



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101693672 B

(45) 授权公告日 2014. 11. 12

(21) 申请号 200910149350. 3

(22) 申请日 2001. 08. 31

(30) 优先权数据

60/229, 398 2000. 08. 31 US

60/277, 641 2001. 03. 21 US

(62) 分案原申请数据

01815055. 1 2001. 08. 31

(73) 专利权人 弗特克斯药品有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 R·E·巴比尼 S·H·陈

J·E·拉马 N·J·斯尼德尔

孙喜成 M·J·特贝 F·维克托尔

王清梅 叶绮湄 I·科拉多

C·加西亚-帕雷德斯

R·S·帕克三世 L·金 郭德其

J·I·格拉斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 温宏艳 李连涛

(51) Int. Cl.

C07C 251/24 (2006. 01)

C07D 209/52 (2006. 01)

C07D 209/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 01/28979 A2, 2001. 04. 26, 权利要求 1.

E. J. Corey, et al.. Highly

Enantioselective Synthesis of Cyclic and Functionalized alpha-Amino Acids By Means of a Chiral Phase Transfer Catalyst.

《Tetrahedron Letters》. 1998, 第 39 卷第 5347-5350 页.

审查员 冯清伟

权利要求书2页 说明书243页 附图11页

(54) 发明名称

模拟肽蛋白酶抑制剂

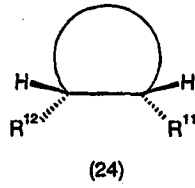
(57) 摘要

本发明涉及用作蛋白酶抑制剂,更特别是用作丝氨酸蛋白酶抑制剂,更特别是用作丙型肝炎 NS3 蛋白酶抑制剂的模拟肽化合物 (1); 其中间体;其制备方法,包括制备中间体的新的立体选择性方法。本发明也涉及药物组合物和使用该化合物抑制 HCV 蛋白酶的方法或对患有 HCV 感染或与所述感染相关的生理学病症的患者进行治疗的方法。本发明还提供了药物组合物,除了包含一种或多种 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂外,还包含一种或多种显示出抗 HCV 活性的干扰素和 / 或一种或多种具有抗 HCV 活性的化合物和可药用载体,还提供了采用所述组合物治疗或预防 HCV 感染的方法。本发明也涉及用于对患者治疗或预防 HCV 感染的药盒或药包。

CN 101693672 B



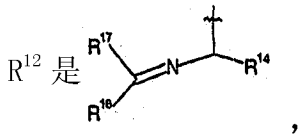
1. 式 24 的中间体化合物



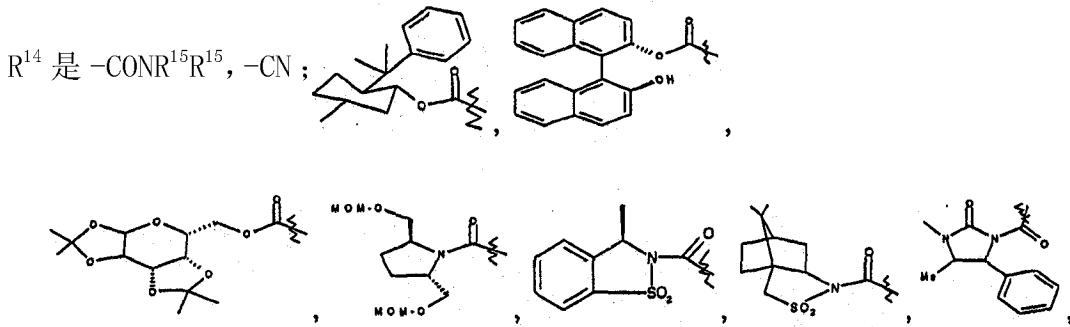
其中：



$R^{11}$  是  $-\text{CO}_2R^{13}$ ；



其中：



或  $-\text{CO}_2R^{16}$ ；

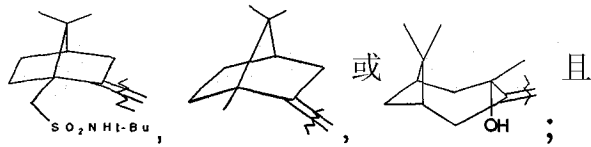
$R^{15}$  是任选地被取代的脂族基；

$R^{16}$  是任选地被取代的脂族基；

$R^{17}$  是任选地被取代的芳基、

$R^{18}$  是任选地被取代的芳基；或

$R^{17}$  和  $R^{18}$  与它们所相连的碳一起形成



$R^{13}$  是任选地被取代的脂族基，其中所述任选地被取代的脂族基是烷基、链烯基或炔基。

2. 权利要求 1 的中间体化合物，其中  $R^{13}$  是烷基，其中术语烷基指烃基团，其可以是直链或支链的，在链中具有 1 至 20 个碳原子。

3. 权利要求 1 或 2 任一项的中间体化合物，其中  $R^{13}$  是  $\text{C}_1\text{-C}_4$  烷基。

4. 权利要求 1 或 2 任一项的中间体化合物，其中  $R^{13}$  是甲基。

5. 权利要求 1 的中间体化合物，其中  $R^{14}$  是  $-\text{CO}_2R^{16}$ 。

6. 权利要求 5 的中间体化合物，其中  $R^{16}$  是烷基。

7. 权利要求 6 的中间体化合物, 其中  $R^{16}$  是  $C_1-C_4$  烷基。
8. 权利要求 7 的中间体化合物, 其中  $R^{16}$  是 t-Bu。
9. 权利要求 1 的中间体化合物, 其中  $R^{17}$  是任选地被取代的芳基。
10. 权利要求 9 的中间体化合物, 其中  $R^{17}$  是苯基。
11. 权利要求 1 的中间体化合物, 其中  $R^{18}$  是任选地被取代的芳基。
12. 权利要求 11 的中间体化合物, 其中  $R^{18}$  是苯基。
13. 权利要求 1 的中间体化合物, 其中  $R^{17}$  和  $R^{18}$  与它们所相连的碳一起形成



## 模拟肽蛋白酶抑制剂

[0001] 本申请是申请号为 01815055.1、申请日为 2001 年 8 月 31 日的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及模拟肽化合物和其中间体,它们的制备,包括立体选择合成中间体的方法,含有所述模拟肽化合物的药物组合物,所述模拟肽化合物或其组合物作为蛋白酶抑制剂的用途,特别是作为丝氨酸蛋白酶抑制剂的用途,更具体地作为丙型肝炎病毒("HCV")NS3 蛋白酶抑制剂的用途。作为 HCV NS3 蛋白酶抑制剂的这些模拟肽化合物,在干扰丙型肝炎病毒生命周期和 HCV 感染或与其有关的生理学病症的治疗或者预防中特别有效。本发明亦涉及采用这些模拟肽化合物或药物组合物,或其药盒和药包的联合治疗,以便抑制细胞内 HCV 复制,或者治疗或预防患者的 HCV 感染的方法。按照本发明,作为药物组合物包括的是那些,它们包含与具有抗 HCV 活性的干扰素联用的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂;与具有抗 HCV 活性的非干扰素化合物联用的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂;或者与具有抗 HCV 活性的干扰素和具有抗 HCV 活性的非干扰素化合物联用的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂。本发明进一步涉及制备用于模拟肽化合物合成的手性双环脯氨酸酯中间体的立体选择方法。

### 背景技术

[0003] HCV 感染是紧迫的人类医学问题,并且现在被认为是大多数情形的非甲、非乙型肝炎的病原体。

[0004] HCV 被认为慢性感染了世界人口的 3% [A. Alberti 等., " Natural History of Hepatitis C, " J. Hepatology, 31, (Suppl. 1), 17-24 (1999)]. 仅在美国的感染率是 1.8% 或三百九十万 [M. J. Alter, " 美国丙型肝炎病毒的感染, " J. Hepatology, 31, (Suppl. 1), 88-91 (1999)]. 所有感染的患者中,超过 70% 的发展成被认为是肝硬化和肝细胞癌的主要原因的慢性感染。[D. Lavanchy, " Global Surveillance and Control of Hepatitis C, " J. Viral Hepatitis, 6, 35-47 (1999)]

[0005] HCV 的复制包括编码 3010-3033 氨基酸的多蛋白的基因组 [Q. -L. Choo, 等., " Genetic Organization and Diversity of the Hepatitis C Virus " , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2451-2455 (1991); N. Kato 等., " Molecular Cloning of the Human Hepatitis C Virus Genome From Japanese Patients with Non-A, Non-B Hepatitis " , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 9524-9528 (1990); A. Takamizawa 等., " Structure and Organization of the Hepatitis C Virus Genome Isolated From Human Carriers " , J. Virol., 65, 1105-1113 (1991)]. 据假定 HCV 非结构 (NS) 蛋白供给病毒复制必需的催化工具。NS 蛋白源自多蛋白的蛋白酶裂解 [R. Bartenschlager 等., " Nonstructural Protein 3 of the Hepatitis C Virus Encodes a Serine-Type Proteinase Required for Cleavage at the NS3/4 and NS4/5 Junctions " , J. Virol., 67, 3835-3844 (1993); A. Grakoui 等., " Characterization of the Hepatitis C Virus-Encoded Serine Proteinase :

Determination of Proteinase-Dependent Polyprotein Cleavage Sites" , J. Virol. ,67, 2832-2843(1993) ;A. Grakoui 等 . , Expression and Identification of Hepatitis C Virus Polyprotein Cleavage Products" , J. Virol. ,67, 1385-1395(1993) ;L. Tomei 等 . , " NS3 is a serine protease required for processing of Hepatitis C Virus polyprotein " , J. Virol. ,67, 4017-4026(1993)]. 事实上,已经显示包含具有 HCV 多蛋白所有四个下游位点的 NS3 丝氨酸蛋白酶域的是 NS3 的前 181 个氨基酸病毒多蛋白的残基 1027-1207[C. Lin 等 . , " Hepatitis C Virus NS3 Serine Proteinase :Trans-Cleavage Requirements and Processing Kinetics" , J. Virol. ,68, 8147-8157(1994)].

[0006] HCV NS 蛋白 3(NS3) 包含有助于加工大多数病毒酶的丝氨酸蛋白酶活性,因此被认为是病毒复制和传染性必需的。由黄热病病毒 NS 3 蛋白酶突变减小病毒传染性的事实推断出 NS3 蛋白酶的必不可少性 [T. J. Chambers 等 . , " Evidence that the N-terminal Domain of Nonstructural Protein NS3 From Yellow Fever Virus is a Serine Protease Responsible for Site-Specific Cleavages in the Viral Polyprotein" , Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 8898-8902(1990)]. 更近一些,据证实 HCV NS3 蛋白酶活性部位的突变能够彻底消除黑猩猩模型中的 HCV 感染 [C. M. Rice 等 . " Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' -nontranslated region are essential for virus replication in vivo. " J. Virol. ,74(4) 2046-51(2000)]nHCV NS3 丝氨酸蛋白酶也被认为病毒复制必需的,由于它和它的相关辅助因子 NS4A 有助于所有病毒酶的加工。这种加工似乎类似于由人免疫缺陷病毒 (" HIV" ) 天冬氨酰蛋白酶实施的情况。此外, HIV 蛋白酶抑制剂作为人有效抗病毒剂的得以证实的用途证明,中断病毒生命周期中蛋白酶蛋白加工阶段确实产生治疗活性剂。所以,蛋白酶是适于药物发现的有吸引力的目标。

[0007] 已经介绍了几种有效的 HCV 蛋白酶抑制剂。PCT 公开号 W000/09558, W0 00/09543, W0 99/64442, W0 99/07733, W0 99/07734, W099/50230, W098/46630, W0 98/17679 和 W0 97/43310, 美国专利 No. 5,990,276, M. Llinás-Brunet 等 . , Bioorg. Med. Chem. Lett. ,8, 1713-1718(1998), W. Han 等 . , Bioorg. Med. Chem. Lett. ,10, 711-713(2000), R. Dunsdon 等 . , Bioorg. Med. Chem. Lett. ,10, 1571-1579(2000), M. Llinás-Brunet 等 . , Bioorg. Med. Chem. Lett. ,10, 2267-2270(2000), 和 S. LaPlante 等 . , Bioorg. Med. Chem. Lett. ,10, 2271-2274(2000) 分别描述了有效的 HCV NS3 蛋白酶抑制剂。遗憾的是,目前没有获得用作抗 HCV 剂的丝氨酸蛋白酶抑制剂。

[0008] 事实上,除了干扰素 - $\alpha$ 、干扰素 - $\alpha$  / 利巴韦林组合和更近的聚乙二醇化 (pegylated) 干扰素 - $\alpha$  之外,不存在抗 HCV 治疗。然而,干扰素 - $\alpha$  治疗和干扰素 - $\alpha$  / 利巴韦林的持续反应率往往是低的 (< 50%), 治疗显示的副反应往往是显著和严重的 [M. A. Walker, " Hepatitis C Virus :an Overview of Current Approaches and Progress," DDT, 4, 518-529(1999) ;D. Moradpour 等 . , " Current and Evolving Therapies for Hepatitis C," Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. ,11, 1199-1202(1999) ; H. L. A. Janssen 等 . , " Suicide Associated with Alfa-Interferon Therapy for Chronic Viral Hepatitis," J. Hepatol. ,21, 241-243(1994) ;和 P. F. Renault 等 . , " Side effects of alpha Interferon" , Seminars in Liver Disease 9, 273-277, (1989)]. 此外,干扰素治疗仅在部分病例 (~ 25%) 中诱导长期缓解 [O. Weiland, " Interferon Therapy in

Chronic Hepatitis C Virus Infection", FEMS Microbiol. Rev., 14, 279-288 (1994)]. 以上所述的干扰素- $\alpha$  治疗的问题甚至已经导致使用聚乙二醇化衍生的干扰素- $\alpha$  化合物作为改善的抗 HCV 治疗剂来进行开发和临床研究。

[0009] 鉴于目前有关抗 HCV 治疗的形势, 很明显, 需要更有效和更好的耐受治疗。

[0010] 此外, 大多数合成有机方法的非立体选择性实质长期阻碍了复杂模拟肽化合物的合成。众所周知, 模拟肽化合物的对映体的治疗活性变化很大。因此, 提供这种立体有择的合成方法极有意义。

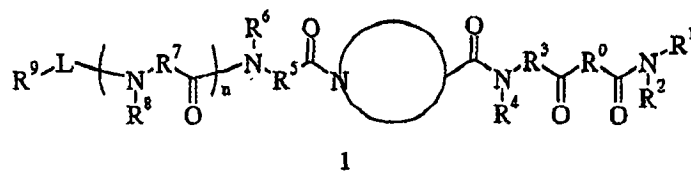
[0011] 先前合成用于目前治疗模拟肽蛋白酶抑制剂合成的手性特异的双环脯氨酸酯中间体的努力, 已经受到了下述因素的阻碍: 非对映选择性 (non enantioselective), 或非对映选择性 (diastereoselective), 或者包括长的合成途径, 或者不适于制备大量产品。因此, 这里亦有以非立体选择性方式和富含对映形式制备大量双环脯氨酸酯类的方法的需要。

## 发明内容

[0012] 发明概述

[0013] 本发明涉及式 1 的模拟肽化合物

[0014]



[0015] 其中:


[0016]  $R^0$  是一个键或二氟亚甲基;

[0017]  $R^1$  是氢、任选地被取代的脂族基、任选地被取代的环基团或任选地被取代的芳族基;

[0018]  $R^2$  和  $R^9$  彼此独立地是任选地被取代的脂族基、任选地被取代的环基团或任选地被取代的芳族基;

[0019]  $R^3$ 、 $R^5$  和  $R^7$  彼此独立地是:( 任选被取代的脂族基、任选被取代的环基团或任选被取代的芳族基)( 任选被取代的亚甲基或任选被取代的亚乙基)、任选被取代的 (1,1- 或 1,2-) 亚环烷基或任选被取代的 (1,1- 或 1,2-) 亚杂环基;

[0020]  $R^4$ 、 $R^6$ 、 $R^8$  和  $R^{10}$  彼此独立地是氢或任选地被取代的脂族基;


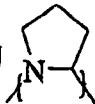
[0021]  是被取代的单环氮杂环基或任选地被取代的多环氮杂环基, 或任选地被取代的多环氮杂环烯基, 其中不饱和键位于在带有  $R^9-L-(N(R^8)-R^7-C(=O)-)_n-N(R^6)-R^5-C(=O)-N$

部分以及连接有  $-C(=O)-N(R^4)-R^3-C(=O)-C(=O)-NR^2R^1$  部分的环远侧的环中;

[0022] L 是  $-C(=O)-$ 、 $-OC(=O)-$ 、 $-NR^{10}C(=O)-$ 、 $-S(O)_2-$  或  $-NR^{10}S(O)_2-$ ; 且

[0023] n 是 0 或 1,

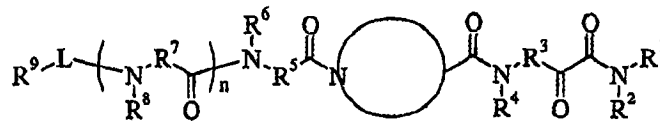
[0024] 或其药用盐或前药, 或此化合物、其盐或其前药的溶剂化物,

[0025] 条件是当  是取代的  时, 则 L 是  $-OC(=O)-$ , 且  $R^9$  是任选地被取代的脂族

基；或  $R^3$ 、 $R^5$  和  $R^7$  当中至少有一个是（任选被取代的脂族基、任选被取代的环基团或任选被取代的芳族基）（任选被取代的乙烷二基），或  $R^4$  是任选地被取代的脂族基。

[0026] 本发明也提供了如下结构式的化合物

[0027]




[0028] 其中：

[0029]  $R^1$  是氢，任选地被取代的脂族基，任选地被取代的环基团或任选地被取代的芳族基；

[0030]  $R^2$  和  $R^9$  彼此独立地是任选地被取代的脂族基，任选地被取代的环基团或任选地被取代的芳族基；

[0031]  $R^3$ 、 $R^5$  和  $R^7$  彼此独立地是（任选被取代的脂族基、任选被取代的环基团或任选被取代的芳族基）（任选被取代的甲烷二基或任选被取代的乙烷二基）；

[0032]  $R^4$ 、 $R^6$ 、 $R^8$  和  $R^{10}$  彼此独立地是氢或任选地被取代的脂族基；



[0033]  是取代的单环氮杂环基或任选地被取代的多环氮杂环基，或任选地被取代的多环氮杂环烯基，其中不饱和键位于在带有  $R^9-L-(N(R^8)-R^7-C(O)-)_n-N(R^6)-R^5-C(O)-N$  部分以及连接有  $-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)C(O)NR^2R^1$  部分的环远侧的环中；

[0034] L 是  $-C(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-NR^{10}C(O)-$ 、 $-S(O)_2-$  或  $-NR^{10}S(O)_2-$ ；和

[0035] n 为 0 或 1，或

[0036] 其药用盐或前药，或此化合物、其盐或其前药的溶剂化物，

[0037] 条件是：

[0038] 当  为取代的  时，则 L 是  $-OC(O)-$  和  $R^9$  为任选地被取代的脂族基，或  $R^3$ 、 $R^5$  和  $R^7$  当中至少有一个是（任选被取代的脂族基、任选被取代的环基团或任选被取代的芳族基）（任选被取代的乙烷二基），或

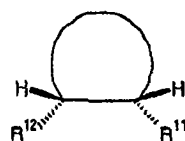
[0039]  $R^4$  是任选地被取代的脂族基。

[0040] 本发明也涉及包含式 1 化合物的药物组合物，和采用式 1 化合物抑制 HCV 蛋白酶或者对患有 HCV 感染或与该感染相关的生理学病症的患者进行治疗或预防的方法。

[0041] 本发明也涉及用于制备手性双环脯氨酸酯化合物的立体选择性方法，所述化合物是用于制备式 1 化合物的中间体。该合成方法包括下述步骤：


[0042] (a) 在分裂和环化条件下，使式 24 的化合物分裂和环化

[0043]



(24)

[0044] 其中：

[0045]  是任选地被取代的环烷基或任选地被取代的稠合的芳基环烷基；

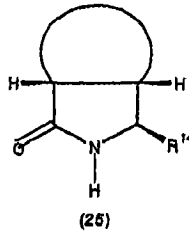
[0046]  $R^{11}$  是  $-\text{CO}_2R^{13}$ ；

[0047]  $R^{12}$  是亚胺甘氨酸亚胺 (iminic glycinimide) 加成物；

[0048]  $R^{13}$  是酸保护基或任选地被取代的脂族基；

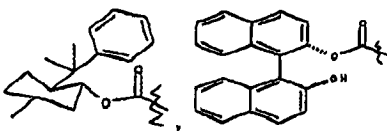
[0049] 以形成式 25 的化合物

[0050]

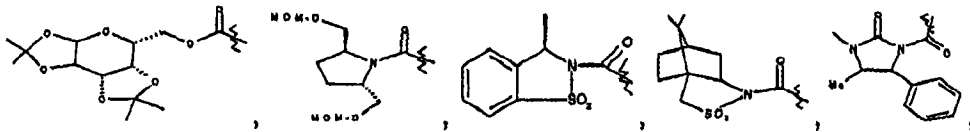


[0051] 其中：

[0052]  $R^{14}$  是  $-\text{CONR}^{15}R^{15}$ 、 $-\text{CN}$ ；



[0053]



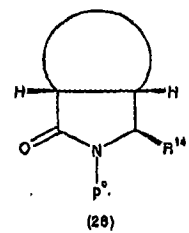
[0054] 或  $-\text{CO}_2R^{16}$ ；

[0055]  $R^{15}$  是任选地被取代的脂族基；

[0056]  $R^{16}$  是酸保护基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的脂族基；和

[0057] (b) 用酰胺保护基将式 25 化合物中内酰胺部分的氮原子保护，形成式 26 的化合物

[0058]



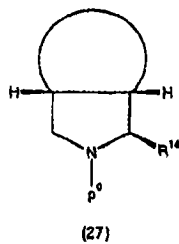
[0059] 其中：

[0060]  $p^\circ$  是酰胺保护基；

[0061]  $R^{14}$  如本文所述；和

[0062] (c) 在还原条件下将式 26 的化合物还原，而形成式 27 的化合物

[0063]

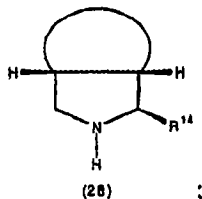


[0064] 其中：

[0065]  $P^o$  和  $R^{14}$  如本文所述；和

[0066] (d) 在脱保护条件下使式 27 的化合物脱保护，形成式 28 的化合物

[0067]

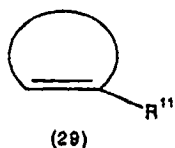


[0068] 其中：


[0069]  $R^{14}$  如本文所定义。

[0070] 本发明也涉及上述合成方法，其进一步包含下述步骤，其中式 24 的化合物是通过使亚胺甘氨酸亚胺化合物与式 29 的化合物进行 Michael 加成而制备的：

[0071]



[0072] 其中：

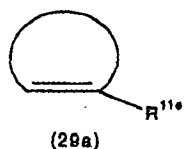
[0073]  是任选地被取代的环烯基或任选地被取代的稠合的芳基环烯基；


[0074]  $R^{11}$  是  $-CO_2R^{13}$ ；

[0075] 其中：

[0076] 式 29 的化合物可通过酯化式 29a 的化合物制备

[0077]



[0078]  是任选地被取代的环烯基或任选地被取代的稠合的芳基环烯基；

[0079]  $R^{11a}$  是  $-CHO$ 、 $-COR^{15}$ 、 $-C \equiv N$  或  $-CONR^{15}R^{15}$ ；且

[0080]  $R^{15}$  如本文所定义。

[0081] 特别是，本领域的技术人员将都知道，酮向酯的转化过程可以例如通过 Bayer-Villiger 反应完成。腈和酰胺向酯的转化过程可以例如通过水解然后进一步的酯化过程完成。醛向酯的转化可通过将醛氧化然后酯化来完成。

[0082] 另一方面,本发明提供式 1 化合物,其中取代基选自在本文中定义的优选的或具体的实施方案的组合。

[0083] 另一方面,本发明提供了式 24-29 的化合物,其中取代基选自在本文中定义的优选的或具体的实施方案的组合。

[0084] 另一方面,本发明提供了药物组合物,除包含一种或多种 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂以外,还包含一种或多种干扰素或能够诱导产生显示抗 HCV 活性的干扰素的化合物和 / 或一种或多种具有抗 HCV 活性的化合物,包括免疫调节化合物如显示 HCV 抗病毒活性的免疫刺激性细胞因子,和可药用载体。

[0085] 另一方面,本发明提供了治疗或有此需要的患者中预防 HCV 感染的方法,包含向患者联合给药药理学有效量的一种或多种 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂;一种或多种干扰素或能够诱导产生显示抗 HCV 活性的干扰素的化合物;和 / 或一种或多种具有抗 HCV 活性的化合物,包括免疫调节化合物如显示 HCV 抗病毒活性的免疫刺激性细胞因子。

[0086] 本发明也涉及一种或多种 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂与一种或多种干扰素或能够诱导产生显示抗 HCV 活性的干扰素的化合物和 / 或一种或多种具有抗 HCV 活性的化合物,包括免疫调节化合物如显示 HCV 抗病毒活性的免疫刺激性细胞因子的组合在制备用于治疗或预防有此需要的患者的 HCV 感染的药物中的用途。

[0087] 本发明也涉及一种用于治疗或预防患者中 HCV 感染的药盒或药包,其中,所述药盒或药包包含多个分开的容器,其中至少一个所述容器包含一种或多种 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂(单独或与可药用载体或稀释剂组合),至少另一种所述容器包含一种或多种干扰素或能够诱导产生显示抗 HCV 活性的干扰素的化合物(单独或与可药用载体或稀释剂组合),以及任选地,至少另一种所述容器包含一种或多种具有抗 HCV 活性的化合物(单独或与可药用载体或稀释剂组合),包括免疫调节化合物如显示 HCV 抗病毒活性的免疫刺激性细胞因子。

[0088] 在上述各种应用中 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂、干扰素或抗 HCV 化合物的用量均可以是药理学有效量、亚临床抗 HCV 有效量或其组合,只要 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂,干扰素或能够诱导产生显示抗 HCV 活性的干扰素的化合物,和 / 或抗 HCV 化合物的最终的组合包含药理学有效量的能够有效地治疗或预防患者中 HCV 感染的化合物。

[0089] 附图简述

[0090] 通过以下的发明详述并结合附图可更好地理解本发明的上述各个方面和其它方面、特征及优点,所有这些仅用于进行说明,而非对本发明的限制,其中:

[0091] 图 1 显示了单独或联合采用化合物 CU 和干扰素- $\alpha$  2B 对含复制子的细胞治疗 48 小时后,对 HCV 复制子 RNA 积聚的抑制。

[0092] 图 2 图示显示了按照以下文献所述的协同计算方法,由作为拮抗、叠加和协同性组合而使用的化合物显示出的 isobol 凹曲线, Greco, Park 和 Rustom ((1990) 用于与顺二氨合二氯铂和 1- $\beta$ -D-阿拉伯呋喃糖胞嘧啶的组合的药物协同定量新研究应用 (Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the combination of cis-Diamminedichloroplatinum and 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosylcytosine), Cancer Research, 50, 5318-5327)。

[0093] 图 3 显示了在  $\alpha$  与 isobol 曲率数量间的几何关系。采用在叠加下预期的直线

isobol 显示在  $E = 50\%$  效果水平时的假设 isobol。M 是线  $y = x$  与假设的 isobol 的交叉点。N 是线  $y = x$  与直线 isobol 的交叉点。O 是原点 (0,0)。S 给出在 isobol 中曲率量的度量, 其中  $S = ON/OM$ 。ON 是 O 至 N 的距离, OM 是 O 至 M 的距离。参数  $\alpha$  是经方程  $\alpha = 4(S^2 - S)$  与 S 关联。

[0094] 图 4 显示了在实验 1 中采用以上 Greco 等的方法对分别 6 倍稀释的化合物 CU 与干扰素  $\alpha$ -2B(Schering-Plough) 组合的 isobol 计算值。

[0095] 图 5 显示了在实验 2 中采用以上 Greco 等的方法对分别 6 倍稀释的化合物 CU 与干扰素  $\alpha$ -2A 组合的 isobol 计算值。

[0096] 图 6 显示了在实验 3 中采用以上 Greco 等的方法对分别 8 倍稀释的化合物 CU 与干扰素  $\alpha$ -2B(Schering-Plough) 组合的 isobol 计算值。

[0097] 图 7 显示了在实验 4 中采用以上 Greco 等的方法对分别 8 倍稀释的化合物 CU 与干扰素  $\alpha$ -2A 组合的 isobol 计算值。

[0098] 图 8 显示了在实验 5 中采用以上 Greco 等的方法对分别 8 倍稀释的化合物 CU 与绵羊干扰素  $\tau$  组合的 isobol 计算值。

[0099] 图 9 显示了在实验 6 中采用以上 Greco 等的方法对分别 8 倍稀释的化合物 EC 与干扰素  $\alpha$ -2B(Schering-Plough) 组合的 isobol 计算值。

[0100] 图 10 显示了在实验 7 中采用以上 Greco 等的方法对分别 8 倍稀释的化合物 EC 与干扰素  $\alpha$ -2A 组合的 isobol 计算值。

[0101] 图 11 显示了在实验 8 中采用以上 Greco 等的方法对分别 8 倍稀释的化合物 CU 与干扰素  $\beta$  组合的 isobol 计算值。

[0102] 图 12 显示了在实验 9 中采用以上 Greco 等的方法对分别 8 倍稀释的化合物 EP 与干扰素  $\alpha$ -2B(Schering-Plough) 组合的 isobol 计算值。

[0103] 图 13 显示了在实验 10 中采用以上 Greco 等的方法对分别 8 倍稀释的利巴韦林与干扰素  $\alpha$ -2B(Schering-Plough) 组合的 isobol 计算值。

[0104] 图 14 显示单独采用 (A) 利巴韦林或 (B) 干扰素  $\alpha$ -2B 治疗复制子细胞引起的 HCV 复制子 RNA 积聚的抑制。在两组中, 显示了测量的抑制率及用化合物的细胞毒性校正的抑制率。

[0105] 发明详述

[0106] 每一件引用于本文中的专利文件和其它文献的内容均以其全部内容引入本文作为参考。

[0107] 如上所使用及在整个发明描述中, 除非另有说明, 以下缩写应理解为具有以下含义:

[0108] 命名 试剂或片断

[0109] ACN 乙腈

[0110] AIBN 2,2'-偶氮二异丁腈

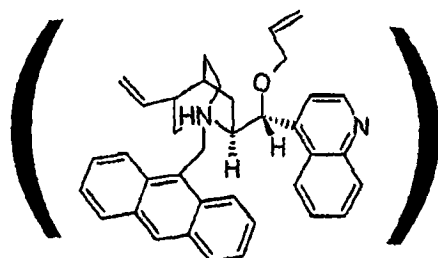
[0111] BOC 或 Boc 氨基甲酸叔丁酯

[0112] BOP 苯并三唑-1-基-氧基三(二甲基氨基)磷六氟磷酸盐

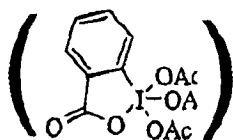
[0113] n-Bu<sub>3</sub>SnH 三正丁基锡氢化物

[0114] t-Bu 叔丁基

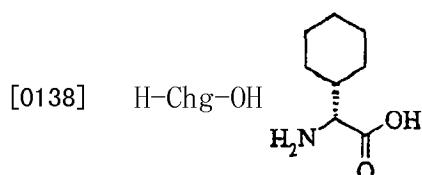
- [0115] Cbz 氨基甲酸苄酯  
 [0116] 手性 PTC 手性相转移催化剂  
 [0117]



- [0118] DAST (二乙基氨基) 三氟化硫 ( $\text{Et}_2\text{NSF}_3$ )  
 [0119] DCC 二环碳化二亚胺  
 [0120] DCM 二氯甲烷 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )  
 [0121] DIBAL-H 二异丁基氢化铝  
 [0122] DIC 1,3-二异丙基碳化二亚胺  
 [0123] DIPEA 二异丙基乙基胺  
 [0124] DMAP 4-(N,N-二甲基氨基)吡啶  
 [0125] DMP 试剂 Dess-Martin Periodinane 试剂  
 [0126]



- [0127] DMF 二甲基甲酰胺  
 [0128] DMSO 甲亚砜  
 [0129] EA 元素分析  
 [0130] EDCI 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺 HCl  
 [0131] eq 当量  
 [0132] Et 乙基  
 [0133]  $\text{Et}_2\text{O}$  乙醚  
 [0134] EtOH 乙醇  
 [0135] EtOAc 酸乙酯  
 [0136]  $\text{Et}_3\text{Si}$  三乙基甲硅烷  
 [0137] Fmoc 9-芴基甲氧羰基



- [0139] HOAt 1-羟基-7-氮杂苯并三唑  
 [0140] HOBT 1-羟基苯并三唑  
 [0141] HOSu N-羟基琥珀酰胺

- [0142] HPLC 高效液相色谱
- [0143] LAH 氢化锂铝
- [0144] Me 甲基
- [0145] MeI 甲基碘
- [0146] MeOH 甲醇
- [0147] MeOC(O)Cl 氯甲酸甲酯
- [0148] MOMCl 甲氧基甲基氯
- [0149] MOM 甲氧基甲基
- [0150] MS 质谱
- [0151] NaBH<sub>4</sub> 氢硼化钠
- [0152] Na<sub>2</sub>C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> 酒石酸钠
- [0153] NMP N-甲基吡咯烷酮
- [0154] NMR 核磁共振
- [0155] P- 聚合物键
- [0156] PyBOP 苯并三唑-1-基-氧基三-吡咯烷子基-磷六磷酸盐
- [0157] TBD 1,5,7-三氮杂双环[4.4.0]-癸-5-烯
- [0158] RP-HPLC 反相高压液相色谱
- [0159] TBSCI 叔丁基二甲基甲硅烷基氯
- [0160] TCA 三氯乙酸
- [0161] TFA 三氟乙酸
- [0162] Tf<sub>2</sub>O 三氟甲磺酸酐
- [0163] THF 四氢呋喃
- [0164] THP 四氢吡喃
- [0165] TLC 薄层色谱
- [0166] 如上所使用及在整个发明描述中,除非另有说明,以下术语应理解为具有以下含义:

[0167] “酸生物等排体”指具有化学和物理相似性的基团,其产生与羧基广泛类似的生物性质(参见Lipinski,医药化学年度报告,“药物设计生物等排性”21,283(1986);Yun, Hwahak Sekye,“新药物设计生物等排性的应用”33,576-579,(1993);Zhao, Huaxue Tongbao,“药物设计中铅化合物的生物等排性置换和发展”34-38,(1995);Graham, Theochem,“药物设计理论研究:在生物等排体中从头开始的电子分布”343,105-109,(1995))。酸生物等排体的实例包括-C(O)-NHOH、-C(O)-CH<sub>2</sub>OH、-C(O)-CH<sub>2</sub>SH、-C(O)-NH-CN、磺基、膦酰基、烷基磺酰基氨基甲酰基、四唑基、芳基磺酰基氨基甲酰基、N-甲氧基氨基甲酰基、杂芳基磺酰基氨基甲酰基、3-羟基-3-环丁烯-1,2-二酮、3,5-二氧化-1,2,4-噁二唑烷基或羟基杂芳基如3-羟基异噁唑基、3-羟基-1-甲基吡唑基等。

[0168] “酸性官能团”指带有酸性氢的部分。举例性的酸官能团包括羧基(-C(O)OH)、-C(O)-NHOH、-C(O)-CH<sub>2</sub>OH、-C(O)-CH<sub>2</sub>SH、-C(O)-NH-CN、磺基、膦酰基、烷基磺酰基氨基甲酰基、四唑基、芳基磺酰基氨基甲酰基、N-甲氧基氨基甲酰基、杂芳基磺酰基氨基甲酰基、3-羟基-3-环丁烯-1,2-二酮、3,5-二氧化-1,2,4-噁二唑烷基或羟基杂芳基如3-羟基异噁唑

基、3-羟基-1-甲基吡唑基、咪唑基、巯基等,和适当的羟基如芳族羟基如羟基苯基。

[0169] “酸保护基”指本领域中公知保护羧基的酸性氢在合成过程中如阻止或保护酸官能团不进行不想要的反应,同时使化合物的其它官能位置进行反应,且可选择性地除去的易于除去的基团。这种酸保护基团是本领域技术人员公知的,并广泛用于保护羧基,例如描述于下述文献中的那些:US 专利 3,840,556 和 3,719,667,该文献引入本文作为参考。适宜的酸保护基参见 T. W. Green 和 P. G. M. Wuts,“有机化学中的保护基” John Wiley and Sons, 1991。酸保护基也包括如本文所定义的氢化不稳定的酸保护基。举例性的酸保护基团包括酯,如取代的和未取代的  $C_{1-8}$  低级烷基,如甲基、乙基、叔丁基、甲氧基甲基、甲硫基甲基、2,2,2-三氯乙基等,四氢吡喃基,取代的和未取代的苯基烷基如苄基和其取代的衍生物如烷氧基苄基或硝基苄基等,肉桂基,二烷基氨基烷基如二甲基氨基乙基等,三甲基甲硅烷基,取代的和未取代的酰胺和酰肼如 N,N-二甲基胺、7-硝基吡啶、肼、N-苯基肼等的酰胺和酰肼,酰氧基烷基如新戊酰基氧基甲基或丙酰基氧基甲基等,芳酰氧基烷基如苯甲酰基氧基乙基等,烷氧羰基烷基如甲氧羰基甲基环己氧基羰基甲基等,烷氧羰基烷基如叔丁氧羰基甲基等,烷氧羰基氨基烷基如叔丁氧羰基氨基甲基等,烷基氨基羰基氨基烷基如甲基氨基羰基氨基甲基等,酰基氨基烷基如乙酰基氨基甲基等,杂环基羰氧基烷基如 4-甲基哌嗪基-羰氧基甲基等,二烷基氨基羰基烷基如二甲基氨基羰基-甲基等,(5-(低级烷基)-2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4-基)烷基如(5-叔丁基-2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4-基)甲基等,和(5-苯基-2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4-基)烷基如(5-苯基-2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4-基)甲基等。

[0170] “酸不稳定的胺保护基”指如本文所述的胺保护基,其易于通过酸处理除去,同时对其它试剂相对稳定。优选的酸不稳定的胺保护基是 BOC。

[0171] “脂族基”指如本文所定义的烷基、链烯基或炔基。

[0172] “脂族基取代基”指连接至如本文所定义的脂族基上的取代基,其包括芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、环基氧基、芳氧基、杂芳氧基、酰基或其硫代类似物、环基羰基或其硫代类似物、芳酰基或其硫代类似物、杂芳酰基或其硫代类似物、酰氧基、环基羰氧基、芳酰氧基、杂芳酰氧基、卤素、硝基、氰基、羧基(酸)、 $-C(O)-NHOH$ 、 $-C(O)-CH_2OH$ 、 $-C(O)-CH_2SH$ 、 $-C(O)-NH-CN$ 、磺基、膦酰基、烷基磺酰基氨基甲酰基、四唑基、芳基磺酰基氨基甲酰基、N-甲氧基氨基甲酰基、杂芳基磺酰基氨基甲酰基、3-羟基-3-环丁烯-1,2-二酮、3,5-二氧代-1,2,4-噁二唑烷基或羟基杂芳基如 3-羟基异噁唑基、3-羟基-1-甲基吡唑基、烷氧羰基、环基氧基羰基、芳氧羰基、杂芳氧羰基、烷基磺酰基、环基磺酰基、芳基磺酰基、杂芳基磺酰基、烷基亚磺酰基、环基亚磺酰基、芳基亚磺酰基、杂芳基亚磺酰基、烷硫基、环基硫基、芳硫基、杂芳硫基、环基、芳基重氮基、杂芳基重氮基、巯基、亚甲基( $H_2C=$ )、氧代( $O=$ )、硫代( $S=$ )、 $Y^1Y^2N-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)O-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ 、 $Y^1Y^2NSO_2-$  或  $Y^3SO_2NY^1-$ ,其中  $R^2$  如本文所定义, $Y^1$  和  $Y^2$  独立地是氢、烷基、芳基或杂芳基,且  $Y^3$  是烷基、环烷基芳基或杂芳基,或当取代基是  $Y^1Y^2N-$  时,则  $Y^1$  和  $Y^2$  当中有一个可以是如本文所定义的酰基、环基羰基、芳酰基、杂芳酰基、烷氧羰基、环基氧基羰基、芳氧羰基或杂芳氧羰基,而  $Y^1$  和  $Y^2$  当中另一个如上定义,或当对取代基是  $Y^1Y^2NC(O)-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)O-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$  或  $Y^1Y^2NSO_2-$  时, $Y^1$  和  $Y^2$  也可与和其相连的 N 原子一起形成 4 至 7 元氮杂环基或氮杂环烯基。酸性/酰胺脂族基取代基是羧基(酸)、 $-C(O)-NHOH$ 、 $-C(O)-CH_2OH$ 、 $-C(O)-CH_2SH$ 、 $-C(O)-NH-CN$ 、磺基、膦酰基、烷基磺酰基氨基

基甲酰基、四唑基、芳基磺酰基氨基甲酰基、N-甲氧基氨基甲酰基、杂芳基磺酰基氨基甲酰基、3-羟基-3-环丁烯-1,2-二酮、3,5-二氧化-1,2,4-噁二唑烷基或羟基杂芳基如3-羟基异噁唑基、3-羟基-1-甲基吡唑基和 $Y^1Y^2NCO-$ 。非酸性极性脂族基取代基是羟基、氧代( $O=$ )、硫代( $S=$ )、酰基或其硫代类似物、环基羰基或其硫代类似物、芳酰基或其硫代类似物、杂芳酰基或其硫代类似物、烷氧羰基、环基氧羰基、芳氧羰基、杂芳氧羰基、酰氧基、环基羰氧基、芳酰氧基、杂芳酰氧基、烷基磺酰基、环基磺酰基、芳基磺酰基、杂芳基磺酰基、烷基亚磺酰基、环基亚磺酰基、芳基亚磺酰基、杂芳基亚磺酰基、巯基、 $Y^1Y^2N-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)O-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$ 或 $Y^1Y^2NSO_2-$ 。举例性的带有脂族基取代基的脂族基包括甲氧基甲氧基、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、环戊基甲氧基乙基、苄氧基丙基、苄氧基烯丙基、三氟甲基、环丙基-甲基、环戊基甲基、羧基(甲基或乙基)、2-苯乙炔基、苄氧基、1-或2-萘基甲氧基、4-吡啶基-甲氧基、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、苯乙炔基、4-苯基-1,3-戊二烯基、苯基-丙炔基、3-苯基丁-2-炔基、吡啶-3-基乙炔基和喹啉-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、吡嗪基乙烯基、吡啶基戊烯基、吡啶基己烯基和吡啶基庚烯基、噻吩基-甲基、吡啶基甲基、咪唑基甲基、吡嗪基甲基、四氢吡喃基甲基、四氢吡喃基甲氧基甲基等。

[0173] “酰基”指 $H-CO-$ 或(脂族基或环基)- $CO-$ 基团,其中脂族基如本文所定义。优选的酰基包含低级烷基。举例性的酰基包括甲酰基、乙酰基、丙酰基、2-甲基丙酰基、丁酰基、棕榈酰基、丙烯酰基、丙炔酰基、环己基羰基等。

[0174] “链烯酰基”指链烯基- $CO-$ 基团,其中链烯基如本文所定义。

[0175] “链烯基”指脂族烃基团,其包含碳碳双键,可为直链或支链基团,链中具有约2至约15个碳原子。优选的链烯基在链中具有2至约12个碳原子;更优选约2至约4个碳原子。支链指一个或多个低级烷基如甲基、乙基或丙基连接在直链链烯基链上。“低级链烯基”指链中有约2至约4个碳原子,可以是直链或支链的。举例性的链烯基包括乙烯基、丙烯基、正丁烯基、异丁烯基、3-甲基丁-2-烯基、正戊烯基、庚烯基、辛烯基、环己基丁烯基、癸烯基等。“取代的链烯基”指被一个或多个“脂族基取代基”(优选1至3个)取代的如上定义的链烯基,取代基可以相同或不同,并如本文所定义。举例性的链烯基脂族基取代基包括卤素或环烷基。

[0176] “链烯氧基”指链烯基- $O-$ 基团,其中链烯基如本文所定义。举例性的链烯氧基包括烯丙基氧基、3-丁烯基氧基等。

[0177] “烷氧基”指烷基- $O-$ 基团,其中烷基如本文所述。举例性的烷氧基包括甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、庚氧基等。

[0178] “烷氧羰基”指烷基- $O-CO-$ 基团,其中烷基如下定义。举例性的烷氧羰基包括甲氧羰基、乙氧羰基、叔丁氧羰基等。

[0179] “烷基”指脂族烃基团,其可以是直链或支链的,在链中具有约1至约20个碳原子。优选的烷基在其链中具有1至约12个碳原子,更优选如本文所定义的低级烷基。支链是指一个或多个低级烷基如甲基、乙基或丙基连接在直链烷基链上。

[0180] “低级烷基”指在其链中具有约 1 至约 4 个碳原子,可以是直链或支链的。“取代的烷基”指被一个或多个“脂族基取代基”(优选 1 至 3 个)取代的如上定义的烷基,取代基可相同或不同,并如本文所定义。

[0181] “烷基亚磺酰基”指烷基-SO-基团,其中烷基如上定义。优选的基团是其中烷基是低级烷基的基团。

[0182] “烷基磺酰基”指烷基-SO<sub>2</sub>-基团,其中烷基如上定义。优选的基团是其中烷基是低级烷基的基团。

[0183] “烷基磺酰基氨基甲酰基”指烷基-SO<sub>2</sub>-NH-C(=O)-基团,其中烷基如本文所述。优选的烷基磺酰基氨基甲酰基基团是其中烷基是低级烷基的那些。

[0184] “烷硫基”指烷基-S-基团,其中烷基如本文所述。举例性的烷硫基包括甲硫基、乙硫基、异丙硫基和庚硫基。

[0185] “炔基”指脂族炔基团,包含碳碳叁键,可以是直链或支链的,在链中具有约 2 至约 15 个碳原子。优选的炔基在链中具有 2 至约 12 个碳原子;更优选约 2 至约 4 个碳原子。支链是指一个或多个低级烷基如甲基、乙基或丙基连接在直链炔基链上。“低级炔基”指在链中具有约 2 至约 4 个碳原子,可以是直链或支链。炔基可以被一个或多个卤素取代。举例性的炔基包括乙炔基、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。“取代的炔基”指被一个或多个“脂族基取代基”(优选 1 至 3)取代的如上定义的炔基,取代基可以相同或不同,且如本文定义。

[0186] “胺保护基”指本领域中公知保护氨基或酰胺基团的氮部分在合成过程中不进行不想要的反应且可选择性地除去的易于除去的基团。这种胺/酰胺保护基的使用是本领域技术人员公知的,并用于在合成过程中保护基团不进行不想要的反应,许多该类保护基团是公知的,例如, T. W. Green 和 P. G. M. Wuts, “有机化学中的保护基”, 第 2 版, John Wiley and Sons, 纽约 1991, 该文献引入本文作为参考。胺/酰胺保护基也包括“酸不稳定的胺/酰胺保护基”和“氢化不稳定的胺/酰胺保护基”。举例性的胺/酰胺保护基团是酰基,包括甲酰基、乙酰基、氯乙酰基、三氯乙酰基、邻硝基苯基乙酰基、邻硝基苯氧基-乙酰基、三氟乙酰基、乙酰乙酰基、4-氯丁酰基、异丁酰基、邻硝基肉桂酰基、皮考啉酰基 (picolinoyl)、酰基异硫氰酸酯、氨基己酰基、苯甲酰基等、和酰氧基包括甲氧基-羰基、9-芴基甲氧羰基、2,2,2-三氟乙氧羰基、2-三甲基甲硅烷基乙氧基-羰基、乙烯基氧基羰基、烯丙基氧基羰基、叔丁氧基羰基 (BOC)、1,1-二甲基-丙炔基氧基羰基、苄氧羰基 (CBZ)、对硝基苄氧羰基、2,4-二氯-苄氧羰基等。

[0187] “酰胺保护基”指本领域中公知保护酰胺基团的氮部分在合成过程中不进行不想要的反应并且在其转化成胺后选择性地除去的易于除去的基团。这种酰胺保护基的使用是本领域技术人员公知的,并用于在合成过程中保护基团不进行不想要的反应,许多该类保护基团是公知的,例如, T. W. Green 和 P. G. M. Wuts, “有机化学中的保护基”, 第 2 版, John Wiley & Sons, 纽约 (1991), 该文献引入本文作为参考。酰胺保护基也包括“酸不稳定的酰胺保护基”和“氢化不稳定的酰胺保护基”。举例性的酰胺保护基团是邻硝基肉桂酰基、皮考啉酰基 (picolinoyl)、氨基己酰基、苯甲酰基等、和酰氧基包括甲氧基-羰基、9-芴基甲氧羰基、2,2,2-三氟乙氧羰基、2-三甲基甲硅烷基乙氧基-羰基、乙烯基氧基羰基、烯丙基氧基羰基、叔丁氧基羰基 (BOC)、1,1-二甲基-丙炔基氧基羰基、苄氧羰基 (CBZ)、对硝基苄氧

羰基、2,4-二氯-苄氧羰基等。

[0188] “氨基酸”指选自本文定义天然和非天然氨基酸的氨基酸。氨基酸也指包括在 $\alpha$ -碳处具有L或D立体化学的氨基酸。优选的氨基酸为那些具有 $\alpha$ -氨基的氨基酸。氨基酸可以是中性的,阳性的或阴性的,这取决于侧链中的取代基。“中性氨基酸”指包含不带电侧链取代基的氨基酸。举例性的中性氨基酸包括丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、蛋氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和半胱氨酸。“阳性氨基酸”指其中侧链取代基在生理学pH是带正电荷的氨基酸。举例性的阳性氨基酸包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸。“阴性氨基酸”指其中侧链取代基在生理学pH是带负电荷的氨基酸。举例性的阴性氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。优选的氨基酸是 $\alpha$ -氨基酸。举例性的天然氨基酸是异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、蛋氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。“非天然氨基酸”指不存在核酸密码子的氨基酸。举例性的非天然氨基酸例如包括如上所述 $\alpha$ -氨基酸的D-异构体;Aib(氨基丁酸)、 $\beta$ -Aib(3-氨基-异丁酸)、Nva(正缬氨酸)、 $\beta$ -Ala、Aad(2-氨基己二酸)、 $\beta$ -Aad(3-氨基己二酸)、Abu(2-氨基丁酸)、Gaba( $\gamma$ -氨基丁酸)、Acp(6-氨基己酸)、Dbu(2,4-二氨基丁酸)、 $\alpha$ -氨基庚二酸、TMSA(三甲基甲硅烷基-Ala)、aIle(别-异亮氨酸)、Nle(正亮氨酸)、tert-Leu、Cit(瓜氨酸)、Orn、Dpm(2,2'-二氨基庚二酸)、Dpr(2,3-二氨基丙酸)、 $\alpha$ -或 $\beta$ -Nal、Cha(环己基-Ala)、羟基脯氨酸、Sar(肌氨酸)等;环氨基酸;Na-烷基化氨基酸,如MeGly(Na-甲基甘氨酸)、EtGly(Na-乙基甘氨酸)和EtAsn(Na-乙基天冬酰胺);和其中 $\alpha$ -碳带有两个侧链取代基的氨基酸。用于本发明中的天然和非天然氨基酸和其残基的名称采用由有关有机化学IUPAC委员会和有关生物化学命名法的IUPAC-IUB委员会建议的命名约定,“ $\alpha$ -氨基酸的命名法(建议书,1974)”,生物化学,14(2), (1975)。用于本发明说明书及所附权利要求书中的氨基酸和其残基的名称与缩写在某些时候与所注释的不同,不同的名称和缩写使其清楚。

[0189] “氨基酸保护基”指保护氨基酸的酸或胺部分或氨基酸侧链上的其它反应性部分的基团如羟基或巯基。氨基酸侧链的“相应保护的衍生物”的实例参见T. W. Green and P. G. M. Wuts,“有机化学中的保护基团”,John Wiley and Sons,1991。在氨基酸中酸性基团的保护基团例如描述于“酸性官能团”和“氢化不稳定的酸保护基”部分中。在氨基酸中胺基团的保护基团在本文例如描述于部分“胺保护基团”、“酸不稳定的胺保护基”和“氢化不稳定的胺保护基”中。

[0190] “氨基酸残基”指掺入本发明化合物中的单个氨基酸单元。

[0191] “氨基酸侧链”指存在于 $\alpha$ -氨基酸中氨基与羧基间的碳上的取代基。举例性的氨基酸侧链包括分别存在于缬氨酸、丙氨酸和天冬氨酸中的异丙基、甲基和羧基甲基。

[0192] “氨基酸等同物”指按照本发明在肽中可取代另一个氨基酸而不会造成功能的明显损失的氨基酸。在进行,这样的变化中,类似氨基酸的代替是基于侧链取代基的相对相似性,例如,考虑如本文所述的大小、带电性、亲水性、亲水性(hydrophobicity)和疏水性进行的。

[0193] “芳族基团”指本文定义的芳基或杂芳基。举例性的芳族基包括苯基、卤代苯基、氮杂芳基等。

[0194] “芳酰基”指其中芳基如本文所述的芳基-CO-基团。举例性的芳酰基基团包括苯

甲酰基、1- 和 2- 萘甲酰基等。

[0195] “芳基”指约 6 至约 14 个碳原子, 优选约 6 至约 10 个碳原子的芳族单环或多环体系。芳基包括本文定义的通过其芳基部分键合的稠合的芳基环烯基、稠合的芳基环烷基、稠合的芳基杂环烯基和稠合的芳基杂环基。芳基是任选地被一个或多个“环基团取代基”取代的芳基, 取代基可以相同或不同, 且如本文定义。举例性的芳基包括苯基或萘基, 或取代的苯基或取代的萘基。“取代的芳基”指如上定义的被一个或多个可相同或不同且如本文所定义的“环基团取代基”( 优选 1 至 3 个 ) 取代的芳基。

[0196] “芳基重氮基”指芳基 - 重氮 - 基团, 其中芳基和重氮基基团如本文定义。

[0197] “亚芳基”指任选地被取代的 1, 2-, 1, 3-, 1, 4- 二价芳基, 其中芳基如本文定义。举例性的亚芳基基团包括任选地被取代的亚苯基、亚萘基和亚二氢化茛基。具体的亚芳基是任选地被取代的亚苯基。“取代的亚芳基”指如上定义的被一个或多个“环基团取代基”( 优选 1 至 3 个 ) 取代的亚芳基, 取代基可以相同或不同, 且如本文定义。

[0198] “芳氧基”指芳基 -O- 基团, 其中芳基如本文定义。举例性的芳氧基包括苯氧基和 2- 萘基氧基。

[0199] “芳氧羰基”指芳基 -O-CO- 基团, 其中芳基如本文定义。举例性的芳氧羰基基团包括苯氧羰基和萘氧羰基。

[0200] “芳基磺酰基”指芳基 -SO<sub>2</sub>- 基团, 其中芳基如本文定义。

[0201] “芳基磺酰基氨基甲酰基”指芳基 -SO<sub>2</sub>-NH-C(=O)- 基团, 其中芳基如本文所述。举例性的芳基磺酰基氨基甲酰基是苯基磺酰基氨基甲酰基。

[0202] “芳基亚磺酰基”指芳基 -SO- 基团, 其中芳基如本文定义。

[0203] “芳硫基”指芳基 -S- 基团, 其中芳基如本文所述。举例性的芳硫基包括苯硫基和萘硫基。

[0204] “碱性氮原子”指带有能够被质子化的非键合电子对的 sp<sup>2</sup> 或 sp<sup>3</sup> 杂化的氮原子。碱性氮原子的实例包括任选地被取代的亚氨基、任选地被取代的氨基和任选地被取代的脒基。

[0205] “羧基”指 HO(O)C-( 羧酸 ) 基团。

[0206] “偶联剂”指与羧基部分的羟基部分反应从而使其易于受亲核进攻的化合物。举例性的偶联剂包括 DIC、EDCI、DCC 等。

[0207] “环烯基”指约 3 至约 10 个碳原子, 优选约 5 至约 10 个碳原子的非芳族单 - 或多环体系, 其包含至少一个碳碳双键。当通过环烯基键合时, 环烯基包括如本文所定义的稠合的芳基环烯基和稠合的杂芳基环烯基。优选的环系的环的环大小包括约 5 至约 6 个环原子; 该优选的环大小也称之为“低级”。“取代的环烯基”指如上定义的被一个或多个“环基团取代基”( 优选 1 至 3 个 ) 取代的环烯基, 取代基可以相同或不同, 且如本文定义。举例性的单环环烯基包括环戊烯基、环己烯基、环庚烯基等。举例性的多环环烯基是降冰片烯基。

[0208] “环烷基”指约 3 至约 10 个碳原子, 优选约 5 至约 10 个碳原子的非芳族单 - 或多环体系。环系的环的优选的环大小包括约 5 至约 6 个环原子; 该优选的环大小也称之为“低级”。当通过其环烷基部分结合时, 环烷基包括本文所定义的稠合的芳基环烷基和稠合的杂芳基环烷基。“取代的环烷基”指被一个或多个“环基团取代基”( 优选 1 至 3 个 ) 取代的如上所定义环烷基, 取代基可以相同或不同, 且如本文定义。举例性的单环环烷基包括环戊

基、环己基、环庚基等。举例性的多环环烷基包括 1- 十氢化萘、降冰片烷基、金刚烷-(1- 或 2-) 基等。

[0209] “亚环烷基”指具有约 4 至约 8 个碳原子的如本文所述的二价环烷基。优选的亚环烷基的环大小包括约 5 至约 6 个环原子；这种优选的环大小也称之为“低级”。在亚环烷基上结合的点包括 1,1-、1,2-、1,3- 或 1,4- 结合模式，可应用的结合点的立体化学关系是顺式或反式。举例性的亚环烷基包括 (1,1-、1,2- 或 1,3-) 亚环己基和 (1,1- 或 1,2-) 亚环戊基。“取代的亚环烷基”指被一个或多个“环基团取代基”（优选 1 至 3 个）取代的如上定义的亚环烷基，取代基可以相同或不同，并如本文所定义。

[0210] “环”或“环基”指本文定义中环烷基、环烯基、杂环基或杂环烯基。与术语环结合使用的术语“低级”与本文在关于环烷基、环烯基、杂环基或杂环烯基中所述的是相同的。

[0211] “环基氧基”指环基-O- 基团，其中环基如本文所述。举例性的环烷氧基包括环戊氧基、环己氧基、奎宁环基氧基、硫杂环己烷氧基、四氢吡喃氧基、四氢噻吩基氧基、吡咯烷氧基、四氢呋喃基氧基或 7- 氧杂双环 [2.2.1] 庚烷氧基、羟基四氢吡喃氧基、羟基-7- 氧杂双环 [2.2.1] 庚烷氧基等。

[0212] “环基亚磺酰基”指环基-S(O)- 基团，其中环基如本文所述。

[0213] “环基磺酰基”指环基-S(O)<sub>2</sub>- 基团，其中环基如本文所述。

[0214] “环基硫基”指环基-S- 基团，其中环基如本文所述。

[0215] “重氮基”指二价-N=N- 基。

[0216] “可替换的部分”指这样的基团，在与如本文定义的 L 相关时，在存在或不存在促进所述进攻的试剂如偶联剂的情况下该基团被单或二取代的胺部分亲核进攻而被代替。举例性的可替换部分包括羟基、脂族基氧基、卤素、N- 氧基琥珀酰亚胺、酰氧基等。

[0217] “有效量”指本发明的化合物 / 组合物有效地产生所需治疗效果的用量。

[0218] “稠合的芳基环烯基”指如本文定义的稠合的芳基和环烯基。优选的稠合的芳基环烯基为其芳基是苯基且环烯基由约 5 至约 6 个环原子组成的那些。稠合的芳基环烯基作为变量可以通过能够进行键合的环系的任何原子键合。“取代的稠合的芳基环烯基”指如上定义的被一个或多个“环基团取代基”（优选 1 至 3 个）取代的稠合的芳基环烯基，取代基可以相同或不同，且如本文定义。举例性的稠合的芳基环烯基包括 1,2- 二氢亚萘基、茛等。

[0219] “稠合的芳基环烷基”指如本文定义的稠合的芳基和环烷基。优选的稠合芳基环烷基是其中所述其芳基为苯基且环烷基由约 5 至约 6 个环原子组成的那些。稠合的芳基环烷基作为变量可以通过能够进行键合的环系的任何原子键合。“取代的稠合的芳基环烷基”指如上定义的被一个或多个“环基团取代基”（优选 1 至 3 个）取代的稠合的芳基环烷基，取代基可以相同或不同，且如本文定义。举例性的稠合的芳基环烷基包括 1,2,3,4- 四氢- 亚萘基等。

[0220] “稠合的芳基杂环烯基”指如本文定义的稠合的芳基和杂环烯基。优选的稠合的芳基杂环烯基是其中其芳基是苯基且杂环烯基由约 5 至约 6 个环原子组成的那些。稠合的芳基杂环烯基作为变量可以通过能够进行键合的环系的任何原子键合。在稠合的芳基杂环烯基的杂环烯基部分之前以氮杂、氧杂或硫杂作为前缀的命名定义了至少有一个氮、氧或硫原子分别作为环原子存在。“取代的稠合的芳基杂环烯基”指被一个或多个“环基团取代基”（优选 1 至 3 个）取代的如上定义的稠合的芳基杂环烯基，取代基可以相同或不同，且

如本文定义。稠合的芳基杂环烯基的氮原子可为碱性氮原子。稠合的芳基杂环烯基的杂环烯基部分的氮原子或硫原子可任选地被氧化成相应的 N-氧化物、S-氧化物或 S,S-二氧化物。举例性的稠合的芳基杂环烯基包括 3H-二氢吡啶基、1H-2-氧代喹啉基、2H-1-氧代异喹啉基、1,2-二氢喹啉基、3,4-二氢喹啉基、1,2-二氢异喹啉基、3,4-二氢异喹啉基等。

[0221] “稠合的芳基杂环基”指如本文定义的稠合的芳基和杂环基。优选的稠合的芳基杂环基为其中其芳基是苯基且杂环基由约 5 至约 6 个环原子组成的那些。稠合的芳基杂环基作为变量可以通过能够进行键合的环系的任何原子键合。在稠合的芳基杂环基的杂环基部分之前以氮杂、氧杂或硫杂作为前缀的命名定义了至少有一个氮、氧或硫原子分别作为环原子存在。“取代的稠合的芳基杂环基”指如上定义的稠合的芳基杂环基,其是被一个或多个“环基团取代基”(优选 1 至 3 个)取代的,取代基可以相同或不同,且如本文定义。稠合的芳基杂环基的氮原子可为碱性氮原子。稠合的芳基杂环基的杂环基部分的氮原子或硫原子可任选地被氧化成相应的 N-氧化物、S-氧化物或 S,S-二氧化物。举例性的稠合的芳基杂环基环系包括二氢吡啶基、1,2,3,4-四氢异喹啉、1,2,3,4-四氢喹啉、1H-2,3-二氢异吡啶-2-基、2,3-二氢苯并[f]异吡啶-2-基、1,2,3,4-四氢苯并[g]-异喹啉-2-基等。

[0222] “稠合的杂芳基环烯基”指如本文定义的稠合的杂芳基和环烯基。优选的稠合的杂芳基环烯基是其中其杂芳基是苯基且环烯基由约 5 至约 6 个环原子组成的那些。稠合的杂芳基-环烯基作为变量可以通过能够进行键合的环系的任何原子键合。在稠合的杂芳基环烯基的杂芳基部分之前以氮杂、氧杂或硫杂作为前缀的命名定义了至少有一个氮、氧或硫原子分别作为环原子存在。“取代的稠合的杂芳基环烯基”指如上定义的稠合的杂芳基环烯基,其是被一个或多个“环基团取代基”(优选 1 至 3 个)取代的,取代基可以相同或不同,且如本文定义。稠合的杂芳基环烯基的氮原子可为碱性氮原子。稠合的杂芳基环烯基的杂芳基部分的氮原子可任选地被氧化成相应的 N-氧化物。举例性的稠合的杂芳基环烯基包括 5,6-二氢喹啉基、5,6-二氢异喹啉基、5,6-二氢喹啉基、5,6-二氢喹啉基、4,5-二氢-1H-苯并咪唑基、4,5-二-氢苯并噁唑基等。

[0223] “稠合的杂芳基环烷基”指如本文定义的稠合的杂芳基和环烷基。优选的稠合的杂芳基环烷基是那些其中其杂芳基由约 5 至约 6 个环原子组成且环烷基由约 5 至约 6 个环原子组成的那些。稠合的杂芳基环烷基作为变量可以通过能够进行键合的环系的任何原子键合。在稠合的杂芳基环烷基的杂芳基部分之前以氮杂、氧杂或硫杂作为前缀的命名定义了至少有一个氮、氧或硫原子分别以环原子存在。“取代的稠合的杂芳基环烷基”指如上定义的稠合的杂芳基环烷基,其是被一个或多个“环基团取代基”(优选 1 至 3 个)取代的,取代基可以相同或不同,且如本文定义。稠合的杂芳基环烷基的氮原子可为碱性氮原子。稠合的杂芳基环烷基的杂芳基部分的氮原子可任选地被氧化成相应的 N-氧化物。举例性的稠合的杂芳基环烷基包括 5,6,7,8-四氢喹啉基、5,6,7,8-四氢异喹啉基、5,6,7,8-四氢喹啉基、5,6,7,8-四氢喹啉基、4,5,6,7-四氢-1H-苯并咪唑基、4,5,6,7-四氢苯并噁唑基、1H-4-氧杂-1,5-二氮杂萘-2-酮基、1,3-二氢咪唑-[4,5]-吡啶-2-酮基等。

[0224] “稠合的杂芳基杂环烯基”指本文定义的稠合的杂芳基和杂环烯基。优选的稠合的杂芳基杂环烯基是其中其杂芳基由约 5 至约 6 个环原子组成且杂环烯基由约 5 至约 6 个环原子组成的那些。稠合的杂芳基杂环烯基作为变量可以通过能够进行键合的环系的任何原子键合。在稠合的杂芳基杂环烯基的杂芳基或杂环烯基部分之前以氮杂、氧杂或硫杂作为

前缀的命名定义了至少有一个氮、氧或硫原子分别以环原子存在。“取代的稠合的杂芳基杂环烯基”指如上定义的稠合的杂芳基杂环烯基,其是被一个或多个“环基团取代基”(优选 1 至 3 个)取代的,取代基可以相同或不同,且如本文定义。稠合的杂芳基杂环烯基的氮原子可为碱性氮原子。稠合的杂芳基杂环基的杂芳基部分的氮原子或硫原子可任选地被氧化成相应的 N-氧化物。稠合的杂芳基杂环基的杂芳基或杂环基部分的氮或硫原子也可以任选被氧化成相应的 N-氧化物、S-氧化物或 S, S- 二氧化物。举例性的稠合的杂芳基杂环烯基包括 7,8- 二氢 [1,7] 萘啶基、1,2- 二氢 [2,7]- 萘啶基、6,7- 二氢 -3H- 咪唑并 [4,5] 吡啶基、1,2- 二氢 -1,5- 萘啶基、1,2- 二氢 -1,6- 萘啶基、1,2- 二氢 -1,7- 萘啶基、1,2- 二氢 -1,8- 萘啶基、1,2- 氢 -2,6- 萘啶基等。

[0225] “稠合的杂芳基杂环基”指如本文定义的稠合的杂芳基和杂环基。优选的稠合的杂芳基杂环基是其中其杂芳基由约 5 至约 6 个环原子组成且杂环基由约 5 至约 6 个环原子组成的那些。稠合的杂芳基杂环基作为变量可以通过能够进行键合的环系的任何原子键合。在稠合的杂芳基杂环基的杂芳基或杂环基部分之前以氮杂、氧杂或硫杂作为前缀的命名定义了至少有一个氮、氧或硫原子分别以环原子存在。“取代的稠合的杂芳基杂环基”指如上定义的稠合的杂芳基杂环基,其是被一个或多个“环基团取代基”(优选 1 至 3 个)取代的,取代基可以相同或不同,且如本文定义。稠合的杂芳基杂环基的氮原子可为碱性氮原子。稠合的杂芳基杂环基的杂芳基部分的氮原子或硫原子可任选地被氧化成相应的 N-氧化物。稠合的杂芳基杂环基的杂芳基或杂环基部分的氮或硫原子也可以任选被氧化成相应的 N-氧化物、S-氧化物或 S, S- 二氧化物。举例性的稠合的杂芳基杂环基包括 2,3- 二氢 -1H- 吡咯并 [3,4-b] 喹啉 -2- 基、1,2,3,4- 四氢苯并 [b] [1,7] 萘啶 -2- 基、1,2,3,4- 四氢苯并 [b] [1,6] 萘啶 -2- 基、1,2,3,4- 四氢 -9H- 吡啶并 [3,4-b] 吡啶 -2 基、1,2,3,4- 四氢 -9H- 吡啶并 [4,3-b] 吡啶 -2- 基、2,3- 二氢 -1H 吡咯并 [3,4-b] 吡啶 -2- 基、1H-2,3,4,5- 四氢吡啶并 [3,4-b] 吡啶 -2- 基、1H-2,3,4,5- 四氢吡啶并 [4,3-b] 吡啶 -3- 基、1H-2,3,4,5- 四氢吡啶并 [4,5-b] 吡啶 -2- 基、5,6,7,8- 四氢 [1,7] 萘啶基、1,2,3,4- 四氢 [2,7] 萘啶基、2,3- 二氢 [1,4] 二氧六环并 [2,3-b] 吡啶基、2,3- 二氢 -[1,4] 二氧六环并 (dioxino) [2,3-b] 吡啶基、3,4- 二氢 -2H-1- 氧杂 [4,6] 二氮杂萘基、4,5,6,7- 四氢 -3H- 咪唑并 [4,5-c] 吡啶基、6,7- 二氢 [5,8] 二氮杂萘基、1,2,3,4- 四氢 [1,5] 萘啶基、1,2,3,4- 四氢 [1,6] 萘啶基、1,2,3,4- 四氢 [1,7] 萘啶基、1,2,3,4- 四氢 [1,8] 萘啶基、1,2,3,4- 四氢 [2,6] 萘啶基等。

[0226] “卤素”指氟、氯、溴或碘。优选氟、氯或溴,更优选氟或氯。

[0227] “杂芳酰基”指杂芳基 -CO- 基团,其中杂芳基如本文所述。举例性的杂芳酰基包括噻吩甲酰基、烟酰基、吡咯 -2- 基羰基、1- 和 2- 萘甲酰基、吡啶甲酰基等。

[0228] “杂芳基”指约 5 至约 14 个碳原子,优选约 5 至约 10 个碳原子的芳族单环或多环环系,其中该环系中的一个或多个碳原子是碳原子以外的杂单元,例如氮、氧或硫。优选环系包括 1 至 3 个杂原子。环系的环的优选环大小包括约 5 至约 6 个环原子。当通过其杂芳基部分键合时,杂芳基包括如本文所定义的稠合的杂芳基环烯基、稠合的杂芳基环烷基、稠合的杂芳基杂环烯基和稠合的杂芳基杂环基。“取代的杂芳基”指被一个或多个“环基团取代基”(优选 1 至 3 个)取代的如上定义的杂芳基,取代基可以相同或不同,且如本文定义。在杂芳基之前以氮杂、氧杂或硫杂作为前缀的命名定义了至少有一个氮、氧或硫原子分别


以环原子存在。杂芳基的氮原子可为碱性氮原子并也可任选地被氧化成相应的N-氧化物。举例性的杂芳基和取代的杂芳基包括吡嗪基、噻吩基、异噻唑基、噁唑基、吡唑基、呋咱基、吡咯基、1,2,4-噻二唑基、哒嗪基、喹啉基、酞嗪基、咪唑并[1,2-a]吡啶、咪唑并[2,1-b]噻唑基、苯并呋咱基、氮杂吲哚基、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、苯并氮杂吲哚基、1,2,4-三嗪基、苯并噻唑基、呋喃基、咪唑基、吲哚基、吲嗪基、异噁唑基、异喹啉基、异噻唑基、噁二唑基、吡嗪基、哒嗪基、吡唑基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、喹啉基、喹啉基、1,3,4-噻二唑基、噻唑基、噻吩基、三唑基等。优选的杂芳基是吡嗪基。

[0229] “杂芳基重氮基”指杂芳基-偶氮基-基团,其中杂芳基和偶氮基基团如本文定义。

[0230] “杂芳二基”指由杂芳基得到的二价基团,其中杂芳基如本文所述。举例性的杂芳二基是任选地被取代的吡啶二基。

[0231] “杂芳基磺酰基氨基甲酰基”指杂芳基-SO<sub>2</sub>-NH-C(=O)-基团,其中杂芳基如本文所述。

[0232] “杂环烯基”指约3至约10个碳原子,优选约5至约10个碳原子的非芳族单环或多环烃环系,其中该环系中的一个或多个碳原子是碳原子以外的杂单元,例如氮、氧或硫原子,其包含至少一个碳碳双键或碳-氮双键。优选环包括1至3个杂原子。环系的环的优选环大小包括约5至约6个环原子;这样优选的环大小也称为“低级”。当通过其杂环烯基部分键合时,杂环烯基包括如本文所定义的稠合的芳基杂环烯基和稠合的杂芳基杂环烯基。在杂环烯基之前以氮杂、氧杂或硫杂作为前缀的命名定义了至少有一个氮、氧或硫原子分别以环原子存在。“取代的杂环烯基”指被一个或多个“环基团取代基”(优选1至3个)取代的如上定义的杂环烯基,取代基可以相同或不同,且如本文定义。杂环烯基的氮原子可为碱性氮原子。杂环烯基的氮原子或硫原子可任选地被氧化成相应的N-氧化物、S-氧化物或S, S-二氧化物。举例性的单环氮杂环烯基包括1,2,3,4-四氢吡啶、1,2-二氢吡啶基、1,4-二氢吡啶基、1,2,3,6-四氢吡啶、1,4,5,6-四氢嘧啶、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、2-咪唑啉基、2-吡唑啉基等。举例性的氧杂杂环烯基包括3,4-二氢-2H-吡喃、二氢呋喃基和氟二氢呋喃基。举例性的多环氧杂杂环烯基是7-氧杂双环[2.2.1]庚烯基。举例性的单环硫杂杂环烯基环包括二氢噻吩基和二氢噻喃基。

[0233] “杂环基”指约3至约10个碳原子,优选约5至约10个碳原子的非芳族饱和的单环或多环环系,其中该环系中的一个或多个碳原子是碳原子以外的杂单元,例如氮、氧或硫。环系优选包含1至3个杂原子。环系的环的优选环大小包含约5至约6个环原子,这样优选的环大小也称为“低级”。当通过其杂环基部分键合时,杂环基包括如本文所定义的稠合的芳基杂环基和稠合的杂芳基杂环基。在杂环基之前以氮杂、氧杂或硫杂作为前缀的命名定义了至少有一个氮、氧或硫原子分别以环原子存在。“取代的杂环基”指被一个或多个“环基团取代基”(优选1至3个)取代的如上定义的杂环基,取代基可以相同或不同,且如本文定义。杂环基的氮原子可为碱性氮原子。杂环基的氮原子或硫原子可任选地被氧化成相应的N-氧化物、S-氧化物或S, S-二氧化物。举例性的单环杂环基环包括哌啶基、吡咯烷基、哌嗪基、吗啉基、硫代吗啉基、噻唑烷基、1,3-二氧戊环基、1,4-二氧杂六环基、四氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢噻喃基等。N 作为取代的单环氮杂环基直接或通过连接基被至少

一个取代基取代,所述取代基是或包括如本文所定义的芳族基或者被如本文定义的芳族基取代;例如芳基、杂芳基、芳氧基、杂芳氧基、芳酰基或其硫代类似物、杂芳酰基或其硫代类似物、芳酰氧基、杂芳酰氧基、芳氧羰基、杂芳氧羰基、芳基磺酰基、杂芳基磺酰基、芳基亚磺酰基、杂芳基亚磺酰基、芳硫基、杂芳硫基、芳基重氮基、杂芳基重氮基、 $Y^1Y^2N-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)O-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$  或  $Y^1Y^2NSO_2-$ , 其中  $Y^1$  和  $Y^2$  当中有一个是、包括芳基或杂芳基部分,或被芳基或杂芳基部分取代。优选的连接基包括  $-C(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 、低级烷基、低级烷氧基、低级链烯基、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-C(O)C(O)-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-NR^{80}-$ 、其中  $R^{80}$  是氢、烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂环基或杂芳基。特别优选的连接基是  $-C(O)-$  和  $-OC(O)-$ 。“取代的多环氮杂环基”指被一个或多个“环基团取代基”(优选 1 至 3 个)取代的如上定义的多环氮杂环基,取代基可以相同或不同,且如本文定义。“取代的多环氮杂环烯基”指被一个或多个“环基团取代基”(优选 1 至 3 个)取代的如上定义的多环氮杂环烯基,取代基可以相同或不同,且如本文定义。

[0234] “亚杂环基”指具有约 4 至约 8 个碳原子的如本文所定义的二价的杂环基。亚杂环基的优选环大小包括约 5 至约 6 环原子;这种优选的环大小也被称之为“低级”。在亚环烷基上的结合点包括 1,1-、1,2-、1,3- 或 1,4- 键合模式,其中可应用的结合点的立体化学关系是顺或反式。举例性的亚杂环基包括 (1,1-, 1,2- 或 1,3-) 亚哌啶基和 (1,1- 或 1,2-) 亚四氢呋喃基。“取代的亚杂环基”指被一个或多个“环基团取代基”(优选 1 至 3 个)取代的如上定义的亚杂环基,取代基可以相同或不同,且如本文定义。

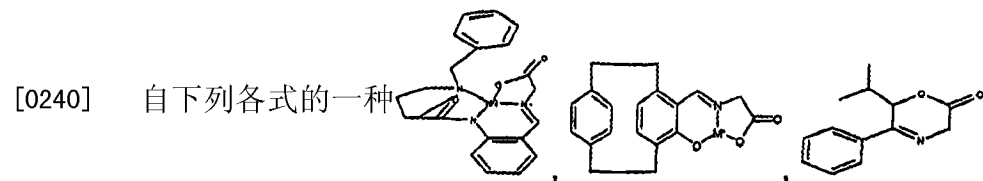
[0235] “水合物”指其中溶剂分子为水的溶剂化物。

[0236] “氢化不稳定的胺保护基”指本文定义的胺保护基,其易于通过氢化除去,同时保持对其它试剂相对稳定。优选的氢化不稳定的胺保护基是 Cbz。

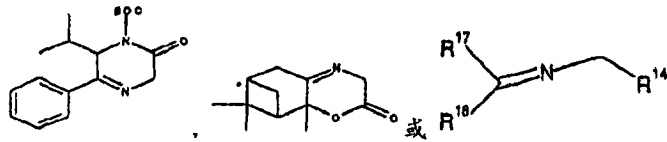
[0237] “氢化不稳定的酸保护基”指本文定义的酸保护基,其易于通过氢化除去,同时保持对其它试剂相对稳定。优选的氢化不稳定的酸保护基是苄基。

[0238] “吸水性”指吸着作用,是指足以影响物质的物理或化学性质的水获得量或状态 (Eds. J. Swarbrick 和 J. C. Boylan, 药物技术百科全书, 10, 33)。

[0239] “亚胺甘氨酸亚胺衍生物”指甘氨酸的亚胺席夫碱,其用于天然和非天然  $\alpha$ -氨基酸的合成。亚胺酯官能团可包含一个或多个不对称中心,其有助于在成键过程中的立体导入。此外,这些亚胺甘氨酸亚胺衍生物可引至促进组合合成的聚合载体上。亚胺甘氨酸亚胺衍生物的制备方法是,在酸催化剂存在下,使甘氨酸酯与适宜的酮进行缩合。可通过除去水而促进该反应的进行。亚胺甘氨酸亚胺衍生物是本领域技术人员公知的,可用于 Michael 加成的合成过程,例如下述文献所述:Guillena, G. 等, J. Org. Chem. 2000, 65, 7310-7322, 该文献引入本文作为参考。本发明的亚胺甘氨酸亚胺衍生物的具体实例包括选



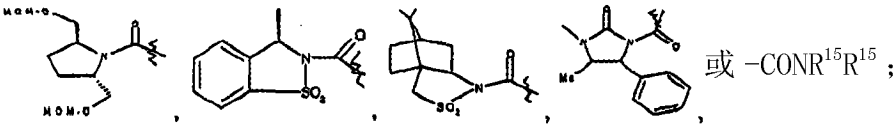
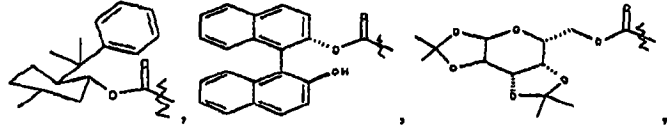
[0241]



[0242] 其中：

[0243] M<sup>+</sup> 是过渡金属，优选 CU，更优选 CU<sup>II</sup>。

[0244] R<sup>14</sup> 是 -CO<sub>2</sub>R<sup>16</sup>，-CN，

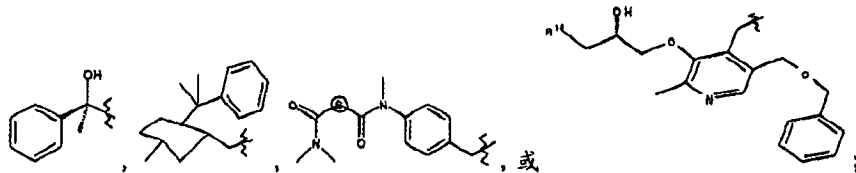


[0245] R<sup>15</sup> 是任选地被取代的脂族基；

[0246] R<sup>16</sup> 是酸保护基、任选地被取代的芳基或任选地被取代的脂族基；

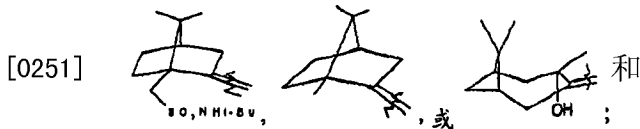
[0247] R<sup>17</sup> 是任选地被取代的芳基、任选地被取代的脂族基，

[0248]



[0249] R<sup>18</sup> 是氢、烷基或烷硫基；或任选地被取代的芳基；

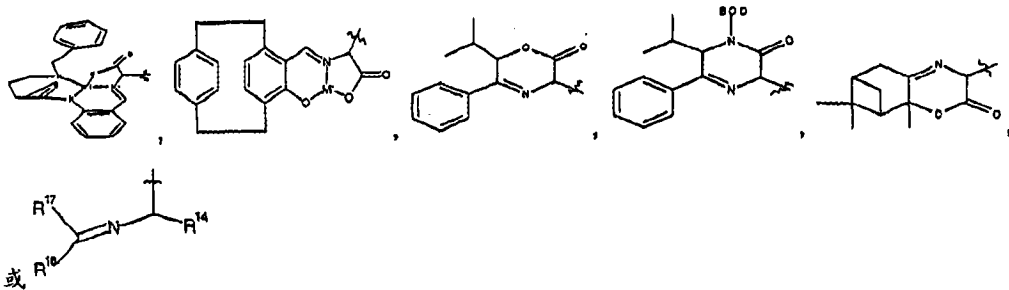
[0250] R<sup>17</sup> 和 R<sup>18</sup> 和与其相连的碳一起形成



[0252] ⊙是固相。

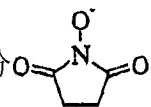
[0253] “亚胺甘氨酸亚胺衍生物加合物”指形成的化合物，其中，α-氢（所述 α-氢是相对于席夫碱部分的氮和羰基部分而言的）被除去，并用于形成用于其键形成的连接。本发明的亚胺甘氨酸亚胺衍生物加合物的具体实例包括选自下列各式的那些：

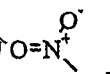
[0254]



[0255] 其中：

[0256] R<sup>14</sup>、R<sup>17</sup> 和 R<sup>18</sup> 的定义如在本文亚胺甘氨酸亚胺衍生物的定义中所述。

[0257] “N- 氧基琥珀酰亚胺”指具有下述结构的部分 

[0258] “N- 氧化物”指下述结构的部分 

[0259] “患者”包括人和其它哺乳动物。

[0260] “模拟肽”指包含通过酰胺键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。

[0261] “可药用酯”指在体内水解的酯,包括易于在人体中分裂、并留下母体化合物或其盐的酯。适宜的酯基团例如包括那些由可药用脂族羧酸衍生得到的基团,所述脂族羧酸特别是链烷酸、链烯酸、环烷酸和链烷双酸,其中,每个烷基或链烯基部分有利地具有不超过 6 个碳原子。举例性的酯包括甲酸酯、乙酸酯、丙酸酯、丁酸酯、丙烯酸酯、乙基琥珀酸酯等。

[0262] 本文所用的“可药用的前药”指这样的本发明化合物的前药:在合理的药学判断的范围内,所述前药适用于与人和低级动物的组织接触,具有不适度的毒性、炎症、变态反应等等,相当地具有合理优点 / 风险率,并有效地用于其目标用途;如果可能的话,它是本发明化合物的两性离子形式。术语“前药”指在体内快速地转化得到上式的母体化合物的化合物,例如通过在血液中水解。可以通过代谢分解而快速转化的官能团在体内形成一组与本发明的化合物的羧基反应的基团。它们包括但不限于基团如链烷酰基(如乙酰基、丙酰基、丁酰基等等)、未取代的和取代的芳酰基(如苯甲酰基和取代的苯甲酰基)、烷氧羰基(如乙氧羰基)、三烷基甲硅烷基(如三甲基-和三乙基甲硅烷基)、与二羧酸形成的一酯(如琥珀酰基)等等。由于本发明的化合物的基团在体内的代谢分解容易,因此含有这些基团的化合物用作前药。含有可代谢分解的基团的化合物的优点是由于可代谢分解基团的存在,因而母体化合物提高溶解度和 / 或溶出速率,因此使它们表现出改进的生物利用度。在以下文献中提供了更为充分的讨论:Design of Prodrugs(前药设计),H. Bundgaard, ed., Elsevier(1985);Methods in Enzymology(酶学中的方法);K. Widder 等, Ed., Academic Press, 42, 309-396(1985);A Textbook of Drug Design and Development(药物设计和研制的教科书),Krogsgaard-Larsen 和 H. B. Anderson, ed., 第 5 章;“Design and Applications of Prodrugs(前药的设计和应用)”113-191(1991);Advanced Drug Delivery Reviews(高级药物转运评论),H. Bundgaard, 8, 1-38, (1992);J. Pharm. Sci., 77, 285(1988);Chem. Pharm. Bull., N. Nakaya 等, 32, 692(1984);Pro-drugs as Novel Delivery Systems(作为新转运系统的前药),T. Higuchi 和 V. Stella, 14 A. C. S. Symposium Series, 和 Bioreversible Carriers in Drug Design(药物设计中的生物可逆载体),E. B. Roche, ed., American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, 引入本文作为参考。

[0263] “可药用的盐”指本发明化合物的相对无毒的无机和有机酸加成盐,和碱加成盐。这些盐在化合物最后分离和纯化中可以原位制备。特别地,可以通过单独使游离碱形式的纯化的化合物与适宜的有机或无机酸反应,并分离如此形成的盐而制备酸加成盐。例举性的酸加成盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、草酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、硼酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘酸盐、甲磺酸盐、葡萄糖酸盐、乳糖酸盐、氨基磺酸盐、丙二酸盐、水杨酸盐、丙酸盐、亚甲基-双-(β-羟基)萘甲酸盐、龙胆酸盐、异硫代硫酸盐、二对甲苯酰基酒石酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯

磺酸盐、环己基氨基磺酸盐和奎尼酸盐、月桂基磺酸盐等等。例如,参见 S. M. Berge, 等., “Pharmaceutical Salts(药用盐)”, “J. Pharm. Sci. ,66,1-19(1977), 将其引入本文作为参考。碱加成盐也可以通过单独地使酸形式的纯化的化合物与适宜的有机或无机碱反应并分离如此形成的盐而制备。碱加成盐包括可药用的金属盐和胺盐。适宜的金属盐包括钠、钾、钙、钡、锌、镁和铝盐。优选钠和钾盐。适宜的无机碱加成盐由金属碱制备,该金属碱包括氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铝、氢氧化锂、氢氧化镁、氢氧化锌等等。适宜的胺碱加成盐由胺制备,所述胺具有充足的碱性以形成稳定的盐,且优选包括由于低毒性和可接受作药用而在医药化学中常用的胺。氨、乙二胺、N-甲基-葡糖胺、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、胆碱、N, N' -二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、二乙醇胺、普鲁卡因、N-苄基苯乙基胺、二乙基胺、哌嗪、三(羟基甲基)-氨基甲烷、氢氧化四甲基铵、三乙基胺、二苄基胺、二苯羟甲胺、脱氢松香基胺、N-乙基哌啶、苄基胺、四甲基铵、四乙基铵、甲基胺、二甲基胺、三甲基胺、乙基胺、碱性氨基酸如赖氨酸和精氨酸和二环己基胺等等。

[0264] “环基团取代基”指连接在芳族或非芳族环系上的取代基、其包括芳基、杂芳基、羟基、烷氧基、环基氧基、芳氧基、杂芳氧基、酰基或其硫代类似物、环基羰基或其硫代类似物、芳酰基或其硫代类似物、杂芳酰基或其硫代类似物、酰氧基、环基羰氧基、芳酰氧基、杂芳酰氧基、卤素、硝基、氰基、羧基(酸)、 $-C(O)-NHOH$ 、 $-C(O)-CH_2OH$ 、 $-C(O)-CH_2SH$ 、 $-C(O)-NH-CN$ 、磺基、膦酰基、烷基磺酰基氨基甲酰基、四唑基、芳基磺酰基氨基甲酰基、N-甲氧基氨基甲酰基、杂芳基磺酰基氨基甲酰基、3-羟基-3-环丁烯-1,2-二酮、3,5-二氧代-1,2,4-噁二唑烷基或羟基杂芳基如 3-羟基异噁唑基、3-羟基-1-甲基吡唑基、烷氧羰基、环基氧羰基、芳氧羰基、杂芳氧羰基、烷基磺酰基、环基磺酰基、芳基磺酰基、杂芳基磺酰基、烷基亚磺酰基、环基亚磺酰基、芳基亚磺酰基、杂芳基亚磺酰基、烷硫基、环基硫基、芳硫基、杂芳硫基、环基、芳基重氮基、杂芳基重氮基、巯基、 $Y^1Y^2N-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)O-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$  或  $Y^1Y^2NSO_2-$ , 其中  $Y^1$ 、 $Y^2$  和  $Y^3$  独立地是氢、烷基、芳基或杂芳基, 或当取代基是  $Y^1Y^2N-$  时, 则  $Y^1$  和  $Y^2$  当中有一个可以是如本文所定义的酰基、环基羰基、芳酰基、杂芳酰基、烷氧羰基、环基氧羰基、芳氧羰基或杂芳氧羰基, 而  $Y^1$  和  $Y^2$  当中另一个如上定义, 或当取代基是  $Y^1Y^2NC(O)-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)O-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$  或  $Y^1Y^2NSO_2-$  时,  $Y^1$  和  $Y^2$  也可以与它们连接的 N 原子一起形成 4 至 7 元氮杂环基或氮杂环烯基。当环系是饱和的或部分饱和的时, “环基团取代基”进一步包括亚甲基 ( $H_2C=$ )、氧代 ( $O=$ ) 和硫代 ( $S=$ )。酸/酰胺环基团取代基是羧基(酸)、 $-C(O)-NHOH$ 、 $-C(O)-CH_2OH$ 、 $-C(O)-CH_2SH$ 、 $-C(O)-NH-CN$ 、磺基、膦酰基、烷基磺酰基氨基甲酰基、四唑基、芳基磺酰基氨基甲酰基、N-甲氧基氨基甲酰基、杂芳基磺酰基氨基甲酰基、3-羟基-3-环丁烯-1,2-二酮、3,5-二氧代-1,2,4-噁二唑烷基或羟基杂芳基如 3-羟基异噁唑基、3-羟基-1-甲基吡唑基和  $Y^1Y^2NCO-$ 。非酸性极性环基团取代基是羟基、氧代 ( $O=$ )、硫代 ( $S=$ )、酰基或其硫代类似物、环基羰基或其硫代类似物、芳酰基或其硫代类似物、杂芳酰基或其硫代类似物、烷氧羰基、环基氧羰基、芳氧羰基、杂芳氧羰基、酰氧基、环基羰氧基、芳酰氧基、杂芳酰氧基、烷基磺酰基、环基磺酰基、芳基磺酰基、杂芳基磺酰基、烷基亚磺酰基、环基亚磺酰基、芳基亚磺酰基、杂芳基亚磺酰基、巯基、 $Y^1Y^2N-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)O-$ 、 $Y^1Y^2NC(O)NY^3-$  或  $Y^1Y^2NSO_2-$ 。

[0265] “溶剂化物”指本发明的化合物与一个或多个溶剂分子的物理缔合物。这种物理缔合包括氢键。在某些情形下, 溶剂化物将能够分离, 例如, 当一个或多个溶剂分子引入了结

晶固体的晶格中时。“溶剂化物”包括溶液相和可分离的溶剂化物。举例性的溶剂化物包括水合物、乙醇合物、甲醇合物等。

[0266] 实施方案

[0267] 参考对本文所述的本发明,以下是与其相关的具体和优选的实施方案。

[0268] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^0$  是一个键。

[0269] 本发明的另一个具体的实施方案是其中  $R^0$  是二氟亚甲基。

[0270] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^1$  是氢或任选地被取代的低级脂族基。

[0271] 本发明的另一个具体的实施方案是其中  $R^1$  是氢或低级烷基。

[0272] 本发明的优选实施方案是其中  $R^1$  是氢。

[0273] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^2$  是任选地被取代的低级脂族基或任选地被取代的单环基团。

[0274] 本发明的另一个具体的实施方案是其中  $R^2$  是任选地被取代的低级烷基、任选地被取代的低级链烯基或任选地被取代的单环环烷基。

[0275] 本发明的进一步具体的实施方案是,其中  $R^2$  是羧基甲基、1-羧基-2-苯基乙基、环丙基、环丁基、1-环己基乙基、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;更优选环丙基。

[0276] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^3$  是任选地被取代的低级脂族基亚甲基。

[0277] 本发明的另一个具体的实施方案是其中  $R^3$  是任选地被卤素取代的低级(烷基或链烯基)亚甲基。

[0278] 本发明的优选实施方案是,其中  $R^3$  是丙基亚甲基、2,2-二氟乙基亚甲基、2,2,2-三氟亚甲基或丙烯-3-基亚甲基;更优选的  $R^3$  是丙基亚甲基或2,2-二氟乙基亚甲基;进一步优选的  $R^3$  是丙基亚甲基。

