

摘要

埃博拉病毒(Ebola virus)、马尔堡病毒(Marbug virus)、非典型肺炎病毒(SARS)、新冠病毒(SARS-CoV-2)是严重影响人类身体健康的重要病毒, 其治疗药物研究十分重要。目前已报道的抑制剂主要为进入抑制剂、逆转录酶抑制剂、合成酶及蛋白酶等, 通过靶向病毒蛋白或与病毒蛋白发生相互作用的蛋白及酶, 进而抑制病毒的进入、转录复制与释放。包膜蛋白 GP 或刺突蛋白(S)是上述四种病毒进入靶细胞的关键蛋白, 组织蛋白酶 L(Cat L)切割 GP(S)促进受体结合区的暴露。目前以膜蛋白(GP)为靶点出现了 EK1、HR2P、EK1C4、IPB02、IPB01 等多肽融合抑制剂。Cat L 抑制剂近年也有较多研究, 其中 K777 作为广谱抗病毒药物已进入临床试验。然而上述病毒采用内吞途径进入靶细胞, 单一的融合抑制剂难以有效与 GP 蛋白作用。目前针对 SARS、EboV、MarV、SARS-CoV-2 的单一融合多肽抑制剂的活性不高(μmol 级)。为提高抑制剂对上述四种病毒的抑制活性, 本论文设计合成融合蛋白-Cat L 双功能抑制剂, 期望抑制 Cat L 的同时, 使融合多肽带入内体利于与病毒蛋白 GP 作用, 从而提高抑制活性。

本论文选择我们发现的及文献报道的对 EboV、MarV、SARS、SARS-CoV-2 高活性融合多肽抑制剂, 在其 C-端用含炔基的赖氨酸修饰, 合成叠氮乙酸修饰高活性 Cat L 抑制剂 K777 衍生物, 然后应用点击反应进行偶联, 形成 GP-Cat L 双靶点抑制剂。为比较双靶点抑制剂的反应活性及机制, 合成 11 个高活性融合多肽抑制剂阳性肽 CHR 肽、NHR 肽及 Cat L 抑制剂 K777。

本论文的主要结果如下:

- (1)合成了阳性化合物 Cat L 抑制剂 K777, 并对某些反应路线进行优化;
- (2)合成了含叠氮乙酰基修饰的 K777 衍生物;
- (3)合成了融合多肽抑制剂连接 K777 衍生物所需含炔基赖氨酸 Fmoc-butynylK;
- (4)合成了 24 条多肽融合抑制剂及 NHR 肽, 其中 9 条为 EboV、MarV、SARS、SARS-CoV-2 融合抑制剂阳性对照肽, 12 条为含炔基融合多肽抑制剂, 3 个阳性 NHR 肽;
- (5)合成了 10 个新型 GP-Cat L 双靶点抑制剂, 其中五个双靶点抑制剂质谱正确。

上述工作为埃博拉病毒、马尔堡病毒、SARS、新冠病毒膜蛋白-组织蛋白酶高效抑制剂的研究奠定了基础。

关键词: 埃博拉病毒; 马尔堡病毒; SARS 病毒; 新冠病毒; 膜蛋白-组织蛋白酶 L 双靶点抑制剂; 合成

Abstract

Ebola virus, Marburg virus, SARS and SARS-COV-2 are very important viruses that seriously affect human health. The development of their therapeutic drugs is very important. The current inhibitors are mainly entry inhibitors, reverse transcriptase inhibitors, synthase inhibitors and protease inhibitors, which inhibit the entry, transcription, replication and release of viruses by targeting viral proteins or proteins and enzymes that interact with viral proteins. The envelope protein GP or spike protein (S) is the key protein for the four viruses to enter the target cell. Cathepsin L (Cat L) cleaves GP (S) to promote the exposure of the receptor binding region. Polypeptide fusion inhibitors, such as EK1, HR2P, EK1C4, IPB02 and IPB01, have been developed to target membrane protein (GP), but no inhibitor enters clinical uses. Recently, Cat L inhibitors have been widely investigated, the compound K777 has entered clinical trial as a broad-spectrum antiviral drug. However, the above-mentioned viruses enter target cells by endocytosis, and a single fusion inhibitor is difficult to interact effectively with GP protein. At present, the inhibitory activity of single fusion polypeptide inhibitors against SARS, EboV, MarV and SARS-COV-2 is not high (μmol level). In order to improve the inhibitory activity of inhibitors against the four viruses mentioned above, this thesis designed and synthesized membrane protein-cathepsin bifunctional inhibitors, in which Cat L inhibitors not only inhibit Cat L, but also bring fusion peptides into cells to interact with viral protein GP, so that they might display highly inhibitory activity.

In this thesis, we selected the high activity fusion polypeptide inhibitors of EboV, MarV, SARS, SARS-COV-2 that we found previously or were reported in the literature, and modified the C-terminal with lysine-containing alkynyl. In the other hand, we synthesized Cat L inhibitor K777 derivative modified by azidoacetic acid, and then applied click reaction to couple fusion inhibitor and the K777 derivative to synthesize GP-Cat L double target inhibitor. In order to compare the reactivity and mechanism of dual-target inhibitors, the highly active fusion polypeptide inhibitors, NHR peptides and Cat L K777 were synthesized.

The main results of this paper are as follows:

- (1) The positive compound Cat L inhibitor K777 was synthesized and some reaction routes were optimized;
- (2) The derivative of K777 containing azide was synthesized;

(3) Fmoc-butynyl K was synthesized, which was used to couple fusion peptide inhibitor into K777 derivative;

(4) 21 peptide fusion inhibitors or NHR peptides were synthesized, 9 peptides were the positive fusion inhibitors of EboV, MarV, SARS, SARS-COV-2, 12 peptides were the peptide fusion inhibitors containing butynyl K, and 3 peptides were NHR positive peptides;

(5) 10 novel GP-Cat L double target inhibitors were synthesized, Five of the double target inhibitors were identified correctly by mass spectrometry.

This work lays a foundation for the research and development of antiviral compounds of coronavirus and filovirus including Ebola, Marburg and SARS

Key words: Ebola viruses; Marburg viruses; SARS viruses; SARS-CoV-2 viruses; Membrane protein-cathepsin L double target inhibitor; Synthesis

目录

第 1 章 引言	1
1.1 埃博拉、马尔堡、SARS、新冠病毒的流行现状	1
1.2 埃博拉、马尔堡、SARS、2019 新冠病毒的结构及功能	3
1.2.1 埃博拉病毒蛋白结构与功能	3
1.2.2 SARS、新冠病毒蛋白结构与功能	5
1.3 埃博拉、马尔堡、SARS、2019 新冠病毒的进入和感染机制	7
1.3.1 埃博拉、马尔堡病毒的进入、感染机制	7
1.3.2 SARS、新冠病毒的进入、感染机制	8
1.4 病毒抑制剂的研究进展	9
1.4.1 进入抑制剂	11
1.5 本论文的研究思路、主要内容和创新点	16
1.5.1 本论文的研究思路	16
1.5.2 本论文的主要内容	16
1.5.3 本论文的创新点	17
第 2 章 组织蛋白酶 L 抑制剂 K777 及其含叠氮衍生物的合成	18
2.1 实验所需试剂、药品和仪器	21
2.1.1 实验所需试剂	21
2.1.2 实验所需主要仪器设备	23
2.2 阳性化合物 K777 的合成	24
2.2.1 中间体 2 的合成	24
2.2.2 中间体 3 的合成	25
2.2.3 中间体 4 的合成	25
2.2.4 中间体 5 的合成	26
2.2.5 中间体 6 的合成	26
2.2.6 中间体 7 的合成	27
2.2.7 中间体 8 的合成	27
2.2.8 中间体 10 的合成	28
2.2.9 中间体 11 的合成	28
2.2.10 阳性化合物 K777 的合成	29
2.3 阳性化合物 K777 合成讨论	29
2.3.1 中间体 4 的合成	29
2.3.2 中间体 10 的合成	30

2.3.3 K777 合成中的其他注意事项	30
2.4 含叠氮乙酰 K777 衍生物合成所需的苯丙氨酸及乙烯砜衍生物中间体的合成	30
2.4.1 中间体 12 的合成	30
2.4.2 中间体 13 的合成 1	31
2.4.3 中间体 13 的合成 2	31
2.4.4 中间体 14 的合成	32
2.4.5 中间体 17 的合成	32
2.4.6 以苯丙氨酸甲酯盐酸盐为起始原料合成中间体 18	33
2.4.7 中间体 18 的合成 2	34
2.4.8 中间体 18 的合成 3	35
2.4.9 固相合成方法合成含叠氮的哌嗪苯丙氨酸中间体 19 探索	35
2.4.10 中间体 19 的合成 2	37
2.4.11 中间体 19 的合成 3(碳二亚胺法)	37
2.5 含叠氮的 K777 衍生物合成路线 1 的实验探索	38
2.5.1 中间体 15 的合成	39
2.5.2 中间体 16 的合成	39
2.6 含叠氮乙酰的 K777 合成路线 2 探索 1	40
2.7 含叠氮乙酰的 K777 衍生物的合成	40
2.7.1 中间体 20 的合成	40
2.7.2 中间体 16 的合成	41
2.7.3 含叠氮乙酰的 K777 衍生物的合成	41
2.8 合成讨论	41
2.9 小结	42
第 3 章 病毒融合抑制剂含炔基衍生物及膜蛋白-组织蛋白酶双靶点抑制剂的合成	43
3.1 实验所需试剂、药品和仪器	45
3.1.1 实验所需试剂	45
3.1.2 实验所需主要设备	46
3.2 Fmoc-ButynylK 的合成	46
3.2.1 3-丁炔-1-基氯甲酸酯(S1)的合成	46
3.2.2 Boc-ButynylK(S2)的合成	46
3.2.3 Fmoc-ButynylK 的合成	47
3.3 融合多肽的合成	47

3.3.1 肽-树脂的合成.....	47
3.3.2 多肽的裂解.....	48
3.3.3 多肽的纯化.....	48
3.3.4 融合多肽的合成结果.....	48
3.4 含炔基融合抑制剂与含叠氮 K777 衍生物双靶点抑制剂的合成.....	52
3.4.1 实验方法.....	52
3.4.2 双靶点抑制剂的合成结果.....	53
3.5 讨论与小结.....	57
第 4 章 结论与展望.....	58
参考文献.....	59
攻读硕士学位期间科研成果.....	69
致谢.....	70
附录 部分化合物的 $^1\text{H-NMR}$ 、MS、 ^{13}C 、HPLC 谱图.....	71

第 1 章 引言

埃博拉(Ebola Virus, EBOV)、马尔堡(Marburg Virus, MARV)病毒均属于丝状病毒科,为单链负链 RNA 病毒^[1],埃博拉病毒能导致人和灵长类动物发生病毒性出血热(埃博拉出血热),患者因中风、心肌梗塞、低血容量休克、多脏器功能衰竭等并发症死亡^[2]。目前已知埃博拉病毒具有六个亚型,分别是扎伊尔型(Zaire EBOV, ZEBOV)、苏丹型(Sudan EBOV, SEBOV)、科特迪瓦型(Ivory Coted EBOV, CEBOV)、莱斯顿型(Reston EBOV, REBOV)、本迪布焦型埃博拉病毒(Bundibugyo EBOV, BEBOV)和孟买病毒(Bombali virus)^[3-8],其中致死率最高的是扎伊尔型,高达 90%^[9,10],由于其高致死率,埃博拉被列为生物安全第四级(BiosafetyLevel 4)病毒^[11]。马尔堡病毒现未发现有亚型存在,病毒感染者会出现马尔堡出血热的症状,临床表现与埃博拉出血热相似^[7],致死率稍低于埃博拉出血热,大约为 25%至 90%^[12,13]。

非典型肺炎病毒(SARS-CoV)、MERS(中东呼吸综合征)冠状病毒和新冠病毒(又称为严重急性呼吸综合征冠状病毒 2)(英文简称 SARS-CoV-2 或者 2019-nCoV)均为冠状病毒属^[14-17],为线性单股正链的 RNA 病毒。SARS 病毒攻击患者的呼吸系统,使患者产生严重急性呼吸综合症(SARS)以及中东呼吸综合征(MERS),SARS 病毒还有可能引起休克、肝肾功能损坏,甚至能引起神经系统综合征^[18]。2019 出现的新冠病毒相比较 SARS 病毒,其临床特征表现基本相似,虽然致死率低于 SARS 病毒,但具有传播途径更广、传染性更强、变异性更强,体外存活率更高等特点^[19-20],目前尚无完全有效的疫苗应对 SARS 及 MERS 病毒^[21],但对于新冠病毒,已有灭活、RNA、蛋白及载体等多种疫苗在临床上广泛应用。

1.1 埃博拉、马尔堡、SARS、新冠病毒的流行现状

埃博拉病毒主要是通过病人的血液、唾液、汗水和分泌物等途径传播^[22-25],潜伏期为 2-21 天。埃博拉病毒对温度的变化相对稳定,可在 60℃ 环境存活半小时以上,在患者死亡后仍可在其体内存活数周^[26]。人群对埃博拉病毒无免疫力、普遍易感^[27]。1976 年 7 月 6 日,苏丹的一名纺织厂工人由于埃博拉病毒出血热死亡,同年的 9 月份,在与苏丹交接的刚果(金)(又称扎伊尔)的埃博拉流域爆发了埃博拉出血热,流域的 55 户村庄遭到病毒肆虐,318 人被感染,死亡人数达 280 人^[28]。在此后的几十年间(至 2014 年),苏丹、扎伊尔、加蓬、乌干达、刚果、中非、喀麦隆、肯尼亚科、特迪瓦等地陆续爆发埃博拉疫情,在大约 1500 例确

诊的埃博拉病例中，死亡率高达 88%^[29]。2014 年至 2016 年的西非发生严重埃博拉疫情，造成 28616 人感染，11310 人死亡^[30]。2022 年刚果(金)等再发生了埃博拉感染小规模感染事件^[31]。

马尔堡病毒的发现略早于埃博拉病毒，1967 年，马尔堡出血热首先在西德马尔堡、法兰克福和南斯拉夫贝尔格莱德的几所医学实验室爆发，此次疫情的爆发导致 31 人感染，7 人死亡，于是根据地名将此种病毒命名为马尔堡病毒^[32-34]。经过病毒来源调查，发现马尔堡病毒是由来自非洲乌干达的猴子带入。1975 年，南非爆发小规模的马尔马出血热，导致 4 人感染。1998 年至 2000 年，刚果民主共和国的马尔堡出血热导致 123 人死亡，这是马尔堡病毒被发现以来最大规模的爆发。2004 年至 2005 年，非洲安哥拉爆发的马尔堡出血热导致 300 多人死亡。此后的几十年里，非洲陆续有马尔堡病毒感染的病例或是马尔出血热疫情爆发，最近的一次疫情爆发是在 2021 年 8 月，西非几内亚再次出现马尔堡出血热感染死亡病例^[35,36]。

SARS 病毒是冠状病毒的一个变体，冠状病毒于 1965 年从感冒病人的分泌液中被发现，由于此类病毒的包膜蛋白上有形状似日冕的棘突^[37]，故命名为冠状病毒。2002 年年底，中国广东出现了大量呼吸系统疾病感染病例，最初症状与普通感冒相似，但随着患病时间增加，患者的呼吸系统遭到严重破坏，甚至肝肾功能都受到了一定影响，严重者因休克、消化道出血、败血症而死亡，并且部分患者康复之后还存在着肺部纤维化等后遗症^[38]。随后，越南、香港、加拿大等地也相继出现此种病例^[39]。SARS 病毒可以由呼吸道飞沫或直接传播，该病情蔓延速度较快，受到了国际社会的广泛关注，随后世界卫生组织将此类疾病命名为“严重急性呼吸道综合症(SARS)”，在 2002 年年底至 2003 年期间，中国大陆有 5327 人感染了 SARS，死亡人数 348 人，中国香港感染 1755 人，死亡 299 人，在统计的全世界范围内的病例共有 8422 例，其中共有 919 人死亡，死亡率约为 11%，涉及了 32 个国家和地区^[40]。关于 SARS 病毒的来源，最先被认为是果子狸^[41]，后经研究证实，果子狸只是 SARS 的直接来源，根本来源是中华菊头蝠^[42]。

新冠病毒(SARS-CoV-2)也是 SARS 病毒的一种。2019 年 12 月，中国武汉出现了大量肺部感染患者，这些患者的最初症状与普通感冒相似，有些表现为轻微发烧，流鼻涕、咳嗽等，而有些重症患者的病情会发展为肺炎，而后经过对新冠患者的遗体进行解剖，发现新冠病毒还会破坏患者的其他内脏器官。该病毒被命名为 2019-nCoV，世界卫生组织 2020 年 2 月将其正式命名为 SARS-CoV-2。。新冠病毒可经直接传播、气溶胶传播、接触传播，且体外存活率较高，该病情被发现之后便开始快速传播，截止 2022 年 10 月 8 日，我国累计报道病例 253141

