

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07D403/14



# [12] 发明专利申请公开说明书

A61K 31/395 A61P 31/00

A61P 35/00 C07D209/42

C07D207/34 C07D409/14

C07D401/14 C07D209/88

[21] 申请号 01811885.2

[43] 公开日 2003 年 8 月 27 日

[11] 公开号 CN 1439006A

[22] 申请日 2001.6.26 [21] 申请号 01811885.2

[30] 优先权

[32] 2000. 6. 27 [33] US [31] 60/214,478

[86] 国际申请 PCT/US01/20334 2001. 6. 26

[87] 国际公布 WO02/00650 英 2002. 1. 3

[85] 进入国家阶段日期 2002. 12. 27

[71] 申请人 基因实验室技术公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 张文涛 S·J·R·莱尔

M·D·弗里根 N·B·戴特金纳

J·伯特彦斯基 史东方

C·D·罗伯特 A·霍尔林

P·H·尼尔森 J·M·马乔斯基

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

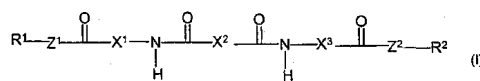
代理人 程 泳

权利要求书 14 页 说明书 115 页 附图 16 页

[54] 发明名称 具有抗细菌、抗真菌或抗肿瘤活性的新的化合物

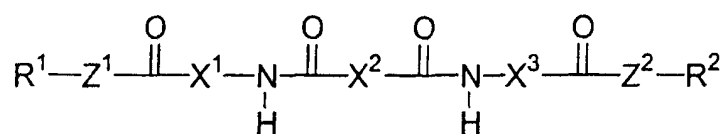
[57] 摘要

本发明提供了具有以下一个或多个活性的新的化合物：抗细菌活性、抗真菌活性和抗肿瘤活性。该化合物具有化学式(I)。也提供了含有这些化合物的药物组合物，以及制造和使用这些化合物的方法。



ISSN 1008-4274

1. 具有化学式 (I) 的化合物或其药学上可接受的酸加成盐:



(I)

其中:

$Z^1$  和  $Z^2$  独立地是  $-NR^3-$  或  $-O-$ , 其中  $R^3$  是氢或烷基;

$R^1$  和  $R^2$  独立地是取代的烷基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基, 前提是  $R^1$  和  $R^2$  中的至少一个是能形成药学上可接受的酸加成的盐的基团;

$R^3$  是氢、烷基, 或者  $R^3$  和  $R^1$  或  $R^2$  一起与它们所连接的原子形成杂环;

$X^2$  是芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、链烯基、炔基、环烷基或杂环;

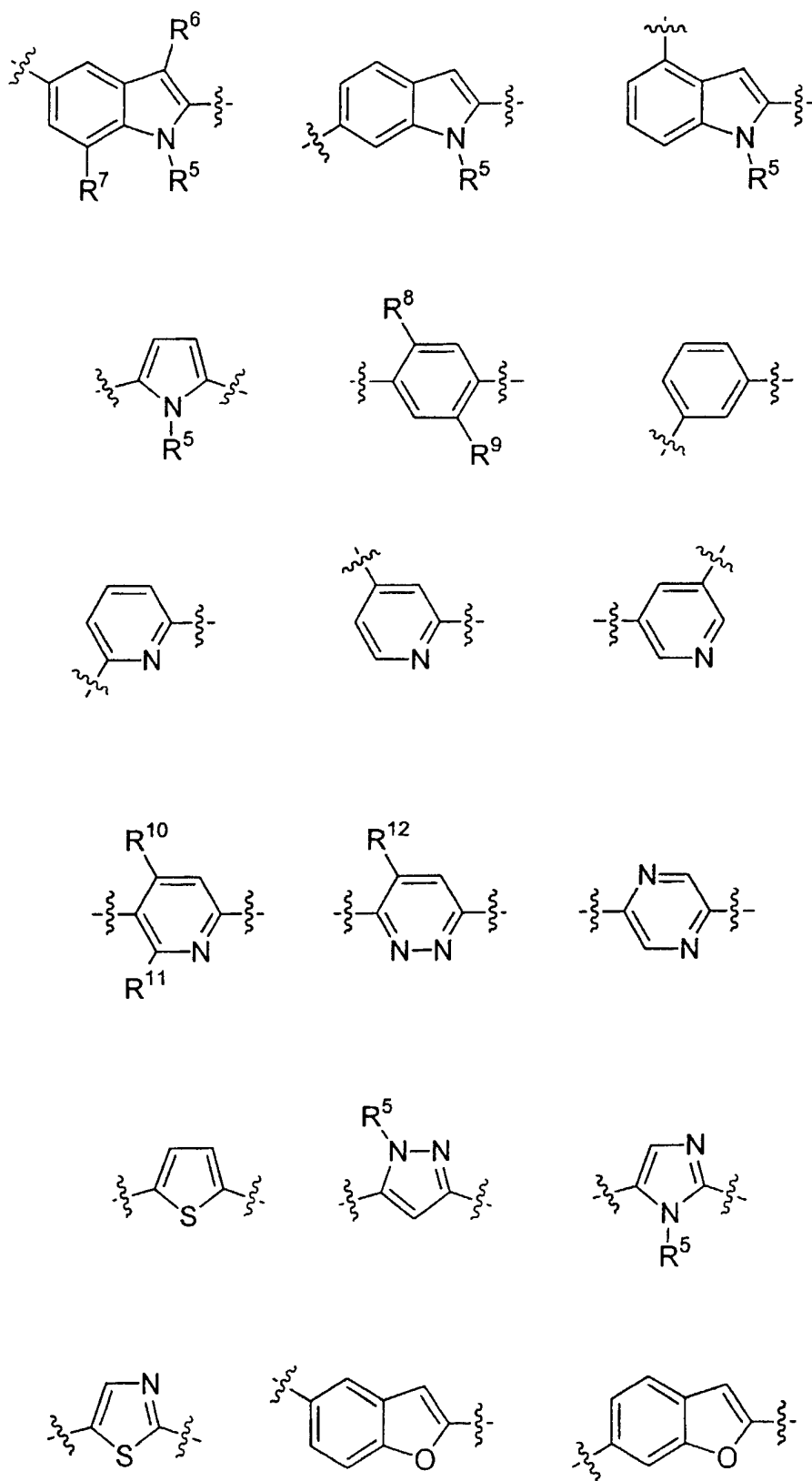
$X^1$  和  $X^3$  独立地是芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基或  $-CHR^4$ , 其中  $R^4$  是自然的或非自然的氨基酸侧链。

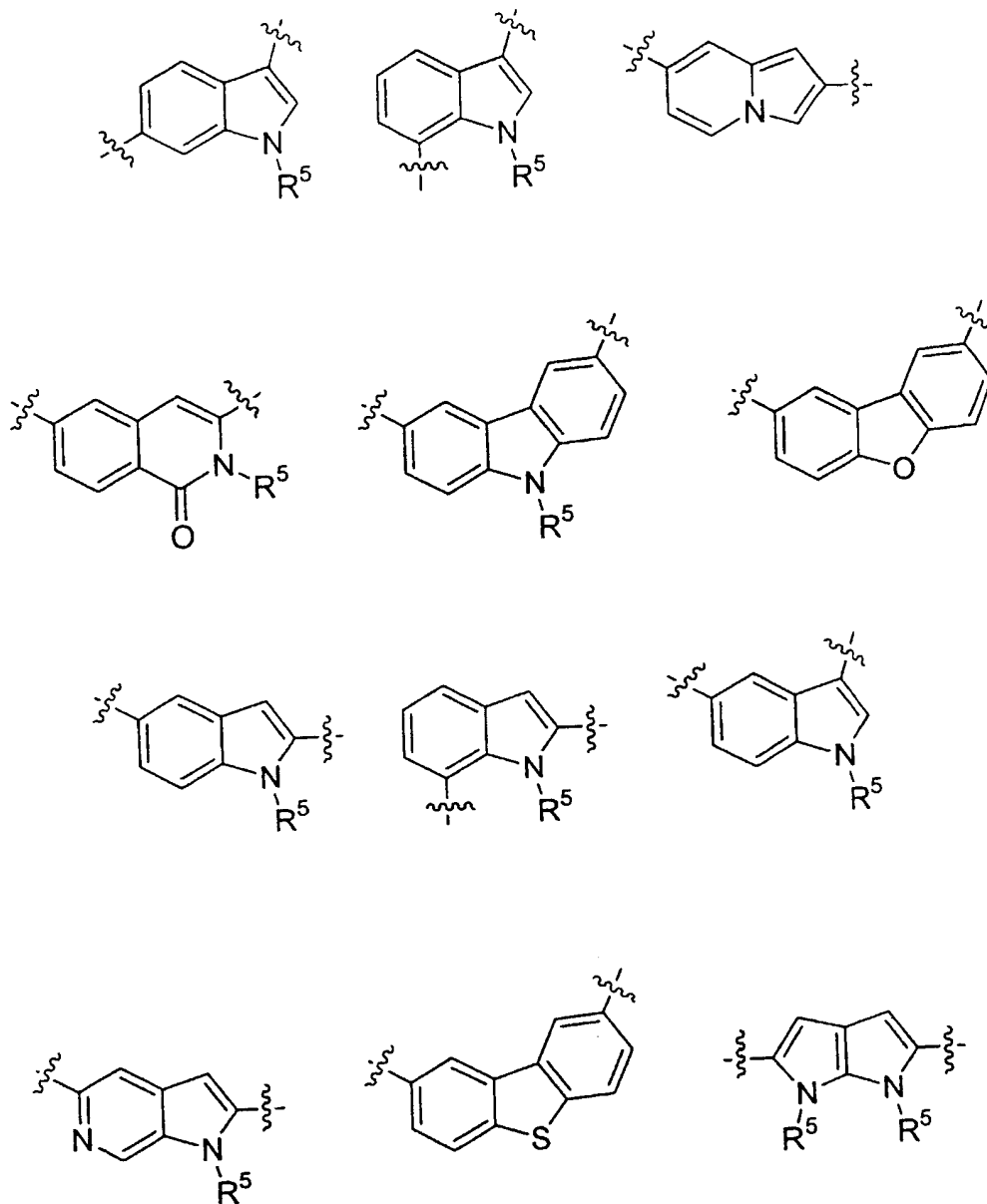
2. 权利要求 1 的化合物, 其中  $Z^1$  和  $Z^2$  是  $-NH-$ 。

3. 权利要求 2 的化合物, 其中  $X^2$  是芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基。

4. 权利要求 2 的化合物, 其中  $R^1$  和  $R^2$  独立地是取代的烷基基团。

5. 权利要求 3 的化合物, 其中  $X^2$  是选自如下部分的芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基部分:





其中:

R<sup>5</sup> 是氢、烷基或取代的烷基;

R<sup>6</sup> 是氢、烷基、卤素或烷氧基;

R<sup>7</sup> 是氢、烷基或卤素;

R<sup>8</sup> 是氢、烷基、取代的烷基、烷氧基或卤素;

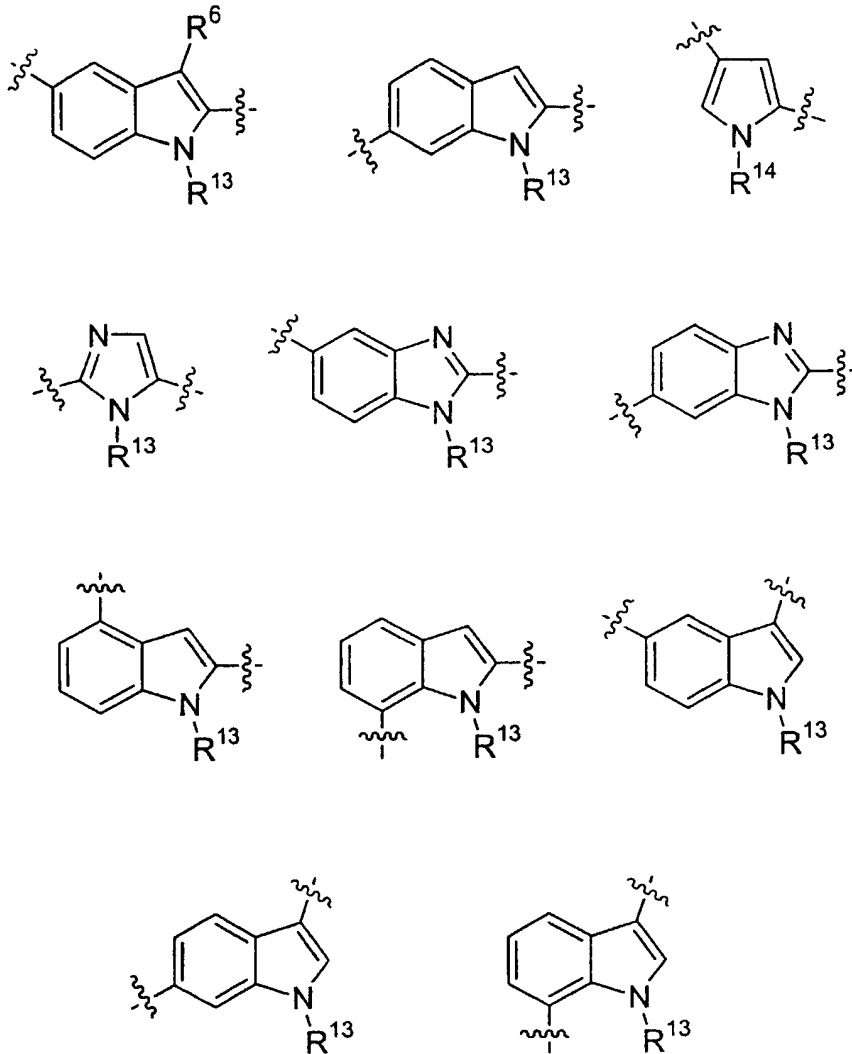
R<sup>9</sup> 是氢、烷基、取代的烷基、烷氧基、硝基或卤素;

R<sup>10</sup> 是氢或烷基;

R<sup>11</sup> 是氢或烷基;

R<sup>12</sup> 是氢或烷基。

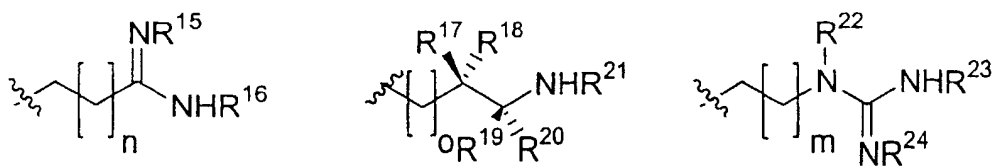
6. 权利要求 2 的化合物, 其中  $X^1$  和  $X^3$  是独立地选自以下部分的杂芳基或取代的杂芳基部分:



其中:  $R^{13}$  是烷基或氢;

$R^{14}$  是氢、烷基或取代的烷基。

7. 权利要求 4 的化合物, 其中  $R^1$  和  $R^2$  是独立地选自以下部分的取代的烷基部分:



其中:

$R^{15}$  是氢、羟基、烷氧基、烷基、环烷基或者  $R^{15}$  和  $R^{16}$  一起与它们所连接的原子形成杂环;

$R^{16}$  是氢、羟基、烷基或环烷基;

$R^{17}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{19}$  和  $R^{20}$  独立地是氢或烷基;

$R^{21}$  是氢、烷基、取代的烷基、环烷基或酰基;

$R^{22}$  是氢或烷基, 或者  $R^{22}$  和  $R^{23}$  一起与它们所连接的原子形成杂环, 或者  $R^{22}$  和  $R^{24}$  一起与它们所连接的原子形成杂环;

$R^{23}$  是氢、羟基、烷基、环烷基或者  $R^{23}$  和  $R^{24}$  一起与它们所连接的原子形成杂环;

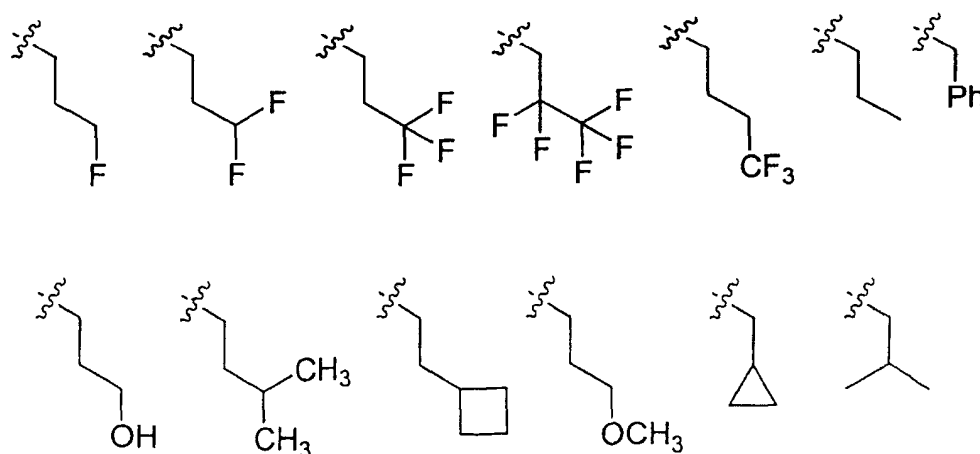
$R^{24}$  是氢、羟基或烷基;

$m$  是 1、2 或 3;

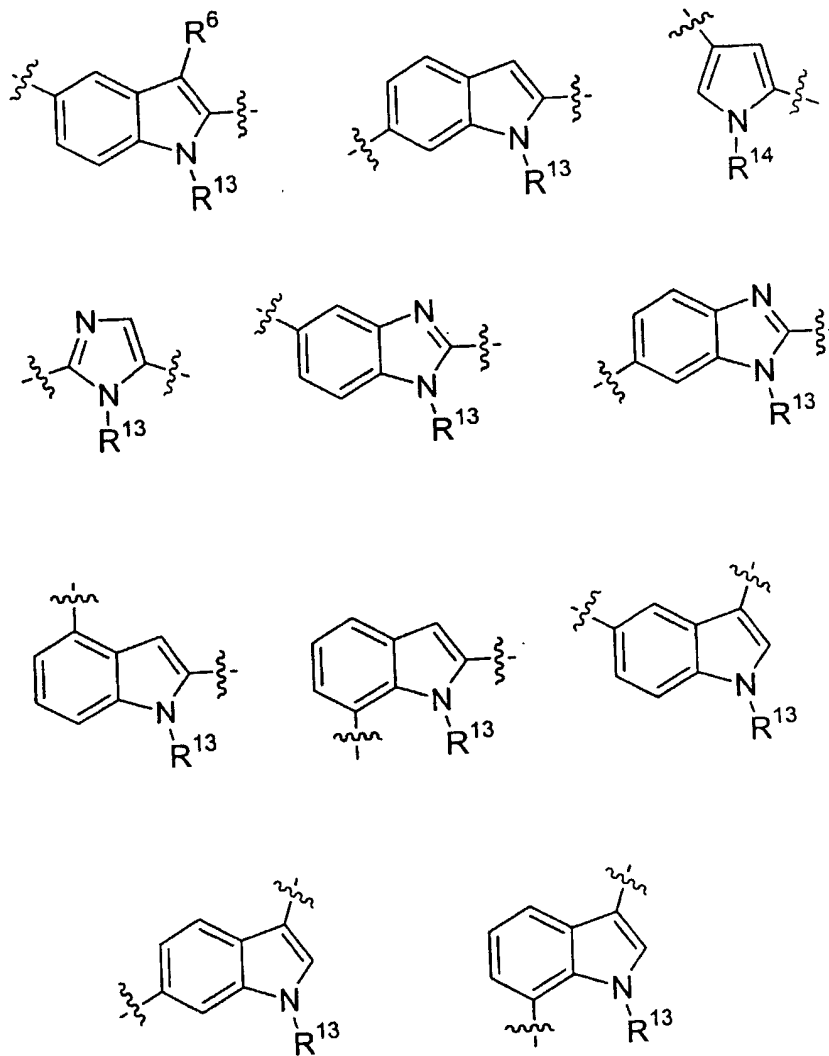
$n$  是 1、2 或 3;

$o$  是 0、1、2 或 3。

8. 权利要求 6 的化合物, 其中  $R^{14}$  是选自以下部分的烷基或取代的烷基部分:



9. 权利要求 5 的化合物, 其中  $X^1$  和  $X^3$  是独立地选自以下部分的杂芳基或取代的杂芳基部分:

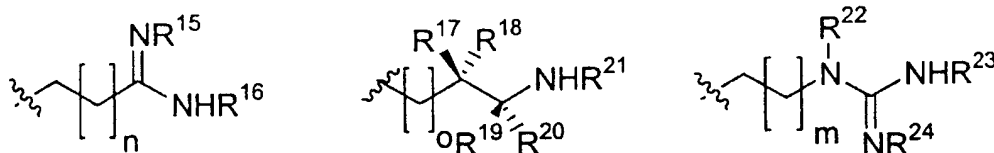


其中:

$R^{13}$  是烷基或氢;

$R^{14}$  是氢、烷基或取代的烷基;

$R^1$  和  $R^2$  是独立地选自以下部分的取代的烷基部分:



其中:

$R^{15}$  是氢、羟基、烷氧基、烷基、环烷基或者  $R^{15}$  和  $R^{16}$  一起与它们

所连接的原子形成杂环;

$R^{16}$  是氢、羟基、烷基或环烷基;

$R^{17}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{19}$  和  $R^{20}$  独立地是氢或烷基;

$R^{21}$  是氢、烷基、取代的烷基、环烷基或酰基;

$R^{22}$  是氢或烷基, 或者  $R^{22}$  和  $R^{23}$  一起与它们所连接的原子形成杂环, 或者  $R^{22}$  和  $R^{24}$  一起与它们所连接的原子形成杂环;

$R^{23}$  是氢、羟基、烷基、环烷基或者  $R^{23}$  和  $R^{24}$  一起与它们所连接的原子形成杂环;

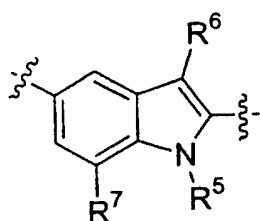
$R^{24}$  是氢、羟基或烷基;

$m$  是 1、2 或 3;

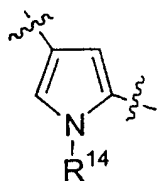
$n$  是 1、2 或 3;

$o$  是 0、1、2 或 3。

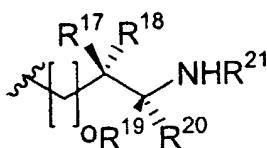
10. 权利要求 9 的化合物, 其中  $X^2$  是:



11. 权利要求 9 的化合物, 其中  $X^1$  和  $X^3$  都是:



12. 权利要求 10 的化合物, 其中  $R^1$  和  $R^2$  具有以下结构:



其中

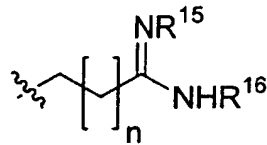


o 是 0;

$R^{17}$  和  $R^{18}$  是 氢;

$R^{21}$  是 氢、烷基或酰基。

13. 权利要求 11 的化合物, 其中  $R^1$  和  $R^2$  具有以下结构:



其中:

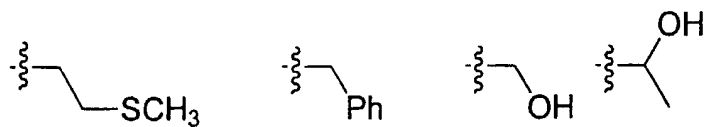
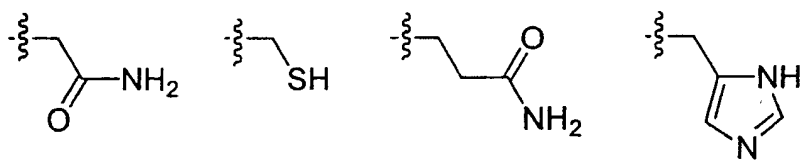
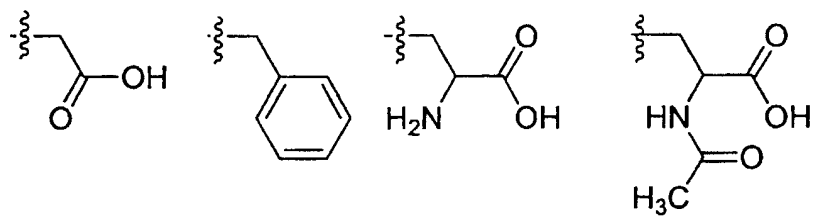
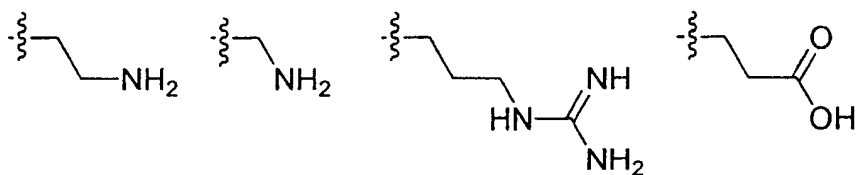
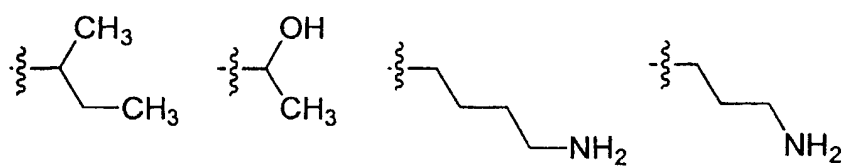
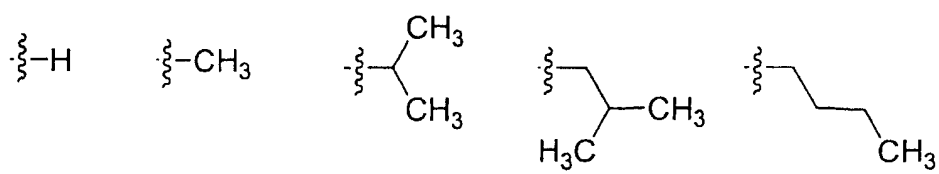
$R^{15}$  和  $R^{16}$  是 氢;

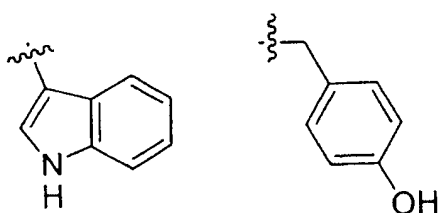
n 是 1 或 2。

14. 权利要求 12 的化合物, 其中  $R^{19}$  和  $R^{20}$  是 氢,  $R^{21}$  是选自甲基、乙基和丙基的烷基基团, 或具有结构  $-C(O)C(R^{25})(R^{26})H$  的酰基部分,

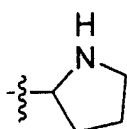
其中:

$R^{25}$  是选自以下取代基的取代基:



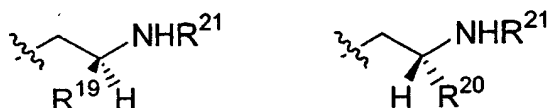


或者  $R^{25}$  和  $R^{26}$  一起与它们所连接的原子形成具有以下结构的杂环:



$R^{26}$  是选自  $-H$ 、 $-NH_2$  和  $-NHCH_3$  的取代基。

15. 权利要求 12 的化合物, 其中  $R^1$  和  $R^2$  独立地是以下结构中的一个:

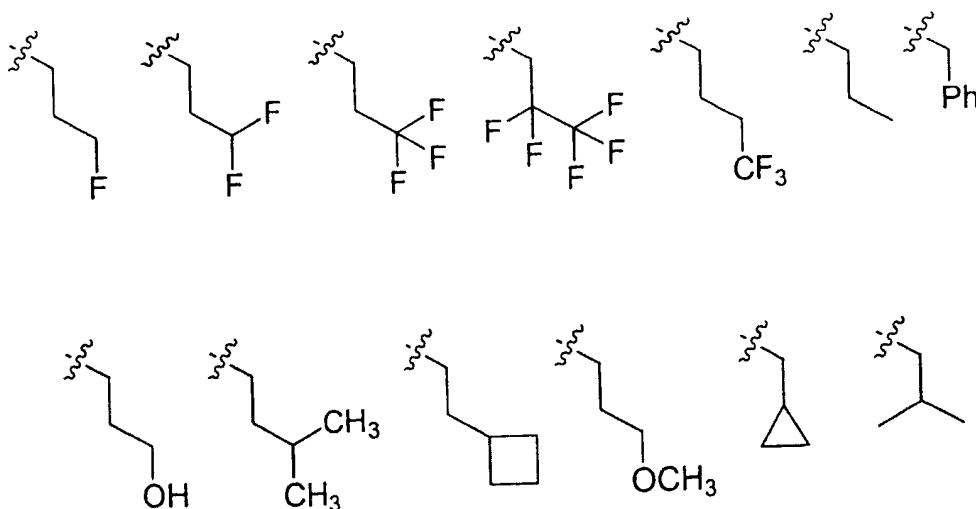


其中:

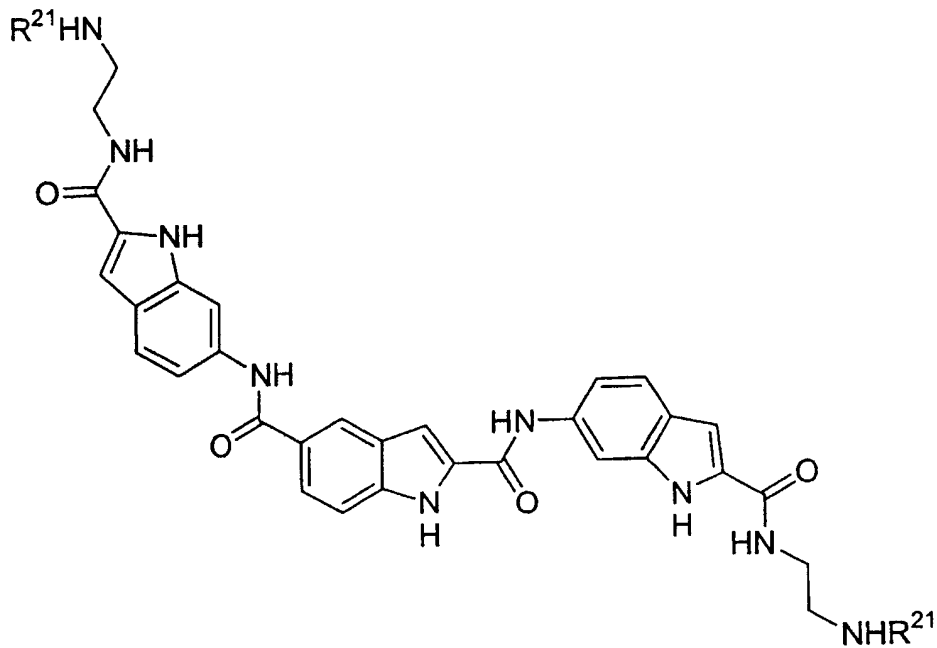
$R^{19}$  和  $R^{20}$  独立地是氢或烷基;

$R^{21}$  是氢、烷基或酰基。

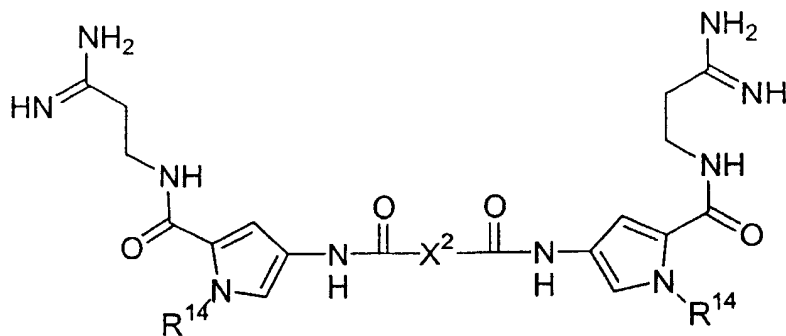
16. 权利要求 13 的化合物, 其中  $R^{14}$  是选自以下部分的烷基或取代的烷基部分:



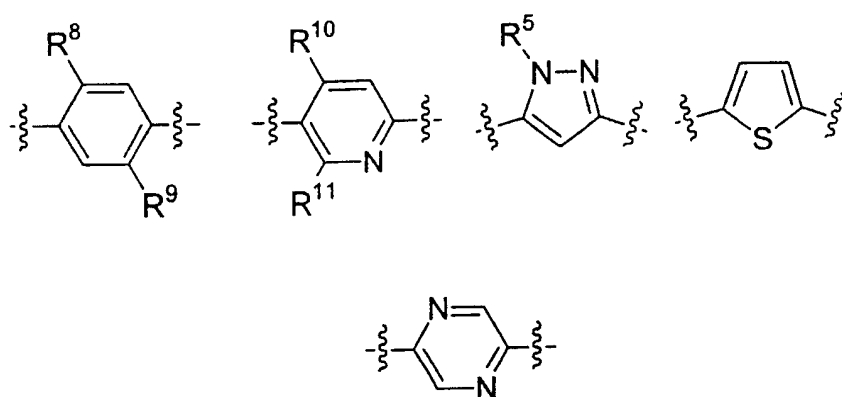
17. 根据权利要求 14 的化合物，其中该化合物具有以下结构：



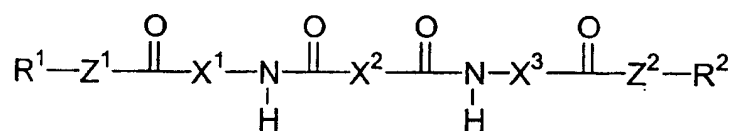
18. 根据权利要求 16 的化合物，其中该化合物具有以下结构：



其中  $R^{14}$  是氢、 $-CH_2CH_2(CH_3)_2$  或  $-CH_2(C_3H_5)$ ，并且  $X^2$  是选自以下部分的部分：



19. 一种治疗细菌或真菌感染的方法，其中该方法包括施用治疗上有效量的具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的酸加成的盐；



(I)

其中：

$Z^1$  和  $Z^2$  独立地是  $-NR^3-$  或  $-O-$ ，其中  $R^3$  是氢或烷基；

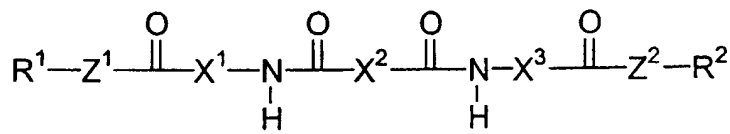
$R^1$  和  $R^2$  独立地是取代的烷基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基，前提是  $R^1$  和  $R^2$  中的至少一个是能够形成药学上可接受的酸加成的盐的基团，

$R^3$  是氢、烷基，或者  $R^3$  和  $R^1$  或  $R^2$  一起与它们所连接的原子形成杂环；

$X^2$  是芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、链烯基、炔基、环烷基或杂环；

$X^1$  和  $X^3$  独立地是芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基或  $-CHR^4$ ；其中  $R^4$  是自然或非自然的氨基酸侧链。

20. 一种抑制拓扑异构酶的方法，其中该方法包括施用治疗上有效量的具有化学式(I)的化合物或其药学上可接受的酸加成的盐：



(I)

其中:

$Z^1$  和  $Z^2$  独立地是  $-NR^3-$  或  $-O-$ , 其中  $R^3$  是氢或烷基;

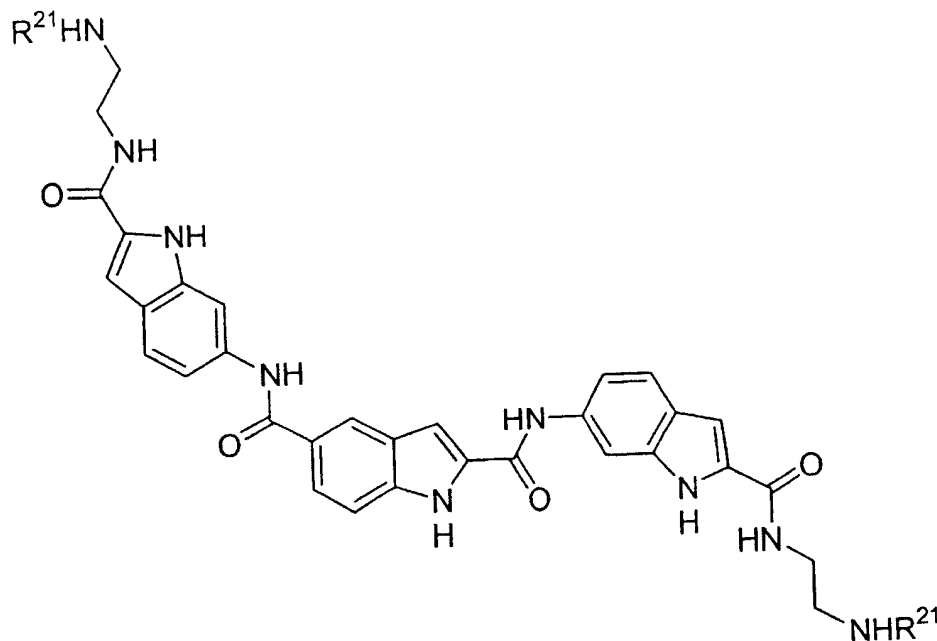
$R^1$  和  $R^2$  独立地是取代的烷基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基, 前提是  $R^1$  和  $R^2$  中的至少一个是能够形成药学上可接受的酸加成的盐的基团;

$R^3$  是氢、烷基, 或者  $R^3$  和  $R^1$  或  $R^2$  一起与它们所连接的原子形成杂环;

$X^2$  是芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、链烯基、炔基、环烷基或杂环;

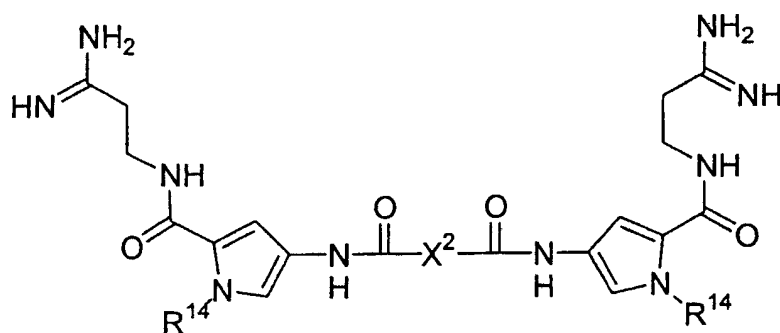
$X^1$  和  $X^3$  独立地是芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基或  $-CHR^4$ ; 其中  $R^4$  是自然或非自然的氨基酸侧链。

21. 一种治疗细菌感染的方法, 其中该方法包括施用治疗上有效量的以下化合物:

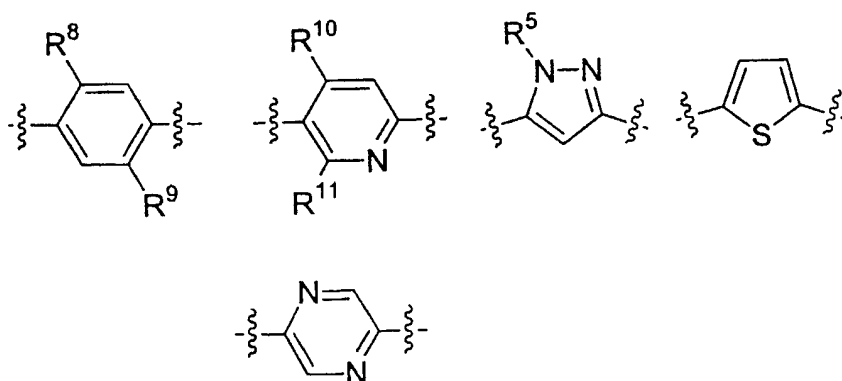


其中  $R^{21}$  是氢、烷基、取代的烷基、环烷基或酰基。

22. 一种治疗真菌感染的方法，其中该方法包括施用治疗上有效量的以下化合物：



其中  $R^{14}$  是氢、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  或  $-\text{CH}_2(\text{C}_3\text{H}_5)$ ，并且  $X^2$  是选自以下部分的部分：



其中：

$R^5$  是氢、烷基或取代的烷基；

$R^8$  是氢、烷基、取代的烷基、烷氧基或卤素；

$R^9$  是氢、烷基、取代的烷基、烷氧基、硝基或卤素；

$R^{10}$  是氢或烷基；

$R^{11}$  是氢或烷基。

23. 一种治疗细菌或真菌感染的方法，其中细菌或真菌株系选自以下株系：白色假丝酵母、烟曲霉、蜡状芽孢杆菌、流感嗜血菌和 *Pseudomonas aeruginosa*。

## 具有抗细菌、抗真菌或抗肿瘤 活性的新的化合物

### 相关申请的交叉引用

本申请要求美国临时申请 No. 60/214, 478 的优先权, 该临时申请是在 2000 年 6 月 27 日申请的, 并且它的公开内容在此整体引用作为参考。

### 发明背景

#### 发明领域

本发明提供了具有以下一个或多个活性的新的化合物: 抗细菌活性、抗真菌活性和抗肿瘤活性。也提供了含有这些化合物的药物组合, 以及制造和使用这些化合物的方法。

#### 现有技术描述

抗细菌的纺锤菌素和偏端霉素对双链 DNA 小沟中富含 AT 的序列的结合是一种研究得相当多的现象。由于此类结合能用来调节 DNA 表达, 例如, 通过阻断和/或替换调节蛋白, 或通过抑制作用于 DNA 的酶(如逆转录酶或拓扑异构酶)活性, 因此对这种结合的优化是近来许多研究的主题。

如 Bailly 和 Chaires 在最近的一篇评论中 (Bioconj. Chem. 9(5):513-38, 1998) 所描述的, 纺锤菌素和偏端霉素的吡咯酰胺单元比完美匹配小沟中对应碱基对序列所需的要长约 20%。因此, 在具有多个结合部分的寡聚类似物中, 连续的结合部分会和小沟中的碱基对不相匹配。因此一些研究已经指向含有不同接头的纺锤菌素或偏端霉素的二聚体, 以改善对较长目标序列的结合。在这些报道中, 确定了多种纺锤菌素或偏端霉素的二聚体的效果, 例如, 在抑制由 HIV

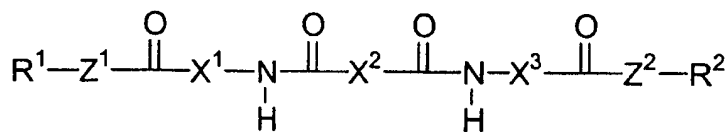


- 1 逆转录酶引起的转录中的效果 (M. Filipowsky 等人, Biochemistry 35: 15397-410, 1996), 在对哺乳动物 DNA 拓扑异构酶 I 的抑制中的效果 (Z. Wang 等人, Biochem. Pharmacol. 53: 309-16, 1997) 或在对 HIV 1 整合酶的抑制中的效果 (N. Neamati 等人, Mol. Pharmacol. 54: 280-90, 1998)。

