

新型甲状腺激素 β 受体激动剂

技术领域

本申请涉及一种新型甲状腺激素 β 受体激动剂，所述新型甲状腺激素 β 受体激动剂可用于治疗肥胖、高血脂、高胆固醇血症、糖尿病、肝脏疾病（脂肪肝、NASH、NAFLD 等）、心血管疾病（动脉粥样硬化等）、甲状腺疾病（甲状腺功能减退、甲状腺癌等）。

背景技术

甲状腺激素是甲状腺所分泌的激素，作用于人体几乎全部细胞，包括：甲状腺素（T4）和三碘甲状腺原氨酸（T3）。T4 可经特异性脱碘酶脱碘成 T3 而显效。T3 作用快而强，维持时间较 T4 短，T4 作用慢而弱，但维持时间长。特异性脱碘酶存在于所有组织中，但在肝和肾中较多。

甲状腺激素为人体正常生长发育所必需，其分泌不足或过量都可引起疾病。甲状腺功能不足时，躯体与智力发育均受影响，可致呆小病（克汀病），成人甲状腺功能不全时，则可引起粘液性水肿。甲状腺功能亢进时，出现神经过敏、急躁、震颤、心率加快、心输出量增加等现象。甲状腺激素能促进物质氧化，增加氧耗，提高基础代谢率，使产热增多。

正常情况下，在中枢神经系统的调控下，下丘脑释放促甲状腺激素释放激素（TRH）调节腺垂体促甲状腺激素（TSH）的分泌，TSH 则刺激甲状腺细胞分泌 T4 和 T3；当血液中 T4 和 T3 浓度增高后，通过负反馈作用，抑制腺垂体 TSH 的合成和释放，降低腺垂体对 TRH 的反应性，使 TSH 分泌减少，从而使甲状腺激素分泌不至于过高；而当血中 T4 和 T3 浓度降低时，对腺垂体负反馈作用减弱。TSH 分泌增加，促使 T4、T3 分泌增加。总之，下丘脑-腺垂体-甲状腺调节环路可维持甲状腺激素分泌的相对恒定。

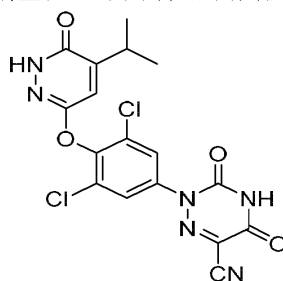
甲状腺激素的生物活性是通过甲状腺激素受体（TRs）介导的。甲状腺激素受体属于细胞核受体的超家族。TR 具有配体结合结构域，DNA 结合结构域和氨基末端结构域。TR 有四种亚型，分别是 TR α 1、TR α 2、TR β 1、TR β 2。其中心脏主要为 TR α 1，肝脏主要为 TR β 1。TR β 2 的 mRNA 表达多限于脑垂体和丘脑下部。TR α 1、TR β 1、TR β 2 可以结合甲状腺激素，并产生相应的生理效应。TR α 2 不结合甲状腺激素。

充分利用甲状腺激素在增加代谢率、氧消耗和放热上的优势，可以带来治疗益处，如治疗肥胖。甲状腺功能亢进症常常伴有食物摄取但是还伴有基础代谢率（BMR）总体增加，同时伴有体重减少约 15%；而甲状腺功能减退症则常常伴有体重增加 25-30%。用 T3 治疗甲状腺功能减退，多数患者存在体重增加的现象。

此外，甲状腺激素还能降低血清低密度脂蛋白（LDL）（Journal of Molecular and Cellular Cardiology 37(2004): 1137-1146）。现有研究表明，甲状腺功能亢进能明显降低血清总胆固醇，其原因主要是甲状腺激素增加肝脏 LDL 受体表达，从而促进了胆固醇向胆汁酸代谢的过程；甲状腺功能减退又与高胆固醇血症有关。所以，甲状腺激素可能降低动脉粥样硬化以及其他心血管疾病的发生。

采用甲状腺激素治疗疾病，由于个体差异的存在，常常出现超生理剂量的副作用出现，包括心脏问题（主要是心动过速）、肌无力以及体重过度降低等，而且长期使用还伴有骨丢失。通过对甲状腺激素进行改造，通过降低由拟甲状腺激素本身带来的不良效果，保留其有益的效果，从而开发出适宜的药物，并治疗相应的疾病：肥胖、高血脂、高胆固醇血症、糖尿病、肝脏疾病（脂肪肝、NASH、NAFLD 等）、心血管疾病（动脉粥样硬化等）、甲状腺疾病（甲状腺功能减退、甲状腺癌等）、以及其他相关的疾病。

已经公开的哒嗪酮类甲状腺激素类似物如 CN101228135B，是由 Madrigal Pharmaceuticals 申请，其代表化合物 MGL3196 目前正在进行 NASH 和 NAFLD 的三期临床试验，由于活性低、渗透性差等问题导致口服给药剂量在每天 80~100mg，给药剂量明显高于同靶点的其他产品。



MGL3196

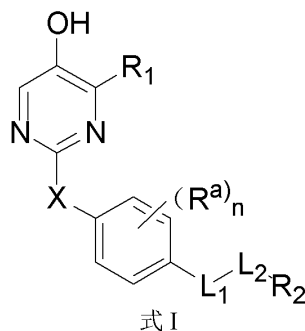
另一篇专利 CN1882327 C 是由 Viking Therapeutics 申请，其代表化合物 VK2809 目前正在进行 NASH 的 2b 临床试验，根据 1 期临床数据显示，该化合物存在安全性问题，存在肝酶升高（肝脏损伤）的现象，并且治疗窗比较窄，同时，在临床前毒理学研究中也发现了软骨损伤（J. Med. Chem. 2014, 57, 3912-3923）。

Bristol-Myers Squibb Co.申请的专利 CN1216857C, 其代表化合物伊罗替罗 (Eprotirome), 三期临床终止, 从报道的临床数据显示, 也存在肝酶升高的现象, 同时在临床前毒理学研究中也发现了软骨损伤。其他专利, 如吡啶衍生物 (CN102459185)、咪唑衍生物 (WO2002051805) 等均只报道了活性数据, 未见进一步的研究, 也未有产品进入临床。

发明内容

针对现有报道存在的问题, 本申请提供了一类活性、选择性或安全性更好的新型甲状腺激素 β 受体激动剂。

本申请的一个方面在于提供一种如式 I 所示的新型甲状腺激素 β 受体激动剂化合物、其药学上可接受的盐或其前药:



其中,

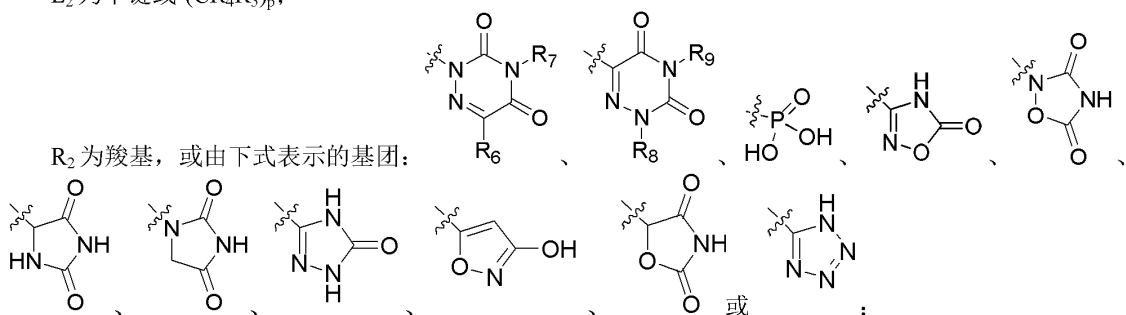
R^1 为氢、任选取代的烷基、任选取代的环烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的杂芳基、任选取代的氨基、任选取代的氨基甲酰基或 $-\text{COR}_{10}$;

X 为任选取代的亚甲基、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 或 $-\text{SO}_2-$;

R^a 选自氢、卤素、 C_{1-6} 的直链、支链烷基或环烷基; 或者两个相邻的 R^a 键合以形成碳环或杂环;

L_1 为单键、亚甲基、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CO}-$ 、 $-\text{NR}_3-$ 、 $-\text{NR}_3\text{CO}-$ 、 $-\text{CONR}_3-$ 、 $-\text{CH}_2\text{NR}_3-$ 或 $-\text{S}-$;

L_2 为单键或 $-(\text{CR}_4\text{R}_5)_p$;



R_3 为氢或任选取代的烷基;

R_4 、 R_5 各自独立地选自氢、卤素或任选取代的烷基, 或 R_4 、 R_5 键合以形成环烷基;

R_6 为氢、氰基、氨基、 COOH 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{3-6} 环烷基或 C_{3-6} 卤代环烷基;

R_8 为氢、氰基、 COOH 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基、 C_{3-6} 环烷基或 C_{3-6} 卤代环烷基;

R_7 、 R_9 为氢、 C_{1-3} 烷基或 C_{1-3} 卤代烷基;

R_{10} 为任选取代的烷基、氨基、羟基、任选取代的环烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂环基、任选取代的杂芳基;

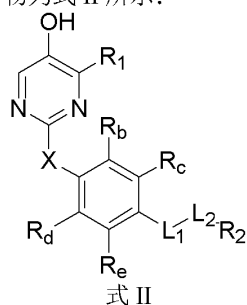
n 为 0、1、2、3 或 4;

p 为 0、1 或 2。

在一些优选的实施方式中, R^1 为氢或 $-\text{COR}_{10}$, 或者任选被氢、氘、氚、 C_{1-6} 烷基、羟基、卤素、CN 取代的烷基、环烷基、环烷基烷基、芳基、芳基烷基、杂环基、杂芳基、氨基或氨基甲酰基。在一些优选的实施方式中, R^1 为 $-\text{COR}_{10}$, 或任选被氢、氘、氚、 C_{1-6} 烷基、羟基、卤素、CN 取代的 C_{1-10} 烷基、 C_{3-10} 环烷基、 C_{3-10} 环烷基 C_{1-6} 烷基、 C_{5-10} 芳基、 C_{5-10} 芳基 C_{1-6} 烷基、5-10 元杂环基、5-10 元杂芳基、氨基或氨基甲酰基。在一些优选的实施方式中, R^1 为 $-\text{COR}_{10}$, 或任选被氢、氘、氚、 C_{1-6} 烷基、羟基、卤素、CN 取代的 C_{1-8} 烷基、 C_{3-8} 环烷基、 C_{3-8} 环烷基 C_{1-6} 烷基、 C_{5-10} 芳基、 C_{5-10} 芳基 C_{1-6} 烷基、5-10 元杂环基、5-10 元杂芳基。

3

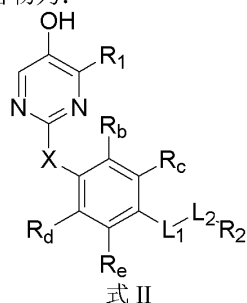
在某些方面，本申请提供的式 I 化合物为式 II 所示：



其中, R_b、R_c、R_d、R_e 为氢、氘、卤素、C₁₋₆ 的直链、支链烷基或环烷基;或者 R_b、R_c 键合以形成 5-或 6-元环烷基或包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1 个或 2 个杂原子的 5-或 6-元非芳香性杂环;或者 R_d、R_e 键合以形成 5-或 6-元环烷基或包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1 个或 2 个杂原子的 5-或 6-元非芳香性杂环;

其他取代基的定义如上文式 I 所述。

在某些方面, 本申请提供的式 II 化合物为:



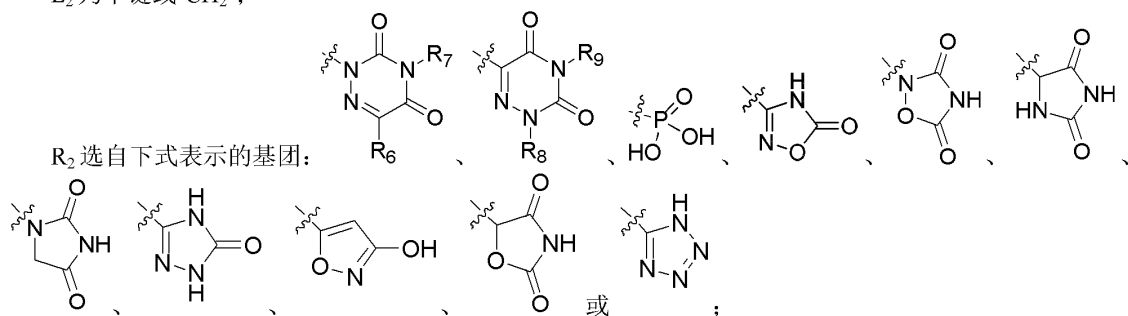
其中, R₁ 为任选取代的 C₁₋₆ 的直链、支链烷基或 C₃₋₈ 环烷基;

X 为 O、S 或 $-\text{CH}_2-$;

R_b、R_c、R_d、R_e 为氢、氘、卤素、C₁₋₆ 的直链、支链烷基或环烷基，或者 R_b、R_c 键合以形成 5-或 6-元环烷基或包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1 个或 2 个杂原子的 5-或 6-元非芳香性杂环；或者 R_d、R_e 键合以形成 5-或 6-元环烷基或包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1 个或 2 个杂原子的 5-或 6-元非芳香性杂环；

L_1 为单键、 $-NR_3-$ 、 $-O$ 或 $-S-$;

L₂ 为单键或-CH₂-;



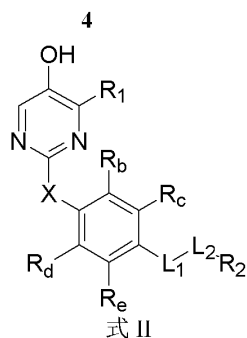
R₃ 为氢或任选取代的 C₁₋₆ 烷基;

R₆为氢、氰基、氨基、COOH、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₆环烷基或C₃₋₆卤代环烷基;

R₈为氢、氰基、COOH、C₁₋₆烷基、C₁₋₆卤代烷基、C₃₋₆环烷基或C₃₋₆卤代环烷基;

R₇、R₉为氢、C₁₋₃烷基或C₁₋₃卤代烷基。

在某些方面，本申请提供的式 II 化合物为：



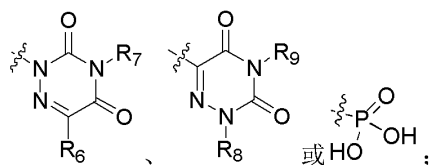
其中, R_1 为任选取代的 C_{1-6} 的直链、支链烷基;

R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_e 为氢、氘、卤素、 C_{1-6} 的直链、支链烷基或环烷基, 或者 R_b 、 R_c 键合以形成 5-或 6-元环烷基或包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1 个或 2 个杂原子的 5-或 6-元非芳香性杂环; 或者 R_d 、 R_e 键合以形成 5-或 6-元环烷基或包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1 个或 2 个杂原子的 5-或 6-元非芳香性杂环;

X 为 O、S 或 $-CH_2-$;

L_1 为单键、 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NH-$;

L_2 为单键;



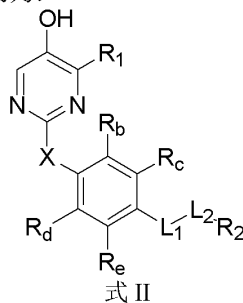
R_2 选自下式表示的基团:

R_6 为氢、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基;

R_8 为氢、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 卤代烷基;

R_7 、 R_9 为氢、 C_{1-3} 烷基或 C_{1-3} 卤代烷基。

在某些方面, 本申请提供的式 II 化合物为:



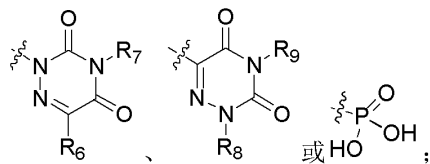
其中, R_1 为任选被氢、氘、氚、 C_{1-6} 烷基、羟基、卤素、CN 取代的 C_{1-6} 的直链或支链烷基、苄基或 C_{5-6} 环烷基亚甲基, 进一步优选为异丙基或苄基;

R_b 和 R_d 为卤素, R_c 和 R_e 为氢, R_b 和 R_d 进一步优选为氯;

X 为 O、S 或 $-CH_2-$;

L_1 为单键、 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-NH-$;

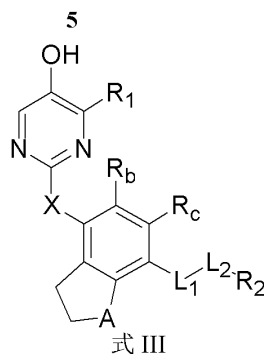
L_2 为单键或 $-CH_2-$;



R_2 选自下式表示的基团:

R_6 、 R_7 、 R_8 、 R_9 为氢或 C_{1-6} 烷基或 C_{3-8} 环烷基。

在某一方面, 本申请提供的式 I 化合物为式 III 化合物:



其中,

R_b 、 R_c 为氢、氘、卤素、 C_{1-6} 的直链、支链烷基或环烷基;

A 为 O 或亚甲基;

其他取代基的定义如式 I 所述。

在另一些优选的实施例中, 本申请提供的式 I 化合物中, R_1 选自:

- 1) 任选取代的 C_{1-6} 直链或支链烷基;
- 2) 任选取代的 C_{3-8} 环烷基;
- 3) 任选取代的包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1-3 个杂原子的 C_{3-8} 非芳香性杂环基;
- 4) 任选取代的苯基;
- 5) 任选取代的包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1-3 个杂原子的 C_{5-6} 杂芳基。

在另一些优选的实施例中, 本申请提供的式 I 化合物中, R_1 选自 $-(CR_{11}R_{12})_mR_{13}$; 其中 R_{11} 、 R_{12} 选自氢、氘、卤素、羟基、氨基、羧基或任选取代的 C_{1-4} 烷基; R_{13} 选自:

- 1) 氢或氘;
 - 2) 卤素;
 - 3) 羟基;
 - 4) 氨基;
 - 5) 羧基;
 - 6) 任选取代的 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 烷氧基;
 - 7) 任选取代的 C_{3-8} 环烷基;
 - 8) 任选取代的包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1-3 个杂原子的 C_{3-8} 非芳香性杂环基;
 - 9) 任选取代的苯基;
 - 10) 任选取代的包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1-3 个杂原子的 C_{5-6} 杂芳基;
- m 为 0、1、2 或 3。

在另一些优选的实施例中, 本申请提供的式 I 化合物中, R_1 选自 $-COR_{10}$; 其中 R_{10} 选自:

- 1) 氨基;
- 2) 羟基;
- 3) 任选取代的 C_{1-4} 烷基或 C_{1-4} 烷氧基;
- 4) 任选取代的 C_{3-8} 环烷基;
- 5) 任选取代的包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1-3 个杂原子的 C_{3-8} 非芳香性杂环基;
- 6) 任选取代的苯基;
- 7) 任选取代的包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1-3 个杂原子的 C_{5-6} 杂芳基。

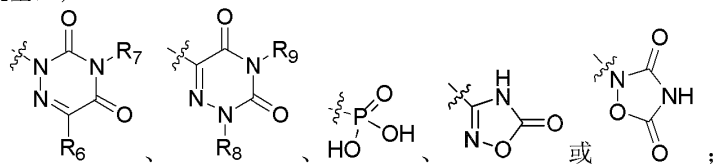
在一些优选的实施方式中, 在所述式 I 化合物中, R^1 为氢、 C_{1-10} 烷基 (优选 C_{1-5} 烷基)、 C_{3-10} 环烷基 (优选 C_{3-8} 环烷基)、 C_{3-10} 环烷基 C_{1-6} 烷基 (优选 C_{3-8} 环烷基 C_{1-4} 烷基)、 C_{5-10} 芳基 (优选 C_{5-8} 芳基)、 C_{5-10} 芳基 C_{1-6} 烷基 (优选 C_{5-8} 芳基 C_{1-4} 烷基)、包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1-3 个杂原子的 5-10 元杂环基、包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1-3 个杂原子的 5-10 元杂芳基、氨基或 $-COR_{10}$, 所述 C_{1-10} 烷基 (优选 C_{1-5} 烷基)、 C_{3-10} 环烷基 (优选 C_{3-8} 环烷基)、 C_{3-10} 环烷基 C_{1-6} 烷基 (优选 C_{3-8} 环烷基 C_{1-4} 烷基)、 C_{5-10} 芳基 (优选 C_{5-8} 芳基)、 C_{5-10} 芳基 C_{1-6} 烷基 (优选 C_{5-8} 芳基 C_{1-4} 烷基)、包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1-3 个杂原子的 5-10 元杂环基、包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1-3 个杂原子的 5-10 元杂芳基、或氨基是未被取代的, 或者可被氘、氘、 C_{1-6} 烷基、羟基、卤素、CN 取代;

X 为亚甲基、 $-O-$ 、 $-S-$ 或 $-SO_2-$;

R^a 为氢、氘、卤素、 C_{1-6} 的直链、支链烷基或环烷基; 或者两个相邻的 R^a 键合以形成 5-10 元碳环, 或包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1-3 个杂原子的 5-10 元杂环;

L₁为单键、亚甲基、-O-、-CO-、-NR₃-、-NR₃CO-、-CONR₃-、-CH₂NR₃-或-S-;

L₂为单键或C₁₋₆烷基(优选C₁₋₄烷基);



R₂为羧基,或由下式表示的基团:

R₃为氢或C₁₋₆烷基;

R₆为氢、氰基、氨基、COOH、C₁₋₆烷基或C₁₋₆卤代烷基;

R₈为氢、氰基、COOH、C₁₋₆烷基或C₁₋₆卤代烷基;

R₇、R₉为氢、C₁₋₃烷基或C₁₋₃卤代烷基;

R₁₀为C₃₋₁₀环烷基(优选C₃₋₈环烷基)、C₅₋₁₀芳基(优选C₅₋₈芳基)、包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的1-3个杂原子的5-10元杂环基、包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的1-3个杂原子的5-10元杂芳基;

n为0、1、2、3或4。

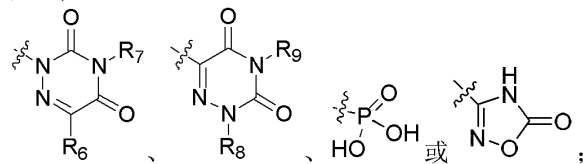
在一些优选的实施方式中,本申请提供的式I化合物中,R¹为C₁₋₈烷基(优选C₁₋₅烷基)、C₃₋₈环烷基(优选C₃₋₆环烷基)、C₃₋₈环烷基C₁₋₅烷基(优选C₃₋₆环烷基C₁₋₃烷基)、C₅₋₈芳基(优选C₅₋₆芳基)、C₅₋₈芳基C₁₋₅烷基(优选C₅₋₆芳基C₁₋₃烷基)、包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的1-3个杂原子的5-8元杂环基、包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的1-3个杂原子的5-8元杂芳基、氨基或-COR₁₀,所述C₁₋₈烷基(优选C₁₋₅烷基)、C₃₋₈环烷基(优选C₃₋₆环烷基)、C₃₋₈环烷基C₁₋₅烷基(优选C₃₋₆环烷基C₁₋₃烷基)、C₅₋₈芳基(优选C₅₋₆芳基)、C₅₋₈芳基C₁₋₅烷基(优选C₅₋₆芳基C₁₋₃烷基)、包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的1-3个杂原子的5-8元杂环基、包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的1-3个杂原子的5-8元杂芳基、或氨基是未被取代的,或者可被氘、氚、C₁₋₆烷基、羟基、卤素、CN取代;

X为亚甲基、-O-、-S-或-SO₂-;

R^a为卤素、C₁₋₄的直链、支链烷基;或者两个相邻的R^a键合以形成5-7元碳环,或包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的1-3个杂原子的5-7元杂环;

L₁为单键、-O-、-NR₃-、-NR₃CO-、-CONR₃-、-CH₂NR₃-或-S-;

L₂为单键或C₁₋₅烷基(优选C₁₋₃烷基);



R₂为羧基,或由下式表示的基团:

R₃为氢或C₁₋₃烷基;

R₆为氢、氰基、COOH或C₁₋₄烷基;

R₈为氢或C₁₋₄烷基;

R₇、R₉为氢或C₁₋₃烷基;

R₁₀为C₅₋₈芳基(优选C₅₋₆芳基),或包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的1-3个杂原子的5-8元杂芳基(优选5-6元杂芳基);

n为1、2或3。

在一些优选的实施方式中,在所述式I化合物中,R¹为甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、环丙烷、环丁烷、环戊烷、环己烷、环丙烷甲基、环丁烷甲基、环戊烷甲基、环己烷甲基、苯基、苄基或-COR₁₀,所述甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、环丙烷、环丁烷、环戊烷、环己烷、环丙烷甲基、环丁烷甲基、环戊烷甲基、环己烷甲基、苯基、苄基是未被取代的,或者可被氘、C₁₋₃烷基、羟基、卤素、CN取代;

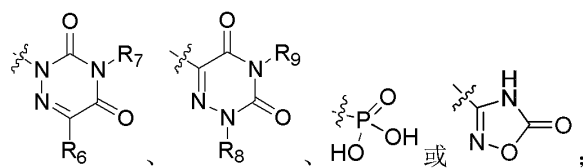
X为亚甲基、-O-、-S-或-SO₂-;

R^a为卤素;或者两个相邻的R^a键合以形成5元碳环,或包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的1-2个杂原子的5元杂环;

L₁为单键、-O-、-NH-、-NHCO-、-CONH-、-CH₂NH-或-S-;

L₂为单键、甲基、乙基或丙基;

7



R_2 为羧基, 或由下式表示的基团:

R_6 为氢、氰基、COOH、甲基、乙基或丙基;

R_8 为氢、甲基、乙基或丙基;

R_7 、 R_9 为氢或甲基;

R_{10} 为苯基;

n 为 2 或 3。

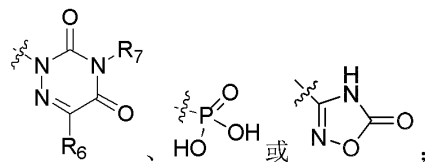
在一些优选的实施方式中, 在所述式 I 化合物中, R^1 为甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、环丙烷、环丁烷、环戊烷、环己烷、环丙烷甲基、环丁烷甲基、环戊烷甲基、环己烷甲基、苯基或苄基, 所述甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、环丙烷、环丁烷、环戊烷、环己烷、环丙烷甲基、环丁烷甲基、环戊烷甲基、环己烷甲基、苯基、苄基是未被取代的, 或者可被氘、 C_{1-3} 烷基、羟基、F、Cl、Br、CN 取代;

X 为亚甲基、-O-或-S-;

R^a 为 F、Cl、Br; 或者两个相邻的 R^a 键合以形成 5 元碳环, 或包含选自氮原子、氧原子和硫原子中的 1-2 个杂原子的 5 元杂环;

L_1 为单键、-O-、-NH-或-NHCO-;

L_2 为单键、甲基、乙基或丙基;



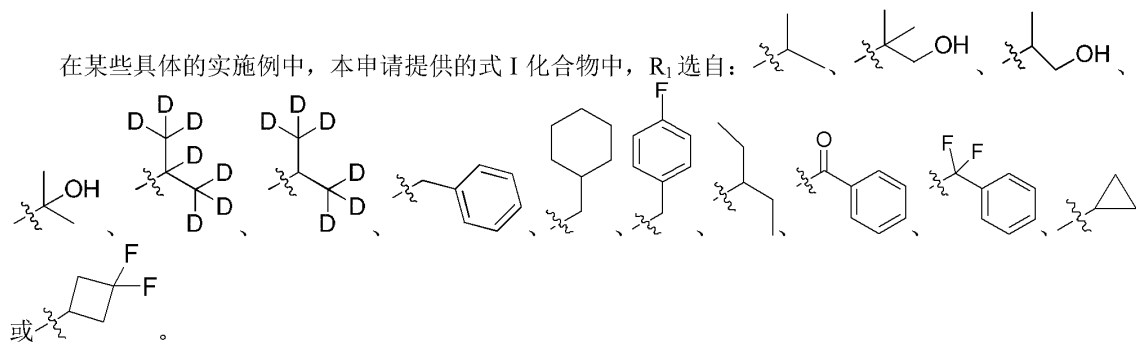
R_2 为羧基, 或由下式表示的基团:

R_6 为氢、氰基或甲基;

R_7 为氢;

n 为 2 或 3。

在某些具体的实施例中, 本申请提供的式 I 化合物中, R_1 选自:

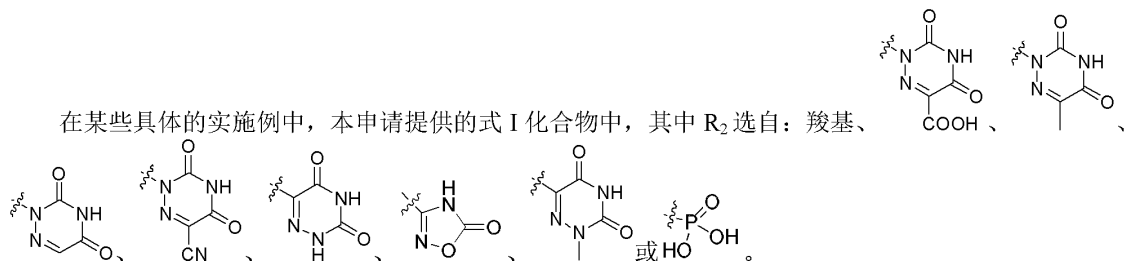


在某些具体的实施例中, 本申请提供的式 I 化合物中, R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_e 选自氢、氘或卤素。

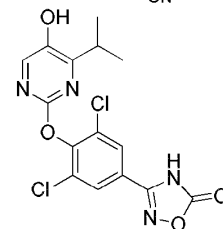
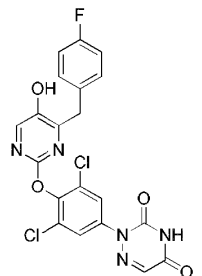
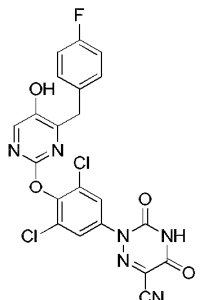
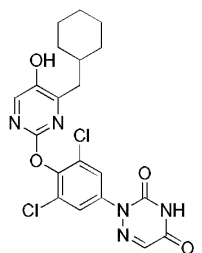
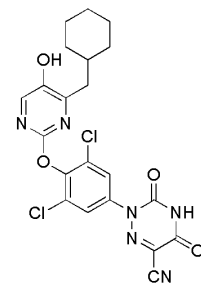
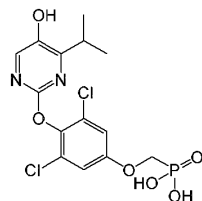
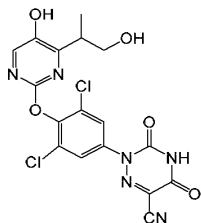
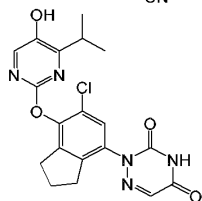
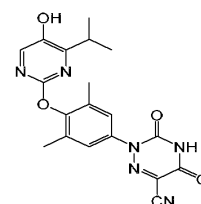
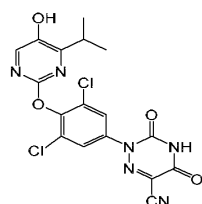
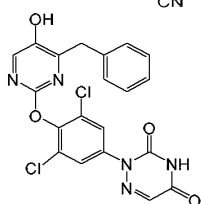
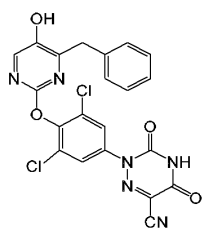
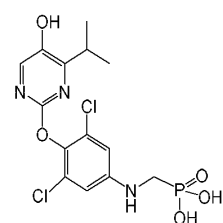
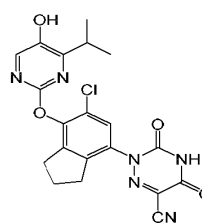
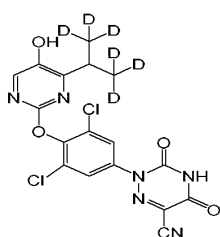
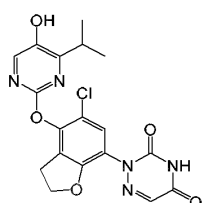
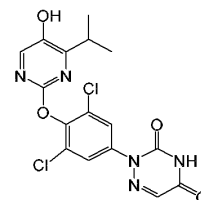
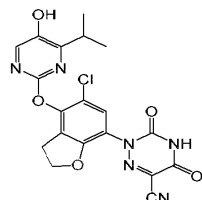
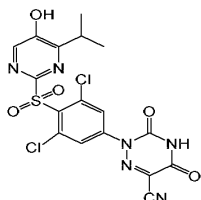
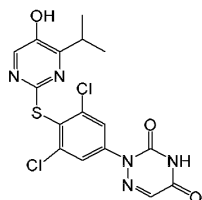
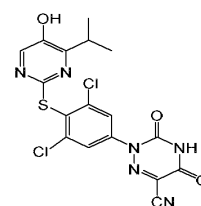
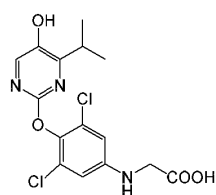
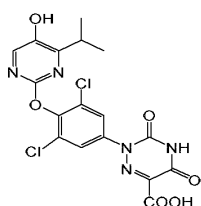
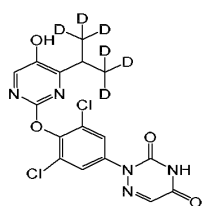
在某些具体的实施例中, 本申请提供的式 I 化合物中, L_1 选自单键、-O-、-NH-、-NHCO-、-NHCH₂-。

