I359144

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I359144B1

(45)公告日： 中華民國 101 (2012) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：099107488 (22)申請日： 中華民國 90 (2001) 年 08 月 31 日

(51)Int. Cl.： *C07D403/00 (2006.01)* *C07D403/12 (2006.01)*
A61K31/495 (2006.01) *A61K31/403 (2006.01)*
A61P31/12 (2006.01)

(30)優先權：2000/08/31 美國 60/229,398
2001/03/21 美國 60/277,641

(71)申請人：維泰克斯製藥公司 (美國) VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED (US)
美國

(72)發明人：巴賓 羅勃 艾德華 BABINE, ROBERT EDWARD (US)；陳書輝 CHEN, SHU HUI (US)；柯雷多 伊凡 COLLADO, IVAN (NMN) (ES)；嘉西雅 帕拉狄絲 克莉絲堤娜 GARCIA-PAREDES, CRISTINA (NMN) (ES)；葛拉斯 約翰 艾文 GLASS, JOHN IRVIN (US)；金翎 JIN, LING (NMN) (CN)；蘭瑪 傑森 艾瑞克 LAMAR, JASON ERIC (US)；帕克三世 雷蒙 山謬 PARKER III, RAYMOND SAMUEL (US)；欣德 南西 茱恩 SNYDER, NANCY JUNE (US)；孫 夕晨 大衛 SUN, XICHENG DAVID (CN)；泰伯 馬可 約瑟夫 TEBBE, MARK JOSEPH (US)；維克多 法蘭茲 VICTOR, FRANTZ (US)；王 Q 梅 WANG, Q MAY (US)；葉伊芳 怡美 YIP, YVONNE YEE MAI (HK)；顧德齊 GUO, DEQI (CA)

(74)代理人：陳長文

審查人員：李東秀

申請專利範圍項數：33 項 圖式數：14 共 408 頁

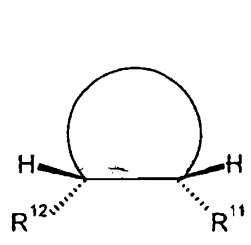
(54)名稱

擬肽蛋白酶抑制劑之中間物

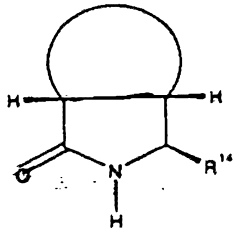
INTERMEDIATES OF PEPTIDOMIMETIC PROTEASE INHIBITORS

(57)摘要

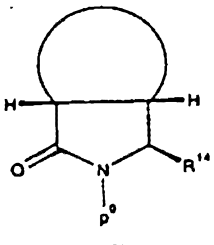
本發明係關於式 24、式 25 及式 26 化合物，



(24)



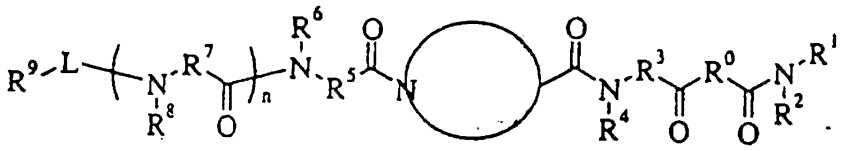
(25)



(26)

其中 R^{11}、R^{12}、R^{14} 及 p^0 係如後復內文中所定義。

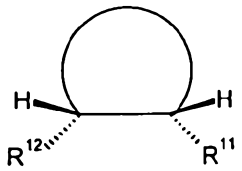
式 24、式 25 及式 26 化合物為其中為雙環之式 1 化合物之中間物：



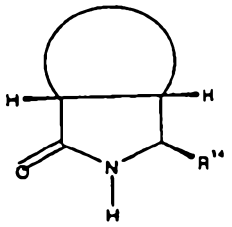
1

式 1 化合物為可用作蛋白酶抑制劑、特別是絲胺酸蛋白酶抑制劑、更特別是 C 型肝炎病毒 NS3 蛋白酶抑制劑之擬肽化合物。

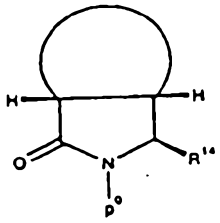
The present invention relates to compounds of formulas 24, 25, and 26



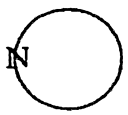
(24)

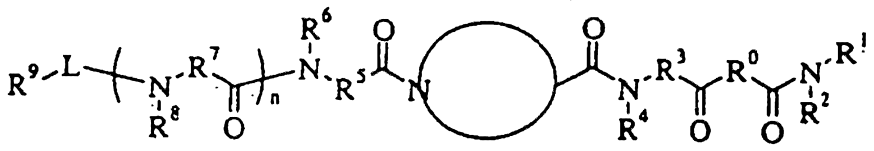


(25)



(28)

wherein R^{11}, R^{12}, R^{14} and p^0 are as defined in the disclosure hereinafter. The compounds of formulas 24, 25, and 26 are intermediates for the compounds of formula I wherein  is bicyclic:



1

The compounds of formula 1 are peptidomimetic compounds useful as protease inhibitors, particularly as serine protease inhibitors and more particularly as hepatitis C NS3 protease inhibitors.

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係針對擬肽化合物及其中間物，其製備，包括中間物之立體選擇性合成方法，含有此擬肽化合物之醫藥組合物，及此擬肽化合物或其組合物作為蛋白酶抑制劑，特別是作為絲胺酸蛋白酶抑制劑，且更特別是作為C型肝炎病毒("HCV")NS3蛋白酶抑制劑之用途。此擬肽化合物，作為HCVNS3蛋白酶抑制劑，特別可用於干擾C型肝炎病毒之生命期，及用於治療或預防HCV感染，或與其有關聯之生理學症狀。本發明亦針對組合治療之方法，使用擬肽化合物或醫藥組合物或供其使用之套件與醫藥包裝，用於抑制細胞中之HCV複製，或用於治療或預防病人中之HCV感染。根據本發明，被包含作為醫藥組合物者，係為包含HCV絲胺酸蛋白酶之抑制劑，且併用具有抗-HCV活性之干擾素；HCV絲胺酸蛋白酶之抑制劑，且併用不為干擾素而具有抗-HCV活性之化合物；或HCV絲胺酸蛋白酶之抑制劑，且併用具有抗-HCV活性之干擾素，及不為干擾素而具有抗HCV活性之化合物。再者，本發明係針對製備對掌性雙環脯胺酸酯中間物之立體選擇性方法，該中間物可用於合成擬肽化合物。

【先前技術】

被HCV感染為一種令人嘆為觀止之人類醫療問題，且目前被認為是大部份非A型、非B型肝炎病例之病因劑。

HCV被認為係以慢性方式感染3%世界人口[A.Alberti等

人，"C型肝炎之自然歷史"，**肝病學期刊**，**31**(補充1)，17-24(1999)]。僅在美國中之感染率，即為1.8%或3百9十萬人[M.J.Alter，"在美國中之C型肝炎病毒感染"，**肝病學期刊**，**31**(補充1),88-91(1999)]。在受感染之所有病人中，超過70%會發展慢性感染，咸認其係為肝硬化與肝細胞癌之一項主要原因[D.Lavanchy，"C型肝炎之全球監督與防治"，**病毒肝炎期刊**，**6**, 35-47(1999)]。

HCV之複製係涵蓋3010-3033胺基酸之多蛋白之基因組編碼[Q.-L.Choo等人，"C型肝炎病毒之基因機體形成與多樣性"，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88**),2451-2455(1991)；N.Kato等人，"得自患有非A型、非B型肝炎之日本病人之人類C型肝炎病毒基因組之分子無性繁殖"，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**, 9524-9528(1990)；A. Takamizawa等人，"自人類載體單離之C型肝炎病毒基因組之結構與機體形成"，**J. Virol.**, **65**, 1105-1113(1991)]。HCV非結構(NS)蛋白質係被假設會對病毒複製提供必須之催化手段。NS蛋白質係藉由多蛋白之蛋白分解分裂而衍生[R.Bartenschlager等人，"C型肝炎病毒之非結構蛋白質3，會使得為在NS3/4與NS4/5接合處分裂所需要之絲胺酸型蛋白酶編碼"，**J. Virol.**, **67**, 3835-3844(1993)；A.Grakoui等人，"C型肝炎病毒編碼之絲胺酸蛋白酶之特徵鑒定：蛋白酶依存性多蛋白分裂位置之測定"，**J. Virol.**, **67**, 2832-2843(1993)；A.Grakoui等人，"C型肝炎病毒多蛋白分裂產物之表現與識別"，**J. Virol.**, **67**, 1385-1395(1993)；L. Tomei等人，

"NS3為處理C型肝炎病毒多蛋白所需要之絲胺酸蛋白酶"，**J. Virol.**, **67**, 4017-4026(1993)]。事實上，NS3之最初181個胺基酸(此病毒多蛋白之殘基1027-1207)已被証實包含NS3之絲胺酸蛋白酶功能部位，其會處理HCV多蛋白之所有四個下游位置[C.Lin等人，"C型肝炎病毒NS3絲胺酸蛋白酶：轉移分裂要求條件與處理動力學"，**J. Virol.**, **68**, 8147-8157(1994)]。

HCVNS蛋白質3(NS3)含有絲胺酸蛋白酶活性，其會幫助處理大部份病毒酶，且因此被認為是病毒複製與感染性所必須的。NS3蛋白酶之必要性，係推論自以下事實，在黃熱病病毒NS3蛋白酶上之突變，會降低病毒感染性[T. J. Chambers等人，"得自黃熱病病毒之非結構蛋白質NS3之N-末端功能部位之証據，係為負責病毒多蛋白中之位置專一分裂之絲胺酸蛋白酶"，**Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**, 8898-8902(1990)]。最近，已証實在HCVNS3蛋白酶之活性位置處之突變，可在黑猩猩模式中完全免除HCV感染[C.M.Rice等人，"C型肝炎病毒編碼之酵素活性及在3'-非轉譯區域中之保守RNA元素，係為活體內病毒複製所必須的"，**J. Virol.**, **74(4)**2046-51(2000)]。HCVNS3絲胺酸蛋白酶亦被認為是病毒複製所必須的，因其及其有關聯之輔因子NS4A會幫助處理所有病毒酶。此處理似乎類似藉由人類免疫不全病毒("HIV")天門冬胺醯基蛋白酶所進行者。此外，HIV蛋白酶抑制劑在人體中作為有效抗病毒劑之經証實用途，係証實在病毒生命期中插入蛋白酶蛋白質處理

階段，確實會造成治療活性劑。因此，此蛋白酶係為藥物發現之吸引人標的。

數種可能之HCV蛋白酶抑制劑已被描述。PCT公報案號WO00/09558, WO00/09543, WO99/64442, WO99/07733, WO99/07734, WO99/50230, WO98/46630, WO98/17679及WO97/43310，美國專利案號5,990,276, M. Llinas-Brunet等人，**Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 8, 1713-1718(1998), W. Han等人，**Bioorg. Med. Chem. Lett.**, **10**, 711-713(2000), R. Dunsdon等人，**Bioorg. Med. Chem. Lett.**, **10**, 1571-1579(2000), M. Llinas-Brunet等人，**Bioorg. Med. Chem. Lett.**, **10**, 2267-2270(2000)及S.LaPlante等人，**Bioorg. Med. Chem. Lett.**, **10**, 2271-2274(2000)，各描述可能之HCVNS3蛋白酶抑制劑。很不幸地，目前沒有絲胺酸蛋白酶抑制劑可有效作為抗-HCV劑。

事實上，除了干擾素-α、干擾素-α/三唑核苷組合及最近之經PEG化之干擾素-α以外，並沒有抗-HCV治療劑。但是，關於干擾素-α治療劑與干擾素-α/三唑核苷之持續回應率，有很低(<50%)傾向，且藉由此等治療劑顯示之副作用，有很顯著且嚴重之傾向[M. A. Walker，"C型肝炎病毒：目前研究途徑與發展之綜觀"，**DDT**, **4**, 518-529(1999)；D. Moradpour等人，"C型肝炎之現行與發展中之療法"，**Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, **11**, 1199-1202(1999)；H. L. A. Janssen等人，"慢性病毒肝炎之α-干擾素療法所伴隨之自殺"，**J. Hepatol.**, **21**, 241-243

(1994)；及P. F. Renault等人，"α-干擾素之副作用"，肝病討論會9, 273-277, (1989)]。再者，干擾素療法只在少部份(~25%)病例中引致長期減輕[O. Weiland，"在慢性C型肝炎病毒感染中之干擾素療法"，**FEMSMicrobiol. Rev., 14,** 279-288(1994)]。前述關於干擾素-α療法之問題，甚至已導致經PEG化之經衍化干擾素-α化合物作為經改良抗-HCV治療劑之發展與臨床研究。

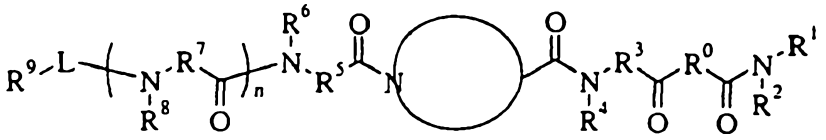
鑒於目前關於抗-HCV治療劑之狀況，顯然仍需要更有效且更良好被容許之療法。

再者，複雜擬肽化合物之合成，長久以來一直被大部份合成有機方法之非立體選擇性質所阻擾。習知擬肽化合物之對掌異構物之治療活性，會廣泛地改變。因此，提供此種立體特異性合成方法，是極為有利的。

以對掌性方式合成可用於本發明治療用擬肽蛋白酶抑制劑合成之專一雙環脯胺酸酯中間物之先前嘗試，已遭遇到非對掌選擇性或非對映異構選擇性或長的涵蓋之合成途徑，或不適合製備大量產物。因此，亦有需要一種以非對映異構選擇性方式及對掌異構上富含形式，以製備大量雙環脯胺酸酯之方式。

【發明內容】

本發明係關於式I擬肽化合物



I

其中：

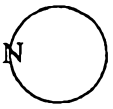
R^0為一個鍵結或二氟亞甲基；

R^1為氫、視情況經取代之脂族基團、視情況經取代之環狀基團或視情況經取代之芳族基團；

R^2與R^9各獨立為視情況經取代之脂族基團、視情況經取代之環狀基團或視情況經取代之芳族基團；

R^3、R^5及R^7各獨立為(視情況經取代之脂族基團、視情況經取代之環狀基團或視情況經取代之芳族基團)(視情況經取代之亞甲基或視情況經取代之次乙基)、視情況經取代之(1,1-或1,2-)次環烷基或視情況經取代之(1,1-或1,2-)次雜環基；

R^4、R^6、R^8及R^{10}各獨立為氫或視情況經取代之脂族基團；



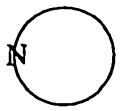
為經取代之單環狀氮雜環基或視情況經取代之多環狀氮雜環基，或視情況經取代之多環狀氮雜環烯基，其中不飽和性係在遠離帶有R^9-L-(N(R^8)-R^7-C(O)-)$_n$N(R^6)-R^5-C(O)-N部份基團之環之環中，且-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)C(O)NR^2R^1部份基團係連接於其上；

L為-C(O)-、-OC(O)-、-NR^{10}C(O)-、-S(O)$_2$-或-NR^{10}S(O)$_2$-；及

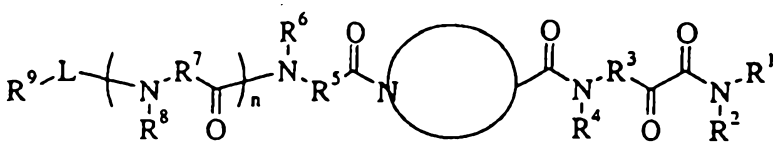
n為0或1，或

其藥學上可接受之鹽或前體藥物，或此種化合物之溶劑合物，其鹽或其前體藥物，

其條件是

當  為經取代之 時，則L為-OC(O)-，且R^9為視情況經取代之脂族，或至少一個R^3、R^5及R^7為(視情況經取代之脂族基團、視情況經取代之環狀基團或視情況經取代之芳族基團)(視情況經取代之乙烷二基)，或R^4為視情況經取代之脂族。

本發明亦提供一種具有下列化學式之化合物：



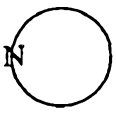
其中：

R^1為氫、視情況經取代之脂族基團、視情況經取代之環狀基團或視情況經取代之芳族基團；

R^2及R^9各獨立為視情況經取代之脂族基團、視情況經取代之環狀基團或視情況經取代之芳族基團；

R^3、R^5及R^7各獨立為(視情況經取代之脂族基團、視情況經取代之環狀基團或視情況經取代之芳族基團)(視情況經取代之甲烷二基或視情況經取代之乙烷二基)；

R^4、R^6、R^8及R^{10}各獨立為氫或視情況經取代之脂族基團；

 為經取代之單環狀氮雜環基或視情況經取代之多環狀氮雜環基、或視情況經取代之多環狀氮雜環烯基，其

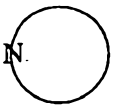
中不飽和性係在遠離帶有R^9-L-($N(R^8)$-R^7-C(O)-)$_n$N(R^6)-R^5-C(O)-N部分基團之環之環中，且-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)C(O)NR^2R^1部分基團係連接於其上；

L為-C(O)-、-OC(O)-、-NR^{10}C(O)-、-S(O)$_2$-或-NR^{10}S(O)$_2$-；及

n為0或1，或

其醫藥上可接受之鹽或前體藥物，或此種化合物之溶劑合物，其鹽或其前體藥物，

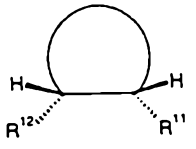
其條件是

當  為經取代之 時，則L為-OC(O)-，且R^9為視情況經取代之脂族，或至少一個R^3、R^5及R^7為(視情況經取代之脂族基團、視情況經取代之環狀基團或視情況經取代之芳族基團)(視情況經取代之乙烷二基)，或R^4為視情況經取代之脂族。

本發明亦針對一種包含式1化合物之醫藥組合物，及使用式1化合物以抑制HCV蛋白酶或治療或預防病人中之HCV感染或與該感染有關聯生理學症狀之方法。

本發明亦針對立體選擇性方法，用以製備對掌性雙環脯胺酸酯化合物，其係為可用於製備式1化合物之中間物。此合成方法包括以下步驟：

(a) 使式24化合物分裂與環化



(24)

其中：

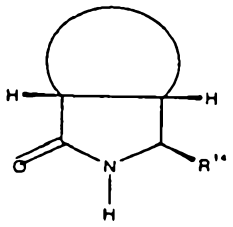
為視情況經取代之環烷基或視情況經取代之稠合芳基環烷基；

R^{11}為$-CO_2R^{13}$；

R^{12}為亞胺性甘胺醯亞胺加成物；

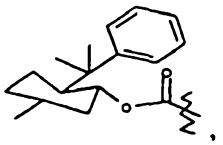
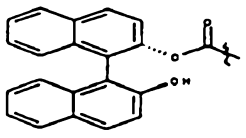
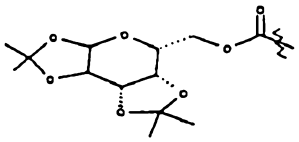
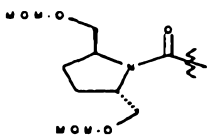
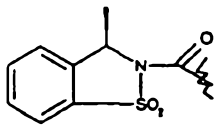
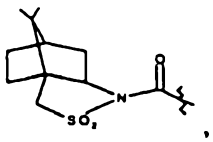
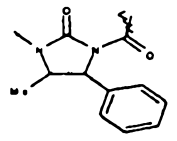
R^{13}為酸保護基或視情況經取代之脂族基團；

於分裂與環化條件下進行，以形成式25化合物



(25)

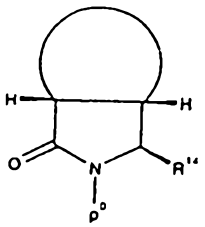
其中：

R^{14}為$-CONR^{15}R^{15}$、-CN；  ，  ，  ，  ，  ，  ，  ，或$-CO_2R^{16}$；

R^{15}為視情況經取代之脂族基團；

R^{16}為酸保護基、視情況經取代之芳基或視情況經取代之脂族基團；及

(b) 以醯胺保護基，保護式25化合物中之內醯胺部份基團之氮，以形成式26化合物



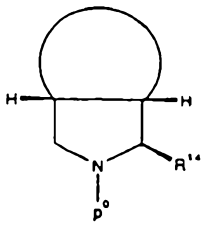
(26)

其中：

p^0為醯胺保護基；

R^{14}係如本文中所述；及

(c) 使式26化合物，在還原條件下還原，以形成式27化合物

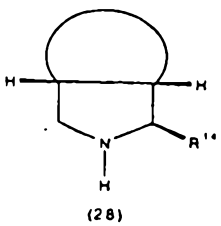


(27)

其中：

p^0與R^{14}均如本文中所述；及

(d) 使式27化合物，於去除保護條件下去除保護，以形成式28化合物

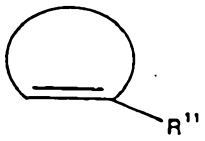


(28)

其中：

R^{14}係如本文中所述。

本發明亦針對上述合成方法，進一步包括以下步驟，其中式24化合物係經由以亞胺性甘胺醯亞胺化合物，於式29化合物上達成Michael加成而製成



(29)

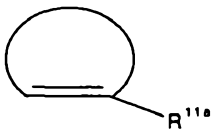
其中：

為視情況經取代之環烯基或視情況經取代之稠合芳基環烯基；

R^{11}為$-CO_2R^{13}$；

其中：

式29化合物可經由使式29a化合物酯化而製成



(29a)

其中：

為視情況經取代之環烯基或視情況經取代之稠合芳基環烯基；

R^{11a}為$-CHO$、$-COR^{15}$、$-C\equiv N$或$-CONR^{15}R^{15}$；及

R^{15}係如本文中所述。

值得注意的是，熟諳此藝者將明瞭酮類之酯化作用可藉由例如Bayer-Villiger反應而達成。將腈類與醯胺類轉化為

酯類可經由例如水溶液水解，接著進一步酯化而達成。將醛類轉化為酯類可藉由例如醛之氧化作用，接著酯化而達成。

本發明之另一方面為式1化合物，其中取代基係選自如本文中定義之較佳或特定具體實施例之組合。

本發明之另一方面為式24-29化合物，其中取代基係選自如本文中定義之較佳或特定具體實施例之組合。

本發明之另一方面為醫藥組合物，其除了一或多種HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑以外，包含一或多種干擾素或會引致顯示抗-HCV活性之干擾素產生之化合物，及/或一或多種具有抗HCV活性之化合物，包括免疫調節化合物，譬如顯示HCV抗病毒活性之免疫刺激細胞活素，及藥學上可接受之載劑。

本發明之另一方面為在有需要之病人中治療或預防HCV感染之方法，其包括對該病人投予藥學上有效量之組合，此組合為一或多種HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑；一或多種干擾素或會引致顯示抗-HCV活性之干擾素產生之化合物；及/或一或多種具有抗-HCV活性之化合物，包括免疫調節化合物，譬如顯示HCV抗病毒活性之免疫刺激細胞活素。

本發明亦針對一或多種HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑，且併用一或多種干擾素或會引致顯示抗-HCV活性之干擾素產生之化合物，及/或一或多種具有抗-HCV活性之化合物，包括免疫調節化合物，譬如顯示HCV抗病毒活性之免疫刺激細胞活素，於藥劑製備上之用途，該藥劑係在有需要之

病人中用於治療或預防HCV感染。

本發明亦針對在病人中治療或預防HCV感染之套件或醫藥包裝，其中該套件或醫藥包裝包含許多個別容器，其中至少一個該容器含有一或多種HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑(單獨或併用藥學上可接受之載劑或稀釋劑)，至少另一個該容器含有一或多種干擾素或會引致顯示抗-HCV活性之干擾素產生之化合物(單獨或併用藥學上可接受之載劑或稀釋劑)，及視情況，至少另一個該容器含有一或多種具有抗-HCV活性之化合物(單獨或併用藥學上可接受之載劑或稀釋劑)，包括免疫調節化合物，譬如顯示HCV抗病毒活性之免疫刺激細胞活素。

HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑、干擾素或抗-HCV化合物在任何前述應用中之量，可為藥學上有效量，亞臨床抗-HCV有效量或其組合，只要HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑、干擾素或會引致顯示抗-HCV活性之干擾素產生之化合物及/或抗-HCV化合物之最後組合，包含藥學上有效量之化合物，有效用以治療或預防病人中之HCV感染即可。

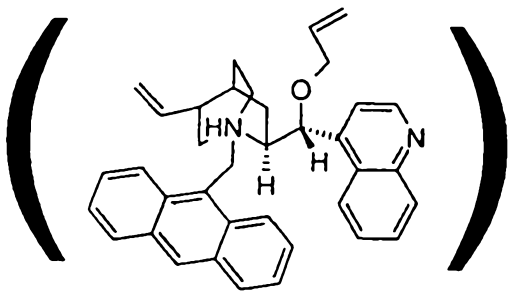
【實施方式】

本文中所引用各專利文件及其他參考資料之內容，均以其全文併於本文供參考。

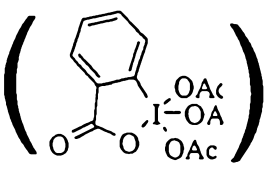
當於上文及在整個本發明之說明文中使用時，下列縮寫，除非另有指出，否則應明瞭係具有下述意義：

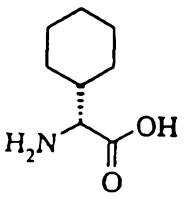
名稱	試劑或片段
ACN	乙腈

AIBN	2,2'-偶氮雙異丁腈
BOC或Boc	胺基甲酸第三-丁酯
BOP	六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基參(二甲胺基)鏻
n-Bu_3SnH	氫化三-正-丁基錫
t-Bu	第三-丁基
Cbz	胺基甲酸苄酯
對掌性PTC	對掌性相轉移觸媒



DAST	三氟化(二乙胺基)硫(Et_2NSF_3)
DCC	二環碳化二亞胺
DCM	二氯甲烷(CH_2Cl_2)
DIBAL-H	氫化二異丁基鋁
DIC	1,3-二異丙基碳化二亞胺
DIPEA	二異丙基乙胺
DMAP	4-(N,N-二甲胺基)吡啶
DMP試劑	Dess-Martin過碘烷試劑



DMF	二甲基甲醯胺
DMSO	二甲亞碸
EA	元素分析
EDCI	1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳化二亞胺HCl
eq	當量
Et	乙基
Et_2O	乙醚
EtOH	乙醇
EtOAc	醋酸乙酯
Et_3Si	三乙基矽烷
FMOC	9-芴基甲氧羰基
H-Chg-OH	
HOAt	1-羥基-7-氮苯并三唑
HOBT	1-羥基苯并三唑
HOSu	N-羥基琥珀醯胺
HPLC	高性能液相層析法
LAH	鋰鋁酐
Me	甲基
MeI	碘化甲烷
MeOH	甲醇
MeOC(O)Cl	氯甲酸甲酯
MOMCl	甲氧基氯化甲烷

MOM	甲氧基甲基
MS	質量光譜
$NaBH_4$	硼氫化鈉
$Na_2C_4H_4O_6$	酒石酸鈉
NMP	N-甲基四氫吡咯酮
NMR	核磁共振
P-	聚合體鍵結
PyBOP	六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基參-四氫吡咯基-鏻
TBD	1,5,7-三氮雙環并[4.4.0]-癸-5-烯
RP-HPLC	逆相-高壓液相層析法
TBSCl	氯化第三-丁基二甲基矽烷
TCA	三氯醋酸
TFA	三氟醋酸
Tf_2O	三氟甲烷磺酸酐
THF	四氫呋喃
THP	四氫哌喃
TLC	薄層層析法

當於上文及在整個本發明之說明文中使用時，下列術語，除非另有指出，否則應明瞭係具有下述意義：-

"酸生物電子等排體"係意謂與羧基具有化學與物理類似性，產生廣泛類似生物學性質之基團(參閱Lipinski,醫藥化學年報，"於藥物設計上之生物同電異素"，**21**, 283 (1986)；Yun, Hwahak Sekye，"生物同電異素之應用於新穎藥物設計"*33*, 576-579, (1993)；Zhao, Huaxue Tongbao，

"鉛化合物在藥物設計上之生物電子等排體置換與發展" 34-38, (1995)；Graham, Theochem，"應用於藥物設計之理論研究：於生物電子等排體中之從頭電子分佈" **343**, 105-109, (1995))。舉例之酸生物電子等排體包括-C(O)-NHOH、-C(O)-CH_2OH、-C(O)-CH_2SH、-C(O)-NH-CN、磺酸基、膦酸基、烷基磺醯基胺甲醯基、四唑基、芳基磺醯基胺甲醯基、N-甲氧基胺甲醯基、雜芳基磺醯基胺甲醯基、3-羥基-3-環丁烯-1,2-二酮、3,5-二酮基-1,2,4-氧二唑啶基或羥基雜芳基，譬如3-羥基異噁唑基、3-羥基-1-甲基吡唑基等。

"酸性官能基"係意謂一種帶有酸性氫之部份基團。舉例之酸官能基包括羧基(-C(O)OH)、-C(O)NHOH-、-C(O)-CH_2OH、-C(O)-CH_2SH、-C(O)-NH-CN、磺基、磷基、烷基磺醯基胺甲醯基、四唑基、芳基磺醯基胺甲醯基、N-甲氧基胺甲醯基、雜芳基磺醯基胺甲醯基、3-羥基-3-環丁烯-1,2-二酮、3,5-二酮基-1,2,4-噁二唑烷基或羥基雜芳基如3-羥基異噁唑基、3-羥基-1-甲基吡唑基、咪唑基、巰基等，及適當羥基，譬如芳族羥基，例如羥苯基。

"酸保護基"係意謂一種易於移除之基團，其係為此項技藝中已知，用以保護羧基之酸性氫，以防止合成程序期間不期望之反應，例如阻斷或保護酸官能基，而同時進行涉及此化合物其他官能性位置之反應，並可選擇性移除。此種酸保護基係為熟諳此藝者所習知，已被廣泛地使用於羧基之保護，如在美國專利3,840,556與3,719,667中所述者，

其揭示內容係併於本文供參考。關於適當酸保護基，可參閱T. W. Green與P. G.M. Wuts "有機化學中之保護基" John Wiley & Sons, 1991。酸保護基亦包括如本文中定義之氫化作用不安定酸保護基。舉例之酸保護基包括酯類，譬如經取代與未經取代之C_{1-8}低碳烷基，例如甲基、乙基、第三-丁基、甲氧基甲基、甲硫基甲基、2,2,2-三氯乙基等，四氫哌喃基，經取代與未經取代之苯基烷基，譬如苄基，及其經取代之衍生物，譬如烷氧基苄基或硝基苄基等，桂皮基，二烷胺基烷基，例如二甲胺基乙基等，三甲基矽烷基，經取代與未經取代之醯胺與醯肼，例如N,N-二甲胺、7-硝基吲哚、肼、N-苯基肼等之醯胺與醯肼，醯氧基烷基，譬如三甲基乙醯基氧基甲基或丙醯氧基甲基等，芳醯基氧基烷基，譬如苯甲醯氧基乙基等，烷氧羰基烷基，譬如甲氧羰基甲基、環己基氧基羰基甲基等，烷氧羰基氧基烷基，譬如第三-丁氧羰基氧基甲基等，烷氧羰基胺基烷基，譬如第三-丁氧羰基胺基甲基等，烷胺基羰基胺基烷基，譬如甲胺基羰基胺基甲基等，醯基胺基烷基，譬如乙醯胺基甲基等，雜環基羰基氧基烷基，譬如4-甲基六氫吡呯基-羰基氧基甲基等，二烷胺基羰基烷基，譬如二甲胺基羰基-甲基等，(5-(低碳烷基)-2-酮基-1,3-二氧伍圜烯-4-基)烷基，譬如(5-第三-丁基-2-酮基-1,3-二氧伍圜烯-4-基)甲基等，及(5-苯基-2-酮基-1,3-二氧伍圜烯-4-基)烷基，譬如(5-苯基-2-酮基-1,3-二氧伍圜烯-4-基)甲基等。

"酸不安定性胺保護基"係意謂如本文中定義之胺保護

基，其可容易地經由以酸處理而被移除，同時對其他試劑保持相對安定。較佳酸不安定之胺保護基為BOC。

"脂族"係意謂如本文中定義之烷基、烯基或炔基。

"脂族基團取代基"係意謂連接至如本文中定義之脂族基團之取代基，包括芳基、雜芳基、羥基、烷氧基、環基氧基、芳氧基、雜芳基氧基、醯基或其硫酮基類似物、環基羰基或其硫酮基類似物、芳醯基或其硫酮基類似物、雜芳醯基或其硫酮基類似物、醯氧基、環基羰基氧基、芳醯基氧基、雜芳醯基氧基、鹵基、硝基、氰基、羧基(酸)、-C(O)NHOH-、-C(O)-CH_2OH、-C(O)-CH_2SH、-C(O)-NH-CN、磺基、磷基、烷基磺醯基胺甲醯基、四唑基、芳基磺醯基胺甲醯基、N-甲氧基胺甲醯基、雜芳基磺醯基胺甲醯基、3-羥基-3-環丁烯-1,2-二酮、3,5-二酮基-1,2,4-噁二唑烷基或羥基雜芳基如3-羥基異噁唑基、3-羥基-1-甲基吡唑基、烷氧羰基、環基氧基羰基、芳氧基羰基、雜芳基氧基羰基、烷基磺醯基、環基磺醯基、芳基磺醯基、雜芳基磺醯基、烷基亞磺醯基、環基亞磺醯基、芳基亞磺醯基、雜芳基亞磺醯基、烷硫基、環基硫基、芳基硫基、雜芳基硫基、環基、芳基重氮基、雜芳基重氮基、硫醇、亞甲基(H_2C=)、酮基(O=)、硫酮基(S=)、Y^1Y^2N-、$Y^1Y^2NC(O)$-、$Y^1Y^2NC(O)O$-、$Y^1Y^2NC(O)NY^3$-、$Y^1Y^2NSO_2$-或$Y^3SO_2NY^1$-，其中R^2係如本文定義，Y^1與Y^2係獨立為氫、烷基、芳基或雜芳基，及Y^3為烷基、環烷基、芳基或雜芳基，或關於其中取代基為Y^1Y^2N-之情況，則Y^1與Y^2之一可為如本文中

定義之醯基、環基羰基、芳醯基、雜芳醯基、烷氧羰基、環基氧基羰基、芳氧基羰基或雜芳基氧基羰基，而Y^1與Y^2中之另一個係如先前定義，或關於其中取代基為$Y^1Y^2NC(O)$-、$Y^1Y^2NC(O)O$-、$Y^1Y^2NC(O)NY^3$-或$Y^1Y^2NSO_2$-之情況，Y^1與Y^2亦可和Y^1與Y^2所經過而連接之N原子一起採用，而形成4至7員氮雜環基或氮雜環烯基。酸性/醯胺脂族基團取代基係為羧基(酸)、-C(O)NHOH-、-C(O)-CH_2OH、-C(O)-CH_2SH、-C(O)-NH-CN、磺基、磷基、烷基磺醯基胺甲醯基、四唑基、芳基磺醯基胺甲醯基、N-甲氧基胺甲醯基、雜芳基磺醯基胺甲醯基、3-羥基-3-環丁烯-1,2-二酮、3,5-二酮基-1,2,4-噁二唑烷基或羥基雜芳基如3-羥基異噁唑基、3-羥基-1-甲基吡唑基及Y^1Y^2NCO-。非酸性極性脂族基團取代基為羥基、酮基(O=)、硫酮基(S=)、醯基或其硫酮基類似物、環基羰基或其硫酮基類似物、芳醯基或其硫酮基類似物、雜芳醯基或其硫酮基類似物、烷氧羰基、環基氧基羰基、芳氧基羰基、雜芳基氧基羰基、醯氧基、環基羰基氧基、芳醯基氧基、雜芳醯基氧基、烷基磺醯基、環基磺醯基、芳基磺醯基、雜芳基磺醯基、烷基亞磺醯基、環基亞磺醯基、芳基亞磺醯基、雜芳基亞磺醯基、硫醇、Y^1Y^2N-、$Y^1Y^2NC(O)$-、$Y^1Y^2NC(O)O$-、$Y^1Y^2NC(O)NY^3$-或$Y^1Y^2NSO_2$-。舉例之帶有脂族基團取代基之脂族基團，包括甲氧基甲氧基、甲氧基乙氧基、乙氧基乙氧基，(甲氧基-、苄氧基-、苯氧基-或乙氧基-)羰基(甲基或乙基)，苄

氧羰基、吡啶基甲氧基-羰基甲基、甲氧基乙基、乙氧基甲基、正-丁氧基甲基、環戊基甲氧基乙基、苯氧基丙基、苯氧基烯丙基、三氟甲基、環丙基-甲基、環戊基甲基、羧基(甲基或乙基)、2-苯乙烯基、苄氧基、1-或2-萘基-甲氧基、4-吡啶基-甲基氧基、苄氧基乙基、3-苄氧基烯丙基、4-吡啶基甲基-氧基乙基、4-吡啶基甲基-氧基烯丙基、苄基、2-苯乙基、萘基甲基、苯乙烯基、4-苯基-1,3-戊二烯基、苯基-丙炔基、3-苯基丁-2-炔基、吡啶-3-基乙炔基及喹啉-3-基乙炔基、4-吡啶基-乙炔基、4-吡啶基乙烯基、噻吩基乙烯基、吡啶基乙烯基、咪唑基-乙烯基、吡咯基乙烯基、吡啶基戊烯基、吡啶基己烯基及吡啶基庚烯基、噻吩基-甲基、吡啶基甲基、咪唑基甲基、吡咯基甲基、四氫哌喃基甲基、四氫哌喃基-甲基氧基甲基等。

"醯基"係意謂H-CO-或(脂族或環基)-CO-，其中脂族基團係如本文中所述。較佳醯基含有低碳烷基。舉例之醯基包括甲醯基、乙醯基、丙醯基、2-甲基丙醯基、丁醯基、棕櫚醯基、丙烯醯基、丙炔醯基、環己羰基等。

"烯醯基"係意謂烯基-CO-基團，其中烯基係如本文定義。

"烯基"係意謂含有一個碳-碳雙鍵之脂族烴基，且其可為直鏈或分枝狀，具有約2至約15個碳原子在此鏈中。較佳烯基具有2至約12個碳原子在此鏈中；且更佳為約2至約4個碳原子在此鏈中。分枝狀係意謂一或多個低碳烷基，譬

如甲基、乙基或丙基，被連接至線性烯基鏈。"低碳烯基"係意謂約2至約4個碳原子在此鏈中，其可為直鏈或分枝狀。舉例之烯基包括乙烯基、丙烯基、正-丁烯基、異-丁烯基、3-甲基丁-2-烯基、正-戊烯基、庚烯基、辛烯基、環己基丁烯基、癸烯基等。"經取代之烯基"意謂如上所述之烯基經一或多個"脂族基團取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。例舉之烯基脂族基團取代基包括鹵素或環烷基團。

"烯氧基"係意謂烯基-O-基團，其中烯基係如本文中所述。舉例之烯氧基包括烯丙氧基、3-丁烯基氧基等。

"烷氧基"係意謂烷基-O-基團，其中烷基係如本文中所述。舉例之烷氧基包括甲氧基、乙氧基、正-丙氧基、異-丙氧基、正-丁氧基、庚氧基等。

"烷氧羰基"係意謂烷基-O-CO-基團，其中烷基係如本文定義。舉例之烷氧羰基包括甲氧羰基、乙氧羰基、第三-丁氧羰基等。

"烷基"係意謂脂族烴基，其可為直鏈或分枝狀，具有約1至約20個碳原子在此鏈中。較佳烷基具有1至約12個碳原子在此鏈中，更佳為如本文中定義之低碳烷基。分枝狀係意謂一或多個低碳烷基，譬如甲基、乙基或丙基，被連接至線性烷基鏈。"低碳烷基"係意謂約1至約4個碳原子在此鏈中，其可為直鏈或分枝狀。"經取代之烷基"意謂如上所述之烷基被一或多個"脂族取代基"(較佳為1至3個)取代，其可為相同或不同，且如本文所定義者。

"烷基亞磺醯基"係意謂烷基-SO-基團，其中烷基係如上文定義。較佳基團為其中烷基為低碳烷基者。

"烷基磺醯基"係意謂烷基-SO_2-基團，其中烷基係如上文定義。較佳基團為其中烷基為低碳烷基者。

"烷基磺醯基胺甲醯基"係意謂烷基-SO_2-NH-C(=O)-基團，其中烷基係如本文中所述。較佳烷基磺醯基胺甲醯基係為其中烷基為低碳烷基者。

"烷硫基"係意謂烷基-S-基團，其中烷基係如本文中所述。舉例之烷硫基包括甲硫基、乙硫基、異-丙硫基及庚硫基。

"炔基"係意謂含有一個碳-碳參鍵之脂族烴基，且其可為直鏈或分枝狀，具有約2至約15個碳原子在此鏈中。較佳炔基具有2至約12個碳原子在此鏈中；且更佳為約2至約4個碳原子在此鏈中。分枝狀係意謂一或多個低碳烷基，譬如甲基、乙基或丙基，被連接至線性炔基鏈。"低碳炔基"係意謂約2至約4個碳原子在此鏈中，其可為直鏈或分枝狀。此炔基可被一或多個鹵基取代。舉例之炔基包括乙炔基、丙炔基、正-丁炔基、2-丁炔基、3-甲基丁炔基、正-戊炔基、庚炔基、辛炔基、癸炔基等。"經取代之炔基"意謂如上所述之炔基經一或多個"脂族基團取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。

"胺保護基"係意謂易於移除之基團，其係為此項技藝中已知，用以保護胺基或醯胺基之氮部份基團，以在合成程序期間防止不期望之反應，並可選擇性地移除。胺/醯胺

保護基之利用，係為此項技藝中所習知，用以保護基團，以在合成程序期間防止不期望反應，且許多此種保護基係為已知，例如T. W. Greene與P. G. M. Wuts，有機合成之保護基，第2版(John Wiley & Sons, New York (1991))，併於本文供參考。胺/醯胺保護基亦包括"酸不安定性胺/醯胺保護基"與"氫化作用不安定性胺/醯胺保護基"。舉例之胺/醯胺保護基係為醯基，包括甲醯基、乙醯基、氯基乙醯基、三氯基乙醯基、鄰-硝基苯基乙醯基、鄰-硝基苯氧基-乙醯基、三氟乙醯基、乙醯乙醯基、4-氯基丁醯基、異丁醯基、鄰-硝基桂皮醯基、甲基吡啶醯基、醯基異硫氰酸酯、胺基己醯基、苯甲醯基等，及醯氧基，包括甲氧羰基、9-芴基甲氧羰基、2,2,2-三氯乙氧羰基、2-三甲基矽烷基乙氧基羰基、乙烯基氧基羰基、烯丙氧基羰基、第三-丁氧羰基(BOC)、1,1-二甲基-丙炔基氧基羰基、苄氧羰基(CBZ)、對-硝基苄氧羰基、2,4-二氯苄氧羰基等。

"醯胺保護基"係意謂易於移除之基團，其係為此項技藝中已知，用以保護醯胺基之氮部份基團，以在合成程序期間防止不期望之反應，並可在其轉化成胺之後，選擇性地移除。醯胺保護基之利用係為此項技藝中所習知，用以保護基團，以在合成程序期間防止不期望之反應，且許多此種保護基係為已知，例如T. W. Greene與P. G. M. Wuts，有機合成之保護基，第2版(John Wiley & Sons, New York (1991))，併於本文供參考。醯胺保護基亦包括"酸不安定性醯胺保護基"與"氫化作用不安定性醯胺保護基"。舉例

之醯胺保護基係為鄰-硝基桂皮醯基、甲基吡啶醯基、胺基己醯基、苯甲醯基等，及醯氧基，包括甲氧羰基、9-芴基甲氧羰基、2,2,2-三氟乙氧羰基、2-三甲基矽烷基乙氧基羰基、乙烯基氧基羰基、烯丙氧基羰基、第三-丁氧羰基(BOC)、1,1-二甲基-丙炔基氧基羰基、苄氧羰基(CBZ)、對-硝基苄氧羰基、2,4-二氯-苄氧羰基等。

"胺基酸"係意謂一種選自包括如本文中定義之天然與非天然胺基酸類之胺基酸。胺基酸亦意謂包括在α-碳處具有L或D立體化學之胺基酸。較佳胺基酸為具有α-胺基者。胺基酸可為中性、正或負，依側鏈中之取代基而定。"中性胺基酸"係意謂含有未帶電荷之側鏈取代基之胺基酸。舉例之中性胺基酸包括丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、甲硫胺酸、甘胺酸、絲胺酸、蘇胺酸及半胱胺酸。"正胺基酸"係意謂其中側鏈取代基在生理pH下係為帶正電荷之胺基酸。舉例之正胺基酸包括離胺酸、精胺酸及組胺酸。"負胺基酸"係意謂其中側鏈取代基在生理pH下帶有淨負電荷之胺基酸。舉例之負胺基酸包括天門冬胺酸與麩胺酸。較佳胺基酸為α-胺基酸。舉例之天然胺基酸為異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、甲硫胺酸、甘胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、半胱胺酸、酪胺酸、天冬素、麩醯胺、離胺酸、精胺酸、組胺酸、天門冬胺酸及麩胺酸。"非天然胺基酸"係意謂沒有核酸密碼子之胺基酸。舉例之非天然胺基酸包括例如，如上文指出之天然α-胺基酸之D-異構物；Aib(胺基丁酸)、βAib(3-胺基-

異丁酸)、Nva(正纈胺酸)、β-Ala、Aad(2-胺基己二酸)、βAad (3-胺基己二酸)、Abu(2-胺基丁酸)、Gaba(γ-胺基丁酸)、Acp(6-胺基己酸)、Dbu(2,4-二胺基丁酸)、α-胺基庚二酸、TMSA(三甲基矽烷基-Ala)、aIle(別-異白胺酸)、Nle(正白胺酸)、第三-Leu、Cit(瓜胺酸)、Orn、Dpm(2,2'-二胺基庚二酸)、Dpr(2,3-二胺基丙酸)、α-或β-Nal、Cha(環己基-Ala)、羥脯胺酸、Sar(肌胺酸)等；環狀胺基酸；N^a-烷基化胺基酸，譬如MeGly(N^a-甲基甘胺酸)、EtGly(N^a-乙基甘胺酸)及EtAsn(N^a-乙基天冬素)；及其中α-碳帶有兩個側鏈取代基之胺基酸。於本文中所使用天然與非天然胺基酸及其殘基之名稱，係遵照由IUPAC委員會關於有機化學之命名法，及IUPAC-IUB委員會關於生物化學命名法，如在"α-胺基酸之命名法(建議，1974)"，Biochemistry, 14(2), (1975)所提出者中所建議之命名慣例。在本專利說明書及隨文所附申請專利範圍中所採用之胺基酸及其殘基之名稱與縮寫和其中所指出者不同之範圍下，不同名稱與縮寫將會進行澄清。

"胺基酸保護基"係意謂一種基團，其會保護胺基酸之酸或胺部份，或在胺基酸側鏈上之其他反應性部份，例如羥基或硫醇。關於胺基酸側鏈之"相應經保護衍生物"之實例，可參閱T. W. Green與P. G. M. Wuts"有機化學中之保護基" (John Wiley & Sons, 1991)。關於胺基酸中酸基之保護基，係描述於本文中，例如在"酸性官能基"與"氫化作用不安定性酸保護基"之段落中。關於胺基酸中胺基之保護

基，係描述於本文中，例如在"胺保護基"、"酸不安定性胺保護基"及"氫化作用不安定性胺保護基"之段落中。

"胺基酸殘基"係意謂被併入本發明化合物中之個別胺基酸單位。

"胺基酸側鏈"係意謂在α-胺基酸中之胺基與羧基間之碳上發現之取代基。舉例之α-胺基酸側鏈，對於纈胺酸、丙胺酸及天門冬胺酸，個別包括異丙基、甲基及羧甲基。

"胺基酸等效物"係意謂一種胺基酸，其可用以取代根據本發明肽中之另一種胺基酸，而無任何可感覺得到之功能損失。在施行此種改變時，類似胺基酸之取代，係以側鏈取代基之相對類似性為基礎施行，例如關於大小、電荷、親水性、水療性及疏水性，如本文中所述。

"芳族基團"係意謂如本文中定義之芳基或雜芳基。舉例之芳族基團包括苯基、鹵基取代之苯基、氮雜芳基等。

"芳醯基"係意謂芳基-CO-基團，其中芳基係如本文中所述。舉例之芳醯基包括苯甲醯基、1-與2-萘甲醯基等。

"芳基"係意謂芳族單環狀或多環狀環系統，具有約6至約14個碳原子，較佳為約6至約10個碳原子。被芳基所涵蓋者，係為稠合芳基環烯基、稠合芳基環烷基、稠合芳基雜環烯基及稠合芳基雜環基，如本文中定義，當經過其芳基部份基團結合時。此芳基係視情況被一或多個"環基取代基"取代，其可為相同或不同，且均如本文定義。舉例之芳基包括苯基或萘基，或苯基經取代或萘基經取代。"經取代之芳基"意謂如上所述之芳基經一或多個"環基取代

基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。

"芳基重氮基"係意謂芳基-重氮基，其中芳基與重氮基均如本文定義。

"次芳基"係意謂視情況經取代之1,2-、1,3-、1,4-、二價芳基，其中芳基係如本文定義。舉例之次芳基包括視情況經取代之次苯基、次萘基及次氫茚基。特定次芳基為視情況經取代次苯基。"經取代之次芳基"意謂如上所述之次芳基經一或多個"環基取代基"(較佳為1至3個)取代，其可為相同或相異，且如本文所定義者。

"芳氧基"係意謂芳基-O-基團，其中芳基係如本文定義。舉例之芳氧基包括苯氧基與2-萘氧基。

"芳氧基羰基"係意謂芳基-O-CO-基團，其中芳基係如本文定義。舉例之芳氧基羰基包括苯氧基羰基與萘氧基羰基。

"芳基磺醯基"係意謂芳基-SO_2-基團，其中芳基係如本文定義。

"芳基磺醯基胺甲醯基"係意謂芳基-SO_2-NH-C(=O)-基團，其中芳基係如本文中所述。舉例之芳基磺醯基胺甲醯基為苯基磺醯基胺甲醯基。

"芳基亞磺醯基"係意謂芳基-SO-基團，其中芳基係如本文定義。

"芳基硫基"係意謂芳基-S-基團，其中芳基係如本文中所述。舉例之芳基硫基包括苯硫基與萘基硫基。

"鹼性氮原子"係意謂sp^2或sp^3雜化之氮原子，具有未結合之電子對，其能夠被質子化。舉例之鹼性氮原子包括視情況經取代之亞胺基、視情況經取代之胺基及視情況經取代之甲脒基。

"羧基"係意謂HO(O)C-(羧酸)基。

"偶合劑"係意謂一種會與羧基部份基團之羥基部份反應，於是使其容易接受親核性攻擊之化合物。舉例之偶合劑包括DIC、EDCI、DCC等。

"環烯基"係意謂非芳族單-或多環狀環系統，具有約3至約10個碳原子，較佳為約5至約10個碳原子，且其含有至少一個碳-碳雙鍵。被環烯基所涵蓋者，係為稠合芳基環烯基與稠合雜芳基環烯基，如本文中定義，當經過其環烯基部份基團結合時。此環系統環之較佳環大小，係包含約5至約6個環原子；且此種較佳環大小亦被稱為"低碳"。"經取代之環烯基"意謂如上所述之環烯基被一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且係如本文所定義者。舉例之單環狀環烯基包括環戊烯基、環己烯基、環庚烯基等。舉例之多環狀環烯基為正葙烯基。

"環烷基"係意謂非芳族單-或多環狀環系統，具有約3至約10個碳原子，較佳為約5至約10個碳原子。此環系統環之較佳環大小，係包含約5至約6個環原子；且此種較佳環大小亦被稱為"低碳"。被環烷基所涵蓋者，係為稠合芳基環烷基與稠合雜芳基環烷基，如本文中定義，當經過其環烷基部份基團結合時。"經取代之環烷基"意謂如上所述之

環烷基被一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且係如本文定義。舉例之單環狀環烷基包括環戊基、環己基、環庚基等。舉例之多環狀環烷基包括1-十氫萘、正蒈基、金鋼烷-(1-或2-)基等。

"次環烷基"係意謂如本文中定義之二價環烷基，具有約4至約8個碳原子。次環烷基之較佳環大小，包括約5至約6個環原子；且此種較佳環大小亦被稱為"低碳"。於次環烷基上之結合點，包括1,1-、1,2-、1,3-或1,4-結合樣式，且在合適之情況下，結合點之立體化學關係，係為順式或反式。舉例之次環烷基包括(1,1-、1,2-或1,3-)次環己基與(1,1-或1,2-)次環戊基。"經取代之次環烷基"意謂如上所述之次環烷基經一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。

"環狀"或"環基"係意謂如本文中定義之環烷基、環烯基、雜環基或雜環烯基。"低碳"一詞，當伴隨著環狀一詞使用時，係與本文關於環烷基、環烯基、雜環基或雜環烯基所指出者相同。

"環基氧基"係意謂環基-O-基團，其中環基係如本文中所述。舉例之環烷氧基包括環戊氧基、環己氧基、喹啶基氧基、五亞甲基硫化氧基、四氫哌喃基氧基、四氫苯硫基氧基、四氫吡咯基氧基、四氫呋喃基氧基或7-氧雙環并[2.2.1]庚烷基氧基、羥基四氫哌喃基氧基、羥基-7-氧雙環并[2.2.1]庚烷基氧基等。

"環基亞磺醯基"係意謂環基-S(O)-基團，其中環基係如

本文中所述。

"環基磺醯基"係意謂環基-$S(O)_2$-基團，其中環基係如本文中所述。

"環基硫基"係意謂環基-S-，其中環基係如本文中所述。

"重氮基"係意謂二價-N=N-基團。

"可置換之部份基團"係意謂一種基團，在與如本文中定義之L有關聯之情況中，其易遭受到親核性攻擊，被單-或二取代之胺部份基團置換，於一種有助於該攻擊之作用劑例如偶合劑存在或不存在下進行。舉例之可置換部份基團包括羥基、脂族氧基、鹵基、N-氧基琥珀醯亞胺、醯氧基等。

"有效量"係意謂根據本發明之化合物/組合物有效產生所要治療效果之量。

"稠合芳基環烯基"係意謂如本文中定義之稠合芳基與環烯基。較佳稠合芳基環烯基係為其中之芳基為苯基，且環烯基由約5至約6個環原子所組成者。作為變數之稠合芳基環烯基，可經過環系統之任何能夠結合之原子進行結合。"經取代之稠合芳基環烯基"意謂如上所述之稠合芳基環烯基經一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。舉例之稠合芳基環烯基包括1,2-二氫次萘基、次茚基等。

"稠合芳基環烷基"係意謂如本文中定義之稠合芳基與環烷基。較佳稠合芳基環烷基為其中之芳基為苯基，且環烷基由約5至約6個環原子所組成者。作為變數之稠合芳基環

烷基，可經過環系統之任何能夠結合之原子進行結合。"經取代之稠合芳基環烷基"意謂如上所述之稠合芳基環烷基經一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。舉例之稠合芳基環烷基包括1,2,3,4-四氫次萘基等。

"稠合芳基雜環烯基"係意謂如本文中定義之稠合芳基與雜環烯基。較佳稠合芳基雜環烯基為其中之芳基為苯基，且雜環烯基由約5至約6個環原子所組成者。作為變數之稠合芳基雜環烯基，可經過環系統之任何能夠結合之原子進行結合。在稠合芳基雜環烯基之雜環烯基部份之前，作為字首之氮、氧或硫名稱，係定義至少一個氮、氧或硫原子，個別存在作為環原子。"經取代之稠合芳基雜環烯基"意謂如上所述之稠合芳基雜環烯基經一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。稠合芳基雜環烯基之氮原子，可為鹼性氮原子。稠合芳基雜環烯基之雜環烯基部份之氮或硫原子，亦可視情況被氧化成其相應之N-氧化物、S-氧化物或S,S-二氧化物。舉例之稠合芳基雜環烯基包括3H-二氫吲哚基、1H-2-酮基喹啉基、2H-1-酮基異喹啉基、1,2-二氫喹啉基、3,4-二氫喹啉基、1,2-二氫異喹啉基、3,4-二氫異喹啉基等。

"稠合芳基雜環基"係意謂如本文中定義之稠合芳基與雜環基。較佳稠合芳基雜環基為其中之芳基為苯基，且雜環基由約5至約6個環原子所組成者。作為變數之稠合芳基雜環基，可經過環系統之任何能夠結合之原子進行結合。在

稠合芳基雜環基之雜環基部份之前，作為字首之氮、氧或硫名稱，係定義至少一個氮、氧或硫原子，個別存在作為環原子。"經取代之稠合芳基雜環基"意謂如上所述之稠合芳基雜環基經一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。稠合芳基雜環基之氮原子，可為鹼性氮原子。稠合芳基雜環基之雜環基部份之氮或硫原子，亦可視情況被氧化成其相應之N-氧化物、S-氧化物或S,S-二氧化物。舉例之稠合芳基雜環基環系統包括二氫吲哚基、1,2,3,4-四氫異喹啉、1,2,3,4-四氫喹啉、1H-2,3-二氫異吲哚-2-基、2,3-二氫苯并[f]異吲哚-2-基、1,2,3,4-四氫苯并[g]異喹啉基-2-基等。

"稠合雜芳基環烯基"係意謂如本文中定義之稠合雜芳基與環烯基。較佳稠合雜芳基環烯基為其中之雜芳基為苯基，且環烯基由約5至約6個環原子所組成者。作為變數之稠合雜芳基環烯基，可經過環系統之任何能夠結合之原子進行結合。在稠合雜芳基環烯基之雜芳基部份之前，作為字首之氮、氧或硫名稱，係定義至少一個氮、氧或硫原子，個別存在作為環原子。"經取代之稠合雜芳基環烯基"意謂如上所述之稠合雜芳基環烯基經一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。稠合雜芳基環烯基之氮原子可為鹼性氮原子。稠合雜芳基環烯基之雜芳基部份之氮原子，亦可視情況被氧化成其相應之N-氧化物。舉例之稠合雜芳基環烯基包括5,6-二氫喹啉基、5,6-二氫異喹啉基、5,6-二氫喹喏啉基、

5,6-二氫喹唑啉基、4,5-二氫-1H-苯并咪唑基、4,5-二-氫苯并噁唑基等。

"稠合雜芳基環烷基"係意謂如本文中定義之稠合雜芳基與環烷基。較佳稠合雜芳基環烷基為其中之雜芳基由約5至約6個環原子所組成，而環烷基由約5至約6個環原子所組成。作為變數之稠合雜芳基環烷基，可經過環系統之任何能夠結合之原子進行結合。在稠合雜芳基環烷基之雜芳基部份之前，作為字首之氮、氧或硫名稱，係定義至少一個氮、氧或硫原子，個別存在作為環原子。"經取代之稠合雜芳基環烷基"意謂如上所述之稠合雜芳基環烷基經一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。稠合雜芳基環烷基之氮原子可為鹼性氮原子。稠合雜芳基環烷基之雜芳基部份之氮原子，亦可視情況被氧化成其相應之N-氧化物。舉例之稠合雜芳基環烷基，包括5,6,7,8-四氫喹啉基、5,6,7,8-四氫異喹啉基、5,6,7,8-四氫喹喏啉基、5,6,7,8-四氫喹唑基、4,5,6,7-四氫-1H-苯并咪唑基、4,5,6,7-四氫苯并噁唑基、1H-4-氧-1,5-二氮萘-2-酮基、1,3-二氫咪唑-[4,5]-吡啶-2-酮基等。

"稠合雜芳基雜環烯基"係意謂如本文中定義之稠合雜芳基與雜環烯基。較佳稠合雜芳基雜環烯基為其中之雜芳基由約5至約6個環原子所組成，而雜環烯基由約5至約6個環原子所組成者。作為變數之稠合雜芳基雜環烯基，可經過環系統之任何能夠結合之原子進行結合。在稠合雜芳基雜

環烯基之雜芳基或雜環烯基部份之前，作為字首之氮、氧或硫名稱，係定義至少一個氮、氧或硫原子，個別存在作為環原子。"經取代之稠合雜芳基雜環烯基"意謂如上所述之稠合雜芳基雜環烯基經一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。稠合雜芳基氮雜環烯基之氮原子，可為鹼性氮原子。稠合雜芳基雜環基之雜芳基部份之氮或硫原子，亦可視情況被氧化成其相應之N-氧化物。稠合雜芳基雜環基之雜芳基或雜環基部份之氮或硫原子，亦可視情況被氧化成其相應之N-氧化物、S-氧化物或S,S-二氧化物。舉例之稠合雜芳基雜環烯基，包括7,8-二氫[1,7]萘啶基、1,2-二氫[2,7]-萘啶基、6,7-二氫-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶基、1,2-二氫-1,5-萘啶基、1,2-二氫-1,6-萘啶基、1,2-二氫-1,7-萘啶基、1,2-二氫-1,8-萘啶基、1,2-二氫-2,6-萘啶基等。

"稠合雜芳基雜環基"係意謂如本文中定義之稠合雜芳基與雜環基。較佳稠合雜芳基雜環基為其中之雜芳基由約5至約6個環原子所組成，而雜環基由約5至約6個環原子所組成者。作為變數之稠合雜芳基雜環基，可經過環系統之任何能夠結合之原子進行結合。在稠合雜芳基雜環基之雜芳基或雜環基部份之前，作為字首之氮、氧或硫名稱，係定義至少一個氮、氧或硫原子，個別存在作為環原子。"經取代之稠合雜芳基雜環基"意謂如上所述之稠合雜芳基雜環基經一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。稠合雜芳

基雜環基之氮原子可為鹼性氮原子。稠合雜芳基雜環基之雜芳基部份之氮或硫原子，亦可視情況被氧化成其相應之N-氧化物。稠合雜芳基雜環基之雜芳基或雜環基部份之氮或硫原子，亦可視情況被氧化成其相應之N-氧化物、S-氧化物或S,S-二氧化物。舉例之稠合雜芳基雜環基，包括2,3-二氫-1H吡咯[3,4-b]喹啉-2-基、1,2,3,4-四氫苯并[b][1,7]萘啶-2-基、1,2,3,4-四氫苯并[b][1,6]萘啶-2-基、1,2,3,4-四-氫-9H-吡啶并[3,4-b]吲哚-2-基、1,2,3,4-四氫-9H-吡啶并[4,3-b]吲哚-2-基、2,3-二氫-1H-吡咯并[3,4-b]吲哚-2-基、1H-2,3,4,5-四氫一氮七圜烯并[3,4-b]吲哚-2-基、1H-2,3,4,5-四-氫一氮七圜烯并[4,3-b]吲哚-3-基、1H-2,3,4,5-四氫一氮七圜烯并[4,5-b]吲哚-2-基、5,6,7,8-四-氫[1,7]萘啶基、1,2,3,4-四氫[2,7]萘啶基、2,3-二氫[1,4]二氧陸圜烯并[2,3-b]吡啶基、2,3-二氫[1,4]二氧陸圜烯并[2,3-b]吡啶基、3,4-二氫-2H-1-氧[4,6]二氮萘基、4,5,6,7-四氫-3H-咪唑并[4,5-c]吡啶基、6,7-二氫[5,8]二氮萘基、1,2,3,4-四氫[1,5]-萘啶基、1,2,3,4-四氫[1,6]萘啶基、1,2,3,4-四氫[1,7]萘啶基、1,2,3,4-四氫[1,8]萘啶基、1,2,3,4-四氫[2,6]萘啶基等。

"鹵基"係意謂氟基、氯基、溴基或碘基。較佳為氟基、氯基或溴基，而更佳為氟基或氯基。

"雜芳醯基"係意謂雜芳基-CO-基團，其中雜芳基係如本文中所述。舉例之雜芳醯基包括硫苯甲醯基、菸鹼醯基、吡咯-2-基羰基、1-與2-萘甲醯基、吡啶醯基等。

"雜芳基"係意謂芳族單環狀或多環狀環系統，具有約5至約14個碳原子，較佳為約5至約10個碳原子，其中在此環系統中之一或多個碳原子係為碳以外之雜元素，例如氮、氧或硫。此環系統較佳含有1至3個雜原子。此環系統環之較佳環大小，係包含約5至約6個環原子。被雜芳基所涵蓋者，係為稠合雜芳基環烯基、稠合雜芳基環烷基、稠合雜芳基雜環烯基及稠合雜芳基雜環基，如本文中定義，當經過其雜芳基部份基團結合時。經取代之"雜芳基"意味如上所述之雜芳基被一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且係如本文所定義者。於雜芳基前作為字首之氮、氧或硫名稱，係定義至少一個氮、氧或硫原子，個別存在作為環原子。雜芳基之氮原子可為鹼性氮原子，且亦可視情況被氧化成其相應之N-氧化物。舉例之雜芳基與經取代之雜芳基，包括吡咯基、噻吩基、異噻唑基、噁唑基、吡唑基、呋呫基、吡咯基、1,2,4-噻二唑基、嗒咯基、喹喏啉基、呔咯基、咪唑并[1,2-a]吡啶、咪唑并[2,1-b]噻唑基、苯并呋呫基、氮吲哚基、苯并咪唑基、苯并噻吩基、噻吩并吡啶基、噻吩并嘧啶基、吡咯并吡啶基、咪唑并吡啶基、苯并氮吲哚基、1,2,4-三咯基、苯并噻唑基、呋喃基、咪唑基、吲哚基、吲咯基、異噁唑基、異喹啉基、異噻唑基、噁二唑基、吡咯基、嗒咯基、吡唑基、吡啶基、嘧啶基；吡咯基、喹唑啉基、喹啉基、1,3,4-噻二唑基、噻唑基、噻吩基、三唑基等。較佳雜芳基為吡咯基。

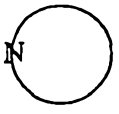
"雜芳基重氮基"係意謂雜芳基-偶氮基-，其中雜芳基與偶氮基均如本文定義。

"雜芳二基"係意謂衍生自雜芳基之二價基團，其中雜芳基係如本文中所述。舉例之雜芳二基為視情況經取代之吡啶二基。

"雜芳基磺醯基胺甲醯基"係意謂雜芳基-SO_2-NH-C(=O)-基團，其中雜芳基係如本文中所述。

"雜環烯基"係意謂非芳族單環狀或多環狀烴環系統，具有約3至約10個碳原子，較佳為約5至約10個碳原子，其中在此環系統中之一或多個碳原子為碳以外之雜元素，例如氮、氧或硫原子，且其含有至少一個碳-碳雙鍵或碳-氮雙鍵。此環系統較佳含有1至3個雜原子。此環系統環之較佳環大小，係包含約5至約6個環原子；且此種較佳環大小亦被稱為"低碳"。被雜環烯基所涵蓋者為稠合芳基雜環烯基與稠合雜芳基雜環烯基，如本文中定義，當經過其雜環烯基部份基團結合時。於雜環烯基之前作為字首之氮、氧或硫名稱，係定義至少一個氮、氧或硫原子，個別存在作為環原子。"經取代之雜環烯基"意謂如上所述之雜環烯基經一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。雜環烯基之氮原子可為鹼性氮原子。雜環烯基之氮或硫原子，亦可視情況被氧化成其相應之N-氧化物、S-氧化物或S,S-二氧化物。舉例之單環狀氮雜環烯基包括1,2,3,4-四氫吡啶、1,2-二氫吡啶基、1,4-二氫吡啶基、1,2,3,6-四氫吡啶、1,4,5,6-四氫-嘧啶、

2-二氫吡咯基、3-二氫吡咯基、2-二氫咪唑基、2-二氫吡唑基等。舉例之氧雜環烯基包括3,4-二氫-2H-哌喃、二氫呋喃基及氟基二氫呋喃基。舉例之多環狀氧雜環烯基為7-氧雙環并[2.2.1]庚烯基。舉例之單環狀硫雜環烯基環包括二氫苯硫基與二氫硫代哌喃基。

"雜環基"係意謂非芳族飽和單環狀或多環狀環系統，具有約3至約10個碳原子，較佳為約5至約10個碳原子，其中在此環系統中之一或多個碳原子係為碳以外之雜元素，例如氮、氧或硫。此環系統較佳含有1至3個雜原子。此環系統環之較佳環大小，係包含約5至約6個環原子；且此種較佳環大小亦被稱為"低碳"。被雜環基所涵蓋者，係為稠合芳基雜環基與稠合雜芳基雜環基，如本文中定義，當經過其雜環基部份基團結合時。於雜環基之前，作為字首之氮、氧或硫名稱，係定義至少一個氮、氧或硫原子，個別存在作為環原子。"經取代之雜環基"意謂如上所述之雜環基經一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。雜環基之氮原子可為鹼性氮原子。雜環基之氮或硫原子，亦可視情況被氧化成其相應之N-氧化物、S-氧化物或S,S-二氧化物。舉例之單環狀雜環基環，包括六氫吡啶基、四氫吡咯基、六氫吡哄基、嗎福啉基、硫代嗎福啉基、噻唑啶基、1,3-二氧伍圜基、1,4-二氧陸圜基、四氫呋喃基、四氫苯硫基、四氫硫代哌喃基等。  作為經取代之單環狀氮雜環基時，係

直接或經過連結基，被至少一個取代基團取代，此部份基團係為或涵蓋，或係被如本文中定義之芳族基團取代；例如芳基、雜芳基、芳氧基、雜芳基氧基、芳醯基或其硫酮基類似物、雜芳醯基或其硫酮基類似物、芳醯基氧基、雜芳醯基氧基、芳氧基羰基、雜芳基氧基羰基、芳基磺醯基、雜芳基磺醯基、芳基亞磺醯基、雜芳基亞磺醯基、芳基硫基、雜芳基硫基、芳基重氮基、雜芳基重氮基、Y^1Y^2N-、$Y^1Y^2NC(O)$-、$Y^1Y^2NC(O)O$-、$Y^1Y^2NC(O)NY^3$-或$Y^1Y^2NSO_2$-，其中至少一個Y^1與Y^2係為、涵蓋或係被芳基或雜芳基部份基團取代。較佳之連結基包括-C(O)-、-OC(O)-、低碳烷基、低碳烷氧基、低碳烯基、-O-、-S-、-C(O)C(O)-、-S(O)-、$-S(O)_2$-、$-NR^{80}$-(其中R^{80}為氫、烷基、環烷基、芳基、芳烷基、雜環基或雜芳基)。特別較佳之連結基為-C(O)-及-OC(O)-。"經取代之多環狀氮雜環基"意謂如上所述之多環狀氮雜環基經一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。"經取代之多環狀氮雜環烯基"意謂如上所述之多環狀氮雜環烯基經一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。

"次雜環基"係意謂如本文中定義之二價雜環基，具有約4至約8個碳原子。次雜環基之較佳環大小，係包含約5至約6個環原子；且此種較佳環大小亦被稱為"低碳"。於次環烷基上之結合點，包括1,1-、1,2-、1,3-或1,4-結合樣式，且在合適之情況下，結合點之立體化學關係，係為順

式或反式。舉例之次雜環基包括(1,1-、1,2-或1,3-)次六氫吡啶基與(1,1-或1,2-)次四氫呋喃基。"經取代之次雜環基"意謂如上所述之次雜環基經一或多個"環基取代基"取代(較佳為1至3個)，其可為相同或不同，且如本文所定義者。

"水合物"係意謂溶劑合物，其中溶劑分子為H_2O。

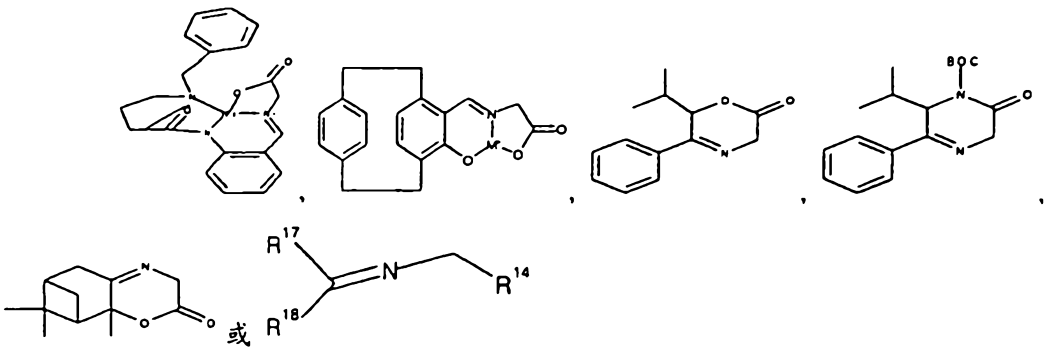
"氫化作用不安定性胺保護基"係意謂如本文中定義之胺保護基，其易於藉氫化作用移除，而同時對其他試劑保持相對安定性。較佳氫化作用不安定性胺保護基為Cbz。

"氫化作用不安定性酸保護基"係意謂如本文中定義之酸保護基，其易於藉氫化作用移除，而同時對其他試劑保持相對安定性。較佳氫化作用不安定性酸保護基為苄基。

"吸濕性"係意謂吸著作用，其意謂水之吸取量或狀態足以影響物質之物理或化學性質(J. Swarbrick與J. C. Boylan編著，醫藥技術百科全書，**10**, 33)。

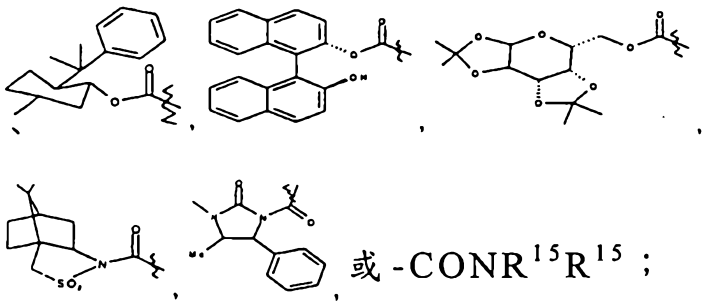
"亞胺性甘胺醯亞胺衍生物"係意謂甘胺酸之亞胺性Schiff氏鹼，其可用於合成α-胺基酸，天然與非天然兩者。亞胺酯官能性可含有一或多個不對稱中心，其可在鍵結形成程序期間幫助立體誘導。此外，此等亞胺性甘胺醯亞胺衍生物可併入聚合體載體中，以幫助結合合成。亞胺性甘胺醯亞胺衍生物可經由使甘胺酸酯與適當酮，於酸性觸媒存在下縮合而製成。反應係藉助於水之移除。亞胺性甘胺醯亞胺衍生物係為此項技藝中所習知，供使用於Michael加成合成程序中，例如由Guillena, G.等人，J. Org. Chem. **2000**, 65, 7310-7322所揭示者，併於本文供參考。

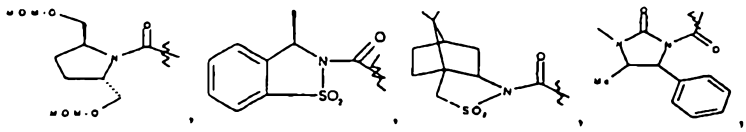
根據本發明之亞胺性甘胺醯亞胺衍生物之特定實例，包括選自下式之一者



其中：

M*為過渡金屬，較佳為CU，更佳為CU^{II}。

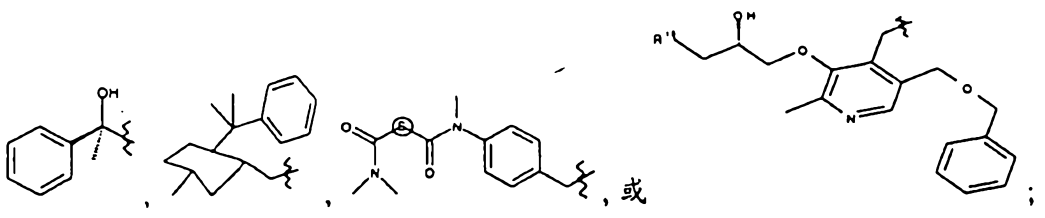
R^{14}為$-CO_2R^{16}$、-CN 

 或$-CONR^{15}R^{15}$；

R^{15}為視情況經取代之基團；

R^{16}為酸保護基，視情況經取代之芳基或視情況經取代之脂族基團；

R^{17}為視情況經取代之芳基，視情況經取代之脂族基團，

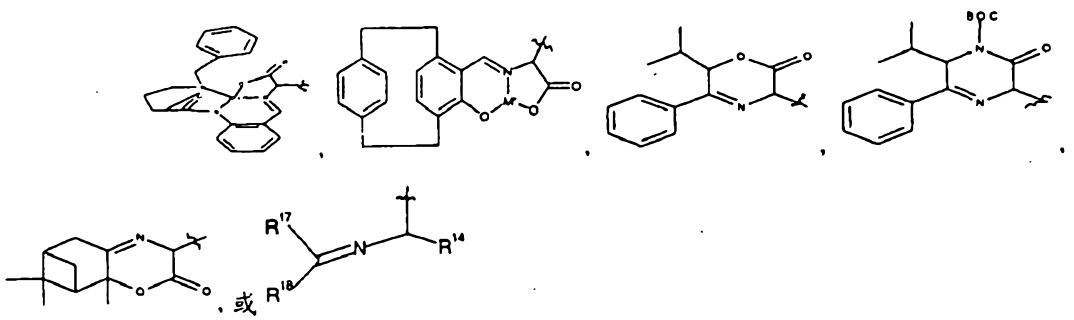


R^{18}為氫、烷基或烷硫基；或視情況經取代之芳基；

R^{17}與R^{18}係和該R^{17}與R^{18}所連接之碳一起採用

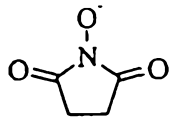
Ⓢ為固相。

"亞胺性甘胺醯亞胺衍生之加成物"係意謂所形成之化合物，其中對於Schiff氏鹼部份之氮與羰基部份基團之α-氫係被移除，並用於形成供鍵結形成於其上之連接處。根據本發明亞胺性甘胺醯亞胺衍生加成物之特定實例，包括選自下式之一者



其中：

R^{14}、R^{17}及R^{18}係被定義為如在本文亞胺性甘胺醯亞胺衍生物定義中所述者。

"N-氧基琥珀醯亞胺"係意謂一種具有下列結構之部份基團  。

"N-氧化物"係意謂一種具有下列結構之部份基團 。

"病人"包括人類及其他哺乳動物兩者。

"擬肽"係意謂一種聚合體，其包含胺基酸殘基，經過醯胺鍵結接合在一起。

"藥學上可接受之酯"係指會在活體內水解之酯類，且包括易在人類體中分解而留下母體化合物或其鹽者。適當酯基包括例如衍生自藥學上可接受之脂族羧酸類者，特別是烷酸、烯酸、環烷酸及烷二酸，其中各烷基或烯基部份基團可有利地具有不超過6個碳原子。舉例之酯類包括甲酸酯、醋酸酯、丙酸酯、丁酸酯、丙烯酸酯、乙基琥珀酸酯等。

於本文中使用之"藥學上可接受之前體藥物"，係指本發明化合物之前體藥物，其在安全可靠醫療判斷範圍內係適用於與人類及低等動物之組織接觸，而無不當毒性、刺激性、過敏性回應等，伴隨著合理利益/風險比，及對於其所意欲之用途有效，以及在可能之情況下為本發明化合物之兩性離子形式。"前體藥物"一詞係指會在活體內迅速地轉變，而產生上式母體化合物之化合物，例如經由在血液中水解。可於活體內藉由代謝分裂而迅速地轉變之官能基，係構成與本發明化合物之羧基具有反應性之基團種類。其包括但不限於以下基團，譬如烷醯基(譬如乙醯基、丙醯基、丁醯基等)，未經取代與經取代之芳醯基(譬如苯甲醯基與經取代之苯甲醯基)、烷氧羰基(譬如乙氧羰基)、三烷基矽烷基(譬如三甲基-與三乙基矽烷基)、與二羧酸(譬如琥珀醯基)形成之單酯類等。由於本發明化合物之可以代謝方式分裂之基團，易於在活體內分裂，故帶有此種基團之化合物係充作前體藥物。帶有此等可以代謝方式分裂基團之化合物，具有之優點是，其可顯示經改良之

生物利用性，由於母體化合物所賦予之提高的溶解度及/或吸收速率所造成，而此係由於可以代謝方式分裂之基團存在所致。充分討論係提供於前體藥物之設計，H. Bundgaard編著，Elsevier (1985)；酶學上之方法，K. Widder等人編著，大學出版社，**42**, 309-396(1985)；藥物設計與發展之教科書，Krogsgaard-Larsen與H. Bandged編著，第5章；"前體藥物之設計與應用"113-191 (1991)；先進藥物傳輸回顧，H.Bundgard, **8**, 1-38,(1992)；J. Pharm. Sci., 77, 285(1988)；Chem. Pharm. Bull., N. Nakeya等人，**32**, 692(1984)；作為新穎傳輸系統之前體藥物，T. Higuchi與V. Stella, **14** A.C.S.論集系列，及藥物設計上之生物可逆載體，E.B.Roche編著，美國醫藥協會與Pergamon出版社，1987，其係併於本文供參考。

"藥學上可接受之鹽"係指本發明化合物之相對無毒性無機與有機酸加成鹽及鹼加成鹽。此等鹽可在化合物之最後單離與純化期間當場製成。特定言之，酸加成鹽可經由個別使已經純化之化合物，呈其自由態鹼形式，與適當有機或無機酸反應，及單離如此形成之鹽而製成。舉例之酸加成鹽，包括氫溴酸鹽、鹽酸鹽、硫酸鹽、酸性硫酸鹽、磷酸鹽、硝酸鹽、醋酸鹽、草酸鹽、戊酸鹽、油酸鹽、棕櫚酸鹽、硬脂酸鹽、月桂酸鹽、硼酸鹽、苯甲酸鹽、乳酸鹽、磷酸鹽、甲苯磺酸鹽、檸檬酸鹽、順丁烯二酸鹽、反丁烯二酸鹽、琥珀酸鹽、酒石酸鹽、萘酸鹽、甲烷磺酸鹽、葡庚糖酸鹽、乳糖酸鹽、胺基磺酸鹽、丙二酸鹽、柳

酸鹽、丙酸鹽、亞甲基-雙-β-羥基萘甲酸鹽、龍膽酸鹽、羥乙磺酸鹽、二-對-甲苯甲醯基酒石酸鹽、甲烷磺酸鹽、乙烷磺酸鹽、苯磺酸鹽、對-甲苯磺酸鹽、環己基胺基磺酸鹽及金雞鈉酸月桂基磺酸鹽等。參閱，例如S.M.Berge等人，"醫藥鹽"，**J. Pharm. Sci., 66**, 1-19(1977)，其係併於本文供參考。鹼加成鹽亦可經由個別使已經純化之化合物，呈其酸形式，與適當有機或無機鹼反應，及單離如此形成之鹽而製成。鹼加成鹽包括藥學上可接受之金屬與胺鹽。適當金屬鹽包括鈉、鉀、鈣、鋇、鋅、鎂及鋁鹽。鈉與鉀鹽為較佳。適當無機鹼加成鹽係製自金屬鹼，其包括氫化鈉、氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化鈣、氫氧化鋁、氫氧化鋰、氫氧化鎂、氫氧化鋅等。適當胺鹼加成鹽係製自胺類，其具有足夠鹼度以形成安定鹽，且較佳係包括常用於醫藥化學之胺類，因其具有低毒性及對於醫藥用途之可接受性。其係為氨、乙二胺、N-甲基-葡萄糖胺、離胺酸、精胺酸、烏胺酸、膽鹼、N,N'-二苄基乙二胺、氯普魯卡因、二乙醇胺、普魯卡因、N-苄基苯乙胺、二乙胺、六氫吡咔、參(羥甲基)-胺基甲烷、氫氧化四甲基銨、三乙胺、二苄胺、麻黃胺、脫氫松香胺、N-乙基六氫吡啶、苄胺、四甲基銨、四乙基銨、甲胺、二甲胺、三甲胺、乙胺，鹼性胺基酸，例如離胺酸與精胺酸，及二環己基胺等。

"環基取代基"係意謂連接至芳族或非芳族環系統之取代基，其包括芳基、雜芳基、羥基、烷氧基、環基氧基、芳

氧基、雜芳基氧基、醯基或其硫酮基類似物、環基羰基或其硫酮基類似物、芳醯基或其硫酮基類似物、雜芳醯基或其硫酮基類似物、醯氧基、環基羰基氧基、芳醯基氧基、雜芳醯基氧基、鹵基、硝基、氰基、羧基(酸)、-C(O)NHOH-、-C(O)-CH_2OH、-C(O)-CH_2SH、-C(O)-NH-CN、磺基、磷基、烷基磺醯基胺甲醯基、四唑基、芳基磺醯基胺甲醯基、N-甲氧基胺甲醯基、雜芳基磺醯基胺甲醯基、3-羥基-3-環丁烯-1,2-二酮、3,5-二酮基-1,2,4-噁二唑烷基或羥基雜芳基如3-羥基異噁唑基、3-羥基-1-甲基吡唑基、烷氧羰基、環基氧基羰基、芳氧基羰基、雜芳基氧基羰基、烷基磺醯基、環基磺醯基、芳基磺醯基、雜芳基磺醯基、烷基亞磺醯基、環基亞磺醯基、芳基亞磺醯基、雜芳基亞磺醯基、烷硫基、環基硫基、芳基硫基、雜芳基硫基、環基、芳基重氮基、雜芳基重氮基、硫醇、Y^1Y^2N-、$Y^1Y^2NC(O)$-、$Y^1Y^2NC(O)O$-、$Y^1Y^2NC(O)NY^3$-或$Y^1Y^2NSO_2$-，其中Y^1、Y^2及Y^3獨立為氫、烷基、芳基或雜芳基，或對其中取代基為Y^1Y^2N-而言，則Y^1與Y^2之一可為如本文中定義之醯基、環基羰基、芳醯基、雜芳醯基、烷氧羰基、環基氧基羰基、芳氧基羰基或雜芳基氧基羰基，而Y^1與Y^2中之另一個係如先前定義，或對其中取代基為$Y^1Y^2NC(O)$-、$Y^1Y^2NC(O)O$-、$Y^1Y^2NC(O)NY^3$-或$Y^1Y^2NSO_2$-而言，Y^1與Y^2亦可和該Y^1與Y^2經過其上而連接之N原子，一起採用而形成4至7員氮雜環基或氮雜環烯基。當環系統為飽和或部份飽和時，"環基取代基"進一步

包括亞甲基(H_2C=)、酮基(O=)及硫酮基(S=)。酸性/醯胺環基取代基係為羧基(酸)、-C(O)NHOH-、-C(O)-CH_2OH、-C(O)-CH_2SH、-C(O)-NH-CN、磺基、磷基、烷基磺醯基胺甲醯基、四唑基、芳基磺醯基胺甲醯基、N-甲氧基胺甲醯基、雜芳基磺醯基胺甲醯基、3-羥基-3-環丁烯-1,2-二酮、3,5-二酮基-1,2,4-噁二唑烷基或羥基雜芳基如3-羥基異噁唑基、3-羥基-1-甲基吡唑基及Y^1Y^2NCO-。非酸性極性環基取代基係為羥基、酮基(O=)、硫酮基(S=)、醯基或其硫酮基類似物、環基羰基或其硫酮基類似物、芳醯基或其硫酮基類似物、雜芳醯基或其硫酮基類似物、烷氧羰基、環基氧基羰基、芳氧基羰基、雜芳基氧基羰基、醯氧基、環基羰基氧基、芳醯基氧基、雜芳醯基氧基、烷基磺醯基、環基磺醯基、芳基磺醯基、雜芳基磺醯基、烷基亞磺醯基、環基亞磺醯基、芳基亞磺醯基、雜芳基亞磺醯基、硫醇、Y^1Y^2N-、Y^1Y^2NC(O)-、Y^1Y^2NC(O)O-、Y^1Y^2NC(O)NY^3-或$Y^1Y^2NSO_2$-。

"溶劑合物"係意謂本發明化合物與一或多種溶劑分子之物理締合作用。此物理締合作用包括氫鍵。於某些情況中，溶劑合物能夠單離，例如當一或多個溶劑分子被併入結晶性固體之晶格中時。"溶劑合物"涵蓋溶液相與可單離之溶劑合物。舉例之溶劑合物包括水合物、乙醇化物、甲醇化物等。

具體實施例

參考本文中所述之本發明，下文係為與其相關之特定且

較佳之具體實施例。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^0為一個鍵結。

根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^0為二氟亞甲基。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^1為氫或視情況經取代之低碳脂族基團。

根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^1為氫或低碳烷基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^1為氫。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^2為視情況經取代之低碳脂族基團或視情況經取代之單環狀基團。

根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^2為視情況經取代之低碳烷基、視情況經取代之低碳烯基或視情況經取代之單環狀環烷基。

根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^2為羧甲基、1-羧基-2-苯基乙基、環丙基、環丁基、1-環己基乙基、1-苯基乙基、丁-2-基、1-吡啶-4-基乙基、丙烯-3-基或3-甲基丁-2-基；更佳為環丙基。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^3為視情況經取代之低碳脂族基團亞甲基。

根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^3為視情況經鹵基取代之低碳(烷基或烯基)亞甲基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^3為丙基

亞甲基、2,2-二氟乙基亞甲基、2,2,2-三氟亞甲基或丙烯-3-基亞甲基；更佳R^3為丙基亞甲基或2,2-二氟乙基亞甲基；更佳R^3為丙基亞甲基。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^4為氫或視情況經取代之低碳脂族基團。

根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^4為氫或低碳烷基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^4為氫。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^5為視情況經取代之低碳脂族基團亞甲基。

根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^5為視情況經(苯基、羧基、羧醯胺基或烷氧羰基)取代之低碳(烷基或烯基)亞甲基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^5為甲基亞甲基、異丙基亞甲基、第三-丁基亞甲基、丁-2-基亞甲基、丁基亞甲基、苄基亞甲基、3-甲基丁基亞甲基、2-甲基丙基亞甲基、羧甲基亞甲基、羧醯胺基甲基亞甲基、苄氧羰基甲基亞甲基、苄氧羰基丙基亞甲基或苯基丙烯-3-基亞甲基；更佳R^5為異丙基亞甲基或第三-丁基-亞甲基。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^6為氫或視情況經取代之低碳脂族基團。

根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^6為氫或低碳烷基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^6為氫。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^7係視情況經取代之低碳脂族基團亞甲基、視情況經取代之低碳環狀基團亞甲基或視情況經取代之單環狀(芳基或雜芳基)亞甲基。

根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^7為視情況經取代之低碳烷基亞甲基、視情況經取代之低碳環烷基亞甲基或視情況經取代之苯基亞甲基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^7為甲基亞甲基、異丙基亞甲基、正-丙基亞甲基、苯基亞甲基、環己基亞甲基、環戊基亞甲基、第三-丁基亞甲基、第二-丁基亞甲基、環己基甲基亞甲基或苯基甲基亞甲基；更佳為異丙基亞甲基、環己基亞甲基、環戊基亞甲基、第三-丁基亞甲基或第二-丁基亞甲基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，亦為其中各R^3、R^5及R^7為單取代之亞甲基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，亦為其中R^3為單取代之亞甲基，且在連接至-C(O)-R^0-C(O)-NR^1R^2部份基團之碳上具有(S)組態。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^8為氫或視情況經取代之低碳脂族基團。

根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^8為氫或低碳烷基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^8為氫。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^9為視情

況經取代之低碳脂族基團或視情況經取代之單環狀芳族基團。

根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^9為視情況經取代之低碳烷基或視情況經取代之單環狀雜芳基。

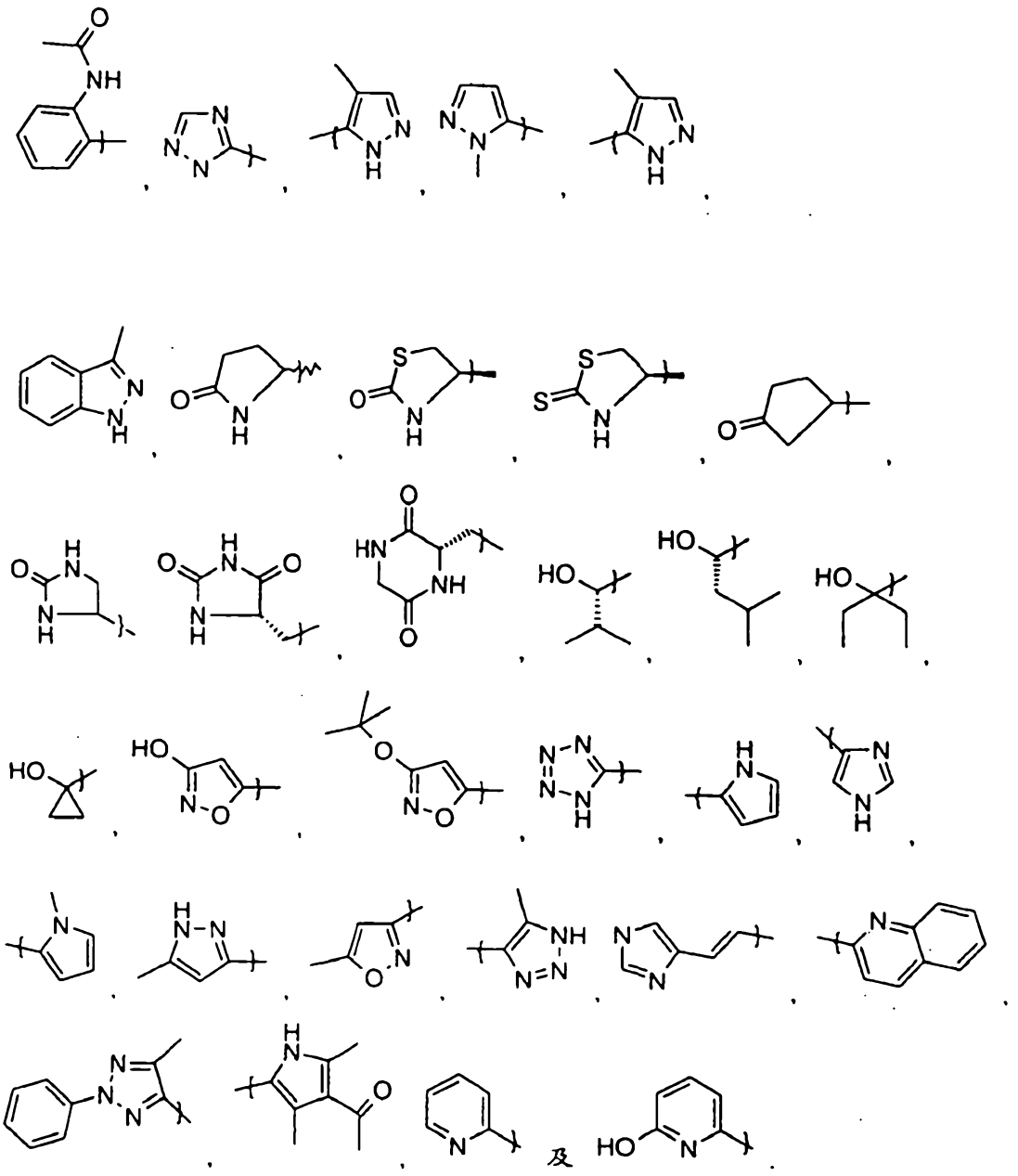
根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^9為視情況經(羧基、(低碳烷基)SO_2NH-、(低碳烷基)HNCO-、羥基、苯基、雜芳基或(低碳烷基)OC(O)NH-)取代之低碳烷基或視情況經取代之單環狀雜芳基。

根據本發明之另外一項較佳具體實施例，係為其中R^9為被(單-或二-)MeOC(O)NH-取代之低碳烷基；更佳為1,2-二(MeOC(O)NH)乙基或1-(MeOC(O)NH)乙基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^9為經(羧基、(低碳烷基)HNCO-或四唑基)取代之低碳烷基；更佳3-羧基丙基、2-四唑-5-基丙基、3-(N-甲基羧醯胺基)丙基或3-羧基-2,2-二甲基丙基；更佳為3-羧基丙基、2-四唑-5-基丙基或3-(N-甲基羧醯胺基)丙基。

根據本發明之另一項較佳具體實施例，係為其中R^9為視情況經取代之低碳烷基；更佳為1-羥基-2-苯基乙基、甲基、異丙基或第三-丁基；更佳為甲基、異丙基或第三-丁基。

根據本發明之另一項較佳具體實施例，係為其中R^9係選自包括



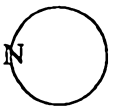
根據本發明之又再另一項較佳具體實施例，係為其中R^9為吡咔基。

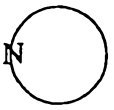
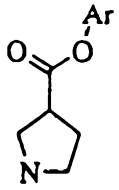
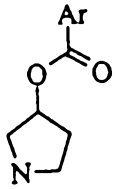
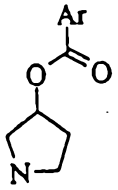
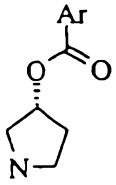
根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^{10}為氫或視情況經取代之低碳脂族基團。

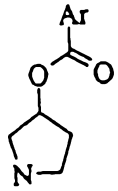
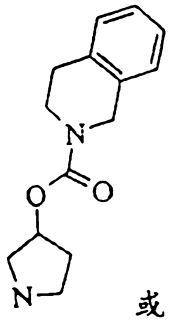
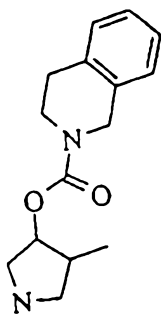
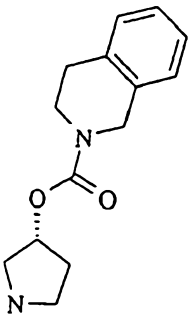
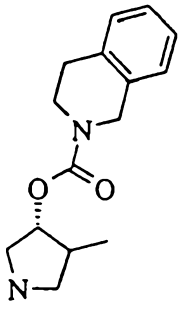
根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^{10}為氫或低碳烷基。

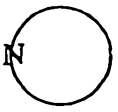
根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^{10}為

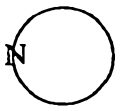
氫。

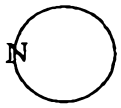
根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中  為經取代之單環狀氮雜環基時，係為經取代之四氫吡咯基。

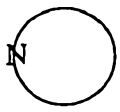
根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中  為經取代之單環狀氮雜環基時，係為視情況經取代之  或視情況經取代之  ，其中Ar為R^2，包括芳族部份基團；更佳為視情況經取代之  ；進一步較佳為視情況經取代之  。

其他較佳視情況經取代之  係為  或  ；又更佳為  或  。

根據本發明之另一項較佳具體實施例，係為其中  當為視情況經取代之多環狀氮雜環基時，係為視情況經取代之 ；更佳為視情況經取代之 。關於 之特定取代基為羥基、氟基或酮基。

根據本發明之另一項較佳具體實施例，係為其中  當為視情況經取代之多環狀氮雜環烯基時，係為視情況經取代之 ；更佳為 ；進一步較佳為 。

根據本發明之另一項較佳具體實施例，係為其中  當為視情況經取代之多環狀氮雜環烯基時，係為視情況經取代之 。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中連接至  之 -C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)R^0C(O)NR^2R^1 部份基團，係連接對氮原子為α之碳。

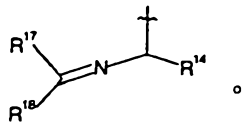
根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中L為-C(O)-或-OC(O)-。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中n為0。

根據本發明之另一項較佳具體實施例，係為其中n為1。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^{11}為$-CO_2R^{13}$。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^{12}為



。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^{13}為視情況經取代之脂族基團。

根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^{13}為烷基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^{13}為低碳烷基。

根據本發明之另一項較佳具體實施例，係為其中R^{13}為甲基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^{14}為$-CO_2R^{16}$。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^{15}為烷基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^{15}為低碳烷基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^{15}為甲基。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^{16}為視情況經取代之脂族。

根據本發明之另一項特定具體實施例，係為其中R^{16}為烷基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^{16}為低碳烷基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^{16}為第三-Bu。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^{17}為視情況經取代之芳基。

根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^{17}為苯基。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中R^{18}為視情況經取代之芳基。

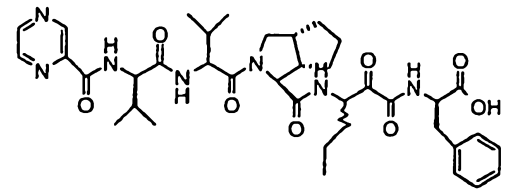
根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中R^{18}為苯基。

