[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl[6]
C07K 5/023
C07K 5/027 A61K 38/04

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 97192762.6

[43]公开日 1999年3月31日

[11]公开号 CN 1212706A

[22]申请日 97.2.11 [21]申请号 97192762.6

[30]优先权

[32]96.2.13 [33]EP [31]96200334.9

[32]96.2.19 [33]EP [31]96200421.4

[32]96.8.23 [33]EP [31]96202337.0

[86]国际申请 PCT/EP97/00625 97.2.11

[87]国际公布 WO97/30073 英 97.8.21

[85]进入国家阶段日期 98.9.2

[71]申请人 阿克佐诺贝尔公司

地址 荷兰阿纳梅

[72]发明人 P·D·J·格鲁顿胡伊斯

A·P·A·迪曼

A·E·P·阿丹

[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

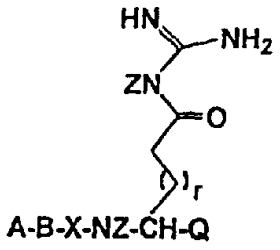
代理人 郭建新

权利要求书5页 说明书33页 附图页数0页

[54]发明名称 丝氨酸蛋白酶抑制剂

[57]摘要

本发明涉及具有式(Ⅰ)的化合物,其中A、B、X、N、Z和Q如说明书中 所定义。本发明的化合物具有抗凝血活性,且可以用于治疗或防止与凝血酶相 关的疾病。

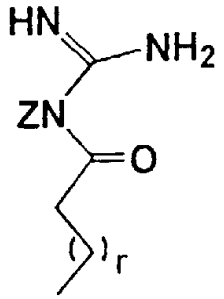


(I)

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1. 一种式I化合物:



A-B-X-NZ-CH-Q (I)

其中

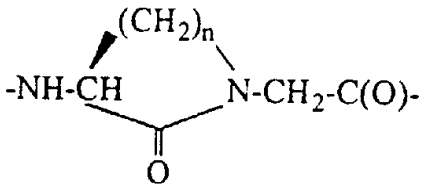
A是H、任选取代的D,L α-羟基乙酰基、R^1、R^1-O-C(O)-、R^1-C(O)-、R^1-SO_2-、R^2OOC-$(CHR^2)_m$-SO_2-、R^2OOC-$(CHR^2)_m$-、H_2NCO-$(CHR^2)_m$-、或N-保护基团，其中R^1选自(1-12C)烷基、(2-12C)链烯基、(2-12C)炔基和(3-8C)环烷基，这些基团可任选由(3-8C)环烷基、(1-6C)烷氧基、氧代、OH、COOH、CF_3或卤素取代，和选自(6-14C)芳基、(7-15C)芳烷基和(8-16C)芳链烯基，它们中的芳基可以任选由(1-6C)烷基、(3-8C)环烷基、(1-6C)烷氧基、OH、COOH、CF_3或卤素取代；每个基团R^2独立地是H或具有与R^1相同的含意；m是1、2或3;

B是一个键，式-NH-CH[$(CH_2)_p$C(O)OH]-C(O)-的氨基酸或其酯衍生物且p是0、1、2或3，-N((1-12C)烷基)-CH_2-CO-、-N((2-12C)链烯基)-CH_2-CO-、-N((2-12C)炔基)-CH_2-CO-、-N(苄基)-CH_2-CO-、D-1-Tiq、D-3-Tiq、D-Atc、Aic、D-1-Piq、D-3-Piq或具有疏水、碱性或中性侧链的L-或D-氨基酸，这些氨基酸可以任选是N-(1-6C)烷基取代的;

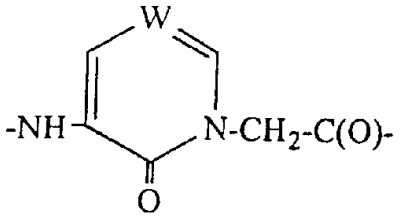
或A与B一起是残基R^3R^4N-CHR^5-C(O)-，其中R^3和R^4独立地是R^1、R^1-O-C(O)-、R^1-C(O)-、R^1-SO_2-、R^2OOC-$(CHR^2)_m$-SO_2-、R^2OOC-$(CHR^2)_m$-、H_2NCO-$(CHR^2)_m$-、或N-保护基团，或R^3和R^4之一与R^5相连与它们键合的“N-C”一起形成5-或6-元环，这些环可以与

脂族或芳族6-元环稠合；且R^5是疏水、碱性或中性侧链；

X是带有疏水侧链的L-氨基酸、丝氨酸、苏氨酸、任选含有另外的选自N、O或S的杂原子和任选由(1-6C)烷基、(1-6C)烷氧基、苄氧基或氧代取代的环状氨基酸，或X是$-NR^2-CH_2-C(O)-$或片断



或



，

其中n是2、3或4，且W是CH或N；

Q是H或$-C(O)Y$，其中Y是H、$-CHF_2$、$-CF_3$、-CO-NH-(1-6C)亚烷基$-C_6H_5$、$-COOR^6$且R^6是H或(1-6C)烷基、$-CONR^7R^8$且R^7和R^8独立地是H或(1-6C)烷基或R^7和R^8一起是(3-6C)亚烷基，或Y是选自下列的杂环：2-噻唑、2-噻唑啉、2-苯并噻唑、2-噁唑、2-噁唑啉和2-苯并噁唑，这些杂环可任选由(1-6C)烷基、(1-6C)烷氧基或氧代取代；

Z是H或(1-6C)烷基；

如果Q是$-C(O)Y$，r是0或1，或如果Q是H，r是0、1、2、3或4；

或其前药或其可药用的盐。

2. 权利要求1的化合物，其中X是带有疏水侧链的L-氨基酸、丝氨酸、苏氨酸或$-NR^2-CH_2-C(O)-$；Z是H或甲基。

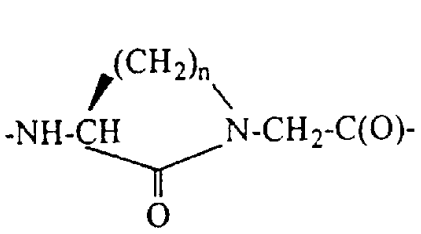
3. 权利要求1的化合物，其中A如前面所定义；

B是一个键，式$-NH-CH[(CH_2)pC(O)OH]-C(O)-$的氨基酸或其酯衍生物且p是0、1、2或3，$-N((1-6C)烷基)-CH_2-CO-$、$-N((2-6C)链烯基)-CH_2-CO-$、$-N(苄基)-CH_2-CO-$、D-1-Tiq、D-3-Tiq、D-Atc、Aic、D-1-Piq、D-3-Piq或具有疏水侧链的D-氨基酸，这些氨基酸可以任选是N-(1-6C)烷基取代的；