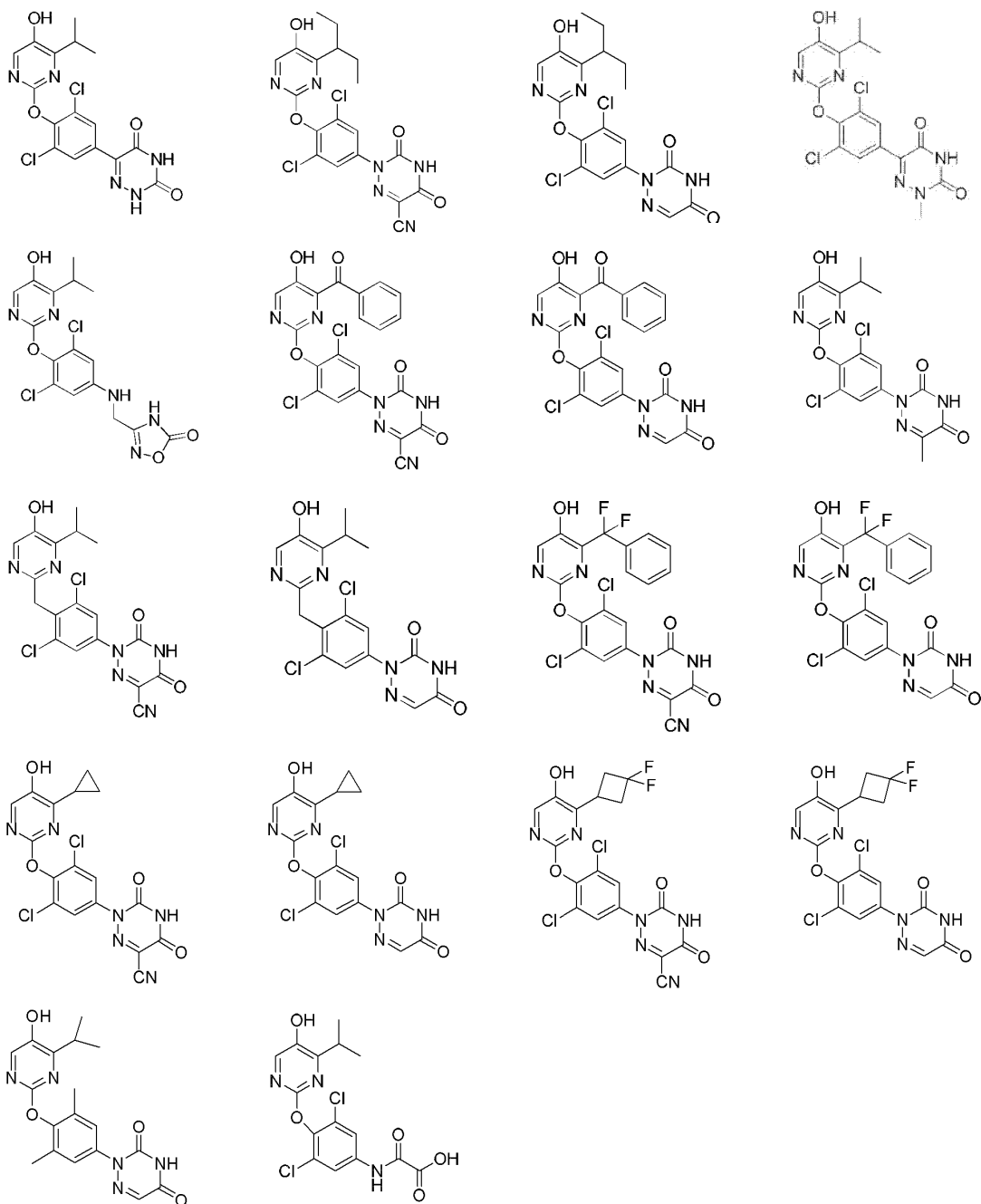
在某些具体的实施例中, 本申请提供的式 I 化合物中, L_2 选自单键或亚甲基 (-CH₂-)。

在某些具体的实施例中, 本申请提供的式 I 化合物中, 其中 R_2 选自: 羧基、



在某些具体的实施例中, 本申请提供的式 I 化合物选自:





本申请的另一方面在于提供一种药物组合物，所述药物组合物包含本申请式 I 化合物、其药学上可接受的盐或其前药，以及一种或多种药学上可接受的载体。

本申请的另一方面在于提供本申请的化合物、其药学上可接受的盐或其前药在制备用于预防或治疗 β 受体激动剂作用有关的疾病（例如肥胖、高血脂、高胆固醇血症、糖尿病、脂肪性肝炎、非酒精性脂肪性肝炎、非酒精性脂肪肝病、动脉粥样硬化、甲状腺癌、甲状腺功能减退疾病或病症）的药物中的用途。或者，本申请提供了用于预防或治疗 β 受体激动剂作用有关的疾病中的上述的化合物、其药学上可接受的盐或其前药。或者，本申请提供了一种预防或治疗 β 受体激动剂作用有关的疾病的方法，包括向有需要的受试者给予上述的化合物、其药学上可接受的盐或其前药。优选地，所述 β 受体激动剂作用有关的疾病包括但不限于：高胆固醇血症、高脂血症、高甘油三酯血症、家族性高胆固醇血症、血脂异常、甲状腺癌、甲状腺功能减退症、潜在的甲状腺功能减退症、动脉粥样硬化、代谢综合症、肥胖症、糖尿病、心血管疾病、

冠状动脉疾病、心肌梗死、心室功能不全、心功能衰竭、脂肪肝、肝硬化、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、抑郁症、痴呆症、骨质疏松症、秃头症、指甲疾病、皮肤病、肾脏疾病、慢性肾功能衰竭和/或癌症等，尤其是高胆固醇血症、高脂血症、高甘油三酯血症、家族性高胆固醇血症、血脂异常、动脉粥样硬化、甲状腺功能减退症和/或潜在的甲状腺功能减退症。

定义

除非在下文中另有定义，本文中所用的所有技术术语和科学术语的含义意图与本领域技术人员通常所理解的相同。提及本文中使用的技术意图指在本领域中通常所理解的技术，包括那些对本领域技术人员显而易见的技术的变化或等效技术的替换。虽然相信以下术语对于本领域技术人员很好理解，但仍然阐述以下定义以更好地解释本申请。

如本文中所使用，术语“包括”、“包含”、“具有”、“含有”或“涉及”及其在本文中的其它变体形式为包含性的 (inclusive) 或开放式的，且不排除其它未列举的元素或方法步骤。

如本文中所使用，术语“氢”及各基团中的氢涵盖其天然存在的同位素氕 (P)、氘 (D) 或氚 (T)。

“烷基”是一类仅含有碳原子、氢原子两种原子的直链或支链的链状有机基团。烷基的实例包括 C₁₋₁₀、优选 C₁₋₆、更优选 C₁₋₄ 的直链或支链烷基，例如 C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₇、C₈、C₉ 或 C₁₀ 烷基，具体地，例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、1-甲基丙基、戊基和己基等。

“卤素”包括氟原子、氯原子、溴原子和碘原子。

“环烷基”包括 C₃₋₁₄、优选 C₃₋₁₀、更优选 C₆₋₁₀ 的单环式、双环式或三环式非芳香性碳环，其任选地为部分或全部饱和。

“杂环基”包括包含 1 个或多个 (例如 1-5 个、1-4 个、1-3 个或 1-2 个) 选自磷原子、氮原子、氧原子和硫原子 (特别地，氮原子、氧原子和硫原子) 等的杂原子的单环式、双环式或三环式非芳香性碳环或环烷烃；示例性的，“杂环”包括包含 1-4 个选自氮原子、氧原子和硫原子的杂原子的 5-至 12-元单环式或双环式非芳香性碳环或环烷烃，其任选地为部分或全部饱和。

“芳基”指具有共轭 π 电子系统的全碳单环或稠合多环芳族基团。例如，如本文中所使用，术语“C₆₋₁₄ 芳基”意指含有 6 至 14 个碳原子的芳族基团，诸如苯基或萘基。芳基任选地被 1 或多个 (诸如 1 至 3 个) 适合的取代基 (例如卤素、-OH、-CN、-NO₂、C₁₋₆ 烷基等) 取代。

“杂芳基”为包含至少一个杂原子 (氮、氧或硫) 和碳原子的芳族环基，其包括 5-或 6-元单环式化合物、其中将相同或不同的单环式杂芳环稠合的 8-至 10-元双环式基团和其中将单环式杂芳环与苯稠合的 8-至 10-元双环式基团。杂芳基的具体实例包括呋喃基、噻吩基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、三唑基、四唑基、噁唑基、噻唑基、异噁唑基、异噻唑基、噁二唑基、噻二唑基、呋咱基、吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、哒嗪基、三嗪基、吡啶基、吡唑基、苯并咪唑基、嘌呤基、喹啉基、异喹啉基、二氮杂萘基、喹啉基、喹唑啉基、噌啉基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并噁唑基、苯并噻唑基、苯并异噁唑基和苯并异噻唑基等。

如本文中所使用，术语“取代”指所指定的原子的一个或多个 (例如一个、两个、三个或四个) 氢被从所指出的基团的选择代替，条件是未超过所指定的原子在当前情况下的正常原子价并且所述取代形成稳定的化合物。取代基和/或变量的组合仅仅当这种组合形成稳定的化合物时才是允许的。

如果取代基被描述为“任选取代的”，则取代基可 (1) 未被取代或 (2) 被取代。如果取代基的碳被描述为任选取地被取代基列表中的一个或多个取代，则碳上的一个或多个氢 (至存在的任何氢的程度) 可单独和/或一起被独立地选择的取代基任选地替代。如果取代基的氮被描述为任选取地被取代基列表中的一个或多个取代，则氮上的一个或多个氢 (至存在的任何氢的程度) 可各自被独立地选择的取代基任选地替代。

“任选取代”可以由 1-5 个、优选 1-3 个取代基取代，并且所述取代基包括 (1) 由 1-3 个选自卤素、羟基、羧基、氨基、芳基、杂芳基、环烷基、杂环基取代的烷基，(2) 由 1-3 个选自烷基、卤素、羟基、羧基、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、烷酰基和酰基中的基团取代的碳环基，(3) 由 1-3 个选自烷基、卤素、羟基、羧基、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、烷酰基和酰基中的基团取代的杂环基，(4) 由 1-3 个选自烷基、卤素、羟基、羧基、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、烷酰基和酰基中的基团取代的芳基，(5) 由 1-3 个选自烷基、卤素、羟基、羧基、卤代烷基、烷氧基、卤代烷氧基、烷酰基和酰基中的基团取代的杂芳基，(6) 羟基，(7) 烷氧基，(8) 卤素，(9) 由 1 或 2 个烷基任选取代的氨基，和 (10) 氧基。

本申请还包括所有药理学上可接受的同位素标记的化合物，其与本申请的化合物相同，除了一个或多个原子被具有相同原子序数但原子质量或质量数不同于在自然界中占优势的原子质量或质量数的原子替代。适合包含入本申请的化合物中的同位素的实例包括 (但不限于) 氢的同位素 (例如氕 (²H)、氘 (³H))；碳的同位素 (例如 ¹¹C、¹³C 及 ¹⁴C)；氯的同位素 (例如 ³⁶Cl)；氟的同位素 (例如 ¹⁸F)；碘的同位素 (例

如 ^{123}I 及 ^{125}I); 氮的同位素 (例如 ^{13}N 及 ^{15}N); 氧的同位素 (例如 ^{15}O 、 ^{17}O 及 ^{18}O); 磷的同位素 (例如 ^{32}P); 及硫的同位素 (例如 ^{35}S)。某些同位素标记的本申请的化合物 (例如掺入放射性同位素的那些) 可用于药物和/或底物组织分布研究 (例如分析) 中。放射性同位素氚 (即 ^3H) 及碳-14 (即 ^{14}C) 因易于掺入且容易检测而特别可用于该目的。用正电子发射同位素 (例如 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 及 ^{13}N) 进行取代可在正电子发射断层显像术 (PET) 研究中用于检验底物受体占据情况。

本文所描绘的结构也意味着包括该结构的所有异构 (例如对映异构、非对映异构和几何异构 (或构象异构)) 形式; 例如每一不对称中心的 R 与 S 构型, (Z) 与 (E) 双键异构体, 和 (Z) 与 (E) 构象异构体。因此, 这些化合物的单一立体化学异构体以及对映异构、非对映异构和几何异构 (或构象异构) 混合物都属于本申请的范围。除非另有规定, 本申请化合物的所有互变异构形式都属于本申请的范围。另外, 除非另有规定, 本文所描绘的结构也意味着包括仅在一个或多个同位素富集原子的存在上有所不同的化合物。

本文涵盖本申请的化合物的所有可能的结晶形式或多晶型物, 其可为单一晶型或多于一种的多晶型物的任意比例的混合物。

还应当理解, 本申请的某些化合物可以游离形式存在用于治疗, 或适当时, 以其药学上可接受的衍生物形式存在。在本申请中, 药学上可接受的衍生物包括但不限于, 药学上可接受的盐、溶剂合物、N-氧化物、代谢物或前药, 在将它们向需要其的患者给药后, 能够直接或间接提供本申请的化合物或其代谢物或残余物。因此, 当在本文中提及“本申请的化合物”时, 也意在涵盖化合物的上述各种衍生物形式。

本申请的化合物的药学上可接受的盐包括其酸加成盐及碱加成盐, 其中所述盐的种类不特别限定, 只要其为生理上可接受的即可。适合的药学上可接受的酸加成盐实例包括但不限于盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、硝酸盐、磷酸盐、醋酸盐、三氟醋酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、草酸盐、马来酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、甲磺酸盐、苯磺酸盐、苹果酸盐、天冬氨酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、乳清酸盐、棕榈酸盐及其它类似的盐。适合的药学上可接受的碱加成盐实例包括但不限于钠盐、钾盐、铵盐、钙盐、镁盐、铝盐、铁盐、组氨酸盐、精氨酸盐、胆碱盐及其它类似的盐。

本申请的化合物可以溶剂合物 (优选水合物) 的形式存在, 其中本申请的化合物包含作为所述化合物晶格的结构要素的极性溶剂, 特别是例如水、甲醇或乙醇。极性溶剂特别是水的量可以化学计量比或非化学计量比存在。

本领域技术人员会理解, 由于氮需要可用的孤对电子来氧化成氧化物, 因此并非所有的含氮杂环都能够形成 N-氧化物; 本领域技术人员会识别能够形成 N-氧化物的含氮杂环。本领域技术人员还会认识到叔胺能够形成 N-氧化物。用于制备杂环和叔胺的 N-氧化物的合成方法是本领域技术人员熟知的, 包括用过氧酸如过氧乙酸和间氯过氧苯甲酸 (MCPBA)、过氧化氢、烷基过氧化氢如叔丁基过氧化氢、过硼酸钠和双环氧乙烷 (dioxirane) 如二甲基双环氧乙烷来氧化杂环和叔胺。

在本申请的范围内还包括本申请的化合物的代谢物, 即在给予本申请的化合物时体内形成的物质。这样的产物可由例如被给药的化合物的氧化、还原、水解、酰胺化、脱酰胺化、酯化、酶解等产生。因此, 本申请包括本申请的化合物的代谢物, 包括通过使本申请的化合物与哺乳动物接触足以产生其代谢产物的时间的方法制得的化合物。

本申请在其范围内进一步包括本申请的化合物的前药, 其为自身可具有较小药理学活性或无药理学活性的本申请的化合物的某些衍生物当被给药至身体中或其上时可通过例如水解裂解转化成具有期望活性的本申请的化合物。通常这样的前药会是所述化合物的官能团衍生物, 其易于在体内转化成期望的治疗活性化合物。

本申请中“药学上可接受的载体”是指与活性成分一同给药的药理学上和药物学上可接受的添加剂, 可使用赋形剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、包衣剂、染料、稀释剂、基剂和等张剂等。

所述剂型包括但不限于片剂、胶囊剂、锭剂、硬糖剂、散剂、喷雾剂、乳膏剂、软膏剂、滴剂、栓剂、凝胶剂、糊剂、洗剂、水性混悬剂、可注射溶液剂、酞剂、糖浆剂。

适于口服给药的剂型的实例包括片剂、胶囊、粉剂、细颗粒剂、颗粒剂、液剂和糖浆剂等。适于非口服给药的剂型的实例包括注射剂、滴剂和栓剂等。

在本文中, 除非另有说明, 单数术语涵盖复数的指代物, 反之亦然。

在本文中, 除非另有说明, 术语“受试者”可以和“个体”、“患者”互换使用, 包括脊椎动物, 例如鸟类、鱼类、哺乳动物, 例如但不限于小鼠、大鼠、豚鼠、狗、猪、羊、牛、鸡、兔、猴 (例如恒河猴)、人等。

在本文中, 除非另有说明, 本文所使用的表示成分的量、测量值或反应条件的所有数字应理解为在所

有情况下均由术语“约”修饰，以表示可能的测量误差。例如，当与百分比相连时，术语“约”可以表示 $\pm 1\%$ 。

本申请的式 I 的化合物显示甲状腺激素 β 受体激动剂作用，并能够为对 β 受体激动剂作用有关的疾病的预防或治疗，如用于预防、减少和/或治疗以下疾病的药物：高胆固醇血症、高脂血症、高甘油三酯血症、家族性高胆固醇血症、血脂异常、甲状腺癌、甲状腺功能减退症、潜在的甲状腺功能减退症、动脉粥样硬化、代谢综合征、肥胖症、糖尿病、心血管疾病、冠状动脉疾病、心肌梗死、心室功能不全、心功能衰竭、脂肪肝、肝硬化、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、非酒精性脂肪肝病 (NAFLD)、抑郁症、痴呆症、骨质疏松症、秃头症、指甲疾病、皮肤病、肾脏疾病、慢性肾功能衰竭和/或癌症等，尤其是高胆固醇血症、高脂血症、高甘油三酯血症、家族性高胆固醇血症、血脂异常、动脉粥样硬化、甲状腺功能减退症和/或潜在的甲状腺功能减退症等。

附图说明

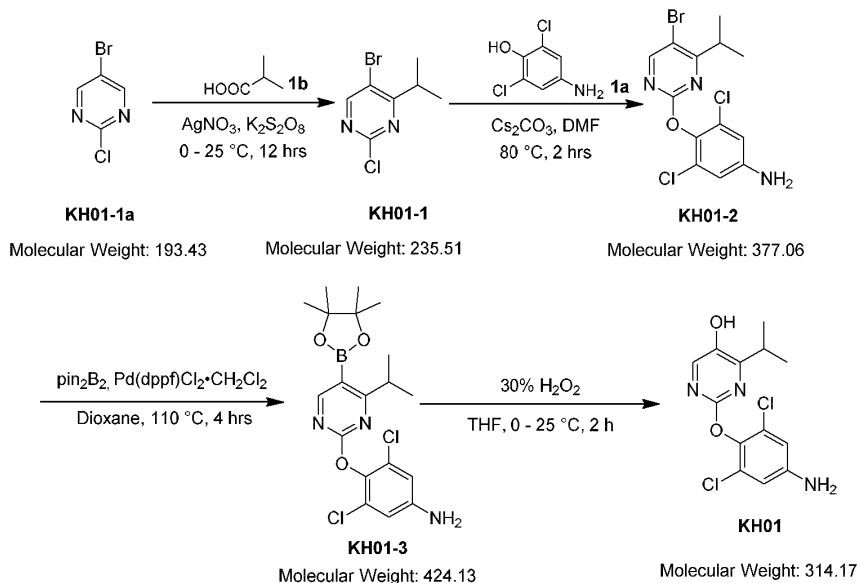
附图 1 为纤维化评价结果。

附图 2 为 NAS 评分结果。

具体实施方式

为了使本申请的目的和技术方案更加清楚，以下结合具体实施例进一步阐述本申请。应理解，这些实施例仅用于说明本申请而并不用于限制本申请的范围。并且，下列实施例中未提及的具体实验方法，均按照常规实验方法进行。

实施例 1 关键中间体 KH01 的合成



化合物 KH01-1: 于 0°C 下，将起始物料 2-氯-5-溴嘧啶 (KH01-1a) (100 g, 516 mmol, 1.00 eq)、异丁酸 (1b) (36.4 g, 413 mmol, 38.3 mL, 0.80 eq)、过硫酸钾 (111 g, 413 mmol, 82.8 mL, 0.80 eq)、硝酸银 (17.5 g, 103 mmol, 0.20 eq) 加入到圆底烧瓶中，加入二氯甲烷 1L、水 1L，搅拌均匀后，有固体未溶解，转至室温 (25°C)，氮气保护下，搅拌反应 12h。TLC 检测，原料反应完全，有新点产生。将反应液过滤，滤饼用二氯甲烷洗涤两次 (每次 1L)；收集滤液，减压浓缩；硅胶 (100-200 目) 柱层析纯化 (石油醚/乙酸乙酯 100:1) 得油状物 KH01-1, 54.0 g, 收率: 44.3%。LCMS: MS (ESI) $m/z = 236.9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (400MHz CDCl_3): δ 8.58 (s, 1H), 3.48-3.41 (m, 1H), 1.29 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。

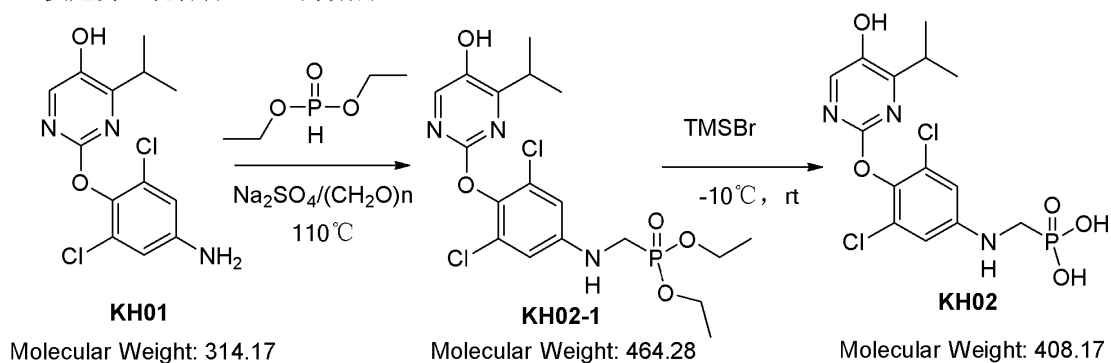
化合物 KH01-2: 将 KH01-1 (15.0 g, 63.6 mmol, 1.00 eq) 加入到圆底烧瓶中，加入化合物 1a (11.3 g, 63.6 mmol, 1.00 eq)、碳酸铯 (62.2 g, 191 mmol, 3.00 eq)、N,N-二甲基乙酰胺 (150 mL)，充分搅拌后，氮气置换三次，并于氮气保护下，外温 80°C 反应 2h。TLC 检测原料反应完全，将反应液倒入 100mL 水中，搅拌，固体溶解，加入乙酸乙酯萃取 (100mL*2 次)，合并乙酸乙酯层，饱和食盐水洗涤 (100mL*2 次)，无水硫酸钠干燥，过滤，将滤液浓缩，硅胶 (100-200 目) 柱层析纯化 (石油醚/乙酸乙酯 1:2)，得 KH01-2 黄色固体 13.0g, 收率: 54.1%。LCMS: MS (ESI) $m/z = 378.0$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (400MHz CDCl_3): δ 8.46 (s, 1H), 6.68 (s, 2H), 3.78 (s, 2H), 3.43-3.36 (m, 1H), 1.22 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。

化合物 KH01-3: 将原料 KH01-2 (10.0 g, 26.5 mmol, 1.00 eq)、双联频哪醇硼酸酯 (pin_2B_2) (13.4 g, 53.0

mmol, 2.00 eq)、1,1-双(二苯基膦)二茂铁二氯化钨二氯甲烷络合物(1.08 g, 1.33 mmol, 0.05 eq)、醋酸钾(5.21 g, 53.0 mmol, 2.00 eq)用二氧六环(100mL)溶解后, 氮气置换三次, 氮气保护下, 于外温 110℃反应 4h 后, TLC 检测原料反应完全, 向反应液中加入 200mL 水, 用乙酸乙酯萃取 (200mL*3), 合并乙酸乙酯层, 用饱和食盐水洗涤 (300mL*2), 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液浓缩后得棕色油状物 12.0g, 无需纯化, 直接下一步反应。LCMS: MS (ESI) $m/z = 425.2 [M+H]^+$ 。

化合物 **KH01**: 于外温 0℃下, 将原料 **KH01-3** (12.0 g, 28.2 mmol, 1.00 eq)、30.0%双氧水(6.74 g, 59.4 mmol, 5.71 mL, 2.10 eq)用四氢呋喃(120 mL)溶解后, 氮气保护下转至室温 (25℃) 搅拌反应 2h, TLC 检测反应完全后, 加入 2M 亚硫酸钠溶液 50mL 终止反应, 用二氯甲烷萃取 (5mL*3), 收集有机层, 无水硫酸钠干燥, 浓缩后, 硅胶 (100-200 目) 柱层析纯化 (石油醚/乙酸乙酯 1:2), 得黄色固体 4.80g, 收率: 53.4%。LCMS: MS (ESI) $m/z = 314.1 [M+H]^+$ 。 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9.85 (br s, 1H), 7.95 (s, 1H), 6.66 (s, 2H), 5.52 (s, 2H), 3.31 - 3.18 (m, 1H), 1.10 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。

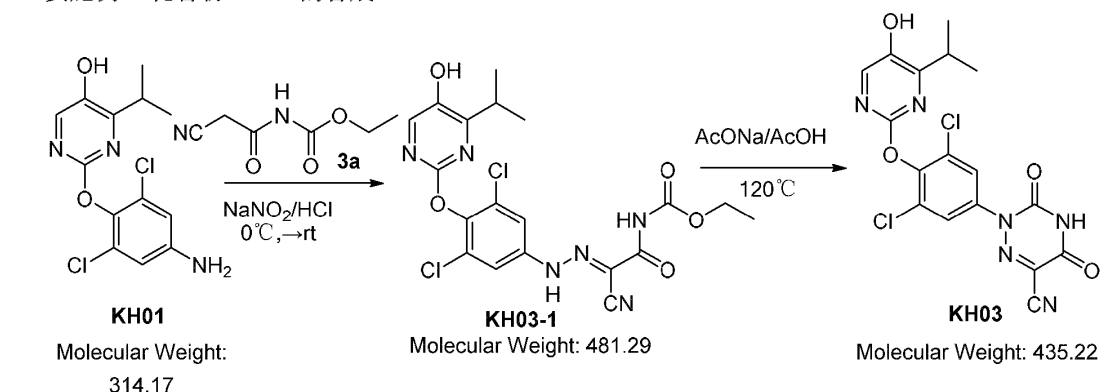
实施例 2 化合物 **KH02** 的合成



化合物 **KH02-1**: 称取化合物 **KH01** (0.152 g, 0.485 mmol)、亚磷酸二乙酯(0.104 g, 0.754 mmol)、多聚甲醛(0.095 g, 1.055 mmol)和硫酸钠(0.156 g, 1.098 mmol)放入单口瓶中, 加入甲苯 (8 mL) 部分溶解, N_2 保护。于外温 110℃下反应 3 小时后, TLC 监测原料反应完全, 有极性变大主点生成, 停止反应。向反应液中加入水 100mL, 并用乙酸乙酯(50mL*3)萃取, 收集有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩, 硅胶色谱柱纯化残余物 (石油醚/乙酸乙酯=1:2), 得到无色油状物 **KH02-1** (142mg, 63%)。LC-MS (ESI, m/z): 465.3 $[M+H]^+$ 。

化合物**KH02**: 取化合物**KH02-1** (0.142 g, 0.306 mmol)放入单口瓶中, 加入二氯甲烷 (10 mL) 溶解, N_2 保护。在外温-10℃下, 向反应体系缓慢滴加三甲基溴硅烷(3.2mL), 保持该温度反应30min后, 缓慢升至室温反应过夜。LCMS检测原料完全反应, 直接旋干反应液, 用制备HPLC纯化产品。收集目标产品冻干得到淡黄色固体化合物**KH02** (55 mg, 44%)。 1H NMR (400 MHz, DMSO): δ 9.87 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 6.82 (s, 2H), 4.61 - 5.22 (m, 3H), 3.27 (m, 3H), 1.12 (d, $J = 4$ MHz, 6H)。LC-MS (ESI, m/z): 408.0 $[M+1]^+$ 。

实施例 3 化合物 **KH03** 的合成

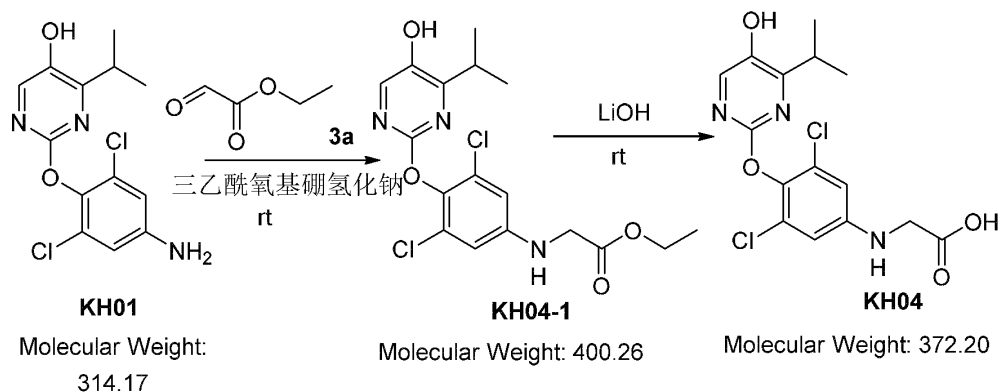


化合物 **KH03-1**: 将化合物 **KH01** (0.265 g, 0.846 mmol)加入 11.2 mL 水中, 在外温 0℃下加入 5.6 mL 浓盐酸, 将称取的亚硝酸钠(0.072 g, 1.043 mmol)溶于 0.8 mL 水中, 缓慢的滴加至上述反应液中, 并在 0℃下搅拌 1.5h, 使其成为溶液; 另称取化合物 **3a** (0.148 g, 0.948 mmol)溶于 19.4 mL 水中, 在 0℃下加入 5.6 mL 吡啶, 并在该温度下搅拌 1.5 h 后, 在 0℃下迅速加入到上述反应中, 此时有橘红色固体生成, 将反应液缓