[0279] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^4$  是氢或任选地被取代的低级脂族基。

[0280] 本发明的另一个具体的实施方案是其中  $R^4$  是氢或低级烷基。

[0281] 本发明的优选实施方案是其中  $R^4$  是氢。

[0282] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^5$  是任选地被取代的低级脂族基亚甲基。

[0283] 本发明的另一个具体的实施方案是其中  $R^5$  是任选地被(苯基、羧基、羧酰氨基或烷氧羰基)取代的低级(烷基或链烯基)亚甲基。

[0284] 本发明的优选实施方案是其中  $R^5$  是甲基亚甲基、异丙基亚甲基、叔丁基亚甲基、丁-2-基亚甲基、丁基亚甲基、苄基亚甲基、3-甲基丁基亚甲基、2-甲基丙基-亚甲基、羧基甲基亚甲基、羧酰氨基甲基亚甲基、苄氧羰基甲基亚甲基、苄氧羰基丙基亚甲基或苯基丙烯-3-基亚甲基;更优选的  $R^5$  是异丙基亚甲基或叔丁基-亚甲基。

[0285] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^6$  是氢或任选地被取代的低级脂族基。

[0286] 本发明的另一个具体的实施方案是其中  $R^6$  是氢或低级烷基。

[0287] 本发明的优选实施方案是其中  $R^6$  是氢。

[0288] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^7$  是任选地被取代的低级脂族基亚甲基、任选地被取代的低级环基团亚甲基或任选地被取代的单环(芳基或杂芳基)亚甲基。

[0289] 本发明的另一个具体的实施方案是其中  $R^7$  是任选地被取代的低级烷基亚甲基、任选地被取代的低级环烷基亚甲基或任选地被取代的苯基亚甲基。

[0290] 本发明的优选实施方案是其中  $R^7$  是甲基亚甲基、异丙基亚甲基、正丙基亚甲基、苯基亚甲基、环己基亚甲基、环戊基亚甲基、叔丁基亚甲基、仲丁基亚甲基、环己基甲基亚甲基或苯基甲基亚甲基；更优选的是异丙基亚甲基、环己基亚甲基、环戊基亚甲基、叔丁基亚甲基或仲丁基亚甲基。

[0291] 本发明的优选实施方案还是其中每一个  $R^3$ 、 $R^5$  和  $R^7$  是单取代的亚甲基。

[0292] 本发明的优选实施方案还是其中  $R^3$  是单取代的亚甲基，并在连接至  $-C(O)-R^0-C(O)-NR^1R^2$  部分上的碳上具有 (S) 构型。

[0293] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^8$  是氢或任选地被取代的低级脂族基。

[0294] 本发明的另一个具体的实施方案是其中  $R^8$  是氢或低级烷基。

[0295] 本发明的优选实施方案是其中  $R^8$  是氢。

[0296] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^9$  是任选地被取代的低级脂族基或任选地被取代的单环芳族基。

[0297] 本发明的另一个具体的实施方案是其中  $R^9$  是任选地被取代的低级烷基或任选地被取代的单环杂芳基。

[0298] 本发明的另一个具体的实施方案是其中  $R^9$  是任选地被 (羧基、(低级烷基)  $SO_2NH-$ 、(低级烷基)  $HNCO-$ 、羟基、苯基、杂芳基或 (低级烷基)  $OC(O)NH-$ ) 取代的低级烷基，或任选地被取代的单环杂芳基。

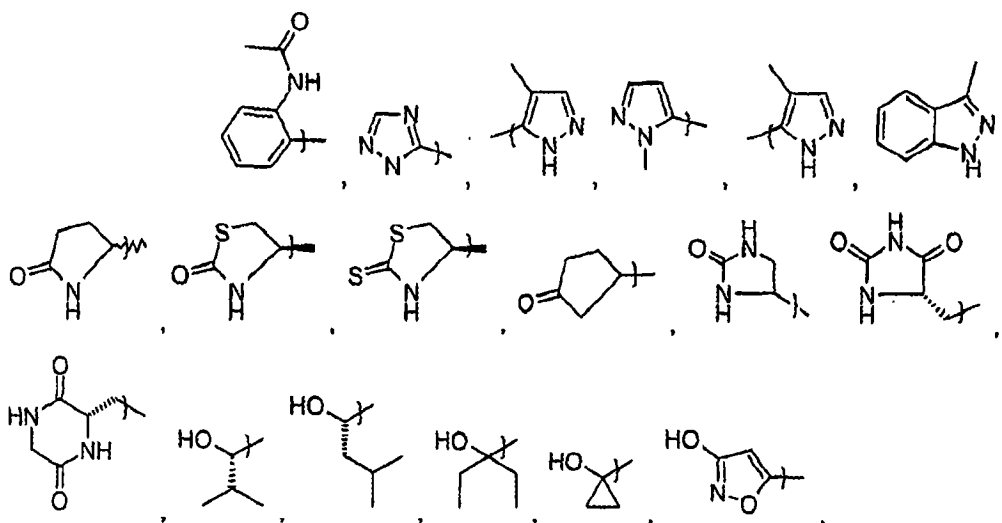
[0299] 本发明的进一步优选的实施方案是其中  $R^9$  是被 (单-或二-)  $MeOC(O)NH-$  取代的低级烷基；更优选的是 1,2-二  $(MeOC(O)NH)$  乙基或 1- $(MeOC(O)NH)$  乙基。

[0300] 本发明的优选实施方案是其中  $R^9$  是 (羧基、(低级烷基)  $HNCO-$  或四唑基) 取代的低级烷基；更优选的 3-羧基丙基、2-四唑-5-基丙基、3-(N-甲基羧酰氨基) 丙基或 3-羧基-2,2-二甲基丙基；更优选的是 3-羧基丙基、2-四唑-5-基丙基或 3-(N-甲基羧酰氨基) 丙基。

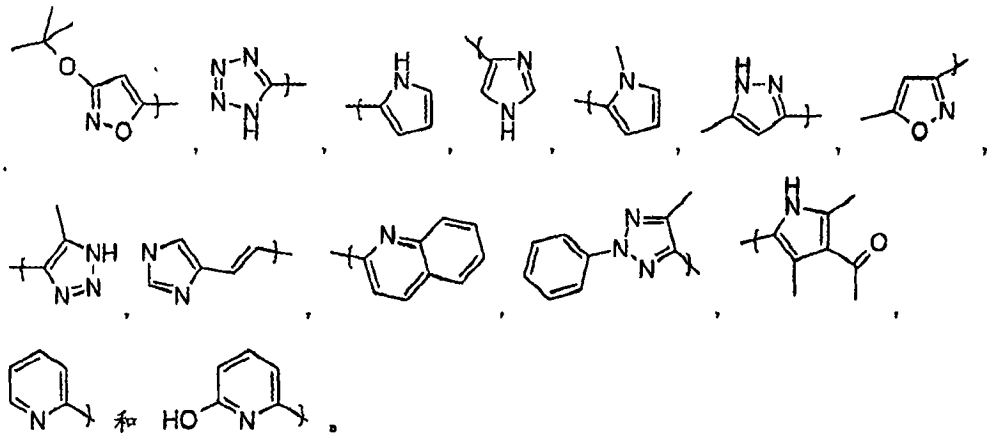
[0301] 本发明另一个优选的实施方案是其中  $R^9$  是任选地被取代的低级烷基；更优选的是 1-羟基-2-苯基乙基、甲基、异丙基或叔丁基；更优选的是甲基、异丙基或叔丁基。

[0302] 本发明另一个优选的实施方案是其中  $R^9$  选自

[0303]



[0304]

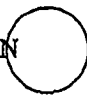


[0305] 本发明另一个优选的实施方案是其中 R<sup>9</sup> 是吡嗪基。

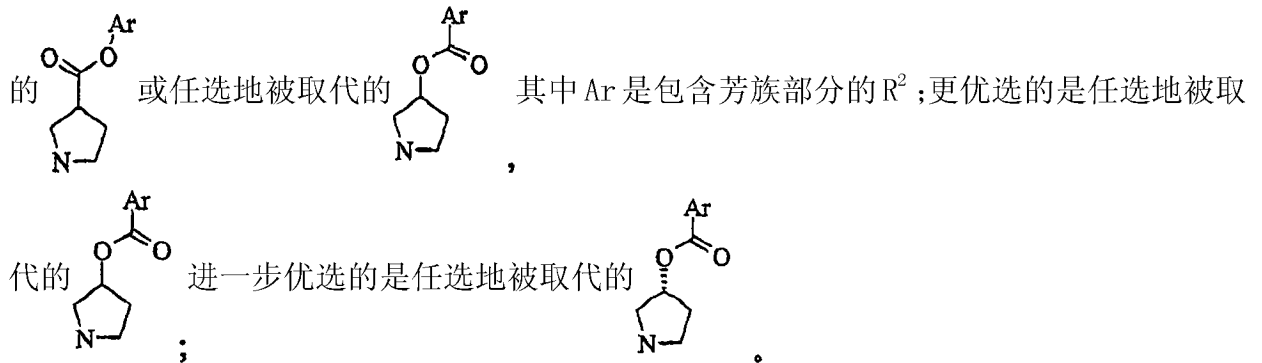
[0306] 本发明的一个具体的实施方案是其中 R<sup>10</sup> 是氢或任选地被取代的低级脂族基。

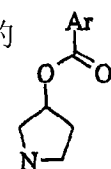
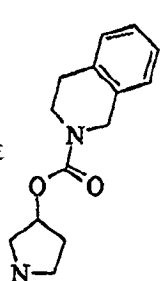
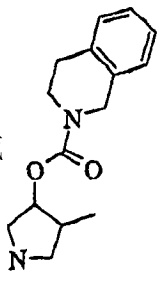
[0307] 本发明的另一个具体的实施方案是其中 R<sup>10</sup> 是氢或低级烷基。

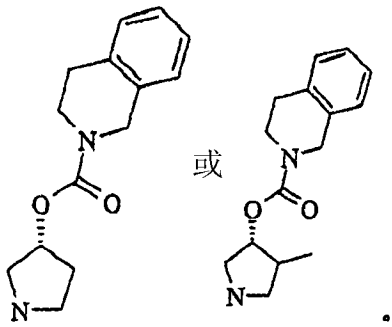
[0308] 本发明的优选实施方案是其中 R<sup>10</sup> 是氢。


[0309] 本发明的优选实施方案是其中  作为取代的单环氮杂环基是取代的吡咯烷基。

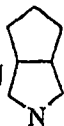


[0310] 本发明的优选实施方案是其中  作为取代的单环氮杂环基是任选地被取代的





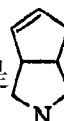

[0311] 进一步优选的任选地取代的  是  或  进一步优选的




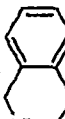
[0312] 本发明的另一个优选的实施方式是其中  作为任选地被取代的多环氮杂环


基是任选地被取代的  更优选的是任选地被取代的   的具体取代基是羟基、氟或氧代。

[0313] 本发明的另一个优选的实施方式是其中  作为任选地被取代的多环氮杂环

烯基是任选地被取代的  更优选的是  进一步优选的是 。

[0314] 本发明的另一个优选的实施方式是其中  作为任选地被取代的多环氮杂环

烯基是任选地被取代的 。

[0315] 本发明的优选实施方案是其中连接在  上的  $-C(O)-N(R^4)-R^3-C(O)R^0C(O)$

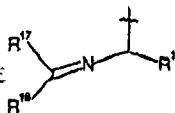
$NR^2R^1$  部分连接在相对于氮原子处于  $\alpha$ -位的碳上。

[0316] 本发明的优选实施方案是其中 L 是  $-C(O)-$  或  $-OC(O)-$ 。

[0317] 本发明的优选实施方案是其中 n 为 0。

[0318] 本发明的另一个优选的实施方式是其中 n 为 1。

[0319] 本发明的优选实施方案是其中  $R^{11}$  是  $-CO_2R^{13}$ 。

[0320] 本发明的优选实施方案是其中  $R^{12}$  是 。

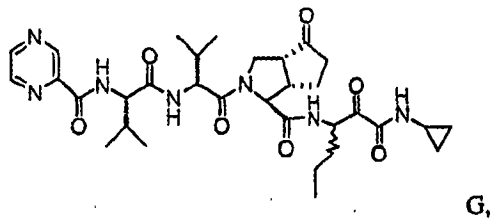
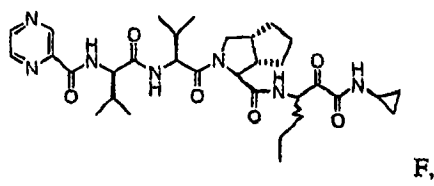
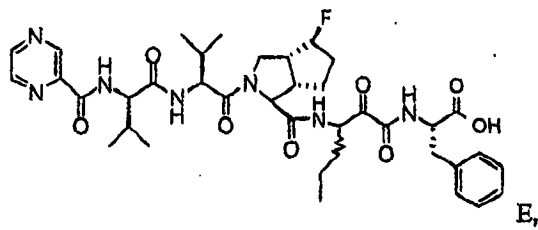
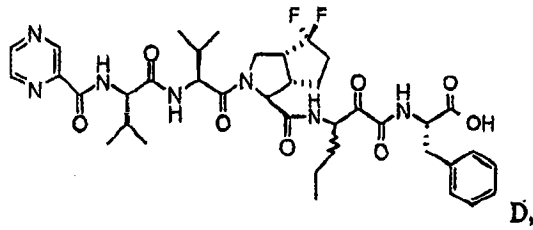
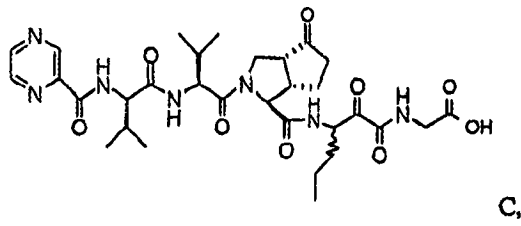
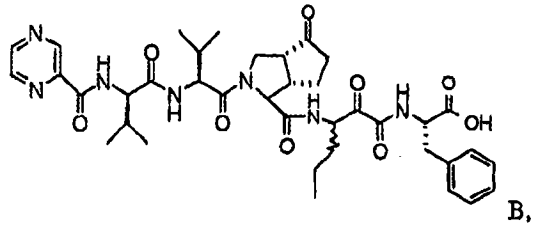
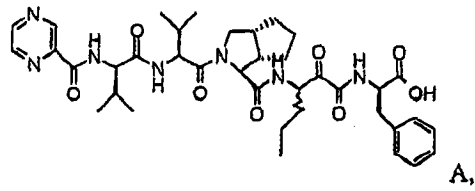
[0321] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^{13}$  是任选地被取代的脂族基。

[0322] 本发明的另一个具体的实施方案是其中  $R^{13}$  是烷基。

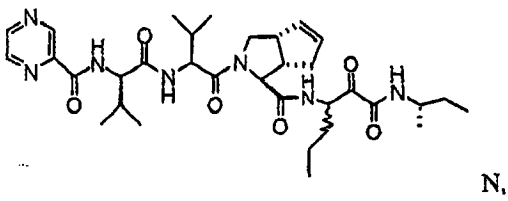
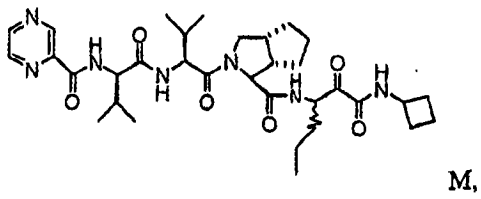
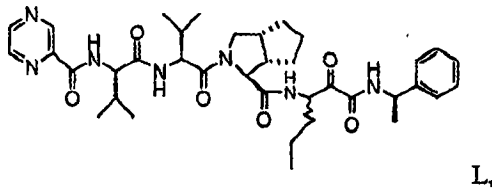
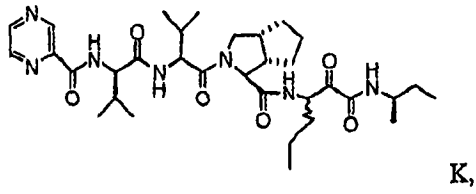
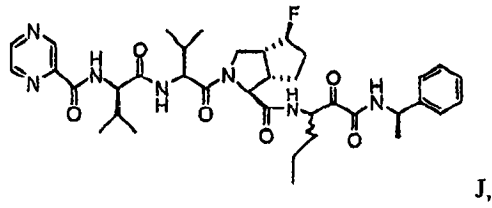
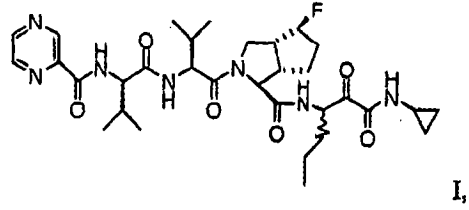
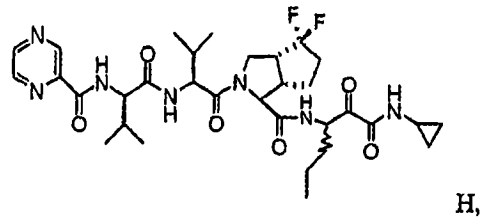
[0323] 本发明的优选实施方案是其中  $R^{13}$  是低级烷基。

[0324] 本发明的另一个优选的实施方式是其中  $R^{13}$  是甲基。

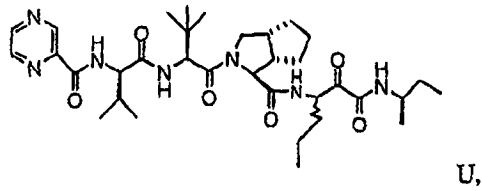
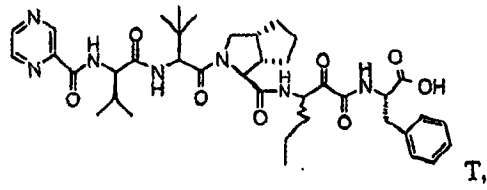
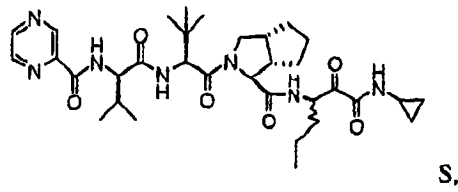
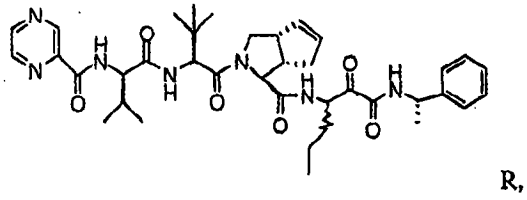
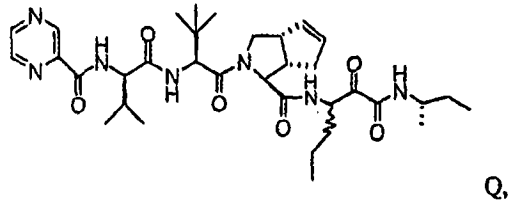
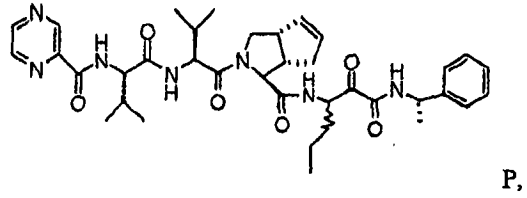
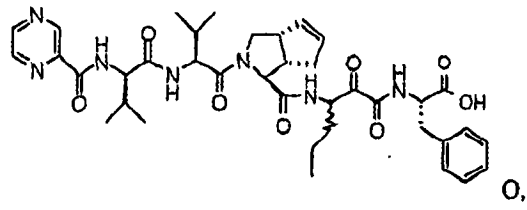
- [0325] 本发明的优选实施方案是其中  $R^{14}$  是  $-CO_2R^{16}$ 。
- [0326] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^{15}$  是烷基。
- [0327] 本发明的优选实施方案是其中  $R^{15}$  是低级烷基。
- [0328] 本发明的优选实施方案是其中  $R^{16}$  是甲基。
- [0329] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^{16}$  是任选地被取代的脂族基。
- [0330] 本发明的另一个具体的实施方案是其中  $R^{16}$  是烷基。
- [0331] 本发明的优选实施方案是其中  $R^{16}$  是低级烷基。
- [0332] 本发明的优选实施方案是其中  $R^{16}$  是 t-Bu。
- [0333] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^{17}$  是任选地被取代的芳基。
- [0334] 本发明的优选实施方案是其中  $R^{17}$  是苯基。
- [0335] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $R^{18}$  是任选地被取代的芳基。
- [0336] 本发明的优选实施方案是其中  $R^{18}$  是苯基。
- [0337] 本发明的一个具体的实施方案是其中  $p^\circ$  选自 BOC、CBz 和  $-CO_2$  烷基。
- [0338] 本发明的优选实施方案是其中  $p^\circ$  是 BOC。
- [0339] 可以理解,本发明包括本文所述具体的和优选的集合的所有适宜的组合。
- [0340] 本发明具体的化合物选自一组化合物 A-FH
- [0341]



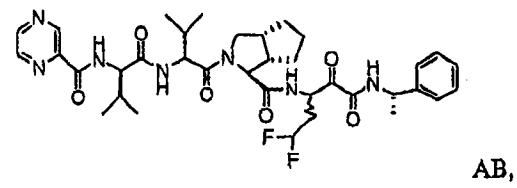
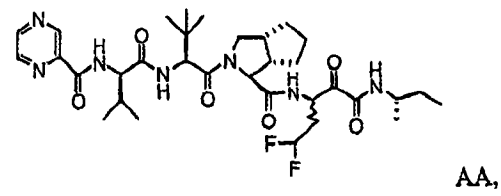
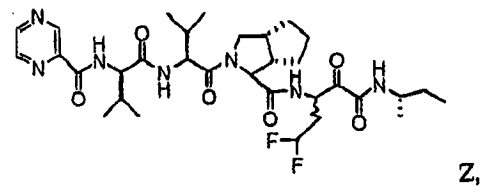
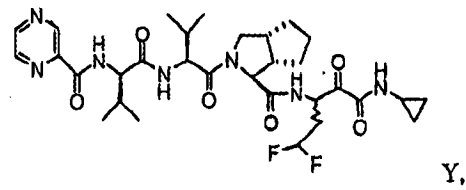
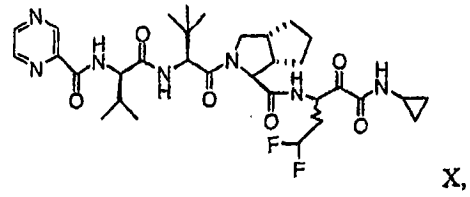
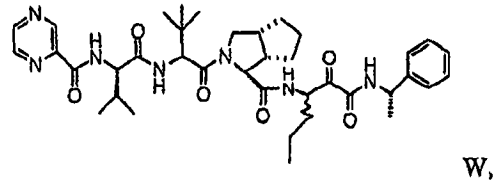
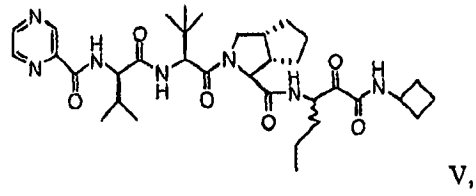
[0342]



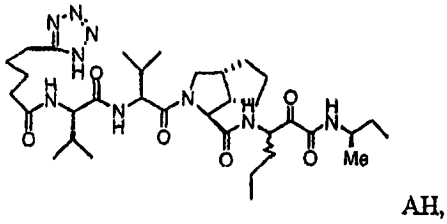
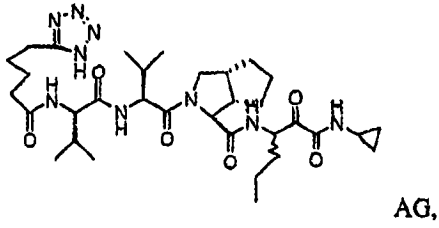
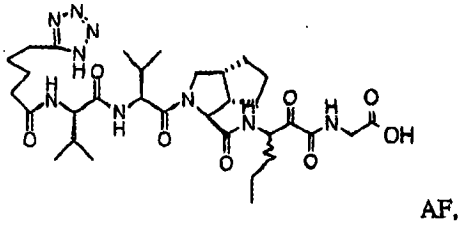
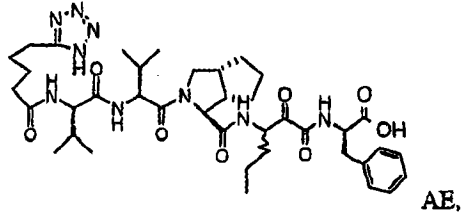
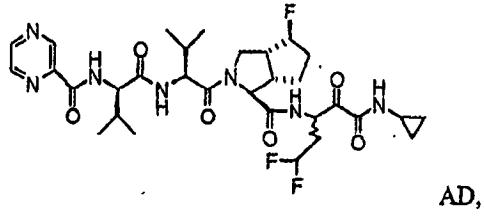
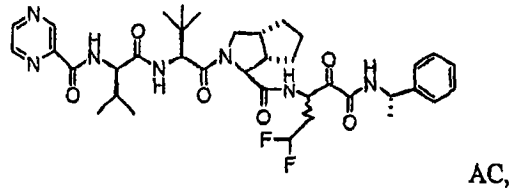
[0343]



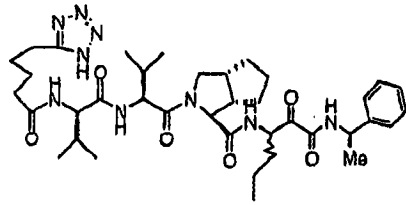
[0344]



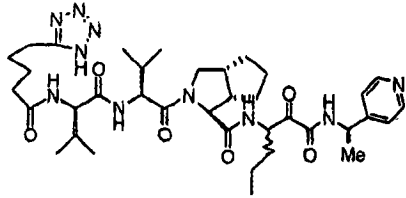
[0345]



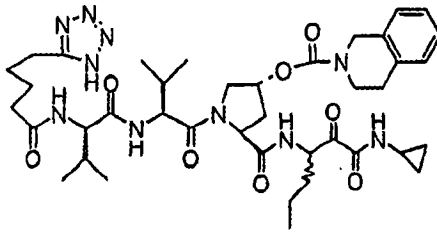
[0346]



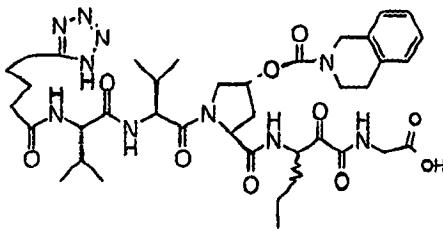
AI,



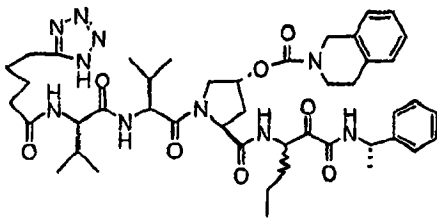
AJ,



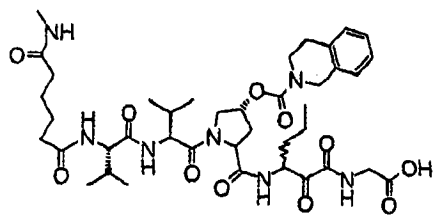
AK,



AL,

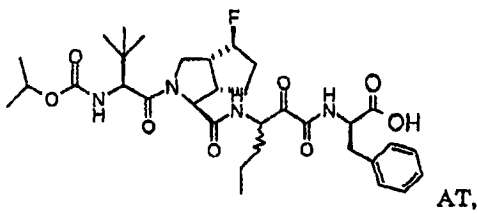
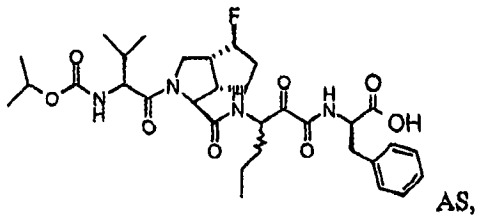
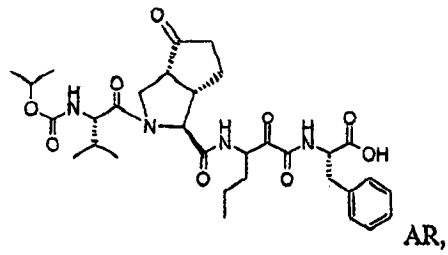
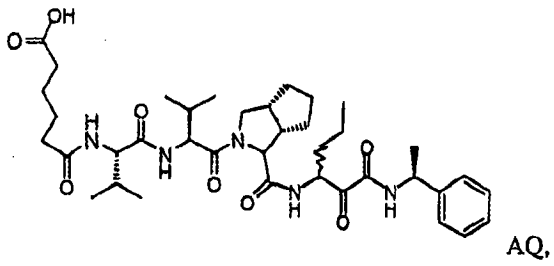
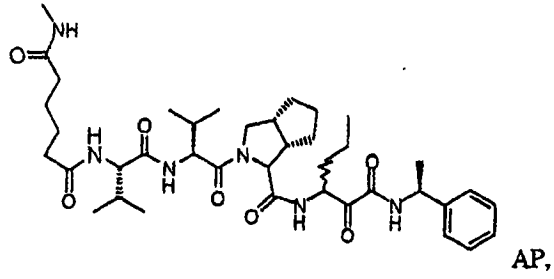
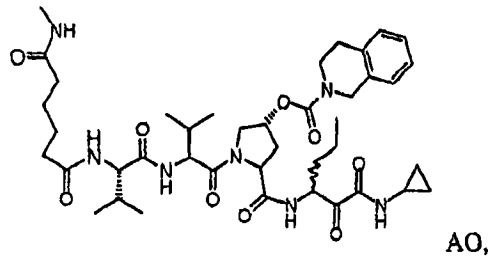


AM,

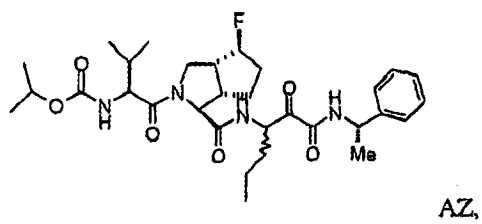
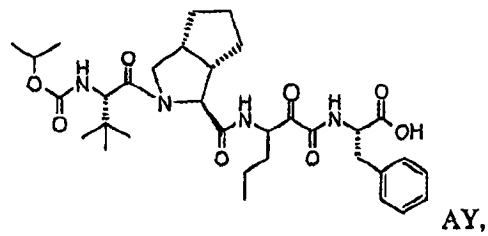
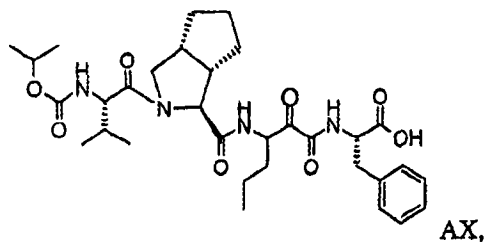
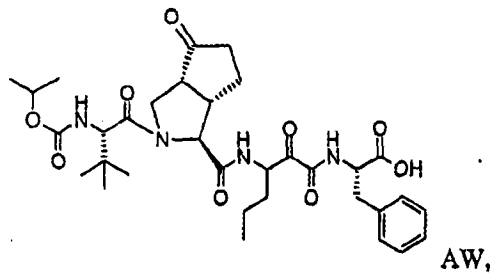
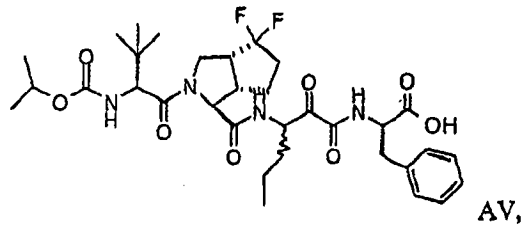
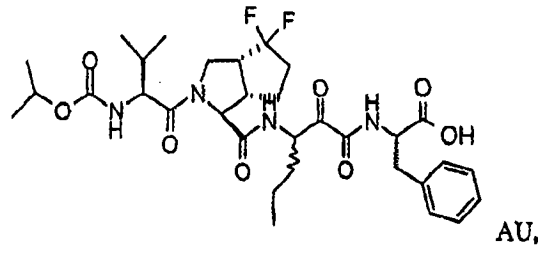


AN,

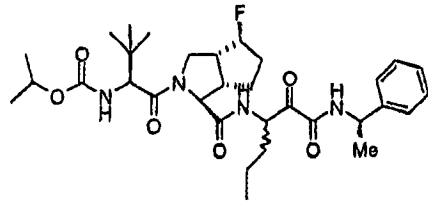
[0347]



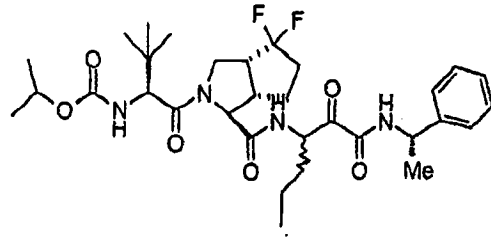
[0348]



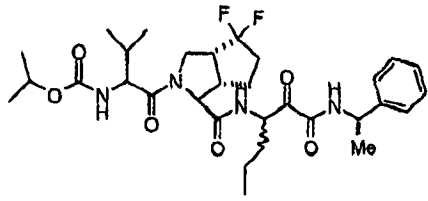
[0349]



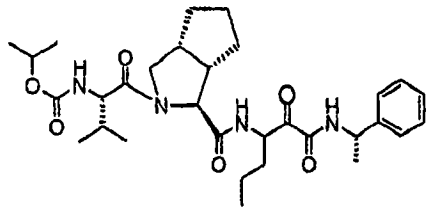
BA,



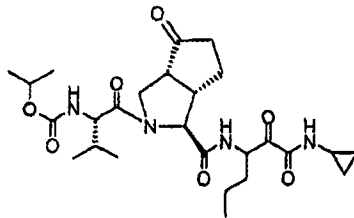
BB,



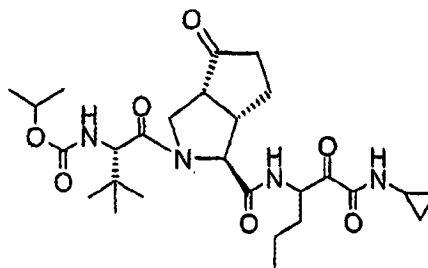
BC,



BD,

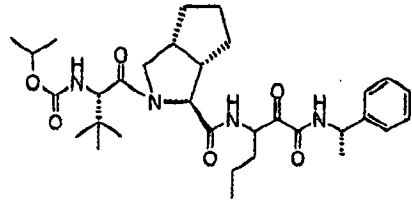


BE,

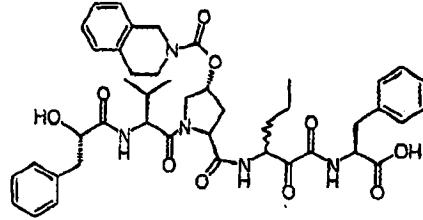


BF,

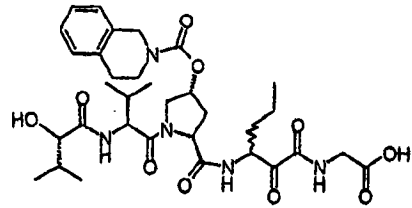
[0350]



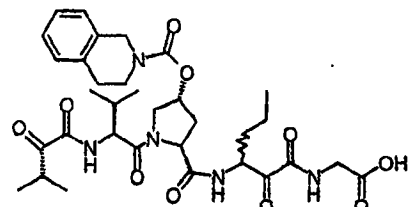
BG,



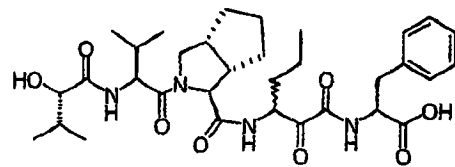
BH,



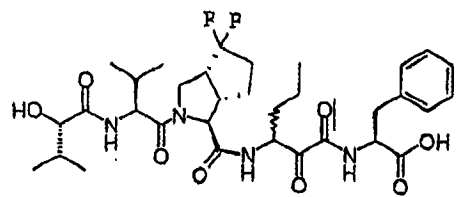
BI,



BJ,

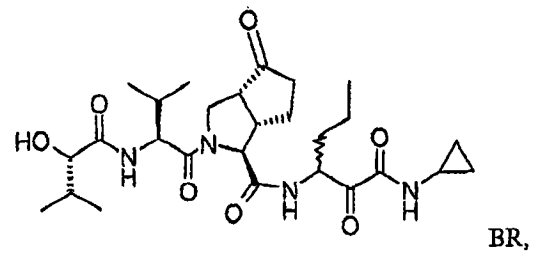
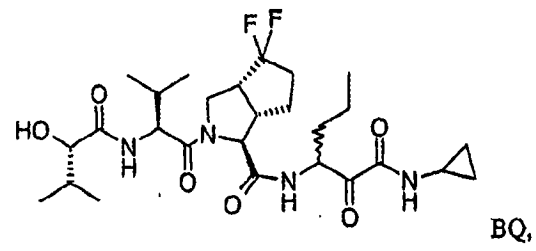
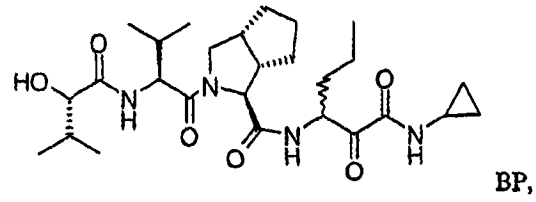
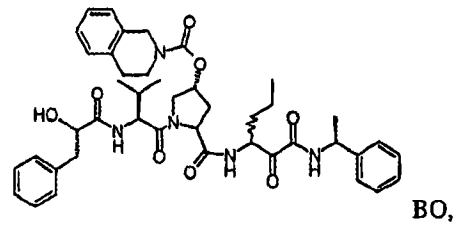
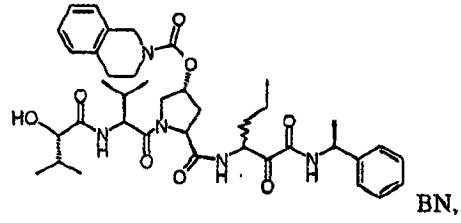
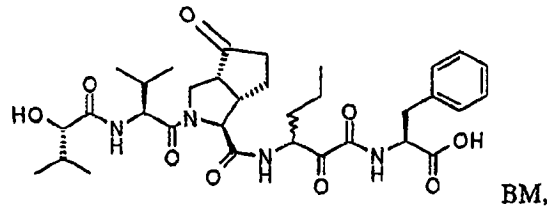


BK,

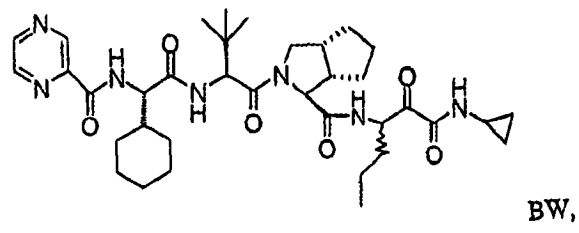
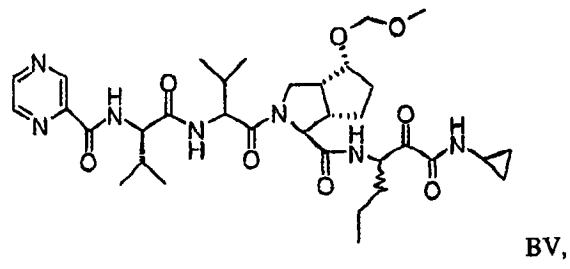
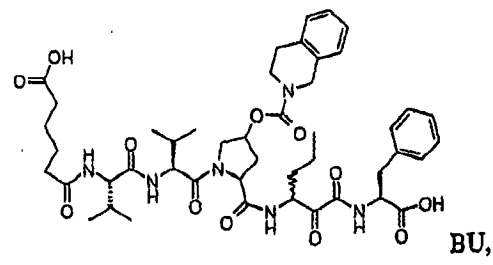
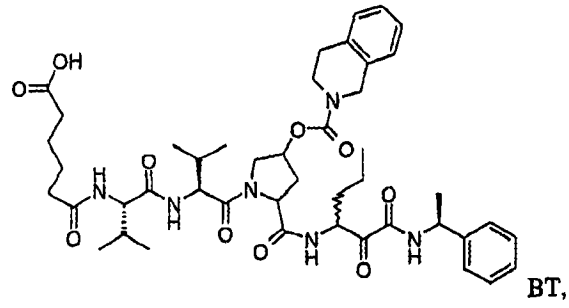
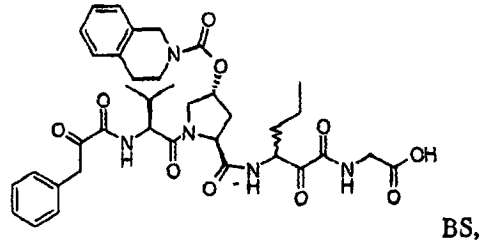


BL,

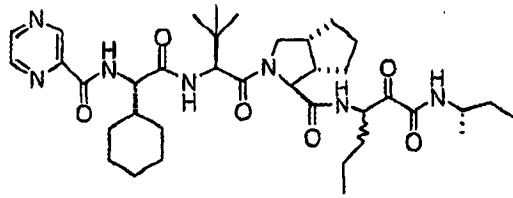
[0351]



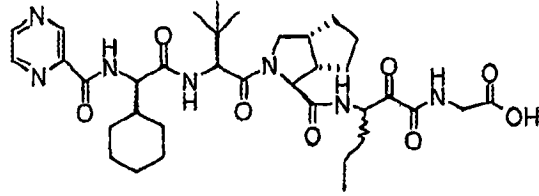
[0352]



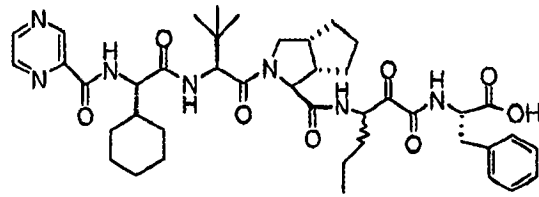
[0353]



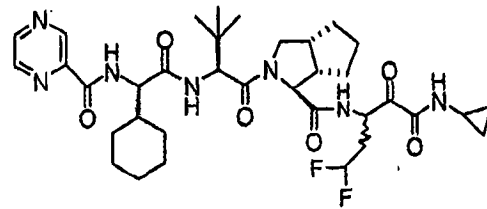
BX,



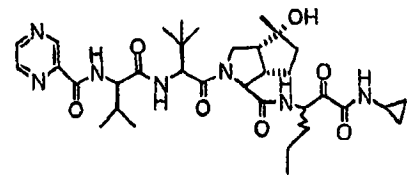
BY,



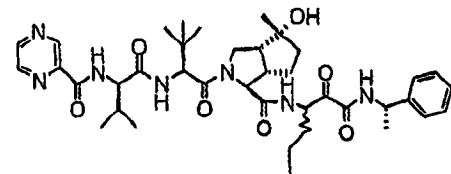
BZ,



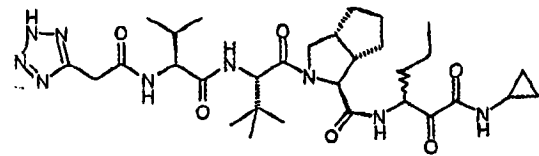
CA,



CB,

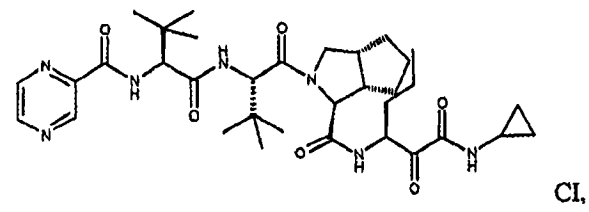
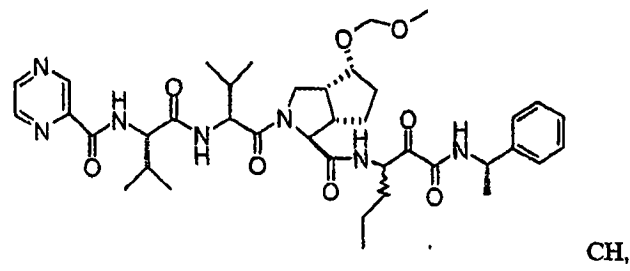
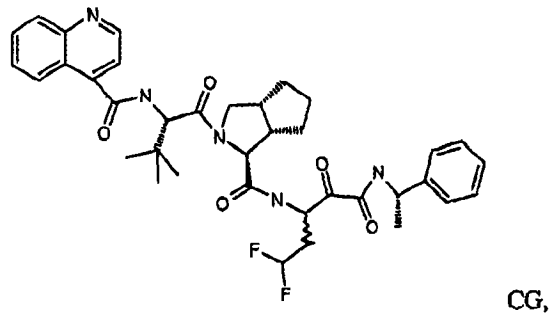
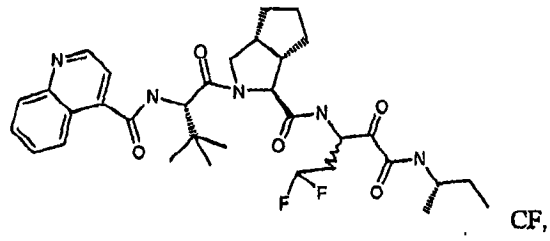
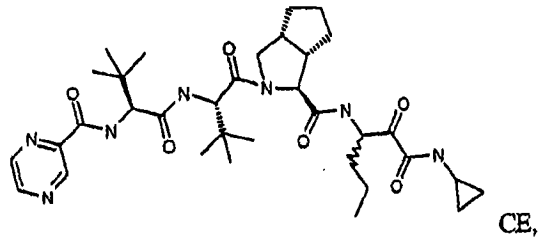


CC,

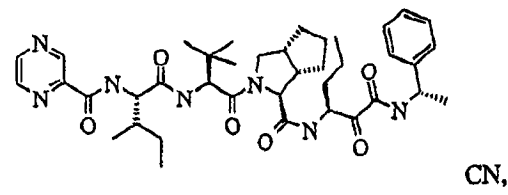
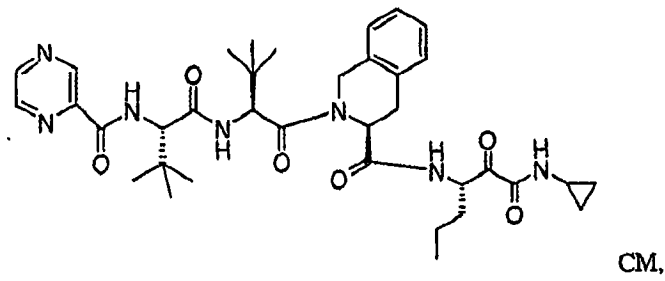
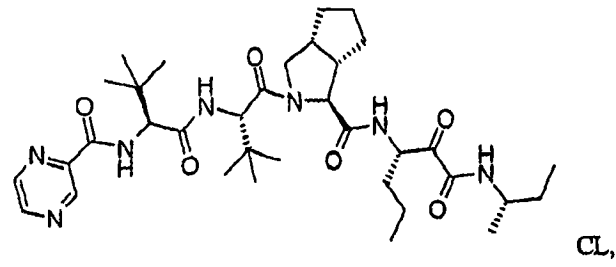
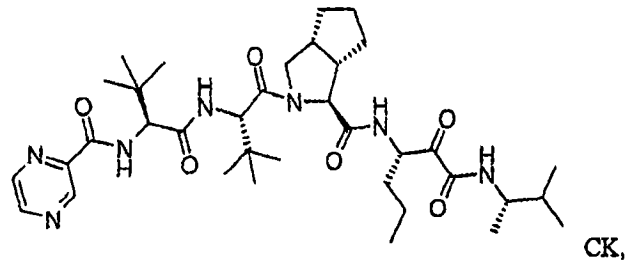
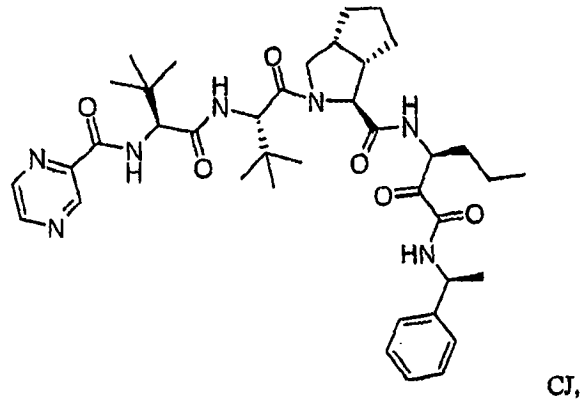


CD,

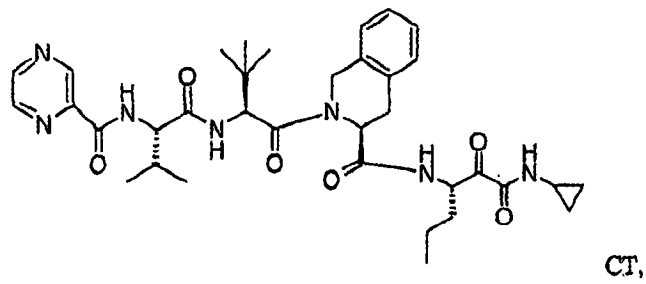
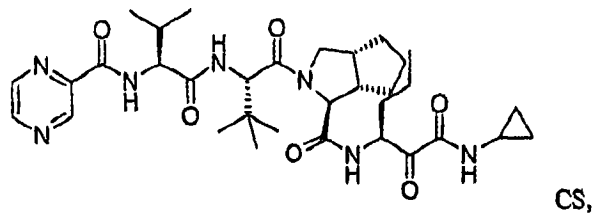
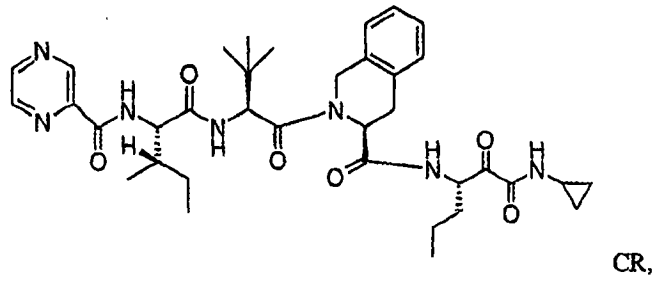
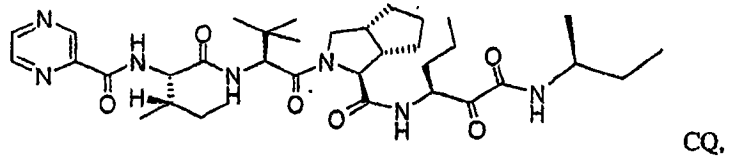
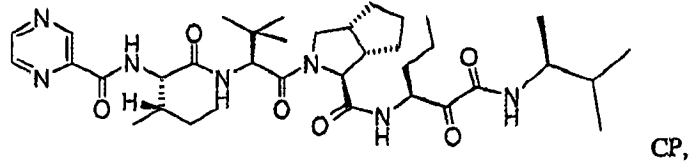
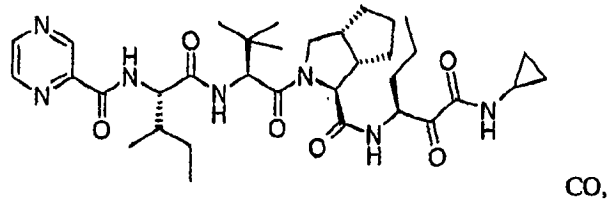
[0354]



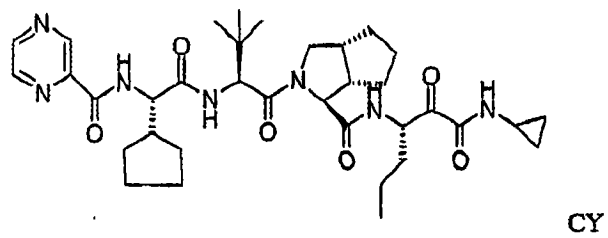
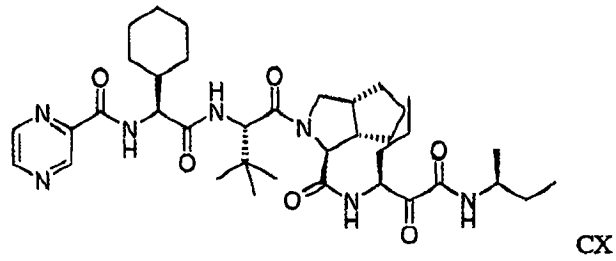
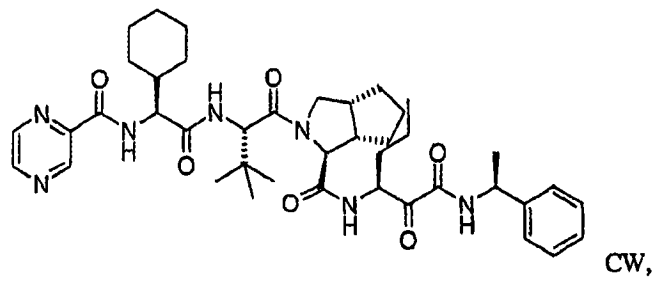
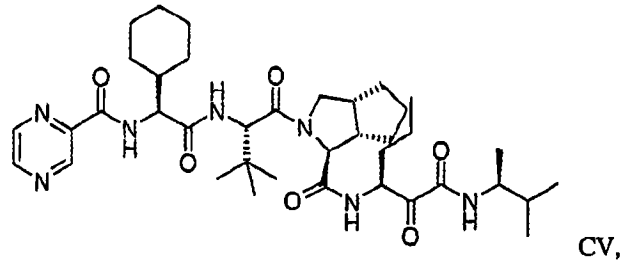
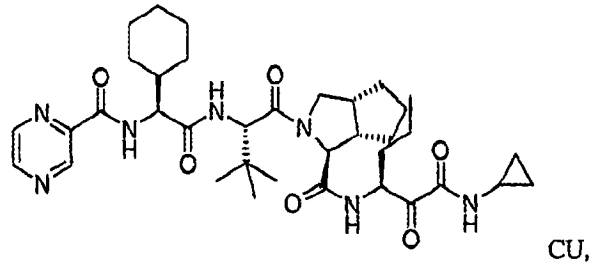
[0355]



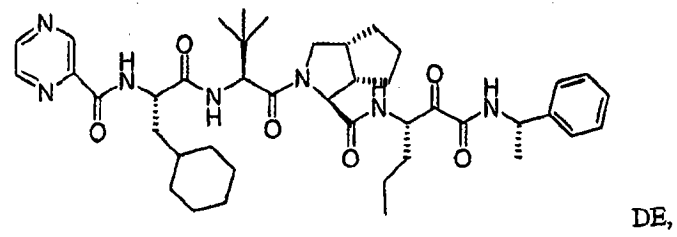
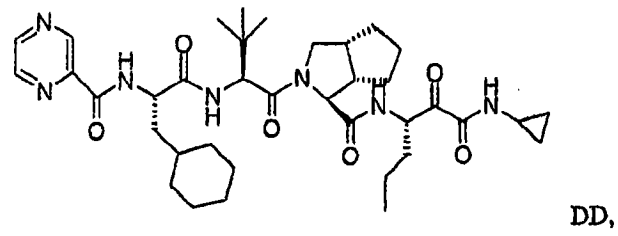
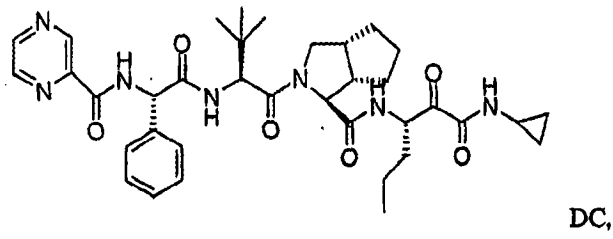
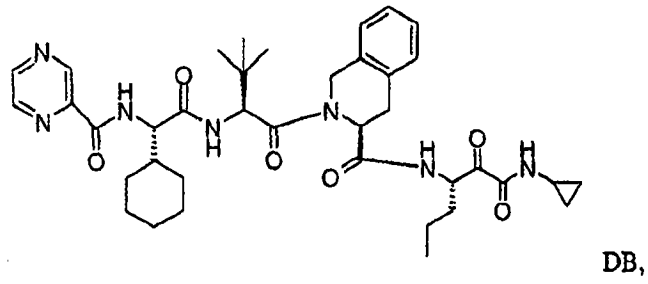
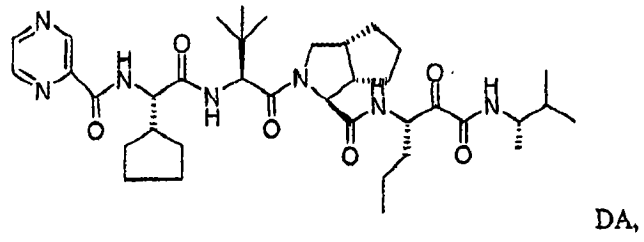
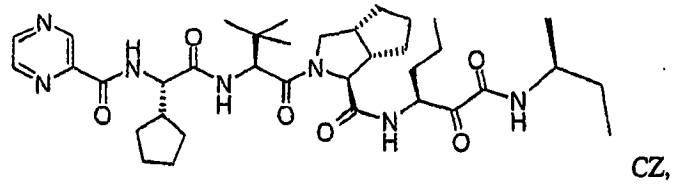
[0356]



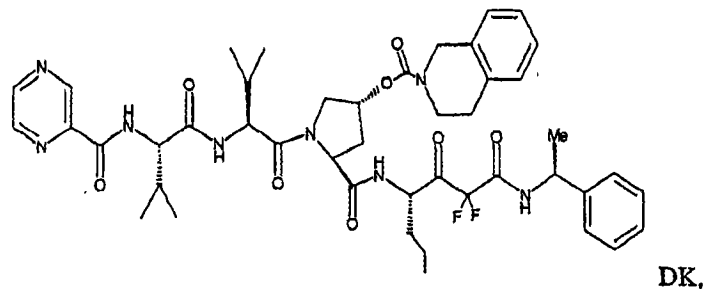
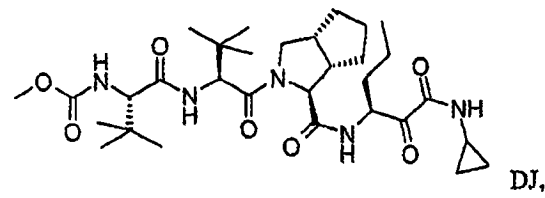
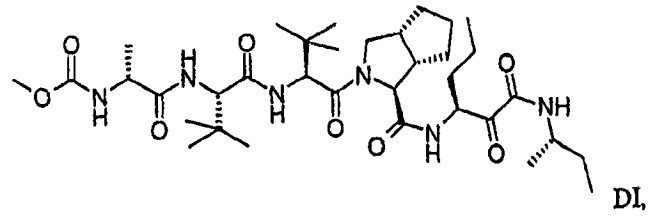
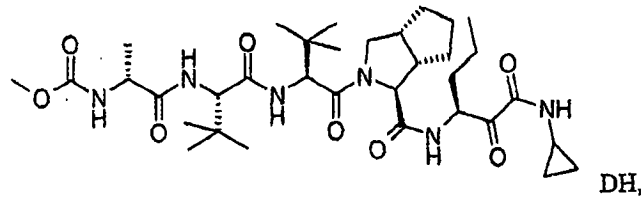
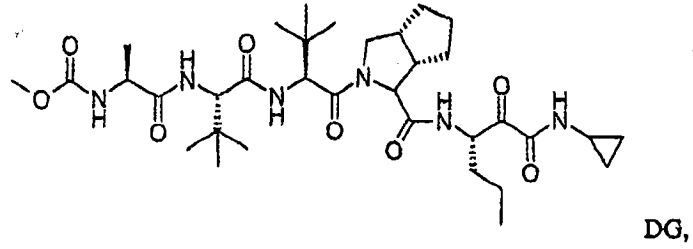
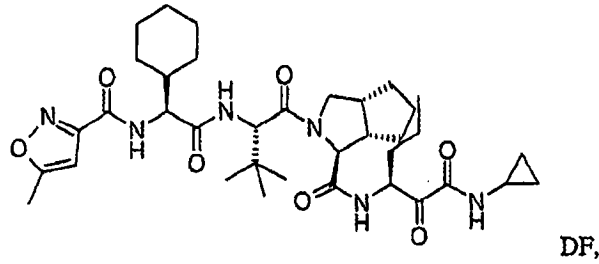
[0357]



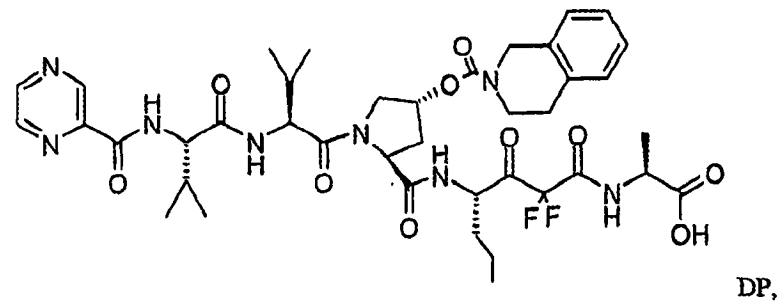
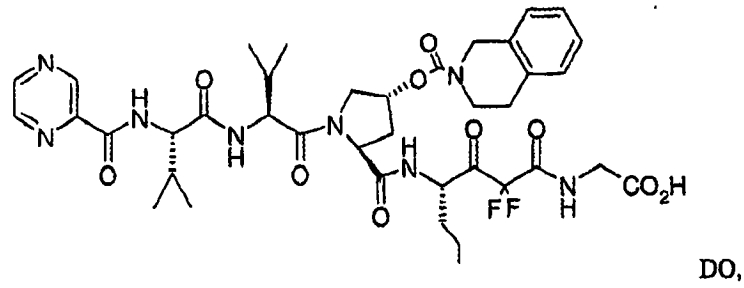
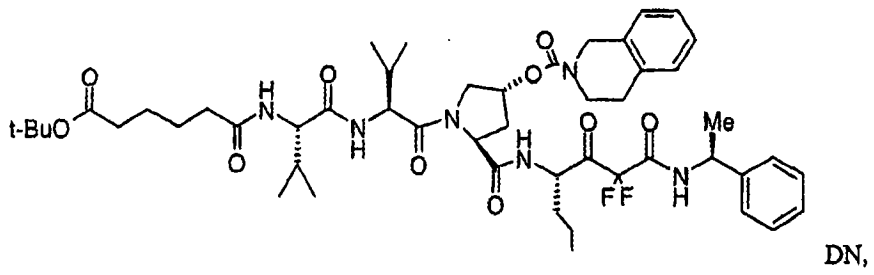
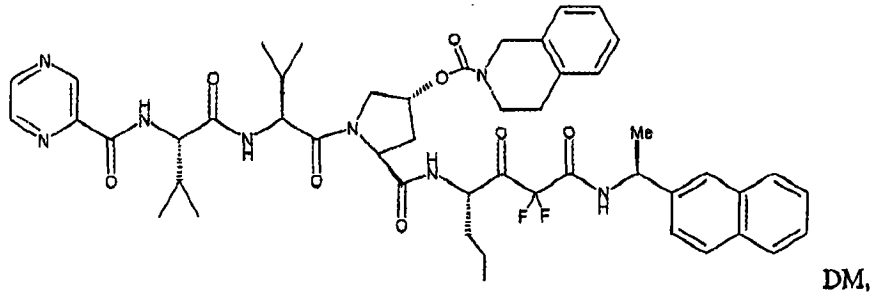
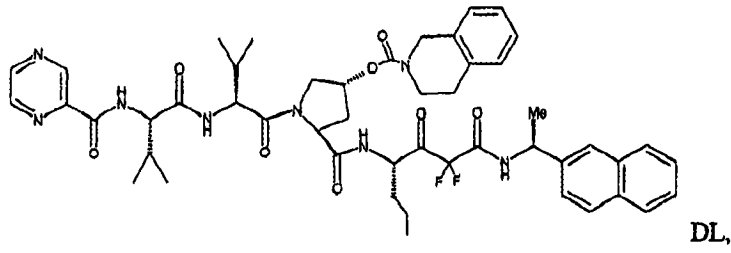
[0358]



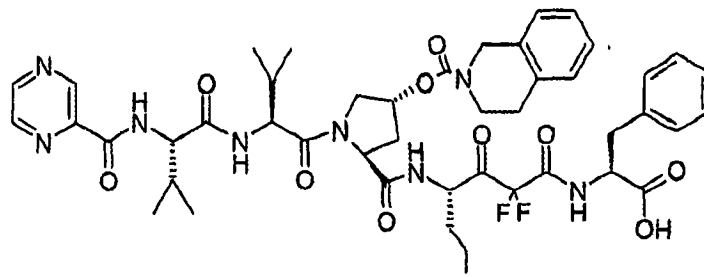
[0359]



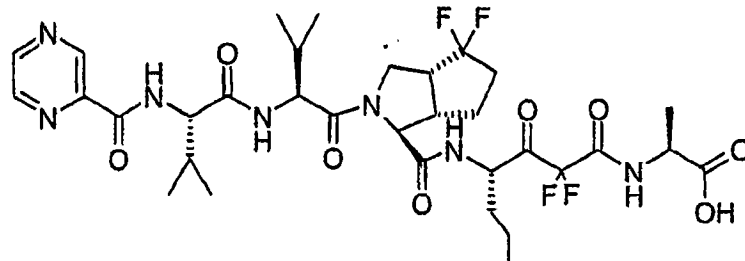
[0360]



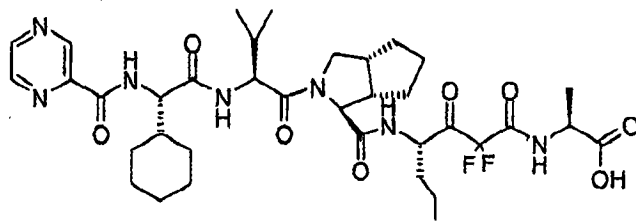
[0361]



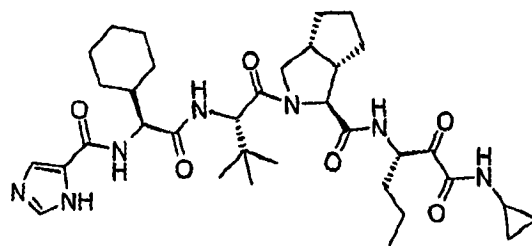
DQ,



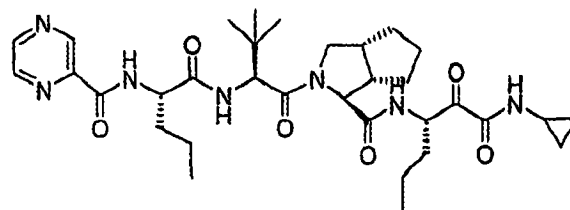
DR,



DS,

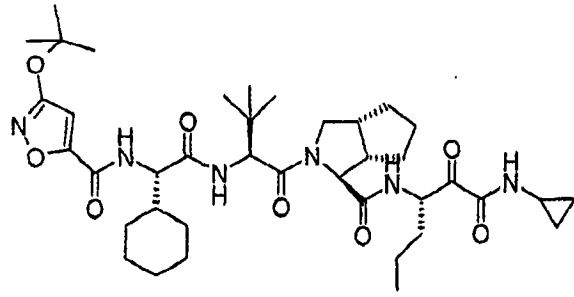


DT,

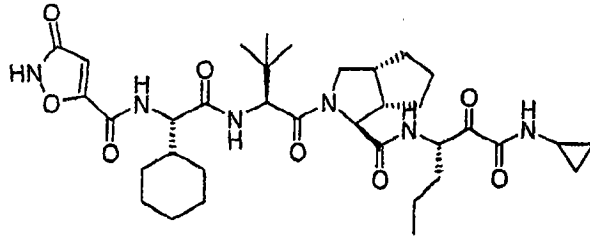


DU,

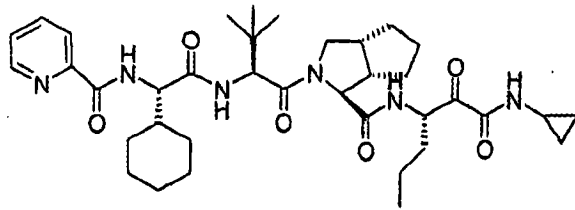
[0362]



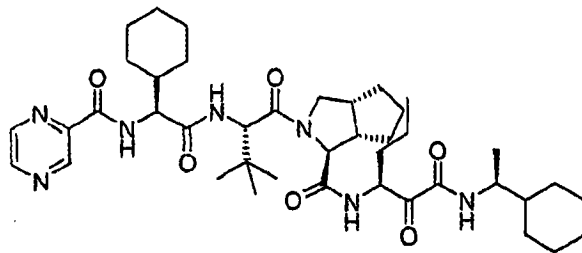
DV,



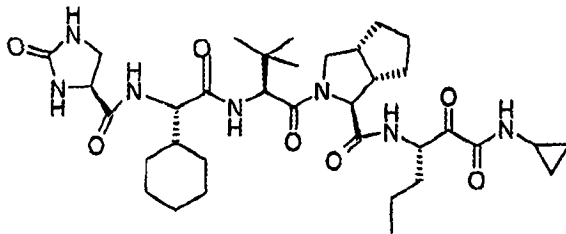
DW,



DX,

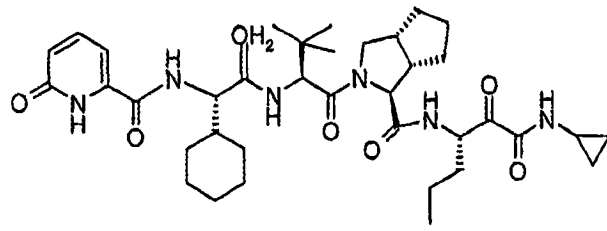


DY,

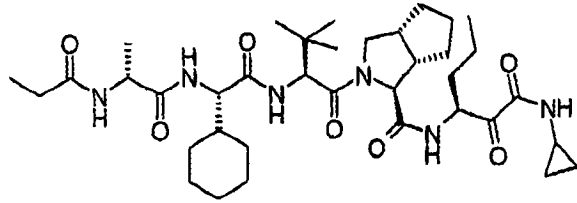


DZ,

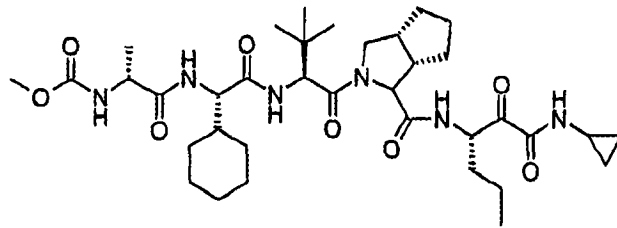
[0363]



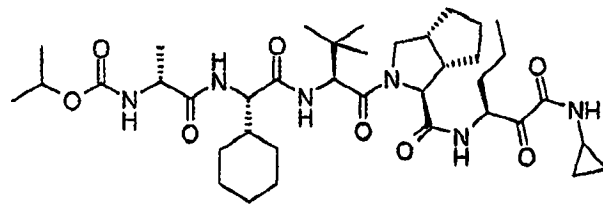
EA,



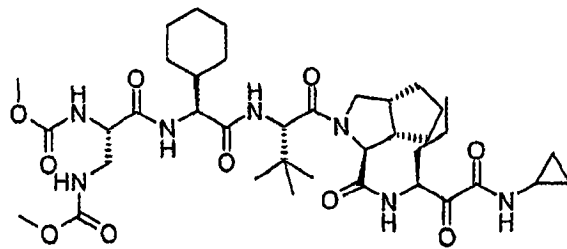
EB,



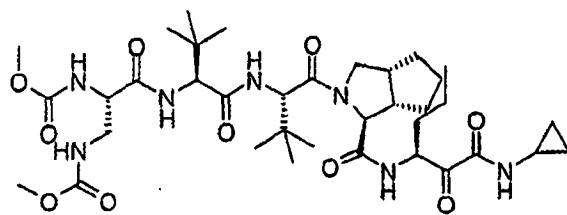
EC,



ED,

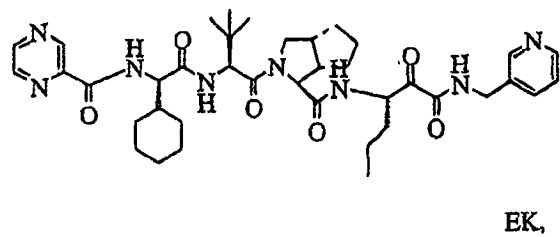
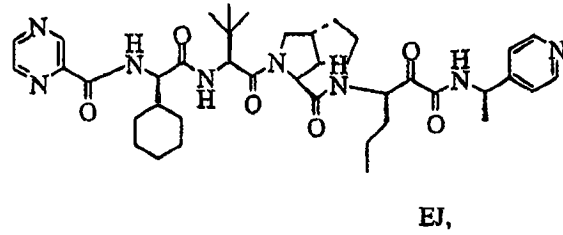
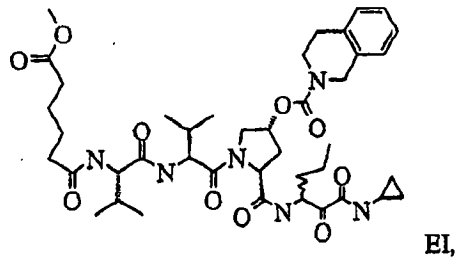
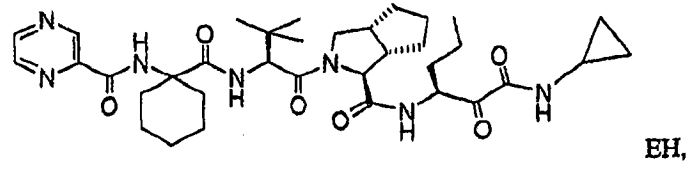
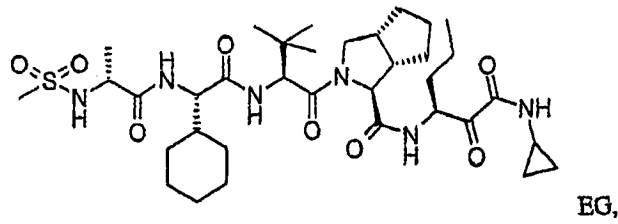


EE,

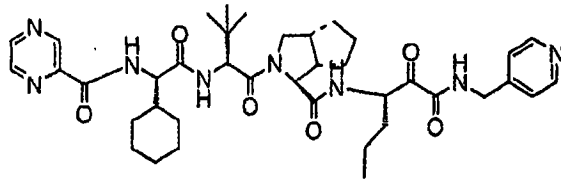


EF,

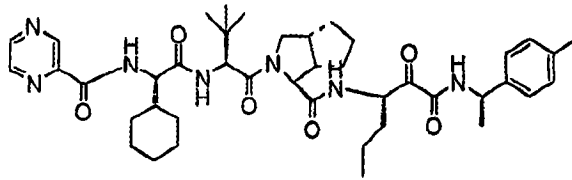
[0364]



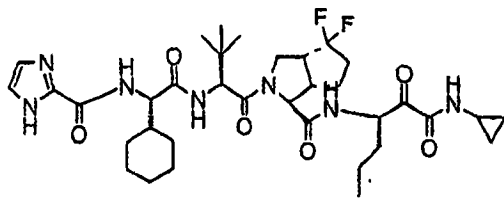
[0365]



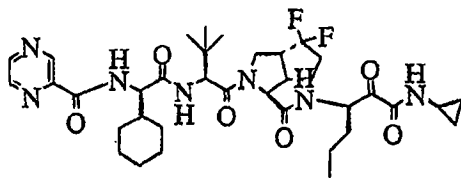
EL,



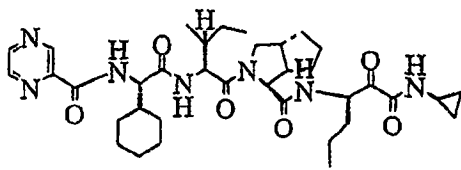
EM,



EN,

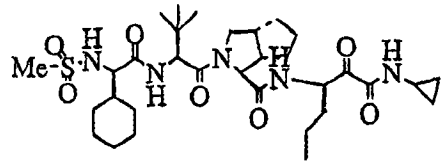


EO,

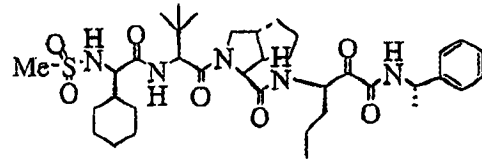


EP,

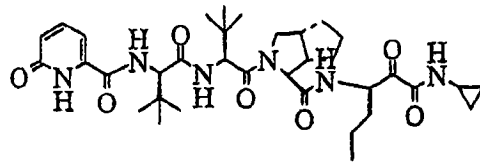
[0366]



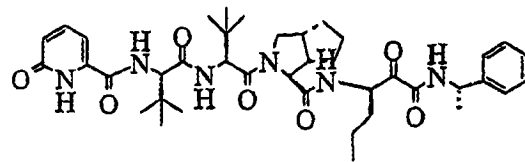
EQ,



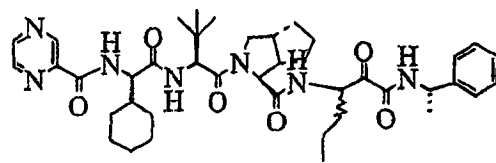
ER,



ES,

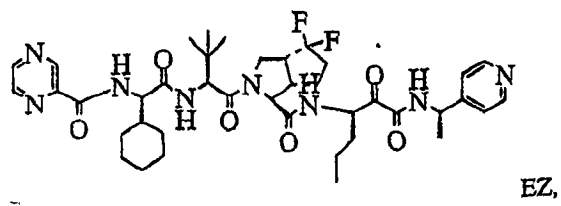
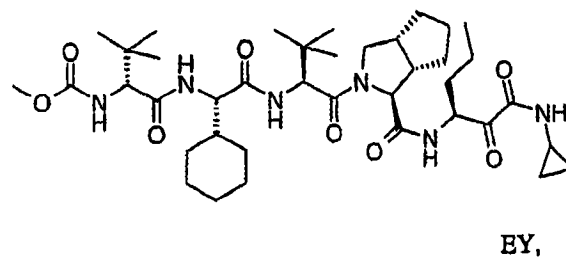
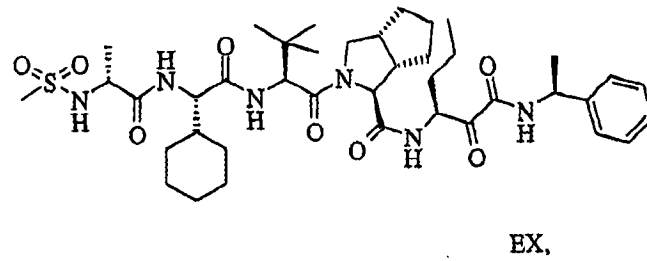
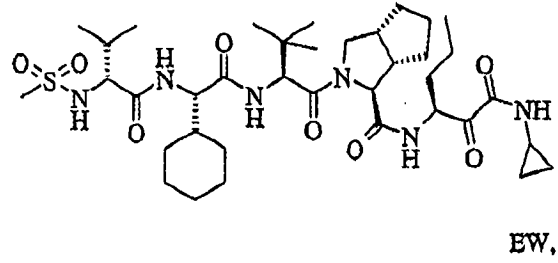
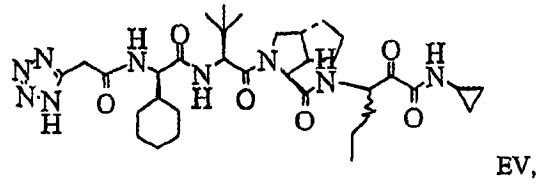


ET,

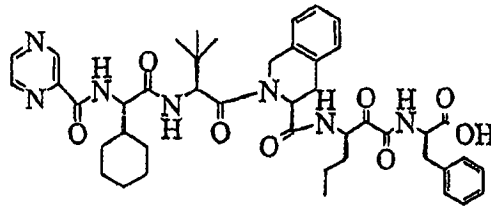


EU,

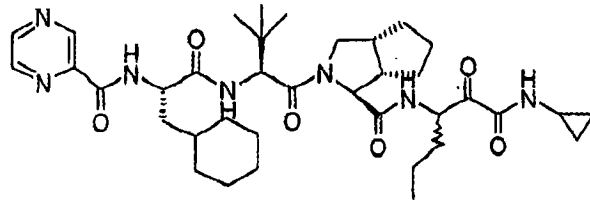
[0367]



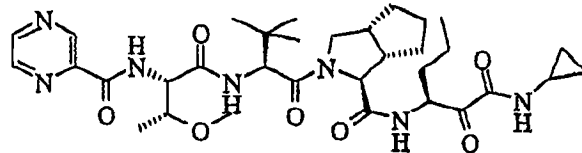
[0368]



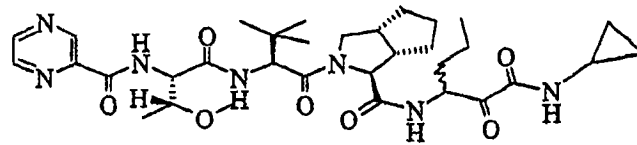
FA,



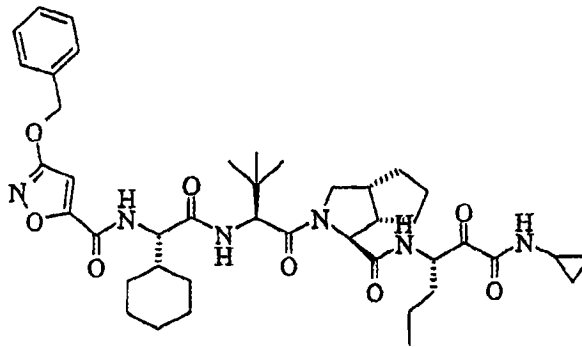
FB,



FC,

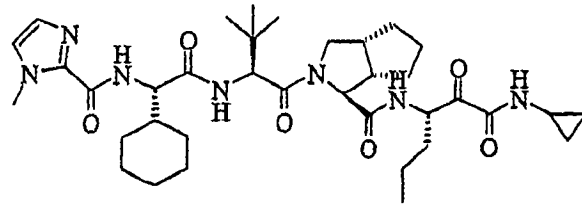


FD,

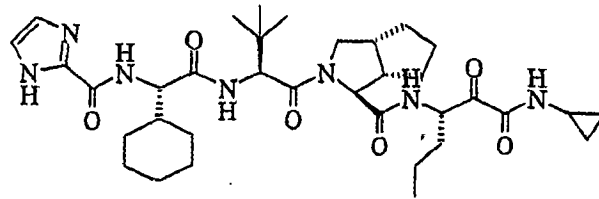


FE,

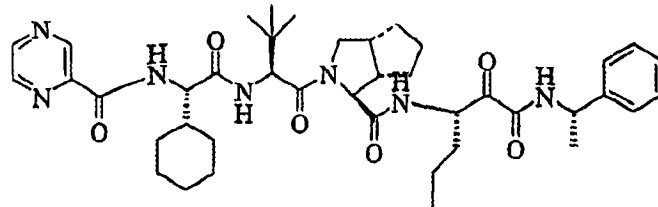
[0369]



FF,



FG, 和



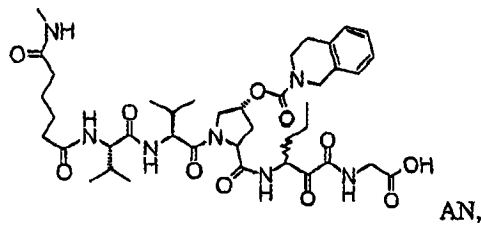
FH,

[0370] 或其药用盐或前药,或此化合物、其盐或其前药的溶剂化物。

[0371] 优选的化合物选自 S、U、BW、BX、BY、BZ、CE、CU、CW、CY、DZ、EA、EC、EJ、FH、EW、EO、EZ、FG 和 EN,其药用盐或前药,或此化合物、其盐或其前药的溶剂化物。

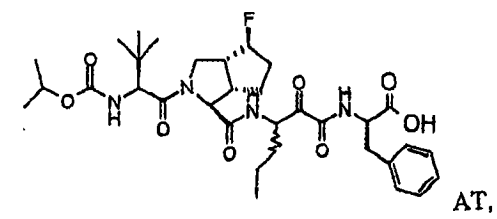
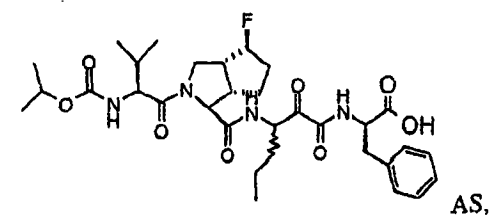
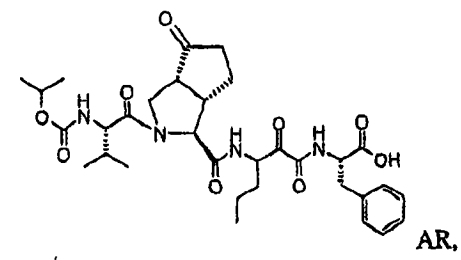
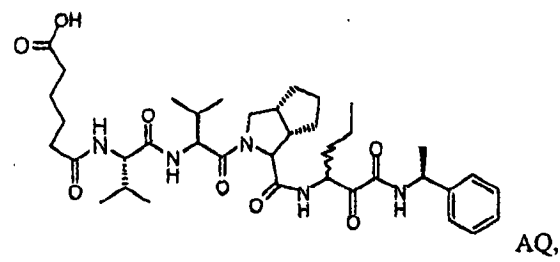
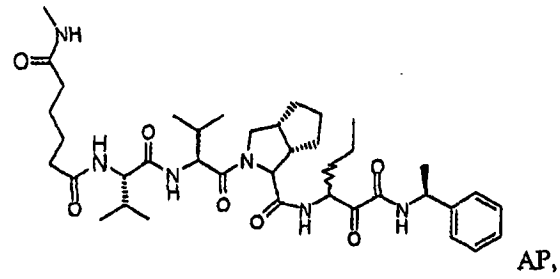
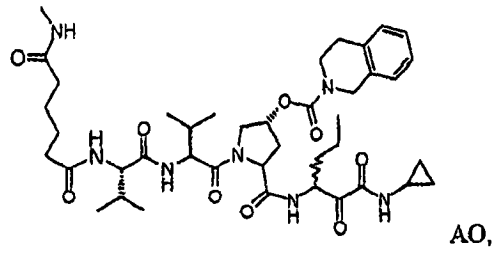
[0372] 本发明另一个优选的实施方案选自下述化合物:

[0373]

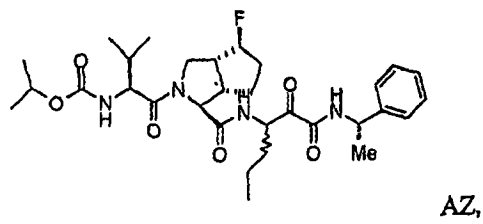
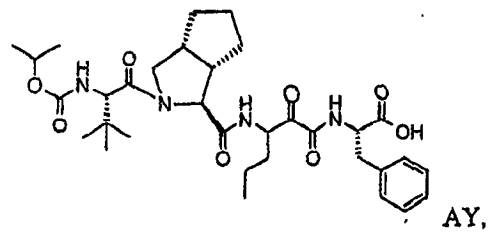
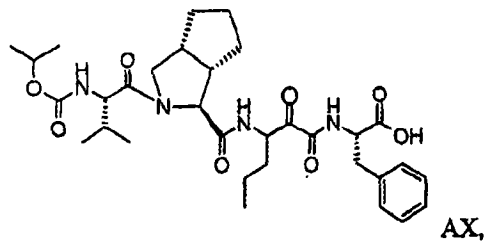
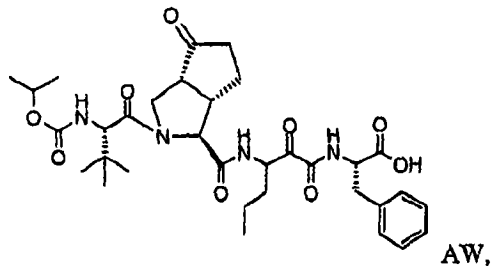
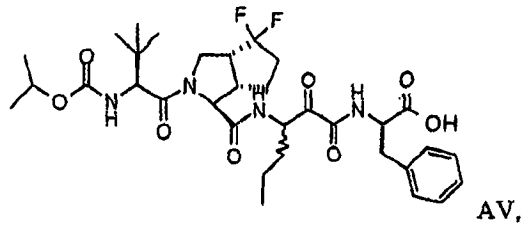
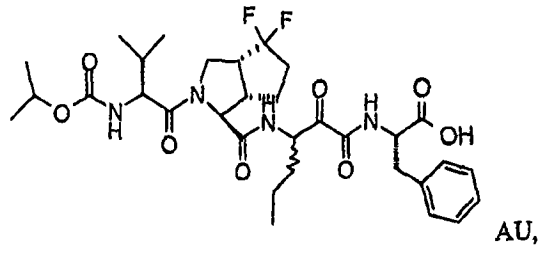


AN,

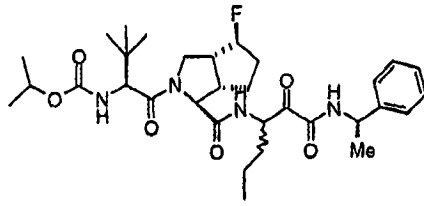
[0374]



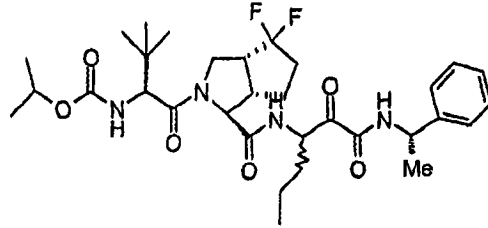
[0375]



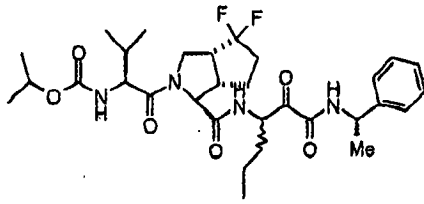
[0376]



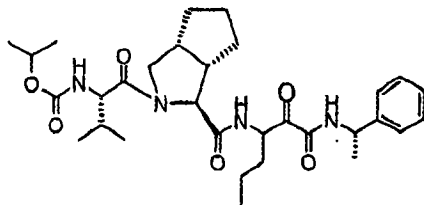
BA,



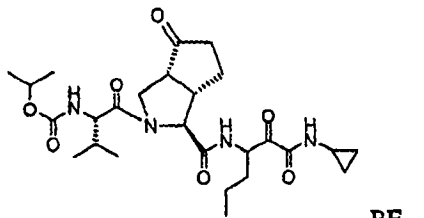
BB,



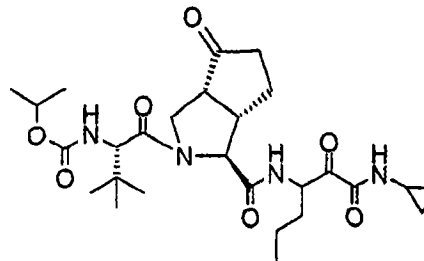
BC,



BD,

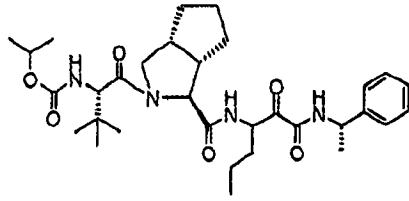


BE,

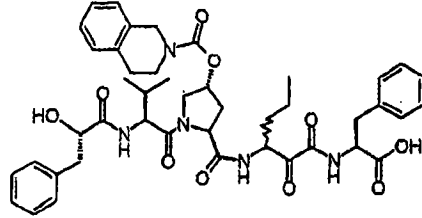


BF,

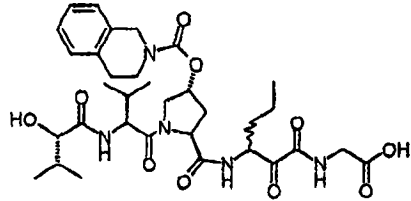
[0377]



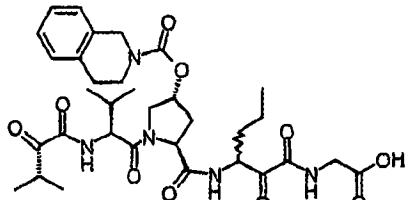
BG,



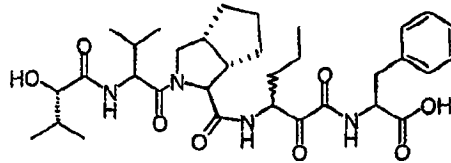
BH,



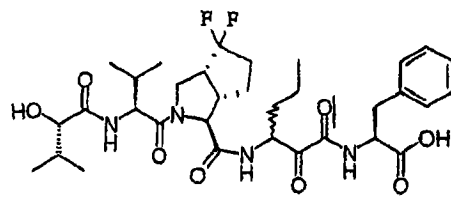
BI,



BJ,

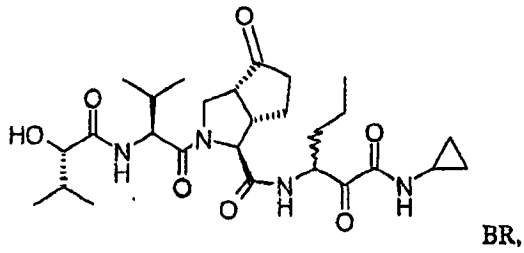
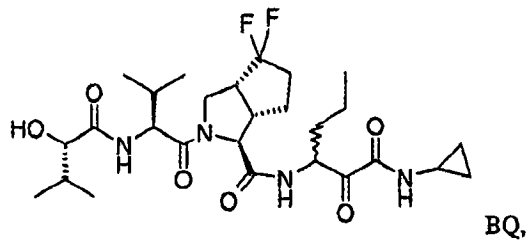
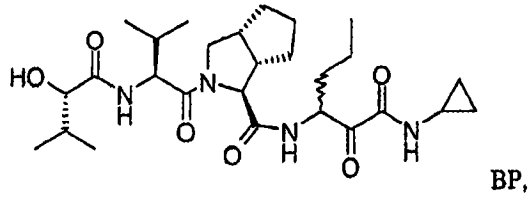
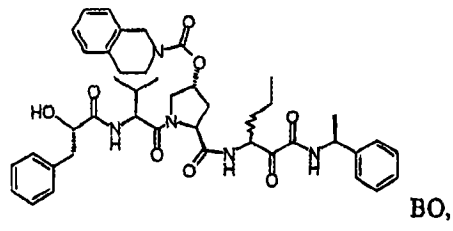
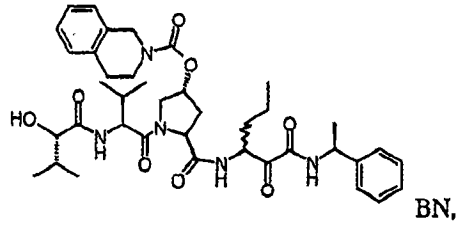
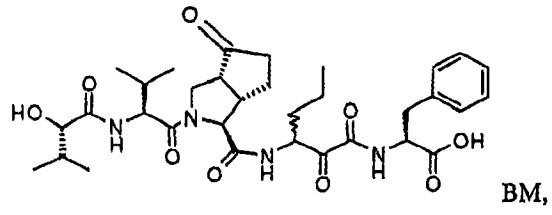