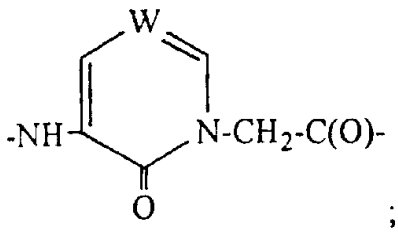
或A与B一起是残基$R^3R^4N-CHR^5-C(O)-$；

X是任选含有另外的选自N、O或S的杂原子和任选由(1-6C)烷基、

(1-6C)烷氧基、苄氧基或氧代取代的环状氨基酸，或X是-NR^2-CH_2-C(O)-或片断



或



;

且Z是H或甲基。

4. 权利要求3的化合物，其中A是H、2-羟基-3-环己基-丙酰基-、9-羟基-芴-9-羰基、R^1、R^1-SO_2-、R^2OOC-$(CHR^2)_m$-SO_2-、R^2OOC-$(CHR^2)_m$-、H_2NCO-$(CHR^2)_m$-、或N-保护基团，其中R^1选自(1-12C)烷基、(2-12C)链烯基、(6-14C)芳基、(7-15C)芳烷基和(8-16C)芳链烯基；每个基团R^2独立地是H或具有与R^1相同的含意；

B是一个键，D-1-Tiq、D-3-Tiq、D-Atc、Aic、D-1-Piq、D-3-Piq或具有疏水侧链的D-氨基酸，这些氨基酸可以任选是N-(1-6C)烷基取代的；

或A与B一起是残基R^3R^4N-CHR^5-C(O)-；

Y是-CO-NH-(1-6C)亚烷基-C_6H_5、-$COOR^6$、-$CONR^7R^8$，或Y是选自下列的杂环：2-噻唑、2-噻唑啉、2-苯并噻唑、2-噁唑、2-噁唑啉和2-苯并噁唑。

5. 权利要求4的化合物，其中A是R^1-SO_2-、R^2OOC-$(CHR^2)_m$-；

B是一个键，D-1-Tiq、D-3-Tiq、D-Atc、Aic、D-1-Piq、D-3-Piq或具有疏水侧链的D-氨基酸；

或A与B一起是残基R^3R^4N-CHR^5-C(O)-，其中至少R^3和R^4之一是R^2OOC-$(CHR^2)_m$-或R^1-SO_2-，另一个独立地是(1-12C)烷基、(2-12C)链烯基、(2-12C)炔基、(3-8C)环烷基、(7-15C)芳烷基、R^1-SO_2-或

$R^2OOC-(CHR^2)m-$，且R^5是疏水侧链；

Y是-CO-NH-(1-6C)亚烷基-C_6H_5、$-COOR^6$且R^6是H或(1-3C)烷基、$-CONR^7R^8$，R^7和R^8独立地是H或(1-3C)烷基或R^7和R^8一起是(3-5C)亚烷基，或Y是选自下列的杂环：2-噻唑、2-苯并噻唑、2-噁唑或2-苯并噁唑。

6. 权利要求5的化合物，其中A是$R^2OOC-(CHR^2)m-$；

B是具有疏水侧链的D-氨基酸；

或A与B一起是残基$R^3R^4N-CHR^5-C(O)-$，其中至少R^3和R^4之一是$R^2OOC-(CHR^2)m-$且另一个独立地是(1-12C)烷基、 (3-8C)环烷基、R^1-SO_2-或$R^2OOC-(CHR^2)m-$；

和X是2-氮杂环丁烷羧酸、脯氨酸、2-哌啶酸、4-噻唑烷羧酸、3,4-脱氢-脯氨酸、2-八氢吲哚羧酸。

7. 权利要求6的化合物，其中A是$HOOC-CH_2-$；

B是D-Phe、D-Cha、D-Coa、D-Dpa、p-Cl-D-Phe、p-OMethyl-D-Phe、p-OEthyl-D-Phe、D-Nle、m-Cl-D-Phe、3,4-二-OMe-D-Phe、D-Chg；

或A与B一起是残基$R^3R^4N-CHR^5-C(O)-$，其中至少R^3和R^4之一是$HOOC-CH_2-$且另一个独立地是甲基、(1-4C)烷基-SO_2-或$HOOC-CH_2-$，且R^5是(3-8C)环烷基、(3-8C)环烷基(1-4C)烷基、苯基、苄基、任选由氯或(1-4C)烷氧基取代。

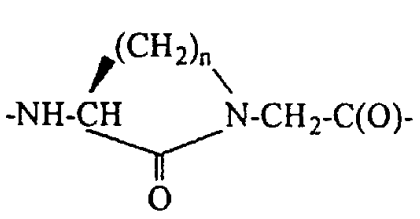
8. 权利要求5的化合物，其中A是R^1-SO_2-；

B是一个键、D-1-Tiq、D-3-Tiq、D-Atc、Aic、D-1-Piq、D-3-Piq或具有疏水侧链的D-氨基酸；

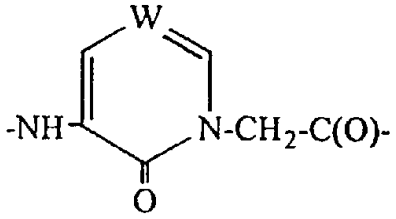
或A与B一起是残基$R^3R^4N-CHR^5-C(O)-$，其中至少R^3和R^4之一是R^1-SO_2-且另一个独立地是(1-12C)烷基或R^1-SO_2-；

X是2-氮杂环丁烷羧酸、脯氨酸、2-哌啶酸、4-噻唑烷羧酸、3,4-脱

氢-脯氨酸、2-八氢吲哚羧酸或片断



或



9. 权利要求8的化合物，其中A是乙基-SO_2-或苄基-SO_2-；

B是一个键、D-Phe、D-Cha、D-Coa、D-Dpa、p-Cl-D-Phe、p-OMethyl-D-Phe、p-OEthyl-D-Phe、D-Nle、m-Cl-D-Phe、3,4-二-OMe-D-Phe、D-Chg；

或A与B一起是残基R^3R^4N-CHR^5-C(O)-，其中至少R^3和R^4之一是乙基-SO_2-或苄基-SO_2-且另一个独立地是(1-12C)烷基或R^1-SO_2-，且R^5是(3-8C)环烷基、(3-8C)环烷基(1-4C)烷基、苯基、苄基、二苯基次甲基，这些基团任选由氯或(1-4C)烷氧基取代。