例,死亡人数 5226 人(财新周刊, 2022.10.08)。由于其传播速度快、传播范围广,新冠病毒迅速在全球多个地区与国家蔓延,并成为一种常态化病毒,从 2019 年 12 月被发现以来,世界多地区都不断有疫情爆发,据世界卫生组织数据,截止 2022 年 10 月 17 日,全球累计确诊病例达 6 亿,死亡人数 664.5 万,这个数字仍在不断增加,已经严重威胁世界人民健康安全。新冠病毒的变异性极强^[43],至今已有数百种变异植株,其中致死率较高的是德尔塔、奥密克戎^[44],这些变异植株为新冠病毒疫苗的研发带来了巨大的挑战。无症状感染、人员流动量大、贸易全球化、也为疫情防控带来了困难。最初,武汉华南海鲜市场被认为是新冠病毒的源头,后面经研究证实,华南海鲜市场并不是新冠病毒的源头,具体来源还有待探索^[45]。

1.2 埃博拉、马尔堡、SARS、2019 新冠病毒的结构及功能

1.2.1 埃博拉病毒蛋白结构与功能

埃博拉、马尔堡病毒均为单链负链 RNA 病毒,两者除了抗原不同,其蛋白质结构类似^[46]。埃博拉病毒(图 1-1),全长 970 nm,分子量为 4.17×10^6 ,含有 18959 个碱基, RNA 长度 19Kb。埃博拉病毒有 7 个开放阅读编码框(ORF),基因组排列顺序为 3'-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5'(图 1-2),编码 7 种病毒蛋白,包括核衣壳蛋白 NP (Nucleo Protein)、非结构蛋白 VP30 和蛋白 VP35、基质蛋白 (Matrix Protein)VP24 和 VP40、包膜糖蛋白 4 (GP4)、RNA 聚合酶 L(polymerase)^[47,48]。

核衣壳蛋白 NP 位于病毒的 3' 端,病毒的核衣壳的形成高度依赖 NP 蛋白的 O-糖基化, NP 蛋白的 C 端(氨基酸序列 2-150)和 N 端(氨基酸序列 601-739)对病毒的结构形成起着关键作用, NP 蛋白 451-600 区域是形成核衣壳样结构和病毒基因组复制所必需的,可以防止病毒 RNA 被分解,在病毒复制过程中发挥着重要作用^[49]。VP35 作用于病毒 RNA 的合成,是一种 I 型干扰素(IFN)拮抗剂, VP35 可以抑制 I 型干扰素转录,降低宿主获得性免疫力以及获得性免疫力^[50]。VP35 还可以通过抑制 PKR(蛋白激酶)调节的途径来抵消干扰素的抗病毒作用,加快了病毒的传播的传播速度以及感染率^[51]。基质蛋白 VP24 和 VP40 参与病毒的组装并在病毒的结构形成发挥重要作用,在病毒的所有基质蛋白中, VP40 含量最多,在复制周期中参与病毒或宿主细胞的 RNA 代谢,分泌物还可以杀死免疫细胞,也是埃博拉疫苗研发的重要靶点^[52,53]。RNA 聚合酶 L 催化核苷酸聚合反应^[54]。VP30 与锌离子结合在病毒的转录过程发挥作用^[55]。

GP(Glycoprotein, 包膜糖蛋白)蛋白是埃博拉病毒唯一的跨膜蛋白,在病毒

的组装、萌发、附着、进入、发挥核心作用，也被认为是病毒抑制剂、疫苗、药物治疗重要的靶点^[56,57,58]。埃博拉病毒 GP 蛋白包含 676 个氨基酸，被蛋白酶和 Furin 切割形成 GP1(MET1-Arg501)和 GP2(Glu502-Phe676)两个亚基(图 1-3)。GP1 负责细胞-表面附着，可能由残基 54-201 的区域介导，GP1 的 N-末端区域负责病毒进入细胞受体的结合，GP2 负责病毒和宿主细胞膜的融合，包含内部融合环和七肽重复区域(HR1 和 HR2)，由包含 CX6CC 基序的 25 个残基连接子和内部融合环连接，两个七肽重复区域形成反平行的 α -螺旋，CX6CC 基序在 Cys601 和 Cys608 之间形成亚基内二硫键。所有病毒蛋白内部融合环共享其融合功能的共同架构，N 端的融合肽在前体裂解后释放。HR1 螺旋中 β -19 碱基的 Cys511 和 Cys556 之间的二硫键共价连接形成反平行的 β -折叠^[59,60]。

GP1 和 GP2 两个亚基之间以二硫键形式连接形成三聚体(图 1-4)，三个多肽链中的每个都折叠成螺旋发夹构象，GP1 也以可溶性形式从感染细胞中脱落，内体组织蛋白酶 B(Cat B)和组织蛋白酶 L(Cat L)对 GP1 的切割，诱导 GP2 的两个同源三聚体形成六束螺旋结构^[61]，从而发生感染。

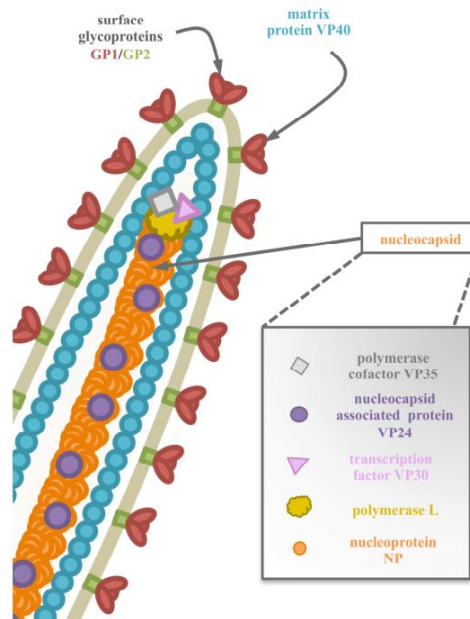


图 1-1 埃博拉的结构^[62]

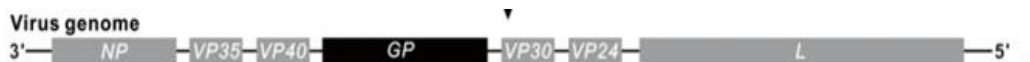


图 1-2 埃博拉病毒基因组序列^[63]

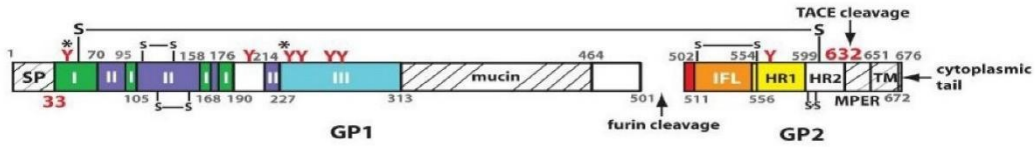


图 1-3 埃博拉病毒 GP 结构^[64]

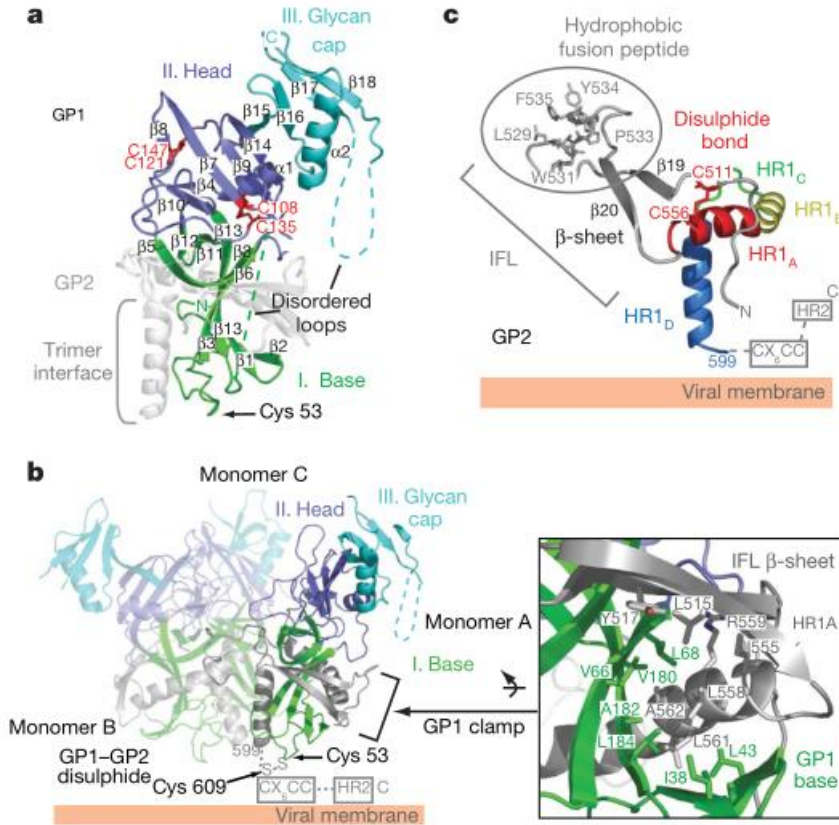


图 1-4 埃博拉 GP 三维结构图^[64]

a GP1 的结构 b.三聚体结构 c.融合前 GP2 结构

1.2.2 SARS、新冠病毒蛋白结构与功能

SARS 和新冠病毒的基因组同源性高达 79%，为正链单链 RNA 病毒，基因组大小为 27~32 kb^[65]。冠状病毒基因组排列序列为 5'-复制酶-刺突蛋白(S)-小包膜蛋白(E)-包膜蛋白(M)-核衣壳蛋白(N)-3'，复制酶可以进行自我切割，形成多个非结构蛋白。冠状病毒的基因组序列分别编码结构蛋白和非结构蛋白，结构蛋白是病毒的组成部分，有 E 蛋白、S 蛋白、M 蛋白、N 蛋白、血凝素酶 HE(图 1-5)^[66]。

S(Spike Glycoprotein)蛋白是一种大的跨膜蛋白，自身组成三聚体形成冠状病

毒的表面刺突结构(图 1-6)。S 蛋白通过切割的氨基末端信号肽插入内质网(ER)构成跨膜结构域和内域^[67]。胞内 S 蛋白是高度糖基化的,通过 S 蛋白 N 端连接修饰,胞外含有多个糖基化位点,对 S 蛋白的折叠起作用,还可能调节抗体识别。S 蛋白含有 S1(NTD)和 S2(CTD)两个大小大致相同的多肽亚型^[68]。S1 特异性识别宿主表面受体,起固定作用。S2 包含连接区、融合肽(fusion peptide, FP)、2 个保守的七肽重复区(heptad repeatregion, HR) HR1 和 HR2、跨膜区及胞内区。S 蛋白受体结合结构域(receptor binding domain, RBD)、受体结合基序(receptor binding motify, RBM) 位于 S2 中,是病毒和受体结合的核心^[69](图 1-7)。M 蛋白是冠状病毒包膜上主要的结构蛋白,是多跨膜蛋白的一种。在四种结构蛋白中数量最多,由 218 至 263 个氨基酸组成。M 蛋白保守程度较高, M 蛋白的糖基化影响病毒体内趋向性和体外诱导 α 干扰素的能力,在病毒的形成过程中扮演重要角色。E 蛋白是一种小分子多肽,由 76-109 个氨基酸组成,是病毒的辅助结构,可能影响病毒的释放。N 蛋白的大小从 43 kDa 到 50 kDa,是病毒衣壳成分^[70],其磷酸化能够帮助病毒区分底物,也可能影响病毒的复制与转录。复制酶自我切割产生非结构蛋白,作用于病毒的复制、转录过程^[71]。

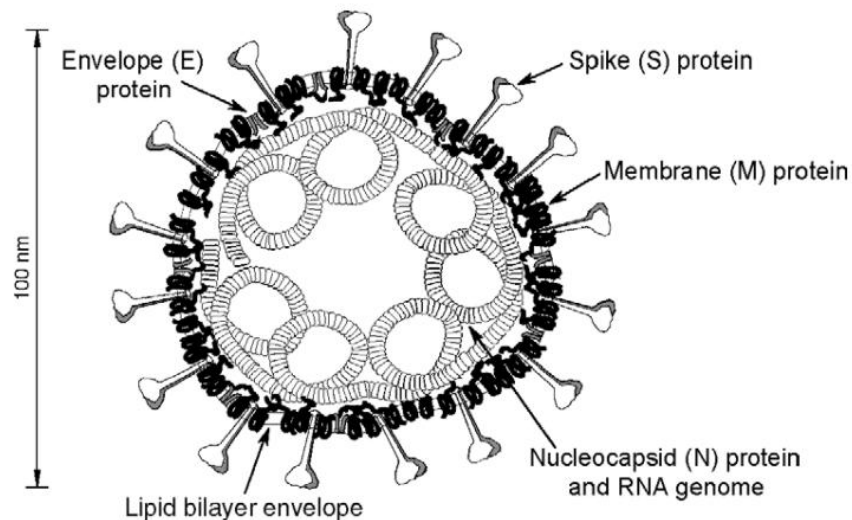
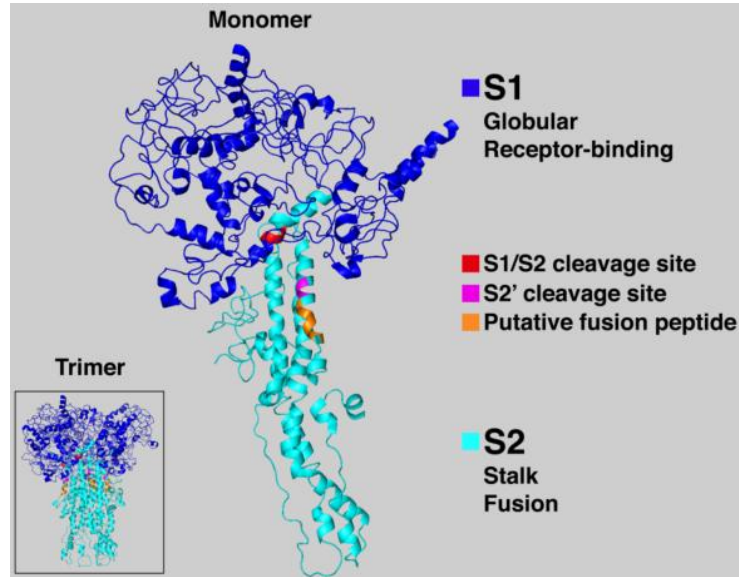
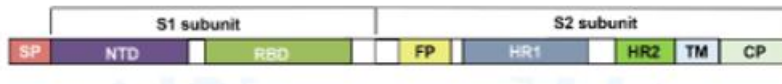


图 1-5 SARS 病毒的结构^[66]

图 1-6 新冠病毒 S 蛋白的三聚体^[67]图 1-7 S 蛋白的结构^[69]

1.3 埃博拉、马尔堡、SARS、2019 新冠病毒的进入和感染机制

1.3.1 埃博拉、马尔堡病毒的进入、感染机制

埃博拉、马尔堡病毒的进入、感染机制大致相似。根据细胞类型不同以及病毒颗粒的大小，埃博拉病毒利用不同途径进入细胞。巨胞饮(macropinocytosis)作用是病毒颗粒进入的主要途径，病毒进入宿主细胞由 GP1 和 GP2 介导。GP1、GP2 和基质蛋白 VP40 组成埃博拉病毒样颗粒(EBOV-VLPs)，EBOV-VLPs 在巨噬细胞的吞噬作用和网格蛋白的内吞作用进入细胞^[72]。埃博拉病毒进入受体细胞主要分为三个步骤(图 1-8)：(1)GP1 介导埃博拉病毒附着在宿主细胞膜上，C 型凝集素和巨噬细胞与 GP 1 糖帽区上的 N 端和 O 端连接的糖链相互作用使病毒附着；(2)巨噬细胞吞噬小泡被传送到宿主细胞的内体小泡，然后发生蛋白切割，EBOV GP1 和 GP2 在酸性条件下被内体 CaT L/B 切割(MARV GP1 的切割不依赖 CaT B)，GP1 的糖帽结构和粘蛋白结构域(MLD)，GP1 缩短至 20Kda 以下，Niemann-Pick C1 蛋白(一种小体、溶酶体蛋白，NPC1)与 GP 1 切割剩余片段相互作用。(3)NPC1 与被切割的 GP1 相互作用触发 GP2 的构象变化，无序的 HRR 重