BK,

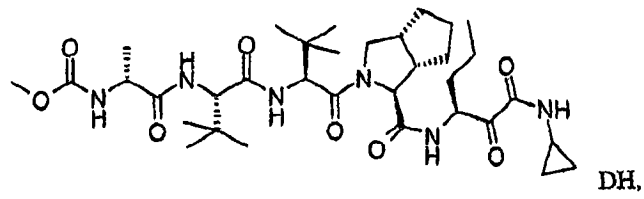
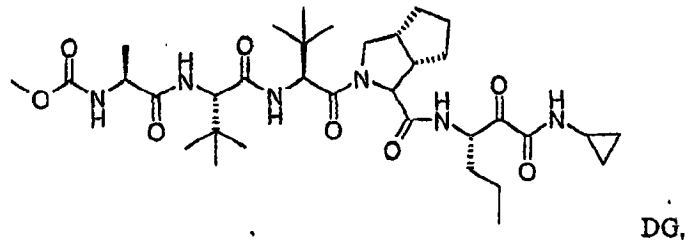
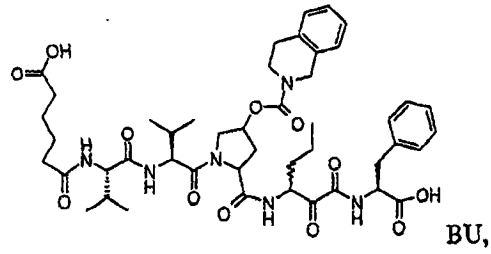
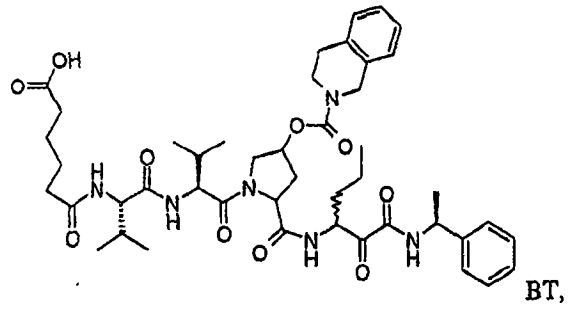
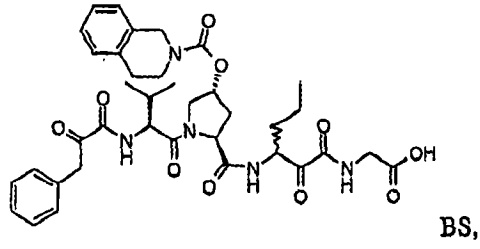


BL,

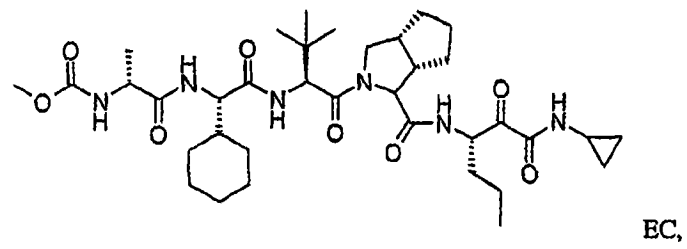
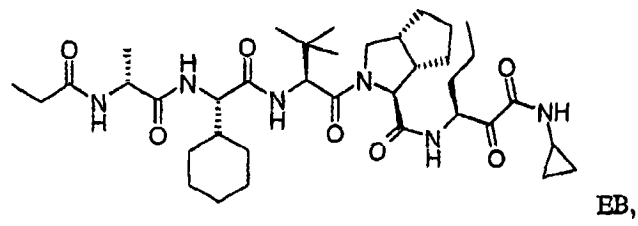
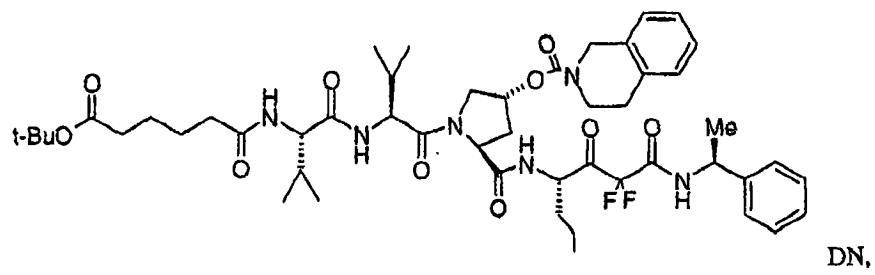
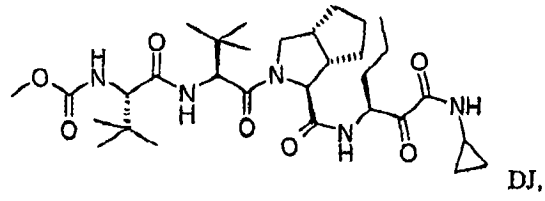
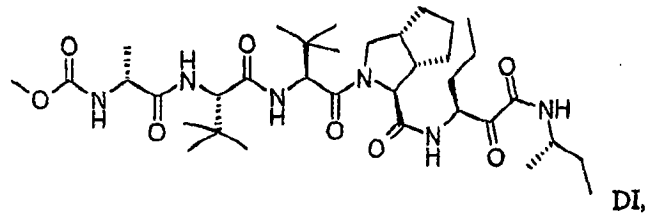
[0378]



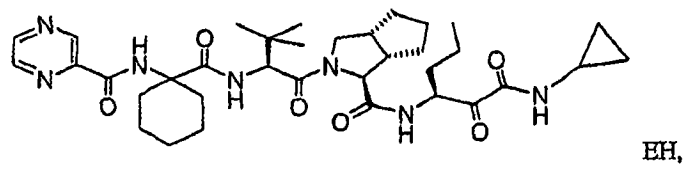
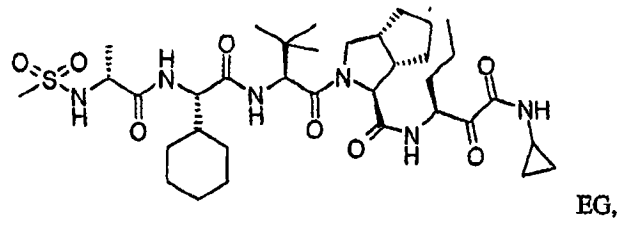
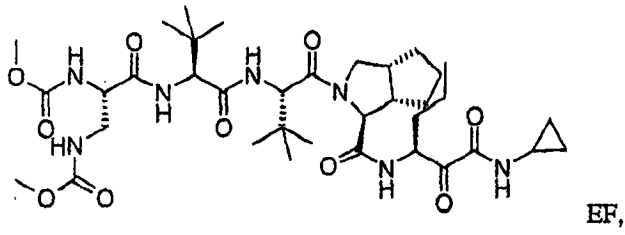
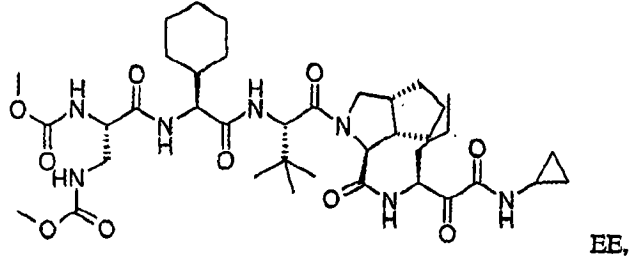
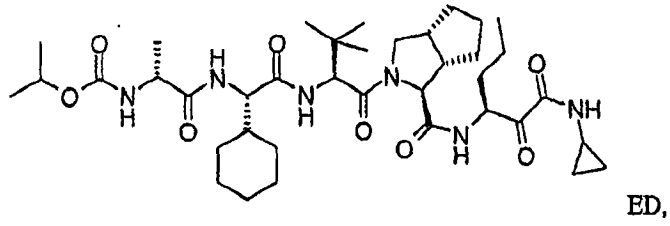
[0379]



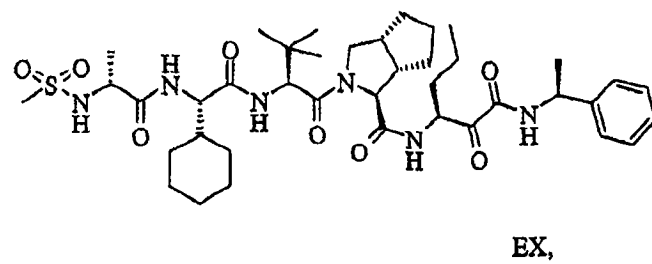
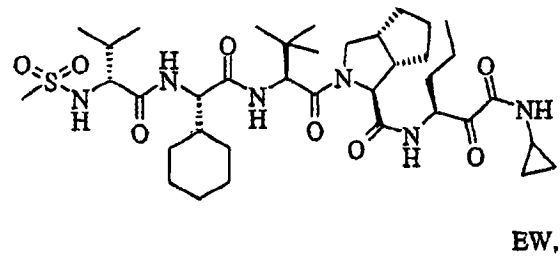
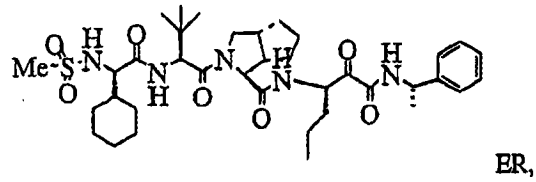
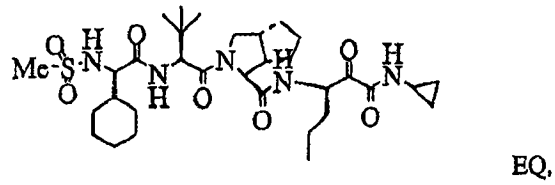
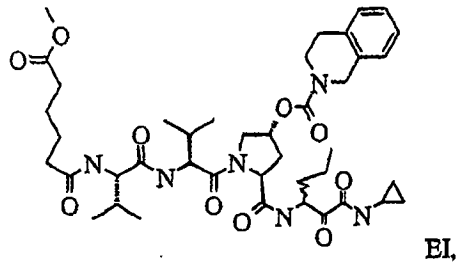
[0380]



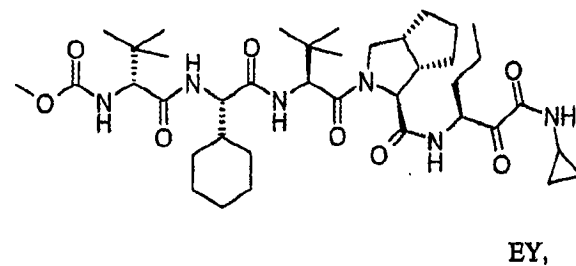
[0381]



[0382]

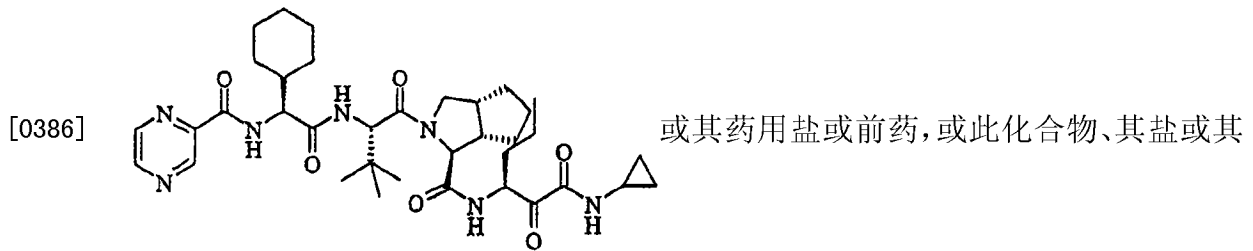


[0383]



[0384] 或其药用盐或前药,或此化合物、其盐或其前药的溶剂化物。

[0385] 本发明另一个优选的实施方式是下式的化合物



前药的溶剂化物。

[0387] 本发明的另一个优选的实施方式是式 1 的化合物, 其中:

[0388]  $R^0$  是一个键;

[0389]  $R^1$  是氢;


[0390]  $R^2$  是任选地被 1 至 3 个脂族基取代基取代的低级烷基; 或任选地被 1 至 3 个环取代基取代的低级环烷基;

[0391]  $R^3$  和  $R^5$  彼此独立地是任选地被 1 至 3 个脂族基取代基取代的亚甲基;

[0392]  $R^4$ 、 $R^6$ 、 $R^8$  和  $R^{10}$  是氢;

[0393]  $R^7$  是被环烷基, 低级烷基或芳基取代的亚甲基; 或任选地被环烷基, 低级烷基或芳基取代的 (1,1- 或 1,2-) 环烯基;

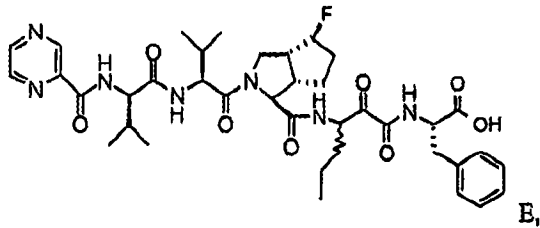
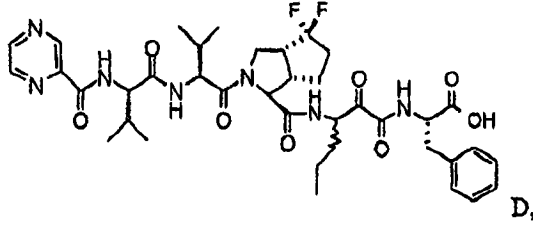
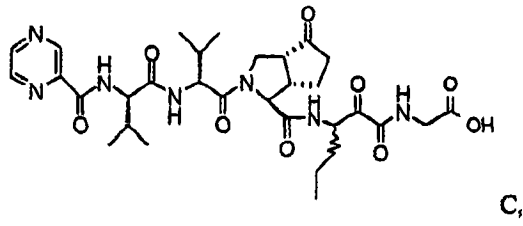
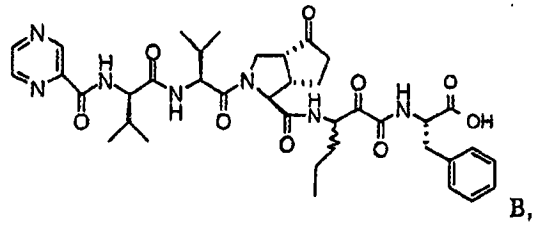
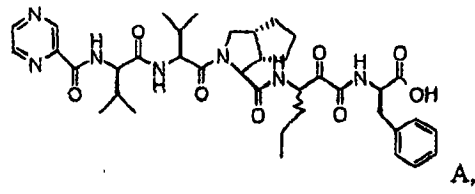
[0394]  $R^9$  是任选地被 1 至 3 个脂族基取代基取代的低级烷基; 或任选地被 1 至 3 个环基团取代基取代的杂芳基; 或任选地被 1 至 3 个环基团取代基取代的杂环;

[0395]  是任选地被 1 至 3 个环基团取代基取代的单环氮杂环基、多环氮杂环基或多环氮杂环烯基; 且

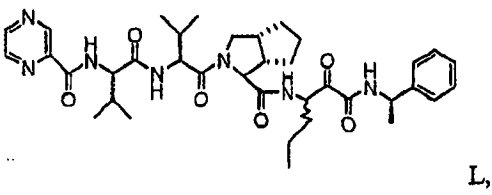
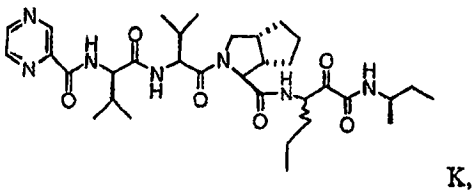
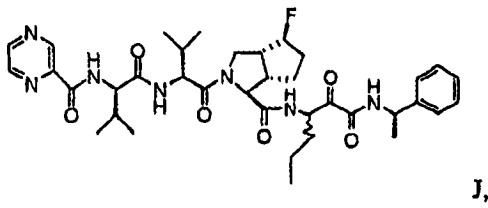
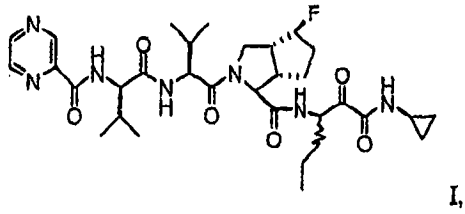
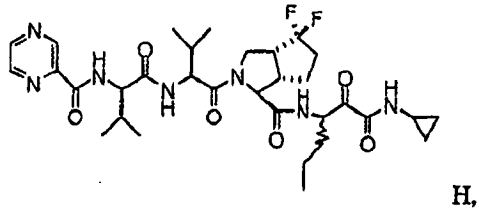
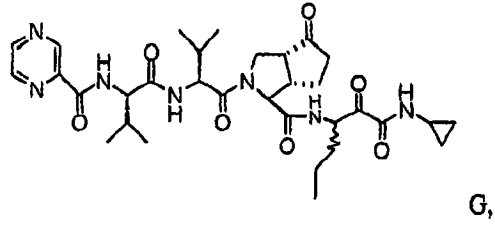
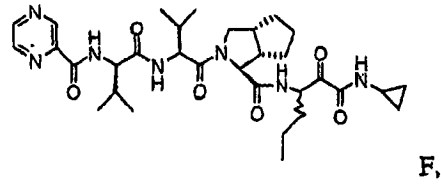
[0396] L 是  $-C(O)-$ 、 $-OC(O)-$ 。

[0397] 本发明另一个优选的实施方式是选自下述的化合物:

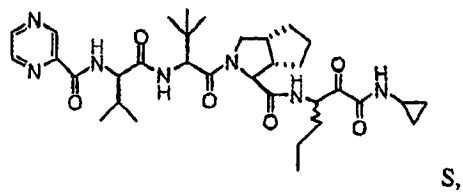
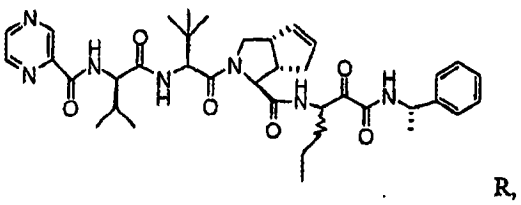
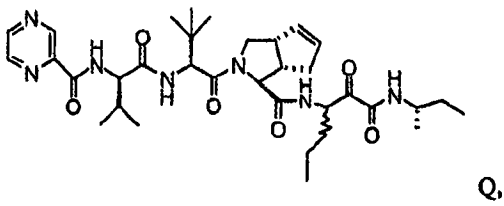
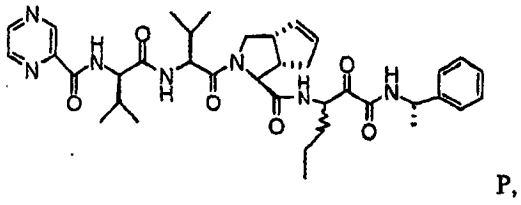
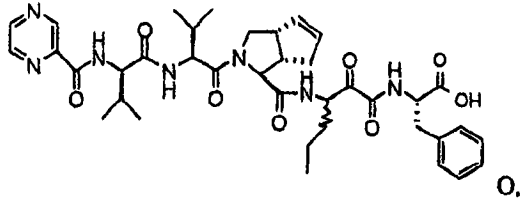
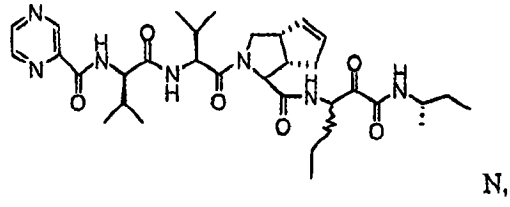
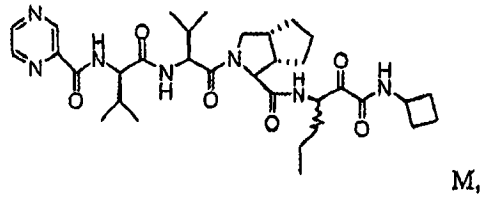
[0398]



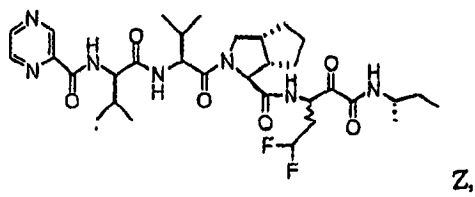
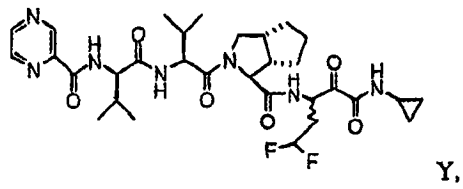
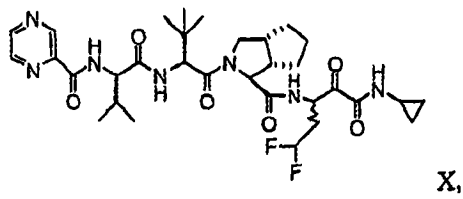
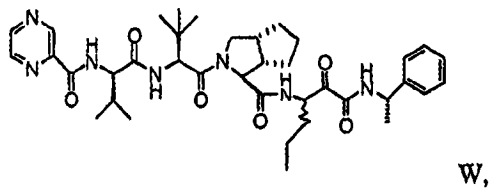
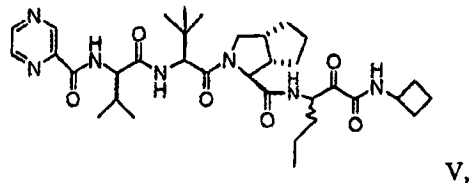
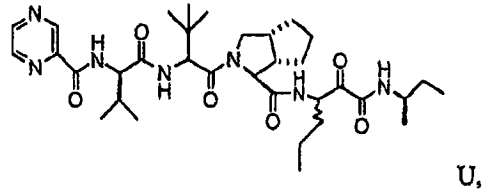
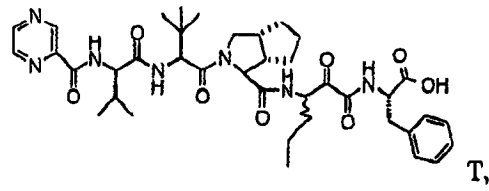
[0399]



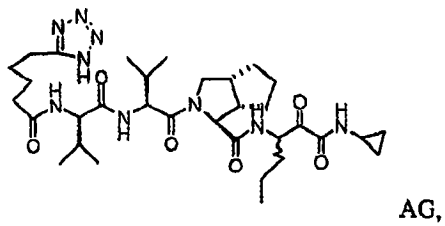
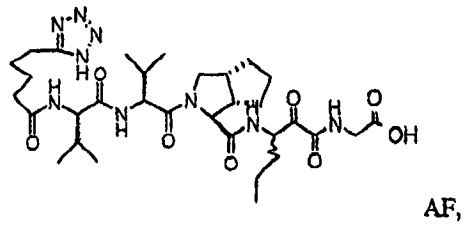
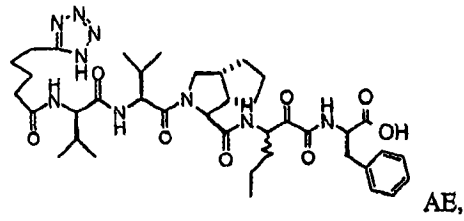
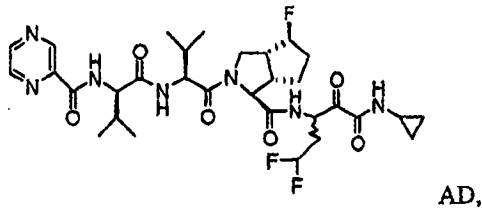
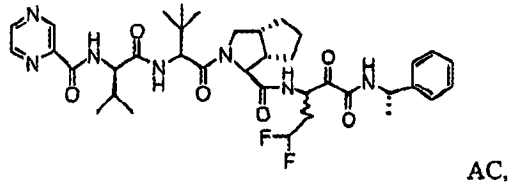
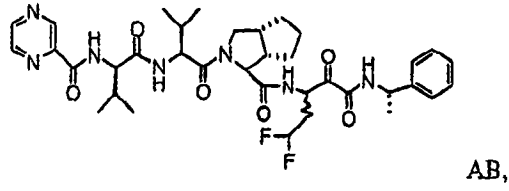
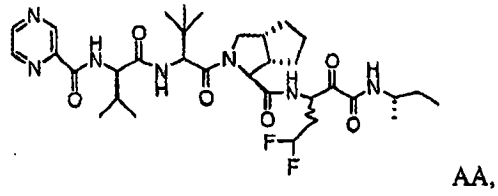
[0400]



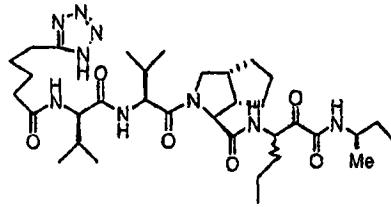
[0401]



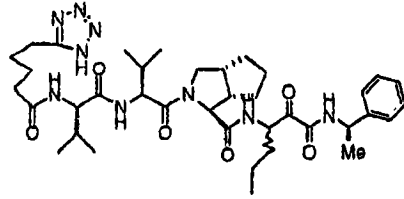
[0402]



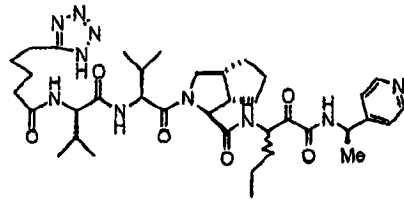
[0403]



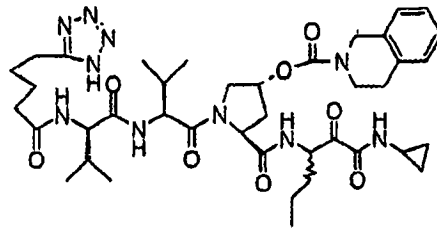
AH,



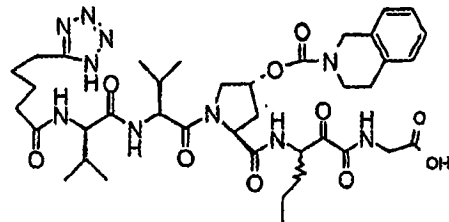
AI,



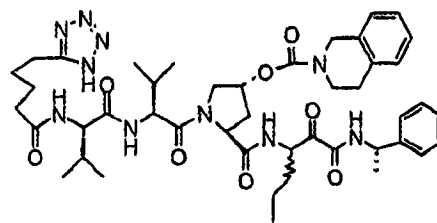
AJ,



AK,

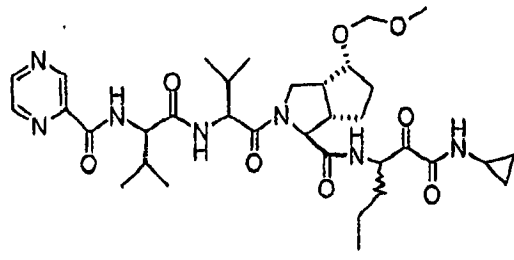


AL,

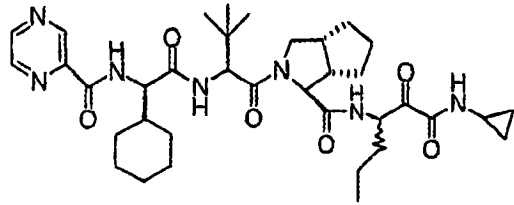


AM,

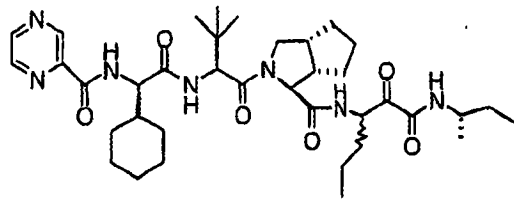
[0404]



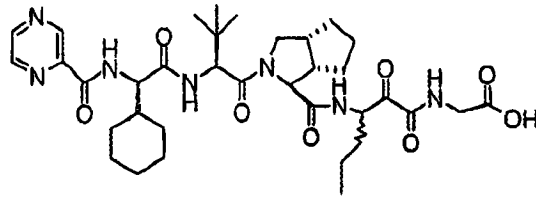
BV,



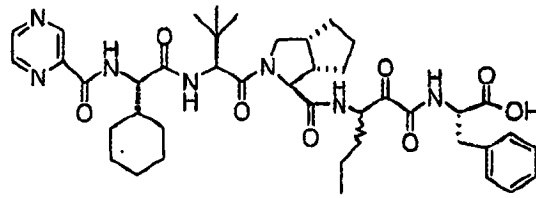
BW,



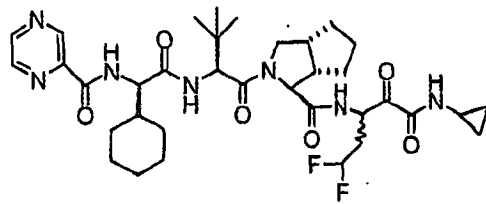
BX,



BY,

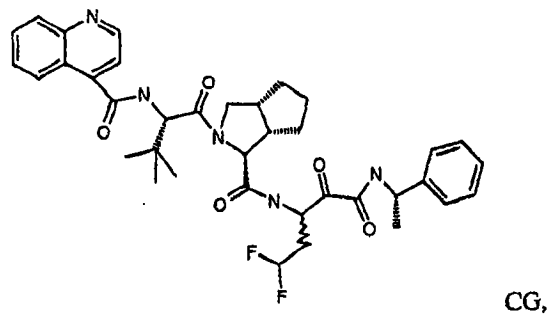
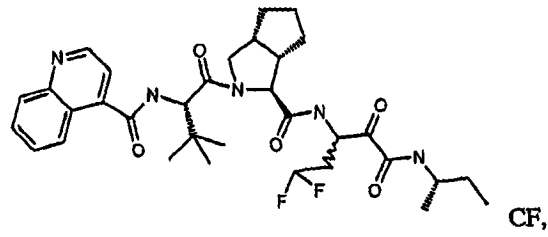
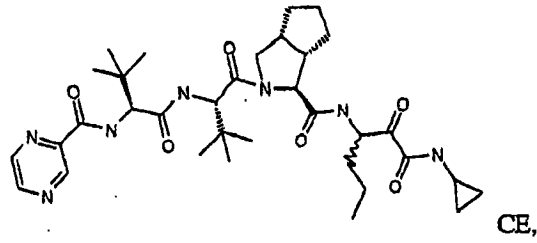
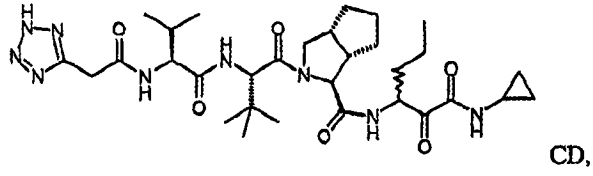
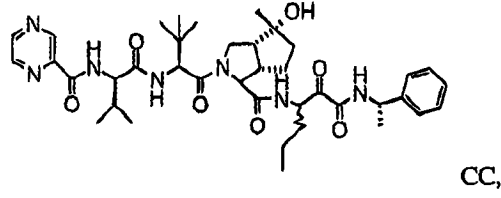
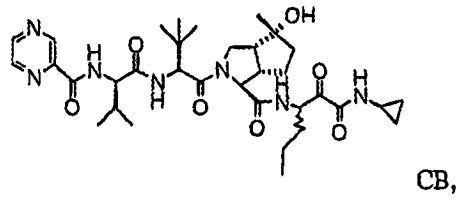


BZ,

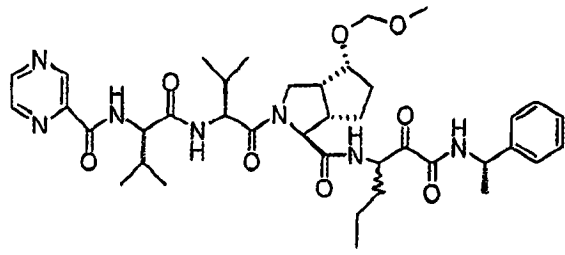


CA,

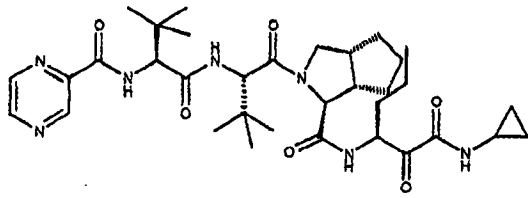
[0405]



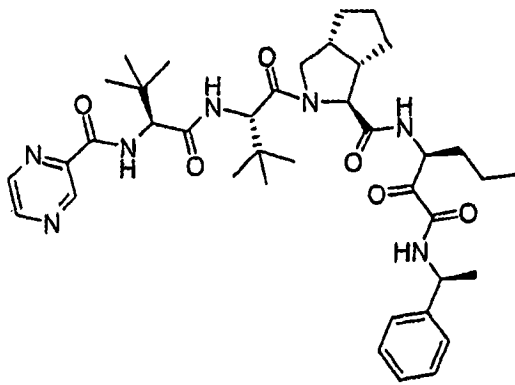
[0406]



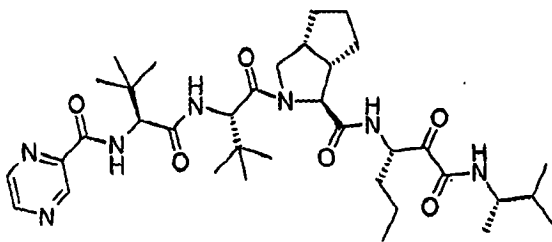
CH,



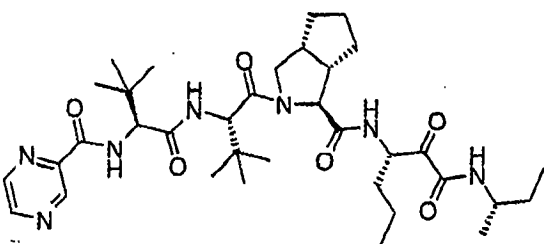
CI,



CJ,

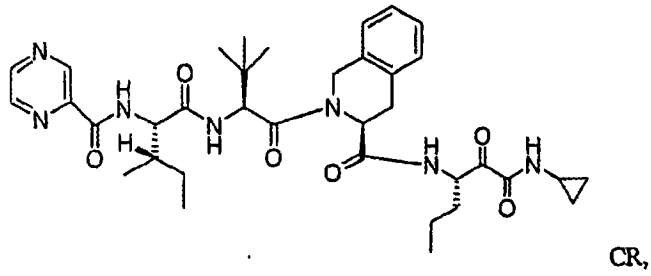
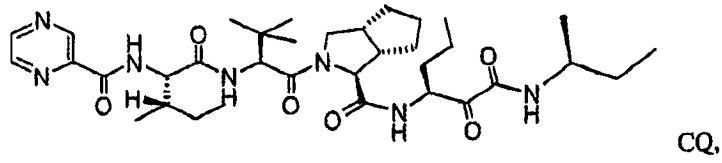
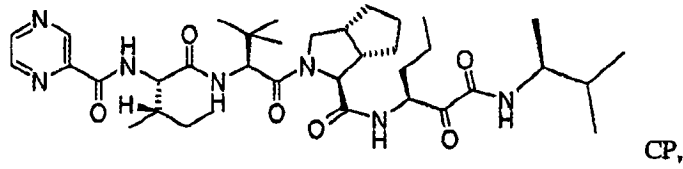
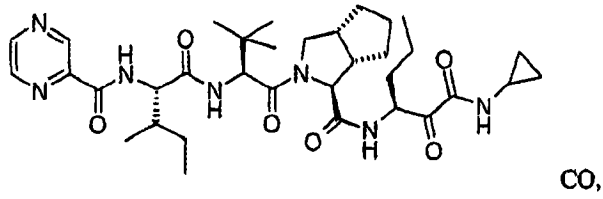
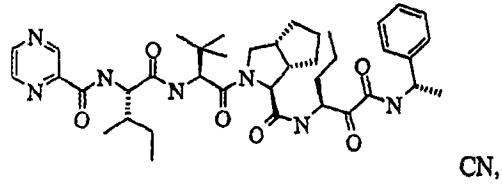
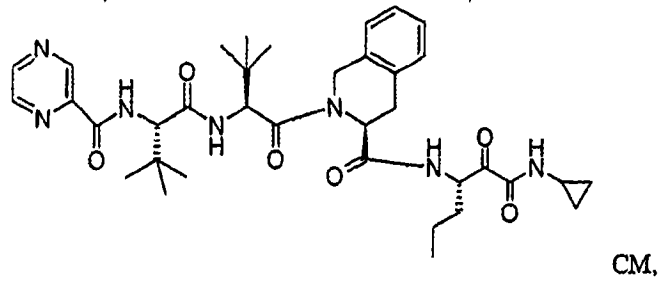


CK,

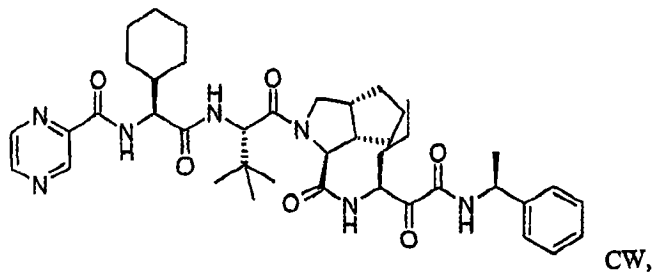
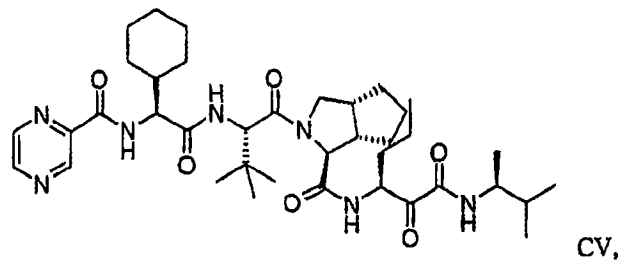
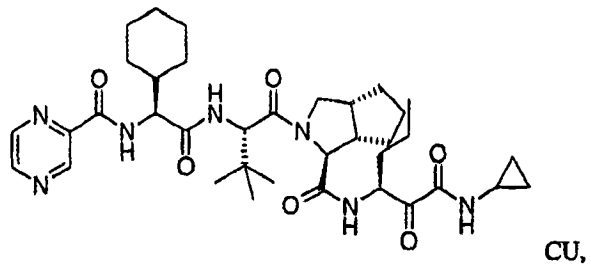
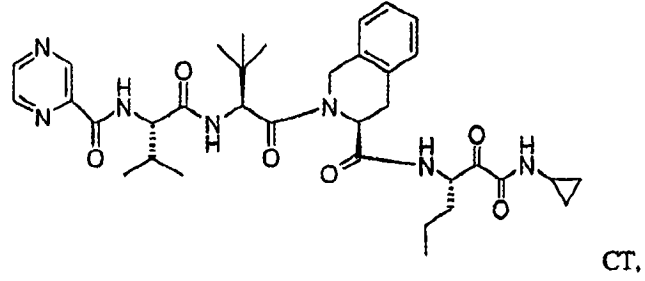
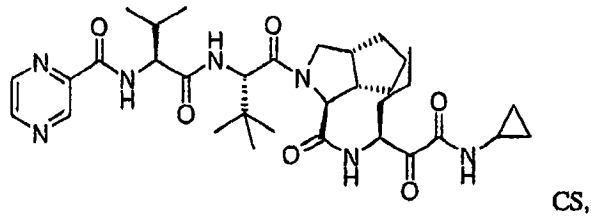


CL,

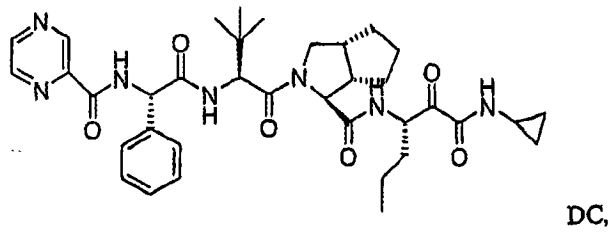
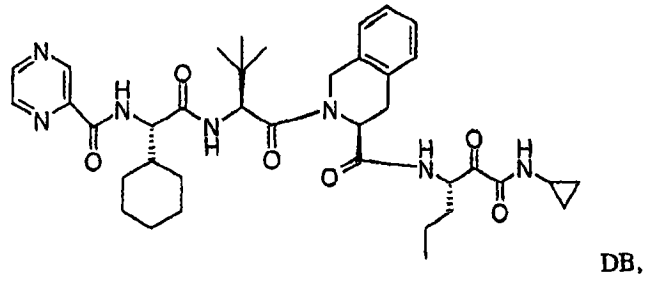
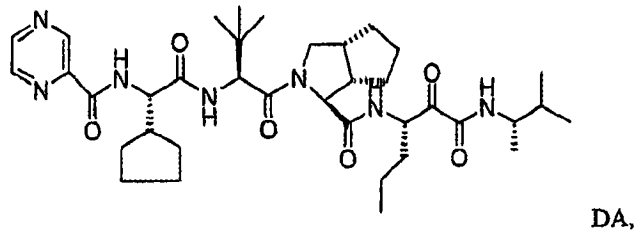
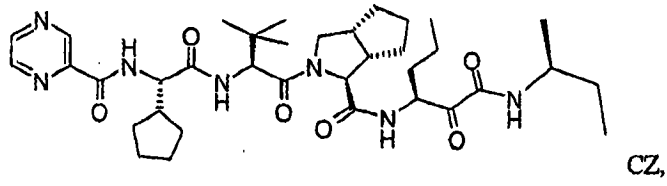
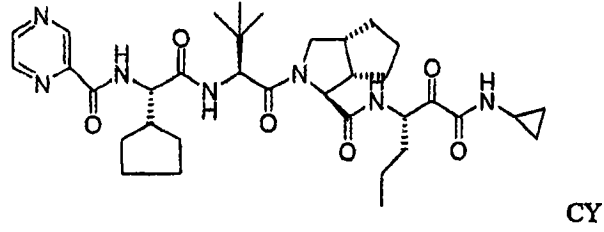
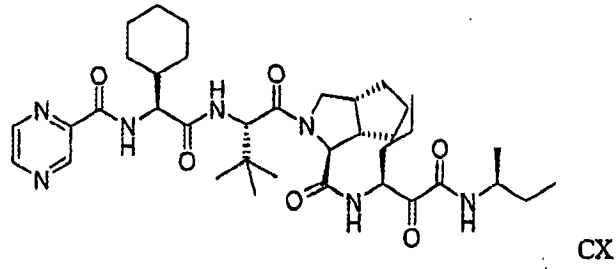
[0407]



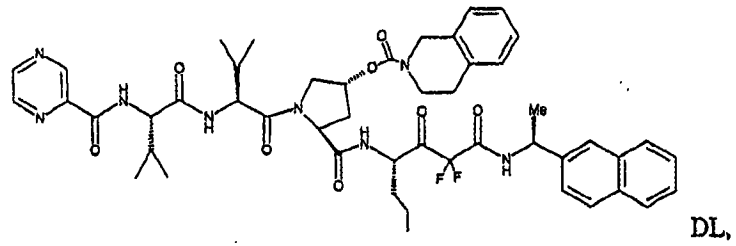
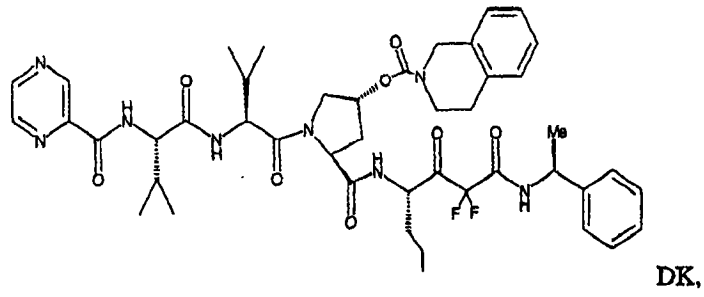
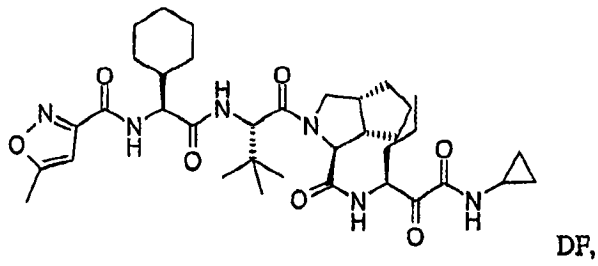
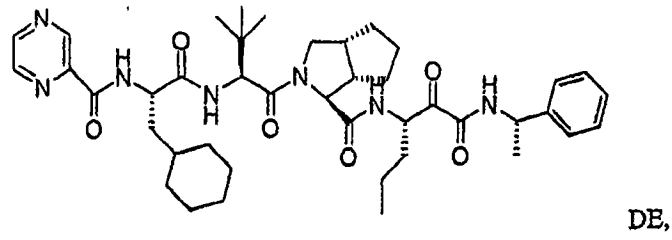
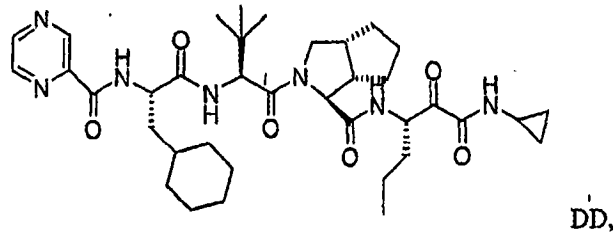
[0408]



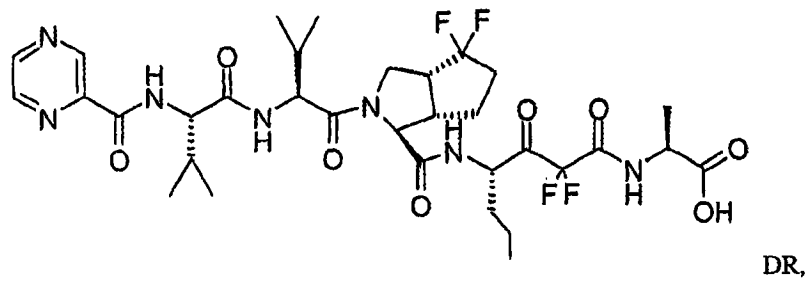
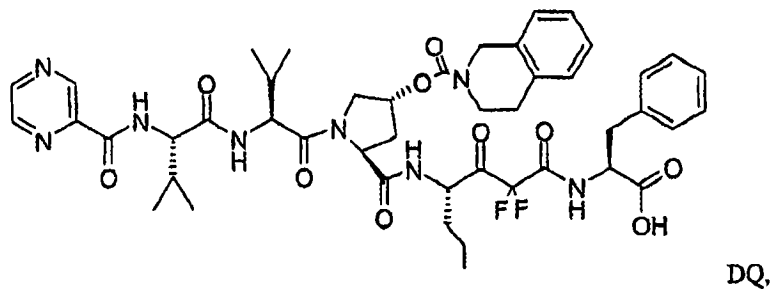
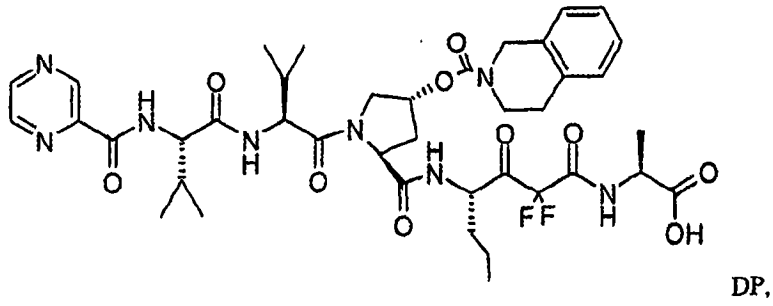
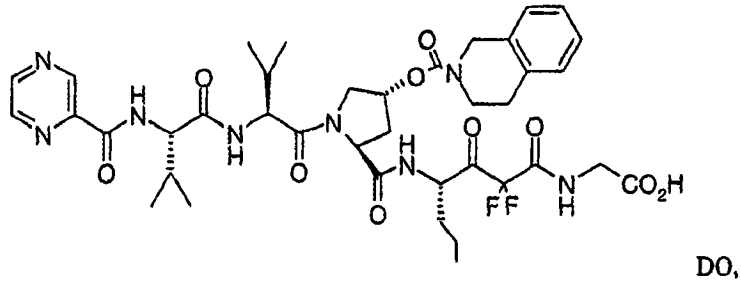
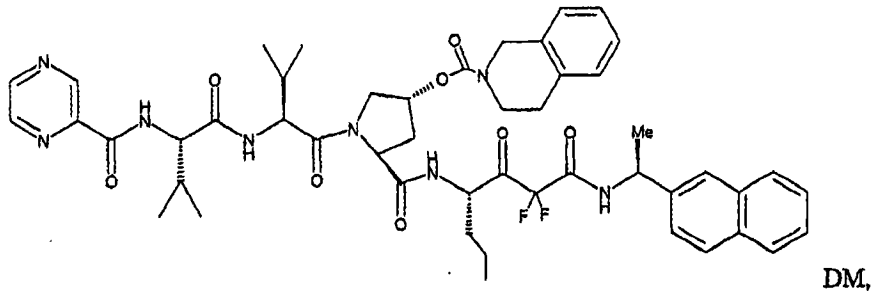
[0409]



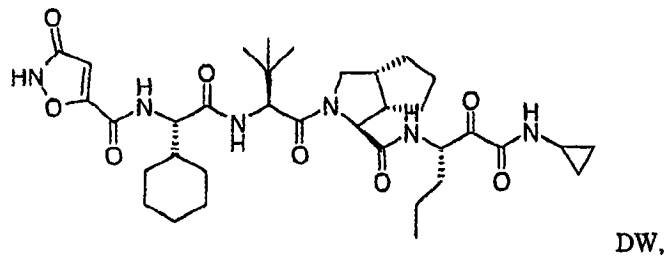
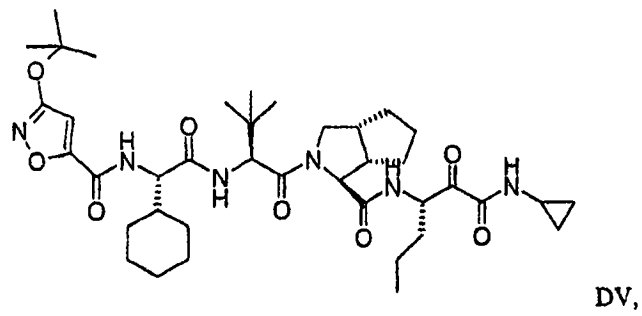
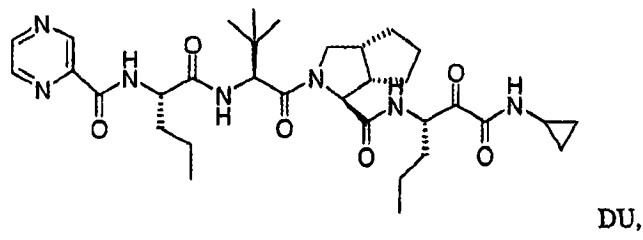
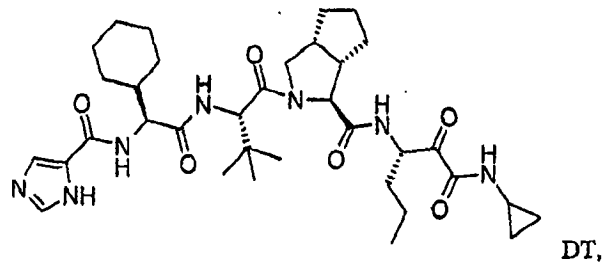
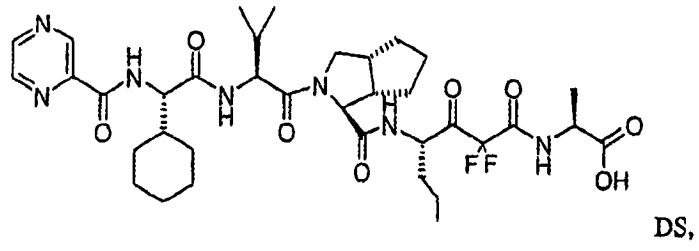
[0410]



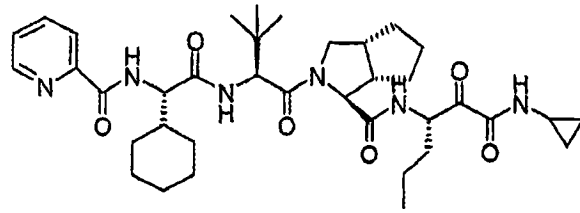
[0411]



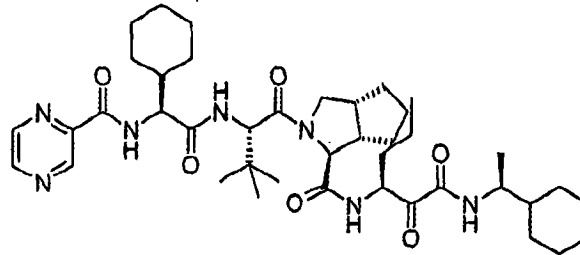
[0412]



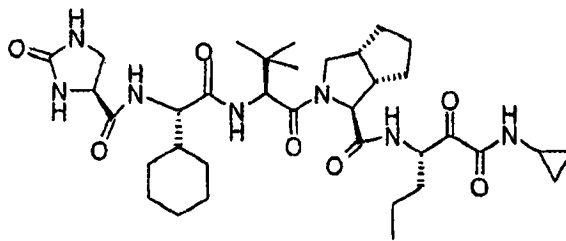
[0413]



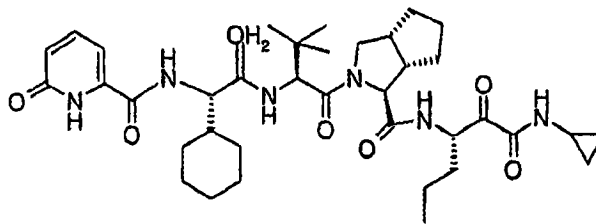
DX,



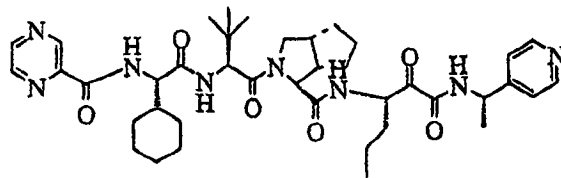
DY,



DZ,

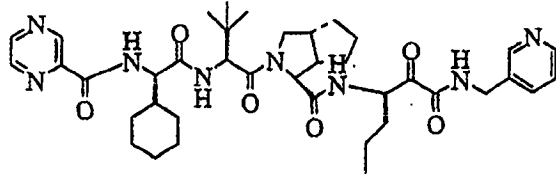


EA,

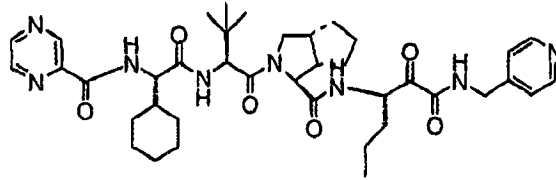


EJ,

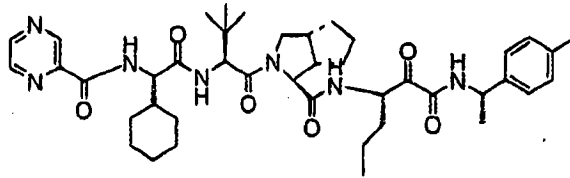
[0414]



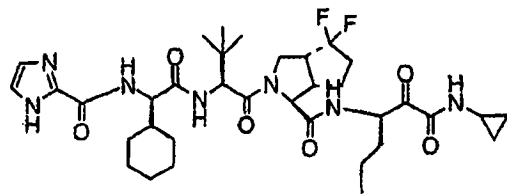
EK,



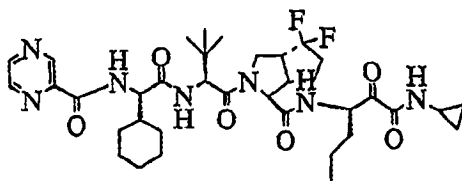
EL,



EM,

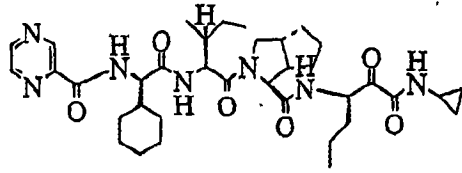


EN,

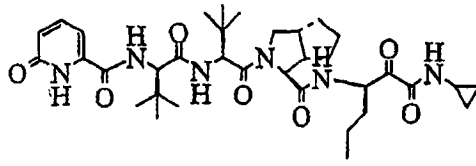


EO,

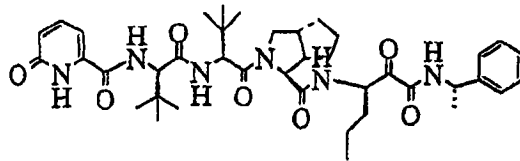
[0415]



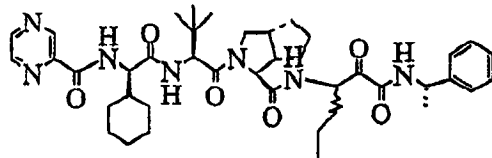
EP,



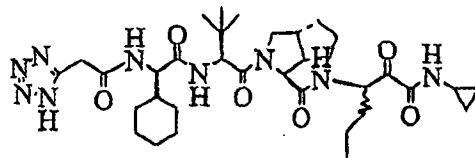
ES,



ET,

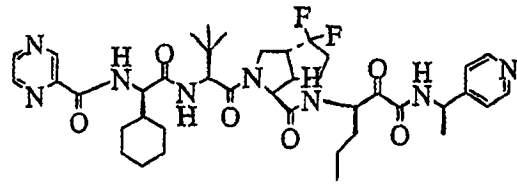


EU,

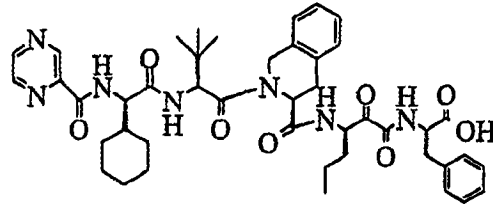


EV,

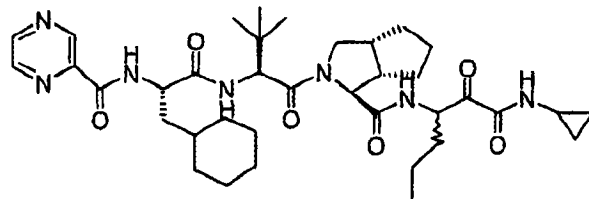
[0416]



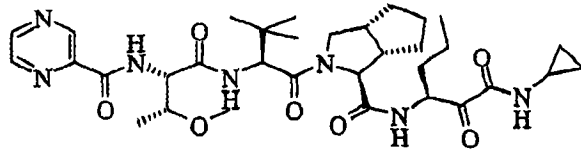
EZ,



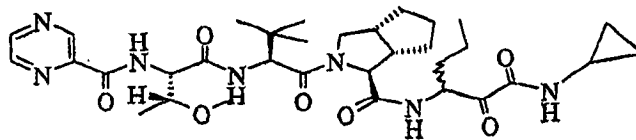
FA,



FB,

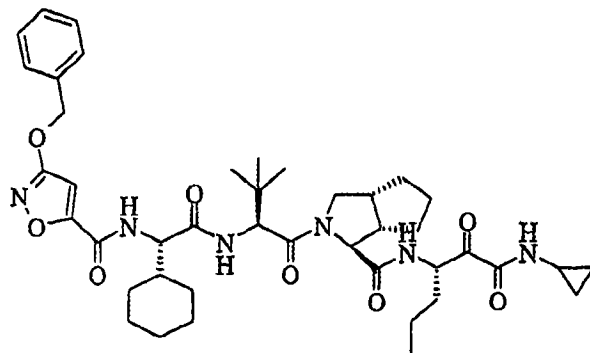


FC,

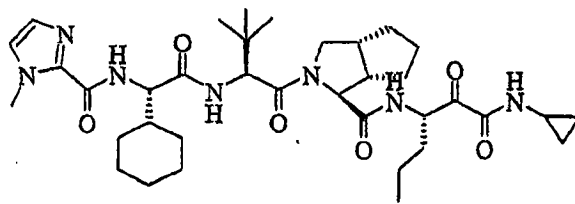


FD,

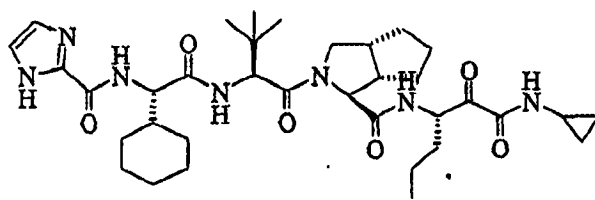
[0417]



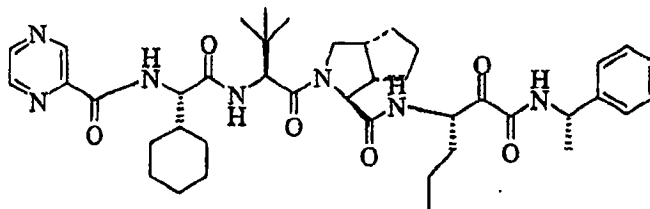
FE,



FF,



FG, 和



FH,

[0418] 或其药用盐或前药,或此化合物、其盐或其前药的溶剂化物。

[0419] 本发明另一个优选的实施方案是式 1 的化合物,其中  $R^9$  的任选地被取代的脂族基,任选地被取代的环基团或任选地被取代的芳族基被至少一个杂芳基取代基取代。

[0420] 本发明另一个优选的实施方案是式 1 的化合物,其中  $R^9$  的任选地被取代的芳族基是任选地被取代的杂芳基。

[0421] 本发明另一个优选的实施方案是式 1 的化合物,其中  $R^9$  的任选地被取代的脂族基是任选地被取代的烷基杂芳基。

[0422] 本发明另一个优选的实施方案是以下的化合物,其中  $R^9$  的任选地被取代的杂芳基是吡嗪基、四唑基、喹啉基、咪唑基、异噁唑基和吡啶酮基 (pyradonyl),所述基团任选地被环基团取代基取代。

[0423] 本发明的化合物任选地作为其盐供应。这些可药用盐具有特殊的意义,因为它们

可为医药用途而将前述化合物给药。不可药用的盐可用于生产过程中,用于分离和纯化目的,在某些时候,可于分离本发明化合物的立体异构形式。后者特别真实的情形是由旋光胺制备的胺盐。

[0424] 在本发明的化合物包含羧基时,或者足够的酸性生物等排体时,可形成碱加成盐,碱加成盐是一种更为便利使用的形式;实际上,盐形式的使用内在地等同于使用游离酸形式。

[0425] 同样,当本发明的化合物包含碱性基团时,或者足够的碱性生物等排体时,可形成酸加成盐,酸加成盐是一种更为便利使用的形式;实际上,盐形式的使用内在地等同于使用游离碱形式。

[0426] 本发明方法的优选的实施方案是一种用于对患有 HCV 感染或与该感染相关的生理学病症的患者进行治疗,包括向患者给药药理学有效量的式 1 的化合物。

[0427] 本发明治疗方法的另一个优选的实施方案是用于对患有 HCV 感染或与该感染相关的生理学病症的患者进行治疗,包含向患者联合给药药理学有效量的式 1 化合物和药理学有效量的另一种抗 HCV 治疗剂。

[0428] 本发明的另一个目的是提供药物组合物,其除包含一种或多种 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂之外,还包含一种或多种显示抗 HCV 活性的干扰素和 / 或一种或多种具有抗 HCV 活性的化合物,包括免疫调节化合物如显示 HCV 抗病毒活性的免疫刺激性细胞因子,和可药用载体或稀释剂。

[0429] 本发明的另一个目的是提供一种药物组合物,其有效地用于及其本身用于效益联合治疗,因为其包含多种可依据本发明使用的活性组分。

[0430] 本发明也提供组合两种或更多种用于治疗或预防患者 HCV 感染的活性成分的药盒或单个药包。药盒可提供(单独或与可药用稀释剂或载体一起)式 1 的化合物和另外的活性组分(单独或与稀释剂或载体组合)其它抗 HCV 治疗剂。

[0431] 式 1 的化合物可采用或改进迄今采用或在文献中描述的公知的方法制备,或者采用本发明中的方法制备。

[0432] 本发明的另一个目的是提供治疗或预防有此需要的患者中 HCV 感染的方法,包含向所述患者联合给药药理学有效量的一种或多种 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂;一种或多种显示抗 HCV 活性的干扰素;和 / 或一种或多种具有抗 HCV 活性的化合物包括免疫调节化合物如显示 HCV 抗病毒活性的免疫刺激性细胞因子。

[0433] 本发明的另一个目的是一种或多种 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂与一种或多种显示抗 HCV 活性的干扰素和 / 或一种或多种具有抗 HCV 活性的化合物,包括免疫调节化合物如显示 HCV 抗病毒活性的免疫刺激性细胞因子的组合在制备用于治疗或预防有此需要的患者 HCV 感染的药物中的用途。

[0434] 本发明的另一个目的是一种用于治疗或预防患者中 HCV 感染的药盒或药包,其中,所述药盒或药包包含多个分开的容器,其中至少一个所述容器包含一种或多种 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂,至少另一种所述容器包含一种或多种干扰素或能够诱导产生显示抗 HCV 活性的干扰素的化合物(单独或与可药用载体或稀释剂组合),以及任选地,至少另一种所述容器包含一种或多种具有抗 HCV 活性的化合物(单独或与可药用载体或稀释剂组合),包括免疫调节化合物如显示 HCV 抗病毒活性的免疫刺激性细胞因子。

[0435] 本发明的另一个目的是提供一种抑制细胞中丙型肝炎病毒复制的方法,包括使所述细胞、丙型肝炎病毒丝氨酸蛋白酶抑制剂,和任选的能够诱导产生具有抗丙型肝炎病毒活性的干扰素的干扰素或化合物进行接触。

[0436] 在上述各种应用中 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂、干扰素或抗 HCV 化合物的用量均可以是药理学有效量、亚临床抗 HCV 有效量或其组合,只要 HCV 蛋白酶抑制剂,干扰素,和 / 或抗 HCV 化合物的最终浓度包含药理学有效量的能够有效地治疗或预防患者中 HCV 感染的化合物。

[0437] 本发明的另一个目的是提供一种制备用于制备式 1 化合物的手性双环脯氨酸酯化合物的方法。

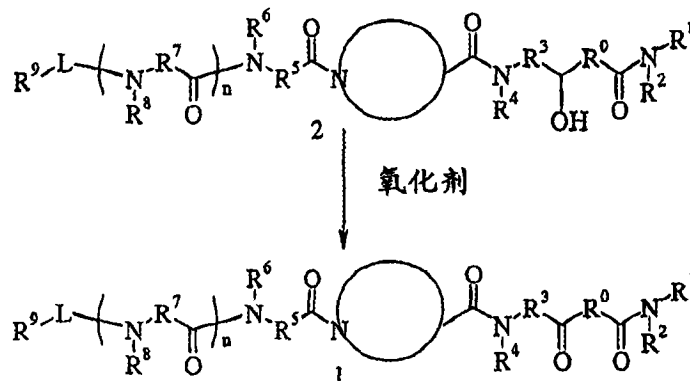
#### [0438] 本发明化合物的制备

[0439] 本发明化合物的原料和中间体可按照公知方法或公知方法的改进形式,例如在参考实施例中所述的方法或它们明显的化学等同方法制备。

[0440] 本发明化合物可采用公知方法或公知方法的改进形式制备,其中公知方法是指迄今使用的方法或在文献中所述的方法,例如以下述文献中所述的方法:R. C. Larock, 综合的有机转化 (Comprehensive Organic Transformations), VCH 出版者 (1989)。

[0441] 式 1 的化合物,其中变量和其  $\text{N}$  部分如本文所述,可通过处理式 2 的化合物来制备,

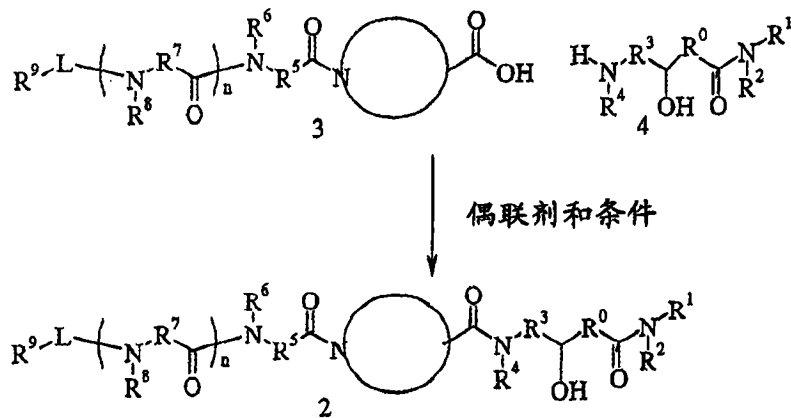
[0442]



[0443] 其中,变量和其  $\text{N}$  部分如本文所述,其中所述处理是采用适宜的氧化剂,并在适宜的条件下进行。具体的氧化剂是 DMP 试剂。具体的条件包括在适宜的有机溶剂如二氯甲烷中在约室温下进行氧化。

[0444] 式 2 的化合物,其中变量和其  $\text{N}$  部分如本文所述,可以由式 3 化合物与式 4 化合物的偶联反应制备,其中变量和其  $\text{N}$  部分如本文所述,

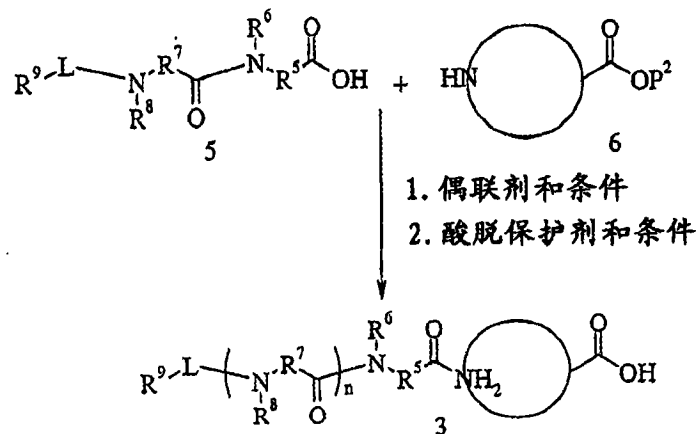
[0445]



[0446] 其中其变量如本文所述,该反应采用适宜的偶联剂,并在适宜的条件下进行。具体的偶联剂和条件包括采用适宜有机溶剂如 DMF 中的 DIC 和 HOAt,在约 0°C 下进行,或者采用在适宜的有机溶剂如二氯甲烷中的 PyBop 和 DIPEA,在约室温下进行。

[0447] 式 3 的化合物,其中变量和其  $\text{N}$  部分如本文所述,可以由式 5 的化合物与式 6 的化合物通过偶联反应制备,其中其变量如本文所述,

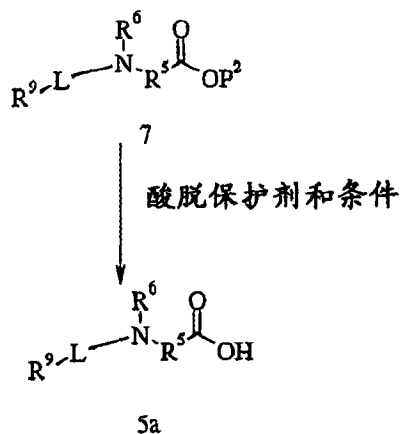
[0448]



[0449] 其中  $\text{P}^2$  是酸保护基,并且其  $\text{N}$  部分如本文所述,该反应采用适宜的偶联剂,并在适宜的偶联条件下进行,接着用适宜的脱保护剂和适宜的脱保护条件下进行。具体的偶联剂和条件包括采用在适宜有机溶剂如 DMF 或二氯甲烷中的 DIC、DCC 和 HOAt,在约 0°C 至约室温下进行。脱保护反应采用适宜的脱保护剂,这取决于保护剂的性质,即,是否其是在酸性、碱性或氢化条件下可脱除(不稳定),以及进行脱保护的化合物中的其它反应性部分,即选择脱保护剂以进行脱保护,但不影响其它反应性部分,除非希望有伴随反应。具体的酸保护剂为  $\text{C}_1$  至  $\text{C}_8$  低级烷基;更具体的是甲基。具体的脱保护剂是无机碱如碱金属氢氧化物;更具体的是 NaOH。具体的脱保护条件包括在醇溶剂如甲醇或乙醇中,在约室温下进行脱保护。

[0450] 式 5 的化合物,其中  $n$  为 0,其它变量如本文所述,即化合物 5a,可以通过使式 7 的化合物脱保护制备

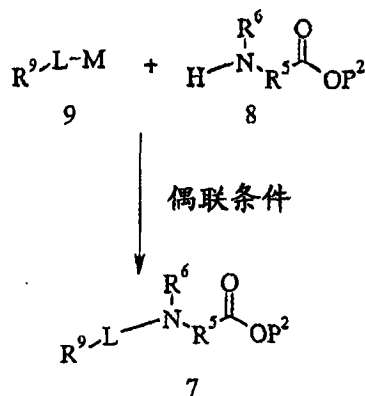
[0451]



[0452] 其中 P<sup>2</sup> 是酸保护基团,且其它变量如本文所述,该反应采用适宜的脱保护剂,并在适宜的条件下进行。脱保护反应采用适宜的脱保护剂,这取决于保护剂的性质,即,是否其是在酸性、碱性或氢化条件下可脱除(不稳定),以及进行脱保护的化合物中的其它反应性部分,即选择脱保护剂以进行脱保护,但不影响其它反应性部分,除非希望有伴随反应。具体的酸保护剂为 C<sub>1</sub> 至 C<sub>8</sub> 低级烷基;更具体的是甲基。具体的脱保护剂是无机碱如碱金属氢氧化物;更具体的是 NaOH。具体的脱保护条件包括在醇溶剂如甲醇或乙醇中,在约室温下进行脱保护。

[0453] 式 7 的化合物,其中其变量如本文所述,可以通过式 8 的化合物(其中变量如本文所述)用式 9 的化合物(其中 M 是可置换的部分,其它变量如本文所述)进行酰基化反应制备

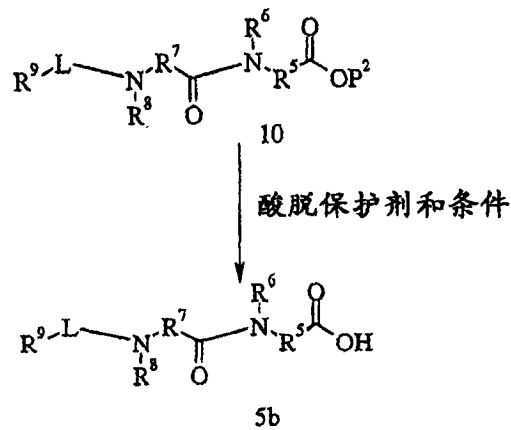
[0454]



[0455] 该反应在适宜的条件下进行。具体的偶联条件是采用在适宜的有机溶剂如 DMF 或二氯甲烷中的 DIC 或 DCC 和 HOAt,在约 0°C 至约室温下进行,或者是在适宜的有机溶剂如 DMF 或二氯甲烷中的 PyBop 和 DIPEA 在约室温下进行;优选后一种条件。具体的 L 是羰基。具体的 M 是羟基或 N-氧基琥珀酰亚胺。

[0456] 式 5 的化合物,其中 n 为 1 和其它变量如本文所述,即,化合物 5b,可以由式 10 的化合物脱保护制备,

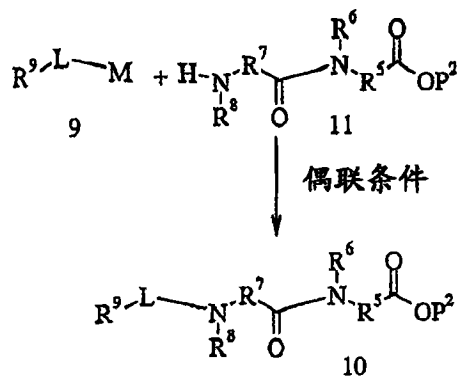
[0457]



[0458] 其中 P<sup>2</sup> 是酸保护基, 且其它变量如本文所述, 该反应采用适宜的脱保护剂, 并在适宜的条件下进行。脱保护反应采用适宜的脱保护剂, 这取决于酸保护剂的性质, 即, 是否其是在酸性、碱性或氢化条件下可脱除 (不稳定), 以及进行脱保护的化合物中的其它反应性部分, 即选择脱保护剂以进行脱保护, 但不影响其它反应性部分, 除非希望有伴随反应。具体的酸保护剂为 C<sub>1</sub> 至 C<sub>8</sub> 低级烷基; 更具体的是甲基。具体的脱保护剂是无机碱如碱金属氢氧化物; 更具体的是 NaOH。具体的脱保护条件包括在醇溶剂如甲醇或乙醇中, 在约室温下进行脱保护。

[0459] 式 10 的化合物, 其中变量如本文所述, 可以通过式 11 的化合物 (其中变量如本文所述) 用式 9 的化合物 (其中变量如本文所述) 进行酰基化反应制备

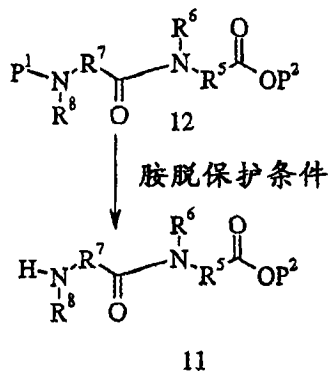
[0460]



[0461] 该反应在适宜的条件下进行。具体的偶联条件是采用在适宜的有机溶剂如 DMF 或二氯甲烷中的 DIC 或 DCC 和 HOAt, 在约 0°C 至约室温下进行, 或者是在适宜的有机溶剂如 DMF 或二氯甲烷中的 PyBop 和 DIPEA 在约室温下进行; 优选后一种条件。具体的 L 是羰基。具体的 M 是羟基或 N-氧基琥珀酰亚胺。

[0462] 式 11 的化合物, 其中变量如本文所述, 可以由式 12 的化合物脱保护制备,

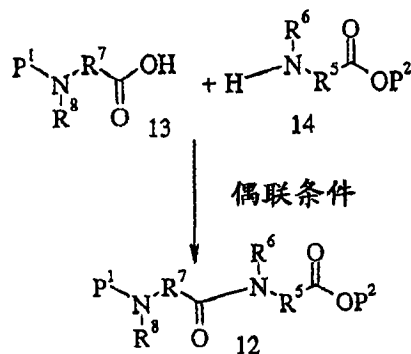
[0463]



[0464] 其中  $P^1$  是胺保护基, 且其它变量如本文所述, 该反应采用适宜的脱保护剂, 并在适宜的条件下进行。脱保护反应采用适宜的脱保护剂, 这取决于胺保护剂的性质, 即, 是否其是在酸性、碱性或氢化条件下可脱除 (不稳定), 以及进行脱保护的化合物中的其它反应性部分, 即选择脱保护剂以进行脱保护, 但不影响其它反应性部分, 除非希望有伴随反应。具体的胺保护剂是 Cbz 或 BOC; 更具体的是 Cbz。具体的脱保护剂是酸, 如 HCl 或  $H_2/Pd(OH)_2$ ; 更具体的是  $H_2/Pd(OH)_2$ 。具体的脱保护条件包括在醇溶剂如甲醇或乙醇或链烷酸烷基酯溶剂如乙酸乙酯中, 在约室温下进行脱保护。

[0465] 式 12 的化合物, 其中变量如本文所述, 可以通过式 13 的化合物 (其中变量如本文所述) 与式 14 的化合物 (其中变量如本文所述) 进行偶联反应制备

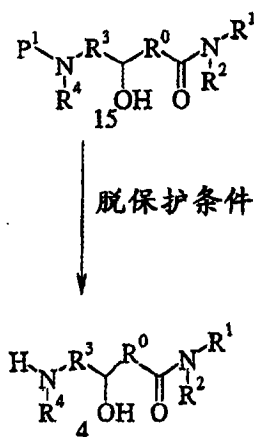
[0466]



[0467] 该反应在适宜的条件下进行。具体的偶联条件是采用在适宜的有机溶剂如 THF 中的 HOAt/DIC 和 DIPEA, 在约室温下进行。

[0468] 式 4 的化合物, 其中变量如本文所述, 可以由式 15 的化合物脱保护制备

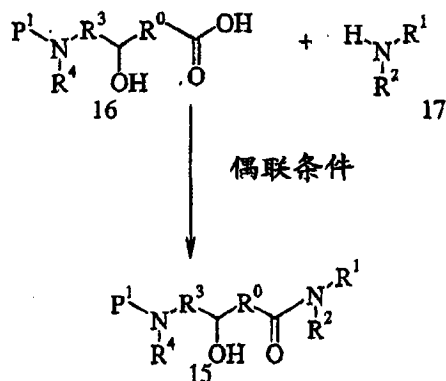
[0469]



[0470] 其中变量如本文所述,该反应采用适宜的脱保护剂,并在适宜的条件下进行。脱保护反应采用适宜的脱保护剂,这取决于胺保护剂的性质,即,是否其是在酸性、碱性或氢化条件下可脱除(不稳定),以及进行脱保护的化合物中的其它反应性部分,即选择脱保护剂以进行脱保护,但不影响其它反应性部分,除非希望有伴随反应。具体的胺保护剂是Cbz或BOC;更具体的是Cbz。具体的脱保护剂是酸,如HCl或H<sub>2</sub>/Pd(OH)<sub>2</sub>;更具体的是H<sub>2</sub>/Pd(OH)<sub>2</sub>。具体的脱保护条件包括在醇溶剂如甲醇或乙醇或链烷酸烷基酯溶剂如乙酸乙酯中,在约室温下进行脱保护。

[0471] 式15的化合物,其中变量如本文所述,可以通过式16的化合物(其中变量如本文所述)与式17的化合物(其中变量如本文所述)进行偶联反应制备

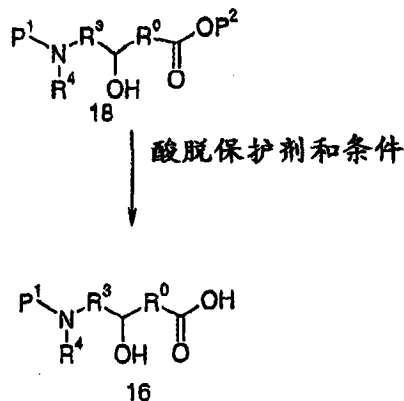
[0472]



[0473] 该反应在适宜的条件下进行。具体的胺保护剂是Cbz或BOC;更具体的是Cbz。具体的偶联条件采用在适宜有机溶剂如二氯甲烷中的HOBT, PyBop和DIPEA,在约0°C至约室温下进行。

[0474] 式16的化合物,其中变量如本文所述,可以由式18的化合物脱保护制备,

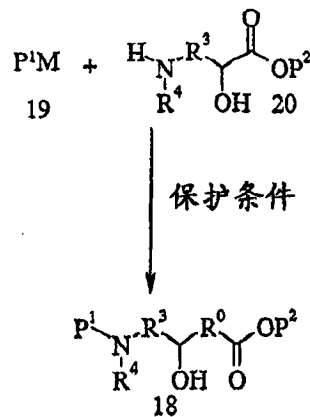
[0475]



[0476] 其中变量如本文所述,该反应采用适宜的脱保护剂,并在适宜的条件下进行。脱保护反应采用适宜的脱保护剂,这取决于酸保护剂的性质,即,是否其是在酸性、碱性或氢化条件下可脱除(不稳定),以及进行脱保护的化合物的其它反应性部分,即选择脱保护剂以进行脱保护,但不影响其它反应性部分,除非希望有伴随反应。具体的胺保护剂Cbz。具体的酸保护剂为C<sub>1</sub>至C<sub>8</sub>低级烷基;更具体的是甲基。具体的脱保护剂是无机碱如碱金属氢氧化物;更具体的是NaOH。具体的脱保护条件包括在醇溶剂如甲醇或乙醇中,在约室温下进行脱保护。

[0477] 式18的化合物,其中R<sup>0</sup>是一个键和其它变量如本文所述,可以通过用式19的化

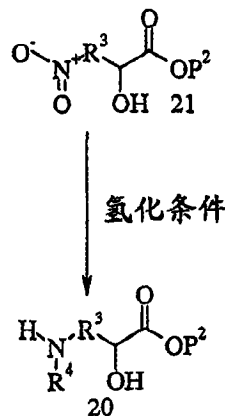
合物（其中变量如本文所述）保护式 20 的化合物（其中变量如本文所述）来制备，  
[0478]



[0479] 该反应在适宜的条件下进行。具体的胺保护剂是 Cbz 或 BOC。具体的偶联条件采用适宜有机溶剂如二氯甲烷，在约 0°C 至约室温下进行。

[0480] 式 20 的化合物，其中 R<sup>4</sup> 是氢且其它变量如本文所述，可通过氢化式 21 的化合物制备，

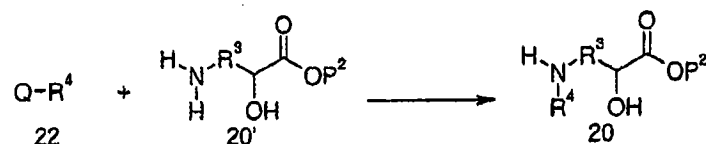
[0481]



[0482] 其中变量如本文所述，其中氢化是采用适宜的氢化剂和适宜的条件。具体的氢化剂是 H<sub>2</sub>/Pd(OH)<sub>2</sub>。具体的氢化条件包括在醇溶剂如甲醇或乙醇中或链烷酸烷基酯如乙酸乙酯中，在约室温下进行氢化。

[0483] 式 20 的化合物（其中 R<sup>4</sup> 是任选地被取代的脂族基，且其它变量如本文所述）可通过用式 22 的化合物（烷化剂，其中 R<sup>4</sup> 是任选地被取代的脂族基，且 Q 是可置换的基团如卤化物、甲苯磺酸酯或磺酸酯）将式 20' 的化合物（其中变量如本文所述）在适宜的条件下烷基化来制备。

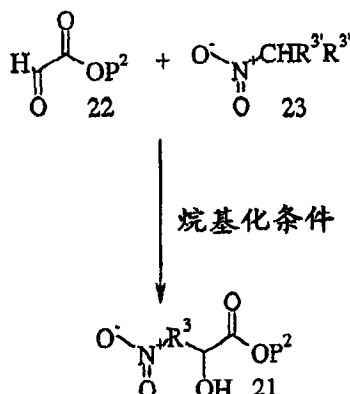
[0484]



[0485] 适宜的烷化剂包括脂族烷化剂（卤化物、甲苯磺酸酯或磺酸酯）。适宜的烷基化条件包括在适宜的有机溶剂如醇溶剂如甲醇或乙醇或醚溶剂如醚或四氢呋喃中，在约室温至约回流下进行烷基化反应。

[0486] 式 21 的化合物（其中变量如本文所述）可以通过用式 23 的化合物（其中  $R^{3'}$  独立地是本文所述的任选地被取代的取代的脂族基、任选地被取代的环基团或任选地被取代的芳族基）将式 22 的化合物（其中变量如本文所述）烷基化来制备。

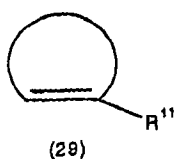
[0487]



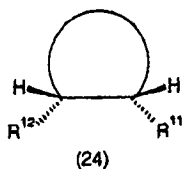
[0488] 反应在适宜的条件下进行。具体的烷基化条件包括采用在醇溶剂如甲醇或乙醇中的强碱如叔丁醇钾进行烷基化反应，反应在约室温下进行。

[0489] 式 24 的化合物，其中变量如本文所述，可以通过用亚胺甘氨酸亚胺衍生物对式 29 的 Michael 受体（其中变量如本文所述）进行 Michael 加成反应制备

[0490]



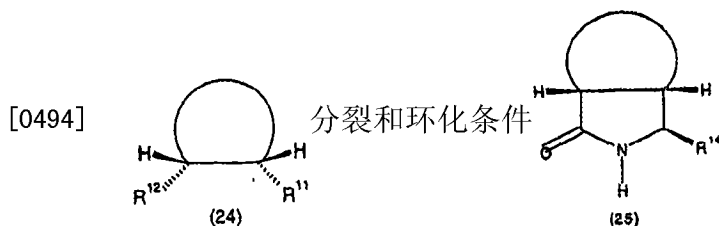
↓ Michael 加成条件



[0491] Michael 加成反应包含适宜的质子惰性极性溶剂，碱金属甲基氢氧化物碱和适宜的温度。Michael 加成反应可参看：Corey, E. J. ;Noe, M. C. ;Xu, F. Tetrahedron Letter 1998, 39, 5347。手性相转移催化剂的合成参看：Corey, E. J. ;Noe, M. C. ;Xu, F. J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 12414。适宜的溶剂包括 DCM、ACN 或 THF，这取决于反应条件。适宜的碱包括 CsOH、NaOH、KOH 和 LiOH。适宜的温度范围是约  $-78^{\circ}\text{C}$  至约  $0^{\circ}\text{C}$ ，更具体的是约  $-60^{\circ}\text{C}$ 。用于本发明中的亚胺甘氨酸亚胺类如本文所述。优选的亚胺甘氨酸亚胺是 N-(二苯基亚甲基)甘氨酸叔丁酯。此外，Michael 加成条件可用或不用相转移催化剂 (PTC) (手性和非手性) 来影响。

[0492] 优选的 PTC 是 O-[9] 烯丙基 -N-9- 蒎基甲基辛可尼定溴化物。

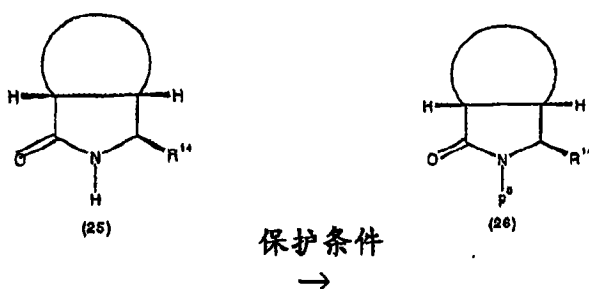
[0493] 式 25 的化合物，其中变量如本文所述，可以通过式 24 的亚胺分裂和环化制备。



[0495] 分裂和环化过程参看 Javidan, A. ;Schfer, K. ;Pyne, S. Synlett1996,100 ; Tatsukawa, A. ;Dan, M. ;Ohbatake, M. ;Kawatake, K. ;Fukata, T. ;Wada, E. ;Kanemase, S. ; Kakei, S. J. Org. Chem. 1993,58,4221。分裂和环化条件包括使用极性溶剂、酸试剂和约室温至约 150°C 的温度。优选的条件包括使用 EtOH、AcONa 和  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ , 和约所用溶剂的沸点的温度。

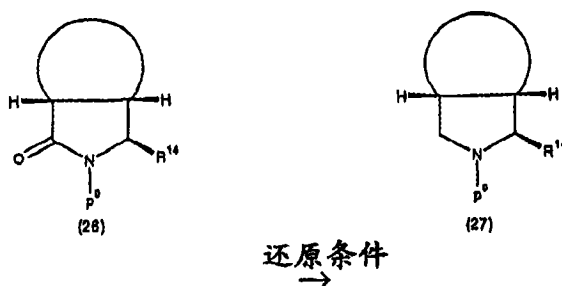
[0496] 式 26 的化合物,其中变量如本文所述,可以用适宜的酰胺保护基如 BOC 保护式 25 化合物的酰胺(其中变量如本文所述)制备。其它适宜的保护基包括 CBz、 $-\text{CO}_2$  烷基。其它的胺保护基同样参看 :Greene, T. W. ;P. G. M. 有机合成中的保护基, Wiley, New York, 1991。保护条件包括采用质子惰性极性溶剂,有机碱作催化剂,温度为约 0°C -100°C。优选的条件包括使用 ACN、二甲基氨基吡啶、温度为约室温。

[0497]



[0498] 式 27 的化合物,其中变量如本文所述,可以通过还原式 26 的被保护的化合物,其中变量如本文所述制备。

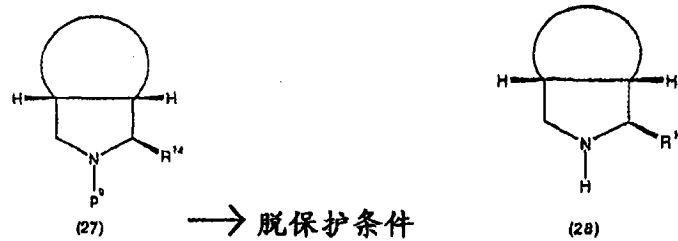
[0499]



[0500] 事实上进行两步还原。第一步还原是采用 DIBALH 或超氢化物 [ $\text{LiEt}_3\text{H}$ ] 进行的酰胺至半缩醛胺 (hemiaminal) 的还原。第二步还原是半缩醛胺至胺的还原,采用  $\text{Et}_3\text{SiH}$  和  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ 。还原条件参看 Collado, I ;Ezquerria, J. ;Mateo, A. I. ;Rubio, A. , J. Org. Chem. 1998,631995-2001 和 Ezqueera, J. ;Pedregal, C. ;Yruretagoyena, B. ;Rubio, A. ; Carreno, M. C. ;Escribano, A. ;Garcia Ruano, J. L. J. Org. Chem. 1995,60,2925。其它有用的转化焦谷氨酸酯至吡咯烷类的条件是采用  $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$ 。

[0501] 式 28 的化合物,其中变量如本文所述,可以由式 27 的化合物,其中变量如本文所述脱保护制备。

[0502]



[0503] 在叔丁酯存在下选择性地除去 N-BOC 保护基的条件参看 Gibson, F. G. ; Bermeier, S. C. ; Rapoport, H. , J. Org Chem. 1994, 59, 3216-3218。本领域的技术人员知道, 脱保护条件取决于保护基的选择。例如, 如果采用 CBz, 可采用氢化或碱性条件。优选地, 如果采用 BOC, 则可采用 1N HCl 的乙酸乙酯溶液。参看 Greene, T. W. ; P. G. M. 有机合成中的保护基, Wiley, New York, 1991。