慢升至室温(25℃)继续反应过夜。TLC 监测反应显示反应完全,直接用过滤漏斗将固体过滤,用 50 mL 水和 PE 分别冲洗固体三次。收集获得橘红色固体 **KH03-1** (380 mg, 93.8%)。LC-MS (ESI, m/z): 482.3 $[M+1]^+$ 。

化合物KH03: 取化合物**KH03-1** (0.380 g, 0.931 mmol)和醋酸钠(0.650 g, 7.926 mmol)放入单口瓶中,加入醋酸(10 mL)溶解, N_2 保护。于外温120℃下反应3h。TLC检测原料完全反应,停止反应。将反应液降温至0℃,加入100mL水后,有大量固体析出,直接用过滤漏斗将固体过滤,用50 mL水和PE分别冲洗固体三次。收集获得橘红色固体**KH03** (230 mg, 66.9%)。 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.09 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.75 (s, 2H), 3.27 - 3.28 (m, 1H), 1.13 (d, J = 4 MHz, 6H)。LC-MS (ESI, m/z): 435.2 $[M+1]^+$ 。

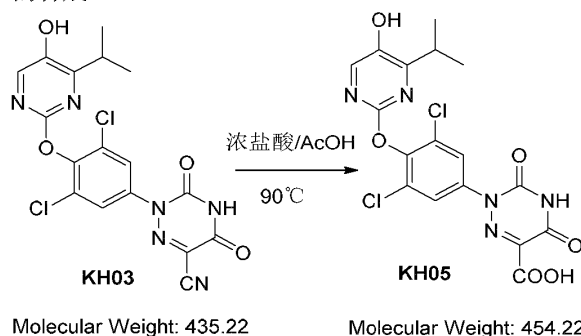
实施例4 化合物 KH04 的合成



化合物KH04-1: 称取化合物**KH01** (0.0512 g, 0.1635 mmol)、乙醛酸乙酯(0.0274 g, 0.268 mmol)和三乙氧基硼氢化钠(0.1023 g, 0.483 mmol)放入单口瓶中,加入1,2-二氯乙烷(3 mL)溶解。于外温75℃下反应3小时,TLC监测原料反应完全,有极性变大主点生成,停止反应。向反应液中加入二氯甲烷50mL和水100mL,搅拌10min后,分出有机相,水相再用二氯甲烷萃取(50mL*2),合并有机相,无水硫酸钠干燥,过滤浓缩,层析板纯化残余物(石油醚/乙酸乙酯=1:2),得到无色油状物**KH04-1** (50 mg, 78.5%)。LC-MS (ESI, m/z): 401.3 $[M+1]^+$ 。

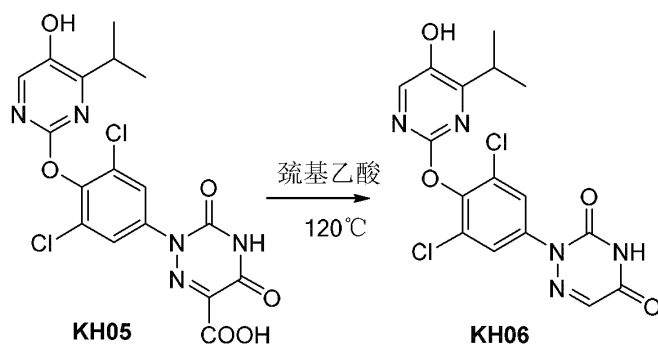
化合物KH04: 取化合物**KH04-1** (50 mg, 0.125 mmol)和氢氧化锂(35 mg, 1.458 mmol)放入单口瓶中,加入四氢呋喃/甲醇/水(4:1:1, 6 mL)溶解。于室温下反应过夜。TLC检测原料完全反应,停止反应。加入20mL水稀释反应液,将有机溶剂减压除去,并在0℃下将反应PH调至3-4,反应液中加入二氯甲烷(50mL*3)萃取,收集有机相,无水 Na_2SO_4 干燥,过滤浓缩去除溶剂,层析板纯化残余物(二氯甲烷/甲醇=5:1),收集目标产品,冻干后得到白色固体**KH04** (24 mg, 51.6%)。 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.48 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 6.65 (s, 2H), 5.98 (s, 1H), 4.21 - 4.22 (m, 1H), 3.49 (s, 1H), 3.34 - 3.19 (m, 2H), 1.12 (d, J = 4 MHz, 6H)。LC-MS (ESI, m/z): 372.1 $[M+1]^+$ 。

实施例5 化合物 KH05 的合成



取100mg化合物**KH03**,用醋酸5mL溶解后,加入浓盐酸1mL,于外温90℃下搅拌反应4h,TLC检测原料反应完全,将反应液减压旋干,加入饱和碳酸钠溶液调至pH 9~10。乙酸乙酯50ml萃取后,弃去有机相,水相,调pH至3~4,再用乙酸乙酯萃取(50mL*3),合并有机相,无水硫酸钠干燥,浓缩的白色固体70mg。收率: 67.1%。LC-MS (ESI, m/z): 455.3 $[M+1]^+$ 。

实施例6 化合物 KH06 的合成

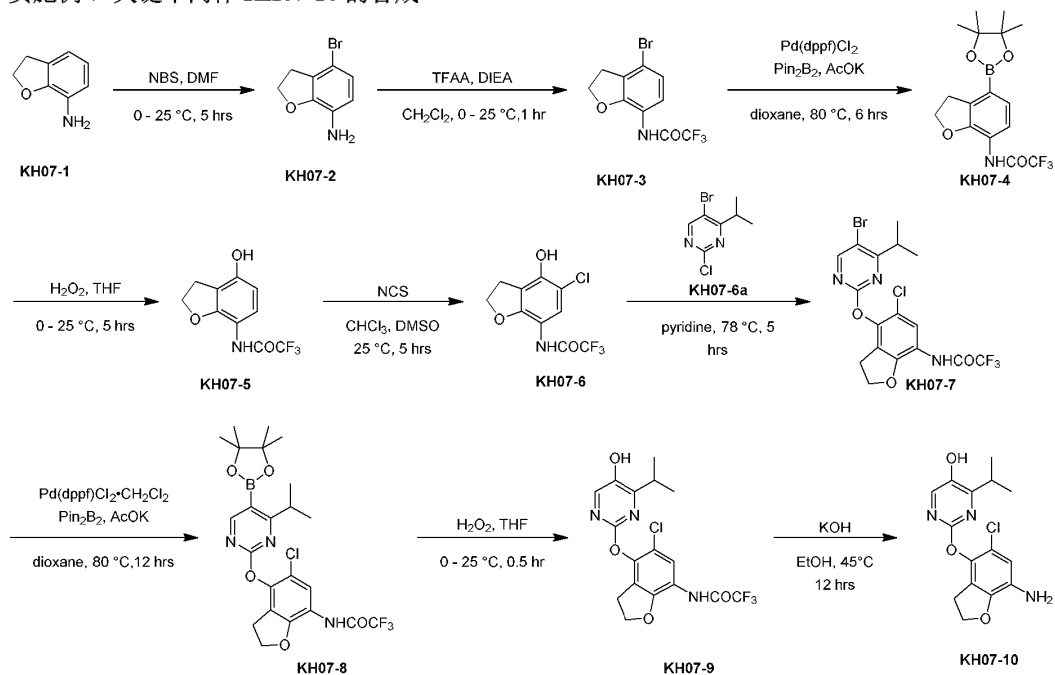


Molecular Weight: 454.22

Molecular Weight: 410.21

取60mg **KH05**, 用巯基乙酸4mL溶解后, 氮气保护下, 于外温120℃下搅拌反应6h后, TLC检测有极性小的产品点产生, 向反应液中加入饱和硫代硫酸钠淬灭反应, 并用乙酸乙酯萃取 (25mL*3), 合并有机相, 无水硫酸钠干燥浓缩, 用层析板纯化(二氯甲烷/甲醇10:1), 收集目标产品, 冻干得到白色固体**KH06**约15mg, 收率: 27.8%。LC-MS (ESI, m/z): 410.1 $[M+1]^+$ 。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ : 12.49(s, 1H), 10.08(s, 1H), 8.01(s, 2H), 7.71(d, $J=4$ MHz, 1H), 3.27-3.33(m, 1H), 1.12(d, $J=4$ MHz, 6H)。

实施例 7 关键中间体 KH07-10 的合成



化合物 **KH07-2**: 将起始原料 **KH07-1** (25.0 g, 184 mmol, 1 eq) 溶解于 DMF (200 mL) 中, 于 0℃ 下, 缓慢加入 NBS (32.9 g, 184 mmol, 1 eq), 加毕, 于外温 25℃ 搅拌反应 5h。LCMS 监测原料反应完全, 有新点 ($RT = 0.483$) 产生。TLC (石油醚/乙酸乙酯=3/1) 监测发现产生两个新点。将反应液用水 (250 mL) 稀释后, 加入乙酸乙酯 (250 mL * 2) 萃取。合并有机相, 饱和食盐水 (250 mL * 2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 硅胶柱层析 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 至 3/1) 得黄色固体 **KH07-2** (29.1 g, 135 mmol, 收率 73.5%)。MS (ESI) m/z : 216.1 $[M+H]^+$ 。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 6.75 - 6.69 (m, 1H), 6.43 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 4.76 (s, 2H), 4.58 - 4.49 (m, 2H), 3.15 - 3.08 (m, 2H)。

化合物 **KH07-3**: 将化合物 **KH07-2** (28.0 g, 130 mmol, 1 eq) 和 TFAA (32.9 g, 156 mmol, 21.8 mL, 1.2 eq) 溶解于二氯甲烷 (280 mL) 中, 于外温 0℃ 缓慢滴加 DIEA (33.8 g, 261 mmol, 45.5 mL, 2 eq), 加毕, 转外温 25℃ 搅拌 1h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 5/1) 监测原料反应完全。将反应液倒入水 (280 mL) 中, 用二氯甲烷 (300 mL * 3) 萃取, 合并有机层, 用饱和食盐水 (280 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 硅胶柱层析纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 至 3/1) 得黄色固体 **KH07-3** (27.8 g, 收率 68.5%)。MS (ESI) m/z : 309.9

$[M+H]^+$. 1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 11.26 - 10.86 (m, 1H), 7.15 - 7.10 (m, 1H), 7.09 - 7.03 (m, 1H), 4.71 - 4.62 (m, 1H), 4.66 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 3.25 (t, J = 8.8 Hz, 2H)。

化合物 **KH07-4**: 将化合物 **KH07-3** (27.0 g, 87.0 mmol, 1 eq)、Pd(dppf)Cl₂•CH₂Cl₂ (3.56 g, 4.35 mmol, 0.05 eq)、Pin₂B₂ (55.2 g, 217 mmol, 2.5 eq)和醋酸钾(25.6 g, 261 mmol, 3 eq)加入到二氧六环中(270 mL), 并于氮气保护下, 外温 80℃搅拌 6h。LCMS 监测原料反应完全, 将反应液倒入水(500mL)中, 用乙酸乙酯(500 mL * 3)萃取。合并有机相, 饱和食盐水(500 mL * 3)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 得棕色固体 **KH07-4**(33.0 g, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 358.1 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KH07-5**: 将化合物 **KH07-4**(32.0 g, 89.6 mmol, 1 eq)用四氢呋喃(300 mL)溶解后, 于外温 0℃下缓慢滴加 H₂O₂ (30.4 g, 268 mmol, 25.8 mL, 纯度 30.0%, 3 eq), 加毕, 转外温 25℃下搅拌反应 5h。LCMS 监测原料反应完全, 将反应液缓慢倒入饱和亚硫酸钠(400 mL)中终止反应, 用乙酸乙酯萃取(200 mL * 2); 合并有机相, 饱和食盐水(100 mL * 2)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 硅胶柱层析(SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 20/1 至 5/1)纯化, 得白色固体 **KH07-5**(20.0 g, 80.9 mmol, 收率 90.3%)。MS (ESI) m/z : 248.1 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 10.6 (s, 1H), 9.63 (s, 1H), 6.87 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.31 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 4.55 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 3.09 (t, J = 8.8 Hz, 2H)。

化合物 **KH07-6**: 将化合物 **KH07-5**(10.0 g, 40.4 mmol, 1 eq)和 NCS (6.48 g, 48.5 mmol, 1.20 eq)加入到氯仿(100 mL)和 DMSO (25.0 mL)的混合溶剂中, 并于外温 25℃下搅拌反应 5h。LCMS 监测原料反应完全, 直接将反应液浓缩, 制备 HPLC 纯化, 得白色固体 **KH07-6**(4.50 g, 15.9 mmol, 收率 39.5%)。MS (ESI) m/z : 282.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(CDCl₃, 400 MHz): δ 8.00 - 7.88 (m, 1H), 7.76 (br s, 1H), 5.57 (br s, 1H), 4.65 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 3.24 - 3.18 (m, 2H)。

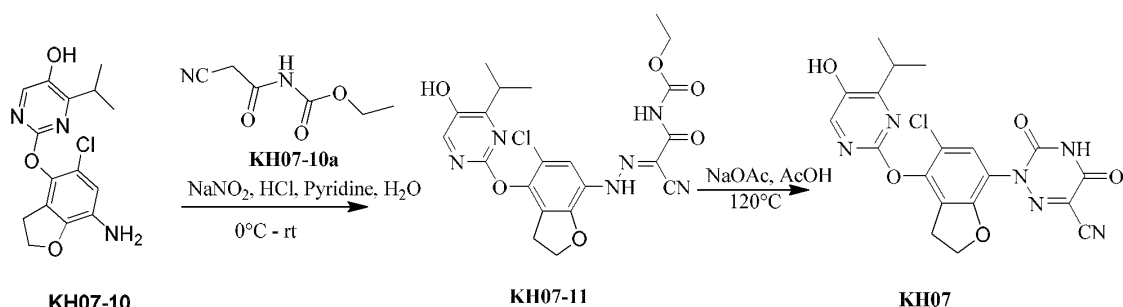
化合物 **KH07-7**: 将化合物 **KH07-6** (2.50 g, 8.88 mmol, 1 eq)和 **KH07-6a** 加入到 25mL 吡啶中, 于外温 78℃下, 搅拌反应 5h。TLC(石油醚/乙酸乙酯 = 5/1) 监测原料反应完全。将反应液倒入 60mL 水中, 用乙酸乙酯(100 mL * 3)萃取, 合并有机相, 饱和食盐水(100 mL * 3)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 硅胶柱层析(SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 5/1 至 3/1)纯化, 得黄色固体 **KH07-7** (1.20 g, 2.50 mmol, 收率 28.1%)。MS (ESI) m/z : 482.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 11.20 - 11.11 (m, 1H), 8.73 (s, 1H), 7.47 - 7.35 (m, 1H), 4.68 - 4.61 (m, 2H), 3.39 - 3.34 (m, 1H), 3.15 - 3.06 (m, 2H), 1.15 (d, J = 6.8 Hz, 6H)。

化合物 **KH07-8**: 将化合物 **KH07-7** (1.05 g, 2.18 mmol, 1 eq)、Pin₂B₂ (1.39 g, 5.46 mmol, 2.5 eq)、AcOK (643 mg, 6.55 mmol, 3 eq)和 Pd(dppf)Cl₂•CH₂Cl₂ (107 mg, 131 mmol, 0.06 eq)加入到 10mL 二氧六环中, 氮气置换反应中的空气 3 次, 并继续在氮气保护下, 于外温 80℃下, 搅拌反应 12h。LCMS 监测原料有剩余, 产生大约 39.8%的产品。直接将反应液浓缩, 残留物加入水 100mL 搅拌, 用乙酸乙酯萃取(100 mL * 2), 饱和食盐水(100 mL * 2)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩得棕色固体(1.00 g, 粗品)。MS (ESI) m/z : 528.1 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KH07-9**: 操作同化合物 **KH07-5** 的合成, 硅胶柱层析纯化(SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 1/0 至 3/1), 得白色固体 **KH07-9**(700 mg)。MS (ESI) m/z : 418.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 11.12 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 4.62 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 4.34 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 3.30 - 3.26 (m, 1H), 3.02 (t, J = 8.8 Hz, 2H), 1.17 - 1.10 (m, 1H), 1.14 (d, J = 6.8 Hz, 6H)。

化合物 **KH07-10**: 将化合物 **KH07-9** (700 mg, 1.68 mmol, 1 eq)和氢氧化钾(376 mg, 6.70 mmol, 4 eq)加入到 4mL 乙醇和 3mL 水的混合液中, 并于外温 45℃下搅拌反应 12h。LCMS 监测原料反应完全, 将反应液用 1N 的盐酸调 pH 7 左右, 加入 50mL 水, 搅拌 10min 后, 用乙酸乙酯萃取(50 mL * 2)。合并有机相, 饱和食盐水(100 mL * 2)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 制备 HPLC 纯化, 得淡黄色固体 **KH07-10**(501.4mg, 收率 93.0%, 纯度 99.6%)。MS (ESI) m/z : 322.2 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 9.81 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 6.71 - 6.35 (m, 1H), 5.75 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 4.50 (br t, J = 8.8 Hz, 2H), 3.31 - 3.21 (m, 1H), 2.90 (br t, J = 8.8 Hz, 2H), 1.12 (d, J = 6.8 Hz, 6H)。

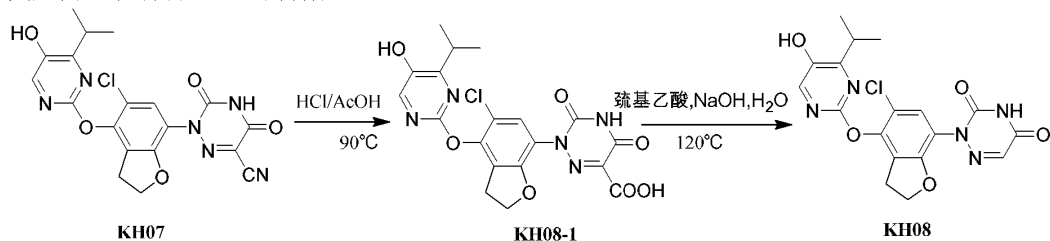
实施例 8 化合物 **KH07** 的合成



化合物 KH07-11: 反应液 A: 称取化合物 **KH07-10** (202.5mg, 0.637 mmol) 加入到 10mL 水中, 在 0°C 下加入 5.6mL 浓盐酸, 将称取的亚硝酸钠(58.3mg, 0.803mmol)溶于 1 mL 水中, 缓慢的滴加进入反应液, 并在 0°C 下搅拌 1.5h, 使其成为溶液; 反应液 B: 称取化合物 **KH07-10a** (108.8mg, 0.7 mmol) 加入到 20 mL 水中, 在 0°C 下加入 5.6 mL 吡啶, 并在该温度下搅拌 1.5 h。然后在 0°C 下将反应液 A 迅速倒入反应液 B 中, 有橘红色固体生成, 缓慢升至室温继续反应过夜。TLC 监测反应显示反应完全, 直接将固体过滤, 并用水和石油醚 (25mL*3) 分别洗涤固体。得橘红色固体 **KH07-11** (280 mg, 收率 89.9%, 粗品), 无须纯化, 直接下一步。MS (ESI) m/z : 289.2 $[M+H]^+$ 。

化合物 KH07: 取化合物 **KH07-11** (280 mg, 0.573 mmol) 和醋酸钠(485.4mg, 5.73 mmol) 放入单口瓶中, 加入醋酸 (10 mL) 溶解, N_2 保护。在 120°C 下反应 3h。TLC 检测原料完全反应, 停止反应。反应降温至 0°C, 加入 50mL 水后, 有大量固体析出, 直接将固体过滤, 用水 (20mL*3) 和石油醚 (20mL*3) 分别冲洗固体。收集获得橘红色固体 (254 mg, 粗品), 并取 50mg 上述粗品用 HPLC 制备纯化得到类白色固体化合物 **KH07** (13.5 mg, 27.0%)。MS (ESI) m/z : 443.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): 10.06(s, 1H), 7.40(s, 1H), 4.65(t, 2H, $J=8.0$ Hz), 3.21-3.32(m, 1H), 3.05(t, 2H, $J=8.0$ Hz), 1.16(d, 6H, $J=8.0$ Hz)。

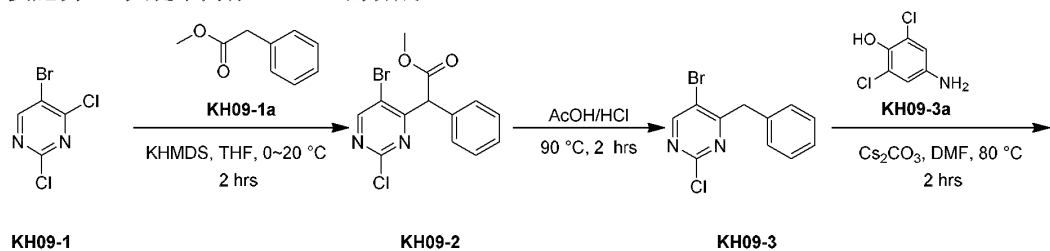
实施例 9 化合物 KH08 的合成



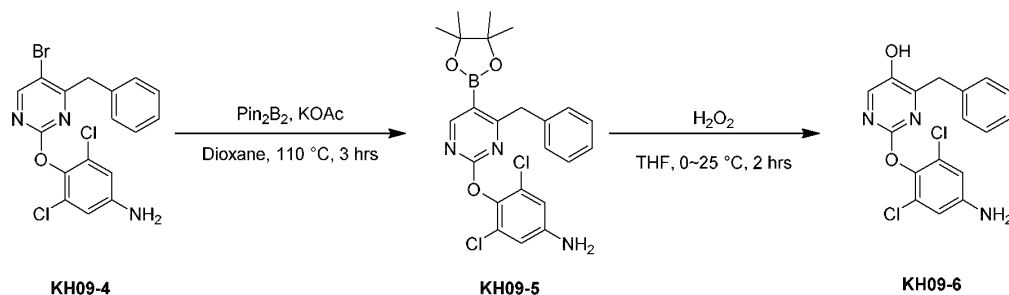
化合物 KH08-1: 称取化合物 **KH07** 粗品(200 mg, 0.452mmol) 放入单口瓶中, 加入醋酸 (7.5 mL) 溶解后, 向反应中滴加浓盐酸(2.5mL)。在 90°C 下反应 4 小时后, TLC 监测原料反应完全, 有极性变大主点生成, 停止反应。直接将反应液旋干, 用饱和碳酸钠溶液将反应 pH 调至 9-10, 用乙酸乙酯(20mL*2)萃取两次, 收集水相并将水相 pH 调至 3-4, 再用乙酸乙酯(20mL*3)萃取, 收集有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 有机相浓缩, 得到黄色固体 **KH08-1** (186.5mg, 89.4%), 无须纯化直接用于下一步。

化合物 KH08: 取化合物 **KH08-1** (150 mg, 0.325 mmol, 1eq) 和氢氧化钠(52mg, 1.3 mmol, 4eq) 放入单口瓶中, 加入水 (20 mL) 溶解, 将巯基乙酸(0.6g, 6.5 mmol, 20eq) 加入至反应液中, 并在 120°C 下反应 3h。TLC 检测原料完全反应, 有极性变小的点生成, 停止反应。加入饱和碳酸钠溶液将反应体系 pH 调至中性, 乙酸乙酯 (20mL*3) 萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干制备 HPLC 纯化后得到白色固体 **KH08** (36.8 mg, 27.1%)。MS (ESI) m/z : 418.2 $[M+H]^+$ 。

实施例 10 关键中间体 KH09-6 的合成



18



化合物 **KH09-2**: 将原料 **KH09-1** (50.0 g, 219 mmol, 28.0 mL, 1.00 eq) 和 **KH09-1a** (32.9 g, 219 mmol, 30.8 mL, 1.00 eq) 用四氢呋喃 (200 mL) 溶解后, 于 0 °C 下, 滴加 KHMDs (1.00 M, 230 mL, 1.05 eq), 加毕, 继续于该温度下搅拌反应 10 min 后, 转至 25 °C 下搅拌反应 2 h。TLC (石油醚/乙酸乙酯=10:1) 监测原料反应完全, 将反应液缓慢倒入冰水中, 并用二氯甲烷 (500 mL*3) 萃取, 合并有机相, 饱和食盐水 (300 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 得黄色油状物 **KH09-2** (75.0 g, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.97 (s, 1H), 7.37 - 7.28 (m, 5H), 7.26 - 7.20 (m, 1H), 5.64 (s, 1H), 3.68 - 3.64 (m, 3H)。

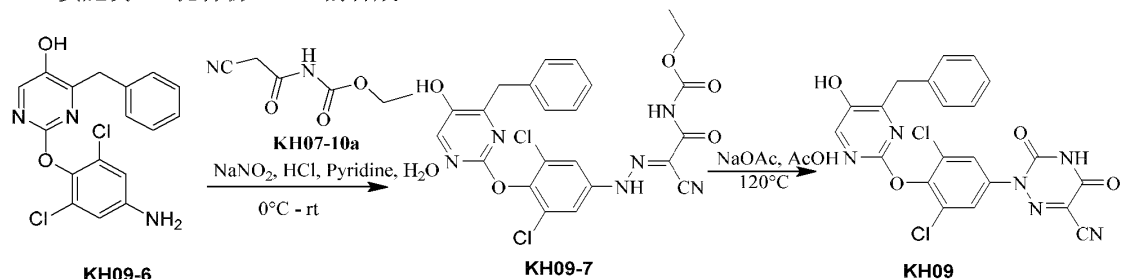
化合物 **KH09-3**: 取 **KH09-2** (75.0 g, 219 mmol, 1.00 eq) 溶于氯化氢的乙酸溶液 (100 mL) 中, 并于外温 90 °C 下, 搅拌反应 2 h。LCMS 监测原料反应完全, 直接将反应液旋干, 硅胶柱层析纯化 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯=100/1 至 20/1) 得类白色固体 **KH09-3** (23.0 g, 81.1 mmol, 收率 36.9%)。MS (ESI) *m/z*: 282.9 [M+H]⁺。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.93 (s, 1H), 7.37 - 7.28 (m, 2H), 7.28 - 7.21 (m, 3H), 4.23 (s, 2H)。

化合物 **KH09-4**: 将化合物 **KH09-3** (10.0 g, 35.2 mmol, 1.00 eq) 和化合物 **KH09-3a** (6.28 g, 35.2 mmol, 1.00 eq) 用 100 mL DMF 溶解后, 加入碳酸铯 (34.4 g, 105 mmol, 3.00 eq), 并于外温 80 °C 下, 搅拌反应 2 h。TLC (石油醚/乙酸乙酯=100:1) 监测原料反应完全。过滤反应液, 滤渣用乙酸乙酯 (20 mL) 洗涤, 收集滤液, 加入 50 mL 水, 搅拌 5 min 后, 分出有机相, 水相再用乙酸乙酯 (20 mL*2) 萃取, 合并有机相, 饱和食盐水 (100 mL*2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 硅胶柱层析纯化 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯=100/1 至 20/1) 得白色固体 **KH09-4** (12.0 g, 28.2 mmol, 收率 80.0%)。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.75 (s, 1H), 7.41 - 7.12 (m, 5H), 6.68 (s, 2H), 5.64 (s, 2H), 4.14 (s, 2H)。

化合物 **KH09-5**: 取化合物 **KH09-4** (5.00 g, 11.7 mmol, 1.00 eq)、Pin₂B₂ (5.97 g, 23.5 mmol, 2.00 eq) Pd(dppf)Cl₂.CH₂Cl₂ (480 mg, 588 μmol, 0.05 eq) 和醋酸钾 (2.31 g, 23.5 mmol, 2.00 eq) 加入到 50 mL 二氧六环中, 氮气置换反应液空气 3 次, 并在氮气保护下, 于外温 110 °C 下搅拌反应 4 h。TLC 监测原料反应完全, 将反应液过滤, 收集滤液, 直接旋干, 硅胶柱层析纯化 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯=100:1 至 50:1) 得棕色油状物 (5.00 g, 粗品, 存在硼酸产物)。

化合物 **KH09-6**: 将化合物 **KH09-5** (5.00 g, 10.5 mmol, 1.00 eq) 用四氢呋喃溶解后, 0 °C 下, 加入 H₂O₂ (2.46 g, 21.7 mmol, 2.08 mL, 纯度 30%, 2.05 eq) 搅拌 30 min 后, 继续加入 H₂O₂ (4.80 g, 42.3 mmol, 4.07 mL, 纯度 30%, 4.00 eq) 后, 转至室温搅拌反应 2 h。TLC 监测原料反应完全, 将反应液倒入 50 mL 饱和亚硫酸钠溶液中, 搅拌 15 min; 用二氯甲烷 (200 mL *3) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 硅胶柱层析纯化 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯=100:1 至 10:1) 得淡黄色固体 **KH09-6** (1.01 g, 2.74 mmol, 收率 25.8%)。MS (ESI) *m/z*: 362.0 [M+H]⁺。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 10.03 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.38 - 7.09 (m, 5H), 6.66 (s, 2H), 5.54 (s, 2H), 3.97 (s, 2H), 1.98 (s, 1H)。

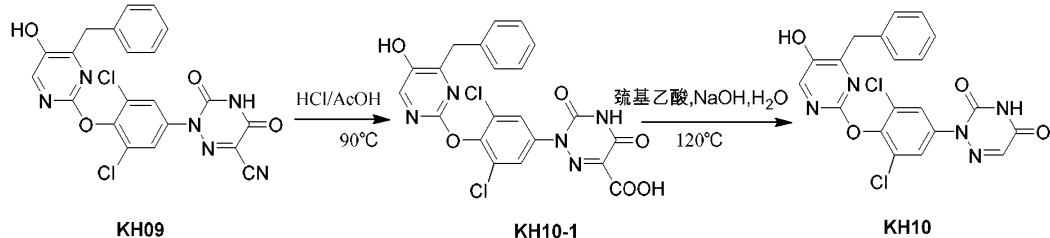
实施例 11 化合物 **KH09** 的合成



化合物 **KH09-7**: 操作同 **KH07-11** 的合成, 得橘红色固体 **KH09-7** (323 mg, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。

化合物 **KH09**: 操作同化合物 **KH07** 的合成, 得橘红色固体 **KH09** (432mg, 粗品), 取 50mg, 制备 HPLC 纯化后, 得 6.12mg 白色固体, 收率 7.65%。MS (ESI) m/z : 482.9 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 13.05 -13.10 (m, 1H), 10.26 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.75 (s, 2H), 7.18 - 7.30(m, 5H), 4.00 (s, 1H)。

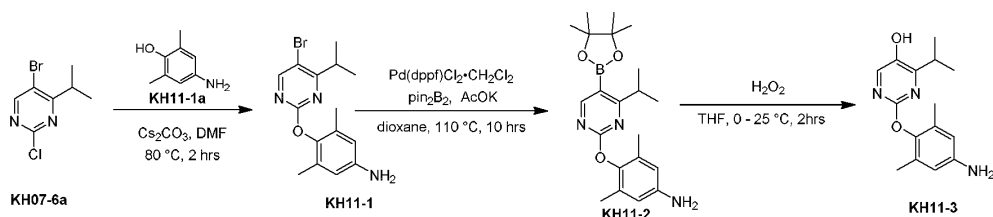
实施例 12 化合物 **KH10** 的合成



化合物 **KH10-1**: 操作同化合物 **KH08-1** 的合成, 得黄色固体(255.7 mg, 粗品), 无须纯化直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 502.0 $[M+1]^+$ 。

