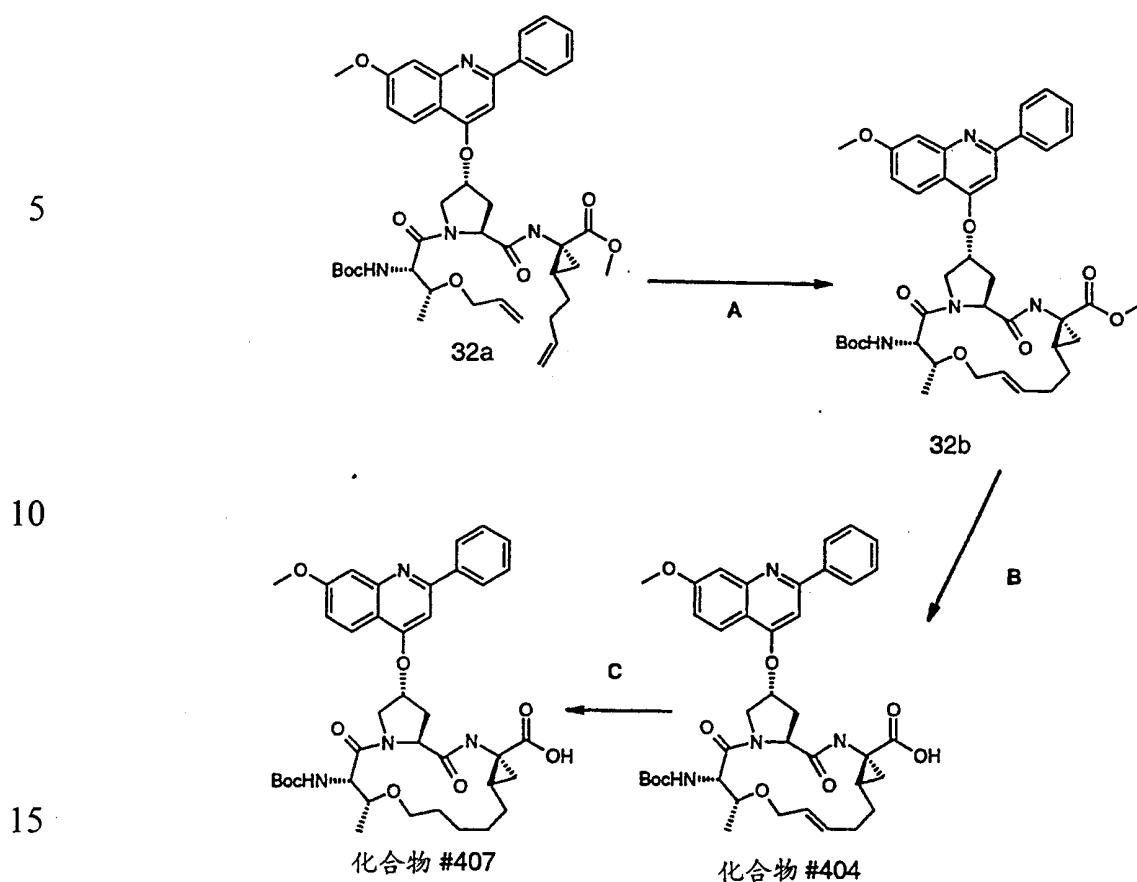
20

ES(+)^(MS): m/z 698.3(M+H)⁺。

25 实施例 32

合成化合物 # 404 和 # 407(表 4)

30



A. 将二烯 32a(84 毫克, 0.11 毫摩尔)溶解于无水的 CH_2Cl_2 (11 毫升)中, 并在 15 分钟期间用氩气流将该溶液脱气。首先将双-(三环己基膦)二氯甲基苯钉 IV 催化剂(19 毫克, 0.023 毫摩尔)溶解于 1 毫升脱气的 CH_2Cl_2 中, 然后经由插管将其输送至反应烧瓶中。在回流下搅拌该反应混合物 2 小时。然后在真空下除去溶剂, 并通过急骤柱层法, 在硅胶上纯化该反应混合物, 使用 EtOAc/己烷(1:1)作为洗脱液, 得到黄色油状的巨环化合物 32b(33 毫克, 41% 产量)。

20

B. 将酯中间物 32b(33 毫克, 0.045 毫摩尔)溶解于 THF/MeOH/ H_2O (2:1:1 的比例, 2 毫升)的混合物中, 加入 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (8 毫克, 0.18 毫摩尔), 并在室温下搅拌该溶液。16 小时后, 通过 HPLC 分析该反应混合物, 指出水解作用未完成。因此加入另外量的 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4 毫克, 0.09 毫摩尔), 并在室温下搅拌该溶液, 总共 36 小时。最后, 以小等份的醋酸将该溶液酸化, 在真空下除去有机溶剂, 并通过 C18 反相 HPLC 纯化剩下的粗制物质, 得到纯的抑制剂 404。

25

30 ^1H NMR(DMSO, 400MHz): δ 1.21(d, $J=6.0\text{Hz}$, 3H, Me), 1.36(s, 9H, Boc), 1.1-1.4(3m, 3H), 1.66(m, 1H), 1.80(m, 1H), 2.10(m, 2H), 2.57(m, 2H), 3.90(m,

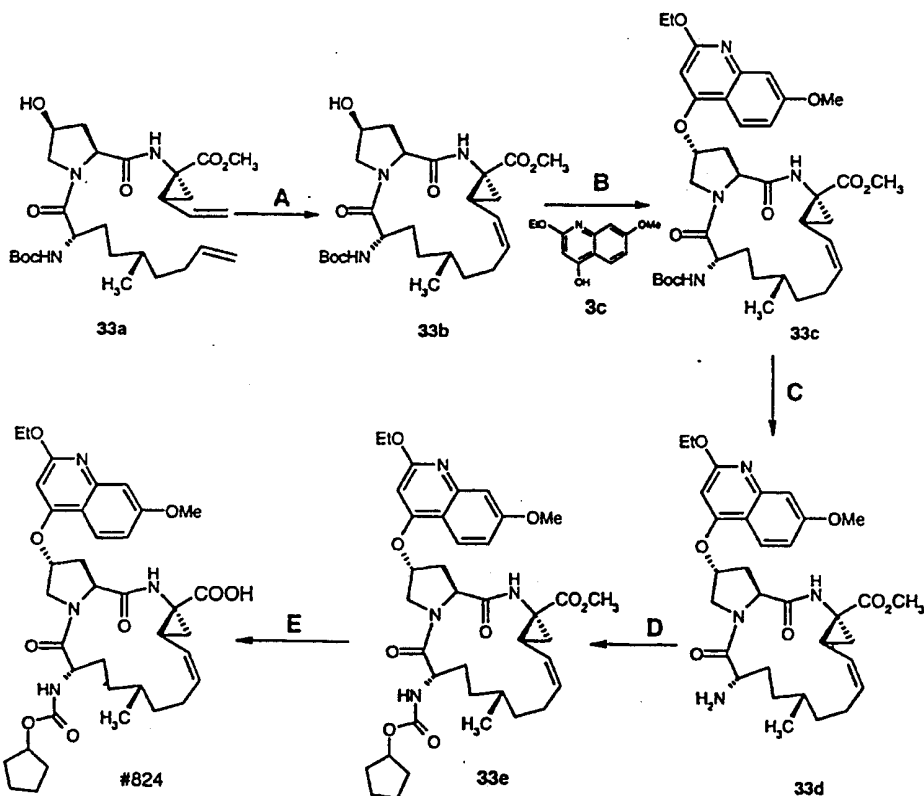
4H), 4.47(bd, J=12.7Hz, 1H), 4.58(bd, J=7.3Hz, 1H), 4.66(dd, J=8.0Hz, 1H), 5.57(m, 1H), 5.66(m, 1H), 5.83(bs, 1H), 6.18(bd, J=6.9Hz, 1H), 7.25(bd, J=7.3Hz, 1H), 7.56(bs, 1H), 7.70(m, 4H), 8.22(bd, J=2.9Hz, 2H), 8.29(bs, 9.2Hz, 1H)。

- 5 C. 将抑制剂 404(15 毫克, 0.021 毫摩尔)溶解于乙醇(2 毫升)中, 并加入 Pd 10 %/C(2 毫克)。在室温下, 在氢气下搅拌该混合物 16 小时。过滤后, 通过 C18 反相 HPLC 纯化该混合物, 得到白色固体的抑制剂 407(10 毫克, 66 % 产量)。¹H NMR(DMSO, 400MHz): δ 1.04(m, 1H), 1.17(d, J=6.0Hz, 3H), 1.35(s, 9H), 1.25-1.75(m, 12H), 2.32-2.45(m, 1H), 3.40-3.50(m, 2H), 3.74-3.83(m, 1H), 10 3.85-3.93(m, 1H), 3.97(s, 3H), 4.27-4.36(dd, J=21.1&8.6Hz, 1H), 4.54(dd, J=7.95&7.95Hz, 1H), 5.64(d, J=8.3Hz, 1H), 5.82(br s, 1H), 7.27-7.33(m, 1H), 7.53-7.57(bs, 1H), 7.60-7.74(m, 4H), 8.13-8.27(m, 3H), 8.30-8.35(br, s, 1H)。

实施例 33

合成化合物 # 824(表 8)

15



20

25

- A. 将化合物 33a(~0.55 毫摩尔)溶解于 CH_2Cl_2 (100 毫升)中, 并在加入哈维达催化剂的试样(17 毫克, 0.028 毫摩尔, 0.05 当量)前, 先小心地脱气。然后在回流下搅拌该溶液 5 小时。浓缩该反应混合物, 并通过急骤柱色谱法纯

化, 使用 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (从 3:2 到 2:3 的比例)的溶剂梯度, 得到化合物 33b, 产量 72%(194 毫克)。

5 B. 在 20 分钟的期间, 将 DIAD(140 微升, 0.71 毫摩尔, 5 当量)慢慢地加至
在无水 THF(15 毫升)中的化合物 33b(70 毫克, 0.142 毫摩尔)、2-乙氧基-4-
羟基-7-甲氧基喹啉 3c(63 毫克, 0.284 毫摩尔, 2 当量)和 Ph_3P (186 毫克, 0.71
毫摩尔, 5 当量)的溶液中。容许将该反应混合物加温至室温, 并在室温下搅
拌 2.5 小时。接着, 在真空下蒸发 THF, 并通过急骤柱层法纯化粗产物,
使用己烷/ EtOAc (从 7:3 到 1:1 的比例)的溶剂梯度。以 73% 的产量分离出化
合物 33c(72 毫克)。

10 C. 将化合物 33c(72 毫克, 0.104 毫摩尔)与 CH_2Cl_2 (5 毫升)和 4M 在二噁烷中
的 HCl (5 毫升)混合, 并容许在室温下搅拌该混合物 1.5 小时, 以裂开 Boc 保
护基, 获得中间物的 HCl 盐 33d。在真空下将粗制反应混合物蒸发至干, 在
真空下干燥, 确保除去全部的 HCl , 并可使用于下一个步骤中, 不需纯化。