10. 权利要求5至9任一项的化合物，其中Q是H且r是0、1或2。

11. 一种药物组合物，它包含权利要求1至10中任一项的化合物和可药用的辅助剂。

12. 用于治疗的权利要求1至10任一项的化合物。

13. 权利要求1至10任一项的化合物在生产用于治疗或防止与凝血酶相关的疾病的药物中的应用。

说　明　书

丝氨酸蛋白酶抑制剂

本发明涉及具有酰基胍侧链的丝氨酸蛋白酶抑制剂，含有它的药物组合物，以及所述的抑制剂在治疗和防止与凝血酶相关的疾病中的应用。

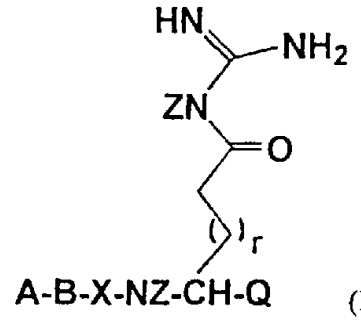
丝氨酸蛋白酶除了别的作用之外，主要是在凝血级联(cascade)中起重要作用。这组蛋白酶的成员是例如凝血酶、胰蛋白酶、凝血因子VIIa、IXa、Xa、XIa、XIIa和C蛋白。

凝血酶是调节凝血级联的最后步骤的丝氨酸蛋白酶。凝血酶的基本功能是切割血纤蛋白原，产生血纤蛋白单体，后者通过交联形成不溶性的凝胶。此外，凝血酶通过在级联的早期活化凝血因子V和VIII来调节凝血酶自身的生产。它在细胞水平也具有重要的作用，在细胞水平，它作用于特定的受体，造成血小板凝集，内皮细胞活化和成纤维细胞增生。因此凝血酶在血停滞和血栓形成中具有中心调节作用。由于凝血酶抑制剂具有广泛的治疗应用，在此领域已进行了详尽的研究。

在丝氨酶蛋白酶，特别是凝血酶的合成抑制剂的开发中，对那些以类似于天然底物的方式被蛋白水解酶识别的小的合成肽的兴趣再增加。结果，制备出新的肽样抑制剂，如凝血酶的转换状态抑制剂和低分子量凝血酶抑制剂Inogatran(Thromb. Haemostas. 1995, 73:1325(Abs.1633); WO 93/11152(实施例67)，据公开它是潜在的选择性凝血酶抑制剂。相关的化合物描述于WO 95/23609中；与Inogatran及其类似物相比，公开于本专利申请的化合物在胍基丁胺样基团具有芳基。

对更有效、更有选择性的凝血酶抑制剂的研究有增无减，为的是获得可以以更低剂量给药且具有更少和更轻的副作用的凝血酶抑制剂。

现已发现一类新的极其有潜力的具有式I的丝氨酸蛋白酶抑制剂，特别是选择性的凝血酶或Xa抑制剂，或其前药或其可药用的盐:



(I)

其中

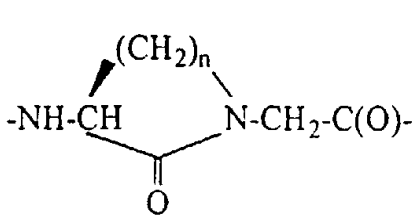
A是H、任选取代的D,L α-羟基乙酰基、R^1、R^1-O-C(O)-、R^1-C(O)-、R^1-SO_2-、R^2OOC-$(CHR^2)_m$-SO_2-、R^2OOC-$(CHR^2)_m$-、H_2NCO-$(CHR^2)_m$-、或N-保护基团，其中R^1选自(1-12C)烷基、(2-12C)链烯基、(2-12C)炔基和(3-8C)环烷基，这些基团可任选由(3-8C)环烷基、(1-6C)烷氧基、氧代、OH、COOH、CF_3或卤素取代，和选自(6-14C)芳基、(7-15C)芳烷基和(8-16)芳链烯基，它们中的芳基可以任选由(1-6C)烷基、(3-8C)环烷基、(1-6C)烷氧基、OH、COOH、CF_3或卤素取代；每个基团R^2独立地是H或具有与R^1相同的含意；m是1、2或3；

B是一个键，式-NH-CH[$(CH_2)_p$C(O)OH]-C(O)-的氨基酸或其酯衍生物且p是0、1、2或3，-N((1-12C)烷基)-CH_2-CO-、-N((2-12C)链烯基)-CH_2-CO-、-N((2-12C)炔基)-CH_2-CO-、-N(苄基)-CH_2-CO-、D-1-Tiq、D-3-Tiq、D-Atc、Aic、D-1-Piq、D-3-Piq或具有疏水、碱性或中性侧链的L-或D-氨基酸，这些氨基酸可以任选是N-(1-6C)烷基取代的；

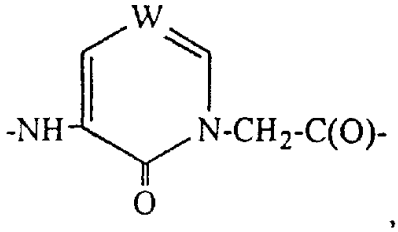
或A与B一起是残基R^3R^4N-CHR^5-C(O)-，其中R^3和R^4独立地是R^1、R^1-O-C(O)-、R^1-C(O)-、R^1-SO_2-、R^2OOC-$(CHR^2)_m$-SO_2-、R^2OOC-$(CHR^2)_m$-、H_2NCO-$(CHR^2)_m$-、或N-保护基团，或R^3和R^4之一与R^5相连与它们键合的“N-C”一起形成5-或6-元环，这些环可以与脂族或芳族6-元环稠合；且R^5是疏水、碱性或中性侧链；

X是带有疏水侧链的L-氨基酸、丝氨酸、苏氨酸、任选含有另外的选自N、O或S的杂原子和任选由(1-6C)烷基、(1-6C)烷氧基、苄氧基或

氧代取代的环状氨基酸，或X是$-NR^2-CH_2-C(O)-$或片断



或



其中n是2、3或4，且W是CH或N；

Q是H或$-C(O)Y$，其中Y是H、$-CHF_2$、$-CF_3$、$-CO-NH-$(1-6C)亚烷基$-C_6H_5$、$-COOR^6$且R^6是H或(1-6C)烷基、$-CONR^7R^8$且R^7和R^8独立地是H或(1-6C)烷基或R^7和R^8一起是(3-6C)亚烷基，或Y是选自下列的杂环：2-噻唑、2-噻唑啉、2-苯并噻唑、2-噁唑、2-噁唑啉和2-苯并噁唑，这些杂环可任选由(1-6C)烷基、(1-6C)烷氧基或氧代取代；

Z是H或(1-6C)烷基；

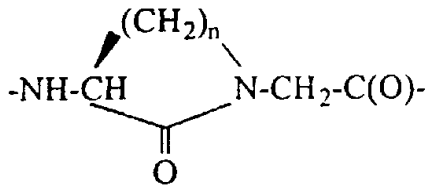
如果Q是$-C(O)Y$，r是0或1，或如果Q是H，r是0、1、2、3或4。

本发明化合物可用于治疗和预防凝血酶介导和与凝血酶相关的疾病。这些疾病包括许多凝血级联被活化的血栓形成和前血栓形成病症，这些病症包括但不限于，深处静脉血栓形成、肺栓塞、血栓性静脉炎、血栓形成或栓塞造成的动脉闭塞、在血管成形术或血栓溶解期间或之后的动脉再闭塞、动脉损伤或侵害性心脏病学操作后的再狭窄、术后静脉血栓形成或栓塞、急性或慢性动脉粥样硬化、中风、心肌梗死、癌症和转移瘤、以及神经变性疾病。本发明化合物也可以在体外血液循环中，如果需要在透析和手术中用作抗凝血剂。本发明化合物也可以用作体外抗凝血剂。