化合物 **KH10**: 操作同化合物 **KH08** 的合成, 得白色固体 **KH10**(51 mg, 收率 20.0%)。MS (ESI) m/z : 458.0 $[M+1]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): 12.49(s, 1H), 10.25(s, 1H), 8.01(s, 1H), 7.77(s, 2H), 7.72(d, 1H, $J=4.0$ Hz), 7.17-7.30(m, 5H), 4.0(s, 2H)。

实施例 13 关键中间体 **KH11-3** 的合成

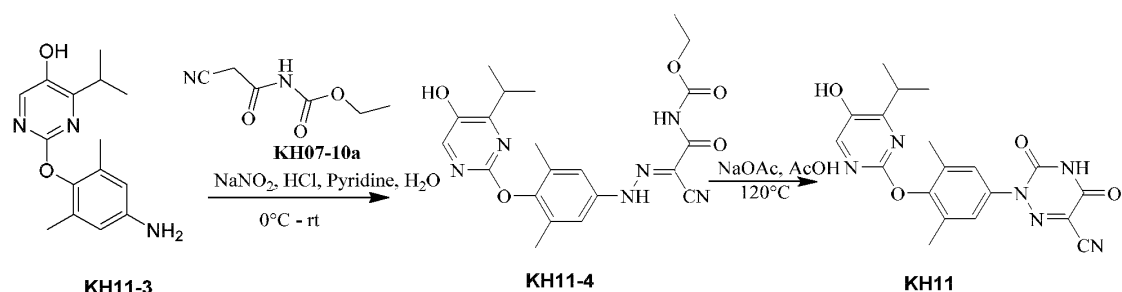


化合物 **KH11-1**: 操作同化合物 **KH09-4** 的合成, 硅胶柱层析纯化(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 1/0 至 1/2), 得橘红色固体 **KH11-1** (9.00 g, 26.7 mmol, 收率 73.4%)。MS (ESI) m/z : 338.1 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 8.42 (s, 1H), 6.43 (s, 2H), 3.52 (br s, 2H), 3.46 - 3.33 (m, 1H), 2.04 (s, 6H), 1.25 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。

化合物 **KH11-2**: 将化合物 **KH11-1** (5.00 g, 14.8 mmol, 1.00 eq)、 pin_2B_2 (7.55 g, 29.7 mmol, 2.00 eq)、 $Pd(dppf)Cl_2 \cdot CH_2Cl_2$ (607 mg, 743 μ mol, 0.05 eq) 和醋酸钾(2.92 g, 29.7 mmol, 2.00 eq) 加入到 50mL 二氧六环中, 氮气置换反应液空气 3 次, 并在氮气保护下, 于外温 110°C 下, 搅拌反应 10h。TLC 监测原料反应完全, 直接将反应液旋干, 加入 50mL 水和乙酸乙酯 50mL, 搅拌 10min 后, 分出有机相, 水相再用乙酸乙酯 (50mL*2) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 得黑色油状物 **KH11-2** (6.00 g, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 384.5 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KH11-3**: 操作同化合物 **KH09-6**, 制备 HPLC (0.1% TFA) 纯化, 得类白色固体 (1.11 g, 2.79 mmol, 收率 17.8%, TFA 盐)。MS (ESI) m/z : 274.2 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(MeOD, 400 MHz): δ 7.93 (s, 1H), 7.12 (s, 2H), 3.40 - 3.33 (m, 1H), 2.13 (s, 6H), 1.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。

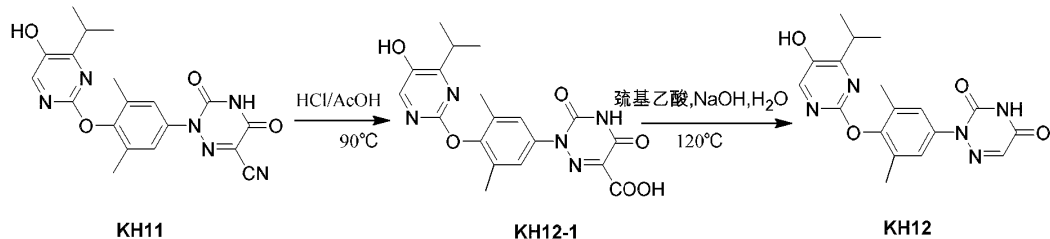
实施例 14 化合物 **KH11** 的合成



化合物 **KH11-4**: 操作同 **KH07-11** 的合成, 得橘红色固体 **KH11-4** (368.4mg, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 441.3 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KH11**: 操作同化合物 **KH07** 的合成, 得橘红色固体 **KH11** (342.3mg, 粗品), 取 50mg, 制备 HPLC 纯化后, 得 11.2mg 白色固体, 收率 23.2%。MS (ESI) m/z : 395.2 $[M+H]^+$ 。

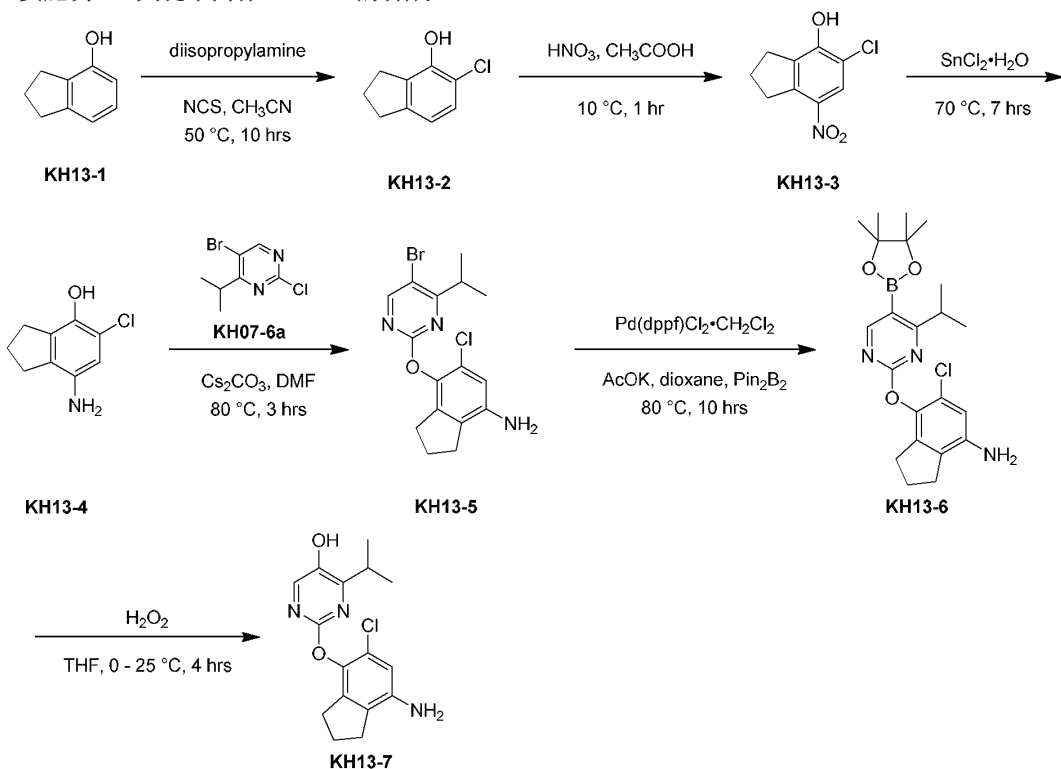
实施例 15 化合物 **KH12** 的合成



化合物 **KH12-1**: 操作同化合物 **KH08-1** 的合成, 得黄色固体 (286 mg, 粗品), 无须纯化直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 414.2 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KH10**: 操作同化合物 **KH08** 的合成, 得白色固体 **KH10** (38.4 mg, 收率 15.2%)。MS (ESI) m/z : 370.1 $[M+H]^+$ 。

实施例 16 关键中间体 **KH13-7** 的合成



化合物 **KH13-2**: 将 N,N-二异丙基胺 (1.89 g, 18.6 mmol, 2.63 mL, 0.1 eq) 和原料 **KH13-1** (25.0 g, 186 mmol, 1 eq) 溶于乙腈 (250 mL) 中, 并将 NCS (26.1 g, 195 mmol, 1.05 eq) 加入上述反应体系中。并在 50°C 下搅拌反应 10 h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 10/1) 监测反应完全。将反应液旋干并且用 100 mL 水稀释, 乙酸乙酯 (100 mL * 3) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 硅胶色谱柱纯化 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 1/0 至 20/1), 得到黄色固体 **KH13-2** (5.00 g, 29.6 mmol, 收率 15.9%)。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 9.24 (s, 1H), 7.07 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 2.85 - 2.77 (m, 4H), 2.05 - 1.96 (m, 2H)。

化合物 **KH13-3**: 取化合物 **KH13-2** (3.70 g, 21.9 mmol, 1 eq) 溶于乙醇 (37 mL) 中, 于 10°C 加入硝酸 (2.42 g, 23.0 mmol, 1.73 mL, 纯度 60.0%, 1.05 eq), 并继续在该温度下搅拌 1h。TLC 检测原料已经完全消失, 反应液用 100 mL 水稀释后, 用乙酸乙酯 (50 mL * 3) 萃取, 收集有机相, 用饱和食盐水 (100 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥后, 过滤, 旋干, 硅胶色谱柱纯化 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 1/0 至 10/1), 得到黄色固体 **KH13-3** (3.50 g, 16.3 mmol, 收率 74.6%)。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 10.96 (br s, 1H), 7.98 (s, 1H), 3.25 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.89 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.50 (td, J = 1.6, 3.5 Hz, 1H), 2.06 (quin, J = 7.6 Hz, 2H)。

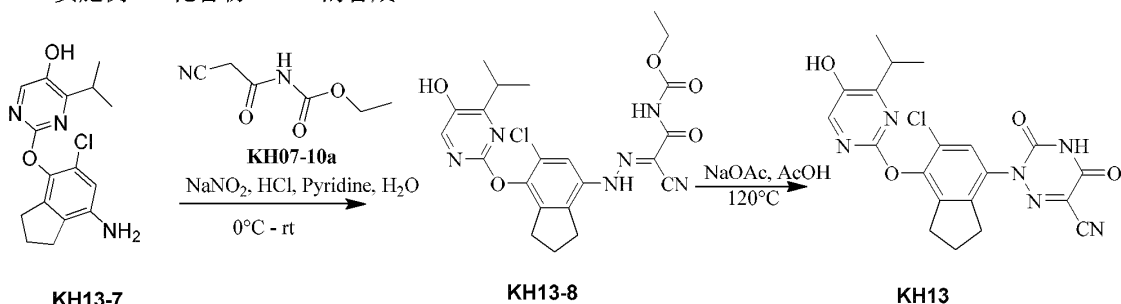
化合物**KH13-4**: 取化合物**KH13-3** (3.50 g, 16.3 mmol, 1 eq)和 $\text{SnCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (18.4 g, 81.9 mmol, 5 eq)溶于甲醇(10 mL)中, 于70℃下搅拌7h。LCMS检测原料已经完全消失, 将反应溶剂直接旋干, 用乙酸乙酯溶解残留物, 加入饱和碳酸氢钠溶液, 有固体产生, 过滤除去固体, 收集滤液, 分出有机相, 用饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥后, 过滤旋干。残余物没有经过进一步的纯化直接用于下一步, 得到黄色固体**KH13-4** (2.70 g, 14.7 mmol, 收率89.7%)。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 8.12 (s, 1H), 6.39 (s, 1H), 4.48 (s, 2H), 2.75 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.59 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.04 - 1.89 (m, 2H)。

化合物KH13-5: 将化合物**KH13-4** (2.50 g, 13.6 mmol, 1 eq)、**KH07-6a** (3.21 g, 13.6 mmol, 1 eq)和碳酸铯(13.3 g, 40.8 mmol, 3 eq)加入到DMF (30 mL)中,并在80℃下搅拌3h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 3/1)检测原料已经完全消失,将反应液用100mL水稀释后,用乙酸乙酯 (50mL*3)萃取,合并有机相,用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥后,过滤,旋干,硅胶色谱柱纯化 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 1/0至3/1),得到黄色固体**KH13-5** (3.70 g, 9.57 mmol, 收率70.3%, 纯度99.0%)。MS (ESI) *m/z* : 383.8 [M+H]⁺。 ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.54 - 8.35 (m, 1H), 6.70 - 6.51 (m, 1H), 3.59 (s, 2H), 3.41 (spt, *J* = 6.8 Hz, 1H), 2.76 (td, *J* = 7.6, 17.5 Hz, 4H), 2.19 - 2.06 (m, 2H), 1.25 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H)。

化合物**KH13-6**: 操作同化合物**KH11-2**的合成, 得到棕色固体**KH13-6** (4.30 g, 粗品)。MS (ESI) m/z : 430.3 $[M+H]^+$ 。

化合物**KH13-7**: 操作同化合物**KH11-3**的合成, 硅胶色谱柱纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯=1/0至1/1), 得到淡黄色固体**KH13-7** (1.20 g, 3.72 mmol, 收率38.0%)。MS (ESI) m/z : 320.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 9.74 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.22 - 4.80 (m, 2H), 3.27 (spt, J = 6.8 Hz, 1H), 2.64 (br t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.59 - 2.51 (m, 2H), 1.95 (br dd, J = 7.6, 15.1 Hz, 2H), 1.11 (d, J = 6.8 Hz, 6H)。

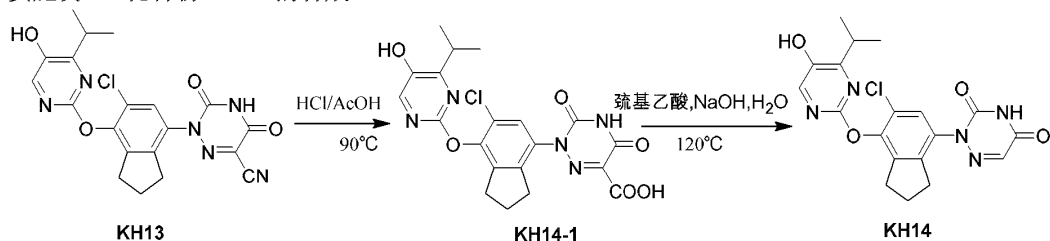
实施例 17 化合物 KH13 的合成



化合物 **KH13-8**: 操作同 **KH07-11** 的合成, 得橘红色固体(431.3mg, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 487.2[M+H]⁺。

化合物 **KH13**: 操作同化合物 **KH07** 的合成, 得橘红色固体 **KH13** (354.2mg, 粗品), 取 120mg, 制备 HPLC 纯化后, 得 43mg 白色固体。MS (ESI) m/z : 441.2 $[M+H]^+$ 。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 400 MHz): 13.07(s, 1H), 10.06(s, 1H), 7.98(s, 1H), 7.38(s, 1H), 3.25-3.34(m, 1H), 2.84(t, 2H, J=8.0Hz), 2.68(t, 2H, J=8.0Hz), 2.01(t, 2H, J=8.0Hz), 1.15(d, 6H, J=4.0Hz)。

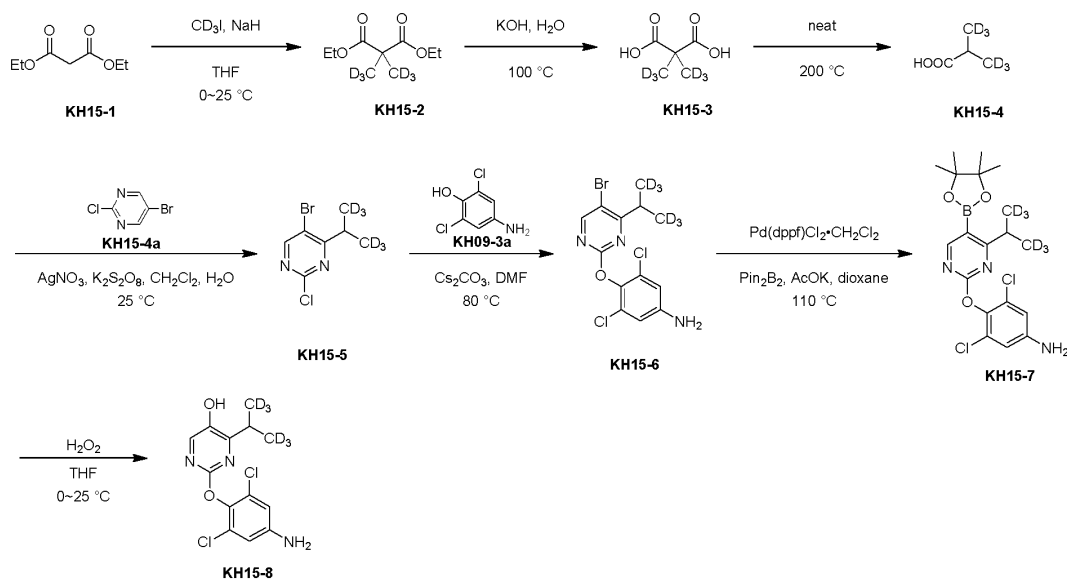
实施例 18 化合物 KH14 的合成



化合物 **KH14-1**: 操作同化合物 **KH08-1** 的合成, 得黄色固体(251.4 mg, 粗品), 无须纯化直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 460.1 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KH14**: 操作同化合物 **KH08** 的合成, 得白色固体 **KH14**(6 mg, 收率 11.1%)。MS (ESI) m/z : 416.2 [M+H]⁺。 ¹H NMR(DMSO-*d*₆ 400 MHz): 12.40(s, 1H), 9.98(s, 1H), 7.99(s, 1H), 7.63(s, 1H), 7.46(s, 1H), 3.27-3.30(m, 1H), 2.83(t, 2H, J=8.0Hz), 2.68 (t, 2H, J=8.0Hz), 2.0(t, 2H, J=8.0Hz), 1.15(d, 6H, J=4.0Hz)。

实施例 19 关键中间体 KH15-8 的合成



化合物**KH15-2**: 将氢化钠(7.49 g, 187 mmol, 纯度60.0%, 3.00 eq)溶于四氢呋喃(100 mL)中, 并在0℃将**KH15-1** (10.0 g, 62.4 mmol, 9.43 mL, 1.00 eq)和 CD_3I (19.0 g, 131 mmol, 8.16 mL, 2.10 eq)加入到上述反应体系中。继续于0℃下搅拌反应0.5 h, 缓慢升温到25℃并搅拌11.5h。TLC监测原料反应完全。将反应液倒入200mL冰水中, 乙酸乙酯(100mL*3)萃取, 收集有机相, 并用无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干得黄色油状物**KH15-2**(8.35 g, 42.9 mmol, 收率68.8%)。无须纯化, 直接下一步反应。

化合物**KH15-3**: 取化合物**KH15-2**(8.95 g, 46.0 mmol, 1.00 eq)溶于水(20 mL)中, 将氢氧化钠(6.27 g, 111 mmol, 2.42 eq)加入到上述反应液中。加毕, 于100℃反应3h。TLC检测有新点生成。在0℃下用6N盐酸调节pH至2, 并用二氯甲烷(100mL*2)萃取。合并有机相, 用饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥后, 过滤, 旋干, 不经过纯化直接用于下一步, 得到无色油状物**KH15-3**(5.02 g, 粗品)。

化合物**KH15-4**: 取化合物**KH15-3** (5.00 g, 36.1 mmol, 1.00 eq)加热到200℃下搅拌0.5h。TLC检测到新点, 将粗品产物蒸馏(140℃, 1 atm), 得到黄色油状物**KH15-4** (2.52 g, 26.7 mmol, 收率73.9%)。

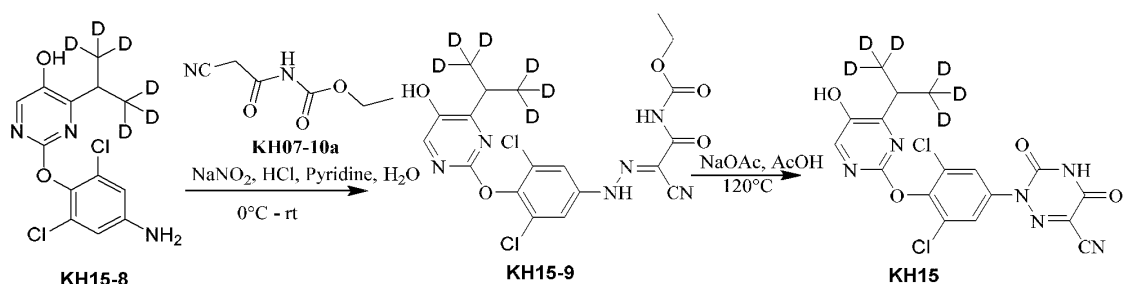
化合物**KH15-5**: 将化合物**KH15-4** (2.50 g, 28.3 mmol, 1.00 eq)、化合物**KH15-4a** (5.49 g, 28.3 mmol, 1.00 eq)、硝酸银(1.64 g, 9.65 mmol, 0.34 eq)、 $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (11.5 g, 42.5 mmol, 8.52 mL, 1.50 eq)加入到二氯甲烷(50 mL)和水(50 mL)中, 在氮气保护, 于外温25℃下搅拌12h。TLC (石油醚/乙酸乙酯= 20/1)检测到产品点。将反应液用亚硫酸钠溶液淬灭, 二氯甲烷(100mL*2)萃取。合并有机相, 用饱和食盐水(50mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥后, 过滤, 旋干, 硅胶色谱柱纯化(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯= 1/0至10/1)得到粗品, 再将粗品用制备HPLC纯化得到黄色油状物**KH15-5**(2.60 g, 10.7 mmol, 收率37.9%)。MS (ESI) m/z : 243.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

化合物**KH15-6**: 将化合物**KH15-5** (2.60 g, 10.7 mmol, 1.00 eq)、化合物**KH09-3a**(1.92 g, 10.7 mmol, 1.00 eq)、碳酸铯(10.5 g, 32.29 mmol, 3.00 eq)加入到DMF (26 mL)后, 在氮气保护下于外温80℃下搅拌10h。LCMS检测原料已经反应完全。向反应液中用加入乙酸乙酯(100mL)和水(100mL)萃取分离, 收集有机相, 用饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥后, 过滤, 旋干, 硅胶色谱柱纯化(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯= 1/0至5/1), 得到黄色油状物**KH15-6** (2.70 g, 7.05 mmol, 收率65.4%)。MS (ESI) m/z : 384.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

化合物**KH15-7**: 操作同化合物**KH11-2**的合成, 硅胶色谱柱纯化残余物(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯= 1/0至5/1), 得到白色固体**KH15-7** (3.00 g, 6.97 mmol, 收率98.9%)。MS (ESI) m/z = 429.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

化合物**KH15-8**: 取化合物**KH15-7** (3.00 g, 6.97 mmol, 1.00 eq)溶于四氢呋喃(30 mL)中, 将双氧水(1.66 g, 14.6 mmol, 1.41 mL, 纯度30.0%, 2.10 eq)在0℃加入反应中, 加毕, 转至室温下搅拌8h。LCMS检测原料反应完全, 发现产品MS。用饱和亚硫酸钠溶液(50mL)终止反应, 用二氯甲烷(50mL*3)萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 硅胶色谱柱纯化, (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯= 10/1至1/1), 得到淡黄色固体**KH15-8**(1.20 g, 3.73 mmol, 收率53.5%)。MS (ESI) m/z : 320.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 9.91 - 9.78 (m, 1H), 8.01 - 7.90 (m, 1H), 6.70 - 6.56 (m, 2H), 5.56 - 5.42 (m, 2H), 3.25 - 3.19 (m, 1H)。

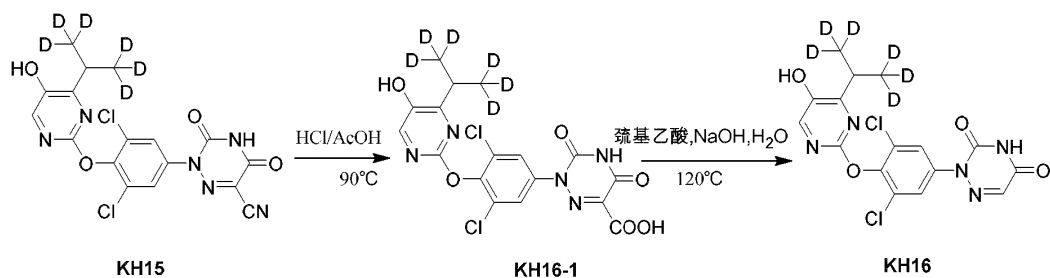
实施例 20 化合物 KH15 的合成



化合物 **KH15-9**: 操作同 **KH07-11** 的合成, 得橘红色固体(430 mg, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 487.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

化合物 **KH15**: 操作同化合物 **KH07** 的合成, 得橘红色固体 **KH15** (320mg, 粗品), 取 100mg, 制备 HPLC 纯化后, 得 6mg 白色固体。MS (ESI) m/z : 441.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

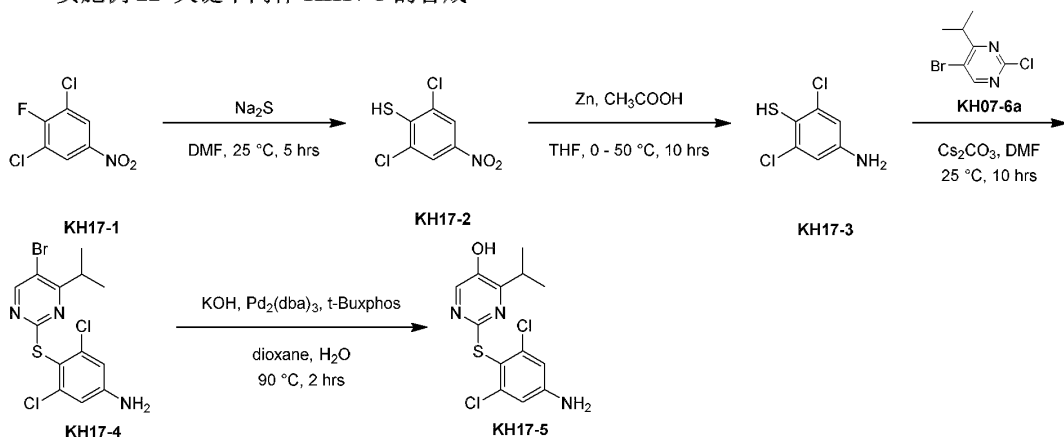
实施例 21 化合物 **KH16** 的合成



化合物 **KH16-1**: 操作同化合物 **KH08-1** 的合成, 得黄色固体(200 mg, 粗品), 无须纯化直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 460.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

化合物 **KH16**: 操作同化合物 **KH08** 的合成, 得白色固体 **KH16**(11 mg, 收率 21.2%)。MS (ESI) m/z : 416.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

实施例 22 关键中间体 **KH17-5** 的合成



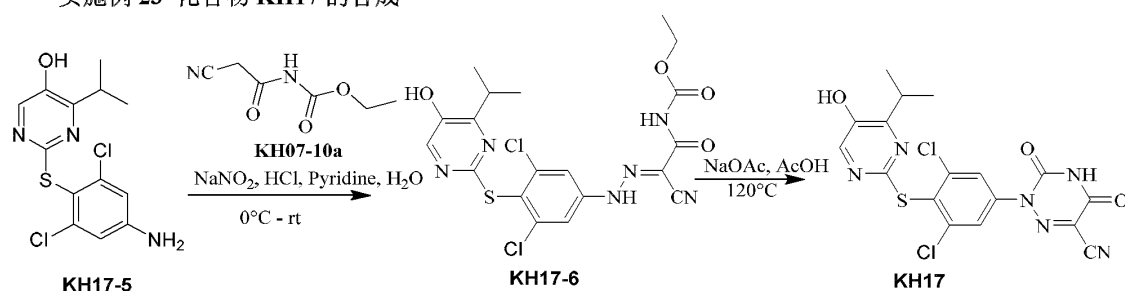
化合物 **KH17-2**: 将化合物 **KH17-1** (50.0 g, 238 mmol, 1 eq) 和硫化钠(27.8 g, 357 mmol, 14.9 mL, 1.5 eq) 加入到 DMF (500 mL) 中, 并在 25°C 下搅拌反应 5 h。LCMS 监测化合物 **KH17-1** 已经消失。将反应液倒入 500mL 冰水中, 用盐酸(2N)调节 pH 到 5。用乙酸乙酯 (200mL*2) 萃取, 合并有机相, 用饱和食盐水 (300mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 残余物不经过纯化直接用于下一步, 得到红色固体 **KH17-2** (43.0 g, 粗品)。MS (ESI) m/z : 224.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

化合物 **KH17-3**: 取化合物 **KH17-2** (40.0 g, 178 mmol, 1 eq)、 Zn (58.3 g, 892 mmol, 5 eq) 加入到四氢呋喃 (1.5 L) 中, 于 0°C 下滴加乙酸(21.4 g, 357 mmol, 20.4mL, 2 eq), 并将该反应在 50°C 搅拌反应 10h。LCMS 检测原料完全消失。反应液直接过滤, 收集滤液旋干得到残余物, 残余物用甲基叔丁基醚打浆成固体粉末, 得到白色固体 **KH17-3** (220 g, 108 mmol, 收率 60.8%, 纯度 95.8%)。MS (ESI) m/z : 194.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

化合物**KH17-4**: 取化合物**KH17-3** (16.0 g, 82.4 mmol, 1 eq)、化合物**KH07-6a** (16.1 g, 57.7 mmol, 0.7 eq) 和碳酸铯 (40.2 g, 123 mmol, 1.5 eq) 加入到DMF (200 mL) 中, 在25℃下搅拌10h。LCMS检测到原料已经反应完全。将反应液加入到200mL水中, 用乙酸乙酯 (200mL*2) 萃取, 收集有机相, 用饱和食盐水 (200mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥后, 过滤, 旋干得到残余物。残余物用甲基叔丁基醚打浆成固体粉末, 得到黄色固体**KH17-4** (2.60 g, 10.7 mmol, 收率37.9%)。MS (ESI) m/z : 394.0 $[M+H]^+$ 。

化合物**KH17-5**: 取化合物**KH17-4** (5.00 g, 12.7 mmol, 1 eq)溶于水(25.0 mL)和二氧六环(100 mL)后, 将氢氧化钾(2.85 g, 50.8 mmol, 4 eq)、Pd₂(dba)₃ (1.16 g, 1.27 mmol, 0.1 eq)和t-Buxphos (540 mg, 1.27 mmol, 0.1 eq)加入反应中, 在氮气保护下, 于90℃下搅拌2h。LCMS检测原料已经完全消失, 用1M稀盐酸将反应液pH调至5, 加入100mL水, 用乙酸乙酯 (100mL*2) 萃取, 收集有机相用饱和食盐水 (100mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥后, 过滤, 旋干, 硅胶色谱柱纯化 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 1/0至 3/1), 得到类白色固体**KH17-5** (1.20 g, 3.48 mmol, 收率27.3%)。MS (ESI) m/z : 330.0 [M+H]⁺。 ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 9.99 (br s, 1H), 8.10 - 7.90 (m, 1H), 6.83 - 6.64 (m, 2H), 6.14 - 5.88 (m, 2H), 3.22 (spt, *J* = 6.8 Hz, 1H), 1.04 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H)

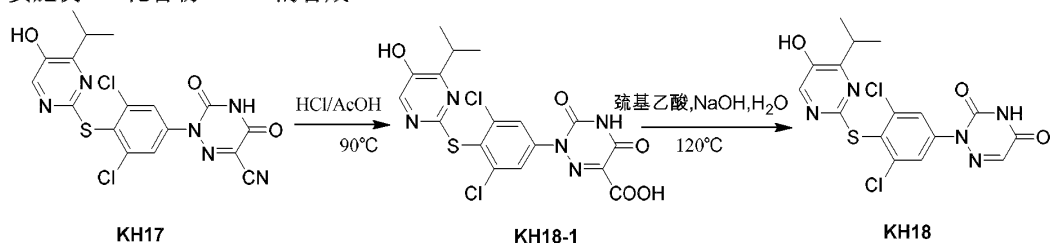
实施例 23 化合物 KH17 的合成



化合物 **KH17-6**: 操作同 **KH07-11** 的合成, 得橘红色固体(390 mg, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 497.1[M+H]⁺。

