[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C07K 5/06

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 00814737.X

[43]公开日 2002年11月27日

[11]公开号 CN 1382155A

[22]申请日 2000.9.8 [21]申请号 00814737.X
[30]优先权
[32]1999.10.27 [33]NL [31]1013404
[86]国际申请 PCT/NL00/00635 2000.9.8
[87]国际公布 WO01/30807 英 2001.5.3
[85]进入国家阶段日期 2002.4.23
[71]申请人 DSM有限公司
地址 荷兰海尔伦
[72]发明人 W·H·J·贝斯藤
Q·B·布罗克斯特曼
M·J·M·普劳姆
[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 姜建成

权利要求书2页 说明书6页 附图0页

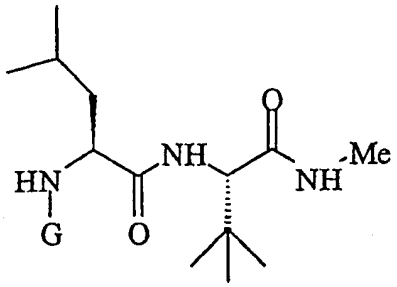
[54]发明名称 制备二肽的方法以及该方法的中间产物

[57]摘要

制备N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺的方法,其中N-甲酰基-L-亮氨酸与L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺在一种活化剂存在下偶合。优选使用对映体过量大于98%的L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺和对映体过量大于98%的N-甲酰基-L-亮氨酸。如果需要,将获得的二肽接着去甲酰化并将合成的N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺或L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺进一步进行一次或多次结晶。本发明也涉及N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺及其在制备药物中的用途。

ISSN1008-4274

1. 一种制备下式 1 的二肽的方法，



其中 G 为保护基，N 保护性 L-亮氨酸在活化剂存在下与 L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺偶合，该方法的特征在于甲酰基用作保护基。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中 L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺的对映体过量大于 98%。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法，其中 N-甲酰基-L-亮氨酸的对映体过量大于 98%。

4. 根据权利要求 1-3 任意一项的方法，其中获得的 N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺接着进行一次或多次结晶。

5. 根据权利要求 1-4 任意一项的方法，其中随后将获得的二肽去甲酰化。

6. 根据权利要求 5 的方法，其中随后将获得的 L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺进行一次或多次结晶。

7. 根据权利要求 5 或 6 的方法，其中随后将所述 L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺与取代或未取代的 α-巯基羧酸偶合形成相应的 N-α-任选取代的巯基羧基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺。

8. N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺。

9. N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺，该二肽中的 N 端氨基酸的对映体过量大于 80%。

10. N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺，该二肽中的 N 端氨基酸的对映体过量大于 98%。

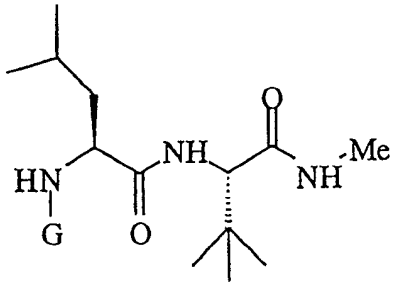
11. 根据权利要求 9 或 10 的 N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺，其非对映体过量大于 80%。

12. 根据权利要求 11 的 N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺，其非对映体过量大于 98%。

13. 根据权利要求 8-12 任意一项的 N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺在制备药物中的用途。

制备二肽的方法以及该方法的中间产物

本发明涉及制备下式 I 的二肽的方法，



(I)

其中 G 是一个保护基，而 N 保护性 L-亮氨酸在一种活化剂存在下与 L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺偶合。

WO-A-96/11209 公开的方法中 N-(1,1-二甲基乙氧基)羰基-L-亮氨酸与 L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺偶合。

该已知方法的缺点是使用昂贵的保护基团，因此从商业的观点来看，此方法缺少吸引力。本发明提供一种具有商业价值的方法，用于制备在制备例如 WO-A-96/11209 介绍的药物中的上述中间产物。

按照本发明应用甲酰基作保护基来实现此目的。

涉及两个氨基酸偶合的二肽偶合是通常的已知方法，并且在文献中有详细说明。在这些偶合中，最终的 N 端氨基酸的活化酸基团与最终的 C 端氨基酸或氨基酸衍生物的氨基反应。本方法中最终的 N 端氨基酸的氨基基团借助于保护基团保护。

本发明的方法中，两种富含对映异构体的氨基酸进行偶合。富含对映异构体的氨基酸的对映体过量优选大于 80%，尤其优选大于 90%，更特别优选大于 98%。众所周知，氨基酸偶合时 N 端氨基酸可能产生外消旋作用。当使用甲酰基保护基时尤其如此，例如 the handbooks Houben-Weyl, Band 15/1(1974), 第 166 页以及在 The Peptides, Academic Press 1979, 第 1 卷，第 279 页中介绍的那样。因