根據本發明之一項特定具體實施例，係為其中p^0係選自包括BOC、CBz及-CO_2烷基。

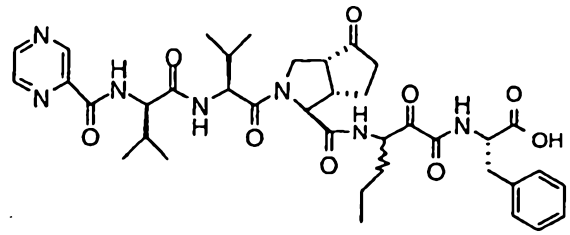
根據本發明之一項較佳具體實施例，係為其中p^0為BOC。

應明瞭的是，本發明係涵蓋本文中所指稱之特定與較佳基團群之所有適當組合。

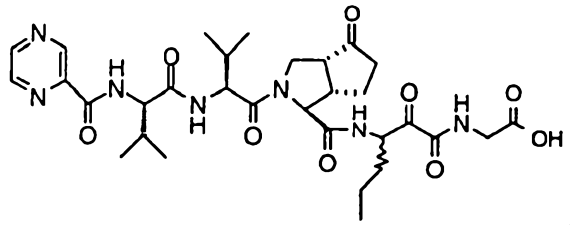
根據本發明之特定化合物，係選自連續包括下列之化合物A-FH



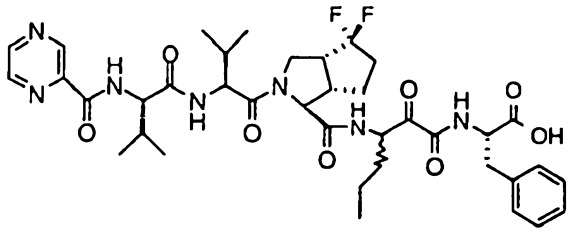
A,



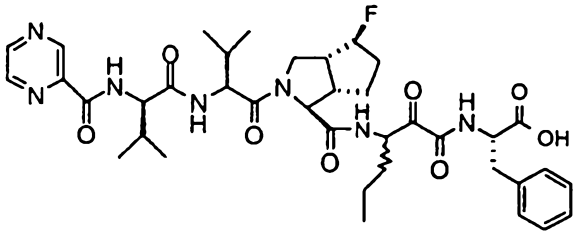
B,



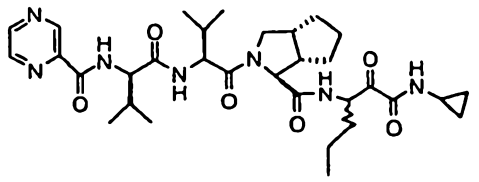
C,



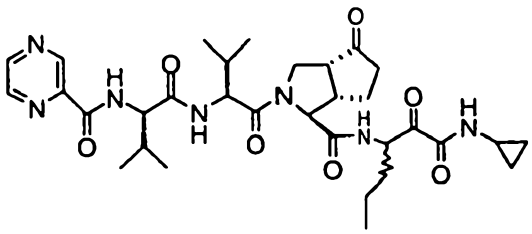
D,



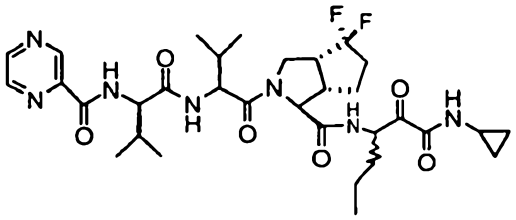
E,



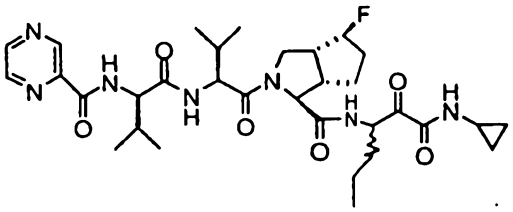
F,



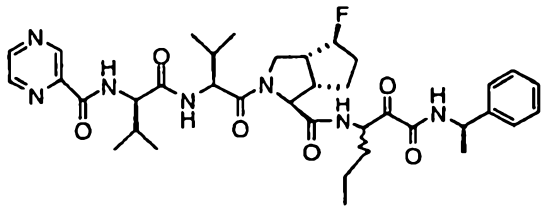
G,



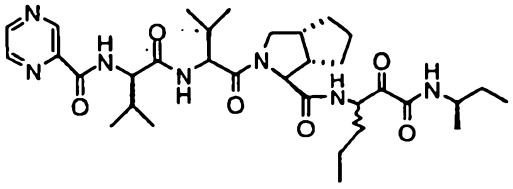
H,



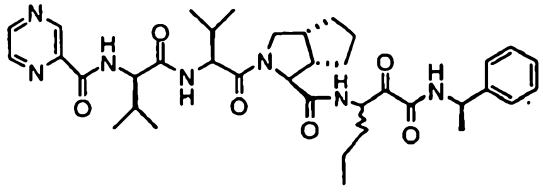
I,



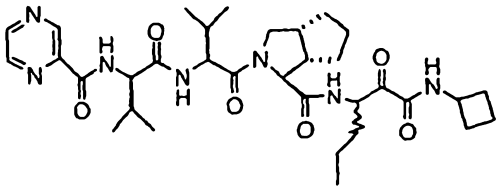
J,



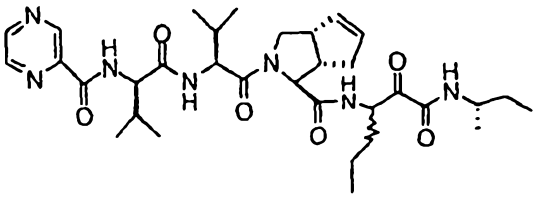
K,



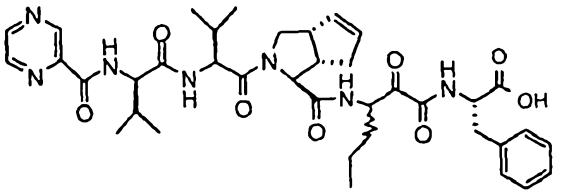
L,



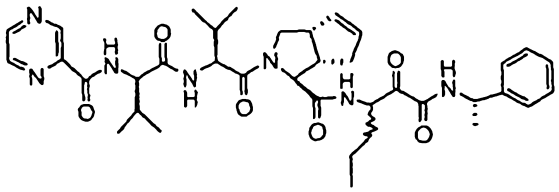
M,



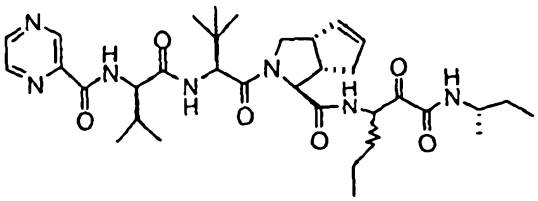
N,



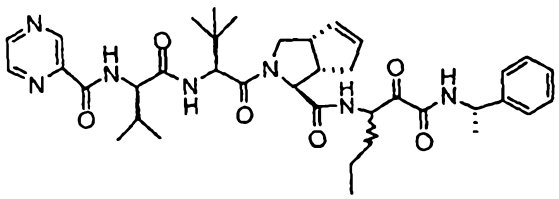
O,



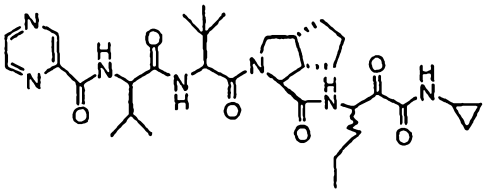
P,



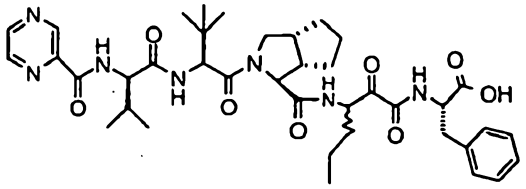
Q,



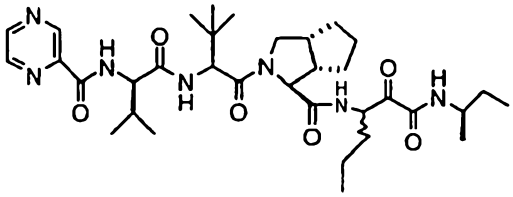
R,



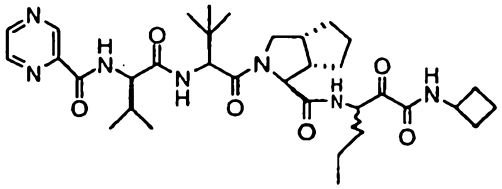
S,



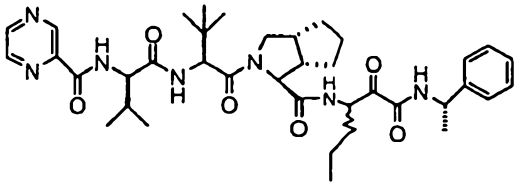
T,



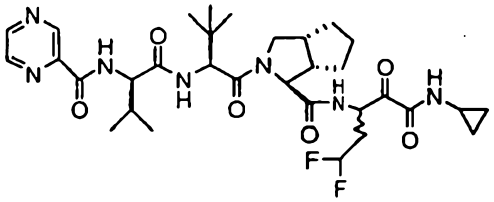
U,



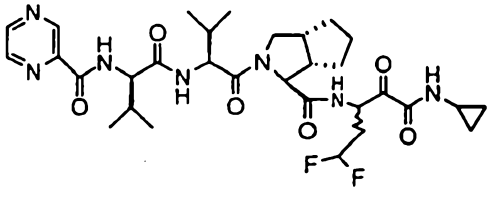
V,



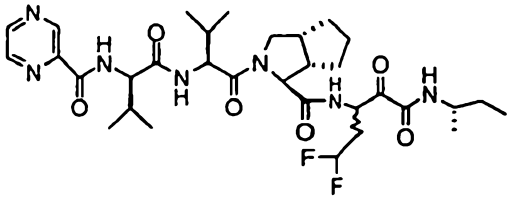
W,



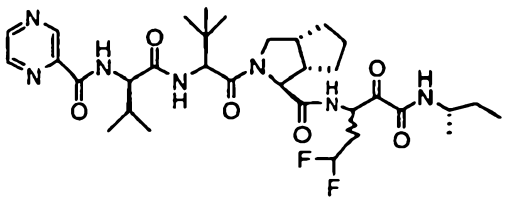
X,



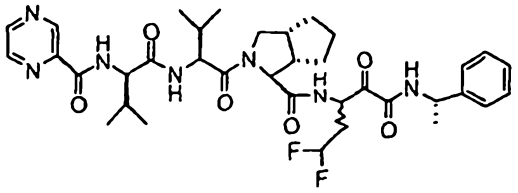
Y,



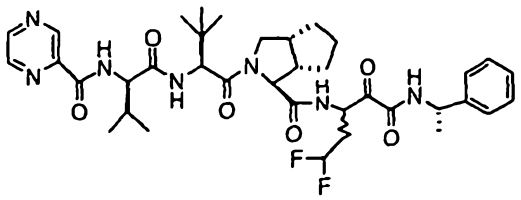
Z,



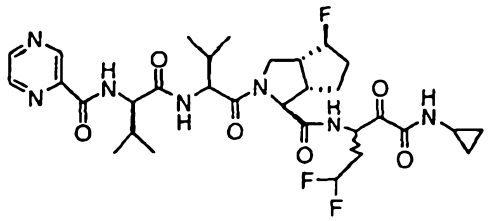
AA,



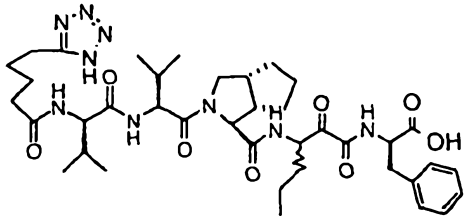
AB,



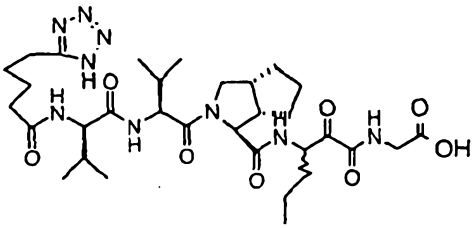
AC,



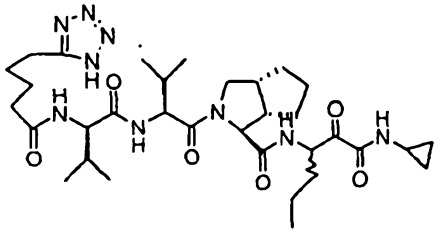
AD,



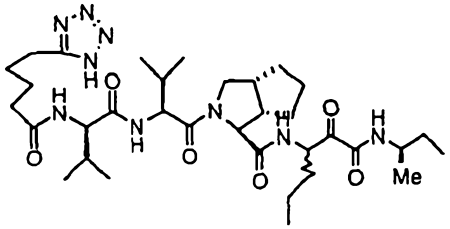
AE,



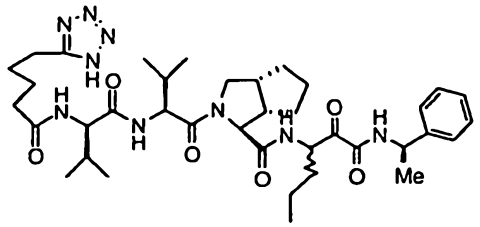
AF,



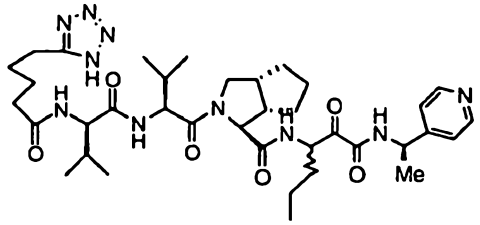
AG,



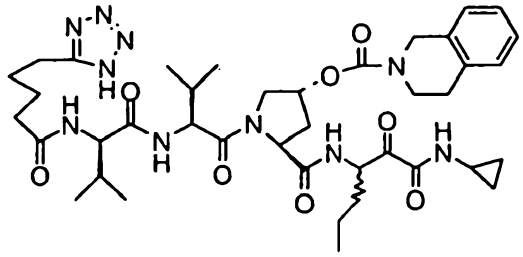
AH,



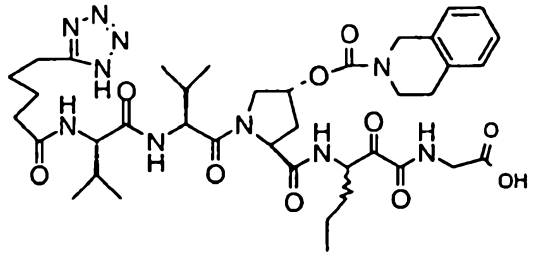
AI,



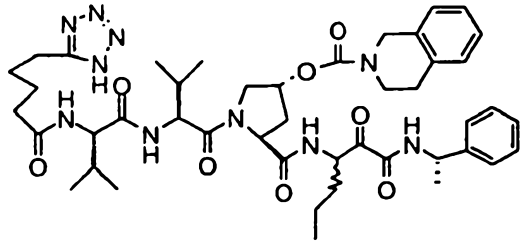
AJ,



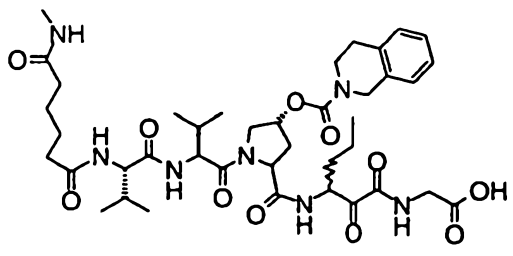
AK,



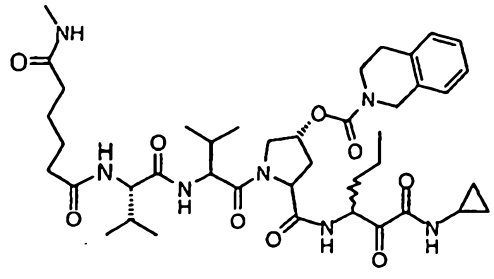
AL,



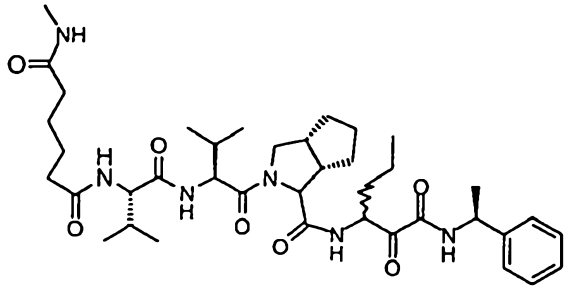
AM,



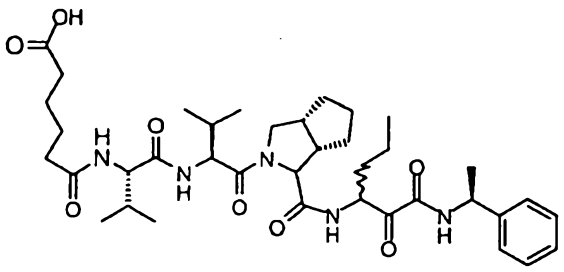
AN,



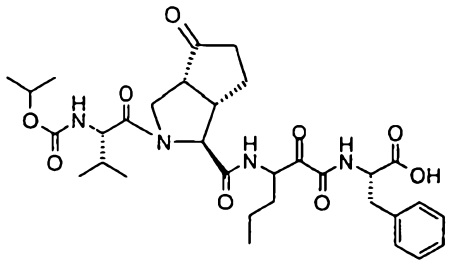
AO,



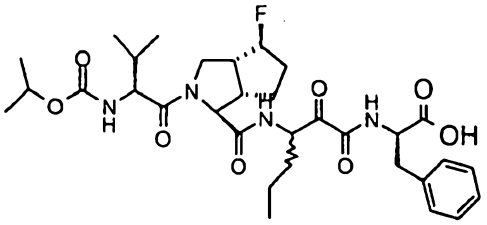
AP,



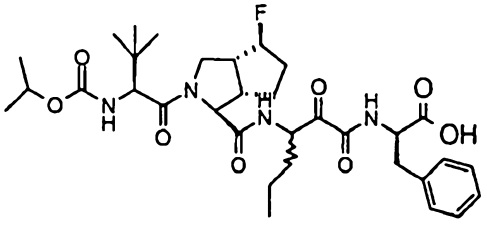
AQ,



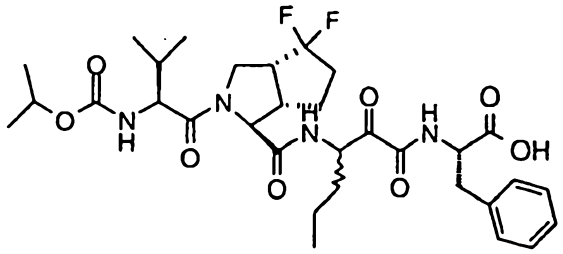
AR,



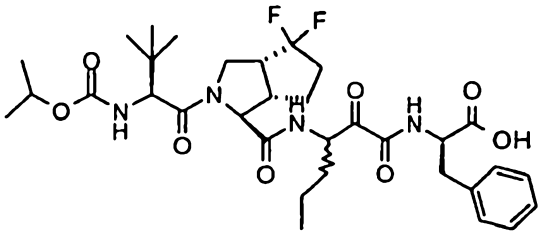
AS,



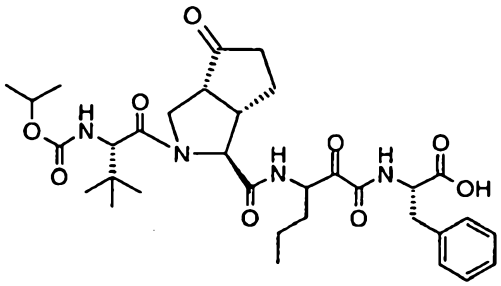
AT,



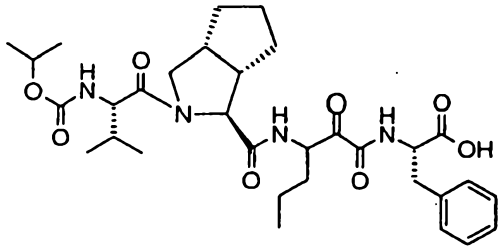
AU,



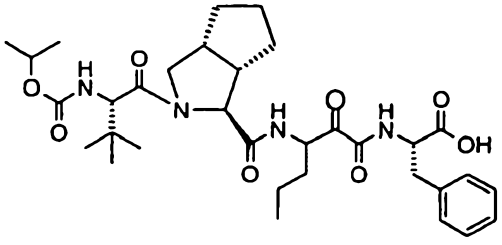
AV,



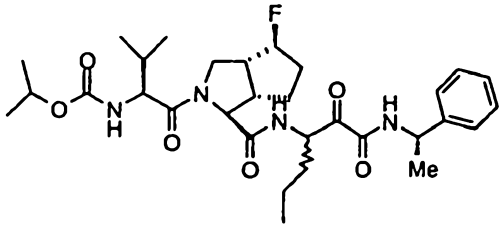
AW,



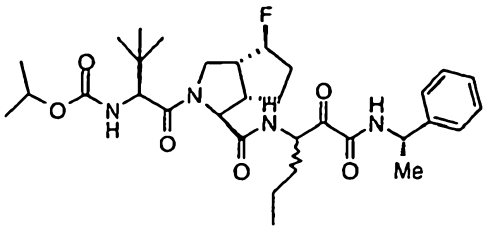
AX,



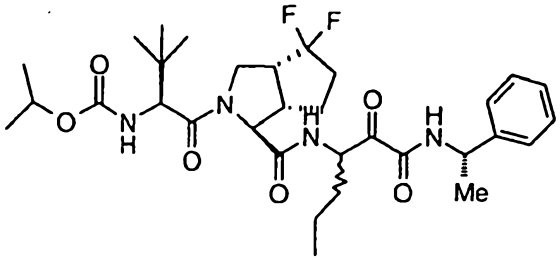
AY,



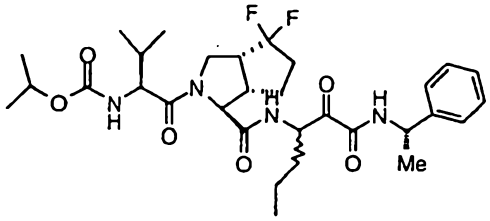
AZ,



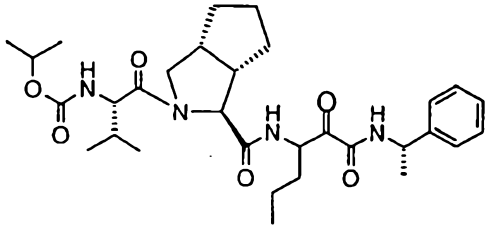
BA,



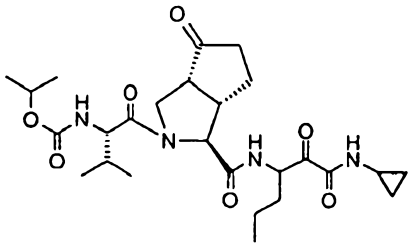
BB,



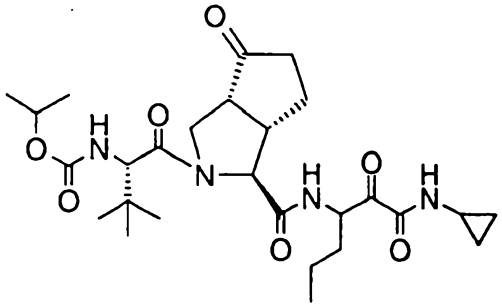
BC,



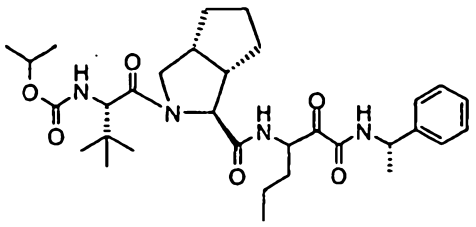
BD,



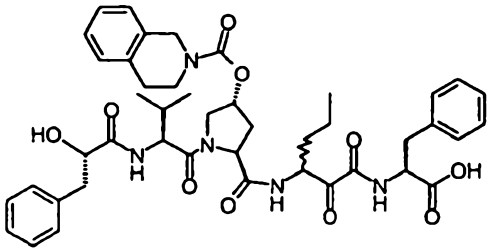
BE,



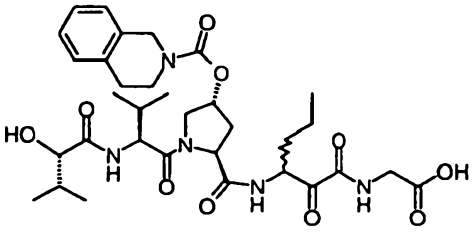
BF,



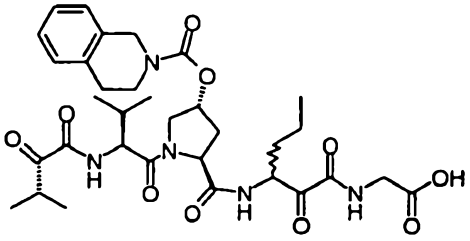
BG,



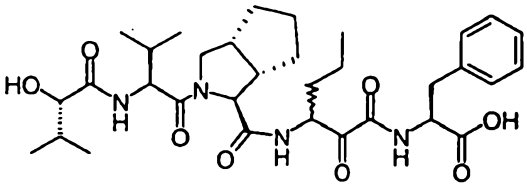
BH,



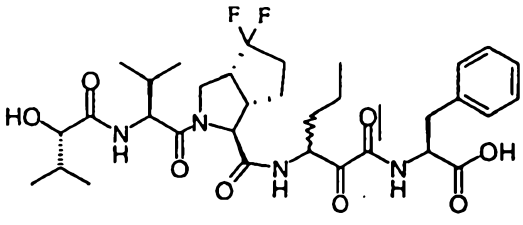
BI,



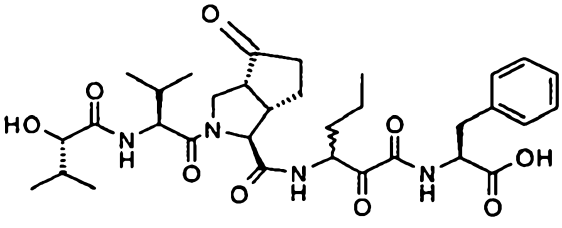
BJ,



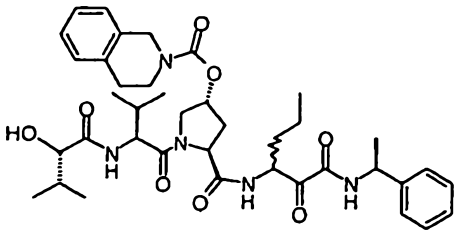
BK,



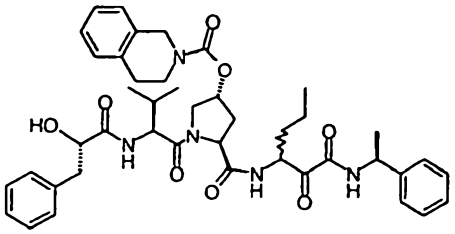
BL,



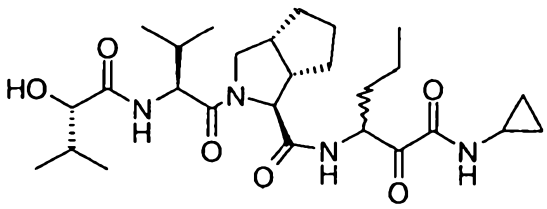
BM,



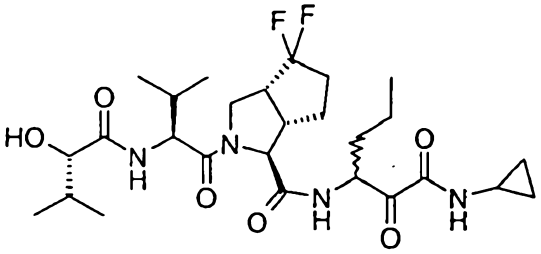
BN,



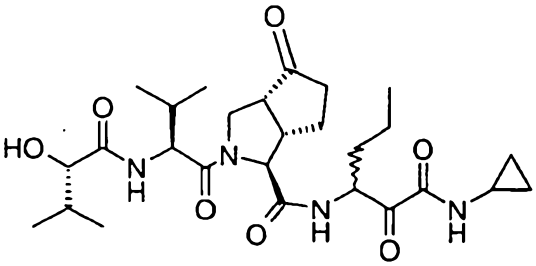
BO,



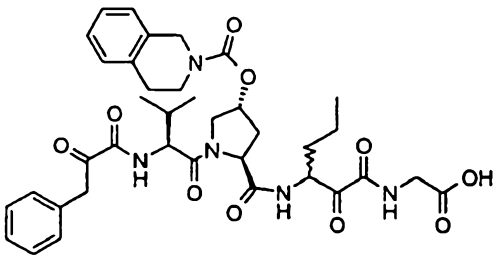
BP,



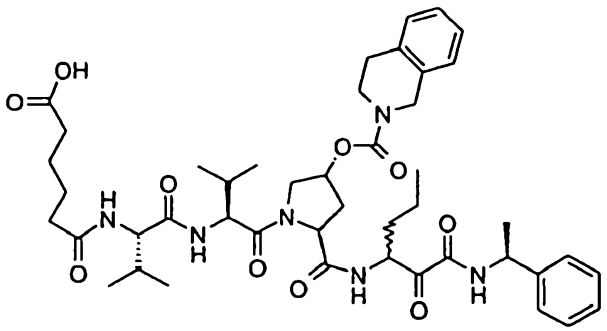
BQ,



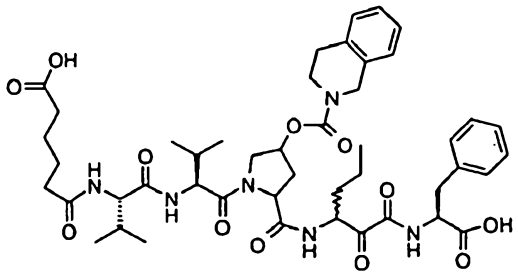
BR,



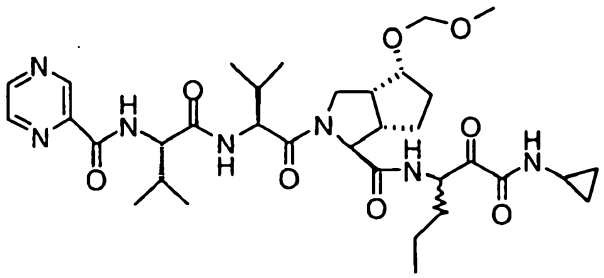
BS,



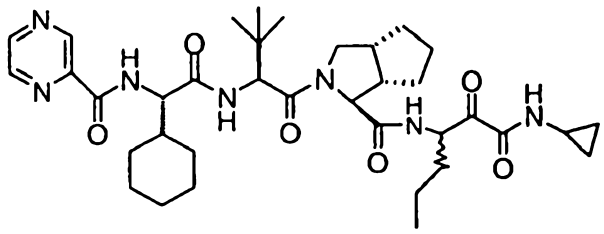
BT,



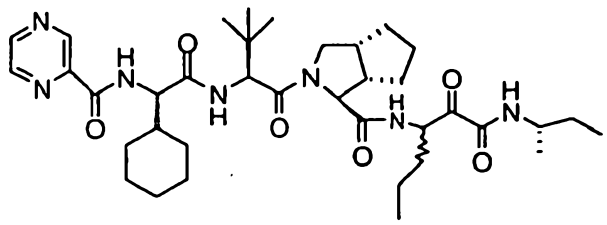
BU,



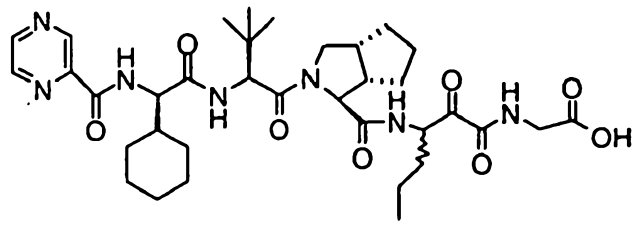
BV,



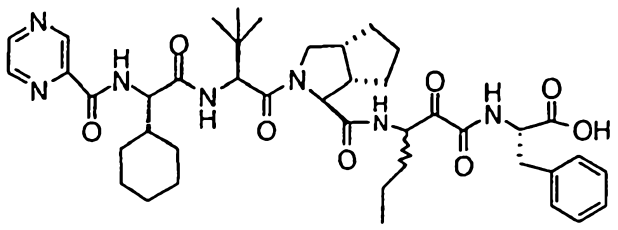
BW,



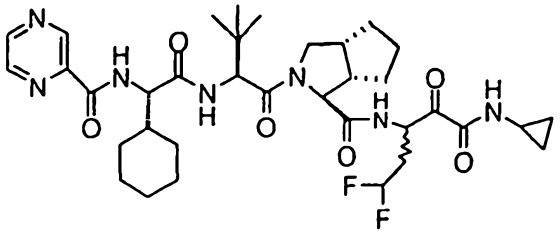
BX,



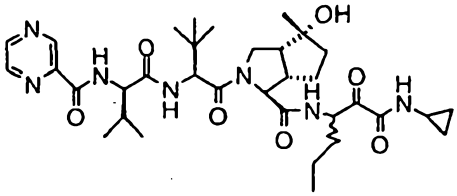
BY,



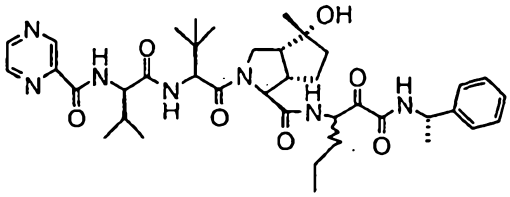
BZ,



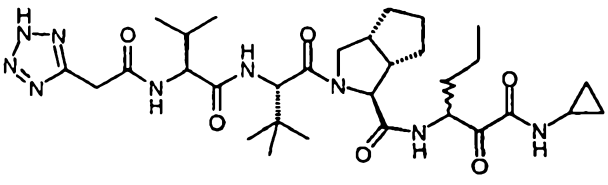
CA,



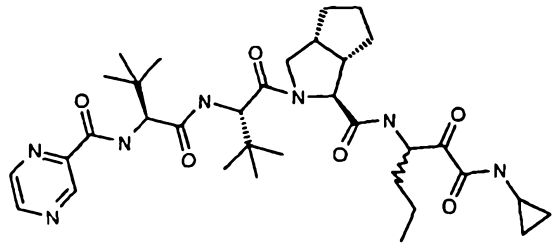
CB,



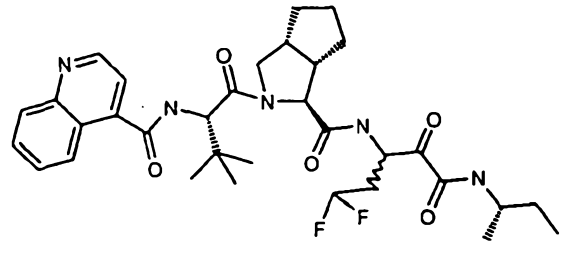
CC,



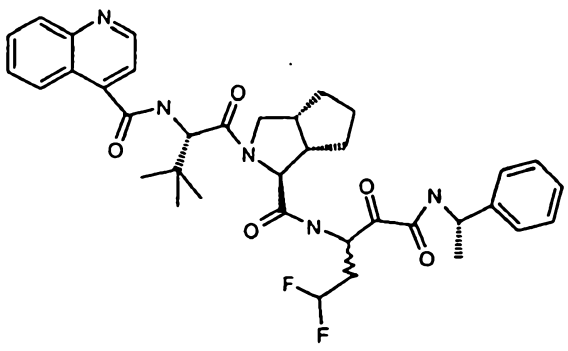
CD,



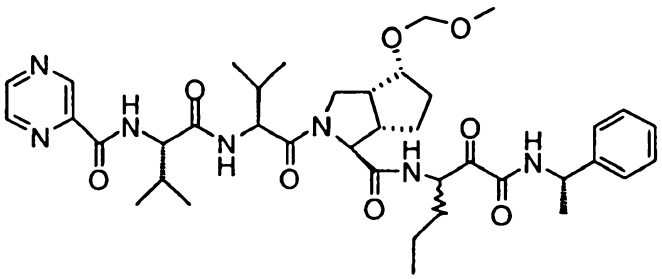
CE,



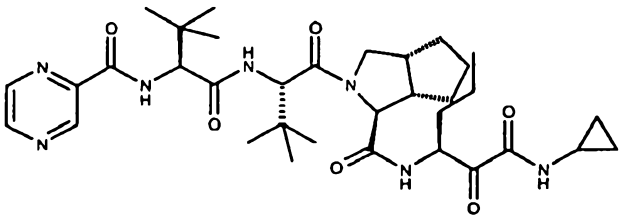
CF,



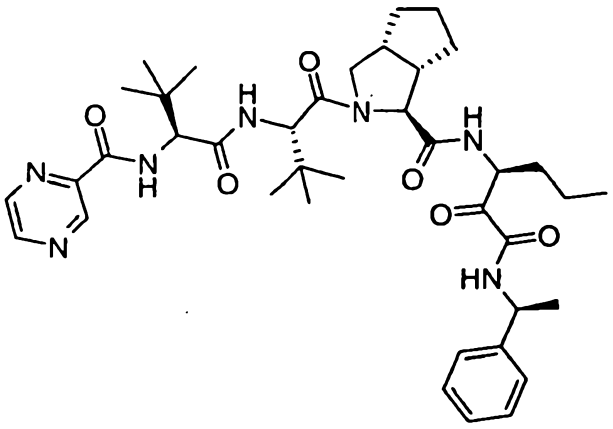
CG,



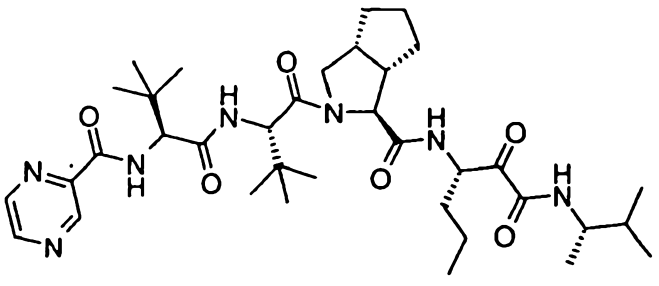
CH,



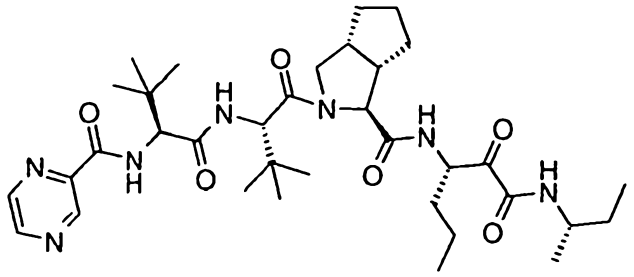
CI,



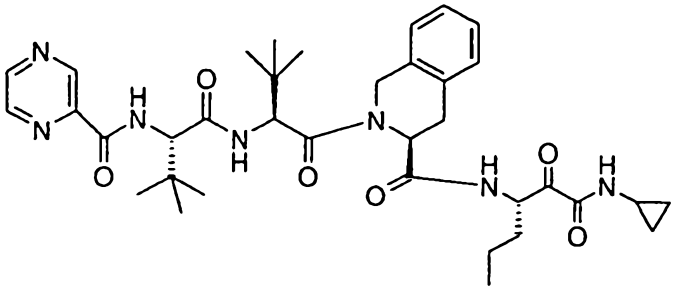
CJ,



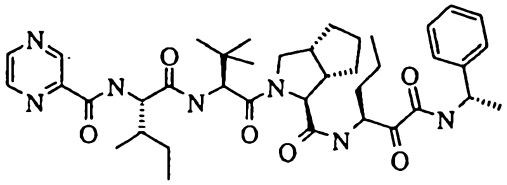
CK,



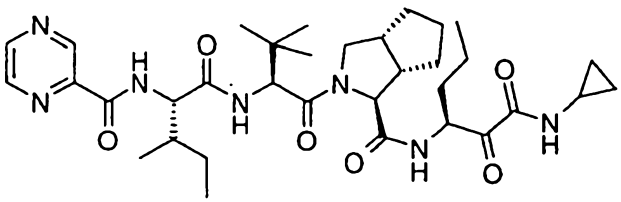
CL,



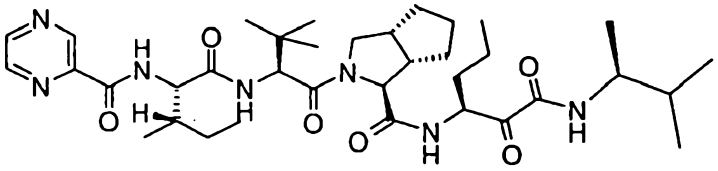
CM,



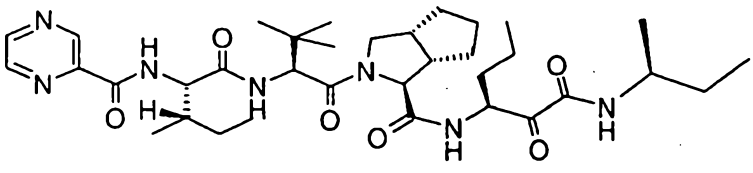
CN,



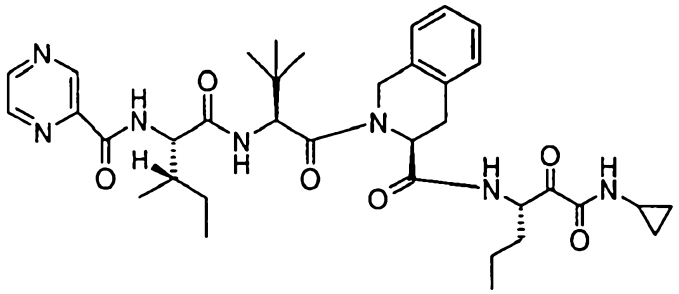
CO,



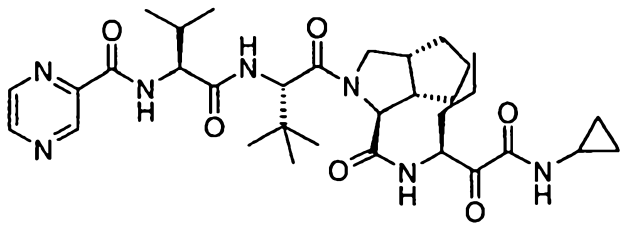
CP,



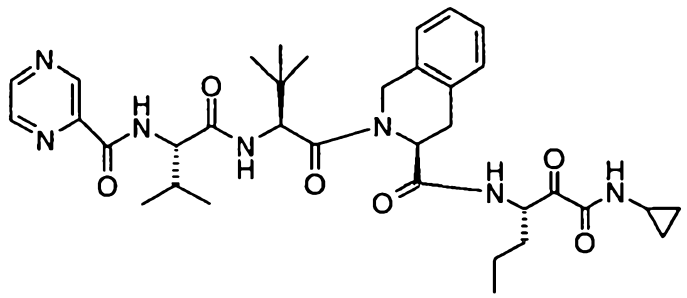
CQ,



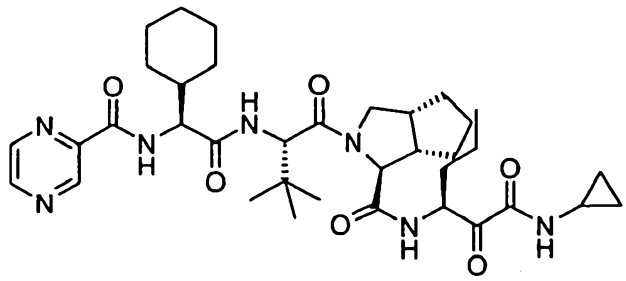
CR,



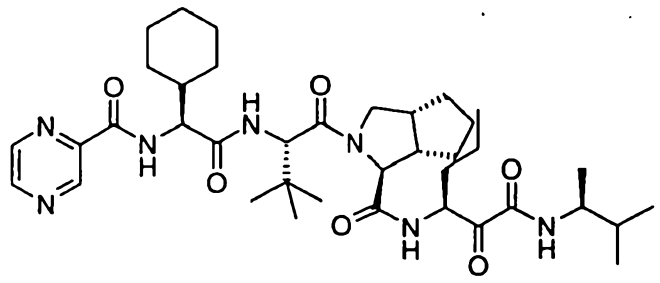
CS,



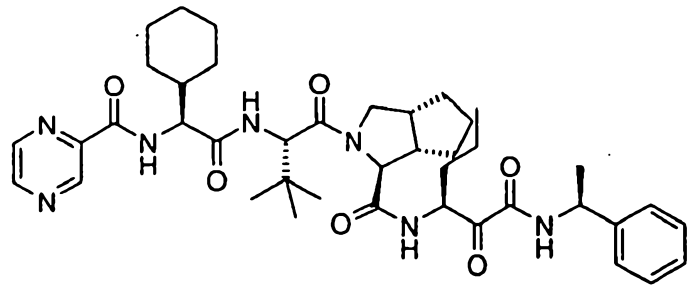
CT,



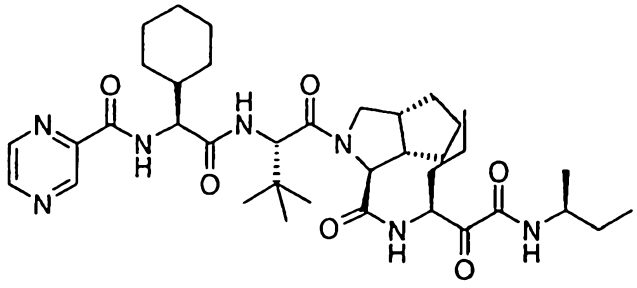
CU,



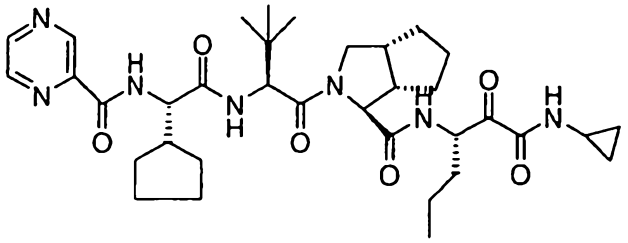
CV,



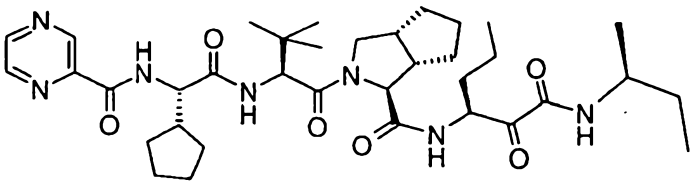
CW,



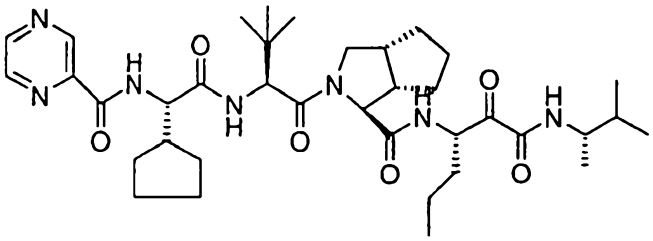
CX



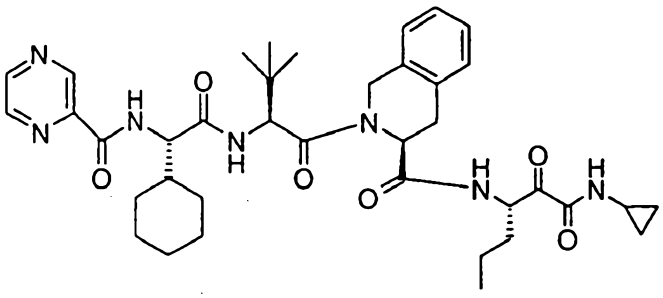
CY



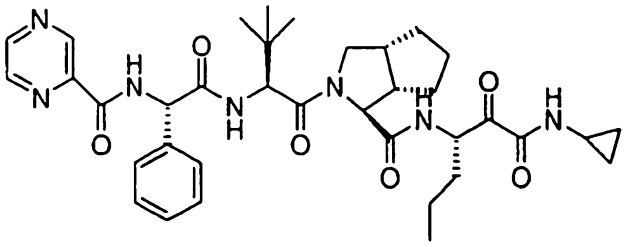
CZ,



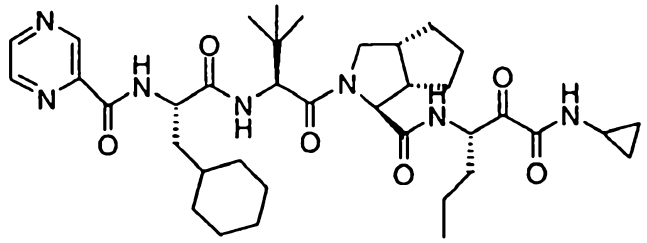
DA,



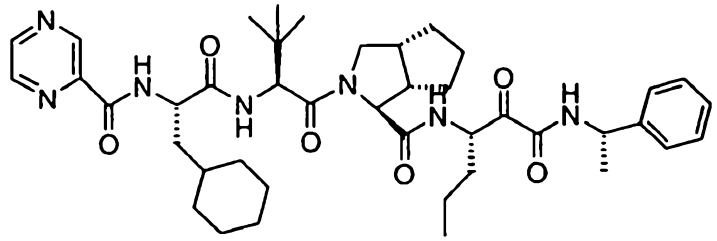
DB,



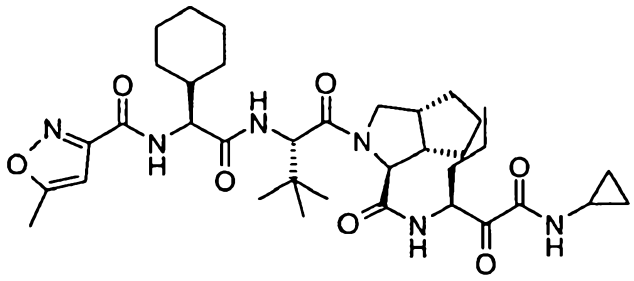
DC,



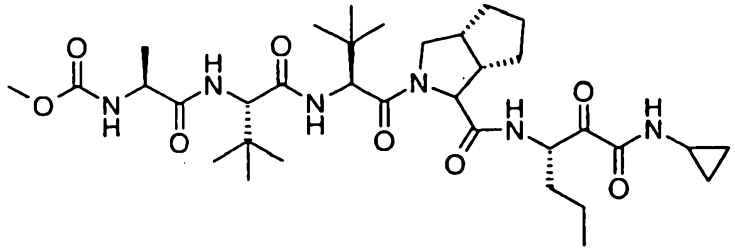
DD,



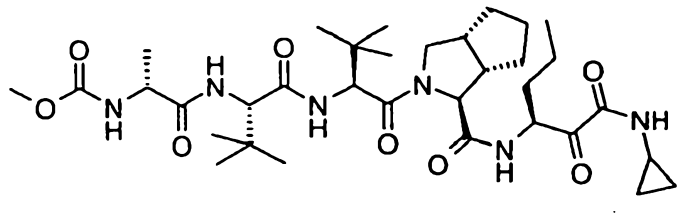
DE,



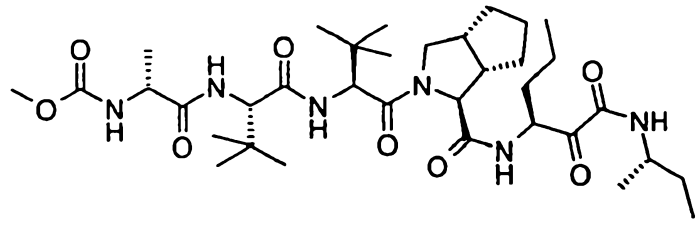
DF,



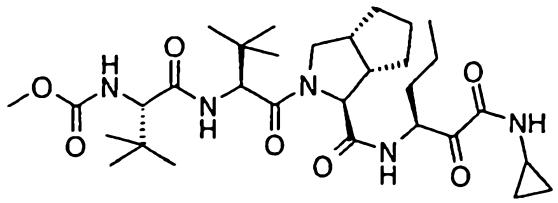
DG,



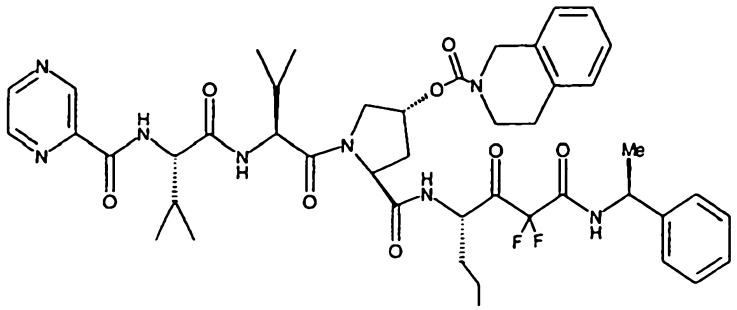
DH,



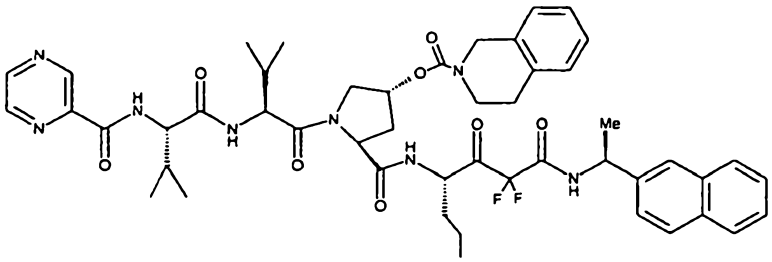
DI,



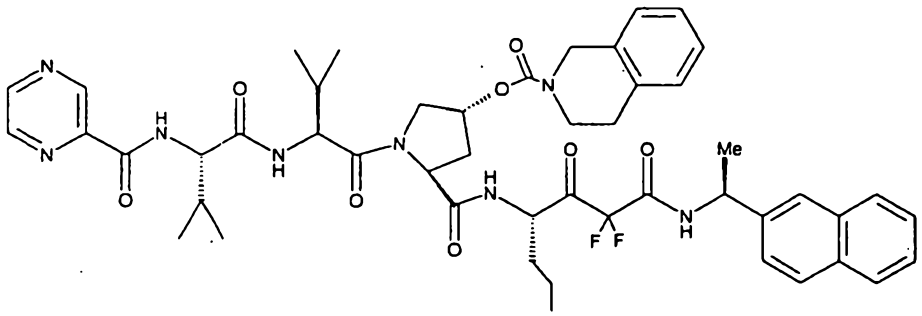
DJ,



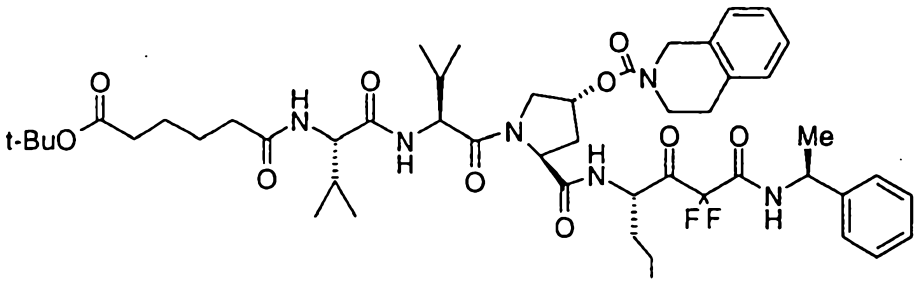
DK,



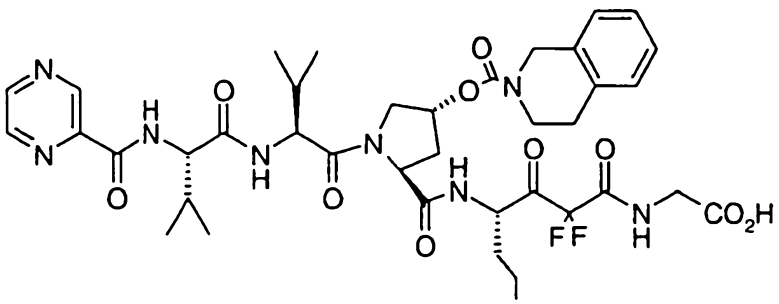
DL,



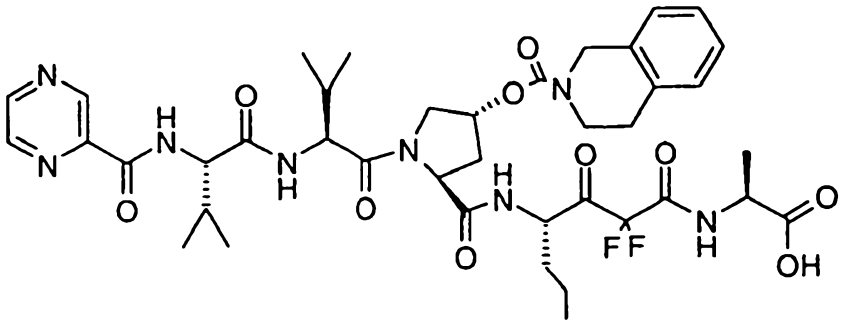
DM,



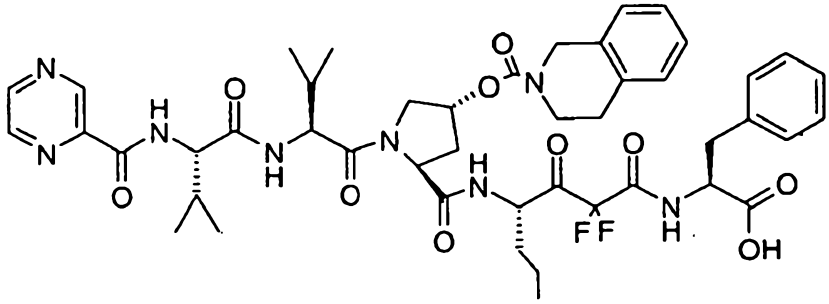
DN,



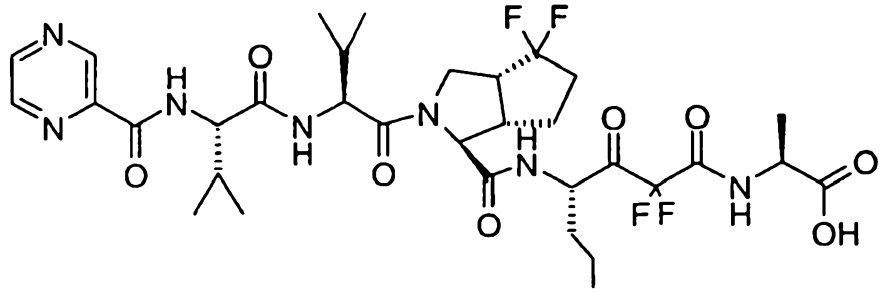
DO,



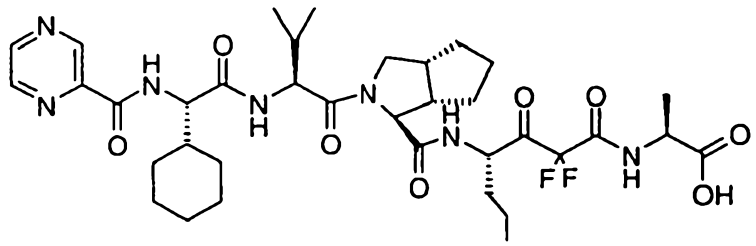
DP,



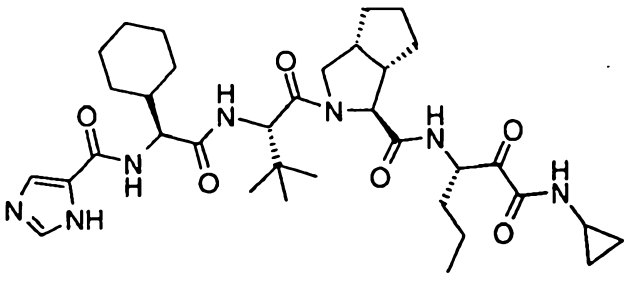
DQ,



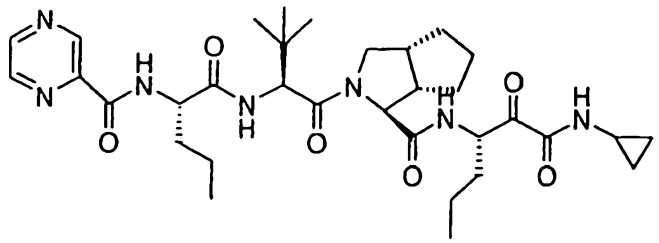
DR,



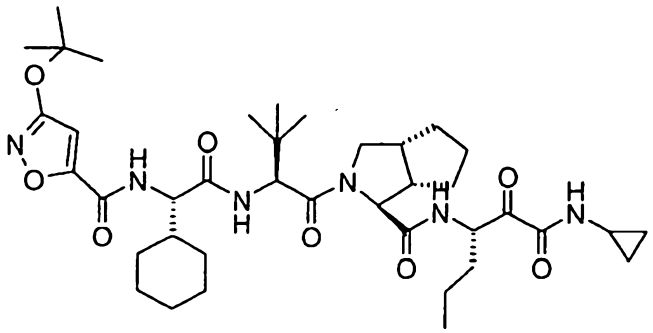
DS,



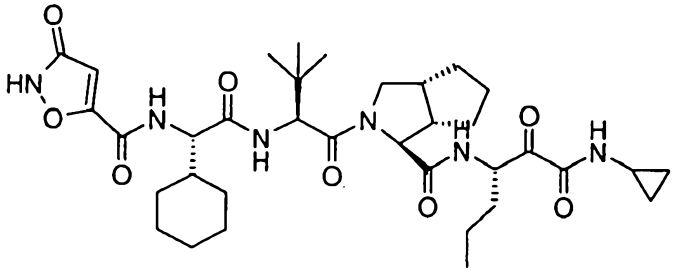
DT,



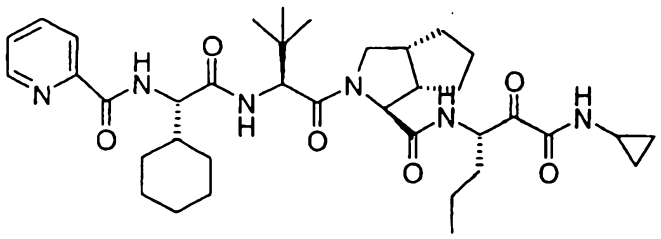
DU,



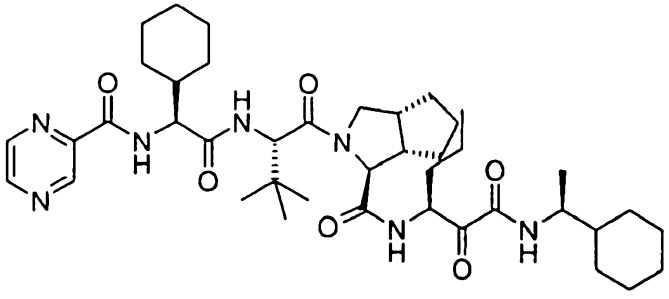
DV,



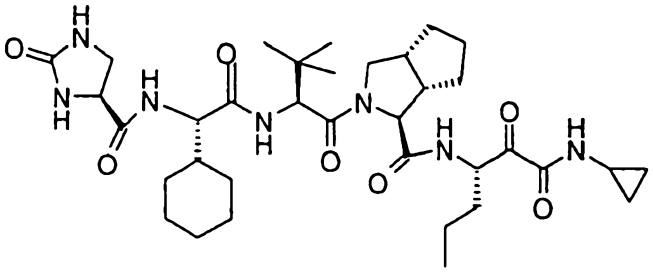
DW,



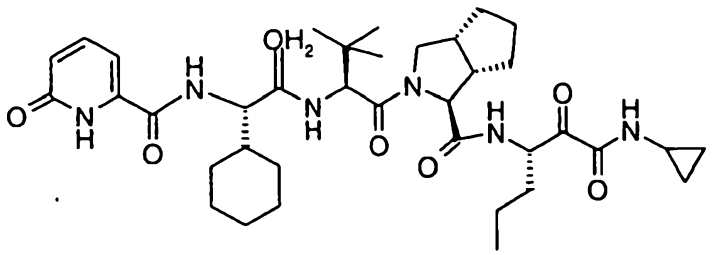
DX,



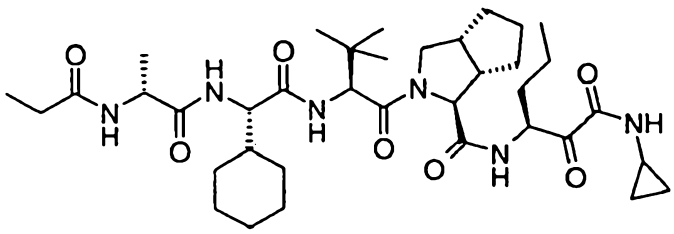
DY,



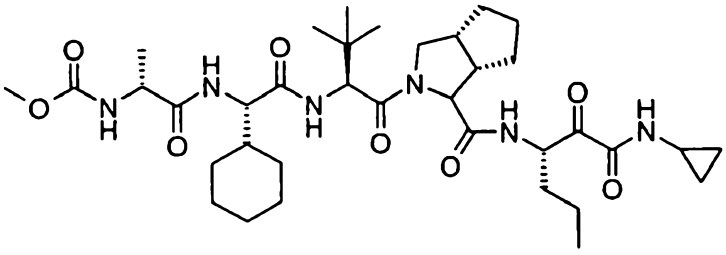
DZ,



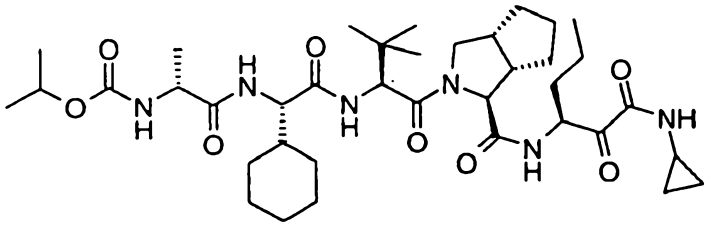
EA,



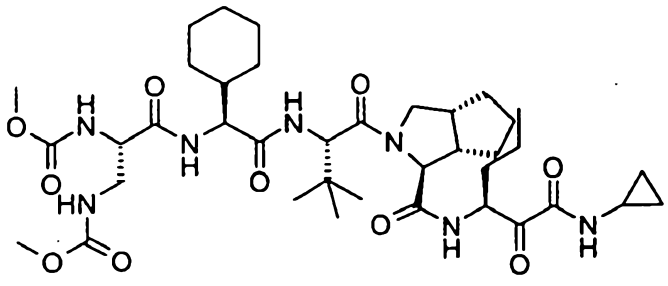
EB,



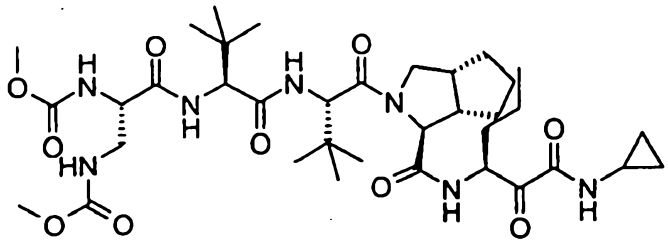
EC,



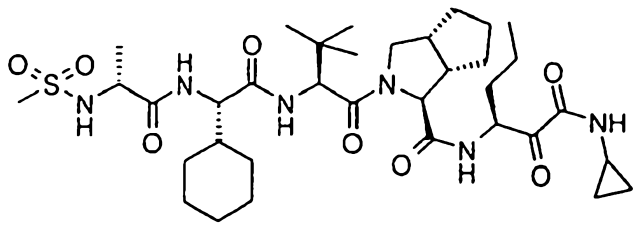
ED,



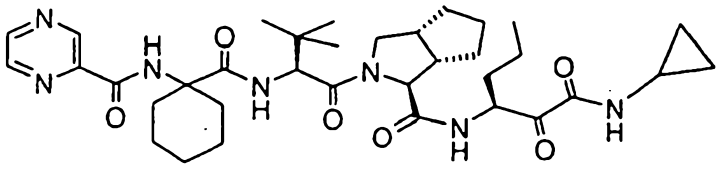
EE,



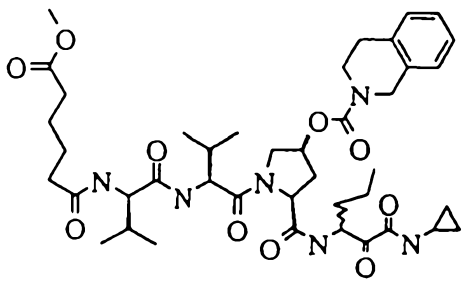
EF,



EG,

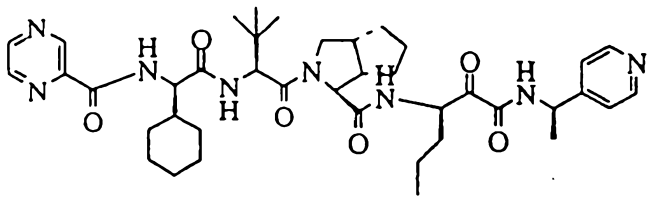


EH,

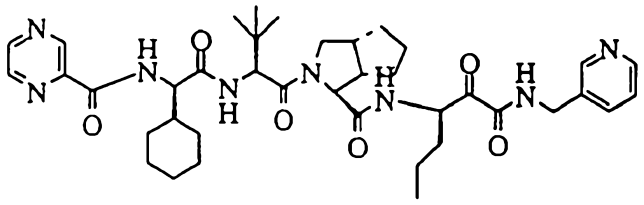


對掌性

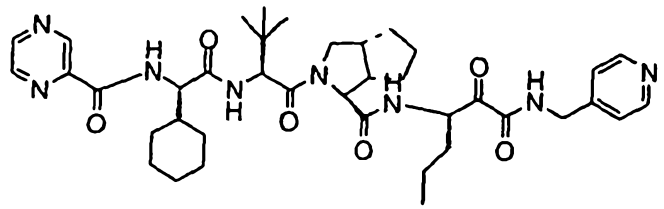
EI,



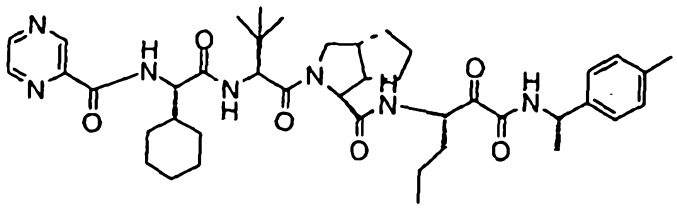
EJ,



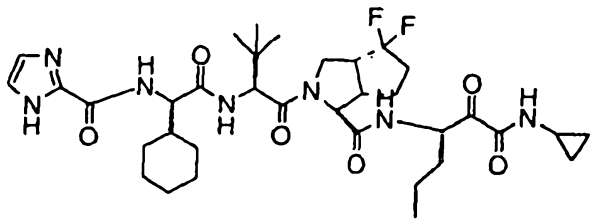
EK,



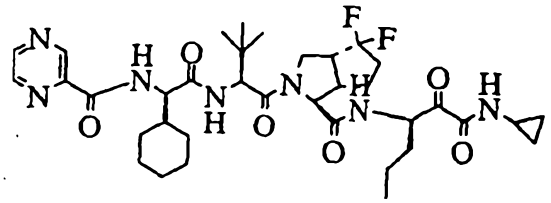
EL,



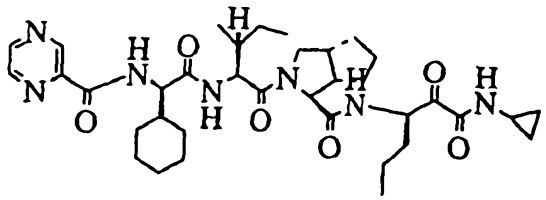
EM,



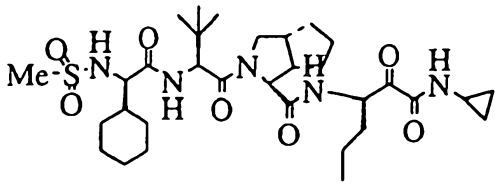
EN,



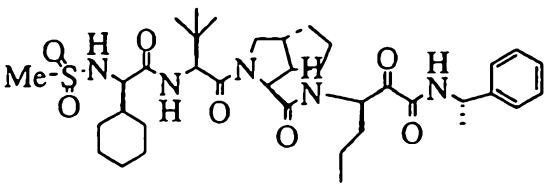
EO,



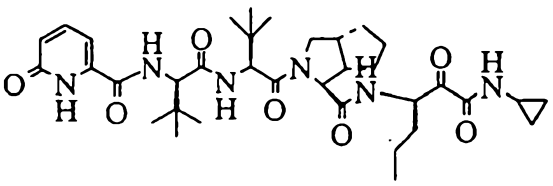
EP,



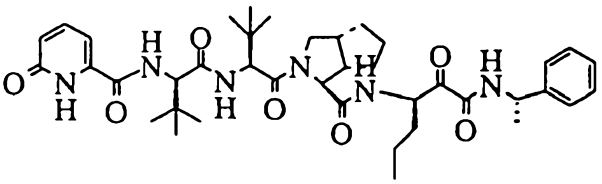
EQ,



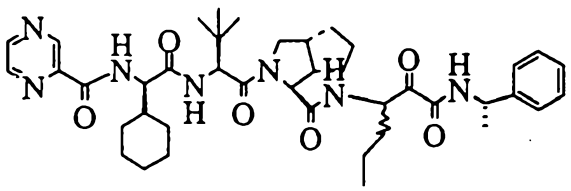
ER,



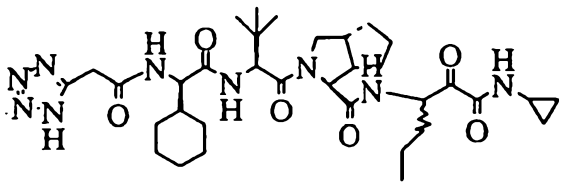
ES,



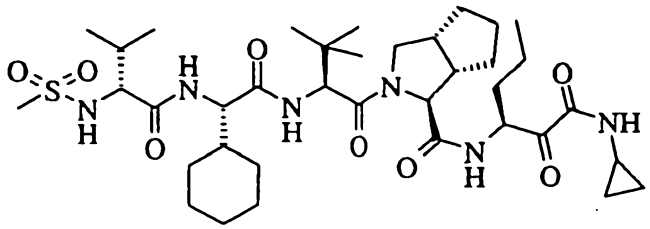
ET,



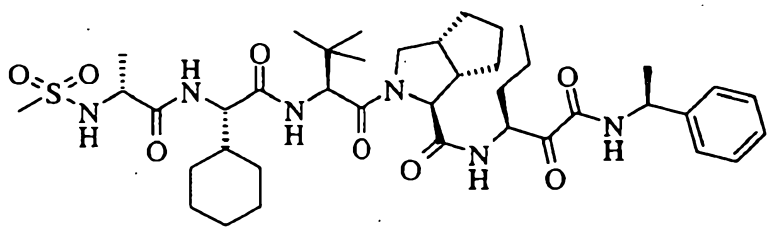
EU,



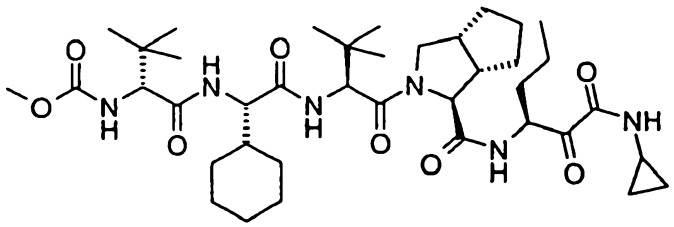
EV,



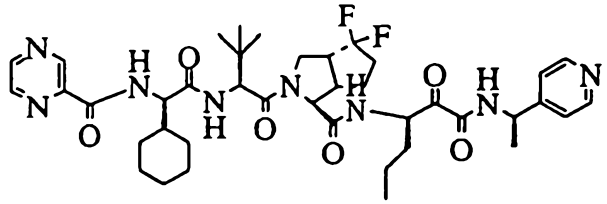
EW,



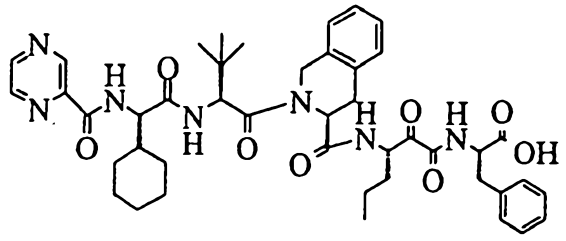
EX,



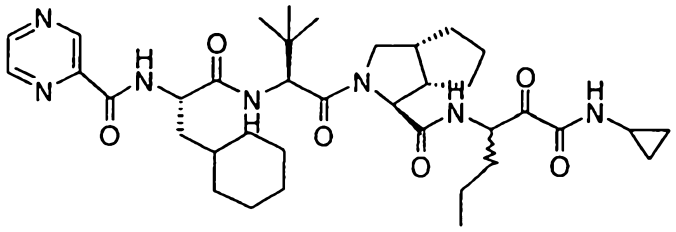
EY,



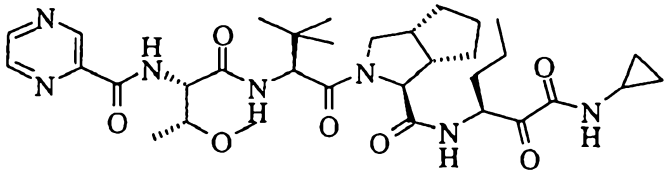
EZ,



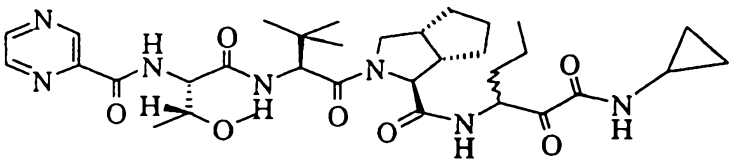
FA,



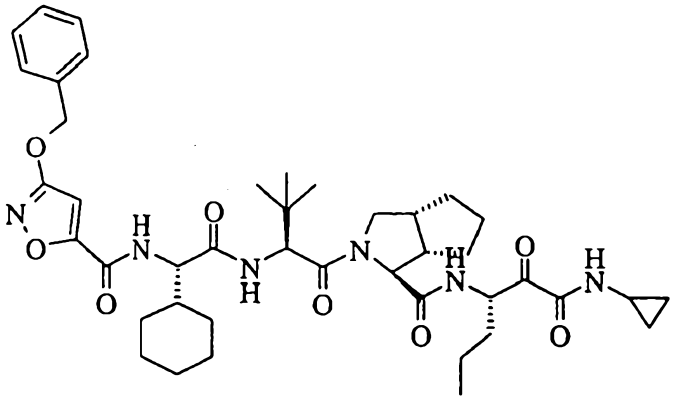
FB,



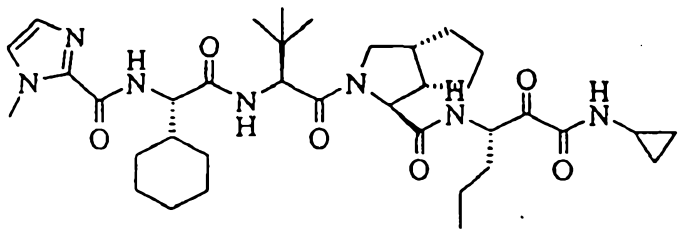
FC,



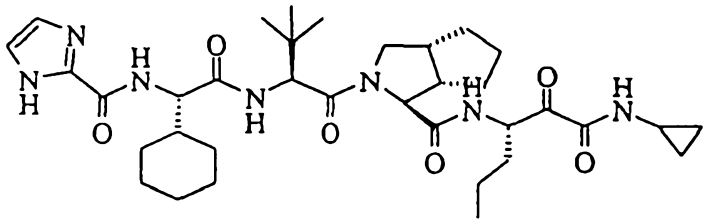
FD,



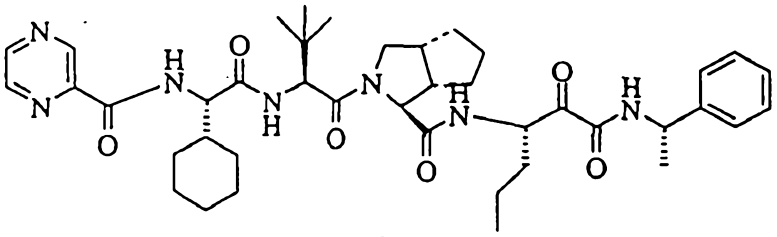
FE,



FF,



FG, 及

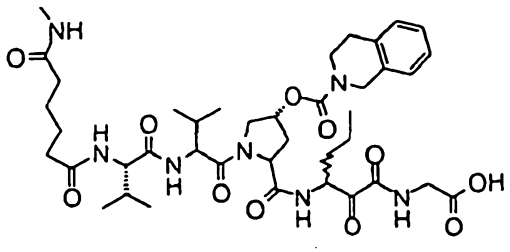


FH,

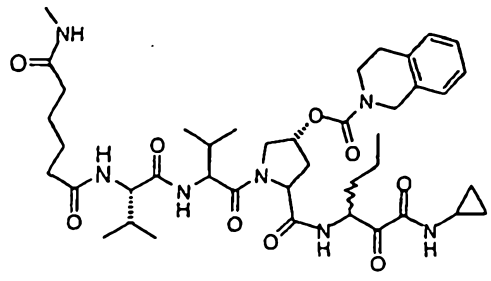
或其醫藥上可接受之鹽或前體藥物，或此種化合物之溶劑合物，其鹽或其前體藥物。

較佳化合物為S、U、BW、BX、BY、BZ、CE、CU、CW、CY、DZ、EA、EC、EJ、FH、EW、EO、EZ、FG及EN，其藥學上可接受之鹽或前體藥物，或此種化合物之溶劑合物、其鹽或其前體藥物。

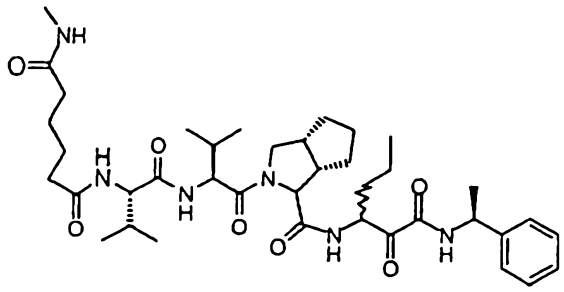
本發明另一較佳具體實施例係選自下列之化合物：



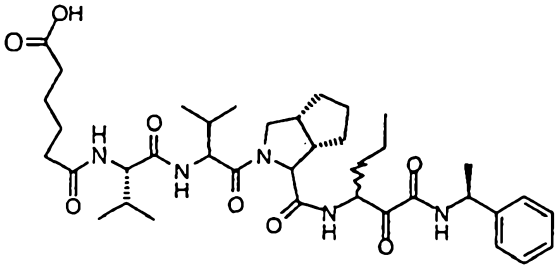
AN,



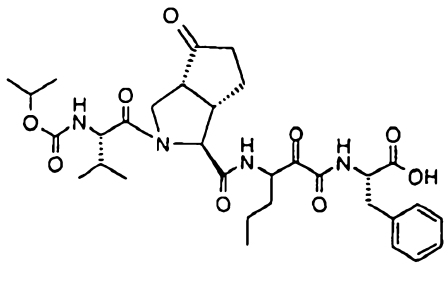
AO,



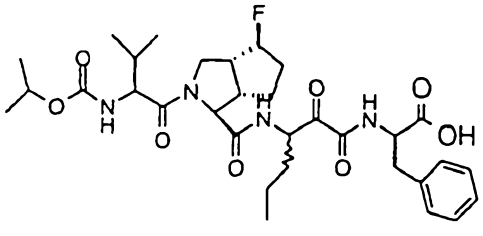
AP,



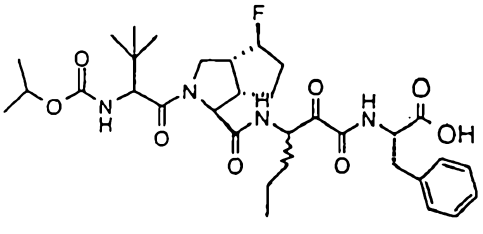
AQ,



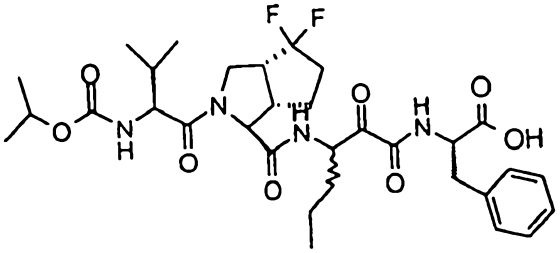
AR,



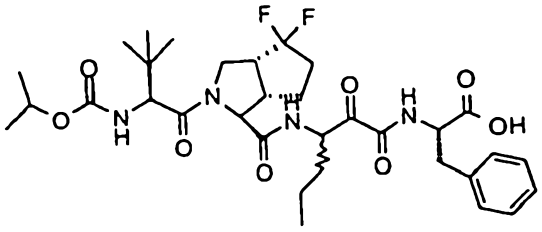
AS,



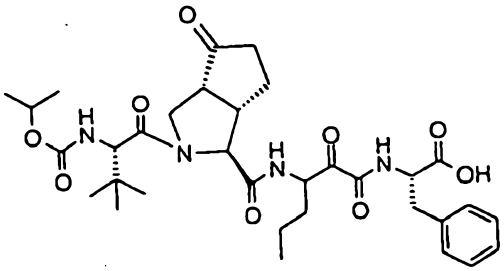
AT.



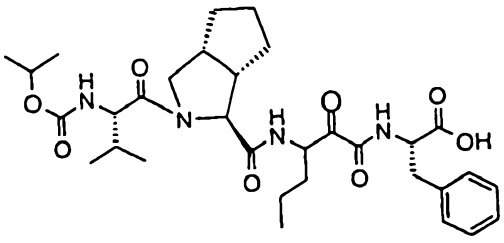
AU,



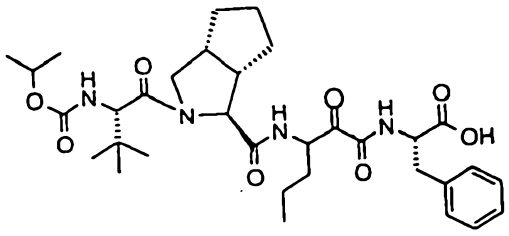
AV,



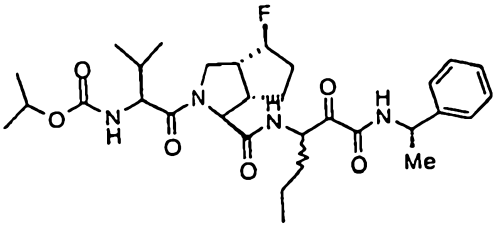
AW,



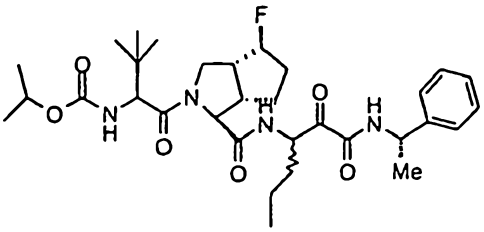
AX,



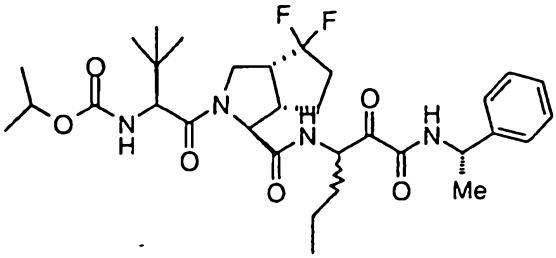
AY,



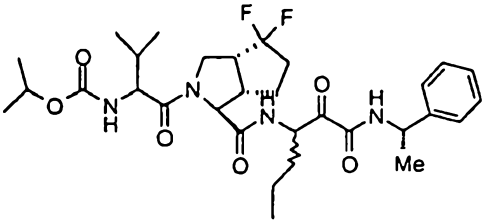
AZ,



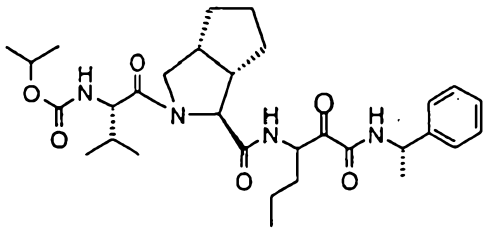
BA.



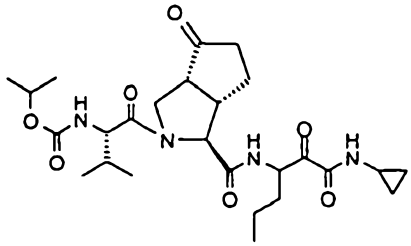
BB,



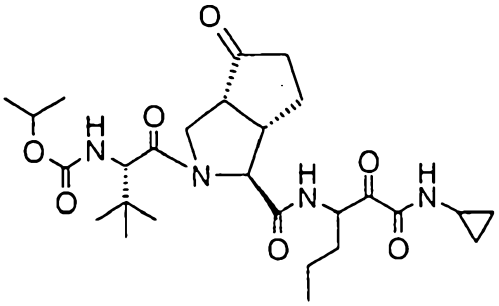
BC,



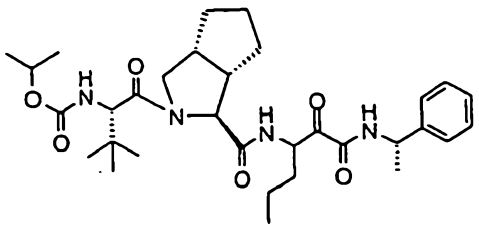
BD,



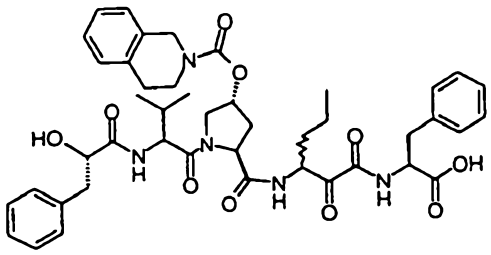
BE,



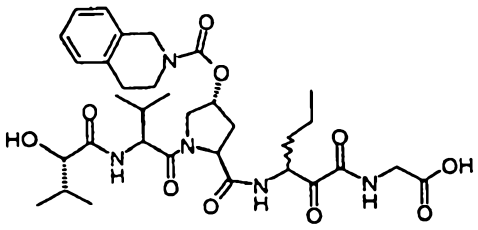
BF,



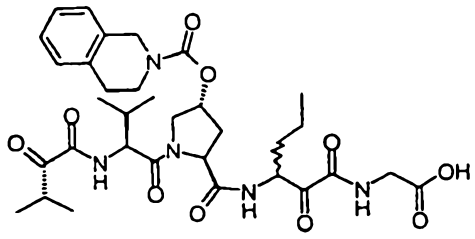
BG,



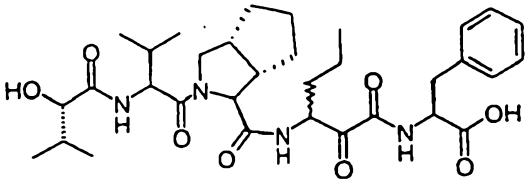
BH,



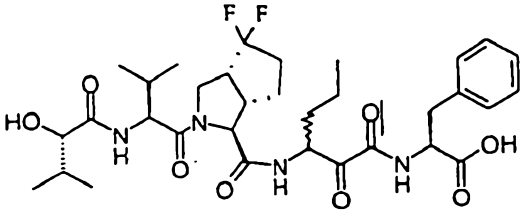
BI,



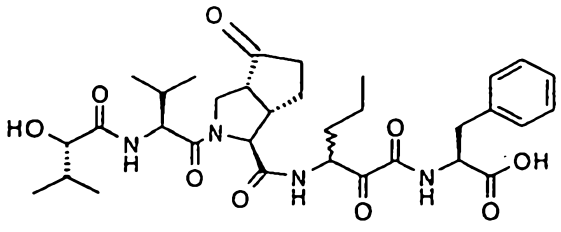
BJ,



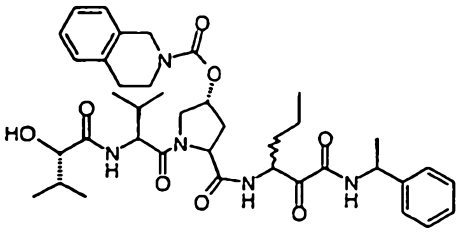
BK,



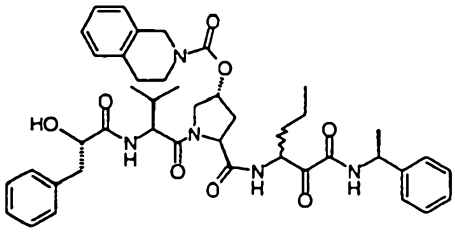
BL,



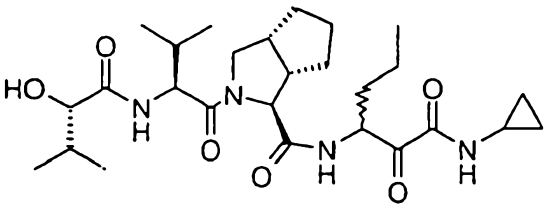
BM,



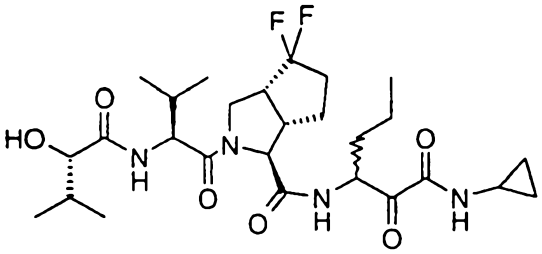
BN,



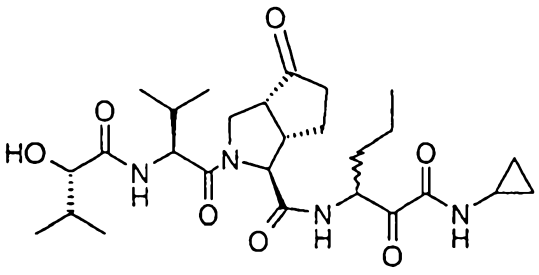
BO,



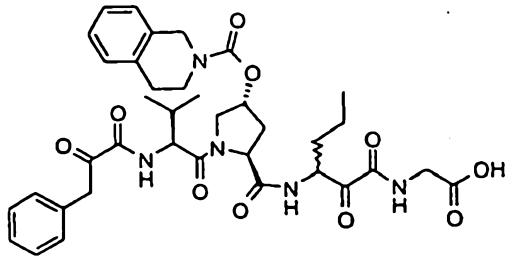
BP,



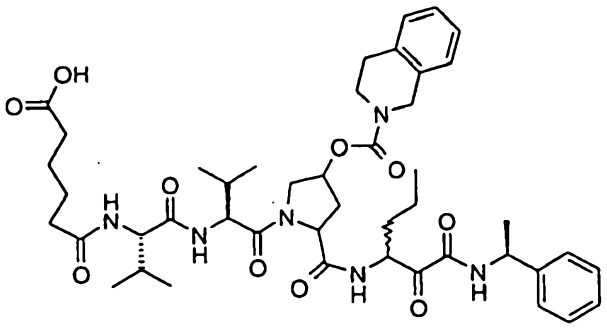
BQ,



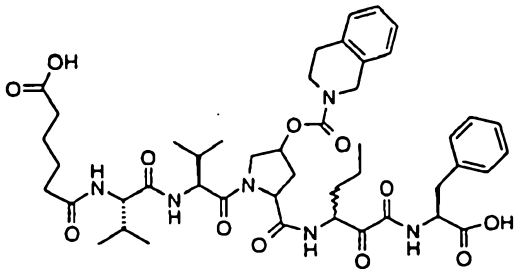
BR,



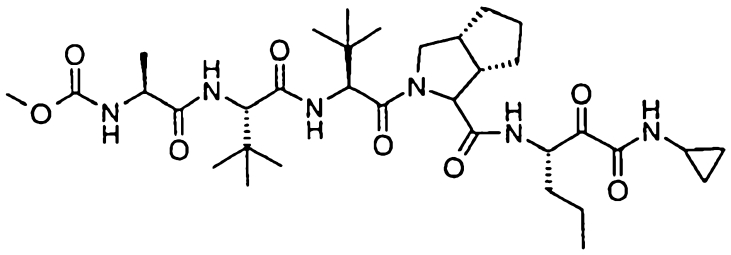
BS,



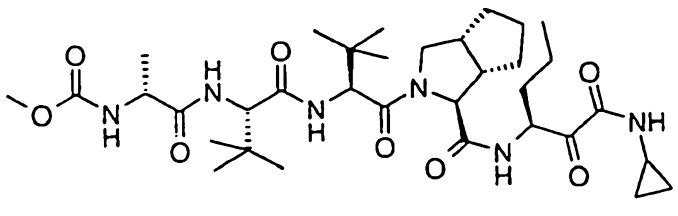
BT,



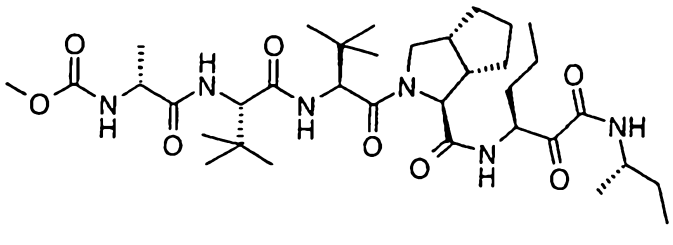
BU,



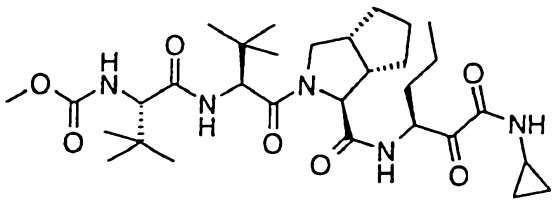
DG,



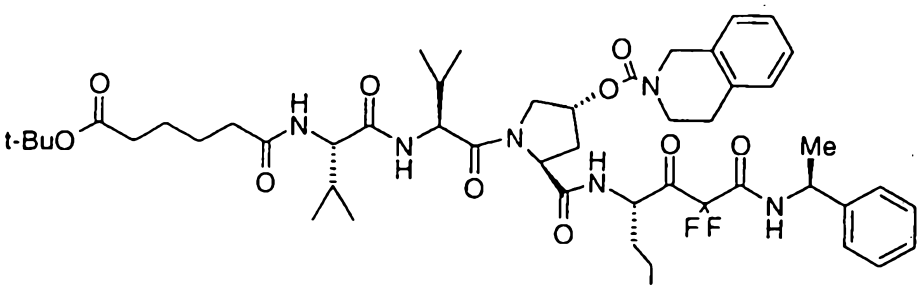
DH,



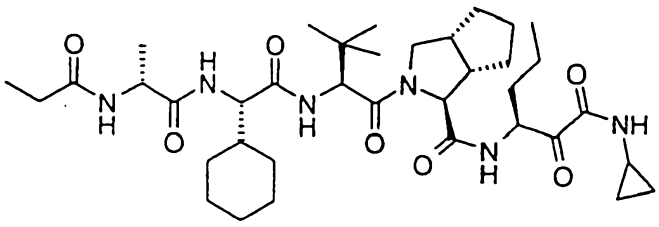
DI,



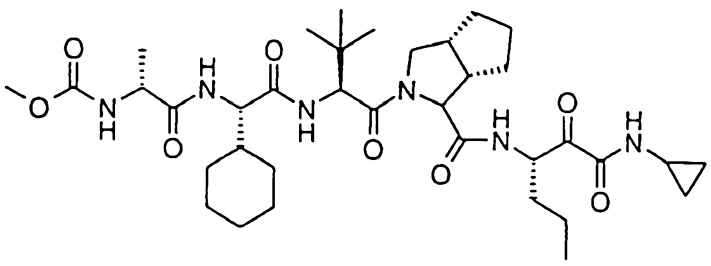
DJ,



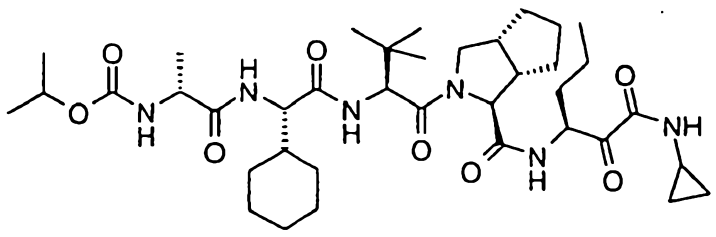
DN,



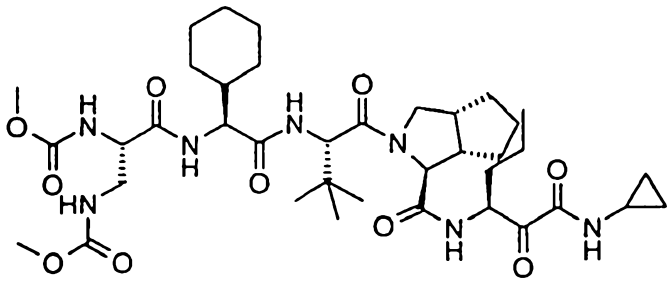
EB,



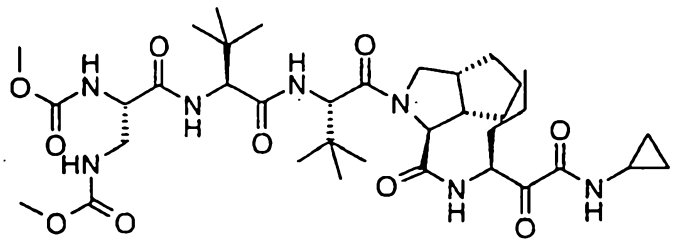
EC,



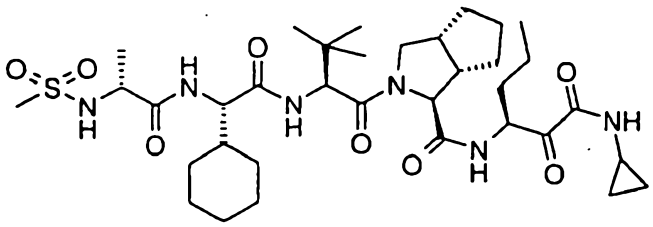
ED,



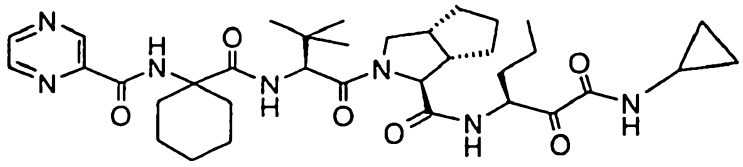
EE,



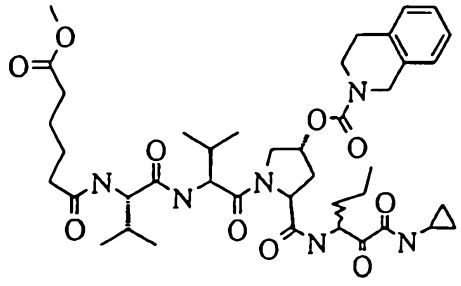
EF,



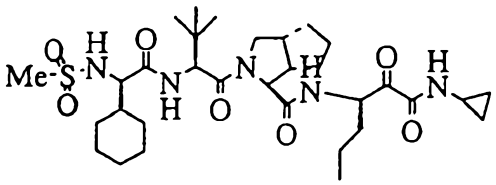
EG,



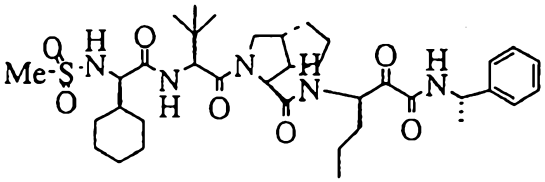
EH,



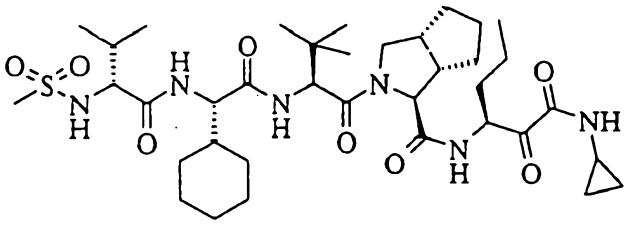
EI,



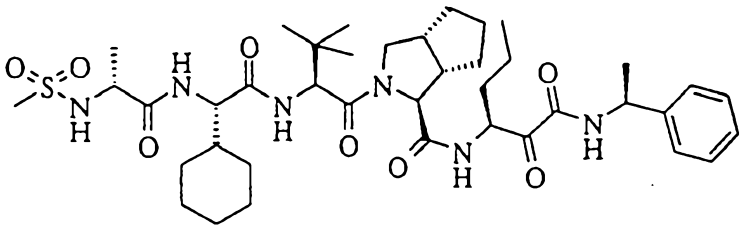
EQ,



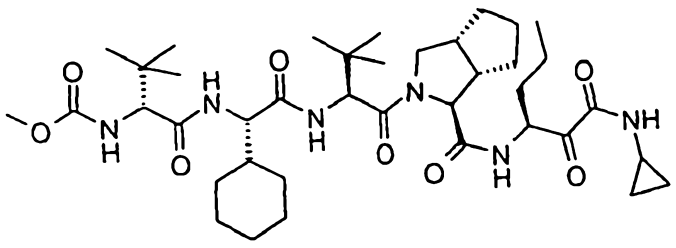
ER,



EW,



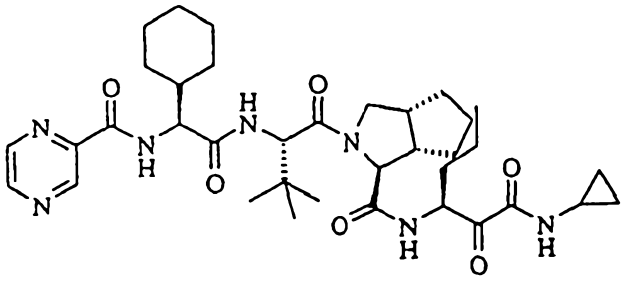
EX,



EY,

或其醫藥上可接受之鹽或前體藥物，或此種化合物之溶劑合物，其鹽或其前體藥物。

本發明另一較佳具體實施例為下式之化合物：



或其醫藥上可接受之鹽或前體藥物，或此種化合物之溶劑合物，其鹽或其前體藥物。

本發明另一較佳具體實施例為式1之化合物，其中：

R^0為一個鍵結；

R^1為氫；

R^2為視情況經1至3個脂族基團取代基取代之低碳烷基；或視情況經1至3個環狀基團取代基取代之低碳環烷基；

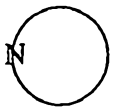
R^3及R^5各獨立為視情況經1至3個脂族基團取代基取代之亞甲基；

R^4、R^6、R^8及R^{10}為氫；

R^7為經環烷基、低碳烷基或芳基取代之亞甲基；或經環烷基、低碳烷基或芳基取代之(1,1-或1,2-)環烯基；

R^9為視情況經1至3個脂族基團取代基取代之低碳烷基；

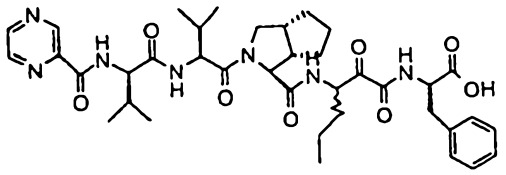
或視情況經1至3個環狀基團取代基取代之雜芳基；或視情況經1至3個環狀基團取代基取代之雜環基；