新排列成 α -螺旋，向宿主膜靠近，疏水肽固定在宿主膜上，GP2 跨越宿主膜和病毒膜，形成“前发夹”的不稳定构象。膜融合发生时，GP2 的 N 端和 C 端发生折叠，形成六束螺旋结构，病毒膜和宿主膜发生脂质融合。融合孔被打开，核衣壳释放到宿主细胞质中，膜融合完成^[73]。

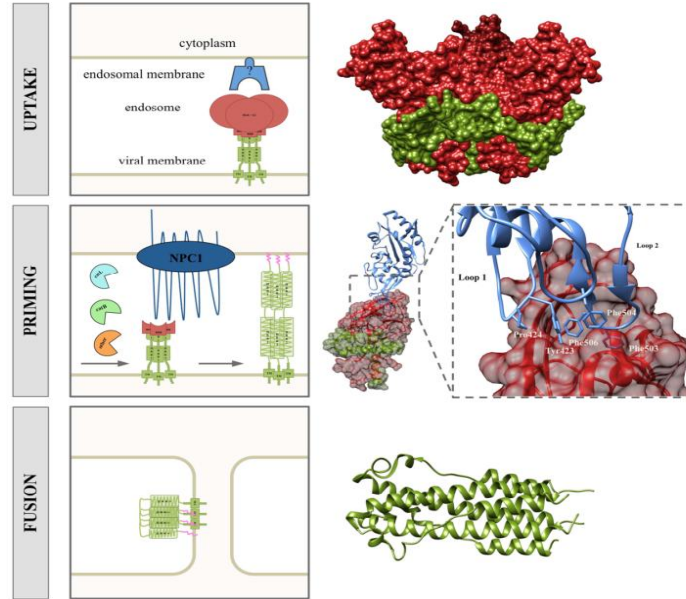
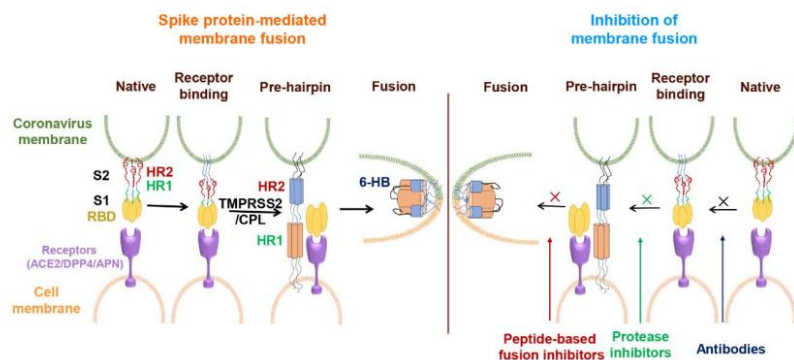


图 1-8 GP 介导的融合感染过程^[73]

1.3.2 SARS、新冠病毒的进入、感染机制

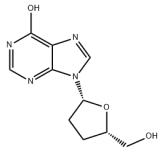
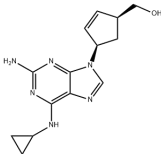
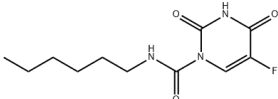
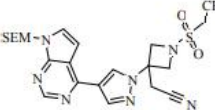
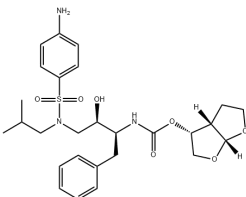
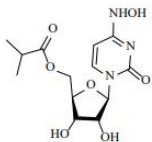
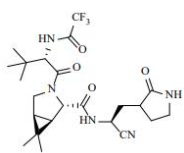
SARS-CoV、SARS-CoV-2 的进入、感染过程大致相似^[74]：(1)S 蛋白结合宿主受体之后，宿主细胞内的组织蛋白酶 CaT L/B、跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (TMPRSS2) 切割 S 蛋白，RBD 被激活的 S 蛋白经细胞内吞或与宿主细胞膜直接融合进入宿主胞内；(2)病毒颗粒核壳被降解，宿主内质网的 mRNA 翻译 N 蛋白、S 蛋白、E 蛋白、M 蛋白，导致受体细胞粗面内质网产生卷曲的膜结构(convoluted membrane, CM)，并形成许多有双层膜的囊泡(double membrane vesicles, DMV)，为病毒复制与转录提供场所；(3)S2 上的疏水 FP 插入宿主细胞膜，HR1 和 HR2 反向折叠形成六螺旋束，病毒与受体胞膜 ACE2 受体结合，使得病毒囊膜与内体膜相互靠拢发生膜融合，进而释放核衣壳或病毒基因组到细胞质中^[75](图 1-9)。在感染早期阶段会导致血液中的淋巴细胞异常呈低水平状态，造成宿主免疫缺陷。ACE2 病毒在气道、肾、心脏等部位表达感染，TMPRSS 主要表达在肺部^[76]。

图 1-9 S 蛋白介导的膜融合过程^[75]

1.4 病毒抑制剂的研宄进展

病毒抑制剂一般分为逆转录酶抑制剂、合成酶、蛋白酶、进入抑制剂等^[77]。埃博拉、马尔堡、SARS、新冠病毒抑制剂的研制思路主要参照 HIV 病毒思路,通过靶向病毒蛋白或与病毒蛋白发生相互作用的蛋白或酶来抑制病毒的进入、转录复制与释放过程^[78]。病毒 RNA 逆转录酶抑制剂能够抑制逆转录酶的活性,通过阻断病毒生命周期的早期阶段,达到降低病毒复制的目的。FDA 批准了阿巴卡韦、地达诺新(Dideoxyinosine)等的用于治疗 HIV 感染的 30 多种抗反转录病毒 (ARV) 药物上市^[79]。合成酶除参与蛋白质合成以外,合成酶还与 RNA 剪接、转录调控、翻译和细胞稳态等多种生理过程密切相关,并在控制炎症、血管生成、免疫应答和肿瘤发生等重要病理过程中发挥重要功能^[80]。近年来,以合成酶为靶点的抑制剂的研发取得了较大进展,目前已经有莫匹罗星(mupirocin)、他伐硼罗(Tavaborole)等多种合成酶抑制剂批准上市^[81]。蛋白酶抑制剂作用于病毒蛋白酶,可以阻断病毒蛋白酶的修饰功能。蛋白酶一直是抗病毒药物研究领域的重要靶点,TMPRSS2(跨膜蛋白酶丝氨酸 2)还可以促进 MERS-CoV 通过内吞途径进入靶细胞^[82]。最近的一项研究表明,SARS-CoV-2 利用 TMPRSS2 激活 S 蛋白,蛋白酶抑制剂可以抑制假病毒入侵^[83]。目前针对冠状病毒、HIV 病毒、寨卡病毒、乙型肝炎等病毒的蛋白酶抑制剂的研究均已获得较大进展,且有一些药物已经获批上市,如卡莫氟(Carmofur, 作用于新冠病毒)和地瑞那韦(Darunavir, 作用于 HIV)等^[84]。2020 年 11 月 22 日,礼来(Eli Lilly and Company)研发的 JAK(一种酪氨酸酶)抑制剂巴瑞替尼(Baricitinib)获批上市,该抑制剂具有较高的活性($IC_{50}=5.7\sim 70$ nM)^[85]。默克的 Molnupiravir(莫匹努韦)及辉瑞的 Paxlovid(帕罗韦德)已于近期获批用于新冠病毒感染治疗,Paxlovid 是蛋白酶抑制剂,通过抑制 M 蛋白而起抗病毒作用^[92,93]。

表 1-1 几种典型的病毒逆转录酶、合成酶、蛋白酶抑制剂 [81-93]

抑制剂名称	结构式	种类	抑制病毒类型及活性 (IC ₅₀ , nM)
地达诺新 (Dideoxyinosine)		逆转录酶抑制剂	HIV, 40
阿巴卡韦 (Abacavir)		逆转录酶抑制剂	HIV, 260
卡莫氟 (Carmofur)		蛋白酶抑制剂	SARS-CoV -2, ND
巴瑞替尼 (Baricitinib)		蛋白酶抑制剂	SARS-CoV -2, 5.7~70
地瑞那韦 (Darunavir)		蛋白酶抑制剂	HIV, 4.5
莫匹努韦 (Molnupiravir)		蛋白酶抑制剂	SARS-CoV -2, 56~99
帕罗韦德 (Paxlovid)		蛋白酶抑制剂	SARS-CoV -2, 17.9

1.4.1 进入抑制剂

进入抑制剂可以抑制病毒和细胞膜或内体发生融合,按照作用机制可分为包膜糖蛋白 GP 或刺突蛋白(S)的抑制剂、靶向受体的抑制剂和靶向辅助蛋白的抑制剂。包膜糖蛋白 GP 或刺突蛋白(S)进入抑制剂可分为蛋白质多肽抑制剂和小分子抑制剂^[94]。埃博拉、马尔堡、SARS、新冠病毒的主要多肽抑制剂见表 1, 分别与 HR1 或 RBD 结合。新冠病毒以 RBD 为靶点的抑制剂是基于 ACE2 设计或者从头合成,合成了融合多肽 SBP1、AHB1、AHB2 等及从头合成的多肽抑制剂 LCB3 和 LCB3^[95]。阻断新冠病毒融合的多肽抑制剂是通过合成 HR2 片段并修饰得到的,基于 HCoV-OC43 HR2 发现了抑制剂 EK1、HR2P、EK1C4、IPB02、IPB01。小分子抑制剂通过抑制组织蛋白酶对 GP1(或者 S1、S2)的切割抑制病毒与靶细胞膜融合的过程^[96]。活性较高的冠状病毒小分子抑制剂主要包括萘及硫嘌呤衍生物、锌络合物抑制剂等^[97]。目前有多种小分子抑制剂获批上市,如 Ebselen、原花青素等(表 1-2)^[98]。2003 年 SARS 冠状病毒爆发后,人们发现了不少的 Cat L 抑制剂^[104], CatL 抑制剂能有效地影响 HCoV-OC43 和 HCoV-229E 进入靶细胞,在 0.1 mM 的浓度下抑制率为 99%^[105]。此外,同时使用 Cat(组织蛋白酶)L 抑制剂 E-64D 和丝氨酸蛋白酶抑制剂 camostat 强烈抑制 SARS-CoV 在气道上皮细胞 Calu-3 等^[106]。Cat L 抑制剂 K777 强烈抑制组织蛋白酶介导的病毒粒子进入细胞,可作为广谱抗病毒药物^[107],目前已进入临床试验, Cat L/B 是 EBOV、MARV、SARS-CoV、SARS-CoV-2 抑制剂的共同靶点。

表 1-2 作用于 SARS、SARS-CoV-2、EBOV、MARV 典型的融合多肽抑制剂氨基酸序列及活性

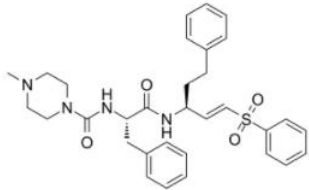
病毒类型	名称	氨基酸序列	IC ₅₀ (nM)	参考 文献
SARS-CoV-2	AHB1	DEDLEELERLYRKAEEVAKEAKDASRR GDDERAKEQMERAMRLFDQVFELAQEL QEKQTDGNRQKATHLDKAV KEAADELYQRVRELEEQVMHVLDQVSE LAHELLHKLTGEELERAAYFNWWATEM MLELIKSDDEREIREIEEEAR	35	95
	AHB2	DEDLEELERLYRKAEEVAKEAKDASRR GDDERAKEQMERAMRLFDQVFELAQEL	15.5	

		QKQTDGNRQKATHLDKAV		
		KEAADELYQRVRELEEQVMHVLDQVSE		
		LAHELLHKLGTGEELERAAYFNWWATEM		
		MLELIKSDDEREIREIEEEAR		
SARS-CoV-2	LCB1	DKEWILQKIYEIMRLLDELGHAEASMRV SDLIYEFMKKGDERLLEEAERLLEEVEE	23540	
SARS-CoV-2	LCB3	NDDELHMLMTDLVYEALHFAKDEEIKK RVFQLFELADKAYKNNDRQKLEKVVEE LKELLERLLS	48100	
SARS-CoV-2	EK1	SLDQINVTFLDLEYEMKKLEEAIKKLEES YIDLKEL	2380	96
SARS-CoV-2	HR2P	DISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNES LIDLQEL	98	
SARS-CoV-2、SARS	EK1C4	SLDQINVTFLDLEYEMKKLEEAIKKLEES YIDLKELGSGSGPEGGGG-Chol	15.8	97
SARS-CoV-2	IPB01	ISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLI DLQEL	251	
SARS-CoV-2	IPB02	ISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLI DLQEL-Chol	80	98
MARV	MP	IGIEDLSRNISEQIDQIKKDEQKEGTG	32670	99
EBOV	EBOV-7	LRQLANETTQALQLFLRATTELRTFSILN RKAIDFLLQR	1900	100

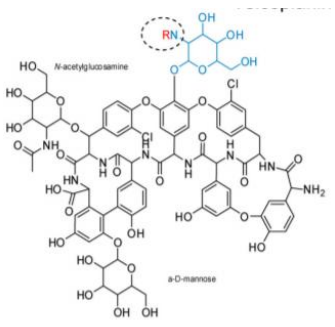
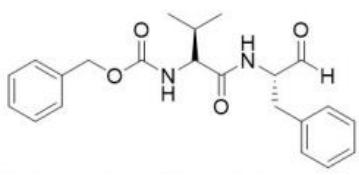
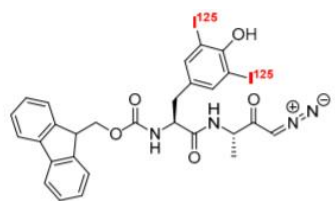
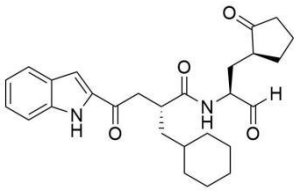
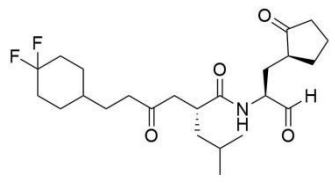
续表 1-2 作用于 SARS、SARS-CoV-2、EBOV、MARV 典型的融合多肽抑制剂氨基酸序列及活性

病毒类型	名称	氨基酸序列	IC ₅₀ (nM)	参考文献
VSV	GP610	IEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDK	170000 0	本实 验室
VSV	1-Chol	C(Chol)KKKKGSGIEPHDWTKNITDKIDQIIHDFVDK	40000	本实 验室
EBOV	EBOV-7	IEPHDWTKNIKDKIDKIIHDFVDKTLPDQ G-C(PEG12-Chol)	1900	本实 验室
HIV	15	AKLIHDWTKKITDDIDEIIHKFVDKTLHK QGDNDWW	220	本实 验室

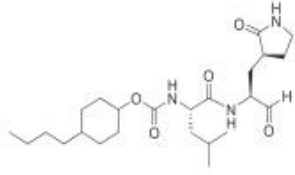
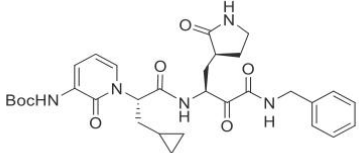
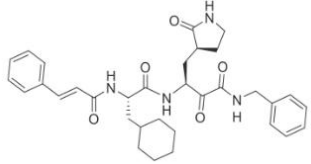
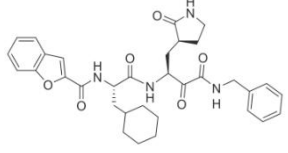
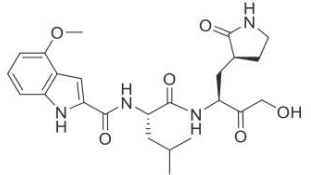
表 1-3 典型性的 Cat L 抑制剂的结构及活性

名称	抑制剂结构	IC ₅₀ (nM)	参考文献
K777		0.68 (SARS-CoV)	101
		1.48 (HCoV-229E)	
		6.78 (HCoV-NL63)	
		46.12 (MERS-CoV)	
		ND (SARS-CoV-2)	

续表 1-3 典型性的 Cat L 抑制剂的结构及活性

名称	抑制剂结构	IC ₅₀ (nM)	参考文献
Teicoplanin		630 (MERS-CoV) 3760 (SARS-CoV) 1660 (SARS-CoV-2)	102
Cathepsin LIII inhibitor		IC ₉₅ =350 (HIV(SARS-CoV S)) IC ₉₅ >200000(HIV(VSV-G))	103
P4		Ki (M ⁻¹ S ⁻¹) 60900	104
Cpd 11a		0.21(n=2) (SARS-CoV-2 3CLpro)	107
6j		<0.5(n=2) (SARS-CoV-2 3CLpro)	108