在这些研究中, 优选的接头包括对亚苯基、反式乙烯基、环丙基、3, 5-吡啶基, 以及 6 碳和 8 碳的脂肪链。这些接头中的几种限制了围绕连接基团的旋转, 从而缩小了纯单齿结合的程度 (例如只有一个纺锤菌素部分结合; 见 Bailly), 但在灵活接头的情况下, 上述现象可以出现。但是, Kissinger 等人 (Chem. Res. Toxicol. 3(2): 162-8, 1990) 报道, 同烷基和亚烷基接头相比, 芳香基连接的基团降低了 DNA 结合的亲和力, Neamati 等人 (上面引用的) 报道反式乙烯基连接的化合物的效能 (在抑制 HIV-1 整合酶中) 比“更僵硬的”环丁基和降冰片烷基接头的效能高许多倍。Wang 和 Bailly 建议, 在某些应用中, 较僵硬的接头 (环丙基和对亚苯基) 不允许对位于接头两侧的两个纺锤菌素部分的优化的同时 (双齿) 结合。因此, 就需要提供减少单齿结合但又为双齿结合提供合适几何形状的接头。随着抗生素/抗真菌抗性的生物的增加, 就需要开发新的化合物来治疗由这些抗生素/抗真菌抗性生物引起的疾病。本发明的化合物满足这一需要。

### 发明概述

本发明提供了具有以下一个或多个活性的新的化合物: 抗细菌活性、抗真菌活性和抗肿瘤活性。特别的, 本发明的化合物是用下面的化学式 (I) 表示的或者是其药学上可接受的酸加成的盐:



(I)

其中:

$Z^1$  和  $Z^2$  独立地是  $-NR^3-$  (其中  $R^3$  是氢或烷基) 或  $-O-$ ;

$R^1$  和  $R^2$  独立地是取代的烷基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基, 前提是  $R^1$  和  $R^2$  中的至少一个是能够形成药学上可接受的酸加成的盐的基团;

$R^3$  是氢、烷基, 或者  $R^3$  和  $R^1$  或  $R^2$  与它们所连接的原子形成杂环;

$X^2$  是芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基、链烯基、炔基、环烷基或杂环;

$X^1$  和  $X^3$  独立地是芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基。

在第二个方面中, 本发明涉及治疗细菌和/或真菌感染的方法, 该方法包括施用治疗上有效量的具有化学式 (I) 的化合物或它们的药学上可接受的酸加成的盐。

在第三个方面中, 本发明涉及通过抑制拓扑异构酶来治疗癌症的方法, 该方法包括施用治疗上有效量的具有化学式 (I) 的化合物或它们的药学上可接受的酸加成的盐。

在第四个方面中, 本发明涉及药物组合物或其药学上可接受的酸加成的盐和药学上可接受的赋形剂, 其中该药物组合物含有治疗上有效量的具有化学式 (I) 的化合物。

#### 附图简述

FIG. 1 说明了本发明的一些代表性的化合物。

FIG. 2 说明了本发明较具代表性的化合物。

FIG. 3-4 说明了本发明更具代表性的化合物。

FIG. 5 说明了具有抗细菌活性的化合物的例子。

FIG. 6 说明了具有抗真菌活性的化合物的例子。

方案 1-5 说明了具有化学式 (I) 的化合物 7、11-15、20、22 和 25 的特定合成途径。

方案 6-13 说明了具有化学式 (I) 的多种化合物的合成途径。

## 发明详述

本发明涉及具有以下一个或多个活性的新的化合物：抗细菌活性、抗真菌活性和抗肿瘤活性。但是，在更具体地描述本发明之前，先定义下面的术语：

除非另外说明，下面这些用于说明书和权利要求书的术语具有以下含义：

“烷基”表示具有1到10个碳原子（优选1到6个碳原子）的饱和的直链或支链的单价烃基，如甲基、乙基、丙基、2-丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基等。

“取代的烷基”表示具有1到10个碳原子（优选1到6个碳原子）的饱和的直链或支链的单价烃基，该烃基被1到5个基团（优选1或2个基团）取代，这些基团选自羟基、烷氧基、酰基、酰氨基、卤素、硫、硫代烷氧基、酰氨基、氨基、单取代或双取代的氨基、羧基、脒基、胍基、偕胺肟（amidoxime）、磺酰氨基、环烷基、杂环、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基和 $-NRSO_2NR'R''$ （其中R是氢或烷基，R'和R''独立地是氢、烷基、卤代烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基和取代的杂芳基）。代表性的例子包括，但不限于2-羟乙基、3-羟丙基、2-羟基-1-羟甲基乙基、2-羟基-2-羟甲基乙基、1-羟甲基乙基、3-羟基丁基、2,3-二羟基丙基、2,3-二羟基丙基、2-羟基-1-甲基丙基、2-甲氧基乙基、3-甲氧基丙基、2-乙酰基乙基、3-乙酰基丙基、2-乙酰氨基乙基、3-乙酰氨基丙基、2-氨基乙基、3-氨基丙基、二甲氨基乙基、二甲氨基丙基、2-吡啶-1-基乙基、2-吡嗪-1-基乙基、3-吡嗪-1-基丙基、3-吡嗪-1-基丙基、3-咪基丙基、3-胍基丙基、2-咪唑-2-基乙基、3-咪唑-2-基丙基等。

“亚烷基”表示具有1到6个碳原子的饱和直链或支链的二价烃基，例如亚甲基、1,2-亚乙基、2,2-二甲基-1,2-亚乙基、1,2-亚丙基、2-甲基-1,2-亚丙基、亚丁基、戊二烯亚戊基等。

“链烯基”表示具有2到6个碳原子的直链单价烃基或具有3到6

个碳原子的支链单价烃基，并且至少含有一个双键，例如，乙烯基、丙烯基等。

“取代的链烯基”表示如此处所定义的链烯基，它被 1 到 3 个基团（优选 1 或 2 个基团）取代，这些基团选自羟基、烷氧基、酰基、酰氨基、卤素、氨基、单取代或双取代的氨基、羧基、脞基、胍基、磺酰氨基、杂环、芳基、取代的芳基、杂芳基、取代的杂芳基和  $-NRSO_2NR'$   $R''$ （其中 R 是氢或烷基， $R'$  和  $R''$  独立地是氢、烷基、卤代烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基和取代的杂芳基）。

“炔基”表示具有 2 到 6 个碳原子的直链的单价烃基，或具有 3 到 6 个碳原子的支链的单价烃基，并且含有至少一个三键，例如乙炔基、丙炔基等。

“环烷基”表示具有 3 到 6 个碳原子的饱和的单价环状烃基，例如环丙基、环戊基、环己基等。

“取代的环烷基”表示如此处所定义的环烷基，其被一、二或三个取代基（优选一个或两个取代基）独立地取代，并且这些取代基选自烷基、烷氧基、取代的烷基、酰基、酰氨基、磺酰氨基、卤素、硝基、氰基、氨基、单取代或双取代的烷基和  $NRSO_2NR'$   $R''$ （其中 R 是氢或烷基， $R'$  和  $R''$  独立地是氢、烷基、卤代烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基和取代的杂芳基。）。

“磺酰氨基”表示  $-NRSO_2R'$  基团，其中 R 是氢或烷基， $R'$  是烷基、取代的烷基、氨基、单取代的氨基、双取代的氨基、芳基、取代的芳基、芳烷基、取代的芳烷基、杂芳基、取代的杂芳基、杂芳烷基和取代的杂芳烷基，例如，甲基磺酰氨基、苄基磺酰氨基、N-甲氨基磺酰氨基等。

“烷氧基”表示  $-OR$  基团，其中 R 是如上所定义的烷基，如甲氧基、乙氧基、丙氧基、丁氧基等。

“酰基”表示  $-C(O)R$  基团，其中 R 是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、取代的芳烷基、杂芳基、取代的杂芳基、杂芳烷基、取代的杂芳烷基、杂环和此处所定义的杂环烷基，代表性

例子包括,但不限于甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、苄基羧基、甘氨酸等。

“酰氨基”表示 $-NR' C(O)R$ 基团,其中 $R'$ 是氢或烷基, $R$ 是氢、烷基、取代的烷基、芳基、取代的芳基、芳烷基、取代的芳烷基、杂芳基、取代的杂芳基、杂芳烷基、取代的杂芳烷基、杂环和此处所定义的杂环烷基。代表性的例子包括,但不限于甲酰氨基、乙酰氨基、苯甲酰氨基、苄基碳酰氨基等。优选的酰氨基团包括以下:

$-NHC(O)CH(NH_2)CH_3$ ; -  
 $NHC(O)CH(NH_2)-(CH_2)_3-NH-C(NH)NH_2$ ;  $-NHC(O)CH(NH_2)-CH_2-C(O)NH_2$ ; -  
 $NHC(O)CH(NH_2)-CH_2-CO_2H$ ;  $-NHC(O)CH(NH_2)-CH_2-SH$ ;  $-NHC(O)CH(NH_2)-(CH_2)_2-$   
 $C(O)NH_2$ ;  $-NHC(O)CH(NH_2)-(CH_2)_2-CO_2H$ ;  $-NHC(O)CH_2-NH_2$ ;  $-NHC(O)CH(NH_2)-CH_2-$   
 $(C_3H_2N_2)$ ;  $-NHC(O)CH(NH_2)-CH(CH_3)CH_2CH_3$ ;  $-NHC(O)CH(NH_2)-CH_2CH(CH_3)_2$ ; -  
 $NHC(O)CH(NH_2)-(CH_2)_4-NH_2$ ;  $-NHC(O)CH(NH_2)-(CH_2)_2-SCH_3$ ;  $-NHC(O)CH(NH_2)-$   
 $CH_2Ph$ ;  $-NHC(O)CH(NH_2)-(C_4H_8N)$ ;  $-NHC(O)CH(NH_2)-CH_2OH$ ;  $-NHC(O)CH(NH_2)-$   
 $CH(OH)CH_3$ ;  $-NHC(O)CH(NH_2)-CH_2-(C_8H_6N)$ ;  $-NHC(O)CH(NH_2)-CH_2-Ph-p-OH$ ; 和 -  
 $NHC(O)CH(NH_2)-CH(CH_3)_2$ .

“单取代的氨基”表示 $-NHR$ 基团,其中 $R$ 代表烷基、酰基、芳基、取代的芳基、芳烷基、取代的芳烷基、杂芳基、取代的杂芳基、杂芳烷基、取代的杂芳烷基、杂环和此处所定义的杂环烷基,代表性的例子包括,但不限于甲氨基、乙氨基、苯氨基、苄氨基等。

“双取代的氨基”表示 $-NRR'$ 基团,其中 $R$ 和 $R'$ 独立地选自烷基、酰基、芳基、取代的芳基、芳烷基、取代的芳烷基、杂芳基、取代的杂芳基、杂芳烷基、取代的杂芳烷基、杂环和如此处所定义的杂环烷基。代表性的例子包括,但不限于二甲氨基、二乙氨基、甲乙氨基、二苯氨基、二苄氨基等。

“卤素”表示氟、氯、溴或碘,优选是氟和氯。

“卤代烷基”表示被一个或多个相同或不同的卤素原子取代的烷基,例如,  $-CH_2Cl$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_2CF_3$ 、 $-CH_2CCl_3$ 等。

“芳基”表示具有6到14个环原子的单价的单环、二环或三环芳香烃基，例如，苯基、萘基或蒽基。

“取代的芳基”表示如上所定义的芳基环，它独立地被一个、两个或三个取代基（优选一个或两个取代基）取代，这些取代基选自烷基、烷氧基、芳氧基、取代的烷基、酰基、酰氨基、磺酰氨基、卤素、硝基、氰基、氨基、单取代或双取代的氨基和 $-NRSO_2NR'R''$ （其中R是氢或烷基，R'和R''独立地是氢、烷基、卤代烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基和取代的杂芳基）。

“杂芳基”表示具有5到12个环原子的单价单环、二环或三环基团，并且该基团至少含有一个芳香环，该芳香环含有1个、2个、3个或4个选自N、O或S的环杂原子，剩下的环原子是C，并且杂芳基的连接点位于芳香环上。更特别的是，术语杂芳基包括，但不限于吡啶基、呋喃基、三烯基、噻唑基、四唑基、异噻唑基、三唑基、咪唑基、异噁唑基、吡咯基、吡唑基、嘧啶基、苯并呋喃基、异苯并呋喃基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并三唑基、吲哚基、异吲哚基、苯并噁唑基、喹啉基、四氢喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、苯并异噁唑基或苯并三烯基。

“取代的杂芳基”表示如上所定义的杂芳基环，它独立地被一个、两个或三个取代基（优选一个或两个取代基）取代，这些取代基选自烷基、烷氧基、芳氧基、取代的烷基、酰基、酰氨基、磺酰氨基、卤素、硝基、氰基、氨基、单取代或双取代的氨基和 $-NRSO_2NR'R''$ （其中R是氢或烷基，R'和R''独立地是氢、烷基、卤代烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基和取代的杂芳基）。

“芳烷基”、“杂芳烷基”、“取代的芳烷基”、“取代的杂芳烷基”表示 $-R^aR^b$ 基团，其中 $R^a$ 是亚烷基， $R^b$ 是此处所定义的芳基或取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基，例如，苄基、吡啶-3-基甲基、咪唑基乙基、吡啶基乙基、3-（苯并呋喃-2-基）丙基等。

“杂环”表示具有5到8个环原子的饱和的非芳香环基团，其中一个或两个环原子是选自NR（其中R独立地是氢、烷基或杂烷基）、

O 或 S(O)<sub>n</sub> (其中 n 是 0 到 2 的整数) 的杂原子, 剩下的环原子是 C, 其中一个或两个 C 原子可以选择性地被羰基取代。杂环可以选择性地被一个、两个或三个取代基独立地取代, 这些取代基选自烷基、烷氧基、取代的烷基、酰基、酰氨基、磺酰氨基、卤素、硝基、氰基、氨基、单取代或双取代的氨基和 -NRSO<sub>2</sub>NR' R'' (其中 R 是氢或烷基, R' 和 R'' 独立地是氢、烷基、卤代烷基、芳基、取代的芳基、杂芳基和取代的杂芳基)。更特别的是, 术语杂环包括, 但不限于四氢吡喃基、2, 2-二甲基-1, 3-二氧戊环、哌啶子基、N-甲基哌啶基-3-基、哌嗪子基 (piperazino)、N-甲基吡咯烷基-3-基、3-吡咯烷子基 (pyrrolidino)、吗啉代、硫代吗啉代、硫代吗啉代-1-氧化物、硫代吗啉代-1, 1-二氧化物、吡咯啉基、咪唑啉基, 以及它们的衍生物。

“杂环烷基”表示 -R<sup>a</sup>R<sup>b</sup> 基团, 其中 R<sup>a</sup> 是亚烷基, R<sup>b</sup> 是如此处所定义的杂环基团, 例如, 四氢吡喃-2-基甲基、4-甲基哌嗪-1-基乙基、3-哌啶基甲基、2, 2-二甲基-1, 3-二氧杂四氢呋喃 (dioxoxolan)-4-基甲基、苄基等。

“选择性的”或“选择性地”表示接下去所描述的事件或状态不是一定要出现的, 并且该描述包括了该事件或状态出现的情况和不出现的情况。例如, “被烷基选择性地单取代或双取代的杂环”表示该烷基不一定非要存在, 该描述包括了杂环基团被烷基单取代或双取代的情况, 也包括了杂环基团不被烷基取代的情况。

“羟基或氨基保护基团”指那些在合成步骤中倾向于保护氧原子和氮原子不发生不需要的反应的有机基团。合适的氧和氮保护基团在本领域中是熟知的, 例如, 三甲代甲硅烷基、二甲基叔丁基甲硅烷基、苄基、苄氧基-羰基 (CBZ)、叔丁氧基羰基 (Boc)、三氟乙酰基、2-三甲代甲硅烷基乙磺酰基 (SES) 等。另外一些可以在 T. W. Greene 和 G. M. Wuts 写的《有机合成中的保护基团》(Protecting Groups in Organic Synthesis) (第三版, Wiley, New York, 1999) 以及引用的这方面的文献中找到。

氨基酸指任何自然出现的氨基酸以及其人工合成的类似物和衍生物（如，自然出现的氨基酸的D-立体异构体，如D-苏氨酸）。 $\alpha$ -氨基酸含有一个在其上结合了氨基、羧基、氢原子和称为“侧链”的特色基团的碳原子。自然出现的氨基酸的侧链在本领域中是熟知的，它包括例如氢（例如在甘氨酸中）、烷基（如在丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸中）、取代的烷基（如在苏氨酸、丝氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸、谷氨酰胺、精氨酸、赖氨酸中）、芳基烷基（如在苯丙氨酸和色氨酸中）、取代的芳基烷基（如在酪氨酸中），以及杂芳基烷基（如在组氨酸中）。非自然的氨基酸在本领域中也是熟知的，例如在以下文献中所述的：Williams（编）《旋光 $\alpha$ -氨基酸的合成》（*Synthesis of Optically Active  $\alpha$ -Amino Acids*），Pergamon Press（1989）；Evans等人，*J. Amer. Chem. Soc.*，112:4011-4030（1990）；Pu等人，*J. Amer. Chem. Soc.*，56: 1280-1283（1991）；Williams等人，*J. Amer. Chem. Soc.*，113: 9276-9286（1991）；以及所有引用的这方面的文献。本发明也包括了非自然氨基酸的侧链。

具有相同分子式但在原子键合性质和键合顺序或原子在空间的排列不同的化合物称为“异构体”。原子空间排列不同的异构体称为“立体异构体”。

不是互为镜像体的立体异构体称为“非对映异构体”。那些互为非叠加的镜像的立体异构体称为“对映异构体”。当化合物具有非对称中心时，例如，它结合了四个不同的基团，就可能有一对对映异构体存在。对映异构体可以通过其非对称中心的绝对构型来表征，并可以通过Cahn和Prelog的R-和S-顺序法则来描述，也可以通过分子围绕偏振光平面旋转的方式来描述，记为右旋或左旋（即分别为（+）或（-）异构体）。手性化合物可以以单个对映异构体或其混合物的形式存在。含有相等比例的对映异构体的混合物称为“消旋混合物”。

本发明的化合物可以含有一个或多个非对称中心；因此，此类化合物可以以单独的I-或（S）-立体异构体或其混合物的形式产生。



例如，如果具有化学式(I)的化合物中的R<sup>1</sup>取代基是2-羟乙基，那么羟基所连的碳原子就是非对称中心，因此具有化学式(I)的化合物就可以以I-或(S)-立体异构体的形式存在。除非另外说明，在说明书和权利要求书中对特定化合物的描述或命名倾向于包括单独的对映异构体和其混合物(消旋的或非消旋的)。确定立体化学方法和分离立体异构体的方法在本领域中是熟知的[见《高级有机化学》(Advanced Organic Chemistry)(J. March, John Wiley 和 Sons, New York, 1992)第四版第四章中的讨论]。

“药学上可接受的赋形剂”指在制备药物组合物(该药物组合物通常是安全、无毒并且不具有不需要的生物学或其它方面的特性)中有用的赋形剂，也包括在兽医上和人类药物应用中可接受的赋形剂。用于说明书和权利要求书的“药学上可接受的赋形剂”包括一个和多个此类的赋形剂。

“药学上可接受的酸加成的盐”是指那些保留了游离碱的生物效用和特性的盐，并且这些盐不具有不需要的生物学或其它特性，而且这些盐同无机酸和有机酸一起形成，无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等，有机酸如乙酸、丙酸、乙醇酸、丙酮酸、草酸、马来酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸等。

形成药学上可接受的酸加成的盐的基团包括氨基、胍基、脒基、胍基、至少含有一个含氮取代基(如氨基、胍基(uanidine)、脒基、uanidine等)的取代的芳基/杂芳基和取代的烷基基团。

氨基用分子式-NR' R''代表，其中R'和R''独立地是氢、烷基、取代的烷基、链烯基、取代的链烯基、芳基、取代的芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环、杂芳基、取代的杂芳基，并且R'、R''和它们所连接的氮一起形成一个杂环或杂芳基基团。

胍基用分子式-NHNR' R''代表，其中R'和R''独立地是氢、烷基、取代的烷基、链烯基、取代的链烯基、芳基、取代的芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环、杂芳基、取代的杂芳基，并且R'、R''和

它们所连接的氮一起形成一个杂环或杂芳基基团。

脒基用分子式  $-C(=NH)NR'R''$  代表，其中  $R'$  和  $R''$  独立地是氢、烷基、取代的烷基、链烯基、取代的链烯基、芳基、取代的芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环、杂芳基、取代的杂芳基，并且  $R'$ 、 $R''$  和它们所连接的氮一起形成一个杂环或杂芳基基团。

脒基用分子式  $-NHC(=NH)NR'R''$  代表，其中  $R'$  和  $R''$  独立地是氢、烷基、取代的烷基、链烯基、取代的链烯基、芳基、取代的芳基、环烷基、取代的环烷基、杂环、杂芳基、取代的杂芳基，并且  $R'$ 、 $R''$  和它们所连接的氮一起形成一个杂环或杂芳基基团。

具有化学式 (I) 的化合物可作为前体药物。前体药物是指任何能在体内释放出根据化学式 (I) 的具有活性的母体药物 (当这样的前体药物给哺乳动物主体施用)。用某种方式修饰具有化学式 (I) 的化合物中的官能基团，从而制备具有化学式 (I) 的化合物的前体药物，其中该某种方式是这样一种方式，即用该方式进行的修饰在体内可以裂解而释放出母体药物。前体药物包括具有化学式 (I) 的化合物，其中化学式 (I) 中的羟基、氨基或硫氢基团结合在任何能在体内裂解的基团上，从而分别再生出羟基、氨基或硫氢基。前体药物的例子包括，但不限于，具有化学式 (I) 的化合物中的羟基官能团的氨基甲酸酯 (如  $N,N$ -二甲氨基-羧基) 和酯 (如乙酸酯、甲酸酯和苯甲酸酯的衍生物) 等。

对疾病的“治疗”包括：

(3) 预防疾病，即不使哺乳动物的疾病的临床症状发展，其中该哺乳动物暴露于疾病源中或预先诱导使其易于患病，但是还没有经历或显示疾病的症状。

(3) 抑制疾病，即阻止或减低疾病或其临床症状的发展，或

(3) 缓解疾病，即使疾病或其临床症状消退。

“治疗上有效量”表示当把化合物施用给哺乳动物以治疗疾病时，足以影响对这种疾病的治疗的化合物的量。“治疗上有效量”依赖于化合物、疾病和其严重程度、被治疗哺乳动物的年龄、体重等而变化。

“抗真菌”或“抗细菌”是指真菌或细菌的生长停止或被抑制。

“抗肿瘤”表示化合物具有抑制肿瘤细胞生长的特性。优选的，当化合物以  $100\ \mu\text{M}$  的浓度与肿瘤细胞系接触时，肿瘤细胞的生长是不经过处理的生长细胞的 32% 或更少。

“抑菌的”表示化合物具有抑制细菌或真菌繁殖的能力，其中，在除去活性化合物之后，繁殖又能恢复。对于抑菌化合物来说，它的最小抑菌浓度 (MBC) 大于它的最小抑制浓度 (MIC) 的 4 倍。

“杀菌的”或“杀真菌的”表示化合物具有杀死细菌或真菌的性质。杀菌作用/杀真菌作用与抑菌作用或抑真菌作用的区别仅在于前者是不可逆的。例如，被“杀死”的生物不能再繁殖，即使在与活性化合物脱离接触之后。在某些情况下，活性化合物导致细菌或真菌细胞裂解；在另外一些情况下，细菌或真菌细胞仍保持完整，并且可以继续具有代谢活性。杀菌化合物显示了小于  $4\times\text{MIC}$  的 MBC。类似的，杀真菌的化合物显示了小于  $4\times\text{MIC}$  的最小杀真菌浓度 (MFC)。

“最小抑制浓度”或“MIC”指完全抑制待测生物的生长所必需的化合物的最小浓度。本发明中具有 MIC 至少为  $1\text{mM}$  的化合物在下面的实施例中描述的试验中是有活性的。优选的化合物具有  $500\ \mu\text{M}$  的 MIC，更优选的 MIC 为  $100\ \mu\text{M}$ 。

“dsDNA”表示双链 DNA。

### 优选实施方案

尽管在发明概述中对本发明作了最广泛的限定，一些具有化学式 (I) 的化合物仍是优选的。

(A) 一类优选的化合物是那些  $Z^1$  和  $Z^2$  为  $-\text{NH}-$  的。

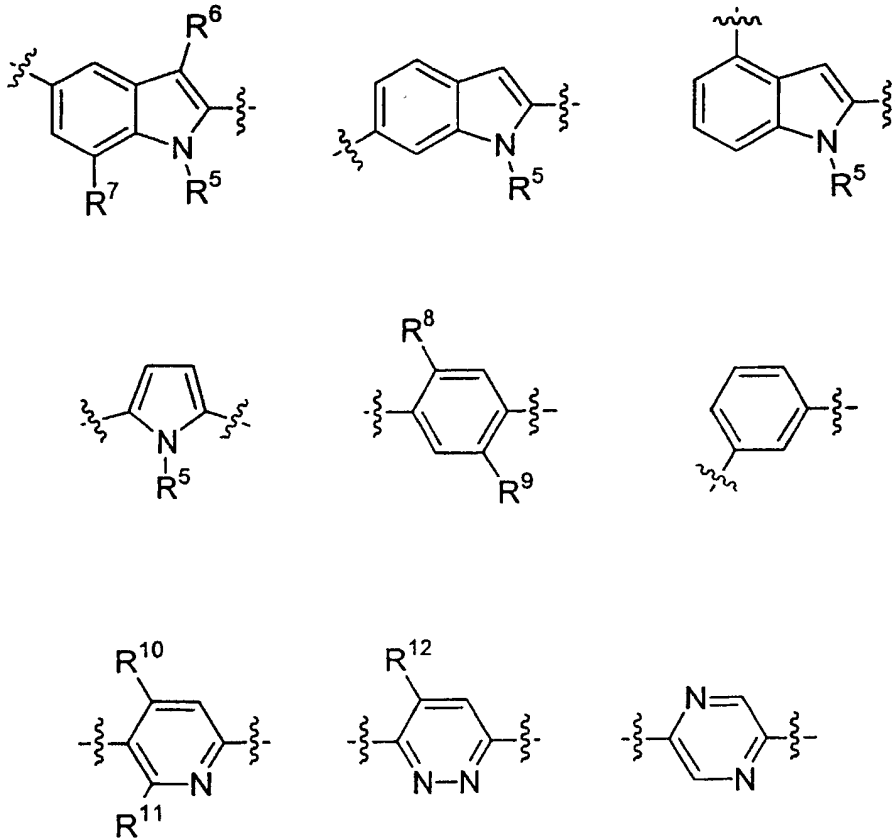
(B) 另一类优选的化合物是那些  $X^2$  为芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基的化合物。

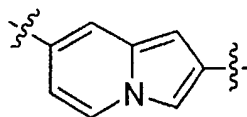
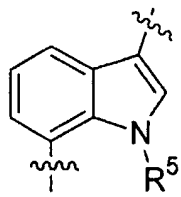
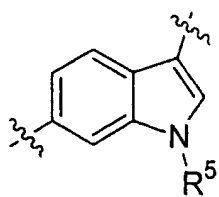
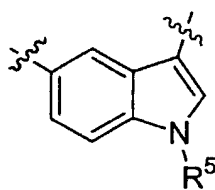
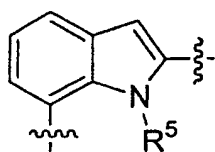
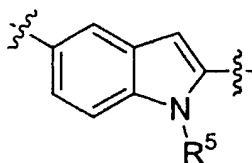
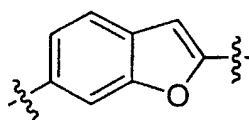
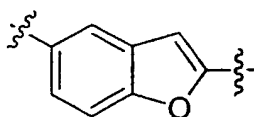
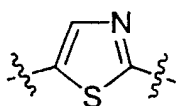
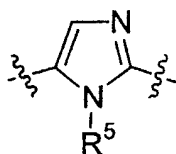
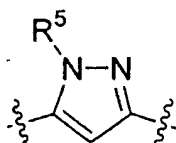
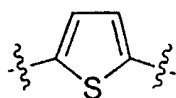
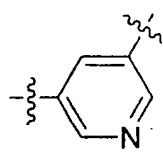
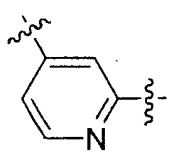
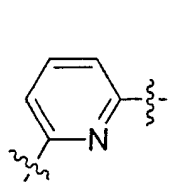
(C) 另一类优选的化合物是那些  $X^1$  和  $X^3$  独立地是杂芳基或取代的杂芳基的化合物。

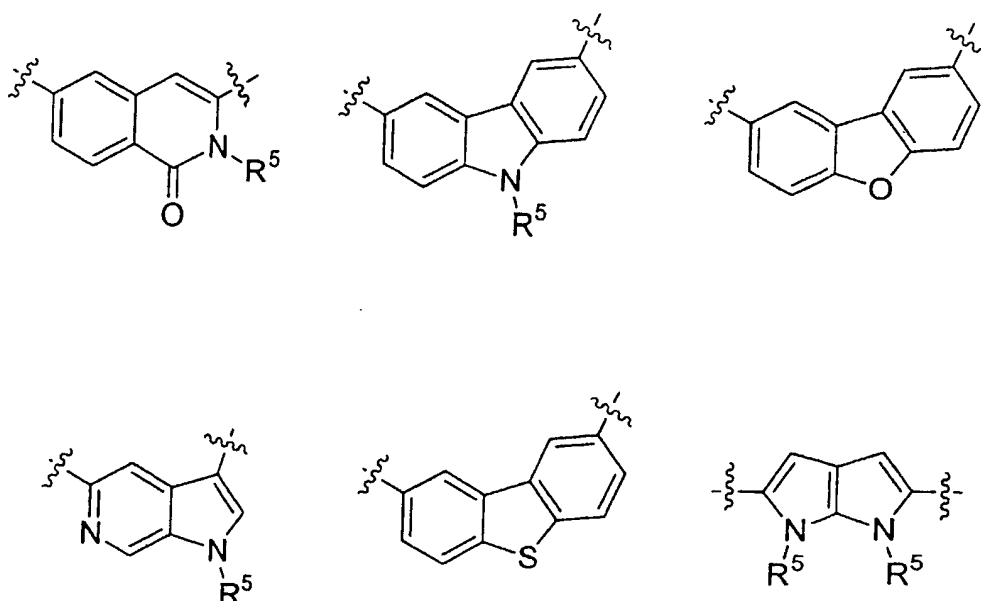
(D) 另一类优选的化合物是那些  $R^1$  和  $R^2$  独立地是取代的烷基的

化合物。

(E) 另一类优选的化合物是那些  $X^2$  为选自以下部分的芳基、取代的芳基、杂芳基或取代的杂芳基部分的化合物:







其中:

$R^5$  是氢、烷基或取代的烷基;

$R^6$  是氢、烷基、卤素或烷氧基;

$R^7$  是氢、烷基或卤素;

$R^8$  是氢、烷基、取代的烷基、烷氧基或卤素;

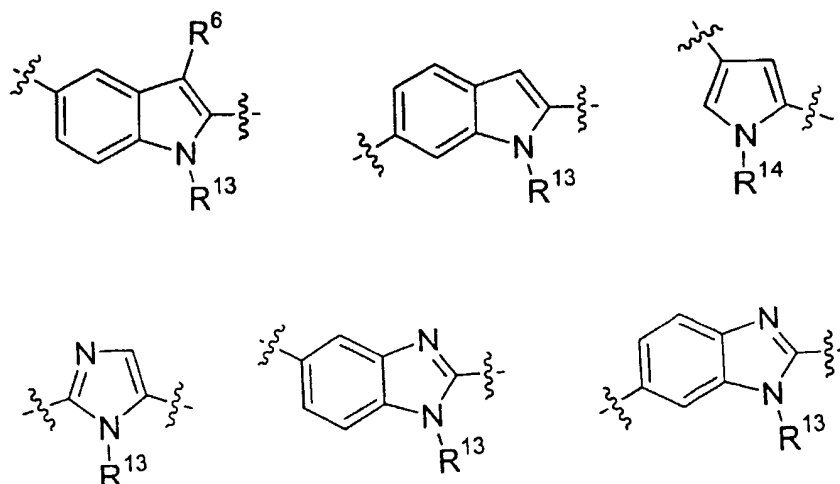
$R^9$  是氢、烷基、取代的烷基、烷氧基、硝基或卤素;

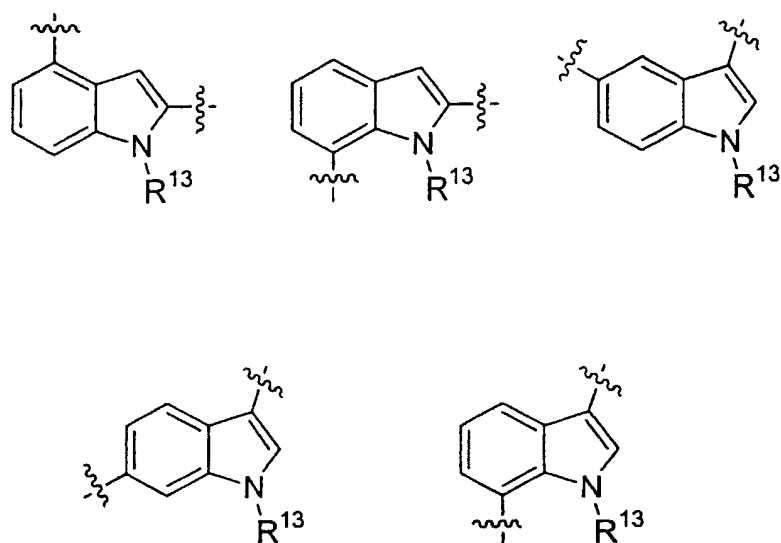
$R^{10}$  是氢或烷基;

$R^{11}$  是氢或烷基;

$R^{12}$  是氢或烷基。

(F) 另一类优选的化合物是那些  $X^1$  和  $X^3$  为独立地选自以下部分的杂芳基或取代的杂芳基部分的化合物:





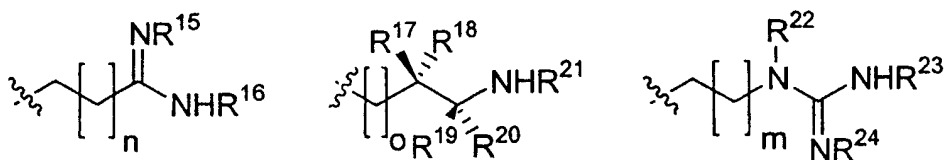
其中:

$R^6$  是氢、烷基、卤素或烷氧基;

$R^{13}$  是氢或烷基;

$R^{14}$  是氢、烷基、取代的烷基或芳烷基。

(G) 另一类优选的化合物是那些  $R^1$  和  $R^2$  为独立地选自以下部分的取代的烷基部分的化合物:



其中:

$R^{15}$  是氢、羟基、烷氧基、烷基、环烷基或者  $R^{15}$  和  $R^{16}$  一起与它们所连接的原子形成杂环;

$R^{16}$  是氢、羟基、烷基或环烷基;

$R^{17}$ 、 $R^{18}$ 、 $R^{19}$  和  $R^{20}$  独立地是氢或烷基;

$R^{21}$  是氢、烷基、取代的烷基、环烷基或酰基;

$R^{22}$  是氢或烷基, 或者  $R^{22}$  和  $R^{23}$  一起与它们所连接的原子形成杂环, 或者  $R^{22}$  和  $R^{24}$  一起与它们所连接的原子形成杂环。

$R^{23}$  是氢、羟基、烷基、环烷基或者  $R^{23}$  和  $R^{24}$  一起与它们所连接的原子形成杂环;

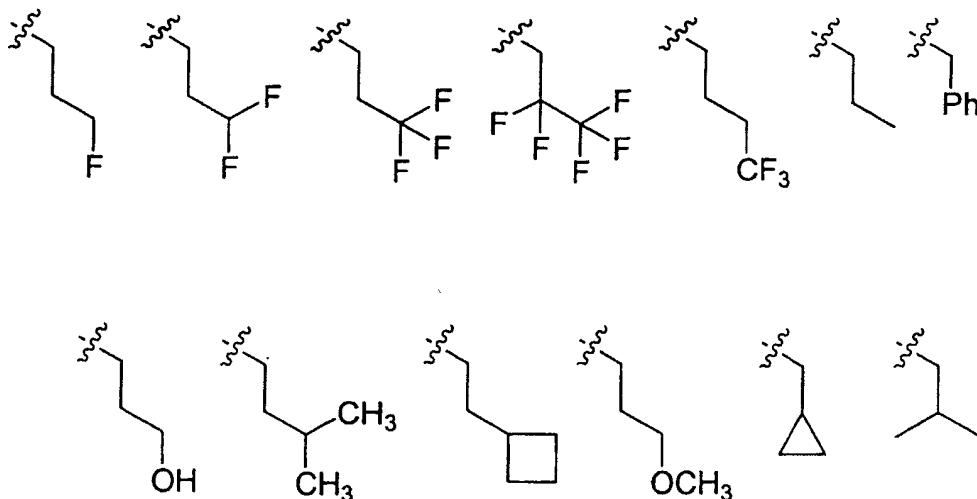
$R^{24}$  是氢、羟基或烷基;

m 是 1、2 或 3;

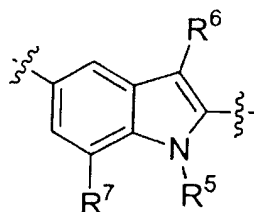
n 是 1、2 或 3;

o 是 0、1、2 或 3;

(H) 另一类优选的化合物是那些  $R^{14}$  为烷基、取代的烷基或芳烷基部分的化合物, 其中上述部分选自以下部分:



(I) 另一类优选的化合物是那些  $X^2$  为以下化学式的化合物:



其中:

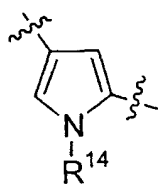
$R^5$  是氢、烷基或取代的烷基;

$R^6$  是氢、烷基、卤素或烷氧基;

$R^7$  是氢、烷基或卤素。

(J) 另一类优选的化合物是那些  $X^1$  和  $X^3$  都为以下化学式的化合物:

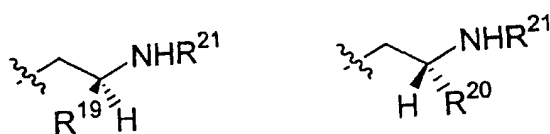




其中:

$R^{14}$  是氢、烷基、取代的烷基或芳烷基。

(K)另一类优选的化合物是那些  $R^1$  和  $R^2$  独立地为以下结构中的某一个的化合物:

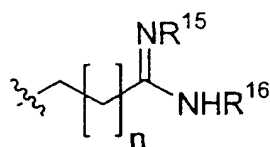


其中:

$R^{19}$  和  $R^{20}$  独立地是氢或烷基;

$R^{21}$  是氢、烷基或酰基。

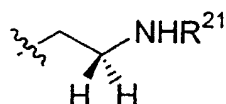
(L)另一类优选的化合物是那些  $R^1$  和  $R^2$  具有以下结构的化合物:



其中:

$R^{15}$  和  $R^{16}$  为氢, 并且  $n$  是 1 或 2。

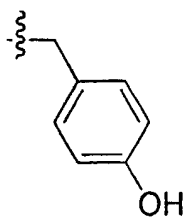
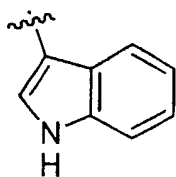
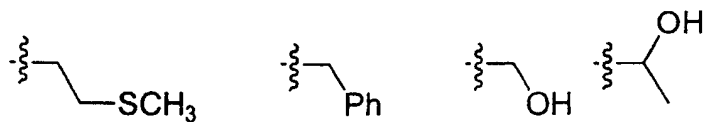
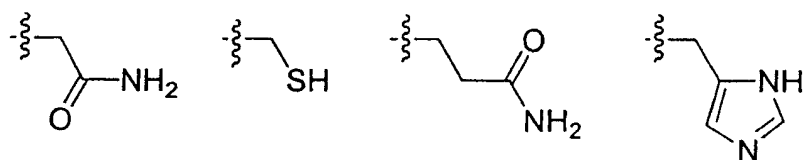
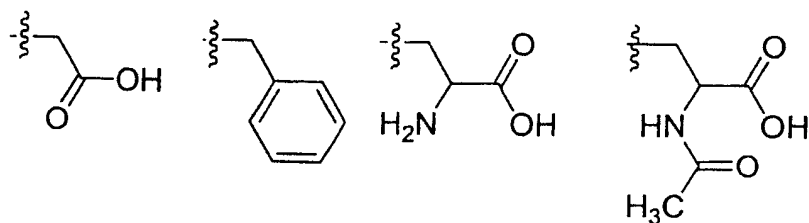
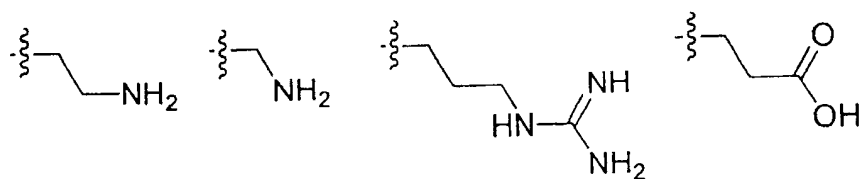
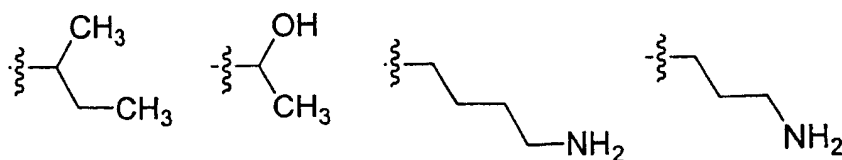
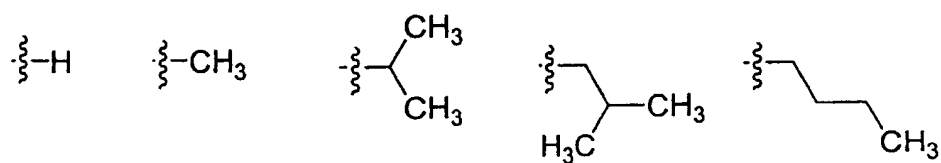
(M)另一类优选的化合物是那些  $R^1$  和  $R^2$  具有以下结构的化合物:



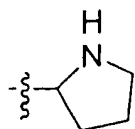
其中:

$R^{21}$  是选自甲基、乙基、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Oac}$  和丙基的烷基基团, 或者是具有  $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{R}^{25})(\text{R}^{26})\text{H}$  结构的酰基部分;

$R^{25}$  是选自以下取代基的取代基:

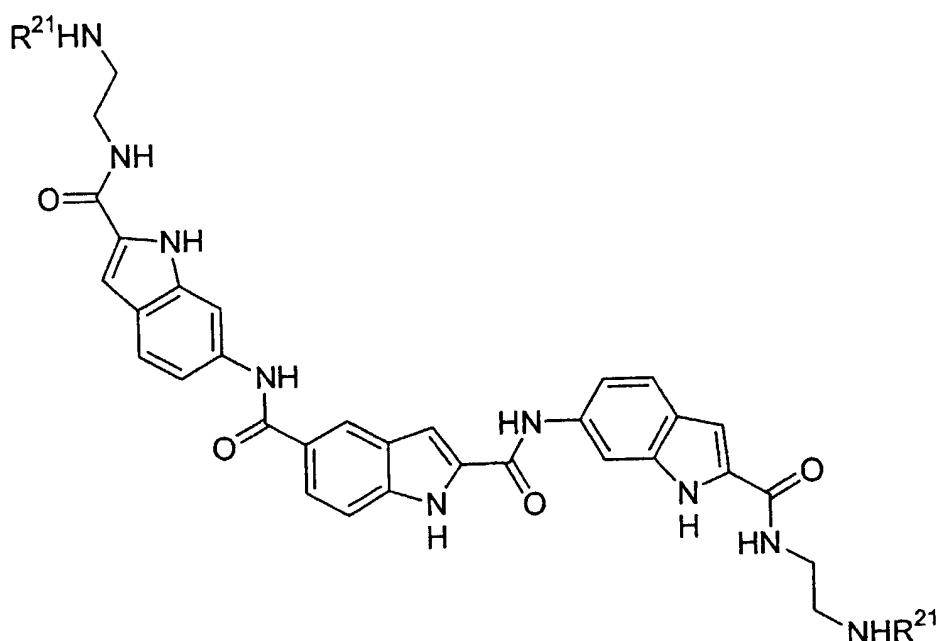


或者  $R^{25}$  和  $R^{26}$  一起与它们所连接的原子形成具有以下结构的杂环:



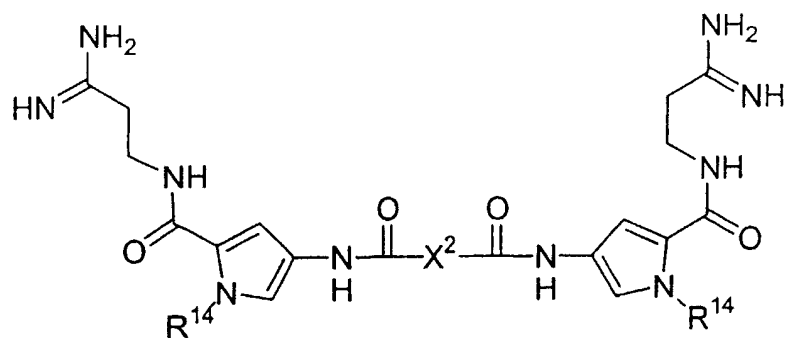
并且  $R^{26}$  是选自  $-H$ 、 $-NH_2$  和  $-NHCH_3$  的取代基。

(N) 另一类优选的化合物是那些具有以下结构式的化学式为 (I) 的化合物:



其中  $R^{21}$  是烷基基团或酰基基团。

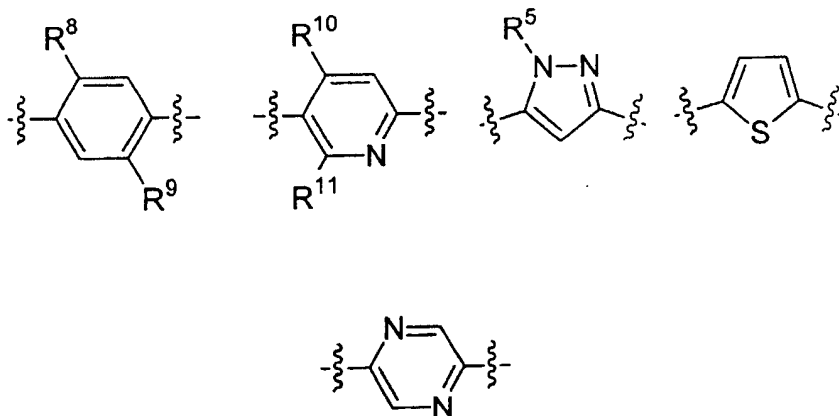
(O) 另一类优选的化合物是那些具有以下结构式的化学式为 (I) 的化合物:



其中:

$R^{14}$  是氢、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  或  $-\text{CH}_2(\text{C}_3\text{H}_5)$ ;

$X^2$  是选自以下部分的部分:



### 一般合成方案

本发明的化合物可以用下面的反应方案中所描述的方法制备。

在制备这些化合物中所用的起始材料和试剂可以从商业供应者如 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wisconsin, USA)、Bachem (Torrance, California, USA)、Emka-Chemie 或 Sigma (St. Louis, Missouri, USA) 购买到, 也可以按照参考文献中所述的步骤, 用本领域技术人员所熟知的方法制备, 这些参考文献是如 Fieser 和 Fieser 的《有机合成试剂》(Reagents for Organic Synthesis), 卷 1-15 (John Wiley 和 Sons, 1991); Rodd 的《碳化合物的化学》(Chemistry of Carbon Compounds), 卷 1-5 和补充本 (Elsevier Science Publishers, 1989); 《有机反应》(Organic Reactions), 卷 1-40 (John Wiley 和 Sons, 1991); March 的《高级有机化学》(Advanced Organic Chemistry) (John Wiley 和 Sons, 第 5 版) 和 Larock 的《综合有机转化》(Comprehensive Organic Transformation) (VCH Publishers Inc., 1989)。这些方案只是说明性的描述了本发明的化合物合成的方法, 可以对这些方案作多种修改, 并且建议这些修改由参考过这些公开内容的本领域中的技术人员来做。(确信包括了最新的

卷本，以及任何更好的书和 sm 供应者)

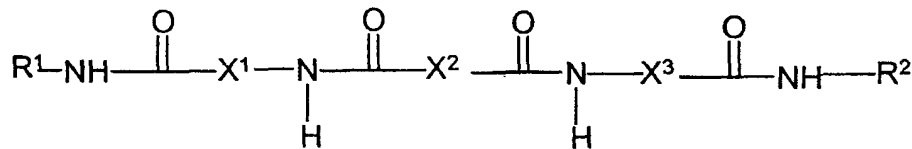
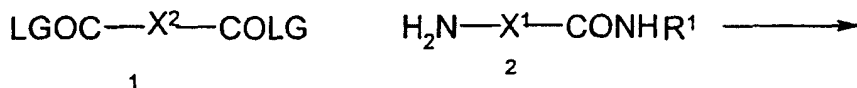
如果需要，可以用传统的技术将起始材料和反应中间物分离并纯化，这些传统技术包括，但不限于过滤、蒸馏、结晶、色谱等。此类材料可以用传统方法表征，包括物理常数和光谱数据。

### 具有化学式 (I) 的化合物的制备

方案 A 和 B 描述了制备具有化学式 (I) 的化合物的可选方法。

具有化学式 (I) 的化合物 (其中  $Z^1$  和  $Z^2$  是  $-NH-$ ;  $R^1$  和  $R^2$  以及  $X^1$  和  $X^2$  如发明概述中所定义，并且  $R^1$  和  $R^2$  相同， $X^1$  和  $X^2$  相同) 可以用下面方案 A 中的方法制备。

#### 方案 A



I

$R^1$  和  $R^2$  相同;  
 $X^1$  和  $X^3$  相同

具有化学式 (I) 的化合物 (其中  $Z^1$  和  $Z^2$  是  $-NH-$ ;  $R^1$  和  $R^2$  以及  $X^1$  和  $X^2$  如发明概述中所定义，并且  $R^1$  和  $R^2$  相同， $X^1$  和  $X^2$  相同) 可以一步制备，具体方法是使二羧酸衍生物 1 (其中 LG 是合适的离去基团，如卤素、五氟苯氧基等) 和至少两当量具有化学式 2 的胺反应。反应通常在极性有机溶剂 (如二甲基甲酰胺、四氢呋喃等) 和环境温度下进行。本领域中的技术人员知道，如果离去基团是卤素，反应将在非亲核基 (如三乙胺等) 存在的情况下进行。

具有化学式 1 和 2 的化合物可以从如 Aldrich、Sigma 等之类的卖主那儿购买到。这些化合物也可以用本领域熟知的方法制备。例如，

具有化学式 1 和 2 的化合物可以用方案 1 中所述的、并且将在以下的实施例 1 中详细描述的方法制备。

另外，对于本领域的技术人员来说，很明显具有化学式 (I) 的化合物 ( $Z^1$  和  $Z^2$  是  $-O-$ ) 可以根据上述步骤制备，但是要把化合物 2 中的氨基基团用羟基基团取代。

可选择的是，具有化学式 (I) 的化合物 ( $Z^1$  和  $Z^2$  是  $-NH-$ ;  $R^1$  和  $R^2$  以及  $X^1$  和  $X^2$  如发明概述中所定义，并且  $R^1$  和  $R^2$  相同， $X^1$  和  $X^2$  相同) 可以用下面方案 B 中所述的方法制备。



在前面方案 A 中所述的条件下, 使化学式为 1 的化合物与化学式为 3 的氨基酯反应得到化学式为 4 的二酯化合物。根据前面方法 (a) 或 (b) 所述的步骤, 将化合物 4 转变成化学式为 I 的化合物。在方法 (a) 中, 用至少两当量化学式为  $R^1NH_2$  的胺处理二酯 4 得到化学式为 (I) 的化合物。反应在 40-60°C 下, 在极性有机溶剂 (如二甲基甲酰胺、四氢呋喃等) 中进行。

在方法 (b) 中, 先使二酯在碱性水解反应条件下水解得到二酸 5, 接着在前面所述的条件下使二酸 5 转变成具有化学式 (I) 的化合物。根据方案 B 中描述的步骤进行的化学式为 (I) 的化合物的合成在实施例 2-6 中有描述。

### 效用、测试和施用

#### 效用

本发明提供具有以下一种或多种活性的新的化合物: 抗细菌活性、抗真菌活性和抗肿瘤活性。因此, 该化合物和含有该化合物的组合物在治疗以下一种或多种疾病中是有用的: 细菌感染、真菌感染和癌症。不受任何理论的约束, 申请者相信化学式为 (I) 的化合物的抗细菌和抗真菌活性归因于它们与双链 DNA 小沟的结合。申请者进一步相信化学式为 (I) 的化合物的抗肿瘤活性归因于它们对拓扑异构酶的抑制。

拓扑异构酶在几乎所有的活细胞中是基本的酶。该酶有两个明显不同的类别: I 型和 II 型酶 (J. C. Wang, 评论)。通过暂时性地在一条 DNA 链上切口, 并使一条链围绕另一条链旋转, I 型拓扑异构酶使超螺旋 DNA 松弛。通过暂时性地裂解 DNA 双链, 并从切口穿过另一条 DNA, II 型拓扑异构酶使超螺旋 DNA 松弛并使连接的 DNA 去连环。自从它们被发现以来, 拓扑异构酶在癌症治疗中已经广泛作为靶标。

具有化学式 (I) 的化合物作为紫外线 (UV) 吸收体也是有用的。因此, 它们适合用于需要紫外线吸收添加剂的组合物中, 如塑料组合物。在这方面, 已知延长暴露于紫外线中会对某些塑料的物理特性和组成稳定性造成破坏作用。因此, 通常就需要在此类塑料组合物中包



含紫外线吸收添加剂，具有化学式(I)的化合物可以以这种方式应用。

由于本发明中化合物结合于 dsDNA 的小沟，从而诱导 DNA 双链的形成，因此它们还有进一步的用处。这一特性在测量 DNA 双链的形成或稳定性的生物试验或诊断试验中是有用的。例如，如果有人试图测量具有较低  $T_m$  的 DNA 双链的形成，他可以通过加入具有化学式(I)的化合物以增加双链数量。此类数量增长能够确保很容易地测量结合事件。当有人想通过双链的形成来检测单核苷酸多态性(SNP)时，也可以用到具有化学式(I)的化合物。化合物会使完全匹配的双链的  $T_m$  比具有单个突变的双链的  $T_m$  优先增加，从而使得能很容易地区别这两者。

### 施用和药物组合物

通常，本发明的化合物以治疗上的有效量施用，其施用方式可以是任何适合具有相似效能试剂的已接受的施用方式。本发明的化合物的实际施用量(即活性组分)依赖于许多因素，如待治疗疾病的严重性、治疗对象的年龄和相对健康程度、所使用化合物的效能、施用途径和形式，以及其它因素。该药物可以在一天之内施用超过一次，优选一天一次或两次。

具有化学式(I)的化合物的治疗上的有效量可以在大约每天 0.05 - 50 毫克每千克受体体重范围内；优选约 0.01-25mg/kg/day，更优选约 0.5-10mg/kg/day。因此，要给 70kg 体重的人施用，剂量范围最优选约为 35-70 毫克每天。

通常，本发明的化合物通过以下任一途径以药物组合物施用：口服、系统性施用(例如，透过皮肤的、鼻内的或者用栓剂)或肠胃外施用(例如，肌肉内、静脉内或皮下)。优选的施用方法是使用方便的日剂量方案的口服，它可以根据疾病程度调节。组合物的形式可以是片剂、药丸、胶囊、半固体、粉末、缓释剂型、溶液、混悬液、酞剂、气雾剂或其它任何合适的组合物。本发明的化合物的另一种优选的施用方法是吸入法。这是一种用来直接将治疗试剂传送给呼吸道以

治疗疾病(如哮喘以及类似的或相关的呼吸道疾病)的有效的方法(见美国专利 5, 607, 915)。

剂型的选择依赖于多种因素如药物施用的方式和药物物质的生物利用度。对于通过吸入法的传送, 化合物可以配制成液体溶液、混悬液、气雾剂推进剂或干粉, 并且装载在合适的分样器中以施用。有几种药物吸入装置—雾化吸入器、定量吸入器(MDI)和干粉吸入器(DPI)。雾化吸入器产生一股高速气流使治疗试剂(配制成液体形式)以薄雾形式喷射入患者的呼吸道。用于MDI的剂型通常是与压缩气体一起包装的剂型。当操作时, 该装置通过压缩气体释放定量的治疗试剂, 从而提供了一种施用固定量试剂的可靠方法。DPI以自由流动的粉末形式分发治疗试剂, 通过该装置, 这些自由流动的粉末能够在患者呼吸期间散布在患者的吸入气流中。为了得到自由流动的粉末, 将治疗试剂和赋形剂(如乳糖)一起配制。定量的治疗试剂以胶囊形式贮存, 并在每次操作时分发治疗试剂。

最近, 根据增加表面积(即降低颗粒尺寸)能增加生物利用度的原理, 特别针对那些显示较差生物利用度的药物开发了药物剂型。例如, 美国专利 No. 4, 107, 288 描述了一种含有尺寸在 10 到 1000nm 之间的颗粒的药物剂型, 在该剂型中, 活性材料由交联的大分子基质支撑。美国专利 No. 5, 145, 684 描述了一种药物剂型的生产, 其中在表面改性剂存在的情况下, 将药物物质研磨成纳米粒(平均颗粒尺寸 400nm), 然后分配入液体介质中以得到显示非常高的生物利用度的药物剂型。

通常组合物由化学式为(I)的化合物和至少一种药学上可接受的赋形剂组成。可接受的赋形剂是无毒的、能辅助施用并且对化学式为(I)的化合物的治疗益处没有不利影响。此类赋形剂可以是本领域技术人员通常能得到的任何固体赋形剂、液体赋形剂、半固体赋形剂或者在气雾剂组合物中可以是气体赋形剂。

固体药物赋形剂包括淀粉、纤维素、滑石、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸镁、硬脂酸钠、甘油

单硬脂酰酯、氯化钠、无水脱脂乳等。液体和半固体赋形剂可以选自甘油、丙二醇、水、乙醇和各种油，包括那些源于石油、动物、植物或人工合成的油，例如，花生油、豆油、矿物油、芝麻油等。优选的液体载体，特别是用于可注射溶液的，包括水、盐水、葡萄糖水溶液和甘醇。

压缩气体可以用来使本发明的化合物以气雾剂形式分配。适合于这一目的惰性气体是氮气、二氧化碳等。另外一些合适的药物赋形剂和它们的剂型在 Remington's Pharmaceutical Sciences (E. W. Martin 编, Mack Publishing Company, 第 18 版, 1990) 中有描述。

剂型中化合物的量可以在本领域技术人员所用的全部范围内变动。通常，按重量百分比 (wt%) 记，剂型中含有占总剂型约 0.01-99.99wt% 的具有化学式 (I) 的化合物，并且还有一种或多种合适的药物赋形剂作为平衡物。优选的，化合物以大约 1-80wt% 的比例存在。下面描述了含有化学式为 (I) 的化合物的代表性药物剂型。

## 实施例

下面的制备与实施例是为了使本领域的技术人员更清楚地理解和实行本发明的。它们不应该被认为是限制了本发明的范围，而应该被认为仅仅是其说明和陈述。

使用了下列缩写：AcOEt 指乙酸乙酯；DCE 指 1,2-二氯乙烷；DCM 指二氯甲烷；DIPEA 指二异丙基乙胺；DMF 指二甲基甲酰胺；DMSO 指二甲亚砜；EtOH 指乙醇；MeOH 指甲醇；THF 指四氢呋喃；Pyr 指吡啶；TFA 指三氟乙酸；DCC 指 N,N'-二环己基碳二亚胺；DCU 指 N,N'-二环己脲；Me 指甲基基团；Et 指乙基基团；Phe 指苯基基团；Np 指 4-硝基苯基基团；Pfp 指五氟苯基基团；Gly 指甘氨酸残基；Lys 指赖氨酸残基；Arg 指精氨酸残基；Py 指 4-氨基-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸残基；

Npc (Me) 指 4-硝基-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸残基; Npc (Et) 指 4-硝基-1-乙基-1H-吡咯-2-羧酸残基; Npc (Pr) 指 4-硝基-1-丙基-1H-吡咯-2-羧酸残基; MMT 指单甲氧基三苯甲基(对甲氧苯基二苯基甲基)保护基; Bzl 指苯甲基保护基; Boc 指叔丁氧基羰基保护基; Fmoc 指芴基甲氧羰基保护基; Z 指苄氧基羰基保护基; t-Bu 指叔丁基保护基; Boc-5-Ain 指 N-Boc-5-氨基-吡啶-2 羧酸; Boc-5-Ain-HBA-AMPS 指 N-Boc-5-氨基-吡啶-2 羧酸(对羟基苯甲酰胺甲基聚苯乙烯)酯; Boc Py 指 N-Boc-4-氨基-1-甲基吡咯-2-羧酸; Boc-Py-HBA-AMPS 指 N-Boc-4-氨基-1-甲基吡咯-2-羧酸(对羟基苯甲酰胺甲基聚苯乙烯)酯; BOP 指六氟磷酸苯并三唑-1-基氧代-三(二甲氨基)磷鎓; DE 指 2-(二甲氨基)乙胺; DIC 指 N,N'-二异丙基碳二亚胺; DIEA 指二异丙基乙胺; DMAP 指 4-二甲氨基吡啶; DMF 指二甲基甲酰胺; DP 指 3-(二甲氨基)丙胺; HBA-AMPS 指对羟基苯甲酰胺-甲基聚苯乙烯; HBTU 指六氟磷酸 O-苯并三唑-1 基-N,N,N',N'-四甲基脲鎓; HCl 指盐酸; Pzl-Gu-(Boc)<sub>2</sub> 指 N,N'-双(叔丁氧基羰基)-1H-吡啶-1-甲脒; TFA 指三氟乙酸; NMR 指核磁共振波谱; MS 指质谱; TLC 指在硅胶上的薄层色谱; HPLC 指高压液相色谱; mp 指熔点; mp d 指分解熔点。在报告 NMR 数据时,化学位移以 ppm 单位给出,偶合常数(J)以赫兹(Hz)单位给出。所有熔点均为未校正的。

## 实施例 1

### (遵循方案 1)

#### (A) 吡啶-2,5-二羧酸, 1 的合成

将 1H-吡啶-2,5-二羧酸 2-乙酯\* (20.0 g, 85.75 mmole) 和 NaOH (100 mmole) 在水/MeOH 混和物 (1/1) (200 ml) 中的溶液在 50℃ 搅动 4 小时, 然后在环境温度过夜。将反应混和物在真空中蒸干, 将残余物溶解于水 (200 ml) 中并加入 1 M HCl 酸化至 pH=3。在过滤器中收集沉淀物, 用水 (3x50 ml) 洗涤, 在干燥器中用五氧化二磷干燥,

即可制得白色晶体状的化合物吡啶-2,5-二羧酸 1 (10.38 g, 59%)。MS: 203.7 (M-2H); 204.7 (M-H)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 8.32 (m, 1H, H-4, 吡啶); 7.80 (m, 1H, H-6, 吡啶); 7.45 (d, 1H, H-7, 吡啶); 7.22 (s, 1H, H-3, 吡啶)。

(B) 1H-吡啶-2,5-二羧酸二五氟苯酯, 2

将吡啶-2,5-二羧酸 1 (5.15 g, 25.1 mmole), 五氟苯酚 (10.00 g, 52.7 mmole) 和 DCC (10.9 g, 52.7 mmole) 在 DMF (250 ml) 中的溶液在环境温度搅动 16 小时并蒸发。将残余物与甲苯 (3x100 ml) 共同蒸发并在相同的溶剂中重结晶。产量: 11.16 g (82.5%)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 13.03 (s, 1H, H-1, 吡啶); 8.76 (m, 1H, H-4, 吡啶); 8.08 (m, 1H, H-6, 吡啶); 7.84 (s, 1H, H-3, 吡啶); 7.70 (d, 1H, H-7, 吡啶)。<sup>19</sup>F-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): -153.22 和 -153.60 (m, 2F 和 2F, F-2 和 F-6, -OPfp); -157.15 和 -157.80 (m, 1F 和 1F, F-4, -OPfp); -162.03 和 -162.40 (m, 2F, F-3 和 F-5, -OPfp)。

(C) Npc (Me) -OH, 3

将 Npc (Me) -OMe (18.4 g, 100.0 mmole) 和 NaOH (200 mmole) 在水/MeOH 混和物 (2/3) (200 ml) 中的溶液在 50℃ 搅动 6 小时, 然后在环境温度过夜并蒸发。将残余物溶解于水 (200 ml) 中并加入 1 N HCl 酸化使 pH 为 2.0。收集微黄色的沉淀物, 用水 (5x250 ml) 洗涤, 在真空中用五氧化二磷干燥, 即可制得 16.16 g (95%) 的微黄色晶体状物质 Npc (Me) -OH, 3。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 7.61 和 7.40 (m 和 m, 1H 和 1H, H-3 和 H-5, Py); 3.87 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>, Py)。

(D) Npc (Me) -Cl, 4

将经过搅拌的 Npc (Me) -OH 3 (13.66 g, 80.0 mmole) 在亚硫酸酐 (50ml) 中的悬浮液温和回流 4 小时并蒸发。残余物与无水甲苯 (3x50 ml) 共同蒸发, 不经纯化即用于下一步骤。

(E) Npc (Me) -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, 5

将氨基丙腈 (14.0 g, 200.0 mmole) 逐滴地加入到 Npc (Me) -Cl 4 (80.0 mmole) 和 DIPEA (13.0 g, 17.4 ml, 100 mmole) 在 0℃ 无

水甲苯 (300 ml) 中的经过搅拌的溶液中。将反应混和物在 0℃ 搅动 30 分钟, 在环境温度搅动 3 小时并蒸发。将残余物在 AcOEt (300 ml) 中悬浮, 用水 (2x100 ml)、0.1M HCl (3x100 ml)、盐水 (2 x100 ml)、9.5% NaHCO<sub>3</sub> (3x100 ml) 和盐水 (2x100 ml) 洗涤。有机层用硫酸钠干燥并蒸发得到 17.70 g (99%) 的白色晶体状物质 Npc (Me)-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN<sub>5</sub>。MS: 223.11 (M+H)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 7.59 和 7.18 (m 和 m, 1H 和 1H, H-3 和 H-5, Py); 6.63 (t, 1H, -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 3.99 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>, Py); 3.67 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN); 2.74 (t, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN)。

(F) Npc (Me) -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub>. HCl, 6

Npc (Me) -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN<sub>5</sub> (9.0 g, 40.5 mmole) 在无水 EtOH (250 ml) 中的悬浮液用 HCl (气体) 在环境温度饱和, 在 0℃ 放置 16 小时并蒸发。将残余物与无水甲苯 (3x200 ml) 共同蒸发并在无水 EtOH (250 ml) 悬浮。悬浮液用氨 (气体) 在 0℃ 饱和, 在 0℃ 放置 16 小时并蒸发。残余物从水-乙醇中结晶得到 8.26 g (74%) 的白色晶体状物质 Npc (Me) -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub> 6。 <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 9.08 和 8.76 (bs 和 bs, 4H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub>. HCl); 8.13 和 7.52 (d 和 d, 1H 和 1H, H-3 和 H-5, Py); 3.99 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>, Py); 3.51 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub>); 2.62 (t, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub>)。

(G) 1H- 吡啶 -2,5- 二羧酸双 -{[5- (2-亚氨基氨基甲酰基 (carbamimidoyl)-乙基氨基甲酰基) -1-甲基-1H-吡咯-3-基]-酰胺 7

将 10%Pd/C (Degussa 类型, Aldrich) (0.1 g) 加入到 Npc (Me) -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub> 6 (55.2 mg, 0.20 mmole) 在甲醇 (20 ml) 中的经过搅拌的溶液中。将烧瓶倒空, 再用氢气冲洗 3 次, 最后在 40 到 50psi 用氢气充满。将所得的悬浮液在 23℃ 剧烈搅动 1 小时。悬浮物质通过一层在布氏漏斗中的硅藻土过滤除掉, 之后漏斗用少量 MeOH 漂洗数次。将滤液和洗出液一起在真空中蒸发至干燥。所得的 4-氨基-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸(2-脲基-乙基)-酰胺不经纯化即用于下一步骤。

将化合物 2 (51.0 mg, 0.095 mmole) 和新鲜制备 (如上面所述)

的 4-氨基-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸(2-脲基-乙基)-酰胺(22.0 mmole) 在无水 DMF (2.0 ml) 中的溶液在环境温度放置 72 小时并蒸发。残余物从 MeOH-醚再次沉淀, 将沉淀物在真空中干燥并溶解于水(5.0 ml)。所得的水溶液通过 0.45  $\mu\text{m}$  过滤器过滤并冻干得到 53 mg (83%) 的 1H-吡咯-2,5-二羧酸双-[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-甲基-1H-吡咯-3-基]-酰胺 7。MS: 294.60 (带双电荷的峰, (M+H)/2)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 11.97 (s, 1H, H-1, 吡咯); 10.54 和 10.22 (s 和 s, 1H 和 1H, -C(=O)NH); 9.01 和 8.67 (bs 和 bs, 4H 和 4H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub>xHCl); 8.31 (m, 2H (带有\*), H-6, 吡咯); 8.30 (m, \*, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub>xHCl); 8.25 (t, 1H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub>xHCl); 7.79 (m, 1H, H-6, 吡咯); 7.48 (m, 1H, H-7, 吡咯); 7.45 (s, 1H, H-3, 吡咯); 7.31 和 7.28 和 6.97 和 6.96 (s 和 s 和 d 和 s, 4H, H-3 和 H-5, Py<sub>1</sub> 和 Py<sub>2</sub>); 3.83 和 3.81 (s 和 s, 6H, NCH<sub>3</sub>, Py<sub>1</sub> 和 Py<sub>2</sub>); 3.50 (m, 4H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub>); 2.62 (m, 4H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=NH)NH<sub>2</sub>)。

## 实施例 2

*1H-吡咯-2,5-二羧酸双-[[5-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1-甲基-1H-吡咯-3-基]-酰胺} 的合成*

(A) 4-({1-[2-(5-甲氧羰基-1-甲基-1H-吡咯-3-基氨基甲酰基)-1H-吡咯-5-基]-甲酰氧基}-氨基)-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸甲酯, 8 将 10% 的 Pd/C (Degussa 类型, Aldrich) (0.2 g) 加入到化合物 4-硝基-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸甲酯 (967 mg, 5.25mmole) 在 AcOEt/EtOH (3/2) 混和物 (50 ml) 中的搅拌过的溶液中。将烧瓶倒空, 再用氢气冲洗 3 次, 最后在 40 到 50psi 用氢气充满。将所得的悬浮液在 23°C 剧烈搅动 1 小时。悬浮的物质用一层在布氏漏斗中的硅藻土过滤除掉, 之后漏斗用少量 AcOEt 和 EtOH 漂洗数次。将滤液和洗出液一起在真空中蒸发至干燥。所得的 4-氨基-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸

甲酯不经纯化即用于下一步骤。

将化合物 7 (1.13, 2.1 mmole) 和新鲜制备 (如上面所述) 的 4-氨基-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸甲酯在无水的 DMF (10.0 ml) 中的溶液在环境温度放置 48 小时并蒸发。残余物从 DMF (10 ml) -0.01M HCl (100ml) 再次沉淀。在过滤器中收集沉淀, 用水 (3x5 ml) 洗, 最后用醚 (2x3 ml) 洗涤, 并在真空中用五氧化二磷干燥, 即制得定量产量的 4-({1-[2-(5-甲氧羰基-1-甲基-1H-吡咯-3-基氨基甲酰基)-1H-吡咯-5-基]-甲酰氧基}-氨基)-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸甲酯 8。MS: 478.14 (M+H)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 11.96 (s, 1H, H-1, 吡咯); 10.43 和 10.23 (s 和 s, 1H 和 1H, -C(=O)NH); 8.29 (m, 1H, H-6, 吡咯); 7.50 (m, 3H, H-7, 吡咯; H-3 或 H-5, Py<sub>1</sub> 和 Py<sub>2</sub>); 7.37 (s, 1H, H-3, 吡咯); 6.95 (m, 2H, H-3 或 H-5, Py<sub>1</sub> 和 Py<sub>2</sub>); 3.86 和 3.85 (s, 6H, NCH<sub>3</sub>, Py<sub>1</sub> 和 Py<sub>2</sub>); 3.74 和 3.73 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>, Py<sub>1</sub> 和 Py<sub>2</sub>)。

(B) 4-({1-[2-(5-羟基羰基-1-甲基-1H-吡咯-3-基氨基甲酰基)-1H-吡咯-5-基]-甲酰氧基}-氨基)-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸, 9

将 4-({1-[2-(5-甲氧羰基-1-甲基-1H-吡咯-3-基氨基甲酰基)-1H-吡咯-5-基]-甲酰氧基}-氨基)-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸甲酯 8 (1.04 g, 2.18 mmole) 和 NaOH (10 mmole) 在水/MeOH 混和物 (1/4) (25 ml) 中的溶液在 50℃ 搅动 6 小时, 然后在环境温度搅动过夜。将反应混和物在真空中蒸干, 将残余物溶解于水 (50 ml) 中并加入 1 M HCl 酸化使 pH=3。在过滤器中收集沉淀物, 用水 (3x50 ml) 洗涤, 在干燥器中用五氧化二磷干燥, 即可制得 0.85 g (87%) 白色晶体状物质 4-({1-[2-(5-羟基羰基-1-甲基-1H-吡咯-3-基氨基甲酰基)-1H-吡咯-5-基]-甲酰氧基}-氨基)-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸 9。MS: 448.08 (M-H)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 11.96 (s, 1H, H-1, 吡咯); 10.45 和 10.25 (s 和 s, 1H 和 1H, -C(=O)NH); 8.30 (m, 1H, H-6, 吡咯); 7.48 (m, 3H (带有\*), H-7, 吡咯); 7.49 和 7.46 (d 和 d, \*, H-3 或 H-5, Py<sub>1</sub> 和 Py<sub>2</sub>); 7.39 (s, 1H, H-3, 吡咯), 6.91 (m, 2H, H-3



或 H-5, Py<sub>1</sub> 和 Py<sub>2</sub>) ; 3.84 和 3.83 (s 和 s, 6H, NCH<sub>3</sub>, Py<sub>1</sub> 和 Py<sub>2</sub>) 。

(C) 4-({1-[2-(5-五氟苯氧基羰基-1-甲基-1H-吡咯-3-基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-甲酰氧基}-氨基)-1-甲基-1H-吡咯-2 羧酸五氟苯酯, 10

将 4-({1-[2-(5-羟基羰基-1-甲基-1H-吡咯-3-基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-甲酰氧基}-氨基)-1-甲基-1H-吡咯-2 羧酸 9 (0.85 g, 1.86 mmole)、五氟苯酚 (0.72 g, 3.9 mmole) 和 DCC (0.81 g, 3.9 mmole) 在 DMF (15 ml) 中的溶液在环境温度搅动 16 小时并蒸发。将残余物与甲苯 (3x100 ml) 共同蒸发, 并在一个硅胶柱 (2.5x25 cm) 中以甲苯/AcOEt (7:3) 作为洗脱液进行色谱, 制得 1.23 g (84%) 的 4-({1-[2-(5-五氟苯氧基羰基-1-甲基-1H-吡咯-3-基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-甲酰氧基}-氨基)-1-甲基-1H-吡咯-2 羧酸五氟苯酯 10。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 12.03 (s, 1H, H-1, 吡啶); 10.60 和 10.41 (s 和 s, 1H 和 1H, -C(=O)NH); 7.81 (m, 3H (带有\*), H-6, 吡啶); 7.80 和 7.78 (d 和 d, \*, H-3 或 H-5, Py<sub>1</sub> 和 Py<sub>2</sub>); 7.52 (m, 1H, H-6, 吡啶); 7.41 (s, 1H, H-3, 吡啶); 7.34 (m, 2H, H-3 或 H-5, Py<sub>1</sub> 和 Py<sub>2</sub>); 3.92 和 3.90 (s 和 s, 6H, NCH<sub>3</sub>, Py<sub>1</sub> 和 Py<sub>2</sub>)。 <sup>19</sup>F-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): -153.56 和 -153.60 (m 和 m, 2F 和 2F, F-2 和 F-6, -OPfp); -158.17 和 -158.27 (m 和 m, 1F 和 1F, F-4, -OPfp); -162.69 和 -162.73 (m 和 m, 2F 和 2F, F-3 和 F-5, -OPfp)。

(D) 1H-吡啶-2,5-二羧酸双-{{5-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1-甲基-1H-吡咯-3-基}-酰胺} 11

将 4-({1-[2-(5-五氟苯氧基羰基-1-甲基-1H-吡咯-3-基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-甲酰氧基}-氨基)-1-甲基-1H-吡咯-2 羧酸五氟苯酯 10 (150 mg, 0.192 mmole) 和 1, 2-乙二胺 (0.26 ml, 3.94 mmole) 在无水的 DMF (2.0 ml) 中的溶液在环境温度放置 24 小时并蒸发。将残余物溶解于 0.1 TFA 中, 经 HPLC (Vydac 12 μm C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 流速 20mL/min) 纯化制得 1H-吡啶-2,5-二羧酸双-{{5-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1-甲基-1H-吡

咯-3-基]-酰胺} 11, 其以双-三氟乙酸盐形式存在: 56 mg (38%)。ES MS: 534.28 (M+H<sup>+</sup>的计算值:534.28)。

### 实施例 3

*1H*-吡啶-2,5-二羧酸双-{[5-(2-二甲氨基-乙基氨基甲酰基)-1-甲基-1*H*-吡啶-3-基]-酰胺}, 12的合成

化合物 12 依照上面对化合物 11 所述的方法合成。产量: (35%)  
化合物 12。ES MS: 590.32 (M+H<sup>+</sup>的计算值:590.32)。

### 实施例 4

*1H*-吡啶-2,5-二羧酸双-{[5-(2-氨基-丙基氨基甲酰基)-1-甲基-1*H*-吡啶-3-基]-酰胺}, 13的合成

化合物 13 依照上面对化合物 11 所述的方法合成。产量: (37%)  
化合物 12。结构经 ES MS 证实。

### 实施例 5

*1H*-吡啶-2,5-二羧酸双-{[5-(2-二甲氨基-丙基氨基甲酰基)-1-甲基-1*H*-吡啶-3-基]-酰胺}, 14的合成

化合物 12 依照上面所述的化合物 11 的方法合成。产量: (31%)  
化合物 12。结构经 ES MS 证实。

### 实施例 6

*1H*-吡啶-2,5-二羧酸双-{[1-甲基-5-(2-哌嗪-1-基-乙基氨基甲酰基)-1*H*-吡啶-3-基]-酰胺}, 15的合成

化合物 15 依照上面所述的化合物 10 的方法合成。产量: (15%)

化合物 15。结构经 ES MS 证实。

### 实施例 7

1-甲基-吡啶-2,5-二羧酸双-[[5-(2-亚氨基氨基甲基乙酰基-乙基氨基甲酰基)-1-甲基-1H-吡咯-3-基]-酰胺], 20 的合成

#### (A) 1H-吡啶-2,5-二羧酸二乙酯, 16

将 1H-吡啶-2,5-二羧酸 2-乙酯 (20.0 g, 85.75 mmole) 在饱和 HCl/EtOH (200 ml) 中的悬浮液在 55℃ 搅动 24 小时, 并在真空中蒸发至干燥。将残余物从二噁烷中冻干制得 22.18 g (99%) 白色粉末状 1H-吡啶-2,5-二羧酸二乙酯, 16。MS: 262.12 (M+H)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 12.23 (s, 1H, H-1, 吡啶); 8.34 (m, 1H, H-4, 吡啶); 7.83 (m, 1H, H-6, 吡啶); 7.49 (m, 1H, H-7, 吡啶), 7.30 (s, 1H, H-3, 吡啶), 4.31 (m, 4H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1.32 (m, 4H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。

#### (B) 1-甲基-吡啶-2,5-二羧酸二乙酯, 17

将氢氧化钠 (60%-悬浮液, 144 mg, 3.6 mmole) 加入到 1H-吡啶-2,5-二羧酸二乙酯 16 (784 mg, 3.0 mmole) 在无水的 DMF (15.0 ml) 中的搅拌过的溶液中并在环境温度放置 30 分钟。将 MeI (280 μl, 4.5 mmole) 加入到所得的反应混合物中, 在环境温度放置 16 小时并蒸干。残余物在 AcOEt (100 ml) 中悬浮, 用水 (2x20 ml)、0.01 M HCl (3x20 ml) 和盐水 (2x100 ml) 洗涤。将有机层用硫酸钠干燥并蒸发得到 800mg (97%) 黄色油状物 1-甲基-吡啶-2,5-二羧酸二乙酯 17。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 8.45 (m, 1H, H-4, 吡啶); 8.03 (m, 1H, H-6, 吡啶); 7.40 (m, 1H, H-7, 吡啶); 7.38 (s, 1H, H-3, 吡啶); 4.40 (m, 4H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 4.10 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>, 吡啶); 1.42 (m, 4H, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)。

#### (C) 1-甲基-吡啶-2,5-二羧酸, 18

将 1-甲基-吡啶-2,5-二羧酸二乙酯 17 (675 mg, 2.5 mmole) 和 NaOH (5.00 mmole) 在水/MeOH (1/4) 混合物 (20 ml) 中的溶液在

50℃搅动 4 小时，然后在环境温度搅动过夜。将反应混和物在真空中蒸干，将残余物溶解于水（20 ml）中并用 1 M HCl 酸化使 pH=3。在过滤器中收集沉淀物，用水（3x5 ml）洗涤，在干燥器中用五氧化二磷干燥，即可制得 488 mg（89%）的白色晶体状物质 1-甲基-吡啶-2,5-二羧酸 18。MS: 218.2 (M-H)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 8.35 (m, 1H, H-4, 吡啶); 7.90 (m, 1H, H-6, 吡啶); 7.41 (d, 1H, H-7, 吡啶); 7.32 (s, 1H, H-3, 吡啶); 4.05 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>, 吡啶)。

(D) 1-甲基-吡啶-2,5-二羧酸二(2,3,5,6-四氟苯)酯, 19

将三氟乙酸四氟苯基酯（6 mmole）在无水 DCM（20 ml）中的溶液逐滴地加入到 1-甲基-吡啶-2,5-二羧酸 18（439 mg, 2.0 mmole）和三乙胺（12 mmole）在无水 DCM（20 ml）中的搅拌过的 0℃溶液中。将搅动过的反应混和物冰浴 2 小时，然后环境温度放置过夜。在真空中将反应混和物蒸发至干燥，残余物溶解于 DMF（20 ml），所得溶液以该状态用于下一步反应。

(E) 1-甲基-吡啶-2,5-二羧酸双-[[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-甲基-1H-吡咯-3-基]-酰胺], 20

将 10% Pd/C (Degussa 类型, Aldrich) (0.1 g) 加入到化合物 6 (110 mg, 0.40 mmole) 在甲醇 (20 ml) 中的搅拌过的溶液中。将烧瓶倒空，再用氢气冲洗 3 次，最后在 40 到 50psi 用氢气充满。将所得的悬浮液在 23℃剧烈搅动 1 小时。悬浮的物质用一层在布氏漏斗中的硅藻土过滤除掉，之后漏斗用少量 MeOH 漂洗数次。将滤液和洗出液一起在真空中蒸发至干燥。所得的 4-氨基-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸 (2-脲基-乙基)-酰胺不经纯化即用于下一步骤。

将 1-甲基-吡啶-2,5-二羧酸二(2,3,5,6-四氟苯)酯 19 (2.0 ml, 0.2 mmole; 见实施例 19) 和新鲜制备 (如上面所述) 的 4-氨基-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸 (2-脲基-乙基)-酰胺 (0.4 mmole) 在无水 DMF (2.0 ml) 中的溶液在环境温度放置 72 小时并蒸发。残余物从 MeOH-醚再次沉淀，将沉淀在真空中干燥并溶解于 0.1 TFA 中，经 HPLC (Vydac 12 μm C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 流速

20mL/min) 纯化制得 1-甲基-吡啶-2,5-二羧酸双-{[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-甲基-1H-吡啶-3-基]-酰胺} 20, 其是一种双三氟乙酸盐: mg (18%)。结构经 ES MS 证实。

### 实施例 8

#### 1H-吡啶-2,5-二羧酸双-{[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1-1H-吡啶-5-基]-酰胺}的合成

(A) 5-({1-[2-(2-乙氧羰基-1H-吡啶-5-基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-甲酰氧基}-氨基)-1H-吡啶-2-羧酸乙酯, 21

将 10% Pd/C (Degussa 类型, Aldrich) (0.1 g) 加入到 5-硝基吡啶-2-羧酸乙酯 (220 mg, 0.93 mmole) 在甲醇 (10 ml) 中的搅拌过的溶液中。将烧瓶倒空, 再用氢气冲洗 3 次, 最后在 40 到 50psi 用氢气充满。将所得的悬浮液在 23°C 剧烈搅动 1 小时。悬浮物质用一层在布氏漏斗中的硅藻土过滤除掉, 之后漏斗用少量 MeOH 漂洗数次。将滤液和洗出液一起在真空中蒸发至干燥。所得的 4-氨基-1-甲基-1H-吡啶-2-羧酸 (2-脲基-乙基)-酰胺不经纯化即用于下一步骤。

将化合物 2 (200 mg, 0.372 mmole) 和新鲜制备的 5-氨基吡啶-2-羧酸乙酯 (如上面所述) 以及 4-氨基-1-甲基-1H-吡啶-2-羧酸甲酯在无水 DMF (5.0 ml) 中的溶液在环境温度放置 48 小时并蒸发。残余物从 DMF (1.0 ml) -0.01 M HCl (10ml) 再次沉淀。将沉淀物在过滤器中收集, 用水 (3x5 ml) 洗, 最后用醚 (2x3 ml) 洗涤, 然后在真空中用五氧化二磷干燥即制得 142 mg (66%) 的 5-({1-[2-(2-乙氧羰基-1H-吡啶-5-基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-甲酰氧基}-氨基)-1H-吡啶-2-羧酸乙酯 21。结构经 ES MS 和 <sup>1</sup>H-NMR 证实。

(B) 1H-吡啶-2,5-二羧酸双-{[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1-1H-吡啶-5-基]-酰胺}, 22

将 5-({1-[2-(2-乙氧羰基-1H-吡啶-5-基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-甲酰氧基}-氨基)-1H-吡啶-2-羧酸乙酯 21 (115 mg, 0.2

mmole) 和 1, 2-乙二胺 (1.5 ml) 在无水 DMF (2.0 ml) 中的溶液在 55℃ 放置 16 小时并蒸发。将残余物溶解于 0.1 TFA 中, 经 HPLC (Vydac 12  $\mu$ m C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 流速 20mL/min) 纯化制得 1H-咪唑-2, 5-二羧酸双-{[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1-1H-咪唑-5-基]-酰胺} 22, 其是一种双-三氟乙酸盐: 62 mg (%)。ES MS: 606.27 (M+H<sup>+</sup>)。