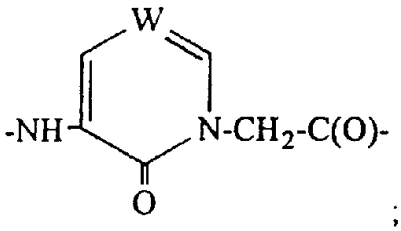
优选的本发明化合物具有式I，其中X是带有疏水侧链的L-氨基酸、丝氨酸、苏氨酸或$-NR^2-CH_2-C(O)-$；且Z是H或甲基。

其它优选的式I化合物是这样的化合物，其中A如前面所定义；B是一个键，式$-NH-CH[(CH_2)pC(O)OH]-C(O)-$的氨基酸或其酯衍生物且p是0、1、2或3，$-N$((1-6C)烷基)$-CH_2-CO-$、$-N$((2-6C)链烯基)$-CH_2-CO-$、$-N$(苄基)$-CH_2-CO-$、D-1-Tiq、D-3-Tiq、D-Atc、Aic、D-1-Piq、D-3-

Piq或具有疏水侧链的D-氨基酸，这些氨基酸可以任选是N-(1-6C)烷基取代的；或A与B一起是残基R^3R^4N-CHR^5-C(O)-；X是任选含有另外的选自N、O或S的杂原子和任选由(1-6C)烷基、(1-6C)烷氧基、苄氧基或氧代取代的环状氨基酸，或X是-NR^2-CH_2-C(O)-或片断



或



；

且Z是H或甲基。

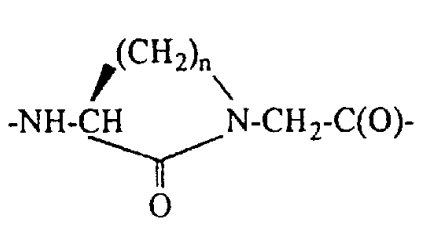
更优选的是式I化合物，其中A是H、2-羟基-3-环己基-丙酰基-、9-羟基-芴-9-羰基、R^1、R^1-SO_2-、R^2OOC-$(CHR^2)_m$-SO_2-、R^2OOC-$(CHR^2)_m$-、H_2NCO-$(CHR^2)_m$-、或N-保护基团，其中R^1选自(1-12C)烷基、(2-12C)链烯基、(6-14C)芳基、(7-15C)芳烷基和(8-16)芳链烯基；每个基团R^2独立地是H或具有与R^1相同的含意；B是一个键，D-1-Tiq、D-3-Tiq、D-Atc、Aic、D-1-Piq、D-3-Piq或具有疏水侧链的D-氨基酸，这些氨基酸可以任选是N-(1-6C)烷基取代的；或A与B一起是残基R^3R^4N-CHR^5-C(O)-；Y是-CO-NH-(1-6C)亚烷基-C_6H_5、-$COOR^6$、-$CONR^7R^8$，或Y是选自下列的杂环：2-噻唑、2-噻唑啉、2-苯并噻唑、2-噁唑、2-噁唑啉和2-苯并噁唑。

特别优选是那些化合物，其中A是R^1-SO_2-、R^2OOC-$(CHR^2)_m$-；B是一个键，D-1-Tiq、D-3-Tiq、D-Atc、Aic、D-1-Piq、D-3-Piq或具有疏水侧链的D-氨基酸；或A与B一起是残基R^3R^4N-CHR^5-C(O)-，其中至少R^3和R^4之一是R^2OOC-$(CHR^2)_m$-或R^1-SO_2-且另一个独立地是(1-12C)烷基、(2-12C)链烯基、(2-12C)炔基、(3-8C)环烷基、(7-15C)芳烷基、R^1-SO_2-或R^2OOC-$(CHR^2)_m$-，且R^5是疏水侧链；Y是-CO-NH-(1-6C)亚烷基-C_6H_5、-$COOR^6$且R^6是H或(1-3C)烷基、-$CONR^7R^8$，R^7和

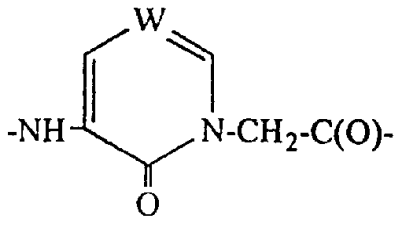
R^8独立地是H或(1-3C)烷基或R^7和R^8一起是(3-5C)亚烷基，或Y是选自下列的杂环：2-噻唑、2-苯并噻唑、2-噁唑或2-苯并噁唑。

当A是$R^2OOC-(CHR^2)_m$-时，优选B是具有疏水侧链的D-氨基酸；或A与B一起是残基$R^3R^4N-CHR^5-C(O)$-，其中至少R^3和R^4之一是$R^2OOC-(CHR^2)_m$，且另一个独立地是(1-12C)烷基、(3-8C)环烷基、R^1-SO_2-或$R^2OOC-(CHR^2)_m$-；和X是2-氮杂环丁烷羧酸、脯氨酸、2-哌啶酸、4-噻唑烷羧酸、3,4-脱氢-脯氨酸、2-八氢吲哚羧酸。最优选的是那些化合物，其中A是$HOOC-CH_2$-；B是D-Phe、D-Cha、D-Coa、D-Dpa、p-Cl-D-Phe、p-OMethyl-D-Phe、p-OEthyl-D-Phe、D-Nle、m-Cl-D-Phe、3,4-二-OMe-D-Phe、D-Chg；或A与B一起是残基$R^3R^4N-CHR^5-C(O)$-，其中至少R^3和R^4之一是$HOOC-CH_2$-且另一个独立地是甲基、(1-4C)烷基-SO_2-或$HOOC-CH_2$-，且R^5是(3-8C)环烷基、(3-8C)环烷基(1-4C)烷基、苯基、苄基、任选由氯或(1-4C)烷氧基取代。

当A是R^1-SO_2-时，优选B是一个键、D-1-Tiq、D-3-Tiq、D-Atc、Aic、D-1-Piq、D-3-Piq或具有疏水侧链的D-氨基酸；或A与B一起是残基$R^3R^4N-CHR^5-C(O)$-，其中至少R^3和R^4之一是R^1-SO_2-且另一个独立地是(1-12C)烷基或R^1-SO_2-；X是2-氮杂环丁烷羧酸、脯氨酸、2-哌啶酸、4-噻唑烷羧酸、3,4-脱氢-脯氨酸、2-八氢吲哚羧酸或片断