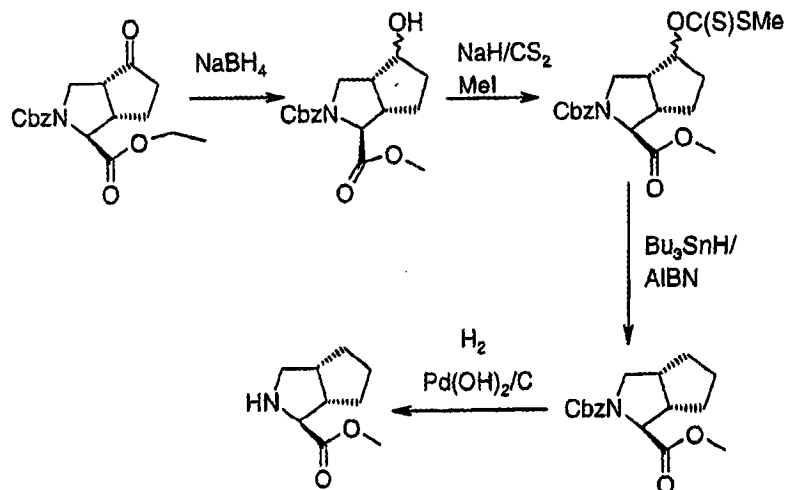
[0504] 本领域的技术人员可以理解, 式 3 的化合物可通过使式 5 的化合物与式 28 的化合物在本文上述条件下进行偶联反应制备。

[0505] 用于制备 R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup> 或 R<sup>7</sup> 作为任选地被取代的乙烷二基部分的方法包括本领域技术人员公知的那些, 这些方法描述于“β-内酰胺有机化学”中, G. Georg 编辑, VCH Publishers, Inc. (1993), 例如第 240-241 页和 303-305 页。

[0506] 以下列举的反应路线 1-11 分类了制备任选地被取代的多环氮杂环基的方法。在以下反应路线中的方法也可应用于其它任选地被取代的多环氮杂环基, 包括相容的类似取代基。

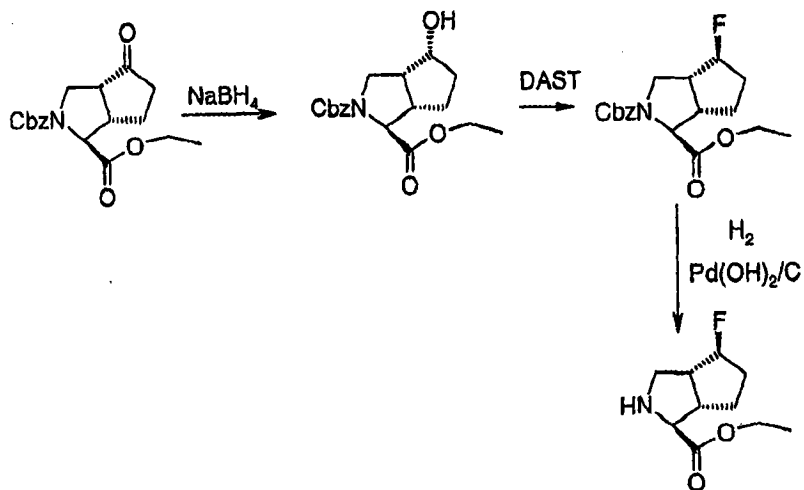
[0507] 反应路线 1

[0508]



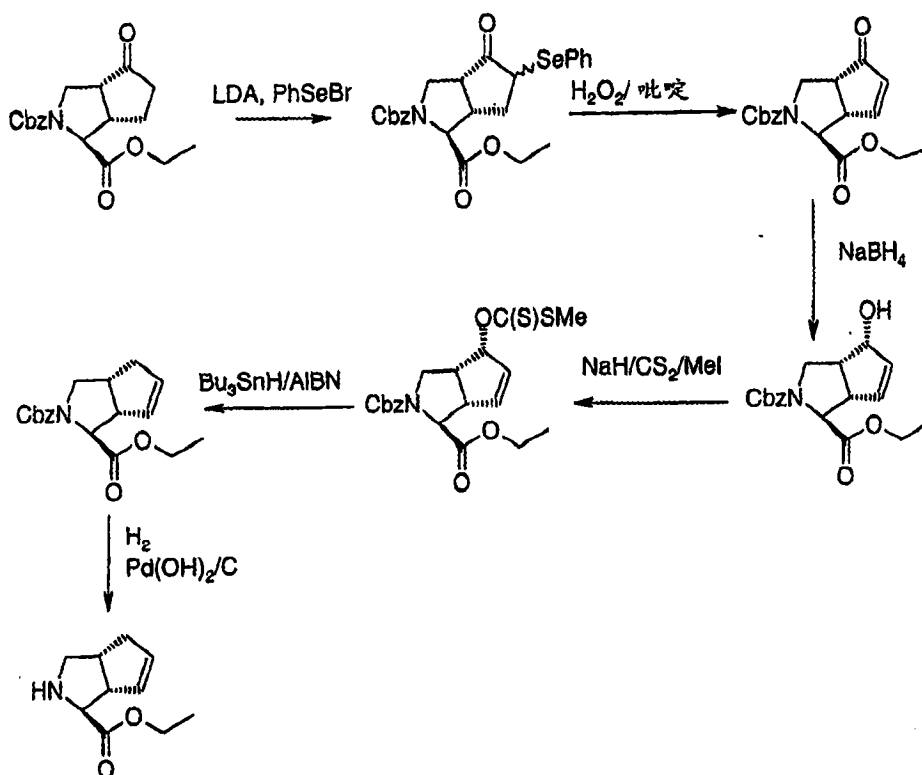
[0509] 反应路线 2

[0510]



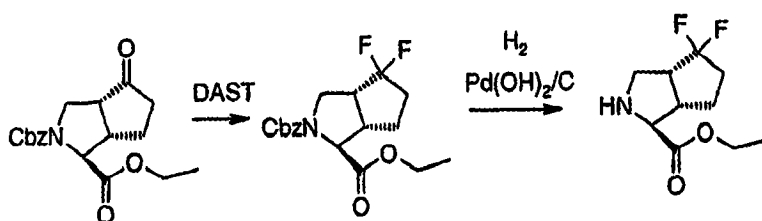
[0511] 反应路线 3

[0512]



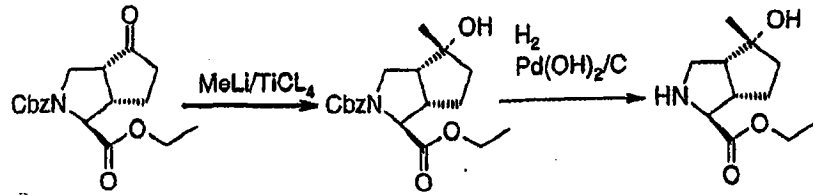
[0513] 反应路线 4

[0514]



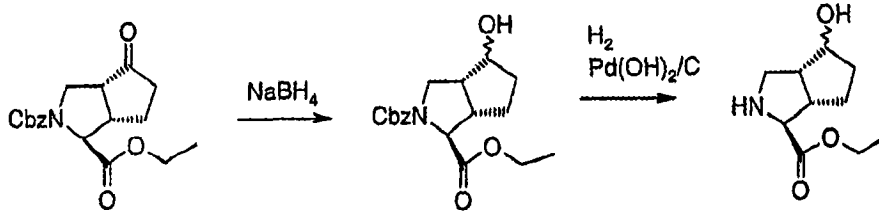
[0515] 反应路线 5

[0516]



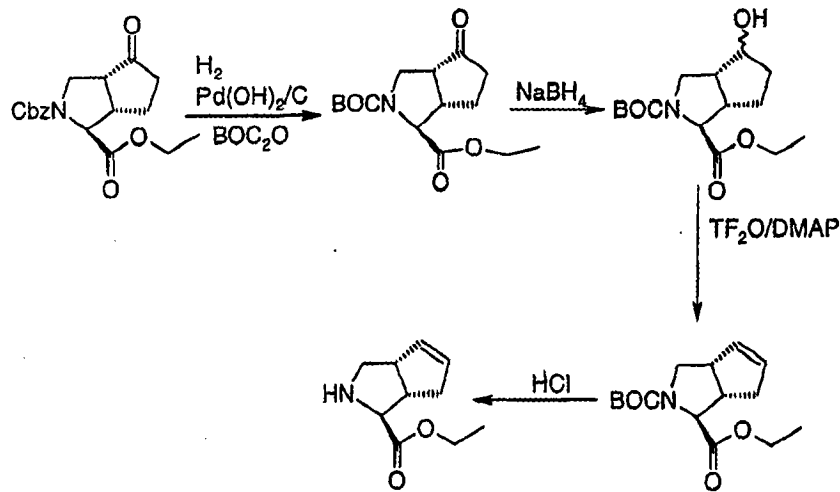
[0517] 反应路线 6

[0518]



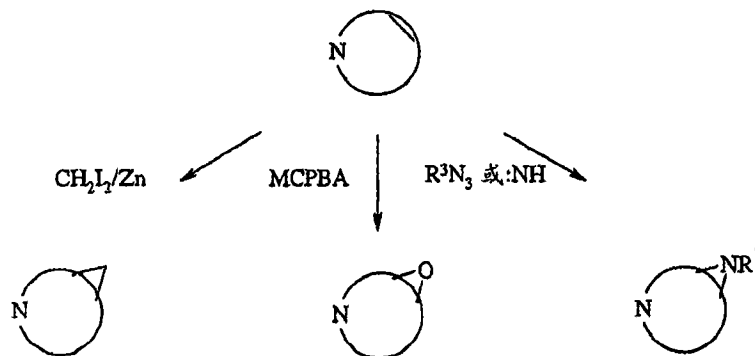
[0519] 反应路线 7

[0520]



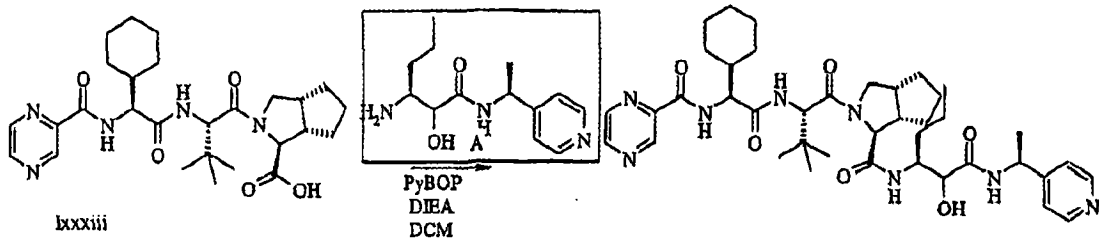
[0521] 反应路线 8

[0522]

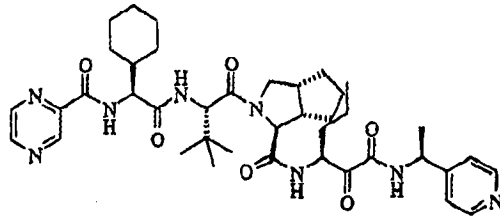


[0523] 反应路线 9

[0524]

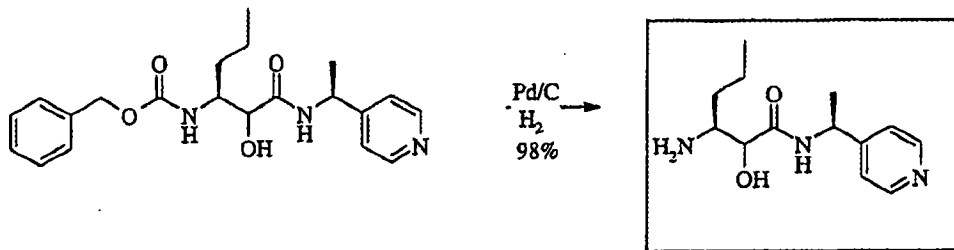
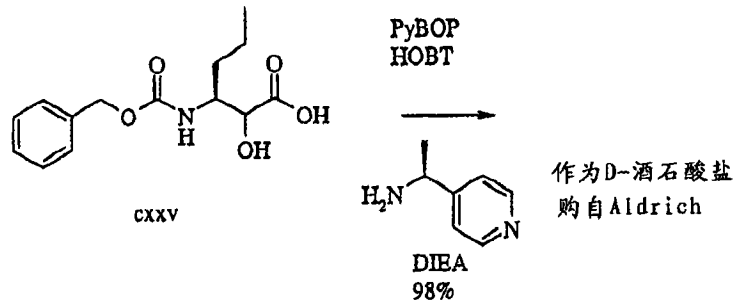


Dess-Martin  
DCM  
33%  
经过2步



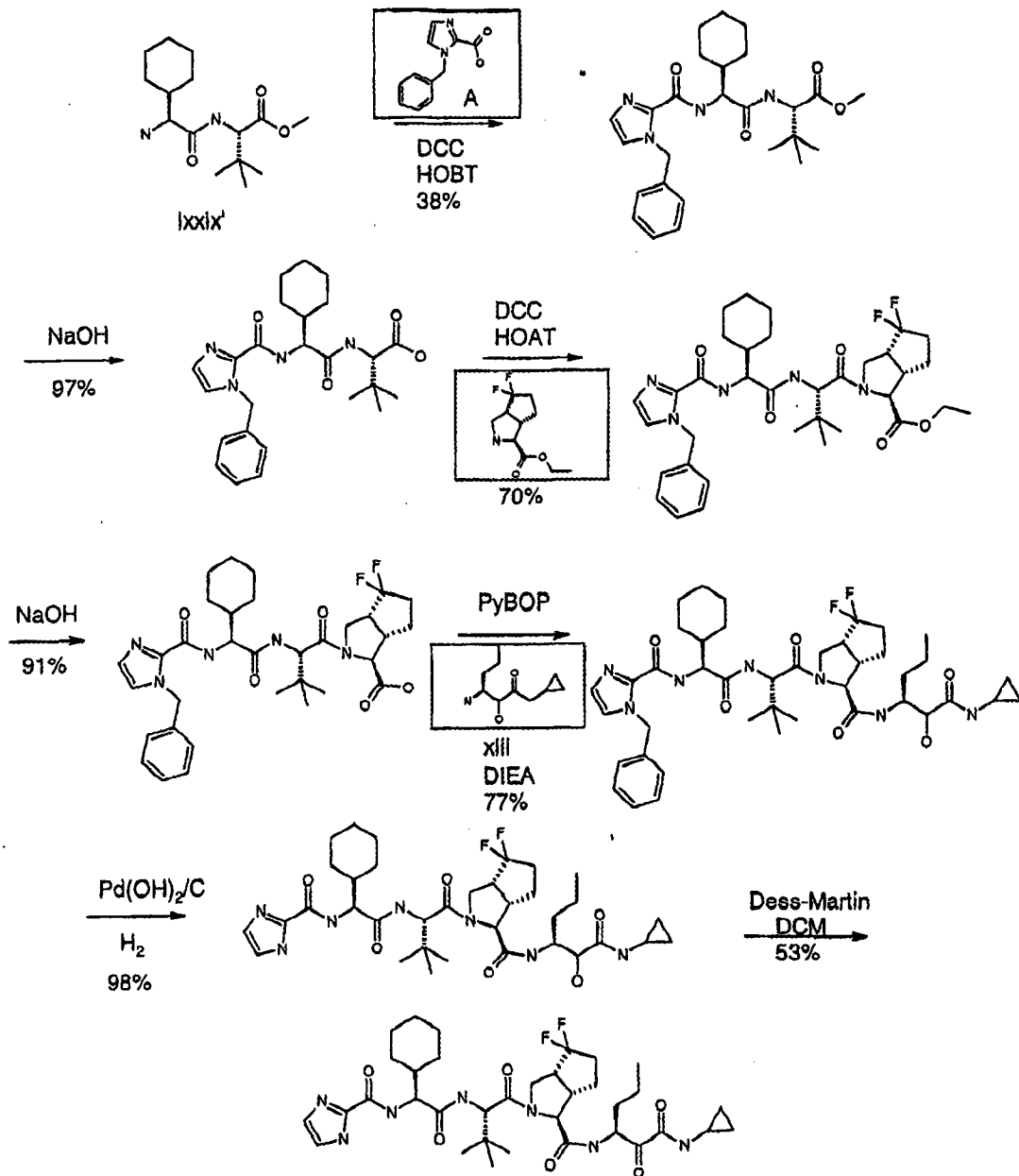
[0525] 反应路线 10

[0526]



[0527] 反应路线 11

[0528]



[0529] 包括含有一个或多个氮环原子的基团优选亚胺 (=N-) 的式 1 的化合物可以转化为对应的化合物, 其中该基团的一个或多个氮原子被氧化成 N-氧化物, 优选通过与过酸, 如在乙酸中的过乙酸或在惰性溶剂如二氯甲醇中的间氯过苯甲酸, 在大约室温至回流温度下, 优选在高温下反应。

[0530] 在下文所述的反应中, 可能需要保护在终产物中所需的反应性官能团, 如羟基、氨基、亚氨基、硫基 (thio) 或羧基, 以避免所不期望它们参与反应。可以根据标准实践使用常规保护基, 例如参见 T. W. Green 和 P. G. M. Wuts in "Protective Group in Organic Chemistry (有机化学中的保护基)" John Wiley 和 Sons (1991); J. F. W. McOmie in "Protective Group in Organic Chemistry" Plenum Press, 1973。

[0531] 可以通过常规方法从反应混合物中收集按本文所述制备的化合物。例如, 所述化合物可以通过以下方法收集: 从反应混合物中蒸馏出溶剂, 或者如果需要的话, 在从反应混合物中蒸馏出溶剂之后, 将残余物倾入水中, 然后用水不混溶性有机溶剂萃取, 并从萃取物中蒸馏出溶剂。此外, 如果需要的话, 可以通过多种已知的技术, 如重结晶、沉淀或多种色谱

技术,特别是柱色谱法或制备薄层色谱法进一步纯化产物。

[0532] 根据本发明的另一个特征,可以通过相互转化本发明的其它化合物而制备本发明的化合物。

[0533] 作为相互转换方法的一个实例,包含亚砷键的式 1 的化合物可以通过氧化相应的包含 -S- 键的化合物而制备。例如,可以通过与过酸,如 3- 氯过苯甲酸,优选在惰性溶剂,如二氯甲烷中,优选在或接近室温下反应,或者可通过与过氧一硫酸氢钾在缓冲至大约 pH 5 的介质如甲醇水溶液中,在大约 0°C 和室温之间的温度下反应来方便地进行氧化反应。对于包含酸不稳定基团的化合物优选后一种方法。

[0534] 作为所述相互转换方法的另一实例,可以通过氧化相应的含 -S- 或亚砷键的化合物而制备含砷键的式 1 的化合物。例如,可以通过与过氧酸,如 3- 氯过苯甲酸,优选在惰性溶剂,如二氯甲醇中,在或接近室温下反应来方便地进行所述的氧化反应。

[0535] 可以理解,关于本文的芳基和杂芳基的芳香性指示包括任何高度共振的不饱和环结构。可选择地,如果指出的话,双键的位置代表所描绘的化合物的一种可能的结构,但可以理解它包括所述化合物的其它共振状态以及质子化和带电的种类,可以仅显示其中的一种。

[0536] 可以认识到本发明的化合物可以包含不对称中心。这些不对称中心可以独立地为 R 或 S 构型。本领域技术人员可以明了,本发明的某些化合物还可以表现出几何异构现象。可以理解,本发明包括本发明化合物的单独的几何异构体和立体异构体以及它们的混合物,包括外消旋混合物。这些异构体可以通过应用或改良已知的方法,如色谱技术和重结晶技术而从它们的混合物中分离,或者它们独立地由它们的中间产物的适宜的异构体制备。

[0537] 为本发明目的,应理解在所述基团的列举中包括互变异构形式,如硫代 / 巯基或氧代 / 羟基。

[0538] 使用其中存在碱官能团如氨基、烷基氨基或二烷基氨基的本发明的化合物形成酸加成盐。优选药学上可接受的,即无毒的酸加成盐。选择的盐最好与常规的药物赋形剂相容并适于口服或肠胃外给药。可以应用或改良已知的方法,通过游离碱与适宜的酸反应而制备本发明化合物的酸加成盐。例如,本发明化合物的酸加成盐可以通过以下方法制备:将游离碱溶于含有适宜的酸的水或水醇溶液或其它适宜溶剂,并通过蒸发溶液来分离盐,或者使游离碱与酸在有机溶剂中反应,在这种情况下,盐直接分离或可以通过浓缩溶液而获得。用于制备这些盐的某些适宜的酸为盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸、多种有机羧酸和磺酸如乙酸、柠檬酸、丙酸、琥珀酸、苯甲酸、酒石酸、富马酸、扁桃酸、抗坏血酸、苹果酸、甲磺酸、甲苯磺酸、脂肪酸、己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、氢碘酸盐、2- 羟基 - 乙磺酸盐、甘油磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、双羟萘酸盐、果胶酯酸盐、过硫酸盐、3- 苯基丙酸盐、硫氰酸盐、2- 萘磺酸盐、十一酸盐、烟酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐等等。

[0539] 本发明化合物的酸加成盐可以通过应用或改良已知方法而由盐再生。例如,本发明的母体化合物可以通过用碱如碳酸氢钠水溶液或氨水溶液处理它们的酸加成盐而再生。

[0540] 本发明的化合物可以通过应用或改良已知的方法而由它们的碱加成盐再生。例

如,本发明的母体化合物可以通过用酸如盐酸处理它们的碱加成盐而再生。

[0541] 可以制备碱加成盐,其中本发明的化合物包含羧基或充足的酸性生物电子等排体。可以用于制备碱加成盐的碱优选包括这样的碱:当它与游离的酸结合时产生药学上可接受的盐,即药学剂量的该盐的阳离子对患者无毒,从而使这些游离碱的固有的有效的抑制作用不被这些阳离子的副作用损害。本发明范围内的药学上可接受的盐,包括由碱金属和碱土金属盐衍生的盐包括由以下碱衍生的盐:氯化钠、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铝、氢氧化锂、氢氧化镁、氢氧化锌、氨、乙二胺、N-甲基-葡糖胺、赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、氯普鲁卡因、二乙醇胺、普鲁卡因、N-苄基苯乙基胺、二乙胺、哌嗪、三(羟基甲基)-氨基甲烷、四甲基氢氧化铵等等。

[0542] 在本发明的方法中可以方便地制备或形成作为溶剂化物(如水合物)的本发明的化合物。本发明化合物的水合物可以方便地通过使用有机溶剂如二噁烷、四氢呋喃或甲醇,从水/有机溶剂混合物中重结晶而方便地制备。

[0543] 可以通过应用或改良已知的方法制备原料和中间产物,例如在参考实施例中描述的方法或它们明显的化学等同方法。

[0544] 通过检查以下的实施例似乎将更清楚地看出本发明的化合物,它们的方法或制备以及它们的生物活性,这些实施例仅作为举例出现而不应被认为是对本发明范围的限定。

[0545] 通过 TLC、NMR、RP-HPLC 或 EA 法分析样品。

[0546] 通过检验以下的实施例似乎将更清楚地看出本发明的化合物、它们的方法或制备和它们的生物活性,这些实施例仅作为举例出现而不应被理解为对本发明范围的限定。

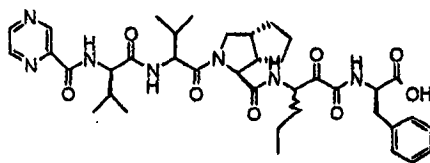
[0547] 通过 TLC、NMR、RP-HPLC 或 EA 法分析样品。

### 具体实施方式

[0548] 实施例 1- 化合物 A-E :

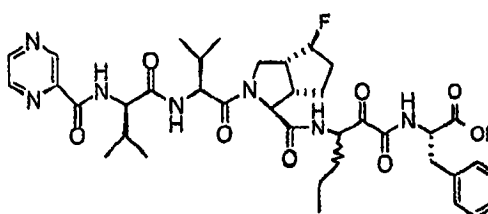
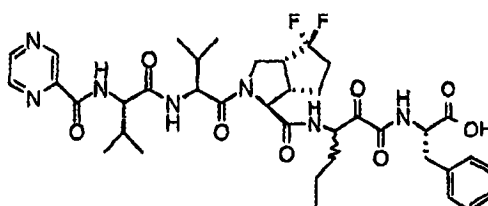
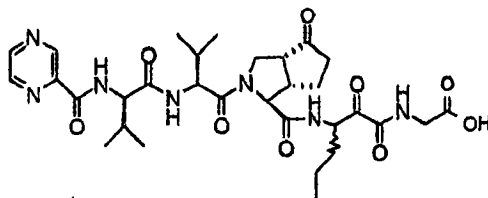
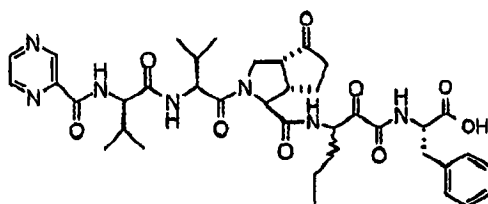
[0549] 将 TFA(4mL) 加到化合物 xi(310mg, 0.39mmol) 的 DCM 溶液(10mL) 中。在大约室温下将反应物搅拌 5 小时。此时,真空下除去溶剂。通过反相 HPLC 纯化所得的残余物以得到 195mg(68%) 化合物 A。

[0550]



[0551] 根据上述方法并使用适宜的原料,制备下列化合物 B-E :

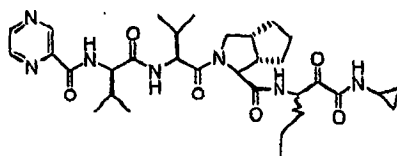
[0552]



[0553] 实施例 2- 化合物 F-M :

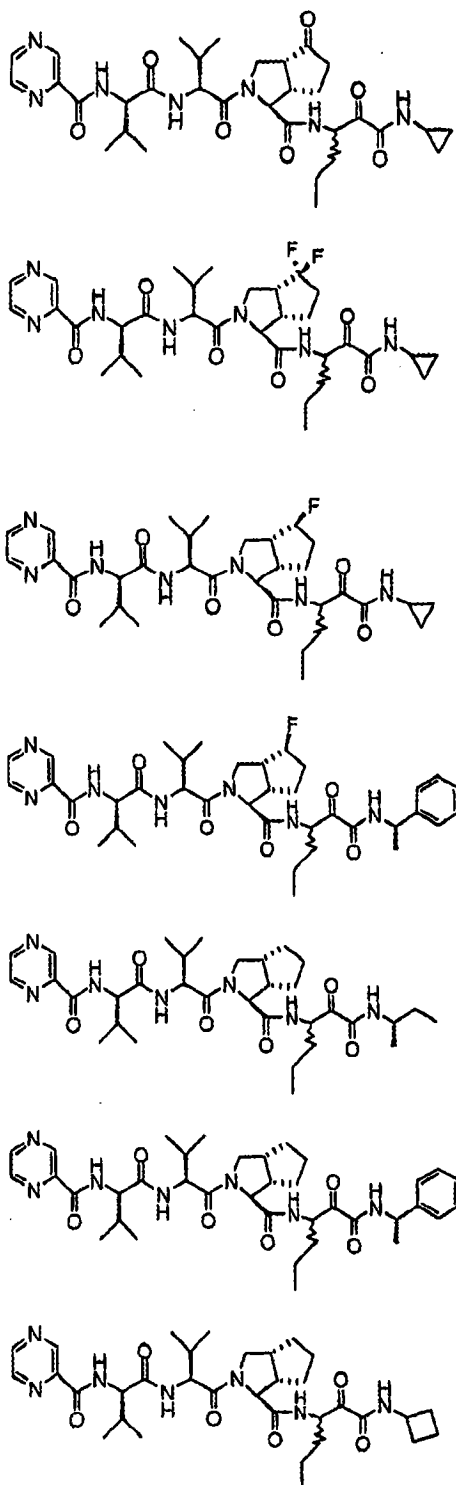
[0554] 将 DMP 试剂 (307mg, 0.73mmol) 加到化合物 xii (350mg, 0.56mmol) 的 DCM 溶液 (10mL)。在大约室温下将反应物搅拌 2 小时, 然后用 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 中止反应 30 分钟。然后用 EtOAc (75mL) 萃取反应混合物并用盐水洗涤。干燥有机层并真空浓缩。用硅胶色谱法纯化所得的残余物 (80-90% EtOAc/ 己烷) 得到 248mg (71%) 化合物 F。

[0555]



[0556] 根据上述方法并使用适宜的原料, 制备以下的化合物 G-M :

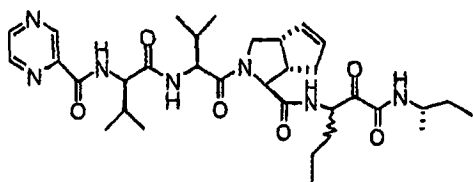
[0557]



[0558] 实施例 3- 化合物 N-R :

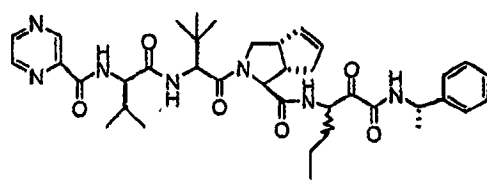
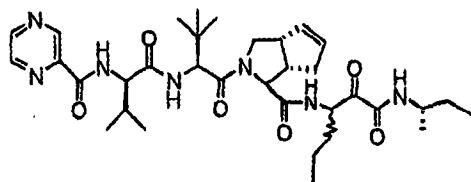
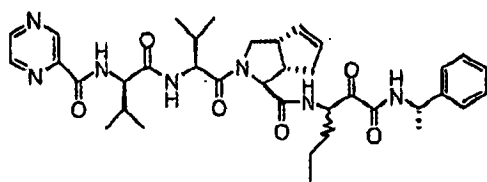
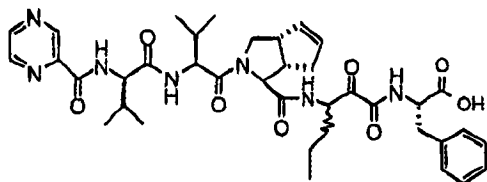
[0559] 将 DMP 试剂 (146mg, 0.34mmol) 加到化合物 xix (约 0.22mmol) 的 DCM 溶液 (4mL)。在大约室温下将反应物搅拌 2 小时, 然后用 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  中止反应。用 DCM 稀释反应混合物。分离有机层并用 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  洗涤两次并有盐水洗涤。将所得的有机层干燥并真空浓缩得到残余物, 通过硅胶色谱法纯化 (5% EtOH/EtOAc) 得到 78mg (56%) 所需化合物 N。

[0560]



[0561] 根据上述方法并使用适宜的原料,制备化合物 O-R:

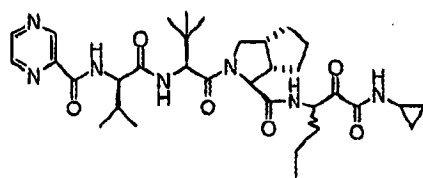
[0562]



[0563] 实施例 4- 化合物 S-W:

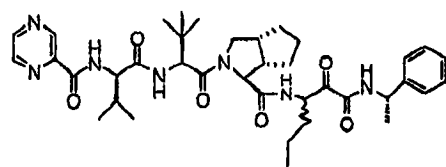
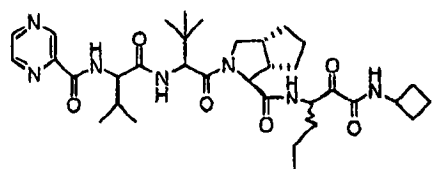
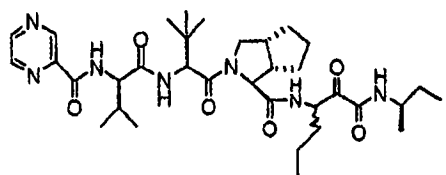
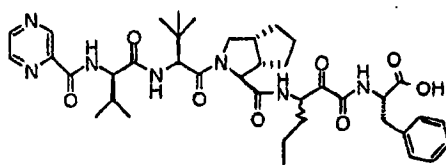
[0564] 将 DMP 试剂 (272mg, 0.65mmol) 加到化合物 xxv (320mg, 0.5mmol) 的 DCM 溶液 (10mL)。在大约室温下将反应物搅拌 2 小时,并用 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  中止反应 20 分钟。然后用 EtOAc 萃取所得的混合物。用盐水洗涤有机层,干燥并真空浓缩。通过硅胶色谱法纯化所得的残余物 (80% EtOAc/ 己烷) 得到 170mg (53%) 化合物 S,

[0565]



[0566] 根据上述方法并使用适宜的原料,制备以下化合物 T-W:

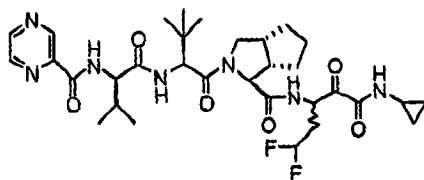
[0567]



[0568] 实施例 5- 化合物 X-AD :

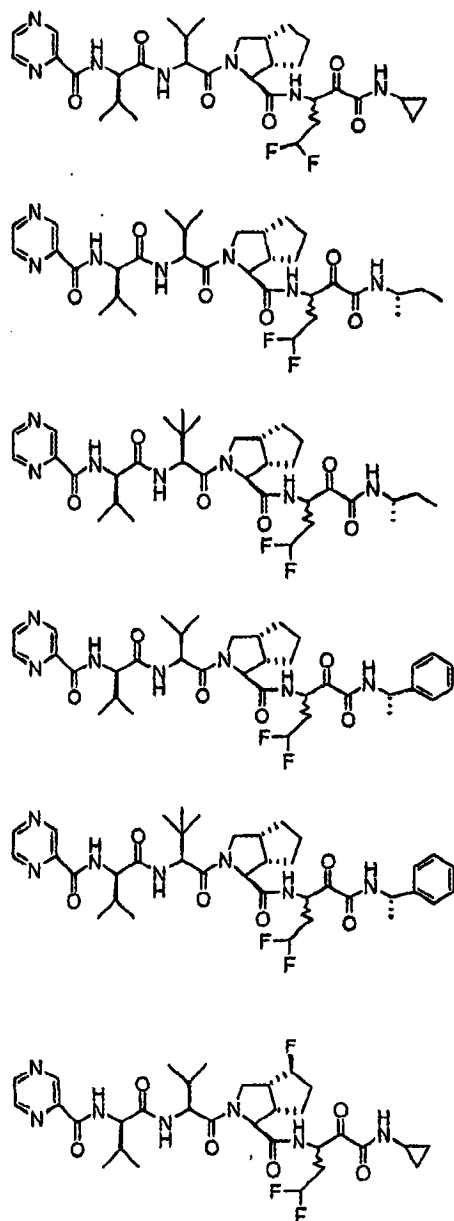
[0569] 将 DMP 试剂 (329mg, 0.78mmol) 加到化合物 xxvi (400mg, 0.6mmol) 的 DCM 溶液 (20mL)。在大约室温下将反应物搅拌 1.5 小时,并用 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  中止反应 20 分钟。然后用 EtOAc 萃取所得的混合物。用盐水洗涤有机层,干燥并真空浓缩。通过硅胶色谱法纯化所得的残余物 (70-100% EtOAc/ 己烷) 得到 210mg (53%) 化合物 X,

[0570]



[0571] 根据上述方法并使用适宜的原料,制备以下化合物 Y-AD :

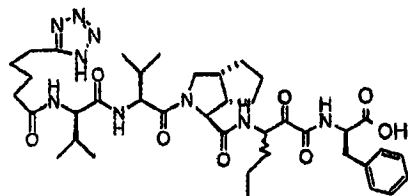
[0572]



[0573] 实施例 6- 化合物 AE-AI :

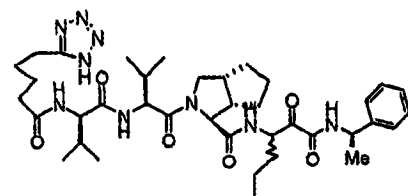
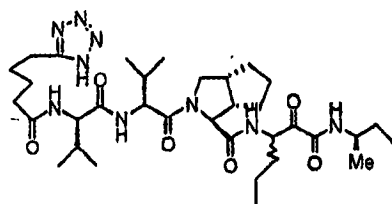
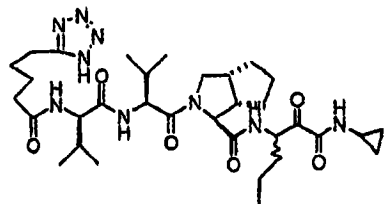
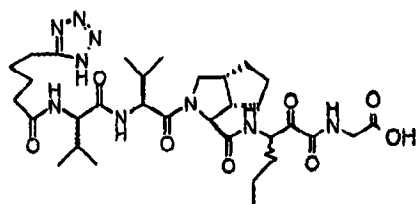
[0574] 将化合物 xxxiii (150mg ;0.076mmol) 溶于 5mL TFA, 并搅拌二天。用 RP-HPLC 法纯化产物得到 40mg (33% 产率) 的化合物 AE,

[0575]



[0576] 根据上述方法并使用适宜的原料, 制备以下化合物 AF-AI :

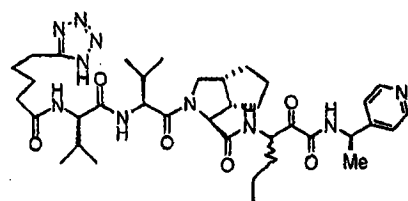
[0577]



[0578] 实施例 7- 化合物 AJ :

[0579] 将化合物 xxxviii (180mg, 0.21mmol) 溶于纯净的 TFA (5mL) 并在大约室温下放置 3 天。此时, 真空浓缩反应混合物得到残余物, 通过反相 HPLC 法纯化得到 50mg (32%) 化合物 AJ,

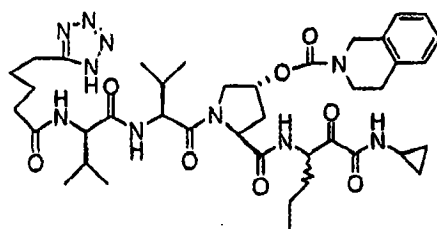
[0580]



[0581] 实施例 8- 化合物 AK-AM

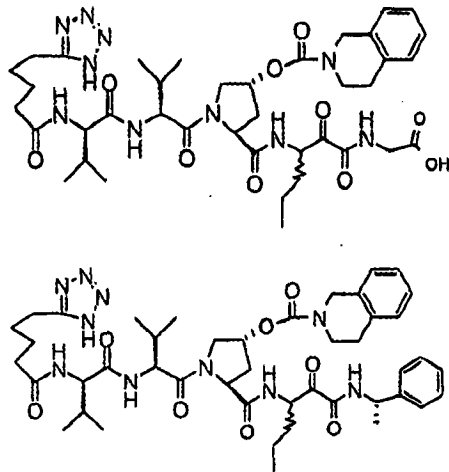
[0582] 将化合物 xxxxiii (150mg ; 0.16mmol) 溶于 4.5mL TFA 并搅拌 3 天。通过 RP-HPLC 法将产物纯化得到 70mg (54% 产率) 化合物 AK,

[0583]



[0584] 根据上述方法并使用适宜的原料,制备以下化合物 AL-AM:

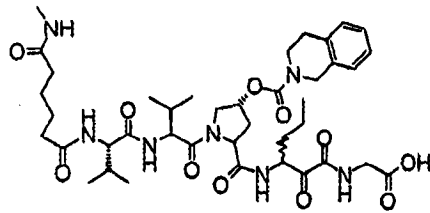
[0585]



[0586] 实施例 9- 化合物 AN:

[0587] 将化合物 l ii (80mg) 溶于 3mL TFA 和 3mL DCM。在大约室温下将混合物搅拌 5 小时。蒸发除去溶剂。通过 HPLC 法纯化所得的残余物得到 62mg (83%) 化合物 AN,

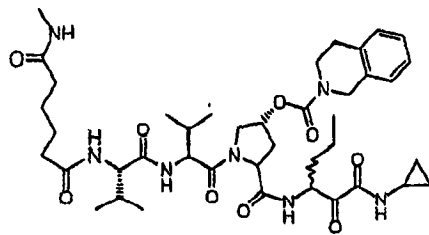
[0588]



[0589] 实施例 10- 化合物 A0:

[0590] 将化合物 l i i i (160mg ; 0.2mmol) 溶于 5mL DCM 并加入 DMP 试剂 (170mg ; 0.4mmol)。在大约室温下将混合物搅拌三小时。蒸发除去溶剂并将残余物溶于 50% 乙腈 / 水并通过 RP-HPLC 法纯化得到 51mg (32%) 化合物 A0,

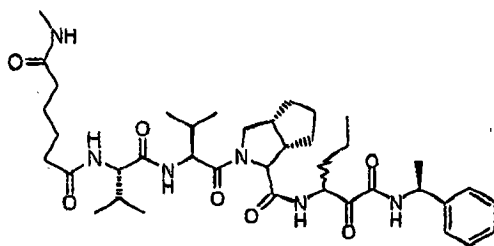
[0591]



[0592] 实施例 11- 化合物 AP:

[0593] 将化合物 l i x (162mg ; 0.22mmol) 溶于 8mL DCM 并加入 DMP 试剂 (189mg ; 0.44mmol)。在大约室温下将混合物搅拌 3 小时。蒸发除去溶剂并通过 RP-HPLC 法纯化产物得到 41mg (25%) 化合物 AP,

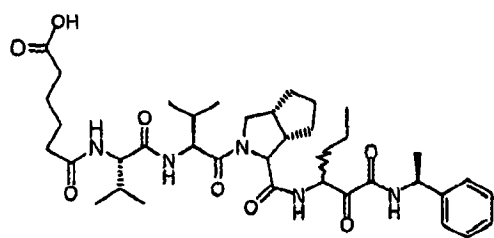
[0594]



[0595] 实施例 12- 化合物 AQ :

[0596] 将化合物 1x (70mg ;0.09mmol) 溶于 5mL TFA 和 5mL DCM。在大约室温下将混合物搅拌 3 小时。真空除去溶剂并将残余物溶于 50%乙腈 / 水, 并冻干得到化合物 AQ, 为一种粉末,

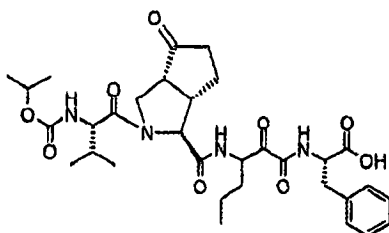
[0597]



[0598] 实施例 13- 化合物 AR-BG :

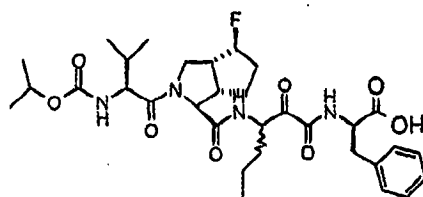
[0599] 在 TFA (5mL) 和 DCM(5mL) 的溶液中将化合物 1xvi (223mg, 0.326mmol) 搅拌 4 小时。TLC( 硅胶 :2% MeOH/EtOAc) 表明完全转化成移动较慢的产物。减压下除去溶剂并冻干产物得到 198mg (97% ) 化合物 AR,

[0600]

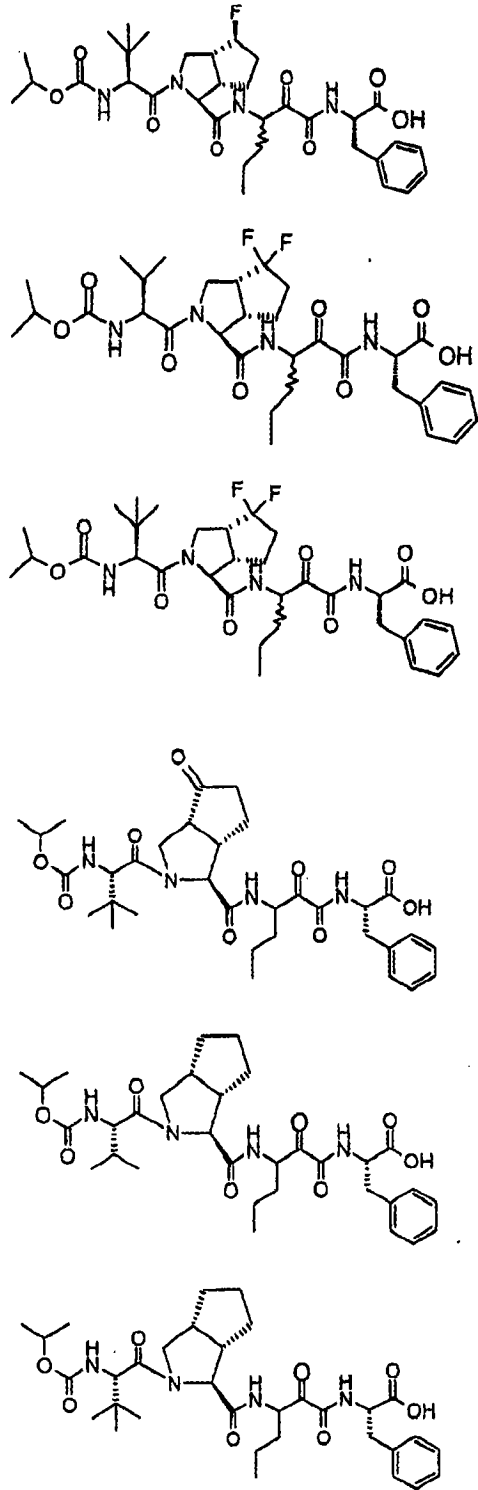


[0601] 根据上述方法并使用适宜的原料, 制备以下化合物 AS-BG :

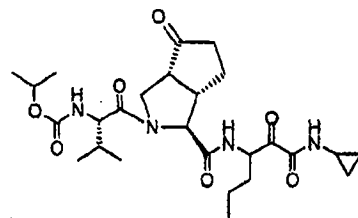
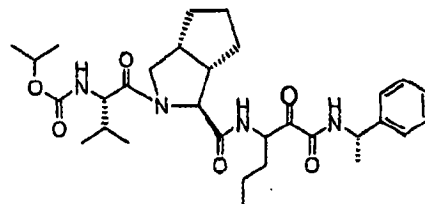
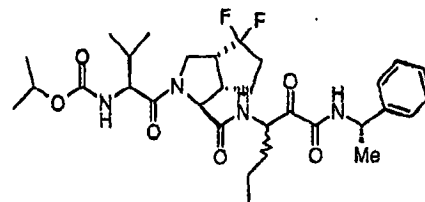
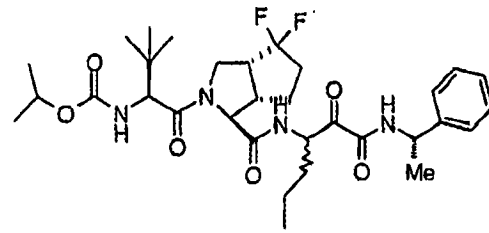
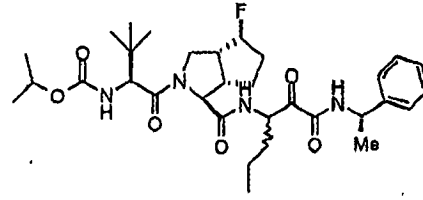
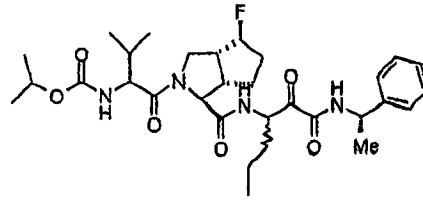
[0602]



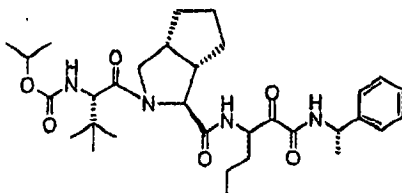
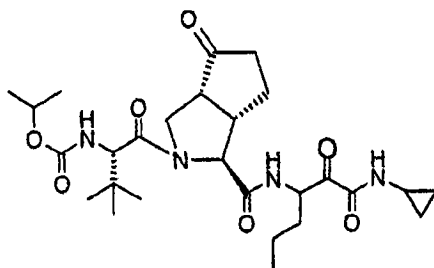
[0603]



[0604]



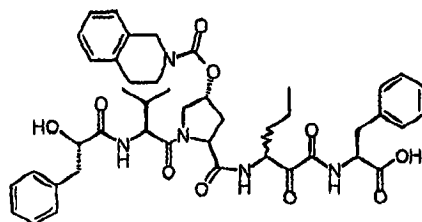
[0605]



[0606] 实施例 14- 化合物 BH-BS :

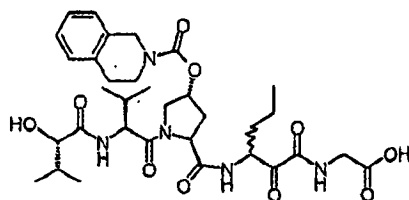
[0607] 将化合物 1xxiii (150mg, 0.15mmol) 置于 DCM (3mL)。将 TFA (1.5mL) 加到此溶液。将所得的溶液搅拌过夜。此时, 真空浓缩反应物以得到残余物。通过反相 HPLC 纯化残余物并冻于得到 60mg (50%) 化合物 BH,

[0608]

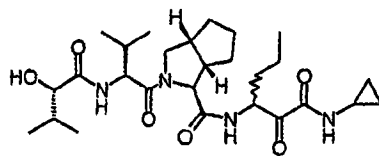
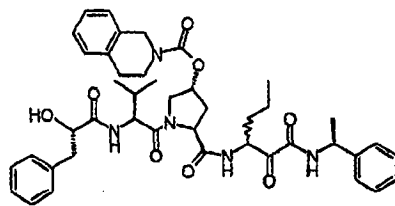
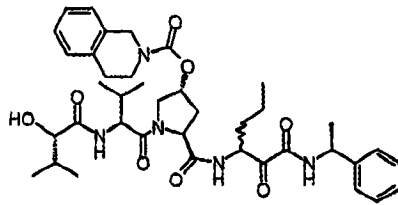
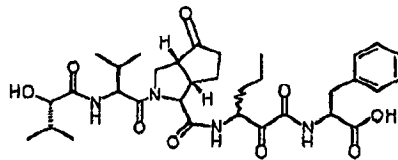
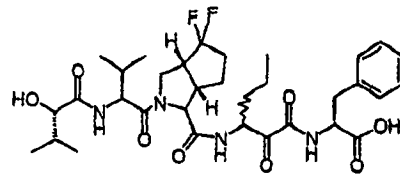
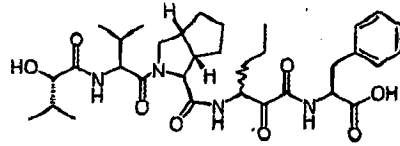
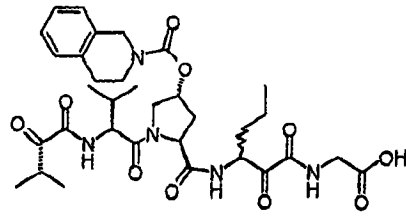


[0609] 根据上述方法并使用适宜的原料, 制备以下化合物 BI-BS :

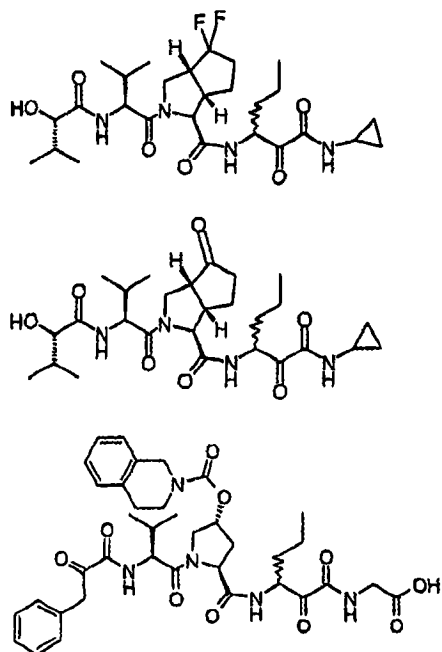
[0610]



[0611]



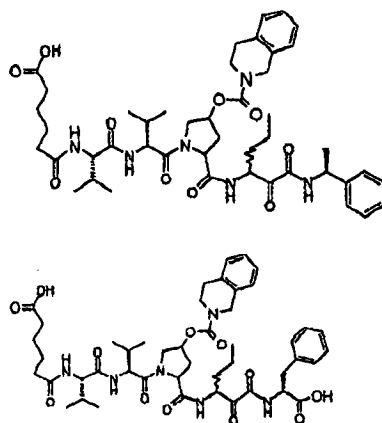
[0612]



[0613] 实施例 15- 化合物 BT-BU :

[0614] 根据实施例 12 的方法并使用适宜的原料, 制备以下化合物 BT-BU :

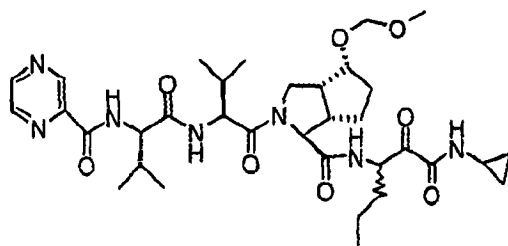
[0615]



[0616] 实施例 16- 化合物 BV :

[0617] 将 DMP 试剂 (165mg, 0.39mmol) 加到化合物 lxxvii (143mg, 0.21mmol) 的二氯甲烷溶液 (4.2mL)。在大约室温下将反应物搅拌 2 小时并用 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (水溶液) 中止反应 20 分钟。用 EtOAc 萃取所得的混合物。用盐水洗涤有机层, 用  $\text{MgSO}_4$  干燥并浓缩得到一种黄色油。通过硅胶色谱法纯化 (5% EtOH/EtOAc) 得到 124mg (79%) 化合物 BV,

[0618]

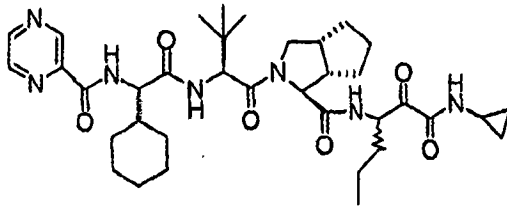


[0619] 实施例 17- 化合物 BW-CA :

[0620] 将 DMP 试剂 (342mg, 0.81mmol) 加到化合物 lxxxix (420mg, 0.62mmol) 的二氯甲烷

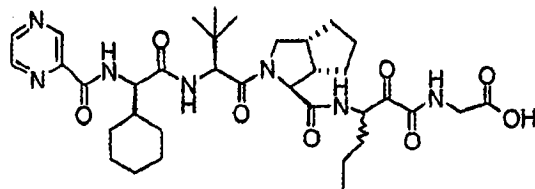
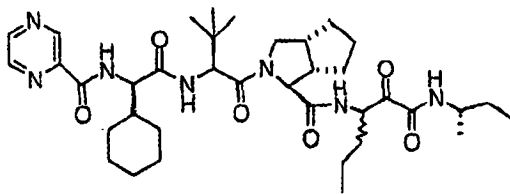
溶液 (20mL)。在大约室温下将反应物搅拌 1 小时,并用 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  中止反应 20 分钟。然后用 EtOAc 萃取所得的混合物。用盐水洗涤有机层,干燥并真空浓缩。通过硅胶色谱法纯化所得的残余物 (80% EtOAc/ 己烷) 得到 208mg (50%) 化合物 BW,

[0621]

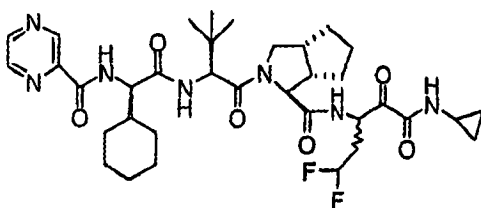
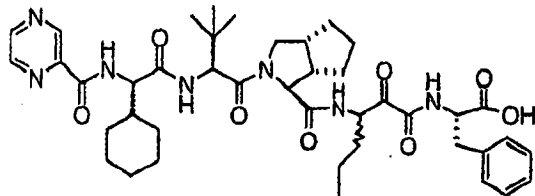


[0622] 根据上述的方法但使用适宜的原料,制备以下化合物 BX-CA:

[0623]



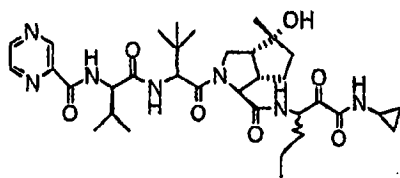
[0624]



[0625] 实施例 18- 化合物 CB-CC:

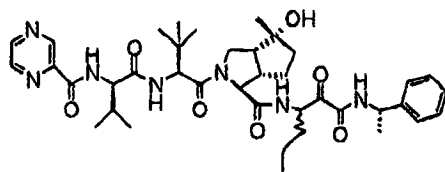
[0626] 将 DMP 试剂 (227mg, 0.54mmol) 加到化合物 lxxxvii (200mg, 0.3mmol) 的二氯甲烷溶液 (6.5mL)。在大约室温下将反应物搅拌 2 小时并用 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (水溶液) 中止反应 20 分钟。用 EtOAc 萃取所得的混合物。用盐水洗涤有机层,用  $\text{MgSO}_4$  干燥并浓缩得到一种油。硅胶色谱法纯化 (5% EtOH/EtOAc) 得到 138mg (70%) 化合物 CB,

[0627]



[0628] 根据以上方法但使用适宜的原料,制备以下化合物 CC:

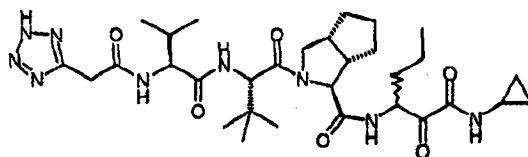
[0629]



[0630] 实施例 19- 化合物 CD:

[0631] 将化合物 1xxxxviii (40mg, 0.05mmol) 置于 TFA (3mL) 中。将溶液搅拌两个晚上并浓缩。用反相 HPLC 纯化残余物得到 25mg (74%) 化合物 CD,

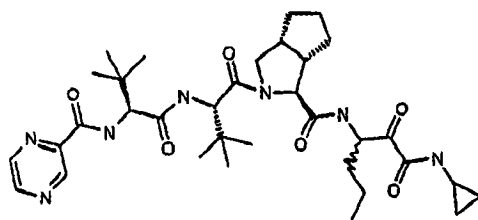
[0632]



[0633] 实施例 20- 化合物 CE:

[0634] 根据实施例 17 的方法并使用适宜的原料,制备以下化合物 CE:

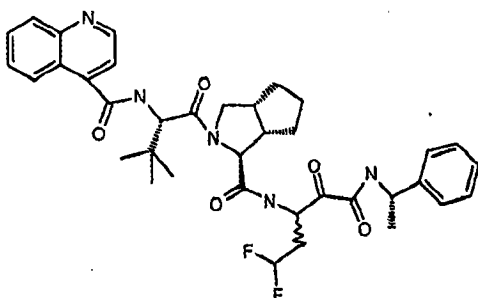
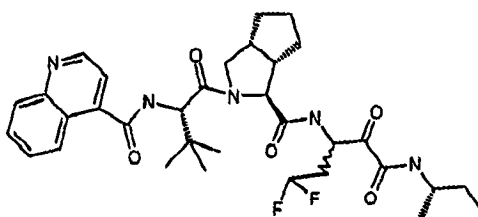
[0635]



[0636] 实施例 21- 化合物 CF-CG:

[0637] 根据实施例 14 的方法并使用适宜的原料,制备以下化合物 CF-CG:

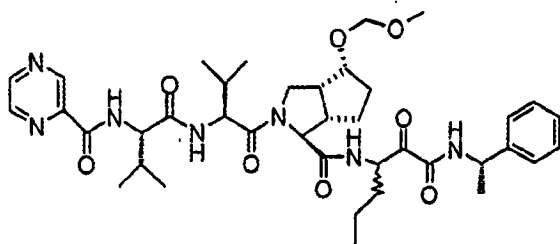
[0638]



[0639] 实施例 22- 化合物 CH :

[0640] 根据实施例 16 的方法并使用适宜的原料, 制备以下化合物 CH :

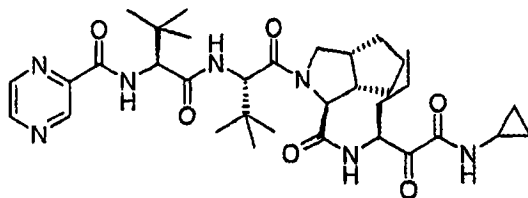
[0641]



[0642] 实施例 23- 化合物 CI-CM

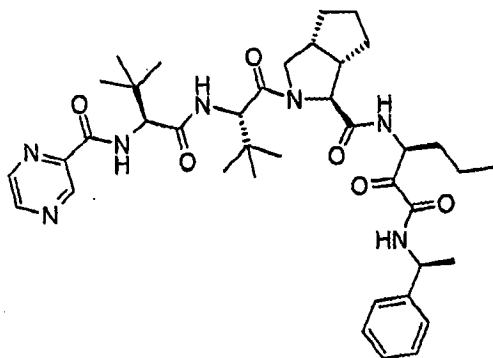
[0643] 将化合物 cxi (490mg, 0.75mmol) 溶于 DCM (6mL)。将 DMP 试剂 (380mg, 0.9mmol) 加到此溶液并搅拌 1 小时。用 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  溶液中止反应混合物, 然后用饱和的  $\text{NaHCO}_3$  和盐水洗涤有机相。浓缩有机相, 然后用 70% EtOAc/ 己烷将所得的残余物色谱纯化得到化合物 CI (325mg, 66.4%)。

[0644]

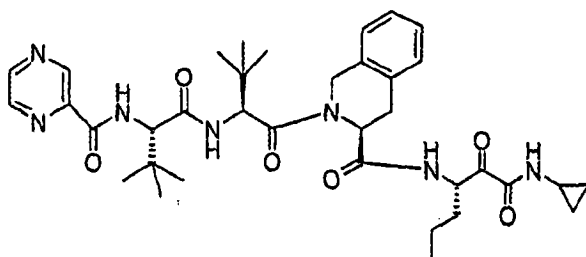
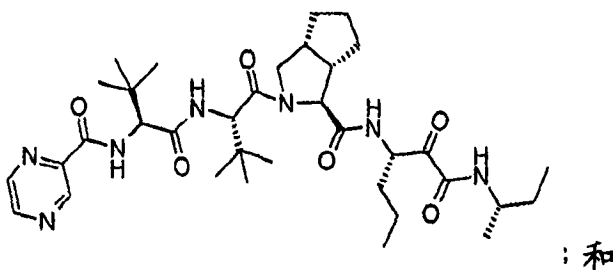
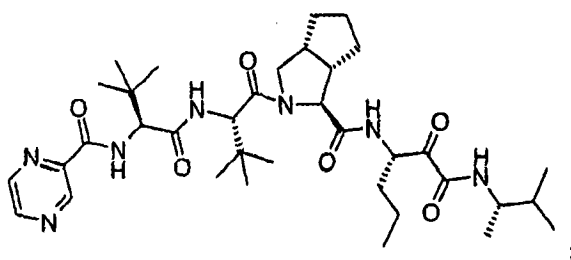


[0645] 根据制备以上化合物的以上方法和关于制备其中间产物的方法, 但使用适宜的原料, 制备以下化合物 CJ-CM :

[0646]



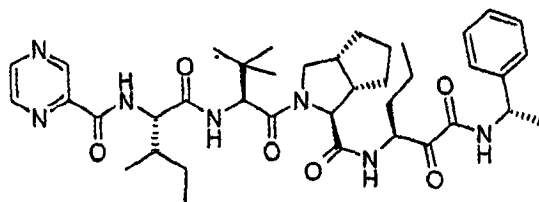
[0647]



[0648] 实施例 24- 化合物 CN

[0649] 将 DMP 试剂 (300mg, 0.69mmol) 加到化合物 cxviii (335mg, 0.46mmol) 的 DCM/THF 溶液 (3mL/3mL)。室温下将反应混合物搅拌 2 小时并用 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (水溶液) 中止反应 20 分钟。用 EtOAc 萃取所得的混合物。用盐水洗涤有机相, 用  $\text{MgSO}_4$  干燥并浓缩得到一种黄色油。通过硅胶色谱法纯化 (80% EtOAc/ 己烷) 得到化合物 CN (220mg, 67%)。

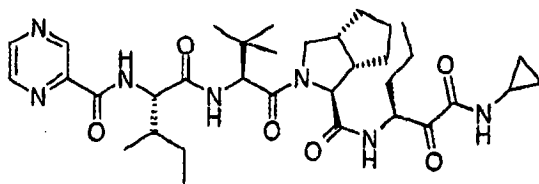
[0650]



[0651] 实施例 25- 化合物 CO-CR

[0652] 将 DMP 试剂 (159mg, 0.38mmol) 加到化合物 cxix (164mg, 0.25mmol) 的 DCM/THF 溶液 (1.5mL/1.5mL)。室温下将反应混合物搅拌 2 小时并用 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (水溶液) 中止反应 20 分钟。用 EtOAc 萃取所得的混合物。用盐水洗涤有机相, 用  $\text{MgSO}_4$  干燥并浓缩至黄色油。通过硅胶色谱法纯化 (70% EtOAc/ 己烷) 得到化合物 CO (100mg, 61%)。

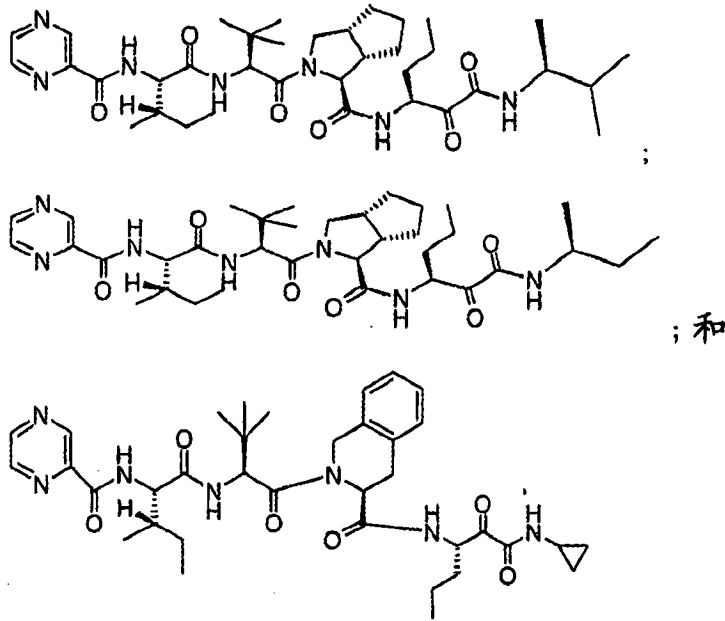
[0653]



[0654] 根据制备以上化合物的以上方法和关于制备其中间产物的方法, 但使用适宜的原

料,制备以下化合物 CP-CR :

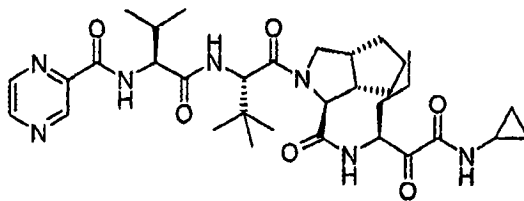
[0655]



[0656] 实施例 26- 化合物 CS-CT

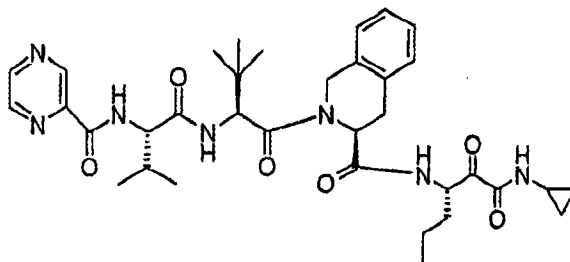
[0657] 将化合物 cxx 溶于 DCM(3mL)。将 DMP 试剂 (180mg, 0.41mmol) 加到此溶液,然后搅拌 1 小时。用 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 中止反应混合物,然后用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机相。在浓缩有机相之后,用 100% EtOAc 经色谱法纯化残余物得到化合物 CS(95mg, 43.7%)。

[0658]



[0659] 根据制备以上化合物的以上方法和关于制备其中间产物的方法,但使用适宜的原料制备以下化合物 CT :

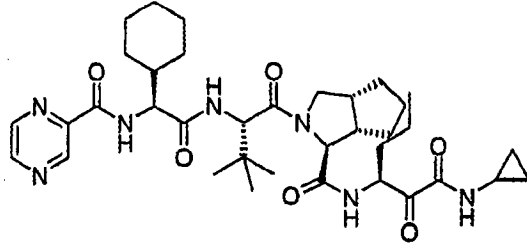
[0660]



[0661] 实施例 27- 化合物 CU、EI、EK-EM、E0-EZ 和 FA-FG

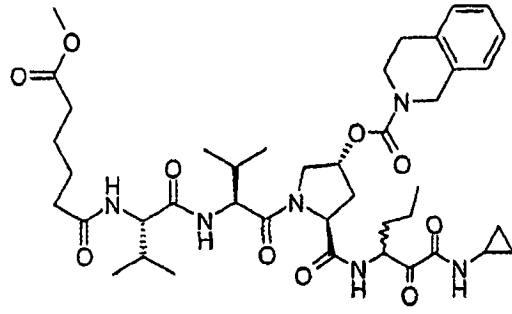
[0662] 将化合物 cxxviii(356mg, 0.52mmol) 溶于 DCM(5mL)。将 DMP 试剂 (270mg, 0.63mmol) 加到此溶液并搅拌 1 小时。用 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 中止反应混合物,然后分离有机相并用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤。在浓缩有机溶剂之后,用 100% EtOAc 经色谱纯化残余物得到化合物 CU(200mg, 56.3%)。mp 225-235°C。

[0663]

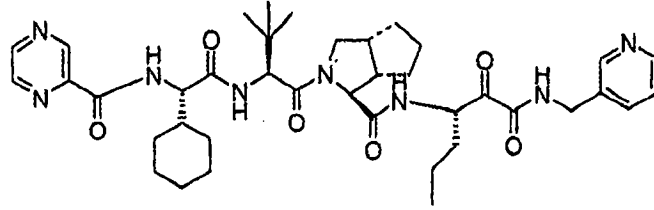


[0664] 根据制备以上化合物的以上方法和关于制备其中间产物的方法,但使用适宜的原料制备以下化合物 EI、EK-EM、EO-EZ 和 FA-FH:

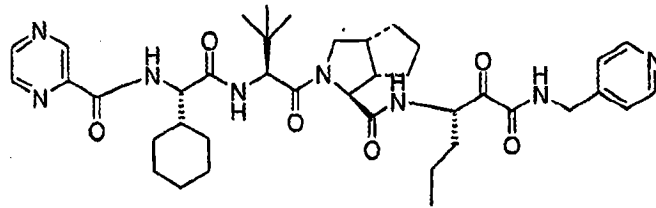
[0665]



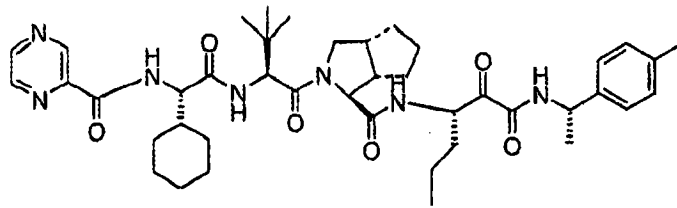
EI,



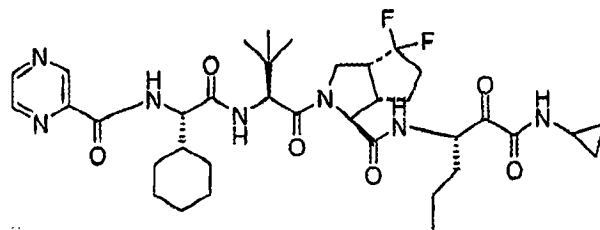
EK,



EL,

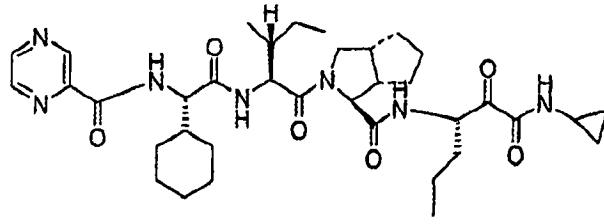


EM,

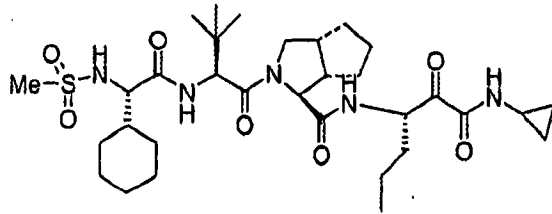


EO,

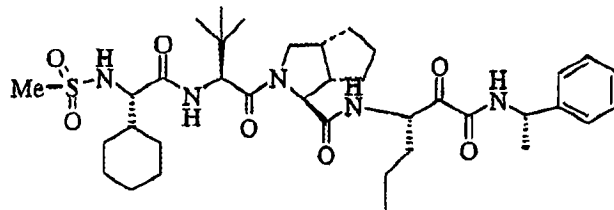
[0666]



EP,

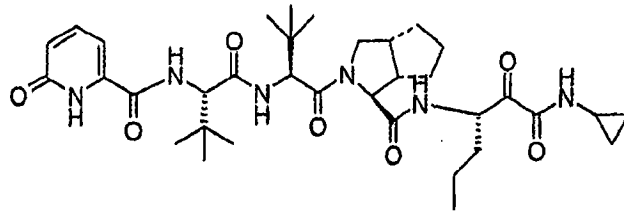


EQ,

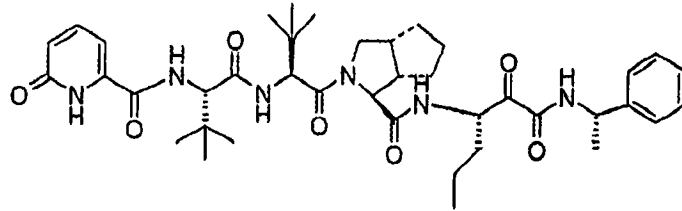


ER,

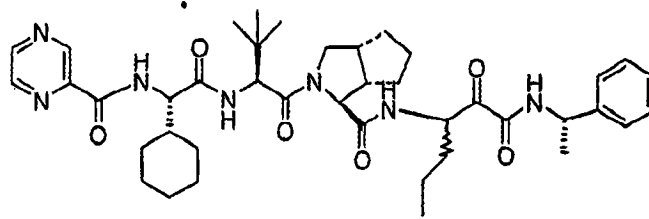
[0667]



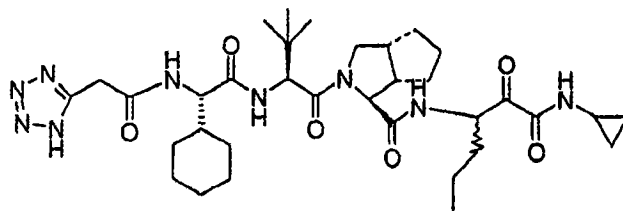
ES,



ET,

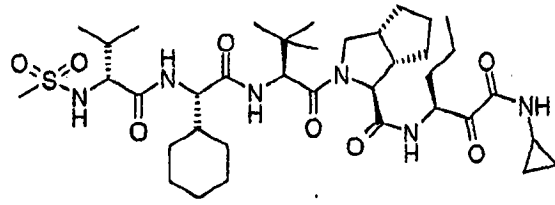


EU,

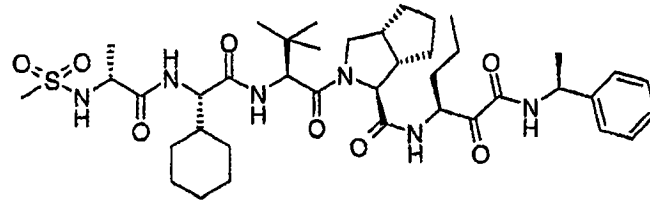


EV,

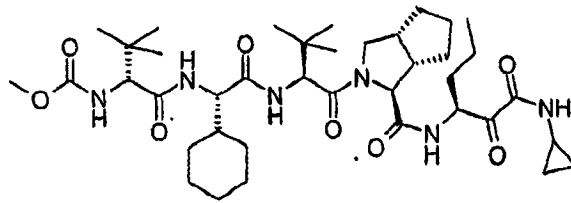
[0668]



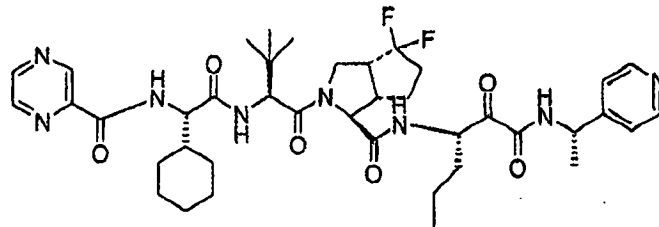
EW,



EX,

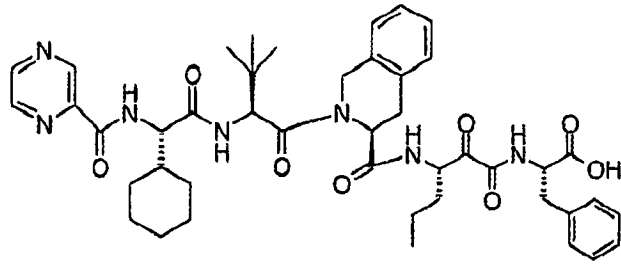


EY,

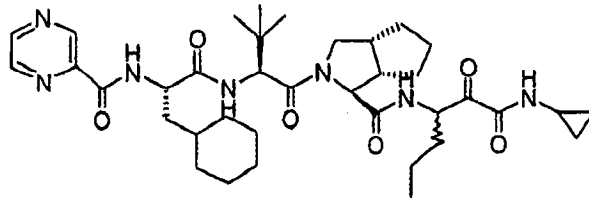


EZ,

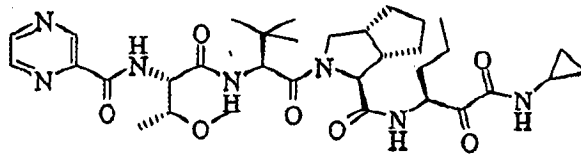
[0669]



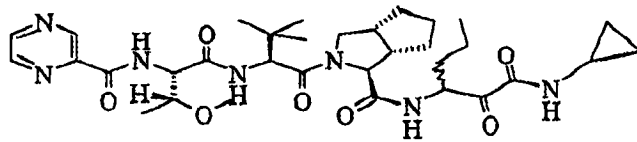
FA,



FB,

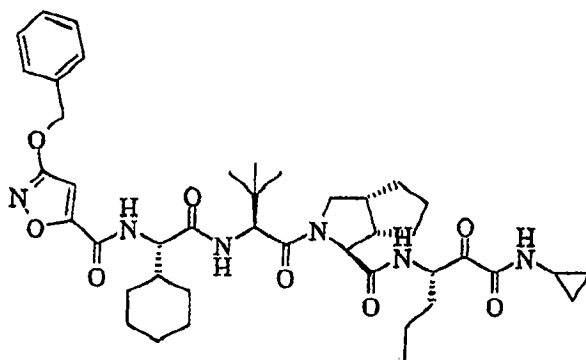


FC,

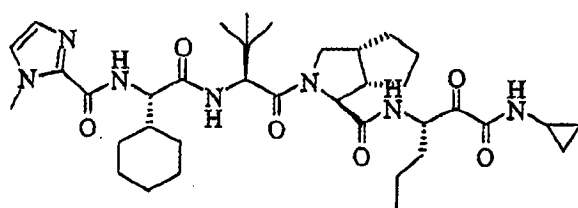


FD,

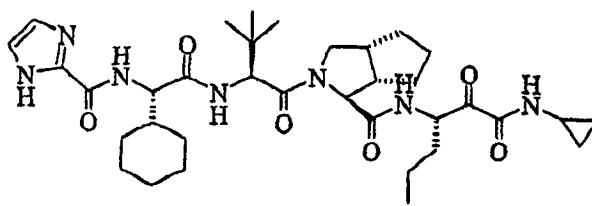
[0670]



FE,

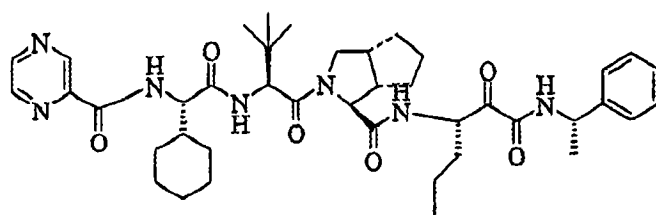


FF,



FG, 和

[0671]



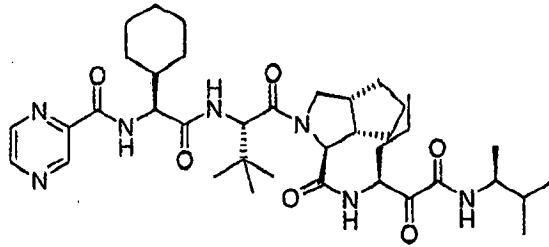
FH.

[0672] 实施例 28- 化合物 CV-DC

[0673] 将化合物 cxxx (330mg, 0.46mmol) 溶于 DCM (5mL)。将 DMP 试剂 (240mg, 0.56mmol) 加到此溶液并搅拌 1 小时。用 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 中止反应混合物, 用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机相。

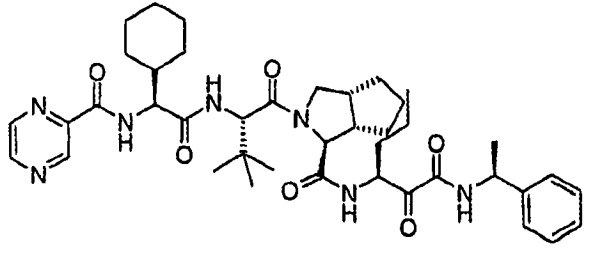
[0674] 在浓缩有机相之后, 用 100% EtOAc 经色谱纯化所得的残余物得到化合物 cxxx (280mg, 85.9%)。

[0675]

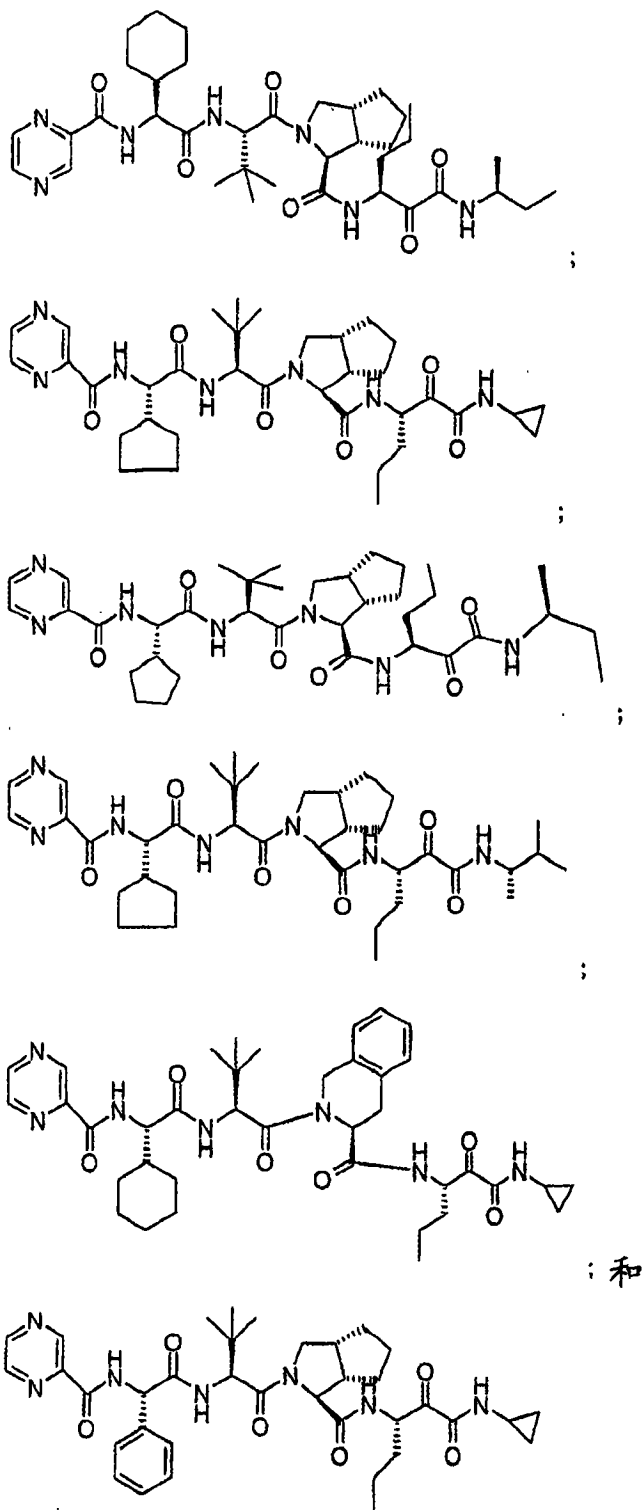


[0676] 根据制备以上化合物的以上方法和关于制备其中间产物的方法,但使用适宜的原料制备以下化合物 CW-DC :

[0677]



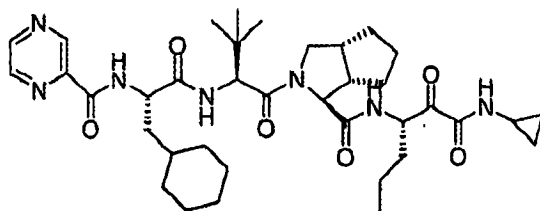
[0678]



[0679] 实施例 29- 化合物 DD-DE

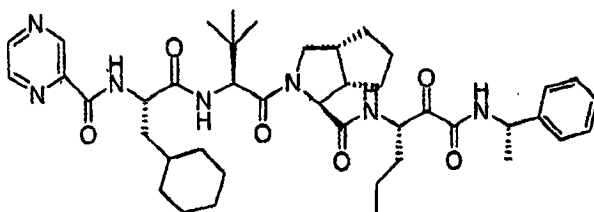
[0680] 将 DMP 试剂 (362mg, 0.85mmol) 加到化合物 cxxxviii (400mg, 0.57mmol) 的 DCM 溶液 (6mL)。室温下将反应混合物搅拌 2 小时并用 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (水溶液) 中止反应 20 分钟。用 EtOAc 萃取所得的混合物。用盐水洗涤萃取的有机相, 用  $\text{MgSO}_4$  干燥并浓缩得到黄色油。用硅胶 (70% EtOAc/ 己烷) 纯化得到化合物 DD (201mg, 51%)。

[0681]



[0682] 根据制备以上化合物的以上方法和关于制备其中间产物的方法,但使用适宜的原料制备以下化合物 DE:

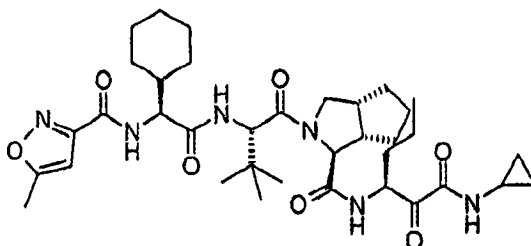
[0683]



[0684] 实施例 30- 化合物 DF

[0685] 将化合物 cxxxxiii (165mg, 0.24mmol) 溶于 DCM (5mL)。将 DMP 试剂 (125mg, 0.29mmol) 加到此溶液并搅拌 1 小时。用 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  中止反应混合物,并用饱和的  $\text{NaHCO}_3$  和盐水洗涤有机相。在浓缩有机相之后,用 70% EtOAc/ 己烷经色谱纯化所得的残余物得到化合物 DF (108mg, 65.6%)。

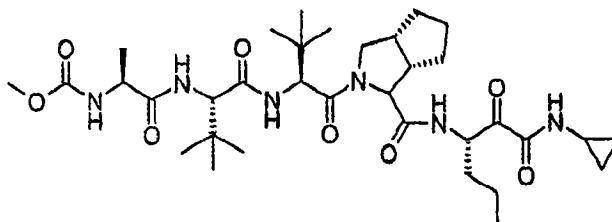
[0686]



[0687] 实施例 31- 化合物 DG-DJ

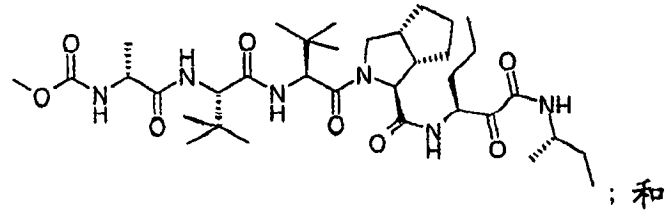
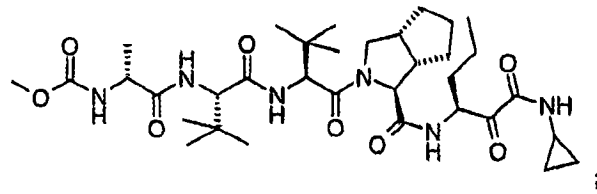
[0688] 将 DMP 试剂 (0.281g, 0.671mmol) 加到冰浴冷却的在 DCM (15mL) 中的化合物 cil (0.350g, 0.516mmol) 的溶液。室温下将混合物搅拌 2 小时,然后用 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  溶液中止反应,并搅拌 20 分钟。用 DCM (3x20mL) 萃取所得的混合物并干燥 ( $\text{MgSO}_4$ ) 该有机萃取物。在过滤除去  $\text{MgSO}_4$  之后,浓缩滤液并通过柱色谱法 (70% 乙酸乙酯 / 己烷) 纯化得到最终化合物 DG (0.265g, 76%), 为一种白色固体。

[0689]

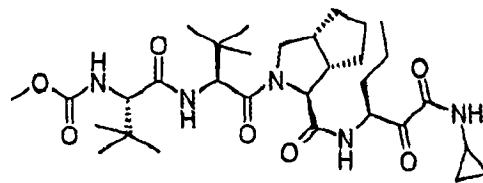


[0690] 根据制备以上化合物的以上方法和关于制备其中间产物的方法,但使用适宜的原料制备以下化合物 DH-DJ:

[0691]



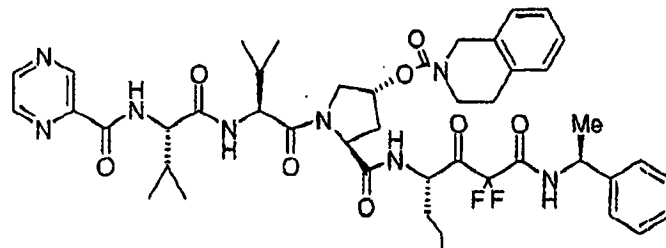
[0692]



[0693] 实施例 32- 化合物 DK-DN

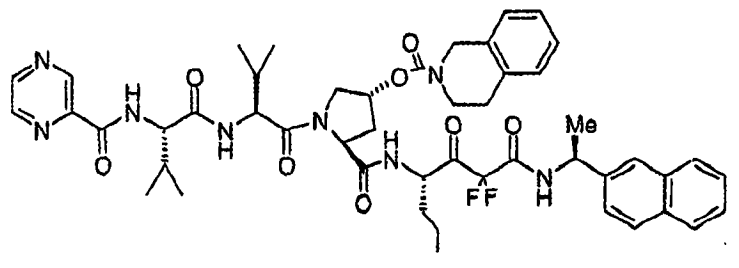
[0694] 用 DMP 试剂 (78mg, 0.185mmol) 处理化合物 c1x (108mg, 0.123mmol) 的 DCM 溶液。室温下搅拌 1 小时后, 用 EtOAc (50mL) 稀释反应混合物, 然后用 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 中止反应。搅拌 30 分钟后, 分离有机相并用 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤。干燥有机相并真空浓缩得到一种残余物, 硅胶色谱法 (80% EtOAc/ 己烷) 纯化残余物得到化合物 DK (84mg, 78%)。

[0695]

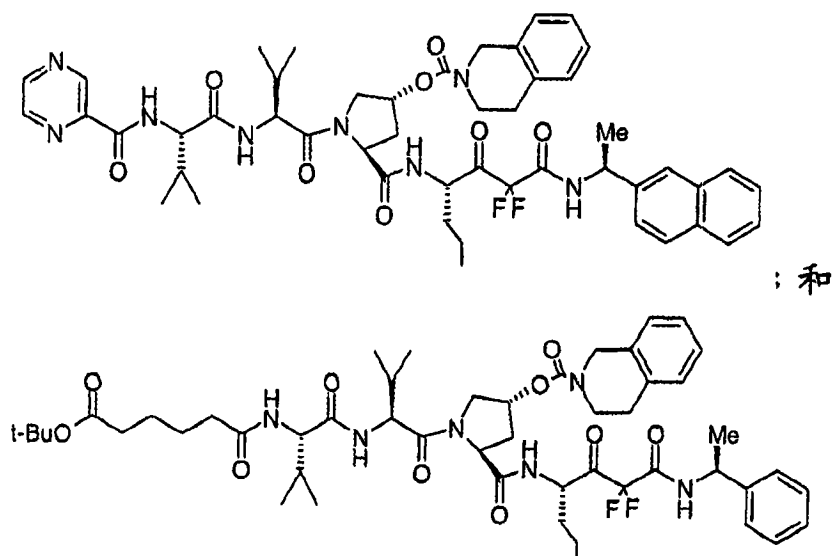


[0696] 根据制备以上化合物的以上方法和关于制备其中间产物的方法, 但使用适宜的原料制备以下化合物 DL-DN。

[0697]



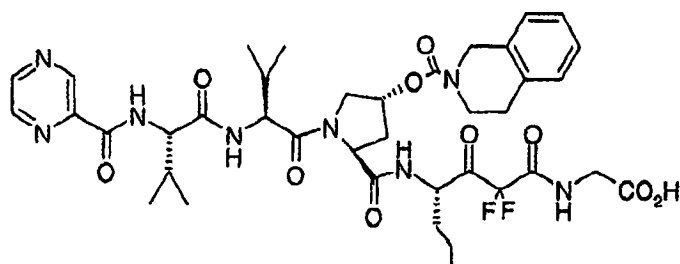
[0698]