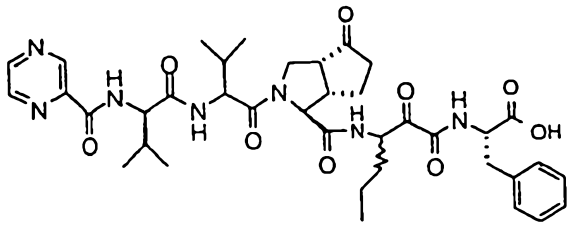
為視情況經1至3個環狀基團取代基取代之單環狀氮雜環基、多環狀氮雜環基、或多環狀氮雜環烯基；及

L為-C(O)-、-OC(O)-。

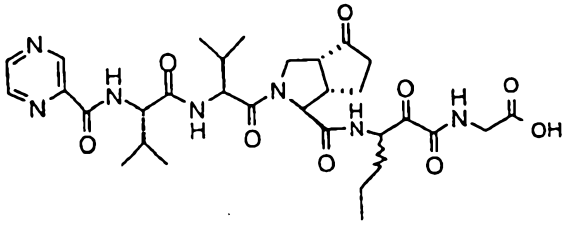
本發明另一較佳具體實施例係選自由下列組成之群之化合物：



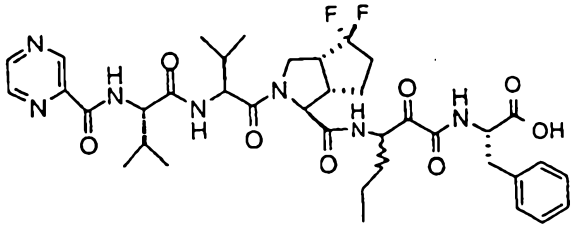
A,



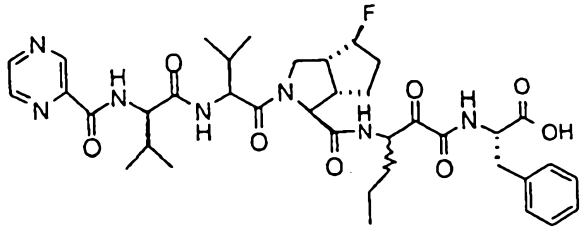
B,



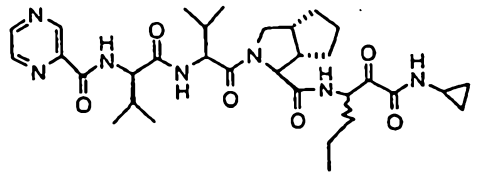
C,



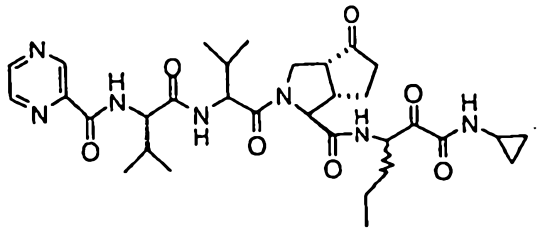
D,



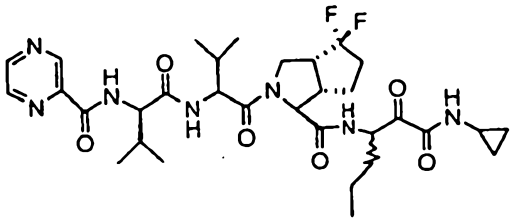
E,



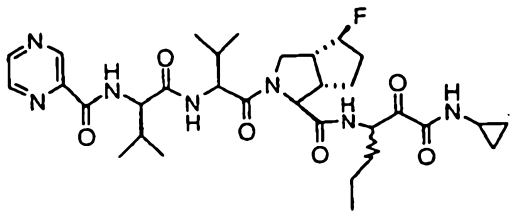
F,



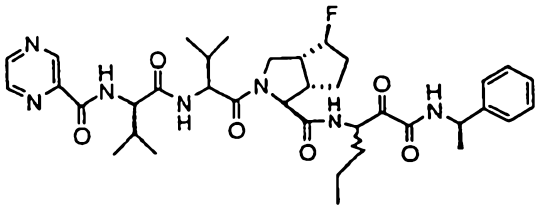
G,



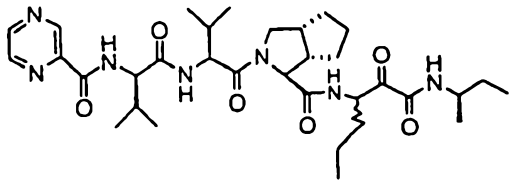
H,



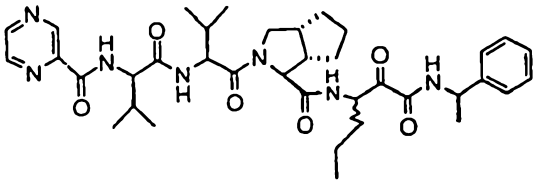
I,



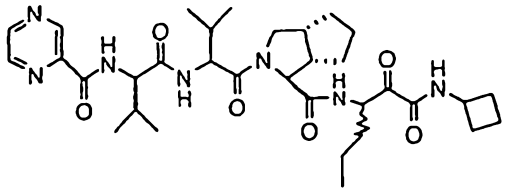
J,



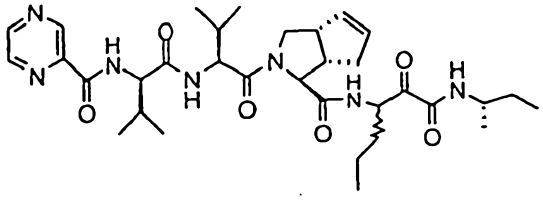
K,



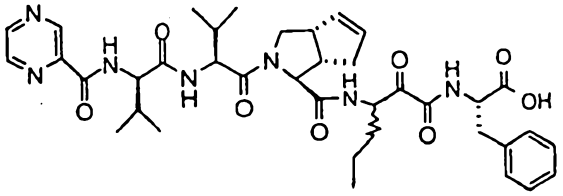
L,



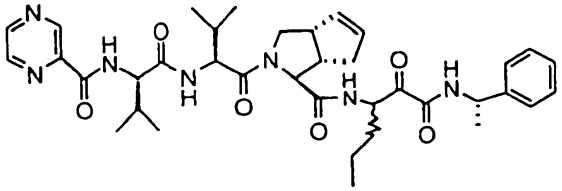
M,



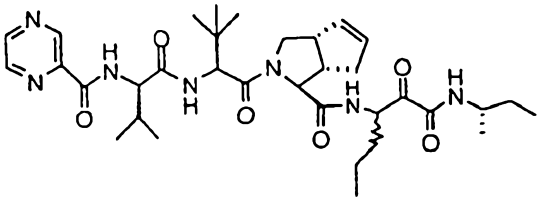
N,



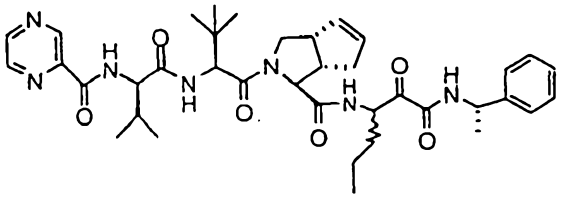
O,



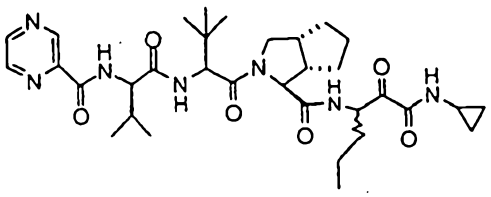
P,



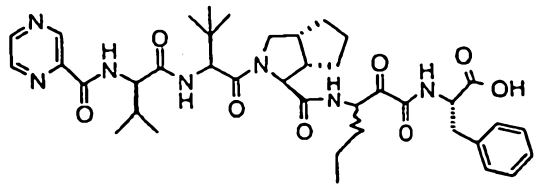
Q,



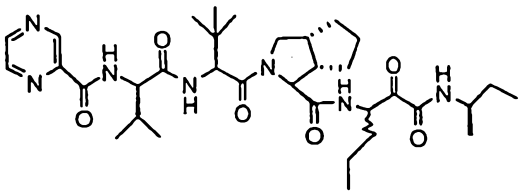
R,



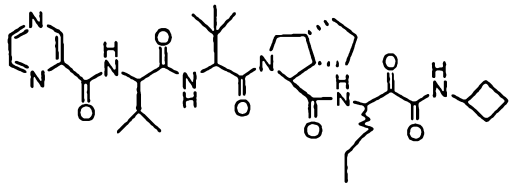
S,



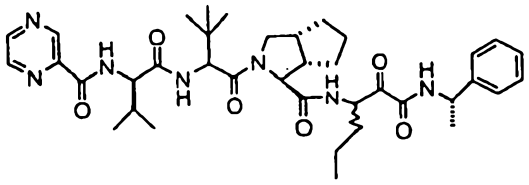
T,



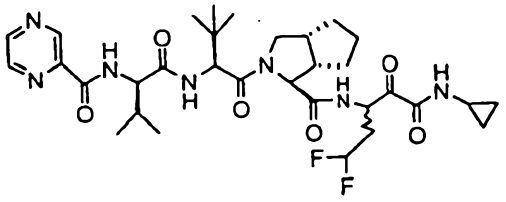
U,



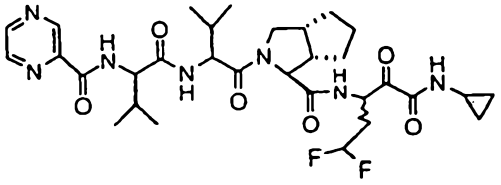
V,



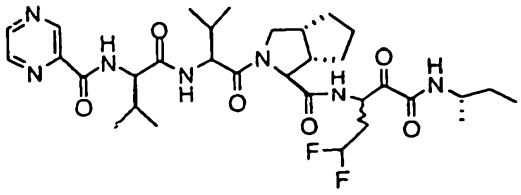
W,



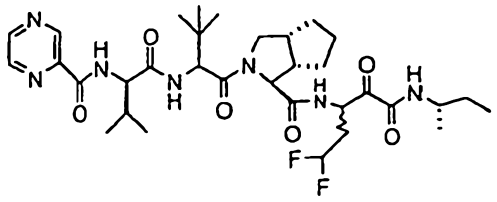
X,



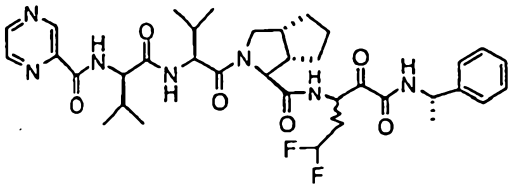
Y,



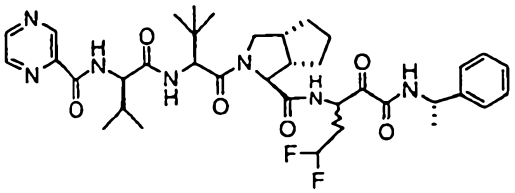
Z,



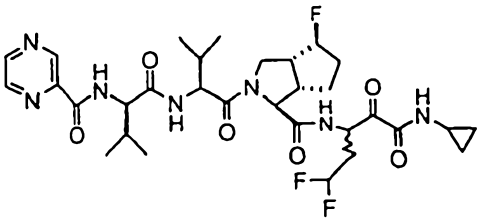
AA,



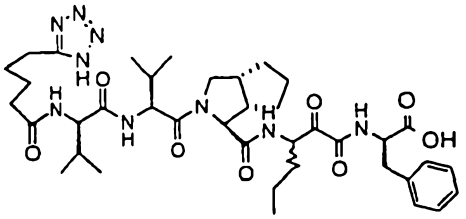
AB,



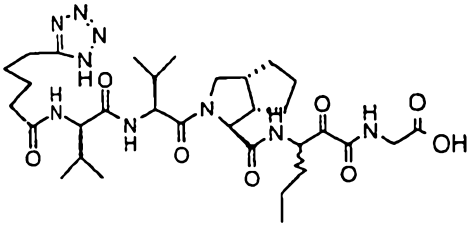
AC,



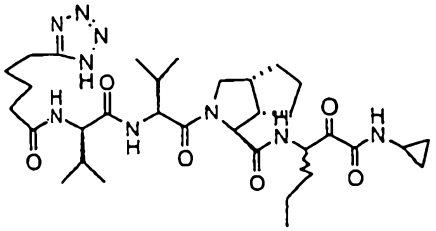
AD,



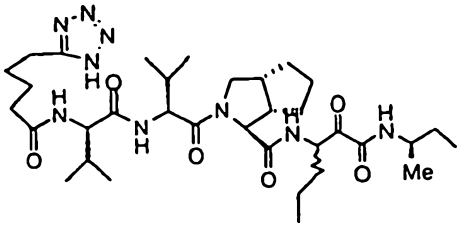
AE,



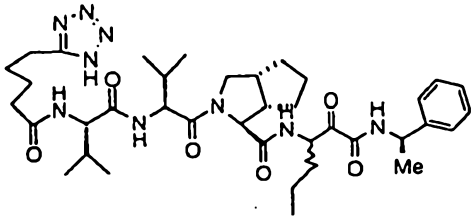
AF,



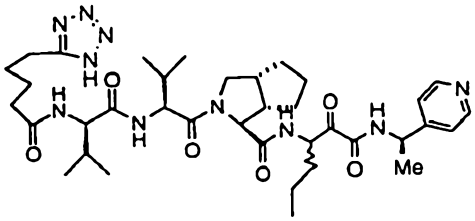
AG,



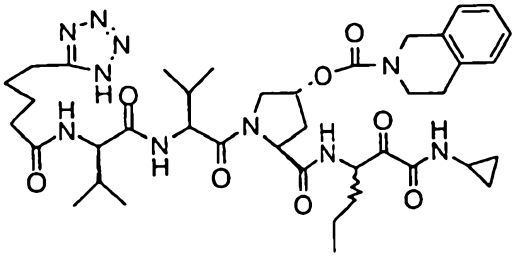
AH,



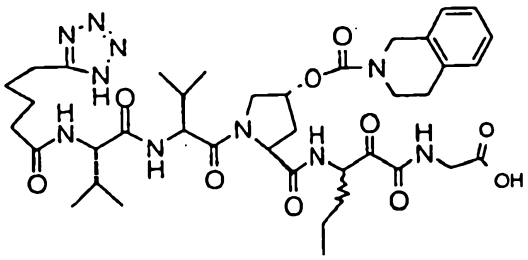
AI,



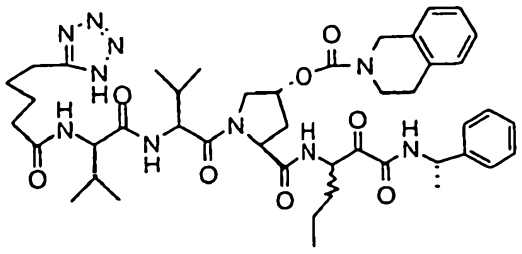
AJ,



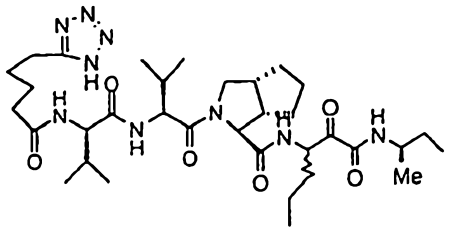
AK,



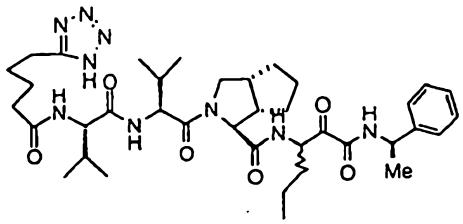
AL,



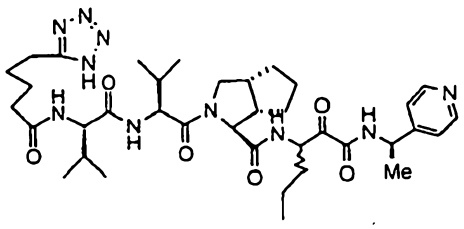
AM.



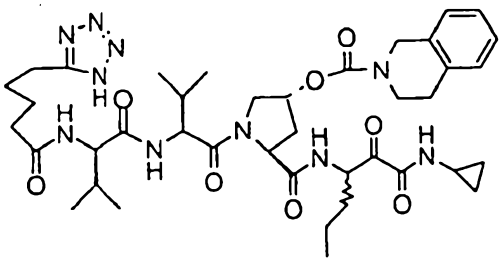
AH,



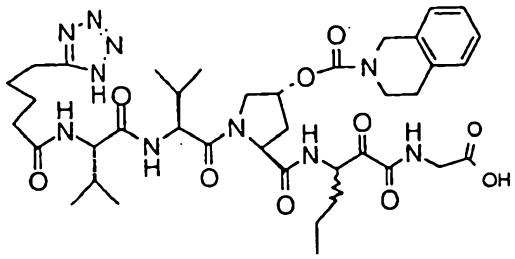
AI,



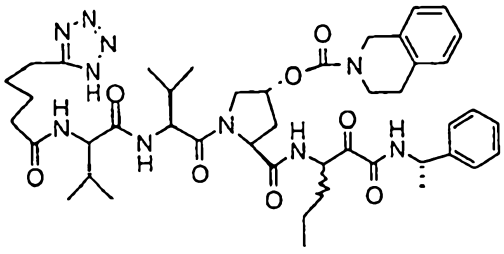
AJ,



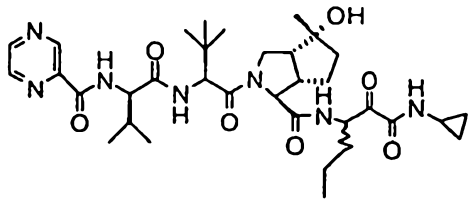
AK,



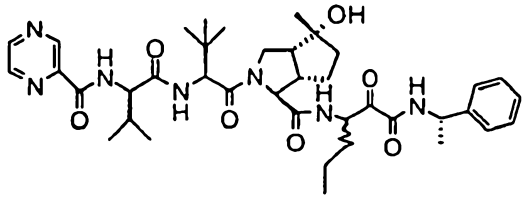
AL,



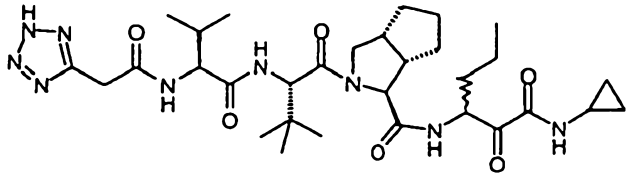
AM.



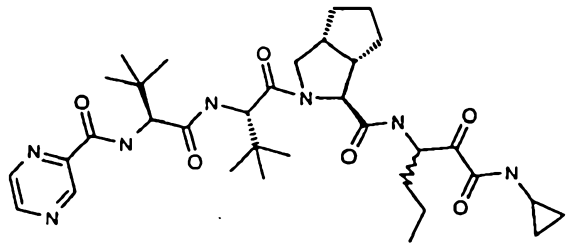
CB,



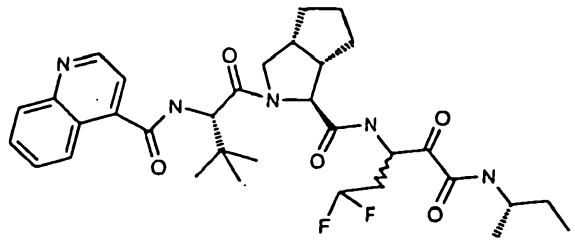
CC,



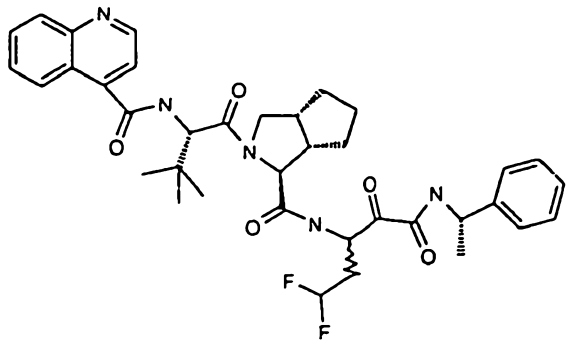
CD,



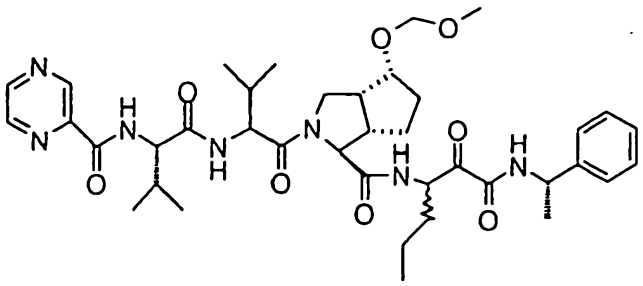
CE,



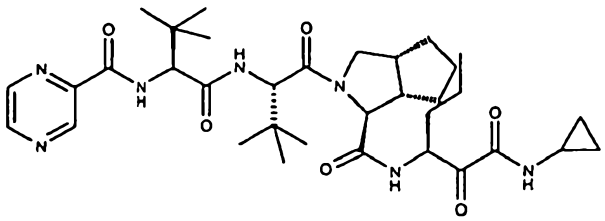
CF,



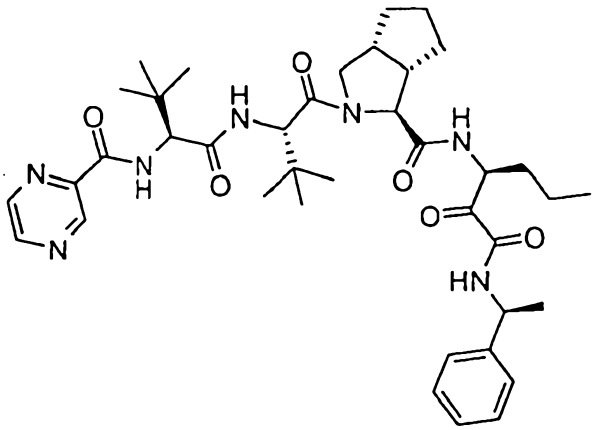
CG.



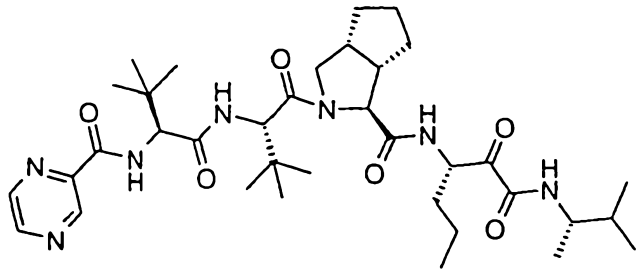
CH,



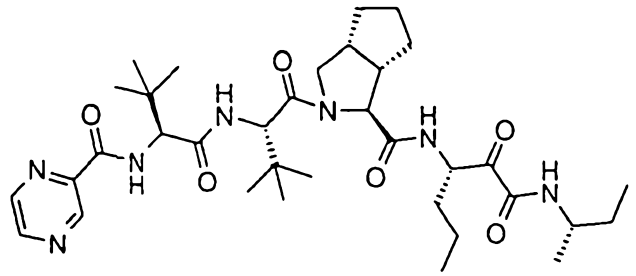
CI,



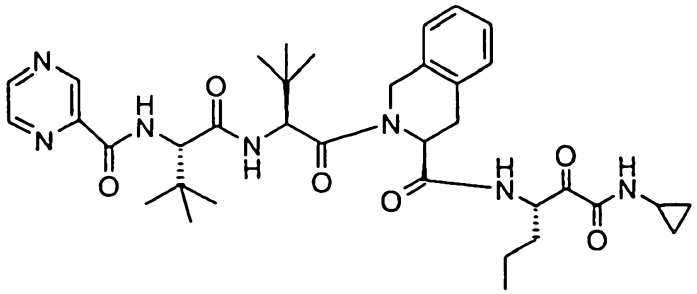
CJ,



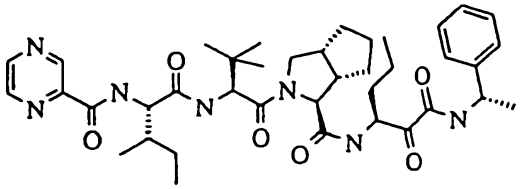
CK,



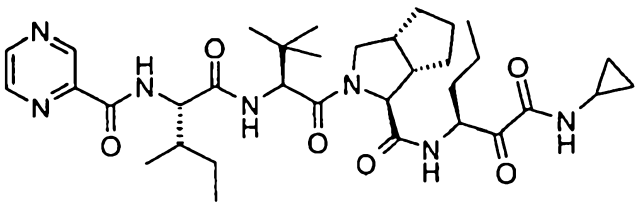
CL,



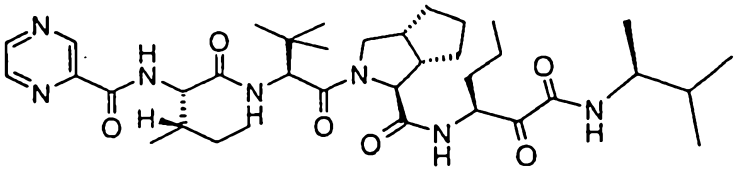
CM,



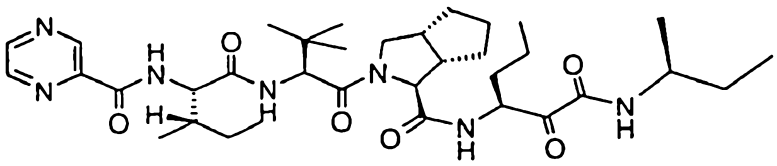
CN,



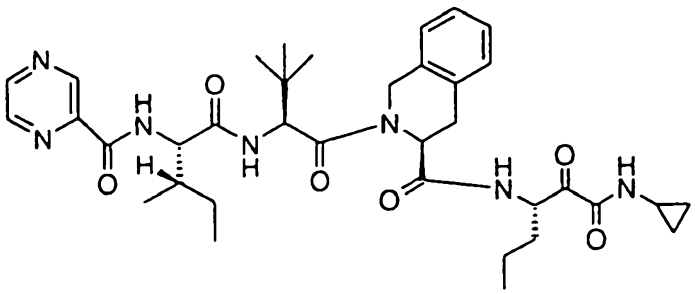
CO,



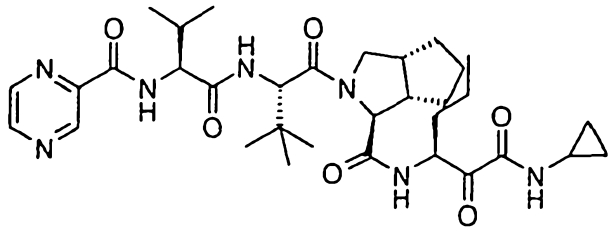
CP,



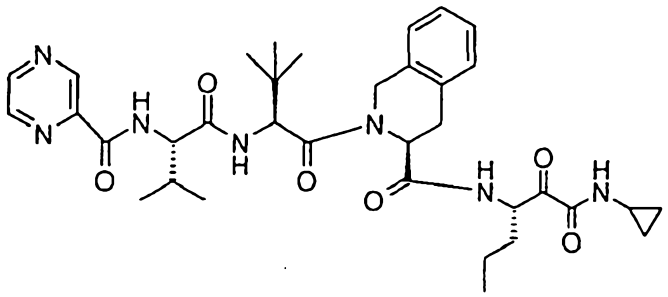
CQ,



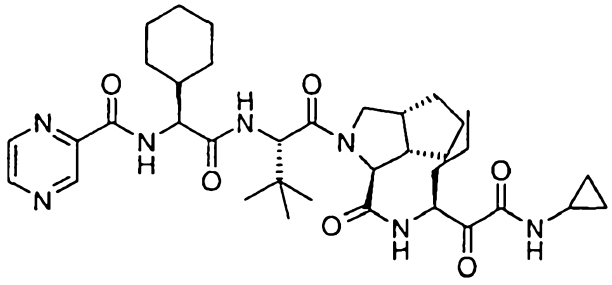
CR,



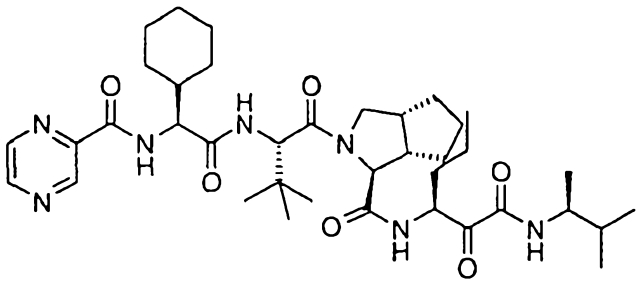
CS,



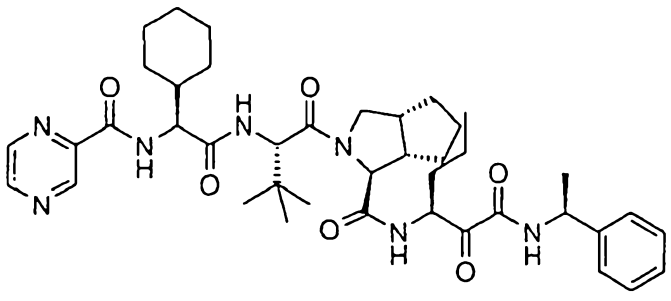
CT,



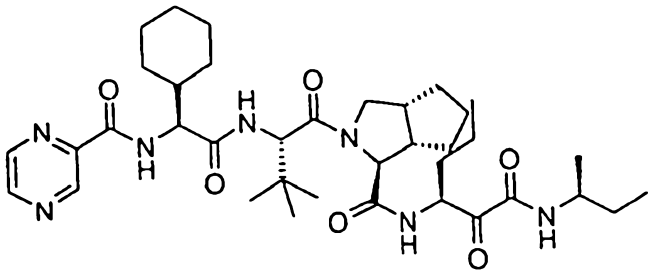
CU,



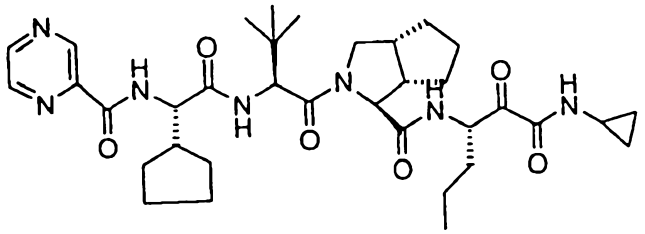
CV,



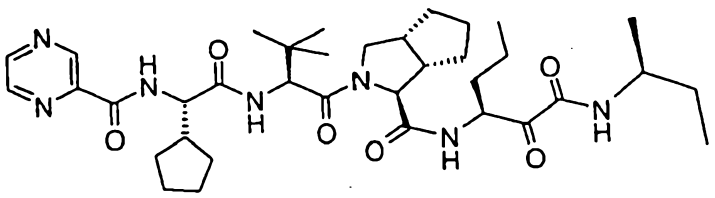
CW,



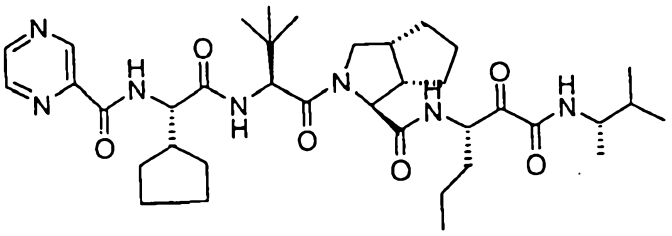
CX



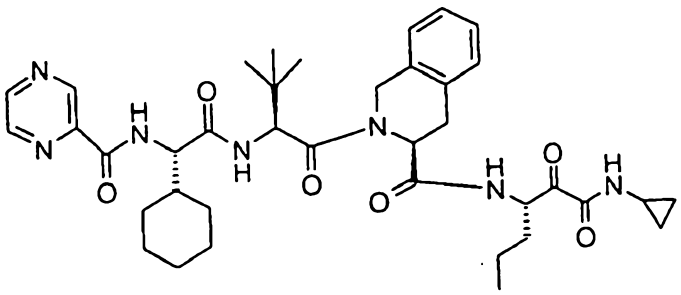
CY



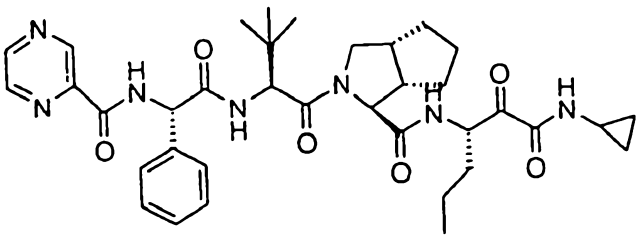
CZ,



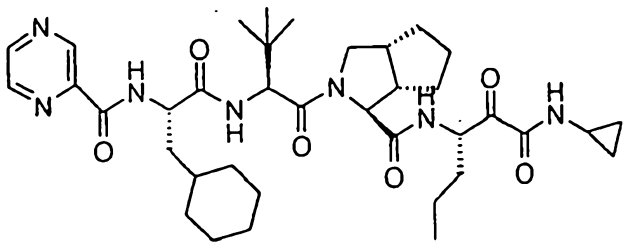
DA,



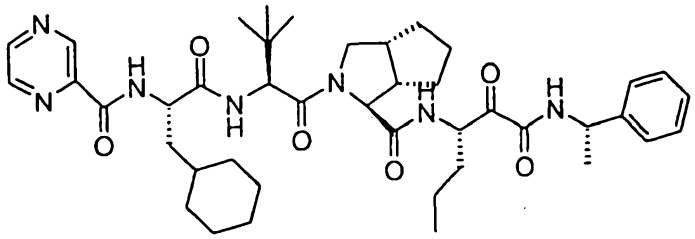
DB,



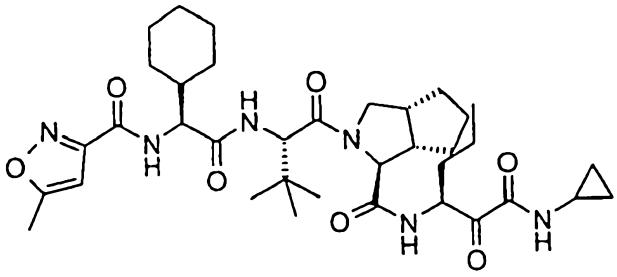
. DC.



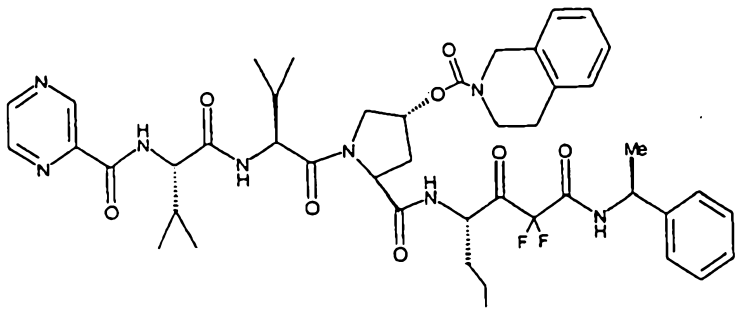
DD,



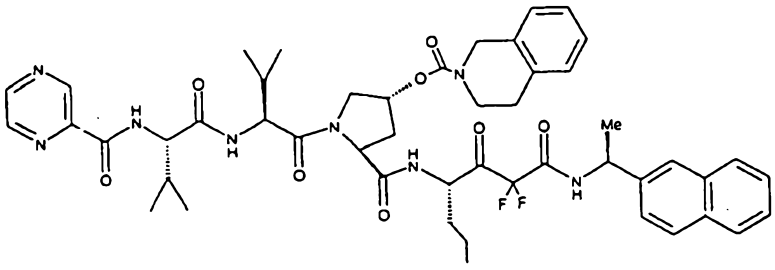
DE,



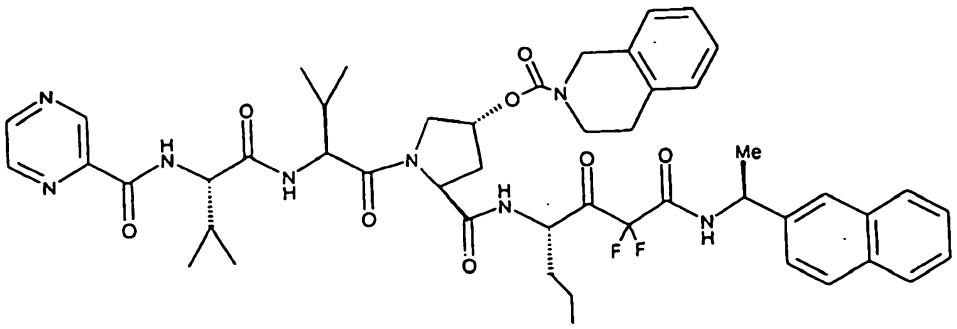
DF,



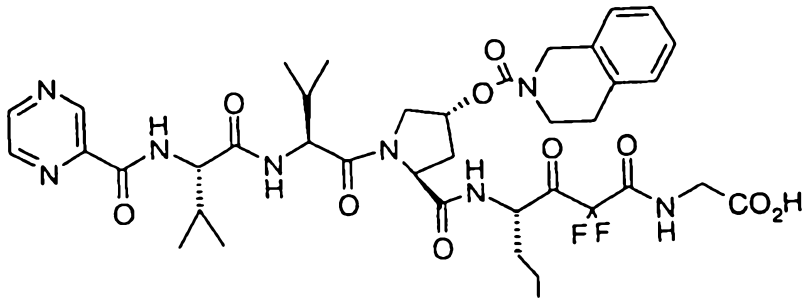
DK,



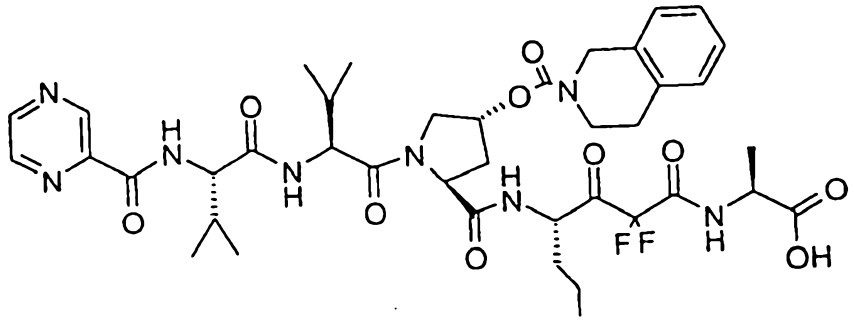
DL,



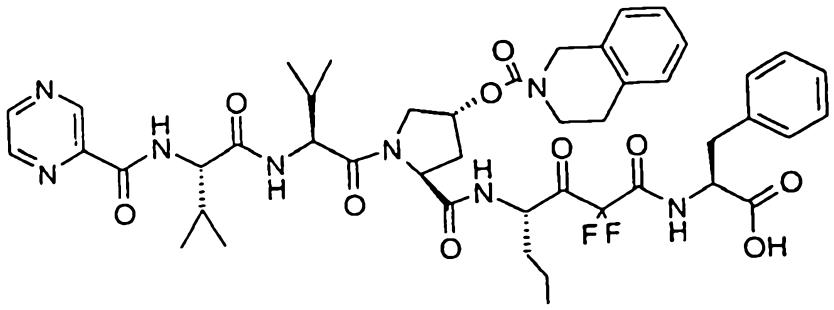
DM,



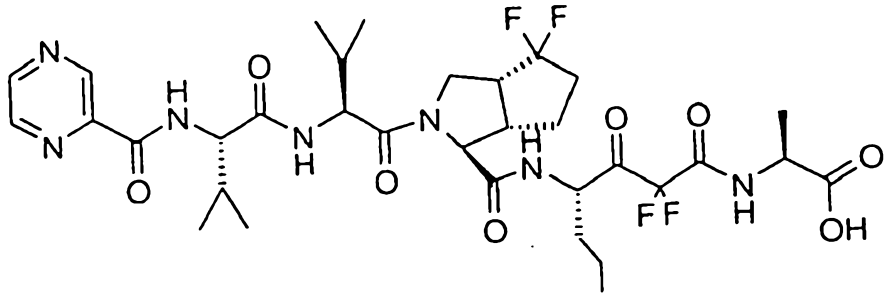
DO,



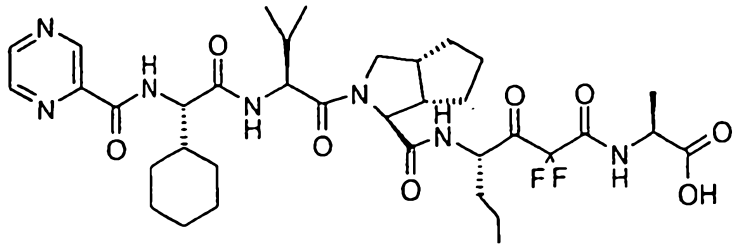
DP,



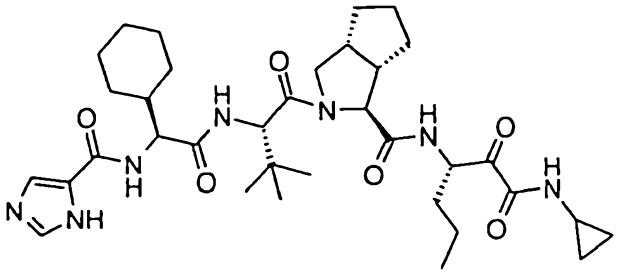
DQ,



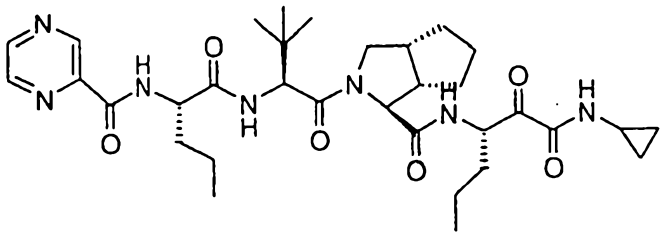
DR,



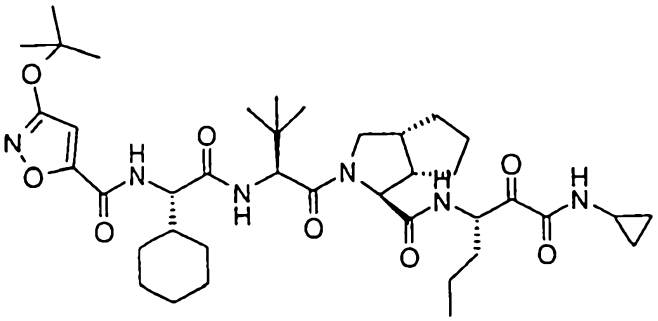
DS,



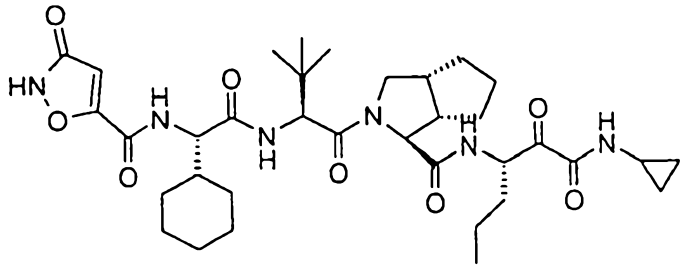
DT,



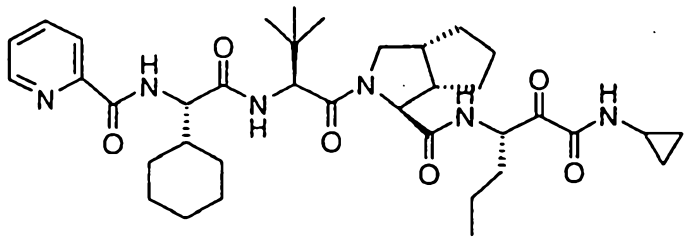
DU,



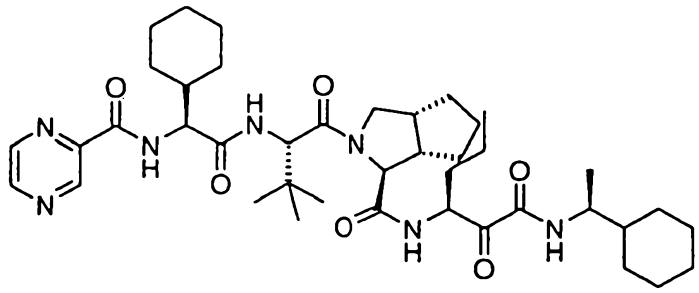
DV,



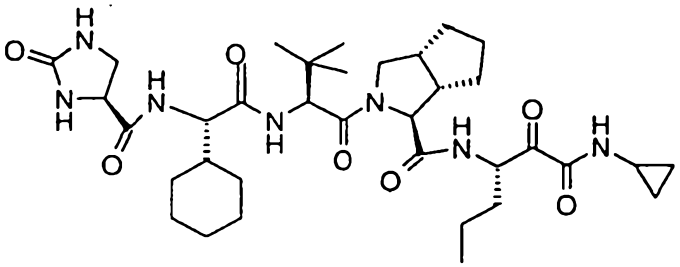
DW,



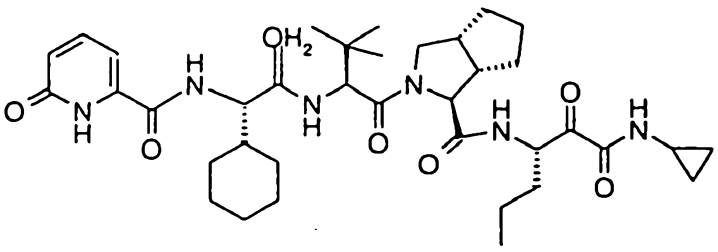
DX,



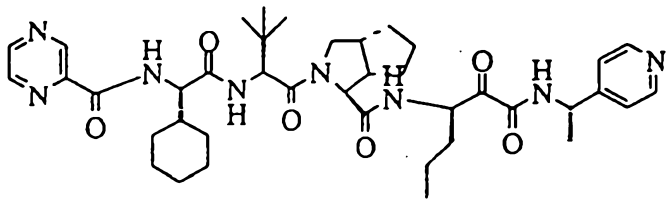
DY,



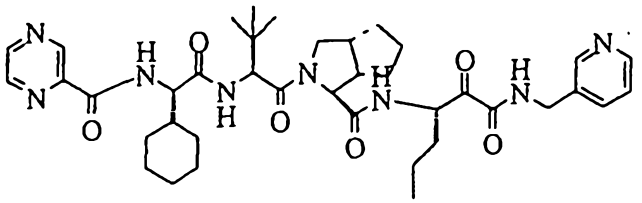
DZ,



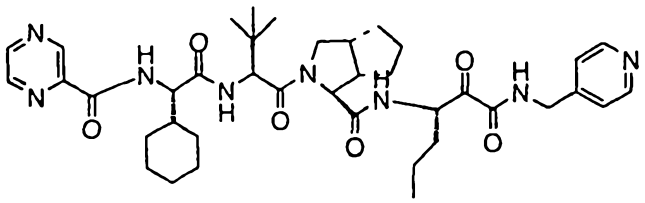
EA,



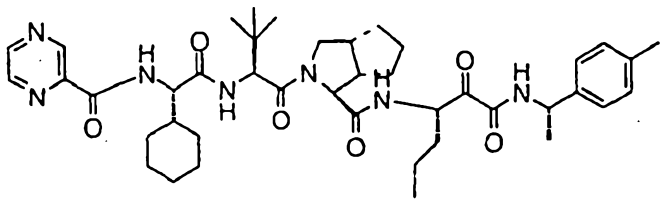
EJ,



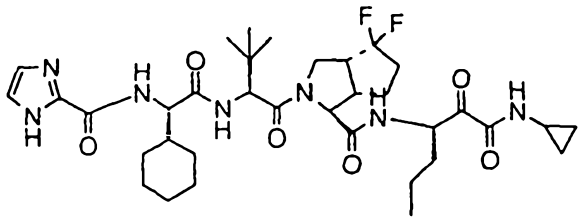
EK,



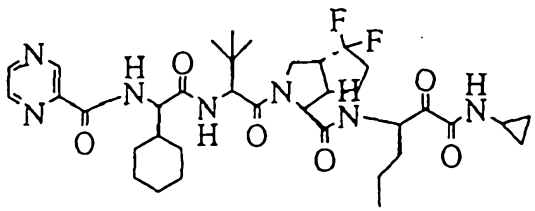
EL,



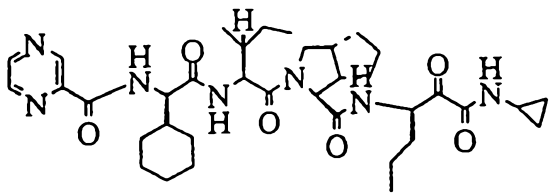
EM,



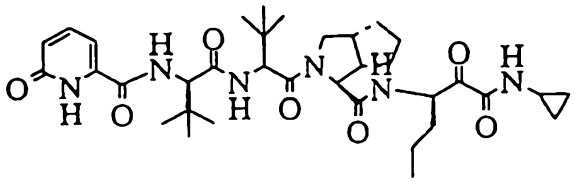
EN,



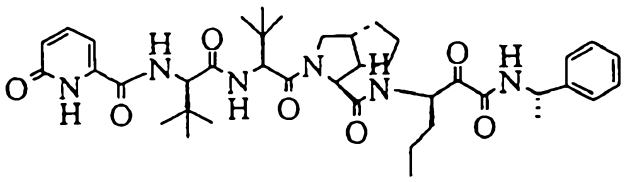
EO,



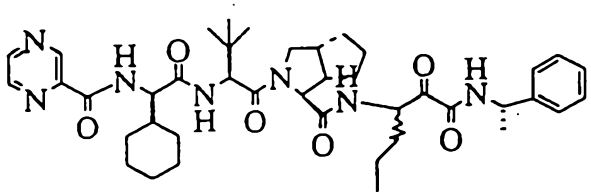
EP,



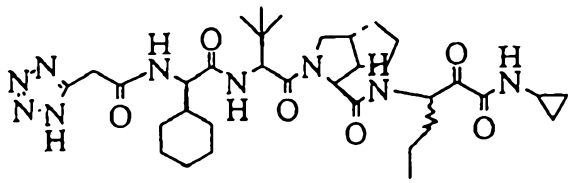
ES,



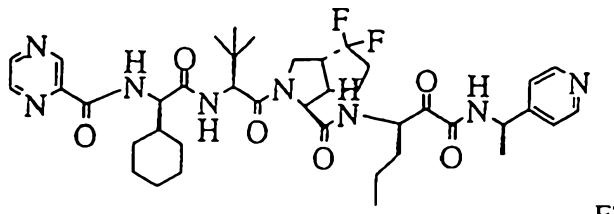
ET,



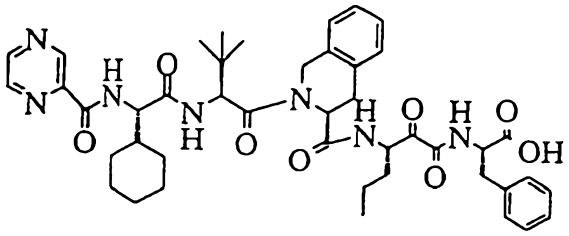
EU,



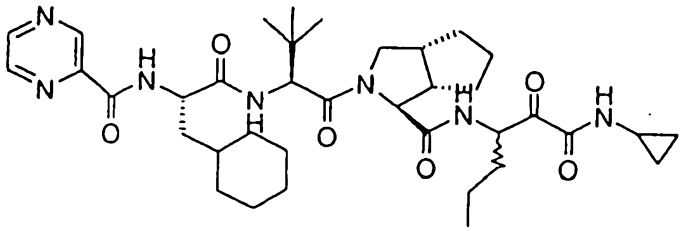
EV,



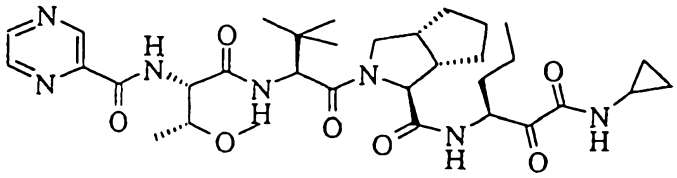
EZ,



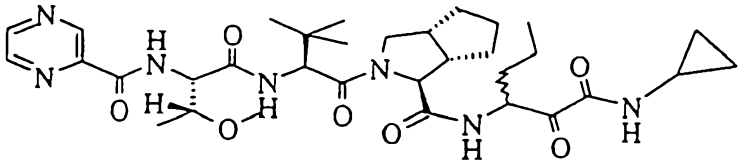
FA,



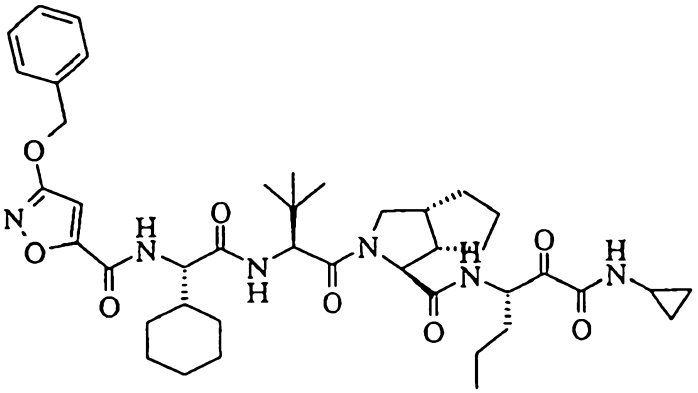
FB,



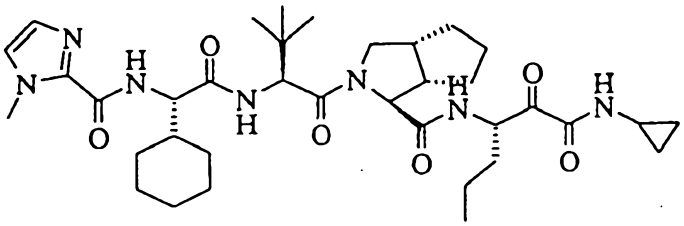
FC,



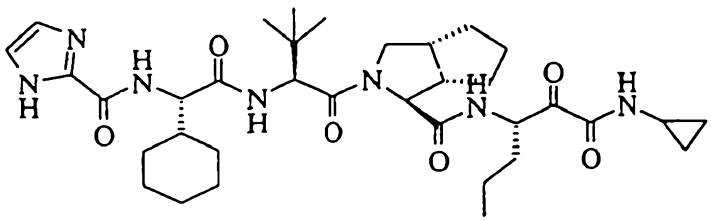
FD.



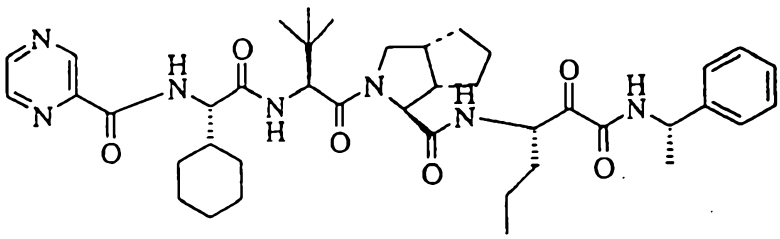
FE,



FF,



及 and



FH,

或其醫藥上可接受之鹽或前體藥物，或此種化合物之溶劑合物，其鹽或其前體藥物。

本發明另一較佳具體實施例為式1之化合物，其中R^9之視情況經取代之脂族基團、視情況經取代之環狀基團或視情況經取代之芳族基團係經至少一個雜芳基取代基取代。

本發明另一較佳具體實施例為式1之化合物，其中R^9之視情況經取代之芳族基團為視情況經取代之雜芳基。

本發明另一較佳具體實施例為式1之化合物，其中R^9之視情況經取代之脂族基團為視情況經取代之烷基雜芳基。

本發明另一較佳具體實施例為一化合物，其中R^9之視情況經取代之雜芳基團為視情況經一個環基取代基取代之吡咁基、四唑基、喹啉基、咪唑基、異噁唑基及吡咚基(pyradonyl)。

本發明化合物係視情況以鹽提供。醫藥上可接受之鹽，係為特別令人感興趣的，因其可用於投予前述化合物，以供醫療目的使用。非醫藥上可接受之鹽，可用於製程中，供單離與純化目的使用，而於一些情況中，係用於分離本發明化合物之立體異構物形式。後者對於製自光學活性胺類之胺鹽，特別是真實的。

在本發明化合物含有羧基或足夠酸性生物電子等排體之情況中，鹼加成鹽可以形成，且僅只是較合宜形式以供使用；而實際上，此鹽形式之使用，本性上係相當於自由態酸形式之使用。

而且，在本發明化合物含有鹼性基團或足夠鹼性生物電子等排體之情況中，酸加成鹽可以形成，且僅只是較合宜形式，以供使用；而實際上，此鹽形式之使用，本性上係

相當於自由態鹼形式之使用。

根據本發明方法之一項較佳具體實施例，係為治療患有HCV感染或與該感染有關聯生理學病症之病人，其包括對該病人投予藥學上有效量之式1化合物。

根據本發明治療方法之另一項較佳具體實施例，係為治療患有HCV感染或與該感染有關聯生理學病症之病人，其包括對該病人投予藥學上有效量之式1化合物，且併用藥學上有效量之另一種抗-HCV治療劑。

本發明之另一項目的係為提供醫藥組合物，其除了一或多種HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑以外，包含一或多種顯示抗-HCV活性之干擾素，及/或一或多種具有抗HCV活性之化合物，包括免疫調節化合物，譬如顯示HCV抗病毒活性之免疫刺激細胞活素，及藥學上可接受之載劑或稀釋劑。

本發明之另一項目的係為提供一種醫藥組合物，其本身且自行地，有效用於有利之組合療法，因其包含許多可根據本發明使用之活性成份。

本發明亦提供套件或單一包裝，其係組合兩種或多種可用於治療或預防病人中之HCV感染之活性成份。套件可提供(單獨或併用藥學上可接受之稀釋劑或載劑)式1化合物，及另外之活性成份(單獨或併用稀釋劑或載劑)與其他抗-HCV治療劑。

式1化合物可藉由應用或修改已知方法，如迄今所使用或在文獻中所述者，或藉由此處根據本發明之方法製備。

本發明之另一項目的係為在有需要之病人中提供治療或

預防HCV感染之方法，其包括對該病人投予藥學上有效量之組合，此組合為一或多種HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑；一或多種顯示抗-HCV活性之干擾素；及/或一或多種具有抗-HCV活性之化合物，包括免疫調節化合物，譬如顯示HCV抗病毒活性之免疫刺激細胞活素。

本發明之另一項目的係為一或多種HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑，且併用一或多種顯示抗-HCV活性之干擾素，及/或一或多種具有抗-HCV活性之化合物，包括免疫調節化合物，譬如顯示HCV抗病毒活性之免疫刺激細胞活素，於藥劑製備上之用途，該藥劑係在有需要之病人中用於治療或預防HCV感染。

本發明之另一項目的係為在病人中治療或預防HCV感染之套件或醫藥包裝，其中該套件或醫藥包裝包含許多個別容器，其中至少一個該容器含有一或多種HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑，至少另一個該容器含有一或多種干擾素或會引致顯示抗-HCV活性之干擾素產生之化合物(單獨或併用藥學上可接受之載劑或稀釋劑)，及視情況，至少另一個該容器含有一或多種具有抗-HCV活性之化合物(單獨或併用藥學上可接受之載劑或稀釋劑)，包括免疫調節化合物，譬如顯示HCV抗病毒活性之免疫刺激細胞活素。

本發明之又另一項目的係為提供一種抑制C型肝炎病毒在細胞中複製之方法，其包括使該細胞、C型肝炎病毒絲胺酸蛋白酶抑制劑及視情況選用之干擾素或會引致具有抗-C型肝炎病毒活性之干擾素產生之化合物接觸。

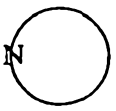
HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑、干擾素或抗-HCV化合物在任何前述應用中之量，可為藥學上有效量、亞最適宜抗-HCV有效量或其組合，只要HCV蛋白酶抑制劑、干擾素及/或抗-HCV化合物之最後組合包含藥學上有效量之化合物，有效用於治療或預防病人中之HCV感染即可。

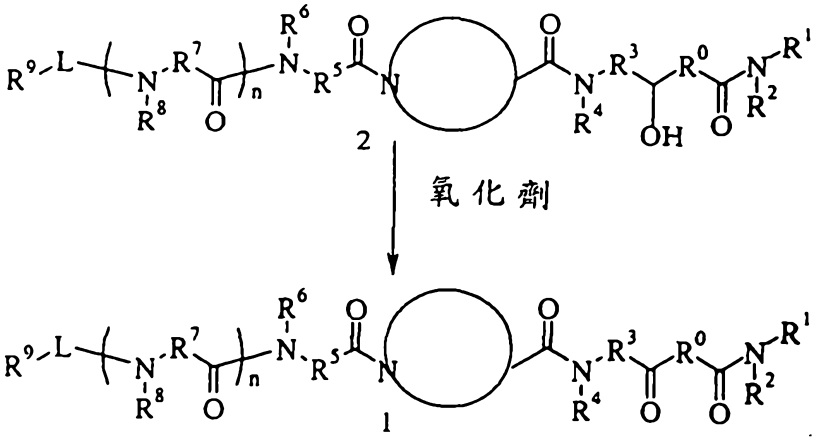
本發明之進一步目的係為提供一種製備對掌性雙環脯胺酸酯化合物之方法，該化合物可用於製備式1化合物。

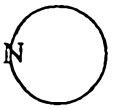
本發明化合物之製備

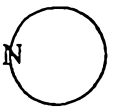
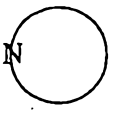
本發明化合物之起始物質與中間物，可藉由應用或修改已知方法製成，例如按參考實例中所述之方法或其顯著化學等效方法。

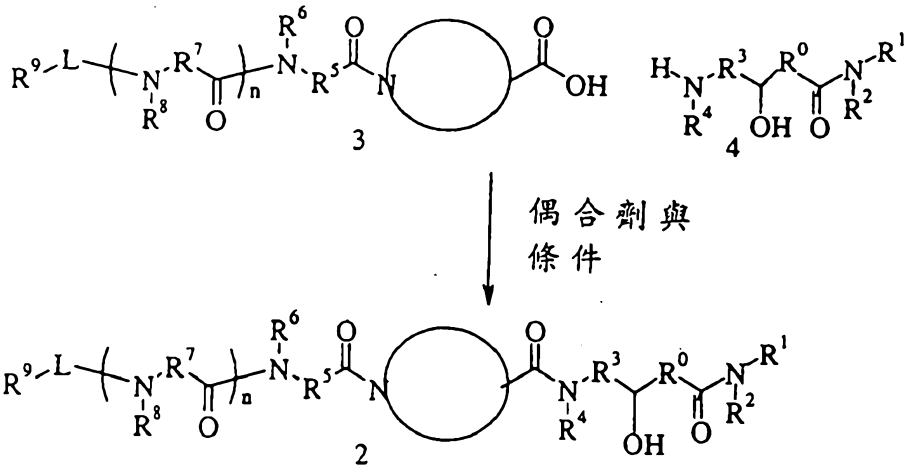
本發明化合物可藉由應用或修改已知方法製成，其係意謂迄今所使用或在文獻中所述之方法，例如由R.C.Larock在綜合有機轉變，VCH出版社(1989)中所述者。

一種式1化合物，其中變數及其  部份基團，均如本文中所述，其可經由以適當氧化劑及在適當條件下，處理式2化合物而製成，

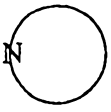


其中變數及其  部份基團，均如本文中所述。一種特定氧化劑為DMP試劑。特定條件包括在適當有機溶劑譬如二氯甲烷中，於約室溫下，進行氧化作用。

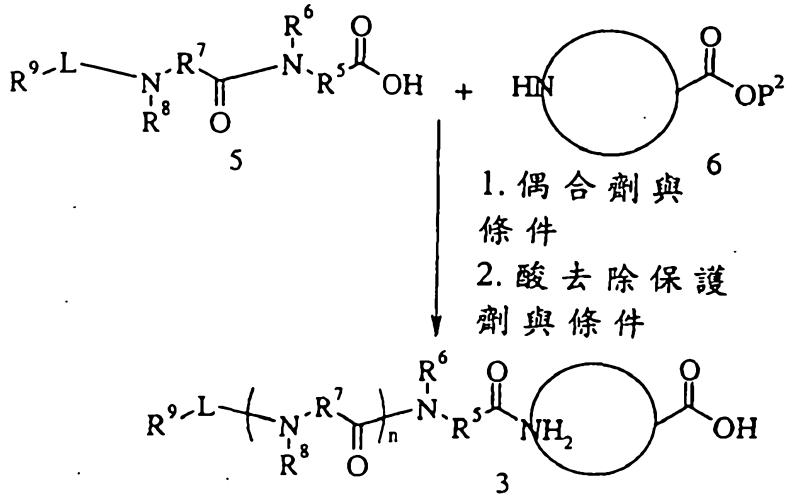
一種式2化合物，其中變數及其  部份基團，均如本文中所述，其可經由以適當偶合劑及在適當條件下，使式3化合物，其中變數及其  部份基團，均如本文中所述，與式4化合物偶合而製成，其中變數均如本文中所述。

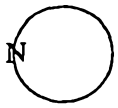


特定偶合劑與條件包括使用DIC與HOAt，在適當有機溶劑譬如DMF中，於約0℃下，或使用PyBop與DIPEA，在適當有機溶劑譬如二氯甲烷中，於約室溫下。

一種式3化合物，其中變數及其  部份基團，均如本文中所述，其可經由以適當偶合劑及在適當偶合條件下，使式5化合物，其中變數均如本文中所述，與式6化合

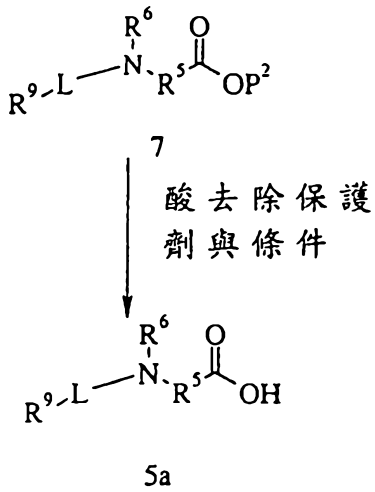
物偶合，其中P^2為酸保護基



而其  部份基團係如本文中所述，接著為適當去除保護劑及在適當去除保護條件下製成。特定偶合劑與條件，包括使用DIC或DCC與HOAt，在適當有機溶劑譬如DMF或二氯甲烷中，於約0℃至約室溫下。去除保護作用係使用適當去除保護劑進行，其係依保護劑之性質，意即其在酸、鹼或氫化作用條件下是否可移除(不安定)，及在進行去保護作用之化合物中之其他反應性部份基團而定，意即去除保護劑係經選擇，以進行去保護作用，而不會影響其他反應性部份基團，除非共同反應是所想要的。特定酸保護劑為C_1至C_8低碳烷基；更特別是甲基。特定去除保護劑為無機鹼，譬如鹼金屬氫氧化物；更特別是NaOH。特定去保護作用條件，係包括在醇性溶劑中，譬如甲醇或乙醇，於約室溫下進行去保護作用。

一種式5化合物，其中n為0，且其他變數均如本文中所

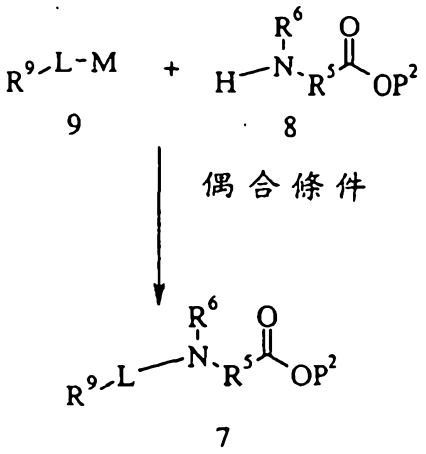
述，意即化合物5a，其可經由以適當去除保護劑及在適當條件下，使式7化合物去除保護而製成，



5a

其中P^2為酸保護基，且其他變數均如本文中所述。去除保護作用係使用適當去除保護劑進行，其係依保護劑之性質，意即其在酸、鹼或氫化作用條件下，是否可移除(不安定)，及在進行去保護作用之化合物中之其他反應性部份基團而定，意即去除保護劑係經選擇，以進行去保護作用，而不會影響其他反應性部份基團，除非共同反應是所想要的。特定酸保護劑為C_1至C_8低碳烷基；更特別是甲基。特定去除保護劑為無機鹼，譬如鹼金屬氫氧化物；更特別是NaOH。特定去保護作用條件係包括在醇性溶劑中，譬如甲醇或乙醇，於約室溫下進行去保護作用。

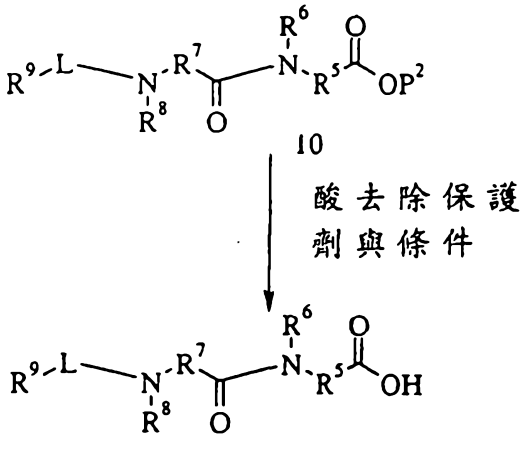
一種式7化合物，其中變數均如本文中所述，其可經由以式9化合物，其中M為可置換之部份基團，且其他變數均如本文中所述，在適當條件下，使式8化合物醯基化而製成，其中變數均如本文中所述。



9　　8　　7

特定偶合條件係使用DIC或DCC與HOAt，在適當有機溶劑譬如DMF或二氯甲烷中，於約0℃至約室溫下，或PyBOP與DIPEA，在適當有機溶劑譬如DMF或二氯甲烷中，於約室溫下；且較佳為後述條件。特定L為羰基。特定M為羥基或N-氧基琥珀醯亞胺。

一種式5化合物，其中n為1，且其他變數均如本文中所述，意即化合物5b，其可經由以適當去除保護劑及在適當條件下，使式10化合物去除保護而製成，其中P^2為酸保護基，且其他變數均如本文中所述。

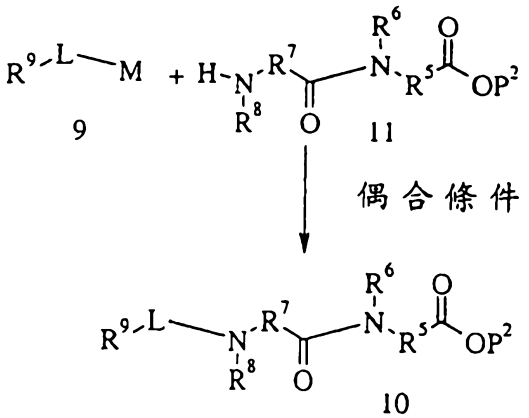


10　　5b

去除保護作用係使用適當去除保護劑進行，其係依酸保護劑之性質，意即在酸、鹼或氫化作用條件下，是否可移

除(不安定)，及在進行去保護作用之化合物中之其他反應性部份基團而定，意即去除保護劑係經選擇，以進行去保護作用，而不會影響其他反應性部份基團，除非共同反應是所想要的。特定酸保護劑為C_1至C_8低碳烷基；更特別是甲基。特定去除保護劑為無機鹼，譬如鹼金屬氫氧化物；更特別是NaOH。特定去保護作用條件係包括在醇性溶劑中，譬如甲醇或乙醇，於約室溫下進行去保護作用。

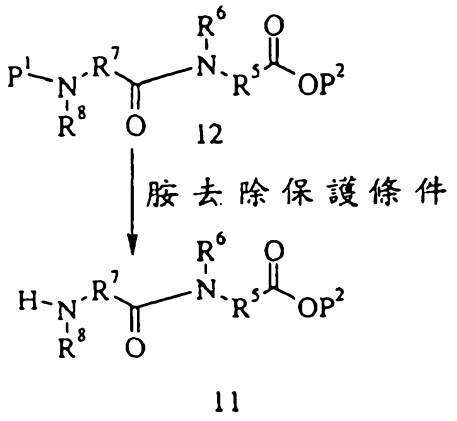
一種式10化合物，其中變數均如本文中所述，其可經由以式9化合物，其中變數均如本文中所述，在適當條件下，使式11化合物醯基化而製成，其中變數均如本文中所述。



特定偶合條件係使用DIC或DCC與HOAt，在適當有機溶劑譬如DMF或二氯甲烷中，於約0℃至約室溫下，或PyBop與DIPEA，在適當有機溶劑譬如DMF或二氯甲烷中，於約室溫下；且較佳為後述條件。特定L為羰基。特定M為羥基或N-氧基琥珀醯亞胺。

一種式11化合物，其中變數均如本文中所述，其可經由

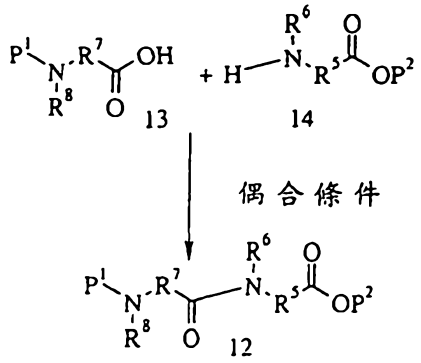
以適當去除保護劑及在適當條件下，使式12化合物去除保護而製成，其中P^1為胺保護基，且其他變數均如本文中所述。



12　　11

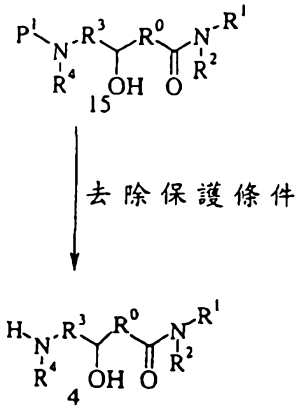
去除保護作用係使用適當去除保護劑進行，其係依胺保護劑之性質，意即在酸、鹼或氫化作用條件下，是否可移除(不安定)，及在進行去保護作用之化合物中之其他反應性部份基團而定，意即去除保護劑係經選擇，以進行去保護作用，而不會影響其他反應性部份基團，除非共同反應係為所想要的。特定胺保護劑為Cbz或BOC；更特別是Cbz。特定去除保護劑為酸，譬如HCl或$H_2/Pd(OH)_2$；更特別是$H_2/Pd(OH)_2$。特定去保護作用條件係包括在醇性溶劑，譬如甲醇或乙醇，或烷酸烷酯溶劑，譬如醋酸乙酯中，於約室溫下，進行去保護作用。

一種式12化合物，其中變數均如本文中所述，其可經由使式13化合物，其中變數均如本文中所述，與式14化合物，其中變數均如本文中所述，在適當條件下偶合而製成。



特定偶合條件係使用HOAt/DIC與DIPEA，在適當有機溶劑譬如THF中，於約室溫下。

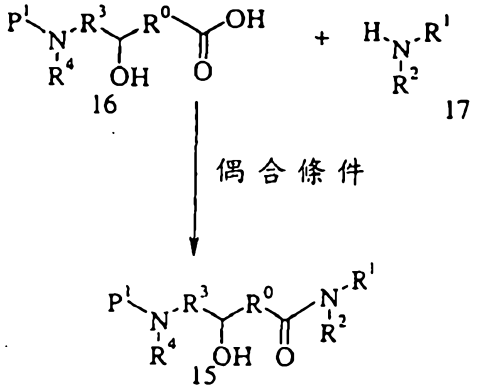
式4化合物，其中變數均如本文中所述，其可經由以適當去除保護劑及在適當條件下，使式化合物15去除保護而製成，其中變數均如本文中所述。



去除保護作用係使用適當去除保護劑進行，其係依胺保護劑之性質，意即在酸、鹼或氫化作用條件下，是否可移除(不安定)，及在進行去保護作用之化合物中之其他反應性部份基團而定，意即去除保護劑係經選擇，以進行去保護作用，而不會影響其他反應性部份基團，除非共同反應係為所想要的。特定胺保護劑為Cbz或BOC；更特別是Cbz。特定去除保護劑為酸，譬如HCl或$H_2/Pd(OH)_2$；更特別是$H_2/Pd(OH)_2$。特定去保護作用條件係包括在醇性溶劑

譬如甲醇或乙醇，或烷酸烷酯溶劑，譬如醋酸乙酯中，於約室溫下，進行去保護作用。

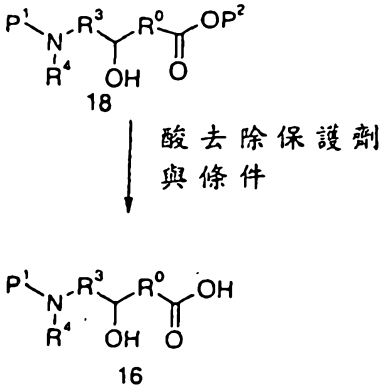
一種式15化合物，其中變數均如本文中所述，其可經由使式16化合物，其中變數均如本文中所述，與式17化合物，其中變數均如本文中所述，在適當條件下偶合而製成。



16　　17　　15

特定胺保護劑為Cbz或BOC；更特別是Cbz。特定偶合條件係使用HOBT、PyBop及DIPEA，在適當有機溶劑譬如二氯甲烷中，於約0℃至約室溫下。

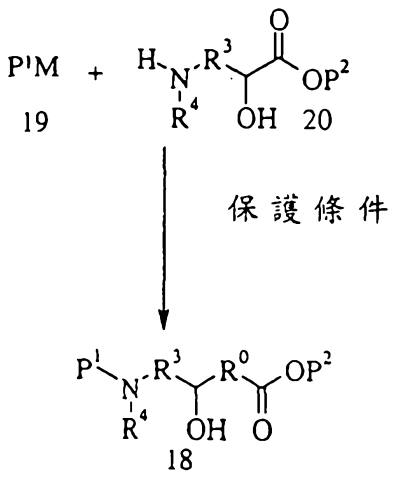
一種式16化合物，其中變數均如本文中所述，其可經由以適當去除保護劑及在適當條件下，使式18化合物去除保護而製成，其中其他變數均如本文中所述。



18　　16

去除保護作用係使用適當去除保護劑進行，其係依酸保護劑之性質，意即在酸、鹼或氫化作用條件下，是否可移除(不安定)，及在進行去保護作用之化合物中之其他反應性部份基團而定，意即去除保護劑係經選擇，以進行去保護作用，而不會影響其他反應性部份基團，除非共同反應係為所想要的。特定胺保護劑為Cbz。特定酸保護劑為C_1至C_8低碳烷基；更特別是甲基。特定去除保護劑為無機鹼，譬如鹼金屬氫氧化物；更特別是NaOH。特定去保護作用條件係包括在醇性溶劑譬如甲醇或乙醇中，於約室溫下進行去保護作用。

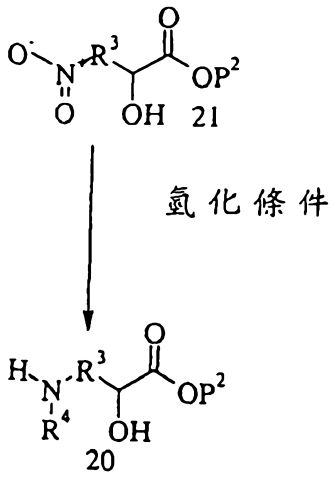
一種式18化合物，其中R^0為一個鍵結，且其他變數均如本文中所述，其可經由以式19化合物，其中變數均如本文中所述，在適當條件下，保護式20化合物而製成，其中變數均如本文中所述。



特定胺保護劑為Cbz或BOC。特定偶合條件係使用適當有機溶劑，譬如二氯甲烷，於約0℃至約室溫下。

一種式20化合物，其中R^4為氫，且其他變數均如本文中

所述，其可經由以適當氫化劑及在適當條件下，使式21化合物氫化而製成，其中變數均如本文中所述。

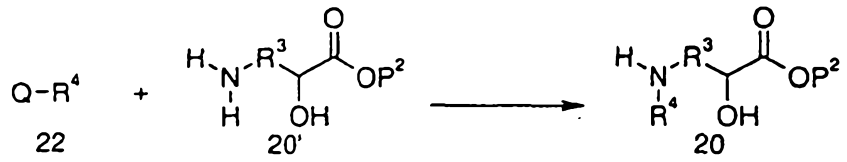


21

20

特定氫化劑為$H_2/Pd(OH)_2$。特定氫化條件，係包括在醇性溶劑，譬如甲醇或乙醇，或烷酸烷酯溶劑，譬如醋酸乙酯中，於約室溫下進行氫化作用。

一種式20化合物，其中R^4為視情況經取代之脂族，且其他變數均如本文中所述，其可經由以化合物22(烷基化劑)，其中R^4為視情況經取代之脂族，且Q為可置換基團，譬如鹵根、甲苯磺酸根或磺酸根，在適當條件下，使化合物20'烷基化而製成，其中變數均如本文中所述。

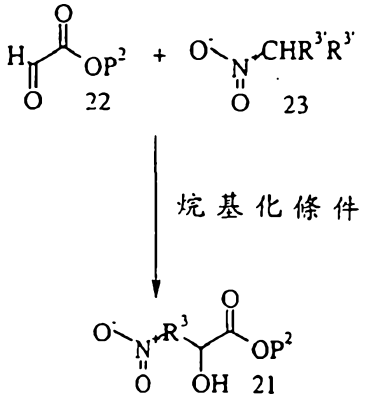


22 20' 20

適當烷基化劑包括脂族(鹵化物、甲苯磺酸酯或磺酸酯)。適當烷基化條件包括在適當有機溶劑，譬如醇性溶劑，例如甲醇或乙醇，或含醚溶劑，例如醚或四氫呋喃

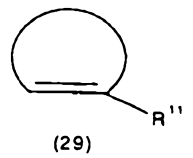
中，於約室溫至約回流下，進行烷基化作用。

一種式21化合物，其中變數均如本文中所述，其可經由以式23化合物，其中$R^{3'}$係獨立為視情況經取代之脂族基團、視情況經取代之環狀基團或視情況經取代之芳族基團，如本文中所述，在適當條件下，使式22化合物烷基化而製成，其中變數係如本文中所述。

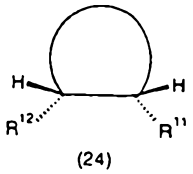


特定烷基化條件係包括使用強鹼，譬如第三-丁醇鉀，在醇性溶劑，譬如甲醇或乙醇中，於約室溫下進行烷基化。

一種式24化合物，其中變數均如本文中所述，其可經由以亞胺性甘胺醯亞胺衍生物，在式29之Michael接受劑上達成Michael加成而製成，其中變數係如本文中所述。

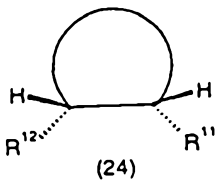

(29)

↓ Michael 加成條件


(24)

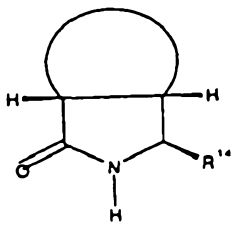
Michael加成係包括適當非質子性極性溶劑、鹼金屬甲醇鹼及適當溫度。關於Michael加成，可參閱Corey, E. J.；Noe, M. C.；Xu, F. Tetrahedron Letter **1998**, 39, 5347。關於對掌性相轉移觸媒之合成，可參閱Corey, E. J.；Noe, M. C.；Xu, F. J. Am. Chem. Soc. **1997**, 119, 12414。適當溶劑包DCM、ACN或THF，依反應條件而定。適當鹼包括CsOH、NaOH、KOH及LiOH。適當溫度範圍從約-78℃至約0℃，更特別是在約-60℃下。可用於本發明之亞胺性甘胺醯亞胺類，係描述本文中。較佳亞胺性甘胺醯亞胺為N-(二苯亞甲基)甘胺酸第三-丁酯。此外，Michael加成條件可使用或未使用相轉移觸媒(PTC)(對掌性與非對掌性)而達成。較佳PTC為溴化鄰-[9]烯丙基-N-9-蒽基甲基金雞尼丁鹽。

一種式25化合物，其中變數均如本文中所述，其可經由式24化合物之亞胺分裂與環化而製成。



(24)

分裂與環化條件



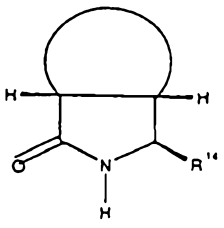
(25)

→

關於分裂與環化程序，可參閱Javidan, A.；Schfer, K.；Pyne, S. Synlett **1996**, 100；Tatsukawa, A.；Dan, M.；Ohbatake, M.；Kawatake, K.；Fukata, T.；Wada, E.；

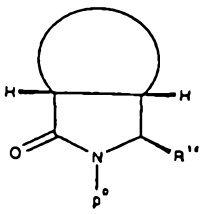
Kanemase, S.; Kakei, S. J. Org. Chem. **1993**, 58, 4221。分裂與環化條件包括使用極性溶劑、酸試劑及約室溫至約150℃之溫度。較佳條件包括使用EtOH、AcONa及$NH_2OH.HCl$，及溫度為所使用溶劑之約沸點。

一種式26化合物，其中變數均如本文中所述，其可經由以適當醯胺保護基，譬如BOC，保護式25醯胺化合物而製成，其中變數均如本文中所述。其他適當保護基包括CBz、-CO_2烷基。亦參閱Greene, T. W.; P. G. M.有機合成之保護基，Wiley, New York, 1991，關於其他胺保護基。保護條件包括使用非質子性極性溶劑，有機鹼作為觸媒，及溫度約0℃-100℃。較佳條件包括使用CAN、二甲胺基吡啶，及溫度約室溫。



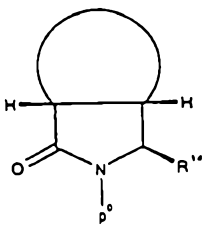
(25)

保護條件 →



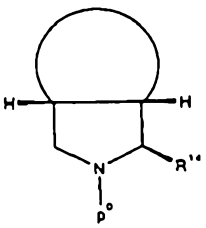
(26)

一種式27化合物，其中變數均如本文中所述，其可經由使已經保護之式26化合物還原而製成，其中變數均如本文中所述。



(26)

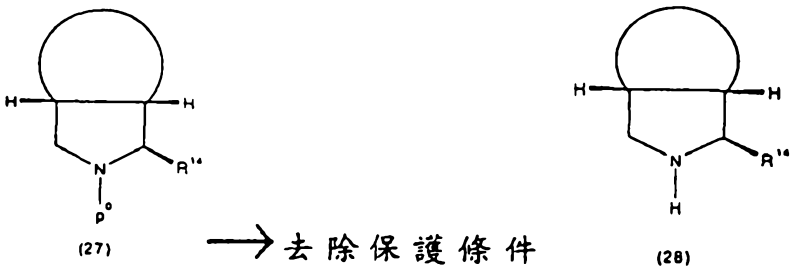
還原條件 →



(27)

事實上完成兩次還原作用。第一次還原作用為醯胺成為半胺醛，使用DIBALH或超氫化物[$LiBEt_3H$]。第二次還原作用為半胺醛成為胺，使用Et_3SiH與$BF_3 \cdot OEt_2$。關於還原條件，可參閱Collado, I；Ezquerra, J.；Mateo, A. I.；Rubio, A., J. Org. Chem. **1998**, 631995-2001，與Ezqueera, J.；Pedregal, C.；Yruretagoyena, B.；Rubio, A.；Carreno, M. C.；Escribano, A.；Garcia Ruano, J. L. J. Org. Chem. **1995**, 60, 2925。關於使焦麩胺酸酯轉化成四氫吡咯之其他常用條件，係為使用$BH_3 \cdot SMe_2$。

一種式28化合物，其中變數均如本文中所述，其可經由使式27化合物去除保護而製成，其中變數均如本文中所述。



參閱Gibson, F. G.；Bermeier, S. C.；Rapoport, H., J. Org Chem. **1994**, 59, 3216-3218，關於第三-丁酯存在下，選擇性移除N-BOC保護基之條件。熟諳此藝者明瞭去除保護條件係依保護基之選擇而定。例如，若使用CBz，則可使用氫化作用或鹼性條件。較佳情況是，若使用BOC，則可使用醋酸乙酯中之1 N HCl。參閱Greene, T. W.；P. G. M.有機合成之保護基(Wiley, New York, 1991)。

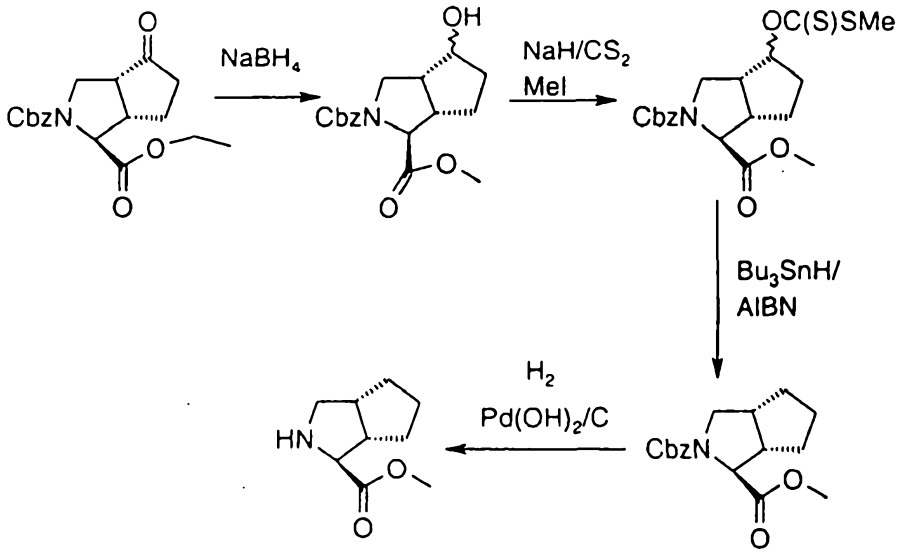
本技藝中一般技術人士當知式3化合物可藉由使式5化合

物與式28化合物在如上所述之條件下偶合而製備。

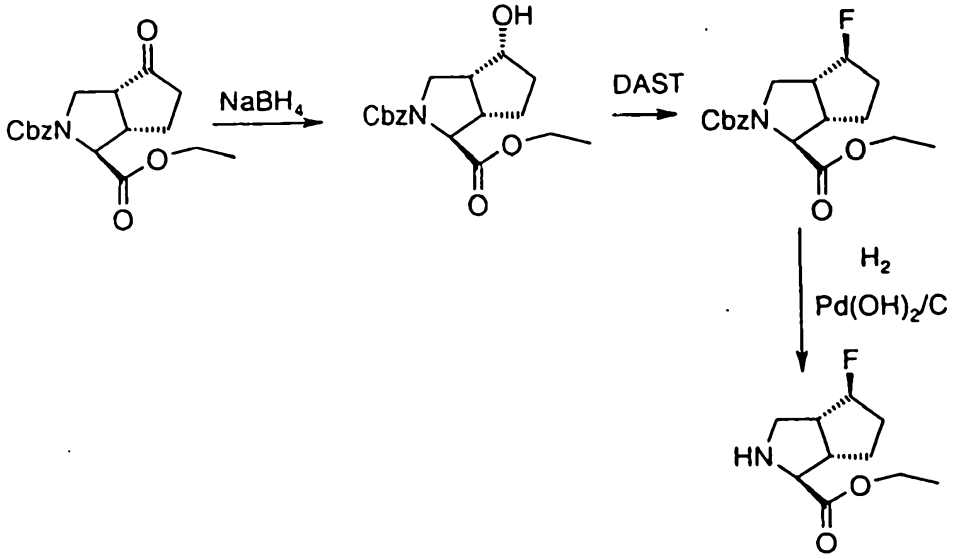
製備當R^3、R^5或R^7為視情況經取代之乙烷二基部份基團時之方法，包括熟諳此藝者所已知者，例如在"β-內醯胺之有機化學"中所述之方法(由G. Georg編著，VCH出版公司(1993)，例如第240-241與303-305頁)。

下列圖式1-11係舉例說明各種製備視情況經取代之多環狀氮雜環基之方法。在下文圖式中之方法，亦可應用於包含可相容類似取代基之其他視情況經取代之多環狀氮雜環基。

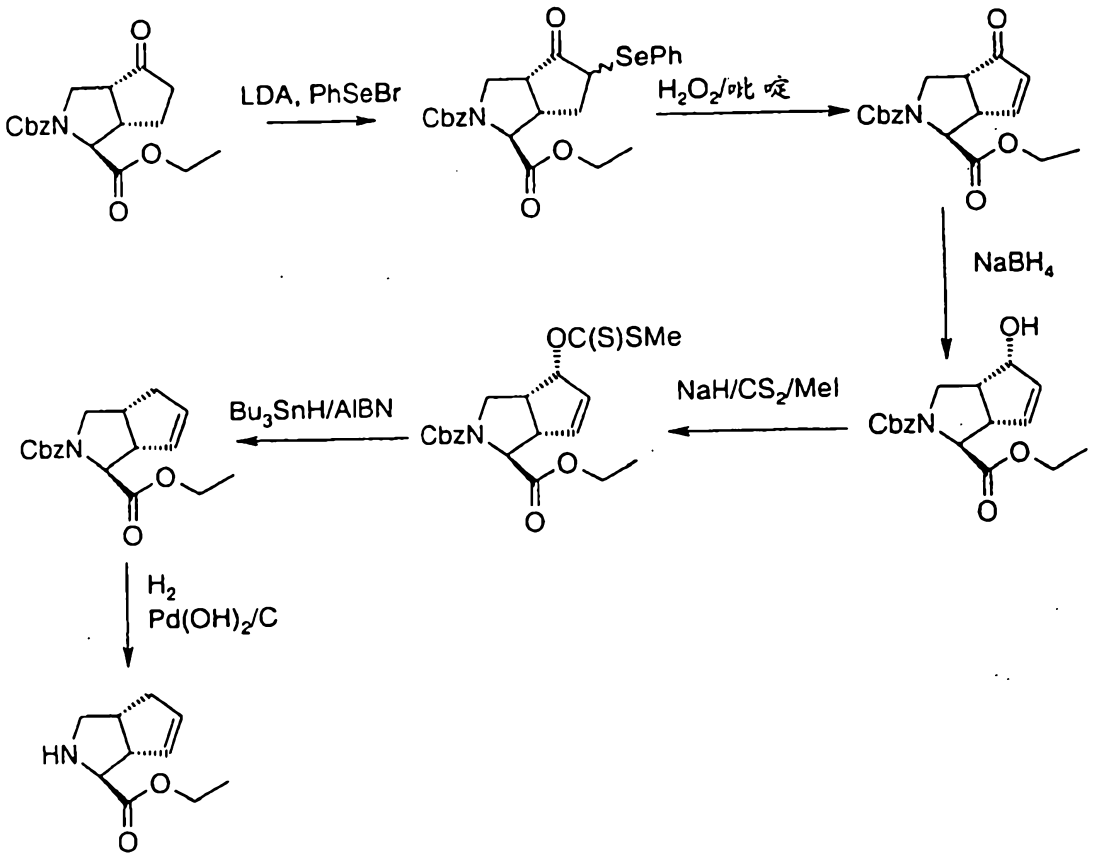
圖式1



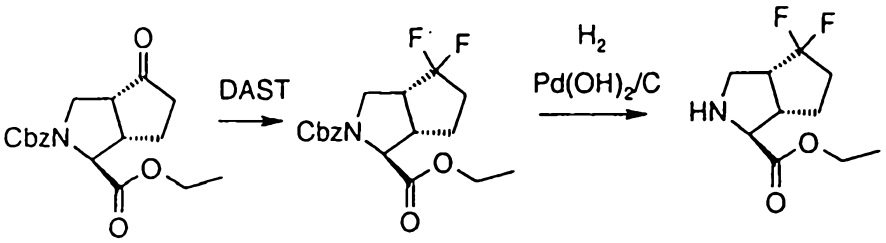
圖式2


NaBH4
DAST
H2
Pd(OH)2/C
CbzN
HN
OH
F

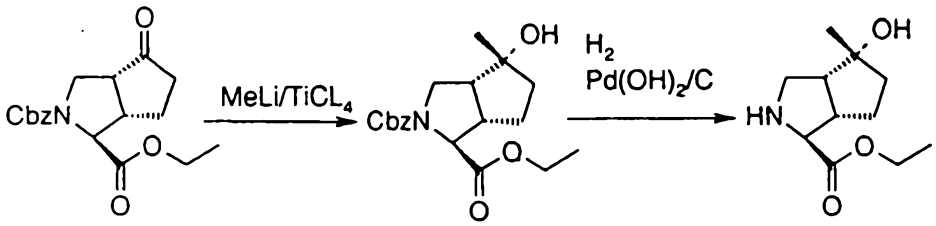
圖式3


LDA, PhSeBr
H2O2/吡啶
NaBH4
NaH/CS2/MeI
Bu3SnH/AIBN
H2
Pd(OH)2/C
CbzN
HN
SePh
OC(S)SMe
OH