续表 1-3 典型性的 Cat L 抑制剂的结构及活性

名称	抑制剂结构	IC ₅₀ (nM)	参考文献
6e		<0.5(n=2) (SARS-CoV-2 3CLpro)	109
Cpd 13b		291(n=2) (SARS-CoV-2 3CLpro)	110
Cpd 11r		<0.5(n=2) (SARS-CoV-2 3CLpro)	111
A9		<0.5(n=2) (SARS-CoV-2 3CLpro)	112
PF-231		146(n=13) (SARS-CoV-2 3CLpro)	113

1.5 本论文的研究思路、主要内容和创新点

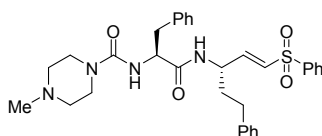
1.5.1 本论文的研究思路

前期本课题开展了抗 HIV 融合多肽、CCR5 抑制剂以及抗埃博拉(Ebola)、马尔堡病(Marburg)病毒融合抑制剂研究。在 HIV 融合抑制剂研究中,发现 HIV GP40 的 CHR 区域中 Trp628 前的序列对抗 HIV 的活性十分重要,不包含 Trp628 前序列的 CP628-654 基本无活性(> 4000 nM),而 CP621-652 的 IC₅₀ 达 22 nM^[114]。以此发现为基础,设计合成了 20 条多肽,并由美国纽约血液研究中心 LFK 研究所进行抑制真病毒的活性实验,从中筛选出活性很强的 30 肽及 32 肽(CP32M),其 IC₅₀ 仅为 4.3 nM,对 T-20、C34 病毒株也非常有效,对一些耐药株的 IC₅₀ 达 pM 级,该工作发表在 2008 年的国际著名期刊美国科学院院刊上^[115]。发现托烷类及链状哌啶类衍生物有强烈的抗 HIV 活性^[116]以及 CCR5 及 CXCR4 双功能小分子抑制剂具有较好的抗 HIV 活性。在埃博拉及马尔堡融合抑制剂中,设计合成了 30 个埃博拉及马尔堡病毒病毒 C 肽及突变体,发现 13 个 GP610 突变体的抑制活性较 GP610 提高 1~57 倍。目前针对 SARS、EboV、MarV、新冠病毒(2019-nCoV)的单一融合多肽抑制剂的活性不高,主要原因是病毒进入采用内吞途径,单一的融合抑制剂难以有效与 GP 蛋白作用。本课题对前期合成的高活性融合多肽抑制剂连接组织蛋白酶(CatL)抑制剂形成融合多肽-组织蛋白酶抑制剂的双靶点抑制剂,以提高抗病毒活性。

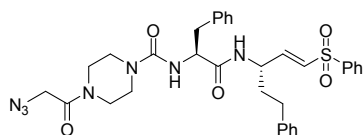
1.5.2 本论文的主要内容

为促进 EboV、MarV、SARS、SARS-CoV-2 融合多肽抑制剂进入细胞并提高抑制活性,本论文选择文献报道的及我们发现的对 EboV、MarV、SARS、SARS-CoV-2 高活性融合多肽抑制剂,在其 C-端用含炔基的赖氨酸进行修饰,再合成叠氮乙酸修饰的高活性组织蛋白酶抑制剂(Cat L)K777 衍生物,然后应用点击反应对二者进行偶联,形成 GP-Cat L 双靶点抑制剂。为比较双靶点抑制剂的反应活性及机制,合成了高活性融合多肽抑制剂阳性肽 CHR 肽、NHR 肽及 Cat LK777。

(1)阳性化合物 Cat L 抑制剂 K777 的合成

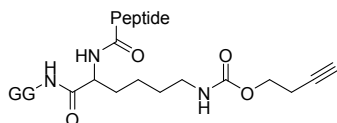


(2)含叠氮乙酰基 K777 衍生物的合成

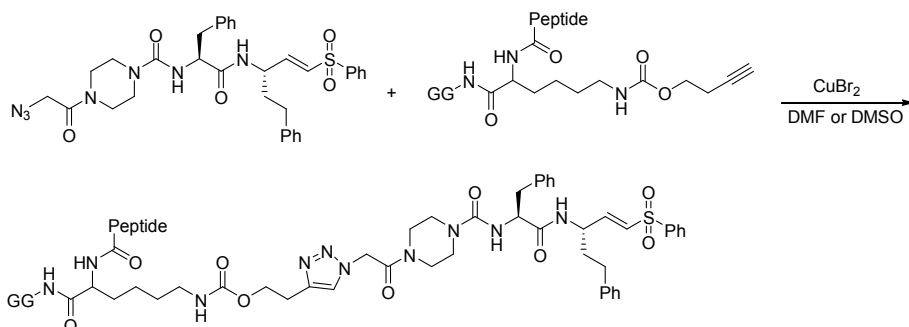


(3)EboV、MarV、SARS、SARS-CoV-2 融合抑制剂、含炔基融合抑制剂及对应 NHR 肽的合成

用固相合成方法合成文献报道的及本实验室发现的埃博拉、马尔堡、SARS、新冠病毒融合抑制剂，并合成其 C 端含有炔基的赖氨酸修饰肽。



(4)融合多肽-组织蛋白酶抑制剂双靶点抑制剂的合成



此处 peptide 包含 EboV、MarV、SARS、SARS-CoV-2 融合抑制剂

1.5.3 本论文的创新点

单一的融合多肽抑制剂或小分子抑制剂对埃博拉、马尔堡、SARS、新冠病毒具有一定的抗病毒作用，但这些病毒主要通过内吞进入胞内，抑制剂不易与病毒的 GP 蛋白或刺突蛋白作用。在 2019 新冠病毒爆发之前就有科学家猜测 Cal L 抑制剂阿比多尔可以通过改变体内 pH 来抑制 Cat L 的酶活性($EC_{50}=4.11 \mu\text{M}$),其疗效不佳。Cat L 抑制剂虽对 SARS 等病毒活性高，但对 SARS-CoV-2 抑制作用还不佳^[117]。目前针对 HIV 已出现膜蛋白-CCR5 双靶点抑制剂^[118]或作用于 CCR5 及 CXCR4 的双功能抑制剂^[119]。但无还没有针对埃博拉、马尔堡、SARS、新冠病毒双靶点抑制剂的报道。为寻求更有效的抗病毒抑制剂，本论文设计同时作用于组织蛋白酶和融合多肽的双功能抑制剂，以达到更好的抗病毒活性。

第 2 章 组织蛋白酶 L 抑制剂 K777 及其含叠氮衍生物的合成

组织蛋白酶 L(Cat L)抑制剂 K777(也称为 K11777)1995 年由美国 Khepri 制药公司研发, 最开始的研发目的是用于 Chagas disease(美洲锥虫病)治疗^[120], 目前其用于埃博拉治疗处于临床试验阶段^[121]。K777 可抑制 CYP3A4 及 CCR4 受体^[122,123], 也可以抑制多种病毒感染(见表 2-1), 且活性高^[124]。K777 对人体组织蛋白酶有较强的抑制作用(VeroE6($EC_{50}<74$ nM)、HeLa/ACE2(4 nM)Caco-2($EC_{90}=4.3$ μ M)和 A549/ACE2(<80 nM))^[125], 也能降低几种宿主细胞中 SARS-CoV-2 病毒的活性, K777 对宿主细胞毒性很低, 是有开发潜力的广谱抗病毒化合物。为比较融合多肽-Cat L 抑制剂 K777 双靶点抑制剂的活性及作用机理, 本论文合成该阳性化合物。本论文参照了文献的合成路线, 综合原料易得程度、反应条件、合成效率等因素^[126,127], 选择反应条件更为简单、成本较低、反应效率较高的反应路线一(图 2-1), 并且对于关键化合物 4 的合成路线加以改进(图 2-2), 产率得到提高, 反应条件更易控制。

表 2-1 K777 的对病毒的抑制作用^[124]

病毒名称	作用靶点	抑制效率(IC_{50} , nM)
SARS-CoV	293T-ACE2	0.68±0.09
MERS-CoV	Vero	46.12±6.63
Zaireebolavirus(EBOV)	293T	0.87±0.06
Marburg(MARV)	293T	1.90±0.16
HCoV-229E	293T-CD13	1.48±0.13

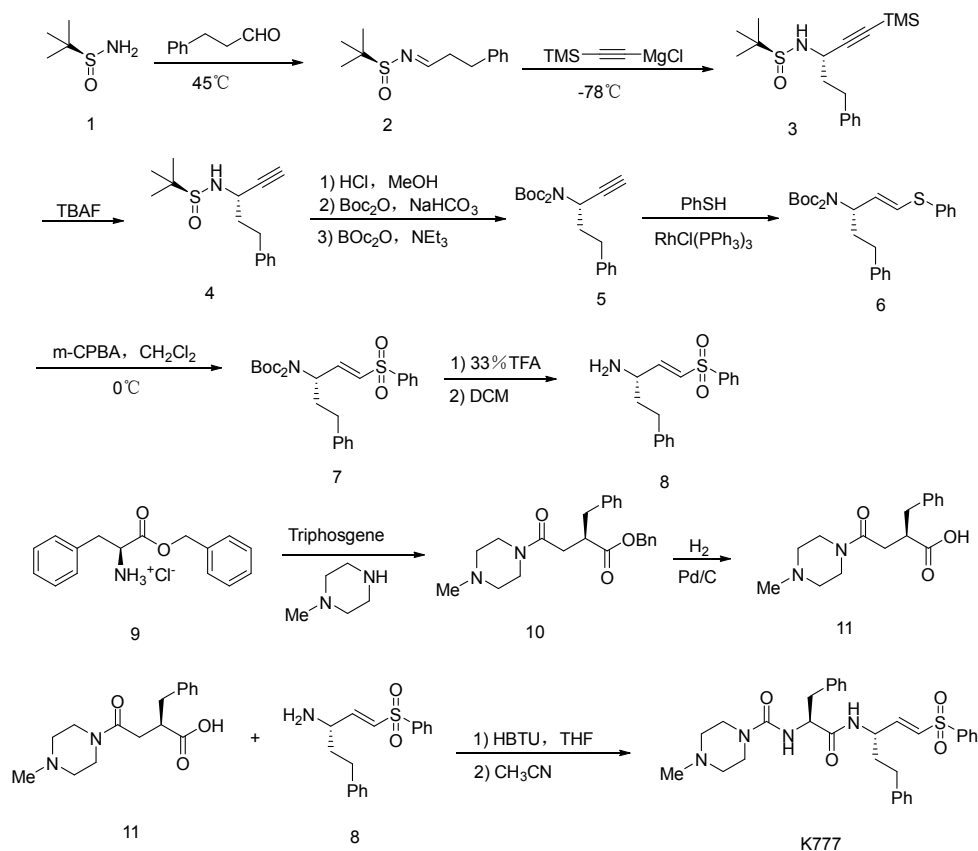


图 2-1 K777 的合成路线一 [126]

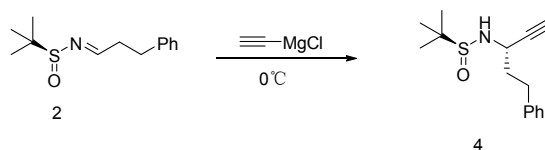


图 2-2 中间体 4 的合成改进

Cat L 抑制剂 K777 的结构活性研究表明，其左边的哌嗪的修饰对活性影响较小^[122,123]，故本论文在 K777 左边的哌嗪处进行叠氮乙酸修饰，以接入多肽。该衍生物的设计了三条合成路线(图 2-3~5)。路线 1 中，先合成含 Fmoc 保护基的中体 14，然后与中间体 8，缩合获得含 Fmoc 的 K777 中间体，目前已合成中间体 16，后发现该中间体脱除 Fmoc 后，分离较困难。然后我们探索了路线 2，合成了含 Boc 保护基的中间体 18，然后与叠氮乙酸缩合形成中间体 19，但在衍生物的合成过程中易产生较多副产物。最后经过探索，设计出了路线 3，采用含 Boc 保护基的中间体 18 与右边乙烯砜中间体缩合，脱除 Boc 基后再与叠氮乙酸缩合，该反应路程较短，且各步反应条件易控制。