或



更优选的是这样的化合物，其中A是乙基-SO_2-或苄基-SO_2-；B是一个键、D-Phe、D-Cha、D-Coa、D-Dpa、p-Cl-D-Phe、p-OMethyl-D-

Phe、p-OEthyl-D-Phe、D-Nle、m-Cl-D-Phe、3,4-二-OMe-D-Phe、D-Chg；或A与B一起是残基R^3R^4N-CHR^5-C(O)-，其中至少R^3和R^4之一是乙基-SO_2-或苄基-SO_2-且另一个独立地是(1-12C)烷基或R^1-SO_2-，且R^5是(3-8C)环烷基、(3-8C)环烷基(1-4C)烷基、苯基、苄基、二苯基次甲基，这些基团任选由氯或(1-4C)烷氧基取代。

最优选的式I化合物是其中Q是H且r是0、1或2的化合物。

在基团A的定义中定义的N-保护基团是任何的用于肽的N-保护基团。适合的N-保护基团可见于T.W.Green和P.G.M Wuts: 《有机合成中的保护基团》，第二版(Wiley, 纽约, 1991)和《肽、分析、合成、生物学》，第3卷，E. Gross和J. Meienhofer编(Academic Press, 纽约，1981)。

“任选取代的D,L α-羟基乙酰基”一词是指式HO-CR^aR^b-C(O)-的基团，其中R^a和R^b独立地是H、疏水侧链，或R^a和R^b一起形成5-或6-元环，它任选与一或两个脂族或芳族6-元环稠合，且此5-或6-元环由碳原子和任选一个选自N、O和S的杂原子组成。优选的D,L α-羟基乙酰基基团是2-羟基-3-环己基-丙酰基-和9-羟基-芴-9-羧基。

“(1-12C)烷基”一词是指具有1至12个碳原子的支链或未支链化的烷基，如甲基、乙基、叔丁基、异戊基、庚基、十二烷基等。优选的烷基是(1-6C)烷基，具有1-6个碳原子。在R^6、R^7和R^8中的定义中最优选的是(1-3C)烷基，具有1-3个碳原子，如甲基、乙基、异丙基。

(2-12C)链烯基是指具有2至12个碳原子的支链或未支链化的不饱和烃基。优选的是(2-6C)链烯基。例子有乙烯基、丙烯基、烯丙基。

“(1-6C)亚烷基”一词是指具有1至6个碳原子的支链或未支链化的亚烷基，如-$(CH_2)_m$-且m是1至6，-$CH(CH_3)$-、-$CH(CH_3)$-(CH_2)-等。在Y定义中的优选的亚烷基是亚乙基和亚甲基。

(2-12C)炔基是支链或未支链化的含有一个叁键和具有2至12个碳原子的烃基。优选的是(2-6C)炔基，如乙炔基和丙炔基。

(6-14C)芳基是6-14个碳原子的芳族基团。芳基可以另含有一或多个杂原子，如N、S或O。芳基的实例是苯基、萘基、(异)喹啉基、2,3-二氢

化茚基等。最优选的是苯基。

(7-15C)芳烷基和(8-16C)芳链烯基是分别被一或多个芳基取代的烷基和链烯基，碳原子的总数分别为7-15和8-16。

“(1-6C)烷氧基”一词是指具有1-6个碳原子的烷氧基，烷基部分具有前面定义的含义。

“(3-8C)环烷基”一词是指具有3-8个碳原子的环烷基，为环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基或环辛基。环戊基和环己基是优选的环烷基。

“卤素”一词是指氟、氯、溴或碘。

“酯衍生物”一词是指任何适宜的酯衍生物，优选是(1-4C)烷基酯、如甲基-、乙基-或叔丁基酯。

1-和3-Tiq分别是指1,2,3,4-四氢异喹啉-1-或-3-羧酸；1-和3-Piq分别是指1-和3-羧基全氢异喹啉；Atc是2-氨基-1,2,3,4-四氢化萘-2-羧酸；Aic是氨基-1,2-二氢化茚-羧酸；Phe是苯丙氨酸；Cha是环己基丙氨酸；Dpa是二苯基丙氨酸；Coa是环辛基丙氨酸；Chg是环己基甘氨酸；Nle是正亮氨酸。

“疏水侧链”一词是指(1-12C)烷基，任选由一或多个(3-8C)环烷基或(6-14C)芳基(它可以含有杂原子，例如氮)如环乙基、环辛基、苯基、吡啶基、萘基、四氢化萘基等取代，这些疏水侧链可任选由取代基如卤素、三氟甲基、低级烷基(例如甲基或乙基)、低级烷氧基(例如甲氧基)、苯氧基、苄氧基等取代。

“取代的”一词是指：由一或多个取代基取代。

具有碱性侧链的氨基酸是例如，但不限于，精氨酸和赖氨酸，优选是精氨酸。“具有中性侧链的氨基酸”是指氨基酸如具有2-甲基磺酰基-乙基侧链的氨基酸(methionine sulphon)等。

环状氨基酸是例如2-氮杂环丁烷羧酸、脯氨酸、2-哌啶酸、1-氨基-1-羧基-(3-8C)环烷(优选4C、5C或6C)、4-哌啶羧酸、4-噻唑烷羧酸、3,4-脱氢-脯氨酸、氮杂脯氨酸、2-八氢吲哚羧酸等。优选的是2-氮杂环丁烷羧酸、脯氨酸、2-哌啶酸、4-噻唑烷羧酸、3,4-脱氢-脯氨酸和2-八氢吲哚

羧酸。

“前药”一词是其中式I化合物的脒基被保护的化合物，例如被羟基或(1-6C)烷氧基羰基保护。

本发明还涉及制备式I化合物的方法，包括偶合适合地被保护的氨基酸或氨基酸类似物，接着去除保护基团。

式I化合物可以用常规用于这些化合物的方式制备。

为此目的，在溶液中或固体载体上，将适当Nα保护的(和侧链保护的，如果反应性侧链存在)氨基酸衍生物或肽活化和偶合到适当羧基保护的氨基酸或肽衍生物上。α-氨基官能团的保护通常是通过氨基甲酸乙酯官能团如酸不稳定的叔丁氧基羰基(Boc)、苄氧羰基(Z)和取代的类似物或碱不稳定的9-芴基-甲氧羰基(Fmoc)基团来发生。Z基团也可以通过催化氢化来去除。其它适合的氨基保护性基团包括Nps、Bmv、Bpoc、Msc等。氨基保护性基团的全面的综述给出在《肽、分析、合成、生物学》第3卷，E. Gross和J. Meienhofer编(Academic Press，纽约，1981)。羧基的保护可以通过形成酯来保护，例如碱不稳定的酯，象甲基-或乙基酯、酸不稳定的酯象叔丁基酯，或氢解不稳定的酯如苄基酯。赖氨炔酸(lysinine)的侧链官能团的保护可以用上文提到的基团来实现。适合地保护的氨基酸或肽的羧基的活化可以用叠氮化物、混合酐、活化酯或碳化二亚酰胺方法来发生，特别是添加催化和外消旋抑制化合物，如1-羟基苯并三唑、N-羟基琥珀酰亚胺、3-羟基-4-氧代-3,4-二氢-1,2,3-苯并三嗪、N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚胺。参见，例如《肽、分析、合成、生物学》(参见上文)和Pure and Applied Chem. 59(3), 331-334(1987)。可以用上述偶合方法将酰基胍基团偶合到适当Nα-保护的氨基酸衍生物或肽的C端上。