[0699] 实施例 33- 化合物 D0-DS

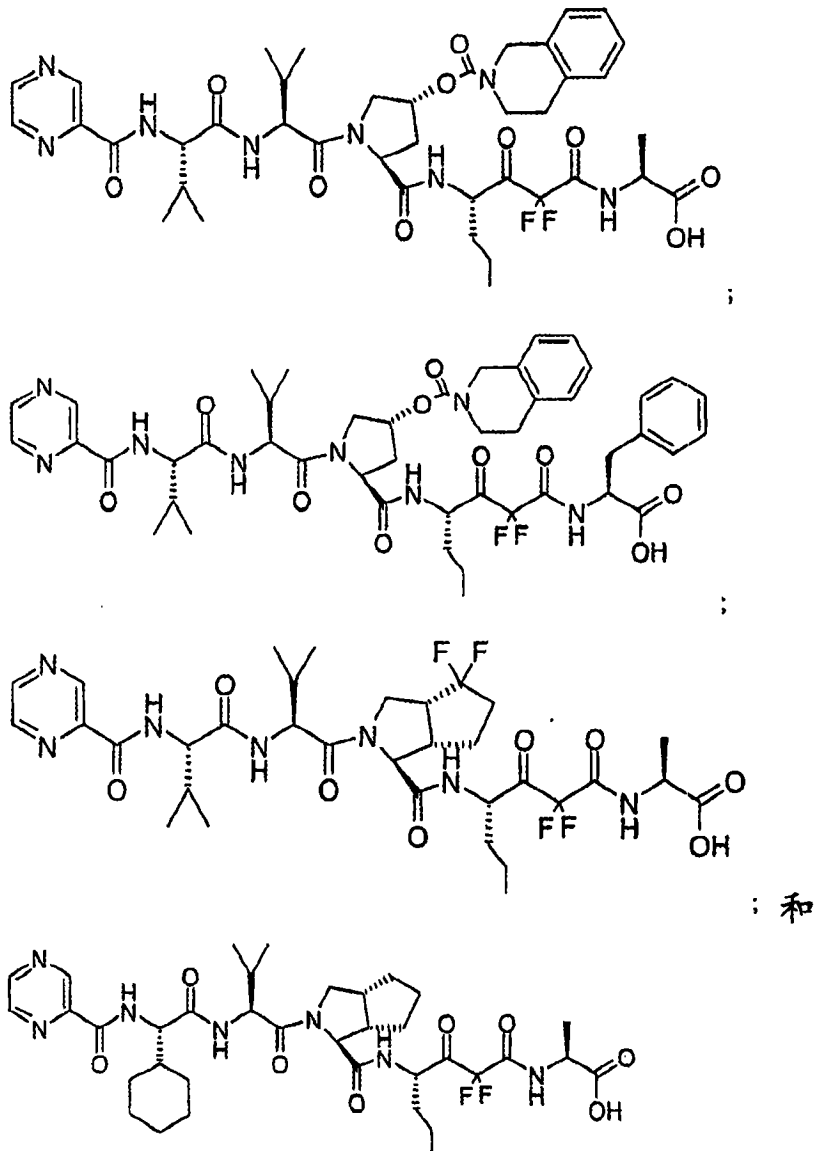
[0700] 使用 Pd/C(30% eq., 60mg, 10% 钯含量) 将化合物 clxii(174mg, 0.189mmol) 的 EtOH 溶液 (10mL) 氢化 2.5 小时。滤出催化剂。真空浓缩所得的滤液得到一种残余物, 通过半制备反相色谱法纯化残余物并冻干得到化合物 D0, 70% 产率。

[0701]



[0702] 根据制备以上化合物的以上方法和关于制备其中间产物的方法, 但使用适宜的原料制备以下化合物 DP-DS。

[0703]



[0704] 实施例 34- 化合物 CW :

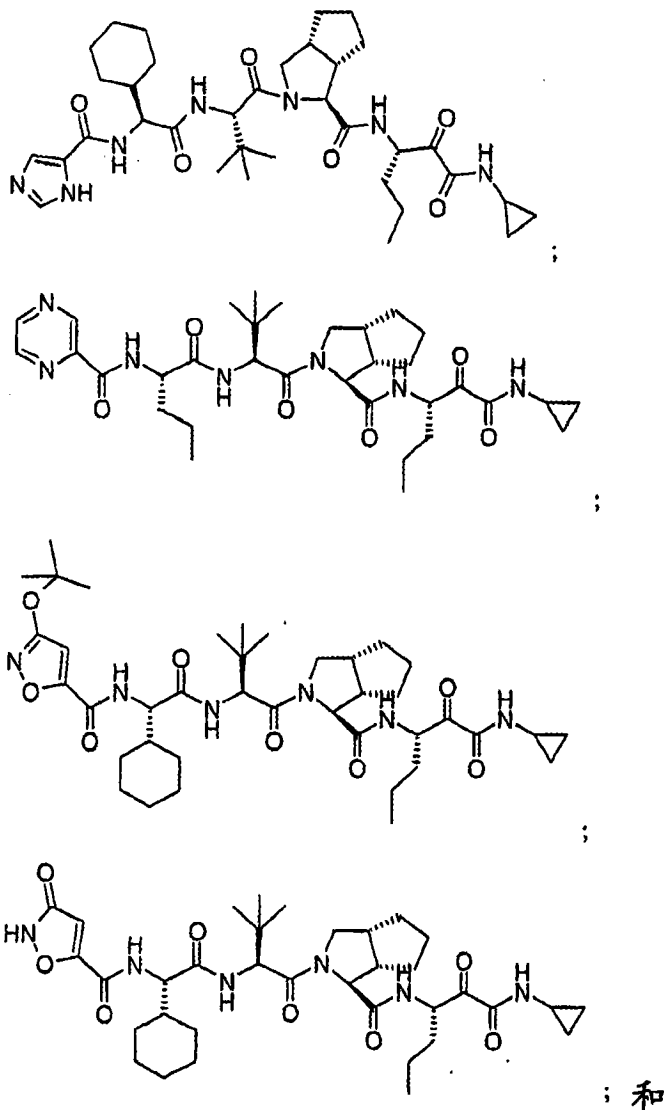
[0705] 将化合物 clxiii (175mg, 0.24mmol) 置于 DCM (3mL)。将 DMP 试剂 (120mg, 0.28mmol) 加到此溶液并搅拌 1 小时。用 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 中止反应并用饱和的 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤。用 70% EtOAc 纯化得到化合物 CW (134mg, 75%)。

[0706] 实施例 35- 化合物 CY 和 DT-DX :

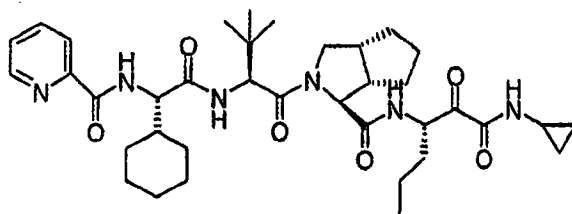
[0707] 将 DMP 试剂 (239mg, 0.56mmol) 加到 clxxii (290mg, 0.43mmol) 的 DCM 溶液 (15mL)。室温下将反应物搅拌 1 小时, 并用 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 中止反应 20 分钟。然后用 EtOAc 萃取所得的混合物。用盐水洗涤有机层, 干燥并真空浓缩。通过硅胶色谱法纯化所得的残余物 (8-100% EtOAc/ 己烷) 得到化合物 CY (151mg, 52%)。

[0708] 根据制备以上化合物的以上方法和关于制备其中间产物的方法, 但使用适宜的原料制备以下化合物 DT-DX。

[0709]



[0710]

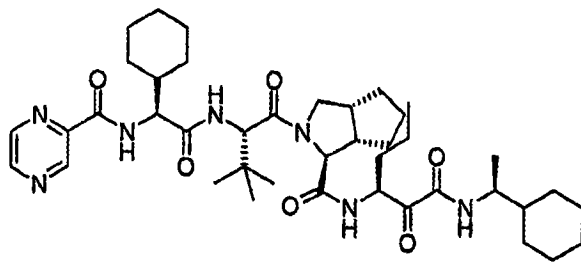


[0711] 实施例 36- 化合物 DY :

[0712] 将化合物 1xxxv (1.17mmol) 置于 DCM (5mL)。将 DMP 试剂 (545mg, 1.3mmol) 加到此溶液并搅拌 1 小时。用 P-Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (1.5mmol/g 树脂) 中止反应并搅拌 1 小时。加入 P-TBD 净化树脂 (2.5mmol/g 树脂) 并搅拌 45 分钟。过滤所得的混合物并用 50% EtOAc 纯化得到化合物 DY (440mg, 50.2%, 经过两步)。

[0713] 关于 P-TBD 净化树脂的参考文献: J. Parlow 等, Tetrahedron, 55, 6785-6796 (1999)。

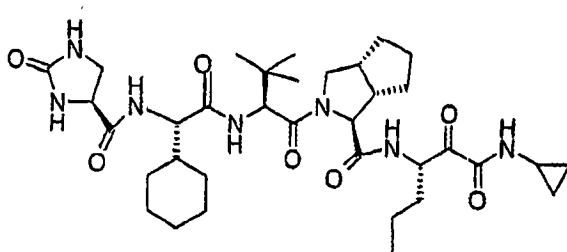
[0714]



[0715] 实施例 37- 化合物 DZ :

[0716] 将原料化合物 c1xxxxi (94mg, 0.14mmol) 溶于 THF (10mL) 和 DCM (20mL) 的混合物。然后加入 DMP 试剂 (118mg, 0.28mmol)。在室温下搅拌 2 小时后, 将反应物倾入包含 Dri Solv THF (120mL) 的分离漏斗。用 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (50mL) 洗涤反应物, 然后用盐水 (75mL) 洗涤。随后分离有机层, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 并在减压下除去溶剂。色谱处理 (硅胶 : 洗脱剂 50% Dri Solv THF/EtOAc, 然后 4% MeOH/THF) 后, 通过 MS 检查馏分。将适宜的级分冻干得到化合物 DZ (38.8mg, 41%)。

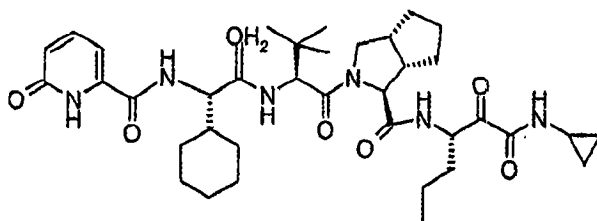
[0717]



[0718] 实施例 38- 化合物 EA-EB :

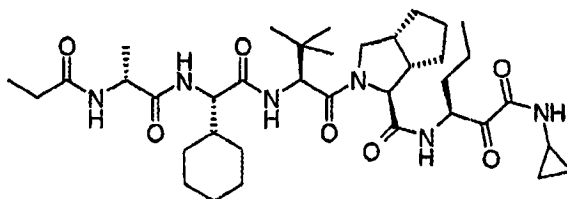
[0719] 将原料化合物 c1xxxxv (185mg, 0.26mmol) 溶于 THF (20mL)。然后加入 DMP 试剂 (219mg, 0.52mmol)。室温下搅拌 1 小时后, TLC 表明完全转化为酮 (5% MeOH/THF)。将反应物倾入包含 Dri Solv THF (120mL) 的分离漏斗。用 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (50mL) 洗涤反应物, 然后用盐水 (75mL) 洗涤。随后分离有机层, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥并减压除去溶剂得到一种残余物, 通过色谱法纯化残余物 (硅胶 : 洗脱剂 50% Dri Solv THF/EtOAc, 然后 4% MeOH/THF), 并用 UV 和 MS 检查级分。将适宜的级分冻干得到化合物 EA (159mg, 88%)。

[0720]



[0721] 根据制备以上化合物的以上方法和关于制备其中间产物的方法, 但使用适宜的原料制备以下化合物 EB :

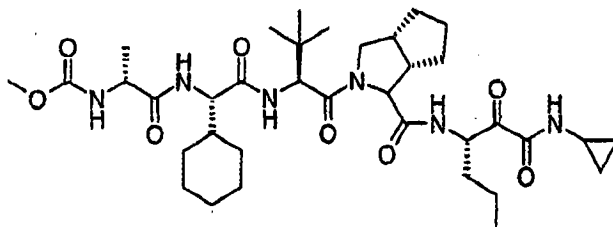
[0722]



[0723] 实施例 39- 化合物 EC-ED :

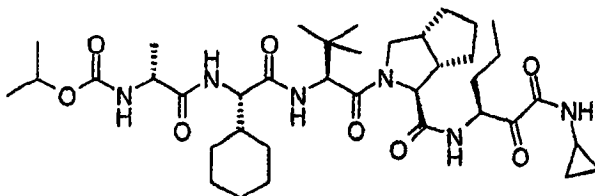
[0724] 将 DMP 试剂 (0.277g, 0.654mmol) 加到在冰浴中冷却的在 DCM(15mL) 中的化合物 clxxxxviii(0.341g, 0.503mmol) 的溶液。室温下将混合物搅拌 2 小时, 然后用 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 溶液中止反应, 并搅拌 20 分钟。用 DCM(3x20mL) 萃取所得的混合物并干燥 (MgSO<sub>4</sub>) 有机萃取物。在过滤除去 MgSO<sub>4</sub> 后, 浓缩滤液并用柱色谱法 (70% EtOAc/ 己烷) 纯化得到化合物 EC(0.183g, 54%), 为一种白色固体。

[0725]



[0726] 根据制备以上化合物的以上方法和关于制备其中间产物的方法, 但使用适宜的原料制备以下化合物 ED :

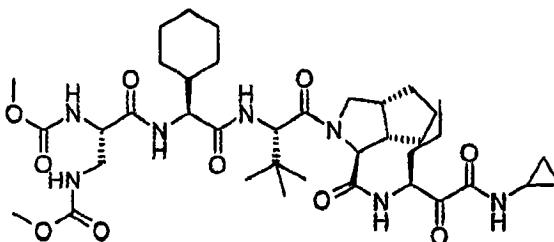
[0727]



[0728] 实施例 40- 化合物 EE-EG :

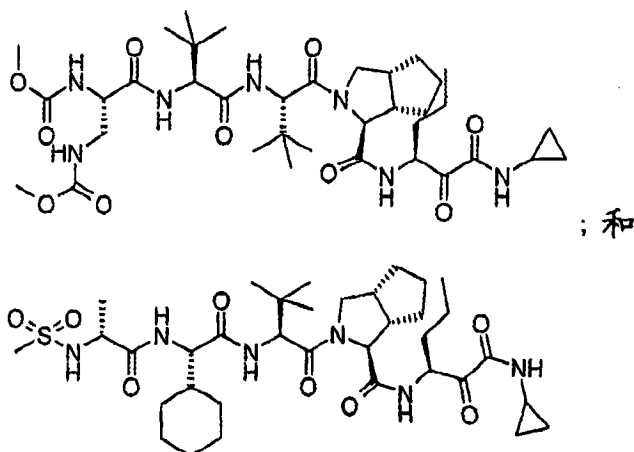
[0729] 将化合物 ccii (290mg, 0.37mmol) 置于 DCM(5mL)。将 DMP 试剂 (175mg, 0.41mmol) 加到此溶液并搅拌 1 小时。用 P-Na<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1.5mmol/g 树脂) 终止反应并搅拌 1 小时。用 P-TBD (2.5mmol/g 树脂) 净化中止反应的 DMP 试剂并搅拌 1 小时。过滤所得的混合物并用 DCM 冲洗, 然后浓缩成残余物。用 50% EtOAc/ 己烷纯化所得的残余物得到化合物 EE (440mg, 28%)。

[0730]



[0731] 根据制备以上化合物的以上方法和关于制备其中间产物的方法, 但使用适宜的原料制备以下化合物 EF-EG :

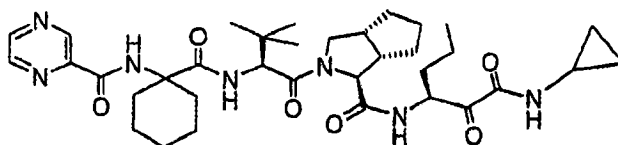
[0732]



[0733] 实施例 41- 化合物 EH:

[0734] 将 DMP 试剂 (133mg, 0.3mmol) 加到化合物 cciii (140mg, 0.2mmol) 的 DCM 溶液 (3mL)。室温下将反应物搅拌 2 小时并用 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (水溶液) 中止反应 20 分钟。用 EtOAc 萃取所得的混合物。用盐水洗涤有机层, 用  $\text{MgSO}_4$  干燥, 浓缩得到一种黄色油, 用硅胶 (70% EtOAc/ 己烷) 纯化, 并在冻干后得到化合物 EH (50mg, 38%)。

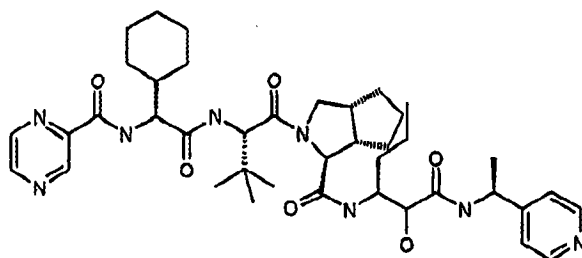
[0735]



[0736] 实施例 42- 化合物 EJ

[0737] 将化合物 ixiii (520mg, 1mmol) 置于 DCM (5mL)。将 PyBOP (624mg, 1.2mmol) 加到以上溶液并搅拌 5 分钟。将在 THE (5mL) 中的化合物 cdviii (300mg, 1.2mmol) 滴加到此溶液, 然后加入 DIPEA (0.22ml, 1.2mmol)。室温和氮气氛围下将反应物搅拌过夜。此时, 用 THE (5mL) 稀释反应物, 用饱和的  $\text{NaHCO}_3$  和盐水洗涤。用  $\text{MgSO}_4$  干燥有机相, 过滤并浓缩得到粗品偶联中间产物 cdix。

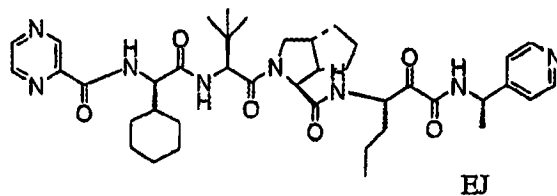
[0738]



cdix

[0739] 将此中间产物 cdix ( $\sim 1\text{mmol}$ ) 置于 DCM (10mL)。将 Dess-Martin Periodinane (466mg, 1.1mmol) 加到此溶液。室温下搅拌 1 小时后, 用结合聚合物的  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (740mg, 1.5mmol DMP/g 树脂) 中止反应并搅拌 45 分钟。然后用结合聚合物的 TBD 树脂 (440mg, 2.5mmol DMP/g 树脂) 净化反应混合物。将所得的混合物搅拌 45 分钟, 然后过滤。用 5% EtOH/EtOAc 完成纯化得到化合物 EJ (245mg, 32%, 经过两步)。关于处理方法的文献参考可见 Tetrahedron (四面体) 55 (1999) 6785-6796。

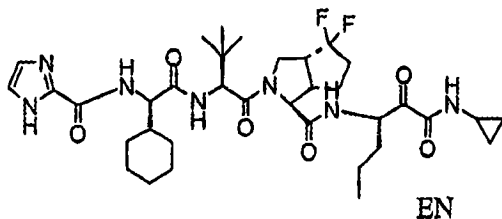
[0740]



[0741] 实施例 43- 化合物 EN

[0742] 将中间产物化合物 cdvii (415mg, 0.59mmol) 置于 DCM(10mL) 和 THF(10mL)。加入 t-BuOH(300 μL), 然后加入 Dess-Martin Periodinane (750mg, 1.77mmol)。将反应物搅拌 50 分钟, 然后用 P-Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (1.5mmol DMP/g 树脂) 中止反应。室温下搅拌 20 分钟后, 用 P-TBD (2.5mmol DMP/g 树脂) 净化反应混合物。搅拌 1 小时后, 将所得的混合物过滤并浓缩。通过硅胶色谱法 (50% 至 70% EtOAc/ 己烷) 纯化产物得到化合物 EN (220mg, 53%)。

[0743]



[0744] 如以下表 1 所示, 获得以下化合物的质谱 [M]。

[0745] 表 1

[0746] LY# 实施例 发现的质量

[0747]	A	733.3
[0748]	B	747.2
[0749]	C	657.2
[0750]	D	769.4
[0751]	E	733.4
[0752]	F	625.4
[0753]	G	639.3
[0754]	H	661.4
[0755]	I	643.4
[0756]	J	707.3
[0757]	K	641.3
[0758]	L	689.3
[0759]	M	639.3
[0760]	N	639.4
[0761]	O	731.4
[0762]	P	687.4
[0763]	Q	653.4
[0764]	R	701.4
[0765]	S	639.3
[0766]	T	747.1

---

[0767]	U	655.4
[0768]	V	653.4
[0769]	W	703.4
[0770]	X	661.3
[0771]	Y	647.3
[0772]	Z	663.3
[0773]	AA	667.4
[0774]	AB	711.4
[0775]	AC	725.4
[0776]	AD	647.3
[0777]	AE	779.4
[0778]	AF	689.3
[0779]	AG	671.4
[0780]	AK	806.4
[0781]	AH	687.5
[0782]	AI	735.4
[0783]	AJ	736.5
[0784]	AM	870.4
[0785]	AN	813.3
[0786]	AP	724.4
[0787]	AQ	653.4
[0788]	AR	628.2
[0789]	AW	642.2
[0790]	AX	614.2
[0791]	AY	628.3
[0792]	BD	570.3
[0793]	BE	520.2
[0794]	BF	534.3
[0795]	BG	584.3
[0796]	BU	890.3
[0797]	BV	685.4
[0798]	BW	679.3
[0799]	BX	695.3
[0800]	BY	697.3
[0801]	BZ	787.4
[0802]	CA	701.3
[0803]	CB	669.4
[0804]	CC	733.5
[0805]	CD	643.3

---

[0806]	CE	653.5
[0807]	CH	749.4
[0808]	CI	653.3
[0809]	CJ	717.5
[0810]	CK	683.4
[0811]	CL	669.3
[0812]	CM	675.2
[0813]	CN	717.2
[0814]	CO	653.3
[0815]	CP	683.3
[0816]	CQ	669.3
[0817]	CR	675.2
[0818]	CT	661.8
[0819]	CS	639.3
[0820]	CU	679.2
[0821]	CV	709.3
[0822]	CW	743.3
[0823]	CX	695.3
[0824]	CY	665.2
[0825]	CZ	681.3
[0826]	DA	695.3
[0827]	DB	701.2
[0828]	DC	673.3
[0829]	DD	693.3
[0830]	DE	757.4
[0831]	DF	682.3
[0832]	DG	676.3
[0833]	DH	676.2
[0834]	DI	692.5
[0835]	DJ	605.2
[0836]	DK	874.4
[0837]	DL	924.5
[0838]	DM	924.2
[0839]	DN	952.7
[0840]	DO	830
[0841]	DP	842.5
[0842]	DT	667.4
[0843]	DU	639.2
[0844]	DV	740.3

[0845]	DW	684.2
[0846]	DX	678.5
[0847]	DY	749.3
[0848]	DZ	685.3
[0849]	EA	649.3
[0850]	EB	700.3
[0851]	EC	702.3
[0852]	ED	730.3
[0853]	EE	775.3
[0854]	EF	749.3
[0855]	EG	722.3
[0856]	EH	665.2
[0857]	EI	796.4
[0858]	EJ	744.3
[0859]	EK	730.5
[0860]	EL	730.5
[0861]	EM	757.3
[0862]	EN	703.5
[0863]	EO	715.5
[0864]	EP	679.2
[0865]	EQ	651.3
[0866]	ER	715.3
[0867]	ES	668.5
[0868]	ET	732.5
[0869]	EU	743.3
[0870]	EV	683.3
[0871]	EW	750.4
[0872]	EX	786.4
[0873]	EY	744.5
[0874]	EZ	780.4
[0875]	FB	693.4
[0876]	FC	655.3
[0877]	FD	655.3
[0878]	FE	774.4
[0879]	FF	681.5
[0880]	FG	667.5

[0881] 如下表 2 所示, 获得以下化合物的高分辨率质谱 (HRMS)。

[0882] 表 2

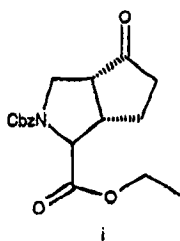
[0883]

实施例	分子式 (M+1)	MS 计算值 (M+1)	MS 实测值 (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
无	C41H58N7O6	744.4448	744.4691

[0884] 中间产物实施例 1- 化合物 ii

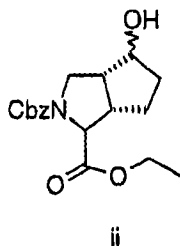
[0885] -10 °C 下将 NaBH<sub>4</sub> (924mg, 24.4mmol) 加到化合物 i (8.1g, 24.4mmol) 的乙醇溶液 (40mL) 中。

[0886]



[0887] 室温下将反应物搅拌 30 分钟,然后用 AcOH(3mL) 中止反应。用 EtOAc(250mL) 稀释反应混合物,并用 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤。干燥有机层并真空浓缩得到一种残余物,用硅胶色谱法(50% EtOAc/ 己烷)纯化得到 7.85g(97%) 化合物 ii,

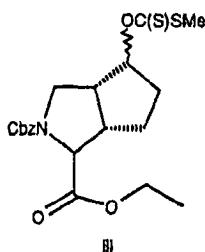
[0888]



[0889] 中间产物实施例 2- 化合物 iii

[0890] 将 0℃ 的 NaH(699mg, 60%, 17.42mmol) 加到化合物 ii(4.48g, 13.4mmol) 的 THF 溶液(70mL)。在此温度下搅拌 40 分钟,加入纯净的 MeI(1.25mL, 20.1mmol)。在大约室温下将反应物搅拌过夜。此时,在 0℃ 下小心地用饱和 NH<sub>4</sub>Cl 溶液中止反应。用 Et<sub>2</sub>O 和 EtOAc 萃取反应混合物。用水、盐水洗涤有机层并用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥。真空浓缩如此得到的有机层得到黄原酸盐化合物 iii,

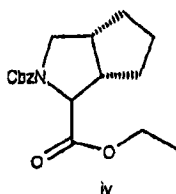
[0891]



[0892] 中间产物实施例 3- 化合物 iv

[0893] 将黄原酸盐化合物 iii( ~ 13.4mmol) 溶于甲苯(100mL)。将 AIBN(216mg, 1.34mmol) 加到此溶液。用干燥氮将所得的溶液脱气,然后用 n-Bu<sub>3</sub>SnH(5.4mL, 20.1mmol) 处理。在 90℃ 下将反应混合物加热 3 小时。此时,将反应物冷却至室温并真空浓缩。用硅胶色谱法(15-20% EtOAc/ 己烷)纯化所得的残余物得到 2.8g(66%, 从化合物 ii 开始计算的) 化合物 iv,

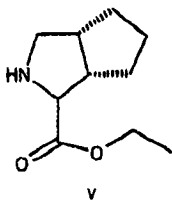
[0894]



[0895] 中间产物实施例 4- 化合物 v

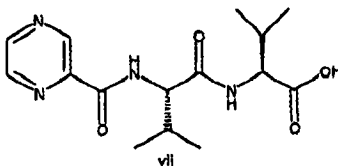
[0896] 在氮气流下将 Pd(OH)<sub>2</sub>/C(655mg, 20%, 0.95mmol) 加到化合物 iv(1g, 3.15mmol) 的乙醇溶液 (21mL) 中。将所得的反应混合物进行标准氢化 (1.5atm)。5 小时后, 除去氢源并过滤反应物。真空浓缩滤液得到游离胺化合物 v,

[0897]



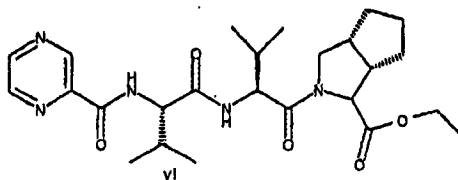
[0898] 中间产物实施例 5- 化合物 vi

[0899]



[0900] 在大约室温下将 HOAt (265mg, 1.95mmol) 加到化合物 vii (629mg, 1.95mmol) 的 DCM 溶液 (10mL), 然后加入在 DCM (1.95mL, 1.95mmol) 中的 1M DCC 溶液。搅拌 30 分钟后, 将化合物 v (1.5mmol) 的 DCM 溶液 (3mL) 加到上述 HOAt- 活化的酸。在大约室温下将反应物搅拌过夜。此时, 通过硅藻土过滤反应物。用 EtOAc (75mL) 稀释滤液并用水和盐水洗涤。将有机层干燥并真空浓缩。通过硅胶色谱法纯化所得的残余物 (70-80% EtOAc/ 己烷) 得到 620mg (85%) 化合物 vi,

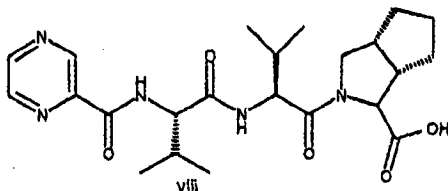
[0901]



[0902] 中间产物实施例 6- 化合物 viii

[0903] 将 2N NaOH 水溶液 (1.26mL, 2.52mmol) 加到化合物 vi (615mg, 1.26mmol) 的乙醇溶液 (10mL)。在大约室温下将反应物搅拌过夜, 然后用 Dowex 酸性树脂酸化至 pH 3。滤出固体并在真空下浓缩滤液得到一种残余物, 将此残余物溶于 1 : 1 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O。将此溶液冻干得到 495mg (85%) 化合物 viii,

[0904]

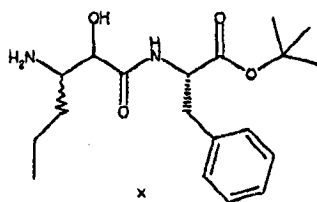


[0905] 中间产物实施例 7- 化合物 ix

[0906] 将 PyBop (417mg, 0.8mmol) 加到化合物 viii (230mg, 0.5mmol) 的 DCM 溶液 (10mL)。在大约室温下将混合物搅拌 30 分钟。然后将化合物 x (263mg, 0.75mmol) 的 THF 溶液

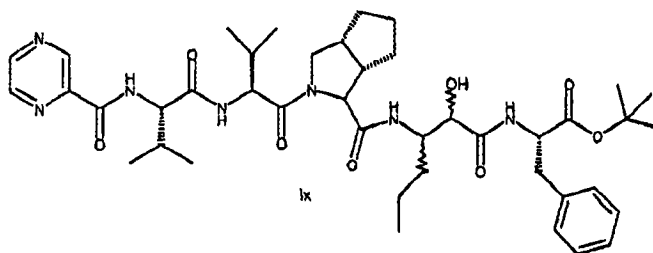
(5.25mL) 加到此溶液, 然后加入 DIPEA (0.174mL, 1mmol)。

[0907]



[0908] 在大约室温下将反应物搅拌过夜, 然后用水 (30mL) 中止反应 30 分钟。用 EtOAc (100mL) 萃取反应混合物。用盐水洗涤有机层和干燥并真空浓缩得到一种残余物, 通过硅胶色谱法 (5% EtOH/EtOAc) 纯化此残余物得到 ~ 400mg (100%) 化合物 ix,

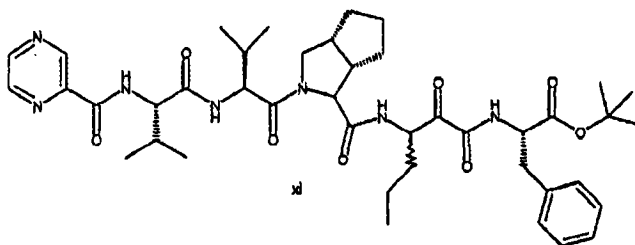
[0909]



[0910] 中间产物实施例 8- 化合物 xi

[0911] 将 DMP 试剂 (278mg, 0.65mmol) 加到化合物 ix (396mg, 0.5mmol) 的 DCM 溶液 (10mL)。在大约室温下将反应物搅拌 1 小时, 然后用 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 终止 30 分钟。用 EtOAc (75mL) 萃取反应混合物并用盐水洗涤。将有机层干燥并真空浓缩。用硅胶色谱法 (70% EtOAc/ 己烷) 纯化所得的残余物得到 320mg (81%) of 化合物 xi,

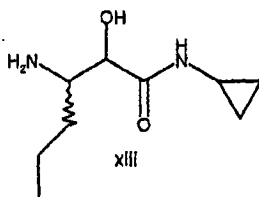
[0912]



[0913] 中间产物实施例 9- 化合物 xii

[0914] 将 PyBop (417mg, 0.8mmol) 加到化合物 viii (230mg, 0.5mmol) 的 DCM 溶液 (10mL) 溶液。在大约室温下将反应物搅拌 30 分钟。将化合物 xiii (140mg, 0.75mmol) 的 THF 溶液 (3.5mL) 加到此溶液,

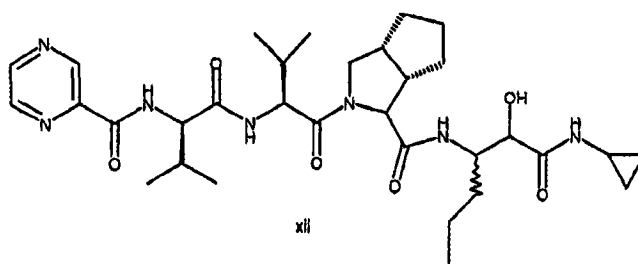
[0915]



[0916] 然后加入 DIPEA (0.174mL, 1mmol)。在大约室温下将反应物搅拌过夜, 然后用水 (30mL) 终止 30 分钟。用 EtOAc (75mL) 萃取反应混合物。用盐水洗涤有机层, 并干燥和真空浓缩得到一种残余物, 通过硅胶色谱法 (5% EtOH/EtOAc) 纯化此残余物, 以定量产率得到

化合物 xii,

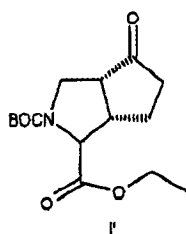
[0917]



[0918] 中间产物实施例 10- 化合物 i'

[0919] 将  $(\text{BOC})_2\text{O}$  (3.3g, 15.1mmol) 和  $\text{H}_2/\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  (1.6g, 10% Pd 含量) 加到化合物 i (5g, 15.1mmol) 的甲醇溶液 (30mL)。在大约室温下将反应物搅拌 2 小时, 然后通过硅藻土过滤两次。用 DCM 冲洗硅藻土床。真空浓缩合并的滤液得到一种油状残余物, 用硅胶色谱法 (40% EtOAc/ 己烷) 纯化此残余物得到 3.8g (85%) 化合物 i' ,

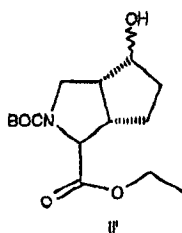
[0920]



[0921] 中间产物实施例 11- 化合物 ii'

[0922]  $0^\circ\text{C}$  下将  $\text{NaBH}_4$  (0.805g, 21mmol) 加到化合物 i' (3.7g, 12.5mmol) 的甲醇溶液 (111mL)。 $0^\circ\text{C}$  下搅拌 2.5 小时, 真空下缓慢蒸发反应溶剂得到一种残余物, 用 EtOAc 稀释此残余物。然后用水洗涤溶液两次。用 EtOAc 萃取水层。用  $\text{MgSO}_4$  干燥合并的有机层并过滤和真空浓缩, 得到一种残余物, 用色谱法纯化得到 3.76g (99%) 化合物 ii' ,

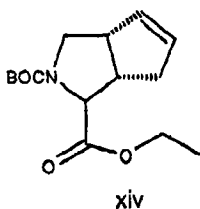
[0923]



[0924] 中间产物实施例 12- 化合物 xiv

[0925]  $0^\circ\text{C}$  下将 DMAP (5g, 40.1mmol) 加到化合物 ii' (3.76g, 12.3mmol) 的 DCM 溶液 (180mL), 然后加入  $\text{Tf}_2\text{O}$  (4mL, 23.7mmol)。在  $0^\circ\text{C}$  下将反应物搅拌 1 小时, 并在大约室温下再搅拌 1.5 小时。然后用 5%  $\text{NaHCO}_3$  洗涤反应混合物两次并用  $\text{MgSO}_4$  干燥。真空浓缩如此得到的有机层得到三氟乙酸盐粗产物。将所得的三氟乙酸盐 (2.7g, 6mmol) 溶于 DCM (120mL)。将 DMAP (2.5g, 20.5mmol) 加到此溶液。将所得的反应混合物加热至回流过夜。此时, 将反应物冷却至室温, 并用 5%  $\text{NaHCO}_3$  洗涤两次。用  $\text{MgSO}_4$  干燥反应混合物, 过滤并真空浓缩得到一种褐色油状残余物, 将其纯化 (1% MeOH/DCM) 得到 500mg (30%) 化合物 xiv,

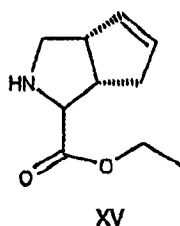
[0926]



[0927] 中间产物实施例 13- 化合物 xv

[0928] 将化合物 xiv (500mg, 1.8mmol) 溶于在二噁烷 (6.75mL) 中的 4N HCl。在大约室温下将反应物搅拌约 4 小时。此时, 真空下除去溶剂。用二乙醚将所得的残余物滴定两次, 几乎以定量产率得到化合物 xv 的 HCl 盐,

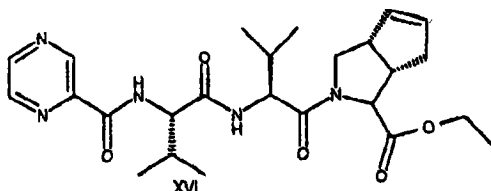
[0929]



[0930] 中间产物实施例 14- 化合物 xvi

[0931] 将 HOAt (245mg, 1.8mmol) 和 DCC (1.8ml, 1M DCM 溶液) 加到化合物 vii (579mg, 1.8mmol) 的 THF 溶液 (7mL)。得到悬浮液。在大约室温下搅拌 15 分钟后, 将化合物 xv (1.8mmol) 和 DIPEA (0.63ml, 3.6mmol) 的 THF 溶液 (6mL) 加到以上悬浮液。其后再加入 DIPEA (0.8mL)。在大约室温下将反应混合物搅拌过夜。此时, 滤出如此形成的白色固体。用 THF 冲洗该白色固体。真空浓缩合并的滤液和洗液得到粗产物, 用硅胶色谱法 (100% EtOAc) 纯化该粗产物得到 665mg (76%) 化合物 xvi,

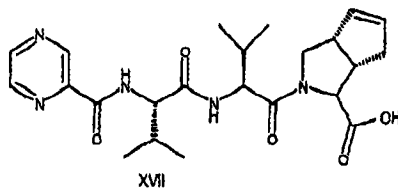
[0932]



[0933] 中间产物实施例 15- 化合物 xvii

[0934] 0°C 下将 1N NaOH (2.4mmol) 水溶液加到 7 (665mg, 1.37mmol) 的乙醇溶液。在大约室温下将反应物搅拌过夜, 然后用 Dowex 酸性树脂酸化至 pH 3。过滤固体。真空浓缩所得的滤液得到一种浅黄色残余物, 将此残余物溶于 1 : 1 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, 并冻干得到 467mg (74%) 化合物 xvii,

[0935]

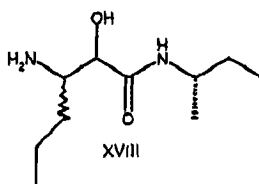


[0936] 中间产物实施例 16- 化合物 xix

[0937] 在大约室温下用 PyBop (207mg, 0.4mmol) 对化合物 xvii (100mg, 0.22mmol) 的 DCM 溶液 (4mL) 处理 20 分钟。此时, 用化合物 xviii (65mg, 0.32mmol) 的 THF 溶液 (2.6mL) 处

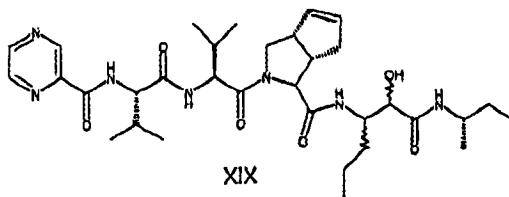
理以上溶液,然后用 DIPEA

[0938]



[0939] (0.076mL) 处理。在大约室温下搅拌 7 小时后,用水中止反应。用 DCM(60mL) 稀释反应混合物。分离有机层,用盐水洗涤两次并用  $MgSO_4$  干燥。过滤后,浓缩并进行硅胶色谱处理 (5% EtOH/EtOAc),得到 148mg (~ 100%) 化合物 xix。

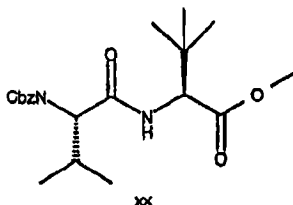
[0940]



[0941] 中间产物实施例 17- 化合物 xx

[0942] 将 HOBT(7.72g, 57.2mmol) 和 EDCI(10.98g, 57.2mmol) 加到 N-Cbz-L-缬氨酸(14.4g, 57.2mmol) 的 THF 溶液 (100mL)。在大约室温下搅拌 20 分钟后,将含有叔-L-亮氨酸甲酯-盐酸盐(104g, 57.2mmol) 和 DIPEA(11.9ml, 68.7mmol) 的 THF 溶液 (50mL) 加到以上溶液。在大约室温下将反应物搅拌过夜。在进行标准水后处理和硅胶色谱处理 (30% EtOAc/ 己烷) 后,得到 14g(64%) 化合物 xx。

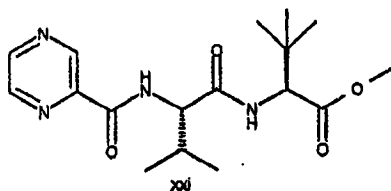
[0943]



[0944] 中间产物实施例 18- 化合物 xxi

[0945] 将 (在  $N_2$  气流下) Pd/C(1.88g, 10% Pd 含量) 加到 xx(6.71g, 17.7mmol) 的甲醇溶液 (80mL)。在大约室温下将反应容器氢化 (1atmH<sub>2</sub>) 过夜。此时,通过硅藻土垫过滤反应混合物,并真空浓缩得到相应的用于下一步的游离胺粗产物。将此胺 (~ 17.7mmol) 的 THF 溶液加到包含 2-吡嗪-甲酸(2.85g, 23mmol)、Hobbit(3.12g, 23mmol) 和 EDCI(4.41g, 23mmol) 的 THF(46mL) 和 DMF(5mL) 溶液中。将 DIPEA(3.08g, 17.7mmol) 加入所得的混合物。在大约室温下将反应物搅拌过夜,然后用水中止反应。用 EtOAc 萃取反应混合物。用盐水洗涤有机层并真空浓缩得到一种残余物,通过硅胶色谱法 (40-50% EtOAc/ 己烷) 纯化得到 3.9g(63%) 化合物 xxi,

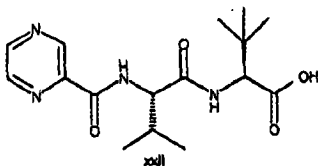
[0946]



[0947] 中间产物实施例 19- 化合物 xxi

[0948] 将 2N NaOH(10ml, 20mmol) 加到化合物 xxi(4.67g, 13.34mmol) 的甲醇溶液(40mL)。在大约室温下将反应物搅拌 2 小时。此时, 将附加量的 2N NaOH(3.3ml, 6.67mmol) 加到此反应混合物。在大约室温下搅拌过夜后, 使用酸性树脂将反应物酸化至 pH3。然后过滤反应物, 并将滤液真空浓缩得到一种残余物, 将其溶于 1 : 1 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 用于冻干。获得 4.15g(93%) 化合物 xxii。

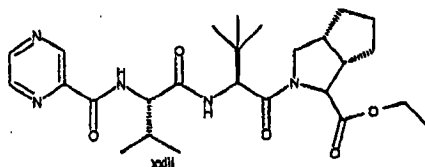
[0949]



[0950] 中间产物实施例 20- 化合物 xxiii

[0951] 用 HOAt(371mg, 2.73mmol) 和 DCC(2.73ml, 1M, 2.73mmol) 处理化合物 xxii(917mg, 2.73mmol) 的 DCM 溶液(10mL)。搅拌 30 分钟后, 用化合物 v(500mg, 2.73mmol) 的 THF 溶液(10mL) 处理反应混合物。在大约室温下搅拌过夜后, 过滤白色固体(尿素)。真空浓缩滤液得到一种残余物, 通过硅胶色谱法(60-70% EtOAc/ 己烷) 纯化此残余物得到 1.06g(77%) 化合物 xxiii,

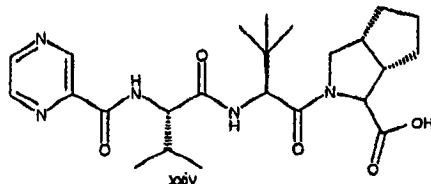
[0952]



[0953] 中间产物实施例 21- 化合物 xxiv

[0954] 用 2N NaOH(2.11ml, 4.23mmol) 处理化合物 xxiii(1.06g, 2.11mmol) 的乙醇溶液(20mL)。在大约室温下搅拌过夜后, 用酸性树脂将反应混合物酸化至 pH 3。滤出固体。真空浓缩所得的滤液得到一种残余物, 将此残余物冻干得到 ~ 1g(100%) 化合物 xxiv,

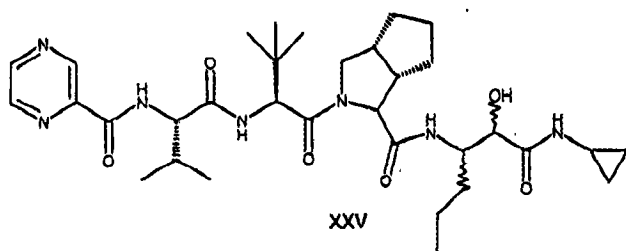
[0955]



[0956] 中间产物实施例 22- 化合物 xxv

[0957] 用 PyBop(417mg, 0.8mmol) 处理化合物 xxiv(236.7mg, 0.5mmol) 的 DCM 溶液(10mL)。在大约室温下搅拌 20 分钟后, 用化合物 xiii(139.5mg, 0.75mmol) 的 DMF 溶液(5.6mL) 处理反应混合物, 然后用 DIPEA(0.174ml, 1mmol) 处理。在大约室温下搅拌 8 小时后, 用水中止反应并用 Et OAc 萃取。用盐水洗涤所得的有机层, 干燥并真空浓缩得到一种残

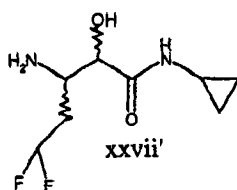
余物,通过硅胶色谱法 (5% EtOH/EtOAc) 纯化此残余物得到~ 320mg (100%) 化合物 xxv, [0958]



[0959] 中间产物实施例 23- 化合物 xxvi

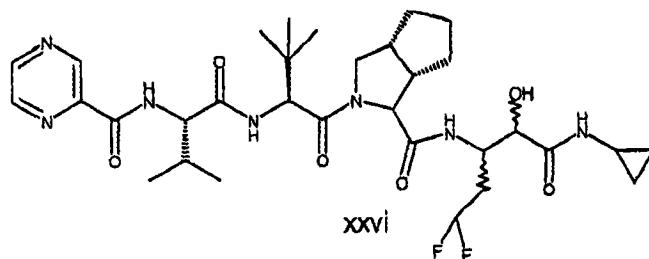
[0960] 用 PyBop (622mg, 1.2mmol) 处理化合物 xxiv (355mg, 0.75mmol) 的 DCM 溶液 (15mL)。在大约室温下搅拌 20 分钟后,用化合物 xxvii' (156mg, 0.75mmol) 的 THF 溶液 (10mL)

[0961]



[0962] 处理反应混合物,然后用 DIPEA (0.26ml, 1.5mmol) 处理。在大约室温下搅拌过夜后,用水中止反应并用 EtOAc 萃取。用盐水洗涤所得的有机层,干燥并真空浓缩得到一种残余物,通过硅胶色谱法 (2% EtOH/EtOAc) 纯化此残余物得到~ 400mg (80%) 的化合物 xxvi,

[0963]



[0964] 中间产物实施例 24-5- 氰基戊酸甲酯

[0965] 将氰化钾 (4g, 61.44mmol) 溶于 70mL 水和 200mL 甲醇。加入 10g (51.2mmol) 5- 溴戊酸甲酯溶液并将混合物回流过夜。将反应混合物浓缩至干。将 100mL EtOAc 加到此残余物以萃取产物。用水洗涤有机层三次,干燥并浓缩得到 5.37g (74%) 5- 氰基戊酸甲酯,为一种油。

[0966] 中间产物实施例 25-5- 四唑-5-基戊酸甲酯

[0967] 将 5- 氰基戊酸甲酯 (4.8g, 34mmol) 溶于甲苯,加入氯化三乙基铵 (14g, 102mmol) 和叠氮化钠 (6.63g, 102mmol)。加热混合物至回流过夜。将反应混合物冷却至室温,加入水以从有机层中萃取 (3x100mL) 5- 四唑-5-基戊酸甲酯。将浓 HCl 加到水相以调节 pH 至 2。用 EtOAc (3x50mL) 从水溶液中萃取产物。合并有机层,干燥并浓缩得到 4.25g (68%) 5- 四唑-5-基戊酸甲酯。

[0968] 中间产物实施例 26-5-[N-(1,1-二甲基苄基)四唑-5-基]戊酸甲酯

[0969] 将 5-四唑-5-基戊酸甲酯 (4.23g, 23mmol) 和三氯乙酸 (8.69g, 53mmol) 溶于 50mLCHCl<sub>3</sub>。将  $\alpha$ -甲基苯乙烯 (2.72, 23mmol) 滴加到此溶液, 并在大约室温下将反应混合物搅拌过夜。用 EtOAc 将反应混合物稀释至 200mL, 用 10% KOH 水溶液和盐水洗涤有机层。干燥有机层, 浓缩。通过闪烁柱色谱法纯化产物得到 6.6g (95%) 5-[N-(1,1-二甲基苄基)四唑-5-基]戊酸甲酯。

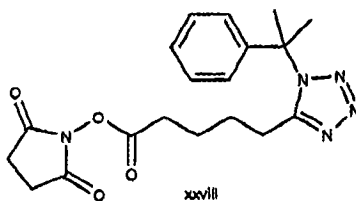
[0970] 中间产物实施例 27-5-[N-(1,1-二甲基苄基)四唑-5-基]戊酸

[0971] 将 5-[N-(1,1-二甲基苄基)四唑-5-基]戊酸甲酯 (6.6g, 21.8mmol) 溶于甲醇 (100mL) 并加入 23mL 1N NaOH 水溶液。将混合物搅拌过夜并浓缩除去甲醇。将残余物溶于水 (100mL), 并通过加入同当量的 1N HCl 水溶液中和此溶液。用 EtOAc (3x50mL) 萃取产物。将有机层干燥并浓缩得到 4.75g (75%) 5-[N-(1,1-二甲基苄基)四唑-5-基]戊酸。

[0972] 中间产物实施例 28- 化合物 xxviii

[0973] 将 5-[N-(1,1-二甲基苄基)四唑-5-基]戊酸 (4.75g, 16.5mmol) 溶于 DCM (100mL), 加入 4.8g (24.8mmol) EDCI 和 6mL DIPEA。将 N-羟基琥珀酰亚胺 (3.8g, 33mmol) 加到此混合物。在大约室温下将此反应混合物搅拌 3 小时。用 DCM 将混合物稀释至 200mL, 并用水将溶液洗涤三次。将有机层干燥并浓缩得到 4.79g (75%) 化合物 xxviii,

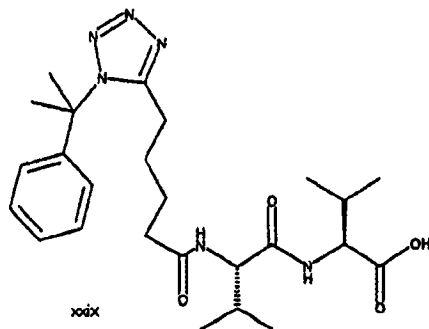
[0974]



[0975] 中间产物实施例 29- 化合物 xxix

[0976] 将二肽 H-Val-Val-OH (3.22g, 14.9mmol) 悬浮在 50mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF), 并加入 4.75g (12.42mmol) 化合物 xxviii, 然后加入 3.4mL (18.63mmol) 二异丙基乙基胺 (DIPEA)。将混合物加热至 40°C 并搅拌过夜。高度真空下蒸发溶剂。将残余物溶于 EtOAc, 并用 1N HCl 和盐水洗涤得到 5.52g (91%) 化合物 xxix,

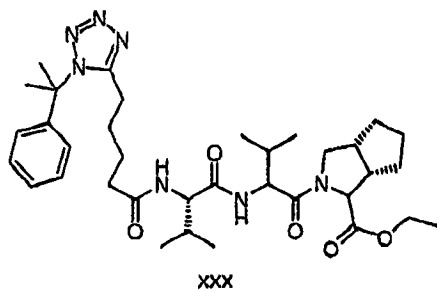
[0977]



[0978] 中间产物实施例 30- 化合物 xxx

[0979] 将 1.6g (3.29mmol) 化合物 xxix 溶于 20mL DCM, 加入在 THF 中的 3.3mL 1M 的 DCC 溶液。将 500mg (2.73mmol) 化合物 v 加到此混合物。在大约室温下将混合物搅拌过夜。用 EtOAc 将混合物稀释至 100mL 并用 1N HCl、NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤。通过柱色谱法 (50% EtOAc/己烷) 纯化得到 1.02g (58%) 化合物 xxx,

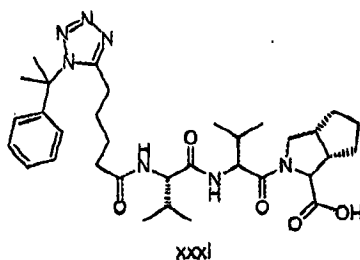
[0980]



[0981] 中间产物实施例 31- 化合物 xxxi

[0982] 将化合物 xxx (1.02g, 1.57mmol) 溶于 10mL MeOH, 并加入 2mL 1N NaOH 水溶液。将混合物搅拌过夜。蒸发除去甲醇, 将残余物溶于水, 并用 2mL HCl 中和。在用 EtOAc 萃取后, 得到 1.00g (~100%) 化合物 xxxi。

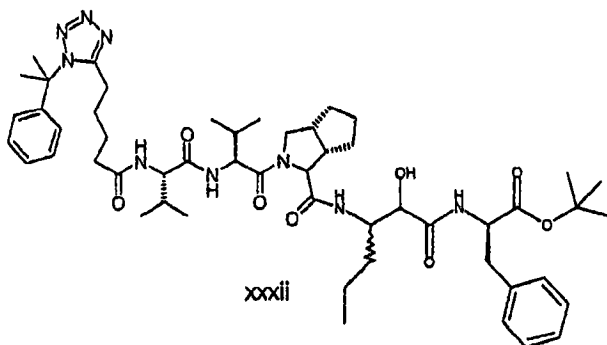
[0983]



[0984] 中间产物实施例 32- 化合物 xxxii

[0985] 将化合物 xxxi (300mg, 0.48mmol) 和 PyBop (300mg, 0.58mmol) 溶于 10mL DCM。将化合物 x (201mg, 0.58mmol) 加到此溶液, 然后加入 DIPEA (104 μl)。在大约室温下将混合物搅拌过夜。然后用 EtOAc 将反应混合物稀释至 100mL, 用 1N HCl 洗涤两次, 用 NaHCO<sub>3</sub> 洗涤两次并用盐水洗涤三次。干燥有机层并浓缩。通过柱色谱法 (100% EtOAc) 纯化残余物得到 450mg (98%) 化合物 xxxii,

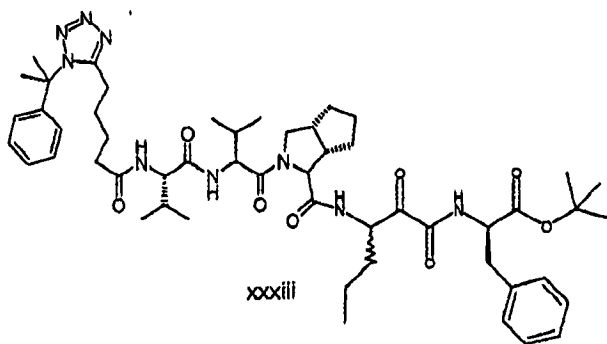
[0986]



[0987] 中间产物实施例 33- 化合物 xxxiii

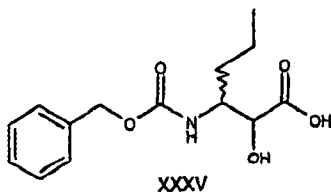
[0988] 将化合物 xxxii 360mg (0.38mmol) 溶于 8mL DCM 并加入 240mg (0.57mmol) DMP 试剂。在大约室温下将混合物搅拌 3 小时。用 EtOAc 将混合物稀释至 50mL, 并用盐水洗涤三次。通过柱色谱法 (25% 乙醇 /EtOAc) 纯化产物得到 300mg (83%) 化合物 xxxiii,

[0989]



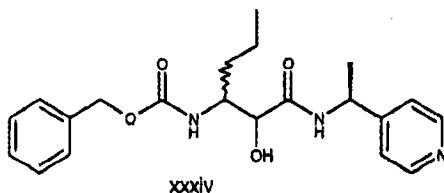
[0990] 中间产物实施例 34- 化合物 xxxiv

[0991]



[0992] 将 PyBop(1.7g, 3.36mmol) 和 Hobbit(450mg, 3.36mmol) 加到 xxxv(790mg, 2.80mmol) 的 DCM 溶液(10mL)。将所得的溶液冷却至 0℃并用 (s)- $\alpha$ -(4-吡啶基)乙基胺(410mg, 3.36mmol) 的 DCM 溶液(3mL) 处理。然后加入 DIPEA(0.5ml, 3.36mmol)。在大约室温下将反应物搅拌过夜。此时,用 EtOAc 稀释反应混合物。用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤全部混合物。将如此得到的有机层干燥并真空浓缩。通过硅胶色谱法纯化所得的残余物(5% EtOH/EtOAc) 得到 630mg(58%) 化合物 xxxiv,

[0993]

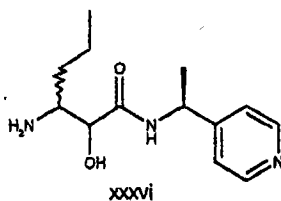


[0994] 注:(s)- $\alpha$ -(4-吡啶基)乙基胺由其 D-酒石酸盐通过碱洗(1N NaOH) 和随后的 EtOAc 萃取而获得。回收率为 89%。

[0995] 中间产物实施例 35- 化合物 xxxvi

[0996] N<sub>2</sub>Pd/C(150mg, 10% 钯含量) 下加入化合物 xxxiv(630mg, 1.64mmol) 的甲醇溶液(15mL)。在 H<sub>2</sub> 下将反应物搅拌过夜。通过 Celite<sup>®</sup> 521 垫过滤反应混合物。真空浓缩滤液得到 420mg( ~ 100%) 化合物 xxxvi,

[0997]

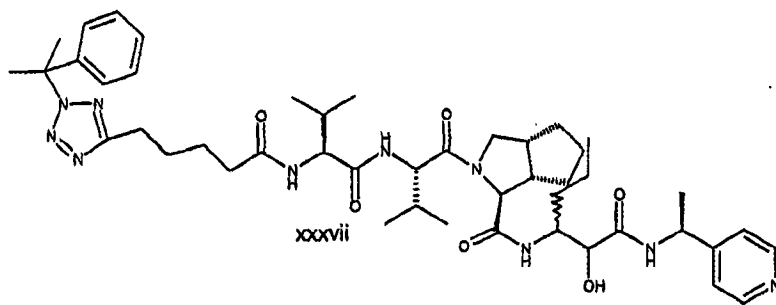


[0998] 中间产物实施例 36- 化合物 xxxvii

[0999] 将 PyBop(270mg, 0.52mmol) 加到化合物 xxxi(270mg, 0.43mmol) 的 DCM 溶液(3mL)。然后加入化合物 xxxvi(160mg, 0.64mmol) 和 DIPEA(0.09ml, 0.52mmol)。在大约室

温下搅拌反应物。此时,用 EtOAc 稀释产物并用 0.1N HCl 洗涤,然后加入饱和的 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水。将所得的有机层干燥和浓缩得到化合物 xxxvii (430mg 总质量) 用于下一步。

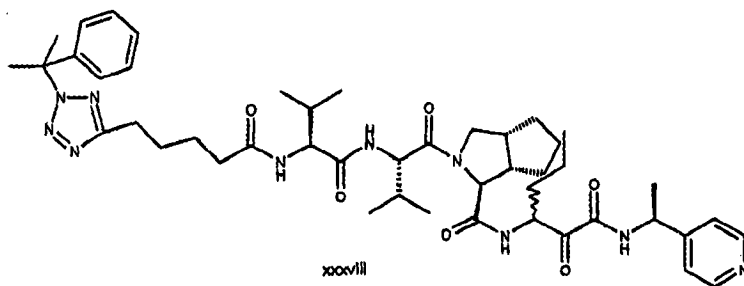
[1000]



[1001] 中间产物实施例 37- 化合物 xxxviii

[1002] 将 DMP 试剂 (280mg, 0.65mmol) 加到化合物 xxxvii (370mg, 0.43mmol) 和 DCM 溶液 (3mL)。在大约室温下将反应物搅拌 2 小时,然后用 10% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 中止反应。搅拌 30 分钟后,用 EtOAc 萃取反应物。用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机层。将所得的有机层干燥并真空浓缩得到一种残余物,通过硅胶色谱法 (5% EtOH/EtOAc) 纯化残余物得到 180mg (49%, 两步) 化合物 xxxviii,

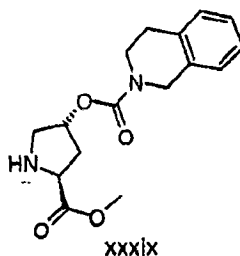
[1003]



[1004] 中间产物实施例 38- 化合物 xxxx

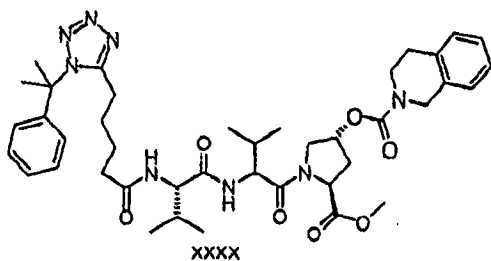
[1005] 将化合物 xxix (2.5g, 5mmol) 溶于 40mL DCM, 将 5.1mL 在 THF 中的 1M DCC 溶液加到此溶液中, 向该混合物中加入 1.08g (3.53mmol) 化合物 xxxix。在大约室温下将混合物搅拌过夜。

[1006]



[1007] 用 EtOAc 将混合物稀释至 100ml, 连续地用 1N HCl、NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤, 然后通过柱色谱法 (80% EtOAc/ 己烷) 纯化得到 2.59g (95%) 化合物 xxxx,

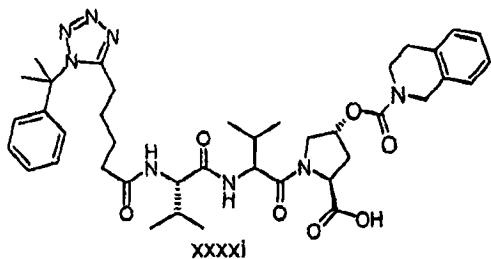
[1008]



[1009] 中间产物实施例 39- 化合物 xxxxi

[1010] 将化合物 xxxxx (2.59g, 3.35mmol) 溶于 20mL MeOH 并加入 4mL 1N NaOH 水溶液。将混合物搅拌过夜, 然后旋转蒸发留下残余物。将残余物溶于水并用 2mL HCl 中和。然后 EtOAc 萃取中和的溶液得到 2.49g (~100%) 化合物 xxxxi,

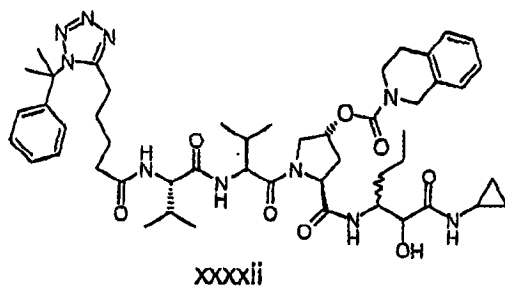
[1011]



[1012] 中间产物实施例 40- 化合物 xxxxii

[1013] 将化合物 xxxxi (847mg, 1.16mmol) 和 724mg (1.39mmol) PyBop 溶于 10mL DCM。将化合物 xiii (260mg, 1.39mmol) 加到此溶液, 然后加入 DIPEA (209  $\mu$ l)。在大约室温下将混合物搅拌过夜。然后用 EtOAc 将反应混合物稀释至 100mL, 用 1N HCl 洗涤两次, 用 NaHCO<sub>3</sub> 洗涤两次并用盐水洗涤三次。干燥有机层并浓缩。通过柱色谱法 (5% 乙醇 /EtOAc) 纯化残余物得到 930mg (86%) 化合物 xxxxii,

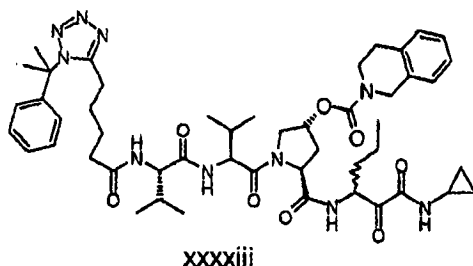
[1014]



[1015] 中间产物实施例 41- 化合物 xxxxiii

[1016] 将化合物 xxxxii (350mg, 0.38mmol) 溶于 10mL DCM, 并加入 242mg (0.57mmol) DMP 试剂。在大约室温下将混合物搅拌三小时。用 EtOAc 将混合物稀释至 50mL, 并用盐水洗涤三次。通过柱色谱法 (100% EtOAc) 纯化产物得到 180mg (51%) 化合物 xxxxiii,

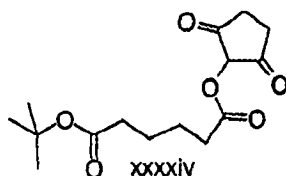
[1017]



[1018] 中间产物实施例 42- 化合物 xxxv

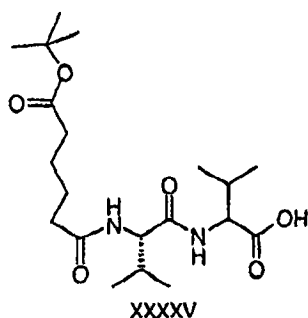
[1019] 将 H-Val-Val-OH (5g, 23mmol) 悬浮在 100mL DMF 中, 并加入化合物 xxxiv (8.3g, 27.6mmol),

[1020]



[1021] 然后加入 6.2mL (35.5mmol) DIPEA。40℃下将混合物搅拌 2 天。在高度真空下除去溶剂, 将残余物溶于 100mL EtOAc, 用 1N HCl 洗涤三次并用盐水洗涤两次。得到 9.14g (99%) 化合物 xxxv。

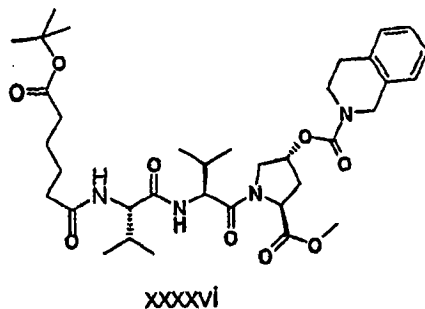
[1022]



[1023] 中间产物实施例 43- 化合物 xxxvi

[1024] 将化合物 xxxv (2.8g, 7mmol) 和 954mg (7mmol) HOAt 溶于 100mL DCM。加入 7mL 1M DCC/DCM。将化合物 xxxix (2.15g) 加到此反应混合物, 并在大约室温下将反应混合物搅拌过夜。将混合物浓缩至干并将残余物溶于 EtOAc, 用柱色谱法 (100% EtOAc) 纯化得到 4.57g (95%) 化合物 xxxvi,

[1025]

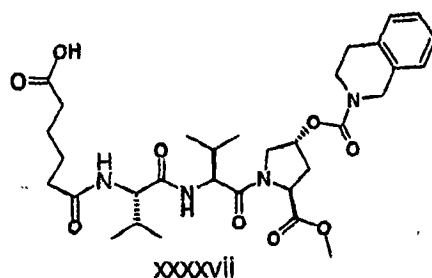


[1026] 中间产物实施例 44- 化合物 xxxvii

[1027] 将化合物 xxxvi (4.57g, 6.65mmol) 溶于 10mL TFA 和 10mLDCM。在大约室温下将

混合物搅拌 4 小时。真空下除去溶剂,将残余物溶于 50 : 50 乙腈 / 水,并冻干得到一种粉末化合物 xxxvii,

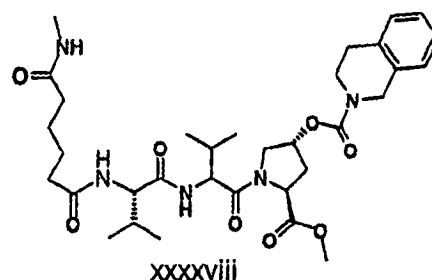
[1028]



[1029] 中间产物实施例 45- 化合物 xxxviii

[1030] 将化合物 xxxvii (1g, 1.59mmol) 和 990mg (2.28mmol) PyBop 溶于 20mL DCM, 并加入在 THF 中的 1.6mL 1M 甲胺。在大约室温下将混合物搅拌 4 小时。用 EtOAc 将反应混合物稀释到 100mL, 并用 1NHCl、NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤。通过闪烁柱色谱法 (10% EtOH/EtOAc) 纯化残余物得到 1g (98%) 化合物 xxxviii,

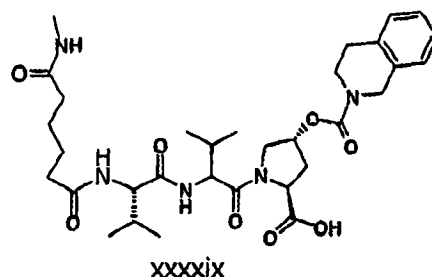
[1031]



[1032] 中间产物实施例 46- 化合物 xxxix

[1033] 将化合物 xxxviii (1g, 1.55mmol) 溶于 10mL MeOH, 并加入 2mL 1N NaOH。在大约室温下将混合物搅拌过夜。蒸发除去溶剂。将残余物溶于水, 中和并用 EtOAc 萃取得到 960mg (98%) 化合物 xxxix,

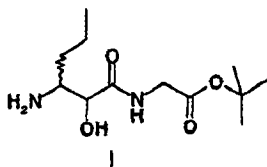
[1034]



[1035] 中间产物实施例 47- 化合物 li

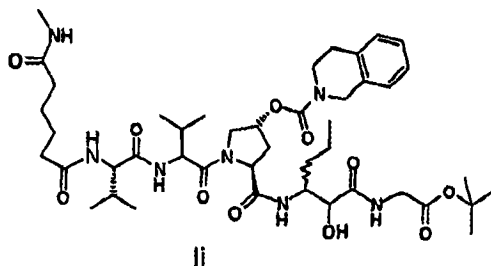
[1036] 将化合物 xxxix (315mg, 0.5mmol) 和 312mg (0.6mmol) PyBop 溶于 10mL DCM。加入化合物 1 (56mg, 0.6mmol) 和 108  $\mu$  l DIPEA。

[1037]



[1038] 在大约室温下将混合物搅拌过夜,用 EtOAc 稀释至 100mL,并用 1NHCl、NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤。通过柱色谱法 (15% EtOH/EtOAc) 纯化得到 400mg (92%) 化合物 Ii,

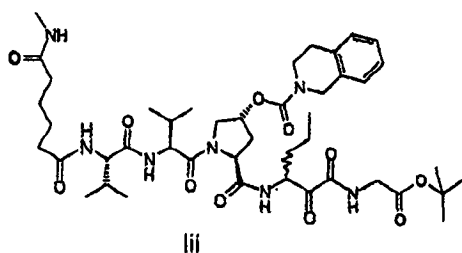
[1039]



[1040] 中间产物实施例 48- 化合物 Iii

[1041] 将化合物 Ii (400mg, 0.46mmol) 溶于 10mL DCM, 并加入 292mg (0.69mmol) DMP 试剂。在大约室温下将混合物搅拌 3 小时。蒸发除去溶剂并通过 RP-HPLC 法纯化得到 130mg (32%) 化合物 Iii,

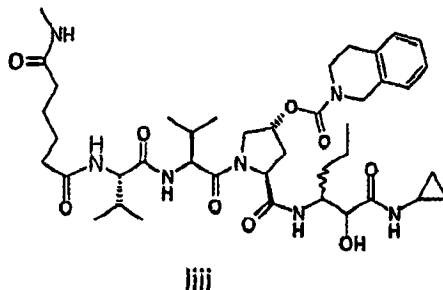
[1042]



[1043] 中间产物实施例 49- 化合物 Iiii

[1044] 将化合物 xxxix (210mg, 0.33mmol) 和 208mg (0.4mmol) PyBop 溶于 10mL DCM。将化合物 xiii (154mg, 0.83mmol) 加到此溶液, 然后加入 DIPEA (72 μl, 0.4mmol)。在大约室温下将混合物搅拌过夜。用 EtOAc 将反应混合物稀释至 100mL, 用 1N HCl、NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤, 然后通过闪烁柱色谱法 (10% EtOH/EtOAc) 纯化得到 250mg (95%) 化合物 Iiii,

[1045]

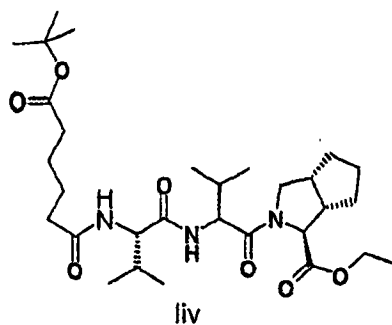


[1046] 中间产物实施例 50- 化合物 Iiv

[1047] 将化合物 xxxv (755mg, 1.88mmol) 和 255mg (1.88mmol) HOAt 溶于 20mL DCM。将 1.88mL 1M DCC/DCM 加到反应混合物, 加入化合物 v (288mg), 并在大约室温下将反应混合物搅拌 2 小时。将混合物浓缩至干, 将残余物溶于 EtOAc, 并通过柱色谱法 (80% EtOAc/ 己

烷) 纯化得到 800mg (90%) 化合物 liv,

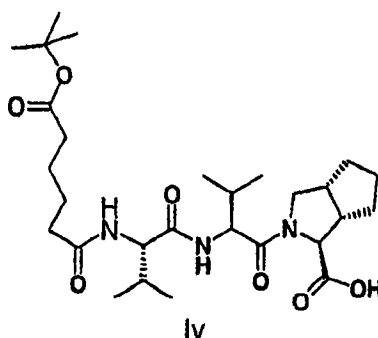
[1048]



[1049] 中间产物实施例 51- 化合物 lv

[1050] 将化合物 liv (800mg, 1.41mmol) 溶于 10mL MeOH 并加入 2mL NaOH。在大约室温下将混合物搅拌过夜。真空除去溶剂, 将残余物溶于水, 并用 2mL 1N HCl 中和。用 EtOAc 萃取产物。蒸发萃取溶剂得到 760mg (~100%) lv,

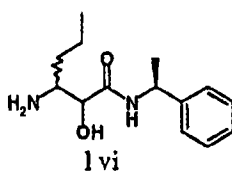
[1051]



[1052] 中间产物实施例 52- 化合物 lvii

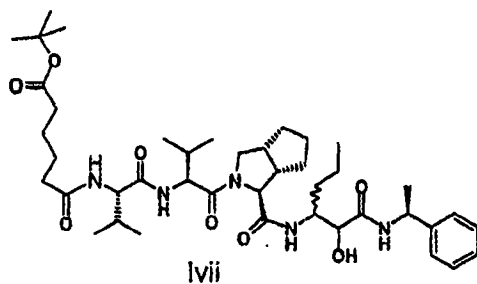
[1053] 将化合物 lv (760mg, 1.41mmol) 和 880mg (1.69mmol) PyBop 溶于 5mL DCM。将化合物 lvi (530mg, 2.12mmol) 加到此溶液, 然后加入 0.31 DIPEA。

[1054]



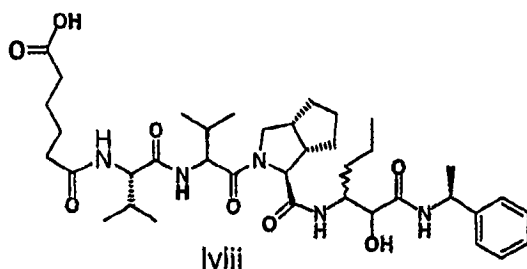
[1055] 在大约室温下将混合物搅拌过夜。用 EtOAc 将反应混合物稀释至 100mL, 用 1N HCl、NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤, 然后通过闪烁柱色谱法 (100% EtOAc) 纯化得到 870mg (80%) 化合物 lvii,

[1056]



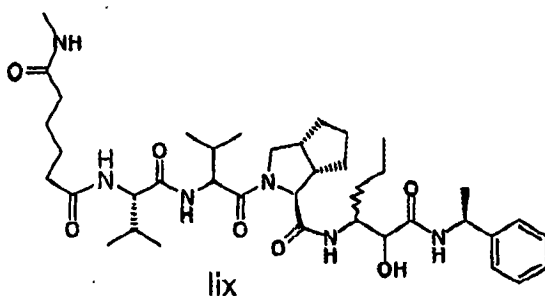
[1057] 中间产物实施例 53- 化合物 lviii

[1058] 化合物 lvii (350mg, 0.45mmol) 溶于 5mL TFA 和 5mL DCM, 并在大约室温下将混合物搅拌 3 小时。蒸发除去溶剂通过 RP-HPLC 纯化产物, 得到了 220mg (69%) 化合物 lviii, [1059]



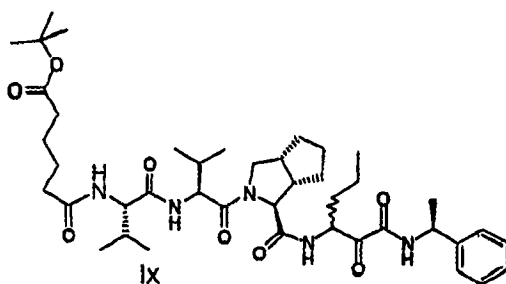
[1060] 中间产物实施例 54- 化合物 lix

[1061] 将化合物 lviii (200mg, 0.28mmol) 和 218mg (0.42mmol) PyBop 溶于 5mL DCM。加入甲胺 (0.28mL, 2M THF 溶液)。在大约室温下将混合物搅拌过夜。用 EtOAc 将混合物稀释至 100mL, 用 1NHCl、NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤, 并通过柱色谱法 (15% EtOH/EtOAc) 纯化得到 168mg (79%) lix, [1062]



[1063] 中间产物实施例 55- 化合物 lx

[1064] 将化合物 lviii (200mg, 0.26mmol) 溶于 4mL DCM, 并加入 165mg (0.39mmol) DMP 试剂。在大约室温下将混合物搅拌 3 小时。蒸发除去溶剂。将残余物溶于 50% 乙腈 / 水, 过滤并通过 RP-HPLC 纯化得到 140mg (70%) 化合物 lx, [1065]

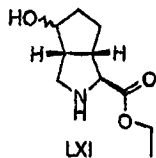


[1066] 中间产物实施例 56- 化合物 ii

[1067] 在 N<sub>2</sub> 气氛下将化合物 i (4g, 12.1mmol) 的 DCM (30mL) 和 EtOH (30mL) 溶液冷却到 -10°C。加入 NaBH<sub>4</sub> (458mg, 12.1mmol) 并在 -10°C 下将溶液搅拌 50 分钟。TLC (50% EtOAc/己烷) 表明完成转化为移动较慢的斑点。用冰小心地中止反应, 然后用冷的饱和 NH<sub>4</sub>Cl 溶液 (10mL) 终止。将混合物倾入 DCM (300mL)。用 NH<sub>4</sub>Cl (60mL) 将有机层洗涤一次, 并用盐水 (60mL) 洗涤两次。然后分离有机层, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥并真空浓缩, 得到 3.5g 化合物 ii (87%)。

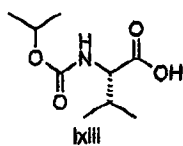
[1068] 中间产物实施例 57- 化合物 1xi

[1069] 在配备 H<sub>2</sub> 气囊的 250mL 圆底烧瓶中, 在大约室温下对化合物 ii (3.5g, 10.5mmol) 的乙醇溶液 (50mL) 实施标准氢化条件 [20% Pd(OH)<sub>2</sub>/C(1.47g, 2.1mmol)] 持续 5 小时。通过硅藻土滤出催化剂并用 DCM 洗涤。然后在减压下除去溶剂得到 2g (96%) 化合物 1xi, [1070]



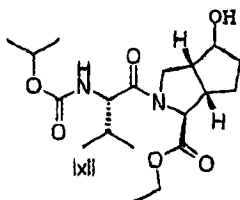
[1071] 中间产物实施例 58- 化合物 1xii

[1072] 在惰性气氛下, 将在无水 DMF (6mL) 中的化合物 1xi (200mg, 1mmol)、化合物 1xiii (233mg, 1.1mmol)、 [1073]



[1074] HOAt (1-羟基-7-氮杂苯并三唑) (156mg, 1.15mmol) 的溶液搅拌 20 分钟。然后将温度降至 0°C, 随后加入 DIC (0.18mL, 1.15mmol)。在大约室温下将反应物搅拌过夜。用 EtOAc 稀释溶液, 然后用 1N HCl 洗涤两次, 用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液和盐水洗涤两次。分离出有机层, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 并在减压下除去溶剂。通过色谱法 (硅胶 :70% EtOAc/DCM) 净化残余物得到 45% 产率的化合物 1xii。

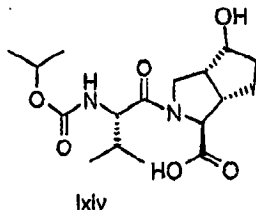
[1075]



[1076] 中间产物实施例 59- 化合物 1xiv

[1077] 在大约室温下将在二噁烷 (6mL) 和 0.5M NaOH (6mL) 中的化合物 1xii (777mg, 2mmol) 的溶液搅拌 5 小时。TLC (100% EtOAc) 检查表明完全转化成在起始位置的点。用冰浴冷却反应, 然后加入 1N HCl (4mL)。然后加入固体 NaCl, 并用 EtOAc (2×150mL) 萃取整个混合物两次。合并有机萃取物, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥并在减压下除去溶剂得到化合物 1xiv, 产率为 92%。

[1078]

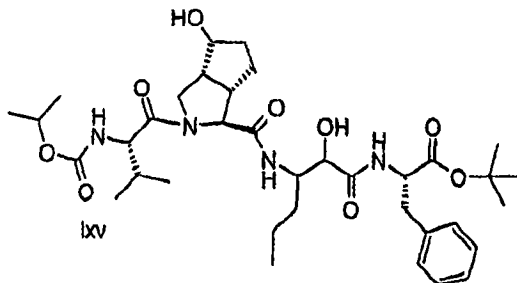


[1079] 中间产物实施例 60- 化合物 1xv

[1080] 在惰性气氛下, 将在无水 DMF (6mL) 中的化合物 x (203mg, 0.58mmol)、化合物

lxiv(276mg, 0.775mmol)、HOAt(1-羟基-7-氮杂苯并三唑)(126mg, 0.93mmol)的溶液搅拌 20 分钟。然后将温度降至 0℃, 随后加入 DIC(0.14ml, 0.93mmol)。在大约室温下将反应物搅拌过夜。用 EtOAc 稀释溶液, 然后用 1N HCl 洗涤两次, 用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液和盐水洗涤两次。分离有机层, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥并在减压下除去溶剂。通过色谱法(硅胶:50% EtOAc/DCM 至 80:19:1 EtOAc/DCM/MeOH) 纯化残余物得到化合物 lxv, 产率为 62%。

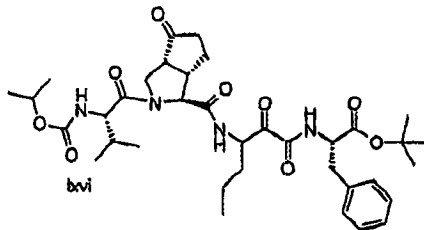
[1081]



[1082] 中间产物实施例 61- 化合物 lxvi

[1083] 在惰性气氛下, 将 DMP 试剂(605mg, 1.43mmol) 加到在无水 DCM(15mL) 中的化合物 lxv(287mg, 0.42mmol) 的溶液。在大约室温下将反应物搅拌 2 小时。(注意.- 假设双倍量的 DMP 试剂和反应时间使醇基团完全氧化成相应的酮基团)。TLC(硅胶:2% MeOH/EtOAc) 检查表明完全转化成移动较快的产物。用 DCM(150mL) 稀释反应物, 然后用 10% 亚硫酸钠水溶液(2×50mL) 洗涤两次, 用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液洗涤两次, 并用盐水洗涤。分离有机层, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥并在减压下除去溶剂。通过色谱法(硅胶:50% EtOAc/DCM 至 80:19:1 EtOAc/DCM/MeOH) 纯化残余物以 77% 产率得到化合物 lxvi。

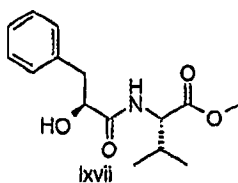
[1084]



[1085] 中间产物实施例 62- 化合物 lxvii

[1086] 将 PyBOP(7.5g, 14.4mmol) 加到 L-3-苯基乳酸(2g, 12mmol) 的 DCM 溶液(60ml)。将包含 L-缬氨酸甲酯 HCl(2.4g, 14.4mmol) 和 DIPEA(2.6mL, 14.4mmol) 的 DCM 溶液(20mL) 加到此溶液。在大约室温下将所得的反应混合物搅拌过夜。此时, 用 EtOAc(30mL) 稀释反应物, 用 NaHCO<sub>3</sub>(30mL) 和盐水(15mL) 洗涤。用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥有机层, 过滤并浓缩。用 50% EtOAc/己烷在硅胶上完成纯化得到 2.97g(89%) 化合物 lxvii,

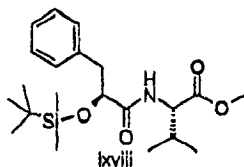
[1087]



[1088] 中间产物实施例 63- 化合物 lxviii

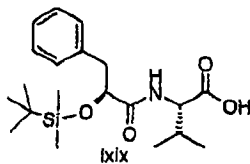
[1089] 将化合物 lxvii(2.97g, 10.6mmol) 置于 DCM(50mL), 并在冰浴中冷却。将

TBSCl (2.1g, 13.8mmol) 加到此溶液, 然后加入咪唑 (0.94g, 13.8mmol)。将所得的溶液搅拌过夜。然后用 EtOAc (50mL) 稀释反应物, 用 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤。用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥有机层, 过滤并浓缩。用 20% EtOAc/ 己烷在硅胶上完成纯化得到 3.79g (90%) 化合物 lxviii, [1090]



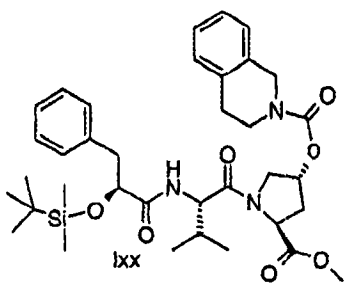
[1091] 中间产物实施例 64- 化合物 lxix

[1092] 将 1N NaOH 水溶液 (14.4ml, 14.4mmol) 加到化合物 lxviii (3.78g, 9.6mmol) 的甲醇 (50ml) 溶液。将所得的溶液搅拌过夜。真空下部分除去溶剂。然后使用 1N HCl 水溶液将反应混合物的 pH 降低到 3。用 EtOAc 和盐水稀释此溶液。用 EtOAc (3x50ml) 萃取目标产物。合并有机层, 用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并浓缩得到 3.5g (96%) 化合物 lxix, [1093]



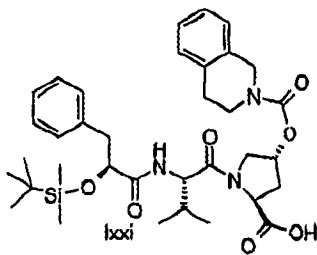
[1094] 中间产物实施例 65- 化合物 lxx

[1095] 将 HOAt (0.44g, 3.2mmol) 加到包含化合物 lxix (1.1g, 2.9mmol) 的 DCM (15mL) 溶液, 然后加入在 DCM 中的 1M DCC (3.2ml, 3.2mmol) 溶液。在大约室温下搅拌 20 分钟后, 加入化合物 xxxix (970mg, 3.2mmol) 的 DCM (15mL) 溶液。N<sub>2</sub> 下将反应物搅拌过夜。然后用 EtOAc (30mL) 稀释反应物, 通过硅胶垫过滤, 用 0.1N HCl、NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤。用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥有机层, 过滤并真空浓缩。用 50% EtOAc/ 己烷在硅胶上完成纯化得到 1.5g (77%) 化合物 lxx, [1096]



[1097] 中间产物实施例 66- 化合物 lxxi

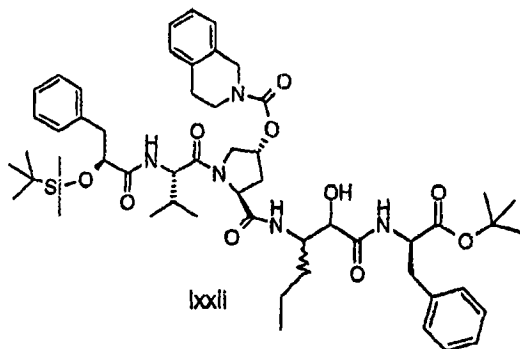
[1098] 将 1N NaOH 水溶液 (3.6ml, 3.6mmol) 加到化合物 xx (1.5g, 2.4mmol) 的甲醇溶液 (30mL)。将所得的溶液搅拌过夜。此时, 部分除去溶剂, 并使用 1N HCl 水溶液将反应混合物的 pH 调节至 3。然后用 EtOAc (50mL) 和盐水 (20mL) 稀释反应物。用 EtOAc (50mL) 和盐水 (20mL) 稀释反应物。用 EtOAc (3x50mL) 萃取含水层。合并有机层, 用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥, 过滤并浓缩得到 1.3g (92%) 化合物 lxxi, [1099]



[1100] 中间产物实施例 67- 化合物 lxxii

[1101] 将 PyBOP (175mg, 0.34mmol) 和 DIPEA (0.06ml, 0.34mmol) 加到包含化合物 lxxi (180mg, 0.28mmol) 的 DCM (2mL) 溶液, 然后加入化合物 x (150mg, 0.41mmol) 的 DCM 溶液 (3mL)。在  $N_2$  下将所得的溶液搅拌过夜。然后用 EtOAc (30mL) 稀释反应物, 用  $NaHCO_3$  和盐水洗涤。用  $Na_2SO_4$  干燥有机层, 过滤并浓缩。用 100% EtOAc 在硅胶上完成纯化得到 270mg (98%) 化合物 lxxii,

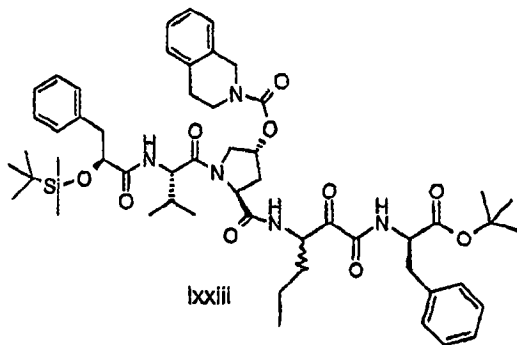
[1102]



[1103] 中间产物实施例 68- 化合物 lxxiii

[1104] 将 DMP 试剂 (140mg, 0.33mmol) 加到化合物 lxxii (270mg, 0.27mmol) 的 DCM (3mL) 溶液。在大约室温下搅拌 1.5 小时后, 用 10%  $Na_2SO_3$  (10mL) 中止反应。用 EtOAc (30mL) 稀释反应物并搅拌 10 分钟。用  $NaHCO_3$  和盐水洗涤有机层。用  $Na_2SO_4$  干燥有机层, 过滤并浓缩。用 EtOAc/ 己烷完成纯化得到 150mg (56%) 化合物 lxxiii,

[1105]



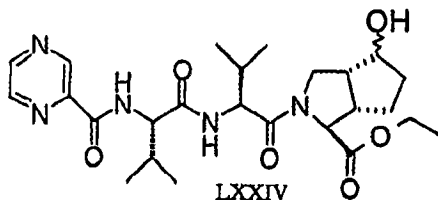
[1106] 中间产物实施例 69- 化合物 lxi

[1107] 在氮气流下将  $Pd(OH)_2/C$  (1.47g, 20% Pd 含量, 2.1mmol) 加到化合物 ii (3.5g, 10.5mmol) 的乙醇溶液 (50mL)。在 1atm 压力下对反应物进行氢化。反应完成时, 通过硅藻土过滤催化剂, 并用二氯甲烷洗涤。真空浓缩滤液得到 2g (96%) 化合物 lxi。

[1108] 中间产物实施例 70- 化合物 lxxiv

[1109] 将 HOAt (4g, 29.4mmol) 和 1,3-二异丙基碳化二亚胺 (3.7g, 29.4mmol) 加到化合物 vii (9.1g, 28.2mmol) 的 DMF 溶液 (60mL)。在大约室温下搅拌 30 分钟后, 将化合物 lxi (5.1g, 25.6mmol) 的 DMF 溶液 (10mL) 加到上述溶液。在大约室温下将反应物搅拌过夜。此时, 滤出白色固体。真空过滤滤液得到一种残余物, 通过硅胶色谱法纯化得到 9.5g (67%) 化合物 lxxiv,

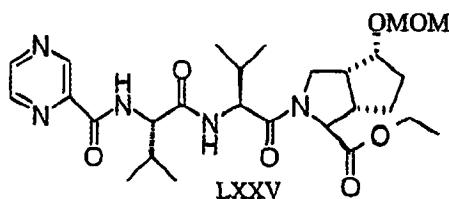
[1110]



[1111] 中间产物实施例 71- 化合物 lxxv

[1112] 在大约室温下将  $\text{Et}_3\text{Pr}_2\text{N}$  (0.78ml, 4.5mmol) 加到在水 THF (25mL) 中的化合物 lxxiv (1.5g, 3mmol) 的溶液。将混合物冷却至  $0^\circ\text{C}$  并滴加 MOMCl (1.5ml, 19.7mmol)。将反应物加热至室温并搅拌过夜。然后用乙醚稀释溶液, 并用水洗涤 (3 次)。进一步用乙醚萃取含水层, 用  $\text{MgSO}_4$  干燥所有有机层, 然后浓缩得到一种黄色油。通过硅胶色谱法 (EtOAc/ 己烷 5/2) 分离化合物 lxxv 的所希望的异构体,

[1113]

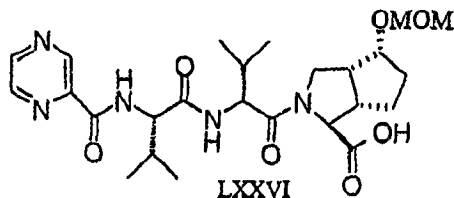


[1114] 产率为 40% 并清楚地分离非对映异构体。

[1115] 中间产物实施例 72- 化合物 lxxvi

[1116]  $0^\circ\text{C}$  下将 2N NaOH 水溶液 (0.9ml, 1.8mmol) 滴加到在 EtOH (5mL) 中的化合物 lxxv (502mg, 0.9mmol) 的溶液。将反应物加热到室温并搅拌过夜。在完成皂化时, 用 Dowex 50W8X-200 酸性树脂将溶液酸化至 pH 3。滤出固体并真空浓缩所得的滤液得到一种油状残余物, 将其冻干得到 370mg (80%) 化合物 lxxvi,

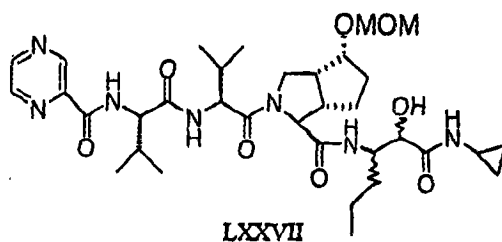
[1117]