化合物 **KH17**: 操作同化合物 **KH07** 的合成, 得橘红色固体 **KH17** (140mg, 粗品), 取 40mg, 制备 HPLC 纯化后, 得 5mg 淡黄色固体, 收率约 12.5%。MS (ESI) m/z : 451.1 $[M+H]^+$ 。

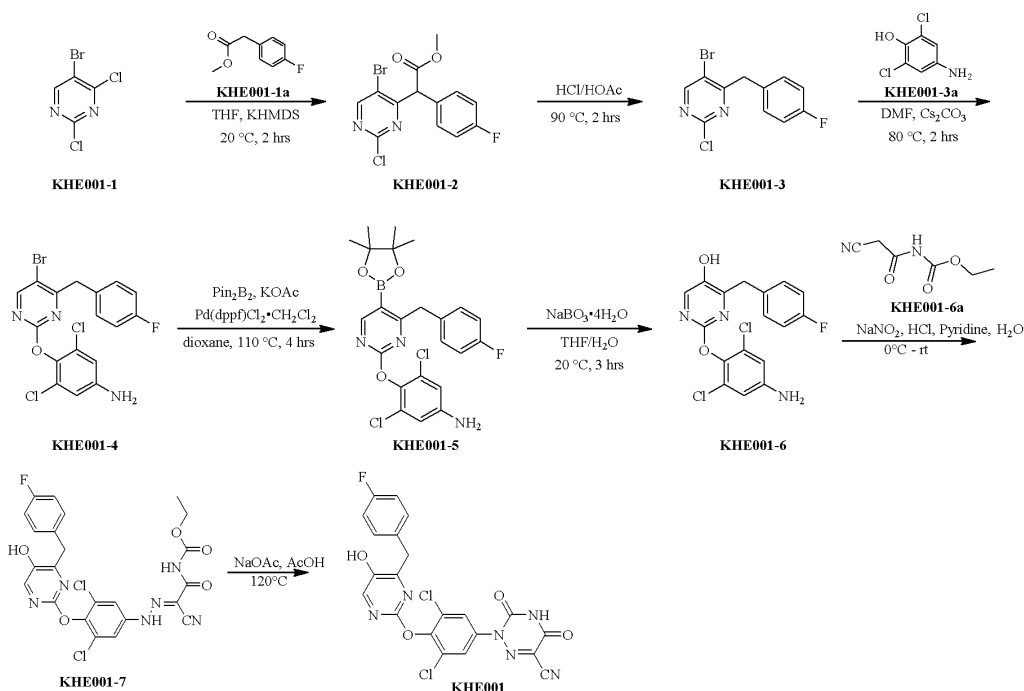
实施例 24 化合物 KH18 的合成



化合物 **KH18-1**:操作同化合物 **KH08-1** 的合成,得棕色固体(102.4 mg, 粗品),无须纯化直接下一步反应。MS (ESI) m/z: 470.1 [M+H]⁺。

化合物 **KH18**: 操作同化合物 **KH08** 的合成, 得白色固体 **KH18**(18 mg, 收率 19.8%)。MS (ESI) m/z : 426.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): 12.50(s, 1H), 10.21(s, 1H), 8.05(s, 1H), 7.94(s, 2H), 7.73(s, 1H), 3.20-3.27(m, 1H), 1.04(d, 6H, $J=4.0$ Hz)。

实施例 25 化合物 KHE001 的合成



化合物 **KHE001-2**: 称取化合物 **KHE001-1** (20.0 g, 87.8 mmol, 1.00 eq) 和 **KHE001-1a** (14.8 g, 87.8 mmol, 1.00 eq) 溶于甲苯 (8 mL), 在 0 °C 下缓慢滴加六甲基二硅基胺基钾 (KHMDS) (1 M, 92.2 mL, 1.05 eq)。该混合物在 20 °C 下搅拌反应 2 小时后, TLC(石油醚/乙酸乙酯 = 10/1) 监测原料剩余量小于 5%, 有极性变大主点生成。将反应放入冰水 (500 mL) 中淬灭, 并加入乙酸乙酯 (50 mL * 3) 萃取, 收集有机相, 饱和食盐水 (100 mL) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 硅胶色谱柱层析纯化 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 30/1 至 5/1), 得到黄色油状物 **KHE001-2** (17.1 g, 产率 54.2%)。

化合物 **KHE001-3**: 取化合物 **KHE001-2** (17.0 g, 47.3 mmol, 1.00 eq) 溶于盐酸 (20 mL, 纯度 36%) 和醋酸 (80 mL), 并在 90 °C 下搅拌 2h。TLC(石油醚/乙酸乙酯 = 10/1) 监测原料反应完全, 并且有个新的点 (R_f = 0.60) 生成。将反应混合物直接减压旋干得到粗品, 将粗品溶于乙酸乙酯, 并且用饱和碳酸氢钠水溶液 (50 mL * 2) 洗涤, 收集有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 有机相浓缩去除溶剂, 硅胶色谱柱层析纯化 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 10/1), 得到白色固体物 **KHE001-3** (9.70 g, 产率 68.0%)。¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 8.62 (s, 1H), 7.31 (dd, *J* = 5.6, 8.8 Hz, 2H), 7.04 - 6.97 (m, 2H), 4.22 (s, 2H)。

化合物 **KHE001-4**: 称取化合物 **KHE001-3** (9.00 g, 29.9 mmol, 1.00 eq)、**KHE001-3a** (6.38 g, 35.8 mmol, 1.20 eq)、碳酸铯 (29.2 g, 89.5 mmol, 3.00 eq) 溶于二甲基甲酰胺 (90 mL), 反应体系氮气保护。并在 80 °C 下搅拌反应 2 小时, LCMS 监测原料 **KHE001-3** 消耗完全, 目标产物信号为主要峰。向反应液中加入乙酸乙酯 (300 mL) 和水 (100 mL) 萃取分离, 收集有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 有机相浓缩去除溶剂得到粗品, 硅胶色谱柱层析纯化 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 30/1 至 5/1), 得到黄色固体 **KHE001-4** (4.50 g, 产率 34.0%)。MS (ESI) *m/z*: 443.8 [M+H]⁺。

化合物 **KHE001-5**: 称取化合物 **KHE001-4** (4.50 g, 10.1 mmol, 1.0 eq)、Pin₂B₂ (5.16 g, 20.3 mmol, 2.00 eq)、Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (415 mg, 508 μmol, 0.05 eq) 和醋酸钾 (1.99 g, 20.3 mmol, 2.00 eq) 溶于二氧六环 (45 mL), 反应体系氮气保护, 并在 110 °C 下搅拌反应 4 小时, LCMS 监测原料 **KHE001-4** 消耗完全, 目标产物信号为主要峰。直接将反应体系旋干, 得到棕色油状物 **KHE001-5** (14.0 g, 混合物), 未经纯化直接用于下一步。MS (ESI) *m/z*: 490.1 [M+H]⁺。

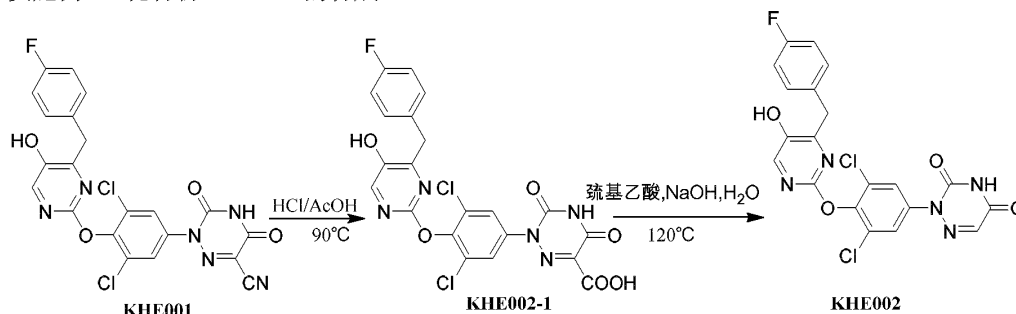
化合物 **KHE001-6**: 称取化合物 **KHE001-5** (14.0 g, 28.6 mmol, 1.00 eq) 溶于四氢呋喃 (70 mL) 和水 (70 mL) 中, 将过硼酸钠 (NaBO₃·4H₂O) (13.2 g, 85.7 mmol, 3.00 eq) 加入反应。该混合物在 20 °C 下搅拌反应 3 小时, TLC(石油醚/乙酸乙酯 = 2/1, R_f = 0.15) 显示反应已经完成。该反应用水 (150 mL) 稀释并且在 25 °C 搅拌十分分钟。过滤, 滤饼用乙酸乙酯 (20 mL * 2) 洗涤。合并的滤液用乙酸乙酯 (100 mL * 2) 萃取。收集有机相用饱和食盐水 (300 mL * 2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 有机相浓缩去除溶剂得到粗品, 硅胶色谱柱层析纯化 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 至 0/1), 得到棕色固体 **KHE001-6** (1.11 g, 产率 28.8%, 纯度 94.2%)。MS (ESI) *m/z* :

380.0 $[M+H]^+$. 1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): δ 10.10-10.05 (m, 1H), 8.02 (s, 1H), 7.30-7.20 (m, 2H), 7.14-7.02 (m, 2H), 6.66 (s, 2H), 5.54 (br s, 2H), 3.99-3.91 (m, 2H)。

化合物 **KHE001-7**: 反应液 A: 称取化合物 **KHE001-6** (0.5014 g, 1.322 mmol) 加入 26 mL 水中, 在 0℃ 下加入 14 mL 浓盐酸, 将称取的亚硝酸钠(0.1218 g, 1.765mmol)溶于 4 mL 水中, 缓慢的滴加进入反应液, 并在 0℃ 下搅拌 1.5h, 使其成为溶液; 反应液 B: 称取化合物 **KHE001-6a** (0.2381 g, 1.526 mmol) 于 40 mL 水中, 在 0℃ 下加入 14 mL 吡啶, 并继续在该温度下搅拌 1.5 h。然后在 0℃ 下将反应液 A 迅速倒入反应液 B 中, 有橘红色固体生成, 缓慢升至室温继续反应过夜。TLC 监测反应显示反应完全, 直接将固体过滤, 并用 50 mL 水和石油醚分别洗涤固体 3 次。得橘红色固体 **KHE001-7** (600 mg, 收率 82.9%, 粗品), 无须纯化, 直接下一步。MS (ESI) m/z : 547.1 $[M+H]^+$ 。

化合物**KHE001**: 取化合物**KHE001-7** (600 mg, 1.097 mmol)和醋酸钠(0.9035 g, 11.018 mmol)放入单口瓶中, 加入醋酸 (12 mL) 溶解, N_2 保护。在 120℃ 下反应 3h。TLC 检测原料完全反应, 停止反应。反应降温至 0℃, 加入 100mL 水后, 有大量固体析出, 直接将固体过滤, 用 50 mL 水和石油醚分别冲洗固体 3 次。收集获得橘红色固体 (560 mg, 粗品), 并取 100mg 上述粗品 HPLC 制备纯化得到类白色固体化合物**KHE001** (21.8 mg, 23.8%)。MS (ESI, m/z): 500.9 $[M+1]^+$ 。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 13.25 (s, 1H), 10.28 (s, 1H), 8.08 (s, 2H), 7.74 (s, 2H), 7.22-7.24 (m, 2H), 7.07-7.11 (m, 2H), 3.39 (s, 2H)。

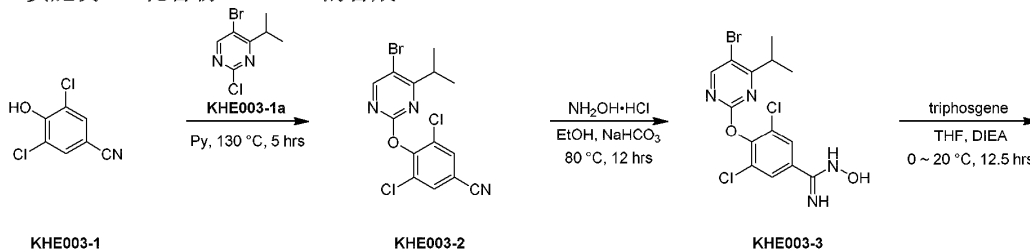
实施例 26 化合物 **KHE002** 的合成

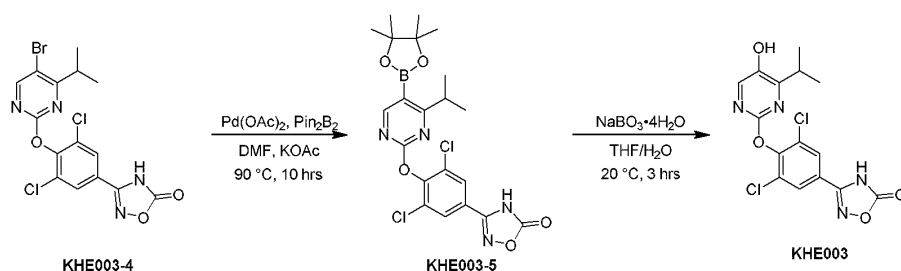


化合物**KHE002-1**: 称取化合物**KHE001**粗品(460 mg, 0.918mmol)放入单口瓶中, 加入醋酸 (15 mL) 溶解后, 向反应中滴加浓盐酸(5 mL)。在 90℃ 下反应 4 小时后, TLC 监测原料反应完全, 有极性变大主点生成, 停止反应。直接将反应液旋干, 用饱和碳酸钠溶液将反应 pH 调至 9-10, 用乙酸乙酯(20mL*2)萃取两次, 收集水相并将水相 pH 调至 3-4, 再用乙酸乙酯(20mL*3)萃取, 收集有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 有机相浓缩, 得到黄色固体**KHE002-1** (300 mg, 62.8%), 无须纯化直接用于下一步。

化合物**KHE002**: 取化合物**KHE002-1** (300 mg, 0.577 mmol)和氢氧化钠(0.0985 g, 2.462 mmol)放入单口瓶中, 加入水 (40 mL) 溶解, 将巯基乙酸(1.0831 g, 11.773 mmol)加入至反应液中, 并在 120℃ 下反应 3h。TLC 检测原料完全反应, 有极性变小的点生成, 停止反应。加入饱和碳酸钠溶液将反应体系 pH 调至中性, 乙酸乙酯 (20mL*3) 萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干制备 HPLC 纯化后得到白色固体**KHE002** (46.7 mg, 17.0%)。MS (ESI, m/z): 476.3 $[M+1]^+$ 。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 12.49 (s, 1H), 10.25 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.69 (s, 2H), 7.60 (s, 1H), 7.23-7.24 (m, 2H), 7.07-7.12 (m, 1H), 3.98 (m, 2H)。

实施例 27 化合物 **KHE003** 的合成





化合物 **KHE003-2**: 将 **KHE003-1a** (10.0 g, 42.5 mmol, 1.60 eq)、化合物 **KHE003-1** (5.00 g, 26.6 mmol, 1.00 eq)溶于吡啶(50 mL)中,并在 130℃下搅拌反应 5 小时。TLC(石油醚/乙酸乙酯 = 10/1, R_f = 0.52)监测反应完全。将反应降温到 20℃,并用水(500 mL)稀释,乙酸乙酯(200 mL * 2)萃取,合并的有机相用饱和食盐水(300 mL * 2)洗涤,无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩去除溶剂,得到粗品,硅胶色谱柱纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 至 5/1),得到黄色油状物 **KHE003-2** (2.40 g, 产率 23.2%)。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400MHz): δ 8.51 - 8.47 (m, 1H), 7.73 - 7.70 (m, 2H), 3.41 (spt, J = 6.8 Hz, 1H), 1.19 (d, J = 6.8 Hz, 6H)。

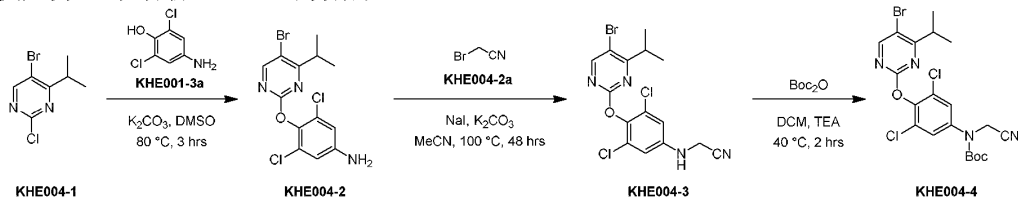
化合物 **KHE003-3**: 将盐酸羟胺(377 mg, 5.43 mmol, 1.50 eq)、化合物 **KHE003-2** (1.40 g, 3.62 mmol, 1.00 eq)、碳酸氢钠(304 mg, 3.62 mmol, 1.00 eq)加入到乙醇(20 mL)中,并在 80℃下搅拌反应 12 小时。TLC(石油醚/乙酸乙酯 = 2/1, R_f = 0.11)监测反应完全。将反应直接旋干得到粗品,硅胶色谱柱纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 1/0 至 20/1),得到黄色油状物 **KHE003-3** (1.00 g, 产率 65.8%)。

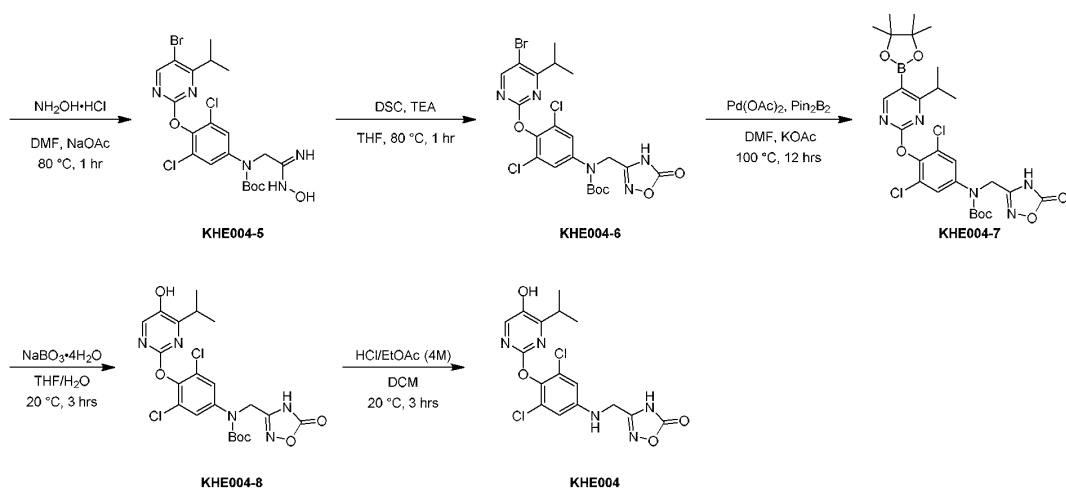
化合物**KHE003-4**: 在氮气保护和0℃下将三光气 (triphosgene) (1.61 g, 5.43 mmol, 1.20 eq)、化合物 **KHE017-3** (1.90 g, 4.52 mmol, 1.00 eq)、DIEA (2.92 g, 22.6 mmol, 3.94 mL, 5.00 eq)溶于四氢呋喃(20 mL)中,并继续在0℃下搅拌反0.5小时,升温到20℃搅拌12h。TLC(石油醚/乙酸乙酯 = 1/1, R_f = 0.22)监测反应完全。用水(500 mL)稀释,并向反应液中加入乙酸乙酯(30mL)和水(150mL)萃取分离,收集有机相,用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,有机相浓缩去除溶剂得到粗品,硅胶色谱柱纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 至 0/1),得到黄色固体**KHE003-4** (1.30 g, 产率64.4%)。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400MHz): δ 13.02 (br s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.05 (s, 2H), 3.42-3.40 (m, 1H), 1.13 (d, J = 6.8 Hz, 6H)。

化合物 **KHE003-5**: 在氮气保护下,将醋酸酐(60.4 mg, 269 μmol , 0.10 eq)、化合物 **KHE003-4** (1.20 g, 2.69 mmol, 1 eq)、Pin $_2\text{B}_2$ (6.83 g, 26.9 mmol, 10.0 eq)和醋酸钾(792 mg, 8.07 mmol, 3.00 eq)加入到 DMF (10 mL)中,并在 90℃下搅拌反应 10 小时。LCMS 监测反应完全。将反应液降到 20℃后,缓慢加入水(100 mL),用乙酸乙酯(30 mL * 2)萃取,收集有机相,用饱和食盐水(100 mL * 2)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,旋干有机溶剂得到黄色油状物 **KHE003-5** (2.00 g, 混合物),未纯化直接用于下一步。MS (ESI) m/z = 493.0 $[\text{M}+1]^+$ 。

化合物**KHE003**: 称取化合物**KHE003-5** (2.00 g, 4.06 mmol, 1.00 eq)溶于四氢呋喃(10 mL)和水(10 mL)中,将过硼酸钠 ($\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (1.87 g, 12.2 mmol, 3.00 eq)加入至反应中。在20℃下搅拌反应3小时,LCMS 监测反应完全。用乙酸乙酯 (20 mL)和水(100 mL)萃取分离,收集有机相,再用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤旋干有机相得到残留物。用制备HPLC纯化,得到黄色固体**KHE003** (154 mg, 产率14.9%, 纯度97.0%)。MS (ESI) m/z : 383.1 $[\text{M}+1]^+$ 。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400MHz): δ 10.12 (br s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.97 (s, 2H), 3.27 (br s, 1H), 1.10 (d, J = 6.8 Hz, 6H)。

实施例 28 化合物 **KHE004** 的合成





化合物**KHE004-2**: 将**KHE001-3a** (7.56 g, 42.5 mmol, 1.00 eq)、化合物**KHE004-1** (10.0 g, 42.5 mmol, 1.00 eq)、碳酸钾(11.7 g, 84.9 mmol, 2.00 eq)加入到DMF(100mL)中, 在氮气的保护下, 80℃下搅拌反应3小时。LCMS监测反应完全。将反应降到20℃后, 用水(200mL)稀释, 乙酸乙酯(100mL*2)萃取。收集有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 硅胶色谱柱纯化(SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 1/0至2/1), 得到黄色固体**KHE004-2** (12.0 g, 产率75.0%)。MS (ESI) m/z = 378.0 $[M+1]^+$ 。

化合物**KHE004-3**: 取化合物**KHE004-2** (5.00 g, 13.3 mmol)和溴乙腈(**KHE004-2a**) (11.9 g, 99.5 mmol)溶于MeCN (50 mL)中, 加入碘化钠(5.96 g, 39.8 mmol)和碳酸钾(5.50 g, 39.8 mmol)。在100mL的封管中加热至100℃, 搅拌反应48h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 5/1, R_f = 0.22)监测反应完全。反应直接旋干, 硅胶色谱柱纯化残余物(SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1至2/1), 得到黄色固体**KHE004-3** (4.00 g, 产率72.5%)。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400MHz): δ 8.72 (s, 1H), 6.92 (s, 2H), 6.77 (br t, J = 6.8 Hz, 1H), 4.41 - 4.34 (m, 1H), 4.38 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 3.39 - 3.34 (m, 1H), 3.39 - 3.34 (m, 1H), 1.14 (d, J = 6.8 Hz, 6H)。

化合物**KHE004-4**: 取化合物**KHE004-3** (4.00 g, 9.61 mmol)和三乙胺(1.02 g, 10.1 mmol, 1.40 mL)溶于二氯甲烷(40 mL)中, 加入Boc₂O (2.20 g, 10.1 mmol, 2.32 mL)。在40℃下搅拌2h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 5/1, R_f = 0.62)检测反应完全。将反应液降至20℃, 并且缓慢加入水(200 mL), 用二氯甲烷(40 mL * 2)萃取, 收集有机相, 并用饱和食盐水(200 mL * 2)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干得到黄色油状物**KHE004-4** (4.80 g, 产率96.7%)。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400MHz): δ 8.78 (s, 1H), 7.65 (s, 2H), 4.81 (s, 2H), 3.38 - 3.33 (m, 1H), 1.46 - 1.41 (m, 10H), 1.10 (d, J = 6.8 Hz, 6H)。

化合物**KHE004-5**: 将化合物**KHE004-4** (4.80 g, 9.30 mmol)、醋酸钠(6.10 g, 74.4 mmol)溶于DMF (40 mL)中, 加入盐酸羟胺(5.17 g, 74.4 mmol)。并在80℃下搅拌1h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 1/1, R_f = 0.39)检测反应完全。冷却至室温后, 乙酸乙酯(100 mL)和水(250 mL)萃取, 收集有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干, 硅胶色谱柱纯化(SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1至0/1), 得到黄色固体**KHE004-5** (4.60 g, 产率90.1%)。¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400MHz): δ 8.78 (s, 1H), 7.65 (s, 2H), 4.81 (s, 2H), 3.38 - 3.33 (m, 1H), 1.46 - 1.41 (m, 9H), 1.10 (d, J = 6.8 Hz, 6H)。

化合物 **KHE004-6**:在氮气保护下, 将 N,N'-琥珀酰亚胺基碳酸酯(DSC)(2.67 g, 10.4 mmol)、化合物**KHE004-5** (4.40 g, 8.01 mmol)、三乙胺(3.05 g, 30.1 mmol, 4.19 mL)溶于 DMF (10 mL)中, 在 80℃下搅拌反应 1 小时。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 2/1, R_f = 0.07)监测反应完全。LCMS 监测到 **KHE004-6** 的信号, 将反应液用乙酸乙酯 (50mL) 和水 (50mL) 分离。收集有机相, 用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干得到黄色固体 **KHE004-6**(4.20 g, 混合物), 直接用于下一步反应。MS (ESI) m/z : 576.0 $[M+1]^+$ 。

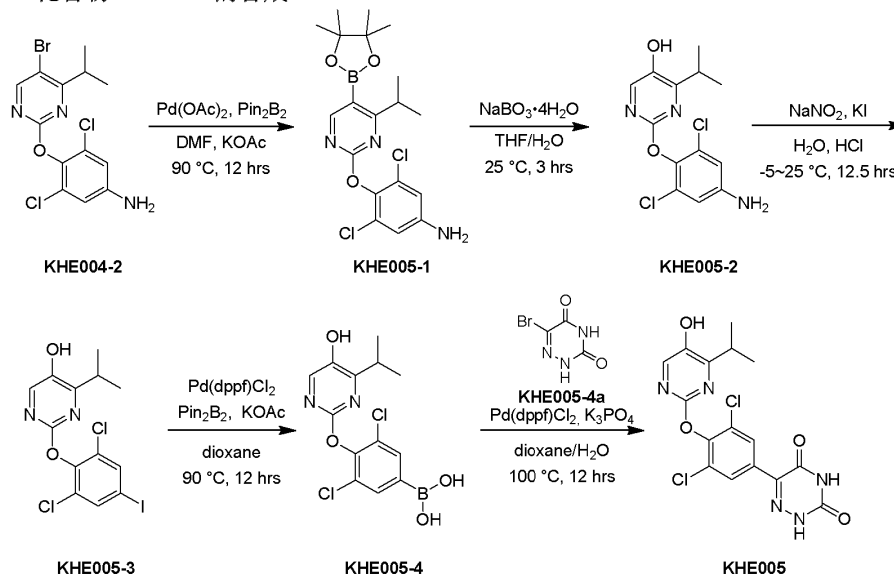
化合物 **KHE004-7**:在氮气保护下将醋酸钯(39.0 mg, 174 μ mol, 0.10 eq)、化合物 **KHE004-6** (1.00 g, 1.74 mmol, 1.00 eq)、醋酸钾(512 mg, 5.22 mmol, 3.00 eq)和 Pin₂B₂ (4.41 g, 17.4 mmol, 10.0 eq)溶于 DMF (15 mL)中, 在 100℃下搅拌反应 12 小时。LCMS 监测到目标产物 **KHE004-7**。反应液用乙酸乙酯 (20mL) 和水 (20mL) 萃取分离, 收集有机相, 并用无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干得到黄色油状物 **KHE004-7**(4.00 g, 粗品), 该粗品直接用于下一步反应。MS (ESI) m/z : 622.3 $[M+1]^+$ 。

化合物**KHE004-8**: 称取化合物**KHE004-7** (4.00 g, 6.43 mmol, 1.00 eq)溶于四氢呋喃 (20 mL)和水(20 mL)中, 将过硼酸钠(NaBO₃·4H₂O)(2.97 g, 19.3 mmol, 3.00 eq)加入至反应中, 并在20℃下搅拌反应3小时, LC-MS监测反应完全。反应液用乙酸乙酯 (20 mL)和水(100 mL)萃取分离, 有机相再用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干得到黄色油状物**KHE004-8** (2.00 g, 粗品), 该粗品直接用于下一步反应。MS

(ESI) m/z: 514.0 [M+1]⁺。

化合物 **KHE004**: 称取化合物 **KHE004-8** (2.00 g, 3.90 mmol, 1.00 eq) 溶于二氯甲烷(20 mL)中, 将氯化氢的乙酸乙酯溶液(4 M, 10 mL, 10.3 eq)加入至反应液中, 在 20℃ 下搅拌反应 3 小时, LC-MS 监测反应完全。将反应液直接旋干, 用制备 HPLC 纯化得到棕色固体 **KHE004**(19.5 mg, 产率 1.16%, 纯度 96.3%)。MS (ESI) m/z: 412.0 [M+1]⁺。 ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400MHz): δ 12.42 (br s, 1H), 9.89 (br s, 1H), 7.95 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.68 - 6.55 (m, 1H), 4.29 (s, 2H), 3.32 - 3.23 (m, 2H), 1.11 (s, 6H)。

实施例 29 化合物 **KHE005** 的合成



化合物 **KHE005-1**: 在氮气保护下将醋酸钯(238 mg, 1.06 mmol, 0.10 eq)、化合物 **KHE004-2** (4.00 g, 10.6 mmol, 1.00 eq)、 Pin_2B_2 (27.0 g, 106 mmol, 10.0 eq)、醋酸钾(3.12 g, 31.8 mmol, 3.00 eq)溶于 DMF (100 mL) 中, 并在 90℃ 下搅拌反应 12 小时。LCMS 监测反应完成, 目标峰明显。反应液用乙酸乙酯 (50mL) 和水 (50mL) 萃取分离, 收集有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤旋干得到黄色油状物 **KHE005-1** (4.00 g, 9.43 mmol, 粗品), 该粗品直接用于下一步反应。MS (ESI) m/z: 424.1 [M+H]⁺。

化合物 **KHE005-2**: 将化合物 **KHE005-1** (4.00 g, 9.43 mmol, 1.00 eq) 溶于四氢呋喃(10 mL)和水(10 mL)中, 将过硼酸钠 $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (4.35 g, 28.3 mmol, 3.00 eq)加入到反应中。并在 20℃ 下搅拌反应 3h, LCMS 监测反应完成, 目标峰明显。用乙酸乙酯(20 mL)和水(100 mL)萃取分离, 收集有机相, 再用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干有机相, 硅胶色谱柱纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 20/1 至 5/1), 得紫色油状物 **KHE005-2** (1.40 g, 产率 42.0 %)。MS (ESI) m/z : 314.0 [M+H]⁺。 ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400MHz): δ 10.04 (s, 1 H), 7.97-7.99 (m, 3 H), 3.27 (d, *J* = 6.8 Hz, 1 H), 1.11 (s, 3 H), 1.09 (s, 3 H)。