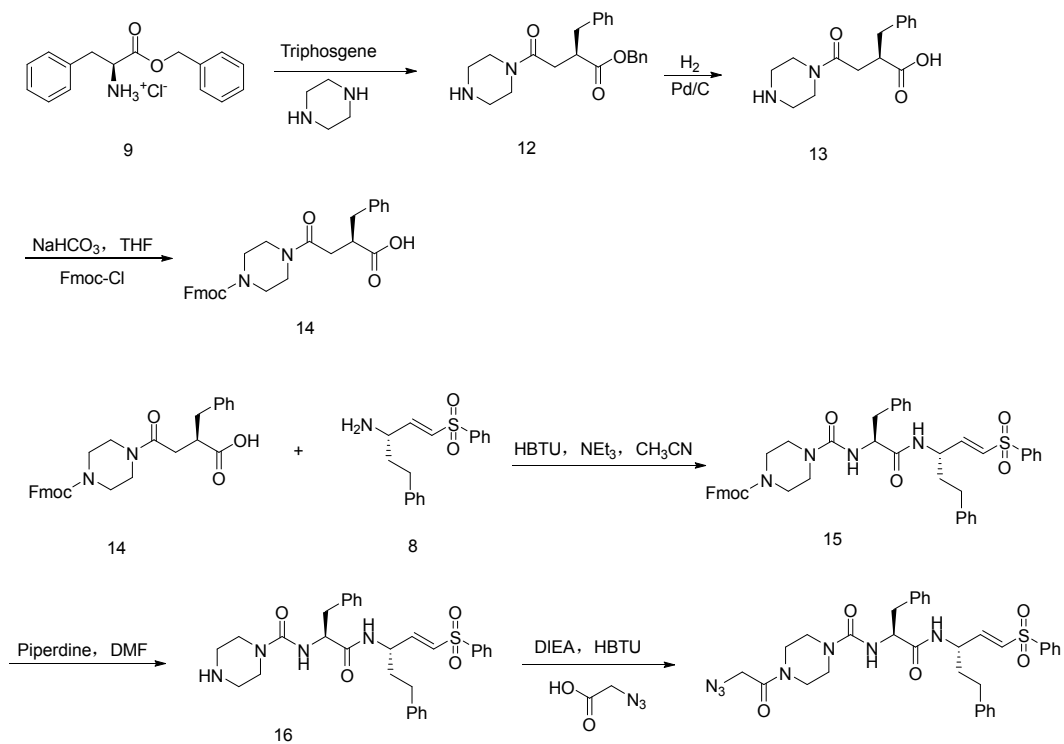


图 2-3 含叠氮乙酰 K777 衍生物的合成路线 1

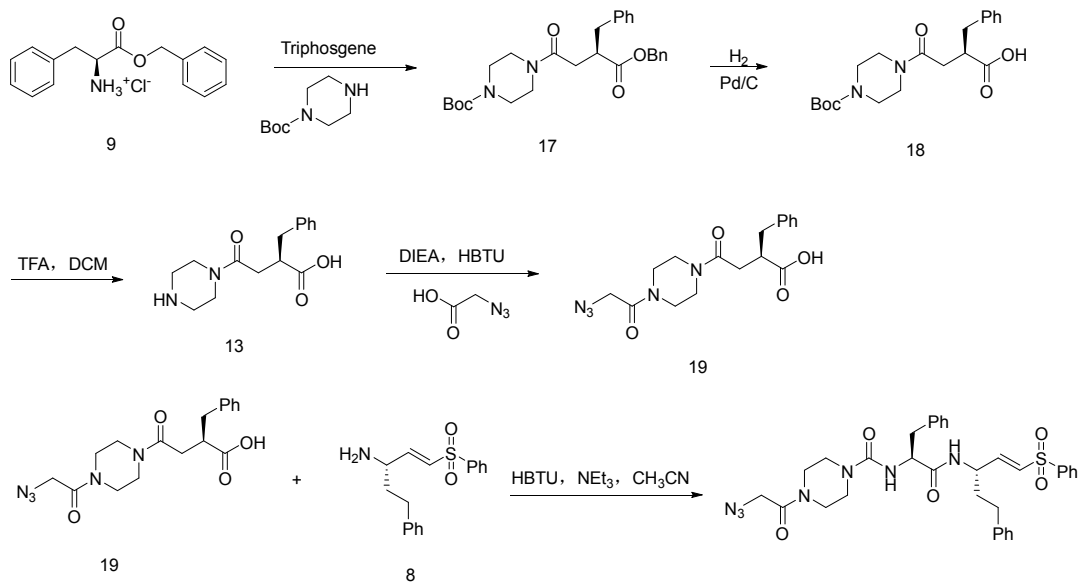


图 2-4 含叠氮 K777 衍生物的合成路线 2

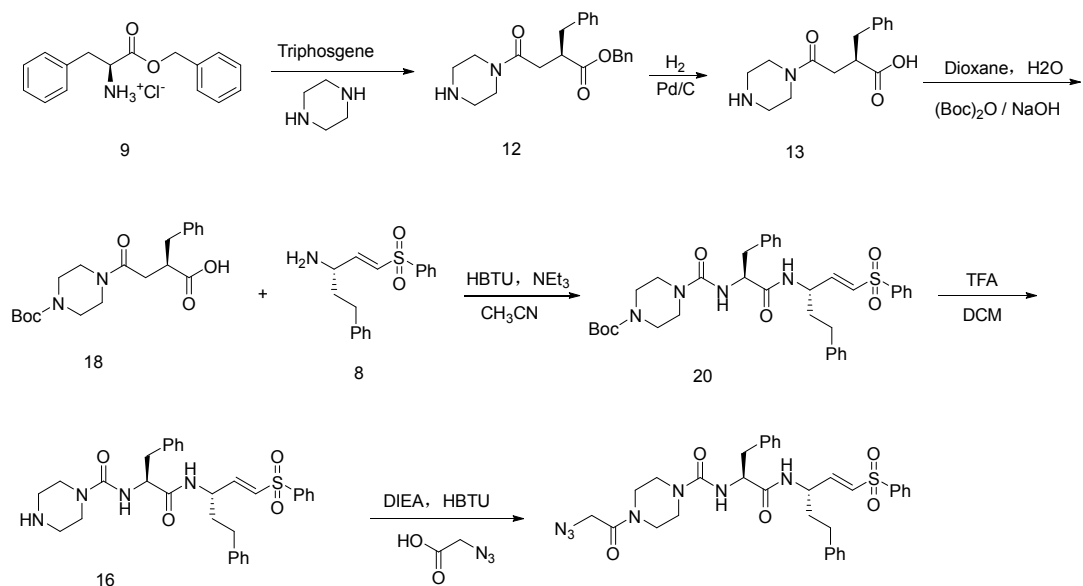


图 2-5 含叠氮乙酰 K777 衍生物的合成路线 3

2.1 实验所需试剂、药品和仪器

2.1.1 实验所需试剂

表 2-2 实验所需试剂

试剂名称	公司
叔丁基苯磺酰胺(纯度≥98%)	北京乐研科技有限公司
苯丙醛(Phenylpropyl aldehyde, 纯度≥98%)	北京伊诺凯科技有限公司
乙炔基氯化镁(0.5 M in THF)	北京伊诺凯科技有限公司
2-(7-氮杂苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HATU)	阿拉丁生化科技有限公司
二碳酸二叔丁酯((Boc) ₂ O)(纯度≥99%)	北京伊诺凯科技有限公司
苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯(HBTU)	吉尔生化有限公司
哌嗪(AR)	伊诺凯科技有限公司
N-甲基哌嗪(AR)	伊诺凯科技有限公司

续表 2-2 实验所需试剂

试剂名称	公司
L-苯丙氨酸苄酯盐酸盐	Ark Pharm
哌嗪(AR)	伊诺凯科技有限公司
三甲基硅基乙炔氯化镁(AR)	盘锦研峰科技有限公司
芴甲氧羰酰氯(Fmoc-Cl)(AR)	伊诺凯科技有限公司
浓硫酸(98%)(AR)	国药集团
浓硝酸(AR)	国药集团
无水乙醇(EtOH)(AR)	国药集团
无水甲醇(MeOH)(AR)	国药集团
无水乙醚(AR)	国药集团
四氢呋喃(THF)(AR)	国药集团
三乙胺(AR)	国药集团
无水硫酸钠(AR)	国药集团
无水氯化钙(AR)	国药集团
乙酸(AR)	国药集团
吡啶(AR)	国药集团
N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(AR)	国药集团
碳酸氢钠(NaHCO ₃)(AR)	国药集团
苯胺(AR)	国药集团
氢氧化钠(NaOH)(AR)	国药集团
亚硝酸钠(AR)	国药集团
无水碳酸钠(Na ₂ CO ₃)(AR)	国药集团
Fmoc-赖氨酸(Fmoc-Lys-OH)(AR)	Ark Pharm
浓盐酸(36-38%)	国药集团

续表 2-2 实验所需试剂

试剂名称	公司
哌啶(AR)	国药集团
石油醚(PE)(AR)	国药集团
氯化钠(AR)	西陇科学
无水硫酸镁(AR)	国药集团
二氯甲烷(DCM)(AR)	国药集团
乙酸乙酯(EA)(AR)	国药集团
Fmoc-Phe-OSu(AR)	北京乐研科技有限公司
3-丁炔-1-醇(But-3-yn-1-ol)(AR)	东京化成工业株式会社
三光气(AR)	阿拉丁生化科技股份有限公司
分子筛	北京伊诺凯科技有限公司
Boc-哌嗪	阿拉丁生化科技股份有限公司
Fmoc-Phe-Wang Resin 树脂	Advanced ChemTech 公司
1-羟基苯并三唑(HOBT)	上海吉尔生化有限公司
三氟乙酸(TFA)	北京偶合科技有限公司
N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)	北京偶合科技有限公司
N, N-二异丙基乙胺(DIEA)	北京博迈杰科技有限公司
四丁基氟化铵(TBAF)(AR)	北京伊诺凯科技有限公司
三(三苯基膦)氯化铯	北京伊诺凯科技有限公司
间氯过氧苯甲酸(m-CPBA)(纯度≥85%)	阿拉丁生化科技股份有限公司

2.1.2 实验所需主要仪器设备

表 2-3 实验所需仪器

仪器名称	生产厂家
旋转蒸发仪	EYELA 东京理化器械株式会社

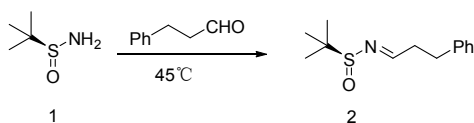
续表 2-3 实验所需仪器

仪器名称	生产厂家
玻璃仪器烘干机	中国长城科工贸有限公司
超导核磁共振仪	日本株式会社
高效液相质谱联用仪	岛津 Shimadzu
高效液相色谱仪	美国安捷伦
电子天平	瑞士 Mettler toledo
手提紫外分析仪	北京六一仪器厂
远红外线干燥箱	北京兴争仪器设备厂
旋转蒸发器	瑞士 BUCHI
熔点仪	天津分析仪器厂
电喷雾质谱仪	美国 AB 公司
型低温恒温反应槽	EYELA 东京理化器械株式会社
真空样品干燥箱	EYELA 东京理化器械株式会社
高压反应釜	常州亚旺仪器有限公司

2.2 阳性化合物 K777 的合成

阳性化合物 K777 的合成参照合成路线一的方法并改进合成, 各化合物或中间体代号见合成路线设计。

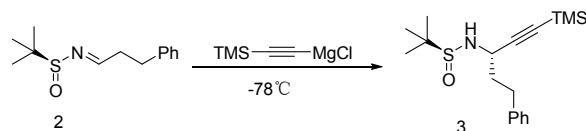
2.2.1 中间体 2 的合成



叔丁基磺酰胺(**1**)(15 g, 123 mmol)溶于 20 mL 甲苯中, 预热至 45°C, 依次加入 33.6 g KHSO₄(247 mmol)、苯丙醛 33 mL(247 mmol), 45°C 反应 24 h, TLC 检测反应原料基本反应完全(展开剂: 乙酸乙酯: 石油醚=1:2 R_f=0.6)。冷却至室温, 过滤 KHSO₄, 旋蒸甲苯, 经硅胶柱纯化得到淡黄色液体 **2**(27g, 113 mmol)产率 92%。为合成目标产物, 该实验重复多次。¹H NMR (400 MHz, CH₂Cl₂)

oroform-d) δ 8.12 (t, 1H), 7.29 (m, 5.7 Hz, 6H), 2.97 (m, 5H), 1.13 (s, 9H). (ESI-TOF) m/z: $[M+H]^+$ Calcd for $C_{13}H_{19}NOS$: 238.13; Found: 238.14.

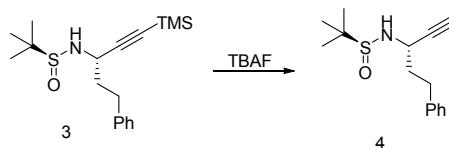
2.2.2 中间体 3 的合成



中间体 **2** (16.1g, 67.9 mmol) 溶于含 100 mL 超干四氢呋喃溶液的三颈瓶中，氮气除去瓶内空气并密封，用液氮-干冰将反应温度降至 -78°C ，用注射器向上述反应液中注射三(三苯基膦)氯化铈(1 M in THF, 200 mL)， -78°C 反应 2 h，再室温反应过夜，反应全程使用氮气保护。反应完成后在冰浴下用饱和氯化铵溶液(50 mL)淬灭反应。用乙酸乙酯萃取(8×40 mL)，无水硫酸钠+无水硫酸镁干燥，旋蒸，硅胶柱层析(展开剂：石油醚：乙酸乙酯=3:1 $R_f=0.3$)得亮黄色液体 **3** (11g, 32.6 mmol)，产率 48%。 ^1H NMR (400MHz, Chloroform-d) δ 7.29 (d, 2H), 7.19 (m, 4H), 4.12 - 4.04(m, 1H), 3.48 (d, 1H), 3.02 - 2.84(m, 1H), 2.80 (m, 2 H), 2.03(m, 2H), 1.21 (s, 9H), 0.19 (s, 9H). (ESI-TOF) m/z: $[M+H]^+$ Calcd for $C_{18}H_{29}NOSSi$: 335.17; Found: 335.21.

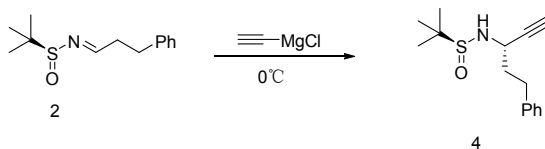
2.2.3 中间体 4 的合成

方法一：



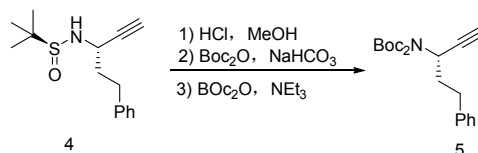
中间体 **3** (4.113 g, 12.26 mmol) 溶于 15 mL 四氢呋喃溶解，冷却至 0°C ，5 min 之内加入四丁基氟化铵(TBAF)(14.7 mL, 14.7 mmol)，溶液由黄变红，室温搅拌 30 min，TLC 点板显示原料点全部消失(展开剂：乙酸乙酯：石油醚=1:3 $R_f=0.4$)，30 mL 水淬灭反应，用乙酸乙酯萃取(4×40 mL)，无水硫酸钠+无水硫酸镁干燥，旋蒸除去乙酸乙酯，经硅胶柱层析得淡黄色油状液体 **4** (2.42 g, 9.2 mmol)，产率 75%。 ^1H NMR (400MHz, Chloroform-d) δ 7.32- 7.27(m, 2H), 7.23 - 7.17 (m, 3H), 4.04 (m, 1H), 3.40(d, 1H), 2.87 - 2.71(m,2H), 2.51 - 2.44 (m, 1H), 2.10 - 1.99 (m, 2H), 1.21 (d, 9H). (ESI-TOF) m/z: $[M+H]^+$ Calcd for $C_{15}H_{21}NOS$: 264.14; found: 264.17.

方法二：



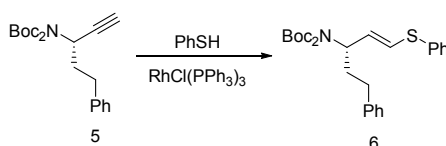
乙炔基氯化镁溶液(0.5 M in THF, 50 mL)加至 250 mL 三颈烧瓶中, 冷却至 0°C, N₂ 保护, 将溶有中间体 **2**(1.19 g, 5 mmol)的超干 THF(10 mL), 通过注射器加入上述体系中, 0°C 反应 4h 再室温反应 12 h, TLC 点板显示原料(展开剂: 乙酸乙酯: 石油醚=1:2, R_f=0.5)化合物 **7** 已反应完全, 饱和氯化铵溶液(50 mL)淬灭反应(0 °C, 5 min), 溶液分层, 乙酸乙酯(60 mL×5)萃取, 无水硫酸钠+无水硫酸镁干燥酯层, 过滤, 旋蒸, 硅胶柱层析得到淡黄色油状液体 **4**(0.92 g, 3.6 mmol), 产率 72%。

2.2.4 中间体 **5** 的合成



在 100 mL 圆底烧瓶中加入中间体 **4**(2g, 7.57 mmol)、甲醇(30 mL), 室温搅拌 30 min, 旋去甲醇, 加入 70 mL 二氯甲烷使其溶解, 再加入 NaHCO₃(1.27 g, 15.14 mmol)、Boc₂O(2.48 g, 11.35 mmol), 室温搅拌过夜, 再经 TLC 点板观察原料基本反应完全(展开剂: 乙酸乙酯: 石油醚=3:1), 过滤瓶中沉淀再旋蒸掉溶剂, 25 mL 乙腈溶解旋蒸产物, 加入 4-二甲氨基吡啶(DMAP)(0.37 g, 3 mmol)、Et₃N(1 mL)、Boc₂O(2.48 g, 11.35 mmol), 室温搅拌过夜, TLC 点板显示反应基本完全(展开剂: 乙酸乙酯: 石油醚=12:1, R_f = 0.7)。旋蒸除去溶剂, 硅胶柱层析得到白色固体 **5**(2 g, 5.3 mmol), 产率 70%。¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.29 (d, 3H), 7.18 (s, 2H), 5.02 (m, 1H), 2.77 (m, 1H), 2.65 (m, 1H), 2.39 - 2.25 (m, 2H), 2.16 (m, 1H), 1.50 (s, 18H) (ESI-TOF) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₂₁H₂₉NO₄:359.21; Found:359.21.

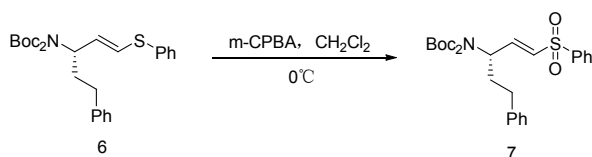
2.2.5 中间体 **6** 的合成



在被锡箔纸包裹的 10 mL 圆底烧瓶中加入催化剂 RhCl(PPh₃)₃(0.331g, 3

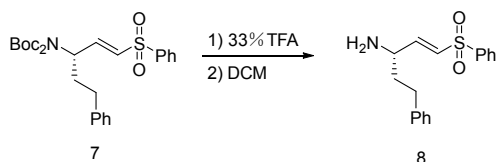
moL%), 再加入苯硫酚(1.3 mL, 12.2 mmol), 盖上橡胶塞, 向瓶内通入 N₂。再将中间体 **5**(4 g, 11.0 mmol)的二氯乙烷(2 mL)溶液注射至苯硫酚溶液中, 室温搅拌 24 h, TCL 点板检测显示原料化合物 **5** 已基本反应完全(展开剂: 乙酸乙酯: 石油醚=1:12, R_f=0.4), 旋去溶剂, 由红棕色变为黑棕色, 硅胶柱层析纯化后得无色液体 **6**(4.3 g, 8.4 mmol)产率 76%。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.37 - 7.18 (m, 10H), 6.39 (d, 1H), 6.08 (m, 1H), 4.79 (m, 1H), 2.65 (t, 2H), 2.28 - 2.17 (m, 1H), 2.16 - 2.00 (m, 1H), 1.50 (s, 18H). [M+H]⁺ m/z: Calcd for C₂₇H₃₅NO₄S: 469.23. Found: 469.23.

2.2.6 中间体 **7** 的合成



在 100 mL 圆底烧瓶中加入中间体 **6**(3.2 g, 6.8 mmol), 再加入 48 mL 二氯甲烷溶解, 冷却至 0 °C。溶有 77% 间氯过氧苯甲酸(m-CPBA)(3.36 g, 1.50 mmol)二氯甲烷(5 mL)溶液加入上述反应体系中, 0°C 搅拌 3 h, TCL 点板检测显示反应基本完全(展开剂: 乙酸乙酯: 石油醚=1:5, R_f=0.5)。将 10% NaHSO₃ 溶液和饱和 NaHCO₃ 溶液(40 mL)混合溶液加入反应体系中, 0°C 搅拌 5 min, 淬灭反应, 此时放出了大量气泡。溶液分层后保留下层的有机溶液, 上层的水相用二氯甲烷(3×60 mL)萃取, 合并有机溶液之后用 Na₂SO₄+MgSO₄ 干燥, 过滤之后再经旋蒸、硅胶柱层析纯化得白色固体 **7**(2.7 g, 5.1 mmol), 产率 76%。¹H NMR (400 MHz; CDCl₃): δ 7.87 (dd, 2H), 7.63 - 7.58(m, 1H), 7.54 - 7.50 S. 9 (m, 2 H), 7.28 - 7.25 (m, 2H), 7.20 - 7.17 (m, 1H), 7.14 - 7.12 (m, 2H), 7.08 (m, 1H), 6.35 (m, 1H), 4.96 - 4.90 (m, 1H), 2.68-2.56 (m, 2H), 2.28 (m, 1H), 2.09 - 2.00 (m, 1H), 1.44 (s, 18H). [M+Na]⁺ m/z: Calcd for C₂₇H₃₅NO₆NaS: 524.20. Found: 524.22.