### 实施例 9

1H-咪唑-2, 5-二羧酸双-{[5-(2-胍基-乙基氨基甲酰基)-1-甲基-1H-吡咯-3-基]-酰胺}的合成

#### (A) MMT-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 23

将 MMT-Cl (15.44 g, 50 mmole) 逐滴加入到 1, 2-乙二胺 (24.0 g, 400 mmole) 在 DCM (500 ml) 中的搅拌过的 0℃ 溶液中。将反应混合物在环境温度放置 2 小时, 用 NaHCO<sub>3</sub> (5x100 ml) 和水 (3x100 ml) 洗涤, 用硫酸钠干燥并蒸发。残余物在一个硅胶柱 (5.0x25 cm) 中以氯仿/MeOH (19:1+0.01%氨) 混合物作为洗脱液进行色谱, 制得 11.38 g (68%) 的淡黄色泡沫状的 MMT-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 23。结构经 <sup>1</sup>H-NMR 证实。

#### (B) MMT-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=N-Boc)NH-Boc, 24

将 MMT-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>23 (8.06 g, 24.24 mmole)、1-H-吡唑-1-[N, N'-双(叔丁氧基羰基)]甲脒 (6.02 g, 19.4 mmole) 在 MeCN (100 ml) 中的溶液在环境温度搅动 16 小时并蒸发。将残余物与甲苯 (3x100 ml) 共同蒸发, 并在一个硅胶柱 (2.5x25 cm) 中以己烷/AcOEt (9:1) 作为洗脱液进行色谱, 制得 10.71 g (96%) 的 MMT-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=N-Boc)NH-Boc24。结构经 ES MS 和 <sup>1</sup>H-NMR 证实。

#### (C) NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=N-Boc)NH-Boc, 25

将 10%Pd/C (Degussa 类型, Aldrich) (1.0 g) 加入到 MMT-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(=N-Boc)NH-Boc24 (7.0 mg, 12.2 mmole) 在 AcOEt/MeOH 混合物 (3:1, 200 ml) 中的搅拌过的溶液中。将烧瓶倒

空，再用氢气冲洗3次，最后在40到50psi用氢气充满。将所得的悬浮液在23℃剧烈搅动24小时。悬浮物质用一层在布氏漏斗中的硅藻土过滤除掉，之后漏斗用少量MeOH漂洗数次。将滤液和洗出液一起在真空中蒸发至干燥。所得的化合物  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{N}-\text{Boc})\text{NH}-\text{Boc}$  25 不经纯化即用于下一步骤。

(D) 1H-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[5-(2\text{-胍基-乙基氨基甲酰基})-1\text{-甲基-1H-吡啶-3-基}]-\text{酰胺}\}$ , 26

将化合物 10 (78.2 g, 0.10 mmole) 和  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(=\text{N}-\text{Boc})\text{NH}-\text{Boc}$  25 (144 mg, 0.25 mmole) 在无水的DMF (1.0 ml) 中的溶液在环境温度放置24小时并蒸发。将残余物溶解于TFA/DCM/苯甲醚 (49/49/2) 混和物中，环境温度放置1小时并蒸发。将残余物溶解于0.1 TFA中，经HPLC (Vydac 12  $\mu\text{m}$   $\text{C}_{18}$  2.2x25 cm 柱, 0%到60%乙腈梯度超过30分钟, 流速20mL/min) 纯化制得1H-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[5-(2\text{-胍基-乙基氨基甲酰基})-1\text{-甲基-1H-吡啶-3-基}]-\text{酰胺}\}$ , 26, 其是一种双-三氟乙酸盐: 56 mg (38%)。ES MS: 618.32 (M+H)。

### 实施例 10

1H-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[5-(2\text{-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基})-1\text{-丙基-1H-吡啶-3-基}]-\text{酰胺}\}$  30 的合成

(A) 吡啶-2,5-二羧酸 (31)

参照文献 (R. Miller 和 K. Olsson, *Acta Chemica Scandinavica* B, 1981, 35, 303-304) 从吡啶-2-甲醛经三个步骤制得吡啶-2,5-二甲醛。 $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$ 13.08 (br. s), 9.74 (s), 7.04 (s)。

将吡啶-2,5-二甲醛 (0.21 g, 1.71 mmol) 溶解于35 ml 热水并置于热水浴 (95-100℃) 中。将  $\text{KMnO}_4$  (0.788 g, 5.13 mmol) 在10 ml 水中的溶液在5分钟内逐滴地加入。将反应混和物在95-100℃搅动1小时，然后冷却到70℃。将褐色的沉淀物 ( $\text{MnO}_2$ ) 过滤出来并用水洗涤。将滤液在0℃用5 M HCl 酸化到 pH 2, 蒸发至干燥，并在高真空

中干燥。将产物溶解于 80 ml 无水的 EtOH 中，并将溶液通过一个漏斗过滤。将滤液蒸发得到一种褐色的固体 (0.25 g)，该固体不经进一步纯化即用于下一步反应。ESI MS: 154.00 (M-H<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.68 (br. s), 12.17 (s), 6.72 (s)。

(B) 吡咯-2,5-二羧酸二五氟苯酯 (32)

在三乙胺 (0.48 ml, 3.42 mmol) 存在时，将三氟乙酸五氟苯酯在 2 分钟内于 0℃ 加入到吡咯-2,5-二羧酸 (0.24 g) 在 10 ml 无水的 DMF 中的溶液中。将反应混合物缓缓加热到室温并在室温搅动过夜。将溶剂蒸发后，将残余物溶解于 30 ml 乙酸乙酯中，用水 (30 ml x3) 洗涤并用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥。溶剂蒸发后，将产物吸附到硅胶 (其放置在硅胶柱的顶端) 上，以甲苯-乙酸乙酯 (30:1) 为洗脱液进行快速色谱。得到了小晶体产物 (0.406 g)。<sup>19</sup>F NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ -152.13 (d), -156.80 (t), -161.60 (t)。上述两个反应步骤的总产率为 49%。

(C) 1H-吡咯-2,5-二羧酸双-{[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-丙基-1H-吡咯-3-基]-酰胺} (33)

常规程序 A: 在氩中，将 20 mg 5% 的 Pd/C 加入到 4-硝基-1-丙基-1H-吡咯-2-羧酸 (2-亚氨基氨基甲酰基-乙基)-酰胺 (52 mg, 0.2 mmol) 在 15 ml MeOH 中的溶液中。将反应混合物用氢气闪蒸并在 30 psi 氢气中振动 30 分钟。催化剂通过硅藻土过滤除掉并用甲醇洗涤。将滤液蒸发至干燥即得到 4-氨基-1-丙基-1H-吡咯-2-羧酸 (2-亚氨基氨基甲酰基-乙基)-酰胺 34。将该产物立即用于下一步反应。

常规程序 B: 将上述酰胺 34 和吡咯-2,5-二羧酸二五氟苯酯 32 (34.1 mg, 0.07 mmol) 在 2 ml 无水的 DMF 中的混合物 (在氩中) 于 55℃ 搅动过夜。产物直接经反相 HPLC (Zorbax SB-C18 2.2X25 cm; 流动相: A=含 0.1%TFA 的水; B=含 0.1%TFA 的 CH<sub>3</sub>CN; 梯度: 0 到 60%B, 40 分钟; 流速: 10ml/min) 纯化。通过将纯化的化合物溶解于 2 ml 甲醇，随后于 0℃ 加入 0.5 ml 含 HCl 气体的饱和乙醇或溶于二噁烷中的 4 N HCl 使得该化合物转化为其 HCl 盐。将溶液用 40 ml 冷的无水醚稀释，收集沉淀物并干燥。总产量为 21.2 mg (45%)。ESI MS: 594.32



(M+H<sup>+</sup>)。297.66 (M/2+H<sup>+</sup>)。

### 实施例 11

*1H-吡咯-2,5-二羧酸双-([5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-酰胺)* 35 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基)-酰胺 36(60 mg, 0.2 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-羧酸(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基)-酰胺 37。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将吡咯-2,5-二羧酸二五氟苯酯 32(34.1 mg, 0.07 mmol) 和上述胺缩合得到 35(24.2 mg, 48%)。ESI MS: m/z 650.39 (M+H<sup>+</sup>), 325.69 (M/2+H<sup>+</sup>)。

### 实施例 12

*1H-吡咯-2,5-二羧酸双-([5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-甲基-1H-吡咯-3-基]-酰胺)* 38 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-甲基-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基)-酰胺 39(47.8 mg, 0.2 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-甲基-1H-吡咯-2-羧酸(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基)-酰胺 40。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将吡咯-2,5-二羧酸二五氟苯酯 32(34.1 mg, 0.07 mmol) 和上述胺缩合得到 38(31.5 mg, 74%)。ESI MS: 538.26 (M+H<sup>+</sup>), 269.63 (M/2+H<sup>+</sup>)。

### 实施例 13

*噻吩-2,5-二羧酸双-([5-(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基氨基甲酰基)*

### -1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-酰胺} 41 的合成

#### (A) N-(3-氰基丙基)苯邻二甲酰亚胺 (42)

将苯邻二甲酰亚胺钾 (8.48 g, 0.046 mol) 和 4-溴丙基氰 (6.4 g, 0.043 mol) 在 50 ml 无水的 DMF 中的混和物在 90℃ 搅动 2 小时。在用 300 ml 水稀释以后, 水溶液用氯仿 (80 ml X 3) 抽提。复合的氯仿溶液用 0.5% NaOH 水溶液 (80 ml) 和水 (100 ml) 洗涤, 并用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥。将氯仿蒸发后, 得到了一种油, 向其中加入 300 ml 水。该油迅速固化。形成的固体物经过滤收集, 用水洗涤, 然后在高真空中干燥。产物从经水稀释的甲醇中重结晶, 即制得白色的晶体 (7.75 g, 84%)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.87 (dd, 2H), 7.75 (dd, 2H), 3.83 (t, 2H), 2.44 (t, 2H), 2.09 (五重峰, 2H)。

#### (B) 3-氨基-丙基氰盐酸盐 (43)

将 N-(3-氰基丙基)苯邻二甲酰亚胺 (7.56 g, 35.29 mmol) 和水合肼 (4.4 g, 88.22 mmol) 在 20 ml 乙醇中的混和物在室温放置过夜。该溶液在用 8 ml 水稀释以后, 用盐酸调节到 pH 值为 3.5, 沉淀物经过滤除去。滤液经蒸发至较小体积。将残余物冷却至 0℃ 后再用 10 N NaOH 溶液 (6 ml) 处理。该碱性溶液用氯仿 (80 ml X 4) 抽提。复合的氯仿溶液用 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥并蒸发至干燥。将残余物用醚 (100 ml) 抽提, 并在无水 HCl 通过该醚溶液后沉淀。即得到了一种白色固体 (2.2 g, 51%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.12 (br, s), 2.82 (m, 2H), 2.61 (t, 2H), 1.86 (五重峰, 2H)。

#### (C) 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸乙酯 (44)

将 4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸乙酯 (3.69 g, 20.04 mmol) 溶于 100 ml 热的无水乙醇, 然后将溶液冷却至室温。将 30 ml 在乙醇中的乙醇钠 (约 1M) 加入该溶液。将反应混和物在室温搅动 20 分钟, 再加入 1-溴-3-甲基丁烷 (8 ml)。混和物再回流搅动 6 小时, 冷却至室温, 然后倾倒入水中。浅黄色的沉淀物经过滤收集, 经水洗涤后干燥即得到产物 (1.48 g, 29%)。

(D) 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-碳酰氯 (45)

将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸乙酯 (1.44 g, ) 溶解到 50 ml 甲醇中并加入 25ml 20% NaOH 水溶液。反应混和物在 50℃ 搅动 1.5 小时直到经 TLC 检查没有初始物质为止。将反应混和物浓缩到约 20 ml, 再加入 200 ml 水。所得溶液用 5 M 盐酸中和至 pH 值为 2, 形成的沉淀物经过滤收集, 用水洗涤并干燥而制得 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸 (1.29 g, 99%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 13.12 (br, s, 1H), 8.27 (d, 1H), 7.26 (d, 1H), 4.36 (t, 2H), 1.59 (dd, 2H), 1.50 (dt, 1H), 0.88 (d, 6H)。

该酸悬浮于 15 ml SOCl<sub>2</sub>。反应混和物在氩中回流搅动 4 小时, 冷却至室温并蒸发。将 80 ml 无水甲苯加入到残余物中并使甲苯蒸发。此过程重复 3 次。将残余物溶解于 20 ml 无水苯中, 冷冻并冻干得到白色粉末 (1.26 g, 99%)。

(E) 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(3-氨基丙基)-酰胺 (46)

将 1.5 ml 无水的吡啶加入到酰基氯 45 (0.6 g, 2.45 mmol) 和 3-氨基丙基氰盐酸盐 (0.31 g, 2.57 mmol) 在无水甲苯中的混和物中。反应混和物在 50℃ 搅动过夜, 然后蒸发至干燥。产物用甲苯-乙酸乙酯 (2:1) 经色谱纯化而得到白色晶体 (0.623 g, 87%)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.46 (t, 1H), 8.17 (d, 1H), 7.39 (d, 1H), 4.37 (t, 2H), 3.27 (五重峰, 2H), 2.53 (d, 2H), 1.77 (五重峰, 2H), 1.60-1.42 (q 和五重峰, 3H), 0.87 (d, 6H)。

(F) 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺盐酸盐 (47)

将 48 (0.6 g, 2.05 mmol) 溶解于 25 ml 无水乙醇中, 在冰浴中将溶液冷却至 0℃。然后将经浓 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥的氯化氢气体以气泡形式在 5 小时内通过该溶液。反应烧瓶用橡胶塞子塞住。上述饱和溶液在室温搅动 4 小时, 然后置于冰箱内过夜。蒸发掉溶剂后得到一种油。将 80 ml 无水甲苯加入到残余物中并使甲苯蒸发。此过程重复 2 次。所

得的白色固体在高真空中干燥。

将产物溶解于 40 ml 无水乙醇中，然后在室温使无水氨气以气泡形式在 1.5 小时内通过该溶液。反应烧瓶用橡胶塞子塞住。反应溶液在 50℃ 搅动 1 小时，然后室温放置过夜。将溶剂蒸发及与无水甲苯共蒸发两次。残余物在高真空中干燥并溶解于 1 ml 无水甲醇中，所得溶液用 45 ml 冷的无水醚稀释。沉淀物经离心收集并干燥得到白色粉末 (0.63 g, 89%)。ESI MS: 310.19 ( $M+H^+$ )。 $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.97 (br. s, 2H), 8.56 (br, s, 3H), 8.18 (d, 1H), 7.44 (d, 1H), 4.37 (t, 2H), 3.21 (q, 2H), 2.40 (t, 2H), 1.80 (五重峰, 2H), 1.56 (五重峰, 2H), 1.46 (五重峰, 1H), 0.87 (d, 6H)。(G) 噻吩-2,5-二羧酸双- $\{[5-(3\text{-亚氨基氨基甲酰基-丙基氨基甲酰基})-1-(3\text{-甲基-丁基})-1H\text{-吡咯-3-基}]-\text{酰胺}\}$  (49)

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺盐酸盐(47) (48.4 mg, 0.14 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-羧酸(2-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺 50。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将 5-五氟苯基氨基甲酰基-噻吩-2-羧酸五氟苯酯 50 (25.2 mg, 0.05 mmol) 和上述胺 51 缩合得到 GL800918 (28.7 mg, 75%)。ESI MS: 695.35 ( $M+H^+$ ), 348.18 ( $M/2+H^+$ )。

#### 实施例 14

噻吩-2,5-二羧酸双- $\{[5-(4\text{-亚氨基氨基甲酰基-丁基氨基甲酰基})-1-(3\text{-甲基-丁基})-1H\text{-吡咯-3-基}]-\text{酰胺}\}$  52 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺盐酸盐 53 (50.4 mg, 0.14 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-羧酸(5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺 54。

依照常规程序 B, 将 5-五氟苯基氨基甲酰基-噻吩-2-羧酸五氟苯

酯 50 (25.2 mg, 0.05 mmol) 和上述胺 54 缩合得到 52 (28.3 mg, 71%)。ESI MS: 723.39 ( $M+H^+$ ), 362.20 ( $M/2+H^+$ )。

### 实施例 15

*1H-吡唑-3,5-二羧酸双-[[5-(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-酰胺]55 的合成*

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺盐酸盐(47) (17.3 mg, 0.05 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-羧酸(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺 51。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将 5-五氟苯基氨基甲酰基-2H-吡唑-3-羧酸五氟苯酯 56 (8.8 mg, 0.018 mmol) 和上述胺 51 缩合得到 55 (5.6 mg, 41%)。ESI MS: 679.43 ( $M+H^+$ ), 340.22 ( $M/2+H^+$ )。

### 实施例 16

*1H-吡唑-3,5-二羧酸双-[[5-(4-亚氨基氨基甲酰基-丁基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-酰胺]57 的合成*

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺盐酸盐 53 (18 mg, 0.05 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-羧酸(5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺 54。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将 5-五氟苯基氨基甲酰基-2H-吡唑-3-羧酸五氟苯酯 56 (8.8 mg, 0.018 mmol) 和上述胺 54 缩合得到 GL190472 (5.2 mg, 37%)。ESI MS: 707.46 ( $M+H^+$ ), 354.24 ( $M/2+H^+$ )。

### 实施例 17

*N,N'-双-[5-(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-*

### 丁基)-1H-吡咯-3-基]-对苯二酰胺 58 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸 (3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺盐酸盐 47 (50 mg, 0.15 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-羧酸 (3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺 51。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将对苯二酸二五氟苯酯 59 (30 mg, 0.06 mmol) 和上述胺 51 缩合得到 GL324265 (9.4 mg, 21%)。ESI MS: 689.40 ( $M+H^+$ ), 345.21 ( $M/2+H^+$ )。

### 实施例 18

*N,N'*-双-[5-(4-亚氨基氨基甲酰基-丁基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-对苯二酰胺 60 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸 (5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺盐酸盐 53 (54 mg, 0.15 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-羧酸 (5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺 54。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将对苯二酸二五氟苯酯 59 (30 mg, 0.06 mmol) 和上述胺 54 缩合得到 60 (29.9 mg, 63%)。ESI MS: 359.23 ( $M/2+H^+$ )。

### 实施例 19

吡啶-2,5-二羧酸双-{[5-(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-酰胺} 61 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸 (3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺盐酸盐 (47) (48.4 mg, 0.14 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-

羧酸(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺 51。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将吡啶-2,5-二羧酸二五氟苯酯 62 (25 mg, 0.05 mmol) 和上述胺缩合得到 61 (35.7 mg, 89%)。ESI MS: 345.74 ( $M/2+H^+$ )。

### 实施例 20

吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[5-(4\text{-亚氨基氨基甲酰基-丁基氨基甲酰基})-1-(3\text{-甲基-丁基})-1H\text{-吡咯-3-基}]-\text{酰胺}\}$  63 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺盐酸盐 53 (54 mg, 0.15 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-羧酸(5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺 54。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将吡啶-2,5-二羧酸二五氟苯酯 62 (30 mg, 0.06 mmol) 和上述胺 54 缩合得到 63 (28.5 mg, 57%)。ESI MS: 718.46 ( $M+H^+$ ), 359.73 ( $M/2+H^+$ )。

### 实施例 21

吡嗪-2,5-二羧酸双- $\{[5-(3\text{-亚氨基氨基甲酰基-丙基氨基甲酰基})-1-(3\text{-甲基-丁基})-1H\text{-吡咯-3-基}]-\text{酰胺}\}$  64 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺盐酸盐(47) (52 mg, 0.15 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-羧酸(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺 51。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将吡嗪-2,5-二羧酸二五氟苯酯 65 (30 mg, 0.06 mmol) 和上述胺 51 缩合得到 64 (30 mg, 65%)。ESI MS: 691.40 ( $M+H^+$ ), 346.20 ( $M/2+H^+$ )。

## 实施例 22

吡嗪-2,5-二羧酸双- $\{[5-(4\text{-亚氨基氨基甲酰基-丁基氨基甲酰基})-1-(3\text{-甲基-丁基})-1H\text{-吡咯-3-基}]-\text{酰胺}\}$  66 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺盐酸盐 53 (54 mg, 0.15 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-羧酸(5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺 54。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将吡嗪-2,5-二羧酸二五氟苯酯 65 (30 mg, 0.06 mmol) 和上述胺缩合得到 66 (29 mg, 61%)。ESI MS: 360.22 (M/2+H<sup>+</sup>)。

## 实施例 23

*N,N'*-双- $[5-(3\text{-亚氨基氨基甲酰基-丙基氨基甲酰基})-1-(3\text{-甲基-丁基})-1H\text{-吡咯-3-基}]-2\text{-甲基-对苯二酰胺}$  67 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺盐酸盐(47) (52 mg, 0.15 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-羧酸(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺 51。

依照常规程序 B, 将 2-甲基-对苯二酸二五氟苯酯 68 (30.7 mg, 0.06 mmol) 和上述胺 DS-c-2 缩合得到 67 (20.5 mg, 44%)。ESI MS: 352.22 (M/2+H<sup>+</sup>)。

## 实施例 24

*N,N'*-双- $[5-(4\text{-亚氨基氨基甲酰基-丁基氨基甲酰基})-1-(3\text{-甲基-丁基})-1H\text{-吡咯-3-基}]-2\text{-甲基-对苯二酰胺}$  69 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-



吡咯-2-羧酸(5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺盐酸盐 53 (54 mg, 0.15 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-羧酸(5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺 54。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将 2-甲基-对苯二酸二五氟苯酯 68 (30.7 mg, 0.06 mmol) 和上述胺 54 缩合得到 69 (25 mg, 52%)。ESI MS: 366.23 (M/2+H<sup>+</sup>)。

### 实施例 25

*N,N'*-双-[5-(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-2,5-二甲基-对苯二酰胺 70 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺盐酸盐(47) (52 mg, 0.15 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-羧酸(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺 51。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将 2,5-二甲基-对苯二酸二五氟苯酯 71 (31.6 mg, 0.06 mmol) 和上述胺缩合得到 70 (19.1 mg, 40%)。ESI MS: 359.22 (M/2+H<sup>+</sup>)。

### 实施例 26

*N,N'*-双-[5-(4-亚氨基氨基甲酰基-丁基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-2,5-二甲基-对苯二酰胺 72 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺盐酸盐 53 (54 mg, 0.15 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-2-羧酸(5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺 54。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将 2,5-二甲基-对苯二酸二五氟苯酯 71 (31.6 mg, 0.06 mmol) 和上述胺 54 缩合得到 72 (22.8 mg,

46%)。ESI MS: 373.24 ( $M/2+H^+$ )。

### 实施例 27

*1H*-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[5-(3\text{-亚氨基氨基甲酰基-丙基氨基甲酰基})-1-(3\text{-甲基-丁基})-1H\text{-吡咯-3-基}]-\text{酰胺}\}$ 73 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡啶-2-羧酸(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺盐酸盐(47)(48.4 mg, 0.14 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡啶-2-羧酸(3-亚氨基氨基甲酰基-丙基)-酰胺 51。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将 1H-吡啶-2,5-二羧酸双(五氟苯基酰胺)74(26.8 mg, 0.05 mmol) 和上述胺 51 缩合得到 73(29.6 mg, 74%)。ESI MS: 728.42 ( $M+H^+$ ), 364.71 ( $M/2+H^+$ )。

### 实施例 28

*1H*-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[5-(4\text{-亚氨基氨基甲酰基-丁基氨基甲酰基})-1-(3\text{-甲基-丁基})-1H\text{-吡咯-3-基}]-\text{酰胺}\}$ 75 的合成

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡啶-2-羧酸(5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺盐酸盐 53(50.4 mg, 0.15 mmol) 氢化还原为 4-氨基-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡啶-2-羧酸(5-亚氨基氨基甲酰基-戊基)-酰胺 54。

依照实施例 10 中的常规程序 B, 将 1H-吡啶-2,5-二羧酸双(五氟苯基酰胺)74(26.8 mg, 0.05 mmol) 和上述胺缩合得到 75(13 mg, 31%)。ESI MS: 756.44 ( $M+H^+$ ), 378.73 ( $M/2+H^+$ )。

### 实施例 29

*1H*-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[2-(2\text{-乙氧基-乙基氨基甲酰基})-1H\text{-吡啶-5-基}]-\text{酰胺}\}$ 76 的合成

(A) 5-硝基-1H-吡啶-2-羧酸(2-乙氨基-乙基)-酰胺(77)

将5-硝基-2-吡啶羧酸乙酯细粉(0.8 g, 3.41 mmol)在氩中悬浮于2 ml N-乙基乙二胺中,反应混和物在55℃放置过夜。将混和物与甲苯共蒸发至干燥。将所得的褐色固体溶解于6 ml 乙酸乙酯中,并加入40 ml 醚来沉淀产物。离心后,将液体倒掉,固体用30 ml 醚洗涤并干燥得到小的褐色晶体(0.77 g, 82%)。ESI MS: 277.11 (M+H<sup>+</sup>), 299.09 (M+Na<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.67 (d, 1H), 8.04 (dd, 1H), 7.55 (d, 1H), 7.37 (s), 3.36 (m, 3H), 2.69 (q, 2H), 2.55 (q, 2H), 0.99 (t, 3H)。

(B) 乙基-(2-[[1-(5-硝基-1H-吡啶-2-基)-甲酰氧基]-氨基]-乙基)-氨基甲酸二甲基乙酯(78)

将化合物77(0.12 g, 0.434 mmol)溶解于3 ml DMF中,并加入0.48 ml 1.0 M 的在THF中的二叔丁基碳酸氢盐。反应混和物在室温搅动20分钟直到经TLC确定反应完成为止。将溶剂蒸发至干燥,形成的褐色固体从MeOH-H<sub>2</sub>O重结晶,得到褐色晶体(0.139 g, 85%)。ESI MS: 377.15 (M+H<sup>+</sup>), 399.13 (M+Na<sup>+</sup>)。

(C) 1H-吡啶-2,5-二羧酸双-[[2-(2-乙氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-酰胺}(76)

依照实施例10中的常规程序A,将化合物78(127 mg, 0.336 mmol)氢化还原为79。上述胺DS13a和1H-吡啶-2,5-二羧酸双(五氟苯基酰胺)74(45 mg, 0.084 mmol)在2 ml 无水DMF中的混和物(在氩中)于55℃搅动过夜。将溶剂蒸发至干燥。残余物溶解于5 ml TFA/苯甲醚(8:2)中,混和物在室温放置1小时。产物用醚沉淀并用实施例10中的常规程序B描述的HPLC纯化得到76(22 mg, 40%)。ESI MS: 662.27 (M+H<sup>+</sup>), 331.64 (M/2+H<sup>+</sup>)。

### 实施例 30

1H-吡啶-2,5-二羧酸双-[[2-(2-丙氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶

### -5-基]-酰胺}80 的合成

(A) 5-硝基-1H-吡啶-2-羧酸(2-丙氨基-乙基)-酰胺(81)

以类似于制备 81 的方法用 5-硝基-2-吡啶羧酸乙酯(0.8 g, 3.41 mmol) 和 N-丙基乙二胺(2 ml) 制得了褐色固体(0.84 g, 85%)。

ESI MS: 291.13 (M+H<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.68 (d, 1H), 8.04 (d, 1H), 7.55 (d, 1H), 7.37 (s, 1H), 3.35 (m, 3H), 2.68 (q, 2H), 2.49 9 (q, 2H), 1.40 (tt, 2H), 0.84 (t, 3H)。

(B) (2-[[1-(5-硝基-1H-吡啶-2-基)-甲酰氧基]-氨基]-乙基)-丙基-氨基甲酸二甲基乙酯(82)

以类似于制备 78 的方法从化合物 81(0.12 g, 0.413 mmol) 制得了褐色粉末(0.142 g, 88%)。ESI MS: 391.17(M+H<sup>+</sup>), 413.15(M+Na<sup>+</sup>)。

(C) 1H-吡啶-2,5-二羧酸双-[[2-(2-丙氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-酰胺}(80)

依照实施例 10 中的常规程序 A, 将化合物 82(131.2 mg, 0.336 mmol) 氢化还原为 83。以类似于制备 76 的方法, 用 1H-吡啶-2,5-二羧酸双(五氟苯酰胺)74(45 mg, 0.084 mmol) 和化合物 83 缩合, 随后使 Boc 基团去保护并经 HPLC 纯化制得 GL496564(39.4 mg, 63%)。ESI MS: 690.31 (M+H<sup>+</sup>), 345.66 (M/2+H<sup>+</sup>)。

### 实施例 31

#### 1-辛基-1H-吡啶-2,5-二羧酸 84 的合成

将氢化钠(60%悬浮液, 125 mg, 5 mmol) 加入到在无水 DMF(10 mL) 中的搅动过的 1H-吡啶-2,5-二羧酸(525 mg, 2 mmol) 溶液中, 并在环境温度放置 1 小时。将该反应冷却至 0℃ 后加入辛基溴(1.5 mL, 13 mmol)。3 天后通过加入 5%的 NH<sub>4</sub>Cl 水溶液使反应终止。混和物浓缩至干燥, 并用甲苯经硅胶柱纯化。然后将产物溶解于 30 mL 乙醇中并加入 10 mL 2M NaOH。溶液在 55℃ 加热 2 天。将乙醇在真空中去除,

所得的水溶液用 0.01 M HCl 酸化至 pH 值为 3。得到的沉淀物经过滤得到并用水漂洗两次。分离的产物从无水乙醇 (3x) 中经蒸发而干燥, 制得 460 mg (73%) 的 C1。

$^1\text{H NMR}$  (DMSO) 8.44 (d, 1H, H-4 咪唑), 8.01 (dd, 1H, H-6 咪唑), 7.35 (m, 2H, H-3 和 7 咪唑), 4.43-4.35 (m, 4H, 辛基), 1.4-1.2 (m, 10H, 辛基), 0.865 (m, 3H, 辛基)

MS: 316 [M-H]

### 实施例 32

#### 1-辛基-1H-咪唑-2, 5-二羧酸二五氟苯酯-85 的合成

将 84 (460 mg, 1.45 mmol) 与五氟苯酚 (560 mg, 3.045 mmol) 溶解于无水 DMF (7.25 mL) 中, 然后加入 628 mg (3.05 mmol) 溶解于无水 DMF (7.25 mL) 中的二环己基碳二亚胺。反应在环境温度维持 3 天。将反应物用纸过滤以去除沉淀的脲并浓缩。残余物用 EtOAc (50 mL) 吸收并再次过滤。将该溶液浓缩, 然后溶解于 10 mL 无水二噁烷中, 冻干以制得 C2 (823 mg, 87%)。

### 实施例 33

#### 1-辛基-1H-咪唑-2, 5-二羧酸双-[[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-甲基-1H-吡咯-3-基]-酰胺]-86 的合成

将 90 mg (0.325 mmol) 新还原的 (如上文所述) “氨基-吡咯 (N1-甲基) 脒” 溶解于无水 DMF (1.25 mL) 中并加入 65 mg (0.1 mmol) 84。反应在 40°C 维持 3 天。产物用 40 mL 冷的乙醚沉淀, 轻轻倒出后再用醚漂洗一次。粗产物用 0.1% TFA 水溶液吸收, 经 HPLC (Vydac 12 M  $\text{C}_{18}$  2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 20mL/min) 纯化制得以双-三氟乙酸盐形式存在的 86。将该盐溶解于 2 mL 无水 MeOH 中, 冷却至 -20°C, 然后加入 1 mL 4M HCl/二噁烷。该溶液用 40 mL

冷的醚沉淀即制得以双-HCl 盐形式存在的 86 (13.1 mg)。MS: 350.7 [M+2H]/2

### 实施例 34

#### 1-丙基-1H-吡啶-2,5-二羧酸-87 的合成

将氢氧化钠 (60% 悬浮液, 125 mg, 5 mmol) 加入到在无水 DMF (10 mL) 中的搅动过的 1H-吡啶-2,5-二羧酸 (525 mg, 2 mmol) 溶液中, 并在环境温度放置 1 小时。将该反应冷却至 0℃ 后加入丙基溴 (0.275 mL, 3 mmol)。3 天后通过加入 5% 的 NH<sub>4</sub>Cl 水溶液使反应终止。混和物浓缩至干燥, 并用 5% EtOAc/甲苯经硅胶柱纯化。然后将产物溶解于 30 mL 乙醇中并加入 10 mL 2M NaOH。溶液在 55℃ 加热 2 天。将乙醇在真空中去除, 所得的水溶液用 0.01 M HCl 酸化至 pH 值为 3。产生的沉淀物经过滤得到并用水漂洗两次。分离的产物从无水乙醇 (3x) 中蒸发干燥, 制得 340 mg (67%) 的 87。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 8.38 (s, 1H, H-4 吡啶), 7.87 (d, 1H, H-6 吡啶), 7.71 (d, 1H, H-7 吡啶), 7.44 (d, 1H, H-3, 吡啶), 4.53 (m, 2H, 丙基), 1.7 (m, 2H, 丙基), 0.81 (m, 3H, 丙基)

MS: 246 [M-H]

### 实施例 35

#### 1-丙基-1H-吡啶-2,5-二羧酸二五氟苯酯-88 的合成

将 84 (340 mg, 1.33 mmol) 与五氟苯酚 (514 mg, 2.8 mmol) 溶解于无水 DMF (6.65 mL) 中, 然后加入 575 mg (2.8 mmol) 溶解于无水 DMF (6.65 mL) 中的二环己基碳二亚胺。反应在环境温度维持 3 天。将反应物经纸过滤以去除沉淀的脲并浓缩。残余物用 EtOAc (50 mL) 吸收并再次过滤。将该溶液浓缩, 然后溶解于 10 mL 无水二噁烷中, 冻干以制得 88 (626 mg, 81%)。

## 实施例 36

*1-丙基-1H-吡啶-2,5-二羧酸双-{[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-甲基-1H-吡咯-3-基]-酰胺}*-89 的合成

将 90 mg (0.325 mmol) 新还原的 (如上文所述) 氨基-吡咯 (N1-甲基) 脒溶解于无水 DMF (1.25 mL) 中并加入 58 mg (0.1 mmol) 88。反应在 40℃ 维持 3 天。产物用 40 mL 冷的乙醚沉淀, 轻轻倒出后再用醚漂洗一次。粗产物用 0.1% TFA 水溶液吸收, 经 HPLC (Vydac 12 M C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 20mL/min) 纯化制得以双-三氟乙酸盐形式存在的 89。将该盐溶解于 2 mL 无水 MeOH 中, 冷却至 -20℃, 然后加入 1 mL 4M HCl/二噁烷。该溶液用 40 mL 冷的醚沉淀即制得以双-HCl 盐形式存在的 89 (19.3 mg)。

MS: 315.7[M+2H]/2

## 实施例 37

*1H-吡啶-2,5-二羧酸双-{[2-(2-甲氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-酰胺}*-90 的合成

将 1.5 mL N-甲基乙二胺加入到 30 mg (0.05 mmol) “EtO-Ind-Ind-Ind-OEt” 中。混和物在 50℃ 反应 72 小时, 然后在真空中浓缩。残余物用 2 mL DMF 吸收并用 40 mL 冷的乙醚沉淀, 轻轻倒出后再用醚漂洗一次。粗产物用 0.1% TFA 水溶液吸收, 经 HPLC (Vydac 12 M C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 20mL/min) 纯化制得以双-三氟乙酸盐形式存在的 90。将该盐溶解于 2 mL 无水 MeOH 中, 冷却至 -20℃, 然后加入 1 mL 4M HCl/二噁烷。该溶液用 40 mL 冷的醚沉淀即制得以双-HCl 盐形式存在的 90 (11.5 mg)。MS:

317.7[M+2H]/2

## 实施例 38

*1H-吡啶-2, 5-二羧酸双-[(2-{2-[双-(2-氨基-乙基)-氨基]-乙基氨基甲酰基}-1H-吡啶-5-基)-酰胺]-91 的合成*

将 3 mL 三-(2-氨基乙基)胺加入到 50 mg (0.087 mmol) “EtO-Ind-Ind-Ind-OEt”中。混和物在 55℃反应 24 小时, 然后用 40 mL 冷的乙醚沉淀, 轻轻倒出后再用醚漂洗一次。粗产物用 0.1% TFA 水溶液吸收, 经 HPLC (Vydac 12 M C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 20mL/min) 纯化制得以六-三氟乙酸盐形式存在的 91。(22.9 mg)。

MS: 389.7[M+2H]/2

## 实施例 39

*1H-吡啶-2, 5-二羧酸双-( {2-[3-(3-氨基-丙氨基)-丙基氨基甲酰基]-1H-吡啶-5-基}-酰胺) -92 的合成*

将 3 mL 3-氨基丙基-丙烷-二胺和 1 mL DMF 加入到 50 mg(0.087 mmol) “EtO-Ind-Ind-Ind-OEt”中。混和物在 55℃反应 48 小时后, 用 40 mL 冷的乙醚沉淀, 轻轻倒出后再用醚漂洗一次。粗产物用 0.1% TFA 水溶液吸收, 经 HPLC (Vydac 12 M C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 20mL/min) 纯化制得以四-三氟乙酸盐形式存在的 92。(20.4 mg)。

MS: 374.7[M+2H]/2

## 实施例 40

*5-硝基-1-丙基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯-93 的合成*

将 2.01 g (31.5 mmol) KOH 加入到 3.69 g (15.75 mmol) 溶解于 35 mL DMSO 中的商业乙基 5-硝基-2-羧基-吡啶中。将反应物剧烈



搅动 30 分钟，并同时加入 2.86 mL (31.5 mmol) 丙基溴。4 小时后，加入另外 5 mL DMSO 并使反应物反应过夜。加入 1 mL 5% 的  $\text{NH}_4\text{Cl}$  水溶液，倾倒入甲苯 (150 mL)，并用饱和  $\text{NaHCO}_3$  (100 mL) 洗涤。将水层用甲苯 (每次 75 mL) 抽提两次，两次所得的有机层用盐水 (100 mL) 洗涤，经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥，并浓缩。将产物溶解于 100 mL 二噁烷中并冻干而制得 4.15 g (15.1 mmol, 95%) 93。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 8.64 (s, 1H, H-4 吡啶), 8.2 (m, 1H, H-6 吡啶), 7.47-7.42 (m, 2H, H-7 和 H-3 吡啶), 4.57 (m, 2H, 丙基), 4.45-4.37 (m, 4H, 乙酸乙酯), 1.89-1.8 (m, 2H, 丙基), 1.47-1.41 (m, 3H, 丙基), 0.98-0.98-0.92 (m, 6H, 乙酸乙酯)

MS: 299 [M+Na]

#### 实施例 41

*1H-吡啶-2,5-二羧酸双-[[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1-丙基-1H-吡啶-5-基]-酰胺]-94 的合成*

将 10%Pd/C (Degussa 类型, Aldrich) (0.05 g) 加入到 93 (104 mg, 0.375 mmol) 在 50 mL 无水 EtOAc 和 25 mL 无水甲醇中的溶液中。将烧瓶倒空，再用氢气冲洗 3 次，最后在 40 psi 用氢气充满。将该悬浮液在环境温度剧烈振动 45 分钟。悬浮液通过一个布氏漏斗过滤，并用甲醇漂洗数次。将滤液和洗出液浓缩至干燥。所得的氨基-吡啶在一个小瓶中溶解于无水 DMF (1 mL) 并加入到 75 mg (0.15 mmol) 的 Pfp-吡啶-Pfp 中，然后于 55°C 放置 24 小时。通过向反应混合物加入 40 mL 0.001 M HCl 分离粗产物三-吡啶。沉淀物经离心而分离，将酸性上清液倒出。将粗产物用 0.001 M HCl 漂洗并再次离心，用水漂洗三次并离心三次。产物从乙醇中蒸发干燥两次。最后，将粗的残余物置于一小瓶中，并加入 2 mL 重蒸馏的 1,2-乙二胺。将反应物于 55°C 加热 72 小时，然后在真空中浓缩。残余物用 2 mL DMF 吸收并用 40 mL 冷的乙醚沉淀，轻轻倒出后再用醚漂洗一次。粗产物用 0.1% TFA 水溶液

吸收, 经 HPLC (Vydac 12 M C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 20mL/min) 纯化制得以双-三氟乙酸盐形式存在的 94。将该盐溶解于 2 mL 无水 MeOH 中, 冷却至 -20℃, 然后加入 1 mL 4M HCl/二噁烷。该溶液用 40 mL 冷的醚沉淀即制得以双-HCl 盐形式存在的 94 (30.0 mg)。

MS: 345.7[M+2H]/2

#### 实施例 42

#### 1-丙基-1H-吡啶-2, 5-二羧酸双-{[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1-丙基-1H-吡啶-5-基]-酰胺}-95 的合成

将 10%Pd/C (Degussa 类型, Aldrich) (0.05 g) 加入到 93 (104 mg, 0.375 mmol) 在 50 mL EtOAc 和 25 mL 甲醇中的溶液中。将烧瓶倒空, 再用氢气冲洗 3 次, 最后在 40 psi 用氢气充满。将该悬浮液在环境温度剧烈振动 45 分钟。悬浮液通过一个布氏漏斗过滤, 并用甲醇漂洗数次。将滤液和洗出液浓缩至干燥。所得的氨基-吡啶在一个小瓶中溶解于无水 DMF (1 mL) 并加入到 87 mg (0.15 mmol) 的 88 中, 然后于 55℃ 放置 24 小时。通过向反应混合物加入 40 mL 0.001 M HCl 分离粗产物三-吡啶。沉淀物经离心而分离, 将酸性上清液倒出。将粗产物用 0.001 M HCl 漂洗并再次离心, 用水漂洗三次并离心三次。产物从乙醇中蒸发干燥两次。最后, 将粗的残余物置于一小瓶中, 并加入 2 mL 重蒸馏的 1, 2-乙二胺。将反应物于 55℃ 加热 72 小时, 然后在真空中浓缩。残余物用 2 mL DMF 吸收并用 40 mL 冷的乙醚沉淀, 轻轻倒出后再用醚漂洗一次。粗产物用 0.1% TFA 水溶液吸收, 经 HPLC (Vydac 12 M C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 20mL/min) 纯化制得以双-三氟乙酸盐形式存在的 95。将该盐溶解于 2 mL 无水 MeOH 中, 冷却至 -20℃, 然后加入 1 mL 4M HCl/二噁烷。该溶液用 40 mL 冷的醚沉淀即制得以双-HCl 盐形式存在的 95 (48.5 mg)。