[1118] 中间产物实施例 73- 化合物 lxxvii

[1119] 用 PyBOP (200mg, 0.38mmol) 处理化合物 lxxvi (110mg, 0.21mmol) 的二氯甲烷溶液 (4mL)。在大约室温下搅拌 30 分钟后, 往反应混合物中加入化合物 xiii (60mg, 0.32mmol) 的 THF 溶液 (3.2mL), 然后加入  $\text{Et}_3\text{Pr}_2\text{N}$ 。在大约室温下搅拌过夜后, 用水中止反应并用 EtOAc 萃取。用盐水洗涤所得的有机层并用  $\text{MgSO}_4$  干燥, 然后浓缩得到一种油。通过硅胶色谱法

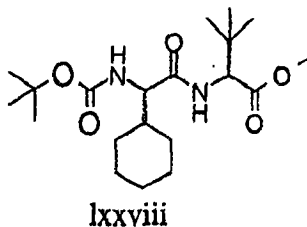
(5% EtOH/EtOAc) 纯化得到 143mg(100%) 化合物 lxxvii,  
[1120]



[1121] 中间产物实施例 74- 化合物 lxxviii

[1122] 将 HOBt(2.63g, 19.4mmol) 和 EDCI(3.72g, 19.4mmol) 加到 H-Chg-OH 2(5g, 19.4mmol) 的 THF 溶液(50mL)。在大约室温下搅拌 20 分钟后,将包含叔-L-亮氨酸甲酯-盐酸盐(19.4mmol)和 DIPEA(6.75ml, 38.6mmol) 的 THF(19mL) 和 DMF(10mL) 溶液加到以上溶液。在大约室温下将反应物搅拌过夜。进行标准水处理和硅胶色谱处理(15-20% EtOAc/己烷)得到 2.27g(30%) 化合物 lxxviii,

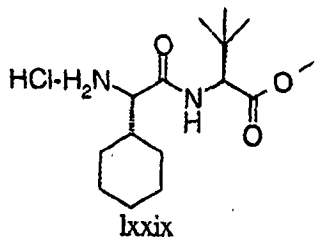
[1123]



[1124] 中间产物实施例 75- 化合物 lxxix

[1125] 将在二噁烷(7.38mL, 29.5mmol) 中的 4N HCl 溶液加到化合物 lxxviii(2.27g, 5.91mmol) 的 THF 溶液(12mL)。在大约室温下将反应物搅拌过夜。此时,在减压下除去溶剂得到化合物 lxxix,将此化合物直接用于下一反应。

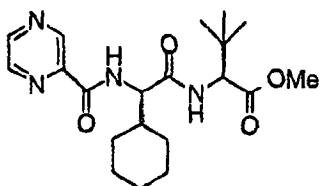
[1126]



[1127] 中间产物实施例 76- 化合物 lxxx

[1128] 将化合物 lxxix(5.9mmol) 的 THF 溶液加到包含 2-吡嗪甲酸(878mg, 7.08mmol)、HOBt(957mg, 7.08mmol) 和 EDCI(1.36g, 7.08mmol) 的 THF(20mL) 溶液。然后将 DIPEA(2.05ml, 11.8mmol) 加到所得的混合物。在大约室温下将反应物搅拌过夜,然后用水中止反应。用 EtOAc 萃取反应混合物。用盐水洗涤有机层并真空浓缩得到一种残余物,通过硅胶色谱法(40-50% EtOAc/己烷)纯化得到 1g(36%) 化合物 lxxx,

[1129]

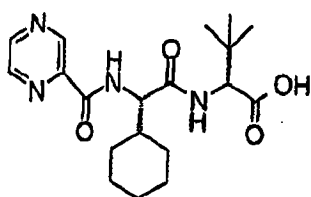


lxxx

[1130] 中间产物实施例 77- 化合物 lxxx

[1131] 将 2N NaOH(3.2ml, 6.4mmol) 加到化合物 lxxx(1g, 2.56mmol) 的甲醇溶液(20mL)。在大约室温下将反应物搅拌过夜。此时, 用 5N HCl 将反应物酸化至 pH 3。用 EtOAc(75mL) 稀释反应物, 并用水和盐水洗涤。干燥如此得到的有机层并真空浓缩得到一种残余物, 将此残余物溶于 1 : 1 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 用于冻干。获得总共 ~ 1g(100%) 化合物 lxxx。

[1132]

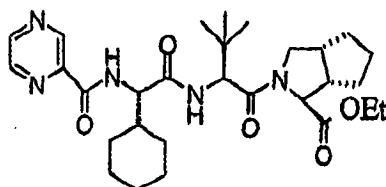


lxxxi

[1133] 中间产物实施例 78- 化合物 lxxxii

[1134] 用 HOAt(348mg, 2.56mmol) 和 DCC(2.56ml, 1M, 2.56mmol) 处理化合物 lxxxi(2.56mmol) 的二氯甲烷溶液(10mL)。搅拌 30 分钟后, 用化合物 v(2.56mmol) 的 THF 溶液(5mL) 处理反应混合物。在大约室温下搅拌过夜后, 过滤除去白色固体(尿素)。将滤液真空浓缩得到一种残余物, 通过硅胶色谱法纯化此残余物得到 1.4g(100%) 化合物 lxxxii,

[1135]

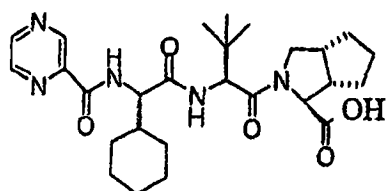


lxxxii

[1136] 中间产物实施例 79- 化合物 lxxxiii

[1137] 用 2N NaOH(2.58ml, 5.17mmol) 处理化合物 lxxxii(1.4g, 2.58mmol) 的乙醇溶液(15mL)。在大约室温下搅拌过夜后, 用酸性树脂将反应混合物酸化至 pH 3。滤出固体。真空浓缩所得的滤液得到一种残余物, 将此残余物冻干得到 1.32g(~ 100%) 化合物 lxxxiii,

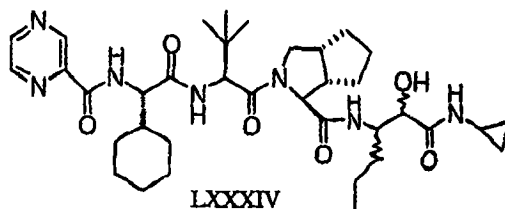
[1138]



lxxxiii

[1139] 中间产物实施例 80- 化合物 lxxxiv

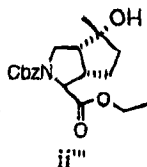
[1140] 用 PyBOP (582mg, 1.12mmol) 处理化合物 lxxxiii (360mg, 0.7mmol) 的二氯甲烷溶液 (15mL)。在大约室温下搅拌 20 分钟后, 用化合物 xiii (195.6mg, 1.05mmol) 的 THF 溶液 (10mL) 处理反应混合物, 然后用 DIPEA (0.25ml, 1.40mmol) 处理。在大约室温下搅拌过夜后, 用水中止反应, 并用 EtOAc 萃取。用盐水洗涤所得的有机层, 干燥并真空浓缩得到一种残余物, 用硅胶色谱法 (3% EtOH/EtOAc) 纯化此残余物得到 420mg (88%) 化合物 lxxxiv, [1141]



[1142] 中间产物实施例 81- 化合物 ii'''

[1143] 在 N<sub>2</sub>(g) 气氛下将无水二氯甲烷和醚 (20mL : 20mL) 的混合物冷却至 -78°C。将 TiCl<sub>4</sub> (1M, 二氯甲烷溶液, 10ml, 10mmol) 加到此溶液, 然后加入 MeLi (1.4M 醚溶液, 7.1ml, 10mmol), 同时在 -78°C 下再搅拌 30 分钟。在相同的温度下在 15 分钟内将在 10mL 二氯甲烷中的化合物 i (2g, 6mmol) 的溶液滴加到此混合物中。将此溶液缓慢加热到 -40°C, 保持 10 分钟, 然后在 0°C 下搅拌 2 小时。通过将混合物倾入水 / 醚混合物 (1 : 1) 而中止反应, 然后分离各层。进一步用醚萃取水层两次。用水、盐水洗涤所有有机层, 并用 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 然后浓缩得到一种黄色油。通过硅胶色谱法 (EtOAc/ 己烷 2/1) 分离目标化合物 ii''', 产率为 83%。

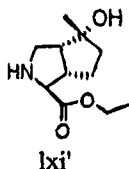
[1144]



[1145] 中间产物实施例 82- 化合物 lxi'

[1146] 将担载于 C 上的 10wt% Pd (0.53g, 0.5mmol) 加到化合物 ii''' (1.7g, 5mmol), 然后加入 MeOH (17mL)。使氢气冲洗通过反应混合物, 并将氢气在 1atm 下保持过夜。然后过滤反应混合物, 并浓缩得到 929mg (87%) 化合物 lxi', 为一种无色油。

[1147]

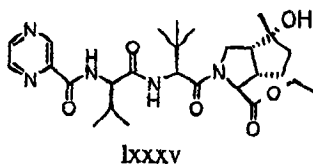


[1148] 中间产物实施例 83- 化合物 lxxxv

[1149] 在大约室温下将 HOAt (0.41g, 3mmol) 加到化合物 xxii (1g, 3mmol) 的 THF 溶液 (16mL), 然后加入 1M DCC 的二氯甲烷溶液 (3ml, 3mmol)。在大约室温下搅拌 30 分钟后, 将化合物 lxi' 的二氯甲烷溶液 (6mL) 加到以上 HOAt 活化的酸。在大约室温下将反应物搅拌过夜。此时, 通过硅藻土过滤反应物。用 EtOAc (120mL) 稀释滤液, 用水洗涤, 然后用盐水洗涤。

干燥有机层并浓缩至一种黄色油,通过硅胶色谱法(100% EtOAc)纯化此油得到 1g(65%) 化合物 lxxxv,

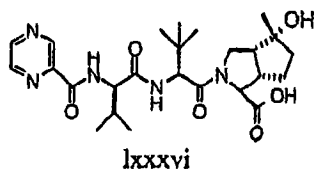
[1150]



[1151] 中间产物实施例 84- 化合物 lxxxvi

[1152] 将 2N NaOH 水溶液(1.7ml, 3.4mmol) 加到化合物 lxxxv(920mg, 1.7mmol) 的乙醇溶液(8mL)。在大约室温下将反应物搅拌过夜,然后通过 Dowes 酸性树脂酸化至 pH 3。滤出固体并将滤液浓缩得到一种无色的油,将此油再溶于 1 : 1 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O,并冻干得到 800mg(93%) 化合物 lxxxvi。HPLC 表明一种单一产物峰。

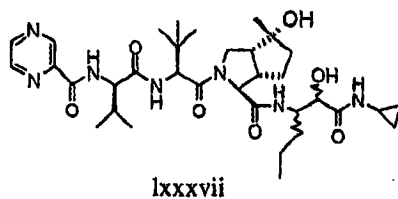
[1153]



[1154] 中间产物实施例 85- 化合物 lxxxvii

[1155] 将 PyBOP(250mg, 0.47mmol) 加到化合物 lxxxvi(150mg, 0.3mmol) 的二氯甲烷溶液(4mL)。在大约室温下将溶液搅拌 30 分钟。将化合物 xiii(84mg, 0.45mmol) 的 THF(4.5mL) 溶液加到此溶液,然后加入 Et<sub>3</sub>Pr<sub>2</sub>N(0.1ml, 0.6mmol)。将反应物在大约室温下搅拌过夜,然后用水(25mL)中止反应 30 分钟。随后用 EtOAc 萃取混合物。用盐水洗涤所得的有机层,并用 MgSO<sub>4</sub> 干燥,然后浓缩至一种黄色的油。硅胶色谱法(5% EtOH/EtOAc)纯化得到 200mg(100%) 化合物 lxxxvii,

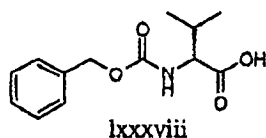
[1156]



[1157] 中间产物实施例 86- 化合物 lxxxix

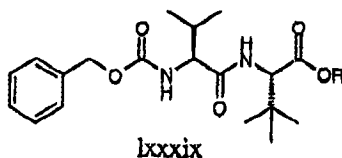
[1158] 将化合物 lxxxviii, N-Cbz-L- 缬氨酸(2.5g, 9.9mmol) 置于 THF(30mL)。

[1159]



[1160] 加入 EDCI(2.29g, 11.9mmol) 和 HOBT(1.62g, 11.9mmol), 并将混合物搅拌 5 分钟。加入在 THF(23.9mL) 中的 L- 叔 - 亮氨酸甲酯盐酸盐(2.17g, 11.9mmol), 然后加入 DIPEA(2.1mL)。在氮下将反应混合物搅拌过夜。用乙酸乙酯稀释反应混合物,用 1N HCl、饱和碳酸氢钠和盐水洗涤。用硫酸钠干燥有机相,过滤并浓缩。用 25% 乙酸乙酯 / 己烷纯化浓缩残余物得到 1.1g(29%) 化合物 lxxxix,

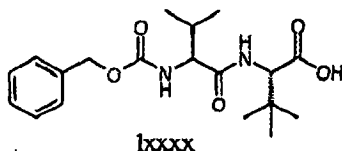
[1161]



[1162] 中间产物实施例 87- 化合物 Lxxxx

[1163] 在标准条件下,使用甲醇 (0.3M) 和 1N NaOH(1.5eq) 将化合物 Lxxxix 水解得到 1.03g(95%) 化合物 Lxxxx,

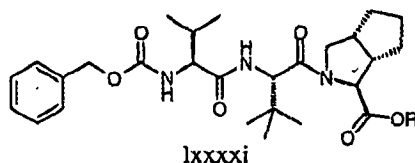
[1164]



[1165] 中间产物实施例 88- 化合物 Lxxxxi

[1166] 将化合物 Lxxxx (385mg, 1.06mmol) 置于二氯甲烷 (3mL)。加入 DCC(1.4mmol), 然后加入 HOAt(190mg, 1.4mmol)。随后加入在二氯甲烷 (3mL) 中的化合物 v(260mg, 1.4mmol)。将所得的混合物在氮气气氛下搅拌过夜。用乙酸乙酯稀释反应物,通过硅胶过滤并浓缩。用 50% 乙酸乙酯 / 己烷纯化残余物得到 440mg(80%) 化合物 Lxxxxi,

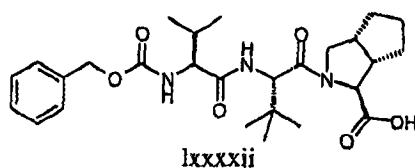
[1167]



[1168] 中间产物实施例 89- 化合物 Lxxxxii

[1169] 在标准条件下使用乙醇 (0.3M) 和 1N NaOH(1.5eq) 将化合物 Lxxxxi 水解得到 390mg 化合物 Lxxxxii,

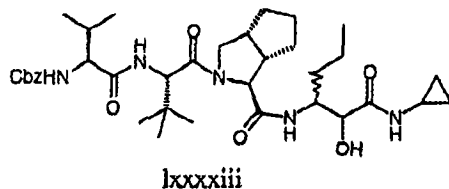
[1170]



[1171] 中间产物实施例 90- 化合物 Lxxxxiii

[1172] 将化合物 Lxxxxii(350mg,0.7mmol) 置于二氯甲烷 (3mL)。加入 PyBOP(480mg, 0.91mmol), 然后加入化合物 xiii(170mg,0.91mmol)。加入 DIPEA(0.16ml,0.91mmol) 并将混合物搅拌过夜。浓缩反应混合物并用 100% 乙酸乙酯纯化得到 420mg(90%) 化合物 Lxxxxiii,

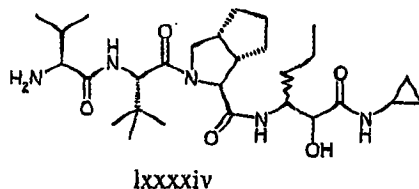
[1173]



[1174] 中间产物实施例 91- 化合物 lxxxxiv

[1175] 在氢气氛下使用在甲醇中的 10% Pd/C(1% mol) 将化合物 lxxxiii 氢化得到 335mg(100%) 化合物 lxxxxiv,

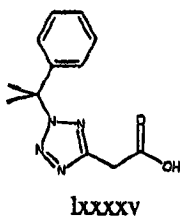
[1176]



[1177] 中间产物实施例 92- 化合物 lxxxxv

[1178] 将 1H- 四唑-5- 乙酸乙酯 (5g, 32mmol) 置于氯仿 (80mL)。加入三氯乙酸 (12.03g, 73.65mmol), 然后加入  $\alpha$ - 甲基苯乙烯 (3.78g, 32mmol)。将反应混合物搅拌过夜。第二天, 用乙酸乙酯稀释此溶液, 用 10% KOH 和盐水洗涤。用硫酸镁干燥有机相, 过滤并浓缩得到 8g(96%) 相应的 N- 保护的 4- 乙酸乙酯。使用乙醇 (0.3M) 和 1N NaOH(3eq) 给此物质实施标准水解条件得到 7g(99%) 化合物 lxxxxv,

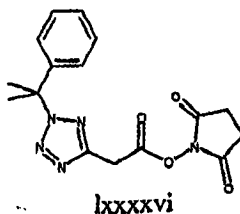
[1179]



[1180] 中间产物实施例 93- 化合物 lxxxxvi

[1181] 将化合物 lxxxxv(3.62g, 14.7mmol) 置于二氯甲烷 (50mL)。加入 EDCI(4.32g, 22.1mmol) 和 DIPEA(5.1ml, 29.4mmol), 并搅拌 5 分钟。加入 N- 羟基琥珀酰亚胺 (3.38g, 29.4mmol) 并搅拌 3 小时。用二氯甲烷稀释反应物, 并用水洗涤三次。用硫酸镁干燥有机层, 过滤并浓缩得到 3.66g(73%) 化合物 lxxxxvi,

[1182]

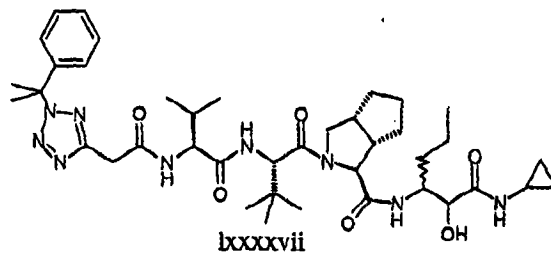


[1183] 中间产物实施例 94- 化合物 lxxxxvii

[1184] 将化合物 lxxxxiv(335mg, 0.62mmol) 和化合物 lxxxxvi(343mg, 1mmol) 置于二氯甲烷 (6mL)。加入 DIPEA(0.17ml, 1mmol) 并将反应混合物搅拌过夜。用乙酸乙酯稀释反应物, 用饱和碳酸氢钠、盐水洗涤并浓缩。用 5% 乙醇 / 乙酸乙酯纯化残余物得到 80mg(16%)

化合物 lxxxxvii,

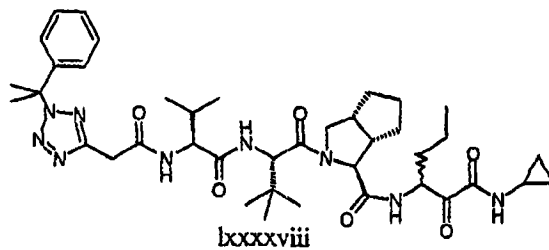
[1185]



[1186] 中间产物实施例 95- 化合物 lxxxxviii

[1187] 将化合物 lxxxxvii (80mg, 0.11mmol) 置于二氯甲烷 (3mL)。加入 DMP 试剂 (55mg, 0.13mmol) 并搅拌 1 小时。用乙酸乙酯稀释反应混合物并用 10% 亚硫酸钠溶液中止反应。用饱和碳酸氢钠和盐水洗涤有机相。将有机相浓缩并用 100% 乙酸乙酯将所得的残余物纯化得到 40mg (48%) 化合物 lxxxxviii,

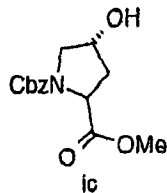
[1188]



[1189] 中间产物实施例 96- 化合物 xxxix

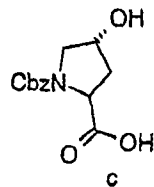
[1190] 将化合物 ic, N-Cbz-4- 羟基 Pro 甲酯,

[1191]



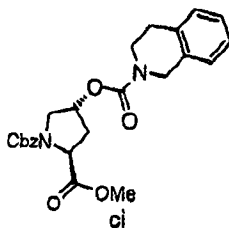
[1192] (2.1g, 7.9mmol, 以定量产率由化合物 c, N-Cbz-4- 羟基 Pro 制备)

[1193]



[1194] 溶于 DCM (25mL)。将 CDI (1.54g, 9.5mmol) 和 DIPEA (1.7ml, 9.5mmol) 加到此溶液, 并搅拌 10 分钟。将 1,2,3,4- 四氢异喹啉 (TIQ) (1.2ml, 9.5mmol) 滴加到反应混合物并搅拌 5 分钟。用水、1N HCl 和盐水洗涤有机相。在浓缩三种有机相后, 用 40% EtOAc/ 己烷将所得的残余物色谱纯化得到化合物 ci, N-Cbz-4-TIQ 羧基 -Pro 甲酯, (2.5g, 75%)。

[1195]

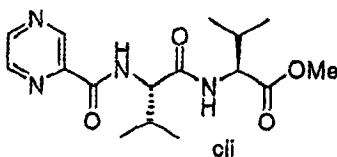


[1196] 将化合物 **ci** (2.5g, 5.9mmol) 溶于 MeOH (75mL)。用 N<sub>2</sub> 冲洗此溶液并加入 Pd/C (10%, 300mg)。用 H<sub>2</sub> 冲洗反应混合物并搅拌过夜。通过硅藻土过滤反应混合物并浓缩得到化合物 **xxxix**, 4-(TIQ-羰氧基)-Pro, 甲酯, (1.49g, 83%)。

[1197] 中间产物实施例 97- 化合物 **vii**

[1198] 将化合物 **cii**, N-吡嗪-2-基羰基-Val-Val 甲酯, (10.9g, 32.4mmol)

[1199]

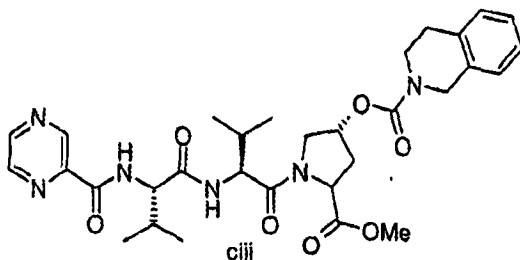


[1200] 溶于 THF (80mL), 然后加入 NaOH 水溶液 (48.6ml, 48.6mmol)。将所得的混合物搅拌 48 小时, 然后再加入 NaOH (16.3ml, 16.3mmol), 并将混合物加热到 40℃, 持续 3 小时。随后将反应混合物的 pH 降至 3, 并用 EtOAc 萃取水相, 然后浓缩得到化合物 **vii** 粗产物, N-吡嗪-2-基羰基-Val-Val 酸 (10.6g, 100%)。

[1201] 中间产物实施例 98- 化合物 **ciii**

[1202] 将化合物 **cii** (4.1g, 12.7mmol) 溶于 DCM (20mL)。将 HOAt (1.73g, 12.7mmol) 和 DCC (12.7mmol) 加到此溶液, 并将溶液搅拌 1 小时。将在 DCM (10mL) 中的化合物 **xxxix** (3.22g, 10.6mmol) 加到反应混合物。在 N<sub>2</sub> 气氛下将所得的混合物搅拌过夜。使反应混合物通过硅胶过滤并浓缩。通过硅胶色谱法 (50% 至 80% EtOAc/ 己烷梯度) 纯化所得的残余物得到化合物 **ciii**, N-吡嗪-2-基羰基-Val-Val-4-(TIQ-羰氧基)-Pro 甲酯, (5.27g, 81.7%)。

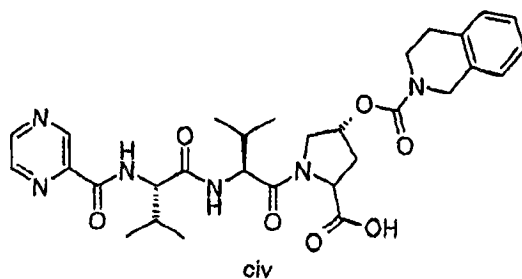
[1203]



[1204] 中间产物实施例 99- 化合物 **civ**

[1205] 将化合物 **ciii** (650mg, 1.29mmol) 溶于 THF (5mL)。加入 NaOH 水溶液 (1.42ml, 1.42mmol), 然后将溶液搅拌过夜。将此溶液的 pH 降至 3, 分离有机层, 并浓缩得到一种残余物。使用在乙腈/水中的反相 HPLC 纯化残余物得到化合物 **civ**, N-吡嗪-2-基羰基-Val-Val-4-(TIQ-羰氧基)-Pro 酸, (600mg, 95%)。

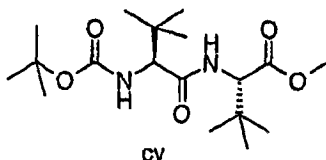
[1206]



[1207] 中间产物实施例 100- 化合物 cv

[1208] 将 N-Boc-L-叔-亮氨酸 (2.3g, 10mmol) 和 L-叔-亮氨酸甲酯盐酸盐 (2g, 11mmol) 合并至 DMF (30mL)。然后将 HOAt (1.6g, 11.5mmol) 加到此溶液。在 N<sub>2</sub> 下将所得的混合物搅拌 20 分钟, 然后降温至 0°C, 此时加入 DIC (1.8ml, 11.5mmol) 和 2,4,6-三甲基吡啶 (1.45ml, 11mmol)。将所得的溶液搅拌过夜并加热至室温。用 EtOAc 稀释反应混合物, 并用 1N HCl、饱和的 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机相。在浓缩有机相之后, 用 20% -30% EtOAc/ 己烷梯度色谱纯化所得的残余物得到化合物 cv (3.3g, 92%)。

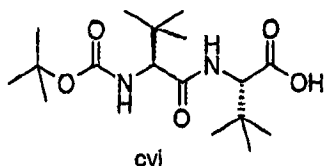
[1209]



[1210] 中间产物实施例 101- 化合物 cvi

[1211] 使用二噁烷 (40mL) 和 0.5N NaOH (37ml, 18.4mmol) 水解化合物 cv (3.3g, 9.2mmol) 得到化合物 cvi (2.9g, 92%)。

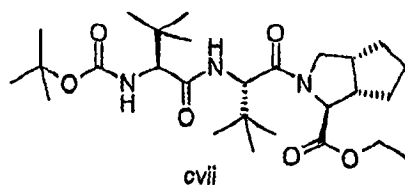
[1212]



[1213] 中间产物实施例 102- 化合物 cvii

[1214] 将化合物 cvi (2g, 5.8mmol) 和化合物 v (1g, 5.5mmol) 溶于 DMF (20mL)。然后将 HOAt (832mg, 6.6mmol) 和 DIC (1.1ml, 6.6mmol) 加到此溶液。在 N<sub>2</sub> 下将所得的溶液搅拌过夜。用 EtOAc 稀释反应混合物, 用 1N HCl、饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机相。在浓缩有机相之后, 用 20% -30% EtOAc/ 己烷梯度色谱纯化所得的残余物得到化合物 cvii (2.4g, 81%)。

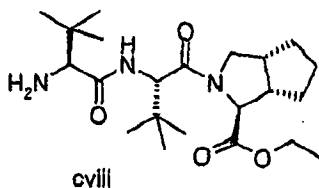
[1215]



[1216] 中间产物实施例 103- 化合物 cviii

[1217] 将化合物 cvii (2.4g, 4.72mmol) 溶于 DCM (10mL)。将 TFA (10mL) 加到此溶液。将所得的溶液搅拌 4 小时。浓缩反应混合物, 将其溶于 EtOAc, 然后用 1N NaOH 和盐水洗涤有机相。将有机相浓缩得到化合物 cviii (1.084g, 56.1%)。

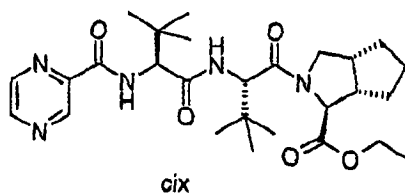
[1218]



[1219] 中间产物实施例 104- 化合物 cix

[1220] 将 2-吡嗪甲酸 (181mg, 1.46mmol) 和化合物 cviii (541mg, 1.325mmol) 溶于 DMF (15mL). 将 HOAt (207mg, 1.52mmol) 和 DIC (0.24mL, 1.52mmol) 加到此溶液。在 N<sub>2</sub> 气氛下将所得的溶液搅拌过夜。用 EtOAc 稀释反应混合物, 用 1N HCl、饱和的 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机相。在浓缩有机相之后, 用 20% -30% -35% EtOAc/ 己烷梯度色谱纯化所得的残余物得到化合物 cix (430mg, 63%)。

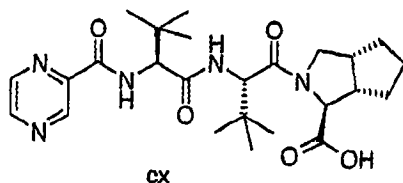
[1221]



[1222] 中间产物实施例 105- 化合物 cx

[1223] 使用 EtOH (7mL) 和 1N NaOH (4.7mL, 4.7mmol) 将化合物 cix 水解得到化合物 cx (700mg, 91.6%)。

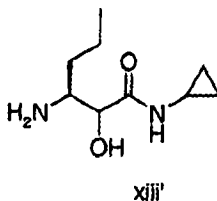
[1224]



[1225] 中间产物实施例 106- 化合物 cxi

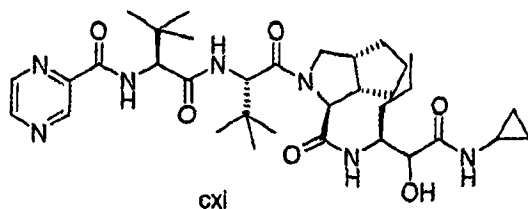
[1226] 将化合物 cx (690mg, 1.42mmol) 溶于 DCM (9mL)。然后将 PyBOP (890mg, 1.7mmol) 加到此溶液, 随后加入化合物 xiii' (320mg, 1.7mmol)。

[1227]



[1228] 将 DIPEA (0.3mL, 1.7mmol) 加到所得的混合物。在 N<sub>2</sub> 气氛下将此反应混合物搅拌过夜。然后用 EtOAc 稀释反应混合物, 用饱和的 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤。在浓缩有机相之后, 用 100% EtOAc 色谱纯化所得的残余物得到化合物 cxi (490mg, 52.7%)。

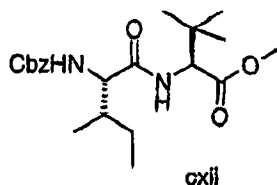
[1229]



[1230] 中间产物实施例 107- 化合物 cxiv

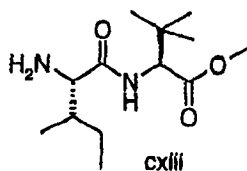
[1231] 将化合物 cxii (1.2g, 3.06mmol) 溶于 MeOH(12mL)。

[1232]



[1233] 在用 N<sub>2</sub> 完全冲洗之后, 加入 10wt% 担载在炭上的 Pd(OH)<sub>2</sub> (0.6g), 将混合物氢化过夜, 此时 TLC 表明形成完全反应混合物。通过过滤从固体物质中分离此溶液, 并浓缩得到相应的去保护的化合物 cxiii, 为一种无色的油 (100%)

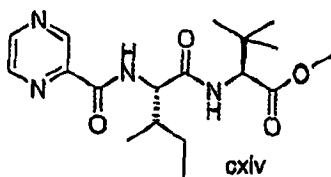
[1234]



[1235] 此物质不经进一步纯化用于下一步骤。

[1236] 将 2-吡嗪甲酸 (400mg, 3.2mmol, 1.1eq) 溶于 DCM/THF(4mL/4mL), 然后加入 HOAt(440mg, 3.2mmol) 和 DCC(343mg, 1M 的 DCM)。室温下搅拌 20 分钟后, 将先前获得的化合物 cxiii (0.96g, 3.2mmol) 溶于 DCM(6.4mL), 并加到活化的混合物。在室温下搅拌过夜后, 通过硅藻土过滤反应混合物, 通过柱色谱法 (30% EtOAc/ 己烷) 纯化化合物 cxiv

[1237]

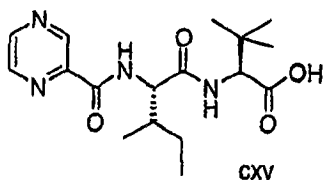


[1238] 得到一种白色固体 (0.8g, 80%)。

[1239] 中间产物实施例 108- 化合物 cxv

[1240] 将化合物 cxiv (0.8g, 2.2mmol) 溶于 MeOH(10mL), 然后加入 2N NaOH(水溶液) (3.3mL, 6.6mmol)。室温下将此溶液搅拌过夜, 此时由 TLC(50% EtOAc/ 己烷) 表明形成完全反应混合物。用 5N HCl 酸化至 pH 3, 并用 EtOAc 稀释, 然后萃取有机层。用盐水洗涤萃取的有机层, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 浓缩得到化合物 cxv (0.74, 95%)。

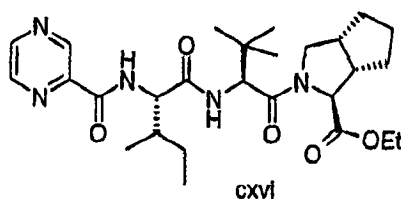
[1241]



[1242] 中间产物实施例 109- 化合物 cxvi

[1243] 室温下将 HOAt (290mg, 2.1mmol) 加到化合物 cxv (0.74g, 2.1mmol) 的 DCM 溶液 (6mL), 然后加入在 DCM (2.2ml, 2.2mmol) 中的 1M DCC 溶液。室温下搅拌 30 分钟后, 将化合物 v (2.1mmol) 的 THF 溶液 (10.5ml, 0.2M) 加到上述 HOAt- 活化的酸。室温下将反应混合物搅拌过夜。此时, 通过硅藻土过滤反应混合物。用 EtOAc (120mL) 稀释滤液并用水和盐水洗涤。将有机相干燥并浓缩得到一种黄色的油, 将此通过硅胶色谱法 (50% EtOAc/ 己烷) 纯化得到化合物 cxvi (0.714g, 66%)。

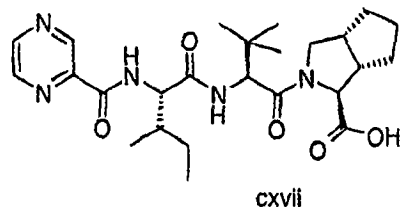
[1244]



[1245] 中间产物实施例 110- 化合物 cxvii

[1246] 将 2N NaOH 水溶液 (2ml, 4mmol) 加到化合物 cxvi (0.7g, 1.4mmol) 的 EtOH 溶液。室温下将此混合物搅拌过夜, 然后用 5N HCl 酸化至 pH 3, 用 EtOAc 稀释, 然后萃取有机相。用盐水洗涤萃取的有机相, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 浓缩得到化合物 cxvii (95%)。

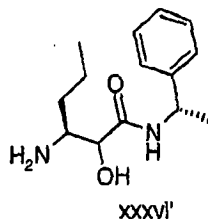
[1247]



[1248] 中间产物实施例 111- 化合物 cxviii

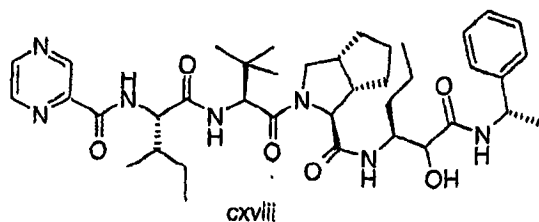
[1249] 将 PyBOP (416mg, 0.8mmol) 加到化合物 cvii (300mg, 0.6mmol) 的 DCM/THF 溶液 (10mL/2mL)。室温下将此溶液搅拌 30 分钟。将化合物 xxxvi' (200mg, 0.8mmol) 加到此溶液,

[1250]



[1251] 然后加入 DIPEA (0.22ml, 1.2mmol)。室温下将反应混合物搅拌过夜, 然后用水 (25mL) 中止反应 30 分钟。随后用 EtOAc 萃取混合物。用盐水洗涤所得的有机相, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 然后浓缩得到一种黄色的油。硅胶色谱法 (3-5% EtOH/EtOAc) 纯化得到化合物 cxviii (335mg, 76%)。

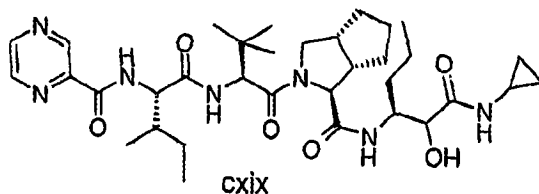
[1252]



[1253] 中间产物实施例 112- 化合物 cxix

[1254] 将 PyBOP(470mg, 0.9mmol) 加到化合物 cxviii(340mg, 0.6mmol) 的 DCM 溶液(10mL)。室温下将此溶液搅拌 30 分钟。然后将化合物 xiii' (170mg, 0.9mmol) 加到此溶液, 随后加入 DIPEA(0.24ml, 1.2mmol)。室温下将反应混合物搅拌过夜, 然后用水(25mL)中止反应 30 分钟。然后用 EtOAc 萃取混合物。用盐水洗涤所得的有机相, 用  $MgSO_4$  干燥, 然后浓缩得到一种黄色的油。硅胶色谱法(3-5% EtOH/EtOAc)纯化得到化合物 cxix(164mg, 36%)。

[1255]



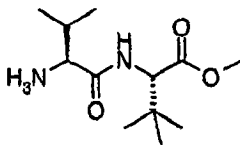
[1256] 中间产物实施例 113- 化合物 xx

[1257] 将 N-Cbz-L-缬氨酸(6.28g, 25mmol)溶于 DCM(30mL)。将 HOBT(3.38g, 25mmol)和 DCC(25ml, 1M 溶液)加到此溶液并搅拌 5 分钟。加入 L-叔-亮氨酸甲酯盐酸盐(25ml, 1M 溶液), 并在  $N_2$  气氛下搅拌过夜。用 EtOAc 稀释反应混合物, 用 1N HCl、饱和  $NaHCO_3$  和盐水洗涤。用  $Na_2SO_4$  干燥有机相, 过滤并浓缩。通过 20% -30% EtOAc/己烷将残余物色谱纯化得到化合物 xx(2.96g, 31%)。

[1258] 中间产物实施例 114- 化合物 xxi

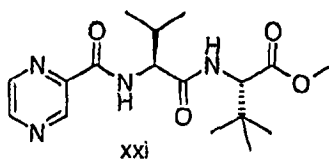
[1259] 在  $H_2$  气氛下使用在 MeOH(40mL) 中的 10% Pd/C(800mg) 将化合物 xx(2.95g, 7.8mmol) 氢化得到以下相应的游离胺(1.9g, 100%)。

[1260]



[1261] 将 2-吡嗪-甲酸(970mg, 7.8mmol)溶于 DCM(20mL)。将 PyBOP(4.06g, 7.8mmol)加到此溶液。将在 DCM(15mL) 中的游离胺(1.9g, 7.8mmol)加到此溶液, 然后加入 DIPEA(1.36ml, 7.8mmol)。在  $N_2$  气氛下将所得的混合物搅拌过夜。用 EtOAc 稀释反应混合物, 用饱和  $NaHCO_3$  和盐水洗涤有机相。在浓缩有机相之后, 用 30% -40% EtOAc/己烷将残余物色谱纯化得到化合物 xxi(2.07g, 75.8%)。

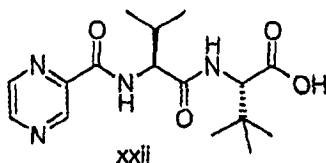
[1262]



[1263] 中间产物实施例 115- 化合物 xxii

[1264] 使用 MeOH(20mL) 和 1N NaOH(3eq) 将化合物 xxi 水解得到化合物 xxii(1.82g, 93.9%)。

[1265]



[1266] 中间产物实施例 116- 化合物 xxiii

[1267] 将化合物 xxii(895mg, 2.66mmol) 溶于 DCM(10mL)。将 DCC(3.2mmol) 加到此溶液, 然后加入 HOAt(435mg, 3.2mmol)。随后加入在 THF(16mL) 中的化合物 v(3.2mmol)。在 N<sub>2</sub> 气氛下将所得的混合物搅拌过夜。用 EtOAc 稀释反应混合物, 通过硅胶过滤, 并浓缩。用 50% EtOAc/ 己烷将所得的残余物色谱纯化得到化合物 xxiii(730mg, 54.8%)。

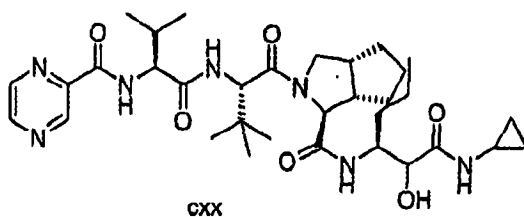
[1268] 中间产物实施例 117- 化合物 xxiv

[1269] 使用 EtOH(5mL) 和 1N NaOH(1.5eq) 将化合物 xxiii 水解得到化合物 xxiv(690mg, 100%)。

[1270] 中间产物实施例 118- 化合物 cxx

[1271] 将化合物 xxiv(245mg, 0.52mmol) 溶于 DCM(3mL)。将 PyBOP(330mg, 0.62mmol) 加到此溶液, 然后加入化合物 xiii' (120mg, 0.62mmol)。将 DIPEA(0.11mL, 0.62mmol) 加到所得的混合物。在 N<sub>2</sub> 气氛下将反应混合物搅拌过夜。用 EtOAc 稀释反应混合物, 用饱和的 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机相。在浓缩有机相之后, 用 5% EtOH/EtOAc 将残余物色谱纯化得到化合物 cxx(220mg, 60%)。

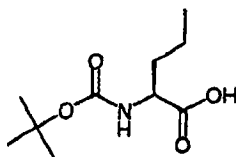
[1272]



[1273] 中间产物实施例 119- 化合物 xiii'

[1274] 将 Boc-NVA-OH(24.96g, 114.9mmol) 溶于 THF(200mL)。

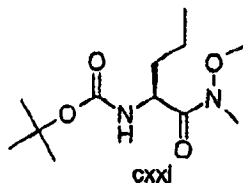
[1275]



[1276] 将 CDI(22.35, 137.8mmol) 滴加到此溶液, 并将此溶液搅拌 30 分钟。将 N, O- 二甲基羟基胺盐酸盐(12.33g, 126.4mmol) 溶于 DMF(50mL), 然后将 DIPEA(22mL, 126.4mmol) 加

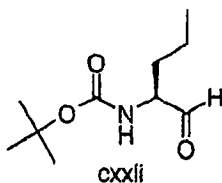
到此溶液。室温下将 DMF 溶液搅拌 20 分钟,然后将其加至 THF 溶液。在  $N_2$  气氛下将所得的混合物搅拌一个周末。真空浓缩反应混合物至 100mL 总体积。用 1N HCl、饱和  $NaHCO_3$  和盐水洗涤有机相。将有机相浓缩得到化合物 cxxi 粗产物 (25.3g)。

[1277]



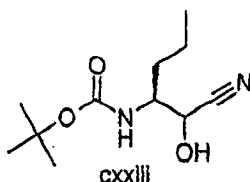
[1278]  $N_2$  气氛下将在 1M  $Et_2O$  溶液中的 LAH(107.3mmol) 加到干燥的 1-L 圆底烧瓶。将溶液降温至  $0^\circ C$ ,然后滴加在  $Et_2O$ (100mL) 中的化合物 cxxi (97.5mmol)。完成加入时,将所得的混合物搅拌 30 分钟。 $0^\circ C$  下通过缓慢加入  $EtOAc$ (50mL),然后缓慢加入 5%  $KHSO_4$ (50mL) 溶液中止反应。将此混合物搅拌 30 分钟。用 1N HCl、饱和  $NaHCO_3$  和盐水洗涤有机相。将有机相浓缩得到化合物 cxxii 粗产物 (22.28g)。

[1279]



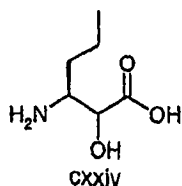
[1280] 将化合物 cxxii 溶于  $MeOH$ (100mL)。将  $Na_2S_2O_4$ (16.82g, 96.6mmol) 溶于水 (100mL),然后在  $0^\circ C$  下加到化合物 cxxii 的溶液。在电冰箱中将此混合物保存 ( $5^\circ C$ ) 过夜。将在水 (100mL) 中的  $KCN$ (7.53g, 115.9mmol) 加到反应混合物并在室温下搅拌 1.5 小时。用  $EtOAc$ (3x100mL) 萃取化合物。用盐水 (3x50mL) 洗涤有机相,用  $MgSO_4$  干燥,过滤并浓缩得到化合物 cxxiii 粗产物 (15.86g)。

[1281]



[1282] 将化合物 cxxiii (15.86g) 溶于二噁烷 (100mL)。将浓 HCl (37%, 100mL) 加到此溶液,然后加入茴香醚 (10mL) 并进行回流 ( $110^\circ C$ )。将反应物搅拌 1.5 小时。当将反应混合物冷却至室温时,真空下除去溶剂得到一种干燥的糊状物。在高度真空下将残余物干燥得到化合物 cxxiv 粗产物。

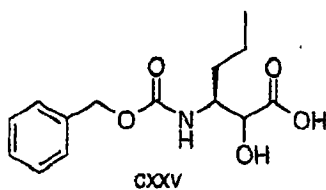
[1283]



[1284] 将化合物 cxxiv (69.6mmol) 溶于  $DMF$  (60mL) 和  $THF$  (60mL)。将 N-(苄基-氧羰氧基)琥珀酰亚胺 (17.33g, 69.6mmol) 加到混合物,然后加入 DIPEA (12.1ml, 69.6mmol)。在  $N_2$  气氛下将反应混合物搅拌过夜。将混合物浓缩至减少的体积 (50mL) 并用  $EtOAc$  稀释。用

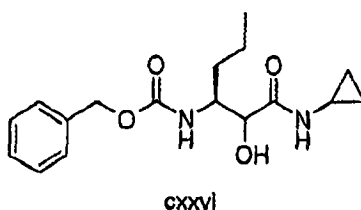
0.1N HCl (2x100mL) 和盐水洗涤有机相得到化合物 cxxv (17.5g, 54.2%, 经 5 步)。

[1285]



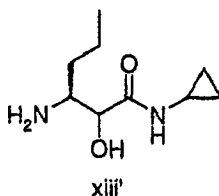
[1286] 将化合物 cxxv (5.66g, 20.14mmol) 溶于 DCM (60mL)。将 PyBOP (12.57g, 24.2mmol) 和 HOBT (3.27g, 24.2mmol) 加到此溶液并搅拌 5 分钟。将所得的混合物降温至 0°C, 然后加入环丙基胺 (1.67ml, 24.2mmol) 和 DIPEA (4.2ml, 24.2mmol)。将反应混合物搅拌过夜, 并温热至室温。用 0.1N HCl、饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤反应混合物。然后浓缩有机相并用 70% EtOAc/ 己烷色谱纯化得到化合物 cxxvi (3.18g, 49.3%)。

[1287]



[1288] 使用在 MeOH (70mL) 中的 10% Pd/C (600mg) 氢化化合物 cxxvi (3.18g, 9.94mmol)。在 H<sub>2</sub> 下将反应混合物搅拌过夜, 通过硅藻土过滤, 并浓缩得到化合物 xiii' 粗产物 (2.1g, 100%)。

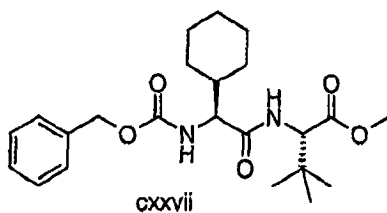
[1289]



[1290] 中间产物实施例 120- 化合物 cxxvii

[1291] 将 N-Cbz-L- 环己基甘氨酸 (3g, 10.3mmol) 溶于 DCM (36mL)。将 HOAt (1.5g, 11.28mmol) 和 DCC (11.28ml, 11.28mmol) 加到此溶液, 并搅拌 5 分钟。将 L- 叔-亮氨酸甲酯盐酸盐 (103ml, 1M 溶液, 10.3mmol) 加到此混合物并在 N<sub>2</sub> 下搅拌过夜。通过硅藻土过滤反应混合物, 用 EtOAc 冲洗并浓缩成一种残余物, 使用 20% -30% EtOAc/ 己烷将残余物色谱纯化得到化合物 cxxvii (2.2g, 52%)。

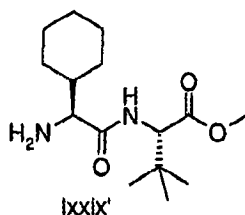
[1292]



[1293] 中间产物实施例 121- 化合物 lxxix'

[1294] 在 H<sub>2</sub> 下使用在 MeOH (15mL) 中的 20% Pd(OH)<sub>2</sub>/C (1g) 氢化化合物 cxxvii (2.2g, 5.2mmol) 得到化合物 lxxix' (1.4g, 98%)。

[1295]



[1296] 中间产物实施例 122- 化合物 lxxx

[1297] 将 2-吡嗪甲酸 (360mg, 2.9mmol) 溶于 DCM(10mL)。将 PyBOP(1.81g, 3.5mmol) 加到此溶液。然后将在 THF(10mL) 中的化合物 lxxix' (825mg, 2.9mmol) 加到此溶液, 随后加入 DIPEA(0.5ml, 2.9mmol)。在 N<sub>2</sub> 气氛下将所得的混合物搅拌过夜。用 EtOAc 稀释反应混合物, 用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机层。用 30% EtOAc/ 己烷将通过浓缩有机层而得到的残余物色谱纯化得到化合物 lxxx(780mg, 69%)。

[1298] 中间产物实施例 123- 化合物 lxxxii

[1299] 使用 MeOH(10mL) 和 1N NaOH(3eq) 将化合物 lxxx 水解得到化合物 lxxxii(615mg, 81.8%)。

[1300] 中间产物实施例 124- 化合物 lxxxiii

[1301] 将化合物 lxxxii(610mg, 1.6mmol) 溶于 DCM(10mL)。然后将 DCC(1.94ml, 1.94mmol) 加到此溶液, 随后加入 HOAt(270mg, 1.94mmol)。将在 THF(19.4mL) 中的化合物 v(1.94mmol) 加到此溶液。在 N<sub>2</sub> 气氛下将所得的混合物搅拌两夜。用 EtOAc 稀释反应混合物, 通过硅胶过滤, 并浓缩。用 40% EtOAc/ 己烷将所得的残余物色谱纯化得到化合物 lxxxiii(450mg, 83.4%)。

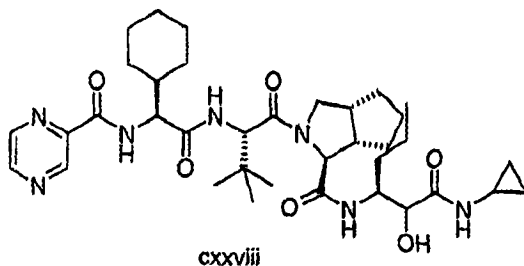
[1302] 中间产物实施例 125- 化合物 lxxxiiii

[1303] 使用 EtOH(10mL) 和 1N NaOH(3eq) 将化合物 lxxxii 水解得到化合物 lxxxiiii(650mg, 99%)。

[1304] 中间产物实施例 126- 化合物 cxxviii

[1305] 将化合物 lxxxiii(400mg, 0.78mmol) 溶于 DCM(5mL)。将 PyBOP(610mg, 1.2mmol) 加到此溶液, 然后加入化合物 xiii' (230mg, 1.2mmol)。将 DIPEA(0.2ml, 1.2mmol) 加到所得的混合物。在 N<sub>2</sub> 气氛下将反应物搅拌过夜。用 EtOAc 稀释反应混合物, 用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机相。在浓缩有机相之后, 通过 100% EtOAc 至 5% EtOH/EtOAc 梯度色谱纯化残余物得到化合物 cxxviii(365mg, 68.7%)。

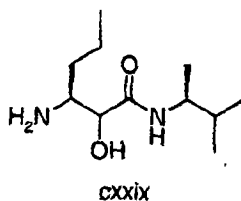
[1306]



[1307] 中间产物实施例 127- 化合物 cxxx

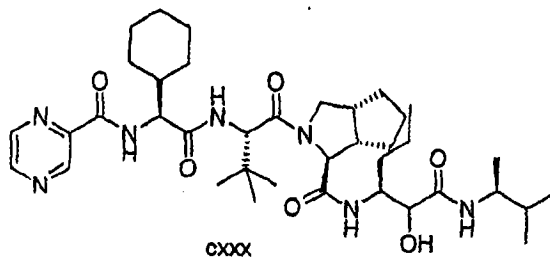
[1308] 将化合物 lxxxiii(365mg, 0.7mmol) 溶于 DCM(5mL)。将 PyBOP(440mg, 0.84mmol) 加到此溶液, 然后加入在 THF(8.4mL) 中的化合物 cxxix(0.84mmol)。

[1309]



[1310] 将 DIPEA (0.1ml, 0.84mmol) 加到所得的混合物。在  $N_2$  气氛下将反应混合物搅拌过夜。用 EtOAc 稀释反应混合物, 并用  $NaHCO_3$  和盐水洗涤有机相。在浓缩有机相之后, 通过 100% EtOAc 色谱纯化所得的残余物得到化合物 cxxx (350mg, 70%)。

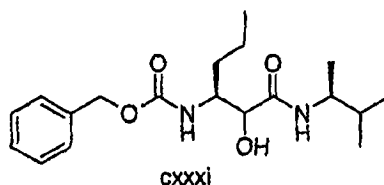
[1311]



[1312] 中间产物实施例 128- 化合物 cxxxix

[1313] 将化合物 cxxv (2.54g, 9.05mmol) 溶于 DCM (30mL)。将 PyBOP (5.65g, 10.9mmol) 和 HOBT (1.47g, 10.9mmol) 加到此溶液并搅拌 5 分钟。将所得的混合物降温到  $0^\circ C$ , 此时加入 (S)-(+)-3-甲基-2-丁基胺 (1.27ml, 10.9mmol) 和 DIPEA (1.9ml, 10.9mmol)。将反应混合物搅拌过夜, 并温热至室温。用 0.1N HCl、饱和  $NaHCO_3$  和盐水洗涤有机相。在浓缩有机相之后, 通过 30% EtOAc/ 己烷色谱纯化所得的残余物得到化合物 cxxxix (1.44g, 45.5%)。

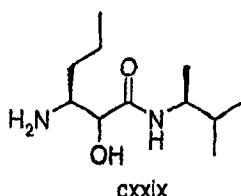
[1314]



[1315] 中间产物实施例 129- 化合物 cxxix

[1316] 使用在 MeOH (40mL) 中的 10% Pd/C (500mg) 氢化化合物 cxxxix (1.3g, 3.7mmol)。在  $H_2$  气氛下将反应混合物搅拌过夜。通过硅藻土过滤反应混合物并将有机相浓缩得到粗化合物 cxxix (800mg, 100%)。

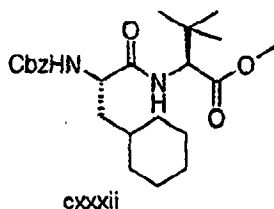
[1317]



[1318] 中间产物实施例 130- 化合物 cxxxiv

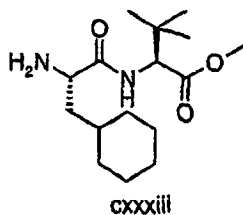
[1319] 将化合物 cxxxii (1.6g, 3.7mmol) 溶于 MeOH (12mL)。

[1320]



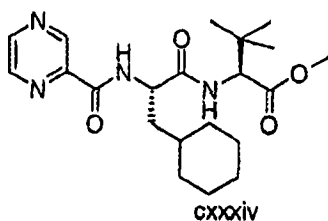
[1321] 在用  $N_2$  完全冲洗后,加入担载在炭上的 10wt%  $Pd(OH)_2$  (0.74g),并将混合物氢化,此时 TLC (30% EtOAc/ 己烷) 表明得到完全反应混合物。通过过滤从固体物质中分离溶液,并浓缩得到化合物 cxxxiii,为一种无色油 (100%),

[1322]



[1323] 将此油不经纯化用于下一步骤。将 2-吡嗪甲酸 (400mg, 3.2mmol, 1.1eq) 溶于 DCM/THF (4mL/4mL), 然后加入 HOAt (440mg, 3.2mmol) 和 DCC (3.3mL, 1M, DCM 溶液)。室温下搅拌 20 分钟后,将先前获得的化合物 cxxxiii (0.96g, 3.2mmol) 溶于 DCM (6.4mL), 并将其加到活化的混合物。室温下搅拌 2 天以后,通过硅藻土过滤反应混合物,并浓缩得到一种残余物,通过柱色谱法 (50% EtOAc/ 己烷) 纯化残余物得到化合物 cxxxiv,为一种白色固体 (1.06g, 83%)。

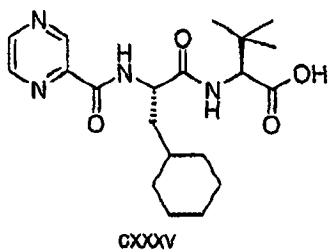
[1324]



[1325] 中间产物实施例 131- 化合物 cxxxv

[1326] 将化合物 cxxxiv (1.06g, 2.6mmol) 溶于 MeOH (10mL), 然后加入 2N NaOH (水溶液) (4mL, 8mmol)。室温下将溶液搅拌过夜,此时 TLC (50% EtOAc/ 己烷) 表明水解完全。用 5N HCl 将溶液酸化至 pH 3, 用 EtOAc 稀释, 然后萃取有机相。用盐水洗涤萃取的有机相, 用  $MgSO_4$  干燥浓缩得到化合物 cxxxv (100%)。

[1327]

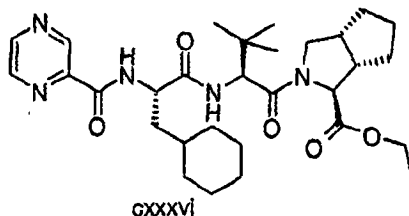


[1328] 中间产物实施例 132- 化合物 cxxxvi

[1329] 室温下将 HOAt (500mg, 3.7mmol) 加到化合物 cxxxv (1.44g, 3.7mmol) 的 DCM 溶液 (8mL), 然后加入在 DCM (3.7mL, 3.7mmol) 中的 1M DCC 溶液。室温下搅拌 30 分钟后, 将化

合物 v (3.7mmol) 的 THF 溶液 (18.5ml, 0.2M) 加到上述 HOAt- 活化的酸。室温下将反应混合物搅拌过夜。通过硅藻土过滤反应混合物。用 EtOAc (120mL) 稀释滤液并用水和盐水洗涤。干燥有机相并浓缩得到黄色油, 通过硅胶色谱法 (70% EtOAc/ 己烷) 纯化得到化合物 cxxxvi (1g, 71%)。

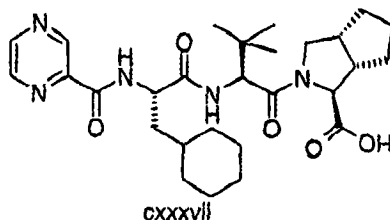
[1330]



[1331] 中间产物实施例 133- 化合物 cxxxvii

[1332] 将 2N NaOH 水溶液 (2.7ml, 5.4mmol) 加到化合物 cxxxvi (1g, 1.8mmol) 的 EtOH 溶液 (8mL)。室温下将反应混合物搅拌过夜, 然后用 5N HCl 酸化至 pH 3, 用 EtOAc 稀释, 然后萃取有机相。用盐水洗涤萃取的有机相, 并用 MgSO<sub>4</sub> 干燥浓缩得到化合物 cxxxvii (88%)。

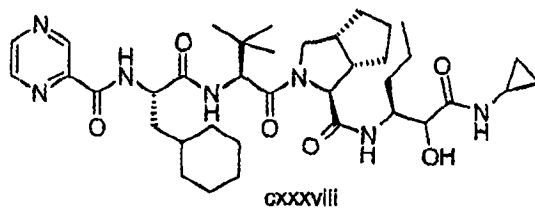
[1333]



[1334] 中间产物实施例 133- 化合物 cxxxviii

[1335] 将 PyBOP (450mg, 0.86mmol) 加到化合物 cxxxvii (350mg, 0.6mmol) 的 DCM 溶液 (10mL)。室温下将溶液搅拌 30 分钟, 将化合物 xiii' (160mg, 0.86mmol) 加入此溶液, 然后加入 DIPEA (0.23ml, 1.3mmol)。室温下将反应混合物搅拌过夜, 然后用水 (25ml) 中止反应 30 分钟。随后用 EtOAc 萃取混合物。用盐水洗涤萃取的有机相, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 然后浓缩得到黄色油。通过硅胶色谱法 (5% EtOH/EtOAc) 纯化得到化合物 cxxxviii (407mg, 88%)。

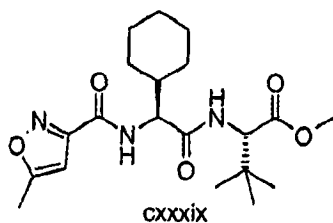
[1336]



[1337] 中间产物实施例 134- 化合物 cxxxix

[1338] 5- 甲基异噁唑-3- 甲酸 (200mg, 2.05mmol) 溶于 DCM (5mL)。将 PyBOP (1.07g, 2.05mmol) 加到此溶液。将在 DCM (5mL) 中的化合物 lxxix' (582mg, 2.05mmol) 加到此溶液, 然后加入 DIPEA (0.36ml, 2.05mmol)。在 N<sub>2</sub> 气氛下将所得的混合物搅拌过夜。用 EtOAc 稀释反应混合物, 并用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机相。将有机相浓缩, 并用 30% EtOAc/ 己烷将所得的残余物色谱纯化得到化合物 cxxxix (495mg, 61.4%)。

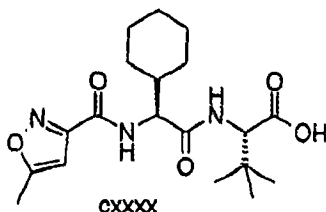
[1339]



[1340] 中间产物实施例 135- 化合物 cxxxx

[1341] 用 MeOH(10mL) 和 1N NaOH(3eq) 将化合物 cxxxix 水解得到化合物 cxxxx(430mg, 90%)。

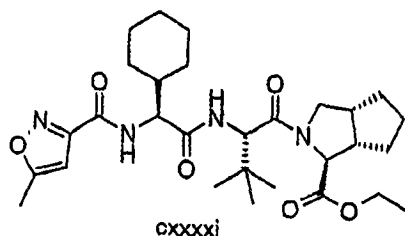
[1342]



[1343] 中间产物实施例 136- 化合物 cxxxxi

[1344] 将化合物 cxxxx(380mg, 1mmol) 溶于 DCM(5mL)。然后将 DCC(1.2mmol) 加到此溶液, 随后加入 HOAt(165mg, 1.2mmol)。接着加入在 THF(12mL) 中的化合物 v(1.2mmol)。在 N<sub>2</sub> 气氛下将所得的混合物搅拌过夜。用 EtOAc 稀释反应混合物, 通过硅胶过滤并浓缩。用 35% EtOAc/ 己烷将所得的残余物色谱纯化得到化合物 cxxxxi(320mg, 58%)。

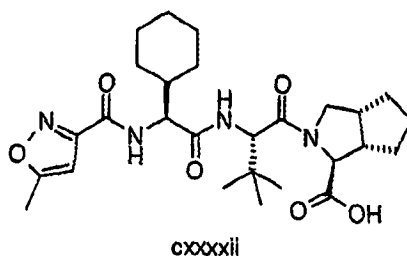
[1345]



[1346] 中间产物实施例 137- 化合物 cxxxxii

[1347] 使用 EtOH(10mL) 和 1N NaOH(3eq) 将化合物 cxxxxi 水解得到化合物 cxxxxii(730mg, 94.3%)。

[1348]

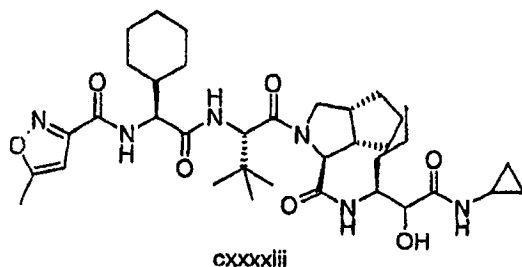


[1349] 中间产物实施例 138- 化合物 cxxxxiii

[1350] 将化合物 cxxxxii(240mg, 0.46mmol) 溶于 DCM(5mL)。然后将 PyBOP(295mg, 0.56mmol) 加到此溶液, 接着加入化合物 xiii' (110mg, 0.56mmol)。将 DIPEA(0.1ml, 0.56mmol) 加到所得的混合物。在 N<sub>2</sub> 气氛下将反应混合物搅拌两夜。用 EtOAc 稀释反应混

合物,用饱和  $\text{NaHCO}_3$  和盐水洗涤有机相。在浓缩有机相之后,用 90% EtOAc/ 己烷色谱纯化所得的残余物得到化合物 cxxxxiii (168mg, 53%)。

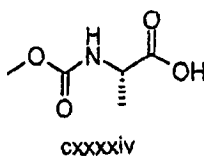
[1351]



[1352] 中间产物实施例 139- 化合物 cxxxxiv

[1353] 5°C 下将 L- 丙氨酸 (5.00g, 56.1mmol) 加到 NaOH 溶液 (2N, 42.1mL, 84.2mmol) 中。搅拌 10 分钟,同时滴加氯甲酸甲酯 (6.5ml, 84.2mmol) 和 NaOH (2N, 42.1ml, 84.2mmol)。在冰浴上将溶液搅拌 2 小时,然后在室温下搅拌 1 小时。用  $\text{Et}_2\text{O}$  (2×50mL) 洗涤混合物,用 5NHCl 将含水层中和至 pH ~ 2,并用 EtOAc (3×50mL) 萃取。用盐水洗涤萃取的有机相,用  $\text{MgSO}_4$  干燥并浓缩得到化合物 cxxxxiv

[1354]

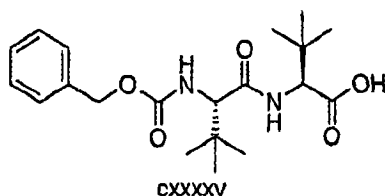


[1355] N- 甲酯基 -L- 丙氨酸, (4.54g, 54%), 为一种无色油。

[1356] 中间产物实施例 140- 化合物 cxxxxvi

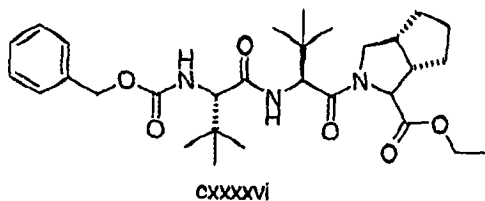
[1357] 5°C 下用 HOAt (1.28g, 9.44mmol) 处理在 THF 中的化合物 cxxxxv (3.57g, 9.44mmol) 的溶液,

[1358]



[1359] 然后加入 DCC (9.50ml, 9.50mmol)。在冰浴上搅拌 45 分钟后,加入在 THF 中的化合物 v 的溶液 (104ml, 10.4mmol)。室温下将混合物搅拌过夜。将混合物冷却至 5°C 并用饱和  $\text{NaHCO}_3$  中止反应。过滤除去沉淀的 DCU 之后,将混合物溶于 EtOAc (100mL),用饱和  $\text{NaHCO}_3$ 、盐水洗涤,然后用  $\text{MgSO}_4$  干燥并浓缩至一种残余物,通过硅胶柱色谱法 (25% EtOAc/ 己烷) 纯化残余物得到化合物 cxxxxvi (2.91g, 57%), 为胶质泡沫。

[1360]

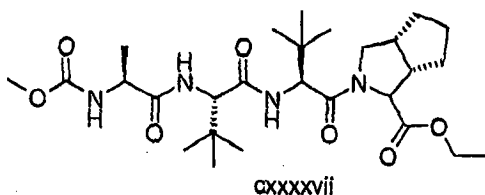


[1361] 中间产物实施例 141- 化合物 cviii

[1362] 将 Pd/C 缓慢加至在 N<sub>2</sub> 气流下被冰浴冷却的在 MeOH 中的化合物 cxxxxvi 的溶液 (25mL)。在 1atm 下将混合物氢化过夜。过滤除去催化剂, 将滤液与 5mL DMF 合并, 并真空干燥得到化合物 cviii。中间产物实施例 142- 化合物 cxxxxvii

[1363] 用 DCC(2.05ml, 2.05mmol) 处理在冰浴中冷却的在 THF 中的化合物 cxxxxiv(0.298g, 2.03mmol) 和 HOAt(0.276g, 2.03mmol) 的溶液。在冰浴上搅拌 0.5 小时后, 加入在 THF 中的化合物 cviii 的溶液, 然后加入 DIPEA(0.39ml, 2.2mmol)。室温下将混合物搅拌过夜, 然后用冰浴冷却, 用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 终止。过滤沉淀的 DCU, 并将滤液溶于 EtOAc(100mL)。用饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机相, 然后用 MgSO<sub>4</sub> 干燥。在除去有机溶剂之后, 通过硅胶柱色谱法 (60% EtOAc/ 己烷) 纯化得到化合物 cxxxxvii (0.47g, 48%), 为粘性泡沫。

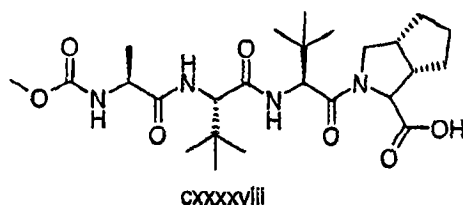
[1364]



[1365] 中间产物实施例 143- 化合物 cxxxxviii

[1366] 5 °C 下将 NaOH(2N, 1.31ml, 2.62mmol) 加到在 EtOH(5mL) 中的化合物 cxxxxvii(0.47g, 0.847mmol) 的溶液。室温下将混合物搅拌 4 小时。用 HCl(1N) 将溶液酸化至 pH ~ 2, 通过旋转蒸发除去 EtOH。用 EtOAc(3x30mL) 萃取混合物, 用盐水洗涤合并的萃取物, 然后用 MgSO<sub>4</sub> 干燥。除去溶剂, 并将残余物真空干燥得到化合物 cxxxxviii(0.366g, 82%), 为胶质泡沫。

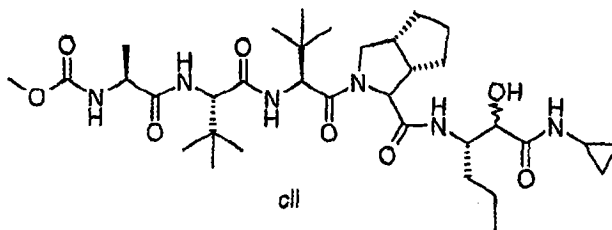
[1367]



[1368] 中间产物实施例 144- 化合物 cil

[1369] 用冰浴冷却在 DCM 中的化合物 cxxxxviii(0.366g, 0.718mmol) 的溶液, 并用 PyBop(0.599g, 1.15mmol) 处理。室温下搅拌 0.5 小时后, 用冰浴冷却混合物, 并用 THF 和 DIPEA(0.250ml, 1.44mmol) 中的化合物 xiii' (0.200g, 1.08mmol) 的溶液处理。室温下将混合物搅拌过夜, 然后用 NH<sub>4</sub>Cl 溶液中止反应。浓缩溶剂并将混合物溶于 EtOAc(100mL)。用饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤有机相, 然后用 MgSO<sub>4</sub> 干燥。除去有机溶剂后, 通过柱色谱法 (5% EtOH/EtOAc) 纯化残余物得到化合物 cil(0.35g, 72%)。

[1370]



[1371] 中间产物实施例 145- 化合物 cxxi

[1372] 将 CDI (7.79g, 48mmol) 加到 N-Boc-Nva-OH (化合物 1) (8.68g, 40mmol) 的 THF 溶液 (85mL)。室温下搅拌 30 分钟后,用含有 N,O-二甲基-羟基胺盐酸盐 (4.25g, 44mmol) 和 DIPEA (7.66ml, 44mmol) 的 DMF 溶液 (25mL) 处理上述溶液。室温下将反应混合物搅拌过夜。然后真空浓缩反应混合物。用 EtOAc (300mL) 稀释所得的残余物。依次 0.1N HCl (50mL)、饱和 NaHCO<sub>3</sub> (3x50mL) 和盐水洗涤此溶液。真空浓缩有机相得到一种残余物,用硅胶色谱法 (40% EtOAc/ 己烷) 纯化此残余物得到化合物 cxxi (9.38g, 94%)。

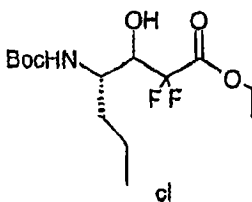
[1373] 中间产物实施例 146- 化合物 cxxii

[1374] 将 LAH (34.7ml, 1M, 34.7mmol) (缓慢) 加到冷却至 0°C 的化合物 cxxi (9.38g, 31.9mmol) 的 Et<sub>2</sub>O 溶液 (50mL)。在 LAH 加入期间保持反应瓶的温度在 5°C 以下。加入完成后,向反应中加入 EtOAc (20mL) 以中止过量的 LAH。然后滴加 KHSO<sub>4</sub> 水溶液 (5%, 20mL) 以保持温度低于 5°C。分离有机相,然后依次用 1N HCl (3×30mL)、饱和 NaHCO<sub>3</sub> (3x30mL) 和盐水洗涤。浓缩有机相并真空干燥得到化合物 cxxii 粗产物 (5.18g, 69%)。

[1375] 中间产物实施例 147- 化合物 c1

[1376] 回流下将 0.2mL EtOC(O)CF<sub>2</sub>Br 加到 Zn (2.75g, 42mmol) 的 THF (25mL) 悬浮液。然后缓慢加入化合物 cxxii (3.05g, 15.0mmol) 和 EtOC(O)CF<sub>2</sub>Br (4.84ml, 37.5mmol) 的 THF 溶液 (25mL)。在完成两种试剂的加入时,将反应混合物进一步回流 30 分钟。将反应混合物冷却至室温,用 DCM (200mL) 稀释。用 1N KHSO<sub>4</sub> 洗涤有机相。浓缩有机相并真空干燥得一种残余物,通过硅胶色谱法 (20% EtOAc/ 己烷) 纯化得到化合物 c1 (2.78g, 57%)。

[1377]

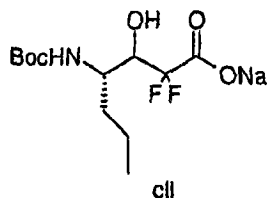


[1378] 此制备基本上与 Thaisrivongs 等., J. Med. Chem., 29, 2080-2087 (1986) 公开的制备相同。

[1379] 中间产物实施例 148- 化合物 cli

[1380] 用 1N NaOH (12.8ml, 12.8mmol) 处理化合物 c1 (2.78g, 8.53mmol) 的 THF 溶液 (40mL)。室温下搅拌过夜后,真空下部分除去溶剂。用水 (50mL) 稀释剩余的反应混合物并冻干得到化合物 cli 粗产物 (2.82g, > 100%), 为它的钠盐。

[1381]



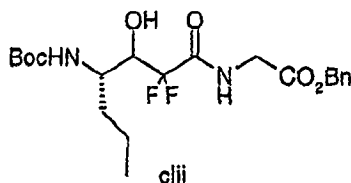
[1382] 此制备基本上与 Thaisrivongs 等., J. Med. Chem., 29, 2080-2087 (1986) 公开的制备相同。

[1383] 中间产物实施例 149- 化合物 clii

[1384] 用 HOBt (436mg, 3.23mmol) 和 DIC (0.328ml, 2.09mmol) 处理化合物 cli 粗产物 (516mg, 1.61mmol) 的 DCM 溶液 (10mL)。室温下搅拌 30 分钟后, 用含有甘氨酸苄基酯-TsOH 盐 (815mg, 2.42mmol) 和 DIPEA (0.422ml, 2.42mmol) 的 DCM 溶液 (5mL) 处理反应混合物。室温下搅拌 12 小时后, 用水中止反应混合物, 并用 EtOAc 萃取。将有机相干燥并真空浓缩, 用硅胶色谱法 (40% EtOAc/ 己烷) 纯化得到化合物 clii (495mg, 69%)。

[1385] 化合物 clii 的  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  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)。

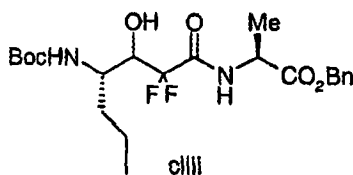
[1386]



[1387] 从化合物 cli 粗产物开始, 以与关于化合物 clii 所述的相同方法制备化合物 cliii (83%) 和 cliiv (50%)。

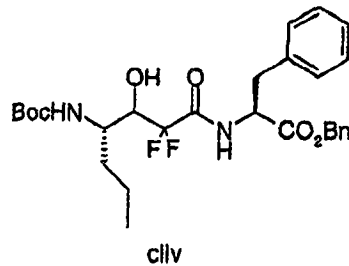
[1388] 化合物 cliii 的  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  7.49 (bs, 1H), 7.34-7.24 (m, 5H), 5.13 (AB q,  $J = 12.2\text{Hz}$ ,  $J' = 23.9\text{Hz}$ , 2H), 4.88 (bd,  $J = 8.8\text{Hz}$ , 1H), 4.53 (m, 1H), 3.98-3.91 (m, 2H), 3.82 (m, 1H), 1.65-1.20 [m, 16H, 包括 1.37 (9H) 处的单峰], 0.86 (t,  $J = 7.3\text{Hz}$ , 3H)。

[1389]



[1390] 化合物 cliiv 的  $^1\text{H NMR}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) :  $\delta$  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, 包括 1.36 (9H) 处的单峰], 0.86 (bs, 3H)。

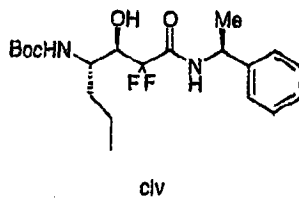
[1391]



[1392] 中间产物实施例 150- 化合物 clv

[1393] 将 HOBt (634mg, 4.69mmol) 和 EDCI (781mg, 4.07mmol) 加到 DCM (10mL) 和化合物 cli 粗产物 (1g, 3.13mmol) 的 THF (5mL) 溶液, 然后加入 (s)- $\alpha$ -甲基苄基胺 (0.604ml, 4.69mmol)。室温下将反应混合物搅拌过夜, 然后用水中止反应。用 EtOAc 萃取反应混合物。用盐水洗涤有机相并用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥。真空浓缩有机相得到一种残余物, 用硅胶色谱法 (20% EtOAc/ 己烷) 纯化此残余物得到化合物 clv (459mg, 37%)。化合物 clv 的  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  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, 包括 1.51 处的双峰 ( $J = 6.8\text{Hz}$ , 3H), 1.39 处的单峰 (9H)], 0.82 (m, 3H)。

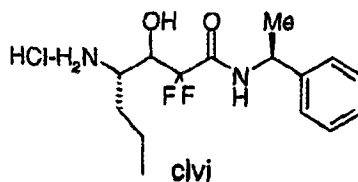
[1394]



[1395] 中间产物实施例 151- 化合物 clvi

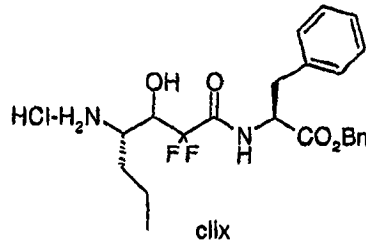
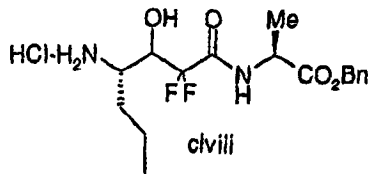
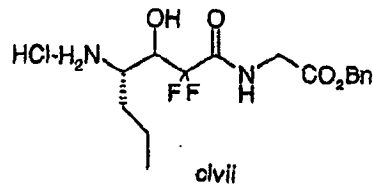
[1396] 将化合物 clv (220mg, 0.55mmol) 溶于在二噁烷 (10mL) 中的 4N HCl。室温下将反应混合物搅拌 2 小时, 然后真空浓缩得到化合物 clvi 粗产物 (~100%), 为它的 HCl 盐。

[1397]



[1398] 根据以上关于制备化合物 clvi 所述的方法, 以几乎定量的产率由化合物 cli 粗产物制得了化合物 clvii、clviii 和 clix。

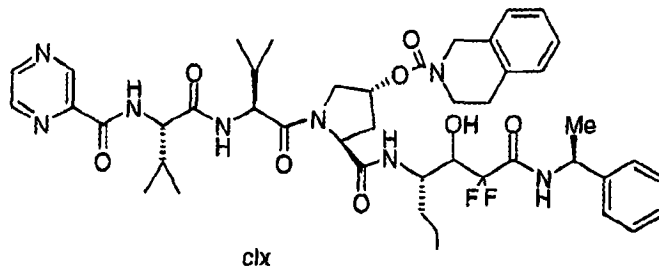
[1399]



[1400] 中间产物实施例 152- 化合物 clx

[1401] 用 PyBOP (120mg, 0.23mmol) 和 DIPEA (0.1ml, 0.576mmol) 处理化合物 vii (96mg, 0.144mmol) 的 HCl 盐的 DCM 溶液 (4mL)。室温下搅拌 30 分钟后,用含化合物 clv (0.288mmol) 和 DIPEA (0.2ml, 1.152mmol) 的 THF 溶液 (4mL) 处理此溶液。室温下将反应混合物搅拌过夜。然后用 EtOAc (50mL) 稀释反应混合物,随后用 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机相。真空浓缩有机相,并通过硅胶色谱法 (80% EtOAc/ 己烷) 纯化残余物得到化合物 clx (113mg, 89%)。

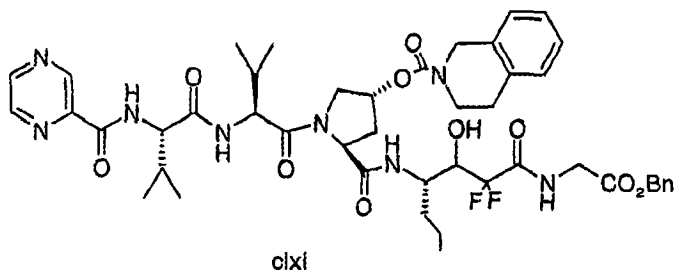
[1402]



[1403] 中间产物实施例 153- 化合物 clxi

[1404] 用 PyBOP (196mg, 0.376mmol) 将化合物 vii (140mg, 0.235mmol) 的 DCM 溶液 (6mL) 处理 30 分钟。然后将化合物 clvii (~ 0.47mmol) 和 DIPEA (0.327ml, 1.88mmol) 的 THF 溶液 (6mL) 加到上述溶液。室温下将反应混合物搅拌过夜并用水中止反应 (30 分钟)。用 EtOAc (50mL) 萃取反应混合物。用 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机相。用 EtOAc (50mL) 萃取回合并的水相。将合并的有机相干燥并真空浓缩。用硅胶色谱法 (80-100 EtOAc/ 己烷) 纯化所得的残余物得到化合物 clxi (104mg, 48%)。

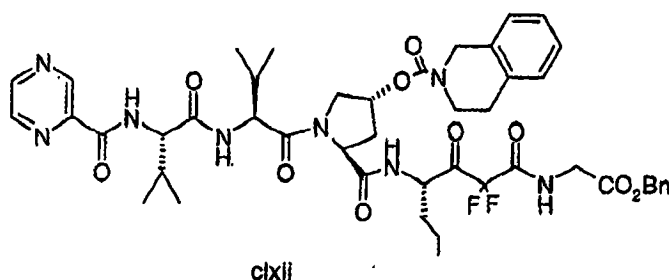
[1405]



[1406] 中间产物实施例 154- 化合物 clxii

[1407] 将 DMP 试剂 (193mg, 0.456mmol) 加到化合物 clxi (280mg, 0.304mmol) 的 DCM 溶液 (10mL)。室温下将反应混合物搅拌 3 小时,并用 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 中止反应。用 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤有机相。将所得的有机相干燥并真空浓缩得到一种残余物,用硅胶色谱法 (80-100% EtOAc/ 己烷) 纯化得到化合物 clxii (271mg, 97%)。

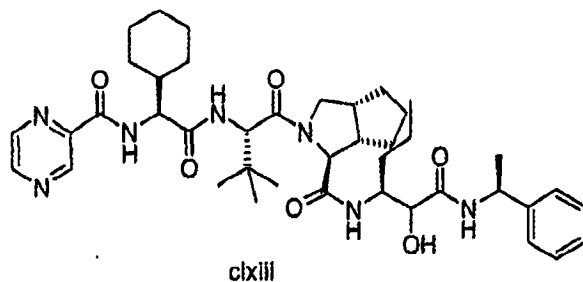
[1408]



[1409] 中间产物实施例 155- 化合物 clxiii

[1410] 将化合物 lxxxiii (220mg, 0.43mmol) 置于 DCM (5mL)。将 PyBOP (270mg, 0.51mmol) 加到此 DCM 溶液并搅拌 5 分钟。将在 THF (5.1mL) 中的化合物 xxxvi' (0.51mmol) 滴加到此溶液。将 DIPEA (0.09ml, 0.51mmol) 加到反应混合物,并在 N<sub>2</sub> 气氛下搅拌过夜。第二天,用 EtOAc 稀释反应混合物,用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 洗涤,用盐水洗涤。用 70%至 90% EtOAc/ 己烷梯度纯化得到化合物 clxiii (180mg, 56%)。

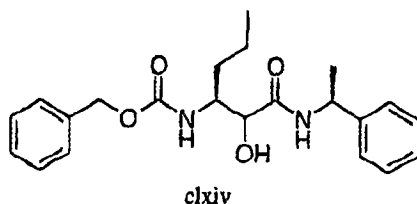
[1411]



[1412] 中间产物实施例 156- 化合物 clxiv

[1413] 将化合物 cxxv (2.09g, 7.4mmol) 置于 DCM (20mL)。将 PyBOP (4.64g, 8.9mmol) 和 HOBT (1.2g, 8.9mmol) 加到此溶液并搅拌 5 分钟。将所得的混合物降温至 0℃,其中加入 S(-)-α-甲基苄基胺 (1.15ml, 8.9mmol) 和 DIPEA (1.55ml, 8.9mmol)。将反应物搅拌过夜,并加热至室温。用 0.1N HCl、饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤反应混合物。用 30% EtOAc/ 己烷纯化得到化合物 clxiv (1.6g, 56.3%)。

[1414]



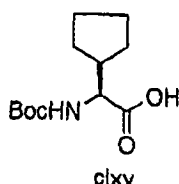
[1415] 中间产物实施例 157- 化合物 xxxvi'

[1416] 用在 MeOH(50mL) 中的 10% Pd/C(300mg) 将化合物 clxiv(1.48g, 3.8mmol) 氢化。在 H<sub>2</sub> 气氛下将反应混合物搅拌过夜。通过硅藻土过滤反应混合物, 并浓缩得到化合物 xxxvi' (895mg, 94.2%)。

[1417] 中间产物实施例 158- 化合物 clxvi :

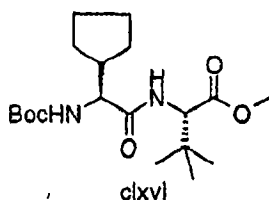
[1418] 将 HOAt(1.34g, 9.84mmol) 和 DCC(9.84ml, 1M, 9.84mmol) 加到化合物 clxv(2g, 8.2mmol) 的 DCM 溶液 (15mL)。

[1419]



[1420] 室温下搅拌 20 分钟后, 将包含叔-L-亮氨酸甲酯-盐酸盐 (9.84mmol) 和 DIPEA(1.72ml, 9.84mmol) 的 THF 溶液 (9.84mL) 加到上述溶液。然后室温下加入 DMAP(1g, 8.2mmol)。室温下将反应物搅拌过夜。在标准水处理和硅胶色谱处理 (20% EtOAc/ 己烷) 之后, 获得化合物 clxvi (1.75g, 58%)。

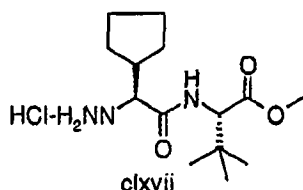
[1421]



[1422] 中间产物实施例 159- 化合物 clxvii :

[1423] 将在二噁烷 (11.8ml, 47.3mmol) 中的 4N HCl 溶液加到化合物 clxvi(1.75g, 4.73mmol) 的 THF 溶液 (35mL)。室温下将反应物搅拌过夜。此时在减压下除去溶剂得到 clxvii 粗产物 (~100%), 将其再溶于 DMF 并直接用于下一反应。

[1424]

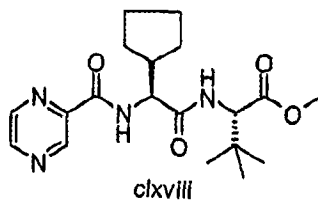


[1425] 中间产物实施例 160- 化合物 clxviii :

[1426] 将化合物 clxvii(811mg, 3mmol) 的 DMF 溶液 (15mL) 加到包含 2-吡嗪甲酸 (447mg, 3.6mmol)、PyBOP(1.87g, 3.6mmol) 的 DCM 溶液 (15mL)。将 DIPEA(0.63ml, 3.6mmol) 加到所得的混合物。室温下将反应物搅拌过夜, 然后用水中止反应。用 EtOAc 萃取反应混合物。

用盐水洗涤有机层并真空干燥得到一种残余物,通过硅胶色谱法(40% EtOAc/ 己烷)将其纯化得到化合物 clxviii(0.93g,82%)。

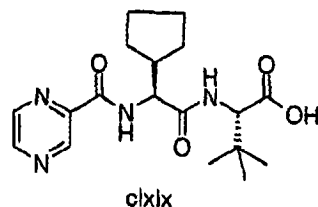
[1427]



[1428] 中间产物实施例 161- 化合物 clxix :

[1429] 将 2N NaOH(3.71ml,7.41mmol) 加到化合物 clxviii(0.93g,2.47mmol) 的 MeOH 溶液(10mL)。室温下将反应物搅拌过夜。然后用 1N HCl 将反应物酸化至 pH3。用 EtOAc(75mL) 稀释反应物,用水和盐水洗涤。将如此得到的有机层干燥并真空浓缩得到化合物 clxix(~100%)。

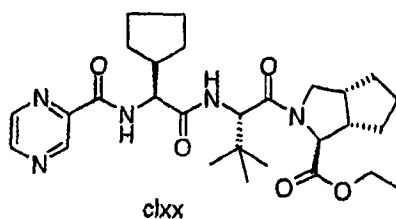
[1430]



[1431] 中间产物实施例 162- 化合物 clxx :

[1432] 用 HOAt(436mg,3.21mmol) 和 DCC(3.2ml,1M,3.2mmol) 处理化合物 clxix(2.47mmol) 的 DCM 溶液(10mL)。在搅拌 30 分钟后,用化合物 v(499mg,2.72mmol) 的 THF 溶液(13.6mL) 处理反应混合物。室温下搅拌过夜后,过滤白色固体(尿素)。真空浓缩滤液得到一种残余物,硅胶色谱法纯化此残余物得到化合物 clxx(0.99g,76%)。

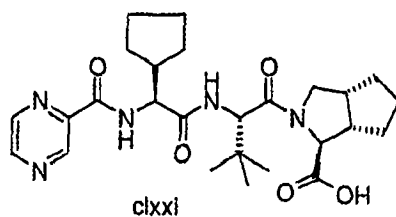
[1433]



[1434] 中间产物实施例 163- 化合物 clxxi

[1435] 用 2N NaOH(2.81mL,5.63mmol) 处理化合物 clxx(0.99g,1.88mmol) 的 EtOH 溶液(20mL)。室温下搅拌过夜后,用 1N HCl 将反应混合物酸化至 pH3。用 EtOAc(75mL) 萃取反应混合物。将有机层干燥并真空浓缩得到化合物 clxxi(772mg,82%)。

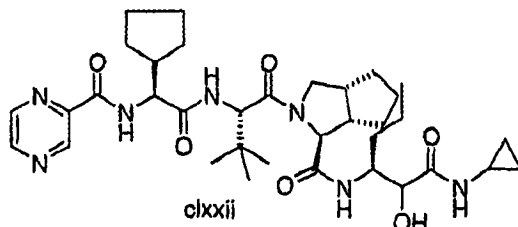
[1436]



[1437] 中间产物实施例 164- 化合物 clxxi :

[1438] 用 PyBOP(484mg, 0.93mmol) 处理化合物 clxxi(290mg, 0.58mmol) 的 DCM 溶液 (10mL)。室温下搅拌 20 分钟后, 用化合物 xiii' (140mg, 0.75mmol) 的 THF 溶液 (7.5mL) 处理反应混合物, 然后用 DIPEA(0.13mL, 0.75mmol) 处理。室温下搅拌过夜后, 用水中止反应并用 EtOAc 萃取。用盐水洗涤所得的有机层, 干燥并真空浓缩。通过硅胶色谱法纯化所得的残余物 (5% EtOH/EtOAc) 得到化合物 clxxii 290mg(75%)。

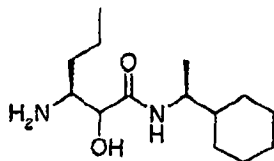
[1439]



[1440] 中间产物实施例 165- 化合物 clxxiv :

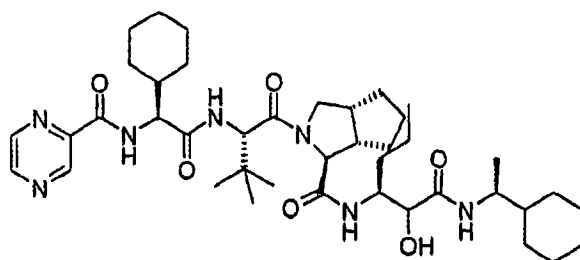
[1441] 将化合物 lxxxiii(600mg, 1.17mmol) 置于 DCM(4mL)。加入 PyBOP(670mg, 1.3mmol), 搅拌 5 分钟, 并冷却至 0 °C。将在 THF(13mL) 中的化合物 clxxiii(333mg, 1.3mmol) 滴加到此溶液。

[1442]



[1443] 将 DIPEA(0.23ml, 1.3mmol) 加到反应混合物并将其温热至室温, 同时搅拌两夜。第二天, 浓缩反应物并用 2% EtOH/EtOAc 纯化得到化合物 clxxiv 粗产物 (900mg, 100% 的过量)。

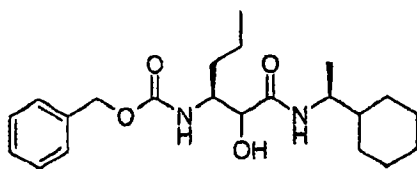
[1444]



[1445] 中间产物实施例 166- 化合物 clxxxv :

[1446] 将化合物 cxxv(3.01g, 10.7mmol) 置于 DCM(30mL), 并将温度降至 -78 °C。将 PyBOP(6.1g, 11.7mmol) 和 HOBT(1.58g, 11.7mmol) 加到此溶液, 然后加入 (S)-(+)-1-环己基乙基胺、化合物 clxxv(1.74ml, 11.7mmol) 和 DIPEA(2.1mL, 11.7mmol)。将所得的混合物在室温下搅拌过夜。第二天, 用 EtOAc 稀释反应混合物, 用 0.1N HCl、饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤。用 40% EtOAc/ 己烷将产物纯化得到 2g(47.8%) 化合物 clxxvi。