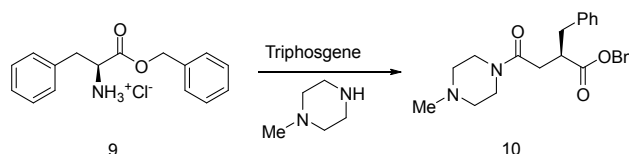
2.2.7 中间体 **8** 的合成



在 10 mL 圆底烧瓶中加入中间体 **7**(2.22 g, 4.42 mmol)、12 mL 33 % TFA/DCM 溶液, 0°C 搅拌 1.5 h, 反应完成后旋去剩余 TFA, 甲苯带尽剩余 TFA(1

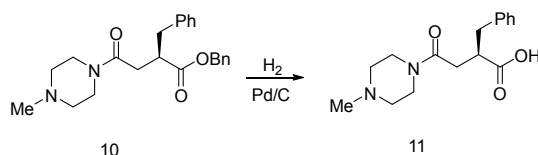
0 mL×3),经 NaHCO₃%洗涤(20 ml×3),旋去溶剂可得纯净的化合物 **8**(1.02 g, 3.8 mmol), 产率 86%。[M+H]⁺m/z: Calcd for C₁₇H₁₉NO₂S: 301.11. Found: 301.21.

2.2.8 中间体 **10** 的合成



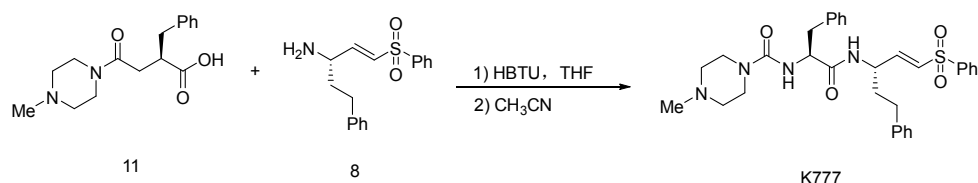
L-苯丙氨酸苄酯盐酸盐(**9**)(25.2 g, 86.3 mmol)加入二氯甲烷(200 mL)和饱和碳酸氢钠(200 mL)混合溶液中, 0℃搅拌 30 min, 溶液分层, 分离出有机相, 再用二氯甲烷萃取水相(4×60 mL), 合并有机相, 蒸馏水洗涤直至 pH 为中性。有机相用无水硫酸钠和无水硫酸镁干燥过夜, 过滤, 将滤液冷却至 0℃, 缓慢加入含 15 mL 超干二氯甲烷溶解的三光气(12.0 g, 40.6 mmol)溶液, 0℃搅拌 1h。再将 N-甲基哌嗪(9.40 g, 84.7 mmol)加入至上述有机溶液中, 过夜反应, TLC 检测原料基本反应完全(展开剂: 二氯甲烷: 甲醇=5:1, R_f=0.4), 硅胶柱层析得较纯化合物 **10**(26 g, 67.9 mmol), 产率 78.6%。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.41 - 7.34 (m, 3H), 7.31 (m, 2H), 7.24 - 7.19(m, 3H), 6.99(m,2H), 5.19 (d, 1H), 5.10 (d, 1H), 4.89 - 4.79 (m, 2H), 3.41 (s, 4H), 3.15 -3.06 (m, 2H), 2.43 (s, 4H), 2.35 (s, 3H)。[M+H]⁺ m/z: Calcd for C₂₂H₂₇N₃O₃:381.21. Found: 381.15.

2.2.9 中间体 **11** 的合成



中间体 **10**(18.57 g, 41.1 mmol)、乙酸乙酯(30 mL)及甲醇(29 mL)置于 100 mL 三颈烧瓶中, 加入 10%钯碳(4.74 g), 用氢气球向体系充氢气, 搅拌反应过夜。TLC 点板显示反应原料反应已完全(展开剂: 二氯甲烷: 甲醇=5:1 R_f=0.4)。催化剂通过 CELITETM 滤板过滤除去, 滤液经旋转蒸发浓缩, 得到白色固体 **11** (11 g, 37.0 mmol), 收率 90%。[M+H]⁺ m/z: Calcd for C₁₅H₂₁N₃O₃: 291.16. Found: 291.07.

2.2.10 阳性化合物 K777 的合成



在 10 mL 圆底烧瓶加入中间体 **8**(1.2, 4.4 mmol), 5 mL 乙腈溶解, 依次加入中间体 **11**(1.3 g, 4.3 mmol)、NEt₃(1.2 mL, 8.9 mmol)、HBTU(1.7 g, 4.4 mmol), 室温搅拌 1 h, 用饱和食盐水淬灭(0 °C), 溶液分层, 水层用乙酸乙酯萃取(6×60 mL), 合并有机相, 用 0.5 N HCl(40 mL)、5% Na₂CO₃(40 mL)、H₂O(40 mL×2)洗涤, 直至 pH≈7, 再用无水硫酸钠及硫酸镁过夜干燥, 过滤, 旋去溶剂后, 经硅胶柱层析纯化得透明液体 K777(1.4 g, 2.4 mmol), 产率 54.55%。¹HNMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.79 (d, 2H), 7.61 (t, 1H), 7.52 (t, 2H), 7.25 - 7.13 (m, 10H), 7.06 (d, 2H), 6.80 - 6.75 (m, 2H), 6.30 (d, 1H), 5.53 (s, 1H), 4.55 - 4.47 (m, 1H), 4.33 - 3.23 (m, 1H), 3.57 - 3.38 (m, 4H), 3.16 - 3.05 (m, 1H), 3.04 - 2.94 (m, 1H), 2.91 - 2.71 (m, 4H), 2.67 - 2.46 (m, 3H), 1.86 - 1.79 (m, 2H). [M+H]⁺ for C₃₂H₃₉N₄O₄S: 575.27. Found: 575.27.

2.3 阳性化合物 K777 合成讨论

2.3.1 中间体 **4** 的合成

文献中中间体 **4** 的合成分两步进行, 总转化率为 36%。第一步是中间体 **3** 在 -78 °C 超低温环境下和三甲基硅基乙炔氯化镁(2 M in THF, 20.4 mmol)反应引入炔基-TMS, 再通过 TBAF 除去 TMS, 此过程对低温环境要求严格, 反应过于缓慢, 且原料三甲基硅基乙炔氯化镁价格过高(市场价格约为 1500 RMB/50 mmol)。

设计出中间体 **4** 新的合成方法: 是将乙炔基氯化镁溶冷却至 0 °C, 通入 N₂ 保护, 中间体 **2** 严格干燥处理之后溶于超干 THF, 通过注射器进样。0 °C 反应 4h 再室温反应 12h, 通过饱和氯化铵溶液淬灭反应再通过乙酸乙酯萃取, 再经干燥、过滤、旋蒸过硅胶柱得到中间体 **4**。投料比: n 乙炔基氯化镁: n 中间体 **2** = 2:1 时, 且反应时间控制在 16h, 转化效率最高, 约为 72%(表 2-4)。

优点: 相比较原文献记载的方法, 此方法大大提高了中间体 **2** 的转化率(72%), 节约了成本, 简化了操作步骤减少了反应步骤, 且反应条件易于控制。

缺点: TMS 具有较高的光学选择性, 可能导致所合成的中间体 **4** 有部分消旋体产生。

表 2-4 中间体 4 转化率与反投料、反应时间的关系

时间(h)	投料比(乙炔基氯化镁:中间体 2)	
	2:1(eq)	3:1(eq)
12	40%	33%
14	68%	38%
16	72%	40%
18	56%	37%

2.3.2 中间体 10 的合成

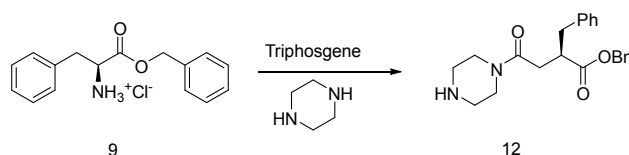
文献中 L-苯丙氨酸苄酯盐酸盐用溶解($\text{NaHCO}_3/\text{DCM}$)之后直接滴入光气饱和溶液, 经过试验发现, 直接将光气饱和溶液滴入, 瓶内瞬间出现白雾, 光气损失量过多, 导致反应收率降低。改进方法: L-苯丙氨酸苄酯盐酸盐溶解之后, 用 DCM 萃取水相, 干燥放置一晚, 再滴加光气饱和溶液进行, 收率有所提高(70% \rightarrow 78.6%)。

2.3.3 K777 合成中的其他注意事项

各项反应步骤的所用溶剂均需严格去水, 每步反应结束之后均需用 TLC 点板检测反应过程, 反应时间过短会导致转化率过低, 反应时间过长则会导致副反应的发生。K777 整个反应过程大多采用易挥发微毒或高毒的试剂作为溶剂或原料, 需要在通风柜中进行, 防火防爆, 并做好个人防护, 特别是合成中间体 2 和中间体 6 的反应, 甲苯和苯硫酚气体对人体有一定危害。

2.4 含叠氮乙酰 K777 衍生物合成所需的苯丙氨酸及乙烯砜衍生物中间体的合成

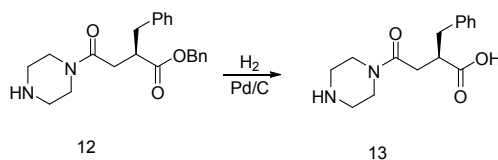
2.4.1 中间体 12 的合成



L-苯丙氨酸苄酯盐酸盐(9)(25.2 g, 86.3 mmol)、二氯甲烷(200 mL)及饱和碳酸氢钠(200 mL)加入 1L 三颈烧瓶中, 0°C 搅拌 30 min, 分液, 用二氯甲烷萃取

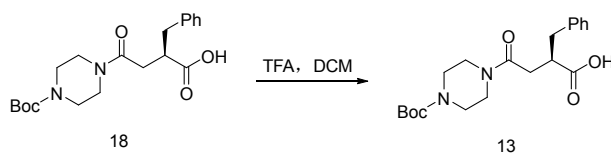
水相(4×80 mL), 合并有机相, 蒸馏水洗涤直至 pH 为中性。有机相用无水硫酸钠和无水硫酸镁干燥过夜, 过滤掉残渣。将上述所得溶液冷却至 0°C, 15 mL 超干二氯甲烷溶解的三光气(12.0 g, 40.6 mmol)溶液缓慢滴入, 0°C 搅拌 1h。另取一 250 mL 三颈烧瓶, 加入 150 mL 二氯甲烷、哌嗪(37.2 g, 431.5 mmol), 降温至 0°C, 搅拌 10 min, 用加样器将上述 L-苯丙氨酸酰氯溶液缓慢滴加至冷的哌嗪溶液中, 0°C 反应 1 h 之后再过夜反应, TLC 检测原料基本反应完全(展开剂: 二氯甲烷: 甲醇=10:1, $R_f=0.4$), 经过硅胶柱层析得到纯净产物 **12**(16.6 g, 45.2 mmol), 产率 52.4%。¹H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ 7.36 (q, 3H), 7.33 - 7.29 (m, 2H), 7.22 (p, 3H), 7.03 - 6.97 (m, 2H), 5.19 (d, 1H), 5.11 (d, 1H), 4.92 (d, 1H), 4.87 - 4.78 (m, 1H), 4.09 (s, 2H), 3.48 - 3.35 (m, 4H), 3.18 - 3.05 (m, 2H), 2.99 - 2.85 (m, 4H). (ESI-TOF) m/z: $[M+H]^+$ Calcd for $C_{21}H_{25}N_3O_3$: 367.98; found: 367.94.

2.4.2 中间体 **13** 的合成 1



10%钯碳(0.43 克) 加至含有中间体 **12**(1.86g, 5 mmol)的乙酸乙酯(10 mL)和甲醇(20 mL)的混合物的三颈瓶中, 用氢气球向体系充氢气, 常压常温搅拌反应过夜。TLC 点板显示反应原料反应已完全(展开剂: 二氯甲烷: 甲醇=10:1, $R_f=0.4$), 催化剂通过 CELITETM 滤板过滤除去, 经旋转蒸发浓缩, 得到白色固体(1.25 g, 4.5 mmol)收率 95%。(ESI-TOF) m/z: $[M+H]^+$ Calcd for $C_{14}H_{19}N_3O_3$: 277.14; found: 277.27.

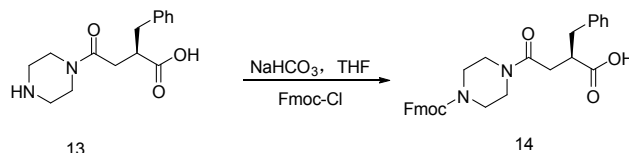
2.4.3 中间体 **13** 的合成 2



在 50 mL 圆底烧瓶中加入中间体 **18**(0.136 g, 0.36 mmol), 加入 20 mL 二氯甲烷溶解, 再加入 33%TFA/DCM 溶液 15 mL, 室温搅拌 30 min, 反应完全后, 旋蒸除去瓶内溶剂, 用甲苯(10 mL×2)重蒸, 剩余粘稠状液滴用 DCM(20 mL)溶解, 再用 5% $NaHCO_3$ (30 mL×2)洗涤两次出去多余的 TFA, 旋蒸除去 DCM, 得

纯品 0.072 g(0.26 mmol)，产率 72.2 %。(ESI-TOF) m/z: $[M+H]^+$ Calcd for $C_{14}H_{19}N_3O_3$: 277.14; found:277.27.

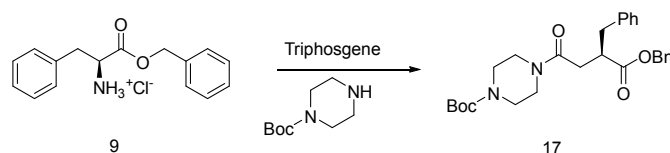
2.4.4 中间体 14 的合成



在 50 mL 圆底烧瓶中，加入上一步产物 **13**(2 g, 5.43 mmol)、 $NaHCO_3$ (0.912 g, 10.86 mmol)、 H_2O (10 mL)，冰浴搅拌至溶解。加入 Fmoc-Cl(1.545 g, 5.973 mmol)的 10 mL 四氢呋喃溶液，室温搅拌 5h，TLC 点板显示原料点已消失(展开剂：二氯甲烷：甲醇=5:1, $R_f=0.6$)，旋去四氢呋喃，有白色固体析出，加 10 mL 水溶解，乙醚萃取(20 mL \times 5)，收集乙醚层并保留水相，乙醚层再用 1N $NaHCO_3$ 萃取(3 \times 10 mL)，合并水层，用 2N HCl 溶液调节水层 pH=2，乙酸乙酯萃取(5 \times 20 mL)，有机相再用去离子水(20 mL)、饱和食盐水(20 mL)依次洗涤，无水硫酸钠及无水硫酸镁干燥过夜，过滤，旋去乙酸乙酯，经硅胶柱纯化得产物 **14**(1.2 g, 2.4 mmol)，产率 44.2%。 1H

NMR (400MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.89 (d, 2H), 7.62(d, 2H), 7.42 (t, 2H), 7.34 (t, 2H), 7.26 (d, 4H), 7.22 - 7.16 (m, 1H), 6.73 (d, 1H), 4.41 (d, 2H), 4.28 (t, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.17 (s, 8H), 3.06 (d, 1H), 3.03 (d, 1H). (ESI-TOF) m/z: $[M+H]^+$ Calcd for $C_{29}H_{29}N_3O_5$: 499.56; found: 500.22.