MS: 366.7[M+2H]/2

## 实施例 43

1-丙基-1*H*-吡啶-2, 5-二羧酸双- $\{[2-(2\text{-氨基-乙基氨基甲酰基})-1*H*-吡啶-5-基]-酰胺\}$ -96 的合成

将 10%Pd/C (Degussa 类型, Aldrich) (0.05 g) 加入到商业乙基 5-硝基-2-羧基-吡啶 (87 mg, 0.37 mmol) 在 75 mL EtOAc 和 25 mL 甲醇中的溶液中。将烧瓶倒空, 再用氢气冲洗 3 次, 最后在 40 psi 用氢气充满。将该悬浮液在环境温度剧烈振动 45 分钟。悬浮液通过一个布氏漏斗过滤, 并用甲醇漂洗数次。将滤液和洗出液浓缩至干燥。所得的氨基-吡啶在一个小瓶中溶解于无水 DMF (1 mL) 并加入到 87 mg (0.15 mmol) 的 C5 中, 然后于 55°C 放置 24 小时。通过向反应混合物加入 40 mL 0.001 M HCl 分离粗产物三-吡啶。沉淀物经离心而分离, 将酸性上清液倒出。将粗产物用 0.001 M HCl 漂洗并再次离心, 用水漂洗三次并离心三次。产物从乙醇中蒸发干燥两次。最后, 将粗的残余物置于一小瓶中, 并加入 3 mL 重蒸馏的 1, 2-乙二胺。将反应物于 55°C 加热 72 小时, 然后在真空中浓缩。残余物用 1 mL DMF 吸收并用 40 mL 冷的乙醚沉淀, 轻轻倒出后再用醚漂洗一次。粗产物用 0.1% TFA 水溶液吸收, 经 HPLC (Vydac 12 M C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 20mL/min) 纯化制得以双-三氟乙酸盐形式存在的 96。将该盐溶解于 2 mL 无水 MeOH 中, 冷却至 -20°C, 然后加入 1 mL 4M HCl/二噁烷。该溶液用 40 mL 冷的醚沉淀即制得以双-HCl 盐形式存在的 96 (7.7 mg)。

MS: 324.7[M+2H]/2

## 实施例 44

5-硝基-1*H*-吡啶-2-羧酸-97 的合成

将 110 mL 2M 的 NaOH 加入到溶解于乙醇 (220 mL) 中的商业乙基

5-硝基-2-羧基-吲哚 (10.21 g, 43.6 mmol) 溶液中。将反应物于 60 °C 搅动 18 小时。然后使反应物冷却, 在真空中去除乙醇并另外加入 200 mL 的水。向剧烈搅动的水溶液中先加入 5 M HCl, 再加入 1 M HCl 直到 pH 值为 4, 即有酸性产物沉淀出来。将产物通过一个布氏漏斗过滤而收集, 并用稀释的 HCl (1:40 v/v) 洗涤一次, 用水洗涤两次。将滤液于真空中在干燥器中经 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 干燥即得到 8.83 g (42.8, 98%) 酸 97。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO): 12.4 (br s, 1H, 1H 吲哚), 8.68 (dd, 1H, H-4 吲哚), 8.08 (m, 1H, H-6 吲哚), 7.54 (m, 1H, H-7 吲哚), 7.34 (dd, 1H, H-3 吲哚)

#### 实施例 45

##### 5-硝基-1H-吲哚-2-羧酸 (2-氟基-乙基)-酰胺 98 的合成

将 4.5 g (21.8 mmol) 酸 97 置于烧瓶中并加入 100 mL 亚硫酸氯。将反应物在干燥空气中于 85 °C 回流 2.5 小时。使反应物冷却至环境温度并在真空中浓缩该混和物。将残余物用 75 mL 二噁烷吸收, 而悬浮液在真空中浓缩。最后, 将残余物用 100 mL 甲苯吸收, 而悬浮液在真空中浓缩。将残余物悬浮于无水二噁烷 (220 mL) 中并逐滴加入氨基-丙腈 (3.96 mL, 54.5 mmol)。将反应物在环境温度搅动 18 小时然后在真空中浓缩。残余物用 50 mL DMF 吸收, 在剧烈搅动中加入 0.001 M HCl 直到 pH 值为 3, 然后加入另外的 200 mL 0.001 M HCl。将产物通过一个布氏漏斗过滤而收集, 并用水洗涤两次。将滤液于真空中在干燥器中用 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 干燥即得到 5.13 g (19.9, 91%) 98。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO): 12.34 (br s, 1H, 1H 吲哚), 9.1 (dd, 1H, H-4 吲哚), 8.7 (s, 1H, 酰胺 NH), 8.04 (m, 1H, H-6 吲哚), 7.55 (m, 1H, H-7 吲哚), 7.38 (s, 1H, H-3 吲哚), 3.54-3.49 (m, 2H), 2.78 (dd, 2H)。

## 实施例 46

## 5-硝基-1H-吡啶-2-羧酸 (2-亚氨基氨基甲酰基-乙基)-酰胺 99 的合成

将腈 98 (2.5 g, 9.68 mmol) 悬浮于无水乙醇 (75 mL) 中并冷却至 0°C。然后将冷却的乙醇悬浮液用干燥的 HCl 气体饱和 5 小时。将气流移去后, 密封烧瓶并置于 4°C 过夜。在早晨, 将悬浮物在真空中浓缩并与无水乙醇 (100 mL) 共蒸发得到 3.26 g 亚氨酸酯中间物。2.26 g 粗产物悬浮于无水乙醇 (100 mL), 冷却至 0°C 并用无水 NH<sub>3</sub> 气体饱和。4 小时后, 去除气体来源, 密封烧瓶并置于 4°C 过夜。在早晨, 将反应物在真空中浓缩并与无水乙醇 (100 mL) 共蒸发一次。残余物用无水乙醇 (200 mL) 悬浮, 过滤, 用无水乙醇漂洗, 在真空中干燥得到 1.89 g (5.86 mmol) 99。

<sup>1</sup>H NMR (DMSO): 9.1-9.05 (br m, 3H, H4 吡啶和脒), 8.75-8.65 (br s, 2H, 脒), 8.06 (dd, 1H, H-6, 吡啶), 7.57 (d, 1H, H-7 吡啶), 7.45 (s, 1H, H-3 吡啶), 3.65-3.61 (m, 2H), 2.71-2.66 (m, 2H)。

MS: 276 [M+H]

## 实施例 47

## 1H-吡啶-2, 5-二羧酸双- {[2-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-酰胺} -100 的合成

将 10%Pd/C (Degussa 类型, Aldrich) (0.05 g) 加入到“硝基-吡啶-脒”99 (117 mg, 0.375 mmol) 在甲醇 (30 mL) 和 EtOAc (10 mL) 中的溶液中。将烧瓶倒空, 再用氢气冲洗 3 次, 最后在 50 psi 用氢气充满。将该悬浮液在环境温度剧烈振动 45 分钟。悬浮液通过一个布氏漏斗过滤, 并用甲醇漂洗数次。将滤液和洗出液浓缩至干燥。所得的氨基-吡啶在一个小瓶中溶解于无水 DMF (1.9 mL) 并加入到 75 mg (0.15

mmol) 的 "Pfp-咪唑-Pfp" 中, 然后于 45℃ 放置 48 小时。产物用 40 mL 冷的乙醚沉淀, 轻轻倒出后再用醚漂洗一次。粗产物用 0.1% TFA 水溶液吸收, 经 HPLC (Vydac 12 M C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 20mL/min) 纯化制得以双-三氟乙酸盐形式存在的 100。将该盐溶解于 6 mL 无水 MeOH 中, 冷却至 -20℃, 然后加入 1 mL 4M HCl/二噁烷。该溶液用 40 mL 冷的醚沉淀即制得以双-HCl 盐形式存在的 100 (62.0 mg)。

MS: 330.6 [M+2H]/2

### 实施例 48

#### 9H-咪唑-3,6-二羧酸二五氟苯酯-101 的合成

将商业的咪唑 (5.02 g, 30 mmol) 悬浮于氯苯 (48 mL) 中并加入三氟乙腈 (7.2 mL, 72 mmol)。然后将 AlCl<sub>3</sub> 加入到搅动的反应混合物中。将该反应混合物在干燥空气中置于回流浓缩器并缓缓加热至 100℃。2 小时后, 加入 20 mL 浓 HCl 并将温度升高到 120℃ 加热 2 小时。混合物在真空中浓缩, 然后悬浮于 2 M KOH (200 mL) 中, 回流 1 小时, 最后用布氏漏斗过滤。滤液用 5 M HCl 调节 pH 值到 3, 冷却至环境温度并过滤。将滤液通过与甲醇共蒸发三次而干燥制得 1.86 g 粗产物二酸。

将该粗产物二酸用无水吡啶溶解并浓缩三次, 然后溶解于无水 DMF (14.5 mL) 中。加入二异丙基乙胺 (5.05 mL), 随后再加入三氟乙酸五氟苯基酯 2.62 mL (15.25 mmol)。将反应物在环境温度搅动过夜然后在真空中蒸发。然后残余物用 50% 的 EtOAc/甲苯通过硅胶柱纯化。将产物溶解于无水苯 (30 mL) 中并冻干而得到 290 mg (0.494 mmol, 7%) 的 101。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 9.04 (s, 2H, H-4 和 5), 8.3 (dd, 2H, H-1 和 8), 7.64 (d, 2H, H-2 和 7)。

## 实施例 49

*9H-吡唑-3,6-二羧酸双-[[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡唑-5-基]-酰胺]-102 的合成*

将 10%Pd/C (Degussa 类型, Aldrich) (0.01 g) 加入到 “5-硝基-吡唑-EDA-Boc” (74 mg, 0.21 mmol) 在甲醇 (25 mL) 和 EtOAc (25 mL) 中的溶液中。将烧瓶倒空, 再用氢气冲洗 3 次, 最后在 40 psi 用氢气充满。将该悬浮液在环境温度剧烈振动 45 分钟。悬浮液通过一个布氏漏斗过滤, 并用甲醇漂洗数次。将滤液和洗出液浓缩至干燥。所得的氨基-吡唑在一个小瓶中溶解于无水 DMF (1.0 mL) 并加入到 57 mg (0.1 mmol) 的 “Pfp-吡唑-Pfp”-101 中, 然后于 50℃ 放置 20 小时。Boc-保护的产物用 40 mL 冷的乙醚沉淀, 轻轻倒出后再用醚漂洗一次。向残余物中加入苯甲醚 (0.8 mL), 随后再加入三氟乙酸 (3.2 mL)。将溶液在环境温度放置 30 分钟, 然后产物用 40 mL 冷的乙醚沉淀, 轻轻倒出后再用醚漂洗两次。粗产物用 0.1% TFA 水溶液吸收, 经 HPLC (Vydac 12 M C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 20mL/min) 纯化制得以双-三氟乙酸盐形式存在的 102。将该盐溶解于 6 mL 无水 MeOH 中, 冷却至 -20℃, 然后加入 1 mL 4M HCl/二噁烷。该溶液用 40 mL 冷的醚沉淀即制得以双-HCl 盐形式存在的 102 (38.4 mg)。MS: 328.7 [M+2H]/2

## 实施例 50

*1H-吡唑-2,5-二羧酸-2-[[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡唑-5-基]-酰胺]5-[[2-(2-胍基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡唑-5-基]-酰胺], 103 的合成 (方案 6)*

加载连接体。使 2.5 g (2.55 mmol) MBHA 树脂 (S=1.02) 在 DMF 中膨胀 5 分钟。将 1.06 g (7.65 mmol) 4-羟基苯甲酸和 1.03 g (7.65 mmol) HOBt 溶解于 DMF 中, 并向其中加入 1.18 mL (7.65 mmol) DIC。

将清的混和物倒入树脂中，轻轻搅动 2 小时。将树脂排干，用 DMF (5x) 洗涤。加入 10 mL DMF 和 5 mL 乙醇胺的混和物后在室温搅动过夜 (18 小时)。第二天早晨，将树脂排干，用 DMF (3x)、DCM (3x)、50%TFA/DCM (2x)、DCM (2x)、DMF (2x)、DCM (2x)、甲醇 (2x)、醚 (2x) 洗涤，并干燥后得到 2.8 g 酚树脂，B1。取代的程度为  $S=0.89 \text{ mmol/g}$  树脂 (通过重量增量计算)。

加载第一种酸。将 1.2 g (5 mmol) N-叔丁氧基羰基-5-氨基咪唑-2-羧酸 (Boc-5Ain-OH) 悬浮于 20 mL DCM 中。加入 0.78 mL (5 mmol) DIC，随后再加入 100 mg (0.8 mmol) DMAP。在 5 分钟内悬浮液变清。将该清溶液加入到干燥的 2.8 g (2.5 mmol) 酚树脂，B1 中并将混和物在室温搅动过夜 (18 小时)。第二天将树脂排干，用 DMF (3x) 洗涤。没有反应的酚 OH 基团用 DCM 中的 20% 乙酸酐 (acetic anhydride) 加 0.5 mL DIEA 乙酰化来封闭。将树脂再用 DMF (3x)、DCM (3x)、甲醇 (2x)、醚 (2x) 洗涤，并干燥后得到 3.2 g B2。取代的程度约为  $0.55 \text{ mmol/g}$  树脂-基于重量增量。

合成。将 160 mg (0.1 mmol) Boc-5Ain-Hba-树脂 (B2) 在 DCM 中膨胀十分钟，然后在 DCM 中用 25%TFA 2% 苯甲醚处理 20 分钟。用 DCM 洗涤 3 次，用 DMF 洗涤 3 次。将未保护的 B3 与 151 mg (0.3 mmol) B4 二肽 (单独在溶液中合成) 用 108 mg (0.285 mmol) HBTU 和 104  $\mu\text{L}$  (0.6 mmol) DIEA 在 DMF 中偶联三小时得到树脂结合的三肽，B5。将树脂用 DMF (3x)、DCM (3x) 洗涤，并用 TFA/苯甲醚/DCM 试剂再处理 20 分钟。用 DCM (3x) 和 DMF (3x) 将 TFA 洗掉。将含有游离氨基的分子用 10 倍过量的 1H-吡唑-1-甲脒盐酸盐 (146.6 mg, 1.0 mmol) 和 DIEA (344  $\mu\text{L}$ , 2.0 mmol) 在室温处理过夜得到 B6。最后，通过在室温用 EDA 处理 1 小时而使产物 (103) 从树脂裂解出来。将树脂过滤掉，上清液在真空中蒸发，剩下的油用醚从甲醇中沉淀。将沉淀物离心下来并干燥。粗产物经 HPLC (Vydac 12  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱，0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟，流速 20mL/min) 纯化。总产量为 16.4 mg (24%) 103。ES MS: 648.26 (  $M+H^+$  的计算值: 648.28 )。



### 实施例 51

*1H*-吡啶-2,5-二羧酸 5- $\{[2-(2\text{-氨基-乙基氨基甲酰基})-1H\text{-吡啶-5-基}]-\text{酰胺}\}$  2- $\{[2-(2\text{-胍基-乙基氨基甲酰基})-1H\text{-吡啶-5-基}]-\text{酰胺}\}$ ,  
104 的合成

将相同量的 tBoc 保护的肽-树脂 (0.1 mmole, 方案 6 (B5)) 不是去掉保护基, 而是以实施例 50 所述的方法, 先用 EDA 从树脂中裂解出来。所得的胺用 146.6 mg 在 DMF (2 mL) 溶液中的 1H-吡啶-1-甲脒盐酸盐 (1.0 mmol) 处理过夜。将反应混和物蒸发至干燥, 剩下的油溶解于 5 mL 含有 20% 苯甲醚的 TFA 中。当通过加入 45 mL 冷乙醚而使产物沉淀时, 去保护过程在 30 分钟内完成。将沉淀物过滤, 用醚洗涤然后干燥。粗产物经 HPLC (Vydac 12  $\mu\text{m}$  C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱, 0%到 60% 乙腈梯度超过 30 分钟, 流速 20mL/min) 纯化。总产量为 15.2 mg (22%) 104。ES MS: 648.26 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 648.28)。

### 实施例 52

*1H*-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[2-(2\text{-胍基-乙基氨基甲酰基})-1H\text{-吡啶-5-基}]-\text{酰胺}\}$ , 105 的合成

以实施例 51 所述的方法, 将 8.2mg (0.01 mmole) 103 用 14.6 mg (0.1 mmole) 在 DMF (2 mL) 溶液中的 1H-吡啶-1-甲脒盐酸盐处理。蒸发后, 油状残余物以同样方法经 HPLC 纯化。产量: 15.6 mg (23%) B9。ES MS: 690.27 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 690.30)。

### 实施例 53

*1H*-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[2-(2\text{-氨基-乙基氨基甲酰基})-1H\text{-吡啶-6-基}]-\text{酰胺}\}$ , 106 的合成

(A) 6-氨基-1H-吡啶-2-羧酸甲酯, 107 (R=CH<sub>3</sub>)。

将 10%Pd/C (40 mg) 加入到 200 mg (0.91 mmole) 6-硝基-1H-吡啶-2-羧酸甲酯 (108) 在 1:1 甲醇/乙酸乙酯混和物中的溶液中。将烧瓶用氢气冲洗 3 次, 最后在 30 到 35 psi 用氢气充满。将该悬浮液在室温剧烈搅动 30 分钟。将催化剂过滤掉, 滤液在真空中蒸发至干燥。所得的 6-氨基-1H-吡啶-2-羧酸甲酯在 TLC (二氧化硅, 甲苯-乙酸乙酯 7:3, R<sub>f</sub>: 0.31) 上呈单一样品点, 不经纯化即用于下一步。

(B) 1H-吡啶-2,5-二羧酸双-[[2-甲氧羰基-1H-吡啶-6-基]-酰胺],  
109 (R=CH<sub>3</sub>)

将新制备 (如前文所述) 的 6-氨基-1H-吡啶-2-羧酸甲酯 (0.91 mmole) 溶解于 3 mL 无水 DMF 中。加入 235 mg (0.44 mmole) 1H-吡啶-2,5-二羧酸二五氟苯酯, 110 (实施例 1, 步骤 B) 和 156 μL (0.91 mmole) DIEA, 并将混和物在氩中于 55℃ 加热三天, 然后蒸发至干燥。油状残余物用醚研制得到 200 mg (83%) 的固体产物, 该产物的纯度不经进一步纯化就足够用于继续合成了。

(C) 1H-吡啶-2,5-二羧酸双-[[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-6-基]-酰胺], 106

将 50 mg (0.091 mmole) 109 (R=CH<sub>3</sub>) 溶解于 2 mL 纯的 1,2-乙二胺中, 在 55℃ 维持过夜 (18 小时), 然后蒸发至干燥。将残余物溶解于 2mL 甲醇中并通过加入 45 mL 醚而沉淀。将沉淀物离心下来, 沉淀块 (pallet) 用醚洗涤两次并干燥。粗产物 106 经 HPLC (Vydac 12 μm C<sub>18</sub> 2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 流速 20mL/min) 纯化。通过将纯化的化合物溶解于 2 mL 甲醇, 用在二噁烷中的 1 mL 4N HCl 处理并用醚沉淀, 使该化合物转化为 HCl 盐。总产量为 9.1 mg (15%) 106。ES MS: 606.30 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 606.26)。

#### 实施例 54

1H-吡啶-2,5-二羧酸双-[[2-(3-氨基-丙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-6-基]-酰胺], 111 的合成

化合物 111 以实施例 53 所述合成化合物 106 的方法合成, 在步骤 C 中用丙烷-1, 3-二胺。产量 8.6 mg (18%); MS: 634.38 ( $M+H^+$  的计算值: 634.29)。

#### 实施例 55

*N, N'*-双- $\{[2-(2\text{-氨基-乙基氨基甲酰基})-1H\text{-吡啶-5-基}]-\text{间苯二甲酰胺}\}$ , 112 的合成

化合物 112 以实施例 53 一般描述的合成化合物 106 的方法合成。产量 10.9 mg (18%); MS: 567.26 ( $M+H^+$  的计算值: 567.25)。

#### 实施例 56

吡啶-2, 6-二羧酸双- $\{[2-(2\text{-氨基-乙基氨基甲酰基})-1H\text{-吡啶-5-基}]-\text{酰胺}\}$ , 113 的合成

化合物 113 以实施例 53 一般描述的合成化合物 106 的方法合成。产量 23.2 mg (41%); MS: 568.24 ( $M+H^+$  的计算值: 568.24)。

#### 实施例 57

吡啶-2, 4-二羧酸双- $\{[2-(2\text{-氨基-乙基氨基甲酰基})-1H\text{-吡啶-5-基}]-\text{酰胺}\}$ , 114 的合成

化合物 114 以实施例 53 一般描述的合成化合物 106 的方法合成。产量 17.1 mg (30%); MS: 568.24 ( $M+H^+$  的计算值: 568.24)。

#### 实施例 58

吡啶-3, 5-二羧酸双- $\{[2-(2\text{-氨基-乙基氨基甲酰基})-1H\text{-吡啶-5-基}]-\text{酰胺}\}$ , 115 的合成

化合物 115 以实施例 53 一般描述的合成化合物 106 的方法合成。  
产量 30 mg (53%) ; MS: 568.25 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 568.24) 。

#### 实施例 59

*N, N'*-双-[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1*H*-吡啶-6-基]-间苯二甲酰胺}, 116 的合成

化合物 116 以实施例 53 一般描述的合成化合物 106 的方法合成。  
产量 34.9 mg (61%) ; MS: 567.26 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 567.25) 。

#### 实施例 60

吡啶-2, 6-二羧酸双-{[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1*H*-吡啶-6-基]-酰胺}, 117 的合成

化合物 117 以实施例 53 一般描述的合成化合物 106 的方法合成。  
产量 35.5 mg (61%) ; MS: 568.25 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 568.24) 。

#### 实施例 61

吡啶-2, 4-二羧酸双-{[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1*H*-吡啶-6-基]-酰胺}, 118 的合成

化合物 118 以实施例 53 一般描述的合成化合物 106 的方法合成。  
产量 35.3 mg (61%) ; MS: 568.26 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 568.24) 。

#### 实施例 62

1*H*-吡啶-3, 5-二羧酸双-{[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1*H*-吡啶-6-基]-酰胺}, 119 的合成

化合物 119 以实施例 53 一般描述的合成化合物 106 的方法合成。  
产量 9.6 mg (17%) ; MS: 557.23 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 557.24)。

#### 实施例 63

噻吩-2,5-二羧酸双- $\{[2-(2\text{-氨基-乙基氨基甲酰基})-1H\text{-吡啶-5-基}]-\text{酰胺}\}$ , 120 的合成

化合物 120 以实施例 53 一般描述的合成化合物 106 的方法合成。  
产量 8.7 mg (15%) ; MS: 573.19 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 573.21)。

#### 实施例 64

1H-吡啶-3,5-二羧酸双- $\{[2-(2\text{-氨基-乙基氨基甲酰基})-1H\text{-吡啶-5-基}]-\text{酰胺}\}$ , 121 的合成

化合物 121 以实施例 53 一般描述的合成化合物 106 的方法合成。  
产量 3.7 mg (7%) ; MS: 557.23 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 557.24)。

#### 实施例 65

1H-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[2-(2\text{-氨基-乙基氨基甲酰基})-1\text{-甲基-1H-苯并咪唑-5-基}]-\text{酰胺}\}$ , 122 的合成

化合物 122 以实施例 53 一般描述的合成化合物 106 的方法合成。  
产量 6.8 mg (10%) ; MS: 636.37 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 636.40)。

#### 实施例 66

1H-吡啶-2,5-二羧酸双- $(\{2-[2-(2\text{-羟基-乙氧基})-乙基氨基甲酰基]-1H\text{-吡啶-6-基}\}-\text{酰胺})$ , 123 的合成

化合物 123 以实施例 53 一般描述的合成化合物 106 的方法合成。

产量 12.5 mg (17%) ; MS: 694.35 ( $M+H^+$ 的计算值: 694.31)。

### 实施例 67

1H-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[2-(2-二甲氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-6-基]-酰胺\}$ , 124 的合成

(A) 6-硝基-1H-吡啶-2-羧酸(2-二甲氨基-乙基)-酰胺, 125 的合成

将 500 mg (2.27 mmol) 6-硝基-1H-吡啶-2-羧酸甲酯溶解于 4 mL 纯  $N^1, N^1$ -二甲基-乙烷-1,2-二胺中, 在 55°C 放置过夜并蒸发。油状残余物用正己烷研制得到 528 mg (84%) 无需进一步纯化的黄色固体。MS: 277.13 ( $M+H^+$ 的计算值: 277.13)。

(B) 6-氨基-1H-吡啶-2-羧酸-(2-二甲氨基-乙基)-酰胺, 126 的合成

将 10%Pd/C (40 mg) 加入到 82.9 mg (0.3 mmole) 125 在 1:1 乙醇/乙酸乙酯混和物中的溶液中。将烧瓶用氢气冲洗 3 次, 最后在 30 到 35 psi 用氢气充满。将该悬浮液在室温剧烈搅动 30 分钟。将催化剂过滤掉, 滤液在真空中蒸发至干燥。固体 126 不经纯化即用于下一步。

(C) 1H-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[2-(2-二甲氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-6-基]-酰胺\}$ , 124 的合成

将新制备(如前文所述)的 126 溶解于 3 mL 无水 DMF 中。加入 54 mg (0.1 mmole) 1H-吡啶-2,5-二羧酸二五氟苯酯(实施例 1, 步骤 B) 和 103  $\mu$ L (0.6 mmole) DIEA, 并将混和物在氩中于 55°C 加热过夜(18 小时), 然后蒸发至干燥。粗产物 124 经 HPLC(Vydac 12  $\mu$ m  $C_{18}$  2.2x25 cm 柱, 0%到 60%乙腈梯度超过 30 分钟, 流速 20mL/min) 纯化。通过将纯化的化合物溶解于 2 mL 甲醇, 用 1 mL 溶于二噁烷的 4N HCl 处理并用醚沉淀而转化为 HCl 盐, 得到 7.0 mg (9.5%) 124。MS: 662.29 ( $M+H^+$ 的计算值: 662.32)。

## 实施例 68

1H-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[2-(3\text{-二甲氨基-丙基氨基甲酰基})-1\text{H-吡啶-5-基}]-\text{酰胺}\}$ , 127 的合成

化合物 127 按实施例 67 中对化合物 124 一般描述的方法来合成。  
产量 16.7mg (24%); MS: 690.34 ( $M+H^+$ 的计算值: 690.35)。

## 实施例 69

1H-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[2-(2\text{-二甲氨基-乙基氨基甲酰基})-2,3\text{-二氢-1H-吡啶-6-基}]-\text{酰胺}\}$ , 128 的合成

化合物 128 按实施例 67 中对化合物 124 一般描述的方法来合成。  
产量 4.8mg (7%); MS: 666.33 ( $M+H^+$ 的计算值: 666.35)。

## 实施例 70

1H-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[2-(2\text{-二甲氨基-丙基氨基甲酰基})-2,3\text{-二氢-1H-吡啶-6-基}]-\text{酰胺}\}$ , 129 的合成

化合物 129 按实施例 67 中对化合物 124 一般描述的方法来合成。  
产量 23.7mg (34%); MS: 694.36 ( $M+H^+$ 的计算值: 694.39)。

## 实施例 71

1H-吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[2-[2-(2\text{-羟基-乙氨基})-乙基氨基甲酰基]-1\text{H-吡啶-5-基}]-\text{酰胺}\}$ , 130 的合成

(A) 5-硝基-1H-吡啶-2-羧酸 $[2-(2\text{-羟基-乙氨基})-乙基]-\text{酰胺}$ , 131  
向 2.34g (10mmole) 5-硝基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯 (132) 溶于 25ml DMF 所形成的溶液中, 加入 5.2g (50mmole) 2-(2-氨基-乙氨基)-

乙醇 (133), 所得混合物在氩气环境中于 55℃ 保持 36 小时。然后将其蒸发干燥, 剩下的油样物质在室温下溶于乙醇, 结果导致快速的结晶形成。过滤出结晶物, 再用乙醇洗涤 (2 次) 并干燥, 就得到 2.08g 产物 (71%)。MS: 293.13 ( $M+H^+$  的计算值: 293.31)。 $^1H-NMR(DMSO-d_6)$ : 8.70-8.67 (m, 2H, 酰胺和吡啶 H-4); 8.04 (dd, 1H, 吡啶 H-6); 7.55 (d, 1H, 吡啶 H-7); 7.37 (s, 1H, 吡啶 H-3); 3.43 (t, 2H,  $-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-OH$ ); 3.39-3.33 (m, 2H,  $-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-OH$ ); 2.71-2.66 (m, 2H,  $-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-OH$ ); 2.59 (t, 2H,  $-NH-CH_2-CH_2-NH-CH_2-CH_2-OH$ )。

(B) 5-硝基-1H-吡啶-2-羧酸[2-(2-羟基-乙基-2-叔丁基氧基羰基-氨基)-乙基]-酰胺, 134

2.08g (7.12mmole) 131 悬浮于 10ml DMF 中。在室温, 向此悬浮液中加入 1.71g (7.83mmole)  $tBoc_2O$ 。十分钟之内混合物变澄清, 一小时之内反应完全。在真空条件下, 将 DMF 蒸发掉, 剩下的固体物质从异丙醇溶液中结晶出来, 就得到 1.82g (65%) 产物。 $^1H-NMR(DMSO-d_6)$ : 12.33 (s, 1H, 吡啶 H-1); 8.79 (s, 1H, CO-NH); 8.69 (s, 1H, 吡啶 H-3); 8.03 (dd, 1H, 吡啶 H-6); 7.55 (d, 1H, 吡啶 H-7); 7.34 (d, 1H, 吡啶 H-4); 3.46-3.23 (m, 8H, 亚甲基); 1.32 (s, 9H,  $CH_3$ )。

(C) 5-氨基-1H-吡啶-2-羧酸[2-(2-羟基-乙基-2-叔丁基氧基羰基-氨基)-乙基]-酰胺, 135

向 196mg (0.5mmole) 134 溶于 1:1 乙醇/乙酸乙酯混合物所形成的溶液中加入 10% Pd/C (50mg)。在 30 至 35psi 压力下, 烧瓶用氢气漂洗三次, 并用氢气充满。悬浮液在室温剧烈搅拌 30 分钟。过滤掉催化剂, 滤液在真空中蒸发干燥, 结果得到 180mg (100%) 135, 该产物在 TLC 中有单一点 (二氧化硅, 甲苯-乙酸乙酯 1:9,  $R_f$ : 0.16), 其无需纯化就可用于下一步反应。

(D) 1H-吡啶-2,5-二羧酸双-({2-[2-(2-羟基-乙氨基)-乙基氨基甲酰基]-1H-吡啶-5-基}-酰胺), 130



180mg (0.5mmole) 135 溶解于 3ml DMF 中, 并在 55℃ 与 50mg (0.1mmole) 1H-吡啶-2,5-二羧酸二五氟苯酯和 86 $\mu$ L (0.5mmole) DIEA 反应过夜 (18 小时)。混合物在真空中蒸发干燥, 剩下的半固体用醚加以研制, 就得到 190mg 固体 136。通过将其溶解在含有 20% 苯甲醚的 5ml TFA 中, 并在室温反应 30 分钟, 可以除去 tBoc 保护基团。加入 40ml 醚, 并将混合物离心。丢弃上清液, 沉淀物用醚洗三次并干燥。粗制的 130 用 HPLC (Vydac 12 $\mu$ m C<sub>18</sub> 2.2 $\times$ 25cm 柱, 0% 至 60% 乙腈梯度超过 30 分钟, 流速 20ml/min) 纯化。将纯化的化合物溶解于 2ml 甲醇, 用 1ml 4N HCl 的二噁烷溶液处理, 并用醚沉淀, 可将其转化为盐酸盐, 由此得到 29.3mg (42.3%) 130。ES MS: 694.29 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 694.31)。

### 实施例 72

1H-吡啶-2,5-二羧酸双-{[2-(3-氨基-2-羟基-丙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-酰胺}, 137 的合成

化合物 137 按实施例 71 中对化合物 130 一般描述的方法来合成。产量 58mg (86%); MS: 666.42 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 666.28)。

### 实施例 73

1H-吡啶-2,5-二羧酸双-{[2-(2-胍基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-6-基]-酰胺}, 138 的合成

向 23.8mg (35 $\mu$ mole) 106 (按实施例 53 中所描述的方法合成) 溶于 2ml DMF 所形成的溶液中加入 51mg (0.35mmole) 1-H-吡啶-1-甲脒盐酸盐和 73 $\mu$ l (0.42mmole) DIEA。混合物在室温下保持过夜 (18 小时), 然后蒸发干燥。油样的剩余物用 HPLC (Vydac 12 $\mu$ m C<sub>18</sub> 2.2 $\times$ 25cm 柱, 0% 至 60% 乙腈梯度超过 30 分钟, 流速 20ml/min) 纯化。将纯化的化合物溶解于 2ml 甲醇, 用 1ml 4N HCl 的二噁烷溶液处理, 并用醚沉

淀, 可将其转化为盐酸盐, 由此得到 3.3mg (13%) 138。ES MS: 690.41 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 690.30)。

#### 实施例 74

*1H-吡啶-2, 5-二羧酸双-[[2-(2-胍基-丙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-6-基]-酰胺}*, 139 的合成

化合物 139 按实施例 73 中对化合物 138 一般描述的方法来合成。产量 2.0mg (8%); MS: 718.43 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 718.33)。

#### 实施例 75

*1H-吡啶-2, 5-二羧酸双-[[2-(2-胍基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-酰胺}*, 140 的合成

化合物 140 按实施例 53 中对化合物 138 一般描述的方法来合成。产量 50mg (24%); MS: 690.39 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 690.30)。

#### 实施例 76

*1H-吡啶-2, 5-二羧酸双-[[2-(3-胍基-2-羟基-丙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-酰胺}*, 141 的合成

化合物 141 按实施例 53 中对化合物 138 一般描述的方法来合成。产量 9.1mg (60%); MS: 750.37 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 750.32)。

#### 实施例 77

*1H-吡啶-2, 5-二羧酸双-[[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1-乙氧基甲基-1H-吡啶-5-基]-酰胺}*, 142 的合成

将 2.3g (10mmole) 5-硝基-1H-吡啶-2-羧酸乙酯 (143) 溶于 DMF

所形成的溶液冷却至 0℃，并边剧烈搅拌边加入 598mg (15mmole) NaH (60%，溶于矿物油)。将烧瓶倒空，在真空中保持 1 小时。仍在 0℃ 加入 1.44ml (15.5mmole) 乙氧基甲基氯。混合物在室温再搅拌 1 小时，然后在真空中蒸发干燥。油样的剩余物用醚提取，将醚相蒸发，剩下的固体物质从 70ml 异丙醇 (iso-propy alcohol) 结晶两次。得到 1.7g (58%) 144。

将 146mg (0.5mmole) 144 还原，与 1H-吡啶-2,5-二羧酸二五氟苯酯 (实施例 1, 步骤 B) 偶联，和 1,2-乙二胺反应，并按实施例 53 中对 106 所描述的方法来纯化。得到 40mg (55%) B 507-b。ES MS: 722.49 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 722.34)。

#### 实施例 78

*1H-吡啶-2,5-二羧酸双-{[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1-甲氧基乙氧基甲基-1H-吡啶-5-基]-酰胺}*, 145 的合成

化合物 145 按实施例 77 中对 142 一般描述的方法用甲氧基乙氧基甲基氯来合成。产量 22mg (27%)。ES MS: 782.52 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 782.36)。

#### 实施例 79

*1H-吡啶-2,5-二羧酸双-{[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1-甲氧基甲基-1H-吡啶-5-基]-酰胺}*, 146 的合成

化合物 146 按实施例 77 中对 142 所描述的方法用甲氧基甲基氯来合成。产量 20.3mg (29%)。ES MS: 694.35 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 694.31)。

#### 实施例 80

*1H-吡啶-2,5-二羧酸双-{[2-(2-L-丙氨酰基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-6-基]-酰胺}*, 147 的合成

向 25mg (0.031mmole) 106 (实施例 53) 溶于 DMF 所形成的溶液中加入 21.5mg (0.075mmole) Boc-Ala-Opfp (148) 和 22 $\mu$ l (0.124mmole) DIEA, 混合物在室温搅拌 2 小时。然后将其蒸发干燥, 再用醚研制并干燥。通过将干燥的固体物质溶解在含 20% 苯甲醚的 TFA 中并反应 30 分钟, 可以把 tBoc 保护基团除去。粗产物用醚沉淀, 再用醚洗涤 3 次并干燥。然后用 HPLC (Vydac 12 $\mu$ m C<sub>18</sub> 2.2 $\times$ 25cm 柱, 0% 至 60% 乙腈梯度超过 30 分钟, 流速 20ml/min) 纯化。将纯化的化合物溶解于 2ml 甲醇, 用 1ml 4N HCl 的二噁烷溶液处理, 并用醚沉淀, 可将其转化为盐酸盐, 由此得到 16mg (68%) 147。ES MS: 748.31 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 748.33)。

### 实施例 81

*1H-吲哚-2, 5-二羧酸双- {[2-(2-L-苯丙氨酰基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吲哚-6-基]-酰胺}*, 149 的合成

化合物 149 按实施例 80 中对化合物 147 所描述的方法用 Fmoc-Phe-Opfp (150) 来合成, 不同的是要通过用 20% 哌啶的 DMF 溶液在室温处理研制过的干物质 30 分钟来除去 Fmoc 保护基团。将哌啶试剂蒸发, 剩下的油用醚研制。按上面实施例 80 所描述的方法, 固体粗产物经过纯化, 再将其转化成盐酸盐。得到 19.2mg (68%) 149; MS: 900.37 (M+H<sup>+</sup>的计算值: 900.40)。

### 实施例 82

*1H-吲哚-2, 5-二羧酸双- {[2-(2-L-亮氨酰基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吲哚-6-基]-酰胺}*, 151 的合成

化合物 151 按实施例 81 中对化合物 149 所描述的方法用 Fmoc-Leu-OPfp 来合成。得到 15.4mg (59%) 151; MS: 832.41 (M+H<sup>+</sup>的计算

值: 832.43)。

### 实施例 83

*1H-吲哚-2, 5-二羧酸双-[[2-(2-L-异亮氨酸酰基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吲哚-6-基]-酰胺}*, 152 的合成

化合物 152 按实施例 81 中对化合物 149 所描述的方法用 Fmoc-Ile-OPfp 来合成。得到 13.2mg (50%) 152; MS: 832.41 (M+H<sup>+</sup> 的计算值: 832.43)。

### 实施例 84

*1H-吲哚-2, 5-二羧酸双-[[2-(2-L-缬氨酸酰基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吲哚-6-基]-酰胺}*, 153 的合成

化合物 153 按实施例 81 中对化合物 149 所描述的方法用 Fmoc-Val-OPfp 来合成。得到 17.1mg (68%) 153; MS: 804.39 (M+H<sup>+</sup> 的计算值: 804.40)。

### 实施例 85

*1H-吲哚-2, 5-二羧酸双-[[2-(2-甘氨酸酰基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吲哚-6-基]-酰胺}*, 154 的合成

化合物 154 按实施例 81 中对化合物 149 所描述的方法用 Fmoc-Gly-OPfp 来合成。得到 18.5mg (82%) 154; MS: 720.29 (M+H<sup>+</sup> 的计算值: 720.30)。

### 实施例 86

*1H-吲哚-2, 5-二羧酸双-[[2-(2-L-谷氨酸酰基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吲哚-6-基]-酰胺}*, 155 的合成

化合物 155 按实施例 81 中对化合物 149 所描述的方法用 Fmoc-Glu(OtBu)-OPfp 来合成。用实施例 80 中描述去除 tBoc 基团的方法来去除 OtBu 保护基团, 得到 3.2mg (11%) 155; MS: 864.37 ( $M+H^+$  的计算值: 864.35)。

#### 实施例 87

*1H-吡啶-2, 5-二羧酸双- {[2-(2-L-鸟氨酸酰基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-6-基]-酰胺}*, 156 的合成

化合物 156 按实施例 86 中对化合物 155 所描述的方法用 Fmoc-Orn(Boc)-OPfp 来合成。得到 18.4mg (71%) 156; MS: 834.42 ( $M+H^+$  的计算值: 834.41)。

#### 实施例 88

*1H-吡啶-2, 5-二羧酸双- {[2-(2(N-乙酰基- $\gamma$ -L-谷氨酸酰基)-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-6-基]-酰胺}*, 157 的合成

化合物 157 按实施例 80 中对化合物 147 所描述的方法用 Boc-Glu(OSu)-OBzl 来合成, 不同的是要通过用 500 $\mu$ l 苯硫基甲烷 (thioanisol)、250 $\mu$ l EDT、5ml TFA 和 500 $\mu$ l TFMSA 的混合物在室温处理研制过的干物质 2 小时来除去 Bzl 和 tBoc 保护基团。按 80 中所描述的方法, 粗产物用醚沉淀, 并纯化和转化为盐酸盐。得到 6.8mg (25%) 157; MS: 472.67 ( $M+H^+$  的计算值: 472.67)。

#### 实施例 89

*1H-吡啶-2, 5-二羧酸双- {[2-(2-L-正亮氨酸酰基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-6-基]-酰胺}*, 158 的合成

化合物 158 按实施例 81 中对化合物 149 所描述的方法用 Fmoc-Nle-OPfp 来合成。得到 15.3mg (61%) 158; MS: 832.41 (M+H<sup>+</sup> 的计算值: 832.43)。

#### 实施例 90

*1H-吲哚-2,5-二羧酸双-{[2-(2-L-赖氨酸基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吲哚-6-基]-酰胺}*, 159 的合成

化合物 159 按实施例 80 中对化合物 147 所描述的方法用 Boc-Lys(Boc)-OSu 来合成。得到 19mg (73%) 159; MS: 862.45 (M+H<sup>+</sup> 的计算值: 862.45)。

#### 实施例 91

*1H-吲哚-2,5-二羧酸双-{[2-(2-(L-2,3-二氨基丙基)-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吲哚-5-基]-酰胺}*, 160 的合成

51mg (0.093mmole) Fmoc-Dap(Fmoc)-OH 溶于 DMF 中。加入 22 $\mu$ l (0.124mmole) DIEA, 随后加入 15 $\mu$ l (0.087mmole) TFA-Opfp, 混合物在室温搅拌 15 分钟。按实施例 81 中对化合物 149 所描述的方法, 此活性酸溶液用于合成 160。得到 11.9mg (49%) 160; MS: 778.37 (M+H<sup>+</sup> 的计算值: 778.356)。

#### 实施例 92

*1H-吲哚-2,5-二羧酸双-{[2-(2-(L-2,4-二氨基丁酰基)-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吲哚-5-基]-酰胺}*, 161 的合成

化合物 161 按实施例 91 中对化合物 160 所描述的方法用 Fmoc-Dab(Fmoc)-OH 来合成。得到 9.3mg (38%) 161; MS: 805.39 (M+H<sup>+</sup> 的计算值: 805.39)。

### 实施例 93

*1H*-吡啶-2, 5-二羧酸双- $\{[2-(2-(N\text{-甲基-L-缬氨酸酰基})\text{-酰氨基-乙基氨基甲酰基})\text{-1H-吡啶-5-基}]\text{-酰胺}\}$ , 162 的合成

化合物 162 按实施例 91 中对化合物 160 所描述的方法用 Fmoc-MeVal-OH 来合成。得到 19.1mg (76%) 162; MS: 832.42 ( $M+H^+$  的计算值: 832.43)。

### 实施例 94

*1H*-吡啶-2, 5-二羧酸双- $\{[2-(2-L\text{-精氨酸酰基}\text{-酰氨基-乙基氨基甲酰基})\text{-1H-吡啶-6-基}]\text{-酰胺}\}$ , 163 的合成

化合物 163 按实施例 88 中对化合物 157 所描述的方法用 Boc-Arg( $Z_2$ )-OSu 来合成。得到 23.3mg (84%) 163; MS: 918.45 ( $M+H^+$  的计算值: 918.46)。