15 D. 将在甲苯中的光气的溶液(1.93M, 274 微升, 0.528 毫摩尔), 逐滴加至在
THF(10 毫升)中的环戊醇(29 微升, 0.32 毫摩尔)的溶液中, 并在室温下搅拌
该混合物 2 小时以形成氯甲酸环戊酯试剂。在这期间后, 通过在真空下蒸发
除去约一半的溶剂, 通过加入 CH_2Cl_2 (5 毫升)稀释剩下的淡黄色溶液, 并再
浓缩至其原始体积的一半, 以确保除去所有的过量光气。进一步以 THF(10
毫升)稀释上述氯甲酸环戊酯试剂溶液, 冷却至 0°C , 并加入 0°C 的固体化合
20 物 33d(0.104 毫摩尔)。在该反应混合物中加入 Et_3N (75 微升, 0.534 毫摩尔,
5.2 当量), 并在 0°C 下继续搅拌 1.5 小时。在真空下除去溶剂, 并通过急骤柱
层析法纯化粗制的物质, 使用 $\text{EtOAc}/$ 己烷(1:1)作为洗脱液, 获得几乎定量产
量的化合物 33e(75 毫克)。

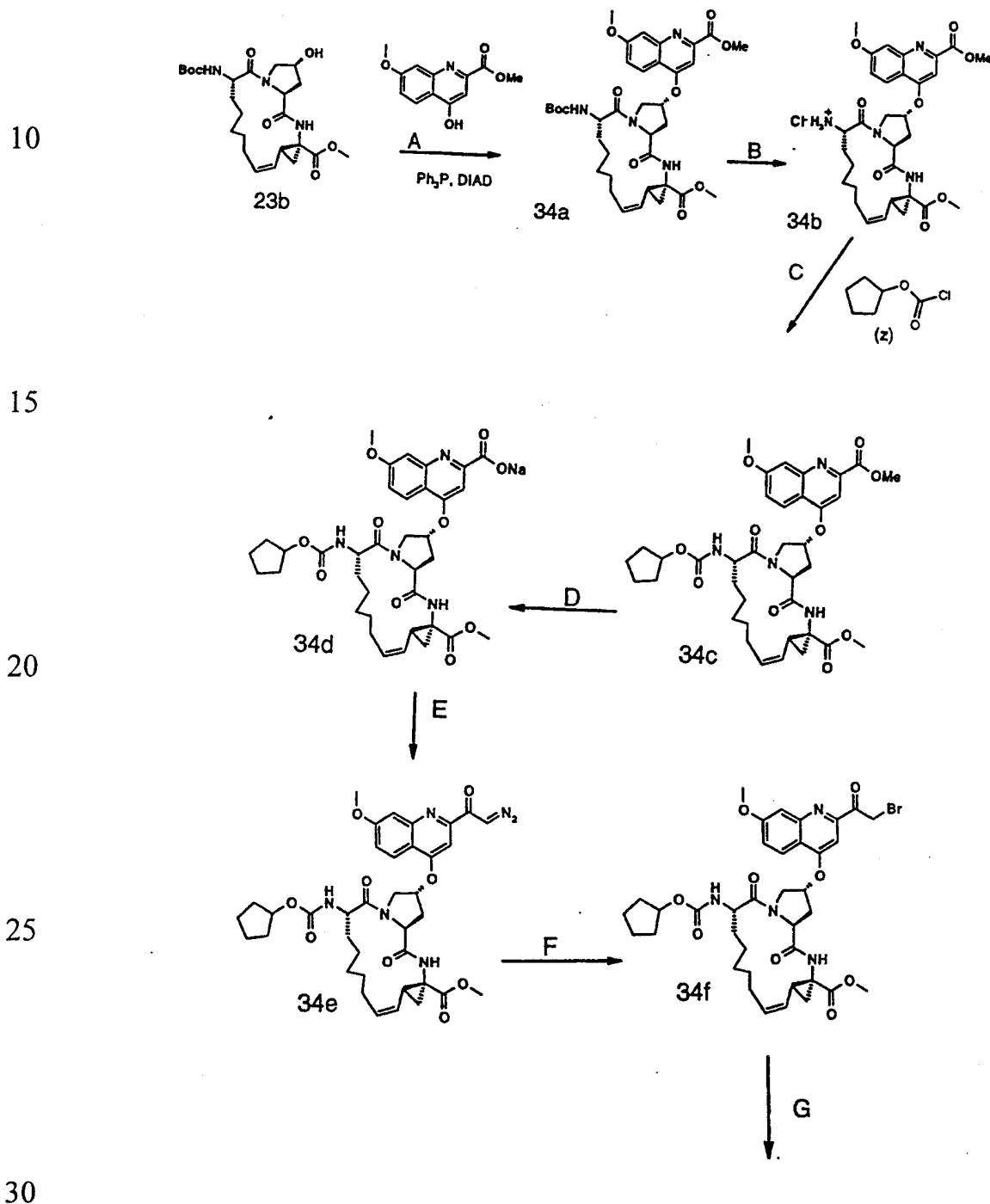
25 E. 通过在 50°C 下, 使化合物 33e(75 毫克, 0.11 毫摩尔)与 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (35 毫
克, 0.84 毫摩尔, 8 当量), 在 THF/ $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (2:2:1 的比例, 7.5 毫升)的溶剂
混合物中反应 2.5 小时。当完成水解作用时, 将该混合物酸化至 $\text{pH}=4.5$, 并
在真空下将溶剂蒸发至干。通过 C18 反相制备 HPLC 纯化粗产物, 使用 H_2O
至 58% CH_3CN 水溶液的溶剂梯度(有 0.06% TFA), 得到白色非晶形固体的
抑制剂 #824(45 毫克, 65% 产量)。

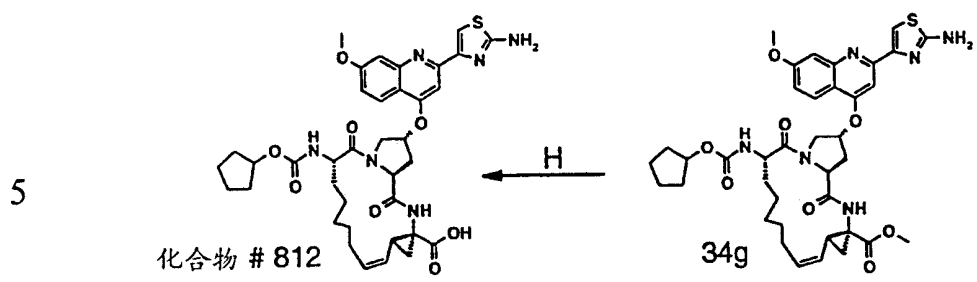
30 #824 的 Na^+ 盐的 $^1\text{H NMR}$ (DMSO, 400MHz): δ 0.88(d, $J=7.6\text{Hz}$, 3H), 0.95-
1.70(重叠的共振, 17H), 1.37(t, $J=7\text{Hz}$, 3H), 2.00-2.10(m, 1H), 2.10-2.33(m,

3H), 2.38-2.44(m, 1H), 3.80-3.85(m, 1H), 3.85(s, 3H), 4.02-4.08(m, 1H), 4.42(q, J=7Hz, 2H), 4.35-4.44(m, 1H), 4.50(d, J=10.8Hz, 1H), 4.63(bs, 1H), 5.28(dd, J=9.5Hz, 1H), 5.38(bs, 1H), 5.42-5.49(m, 1H), 6.37(s, 1H), 6.87(dd, J=8.9&2.2Hz, 1H), 7.07(d, J=2.2Hz, 1H), 7.28(d, J=7.0Hz, 1H), 7.90(d, J=8.9Hz, 1H), 8.57(s, 1H)。

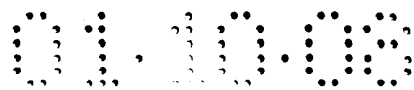
实施例 34

合成化合物 # 812(表 8)





- A. 在 15 分钟期间，将 DIAD(10.75 毫升，54.6 毫摩尔，2.0 当量)逐滴加至 0 °C，在 THF(450 毫升)中的巨环中间物 23b(13.05 克，27.2 毫摩尔，1.0 当量)、
- 10 Ph₃P(14.28 克，54.5 毫摩尔，2.0 当量)和 2-羧基甲氧基-4-羟基-7-甲氧基喹啉 (WO 00/09543 & WO 00/09558)(6.67 克，28.6 毫摩尔，1.05 当量)的溶液中，然后移开冰浴，并在室温下搅拌该反应混合物 3 小时。在起始物质完全转化为产物后，在真空下蒸发溶剂，以 EtOAc 稀释剩下的混合物，以饱和的 NaHCO₃(2x)和盐水(1x)冲洗，将有机层以无水的 MgSO₄干燥，过滤并蒸发至
- 15 干。在急骤柱色层法后，获得纯的化合物 34a：该柱首先以己烷/EtOAc(50:50)洗脱，接着以 CHCl₃/EtOAc(95:5)洗脱，以除去 Ph₃PO 和 DIAD 副产物，并通过 TLC 监测杂质的洗脱。最后，用 CHCl₃/EtOAc(70:30)从柱中洗脱想要的产物 34a。通常，层析步骤在分离高纯度的白色固体化合物 34a 之前重复 2-3 次，总产量为 68%(12.8 克，由 HPLC 得知纯度为 99.5%)。
- 20 B. 将在二噁烷中的 4N HCl(12 毫升)加至在 CH₂Cl₂(15 毫升)中的 Boc-保护的中间物 34a(1.567 克)的溶液中，并在室温下搅拌该反应混合物 1 小时[结果在反应期间的中途形成粘稠的凝胶，加入另外 10 毫升的 CH₂Cl₂]。当脱保护作用完成时，将溶剂蒸发至干，获得黄色的固体，和类似膏状物质。将该混合物再溶解于在 CH₂Cl₂中的约 5% MeOH 中，并在真空下再蒸发至干，得到
- 25 黄色固体的化合物 34b，将其使用在下一个步骤中，不需任何纯化作用。
- C. 将在甲苯中的光气的溶液(1.93M, 5.96 毫升，11.502 毫摩尔)，逐滴加至在 THF(15 毫升)中的环戊醇(614 微升，6.76 毫摩尔)的溶液中，并在室温下搅拌该混合物 2 小时，以形成氯甲酸环戊酯试剂(z)。在这期间后，通过在真空下蒸发除去约一半的溶剂，以另外的 CH₂Cl₂(5 毫升)稀释剩下的淡黄色溶液，
- 30 并浓缩至其原始体积的一半，以确保除去所有过量的光气。以 THF(15 毫升)进一步稀释上述氯甲酸环戊酯试剂的溶液，并加至胺-2HCl 盐 34b 中。在冰



