

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99810916.9

C07K 5/11

C07K 5/09

A61K 38/06

A61K 38/07

A61P 7/02

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1203087C

[22] 申请日 1999.9.2 [21] 申请号 99810916.9

[30] 优先权

[32] 1998.9.15 [33] EP [31] 98117506.0

[86] 国际申请 PCT/EP1999/006449 1999.9.2

[87] 国际公布 WO2000/015658 英 2000.3.23

[85] 进入国家阶段日期 2001.3.14

[71] 专利权人 阿文蒂斯药物德国有限公司

地址 德国法兰克福

[72] 发明人 P·萨法 A·萨法罗瓦

P·维尔德古斯

审查员 刘玉玲

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利  
商标事务所

代理人 周中琦

权利要求书 4 页 说明书 41 页

[54] 发明名称 因子 VIIa 抑制剂

[57] 摘要

本发明涉及新的化合物、其制备方法、其应用和含有这些化合物的药物组合物，所述化合物通过可逆性抑制活化的凝血因子 VIIa(FVIIa) 具有强的抗凝作用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1.任何立体异构形式的式 I 的化合物、其立体异构形式之间任何比例的混合物及其药用盐，



其中

R1 是烯丙基氧基羰基或烯丙基氨基羰基；

R93 是 4-脒基苯基甲基；

R97 是 2-羟基羰基乙基；

D 是选自精氨酸、2,3-二氨基丙酸、丙氨酸、天门冬酰胺、2,4-二氨基丁酸、甘氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、色氨酸、苯基甘氨酸、苯基丙氨酸、2-氨基丁酸、鸟氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、甲硫氨酸或赖氨酸的氨基酸残基，其中该氨基酸被或不被选自下列的取代基取代：脒基、苄基、氰基、硝基、胍基、 $-\text{C}(\text{=NH})-\text{CH}_3$ 、乙酰氨基甲基、 $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ -烷基和烯丙基羰基；

n 是 0 和 1；

E 是选自被取代基  $\text{C}(\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-})$ -苯基在位置 4 取代的苯基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸和甘氨酸的氨基酸残基，其中氨基被或不被  $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ -烷基或苯基  $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ -烷基取代；

R21 选自氢、 $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ -烷基和苯基  $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ -烷基；

R22 选自氢、 $(\text{C}_1-\text{C}_6)$ -烷基、苯基  $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ -烷基、二苯基  $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ -烷基、环己基  $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ -烷基、萘基  $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ -烷基、四氢萘基、苄基、吡啶  $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ -烷基、吗啉基  $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ -烷基和四氢呋喃  $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ -烷基，其中 R22 中的苯基被或不被一和两个选自下列的取代基取代：卤素、三氟甲基、 $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ -烷氧基、 $(\text{C}_1-\text{C}_2)$  亚烷基二氧基、氮磺酰基和二  $(\text{C}_1-\text{C}_4)$ -烷基氨基。

2.根据权利要求 1 所述的化合物、其立体异构形式的混合物及其药用盐，其是：

Alloc-pAph-Glu-Arg-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Allylaminocarbonyl-pAph-Glu-Arg-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Arg-Chg-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Dap[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>]-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Ala[3-C(=NH)-NH<sub>2</sub>]-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Asn-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Dab-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Dap[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>]-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Gly-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Thr(Bzl)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-CH(Ph)<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Dab-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-Ph,  
Alloc-pAph-Glu-Asn-NH-CH<sub>2</sub>-Chx,  
Alloc-pAph-Glu-Dap[-C(=NH)-CH<sub>3</sub>]-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Dab[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>]-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-2-Abu(4-CN)-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Ala(3-CN)-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Asn-1-萘基甲基酰胺,  
Alloc-pAph-Glu-Asn-1-(1-萘基)乙基酰胺,  
Alloc-pAph-Glu-Asn-2-萘基甲基酰胺,  
Alloc-pAph-Glu-Asn-3,4-二氯苄基酰胺,  
Alloc-pAph-Glu-Asn-2-(3-氯苄基)乙基酰胺,  
Alloc-pAph-Glu-Arg(NO<sub>2</sub>)-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Cys(Bzl)-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Trp-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Phg-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Asn-9-苄基酰胺,  
Alloc-pAph-Glu-Asn-3,5-双三氯甲基苄基酰胺,  
Alloc-pAph-Glu-Dap[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>]-Phe[4-C(-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S-)-Ph]-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Cys(Bzl)-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Thr(Bzl)-Cha-NH<sub>2</sub>,  
Alloc-pAph-Glu-Phe(4-NO<sub>2</sub>)-Cha-NH<sub>2</sub>,  
  
Alloc-pAph-Glu-Asn-3,4-亚甲基二氧基苄基酰胺,

Alloc-pAph-Glu-Asn-2-(1-萘基)乙基酰胺，  
Alloc-pAph-Glu-Asn-2-(2-吡啶基)乙基酰胺，  
Alloc-pAph-Glu-Asn-2,2-联苯基乙基酰胺，  
Alloc-pAph-Glu-Asn-2,4-二氟苄基酰胺，或  
Alloc-pAph-Glu-Asn-4-二甲基氨基苄基酰胺，  
或其可药用盐、酰胺或酯。

3.制备权利要求 1 或 2 中所述化合物的方法，其中包括：

- a1)将式 Fmoc-E<sub>n</sub>-OH 的化合物与结合在树脂上的酸敏感接头偶联，其中 n 是 1，裂解掉保护基 Fmoc，令式 Fmoc-D -C(O)OH 的化合物与获得的自由氨基偶联并且再次裂解掉保护基 Fmoc，或为了制备其中 n 是 0 的式 I 化合物，令式 Fmoc-D -C(O)OH 的化合物与结合在树脂上的酸敏感接头偶联，并且裂解掉保护基 Fmoc，
- a2)令式 Fmoc-NH-CHR<sup>97</sup>-C(O)OH 的化合物与步骤 a1)获得的自由氨基偶联并且裂解掉保护基 Fmoc，
- a3)令式 R<sup>1</sup>-NH-CHR<sup>93</sup>-C(O)OH 的化合物与步骤 a2)获得的自由氨基偶联，和
- a4)用三氟乙酸由树脂上裂解下由步骤 a1)至 a3)制备的化合物；  
或
- b1)令式 Fmoc-NH-CHR<sup>97</sup>-C(O)OPG 的化合物的侧链羧酸与结合于氨基官能化树脂上的酸敏感苄醇型的接头偶联，其中 PG 是保护基，
- b2)裂解掉保护基 PG，
- b3)令式 D-E<sub>n</sub>-NHR<sup>21</sup>R<sup>22</sup> 的化合物与步骤 b2)获得的自由羧酸偶联，其中 n 是 0 或 1，
- b4)裂解掉保护基 Fmoc，
- b5)令化合物 R<sup>1</sup>-NH-CHR<sup>93</sup>-C(O)OH 的化合物与步骤 b4)所得自由氨基偶联，和
- b6)用三氟乙酸由树脂裂解下按照步骤 b1)至 b5)所得的化合物；  
或

c1)通过传统药物化学偶联保护的氨基酸，并且通过该领域已知的标准方法脱保护靶分子；

其中 R1、NR21R22、R97、R93、D 和 E 如权利要求 1 所定义并且 Fmoc 是 9-芴基甲氧基羰基。

4.权利要求 1 或 2 所述的化合物或其立体异构形式的混合物或其药用盐在制备药物中的用途。

5.一种药物组合物，其中含有有效量的如权利要求 1 或 2 所述的化合物或其立体异构形式的混合物或其药用盐，和药用载体。

6.权利要求 1 或 2 所述的化合物或其立体异构形式的混合物或其药用盐在制备用作凝血因子 VIIa 抑制剂的药物中的用途。

7.权利要求 1 或 2 所述的化合物或其立体异构形式的混合物或其药用盐在制备用于抑制或减少凝血、炎性反应、血栓栓塞疾病或血管再狭窄的药物中的用途。

## 因子 VIIa 抑制剂

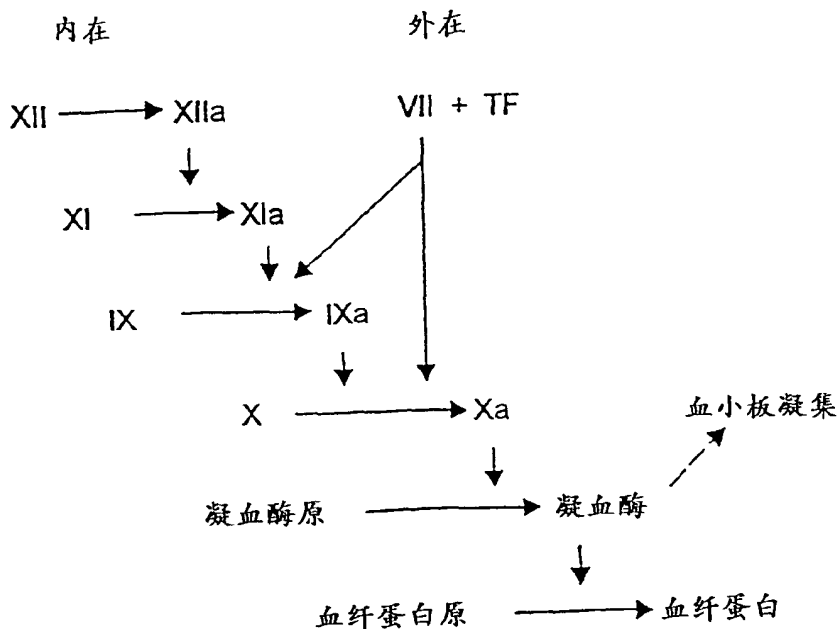
## 发明领域

本发明涉及新的化合物、其制备方法、其应用和含有该化合物的药物组合物,该化合物通过可逆性抑制活化凝血因子 VIIa (FVIIa) 产生强抗凝血作用。

## 发明背景

血栓形成一般是组织损伤的结果,损伤引发凝血级联并且具有减慢或阻止血液流入创伤愈合处的作用。其他不直接涉及组织损伤的因素如动脉粥样硬化和炎症也可以引发凝血级联,并且可导致病理性后果。

血液凝固是一个复杂过程,包括渐进扩增系列的酶活化反应,其中血浆酶原通过有限蛋白酶解顺序激活。从机械学上讲,凝血级联分为内在途径和外途径,它们在凝血因子 X 的活化处汇聚;随后的凝血酶生成是通过一条共同的途径进行(参见路线 1)。



### 路线 1: 凝血级联

现有迹象表明, 内在途径在血纤蛋白形成的维持和增长中发挥重要作用, 而外在途径在血液凝固的起始相中起决定作用(H. Cole, 《澳州医学科学杂志》(Aust. J. Med. Sci.). 16(1995)87; G. J. Broze, 《凝血和纤维蛋白溶解》6, 增补 1(1995)S7-S13)。一般认为, 血液凝固实际上是由组织因子(TF)/凝血因子 VIIa 复合物的形成而引起。一旦形成, 这种复合物迅速通过激活凝血因子 IX 和 X 来引发凝固。新生成的活化凝血因子 X, 即凝血因子 Xa 进而与凝血因子 Va 生成一对一的复合物, 并且再和磷脂生成凝血酶原酶复合物, 该复合物通过激活凝血酶由其前体凝血酶原使可溶性血纤蛋白酶原转化为不溶性血纤蛋白。随着时间的继续, 凝血因子 VIIa/组织因子复合物的活性(外在途径)被 Kunitz 型蛋白酶抑制蛋白 TFPA 抑制, 它与凝血因子 Xa 复合时可以直接抑制凝血因子 VIIa/组织因子的蛋白水解活性。为了在被抑制外在体系的存在下保持凝血进程, 通过凝血酶介导的内在途径的活性产生附加凝血因子 Xa。因此, 凝血酶起着双重自动催化作用, 介导其自身的生成同时将血纤蛋白酶原转化为血纤蛋白。

凝血酶生成的自动催化性质是对抗失控出血的重要保护措施, 并且可以肯定, 一旦存在给定的凝血酶原酶的阈值水平, 血液凝固将进行至完全。形成血凝块的能力对于存活来说是至关重要的。然而, 在某些疾病状态中, 在循环系统内形成的血凝块本身就是发病的来源。但是, 在此类疾病状态中并不希望完全抑制该凝固体系, 因为这将继续威胁生命的出血。所以, 最希望开发出通过抑制凝血因子 VIIa 来抑制凝固而不直接抑制凝血酶的药物。

在许多临床应用中, 非常需要预防血管内的血凝块或某些抗凝治疗。目前有效的药物不能满足多种特定临床应用。例如, 约 50% 全髌部复位的患者恶化为深层静脉血栓形成(DVT)。目前已批准的治疗为固定剂量的低分子量肝素(LMWH)和可变剂量的肝素。甚至利用这些药物治疗方案, 也会有 10% 至 20% 的患者恶化为 DVT 并且 5%