### 实施例 95

*1H*-吡啶-2, 5-二羧酸双- $\{[2-(2-(L\text{-2, 3-二氨基丙基})\text{-酰氨基-乙基氨基甲酰基})\text{-1H-吡啶-6-基}]\text{-酰胺}\}$ , 164 的合成

化合物 164 按实施例 91 中对化合物 160 所描述的方法来合成。得到 12.9mg (55%) 164; MS: 778.35 ( $M+H^+$  的计算值: 778.36)。

### 实施例 96

*1H*-吡啶-2, 5-二羧酸双- $\{[2-(2-(L\text{-2, 4-二氨基丁酰基})\text{-酰氨基-乙基氨基甲酰基})\text{-1H-吡啶-6-基}]\text{-酰胺}\}$ , 165 的合成

化合物 165 按实施例 92 中对化合物 161 所描述的方法来合成。得



到 11.2mg (46%) 165; MS: 805.39 ( $M+H^+$ 的计算值: 805.39)。

#### 实施例 97

*1H-吡啶-2,5-二羧酸双-[[2-(2-(N-甲基-L-缬氨酸基)-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-6-基]-酰胺}*, 166 的合成

化合物 166 按实施例 93 中对化合物 162 所描述的方法来合成。得到 12.7mg (50%) 166; MS: 832.42 ( $M+H^+$ 的计算值: 832.43)。

#### 实施例 98

*1H-吡啶-2,5-二羧酸双-[[2-(2-L-苏氨酸基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-酰胺}*, 167 的合成

化合物 167 按实施例 80 中对化合物 147 所描述的方法用 Boc-Thr-OSu 来合成。得到 20.4mg (84%) 167; MS: 808.37 ( $M+H^+$ 的计算值: 808.36)。

#### 实施例 99

*1H-吡啶-2,5-二羧酸双-[[2-(2-苏氨酸基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-6-基]-酰胺}*, 168 的合成

化合物 168 按实施例 80 中对化合物 147 所描述的方法用 Boc-Thr-OSu 来合成。得到 18.8mg (77%) 168; MS: 808.37 ( $M+H^+$ 的计算值: 808.36)。

#### 实施例 100

*1H-吡啶-2,5-二羧酸双-[[2-(2-甘氨酸基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-酰胺}*, 169 的合成

化合物 169 按实施例 80 中对化合物 147 所描述的方法用 Boc-Gly-OSu 来合成。得到 13.2mg (73%) 169; MS: 720.28 ( $M+H^+$  的计算值: 720.30)。

#### 实施例 101

*1H-吡啶-2,5-二羧酸双-{[2-(2-乙酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-酰胺}*, 170 的合成

化合物 170 按实施例 80 中对化合物 147 所描述的方法用乙酸酐来合成, 不同的是无需除去保护基团。得到 11mg (60%) 170; MS: 690.16 ( $M+H^+$  的计算值: 690.28)。

#### 实施例 102

*1H-吡啶-2,5-二羧酸双-{[2-(2-L-谷氨酰基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-酰胺}*, 171 的合成

化合物 171 按实施例 81 中对化合物 149 所描述的方法用 Fmoc-Glu(OtBu)-OPfp 来合成。OtBu 保护基团按实施例 80 中所描述的去除 tBoc 基团的方法来除去。得到 5mg (23%) 171; MS: 864.37 ( $M+H^+$  的计算值: 864.35)。

#### 实施例 103

*1H-吡啶-2,5-二羧酸双-{[2-(2-L-赖氨酰基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-酰胺}*, 172 的合成

化合物 172 按实施例 80 中对化合物 147 所描述的方法用 Boc-Lys(Boc)-OSu 来合成。得到 19mg (88%) 172; MS: 862.45 ( $M+H^+$  的计算值: 862.45)。

## 实施例 104

*1H-吡啶-2, 5-二羧酸双-[[2-(2-L-缬氨酰基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-酰胺}*, 173 的合成

化合物 173 按实施例 81 中对化合物 149 所描述的方法用 Fmoc-Val-OPfp 来合成。得到 15.4mg (76%) 173; MS: 804.41 (M+H<sup>+</sup> 的计算值: 804.40)。

## 实施例 105

*1H-吡啶-2, 5-二羧酸双-[[2-(2-L-天冬氨酰基-酰氨基-乙基氨基甲酰基)-1H-吡啶-5-基]-酰胺}*, 174 的合成

化合物 174 按实施例 81 中对化合物 149 所描述的方法用 Fmoc-Asp(OtBu)-OPfp 来合成。OtBu 保护基团按实施例 80 中所描述的去 tBoc 基团的方法来除去。得到 9.3mg (44%) 174; MS: 836.38 (M+H<sup>+</sup> 的计算值: 836.31)。

## 实施例 106

*Boc-Py-HBA-AMPS (175) 的合成*

将 Boc Py (5mmole, 1.20g) 溶于 20ml 二氯甲烷中, 再加入 0.774ml (5mmole) DIC 和 100mg (0.8mmole) DMAP。该溶液加入到 2.5g Hba-AMPS 树脂中, 并在室温搅动过夜。将溶液过滤掉后, 得到的树脂分别用 DMF 洗涤 3 次, 二氯甲烷洗涤 3 次, 甲醇洗涤 2 次和乙醚洗涤 2 次。每次洗涤的体积大约等于树脂的体积。随后将树脂在高度真空中干燥并称重。175 的产量: 2.9226g, 相应于 0.76mmol/g 的替换。

## 实施例 107

*Boc-5-Ain-HBA-AMPS (176) 的合成*

将 Boc-5-Ain (5mmol, 1.38g) 溶于 20ml DMF, 再加入 2.21g (2 当量) BOP 和 0.871ml (2 当量) DIEA。该溶液加入到 2.5g Hba-AMPS 树脂中, 并在室温搅动过夜。将溶液过滤掉后, 得到的树脂分别用 DMF 洗涤 3 次, 二氯甲烷洗涤 3 次, 甲醇洗涤 2 次和乙醚洗涤 2 次。每次洗涤的体积大约等于树脂的体积。随后将树脂在高度真空中干燥并称重。(176) 的产量: 2.9327g, 相应于 0.626mmol/g 的替换。

### 实施例 108

#### 化合物 (177) 的模范合成程序 (方案 7)

0.03mM 树脂 176 用大约 5ml DMF 洗涤 3 次, 大约 5ml 二氯甲烷洗涤 3 次。然后溶胀的树脂用 25%三氟乙酸/2%苯甲醚的二氯甲烷混合物洗涤 1 分钟, 排干后用同样的混合物再处理 20 分钟。排干后, 树脂用大约 5ml 二氯甲烷洗涤 2 次, 大约 5ml DMF 洗涤 2 次, 就得到无保护的 178。将单独在溶液中合成的二肽 179 (34.4mg, 0.09mmol) 溶于 2ml DMF 中, 并混合 32.4mg HBTU 和 30.9 $\mu$ l DIEA。5 分钟之后, 将该混合物加入到树脂中并搅动 2 小时, 就得到与树脂结合的三肽 180。该树脂用 2ml 纯的 1, 2-乙二胺处理 2 小时, 得到产物 177。将树脂过滤掉, 所得溶液在真空中蒸发, 最后所得的油溶于甲醇并用乙醚沉淀。将最后所得的沉淀物离心, 轻轻倾去醚并把产物于真空干燥。该粗产物用 HPLC (Vydac 12 $\mu$ m, C<sub>18</sub> 2.2 $\times$ 25cm 柱, 0%至 80%乙腈水溶液梯度超过 20 分钟, 流速 20ml/min) 纯化, 就得到纯化的 177 (见表 1)。

化合物 181-188 用上述同样的合成程序来合成, 但要作以下修改: 化合物 181, 182, 183, 184 和 188 用树脂 175 开始它们的合成, 化合物 185, 186 和 187 用树脂 176。用于从树脂上切下三肽前体从而形成化合物 181 至 188 的胺列于表 1 中“所用的胺”这一项目之下。所有的胺都要用纯的(每种 2ml), 除了 1, 4-二氨基丁烷, 它是溶解在 600 $\mu$ l 四氢呋喃中的。

表 1

化合物 编号	所用的 树脂	所用的 胺	产量 (mg)	测得的 MS (M+H <sup>+</sup> )	计算的 MS (M+H <sup>+</sup> )
181	175	1,4-二氨基丁烷	7.7	575.35	575.69
182	175	1,2-乙二胺	5.4	547.30	547.64
183	175	DP	8.5	589.35	589.72
184	175	DE	9.5	575.33	575.69
185	176	1,4-二氨基丁烷	8.3	611.33	611.72
177	176	1,2-乙二胺	8.6	583.30	583.67
186	176	DP	13.1	625.35	625.75
187	176	DE	14.7	611.33	611.72
188	175	乙醇胺	21.1	548.27	548.62

### 实施例 109

#### 化合物 191 的模范合成程序 (方案 8)

0.03mm 树脂 176 用大约 5ml DMF 洗涤 3 次, 大约 5ml 二氯甲烷洗涤 3 次。然后溶胀的树脂用 25%三氟乙酸/2%苯甲醚的二氯甲烷混合物洗涤 1 分钟, 排干后用同样的混合物再处理 20 分钟。排干后, 树脂用大约 5ml 二氯甲烷洗涤 2 次, 大约 5ml DMF 洗涤 2 次, 就得到无保护的 178。将单独在溶液中合成的二肽 189 (42.2mg, 0.09mmol) 溶于 2ml DMF 中并混合 32.4mg HBTU 和 30.9 $\mu$ l DIEA。5 分钟之后, 将该混合物加入到树脂中并搅动 2 小时, 就得到与树脂结合的三肽 190。该树脂用 2ml 2M 甲胺的 THF 溶液处理 2 小时, 得到产物 191。将树脂过滤掉, 所得溶液在真空中蒸发, 最后所得的油用 500 $\mu$ l 苯甲醚和 2ml TFA 溶解。经过 30 分钟搅拌后, 该溶液在真空中蒸发, 再用甲醇溶解并用乙醚沉淀。将所得的沉淀物离心, 轻轻倾去醚并把产物于真空干燥。该粗产物用 HPLC (Vydac 12 $\mu$ m, C<sub>18</sub> 2.2 $\times$ 25cm 柱, 0%至 80%乙腈水溶液梯度超过 20 分钟, 流速 20ml/min) 纯化, 就得到纯化的 191

(见表 2)。

化合物 192-200 用上述同样的合成程序来合成,但要作以下修改:化合物 192, 193, 194, 195 和 200 用树脂 175 开始它们的合成,化合物 196, 197, 198 和 199 用树脂 176。用于从树脂上切下三肽前体从而形成化合物 192 至 200 的胺列于表 2 中“所用的胺”这一项目之下。1, 2-乙二胺要用纯的 (2ml), 其他所有的胺以溶液形式使用: 甲胺 (2M, 溶于 THF), 1, 4-二氨基丁烷 (2ml, 溶于 600 $\mu$ l 四氢呋喃中), 二亚乙基三胺 (10 当量, 溶于 2ml THF 中), N, N'-双 (3-氨基丙基)-1, 3-丙二胺 (10 当量, 溶于 2ml THF 中), 三 (2-氨基乙基) 胺 (10 当量, 溶于 2ml THF 中)。

表 2

化合物编号	所用的树脂	所用的胺	产量 (mg)	测得的 MS (M+H <sup>+</sup> )	计算的 MS (M+H <sup>+</sup> )
192	175	甲胺	14.3	505.25	505.56
193	175	1, 4-二氨基丁烷	25.9	562.30	562.65
194	175	二亚乙基三胺	4.1	577.31	577.67
195	175	N, N'-双 (3-氨基丙基)-1, 3-丙二胺	8.7	662.41	662.82
191	176	甲胺	17.5	541.25	541.59
196	176	1, 4-二氨基丁烷	26.1	598.31	598.69
197	176	二亚乙基三胺	8.5	613.32	613.70
198	176	1, 2-乙二胺	27.9	570.28	570.63
199	176	三 (2-氨基乙基) 胺	13.0	620.37	620.74
200	175	三 (2-氨基乙基) 胺	24.4	656.36	656.77

### 实施例 110

#### 化合物 201 的模范合成程序 (方案 9)

0.05mM 树脂 175 用大约 5ml DMF 洗涤 3 次, 大约 5ml 二氯甲烷洗涤 3 次。然后溶胀的树脂用 25%三氟乙酸/2%苯甲醚的二氯甲烷混合物

洗涤 1 分钟，排干后用同样的混合物再处理 20 分钟。排干后，树脂用大约 5ml 二氯甲烷洗涤 2 次，大约 5ml DMF 洗涤 2 次，就得到无保护的 178。将单独在溶液中合成的二肽 202 (61.1mg, 0.10mmol) 溶于 2ml DMF 中并混合 36.1mg HBTU 和 34.7 $\mu$ l DIEA。5 分钟之后，将该混合物加入到树脂中并搅动 2 小时，就得到与树脂结合的三肽 203。该树脂用 2ml 纯的 1, 2-乙二胺处理 2 小时，得到产物 201。将树脂过滤掉，所得溶液在真空中蒸发，最后所得的油用 500 $\mu$ l 苯甲醚和 2ml TFA 溶解。经过 30 分钟搅拌后，该溶液在真空中蒸发，再用甲醇溶解并用乙醚沉淀。将最后所得的沉淀物离心，轻轻倾去醚并把产物于真空干燥。该粗产物用 HPLC (Vydac 12 $\mu$ m, C<sub>18</sub> 2.2 $\times$ 25cm 柱, 0%至 80% 乙腈水溶液梯度超过 20 分钟, 流速 20ml/min) 纯化, 就得到纯化的 201 (见表 3)。

化合物 204-210 用上述同样的合成程序来合成, 但要作以下修改: 化合物 204, 205, 206 和 207 用树脂 175 开始它们的合成, 化合物 208, 209 和 210 用树脂 176。用于从树脂上切下三肽前体从而形成化合物 201 至 210 的胺列于表 3 中“所用的胺”这一项目之下。1, 2-乙二胺和丁胺要用纯的 (2ml), 其他所有的胺以溶液形式使用: 甲胺 (2M, 溶于 THF), 辛胺 (1ml, 溶于 1ml 四氢呋喃中), 2-甲氨基吡啶 (1ml, 溶于 1ml 四氢呋喃中)。

表 3

化合物 编号	所用的 树脂	所用的 胺	产量 (mg)	测得的 MS (M+H <sup>+</sup> )	计算的 MS (M+H <sup>+</sup> )
204	175	甲胺	8.5	547.25	547.59
205	175	丁胺	17.1	589.30	589.67
206	175	辛胺	8.1	645.37	645.78
207	175	1, 2-乙二胺	12.6	576.28	576.63
208	176	辛胺	20.0	681.36	681.81
209	176	丁胺	10.4	625.31	625.70
210	176	1, 2-乙二胺	12	612.29	612.66
211	176	2-甲氨基吡啶	4.8	660.29	660.71

## 实施例 111

## 化合物 211 的模范合成程序 (方案 10)

将 1-甲基-4-硝基-咪唑-2-羧酸乙酯 (4g, 20mmol) 放入带螺旋盖的烧瓶中, 并用 20ml 1, 2-乙二胺覆盖, 然后放入 55℃ 烘箱中过夜。溶剂在真空中蒸发, 接着在高度真空中干燥, 就得到 212。

将 212 溶于 100ml DMF 中, 然后向此溶液中分批加入 6.55g 二碳酸二叔丁基酯。经过 1 小时搅拌后, 将反应体系浓缩至 50ml, 并分散于氯仿 (150ml) 和 0.5M 碳酸氢钠 (150ml) 中。有机相分别用 0.1M 的硫酸洗涤 2 次, 水洗涤 2 次, 然后通过无水硫酸钠干燥, 就得到黄色的油, 这一油状物稍后即凝固。用热的甲苯再结晶就得到 3.51g (56% 全部产量) 213。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 8.74 (tr, 1H, δ=5.9, NH), 8.54 (s, 1H, 咪唑 C-H), 6.87 (tr, 1H, δ=5.2, NH), 3.99 (s, 3H, Me), 3.23-3.28 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.04 (q, 2H, δ=5.9, CH<sub>2</sub>), 1.35 (s, 9H, tBu); m. p. 138-139℃。

213 (3.12g, 10mmol) 在加热条件下溶解于 100ml 乙酸乙酯中。加入甲醇 (20ml), 随后加入 1g 5% 披钨碳, 在 37psi 压力下于帕尔摇动器中开始氢化反应。30 分钟之后, 气压稳定下来, 反应停止。将催化剂滤掉, 溶剂在真空中蒸发。于高度真空下干燥, 就得到黄色/褐色的油 214。

将 214 溶于 15ml DMF 中, 再加入 3.59g (9mmol) 先前在溶液中合成的 Pfp-酯 SL40, 然后把反应烧瓶放入 55℃ 烘箱。经过整夜的反应后, TLC 显示反应不完全。按上面所描述的方法将 SL38 (0.7g) 氢化, 其反应产物 (214) 溶于 2ml DMF 并加入到溶液中。于 55℃ 经过又一天的继续反应后, 将反应体系蒸发, 最后所得的褐色油经过硅胶柱色谱法纯化。慢慢增加甲苯/乙酸乙酯梯度 (从 9:1 至 1:1), 就得到 320mg (8%) 产物 215; <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 12.12 (s, 1H, NH), 10.61 (s, 1H, NH), 8.38 (s, 1H, 咪唑 C4-H), 7.97 (tr, 1H, NH, δ=5.4), 7.89 (d, 1H, 咪唑 C6-H, δ=8.6), 7.55 (s, 1H, 咪唑 C5-H), 7.48



(d, 1H, 吡啶 C7-H,  $\delta=8.7$ ), 7.35 (s, 1H, 吡啶 C3-H), 6.89 (tr, 1H, NH,  $\delta=4.8$ ), 4.34 (q, 2H, O-CH<sub>2</sub>,  $\delta=6.9$ ), 3.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.31 (H<sub>2</sub>O 后的 CH<sub>2</sub> 信号), 3.06 (q, 2H, CH<sub>2</sub>,  $\delta=6.0$ ), 1.348 (m, 12H, *tert*-Bu, CH<sub>3</sub>) ESI-MS: 计算的质量 (M+H<sup>+</sup>) 499.23, 测得的 499.22.

将 215 (300mg) 溶于 4ml 甲醇并加热至 60℃。加入 1.2ml 1N 氢氧化钠水溶液, 并把反应体系于 60℃ 搅拌 3 小时。接着将反应混和物蒸发, 再次溶解于 5ml 水中。用 1N 氯化氢水溶液将其酸化至 pH3, 由此沉淀出产物, 然后将沉淀离心。用水洗涤 4 次 (每次 30ml), 使 pH 到 4.5。最后所得的晶体经过冻干和高度真空下通过 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 干燥, 就得到 248.9mg (88%) 216。

0.05mM 树脂 176 用大约 5ml DMF 洗涤 3 次, 大约 5ml 二氯甲烷洗涤 3 次。然后溶胀的树脂用 25% 三氟乙酸/2% 苯甲醚的二氯甲烷混合物洗涤 1 分钟, 排干后用同样的混合物再处理 20 分钟。排干后, 树脂分别用大约 5ml 二氯甲烷洗涤 2 次, 大约 5ml DMF 洗涤 2 次, 就得到无保护的 178。将按上面所描述的方法合成的二肽 216 (61.1mg, 0.10mmol) 溶于 2ml DMF 中并混合 36.1mg HBTU 和 34.7 $\mu$ l DIEA。5 分钟之后, 将该混合物加入到树脂中并搅动 2 小时, 就得到与树脂结合的三肽 217。该树脂用 2ml 纯的 1, 2-乙二胺处理 2 小时。将树脂过滤掉, 所得溶液在真空中蒸发, 最后所得的油用 500 $\mu$ l 苯甲醚和 2ml TFA 溶解。经过 30 分钟搅拌后, 该溶液在真空中蒸发, 再与 0.5mM N,N'-双(叔丁氧基羰基)-1H-吡啶-1-甲脒溶于 2ml DMF 的溶液搅拌 2 小时。溶液在真空中蒸发, 所得的油用 500 $\mu$ l 苯甲醚和 2ml TFA 溶解。经过 30 分钟搅拌后, 该溶液在真空中蒸发, 再用甲醇溶解并用乙醚沉淀。将所得的沉淀物离心, 轻轻倾去醚并把产物于真空干燥。该粗产物用 HPLC (Vydac 12 $\mu$ m, C<sub>18</sub> 2.2 $\times$ 25cm 柱, 0%至 80%乙腈水溶液梯度超过 20 分钟, 流速 20ml/min) 纯化, 就得到纯化的 211 (见表 4)。

表 4

化合物 编号	所用的 树脂	所用的 胺	产量 (mg)	测得的 MS (M+2H <sup>+</sup> )/2	计算的 MS (M+2H <sup>+</sup> )/2
218	175	1, 2-乙二胺	19.1	310.16	310.34
211	176	1, 2-乙二胺	22.1	328.16	328.35

### 实施例 112

#### 化合物 219 的模范合成程序 (方案 11)

2,2-双(叠氮基甲基)-1,3-丙二醇是由 2,2-双(溴甲基)-1,3-丙二醇经过两步合成的,其方法类似于先前发表的程序(J. Med. Chem. 1989, 32, 2015-2020)。

2,2-双(溴甲基)-1,3-丙二醇(3g, 11.453mmol)和 3g(4当量)叠氮化钠于 120℃在 100ml DMF 中搅拌两天。让反应体系冷却至室温,过滤,蒸发至大约 10ml。剩余物溶解于 100ml 二氯甲烷中,过滤并再次蒸发。剩余物用 NMR 检测,其只含有 DMF 和 2,2-双(叠氮基甲基)-1,3-丙二醇。产物不用再蒸发,即可用于下一步程序。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 4.73 (tr, 2H, OH), 3.28 (s, 4H, 2\*CH<sub>3</sub>), 3.25 (d, 4H, 4.1Hz); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 60.43, 51.80, 46.20。

将 2,2-双(叠氮基甲基)-1,3-丙二醇溶解于 20ml 乙醇中,冷却至 0℃,并加入 500mg 5% Pd/CaCO<sub>3</sub>。Ar 气泡通过混和物 15 分钟之后,用 H<sub>2</sub> 气泡通过悬浮液来对混和物进行 6 小时的氢化。1-2 小时后褐色的悬浮物变成黑色。经过过滤、蒸发和干燥,就得到 1.5g 油腻的晶体。粗产物(2,2-双(氮甲基)-1,3-丙二醇)不需进一步纯化即可使用。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 4.22 (s, 4H, 2\*CH<sub>2</sub>), 2.69 (br s, 6H, 2\*OH, 2\*NH<sub>2</sub>), 2.47 (s, 4H, 2\*CH<sub>2</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) 59.41, 39.57, 39.19; ESI-MS: 计算的质量 (M+H<sup>+</sup>) 135.11, 测得的 135.12。

220 是由 221 经过三步合成的。221(6g, 25.7mmol)悬浮于 125ml 甲醇中,并加热至 55℃。加入 3N 氢氧化钠水溶液,于是所有的起始物质都溶解了。在 55℃ 搅拌 5 小时后,将溶液酸化至 pH 2,并过滤。

滤液用水 (50ml) 洗涤, 随后通过五氧化二磷干燥, 得到定量产量的  
吡啶-2,5-二羧酸 222。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 12.06 (s, 1H, NH), 8.34  
(s, 1H, CH), 7.82 (d, 1H, CH,  $\delta=8.8$  Hz), 7.47 (d, 1H, CH,  
 $\delta=8.8$  Hz), 7.23 (s, 1H, CH); m. p. 314-315°C。

将吡啶-2,5-二羧酸 (222) (3g, 12.86mmol) 溶解于 40ml DMF  
中。加入二异丙基乙胺 (5.37ml, 2.4 当量) 和 5.3ml (2.4 当量) 三  
氟乙酸五氟苯酯到反应混合物中。将反应混合物搅拌过夜, 蒸发并分  
散于 150ml 乙酸乙酯和 150ml 饱和碳酸氢钠水溶液中。水层用乙酸乙  
酯再提取 2 次 (每次 150ml); 将有机层并在一起, 通过无水硫酸钠  
干燥。将粗物质装入充满硅胶的布氏漏斗中, 然后用 50% 己烷/甲苯混  
合物洗脱。得到 2.13g (30.8%) 产物 223。

在 30psi 压力下, 用 5% Pd/C (0.5g) 作为催化剂对 5-硝基-吡啶  
-2-羧酸乙酯 (654mg, 2.79mmol) 进行氢化 30 分钟。通过玻璃料过滤  
以除去催化剂, 在真空中蒸发, 并在高度真空下干燥, 就得到游离的  
胺 (224)。立即将其溶解于 3ml DMF 中, 并加入 500mg 223。将反应  
体系于 55°C 保温过夜, 然后蒸发。粗物质从热的乙醇中再结晶出来,  
然后经蒸发和干燥后得到 273mg (50.8%) 产物 (220)。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>):  
11.98 (s, 1H, NH-吡啶), 11.86 (s, 1H, NH-吡啶), 11.81 (s, 1H,  
NH-吡啶), 10.25 (s, 1H, CONH), 10.11 (s, 1H, CONH), 8.39  
(s, 1H, CH), 8.15 (s, 1H, CH), 7.86 (dd, 1H, CH,  $\delta=9.2$ ,  $\delta=1.4$ ),  
7.53-7.62 (m, 4H, 4\*CH), 7.43 (tr, 2H,  $\delta=9.1$ ), 7.15 (d, 2H,  
2\*CH,  $\delta=7.9$ ), 4.33 (q, 4H, 2\*CH<sub>2</sub>,  $\delta=7.0$ ), 1.34 (tr, 6H, 2\*CH<sub>3</sub>,  
 $\delta=7.0$ )。

将 30mg 三肽 (220) 和 150mg 二胺 ((2,2-双(氨基甲基))-1,3-丙二  
醇) 溶解于 1ml DMF 中。反应体系于室温搅拌 3 天, 然后于 55°C 搅拌 4  
天。经过蒸发, 随后用 HPLC 纯化 (Vydac 12 $\mu$ m, C<sub>18</sub> 2.2 $\times$ 25cm 柱,  
30% 至 80% 乙腈水溶液梯度超过 20 分钟, 流速 20ml/min), 就得到纯  
的产物。经过冻干, 产物溶解于用冰预冷的甲醇中, 用 200 $\mu$ l 4N HCl/  
二噁烷酸化, 然后用乙醚沉淀。将产物离心, 倾去醚。最后的产物在

真空中干燥, 就得到纯的 219。在 225 的合成中, 30mg 三肽 (220) 溶解于 500 $\mu$ l 纯的 2,2-二甲基-1,3-丙二胺中。选择和制备 219 相同的反应条件和纯化步骤。

表 5

化合物 编号	所用的 胺	产量 (mg)	测得的 MS (M+H <sup>+</sup> )	计算的 MS (M+H <sup>+</sup> )
219	(2,2-双(氨基甲基))-1,3-丙二醇	1.7	754.36	754.36
225	(2,2-二甲基)-1,3-丙二胺	4.7	690.35	690.35

### 实施例 113

#### 化合物 226 的模范合成程序 (方案 12)

将 227 (30mg) 溶于 2ml DMF 中, 并放入丙酮/CO<sub>2</sub> 浴中使温度为 -20 $^{\circ}$ C。加入二异丙基乙胺 (19 $\mu$ l, 2.2 当量) 和 4-硝基苄基氯甲酸酯 (24mg)。于 -20 $^{\circ}$ C 搅拌 30 分钟后, 反应体系在室温搅拌过夜。经过蒸发, 随后用 HPLC 纯化 (Vydac 12 $\mu$ m, C<sub>18</sub> 2.2 $\times$ 25cm 柱, 0% 至 100% 乙腈水溶液梯度超过 20 分钟, 流速 20ml/min), 就得到纯的化合物。经过冻干, 产物溶解于用冰预冷的甲醇中, 用 200 $\mu$ l 4N HCl/二噁烷酸化, 然后用乙醚沉淀。将产物离心, 倾去醚。终产物在真空中干燥, 就得到纯的 226 (见表 6)。用 4-甲氧基苄基氯甲酸酯进行同样的合成, 就得到 228。

表 6

化合物 编号	所用的 氯甲酸酯	产量 (mg)	测得的 MS (MH <sup>+</sup> )	计算的 MS (MH <sup>+</sup> )
228	4-硝基苄基氯甲酸酯	7.6	785.40	785.27
226	4-甲氧基苄基氯甲酸酯	9.8	756.41	756.28

### 实施例 114

### 化合物 229 和 230 的合成程序 (方案 13)

将苯并咪唑 231 (349.5mg, 1.2mmol) 溶于纯的 TFA (5ml), 并置于室温 30 分钟。随后加入甲苯, 将溶液在真空中蒸发。该程序重复两次。所得的胺 232 在高度真空下干燥。然后 232 溶于 5ml DMF, 再加入 223 (214.9mg, 0.4mmol) 和 6 当量二异丙基乙胺 (418 $\mu$ l)。该混和物在室温搅拌 1 星期。经过 HPLC 纯化 (Vydac 12 $\mu$ m, C<sub>18</sub> 2.2 $\times$ 25cm 柱, 0%至 100%乙腈水溶液梯度超过 20 分钟, 流速 20ml/min) 来对反应进行监控。在 100%乙腈时一个峰 (对应于 223) 消失, 在大约 75%乙腈时一个主峰出现。峰非常宽, 其主要由二肽 233 和较少数量的 234 组成。对于 233 的取代反应被假定是在 C-2 羧基基团上, 这与一些先前的研究相符, 那些研究显示取代优选发生在这个位置。30mg 233 和 234 的混和物溶解于 5ml 1, 2-乙二胺中, 并搅拌 1.5 天。然后将混和物蒸发并用 HPLC 纯化。分离出三肽并转化成盐酸盐, 得到 2.3mg 终产物 (229)。

将 235 (40mg, 115 $\mu$ mol) 溶解于甲醇/乙酸乙酯中, 并于大约 30psi 压力下在帕尔摇动器中氢化 30 分钟。滤掉催化剂, 将溶剂蒸发, 所得的游离胺 (SL61) 在高度真空下干燥。把 236 溶于 3ml DMF 中, 再加入 30mg (55.1 $\mu$ mol) SL57 和 20 $\mu$ l (115 $\mu$ mol) 异丙基乙胺。将反应体系搅拌 1.5 天, 然后蒸发, 就得到粗产物 237。立即将其溶解在 200 $\mu$ l 苯甲醚和 1800 $\mu$ l TFA 中, 然后静置 300 分钟, 再用醚沉淀, 离心, 倾去醚, 随后干燥。化合物用制备级 HPLC 纯化, 冻干, 溶于用冰预冷的甲醇, 用 4M HCl/二噁烷酸化, 用醚沉淀, 离心, 倾去醚, 然后产物 230 在真空干燥。

表 7

化合物 编号	所用的 胺	产量 (mg)	测得的 MS (MH <sup>+</sup> )	计算的 MS (MH <sup>+</sup> )
229	EDA	2.3	608.32	608.25
230	-	5.1	579.17	579.21

## 实施例 115

吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[5-(2\text{-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基})-1\text{-丙基-1H-吡咯-3-基}]-\text{酰胺}\}$ , 231 的合成

步骤 A: 1-丙基-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸乙酯 232。

将 4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸乙酯 (5g) 溶于 50ml 无水 EtOH 中, 加入 50ml 1M 乙醇钠, 随后加入 10ml CH<sub>3</sub>I。反应混和物在 80℃ 加热 4 小时, 冷却至室温, 然后在水和氯仿之间分配。有机相用水洗涤, 用硫酸钠干燥, 然后蒸发。剩余物从己烷中再结晶出来, 就得到 4.72g (77%) 1-丙基-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸乙酯 232。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>): 0.79 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.25 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.68 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.17-4.28 (m, 4H, 2 CH<sub>2</sub>), 7.23-8.24 (d, 1H, 吡咯)。

步骤 B: 1-丙基-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(2-氰基-乙基)-酰胺 233 的合成。

化合物 232 (5g) 悬浮于 30ml 甲醇中, 加入 2M NaOH (10ml), 混和物于 50℃ 搅拌 2 小时。澄清的溶液用水 (50ml) 稀释, 然后逐滴加入 1N HCl 至 pH 2.5。白色的剩余物经过过滤, 用水洗涤, 并干燥, 就得到 4.6g (95%) 酸 234。ES MS: 220.47 (M+Na-H<sup>+</sup>)。将酸 234 悬浮于 SOCl<sub>2</sub> (20ml) 中, 混和物进行回流 4 小时直至得到澄清的溶液。通过和甲苯 (10ml × 3) 共蒸发, 将反应混和物蒸发并干燥。所得的氯酸酐 (chloroanhydride) 235 无需纯化就可使用。酐 235 溶于甲苯 (10ml), 加入 3-氨基丙腈 (3.9ml, 54.3mmol)。混和物在环境温度下静置 1 小时, 然后蒸发。白色的沉淀物悬浮于 0.1N HCl 中, 过滤,

用水洗涤，并干燥。从甲醇中再结晶，得到 4.4g (81%) 233。

ES MS: 251.87 ( $M+H^+$ )。 $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 0.73-0.79 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.63-1.70 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-丙基), 2.84-2.89 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CN), 3.65-3.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 4.27-4.32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 7.43 和 8.15 (d, 1H, 吡咯), 8.83 (bt, 1H, NH)。

步骤 C: 1-丙基-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基)-脒 236 的合成。

将 1-(丙基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(2-氰基-乙基)-脒 233 (2.5g, 10mmol) 溶于 50ml 无水乙醇所形成的溶液冷却至 0-5℃, 然后用 HCl 气体饱和。将混和物密封冷藏 20 小时。让混和物升温至室温, 然后蒸发掉乙醇。所得固体溶解于 50ml 无水乙醇中, 并用氨气饱和。密封的混和物在室温保持过夜, 然后蒸发。固体溶于 10ml 甲醇中, 加入醚沉淀出 2.4g (94%) 白色固体状的目标产物 236。ES MS: 268.92 ( $M+H^+$ )。 $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 0.79 (t, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.64-1.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-丙基), 2.62-2.66 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CN), 3.49-3.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NH), 4.28-4.33 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 7.54 和 8.15 (d, 1H, 吡咯), 8.83 (t, 1H, NH)。

步骤 D: 吡啶-2,5-二羧酸双-[[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-丙基-1H-吡咯-3-基]-酰胺] 231 的合成。

向经过搅拌的 1-丙基-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基)-脒 236 (70mg, 0.15mmol) 的甲醇 (20ml) 溶液中加入 10% Pd/C (Degussa 类型, Aldrich) (0.1g)。将烧瓶倒空, 用氢气冲洗 3 次, 最后于 25-30psi 压力下用氢气充满。所得的悬浮液于 23℃ 剧烈搅拌 45 分钟。将悬浮的物质过滤, 滤液蒸发至干。所得的 1-丙基-4-氨基-1H-吡咯-2-羧酸(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基)-脒 237 无需纯化便可用于下一步骤。将刚制备的 237 溶于 3ml 无水 DMF 所形成的溶液加入到吡啶-2,5-二羧酸二五氟苯酯 (25mg, 0.07mmol) 中, 反应混和物于 55℃ 搅拌 15 小时, 冷却, 用 HPLC (Vydac 12 $\mu$ m, C<sub>18</sub> 2.2 $\times$ 25cm 柱, 10%至 70%乙腈梯度超过 40 分钟, 流速 10ml/min) 纯化,

就得到吡啶-2,5-二羧酸双- $\{[5-(2\text{-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基})-1\text{-丙基-1H-吡咯-3-基}]\text{-酰胺}\}$  231 的双三氟乙酸盐: 33mg (57%)。ES MS: 606.71 ( $M+H^+$ )。231 的双三氟乙酸盐溶于 2ml 用 HCl 饱和的甲醇中, 加入 35ml 乙醚, 分离得到 231 的盐酸盐沉淀并干燥。

#### 实施例 116

*N,N'*-双- $[5-(2\text{-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基})-1\text{-丙基-1H-吡咯-3-基}]\text{-间苯二酰胺}$ , 238 的合成

化合物 238 按上面对化合物 231 所描述的方法来合成。得到 52% 的化合物 231。ES MS: 605.72 ( $M+H^+$ )。

#### 实施例 117

*N,N'*-双- $[5-(2\text{-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基})-1\text{-}(3\text{-甲基-丁基})-1\text{H-吡咯-3-基}]\text{-对苯二酰胺}$ , 239

步骤 A: 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸乙酯 240 的合成。

化合物 240 按实施例 1 中步骤 A 所描述的方法, 用 1-溴-3-甲基-丁烷作为烷基化试剂来合成。产量为 6.5g (94%)。 $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ): 0.87 (d, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1.26 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.49-1.62 (m, 3H, CH 和  $\text{CH}_2$ ), 1.68 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.23 (q, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.33 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.28 和 8.29 (d, 1H, 吡咯)。

步骤 B: 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(2-氰基-乙基)-酰胺 241 的合成。

化合物 241 按实施例 115 中步骤 B 所描述的方法, 从羧酸乙酯 240 来合成。产量为 5.1g (83%)。ES MS: 277.34 ( $M+H^+$ )。 $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ): 0.83-0.86 (m, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 1.40-1.51 (m, 1H, CH), 1.51-1.61 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}$ ), 2.68-2.72 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CN}$ ), 3.35-3.42 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 4.33-4.37 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 7.38 和 8.15 (d, 1H, 吡咯), 8.56



(bt, 1H, NH)。

步骤 C: 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(2-氟基-乙基)-咪 242 的合成。

化合物 242 按实施例 115 中步骤 C 所描述的方法, 以 10mmol 的规模从氟基乙基酰胺 241 合成。产量为 2.5g (86%)。ES MS: 295.34 ( $M+H^+$ )。<sup>1</sup>H-NMR (DMSO- $d_6$ ): 0.88-0.86 (d, 6H,  $CH_3$ ), 1.43-1.61 (m, 3H, CH 和  $CH_2-CH$ ), 2.61-2.65 (m, 2H,  $CH_2-CN$ ), 3.49-3.55 (m, 2H,  $CH_2-NH$ ), 4.33-4.38 (m, 2H,  $CH_2-N$ ), 7.51 和 8.18 (d, 1H, 吡咯), 8.73 (t, 1H, NH)。

步骤 D: N,N'-双-[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-对苯二酰胺 239 的合成。

按照实施例 115 中步骤 D 所描述的方法, 将化合物 242 与对苯二酸 (terephthalic acid) 的二五氟苯基酯一起缩合。得到 47% 的化合物 239。ES MS: 661.84 ( $M+H^+$ )。

#### 实施例 118

己二酸-双-{[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-酰胺} 243 的合成

化合物 243 按上面 (实施例 117) 对化合物 239 所描述的方法来合成。得到 52% 的化合物 243。ES MS: 640.82 ( $M+H^+$ )。

#### 实施例 119

环己烷-1,4-二羧酸双-{[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-酰胺} 244

化合物 244 按上面 (实施例 117) 对化合物 239 所描述的方法来合成。得到 48% 的化合物 244。ES MS: 667.87 ( $M+H^+$ )。

## 实施例 120

二苯基-4, 4'-二羧酸双- $\{[5-(2\text{-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基})-1-(3\text{-甲基-丁基})-1H\text{-吡咯-3-基}]-\text{酰胺}\}$  245

化合物 245 按上面 (实施例 117) 对化合物 239 所描述的方法来合成。得到 56% 的化合物 245。ES MS: 737.98 ( $M+H^+$ )。

## 实施例 121

噻吩-2, 5-二羧酸双- $\{[5-(2\text{-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基})-1-(3\text{-甲基-丁基})-1H\text{-吡咯-3-基}]-\text{酰胺}\}$  246

化合物 246 按上面 (实施例 117) 对化合物 239 所描述的方法来合成。得到 42% 的化合物 246。ES MS: 666.81 ( $M+H^+$ )。

## 实施例 122

$N, N'$ -双- $[5-(2\text{-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基})-1\text{-环丙基甲基-}1H\text{-吡咯-3-基}]-\text{对苯二酰胺}$  247

步骤 A: 1-环丙基甲基-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸乙酯 248 的合成。

化合物 248 按实施例 1 中步骤 A 所描述的方法, 用溴甲基-环丙烷作为烷基化试剂来合成。产量为 4.8g (74%)。 $^1H\text{-NMR}$  ( $DMSO-d_6$ ): 0.37-0.42 和 0.65-0.72 (m, 2H,  $CH_2$ ), 1.22-1.28 (m, 1H, CH), 1.37 (t, 3H,  $CH_3$ ), 4.23 (d, 2H,  $CH_2$ ), 4.32 (q, 2H,  $CH_2$ ), 7.44 和 7.81 (d, 1H, 吡咯)。

步骤 B: 1-(环丙基甲基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(2-氰基-乙基)-酰胺 249 的合成。

化合物 249 按实施例 115 中步骤 B 所描述的方法, 从羧酸乙酯 248 合成。产量为 4.3g (78%)。ES MS: 263.97 ( $M+H^+$ )。H<sup>1</sup>-NMR ( $DMSO-d_6$ ): 0.02-0.04 和 0.09-0.12 (m, 2H,  $CH_2$ ), 0.89-1.00 (m, 1H, CH),

2.37-2.41 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CN}$ ), 3.06-3.11 (dd, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 3.86-3.88 (d, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 7.09 和 7.87 (d, 1H, 吡咯), 8.45 (t, 1H, NH)。

步骤 C: 1-环丙基甲基-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(2-氰基-乙基)-脒 250 的合成。

化合物 250 按实施例 115 中步骤 C 所描述的方法, 以 10mmol 的规模从氰基乙基酰胺 249 来合成。产量为 2.1g (75%)。ES MS: 280.01 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )。

步骤 D: N, N'-双-[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-环丙基甲基-1H-吡咯-3-基]-对苯二酰胺 247 的合成。

化合物 247 按实施例 115 中步骤 D 对化合物 231 所描述的方法来合成。ES MS: 628.74 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )。

#### 实施例 123

吡啶-2, 5-二羧酸双-{[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-环丙基甲基-1H-吡咯-3-基]-酰胺} 251

化合物 251 按上面(实施例 122)对化合物 247 所描述的方法来合成。得到 56%的化合物 251。ES MS: 630.73 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )。

#### 实施例 124

N, N'-双-[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-环丙基甲基-1H-吡咯-3-基]-2-硝基-对苯二酰胺 252

化合物 252 按上面(实施例 122)对化合物 247 所描述的方法来合成。得到 54%的化合物 252。ES MS: 674.73 ( $\text{M}+\text{H}^+$ )。

#### 实施例 125

噻吩-2, 5-二羧酸双-{[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-环丙基甲基-1H-吡咯-3-基]-酰胺} 253

化合物 253 按上面 (实施例 122) 对化合物 247 所描述的方法来合成。得到 41% 的化合物 253。ES MS: 679.81 (M+H<sup>+</sup>)。

#### 实施例 126

吡嗪-2,5-二羧酸双- $\{[5-(2\text{-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基})-1\text{-环丙基甲基-1H-吡咯-3-基}]-\text{酰胺}\}$  254

化合物 254 按上面 (实施例 122) 对化合物 247 所描述的方法来合成。得到 48% 的化合物 254。ES MS: 630.71 (M+H<sup>+</sup>)。

#### 实施例 127

环己-1,3-二烯-1,4-二羧酸双- $\{[5-(2\text{-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基})-1-(3\text{-甲基-丁基})-1H\text{-吡咯-3-基}]-\text{酰胺}\}$  255

化合物 255 按上面 (实施例 117) 对化合物 239 所描述的方法来合成。得到 48% 的化合物 255。ES MS: 663.85 (M+H<sup>+</sup>)。

#### 实施例 128

1H-吡唑-3,5-二羧酸双- $\{[5-(2\text{-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基})-1\text{-环丙基甲基-1H-吡咯-3-基}]-\text{酰胺}\}$  256

化合物 256 按上面 (实施例 122) 对化合物 247 所描述的方法来合成。得到 48% 的化合物 256。ES MS: 618.76 (M+H<sup>+</sup>)。

#### 实施例 129

环丙烷-1,1-二羧酸双- $\{[5-(2\text{-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基})-1-(3\text{-甲基-丁基})-1H\text{-吡咯-3-基}]-\text{酰胺}\}$  D 21

化合物 257 按上面 (实施例 117) 对化合物 239 所描述的方法来合成。得到 51% 的化合物 257。ES MS: 625.79 ( $M+H^+$ )。

### 实施例 130

*N, N'*-双-[1-(3-甲基-丁基)-5-[(2-(*N*-甲基亚氨基氨基甲酰基)-乙基氨基甲酰基)-1*H*-吡咯-3-基]-对苯二酰胺] 258

步骤 A: 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1*H*-吡咯-2-羧酸[2-(*N*-甲基亚氨基氨基甲酰基)-乙基]-酰胺 259 的合成。

将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1*H*-吡咯-2-羧酸(2-氰基-乙基)-脒 242 (0.5g) 溶于 50ml 无水乙醇所形成的溶液冷却至 0-5℃, 然后用 HCl 气体饱和。将混和物密封冷藏 20 小时。让混和物升温至室温, 然后蒸发掉乙醇。所得固体溶解于 10ml 无水乙醇中, 并加入 1M 甲胺(3ml) 的甲醇溶液。密封的混和物在 15℃ 保持过夜, 然后蒸发。所得固体溶于 10ml 甲醇中, 加入醚沉淀出 2.4g (94%) 白色固体状的 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1*H*-吡咯-2-羧酸[2-(*N*-甲基亚氨基氨基甲酰基)-乙基]-酰胺 259。ES MS: 310.94 ( $M+H^+$ )。H<sup>1</sup>-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 0.86-0.88 (d, 6H, CH<sub>3</sub>-异戊基), 1.43-1.61 (m, 3H, CH 和 CH<sub>2</sub>-CH), 2.60-2.65 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-脒), 3.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-NH), 3.49-3.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NHC=O), 4.33-4.38 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 7.51 和 8.18 (d, 1H, 吡咯), 8.73 (t, 1H, NHC=O)。

步骤 B: *N, N'*-双-[5-(2-亚氨基氨基甲酰基-乙基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1*H*-吡咯-3-基]-对苯二酰胺 258。

化合物 258 按实施例 115 中步骤 D 所描述的方法, 从 259 合成。ES MS: 689.88 ( $M+H^+$ )。

### 实施例 131

吡啶-2, 5-二羧酸双-[[5-[(2-(*N*-乙基亚氨基氨基甲酰基)-乙基氨基甲酰基)]-1-(3-甲基-丁基)-1*H*-吡咯-3-基]-酰胺] 260

步骤 A: 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸[2-(N-乙基亚氨基氨基甲酰基)-乙基]-酰胺 261 的合成。

化合物 261 按实施例 130 中步骤 A 所描述的方法, 用乙胺 (3ml) 从氰基乙基酰胺 242 合成。ES MS: 324.79 ( $M+H^+$ )。 $H^1$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 0.88-0.86 (d, 6H,  $CH_3$ -异戊基), 1.07-1.12 (t, 3H,  $CH_3$ -乙基), 1.43-1.61 (m, 3H, CH 和  $CH_2$ -CH), 2.52-2.56 (t, 2H,  $CH_2CH_2$ -脒), 3.12-3.21 (m, 2H,  $CH_2$ -乙基), 3.49-3.55 (m, 2H,  $CH_2CH_2$ -脒), 4.33-4.38 (t, 2H,  $CH_2$ -N), 7.39 和 8.20 (d, 1H, 吡咯), 8.54-8.60 (NH-脒), 9.38 (t, 1H, NHC=O)。

步骤 B: 吡啶-2,5-二羧酸双-{[5-[(2-(N-乙基亚氨基氨基甲酰基)-乙基氨基甲酰基]-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-酰胺} 262。

化合物 262 按实施例 115 中步骤 D 所描述的方法来合成。得到 40% 的化合物 262。ES MS: 718.92 ( $M+H^+$ )。

### 实施例 132

*N, N'*-双-[5-[2-(*N*-异丙基-亚氨基氨基甲酰基)-乙基氨基甲酰基]-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-对苯二酰胺

步骤 A: 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸[2-(*N*-异丙基亚氨基氨基甲酰基)-乙基]-酰胺 263 的合成。

化合物 263 按实施例 130 中步骤 A 所描述的方法, 用异丙胺 (3ml) 从氰基乙基酰胺 242 来合成。ES MS: 338.67 ( $M+H^+$ )。 $H^1$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 0.85-0.87 (d, 6H,  $CH_3$ -异戊基), 1.09-1.11 (t, 3H,  $CH_3$ -异丙基), 1.43-1.61 (m, 3H, CH 和  $CH_2$ -CH), 2.59-2.64 (t, 2H,  $CH_2CH_2$ -脒), 3.50-3.55 (m, 2H,  $CH_2CH_2$ -脒), 3.73-3.80 (m, 1H, CH-异丙基), 4.33-4.38 (t, 2H,  $CH_2$ -N), 7.55 和 8.18 (d, 1H, 吡咯), 8.70 (t, 1H, NHC=O)。

步骤 B: *N, N'*-双-[5-[2-(*N*-异丙基-亚氨基氨基甲酰基)-乙基氨基甲

酰基]-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-对苯二酰胺 264.