- 浴中将该混合物冷却至 0℃，用 Et₃N(逐滴加入)的加入将 pH 值调整到~8.5-9，并在 0℃下搅拌该反应混合物 1 小时。在这期间后，以 EtOAc 稀释该混合物，以水(1x)、饱和的 NaHCO₃(2x)、H₂O(2x)和盐水(1x)冲洗。将有机层以无水的 MgSO₄ 干燥，过滤并在真空下蒸发，获得黄-琥珀色的泡沫体。在通过急骤柱色层法纯化(使用在 EtOAc 中的从 30% 己烷到 20% 己烷的溶剂梯度作为洗脱液)后，获得化合物 34c，产量 80% (1.27 克)，且纯度 > 93%。
- 5 D. 将二甲基酯 34c(1.17 克)溶解于 THF/MeOH/H₂O 的混合物(20 毫升，2:1:1 的比例)中，加入 NaOH 的水溶液(1.8 毫升，1N, 1 当量)中。在将其蒸发至干前，先在室温下搅拌该反应混合物 1 小时，获得白色固体的钠盐 34d(~1.66 毫摩尔)。
- 10 将化合物 34d 使用在下一个步骤中，不需纯化。
- E. 将粗制钠盐 34d(1.66 毫摩尔)溶解于 THF(17 毫升)中，加入 Et₃N，并在冰浴中将该混合物冷却至 0℃。逐滴加入氯甲酸异丁酯(322 微升，2.5 毫摩尔)，并在 0℃下搅拌该混合物 75 分钟。在这期间后，加入重氮甲烷(15 毫升)，并继续在 0℃下搅拌 30 分钟，然后在室温下搅拌 1 小时。在真空下将大部分的
- 15 溶剂蒸发至干，以 EtOAc 稀释剩下的混合物，以饱和的 NaHCO₃(2x)、H₂O(2x)和盐水(1x)冲洗，以无水的 MgSO₄ 干燥，过滤并蒸发至干，获得淡黄色泡沫状的化合物 34e(1.2 克，~1.66 毫摩尔)。将重氮酮中间物 34e 使用于下一个步骤中，不需纯化。
- F. 将重氮酮 34e(1.2 克，1.66 毫摩尔)溶解于 THF(17 毫升)中，并在冰浴中冷
- 20 却至 0℃。逐滴加入 HBr 水溶液(48%，1.24 毫升)，并在 0℃下搅拌该反应混合物 1 小时。然后以 EtOAc 稀释该混合物，以饱和的 NaHCO₃(2x)、H₂O(2x)和盐水(1x)冲洗，将有机层以无水的 MgSO₄ 干燥，过滤并蒸发至干，获得淡黄色泡沫状的 β-溴酮中间物 34f(~1.657 毫摩尔)。
- G. 将硫脲(118 毫克，1.55 毫摩尔)加至在异丙醇(5 毫升)中的溴酮 34f(600 毫克，0.779 毫摩尔)的溶液中，并将该反应混合物置于预先-加热至 75℃的油浴中，容许在该处搅拌 1 小时。然后在真空下除去异丙醇，并将产物溶解于 EtOAc(100 毫升)中。以饱和的 NaHCO₃ 和盐水冲洗该溶液，将有机层以无水的 Na₂SO₄ 干燥，过滤并蒸发，获得红-棕色固体的粗产物 34g(522 毫克)。将该物质使用在最后的步骤中，不需任何进一步的纯化作用。
- 25
- 30 H. 将粗制的甲基酯 34g(122 毫克，0.163 毫摩尔)溶解于 THF/MeOH/H₂O 的溶液(2:1:1 的比例，4 毫升)，使用 LiOH·H₂O(89 毫克，2.14 毫摩尔)将其皂

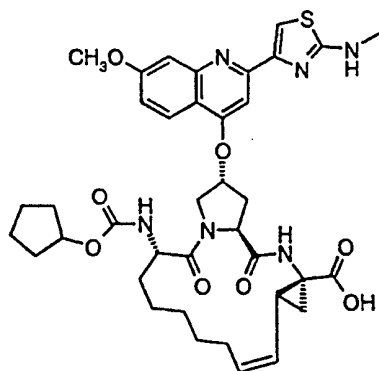
化。在室温下，在 12-15 小时的期间内进行水解反应。然后在真空下除去溶剂，并通过 C18 反相 HPLC 纯化粗产物，使用从 10% 在 H₂O 中的 CH₃CN 到 100% CH₃CN 的溶剂梯度，得到黄色固体的 HCV 蛋白酶抑制剂#812(24 毫克，中间物 34f 转化为抑制剂#812 的总产量为 20%)。

5 ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆): δ 8.63(s, 1H), 8.26-8.15(m, 2H), 7.79(bs, 1H), 7.72(bs, 1H), 7.50(bs, 2H), 7.33-7.25(m, 2H), 5.77(bs, 1H), 5.52(dd, J=8.3Hz, 1H), 5.27(dd, J=9.2Hz, 1H), 4.64(d, J=10.8Hz, 1H), 4.50(dd, J=8.3Hz, 1H), 4.39-4.31(m, 1H), 4.08-3.99(m, 2H), 3.94(s, 3H), 3.87(d, J=9.5Hz, 2H), 2.65-2.53(m, 2H), 2.46-2.36(m, 2H), 2.20-2.12(dd, J=8.6Hz, 1H), 1.80-1.64(m, 2H),
10 1.63-1.06(m, 14H)。MS:es⁺: 733.2(M+H)⁺, es⁻: 731.2(M-H)⁻。

实施例 34A

使用与在实例 34 中所述相同的程序，但使溴酮 34f 与可购得的 N-甲基硫脲反应，得到#811(表 8)

15



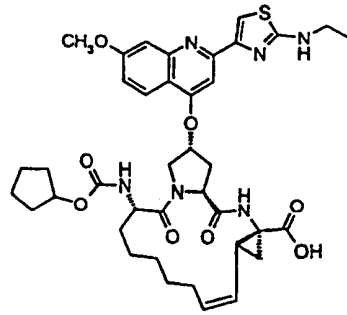
20

¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆): δ 8.63(s, 1H), 8.20(s, 1H), 8.18(s, 1H), 8.12-7.93(m, 1H), 7.88-7.69(m, 2H), 7.32-7.24(m, 2H), 5.82-5.75(m, 1H), 5.52(ddd, J=8.1Hz, 1H), 5.28(d, J=9.9Hz, 1H), 4.67-4.61(m, 1H), 4.51(dd, J=8.8Hz, 1H), 4.44-4.37(m, 1H), 4.08-4.00(m, 1H), 3.96(s, 3H), 3.89(m, 1H),
25 3.04(d, J=4.1Hz, 3H), 2.65-2.37(m, 3H), 2.16(m, 1H), 1.77-1.65(m, 2H), 1.63-1.11(m, 17H)。

MS; es⁺: 747.2(M+H)⁺, es⁻: 745.3(M-H)⁻。

实施例 34B

30 使用与在实例 34 中所述相同的程序，但使溴酮 34f 与可购得的 N-乙基硫脲反应，得到#810(表 8)。

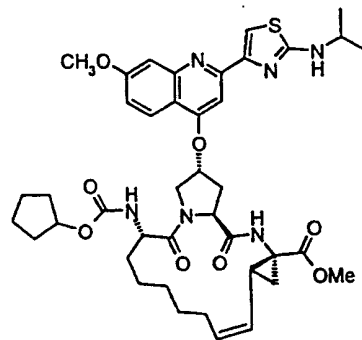


5

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ 8.63(s, 1H), 8.27(bs, 1H), 8.20(d, J=9.0Hz, 1H), 8.13-8.07(m, 1H), 7.86(bs, 1H), 7.78(s, 1H), 7.33-7.25(m, 2H), 5.81(bs, 1H), 5.54(dd, J=8.8Hz, 1H), 5.28(dd, J=9.7Hz, 1H), 4.65(d, J=12.4Hz, 1H), 10 4.51(dd, J=8.8Hz, 1H), 4.38(bs, 1H), 4.03(m, 1H), 3.97(s, 3H), 3.92-3.87(m, 1H), 3.54-3.46(m, 2H), 2.68-2.65(m, 2H), 2.47-2.38(m, 1H), 2.15(dd, J=8.6Hz, 1H), 1.78-1.65(m, 2H), 1.60-1.12(m, 17H), 1.25(t, J=7.3Hz, 3H)。
MS; es^+ : 783.2(M+Na) $^+$, es^- : 761.2(M+H) $^-$ 。

实施例 34C

15 使用与在实例 34 中所述相同的程序，但使溴酮 34f 与可购得的 N-异-丙基硫脲反应，得到#822。



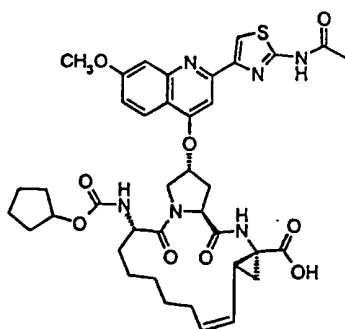
20

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ 8.63(s, 1H), 8.33-8.23(bs, 1H), 8.21(d, 25 J=9.2Hz, 1H), 8.04(d, J=8.3Hz, 1H), 7.86(bs, 1H), 7.77(s, 1H), 7.35-7.23(m, 2H), 5.81(bs, 1H), 5.52(dd, J=8.5Hz, 1H), 5.27(dd, J=9.2Hz, 1H), 4.65(d, J=11.8Hz, 1H), 4.51(dd, J=7.6Hz, 1H), 4.37(bs, 1H), 4.15(bs, 1H), 4.07-3.98(m, 2H), 3.97(s, 3H), 3.88(d, J=8.9Hz, 1H), 2.60-2.53(m, 2H), 2.47-2.37(m, 2H), 2.19-2.10(dd, J=9.2Hz, 1H), 1.80-1.64(m, 2H), 1.63-1.29(m, 13H), 1.27 和 30 1.25(2xd, J=6.5Hz, 6H), 1.23-1.09(m, 2H), MS: es^- : 775.0(M+H) $^+$, es^- : 772.9(M-H) $^-$ 。

实施例 34D

使用与在实例 34 中所述相同的程序，但使溴酮 34f 与可购得的 N-乙酰基硫脲反应，得到#809

5

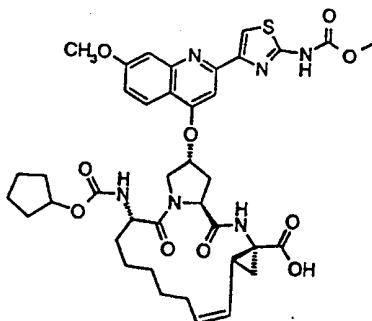


10 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ 8.62(s, 1H), 8.30(bs, 1H), 8.17(d, J=8.9Hz, 1H), 7.62(bs, 1H), 7.52(bs, 1H), 7.28(d, J=6.4Hz, 1H), 7.21(bs, 1H), 5.63(bs, 1H), 5.54(dd, J=8.1Hz, 1H), 5.28(dd, J=9.5Hz, 1H), 4.62(d, J=12.1Hz, 1H), 4.56-4.46(m, 2H), 4.11-4.04(m, 1H), 3.95(s, 3H), 3.93-3.88(m, 1H), 2.62-2.54(m, 1H), 2.45-2.36(m, 1H), 2.22(s, 3H), 2.21-2.13(m, 1H), 1.79-1.69(m, 2H),
15 1.65-1.30(m, 16H), 1.26-1.12(m, 2H)。MS; es^+ : 775.3(M+H) $^+$, es^- : 773.3(M-H) $^-$ 。