[1447]



clxxvi

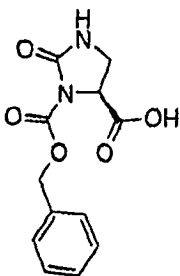
[1448] 中间产物实施例 167- 化合物 clxxiii :

[1449] 使用在 MeOH(40mL) 中的 10% Pd/C(500mg) 将化合物 clxxvi(2g, 5.13mmol) 氢化。在 H<sub>2</sub> 下将反应混合物搅拌过夜。通过硅藻土过滤反应混合物并浓缩得到化合物 clxxiii(1.31g, 99.8%)。

[1450] 中间产物实施例 168- 化合物 clxxix :

[1451] 在圆底烧瓶中, 在惰性气氛下, 将化合物 clxxvii[(S)-(-)-2-氧代-1,5-咪唑啉二甲酸 1-苄基酯](290mg, 1.1mmol)

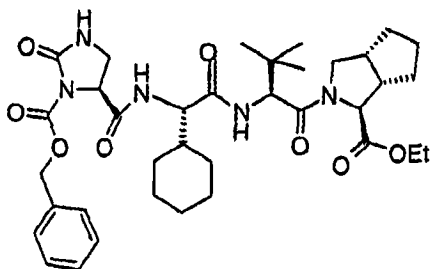
[1452]



clxxvii

[1453] 溶于无水 DMF(6mL)。加入 HOAt(151mg, 1.2mmol) 并在室温下将反应物搅拌 25 分钟。在冰浴中冷却反应物。然后加入 DIC(0.2ml, 0.16g, 1.2mmol), 随后加入在无水 DMF(4mL) 中的化合物 clxxviii(1mmol, 435mg.)。将反应物缓慢升温至室温, 并搅拌 2 天。然后将反应物倾入包含 120mL EtOAc 的分离漏斗, 用 1N HCl(50mL) 洗涤两次并用盐水洗涤一次。分离有机层, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥。减压下蒸发溶剂, 通过硅胶色谱法(担载在 DCM 上, 用 30% EtOAc/DCM 洗脱, 然后用 50% EtOAc/DCM 洗脱, 然后用 2% MeOH/EtOAc 洗脱) 纯化残余物得到产物 clxxix(434mg, 64%)。

[1454]



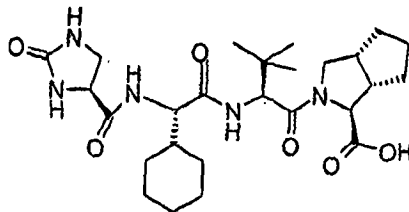
clxxix

[1455] 中间产物实施例 169- 化合物 clxxx :

[1456] 将原料 clxxix(434mg, 0.64mmol) 溶于二噁烷(6mL) 和 0.5MNaOH 水溶液(4ml, 3eq.)。进行反应过夜。用 100% EtOAc 的 TLC(使用 PMA 染色) 表明除了在原始位置的预期的酸产物之外, 还有跑得更快的产物。使用 1N HCl 将反应混合物酸化至 pH 2, 然后用 EtOAc 萃取两次。将固体 NaCl 加到水溶液以沉淀萃取物。合并有机萃取物, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥并减压

蒸发。MS 表明通过水解除去了 CBZ 基团。将所得的化合物 clxxx (定量产率) 用于下一步骤。

[1457]

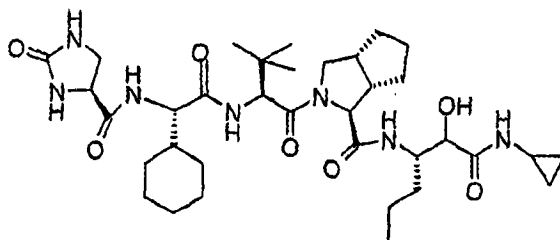


clxxx

[1458] 中间产物实施例 170- 化合物 clxxxii :

[1459] 在圆底烧瓶中, 在惰性气氛下, 将化合物 clxxx (279mg, 0.54mmol) 溶于无水 DMF (6mL)。加入 HOAt (82mg, 0.65mmol), 并在室温下将反应物搅拌 25 分钟。然后在冰浴上冷却反应。随后加入 DIC (0.11ml, 0.65mmol), 接着加入在无水 DMF (4mL) 中的化合物 xiii' (0.7mmol)。将反应物缓慢升温至室温, 并搅拌 21 小时。然后将反应物倾入包含 120mL 的 EtOAc 的分离漏斗, 并用 1N HCl (50mL) 洗涤两次, 用盐水洗涤一次。分离有机层, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥。减压蒸发溶剂并通过硅胶色谱法净化产物 (硅胶担载在 DCM 上, 用 50% EtOAc/己烷洗脱, 然后用 3% MeOH/EtOAc 洗脱, 然后用 20% EtOH/EtOAc 洗脱)。除去溶剂后, 将残余物再溶于 Dri Solv THE, 并过滤除去任何硅胶。除去溶剂得到化合物 clxxxii (434mg, 64% 产率)。

[1460]

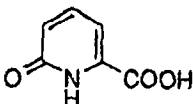


clxxxii

[1461] 中间产物实施例 171- 化合物 clxxxiii :

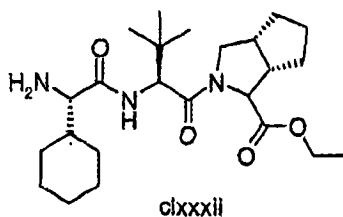
[1462] 在圆底烧瓶中, 在惰性气氛下, 将 6-羟基吡啶甲酸 (153mg, 1.1mmol)

[1463]



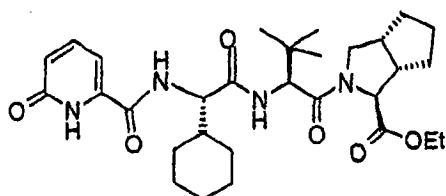
[1464] 溶于无水 DMF (6mL)。加入 HOAt (151mg, 1.2mmol), 然后在室温下将反应物搅拌 25 分钟。随后在冰浴中冷却反应物。随后加入 DIC (0.2ml, 0.16g, 1.2mmol), 接着加入在无水 DMF (4mL) 中的化合物 clxxxiii (1.0mmol, 435mg.)。

[1465]



[1466] 将反应物缓慢升温至室温,并搅拌 2 天。将反应物倾入包含 120ml EtOAc 的分离漏斗,用 1N HCl (50mL) 洗涤两次,并用盐水洗涤一次。分离有机层,用  $MgSO_4$  干燥。减压蒸发溶剂,并用硅胶色谱法(硅胶担载于 DCM,用 30% EtOAc/DCM 洗脱,然后用 50% EtOAc/DCM 洗脱,然后用 2% MeOH/EtOAc 洗脱)纯化收集得到化合物 clxxxiii (314mg, 56%)。

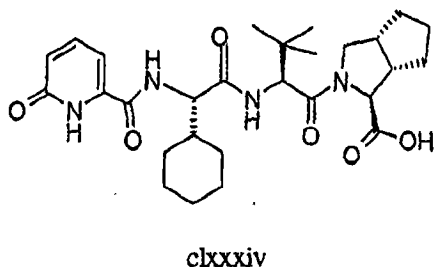
[1467]



[1468] 中间产物实施例 172- 化合物 clxxxiv :

[1469] 将原料 clxxxiii (314mg, 0.56mmol) 溶于二噁烷 (5mL) 和 0.5M NaOH (3.4ml, 3eq)。进行反应过夜。使用 100% EtOAc 的 TLC (使用 UV) 表明完全转化在原始位置缓慢跑动的酸产物。用 1N HCl 将反应物酸化至 pH 2, 然后用 EtOAc 萃取两次。将固体 NaCl 加到此水溶液以利于萃取。然后合并原始萃取物,用  $MgSO_4$  干燥,然后减压蒸发得到化合物 clxxxiv (0.5mmol, 89%), 将此化合物用于下一步。

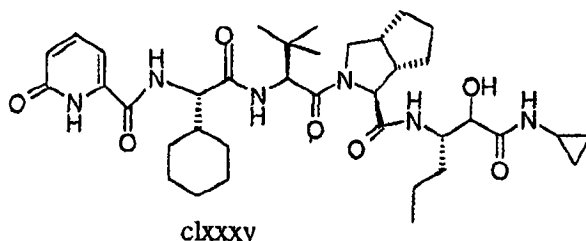
[1470]



[1471] 中间产物实施例 173- 化合物 clxxxv :

[1472] 在圆底烧瓶中,在惰性气氛下,将酸性化合物 clxxxiv (265mg, 0.5mmol) 溶于无水 DMF (6mL)。加入 HOAT (75.6mg, 0.6mmol) 并在室温下将反应物搅拌 25 分钟。然后在冰浴中冷却反应物。随后加入 DIC (0.1ml, 0.6mmol), 接着加入在无水 DMF (4mL) 中的化合物 xiii' (0.65mmol)。将反应物缓慢升温至室温,并搅拌 21 小时。将反应物倾入包含 EtOAc (120mL) 的分离漏斗,用 1N HCl (50mL) 洗涤两次,并用盐水洗涤一次。分离有机层,用  $MgSO_4$  干燥。通过减压蒸发溶剂,并通过硅胶色谱法(硅胶担载于 DCM,用 50% EtOAc/己烷洗脱,然后用纯 EtOAc 洗脱,然后用 4% MeOH/EtOAc 洗脱)纯化产物得到化合物 clxxxv (185mg, 52%)。

[1473]

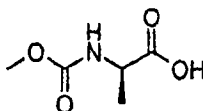


[1474] 中间产物实施例 174- 化合物 cxxxxiv' :

[1475] 0 °C 下将在乙醚 (30mL) 中的 MeOC(O)Cl (6.5ml, 84.2mmol) 溶液加到在 1N NaOH (152ml, 152mmol) 中的 D- 丙氨酸 (5g, 56.1mmol) 溶液。在冰浴中将混合物搅拌 3 小时, 然后用 1N NaOH 调节至 pH 9。在室温下搅拌 1 小时后, 用乙醚 (3x50mL) 洗涤混合物, 用 5N HCl 酸化至 pH ~ 2, 用 EtOAc (5x50mL) 萃取。用水、盐水洗涤有机萃取物, 然后干燥 (MgSO<sub>4</sub>)。除去溶剂得到化合物 cxxxxiv,

[1476] N- 甲氧羰基 -D- 丙氨酸, 为一种无色油 (6.48g, 79%)。

[1477]

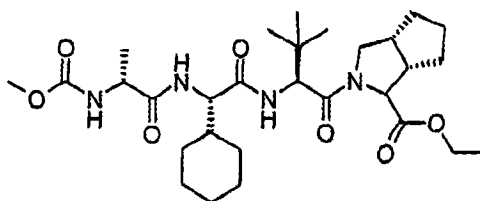


cxxxxiv

[1478] 中间产物实施例 175- 化合物 clxxxvi :

[1479] 用 DCC (1.31ml, 1.31mmol) 处理在冰浴中冷却的在 DCM (10mL) 中的 N- 甲氧羰基 -D- 丙氨酸 (0.193g, 1.31mmol) 和 HOAt (0.177g, 1.31mmol) 的溶液。冰浴中搅拌 0.5 小时后, 加入在 THF (8.8mL) 中的制备的化合物 clxxxii (0.88mmol) 的溶液。将混合物温热至室温并搅拌过夜, 在冰浴中冷却, 并用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液中止反应。过滤沉淀, 并将滤液置于 EtOAc (100mL)。用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液、盐水洗涤有机层, 然后干燥 (MgSO<sub>4</sub>)。除去溶剂后, 通过硅胶色谱法 (60% EtOAc/ 己烷) 纯化残余物得到化合物 clxxxvi, 为胶质泡沫 (0.321g, 68%)。

[1480]

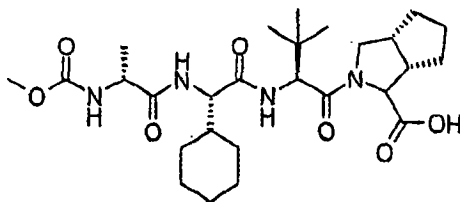


clxxxvi

[1481] 中间产物实施例 176- 化合物 clxxxvii :

[1482] 5 °C 下将 2N NaOH (1.05ml, 2.1mmol) 加到在 EtOH (5mL) 中的化合物 clxxxvi (0.321g, 0.597mmol) 的溶液。室温下将混合物搅拌 4 小时。用 1N HCl 将溶液酸化至 pH ~ 2, 并通过旋转蒸发除去 EtOH。用 EtOAc (3x30mL) 萃取混合物, 用盐水洗涤合并的萃取物, 然后干燥 (MgSO<sub>4</sub>)。除去溶剂, 并真空干燥残余物得到化合物 clxxxvii, 为胶质泡沫 (0.235g, 77%)。

[1483]



clxxxvii

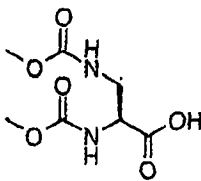
[1484] 中间产物实施例 177- 化合物 clxxxviii :

[1485] 在冰浴中冷却在 DCM(10mL) 中的化合物 clxxxvii(0.363g,0.712mmol) 的溶液,并用 PyBOP(0.594g,1.14mmol) 处理。室温下搅拌 0.5 小时后,在冰浴中冷却混合物,用在 THE(11mL) 和 DIPEA(0.249ml,1.42mmol) 中的化合物 xiii' (1.1mmol) 的溶液处理。室温下将混合物搅拌过夜,并用 NH<sub>4</sub>Cl 溶液终止。浓缩溶剂,并将混合物置于 EtOAc(100mL)。用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液、盐水洗涤有机层,然后干燥 (MgSO<sub>4</sub>)。除去溶剂后,通过柱色谱法 (5% EtOH/EtOAc) 纯化残余物得到 clxxxviii(0.341g,71%)。

[1486] 中间产物实施例 178- 化合物 clxxxix :

[1487] 将二氨基丙酸 (3g,28.7mmol) 置于 1M NaOH(86.2ml,86.2mmol),并冷却到 0℃,然后加入在 Et<sub>2</sub>O(25mL) 中的 MeOC(O)Cl (5.54ml,71.75mmol)。将所得的混合物搅拌过夜,并温热到室温。将反应混合物的 pH 降至 2,并用 EtOAc 萃取水层 3 次。合并萃取物,并用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥,过滤并浓缩得到化合物 clxxxix(3.09g,48.9%)。

[1488]

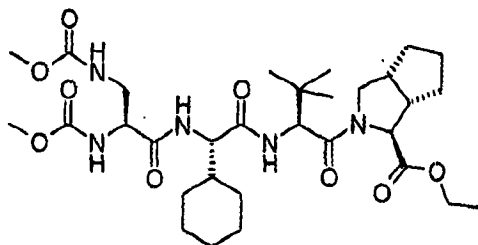


clxxxix

[1489] 中间产物实施例 179- 化合物 cc :

[1490] 将化合物 clxxxix(340mg,1.55mmol) 置于 DCM(4mL)。加入 DCC(1.7mmol) 和 HOAt(235mg,1.7mmol),然后加入在 DCM(3.4mL) 中的化合物 clxxxii(1.7mmol)。将反应混合物搅拌过夜。第二天,通过硅藻土垫过滤反应混合物并浓缩。用 75% EtOAc/ 己烷完成纯化得到化合物 clxxxx(715mg,72.4%)。

[1491]

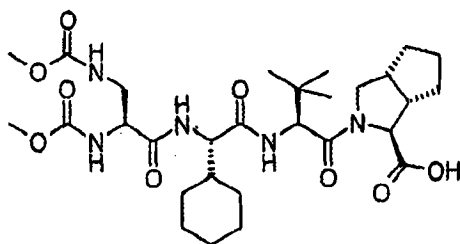


clxxxx

[1492] 中间产物实施例 180- 化合物 clxxxxi :

[1493] 在标准条件下使用 EtOH(4mL) 和 1N NaOH(3eq) 水解化合物 clxxxx(715mg,1.12mmol) 得到化合物 clxxxxi(600mg,88.0%)。

[1494]

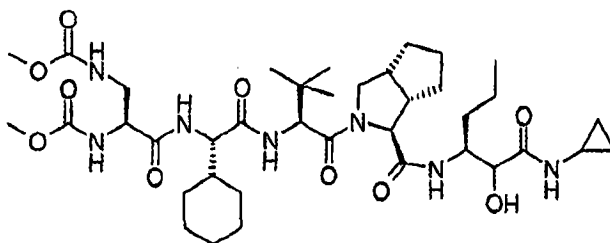


clxxxxxi

[1495] 中间产物实施例 181- 化合物 clxxxxii :

[1496] 将化合物 clxxxxxi (550mg, 0.9mmol) 置于 DCM (8mL)。加入 PyBOP (675mg, 1.3mmol), 然后加入在 THF (1.3mL) 中的化合物 xiii' (1.3mmol)。加入 DIPEA (0.23mL, 1.3mmol) 并将所得的溶液搅拌过夜。第二天, 用 EtOAc 稀释反应物, 用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 洗涤, 然后用盐水洗涤, 随后浓缩得到一种残余物。用 5% EtOH/EtOAc 将所得的残余物纯化得到化合物 clxxxxii (290mg, 41.5%)。

[1497]

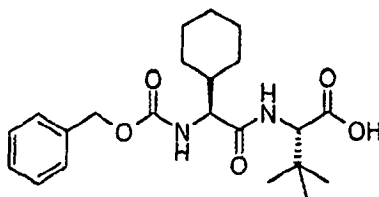


clxxxxii

[1498] 中间产物实施例 182- 化合物 clxxxxiii :

[1499] 在标准条件下使用 MeOH (60mL) 和 1N NaOH (52.8mL, 3eq) 将 Cbz- 环己基甘氨酸 - 叔 - 亮氨酸甲酯 (7.36g, 17.6mmol) 水解得到中间产物 clxxxxiii (92%)。

[1500]

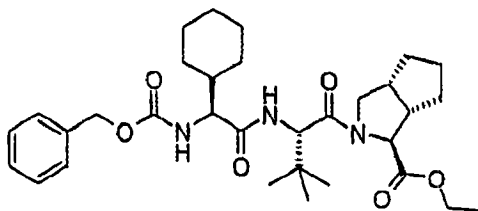


clxxxxiii

[1501] 中间产物实施例 183- 化合物 clxxxxiv :

[1502] 将化合物 clxxxxiii (3.82g, 9.46mmol) 置于 DCM (30mL)。加入在 DCM (11.35mL) 中的 DCC (11.35mmol), 然后加入 HOAt (1.54g, 11.35mmol)。将所得的混合物搅拌 5 分钟, 并加入在 THF (40mL) 中的化合物 v (9.46mmol)。将所得的混合物搅拌过夜。第二天, 用 EtOAc 稀释反应混合物, 用 1N HCl 洗涤, 用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 洗涤, 然后用盐水洗涤, 随后浓缩得到一种残余物。在硅胶上用 20% 至 30% 梯度纯化所得的残余物得到化合物 clxxxxiv (3.03g, 56.3%)。

[1503]



clxxxxiv

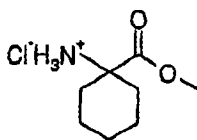
[1504] 中间产物实施例 183- 化合物 clxxxii :

[1505] 在 H<sub>2</sub> 气氛下使用在 MeOH(30mL) 中的 10 % Pd/C(500mg) 将化合物 clxxxxiv(3.03g, 5.33mmol) 氢化 4 小时得到化合物 clxxxii(2.3g, 99%)。

[1506] 中间产物实施例 184- 化合物 clxxxxv :

[1507] 0℃下将 SOCl<sub>2</sub>(3mL) 滴加到在 MeOH(40mL) 中的 1-氨基-1-环己烷甲酸(2.86g, 20mmol) 溶液。将混合物缓慢加热到室温, 然后回流 5 小时。随后将 Et<sub>2</sub>O 加到澄清溶液, 并分离沉淀物。进一步在真空下干燥固体得到化合物 clxxxxv(95%), 为白色粉末。

[1508]

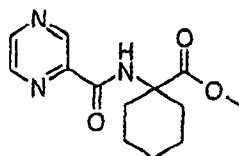


clxxxxv

[1509] 中间产物实施例 185- 化合物 clxxxxvi :

[1510] 加入在 DCM 中的 HOAt(1.1g, 8mmol) 和 DCC(8mL, 1M) 而将 2-吡嗪甲酸(1g, 8mmol, 1eq) 溶于 DCM(15mL)。室温下搅拌 20 分钟后, 将化合物 clxxxxv(1.3g, 8mmol) 加到活化的混合物。之后加入 DIPEA(2mL, 12mmol), 然后加入 DMAP(1.5g, 12mmol)。室温下搅拌 3 天后, 通过硅藻土过滤反应混合物, 浓缩并用柱色谱法(50% EtOAc/ 己烷) 纯化所需产物 clxxxxvi, 为黄色油(2.1g, 100%)。

[1511]

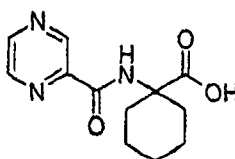


clxxxxvi

[1512] 中间产物实施例 186- 化合物 clxxxxvii :

[1513] 加入 2N NaOH(水溶液)(12mL, 24mmol) 而将化合物 clxxxxvi(1.06g, 2.6mmol) 溶于 MeOH(30mL)。室温下将溶液搅拌过夜, 随后 TLC(50% EtOAc/ 己烷) 表明完全水解。用 5N HCl 将溶液酸化至 pH3, 用 EtOAc 稀释, 然后萃取有机层。然后用盐水洗涤有机层, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥浓缩得到化合物 clxxxxvii(84%)。

[1514]

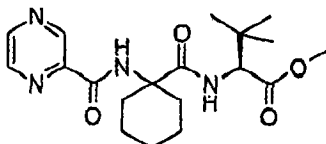


clxxxxvii

[1515] 中间产物实施例 187- 化合物 clxxxxviii :

[1516] 将化合物 clxxxvii(1.6g,6.4mmol) 溶于 DCM(18mL), 然后在室温下加入 HOAt(0.96g,7mmol) 和 DCC(7ml,1M, 在 DCM 中)。室温下搅拌 20 分钟后, 将 L-叔-亮氨酸甲酯盐酸盐(7ml,1M, THF 溶液) 加到此活化的混合物。随后加入 DIPEA(1.2ml,7mmol), 然后加入 DMAP(1.2g,9.8mmol)。室温下搅拌 3 天后, 通过硅藻土过滤反应混合物, 通过柱色谱法纯化并浓缩得到化合物 clxxxxviii(60% EtOAc/ 己烷), 为白色固体(1.74g,72%)。

[1517]

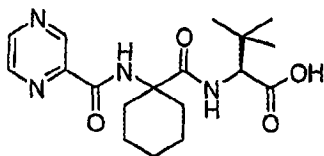


clxxxxix

[1518] 中间产物实施例 188- 化合物 cic :

[1519] 加入 2N NaOH(水溶液)(7ml,14mmol) 而将化合物 clxxxxviii(1.74g,4.6mmol) 溶于 MeOH(22mL)。室温下将溶液搅拌过夜, 随后的 TLC(50% EtOAc/ 己烷) 表明完全水解。用 5N HCl 将溶液酸化至 pH 3, 用 EtOAc 稀释, 然后萃取有机层。用盐水洗涤有机层, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 然后浓缩得到化合物 cic(100%)。

[1520]

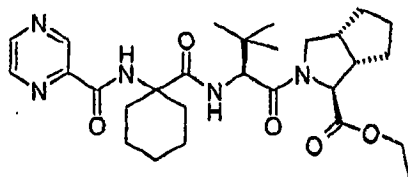


cic

[1521] 中间产物实施例 189- 化合物 cc :

[1522] 室温下将 HOAt(610mg,4.5mmol) 加到化合物 cic(1.5g,4.1mmol) 的 DCM 溶液(15mL), 然后加入在 DCM(4.5ml,4.5mmol) 中的 1M DCC 溶液。室温下搅拌 30 分钟后, 加入化合物 v(4mmol) 的 THF 溶液(20ml,0.2M)。室温下将反应物搅拌过夜。然后, 通过硅藻土过滤反应物。浓缩滤液得到一种黄色油, 通过硅胶色谱法(50% EtOAc/ 己烷) 纯化得到化合物 cci(660mg,32%)。

[1523]

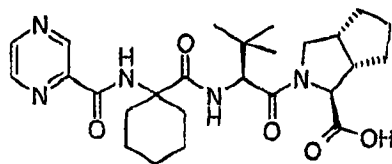


cc

[1524] 中间产物实施例 190- 化合物 cci :

[1525] 将 2N NaOH(1.7ml,3.4mmol) 加到化合物 cc(600mg,1.13mmol) 的 EtOH 溶液(6mL)。室温下将反应物搅拌 2 小时, 用 5N HCl 酸化至 pH 3。然后用 EtOAc 稀释混合物, 随后萃取有机层。接着用盐水洗涤有机层, 而后用 MgSO<sub>4</sub> 干燥浓缩得到化合物 cci(92%)。

[1526]

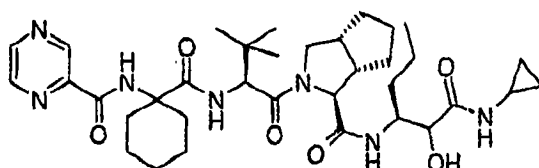


cci

[1527] 中间产物实施例 191- 化合物 ccii :

[1528] 将 PyBOP (420mg, 0.8mmol) 加到 ccii (310mg, 0.62mmol) 的 DCM 溶液 (8mL)。室温下将溶液搅拌 30 分钟。将在 THF 中的化合物 xiii' (8ml, 0.1M) 加到此溶液, 然后加入 DIPEA (0.23ml, 1.3mmol)。在室温下将反应物搅拌过夜, 然后用水 (25mL) 终止 30 分钟。随后用 EtOAc 萃取混合物。用盐水洗涤所得的有机层, 然后用 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 然后浓缩得到一种黄色油。硅胶色谱法 (3% EtOH/EtOAc) 纯化得到化合物 ccii (140mg, 33%)。

[1529]

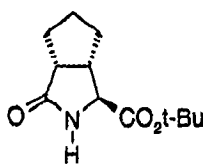


ccii

[1530] 中间产物实施例 192- 化合物 ccxiv

[1531] 在 N<sub>2</sub> 气氛下, 在 -60℃ 下, 将 CsOH·H<sub>2</sub>O (6.9g, 0.0412mmol) 加到在无水 DCM (48mL) 中的化合物 cciii、(N-二苯基亚甲基)-甘氨酸叔丁酯 (6g, 0.0206mmol) 和手性 PTC (1.08g, 0.00206mmol) 的溶液。将在 10mL DCM 中的 1-羧基-1-环戊烯甲酯 (5.2ml, 0.0412mmol) 加到反应混合物。在 -60℃ 下将混合物搅拌 4 天, 然后用 200mLEt<sub>2</sub>O 稀释, 并加入 15mL 饱和 NH<sub>4</sub>Cl 水溶液。分离相, 并用 15mL 水和 15mL 盐水洗涤有机相。用 100mL Et<sub>2</sub>O 萃取水相。合并有机相并用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥。将通过除去溶剂而得到的粗产物溶于 100mL EtOH, 然后加入 NH<sub>2</sub>OH·HCl (1.43g, 0.0206mmol) 和 NaOAc (1.68g, 0.0206mmol)。将混合物回流 48 小时。然后除去溶剂, 并通过闪烁色谱法将所得的粗产物直接纯化, 用 30% -50% EtOAc/己烷洗脱得到化合物 cciv (65%), 为一种白色固体。C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub> (MW = 225.29); MS : m/z (M<sup>+</sup>+1) = 226.5。对映异构过量 : 18% ee, 通过手性 HPLC 测定。

[1532]

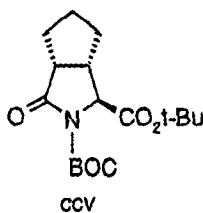


cciv

[1533] 中间产物实施例 193- 化合物 ccv

[1534] 将催化量的 DMAP (0.216g, 0.0017mmol) 和在 30mL ACN 中的二碳酸二叔丁酯 (2.49g, 0.011mmol) 溶液加到在 60mL ACN 中的化合物 cciv (2g, 0.0088mmol) 的溶液。室温下将混合物搅拌 14 小时, 然后用 100mL DCM 稀释, 并用饱和 NaHCO<sub>3</sub> (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥有机相。蒸发溶剂得到一种粗产物, 在硅胶柱上纯化粗产物, 用 15% EtOAc/己烷洗脱得到化合物 ccv (86%), 为白色固体。C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub> MW = 325.40 MS : m/z (M<sup>+</sup>+1) = 326.2

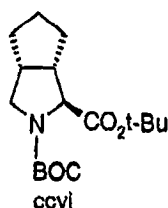
[1535]



[1536] 中间产物实施例 194- 化合物 ccvi

[1537]  $-78^{\circ}\text{C}$  下将 DIBAL-H (7.8ml, 0.0078mmol) 加到在 50mL THF (0.14M) 中的化合物 ccv (1.7g, 0.0052mmol) 的溶液。将混合物搅拌 1 小时, 然后加入 10mL MeOH。用 25mL EtOAc 和 25mL 饱和的酒石酸钠水溶液稀释混合物, 然后在室温下将其搅拌 1 小时。分离相, 并用 50mL EtOAc 萃取水相一次。合并有机相并用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥。蒸发溶剂得到一种粗产物, 将其不经任何纯化而使用。将粗品溶于 25mL DCM, 加入  $\text{Et}_3\text{Si}$  (0.84ml, 0.0052mmol), 然后将混合物冷却到  $-78^{\circ}\text{C}$ , 随后滴加  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$  (0.71ml, 0.0061mmol)。30 分钟后, 加入  $\text{Et}_3\text{Si}$  (0.84mL) 和  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$  (0.71mL), 并在  $-78^{\circ}\text{C}$  下将混合物搅拌 2 小时。然后用饱和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (10mL) 中止反应, 并用 DCM (2x 20mL) 萃取。合并有机相并用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥。蒸发溶剂得到一种粗产物, 通过闪烁色谱法进行纯化, 用 13% EtOAc/ 己烷洗脱得到化合物 ccvi (87%)。  $\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{NO}_4$  MW = 311, 42 MS :m/z ( $\text{M}^+ + 1$ ) = 312.6。

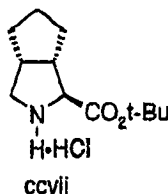
[1538]



[1539] 中间产物实施例 195- 化合物 ccvii

[1540] 将化合物 ccvi (0.5g, 0.0016mmol) 溶于 8mL 在 EtOAc 中的 1N HCl (通过将干燥的 HCl 通入无水 EtOAc, 然后再用 EtOAc 稀释至 1N 而制得的)。室温下将混合物搅拌 6 小时。真空下除去溶剂, 并将所得的沉淀溶于  $\text{Et}_2\text{O}$ 。将混合物搅拌 15 分钟后, 在减压下除去溶剂。用  $\text{Et}_2\text{O}$  洗涤所得的白色固体, 并过滤分离化合物 ccvii (0.27g, 80% 产率)。  $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_2$  MW 211, 15 MS :m/z ( $\text{M}^+ + 1$ ) = 212.6

[1541]



[1542] 中间产物实施例 196- 化合物 v

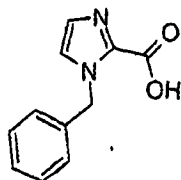
[1543] 将 TFA (2.85mL) 加到在 DCM (3.7mL) 中的化合物 ccxvi (0.230g, 0.74mmol) 的溶液。将混合物搅拌过夜后, 真空下除去溶剂至干燥, 并将残余物溶于 EtOH (7.5mL)。在  $0^{\circ}\text{C}$  下冷却混合物并滴加  $\text{SOCl}_2$  (0.22ml, 2.96mmol), 然后回流 2 小时。减压下除去 EtOH 并将残余物溶于 DCM (10mL)。用饱和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (5mL) 将所得的溶液洗涤两次。分离相并用  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥有机相, 真空下除去溶剂得到化合物 v (80%), 为油。  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_2$  M. W. :183.25 MS :

$m/z(M^+1) = 184.2$ 。

[1544] 中间产物实施例 197- 化合物 cd

[1545] 将 1- 苄基咪唑 (6g, 37.9mmol) 置于 Et<sub>2</sub>O(180mL)。将所得的溶液降温到 -60℃ 并用 n-BuLi (1.6M, 24mL) 处理。将反应物搅拌 30 分钟, 然后使 CO<sub>2</sub> 冒泡通过混合物 15 分钟。过滤沉淀物, 用 Et<sub>2</sub>O 冲洗, 并再次置于 H<sub>2</sub>O。用 5N HCl 将此溶液酸化至 pH 3。冻干后分离所需产物, cd, 为一种白色固体。

[1546]

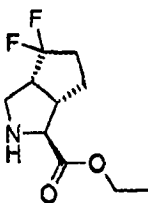


cd

[1547] 中间产物实施例 198- 化合物 cdi

[1548] 0℃ 下用 DAST(9.2ml, 69.8mmol) 处理化合物 i(9.25g, 27.9mmol) 的 DCM 溶液 (100mL)。在室温下搅拌过夜后, 用冰终止反应, 并用 DCM(200mL) 萃取。用盐水洗涤有机层并真空浓缩。用硅胶色谱法 (30% EtOAc/ 己烷) 纯化残余物得到 8.5g(86%) 目标氟化中间产物。将部分此中间产物 (4.5g, 14.2mmol) 溶于 EtOH(75mL)。使用 Pd(OH)<sub>2</sub>/C(2.98g, 20% Pd 含量, 4.26mmol) 使此溶液接触标准氢化条件。室温下搅拌过夜后, 通过硅藻土过滤反应混合物。真空浓缩滤液得到化合物 cdi (2.5g, 96%)。

[1549]

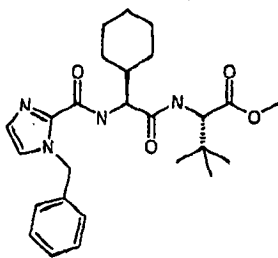


cdi

[1550] 中间产物实施例 199- 化合物 cdii

[1551] 将化合物 cd(890mg, 4.4mmol) 的溶液置于 DCM(15mL)。加入 HOBT(595mg, 4.4mmol) 和 DCC(4.4mmol, 1M DCM 溶液) 并搅拌 20 分钟。将 lxxix' (990mg, 3.5mmol) 的 DCM 溶液 (15mL) 加到此混合物。在氮气氛下将所得的混合物搅拌过夜。用 EtOAc 稀释反应混合物, 用饱和 NaHCO<sub>3</sub> 和盐水洗涤。真空浓缩有机层得到一种残余物, 用 30% EtOAc/ 己烷将其纯化得到化合物 cdii (666mg, 41%)。

[1552]

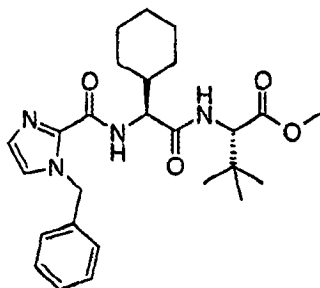


cdii

[1553] 中间产物实施例 200- 化合物 cdiii

[1554] 在标准水解条件下,使用甲醇 (10mL) 和 1N NaOH(3eq) 由化合物 cdii 制备化合物 cdiii。回收到 565mg 化合物 cdiii(88%)。

[1555]

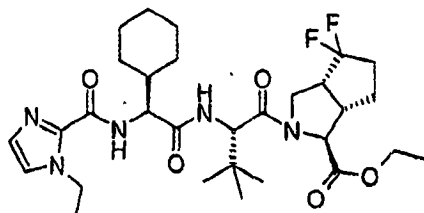


cdiii

[1556] 中间产物实施例 201- 化合物 cdiv

[1557] 将化合物 cdiii(1.24mmol) 置于 DCM(5mL)。加入 DCC(1.6mmol, 1M DCM), 然后加入 HOAT(1.6mmol)。将所得的混合物搅拌 20 分钟,并滴加在 THF(8mL) 中的化合物 cdi(1.6mmol)。将反应物搅拌过夜。将反应物过滤并用 EtOAc 冲洗。用饱和 NaHCO<sub>3</sub>、盐水洗涤合并的有机层,用 MgSO<sub>4</sub> 干燥,并浓缩。用 30% EtOAc/ 己烷完成纯化得到化合物 cdiv(565mg, 70%)。

[1558]

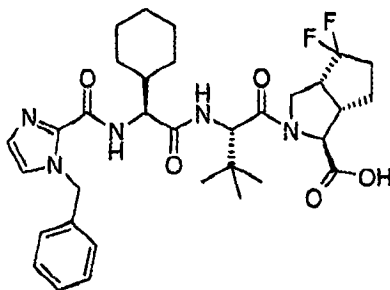


cdiv

[1559] 中间产物实施例 202-cdv

[1560] 在标准水解条件下,使用乙醇 (10mL) 和 1N NaOH(3eq) 由化合物 cdiv 制备化合物 cdv(565mg, 0.86mmol)。回收 490mg(91%) 化合物 cdv。

[1561]



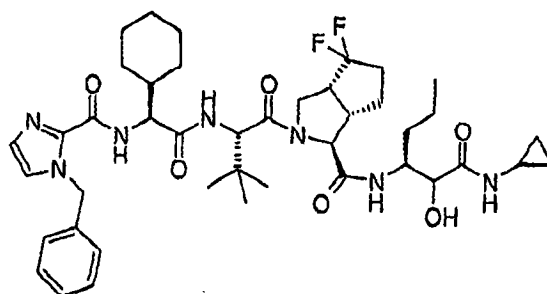
cdv

[1562] 中间产物实施例 203-cdvi

[1563] 将化合物 cdv(490mg, 0.78mmol) 置于 DCM(10mL)。将 PyBOP(520mg, 1mmol) 加到

DCM 溶液, 然后加入 xiii(186mg, 1mmol) 的 THF 溶液 (10mL)。将 DIEA (0.18ml, 1mmol) 加到此反应混合物并在氮下搅拌过夜。第二天, 用 EtOAc 稀释反应物, 用饱和  $\text{NaHCO}_3$  和盐水洗涤。用 100% EtOAc 完成纯化得到化合物 cdvi (478mg, 77%)。

[1564]

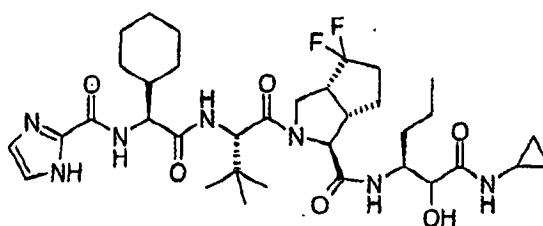


cdvi

[1565] 中间产物实施例 204-cdvii

[1566] 使用在 MeOH(40mL) 中的  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  (按 20% 无水计, 100mg) 氢化化合物 cdvi (478mg, 0.6mmol)。在氢气氛下将反应混合物搅拌过夜。此时, 通过硅藻土过滤反应混合物, 并浓缩得到化合物 cdvii (417mg, 98%)。

[1567]

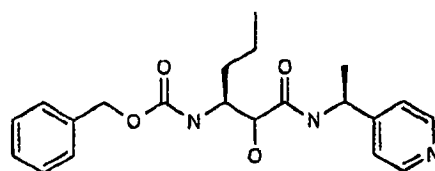


cdvii

[1568] 中间产物实施例 205-cdx

[1569] 将化合物 cxxv (购自 Albany Molecular Research Inc., 1.5g, 5.2mmol) 置于 DCM(15mL)。将 PyBOP (2.7g, 5.2mmol) 和 HOBT (700mg, 5.2mmol) 加到此溶液。将 (-)- $\alpha$ -(4-吡啶基)乙基胺 (640mg, 5.2mmol) 的 THF 溶液 (15mL) 加到上述溶液, 然后加入 DIEA (0.93ml, 5.2mmol)。[(-)- $\alpha$ -(4-吡啶基)乙基胺由 (-)- $\alpha$ -(4-吡啶基)乙基胺 (Aldrich) 的酒石酸盐通过以下方法获得: 与 1N NaOH(2eq) 一起搅拌 1 小时, 然后用 EtOAc(3x) 萃取, 回收率为 70%]。室温下搅拌反应物。用饱和  $\text{NaHCO}_3$  和盐水洗涤反应物。用 5% EtOH/EtOAc 纯化产物得到 2g (99%) 中间产物化合物 cdx。

[1570]



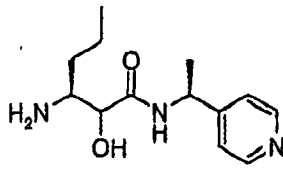
cdx

[1571] 中间产物实施例 206-cdviii

[1572] 采用在 MeOH(50mL) 中的 10% Pd/C(500mg) 氢化化合物 cdx (2g, 5.2mmol)。将反应混合物在氢气氛下过夜搅拌。将产物用硅藻土过滤, 浓缩, 得到化合物 cdviii (1.3, g

98%)。

[1573]



cdviii

[1574] 药理学

[1575] 按照如本文所述的能够用于抑制 HCV 蛋白酶的本发明的化合物,因此,也适用于抑制 HCV 复制。

[1576] 因此,本发明涉及抑制 HCV 蛋白酶的方法,包括以抗 HCV 蛋白酶抑制量的式 1 的化合物和包含 HCV 蛋白酶的组合物接触。

[1577] 本文的又一项发明涉及抑制 HCV 复制的方法,包括以有效量的化学式 1 的化合物与 HCV 接触。

[1578] 此外,本发明的另一项涉及患有或易于进行 HCV 感染的患者的治疗方法,包括给予患者施用药学有效量的式 1 的化合物。本文所指的治疗 HCV 感染应该理解成包括预防或抑制感染的预防性治疗,以及治疗已有的急性或慢性 HCV 感染或与 HCV 感染有关的生理学症状,以基本上治愈感染的患者、抑制感染的程度(量)或者改善与其有关的生理学症状。“有效量”意欲描述在合理的生物学判断范围内有效的,适于与人和其它哺乳动物细胞无过度毒性、刺激、过敏性反应等接触,并且在治疗 HCV 感染中和合理的优点/风险相匹配从而产生希望的治疗作用的本发明化合物的量。

[1579] 本文讨论的生理学症状包括一些,但不是全部,批准抗 HCV 治疗的可能的临床情形。本领域的有经验人员对任何需要抗 HCV 治疗的情形有良好地意识。

[1580] 本发明特别的方面提供按照本发明的化合物以药物组合物形式给药,尽管这种化合物可以单独给药。“药物组合物”指包含式 1 的化合物和至少一种选自下列的组分的组合物:药学上可接受的载体、稀释剂、包衣剂、助剂、赋形剂或载体,例如防腐剂、填充剂、崩解剂、润湿剂、乳化剂、乳液稳定剂、悬浮剂、等渗剂、增甜剂、矫臭剂、香味剂、着色剂、抗菌剂、抗真菌剂、其它的治疗剂、润滑剂、吸收延缓和促进剂和分粉剂,取决于给药模式和剂型。组合物可以是以下形式:片剂、丸剂、颗粒剂、粉剂、水溶液或悬浮液、注射液、酏剂或糖浆剂。示例的悬浮剂包括乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、间氢氧化铝(aluminummetahydroxide)、膨润土、琼脂和西黄蓍胶,或者这些物质的混合物。预防微生物作用的示例性的抗细菌和抗真菌剂包括尼泊金、氯代丁醇、苯酚、山梨酸等。示例性的等渗剂包括糖、氯化钠等。示例性的延长吸收的吸收延缓剂包括一硬脂酸铝和明胶。示例性的增强吸收的吸收促进剂包括二甲亚砜和有关类似物。示例性的载体、稀释剂、溶剂、赋形剂、增溶剂、乳化剂和乳液稳定剂包括水、氯仿、蔗糖、乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯醇、四氢糠基醇、苯甲酸苄酯、多元醇、丙二醇、1,3-丁二醇、甘油、聚乙二醇、二甲基甲酰胺、吐温®60、斯盘®80、十六醇十八醇混合物、肉豆蔻醇、单硬脂酸甘油酯和十二烷基硫酸钠、脱水山梨醇脂肪酸酯、植物油(如棉子油、花生油、玉米胚油、橄榄油、蓖麻子油和芝麻油)和注射用有机酯,如油酸乙酯等,或者这些物质适合的混合物。示例性的赋形剂

包括乳糖、乳糖、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸二钙。示例性的崩解剂包括淀粉、海藻酸和某些复合硅酸盐。示例性的润滑剂包括硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠、滑石,以及高分子量聚乙二醇类。

[1581] 其它的可与本发明的化合物联合使用的治疗剂包括其它的抗 HCV 剂。一些示例性的已知抗 HCV 剂包括免疫调节剂,如  $\alpha$ -、 $\beta$ -或  $\gamma$ -干扰素;聚乙二醇化衍生的干扰素- $\alpha$  化合物,其它的抗病毒剂如利巴韦林和金钢烷胺;其它的丙型肝炎蛋白酶抑制剂;HCV 生命周期内包括解螺旋酶、聚合酶、金属蛋白酶、内部核糖体进入的其它目标的抑制剂,或者广谱抗病毒化合物,如 VX-497,一种细胞肌苷一磷酸脱氢酶, IMPDH, 的抑制剂,美国专利 No. 5, 807, 876 覆盖;或者它们的组合。和本发明的化合物联合使用的治疗剂可单独、同时或按顺序给药。

[1582] 药物组合物中除了式 1 的化合物之外的物质的选择通常根据活性化合物的化学性质(如溶解度)、具体的给药方式确定和制药实践中注意到的需要确定。例如,如乳糖、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸二钙的赋形剂和如淀粉、海藻酸、某些复合硅酸盐的崩解剂与如硬脂酸镁、十二烷基硫酸钠和滑石的润滑剂的混合可用于制备片剂。

[1583] 出现的药物组合物可以分类,例如片剂、丸剂、颗粒剂、粉剂、水溶液或悬浮液、注射液、酏剂或糖浆剂。

[1584] “液体剂型”意指该剂量的对患者给药的活性化合物是液体形式,例如,药学上可接受的乳剂、溶液、悬浮液、糖浆剂和酏剂。除了活性化合物之外,液体剂型可包含本领域通常使用的惰性稀释剂,例如溶剂、助溶剂和乳化剂。

[1585] 在软或硬胶囊中采用的固体组合物作为填充剂使用例如乳糖或乳糖以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂。

[1586] 使用水悬浮液时,它们可包含乳化剂或悬浮促进剂。

[1587] 乳剂药物组合物的油相可由已知的组分以已知方式组成。油相仅包括乳化剂(又称为乳化剂(emulgent))时,它希望包括至少一种乳化剂和脂肪或油或者与脂肪和油的混合物。优选地,亲水性乳化剂与充当稳定剂的亲脂性乳化剂一起包含在组合物中。既包括油又包括脂肪同样是优选的。同时,具有或不具有稳定剂的乳化剂组成乳化蜡,并且加油和脂肪的方法组成乳化软膏基质,它形成膏剂的油分散相。

[1588] 如果希望,霜剂基质的水相包括,例如,至少 30% w/w 的多元醇,即具有两个或更多个羟基基团的醇,例如丙二醇、1,3-丁二醇、甘露醇、山梨醇、甘油和聚乙二醇(包括 PEG 400)和它们的混合物。局部制剂希望包括增强活性组分经皮或其它受影响区吸收或渗透的化合物。

[1589] 适于制剂的适当的油或脂肪的选择基于获得希望的化妆性能。因此,霜剂应该优选是非多脂的、非染色或可洗的产品,它具有避免从管或其它容器中渗漏的适当的稠度。可以采用直或支链、一元或二元烷基酯,例如肉豆蔻酸二异丙酯、油酸癸酯、棕榈酸异丙酯、硬脂酯丁酯、棕榈酸 2-乙基己酯或者称为 Crodamol CAP 的支链酯的混合物。根据需要的性能这些可以单独或联合使用。选择性地,可以使用高熔点的脂,例如白软石蜡和/或液体石蜡或者其它的矿物油。

[1590] 实践中,本发明的化合物/药物组合物可以以适当的制剂通过局部或全身给药于人或动物,包括口服、吸入、直肠、经鼻、颊、舌下、阴道、结肠、非胃肠道(包括皮下、肌内、静

脉内、真皮内、鞘内和硬膜外)、脑池内和腹膜内。优选的途径理解为可以随受体的情况变化。

[1591] “药学上可接受的剂型”指本发明化合物的剂型,并且包括例如片剂、糖衣丸剂、粉剂、酏剂、糖浆剂,液体制剂,包括悬浮液、喷雾剂、吸入片剂、锭剂、乳剂、溶液、颗粒剂和栓剂,以及注射用液体制剂,包括脂质体制剂。技术和制剂通常可见于 Remington 药物科学, Mack Publishing Co., Easton, PA, 最近一版。

[1592] “适于口服给药的制剂”可表示为离散的单元,如胶囊、扁囊剂或片剂,每个含有预定量的活性组分;如粉剂或颗粒剂;如含水液体或非水液体的溶液或悬浮液;或者如水包油液体乳剂或油包水液体乳剂。活性组分也可作为大丸剂、药糖剂或糊剂使用。

[1593] 片剂可通过压缩或模制制备,任选地和一种或多种辅助组分。压缩片可通过在适当的机器中压缩自由流动形式(如粉末或颗粒)的活性组分,任选与粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、表面活性剂或分散剂混合。模制片可通过在适当的机器中模制以惰性液体润湿的粉末状化合物制备。片剂任选被包衣或刻线,并且可以被配制成能够提供延缓或控制其中活性组分释放的形式。

[1594] 直肠给药的固体组合物包括以已知方法配制的、含有本发明至少一种化合物的栓剂。

[1595] 如果希望,并且为了更有效的分配,化合物能够被微胶囊化,或者连接在缓慢释放或靶输送系统,例如生物相容的、生物可降解的聚合物基质(例如,聚(d, l-丙交酯共-乙交酯)、脂质体和微球上,并且通过称之为皮下或肌肉贮存的技术皮下或肌肉注射,以提供化合物在2周或更长时期内持续缓慢释放。可将化合物灭菌,例如,通过经细菌截留过滤器过滤,或者通过在可在临用前溶于无菌水或一些其它无菌注射介质的无菌固体组合物中掺入灭菌剂。

[1596] “适于鼻或吸入给药的制剂”意指适于对患者经鼻或吸入给药形式的制剂。该制剂可含有载体,粉末形式,粒度例如在1至500微米之间(包括20至500微米之间的粒度,增量为5微米,如30微米、35微米,等)。其中载体是液体以便例如作为鼻喷雾剂或作为滴鼻剂给药的适合的制剂,包括活性组分的水或油溶液。适于气溶胶给药的制剂可按照常规方法制备,并且可与其它治疗剂一起输送。吸入治疗通过计量剂量的吸入器轻易地给药。

[1597] “适于口服给药的制剂”指适于经口对患者给药形式的制剂。这种制剂可作为离散单元提供,如胶囊、扁囊剂或片剂,每个含有预定量的活性组分;如粉剂或颗粒剂;如含水液体或非水液体形式的溶液或悬浮液;或者如水包油液体乳剂或油包水液体乳剂。活性组分也可以作为大丸剂、药糖剂或糊剂使用。

[1598] “非胃肠道给药的制剂”指适于对患者非胃肠道给药形式的制剂。该制剂是无菌的并且包括乳剂、悬浮液、水和非水注射液,它们含有悬浮剂和增稠剂和抗氧化剂、缓冲剂、制菌剂和致使制剂和预期受体血液等渗的溶质,并且具有适当调节的pH。

[1599] “适于直肠或阴道给药的制剂”指适于对患者直肠或阴道给药形式的制剂。该制剂优选是栓剂形式,它能够通过混合本发明的化合物和适当的非刺激赋形剂或载体(如椰子油、聚乙二醇或栓剂蜡,它们在常温是固体,但是在体温是液体,因此,在直肠或阴道腔内融化并释放活性组分)制备。

[1600] “适于全身给药的制剂”指适于对患者全身给药形式的制剂。该制剂优选通过注

射给药,包括肌肉、静脉内、腹膜内和皮下注射。为了注射,本发明的化合物配制成液体溶液,优选生理学相容的缓冲剂,如Hank氏溶液或Ringer氏溶液。此外,该化合物可配制成固体形式并且在临使用之前再溶解或悬浮。也可包括冻干形式。全身给药也可通过透粘膜或透皮途径,或者该化合物可经口给药。为了透粘膜或透皮给药,在制剂中使用适于待渗透屏障的渗透剂。这种渗透剂通常是本领域已知的,并且包括,例如,适于透皮给药的胆汁盐和褐霉酸衍生物。此外,可使用洗剂以促进渗透。透粘膜给药可通过,例如,使用鼻喷雾剂,或栓剂。为了口服给药,化合物配制成常规口服给药形式,如胶囊剂、片剂和滋补形式制剂。

[1601] “适于局部给药的制剂”指适于对患者局部给药形式的制剂。该制剂可以是局部软膏、油膏、粉剂、喷雾剂和吸入剂、凝胶(以水或醇为基质)、霜剂,如本领域公知的,或者被掺入用于片的基质,它会允许化合物经透皮屏障控制释放。当配制成软膏时,活性组分可与或者石蜡或水可混合的软膏基质一起使用。或者,可用水包油霜剂基质将活性组分配制成霜剂。适于眼内局部给药的制剂包括滴眼剂,其中活性组分溶于或悬浮于适当载体,特别是适于活性组分的水溶剂。适于口腔局部给药的制剂包括糖锭,它含矫味成分,通常是蔗糖和阿拉伯胶或西黄蓍胶;如明胶和甘油(或者蔗糖和阿拉伯胶)的惰性成分中包括活性组分的锭剂;适当液体载体中包括活性组分的漱口剂。

[1602] “固体剂型”指本发明的化合物的剂型是固体形式,例如胶囊、片剂、丸剂、粉剂、糖衣丸或颗粒剂。在这种固体剂型中,本发明的化合物与至少一种惰性常规赋形剂(或载体)如柠檬酸钠或磷酸二钙或者(a)填充剂或增量剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸,(b)粘合剂,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶,(c)湿润剂,例如,甘油,(d)崩解剂,例如,琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些复合硅酸盐和碳酸钠,(e)溶液阻滞剂,例如石蜡,(f)吸收促进剂,例如,季铵化合物,(g)润湿剂,例如,鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯,(h)吸附剂,例如,高岭土和膨润土,(i)润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠,(j)不透明剂,(k)缓冲剂,和在肠道的某一部分以延迟方式释放本发明化合物的药剂。

[1603] 可以变化本发明组合中活性组分的实际剂量水平,这样以致于对于特别的组合物和患者的给药方法,获得有效得到希望的治疗反应的活性组分量。因此适于任何特别患者的选择剂量水平取决于许多因素,包括希望的治疗作用、给药途径、希望的治疗周期、疾病的病因和严重性、患者的身体状况、体重、性别、饮食和年龄、每种活性组分的类型和效力、吸收速率、代谢和或排泄以及其它因素。

[1604] 本发明化合物以单次或分为多次剂量给予患者的日总剂量可以是,例如,每天约0.001至约100mg/kg体重并且优选0.01至10mg/kg/天。例如,成年人中,剂量通常是每天吸入约0.01至约100,优选约0.01至约10,mg/kg体重,每天口服给药约0.01至约100,优选0.1至70,更特别0.5至10,mg/kg体重,并且静脉内给药约0.01至约50,优选0.01至10,mg/kg体重。组合中的活性组分的百分比可以变化,尽管它应当组成足以获得适当剂量的比例。剂量单位的组合包含如此量的这样约数,于是可用于组成每天剂量。明显地,几个单位剂型在大约同一时刻可同时给药。需要时可经常给予剂量,以便获得希望的治疗作用。一些患者会对较高或较低剂量迅速反应,并且发现更弱的适当的维持剂量。对于其它患者,根据每个特别患者的生理学需要,每天1至4剂量的速率进行长期治疗是必需的。不言自明,对于其它患者,处方不超过每天一次或两次剂量是必需的。

[1605] 通过任何药剂学领域公知的方法能够制备单位剂型的制剂。这些方法包括使活性组分和组成一个或多个辅助组分的载体混合在一起的步骤。一般,制剂通过均匀且紧密地使活性组分和液体载体或细粉碎的固体载体或两者混合来开始制备,接着,如果需要,将产品成形。

[1606] 制剂可以单位剂量或多剂量容器出现,例如密闭的安瓿和具有弹性塞的小瓶,并且可以在冷冻-干燥(冻干)条件下贮藏,临使用之前仅仅需要加入无菌液体载体,例如注射用水。临时注射溶液和悬浮液可由先前的描述过的无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[1607] 按照文献和以下描述的试验,本发明范围内的化合物显示显著药理学活性,这些试验结果确信与人和其它哺乳动物的药理学活性相关。

#### [1608] 体外酶分析步骤

##### [1609] 抑制 HCV NS3 丝氨酸蛋白酶

[1610] 如先前描述过的表达和纯化 HCV NS3 蛋白酶域(Vertex, PCT 公开 W098/17679; 将其引入本文作为参考)。American Peptide Com(Ca) 常规合成 NS3 蛋白酶用的显色肽底物、EDVVAbuC-p- 硝基酰苯胺(nitroanilide) 以及 NS4A 辅助因子片段(-KKGSVVIVGRIVLSGK-)。采用分光光度计分析,以 EDVVAbuC-p- 硝基酰苯胺作为底物分析本发明的化合物抑制 HCV NS3 蛋白酶活性的能力。采用具有动力能力的 SpectraMax 250 阅读器(Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 在 96 孔微量滴定板上进行该分析。HCV NS3 蛋白酶(0.5  $\mu$ M) 纯化的 EDVVAbuC-p- 硝基酰苯胺(500  $\mu$ M) 底物的剪切在无或含有试验化合物的情形下,于 30°C 在含有 30  $\mu$ M NS4A 片段、46mM Hepes、pH 8.0、92mM NaCl、18% 甘油、5mM DTT 和 7.5% DMSO 的缓冲液中实施。在 405nm 监测反应中 pNA(p- 硝基苯胺) 的释放。

[1611] 包括  $V_{max}$ 、 $K_m$  和  $V_{max}/K_m$  的动力参数的测量在如上所述的条件下进行。在固定的酶和底物浓度下,通过将数据非线性最小二乘法拟合至用于紧密结合竞争性抑制的 Morrison 方程上,由速率 vs. [抑制剂] 曲线计算  $K_i$  [J. F. Morrison, Biochim. Biophys. Acta., 185, 269-286 (1969)]. Prism 程序(GraphPad Software, Inc.) 用于此步骤。

[1612] 本文公开的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂能够与其它分子联合使用,这些分子或者在感染 HCV 感染风险的患者中预防性地直接显示或间接引起抗 HCV 活性,或者在已经感染的患者中治疗患者。术语“抗 HCV 活性”指与 HCV 病毒粒子在无该分子情形下蓄积相比,该分子存在时完全抑制或减少 HCV 病毒粒子蓄积的能力,和/或分子减轻或改善与 HCV 感染或患者发病有关的症状或综合征的能力。具有抗 HCV 活性的分子包括中断 HCV 感染或复制的一个或多个步骤的那些,以及引起宿主细胞中免疫调节和抗增生作用的那些。具有抗 HCV 活性的分子能够抑制 HCV 特异性复制型事件,例如但不限于 HCV- 定向核酸或蛋白合成。具有抗 HCV 活性的分子可作用的 HCV 复制阶段包括细胞进入(例如,附着;渗入);HCV 基因组的脱壳和释放;HCV 基因组的复制(例如,病毒 RNA 基因组的任何链的复制;病毒信使 RNA 的转录);HCV 蛋白的翻译;HCV 蛋白的翻译后修饰(例如,解蛋白剪切;糖基化);病毒蛋白的胞内转运;病毒粒子组分的装配;病毒颗粒的释放(例如,出芽)。具有抗病毒活性分子的种类包括但不限于可溶的受体引诱物和抗受体抗体;离子通道阻滞剂、壳体稳定剂和融合蛋白抑制剂;病毒聚合酶、逆转录酶、解螺旋酶、引发酶或整合酶的抑制剂;反义寡核苷酸和核糖酶;免疫调节和免疫刺激剂,包括细胞因子如干扰素,以及肽激动剂、类固醇、和如左旋咪唑的典型药物;调节蛋白抑制剂;蛋白酶抑制剂;装配蛋白抑制剂;和抗病毒抗

体和细胞毒素淋巴细胞。术语“抗 HCV 有效量”或“药理学有效量”指如本文公开的化合物或化合物的组合的用量,在减轻或改善与 HCV 感染有关的或与患者发病有关的症状或综合征中,或者在减少病毒体外或体内水平中有效。体外应用包括如下所述的 Replicon 分析系统,这里这些量有效减少 HCV 复制子 RNA 蓄积和 / 或由其中包含的基因编码的蛋白的蓄积。

[1613] 本文公开的具有抗 HCV 活性意欲用于组合物和联合治疗方法的化合物包括但不限于免疫调节分子,包括免疫刺激细胞因子和其它已知具有 HCV 抗病毒活性的化合物,如各种抗病毒核苷和核苷酸。

[1614] 本文公开的意欲用于组合 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂的免疫调节分子包括但不限于干扰素- $\alpha$  2B (Intron A, Schering Plough); Rebatron (Schering Plough, 干扰素- $\alpha$  2B+ 利巴韦林); 聚乙二醇化干扰素  $\alpha$  (Reddy, K. R. 等. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 33, 433-438 (2001)); 共有序列干扰素 (Kao, J. H., Chen, P. J., Lai, M. Y. & Chen, D. S. Efficacy of consensus interferon in the treatment of chronic hepatitis C. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15, 1418-1423 (2000)); 干扰素- $\alpha$  2A (Roferon A; Roche); 淋巴母细胞样或“天然”干扰素; 干扰素  $\tau$  (Clayette, P. 等. IFN-tau, a new interferon type I with antiretroviral activity. *Pathol. Biol. (Paris)* 47, 553-559 (1999)); 白细胞间介素 2 (Davis, G. L., Nelson, D. R. & Reyes, G. R. Future options for the management of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease* 19, 103-112 (1999)); 白细胞间介素 6 (Davis, G. L., Nelson, D. R. & Reyes, G. R. Future options for the management of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease* 19, 103-112 (1999)); 白细胞间介素 12 (Davis, G. L., Nelson, D. R. & Reyes, G. R. Future options for the management of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease* 19, 103-112 (1999)); 利巴韦林; 和增强 1 型辅助 T 细胞反应发展的化合物 (Davis, G. L., Nelson, D. R. & Reyes, G. R. Future options for the management of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease* 19, 103-112 (1999))。干扰素通过执行间接抗病毒作用和 / 或通过修正对感染的免疫反应改善病毒感染。干扰素的抗病毒作用通常通过病毒侵入或脱壳、病毒 RNA 的合成、病毒蛋白的翻译和 / 或病毒装配和释放的抑制调节。

[1615] 刺激细胞内干扰素合成的化合物 (Tazulakhova, E. B., Parshina, O. V., Gusev, T. S. & Ershov, F. I. Russian Experience in Screening, Analysis, and Clinical Application of Novel Interferon Inducers. *J. 干扰素 Cytokine Res.* 21, 65-73)) 包括但不限于单独或与妥布霉素联合的双链 RNA, 和咪喹莫特 (3M 制药) (Sauder, D. N. Immunomodulatory and pharmacologic properties of imiquimod. *J. Am. Acad. Dermatol.* 43, S6-11 (2000))。

[1616] 根据非免疫调节机理, 已知具有, 或者可能具有, HCV 抗病毒活性的其它化合物包括但不限于利巴韦林 (ICN 制药); 肌苷 5' - 一磷酸脱氢酶抑制剂 (VX-497, Vertex 制药研发); 金刚烷胺和金刚乙胺 (Younossi, A. M. and Perillo, R. P. The roles of amantadine, rimantadine, ursodeoxycholic acid, NSAIDs, alone or in combination with alpha interferons, in the treatment of chronic hepatitis C. *Seminars in Liver Disease* 19, 95-102 (1999)); LY217896 (美国专利 4, 835, 168) (Colacino, J. M. 等. Evaluation of the

anti-influenza virus activities of 1,3,4-thiadiazol-2-ylcyanamide (LY217896) and its sodium salt. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy* 34, 2156-2163 (1990)); 和 9-羟基亚氨基-6-甲氧基-1,4a-二甲基-1,2,3,4,4a,9,10,10a-八氢-菲-1-甲酸甲酯; 6-甲氧基-1,4a-二甲基-9-(4-甲基-哌嗪-1-基亚氨基)-1,2,3,4,4a,9,10,10a-八氢-菲-1-甲酸甲酯-盐酸盐; 1-(2-氯-苯基)-3-(2,2-二苯基-乙基)-脲 (美国专利 6,127,422)。

[1617] 适于前述分子的给药制剂、剂量和途径或者在以下引用的参考中教导,或者是本领域公知的,例如,如下公开的:F. G. Hayden, Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第九版, Hardman 等., Eds., McGraw-Hill, New York (1996), 50 章, pp. 1191-1223, 以及其中引用的参考。选择性地,一旦已经鉴别出显示 HCV 抗病毒活性的化合物,采用本领域技术人员已知的技术可测定该化合物的药学有效量。参见例如, Benet 等., Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 第九版, Hardman 等., Eds., McGraw-Hill, New York (1996), 1 章, pp. 3-27, 以及其中引用的参考。因此,可通过常规方法轻易地确定这类化合物的适当制剂、剂量范围和给药方案。

[1618] 本发明的药物组合可提供给细胞或细胞群,患者,或者以单独的同时或按顺序给药的药学上可接受的制剂,含有多于一种的治疗剂的制剂或者通过单一药剂和多种药剂制剂的分类。然而给药时,这些药物组合形成抗 HCV 有效量的成分。

[1619] 本发明的方法能够使用的大量的其它免疫调节剂和免疫刺激剂目前是可得到的并且包括:AA-2G;金钢烷基酰胺二肽;腺苷脱氨酶, Enzon;佐剂, Alliance;佐剂 Ribi;佐剂, Vaxcel;Adjuvax;agelasphin-11;AIDS 治疗剂, Chiron;藻葡聚糖, SRI;algammulin, Anutech;Anginlyc;抗细胞因子, Yeda;Anticort;抗胃泌素-17 免疫原, Ap;抗原递送系统, Vac;抗原制剂, IDBC;抗 GnRH 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; 头孢地嗪; 化学促活抑制剂, ICOS; CMV 肽, City of Hope; CN-5888; 细胞因子释放剂, St; DHEAS, Paradigm; DISC TA-HSV; J07B; I01A; I01Z; 二硫卡钠; ECA-10-142; ELS-1; 内毒素, Novartis; FCE-20696; CE-24089; FCE-24578; FLT-3 配体, Immunex; FR-900483; FR-900494; FR-901235; FTS-Zn; G-蛋白, Cadus; glutapcin; glutaurine; 葡萄糖磷酸肽 (glycophosphopeptical); GM-2; GM-53; GMDP; 生长因子疫苗, EntreM; H-BIG, NABI; H-CIG, NABI; HAB-439; 幽门螺杆菌疫苗; 疱疹-特异性免疫因子; HIV 治疗, United Biomed; HyperGAM+CF; ImmuMax; Immun BCG; 免疫疗法, Connective; 免疫调节剂, Evans; 免疫调节剂, Novacell; imreg-1; imreg-2; Indomune; 肌苷 pranobex; 干扰素, Dong-A ( $\alpha 2$ ); 干扰素, Genentech ( $\gamma$ ); 干扰素, Novartis ( $\alpha$ ); 白细胞间介素-12, Genetics Ins; 白细胞间介素-15, Immunex; 白细胞间介素-16, Research Cor; ISCAR-1; J005X; L-644257; licomarasminic acid; LipoTher; LK-409; LK-410; LP-2307; LT(R1926); LW-50020; MAF, Shionogi; MDP 衍生物, Merck; 间-脑啡肽 TNI; 甲基咪喃基丁内酯; MIMP; 米立司亭; 混合的细菌疫苗, Tem; MM-1; moniliastat; MPLA, Ribi; MS-705; 莫拉丁酯; 莫拉丁酯, Vacsyn; 胞壁酰基二肽衍生物; 胞壁酰基肽衍生物 myelopid; -563; NACOS-6; NH-765; NISV, Proteus; NPT-16416; NT-002; PA-485; PEFA-814; 肽, Scios; 肽葡聚糖, Pliva; Perthon, Advanced Plant; PGM 衍生物, Pliva; Pharmaprojects No. 1099; No. 1426; No. 1549; No. 1585; No. 1607; No. 1710; No. 1779; No. 2002; No. 2060; No. 2795;

No. 3088 ;No. 3111 ;No. 3345 ;No. 3467 ;No. 3668 ;No. 3998 ;No. 3999 ;No. 4089 ;No. 4188 ;  
No. 4451 ;No. 4500 ;No. 4689 ;No. 4833 ;No. 494 ;No. 5217 ;No. 530 ;匹多莫德 ;匹美劳  
肽 ;吡萘非特 ;PMD-589 ;鬼臼霉素, Conpharm ;POL-509 ;聚-ICLC ;聚-ICLC, Yamasa  
Shoyu ;聚A-聚U ;多糖A ;蛋白A, Berlox Bioscience ;PS34W0 ;假单胞菌属 MABs,  
Teijin ;Psomaglobin ;PTL-78419 ;Pyrexol ;pyriferone ;Retrogen ;Retropep ;RG-003 ;  
Rhinostat ;利福克昔 rifamaxil ;RM-06 ;Rollin ;罗莫肽 ;RU-40555 ;RU-41821 ;Rubella  
抗体, 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 溶胞产物 ;促病毒  
素 ;suppressin ;T-150R1 ;T-LCEF ;他比劳肽 ;替莫肽 ;Theradigm-HBV ;Theradigm-HPV ;  
Theradigm-HSV ;THF, Pharm &Upjohn ;THF, Yeda ;thymalfasin ;胸腺激素成分 ;胸腺卡汀 ;  
thymolymphotropin ;胸腺增生素 ;胸腺增生素类似物 ;胸腺增生素, Peptech ;胸腺素成分  
5,  $\alpha$  ;胸腺刺激素 ;胸腺曲南 ;TMD-232 ;T0-115 ;转移因子, Viragen ;他福新, Selavo ;鸟苯  
美司 ;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+L LYM-B+ ;LYM-NK+ ;LYM-T+ ;OPI+ ;PEP+ ;PHG-MA+ ;RNA-SYN- ;SY-CW- ;TH-A-1+ ;  
TH-5+ ;TNF+ ;UN。

[1620] 用于本发明的代表性的核苷和核苷酸化合物包括但不限于:(+)-顺  
式-5-氟-1-[2-(羟基-甲基)-[1,3-氧硫杂环戊烷-5-基]胞嘧啶;(-)-2'-脱  
氧-3'-硫代胞苷-5'-三磷酸盐(3TC);(-)-顺式-5-氟-1-[2-(羟基-甲基)-[1,  
3-氧硫杂环戊烷-5-基]胞嘧啶(FTC);(-)2',3',二脱氧-3'-硫杂胞苷[(-)-SddC];  
1-(2'-脱氧-2'-氟- $\beta$ -D-阿糖呋喃基)-5-碘代胞嘧啶(FIAC);1-(2'-脱  
氧-2'-氟- $\beta$ -D-阿糖呋喃基)-5-碘代胞嘧啶三磷酸盐(FIACTP);1-(2'-脱  
氧-2'-氟- $\beta$ -D-阿糖呋喃基)-5-甲尿嘧啶(FMAU);1- $\beta$ -D-呋喃核糖基-1,2,4-三  
唑-3-甲酰胺;2',3'-二脱氧-3'-氟-5-甲基-脱氧胞苷(Fdd MeCyt);2',3'-二  
脱氧-3'-氯-5-甲基-脱氧胞苷(ClddMeCyt);2',3'-二脱氧-3'-氨基-5-甲  
基-脱氧胞苷(Add MeCyt);2',3'-二脱氧-3'-氟-5-甲基-胞苷(FddMeCyt);2',  
3'-二脱氧-3'-氯-5-甲基-胞苷(ClddMeCyt);2',3'-二脱氧-3'-氨基-5-甲  
基-胞苷(AddMeCyt);2',3'-二脱氧-3'-氟代胸腺密啶核苷(FddThd);2',3'-二  
脱氧- $\beta$ -L-5-氟代胞苷( $\beta$ -L-FddC);2',3'-二脱氧- $\beta$ -L-5-噻胞苷;2',3'-二  
脱氧- $\beta$ -L-5-胞苷( $\beta$ -1-ddC);9-(1,3-二羟基-2-丙氧基甲基)鸟嘌呤;2'-脱  
氧-3'-硫杂-5-氟胞嘧啶;3'-氨基-5-甲基-脱氧胞苷(AddMeCyt);2-氨基-1,  
9-[2-(羟基甲基-1-(羟基甲基)乙氧基)甲基]-6H-嘌呤-6-酮(更昔洛韦);2-[2-(2-氨  
基-9H-嘌呤-9-基)乙基]-1,3-propandil 二醋酸盐(famciclovir);2-氨基-1,9-二  
氢-9-[2-(羟基-乙氧基)甲基]6H-嘌呤-6-酮(阿昔洛韦);9-(4-羟基-3-羟基甲  
基-丁-1-基)鸟嘌呤(喷昔洛韦);9-(4-羟基-3-羟基甲基-丁-1-基)-6-脱氧-鸟嘌  
呤二醋酸盐(法昔洛韦);3'-叠氮-3'-脱氧胸腺密啶核苷(AZT);3'-氯-5-甲基-脱  
氧胞苷(ClddMeCyt);9-(2-磷酸基-甲氧基乙基)-2',6'-二氨基嘌呤-2',3'-二  
脱氧核苷;9-(2-磷酸基甲氧基乙基)腺嘌呤(PMEA);阿昔洛韦三磷酸盐(ACVTP);D-碳  
环-2'-脱氧鸟苷(CdG);二脱氧-胞苷;二脱氧-胞嘧啶(ddC);二脱氧-鸟嘌呤(ddG);

二脱氧-肌苷(ddI);E-5-(2-溴代乙烯基)-2'-脱氧尿苷三磷酸盐;氟-阿糖呋喃基-碘尿嘧啶;1-(2'-脱氧-2'-氟-1-β-D-阿糖呋喃基)-5-碘代-尿嘧啶(F1AU);斯塔夫定;9-β-D-阿糖呋喃基-9H-嘌呤-6-胺一水合物(Ara-A);9-β-D-阿糖呋喃基-9H-嘌呤-6-胺-5'-一磷酸盐一水合物(Ara-AMP);2-脱氧-3'-硫杂-5-氟胞苷;2',3'-二脱氧-鸟嘌呤;和2',3'-二脱氧-鸟苷。

[1621] 用于制备本发明的核苷和核苷酸的合成方法是本领域公知的,如以下所公开的:Acta Biochim. Pol., 43, 25-36(1996);Swed. Nucleosides Nucleotides 15, 361-378(1996);Synthesis 12, 1465-1479(1995);Carbohydr. Chem. 27, 242-276(1995);Chem. Nucleosides Nucleotides 3, 421-535(1994);Ann. Reports in Med. Chem., Academic Press;and Exp. Opin. Invest. Drugs 4, 95-115(1995)。

[1622] 以上引用的参考文献介绍的化学反应一般公开了它们在本发明的化合物的制备中的最广泛应用。有时候,这些反应不能如所述的那样用于包括在本文公开的化合物范围内的每个化合物。本领域熟练人员易于确定发生此情形的化合物。所有这种情形下,或者通过通常本领域熟练人员已知的常规修正成功地实施该反应,例如,通过适当的保护干扰基团,通过改变可选择的常规试剂,通过反应条件的常规修正,等,或者本文公开的其它反应或别的常规方式能应用于本发明相应化合物的制备。在所有制备方法中,所有原料是已知的或易于由已知原料制备。

[1623] 当核苷类似物通常像抗病毒剂一样使用时,有时核苷酸(核苷磷酸)必须转化成核苷以便促进它们经细胞膜的转运。能够进入细胞的化学改性的核苷酸的例子是S-1-3-羟基-2-磷酸基甲氧基丙基胞嘧啶(HPMPC, Gilead Sciences)。为酸的本发明的核苷和核苷酸化合物能形成盐。例子包括碱金属盐或碱土金属盐,如钠、钾、钙或镁,或者有机碱或碱性季铵盐。

[1624] 用于本发明的联合治疗方法的免疫调节剂和免疫刺激剂能以低于本领域常规量的剂量施用。例如,干扰素α通常以约 $1 \times 10^6$ 单位/人每周三次至约 $10 \times 10^6$ 单位/人每周三次的剂量给予患者用于治疗HCV感染(Simon等., Hepatology 25:445-448(1997))。在本发明的方法和组合物中,此剂量的范围是约 $0.1 \times 10^6$ 单位/人每周三次至约 $7.5 \times 10^6$ 单位/人每周三次;更优选约 $0.5 \times 10^6$ 单位/人每周三次至约 $5 \times 10^6$ 单位/人每周三次;最优选约 $1 \times 10^6$ 单位/人每周三次至约 $3 \times 10^6$ 单位/人每周三次。由于在有本发明的HCV丝氨酸蛋白酶抑制剂的情形下,免疫调节剂和免疫刺激剂增强的丙型肝炎病毒抗病毒效力,在本文公开的方法和组合物中可采用减少量的这些免疫调节剂/免疫刺激剂。类似地,由于在有免疫调节剂和免疫刺激剂的情形下,目前的HCV丝氨酸蛋白酶抑制剂的强丙型肝炎病毒抗病毒效力,在本文公开的方法和组合物中可采用减少量的这些HCV丝氨酸蛋白酶抑制剂。在感染的经受治疗的患者中通过常规监测丙型肝炎病毒滴度能够测定该减少数量。这可通过以下方案实现,例如,由狭线印迹、斑点印迹或RT-PCR技术,或者由HCV表面或其它抗原测量监测患者血清中HCV RNA。在采用本文公开的HCV丝氨酸蛋白酶抑制剂和其它具有抗HCV病毒活性的化合物(例如核苷和/或核苷酸抗病毒剂)的联合治疗期间,同样可监测患者以测定联合使用时每个的最低有效剂量。

[1625] 本文公开的联合治疗方法中,核苷或核苷酸抗病毒化合物,或其混合物,能以约0.1mg/人/天至约500mg/人/天的量对人给药;优选约10mg/人/天至约300mg/人/天;

更优选约 25mg/ 人 / 天至约 200mg/ 人 / 天 ;甚至更优选约 50mg/ 人 / 天至约 150mg/ 人 / 天 ;并且最优选约 1mg/ 人 / 天至约 50mg/ 人 / 天的范围。

[1626] 化合物的剂型可以以单次剂量或适当的多次亚剂量对病人给药。在后者中,剂量单位组合物可以包含其亚多次用量以组成每天剂量的量。每天多剂量亦能增加每天总剂量,这应是开药物处方的人希望的。

[1627] 以本发明的化合物和 / 或组合物治疗患有 HCV 感染的患者的方案根据多种因素选择,这些因素包括年龄、体重、性别、饮食,和患者的医学症状、感染的严重性、给药途径,药理学考虑,如活性、功效、药动学和采用具体化合物的毒理学曲线,以及是否采用药物输送系统。本文公开的药物组合的给药通常应该持续几周至数月或几年的周期,直到病毒滴度达到可接受的水平,这表明已经控制或根除感染。经受本文公开的药物联合治疗的患者可通过由狭线印迹、斑点印迹或 RT-PCR 技术测量肝炎病毒 RNA 进行常规监测,或者由血清中丙型肝炎病毒抗原(如表面抗原)测量确定治疗的效力来进行常规监测。这些方法得到的数据的连续分析允许治疗期间修正治疗方案,这样以致于服用组合中每个组分的优化量,并且也可测定治疗的持续时间。因此,在治疗过程中能合理地修改治疗方案 / 给药时间表,这样以致于服用每种共同显示满意地抗丙型肝炎病毒效力的联合使用的抗病毒化合物的最低量,并且以致于这些组合的抗病毒化合物仅仅连续给药,只要这对于成功治疗感染是必需的。

[1628] 本发明包括使用本文公开的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂与前述和类似类型的具有抗 HCV 活性的化合物的各种组合,以治疗或预防患者的 HCV 感染。例如,一种或多种 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂可用于与下列物质组合:一种或多种干扰素或具有抗 HCV 活性的干扰素衍生物;一种或多种具有抗 HCV 活性的非-干扰素化合物;或一种或多种干扰素或具有抗 HCV 活性的干扰素衍生物和一种或多种具有抗 HCV 活性的非-干扰素化合物。联合用于治疗或预防患者 HCV 感染时,任何目前公开的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂和前述具有抗 HCV 活性的化合物可以药学上或抗 HCV 有效量存在。由于它们的加和作用或协同作用,在用于上述组合时,每个亦可为亚临床药学有效或抗 HCV 有效量存在,即若单独使用时,与这些以药学有效量使用时 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂和具有抗 HCV 活性的化合物相比,在完全抑制或减少 HCV 病毒粒子蓄积和 / 或减轻或改善与 HCV 感染有关的症状或综合征或患者的发病中提供减少的药效的量。此外,本发明包括如上所述的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂和具有抗 HCV 活性的化合物联合使用,以治疗或预防 HCV 感染,这里一个或多个的这些抑制剂或化合物以药学有效量存在,并且其它的由于它们的加和或协同作用是以亚临床药学有效或抗 HCV 有效量存在。如本文使用的,术语“加和作用”描述两个(或多个)药物活性剂等于每个单独给药的药剂作用之和的联合作用。协同作用是两个(或多个)药物活性剂的联合作用大于每个单独给药的药剂作用之和。

#### [1629] 实施例 42

[1630] 当前丙型肝炎病毒(HCV)感染的治疗标准是以免疫调节剂  $\alpha$ -干扰素治疗(Chronic Hepatitis C:Current Disease Management, U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999)。这种疗法在大多数 HCV 患者中无效,他们或者无应答,或者甚至在延长干扰素治疗之后复发。另外,这里有与干扰素治疗有关的严重副作用。

[1631] 考虑到对于新型、更有效的治疗 HCV 感染患者的抗病毒药的紧迫需要, 本发明人已经研发了一系列的抑制 HCV 丝氨酸蛋白酶的化合物 (HCV 病毒蛋白 NS3 和 NS4A 的复合体)。这些化合物可以单独使用, 彼此共同使用, 以及组合其它类的化合物, 以治疗或预防 HCV 感染。本实施例描述了三种典型的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂的实验, 即化合物 CU、化合物 EP 和化合物 EC, 在 HCV 次基因组 RNA 复制子分析 (Replicon Assay) 中单独和组合一组干扰素 (干扰素  $\alpha$ -2B (Schering Plough), 干扰素  $\alpha$ -2A (PBL Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ), 干扰素  $\beta$  (Research Diagnostics Inc, Flanders, NJ), 和羊-干扰素  $\tau$  (Research Diagnostics Inc, Flanders, NJ)) 的个体以测定是否两个化合物共同作用以减少 HCV RNA 的蓄积。相对于未治疗细胞内复制子 RNA 的数量, 在药物治疗两天之后复制子分析测量保留在复制子细胞内的 HCV 次基因组 RNA (复制子 RNA) 的含量 (Lohmann 等人, Science, 285 :110-113 (1999))。此分析中, 化合物作为 HCV 抗病毒药物的效力直接与复制子 RNA 蓄积的抑制水平成比例。

[1632] 在体外复制子分析系统内组合分析这两个药物以确定一起使用时它们是否显示加和或协同的抗 HCV 活性。采用复制子分析作为体外 HCV 感染的替代模型以评价免疫调节剂, 例如干扰素- $\alpha$  2B (Intron A; Schering Plough), 和 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂, 例如化合物 CU, 的联合作用。如下所示, 结果证明, 采用分析它们在复制子分析中减少 HCV RNA 水平能力的协同性的形式数学测定测量时, 这两类的药物有明显的抗 HCV 协同作用。

#### [1633] 复制子分析

[1634] Lohmann 等于 Science 285 :110-113 (1999) 描述了采用含有自我复制 HCV 次基因组 RNA (复制子) 细胞系的复制子分析。在本文介绍的实验使用的复制子序列的 Genbank 入藏登记号在此参考中列为 AJ242654。该文献公开了 RNA 由复制子 cDNA 的体外转录、复制子 RNA 通过电穿孔转染入 Huh7 细胞, 和采用抗生素 G418 选择包含复制子 RNA 的细胞的方法。Huh7 细胞是得自 Fox Chase 癌症研究中心 (Philadelphia) William Mason 博士的肝细胞瘤细胞。这些细胞以公众名义得自 Fox Chase, 并且已经被广泛描述在科技文献中 (Nakabayashi 等. Cancer Res. 42 :3858-3863 (1982))。在本文描述的分析中, 所有的模板 DNA 在这种 RNA 电穿孔入 Huh7 细胞之前, 通过 DNase 的多步处理 (三次连续处理) 自体外转录的复制子 RNA 制剂除去。

[1635] 如下详细介绍的实施复制子分析。简要地, 复制子细胞以每孔 10000 个细胞的密度置于 96 孔盘且在 37°C 培养。这些细胞在补充 10% 胎牛血清、谷氨酰胺、非必需氨基酸和抗生素 G418 (0.25mg/ml) 的 DMEM (Dulbecco's 极限必需培养基) 中培养。过夜培养之后, 培养基以含有 2% 胎牛血清和各种浓度的丝氨酸蛋白酶抑制剂, 如化合物 CU, 和 / 或干扰素, 如干扰素- $\alpha$  2B (Intron A, Schering Plough) 的 DMEM 代替。在 6 至 8 个不同浓度测试每个化合物。对于该浓度范围的一个极点, 选择在治疗两天后会致复制子 RNA 蓄积几乎完全抑制的高浓度的化合物。由这些开始浓度, 制备系列稀释液, 这样以致于复制子分析中的浓度范围包括其中化合物极有效的浓度, 以及其中无显著作用的浓度。未加入任何干扰素, 以及加入 6 至 8 个不同干扰素剂量, 测试每个 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂浓度。同样地, 未加入任何 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂, 测试干扰素。以这种化合物培养 48 小时之后, 由板除去培养基, 采用 Qiagen 公司 (Valencia, CA) 制造的 RNeasy-96 药盒由细胞中提取总细胞 RNA。接着通过定量 RT-PCR, 或 TaqMan<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City CA) 分析这种

RNA。TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR 靶是复制子 RNA 中新霉素耐药基因。配置板, 这样以致于每个药物治疗样品有 5 个平行测定, 未治疗样品有 16 个平等测定。这使定量 RT-PCR 数据有极大的统计学置信度。

[1636] 复制子分析数据的分析产生两个用于评估有效 HCV 病毒剂功效的值。在每个分析的化合物浓度, 要相对于未治疗细胞内复制子 RNA 的数量, 测定治疗两天期间化合物引起的复制子 RNA 蓄积的抑制水平。这报道为抑制百分比。当获得通过在浓度范围内细胞治疗产生的一系列数据点时, 产生 IC<sub>50</sub> 值, 即, HCV 复制子 RNA 蓄积通过该化合物减少 50% 的化合物浓度。通过重复 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂在复制子分析中的分析, 确定 IC<sub>50</sub> 具有约 20% 的变异系数百分比 (IC<sub>50</sub>/ 平均 IC<sub>50</sub> 中 % CV 或 100% x 的标准误差)。IC<sub>50</sub> 是用于把此分析中分析的各个化合物基于它们作为 HCV 抗病毒剂的功效分类的值。简单的 IC<sub>50</sub> 测定对于评估联合中使用的化合物的应用是不充分的。采用各种干扰素和丝氨酸蛋白酶抑制剂的所有组合产生的分析数据的最有效的分析需要采用以下描述的数学方法评价如表 7 所示的抑制百分比, 该方法被设计成确定联合治疗是否是竞争、加和或协同的。

[1637] 复制子分析的细节如下:

[1638] 在 HCV 复制子分析中采用 TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR 定量分析 HCV 复制子 RNA 的方法

[1639] 采用复制子分析测量有效的 HCV 抗病毒化合物抑制 HCV 次基因组 RNA 复制子分子在 Huh7 细胞系中蓄积的能力 (Lohmann 等. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. Science 285, 110-113 (1999))。此分析包括三个操作组分: (1) 复制子细胞培养, 分析板装置, 和化合物应用; (2) 由复制子细胞提取总的细胞 RNA; 和 (3) 实时 RT-PCR (TaqMan<sup>®</sup>) 以测量每个样品内复制子 RNA 的数量。复制子分析需要实施至少 4 天; 然而, 步骤之间可中断该方法并且冷冻样品。以下描述每个分析组分。

[1640] 1. 复制子细胞培养, 分析板装置, 和化合物施用

[1641] 1.1 复制子细胞系培养

[1642] 如 Lohmann 等所述 (Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. Science 285, 110-113 (1999)) 生产用于复制子分析的细胞系。含有复制子细胞的 150cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶 (Costar) 于 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 培养且融合之后, 细胞以 1 : 10, v/v, 稀释入新鲜的 150cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶。培养基是含有 10% 胎牛血清 (FBS)、1X 非必需氨基酸 (NEAA)、1X 谷氨酰胺 (Glu) 和 0.25mg/ml G418 的 DMEM。进行三个连续传代, 每个时间允许细胞融合, 之后细胞稀释入新鲜的 150cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶。这些细胞, 称为 "原始细胞," 接着等分并贮藏以便将来用于复制子分析。进行 TaqMan<sup>®</sup> 基分析以确定每个细胞 HCV 复制子基因组数量, 它显示每个细胞有 ~ 150 个拷贝的复制子。这基于复制子 RNA 的拷贝与两倍的人 apoB 基因 (单倍体基因组数目) 的拷贝的比值。

[1643] 1.1.1 原始细胞贮藏于液态 N<sub>2</sub>。对于用于复制子分析的细胞, 20 连续传代后, 抛弃细胞, 由液态 N<sub>2</sub> 贮藏复苏新鲜批量。

[1644] 1.2 细胞在复制子分析用 96 孔盘上的接种

[1645] 1.2.1. 为了制备 96 孔板, 胰蛋白酶化 75cm<sup>2</sup> 烧瓶 75% 融合的含复制子的细胞, 并在 10ml 培养基 A 中再悬浮。通过除去培养基, 加入 1ml 0.25% w/v 胰蛋白酶-EDTA, 接着除去胰蛋白酶-EDTA 进行胰蛋白酶化。5-10 分钟之后, 细胞从烧瓶释放并在培养基中再悬浮。

- [1646] 1. 2. 2. 采用血球计数器计数细胞,并且细胞浓度调节至 105 个细胞 /ml。
- [1647] 1. 2. 3. 每个孔采用 Impact 2 多通道移液管 (Matrix) 接种 100  $\mu$  l 细胞悬浮液,单个细胞悬浮液不再接种超过 4 个的 96 孔板
- [1648] 1. 2. 4. 96- 孔板在 37°C 培养过夜。
- [1649] 1. 3. 化合物稀释并应用至复制子细胞盘
- [1650] 1. 3. 1. HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂化合物溶于二甲基亚砜 (DMSO), 至最终浓度 20mM。干扰素悬浮于含有 0.1% w/v 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲的生理盐水溶液。
- [1651] 1. 3. 2. 20 mM 化合物溶液以 DMSO 稀释至 1mM。
- [1652] 1. 3. 3. 50  $\mu$  l 溶于 DMSO 的化合物加至 10ml 培养基 B (化合物浓度是 5mM, 并且 DMSO 浓度现在是 0.5%), 或 20  $\mu$  l 的 1mM 化合物和 30  $\mu$  l DMSO 加至 10ml 培养基 B (化合物浓度是 2  $\mu$  M)。
- [1653] 1. 3. 4. 通过混合化合物 / 培养基 B 溶液和培养基 C (含有 0.5% DMSO) 完成化合物稀释至最终浓度。在 2ml 聚丙烯 96 孔区以培养基 C 进行化合物的连续 1 至 5 次稀释, 获得希望的最终浓度的化合物。
- [1654] 1. 3. 5. 细胞板由 37°C 培养器移走, 在盖的右角和底部的右侧标记。培养基倾入到 96 孔板上。
- [1655] 1. 3. 6. 源自 96 孔稀释区的每个孔的 100  $\mu$  l 化合物 / 培养基溶液采用 Impact2 移液管加至 96 孔细胞板。
- [1656] 1. 3. 7. 按照表 3, 100  $\mu$  l 培养基 C 加至所有未处理孔以便在或者 1、3, 或者 6 个不同浓度分析化合物。" Untx " 指模拟处理的细胞 (DMSO 以和处理细胞中一样的浓度加入); " Con. " 指化合物浓度。

[1657] 表 3

[1658] 2 个化合物, 6 种浓度, 5 个平行测定

[1659]	化合物 1			化合物 2								
[1660]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[1661]	A	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx
[1662]	B	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1
[1663]	C	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2
[1664]	D	con. 3	con. 3	con. 3	con. 3	con. 3	con. 3	con. 3	con. 3	con. 3	con. 3	con. 3
[1665]	E	con. 4	con. 4	con. 4	con. 4	con. 4	con. 4	con. 4	con. 4	con. 4	con. 4	con. 4
[1666]	F	con. 5	con. 5	con. 5	con. 5	con. 5	con. 5	con. 5	con. 5	con. 5	con. 5	con. 5
[1667]	G	con. 6	con. 6	con. 6	con. 6	con. 6	con. 6	con. 6	con. 6	con. 6	con. 6	con. 6
[1668]	H	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx

[1669] 4 个化合物, 3 种浓度, 5 个平行测定

[1670]	化合物 1			化合物 2								
[1671]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[1672]	A	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx	untx
[1673]	B	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1	con. 1
[1674]	C	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2	con. 2