在制备本发明的其中Q是-C(O)Y的化合物的一种适合方法中，保护的谷氨酸(Glu)偶合到基团Y上，脱保护，接着在N-末端偶合到分子的A-B-X部分，形成式A-B-X-Glu-Y的化合物。在另一种方法中，将S-甲基异脲保护，并转化成保护的胍。将保护的胍偶合到A-B-X-Gly-Y上，脱保护后获得式I化合物。

本发明化合物，它可以是游离碱形式，可以以可药用盐的形式，由反应混合物分离。可药用盐也可以通过用有机或无机酸如氢氯酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、磷酸、乙酸、丙酸、乙醇酸、马来酸、丙二酸、甲磺酸、富马酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸和抗坏血酸处理式I的游离碱来获得的。

本发明化合物可具有一或多个手性碳原子，因此可以获得其纯对映体，或对映体混合物，或含有非对映体的混合物。获得纯对映体的方法是本领域已知的，例如由旋光酸和外消旋混合物获得的盐的结晶，或使用手性柱色谱。对于非对映体可以使用正相或反相柱。

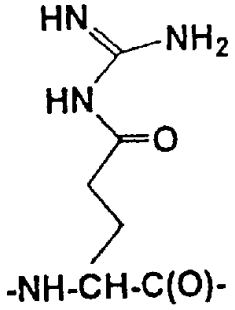
本发明化合物可以经肠或不经肠给药，且优选给药于人，每日剂量0.001-100mg/kg体重，优选0.01-10mg/kg体重。与可药用的辅助剂混合，例如如标准参考文献中所描述的，Gennaro等，Remington's Pharmaceutical Sciences, (第18版，Mack Publishing Company, 1990, 参见特别是第8部分，Pharmaceutical Preparations and Their Manufacture)，化合物可以压制成固体剂量单位，如丸剂、片剂，或配制成胶囊或栓剂。借助于可药用的液体，化合物也可以以溶液、悬浮液、乳液的形式施用，例如用作注射制剂，或作为喷雾剂，例如用作鼻喷雾剂。

制作剂量单位，例如片剂时，考虑使用常规的添加剂如填充剂、着色剂、聚合物粘合剂等。通常可以使用不干扰活性化合物功能的可药用添加剂。可与组合物一起给药的适合的载体包括乳糖、淀粉、纤维素衍生物等，或其混合物，以适合量使用。

本发明用下列实施例进一步说明。

实施例

“-Glu(胍)”是指：



Bzl=苄基；Boc=叔丁氧羰基：Cbz=苄氧羰基；Ac=乙酰基；PAc=苯乙酰基；Glu=谷氨酸；Cha=环己基丙氨酸；Pro=脯氨酸；Phe=苯丙氨酸；1-Piq=1-羧基全氢异喹啉；Nal=2-萘基丙氨酸；Asp=天冬氨酸。

如无不同的指明，则保留时间(Rt(LC))用反相液相色谱在Supelcosil LC-18-DB(2.1mm x 25cm)柱上确定。

实施例1

HOOC-CH_2-D-Cha-(N-环戊基)-Gly-β-Ala-胍

(a) N-(叔丁氧羰基)-S-甲基异硫脲

将S-甲基异硫脲半硫酸盐(10g)悬浮于二氯甲烷(100ml)中。在搅拌下，向此悬浮液中加入4N氢氧化钠溶液(10ml)。反应混合物放置在冰浴上，将于二氯甲烷(100ml)中的二碳酸二叔丁基酯(15.7g)与2N氢氧化钠溶液一起滴加入，以保持pH在11左右。滴加完毕后，反应混合物在室温下搅拌过夜。分离开二氯甲烷层，水层用二氯甲烷萃取。合并的有机层用水洗涤，经硫酸钠干燥，过滤并真空蒸发。残留物在硅胶上(洗脱液：庚烷/乙酸乙酯=4/1 v/v%)色谱纯化，产生N-(叔丁氧羰基)-S-甲基异硫脲(9.38g)。

TLC: R_f=0.75, 硅胶，乙酸乙酯/庚烷 = 3/1 v/v%。

(b) N-(苄氧羰基)-N'-(叔丁氧羰基)-S-甲基异硫脲

将N-(叔丁氧羰基)-S-甲基异硫脲(2g)溶解于二氯甲烷(20ml)中。在搅拌下，向此溶液中加入4N氢氧化钠溶液(2ml)。反应混合物放置在冰浴上，将于二氯甲烷(20ml)中的N-(苄氧基羰氧基)-琥珀酰亚胺(2.62g)与2N氢氧化钠溶液一起滴加入，以保持pH在11左右。滴加完毕后，反应混合物在室温下搅拌过夜。分离开二氯甲烷层，水层用二氯甲烷洗涤二次。合并的有机层用水洗涤，经硫酸钠干燥，过滤并真空蒸发。残留物在硅

胶上(洗脱液：庚烷/乙酸乙酯=3/2 v/v%)色谱纯化，产生N-(苄氧羰基)-N'-(叔丁氧羰基)-S-甲基异硫脲(3.15g)。

TLC: Rf=0.78，硅胶，乙酸乙酯/庚烷1/1 v/v%。

(c) N-(Cbz)-N'-(t-Boc)-胍

将N-(苄氧羰基)-N'-(叔丁氧羰基)-S-甲基异硫脲(3.15g)溶解于氨的甲醇液(2.4M, 50ml)中。反应混合物在室温下搅拌过夜。混合物真空蒸发，所得的残留物在硅胶上(洗脱液：二氯甲烷/甲醇=95/5 v/v%)色谱纯化，产生N-(Cbz)-N'-(t-Boc)-胍(1.83g)。

TLC: Rf=0.80，硅胶，二氯甲烷/甲醇=9/1 v/v%。

(d) N-(t-Boc)-胍.盐酸盐

将10%炭载钯(250mg)和3.12ml 2N盐酸溶液加入到N-(Cbz)-N'-(t-Boc)-胍(1.8g)的甲醇(50ml)溶液中。将混合物在室温常压下氢化1小时。过滤去除钯催化剂，通过减压蒸发去除溶剂，定量产生N-(t-Boc)-胍.盐酸盐。