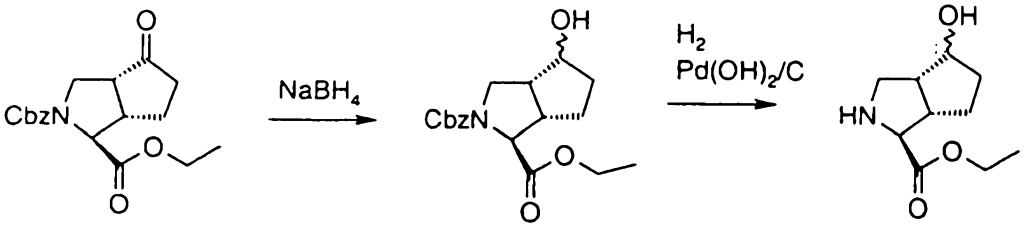
圖式 4



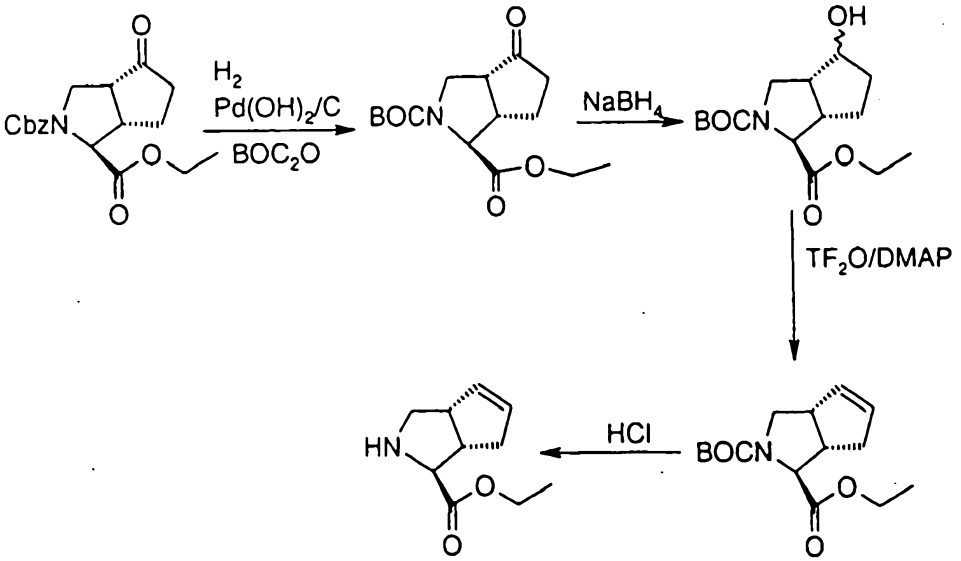
圖式 5



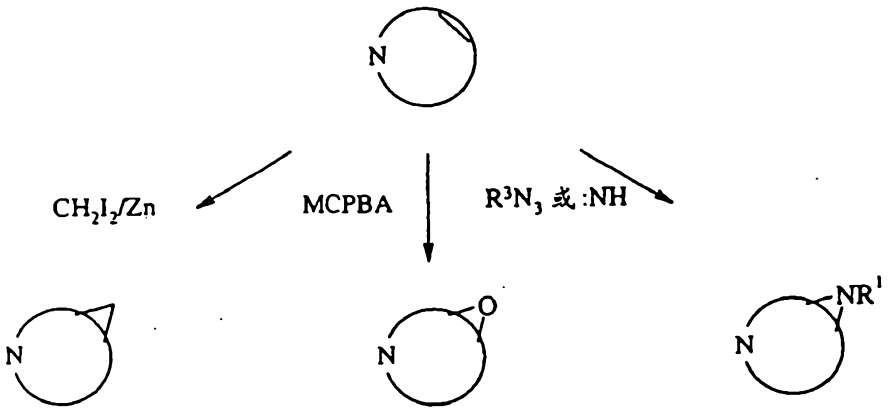
圖式 6



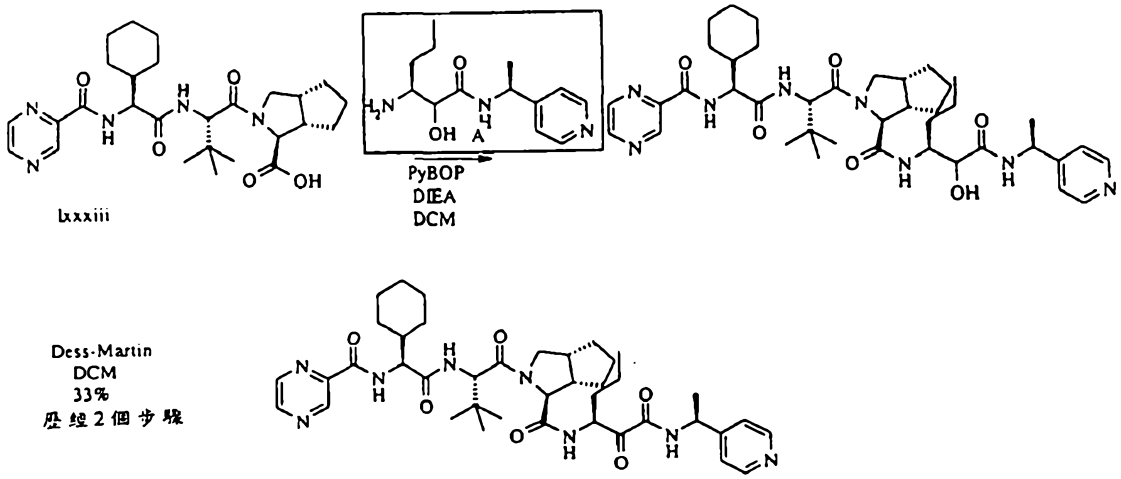
圖式 7



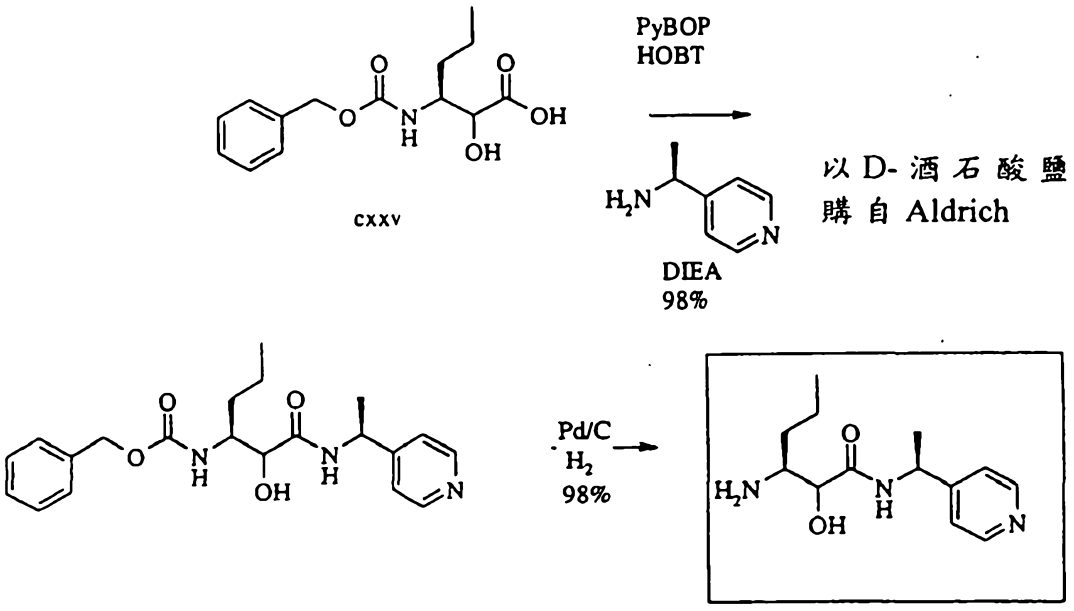
圖式 8


N
CH2I2/Zn
MCPBA
R3N3 或 :NH
NR1

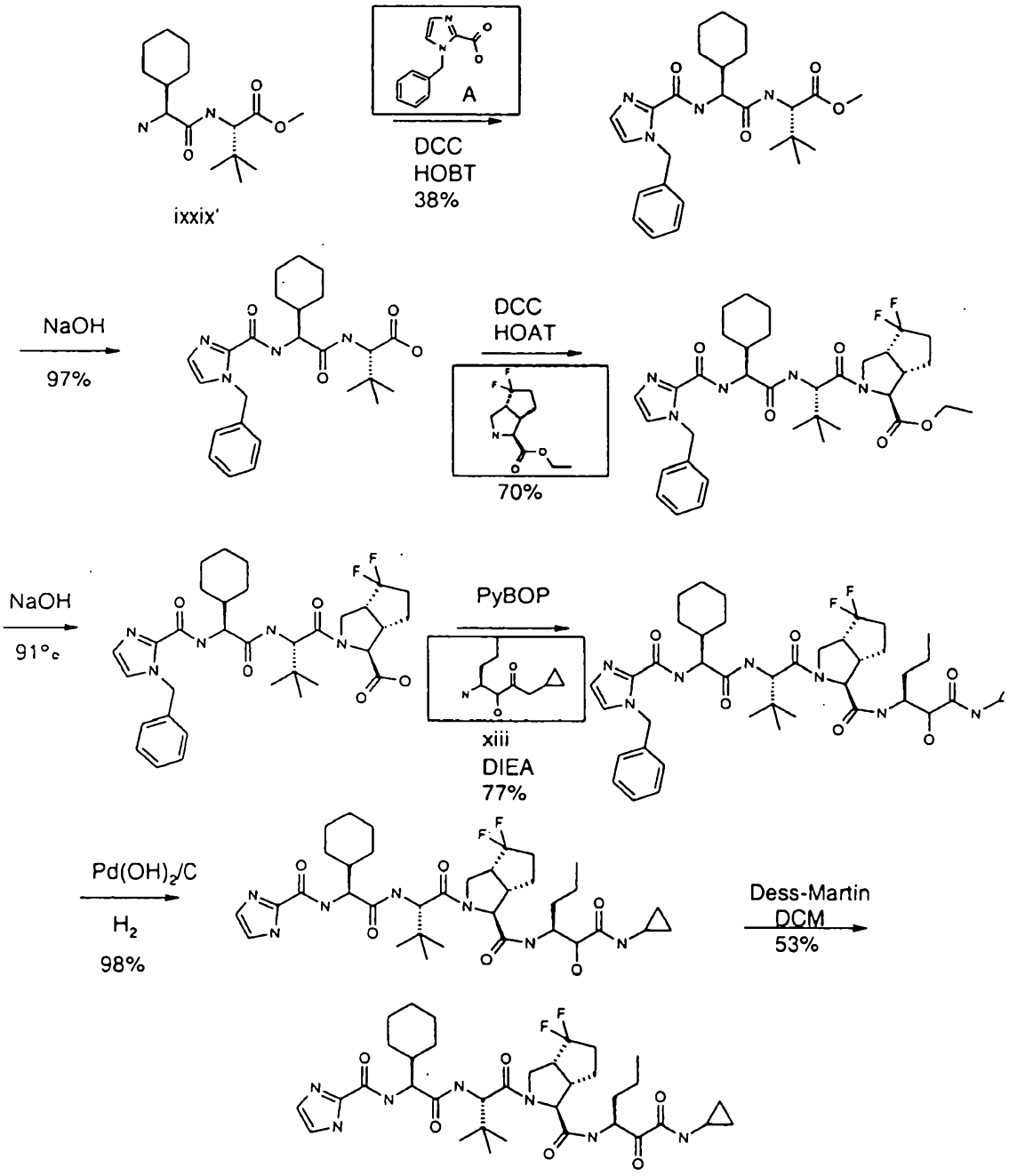
圖式 9


lxxiii
PyBOP
DIEA
DCM
Dess-Martin
DCM
33%
歷經 2 個步驟

圖式 10


cxxv
PyBOP
HOBT
以 D- 酒石酸鹽
購自 Aldrich
DIEA
98%
Pd/C
H2
98%

圖式11



包含一種含有一或多個氮環原子之基團，較佳為亞胺(=N-)之式1化合物，可轉化成其相應之化合物，其中該基團之一或多個氮環原子係被氧化成N-氧化物，較佳係經由與過酸，例如過醋酸在醋酸中，或間-氯過氧苯甲酸於惰性溶劑譬如二氯甲烷中，在溫度從約室溫至回流，較佳係

於高溫下反應。

在後文所述之反應中，可能必須保護反應性官能基，例如羥基、胺基、亞胺基、硫基或羧基，在想要其留在最後產物中之情況下，係為避免其不期望地參與反應。習用保護基可根據標準實務使用，關於實例可參閱T.W.Green與P. G. M. Wuts，"有機化學中之保護基" (John Wiley & Sons (1991))；J. F. W. Mc Omie，"有機化學中之保護基" (Plenum出版社，1973)。

按本文中所述製成之化合物，可藉習用方式，自反應混合物回收。例如，化合物可以下述方式回收，自反應混合物餾出溶劑，或若必要，則在自反應混合物餾出溶劑後，將殘留物傾倒至水中，接著以水不可溶混之有機溶劑萃取，及自萃液餾出溶劑。此外，若需要，可將產物藉各種習知技術進一步純化，譬如再結晶作用、再沉澱或各種層析技術，特別是管柱層析或預備薄層層析法。

根據本發明之另一項特徵，本發明化合物可經由本發明其他化合物之相互轉化而製成。

以下述作為相互轉化方法之實例，含有亞碸鍵結之式1化合物，可經由相應含有-S-鍵結之化合物之氧化作用而製成。例如，此氧化作用可合宜地以下述方式進行，經由與過氧酸反應，例如3-氯過苯甲酸，較佳係於惰性溶劑中，例如二氯甲烷，較佳係在於或接近室溫，或者，利用氫過氧單硫酸鉀，在媒質中，譬如經緩衝至約pH5之甲醇水溶液，在約0℃與室溫間之溫度下。此後述方法對於含

有酸不安定基團之化合物，係為較佳的。

以下述作為相互轉化方法之另一項實例，含有碸鍵結之式1化合物，可藉由相應含有-S-或亞碸鍵結之化合物之氧化作用而製成。例如，此氧化作用可合宜地利用與過氧酸之反應，例如3-氯過苯甲酸，較佳係於惰性溶劑中，例如二氯甲烷，較佳係在於或接近室溫進行。

應明瞭的是，此處關於芳基與雜芳基芳香性之指稱，係包括任何高度地共振之不飽和環結構。或者，雙鍵之安置，在顯示之情況下，係表示關於所描繪化合物之一種可能結構，但應明瞭係包括此化合物之其他共振狀態，以及質子化與荷電物種，只有其中一種可能顯示。

應明瞭的是，本發明化合物可含有不對稱中心。此等不對稱中心可獨立呈無論是R或S組態。熟諳此藝者將顯而易見的是，某些本發明化合物亦可顯示幾何異構現象。應明瞭的是，本發明包括根據本發明化合物之個別幾何異構物與立體異構物及其混合物，包括消旋混合物。此種異構物可藉由應用或修改已知方法，與其混合物分離，例如層析技術與再結晶技術，或其係個別地製自其中間物之適當異構物。

對本文之目的而言，應明瞭的是，互變異構形式係包含在特定基團例如硫酮基/巯基或酮基/羥基之敘述中。

酸加成鹽係以其中存在鹼性官能基譬如胺基、烷胺基或二烷胺基之本發明化合物形成。藥學上可接受，意即無毒性之酸加成鹽，係為較佳的。所選擇之鹽，係經最適宜地

選擇為可與習用醫藥媒劑相容，且適合口服或非經腸投藥。本發明化合物之酸加成鹽，可藉由應用或修改已知方法，經由自由態鹼與適當酸之反應而製成。例如，本發明化合物之酸加成鹽，可以下述任一方式製成，使自由態鹼溶於含有適當酸之水或醇水溶液或其他適當溶劑中，並藉由蒸發溶液分離此鹽，或經由在有機溶劑中使自由態鹼與酸反應，於此種情況中，鹽係直接分離，或可經由使溶液濃縮而獲得。用於製備此種鹽之一些適當酸，係為鹽酸、氫溴酸、磷酸、硫酸，各種有機羧酸及磺酸，譬如醋酸、檸檬酸、丙酸、琥珀酸、苯甲酸、酒石酸、反丁烯二酸、苯乙醇酸、抗壞血酸、蘋果酸、甲烷磺酸、甲苯磺酸、脂肪酸類，己二酸鹽、海藻酸鹽、抗壞血酸鹽、天冬胺酸鹽、苯磺酸鹽、苯甲酸鹽、環戊烷丙酸鹽、二葡萄糖酸鹽、十二基硫酸鹽、酸性硫酸鹽、丁酸鹽、乳酸鹽、月桂酸鹽、月桂基硫酸鹽、蘋果酸鹽、氫碘酸鹽、2-羥基-乙烷磺酸鹽、甘油磷酸鹽、苦味酸鹽、三甲基醋酸鹽、雙羥萘酸鹽、果膠酯酸鹽、過硫酸鹽、3-苯基丙酸鹽、硫氰酸鹽、2-萘磺酸鹽、十一烷酸鹽、菸鹼酸鹽、半硫酸鹽、庚糖酸鹽、己酸鹽、樟腦酸鹽、樟腦磺酸鹽及其他。

本發明化合物之酸加成鹽，可藉由應用或修改已知方法，自其鹽再生。例如，本發明之母體化合物可經由以鹼處理，例如碳酸氫鈉水溶液或氨水溶液，自其酸加成鹽再生。

本發明化合物可藉由應用或修改已知方法，自其鹼加成

鹽再生。例如，本發明之母體化合物可以酸例如鹽酸處理，自其鹼加成鹽再生。

鹼加成鹽可在本發明化合物含有羧基或足夠酸性生物電子等排體之情況下形成。可用以製備鹼加成鹽之鹼類，包括較佳為當與自由態酸合併時，會產生藥學上可接受之鹽者，意即該鹽之陽離子在該鹽之醫藥劑量下，對病人為無毒性，因此在自由態鹼中固有之有利抑制作用，不會被可歸因於該陽離子之副作用而受損害。藥學上可接受之鹽，包括衍生自鹼金屬與鹼土金屬鹽者，在本發明之範圍內包括衍生自下列鹼者：氫化鈉、氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化鈣、氫氧化鋁、氫氧化鋰、氫氧化鎂、氫氧化鋅、氨、乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、離胺酸、精胺酸、鳥胺酸、膽鹼、N,N'-二苄基乙二胺、氯普魯卡因、二乙醇胺、普魯卡因、N-苄基苯乙胺、二乙胺、六氫吡啉、參(羥甲基)-胺基甲烷、氫氧化四甲基銨等。

本發明化合物可合宜地在本發明方法期間，被製成或形成溶劑合物(例如水合物)。本發明化合物之水合物可合宜地自水溶液/有機溶劑混合物，藉再結晶而製成，使用之有機溶劑，譬如二氧陸圜、四氫呋喃或甲醇。

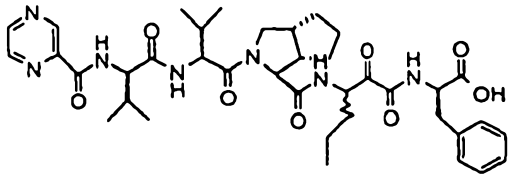
起始物質與中間物可藉由應用或修改已知方法製成，例如按參考實例中所述或其顯而易見之化學等效方法。

本發明化合物、其方法或製備法及其生物活性，將自下述實例之檢視，而變得更清楚明白，其僅被提出作為說明，而非欲被視為限制本發明之範圍。

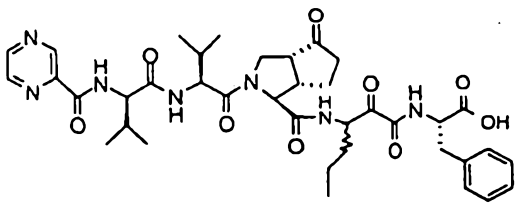
試樣係藉TLC、NMR、RP-HPLC或EA分析。

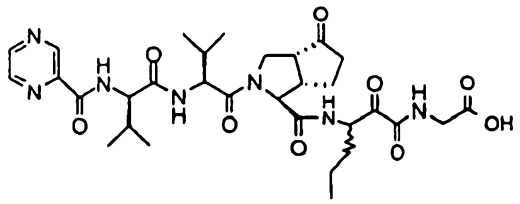
實例1-化合物A-E：

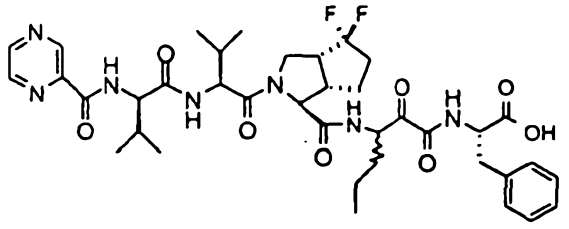
於化合物xi(310毫克，0.39毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)中，添加TFA(4毫升)。將此反應物於約室溫下攪拌5小時。此時於真空中移除溶劑。將所形成之殘留物藉逆相HPLC純化，獲得195毫克(68%)化合物A，

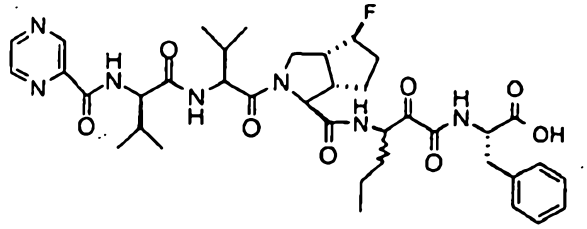


按照上述方法，並使用適當起始物質，製備下列連續化合物B-E：



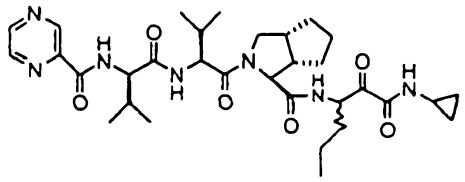




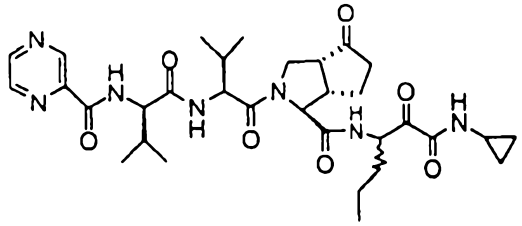


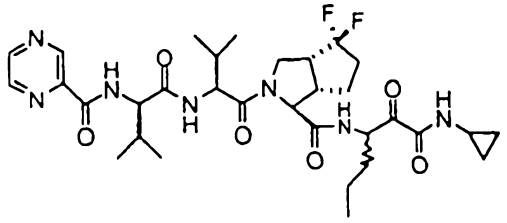
實例2-化合物F-M：

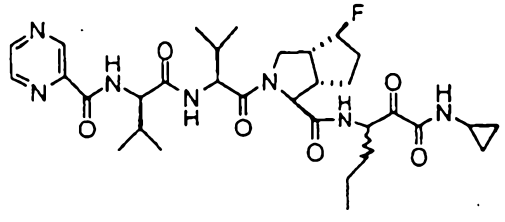
於化合物xii(350毫克，0.56毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)中，添加DMP試劑(307毫克，0.73毫莫耳)。將反應物於約室溫下攪拌2小時，然後以10% Na_2SO_3，使反應淬滅，歷經30分鐘。接著將反應混合物以EtOAc(75毫升)萃取，並以鹽水洗滌。使有機層乾燥，及在真空中濃縮。將所形成之殘留物以矽膠層析(80-90% EtOAc/己烷)純化，獲得248毫克(71%)化合物F

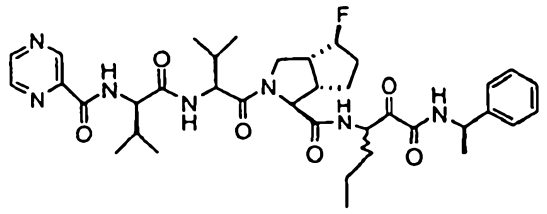


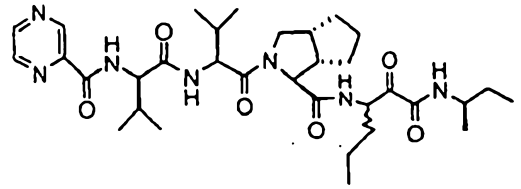
按照上述方法，並使用適當起始物質，製備下列連續化合物G-M：

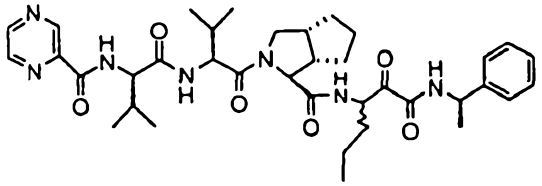


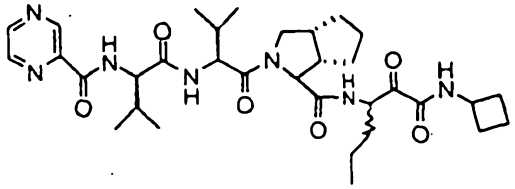






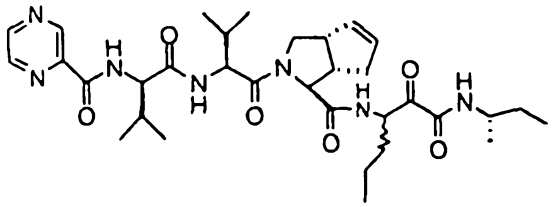




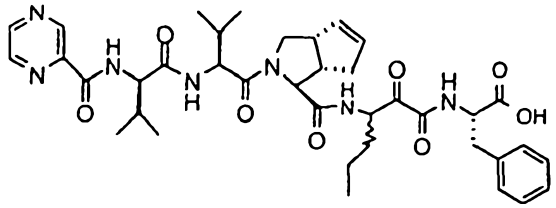


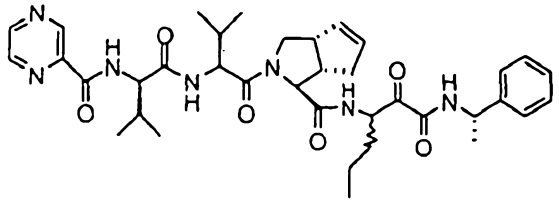
實例3-化合物N-R：

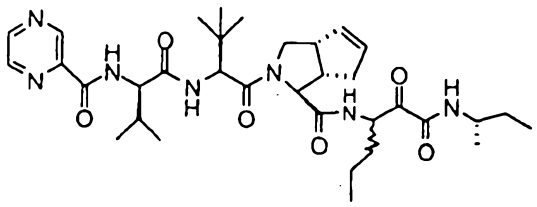
於化合物xix(~0.22毫莫耳)之DCM溶液(4毫升)中，添加DMP試劑(146毫克，0.34毫莫耳)。於約室溫下攪拌2小時後，以10% Na_2SO_3使反應淬滅。接著以DCM稀釋此反應混合物。分離有機層，並以10% Na_2SO_3洗滌兩次，及以鹽水洗滌。使所形成之有機層脫水乾燥，並在真空中濃縮，獲得殘留物，使其藉矽膠層析純化(5% EtOH/EtOAc)，以提供78毫克(56%)所要之化合物N

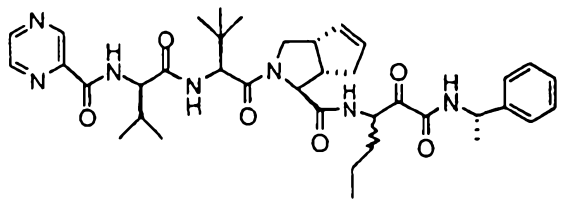


按照上述方法，並使用適當起始物質，製備下列連續化合物O-R：



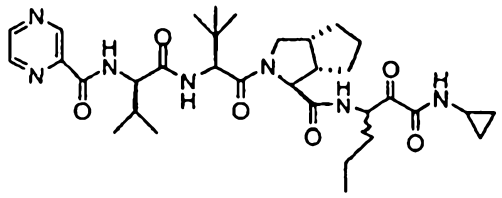




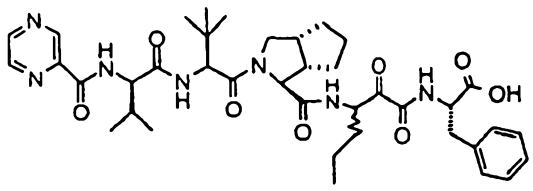


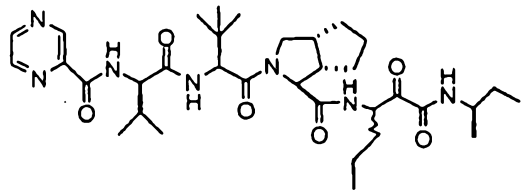
實例4-化合物S-W：

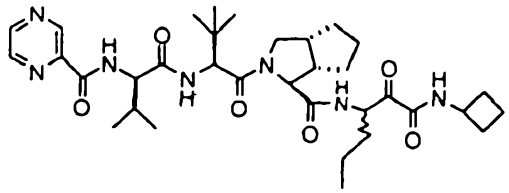
於化合物xxv(320毫克，0.5毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)中，添加DMP試劑(272毫克，0.65毫莫耳)。將此反應物於約室溫下攪拌2小時，並以10% Na_2SO_3使反應淬滅，歷經20分鐘。接著將所形成之混合物以EtOAc萃取。有機層以鹽水洗滌，脫水乾燥，及在真空中濃縮。將所形成之殘留物藉矽膠層析純化(80% EtOAc/己烷)，獲得170毫克(53%)化合物S，

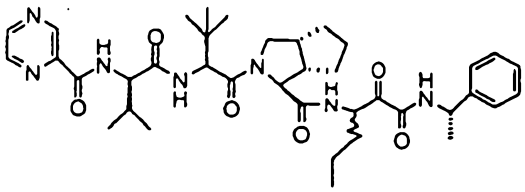


按照上述方法，並使用適當起始物質，製備下列連續化合物T-W：





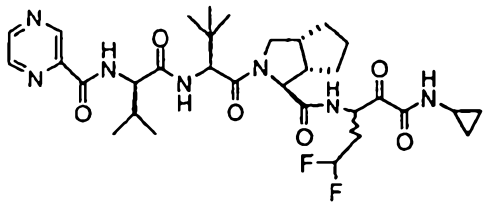




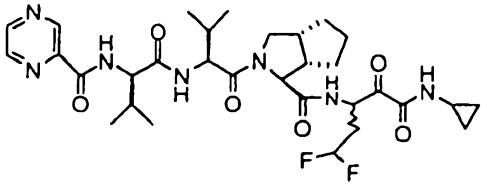
實例5-化合物X-AD：

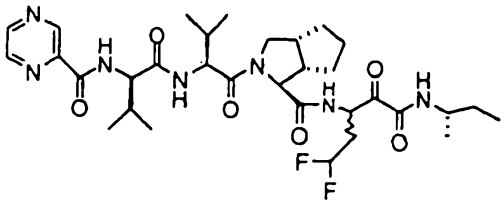
於化合物xxvi(400毫克，0.6毫莫耳)之DCM溶液(20毫升)中，添加DMP試劑(329毫克，0.78毫莫耳)。將此反應物於約室溫下攪拌1.5小時，並以10% Na_2SO_3使反應淬滅，歷經20分鐘。接著將所形成之混合物，以EtOAc萃取。有機層以鹽水洗滌，脫水乾燥，及在真空中濃縮。將所形成之

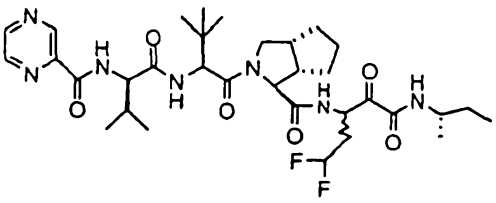
殘留物藉矽膠層析純化(70-100% EtOAc/己烷)，獲得210毫克(53%)化合物X，

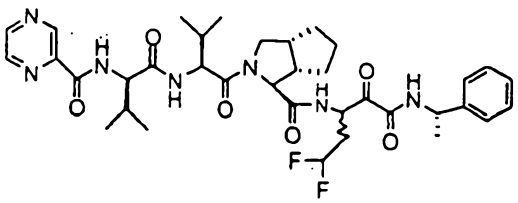


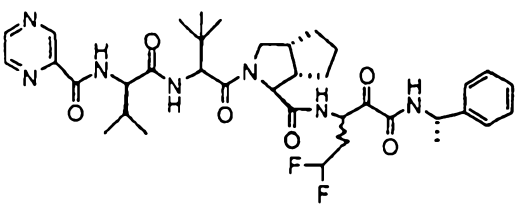
按照上述方法，並使用適當起始物質，製備下列連續化合物Y-AD：

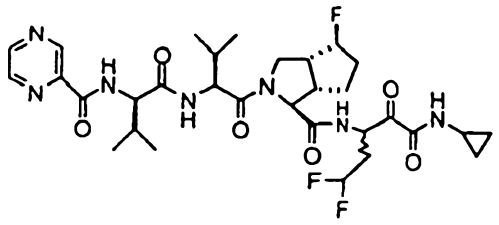






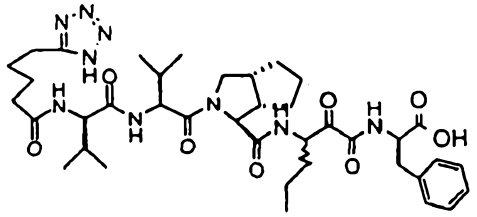




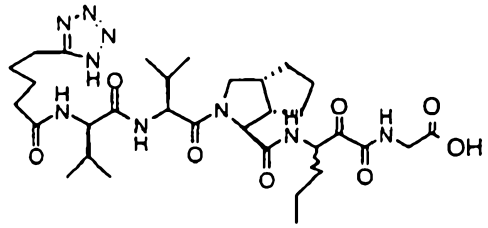


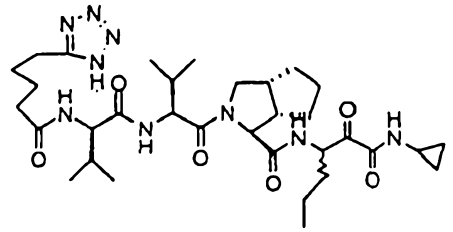
實例6-化合物AE-AI：

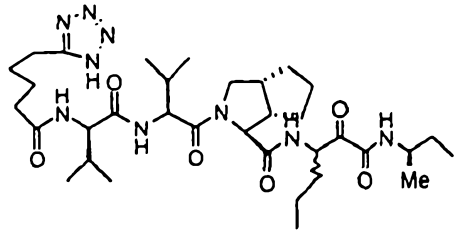
使化合物xxxiii(150毫克；0.076毫莫耳)溶於5毫升TFA中，並攪拌兩天。產物藉RP-HPLC純化，產生40毫克(33%產率)化合物AE，

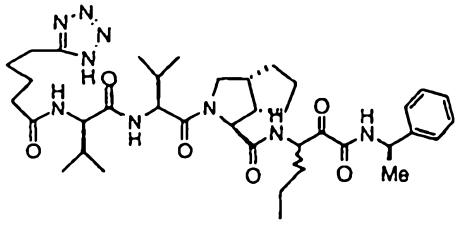


按照上述方法，並使用適當起始物質，製備下列連續化合物AF-AI：



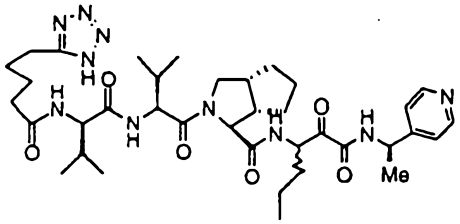






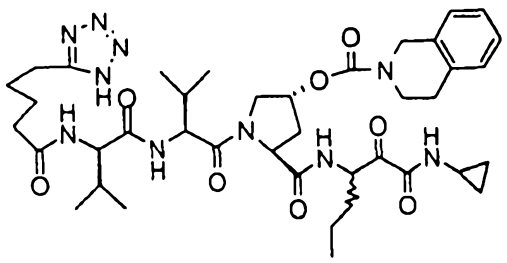
實例7-化合物AJ：

使化合物xxxviii(180毫克，0.21毫莫耳)溶於純TFA(5毫升)中，並在約室溫下留置3天。此時，使反應混合物在真空中濃縮，而得殘留物，使其藉逆相HPLC純化，獲得50毫克(32%)化合物AJ，

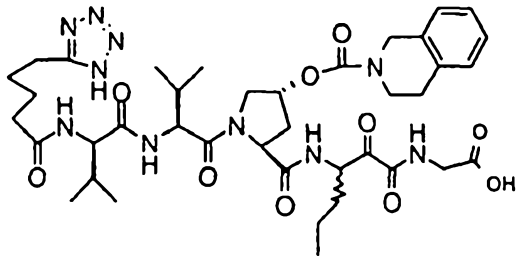


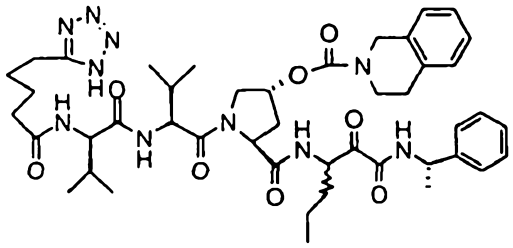
實例8-化合物AK-AM：

使化合物xxxxiii(150毫克；0.16毫莫耳)溶於4.5毫升TFA中，並攪拌三天。藉RP-HPLC純化產物，產生70毫克(54%產率)化合物AK，



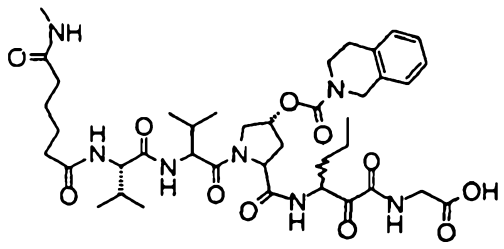
按照上述方法，並使用適當起始物質，製備下列連續化合物AL-AM：





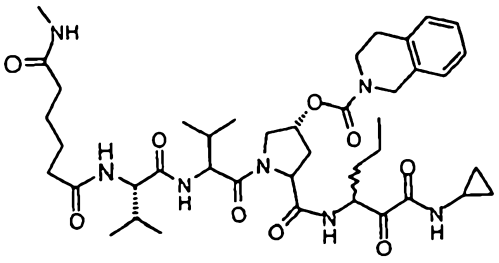
實例9-化合物：

使化合物lii(80毫克)溶於3毫升TFA與3毫升DCM中。將此混合物於約室溫下攪拌5小時。藉蒸發移除溶劑。將所形成之殘留物藉HPLC純化，產生62毫克(83%)化合物AN，



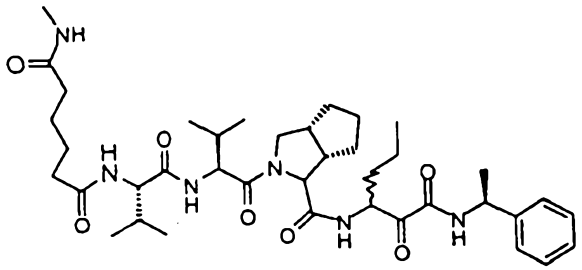
實例10-化合物AO：

使化合物liii(160毫克；0.2毫莫耳)溶於5毫升DCM中，並添加DMP試劑(170毫克；0.4毫莫耳)。將此混合物於約室溫下攪拌三小時。藉蒸發移除溶劑，並使殘留物溶於50%乙腈/水中，及藉由RP-HPLC純化，產生51毫克(32%)化合物AO，



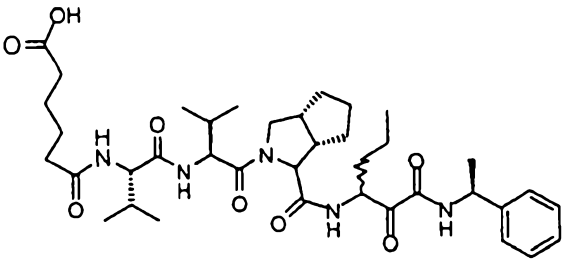
實例11-化合物AP：

使化合物lix(162毫克；0.22毫莫耳)溶於8毫升DCM中，並添加DMP試劑(189毫克；0.44毫莫耳)。將此混合物於約室溫下攪拌3小時。藉蒸發移除溶劑，並藉RP-HPLC純化產物，產生41毫克(25%)化合物AP，



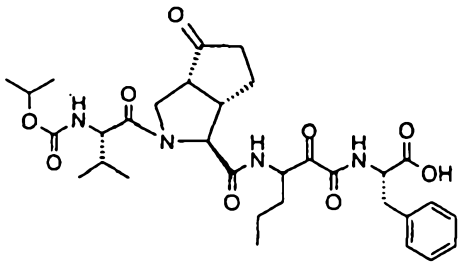
實例12-化合物AQ：

使化合物lx(70毫克；0.09毫莫耳)溶於5毫升TFA與5毫升DCM中。將此混合物於約室溫下攪拌3小時。藉真空移除溶劑，並使殘留物溶於50%乙腈/水中，及凍乾而產生化合物AQ，為粉末，

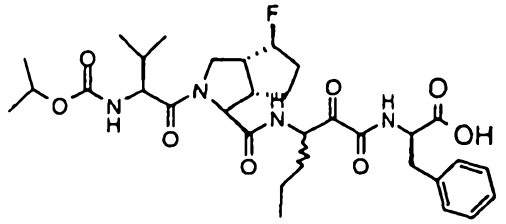


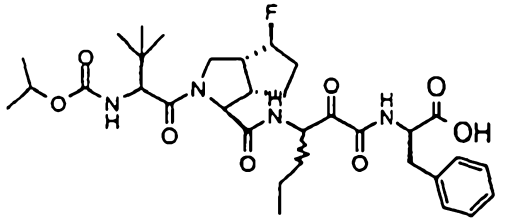
實例13-化合物AR-BG：

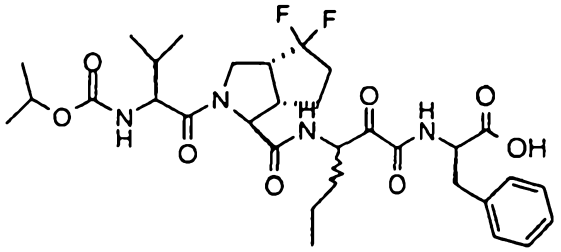
將化合物lxvi(223毫克，0.326毫莫耳)於TFA(5毫升)與DCM (5毫升)之溶液中攪拌4小時。TLC(矽膠：2% MeOH/EtOAc)顯示完全轉化成較緩慢產物。在減壓下移除溶劑，並使產物凍乾，獲得198毫克(97%)化合物AR，

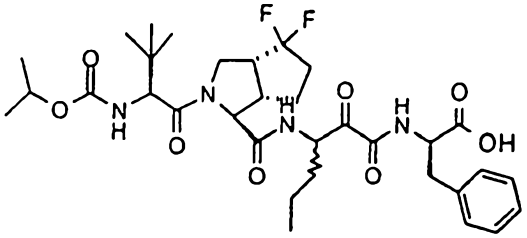


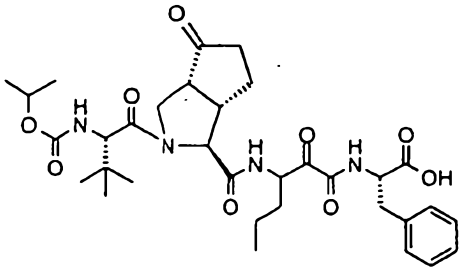
按照上述方法，並使用適當起始物質，製備下列連續化合物AS-BG：

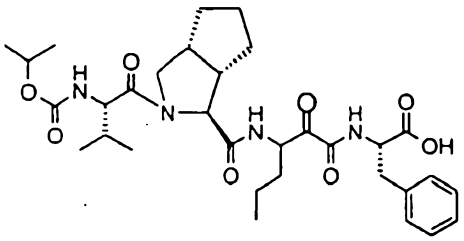


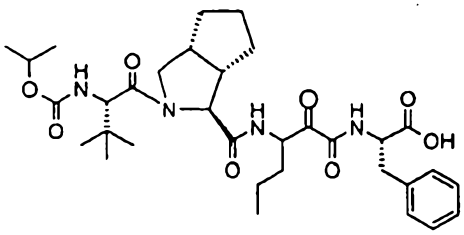


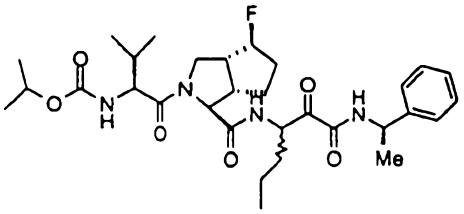


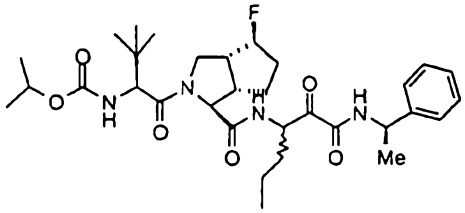


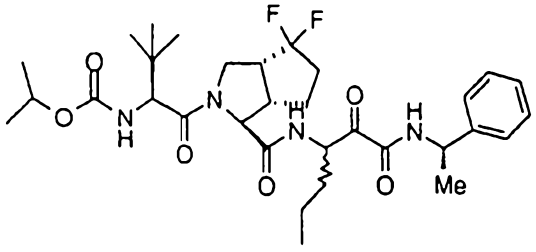


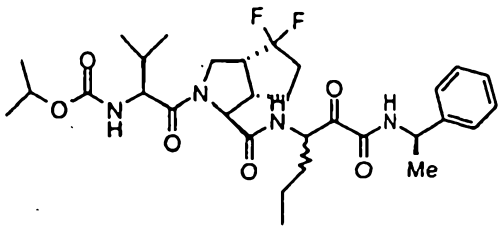


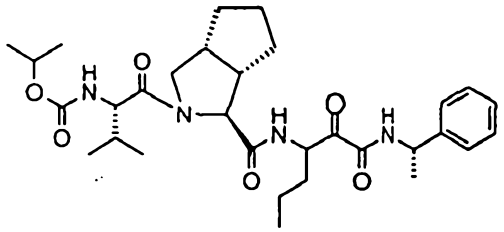


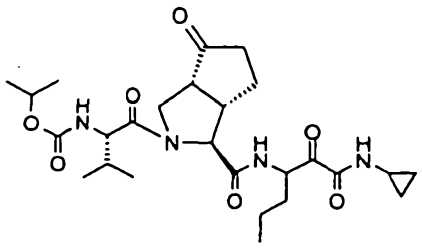


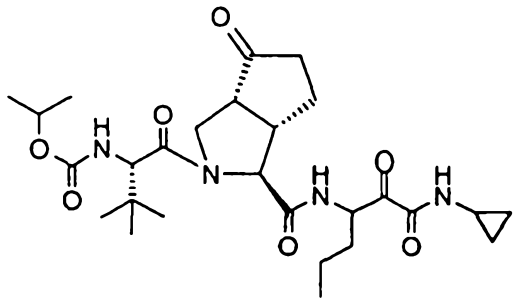


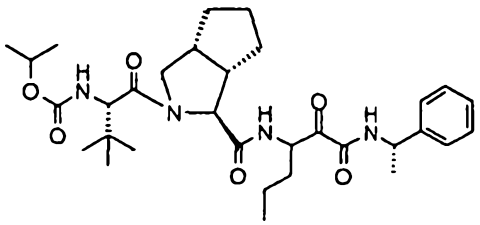








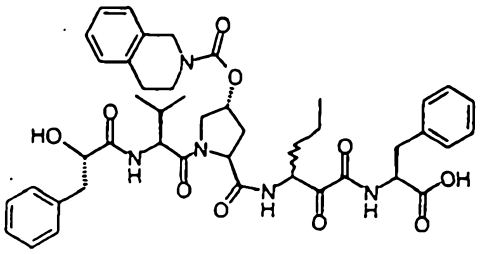




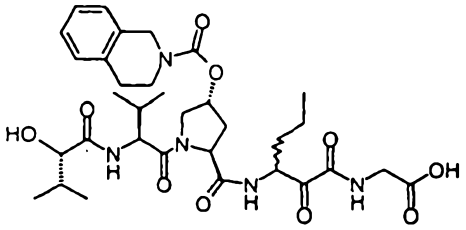
實例14-化合物BH-BS：

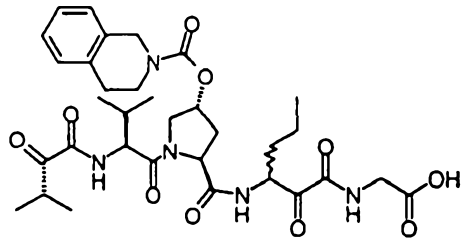
使化合物lxxiii(150毫克，0.15毫莫耳)溶於DCM(3毫升)中。於此溶液中添加TFA(1.5毫升)。將所形成之溶液攪拌過夜。此時，使反應物在真空中濃縮，而得殘留物。藉逆相HPLC純化殘留物並凍乾，獲得60毫克(50%)化合物

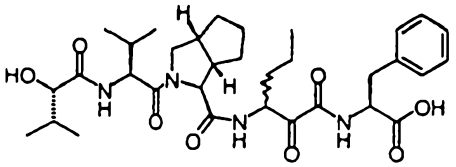
BH，

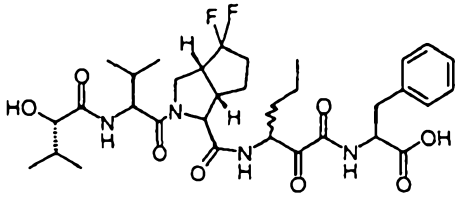


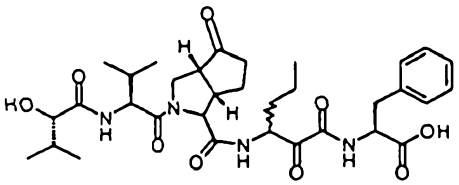
按照上述方法，並使用適當起始物質，製備下列連續化合物BI-BS：

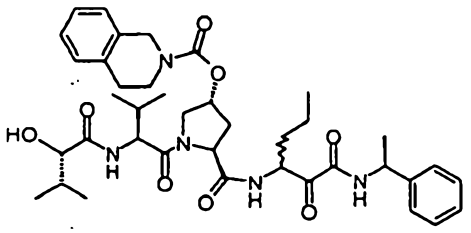


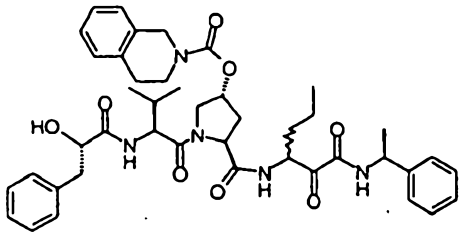


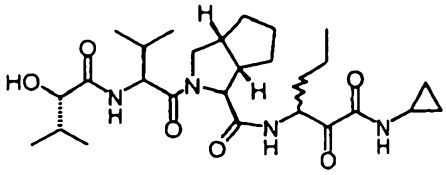


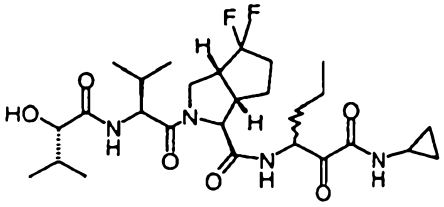


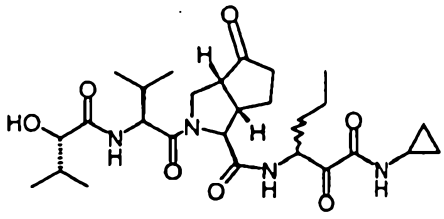


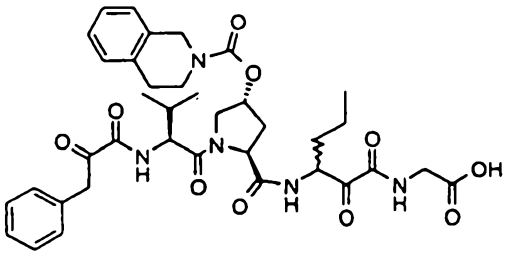






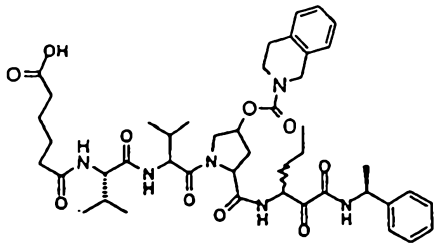


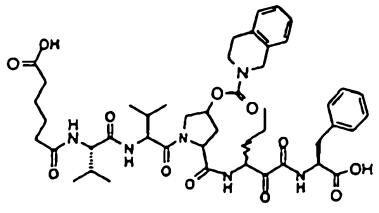




實例15-化合物BT-BU：

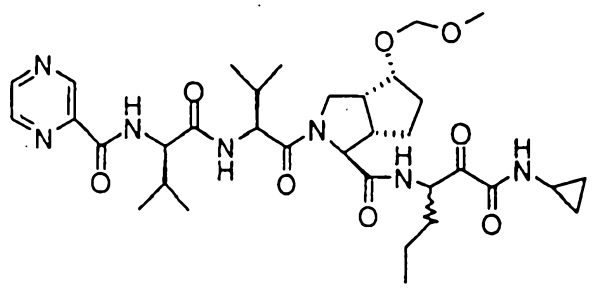
按照實例12之方法，並使用適當起始物質，製備下列連續化合物BT-BU：





實例16-化合物BV：

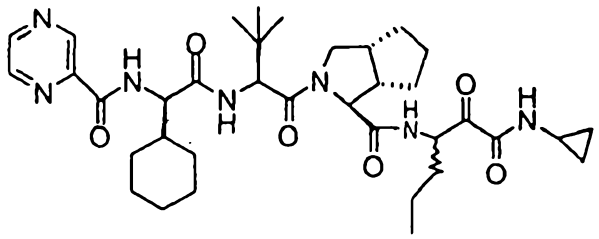
於化合物lxxvii(143毫克，0.21毫莫耳)之二氯甲烷溶液(4.2毫升)中，添加DMP試劑(165毫克，0.39毫莫耳)。將此反應物於約室溫下攪拌2小時，並以10% Na_2SO_3(水溶液)使反應淬滅，歷經20分鐘。將所形成之混合物以EtOAc萃取。有機層以鹽水洗滌，以$MgSO_4$脫水乾燥，及濃縮成黃色油。藉矽膠層析(5% EtOH/EtOAc)純化，產生124毫克(79%)化合物BV，



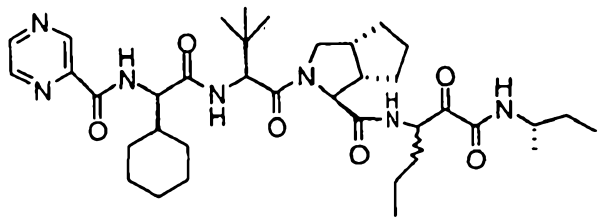
實例17-化合物BW-CA：

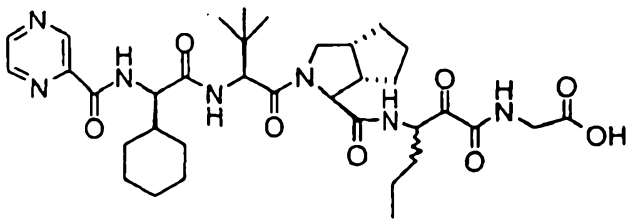
於化合物lxxxix(420毫克，0.62毫莫耳)之二氯甲烷溶液(20毫升)中，添加DMP試劑(342毫克，0.81毫莫耳)。將此反應物於約室溫下攪拌1小時，並以10% Na_2SO_3使反應淬

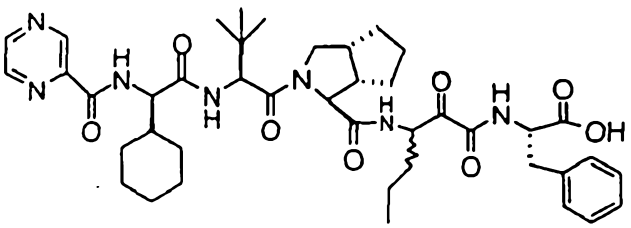
減，歷經20分鐘。接著將所形成之混合物以EtOAc萃取。有機層以鹽水洗滌，脫水乾燥，及在真空中濃縮。將所形成之殘留物藉矽膠層析純化(80% EtOAc/己烷)，獲得208毫克(50%)化合物BW，

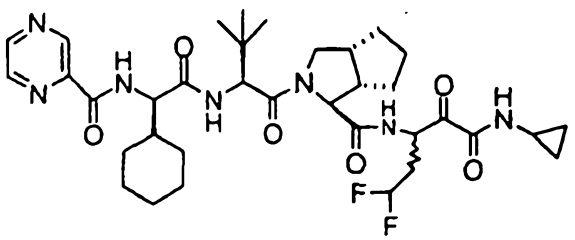


按照上述方法，但使用適當起始物質，製備下列連續化合物BX-CA：



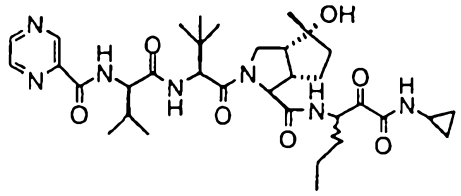




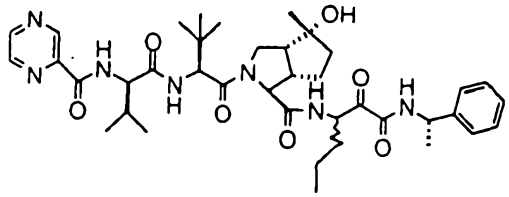


實例18-化合物CB-CC：

於化合物lxxxvii(200毫克，0.3毫莫耳)之二氯甲烷溶液(6.5毫升)中，添加DMP試劑(227毫克，0.54毫莫耳)。將此反應物於約室溫下攪拌2小時，並以10% Na_2SO_3(水溶液)使反應淬滅，歷經20分鐘。將所形成之混合物以EtOAc萃取。有機層以鹽水洗滌，以$MgSO_4$脫水乾燥，及濃縮成黃色油。藉矽膠層析(5% EtOH/EtOAc)純化，產生138毫克(70%)化合物CB，

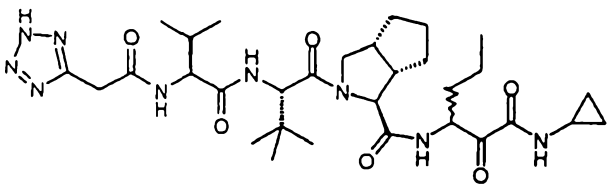


按照上述方法，但使用適當起始物質，製備下列化合物CC：



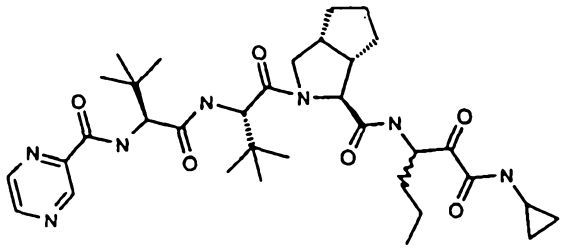
實例19-化合物CD：

使化合物lxxxxviii(40毫克，0.05毫莫耳)溶於TFA(3毫升)中。將此溶液攪拌兩夜，及濃縮。於逆相HPLC上純化殘留物，獲得25毫克(74%)化合物CD，



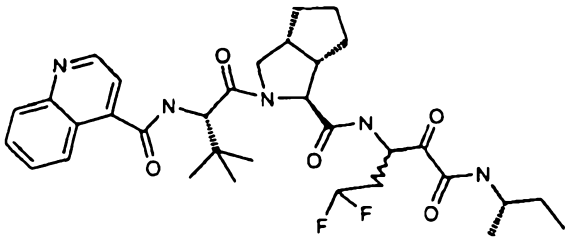
實例20-化合物CE：

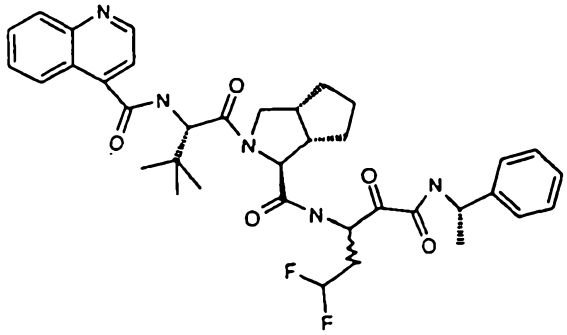
按照實例17之方法，並使用適當起始物質，製備下列化合物CE：



實例21-化合物CF-CG：

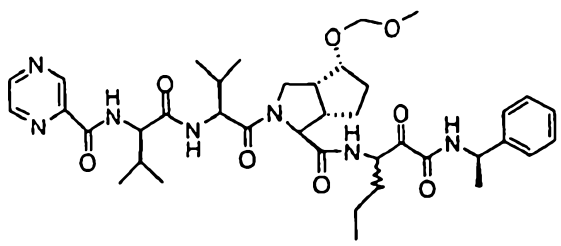
按照實例14之方法，並使用適當起始物質，製備下列連續化合物CF-CG：





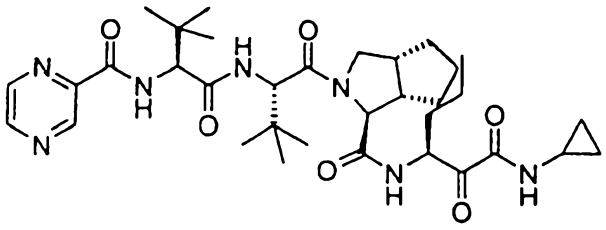
實例22-化合物CH：

按照實例16之方法，並使用適當起始物質，製備下列化合物CH：

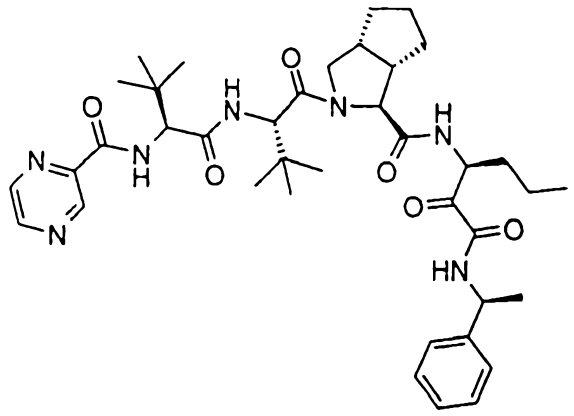


實例23-化合物CI-CM

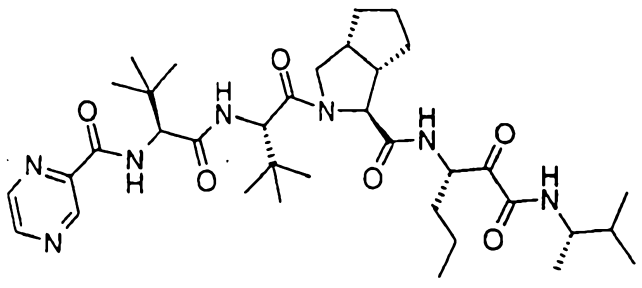
使化合物cxi(490毫克，0.75毫莫耳)溶於DCM(6毫升)中。將DMP試劑(380毫克，0.9毫莫耳)添加至此溶液中，並攪拌1小時。以10% Na_2SO_3溶液，使反應混合物淬滅，接著將有機相以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。在濃縮有機相之後，將所形成之殘留物，藉由70% EtOAc/己烷，以層析方式純化，產生化合物CI(325毫克，66.4%)。



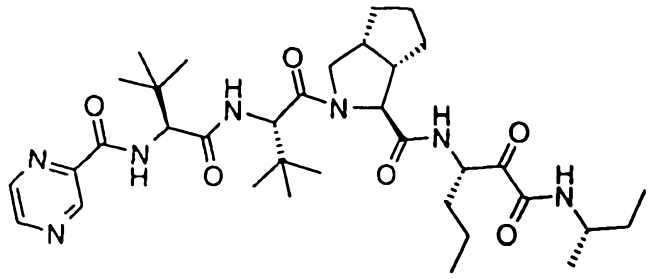
按照上述關於製備上述化合物之方法，及相關於製備其中間物之方法，但使用適當起始物質，製備下列連續化合物CJ-CM：



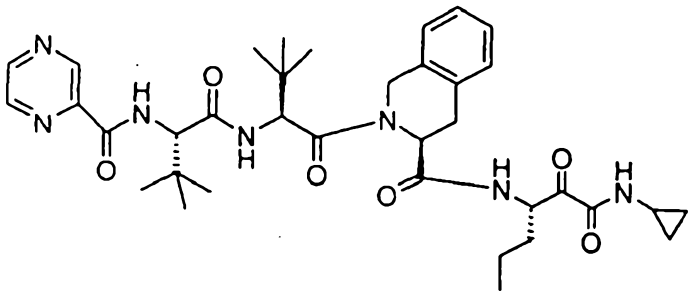
;



;

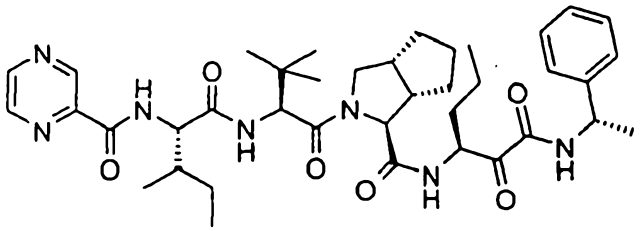


; and



實例24-化合物CN

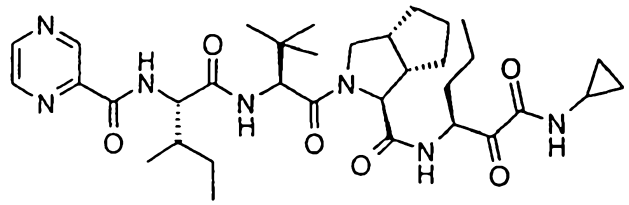
於化合物cxviii(335毫克，0.46毫莫耳)之DCM/THF溶液(3毫升/3毫升)中，添加DMP試劑(300毫克，0.69毫莫耳)。將此反應混合物於室溫下攪拌2小時，並以10% Na_2SO_3(水溶液)使反應淬滅，歷經20分鐘。將所形成之混合物以EtOAc萃取。有機相以鹽水洗滌，以$MgSO_4$脫水乾燥，及濃縮而產生黃色油。藉矽膠層析(80% EtOAc/己烷)純化，產生化合物CN(220毫克，67%)。



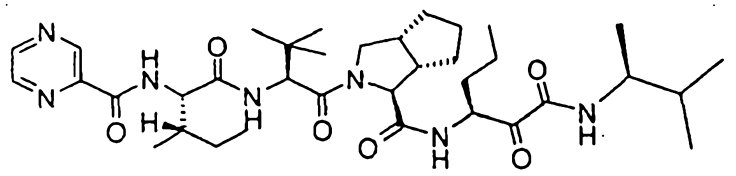
實例25-化合物CO-CR

於化合物cxix(164毫克，0.25毫莫耳)之DCM/THF溶液(1.5毫升/1.5毫升)中，添加DMP試劑(159毫克，0.38毫莫耳)。將此反應混合物於室溫下攪拌2小時，並以10%

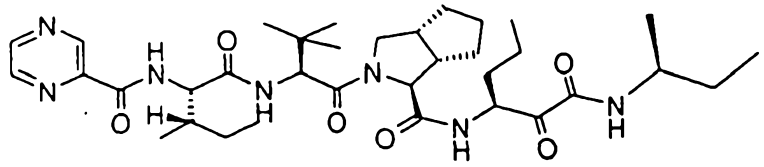
Na_2SO_3(水溶液)使反應淬滅，歷經20分鐘。將所形成之混合物以EtOAc萃取。有機相以鹽水洗滌，以$MgSO_4$脫水乾燥，及濃縮成黃色油。藉矽膠層析(70% EtOAc/己烷)純化，產生化合物CO (100毫克，61%)。



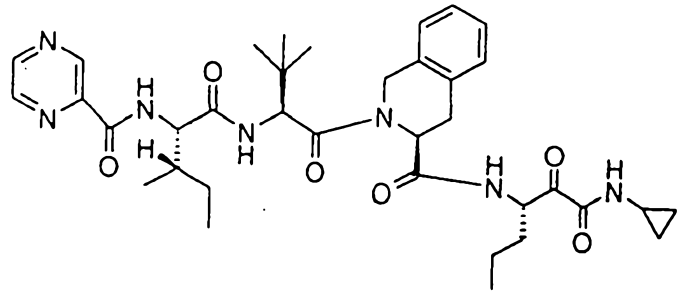
按照上述關於製備上述化合物之方法，及相關於製備其中間物之方法，但使用適當起始物質，製備下列連續化合物CP-CR：



；



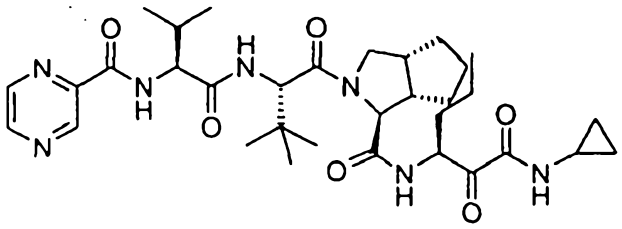
：及



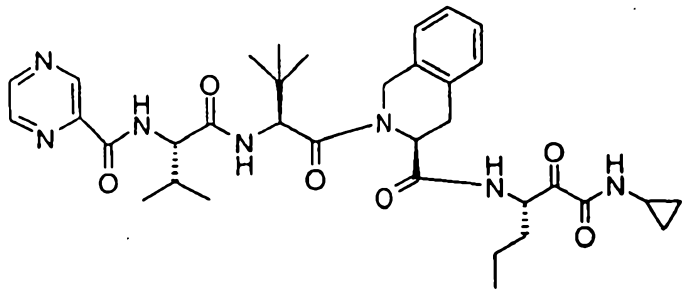
實例26-化合物CS-CT

使化合物cxx溶於DCM(3毫升)中。將DMP試劑(180毫

克，0.41毫莫耳)添加至溶液中，然後攪拌1小時。以10% Na_2SO_3使反應混合物淬滅，然後將有機相以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。在濃縮有機相之後，殘留物藉由100% EtOAc以層析方式純化，產生化合物CS(95毫克，43.7%)。

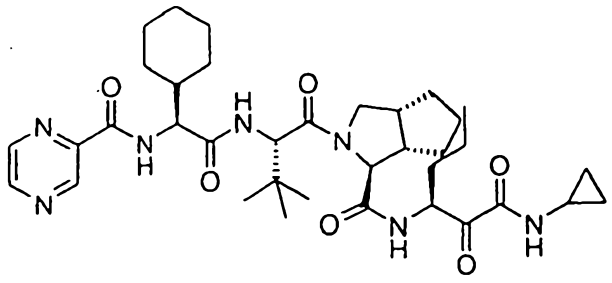


按照上述關於製備上述化合物之方法，及相關於製備其中間物之方法，但使用適當起始物質，製備下列化合物CT：

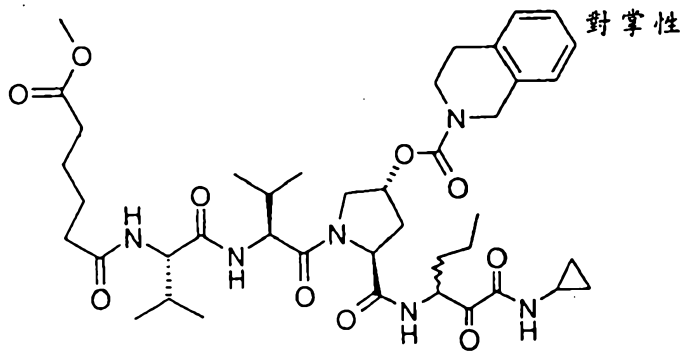


實例27-化合物CU、EI、EK-EM、EO-EZ及FA-FG

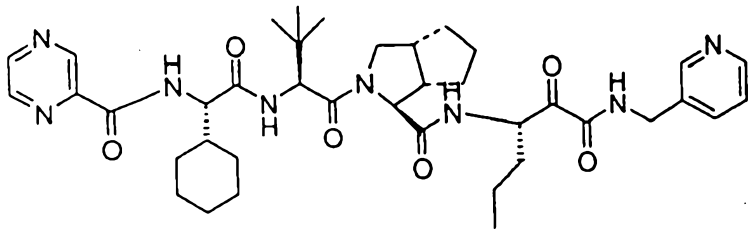
使化合物cxxviii(356毫克，0.52毫莫耳)溶於DCM(5毫升)中。將DMP試劑(270毫克，0.63毫莫耳)添加至此溶液中，並攪拌1小時。以10% Na_2SO_3使反應混合物淬滅，接著分離有機相，並以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。在濃縮有機溶劑之後，殘留物藉由100% EtOAc以層析方式純化，產生化合物CU (200毫克，56.3%)。熔點225-235℃。



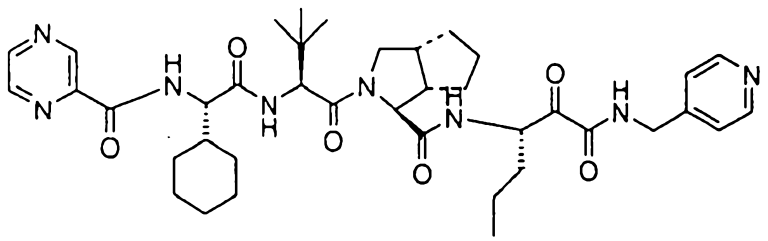
按照上述關於製備上述化合物之方法，及相關於製備其中間物之方法，但使用適當起始物質，製備下列連續化合物EI、EK-EM、EO-EZ及FA-FH：



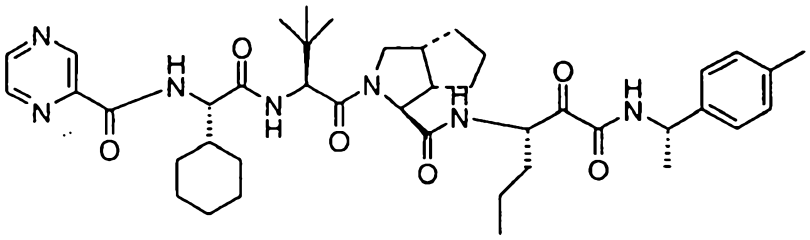
EI,



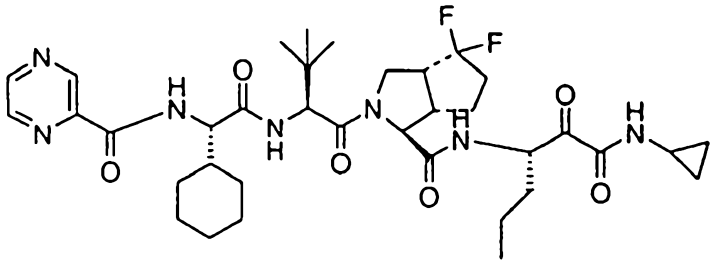
EK



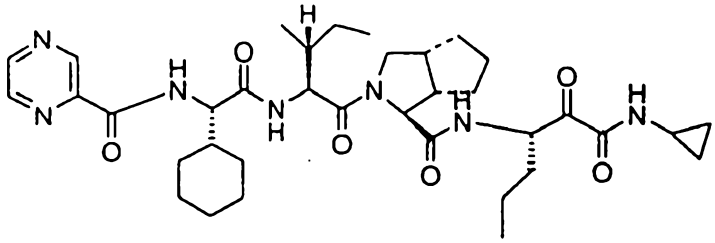
EL,



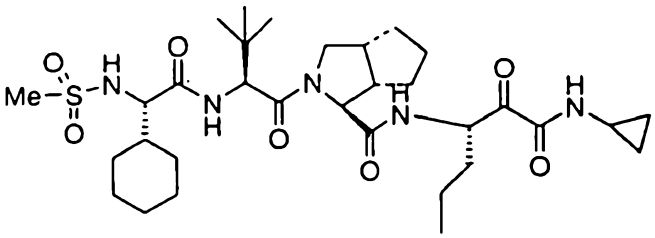
EM,



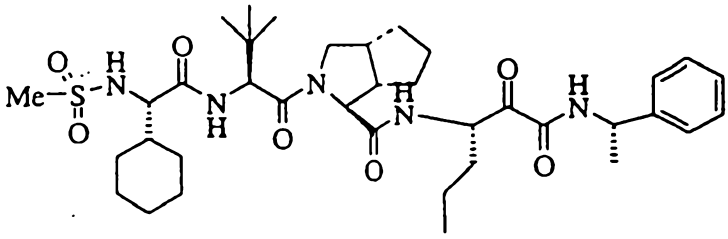
EO,



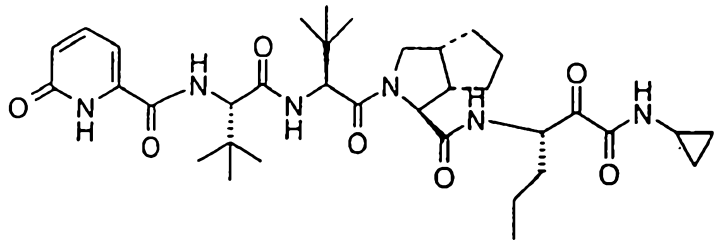
EP,



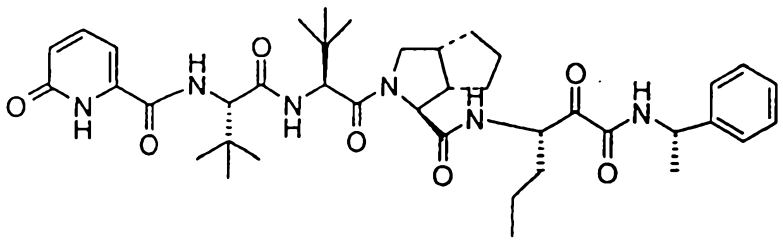
EQ,



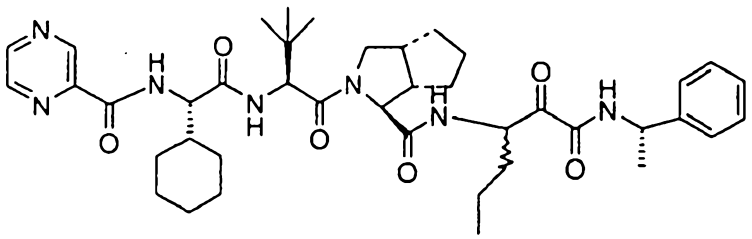
ER,



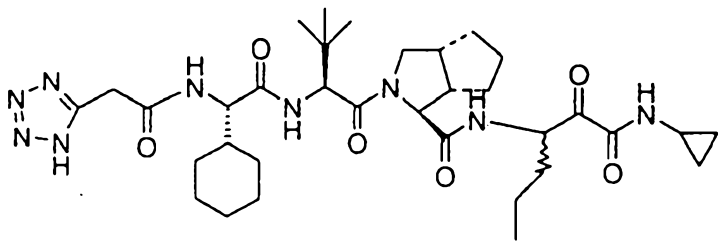
ES,



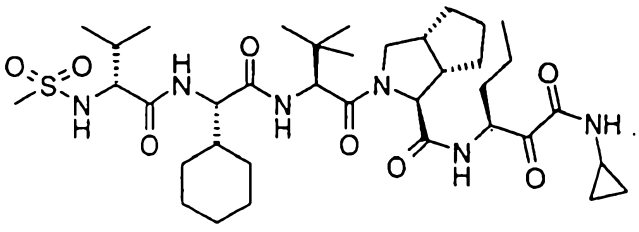
ET,



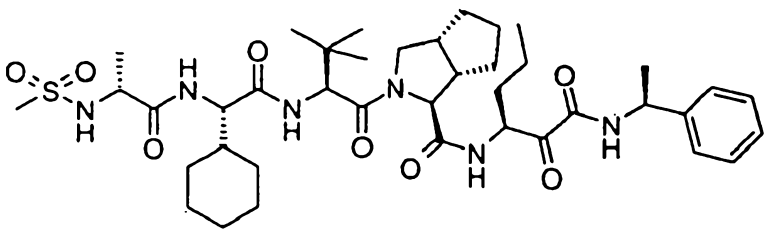
EU,



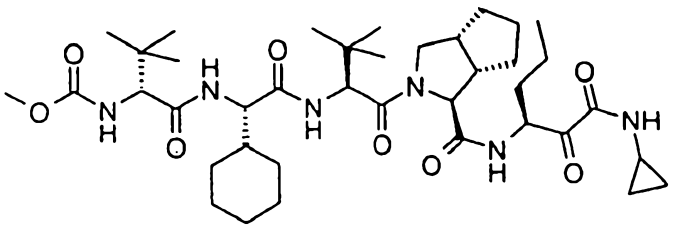
EV,



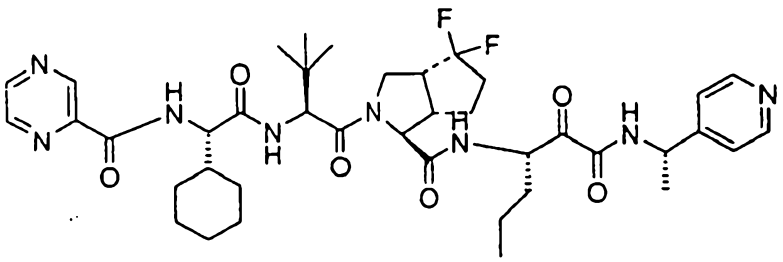
EW,



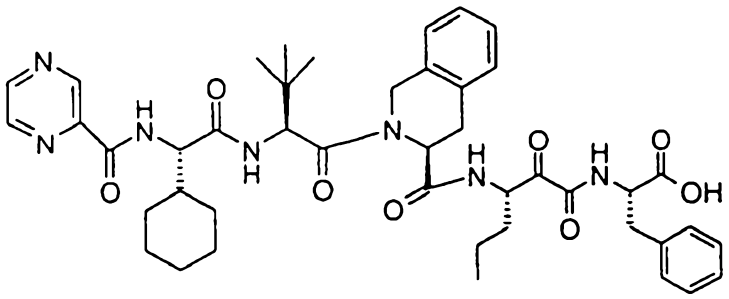
EX,



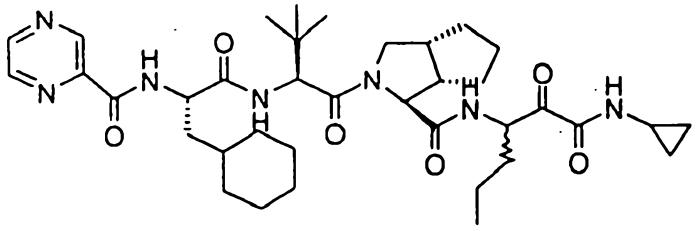
EY,



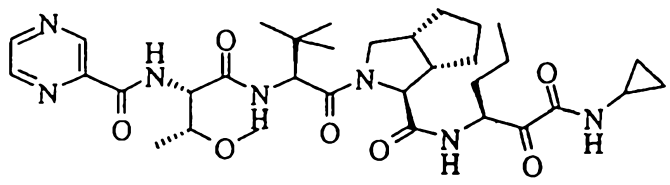
EZ,



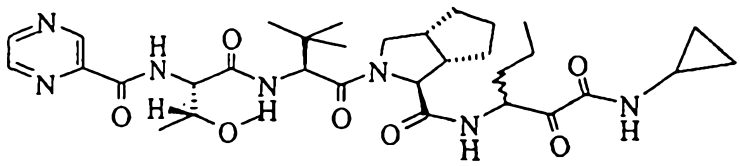
FA,



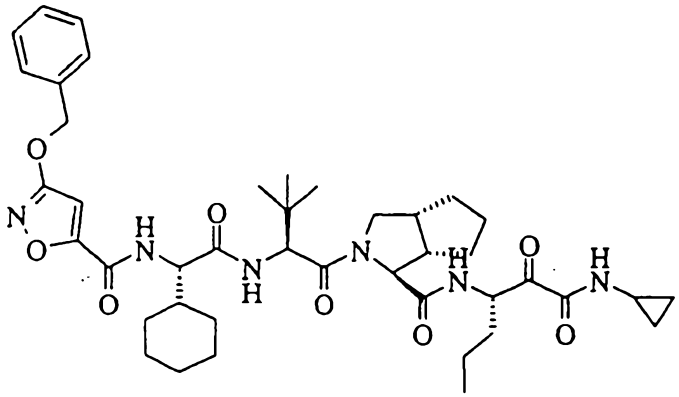
FB,



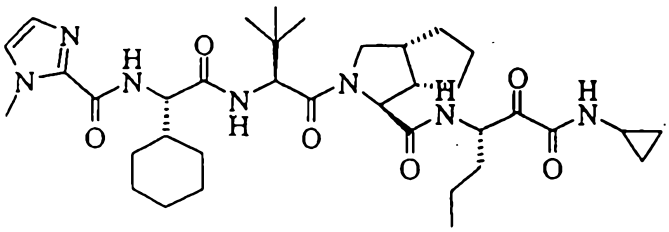
FC,



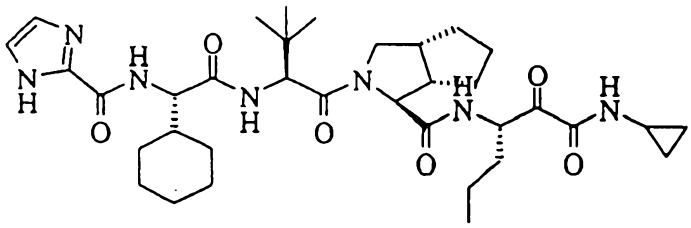
FD,



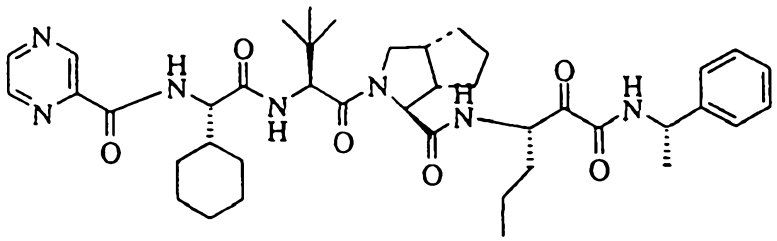
FE,



FF,



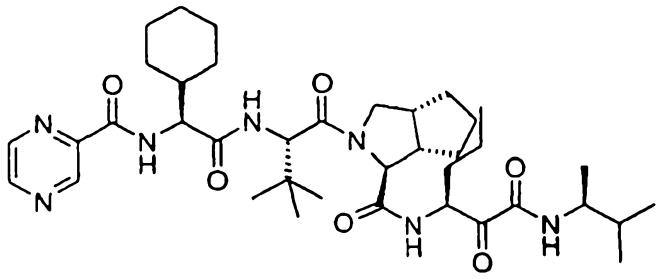
FG, 及



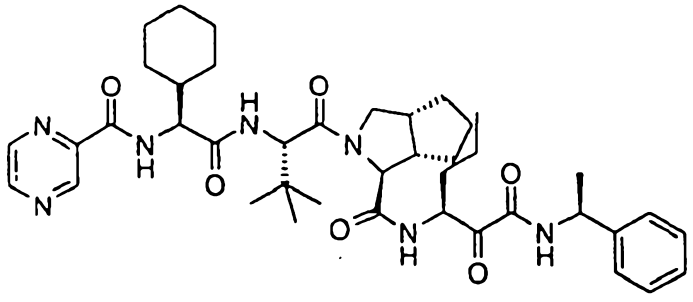
FH.

實例28-化合物CV-DC

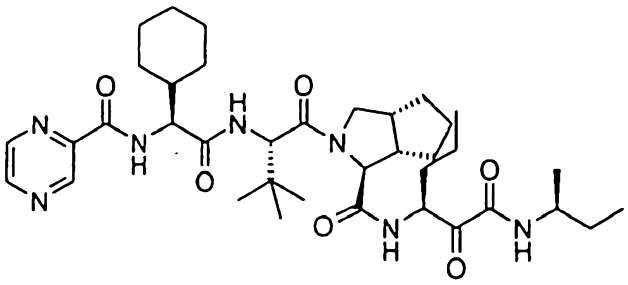
使化合物cxxx(330毫克，0.46毫莫耳)溶於DCM(5毫升)中。將DMP試劑(240毫克，0.56毫莫耳)添加至此溶液中，並攪拌1小時。以10% Na_2SO_3使反應混合物淬滅，並將有機相以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。在濃縮有機相之後，將所形成之殘留物藉由100% EtOAc以層析方式純化，產生化合物cxxx (280毫克，85.9%)。



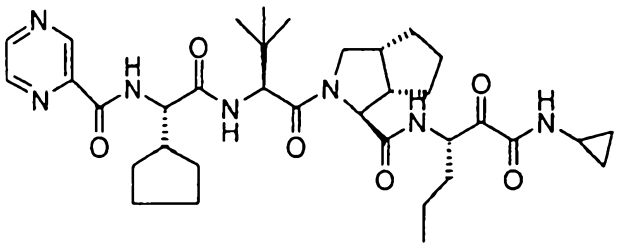
按照上述關於製備上述化合物之方法，及相關於製備其中間物之方法，但使用適當起始物質，製備下列連續化合物CW-DC：



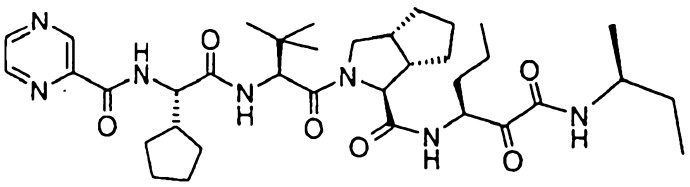
;



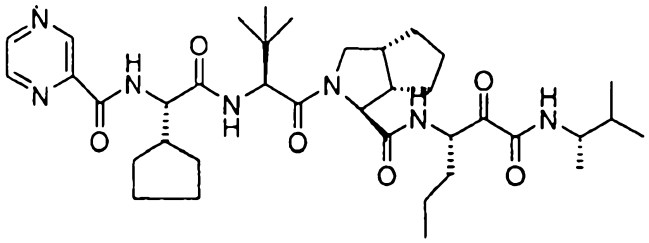
;



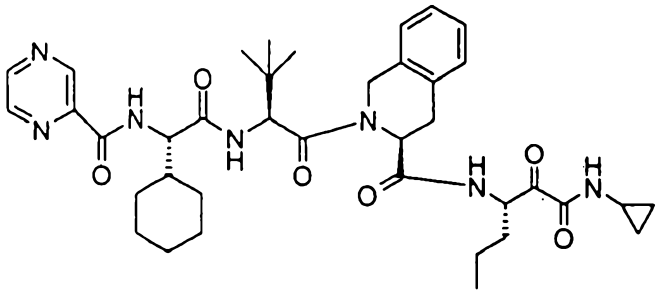
;



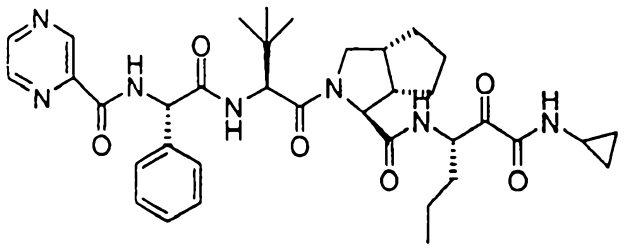
;



;

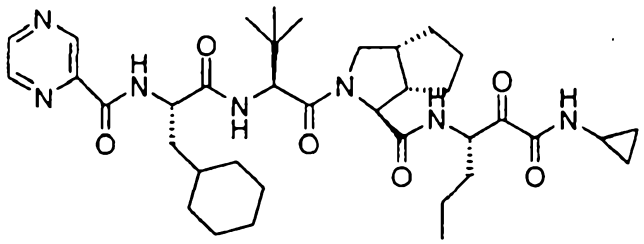


；及

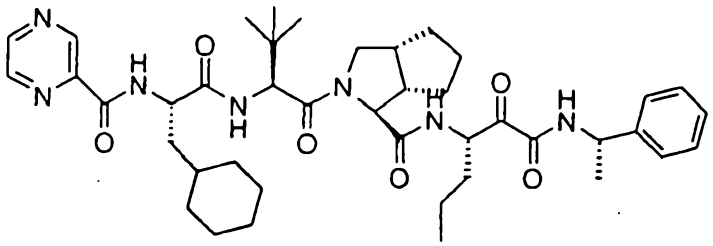


實例29-化合物DD-DE

於化合物cxxxviii(400毫克，0.57毫莫耳)之DCM溶液(6毫升)中，添加DMP試劑(362毫克，0.85毫莫耳)。將此反應混合物於室溫下攪拌2小時，並以10% Na_2SO_3(水溶液)使反應淬滅，歷經20分鐘。以EtOAc萃取所形成之混合物。將所萃取之有機相以鹽水洗滌，以$MgSO_4$脫水乾燥，及濃縮而產生黃色油。藉由矽膠(70% EtOAc/己烷)純化，產生化合物DD (201毫克，51%)。



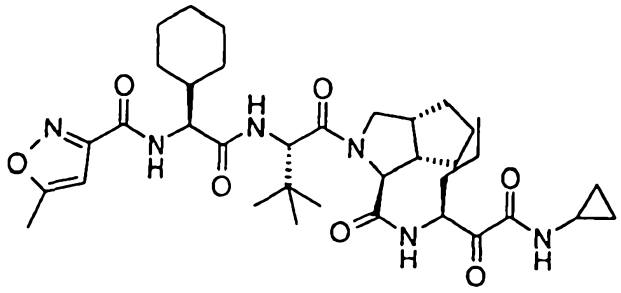
按照上述關於製備上述化合物之方法，及相關於製備其中間物之方法，但使用適當起始物質，製備下列化合物DE：



實例30-化合物DF

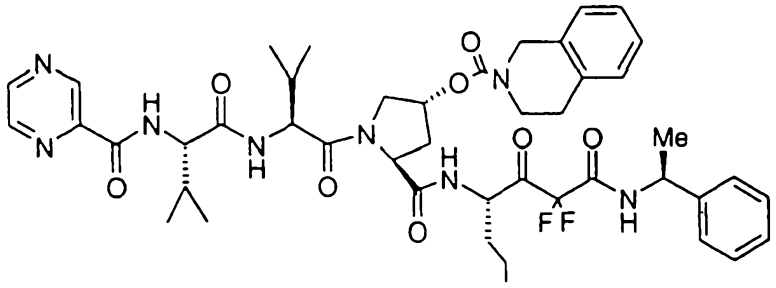
使化合物cxxxxiii(165毫克，0.24毫莫耳)溶於DCM(5毫升)中。將DMP試劑(125毫克，0.29毫莫耳)添加至此溶液中，並攪拌1小時。以10% Na_2SO_3使反應混合物淬滅，並將有機相以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。在濃縮有機相之

後，將所形成之殘留物藉由70% EtOAc/己烷，以層析方式純化，產生化合物DF(108毫克，65.6%)。

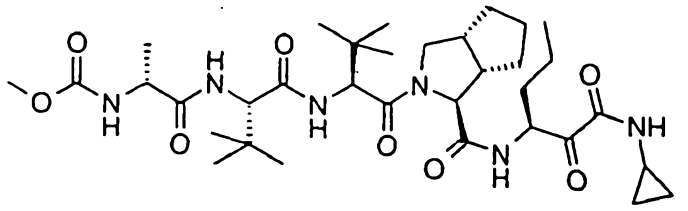


實例31-化合物DG-DJ

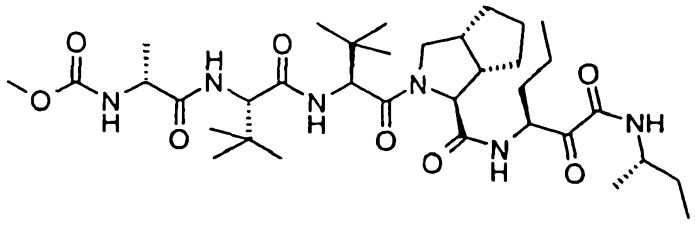
於化合物cil(0.350克，0.516毫莫耳)在DCM(15毫升)中，藉由冰浴冷卻之溶液內，添加DMP試劑(0.281克，0.671毫莫耳)。將混合物於室溫下攪拌2小時，然後以10% Na_2SO_3溶液，使反應淬滅並攪拌20分鐘。將所形成之混合物以DCM (3x20毫升)萃取，並使有機萃液脫水乾燥($MgSO_4$)。在過濾以移除$MgSO_4$之後，使濾液濃縮，並藉管柱層析純化(70%醋酸乙酯/己烷)，產生最後化合物DG(0.265克，76%)，為白色固體。



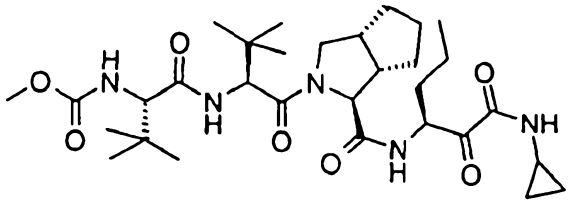
按照上述關於製備上述化合物之方法，及相關於製備其中間物之方法，但使用適當起始物質，製備下列連續化合物DH-DJ：



;



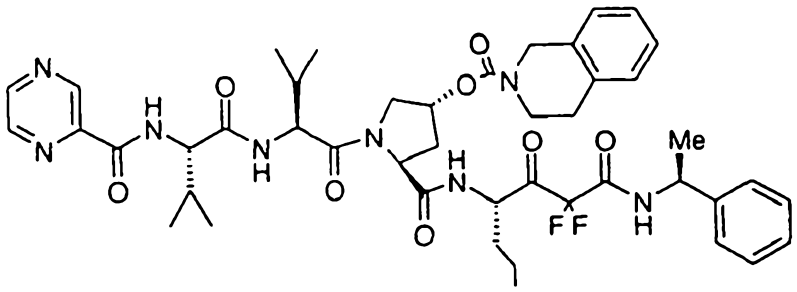
；及



.

實例32-化合物DK-DN

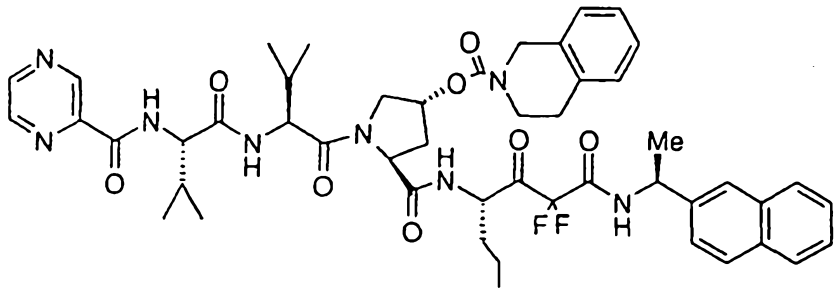
將化合物clx(108毫克，0.123毫莫耳)之DCM溶液，以DMP試劑(78毫克，0.185毫莫耳)處理。在室溫下攪拌1小時後，以EtOAc(50毫升)稀釋反應混合物，然後以10% Na_2SO_3使反應淬滅。在攪拌30分鐘後，分離有機相，並以$NaHCO_3$與鹽水洗滌。使有機相脫水乾燥及在真空中濃縮，獲得殘留物，將其藉矽膠層析純化(80% EtOAc/己烷)，產生化合物DK (84毫克，78%)。



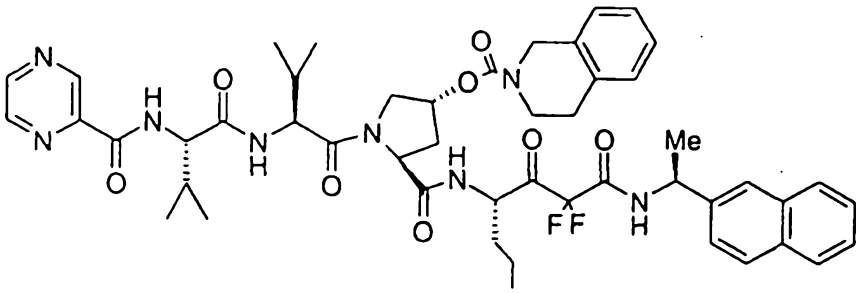
.