化合物 264 按实施例 115 中步骤 D 所描述的方法来合成。ES MS: 745.98 (M+H<sup>+</sup>)。

## 实施例 133

噻吩-2,5-二羧酸双-[(1-(3-甲基-丁基)-5-{2-[N-(3-甲基-丁基)-亚氨基氨基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-1H-吡咯-3-基)-酰胺]265

步骤 A: 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸{2-[N-(3-甲基-丁基)异丙基亚氨基氨基甲酰基]-乙基}-酰胺 266 的合成。

化合物 266 按实施例 130 中步骤 A 所描述的方法, 用 3-甲基-丁胺 (3ml) 从氰基乙基酰胺 242 来合成。ES MS: 365.27 (M+H<sup>+</sup>)。H<sup>1</sup>-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 0.79-0.81 (d, 6H, 吡咯的 CH<sub>3</sub>-异戊基), 0.86-0.88 (d, 6H, 咪的 CH<sub>3</sub>-异戊基), 1.31-1.60 (m, 6H, CH 和 CH<sub>2</sub>-CH), 2.64-2.68 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-咪), 3.12-3.17 (t, 2H, 咪的 NH-CH<sub>2</sub>-异戊基), 3.50-3.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-咪), 4.33-4.38 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 7.55 和 8.18 (d, 1H, 吡咯), 8.72 (t, 1H, NHCO)。

步骤 B: 噻吩-2,5-二羧酸双-[(1-(3-甲基-丁基)-5-{2-[N-(3-甲基-丁基)-亚氨基氨基甲酰基]-乙基氨基甲酰基}-1H-吡咯-3-基)-酰胺]。

化合物 265 按实施例 115 中步骤 D 所描述的方法来合成。得到 54% 的化合物 265。ES MS: 808.12 (M+H<sup>+</sup>)。

## 实施例 134

1H-吡啶-3,5-二羧酸双-[[5-[2-(N-环戊基亚氨基氨基甲酰基)-乙基氨基甲酰基]-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-酰胺] 267

步骤 A: 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸[2-(N-环戊基亚氨基氨基甲酰基)-乙基]-酰胺 268 的合成。

化合物 268 按实施例 115 中步骤 D 所描述的方法, 用环戊胺 (3ml)

从氰基乙基酰胺 242 合成。ES MS: 364.37 ( $M+H^+$ )。 $H^1$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 0.85-0.87 (d, 6H,  $CH_3$ ), 1.43-1.61 (m, 10H, 吡咯的 CH 和  $\underline{CH_2-CH}$  及环戊基(cyclopentyl)的  $\underline{CH_2}$ ), 1.82-1.88 (m, 2H, CH), 2.63-2.67 (t, 2H,  $\underline{CH_2CH_2}$ -脒), 3.47-3.56 (m, 2H,  $\underline{CH_2CH_2}$ -脒), 4.33-4.38 (t, 2H,  $\underline{CH_2-N}$ ), 7.56 和 8.18 (d, 1H, 吡咯), 8.71 (t, 1H, NHC=O)。

步骤 B: 1H-吡唑-3,5-二羧酸双-{[5-[2-(N-环戊基亚氨基氨基甲酰基)-乙基氨基甲酰基]-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-酰胺} 267。

化合物 265 按实施例 115 中步骤 D 所描述的方法来合成。得到 54% 的化合物 267。ES MS: 788.03 ( $M+H^+$ )。

### 实施例 135

*N,N'*-双-[5-[2-(*N,N'*-二甲基-亚氨基氨基甲酰基)-乙基氨基甲酰基]-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-对苯二酰胺 269

步骤 A: 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸[2-(*N,N'*-二甲基亚氨基氨基甲酰基)-乙基]-酰胺 270 的合成。

将 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸(2-氰基-乙基)-脒 242 (0.5g) 溶于 50ml 无水乙醇所形成的溶液冷却至 0-5 $^{\circ}C$ , 然后用 HCl 气体饱和。将混和物密封冷藏 20 小时。让混和物升温至室温, 然后蒸发掉乙醇。所得固体溶解于 10ml 无水乙醇中, 并加入 1M 甲胺(6ml) 的甲醇溶液。密封的混和物在 55 $^{\circ}C$  保持过夜, 然后蒸发。所得固体溶于 10ml 甲醇中, 加入醚沉淀出 2.4g (94%) 白色固体状的目标产物。ES MS: 324.74 ( $M+H^+$ )。 $H^1$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 0.85-0.87 (d, 6H,  $CH_3$ -异戊基), 1.43-1.61 (m, 3H, CH 和  $\underline{CH_2-CH}$ ), 2.76-2.79 (m, 5H,  $\underline{CH_2CH_2}$ -脒和  $\underline{CH_3-NH}$ ), 2.96-2.98 (d, 3H,  $\underline{CH_3-NH}$ ), 3.46-3.55 (m, 2H,  $\underline{CH_2-NHC=O}$ ), 4.34-4.39 (t, 2H,  $\underline{CH_2-N}$ ), 7.51 和 8.18 (d, 1H, 吡咯), 9.76 (t, 1H, NHC=O)。

步骤 B: *N,N'*-双-[5-[2-(*N,N'*-二甲基-亚氨基氨基甲酰基)-乙基氨基甲酰基]-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-对苯二酰胺 269。



化合物 269 按实施例 115 中步骤 D 所描述的方法来合成。ES MS: 717.93 ( $M+H^+$ )。

### 实施例 136

吡啶-2,5-二羧酸双-[[5-[2-(N,N'-二乙基-亚氨基氨基甲酰基)-乙基氨基甲酰基]-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-酰胺}271

步骤 A: 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸[2-(N,N'-二乙基亚氨基氨基甲酰基)-乙基]-酰胺 272 的合成。

化合物 272 按上面对化合物 270 所描述的方法, 用乙胺 (3ml) 从氰基乙基酰胺 242 合成。ES MS: 351.53 ( $M+H^+$ )。 $H^1$ -NMR (DMSO- $d_6$ ): 0.86-0.88 (d, 6H,  $CH_3$ -异戊基), 1.07-1.17 (t, 6H,  $CH_3$ -乙基), 1.42-1.60 (m, 3H, CH 和  $CH_2$ -CH), 2.67-2.72 (t, 2H,  $CH_2CH_2$ -脒), 3.12-3.21 (m, 2H,  $CH_2$ -乙基), 3.36-3.50 (m, 4H,  $CH_2$ -NHCO 和  $CH_2$ -乙基), 4.33-4.38 (t, 2H,  $CH_2$ -N), 7.39 和 8.20 (d, 1H, 吡咯), 8.63-8.71 (NH-脒), 9.30 (t, 1H, NHCO)。

步骤 B: 吡啶-2,5-二羧酸双-[[5-[2-(N,N'-二乙基-亚氨基氨基甲酰基)乙基氨基甲酰基]-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-酰胺}271。

化合物 271 按实施例 115 中步骤 D 所描述的方法来合成。得到 51% 的化合物 271。ES MS: 775.03 ( $M+H^+$ )。

### 实施例 137

N,N'-双-{1-(3-甲基-丁基)-5-[2-(1,4,5,6-四氢-嘧啶-2-基)-乙基氨基甲酰基]-1H-吡咯-3-基}-对苯二酰胺 273

步骤 A: 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸[2-(1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)-乙基]-酰胺 274 的合成。

化合物 274 按上面对化合物 270 所描述的方法, 用 1,3-丙胺 (6ml) 从氰基乙基酰胺 242 合成。ES MS: 364.37 ( $M+H^+$ )。 $H^1$ -NMR (DMSO- $d_6$ ):

0.85-0.87 (d, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.42-1.61 (m, 3H, 吡咯的 CH 和 CH<sub>2</sub>-CH), 1.79-1.84 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.55-2.60 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-脘), 3.25 (m, 4H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.40-3.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-NHC=O), 4.33-4.38 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 7.48 和 8.18 (d, 1H, 吡咯), 8.15 和 9.78 (bs, 1H, NH-脘), 8.89 (t, 1H, NHC=O)。

步骤 B: 1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-羧酸[2-(1,4,5,6-四氢嘧啶-2-基)-乙基]-酰胺 273 的合成。

化合物 273 按实施例 115 中步骤 D 所描述的方法来合成。ES MS: 741.96 (M+H<sup>+</sup>)。

### 实施例 138

*N, N'*-双-[5-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-对苯二酰胺 274

步骤 A: [2-({1-[1-(3-甲基-丁基)-4-硝基-1H-吡咯-2-基]-甲酰基}-氨基)-乙基]-氨基甲酸叔丁酯 275。

化合物 240 (1.3g, 5mmol) 溶于二乙胺 (20ml) 中。该溶液在 60 °C 保持 50 小时, 然后蒸发。剩余物溶于 DMF (20ml), 并加入二 Boc-碳酸酯 (2.18g, 10mmol)。反应体系在环境温度下保持 1 小时, 然后蒸发。剩余物溶于氯仿 (30ml) 中, 分别用 0.1M HCl (10 × 2ml)、5% NaHCO<sub>3</sub> (10 × 2ml)、水洗涤, 然后通过硫酸钠干燥, 并蒸发。粗制的化合物 D33 从甲苯/己烷 (4:1 v/v) 中结晶出来, 就得到白色的晶体。产率为 69% (1.27g)。H<sup>1</sup>-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 0.85-0.87 (d, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.34 (s, 9H, Boc), 1.42-1.61 (m, 3H, 吡咯的 CH 和 CH<sub>2</sub>-CH), 3.03-3.08 和 3.18-3.22 (每个都是 m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 4.33-4.38 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 6.85 (t, 1H, NHBoc), 7.48 和 8.18 (d, 1H, 吡咯), 8.36 (t, 1H, NHC=O)。

步骤 B: *N, N'*-双-[5-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-对苯二酰胺 274。

向经过搅拌的化合物 275 (70mg, 0.15mmol) 的甲醇 (20ml) 溶液中加入 10% Pd/C (Degussa 类型, Aldrich) (0.1g)。将烧瓶倒空, 用氢气冲洗 3 次, 最后于 25-30psi 压力下用氢气充满。所得的悬浮液于 23℃ 剧烈搅拌 45 分钟。将悬浮的物质过滤, 滤液蒸发至干。所得的氨基吡咯溶于 3ml 无水 DMF 中, 并加入到邻苯二甲酸二五氟苯酯 (25mg, 0.07mmol) 中, 反应混合物于 55℃ 搅拌 15 小时, 然后将 DMF 蒸发。将 Boc 保护的衍生物 276 溶于甲醇中 (3ml), 然后加入 3ml 4N HCl 的二噁烷溶液。于 30 分钟内将溶剂蒸发, 固体按实施例 1 中步骤 D 所描述的方法用 HPLC 纯化。得到 40% 的化合物 274。ES MS: 607.78 ( $M+H^+$ )。

### 实施例 139

*N, N'*-双-[5-(2-胍基-乙基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-对苯二酰胺 277

将化合物 274 (30mg, 0.05mmol) 和吡唑-1-甲脒盐酸盐 (0.1mmol, 9mg) 溶于 5ml DMF 中所形成的溶液于环境温度下静置过夜, 然后蒸发。剩余物按实施例 1 中步骤 D 所描述的方法用 HPLC 纯化。得到 68% 的 *N, N'*-双-[5-(2-胍基-乙基氨基甲酰基)-1-(3-甲基-丁基)-1H-吡咯-3-基]-对苯二酰胺 277。ES MS: 691.81 ( $M+H^+$ )。

### 制剂实施例

下面是具代表性的包含具有分子式 (I) 的化合物的药物制剂。

### 实施例 1

#### 片剂制剂

将下面的成分紧密混和，并压缩成带单个刻痕的片剂。

成分	每个片剂中的量 (mg)
本发明的化合物	400
玉米淀粉	50
Croscarmellose sodium	25
乳糖	120
硬脂酸镁	5

### 实施例 2

#### 胶囊制剂

将下面的成分紧密混和，并装入硬壳的明胶胶囊。

成分	每个胶囊中的量 (mg)
本发明的化合物	200
乳糖，喷雾干燥	148
硬脂酸镁	2

### 实施例 3

#### 悬浮液制剂

将下面的成分混和形成用于口服施药的悬浮液。

成分	数量
本发明的化合物	1.0g
富马酸	0.5g
氯化钠	2.0g
对羟基苯甲酸甲酯	0.15g
对羟基苯甲酸丙酯	0.05g
砂糖	25.0g
山梨糖醇 (70%溶液)	13.00g
Veegum K (Vanderbilt Co.)	1.0g
调味剂	0.035ml
着色剂	0.5mg
蒸馏水	适量至 100ml

### 实施例 4

#### 可注射制剂

将下面的成分混和形成可注射制剂。

成分	数量
本发明的化合物	0.2mg-20mg
乙酸钠缓冲溶液, 0.4M	2.0ml
HCl (1N) 或 NaOH (1N)	适量至合适的 pH
水 (经蒸馏的, 无菌的)	适量至 20ml

### 实施例 5

#### 栓剂制剂

通过将本发明的化合物和 Witepsol® H-15 (饱和植物脂肪酸的甘油三酯; Riches-Nelson, Inc., New York) 混和制备了总重 2.5g 的栓剂, 其含有下面的组合物:

本发明的化合物	500mg
Witepsol® H-15	平衡

### 生物学实施例

#### 实施例 1

#### 最小抑制浓度 (MIC) 分析

下面所描述的分析用于测量完全抑制被测有机体的可视生长所必需的化合物的最小抑制浓度 (MIC)。这些分析方法选自 NCCLS 方案 M7-A4 和 M27-A (NCCLS vol 17:9 和 vol 17:2), 并由 Sandven (S. *Clin. Micro.* (1999) 37:12, p. 3856-3859) 修改。烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 的 MIC 值用 NCCLS 方案 M38-P 来测定。

#### 接种物的制备、孵育和读取结果

所有的化合物溶于 100% DMSO 中形成 10mM 的原液浓度, 使用新鲜

的制液或者将其储存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 。原液化合物保持冷冻状态直至需要的时候，使用新鲜的、不超过一次冷冻-解冻循环的原液。当化合物用于测试目的时，要根据被测生物将化合物用适当的培养基稀释。

对于酵母和曲霉属物种，在用 pH7.0 的 MOPS 缓冲的适当的培养基中制备七个 1:2 系列的化合物稀释液，如此最终的起始测试化合物浓度对于酵母是  $50.0\mu\text{M}$  而对于曲霉属物种是  $50\mu\text{M}$ 。对于细菌，在用于特定的被测细菌生物的生长培养基中进行稀释。

### 酵母

从在  $35^{\circ}\text{C}$  培养了 24 小时的 Sabouraud Detrose 平板上挑出五个分离良好的克隆，并用 5.0ml 生理盐水重悬浮。读取 O.D.<sub>530</sub>，然后用生理盐水将培养物调整至 0.5 McFarland 单位。用以 pH7.0 的 MOPS 缓冲的 RPMI 1640 培养基作 1:2000 的稀释，然后将  $100\mu\text{l}$  该种菌制备物加入相同体积的含有测试化合物的培养基中。向每个孔中加入  $25\mu\text{l}$  氧化还原指示剂 Alamar Blue (Biosource International)，然后把平板于  $35^{\circ}\text{C}$  孵育 48 小时。有酵母生长的孔的颜色就会从蓝色变成粉红色。因此，基于具有最低浓度的孔（该孔没有从蓝色变成粉红色，例如生长被抑制了）就可以计算出 MIC。

### 细菌

按照和酵母同样的方式来制备接种物，不同的是要用生理盐水作所有稀释，最终的稀释度为 1:200，使用  $10\mu\text{l}$  接种物。各种被测有机体的固体和液体培养基及平板孵育时间列于下面的表 1 中。

表 1

有机体	液体培养基	固体培养基 (琼脂)	96 孔平板孵育时间	说明
VRE-UCD3	BHI	BHIA	无万古霉素-16 小时 25µg/ml 万古霉素-24 小时	BHI-脑心浸液
VRE-CSUC4	BHI	BHIA	无万古霉素-16 小时 25µg/ml 万古霉素-24 小时	BHI-脑心浸液
VRE-UL17	BHI	BHIA	无万古霉素-16 小时 25µg/ml 万古霉素-24 小时	BHI-脑心浸液
VRE-BM4147	BHI	BHIA	无万古霉素-16 小时 25µg/ml 万古霉素-24 小时	BHI-脑心浸液
粘膜炎莫拉氏菌 ( <i>Moraxella</i> <i>catarrhalis</i> )	BHI	BHIA	16 小时	BHI-脑心浸液
蜡状芽孢杆菌 ( <i>Bacillus cereus</i> )	CAMHB	BHIA	16 小时	BHI-脑心浸液
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	CAMHB	BHIA	16 小时	BHI-脑心浸液
金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> )	CAMHB	BHIA	16 小时	CAMHB-阳离子调节过的 Muller Hinton 肉汤
流感嗜血菌 ( <i>Haemophilus</i> <i>influenzae</i> )	HTM	巧克力琼脂 (Chocolate Agar)	24 小时	巧克力琼脂-营养琼脂+5%热裂解的绵羊血
肺炎链球菌 ( <i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i> )	CAMHB+5 % LHB	MHA+5% SB	24 小时	LHB-裂解的马血
白色假丝酵母 ( <i>Candida albicans</i> )	RPMI	SABDEX	48 小时	SABDEX-Sabouraud Dextrose 琼脂

### 丝状真菌

通过将烟曲霉于 35℃ 在马铃薯葡萄糖琼脂斜面上培养 7 天来制备接种物。然后斜面用 1.0ml 的 0.85% 盐水覆盖，加入一滴 Tween 20，

克隆经无菌接种环的梳理形成悬浮液，让悬浮液静置 5 分钟从而使更重的微粒能够沉降出来。将上面的悬浮液分离出来，并调整到光密度 0.09 至 0.11。所得的悬浮液按 1:50 稀释，由此产生 2 倍所需的最终接种物。微稀释盘 (micro dilution tray) 按酵母那样制备，并于 35℃ 培养 48 小时。对于我们的目的来说，将 MIC 定义为 48 小时后观察不到可视生长的最低化合物浓度。

本发明化合物按上面所描述的分析方法进行测试，结果发现其具有活性。显示出抗细菌活性 (MIC < 45.5 μM) 的化合物的例子显示于 FIG. 5 中。显示出抗真菌活性 (MIC < 45.5 μM) 的化合物的例子显示于 FIG. 6 中。

### 拓扑异构酶抑制分析

依照 Fostel 等人 (1992) 和 Shen 等人 (1992) 的方法分离得到白色假丝酵母拓扑异构酶 I 和 II (cTop1 和 cTop2)。人的拓扑异构酶 I 和 II (hTop1 和 hTop2) 购自 Topogen (Columbia, OH)。

### 拓扑异构酶 I 的抑制

利用凝胶电泳研究了 GL 化合物对拓扑异构酶 I 引起的 DNA 松弛的作用。负超螺旋的质粒 DNA (pARG, 8kb) 用作底物。对白色假丝酵母拓扑异构酶 I 的反应于 35℃ 在 25 mM TrisHCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA 和 50 μg/mL BSA 中进行。将该反应在任一给定时间加入 SDS 使终浓度为 0.5% 而终止。随后，加入蛋白酶 K 至 250 μg/mL 并将混和物在 60℃ 孵育 30 分钟。反应混和物进一步用苯酚抽提再用苯酚: 异戊醇: 氯仿 (25: 1: 24) 抽提。将样品上样到 0.8% 的琼脂糖凝胶中，用 1 X TBE 进行电泳。利用不同的 DNA 嵌入剂以得到较好的凝胶分辨率。有时将溴化乙锭加入到凝胶和电泳缓冲液两者中至 0.25 μg/mL。其他情况下，加入氯喹至 0.25 μg/mL 以分离 DNA 拓扑异构体。

### 拓扑异构酶 II 的抑制



通过监控用纠缠的动基体 DNA (Topogen) 的去连环反应研究了 GL 化合物对拓扑异构酶 II 的作用。去连环反应在 10 mM TrisHCl (pH 7.5)、50 mM NaCl、50 mM KCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 mM EDTA 和 0.5 mM ATP 中进行。将该反应在任一给定时间加入 SDS 使终浓度为 1% 而终止。随后, 加入蛋白酶 K 至 250 μg/mL 并将混和物在 60°C 孵育 30 分钟。反应混和物进一步用苯酚抽提, 再用苯酚: 异戊醇: 氯仿 (25: 1: 24) 抽提。将样品上样到 0.8% 的琼脂糖凝胶中, 用 1 X TBE 进行电泳。加入溴化乙锭到凝胶和电泳缓冲液两者中至 0.25 μg/mL。

### 本发明化合物的 DNA 结合特性

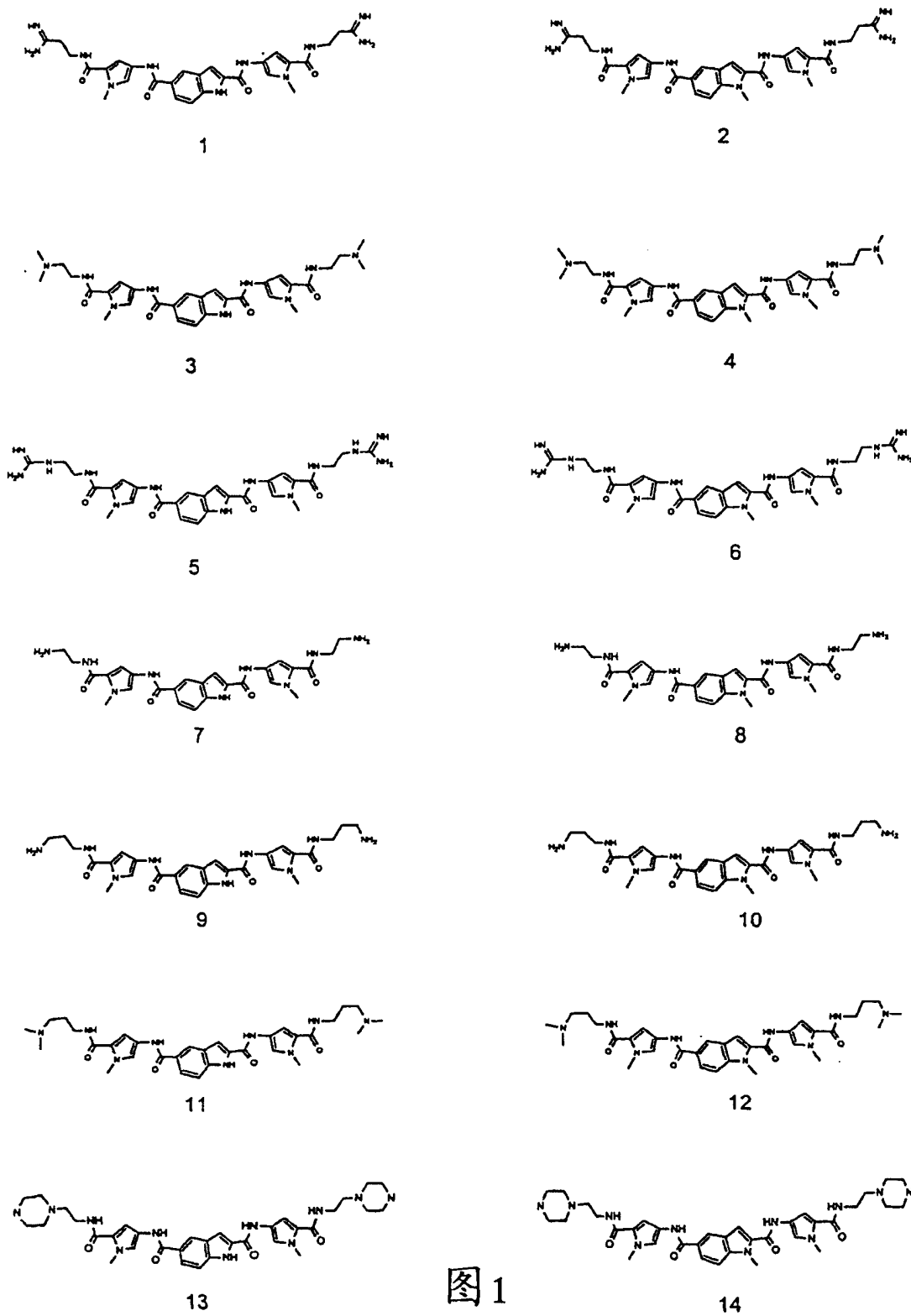
#### 荧光研究

当化合物优选结合 dsDNA 的小沟时, 它们可诱导 DNA 双链体的形成。荧光标记的互补链杂交使得两种标记物 (荧光素和 dabcy1) 距离非常近, 从而使得荧光素的荧光淬灭了。因此, 这种杂交稳定分析 ("HSA") 可用来测量结合双链 DNA 的配体。

本发明中一些化合物的 DNA 结合特性是通过荧光光谱学进行研究的。将在一条链的 5' 端有荧光素而在互补链的 3' 端有 dabcy1 的 11 bp 的寡聚 CGA<sub>8</sub>G ("FQ11") 用作富含 AT 的配体结合的靶子。在室温时, FQ11 在 HEN 缓冲液 (10 mM HEPES, pH7.2, 0.1 mM EDTA, 10 mM NaCl) 中主要以单链形式存在。

用 96 孔的平板荧光阅读器 (PE CytoFluor® Series 4000) 在激发波长为 485 nm 和发射波长为 530 nm 时测量荧光。使 FQ11 的浓度在结合实验中保持在 5 nM (双链体浓度), 然后加入各种浓度的配体。除非另有说明, 所有实验均于室温在 HEN 缓冲液中重复进行一次。根据该重复实验计算了标准差。将荧光信号对无化合物时的荧光进行了归一化。随配体浓度升高而减弱的荧光信号指示配体结合了 dsDNA。通过最小二乘法拟合程序, 计算了所实验的每一化合物的表观解离常数 ( $K_{d, app}$ )。本研究证明本发明的化合物紧密结合到 DNA 上, 大多数所实验的化合物都具有低于 100 nM 的表观  $K_{d, app}$ 。

#### 圆二色性研究



由于配体与 DNA 间电子的相互作用,配体的结合常常可以诱导圆二色性(“CD”)信号,当 DNA 或配体单独在溶液中时该信号是不存在的。本发明化合物对 DNA 的结合用 CD 光谱学进行了测定。

所有溶液条件如上文所述。使用 50  $\mu\text{M}$  的 PolydA-PolydT。用 JASCO J-600 CD 偏振计在室温监控 CD 信号。结果说明有显示 2:1 的复合物的结合特性。结合上这些化合物后, DNA 吸收区域(260-300 nm) CD 的急剧改变表明本发明的化合物诱导了 DNA 构象的变化。

### DNA 热解链分析

DNA 与本发明的化合物之间的相互作用通过以在 UV 波长 260 nm 监控的热解链技术进行了分析。所有被研究的化合物均显示了对 DNA 双链体形成的稳定作用。

在解链实验中, 3  $\mu\text{M}$  GCGA3T3CGC (A3T3) 寡聚双链体与 6  $\mu\text{M}$  化合物在 HEN 缓冲液中混和, 总体积为 200  $\mu\text{L}$ 。UV 的吸收用具有温度控制的 Beckman UV 分光光度计来监控。在相对吸收为 0.5 时确定了解链温度( $T_m$ ) (一半双链体解链时的温度)。游离的 A3T3 具有约 42 $^{\circ}\text{C}$  的  $T_m$  值。当配体存在时,  $T_m$  即增加。结果显示本发明的化合物通过结合到小沟而倾向于稳定双链体 DNA。在有化合物存在时的双链体寡聚 CGATTATTAAGC 中也观察到了  $T_m$  的增加。

通过说明和实施例等方式在一定程度上描述了前述的发明, 目的在于阐明和理解本发明。对于本领域的技术人员而言, 可以在后面的权利要求的范围之内作变化和修正是显而易见的。因此, 应当理解上面的描述目的在于说明而不是限制性的。因此, 本发明的范围不应该参考上面的描述而确定, 而相反应该参考下面附加的权利要求, 连同这些权利要求享有权利的等价物的所有范围而确定。

为了所有的目的, 本发明引用的所有专利、专利申请及出版物在此处整体引用作为参考, 其引用程度与每一专利、专利申请及出版物单独所显示的那种程度相当。

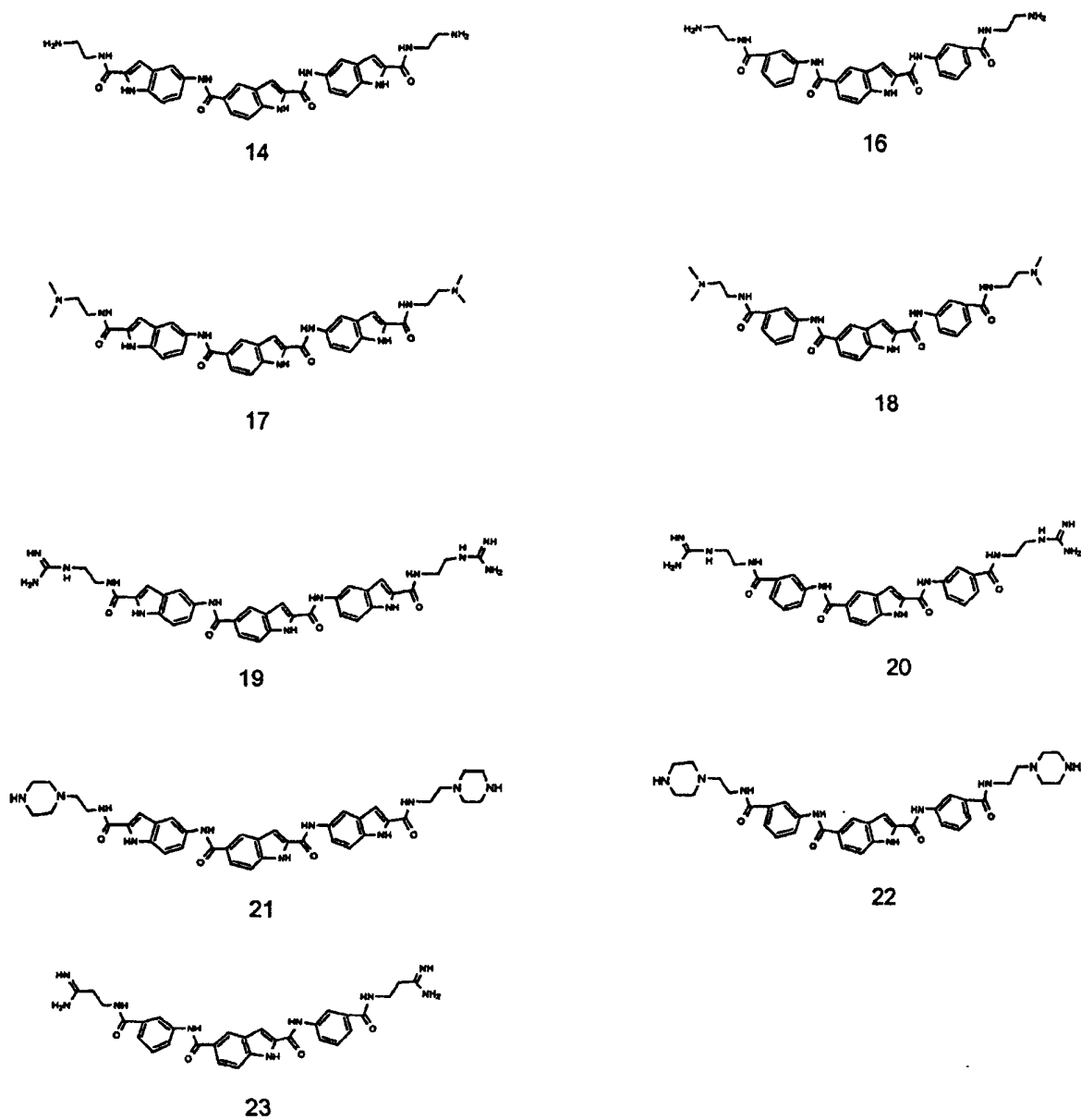
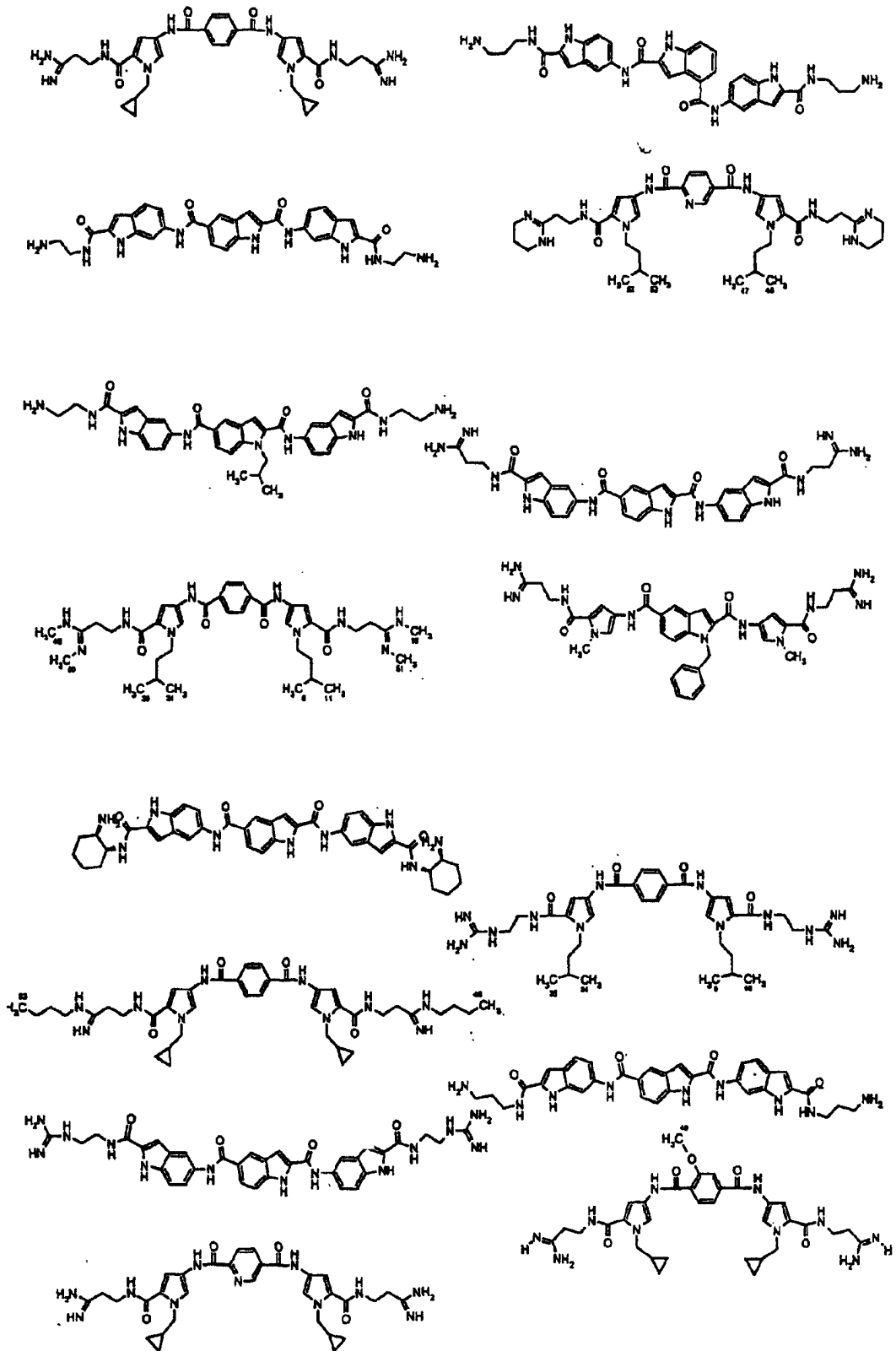
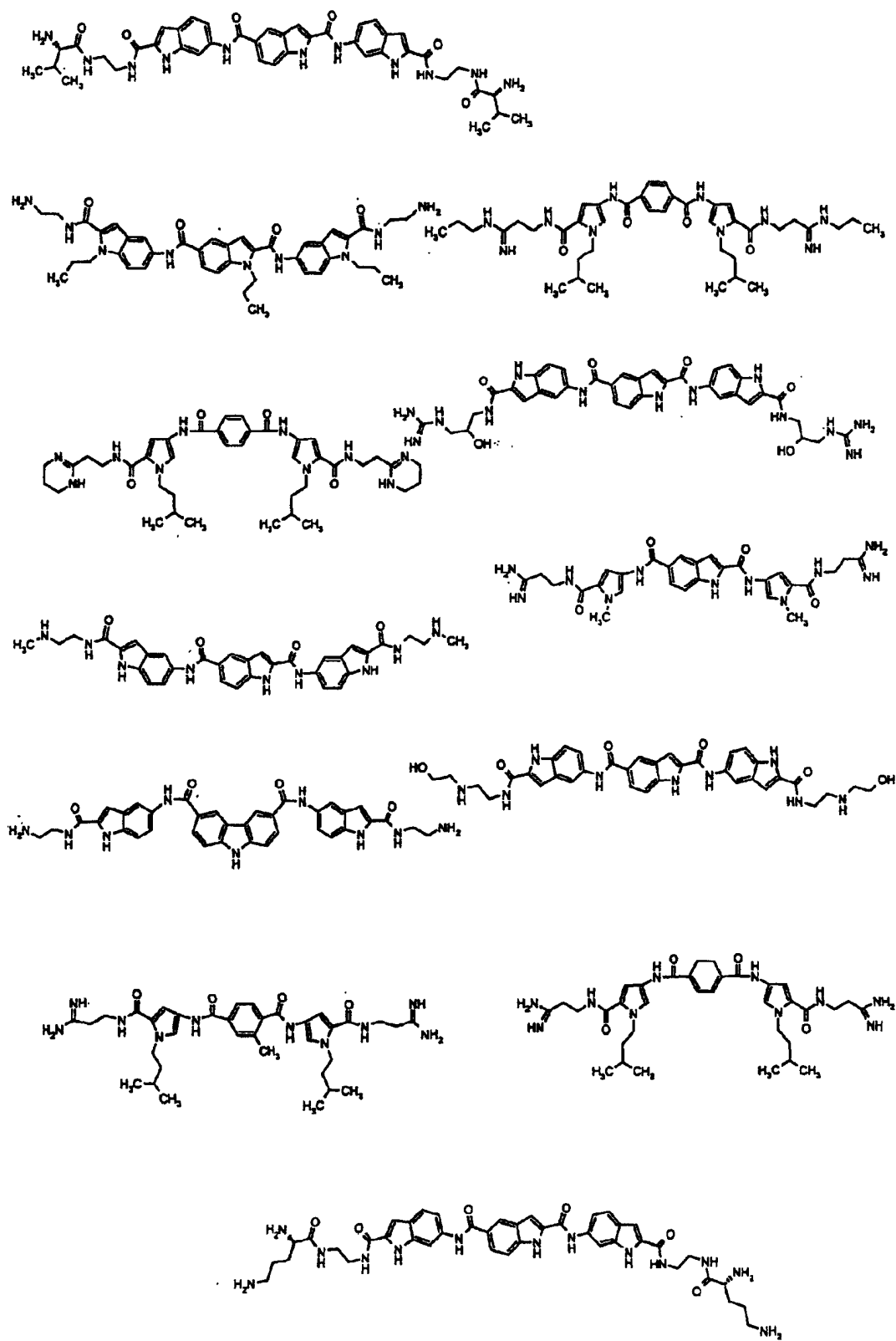
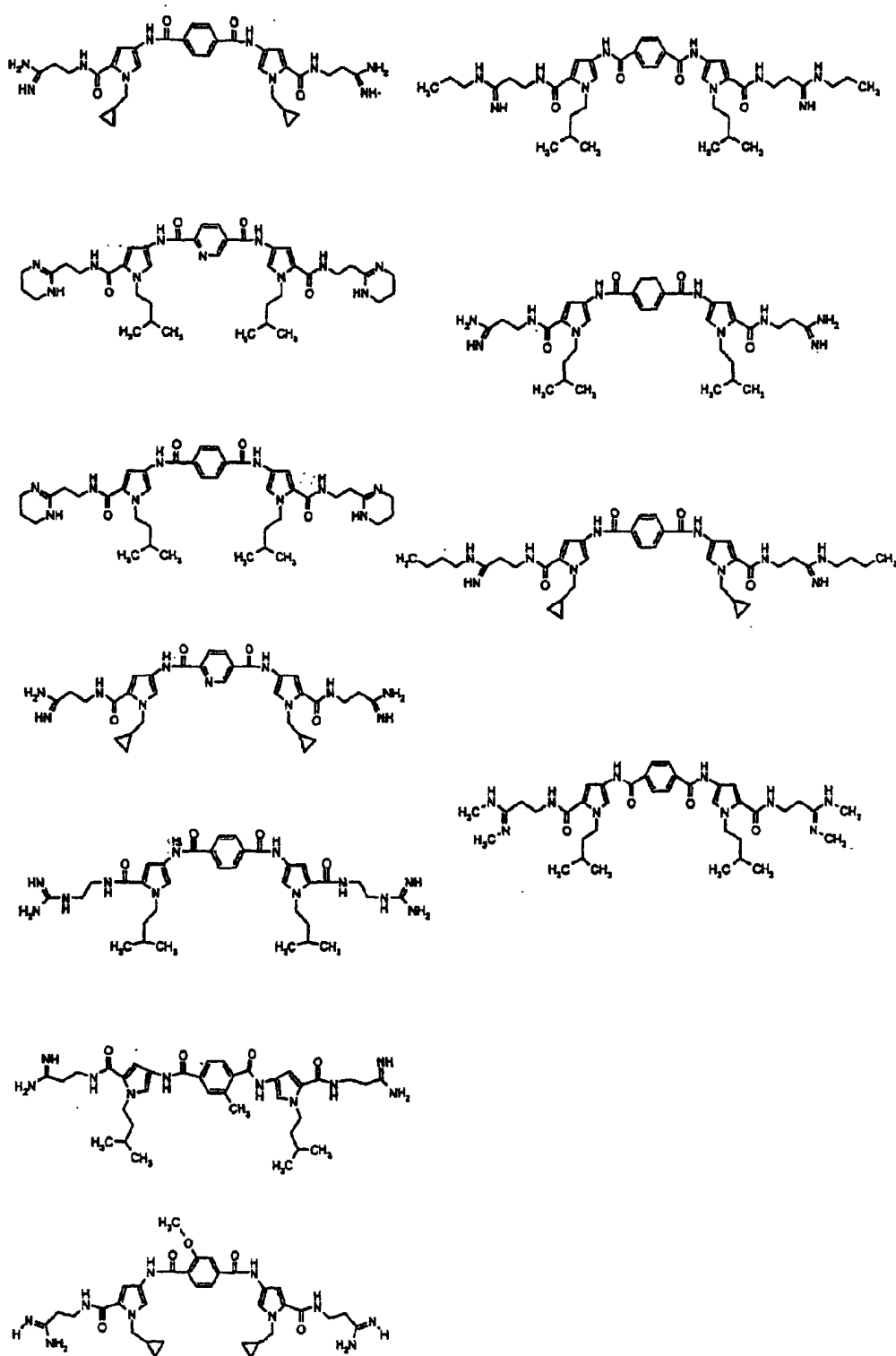
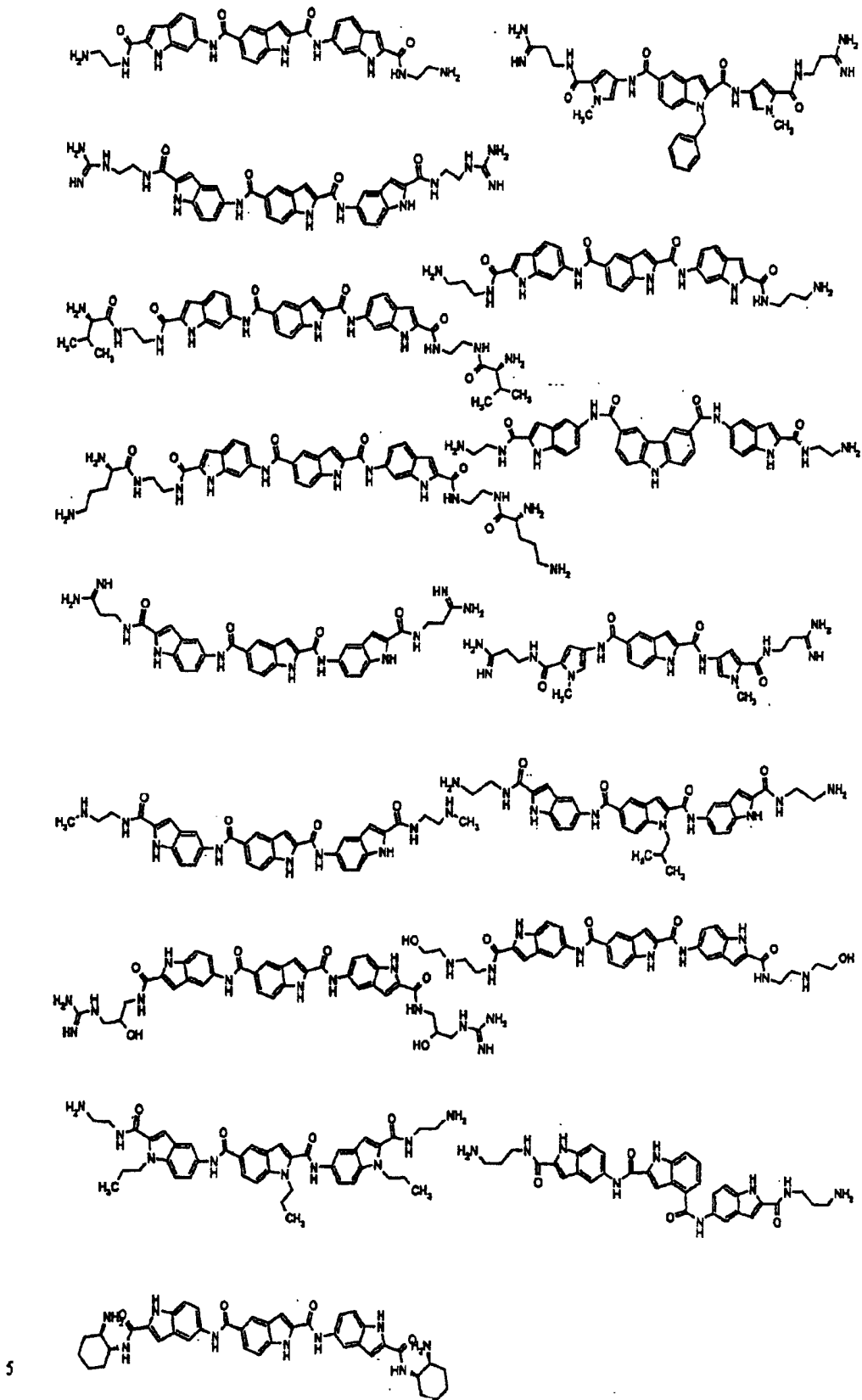