实施例 34E

将 DIPEA(0.55 毫升, 3.18 毫摩尔, 10 当量)和氯甲酰甲酯(0.13 毫升, 1.6 毫摩尔, 5 当量)加至在室温下, 在 CH_2Cl_2 (5 毫升)中的 2-氨基-4-噻唑基
20 中间物 34g(0.24 克, 0.32 毫摩尔)搅拌的溶液中。在真空下浓缩前, 先搅拌该反应混合物 6.5 小时。然后按照在实例 34 中的描述, 将粗制的分离产物水解成想要的羧酸, 得到化合物#818。

25

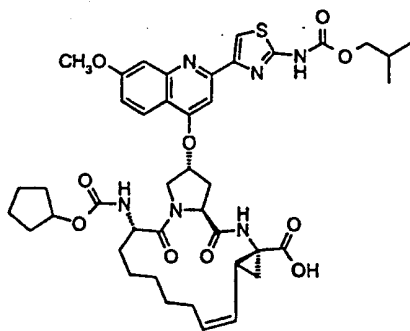


30 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ 8.61(s, 1H), 8.21-8.07(m, 2H), 7.61-6.38(m, 2H), 7.26(d, J=6.4Hz, 1H), 7.19-7.10(m, 1H), 5.60-5.47(m, 2H), 5.27(dd, J=9.2Hz, 1H), 4.63-4.53(m, 1H), 4.47(d, J=7.9Hz, 1H), 4.13-4.04(m, 1H), 3.93(s,

3H), 3.92-3.87(m, 2H), 3.79(s, 3H), 4.42-2.30(m, 2H), 2.17(dd, J=9.3Hz, 1H), 1.81-1.68(m, 2H), 1.63-1.29(m, 16H), 1.23-1.10(m, 2H) • MS; es⁺: 791.1(M+H)⁺, es⁻: 789.1(M-H)⁻。

实施例 34F

5 依据上述在实施例 34 中的条件, 但使用氯甲酸异丁酯, 得到类似的取代的氨基甲酸酯中间物。然后将粗制的分杂物质水解成想要的化合物#819。



10

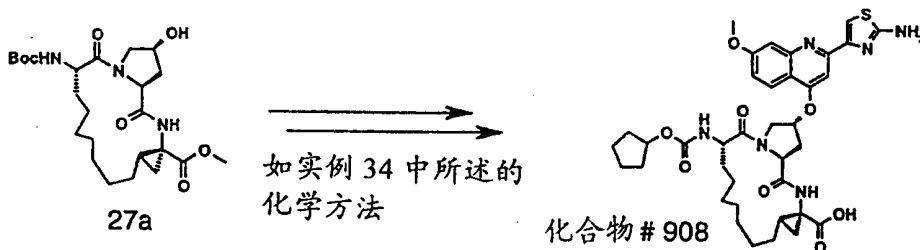
¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆): δ 8.62(s, 1H), 8.47-8.27(bs, 1H), 8.18(d, J=8.6Hz, 1H), 7.69-7.60(m, 1H), 7.60-7.51(m, 1H), 7.28(d, J=6.7Hz, 1H), 7.28-7.19(m, 1H), 5.70-5.60(m, 1H), 5.52(dd, J=8.3Hz, 1H), 5.27(dd, J=9.8Hz, 1H), 4.63(d, J=11.8Hz, 1H), 4.53-4.44(m, 2H), 4.10-3.99(m, 1H), 4.04(d, J=6.7Hz, 2H), 3.95(s, 3H), 3.94-3.87(m, 1H), 2.65-2.53(m, 1H), 2.46-2.34(m, 1H), 2.16(dd, J=8.1Hz, 1H), 2.03-1.91(m, 1H), 1.79-1.09(m, 20H), 0.95(d, J=6.7Hz, 6H) • MS:es⁺: 833.2(M+H)⁺, es⁻: 831.2(M-H)⁻。

15

20 实施例 35

合成化合物 # 908

从衍生物 27a 开始, 使用与在实例 34 中所述相同的化学方法, 获得下列的饱和巨环, 化合物#908(表 9)



25

¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆): δ 8.47(s, 1H), 8.16(d, J=10Hz, 1H), 8.15-8.07(m, 1H), 7.82-7.63(m, 2H), 7.53-7.43(m, 2H), 7.33-7.22(m, 1H), 7.13(d, J=7Hz, 1H), 5.77-5.65(m, 1H), 4.62-4.52(m, 2H), 4.50-4.4(m, 1H), 4.20-4.10(m, 1H),

30

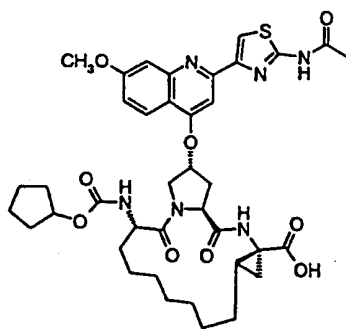
3.94(s, 3H), 3.89-3.83(m, 1H), 2.59-2.53(m, 1H), 2.48-2.40(m, 1H), 1.79-1.0(m, 25H)。MS: es^+ : 735.2(M+H)⁺, es^- : 733.2(M-H)⁻。

实施例 35A

合成化合物#909

- 5 使用与在实例 35 中所述相同的程序，但使用可购得的 N-乙酰基硫脲，得到化合物#909(表 9)

10



15

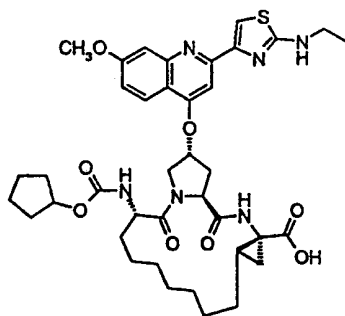
¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆): δ 8.53-8.41(m, 2H), 8.20(d, J=9.2Hz, 1H), 7.68(bs, 1H), 7.27(dd, J=9.2Hz, 1H), 7.15(d, J=6.4Hz, 1H), 5.67(bs, 1H), 4.65-4.50(m, 3H), 4.44-4.37(m, 1H), 4.21-4.13(m, 1H), 3.96(s, 3H), 3.99-3.86(m, 1H), 2.62-2.39(m, 2H), 2.24(s, 3H), 1.78-1.67(m, 3H), 1.67-1.01(m, 22H)。MS: es^+ : 798.0(M+Na)⁺, es^- : 777.0(M+H)⁺。

实施例 35B

合成化合物#910

- 20 使用与在实例 35 中所述相同的程序，但使用可购得的 N-乙基硫脲，得到化合物#910(表 9)

25



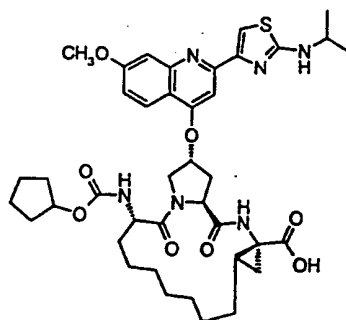
¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆): δ 8.47(s, 1H), 8.29(bs, 1H), 8.20(d, J=9.2Hz, 1H), 8.09(bs, 1H), 7.87(s, 1H), 7.77(s, 1H), 7.32(dd, J=9.2Hz, 1H), 7.14(dd, J=6.7Hz, 1H), 5.78(bs, 1H), 4.58(dd, J=8.1Hz, 2H), 4.43(bs, 1H), 4.18-4.12(m, 1H), 3.97(s, 3H), 3.87(d, J=8.9Hz, 1H), 3.55-3.46(m, 2H), 2.63-2.53(m, 1H),

2.47-2.41(m, 1H), 1.78-1.00(m, 25H), 1.25(t, J=7.3Hz, 3H)。MS: es⁺:
763.1(M+H)⁺, es⁻: 761.1(M-H)⁻。

实施例 35C

合成化合物#911

5 使用与在实例 35 中所述相同的程序, 但使用可购得的 N-异丙基硫脲, 得到化合物#911(表 9)



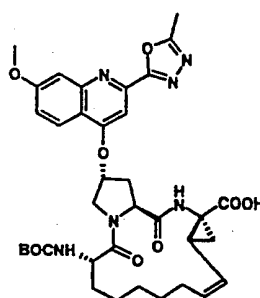
10

¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆): δ 8.47(s, 1H), 8.29-8.19(m, 1H), 8.19(d, J=9.2Hz, 1H), 8.09-8.0(m, 1H), 7.83(bs, 1H), 7.74(bs, 1H), 7.31(d, J=8Hz, 1H), 7.14(d, J=6.4Hz, 1H), 5.76(bs, 1H), 4.64-4.53(m, 2H), 4.44(bs, 1H), 4.22-4.09(m, 3H), 3.97(s, 3H), 3.87(d, J=8.6Hz, 1H), 2.63-2.58(m, 1H), 2.46-2.41(m, 1H), 1.79-1.10(m, 24H), 1.27 和 1.26(2xd, J=6.5Hz, 6H)。MS: es⁺:
777.0(M+H)⁺, es⁻: 775.0(M-H)⁻。

15

实施例 36

20 合成化合物#716



25

¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆): δ (ppm)8.62(s, 1H), 8.13(d, J=9.2Hz, 1H), 7.64-7.54(m, 2H), 7.47(d, J=2.6Hz, 1H), 7.16(dd, J=9.2, 2.2Hz, 1H), 7.03(d, J=6.0Hz, 1H), 5.63(s, 1H), 5.52(q, J=9.9Hz, 1H), 5.26(t, J=8.9Hz, 1H), 4.62(d, J=11.45Hz, 1H), 4.45(dd, J=9.2, 8.27Hz, 1H), 4.02(m, 1H), 3.93(s, 3H), 3.7(dd, J=7.6, 1.0Hz, 1H), 2.66(s, 3H), 2.55-2.65(m, 1H), 2.35-2.45(m, 1H), 2.17(q,

30

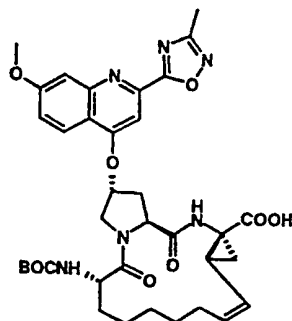
J=8.6Hz, 1H), 1.65-1.75(m, 2H), 1.5-1.35(m, 7), 1.15(s, 9H)。

MS: 705(M+1), 703(M-1)

实施例 37

合成化合物#717

5



10

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ (ppm)8.62(s, 1H), 8.15(d, J=8.9Hz, 1H), 7.62(s, 1H), 7.49(s, 1H), 7.19(dd, J=9.2, 2.2Hz, 1H), 7.02(d, J=5.4Hz, 1H), 5.64(s, 1H), 5.52(q, J=9.9Hz, 1H), 5.26(t, J=9.2Hz, 1H), 4.63(d, J=11.44Hz, 1H), 4.45(t, J=9.2Hz, 1H), 3.94(s, 3H), 3.9-3.8(m, 1H), 2.7-2.55(m, 1H), 2.4-2.3(m, 1H), 2.18(q, J=8.9Hz, 1H), 1.75-1.65(m, 2H), 1.5-1.2(m, 7H), 1.14(s, 9H)。