2.4.5 中间体 17 的合成



中间体 **9** 用二氯甲烷(135 mL)溶解后加入至 500 mL 三颈烧瓶中， $0^\circ C$ 搅拌 30 min，分液，用二氯甲烷萃取水相(3 \times 60 mL)，合并有机相，蒸馏水洗涤直至 pH 为中性。有机相用无水硫酸钠和无水硫酸镁干燥过夜，过滤掉残渣。将上述所得溶液冷却至 $0^\circ C$ ，3.5 mL 超干二氯甲烷溶解的三光气(1.20 g, 4.06mmol)溶液缓慢滴入， $0^\circ C$ 搅拌 1h。另取一 250 mL 三颈烧瓶，加入 20 mL 二氯甲烷、Boc-哌嗪(7.25 g, 43.15 mmol)，降温至 $0^\circ C$ ，搅拌 10min，用加样器将上述 L-苯丙氨酸酰氯溶液缓慢滴加至冷的哌嗪溶液中， $0^\circ C$ 反应 1h 之后再过夜反应，TLC 检测原料基本反应完全(展开剂：二氯甲烷：甲醇=10:1, $R_f=0.7$)，经过硅胶柱层

析得到纯净产物 **19**(2.22 g, 4.75 mmol), 产率 55%。¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ 7.37 - 7.18 (m, 10H), 6.97 (d, 1H), 5.75 (s, 3H), 5.07(s, 2H), 4.38 - 4.28 (m, 1H), 3.22 (m, 8H), 3.01 (m, 2H), 1.40 (s, 9H). (ESI-TOF) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₄₆H₄₆N₄O₆S: 467.24; found: 467.26.

2.4.6 以苯丙氨酸甲酯盐酸盐为起始原料合成中间体 **18**

相比较-Bn 保护基团, -OMe 保护基团更容易去除, 并且在反应过程中, 对原料中哌嗪的-Boc 基团影响较小。因此本论文设计了以苯丙氨酸甲酯盐酸盐为起始原料, 通过缩合反应合成中间体 **18**。

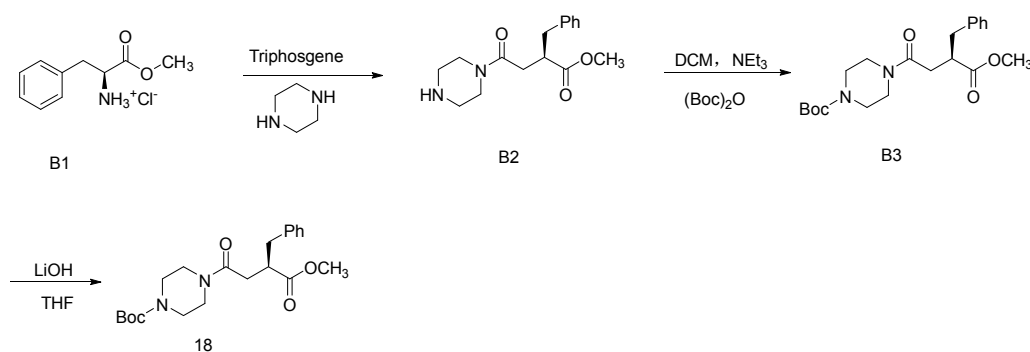
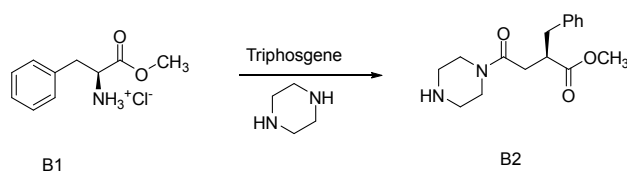


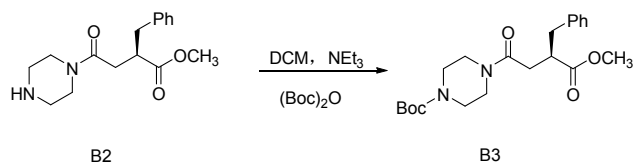
图 2-6 苯丙氨酸甲酯盐酸盐合成中间体 **18** 的反应路线

(1) 中间体 **B2** 的合成



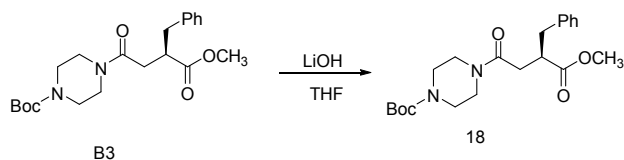
L-苯丙氨酸甲酯盐酸盐(**B1**) (18.6 g, 86.3 mmol)、二氯甲烷(300 mL)及饱和碳酸氢钠(300 mL)加入 1 L 三颈烧瓶中, 0℃ 搅拌 1 h, 分液, 用二氯甲烷萃取水相(4×100 mL), 合并有机相, 蒸馏水洗涤直至 pH 为中性。有机相用无水硫酸钠和无水硫酸镁干燥过夜, 过滤掉残渣。将上述所得溶液冷却至 0℃, 30 mL 超干二氯甲烷溶解的三光气(12.0 g, 40.6 mmol)溶液缓慢滴入, 0℃ 搅拌 1 h。另取一 250 mL 三颈烧瓶, 加入 200 mL 二氯甲烷、哌嗪(37.2 g, 431.5 mmol), 降温至 0℃, 搅拌 10 min, 用加样器将上述 L-苯丙氨酸酰氯溶液缓慢滴加至冷的哌嗪溶液中, 0℃ 反应 1 h 之后再过夜反应, TLC 检测原料基本反应完全(展开剂: 二氯甲烷: 甲醇=8:1, R_f=0.6), 经过硅胶柱层析得到纯净产物 14.0 g(4.80 mmol), 产率 55.6%。m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₁₅H₂₁N₃O₃: 291.16; found: 291.11.

(2) 中间体 **B3** 的合成



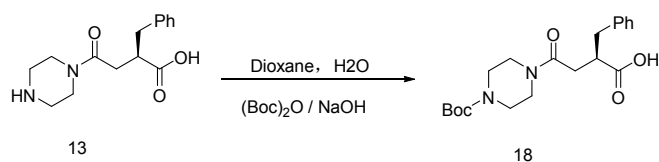
在 200 mL 圆底烧瓶中，加入中间体 **B2**(2.9 g, 10 mmol)、150 mL 二氯甲烷溶解，冰浴搅拌，加入三乙胺(3.2 mL, 24 mmol)。加入(Boc)₂O(2.61 g, 12 mmol)，冰浴反应 1 h 后，常温反应过夜，TLC 点板显示原料基本反应完全(展开剂：乙酸乙酯：石油醚=1:1, R_f=0.45)，乙醚萃取(5×50 mL)，水层用 2N 柠檬酸溶液调节 pH=2，水相用乙酸乙酯萃取(4×60 mL)，再用去离子水(50 mL)、饱和食盐水(50 mL)依次洗涤，无水硫酸钠及无水硫酸镁干燥过夜，过滤，旋去乙酸乙酯，柱层析纯化得纯品 2.4 g(6.22 mmol)，产率 62.2%。m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₁₉H₂₇N₃O₅: 391.21; found: 391.31.

(3) 中间体 **18** 的合成



在 25 mL 圆底烧瓶中，加入中间体 **B3**(1g, 3.2 mmol)，用 10 mL THF 溶解，冷却至 0°C，LiOH(0.23 g, 9.6 mmol)用 3 mL H₂O 溶解，加入至圆底烧瓶中，常温反应 4.5 h，TLC 点板显示原料反应完全(展开剂：乙酸乙酯：石油醚=1:2, R_f=0.6)，加 10% 柠檬酸(20 mL)除去溶液中剩余的 LiOH，再经 H₂O 洗涤(20 mL × 3)，有机相经无水硫酸钠及无水硫酸镁干燥过夜后再过滤、旋蒸，得油状液体，油状液体用乙酸乙酯溶解，再经 H₂O 洗涤两次，干燥后经硅胶柱纯化得白色固体 0.87 g(2.31 mmol)，收率 72.3%。m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₁₉H₂₇N₃O₅: 377.20; found: 377.22.

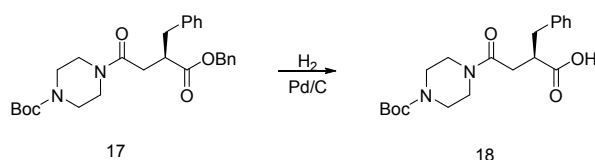
2.4.7 中间体 **18** 的合成 2



在 100 mL 圆底烧瓶中，加入中间体 **13**(2.7 g, 10 mmol)、60 mL 二氧六环、10 mL H₂O，冰浴搅拌，2M 氢氧化钠溶液调节 pH≈9。再加入 (Boc)₂O(2.61g, 12 mmol)，冰浴反应 1 h 后，常温反应过夜，TLC 点板显示原料基本反应完全(展开剂：乙酸乙酯：石油醚=1:1)，乙醚萃取(5×20 mL)，水层用 2 N 柠檬酸溶液

调节 pH=2, 水相用乙酸乙酯萃取(6×40 mL), 再用去离子水(30 mL)、饱和食盐水(30 mL)依次洗涤, 无水硫酸钠及无水硫酸镁干燥过夜, 旋去乙酸乙酯, 石油醚析晶、柱层析纯化得纯品 1.8 g(4.7 mmol), 产率 47.8%. m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₁₉H₂₇N₃O₅: 377.20; found: 377.20.

2.4.8 中间体 18 的合成 3



10%钯碳(0.26 克)加至含有中间体 17(1.06 g, 3.21 mmol)的乙酸乙酯(10 mL)和甲醇(20 mL)的混合物的三颈瓶中, 常压常温加 H₂ 搅拌反应过夜。TLC 点板显示反应原料反应已完全(展开剂: 二氯甲烷: 甲醇=10:1, R_f=0.7), 催化剂通过 CELITETM 滤板过滤除去, 经过旋蒸得到白色固体(1.25 g, 2.81 mmol), 收率为 87.5%。(ESI-TOF) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₁₉H₂₇N₃O₅:377.20; found: 377.22.

2.4.9 固相合成方法合成含叠氮的哌嗪苯丙氨酸中间体 19 探索

为分离简单, 我们探索在树脂上引入哌嗪以及叠氮基团, 以 Fmoc-Phe-Wang Resin 树脂为起始原料, 通过取代、缩合等常见的有机合成反应, 以合成含叠氮的哌嗪苯丙氨酸中间体 19。

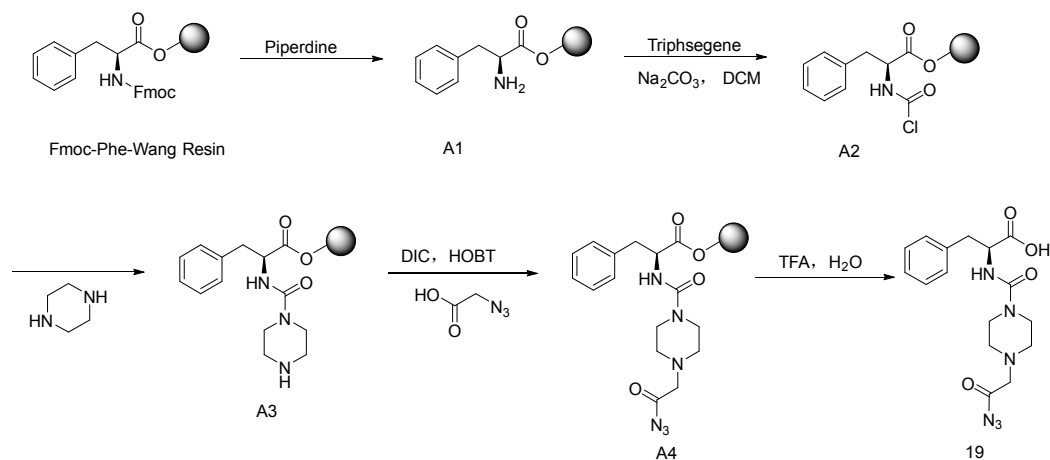
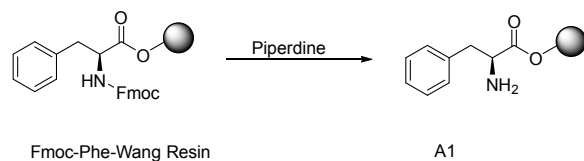


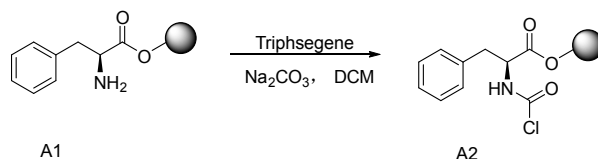
图 2-7 含叠氮的哌嗪苯丙氨酸中间体 19 固相合成路线探索

(1)A1 的合成



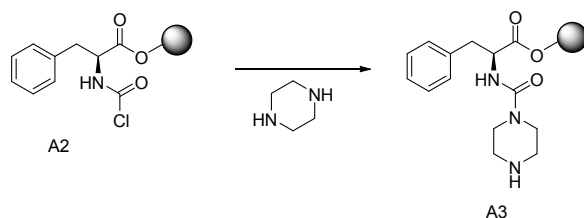
Fmoc-Phe-Wang Resin 树脂 9.4 g (7.0 mmol) (平均 0.75 mmol/g) 放入 100 mL 反应腔中, 加入 50 mL 30% 哌啶/DMF、20% 哌啶/DMF 分别反应 15 min、30 min, 以脱去 Fmoc 保护基, 然后用 50 mL DMF、CH₃OH、DCM、DMF、DCM、DCM、DCM 分别洗涤。

(2) A2 的合成



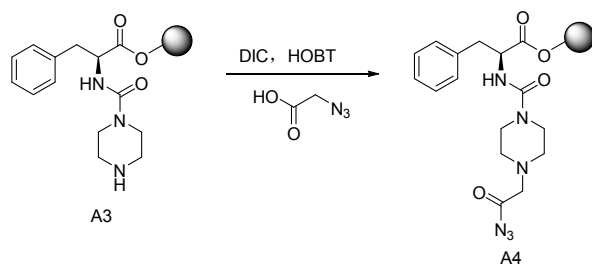
将树脂放入 100 mL 圆底烧瓶, 加入 150 mL DCM 浸泡, 冰浴下磁力搅拌 30 min, 再加入饱和 Na₂CO₃ 溶液 (200 mL) 并冰浴 30 min, 滴加三光气 (2.07 g, 7 mmol) DCM 溶液 (10 mL), 恒压漏斗再用 DCM 洗两次并加入反应瓶中, 0 °C 反应 30 min, 茚三酮显色检查反应完全。

(3) A3 的合成



把树脂转移至 100 mL 反应腔中并用冷水 (20 mL)、THF (20 mL) 及 DCM (20 mL) 各洗涤 4 次, 冷却下然后加入哌嗪 (3.62 g, 42 mmol), 震荡反应过夜, 用 50 mL DMF、CH₃OH、DCM、DMF、DCM、DCM、DCM 分别洗涤。

(4) A4 的合成

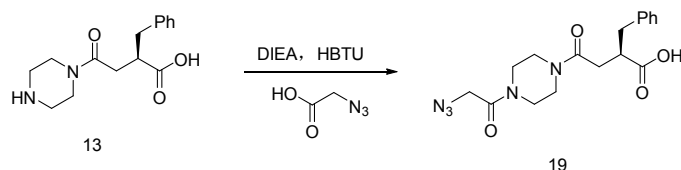


活化叠氮乙酸: 40 mL DMF 中, 加入叠氮乙酸 (3.0 g, 29.5 mmol)、缩合剂 HOBT (32.45 mmol, 4.38 g, 1.1 eq)/DIC (30.98 mmol, 4.8 mL, 1.05 eq), 在冰浴下活

化 1 h 后置于固相反应腔中，反应时间为 3 小时，茚三酮检查，反应完成后用 50 mL DMF、CH₃OH、DCM、DMF、DCM、DCM、DCM 分别洗涤。

三氟乙酸裂解：转移树脂，加入三氟乙酸(48 mL)/水(2 mL)，裂解 3 h，过滤，旋去过量 TFA，形成沉淀，过滤得产物。经 HPLC 分析得到的峰太杂乱，无法进行纯化及下一步鉴定。可能在引入甲酰氯时，甲酰氯也与树脂的苯环反应，导致产物很杂，放弃此条路线。

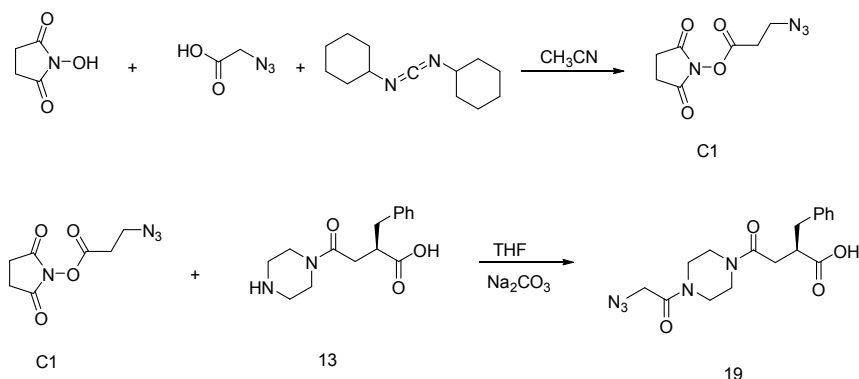
2.4.10 中间体 19 的合成 2



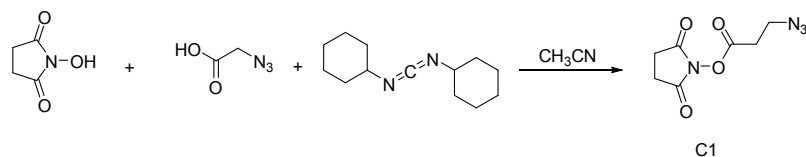
在 100 mL 圆底烧瓶中依次加入中间体 **13**(0.83 g, 3 mmol)、三乙胺(1.6 mL, 12 mmol)、HBTU(1.2 g, 3 mmol)、HATU(1.5 g, 3 mmol)，DCM(30 mL)搅拌 0.5 h 之后加入叠氮乙酸(6.06 g, 6 mmol)，常温反应 4 h，TLC 点板显示原料点消失(展开剂：二氯甲烷：甲醇=10:1, R_f=0.75)，加 50 mL H₂O，用饱和食盐水(50 mL)淬灭(0℃)，溶液分层，水层用乙酸乙酯萃取(5×15 mL)，合并有机相，用 0.5 N HCl(20 mL)、5%Na₂CO₃(20 mL)、H₂O(20 mL×2)洗涤，直至 pH≈7，最后用无水硫酸钠及无水硫酸镁干燥过夜，过滤，旋蒸溶剂，经硅胶柱层析可得白色固体 1.0 g(2.8 mmol)，产率 93.3%。(ESI-TOF) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₁₆H₂₀N₆O₄: 360.15; found: 643.24.