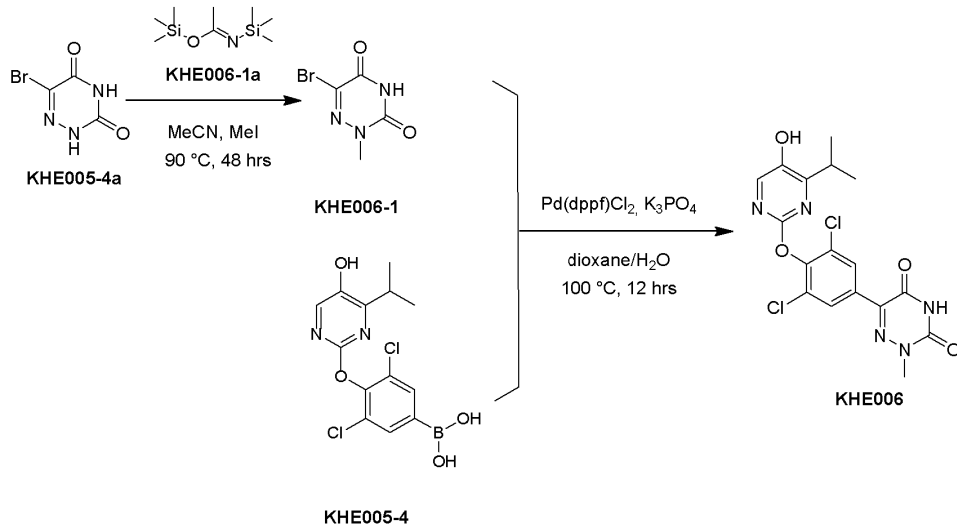
化合物 **KHE005-3**: 将化合物 **KHE005-2** (800 mg, 2.55 mmol, 1.00 eq) 加入到浓盐酸(12.0 M, 20 mL, 94.3 eq)中, 并且将反应降到-5℃; 将亚硝酸钠(1.05 g, 15.3 mmol, 6.00 eq)溶于水(4.00 mL)后, 缓慢滴加到上述溶液中, 并剧烈搅拌, 保持反应温度在-5~0℃的范围之间。反应 0.5h 后, 将碘化钾(6.34 g, 38.2 mmol, 15.0 eq)溶于水(6.00 mL)后, 缓慢滴加到上述溶液中, 并剧烈搅拌, 继续保持反应温度在-5~0℃的范围之间。加毕, 反应液在氮气保护下升温至 25℃ 搅拌 12h。LCMS 监测反应完全。用乙酸乙酯(20 mL)和水(100 mL)萃取分离, 收集有机相, 再用饱和亚硫酸钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干有机相, 硅胶色谱柱纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 20/1 至 0/1), 得黄色固体 **KHE005-3** (546 mg, 产率 50.5%)。MS (ESI) m/z: 424.9 [M+H]⁺。 ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400MHz): δ 10.05 (br s, 1 H) 7.98 (s, 2 H) 7.98 (s, 1 H) 3.27 (d, *J* = 6.8 Hz, 1 H) 1.11 (s, 3 H) 1.10 (s, 3 H)。

化合物 **KHE005-4**: 在氮气保护下, 将 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (93 mg, 0.127 mmol, 0.10 eq)、化合物 **KHE005-3** (540 mg, 1.27 mmol, 1.00 eq)、 Pin_2B_2 (3.227 g, 12.7 mmol, 10.0 eq) 和醋酸钾(374 mg, 3.81 mmol, 3.00 eq)溶于二氧六环(7 mL)中, 在 90℃ 下搅拌反应 12h。LCMS 监测反应完全。将反应直接旋干, 硅胶色谱柱纯化 (SiO_2 , 二氯甲烷/甲醇 = 20/1) 得到粗产物。产物粗品再用制备 HPLC 纯化, 得到红色固体硼酸产物 **KHE005-4** (400 mg, 收率 92.0%)。MS (ESI) m/z : 343.0 [M+H]⁺。 ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400MHz): δ 10.05 (s, 1 H), 8.47 (s, 1 H), 7.96 (s, 1 H), 7.86 (s, 1 H), 3.27 (d, *J* = 6.8 Hz, 1 H), 1.10 (s, 3 H), 1.08 (s, 3 H)。

化合物 **KHE005**: 在氮气保护下将 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (51.2 mg, 0.07 mmol, 0.06 eq)、化合物 **KHE005-4** (400 mg,

1.17 mmol, 1.00 eq)、**KHE005-4a** (224 mg, 1.17 mmol, 1.00 eq)和磷酸钾(495 mg, 2.33 mmol, 2.00 eq)加入到二氧六环(2.5 mL)和水(2.5 mL)的体系中,并在100℃下搅拌反应12h。LCMS监测反应完全。反应液用乙酸乙酯(10 mL)和水(80 mL)萃取分离,收集有机相,再用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,旋干有机相,硅胶色谱柱纯化(SiO₂, 二氯甲烷/甲醇 = 20/1)得到粗产物,再用制备HPLC纯化,得到黄色固体**KHE005**(101 mg, 收率21.0%, 纯度99.5%)。MS (ESI) *m/z* : 410.1 [M+1]⁺。 ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400MHz): δ 12.69 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 12.23 (s, 1H), 10.07 (br s, 1H), 8.04-7.97 (m, 3H), 3.36-3.21 (m, 1H), 1.12 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H)。

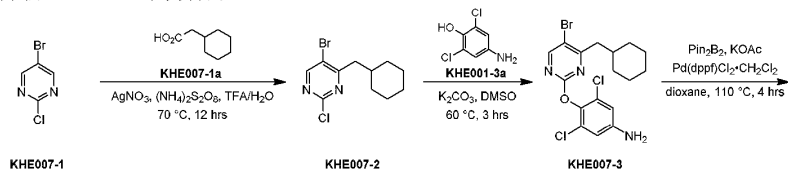
实施例 30 化合物 **KHE006** 的合成



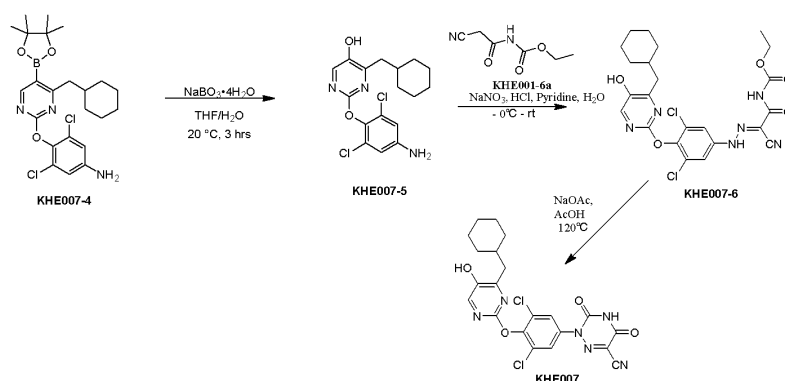
化合物 **KHE006-1**: 将化合物 **KHE005-4a** (3.00 g, 15.6 mmol, 1.00 eq)溶于乙腈(45 mL)中,将**KHE006-1a** (8.14 g, 40.0 mmol, 9.89 mL, 2.56 eq)加入到反应中,并在82℃下搅拌反应3h,接着将碘甲烷(2.71 g, 19.1 mmol, 1.19 mL, 1.22 eq)加入到上述反应体系中,搅拌24h后,继续加碘甲烷(1.11 g, 7.81 mmol, 486 μL, 0.50 eq)至反应中并搅拌24h。TLC(石油醚/乙酸乙酯= 2/1, *R_f* = 0.55)显示反应已经完成。向反应液中,加入乙酸乙酯(50mL)和水(50mL)萃取,收集有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液浓缩,硅胶色谱柱纯化(SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯= 20/1 至 0/1)得黄色固体**KHE006-1** (2.00 g, 产率 62.1%)。 ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400MHz): δ 3.44 (s, 3 H), 12.49 (br s, 1 H)。

化合物**KHE006**:在氮气保护下,将Pd(dppf)Cl₂ (89.6 mg, 0.122 mmol, 0.06 eq)、化合物**KHE005-4** (700 mg, 2.04 mmol, 1.00 eq)、**KHE006-1** (631 mg, 3.06 mmol, 1.50 eq)和磷酸钾(866 mg, 4.08 mmol, 2.00 eq)溶于二氧六环(2.5 mL)和水(2.5 mL)的体系中,并在100℃下搅拌反应12h。LCMS监测反应完全。反应液用乙酸乙酯(10 mL)和水(80 mL)萃取分离,收集有机相,再用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,旋干有机相,用制备HPLC纯化,得到淡黄色固体**KHE006**(10.4 mg, 收率1.11%, 纯度91.9%)。MS (ESI) *m/z* : 424.1 [M+1]⁺。

实施例 31 化合物 **KHE007** 的合成



31



化合物 **KHE007-2**: 将化合物 **KHE007-1** (30.0 g, 155 mmol, 1.00 eq) 加入水 (300 mL) 中, 将 **KHE007-1a** (26.5 g, 186 mmol, 26.2 mL, 1.20 eq)、硝酸银 (5.27 g, 31.0 mmol, 0.20 eq) 和三氟乙酸 (8.84 g, 77.6 mmol, 5.74 mL, 0.50 eq) 加入到上述反应体系中, 反应升温到 70°C 搅拌, 缓慢加入过硫酸铵 $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (70.8 g, 310 mmol, 2.00 eq), 加毕, 继续反应 12h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 1/0, $R_f = 0.12$) 显示反应已经完成。将反应液降温至 20°C, 用乙酸乙酯 (20 mL) 和水 (100 mL) 萃取分离, 收集有机相, 再用饱和氯化钠溶液洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干有机相, 硅胶色谱柱纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 1/0 至 10/1), 得无色油状物 **KHE007-2** (24.4 g, 84.3 mmol, 产率 54.3%)。MS (ESI) m/z : 291.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 8.88 (s, 1H), 2.74 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.81 (dt, $J = 3.6, 7.2$ Hz, 1H), 1.69-1.54 (m, 5H), 1.27-1.12 (m, 3H), 1.09-0.96 (m, 2H)。

化合物 **KHE007-3**: 将化合物 **KHE007-2** (24.4 g, 84.3 mmol, 1.00 eq) 和 K_2CO_3 (23.3 g, 169 mmol, 2.00 eq) 加入到 DMSO (200 mL) 中, 同时, 将 **KHE001-3a** (15.0 g, 84.3 mmol, 1.00 eq) 加入到上述反应体系中, 在氮气保护下反应升温到 60°C 搅拌 3h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 5/1, $R_f = 0.34$) 显示反应已经完成。反应液用乙酸乙酯 (20 mL) 和水 (100 mL) 萃取分离, 收集有机相, 再用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干有机相, 硅胶色谱柱纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 至 1/1), 得无色油状物 **KHE007-3** (28.0 g, 64.9 mmol, 产率 77.1%)。MS (ESI) m/z : 432.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 8.71 (s, 1H), 6.68 (s, 2H), 5.62 (s, 2H), 2.68-2.63 (m, 2H), 1.83-1.69 (m, 1H), 1.66-1.51 (m, 5H), 1.15-1.05 (m, 3H), 1.02-0.88 (m, 2H)。

化合物 **KHE007-4**: 将化合物 **KHE007-3** (2.00 g, 4.64 mmol, 1.00 eq)、醋酸钾 (911 mg, 9.28 mmol, 2.00 eq) 和 Pin_2B_2 (2.36 g, 9.28 mmol, 2.00 eq) 加入到二氧六环 (10 mL) 中, 再将 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (189 mg, 0.232 mmol, 0.05 eq) 加入到上述反应体系中, 在氮气保护下反应升温到 110°C 搅拌 4h。LCMS 监测反应完全。反应液用乙酸乙酯 (20 mL) 和水 (100 mL) 萃取分离, 收集有机相, 再用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤旋干有机相得到棕色固体 **KHE026-4** (4.00 g, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 478.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

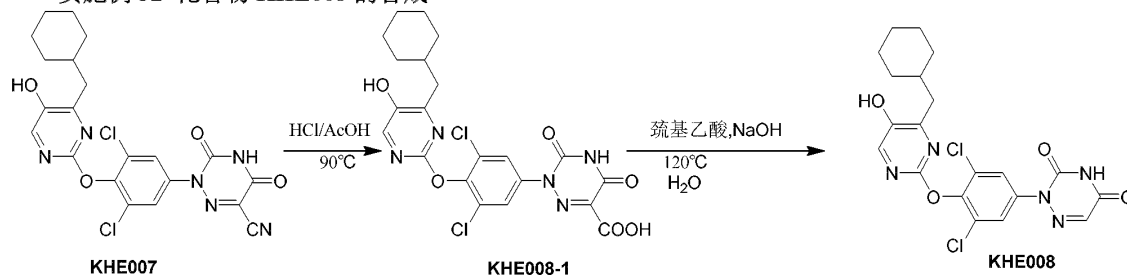
化合物 **KHE007-5**: 将化合物 **KHE007-4** (4.00 g, 8.36 mmol, 1.00 eq) 粗品溶于四氢呋喃 (20 mL) 和水 (20 mL) 中, 将过硼酸钠 $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3.86 g, 25.1 mmol, 3.00 eq) 加入到上述溶液中。在 20°C 下搅拌反应 3h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 2/1, $R_f = 0.15$) 显示反应已经完成。将反应液过滤, 滤饼用乙酸乙酯洗涤, 收集滤液, 用乙酸乙酯 (50 mL $\times 2$) 萃取, 合并有机相, 再用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤旋干有机相, 硅胶色谱柱纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 至 0/1) 得到淡黄色产物油状物 (1.40 g), 再用制备 HPLC 纯化得到灰色固体 **KHE007-5** (1.23 g, 3.27 mmol, 产率 72.0%, 纯度 97.8%)。MS (ESI) m/z : 368.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 9.74 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 6.65 (s, 2H), 5.51 (s, 2H), 2.94 (s, 1H), 1.62-1.41 (m, 4H), 0.68 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H)。

化合物 **KHE007-6**: 反应液 **A**: 称取化合物 **KHE007-5** (0.5038 g, 1.369 mmol) 溶于水 (26 mL) 中, 在 0°C 下加入 14 mL 浓盐酸, 将称取的亚硝酸钠 (0.1234 g, 1.788 mmol) 溶于 4 mL 水中, 缓慢的滴加进入反应液, 维持反应温度 0~5°C, 加毕, 继续在 0°C 下搅拌 1.5h, 使其成为溶液; 反应液 **B**: 称取化合物 **KHE001-6a** (0.2381 g, 1.526 mmol) 加入到 40 mL 水中, 在 0°C 下加入 14 mL 吡啶, 并在该温度下搅拌 1.5 h。然后在 0°C 下将反应液 **A** 迅速倒入反应液 **B** 中, 有橘红色固体生成, 缓慢升至室温继续反应过夜。TLC 监测反应显示反应完全, 直接将固体过滤, 用 50 mL 水和石油醚分别冲洗固体 3 次。收集固体, 获得橘红色固体 **KHE007-6** (700 mg, 95.6%, 粗品)。无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 535.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

化合物 **KHE007**: 取化合物 **KHE007-6** (700 mg, 1.310 mmol) 和 NaOAc (1.075 g, 13.110 mmol) 放入单口瓶中, 加入乙酸 (12 mL) 溶解, 氮气保护。在 120°C 下反应 3h。TLC 检测原料完全反应, 停止反应。反应降温至 0°C, 加入 100 mL 水后, 有大量固体析出, 直接将固体过滤, 用 50 mL 水和石油醚分别冲洗固体 3 次。收集获得橘红色固体 (620 mg, 粗品), 取 120 mg 送制备 HPLC 纯化得到淡黄色固体化合物 **KHE007** (26.9 mg,

产率22.4%)。MS (ESI) m/z : 489.3 $[M+1]^+$ 。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 13.25 (s, 1H), 10.02 (s, 1H), 8.03 (s, 2H), 7.75 (s, 1H), 2.49 - 2.50 (m, 2H), 1.55-1.71 (m, 6H), 1.04 - 1.13 (m, 4H), 0.92 - 0.97 (m, 2H)。

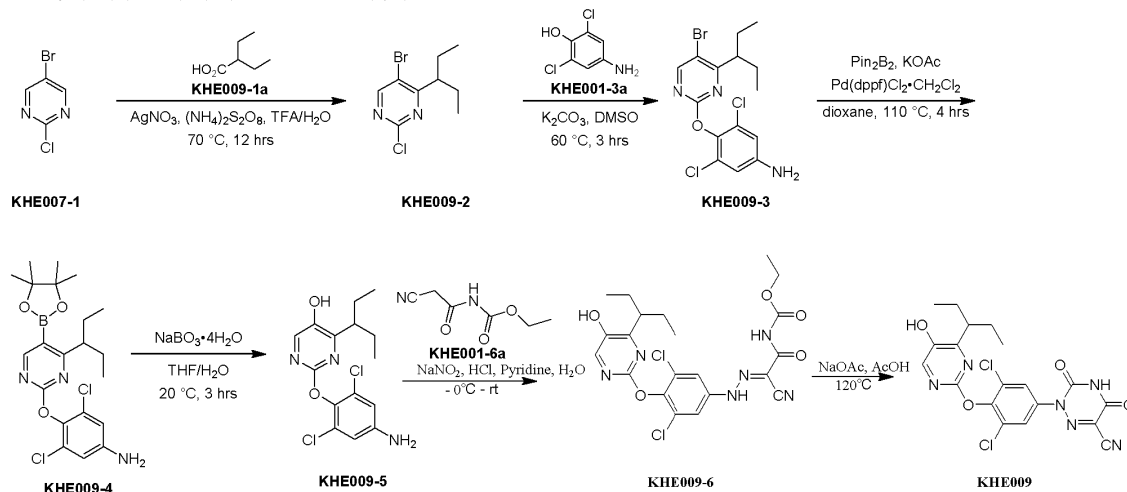
实施例 32 化合物 KHE008 的合成



化合物KHE008-1: 称取化合物KHE007(503.8 mg, 1.030mmol)放入单口瓶中, 加入乙酸(15 mL)溶解后, 向反应中滴加浓盐酸(5 mL)。加毕, 在90°C下反应4h后, TLC监测原料反应完全, 有极性变大主点生成, 停止反应。直接将反应液旋干, 用饱和碳酸钠溶液将反应pH调至9-10, 用乙酸乙酯(20mL*2)萃取, 收集水相并将水相pH调至3-4, 再用乙酸乙酯(20mL*2)萃取, 收集有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 有机相浓缩去除溶剂得到黄色固体**KHE008-1**(260 mg, 49.7%), 不需要纯化直接用于下一步。

化合物KHE008: 取化合物**KHE008-1**(260 mg, 0.581 mmol)和氢氧化钠(0.0891 g, 2.227 mmol)放入单口瓶中, 用水(40 mL)溶解后, 将巯基乙酸(1.0125 g, 10.331 mmol)加入反应中。在120°C下反应3h。TLC检测原料完全反应, 有极性变小的点生成, 停止反应。加入饱和碳酸钠溶液将反应体系pH调至中性, 乙酸乙酯(20mL*2)萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 制备HPLC纯化后得到白色固体**KHE008**(96.9 mg, 40.9%)。MS (ESI) m/z : 464.3 $[M+1]^+$ 。 ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 12.46 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 8.03 (s, 2H), 7.77 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 2.49 - 2.50 (m, 2H), 1.60 - 1.71 (m, 1H), 1.56 - 1.59 (m, 5H), 1.10 - 1.13 (m, 3H), 0.92 - 0.97 (m, 2H)。

实施例 33 化合物 KHE009 的合成



化合物 KHE009-2:操作同化合物 **KHE007-2** 的合成, 粗品经硅胶色谱柱纯化(SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯 = 1/0 至 10/1), 得黄色油状物 **KHE009-2** (45.5 g, 173 mmol, 产率 66.8%)。MS (ESI) m/z : 263.0 $[M+1]^+$ 。 ^1H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 8.93 (s, 1H), 3.15 - 3.05 (m, 1H), 1.73 - 1.59 (m, 4H), 0.74 (t, J = 7.6 Hz, 6H)。

化合物 KHE009-3: 操作同化合物 **KHE007-3** 的合成, 硅胶色谱柱纯化(SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯= 50/1 至 0/1)得白色固体 **KHE009-3** (11.8 g, 29.1 mmol, 收率 38.4%)。MS (ESI) m/z : 404.0 $[M+1]^+$ 。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): δ 8.77 (s, 1H), 6.68 (s, 2H), 5.61 (s, 2H), 3.04 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 1.54 (quin, J = 7.2 Hz, 4H), 0.69 (t, J = 7.2 Hz, 6H)。

化合物 KHE009-4:操作同化合物 **KHE007-4** 的合成, 得到棕色固体 **KHE009-4** (22.0 g, 粗品)。无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 452.2 $[M+H]^+$ 。

化合物KHE009-5:操作同化合物**KHE007-5**的合成, 得到白色固体**KHE009-5** (4.44 g, 12.5 mmol, 收率 48.7%, 纯度96.5%)。MS (ESI) m/z : 342.0 $[M+H]^+$ 。

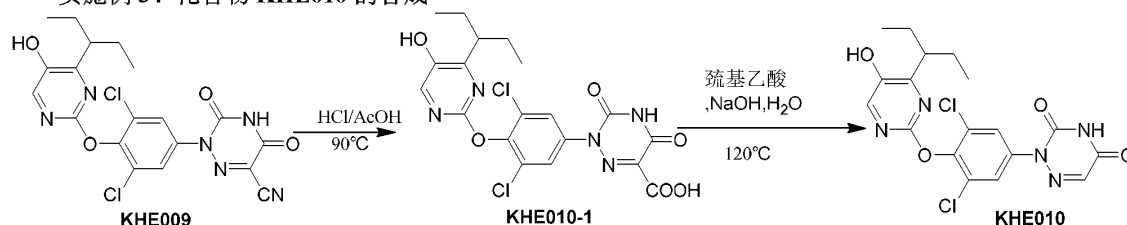
^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): δ 9.74 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 6.65 (s, 2H), 5.51 (s, 2H), 2.82 - 3.01 (m, 1H),

1.62 - 1.41 (m, 4H), 0.68 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H)。

化合物 **KHE009-6**: 操作同化合物 **KHE007-6** 的合成, 得橘红色固体 **KHE009-6** (650 mg, 86.7%, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 509.2 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KHE009**: 操作同化合物 **KHE007** 的合成, 获得橘红色固体 (570 mg, 粗品), 取 100mg 用制备 HPLC 纯化得到淡黄色固体 **KHE009** (18 mg, 产率 18.2%)。MS (ESI) m/z : 463.0 $[M+1]^+$ 。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 13.26 (s, 1H), 10.00 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.75 (s, 2H), 2.98 - 3.02 (m, 1H), 1.52-1.55 (m, 4H), 1.24 (s, 1H), 0.68 - 0.72 (m, 6H)。

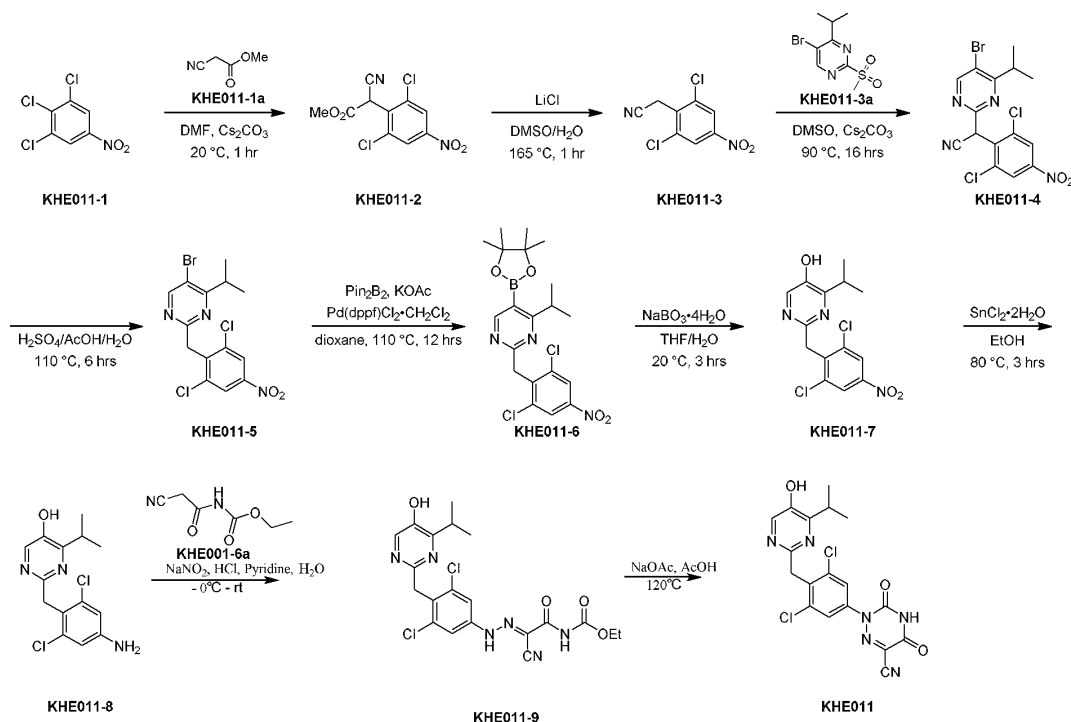
实施例 34 化合物 **KHE010** 的合成



化合物 **KHE010-1**: 操作同化合物 **KHE008-1** 的合成, 得到黄色固体 **KHE010-1** (280 mg, 57.4%), 不需要纯化直接用于下一步。MS (ESI) m/z : 482.0 $[M+1]^+$ 。

化合物 **KHE010**: 操作同化合物 **KHE008** 的合成, 制备 HPLC 纯化后得到白色固体 **KHE010** (113.6 mg, 44.7%)。MS (ESI) m/z : 438.2 $[M+1]^+$ 。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): 12.47(s, 1H), 9.98(s, 1H), 8.06(s, 1H), 7.78(s, 2H), 7.70(s, 1H), 2.94-3.01(m, 1H), 1.48-1.61(m, 4H), 0.70(t, 6H, $J=8.0$ Hz)。

实施例 35 化合物 **KHE011** 的合成



化合物 **KHE011-2**: 将化合物 **KHE011-1** (50.0 g, 221 mmol, 1.00 eq)、**KHE011-1a** (30.0 g, 265 mmol, 28.3 mL, 1.20 eq)、 Cs_2CO_3 (144 g, 442 mmol, 2.00 eq) 加入到 DMF (250 mL) 中, 氮气保护下, 于 $20^\circ C$ 下, 搅拌 1h。

TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 10/1) 监测原料反应完全, 有新点产生 ($R_f = 0.20$)。将反应液倒入 1N HCl (1 L), 有黄色固体析出, 过滤, 滤饼用水 (200 mL * 3) 洗涤, 收集滤饼, 用乙酸乙酯 (1L) 溶解后, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩滤液, 得黄色固体化合物 **KHE011-2** (60.0 g, 198 mmol, 收率 89.7%), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 289.0 $[M+1]^+$ 。

化合物 **KHE011-3**: 将化合物 **KHE001-2** (60.0 g, 198 mmol, 1.00 eq)、LiCl (12.6 g, 297 mmol, 1.50 eq)

加入到 DMSO (150 mL) 和水 (50 mL) 中, 氮气置换 3 次, 于氮气保护下, 165°C 反应 1h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 5/1) 原料反应完全, 有新点生成 ($R_f = 0.50$)。将反应液倒入冰水 (1L) 中, 用乙酸乙酯 (500 mL * 3) 萃取, 收集有机相, 用饱和食盐水 (200 mL * 3) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩滤液, 硅胶柱层析纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 30/1 至 5/1) 得黄色固体 **KHE011-3** (22.1 g, 95.7 mmol, 收率 48.3%)。MS (ESI) m/z : 231.0 $[M+1]^+$ 。

化合物 **KHE011-4**: 将化合物 **KHE011-3** (7.50 g, 32.5 mmol, 1.00 eq)、**KHE011-3a** (9.06 g, 32.5 mmol, 1.00 eq)、 Cs_2CO_3 (21.2 g, 64.9 mmol, 2.00 eq) 加入到 DMSO (70 mL) 中, 并在 90°C 下搅拌 16h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 5/1) 监测原料反应完全, 有小极性 ($R_f = 0.70$) 新点产生。将反应液倒入饱和食盐水 (500 mL) 中, 用乙酸乙酯 (500 mL * 3) 萃取, 合并有机相, 饱和食盐水洗涤 (200 mL * 3), 无水硫酸钠干燥, 过滤、浓缩, 硅胶柱层析纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 至 1/1) 得深灰色固体 **KHE011-4** (3.95 g, 9.18 mmol, 收率 28.3%)。MS (ESI) m/z : 429.0 $[M+1]^+$ 。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400MHz): δ 8.66 (s, 1H), 8.29 (s, 2H), 6.39 (s, 1H), 3.43 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 1.24 - 1.13 (m, 6H)。

化合物 **KHE011-5**: 将化合物 **KHE011-4** (2.90 g, 6.74 mmol, 1.0 eq) 加入到水 (12 mL)、乙酸 (12 mL) 和浓硫酸 (12 mL) 的体系中, 并在 110°C 搅拌 6h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 5/1) 监测原料反应完全, 并有新点产生 ($R_f = 0.47$)。反应液用水 (200 mL) 稀释后, 乙酸乙酯萃取 (80 mL * 3); 合并有机相, 饱和食盐水 (200 mL * 2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩、硅胶柱层析纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 至 1/1) 得黄色固体 **KHE011-5** (2.50 g, 6.17 mmol, 收率 91.5%)。MS (ESI) m/z : 404.0 $[M+1]^+$ 。 $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400MHz): δ 8.79 (s, 1H), 8.35 (s, 2H), 4.62 (s, 2H), 3.38 - 3.33 (m, 1H), 1.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。

化合物 **KHE011-6**: 操作同化合物 **KHE007-4** 的合成, 得棕色油状物 **KHE011-6** (4.50 g, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 452.2 $[M+1]^+$ 。

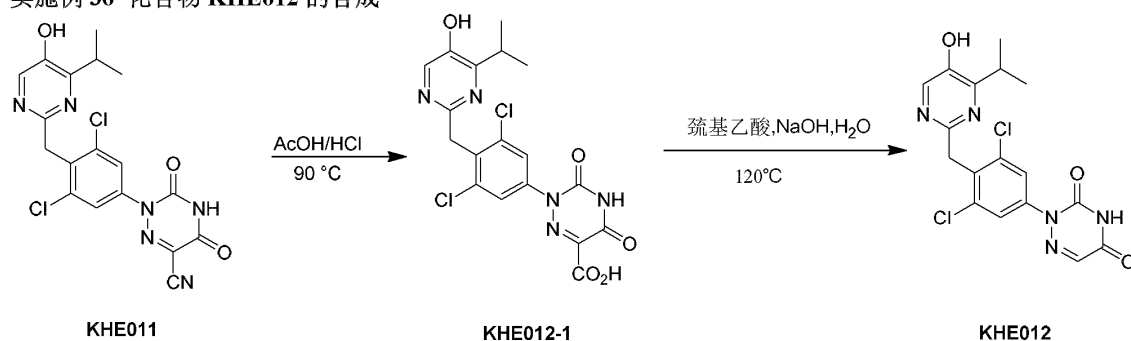
化合物 **KHE011-7**: 操作同化合物 **KHE007-5** 的合成, 制备 HPLC 纯化后, 得灰色固体 **KHE011-7** (680 mg, 1.94 mmol, 收率 31.5%, 纯度 97.8%)。MS (ESI) m/z : 342.0 $[M+1]^+$ 。

化合物 **KHE011-8**: 将化合物 **KHE011-7** (680 mg, 1.95 mmol, 纯度 97.9%, 1.00 eq) 溶于乙醇 (10 mL) 中, 加入氯化亚锡 ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (1.32 g, 5.84 mmol, 3.00 eq), 并于 80°C 下搅拌反应 3h。LCMS 监测原料反应完全, 将反应液分批次加入到乙酸乙酯 (30 mL) 和水 (80 mL) 的体系中, 分离有机相, 水相再用乙酸乙酯 (30 mL * 2) 萃取, 合并有机相, 饱和食盐水 (100 mL * 2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 制备 HPLC 纯化, 得黄色固体 **KHE011-8** (254 mg, 788 μmol , 收率 40.5%, 纯度 96.8%)。MS (ESI) m/z : 312.0 $[M+1]^+$ 。 $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400MHz): δ 10.19 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 6.80 - 6.68 (m, 2H), 4.24 (s, 2H), 3.31 - 3.23 (m, 1H), 2.08 - 2.06 (m, 1H), 1.10 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。