TLC: Rf=0.1，硅胶，二氯甲烷/甲醇=9/1 v/v%。

(e) Cbz-β-Ala-(N-t-Boc)-胍

将Cbz-β-Ala-OH(171mg)溶解于无水二甲基甲酰胺(5ml)中。在加入三乙胺(212μl)后，反应混合物置于氮气下，并冷却到-15℃。随后加入氯甲酸异丁酯(99μl)，让混合物在-15℃下搅拌15分钟。向冷的混合物中加入N-(t-Boc)-胍.盐酸盐(150mg)和三乙胺(106μl)。反应混合物在-15℃下搅拌1小时，之后保持在室温下45分钟。过滤掉三乙胺.盐酸盐，滤液蒸发至干。残留物在硅胶上色谱(洗脱液：二氯甲烷/甲醇=95/5 v/v%)纯化，产生Cbz-β-Ala-(N-t-Boc)-胍(256mg)。

TLC: Rf=0.50，硅胶，二氯甲烷/甲醇=9/1 v/v%。

(f) H-β-Ala-(N-t-Boc)-胍.盐酸盐

将10%炭载钯(100mg)和300μl 4M盐酸溶液加入到Cbz-β-Ala-(N-t-Boc)-胍(220mg)的二甲基甲酰胺(5ml)溶液中。将混合物在室温常压下氢化1小时。过滤去除钯催化剂，通过减压蒸发去除溶剂，定量产生H-β-Ala-(N-t-Boc)-胍.盐酸盐。

TLC: R_f=0.10，硅胶，二氯甲烷/甲醇=9/1 v/v%。

(g) N-环戊基-Gly-OMe

将环戊酮(15.6g)加入到H-Gly-OMe.HCl(23.2g)的200ml甲醇溶液中。混合物搅拌15分钟，加入氰基氢硼化钠(7g)。pH调节到6。反应混合物在室温下搅拌16小时。为使反应完全，加入环戊酮(1g)，继续搅拌。

在TLC上监测反应。当所有的起始原料消失时，将混合物酸化到pH2，并搅拌30分钟。去除溶剂，残留物用水稀释。溶液用乙醚洗涤，pH用6N氢氧化钠调节到12，并用二氯甲烷萃取。合并的有机层用饱和氯化钠溶液洗涤，经硫酸钠干燥，并真空蒸发，产生16g油状物。

Rf=0.46，在硅胶上于乙酸乙酯/吡啶/乙酸/水63/20/6/11(v/v/v/v)。

(h) N-(叔丁氧基羰基甲基)-D-Cha-OMe

将溴代乙酸叔丁基酯(17g)加入到搅拌的H-D-Cha-OMe.HCl(26g)的300ml乙腈溶液中。混合物的pH用二异丙基乙胺调节至8.5。混合物在室温下搅拌16小时，真空蒸发。残留物溶解于二氯甲烷中，溶液用水洗涤，用硫酸钠干燥，真空蒸发。在硅胶上用己烷/乙酸乙酯9/1(v/v)作洗脱液色谱，给出20g N-(叔丁氧羰基甲基)-D-Cha-OMe。

Rf=0.46，在硅胶上于乙酸乙酯/吡啶/乙酸/水15.75/5/1.5/2.75(v/v/v/v)中。

(i) N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-OMe

将N-(叔丁氧羰基甲基)-D-Cha-OMe(20g)和二碳酸二叔丁基酯(17g)的溶液的pH用二异丙基乙胺调节到8.5。混合物在室温下搅拌16小时。真空去除溶剂。向残留物加入二氯甲烷和水。将有机层分开，用冷1N盐

酸、水、5%碳酸氢钠和水洗涤。有机层用硫酸钠干燥，蒸发滤液成非晶形固体状的N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-OMe，产量28g。

Rf=0.60，在硅胶上于乙酸乙酯/吡啶/乙酸/水252/20/6/11(v/v/v/v)中。

(j) N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-OH

将N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-OMe(28g)的420ml二噁烷/水9/1(v/v)溶液用足够量的1N氢氧化钠处理，在室温下保持其pH为13持续90分钟。酸化后，混合物倒入水中，并用二氯甲烷萃取。有机层用水洗涤，用硫酸钠干燥。滤液蒸发，产生24g N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-OH。

Rf=0.23，在硅胶上于二氯甲烷/甲醇 9/1(v/v)中。

(k) N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-(N-环戊基)-Gly-OMe

将N-环戊基-Gly-OMe(10.2g)和2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基尿鎓四氟硼酸盐(TBTU；21.2g)加入到N-(t-丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-OH(24g)的300ml N,N-二甲基甲酰胺中。混合物的pH调节到8.5。室温下搅拌混合物过夜并蒸发浓缩。向残留物中加入水和乙酸乙酯。有机层分离，并用1N盐酸、水、5%碳酸氢钠和水洗涤，经硫酸钠干燥。将滤液蒸发，残留物在硅胶上用己烷/乙酸乙酯8/2(v/v)作洗脱液色谱。将含有N-(t-丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-(N-环戊基)-Gly-OMe级分合在一处，并蒸发。产量：17g。

Rf=0.57，在硅胶上于己烷/乙酸乙酯7/3(v/v)中。

(l) N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-(N-环戊基)-Gly-OH

将N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-(N-环戊基)-Gly-OMe(17g)在二噁烷/水1/1(v/v，150ml)和稀氢氧化钠的混合物中皂化，产生15g非晶形固体。在硅胶上用二氯甲烷/甲醇95/5(v/v)作洗脱液色谱，给出13g N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-(N-环戊基)-Gly-OH。

Rf=0.30，在硅胶上于二氯甲烷/甲醇9/1(v/v)中。

(m) N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-(N-环戊基)-Gly-β-Ala-(N-t-Boc)-胍

将N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-(N-环戊基)-Gly-OH(310mg)溶解于无水二甲基甲酰胺(10ml)中。在加毕三乙胺(168μl)之后，将反应混合物置于氮气下，并冷却到-15℃。随后加入氯甲酸异丁基酯(79μl)，让混合物在-15℃下搅拌15分钟。将H-β-Ala-(N-t-Boc)-胍.盐酸盐(154mg)溶解于无水二甲基甲酰胺(5ml)，并滴中入冷的混合酐溶液，通过加入三乙胺保持pH在8.5。将反应混合物在-15℃下搅拌1小时，之后在0℃下搅拌1小时。反应混合物蒸发至干。残留物溶解于乙酸乙酯中，依次用水、盐水洗涤，经硫酸钠干燥，真空浓缩。残留物在硅胶(洗脱液：二氯甲烷/甲醇=95/5 v/v%)上色谱纯化，产生N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-(N-环戊基)-Gly-β-Ala-(N-t-Boc)-胍(268mg)。