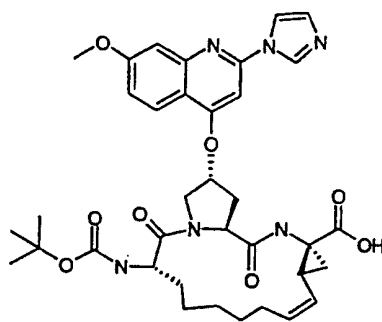
15

MS: 705(M+1), 703(M-1)

实施例 38

合成化合物#718

20



25

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ (ppm): 9.55(s, 1H), 8.63(s, 1H), 8.43(s, 1H), 8.13(d, J=9.2Hz, 1H), 7.66(s, 1H), 7.46(s, 1H), 7.32(d, J=2.6Hz, 1H), 7.10-7.07(m, 2H), 5.64-5.54(m, 1H), 5.59-5.48(m, 1H), 5.33-5.23(m, 1H), 4.73-4.61(m, 1H), 4.45(dd, J=7.5, 9.1Hz, 1H), 4.09-4.00(m, 1H), 3.92(s, 3H), 3.93-3.83(m, 1H), 2.67-2.55(m, 2H), 2.53-2.43(m, 1H), 2.42-2.31(m, 1H), 2.23-2.12(m, 1H), 1.81-1.66(m, 2H), 1.52-1.52(m, 2H), 1.42-1.25(m, 6H), 1.21(s,

30

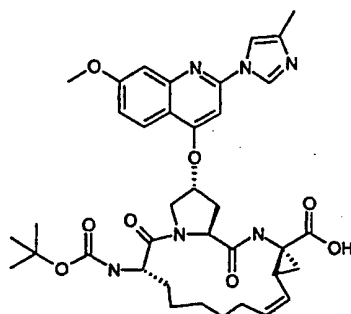
1H)。

MS: 689.3(M+1), 687.3(M-1)

实施例 39

合成化合物#722

5



10

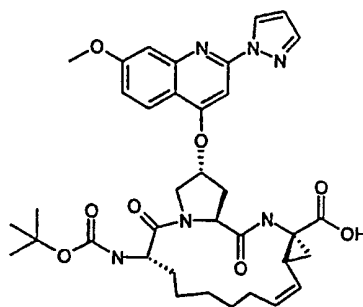
$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ (ppm): 9.70(s, 1H), 8.64(s, 1H), 8.26(s, 1H), 8.14(d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.45(s, 1H), 7.30(d, $J=2.5\text{Hz}$, 1H), 7.14-7.06(m, 2H), 5.60-5.54(m, 1H), 5.58-5.48(m, 1H), 5.31-5.23(m, 1H), 4.71-4.62(m, 1H), 4.49-4.40(m, 1H), 4.08-3.99(m, 1H), 3.92(s, 3H), 3.92-3.84(m, 1H), 2.69-2.54(m, 2H), 2.53-2.46(m, 1H), 2.42-2.31(m, 1H), 2.37(s, 3H), 2.22-2.13(m, 1H), 1.81-1.64(m, 2H), 1.54-1.42(m, 2H), 1.42-1.27(m, 6H), 1.22(s, 9H)。

15

实施例 40

合成化合物#733

20



$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ (ppm): 8.75(m, 1H), 8.62(s, 1H), 8.06(d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.88-7.87(m, 1H), 7.48(s, 1H), 7.28(d, $J=2.6\text{Hz}$, 1H), 7.05-7.00(m, 2H), 6.64-6.63(m, 1H), 5.62-5.58(m, 1H), 5.55-5.49(m, 1H), 5.28-5.24(m, 1H), 4.64-4.61(m, 1H), 4.48-4.44(m, 1H), 4.07-4.03(m, 1H), 3.91(s, 3H), 3.92-3.85(m, 1H), 2.67-2.54(m, 2H), 2.53-2.45(m, 1H), 2.41-2.34(m, 1H), 2.20-2.14(m, 1H), 1.75-1.69(m, 2H), 1.50-1.43(m, 2H), 1.41-1.32(m, 6H), 1.17(s, 9H)。

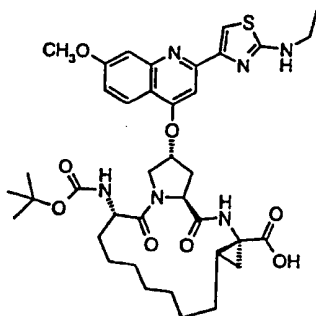
25

MS: 689.3(M+1), 687.2(M-1)

实施例 41

合成化合物#703

5

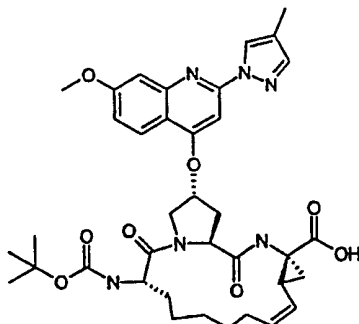


$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ : 8.50(s, 1H), 8.19(s, 1H), 8.17(s, 1H),
 10 8.11-8.00(m, 1H), 7.88-7.77(m, 1H), 7.73(s, 1H), 7.25(d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 6.93(d,
 $J=6\text{Hz}$, 1H), 5.89-5.68(m, 1H), 4.62(d, $J=11\text{Hz}$, 1H), 4.53(dd, $J=8.3\text{Hz}$, 1H),
 4.16-4.07(m, 1H), 3.96(s, 3H), 3.88(bd, $J=9.5\text{Hz}$, 1H), 3.53-3.43(m, 2H),
 2.63-2.51(m, 1H), 2.46-2.36(m, 1H), 1.81-1.62(m, 2H), 1.60-1.01(m, 15H),
 1.24(t, $J=7.4\text{Hz}$, 3H), 1.17(s, 9H)。MS: es^+ : 751.1(M+H) $^+$, es^- : 749.1-(M-H) $^-$ 。

15 实施例 42

合成化合物#734

20

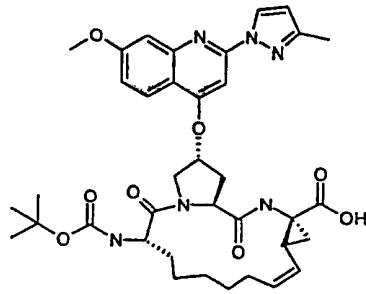


$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ (ppm): 8.62(s, 1H), 8.54(s, 1H), 8.04(d,
 $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.70(s, 1H), 7.43(s, 1H), 7.24(d, $J=2.6\text{Hz}$, 1H), 7.05-6.98(m,
 25 2H), 5.57-5.54(m, 1H), 5.55-5.48(m, 1H), 5.28-5.24(m, 1H), 4.63-4.59(m, 1H),
 4.47-4.43(m, 1H), 4.13-3.99(m, 1H), 3.09(s, 3H), 3.92-3.83(m, 1H), 2.67-2.55(m,
 2H), 2.53-2.46(m, 1H), 2.43-2.31(m, 1H), 2.22-2.15(m, 1H), 2.15(3H),
 1.75-1.70(m, 2H), 1.51-1.42(m, 2H), 1.41-1.28(m, 6H), 1.17(s, 9H)。
 MS: 703.2(M+1), 701.3(M-1)。

30 实施例 43

合成化合物#738

5



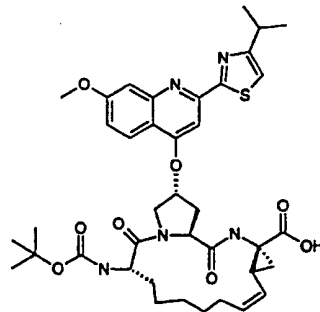
$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ (ppm): 8.64(d, $J=2.5\text{Hz}$, 1H), 8.62(s, 1H), 8.04(d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.39(s, 1H), 7.24(d, $J=2.5\text{Hz}$, 1H), 7.04(d, $J=6.0\text{Hz}$, 1H), 6.99(dd, $J=2.2, 9.2\text{Hz}$, 1H), 6.43(d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H), 5.62-5.57(m, 1H), 5.56-5.47(m, 1H), 5.31-5.22(m, 1H), 4.65-4.56(m, 1H), 4.45(dd, $J=7.6, 8.9\text{Hz}$, 1H), 4.07-4.00(m, 1H), 3.90(s, 3H), 3.88-3.84(m, 1H), 2.68-2.56(m, 2H), 2.54-2.43(m, 1H), 2.24-2.31(m, 1H), 2.34(s, 3H), 2.24-2.14(m, 1H), 1.80-1.64(m, 2H), 1.52-1.43(m, 2H), 1.43-1.27(m, 6H), 1.18(s, 9H)。

MS: 703.2(M+1), 701.2(M-1)。

15 实施例 44

合成化合物#725

20



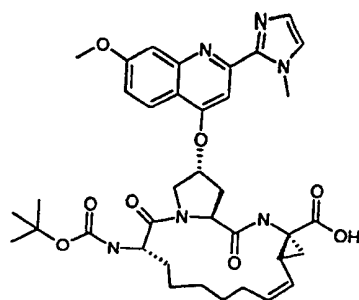
$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ (ppm): 8.62(s, 1H), 8.10(d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.57(s, 1H), 7.49(s, 1H), 7.35(d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H), 7.09-7.03(m, 2H), 5.65-5.61(m, 1H), 5.55-5.49(m, 1H), 5.28-5.24(m, 1H), 4.62-4.57(m, 1H), 4.49-4.45(m, 1H), 4.08-4.01(m, 1H), 3.93(s, 3H), 3.92-3.86(m, 1H), 3.20-3.14(m, 1H), 2.65-2.56(s, 1H), 2.53-2.47(m, 1H), 2.42-2.35(m, 1H), 2.22-2.15(m, 1H), 1.79-1.68(m, 2H), 1.50-1.43(m, 2H), 1.41-1.28(m, 12H), 1.18(s, 9H)。

MS: 748.2(M+1), 746.2(M-1)。

30 实施例 45

合成化合物#726

5



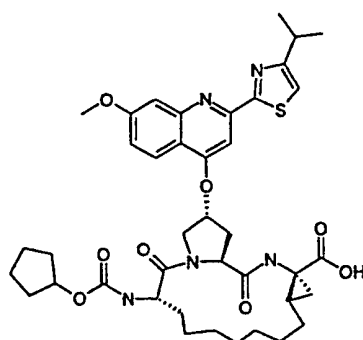
10

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ (ppm): 8.64(s, 1H), 8.10(d, $J=9.5\text{Hz}$, 1H), 7.83-7.76(m, 2H), 7.60(s, 1H), 7.44-7.42(m, 1H), 7.18-7.01(m, 2H), 5.56-5.49(m, 2H), 5.29-5.24(m, 1H), 4.66-4.63(m, 1H), 4.47-4.42(m, 1H), 4.28(s, 3H), 4.06-4.02(m, 2H), 3.94(s, 3H), 3.93-3.86(m, 1H), 2.66-2.55(m, 2H), 2.42-2.31(m, 2H), 2.22-2.14(m, 1H), 1.79-1.65(m, 2H), 1.52-1.27(m, 7H), 1.22(s, 9H).
MS: 703.2(M+1), 701.3(M-1).