至 10% 的患者发展为出血并发症。

另一种需要更好抗凝剂的临床情况是接受透照冠状血管成形术的对象和有心肌梗塞危险或患有渐强性心绞痛的对象。目前被普遍接受的疗法包括给予肝素和阿斯匹林, 该疗法在 24 小时期间内与 6% 至 8% 的突发性血管闭锁率有关。由于使用肝素导致的需输血治疗的出血并发症的概率约为 7%。此外, 虽然延迟闭锁很明显, 但在疗程结束后给予肝素没有价值并且可能有害。

应用最广泛的血块形成抑制剂是肝素和有关硫酸化多糖类化合物, LMWH 和硫酸肝素。这些分子通过促进凝血过程的天然调节剂—抗凝血酶 III 与凝血酶和凝血因子 Xa 的结合来发挥其抗凝血作用。肝素的抑制活性主要针对凝血酶, 凝血酶被灭活比凝血因子 Xa 约快 100 倍。水蛭素和 Hirulog 目前是临床试验中两种辅助凝血酶特异性抗凝剂。然而, 这些抑制凝血酶的抗凝剂也与出血并发症有关。在狒狒和狗中的临床前研究表明, 靶向酶参与凝血级联的早期阶段, 例如凝血因子 Xa 或凝血因子 VIIa, 在直接凝血酶抑制剂的观察到, 可防止血块形成而不产生出血副作用 (T. Yaloyama, A. B. Kelly, U. M. Marzec, S. R. Hanson, S. Kunitada, L. A. Harker, 《循环》(Circulation)92 (1996)485-491; L. A. Harker, S. R. Hanson, A. B. Kelly, 《血栓形成与止血法》74(1995); C. R. Benedict, J. Ryan, J. Todd, K. Kuwabar, P. Tyburg, Jr., J. Cartwright, D. Stern, 《血液》81(1993)2059-2066)。

利用单克隆抗体(国际专利申请号 W092/06711)和蛋白质如氯甲基酮灭活 FVIIa(国际专利申请号 W096/12800 和 W097/47651)的凝血因子 VIIa/TF 催化复合物的特异性抑制作用是一种非常有效的、控制由急性动脉损伤或涉及细菌败血症的血栓形成并发症引起的血栓形成的方法。另外有试验资料显示, 抑制凝血因子 VIIa/TF 的活性可以预防气球血管成形术继发性再狭窄 (L. A. Harker, S. R. Hanson, J. N. Wilcox, A. B. Kelly, 《淤血》26(1996)S1: 76-82)。在狒狒中进行出血研究并且研究显示, 对于治疗有效性和任何

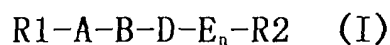
试验抗凝剂的出血危险性，凝血因子 VIIa/TF 复合物的抑制具有最宽的安全窗，包括凝血酶、血小板和凝血因子 Xa 抑制 (L. A. Harker, S. R. Hanson, A. B. Kelly, 《血栓形成和止血法》74(1995) 464-472)。

凝血因子 VIIa 的特异性抑制剂在药物实践中具有相当大的实用价值。特别是，在选择现有药物肝素或有关硫酸化多糖无效或仅仅略微有效的情况中因子 VIIa 抑制剂有效。所以，目前需要低分子量凝血因子 VIIa 特异性的血凝抑制剂，它有效但不引起不良副作用。本发明符合这种要求，提供了抑制凝血因子 VIIa 活性的式 I 的衍生物并且提供有关优越性。

式 I 的化合物是血液凝固酶因子 VIIa 的抑制剂。本发明还涉及一种制备式 I 化合物的方法，涉及抑制凝血因子 VIIa 活性和抑制血液凝固的方法，式 I 化合物在治疗和预防疾病中的应用，该疾病可以通过抑制凝血因子 VIIa 活性治愈或预防，例如血栓栓塞疾病，例如血栓形成、再狭窄、梗塞和绞痛，并且涉及式 I 化合物在制备适用于上述疾病的药物中的应用。本发明还涉及含有混有或与其他惰性载体相结合的式 I 化合物的组合物，特别是含有式 I 化合物和可药用载体物质或赋形剂和/或辅剂或添加剂的药物组合物。

### 发明概述

本发明提供特异性抑制凝血因子 VIIa 活性的化合物。特别是，本发明的主题是式 I 的化合物：



其中

R1 代表

R13,

R12C(0), 或

1 或 3 个氨基酸，其 N-末端可以被选自 R14C(0)、R15S(0)<sub>2</sub> 和氨基保护基的取代基取代，

其中

R12 选自烷基、链烯基、炔基、烷氧基、烷基氨基、链烯基氨基、炔基氨基、链烯基氧基、炔基氧基、芳基、杂芳基、杂环烷基、芳烷基、杂芳基烷基、杂环烷基烷基、杂烷基、杂烯基和杂炔基，这些残基均可以被取代，

R13 选自氨基保护基、氢、烷基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳基烷基、杂环烷基和杂环烷基烷基，

R14 和 R15 独立地选自烷基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳基烷基、杂环烷基和杂环烷基烷基，

A 是基团 A1-A2-A3，其中

A1 是 NH，

A2 是 CHR93，其中 R93 是 4-脒基苯基甲基，

A3 是 C(O)，

B 是基团 B1-B2-B3，其中

B1 是 NR95，其中 R95 选自氢和烷基，

B2 是 CHR97，其中 R97 是其 2 位被选自羟基羰基、烷氧基羰基和芳基烷氧基羰基的取代基取代的乙基，

B3 是 C(O)，

D 是基团 D1-D2-D3，其中

D1 是 NH，

D2 是 CR81R82，其中 R81 和 R82 独立地选自氢和未取代或取代的残基烷基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳基烷基、杂环烷基和杂环烷基烷基，

D3 是 C(O)，

$E_n$  是 (E1-E2-E3) $_n$ ，其中

n 是 0、1、2 或 3，

E1 是 NR70，其中 R70 选自氢、烷基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳基烷基、杂环烷基和杂环烷基烷基，

E2 是 CR71R72，其中 R71 和 R72 独立地选自氢和取代或未取代残基烷基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳基烷基、杂环烷基

和杂环烷基烷基，

E3 是 C(O)，

R2 选自 NR<sub>21</sub>R<sub>22</sub>，OR<sub>23</sub> 和 R<sub>24</sub>，其中 R<sub>21</sub>、R<sub>22</sub>、R<sub>23</sub> 和 R<sub>24</sub> 独立地选自氢和取代或未取代烷基、芳基、芳烷基、杂芳基、杂芳基烷基、杂环烷基和杂环烷基烷基，

烷基和杂烷基含有 1-13 个碳原子，所述杂烷基残基中一个或多个碳原子被选自 N、O 和 S 的杂原子置换；

链烯基、炔基、杂烯基和杂炔基含有 2-13 个碳原子，所述杂烯基和杂炔基残基中一个或多个碳原子被选自 N、O 和 S 的杂原子置换；

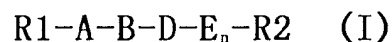
芳基和杂芳基含有 5-13 个环碳原子，所述杂芳基残基中一个或多个被选自 N、O 和 S 的杂原子置换；

杂环烷基含有 3-8 个环碳原子，其中 1-3 个碳原子被选自 N、O 和 S 的杂原子置换；

其以任何立体异构体形式存在和其任意比例的混合物，和其可药用盐。

## 发明详述

本发明提供式 I 的肽类化合物



其中 R1、R2、A、B、D、E 和 n 如上定义，它们是抑制凝血因子 VIIa 活性但基本不抑制其他参与凝血途径的蛋白水解酶活性的化合物。

在式 I 的化合物中，结构单元含在例如基团 A、B、D 或 E 中，或当 R1 代表 1、2 或 3 个氨基酸时含在基团 R1 中，其是氨基酸或其衍生物或氨基酸类似物或模拟结构，并且以肽方式与相邻基团经酰胺键 C(O)-N 相连，该酰胺键是在一个此类氨基酸等的羧基和另一氨基酸的氨基之间形成。在肽化学中常见的是，通过形式上脱去氨基的氢原子和羧基的羟基可以由各种氨基酸获得氨基酸的二价基团或存在于式 I 中的基团 A、B、D 或 E 的二价基团。

此处所用术语“氨基酸”采用其最广义的含义，是指 20 种天然

氨基，它们翻译自遗传密码并且含有蛋白质的结构单元，除非特别指出，其中还包括 L-氨基酸和 D-氨基酸；以及化学修饰氨基酸，如氨基酸类似物；不常掺入蛋白质中的天然氨基酸，例如正亮氨酸；具有该领域中认为是氨基酸特征性质的化学合成化合物。例如，苯丙氨酸或脯氨酸的类似物和模拟物使肽化合物的构象限制如同天然 Phe 或 Pro 一样，因此它们属于“氨基酸”的定义范畴并且为该领域技术人员公认。这些类似物和模拟物在此称作氨基酸的“功能等效物”。其他氨基酸和氨基酸类似物的实例如 Roberts 和 Vellaccio 所列的那些(《肽类化合物：分析，合成，生物学》Gross & Meienhofer 编辑，5 卷，341 页，Academic Press, Inc, 纽约 1983, 该文献在此引入作为参考)。氨基酸、氨基酸类似物和模拟结构的缩写和本申请中使用的其他缩写如表 1 所列。

表 1: 申请中的缩写

化合物/残基	缩写
乙酸	AcOH
乙酰基氨基甲基	Acm
丙氨酸	Ala
烯丙基氧基羰基	Alloc
对-脒基苯基丙氨酸	pAph
2-氨基丁酸	2-Abu
精氨酸	Arg
天门冬酰胺	Asn
天门冬氨酸	Asp
苄基	Bzl
叔丁氧基羰基	Boc
叔丁基	tBu
环己基甘氨酸	Chg
环己基	Chx
环己基丙氨酸	Cha

半胱氨酸	Cys
2,4-二氨基丁酸	Dab
2,3-二氨基丙酸	Dap
二氯甲烷	DCM
二异丙基碳二亚胺	DIC
二异丙基乙基胺	DIEA
N,N-二甲基甲酰胺	DMF
二甲基亚砷	DMSO
9-芴基甲氧基羰基	Fmoc
谷氨酸	Glu
谷酰胺	Gln
甘氨酸	Gly
组氨酸	His
N-羟基苯并三唑	HOBt
4-羟甲基苯氧基乙酸	HMPA
异亮氨酸	Ile
亮氨酸	Leu
赖氨酸	Lys
甲基	Me
N-甲基咪唑	NMI
N-甲基吗啉	NMM
2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基	Pmc
鸟氨酸	Orn
苯基	Ph
苯基丙氨酸	Phe
苯基甘氨酸	Phg
脯氨酸	Pro
丝氨酸	Ser

四氢呋喃	THF
四甲基氟亚胺甲基氨基六氟磷酸酯	TFFH
苏氨酸	Thr
三氟乙酸	TFA
三苯甲基	Trt
色氨酸	Trp
缬氨酸	Val

除非另外说明,如上定义的缩写氨基酸具有L构型。D构型的氨基酸用带有D前缀的三个字符表示(例如D-Ala, D-Asp, D-Trp, D-pAph)。缩写如Phe(4-CN)和Phe[4-C(-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-)-Ph]分别代表其苯基4位带有氰基取代基或2-苯基-1,3-二硫戊环-2-基取代基的氨基酸苯丙氨酸残基。缩写如Dap[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>]代表氨基酸2,3-二氨基丙酸的残基,其中侧链中的氨基,即3位氨基被脒基-C(=NH)-NH<sub>2</sub>(亚氨基氨基甲酰基)取代,由此胍基-NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>连接在丙酸单元的3位上。缩写如Orn[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>]或Cys(Me)分别代表氨基酸鸟氨酸的残基,其中侧链中的氨基带有脒基,或氨基酸半胱氨酸的残基,其中巯基带有甲基。

术语TOTU、HATU和BOP分别是指O-[氰基(乙氧基羰基)亚甲基氨基]-1,1,3,3-四甲基脲鎓四氟硼酸盐, O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐,和1-苯并三唑基氧基-三(二甲基氨基)-磷六氟磷酸盐。

此处所用术语“特异性”当用于描述凝血因子VIIa的抑制时是指式I的化合物可以抑制凝血因子VIIa活性,而且基本上不抑制其他特定蛋白酶的活性,包括纤溶酶和凝血酶(使用相同浓度的抑制剂)。此类蛋白酶参与血液凝固和纤维蛋白溶解级联。

此处所用术语“取代基”是指任何位于此处公开的肽、肽类似物、模拟物或有机化合物的肽主链或侧链上的多种化学基团。取代基可以包括该领域技术人员公知的任意多种的不同基团(残

基, 例如, Giannis & Kolter, *Angew, Chem. Int. ed. Engl.* 32(1993)1244-1267, 该文献在此引入作为参考)。