按照上述關於製備上述化合物之方法，及相關於製備其中間物之方法，但使用適當起始物質，製備下列化合物

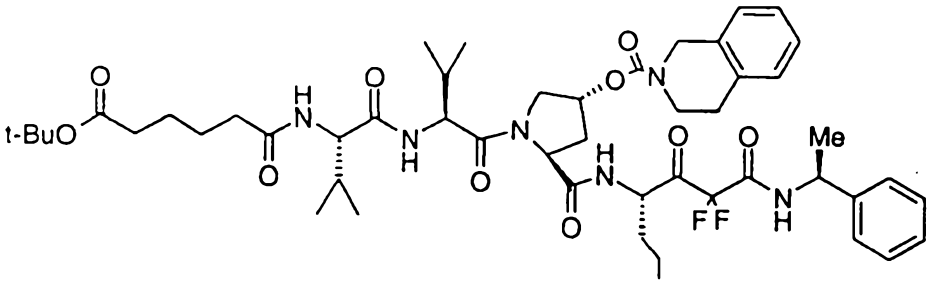
DL-DN。



；

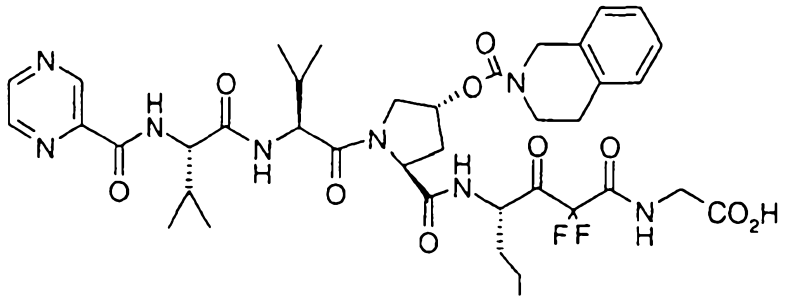


；及

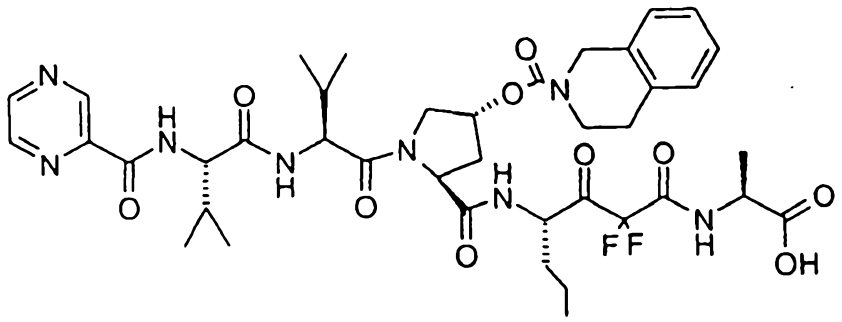


實例33-化合物DO-DS

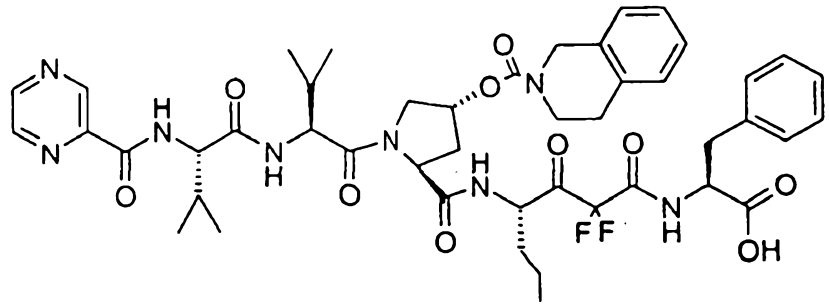
將化合物clxii(174毫克，0.189毫莫耳)之EtOH溶液(10毫升)，使用Pd/C(30%當量，60毫克，10%鈀含量)氫化2.5小時。然後，濾出觸媒。將所形成之濾液在真空中濃縮，產生殘留物，使其藉半預備逆相層析純化，並凍乾，而得化合物DO，70%產率。



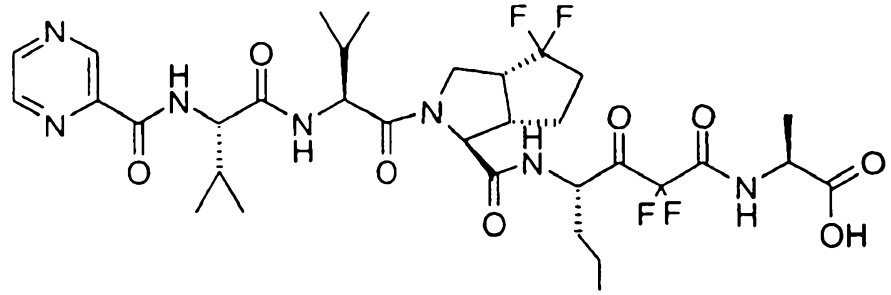
按照上述關於製備上述化合物之方法，及相關於製備其中間物之方法，但使用適當起始物質，製備下列連續化合物DP-DS。



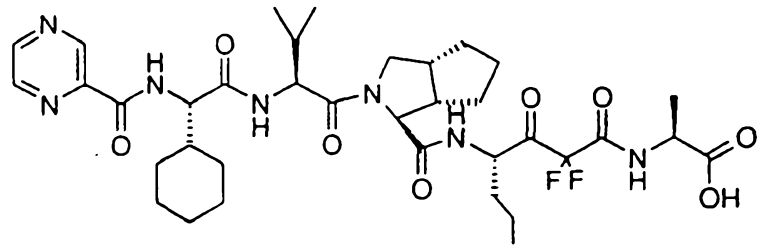
；



；



；及



實例34-化合物CW：

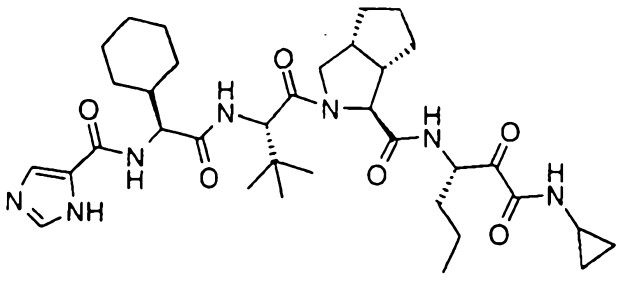
使化合物clxiii(175毫克，0.24毫莫耳)溶於DCM(3毫升)

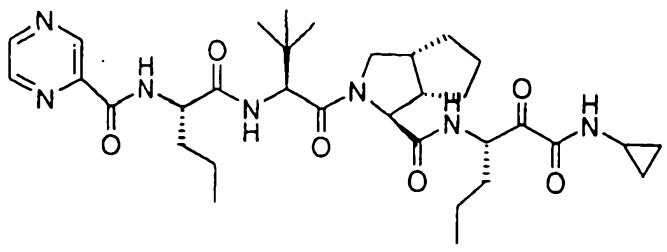
中。將DMP試劑(120毫克，0.28毫莫耳)添加至此溶液中，並攪拌1小時。以10% Na_2SO_3使反應淬滅，並以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。藉由70% EtOAc純化，產生化合物CW(134毫克，75%)。

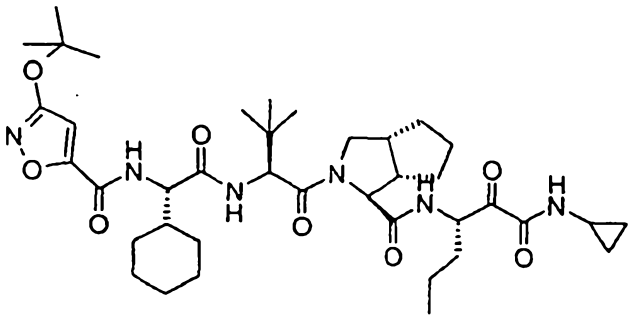
實例35-化合物CY與DT-DX：

於clxxii(290毫克，0.43毫莫耳)之DCM溶液(15毫升)中，添加DMP試劑(239毫克，0.56毫莫耳)。將反應物於室溫下攪拌1小時，並以10% Na_2SO_3使反應淬滅，歷經20分鐘。接著將所形成之混合物以EtOAc萃取。有機層以鹽水洗滌，脫水乾燥，及在真空中濃縮。將所形成之殘留物藉矽膠層析純化(8-100% EtOAc/己烷)，獲得化合物CY(151毫克，52%)。

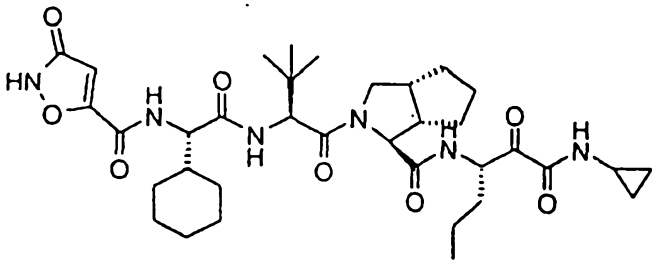
按照上述關於製備上述化合物之方法，及相關於製備其中間物之方法，但使用適當起始物質，製備下列連續化合物DT-DX。



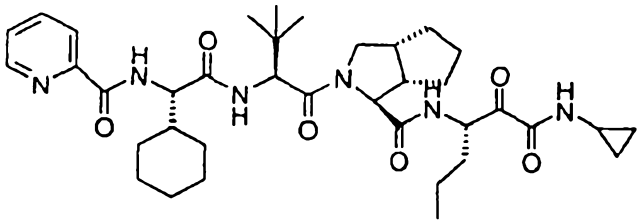




;



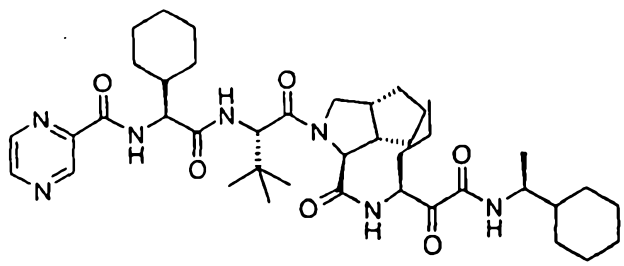
；及



實例36-化合物DY：

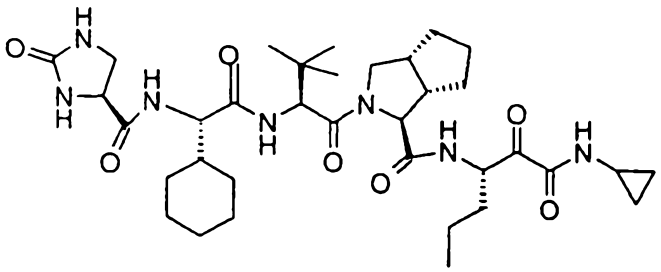
使化合物lxxxv(1.17毫莫耳)溶於DCM(5毫升)中。將DMP試劑(545毫克，1.3毫莫耳)添加至此溶液中，並攪拌1小時。以P-Na_2SO_3(1.5毫莫耳/克樹脂)使反應淬滅，並攪拌一小時。添加P-TBD清除劑樹脂*(2.5毫莫耳/克樹脂)，並攪拌45分鐘。過濾所形成之混合物，並藉由50% EtOAc純化，獲得化合物DY(440毫克，50.2%，歷經兩個步驟)。

*關於P-TBD清除劑樹脂之參考資料：J.Parlow等人，**Tetrahedron**, 55,6785-6796(1999)。



實例37-化合物DZ：

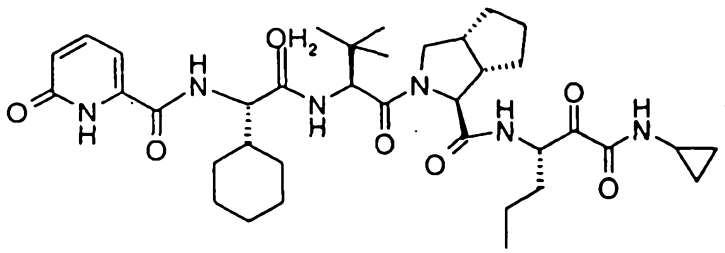
使起始物質化合物clxxxxi(94毫克，0.14毫莫耳)溶於THF (10毫升)與DCM(20毫升)之混合物中。然後，添加DMP試劑(118毫克，0.28毫莫耳)。在室溫下攪拌2小時後，將反應傾倒於含有Dri Solv THF(120毫升)之分液漏斗中。將反應物以10% Na_2SO_3(50毫升)，然後以鹽水(75毫升)洗滌。接著，使有機層分離，以$MgSO_4$脫水乾燥，及在減壓下移除溶劑。於層析(矽膠：以50% Dri Solv THF/EtOAc，然後以4% MeOH/THF溶離)後，藉MS查核溶離份。使適當溶離份凍乾，產生化合物DZ(38.8毫克，41%)。



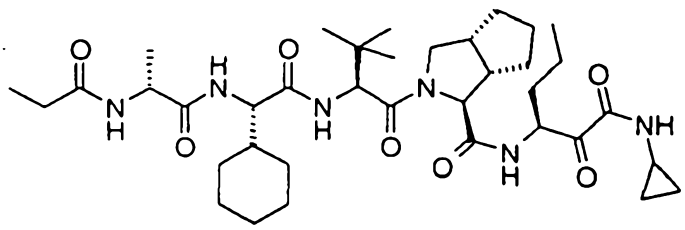
實例38-化合物EA-EB：

使起始化合物clxxxxv(185毫克，0.26毫莫耳)溶於THF(20毫升)中。然後，添加DMP試劑(219毫克，0.52毫莫耳)。在室溫下攪拌1小時後。TLC顯示完全轉化成酮(5% MeOH/THF)。將反應物傾倒於含有Dri Solv THF(120毫升)之分液漏斗中。將反應物以10% Na_2SO_3(50毫升)，然後以鹽水(75毫升)洗滌。接著，分離有機層，以$MgSO_4$脫水乾燥，及藉由減壓移除溶劑，產生殘留物，使其藉層析純化

(矽膠：以50% Dri Solv THF/EtOAc，然後以4% MeOH/THF溶離)，及藉UV與MS查核溶離份。使適當溶離份凍乾，產生化合物EA(159毫克，88%)。

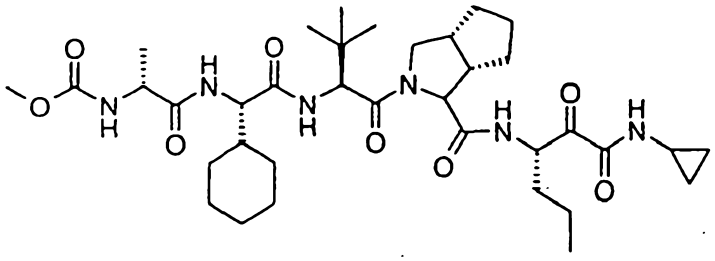


按照上述關於製備上述化合物之方法，及相關於製備其中間物之方法，但使用適當起始物質，製備下列化合物EB：

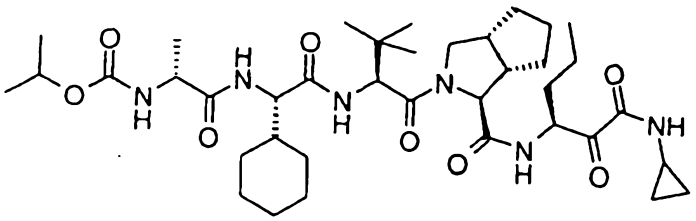


實例39-化合物EC-ED：

於化合物clxxxxviii(0.341克，0.503毫莫耳)在DCM(15毫升)中，於冰浴中冷卻之溶液內，添加DMP試劑(0.277克，0.654毫莫耳)。將混合物於室溫下攪拌2小時，然後以10% Na_2SO_3溶液使反應淬滅，並攪拌20分鐘。將所形成之混合物以DCM(3x20毫升)萃取，並使有機萃液脫水乾燥($MgSO_4$)。在過濾以移除$MgSO_4$後，使濾液濃縮，並藉管柱層析純化(70% EtOAc/己烷)，獲得化合物EC(0.183克，54%)，為白色固體。

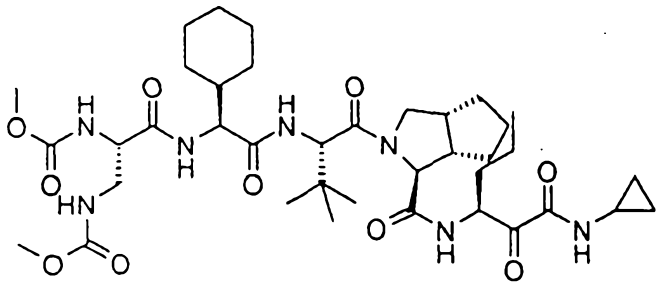


按照上述關於製備上述化合物之方法，及相關於製備其中間物之方法，但使用適當起始物質，製備下列化合物ED：

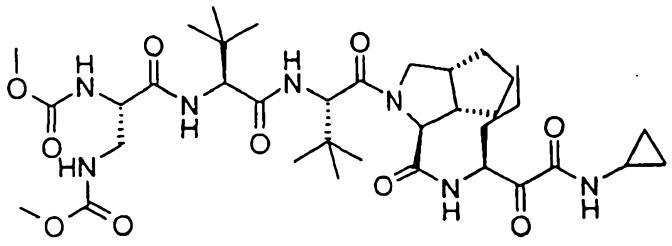


實例40-化合物EE-EG：

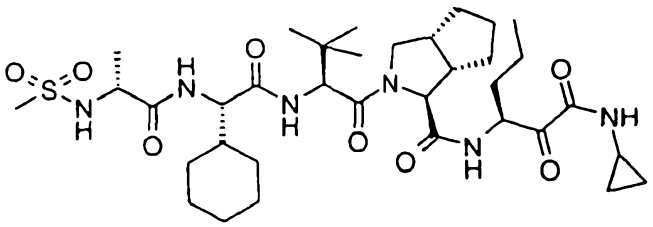
使化合物ccii(290毫克，0.37毫莫耳)溶於DCM(5毫升)中。將DMP試劑(175毫克，0.41毫莫耳)添加至此溶液中，並攪拌1小時。以P-Na_2SO_3(1.5毫莫耳/克樹脂)使反應淬滅，並攪拌1小時。將已淬滅之DMP試劑，以P-TBD(2.5毫莫耳/克樹脂)清除，並攪拌1小時。在濃縮成殘留物之前，將所形成之混合物過濾，以DCM沖洗。將所形成之殘留物藉由50% EtOAc/hex純化，產生化合物EE(440毫克，28%)。



按照上述關於製備上述化合物之方法，及相關於製備其中間物之方法，但使用適當起始物質，製備下列化合物EF-EG：

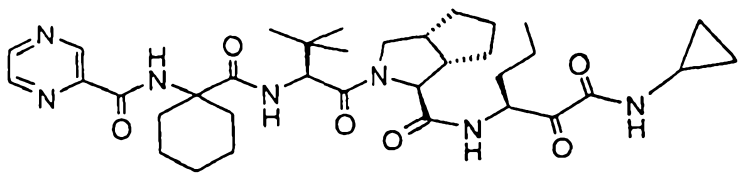


；與



實例41-化合物EH：

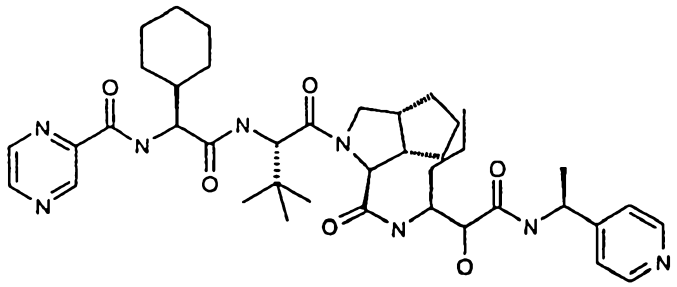
於化合物cciii(140毫克，0.2毫莫耳)之DCM溶液(3毫升)中，添加DMP試劑(133毫克，0.3毫莫耳)。將反應物於室溫下攪拌2小時，並以10% Na_2SO_3(水溶液)使反應淬滅，歷經20分鐘。將所形成之混合物以EtOAc萃取。有機層以鹽水洗滌，以$MgSO_4$脫水乾燥，濃縮成黃色油，將其藉由矽膠(70% EtOAc/己烷)純化，並於凍乾後，產生化合物EH(50毫克，38%)。



實例42-化合物EJ

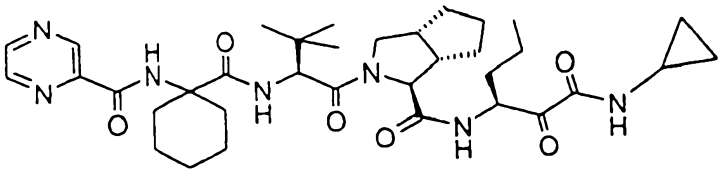
使化合物ixxxiii(520毫克，1毫莫耳)溶於DCM(5毫升)中。將PyBOP(624毫克1.2毫莫耳)添加至上述溶液中，並

攪拌5分鐘。將在THF(5毫升)中之化合物cdviii(300毫克，1.2毫莫耳)逐滴添加至此溶液中，接著為DIPEA(0.22毫升，1.2毫莫耳)。將反應物於室溫及氮氣下攪拌過夜。此時，將反應物以EtOAc稀釋，以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。有機相以$MgSO_4$脫水乾燥，過濾及濃縮，而得粗製偶合中間物cdix。



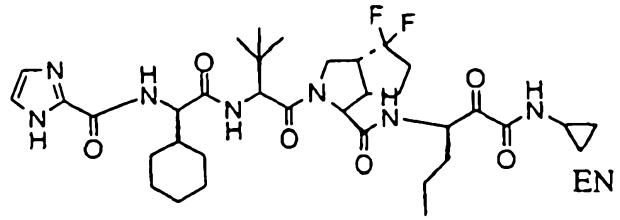
cdix

使此中間物cdix (~1毫莫耳)溶於DCM(10毫升)中。將Dess-Martin過碘烷(466毫克，1.1毫莫耳)添加至此溶液中。在室溫下攪拌1小時後，以聚合體結合之Na_2SO_3(740毫克，1.5毫莫耳DMP/克樹脂)使反應淬滅，並攪拌45分鐘。然後，將反應混合物以聚合體結合之TBD樹脂(440毫克，2.5毫莫耳DMP/克樹脂)去雜。將所形成之混合物攪拌45分鐘，然後過濾。在5% EtOH/ EtOAc中達成純化，產生化合物EJ(245毫克，32%，歷經2個步驟)。關於處理程序之文獻參考資料，可參閱Tetrahedron 55 (1999) 6785-6796。



實例43-化合物EN

使中間化合物cdvii(415毫克，0.59毫莫耳)溶於DCM(10毫升)與THF(10毫升)中。添加t-BuOH(300微升)，接著為Dess-Martin過碘烷(750毫克，1.77毫莫耳)。將反應物攪拌50分鐘，然後以P-Na_2SO_3(1.5毫莫耳DMP/克樹脂)使反應淬滅。於室溫下攪拌20分鐘後，以P-TBD(2.5毫莫耳DMP/克樹脂)，使反應混合物去雜。攪拌1小時後，將所形成之混合物過濾及濃縮。產物藉矽膠層析純化(50%至70% EtOAc/己烷)，產生化合物EN(220毫克，53%)。



對於下列化合物獲得質譜[M]，如下表1中所示。

表1

LY#	實例	實測之質量
	A	733.3
	B	747.2
	C	657.2
	D	769.4
	E	733.4
	F	625.4
	G	639.3
	H	661.4
	I	643.4
	J	707.3
	K	641.3

L	689.3
M	639.3
N	639.4
O	731.4
P	687.4
Q	653.4
R	701.4
S	639.3
T	747.1
U	655.4
V	653.4
W	703.4
X	661.3
Y	647.3
Z	663.3
AA	667.4
AB	711.4
AC	725.4
AD	647.3
AE	779.4
AF	689.3
AG	671.4
AK	806.4
AH	687.5
AI	735.4
AJ	736.5
AM	870.4
AN	813.3
AP	724.4
AQ	653.4
AR	628.2
AW	642.2

AX	614.2
AY	628.3
BD	570.3
BE	520.2
BF	534.3
BG	584.3
BU	890.3
BV	685.4
BW	679.3
BX	695.3
BY	697.3
BZ	787.4
CA	701.3
CB	669.4
CC	733.5
CD	643.3
CE	653.5
CH	749.4
CI	653.3
CJ	717.5
CK	683.4
CL	669.3
CM	675.2
CN	717.2
CO	653.3
CP	683.3
CQ	669.3
CR	675.2
CT	661.8
CS	639.3
CU	679.2
CV	709.3

CW	743.3
CX	695.3
CY	665.2
CZ	681.3
DA	695.3
DB	701.2
DC	673.3
DD	693.3
DE	757.4
DF	682.3
DG	676.3
DH	676.2
DI	692.5
DJ	605.2
DK	874.4
DL	924.5
DM	924.2
DN	952.7
DO	830
DP	842.5
DT	667.4
DU	639.2
DV	740.3
DW	684.2
DX	678.5
DY	749.3
DZ	685.3
EA	649.3
EB	700.3
EC	702.3
ED	730.3
EE	775.3

EF	749.3
EG	722.3
EH	665.2
EI	796.4
EJ	744.3
EK	730.5
EL	730.5
EM	757.3
EN	703.5
EO	715.5
EP	679.2
EQ	651.3
ER	715.3
ES	668.5
ET	732.5
EU	743.3
EV	683.3
EW	750.4
EX	786.4
EY	744.5
EZ	780.4
FB	693.4
FC	655.3
FD	655.3
FE	774.4
FF	681.5
FG	667.5

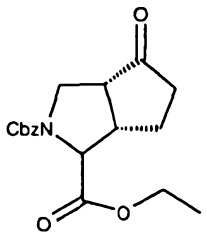
獲得下列化合物之高解析度質譜(HRMS)，係如表2中所示。

表 2

實例	分子式 (M+1)	計算之MS (M+1)	實測之質量 (M+1)
L	C37H52N7O6	690.3979	690.3986
M	C33H50N7O6	640.3822	640.3822
Z	C32H48F2N7O6	664.3634	664.3627
AB	C36H48F2N7O6	712.3634	712.3649
CE	C34H52N7O6	654.3979	654.3967
EN	C35H52N7O6F2	704.3947	704.3945
EK	C37H63N6O8S	751.4428	750.4350 (M)
EC	C36H59N6O8	703.4395	703.4382
CA	C35H50N7O6F2	702.3790	702.3801
EZ	C40H55N8O6F2	781.4213	781.4196
EU	C36H52N7O6F2	716.3947	716.3929
CY	C35H52N7O6	666.3979	666.3966
BX	C37H58N7O6	696.4448	696.4432
S	C33H50N7O6	640.3823	640.3831
BW	C36H54N7O6	680.4136	680.4126
CU	C36H54N7O6	680.4136	680.4128
EJ	C40H57N8O6	745.4401	745.4417
EM	C35H54N7O6	668.4136	668.4139
無	C41H58N7O6	744.4448	744.4691

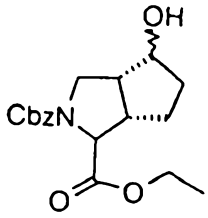
中間物實例1-化合物ii

於化合物i(8.1克，24.4毫莫耳)之乙醇溶液(40毫升)中，在-10℃下添加$NaBH_4$(924毫克，24.4毫莫耳)。



i

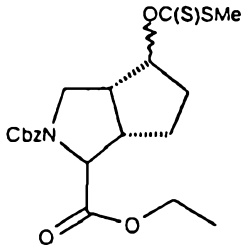
將反應物在該溫度下攪拌30分鐘，然後以AcOH(3毫升)使反應淬滅。將反應混合物以EtOAc(250毫升)稀釋，並以$NaHCO_3$與鹽水洗滌。使有機層脫水乾燥，及在真空中濃縮，產生殘留物，將其藉矽膠層析純化(50% EtOAc/己烷)，以提供7.85克(97%)化合物ii，



ii

中間物實例2-化合物iii

於化合物ii(4.48克，13.4毫莫耳)之THF溶液(70毫升)中，在0℃下添加NaH(699毫克，60%，17.42毫莫耳)。在該溫度下攪拌40分鐘後，添加純MeI(1.25毫升，20.1毫莫耳)。將此反應物於約室溫下攪拌過夜。此時，小心地以飽和NH_4Cl溶液，在0℃下，使反應淬滅。將反應混合物以Et_2O與EtOAc萃取。有機層以水與鹽水洗滌，並以Na_2SO_4脫水乾燥。將如此獲得之有機層在真空中濃縮，以提供黃酸酯化合物iii，

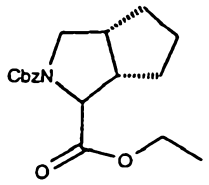


iii

中間物實例3-化合物iv

使黃酸酯化合物iii(~13.4毫莫耳)溶於甲苯(100毫升)中。於此溶液中添加AIBN(216毫克，1.34毫莫耳)。將所形成之溶液以乾燥氮脫氣，然後以n-Bu_3SnH(5.4毫升，20.1毫莫耳)處理。將反應混合物在90℃下加熱3小時。此時，使反應物冷卻至室溫，及在真空中濃縮。將所形成之

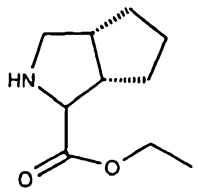
殘留物以矽膠層析純化(15-20% EtOAc/己烷)，提供2.8克(得自化合物ii，整體為66%)化合物iv，



iv

中間物實例4-化合物v

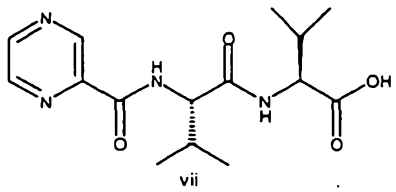
於化合物iv(1克，3.15毫莫耳)之乙醇溶液(21毫升)中，在氮氣流下，添加$Pd(OH)_2/C$(655毫克，20%，0.95毫莫耳)。使所形成之反應混合物接受標準氫化作用(1.5大氣壓)。5小時後，移除氫來源，並將反應物過濾。於真空中濃縮濾液，提供自由態胺化合物v，



v

中間物實例5-化合物vi

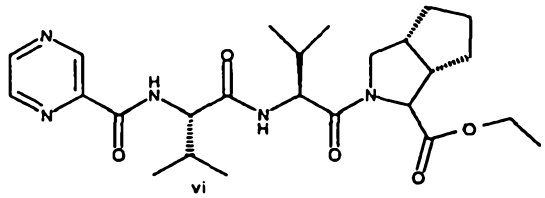
於化合物vii(629毫克，1.95毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)中，在約室溫下



vii

添加HOAt(265毫克，1.95毫莫耳)，及接著為在DCM中之1 M DCC溶液(1.95毫升，1.95毫莫耳)。攪拌30分鐘後，

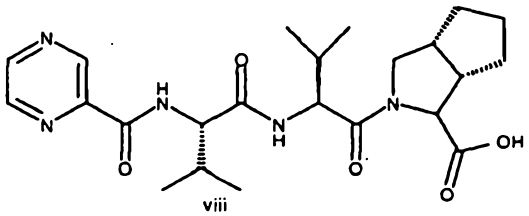
將化合物v(1.5毫莫耳)之DCM溶液(3毫升)添加至上述HOAt活化之酸中。將此反應物於約室溫下攪拌過夜。此時，使反應物經過矽藻土過濾。將濾液以EtOAc(75毫升)稀釋，並以水及鹽水洗滌。使有機層脫水乾燥，及在真空中濃縮。所形成之殘留物藉矽膠層析純化(70-80% EtOAc/己烷)，而得620毫克(85%)化合物vi，



vi

中間物實例6-化合物viii

於化合物vi(615毫克，1.26毫莫耳)之乙醇溶液(10毫升)中，添加2 N NaOH水溶液(1.26毫升，2.52毫莫耳)。將反應物在約室溫下攪拌過夜，然後使用Dowex酸性樹脂，酸化至pH3。將固體濾除，並使濾液在真空中濃縮，而得殘留物，使其再溶解於1：1CH_3CN/H_2O中。使此溶液接受冷凍乾燥，提供495毫克(85%)化合物viii，

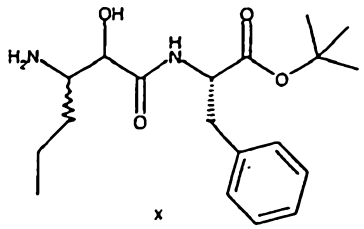


viii

中間物實例7-化合物ix

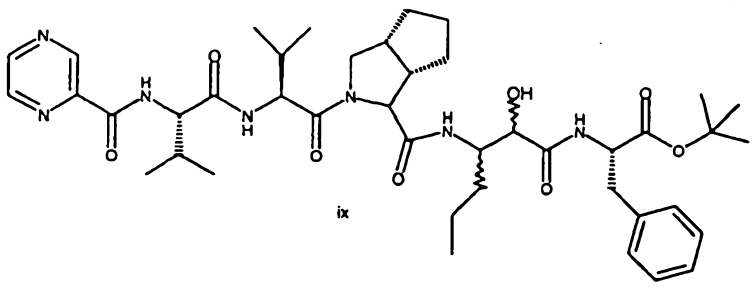
於化合物viii(230毫克，0.5毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)中，添加PyBOP(417毫克，0.8毫莫耳)。將此反應物於約室溫下攪拌30分鐘。然後，於此溶液中添加化合物x(263

毫克，0.75毫莫耳)之THF溶液(5.25毫升)，及接著



x

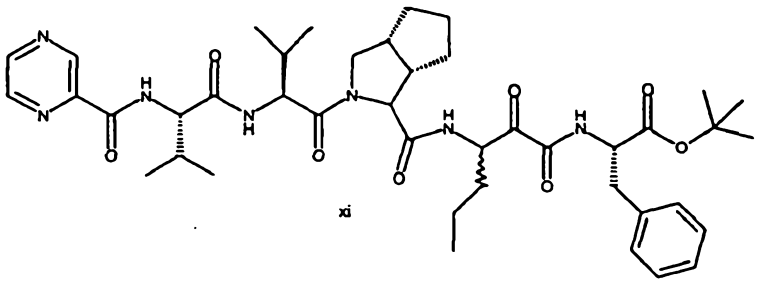
為DIPEA(0.174毫升，1毫莫耳)。將反應物於約室溫下攪拌過夜，然後以水(30毫升)，使反應淬滅，歷經30分鐘。將反應混合物以EtOAc(100毫升)萃取。有機層以鹽水洗滌並脫水乾燥，及在真空中濃縮，而得殘留物，使其經由矽膠層析純化(5% EtOH/EtOAc)，獲得~400毫克(100%)化合物ix，



ix

中間物實例8-化合物xi

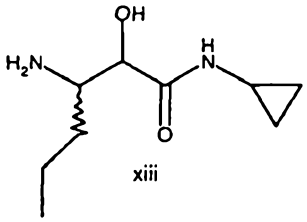
於化合物ix(396毫克，0.5毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)中，添加DMP試劑(278毫克，0.65毫莫耳)。將反應物於約室溫下攪拌1小時，然後以10% Na_2SO_3使反應淬滅，歷經30分鐘。接著將反應混合物以EtOAc(75毫升)萃取，及以鹽水洗滌。使有機層脫水乾燥，及在真空中濃縮。將所形成之殘留物以矽膠層析(70% EtOAc/己烷)純化，獲得320毫克(81%)化合物xi，



xi

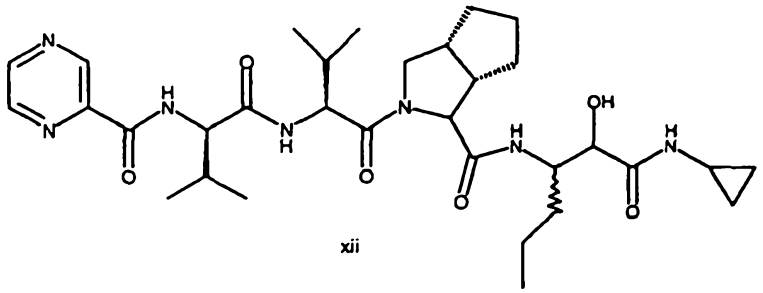
中間物實例9-化合物xii

於化合物viii(230毫克，0.5毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)中，添加PyBOP(417毫克，0.8毫莫耳)。將反應物於約室溫下攪拌30分鐘。然後，於此溶液中添加化合物xiii(140毫克，0.75毫莫耳)之THF溶液(3.5毫升)



xiii

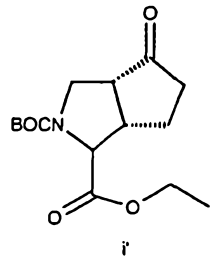
及接著為DIPEA(0.174毫升，1毫莫耳)。將此反應物於約室溫下攪拌過夜，然後以水(30毫升)使反應淬滅，歷經30分鐘。將反應混合物以EtOAc(75毫升)萃取。有機層以鹽水洗滌並脫水乾燥，及在真空中濃縮，而得殘留物，使其經由矽膠層析純化(5% EtOH/EtOAc)，以定量產率獲得化合物xii，



xii

中間物實例10-化合物i'

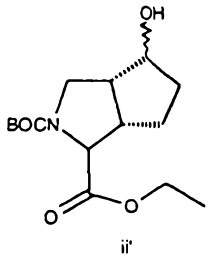
於化合物i(5克，15.1毫莫耳)之甲醇溶液(30毫升)中，添加$(BOC)_2O$(3.3克，15.1毫莫耳)與$H_2/Pd(OH)_2/C$(1.6克，10% Pd含量)。將反應物於約室溫下攪拌2小時，然後經過矽藻土過濾兩次。將矽藻土床以DCM沖洗。使合併之濾液在真空中濃縮，產生油狀殘留物，將其藉矽膠層析純化(40% EtOAc/己烷)，獲得3.8克(85%)化合物i'，



i'

中間物實例11-化合物ii'

於化合物i'(3.7克，12.5毫莫耳)之甲醇溶液(111毫升)中，在0℃下，添加$NaBH_4$(0.805克，21毫莫耳)。在0℃下，攪拌2.5小時後，於真空中慢慢地蒸發反應溶劑，產生殘留物，將其以EtOAc稀釋。然後，將此溶液以水洗滌兩次。水層以EtOAc萃取。將合併之有機層以$MgSO_4$脫水乾燥，及過濾，並在真空中濃縮，產生殘留物，將其以層析純化，提供3.76克(99%)化合物ii'，

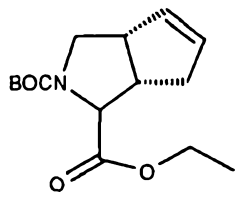


ii'

中間物實例12-化合物xiv

於化合物ii'(3.76克，12.3毫莫耳)之DCM溶液(180毫升)

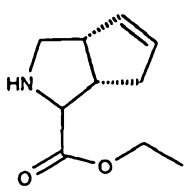
中，在0℃下添加DMAP(5克，40.1毫莫耳)，接著為Tf_2O(4毫升，23.7毫莫耳)。將反應物在0℃下攪拌1小時，及在約室溫下，再攪拌1.5小時。然後，將反應混合物以5% $NaHCO_3$洗滌兩次，並以$MgSO_4$脫水乾燥。使如此獲得之有機層在真空中濃縮，提供粗製三氟甲烷磺酸鹽。使所形成之三氟甲烷磺酸鹽(2.7克，6毫莫耳)溶於DCM(120毫升)中。於此溶液中添加DMAP(2.5克，20.5毫莫耳)。將所形成之反應混合物加熱至回流過夜。此時，使反應物冷卻至室溫，並以5% $NaHCO_3$洗滌兩次。將反應混合物以$MgSO_4$脫水乾燥，過濾，及在真空中濃縮，產生褐色油狀殘留物，使其純化(1% MeOH/DCM)獲得500毫克(30%)化合物xiv，



xiv

中間物實例13-化合物xv

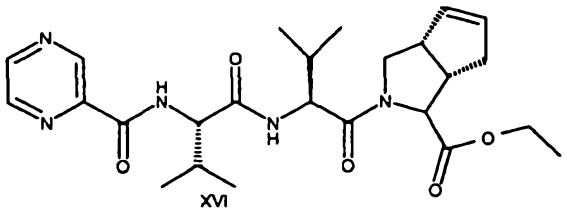
使化合物xiv(500毫克，1.8毫莫耳)溶於二氧陸圜中之4 N HCl(6.75毫升)內。將反應物於約室溫下攪拌~4小時。此時，於真空中移除溶劑。將所形成之殘留物以乙醚滴定兩次，以幾乎定量產率獲得化合物xv之HCl鹽，



XV

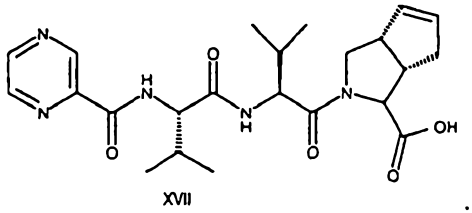
中間物實例14-化合物xvi

於化合物vii(579毫克，1.8毫莫耳)之THF溶液(7毫升)中，添加HOAt(245毫克，1.8毫莫耳)與DCC(1.8毫升，1 M在DCM中)。形成懸浮液。在約室溫下攪拌15分鐘後，將化合物xv(1.8毫莫耳)與DIPEA(0.63毫升，3.6毫莫耳)之THF溶液(6毫升)添加至上述懸浮液中。稍後添加另外之DIPEA(0.8毫升)。將反應混合物於約室溫下攪拌過夜。此時，將如此形成之白色固體濾出。以THF沖洗白色固體。將合併之濾液與洗液在真空中濃縮，而得粗產物，將其藉矽膠層析純化(100% EtOAc)，提供665毫克(76%)化合物xvi，



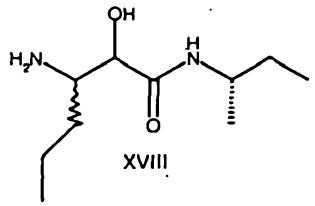
中間物實例15-化合物xvii

於7(665毫克，1.37毫莫耳)之乙醇溶液(8毫升)中，在0℃下添加1 N NaOH水溶液(2.4毫莫耳)。將反應物在約室溫下攪拌過夜，然後使用Dowex酸性樹脂酸化至pH3。將固體過濾。使所形成之濾液在真空中濃縮，而得淡黃色殘留物，使其再溶解於1：1CH_3CN/H_2O中，及凍乾而得467毫克(74%)化合物xvii，



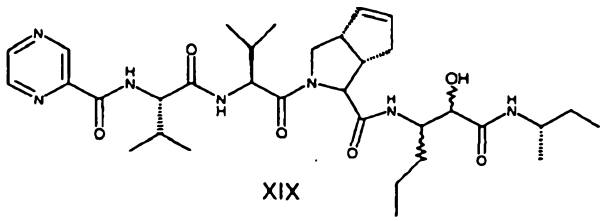
中間物實例16-化合物xix

將化合物xvii(100毫克，0.22毫莫耳)之DCM溶液(4毫升)以PyBop(207毫克，0.4毫莫耳)在約室溫下處理20分鐘。此時，將上述溶液以化合物xviii(65毫克，0.32毫莫耳)之THF溶液(2.6毫升)，接著以DIPEA(0.076毫升)處理。



XVIII

於約室溫下攪拌7小時後，以水使反應淬滅。將反應混合物以DCM(60毫升)稀釋。分離有機層，並以鹽水洗滌兩次，且以$MgSO_4$脫水乾燥。過濾，濃縮及矽膠層析(5% EtOH/ EtOAc)，獲得148毫克(~100%)化合物xix。

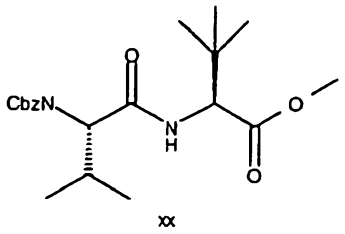


XIX

中間物實例17-化合物xx

於N-Cbz-L-纈胺酸(14.4克，57.2毫莫耳)之THF溶液(100毫升)中，添加HOBT(7.72克，57.2毫莫耳)與EDCI(10.98克，57.2毫莫耳)。於約室溫下攪拌20分鐘後，將含有第三-L-白胺酸甲酯鹽酸鹽(10.4克，57.2毫莫耳)之THF溶液(50毫升)與DIPEA (11.9毫升，68.7毫莫耳)加入上述溶液中。將此反應物於約室溫下攪拌過夜。於標準水溶液處理及矽膠層析(30% EtOAc/己烷)後，獲得14克(64%)化合物

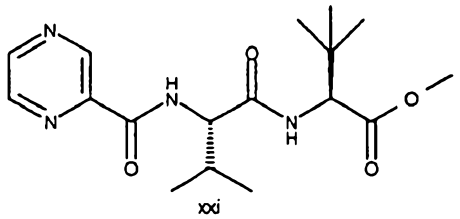
xx。



xx

中間物實例18-化合物xxi

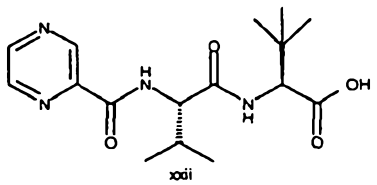
於xx(6.71克，17.7毫莫耳)之甲醇溶液(80毫升)中添加(於N_2氣流下)Pd/C(1.88克，10% Pd含量)。使反應容器，在約室溫下接受氫化作用(1大氣壓H_2)過夜。此時，將反應混合物經過矽藻土墊過濾，及在真空中濃縮，以提供其相應之粗製自由態胺，供下一步驟使用。將此胺(~17.7毫莫耳)之THF溶液，添加至THF(46毫升)與DMF(5毫升)之溶液中，其中含有2-吡咔羧酸(2.85克，23毫莫耳)、Hobbit(3.12克，23毫莫耳)及EDCI(4.41克，23毫莫耳)。然後，於所形成之混合物中，添加DIPEA(3.08克，17.7毫莫耳)。將反應物在約室溫下攪拌過夜，然後以水使反應淬滅。將反應混合物以EtOAc萃取。有機層以鹽水洗滌，及在真空中濃縮，以提供殘留物，使其藉矽膠層析純化(40-50% EtOAc/己烷)，以提供3.9克(63%)化合物xxi，



xxi

中間物實例19-化合物xxii

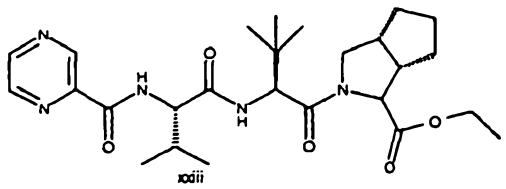
於化合物xxi(4.67克，13.34毫莫耳)之甲醇溶液(40毫升)中，添加2 N NaOH(10毫升，20毫莫耳)。將此反應物於約室溫下攪拌2小時。此時，將另一數量之2 N NaOH(3.3毫升，6.67毫莫耳)添加至此反應混合物中。於約室溫下攪拌過夜後，使用酸性樹脂將反應物酸化至pH3。然後將反應物過濾，並在真空中濃縮濾液，產生殘留物，使其溶於1：1CH_3CN/H_2O中，以供凍乾。獲得4.15克(93%)化合物xxii。



xxii

中間物實例20-化合物xxiii

將化合物xxii(917毫克，2.73毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)以HOAt(371毫克，2.73毫莫耳)與DCC(2.73毫升，1 M，2.73毫莫耳)處理。在攪拌30分鐘後，將反應混合物以化合物v (500毫克，2.73毫莫耳)之THF溶液(10毫升)處理。於約室溫下攪拌過夜後，過濾白色固體(脲)。在真空中濃縮濾液，而得殘留物，將其藉矽膠層析純化(60-70% EtOAc/己烷)，以提供1.06克(77%)化合物xxiii，

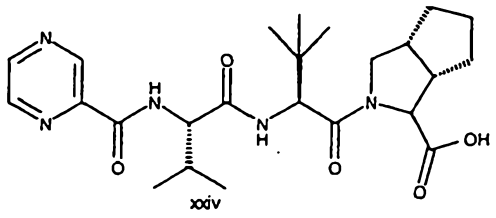


xxiii

中間物實例21-化合物xxiv

將化合物xxiii(1.06克，2.11毫莫耳)之乙醇溶液(20毫升)

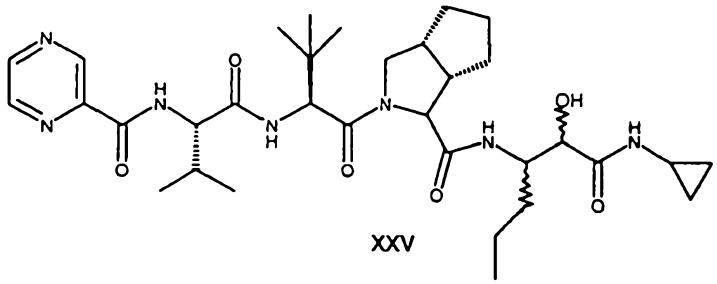
以2 N NaOH(2.11毫升，4.23毫莫耳)處理。於約室溫下攪拌過夜後，以酸性樹脂使反應混合物酸化至pH3。濾除固體。將所形成之濾液在真空中濃縮，而得殘留物，使其凍乾，獲得~1克(100%)化合物xxiv，



xxiv

中間物實例22-化合物xxv

將化合物xxiv(236.7毫克，0.5毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)以PyBop(417毫克，0.8毫莫耳)處理。於約室溫下攪拌20分鐘後，將反應混合物以化合物xiii(139.5毫克，0.75毫莫耳)之DMF溶液(5.6毫升)，接著以DIPEA(0.174毫升，1毫莫耳)處理。於約室溫下攪拌8小時後，以水使反應淬滅，並以EtOAc萃取。將所形成之有機層以鹽水洗滌，並乾燥，及在真空中濃縮，獲得殘留物，將其藉矽膠層析純化(5% EtOH/ EtOAc)而得~320毫克(100%)化合物xxv，

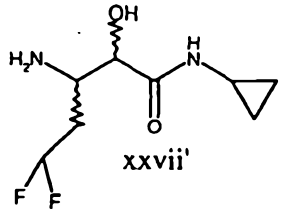


XXV

中間物實例23-化合物xxvi

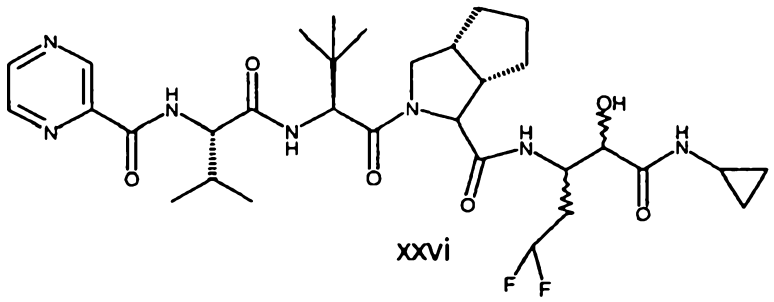
將化合物xxiv(355毫克，0.75毫莫耳)之DCM溶液(15毫升)以PyBop(622毫克，1.2毫莫耳)處理。於約室溫下攪拌

20分鐘後，將反應混合物以化合物xxvii'(156毫克，0.75毫莫耳)之THF溶液(10毫升)，接著以DIPEA(0.26毫升，1.5毫莫耳)處理。



xxvii'

於約室溫下攪拌過夜後，以水使反應淬滅，並以EtOAc萃取。將所形成之有機層以鹽水洗滌並乾燥，及在真空中濃縮，獲得殘留物，藉矽膠層析純化(2% EtOH/EtOAc)而得~400毫克(80%)化合物xxvi，



xxvi

中間物實例24-5-氰基戊酸甲酯

使氰化鉀(4克，61.44毫莫耳)溶於70毫升水與200毫升甲醇中。於此溶液中，添加10克(51.2毫莫耳)5-溴基戊酸甲酯添加，並使混合物回流過夜。將反應混合物濃縮至乾燥。於此殘留物中，添加100毫升EtOAc以萃取產物。將有機物質以水洗滌三次，脫水乾燥及濃縮，產生5.37克(74%)5-氰基戊酸甲酯，為油狀物。

中間物實例25-5-四唑-5-基戊酸甲酯

使5-氰基戊酸甲酯(4.8克，34毫莫耳)溶於甲苯中，添加

三乙基氯化銨(14克，102毫莫耳)與疊氮化鈉(6.63，102毫莫耳)。將混合物加熱至回流過夜。使反應混合物冷卻至室溫，添加水，以自有機物質中萃取(3x100毫升)5-四唑-5-基戊酸甲酯。於水相中，添加濃HCl，以調整pH至2。將產物以EtOAc(3x50毫升)，自水溶液萃取。合併有機相，脫水乾燥及濃縮，產生4.25克(68%)5-四唑-5-基戊酸甲酯。

中間物實例26-5-[N-(1,1-二甲基苄基)四唑-5-基]戊酸甲酯

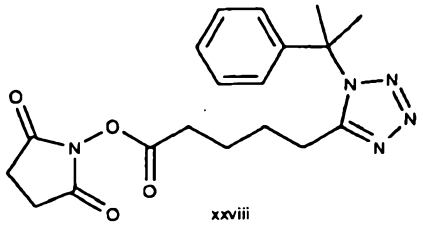
使5-四唑-5-基戊酸甲酯(4.23克，23毫莫耳)與三氯醋酸(8.69克，53毫莫耳)溶於50毫升$CDCl_3$中。將α-甲基苯乙烯(2.72,23毫莫耳)逐滴加入溶液中，並將反應混合物於約室溫下攪拌過夜。將反應混合物以EtOAc稀釋至200毫升，並將有機層以10% KOH水溶液及鹽水洗滌。使有機層脫水乾燥，濃縮。產物藉急驟式管柱層析純化，產生6.6克(95%)5-[N-(1,1-二甲基苄基)四唑-5-基]戊酸甲酯。

中間物實例27-5-[N-(1,1-二甲基苄基)四唑-5-基]戊酸

使5-[N-(1,1-二甲基苄基)四唑-5-基]戊酸甲酯(6.6克，21.8毫莫耳)溶於甲醇(100毫升)中，並添加23毫升1 N NaOH水溶液。將混合物攪拌過夜，及濃縮，以移除甲醇。使殘留物溶於水(100毫升)中，並藉由添加相同當量之1 N HCl水溶液，使溶液中和。產物以EtOAc萃取(3x50毫升)。使有機相乾燥及濃縮，產生4.75克(75%)5-[N-(1,1-二甲基苄基)四唑-5-基]戊酸。

中間物實例28-化合物xxviii

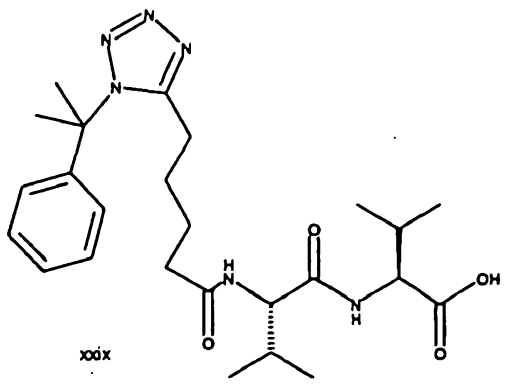
使5-[N-(1,1-二甲基苄基)四唑-5-基]戊酸(4.75克，16.5毫莫耳)溶於DCM(100毫升)中，添加4.8克(24.8毫莫耳)EDCI與6毫升DIPEA。添加N-羥基琥珀醯亞胺(3.8克，33毫莫耳)至混合物中。將反應混合物於約室溫下攪拌三小時。將混合物以DCM稀釋至200毫升，並將此溶液以水洗滌三次。使有機物質乾燥及濃縮，產生4.79克(75%)化合物xxviii，



xxviii

中間物實例29-化合物xxix

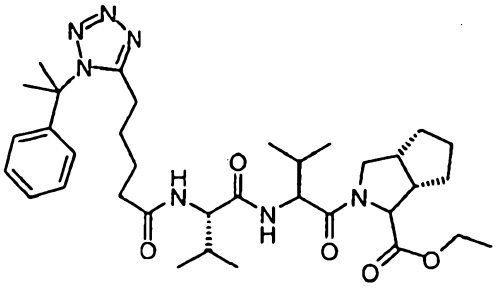
使二肽H-Val-Val-OH(3.22克，14.9毫莫耳)懸浮於50毫升N,N-二甲基甲醯胺(DMF)中，並在添加3.4毫升(18.63毫莫耳)二異丙基乙胺(DIPEA)之後，添加4.75克(12.42毫莫耳)化合物xxviii。使混合物溫熱至40℃，並攪拌過夜。在高真空下蒸發溶劑。使殘留物溶於EtOAc中，並以1 N HCl與鹽水洗滌，產生5.52克(91%)化合物xxix，



xxix

中間物實例30-化合物xxx

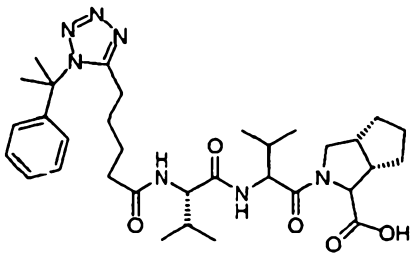
使1.6克(3.29毫莫耳)化合物xxix溶於20毫升DCM中，添加THF中之3.3毫升1 M DCC溶液。於混合物中添加500毫克(2.73毫莫耳)化合物v。將此混合物於約室溫下攪拌過夜。將混合物以EtOAc稀釋至100毫升，並以1 N HCl、$NaHCO_3$及鹽水洗滌。藉管柱層析純化(50% EtOAc/己烷)，產生1.02克(58%)化合物xxx，



xxx

中間物實例31-化合物xxxi

使化合物xxx(1.02克，1.57毫莫耳)溶於10毫升MeOH中，並添加2毫升1 N NaOH水溶液。將混合物攪拌過夜。藉蒸發移除甲醇，並使殘留物溶於水中，且以2毫升HCl中和。在以EtOAc萃取之後，獲得100克(~100%)化合物xxxi。

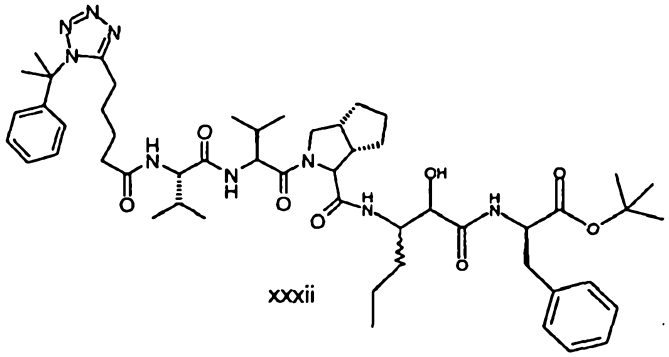


xxxi

中間物實例32-化合物xxxii

使化合物xxxi(300毫克，0.48毫莫耳)與PyBop(300毫

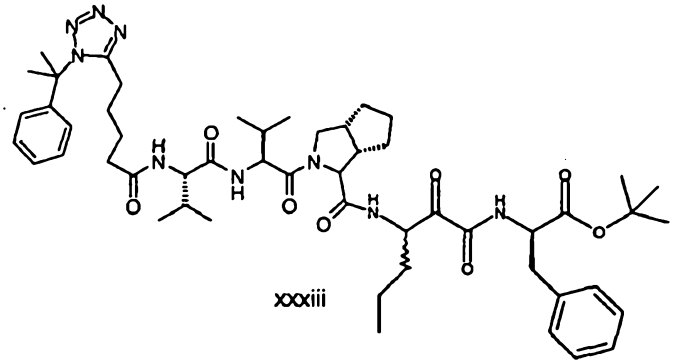
克，0.58毫莫耳)溶於10毫升DCM中。於此溶液中，添加化合物x(201毫克，0.58毫莫耳)，然後添加DIPEA(104微升)。將此混合物於約室溫下攪拌過夜。然後，將反應混合物以EtOAc稀釋至100毫升，並以1 N HCl洗滌兩次，以$NaHCO_3$兩次，及以鹽水三次。使有機物質脫水乾燥，及濃縮。殘留物藉管柱層析純化(100% EtOAc)產生450毫克(98%)化合物xxxii，



xxxii

中間物實例33-化合物xxxiii

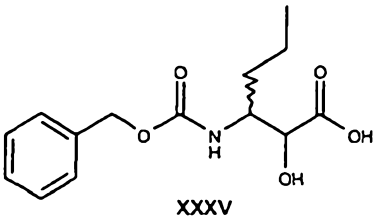
使化合物xxxii360毫克(0.38毫莫耳)溶於8毫升DCM中，並添加240毫克(0.57毫莫耳)DMP試劑。將此混合物於約室溫下攪拌三小時。將混合物以EtOAc稀釋至50毫升，並以鹽水洗滌三次。產物藉管柱層析純化(25%乙醇/EtOAc)產生300毫克(83%)化合物xxxiii，



xxxiii

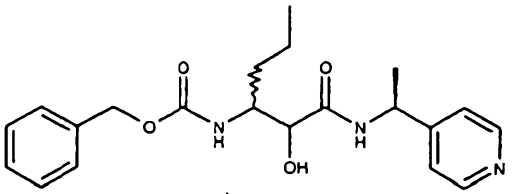
中間物實例34-化合物xxxiv

於xxxv(790毫克，2.80毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)中，添加PyBop(1.7克，3.36毫莫耳)與Hobbit(450毫克，3.36毫莫耳)。



xxxv

使所形成之溶液冷卻至0℃，並以(s)-α-(4-吡啶基)乙胺(410毫克，3.36毫莫耳)之DCM溶液(3毫升)處理。接著添加DIPEA (0.5毫升，3.36毫莫耳)。將反應物在約室溫下攪拌過夜。此時，將反應混合物以EtOAc稀釋。將整體以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。使如此獲得之有機層乾燥，及在真空中濃縮。所形成之殘留物藉矽膠層析純化(5% EtOH/EtOAc)，以提供630毫克(58%)化合物xxxiv，

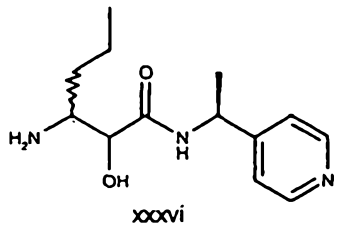


xxxiv

註：(s)-α-(4-吡啶基)乙胺係經由鹼洗(1 N NaOH)及接著EtOAc萃取，得自其D-酒石酸鹽。回收率為89%。

中間物實例35-化合物xxxvi

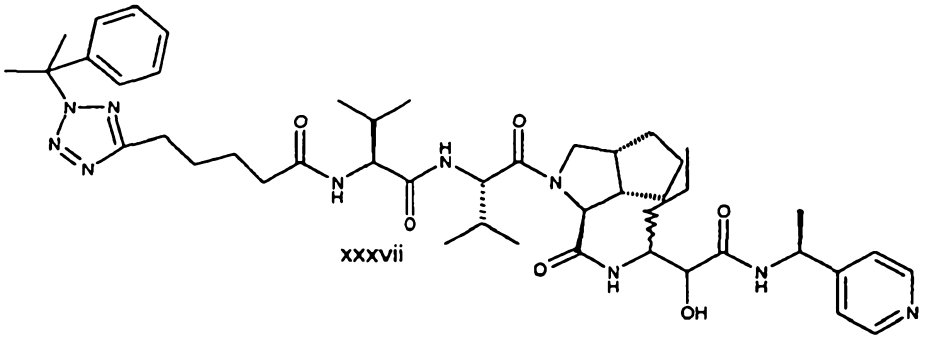
於化合物xxxiv(630毫克，1.64毫莫耳)之甲醇溶液(15毫升)中，在N_2下，添加Pd/C(150毫克，10%鈀含量)。將反應物於H_2下攪拌過夜。使反應混合物經過Celite®521墊片過濾。在真空中濃縮濾液，提供420毫克(~100%)化合物xxxvi，



xxxvi

中間物實例36-化合物xxxvii

於化合物xxxi(270毫克，0.43毫莫耳)之DCM溶液(3毫升)中，添加PyBop(270毫克，0.52毫莫耳)。接著添加化合物xxxvi(160毫克，0.64毫莫耳)與DIPEA(0.09毫升，0.52毫莫耳)。將此反應物於約室溫下攪拌過夜。此時，將反應物以EtOAc稀釋，並以0.1 N HCl，接著以飽和$NaHCO_3$及鹽水洗滌。使所形成之有機層脫水乾燥，及濃縮，而得化合物xxxvii (總質量430毫克)，以供下一步驟使用

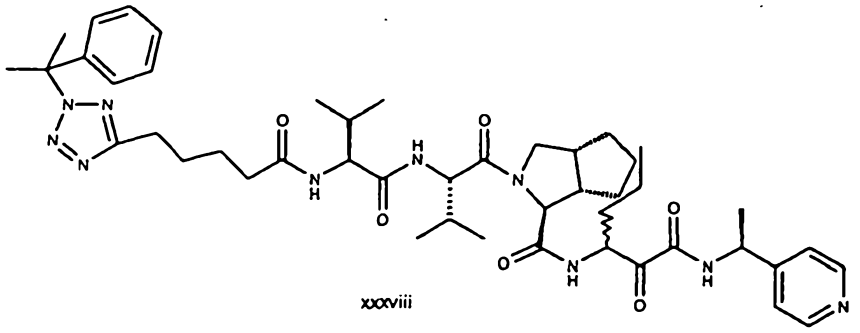


xxxvii

中間物實例37-化合物xxxviii

於化合物xxxvii(370毫克，0.43毫莫耳)之DCM溶液(3毫升)中，添加DMP試劑(280毫克，0.65毫莫耳)。將此反應物於約室溫下攪拌2小時，然後以10% Na_2SO_3使反應淬滅。在攪拌30分鐘後，將反應物以EtOAc萃取。有機層以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。使所形成之有機層乾燥，及在

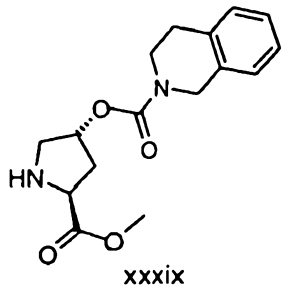
真空中濃縮，獲得殘留物，使其藉矽膠層析純化(5% EtOH/EtOAc)，提供180毫克(49%，歷經2-步驟)化合物xxxviii，



xxxviii

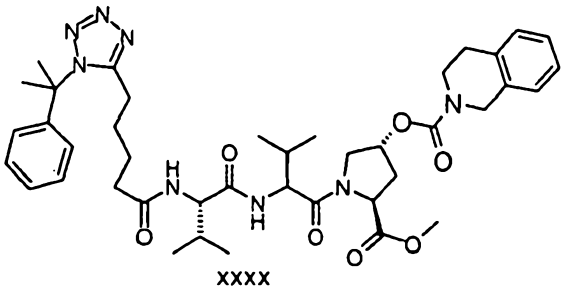
中間物實例38-化合物xxxx

使化合物xxix(2.5克，5毫莫耳)溶於40毫升DCM中，將5.1毫升1 M在THF中之DCC溶液添加至此溶液中。於此混合物中，添加1.08克(3.53毫莫耳)化合物xxxix。將此混合物於約室溫下攪拌過夜。



xxxix

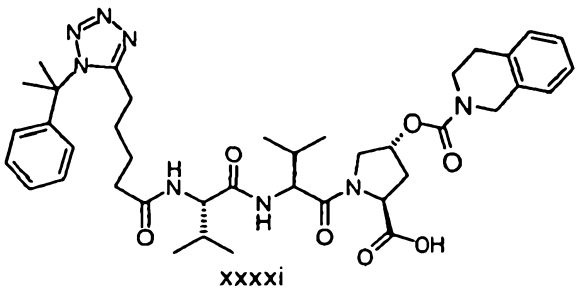
將混合物以EtOAc稀釋至100毫升，相繼以1 N HCl、$NaHCO_3$及鹽水洗滌，然後藉管柱層析純化(80% EtOAc/己烷)，產生2.59克(95%)化合物xxxx，



xxxx

中間物實例39-化合物xxxxi

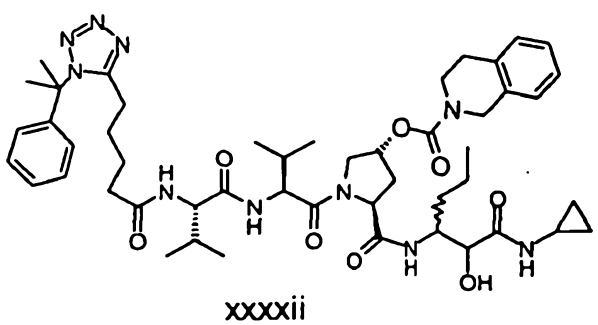
使化合物xxxx(2.59克，3.35毫莫耳)溶於20毫升MeOH中，並添加4毫升1 N NaOH水溶液。將混合物攪拌過夜，然後迴轉蒸發而留下殘留物。使殘留物溶於水中，並以2毫升HCl中和。然後，將已中和之溶液以EtOAc萃取，產生2.49克(~100%)化合物xxxxi，



xxxxi

中間物實例40-化合物xxxxii

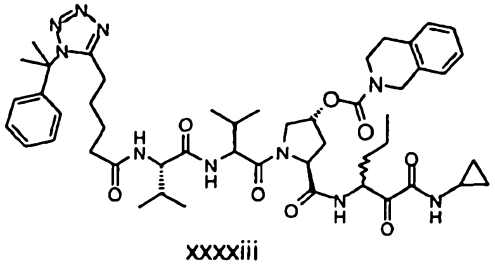
使化合物xxxxi(847毫克，1.16毫莫耳)與724毫克(1.39毫莫耳)PyBop溶於10毫升DCM中。於此溶液中，添加化合物xiii(260毫克，1.39毫莫耳)，然後添加DIPEA(209微升)。將此混合物於約室溫下攪拌過夜。接著，將反應混合物以EtOAc稀釋至100毫升，並以1 N HCl洗滌兩次，以$NaHCO_3$兩次，及以鹽水三次。使有機物質脫水乾燥及濃縮。使殘留物藉管柱層析純化(5%乙醇/EtOAc)，產生930毫克(86%)化合物xxxxii，



xxxxii

中間物實例41-化合物xxxxiii

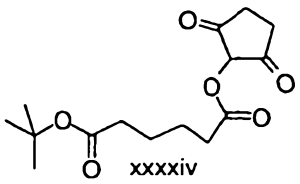
使化合物xxxxii(350毫克，0.38毫莫耳)溶於10毫升DCM中，並添加242毫克(0.57毫莫耳)DMP試劑。將此混合物於約室溫下攪拌三小時。將混合物以EtOAc稀釋至50毫升，並以鹽水洗滌三次。使產物藉管柱層析純化(100% EtOAc)產生180毫克(51%)化合物xxxxiii，



xxxxiii

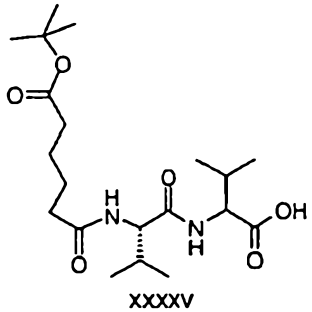
中間物實例42-化合物xxxxv

使H-Val-Val-OH(5克，23毫莫耳)懸浮於100毫升DMF中，添加化合物xxxxiv(8.3克，27.6毫莫耳)，



xxxxiv

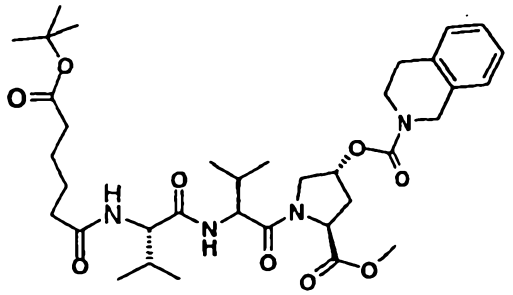
然後添加6.2毫升(35.5毫莫耳)DIPEA。將混合物於40℃下攪拌兩天。在高真空下移除溶劑，並使殘留物溶於100毫升EtOAc中，並以1 N HCl洗滌三次，及以鹽水兩次。獲得9.14克(99%)化合物xxxxv。



xxxxv

中間物實例43-化合物xxxxvi

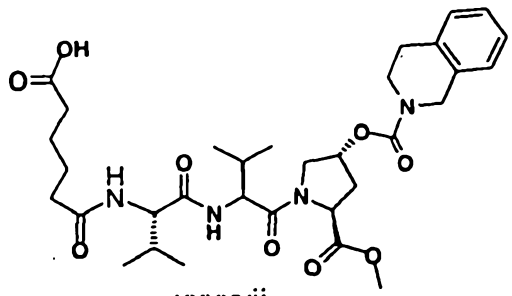
使化合物xxxxv(2.8克，7毫莫耳)與954毫克(7毫莫耳)HOAt溶於100毫升DCM中。添加7毫升1 M DCC/DCM。於此反應混合物中，添加化合物xxxix(2.15克)，並將此反應混合物於約室溫下攪拌過夜。使混合物濃縮至乾涸，並使殘留物溶於EtOAc中，及藉管柱層析純化(100% EtOAc)產生4.57克(95%)化合物xxxxvi，



xxxxvi

中間物實例44-化合物xxxxvii

使化合物xxxxvi(4.57克，6.65毫莫耳)溶於10毫升TFA與10毫升DCM中。將此混合物於約室溫下攪拌4小時。藉真空移除溶劑，並使殘留物溶於50：50乙腈/水中，及凍乾，產生粉末化合物xxxxvii，

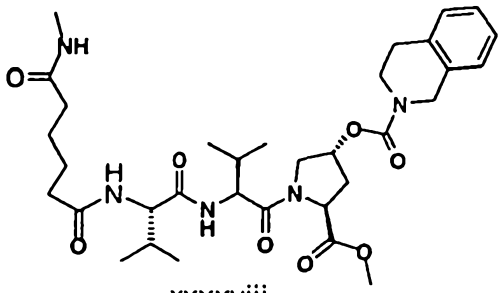


xxxxvii

中間物實例45-化合物xxxxviii

使化合物xxxxvii(1克，1.59毫莫耳)與990毫克(2.28毫莫

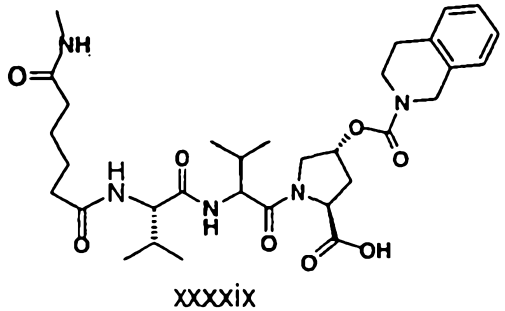
耳) PyBop溶於20毫升DCM中，並添加1.6毫升1 M在THF中之甲胺。將此混合物於約室溫下攪拌4小時。將反應混合物以EtOAc稀釋至100毫升，並以1 N HCl、$NaHCO_3$及鹽水洗滌。殘留物藉急驟式管柱層析純化(10% EtOH/EtOAc)產生1克(98%)化合物xxxxviii，



xxxxviii

中間物實例46-化合物xxxxix

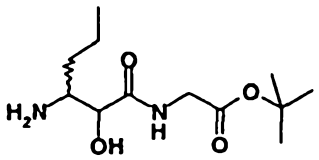
使化合物xxxxviii(1克，1.55毫莫耳)溶於10毫升MeOH中，並添加2毫升1 N NaOH。將此混合物於約室溫下攪拌過夜。藉蒸發移除溶劑。使殘留物溶於水中，中和並以EtOAc萃取，產生960毫克(98%)化合物xxxxix，



xxxxix

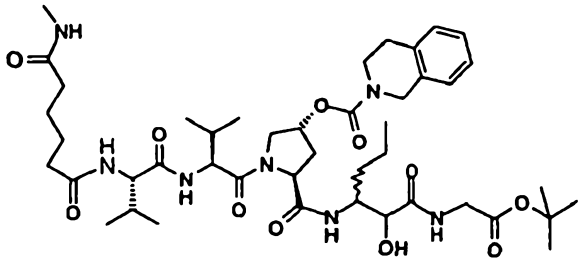
中間物實例47-化合物li

使化合物xxxxix(315毫克，0.5毫莫耳)與312毫克(0.6毫莫耳)PyBop溶於10毫升DCM中。添加化合物1(56毫克，0.6毫莫耳)與108微升DIPEA。



I

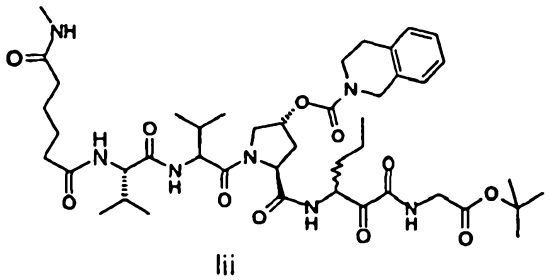
將混合物在約室溫下攪拌過夜，並以EtOAc稀釋至100毫升，及以1 N HCl、$NaHCO_3$及鹽水洗滌。藉管柱層析純化(15% EtOH/EtOAc)產生400毫克(92%)化合物li，



li

中間物實例48-化合物lii

使化合物li(400毫克，0.46毫莫耳)溶於10毫升DCM中，並添加292毫克(0.69毫莫耳)DMP試劑。將此混合物於約室溫下攪拌3小時。藉蒸發移除溶劑，並藉RP-HPLC純化產物，產生130毫克(32%)化合物lii，

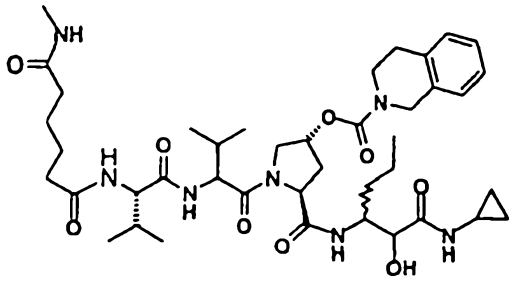


lii

中間物實例49-化合物liii

使化合物xxxxix(210毫克，0.33毫莫耳)與208毫克(0.4毫莫耳)PyBop溶於10毫升DCM中。添加化合物xiii(154毫克，0.83毫莫耳)至此溶液中，接著添加DIPEA(72微升，

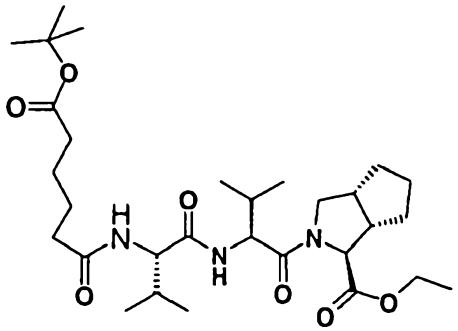
0.4毫莫耳)。將此混合物於約室溫下攪拌過夜。將反應混合物以EtOAc稀釋至100毫升，以1 N HCl、$NaHCO_3$及鹽水洗滌，然後藉急驟式管柱層析純化(10% EtOH/EtOAc)產生250毫克(95%)化合物liii，



liii

中間物實例50-化合物liv

使化合物xxxxv(755毫克，1.88毫莫耳)與255毫克(1.88毫莫耳)HOAt溶於20毫升DCM中。添加1.88毫升1 M DCC/DCM。於反應混合物中，添加化合物v(288毫克)，並將此反應混合物於約室溫下攪拌2小時。使混合物濃縮至乾涸，並使殘留物溶於EtOAc中，及藉管柱層析純化(80% EtOAc/己烷)，產生800毫克(90%)化合物liv，

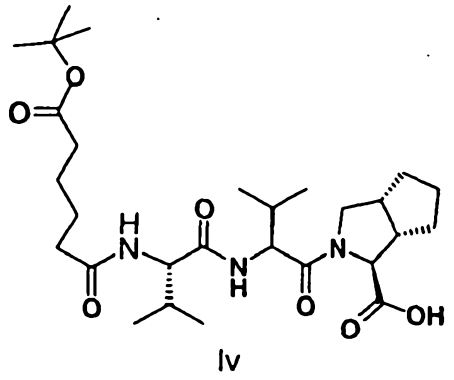


liv

中間物實例51-化合物lv

使化合物liv(800毫克，1.41毫莫耳)溶於10毫升MeOH中，並添加2毫升NaOH。將此混合物於約室溫下攪拌過

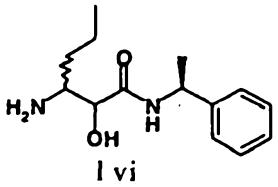
夜。藉真空移除溶劑，並使殘留物溶於水中，及以2毫升1 N HCl中和。將產物以EtOAc萃取。蒸發萃取溶劑，獲得760毫克(~100%)lv，



lv

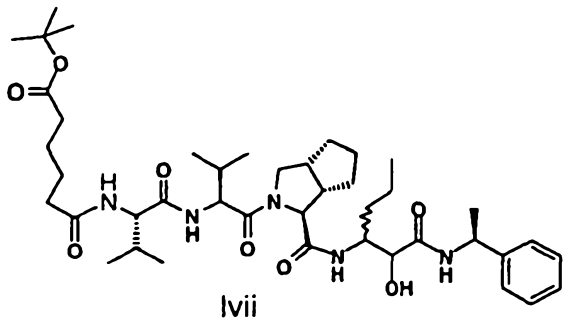
中間物實例52-化合物lvii

使化合物lv(760毫克，1.41毫莫耳)與880毫克(1.69毫莫耳)PyBop溶於5毫升DCM中。將化合物lvi(530毫克，2.12毫莫耳)添加至此溶液中，然後添加0.31毫升DIPEA。



lvi

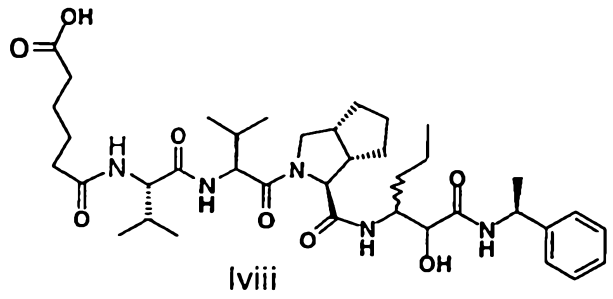
將此混合物於約室溫下攪拌過夜。將反應混合物以EtOAc稀釋至100毫升，以1 N HCl、$NaHCO_3$及鹽水洗滌，然後藉急驟式管柱層析純化(100% EtOAc)產生870毫克(80%)化合物lvii，



lvii

中間物實例53-化合物lviii

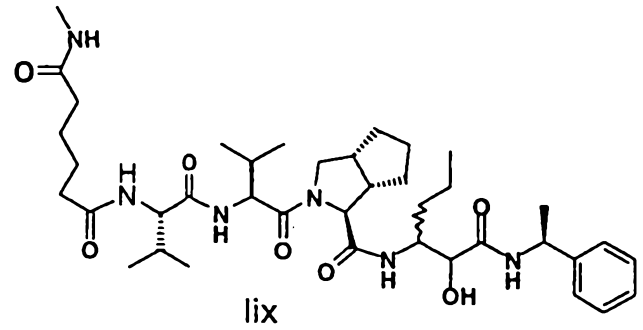
使化合物lvii(350毫克，0.45毫莫耳)溶於5毫升TFA與5毫升DCM中，並將此混合物於約室溫下攪拌3小時。藉蒸發移除溶劑，並藉RP-HPLC純化產物，產生220毫克(69%)化合物lviii，



lviii

中間物實例54-化合物lix

使化合物lviii(200毫克，0.28毫莫耳)與218毫克(0.42毫莫耳)PyBop溶於5毫升DCM中。添加甲胺(0.28毫升，2M，在THF中)。將此混合物於約室溫下攪拌過夜。將混合物以EtOAc稀釋至100毫升，以1 N HCl、$NaHCO_3$及鹽水洗滌，然後藉管柱層析純化(15% EtOH/EtOAc)產生168毫克(79%)lix，

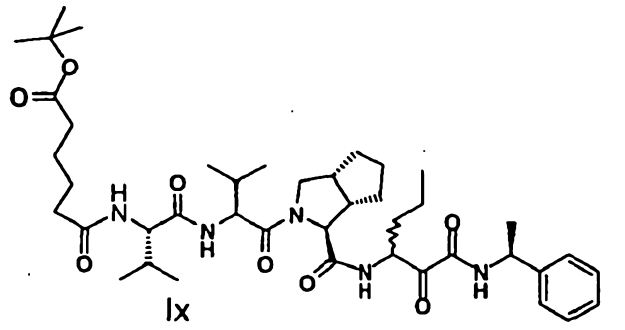


lix

中間物實例55-化合物lx

使化合物lviii(200毫克，0.26毫莫耳)溶於4毫升DCM中，並添加165毫克(0.39毫莫耳)DMP試劑。將此混合物於

約室溫下攪拌3小時。藉蒸發移除溶劑。使殘留物溶於50%乙腈/水中，並藉由RP-HPLC過濾純化，產生140毫克(70%)化合物lx，



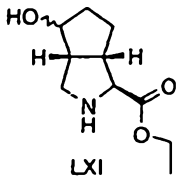
lx

中間物實例56-化合物ii

使化合物i(4克，12.1毫莫耳)之DCM(30毫升)與EtOH(30毫升)溶液，於N_2下冷卻至-10℃。添加$NaBH_4$(458毫克，12.1毫莫耳)，並將此溶液於-10℃下攪拌50分鐘。TLC(50% EtOAc/己烷)顯示全部轉化成較緩慢之流動點。以冰，然後以冷飽和NH_4Cl溶液(10毫升)，使反應小心地淬滅。將混合物傾倒於DCM(300毫升)中。將有機層以飽和NH_4Cl溶液(60毫升)洗滌一次，及以鹽水兩次(60毫升)。然後使有機層分離，以$MgSO_4$脫水乾燥，及在真空中濃縮，產生3.5克化合物ii(87%)

中間物實例57-化合物lxi

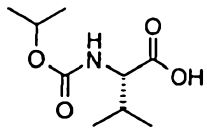
在裝有H_2氣之250毫升圓底燒瓶中，使化合物ii(3.5克，10.5毫莫耳)之含乙醇溶液(50毫升)接受標準氫化條件[20% $Pd(OH)_2/C$(1.47克，2.1毫莫耳)]，在約室溫下歷經5小時。經過矽藻土濾出觸媒，並以DCM洗滌。然後，在減壓下移除溶劑，產生2克(96%)化合物lxi，



LXI

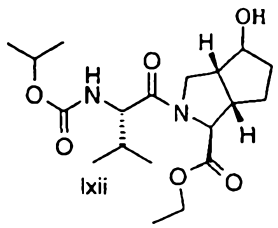
中間物實例58-化合物lxii

在惰性大氣下，將化合物lxi(200毫克，1毫莫耳)、化合物lxiii



lxiii

(233毫克，1.1毫莫耳)、HOAt(1-羥基-7-氮苯并三唑)(156毫克，1.15毫莫耳)在無水DMF(6毫升)中之溶液，攪拌20分鐘。然後，使溫度降至0℃，接著添加DIC(0.18毫升，1.15毫莫耳)。將反應物在約室溫下攪拌過夜。將此溶液以EtOAc稀釋，然後以1 N HCl洗滌兩次，以飽和$NaHCO_3$水溶液兩次，及以鹽水洗滌。分離有機層，以$MgSO_4$脫水乾燥，及在減壓下移除溶劑。將殘留物藉層析(矽膠：70% EtOAc/DCM)純化，以45%產率獲得化合物lxii。

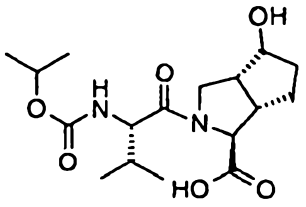


lxii

中間物實例59-化合物lxiv

將在二氧陸圜(6毫升)中之化合物lxii(777毫克，2毫莫耳)溶液與0.5 M NaOH(6毫升)，於約室溫下攪拌5小時。

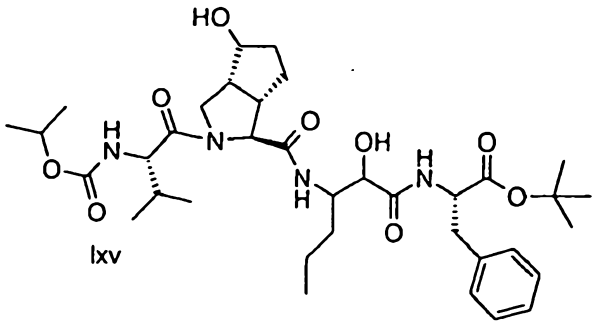
藉TLC (100% EtOAc)檢視，顯示完全轉化成一個光點，在起點處。將反應物以冰浴冷卻下來，接著添加1 N HCl(4毫升)。然後添加固體NaCl，並將整體混合物以EtOAc萃取兩次(2x150毫升)。然後，合併有機萃液，以$MgSO_4$脫水乾燥，及在減壓下移除溶劑，以92%產率獲得化合物lxiv。



lxiv

中間物實例60-化合物lxv

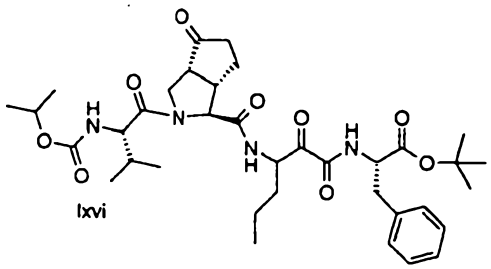
在惰性大氣下，將化合物x(203毫克，0.58毫莫耳)、化合物lxiv(276毫克，0.775毫莫耳)、HOAt(1-羥基-7-氮苯并三唑) (126毫克，0.93毫莫耳)在無水DMF(6毫升)中之溶液，攪拌20分鐘。然後，使溫度降至0℃，接著添加DIC(0.14毫升，0.93毫莫耳)。將反應物在約室溫下攪拌過夜。將溶液以EtOAc稀釋，然後以1 N HCl洗滌兩次，以飽和$NaHCO_3$水溶液兩次，及以鹽水洗滌。分離有機層，以$MgSO_4$脫水乾燥，及在減壓下移除溶劑。將殘留物藉層析純化(矽膠：50% EtOAc/DCM至80：19：1EtOAC/DCM/MeOH)，以62%產率獲得化合物lxv。



lxv

中間物實例61-化合物lxvi

在惰性大氣下，於化合物lxv(287毫克，0.42毫莫耳)在無水DCM(15毫升)中之溶液內，添加DMP試劑(605毫克，1.43毫莫耳)。將反應物在約室溫下攪拌2小時。(註-DMP試劑之量與反應時間加倍，係為確保兩個醇基完全被氧化成其相應之酮基)。藉TLC(矽膠：2% MeOH/EtOAc)檢視，顯示完全轉化成較快速產物。將反應物以DCM稀釋(150毫升)，然後以10%亞硫酸鈉水溶液洗滌兩次(2X50毫升)，以飽和$NaHCO_3$水溶液兩次，及以鹽水洗滌。分離有機層，以$MgSO_4$脫水乾燥，及在減壓下移除溶劑。將殘留物藉層析純化(矽膠：50% EtOAC/DCM至80：19：1EtOAC/DCM/MeOH)，以77%產率獲得化合物lxvi。

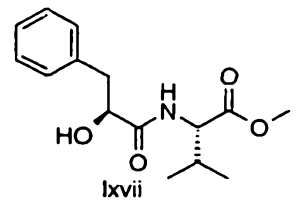


lxvi

中間物實例62-化合物lxvii

於L-3苯基乳酸(2克，12毫莫耳)之DCM溶液(60毫升)中，添加PyBop(7.5克，14.4毫莫耳)。於此溶液中，添加

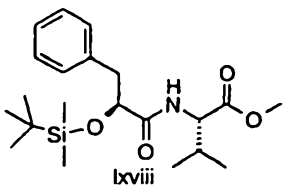
含有L-纈胺酸甲酯HCl(2.4克，14.4毫莫耳)與DIPEA(2.6毫升，14.4毫莫耳)之DCM溶液(20毫升)。將所形成之反應混合物於約室溫下攪拌過夜。此時，將反應物以EtOAc稀釋(30毫升)，以$NaHCO_3$(30毫升)與鹽水(15毫升)洗滌。將有機層以Na_2SO_4乾燥，過濾及濃縮。於矽膠上，在50% EtOAc/己烷中，達成純化，獲得2.97克(89%)化合物lxvii，



lxvii

中間物實例63-化合物lxviii

使化合物lxvii(2.97克，10.6毫莫耳)溶於DCM(50毫升)中，並以冰浴冷卻。於此溶液中添加TBSCl(2.1克，13.8毫莫耳)，接著為咪唑(0.94克，13.8毫莫耳)。將所形成之溶液攪拌過夜。然後，將反應物以EtOAc(50毫升)稀釋，以$NaHCO_3$與鹽水洗滌。將有機層以Na_2SO_4脫水乾燥，過濾及濃縮。在20% EtOAc/己烷中，於矽膠上，達成純化，獲得3.79克(90%)化合物lxviii。

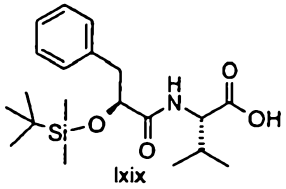


lxviii

中間物實例64-化合物lxix

於化合物lxviii(3.78克，9.6毫莫耳)之甲醇(50毫升)溶液中，添加1 N NaOH水溶液(14.4毫升，14.4毫莫耳)。將所

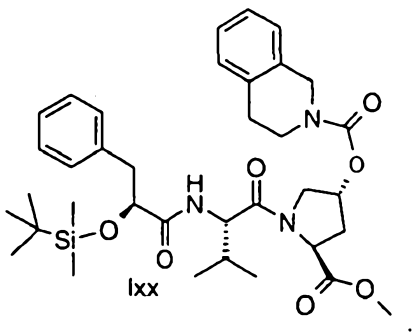
形成之溶液攪拌過夜。於真空中部份移除溶劑。然後，使用1 N HCl水溶液，使反應混合物之pH值降至3。將此溶液以EtOAc與鹽水稀釋。將所要之產物以EtOAc萃取(3x50毫升)。合併有機層，以Na_2SO_4脫水乾燥，過濾及濃縮，而得3.5克(96%)化合物lxix，



lxix

中間物實例65-化合物lxx

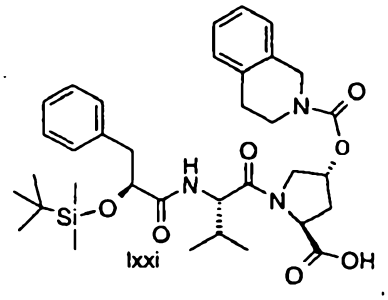
於含有化合物lxix(1.1克，2.9毫莫耳)之DCM(15毫升)溶液中，添加HOAt(0.44克，3.2毫莫耳)，接著為DCC(3.2毫升，3.2毫莫耳)在DCM中之1 M溶液。於約室溫下攪拌20分鐘後，添加化合物xxxix(970毫克，3.2毫莫耳)之DCM(15毫升)溶液。將此反應物於N_2下攪拌過夜。然後，將反應物以EtOAc(30毫升)稀釋，經過矽膠墊過濾，以0.1 N HCl、$NaHCO_3$及鹽水洗滌。將有機層以Na_2SO_4乾燥，過濾，及在真空中濃縮。在50% EtOAc/己烷中，於矽膠上，達成純化，獲得1.5克(77%)化合物lxx，



lxx

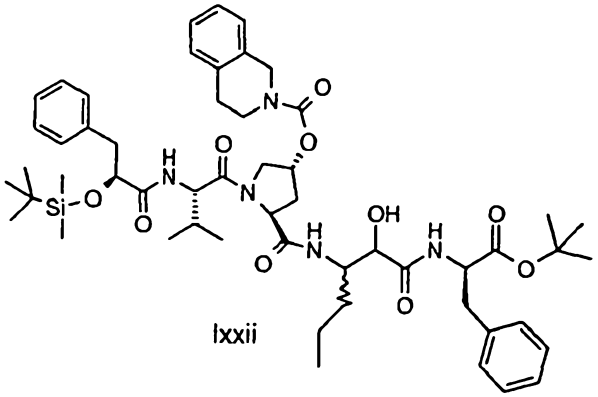
中間物實例66-化合物lxxi

於化合物xx(1.5克，2.4毫莫耳)之甲醇溶液(30毫升)中，添加1 N NaOH水溶液(3.6毫升，3.6毫莫耳)。將所形成之溶液攪拌過夜。此時，部份移除溶劑，並使用1 N HCl水溶液，使反應混合物之pH值調整至3。然後，將反應物以EtOAc (50毫升)與鹽水(20毫升)稀釋。將水層以EtOAc萃取(3x50毫升)。將有機層合併，以Na_2SO_4脫水乾燥，過濾及濃縮，提供1.3克(92%)化合物lxxi，



中間物實例67-化合物lxxii

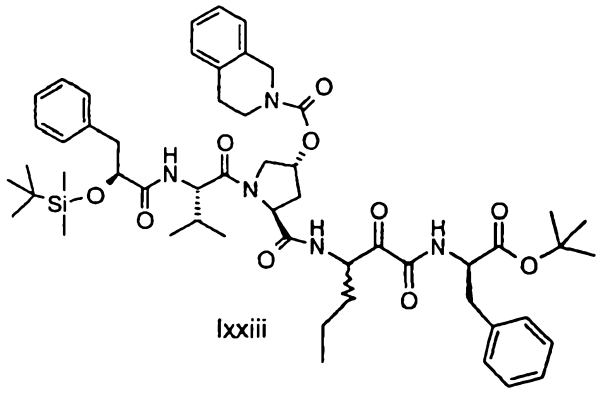
於含有化合物lxxi(180毫克，0.28毫莫耳)之DCM(2毫升)溶液內，添加PyBop(175毫克，0.34毫莫耳)與DIPEA(0.06毫升，0.34毫莫耳)，接著為化合物x(150毫克，0.41毫莫耳)之DCM溶液(3毫升)。將所形成之溶液，於N_2下攪拌過夜。然後，將反應物以EtOAc(30毫升)稀釋，以$NaHCO_3$與鹽水洗滌。將有機層以Na_2SO_4脫水乾燥，過濾及濃縮。在100% EtOAc中，於矽膠上達成純化，獲得270毫克(98%)化合物lxxii，



lxxii

中間物實例68-化合物lxxiii

於化合物lxxii(270毫克，0.27毫莫耳)之DCM(3毫升)溶液中，添加DMP試劑(140毫克，0.33毫莫耳)。於約室溫下攪拌1.5小時後，以10% Na_2SO_3使反應淬滅(10毫升)。將反應物以EtOAc稀釋(30毫升)並攪拌10分鐘。有機層以$NaHCO_3$與鹽水洗滌。將有機層以Na_2SO_4乾燥，過濾及濃縮。在60% EtOAc/己烷中，達成純化，獲得150毫克(56%)化合物lxxiii，



lxxiii

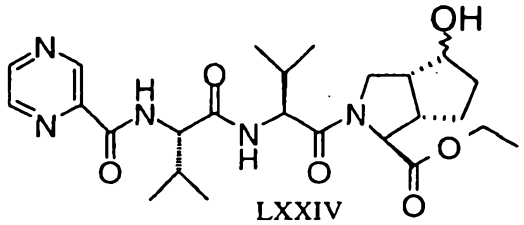
中間物實例69-化合物lxi

於化合物ii(3.5克，10.5毫莫耳)之乙醇溶液(50毫升)中，在氮氣流下，添加$Pd(OH)_2/C$(1.47克，20% Pd含量，2.1毫莫耳)。使反應物在1大氣壓力下，接受氫化作用。於完成

時，將觸媒經過矽藻土墊過濾，並以二氯甲烷洗滌。在真空中濃縮濾液，而得2克(96%)化合物lxi。

中間物實例70-化合物lxxiv

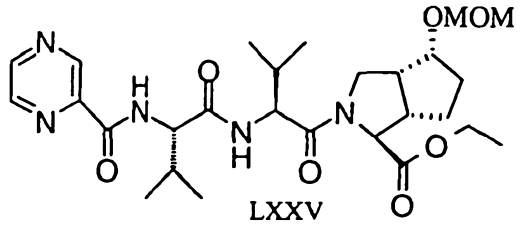
於化合物vii(9.1克，28.2毫莫耳)之DMF溶液(60毫升)中，添加HOAt(4克，29.4毫莫耳)與1,3-雙丙基碳化二亞胺(3.7克，29.4毫莫耳)。於約室溫下攪拌30分鐘後，將化合物lxi(5.1克，25.6毫莫耳)之DMF溶液(10毫升)添加至上述溶液中。將此反應物於約室溫下攪拌過夜。此時，濾除白色固體。在真空中濃縮濾液，而得殘留物，將其藉矽膠層析純化，獲得9.5克(67%)化合物lxxiv，



LXXIV

中間物實例71-化合物lxxv

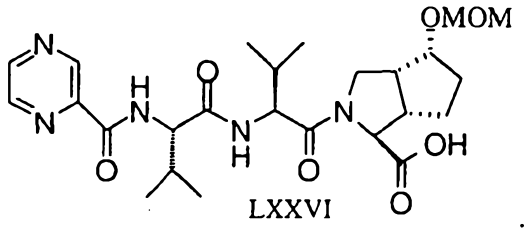
於化合物lxxiv(1.5克，3毫莫耳)在無水THF(25毫升)中之溶液內，在約室溫下，添加EtiPr$_2$N(0.78毫升，4.5毫莫耳)。使混合物冷卻至0℃，並以逐滴方式添加MOMCl(1.5毫升，19.7毫莫耳)。使反應物溫熱至室溫，並攪拌過夜。然後，將此溶液以醚稀釋，並以水洗滌(3次)。將水層進一步以醚萃取，並使所有之有機層以$MgSO_4$脫水乾燥，然後濃縮而得黃色油。藉矽膠層析(EtOAc/己烷5/2)，以40%產率，分離化合物lxxv所要之異構物，且明顯地分離非對映異構物。



LXXV

中間物實例72-化合物lxxvi

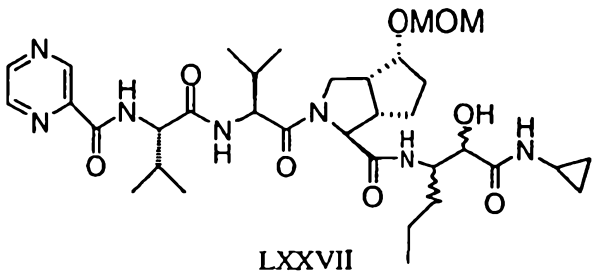
於化合物lxxv(502毫克，0.9毫莫耳)在EtOH(5毫升)中之溶液內，在0℃下逐滴添加2 N NaOH水溶液(0.9毫升，1.8毫莫耳)。使反應物溫熱至室溫，並攪拌過夜。於皂化作用完成時，以Dowex50W8X-200酸性樹脂，使溶液酸化至pH3。濾除固體，並在真空中濃縮所形成之濾液，而得油狀殘留物，使其凍乾而得370毫克(80%)化合物lxxvi，



LXXVI

中間物實例73-化合物lxxvii

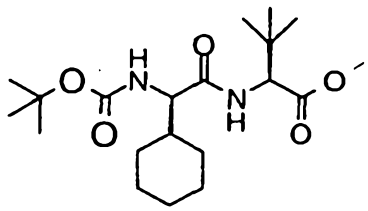
將化合物lxxvi(110毫克，0.21毫莫耳)之二氯甲烷溶液(4毫升)以PyBop(200毫克，0.38毫莫耳)處理。於約室溫下攪拌30分鐘後，在反應混合物中添加化合物xiii(60毫克，0.32毫莫耳)之THF溶液(3.2毫升)，接著為$EtiPr_2N$。於攪拌過夜後，在約室溫下以水使反應淬滅，並以EtOAc萃取。將所形成之有機層以鹽水洗滌並以$MgSO_4$脫水乾燥，然後濃縮成黃色油。藉矽膠層析純化(5% EtOH/EtOAc)產生143毫克(100%)化合物lxxvii，



LXXVII

中間物實例74-化合物lxxviii

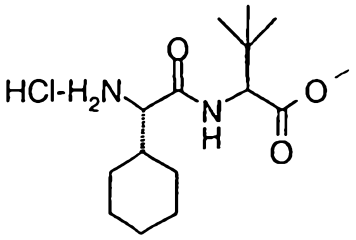
於H-CHg-OH2(5克，19.4毫莫耳)之THF溶液(50毫升)中，添加HOBt(2.63克，19.4毫莫耳)與EDCI(3.72克，19.4毫莫耳)。於約室溫下攪拌20分鐘後，將含有第三-L-白胺酸甲酯鹽酸鹽(19.4毫莫耳)與DIPEA(6.75毫升，38.8毫莫耳)之THF(19毫升)與DMF(10毫升)溶液，添加至上述溶液中。將反應物於約室溫下攪拌過夜。標準水溶液處理及矽膠層析(15-20% EtOAc/己烷)，獲得2.27克(30%)化合物lxxviii，



lxxviii

中間物實例75-化合物lxxix

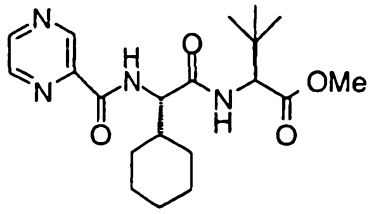
於化合物lxxviii(2.27克，5.91毫莫耳)之THF溶液(12毫升)中，添加二氧陸圜中之4 N HCl溶液(7.38毫升，29.5毫莫耳)。將反應物於約室溫下攪拌過夜。此時，在減壓下移除溶劑，產生化合物lxxix，將其直接使用於下一反應。



lxxix

中間物實例76-化合物lxxx

於化合物lxxix(5.9毫莫耳)之THF溶液中，添加含有2-吡啡羧酸(878毫克，7.08毫莫耳)、HOBt(957毫克，7.08毫莫耳)及EDCI(1.36克，7.08毫莫耳)之THF(20毫升)溶液。然後，在所形成之混合物中，添加DIPEA(2.05毫升，11.8毫莫耳)。將反應物在約室溫下攪拌過夜，然後以水使反應淬滅。將反應混合物以EtOAc萃取。有機層以鹽水洗滌，及在真空中濃縮，以提供殘留物，將其藉矽膠層析純化(40-50% EtOAc/己烷)，以提供1克(36%)化合物lxxx，

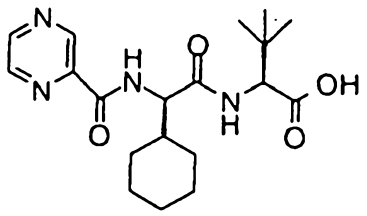


lxxx

中間物實例77-化合物lxxxi

於化合物lxxx(1克，2.56毫莫耳)之甲醇溶液(20毫升)中，添加2 N NaOH(3.2毫升，6.4毫莫耳)。將此反應物於約室溫下攪拌過夜。此時，使用5 N HCl，使反應物酸化至pH3。將反應物以EtOAc稀釋(75毫升)，並以水及鹽水洗滌。使如此獲得之有機層脫水乾燥，及在真空中濃縮，獲得殘留物，使其溶於1：1CH_3CN/H_2O中，以供冷凍乾燥。