实施例 46

合成化合物#906

15



20

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): δ (ppm): 8.46(s, 1H), 8.06(d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.57(s, 1H), 7.49(s, 1H), 7.34(m, 1H), 7.14-7.05(m, 2H), 5.63-5.58(m, 1H), 4.66-4.61(m, 1H), 4.54-4.44(m, 2H), 4.23-4.18(m, 1H), 3.93(s, 3H), 3.92-3.88(m, 1H), 3.21-3.14(m, 1H), 2.44-2.33(m, 1H), 1.35(d, $J=7\text{Hz}$, 6H), 1.73-1.01(m, 26H).

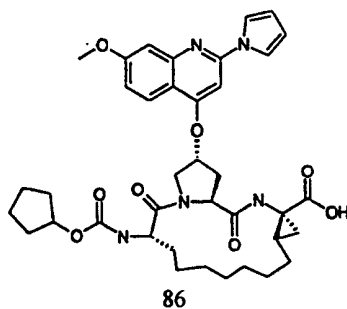
25

MS: 762.0(M+1), 759.9(M-1).

实施例 47

合成化合物#907

30



¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆): δ (ppm): 8.46(s, 1H), 7.98(d, J=8.9Hz, 1H), 7.91-7.89(m, 2H), 7.23-7.21(m, 2H), 7.07-7.00(m, 2H), 6.35-6.32(m, 2H),

5 5.64-5.58(m, 1H), 4.65-4.61(m, 1H), 4.53-4.47(m, 2H), 4.24-4.19(m, 1H), 3.90(s, 3H), 3.86-3.84(m, 1H), 2.40-2.33(m, 1H), 1.73-1.01(m, 26H)。

MS:702.0(M+1), 699.9(M-1)。

实施例 48

全长 NS3-NS4 异种二聚体蛋白质的荧光基因(fluorogenic)测定

10 使用从 HCV 基因型 1b 感染的个体的血清中萃取出的 RNA(由 Dr. Bernard Wilems, Hopital St-Luc, Montreal, Quebec, Canada 提供), 通过 RT-PCR 将 NS2-NS5B-3'非编码区克隆到 pCR[®]3 载体(Invitrogen)内。然后通过 PCR 将 NS3-NS4 区(NS3-NS4AFL)亚克隆到 pFastBac[™] HTa 杆状病毒表达载体(Gibco/BRL)内。载体序列包括编码 28-残基 N-终端序列的区域, 其含有六

15 组氨基酸标志。使用 Bac-to-Bac[™] 杆状病毒表达系统(Gibco/BRL)以产生重组杆状病毒。在 27℃ 下以 0.1-0.2 的感染多重性, 通过以重组的杆状病毒感染 10⁶ Sf21 细胞/毫升来表达 His-NS3-NS4AFL。在表达期间发生真实的自体-蛋白水解作用, 产生非共价和稳定的 NS3-NS4A 蛋白质复合物(称为全长“FL”)。在 48 至 64 小时后, 通过在 4℃ 下离心收获被感染的培养物。在 50mM NaPO₄,

20 pH7.5, 40% 甘油(重量/体积), 2mM β-巯基乙醇中, 在蛋白酶抑制剂的混合物存在下, 使细胞丸均质化。然后用 1.5% NP-40, 0.5% Triton X-100, 0.5M NaCl 和 DNA 酶处理从细胞溶胞产物中萃取的 His-NS3-NS4AFL。在超离心后, 将可溶的萃取物稀释四倍, 并结合在 Pharmacia Hi-Trap Ni-螯合柱上。使用 50

25 PAGE 判断)。将 His-NS3-NS4AFL 储存在 -80℃ 的 50 mM 磷酸钠, pH 7.5, 10% (重量/体积)甘油, 0.5M NaCl, 0.25M 咪唑和 0.1% NP-40 中。在使用之前才在冰上融化并稀释。

在 50mM Tris-HCl, pH8.0, 0.25M 柠檬酸钠, 0.01% (重量/体积)正-十二烷基-β-D-麦芽糖苷, 1mM TECP 中测定 His-NS3-NS4AFL 的蛋白酶活性。在

30 各种浓度的抑制剂的存在下, 在 23℃ 下将五(5)μM 内部骤冷的基质邻氨基苯甲酰基(anthranylyl)-DDIVPAbu[C(O)-O]-AMY(3-NO₂)TW-OH 和 1.5nM His-

NS3-NS4AFL 一起培养 45 分钟。终 DMSO 浓度未超过 5.25%。用加入 1M MES, pH 5.8 使该反应中止。在配有 96-孔培养盘读取器的 Perkin-Elmer LS-50B 荧光计上监视 N-终端产物的荧光(激发波长: 325 毫微米; 发射波长: 423 毫微米)。

5 用下式来计算抑制%:

$$100 - [(\text{荧光}_{\text{inh}} - \text{荧光}_{\text{blank}}) / (\text{荧光}_{\text{ctl}} - \text{荧光}_{\text{blank}}) \times 100]$$

将适合 Hill 模式的非线性曲线应用于该抑制-浓度数据上, 并通过使用 SAS 软件(Statistical Software System: SAS Institute, Inc. Cary, N.C.)来计算 50% 有效浓度(IC₅₀)。

10 实施例 49

重组的 HCV NS3 蛋白酶的放射性测定

HCV NS3 蛋白酶的放射性测定使用的基质, DDIVPC-SMSYTW, 在半胱氨酸和丝氨酸残基之间通过酶切开。序列 DDIVPC-SMSYTW 相当于 NS5A/NS5B 的天然切开位置, 其中已经以脯氨酸取代在 P2 中的半胱氨酸残基。在抑制剂的存在或缺乏之下, 将肽基质 DDIVPC-SMSYTW 和示踪物生物素 DDIVPC-SMS[¹²⁵I-Y]TW 与重组体 NS3 蛋白酶一起培养。通过加入抗生物素蛋白-涂覆的琼脂糖小珠于试样混合物, 接着过滤该分析混合物, 完成从产物中分离基质。容许以在(有或无抑制剂的)滤液中发现的 SMS[¹²⁵I-Y]TW 产物的含量, 来计算基质转化的百分比和抑制作用的百分比。

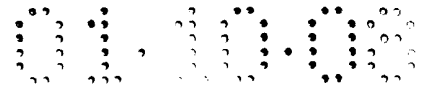
20 A. 试剂

Tris 和 Tris-HCl(超纯的)得自 Life Technologies。甘油(超纯的)、MES 和 BSA 购自 Sigma[®]。TCEP 得自 Pierce, DMSO 得自 Aldrich[®], 且 NaOH 得自 Anachemia[®]。

25 测定缓冲溶液: 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 30% (重量/体积)甘油, 2% (重量/体积)CHAPS, 1 毫克/毫升 BSA, 1mM TCEP(在使用前才加入 TCEP, 得自 1M 在水中的母液)。

基质: DDIVPC-SMSYTW, 25 微升终浓度(得自在 DMSO 中的 2mM 母液, 储存在 -20℃ 下以避免氧化作用)。示踪物: 还原的单-碘化的基质(生物素-DDIVPC-SMS[¹²⁵I-Y]TW)(≈1nM 终浓度)。

30 HCV NS3 蛋白酶型 1b, 终浓度 25nM(来自 50mM 磷酸钠, pH 为 7.5, 10% 甘油, 300mM NaCl, 5mM DTT, 0.01% NP-40)。



"7

B. 草案

在 96-孔聚丙烯盘中进行测定。每孔含有：

20 微升基质/示踪物，在测定缓冲溶液中；

10 微升±抑制剂，在 20% DMSO/测定缓冲溶液；

5 10 微升 NS3 蛋白酶 1b。

在相同的测定盘上制备空白(无抑制剂且无酶)和对照组(无抑制剂)。

通过加入酶溶液，并在温和的搅动下，在 23℃ 下培养该测定混合物 60 分钟，开始该酶反应。加入二十(20)微升 0.025 NaOH，使该酶反应骤冷。

10 在 Millipore[®] MADP N65 过滤盘中加入二十(20)微升抗生物素蛋白-涂覆的琼脂糖小珠(购自 Pierce[®])。将骤冷的测定混合物移至该过滤盘上，并在温和的搅动下在 23℃ 下培养 60 分钟。

使用 Millipore[®] MultiScreen Vacuum Manifold Filtration 装置过滤该盘，并将 40 微升的滤液转移至每孔含有 60 微升闪烁液体的不透明 96-孔培养盘中。

15 在 Packard[®] TopCount 设备上，使用 ¹²⁵I-液体程序(protocol)1 分钟，来计算滤液。

利用下式计算抑制%：

$$100 - [(计数_{inh} - 计数_{blank}) / (计数_{ctl} - 计数_{blank}) \times 100]$$

20 将适合 Hill 模式的非线性曲线应用于该抑制-浓度数据上，并通过使用 SAS 软件(Statistical Software System: SAS Institute, Inc. Cary, N.C.)来计算 50% 有效浓度(IC₅₀)。

实施例 50

特定性测定

25 测定化合物对抗各种丝氨酸蛋白酶的特异性：人类白细胞弹性蛋白酶、猪胰腺弹性蛋白酶和牛胰腺 α-胰凝乳蛋白酶和一个半胱氨酸蛋白酶：人类肝组织蛋白酶 B。在所有的情况下，96-孔培养盘格式程序是使用对每种酶具有特异性的色原基质。每种测定包括酶-抑制剂在室温下预先培养 1 小时，接着加入基质并水解到约 30% 的转化，通过在 UV Thermomax[®] 微量滴定盘读取器或荧光 Perkin-Elmer[®] LS50B 培养盘读取器上测量。保持基质浓度尽可能
30 像 K_M 一样低，以便减少基质的竞争作用。化合物依据其效力从 300 变化至 0.06 μM。

每种测定的最终条件如下：

50mM Tris-HCl pH8, 0.5M Na₂SO₄, 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 3 % DMSO, 0.01 % 吐温，含有

5 [100μM Succ-AAPF-pNA 和 250pM α-胰凝乳蛋白酶]、[133μM Succ-AAA-pNA 和 8nM 猪弹性蛋白酶]、[133μM Succ-AAV-pNA 和 8n M 白细胞弹性蛋白酶]；或

[100mM NaHPO₄ pH6, 1mM EDTA, 3 % DMSO, 1mM TCEP, 0.01 % 吐温 20, 4μM Z-FR-AMC(7-氨基-4-甲基香豆素)和 0.5nM 组织蛋白酶 B(在使用前才在含有 20mM TCEP 缓冲溶液中活化原料酶)]。