在此所用术语“烷基(alkyl)”使用其最广义的含义, 是指含有 1-13 个碳原子的饱和或不饱和、直链、支链或环状链, 显然, 其中不饱和烷基含有至少 2 个碳原子并且环烷基至少含有 3 个碳原子。不饱和基团可以含有一个或多个双键和/或叁键。因此, 术语“烷基”包括例如: 甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、1-甲基丁基、2,2-二甲基丁基、2-甲基戊基、2,2-二甲基丙基、正戊基和正己基, 链烯基, 环状碳原子链, 例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基和环庚基, 和直链或支链与环状碳原子链的组合, 例如甲基环己基-、环己基甲基-、1-环己基乙基-、2-环己基乙基-、环戊基甲基-、1-环戊基乙基-、2-环戊基乙基-、环丙基甲基-、1-环丙基乙基-、2-环丙基乙基-或环丙基亚甲基。所以, 烷基还包括带有一个或多个烷基取代基的环烷基。烷基的其他实例是下列特定不饱和基团。此外, 应理解在此定义的烷基可以被一个或多个相同或不同的取代基取代, 例如 1、2、3 或 4 个取代基, 它们可以存在于任何预期的适当位置。

优选术语“烷基”是指含有 1-6 个碳原子的饱和直链或支链, 含有 2-6 个碳原子的不饱和直链或支链, 或含有 3-8 个碳原子的环烷基, 特别是 3-6 个碳原子或 4-6 个碳原子。对于不饱和烷基链, 优选(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-链烯基和(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-炔基。不饱和烷基的实例是链烯基和炔基, 例如乙烯基、丙-1-烯基、丙-2-烯基(=烯丙基)、丁-2-烯基、丁烯-3-基、3-甲基丁-2-烯基、乙炔基、丙-2-炔基、丁-2-炔基等。

同样地, 术语“酰基”采用其最广义的含义, 是指与羰基部分-C(=O)-相连并且通过该羰基键合的含有约 1 至 13 个碳原子的饱和或不饱和、直链、支链或环状链或具有 5 至 13 个环碳原子的芳基。酰基可以被视作是由各种含有羧基 C(=O)-OH 的化合物通过形式上脱去羟基衍生而来。术语“酰基”包括, 例如甲酰基、乙酰基、苯甲酰基等。优选的酰基包括此前提及的具有优选碳原子数的饱和或不饱

和、直链、支链或环状链，此外，它们含有羰基，通过该羰基键合。

术语“芳基”是指含有约 5-13 个碳原子和至少一个具有共轭  $\pi$  电子体系的“环状”基团的芳基。优选术语“芳基”是指具有 6-10 个环碳原子的芳基。芳基的实例包括，例如苯基，萘基如 1-萘基和 2-萘基，茚基，联苯基，和它们的类似基团和衍生物；它们全部可以任选地被一个或多个，例如 1、2、3 或 4 个相同或不同的取代基取代，取代基存在于任何预期适当位置。例如，一取代苯基可以在 2-、3-或 4-位取代，二取代苯基在 2,3-、2,4-、2,5-、2,6-、3,4-或 3,5-位。

术语“芳烷基”是指被一个或多个(例如 1 或 2 个)相同或不同的芳基取代的定义如上的烷基。适当的芳烷基包括苄基，苯基乙基如 1-苯基乙基和 2-苯基乙基，二苯基甲基，二苯基乙基如 1,2-二苯基乙基和 2,2-二苯基乙基，苯基丙基如 1-苯基丙基、2-苯基丙基和 3-苯基丙基，二苯基丙基如 2,3-二苯基丙基和 3,3-二苯基丙基，萘基甲基，萘基乙基如 1-萘基乙基和 2-萘基乙基，萘基丙基如 1-萘基丙基、2-萘基丙基和 3-萘基丙基，1,2,3,4-四氢-1-萘基，1,2,3,4-四氢-2-萘基等，所有基团可以任选取代。

此处所用术语“杂烷基”、“杂烯基”、“杂炔基”、“杂芳烷基”和“杂芳基”分别是指烷基、芳烷基和芳基，其中一个或多个碳原子，例如 1、2 或 3 个碳原子，被相同或不同的杂原子如 N、O 或 S 置换。此外，所用术语“杂环烷基”是指环状烷基，其中一个或多个环碳原子被杂原子置换。优选术语“杂环烷基”是指具有 3-8 个环碳原子的环烷基，其中 1、2 或 3 个环碳原子被相同或不同的杂原子如 N、O 或 S 置换。所用这些基团可以通过任何预定适当位置键合，在氮杂环的情况中包括适当的环氮原子。适当的杂芳基、杂芳基烷基、杂烷基和杂环烷基包括，例如：2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-噁吩基、3-噁吩基、吡唑基、咪唑基、呋喃基、胡椒基、2-吡啶基甲基、3-吡啶基甲基、4-吡啶基甲基、1-(2-吡啶基)乙基、1-(3-吡啶基)乙基、1-(4-吡啶基)乙基、2-(2-吡啶基)乙基、

2-(3-吡啶基)乙基、2-(4-吡啶基)乙基、吡啶甲基、吡咯烷基、哌啶基、四氢呋喃基、四氢呋喃-2-基甲基、吗啉基、4-吗啉基、2-(4-吗啉基)乙基、哌嗪基、2-(4-甲基哌嗪-1-基)乙基等，所有这些基团可以被一个或多个，例如 1、2、3 或 4 个相同或不同的取代基任选取代。

本发明的肽可以分别通过与适当试剂反应或通过引入(或通过存在)氨基保护基或羧基保护基修饰其 N-末端和/或 C-末端。肽或肽类似物的 N-末端在化学上可以修饰，使 N-末端氨基被例如酰基(如乙酰基、环戊基羧基异喹啉基羧基、呋喃基、甲苯磺酰基、苯甲酰基、哌嗪羧基或其他此类基团)取代，与异氰酸酯、氯甲酸酯、烷基化试剂反应，或引入其他此类基团，所有这些可以被如上所述的取代基取代。应理解，在此所用术语“氨基”广义地是指任何存在于肽中的自由氨基，包括伯、仲或叔氨基。对比之下，术语“N-末端”是指存在于以常规方式撰写的肽中的首个氨基酸的 $\alpha$ -氨基。

通过与氨基保护基相连可以保护本发明的肽的 N-末端。在此所用术语“氨基保护基”广义上是指可与自由氨基，包括例如存在于本发明肽的 N-末端中的 $\alpha$ -氨基反应的化学基团。由于该反应，氨基保护基保护反应性氨基不发生副反应，这些副反应可能在合成过程中或由于外肽酶活性对最终化合物的作用时出现。氨基的修饰也可以提供其他优越性，包括，例如提供化合物的溶解度或活性。多种氨基保护基在公开本文中或为所属领域技术人员已知，并且包括，例如酰基如乙酰基，叔丁氧基羧基，烯丙氧基羧基，苄氧基羧基或苯甲酰基；以及氨基酰基，其自身可以被氨基保护基修饰。其他氨基保护基公开在例如《肽类化合物》Gross & Meienhofer 编辑 3 卷(Academic Press, Inc., New York, 1981); 和 Greene & Wuts, 《有机合成中的保护基》第 2 版, 309-405 页(John Wiley & Sons, New York, 1991), 各著作在此引入作为参考。任何本发明肽或肽类似物的 N-末端氨基的此类修饰产物在此称作“N-末端衍生物”。

同样地，羧基如存在于肽的 C-末端的羧基在化学上可以用羧基

保护基修饰。所用术语“羧基”和“C-末端”是以与上述定义的术语“氨基”和“N-末端”一致的方式使用。羧基如存在于肽的C-末端的羧基可以通过将C-末端羧基还原为醇或醛或通过形成口端酯(oral ester)或用取代基(如噻唑基、环己基或其他基团)取代羧基来修饰。口端酯是所属领域熟知的并且包括,例如:烷氧基甲基,例如甲氧基甲基、乙氧基甲基、异丙氧基甲基等;1-((C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷氧基)乙基,例如甲氧基乙基,乙氧基乙基、丙氧基乙基、异丙氧基乙基等;2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4-基甲基,例如5-甲基-2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4-基甲基,5-苯基-2-氧代-1,3-二氧杂环戊烯-4-基甲基等;((C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>)-烷基硫)甲基,例如甲基硫甲基,乙基硫甲基,异丙基硫甲基等;酰氧基甲基,例如新戊酰氧基甲基、乙酰氧基甲基等;乙氧基羰基甲基;1-酰氧基-1-取代甲基,例如1-乙酰氧基乙基;3-2-苯并[c]咪喃酮基或5,6-二甲基2-苯并[c]咪喃酮基;1-(((C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷氧基)羰氧基)乙基,例如1-(乙氧基羰氧基)乙基;和1-(((C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基氨基)羰氧基)乙基,例如1-(甲基氨基羰氧基)乙基。

通过与羧基保护基连接可以修饰本发明的肽。羧基保护基是该技术领域熟知的,通过与肽键合,被保护羧基不再发生副反应(参见实施例, Greene & Wuts, 同上, 224-276页(1991), 该文献在此引入作为参考)。所属领域普通技术人员应理解,上述能够作用于肽的N-末端氨基或C-末端羧基的修饰同样也可以作用于存在于例如本发明肽的氨基酸或氨基酸类似物侧链上的反应性氨基或羧基。修饰方法公开在本申请中或为所属领域技术人员熟知。

对本发明化合物中含L-或D-氨基酸的选择可能部分取决于肽的预期特性。例如,掺入一种或多种D-氨基酸可以提高化合物在体外或体内的稳定性。掺入一种或多种D-氨基酸也可以提高或降低化合物的药理学活性。在某些情况中,希望化合物仅在短时间内保持活性。在这种情况下,在化合物中掺混一种或多种L-氨基酸可以使个体中的内源性肽酶体内消化该化合物,由此限制个体对该活性化

合物的暴露。所属领域技术人员可以通过考虑例如个体的年龄和健康状况来判断本发明化合物预期的理想特征。通常，本发明涉及任何立体异构体形式的式 I 化合物和两种或多种立体异构体以任意比例的混合物，例如纯的对映异构体，纯的非对映异构体，任意比例的两种对映异构体的混合物，包括消旋体，非对映异构体的混合物，顺式异构体，反式异构体，E 异构体或 Z 异构体。本发明还涉及任意互变异构形式的式 I 化合物。此外，本发明涉及式 I 的化合物的前药，例如由上述羧基获得的酯、酰胺、醛或醇，或由可酰化基团包括氨基、亚氨基、胍基和脒基获得的酰基衍生物，例如  $(C_1-C_6)$ -烷基羧基， $(C_1-C_6)$ -烷氧基羧基或芳基  $(C_1-C_4)$ -烷氧基羧基衍生物，并且本发明也涉及式 I 化合物的活性代谢产物。

在式 I 的化合物中，基团 R1 优选是 R12C(O)。具体系列的 R12 的意义由以下基团构成：烷基、链烯基、炔基、烷氧基、烷基氨基、链烯基氨基、炔基氨基、链烯基氧基、炔基氧基、芳基、杂芳基、杂环烷基、杂芳基烷基、杂环烷基烷基、杂烷基、杂烯基和杂炔基，这些基团均可以是未取代或被取代。R12 优选是烷基、链烯基、炔基、烷氧基、链烯基氧基、炔基氧基、烷基氨基、链烯基氨基、炔基氨基、芳基、杂芳基、芳烷基或杂芳基烷基，更优选链烯基氧基、链烯基氨基或芳基，这些基团全部可以是未取代或取代的。特别优选的 R12 是链烯基氧基或链烯基氨基，如分别含有一个双键的  $(C_2-C_6)$  链烯基氧基或  $(C_2-C_6)$  链烯基氨基，如烯丙基氧基或烯丙基氨基。更优选 R12 是  $(C_2-C_6)$ -链烯基氧基。代表 R12 的残基可以是未取代或取代的。在取代的残基 R12 中，残基优选被一个或多个相同的或不同的取代基取代，所述取代基选自卤素，即氟、氯、溴或碘，三氟甲基，羟基，硝基，氨基，氰基，羧基，氨基羧基，烷基磺酰基，氨基磺酰基，烷氧基，烷基羧基氨基和一或二烷基氨基。同样地，代表 R13、R14 和 R15 的残基可以是未取代或取代的，例如被存在于 R12 中的取代基取代，其中 R14 和 R15 彼此独立并且可以相同或不同。

式 I 化合物中是二价 4-脒基苯基丙氨酸残基  $-NH-CH[-CH_2-$

$C_6H_4-(4-C(=NH)-NH_2)]-C(O)-$ 的基团 A, 优选是(L)-4-脞基苯基丙氨酸残基(=(S)-4-脞基苯基丙氨酸残基)。是二价谷氨酸残基-NH-CH[-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-C(O)OH]-C(O)-或其可药用盐或酯的基团 B, 优选是(L)-谷氨酸残基(=(S)-谷氨酸残基)或其可药用盐或酯。

R95 优选是氢或(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基, 更优选氢或甲基, 特别优选氢。