此，人们不将甲酰基保护基团用于富含对映异构体的氨基酸偶合。目前，申请人发现，当按照本发明用甲酰基作保护基团进行偶合时，不发生外消旋或只有很低程度的外消旋。此外，申请人发现，假如发生外消旋作用，根据本发明的偶合产物尤其适合通过结晶富集需要的非对映形。

本发明方法的另一优势是在所述方法中可以使用廉价活化剂。

本发明方法中使用的 N-甲酰基-L-亮氨酸可以用已知方法制备，举例来说使 L-亮氨酸与甲酸以及例如一种酸酐接触制备。优选使用醋酸酐。

L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺的制备举例来说能够由 L-叔亮氨酸如下制备：L-叔亮氨酸和光气转换成 L-叔亮氨酸-N-羧基酐，再用 N-甲胺将它转换成 L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺。

在本发明方法中使用一种活化剂和一种碱活化 N-甲酰基-L-亮氨酸，活化剂优选具有空间位阻的酰基氯或氯甲酸烷酯。这种活化步骤为众所周知的方法并且在肽偶合中经常应用。因此，选用的碱优选为所述活化步骤中使用的、外消旋程度低的已知碱。作为碱优选使用 N-甲基吗啉。

进行活化的温度不是非常重要，实践中通常为-30℃至+30℃，优选-20℃至+10℃。

如果需要，在溶剂中进行活化，优选在反应混合物中呈惰性的溶剂。酯性溶剂实例有酯类，尤其是醋酸乙酯、醋酸异丙酯和醋酸异丁酯；醚类，尤其是四氢呋喃(THF)、甲基-叔-丁基醚(MTBE)以及二氧杂环己烷；腈类，尤其是乙腈。

在一个实施方案中，首先进行活化，然后进行偶合步骤。对于偶合，使活化的 N-甲酰基-L-亮氨酸与 L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺接触。优选使用 L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺溶液。

原则上，偶合反应温度与活化作用温度保持一致。优选偶合温度与活化温度大致相同。L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺的合适溶剂的实例

有醇类，尤其是甲醇、乙醇以及异丙醇；酯类，尤其是醋酸乙酯、醋酸异丙酯以及醋酸异丁酯；醚类，尤其是 THF、MTBE 和二氧杂环己烷。

另一方面，也可以采用一步法进行活化以及偶合反应，其中 N-甲酰基-亮氨酸、L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺以及所述碱溶解于上述的合适溶剂中，并将所述活化剂加入该溶液。

然后，合成的 N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺可以用通常的已知方法去甲酰化，例如在酸性环境中。去甲酰化可以例如在水性环境、水/醇混合物或两相体系中进行。

进行去甲酰的温度例如为 20℃-110℃，优选 40℃-80℃。如果需要，例如通过结晶可以纯化合成的 N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺或 L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺。令人惊奇的发现是，肽偶合发生外消旋的情况下，结晶可增加保护或未保护的二肽中的 N 端氨基酸的对映体过量。

可用于结晶的合适溶剂的实例有烃类，尤其是庚烷和己烷；酯类，尤其是醋酸异丙酯、醋酸异丁酯和醋酸乙酯；醚类，尤其是 MTBE；醇类，尤其是甲醇、乙醇、异丙醇以及丁醇；或者它们的混合物。合适的溶剂混合物实例为庚烷和醋酸异丙酯的混合物。

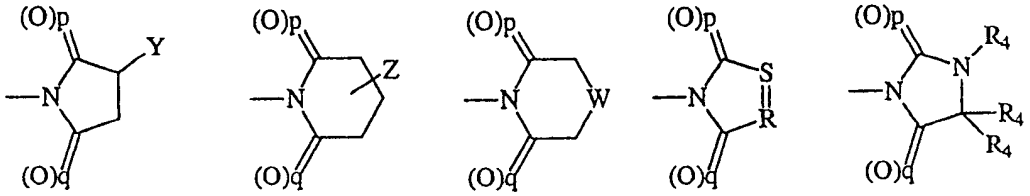
进行结晶的温度并不特别重要，主要取决于所选溶剂的物理参数，尤其是沸点。实践中，通常在 20℃-100℃之间进行结晶。

根据肽偶合的具体实施方案，例如通过萃取或结晶分离获得的中间产物 N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺可能是有利的。

获得的 L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺可用于例如制备药物，例如 WO-A-96/11209 和 WO-A-97/12902 介绍的 N-(α-任选取代的巯基羧基)-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺。举例来说，α-任选取代的巯基羧基是式 R_1S-C(R_2)-C(O)-的基团，其中 R_1 是氢或 R_3CO，其中 R_3 是 C_{1-4} 烷基、(C_{1-4} 烷基)芳基、(C_{1-6} 烷基)杂芳基、C_{3-6} 环烷基、(C_{3-}

$_6$环烷基)C_{1-4}烷基、C_{2-6}链烯基、(C_{2-6}链烯基)芳基、芳基或杂芳基;

R_2是H或C_{1-4}烷基-C(O)-A-或C_{1-4}烷基-NH-C(O)-A基团，其中A是



p和q分别独立为0或1

R_4=H或C_{1-6}烷基(各R_4彼此独立)