10 在下文中摘述猪胰腺弹性蛋白酶的代表性实例：

使用 Biomek 液体操作器(Beckman)，将下列物质加至聚苯乙烯的平底 96-孔的培养盘(Cellwells, Corning)中：

40 微升测定缓冲溶液(50mM Tris-HCl, pH8, 1M Na₂SO₄, 50mM NaCl, 0.1mM EDTA)；

15 20 微升酶溶液(50mM Tris-HCl, pH8, 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.02 % 吐温-20, 40nM 猪胰腺弹性蛋白酶)；以及

20 微升抑制剂溶液(50mM Tris-HCl, pH8, 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.02 % 吐温-20, 1.5mM-0.3μM 抑制剂，15 % 体积/体积 DMSO)。

在室温下预先培养 60 分钟后，在每孔中加入 20 微升基质溶液(50mM Tris-HCl pH8, 0.5M Na₂SO₄, 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 665μM Succ-AAA-pNA)，并在室温下进一步培养该反应 60 分钟，之后在 UV Thermomax[®] 培养盘读取器上读取吸光度。有一排孔是对照组(无抑制剂)和空白(无抑制剂且无酶)。

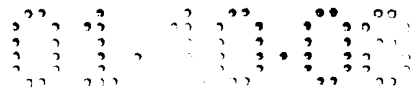
20 在不同的培养盘上，通过液体操作器，使用 50mM Tris-HCl pH8, 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.02 % 吐温-20, 15 % (体积/体积)DMSO 来完成抑制剂溶液的连接 2-倍稀释。以类似方式完成所有其他的特异性测定。

25 利用下式计算抑制 %：

$$[1 - ((UV_{inh} - UV_{blank}) / (UV_{ctl} - UV_{blank}))] \times 100$$

30 将适合 Hill 模式的非线性曲线应用于该抑制-浓度数据上，并通过使用 SAS 软件(Statistical Software System: SAS Institute, Inc. Cary, N.C.)来计算 50 % 有效浓度(IC₅₀)。

实施例 51



NS3 蛋白酶以细胞为基础的测定

用 Huh-7 细胞，从肝癌衍生的人类细胞株进行本测定，以 2 个 DNA 构建体共转染：

一个(称为 NS3)表达部分 HCV 非-结构性的多蛋白，以下列顺序通过 NS5A-NS5B 切割位点与 tTA 蛋白质融合；NS3-NS4A-NS4B-NS5A-(NS5B)-tTA，其中(NS5B)代表 NS5B 的前 6 个氨基酸。在 CMV 启动子的控制之下，表达该多蛋白，另一个(称为 SEAP)在 tTA-应答性启动子的调节下，表达报告基因蛋白，分泌的碱性磷酸酶(SEAP)。

第一个构建导致多蛋白的表达，通过 NS3 蛋白酶的切割，从其中释放出不同的成熟蛋白质。可相信该成熟的病毒蛋白质在内质网的膜上形成复合物。tTA 为融合蛋白质，由 Gossen 和 Bujard(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(1992); 5547-5551)描述，其含有一个 DNA 结合区和转录活化剂。tTA 蛋白质的释放，需要在 NS5A 和它自己之间的 NS5A-NS5B 切割位点处的 NS3-依赖性切割作用。最后的切割容许 tTA 移动至核，并反式激活 SEAP 基因。因此，减少 NS3 蛋白水解活性，导致将 tTA 限制在细胞质中，并伴随着降低 SEAP 的活性。

要控制由该化合物引起的 NS3 蛋白酶的抑制作用以外的细胞活性，用单独表达 tTA 的构建，以及相同的报告基因构建，进行平行的共-转染，得以使 SEAP 活性不依赖于 NS3 蛋白酶。

测定的方案：以两种 DNA 构建，以下列的比例来共转染在 CHO-SFMII(Life Technologies)+10% FCS(胎牛血清)中生长的 Huh-7 细胞；每 4×10^6 个 Huh-7 细胞用 7 微克 NS3-500 毫微克 SEAP+800 微升 FuGENE(Boehringer Mannheim)。在 37°C 5 小时之后，冲洗细胞，以胰蛋白酶消化，并(以 80,000 个细胞/孔)平铺在含有受试化合物的浓度范围的 96-孔培养盘上。在 24 小时培养后，用 Phospha-Light 工具合(Tropix)测量培养基中的 SEAP 活性。

用 SAS 软件进行有关化合物浓度的 SEAP 活性抑制%的分析，获得 EC_{50} 。

化合物的表

下列列举本发明的代表性化合物。

发现列于表 1 至 9 中的所有化合物，在实施例 48 中提供的酶测定中都

是有活性的。有星号(*)的数字代表用实施例 49 中提供的放射性测定而获得的酶活性，具有在 $50\mu\text{M}$ 下的 IC_{50} 。在这些酶测定中，使用下列的分级：A $\geq 1\mu\text{M}$; $1\mu\text{M} > B > 0.1\mu\text{M}$; 且 $C \leq 0.1\mu\text{M}$ 。

在实施例 50 中提供的特异性测定中测试数个化合物，并发现其对 NS3 蛋白酶有特异性。一般而言，得自不同特异性测定的结果如下： $\text{HLE} > 300\mu\text{M}$; $\text{PPE} > 300\mu\text{M}$; $\alpha\text{-Chym} > 300\mu\text{M}$; $\text{Cat. B} > 300\mu\text{M}$; 表示这些化合物对 HCV NS3 蛋白酶是具有高度特异性而并未预期显示严重的副作用。此外，以在实施例 51 所述的细胞-基的测定测试这些化合物中的某些，发现其具有低于 $10\mu\text{M}$ 的 EC_{50} ，强烈地表示这些化合物可跨越细胞膜。特别是表 7、8 和 9 的化合物，已经在细胞测定中进行了评估，并在最后的一栏中指出其结果。在细胞测定中，使用下列的编码：A $> 1\mu\text{M}$; B $\leq 1\mu\text{M}$ 。

在下表中使用下列的缩写：

MS：电喷雾质谱数据： $m/z \text{MH}^+$ 除非另有以星号*指示= $m/z \text{MH}$ ；Ac：乙酰基；Bn：苄基；Boc：叔-丁氧羰基；Ph：苯基；Pr：丙基。

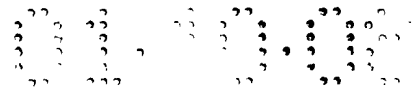
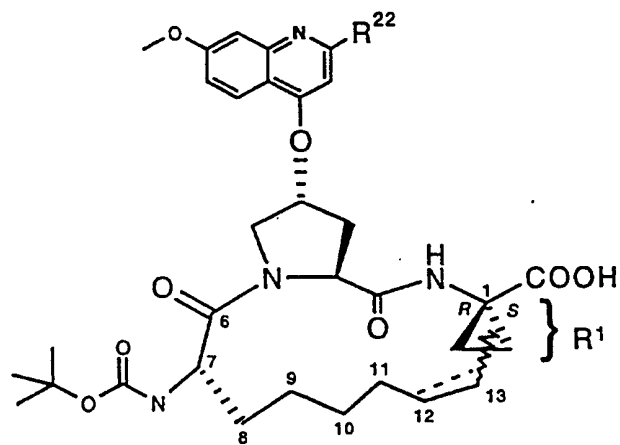


表 1



在 R¹ 处的单一立体异构体

化合物号	双键	D-R ¹ 键的立体化学	R ²²	MS	酶活性
101	12,13-反式	1R,D 与酰胺同侧	苯基	685.8	A*
102	无	1R,D 与酸同侧	苯基	687.2	C
103	无	1R,D 与酰胺同侧	苯基	687.2	A*


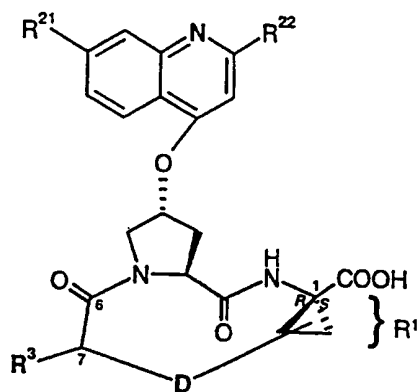
化合物 #	R ³	R ⁴	双键	D-R ¹ 键的立体化学	R ²¹	R ²²	MS	酶活性
210	NH-Boc	H	13,14-顺式	1S,D 与酸同侧	OMe	苯基	699.8	A*
211	NH ₂	H	13,14-顺式	1R,D 与酸同侧	OMe	苯基	599.7	C
213	OH (一个异构物)	H	13,14-顺式	1R,D 与酸同侧	OMe	H	524.6	B
214	NH-Boc	10-氧代	13,14-顺式	1R,D 与酸同侧	OMe	苯基	713.8	C
215	NH-Boc	H	无	1R,D 与酸同侧	OMe	苯基	701.8	C
217	NH-Boc	10-OH (混合的非对映体)	13,14-顺式	1R,D 与酸同侧	OMe	苯基	715.8	C
218	NH-Boc	10-氧代	13,14-顺式	1R,D 与酰胺同侧	OMe	苯基	713.8	C
219	NH-Ac	H	无	1R,D 与酸同侧	OMe	苯基	643.2	C
220	NH-Boc	H	13,14-顺式	1R,D 与酰胺同侧	OMe		706.2	C

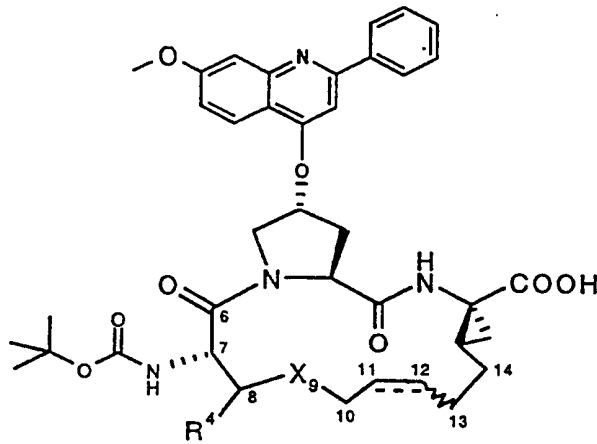
表 3

在 R^1 处的单一立体异构物

化合物 #	R^3	-D-	D- R^1 键的 立体化学	R^{21}	R^{22}	MS	酶 活性
301	NH- Boc		1R 或 1S,D 与酸同侧	H	H	621.7	B
302	NH- Boc		1R,D 与酰 胺同侧	OMe	Ph	671	A
303	NH- Boc		1R,D 与酰 胺同侧	OMe	Ph	701.3	B
304	NH- Boc		1R,D 与酸 同侧	OMe	Ph	711.1	C
305	HO		1R,D 与酸 同侧	OMe	Ph	602.2	B
306	NH- Boc		1R,D 与酰 胺同侧	OMe	Ph	673.2	A*

化合物 #	R ³	-D-	D-R ¹ 键的立体化学	R ²¹	R ²²	MS	酶活性
307	NH-Boc		1R,D与酸同侧	OMe		777	C
308	NH-Ac		1R,D与酸同侧	OMe	OEt	609.2	C

表 4



D-R¹键与酸同侧

化合物 #	R ⁴	9-X	11, 12 双键	MS	酶活性
401	H	CH ₂	反式	699.3	C
402	H	CH ₂	顺式	699.4	B
403	H	O	反式	701.3	C
404	Me	O	反式	715.3	B