取代的残基 R81 和 R82 可以独立地带有一个或多个, 例如 1、2、3 或 4 个相同或不同的残基, 优选地选自氨基, 氨基羰基, 脞基, 胍基, 氨基烷基, 羟基, 巯基, 这些基团均可以被保护基取代, 和乙酰亚氨基(-C(=NH)-CH<sub>3</sub>), 硝基和氰基。对于硝基, 本发明的式 I 化合物中优选至多只能存在两个硝基。适用于上述基团的保护基是所属领域技术人员已知的并且可以在上述参考文献中发现, 例如 Greene & Wuts, 《有机合成中的保护基》第 2 版(John Wiley & Sons, New York, 1991), 该著作在此引入作为参考。保护基的实例是上述氨基保护基, 如叔丁氧基羰基、苄氧基羰基和烯丙氧基羰基, 它们也可以是脞基和胍基的保护基; 可以用来保护胍基的硝基, 或可以用来保护如羟基、巯基和其他基团的象苄基、甲基、三苯甲基或乙酰基氨基甲基的基团。优选的 R81 和 R82 选自氢, 烷基如(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-烷基, 芳基如苯基, 芳烷基如苯基-(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)-烷基和杂芳基烷基如杂芳基-(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)-烷基, 它们全部可以未取代或取代, 且其中杂芳基优选是含有 1 或 2 个相同或不同环杂原子如 N、O 或 S 的一环或双环芳香环系的残基, 更优选 R81 是氢并且 R82 是未取代或取代的上述的残基。

特别优选的基团 D 代表选自下列的残基:

Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>], Dab[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>],  
Lys[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>], Lys[-C(=NH)-CH<sub>3</sub>], Orn[-C(=NH)-CH<sub>3</sub>], Dab[-C(=NH)-CH<sub>3</sub>],  
Dap[-C(=NH)-CH<sub>3</sub>], Dab(Alloc), Asn, Gln, Met, Ser, Thr, Ser(Bzl), Thr(Bzl), Cys(Me),  
Cys(Bzl), Cys(Acm), Arg(NO<sub>2</sub>), His, Trp, Phg, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Phe,  
Phe(4-NO<sub>2</sub>), Phe(4-NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>), 2-Abu, Ala(3-CN), Ala[3-C(=NH)-NH<sub>2</sub>],  
2-Abu(4-CN) 和 2-Abu[4-C(=NH)-NH<sub>2</sub>].

特别优选的基团 D 选自其中的亚组残基由以下构成:

Arg, Dap, Dab, Orn, Lys, Dap[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>], Dab[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>], Lys[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>],  
Asn, Ser, Thr, Ser(Bzl), Arg(NO<sub>2</sub>), Trp, Phg, Ala, Val, Ile, Leu, Phe, 2-Abu,  
Ala(3-CN), Ala(3-C(=NH)-NH<sub>2</sub>), 2-Abu(4-CN) 和 2-Abu(4-C(=NH)-NH<sub>2</sub>).

数字 n 优选是 0、1 或 2, 更优选 0 或 1。如果 n 是 0, 基团 R2 直接与代表 D3 的羰基相连。如果 n 不等于 0, 基团 R2 与代表端基 E3 的羰基相连。如果 n 是 2 或 3, 基团 E 可以全部相同或不同。

取代的残基 R71 和 R72 可以独立地带有一个或多个, 例如 1、2、3 或 4 个相同或不同的基团, 所述基团选自烷基、烷氧基、卤素、三氟甲基、硝基、氰基、烷基磺酰基、烷基羰基、苯基羰基和 2-苯基-1,3-二硫杂环戊烷-2-基, 它们可以被进一步取代。可以存在于 R71 和 R72 中的亚组取代基选自烷基、烷氧基、卤素、三氟甲基、硝基、氰基、烷基磺酰基和烷基羰基, 它们可以被进一步取代。优选 R71 是氢并且 R72 是上述未取代或取代基团。R72 优选是烷基, 特别是 (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>) 烷基, 包括环烷基, 例如环烷基烷基, 如环烷基-(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)-烷基; 或芳基, 特别是苯基; 或芳烷基, 特别是苯基-(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)-烷基; 或杂芳基烷基, 特别是杂芳基-(C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>)-烷基, 其中所有这些基团可以是未取代或取代, 并且其中杂芳基优选是含有 1 或 2 个相同或不同的环杂原子如 N、O 和 S 的单环 5 元或 6 元芳香环。基团 E, 特别是在 n 是 1 的情况中, 优选地选自苯基中未取代或取代的 Phe, Cha 和 Chg。特别优选 E 选自 Cha, Chg 和 Phe[4-C(-S-CH<sub>2</sub>-S-)-Ph]。存在于基团 E 中的基团 R70 优选是氢; 烷基, 特别是 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基, 包括甲基; 或芳烷基, 特别是苯基-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基, 包括苄基和 2-苯基乙基, 其中的苯基可以未取代或取代。特别优选 R70 是氢。

取代的残基 R21、R22、R23 和 R24 可以独立地带有一个或多个, 例如 1、2、3 或 4 个相同或不同的优选地选自下列的基团: 卤素, 特别是 F、Cl、Br; 羟基, 三氟甲基, 硝基, 氰基, 二烷基氨

基；烷氧基，如甲氧基；亚烷基二氧基，烷基磺酰基，氨基磺酰基和氧代(=O)，这些基团可以被进一步取代。亚烷基二氧基的实例是亚甲基二氧基(O-CH<sub>2</sub>-O)或1,2-乙氧基二氧基。二烷基氨基的实例是二甲基氨基，二乙基氨基或二丁基氨基，烷基磺酰基的实例是甲基磺酰基、乙基磺酰基或丁基磺酰基。R2 优选是 NR<sub>21</sub>R<sub>22</sub>，其中 R<sub>21</sub> 和 R<sub>22</sub> 如定义。R<sub>21</sub> 优选是氢，(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基或苯基-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基，其中苯基可以未取代或取代。特别优选 R<sub>21</sub> 是氢，即特别优选 NR<sub>21</sub>R<sub>22</sub> 是 NHR<sub>22</sub>，由此特别优选 R<sub>2</sub> 是 NHR<sub>22</sub>。R<sub>22</sub> 优选是选自下列的残基：氢；烷基，特别是(C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>)-烷基，包括环烷基，如环烷基烷基，例如环烷基(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基；芳基，特别是(C<sub>6</sub>-C<sub>13</sub>)-芳基；芳烷基，特别是被1或2个(C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>)-芳基残基取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基；杂芳基烷基，特别是被含有1或2个相同或不同的杂原子如N、O和S的单环或双环杂芳基取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷基；和杂环烷基烷基，特别是被含有1或2个相同或不同的杂原子如N、O和S的单环4-、5-、6-或7-元杂环烷基取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)烷基，这些残基全部是可以如上述定义的未取代或取代的。

特别优选的 R<sub>22</sub> 是选自下列的残基：氢、苄基、萘基甲基、吡啶基甲基、苯基乙基、萘基乙基、吡啶基乙基、苯基丙基、萘基丙基、吡啶基丙基、苄基、联苯基甲基、联苯基乙基和联苯基丙基，这些基团是未取代或被一个或多个，例如1、2、3或4个相同或不同的取代基取代，它们优选自F、Cl、Br、羟基、甲氧基、亚甲基二氧基、硝基、氰基、二烷基氨基、烷基磺酰基、氨基磺酰基和三氟甲基，它们可以被进一步取代。一组特别优选的式 I 化合物是其中同时地，数字 n 不是 0，R<sub>2</sub> 是 NHR<sub>22</sub> 并且 R<sub>22</sub> 是氢的化合物。另一组特别优选的化合物是其中同时地，n 是 0、R<sub>2</sub> 是 NHR<sub>22</sub> 并且 R<sub>22</sub> 不是氢的化合物，其中在该组化合物中，基团 D 的优选定义是 Asn。

优选的式 I 化合物是那些化合物，其中一个或多个基团具有优选含义，优选含义的所有组合是本发明的一个主题。

本发明的一组优选化合物由式 I 的化合物构成，其中

R1 是 R12C(O)，其中 R12 如所述定义，

A 如定义的，

B 如定义的，并且优选 B 是 NH-CHR97-C(O)，其中 R97 是 2 位被羟基羰基或其盐或烷氧基羰基如 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-烷氧基羰基取代的乙基，

D 是 NH-CHR82-C(O)，其中 R82 如定义的，

E<sub>n</sub> 是 (E1-E2-E3)<sub>n</sub>，其中

n 是 0、1 或 2，

E1 是 NH，

E2 是 CHR72，其中基团 R72 彼此独立并且相同或不同，如定义的，

E3 是 C(O)，和

R2 如定义的，

其以它们的任何立体异构体形式或其任何比例的混合物，和它们的可药用盐，酰胺和酯。

一组特别优选的化合物是由式 I 的化合物组成，其中：

R1 是烯丙基氧基羰基或烯丙基氨基羰基，

A 是 (L)-4-脒基苯基丙氨酸的残基，

B 是 (L)-谷氨酸或 (L)-谷氨酸的可药用盐或酯的残基，

D 是选自下列的残基：

Arg, Dap, Dab, Orn, Lys,

Dap[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>], Dab[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>], Lys[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>], Lys[-C(=NH)-CH<sub>3</sub>],

Orn[-C(=NH)-CH<sub>3</sub>], Dab[-C(=NH)-CH<sub>3</sub>], Dap[-C(=NH)-CH<sub>3</sub>], Dab(Alloc), Asn,

Gln, Met, Ser, Thr, Ser(Bzl), Thr(Bzl), Cys(Me), Cys(Bzl), Cys(Acm),

Arg(NO<sub>2</sub>), His, Trp, Phg, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Phe(4-NO<sub>2</sub>),

Phe(4-NH-C(=NH)-NH<sub>2</sub>), 2-Abu, Ala(3-CN), Ala[3-C(=NH)-NH<sub>2</sub>], 2-Abu(4-CN)

和 2-Abu[4-C(=NH)-NH<sub>2</sub>],

n 是 0 或 1，

E 选自 Cha、Chg 和 Phe[4-C(-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S)-Ph] 的残基，

R2 是 NHR22，

R22 是氢或选自下列的基团：苄基、萘甲基、吡啶基甲基、苯基乙基、萘基乙基、吡啶基乙基、苯基丙基、萘基丙基、吡啶基丙基、苄基、联苯基甲基、联苯基乙基和联苯基丙基，这些基团是未取代的或被一个或多个相同或不同的选自下列的取代基取代：F、Cl、Br、羟基、甲氧基、亚甲基二氧基、硝基、氰基、二烷基氨基、烷基磺酰基、氨基磺酰基和三氟甲基，

其以它们的任何立体异构体形式和其任意比例的混合物，以及它们的可药用盐、酰胺和酯。

本发明化合物的具体实施例包括例如下表 2 和实施例部分中所列的化合物，和它们的可药用盐、酰胺和酯。

式 I 的化合物可以按照例如固相化学的方法制备，利用的方法包括：

- a1) 将式  $\text{Fmoc-E}_n\text{-OH}$  的化合物与结合在树脂或通常地固相载体上的酸敏感性接头偶联，其中  $n$  是 1、2 或 3，裂解掉保护基 Fmoc，将式  $\text{Fmoc-D1-D2-C(O)OH}$  的化合物与获得的自由氨基偶联并且再次裂解掉保护基 Fmoc，  
或为了制备其中  $n$  是 0 的式 I 化合物，令式  $\text{Fmoc-D1-D2-C(O)OH}$  的化合物与结合在树脂或通常地固相载体上的酸敏感接头偶联，并且裂解掉保护基 Fmoc，
- a2) 令式  $\text{Fmoc-B1-B2-C(O)OH}$  的化合物与步骤 a1) 获得的自由氨基偶联并且裂解掉保护基 Fmoc，
- a3) 令式  $\text{R1-A1-A2-C(O)OH}$  的化合物与步骤 a2) 获得的自由氨基偶联，和
- a4) 用三氟乙酸由树脂上裂解下由步骤 a1) 至 a3) 制备的化合物。

该方法中所用的树脂或接头可以是一类使该化合物中分别与树脂或接头偶联的羧基转化为酰氨基  $\text{C(O)-NH}_2$  的树脂或接头，例如 Knorr 接头或 Rink 酰胺树脂。其中  $n$  是 2 或 3 的化合物的制备还可通过如下分步装配单元  $\text{E}_n$  来进行。在步骤 a1) 中，首先用其中  $n$  是 1 的  $\text{Fmoc-E}_n\text{-OH}$  化合物代替  $n$  是 2 或 3 的  $\text{Fmoc-E}_n\text{-OH}$  与结合在树脂

上的酸敏感接头偶联，随后脱去保护基 Fmoc，并且将第二个其中 n 是 1 的 Fmoc-E<sub>n</sub>-OH 化合物偶联在所得自由氨基上。为了制备其中 n 是 3 的化合物，随后脱去保护基 Fmoc，并且将第三个其中 n 是 1 的 Fmoc-E<sub>n</sub>-OH 化合物偶联在所得自由氨基上。最后，脱去保护基 Fmoc 并且进行步骤 a2) 至 a4)。