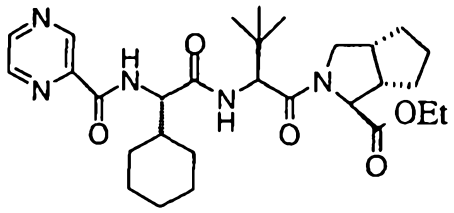
總計獲得~1克(100%)化合物lxxxi。



lxxxi

中間物實例78-化合物lxxxii

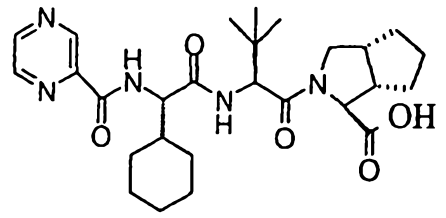
將化合物lxxxi(2.56毫莫耳)之二氯甲烷溶液(10毫升)以HOAt(348毫克，2.56毫莫耳)及DCC(2.56毫升，1 M，2.56毫莫耳)處理。在攪拌30分鐘後，將反應混合物以化合物v(2.56毫莫耳)之THF溶液(5毫升)處理。於約室溫下攪拌過夜後，藉過濾移除白色固體(脲)。在真空中濃縮濾液，而得殘留物，使其藉矽膠層析純化，提供1.4克(100%)化合物lxxxii，



lxxxii

中間物實例79-化合物lxxxiii

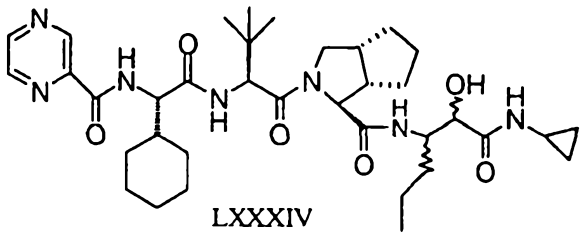
將化合物lxxxii(1.4克，2.58毫莫耳)之乙醇溶液(15毫升)以2 N NaOH(2.58毫升，5.17毫莫耳)處理。於約室溫下攪拌過夜後，以酸性樹脂使反應混合物酸化至pH3。濾除固體。將所形成之濾液在真空中濃縮，而得殘留物，使其凍乾，獲得1.32克(~100%)化合物lxxxiii，



lxxxiii

中間物實例80-化合物lxxxiv

將化合物lxxxiii(360毫克，0.7毫莫耳)之二氯甲烷溶液(15毫升)以PyBop(582毫克，1.12毫莫耳)處理。於約室溫下攪拌20分鐘後，將反應混合物以化合物xiii(195.6毫克，1.05毫莫耳)之THF溶液(10毫升)，接著以DIPEA(0.25毫升，1.40毫莫耳)處理。於約室溫下攪拌過夜後，以水使反應淬滅，並以EtOAc萃取。將所形成之有機層以鹽水洗滌，並乾燥，及在真空中濃縮，獲得殘留物，使其藉矽膠層析純化(3% EtOH/EtOAc)，而得420毫克(88%)化合物lxxxiv，

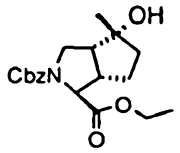


LXXXIV

中間物實例81-化合物ii"'

使無水二氯甲烷與醚(20毫升：20毫升)之混合物，於N_2(氣體)下冷卻至78℃。於此溶液中，添加$TiCl_4$(1 M，在二氯甲烷中，10毫升，10毫莫耳)，然後添加MeLi(1.4 M，在醚中，7.1毫升，10毫莫耳)，接著於-78℃下再攪拌30分鐘。將化合物i(2克，6毫莫耳)在10毫升二氯甲烷中之

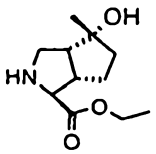
溶液，逐滴添加至該混合物中，於相同溫度下歷經15分鐘。將此溶液慢慢溫熱至-40℃，歷經10分鐘，然後在0℃下攪拌2小時。藉由將混合物傾倒至水/醚混合物(1：1)中，使反應淬滅，然後使液層分離。將水層進一步以醚萃取兩次。將全部有機層以水、鹽水洗滌，並以$MgSO_4$脫水乾燥，然後濃縮成黃色油。藉矽膠層析(EtOAc/己烷2/1)，分離所要之化合物ii"'，83%。



ii'"

中間物實例82-化合物lxi'

於化合物ii"'(1.7克，5毫莫耳)中添加10重量% Pd/C(0.53克，0.5毫莫耳)，接著添加MeOH(17毫升)。使氫氣溢流經過反應混合物，並保持氫氣，以在1大氣壓下反應過夜。然後，將反應混合物過濾及濃縮，而得929毫克(87%)化合物lxi'，為無色油。

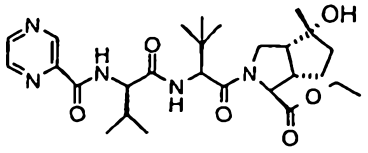


lxi'

中間物實例83-化合物lxxxv

於化合物xxii(1克，3毫莫耳)之THF溶液(16毫升)中，在約室溫下添加HOAt(0.41克，3毫莫耳)，及接著為二氯甲烷之1 M DCC溶液(3毫升，3毫莫耳)。在約室溫下攪拌30分鐘後，將化合物lxi'之二氯甲烷溶液(6毫升)添加至上述

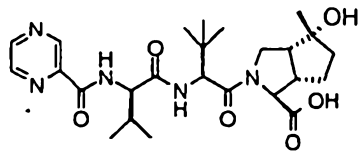
HOAt活化之酸中。將反應物於約室溫下攪拌過夜。此時，使反應物經過矽藻土過濾。將濾液以EtOAc(120毫升)稀釋，並以水，然後以鹽水洗滌。使有機層脫水乾燥及濃縮成黃色油，使其藉矽膠層析純化(100% EtOAc)，產生1克(65%)化合物lxxxv，



lxxxv

中間物實例84-化合物lxxxvi

於化合物lxxxv(920毫克，1.7毫莫耳)之乙醇溶液(8毫升)中，添加2 N NaOH水溶液(1.7毫升，3.4毫莫耳)。將反應物在約室溫下攪拌過夜，然後藉由Dowes酸性樹脂，酸化至pH3。濾除固體，並使濾液濃縮，獲得無色油，使其再溶解於1：1CH_3CN/H_2O中，並凍乾而提供800毫克(93%)化合物lxxxvi。HPLC顯示單一產物峰。

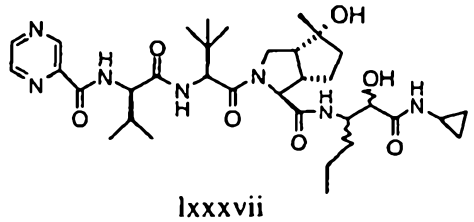


lxxxvi

中間物實例85-化合物lxxxvii

於化合物lxxxvi(150毫克，0.3毫莫耳)之二氯甲烷溶液(4毫升)中，添加PyBop(250毫克，0.47毫莫耳)。將此溶液於約室溫下攪拌30分鐘。然後，於此溶液中添加化合物xiii(84毫克，0.45毫莫耳)之THF(4.5毫升)溶液，接著為$EtiPr_2N$(0.1毫升，0.6毫莫耳)。將此反應物於約室溫下攪

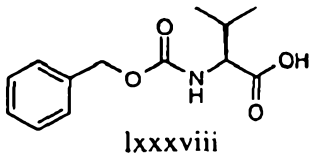
拌過夜，然後以水(25毫升)使反應淬滅，歷經30分鐘。接著以EtOAc萃取混合物。將所形成之有機層以鹽水洗滌，並以$MgSO_4$脫水乾燥，然後濃縮成黃色油。藉矽膠層析純化(5% EtOH/ EtOAc)產生200毫克(100%)化合物lxxxvii，



lxxxvii

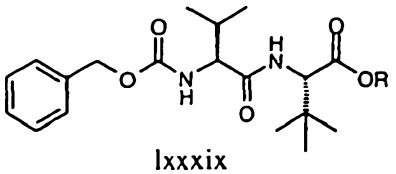
中間物實例86-化合物lxxxix

使化合物lxxxviii,N-Cbz-L-纈胺酸(2.5克，9.9毫莫耳)溶於THF(30毫升)中。



lxxxviii

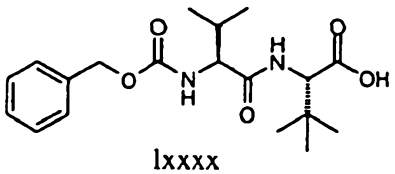
添加EDCI(2.29克，11.9毫莫耳)與HOBt(1.62克，11.9毫莫耳)，並將混合物攪拌五分鐘。在THF(23.9毫升)中添加L-第三-白胺酸甲酯鹽酸鹽(2.17克，11.9毫莫耳)，接著為DIPEA(2.1毫升)。將反應混合物於氮氣下攪拌過夜。將反應混合物以醋酸乙酯稀釋，以1 N HCl、飽和碳酸氫鈉及鹽水洗滌。將有機相以硫酸鈉脫水乾燥，過濾及濃縮。使濃縮殘留物在25%醋酸乙酯/己烷中純化，而得1.1克(29%)化合物lxxxix，



lxxxix

中間物實例87-化合物lxxxx

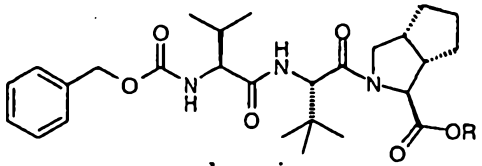
使化合物lxxxix在標準條件下，使用甲醇(0.3 M)與1 N NaOH (1.5當量)水解，而得1.03克(95%)化合物lxxxx，



lxxxx

中間物實例88-化合物lxxxxi

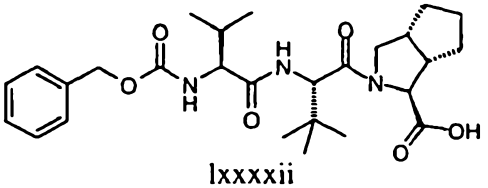
使化合物lxxxx(385毫克，1.06毫莫耳)溶於二氯甲烷(3毫升)中。添加DCC(1.4毫莫耳)，接著為HOAt(190毫克，1.4毫莫耳)。然後，在二氯甲烷(3毫升)中添加化合物v(260毫莫耳)。將所形成之混合物於氮氣下攪拌過夜。將反應物以醋酸乙酯稀釋，經過矽膠過濾及濃縮。使殘留物在50%醋酸乙酯/己烷中純化，而得440毫克(80%)化合物lxxxxi，



lxxxxi

中間物實例89-化合物lxxxxii

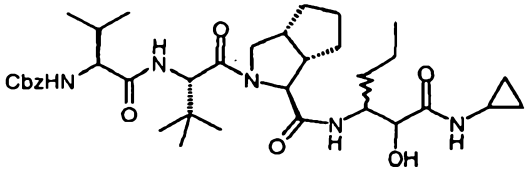
使化合物lxxxxi在標準條件下，使用乙醇(0.3 M)與1 N NaOH (1.5當量)水解，而得390毫克化合物lxxxxii，



lxxxxii

中間物實例90-化合物lxxxxiii

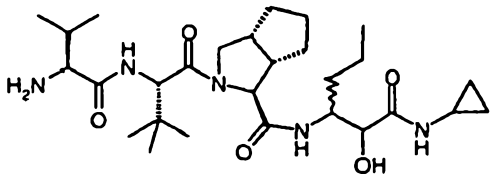
使化合物lxxxxii(350毫克，0.7毫莫耳)溶於二氯甲烷(3毫升)中。添加PyBOP(480毫克，0.91毫莫耳)，接著為化合物xiii (170毫克，0.91毫莫耳)。添加DIPEA(0.16毫升，0.91毫莫耳)，並將反應混合物攪拌過夜。使反應混合物濃縮，並在100%醋酸乙酯中純化，而得420毫克(90%)化合物lxxxxiii，



lxxxxiii

中間物實例91-化合物lxxxxiv

使用10% Pd/C(1%莫耳)，在甲醇中，於氫氣下，使化合物lxxxxiii氫化，而得335毫克(100%)化合物lxxxxiv，

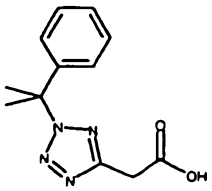


lxxxxiv

中間物實例92-化合物lxxxxv

使1H-四唑-5-醋酸乙酯(5克，32毫莫耳)溶於氯仿(80毫升)中。添加三氯醋酸(12.03克，73.65毫莫耳)，接著為α甲

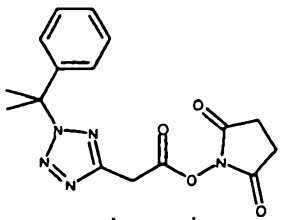
基苯乙烯(3.78克，32毫莫耳)。將反應混合物攪拌過夜。隔天，以醋酸乙酯稀釋此溶液，以10% KOH及鹽水洗滌。使有機相以硫酸鎂脫水乾燥，過濾及濃縮，而得8克(96%)相應經N-保護之四唑-5-醋酸乙酯。使用乙醇(0.3 M)與1 N NaOH(3當量)，使此物質接受標準水解條件，而得7克(99%)化合物lxxxxv，



lxxxxv

中間物實例93-化合物lxxxxvi

使化合物lxxxxv(3.62克，14.7毫莫耳)溶於二氯甲烷(50毫升)中。添加EDCI(4.32克，22.1毫莫耳)與DIPEA(5.1毫升，29.4毫莫耳)，並攪拌五分鐘。添加N-羥基琥珀醯亞胺(3.38克，29.4毫莫耳)，並攪拌三小時。將反應物以二氯甲烷稀釋，並以水洗滌三次。有機相以硫酸鈉脫水乾燥，過濾及濃縮，而得3.66克(73%)化合物lxxxxvi，

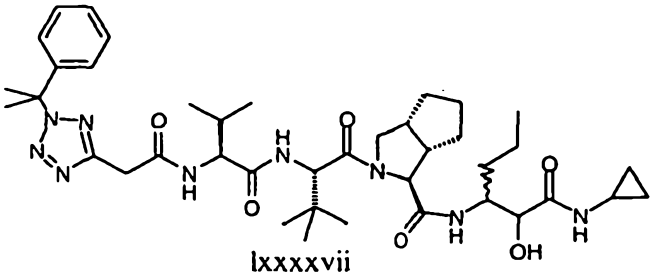


lxxxxvi

中間物實例94-化合物lxxxxvii

使化合物lxxxxiv(335毫克，0.62毫莫耳)與化合物lxxxxvi(343毫克，1毫莫耳)溶於二氯甲烷(6毫升)中。添加

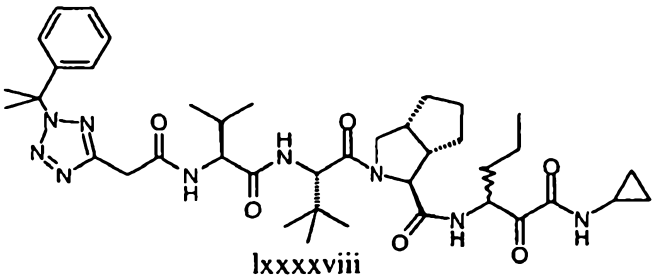
DIPEA(0.17毫升，1毫莫耳)，並將反應混合物攪拌過夜。將反應物以醋酸乙酯稀釋，以飽和碳酸氫鈉、鹽水洗滌，及濃縮。使殘留物在5%乙醇/醋酸乙酯中純化，獲得80毫克(16%)化合物lxxxxvii，



lxxxxvii

中間物實例95-化合物lxxxxviii

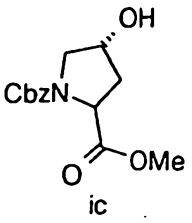
使化合物lxxxxvii(80毫克，0.11毫莫耳)溶於二氯甲烷(3毫升)中。添加DMP試劑(55毫克，0.13毫莫耳)並攪拌一小時。將反應混合物以醋酸乙酯稀釋，並以10%亞硫酸鈉溶液，使反應淬滅。有機相以飽和碳酸氫鈉及鹽水洗滌。使有機相濃縮，並將所形成之殘留物在100%醋酸乙酯中純化，而得40毫克(48%)化合物lxxxxviii，



lxxxxviii

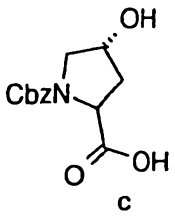
中間物實例96-化合物xxxix

使化合物ic,N-Cbz-4-羥基Pro甲酯



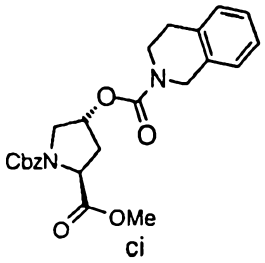
ic

(2.1克，7.9毫莫耳，以定量產率製自化合物c,N-Cbz-4-羥基Pro)溶於DCM(25毫升)中。



c

將CDI(1.54克，9.5毫莫耳)與DIPEA(1.7毫升，9.5毫莫耳)添加至該溶液中，並攪拌10分鐘。將1,2,3,4-四氫異喹啉(TIQ) (1.2毫升，9.5毫莫耳)逐滴添加至反應混合物中，並攪拌五小時。有機相以水、1 N HCl及鹽水洗滌。在使有機相濃縮之後，藉由40% EtOAc/己烷，使所形成之殘留物以層析方式純化，產生化合物ci,N-Cbz-4-TIQ羰基氧基-Pro甲酯(2.5克，75%)。



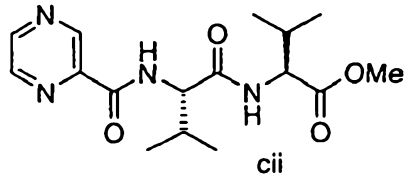
ci

使化合物ci(2.5克，5.9毫莫耳)溶於MeOH(75毫升)中。將此溶液以N_2溢流，並添加Pd/C(10%，300毫克)。將反應混合物以H_2溢流，並攪拌過夜。使反應混合物經過矽藻土過濾，及濃縮，產生化合物xxxix,4-(TIQ-羰基氧基)-Pro甲

酯(1.49克，83%)。

中間物實例97-化合物vii

使化合物cii,N-吡呾-2-基羰基-Val-Val甲酯(10.9克，32.4毫莫耳)溶於THF(80毫升)中，然後添加NaOH水溶液(48.6毫升，48.6毫莫耳)。

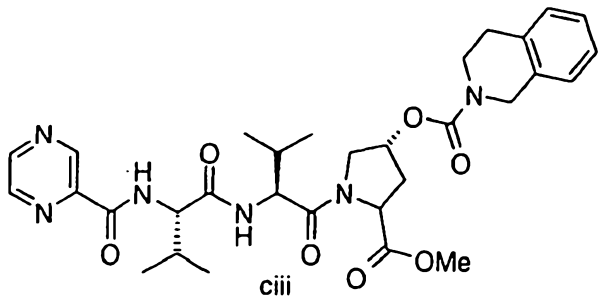


cii

將所形成之混合物攪拌48小時，然後添加另外之NaOH(16.3毫升，16.3毫莫耳)，並將混合物加熱至40℃，歷經三小時。然後，使反應混合物之pH值降至3，並將水相以EtOAc萃取，然後濃縮，產生粗製化合物vii,N-吡呾-2-基羰基-Val-Val酸(10.6克，100%)。

中間物實例98-化合物ciii

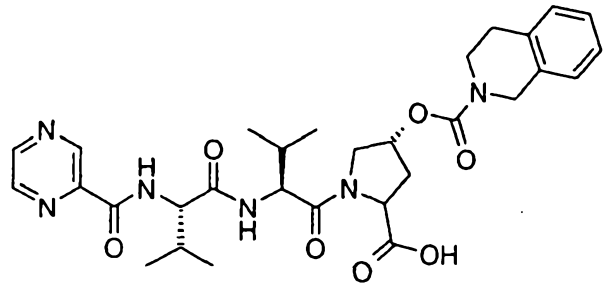
使化合物cii(4.1克，12.7毫莫耳)溶於DCM(20毫升)中。將HOAt(1.73克，12.7毫莫耳)與DCC(12.7毫莫耳)添加至此溶液中，並將此溶液攪拌一小時。將化合物xxxix(3.22克，10.6毫莫耳)添加至DCM中之反應混合物(10毫升)內。將所形成之混合物於N_2下攪拌過夜。使反應混合物經過矽膠過濾及濃縮。所形成之殘留物藉矽膠層析純化(50%至80% EtOAc/己烷梯度液)，產生化合物ciii,N-吡呾-2-基羰基-Val-Val-4-(TIQ羰基氧基)-Pro甲酯(5.27克，81.7%)。



ciii

中間物實例99-化合物civ

使化合物ciii(650毫克，1.29毫莫耳)溶於THF(5毫升)中。將NaOH水溶液(1.42毫升，1.42毫莫耳)添加至溶液中，然後攪拌過夜。使溶液之pH值降至3，並分離有機相，及濃縮，產生殘留物。殘留物使用逆相HPLC在乙腈/水中純化，產生化合物civ,N-吡啡-2-基羰基-Val-Val-4-(TIQ羧基氧基)-Pro酸(600毫克，95%)。

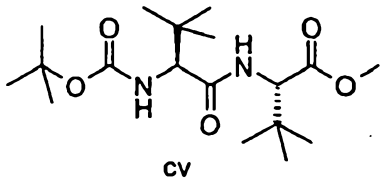


civ

中間物實例100-化合物cv

使N-Boc-L-第三-白胺酸(2.3克，10毫莫耳)與L-第三-白胺酸甲酯鹽酸鹽(2克，11毫莫耳)合併在DMF(30毫升)中。然後，將HOAt(1.6克，11.5毫莫耳)添加至溶液中。將所形成之混合物於N_2下攪拌20分鐘，然後降至0℃，於其中添加DIC (1.8毫升，11.5毫莫耳)與2,4,6-三甲基吡啶(1.45毫升，11毫莫耳)。將所形成之溶液攪拌過夜，且溫熱至室

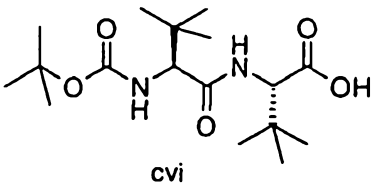
溫。將反應混合物以EtOAc稀釋，並將有機相以1 N HCl、飽和$NaHCO_3$及鹽水洗滌。在濃縮有機相之後，將所形成之殘留物藉由20%-30% EtOAc/己烷梯度液，以層析方式純化，產生化合物cv(3.3克，92%)。



cv

中間物實例101-化合物cvi

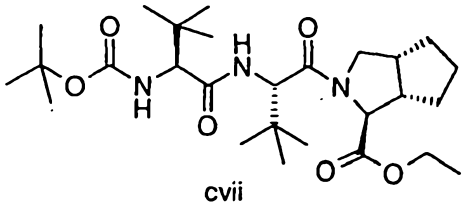
使用二氧陸圜(40毫升)與0.5 N NaOH(37毫升，18.4毫莫耳)，使化合物cv(3.3克，9.2毫莫耳)水解，產生化合物cvi(2.9克，92%)。



cvi

中間物實例102-化合物cvii

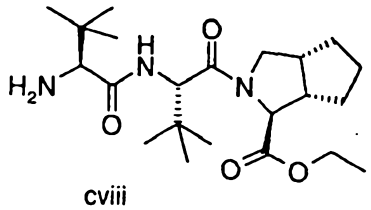
使化合物cvi(2克，5.8毫莫耳)與化合物v(1克，5.5毫莫耳)溶於DMF(20毫升)中。然後，將HOAt(832毫克，6.6毫莫耳)與DIC(1.1毫升，6.6毫莫耳)添加至該溶液中。將所形成之溶液於N_2下攪拌過夜。將反應混合物以EtOAc稀釋，並將有機相以1 N HCl、飽和$NaHCO_3$及鹽水洗滌。在濃縮有機相之後，將所形成之殘留物，藉由20%-30% EtOAc/己烷梯度液，以層析方式純化，產生化合物cvii(2.4克，81%)。



cvii

中間物實例103-化合物cviii

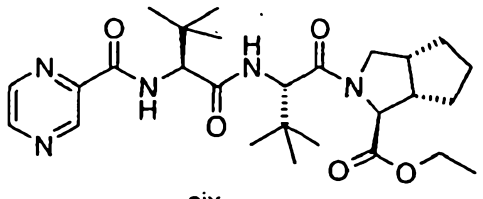
使化合物cvii(2.4克，4.72毫莫耳)溶於DCM(10毫升)中。將TFA(10毫升)添加至溶液中。將所形成之溶液攪拌4小時。使反應混合物濃縮，溶於EtOAc中，然後將有機相以1 N NaOH與鹽水洗滌。使有機相濃縮，產生化合物cviii(1.084克，56.1%)。



cviii

中間物實例104-化合物cix

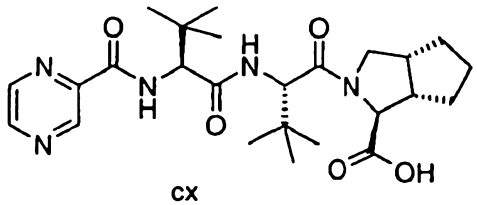
使2-吡咔羧酸(181毫克，1.46毫莫耳)與化合物cviii(541毫克，1.325毫莫耳)溶於DMF(15毫升)中。將HOAt(207毫克，1.52毫莫耳)與DIC(0.24毫升，1.52毫莫耳)添加至該溶液中。將所形成之溶液於N_2下攪拌過夜。將反應混合物以EtOAc稀釋，並將有機相以1 N HCl、飽和$NaHCO_3$及鹽水洗滌。在濃縮有機相之後，將所形成之殘留物，藉由20%-30%-35% EtOAc/己烷梯度液，以層析方式純化，產生化合物cix(430毫克，63%)。



cix

中間物實例105-化合物cx

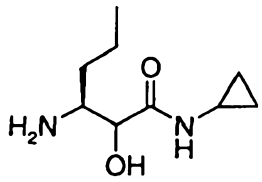
使用EtOH(7毫升)與1 N NaOH(4.7毫升，4.7毫莫耳)，使化合物cix水解，產生化合物cx(700毫克，91.6%)。



cx

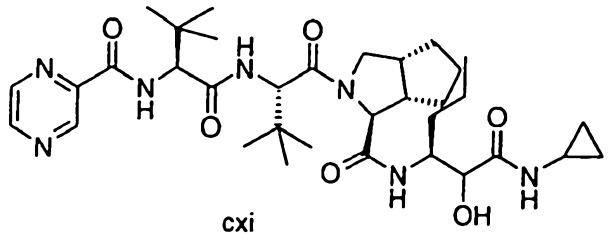
中間物實例106-化合物cxi

使化合物cx(690毫克，1.42毫莫耳)溶於DCM(9毫升)中。然後，將PyBOP(890毫克，1.7毫莫耳)添加至溶液中，接著添加化合物xiii'(320毫克，1.7毫莫耳)。



xiii'

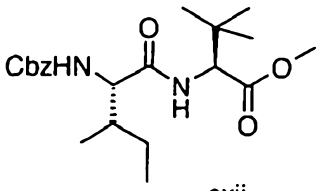
於所形成之混合物中添加DIPEA(0.3毫升，1.7毫莫耳)。將反應混合物於N_2下攪拌過夜。然後，將反應混合物以EtOAc稀釋，以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。在濃縮有機相之後，將所形成之殘留物藉由100% EtOAc以層析方式純化，產生化合物cxi(490毫克，52.7%)。



cxi

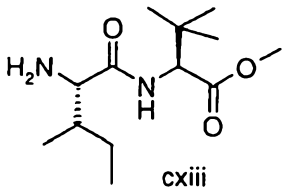
中間物實例107-化合物cxiv

使化合物cxii(1.2克，3.06毫莫耳)溶於MeOH(12毫升)中。



cxii

在以N_2徹底溢流後，添加10重量% $Pd(OH)_2$/碳(0.6克)，並使混合物氫化過夜，藉TLC(30% EtOAc/己烷)証實完全反應混合物。藉過濾，使溶液與固體物質分離，並濃縮成其相應之經去除保護化合物cxiii，為無色油(100%)

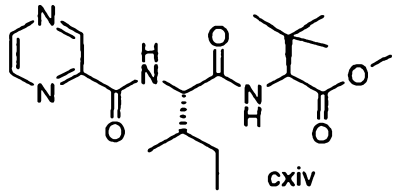


cxiii

將其使用於下一步驟，無需進一步純化。

使2-吡啡羧酸(400毫克，3.2毫莫耳，1.1當量)溶於DCM/THF(4毫升/4毫升)中，然後添加HOAt(440毫克，3.2毫莫耳)與DCC(343毫升，1 M，DCM)。在室溫下攪拌20分鐘後，使先前獲得之化合物cxiii(0.96克，3.2毫莫耳)溶於DCM (6.4毫升)中，並添加至該經活化之混合物中。於室

溫下攪拌過夜後，使反應混合物經過矽藻土過濾，並使化合物cxiv藉管柱層析純化(30% EtOAc/己烷)

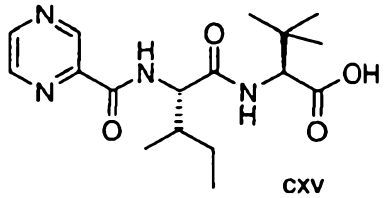


cxiv

產生白色固體(0.8克，80%)。

中間物實例108-化合物cxv

使化合物cxiv(0.8克，2.2毫莫耳)溶於MeOH(10毫升)中，然後添加2 N NaOH(水溶液)(3.3毫升，6.6毫莫耳)。將此溶液在室溫下攪拌過夜，此時反應混合物之完成係藉TLC (50% EtOAc/己烷)指示。藉5 N HCl酸化至pH3及以EtOAc稀釋後，接著為有機相之萃取。將已萃取之有機相以鹽水洗滌，並以$MgSO_4$脫水乾燥，於濃縮後產生化合物cxv (0.74,95%)。

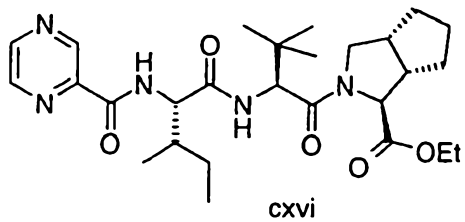


cxv

中間物實例109-化合物cxvi

於化合物cxv(0.74克，2.1毫莫耳)之DCM溶液(6毫升)中，在室溫下添加HOAt(290毫克，2.1毫莫耳)，接著添加DCM中之1 M DCC溶液(2.2毫升，2.2毫莫耳)。在室溫下攪拌30分鐘後，將化合物v(2.1毫莫耳)之THF溶液(10.5毫升，0.2 M)添加至上述HOAt活化之酸中。將反應混合物在

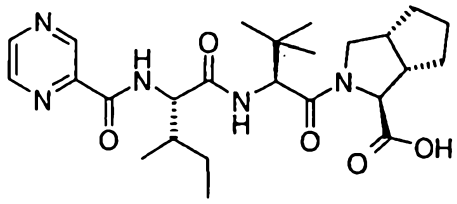
室溫下攪拌過夜。此時，使反應混合物經過矽藻土過濾。將濾液以EtOAc (120毫升)稀釋，並以水及鹽水洗滌。使有機相乾燥，及濃縮成黃色油，使其藉矽膠層析純化(50% EtOAc/己烷)，產生化合物cxvi(0.714克，66%)。



cxvi

中間物實例110-化合物cxvii

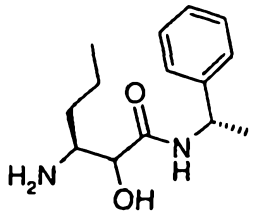
於化合物cxvi(0.7克，1.4毫莫耳)之EtOH溶液中，添加2 N NaOH水溶液(2毫升，4毫莫耳)。將反應混合物於室溫下攪拌過夜，然後藉由5 N HCl酸化至pH3，並以EtOAc稀釋，接著萃取有機相。將已萃取之有機相以鹽水洗滌，並以$MgSO_4$脫水乾燥，於濃縮後，產生化合物cxvii(95%)。



cxvii

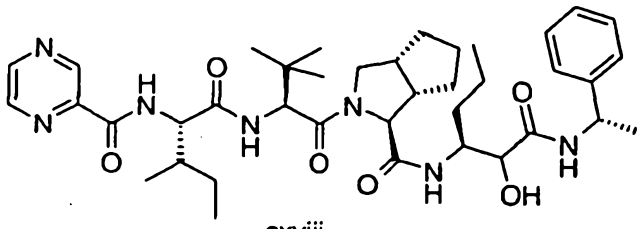
中間物實例111-化合物cxviii

於化合物cvii(300毫克，0.6毫莫耳)之DCM/THF溶液(10毫升/ 2毫升)中，添加PyBOP(416毫克，0.8毫莫耳)。將此溶液於室溫下攪拌30分鐘。然後，於此溶液中添加化合物xxxvi'(200毫克，0.8毫莫耳)，接著為DIPEA(0.22毫升，1.2毫莫耳)。



xxxvi'

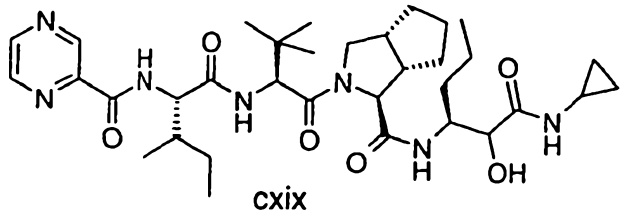
將反應混合物在室溫下攪拌過夜，然後以水(25毫升)使反應淬滅，歷經30分鐘。接著以EtOAc萃取混合物。將所形成之有機相以鹽水洗滌，並以$MgSO_4$脫水乾燥，然後濃縮，產生黃色油。藉矽膠層析純化(3-5% EtOH/EtOAc)產生化合物cxviii(335毫克，76%)。



cxviii

中間物實例112-化合物cxix

於化合物cxvii(340毫克，0.6毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)中，添加PyBOP(470毫克，0.9毫莫耳)。將此溶液於室溫下攪拌30分鐘。然後，於此溶液中添加化合物xiii'(170毫克，0.9毫莫耳)，接著為DIPEA(0.24毫升，1.2毫莫耳)。將反應混合物在室溫下攪拌過夜，然後以水(25毫升)使反應淬滅，歷經30分鐘。然後，以EtOAc萃取混合物。將所形成之有機相以鹽水洗滌，並以$MgSO_4$脫水乾燥，然後濃縮成黃色油。藉矽膠層析純化(3-5% EtOH/EtOAc)產生化合物cxix(164毫克，36%)。



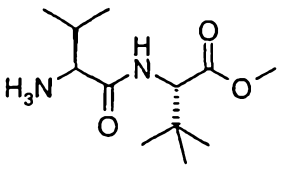
cxix

中間物實例113-化合物xx

使N-Cbz-L-纈胺酸(6.28克，25毫莫耳)溶於DCM(30毫升)中。將HOBT(3.38克，25毫莫耳)與DCC(25毫升，1 M溶液)添加至此溶液中，並攪拌五分鐘。將L-第三-白胺酸甲酯鹽酸鹽(25毫升，1 M溶液)添加至此混合物中，並於N_2下攪拌過夜。將反應混合物以EtOAc稀釋，以1 N HCl、飽和$NaHCO_3$及鹽水洗滌。將有機相以Na_2SO_4脫水乾燥，過濾及濃縮。殘留物藉由20%-30% EtOAc/己烷，以層析方式純化，產生化合物xx(2.96克，31%)。

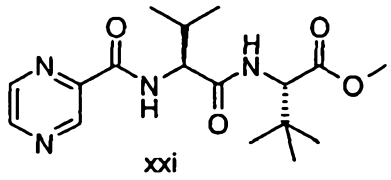
中間物實例114-化合物xxi

使用10% Pd/C(800毫克)，在MeOH(40毫升)中，於H_2下，使化合物xx(2.95克，7.8毫莫耳)氫化，產生下列相應自由態胺(1.9克，100%)。



使2-吡啡羧酸(970毫克，7.8毫莫耳)溶於DCM(20毫升)中。將PyBOP(4.06克，7.8毫莫耳)添加至此溶液中。將自由態胺(1.9克，7.8毫莫耳)在DCM(15毫升)中，添加至該溶液中，接著添加DIPEA(1.36毫升，7.8毫莫耳)。將所形成之混合物於N_2下攪拌過夜。將反應混合物以EtOAc稀釋，

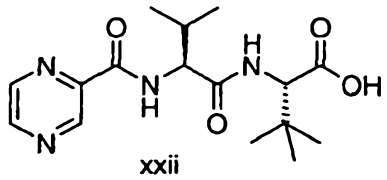
並將有機相以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。在濃縮有機相之後，將殘留物藉由30%-40% EtOAc/己烷，以層析方式純化，產生化合物xxi(2.07克，75.8%)。



xxi

中間物實例115-化合物xxii

使用MeOH(20毫升)與1 N NaOH(3當量)，使化合物xxi水解，產生化合物xxii(1.82克，93.9%)。



xxii

中間物實例116-化合物xxiii

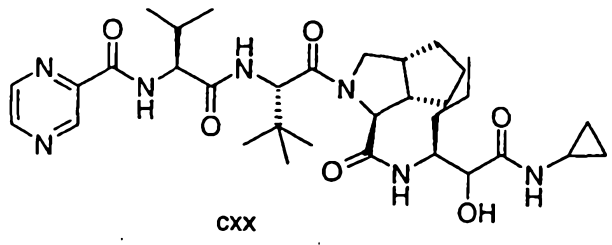
使化合物xxii(895毫克，2.66毫莫耳)溶於DCM(10毫升)中。將DCC(3.2毫莫耳)添加至此溶液中，然後添加HOAt(435毫克，3.2毫莫耳)。接著添加THF(16毫升)中之化合物v(3.2毫莫耳)。將所形成之混合物於N_2下攪拌過夜。將反應混合物以EtOAc稀釋，經過矽膠過濾及濃縮。將所形成之殘留物，藉由50% EtOAc/己烷，以層析方式純化，產生化合物xxiii(730毫克，54.8%)。

中間物實例117-化合物xxiv

使用EtOH(5毫升)與1 N NaOH(1.5當量)，使化合物xxiii水解，產生化合物xxiv(690毫克，100%)。

中間物實例118-化合物cxx

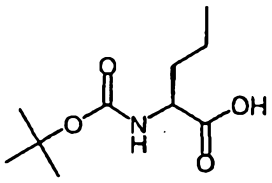
使化合物xxiv(245毫克，0.52毫莫耳)溶於DCM(3毫升)中。將PyBOP(330毫克，0.62毫莫耳)添加至該溶液中，然後添加化合物xiii'(120毫克，0.62毫莫耳)。於所形成之混合物中，添加DIPEA(0.11毫升，0.62毫莫耳)。將反應混合物於N_2下攪拌過夜。將反應混合物以EtOAc稀釋，並將有機相以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。在濃縮有機相之後，將殘留物藉由5% EtOH/EtOAc，以層析方式純化，產生化合物cxx(220毫克，60%)。



cxx

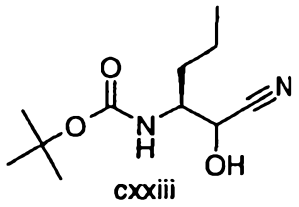
中間物實例119-化合物xiii'

使Boc-NVA-OH(24.96克，114.9毫莫耳)溶於THF(200毫升)中。將CDI(22.35克，137.8毫莫耳)分次添加至該溶液中，並將此溶液攪拌30分鐘。



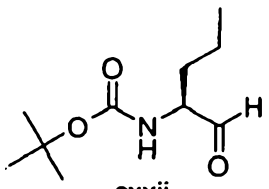
使N,O-二甲基羥胺鹽酸鹽(12.33克，126.4毫莫耳)溶於DMF (50毫升)中，然後將DIPEA(22毫升，126.4毫莫耳)添加至該溶液中。將DMF溶液在室溫下攪拌20分鐘，然後添加至THF溶液中。將所形成之混合物於N_2下攪拌度過週末。使反應混合物在真空中濃縮成100毫升總體積。將此

有機相以1 N HCl、飽和$NaHCO_3$及鹽水洗滌。使有機相濃縮，產生粗製化合物cxxi(25.3克)。



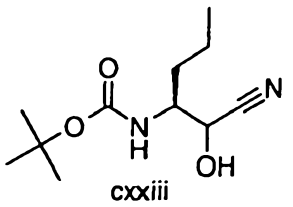
cxxiii

將LAH(107.3毫莫耳)於N_2下，添加至乾燥1升圓底燒瓶內，在1MEt_2O溶液中。使此溶液降至0℃，然後，逐滴添加Et_2O(100毫升)中之化合物cxxi(97.5毫莫耳)。於添加完成時，將所形成之混合物攪拌30分鐘。在0℃下，藉由慢慢添加EtOAc(50毫升)，接著慢慢添加5% $KHSO_4$(50毫升)溶液，使反應混合物淬滅。將此混合物攪拌30分鐘。有機相以1 N HCl、飽和$NaHCO_3$及鹽水洗滌。使有機相濃縮，產生粗製化合物cxxii(22.28克)。



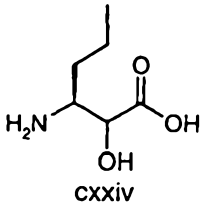
cxxii

使化合物cxxii溶於MeOH(100毫升)中。使$Na_2S_2O_4$(16.82克，96.6毫莫耳)溶於水(100毫升)中，然後添加至化合物cxxii在0℃下之溶液中。將此混合物儲存於冷藏室(5℃)中過夜。將水(100毫升)中之KCN(7.53克，115.9毫莫耳)添加至反應混合物中，並在室溫下攪拌1.5小時。將化合物以EtOAc萃取(3x100毫升)。有機相以鹽水洗滌(3x50毫升)，以$MgSO_4$脫水乾燥，過濾及濃縮，產生粗製化合物cxxiii(15.86克)。



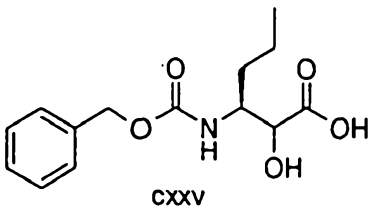
cxxiii

使化合物cxxiii(15.86克)溶於二氧陸圜(100毫升)中。將濃HCl(37%，100毫升)添加至此溶液中，接著為甲苯醚(10毫升)，並建立回流(110℃)。將反應物攪拌1.5小時。當反應混合物冷卻至室溫時，於真空中移除溶劑，產生無水糊劑。使殘留物在高真空下乾燥過夜，產生粗製化合物cxxiv。



cxxiv

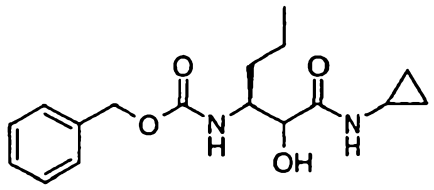
使化合物cxxiv(69.6毫莫耳)溶於DMF(60毫升)與THF(60毫升)中。將N-(苄基氧基羰基氧基)琥珀醯亞胺(17.33克，69.6毫莫耳)添加至混合物中，接著添加DIPEA(12.1毫升，69.6毫莫耳)。將反應混合物於N_2下攪拌過夜。使混合物濃縮至減少之體積(50毫升)，並以EtOAc稀釋。有機相以0.1 N HCl (2x100毫升)及鹽水洗滌，產生化合物cxxv(17.5克，54.2%，歷經五個步驟)。



cxxv

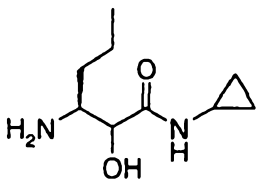
使化合物cxxv(5.66克，20.14毫莫耳)溶於DCM(60毫升)

中。將PyBOP(12.57克，24.2毫莫耳)與HOBT(3.27克，24.2毫莫耳)添加至此溶液中，並攪拌五分鐘。使所形成之混合物降至0℃，然後添加環丙基胺(1.67毫升，24.2毫莫耳)與DIPEA(4.2毫升，24.2毫莫耳)。將反應混合物攪拌過夜，溫熱至室溫。將反應混合物以0.1 N HCl、飽和$NaHCO_3$及鹽水洗滌。然後，使有機相濃縮，並使用70% EtOAc/己烷，以層析方式純化，產生化合物cxxvi(3.18克，49.3%)。



cxxvi

使用10% Pd/C(600毫克)，在MeOH(70毫升)中，使化合物cxxvi(3.18克，9.94毫莫耳)氫化。將反應混合物於H_2下攪拌過夜，經過矽藻土過濾及濃縮，產生粗製化合物xiii'(2.1克，100%)。

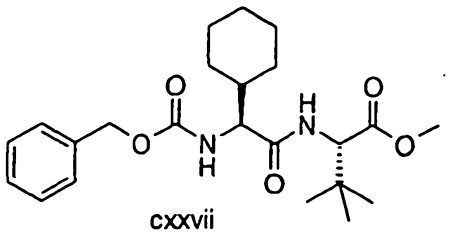


xiii'

中間物實例120-化合物cxxvii

使N-Cbz-L-環己基甘胺酸(3克，10.3毫莫耳)溶於DCM(36毫升)中。將HOAt(1.5克，11.28毫莫耳)與DCC(11.28毫升，11.28毫莫耳)添加至此溶液中，並攪拌五分鐘。將L-第三-白胺酸甲酯鹽酸鹽(103毫升，1 M溶液，

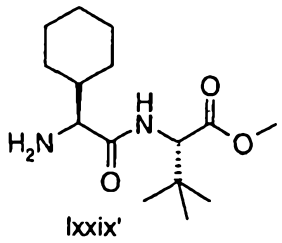
10.3毫莫耳)添加至此混合物中，並於N_2下攪拌過夜。使反應混合物經過矽藻土過濾，以EtOAc沖洗，及濃縮成殘留物，將其使用20%-30% EtOAc/己烷，以層析方式純化，產生化合物cxxvii(2.2克，52%)。



cxxvii

中間物實例121-化合物lxxix'

使用20% $Pd(OH)_2/C$(1克)，在MeOH(15毫升)中，於H_2下，使化合物cxxvii(2.2克，5.2毫莫耳)氫化，產生化合物lxxix'(1.4克，98%)。



lxxix'

中間物實例122-化合物lxxx

使2-吡咔羧酸(360毫克，2.9毫莫耳)溶於DCM(10毫升)中。將PyBOP(1.81克，3.5毫莫耳)添加至該溶液中。然後，將THF(10毫升)中之化合物lxxix'(825毫克，2.9毫莫耳)添加至該溶液中，接著添加DIPEA(0.5毫升，2.9毫莫耳)。將所形成之混合物於N_2下攪拌過夜。以EtOAc稀釋反應混合物，並將有機相以飽和$NaHCO_3$鹽水洗滌。將有機相之濃縮所形成之殘留物，藉由30% EtOAc/己烷，以層析

方式純化，產生化合物lxxx(780毫克，69%)。

中間物實例123-化合物lxxxi

使用MeOH(10毫升)與1 N NaOH(3當量)，使化合物lxxx水解，產生化合物lxxxi(615毫克，81.8%)。

中間物實例124-化合物lxxxii

使化合物lxxxi(610毫克，1.6毫莫耳)溶於DCM(10毫升)中。然後，將DCC(1.94毫升，1.94毫莫耳)添加至該溶液中，接著添加HOAt(270毫克，1.94毫莫耳)。然後，將THF(19.4毫升)中之化合物v(1.94毫莫耳)添加至該溶液中。將所形成之混合物於N_2下攪拌兩夜。將反應混合物以EtOAc稀釋，經過矽膠過濾及濃縮。將所形成之殘留物藉由40% EtOAc/己烷，以層析方式純化，產生化合物lxxxii(450毫克，83.4%)。

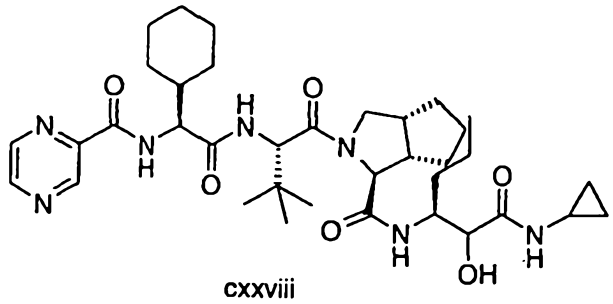
中間物實例125-化合物lxxxiii

使用EtOH(10毫升)與1 N NaOH(3當量)，使化合物lxxxi水解，產生化合物lxxxiii(650毫克，99%)。

中間物實例126-化合物cxxviii

使化合物lxxxiii(400毫克，0.78毫莫耳)溶於DCM(5毫升)中。將PyBOP(610毫克，1.2毫莫耳)添加至該溶液中，接著為化合物xiii'(230毫克，1.2毫莫耳)。於所形成之混合物中，添加DIPEA(0.2毫升，1.2毫莫耳)。將反應混合物於N_2下攪拌過夜。將反應混合物以EtOAc稀釋，並將有機相以飽和$NaHCO_3$鹽水洗滌。在濃縮有機相之後，將殘留物藉由100% EtOAc至5% EtOH/EtOAc梯度液，以層析方式純

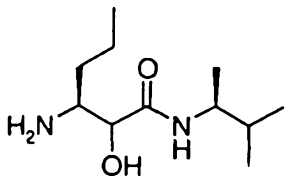
化，產生化合物cxxviii(365毫克，68.7%)。



cxxviii

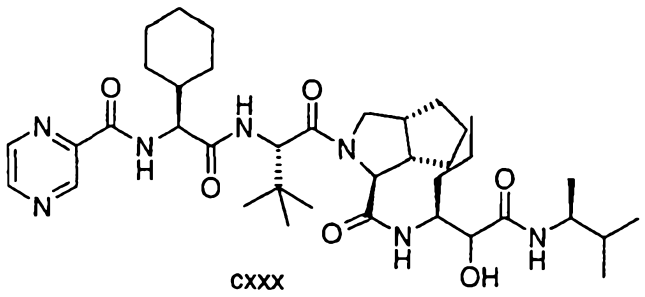
中間物實例127-化合物cxxx

使化合物lxxxiii(365毫克，0.7毫莫耳)溶於DCM(5毫升)中。將PyBOP(440毫克，0.84毫莫耳)添加至該溶液中，接著添加THF(8.4毫升)中之化合物cxxix(0.84毫莫耳)。



cxxix

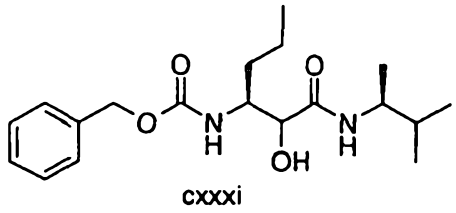
於所形成之混合物中，添加DIPEA(0.1毫升，0.84毫莫耳)。將反應混合物於N_2下攪拌過夜。以EtOAc稀釋反應混合物，並將有機相以飽和$NaHCO_3$鹽水洗滌。在濃縮有機相之後，將所形成之殘留物藉由100% EtOAc，以層析方式純化，產生化合物cxxx(350毫克，70%)。



cxxx

中間物實例128-化合物cxxxi

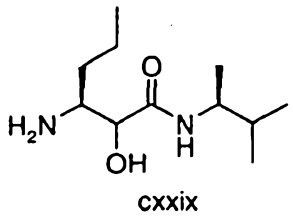
使化合物cxxv(2.54克，9.05毫莫耳)溶於DCM(30毫升)中。將PyBOP(5.65克，10.9毫莫耳)與HOBT(1.47克，10.9毫莫耳)添加至該溶液中，並攪拌五分鐘。使所形成之混合物降至0℃，於其中添加(S)-(+)-3-甲基-2-丁胺(1.27毫升，10.9毫莫耳)與DIPEA(1.9毫升，10.9毫莫耳)。將反應混合物攪拌過夜，並溫熱至室溫。將有機相以0.1 N HCl、飽和$NaHCO_3$鹽水洗滌。在濃縮有機相之後，將所形成之殘留物藉由30% EtOAc/己烷，以層析方式純化，產生化合物cxxxi(1.44克，45.5%)。



cxxxi

中間物實例129-化合物cxxix

使用10% Pd/C(500毫克)，在MeOH(40毫升)中，使化合物cxxxi(1.3克，3.7毫莫耳)氫化。將反應混合物於H_2下攪拌過夜。使反應混合物經過矽藻土過濾，並使有機相濃縮，產生粗製化合物cxxix(800毫克，100%)。

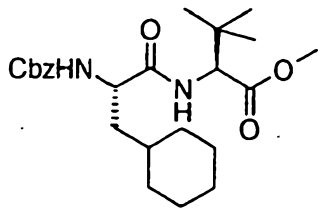


cxxix

中間物實例130-化合物cxxxiv

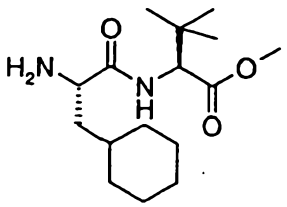
使化合物cxxxii(1.6克，3.7毫莫耳)溶於MeOH(12毫升)

中。



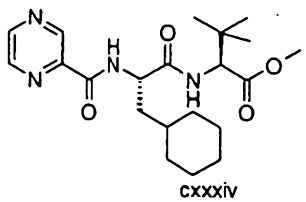
cxxxii

以N_2徹底溢流後，添加10重量% $Pd(OH)_2$/碳(0.74克)，並使混合物氫化過夜，此時藉TLC(30% EtOAc/己烷)証實完全反應混合物。藉過濾使溶液自固體物質分離，及濃縮，產生化合物cxxxiii，為無色油(100%)，將其使用於下一步驟，無需進一步純化。



cxxxiii

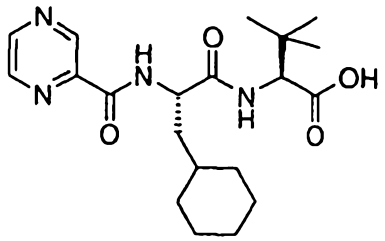
使2-吡咔羧酸(400毫克，3.2毫莫耳，1.1當量)溶於DCM/THF (4毫升/4毫升)中，然後添加HOAt(440毫克，3.2毫莫耳)與DCC(3.3毫升，1 M，在DCM中)。在室溫下攪拌20分鐘後，使先前獲得之化合物cxxxiii(0.96克，3.2毫莫耳)溶於DCM (6.4毫升)中，並添加至經活化之混合物中。在室溫下攪拌2天後，使反應混合物經過矽藻土過濾，及濃縮成殘留物，使其藉管柱層析純化(50% EtOAc/己烷)，產生化合物cxxxiv，為白色固體(1.06克，83%)。



cxxxiv

中間物實例131-化合物cxxxv

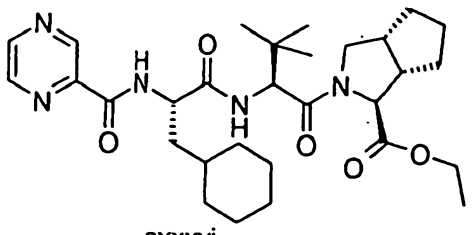
使化合物cxxxiv(1.06克，2.6毫莫耳)溶於MeOH(10毫升)中，然後添加2 N NaOH(水溶液)(4毫升，8毫莫耳)。將此溶液在室溫下攪拌過夜，此時藉TLC(50% EtOAc/己烷)指示完成水解作用。藉由5 N HCl使溶液酸化至pH3，以EtOAc稀釋，然後萃取有機相。將已萃取之有機相以鹽水洗滌，並以$MgSO_4$脫水乾燥，於濃縮後產生化合物cxxxv(100%)。



cxxxv

中間物實例132-化合物cxxxvi

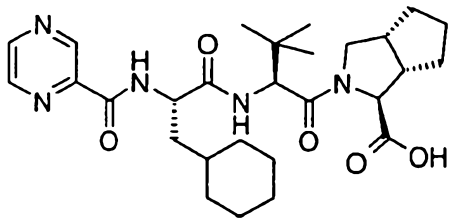
於化合物cxxxv(1.44克，3.7毫莫耳)之DCM溶液(8毫升)中，在室溫下，添加HOAt(500毫克，3.7毫莫耳)，然後添加DCM中之1 M DCC溶液(3.7毫升，3.7毫莫耳)。在室溫下攪拌30分鐘後，將化合物v(3.7毫莫耳)之THF溶液(18.5毫升，0.2 M)添加至上述HOAt活化之酸中。將反應混合物在室溫下攪拌過夜。使反應混合物經過矽藻土過濾。濾液以EtOAc(120毫升)稀釋，並以水及鹽水洗滌。使有機相脫水乾燥及濃縮，產生黃色油，使其藉矽膠層析純化(70% EtOAc/己烷)，產生化合物cxxxvi(1克，71%)。



cxxxvi

中間物實例133-化合物cxxxvii

於化合物cxxxvi(1克，1.8毫莫耳)之EtOH溶液(8毫升)中，添加2 N NaOH水溶液(2.7毫升，5.4毫莫耳)。將反應混合物於室溫下攪拌過夜，然後藉由5 N HCl酸化至pH3，以EtOAc稀釋，然後萃取有機相。將已萃取之有機相，以鹽水洗滌，並以$MgSO_4$脫水乾燥，於濃縮後，產生化合物cxxxvii(88%)。

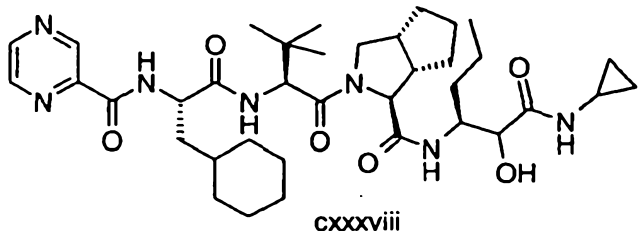


cxxxvii

中間物實例133-化合物cxxxviii

於化合物cxxxvii(350毫克，0.6毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)中，添加PyBOP(450毫克，0.86毫莫耳)。將此溶液於室溫下攪拌30分鐘。然後，於此溶液中添加化合物xiii'(160毫克，0.86毫莫耳)，接著為DIPEA(0.23毫升，1.3毫莫耳)。將反應混合物在室溫下攪拌過夜，然後以水(25毫升)使反應淬滅，歷經30分鐘。然後，以EtOAc萃取混合物。將已萃取之有機相以鹽水洗滌，並以$MgSO_4$脫水乾燥，然後濃縮，產生黃色油。藉矽膠層析純化(5% EtOH/

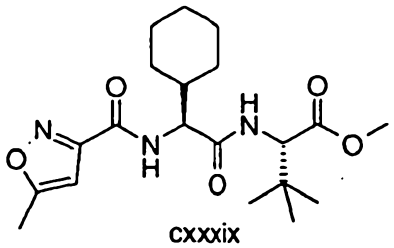
EtOAc)產生化合物cxxxviii (407毫克，88%)。



cxxxviii

中間物實例134-化合物cxxxix

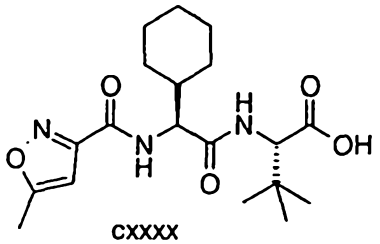
使5-甲基異噁唑-3-羧酸(200毫克，2.05毫莫耳)溶於DCM(5毫升)中。將PyBOP(1.07克，2.05毫莫耳)添加至該溶液中。將DCM(5毫升)中之化合物lxxix'(582毫克，2.05毫莫耳)添加至該溶液中，接著添加DIPEA(0.36毫升，2.05毫莫耳)。將所形成之混合物於N_2下攪拌過夜。以EtOAc稀釋反應混合物，並將有機相以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。使有機相濃縮，並將所形成之殘留物藉由30% EtOAc/己烷，以層析方式純化，產生化合物cxxxix(495毫克，61.4%)。



cxxxix

中間物實例135-化合物cxxxx

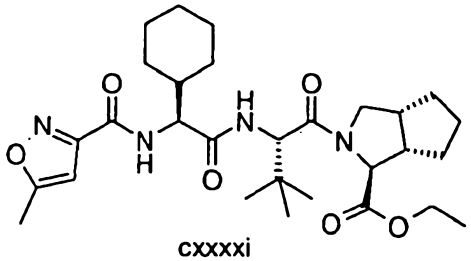
使用MeOH(10毫升)與1 N NaOH(3當量)使化合物cxxxix水解，產生化合物cxxxx(430毫克，90%)。



cxxxx

中間物實例136-化合物cxxxxi

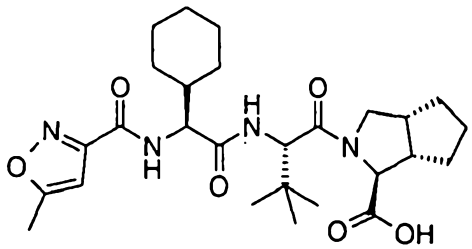
使化合物cxxxx(380毫克，1毫莫耳)溶於DCM(5毫升)中。然後，將DCC(1.2毫莫耳)添加至該溶液中，接著添加HOAt (165毫克，1.2毫莫耳)。接著添加THF(12毫升)中之化合物v(1.2毫莫耳)。將所形成之混合物於N_2下攪拌過夜。將反應混合物以EtOAc稀釋，經過矽膠過濾及濃縮。將所形成之殘留物藉由35% EtOAc/己烷，以層析方式純化，產生化合物cxxxxi(320毫克，58%)。



cxxxxi

中間物實例137-化合物cxxxxii

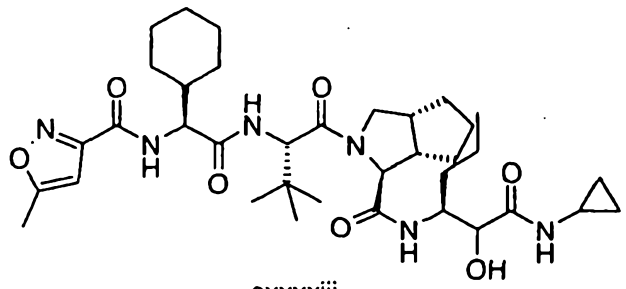
使用EtOH(10毫升)與1 N NaOH(3當量)，使化合物cxxxxi水解，產生化合物cxxxxii(730毫克，94.3%)。



cxxxxii

中間物實例138-化合物cxxxxiii

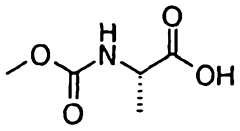
使化合物cxxxxii(240毫克，0.46毫莫耳)溶於DCM(5毫升)中。然後，將PyBOP(295毫克，0.56毫莫耳)添加至該溶液中，接著添加化合物xiii'(110毫克，0.56毫莫耳)。於所形成之混合物中，添加DIPEA(0.1毫升，0.56毫莫耳)。將反應混合物於N_2下攪拌兩夜。以EtOAc稀釋反應混合物，並將有機相以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。在濃縮有機相之後，將所形成之殘留物藉由90% EtOAc/己烷，以層析方式純化，產生化合物cxxxxiii(168毫克，53%)。



cxxxxiii

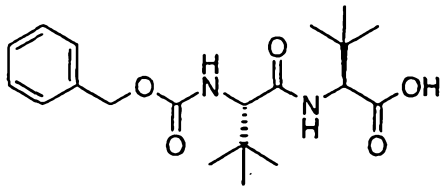
中間物實例139-化合物cxxxxiv

於NaOH溶液(2 N，42.1毫升，84.2毫莫耳)中，在5℃下，添加L-丙胺酸(5.00克，56.1毫莫耳)。在攪拌10分鐘後，同時逐滴添加氯甲酸甲酯(6.5毫升，84.2毫莫耳)與NaOH(2 N，42.1毫升，84.2毫莫耳)。將此溶液於冰浴中攪拌2小時，然後在室溫下1小時。將混合物以Et_2O洗滌(2x50毫升)，以5 N HCl使水層中和至pH~2，並以EtOAc萃取(3x50毫升)。將已萃取之有機相以鹽水洗滌，藉$MgSO_4$脫水乾燥及濃縮，產生化合物cxxxxi,N-甲氧羰基-L-丙胺酸(4.54克，54%)，為無色油。



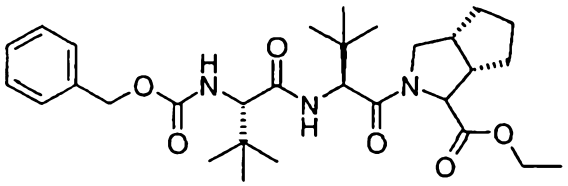
中間物實例140-化合物cxxxxvi

將化合物cxxxxv(3.57克，9.44毫莫耳)在THF中之溶液，



cxxxxv

於5℃下，以HOAt(1.28克，9.44毫莫耳)處理，然後添加DCC(9.50毫升，9.50毫莫耳)。於冰浴中攪拌45分鐘後，添加化合物v(104毫升，10.4毫莫耳)在THF中之溶液。將混合物在室溫下攪拌過夜。使混合物冷卻至5℃，並以飽和$NaHCO_3$使反應淬滅。在過濾以移除已沉澱之DCU後，使混合物溶於EtOAc(100毫升)中，以飽和$NaHCO_3$、鹽水洗滌，然後藉$MgSO_4$脫水乾燥，及濃縮成殘留物，藉由矽膠管柱層析純化(25% EtOAc/己烷)，產生化合物cxxxxvi(2.91克，57%)，為膠黏泡沫物。



cxxxxvi

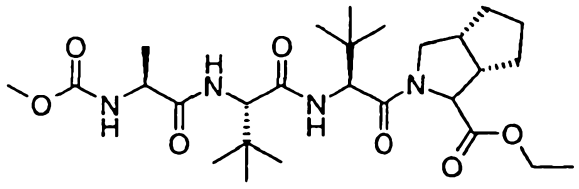
中間物實例141-化合物cviii

於N_2氣流，在藉由冰浴冷卻之化合物cxxxxvi於MeOH(25毫升)中之溶液內，慢慢添加Pd/C。使混合物在1大氣壓下氫化過夜。藉過濾移除觸媒，將濾液與5毫升

DMF合併，及在真空下乾燥，產生化合物cviii。

中間物實例142-化合物cxxxxvii

於化合物cxxxxiv(0.298克，2.03毫莫耳)與HOAt(0.276克，2.03毫莫耳)在THF中，於冰浴中冷卻之溶液內，以DCC(2.05毫升，2.05毫莫耳)處理。於冰浴中攪拌0.5小時後，添加化合物cviii在THF中之溶液，然後添加DIPEA(0.39毫升，2.2毫莫耳)。將混合物在室溫下攪拌過夜，然後在冰浴中冷卻，並以飽和$NaHCO_3$使反應淬滅。過濾已沉澱之DCU，並使濾液溶於EtOAc(100毫升)中。有機相以飽和$NaHCO_3$、鹽水洗滌，然後藉$MgSO_4$脫水乾燥。在移除有機溶劑後，使殘留物藉矽膠管柱層析純化(60% EtOAc/己烷)，產生化合物cxxxxvii(0.47克，48%)，為膠黏泡沫物。

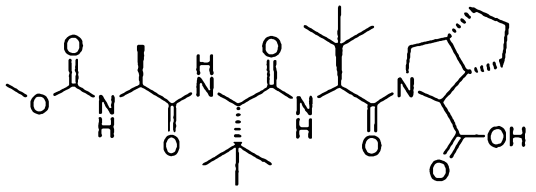


cxxxxvii

中間物實例143-化合物cxxxxviii

於化合物cxxxxvii(0.47克，0.847毫莫耳)在EtOH(5毫升)中之溶液內，在5℃下添加NaOH(2 N，1.31毫升，2.62毫莫耳)。將混合物於室溫下攪拌4小時。以HCl(1N)使溶液酸化至pH~2，並藉迴轉式蒸發移除EtOH。將混合物以EtOAc萃取(3x30毫升)，並將合併之萃液以鹽水洗滌，然後藉$MgSO_4$脫水乾燥。移除溶劑，並使殘留物在真空下乾燥，產生化合物cxxxxviii(0.366克，82%)，為膠黏泡沫

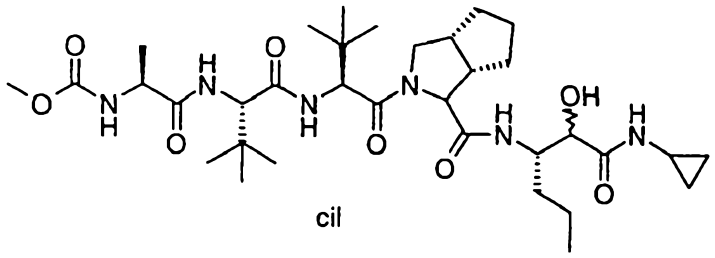
物。



cxxxxviii

中間物實例144-化合物cil

使化合物cxxxxviii(0.366克，0.718毫莫耳)在DCM中之溶液，在冰浴中冷卻，並以PyBOP(0.599克，1.15毫莫耳)處理。在室溫下攪拌0.5小時後，將混合物藉冰浴冷卻，並以化合物xiii'(0.200克，1.08毫莫耳)在THF中之溶液，及DIPEA(0.250毫升，1.44毫莫耳)處理。將混合物在室溫下攪拌過夜，然後以NH_4Cl溶液使反應淬滅。使溶劑濃縮，並使混合物溶於EtOAc(100毫升)中。有機相以飽和$NaHCO_3$、鹽水洗滌，然後藉$MgSO_4$脫水乾燥。在移除有機溶劑後，將殘留物藉管柱層析純化(5% EtOH/EtOAc)，產生化合物cil(0.35克，72%)



cil

中間物實例145-化合物cxxi

於N-Boc-Nva-OH(化合物1)(8.68克，40毫莫耳)之THF溶液(85毫升)中，添加CDI(7.79克，48毫莫耳)。在室溫下攪拌30分鐘後，將上述溶液以含有N,O-二甲基羥胺鹽酸鹽

(4.25克，44毫莫耳)之DMF溶液(25毫升)及DIPEA(7.66毫升，44毫莫耳)處理。將反應混合物於室溫下攪拌過夜。然後，使反應混合物在真空中濃縮。將所形成之殘留物以EtOAc稀釋(300毫升)。將此溶液相繼以0.1 N HCl(50毫升)、飽和$NaHCO_3$(3x50毫升)及鹽水洗滌。使有機相在真空中濃縮，產生殘留物，將其以矽膠層析純化(40% EtOAc/己烷)成為化合物cxxi(9.38克，94%)。

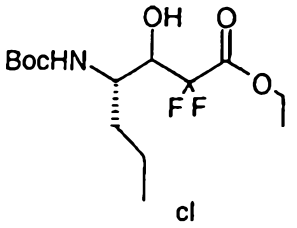
中間物實例146-化合物cxxii

於經冷卻至0℃之化合物cxxi(9.38克，31.9毫莫耳)之Et_2O溶液(50毫升)中，添加(慢慢地)LAH(34.7毫升，1 M，34.7毫莫耳)。在LAH添加期間，使燒瓶之反應溫度保持低於5℃。於添加完成時，將EtOAc(20毫升)添加至反應物中，以使過量LAH淬滅。然後以逐滴方式添加$KHSO_4$水溶液(5%，20毫升)，以保持溫度低於5℃。分離有機相，然後相繼以1 N HCl(3x30毫升)、飽和$NaHCO_3$(3x30毫升)及鹽水洗滌。使有機相濃縮，並在真空中乾燥，產生粗製化合物cxxii (5.18克，69%)。

中間物實例147-化合物cl

於Zn(2.75克，42毫莫耳)之THF(25毫升)懸浮液中，在回流下添加0.2毫升$EtOC(O)CF_2Br$。接著慢慢添加化合物cxxii (3.05克，15.0毫莫耳)與$EtOC(O)CF_2Br$(4.84毫升，37.5毫莫耳)之THF溶液(25毫升)。於兩種試劑添加完成時，使反應混合物進一步回流30分鐘。使反應混合物冷卻至室溫，並以DCM(200毫升)稀釋。將有機相以1 N $KHSO_4$

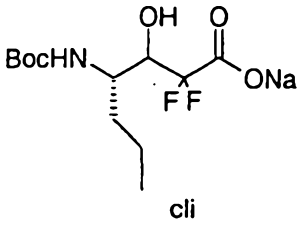
洗滌。使有機相濃縮，並在真空中乾燥，產生殘留物，使其藉矽膠層析純化(20% EtOAc/己烷)，產生化合物cl(2.78克，57%)。



此製備法基本上係與由Thaisrivongs等人，**J. Med. Chem.**, **29**, 2080-2087(1986)所揭示者相同。

中間物實例148-化合物cli

將化合物cl(2.78克，8.53毫莫耳)之THF溶液(40毫升)，以1 N NaOH(12.8毫升，12.8毫莫耳)處理。在室溫下攪拌過夜後，於真空中部份移除溶劑。將殘留反應混合物以水(50毫升)稀釋，及凍乾，產生粗製化合物cli(2.82克，>100%)，為其鈉鹽。



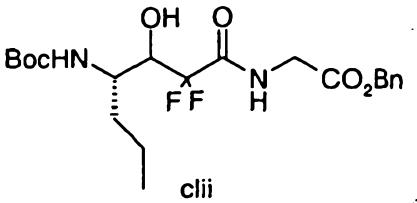
此製備法基本上係與由Thaisrivongs等人，**J. Med. Chem.**, **29**, 2080-2087 (1986)所揭示者相同。

中間物實例149-化合物clii

將粗製化合物cli(516毫克，1.61毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)，以HOBT(436毫克，3.23毫莫耳)及DIC(0.328毫升，2.09毫莫耳)處理。在室溫下攪拌30分鐘後，將反應混

合物以含有甘胺酸苄酯-TsOH鹽(815毫克，2.42毫莫耳)之DCM溶液(5毫升)及DIPEA(0.422毫升，2.42毫莫耳)處理。在室溫下攪拌12小時後，以水使反應混合物淬滅，並以EtOAc萃取。使有機相脫水乾燥，及在真空中濃縮，並藉矽膠層析純化(40% EtOAc/己烷)，產生化合物clii(495毫克，69%)。

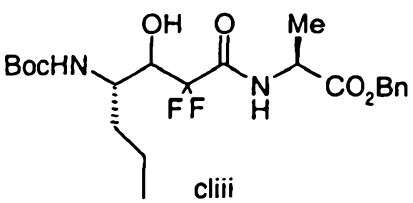
化合物clii之^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)：δ 7.29-7.21 (m, 5H), 5.16 (bs, 2H), 4.89 (bs, 1H), 4.20-3.90 (m, 4H), 3.80 (bs, 1H), 1.75-1.42 (m, 4H), 1.38 (s, 9H), 0.87 (m, 3H).



clii

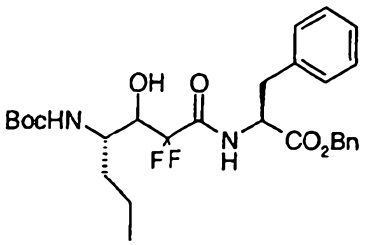
自粗製化合物cli開始，cliii(83%)與cliv(50%)係以關於化合物clii所述之相同方法製成。

化合物cliii之^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)：δ 7.49 (bs, 1H), 7.34-7.24 (m, 5H), 5.13 (ABq, J=12.2 Hz, J'=23.9 Hz, 2H), 4.88 (bd, J=8.8 Hz, 1H), 4.53 (m, 1H), 3.98-3.91 (m, 2H), 3.82 (m, 1H), 1.65-1.20 [m, 16H，包含單峰在1.37 (9H)], 0.86 (t, J=7.3 Hz, 3H).



cliii

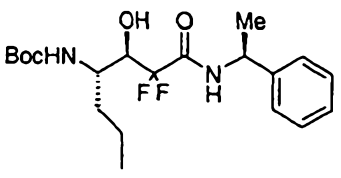
化合物cliv之^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)：δ 7.60-7.0 (m, 10H), 5.30-5.00 (m, 2H), 5.00-4.75 (m, 2H), 4.15-3.70 (m, 3H), 3.30-3.00 (m, 2H), 1.75-1.20 [m, 13H，包含單峰在1.36 (9H)], 0.86 (bs, 3H)..



cliv

中間物實例150-化合物clv

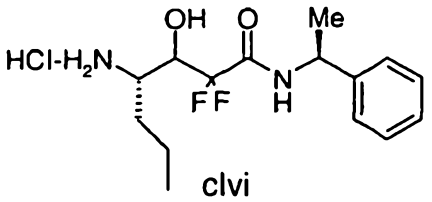
於粗製化合物cli(1克，3.13毫莫耳)之DCM(10毫升)與THF (5毫升)溶液中，添加HOBT(634毫克，4.69毫莫耳)與EDCI (781毫克，4.07毫莫耳)，及接著為(s)-α-甲基苄胺(0.604毫升，4.69毫莫耳)。將反應混合物於室溫下攪拌過夜，然後以水使反應淬滅。將反應混合物以EtOAc萃取。有機相以鹽水洗滌，並藉Na_2SO_4脫水乾燥。使有機相在真空中濃縮，產生殘留物，使其藉矽膠層析純化(20% EtOAc/己烷)，產生化合物clv(459毫克，37%)。化合物clv之^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$)：δ 7.32-7.21 (m, 6H), 5.00 (m, 1H), 4.75 (m, 1H), 3.94 (m, 2H), 3.70 (m, 1H), 1.65-1.15 [m, 16H，包含雙峰在1.51 (J=6.8 Hz, 3H)，單峰在1.39 (9H)], 0.82 (m, 3H).



clv

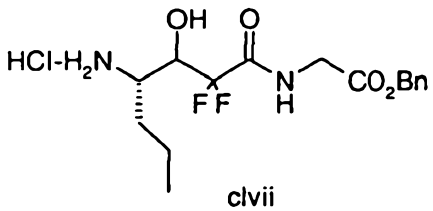
中間物實例151-化合物civi

使化合物clv(220毫克，0.55毫莫耳)溶於二氧陸圜(10毫升)中之4 N HCl內。將反應混合物於室溫下攪拌2小時，然後在真空中濃縮，獲得粗製化合物clvi(~100%)，為其HCl鹽。

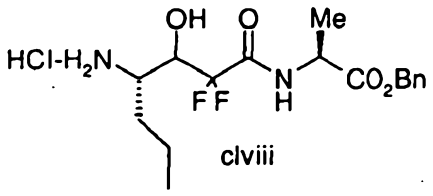


clvi

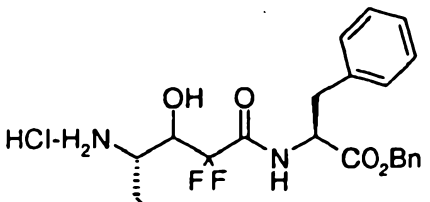
按照關於製備化合物clvi所述之程序，化合物clvii,clviii及clix係以幾乎定量產率，製自粗製化合物cli。



clvii



clviii

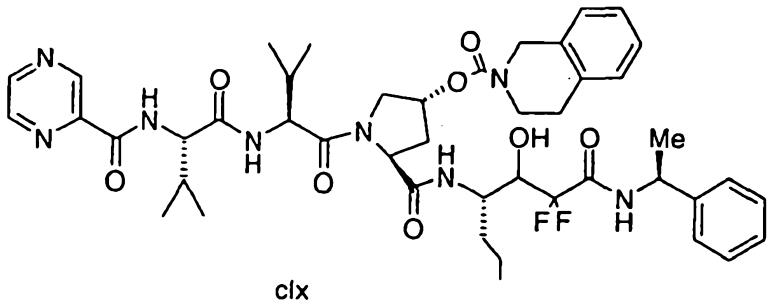


clix

中間物實例152-化合物clx

將化合物vii之HCl鹽(96毫克，0.144毫莫耳)之DCM溶液(4毫升)，以PyBOP(120毫克，0.23毫莫耳)及DIPEA(0.1毫

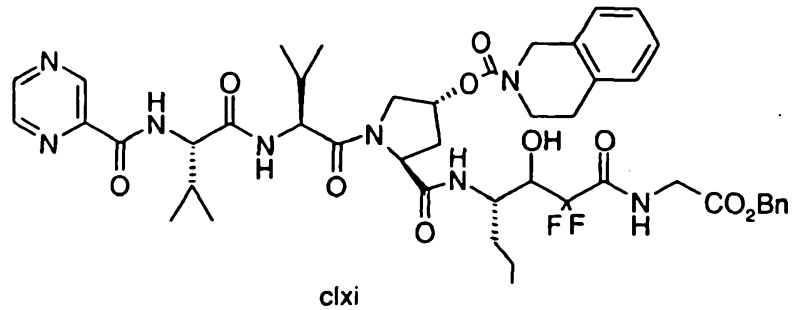
升，0.576毫莫耳)處理。在室溫下攪拌30分鐘後，將溶液以含有化合物clv(0.288毫莫耳)之THF溶液(4毫升)及DIPEA(0.2毫升，1.152毫莫耳)處理。將反應混合物在室溫下攪拌過夜。然後，將反應混合物以EtOAc(50毫升)稀釋，接著將有機相以$NaHCO_3$與鹽水洗滌。使有機相在真空中濃縮，並使殘留物藉矽膠層析純化(80% EtOAc/己烷)，產生化合物clx(113毫克，89%)。



clx

中間物實例153-化合物clxi

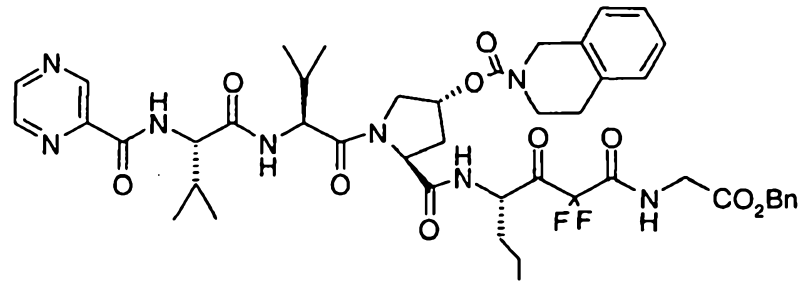
將化合物vii(140毫克，0.235毫莫耳)之DCM溶液(6毫升)，以PyBOP(196毫克，0.376毫莫耳)處理30分鐘。然後，將化合物clvii(~0.47毫莫耳)之THF溶液(6毫升)與DIPEA(0.327毫升，1.88毫莫耳)添加至上述溶液中。將反應混合物在室溫下攪拌過夜，並以水使反應淬滅(30分鐘)。將反應混合物以EtOAc(50毫升)萃取。有機相以$NaHCO_3$與鹽水洗滌。將合併之水層以EtOAc(50毫升)逆萃取。使合併之有機相脫水乾燥，及在真空中濃縮。將所形成之殘留物藉矽膠層析純化(80-100EtOAc/己烷)，產生化合物clxi(104毫克，48%)。



clxi

中間物實例154-化合物clxii

於化合物clxi(280毫克，0.304毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)中，添加DMP試劑(193毫克，0.456毫莫耳)。將反應混合物於室溫下攪拌3小時，並以10% Na_2SO_3使反應淬滅。有機相以$NaHCO_3$與鹽水洗滌。使所形成之有機相脫水乾燥，及在真空中濃縮，產生殘留物，使其以矽膠層析純化(80-100% EtOAc/己烷)，產生化合物clxii(271毫克，97%)。

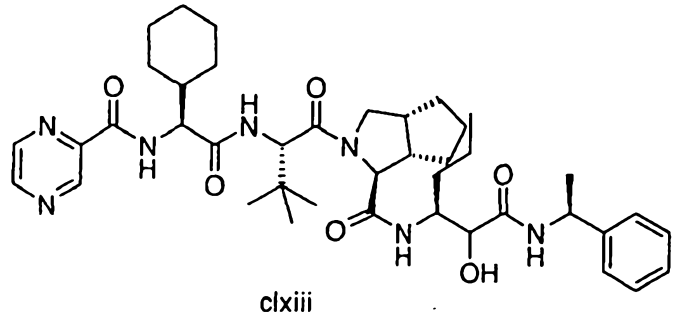


clxii

中間物實例155-化合物clxiii

使化合物lxxxiii(220毫克，0.43毫莫耳)溶於DCM(5毫升)中。將PyBOP(270毫克，0.51毫莫耳)添加至該DCM溶液中，並攪拌5分鐘。將THF(5.1毫升)中之化合物xxxvi'(0.51毫莫耳)逐滴添加至此溶液中。將DIPEA(0.09毫升，0.51毫莫耳)添加至反應混合物中，並於N_2下攪拌過夜。隔天，將反應混合物以EtOAc稀釋，以飽和$NaHCO_3$洗滌，以鹽水

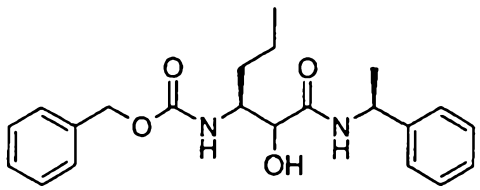
洗滌。藉由70%至90% EtOAc/己烷梯度液純化，產生化合物clxiii(180毫克，56%)。



clxiii

中間物實例156-化合物clxiv

使化合物cxxv(2.09克，7.4毫莫耳)溶於DCM(20毫升)中。將PyBOP(4.64克，8.9毫莫耳)與HOBt(1.2克，8.9毫莫耳)添加至此溶液中，並攪拌五分鐘。使所形成之混合物降至0℃，於其中添加S(-)-α-甲基苄胺(1.15毫升，8.9毫莫耳)與DIPEA (1.55毫升，8.9毫莫耳)。將反應物攪拌過夜，且溫熱至室溫。將反應混合物以0.1 N HCl、飽和$NaHCO_3$及鹽水洗滌。藉由30% EtOAc/己烷純化，產生化合物clxiv(1.6克，56.3%)。



clxiv

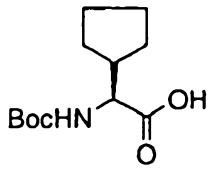
中間物實例157-化合物xxxvi'

使用10% Pd/C(300毫克)，在MeOH(50毫升)中，使化合物clxiv(1.48克，3.8毫莫耳)氫化。將反應混合物於H_2下攪拌過夜。使反應混合物經過矽藻土過濾，及濃縮，而得化

合物xxxvi'(895毫克，94.2%)。

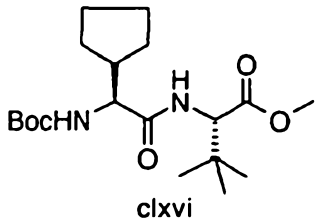
中間物實例158-化合物clxvi：

於化合物clxv(2克，8.2毫莫耳)之DCM溶液(15毫升)中，添加HOAt(1.34克，9.84毫莫耳)與DCC(9.84毫升，1 M，9.84毫莫耳)。



clxv

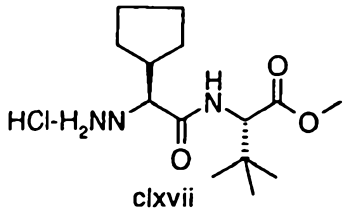
在室溫下攪拌20分鐘後，將含有第三-L-白胺酸甲酯-鹽酸鹽(9.84毫莫耳)之THF溶液(9.84毫升)及DIPEA(1.72毫升，9.84毫莫耳)添加至上述溶液中。然後，在室溫下添加DMAP(1克，8.2毫莫耳)。將反應物在室溫下攪拌過夜。按照標準水溶液處理，及矽膠層析(20% EtOAc/己烷)，獲得化合物clxvi(1.75克，58%)。



clxvi

中間物實例159-化合物clxvii：

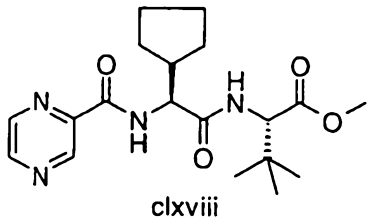
於化合物clxvi(1.75克，4.73毫莫耳)之THF溶液(35毫升)中，添加二氧陸圜中之4 N HCl溶液(11.8毫升，47.3毫莫耳)。將反應物在室溫下攪拌過夜。此時，在減壓下移除溶劑，產生粗製clxvii(~100%)，使其再溶於DMF中，並直接使用於下一反應。



clxvii

中間物實例160-化合物clxviii：

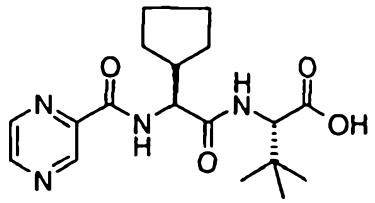
在含有2-吡啡羧酸(447毫克，3.6毫莫耳)、PyBOP(1.87克，3.6毫莫耳)之DCM溶液(15毫升)中，添加化合物clxvii(811毫克，3毫莫耳)之DMF溶液(15毫升)。然後，在所形成之混合物中，添加DIPEA(0.63毫升，3.6毫莫耳)。將反應物於室溫下攪拌過夜，然後以水使反應淬滅。將反應混合物以EtOAc萃取。有機層以鹽水洗滌，及在真空中濃縮，以提供殘留物，使其藉矽膠層析純化(40% EtOAc/己烷)，產生化合物clxviii(0.93克，82%)。



clxviii

中間物實例161-化合物clxix：

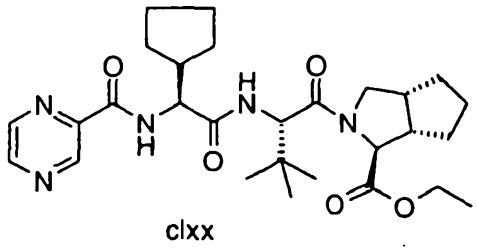
於化合物clxviii(0.93克，2.47毫莫耳)之MeOH溶液(10毫升)中，添加2 N NaOH(3.71毫升，7.41毫莫耳)。將反應物在室溫下攪拌過夜。然後，使用1 N HCl，使反應物酸化至pH3。將反應物以EtOAc(75毫升)稀釋，並以水及鹽水洗滌。使如此獲得之有機層脫水乾燥，及在真空中濃縮，獲得化合物clxix(~100%)。



clxix

中間物實例162-化合物clxx：

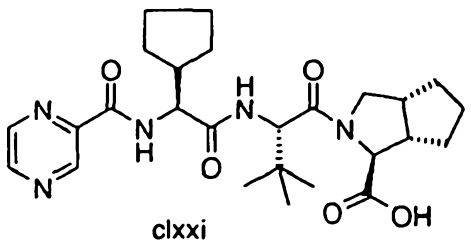
將化合物clxix(2.47毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)以HOAt(436毫克，3.21毫莫耳)及DCC(3.2毫升，1 M，3.2毫莫耳)處理。在攪拌30分鐘後，將反應混合物以化合物v(499毫克，2.72毫莫耳)之THF溶液(13.6毫升)處理。在室溫下攪拌過夜後，將白色固體(脲)過濾。在真空中濃縮濾液，而得殘留物，使其藉矽膠層析純化，產生化合物clxx(0.99克，76%)。



clxx

中間物實例163-化合物clxxi：

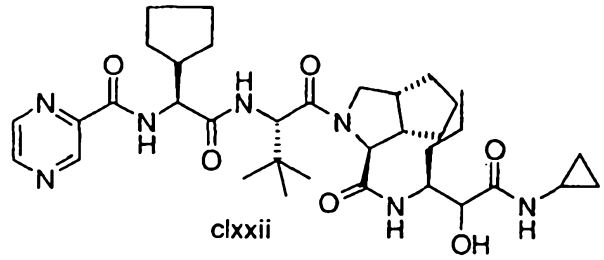
將化合物clxx(0.99克，1.88毫莫耳)之EtOH溶液(20毫升)以2 N NaOH(2.81毫升，5.63毫莫耳)處理。在室溫下攪拌過夜後，以1 N HCl，使反應混合物酸化至pH3。將反應混合物以EtOAc(75毫升)萃取。使有機層脫水乾燥，及在真空中濃縮，獲得化合物clxxi(772毫克，82%)。



clxxi

中間物實例164-化合物clxxi：

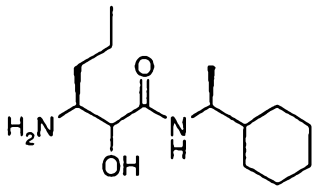
將化合物clxxi(290毫克，0.58毫莫耳)之DCM溶液(10毫升)以PyBOP(484毫克，0.93毫莫耳)處理。在室溫下攪拌20分鐘後，將反應混合物以化合物xiii'(140毫克，0.75毫莫耳)之THF溶液(7.5毫升)，接著以DIPEA(0.13毫升，0.75毫莫耳)處理。於室溫下攪拌過夜後，以水使反應淬滅，並以EtOAc萃取。將所形成之有機層以鹽水洗滌，並脫水乾燥及在真空中濃縮。所形成之殘留物藉矽膠層析純化(5% EtOH/EtOAc)，產生化合物clxxii290毫克(75%)。



clxxii

中間物實例165-化合物clxxiv：

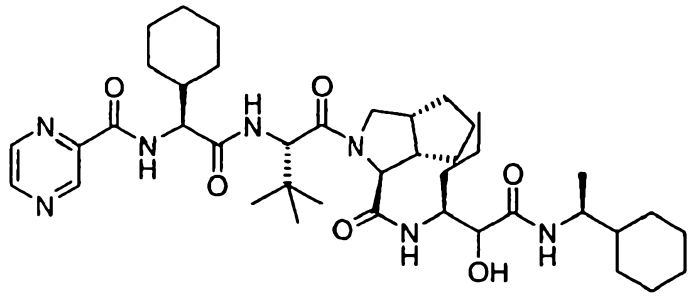
使化合物lxxxiii(600毫克，1.17毫莫耳)溶於DCM(4毫升)中。添加PyBOP(670毫克，1.3毫莫耳)，攪拌五分鐘，並冷卻至0℃。將THF(13毫升)中之化合物clxxiii(333毫克，1.3毫莫耳)逐滴添加至此溶液中。



clxxiii

將DIPEA(0.23毫升，1.3毫莫耳)添加至反應混合物中，並使其溫熱至環境溫度，且攪拌兩夜。隔天，使反應物濃縮，並藉由2% EtOH/EtOAc純化，獲得粗製化合物

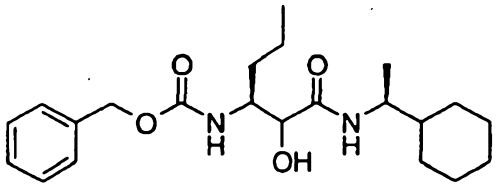
clxxiv(900毫克，超過100%)。



clxxiv

中間物實例166-化合物clxxxv：

使化合物cxxv(3.01克，10.7毫莫耳)溶於DCM(30毫升)中，並使溫度降至-78℃。將PyBOP(6.1克，11.7毫莫耳)與HOBT (1.58克，11.7毫莫耳)添加至此溶液中，接著為(S)-(+)-1-環己基乙胺,化合物clxxv(1.74毫升，11.7毫莫耳)與DIPEA(2.1毫升，11.7毫莫耳)。將所形成之混合物於室溫下攪拌過夜。隔天，將反應混合物以EtOAc稀釋，以0.1 N HCl、飽和$NaHCO_3$及鹽水洗滌。將產物以40% EtOAc/己烷純化，獲得2克(47.8%)化合物clxxvi。



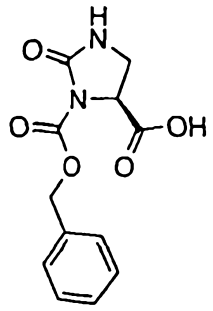
clxxvi

中間物實例167-化合物clxxiii：

使用10% Pd/C(500毫克)，在MeOH(40毫升)中，使化合物clxxvi(2克，5.13毫莫耳)氫化。將反應混合物於H_2下攪拌過夜。使反應混合物經過矽藻土過濾，及濃縮而得化合物clxxiii(1.31克，99.8%)。

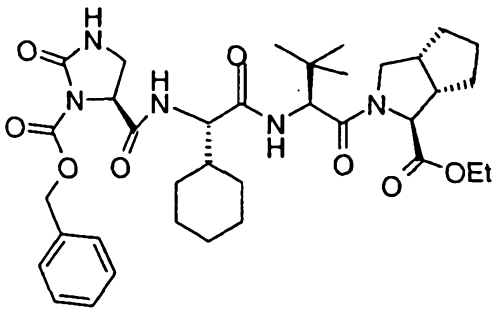
中間物實例168-化合物clxxix：

在圓底燒瓶中，於惰性大氣下，使化合物clxxvii[(S)-(-)-2-酮基-1,5-咪唑啉二羧酸1-苄酯](290毫克，1.1毫莫耳)溶於無水DMF(6毫升)中。



clxxvii

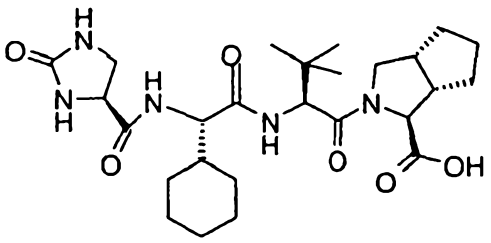
添加HOAt(151毫克，1.2毫莫耳)，並將反應物於室溫下攪拌25分鐘。然後，於冰浴中使反應冷卻下來。然後，添加DIC (0.2毫升，0.16克，1.2毫莫耳)，接著添加無水DMF(4毫升)中之化合物clxxviii(1毫莫耳，435毫克)。使反應物慢慢升至室溫，並攪拌2天。然後，將反應物傾倒在含有120毫升EtOAc之分液漏斗中，並以1 N HCl(50毫升)洗滌2次，及以鹽水洗滌1次。分離有機層，以$MgSO_4$脫水乾燥。在減壓下蒸發溶劑，並使殘留物於矽膠上藉層析純化(負載於DCM中，並以30%，然後50% EtOAc/DCM，然後2% MeOH/EtOAc溶離)，產生產物clxxix(434毫克，64%)。



clxxix

中間物實例169-化合物clxxx：

使起始物質clxxix(434毫克，0.64毫莫耳)溶於二氧陸圜(6毫升)與0.5 M NaOH水溶液(4毫升，3當量)中。反應係操作過夜。在100% EtOAc(使用PMA染色)之TLC顯示除了預期之酸產物在起點以外，有較快速流動之產物。以1 N HCl使反應混合物酸化至pH2，然後以EtOAc萃取2X。將固體NaCl添加至水溶液中，以幫助萃取。然後，將有機萃液合併，以$MgSO_4$脫水乾燥，及在減壓下蒸發。MS顯示CBZ基團係被水解移除。將所形成之化合物clxxx(定量產率)使用於下一步驟中。

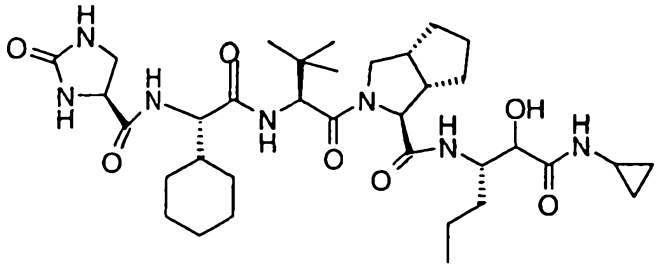


clxxx

中間物實例170-化合物clxxxi：

在圓底燒瓶中，於惰性大氣下，使化合物clxxx(279毫克，0.54毫莫耳)溶於無水DMF(6毫升)中。添加HOAt(82毫克，0.65毫莫耳)，並將反應物於室溫下攪拌25分鐘。然後，使反應於冰浴中冷卻下來。接著添加DIC(0.11毫升，0.65毫莫耳)，然後添加無水DMF(4毫升)中之化合物xiii'(0.7毫莫耳)。使反應物慢慢升至室溫，並攪拌21小時。然後，將反應物傾倒在含有120毫升EtOAc之分液漏斗中，並以1 N HCl(50毫升)洗滌2次，及以鹽水1次。分離有

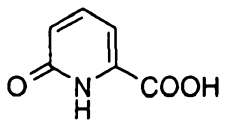
機層，以$MgSO_4$脫水乾燥。藉減壓蒸發溶劑，並使產物於矽膠上藉層析純化(負載於DCM中，並以50% EtOAc/己烷，然後3% MeOH/EtOAc，然後20% EtOH/EtOAc溶離)。移除溶劑後，使殘留物再溶解於Dri Solv THF中，及過濾以移除任何矽膠。然後，移除溶劑，產生化合物clxxxi(434毫克，64%產率)。



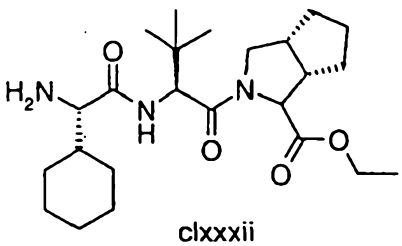
clxxxi

中間物實例171-化合物clxxxiii：

在圓底燒瓶中，於惰性大氣下，使6-羥基吡啶羧酸(153毫克，1.1毫莫耳)溶於無水DMF(6毫升)中。

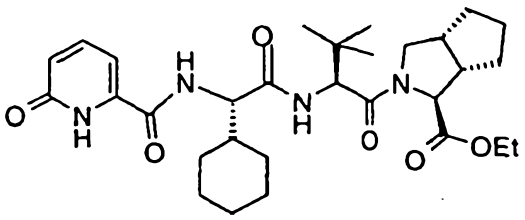


添加HOAt(151毫克，1.2毫莫耳)，然後將反應物於室溫下攪拌25分鐘。接著於冰浴中使反應冷卻下來。然後，添加DIC(0.2毫升，0.16克，1.2毫莫耳)，接著添加無水DMF(4毫升)中之化合物clxxxii(1.0毫莫耳，435毫克)。



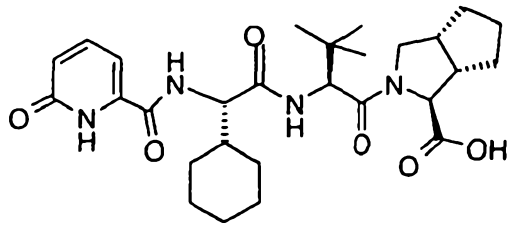
clxxxii

使反應物慢慢升至室溫，並攪拌2天。然後，將反應物傾倒在含有120毫升EtOAc之分液漏斗中，並以1 N HCl(50毫升)洗滌2次，及以鹽水1次。分離有機層，以$MgSO_4$脫水乾燥。藉減壓溶劑蒸發，並使產物於矽膠上藉層析純化(負載於DCM中，以30%，然後50% EtOAc/DCM，接著2% MeOH/EtOAc溶離)，產生所收集之化合物clxxxiii(314毫克，56%)。