图2



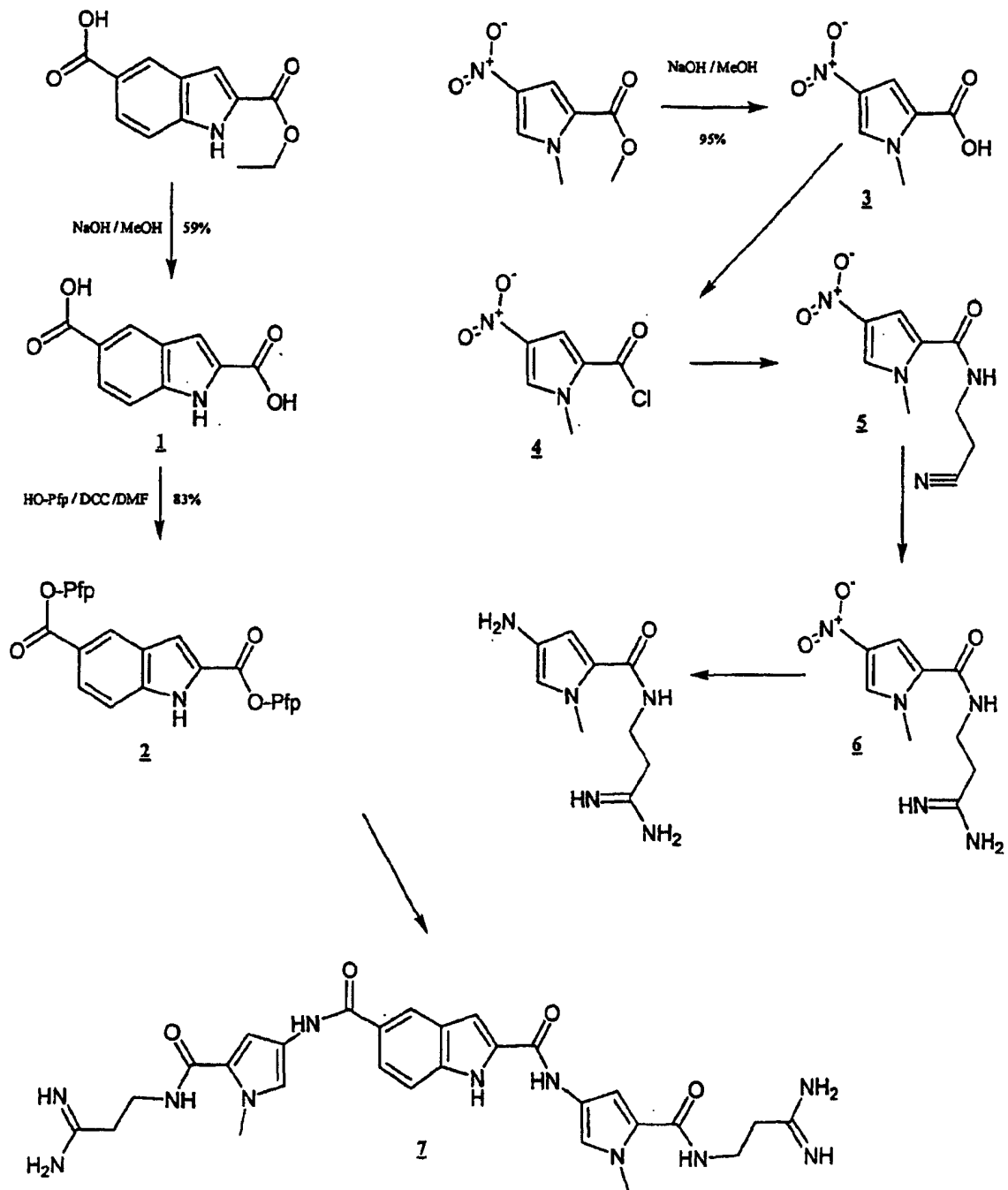




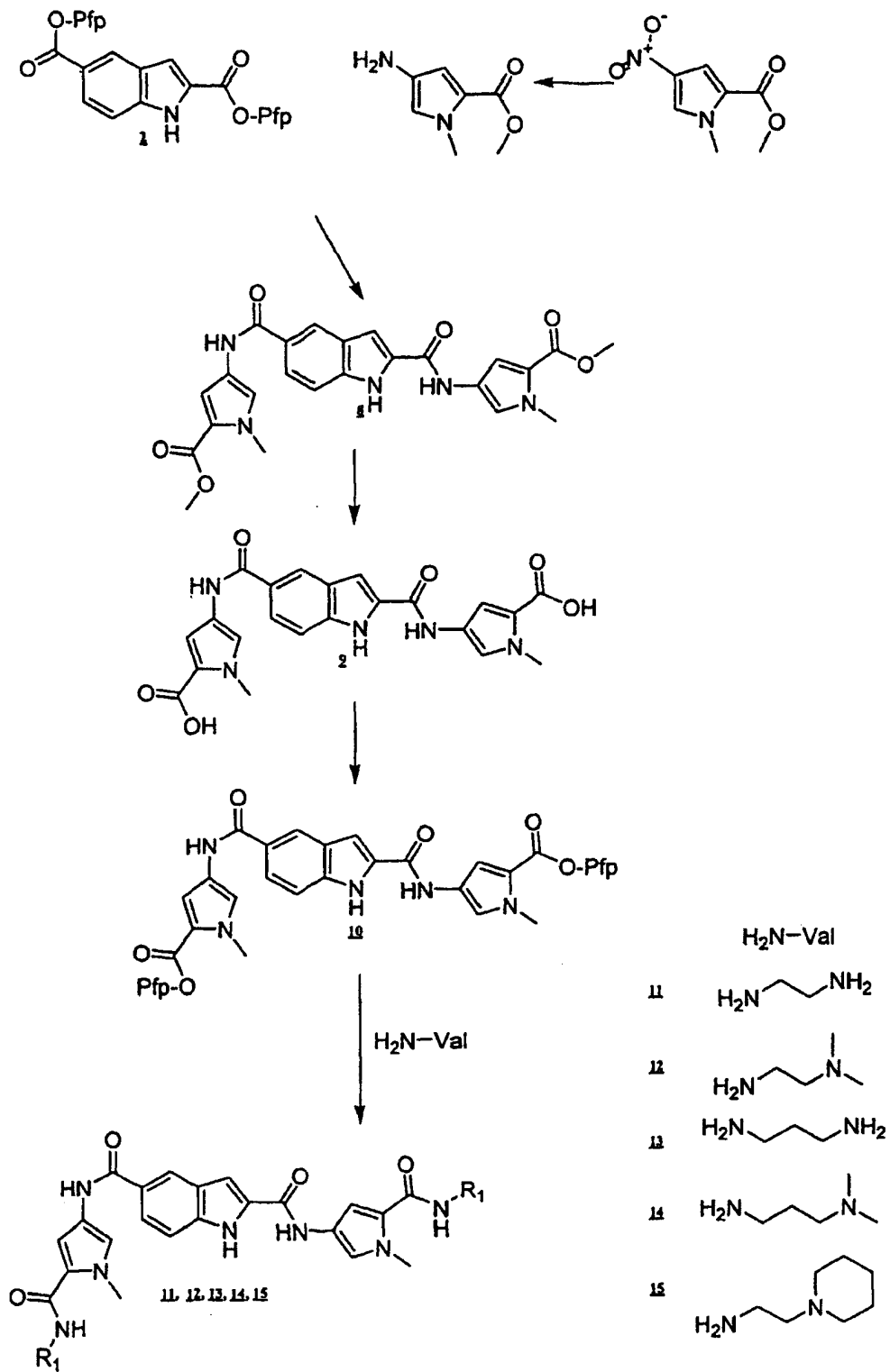




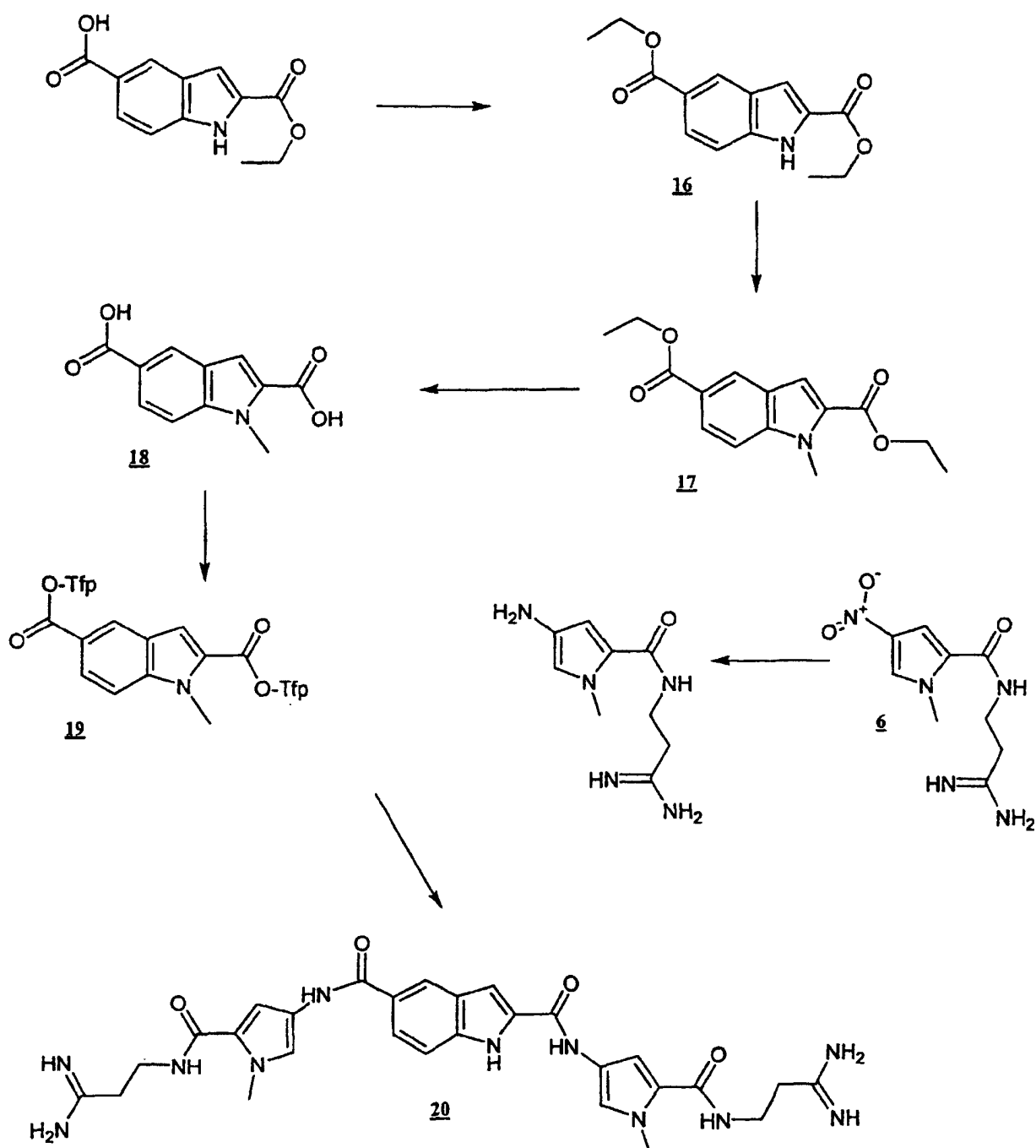
## 方案1



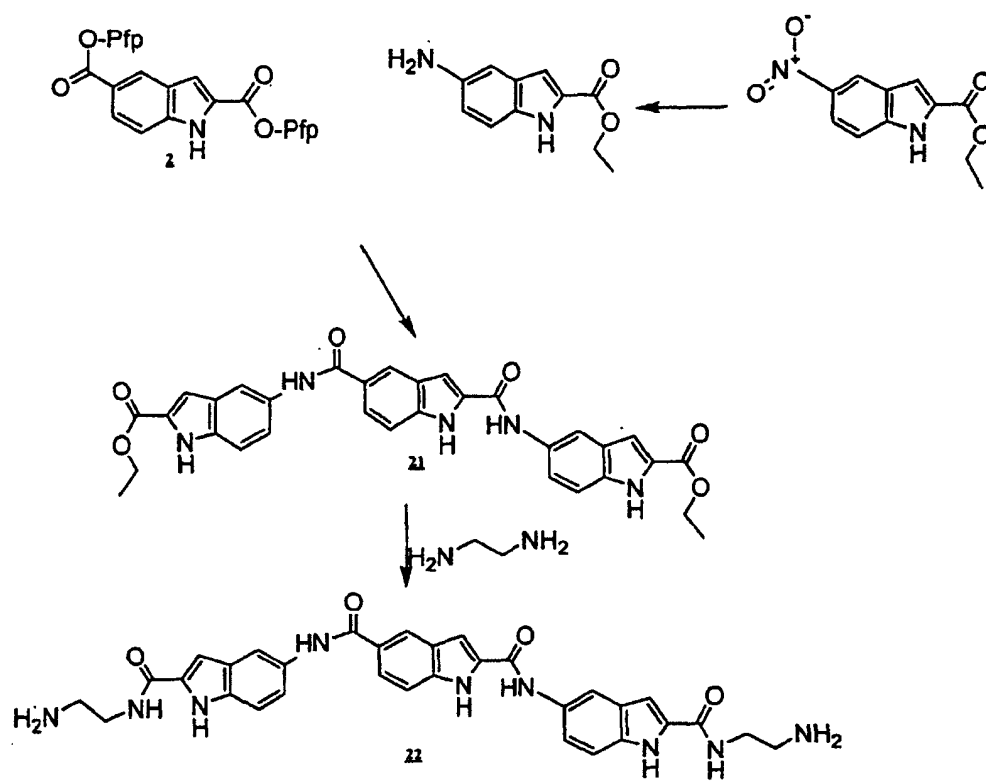
## 方案2



## 方案3

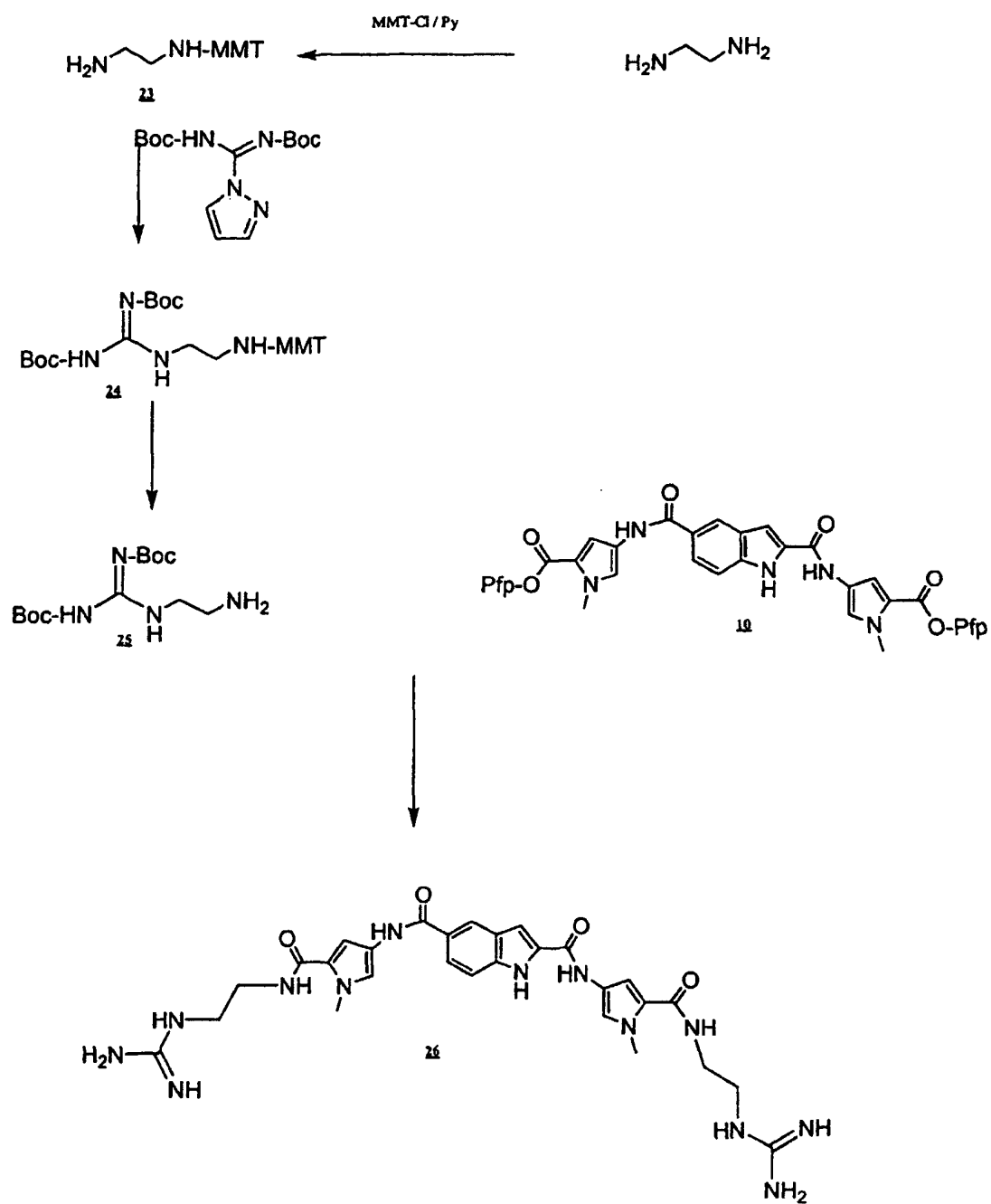


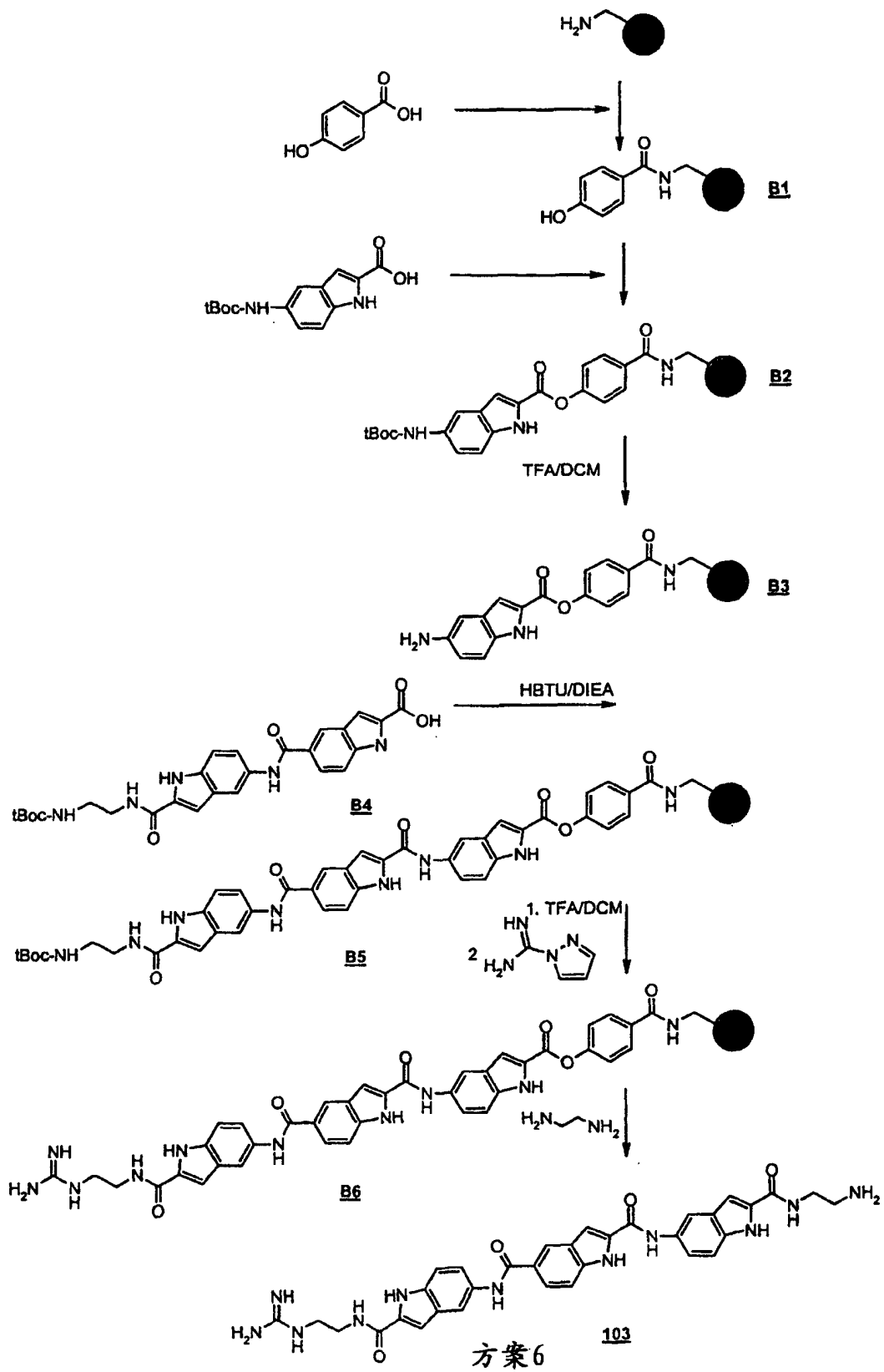
## 方案4

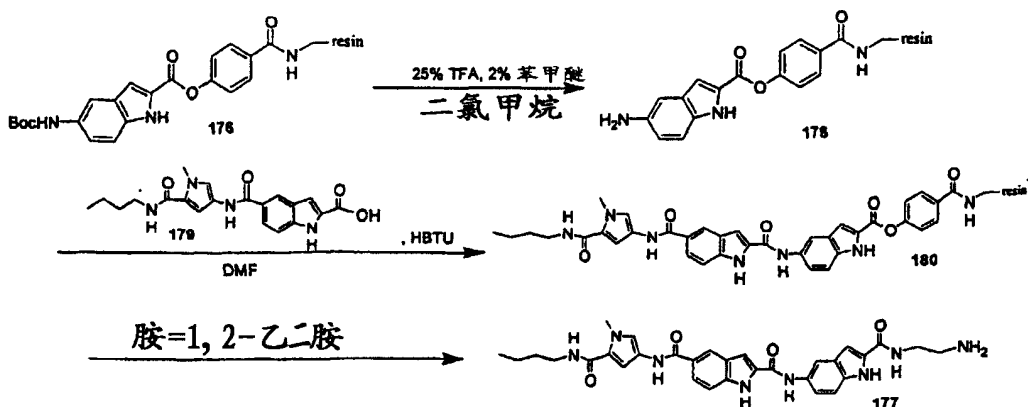


5

## 方案5

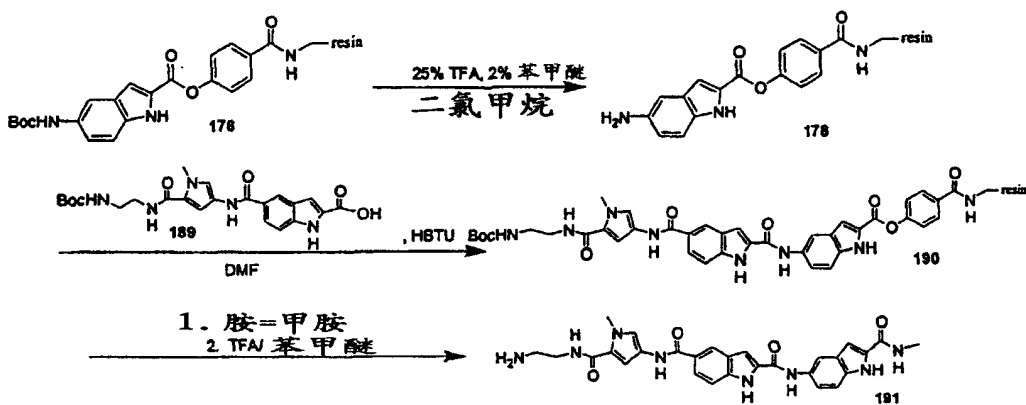






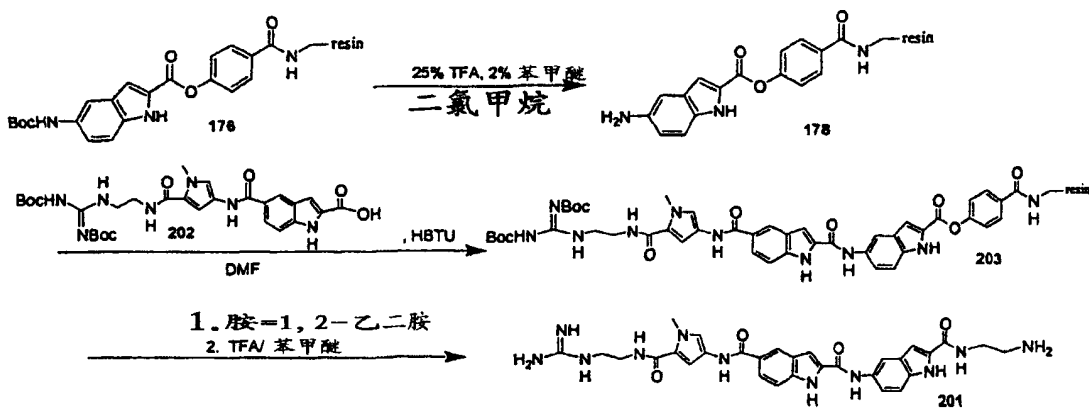
5

## 方案7

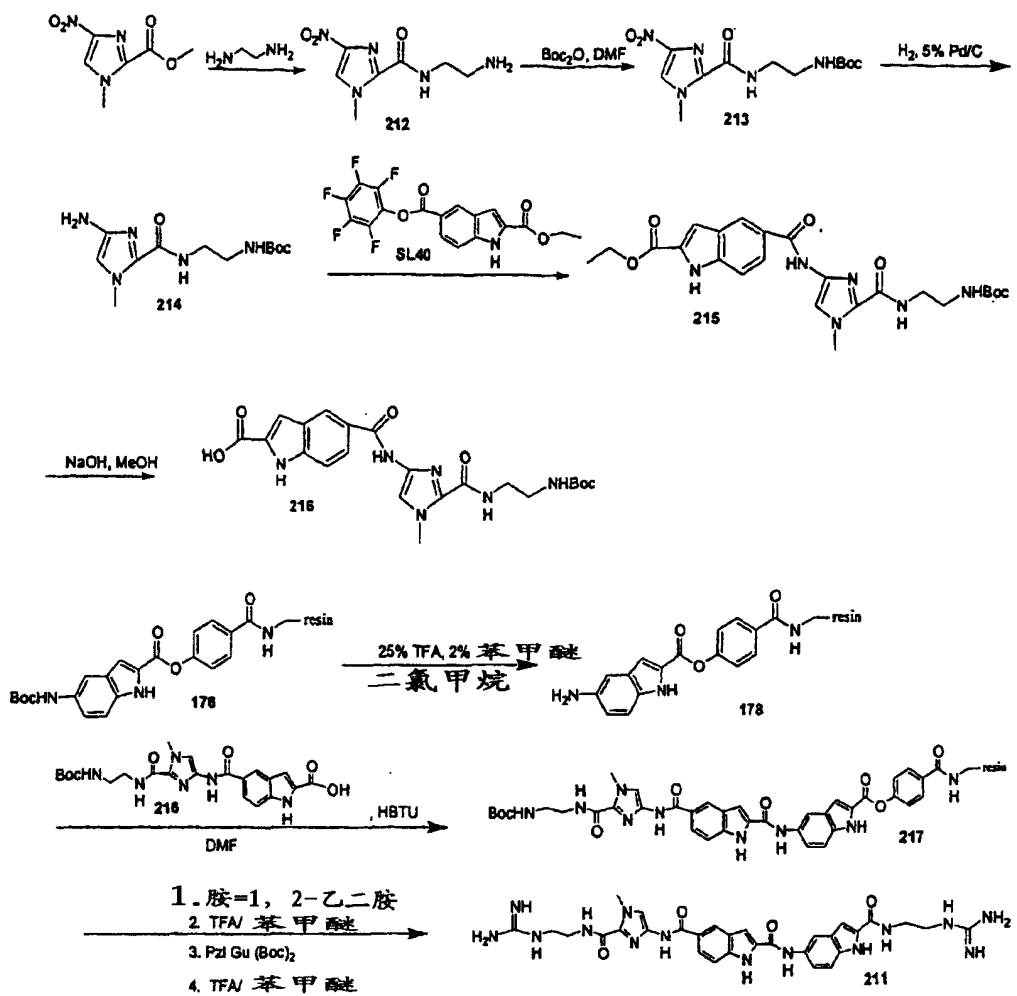


10

## 方案8



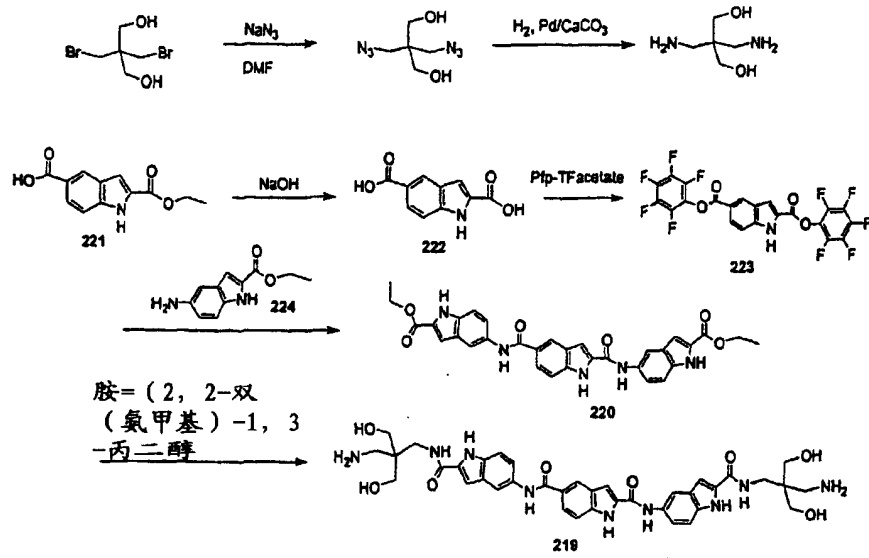
## 方案9



5

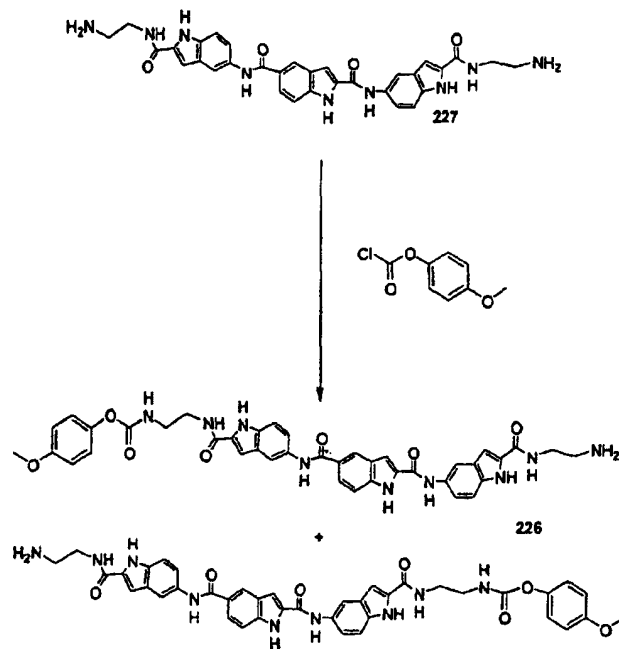
## 方案10



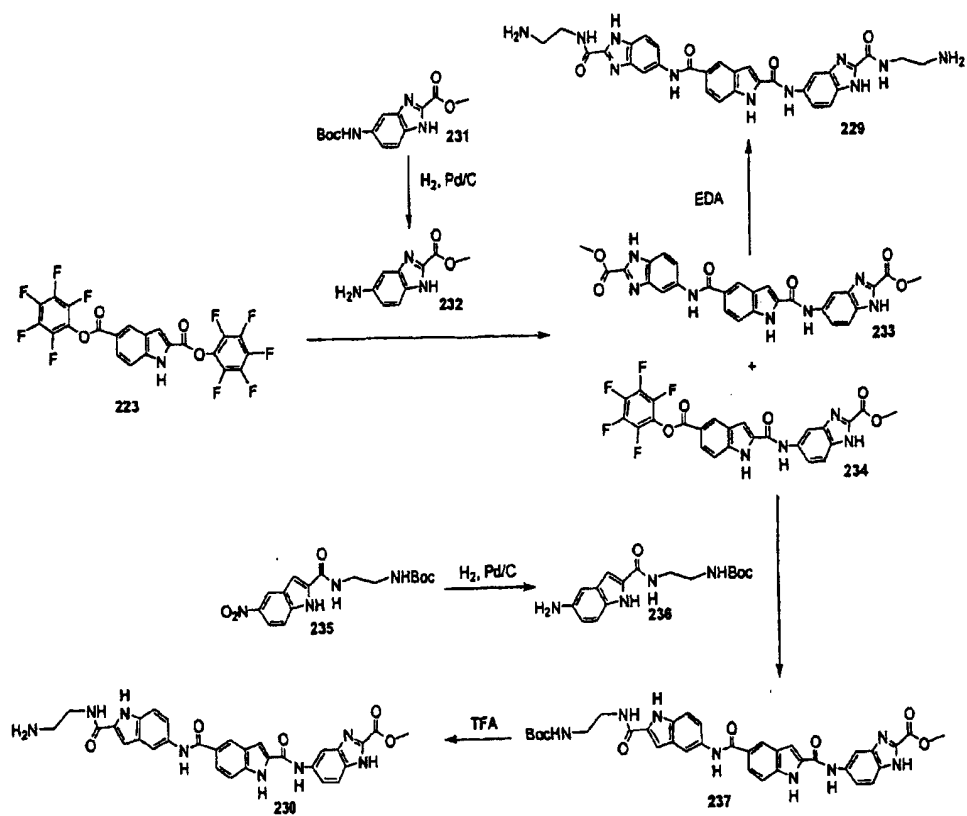


5

## 方案11



## 方案12



5

## 方案13

10