另一种式 I 化合物的制备方法包括：

b1) 令式 Fmoc-B1-CHR97-C(O)OPG 的化合物的侧链羧酸与结合于氨基官能化树脂上的酸敏感苄醇类接头偶联，其中 R97 是 2-羟基羰基乙基并且 PG 是保护基，

b2) 脱去保护基 PG，

b3) 令式 H<sub>2</sub>N-D2-D3-E<sub>n</sub>-R2 的化合物与步骤 b2) 获得的自由羧酸偶联，其中 n 是 0、1、2 或 3，

b4) 脱去保护基 Fmoc，

b5) 令式 R1-A1-A2-C(O)OH 的化合物与步骤 b4) 所得自由氨基偶联，和

b6) 用三氟乙酸由树脂脱下按照步骤 b1) 至 b5) 所得的化合物。

与对第一种方法的改进类似，在该方法中，可将结构单元 H<sub>2</sub>N-D2-D3-E<sub>n</sub>-R2 分步装配在树脂上。按照与此方法类似的另一种方法，首先使存在于基团 D 的基团 D<sub>2</sub> 中，也就是存在于 R81 和 R82 之一中的羧酸基团与结合在树脂上的接头偶联。类似于上述式 Fmoc-B1-CHR97-C(O)OPG 的化合物，此类化合物可以例如具有式 Fmoc-NH-CR81R82-C(O)OPG，其 R82 如上定义，条件是它含有基团 C(O)OH，并且 R81 如所述定义。例如，R81 可以是氢和 R82 可以是羟基羰基甲基，因此式 Fmoc-NH-CR81R82-C(O)OPG 的化合物可以是被保护天门冬氨酸衍生物。脱保护 C(O)OPG 后，其羧基是式 I 的基团 D3，所得自由羧基与化合物如 H<sub>2</sub>N-E<sub>n</sub>-R2 和 H-R2 偶联。此后，脱去保护基 Fmoc 后，所得氨基与式 Fmoc-B1-B2-C(O)OH 的化合物偶联，氨基脱保护后，令产物与式 R1-A1-A2-C(O)OH 的化合物偶联。此外，所用树脂或接头可以是一类使化合物中与树脂或接头偶联的羧基转化为

酰氨基 C(O)-NH<sub>2</sub> 的树脂或接头。例如，利用酰胺树脂，结合在树脂上的天门冬氨酸单元可以转化为最终化合物中的天门冬酰胺单元。

本发明的化合物在化学上可以利用如自动合成仪(参见实施例 1)合成。对反应性基团如存在于肽中氨基酸侧链或 N-末端或 C 末端上的反应性基团的选择性修饰可以为本发明化合物提供预期特性，例如提高溶解度或增强抑制功能。当采用固相合成方法时，在初生肽结合在树脂上或由树脂裂解下肽后可操作化合物的化学组分来得到例如 N-末端衍生物，如 N-末端酰化化合物，例如乙酰化化合物。对化合物的羧基也可以进行类似的修饰，包括例如酰胺化 C-末端羧基。

所述化合物可按照传统药物化学通过偶联保护氨基酸来制备，或通过溶液相有机化学并且利用所属领域已知方法将目标分子脱保护来制备所述化合物。通常，适用于合成式 I 化合物的固相方法或溶液相方法的反应以及试验的详细条件，如适当偶联剂(如碳二亚胺类、TOTU 或 HATU)或溶剂和反应温度，为所属领域技术人员所熟知，而且也可以在标准参考文献(包括上述参考文献)中发现，而且本文下面也作了举例说明。

利用已知方法如反相高效液相色谱(RP-HPLC; 参见实施例 1)或其他基于如化合物大小、电荷或疏水性的分离方法可以提纯合成的化合物。同样地，已知方法如氨基酸序列分析或质谱(MS)可用来定性分析本发明化合物的结构特征(参见实施例 I)。

含有不同取代基排列的多种化合物对凝血因子 VIIa 具有不同水平的抑制活性。例如，取代基的选择影响化合物的结合亲和力。这些化合物按照实施例中所述的方法合成。肽的抑制活性采用实施例 22 所述的分析方法进行测试。利用这些方法，所属领域普通技术人员可以合成出本申请公开的化合物，包括它们的修饰，并且测出该化合物的凝血因子 VIIa 抑制活性。本发明的组合物可以作为均质组合物或化合物的混合物提供，所述化合物含有多种组合的取代基。选择取代基的灵活性可极大地控制本发明的化合物和组合物的

生物学和生化特性。

本发明提供特异抑制凝血因子 VIIa 活性的化合物。此类化合物对凝血因子 VIIa 活性优选地具有  $K_i \leq 500\text{nM}$ ，更优选  $\leq 50\text{nM}$ ，并且与对凝血因子 VIIa 的抑制作用相比，基本上不抑制其他参与凝血和纤溶级联的蛋白酶的活性(利用相同浓度的抑制剂)。这类其他蛋白酶包括，例如凝血因子 Xa、凝血酶和纤溶酶。

下表 2 给出了说明本发明例举的选定的式 I 化合物的凝血因子 VIIa 抑制活性(参见实施例 22 中测定  $K_i$  的方法)。

表 2: 选定的式 I 化合物的凝血因子 VIIa 抑制活性

	Ki ( $\mu\text{M}$ )
Alloc-pAph-Glu-Arg-Cha-NH <sub>2</sub>	0.046
Allylaminocarbonyl-pAph-Glu-Arg-Cha-NH <sub>2</sub>	0.042
Alloc-pAph-Glu-Arg-Chg-NH <sub>2</sub>	0.238
Alloc-pAph-Glu-Dap[-C(=NH)-NH <sub>2</sub> ]-Cha-NH <sub>2</sub>	0.012
Alloc-pAph-Glu-Ala[3-C(=NH)-NH <sub>2</sub> ]-Cha-NH <sub>2</sub>	0.03
Alloc-pAph-Glu-Asn-Cha-NH <sub>2</sub>	0.021
Alloc-pAph-Glu-Dab-Cha-NH <sub>2</sub>	0.055
Alloc-pAph-Glu-Dap[-C(=NH)-NH <sub>2</sub> ]-NH <sub>2</sub>	0.26
Alloc-pAph-Glu-Gly-Cha-NH <sub>2</sub>	0.12
Alloc-pAph-Glu-Thr(Bzl)-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH(Ph) <sub>2</sub>	0.17
Alloc-pAph-Glu-Dab-NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -Ph	0.38
Alloc-pAph-Glu-Asn-NH-CH <sub>2</sub> -Chx	0.15
Alloc-pAph-Glu-Dap[-C(=NH)-CH <sub>3</sub> ]-Cha-NH <sub>2</sub>	0.11
Alloc-pAph-Glu-Dab[-C(=NH)-NH <sub>2</sub> ]-Cha-NH <sub>2</sub>	0.012
Alloc-pAph-Glu-2-Abu(4-CN)-Cha-NH <sub>2</sub>	0.063
Alloc-pAph-Glu-Ala(3-CN)-Cha-NH <sub>2</sub>	0.12
Alloc-pAph-Glu-Asn-1-萘基甲基酰胺	0.031
Alloc-pAph-Glu-Asn-1-(1-萘基)-乙基酰胺	0.021
Alloc-pAph-Glu-Asn-2-萘基甲基酰胺	0.027
Alloc-pAph-Glu-Asn-3,4-二氯苄基酰胺	0.026
Alloc-pAph-Glu-Asn-2-(3-氯苄基) 乙基酰胺	0.023
Alloc-pAph-Glu-Arg(NO <sub>2</sub> )-Cha-NH <sub>2</sub>	0.014
Alloc-pAph-Glu-Cys(Bzl)-Cha-NH <sub>2</sub>	0.026
Alloc-pAph-Glu-Trp-Cha-NH <sub>2</sub>	0.017
Alloc-pAph-Glu-Phg-Cha-NH <sub>2</sub>	0.017
Alloc-pAph-Glu-Asn-9-苄基酰胺	0.023
Alloc-pAph-Glu-Asn-3,5-双三氟甲基苄基酰胺	0.033
Alloc-pAph-Glu-Phe(4-胍基) -Cha-NH <sub>2</sub>	0.12
Alloc-pAph-Glu-D-Phe(4-胍基) -Cha-NH <sub>2</sub>	11.3
Alloc-pAph-Glu-Orn[-C(=NH)-CH <sub>3</sub> ]-Cha-NH <sub>2</sub>	0.13

Alloc-pAph-Glu-Dab[-C(=NH)-CH <sub>3</sub> ]-Cha-NH <sub>2</sub>	0.19
Alloc-pAph-Glu-Dap[-C(=NH)-NH <sub>2</sub> ]-Phe[4-C(-S-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -S-)-Ph]-NH <sub>2</sub>	0.015
Alloc-pAph-Glu-Gln-NH <sub>2</sub>	1.5
Alloc-pAph-Glu-Orn-NH <sub>2</sub>	6.2
Alloc-pAph-Glu-Gly-Cha-NH <sub>2</sub>	0.12
Alloc-pAph-Glu-Cys(Acm)-Cha-NH <sub>2</sub>	0.12
Alloc-pAph-Glu-Cys(Me)-Cha-NH <sub>2</sub>	0.20
Alloc-pAph-Glu-Cys(Bzl)-Cha-NH <sub>2</sub>	0.026
Alloc-pAph-Glu-Thr(Bzl)-Cha-NH <sub>2</sub>	0.019
Alloc-pAph-Glu-Dab(Alloc)-Cha-NH <sub>2</sub>	0.15
Alloc-pAph-Glu-His-Cha-NH <sub>2</sub>	0.14
Alloc-pAph-Glu-Met-Cha-NH <sub>2</sub>	0.11
Alloc-pAph-Glu-Phe(4-NO <sub>2</sub> )-Cha-NH <sub>2</sub>	0.046
Alloc-pAph-Glu-D-Lys[-C(=NH)-NH <sub>2</sub> ]-Cha-NH <sub>2</sub>	22
Alloc-pAph-Glu-D-Arg-Cha-NH <sub>2</sub>	12
Alloc-pAph-Glu-Asn-3,4-亚甲基二氧基苄基酰胺	0.12
Alloc-pAph-Glu-Asn-2-(4-吗啉基)乙基酰胺	0.41
Alloc-pAph-Glu-Asn-2-(2-萘基)乙基酰胺	0.052
Alloc-pAph-Glu-Asn-2-(1-萘基)乙基酰胺	0.022
Alloc-pAph-Glu-Asn-2-四氢呋喃基甲基酰胺	0.17
Alloc-pAph-Glu-Asn-3-甲基丁基酰胺	0.11
Alloc-pAph-Glu-Asn-2-(2-吡啶)乙基酰胺	0.071
Alloc-pAph-Glu-Asn-1,2,3,4-四氢-1-萘基酰胺	0.045
Alloc-pAph-Glu-Asn-N,N-二苄基酰胺	0.41
Alloc-pAph-Glu-Asn-N-甲基-N-(1-萘基甲基)酰胺	1.7
Alloc-pAph-Glu-Asn-2,2-二苯基乙基酰胺	0.049
Alloc-pAph-Glu-Asn-2,4-二氟苄基酰胺	0.051
Alloc-pAph-Glu-Asn-2-(4-氯磺酰基苯基)乙基酰胺	0.35
Alloc-pAph-Glu-Asn-4-二甲基氨基苄基酰胺	0.11
Alloc-pAph-Glu-Asn-(CH <sub>3</sub> )-Cha-NH <sub>2</sub>	0.062
Alloc-pAph-Glu-Asn-3-苯基丙基酰胺	0.026
Alloc-pAph-Glu-Asn-3,3-二苯基丙基酰胺	0.024
Alloc-pAph-Glu-Asn-4-甲氧基苄基酰胺	0.083
Alloc-pAph-Glu-Asn-3,4-二氯苄基酰胺	0.026

上述化合物的凝血酶抑制活性表达为  $K_i$  值, 该值通常明显高于上述指示凝血因子 VIIa 抑制活性的, 例如高达凝血因子 VIIa 抑制活性的约 200 或约 500 或约 1000 倍。另外, 测定的上述化合物的凝血因子 Xa 抑制活性可以表示为  $K_i$  值, 该值通常明显高于上述指示凝血因子 VIIa 抑制活性的, 例如高达凝血因子 VIIa 抑制活性的约 100 倍。

这些结果证实, 式 I 的化合物适合作为凝血因子 VIIa 的抑制剂, 但基本上不抑制凝血因子 Xa 或丝氨酸蛋白酶如凝血酶的活性, 这些酶参与凝血和纤维蛋白溶解的过程。

本发明的化合物适合作为抗凝剂使用, 它与血液样本接触可防止凝血。例如, 有效量的本发明化合物与新鲜抽取的血液样本接触可以防止血样凝固。此处所用的术语“有效量”当用来描述本发明的化合物时是指化合物抑制凝血因子 VIIa 活性所需的量。所属领域普通技术人员应理解, 利用本文公开的方法(参见实施例 22)或其他已知方法可以测定出本发明化合物的有效量。鉴于所公开的本发明化合物的用途, 所属领域技术人员也应懂得, 本发明的化合物可以替代如肝素的试剂。与其他抗凝剂相比, 应用本发明的化合物可以例如降低成本。