Y和Z各自独立为H或(C_{0-4}烷基)R_5，其中R_5是NHR_4、$N(R_4)_2$(R_4彼此独立)、$COOR_4$、$CONHR_4$、$NHCO_2R_4$、$NHSO_2R_4$或$NHCOR_4$以及

W是O、$S(O)_m$，m=0、1或2，或者为NR_6

R_6=H、C_{1-4}烷基、COR_7、CO_2R_7、$CONHR_7$或SO_2R_7

R_7=H、C_{1-4}烷基、芳基、杂芳基、(C_{1-4}烷基)芳基或(C_{1-4}烷基)杂芳基

R和S分别独立为CH或N。

这些化合物可以用已知方法制备，例如活化取代或非取代的α-巯基羧酸，然后使用经典肽偶合方法将它与据本发明获得的二肽L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺偶合，见WO-A-96/11209和WO-A-97/12902介绍。

现在以实施例为基础阐明本发明，当然本发明并不仅限于此。

实施例I

由N-甲酰基-L-亮氨酸和L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺制备N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺

在-18℃的氮环境中，将氯甲酸异丁基酯(6.5 g, 48 mmol)加入N-甲酰基-L-亮氨酸(8.0 g, 50 mmol)的四氢呋喃(125 ml)溶液中。然后将N-甲基吗啉(4.8 g, 48 mmol)滴加入溶液，控制滴加速度使溶液温度保持<-15℃。形成沉淀物。

持续搅拌15 min后，加入L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺(6.5 g, 45 mmol)的四氢呋喃(50 ml)溶液，加入时保持溶液温度<-15℃。随后在-18℃下持续搅拌1小时。

使反应混合物加热到0℃并在此温度下加入水(100 g)。然后在真空下蒸馏除去 THF。加入醋酸异丙酯(75 ml)，然后用盐酸将反应混合物的pH值调至1.5。分层后，分别用50和35 ml的醋酸异丙酯萃取水溶液相两次。然后用50和25 ml的饱和碳酸氢钠溶液洗涤收集的有机相，最后用25 ml水洗涤。然后在真空下蒸发有机相。

以良好产率获得了 N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺，对映体过量(L-亮氨酸部分)为99%(HPLC)。

实施例II

由N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺制备L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺

11.7 g(41 mmol)的 N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺(见实施例I)悬浮于1 M HCl(100 ml)中并加热到40℃。在此温度下搅拌18小时后(所有的原料都溶解入溶液中)，冷却到室温，然后用50 ml的醋酸异丙酯萃取。

分层后，用 50%的氢氧化钠溶液将水相的 pH 值调至 10。用醋酸异丙酯(75 ml)萃取两次。收集的有机相在真空下蒸发。

将残留物悬浮于庚烷(75 ml)中并加热到 65℃。然后加入恰好使所有原料溶解的醋酸异丙酯量。通过冷却到室温结晶并过滤后，用庚烷(25 ml)洗涤结晶物两次然后干燥。以良好产率获得了 L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺，纯度=>98%(HPLC)

对映体过量(L-亮氨酸部分)=99%(HPLC)。

实施例III

由 N-甲酰基-L-亮氨酸和 L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺制备 N-甲酰基

-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺

在-15℃的氮环境中，氯甲酸异丁基酯(12.3 g, 90 mmol)配入到 N-甲酰基-L-亮氨酸(15.9 g, 100 mmol)的醋酸异丙酯(85 ml)悬浮液中。然后将 N-甲基吗啉(9.1 g, 90 mmol)的醋酸异丙酯(25 ml)溶液滴加入悬浮液，滴加速度使温度保持在<-10℃。

在持续搅拌 90 分钟后，形成的悬浮液加入到冷却的 L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺(13.0 g, 90 mmol)的甲醇(65 ml)溶液中，加入时溶液温度保持<-10℃。随后在-10℃持续搅拌 30 分钟。

将反应混合物加热到室温并在此温度下搅拌 2 小时。在反应混合物中加入水(100 ml)，然后用 37%盐酸水溶液将 pH 值调至 1.0。分层后，水溶液相用 75 ml 的醋酸异丙酯洗涤两次。收集的有机相用 100 和 50 ml 的饱和碳酸钠溶液分别洗涤。

在真空下蒸发有机相。获得 N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺的对映体过量(L-亮氨酸部分)为 98%(HPLC)。

实施例 IV

由 N-甲酰基-L-亮氨酸和 L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺制备 N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺

N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺按照实施例 III 所述制备，但是温度变为 0-5℃。获得 N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺的对映体过量(L-亮氨酸部分)为 86%(HPLC)。

实施例 V

由 N-甲酰基-L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺制备 L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺

按照实施例 II 所述处理实施例 IV 获得的物质。获得 L-亮氨酰-L-叔亮氨酸-N-甲基酰胺的对映体过量(L-亮氨酸部分)为 95%(HPLC)。