化合物 **KHE011-9**: 操作同化合物 **KHE007-6** 的合成, 得黄色固体 **KHE011-9** (350 mg, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 479.0 $[M+1]^+$ 。

化合物 **KHE011**: 操作同化合物 **KHE007** 的合成, 制备 HPLC 纯化后, 得黄色固体 **KHE011** (194 mg, 433 μmol , 收率 63.9%, 纯度 96.6%)。MS (ESI) m/z : 433.0 $[M+1]^+$ 。 $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400MHz): δ 13.21 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.63 (s, 2H), 4.46 (s, 2H), 3.30 - 3.26 (m, 1H), 1.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。

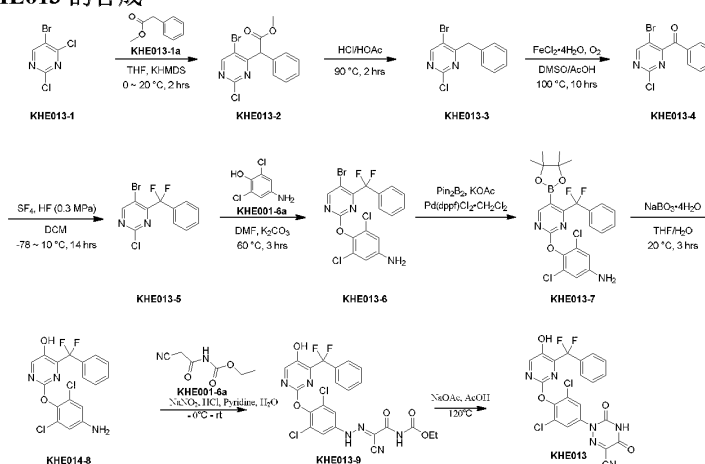
实施例 36 化合物 **KHE012** 的合成



化合物 **KHE012-1**: 操作同化合物 **KHE008-1** 的合成, 得黄色固体 **KHE012-1** (120 mg, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 451.9 $[M+1]^+$ 。

化合物 **KHE012**: 操作同化合物 **KHE008** 的合成, 制备 HPLC 纯化后得到淡黄色固体 **KHE012** (58.0 mg, 收率 51.2%, 纯度 97.9%)。MS (ESI) m/z : 408.2 $[M+1]^+$ 。 $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400MHz): δ 12.43 (s, 1H), 10.05 (m, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.69 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.66 (s, 2H), 4.44 (s, 2H), 3.35 - 3.21 (m, 1H), 1.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。

实施例 37 化合物 KHE013 的合成



化合物 **KHE013-2**: 将 **KHE013-1** (250 g, 1.10 mol, 140 mL, 1.00 eq) 和 **KHE013-1a** (165 g, 1.10 mol, 154 mL, 1.00 eq) 溶解于四氢呋喃 (2L) 中, 于外温 0°C 下, 缓慢滴加 KHMDS (1.0 M, 1.15 L, 1.05 eq), 加毕, 反应液升至 20°C 下搅拌反应 2h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 20/1) 监测显示原料反应完全, 有新点产生 ($R_f = 0.33$)。将反应液缓慢倒入饱和氯化铵 (1L) 溶液中, 加入乙酸乙酯萃取 (600mL*3), 合并有机相, 饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥、浓缩得棕色固体 **KHE013-2** (360 g, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 343.0 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KHE013-3**: 将 **KHE013-2** (330 g, 966 mmol, 1.00 eq) 加入到浓盐酸 (165 mL, 纯度 37%) 和乙酸 (660mL) 的溶液体系中, 并于外温 90°C 下搅拌反应 2h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 20/1) 显示原料反应完全, 并有新点产生 ($R_f = 0.48$), 减压旋去溶剂, 残留油状物直接用硅胶柱层析纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 至 2/1) 得白色固体 **KHE013-3** (117 g, 412 mmol, 收率 37.6%)。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz): δ 8.93 (br d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.37 - 7.21 (m, 5H), 4.23 (br d, $J = 2.4$ Hz, 2H)。

化合物 **KHE013-4**: 将 **KHE013-3** (30.0 g, 106 mmol, 1.00 eq) 溶于 DMSO (300 mL) 和乙酸 (150 mL) 的混合溶液中, 加入 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (2.10 g, 10.6 mmol, 0.10 eq), 并于氧气中, 外温 100°C 下搅拌反应 10h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 20/1) 显示原料反应完全, 有新点产生 ($R_f = 0.24$)。将反应液缓慢倒入乙酸乙酯 (200mL) 和水 (800mL) 中, 分出乙酸乙酯层, 水层再用乙酸乙酯 (150 mL * 2) 萃取, 合并有机层, 饱和食盐水 (500 mL * 2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩、硅胶柱层析纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 至 2/1) 得黄色固体 **KHE013-4** (16.0 g, 53.8 mmol, 收率 50.8%)。

化合物 **KHE013-5**: 于外温 -78°C 下, 将 SF_6 (14.2 g, 131 mmol, 3.00 eq) 和 HF (8.74 g, 437 mmol, 7.95 mL, 10.0 eq) 加入到 **KHE013-4** (13.0 g, 43.7 mmol, 1.00 eq) 的二氯甲烷 (50 mL) 溶液中, 加毕, 转至外温 10°C、0.30 MPa 下搅拌反应 14h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 5/1) 显示反应完全, 有新点产生 ($R_f = 0.70$)。将反应液倒入乙酸乙酯 (100mL) 中, 用饱和碳酸氢钠 (300mL) 调 pH 至 7-8, 分出有机层, 水层再用乙酸乙酯萃取 (100 mL * 3), 合并有机层, 饱和食盐水 (200 mL * 2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩、硅胶柱层析纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 1/0 至 1/1) 得无色油状物 **KHE013-5** (10.0 g, 31.3 mmol, 收率 71.6%)。MS (ESI) m/z : 320.8 $[M+H]^+$ 。 1H NMR: ($CDCl_3$, 400MHz): δ 8.78 (s, 1H), 7.63 (dd, $J = 1.2, 7.2$ Hz, 2H), 7.54 - 7.41 (m, 3H)。 ^{19}F NMR: ($CDCl_3$, 400MHz): δ -96.31。

化合物 **KHE013-6**: 操作同化合物 **KHE007-3** 的合成, 硅胶色谱柱纯化 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 至 2/1) 得黄色固体 **KHE013-6** (10.2 g, 22.1 mmol, 收率 88.4%)。MS (ESI) m/z : 460.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz): δ 9.03 (s, 1H), 7.64 - 7.44 (m, 5H), 6.69 (s, 2H), 5.70 (s, 2H)。

化合物 **KHE013-7**: 操作同化合物 **KHE007-4** 的合成, 得到棕色油状物 **KHE013-7** (25.0 g, 粗品)。无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 508.2 $[M+H]^+$ 。

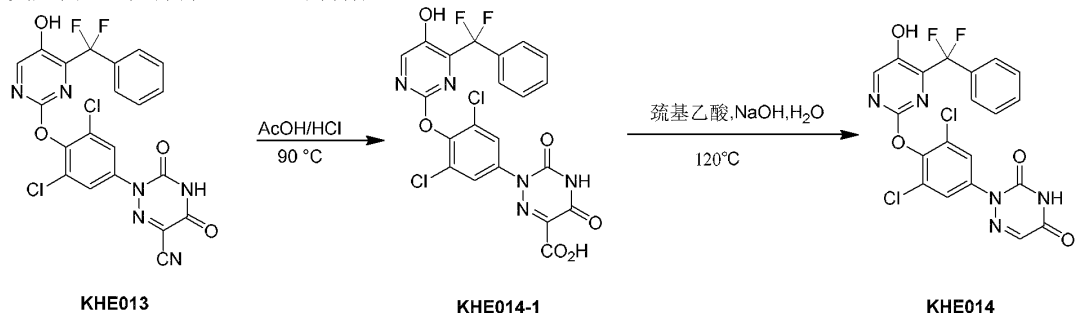
化合物 **KHE013-8**: 操作同化合物 **KHE007-5** 的合成, 制备 HPLC 纯化后, 得类白色固体 **KHE013-8** (3.28 g, 8.09 mmol, 收率 33.3%, 纯度 98.2%)。MS (ESI) m/z : 380.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR (DMSO- d_6 , 400MHz): δ 10.65 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 7.57 - 7.43 (m, 5H), 6.67 (s, 2H)。 ^{19}F NMR (DMSO- d_6 , 400MHz): δ -95.89。

化合物 **KHE013-9**: 操作同化合物 **KHE007-6** 的合成, 得黄色固体 **KHE013-9** (512 mg, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 565.0 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KHE013**: 操作同化合物 **KHE007** 的合成, 制备 HPLC 纯化后, 得类白色固体 **KHE013** (134 mg,

收率 65.2%, 纯度 98.1%)。MS (ESI) m/z : 519.1 $[M+H]^+$ 。

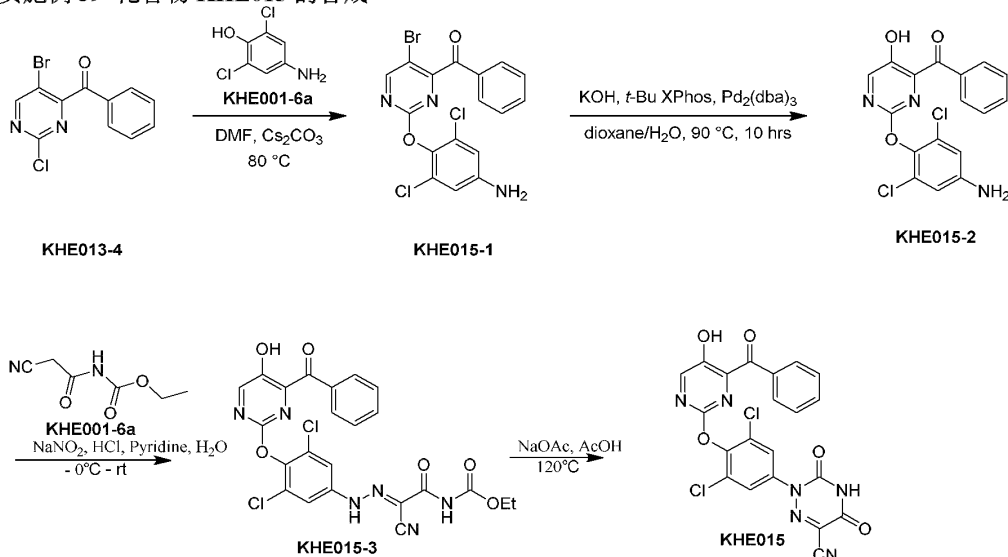
实施例 38 化合物 KHE014 的合成



化合物 **KHE014-1**: 操作同化合物 **KHE008-1** 的合成, 得黄色固体 **KHE014-1** (63 mg, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 538.0 $[M+1]^+$ 。

化合物 **KHE014**: 操作同化合物 **KHE008** 的合成, 制备 HPLC 纯化后得到淡黄色固体 **KHE014** (24.0 mg, 两步收率共 23.2%, 纯度 96.8%)。MS (ESI) m/z : 494.1 $[M+1]^+$ 。

实施例 39 化合物 KHE015 的合成



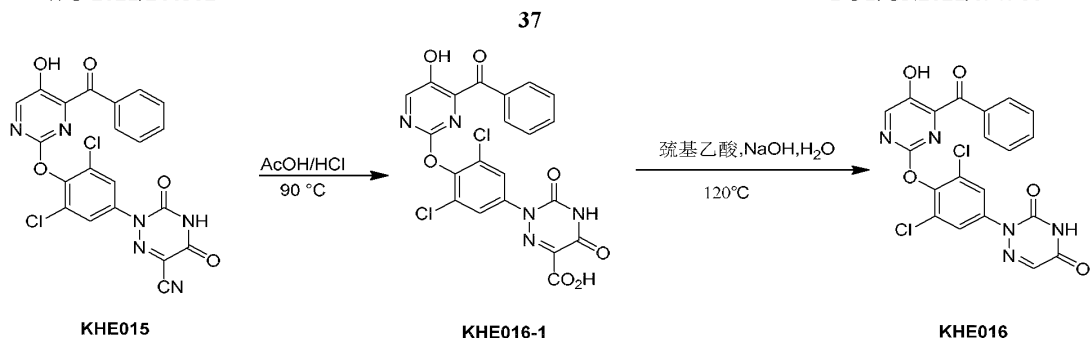
化合物 **KHE015-1**: 操作同化合物 **KHE007-3** 的合成, 硅胶色谱柱纯化(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 至 1/1)得黄色固体 **KHE015-1** (6.00 g, 13.7 mmol, 收率 56.5%)。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): δ 9.09 (s, 1H), 7.85 - 7.75 (m, 3H), 7.62 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 6.66 (s, 2H), 5.66 (br s, 2H)。

化合物 **KHE015-2**: 将化合物 **KHE015-1** (6.00 g, 13.7 mmol, 1.00 eq)、氢氧化钾(3.07 g, 54.7 mmol, 4.00 eq)、*t*-Bu Xphos (580 mg, 1.37 mmol, 0.10 eq)加入到二氧六环(60 mL)和水(15 mL)的体系中, 再加入 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (1.25 g, 1.37 mmol, 0.10 eq), 加毕, 将溶液置外温 90 °C 下, 搅拌反应 10h。TLC (石油醚/乙酸乙酯 = 3/1) 显示反应完全, 有新点产生(R_f = 0.22)。将反应液倒入乙酸乙酯 (50mL) 和水 (200mL) 中, 搅拌 10 分钟后, 分出有机相, 水相再用乙酸乙酯(50 mL * 2)萃取, 合并有机相, 饱和食盐水(100 mL * 2)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 制备 HPLC 纯化得黄色固体 **KHE015-2** (2.45 g, 6.46 mmol, 收率 47.3%, 99.2%)。MS (ESI) m/z : 376.0 $[M+H]^+$ 。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): δ 10.62 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.83 - 7.77 (m, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.56 (s, 2H), 6.64 (s, 2H), 5.84 - 5.29 (m, 2H)。

化合物 **KHE015-3**: 操作同化合物 **KHE007-6** 的合成, 得淡黄色固体 **KHE015-3** (625.7 mg, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 543.0 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KHE015**: 操作同化合物 **KHE007** 的合成, 制备 HPLC 纯化后, 得类白色固体 **KHE015** (278.4 g, 两步收率 31.1%, 95.9%)。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): 10.87(s, 1H), 8.49(s, 1H), 7.82(s, 1H), 7.80(d, 1H, J = 4.0Hz), 7.77(s, 2H), 7.71-7.74(m, 1H), 7.55-7.59(m, 2H)。

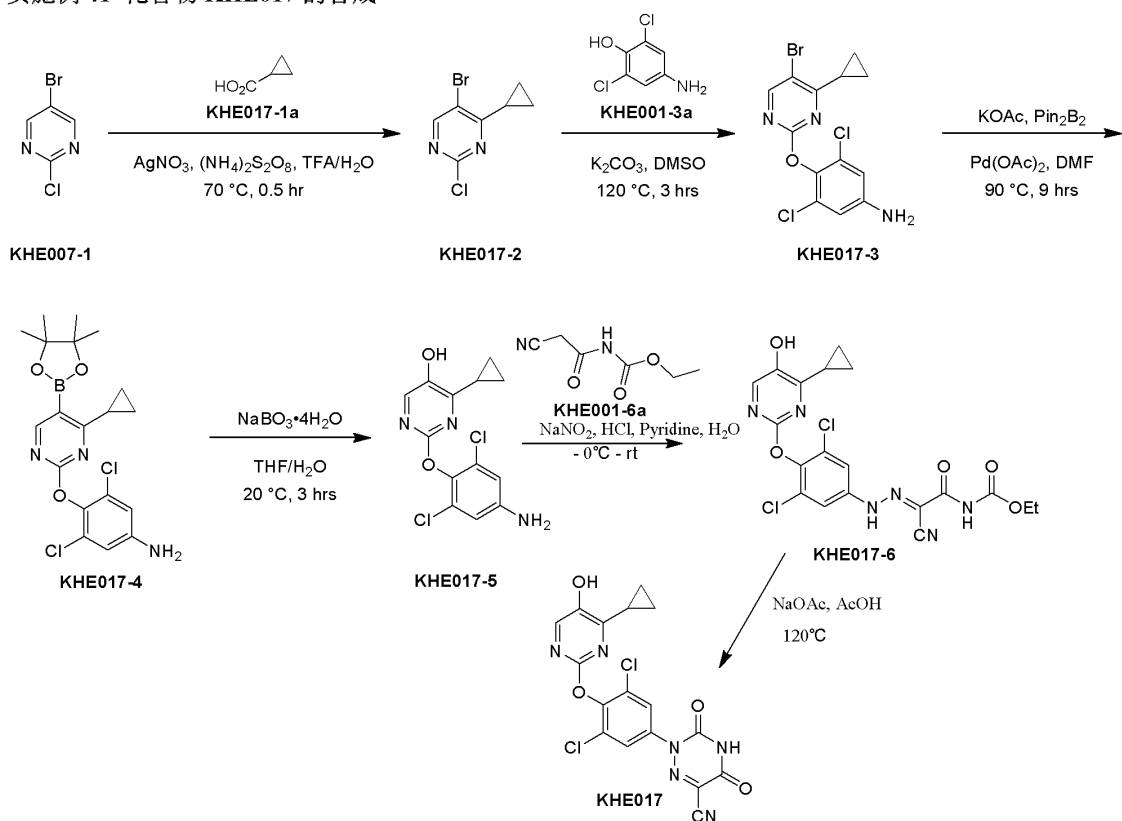
实施例 40 化合物 KHE016 的合成



化合物 **KHE016-1**: 操作同化合物 **KHE008-1** 的合成, 得黄色固体 **KHE016-1** (74.5 mg, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 516.0 $[M+1]^+$ 。

化合物 **KHE016**: 操作同化合物 **KHE008** 的合成, 制备 HPLC 纯化后得到类白色固体 **KHE016** (31.2 mg, 两步收率共 26.3%, 纯度 97.2%)。MS (ESI) m/z : 472.0 $[M+1]^+$ 。

实施例 41 化合物 **KHE017** 的合成



化合物 **KHE017-2**: 操作同 **KHE007-2**, 硅胶柱层析纯化(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯 = 1/0 至 5/1)得无色油状物 **KHE017-2** (9.50 g, 40.7 mmol, 收率 78.7%)。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 8.46 - 8.39 (m, 1H), 2.39 (tt, J = 4.8, 8.0 Hz, 1H), 1.25 - 1.20 (m, 1H), 1.25 - 1.20 (m, 1H), 1.18 - 1.11 (m, 2H)。

化合物 **KHE017-3**: 操作同 **KHE007-3**, 得灰色固体 **KHE017-3** (13.0 g, 粗品), 无须纯化直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 375.9 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KHE017-4**: 操作同 **KHE007-4**, 得黄色固体 **KHE017-4** (25.0 g, 粗品), 无须纯化直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 422.3 $[M+H]^+$ 。

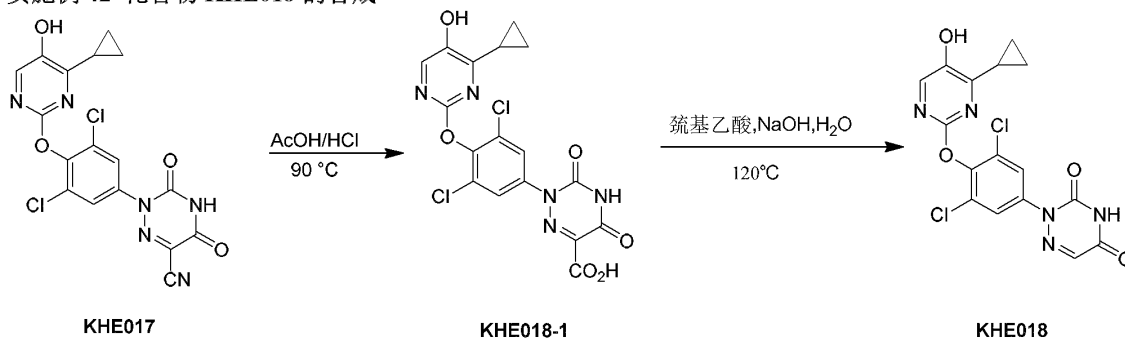
化合物 **KHE017-5**: 操作同 **KHE007-5**, 制备 HPLC 纯化, 得黄色固体 **KHE017-5** (439 mg, 1.40 mmol, 收率 13.1%, 纯度 99.4%)。MS (ESI) m/z : 312.0 $[M+H]^+$ 。

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 9.89 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.70 - 6.60 (s, 1H), 5.52 (s, 2H), 2.39 - 2.25 (m, 1H), 1.06 - 0.93 (m, 2H), 0.88 - 0.76 (m, 2H)。

化合物 **KHE017-6**: 操作同化合物 **KHE007-6**, 得橘红色固体 **KHE017-6** 约 451.6mg, 无须纯化直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 479.1 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KHE017**: 操作同化合物 **KHE007**, 取 200mg 制备 HPLC 纯化得白色固体 **KHE017** 约 56.2mg。MS (ESI) m/z : 433.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): δ 13.27(s, 1H), 10.12(s, 1H), 7.94(s, 1H), 7.74(s, 2H), 2.28(m, 1H), 1.04(m, 2H), 0.86(m, 2H)。

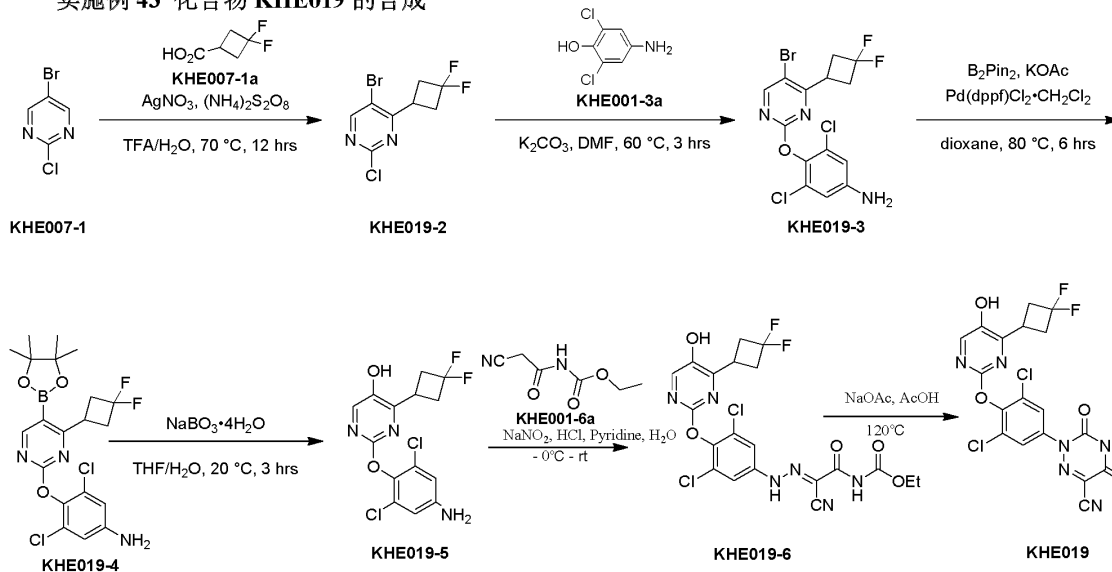
实施例 42 化合物 **KHE018** 的合成



化合物 **KHE018-1**: 操作同化合物 **KHE008-1** 的合成, 得黄棕色固体 **KHE018-1** (205.7 mg, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 452.0 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KHE018**: 操作同化合物 **KHE008** 的合成, 制备 HPLC 纯化后得到类白色固体 **KHE018** (20 mg, 纯度 96.81%)。MS (ESI) m/z : 472.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): 12.46(s, 1H), 10.09(s, 1H), 8.25(s, 1H), 7.75(s, 2H), 7.68(s, 1H), 2.32-2.39(m, 1H), 1.02-1.07(m, 2H), 0.85-0.90(m, 2H)。

实施例 43 化合物 **KHE019** 的合成



化合物 **KHE019-2**: 操作同 **KHE007-2**, 硅胶柱层析纯化(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯= 50/1 ~ 10/1)得黄色固体 **KHE019-2** (9.00 g, 31.7 mmol, 收率 68.2%)。MS (ESI) m/z : 283.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.62 (s, 1H), 3.88 - 3.60 (m, 1H), 3.11 - 2.90 (m, 4H)。

化合物 **KHE019-3**: 操作同 **KHE007-3**, 硅胶柱层析(SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯= 50/1 ~ 10/1), 得黄色固体 **KHE019-3** ((5.20 g, 12.2 mmol, 收率 86.7%))。MS (ESI) m/z : 424.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR ($CDCl_3$, 400MHz): δ 8.50 (s, 1H), 6.69 (s, 2H), 4.06 - 3.75 (m, 2H), 3.75 - 3.64 (m, 1H), 2.91 (td, J = 8.4, 16.4 Hz, 4H)。

化合物 **KHE019-4**: 操作同 **KHE007-4**, 得棕色油状物 **KHE019-4** (5.80 g, 粗品), 无须纯化直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 472.1 $[M+H]^+$ 。

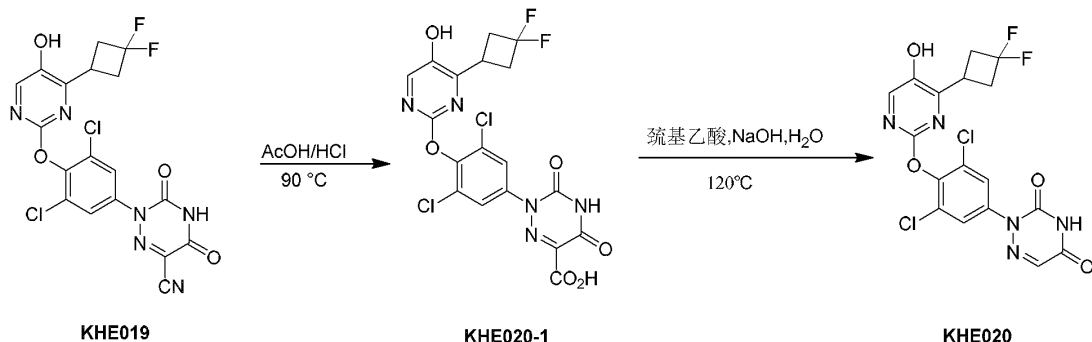
化合物 **KHE019-5**: 操作同 **KHE007-5**, 制备 HPLC 纯化, 得白色固体 **KHE019-5** (1.1 g, 2.96 mmol, 收率 24.0%, 纯度 97.4%)。MS (ESI) m/z : 362.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): δ 10.13 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 6.67 (s, 2H), 5.55 (s, 2H), 3.62 (dquin, J = 2.8, 8.8 Hz, 1H), 2.91 - 2.73 (m, 4H)。 ^{19}F NMR(DMSO- d_6 ,

400MHz): δ -80.48 (d, J = 12.8 Hz, 1F), -95.69 (d, J = 12.8 Hz, 1F)。

化合物 **KHE019-6**: 操作同化合物 **KHE007-6**, 得橘红色固体 **KHE019-6** 约 324mg, 无须纯化直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 529.0 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KHE019**: 操作同化合物 **KHE007**, 取 120mg 制备 HPLC 纯化得白色固体 **KHE019** 约 43.7mg。MS (ESI) m/z : 483.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): δ 13.25(s, 1H), 10.377(s, 1H), 8.073(s, 1H), 7.779(s, 2H), 3.653-3.675(m, 1H), 2.836-2.948(m, 4H)。

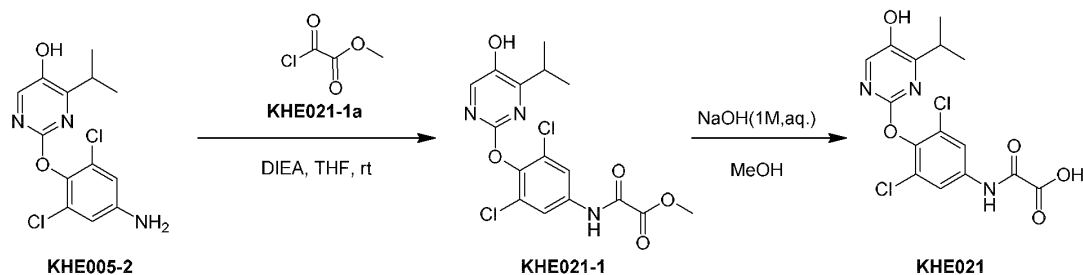
实施例 44 化合物 **KHE020** 的合成



化合物 **KHE020-1**: 操作同化合物 **KHE008-1** 的合成, 得棕色固体 **KHE020-1** (157 mg, 粗品), 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) m/z : 502.0 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KHE020**: 操作同化合物 **KHE008** 的合成, 制备 HPLC 纯化后得到类白色固体 **KHE020** (15.4 mg, 纯度 97.23%)。MS (ESI) m/z : 458.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): δ 12.480(s, 1H), 10.341(s, 1H), 8.073(s, 1H), 7.722(s, 2H), 7.718(s, 1H), 3.343-3.665(m, 1H), 2.841-2.946(m, 4H)。

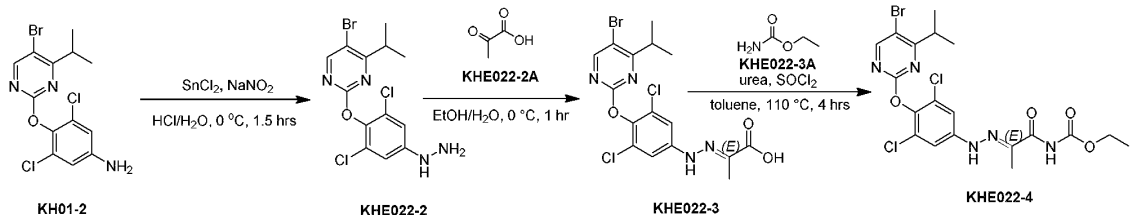
实施例 45 化合物 **KHE021** 的合成

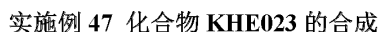


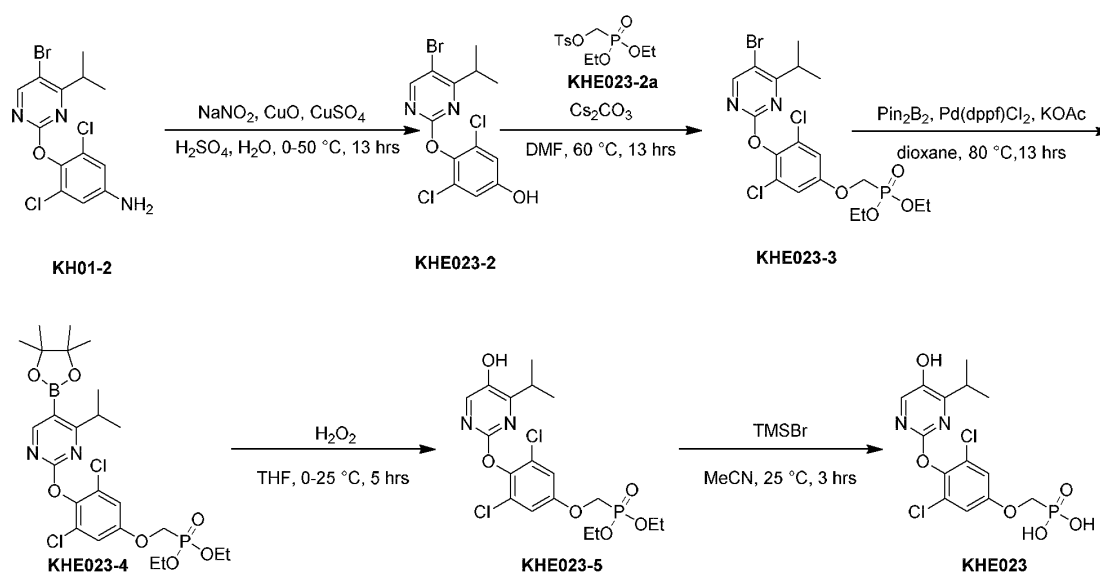
化合物 **KHE021-1**: 将化合物 **KHE005-2** (0.1095 g, 3.498 mmol, 1.00 eq) 溶于 THF (10 mL) 中, 并将 **KHE021-1a** (0.4736 g, 3.882 mmol, 12 eq) 和 DIEA (0.9965 g, 7.665 mmol, 24 eq) 加入反应体系中, 于室温下搅拌反应过夜。TLC 监测有新点生成。将反应液用水稀释, 乙酸乙酯 (20 mL*3) 萃取, 合并有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤旋干得到残留物。TLC 板纯化, 得到黄色固体 **KHE021-1** (80 mg, 收率 57.3%), 取样送 LCMS 确认产物信号。MS (ESI) m/z : 400.0 $[M+H]^+$ 。