此外, 本发明的化合物可以对个体给药用来治疗多种临床症状, 其中包括, 例如治疗心血管疾病或与例如感染或手术有关的并发症。心血管疾病的实例包括血管成形术后的再狭窄、成人呼吸窘迫综合征、多器官衰竭、中风和散播性血管内凝血症。有关手术相关性并发症的实例包括, 例如深层静脉和邻接静脉血栓形成, 这些在手术后可以发生。所以, 本发明的化合物在个体中可作为药物用来减少或抑制不期望的凝血。

由于本发明的化合物可以抑制凝血因子 VIIa 的活性, 此类化合物通常可以用来减少和抑制个体中的凝血。此处所用的术语“个体”是指脊椎动物, 包括哺乳动物如人, 其中凝血因子 VIIa 参与凝血级联。

通过给个体施用治疗有效量的本发明化合物可以减少或抑制个体中的血液凝固。此处所用的术语“治疗有效量”是指为抑制个体中凝血因子 VIIa 的活性所必需施用的化合物剂量。更具体而言，治疗有效量的本发明化合物在凝血酶原酶复合物中或作为可溶性亚单位直接抑制凝血因子 VIIa 的催化活性，或通过抑制凝血因子 VIIa 装配为凝血酶原酶复合物间接抑制凝血因子 VIIa 的催化活性。优选化合物抑制凝血因子 VIIa 的  $K_i \leq 500\text{nM}$ ，更优选的化合物的  $K_i \leq 50\text{nM}$ 。利用上述(如实施例 22)的方法或其他已知方法可以测定出治疗有效量。

在本发明治疗方法的实践中，为获得治疗有效量的药物组合物，施用给个体的特定剂量应取决于多种原因，包括，例如疾病的本质和严重性、给药方案和个体的年龄和机体特征。利用医学领域已知的临床途径可以建立适当的剂量。因此，本发明提供一种通过使凝血因子 VIIa 与具有结构式  $R_1-A-B-D-E_n-R_2$  的化合物接触来特异性抑制凝血因子 VIIa 的方法，本发明进一步提供抑制减少或抑制个体中形成血凝块的方法，该方法通过施用治疗有效量的本发明化合物。

本发明的化合物通常作为组合物给予个体，组合物中含有一种或多种式 I 的化合物和可药用载体。术语“可药用载体”是指由相关管理机构测定的对于个体无毒或具有可接受毒性的介质或组合物。在此所用术语“可药用载体”包括：固体载体物质，如玉米淀粉、乳糖、脂肪、蜡等；或液体，如磷酸盐缓冲盐水、水；乳液，如油/水或水/油乳液；和/或普通添加剂，如任何不同类型的湿润剂。适当药用载体减轻制剂公开在 Martin 的《Remington 氏药物科学》，15 版(Mark Publishing Co. Easton, 1975)，该著作在此引入作为参考。此类组合物一般含有治疗有效量的本发明化合物和适量的载体，从而含有给予个体的适当剂量。所以，所述化合物可以作为药物用来抑制凝血因子 VIIa 活性和个体中的凝血。

本发明的药物组合物和药剂可以经口服给药，例如以丸剂、片

剂、涂层片剂、包衣片剂、颗粒剂、硬和软明胶胶囊、溶液、糖浆剂、乳液、混悬液或气溶胶混合物的形式。然而，也可以经直肠给药，如以栓剂的形式；经非肠道给药，如经静脉内、肌肉内或皮下给药，以注射溶液或输注溶液的形式、微囊、植入物或棒体；或经皮或局部给药，例如软膏、溶液或酊剂的形式；或经其它途径给药，例如气溶胶或喷鼻剂的形式。式 I 的活性成分或其可药用盐或衍生物在单位剂量的药物组合物中的含量通常是约 0.5mg 至约 1000mg，有效约 1mg 至约 500mg，但根据药物组合物的类型，该含量也可以更高。式 I 化合物的日剂量可以每天给药 1 次或可分为数份给药，例如 2、3 或 4 份给药。

可药用载体也可以包括，例如其它介质、化合物或增强其药理学功能的式 I 凝血因子 VIIa 抑制剂化合物的修饰。可药用介质可以包括，例如可药用盐。式 I 化合物的酸加成盐可以与例如无机酸形成，如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸或高氯酸；或与有机酸形成，如乙酸、草酸、马来酸、苹果酸、甲酸、乳酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸；或有机磺酸形成，如甲磺酸或对甲苯磺酸。式 I 化合物中的酸性基团如是羧基可以以金属盐存在，其阳离子基于碱金属或碱土金属，如钠、锂、钾、钙或镁；以及无毒铵盐，包括季铵盐和与胺的酸加成盐，如铵、甲基铵、二甲基铵、三甲基铵、四甲基铵、乙基铵、三乙基铵或四乙基铵盐。

增强式 I 化合物药理学功能的修饰实例包括，例如：酯化，如  $(C_1-C_6)$  烷基酯，优选  $(C_1-C_4)$  烷基酯，其中烷基是直链或支链。其它可接受酯包括，例如  $(C_5-C_7)$  环烷基酯和芳烷基酯，例如苄酯。此类酯可以由本发明所述化合物利用肽化学领域的已知常规方法制备。

药学可接受修饰也可以包括，例如肽酰胺的形成。此类酰胺修饰可影响本发明的化合物，包括例如衍生自氨、伯  $(C_1-C_6)$  烷基胺和仲双  $(C_1-C_6)$  烷基胺的那些，其中烷基是直链或支链，或具有不同取代基的芳基胺。在仲胺的情况中，胺也可以是 5-或 6-元杂环的形式，其除了含有酰胺氮原子以外还可以含有未取代或取代的氮原

子、氧原子或硫原子。制备此类酰胺的方法是所属领域已知的。

在本发明的另一实施方案中，本发明的化合物可在分析试验中用于鉴定凝血因子 VIIa 的存在或用于分离出基本上纯净形式的凝血因子 VIIa。本发明的化合物优选地用例如放射性同位素标记，并且利用检测特定标记的常规方法测定标记化合物。此外，本发明的化合物适宜作为探针在体内、体外或离体中检测凝血因子 VIIa 的位置或含量。

应懂得，基本上不影响本发明多种实施方案的活性的修饰属于本发明的范围内。所以，下列实施例用举例说明但不限定本发明。

#### 实施例 1: 肽合成方法和通用合成方法

合成中所用的起始原料得自化学销售商，例如 Aldrich、Sigma、Fluka、Nova Biochem 和 Advanced Chemtech。在合成过程中，氨基酸衍生物所用的官能团通过保护基保护，防止在偶联步骤中发生副反应。适用保护基的实例及其使用公开在《肽》，如上所述，1981，和第 9 卷 udenfriend & Meienhofer(编辑)，1987，其在此引入作为参考。

采用通用固相肽合成方法来制备本发明的化合物。此类方法公开在，例如 Steward & Young 的《固相肽合成》(Freeman & co., San Franciscan 1969) 中，其在此全文引入作为参考。

除非另外指出，肽类化合物是在 TentaGel S NH<sub>2</sub> 树脂(Rapp Polymere, Tubingen, 德国)上合成。酸敏感接头 p-[(R, S)- $\alpha$ -[1-(9H-芴-9-基)甲氧基甲酰氨基]-2,4-二甲氧基苄基]苯氧基乙酸(Knorr 接头)偶联在固体载体(bernатовicz 等人，《四面体通讯》30(1989), 4645, 在此引入作为参考)上。或者，肽类化合物可在用酸敏感接头修饰的与 1% 二乙烯基苯交联的聚苯乙烯树脂(Rink 接头)上合成(Rink, 《四面体通讯》28(1987)3787; Sieber, 《四面体通讯》28(1987)2107, 各文献在此引入作为参考)。当首先通过使式 Fmoc-B1-CHR<sup>97</sup>-C(O)OPG 化合物的侧链羧酸与树脂偶联

合成肽类化合物时，采用通过 HMPA 接头结合修饰的 Tentagel S NH<sub>2</sub> 树脂。偶联反应采用 N,N'-二异丙基碳二亚胺 (DIC)、在一当量 HOBt 存在下进行，除 Alloc-pAph-OH 以外，采用 Alloc-pAph-OH 时是在 2 当量的 HOBt 存在下进行。全部偶联均是在 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 或 DMF/DMSO (1/1 混合物) 中、在室温 (RT) 下进行。通过茚三酮试验监测偶联反应是否完全。当在首次情况中偶联不完全时，进行第二次 (双) 偶联。

利用存在于 DMF 中的 50% 哌啶将 Fmoc 基团脱保护 2 + 10 分钟。由脱保护后在 300nm 下的吸光度、合成中所用的洗涤液体积和树脂重量来测定出释放的 Fmoc 的量。

各偶联循环如下：

步骤	作用/试剂	溶剂
1.	0.5g 官能化肽树脂	
2.	3 倍过量的氨基酸 衍生物/HOBt/DIC	4ml DMF
3.	偶联 (分钟, 1 小时)	
4.	洗涤 (3 × 5ml)	DMF
5.	茚三酮试验	
6.	脱保护 (2 + 10 分钟) 哌啶/DMF	5ml 50%
7.	洗涤 (6 × 5ml)	DMF
8.	由步骤 2 开始重复	

在树脂上完成肽装配后，如果需要，最后进行 Fmoc 脱保护。连续用 DMF 和 DCM 洗脱肽树脂，随后裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲烷 (95/5) 脱保护 1.5 小时，除非另外说明。用 DCM 洗涤树脂并且将 DCM 洗涤液与 TFA 释放物合并。蒸发该溶液，产物用无水乙醚沉淀，通过过滤或离心分离该固体沉淀并且在固体 KOH 片下真空干燥。将固体重新溶解在水和乙腈的混合液中并且冷冻干燥。

干燥的肽进行 HPLC 纯化, 采用水和乙腈 (ACN) 中含 0.1% TFA 的适当梯度液。在收集含有预定合成产物的洗脱峰后, 将该肽溶液冷冻干燥并且对肽进行鉴定试验, 其中包括电子喷射质谱 (MS) 和/或 NMR 和/或氨基酸分析, 以便证明合成出正确的化合物。

对于 HPLC 分析试验, 利用 Beckman HPLC 系统 (由 126 溶剂输送系统、166 可编程检测模块 507e 自动进样器组成, 由 Gold Nouveau 软件的数据站控制) 和 YMC ODS-AM 4.6 × 250mm 色谱柱在 230nm 和 1ml/分钟的流量下分析产物的样本。

为了纯化产物, 将粗品冻干肽的样本溶解在含有 10% 至 50% ACN 的 0.1% TFA 的水溶液的混合液中。肽溶液通常经注射器过滤, 该注射器与 0.45 $\mu$ m “ACRODISC” 13CR PTFE (gelman Sciences; Ann Arbor MI) 滤器相连。将适当体积的过滤肽溶液注射到半制备 C 18 色谱柱 (Vydac protein and Peptide C18, 218TP1022 (22x250mm); The Separation Group; Hesperia CA, 或 YMC ODS-A 柱 (22x250mm), YMC, Inc., Wilmington, NC) 中。用 Beckman 的 “SYSTEM GOLD” HPLC (Beckman, System Gold, 可编程软件模块 126 和可编程检测模块 166 由 “SYSTEM GOLD” 软件控制) 维持 0.1% TFA 缓冲液和 ACN (HPLC 级) 的梯度液或等度混合液的流速。在 230nm 下通过 UV 检测监测肽的洗脱。在利用 MS 鉴定出相应合成化合物的峰后, 收集该化合物, 冷冻干燥并且进行生物学试验。利用 VG 平台 (Fisons Instruments) 仪以 ES+ 模式进行 MS。对于 NMR, 通常在 DMSO-d<sub>6</sub> (Aldrich) 中利用 Bruker Avance DPX 300 仪测定样品。

## 实施例 2: Alloc-pAph-OH 的合成

Alloc-D-pAph-OH 可以采用相同方法。

### Alloc-Phe(4-CN)-OH

5.7g (30mmol) 的 H-Phe(4-CN)-OH 溶解在 100ml 的 1M NaOH 中, 同时在冰的冷却下加入 2M NaOH 使 pH=10。剧烈搅拌下, 缓慢加入氯甲酸烯丙基酯 (7.5ml) (用 2M NaOH 维持 pH 10)。反应混合物

在 0℃ 下搅拌 15 分钟并且在 RT 下搅拌 30 分钟, 用 HCl 酸化至 pH=2, 用乙酸乙酯提取 (3 次), 用硫酸镁干燥并且蒸发。残余物用乙酸乙酯/己烷重结晶, 得到白色固体。收率: 7.0g (85%)。