中間物實例172-化合物clxxxiv：

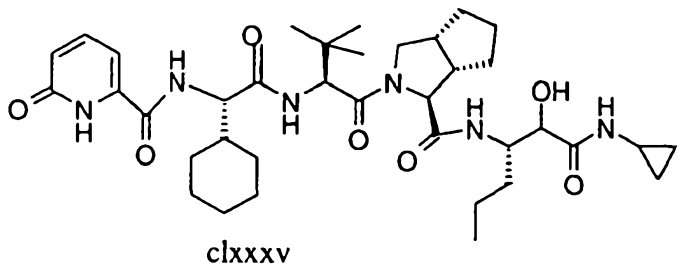
使起始物質clxxxiii(314毫克，0.56毫莫耳)溶於二氧陸圜(5毫升)與0.5 M NaOH(3.4毫升，3當量)中。此反應係操作過夜。在100% EtOAc中之TLC(使用UV)顯示完全轉化成緩慢流動之酸產物，在起點。以1 N HCl使反應物酸化至pH2，然後以EtOAc萃取2次。將固體NaCl添加至水溶液中，以幫助萃取。然後，將有機萃液合併，以$MgSO_4$脫水乾燥，接著在減壓下蒸發，產生化合物clxxxiv(0.5毫莫耳，89%)，將其使用於下一步驟中。



clxxxiv

中間物實例173-化合物clxxxv：

在圓底燒瓶中，於惰性大氣下，使酸化合物clxxxiv(265毫克，0.5毫莫耳)溶於無水DMF(6毫升)中。添加HOAT(75.6毫克，0.6毫莫耳)，並將反應物於室溫下攪拌25分鐘。然後，於冰浴中使反應冷卻下來。然後，添加DIC(0.1毫升，0.6毫莫耳)，接著添加無水DMF(4毫升)中之化合物xiii'(0.65毫莫耳)。使反應物慢慢升至室溫，並攪拌21小時。然後，將反應物傾倒在含有EtOAc(120毫升)之分液漏斗中，並以1 N HCl(50毫升)洗滌2次，及以鹽水1次。分離有機層，以$MgSO_4$脫水乾燥。藉減壓溶劑蒸發，並使產物於矽膠上藉層析純化(負載於DCM中，以50% EtOAc/己烷，然後以純EtOAc，接著以4% MeOH/EtOAc溶離)，產生產物化合物clxxxv (185毫克，52%)。

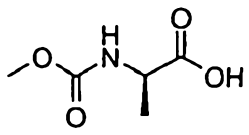


clxxxv

中間物實例174-化合物cxxxxiv'

於D-丙胺酸(5克，56.1毫莫耳)在1 N NaOH(152毫升，152毫莫耳)中之溶液內，在0℃下，添加MeOC(O)Cl(6.5毫升，84.2毫莫耳)在乙醚(30毫升)中之溶液。將混合物於冰浴中攪拌3小時，然後以1 N NaOH調整至pH9。在室溫下攪拌1小時後，將混合物以醚洗滌(3x50毫升)，以5 N HCl酸化至pH~2，以EtOAc萃取(5x50毫升)。將有機萃液以

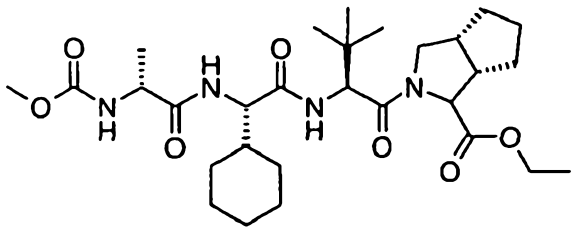
水、鹽水洗滌，然後脫水乾燥($MgSO_4$)。移除溶劑，產生化合物cxxxiv, N-甲氧羰基-D-丙胺酸，為無色油(6.48克，79%)。



cxxxiv

中間物實例175-化合物clxxxvi：

於N-甲氧羰基-D-丙胺酸(0.193克，1.31毫莫耳)與HOAt(0.177克，1.31毫莫耳)在DCM(10毫升)中，於冰浴中冷卻之溶液內，以DCC(1.31毫升，1.31毫莫耳)處理。於冰浴中攪拌0.5小時後，添加所製成化合物clxxxii(0.88毫莫耳)在THF(8.8毫升)中之溶液。使混合物溫熱至室溫，並攪拌過夜，然後於冰浴中冷卻，並以飽和$NaHCO_3$溶液，使反應淬滅。過濾沉澱物，並使濾液溶於EtOAc(100毫升)中。將有機層以飽和$NaHCO_3$溶液鹽、水洗滌，然後脫水乾燥($MgSO_4$)。移除溶劑後，使殘留物藉矽膠管柱層析純化(60% EtOAc/己烷)，產生化合物clxxxvi，為膠黏泡沫物(0.321克，68%)。

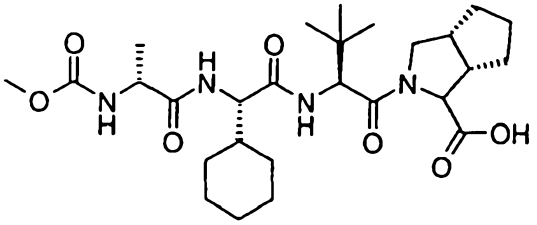


clxxxvi

中間物實例176-化合物clxxxvii：

於化合物clxxxvi(0.321克，0.597毫莫耳)在EtOH(5毫升)

中之溶液內，於5℃下，添加2 N NaOH(1.05毫升，2.1毫莫耳)。將混合物於室溫下攪拌4小時。以1 N HCl使溶液酸化至pH~2，並藉迴轉式蒸發移除EtOH。將混合物以EtOAc萃取(3x30毫升)，並將合併之萃液以鹽水洗滌，然後脫水乾燥($MgSO_4$)。移除溶劑，並使殘留物在真空下乾燥，獲得化合物clxxxvii，為膠黏泡沫物(0.235克，77%)。



clxxxvii

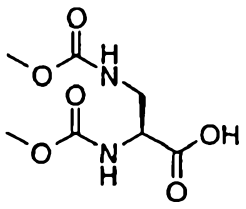
中間物實例177-化合物clxxxviii：

使化合物clxxxvii(0.363克，0.712毫莫耳)在DCM(10毫升)中之溶液，在冰浴中冷卻，並以PyBOP(0.594克，1.14毫莫耳)處理。在室溫下攪拌0.5小時後，使混合物於冰浴中冷卻，並以化合物xiii'(1.1毫莫耳)在THF(11毫升)中之溶液，及DIPEA(0.249毫升，1.42毫莫耳)處理。將混合物在室溫下攪拌過夜，並以NH_4Cl溶液，使反應淬滅。使溶劑濃縮，並使混合物溶於EtOAc(100毫升)中。將有機層以飽和$NaHCO_3$溶液、鹽水洗滌，然後脫水乾燥($MgSO_4$)。移除溶劑後，使殘留物藉管柱層析純化(5% EtOH/EtOAc)，獲得clxxxviii(0.341克，71%)。

中間物實例178-化合物clxxxix：

使二胺基丙酸(3克，28.7毫莫耳)溶於1 M NaOH(86.2毫

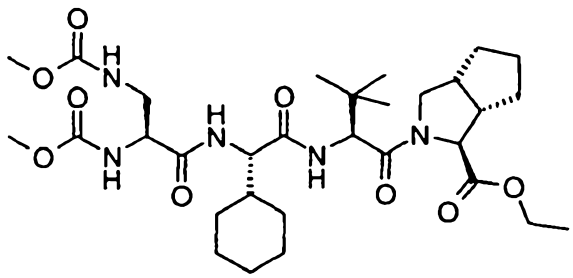
升，86.2毫莫耳)中，並冷卻至0℃，然後添加Et_2O(25毫升)中之MeOC(O)Cl(5.54毫升，71.75毫莫耳)。將所形成之混合物攪拌過夜，溫熱至室溫。使反應混合物之pH值降至2，並將水層以EtOAc萃取3次。將萃液合併，並以Na_2SO_4脫水乾燥，過濾及濃縮，產生化合物clxxxix(3.09克，48.9%)。



clxxxix

中間物實例179-化合物cc：

使化合物clxxxix(340毫克，1.55毫莫耳)溶於DCM(4毫升)中。添加DCC(1.7毫莫耳)與HOAt(235毫克，1.7毫莫耳)，接著為DCM(3.4毫升)中之化合物clxxxii(1.7毫莫耳)。將反應混合物攪拌過夜。隔天，使反應混合物經過矽膠墊片過濾，及濃縮。在75% EtOAc/己烷中達成純化，獲得化合物clxxxx (715毫克，72.4%)。

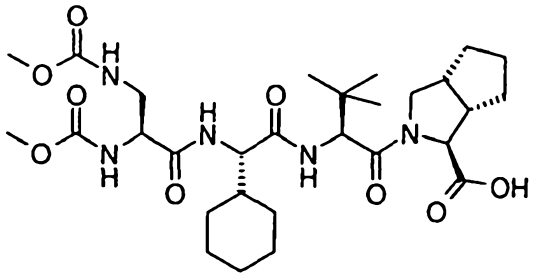


clxxxx

中間物實例180-化合物clxxxxi：

在標準條件下，使用EtOH(4毫升)與1 N NaOH(3當量)，

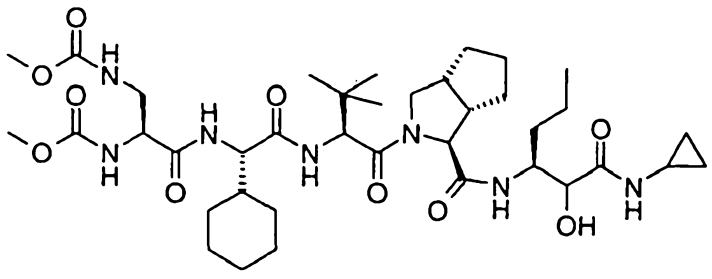
使化合物clxxxx(715毫克，1.12毫莫耳)水解，產生化合物clxxxxi (600毫克，88.0%)。



clxxxxi

中間物實例181-化合物clxxxxii：

使化合物clxxxxi(550毫克，0.9毫莫耳)溶於DCM(8毫升)中。添加PyBOP(675毫克，1.3毫莫耳)，接著為THF(1.3毫升)中之化合物xiii'(1.3毫莫耳)。添加DIPEA(0.23毫升，1.3毫莫耳)，並將所形成之溶液攪拌過夜。隔天，將反應物以EtOAc稀釋，以飽和$NaHCO_3$，然後以鹽水洗滌，接著濃縮，產生殘留物。使所形成之殘留物藉由5% EtOH/EtOAc純化，產生化合物clxxxxii(290毫克，41.5%)。

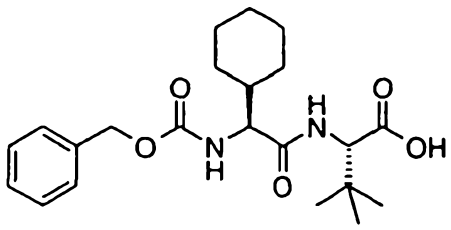


clxxxxii

中間物實例182-化合物clxxxxiii：

在標準條件下，使用MeOH(60毫升)與1 N NaOH(52.8毫升，3當量)，使Cbz-環己基甘胺酸-第三-白胺酸甲酯(7.36克，17.6毫莫耳)水解，回收所產生之中間物clxxxxiii

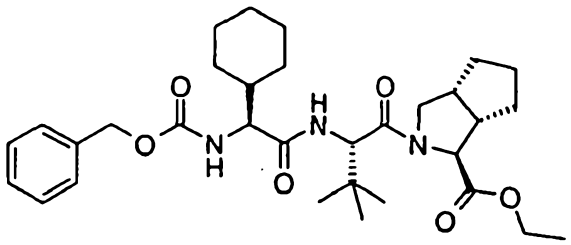
(92%)。



clxxxxiii

中間物實例183-化合物clxxxxiv：

使化合物clxxxxiii(3.82克，9.46毫莫耳)溶於DCM(30毫升)中。添加DCM(11.35毫升)中之DCC(11.35毫莫耳)，接著添加HOAt(1.54克，11.35毫莫耳)。將所形成之混合物攪拌五分鐘，並添加THF(40毫升)中之化合物v(9.46毫莫耳)。將所形成之混合物攪拌過夜。隔天，將反應混合物以EtOAc稀釋，以1 N HCl，飽和$NaHCO_3$，然後以鹽水洗滌，接著濃縮，產生殘留物。使所形成之殘留物藉由20%至30%梯度液，於矽膠上純化，獲得化合物clxxxxiv(3.03克，56.3%)。



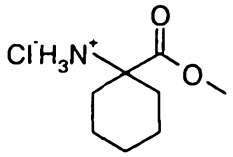
clxxxxiv

中間物實例183-化合物clxxxii：

使用10% Pd/C(500毫克)，在MeOH(30毫升)中，於H_2下，使化合物clxxxxiv(3.03克，5.33毫莫耳)氫化4小時，產生化合物clxxxii(2.3克，99%)。

中間物實例184-化合物clxxxxv：

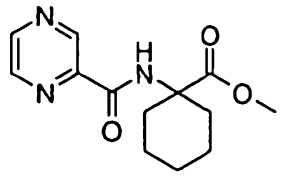
於1-胺基-1-環己烷羧酸(2.86克，20毫莫耳)在MeOH(40毫升)中之溶液內，在0℃下逐滴添加$SOCl_2$(3毫升)。使混合物慢慢溫熱至室溫，然後回流5小時。接著將醚添加至該透明溶液中，並分離沉澱物。使固體在真空下進一步乾燥，產生化合物clxxxxv(95%)，為白色粉末。



clxxxxv

中間物實例185-化合物clxxxxvi：

藉由添加DCM中之HOAt(1.1克，8毫莫耳)與DCC(8毫升，1 M)，使2-吡啡羧酸(1克，8毫莫耳，1當量)溶於DCM(15毫升)中。在室溫下攪拌20分鐘後，將化合物clxxxxv(1.3克，8毫莫耳)添加至該經活化之混合物中。添加DIPEA(2毫升，12毫莫耳)，接著為DMAP(1.5克，12毫莫耳)。在室溫下攪拌3天後，使反應混合物經過矽藻土過濾，濃縮，並將所要之產物clxxxxvi藉管柱層析純化(50% EtOAc/己烷)，為黃色油(2.1克，100%)。

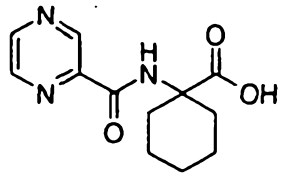


clxxxxvi

中間物實例186-化合物clxxxxvii：

藉由添加2 N NaOH(水溶液)(12毫升，24毫莫耳)，使化合物clxxxxvi(1.06克，2.6毫莫耳)溶於MeOH(30毫升)中。在TLC(50% EtOAc/己烷)顯示完全水解之前，將此溶液在

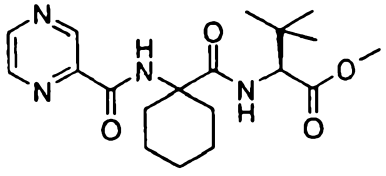
室溫下攪拌過夜。該溶液以5 N HCl酸化至pH3，並以EtOAc稀釋之後，萃取有機層。接著以鹽水洗滌有機層，並使用$MgSO_4$脫水乾燥，於濃縮後，以84%產率獲得化合物clxxxxvii。



clxxxxvii

中間物實例187-化合物clxxxxviii：

使化合物clxxxxvii (1.6克，6.4毫莫耳)溶於DCM(18毫升)中，且接著在室溫下添加HOAt(0.96克，7毫莫耳)與DCC(7毫升，1 M，在DCM中)。在室溫下攪拌20分鐘後，將L-第三-白胺酸甲酯鹽酸鹽(7毫升，1 M在THF中)添加至經活化之混合物中。接著添加DIPEA(1.2毫升，7毫莫耳)，及隨後添加DMAP (1.2克，9.8毫莫耳)。在室溫下攪拌3天後，使反應混合物經過矽藻土過濾，藉管柱層析純化並濃縮產生化合物clxxxxviii(60% EtOAc/己烷)，為白色固體(1.74克，72%)。

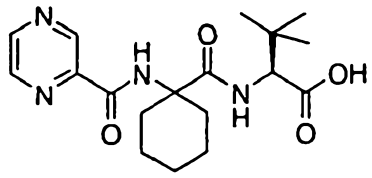


clxxxxviii

中間物實例188-化合物cic：

使化合物clxxxxviii(1.74克，4.6毫莫耳)溶於MeOH(22毫升)中，並添加2 N NaOH(水溶液)(7毫升，14毫莫耳)。在

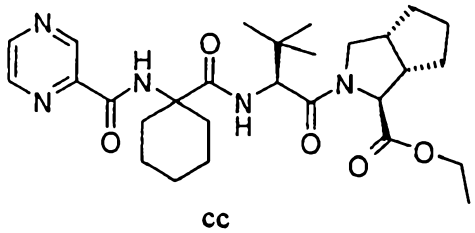
TLC(50% EtOAc/己烷)顯示完全水解之前，將此溶液在室溫下攪拌過夜。該溶液以5 N HCl酸化至pH3，並以EtOAc稀釋之後，萃取有機層。接著以鹽水洗滌有機層，並使用$MgSO_4$脫水乾燥，於濃縮後產生化合物cic(100%)。



cic

中間物實例189-化合物cc：

於化合物cic(1.5克，4.1毫莫耳)之DCM溶液(15毫升)中，在室溫下，添加HOAt(610毫克，4.5毫莫耳)，接著為DCM中之1 M DCC溶液(4.5毫升，4.5毫莫耳)。在室溫下攪拌30分鐘後，接著添加化合物v(4毫莫耳)之THF溶液(20毫升，0.2 M)。將反應物在室溫下攪拌過夜。然後，使反應物經過矽藻土過濾。使濾液濃縮成黃色油，使其藉矽膠層析純化(50% EtOAc/己烷)，產生化合物cc (660毫克，32%)。

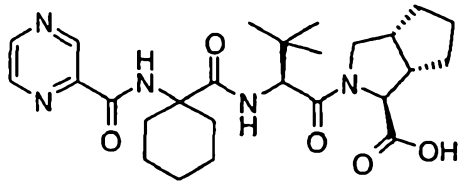


cc

中間物實例190-化合物cci：

於化合物cc (600毫克，1.13毫莫耳)之EtOH溶液(6毫升)中，添加2 N NaOH(1.7毫升，3.4毫莫耳)。將反應物在室溫下攪拌2小時，然後藉5 N HCl酸化至pH3。然後，將混

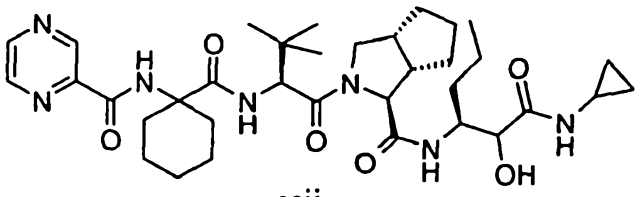
合物以EtOAc稀釋，接著萃取有機層。接著，將有機層以鹽水洗滌，然後以$MgSO_4$脫水乾燥，於濃縮後，產生化合物cci(92%)。



cci

中間物實例191-化合物ccii：

於cci(310毫克，0.62毫莫耳)之DCM溶液(8毫升)中，添加PyBOP(420毫克，0.8毫莫耳)。將此溶液於室溫下攪拌30分鐘。然後，於此溶液中添加THF中之化合物xiii'(8毫升，0.1 M)，接著添加DIPEA(0.23毫升，1.3毫莫耳)。將反應物在室溫下攪拌過夜，然後以水(25毫升)使反應淬滅30分鐘。然後以EtOAc萃取混合物。將所形成之有機層以鹽水洗滌，然後在濃縮之前，以$MgSO_4$脫水乾燥，產生黃色油。藉矽膠層析純化(3% EtOH/EtOAc)產生化合物ccii(140毫克，33%)。

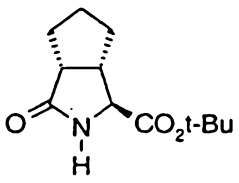


ccii

中間物實例192-化合物cciv

於化合物cciii、(N-二苯亞甲基)-甘胺酸第三-丁酯(6克，0.0206毫莫耳)與對掌性PTC(1.08克，0.00206毫莫耳)在無水DCM(48毫升)中之溶液內，於N_2大氣及-60℃下，

添加 $CsOH \cdot H_2O$(6.9克，0.0412毫莫耳)。於反應混合物中逐滴添加10毫升DCM中之1-羧基-1-環戊烯甲酯(5.2毫升，0.0412毫莫耳)。將混合物在-60℃下攪拌4天，然後以200毫升 Et_2O稀釋，並添加15毫升飽和NH_4Cl水溶液。分離液相，並將有機相以15毫升水及15毫升鹽水洗滌。將水相以100毫升Et_2O萃取。合併有機相，並以Na_2SO_4水乾燥。藉由移除溶劑，獲得粗產物，溶於100毫升EtOH中，然後添加$NH_2OH \cdot HCl$(1.43克，0.0206毫莫耳)與NaOAc(1.68克，0.0206毫莫耳)。使混合物回流48小時。然後，移除溶劑，並將所獲得之粗製殘留物直接藉急驟式層析純化，以30%-50% EtOAc/己烷溶離，產生化合物cciv(65%)，為白色固體。$C_{12}H_{19}NO_3$(MW=225.29)；MS：m/z $(M^+ +1)$=226.5。對掌異構物過量：18%ee，藉對掌性HPLC測得。

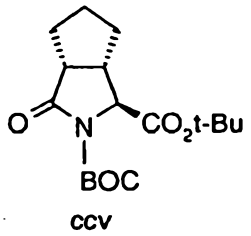


cciv

中間物實例193-化合物ccv

於化合物cciv(2克，0.0088毫莫耳)在60毫升ACN中之溶液內，添加催化量之DMAP(0.216克，0.0017毫莫耳)，及二碳酸二-第三-丁酯(2.49克，0.011毫莫耳)在30毫升ACN中之溶液。將混合物在室溫下攪拌14小時，然後以100毫升DCM稀釋，並以飽和$NaHCO_3$(10毫升)及以鹽水(10毫升)洗滌。有機相以Na_2SO_4脫水乾燥。蒸發溶劑，產生粗產

物，使其在矽膠管柱上純化，以15% EtOAc/己烷溶離，獲得化合物ccv (86%)，為白色固體。$C_{17}H_{27}NO_5$，MW=325.40，MS：m/z (M^++1)=326.2

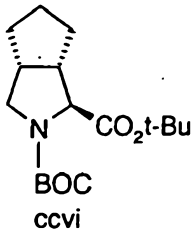


ccv

中間物實例194-化合物ccvi

於化合物ccv(1.7克，0.0052毫莫耳)在50毫升THF(0.14 M)中之溶液內，在-78℃下，添加DIBAL-H(7.8毫升，0.0078毫莫耳)。將混合物攪拌1小時，然後添加10毫升MeOH。將混合物以25毫升EtOAc及25毫升飽和酒石酸鈉水溶液稀釋，然後於室溫下攪拌一小時。分離液相，並將水相以50毫升EtOAc萃取一次。將有機相合併，並以Na_2SO_4脫水乾燥。蒸發溶劑，獲得粗製殘留物，使用之而無需任何純化。使粗製物溶於25毫升DCM中，添加Et_3Si(0.84毫升，0.0052毫莫耳)，然後使混合物在-78℃下冷卻，接著逐滴添加BF_3OEt_2(0.71毫升，0.0061毫莫耳)。30分鐘後，添加Et_3Si(0.84毫升)與BF_3OEt_2(0.71毫升)，並將混合物攪拌2小時至-78℃。接著，以飽和$NaHCO_3$水溶液(10毫升)使反應淬滅，並以DCM萃取(2x20毫升)。合併有機相，並以Na_2SO_4脫水乾燥。蒸發溶劑，獲得粗製殘留物，使其藉急驟式層析純化，以13% EtOAc/己烷溶離，產生化合物ccvi(87%)。$C_{17}H_{29}NO_4$，MW=311.42，MS：m/z

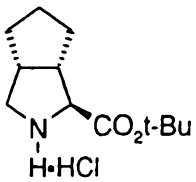
$(M^+ +1)=312.6$



ccvi

中間物實例195-化合物ccvii

使化合物ccvi(0.5克，0.0016毫莫耳)溶於EtOAc中之8毫升1 N HCl(經由使無水HCl起泡至無水EtOAc中，然後以另外之EtOAc稀釋至1N而製成)中。將混合物在室溫下攪拌6小時。於真空中移除溶劑，並使所形成之沉澱物溶於Et_2O中。將混合物攪拌15分鐘後，在減壓下移除溶劑。將所形成之白色固體以Et_2O洗滌，並藉過濾分離化合物ccvii(0.27克，80%產率)，$C_{12}H_{21}NO_2$，MW 211.15，MS：m/z $(M^+ +1)=212.6$



ccvii

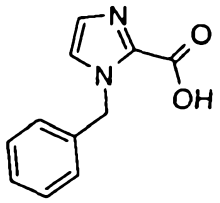
中間物實例196-化合物v

於化合物ccxvi(0.230克，0.74毫莫耳)在CH_2Cl_2(3.7毫升)中之溶液內，添加TFA(2.85毫升)。將混合物攪拌過夜，然後於真空中移除溶劑至乾涸，並使殘留物溶於EtOH(7.5毫升)中。使混合物在0℃下冷卻，並逐滴添加$SOCl_2$(0.22毫升，2.96毫莫耳)，然後回流2小時。於減壓下移除

EtOH，並使殘留物溶於CH_2Cl_2(10毫升)中。將所形成之溶液以飽和$NaHCO_3$水溶液(5毫升)洗滌兩次。分離液相，並使有機相以Na_2SO_4脫水乾燥，及在真空中移除溶劑，產生化合物v(80%)為油。$C_{10}H_{17}NO_2$，M. W.：183.25，MS：m/z(M^++1)=184.2

中間物實例197-化合物cd

使1-苄基咪唑(6克，37.9毫莫耳)溶於Et_2O(180毫升)中。使所形成之溶液降至-60℃，並以n-BuLi(1.6 M，24毫升)處理。將反應物攪拌30分鐘，然後使CO_2起泡通過混合物15分鐘。將沉澱物過濾，以Et_2O沖洗，然後溶於H_2O中。以5 N HCl使此水溶液酸化至pH=3。於冷凍乾燥後，分離所要之產物cd，為白色固體。

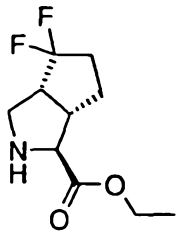


cd

中間物實例198-化合物cdi

將化合物i(9.25克，27.9毫莫耳)之DCM溶液(100毫升)，在0℃下，以DAST(9.2毫升，69.8毫莫耳)處理。在室溫下攪拌過夜後，以冰使反應淬滅，並以DCM(200毫升)萃取。將有機層以鹽水洗滌，及在真空中濃縮。使殘留物以矽膠層析純化(30% EtOAc/己烷)，產生8.5克(86%)所要之氟化中間物。使一部份此中間物(4.5克，14.2毫莫耳)溶於

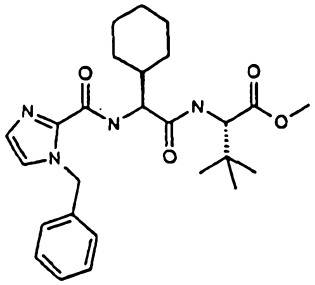
EtOH(75毫升)中。使此溶液接受標準氫化條件，使用$Pd(OH)_2/C$(2.98克，20% Pd含量，4.26毫莫耳)。於室溫下攪拌過夜後，使反應混合物經過矽藻土過濾。在真空中濃縮濾液，產生化合物cdi(2.5克，96%)。



cdi

中間物實例199-化合物cdii

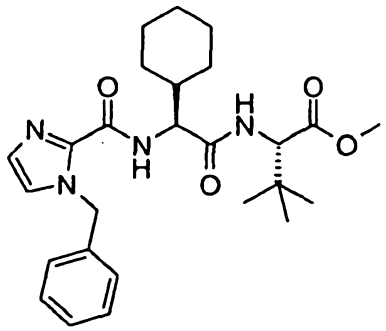
於化合物cd(890毫克，4.4毫莫耳)溶於DCM(15毫升)中之溶液內，添加HOBT(595毫克，4.4毫莫耳)與DCC(4.4毫莫耳，1 M在DCM中)，並攪拌20分鐘。將ixxix'(990毫克，3.5毫莫耳)之DCM溶液(15毫升)添加至此混合物中。將所形成之混合物於氮氣下攪拌過夜。將反應混合物以EtOAc稀釋，以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。使有機層在真空中濃縮，而得殘留物，使其在30% EtOAc/己烷中純化，產生化合物cdii(666毫克，41%)。



cdii

中間物實例200-化合物cdiii

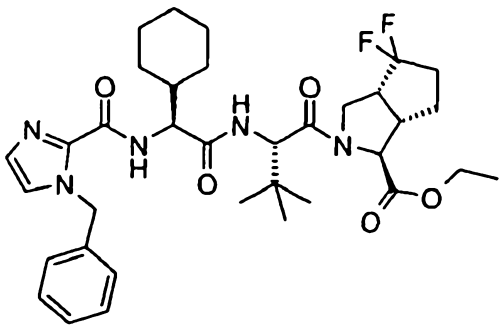
化合物cdiii係於標準水解條件下，使用甲醇(10毫升)與1 N NaOH(3當量)，製自化合物cdi。回收565毫克化合物cdiii (88%)。



cdiii

中間物實例201-化合物cdiv

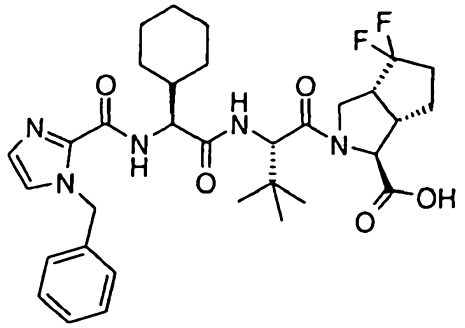
使化合物cdiii(1.24毫莫耳)溶於DCM(5毫升)中。添加DCC (1.6毫莫耳，1MDCM)，接著為HOAT(1.6毫莫耳)。將所形成之混合物攪拌20分鐘，並逐滴添加THF(8毫升)中之化合物cdi(1.6毫莫耳)。將反應物攪拌過夜。過濾反應物，並以EtOAc沖洗。將合併之有機層以飽和$NaHCO_3$、鹽水洗滌，以$MgSO_4$脫水乾燥，及濃縮。在30% EtOAc/己烷中達成純化，產生化合物cdiv(565毫克，70%)。



cdiv

中間物實例202-cdv

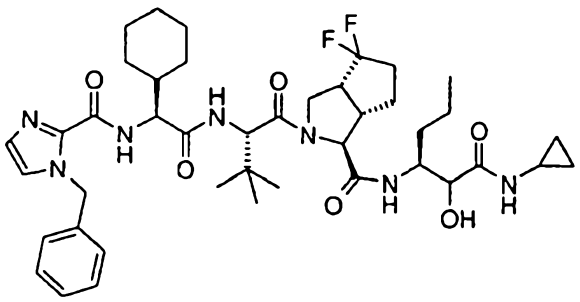
化合物cdv(565毫克，0.86毫莫耳)係於標準水解條件下，使用乙醇(10毫升)與1 N NaOH(3當量)，製自化合物cdiv。回收490毫克(91%)化合物cdv。



cdv

中間物實例203-cdvi

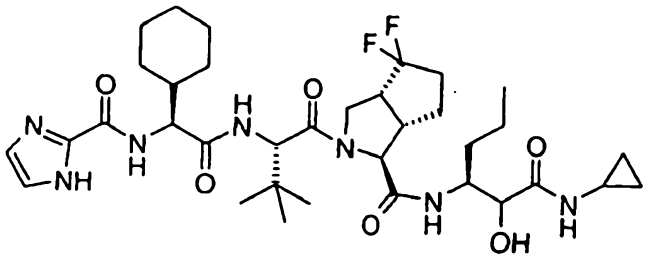
使化合物cdvi(490毫克，0.78毫莫耳)溶於DCM(10毫升)中。將PyBOP(520毫克，1毫莫耳)添加至該DCM溶液中，接著為xiii(186毫克，1毫莫耳)之THF溶液(10毫升)。將DIEA(0.18毫升，1毫莫耳)添加至反應混合物中，並於氮氣下攪拌過夜。隔天，將反應物以EtOAc稀釋，以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。在100% EtOAc中達成純化，產生化合物cdvi(478毫克，77%)。



cdvi

中間物實例204-cdvii

使用$Pd(OH)_2/C$(20%，以乾重為基準，100毫克)在MeOH(40毫升)中，使化合物cdvi(478毫克，0.6毫莫耳)氫化。將反應混合物於氫下攪拌過夜。此時，使反應混合物經過矽藻土過濾及濃縮，產生化合物cdvii(417毫克，98%)。

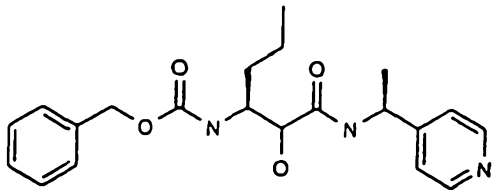


cdvii

中間物實例205-cdx

使化合物cxxv(購自Albanyl分子研究公司，1.5克，5.2毫莫耳)溶於DCM(15毫升)中。將PyBOP(2.7克，5.2毫莫耳)與HOBT(700毫克，5.2毫莫耳)添加至此溶液中。將(-)-α-(4-吡啶基)乙胺(640毫克，5.2毫莫耳)之THF溶液(15毫升)添加至上述溶液中，接著為DIEA(0.93毫升，5.2毫莫耳)。(-)-α-(4-吡啶基)乙胺，係得自(-)-α-(4-吡啶基)乙胺之酒石酸鹽(Aldrich)，其方式是與1 N NaOH(2當量)攪拌1小時，接著以EtOAc萃取(3x)(70%回收)。

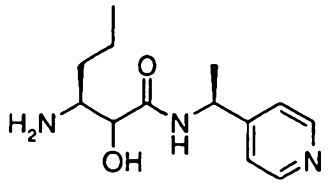
將反應物於室溫下攪拌過夜。將反應混合物以飽和$NaHCO_3$與鹽水洗滌。使產物在5% EtOH/EtOAc中純化，產生2克(99%)中間化合物cdx。



cdx

中間物實例206-cdviii

使用10% Pd/C(500毫克)在MEOH(50毫升)中，使化合物cdx(2克，5.2毫莫耳)氫化。將反應混合物於氫下攪拌過夜。使產物經過矽藻土過濾，及濃縮，而得化合物cdviii(1.3克，98%)。



cdviii

藥理學

根據本發明之化合物，如本文中所述，可用於抑制HCV蛋白酶，因此亦可用於抑制HCV複製。

因此，此處本發明係針對抑制HCV蛋白酶之方法，其包括使抗-HCV蛋白酶抑制量之式1化合物與包含HCV蛋白酶之組合物接觸。

此處之又另一發明係針對一種抑制HCV複製之方法，其包括使HCV與有效量之式1化合物接觸。再者，此處之另一發明係針對一種治療患有或遭受HCV感染之病人之方法，其包括對該病人投予藥學上有效量之式1化合物。於本文中指稱治療HCV感染，應明瞭係包括預防療法，以防止或抑制感染，以及治療已建立之急性或慢性HCV感染或

與HCV感染有關聯之生理學症狀，以基本上治癒感染之病人，抑制感染程度(量)，或改善與其有關聯之生理學症狀。"有效量"係意欲說明本發明化合物之量，在合理生物學判斷之範圍內有效，適用於與人類及其他哺乳動物之細胞接觸，而無不當毒性、刺激性、過敏性回應等，且在治療HCV感染上，伴隨著合理利益/風險比，及因此產生所要之治療效果。

本文中所討論之生理學症狀，包括一部份，但並非所有其中抗-HCV治療被認為正當之可能臨床狀況。在此領域中有經驗者，係極明瞭需要任一種抗-HCV治療之狀況。

本發明之一個特定方面，係提供根據本發明之化合物係欲以醫藥組合物之形式投藥，惟此化合物可單獨投藥。"醫藥組合物"係意謂一種組合物，其包含式1化合物，及至少一種成份，選自包括藥學上可接受之載劑、稀釋劑、塗層、佐劑、賦形劑或媒劑，譬如防腐劑、填料、崩解劑、潤濕劑、乳化劑、乳化安定劑、懸浮劑、等滲劑、增甜劑、矯味劑、芳香劑、著色劑、抗細菌劑、抗真菌劑、其他治療劑、潤滑劑、吸附延遲或促進劑及分配劑，依投藥模式與劑量形式之性質而定。此等組合物可呈現片劑、丸劑、顆粒、粉末、水溶液或懸浮液、可注射溶液、酏劑或糖漿形式。舉例之懸浮劑包括乙氧基化異硬脂基醇類、聚氧化乙烯花楸醇及花楸聚糖酯類、微晶性纖維素、偏氫氧化鋁、膨土、瓊脂及西黃著樹膠，或此等物質之混合物。舉例之用以防止微生物作用之抗細菌劑與抗真菌劑，

包括對羥基苯甲酸酯類、氯丁醇、酚、花楸酸等。舉例之等滲劑，包括糖類、氯化鈉等。舉例之延長吸收之吸附延遲劑，包括單硬脂酸鋁與明膠。舉例之加強吸收之吸附促進劑，包括二甲亞碸及相關類似物。舉例之載劑、稀釋劑、溶劑、媒劑、促溶劑、乳化劑及乳化安定劑，包括水、氯仿、蔗糖、乙醇、異丙醇、碳酸乙酯、醋酸乙酯、苄醇、四氫呋喃甲醇、苯甲酸苄酯、多元醇、丙二醇、1,3-丁二醇、甘油、聚乙二醇、二甲基甲醯胺、Tween® 60、Span® 80、鯨蠟硬脂基醇、十四烷醇、單硬脂酸甘油酯及月桂基硫酸鈉、花楸聚糖之脂肪酸酯類、植物油(譬如棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄欖油、蓖麻油及芝麻油)，及可注射有機酯類，譬如油酸乙酯等，或此等物質之適當混合物。舉例之賦形劑，包括乳糖、乳糖、檸檬酸鈉、碳酸鈣、磷酸二鈣。舉例之崩解劑，包括澱粉、海藻酸類及某些複雜矽酸鹽。舉例之潤滑劑，包括硬脂酸鎂、月桂基硫酸鈉、滑石，以及高分子量聚乙二醇。

其他治療劑可與本發明化合物合併使用，包括其他抗-HCV劑。一些舉例之已知抗-HCV劑，包括免疫調節劑，譬如α-、β-或γ-干擾素；經PEG化之衍生干擾素-α化合物，其他抗病毒劑，譬如三唑核苷與金剛胺；C型肝炎蛋白酶之其他抑制劑；在HCV生命期中其他標的之抑制劑，包括解螺旋酶、聚合酶、金屬蛋白酶、內部核糖體進入物，或廣效抗病毒化合物，譬如VX-497，一種細胞纖維核苷單磷酸鹽脫氫酶(IMPDH)之抑制劑，被美國專利

5,807,876所涵蓋；或其組合。可與本發明化合物併用之治療劑可分別、同時或順序投藥，

在醫藥組合物中，式1化合物以外之物質之選擇，通常係根據活性化合物之化學性質，譬如溶解度，特定投藥模式，及在醫藥實務中欲被遵守之規定作決定。例如，賦形劑，譬如乳糖、檸檬酸鈉、碳酸鈣、磷酸二鈣，及崩解劑，譬如澱粉、海藻酸及某些複合矽酸鹽，與潤滑劑，譬如硬脂酸鎂、月桂基硫酸鈉及滑石併用，可用於製備片劑。

此等醫藥組合物可以各式各樣形式呈現，譬如片劑、丸劑、顆粒、粉末、水溶液或懸浮液、可注射溶液、酏劑或糖漿。

"液體劑量形式"係意謂欲被投予病人之活性化合物劑量，係呈液體形式，例如藥學上可接受之乳化液、溶液、懸浮液、糖漿及酏劑。除了活性化合物以外，液體劑量形式可含有常用於此項技藝中之惰性稀釋劑，譬如溶劑、促溶劑及乳化劑。

亦可採用固體組合物，在軟性與硬質充填明膠膠囊中，作為填料，使用之賦形劑譬如乳糖或牛奶糖，以及高分子量聚乙二醇等。

當使用含水懸浮液時，其可含有乳化劑或有助於懸浮之作用劑。

乳化醫藥組合物之油相，可以已知方式，自已知成份構成。雖然此相可以僅包含乳化劑(另稱為乳化作用劑

(emulgent))，但一般期望包含至少一種乳化劑與脂肪或油，或與脂肪及油兩者之混合物。較佳係包含親水性乳化劑，以及充作安定劑之親脂性乳化劑。亦較佳係包含油與脂肪。乳化劑與安定劑一起或未使用安定劑，構成乳化用蠟，而與油及脂肪一起之方式，係構成乳化軟膏基料，其係形成乳膏配方之油性分散相。

若需要，乳膏基料之水相，可包括例如至少30% w/w多羥醇，意即具有兩個或多個羥基之醇，譬如丙二醇、丁烷1,3-二醇、甘露醇、花楸醇、甘油及聚乙二醇(包括PEG 400)及其混合物。局部配方可能期望包含會加強活性成份吸收或浸透經過皮膚或其他受感染區域之化合物。

供配方用之適當油類或脂肪類，其選擇係以達成所要之美觀性質為基礎。因此，乳膏較佳應為不油膩、非污染性及可洗滌之產物，具有適當稠度，以避免自管件或其他容器滲漏。可使用直鏈或分枝鏈、單-或二元烷基酯類，譬如肉豆蔻酸二異丙酯、油酸癸酯、棕櫚酸異丙酯、硬脂酸丁酯、棕櫚酸2-乙基己酯，或分枝鏈酯類之摻合物，稱為Crodamol CAP。其可單獨或合併使用，依所需要之性質而定。或者，可使用高熔點脂質，譬如白色軟性石蠟及/或液態石蠟或其他礦油。

實用上，本發明之化合物/醫藥組合物可以適當配方，藉由局部或系統投藥，投予人類與動物，包括口腔、吸入、直腸、鼻、面頰、舌下、陰道、結腸、非經腸(包括皮下、肌內、靜脈內、皮內、鞘內及硬膜外)、腦池內及

腹膜腔內。應明瞭的是，較佳途徑可隨著例如接受者之症狀而改變。

"藥學上可接受之劑量形式"係指本發明化合物之劑量形式，且包括例如片劑、糖衣錠、粉末、酏劑、糖漿，液體製劑，包括懸浮液，噴霧劑、吸入片劑、錠劑、乳化液、溶液、顆粒、膠囊及栓劑，以及注射用之液體製劑，包脂質體製劑。技術與調配方法可一般性地參閱最新版之Remington氏醫藥科學，Mack出版公司(Easton, PA)。

"適於口服投藥之配方"可以不連續單位呈現，譬如膠囊、扁囊劑或片劑，各含有預定量之活性成份；成為粉末或顆粒；成為溶液或懸浮液，在水性液體或非水性液體中；或成為油在水中型液體乳化液，或水在油中型液體乳化液。活性成份亦可呈現為大丸劑、舔劑或糊劑。

片劑可藉由壓縮或模製製成，視情況使用一或多種輔助成份。壓縮片劑可經由將呈自由流動形式之活性成份，譬如粉末或顆粒，在適當機器中壓縮而製成，視情況與黏合劑、潤滑劑、惰性稀釋劑、防腐劑、表面活性或分散劑混合。模製片劑可經由將已使用惰性液體稀釋劑濕潤之粉末狀化合物之混合物，在適當機器中模製而製成。此等片劑可視情況經塗覆或刻劃，並可經調配，以提供其中活性成份之緩慢或受控釋出。

供直腸投藥之固體組合物，包括根據已知方法調配且含有至少一種本發明化合物之栓劑。

若需要且為更有效分佈，可將此等化合物微包膠在於或

連附至緩慢釋出或標的傳輸系統，譬如生物可相容、生物可降解之聚合體基質(例如聚(d,l-內交酯共-乙交酯))、脂質體及微球體，及藉由被稱為皮下或肌內積貯之技術，以皮下方式或肌內方式注射，以提供此等化合物之連續緩慢釋出，歷經2週或較長時間。此等化合物可經滅菌，例如經過細菌保留濾器過濾，或經由在無菌固體組合物形式中摻入殺菌劑，其可在即將使用之前，溶於無菌水或某些其他無菌可注射媒質中。

"適用於鼻或吸入投藥之配方"係意謂呈適合以鼻方式或藉吸入方式投予病人形式之配方。此配方可含有載劑，呈粉末形式，具有粒子大小例如在1至500微米之範圍內(包括粒子大小在20與500微米間之範圍內，呈5微米之增量，譬如30微米，35微米等)。其中載劑為液體，以例如鼻噴霧劑或以鼻滴劑供投藥之適當配方，係包含活性成份之水性或油性溶液。適於氣溶膠投藥之配方，可根據習用方法製成，並可與其他治療劑一起傳輸。吸入療法可容易地藉由經計量之劑量吸入器投藥。

"適於口服投藥之配方"係意謂呈適合經口投予病人形式之配方。此等配方可呈現不連續單位，譬如膠囊、扁囊劑或片劑，各含有預定量之活性成份；成為粉末或顆粒；成為溶液或懸浮液，在水性液體或非水性液體中；或成為油在水中型液體乳化液，或水在油中型液體乳化液。活性成份亦可呈現為大丸劑、舔劑或糊劑。

"適於非經腸投藥之配方"係意謂呈適合以非經腸方式投

予病人形式之配方。此等配方係為無菌的，且包括乳化液、懸浮液、水性與非水性注射溶液，其可含有懸浮劑與增稠劑，及抗氧化劑、緩衝劑、制菌劑，及使得配方具有與所意欲接受者之血液呈等滲性之溶質，並具有經適當調整之pH值。

"適於直腸或陰道投藥之配方"係意謂呈適合以直腸方式或以陰道方式投予病人形式之配方。此配方較佳係呈栓劑形式，其可經由將本發明化合物與適當無刺激性賦形劑或載劑譬如可可豆脂、聚乙二醇或栓劑蠟混合而製成，其在一般溫度下為固體，但在體溫下為液體，因此會在直腸或陰道腔中熔解，並釋出活性成份。

"適於系統投藥之配方"係意謂呈適合以系統方式投予病人形式之配方。此配方較佳係藉由注射投藥，包括經由肌肉、靜脈內、腹膜腔內及皮下。對注射而言，係將本發明化合物調配在液體溶液中，較佳係在生理學上可相容之緩衝劑中，譬如Hank氏溶液或林格氏溶液。此外，可將此等化合物調配成固體形式，並在即將使用之前再溶解或懸浮。經凍乾形式亦包括在內。系統投藥亦可藉由經黏膜或經皮方式，或此等化合物可經口投藥。對於經黏膜或經皮投藥而言，係於配方中使用對於欲被滲透之障壁適合之浸透劑。此種浸透劑係為此項技藝中一般已知的，且包括例如供經黏膜投藥用之膽汁鹽與梭鏈孢酸衍生物。此外，可使用清潔劑以幫助滲透。經黏膜投藥可經由使用例如鼻噴霧劑或栓劑。對口服投藥而言，可將化合物調配成習用口

服投藥形式，譬如膠囊、片劑及補藥。

"適用於局部投藥之配方"係意謂呈適合以局部方式投予病人形式之配方。此配方可呈現為局部軟膏、藥膏、粉末、噴霧劑及吸入藥、凝膠(水或醇系)、乳膏，其係為此項技藝中一般已知的，或被摻入基料中，以供塗敷於貼藥上，其允許受控釋出化合物經過經皮障壁。當經調配在軟膏中時，活性成份可與無論是石蠟或水可溶混之軟膏基料一起採用。或者，活性成份可與油在水中型乳膏基料，一起調配在乳膏中。適合局部投予眼睛之配方，包括滴眼劑，其中係使活性成份溶解或懸浮於適當載劑中，尤其是供活性成份用之水性溶劑。適合局部投予嘴巴之配方，包括錠劑，其包含活性成份，在矯味基料中，通常為蔗糖與阿拉伯膠或西黃著樹膠；軟錠劑，其包含活性成份，在惰性基料中，譬如明膠與甘油，或蔗糖與阿拉伯膠；及漱口水，其包含活性成份，在適當液體載劑中。

"固體劑量形式"係意謂本發明化合物之劑量形式為固體形式，例如膠囊、片劑、丸劑、粉末、糖衣錠或顆粒。在此種固體劑量形式中，係將本發明化合物與至少一種惰性習用賦形劑(或載劑)譬如檸檬酸鈉或磷酸二鈣，或下述物質互混，(a)填料或增量劑，例如澱粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇及矽酸，(b)黏合劑，例如羧甲基纖維素、海藻酸鹽、明膠、聚乙烯基四氫吡咯酮、蔗糖與阿拉伯膠，(c)保濕劑，例如甘油，(d)崩解劑，例如瓊脂、碳酸鈣、馬鈴薯或木薯澱粉、海藻酸、某些複合矽酸鹽及碳酸鈉，(e)溶

解阻滯劑，例如石蠟，(f)吸收加速劑，例如四級銨化合物，(g)潤濕劑，例如鯨蠟醇與單硬脂酸甘油酯，(h)吸附劑，例如高嶺土與膨土，(i)潤滑劑，例如滑石、硬脂酸鈣、硬脂酸鎂、固體聚乙二醇、月桂基硫酸鈉，(j)遮光劑，(k)緩衝劑，及以延遲方式在腸道之某一部份釋出本發明化合物之作用劑。

活性成份在本發明組合物中之實際劑量程度，可以改變，以獲得活性成份之量，其係針對特定組合物與投藥方法，對病人有效獲得所要之治療回應。因此，對特定病人所選擇之劑量程度係依所要之治療效果、投藥途徑、所要之治療期間、疾病之病因學與嚴重性、病人之症狀、重量、性別、飲食與年齡、各活性成份之種類及功效、吸收率、代謝及/或排泄及其他因素而定。

以單一或分離劑量投予病人之本發明化合物之總日服劑量，其量可為例如每天約0.001至約100毫克/公斤體重，且較佳為0.01至10毫克/公斤/天。例如，在成人中，此劑量通常為每天藉由吸入約0.01至約100，較佳為約0.01至約10毫克/公斤體重，每天藉口服投藥為約0.01至約100，較佳為0.1至70，更尤其是0.5至10毫克/公斤體重，及每天藉靜脈內投藥為約0.01至約50，較佳為0.01至10毫克/公斤體重。活性成份在組合物中之百分比，可以改變，惟其應構成某一比例，以致將獲得適當劑量。劑量單位組合物可含有其約數之量，其可用以構成日服劑量。顯而易見的是，數個單位劑量形式可大約同時投藥。劑量可按需要而頻繁

地投藥，以獲得所要之治療效果。有些病人可對較高或較低劑量迅速地回應，及可發現遠為較弱之維持足夠劑量。對其他病人可能必須在每天1至4份劑量之比率下，有長期治療，根據各特定病人之生理學需要量而定。而對於其他病人更不用說了，其將必須開立每天不大於一或兩份劑量。

此等配方可藉製藥技藝中所習知之任何方法，以單位劑量形式製成。此種方法包括使活性成份與構成一或多種輔助成份之載劑產生結合之步驟。一般而言，此等配方係經由均勻且密切地使活性成份與液體載劑或細分固體載劑或兩者產生結合，然後若必要則使產物成形而製成。

此等配方可呈現於單位劑量或多劑量容器中，例如密封安瓿瓶與具有彈性塞子之小玻瓶，並可儲存於凍乾條件下，在即將使用之前，僅需要添加無菌液體載劑，例如注射用水。臨時注射溶液與懸浮液可製自前文所述種類之無菌粉末、顆粒及片劑。

在本發明範圍內之化合物，根據文獻及下文所述之試驗，顯示顯著藥理學活性，咸信該試驗結果係與在人類及其他哺乳動物中之藥理學活性有關聯。

活體外酶檢測程序

HCVNS3絲胺酸蛋白酶之抑制

HCVNS3蛋白酶功能部位係按以前所述進行表現與純化(Vertex, PCT公報WO 98/17679；其係併於本文供參考)。供NS3蛋白酶用之產色肽受質EDVVAbuC-對-硝基醯基苯

胺，及NS4A輔因子片段(-KKGSVVIVGRIVLSGK-)，係由美國肽公司(Ca)定製合成。使用分光光度測定檢測，並以EDVVAbuC-對-硝基醯基苯胺作為受質，測試本發明化合物抑制HCVNS3蛋白酶活性之能力。此檢測係在96-井微滴定板上，使用具有動力學能力之Spectra Max 250讀取器(分子裝置，Sunnyvale, CA)操作。EDVVAbuC-對-硝基醯基苯胺(500 μM)受質，藉由已純化HCVNS3蛋白酶(0.5 μM)之分裂，係於30℃下，在測試化合物不存在或存在下，在緩衝劑中施行，其中含有30 μM NS4A片段，46 mM Hepes, pH8.0, 92 mM NaCl, 18%甘油，5 mM DTT及7.5% DMSO。監測此反應關於pNA(對-硝基苯胺)在405毫微米下之釋出。

動力學參數，包括V_{max}, K_m及V_{max}/K_m，其測定係在如上述之條件下施行。Ki值係計算自速率對[抑制劑]圖形，在固定濃度之酶與受質下，藉由數據對Morrison方程式關於緊密結合競爭性抑制之非線性最小平方吻合[J.F.Morrison, **Biochim. Biophys. Acta., 185**, 269-286 (1969)]。Prism程式(GraphPad軟體公司)係使用於此程序。

於本文中揭示之HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑，可與直接顯示或間接引出抗-HCV活性之其他分子合併使用，以預防病人感染HCV或治療已遭感染之病人。"抗-HCV活性"一詞，係指一種分子，當存在時，完全抑制或降低HCV病毒粒子蓄積之能力，與此種分子不存在下之HCV病毒粒子蓄積作比較，及/或一種分子降低或改善與病人中之HCV感

染或發病有關聯症狀或病徵之能力。具有抗-HCV活性之分子，包括會使HCV感染或複製中之一或多個步驟瓦解者，以及會在宿主細胞中引起免疫調節與抗增生作用者。具有抗-HCV活性之分子，可抑制HCV專一複製事件，譬如但不限於HCV導引之核酸或蛋白質合成。具有抗-HCV活性分子可發生作用之HCV複製階段，包括細胞進入(例如連附；穿透)；HCV基因組之脫殼與釋出；HCV基因組之複製(例如，病毒RNA基因組任一股線之複製；病毒信使RNA之轉錄)；HCV蛋白質之轉譯；HCV蛋白質之轉譯後變性(例如蛋白分解之分裂作用；糖基化作用)；病毒蛋白質之胞內輸送；病毒粒子成份之組裝；及病毒粒子之釋出(例如出芽)。具有抗病毒活性之分子之種類，包括但不限於可溶性受體德夸菌素與抗受體抗體；離子通道阻斷劑、衣殼安定劑及融合蛋白質抑制劑；病毒聚合酶、反轉錄酶、解螺旋酶、引導RNA合成酶或整合酶之抑制劑；反有意義寡核苷酸與核糖酵素；免疫調節與免疫刺激劑，包括細胞活素，譬如干擾素，以及肽催動劑，類固醇，及古典藥物，譬如左旋四咪唑；調節蛋白質之抑制劑；蛋白酶抑制劑；組裝蛋白質抑制劑；及抗病毒抗體與細胞毒性淋巴細胞。"抗-HCV有效量"或"藥學上有效量"一詞，係指如本文中所揭示化合物或化合物組合之量，有效降低或改善病人中與HCV感染有關聯或與相關病因有關聯之症狀或病徵，或降低活體外或活體內之病毒含量。活體外應用包括下述之複製子檢測系統，其中該等量對於降低HCV複製子

RNA蓄積及/或其中所含基因編碼之蛋白質蓄積係有效者。

意欲使用於本文中所揭示之組合物與組合治療方法中之具有抗-HCV活性之化合物，包括但不限於免疫調節分子，包括免疫刺激細胞活素，及其他已知具有HCV抗病毒活性之化合物，譬如各種抗病毒核苷與核苷酸。

意欲與本文中所揭示之HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑合併使用之免疫調節分子，包括但不限於干擾素-α2B(IntronA, Schering Plough)；Rebatron (Schering Plough，干擾素-α2B+三唑核苷)；經PEG化之干擾素α(Reddy, K. R.等人，與干擾素α-2a比較，在患有慢性C型肝炎之非硬變病人中，經PEG化之(40-kd)干擾素α-2a之功效與安全性，肝病學期刊，33, 433-438 (2001))；同感干擾素(Kao, J. H., Chen P. J., Lai, M. Y. & Chen, D. S.，同感干擾素在慢性C型肝炎治療上之功效，J. Gastroenterol. Hepatol. 15, 1418-1423 (2000))；干擾素-α2A(Roferon A；Roche)；類淋巴胚細胞或"天然"干擾素；干擾素τ(Clayette, P.等人，IFN-τ，一種具有抗反轉錄酶病毒活性之新穎干擾素類型I, Pathol. Biol. (Paris) 47, 553-559 (1999))；間白血球活素2 (Davis, G. L., Nelson, D. R. & Reyes, G. R., C型肝炎處理之未來選擇性，肝病討論會，19, 103-112 (1999))；間白血球活素6 (Davis, G. L., Nelson, D. R. & Reyes, G. R., C型肝炎處理之未來選擇性，肝病討論會，19, 103-112 (1999))；間白血球活素12 (Davis, G. L., Nelson, D. R. & Reyes, G. R., C

型肝炎處理之未來選擇性，肝病討論會，19, 103-112 (1999))；三唑核苷；及會加強類型1輔助T細胞回應發展之化合物(Davis, G. L., Nelson, D. R. & Reyes, G. R., C型肝炎處理之未來選擇性，肝病討論會，19, 103-112 (1999))。干擾素可藉由施加直接抗病毒作用及/或藉由改變對感染之免疫回應，而改善病毒感染。干擾素之抗病毒作用，通常係經過病毒穿透或脫殼之抑制，病毒RNA之合成，病毒蛋白質之轉譯及/或病毒組裝與釋出作媒介。

會刺激干擾素在細胞中合成之化合物(Tazulakhova, E. B., Parshina, O. V., Gusev, T. S. & Ershov, F. I.，在新穎干擾素誘生劑之篩檢、分析及臨床應用上之俄國經驗，J. Interferon Cytokine Res. 21, 65-73))，係包括但不限於雙股RNA，單獨或與托伯拉黴素(tobramycin)複合，及依米奎莫得(Imiquimod)(3M醫藥)(Sauder, D. N.，依米奎莫得之免疫調節與藥理學性質，J. Am. Acad. Dermatol. 43, S6-11 (2000))。

已知具有或可由於非免疫調節機制而具有HCV抗病毒活性之其他化合物，包括但不限於三唑核苷(ICN醫藥)；纖維核苷5'-單磷酸脫氫酶抑制劑(VX-497，其係由Vertex醫藥所發展)；金剛胺與金剛烷乙胺(Younossi, A. M.與Perillo, R. P.，金剛胺、金剛烷乙胺、烏索去氧膽酸、NSAID，單獨或併用α干擾素，在慢性C型肝炎治療上之角色，肝病討論會，19, 95-102 (1999))；LY217896(美國專利4,835,168)(Colacino, J. M. 等人，1,3,4-噻二唑-2-基氰

胺(LY217896)及其鈉鹽之抗流行性感冒病毒活性評估，抗微生物劑與化學療法，34, 2156-2163 (1990))；及9-羥基亞胺基-6-甲氧基-1,4a-二甲基-1,2,3,4,4a,9,10,10a-八氫-菲-1-羧酸甲酯；6-甲氧基-1,4a-二甲基-9-(4-甲基-哌咁-1-基亞胺基)-1,2,3,4,4a,9,10,10a-八氫-菲-1-羧酸甲酯鹽酸鹽；1-(2-氯-苯基)-3-(2,2-聯苯基-乙基)-脲(美國專利6,127,422)。

關於前述分子之配方、劑量及投藥途徑，係無論是陳述於下文所引用之參考資料中，或為此項技藝中所習知，譬如揭示於F. G. Hayden, Goodman & Gilman之治療學之藥理學基礎，第九版，Hardman等人編著，Mc Graw-Hill, New York (1996)，第50章，第1191-1223頁，及其中引述之參考資料。或者，一旦顯示HCV抗病毒活性之化合物已被確認，則該化合物之藥學上有效量，可使用熟練技師所習知之技術測得。應指出者為例如Benet等人，Goodman & Gilman之治療學之藥理學基礎，第九版，Hardman等人編著，Mc Graw-Hill, New York (1996)，第1章，第3-27頁，及其中引述之參考資料。因此，此種化合物之適當調配法、劑量範圍及劑量服用法，可容易地藉由例行方法測得。

本發明之藥物組合，可提供予一種細胞或多種細胞，或予人類病患，無論是呈個別藥學上可接受之配方，同時或相繼地投予，含有一種以上治療劑之配方，或藉由單一藥劑與多重藥劑配方之各種配合。但是，經投予後，此等藥物組合係形成諸成份之抗-HCV有效量。

目前有很大數目之其他免疫調節劑與免疫刺激劑可使用於本發明方法中，包括：

AA-2G

金鋼烷基醯胺二肽

腺苷脫胺酶，Enzon

佐劑，Alliance

佐劑，Ribi

佐劑，Vaxcel

Adjuvax

agelasphin-11

AIDS療法，Chiron

藻聚葡糖，SRI

algammulin, Anutech

Anginlyc

抗細胞因子，Yeda

Anticort

抗胃泌素-17免疫原，Ap

抗原傳輸系統，Vac

抗原配方，IDBC

antiGnRH免疫原，Aphton

Antiherpin

Arbidol

azarole

Bay-q-8939

Bay-r-1005

BCH-1393

Betafectin

Biostim

BL-001

BL-009

Broncostat

Cantastim

CDRI-84-246

cefodizime

化學細胞活素抑制劑，ICOS

CMV肽，霍普(Hope)市

CN-5888

細胞活素釋出劑，St

DHEAS, Paradigm

DISCTA-HSV

J07B

101A

101Z

ditiocarb鈉

ECA-10-142

ELS-1

內毒素，Novartis

FCE-20696

FCE-24089

FCE-24578

FLT-3配位體，Immunex

FR-900483

FR-900494

FR-901235

FTS-Zn

G-蛋白質，Cadus

gludapcin

glutaurine

糖磷肽

GM-2

GM-53

GMDP

生長因子疫苗，EntreM

H-BIG, NABI

H-CIG, NABI

HAB-439

幽門螺旋桿菌疫苗

濕疹專一免疫因子

HIV療法，UnitedBiomed

HyperGAM+CF

ImmuMax

ImmunBCG

免疫療法，Connective

免疫調節劑，Evans

免疫調節劑，Novacell

imreg-1

imreg-2

Indomune

纖維核苷pranobex

干擾素，Dong-A(α2)

干擾素，Genentech(γ)

干擾素，Novartis(α)

間白血球活素-12, GeneticsIns

間白血球活素-15, Immunex

間白血球活素-16, ResearchCor

ISCAR-1

J005X

L-644257

licomarasminic酸

LipoTher

LK-409

LK-410

LP-2307

LT(R1926)

LW-50020

MAF, Shionogi

MDP衍生物，Merck

met-腦啡肽，TNI

甲基呋喃基丁內脂

MIMP

mirimostim

混合菌苗，Tem

MM-1

moniliastat

MPLA, Ribi

MS-705

murabutide

murabutide, Vacsyn

胞壁醯基二肽衍生物

胞壁醯基肽衍生物

myelopid

-563

NACOS-6

NH-765

NISV, Proteus

NPT-16416

NT-002

PA-485

PEFA-814

肽，Scios

肽聚醣，Pliva

Perthon, Advanced Plant

PGM衍生物，Pliva

醫藥計劃編號1099；編號1426；編號1549；編號1585；編號1607；編號1710；編號1779；編號2002；編號2060；編號2795；編號3088；編號3111；編號3345；編號3467；編號3668；編號3998；編號3999；編號4089；編號4188；編號4451；編號4500；編號4689；編號4833；編號494；編號5217；編號530；

pidotimod

pimelautide

pinafide

PMD-589

鬼臼素，Conpharm

POL-509

poly-ICLC

poly-ICLC, Yamasa Shoyu

polyA-polyU

多醣A

蛋白質A, BerloxBioscience

PS34WO

假單胞菌屬MAbs, Teijin

Psomaglobin

PTL-78419

Pyrexol

pyriferone

Retrogen

Retropep

RG-003

Rhinostat

rifamaxil

RM-06

Rollin

romurtide

RU-40555

RU-41821

風疹抗體，ResCo

S-27609

SB-73

SDZ-280-636

SDZ-MRL-953

SK&F-107647

SL04

SL05

SM-4333

Solutein

SRI-62-834

SRL-172

ST-570

ST-789

staphage溶胞產物

Stimulon

抑制素

T-150R1

T-LCEF

tabilautide

temurtide

Theradigm-HBV

Theradigm-HPV

Theradigm-HSV

THF, Pharm&Upjohn

THF, Yeda

thymalfasin

胸腺激素溶離份

thymocartin

thymolymphotropin

thymopentin

thymopentin類似物

thymopentin,Peptech

胸腺素溶離份5,α

thymostimulin

thymotrinan

TMD-232

TO-115

轉移因子，Viragen

tuftsin, Selavo

ubenimex

Ulsastat

ANGG-

CD-4+

Collag+

COLSF+

COM+

DA-A+

GAST-

GF-TH+

GP-120-

IF+

IF-A+

IF-A-2+

IF-B+

IF-G+

IF-G-1B+

IL-2+

IL-12+

IL-15+

IM+

LHRH-

LIPCOR+

LYM-B+

LYM-NK+

LYM-T+

OPI+

PEP+

PHG-MA+

RNA-SYN-

SY-CW-

TH-A-1+

TH-5+

TNF+

UN

可用於本發明之代表性核苷與核苷酸化合物，包括但不限於：

(+)-順式-5-氟基-1-[2-(羥基-甲基)-[1,3-氧硫伍圜-5-基]胞嘧啶；

(-)-2'-去氧-3'-硫胞嘧啶核苷-5'-三磷酸(3TC)；

(-)-順式-5-氟基-1-[2-(羥基-甲基)-[1,3-氧硫伍圜-5-基]胞嘧啶(FTC)；

(-)-2',3',二去氧-3'-硫胞嘧啶核苷[(-)-SddC]；

1-(2'-去氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)-5-碘基胞嘧啶

(FIAC)；

1-(2'-去氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)-5-碘基胞嘧啶三磷酸(FIACTP)；

1-(2'-去氧-2'-氟-β-D-阿拉伯呋喃糖基)-5-甲基尿嘧啶(FMAU)；

1-β-D-呋喃核糖基-1,2,4-三唑-3-羧醯胺；

2',3'-二去氧-3'-氟基-5-甲基-去氧胞嘧啶核苷(FddMeCyt)；

2',3'-二去氧-3'-氯基-5-甲基-去氧胞嘧啶核苷(C1ddMeCyt)；

2',3'-二去氧-3'-胺基-5-甲基-去氧胞嘧啶核苷(AddMeCyt)；

2',3'-二去氧-3'-氟基-5-甲基-胞嘧啶核苷(FddMeCyt)；

2',3'-二去氧-3'-氯基-5-甲基-胞嘧啶核苷(C1ddMeCyt)；

2',3'-二去氧-3'-胺基-5-甲基-胞嘧啶核苷(AddMeCyt)；

2',3'-二去氧-3'-氟基胸苷(FddThd)；

2',3'-二去氧-β-L-5-氟基胞嘧啶核苷(β-L-FddC)；

2',3'-二去氧-β-L-5-硫胞嘧啶核苷；

2',3'-二去氧-β-L-5-胞嘧啶核苷(β-L-ddC)；

9-(1,3-二羥基-2-丙氧基甲基)鳥嘌呤；

2'-去氧-3'-噻-5-氟基胞嘧啶；

3'-胺基-5-甲基-去氧胞嘧啶核苷(AddMeCyt)；

2-胺基-1,9-[(2-羥甲基-1-(羥甲基)乙氧基]甲基]-6H-嘌呤-6-酮(gancyclovir)；

二醋酸2-[2-(2-胺基-9H-嘌呤-9-基)乙基]-1,3-丙烷二基酯

(famciclovir)；

2-胺基-1,9-二氫-9-[(2-羥基-乙氧基)甲基]6H-嘌呤-6-酮(acyclovir)；

9-(4-羥基-3-羥甲基-丁-1-基)鳥嘌呤(penciclovir)；

9-(4-羥基-3-羥甲基-丁-1-基)-6-去氧鳥嘌呤二醋酸鹽(famciclovir)；

3'-疊氮基-3'-去氧胸腺嘧啶核苷(AZT)；

3'-氯基-5-甲基-去氧胞嘧啶核苷(C1ddMeCyt)；

9-(2-膦酸基-甲氧基乙基)-2',6'-二胺基嘌呤-2',3'-二去氧核糖核苷；

9-(2-膦酸基甲氧基乙基)腺嘌呤(PMEA)；

阿環維爾(acyclovir)三磷酸(ACVTP)；

D-碳環族-2'-脫氧鳥苷(CdG)；

二去氧-胞嘧啶核苷；

二去氧-胞嘧啶(ddC)；

二去氧-鳥嘌呤(ddG)；

二去氧-纖維核苷(ddI)；

E-5-(2-溴基乙烯基)-2'-去氧脲苷三磷酸；

氟-阿拉伯呋喃糖基-碘尿嘧啶；

1-(2'-去氧-2'-氟基-1-β-D-阿拉伯呋喃糖基)-5-碘-尿嘧啶(FIAU)；

史塔五定(stavudine)；

9-β-D-阿拉伯呋喃糖基-9H-嘌呤-6-胺單水合物(Ara-A)；

9-β-D-阿拉伯呋喃糖基-9H-嘌呤-6-胺-5'-單磷酸鹽單水合

物(Ara-AMP)；

2-去氧-3'-硫-5-氟基胞嘧啶核苷；

2',3'-二去氧-鳥嘌呤；及

2',3'-二去氧-鳥嘌呤核糖苷。

製備可用於本發明之核苷與核苷酸之合成方法，係為此項技藝中所習知，如在ActaBiochim.Pol.,43,25-36(1996)；Swed.核苷核苷酸15,361-378(1996)；合成12,1465-1479(1995)；Carbohyd. Chem.27,242-276(1995)；Chem.核苷核苷酸3,421-535(1994)；Ann. ReportsinMed.Chem.,大學出版社；及Exp.Opin.Invest.Drugs4,95-115(1995)中所揭示者。

於上文引述之參考資料中所述之化學反應，係一般性地以其最廣義應用於製備本發明化合物之觀點作揭示。有時，此等反應可能不能如所述應用於被包含在本文中所揭示化合物範圍內之每一種化合物。會發生此種情況之化合物，將容易地被熟諳此藝者察覺。在所有此種情況中，任一反應均可成功地藉熟諳此藝者所已知之習用修正法施行，例如，藉由干擾基團之適當保護，藉由改變成替代之習用試劑，藉由反應條件之例行修正等，或本文中所揭示之其他反應或者其他習用反應，將可應用於製備相應之本發明化合物。在所有製備方法中，所有起始物質均為已知，或可容易地製自已知起始物質。

雖然通常採用核苷類似物本身作為抗病毒劑，但有時必須使核苷酸(核苷磷酸)轉化成核苷，以幫助其輸送越過細

胞膜。能夠進入細胞中之以化學方式改質之核苷酸，其實例為S-1-3-羥基-2-膦酸基甲氧基丙基胞嘧啶(HPMPC,Gilead Science)。為酸類之本發明核苷與核苷酸化合物，可形成鹽。其實例包括與鹼金屬或鹼土金屬譬如鈉、鉀、鈣或鎂之鹽，或與有機鹼之鹽，或鹼性四級銨鹽。

可用於本發明組合療法之免疫調節劑與免疫刺激劑，可以低於此項技藝中習用之量投藥。例如，典型上係將干擾素α投予人類，用於治療HCV感染，其量為約$1x10^6$個單位/人，每週三次，至約$10x10^6$個單位/人，每週三次(Simon等人，肝病學期刊，25：445-448(1997))。在本發明之方法與組合物中，此劑量之範圍可在約$0.1x10^6$個單位/人，每週三次，至約$7.5x10^6$個單位/人，每週三次；更佳為約$0.5x10^6$個單位/人，每週三次，至約$5x10^6$個單位/人，每週三次；最佳為約$1x10^6$個單位/人，每週三次，至約$3x10^6$個單位/人，每週三次。於本發明HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑存在下，由於免疫調節劑與免疫刺激劑之加強之C型肝炎病毒抗病毒有效性，故可採用減少量之此等免疫調節劑/免疫刺激劑，於本文中所揭示之方法與組合物中。類似地，由於本發明HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑之C型肝炎病毒抗病毒有效性在免疫調節劑與免疫刺激劑存在下有所加強，故於本文所揭示之方法與組合物中可採用減少量之此等HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑。此種減少之量可藉由例行監測受感染而接受治療之病人中之C型肝炎病毒滴定度而測

得。這可藉由例如監測病人血清中之HCVRNA，藉由槽縫沾吸、點沾吸或RT-PCR技術，或藉由度量HCV表面或其他抗原進行。病人可在採用本文中所揭示之HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑及其他具有抗-HCV活性之化合物(例如核苷及/或核苷酸抗病毒劑)之組合療法期間，以類似方式監測，以測定當合併使用時，每一種之最低有效劑量。

在本文中所揭示之組合治療方法中，核苷或核苷酸抗病毒化合物或其混合物，可投予人類，其量之範圍為約0.1毫克/人/天至約500毫克/人/天；較佳為約10毫克/人/天至約300毫克/人/天；更佳為約25毫克/人/天至約200毫克/人/天；又更佳為約50毫克/人/天至約150毫克/人/天；且最佳係在約1毫克/人/天至約50毫克/人/天之範圍內。

化合物之劑量可以單一劑量或以成比例之多重亞劑量投予病人。於後述情況中，劑量單位組合物可含有此種其約數之量，以構成日服劑量。每天之多劑量亦可增加總日服劑量，若這是開立藥物之人員所想要的。

以本發明化合物及/或組合物治療患有HCV感染病人之服用法，係根據多種因素作選擇，包括病人之年齡、體重、性別、飲食及醫療狀態，感染之嚴重性，投藥途徑，藥理學考量，譬如所採用特定化合物之活性、功效、藥物動力學及毒物學作用形態，及是否利用藥物傳輸系統。於本文中所揭示藥物組合之投藥，通常應持續歷經數週至數月或數年期間，直到病毒滴定度達到可接受之程度，這顯示感染已被控制或根除。接受本文中所揭示藥物組合治療

之病人，可例行性地藉由度量病人血清中之肝炎病毒RNA進行監測，其方式是槽縫沾吸、點沾吸或RT-PCR技術，或藉由度量血清中之C型肝炎病毒抗原，譬如表面抗原，以測定治療之有效性。藉此等方法所獲得數據之連續分析，允許修正治療期間之治療服用法，因此係投予各成份在組合中之最適宜量，且因此亦可測得治療延續時間。因此，治療服用法/服藥時間表可在治療過程中合理地修正，以致使用於組合中一起顯示令人滿意抗-C型肝炎病毒有效性之各抗病毒化合物之最低量係被投予，且因此在組合中之此種抗病毒化合物之投藥，係僅持續長達必須成功地治療感染之時間。

本發明係涵蓋本文中所揭示之HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑，與前述及類似型式之具有抗-HCV活性之化合物，以各種組合，以治療或預防病人中之HCV感染之用途。例如，一或多種HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑可併用：一或多種具有抗-HCV活性之干擾素或干擾素衍生物；一或多種具有抗-HCV活性之非干擾素化合物；或一或多種具有抗-HCV活性之干擾素或干擾素衍生物，與一或多種具有抗-HCV活性之非干擾素化合物。當合併使用以治療或預防人類病患中之HCV感染時，任何目前揭示之HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑與前述具有抗-HCV活性之化合物，可以藥學上或抗-HCV有效之量存在。由於其加成或增效作用，故當使用於上述組合中時，各亦可以亞臨床藥學上有效或抗-HCV有效之量存在，意即與此種HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑

及具有抗-HCV活性之化合物，當以藥學上有效量使用時作比較，若單獨使用時，在病人中完全抑制或降低HCV病毒粒子之蓄積及/或降低或改善與HCV感染或病因有關聯症狀或病徵上，提供減少醫藥有效性之量。此外，本發明係涵蓋如前述HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑與具有抗-HCV活性之化合物之組合，以治療或預防HCV感染之用途，其中一或多種此等抑制劑或化合物，係以藥學上有效量存在，而其他係以亞臨床藥學上有效或抗-HCV有效之量存在，此係由於其加成或增效作用。於本文中使用之"加成作用"一詞，係說明兩種(或更多種)醫藥活性劑之合併作用，其係等於各藥劑單獨給予作用之總和。增效作用係為其中兩種(或更多種)醫藥活性劑之合併作用，大於各藥劑單獨給予作用之總和。

實例42

C型肝炎病毒(HCV)感染之現行標準療法，係以免疫調節劑α-干擾素治療(慢性C型肝炎：流行疾病管理，美國國家衛生研究所，衛生與人類服務部門，1999)。此療法在大部份HCV病人中無效，其顯示無論是沒有回應或甚至在長期干擾素治療後復發。此外，有嚴重副作用伴隨著干擾素療法。

鑒於對新穎更有效抗病毒藥物以治療HCV感染病人之迫切需要，本案發明人已發展出一系列化合物，以抑制HCV之絲胺酸蛋白酶(HCV病毒蛋白質NS3與NS4A之複徵)。此等化合物可單獨，彼此一起，及與其他種類之用以治療或

預防HCV感染之化合物合併使用。此實例係描述測試三種代表性HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑，意即化合物CU、化合物EP及化合物EC，單獨及併用一組干擾素之個別成員(干擾素α-2B(Schering-Plough)，干擾素α-2A(PBL生物醫學實驗室，New Brunswick, NJ)，干擾素β(研究診斷劑公司，Flanders, NJ)及羊干擾素τ(研究診斷劑公司，Flanders, NJ))，在HCV亞基因組RNA複製子檢測(複製子檢測)中，以測定兩種化合物是否協力發生作用以減少HCVRNA蓄積。複製子檢測係度量HCV亞基因組RNA(複製子RNA)在藥物治療兩天後，留在複製子細胞中之量(Lohmann等人，Science285：110-113 (1999))，相對於複製子RNA在未經處理之細胞中之量。在此項檢測中，化合物作為HCV抗病毒藥物之功效，係直接正比於抑制複製子RNA蓄積之程度。

將兩種藥物以組合方式在活體外複製子檢測系統中測試，以測定當一起使用時，其是否顯示加成或增效抗-HCV活性。複製子檢測係被採用作為活體外HCV感染之替代模式，以評估免疫調節劑之合併作用，例如干擾素-α2B((插入序列A)；Schering Plough)，與HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑，例如化合物CU。如下文所示，當使用正式數學增效測定法度量，以分析其在複製子檢測中降低HCVRNA含量之能力時，其結果証實此兩種類型之藥物有明顯增效抗-HCV作用。

複製子檢測

採用含有自身複製HCV亞基因組RNA(複製子)之細胞系之複製子檢測，係描述於Lohmann等人，Science285：110-113 (1999)中。使用於本文所述實驗中之複製子之順序，其基因銀行登記號碼，在此參考資料中係被列示為AJ242654。此論文揭示之方法，係關於RNA從複製子cDNA之活體外轉錄，複製子RNA藉由電擊穿孔之轉移感染至Huh7細胞中，及使用抗生素G418選擇含有複製子RNA之細胞。Huh7細胞為肝細胞瘤細胞系，得自FoxChase癌症研究中心(Philadelphia)之William Mason博士。此等細胞係公開地可得自FoxChase，且已被廣泛地描述於科學文獻 (Nakabayashi等人，CancerRes.42：3858-3863(1982))中。在本文所述之實驗中，係將所有模板DNA在RNA電擊穿孔至Huh7細胞中之前，經由以DNase多重處理(三次連續處理)，移離活體外轉錄複製子RNA製劑。

複製子檢測係按下文詳述施行。簡言之，係將複製子細胞置於96井盤中，其密度為每井10,000個細胞，並於37℃下培養。細胞係在補充10%牛胎兒血清、麩醯胺、非必須胺基酸及抗生素G418(0.25毫克/毫升)之DMEM(Dulbecco之最少必須培養基)中培養。於過夜培養後，將培養基以含有2%牛胎兒血清，及不同濃度之絲胺酸蛋白酶抑制劑，譬如化合物CU，及/或干擾素，譬如干擾素-α2B(插入序列A, Schering Plough)之DMEM置換。每一種化合物係在六至八種不同濃度下測試。對濃度範圍之一個極端，係選擇高濃度化合物，其會在兩天處理後，造成幾乎完全抑制複

製子RNA蓄積。自此等起始濃度，進行連續稀釋，因此在複製子檢測中測試之濃度範圍，係包括化合物為高度有效下之濃度，以及沒有顯著作用下之濃度。各HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑濃度，係在無任何外加干擾素下，以及添加六至八種不同干擾素劑量下測試。同樣地，干擾素係在無任何外加HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑下測試。使用化合物進行48小時培養後，將培養基自板移除，並使用由Qiagen公司(Valencia, CA)所製造之RNeasy-96套件，自細胞中萃取出全部細胞RNA。然後，將此RNA藉定量RT-PCR或Taq Man®(應用生物系統，FosterCity, CA)分析。Taq Man® RT-PCR標的為在複製子RNA中之新黴素抗藥性基因。板係經設計，因此各藥物處理試樣有5個複製物，而未經處理試樣有16個複製物。這允許在定量RT-PCR數據中有較大統計可信度。

複製子檢測數據之分析，產生兩個數值，其可用於評估潛在HCV抗病毒劑之功效。在所測試之各化合物濃度中，係測定兩天治療期間因化合物所造成抑制複製子RNA蓄積之程度，相對於複製子RNA在未經處理細胞中之量。其係以抑制百分比作報告。當在一範圍之濃度下藉由細胞處理所產生之一系列數據點已被獲得時，即產生IC_{50}值，意即HCV複製子RNA蓄積被該化合物減少50%下之化合物濃度。經過HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑在複製子檢測中之重複測試，測定出IC_{50}具有百分比變易係數(%CV或100%xIC_{50}/平均IC_{50}中之標準偏差)為約20%。IC_{50}為用以將此項檢測

中測試之個別化合物分等級之數值，以其作為HCV抗病毒劑之功效為基礎。簡易IC_{50}測定不適合用以評估使用於組合中之化合物利用性。使用不同干擾素與絲胺酸蛋白酶抑制劑之所有組合，所產生數據陣列之最有效分析，需要評估百分比抑制作用，如表4中所示，使用下文所述之數學方法，其係經設計以測定組合治療是否為催動性、加成性或增效性。

複製子檢測之細節係如下述。

HCV複製子RNA在HCV複製子檢測中，使用Taq Man® RT-PCR定量分析之程序

此複製子檢測係用以度量潛在HCV抗病毒化合物抑制HCV亞基因組RNA複製子分子在Huh7細胞系中蓄積之能力(Lohmann等人，亞基因組C型肝炎病毒RNA在肝細胞瘤細胞系中之複製，Science285, 110-113 (1999))。此檢測包含三種操作組份：(1)複製子細胞維護，檢測板設立及化合物施用；(2)全部細胞RNA自複製子細胞之萃取；及(3)即時RT-PCR (Taq Man®)以度量複製子RNA於各試樣中之量。複製子檢測需要施行至少4天；但是，此程序可中斷，並使試樣在兩步驟之間冷凍。各檢測組份係描述於下文。

1.複製子細胞維護，檢測板設立及化合物施用

1.1 複製子細胞系維護

使用於複製子檢測中之細胞系，係按Lohmann等人所述製成(亞基因組C型肝炎病毒RNA在肝細胞瘤細胞系中之複製，Science285, 110-113 (1999))。在將含有複製子細胞之

150平方公分細胞培養燒瓶(Costar)於37℃與5% CO_2下培養且變成融合後，將細胞在新的150平方公分細胞培養燒瓶中稀釋1：10v/v。培養基為含有10%牛胎兒血清(FBS)、1X非必須胺基酸(NEAA)、1X麩醯胺(Glu)及0.25毫克/毫升G418之DMEM。進行三個序列繼代，每次允許細胞變成融合，接著將細胞稀釋至新的150平方公分細胞培養燒瓶中。然後，將此等被稱為"原始細胞"之細胞，分成數液份，並儲存以供未來使用於複製子檢測中。進行Taq Man®為基礎之分析，以測定每細胞之HCV複製子基因組數目，其顯現出每細胞有~150份複製之複製子存在。這是以複製子RNA之複製份數對人類apoB基因之兩倍複製份數(單倍體基因組數目)之比例為基礎。

1.1.1 將原始細胞儲存於液態N_2中。對使用於複製子檢測中之細胞而言，係在20次序列繼代後，將細胞捨棄，並使新批次自液態N_2儲存中復活。

1.2 將細胞覆蓋於96-井盤中供複製子檢測

1.2.1. 為製備96-井板，使含複製子之細胞之75%融合75平方公分燒瓶進行胰蛋白酶化，並再懸浮於10毫升培養基A中。胰蛋白酶化係以下述方式進行，移除培養基，添加1毫升胰蛋白酶-EDTA 0.25% w/v，然後移除胰蛋白酶-EDTA。5-10分鐘後，使細胞自燒瓶釋出，並再懸浮於培養基中。

1.2.2. 使用血球計，計數細胞，並將細胞濃度調整至10^5個細胞/毫升。

1.2.3. 使用Impact2多通道吸量管(Matrix)，將各井以100微升細胞懸浮液接種，但絕不從單一細胞懸浮液覆蓋超過四個96-井板。

1.2.4. 將96-井板在37℃下培養過夜。

1.3. 化合物稀釋並施加至複製子細胞盤

1.3.1. 使HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑化合物溶於二甲亞碸(DMSO)中，至最後濃度為20 mM。使干擾素懸浮於含有0.1% w/v牛血清白蛋白之磷酸鹽緩衝鹽水溶液中。

1.3.2. 以DMSO將此20 mM化合物溶液稀釋至1 mM。

1.3.3. 將已溶於DMSO中之50微升化合物，添加至10毫升培養基B中(化合物濃度為5 mM，而DMSO濃度現在為0.5%)，或將20微升1 mM化合物與30微升DMSO添加至10毫升培養基B中(化合物濃度為2 μM)。

1.3.4. 化合物稀釋至最後濃度係經由將化合物/培養基B溶液與培養基C(含有0.5% DMSO)混合而完成。化合物之序列一至五稀釋液，係以培養基C在2毫升聚丙烯96-井板塊中施行，以獲得所要之最後化合物濃度。

1.3.5. 將細胞板移離37℃培養器，並在蓋子之頂部右角落及底部右側上作標記。將培養基倒出96-井板。

1.3.6. 將得自96-井稀釋板塊各井之100微升化合物/培養基溶液，使用Impact2吸量管，添加至96-井細胞板。

1.3.7. 根據表3，將100微升培養基C添加至所有未經處理之井中，以測試化合物，在無論是1、3或6種不同濃度下。"Untx"係指與在經處理細胞中相同濃度下添加之模

做處理細胞(DMSO)；"Con."係指化合物濃度。

表3

2種化合物，6種濃度，5種複製物

		化合物1					化合物2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		untx	untx	untx	untx	Untx	untx	untx	untx	untx	untx	
B		con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	
C		con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	
D		con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	
E		con.4	con.4	con.4	con.4	con.4	con.4	con.4	con.4	con.4	con.4	
F		con.5	con.5	con.5	con.5	con.5	con.5	con.5	con.5	con.5	con.5	
G		con.6	con.6	con.6	con.6	con.6	con.6	con.6	con.6	con.6	con.6	
H		untx	untx	untx	untx	Untx	untx	untx	untx	untx	untx	

4種化合物，3種濃度，5種複製物

		化合物1					化合物2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		untx	untx	untx	untx	Untx	untx	untx	untx	untx	untx	
B		con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	
C		con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	
D		con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	
E		con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	con.1	
F		con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	con.2	
G		con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	con.3	
H		untx	untx	untx	untx	Untx	untx	untx	untx	untx	untx	
		化合物3					化合物4					

16種化合物，1種濃度，4種複製物

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		untx	cpd1	cpd2	cpd3	cpd4	cpd5	cpd6	cpd7	cpd8	untx	
B		untx	cpd1	cpd2	cpd3	cpd4	cpd5	cpd6	cpd7	cpd8	untx	
C		untx	cpd1	cpd2	cpd3	cpd4	cpd5	cpd6	cpd7	cpd8	untx	
D		untx	cpd1	cpd2	cpd3	cpd4	cpd5	cpd6	cpd7	cpd8	untx	
E		untx	cpd9	cpd10	cpd11	cpd12	cpd13	cpd14	cpd15	cpd16	untx	
F		untx	cpd9	cpd10	cpd11	cpd12	cpd13	cpd14	cpd15	cpd16	untx	
G		untx	cpd9	cpd10	cpd11	cpd12	cpd13	cpd14	cpd15	cpd16	untx	
H		untx	cpd9	cpd10	cpd11	cpd12	cpd13	cpd14	cpd15	cpd16	untx	

12種化合物，1種濃度，5種複製物

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		untx	untx	untx	untx	Untx	untx	untx	untx	untx	untx	
B		cpd1	cpd1	cpd1	cpd1	cpd1	cpd7	cpd7	cpd7	cpd7	cpd7	
C		cpd2	cpd2	cpd2	cpd2	cpd2	cpd8	cpd8	cpd8	cpd8	cpd8	
D		cpd3	cpd3	cpd3	cpd3	cpd3	cpd9	cpd9	cpd9	cpd9	cpd9	
E		cpd4	cpd4	cpd4	cpd4	cpd4	cpd10	cpd10	cpd10	cpd10	cpd10	
F		cpd5	cpd5	cpd5	cpd5	cpd5	cpd11	cpd11	cpd11	cpd11	cpd11	
G		cpd6	cpd6	cpd6	cpd6	cpd6	cpd12	cpd12	cpd12	cpd12	cpd12	
H		untx	untx	untx	untx	Untx	untx	untx	untx	untx	untx	

1.4. 將板在37℃下培養48小時，然後使其接受RNA萃取

表4

用於細胞培養與化合物設立之設備與供應源之摘述		
8通道Impact2吸量管，1250微升	目錄編號2004	Matrix
2毫升聚丙烯深井板塊，96-井，無菌	目錄編號4222	Matrix
25毫升試劑儲槽，無菌	目錄編號8096	Matrix
1250微升X-tra長吸量管端	目錄編號8255	Matrix
96-井板	目錄編號3595	Costar
血球計	明亮線條改良型Neubauer0.1毫米深	Reichert
DMEM	目錄編號51444-79P	JRH
L-麩醯胺(Glu)	目錄編號12403-010	GIBCO-BRL
非必須胺基酸(NEAA)	目錄編號11140-050	GIBCO-BRL
牛胎兒血清(FBS)	目錄編號16250-078	GIBCO-BRL
G418	目錄編號55-0273	invitrogen
DMSO	目錄編號D-2650	Sigma
培養基A	DMEM, 10% FBS, 1XNEAA, 1XGlu, 0.25毫克/毫升G418	
培養基B	DMEM, 2% FBS, 1XNEAA, 1XGlu	
培養基C	DMEM, 2% FBS, 1XNEAA, 1XGlu, 0.5% DMSO	
胰蛋白酶-EDTA0.25%	GIBCO-BRL	

2.全部細胞RNA自複製子細胞之萃取

2.1 引進

此程序之目標是從活體外組織培養試樣中萃取RNA，以致病毒或細胞RNA係定量地回收，且足夠純以藉由定量HCVRT-PCR檢測進行分析。

為允許偵測RNA萃取效率上之偏差，將標準量之牛病毒性腹瀉病毒(BVDV)，一種具有部份類似HCV之RNA病毒，在RNA萃取之前，添加至各細胞試樣中。因此，在最後多重RT-PCR反應中檢出之BVDVRNA含量，在所有井中應為一致，在與複製子檢測有關聯之變化性範圍內。此RNA萃取效率內部控制，係進一步討論於下文Taq Man®段落中。

所使用之RNA萃取方式，係為由Qiagen公司(Valencia, CA)所產生之RNeasy-96方法。此方法採用96支以矽石基料之微小管柱，置於可與96-井組織培養操作相容之陣列中。此RNA萃取技術為Boom方法之修正，其中所有細胞蛋白質與核酸，包括核酸酶，係首先以強促溶鹽(胍硫氰酸鹽)變性。在此環境中，核酸對矽石(在微小管柱圓盤中之材料)具有強親和力；但是，蛋白質及其他污染物不會結合至矽石，且會通過管柱。在以促溶/乙醇溶液洗滌管柱後，使試樣部份乾燥，然後小體積水，使核酸釋離管柱。

為減少在回收HCVRNA時之變化性，應小心進行管柱洗滌與部份乾燥條件。少量乙醇存在於管柱上，會污染最後

RNA，及干擾RT-PCR偵測系統。在此程序之所有階段中，均需要留心，因為起始試樣可能是生物危險的，促溶鹽為高度腐蝕性，且成為硫氰酸鹽，若使其與酸性環境接觸，其可產生有毒氰化物氣體。

表5

HCVRNA萃取程序所需要設備與供應源之摘述		
RNeasy 96套件(24)	目錄編號74183	Qiagen
QIAvac96歧管	目錄編號19504	Qiagen
離心機4-15C，供2x96板用，6000x克	目錄編號81010	Qiagen
板轉子，供2x96板用	目錄編號81031	Qiagen
200標準純度乙醇		
8通道Impact2吸量管，250微升	目錄編號2002	Matrix
8通道Impact2吸量管，1250微升	目錄編號2004	Matrix
2毫升聚丙烯深井板塊，96-井，無菌	目錄編號4222	Matrix
25毫升試劑儲槽，無菌	目錄編號8096	Matrix
1250微升X-tra長吸量管端	目錄編號8255	Matrix
200微升吸量管端	目錄編號7275	Matrix
不含血清MEM培養基	目錄編號11095-80	GIBCOBRL

2.2 程序：

2.2.1 細胞溶解

2.2.1.1. 製備溶胞緩衝劑：對一個96-井板，添加150微升β-巯基乙醇(β-ME)與1微升BVDV儲備液(於添加前，使儲備液渦旋)至15毫升RLT緩衝劑(RNeasy套件之一種成

份，Qiagen)中。此儲備液係經由以BVDV感染MDBK細胞(牛腎臟細胞，#CCL-22，可得自美國培養物類型收集處(Manassas VA))而製成，並在尖峰細胞病變作用下採集培養物(CPE)。此儲備液具有感染滴定度為大約$1x10^7$pfu/毫升。這在Taq Man®檢測中，獲得BVDV低限循環(C_t)為約22。BVDV儲備液係儲存於-80℃冷凍庫中。

2.2.1.2. 將細胞以150微升不含血清之MEM培養基洗滌(程序4，在8通道電子吸量管P1250上：充填1250, Disp 150x8)。將150微升溶胞緩衝劑添加至各井(相同程序)。

2.2.1.3. 立即萃取RNA，或使細胞在-80℃下冷凍。

2.2.2. 製備供RNA萃取之試劑與物料。

2.2.2.1. 記下RPE與RNeasy 96套件之批號。

2.2.2.2. RPE：將720毫升100%乙醇添加至一瓶RPE(Qiagen)中，並充分混合；在使用之前，將RPE瓶一直充分振盪。

2.2.2.3. 70%乙醇：將150毫升焦碳酸二乙酯(DEPC)水添加至350毫升100%乙醇中，並充分混合。

2.2.3. 以RNeasy 96套件製備RNA

2.2.3.1. 使冷凍之試樣在室溫下解凍40分鐘。同時，對各板，使一支管柱之萃取對照物解凍(萃取對照物：RNeasy萃取對照物為一組8支管子，全部連接在一起。各管子內部為170微升細胞溶胞產物，具有某一比例之HCV陽性與陰性細胞。從頂部至底部，為兩組各為低、中、高及零數目之對照物。(參閱下文擬案之段落2.3)。

2.2.3.2. 以吸量管吸取100微升上下五次，使試樣混合。將全部試樣轉移至2毫升Matrix方形井板塊之管柱1-10(程序1在P250上：混合100x5，充填170，沖洗)。

2.2.3.3. 將150微升複製子標準物轉移至管柱11(無試樣在管柱12中)。

2.2.3.4. 將150微升70%乙醇(EtOH)添加至各試樣(程序4在P1250上：充填1250，Disp150)。

2.2.3.5. 將以適當板號標記之RNeasy 96板，置於真空歧管中。將溶胞產物/EtOH混合並轉移至RNeasy 96板(程序1在P1250上：混合200，次數5，充填330，及沖洗)。將任何未使用之井，以透明膠帶(由Qiagen提供)密封，通常為管柱12。

2.2.3.6. 施加真空(大約800毫巴)以裝填試樣至微小管柱。

2.2.3.7. 將RNeasy-96板以1000微升RW1緩衝劑(Qiagen)/井洗滌(程序2在P1250上：充填1000，Disp1000)。

2.2.3.8. 施加真空至濾器，經過RW1緩衝劑，並排空流經物。

2.2.3.9. 將RNeasy-96板以1000微升RPE緩衝劑/井洗滌(程序2在P1250上)。

2.2.3.10. 對濾器施加真空，經過RPE緩衝劑。

2.2.3.11.重複步驟2.2.3.9

2.2.3.12. 對濾器施加真空，經過RPE緩衝劑，保持所施加之真空3分鐘。

2.2.3.13. 使RNeasy 96板乾燥：將RNeasy-96板置於收集微試管掛架(由Qiagen提供)上，以所提供之AirPore膠帶覆蓋，並將此單元在6000x克下離心10分鐘(Qiagen Sigma離心機；4-15℃)。

2.2.3.15. 自RNeasy 96-井板溶離出RNA：將RNeasy-96板轉移至新的收集微試管掛架之頂部。將70微升不含RNase之水添加至各井之中間(程序3在P1250上：充填850，Disp70)。

2.2.3.16. 在室溫下培養1分鐘，然後將新的AirPore膠帶放置在板上。

2.2.3.17. 然後，將此單元在6000x克下，於Sigma4-15C離心機中離心4分鐘。度量所溶離之體積，係在28微升與50微升之間。

2.2.3.18. 將RNeasy-96板拋棄，並將收集試管掛架以Qiagen提供之罩蓋密封(每片條8個)。

2.2.3.19. 將已溶離之RNA儲存於-80℃下，或立即在Taq Man®檢測中分析。

2.3 萃取對照物製備

第1天

2.3.1.1. 將$2.5x10^7$個會產生複製子之細胞，平敷在150平方公分組織培養燒瓶(T-150)中。

2.3.1.2. 將$2.0x10^6$個Huh7細胞平敷在75平方公分組織培養燒瓶(T-75)中。

2.3.1.3 在37℃下培養過夜。

第2天

2.3.1.4. 以溶胞緩衝劑，使細胞溶解。

2.3.1.5. 自Huh7與會產生複製子之細胞，移除上層清液，並以10毫升不含血清之培養基(MEM)洗滌單層。

2.3.1.6. 添加30毫升溶胞緩衝劑(具有1微升BVDV儲備液/15毫升溶胞緩衝劑)至Huh7細胞中，藉由重複以吸量管吸取進行混合，及將細胞溶胞產物放置在50毫升圓錐形底之組織培養離心管中。

2.3.1.7. 將10.5毫升溶胞緩衝劑添加至會產生複製子之細胞中，藉由重複以吸量管吸取進行混合，及將細胞溶胞產物放置在15毫升圓錐形底之組織培養離心管中。

2.3.2. 對於高萃取標準物：取170微升會產生複製子之細胞溶胞產物液份，成為兩個Matrix0.75毫升試管掛架之橫列5與6。

2.3.3. 對於中等萃取標準物：將1.0毫升會產生複製子之細胞溶胞產物，添加至9毫升Huh7溶胞產物中，並充分混合。取170微升此混合物之液份，至兩個Matrix0.75毫升試管掛架之橫列3與4中。

2.3.4. 對於低萃取標準物：將50微升會產生複製子之細胞溶胞產物，添加至10毫升Huh7溶胞產物中，並充分混合。取170微升此混合物之液份，至兩個Matrix0.75毫升試管掛架之橫列1與2。

2.3.5. 零萃取對照物：取170微升Huh7細胞溶胞產物之液份，至兩個Matrix0.75毫升試管掛架之橫列7與8。

2.3.6. 將對照物儲存於-80℃下。

3. Taq Man®RT-PCR與數據分析

3.1 引進：使用即時定量RT-PCR，以度量HCV複製子RNA於各試樣中之量。此項技術亦被稱為PCR系5'核酸酶檢測，及Taq Man®。分析儀器為應用生物系統7700 Prism順序偵測系統(應用生物系統公司,FosterCity,CA)。此儀器基本上為時間-多重雷射-引致之螢光光譜儀，與熱循環器聯結。其係監測PCR放大區，在整個PCR程序過程中，於96-井試樣盤之各井中之蓄積。

3.2. BVDV內部對照物之利用：如前一段落中所指出者，係將內部正對照物摻入每一試樣中。其係充作RNA萃取效率之度量物，且若試樣含有污染物，則其証實會抑制Taq Man® PCR。在施加溶胞緩衝劑至細胞之前，將BVDV與促溶細胞溶胞緩衝劑混合。雖然正對照物係在每一試樣中，但BVDV內部正對照物檢測，僅在HCV複製子RNA檢測數據落在所預期範圍之外時才施行，這指出試樣可能有問題。此7700能夠在相同試管中，利用標記兩種不同螢光報告染料之偵測探測物，同時監測兩個不同PCR放大區之蓄積("多重化")。引出試樣板BVDV內部正對照物之Taq Man®分析之特定規範，係描述在關於數據分析之段落(3.6)中。

3.3 HCV複製子RNATaq Man®探測物與引物。由於在複製子中編碼之新黴素抗藥性基因(neo)中，所預期之基因安定性及一般缺乏RNA二級結構，故採用會結合在該區域中

之引物與探測物。複製子RNA之此片段，係自8001鹼基對複製子之鹼基342-1193延伸(順序識別碼：1)：

```
 301 gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac
 361 ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc
 421 acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga
 481 caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt
 541 ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat
 601 cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg
 661 gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg
 721 ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc
 781 cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga
 841 tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctcgcgccag
 901 ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc
 961 atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg CCGCTTTTCT GGATTCATCG
                                                          正向引物
1021 aCTGTGGCCG GCTGGGTGTG Gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata
          TaqMan® 探測物
1081 ttgctgaaga gcTTGGCGGC GAATGGGctg accgcttcct cgtgctttac ggtatcgccg
                逆向引物
1141 ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaaa
```