化合物 **KHE021**: 取化合物 **KHE021-1** (80 mg, 0.2 mmol) 溶于甲醇 (6 mL) 中, 加入氢氧化钠溶液 (1 mL, 1M, aq)。于室温搅拌过夜。TLC 检测反应完成。加入 10 mL 水稀释反应液, 直接将反应中有机溶剂旋干, 调节 pH 至 3~4, 用乙酸乙酯 (20*3) 萃取, 合并有机相, 并用无水硫酸钠干燥, 旋干得残余物。层析板纯化残余物, 得到白色固体化合物 **KHE021** (12 mg, 收率 15.5%)。MS (ESI) m/z : 386.0 $[M+H]^+$ 。 1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): δ 9.87 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 6.65 (s, 2H), 5.53 (s, 2H), 3.23 - 3.28(m, 1H), 1.11 (d, J = 6.8 Hz, 6H)。

实施例 46 化合物 **KHE022** 的合成







化合物 **KHE023-2**: 将 **KH01-2** (40.0 g, 106 mmol, 1.00 eq) 加入到浓硫酸(60.0 mL)和水(25.0 mL)中, 于 0°C 下, 滴加亚硝酸钠溶液(7.32 g, 106 mmol, 1.00 eq, 溶于 150mL 水), 加毕, 继续于该温度下, 搅拌 1h; 另将硫酸铜溶液(253 g, 1.59 mol, 244 mL, 15.0 eq, 溶于 150mL 水)滴加到上述反应液中, 并同时加入氧化铜(8.44 g, 106.08 mmol, 1.34 mL, 1.00 eq)。将反应液升温至 50°C 下搅拌反应 12h。LC-MS 监测显示有目标产物生成。将反应液过滤, 滤液加入乙酸乙酯 800mL, 并用 200mL 饱和食盐水洗涤。收集有机相, 无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩, 反相 HPLC 纯化得黄色固体 **KHE023-2** (7.60 g, 20.0 mmol, 收率: 18.96%)。MS (ESI) $m/z = 378.9$ $[\text{M}+1]^+$ 。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): δ 10.36 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 6.96 (s, 2H), 3.40 - 3.36 (m, 1H), 1.12 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。

化合物 **KHE023-3**: 将 **KHE023-2** (4.50 g, 11.9 mmol, 1.00 eq) 溶于 DMF (50.0 mL) 中, 加入 **KHE023-2a** (4.60 g, 14.2 mmol, 3.68 mL, 1.20 eq) 和碳酸铯(4.65 g, 14.2 mmol, 1.20 eq), 于 60°C 下搅拌反应 13h。LC-MS 监测显示有目标产物生成。将反应物倒入 50mL 水中, 乙酸乙酯萃取(50 mL * 2), 合并有机相, 饱和食盐水洗涤(50 mL * 2)后, 无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩; 残留物柱层析纯化(石油醚/乙酸乙酯 = 50/1 ~2/1)得黄色油状物 **KHE023-3** (3.80 g, 7.19 mmol, 收率: 60.4%)。MS (ESI) $m/z = 529.0$ $[\text{M}+1]^+$ 。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): δ 8.73 (s, 1H), 7.36 (s, 2H), 4.57 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 4.18 - 4.05 (m, 4H), 3.37 (m, 1H), 1.25 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.12 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。

化合物 **KHE023-4**: 取 **KHE023-3** (3.50 g, 6.63 mmol, 1.00 eq) 溶于二氧六环(85.0 mL)中, 加入醋酸钾(1.30 g, 13.2 mmol, 2.00 eq)、 Pin_2B_2 (3.37 g, 13.2 mmol, 2.00 eq)、 Pd(dppf)Cl_2 (484 mg, 662 μmol , 0.10 eq), 于氮气保护下, 80°C 搅拌反应 13h。LC-MS 监测显示有目标产物生成, 将反应液倒入 10mL 水中, 用乙酸乙酯萃取(10 mL * 2), 合并有机相, 用饱和食盐水(20 mL)洗涤后, 无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩, 得黄色油状物 **KHE023-4** (2.00 g) 粗品, 无须纯化, 直接下一步反应。MS (ESI) $m/z = 575.1$ $[\text{M}+1]^+$ 。

化合物 **KHE023-5**: 将 **KHE023-4** (2.00 g, 3.48 mmol, 1.00 eq) 用四氢呋喃(40.0 mL)溶解后, 0°C 下, 加入过氧化氢(3.94 g, 34.7 mmol, 3.34 mL, 纯度 30.0%, 10.0 eq), 转至室温搅拌 5h。LC-MS 监测显示原料反应完全, 有目标产物生成。将反应液倒入饱和亚硫酸钠(50 mL)中, 搅拌 10min 后, 用乙酸乙酯萃取(50 mL * 2), 收集有机相, 饱和食盐水(50 mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩; 残留物用制备 HPLC 纯化, 得棕色油状物 **KHE023-5** (0.80 g, 1.72 mmol, 收率: 49.4%)。MS (ESI) $m/z = 465.2$ $[\text{M}+1]^+$ 。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): δ 10.0 (br s, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.32 (s, 2H), 4.57 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 4.13 (quin, $J = 7.2$ Hz, 4H), 3.31 - 3.25 (m, 1H), 1.27 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H), 1.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。

化合物 **KHE023**: 将 **KHE023-5** (0.65g, 1.40 mmol, 1.00 eq) 溶于 20mL 乙腈中, 加入三甲基溴硅烷(2.6g, 16.8mmol, 2.2 mL, 12.0 eq), 于室温下搅拌反应 3h。LC-MS 监测原料消失, 有目标产物生成, 将反应物倒入 20mL 甲醇中, 搅拌反应 30min 后, 减压旋干后, 将残留物用制备 HPLC 纯化, 得白色固体 **KHE023** (0.5 g, 1.22mmol, 收率 87.4%)。MS (ESI) $m/z = 409.0$ $[\text{M}+H]^+$ 。 ^1H NMR(DMSO- d_6 , 400MHz): δ 9.96 (br s, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.25 (s, 2H), 4.21 (d, $J = 10.0$ Hz, 2H), 3.30 (br d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 1.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H)。

实施例 48 活体外 $\text{TR}\alpha$ 或 $\text{TR}\beta$ 结合实验

化合物对 $\text{TR}\alpha$ 或 $\text{TR}\beta$ 的激动作用的活体外分析是采用时间分辨荧光共振能量转移共激活肽的招募实验

进行的。该实验采用Europium-anti-GST抗体(Cisbio, 61GSTKLB)、biotin-SRC2-2共激活肽(Sangon Biotech)、streptavidin-d2(Cisbio, 610SADAB)、RXR α (Pharmaron) 和带GST标签的TR α -LBD(Invitrogen, PV4762)或TR β -LBD (Invitrogen, PV4764)。Europium-anti-GST抗体通过结合到GST标签来间接标记TR α -LBD或TR β -LBD。Streptavidin-d2(Cisbio, 610SADAB)通过结合到biotin标签来间接标记SRC2-2共激活肽。在RXR α 存在时, TR α -LBD或TR β -LBD可以分别与其形成异质二聚体TR α -LBD/RXR α 或TR β -LBD/RXR α 。激动剂与TR α -LBD/RXR α 或TR β -LBD/RXR α 结合并导致TR α -LBD或TR β -LBD构象的变化,从而增加了异质二聚体对SRC2-2共激活肽的招募能力。同时,由此引起的d2-labeled SRC2-2共激活肽和Europium-anti-GST抗体的距离减小,增加了TR-FRET信号。根据不同浓度的化合物对TR α 或TR β 活性的影响,可以评估化合物的激动能力。

操作步骤:

- 用二甲亚砜(DMSO)制备6mM的阳性化合物(MGL-3196)和待测化合物溶液(100X),阴性对照为100% DMSO。
- 用100%二甲亚砜将阳性化合物(MGL-3196)或待测化合物从6mM(100X)以1:3进行等比稀释,共10个浓度,转入96孔板中。
- 用1X反应缓冲液(50mM HEPES (pH7.0), 50mM KF, 1mM DTT, 0.05% NP-40, 0.2% BSA)制备4X经过浓度梯度稀释的化合物。
- 加5 μ l的4X经过浓度梯度稀释的化合物到384孔实验板。
- 用1X反应缓冲液(50mM HEPES (pH7.0), 50mM KF, 1mM DTT, 0.05% NP-40, 0.2% BSA)制备4X TR α LBD以及4X RXR α 。
- 加5 μ l的4X TR α LBD以及4X RXR α 到384孔实验板。
- 用1X反应缓冲液(50mM HEPES (pH7.0), 50mM KF, 1mM DTT, 0.05% NP-40, 0.2% BSA)制备2X biotin-SRC2-2, 2X Europium-anti-GST以及2X streptavidin-d2的混合液。
- 加10 μ l的2X混合液(步骤g)到384孔实验板。
- 将室温及避光条件下孵育4小时。
- Envision 2104 (PerkinElmer) 酶标仪记录384孔实验板每孔665纳米和615纳米波长处荧光信号值,并计算665纳米/615纳米的荧光比值。

数据分析:

计算每孔的相对比:(比值665nm/615nm-比值空白),活性百分比(% Activity)计算如下:

$$\% \text{ Activity} = \left[\frac{\text{Ratio}_{\text{cmpd}} - \text{Ratio}_{\text{vehicle}}}{\text{Ratio}_{\text{positive}} - \text{Ratio}_{\text{vehicle}}} \right] * 100$$

其中:

Ratio_{positive}为整个板中阳性对照的相对比;

Ratio_{vehicle}为整个板中阴性对照的相对比;

Ratio_{cmpd}为整个板中化合物的相对比。

用Graphpad 8.0通过非线性回归的方法,对活性(%)和化合物对数浓度的关系进行拟合,来计算EC₅₀。

Y=底部+(顶部-底部)/(1+10^{-(LogEC₅₀-X)*坡度})

X: 化合物对数浓度; Y: 活性百分比

具体测试数据见表一。

表一 活体外TR α 或TR β 结合实验结果

化合物编号	TR α (EC ₅₀ μ M)	TR β (EC ₅₀ μ M)
MGL3196	2.223	0.163
KH02	-	1.056
KH03	0.144	0.031
KH04	0.133	0.113
KH06	0.094	0.007
KH07	0.31	0.048
KH09	1.884	0.066
KH10	1.47	0.054
KH13	0.132	0.054
KH14	0.102	0.105
KH15	0.194	0.014
KH16	0.106	0.012
KH17	0.385	0.021

KH18	0.188	0.011
KHE001	0.418	0.007
KHE002	0.272	0.003
KHE003	0.573	0.746
KHE007	5.123	0.089
KHE008	4.545	0.067
KHE009	0.258	0.04
KHE010	0.22	0.029
KHE011	0.014	0.001
KHE017	0.737	0.077
KHE018	0.346	0.04
KHE019	2.375	0.254
KHE021	0.008	0.001

其中，阳性化合物 MGL3196 按照 CN101228135B 中所述方法进行制备。

实施例 49 活体外 TR α 或 TR β 细胞转染实验

本实验研究的目的是评价化合物对 TR α 或 TR β 激动作用。将 TR α -LBD 或 TR β -LBD 和 RXR α -LBD 编码序列插入到 pBIND 质粒 (Promega, E1581)。两种表达载体和报告载体 (携带稳定整合的 GAL4 启动子驱动的荧光素酶报告基因的 pGL4.35) (Promega, E1370) 在宿主细胞中共表达。当激动剂与相应的嵌合受体结合时，嵌合受体与报告基因载体上的 GAL4 结合位点结合并刺激报告基因表达。根据发光信号的强弱来判定化合物对 TR α 或 TR β 的激动活性。

详细步骤：

工作液的制备

- 用二甲亚砜 (DMSO) 制备 30mM 的参比化合物 (MGL-3196) 或待测化合物溶液。
- 所有的化合物用 DMSO 进行 3 倍梯度稀释，10 个浓度梯度，起始浓度为 30 mM。
- 准备阳性对照 50 μ M 的 T3 (三碘甲状腺原氨酸，以 DMSO 进行溶解制备) 和阴性对照 (100% DMSO)。
- 将化合物板子封闭，并震荡 5 min。

细胞悬液制备

- 所有细胞都按照 ATCC 标准操作培养，HEK293T 在指数生长期进行实验。
- 轻轻弃去培养基上清。用 PBS 清洗细胞 2 次。
- 加入 TrypLE™ 胰酶消化液 (Gibco) 消化细胞，用完全培养基 (Gibco) 终止消化。
- 收集细胞并计数，只有在细胞活率大于 90% 时才可以进行实验。
- 分别接种 2.5×10^6 HEK293T 细胞到每个 60 mm 细胞培养皿中。
- 将接种好细胞的培养皿置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中过夜培养。

细胞转染

- 将 Fugene6 转染试剂 (Promega, E2691) 放置于室温。
- 加 30 μ L Fugene6 试剂到 Opti-MEM™ 培养基 (Gibco, 11058-021) 中，注意不要碰到管壁。
- 用移液枪混匀，室温静置 5min。
- 将 6 μ g 质粒 (插入有 TR α -LBD 或 TR β -LBD 和 RXR α -LBD 编码序列的 pBIND 质粒 (Pharmaron)、和 pGL4.35 报告基因质粒 (Promega, E1370)) 加入到稀释好的转染试剂中，用移液枪混匀室温静置 20min。
- 将混合好质粒 DNA 的转染试剂加到上述的接种好细胞的 60 mm 细胞培养皿中。
- 将培养皿置于 37°C、5% CO₂ 培养箱培养 5 h。

化合物处理

- 将稀释好的各化合物溶液、阳性对照、阴性对照用 Echo550 (Labcyte, 550) 转移 50nl 到 384 孔细胞培养板 (PerkinElmer, 6007680-50) 中。
- 将细胞种到所述 384 孔细胞培养板中，每孔 15,000 细胞数，加入 25 μ L 含 5% 胎牛血清培养基 (Gibco, 16000-044)。
- 将细胞在 37°C、5% CO₂ 培养箱中过夜培养。

化合物检测

- 将 Steady-Glo™ (Promega, E2520) 检测试剂放置于室温。
- 将 384 孔细胞培养板放置于室温。
- 每孔加入 25 μ L Steady-Glo™ 检测试剂于细胞培养板。
- 将培养板放到振荡器上避光震荡 5min。

用 Envision 2104 (PerkinElmer, Envision HTS) 检测发光值。
数据分析：
为每个孔计算 RLU 荧光信号 (Signal)，然后活性百分比 (% Activity) 计算如下：

$$\% \text{ Activity} = (\text{Signal}_{\text{compd}} - \text{Signal}_{\text{Ave_VC}}) / (\text{Signal}_{\text{Ave_PC}} - \text{Signal}_{\text{Ave_VC}}) \times 100.$$

其中：
Signal_{ave_pc} 为整个板中阳性对照的平均 RLU 荧光信号；
Signal_{ave_vc} 为整个板中阴性对照的平均 RLU 荧光信号；
Signal_{compd} 为整个板中化合物的平均 RLU 荧光信号。
用 Graphpad 8.0 通过非线性回归的方法，对活性(%)和化合物对数浓度的关系进行拟合，来计算 EC₅₀。
 $Y = \text{底部} + (\text{顶部} - \text{底部}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{坡度})})$
X：化合物对数浓度；Y：活性百分比
具体测试数据见下表二。

表二 TRα 或 TRβ 细胞转染实验结果

化合物编号	TRα (EC ₅₀ μM)	TRβ (EC ₅₀ μM)
T3	0.0023	0.002
MGL3196	2.564	1.083
KH03	0.826	0.089
KH04	2.486	1.283
KH06	0.037	0.009
KH07	0.964	0.208
KH10	0.269	0.032
KH13	2.74	1.13
KH14	0.383	0.148
KH15	1.457	0.205
KH16	0.138	0.019
KH18	0.028	0.007
KHE001	0.563	0.258
KHE002	0.039	0.004
KHE007	0.528	0.227
KHE008	0.049	0.008
KHE009	0.507	0.074
KHE011	0.07	0.02
KHE017	3.313	0.88
KHE018	0.407	0.102
KHE021	1.172	0.5

实施例 50 体外肝毒性检测

原代肝细胞信息：

供体	货号	批号	性别	年龄	种族	供应商
1	M00995-P	ZSE	男	60	高加索人	BioreclamationIVT

实验：

第一步：将受试物制备成 200 mM DMSO 储备液，再按 3 倍梯度连续稀释 7 个浓度，然后 8 个浓度分别取 1.5 μL 加入 498.5 μL 孵育培养基（组成见表五，直接混合均匀）中配制成工作液溶液，孵育培养基配制前于 37℃ 预热。DMSO 作为溶媒对照。工作液以及溶媒对照组中 DMSO 含量均为 0.3vol%。各化合物浓度如下：

化合物	工作液浓度(μM)
-----	-----------

化合物	工作液浓度(μM)
KH03	600、200、66.7、22.2、7.14、2.47、0.823、0.274
KH06	600、200、66.7、22.2、7.14、2.47、0.823、0.274
KH10	600、200、66.7、22.2、7.14、2.47、0.823、0.274

第二步：细胞种板和培养

- 1) 取一管实验所用供体的超低温保存肝细胞，确保肝细胞在复苏之前仍处于低温冰冻状态。将肝细胞迅速置于 37℃ 水浴中并轻摇直至所有冰晶全部分散，喷洒 70vol% 乙醇后转移至生物安全柜中。
- 2) 将肝细胞小管的内容物倾入盛有 50 mL 复苏培养基（组成见表三，直接混合均匀）的 50 mL 离心管中，将其于 80 g 离心 8 分钟。离心后，吸出复苏培养基并加入接种培养基（组成见表四，直接混合均匀），细胞经 AO/PI 染色计数得到细胞密度为每毫升 0.2×10^6 个细胞的细胞悬液。
- 3) 将上述细胞悬液接种于 collagen I 包被的 96 孔板中，每孔 100 μL。将培养板置于 5% 的 CO₂、95% 相对湿度的培养箱中培养 4-6 小时。
- 4) 孵育 4-6 小时后，在显微镜下观察细胞状态。轻轻晃动培养板，吸去接种培养基，每孔加入 100 μL 孵育培养基（组成见表五）。放入培养箱再培养 18-20 小时后即可进行毒性试验。
- 5) 给药前，在显微镜下观察细胞形态。吸出培养板中的培养基，各孔对应加入 100 μL 溶媒对照（DMSO）或受试物工作液溶液。每种条件测试三个平行样本。
- 6) 加药后每过 24 小时，用新鲜配制的上述工作液溶液或溶媒对照换液。

第三步：细胞毒性检测

- 1) 将储存在 -20℃ 的 CellTiter-Glo（供应商 Promega，货号 G9243）试剂置于 37℃ 水浴融化。
 - 2) 上述得到的细胞培养板孵育 48 小时后，直接向各实验孔中加入 50 μL 的 CellTiter-Glo 溶液。
 - 3) 将细胞培养板置于 400 rpm 涡旋 10 分钟，室温孵育稳定发光信号。
- 10 分钟后，每孔吸取 100 μL 反应液，转移到一块新的白色不底透平底板（Corning 96 孔板 Cat No. 3917）中，用酶标仪读取各孔化学发光值（白色不底透平底板的发光值记为“发光值_{空白}”；溶媒对照的发光值记为“发光值_{溶媒}”）。

第四步：数据处理

细胞活力(%) = [(发光值_{待测化合物} - 发光值_{空白}) / (发光值_{溶媒} - 发光值_{空白})] * 100%

绘制化合物的细胞活力(%)与浓度的曲线，并采用 GraphPad Prism 8.0.2 通过拟合细胞活力(%)和化合物浓度来计算化合物的 IC₅₀。

$Y = \text{底部} + (\text{顶部} - \text{底部}) / (1 + 10^{-(\text{LogIC}_{50} - X) * \text{坡度}})$

X: 化合物浓度；Y: 细胞活力(%)

具体测试数据见表六。

表三 复苏培养基

试剂	来源	货号	体积
William's E 培养基 (含酚红)	Gibco	12551-032	30 mL
等渗 percoll	GE Healthcare	17-0891-09	13.5 mL
磷酸盐缓冲溶液(10X)	Gibco	14200-075	1.5 mL
glutaMAX 培养基	Gibco	35050-061	500 μL
N-2 羟乙基哌嗪-N-2-乙烷 磺酸缓冲液 1M (HEPES)	Gibco	15630-080	750 μL
胎牛血清 (FBS)	Corning	35-076-CVR	2.5 mL
人胰岛素 (Human-insulin)	Gibco	12585-014	50 μL
地塞米松 1M	Dr. Ehrenstorfer	C12170400	5 μL

表四 接种培养基

试剂	来源	货号	体积
William's E 培养基 (不含酚红)	Sigma	W1878	46 mL
glutaMAX 培养基	Gibco	35050-061	500 μL
N-2 羟乙基哌嗪-N-2-乙烷	Gibco	15630-080	750 μL

磷酸缓冲液 1M (HEPES)			
胎牛血清 (FBS)	Corning	35-076-CVR	2.5 mL
人胰岛素 (Human-insulin)	Gibco	12585-014	50 μ L
地塞米松 10 mM	Dr. Ehrenstorfer	C12170400	5 μ L
青链霉素混合液(100 $\times$) Penicillin/Streptomycin	Solarbio	P1400-100	500 μ L

表五 繁育培养基

试剂	来源	货号	体积
William's E 培养基 (不含酚红)	Sigma	W1878	46 mL
glutaMAX 培养基	Gibco	35050-061	500 μ L
N-2 羟乙基哌嗪-N-2-乙烷 磷酸缓冲液 1M (HEPES)	Gibco	15630-080	750 μ L
ITS 液体培养基补充剂 (100 $\times$)	Sigma	I3146	500 μ L
地塞米松 10 mM	Dr. Ehrenstorfer	C12170400	0.5 μ L
青链霉素混合液(100 $\times$) Penicillin/Streptomycin	Solarbio	P1400-100	500 μ L

表六 肝毒性检测结果

化合物	IC ₅₀ (μ M)	最高浓度下的细胞活力(%)
KH03	264	0.0421
KH06	207	4.50
KH10	160	0.0142

实施例 51 食蟹猴 PK 实验

本实验目的是评价测试化合物单次静脉推注和灌胃给药后的药代动力学行为，考察灌胃给药后的生物利用度，为临床研究提供动物试验资料。

静脉推注与灌胃给药制剂的配制：准确称量适量测试化合物，并与合适的溶媒（5vol%DMSO+10vol%聚乙二醇-15-羟基硬脂酸酯+85vol%生理盐水）进行混合，经涡旋或超声后，获得澄清透明的溶液（静注给药溶液）或均一的混悬液。静脉推注给药制剂需要通过 0.22 μ m 滤膜过滤。

实验设计：第一次给药前，根据体重将食蟹猴分为 2 组，每组 3 只雄性食蟹猴；第 1 组动物通过静脉单次注射（IV）给予测试化合物（1mg/kg）；第 2 组通过单次灌胃（PO）给予测试化合物（5mg/kg）。在给药前称量动物体重，根据体重计算给药体积。

样品采集：通过上肢静脉穿刺方式在规定的时间采集（或其他合适的采血位点）全血样品（约 0.2mL），并在试验记录中记录实际采血时间。采集时间点可接受的误差为给药 1 小时内时间点 $\pm$ 1 分钟，其他时间点的为理论时间 $\pm$ 5%。所有血样立即转移至贴有标签的含 K2-EDTA 的商品化离心管中。血样采集后，4 $^{\circ}$ C、3200g 离心 10 分钟吸取上清血浆，迅速至于干冰中，保持-70 $\pm$ 10 $^{\circ}$ C 冰箱，用于 LC-MS/MS 分析。2 组采集时间均为给药后：0.083 h、0.25 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h 和 24 h。

数据处理：曲线下面积(AUC(0-t)和 AUC(0- ∞))、消除半衰期(T_{1/2})、峰浓度(C_{max})、达到最大血浆浓度的时间(T_{max})等由 Phoenix WinNonlin 7.0 中使用非房室分析模块计算。

生物利用度 (F) = PO 给药下药时曲线下面积 AUC_(0-t)*剂量_{IV} / (IV 给药下药时曲线下面积 AUC_(0-t)*剂量_{PO}) *100%

具体数据如表七。

表七 食蟹猴 PK 实验结果

待测化合物名称	给药方式	给药剂量	半衰期 (T _{1/2})	峰浓度 C _{max}	药时曲线下面积 AUC(0-t)	生物利用度(F)
		mg/kg	h	ng/mL	h*ng/mL	
MGL3196	IV	1	1.45	11171.33	3896.26	8.47
	PO	5	NA	429.61	1649.25	
KH06	IV	1	9.00	20683.02	48771.23	73.00

	PO	5	16.68	18293.47	178010.66	
--	----	---	-------	----------	-----------	--

实施例 52 体内药效实验

本试验前期先使用高脂饲料饲喂诱导 DIO (diet induced obese: 饮食诱导肥胖) 小鼠, 后在饲喂高脂饲料的同时, 腹腔注射 CCl₄ 诱导 NASH 模型; 在该模型中测试待测化合物的抗 NASH 药效。

动物信息: 采用 C57BL/6J 的雄性小鼠 (~18 周龄), 共 32 只 DIO 小鼠+8 只正常小鼠, DIO 小鼠>38 克。

表八 给药信息

待测化合物名称	给药浓度 (mg/kg)	化合物浓度 (mg/ml)	溶媒	每组动物数量	给药频率	给药天数
MGL3196	3	0.6	1% HPMC (羟丙基甲纤维素)	8	每天一次	从第 0 天到第 27 天, 每天给药
KH06	1	0.2	40% PEG400 /10% Solutol (聚乙二醇-15-羟基硬脂酸酯)/50%水	8	每天一次	从第 0 天到第 27 天, 每天给药
KH06	3	0.6		8	每天一次	从第 0 天到第 27 天, 每天给药

表九 药效动物分组信息

开始分组的时间		第-1 天				
每笼动物数量		4 只				
分组要求		DIO 小鼠按照组与组之间体重差异最小的原则进行随机分组, 同时尽量满足同窝同笼同组的原则, 以避免不同窝小鼠打架。				
组别	每组动物数	CCl ₄ (四氯化碳)	CCl ₄ 浓度 (%)	饲料	每组给药及处理情况	溶媒
11	8	N	NA	正常	溶媒, 口服, 每天一次	40% PEG400 (聚乙二醇 400) /10% Solutol (聚乙二醇-15-羟基硬脂酸酯) /50%水
22	8	Y	25	高脂	溶媒, 口服, 每天一次	
33	8	Y	25	高脂	MGL-3196, 3mg/kg, 口服, 每天一次	1% HPMC(羟丙基甲纤维素)
44	8	Y	25	高脂	KH06, 1mg/kg, 口服, 每天一次	40% PEG400 (聚乙二醇 400) /10% Solutol (聚乙二醇-15-羟基硬脂酸酯) /50%水
55	8	Y	25	高脂	KH06, 3mg/kg, 口服, 每天一次	

CCl₄ 诱导: 充分摇匀 CCl₄, 取 1 份 CCl₄ 与 3 份橄榄油于玻璃瓶中, 配成 25% (体积比) 的 CCl₄ 溶液, 充分混匀, 现配现用。第一组的 8 只动物作为正常对照, 腹腔注射生理盐水; 第 2-5 组的小鼠, 每周两次, 腹腔注射 25% CCl₄ 溶液; 根据体重给 25% (体积比) CCl₄, 0.5ml/kg。CCl₄ 的注射时间应与当天的给药时间点间隔 4 小时以上。

组织病理学分析

所有肝脏样品均通过脱水仪器 (Leica HistoCore Pearl-0348) 脱水, 然后使用石蜡包埋机 (HistoCoreArcadia) 进行包埋, 再通过 Lecia RM2235 机器将嵌入的肝脏样品切片。

NAS 评分

对 HE 染色 (苏木精-伊红) 的切片进行 NAS 评分, 该评分为脂肪变性、气球样变和小叶炎症分别评分之和。病理学家按照下表十中所示的标准对切片进行评分。

表十 NAS 评估方法

NASH		
病理表现	评定	得分(NAS)
肝细胞气球样变	无	0
	少量气球样细胞	1
	多量气球样细胞	2
小叶炎症	无	0

所有炎症灶的总体评估	<2 个炎症灶/200 倍视野	1
	2-4 个炎症灶/200 倍视野	2
	>4 炎症灶/200 倍视野	3
脂肪变性	<5%	0
	5%-33%	1
	>33%-66%	2
	>66%	3

病变评估标准：

(1) 肝细胞气球样：在肝细胞中观察到类似于空泡的病理变化。由于液泡样变化，肝细胞大小增加，肝细胞核集中或偏离。

(2) 炎性细胞浸润：在门静脉区域、腹侧静脉区域或肝小叶周围发现大量聚集的炎症细胞，主要是中性粒细胞和巨噬细胞。

(3) 肝细胞脂肪变化：在不同大小的肝细胞中观察到规则的圆形空泡，肝细胞核位于边缘。

纤维化百分比

用 Leica Aperio AT2 Brightfield 扫描仪扫描所有天狼猩红染色切片，然后使用 the HALO AI 系统计算天狼猩红阳性染色面积的百分比，以评估天狼猩红在总扫描肝脏面积上的百分比面积。

结果如图1和图2所示。

图1为纤维化评价的结果，其中KH06成剂量相关性，均能实现纤维化比例下降的效果。KH06在1mg/kg的剂量的药效优于3mg/kg的MGL3196。

图2 为 NAS 评分的结果，纵坐标 NAS 评分为脂肪变性、气球样变和小叶炎症三者评分之和，相对于模型组，KH06 成剂量相关性，均能实现评分显著降低的效果；同时 1mg/kg 的 KH06 与 3mg/kg 的 MGL3196 药效相当。

为了描述和公开的目的，以引用的方式将所有的专利、专利申请和其它出版物在此明确地并入本文。这些出版物仅因为它们公开早于本申请的申请日而提供。所有关于这些文件的日期的声明或这些文件的内容的表述是基于申请者可得的信息，并且不构成任何关于这些文件的日期或这些文件的内容的正确性的承认。而且，在任何国家，在本中对这些出版物的任何引用并不构成关于该出版物成为本领域的公知常识的一部分的认可。

本领域技术人员将认识到，本申请的范围并不限于上文描述的各种具体实施方式和实施例，而是能够在不脱离本申请的精神的情况下，进行各种修改、替换、或重新组合，这都落入了本申请的保护范围内。