#### Alloc-Phe(4-C(=S)-NH<sub>2</sub>)-OH

将 2.74g Alloc-Phe(4-CN)-OH 溶解在吡啶 (50ml) 和三乙胺 (20ml) 的混合物中并且通入 30 分钟的 H<sub>2</sub>S。RT 下将该反应混合物放置过夜并且蒸发。高真空干燥, 得到固体泡沫的 3.21g 硫代酰胺粗品, 其直接转化未甲基硫代酰亚胺酸酯。

#### Alloc-Phe(4-C(=NH)-SCH<sub>3</sub>)-OH · HI

1g Alloc-Phe(4-C(=S)-NH<sub>2</sub>)-OH 溶解在丙酮 (50ml) 中, 加入碘甲烷 (5ml)。RT 下将该反应混合物放置过夜, 蒸发掉挥发性溶剂 (快速, 最高 35℃), 用乙醚处理残余物。0℃ 下 1 小时后, 倾析醚, 产物用乙醚洗涤并且真空干燥。得到黄色固体泡沫, 其直接转化为脒。

#### Alloc-pAph-OH

将上述全部 Alloc-Phe(4-C(=NH)-SCH<sub>3</sub>)-OH · HI 溶解在有 300μl 的乙酸 50ml 甲醇中, 加入 0.5g 乙酸铵。将该混合物在 55℃ 下加热 3 小时, 蒸发并且加入 10ml 丙酮。0℃ 下 2 小时后, 过滤该固体产物, 用少量冷的丙酮、少量冷的甲醇和乙醚洗涤, 真空干燥, 得到黄色固体。收率: 0.53g。

#### 实施例 3: Alloc-pAph-Glu-Arg-Cha-NH<sub>2</sub> 的合成

将 Korr 酰胺接头结合在 1g 的 TentaGel S NH<sub>2</sub> 树脂 (取代: 0.26mmol/g)。按照实施例 1 所述的通用方法, 偶联下列保护氨基酸: Fmoc-Cha-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH 和 Alloc-pAph。裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲烷 (95/5) 脱保护 3 小

时,按照实施例 1 所述方法处理。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品, MS 定性 (M+H)<sup>+</sup>: 实测值 729.1, 计算值 729.4。

#### 实施例 4: 烯丙基-NH-C(O)-pAph-Glu-Arg-Cha-NH<sub>2</sub>的合成

将 Korr 酰胺接头结合在 0.5g 的 TentaGel S NH<sub>2</sub> 树脂(取代: 0.26mmol/g)。按照实施例 1 所述的通用方法, 偶联下列保护氨基酸: Fmoc-Cha-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-glu(OtBu)-OH 和 Fmoc-Phe(4-CN)。N-末端 Fmoc 脱保护后, 树脂用 1mmol 存在于 3ml DMF 中的异氰酸烯丙基酯处理 2 小时。随后用 DMF 和三乙胺/吡啶(1/2)洗涤树脂, 用 H<sub>2</sub>S 在吡啶/三乙胺中的饱和溶液处理过夜。树脂用丙酮洗涤, 硫代酰胺树脂与碘甲烷(3ml 存在于丙酮中的 10% 碘甲烷溶液)反应 6 小时。用丙酮、甲醇洗涤甲基硫代酰亚胺盐, 用 0.2g 醋酸铵、100 $\mu$ l 醋酸在 3ml 甲醇中的溶液在 55 $^{\circ}$ C 下处理 3 小时。树脂用甲醇、DMF 和 DCM 洗涤, 裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲烷(95/5)脱保护 3 小时, 按照实施例 1 所述方法处理。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品, MS 定性 (M+H)<sup>+</sup>: 实测值 728.3, 计算值 728.4。

#### 实施例 5: Alloc-pAph-Glu-Arg-Chg-NH<sub>2</sub>的合成

将 Korr 酰胺接头结合在 1g 的 TentaGel S NH<sub>2</sub> 树脂(取代: 0.26mmol/g)。按照实施例 1 所述的通用方法, 偶联下列保护氨基酸: Fmoc-Chg-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH 和 Alloc-pAph。裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲烷(95/5)脱保护 3 小时, 按照实施例 1 所述方法处理。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品, MS 定性 (M+H)<sup>+</sup>: 实测值 715.8, 计算值 715.4。

#### 实施例 6: Alloc-D-pAph-Glu-Arg-Cha-NH<sub>2</sub>的合成

将 Korr 酰胺接头结合在 1g 的 TentaGel S NH<sub>2</sub> 树脂(取代: 0.26mmol/g)。按照实施例 1 所述的通用方法, 偶联下列保护氨基

酸：Fmoc-Cha-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH 和 Alloc-D-pAph-OH(按照与实施例 2 中 Alloc-pAph-OH 相同的方法合成)。裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲烷(95/5)脱保护 3 小时，按照实施例 1 所述方法处理。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品，MS 定性(M+H)<sup>+</sup>：实测值 729.2，计算值 729.4。

#### 实施例 7: Alloc-pAph-glu-Phe(4-胍基)-Cha-NH<sub>2</sub>的合成

将 Korr 酰胺接头结合在 0.25g 的 TentaGel S NH<sub>2</sub> 树脂(取代: 0.23mmol/g)。按照实施例 1 所述的通用方法，偶联下列保护氨基酸：Fmoc-Cha-OH, Fmoc-Phe(4-NH-C(=NBoc)-NH-Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH 和 Alloc-pAph-OH。裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲烷(95/5)脱保护 1 小时，按照实施例 1 所述方法处理。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品，MS 定性(M+H)<sup>+</sup>：实测值 777.1，计算值 777.4。

#### 实施例 8: Alloc-pAph-Glu-Dap[-C(=NH)-NH<sub>2</sub>]-Cha-NH<sub>2</sub>的合成

将 Korr 酰胺接头结合在 0.25g 的 TentaGel S NH<sub>2</sub> 树脂(取代: 0.23mmol/g)。按照实施例 1 所述的通用方法，偶联下列保护氨基酸：Fmoc-Cha-OH, Fmoc-Dap[-C(=N-Boc)-NH-Boc]-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH 和 Alloc-pAph-OH。裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲烷(95/5)脱保护 1 小时，按照实施例 1 所述方法处理。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品，MS 定性(M+H)<sup>+</sup>：实测值 729.1，计算值 729.4。

#### 实施例 9: Alloc-pAph-Glu-Dap[-C(=NH)-CH<sub>3</sub>]-Cha-NH<sub>2</sub>的合成

将 Korr 酰胺接头结合在 0.25g 的 TentaGel S NH<sub>2</sub> 树脂(取代: 0.26mmol/g)。按照实施例 1 所述的通用方法，偶联下列保护氨基酸：Fmoc-Cha-OH, Fmoc-Dap(Alloc)-OH 和 Fmoc-Glu(OtBu)-OH。带有连接的 N-末端 Fmoc 保护基，树脂用 DMF/NMM/AcOH(5/0.5/1)

混合液洗涤，并且在恒定混合以氩气流下，加入 100mg Pd(P(Ph)<sub>3</sub>)<sub>4</sub> 在 3 小时内脱保护 Alloc. 树脂用 DMF 洗涤并且用 150mg 存在于 4ml 乙醇/DMSO(3/1) 中的 2-甲基萘基乙酰基硫代酰亚胺酸酯溶液处理 1 小时。随后用 DMF 洗涤树脂，脱去 Fmoc 保护基(1+5 分钟)，并且偶联 N-末端 Alloc-pAph-OH。裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲烷(95/5)脱保护 1 小时，按照实施例 1 所述方法处理。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品，MS 定性 (M+H)<sup>+</sup>: 实测值 700.1, 计算值 700.4.

实施例 10: Alloc-pAph-Glu-Ala[3-C(=NH)-NH<sub>2</sub>]-Cha-NH<sub>2</sub> 的合成

将 Korr 酰胺接头结合在 0.25g 的 TentaGel S NH<sub>2</sub> 树脂(取代: 0.26mmol/g)。按照实施例 1 所述的通用方法，偶联下列保护氨基酸: Fmoc-Cha-OH, Fmoc-Ala(3-CN)-OH, Fmoc-Glu-(OtBu)-OH 和 Alloc-Phe(4-CN)-OH。用 H<sub>2</sub>S(RT, 15-30 分钟)饱和吡啶和三乙胺(2/1)的混合物，将该溶液加入用吡啶/三乙胺(2/1)预洗的树脂中。放置过夜后，用丙酮洗涤树脂，并且树脂用存在于丙酮中的 20% 碘甲烷溶液处理过夜。随后用丙酮和甲醇洗涤该树脂。通过将树脂与 10 当量醋酸铵在含有 5% 乙酸的甲醇中加热(水浴, 55℃, 3 小时)，使与树脂结合的甲基硫代酰亚胺盐进而转化为脒。这种最后转化之后，用甲醇、DMF、DCM 洗涤树脂。裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲烷(95/5)脱保护 1 小时，按照实施例 1 所述方法处理。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品，MS 定性 (M+H)<sup>+</sup>: 实测值 685.9, 计算值 686.4.

实施例 11: Alloc-pAph-Glu-Asn-Cha-NH<sub>2</sub> 的合成

将 Korr 酰胺接头结合在 0.125g 的 TentaGel S NH<sub>2</sub> 树脂(取代: 0.78mmol/g)。脱去 Fmoc 保护基后，按照实施例 1 所述的通用方法，偶联下列保护氨基酸: Fmoc-Cha-OH, Fmoc-Asn-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH 和 Alloc-pAph-OH。裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲

烷(95/5)脱保护 1 小时, 按照实施例 1 所述方法处理。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品, MS 定性(M+H)<sup>+</sup>: 实测值 686.9, 计算值 687.3。

#### 实施例 12: Alloc-pAph-Glu-Dab-Cha-NH<sub>2</sub>的合成

将 Korr 酰胺接头结合在 0.25g 的 TentaGel S NH<sub>2</sub>树脂(取代: 0.26mmol/g)。按照实施例 1 所述的通用方法, 偶联下列保护氨基酸: Fmoc-Cha-OH, Fmoc-Dab(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH 和 Alloc-pAph。裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲烷(95/5)脱保护 1 小时, 按照实施例 1 所述方法处理。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品, MS 定性(M+H)<sup>+</sup>: 实测值 673.2, 计算值 673.4。

#### 实施例 13: Alloc-pAph-Glu-Ala[3-C(=NH)-NH<sub>2</sub>]-NH<sub>2</sub>的合成

将 Korr 酰胺接头结合在 0.25g 的 TentaGel S NH<sub>2</sub>树脂(取代: 0.26mmol/g)。按照实施例 1 所述的通用方法, 偶联下列保护氨基酸: Fmoc-Ala(3-CN)-OH, Fmoc-Glu-(OtBu)-OH 和 Alloc-Phe(4-CN)-OH。用 H<sub>2</sub>S(RT, 15-30 分钟)饱和吡啶和三乙胺(2/1)的混合物, 将该溶液加入用吡啶/三乙胺(2/1)预洗涤的树脂中。放置过夜后, 用丙酮洗涤树脂, 并且树脂用存在于丙酮中的 20% 碘甲烷溶液处理过夜。随后用丙酮和甲醇洗涤该树脂。通过将树脂与 10 当量醋酸铵在含有 5% 乙酸的甲醇中加热(55℃, 水浴, 3 小时), 使与树脂结合的甲基硫代酰亚胺盐进而转化为脒。这种最后转化之后, 用甲醇、DMF、DCM 洗涤树脂。裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲烷(95/5)脱保护 1 小时, 按照实施例 1 所述方法处理。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品, MS 定性(M+H)<sup>+</sup>: 实测值 533.3, 计算值 533.2。

#### 实施例 14: Alloc-pAph-Glu-Gly-Cha-NH<sub>2</sub>的合成

在脱去 Fmoc 保护基后, 按照实施例 1 所述的通用方法, 向

0.150g 的 Rink 树脂(取代: 0.78mmol/g)偶联下列保护氨基酸: Fmoc-Cha-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH 和 Alloc-pAph-OH。裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲烷(95/5)脱保护 1 小时, 按照实施例 1 所述方法处理。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品, MS 定性(M+H)<sup>+</sup>: 实测值 630.1, 计算值 630.3。

#### 实施例 15: Alloc-pAph-Glu-Asn-(Ph-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)Gly-NH<sub>2</sub> 的合成

对于 N-取代甘氨酸, 采用 Zuckermann 等人(《美国化学学会会志》114(1992)10646, 该文献在此引入作为参考)的方法。脱去 Fmoc 保护基后, 向 0.1g 的 Rink 树脂(取代: 0.78mmol/g)通过对称酐在 DCM/DMF 中偶联溴乙酸。10 分钟后, 用 DCM 洗涤树脂并且再反复一次。用 DCM 和 DMF 洗涤后, 树脂用 1M 存在于 DMSO 中的 2-苯基乙基胺溶液处理。用 DMF 洗涤后, 树脂现带有结合在接头上的(Ph-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)NH-CH<sub>2</sub>-C(O)残基, 令该树脂与 Fmoc-Asn(Trt)-OH 的对称酐在 DCM/DMF 中反应。脱去 Fmoc 保护基后, 按照实施例 1 的通用方法, 偶联下列保护氨基酸: Fmoc-Glu(OtBu)-OH 和 Alloc-pAph-OH。裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲烷(95/5)脱保护 1 小时, 按照实施例 1 所述方法处理。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品, MS 定性(M+H)<sup>+</sup>: 实测值 649.9, 计算值 695.3。