- [1675] D con. 3 con. 3 con. 3 con. 3 con. 3 con. 3 con. 3 con. 3 con. 3 con. 3
- [1676] E con. 1 con. 1 con. 1 con. 1 con. 1 con. 1 con. 1 con. 1 con. 1 con. 1
- [1677] F con. 2 con. 2 con. 2 con. 2 con. 2 con. 2 con. 2 con. 2 con. 2 con. 2
- [1678] G con. 3 con. 3 con. 3 con. 3 con. 3 con. 3 con. 3 con. 3 con. 3 con. 3
- [1679] H untx untx untx untx untx untx untx untx untx untx
- [1680] 化合物 3 化合物 4
- [1681] 16 个化合物, 1 种浓度, 4 个平行测定。
- [1682] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
- [1683] A untx cpd1 cpd2 cpd3 cpd4 cpd5 cpd6 cpd7 cpd8 untx
- [1684] B untx cpd1 cpd2 cpd3 cpd4 cpd5 cpd6 cpd7 cpd8 untx
- [1685] C untx cpd1 cpd2 cpd3 cpd4 cpd5 cpd6 cpd7 cpd8 untx
- [1686] D untx cpd1 cpd2 cpd3 cpd4 cpd5 cpd6 cpd7 cpd8 untx
- [1687] E untx cpd9 cpd10 cpd11 cpd12 cpd13 cpd14 cpd15 cpd16 untx
- [1688] F untx cpd9 cpd10 cpd11 cpd12 cpd13 cpd14 cpd15 cpd16 untx
- [1689] G untx cpd9 cpd10 cpd11 cpd12 cpd13 cpd14 cpd15 cpd16 untx
- [1690] H untx cpd9 cpd10 cpd11 cpd12 cpd13 cpd14 cpd15 cpd16 untx
- [1691] 12 个化合物, 1 种浓度, 5 个平行测定。
- [1692] 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
- [1693] A untx untx untx untx untx untx untx untx untx untx
- [1694] B cpd1 cpd1 cpd1 cpd1 cpd1 cpd7 cpd7 cpd7 cpd7 cpd7
- [1695] C cpd2 cpd2 cpd2 cpd2 cpd2 cpd8 cpd8 cpd8 cpd8 cpd8
- [1696] D cpd3 cpd3 cpd3 cpd3 cpd3 cpd9 cpd9 cpd9 cpd9 cpd9
- [1697] E cpd4 cpd4 cpd4 cpd4 cpd4 cpd10 cpd10 cpd10 cpd10 cpd10
- [1698] F cpd5 cpd5 cpd5 cpd5 cpd5 cpd11 cpd11 cpd11 cpd11 cpd11
- [1699] G cpd6 cpd6 cpd6 cpd6 cpd6 cpd12 cpd12 cpd12 cpd12 cpd12
- [1700] H untx untx untx untx untx untx untx untx untx untx
- [1701] 1. 4. 板于 37℃ 培养 48 小时, 接着进行 RNA 提取。
- [1702] 表 4

用于细胞培养和化合物混合的设备和原料的概要		
8通道Impact2移液管, 1250 $\mu$ l	cat no 2004	Matrix
2ml聚丙烯深孔区, 96孔, 无菌	cat no 4222	Matrix
25ml试剂储罐, 无菌	cat no. 8096	Matrix
1250 $\mu$ l X-tra 长吸管尖	cat no. 8255	Matrix
96孔板	cat no. 3595	Costar
血细胞计数器	明线改善 Neubauer 0.1 mm 深	Reichert
DMEM	cat no. 51444-79P	JRH
[1703] L-谷氨酰胺 (Glu)	cat no. 12403-010	GIBCO-BRL
非必需氨基酸 (NEAA)	cat no. 11140-050	GIBCO-BRL
胎牛血清 (FBS)	cat no. 16250-078	GIBCO-BRL
G418	cat no. 55-0273	Invitrogen
DMSO	cat no. D-2650	Sigma
培养基A	DMEM, 10% FBS, 1X NEAA, 1X Glu, 0.25 mg/ml G418	
培养基B	DMEM, 2% FBS, 1X NEAA, 1X Glu	
培养基C	DMEM, 2% FBS, 1X NEAA, 1X Glu, 0.5% DMSO	
胰蛋白酶- EDTA 0.25%	GIBCO-BRL	

## [1704] 2. 复制子细胞的总细胞 RNA 的提取

## [1705] 2.1 介绍

[1706] 该方法的目的是由体外组织培养样品提取 RNA, 这样以致于病毒或细胞 RNA 定量回收, 并且纯度足够定量 HCV RT-PCR 测定分析。

[1707] 为了在 RNA 提取的效率中允许变异的检测, 标准量的牛病毒性腹泻病毒 (BVDV)、与 HCV 某些相似的 RNA 病毒, 在 RNA 提取之前加至每个细胞样品。因此, 在最终的多倍 RT-PCR 反应中检测的 BVDV RNA 水平在所有孔之间应当在复制子分析相关的变异限度内一致。在以下的 **TaqMan**<sup>®</sup> 章节进下讨论了这种 RNA 提取效率内部控制。

[1708] 使用的 RNA 提取方法是 Qiagen 公司 (Valencia, CA). 制备的 RNeasy-96 方法。这种方法采用 96 个二氧化硅基小型柱, 以与 96 孔组织培养操作兼容的阵列安置它们。RNA 提取技术是 Boom 法的修正, 其中所有的蛋白和核酸, 包括核酸酶, 首先以强离液盐 (硫氰酸胍) 变性。在此环境中, 核酸对二氧化硅 (小型圆柱中的材料) 具有强的亲和性; 然而, 蛋白和其它污染物不结合二氧化硅, 并流过该柱。以离液 / 乙醇溶液洗涤该柱之后, 样品部分干燥, 核酸接着以小体积的水由该柱释放。

[1709] 为了在回收 HCV RNA 中减少差异, 要关心柱洗涤和部分干燥条件。柱上有少量乙醇存在会污染最终的 RNA 并干扰 RT-PCR 检测系统。在此方法的所有阶段需要小心, 由于起始样品是生物危险的, 离液盐是高腐蚀性的, 并且作为一种硫氰酸盐, 如果允许与酸性环境接触, 它能产生毒性的氰化物气体。

## [1710] 表 5

HCV RNA提取方法所需的设备和原料的概要		
RNeasy 96药盒 (24)	cat no. 74183	Qiagen
QIAvac 96歧管	cat no. 19504	Qiagen
离心机4-15C, 2x96板用, 6000 x g	cat no. 81010	Qiagen
2x96板用板转子	cat no. 81031	Qiagen
[1711] 200标准普通乙醇8通道Impact2移液管, 250 $\mu$ l	cat no 2002	Matrix
8通道Impact2 移液管, 1250 $\mu$ l	cat no 2004	Matrix
2 ml聚丙烯深孔区, 96孔, 无菌	cat no 4222	Matrix
25 ml试剂储罐, 无菌	cat no. 8096	Matrix
1250 $\mu$ l X-tra 长吸管尖	cat no. 8255	Matrix
200 $\mu$ l吸管尖	cat no. 7275	Matrix
不含血清的MEM培养基	cat no.11095-80	GIBCOBRL

[1712] 2.2 方法:

[1713] 2.2.1 细胞溶解

[1714] 2.2.1.1. 制备溶解缓冲液: 向一个 96-孔板, 加入 150  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇 ( $\beta$ -ME) 和 1  $\mu$ l BVDV 储液 (加入之前涡动储液) 至 15ml RLT 缓冲液 (RNeasy 药盒的一种成分, Qiagen)。这种储液通过以 BVDV 感染 MDBK 细胞 (牛肾细胞, #CCL-22, 得自美国典型培养物收藏中心 (American Type Culture Collection), Manassas VA) 且在致细胞病变效应 (CPE) 峰值收获培养物。此储液具有约  $1 \times 10^7$  pfu/ml 的感染滴度。在 TaqMan<sup>®</sup> 分析中这给予 BVDV 约 22 的阈循环 ( $C_t$ )。BVDV 储液在  $-80^\circ\text{C}$  冷冻机中贮藏。

[1715] 2.2.1.2. 以 150  $\mu$ l 不含血清 MEM 培养基洗涤细胞 (8 通道电子移液管 P1250 的程序 4: 填充 1250, Disp 150x8)。向每个孔加入 150  $\mu$ l 溶解缓冲液 (同样程序)。

[1716] 2.2.1.3. 立即提取 RNA, 或者在  $-80^\circ\text{C}$  冷冻细胞。

[1717] 2.2.2. 制备 RNA 提取用试剂和原料。

[1718] 2.2.2.1. 注意 RPE 和 RNeasy 96 药盒的组 # (lot#)。

[1719] 2.2.2.2. RPE: 720ml 的 100% 乙醇加入一瓶 RPE (Qiagen), 并且良好混合; RPE 瓶在使用之前总是良好摇动。

[1720] 2.2.2.3. 70% 乙醇: 150ml 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水加入 350ml 100% 乙醇并良好混合。

[1721] 2.2.3. 以 RNeasy 96 药盒制备 RNA

[1722] 2.2.3.1. 冷冻样品室温下解冻 40 分钟。同时, 用于每板的一列提取对照品解冻 (提取对照品: RNeasy 提取对照品是彼此相连的 8 管装置。每管内有 170  $\mu$ l 的细胞溶解物, 以及一定比例的 HCV 阳性和阴性细胞。由顶至底部是两个每个分别是低、中、高和零数对照品 (参见以下方案的 2.3 节))。

[1723] 2.2.3.2. 通过移取 100  $\mu$ l, 前后五次, 混合样品。整个样品转入 2ml Matrix 方孔区的列 1-10 (P250 程序 1: 混合 100x5, 填充 170, 净化)。

[1724] 2.2.3.3. 150  $\mu$ l 的复制子标准品转入列 11 (列 12 无样品)。

[1725] 2.2.3.4. 150  $\mu$ l 的 70% 乙醇 (EtOH) 加至每个样品 (P1250 的程序 4: 填充 1250, Disp 150)。

- [1726] 2.2.3.5. 标记适当板号的 RNeasy 96 板置于真空歧管。混合并转移溶解物 / 乙醇至 RNeasy 96 板 (P1250 程序 1 :混合 200, 5 次, 填充 330, 并净化)。任何未使用的孔以透明塞 (Qiagen 提供) 封闭, 通常是列 12。
- [1727] 2.2.3.6. 抽真空 (近似 800mbar) 以将样品装至小型柱上
- [1728] 2.2.3.7. RNeasy-96 板以 1000  $\mu$  l RW1 缓冲液 (Qiagen) / 孔洗涤 (P1250 的程序 2 : 填充 1000, Disp 1000)。
- [1729] 2.2.3.8. 滤过 RW1 缓冲液时过滤器抽真空, 流出通道排空。
- [1730] 2.2.3.9. RNeasy-96 板以 1000  $\mu$  l RPE 缓冲液 / 孔 (P1250 程序 2) 洗涤。
- [1731] 2.2.3.10. 滤过 RPE 缓冲液时过滤器抽真空。
- [1732] 2.2.3.11. 重复步骤 2.2.3.9
- [1733] 2.2.3.12. 滤过 RPE 缓冲液时抽真空, 保持真空 3 分钟。
- [1734] 2.2.3.13. 干燥 RNeasy 96 板 :RNeasy-96 板置于微管收集架 (Qiagen 提供) 上, 盖上提供的 AirPore 塞, 并且此单元在 6000xg 离心 10 分钟 (Qiagen Sigma 离心机 ;4-15 $^{\circ}$ C)。
- [1735] 2.2.3.15. 由 RNeasy 96 孔板洗脱 RNA :RNeasy-96 板转移至新微管收集架的顶部。70  $\mu$  l 的无 Rnase 水加至每个孔的中间 (P1250 程序 3 :填充 850, Disp 70)。
- [1736] 2.2.3.16. 室温下培养 1 分钟, 接着在板上放置新 AirPore 塞。
- [1737] 2.2.3.17. 此单元接着在 Sigma 4-15C 离心机内以 6000xg 离心 4 分钟。洗脱体积测量在 28  $\mu$  l 和 50  $\mu$  l 之间。
- [1738] 2.2.3.18. 弃去 RNeasy-96 板, 管收集架以 Qiagen 提供的盖子密闭 (每带 8 个)。
- [1739] 2.2.3.19. 洗脱出的 RNA 在 -80 $^{\circ}$ C 贮藏, 或者立即以 **TaqNan<sup>®</sup>** 分析。
- [1740] 2.3 提取对照物制备
- [1741] 第 1 天
- [1742] 2.3.1.1. 在 150cm<sup>2</sup> 组织培养瓶中 (T-150) 接种 2.5x10<sup>7</sup> 复制子 - 生成细胞。
- [1743] 2.3.1.2. 在 75cm<sup>2</sup> 的组织培养瓶中 (T-75) 接种 2.0x10<sup>6</sup>Huh7 细胞。
- [1744] 2.3.1.337 $^{\circ}$ C 培养过夜。
- [1745] 第 2 天
- [1746] 2.3.1.4. 以溶解缓冲液溶解细胞。
- [1747] 2.3.1.5. 由 Huh7 和复制子 - 生成细胞除去上清液, 以 10ml 无血清培养基 (MEM) 洗涤单层。
- [1748] 2.3.1.6. 向 Huh7 细胞加入 30ml 溶解缓冲液 (具有 1  $\mu$  l BVDV 储液 /15ml 溶解缓冲液), 通过反复移液混合, 并且细胞溶解物置于 50ml 锥形底组织培养离心管。
- [1749] 2.3.1.7. 向复制子 - 生成细胞加入 10.5ml 溶解缓冲液, 通过反复移液混合, 并且细胞溶解物置于 15ml 锥形底组织培养离心管。
- [1750] 2.3.2. 高提取标准 :170  $\mu$  l 等分试样的复制子 - 形成细胞细胞溶解物进入两个 Matrix 0.75ml 管架的 5 和 6 行。
- [1751] 2.3.3. 中等提取标准 :加 1.0ml 复制子 - 形成细胞细胞溶解物至 9ml Huh7 溶解物, 良好混合。170  $\mu$  l 等分试样的此混合物至两个 Matrix0.75ml 管架的 3 和 4 行。
- [1752] 2.3.4. 低提取标准 :加 50  $\mu$  l 复制子 - 形成细胞细胞溶解物至 10mlHuh7 溶解物, 良好混合。170  $\mu$  l 等分试样的此混合物至两个 Matrix0.75ml 管架的 1 和 2 行。

[1753] 2.3.5. 零提取对照:170  $\mu$ l 等分试样 Huh7 细胞溶解物至两个 Matrix 0.75ml 管架的 7 和 8 行。

[1754] 2.3.6. 在  $-80^{\circ}\text{C}$  贮藏对照品。

### [1755] 3. **TaqMan**<sup>®</sup> RT-PCR 和数据分析

[1756] 3.1 引入:采用实时定量 RT-PCR 测量每个样品内 HCV 复制子 RNV 的量。该技术亦称为 PCR-基 5' 核酸酶分析,和 **TaqMan**<sup>®</sup>。分析仪器是 Applied Biosystems 7700 Prism Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA)。这种仪器实质上是与热循环计耦合的时间-多路激光诱发的荧光光谱仪。它监测 96 孔样品盘的每个孔内 PCR 扩增子在该 PCR 过程内的蓄积。

[1757] 3.2. 使用 BVDV 内部对照:如先前章节所述,每个样品内掺入内部阳性对照。这用作 RNA 提取效率的测量,并且显示样品内是否含有抑制 **TaqMan**<sup>®</sup> PCR 的污染物。BVDV 与离液细胞溶解缓冲液在施用这种溶解缓冲液至细胞之前混合。尽管每个样品中有阳性对照, BVDV 内部阳性对照分析仅仅在 HCV 复制子 RNA 分析数据在预期限度之外时实施,这表明样品中可能存在问题。通过采用以两种不同的荧光报道染料标记的检测探针,7700 能够同时监测同一试管内两个不同的 PCR 扩增子的蓄积("多重")。数据分析节(3.6)描述了引出样品板 BVDV 内部阳性对照用的 **TaqMan**<sup>®</sup> 分析的具体标准。

[1758] 3.3 HCV 复制子 RNA **TaqMan**<sup>®</sup> 探针和引物。由于预期的遗传稳定性和复制子内编码的新霉素耐药基因(neo)通常缺乏 RNA 二级结构,采用在该区域结合的引物和探针。复制子 RNA 的片段从 8001 碱基对复制子 (SEQ ID NO:1) 的碱基 342-1193 延伸:

[1759] 301 gtgcttgcga gtgccccggg aggtctcgta gaccgtgcac catgagcacg aatcctaac

[1760] 361 ctcaaagaaa aaccaaactg aacaccaacg ggccgcgcat gattgaaca gatggattgc

[1761] 421 acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga

[1762] 481 caateggctg ctctgatgcc gccgtgtcc ggctgtcagc gcaggggccc cggttcttt

[1763] 541 ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacaggca gcgcggctat

[1764] 601 cgtggctggc cacgacggc gttccttgcc cagctgtgct cgactttgct actgaagcgg

[1765] 661 gaaggactg gctgctattg ggcaagtgc cggggcagga tctctgtca tctcacctg

[1766] 721 ctctgcccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgag cgggctgcat acgcttgatc

[1767] 781 eggtacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga

[1768] 841 tggaagccgg tcttgctgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctccgcccag

[1769] 901 ccgaactggt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccagcgg cgaggatctc gtcgtgacct

[1770] 961 atggcgatgc ctgcttgccc aatatcatgg tggaaaatgg CCGCTTTTCT GGATTCATCG

[1771] 正向引物

[1772] 1021 aCTGTGGCCG GCTGGGTGTG Gcggaccgct atcaggacat agcgttggt acccgtgata

[1773] TagMan\* 探针

[1774] 1081 ttgctgaaga gcTTGGCGGC GAATGGGctg accgcttct cgtgctttac ggtatcgccc

[1775] 反向引物

[1776] 1141 ctcccgatc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagtttaaa

[1777] 3.4. 方法

[1778] 3. 4. 1. NEO 和 BVDV RT-PCR 用 1x 主混合物的制备方法

[1779] 表 6

制备RT-PCR 10-板主混合物的设备和原料的概要		
设备和原料	序数	供应商
0.5-10 $\mu$ l 移液管	22 47 005-1 2000 系列	Eppendorf
2-20 $\mu$ l 移液管	22 47 015-9 2000 系列	Eppendorf
10-100 $\mu$ l 移液管	22 47 020-5 2000 系列	Eppendorf
50-200 $\mu$ l 移液管	22 47 025-6 2000 系列	Eppendorf
100-1000 $\mu$ l 移液管	22 47 030-2 2000 系列	Eppendorf
1250 $\mu$ l Matrix 吸头	cat no. 8255	Matrix
200 $\mu$ l Matrix 吸头	cat no. 7275	Matrix
10 $\mu$ l ART 吸头	cat no.2140	Molecular Bioproducts
20 $\mu$ l ART 吸头	cat no.2149P	Molecular Bioproducts
100 $\mu$ l ART 吸头	cat no.2065E	Molecular Bioproducts
200 $\mu$ l ART 吸头	cat no.2069	Molecular Bioproducts
1000 $\mu$ l ART 吸头	cat no.2079E	Molecular Bioproducts
电子移液管, Impact2	cat no. 2001	Matrix
1.5 ml无RNase microfuge管	cat no. 12450	Ambion
14 ml聚丙烯管	cat no. 352059	Falcon
25 ml试剂储罐	cat no: 8096	Matrix
[1780] 96孔反应板	cat no. N801-0560	Applied Biosystems
光学帽带 (optical cap strips)	cat no. N801-0935	Applied Biosystems
易处理的无菌长外衣	cat no. 9515-E	Baxter
试剂	序数	供应商
酸	0.1N HCl	Fisher
RNaseZap	cat no. 9780	Ambion
RNase away	cat no. 7005	Molecular Bioproducts
10-pak, EZ RT-PCR核心药盒, 5x反应缓冲液, 25mM醋酸锰, 脱氧NTPs	cat no. 403028	Applied Biosystems
VIC NEO探针, 2 $\mu$ M (=10x), 每个等分试样550 $\mu$ l	cat no. 450003, 定制, 5'- VIC-CTG TGG CCG GCT GGG TGT GG-TAMRA -3' (SEQ ID NO:2)	Applied Biosystems
VIC BVDV探针, 2 $\mu$ M (=10x), 每个等分试样550 $\mu$ l (Vertex)	cat no. 450003, 定制, 5'- VIC-CCC TCG TCC ACG TGG CAT CTC GA-TAMRA -3' (SEQ ID NO:3)	Applied Biosystems
NEO正向引物, 3 $\mu$ M (=10x)	cat no. 4304972, 定制, 5'-	Applied Biosystems

	正向/反向引物混合物, 每个等分试样550 μl	CCG CTT TTC TGG ATT CAT CG-3' (SEQ ID NO:4)	
	NEO反向引物, 3 μM (=10x) 正向/反向引物混合物, 每个等分试样550 μl	cat no. 4304972, 定制, 5'- CCC ATT CGC CGC CAA- 3'(SEQ ID NO:5)	Applied Biosystems
	BVDV正向引物, 3 μM (=10x) 正向/反向引物混合物, 每个等分试样550 μl	定制, 5'-CAG GGT AGT CGT CAG TGG TTC G-3' (SEQ ID NO:6), 1.0 μM 规模w/凝胶纯化	Oligos etc
	BVDV反向引物, 3 μM (=10x) 正向/反向引物混合物, 每个等分试样550 μl	定制, 5'-GGC CTC TGC AGC ACC CTA TC-3' (SEQ ID NO:7), 1.0 μM 规模w/凝胶纯化	Oligos etc
[1781]	NEO RNA标准	由含有HCV复制子RNA新基因部分采用T7 RNA聚合酶体外转录RNA。该体外转录的RNA基于转录物已知分子量和纯化转录溶液的UV吸收定量。稀释RNA, 等份且于-80℃贮藏。各个等分试样融化用于每个 TaqMan <sup>®</sup> 分析。	
	从HCV复制子细胞(该方案第2节)分离的待试验RNA样品, 10 μl/96孔板		
	无核酸酶水(非DEPC处理的)	cat no. 9930	Ambion

[1782] 3.4.2. 主混合物用试剂的制备

[1783] 3.4.2.1. 按照以下两个步骤清洗工作台, 并且以 RNase away 擦移液管。

[1784] RNase Zap (Ambion, Austin, TX)

[1785] RNase Away (Molecular Bioproducts, San Diego, CA)

[1786] 3.4.2.2. 打开核心 EZ RT-PCR 试剂 (Applied Biosystems) 并且将 5x 缓冲液放于冰上, 室温融化冷冻试剂约 15 分钟, 接着将它们放在冰上。可以使用一种 EZ RT-PCR 药盒分析两个 96 孔 RNA 提取物。

[1787] 3.4.2.3. 由 -20℃ 取一管 2 μM VIC 探针 (NEO 或 BVDV, 每管 550 μl) 并置于冰上。

[1788] 3.4.2.4. 由 -20℃ 取一管 3 μM 正向 / 反向引物混合物 (NEO 或 BVDV, 每管 550 μl) 并置于冰上。

[1789] 3.4.2.5. 由 -80℃ 取一管 (30 μl) 标准 RNA 转录物 (10<sup>8</sup> 拷贝 / 10 μl) 并置于冰上。

[1790] 3.4.2.6. 取一管室温 Ambion 水。

[1791] 3.4.3. 用于一个 96 孔板反应的主混合物系统。

[1792] 3.4.3.1. 用 1ml 移液管以转移 5x 缓冲液 (Applied Biosystems) 至 14ml 管; 加入的总体积是 1100 μl。

[1793] 3.4.3.2. 用 1ml 移液管以加 25mM Mn(OAc)<sub>2</sub> (Applied Biosystems) 至 14ml 管; 加入的总体积是 660 μl。

[1794] 3.4.3.3. 用 200 μl 移液管以加 165 μl 10mM dATP 至 14ml 管。10mM dCTP, 20mM

dUTP, 和 10mM dGTP 同样处理。

- [1795] 3.4.3.4. 用 1ml 移液管以添加 550  $\mu$ l 10x 3  $\mu$ M 正向 / 反向引物混合物。
- [1796] 3.4.3.5. 用 1ml 移液管以添加 550  $\mu$ l 10x 2  $\mu$ M 探针。
- [1797] 3.4.3.6. 用 1ml 移液管以添加 220  $\mu$ l rTth DNA 聚合酶 (AppliedBiosystems)。
- [1798] 3.4.3.7. 用 100  $\mu$ l 移液管以添加 55  $\mu$ l AmpErase UNG (AppliedBiosystems)。
- [1799] 3.4.3.8. 用 1ml 移液管以添加 605  $\mu$ l Ambion H<sub>2</sub>O 至 14ml 管 ; 最终体积总计是 4400  $\mu$ l。
- [1800] 3.4.3.9. 转移这种 4400  $\mu$ l 主混合物至 25ml 试剂储罐。
- [1801] 3.4.3.10. 对于所有的 96 孔采用 8 通道移液管每孔分散 40  $\mu$ l。
- [1802] 3.4.3.11. 采用 8 通道移液管转移 10  $\mu$ l 提取的未知样品到反应板的孔, 列接列, 由列 1 至列 11。转移之后每个列都盖上。
- [1803] 3.4.3.12. 加 270  $\mu$ l Ambion H<sub>2</sub>O 至 30  $\mu$ l 10<sup>8</sup> 拷贝 /10  $\mu$ l RNA 转录物, 以便用于标准曲线和混合。现有 10<sup>7</sup> 拷贝的 HCV 复制子数量的标准 RNA/10  $\mu$ l。
- [1804] 3.4.4. 每次运行调置 ABI 7700
- [1805] 3.4.4.1 每次运行之前, 重新启动 ABI 7700 用计算机并重建桌面。
- [1806] 3.4.4.2 从硬盘驱动器关闭和删除任何多余的程序 ; 弃出超出运行的数据。
- [1807] 3.4.4.3 打开 Sequence Detector v1.7 程序 (SDS software)。
- [1808] 3.4.4.5 打开 " 复制子分析运行 " 文件夹。
- [1809] 3.4.4.6 打开 " 复制子分析 " 模板板。程式化入该模板的热循环计条件如下所示 :
- [1810] 阶段 1 :50°C 2 分钟。
- [1811] 阶段 2 :60°C 30 分钟。
- [1812] 阶段 3 :95°C 5 分钟。
- [1813] 阶段 4 :95°C 15 秒。
- [1814] 阶段 5 :60°C 60 秒。
- [1815] 阶段 4-5 循环重复次数 :40。
- [1816] 模板仪器 :诊断 :高级选项 :
- [1817] 选择窗口 :mse 显示。
- [1818] 选择窗口 :最佳适配显示。
- [1819] 选择杂项 :参照染料 ROX。
- [1820] 3.4.4.7 以 " 复制子分析运行 " 文件夹 " 存储 " ( 未 " 存储 " ) 文件。
- [1821] 3.4.4.8 显示安装 :击 RUN。
- [1822] 3.5 使用 SDS 软件运行之后制备 ABI7700 数据。
- [1823] 3.5.1. 由 ABI7700 除去分析板并不打开地弃去。这极大地减少了 PCR 交叉污染的实验室问题。
- [1824] 3.5.2. 采用 Sequence Detector 系统软件 V1.7 分析数据。
- [1825] 3.5.3. 开始采用默认设置设置阈级。
- [1826] 3.5.4. 数据舍去标准 :可以舍去数据点或全部系列板。如果方案存在显著偏差、试剂故障或不幸之事, 或者 ABI7700 运行失败, 可以舍去数据。为了由明显正常运行舍去任

何数据点,必须符合这些标准的一个或多个。

[1827] 3.5.4.1. 阈循环计算。通常采用 SDS 软件用的默认值。如果大多数浓缩样品的 Ct 小于 15,于是需要时改变阈值限值至更低的值,这样以致于最高浓度样品的 Ct 大于限值。进行此变化之后更新计算。

[1828] 3.5.3.2. 如由新 RNA 标准分析产生线的斜率和 y 轴截距的平均值的偏差所指示的,考虑舍去完全异常的 **TaqMan**<sup>®</sup> 运行。那些值可接受的范围是:

[1829] 斜率值应在 3.0 和 3.6 之间

[1830] y- 截距循环应在 36 和 41 个循环之间。

[1831] 3.5.4.3. 如极值  $R_n / \Delta R_n$  所指示的异常的个别 **TaqMan**<sup>®</sup> 孔可以在数据分析之前删去,这样以致于它们不会影响 SDS 软件计算。

[1832] 3.5.4.4. 检查和记录无-模板对照 Ct 值并确认它们  $> 7.0Ct (> 100X)$ , 高于任何化合物治疗样品的 Ct。

[1833] 3.5.5. HCV RNA 标准 Ct 值与先前结果比较。

[1834] 3.5.6. HCV RNA 标准曲线与先前结果比较。

[1835] 3.5.7. 如果在个别孔异常的放大是明显的,识别并记录那些孔。

[1836] 3.5.8. "结果" 文件由 7700 计算机输出并转移至采用 Microsoft Excel 分析的另一计算机。

[1837] 3.5.9. 报道在采用的试剂制备或稀释中的任何以下变化。

[1838] 卖方新探针或引物合成。

[1839] 新探针或引物稀释并等份。

[1840] 新标准 RNA 转录物制备。

[1841] 新标准 RNA 转录物稀释并等份。

[1842] 新 BVDV 病毒制备。

[1843] 新列 11 标准的制备。

[1844] 3.6 **TaqMan**<sup>®</sup> 数据分析。

[1845] 3.6.1. 复制和粘贴 **TaqMan**<sup>®</sup> HCV Ct 值,并且由 **TaqMan**<sup>®</sup> 结果文件复制值进入复制子分析数据分析 Microsoft Excel 宏的适当小区,运行该宏。

[1846] 3.6.2. 由宏表复制 **TaqMan**<sup>®</sup> 结果表至另一表上,输入化合物序号和批号。

[1847] 3.6.3 由此 excel 表,计算 5 个平行测定和无化合物对照中的所有稀释点的平均、标准偏差和化合物抑制活性的 CV 百分比,以及 HCV 复制数、HCV Ct 值和 BVDV Ct 值(如果有用)。

[1848] 3.6.4. BVDV 对照 **TaqMan**<sup>®</sup> 的数据舍去和执行标准。检查所有计算。舍去数据点或全部系板。如果方案存在显著偏差、试剂故障或不幸之事,或者 ABI 7700 运行失败,可以舍去数据。为了由明显正常运行舍去任何数据点,必须符合这些标准的一个或多个。活性化合物中抑制百分比的标准偏差应小于 30%。HCV 复制数的 % CV 应小于 30%。所有样品的 HCV Ct 标准偏差应小于 0.5;大多数样品中这通常是约 0.1 至 0.3。如果 HCV Ct 标准偏差大于 0.5,于是返回原始数据表,并检查 5 个平行测定的 Ct 值。如果任何一个孔的 Ct 值是不同于 5 个平行测定的平均 Ct 值的 2Ct,于是此孔应从该分析中忽略。如果超过 3 个孔

(不在同一列上)具有不寻常的  $C_t$  值,于是应该实行 BVDV **TaqMan**<sup>®</sup> 内部对照分析。如果 BVDV 数据显示不规则,于是再试验该化合物。

[1849] 3.6.5.  $IC_{50}$  计算:复制和粘贴平均抑制数据和标准偏差进入具有采用非线性回归法的变斜率计算器的 S 形剂量反应。采用这种工具,使用两种方法计算  $IC_{50}$ :固定顶点仅在 100% 抑制,或者固定顶点在 100% 抑制,底在 0% 抑制。接着报道每个化合物产生最清楚配合的方法。最可信  $IC_{50}$  来自具有最低标准误差的计算。如果由这两个曲线拟合选项计算的  $IC_{50}$  显示大于一倍差异,或者如果  $IC_{50}SD$  大于  $IC_{50}$ ,在调整过的浓度应再试验该化合物。

[1850] HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂组合干扰素作用的计算

[1851] 在复制子分析中通过有各种水平的干扰素时产生 HSP1 剂量反应曲线,或者通过测定有各种 HSP1 水平时干扰素的剂量反应曲线,可以评估 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂 (HSP1) 和干扰素的组合作用。目标是评估如果这两种药物产生对 RNA 的加和作用,是否有比预期更多或较少的病毒 RNA 蓄积抑制。更具体地,使用 Lowe 的加法性定义 ((1928) Die Quantitation Probleme der Pharmakologic, Ergebn. Physiol., 27, 47-187)。这如下定义。令  $D_{E,INF}$  为产生作用 E 的干扰素浓度,并且令  $D_{E,HSP1}$  为产生作用 E 的蛋白酶抑制剂浓度。

$$[1852] \quad 1 = \frac{D_1}{D_{E,INF}} + \frac{D_2}{D_{E,HSP1}} \quad (1)$$

[1853] 接着通过以下关系定义无相互作用或低加法性,这里  $D_1$  浓度的 INF 和  $D_2$  浓度的 HSP1 的组合产生作用 E。

[1854] 协同或拮抗程度以等效曲线或 Isobol 表示。组合 ( $D_1, D_2$ ) 是轴是干扰素和 HSP1 浓度的图中的点 (图 2)。所有产生有效水平 E 的这种组合形成 E 作用 Isobol。( $D_{E,INF}, 0$ ) 和 ( $0, D_{E,HSP1}$ ) 是 Isobol 上的点的情形是必需的。当满足加和关系 (1) 时 Isobol 是直线连接点 ( $D_{E,INF}, 0$ ) 和 ( $0, D_{E,HSP1}$ )。

[1855] 上凹的 Isobol 表示协同,下凹的 Isobol 表示拮抗。按照 Berenbaum 指南, M. C. ((1985) The expected effect of a combination of agents: the general solution. J. Theor. Biol., 114, 413-431), 以及 Greco, Park 和 Rustom ((1990) Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diamminedichloroplatinum and 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosylcytosine, Cancer Research, 50, 5318-5327), 加一项至 (1) 以计算协同或拮抗。该方程定义为在所有治疗组合适于百分比对照值的反应面。源自这种适合的反应面的轮廓绘图是 Isobol。

[1856] 反应面模型假定适于每个化合物的 S 形剂量反应如 (2) 定义。

$$[1857] \quad E = \frac{E_{max}}{1 + \left(\frac{[Drug]}{IC50}\right)^n} + B \quad (2)$$

[1858] 单独产生规定水平活度 E 的浓度由 (3) 给出

$$[1859] \quad D_{E,INF} = IC50_{INF} \left( \frac{E - B}{E_{max} - E + B} \right)^{1/m_{INF}} \quad D_{E,HSP1} = IC50_{HSP1} \left( \frac{E - B}{E_{max} - E + B} \right)^{1/m_{HSP1}} \quad (3)$$

[1860] 为了满足 Greco 等. (1990) 的模型,对于产生反应水平 E 的药物的每一组合,药物的联合作用接着必需满足方程 (4)。

$$\begin{aligned}
 [1861] \quad & 1 = \frac{[INF]}{IC50_{INF} \left( \frac{E-B}{E_{max}-E+B} \right)^{1/m_{INF}}} + \frac{[HSPI]}{IC50_{HSPI} \left( \frac{E-B}{E_{max}-E+B} \right)^{1/m_{HSPI}}} \\
 [1862] \quad & + \frac{\alpha [INF][HSPI]}{IC50_{INF} IC50_{HSPI} \left( \frac{E-B}{E_{max}-E+B} \right)^{1/2m_{INF}} \left( \frac{E-B}{E_{max}-E+B} \right)^{1/2m_{HSPI}}} \quad (4)
 \end{aligned}$$

[1863] 参数  $\alpha$  测量相互作用的量。 $\alpha$  的零值指无相互作用或加法性,由于该方程在  $\alpha = 0$  时减少至 (1)。给出  $IC_{50}$ 、Hill 斜率 ( $m$ )、最大值 ( $E_{max}$ ) 和最小值 ( $B$ ),解方程,得出由组合 [INF] 和 [HSPI] 的任何治疗产生的作用。因此,此方程定义为反应表面。给出 [INF] 和 [HSPI] 变动的试验,采用非线性加权最小二乘回归选择参数。参数  $\alpha$  与协同测量  $S$  相关 (Hewlett, P. S. (1969) Measurement of potencies of drug mixtures. *Biometrics*, 25, 477-487),它直接取自 50% 作用时的 Isobol。S 是原点至 Isobol 定义加法性的距离,原料至拟合数据 Isobol 的距离,沿该线于与轴成 45 度时的比 ( $S = ON/OM$  参见图 3)。关系是  $\alpha = 4(S^2 - S)$ 。

[1864] 在评估一系列实验测试 HSPI 组合几种不同的干扰素的协同度之后是以上 Greco 等. (1990) 讨论的用于拟合反应表面和测定具有显著水平的协同参数  $\alpha$  的方法。然而,需要具有较低计数的加权观测大于具有较高计数的那些。这种计数直接与百分比对照相关,这是作用  $E$ 。采用 Carroll, R. J. 和 Rupert, D. ((1988) 描述的方法 ((1988) (Transformation and Weighting in Regression, Chapman and Hall, New York), 观察孔至孔的变异性,以增加平均百分比对照值的平方。因此,加权的观测在拟合百分比对照值 ( $E$ ) 平方之上。用于分析这些试验的方差和加权与研究分析放射性配体分析方法的研究人员观测的变异性关系一致 (Finney, D. J., (1976), Radioligand assay, *Biometrics*, 32, 721-740, and Dudley, R. A. Edwards, P., Ekins, R. P., McKinzie, I. G. M., Raab, G. M., Rodbard, D. and Rodgers, R. P. C. (1985), Guidelines for Immunoassay Data Processing, *Clinical Chemistry*, 31/8, 1264-1271)。

#### [1865] 结果

[1866] 初期的实验中,试验  $3 \mu M$  至  $0.0123 \mu M$  浓度范围,即 244 倍范围的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂化合物 CU。干扰素  $-\alpha 2B$  浓度在每个样品 30 单位至每个样品 0.0096 单位变动,即 3125 倍范围。

[1867] 如表 7 所示,当作为单一药物治疗时,化合物 CU 显示  $0.48 \mu M$  的  $IC_{50}$ ,干扰素  $IC_{50}$  是 2.19U。在复制子分析的精密度内,大约为 20%,干扰素  $-\alpha 2B$  的添加导致复制子 RNA 蓄积抑制以剂量依赖方式增加。例如,以  $0.333 \mu M$  化合物 CU 治疗的细胞导致 28% 的复制子 RNA 蓄积抑制。细胞以  $0.333 \mu M$  化合物 CU (它是  $IC_{50}$  ( $0.469 \mu M$ ) 剂量的 71%) 和  $0.24U$  干扰素  $-\alpha 2B$  (它是干扰素  $-\alpha 2B$   $IC_{50}$  ( $2.05 \mu M$ ) 剂量的 11%) 联合治疗时,导致 49% 的复制子 RNA 蓄积抑制。因此,71% 一个  $IC_{50}$  剂量组合 11% 的其它物质导致 49% 的抑制复制子 RNA 累积。采用直觉方法确定联合治疗是否是协同或加和或者拮抗,人们可以预期,如果联合治疗的作用仅是加和性的,则人们可以期望得到 49% 的复制子 RNA 蓄积抑制所需的这两种  $IC_{50}$  剂量的结合部分是 98%。我们的实验结果证实采用 71% 加 11%,即 82% 的  $IC_{50}$  剂量而不是 98%,达到复制子 RNA 蓄积的抑制水平,正如联合治疗的加和作用所预言的。因

此,在化合物的这些浓度,作用似乎是协同的,由于获得 49% 的 HCV 复制子 RNA 抑制所使用的每个化合物的  $IC_{50}$  剂量比任一单独化合物所需的(其中将需要 98% 的  $IC_{50}$  剂量)较少部分剂量。该联合治疗的结果如表 8 所示和图 1 所图示。

[1868] 表 7

[1869] 以化合物 CU 和干扰素 - $\alpha$  2B 个别或组合干扰素 - $\alpha$  2B(单位)治疗 48 小时之后复制子 RNA 蓄积的抑制

化合物	30 U	6 U	1.2 U	0.24 U	0.048 U	0.0096 U	0 U
CU (浓度)							
3 $\mu$ M	99%	99%	99%	99%	98%	98%	98%
1 $\mu$ M	99%	98%	96%	95%	92%	93%	88%
[1870] 0.333 $\mu$ M	94%	87%	66%	49%	33%	27%	28%
0.1111 $\mu$ M	93%	79%	46%	29%	12%	15%	11%
0.0370 $\mu$ M	92%	78%	44%	21%	2%	7%	8%
0.0123 $\mu$ M	92%	78%	44%	20%	19%	19%	5%
0 $\mu$ M	89%	73%	38%	16%	8%	12%	0%

[1871] 这些原始结果,如较早声明的经由利用体外复制子分析和通过该分析产生数据的简单加和性分析得到的,证明复制子细胞以 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂和干扰素联合治疗至少产生加和性抗病毒作用,并且有可能是协同抗病毒作用。

[1872] 采用上述的形式数学工具再分析前面的数据,确定 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂 CU 和干扰素  $\alpha$ -2B 之间的关系是否为协同、加和或拮抗。表 8 以数字、图 4 以图示显示了再分析的数据。

[1873] 表 8 进一步概述了以各种本发明的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂和几种不同的干扰素个别或联合治疗含复制子细胞 48 小时之后,复制子分析中所得的结果。我们指出在复制子分析中测量抑制 HCV 复制子 RNA 的值的标准偏差是~20%。在广泛的浓度范围内和不引起 HCV 复制子 RNA 浓度显著抑制的较低化合物浓度试验化合物。由于分析的标准偏差是~20%,一些数据点会产生负数。负抑制数表明在个别试验中,化合物治疗的样品内的平均 HCV 复制子 RNA 分子多于模拟治疗样品。

[1874] 表 8

[1875] 以 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂和各种干扰素个别或联合治疗 48 小时之后复制子 RNA 蓄积的抑制

[1876] 实验 1

IFN alpha-2B (单位)

		30.00	6.00	1.20	0.24	0.048	0.0096	0.000	
[1877]	化合物 CU ( $\mu\text{M}$ )	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%

## [1878] 实验 2

IFN alpha-2A (单位)

		30	6	1.2	0.24	0.048	0.0096	0	
[1879]	化合物 CU ( $\mu\text{M}$ )	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%

## [1880] 实验 3

化合物 CU ( $\mu\text{M}$ )

		3	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.0234	0	
[1881]	干扰素 alpha-2B (单位)	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%

## [1882] 实验 4

		化合物 CU ( $\mu\text{M}$ )									
		3	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.0234	0	
[1883]	干扰素 alpha-2A (单位)	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%

## [1884] 实验 5

		化合物 CU ( $\mu\text{M}$ )									
		3	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.0234	0	
[1885]	羊 干扰素 tau (单位)	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%

## [1886] 实验 6

		化合物 EC ( $\mu\text{M}$ )									
		3	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.0234	0	
[1887]	干扰素 alpha 2B (单位)	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%

## [1888] 实验 7

		化合物 EC ( $\mu\text{M}$ )									
		3.0	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.02344	0	
[1889]	干扰素 alpha-2A (单位)	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%

## [1890] 实验 8

		化合物 CU ( $\mu\text{M}$ )									
		3.0	1.5	0.75	0.375	0.1875	0.0938	0.0469	0.02344	0	
[1891]	干扰素 beta (单位)	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%	99%	99%	98%	98%	97%

## [1892] 实验 9

		化合物 EP ( $\mu\text{M}$ )									
		8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0	
[1893]	干扰素 alpha-2B (单位)	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%

## [1894] 实验 10

		利巴韦林 (μM)								
		200	80	32	12.8	5.12	2.048	0.8192	0.3277	0
	0	85%	62%	43%	3%	-8%	-17%	-22%	-6%	0
干扰素	0.0492	87%	66%	48%	44%	11%	-4%	-10%	11%	-7%
alpha-2B	0.1229	84%	64%	53%	40%	26%	-12%	-5%	11%	-9%
(单位)	0.3072	86%	70%	62%	44%	28%	1%	6%	14%	7%
[1895]	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%

[1896] 如图 4-13 所示,它以图显示描述表 8 中采用上述测量协同的数学方法绘制的数据,试验的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂和干扰素的所有组合的 Isobol 曲线是上凹的,表明复制子分析中治疗的抗病毒作用是协同的。表 9 列出了这些结果,它表示联合治疗的有关协同水平和个别使用抗病毒化合物的 IC<sub>50</sub> 值。表 9 的关键因素是测定用的 α 值和 p- 值。α 术语是每个联合治疗的 Isobol 的最大感染的度量。α 值为零值表明加和,负值表示拮抗,并且在以以上所示的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂和干扰素联合治疗的情形时远大于表示协同数的值。α 参数越大,协同越强。如表 9 显示 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂和干扰素组会所示,即使忽略每个试验的显著水平,基于这 9 个平均 α 值为 0(无相互作用)的试验的 t 检验的 p 值为 0.00014,表明结果极显著。

[1897] 基于用于此分析的 Greco Rustom 法 ((1990)Application of aNew Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cisDiamminedchloroplatinum and 1-β -D-Arabinofuranosylcytosine, Cancer Research,50,5318-5327) 的 协 同 的 计 算 是 评 价 可 采 用 HCV 复 制 子 分 析 产 生 的 这 种 类 型 实 验 数 据 的 理 想 工 具。还 有 其 它 的 用 于 抗 病 毒 化 合 物 研 究 的 方 法,例 如 Pritchard 和 Shipman(Prichard, M. N., and Shipman, C. Jr., (1990) " Athree-dimensional model to analyze drug-drug interactions(review), " Antiviral Res 14 :181-206)。应用它们的协同计算方法至表 8 所示的数据亦表明复制子细胞与 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂和干扰素联合治疗会产生 HCV 复制子 RNA 蓄积的协同抑制(未显示数据)。

[1898] 表 9

[1899] 联合治疗的协同的相对水平和

[1900] 个别使用抗病毒化合物的 IC<sub>50</sub> 值

[1901] HCV 丝氨酸 IC<sub>50</sub> INF IC<sub>50</sub> HSPi α P 值

[1902] 蛋白酶 干扰素 (单位) (μ M) (SE)<sup>1</sup> α > 0

[1903] 抑制剂

[1904] (HSPi)

[1905]

实验1	化合物	CU	IFN alpha-2B	2.05	0.469	0.477 (0.09)	<0.0001
实验2	化合物	CU	IFN alpha-2A	3.72	0.446	0.770 (0.12)	<0.0001
实验3	化合物	CU	IFN alpha-2B	2.36	0.587	0.730 (0.08)	<0.0001
实验4	化合物	CU	IFN alpha-2A	5.67	0.633	0.438 (0.08)	<0.0001
实验5	化合物	CU	IFN tau	13.22	0.605	0.328 (0.07)	<0.0001
实验6	化合物	EC	IFN alpha-2B	2.53	0.384	0.516 (0.10)	<0.0001
实验7	化合物	EC	IFN alpha-2A	5.50	0.312	1.24 (0.20)	<0.0001
实验8	化合物	CU	IFN beta	1.82	0.466	0.551 (0.09)	<0.0001
实验9	化合物	EP	IFN alpha-2B	3.06	0.426	0.490 (0.12)	<0.0001
实验10	利巴韦林		IFN alpha-2B	1.22	145	-0.24 (0.067)	0.0004

(SE) 标准误差

[1906] 评价采用目前的HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂和干扰素的抗HCV 药物治疗的协同本质的另一措施是使用以上描述的相同方法评价目前HCV 标准联合治疗,即,在复制子分析中干扰素  $\alpha$ -2B 组合利巴韦林。表9的最后一行表示干扰素  $\alpha$ -2B 和利巴韦林混合物的  $\alpha$  参数是负数,表明在这两上药之间有少量的拮抗。这进一步强调本文公开的采用目前的HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂组合干扰素的联合治疗的显著性在于这些治疗明显产生协同,而用于HCV(干扰素  $\alpha$ -2B 组和利巴韦林)的标准联合治疗在复制子分析中无协同。

[1907] 先前在复制子分析中采用目前HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂加干扰素对利巴韦林加干扰素的联合治疗的比较清楚地表明前者是协同,后者不是。采用复制子分析得到的实验结果表明如果使用干扰素组合HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂,比组合利巴韦林使用干扰素  $\alpha$ -2B 时更低剂量的干扰素会是有效的。复制子分析是一种有效的检验有效的抗HCV 化合物的模型系统,目前作为有效的抗HCV 活性化合物预测者广泛地被依赖。注意,例如, Blight 等 . (2000)Efficient Initiation of HCVRNA Replication in Cell Culture. Science 8 ;290 :1972-1974, 和 Chung 等 . (2001)Hepatitis C virus replication is directlyinhibited by IFN-a in a full-length binary expression system. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 98 (17) :9847-52。单独的利巴韦林对于减少复制子分析中HCV 复制子RNA 的蓄积或多或少地有效(表8,实验10和表9的最后一行)。这个结果显然与体内研究矛盾,这里单独使用时,利巴韦林无显著的适于HCV 治疗的治疗价值。相反,在复制子分析中,如以下讨论的校正细胞毒性,利巴韦林具有  $145 \mu\text{M}$  的  $\text{IC}_{50}$ 。这个结果可通过意识到复制子分析允许评价高利巴韦林浓度(归因于体内细胞毒性这在人体治疗中会是不可能的)解释 (ChutaputtiA. (2000)Adverse effects and other safety aspects of thehepatitis C antivirals. Journal of Gastroenterology andHepatology. 15 Suppl :E156-63)。

[1908] 这种评价必需需要利巴韦林细胞毒性评估。这种毒性发生在患者和细胞分析内 (Shiffman M. L. , Verbeke S. B. , Kimball P. M. (2000)  $\alpha$  interferon combined with ribavirin potentiatesproliferative suppression but not cytokine production inmitogenically stimulated human lymphocytes. AntiviralResearch. 48 (2) :91-9)。在本文公开的试验中,两种方法观察和测量复制子分析中的利巴韦林细胞毒性。在确定复制子细胞生存力的XTT 代谢分析 (Roehm N. W. , Rodgers G. H. , Hatfield S. M. , GlasebrookA. L. (1991)An improved colorimetric assay for cellproliferation and viability

utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunol. Methods*. 142(2) :257-65) 和测量复制子分析内治疗和未治疗细胞的甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) mRNA 水平的 **TaqMan**<sup>®</sup> 定量 RT-PCR 分析内 (Brink N., Szamel M., Young A. R., Wittern K. P., Bergemann J. (2000) Comparative quantification of IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-10r, TNF $\alpha$  and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. *Inflammation Research*. 49(6) :290-6), 观察到显著的利巴韦林诱发的细胞毒性, 但是作如下校正。假定 GAPDH mRNA 水平, 它是连续表达的持家基因, 在所有活细胞内一样。由以转录抑制剂放线菌素 D 治疗的细胞内 GAPDH mRNA 水平的测量, 已知 GAPDH mRNA 的半衰期仅仅是几个小时 (数据未显示)。因此, 如采用 **TaqMan**<sup>®</sup> 技术测定人细胞内特定 mRNA 水平的其它方法一样, 假定在任何给定样品内, GAPDH mRNA 水平与活细胞数量 (VCN) 成比例, 关系是  $VCN = 2^{(40 - Ct_{GAPDH\ mRNA})}$ 。计算每个复制子分析样品的 VCN, 接着我们以该孔的 VCN 去除特定孔的 HCV 复制子 RNA 复制数。一旦计算出, 使用该比例代替 HCV 复制数以计算抑制 (" Avg. Inh using ratio" ; Fig 14. A)。没有校正这种细胞毒性的复制子分析数据, 这种细胞毒性被当作 HCV RNA 复制子蓄积的假阳性抑制。在复制子分析中, 假定测量的 HCV RNA 复制子蓄积抑制是 HCV RNA 复制子蓄积的实际抑制和归因于细胞毒性的 HCV RNA 复制子蓄积表面抑制的和。进一步假定, 基于细胞毒性的 XTT 和 **TaqMan**<sup>®</sup> GAPDH mRNA 测量的紧密相关, 由复制子分析中试验的化合物引起的 GAPDH mRNA 蓄积抑制是归因于细胞毒性的 HCV RNA 复制子累积的表面抑制的可靠量度。因此, 在校正常规细胞毒性的复制子分析内化合物真实的抗 HCV 活性可通过 VCN 去除每个样品内测量的 HCV 复制子 RNA 分子数估计, 从而标准化每个样品内活细胞数目。采用这种方法, 图 14 显示复制子分析中利巴韦林真实的抗 HCV 活性的估计 (" Avg. Inh using ratio" )。利巴韦林 IC<sub>50</sub> 的估计采用这种方法最好计算。图 14. A 中, " Avg. Inh original" 显示利巴韦林未校正的 IC<sub>50</sub>, 它大约是 80  $\mu$  M, 而由 " Avg. Inh using ratio" 曲线计算的校正的 IC<sub>50</sub> 值大约是 145  $\mu$  M。鉴于复制子分析的 ~ 20% CV, 作为干扰素  $\alpha$ -2B 治疗 (图 14. B) 的结果, 校正和测量的 HCV RNA 复制子蓄积抑制之间差别不明显。如同干扰素  $\alpha$ -2B, 在本实施例中试验的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂显示在采用的浓度无显著的细胞毒性。这采用 XTT 分析测定, 其中各种化合物的 TC<sub>50</sub> 值是: CU = 64.7  $\mu$  M, EP > 10  $\mu$  M, tEC > 50  $\mu$  M。这些 IC<sub>50</sub> 值比表 9 所示 IC<sub>50</sub> 值大 20-140 倍。因此, 复制子分析内, 在该分析的精密度内, 这些化合物的细胞毒性对 HCV RNA 的蓄积无显著影响, 由于这种细胞毒性仅仅在 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂浓度显著高于复制子分析内试验的那些时发生。

#### [1909] 关于个别和组合的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂和干扰素功效的结论

[1910] 本发明 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂和各种干扰素单独使用时的抗 HCV 活性在 HCV 复制子分析中如个别实验组成的仅采用一种抗病毒剂的表 8 的列和行所示。表 9 列出单独使用时测量的每个抗病毒化合物的 IC<sub>50</sub> 值。先前的结果, 利用这种体外复制子分析得到的, 亦证实以本发明的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂和各种干扰素联合治疗复制子细胞产生协同抗病毒作用。完全希望这些作用会转化成体内效力。

[1911] 采用本发明的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂联合治疗具有优于单一药物治疗的几种主要优点。首先, 通过进行可能具有低于单独使用时可能剂量的剂量的各自药物治疗, 人们会期望减少与治疗有关的毒性和副作用。这在干扰素治疗的情形下是特别重要的, 这里的副作用是严重的, 并且业已被显示与患者给药剂量成比例。先前的数据表明, HCV 丝氨酸蛋

白酶抑制剂如 CU 在  $IC_{95}$  水平的剂量可联合一定剂量（例如  $IC_{50}$  水平）的干扰素  $\alpha$ ，并且结果会是比单独的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂所能达到的更有效的治疗，没有不利的由高剂量的干扰素  $\alpha$  引起的副作用。联合治疗的第二主要优点在于由于这两种药物独立的作用，耐治疗的突变体 HCV 菌株发展的机会很少。耐药性的发展是如 HCV 的 RNA 病毒的主要考虑。由于它们的高变异率，这种病毒能够迅速适应外界影响。联合治疗的第三优点是成本减少，归因于需要更低量的有效治疗所需的治疗剂。

[1912] 本文公开的方法中能够采用的另外的免疫调节剂包括，例如， $\alpha$  干扰素 2A、共有干扰素， $\tau$  干扰素、干扰素 + 利巴韦林 (Rebatron)，聚乙二醇化干扰素和干扰素基因表达促进剂。可以完全预见，这些化合物的抗 HCV 活性例如在组合本文公开的那些的 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂时会被改善。由于已知干扰素体内和复制子分析内有活性，预计本发明 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制剂体内亦有活性，并且更重要地，在与干扰素、其免疫系统刺激剂或其它通过除了 HCV 丝氨酸蛋白酶抑制之外机理作用的具有 HCV 抗病毒活性的化合物联合使用时，能够引起协同活性。

[1913] 目前最好的 HCV 治疗采用干扰素  $\alpha$  和拟核苷利巴韦林。这种治疗仅仅是或多或少的有效，并且导致显著的副作用，即降低患者的配合性 (Chronic Hepatitis C: Current Disease Management, U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999)。此外，在移植患者中，利巴韦林 - 干扰素联合治疗是不明确的，并且事实上会比单独的干扰素差 (Chronic Hepatitis C: Current Disease Management, U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, 1999)。

[1914] 以上所示的结果证实干扰素与一种新类别的 HCV 抗病毒剂（本发明的丝氨酸蛋白酶抑制剂）使用时的协同组合作用。我们完全希望本文公开的体外结果会产生比目前可行的单独使用干扰素治疗更有效的 HCV 患者治疗。干扰素的亚治疗剂量会调动患者的免疫系统更好的斗争病毒，并且丝氨酸蛋白酶抑制剂会直接攻击病毒，经由不同的作用机理处置病毒两个分叉的攻击。因此，由于有效 HCV 抗病毒治疗所需的两种药物减小，患者能够获得减少成本的 HCV 感染治疗，这是基于减少的副作用和更少的必需药剂款项。

[1915] 本发明可以由不背离属于其精神或实质的其它特定形式实施。

采用干扰素 $\alpha$ -2B和化合物CU联合治疗

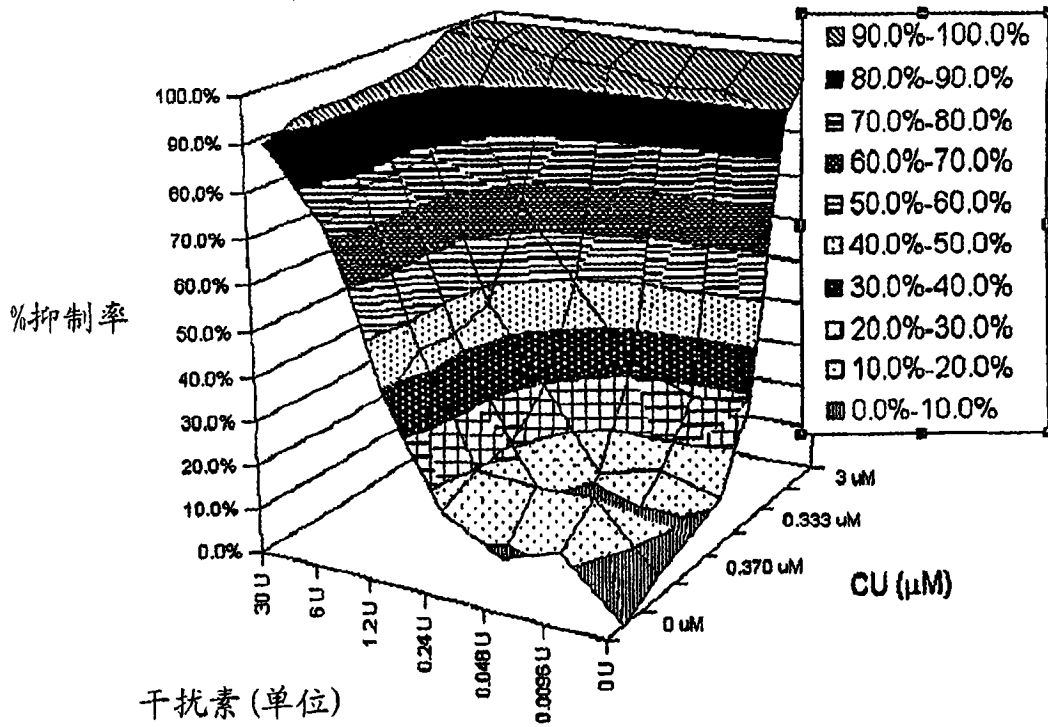


图 1

Isoboles 50%对照下

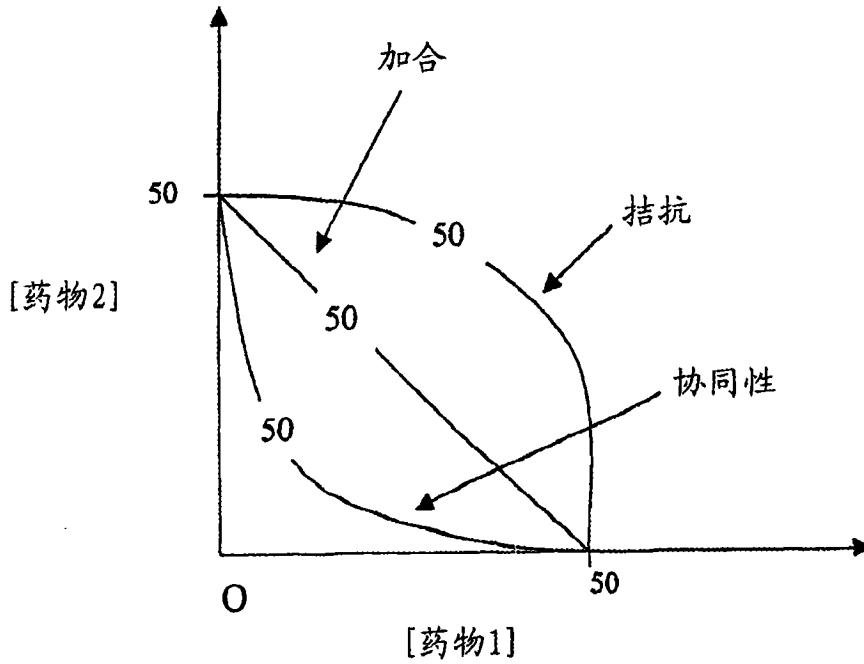


图 2

$[HSPi]/IC50_{HSPi}$

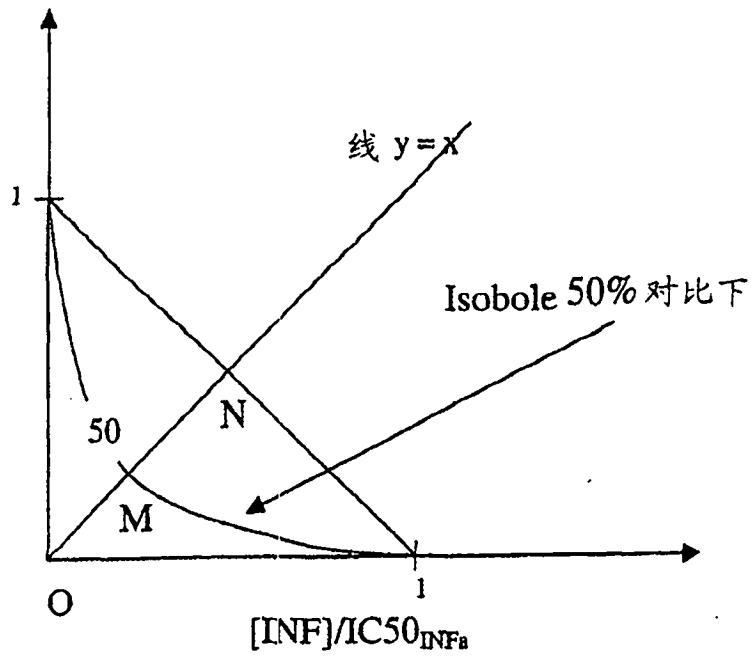


图 3

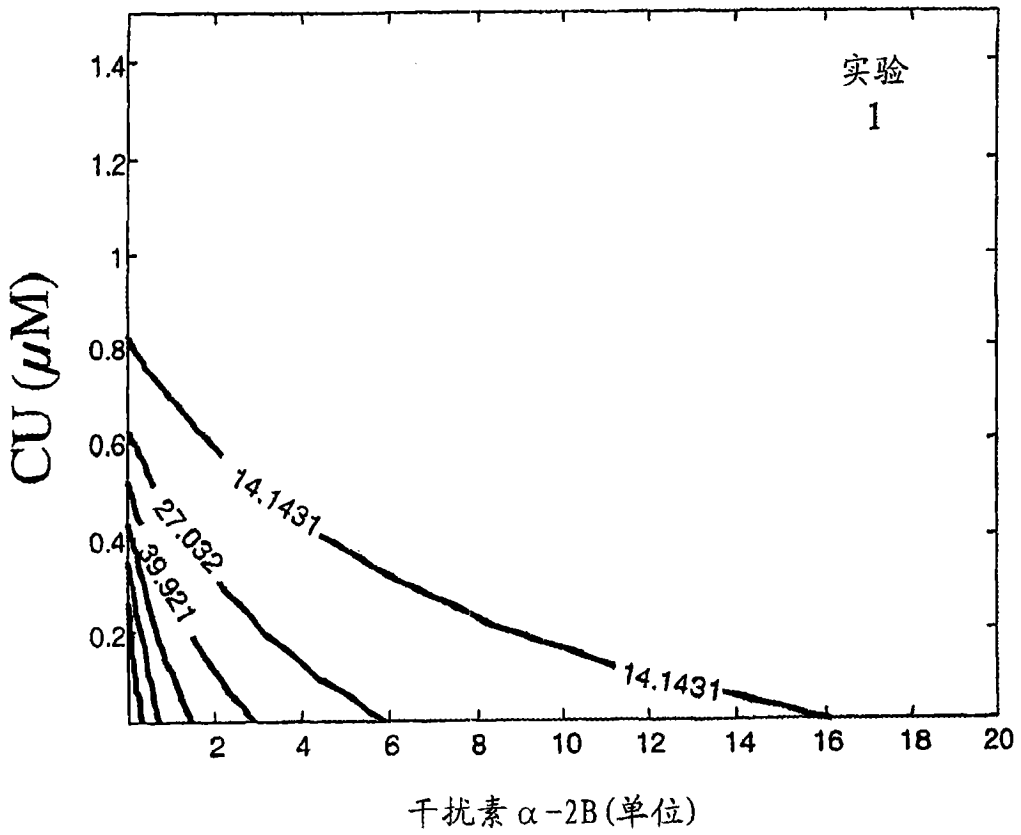


图 4

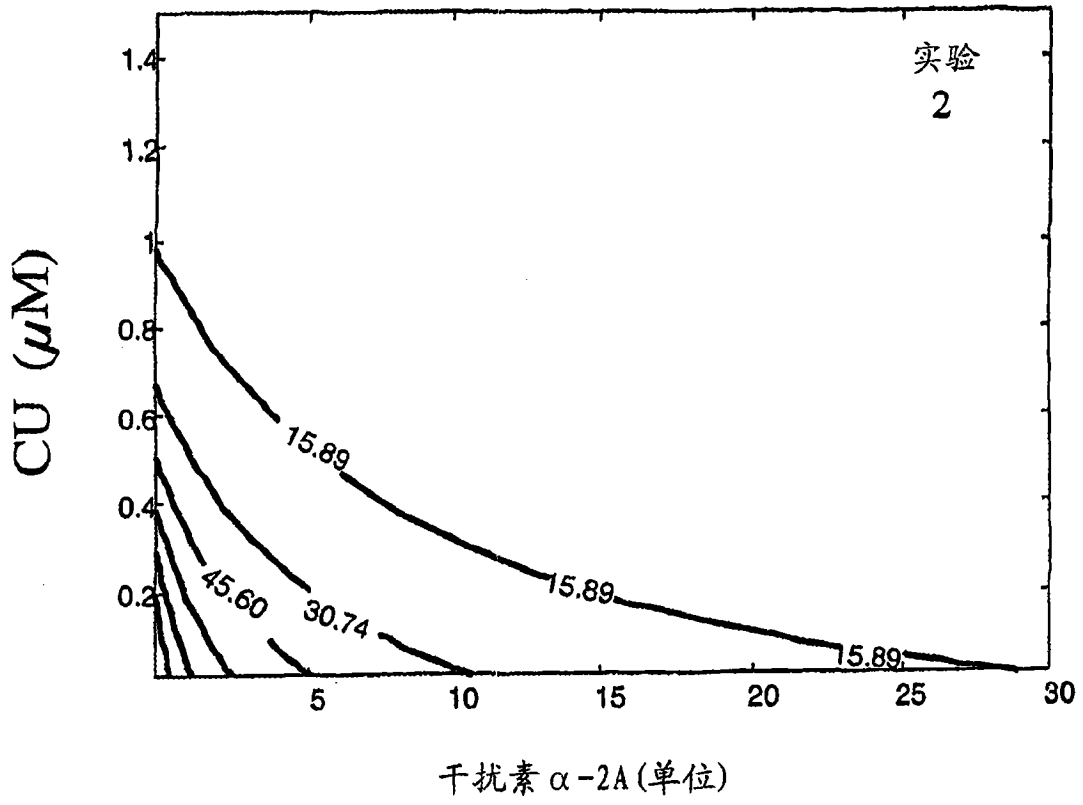


图 5

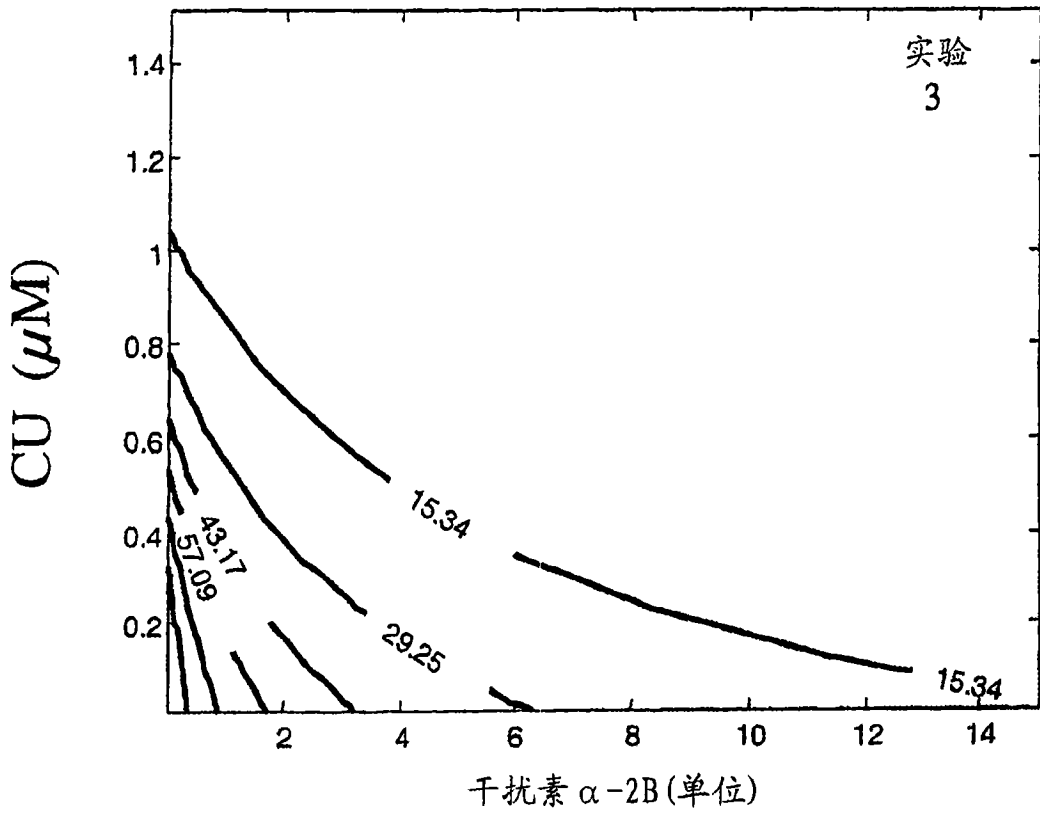


图 6

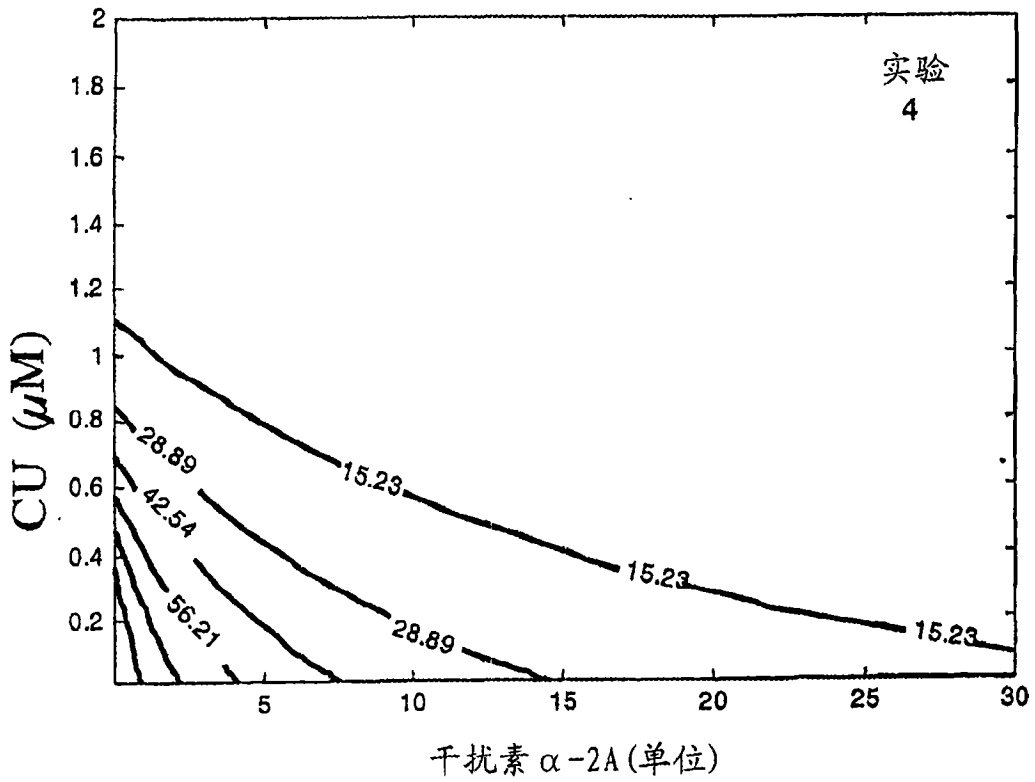


图 7

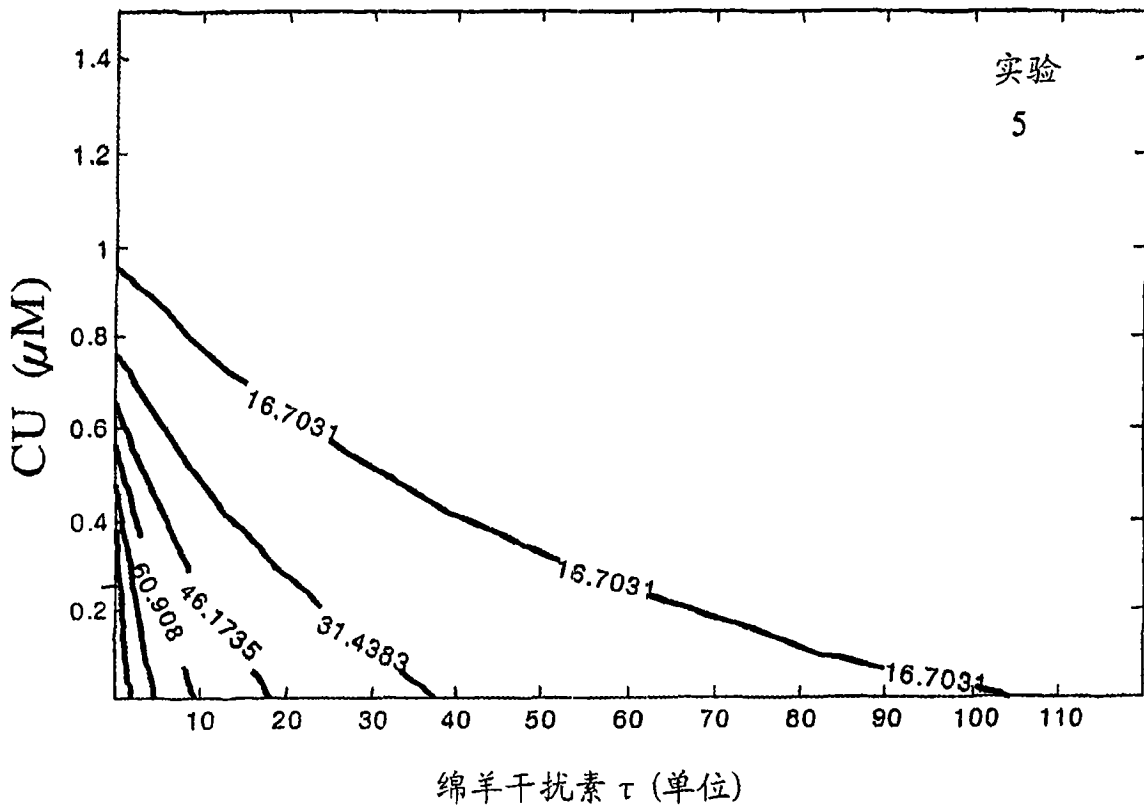


图 8

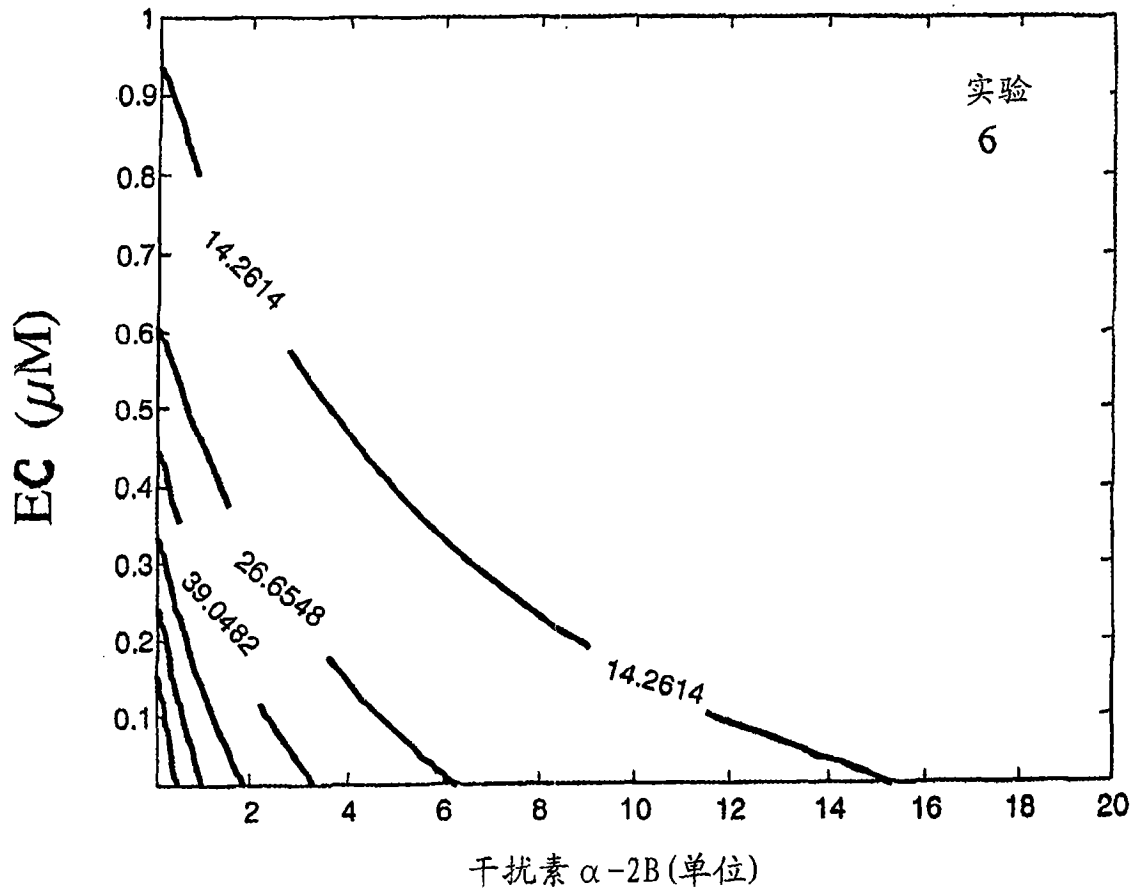


图 9

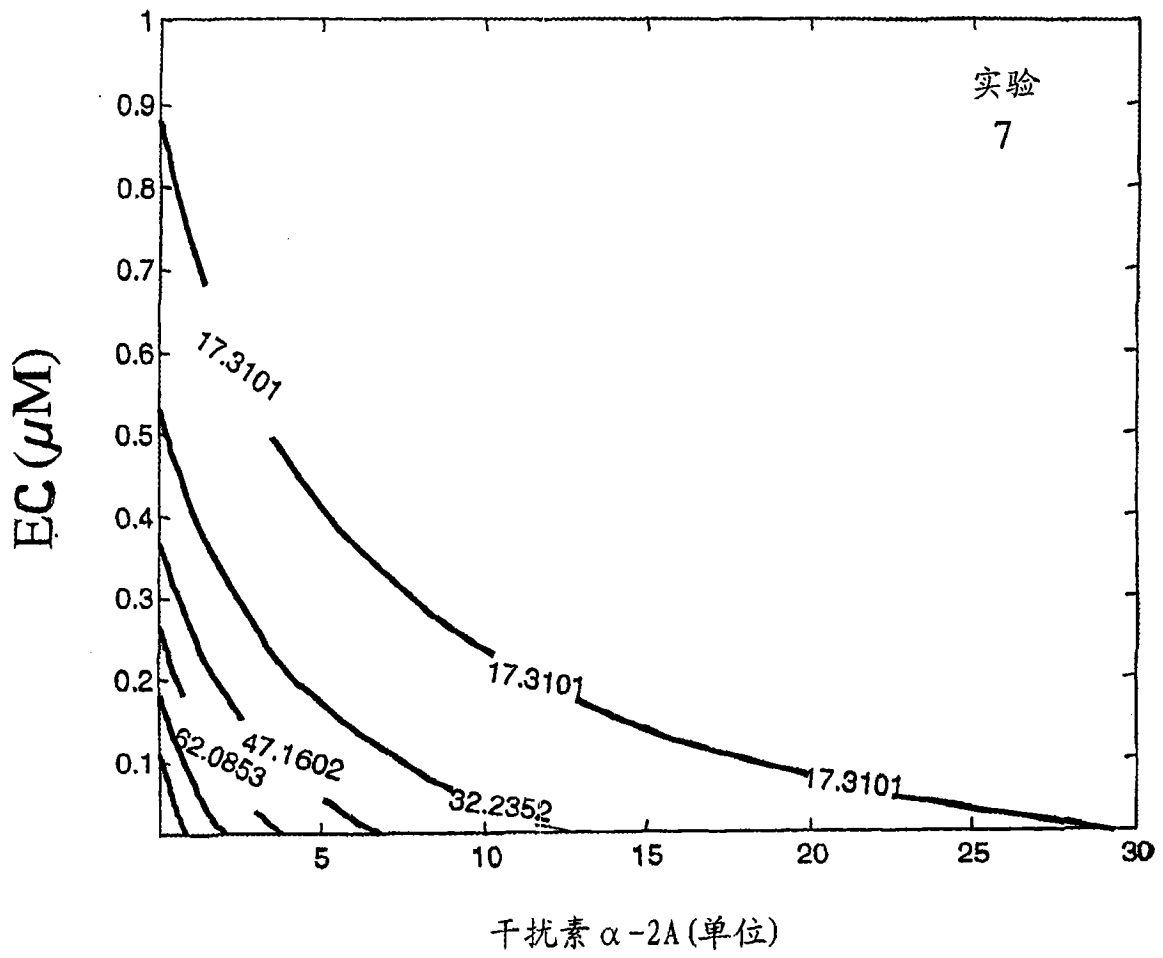


图 10

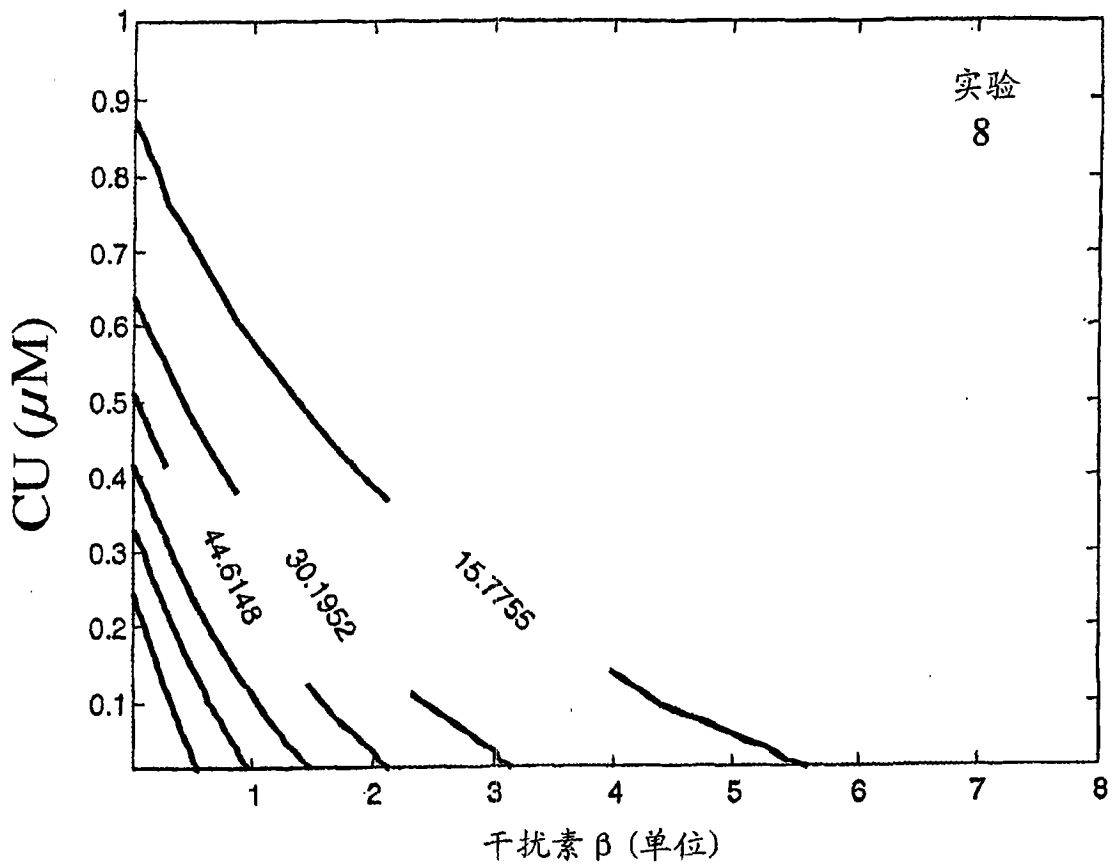


图 11

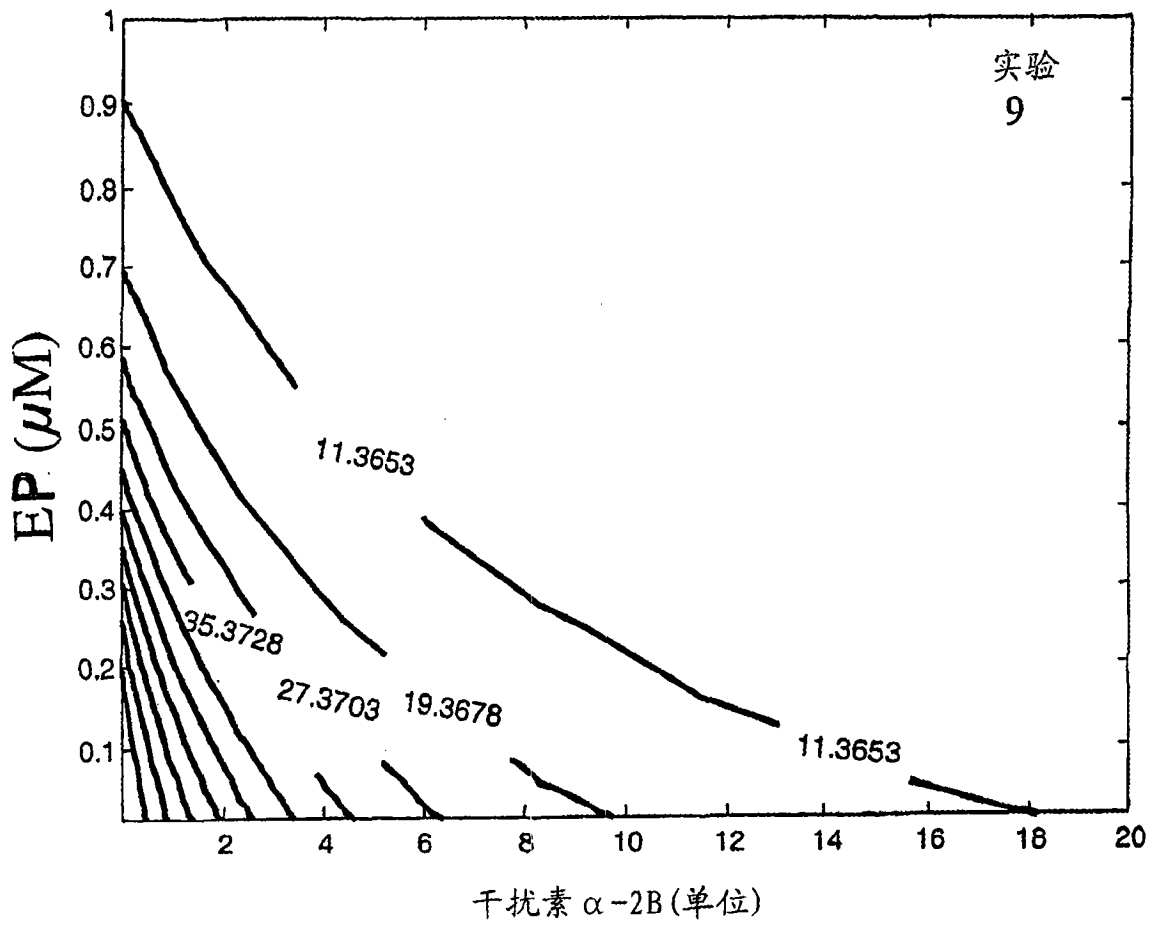


图 12

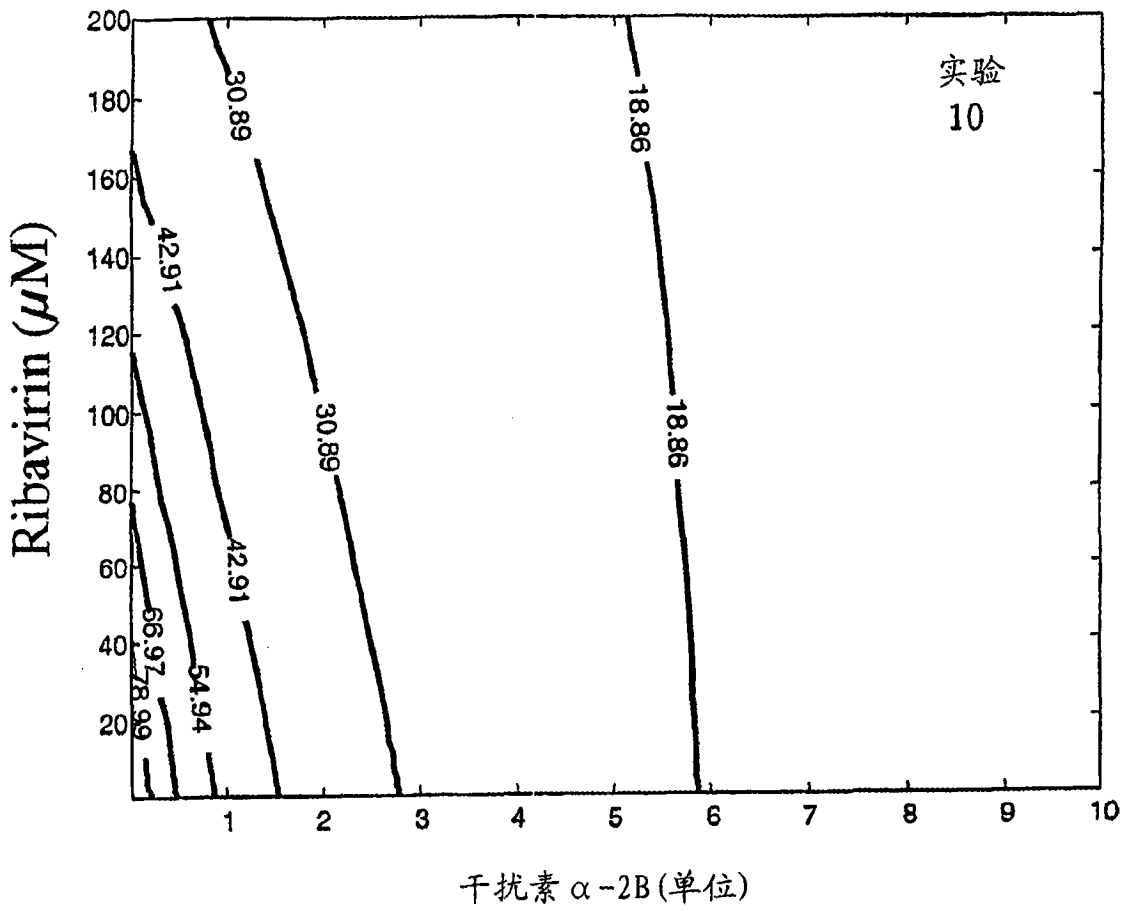


图 13

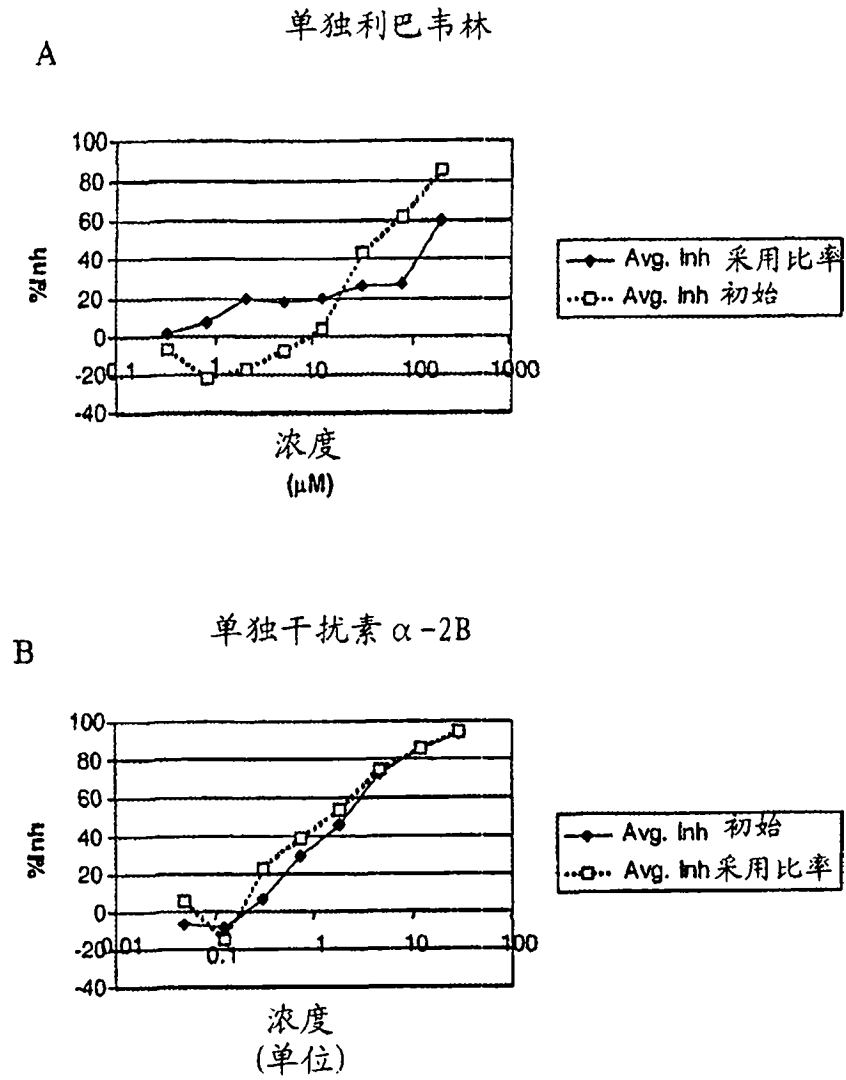


图 14