2.4.11 中间体 19 的合成 3(碳二亚胺法)

采用碳二亚胺法^[129]，以 N-羟基琥珀酰亚胺为起始原料，与叠氮乙酸反应，生成叠氮琥珀酰亚胺，然后与中间体 **13** 进行缩合，因此设计了以下路线：

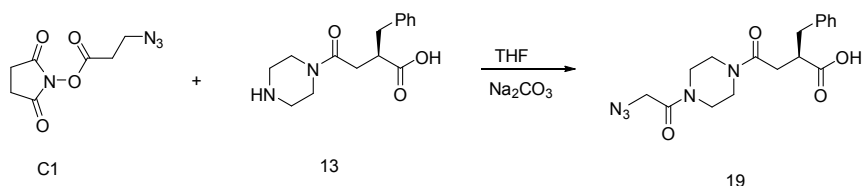


(1) 中间体 C1 的合成



在 50 mL 的圆底烧瓶中, N-羟基琥珀酰亚胺(0.57 g, 4.95 mmol)用乙腈(10 mL)溶解, 加入叠氮乙酸(0.5 g, 4.95 mmol)。另取一 10 mL 圆底烧瓶, 加入二环己基碳二亚胺(1.17 g, 5.67 mmol), 并用二氯甲烷(5 mL)溶解之后加入上述 50 mL 圆底烧瓶中。反应完后旋蒸除去乙腈, 异丙醇重结晶, 得纯品 **C1** 0.82g(3.81 mmol), 转化率 78%。m/z: $[M+H]^+$ Calcd for $C_7H_8N_4O_4$: 212.05; found: 212.11.

(2) 中间体 **19** 的合成



在 50 mL 圆底烧瓶中加入哌嗪苯丙氨酸 **13**(1.2 g, 3.1 mmol), 放置冰浴, 并用 10 mL 四氢呋喃溶解, 缓慢加入 $NaHCO_3$ (0.1 g), 调节 $pH \approx 9$, 再加入叠氮琥珀酰亚胺(0.45g, 2.32 mmol), $0^\circ C$ 反应 2 小时, 原料尚有剩余, TLC 点板显示主点 $R_f=0.85$ (展开剂: DCM: MeOH=5:1), 副产物过多, 无法纯化得到干净产物, 推测其反应失败的原因是没有考虑到空间位阻对反应的影响, 导致实验结果不理想。

2.5 含叠氮的 K777 衍生物合成路线 1 的实验探索

Fmoc 保护基团在酸性环境中及其稳定, 为了寻求更优的合成路线, 本论文探索了以中间体 **13** 为原料, 偶合反应接入 Fmoc 基, 再通过酸胺缩合、脱保护等反应合成含叠氮的 K777 衍生物。

合成路线:

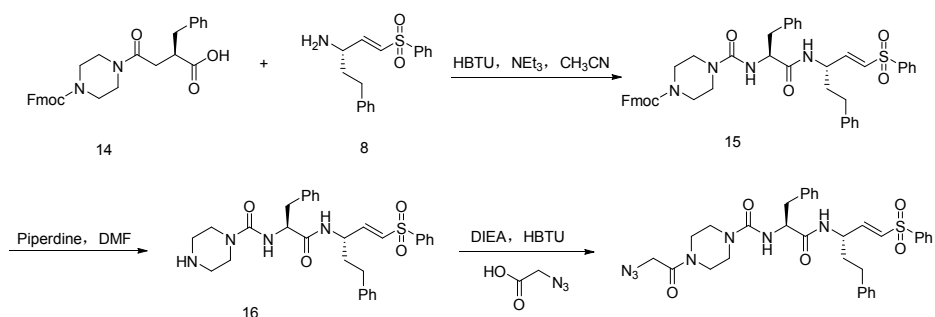
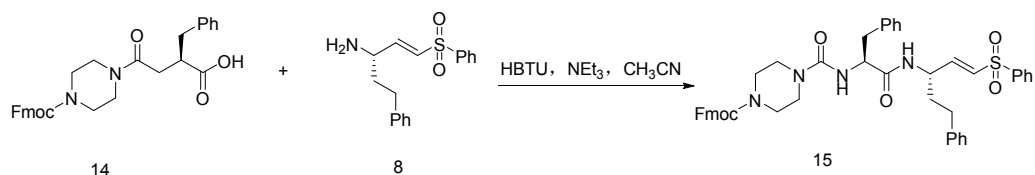


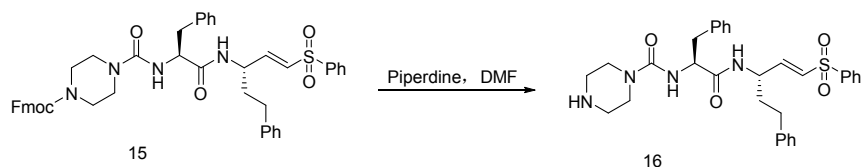
图 2-8 含叠氮的 K777 衍生物的合成路线 1(Fmoc 保护法)

2.5.1 中间体 15 的合成



在 50 mL 茄形瓶中加入中间体 **14**(0.6 g, 1.2 mmol)、三乙胺(0.64 mL, 4.8 mmol)、HBTU(0.45 g, 1.2 mmol)、HATU(0.45 g, 1.2 mmol), 搅拌 0.5h 之后加入中间体 **8**(0.6g, 1.20 mmol), 常温下过夜反应, TLC 点板显示原料点消失(展开剂: 二氯甲烷: 甲醇=10:1, $R_f=0.6$), 加 20 mL H_2O , 放置冰箱降温至 4°C , 发现瓶壁有粘稠状固体析出, 过滤出固体, 水洗固体三遍, 保持溶液体系的 $\text{pH}=9\sim 10$ (可在水中滴加一滴三乙胺)。收集得到的固体, 再用冷水洗涤 2 次, 乙酸乙酯萃取(4×30 mL), 经 2NHCl (20 mL)、5% Na_2CO_3 (20 mL)、 H_2O (20 mL $\times 2$) 洗涤, 最后用无水硫酸钠及无水硫酸镁干燥过夜, 过滤, 旋蒸溶剂, 经硅胶柱层析可得黄色固体(0.493 g, 0.63 mmol), 产率 52.5%。(ESI-TOF) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$: 782.31;found: 783.32.

2.5.2 中间体 16 的合成



中间体 **15**(0.2g, 4 mmol)加入 10 mL 30%哌啶, 搅拌 30 分钟, 加入 H_2O (50 mL), 倾出反应液, 反应液用二氯甲烷萃取(30 mL $\times 3$), 滤出沉淀, 用二氯甲烷溶解, 合并 CH_2Cl_2 , 用无水硫酸钠+无水硫酸镁干燥过夜, 经 TLC 点板分析产生了多个主点, 此方法产率过低, 且不易分离, 故不适用与中间体 **16** 的合成。

2.6 含叠氮乙酰的 K777 合成路线 2 探索 1

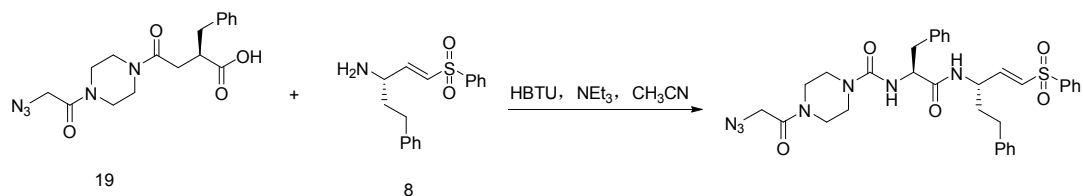
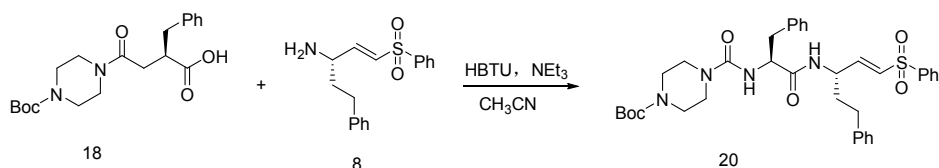


图 2-9 含叠氮乙酰的 K777 合成路线 2

在 100 mL 圆底烧瓶中依次加入中间体 **19**(3.6 g, 1 mmol)、三乙胺(3.2 mL, 24 mmol)、HBTU(4.6 g, 12 mmol)、HATU(4.6 g, 12 mmol), 60 mL 乙腈搅拌 0.5 h 之后加入中间体 **8**(6 g, 12 mmol), 常温反应 4 h, TLC 点板显示原料点 **21** 消失但产物特别杂(展开剂: 二氯甲烷: 甲醇=7:1, $R_f=0.4$), 加 80 mL H_2O , 用饱和食盐水(20 mL)淬灭($0^\circ C$), 溶液分层, 水层用乙酸乙酯萃取(3×15 mL), 合并有机相, 用 0.5 N HCl(12 mL)、0.5 N Na_2CO_3 (12 mL)、 H_2O (12 mL $\times 2$)洗涤, 直至 pH ≈ 7 , 最后用无水硫酸钠+无水硫酸镁干燥过夜, 过滤, 旋蒸溶剂, 再次点板分析瓶内剩余液滴依然复杂, 经硅胶柱、HPLC 仍无法获得纯净产物, 故该路线仍有待改进。

2.7 含叠氮乙酰的 K777 衍生物的合成

2.7.1 中间体 20 的合成



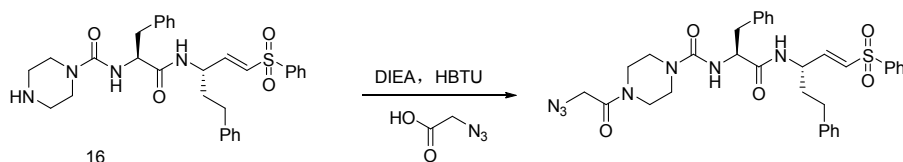
在 50 mL 圆底烧瓶中依次加入中间体 **18**(4.5g, 12 mmol)、三乙胺(6.4 mL, 48 mmol)、HBTU(4.5 g, 12 mmol)、HATU(4.5 g, 12 mmol), 搅拌 0.5 h 之后加入中间体 **8**(6 g, 12.0 mmol), 常温反应 4 h, TLC 点板显示原料点消失(展开剂: 二氯甲烷: 甲醇=10:1, $R_f=0.6$), 加 50 mL H_2O , 用饱和食盐水(50 mL)淬灭($0^\circ C$), 溶液分层, 水层用乙酸乙酯萃取(8×30 mL), 合并有机相, 用 0.5 N HCl(40 mL)、5% Na_2CO_3 (40 mL)、 H_2O (40 mL $\times 2$)洗涤, 直至 pH ≈ 7 , 最后用无水硫酸钠及无水硫酸镁干燥过夜, 过滤, 旋蒸溶剂, 经硅胶柱层析可得黄色固体(4.2g, 6.3 mmol), 产率 52.5%。m/z:[M+H] $^+$ Calcd for $C_{36}H_{44}N_4O_6S$: 660.30; found: 660.28.

2.7.2 中间体 16 的合成



在 100 mL 圆底烧瓶中加入中间体 **20**(1.8g, 2.72 mmol), 加入 50 mL 二氯甲烷溶解, 再加入 33%TFA/DCM 溶液 10 mL, 室温搅拌 30 min, 反应完全后, 旋蒸除去瓶内溶剂, 用甲苯(10 mL×2)重蒸, 剩余粘稠状液滴用 DCM(20 mL)溶解, 再用 5% NaHCO₃(30 mL×3)洗涤两次出去多余的 TFA, 旋蒸除去 DCM, 得纯品 0.76 g(1.16 mmol), 产率 43.2%。m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₃₁H₃₆N₄O₄S: 560.25; found: 560.20.

2.7.3 含叠氮乙酰的 K777 衍生物的合成



在 100 mL 圆底烧瓶中依次加入中间体 **16**(0.72 g, 1.2 mmol)、三乙胺(0.64, 4.8 mmol)、HATU(0.46g, 1.2 mmol), 搅拌 0.5 h 之后加入叠氮乙酸(1.21 g, 1.2 mmol), 常温反应 4h, TLC 点板显示原料点消失(展开剂: 二氯甲烷: 甲醇=10:1, R_f=0.6), 加 40 mL H₂O, 用饱和食盐水(30 mL)淬灭(0℃), 溶液分层, 水层用乙酸乙酯萃取(4×25 mL), 合并有机相, 用 0.5 N HCl(30 mL)、5% Na₂CO₃(30 mL)、H₂O(30 mL×2)洗涤, 直至 pH≈7, 最后用无水硫酸钠及无水硫酸镁干燥过夜, 过滤, 旋蒸溶剂, 经硅胶柱层析可得白色固体 0.48g(0.74 mmol), 产率 62.2%。m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₃₃H₃₇N₇O₅S: 643.26; found: 643.24.

2.8 合成讨论

中间体 **12** 的合成实验中, 适当延长反应时间以及增加哌嗪的投入量可以增加反应转化率(见表 2-5)。

中间体 **15** 的合成实验中, 将三乙胺的量 *n* 控制在 4 eq 时, 反应转化率最佳(表 2-6)。中间体 **16** 在乙腈中溶解性较差, 采用 DMF 做反应溶剂, 在洗涤过程中也需要保持体系整体呈弱碱性。要注意加料顺序, 应当将酸、碱、HATU、HBTU 先加入溶剂, 搅拌均匀后再加入胺, 可以减少副产物。

在改进的路线 3 中, 中间体 **19** 的合成采用了 Boc-哌嗪作为反应原料, 避免

了双取代,提高了转化效率。增加哌嗪与原料 **9** 的摩尔数之比以及适当延长反应时间亦可增加收率

表 2-5 中间体 **12** 的转化率与投料比、反应时间的关系

	投料比(哌嗪:中间体 9)			
	3:1(eq)	4:1(eq)	5:1(eq)	6:1(eq)
12	33.6%	37.5%	48.6%	48.2%
13	32.5%	37.9%	52.4%	49.3%
14	34.2%	39.8%	51.5%	46.5%
15	36.1%	36.4%	40.6%	38.5%

表 2-6 中间体 **15** 的转化率与投料之比的关系

投料比(三乙胺:中间体 14)				
1:1(eq)	2:1(eq)	3:1(eq)	4:1(eq)	5:1(eq)
35.5%	37.1%	45.3%	52.5%	43.2%

2.9 小结

- (1)合成了苯丙氨酸衍生物 **9** 个,其中 **5** 个为新化合物;
- (2)合成含乙烯砜衍生物 **2** 个;
- (3)采用 Boc 保护的苯丙氨酸衍生物合成哌嗪 N-去甲基的 K777, 然后与叠氮乙酸缩合,成功合成了含叠氮乙酰的 K777 衍生物(路线 3),此方法反应条件易控制,合成效率高;
- (4)Fomc 保护的 K777 衍生物脱保护产物较复杂(路线 2),不易获得目标产物;
- (5)含叠氮乙酰的苯丙氨酸衍生物与乙烯砜衍生物缩合效率较差,产物难以纯化。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/968056052065006025>