#### 实施例 16: Alloc-pAph-Glu-Thr(Bzl)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)<sub>2</sub> 的合成 H-Thr(Bzl)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)<sub>2</sub> · HCl

将 0.62g(2mmol) Boc-Thr(Bzl)-OH 溶解在 10ml DCM 中, 加入 2mmol 三乙胺并且将该溶液冷却至 0℃。搅拌下, 缓慢加入 2mmol 氯甲酸异丁酯。撤去冷却浴, 将该溶液搅拌 15 分钟, 加入 2.5mmol 存在于 2ml DMF 中的 3,3-二苯基丙基胺并且在室温下搅拌 1 小时。蒸发该溶液, 溶解在乙酸乙酯中并且用 0.5M KHSO<sub>4</sub> 溶液、饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液和盐水提取, 用硫酸镁干燥并且蒸发。将油性产物溶解在 10ml DCM 中, 加入 10ml 存在于二噁烷中的 4M 盐酸溶液。10 分钟后, 蒸

发溶剂，产物的盐酸盐用乙醚沉淀，过滤，用乙醚洗涤并且真空干燥，得到白色固体。MS分析： $(M+H)^+$ ：实测值 403.1，计算值 403.2。

Alloc-pAph-Glu-Thr(Bzl)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)<sub>2</sub>

向 0.5g TentaGel S NH<sub>2</sub>树脂(取代: 0.26mmol/g)连接 4-羟甲基苯氧基乙酸(3 当量, 用 DIC/HOBt 活化 1.5 小时)。采用 DIC/HOBt/NMI 在 DMF 中过夜使 Fmoc-Glu(OH)-O-烯丙基经侧链连接在树脂上。在氩气下在 DMF/AcOH/NMM (10/2/2) 中振荡树脂与 Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> 4 小时可脱去烯丙基保护基。脱保护羧基用 0.5mmol BOP、0.5mmol HOBt、1.5mmol DIEA 和 0.5mmol 的 H-Thr(Bzl)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(Ph)<sub>2</sub>·HCl 在 1.5ml DMF 中的溶液活化 2 小时。脱去 Fmoc 保护基后, 按照实施例 1 的通用方法偶联 Alloc-pAph-OH。裂解下肽并且用 TFA/苯硫基甲烷(95/5)脱保护 1.5 小时, 按照实施例 1 所述方法处理。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品, MS 定性  $(M+H)^+$ : 实测值 805.0, 计算值 805.4。

实施例 17: Alloc-pAph-Glu-Dab-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph 的合成

向 0.2g TentaGel S NH<sub>2</sub>树脂(取代: 0.26mmol/g)连接 4-羟甲基苯氧基乙酸(2.5 当量, 用 DIC/HOBt 活化 4 小时)。通过用 CBr<sub>4</sub>(5 当量)/PPh<sub>3</sub>(5 当量)在 DCM 中处理 4 小时可以用溴置换羟基。该溴衍生树脂用 2M 存在于 DCM 中的苯基乙基胺溶液处理过夜。利用 TFFH/DIEA 将 Fmoc-Dab(Boc)-OH 偶联在树脂上(就地生成酰氟)。按照实施例 1 的通用方法偶联下列氨基酸: Fmoc-Glu(OtBu)-OH 和 Alloc-pAph-OH。裂解下肽并且用 TFA/三异丙基硅烷(99/1)脱保护 2 小时。蒸发 TFA, 将肽溶解在 H<sub>2</sub>O/ACN 中并且冷冻干燥。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品, MS 定性  $(M+H)^+$ : 实测值 624.2, 计算值 624.3。

实施例 18: Alloc-pAph-Glu-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CN 的合成

向 0.2g TentaGel S NH<sub>2</sub> 树脂(取代: 0.26mmol/g)连接 4-羟甲基苯氧基乙酸(3 当量, 用 DIC/HOBt 活化 1.5 小时)。采用 DIC/HOBt/NMI 在 DMF 中过夜使 Fmoc-Glu(OH)-O-烯丙基经侧链连接在树脂上。在氩气下在 DMF/AcOH/NMM (10/2/2) 中振摇树脂与 Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> 4 小时可脱去烯丙基保护基。脱保护羧基用 DIC(3 当量)/HOBt(3 当量)活化 10 分钟, 向该树脂中在 3 小时内加入存在于 DMF 中的 2-氨基乙胺(3 当量)。脱去 Fmoc 保护基后, 按照实施例 1 的通用方法偶联 Alloc-pAph-OH。裂解下肽并且用 TFA/三异丙基硅烷(99/1)脱保护 2 小时, 蒸发 TFA, 将肽溶解在 H<sub>2</sub>O/ACN 中并且冷冻干燥。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品, MS 定性(M+H)<sup>+</sup>: 实测值 473.1, 计算值 473.2。

#### 实施例 19: Alloc-pAph-Glu-Asn-NH-CH<sub>2</sub>-Chx 的合成

向 0.1g TentaGel S NH<sub>2</sub> 树脂(取代: 0.26mmol/g)连接 Knorr 酰胺接头。Fmoc-Asp(OH)-O-烯丙基经侧链偶联在接头并且按照实施例 18 脱去烯丙基保护基。脱保护羧基用 DIC(5 当量)/HOBt(5 当量)活化, 并且向该树脂中在 2.5 小时内加入存在于 DMF 中的环己基甲基胺(5 当量)。脱去 Fmoc 保护基后, 按照实施例 1 的通用方法偶联 Fmoc-Glu(OtBu)-OH 和 Alloc-pAph-OH。裂解下肽并且用 TFA/三异丙基硅烷(99/1)脱保护 2 小时, 蒸发 TFA, 将肽溶解在 H<sub>2</sub>O/ACN 中并且冷冻干燥。利用实施例 1 中所述的 HPLC 方法纯化化合物粗品, MS 定性(M+H)<sup>+</sup>: 实测值 629.9, 计算值 630.3。

#### 实施例 20: Alloc-pAph-Glu-Asn-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph 的合成

2-(S)-[2-(S)-烯丙氧羰基氨基-3-(4-亚氨基氨基甲酰基(carbamimidoyl)-苯基)-丙酰氨基]-戊二酸-5-叔丁酯-1-甲酯盐酸盐

在-15℃下, 向存在于 20ml DMF 中的 2-(S)-烯丙氧羰基氨基-3-(4-亚氨基氨基甲酰基-苯基)-丙酸盐(3.48g, 10.6mmol)

和 2-(S)-氨基-戊二酸 5-叔丁酯 1-甲酯盐酸盐 (2.7g, 10.6mmol) 中加入 TOTU (3.83g, 11.67mmol) 和 N-乙基吗啉 (2.7ml, 21.2mmol)。将混合物搅拌 1 小时, 随后升至室温。蒸发后, 向残余物中加入乙酸乙酯, 有机层用碳酸氢钠水溶液、硫酸氢钾和水提取。蒸发有机层。收率: 2.8g (50%)。MS:  $m/z=491.3(M+H)^+$ 。

2-(S)-[2-(S)-烯丙氧基羰基氨基-3-(4-亚氨基氨基甲酰基-苯基)-丙酰基氨基]-戊二酸 5-叔丁酯

向存在于 100ml 水和 30ml THF 中的 2-(S)-[2-(S)-烯丙氧基羰基氨基-3-(4-亚氨基氨基甲酰基-苯基)-丙酰基氨基]-戊二酸 5-叔丁酯 1-甲酯盐酸盐 (3.06g, 5.8mmol) 中加入氢氧化锂水合物 (0.49g, 11.6mmol)。室温下将该溶液搅拌 12 小时, 蒸发并且冷冻干燥。在 Sephadex LH20 上用正丁醇/冰醋酸/水 (17/1/2) 作为洗脱剂通过层析纯化残余物。合并纯的馏分。蒸发溶剂, 将残余物溶解在水中并且将该水溶液冷冻干燥。收率: 2.7g (97%)。MS:  $m/z = 477.4 (M+H)^+$ 。

4-(S)-[2-(S)-烯丙氧基羰基氨基-3-(4-亚氨基氨基甲酰基-苯基)-丙酰基氨基]-4-(2-氨基甲酰基-1-(S)-(2-苯基乙基氨基甲酰基)-乙基氨基甲酰基)-丁酸盐酸盐 (Alloc-pAph-Glu-Asn-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Ph)

0℃下, 向存在于 5ml DMF 中的 2-(S)-[2-(S)-烯丙氧基羰基氨基-3-(4-亚氨基氨基甲酰基-苯基)-丙酰基氨基]-戊二酸 5-叔丁酯 (48mg, 0.1mmol) 和 2-(S)-氨基-N1-苯基乙基-琥珀酰胺盐酸盐 (27mg, 0.1mmol) 中加入 HATU (39mg, 0.1mmol) 和三甲吡啶 (24.3mg, 0.2mmol)。将该混合物搅拌 1 小时, 随后升至室温。蒸发后, 在 Sephadex LH20 上用正丁醇/冰醋酸/水 (17/1/2) 作为洗脱剂通过层析纯化残余物。合并纯的馏分。蒸发溶剂, 将残余物溶解在水中并且将该水溶液冷冻干燥。收率: 45mg (66%)。MS:  $m/z = 638.4$

(M+H)<sup>+</sup>。

#### 实施例 21: Alloc-pAph-Glu-Asn-NH-(3-氯苄基)的合成

0℃下,向存在于 5ml DMF 中的 2-(S)-[2-(S)-烯丙氧基羰基氨基-3-(4-亚氨基氨基甲酰基-苯基)-丙酰基氨基]-戊二酸 5-叔丁酯 (50mg, 0.105mmol) 和 2-(S)-氨基-N1-(3-氯苄基)琥珀酰胺三氟乙酸盐 (61mg, 0.16mmol) 中加入 TOTU (36mg, 0.11mmol) 和 N-乙基吗啉 (57μl, 0.4mmol)。将该混合物搅拌 1 小时,随后升至室温。蒸发后,残余物在 Sephadex LH20 上用正丁醇/冰醋酸/水 (17/1/2) 作为洗脱剂通过层析纯化。合并纯的馏分。蒸发溶剂,将残余物溶解在水中并且将该水溶液冷冻干燥。4-(S)-[2-(S)-烯丙氧基羰基氨基-3-(4-亚氨基氨基甲酰基(carbamimidoyl)-苯基)丙酰基氨基]-4-(2-氨基甲酰基-1-(S)-(3-氯苄基氨基甲酰基)-乙基氨基甲酰基)-丁酸 (Alloc-pAph-Glu-Asn-NH-(3-氯苄基)或 Alloc-pAph-Glu-Asn-NH-3-氯苄基酰胺) 的收率: 28mg (41%)。MS: m/z = 658.3 (M+H)<sup>+</sup>。

按照类似于上述实施例的方法也可以制备表 2 中所列的其它举例化合物。

#### 实施例 22: 凝血因子 VIIa 抑制的 Ki 的测定

基本上按照以前公开的方法 (J. A. Ostrem, F. Al-Obeidi, P. A. Sadarova, S. K. Stringer, M. Patek, M. T. Cross, J. Spoonamore, J. C. Locascio, P. Kasireddy, D. S. Thorpe, N. Sepetov, M. Lebl, P. Wildgoose, P. Strop, “通过组合化学法发现的新的、有效的和特异族的凝血因子 Xa 抑制剂”, 《生物化学》37(1998) 1053-1059), 利用显色分析法测定各化合物对于凝血因子 VIIa/组织因子活性的抑制活性 (Ki)。25℃下,在半区微量滴定平板 (Costar Corp. Cambridge, MA) 中用动力学平板读数器 (Molecular Devices Spectramax 250) 进行动力学试验。典型的试

验是由 25 $\mu$ l 人凝血因子 VIIa 和 TF (5nM 和 10nM, 其各自的终浓度) 与 40 $\mu$ l 在 10% DMSO/TBS-PEG 缓冲液 (50mM Tris, 15mM NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>; 0.05% PEG 8k, pH 8.15) 中的抑制剂稀释液组成。15 分钟的预培养期后, 通过加入 35 $\mu$ l 显色底物 S-2288 (D-Ile-Pro-Arg-pNA, Pharmacia Hepar Inc, 500 $\mu$ M 终浓度) 引发试验。在时间过程的线性部分中, 通常在加入底物后 1 至 5 分钟的试验期间, 由进度曲线的斜率计算出表观抑制常数。随后利用  $K_i = K_{i\text{ app}} / (1 + (S) / K_m)$  (I. H. Segal, 《酶动力学》100-125 页 (John Wiley & Sons, New York, 1975)) 通过修正底物浓度 (S) 和  $K_m$  测定出各个化合物的真实  $K_i$ 。