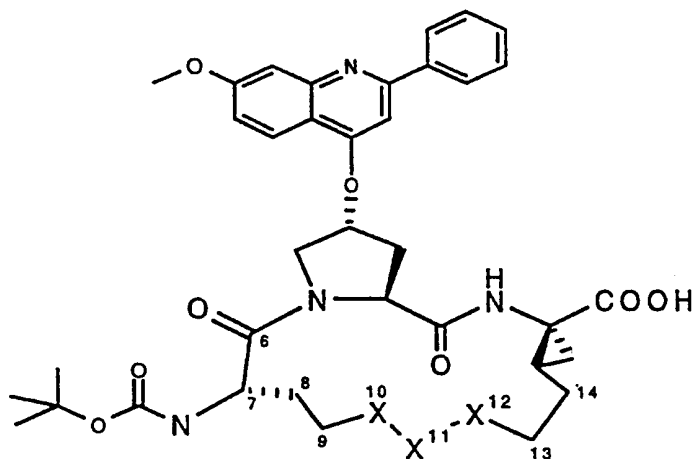
化合物 #	R ⁴	9-X	11, 12 双键	MS	酶活性
405	Me 	O	反式	715.2	C
406	H	O	无	703.3	C
407	Me 	O	无	717.3	B
408	Me 	O	无	717.3	C
409	Me 	O	顺式	715.2	B
410	Me 	S	反式	731.3	C
411	Me 	S	顺式	731.3	A*
412	8-(Me) ₂	9-S	顺式	745.3	A

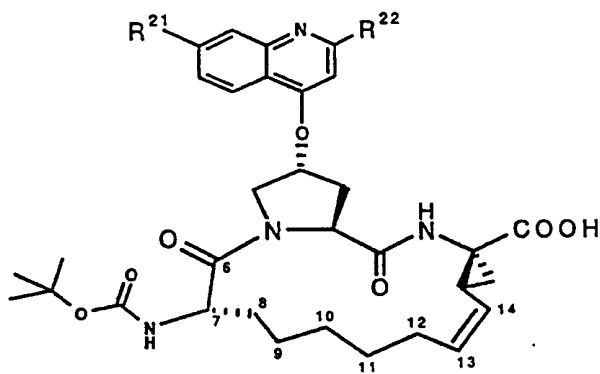
表 5



D-R¹键与酸同侧

化合物 #	10-X	11-X	12-X	MS	酶活性
501	CH ₂	O	CH ₂	703.2	C
502	CH ₂	CH ₂	CH ₂	701	C
503	CH ₂	CH ₂	NH	702.3	A
504	CH ₂	CH ₂	N(Me)	716.3	A*
505	CH ₂	CH ₂	N(CO)Me	744.3	B
506	CH ₂	CH ₂	N(CO)Ph	806.3	B
507	NH	CH ₂	CH ₂	702.3	C
508	N(CO)Me	CH ₂	CH ₂	744.3	C

表 6

D-R¹键结与酸同侧

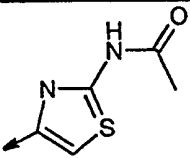
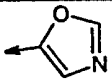
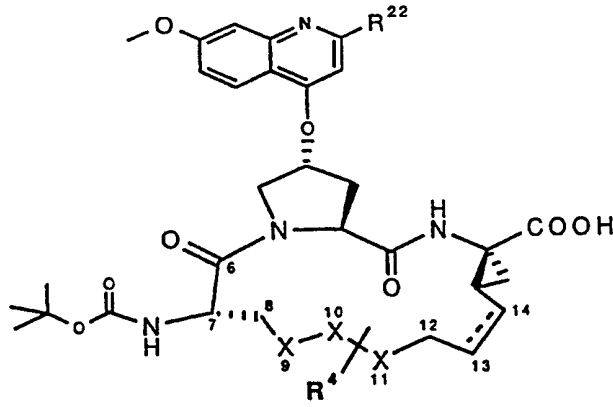
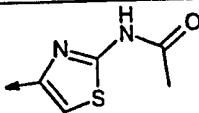
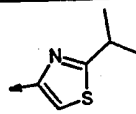


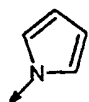
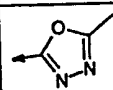
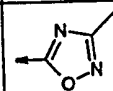
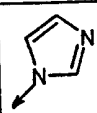
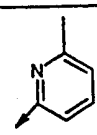
化合物号	R ²¹	R ²²	MS	酶活性
601	N(Me) ₂		776.2	C
602	OH	(CF ₃)	675.2*	C
603	OMe		690.1	C

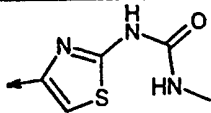
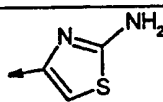
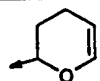
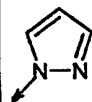
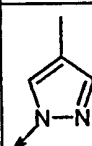
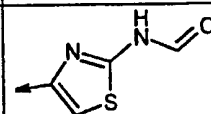
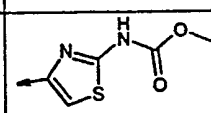
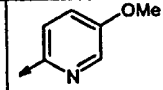
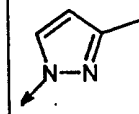
表 7



D-R¹键与酸同侧

化合物号	R ⁴	X ⁹ ; X ¹⁰ ; 或 X ¹¹	13,14 双键	R ²²	MS	细胞活性
701	H	11-O	顺式	苯基	701.3	A
702	H	CH ₂	顺式		763.1	B
703	H	CH ₂	无		751.4	B
704	H	CH ₂	顺式		700.3	B
705	H	CH ₂	顺式		706.2	B
707	H	CH ₂	顺式		748.2	B
708	H	CH ₂	顺式		749.2	B

化合物号	R ⁴	X ⁹ ; X ¹⁰ 或 X ¹¹	13,14 双键	R ²²	MS	细胞活性
709	H	CH ₂	无		765.2	B
710	H	CH ₂	无		750.1	B
711	H	CH ₂	无		702.2	B
712	H	CH ₂	顺式	-OEt	667.3	B
713	H	CH ₂	无		708.1	B
714	H	CH ₂	无	-OEt	669.3	B
715	H	CH ₂	顺式		688.3	B
716	H	CH ₂	顺式		705.3	A
717	H	CH ₂	顺式		705.2	B
718	H	CH ₂	顺式		689.3	B
719	H	CH ₂	顺式		714.2	B

化合物号	R ⁴	X ⁹ ; X ¹⁰ ; 或 X ¹¹	13,14 双键	R ²²	MS	细胞 活性
730	H	CH ₂	无		780.1	B
731	H	CH ₂	顺式		721.1	B
732	H	CH ₂	顺式		705.3	A
733	H	CH ₂	顺式		689.3	B
734	H	CH ₂	顺式		703.2	B
735	H	CH ₂	顺式		749.2	B
736	H	CH ₂	顺式		779.2	B
737	H	CH ₂	顺式		730.2	B
738	H	CH ₂	顺式		703.2	B
739	10-(R) Me	CH ₂	无:	Ph	715.2	B
740	10-(S) Me	CH ₂	无:	Ph	715.3	B

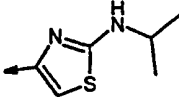
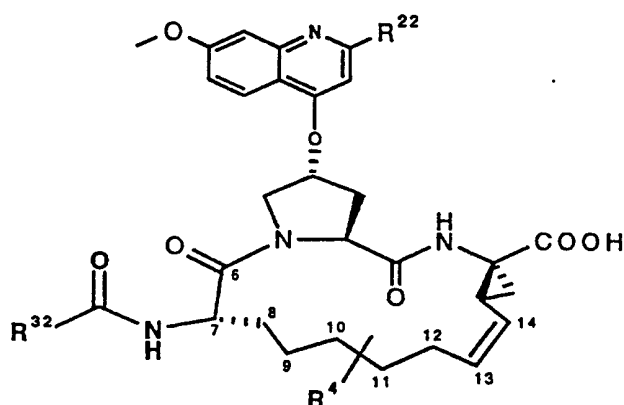
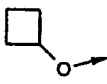
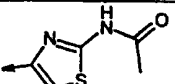
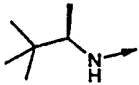
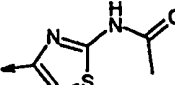
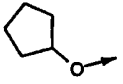
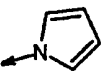
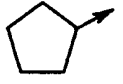
化合物号	R ⁴	X ⁹ ; X ¹⁰ ; 或 X ¹¹	13,14 双键	R ²²	MS	细胞活性
741	H	CH ₂	Cis		763.1	B

表 8

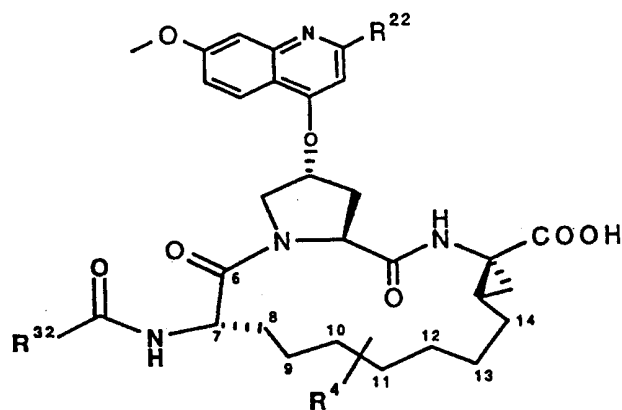
D-R¹键与酸同侧, 双键 13, 14: 顺式

化合物号	R ³²	R ⁴	R ²²	MS	细胞活性
801		H		761.2	B
803	<i>n</i> -Pr	H	OEt	637.3	A
804		H		790.3	B
805		H		700.1	B
806		H	OEt	663.2	A

化合物号	R ³²	R ⁴	R ²²	MS	细胞活性
807		H	OEt	679.3	B
808		H	OEt	653.2	A
809		H		775.1	B
810		H		761.2	B
811		H		747.2	B
812		H		733.2	B
813		H	OEt	691.3	B
814		H		718.3	B
815		H		726.3	B
816		H		776.3	B
817		H		760.2	B
818		H		791.1	B

化合物号	R ³²	R ⁴	R ²²	MS	细胞活性
819		H		833.2	B
820		H		747.2	B
821		H		700.9	B
822		H		775.4	B
823		H		715.2	B
824		10-(R) Me	OEt	693.0	B

表 9



D-R¹键与酸同侧

化合物号	R ³²	R ⁴	R ²²	MS	细胞活性
901		H	OEt	681.3	B
902		H		719.9	B
903		H		705.9	B
904		H		703.0	B
905		H		689.0	B
906		H		762.0	B
907		H		702.0	B

化合物号	R ³²	R ⁴	R ²²	MS	细胞活性
908		H		735.2	B
909		H		777.0	B
910		H		763.1	B
911		H		777.0	B
912		H		748.9	B
913		H		762.9	B
914		H		749.0	B
915		H		751.1	B
916		10 (R) Me	OEt	695.2	B