3.4. 程序

3.4.1. 製備NEO與BVDVRT-PCR之1x主混合物之方法

表6

製備RT-PCR10-板主混合物之設備與供應源之摘述		
設備與供應源	定購編號	供應商
0.5-10微升吸量管	2247005-12000系列	Eppendorf
2-20微升吸量管	2247015-92000系列	Eppendorf
10-100微升吸量管	2247020-52000系列	Eppendorf
50-200微升吸量管	2247025-62000系列	Eppendorf
100-1000微升吸量管	2247030-22000系列	Eppendorf
1250微升Matrix尖端	目錄編號8255	Matrix
200微升Matrix尖端	目錄編號7275	Matrix
10微升ART尖端	目錄編號2140	分子生物產物
20微升ART尖端	目錄編號2149P	分子生物產物

100微升ART尖端	目錄編號2065E	分子生物產物
200微升ART尖端	目錄編號2069	分子生物產物
1000微升ART尖端	目錄編號2079E	分子生物產物
電子吸量管，Impact2	目錄編號2001	Matrix
1.5毫升不含RNase微試管	目錄編號12450	Ambion
14毫升聚丙烯試管	目錄編號352059	Falcon
25毫升試劑儲槽	目錄編號8096	Matrix
96-井反應板	目錄編號N801-0560	應用生物系統
光學罩蓋片條	目錄編號N801-0935	應用生物系統
用後即棄無菌長袍	目錄編號9515-E	Baxter
試劑	**定購編號**	供應商
酸	0.1 N HCl	Fisher
RNAseZap	目錄編號9780	Ambion
RNAse去除劑	目錄編號7005	分子生物產物
10-pak,EZRT-PCR核芯試劑套件，5x反應緩衝劑，25 mM醋酸錳，去氧NTP	目錄編號403028	應用生物系統
VICNEO探測物，2 μM (=10x)，每液份550微升	目錄編號450003，定製，5'-VIC-CTGTGGCCGGCTGGGTGTGG-TAMRA-3' (順序識別碼：2)	應用生物系統
VICBVDV探測物，2 μM (=10x)，每液份550微升 (Vertex)	目錄編號450003，定製，5'-VIC-CCCTCG TCCAC GTGGCAT CTCGA-TAM RA-3' (順序識別碼：3)	應用生物系統

NEO正向引物，3 μM (=10x)正向/逆向引物混合物，每液份550微升	目錄編號4304972，定製，5'-CCGCTTTTCTG GATTCATCG-3' (順序識別碼：4)	應用生物系統
NEO逆向引物，3 μM (=10x)正向/逆向引物混合物，每液份550微升	目錄編號4304972，定製，5'-CCCATTCGCCG CCAA-3' (順序識別碼：5)	應用生物系統
BVDV正向引物，3 μM (=10x)正向/逆向引物混合物，每液份550微升	定製，5'-CAGGGTAGTC GTCAGTGGTTC G-3'(順序識別碼：6)，1.0 μM等級w/凝膠純化	Oligos等
BVDV逆向引物，3 μM (=10x)正向/逆向引物混合物，每液份550微升	定製，5'-GGCCTCTGCA GCACCCTATC-3' (順序識別碼：7)，1.0 μM等級w/凝膠純化	Oligos等
NEORNA標準物	活體外轉錄之RNA，使用T7RNA聚合酶，得自含有HCV複製子RNA之新基因部份之質粒。以轉錄本之已知分子量，及已純化轉錄溶液之UV-吸光率為基礎，將此活體外轉錄之RNA定量。將此RNA稀釋、分成數液份及儲存在-80℃下。針對各Taq Man®檢測，使個別液份解凍。	
欲被測試之RNA試樣，係單離自HCV複製子細胞(此擬案之段落2),10微升/96-井板		
不含核酸酶之水(未經DEPC處理)	目錄編號9930	Ambion

3.4.2. 製備主混合物用之試劑

3.4.2.1. 根據下文兩個步驟清理工作台，並以RNAse去除劑擦拭吸量管。

RNAseZap(Ambion, Austin, TX)

RNAse去除劑(分子生物產物(SanDiego,CA))

3.4.2.2. 打開核芯EZRT-PCR試劑(應用生物系統)，並將5x緩衝劑置於冰上，使已冷凍之試劑，在室溫下解凍約15分鐘，然後將其置於冰上。一個EZRT-PCR試劑套件，可用以分析兩個96-井RNA萃取物。

3.4.2.3. 自-20℃，取用一支2 μMVIC探測物試管(NEO或BVDV，每試管550微升)，並放置在冰上。

3.4.2.4. 自-20℃，取用一支3 μM正向/逆向引物混合物試管(NEO或BVDV，每試管550微升)，並放置在冰上。

3.4.2.5. 自-80℃，取用一支標準RNA轉錄本(10^8複製物/10微升)之試管(30微升)，並放置在冰上。

3.4.2.6. 取用一支室溫Ambion水之試管。

3.4.3. 供一個96-井板反應用之主混合物之組裝

3.4.3.1. 使用1毫升吸量管，轉移5x緩衝劑(應用生物系統)至14毫升試管；所添加之總體積為1100微升。

3.4.3.2. 使用1毫升吸量管，將25 mM $Mn(OAc)_2$(應用生物系統)添加至14毫升試管中；所添加之總體積為66微升。

3.4.3.3. 使用200微升吸量管，將165微升10 mM dATP添加至14毫升試管中。對10 mM dCTP、20 mM dUTP及10 mM dGTP進行相同作業。

3.4.3.4. 使用1毫升吸量管，添加550微升10x3 μM正向/逆向引物混合物。

3.4.3.5. 使用1毫升吸量管，添加550微升10x2 μM探測

物。

3.4.3.6. 使用1毫升吸量管，添加220微升rTth DNA聚合酶(應用生物系統)。

3.4.3.7. 使用100微升吸量管，添加55微升Amp Erase UNG (應用生物系統)。

3.4.3.8. 使用1毫升吸量管，添加605微升Ambion H_2O至14毫升試管中；最後體積為總共4400微升。

3.4.3.9. 轉移4400微升主混合物至25毫升試劑儲槽。

3.4.3.10. 對全部96井，使用8-通道吸量管，每井分配40微升。

3.4.3.11.使用8-通道吸量管，一管柱接著一管柱，從管柱1至管柱11，轉移10微升經萃取之未知試樣，至反應板之井中。轉移後，將各管柱封端。

3.4.3.12. 添加270微升AmbionH_2O至30微升10^8複製物/10微升RNA轉錄本中，供使用於標準曲線，並混合。目前有HCV複製子定量標準RNA/10微升之10^7個複製物。

3.4.4. 安裝ABI7700以供各操作使用

3.4.4.1 每次操作之前，再次靴式啟動ABI7700用之電腦，及重建桌上。

3.4.4.2 自硬碟機關閉及移除任何多餘程式；將資料超轉至廢棄處。

3.4.4.3 開啟順序偵測器v1.7程式(SDS軟體)。

3.4.4.5 開啟"複製子檢測操作"名摺。

3.4.4.6 開啟"複製子檢測"模板。被程式化至模板中之

熱循環器條件如下：

階段1：50℃2分鐘

階段2：60℃30分鐘

階段3：95℃5分鐘

階段4：95℃15秒

階段5：60℃60秒

階段4-5之循環重複次數：40

模板儀器：診斷：高階選擇：

選擇視圖：顯示器mse。

選擇視圖：顯示器最良好吻合。

選擇雜項：參考染料ROX。

3.4.4.7 在"複製子檢測操作"名摺中"儲存"(並非"以其本身儲存")檔案。

3.4.4.8 顯示安裝：按操作

3.5 於一次操作後，使用SDS軟體，準備ABI7700數據。

3.5.1. 將檢測板移離ABI7700，並拋棄而未曾打開。這大為降低關於PCR交叉污染之實驗室問題。

3.5.2. 數據係使用順序偵測器系統軟體V1.7分析。

3.5.3. 低限含量係首先使用預設裝置設定。

3.5.4. 數據捨棄規範：可將數據點或一系列之整個板捨棄。若與擬案已有顯著偏差，試劑失效或不幸事故，或ABI7700操作故障，則可將數據拋棄。對於來自顯然正常操作之任何數據點之排除，必須符合一或多個此等規範。

3.5.4.1. 低限循環計算。正常地使用SDS軟體之預設

值。若最濃試樣之Ct低於15，則按需要將低限值終止極限改變成較低數值，以致使最高濃度試樣之Ct大於終止值。在施行此改變後，更新計算值。

3.5.3.2. 當與藉由新RNA標準物之分析所產生線條之斜率與y-軸截距之平均值，顯示有偏差時，考慮捨棄整個異常Taq Man®操作。此等數值可接受之範圍為：

斜率值應在3.0與3.6之間

y-截距循環應在36與41循環之間。

3.5.3.3. 由極端Rn/ΔRn顯示迷行之個別Taq Man®井，可在數據分析之前刪除，因此其不會影響SDS軟體計算。

3.5.3.4. 檢查與記錄無模板對照物Ct值，並確認其高於任何化合物處理試樣Ct為>7.0Ct(>100X)。

3.5.5. 將HCVRNA標準Ct值與先前結果比較。

3.5.6. 將HCVRNA標準曲線與先前結果比較。

3.5.7. 若迷行擴大作用在個別井中很顯著，則確認及記下此等井。

3.5.8. 將此"結果"檔案輸出，並從7700電腦轉移至另一部電腦，以使用MicrosoftExcel進行分析。

3.5.9. 於所使用試劑製劑或稀釋上之任何下列改變，均作報告。

來自賣方之新探測物或引物合成。

新探測物或引物稀釋與液份。

新標準RNA轉錄本製劑。

新標準RNA轉錄本稀釋與液份。

新BVDV病毒製劑。

新管柱11標準製劑。

3.6 Taq Man®數據分析

3.6.1. 將Taq Man® HCVCt數與得自Taq Man®結果檔案之複製數，複製與貼放至適當細胞複製子檢測數據分析Microsoft Excel巨集指令中，並操作此巨集。

3.6.2. 從巨集表單複製Taq Man®結果表至另一表單，輸入化合物序號及批號。

3.6.3 自此excel表單，計算化合物抑制活性之平均、標準偏差及百分比CV，以及在5個複製物及無化合物對照組中所有稀釋點之HCV複製數、HCVCt數及BVDV Ct數(若可取得時)。

3.6.4. 關於BVDV對照Taq Man®之數據排除與施行之規範。檢查所有計算值。數據點或一系列整個板可以捨棄。若與擬案有顯著偏差，試劑失效或不幸事故，或ABI7700操作故障，則數據可以拋棄。關於來自顯然正常操作之任何數據點之排除，則必須符合一或多個此等規範。抑制百分比之標準偏差，在活性化合物中應低於30%。HCV複製數之%CV，應低於30%。所有試樣之HCVCt之標準偏差，應低於0.5；這在大部份試樣中通常為約0.1至0.3。若HCVCt標準偏差大於0.5，則返回原始數據表，並檢查5次複製物之Ct數。若任一個井之Ct數，與5個複製物之平均Ct數，差別2Ct，則此井應自分析中省略。若大於3個井(並非在相同管柱上)具有不尋常Ct數，則應進

行BVDVTaq Man®內部對照物檢測。若BVDV數據顯示不規則性，則化合物應再一次測試。

3.6.5. IC_{50}計算：將平均抑制與標準偏差之數據複製與貼放至具有可變斜率計算器之S形劑量回應中，其係使用非線性回歸方法。使用此項工具，利用兩種方法計算IC_{50}：僅使頂部固定在100%抑制下，或使頂部固定在100%抑制下，且底部在0%抑制下。然後對各化合物，報告賦予最明顯吻合之方法。最可信賴之IC_{50}，係來自具有最低標準誤差之計算值。若計算自此兩種曲線吻合選擇性之IC_{50}，顯示超過一倍差異，或若IC_{50}SD大於IC_{50}，則化合物應在調整濃度下，再一次測試。

HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑與干擾素組合作用之計算

HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑(HSPI)與干擾素在組合中之作用，可在複製子檢測中評估，其方式是於不同含量之干擾素存在下，產生HSPI之劑量回應曲線，或於不同含量之HSPI存在下，測定干擾素之劑量回應曲線。其目的係為評估，與若兩種藥物對於RNA產生加成作用所預期者比較，是否有較多或較少抑制病毒RNA蓄積之作用。更明確言之，係使用Lowe之加成性定義((1928) Die Quantitation Probleme der Pharmakologic, Ergebn. Physiol., 27, 47-187)。其係定義如下。令$D_{E,INF}$為會造成作用E之干擾素濃度，及令$D_{E,HSPI}$為會造成作用E之蛋白酶抑制劑濃度。則由下列關係式，定義無交互作用或Lowe加成性，其中INF之濃度D_1與HSPI之濃度D_2之組合，會產生作用E。

$$1 = \frac{D_1}{D_{E,INF}} + \frac{D_2}{D_{E.HSPI}} \qquad (1)$$

增效或拮抗作用之程度，係以等作用曲線或等效線為觀點表示。組合(D1, D2)為在圖表上之一個點，其中軸為干擾素與HSPI之濃度(圖2)。會產生作用程度E之所有此種組合，係形成E作用等效線。($D_{E,INF}$, 0)與(0, $D_{E,HSPI}$)為在等效線上之點，即必須是此種情況。當滿足加成關係(1)時，等效線為連接點($D_{E,INF}$, 0)與(0,$D_{E,HSPI}$)之直線。

凹口朝上之等效線表示增效，而凹口朝下之等效線表示拮抗作用。按照Berenbau mM. C.((1985)藥劑組合之預期作用：一般解答。J. Theor. Biol., 114, 413-431)與Greco, Park及Rustom (1990)定量藥物增效作用之新途徑應用至順式-二胺二氯基鉑與1-β-D-阿拉伯呋喃糖基胞嘧啶之組合，癌症研究(CancerResearch) 50, 5318-5327)之指引，增加一項至(1)，以說明增效或拮抗作用。此方程式係定義一個回應表面，其可在所有治療組合中吻合百分比對照值。來自此吻合回應表面之輪廓圖形，係為等效線。

此回應表面模式係對各化合物假定S形劑量回應，由(2)定義。

$$E = \frac{E_{max}}{1 + \left(\frac{[Drug]}{IC50}\right)^m} + \mathbf{B} \qquad (2)$$

獲得單獨活性E特定程度之濃度，係設定為(3)

$$D_{E.INF} = IC50_{INF}\left(\frac{E-B}{E_{max}-E+B}\right)^{1/m_{INF}} \qquad D_{E.HSPI} = IC50_{HSPI}\left(\frac{E-B}{E_{max}-E+B}\right)^{1/m_{310}} \tag{3}$$

對於會產生回應程度E之藥物之每一組合而言，為滿足Greco等人(1990)之模式，則藥物之組合作用必須滿足方程式(4)

$$1=\frac{[INF]}{IC50_{INF}\left(\frac{E-B}{E_{max}-E+B}\right)^{1/m_{INF}}}+\frac{[HSPI]}{IC50_{HSPI}\left(\frac{E-B}{E_{max}-E+B}\right)^{1/m_{310}}}+\frac{\alpha[INF][HSPI]}{IC50_{INF}\,IC50_{HSPI}\left(\frac{E-B}{E_{max}-E+B}\right)^{1/2m_{INF}}\left(\frac{E-B}{E_{max}-E+B}\right)^{1/2m_{310}}} \tag{4}$$

參數α係度量交互作用之量。零值α係意謂無交互作用或加成性，因為當α=0時，方程式減為(1)。在給予IC_{50}、Hill斜率(m)、最大值(Emax)及最小值(B)下，此方程式可以解出，而得由於任何治療組合[INF]與[HSPI]所造成之作用。因此，此方程式係定義回應表面。設若一個實驗，其中[INF]與[HSPI]係經改變，則此等參數可使用非線性加權最小平方回歸以選擇。參數α可與增效度量值S產生關聯(Hewlett, P. S. (1969)藥物混合物功效之度量，生物統計學，25, 477-487)，其係直接取自50%作用下之等效線。S為沿著與軸呈45度之線條，自源點至界定加成性之等效線之距離，對自源點至吻合數據之等效線之距離之比例

(S=ON/OM，參閱圖3)。此關係為$\alpha=4(S^2-S)$。

上文關於吻合回應表面及測定具有其有意義程度之增效參數α，係遵照Greco等人(1990)所討論之方法，以評估在一系列實驗中，測試HSPI併用數種不同干擾素之增效程度。但是，仍需要將具有較低計數之觀察值加權，超過具有較高計數者。此等計數係直接與對照物百分比有關聯，其係為作用E。利用Carroll, R. J.與Rupert, D.中所述之方法((1988)(於回歸上之轉換與加權，Chapman與Hall, New York)，可明瞭井對井變化性，係隨著平均對照物百分比值之平方而增加。因此，此等觀察值係以一除以已被平方之吻合對照物百分比值(E)作加權。用以分析此等實驗之方差與加權，係與藉由研究人員探查關於分析放射配位體檢測之方法所發現之變化性關係一致(Finney, D. J., (1976)，放射配位體檢測，生物統計學，32, 721-740，及Dudley, R. A. Edwards, P., Ekinsm, R. P., McKinzie, I.G.M., Raab, G. M., Rodbard, D.及Rodgers, R.P.C. (1985)，免疫檢測數據處理之指引,臨床化學，31/8,1264-1271)。

結果

在一項最初實驗中，係測試HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑化合物CU，涵蓋之濃度範圍從3 μM至0.123 μM，意即244倍範圍。干擾素-α2B濃度係從每試樣30單位，改變至每試樣0.0096單位，意即3125倍範圍。如表7中所示，當作為單一藥物治療使用時，化合物CU顯示IC_{50}為0.48 μM，而干擾素IC_{50}為2.19U。在複製子檢測之精密度內，其係為大約

20%，添加干擾素-α2B會造成以劑量依存方式，增加複製子RNA蓄積之抑制。例如，以0.333 μM化合物CU治療細胞，會造成複製子RNA蓄積之28%抑制。0.333 μM化合物CU，其係為IC_{50}劑量之71% (0.469 μM)，與0.24U之干擾素-α2B，其係為干擾素-α2BIC_{50}之11% (2.05 μM)，以其組合治療細胞，會造成複製子RNA蓄積之49%抑制。因此，一個IC_{50}劑量之71%，併用另一個之11%，會造成複製子RNA蓄積之49%抑制。以直覺方式判定組合治療是否為協乘性、加成性或拮抗性，則吾人將預期若組合治療之作用僅為加成性，為獲得複製子RNA蓄積之49%抑制，所需要IC_{50}劑量之合併分率係為98%。吾人之實驗結果証實，複製子RNA蓄積之抑制程度，係使用71%加上11%達成，意即IC_{50}劑量之82%，而非如組合治療加成作用所預測之98%。因此，在此等化合物濃度下，此作用顯示係為協乘的，因為獲得HCV複製子RNA之49%抑制所使用之各化合物IC_{50}劑量之分率劑量，係小於各化合物單獨所需者，其將需要98%之IC_{50}劑量。此組合治療之結果係示於表7中，並以圖形方式示於圖1中。

表7

以化合物CU與干擾素-α2B，個別或組合治療48小時後，複製子RNA蓄積之抑制

干擾素-α2B(單位)

化合物CU (濃度)	30 U	6 U	1.2 U	0.24 U	0.048 U	0.0096 U	0 U
3 μM	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%
1 μM	99%	98%	96%	95%	92%	93%	88%
0.333 μM	94%	87%	66%	49%	33%	27%	28%
0.1111 μM	93%	79%	46%	29%	12%	15%	11%
0.0370 μM	92%	78%	44%	21%	2%	7%	8%
0.0123 μM	92%	78%	44%	20%	19%	19%	5%
0 μM	89%	73%	38%	16%	8%	12%	0%

如前所述，經由利用活體外複製子檢測及由該檢測所得數據之簡易加成性分析所衍生之此等初步結果，証實複製子細胞以HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑與干擾素之組合治療，會產生至少加成之抗病毒作用，且多半為協乘之抗病毒作用。

前述數據已使用上述正式數學工具再分析，以測定HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑CU與干擾素α-2B間之關係，是否為增效、加成或拮抗。再分析之數據係以數字方式顯示於表8中，並以圖形方式示於圖4中。

表8摘錄含複製子之細胞，以本發明之各種HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑及數種不同干擾素，個別或組合治療48小時後，在複製子檢測中所獲得之進一步結果。吾人指出，於複製子檢測中測得之HCV複製子RNA抑制值之標準差為約20%。化合物係經廣泛濃度測試，在較低之化合物濃度下並未造成顯著之HCV複製子RNA濃度抑制。由於該檢測之標準差為約20%，某些數據點會產生負數。在特定實驗中

之負抑制數表示在經化合物處理之樣本中平均有較經偽處理之樣本中為多之HCV複製子RNA分子。

表8

以HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑及不同干擾素，個別或組合治療48小時後，複製子RNA蓄積之抑制

實驗1

IFN α-2B（單位）

化合物CU (μM)	30.00	6.00	1.20	0.24	0.048	0.0096	0.000
0.000	89%	73%	38%	16%	8%	12%	0%
0.012	92%	78%	44%	20%	19%	19%	5%
0.037	92%	78%	44%	21%	2%	7%	8%
0.111	93%	79%	46%	29%	12%	15%	11%
0.333	94%	87%	66%	49%	33%	27%	28%
1.000	99%	98%	96%	95%	92%	93%	88%
3.000	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%

實驗2

IFN α-2A（單位）

化合物CU (μM)	30	6	1.2	0.24	0.048	0.0096	0
0	86%	61%	27%	4%	-7%	5%	0%
0.0123	87%	66%	17%	-23%	8%	8%	10%
0.37	85%	62%	13%	-2%	0%	-1%	1%
0.1111	87%	68%	37%	20%	-6%	12%	10%
0.333	92%	77%	58%	41%	26%	25%	44%
1	98%	96%	90%	86%	84%	83%	85%
3	99%	99%	98%	98%	98%	98%	98%

實驗 3

干擾素 α-2B (單位)	化合物 CU (μM) 3	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.0234	0
0	98%	93%	62%	23%	12%	-2%	-4%	-2%	0
0.049	98%	95%	70%	39%	12%	2%	6%	9%	3%
0.123	98%	95%	70%	43%	15%	7%	2%	5%	2%
0.307	98%	95%	73%	46%	16%	14%	7%	19%	-3%
0.768	98%	95%	82%	56%	43%	34%	28%	32%	28%
1.920	98%	98%	87%	71%	51%	54%	49%	52%	45%
4.8	99%	98%	92%	82%	74%	71%	69%	71%	59%
12.0	99%	98%	96%	89%	87%	85%	85%	85%	80%
30.0	99%	99%	98%	95%	93%	92%	92%	93%	89%

實驗 4

干擾素 α-2A (單位)	化合物 CU (μM) 3	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.0234	0
0	98%	94%	74%	38%	17%	3%	-1%	6%	0%
0.049	98%	93%	60%	22%	29%	21%	-9%	-6%	6%
0.123	98%	93%	67%	29%	21%	12%	3%	2%	-8%
0.307	98%	93%	66%	29%	22%	4%	-3%	-4%	10%
0.768	98%	95%	67%	46%	24%	21%	20%	9%	15%
1.920	98%	96%	73%	48%	43%	44%	27%	33%	29%
4.8	98%	97%	82%	61%	61%	59%	52%	55%	43%
12.0	99%	98%	91%	75%	76%	72%	71%	74%	73%
30.0	99%	98%	96%	89%	86%	85%	84%	84%	83%

實驗 5

化合物 CU (μM)

羊干擾素 τ (單位)	3	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.0234	0
0.0	98%	95%	65%	24%	-1%	-14%	-14%	-12%	0
0.9375	97%	95%	72%	41%	17%	11%	12%	6%	17%
1.875	97%	95%	71%	40%	31%	18%	18%	11%	4%
3.75	98%	96%	75%	44%	38%	25%	34%	18%	17%
7.5	98%	96%	82%	61%	42%	37%	25%	26%	36%
15	98%	97%	84%	64%	59%	61%	56%	51%	53%
30	98%	98%	90%	79%	72%	68%	65%	68%	68%
60	98%	98%	93%	87%	80%	80%	74%	77%	82%
120	98%	98%	95%	92%	86%	87%	86%	86%	87%

實驗 6

化合物 EC (μM)

干擾素 α-2B (單位)	3	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.0234	0
0	96%	93%	81%	56%	29%	23%	19%	1%	0
0.0492	96%	92%	80%	60%	31%	15%	19%	29%	6%
0.1229	96%	94%	78%	58%	32%	13%	20%	20%	4%
0.3072	97%	95%	82%	60%	38%	32%	34%	42%	23%
0.768	97%	95%	87%	66%	43%	41%	46%	43%	25%
1.92	98%	97%	90%	73%	62%	51%	54%	58%	47%
4.8	98%	97%	94%	87%	76%	73%	78%	76%	69%
12.0	98%	98%	96%	92%	86%	86%	86%	85%	84%
30.0	98%	98%	96%	96%	93%	92%	92%	95%	91%

實驗 7

干擾素 α-2A (單位) \ 化合物 EC (μM)	3.0	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.02344	0
0	96%	92%	81%	47%	28%	17%	-1%	-8%	0
0.0492	96%	93%	78%	58%	21%	8%	-12%	10%	-17%
0.1229	95%	93%	79%	64%	14%	5%	14%	7%	-22%
0.3072	95%	91%	80%	64%	22%	15%	5%	2%	-5%
0.768	96%	95%	81%	64%	34%	21%	19%	20%	4%
1.92	96%	95%	88%	78%	44%	41%	19%	33%	21%
4.8	97%	95%	91%	85%	60%	58%	60%	53%	49%
12.0	97%	97%	95%	91%	77%	72%	76%	70%	71%
30.0	98%	98%	97%	94%	91%	86%	85%	85%	84%

實驗 8

干擾素 β (單位) \ 化合物 CU (μM)	3.0	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.02344	0
0	97%	95%	77%	34%	16%	6%	-7%	0%	0
0.2344	98%	97%	83%	49%	31%	19%	-21%	-7%	1%
0.4688	98%	96%	84%	56%	39%	27%	10%	-3%	21%
0.9375	98%	97%	91%	73%	54%	42%	31%	15%	30%
1.875	98%	98%	95%	80%	65%	58%	65%	60%	60%
3.75	98%	98%	97%	92%	86%	81%	77%	73%	79%
7.5	99%	98%	98%	96%	93%	93%	93%	90%	92%
15.0	99%	99%	99%	97%	97%	96%	97%	95%	96%
30.0	99%	99%	99%	99%	98%	99%	98%	98%	97%

實驗 9

化合物 EP (μM)

干擾素 α-2B (單位)	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0
0	94%	96%	96%	92%	64%	36%	23%	8%	0
0.0492	95%	96%	96%	91%	67%	25%	28%	8%	3%
0.1229	95%	97%	96%	91%	65%	44%	4%	11%	4%
0.3072	95%	97%	96%	91%	71%	46%	20%	8%	20%
0.7680	96%	97%	97%	93%	75%	49%	36%	24%	24%
1.92	96%	97%	97%	94%	82%	67%	49%	52%	54%
4.8	96%	98%	97%	96%	90%	79%	75%	75%	70%
12	97%	98%	98%	97%	94%	89%	89%	87%	83%
30	97%	98%	98%	98%	96%	94%	94%	95%	92%

實驗 10

三唑核苷 (μM)

干擾素 α-2B (單位)	200	80	32	12.8	5.12	2.048	0.8192	0.3277	0
0	85%	62%	43%	3%	-8%	-17%	-22%	-6%	0
0.0492	87%	66%	48%	44%	11%	-4%	-10%	11%	-7%
0.1229	84%	64%	53%	40%	26%	-12%	-5%	11%	-9%
0.3072	86%	70%	62%	44%	28%	1%	6%	14%	7%
0.7680	90%	80%	72%	65%	38%	30%	28%	44%	29%
1.92	93%	85%	77%	76%	61%	57%	58%	50%	46%
4.8	96%	92%	87%	83%	82%	74%	71%	77%	72%
12	97%	95%	93%	91%	90%	89%	90%	89%	85%
30	98%	97%	96%	95%	94%	94%	93%	95%	94%

如圖4-13中所示，其以圖形方式描繪表8中之數據，使用上述數學方法作圖，用以度量增效作用，關於所測試HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑與干擾素之所有組合之等效線曲線，均為凹口朝上，這表示在複製子檢測中治療之抗病毒作用，係為增效的。此等結果係表列於表9中，其顯示組合治療增效之相對程度，及個別使用抗病毒化合物之IC_{50}值。於表9中之主要構件為α值，及用於測定之p-值。α一詞為對各組合治療之等效線最大轉折之度量。α值為零，表示加成性，負值表示拮抗作用，而如在上文所示HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑與干擾素組合治療之情況中，大於一之數值表示增效作用。α參數愈大，增效作用愈大。如表9中關於HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑與干擾素之組合所示，即使忽視各實驗中之有意義程度，以對於平均α值為0(無交互作用)之9次實驗為基礎之t試驗，具有p-值為0.00014，這表示其結果是高度顯著的。

本分析中所用之協乘性計算法係基於Greco Rustom之方法((1990)將一種定量藥物協乘性之新方法應用於順式-二胺二氯鉑與1-β-D-阿拉伯糖基呋喃糖基胞嘧啶之組合，癌症研究，50，5318-5327)，其為評估使用HCV複製子檢測所產生之實驗數據之理想工具。尚有其他應用於抗病毒化合物研究之方法，例如Pritchard及Shipman(Pritchard, M. N.及Shipman, C. Jr. (1990)"分析藥物-藥物交互作用之三維模型(總覽)"，抗病毒研究14：181-206)。將其協乘性計算方法應用於表8中所示數據，亦顯示以HCV絲胺酸蛋白酶

抑制劑與干擾素之組合治療複製子細胞，會導致HCV複製子RNA蓄積之協乘性抑制(數據未示)。

表9

組合治療增效作用之相對程度及個別使用之抗病毒化合物之IC_{50}值

	絲胺酸蛋白酶抑制劑	干擾素	IC_{50}INF (單位)	IC_{50}HSPI (μM)	α (SE)[1]	P-值 α>0
實驗1	化合物CU	IFNα-2B	2.05	0.469	0.477(0.09)	<0.0001
實驗2	化合物CU	IFNα-2A	3.72	0.446	0.770(0.12)	<0.0001
實驗3	化合物CU	IFNα-2B	2.36	0.587	0.730(0.08)	<0.0001
實驗4	化合物CU	IFNα-2A	5.67	0.633	0.438(0.08)	<0.0001
實驗5	化合物CU	IFNτ	13.22	0.605	0.328(0.07)	<0.0001
實驗6	化合物EC	IFNα-2B	2.53	0.384	0.516(0.10)	<0.0001
實驗7	化合物EC	IFNα-2A	5.50	0.312	1.24(0.20)	<0.0001
實驗8	化合物CU	IFNβ	1.82	0.466	0.551(0.09)	<0.0001
實驗9	化合物EP	IFNα-2B	3.06	0.426	0.490(0.12)	<0.0001
實驗10	三唑核苷	IFNα-2B	1.22	145	-0.24(0.067)	0.0004

[1](SE)標準誤差

使用本發明HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑與干擾素，評估抗-HCV藥物治療增效性質之另一種度量方式，是使用上述相同方法，以在複製子檢測中評估對於HCV之現行標準

組合療法，意即干擾素α-2B併用三唑核苷。表10之最後一行，顯示干擾素α-2B與三唑核苷混合物之α參數，係為負數，這表示有少量拮抗作用在此兩種藥物之間。這進一步強調在本文中揭示之組合治療，採用本發明HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑且併用干擾素之重要性，係在於此等治療藥品明白地產生增效作用，然而使用於HCV之標準組合療法(干擾素α-2B併用三唑核苷)在複製子檢測中並非增效性。

採用本發明HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑加上干擾素，對三唑核苷加上干擾素之組合治療，在複製子檢測中之前文比較，係明白地顯示前者為增效性，而後者則不是。使用複製子檢測所獲得之實驗結果顯示，若干擾素與HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑合併使用，則與當干擾素α-2B與三唑核苷合併使用時所需要者相較，遠為較低劑量之干擾素是有效的。複製子檢測為一種有用模式系統，其中係為測試潛在抗-HCV化合物，且目前廣泛地被倚賴作為化合物抗-HCV活性之有效預測方式。應指出的是，例如Blight等人(2000)在細胞培養物中HCVRNA複製之有效引發，Science8；290：1972-1974，及Chung等人(2001)C型肝炎病毒複製係直接被IFN-α在全長二元表現系統中抑制，Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 98(17)：9847-52。單獨之三唑核苷，在降低HCV複製子RNA於複製子檢測中之蓄積上，係為最低限度地有效(表8實驗10，及表9最後一行)。此結果係顯然與活體內研究衝突，其中當獨自使用時，三唑核苷對於HCV治療，未有顯著治療價值。對照上而言，

在複製子檢測中，矯正如下文所討論之細胞毒性，三唑核苷具有IC_{50}為145 μM。此結果可解釋為明瞭複製子檢測允許評估高三唑核苷濃度，而由於活體內細胞毒性，故其在人類治療上是不可能的(ChutaputtiA.(2000)C型肝炎抗病毒劑之不利作用及其他安全方面,胃腸病學與肝病學期刊，15 Suppl：E156-63)。

此評估必然需要評估三唑核苷之細胞毒性。此種毒性係發生在病人中，及在細胞檢測中(Shiffman M. L., Verbeke S. B., Kimball P. M. (2000) α-干擾素併用三唑核苷，在以有絲分裂原方式刺激之人類淋巴細胞中，會加強增生抑制，而非細胞活素產生，抗病毒研究，48(2)：91-9)。在本文所揭示之實驗中，於複製子檢測中之三唑核苷細胞毒性，係以兩種方式觀察與度量。在測定複製子細胞存活力之XTT代謝檢測(Roehm N. W., Rodgers G. H., Hatfield S. M., Glasebrook A. L. (1991)一種利用四鎓鹽XTT對於細胞增生與存活力之經改良比色檢測，免疫方法期刊，142(2)：257-65)，及在經處理對未經處理細胞中，於複製子檢測中，度量甘油醛-3-磷酸脫氫酶(GAPDH)mRNA含量之Taq Man®定量RT-PCR檢測(Brink N., Szamel M., Young A. R., Wittem K. P., Bergemann J. (2000)在UV-照射人類皮膚中，於活體內之IL-1β, IL-10, IL-10r, TNFα及IL-7mRNA含量之比較定量，發炎研究期刊，49(6)：2906)兩者中，發現顯著三唑核苷所引致之細胞毒性，但按下述改正。假定GAPDH mRNA(其係為一種構成上表現之管理基因)之含

量，在所有存活細胞中均為相同。自以轉錄抑制劑放線菌素D處理之細胞中之GAPDH mRNA含量之度量值，得知GAPDH mRNA之半生期只有數小時(數據未示出)。因此，如由其他人使用Taq Man®技術測定mRNA在人類細胞中之含量所達成者，假設GAPDH mRNA含量，在任何特定試樣中，係與存活細胞數(VCN)成正比，具有關係式為VCN=2^(40-$Ct_{GAPDH\ mRNA}$)。VCN係對各複製子檢測試樣井進行計算，然後吾人將特定井之HCV複製子RNA複製數，除以該井之VCN。一旦計算後，使用此比例代替HCV複製數，以計算抑制("平均抑制使用比例"；圖14.A)。無需針對此細胞毒性校正複製子檢測數據，將此種細胞毒性讀取為HCVRNA複製子蓄積之偽陽性抑制。在複製子檢測中，假定HCVRNA複製子蓄積所度量之抑制，係為HCVRNA複製子蓄積之實際抑制與HCVRNA複製子蓄積之表觀抑制(由於細胞毒性所致)之總和。以細胞毒性之XTT與Taq Man® GAPDH mRNA度量值之密切關係為基礎，進一步假定，因複製子檢測所測試之化合物所造成之GAPDH mRNA蓄積之抑制，係為由於細胞毒性所致HCVRNA複製子蓄積之表觀抑制之可信賴度量。因此，化合物在複製子檢測中，經一般細胞毒性校正之真實抗-HCV活性，可經由將各試樣中度量之HCV複製子RNA分子數目，除以VCN作估計，因此正規化成為各試樣中存活細胞之數目。使用此方法，圖14.A顯示在複製子檢測中，真實三唑核苷抗-HCV活性之估計("平均抑制使用比例")。

三唑核苷IC_{50}之估計，係最良好地使用此方法計算而得。於圖14.A中，"平均最初抑制"係說明三唑核苷之未經校正IC_{50}，其係大約80 μM，然而計算自"平均抑制使用比例"曲線之經校正IC_{50}值，係為大約145 μM。應注意的是，在HCVRNA複製子蓄積之經校正與經度量抑制之間，由於干擾素α-2B治療所造成之差異(圖14.B)，鑒於複製子檢測%CV之~20%，故係為無意義的。類似干擾素α-2B，在本發明實例中測試之HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑，在所採用之濃度下，並未顯示顯著細胞毒性。此係使用XTT檢測測定，其中各種化合物之TC_{50}值為：CU=64.7 μM，EP>10 μM及EC>50 μM。此等TC_{50}值係大於表9中所示之IC_{50}值20-140倍。因此，此等化合物之細胞毒性，在複製子檢測中，於此檢測之精密度內，對於HCVRNA蓄積未具有顯著作用，因為此種細胞毒性僅發生在HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑濃度顯著大於在複製子檢測中所測試者之情況下。

關於HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑與干擾素個別與組合功效之結論

本發明HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑與各種干擾素，當單獨使用於HCV複製子檢測中時，其抗-HCV活性係示於構成表8之個別實驗之欄與行中，其僅採用一種抗病毒劑。表9列出針對各抗病毒化合物，當單獨測試時所度量之IC_{50}值。經由使用活體外複製子檢測，所衍生之前述結果，亦証實複製子細胞以本發明之HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑與各種干擾素之組合治療，會產生增效抗病毒作用。完全預

期，此等作用將轉化成活體內有效性。

採用本發明HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑之組合療法，具有勝過單一藥物療法之數種主要優點。首先，與若單獨使用時所可能使用者相較，可使用較低劑量之個別藥物，以施行治療，則吾人將預期降低與治療有關聯之毒性及副作用。這在干擾素治療之情況中，是特別重要的，其中副作用很嚴重，且顯示係與投予病人之劑量成正比。前述數據指出，可將一定劑量(如於IC_{95}水平之CU)之HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑與一定劑量(如於IC_{50}水平)之干擾素α併用，其結果為較在無高劑量干擾素α之逆向副作用存在下由HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑單獨所達成者更為有效之治療。組合療法之第二個主要利益，是因為兩種藥物獨立發生作用，會抵抗治療之突變型HCV菌株，只有較少發展機會。抗藥性之發展，係為RNA病毒，例如HCV之主要顧慮。由於其高突變率，故此種病毒可迅速地適應環境壓力。組合療法之第三個利益，可為降低成本，此係由於有效治療所需要之治療劑量較低所致。

可採用於本文所揭示方法中之其他免疫調節劑，包括例如α干擾素2A，同感干擾素，τ干擾素，干擾素+三唑核苷(Rebatron)，經PEG化之干擾素，及干擾素基因表現之啟動子。完全預期的是，當併用HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑，譬如於本文中揭示者，此等化合物之抗-HCV活性將會改良。由於已知干擾素在活體內及在複製子檢測中係為活性的，故預期本發明之HCV絲胺酸蛋白酶抑制劑於活體內亦

為活性的，且更重要的是，當併用干擾素，其免疫系統刺激子或其他具有HCV抗病毒活性之化合物(其係藉由抑制HCV絲胺酸蛋白酶以外之機制發生作用)時，能夠引出增效活性。

HCV之最良好現行療法，係採用干擾素α與核苷類似物三唑核苷。此治療僅為最低限度有效，且會造成減少病人順應性之顯著副作用(慢性C型肝炎：流行疾病管理，美國國家衛生研究所，衛生與人類服務部門，1999)。此外，在移植病人中，三唑核苷-干擾素組合作用並不明瞭，且事實上可能比單獨之干擾素更差(慢性C型肝炎：流行疾病管理，美國國家衛生研究所，衛生與人類服務部門，1999)。

上文呈現之結果，証實當干擾素與新穎種類之HCV抗病毒劑，本發明之一種絲胺酸蛋白酶抑制劑，一起使用時，有增效組合作用。吾人完全預期，於本文中所揭示之活體外結果，與目前單獨使用干擾素所可能達成者相較，會導致HCV病人之更有效治療。干擾素之亞治療劑量，可使病人之免疫系統活動，以更良好地與病毒搏鬥，且絲胺酸蛋白酶抑制劑可直接攻擊病毒，經由不同機制作用，以雙叉狀攻擊，處理病毒。HCV感染之治療，因此可在對病人降低成本下達成，此係以減少副作用及所必須藥劑之較低支付為觀點，因有效HCV抗病毒治療僅需要較少之兩種藥物。

本發明可在未偏離其精神或基本特質下，以其他特定形

式具體表現。

【圖式簡單說明】

本發明之上述與其他方面、特徵及優點，將自下文詳述並搭配附圖而更為明瞭，其全部僅為說明而給予，並非本發明之限制，其中：

圖1顯示含複製子之細胞，以化合物CU與干擾素-α2B個別或合併處理48小時後，HCV複製子RNA蓄積之抑制。

圖2係以圖形方式說明藉由使用於組合中之化合物所顯示之等效線凹度，根據Greco、Park及Rustom之增效計算方法((1990)一種定量藥物增效作用之新穎研究途徑於順式-二胺二氯鉑與1-β-D-阿拉伯呋喃糖基胞嘧啶組合上之應用，癌症研究(CancerResearch), 50, 5318-5327)，其係為拮抗、加成及增效。

圖3顯示α與在等效線中之曲率量間之幾何關係。於E=50%作用程度下之假設等效線，係以直線等效線顯示，其係為在加成性上所預期的。M為線y=x與假設等效線之交點。N為線y=x與直線等效線之交點。O為原點(0,0)。S給予等效線中曲率量之度量值，其中S=ON/OM。ON為O至N之距離，而OM為O至M之距離。參數α係藉由等式$\alpha=4(S^2-S)$而與S產生關聯。

圖4顯示使用Greco等人如前文出處之方法，對於化合物CU與干擾素α-2B(Schering-Plough)之組合，使用實驗1中各化合物之6種稀釋液之等效線計算值。

圖5顯示使用Greco等人如前文出處之方法，對於化合物

CU與干擾素α-2A之組合，使用實驗2各化合物之6種稀釋液之等效線計算值。

圖6顯示使用Greco等人如前文出處之方法，對於化合物CU與干擾素α-2B(Schering-Plough)之組合，使用實驗3各化合物之8種稀釋液之等效線計算值。

圖7顯示使用Greco等人如前文出處之方法，對於化合物CU與干擾素α-2A之組合，使用實驗4各化合物之8種稀釋液之等效線計算值。

圖8顯示使用Greco等人如前文出處之方法，對於化合物CU與得自羊之干擾素τ之組合，使用實驗5各化合物之8種稀釋液之等效線計算。

圖9顯示使用Greco等人如前文出處之方法，對於化合物EC與干擾素α-2B(Schering-Plough)之組合，使用實驗6各化合物之8種稀釋液之等效線計算值。

圖10顯示使用Greco等人如前文出處之方法，對於化合物EC與干擾素α-2A之組合，使用實驗7各化合物之8種稀釋液之等效線計算值。

圖11顯示使用Greco等人如前文出處之方法，對於化合物CU與干擾素β之組合，使用實驗8各化合物之8種稀釋液之等效線計算值。

圖12顯示使用Greco等人如前文出處之方法，對於化合物EP與干擾素α-2B(Schering-Plough)之組合，使用實驗9各化合物之8種稀釋液之等效線計算值。

圖13顯示使用Greco等人如前文出處之方法，對於三唑

核苷與干擾素α-2B(Schering-Plough)之組合，使用實驗10各化合物之8種稀釋液之等效線計算值。

圖14顯示抑制因為以無論是單獨之(A)三唑核苷或單獨之(B)干擾素α-2B處理複製子細胞所造成之HCV複製子RNA蓄積。在兩個板面中，係顯示所度量之抑制，以及針對化合物之細胞毒性所校正之抑制。

序列表

<110> 美商维泰克斯製藥公司

<120> 擬肽蛋白酶抑制劑

<130> 223306/00-131/120312

<140> US 10/344,112
<141> 2004-12-17

<150> PCT/US01/026008
<151> 2001-08-31

<150> US 60/229398
<151> 2000-08-31

<150> US 60/277641
<151> 2001-03-21

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 900
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> HCV Replicon RNA TaqMan 探針及引子

<400> 1
gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaaac 60

ctcaaagaaa aaccaaacgt aacaccaacg ggcgcgccat gattgaacaa gatggattgc 120

acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga 180

caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggcgc ccggttcttt 240

ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat 300

cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg 360

gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg 420

ctcctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc 480

cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga 540

tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctcgcgccag 600

ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc gtcgtgaccc 660

atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 720

actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 780

ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttcct cgtgctttac ggtatcgccg 840

ctcccgattc gcagcgcatc gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaaa 900

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> HCV Replicon RNA TaqMan 探針及引子

<400> 2
ctgtggccgg ctgggtgtgg 20

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> HCV Replicon RNA TaqMan 探針及引子

<400> 3
ccctcgtcca cgtggcatct cga 23

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> HCV Replicon RNA TaqMan 探針及引子

<400> 4
ccgcttttct ggattcatcg 20

<210> 5
<211> 15
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> HCV Replicon RNA TaqMan 探針及引子

<400> 5
cccattcgcc gccaa 15

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> HCV Replicon RNA TaqMan 探針及引子

<400> 6
cagggtagtc gtcagtggtt cg 22

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 未知

<220>
<223> HCV Replicon RNA TaqMan 探針及引子

<400> 7
ggcctctgca gcaccctatc 20

公告本

發明專利說明書

分割案

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：99107488

※ 申請日：99.03.31

原申請案號：097127487

※IPC 分類：C07D403/00 (2006.01)
C07D403/12 (2006.01)
A61K31/495 (2006.01)
A61K31/403 (2006.01)
A61P31/12 (2006.01)

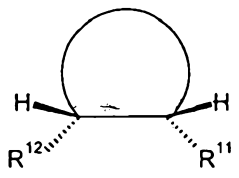
一、發明名稱：（中文/英文）

擬肽蛋白酶抑制劑之中間物

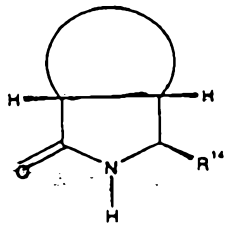
INTERMEDIATES OF PEPTIDOMIMETIC PROTEASE INHIBITORS

二、中文發明摘要：

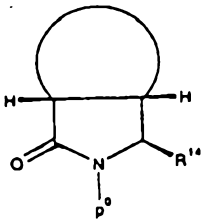
本發明係關於式24、式25及式26化合物，



(24)



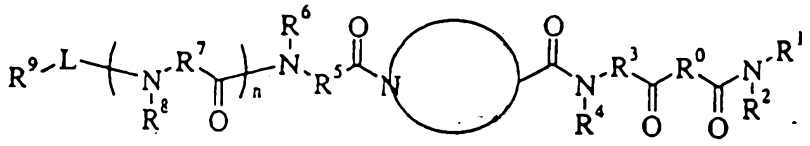
(25)



(26)

其中R^{11}、R^{12}、R^{14}及p^0係如後復內文中所定義。

式24、式25及式26化合物為其中為雙環之式1化合物之中間物：

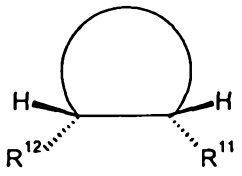


1

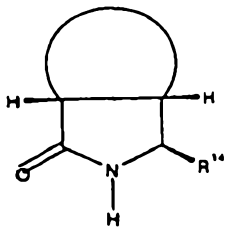
式1化合物為可用作蛋白酶抑制劑、特別是絲胺酸蛋白酶抑制劑、更特別是C型肝炎病毒NS3蛋白酶抑制劑之擬肽化合物。

三、英文發明摘要：

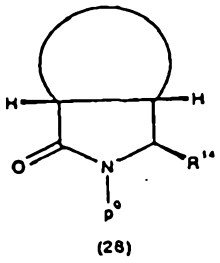
The present invention relates to compounds of formulas 24, 25, and 26



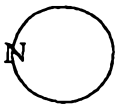
(24)

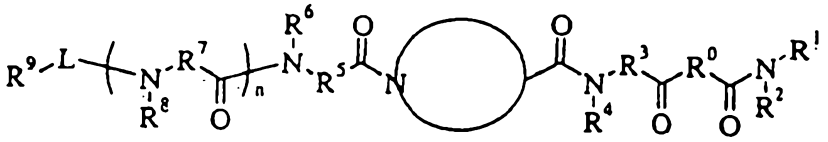


(25)



(26)

wherein R^{11}, R^{12}, R^{14} and p^0 are as defined in the disclosure hereinafter. The compounds of formulas 24, 25, and 26 are intermediates for the compounds of formula I wherein  is bicyclic:



I

The compounds of formula 1 are peptidomimetic compounds useful as protease inhibitors, particularly as serine protease inhibitors and more particularly as hepatitis C NS3 protease inhibitors.

八、圖式：

公告本

以干擾素 α-2B 與化合物 CU 之組合治療

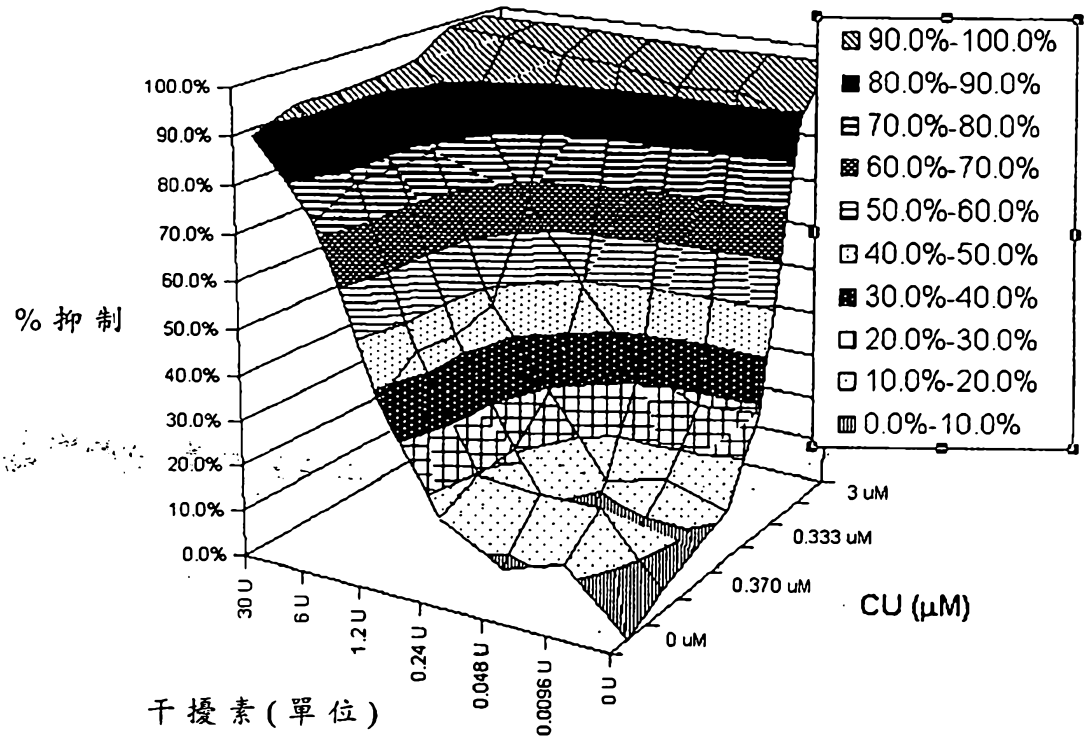


圖 1

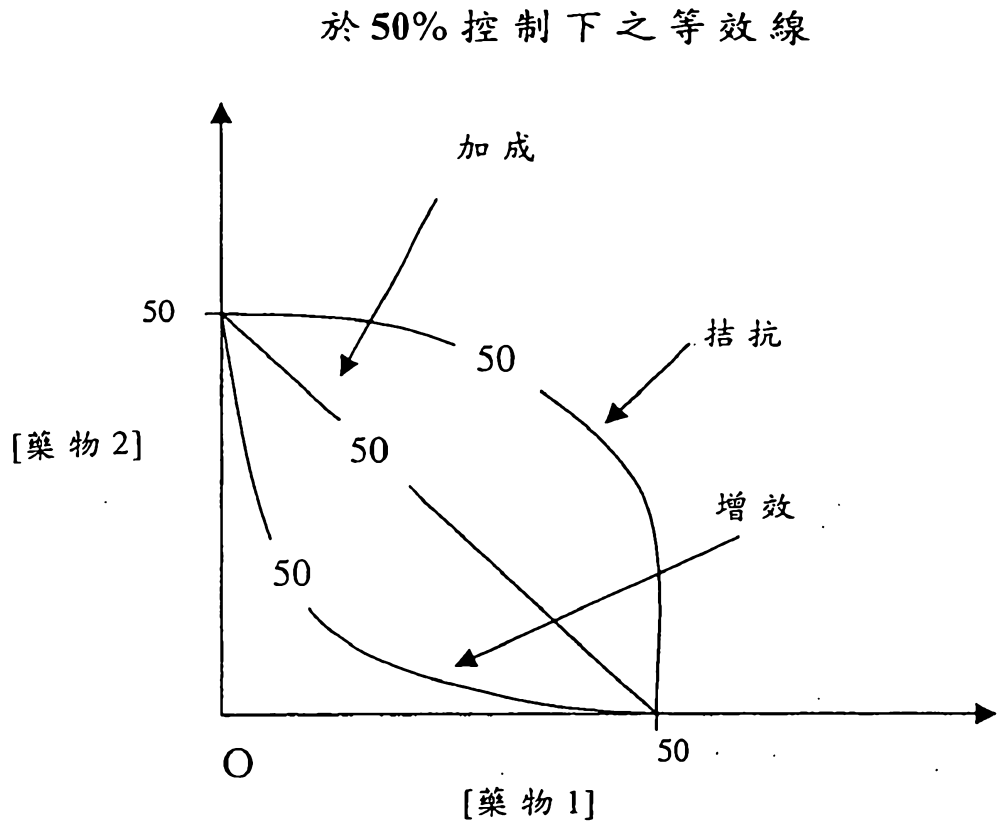


圖 2

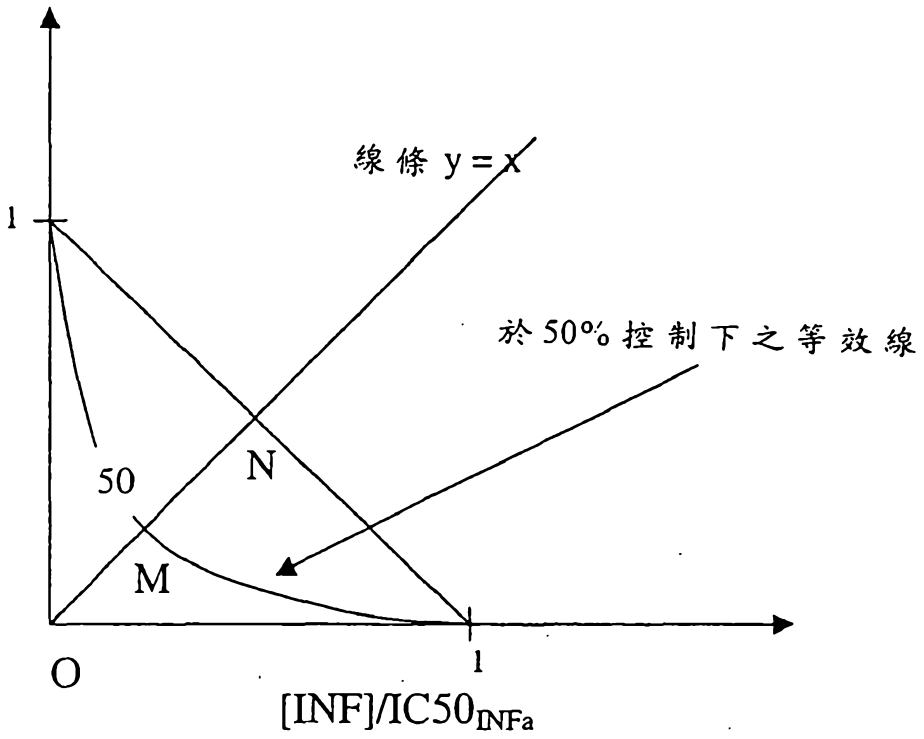


圖 3

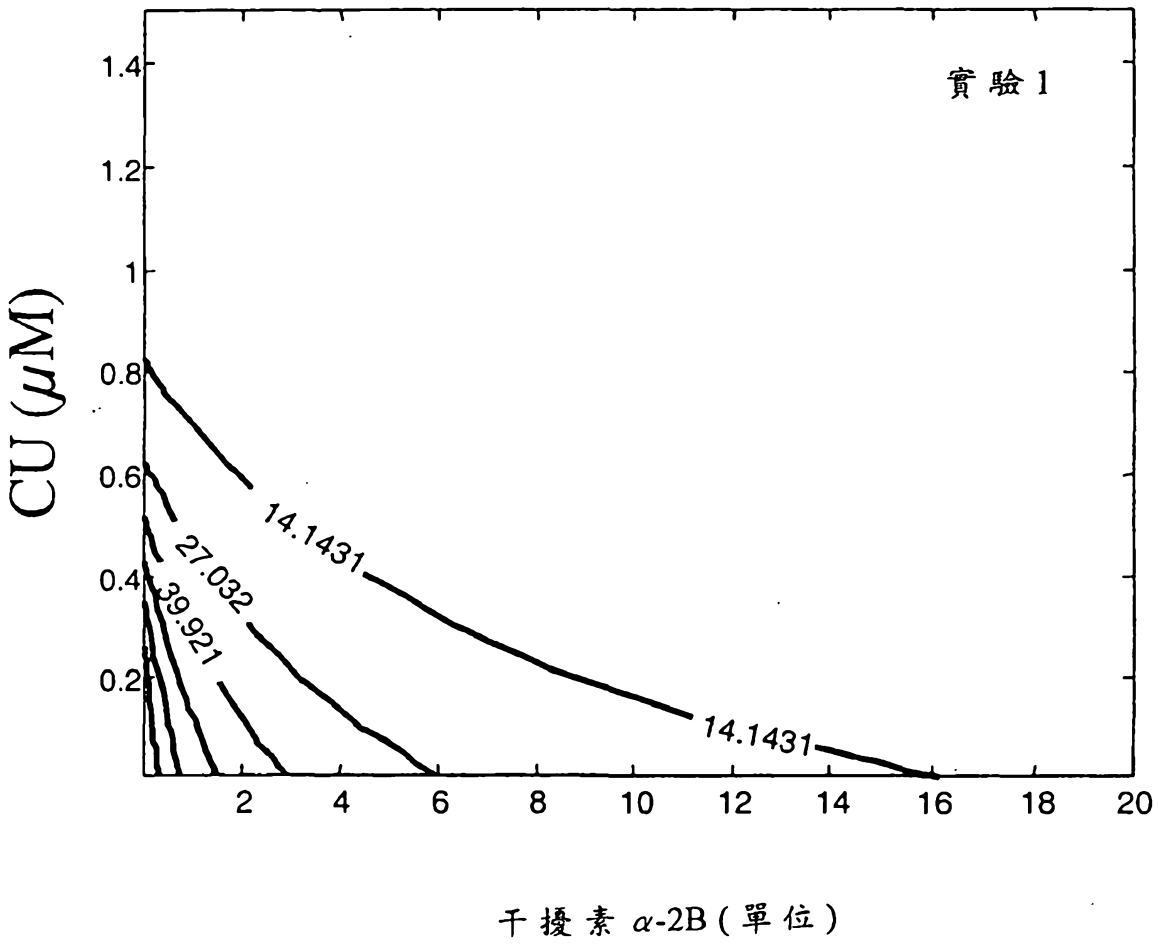

實驗 1
CU (μM)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
14.1431
27.032
39.921
14.1431
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
干擾素 α-2B (單位)

圖 4

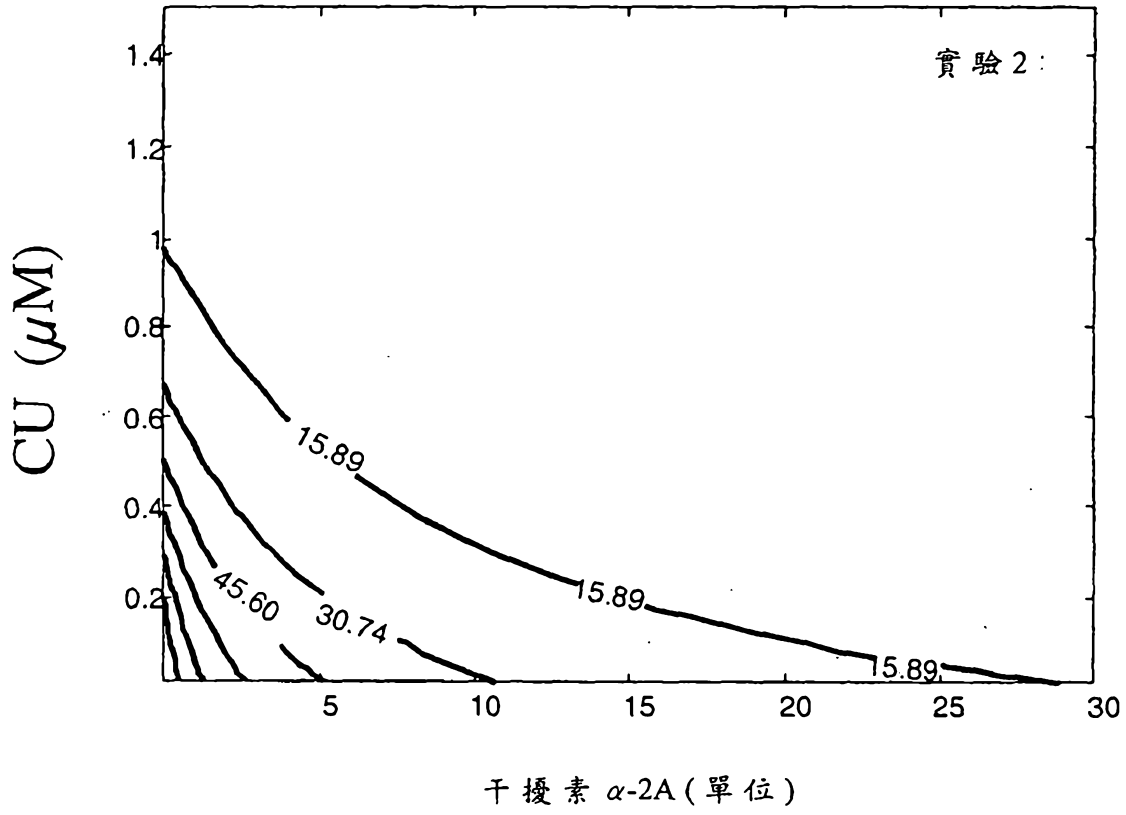

實驗2：
CU (μM)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
15.89
15.89
15.89
45.60
30.74
5
10
15
20
25
30
干擾素 α-2A（單位）

圖 5

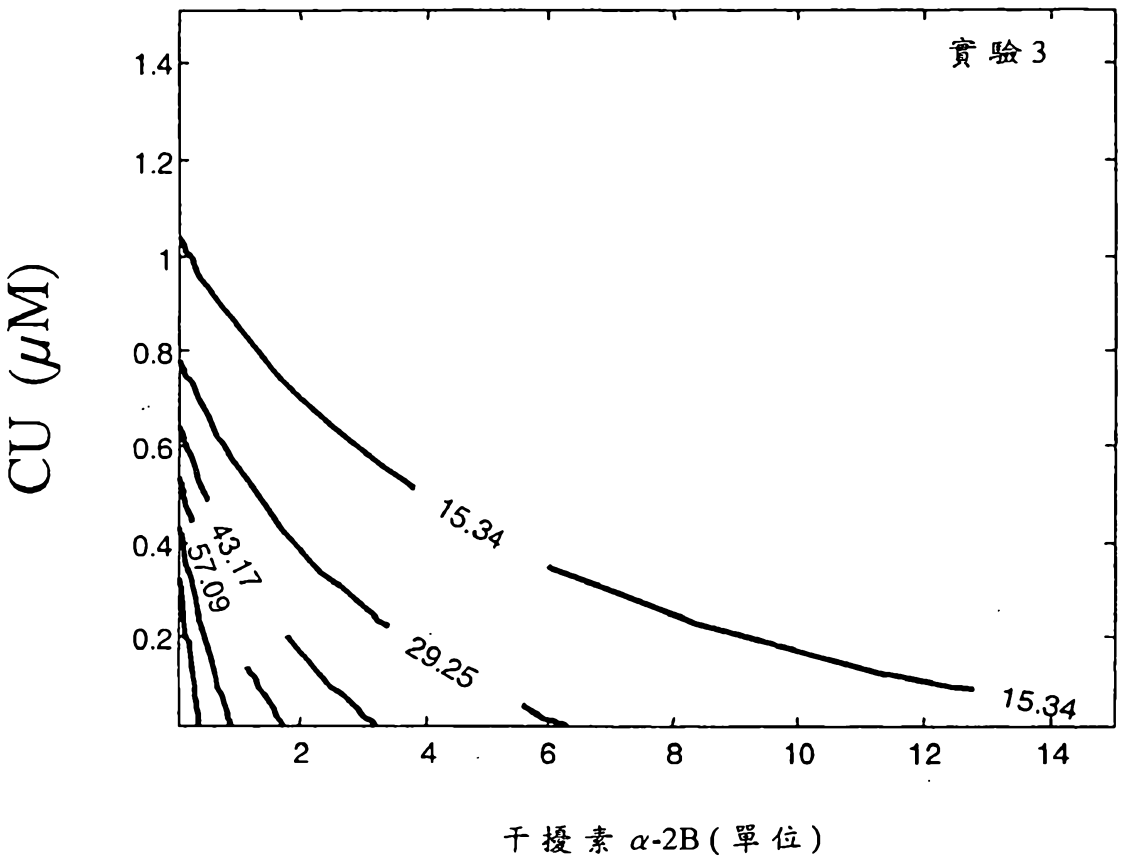

實驗3
CU (μM)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
2
4
6
8
10
12
14
15.34
43.17
57.09
29.25
15.34
干擾素 α-2B (單位)

圖 6

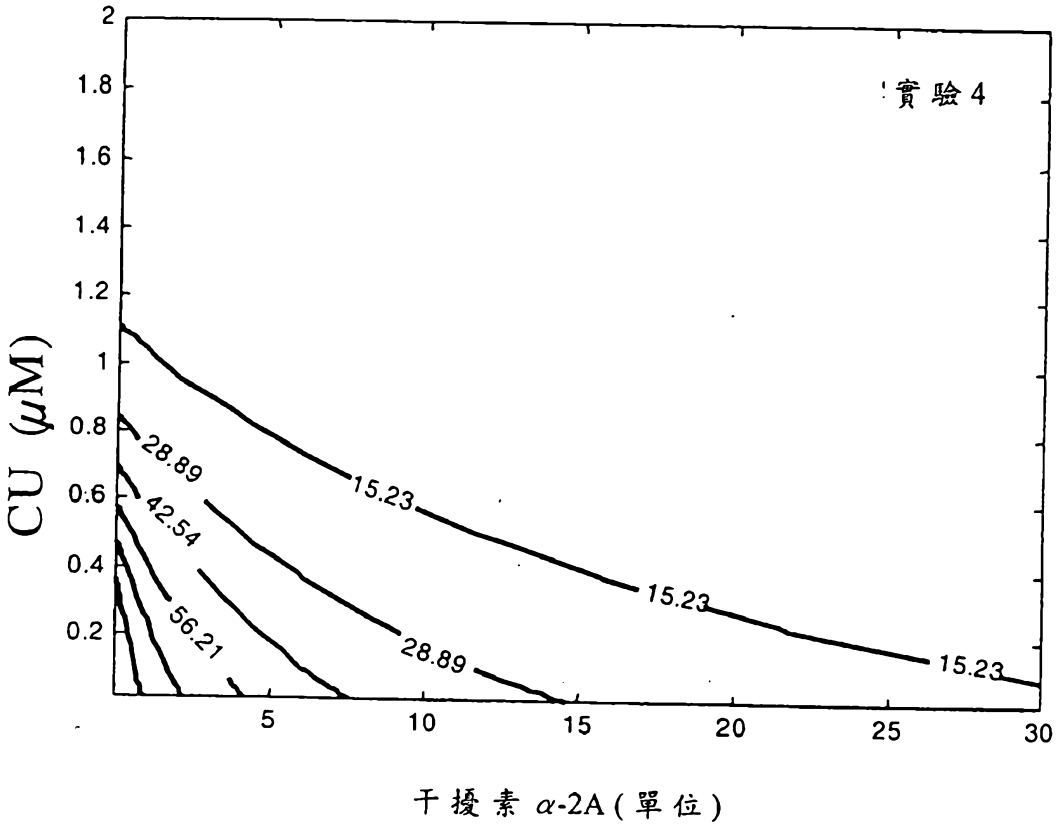

實驗4
CU (μM)
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
5
10
15
20
25
30
28.89
42.54
56.21
15.23
15.23
28.89
15.23
干擾素 α-2A (單位)

圖 7

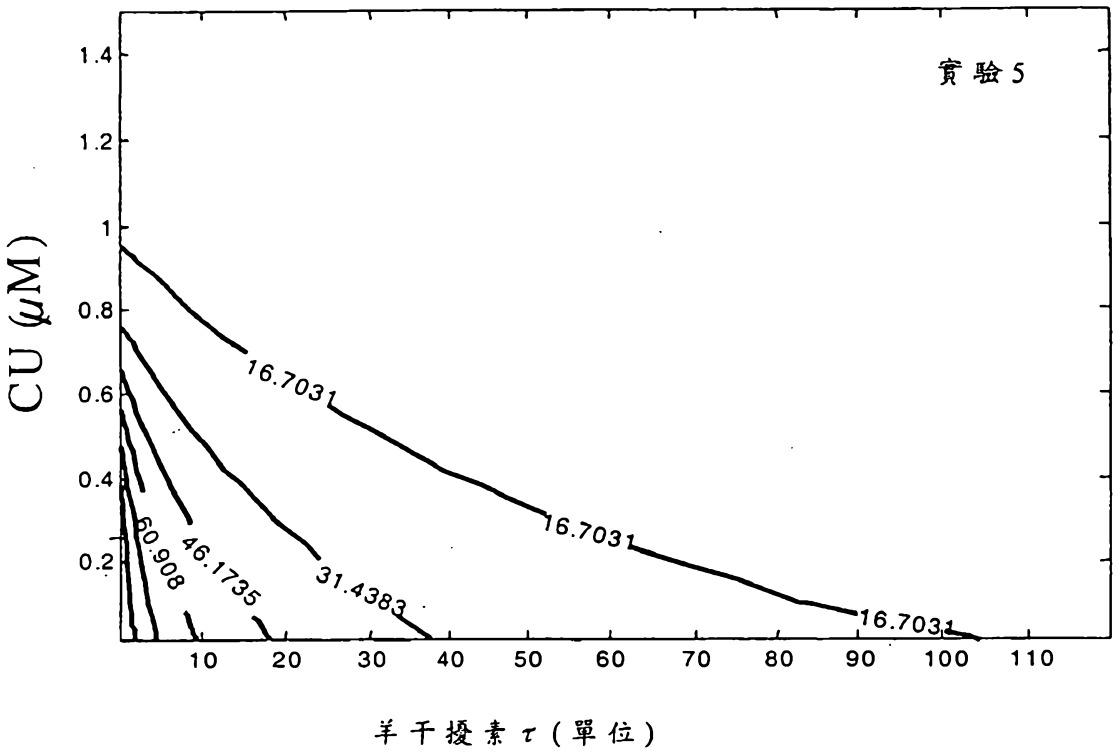

實驗5
CU (μM)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
16.7031
16.7031
16.7031
60.908
46.1735
31.4383
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
羊干擾素τ(單位)

圖 8

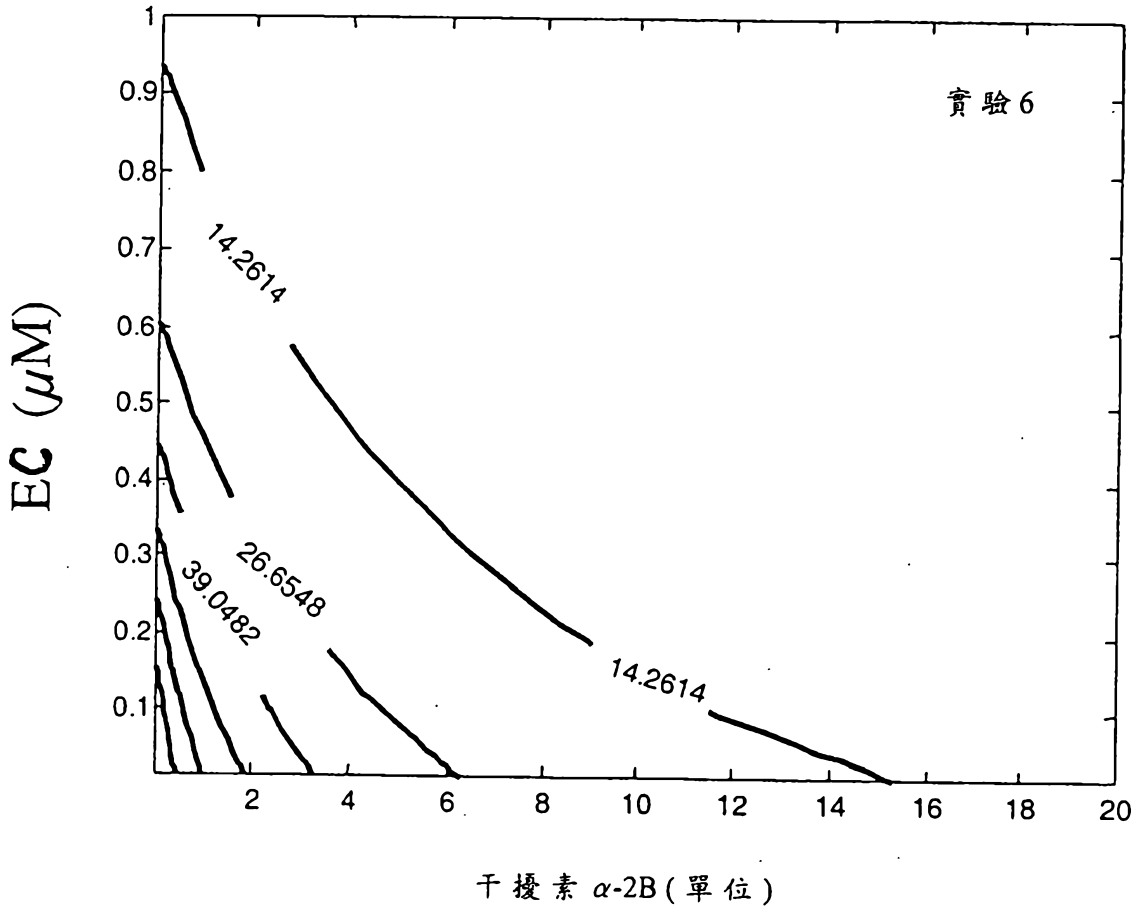

實驗6
EC (μM)
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
14.2614
26.6548
39.0482
14.2614
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
干擾素 α-2B (單位)

圖 9

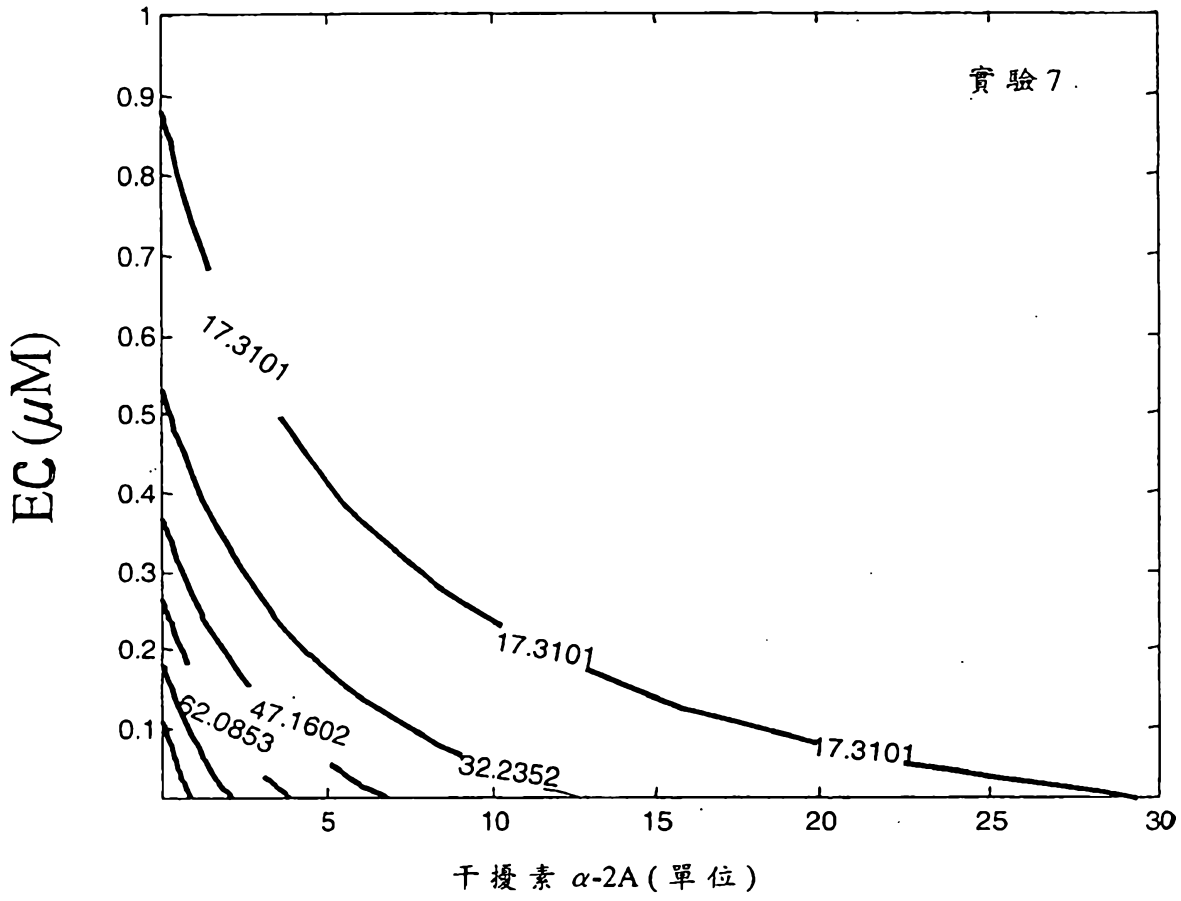

實驗 7
EC (μM)
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
5
10
15
20
25
30
17.3101
17.3101
17.3101
47.1602
62.0853
32.2352
干擾素 α-2A (單位)

圖 10

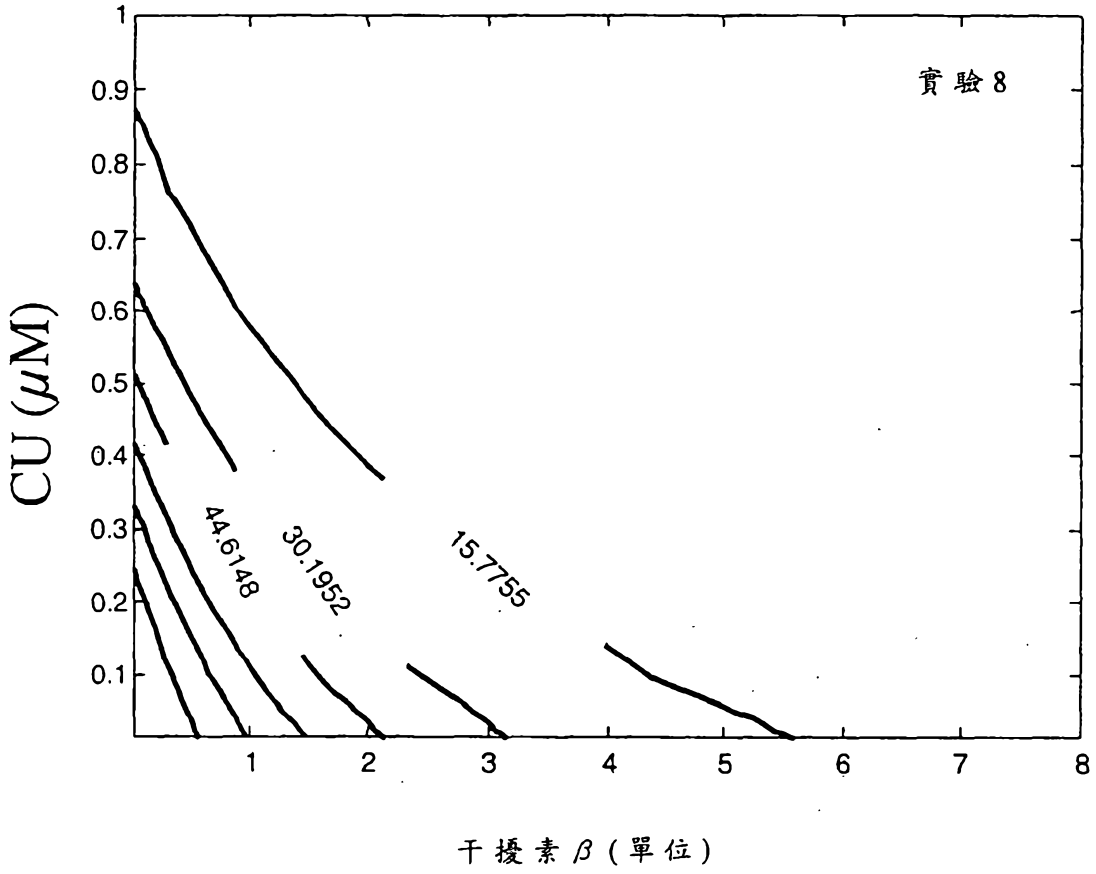

實驗8
CU (μM)
干擾素β（單位）
44.6148
30.1952
15.7755
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
1
2
3
4
5
6
7
8

圖 11

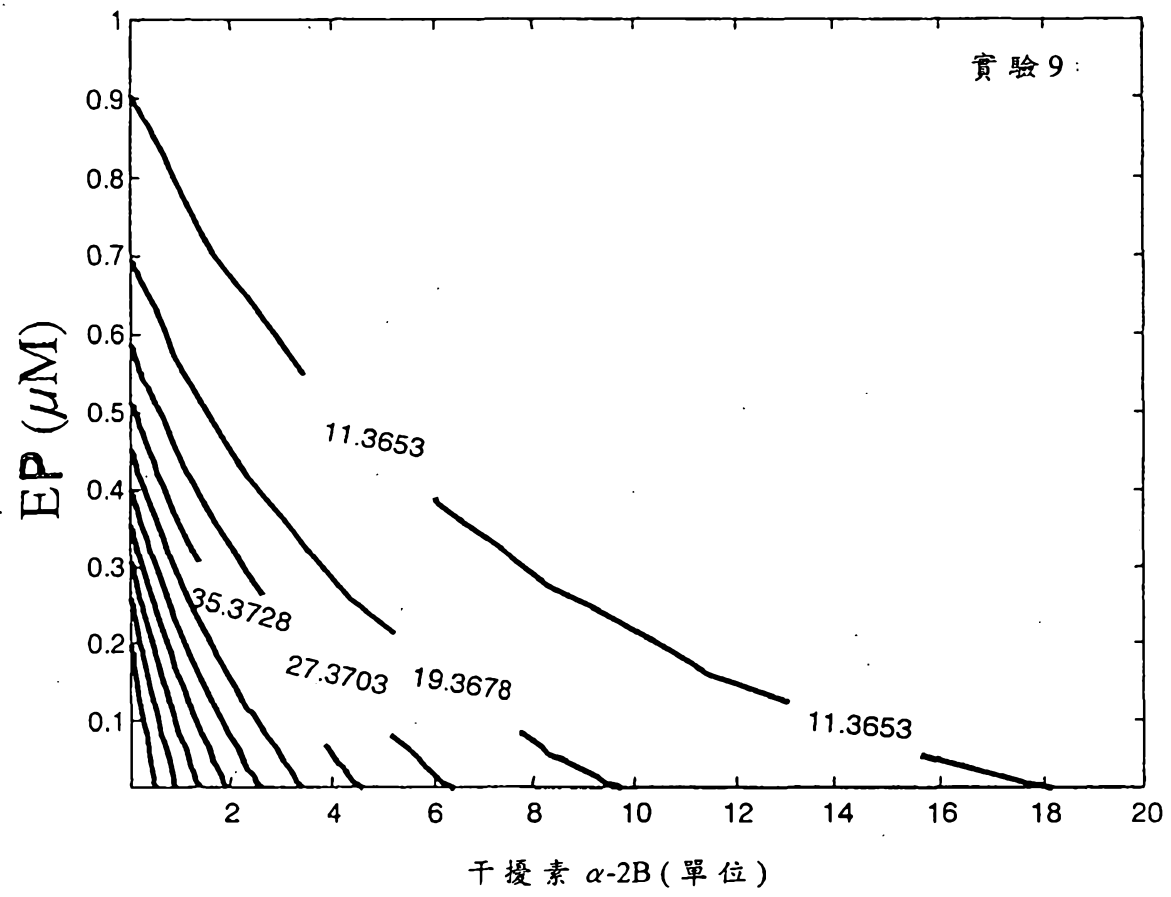

實驗9：
EP (μM)
干擾素 α-2B（單位）
11.3653
35.3728
27.3703
19.3678
11.3653
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20

圖 12

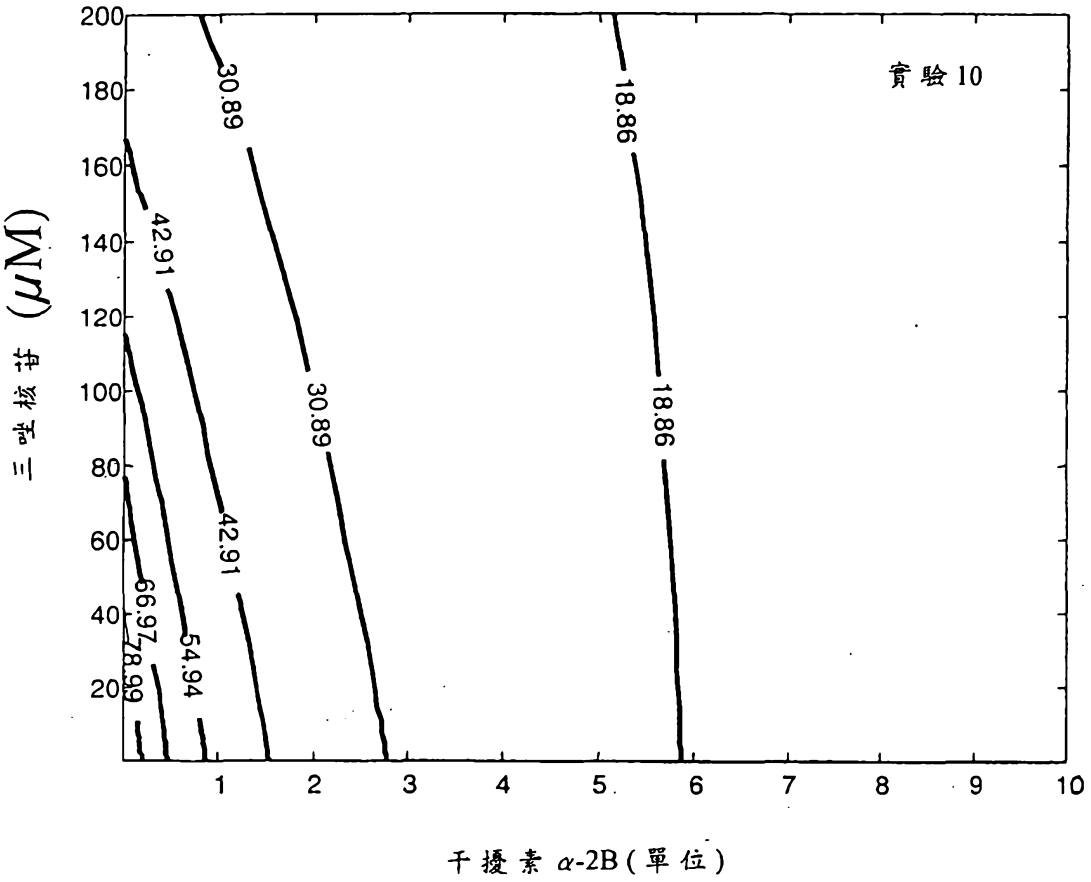
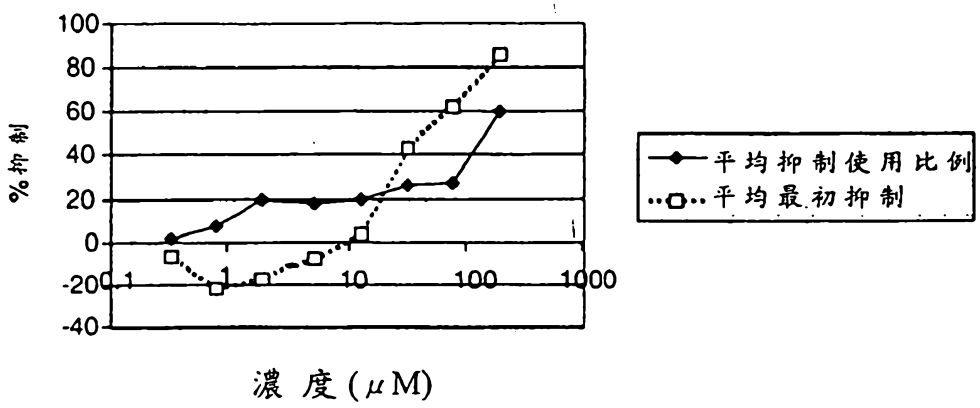

實驗 10
30.89
18.86
42.91
30.89
18.86
42.91
66.97
54.94
78.99
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
三甘油脂 (μM)
干擾素 α-2B (單位)

圖 13

A 單獨之三唑核苷



B 單獨之干擾素 α-2B

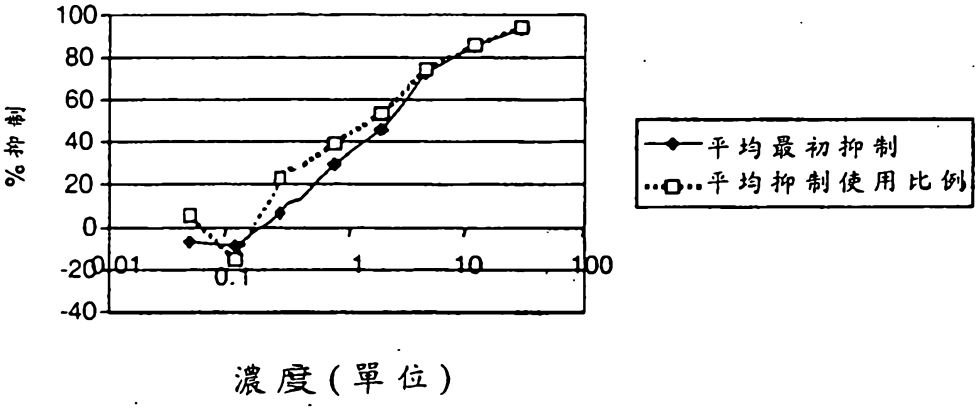


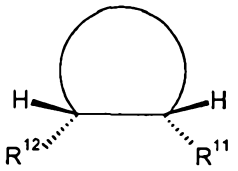
圖 14

四、指定代表圖：

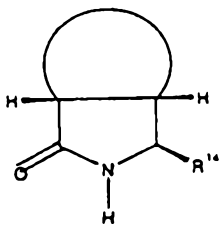
(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

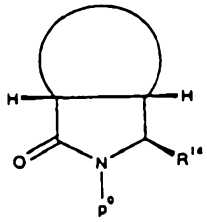
五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



(24)



(25)



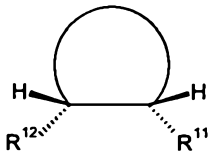
(26)

公告本

七、申請專利範圍：

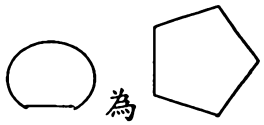
1. 一種式24化合物，

修正替換頁

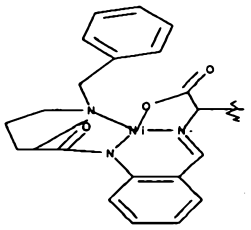
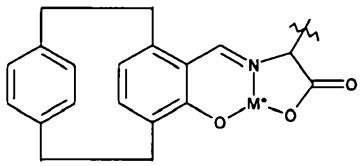
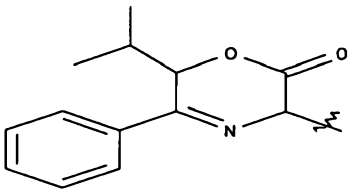
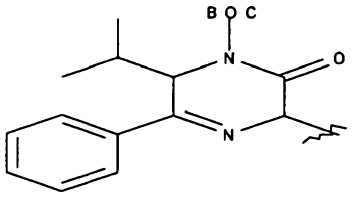
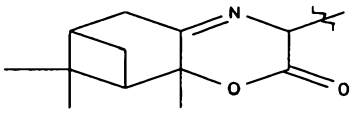
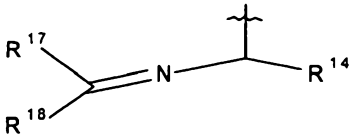


(24)

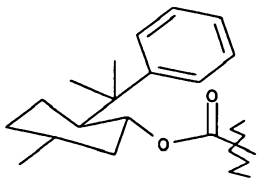
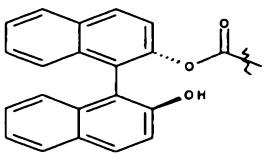
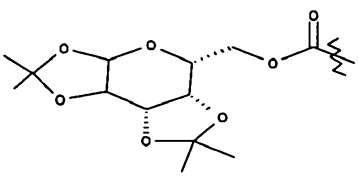
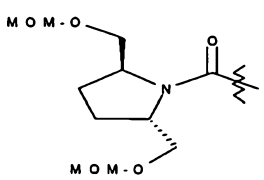
其中：

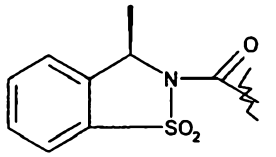

為；

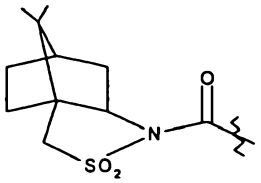
R^{11}為$-CO_2R^{13}-$；

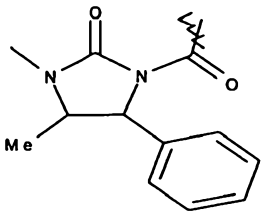
R^{12}為  ，  ，  ，  ，  ，或  ；；

R^{13}為脂族基團；

R^{14}為 $-CONR^{15}R^{15}$，$-CN$，  ，  ，  ，  ，



，


，


，或$-CO_2R^{16}$；

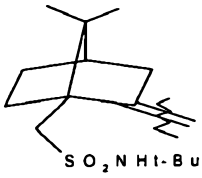
R^{15}為脂族基團；

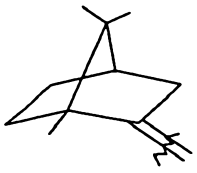
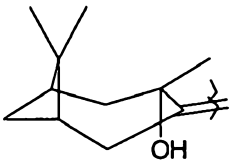
R^{16}為脂族基團；及

R^{17}為芳基；

R^{18}為芳基；或

R^{17}與R^{18}和該R^{17}與R^{18}所連接之碳一起採用而為



，

，或


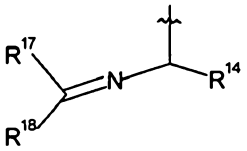
。

2. 根據申請專利範圍第1項之化合物，其中R^{13}為烷基。

3. 根據申請專利範圍第1或2項之化合物，其中R^{13}為C_1-C_4烷基。

4. 根據申請專利範圍第1或2項之化合物，其中R^{13}為甲基。

5. 根據申請專利範圍第1或2項之化合物，其中R^{12}為



。

6. 根據申請專利範圍第5項之化合物，其中R^{14}為$-CO_2R^{16}$。

7. 根據申請專利範圍第6項之化合物，其中R^{16}為烷基。

8. 根據申請專利範圍第6項之化合物，其中R^{16}為C_1-C_4烷基。

9. 根據申請專利範圍第6項之化合物，其中R^{16}為t-Bu。

10. 根據申請專利範圍第5項之化合物，其中R^{17}為芳基。

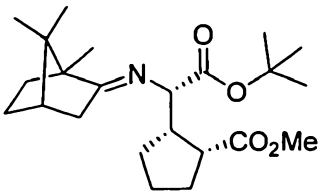
11. 根據申請專利範圍第5項之化合物，其中R^{17}為苯基。

12. 根據申請專利範圍第5項之化合物，其中R^{18}為芳基。

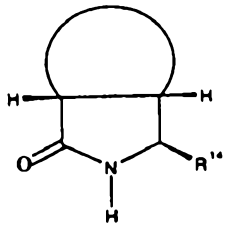
13. 根據申請專利範圍第5項之化合物，其中R^{18}為苯基。

14. 根據申請專利範圍第5項之化合物，其中^{17}與R^{18}和該R^{17}與R^{18}所連接之碳一起採用而為

。

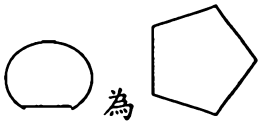
15. 一種化合物，  。

16. 一種式25化合物，

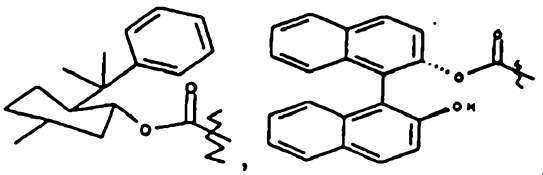


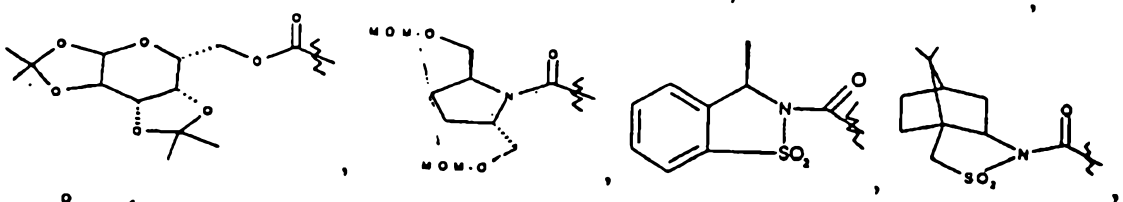
(25)

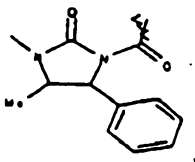
其中：

 為；

R^{14}爲-$CONR^{15}R^{15}$, -CN;







，或-CO_2R^{16};

R^{15}為脂族基團；及

R^{16}為脂族基團。

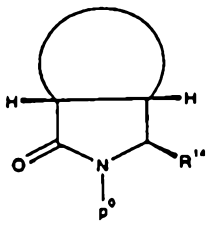
17. 根據申請專利範圍第16項之化合物，其中R^{14}為$-CO_2R^{16}$。

18. 根據申請專利範圍第16或17項之化合物，其中R^{16}為烷基。

19. 根據申請專利範圍第16或17項之化合物，其中R^{16}為C_1-C_4烷基。

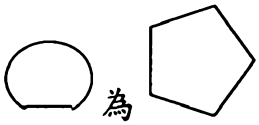
20. 根據申請專利範圍第16或17項之化合物，其中R^{16}為t-Bu。

21. 一種式26化合物，

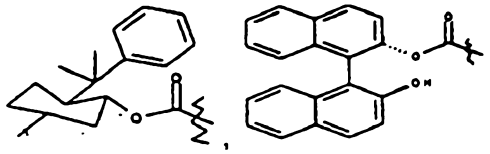
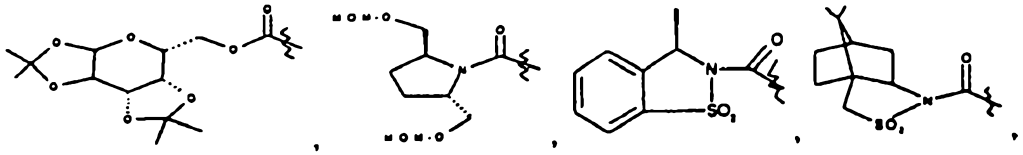
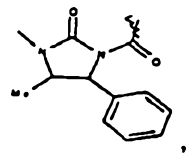


(26)

其中：


為

p^0為醯胺保護基；

R^{14}為-$CONR^{15}R^{15}$, -CN;  ,  , 

R^{15}為脂族基團；及

R^{16}為脂族基團。

22. 根據申請專利範圍第21項之化合物，其中R^{14}為-CO_2R^{16}。

23. 根據申請專利範圍第21或22項之化合物，其中R^{16}為烷基。

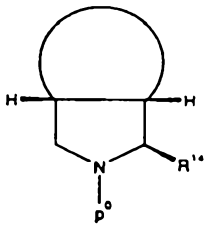
24. 根據申請專利範圍第21或22項之化合物，其中R^{16}為C_1-C_4烷基。

25. 根據申請專利範圍第21或22項之化合物，其中R^{16}為t-Bu。

26. 根據申請專利範圍第21或22項之化合物，其中p^0係選自由BOC、CBz及-CO_2烷基所組成之群。

27. 根據申請專利範圍第26項之化合物，其中p^0為BOC。

28. 一種式27化合物，



(27)

其中：

為未經取代之環戊烷；

p^0為醯胺保護基；

R^{14}為$-CO_2R^{16}$；

R^{16}為脂族基團。

29. 根據申請專利範圍第28項之化合物，其中R^{16}為烷基。

30. 根據申請專利範圍第28或29項之化合物，其中R^{16}為C_1-C_4烷基。

31. 根據申請專利範圍第28或29項之化合物，其中R^{16}為t-Bu。

32. 根據申請專利範圍第28或29項之化合物，其中p^0係選自由BOC、CBz及$-CO_2$烷基所組成之群。

33. 根據申請專利範圍第32項之化合物，其中p^0為BOC。