TLC：Rf=0.80，硅胶，二氯甲烷/甲醇=9/1 v/v %。

(n) $HOOC-CH_2$-D-Cha-(N-环戊基)-Gly-β-Ala-胍

将N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-(N-环戊基)-Gly-β-Ala-(N-t-Boc)-胍(265mg) 在室温下用90%三氟乙酸/水(10ml)处理。反应混合物真空浓缩，残留物溶解于水中，直接装填到制备HLPC Supelcosil LC-18-DB柱上，使用20%A/80%B至20%A/20%B/60%C梯度洗脱体系，历时40分钟，流速15ml/min(A：0.5M磷酸缓冲液pH 2.1，B：水，C：乙腈/水=6/4)。产量：185mg $HOOC-CH_2$-D-Cha-(N-环戊基)-Gly-β-Ala-胍。Rt(LC): 32.22分钟; 20%A/80%B至20%A/20%B/60%C，经40分钟

实施例2

$HOOC-CH_2$-D-Cha-Pro-Glu(胍)-(2-噻唑基)

(a) H-D-Cha-OMe.HCl

向冷(-20℃)无水甲醇(195ml)中滴加入亚硫酰氯(28ml)。加入H-D-Cha-OH.HCl(40g)，反应混合物回流加热5小时。反应混合物真空浓缩，与甲醇共蒸发(3次)。残留物用甲醇/乙醚结晶，产生H-D-Cha-OMe.HCl，为晶状粉末(40.9g)。

TLC: Rf=0.66，硅胶，正丁醇/乙酸/水 = 10/1/3 v/v/v %。

(b) N-(叔丁氧基羰基甲基)-D-Cha-OMe

将溴代乙酸叔丁基酯(36g)加入到搅拌着的H-D-Cha-OMe.HCl(40.9g)的400ml乙腈溶液中。混合物的pH用二异丙基乙胺调节至8.5。混合物在室温下搅拌16小时，真空蒸发。残留物溶解于二氯甲烷中，溶液用水洗涤，用硫酸钠干燥，真空蒸发。在硅胶上用庚烷/乙酸乙酯9/1(v/v)作洗脱液色谱，给出64g N-(叔丁氧羰基甲基)-D-Cha-OMe。

TLC: Rf=0.25，硅胶，乙酸乙酯/庚烷 = 1/1 v/v%。

(c) N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-OMe

将N-(叔丁氧羰基甲基)-D-Cha-OMe(64g)和二碳酸二叔丁基酯(40.3g)的溶液的pH用二异丙基乙胺调节到8.5。混合物在室温下搅拌16小时。真空去除溶剂。向残留物加入二氯甲烷和水。将有机层分开，用冷1N盐酸、水、5%碳酸氢钠和水洗涤。有机层用硫酸钠干燥，蒸发滤液成非晶形固体状的N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-OMe，产量59.6g。

TLC: Rf=0.50，硅胶，乙酸乙酯/庚烷 = 1/1 v/v %。

(d) N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-OH

将N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-OMe(59.6g)的900ml二噁烷/水 = 9/1(v/v)溶液用足够量的6N氢氧化钠处理，保持其pH为12在室温下6小时。酸化后，混合物倒入水中，并用二氯甲烷萃取。有机层用水洗涤，用硫酸钠干燥。滤液蒸发，产生54g N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-OH。

TLC: Rf=0.60, 硅胶，二氯甲烷/甲醇= 9/1 v/v%。

(e) N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-Pro-OBzl

向N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-OH(13.5g)在N,N-二甲基甲酰胺(150ml)中的冷(0℃)溶液中依次加入1-羟基苯并三唑(7.09g)、二环己基碳化二亚胺(7.61g)、H-Pro-OBzl.HCl(9.31g)和三乙胺(6ml)。混合物在0℃下搅拌1小时，之后保持在室温下过夜。混合物冷却到-20℃，过滤去除二环己基脲。将滤液蒸发至干。残留物溶于乙酸乙酯并依次用5%碳酸氢钠、水、3%柠檬酸和盐水洗涤，经硫酸钠干燥，真空浓缩。残留物在硅胶上用庚烷/乙酸乙酯=3/1 (v/v)作洗脱液色谱。将含有N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-Pro-OBzl的级分合在一处。产量: 15g。

TLC: Rf=0.70, 硅胶，庚烷/乙酸乙酯=1/1 v/v%。

(f) N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-Pro-OH

将10%炭载钯(750mg)加入到 N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-Pro-OBzl(15g)的甲醇(150ml)溶液中。将混合物在室温常压下氢化1小时。过滤去除钯催化剂，通过减压蒸发去除溶剂，产生11.2g N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-Pro-OH。

TLC: Rf=0.65, 硅胶，乙酸乙酯/吡啶/乙酸/水213/20/6/11 v/v%。

(g) Boc-Glu(OtBu)-NMeOMe

向Boc-Glu(OtBu)-OH(15g)的二氯甲烷(150ml)溶液中加入N,O-二甲基羟胺盐酸盐(5.3g)和[2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基尿鎓四氟硼酸盐](15.87g)，pH通过加入三乙胺调节到8-8.5。混合物在室温下搅拌16小时。混合物依次用冷的0.3M盐酸溶液、水、5%碳酸氢钠水溶液和水洗涤。有机层经硫酸钠干燥，过滤并蒸发。残留物在硅胶上(洗脱液: 二氯甲烷/甲醇=98/2 v/v%)色谱纯化，产生Boc-Glu(OtBu)-NMeOMe(17.5g)。

TLC: Rf=0.85, 硅胶，二氯甲烷/甲醇=9/1 v/v%。

(h)Boc-Glu(OtBu)-(2-噻唑基)

向冷(-78℃)、搅拌着的正丁基锂(88.9mmol)的乙醚(90.7ml)溶液中滴加2-溴噻唑(14.6g)的乙醚(75ml)溶液。在溶液于-78℃下搅拌30分钟之后，将此溶液滴加入Boc-Glu(OtBu)-NMeOMe(14g)的无水四氢呋喃(150ml)溶液。混合物在-78℃下搅拌1小时，之后将混合物倒入冰冷的5%柠檬酸水溶液中。让混合物温热至室温，将不同的层分离。水层用乙酸乙酯萃取。合并的有机层用水、饱和氯化钠水溶液洗涤，经硫酸钠干燥，过滤并蒸发。残留物在硅胶上(洗脱液：二氯甲烷/乙酸乙酯=9/1 v/v%)色谱纯化，产生Boc-Glu(OtBu)-(2-噻唑基)(6.83g).

TLC: Rf=0.92, 硅胶，二氯甲烷/乙酸乙酯=7/3 v/v%。

(i) H-Glu-(2-噻唑基).TFA

将Boc-Glu(OtBu)-(2-噻唑基)(450mg)溶解于3ml三氟乙酸(TFA)、1ml二氯甲烷和150μl苯甲醚，并在室温下搅拌1小时。在蒸发去除溶剂后，分离出定量产量的粗制的胺，为黄色油状物，即刻用于制备N-Boc-N-(叔丁氧羰基甲基)-D-Cha-Pro-Glu-(2-噻唑基)。

TLC: Rf=0.10, 硅胶，乙酸乙酯/吡啶/乙酸/水=63/20/6/11 v/v/v/v%。

(j) N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc- D-Cha-Pro-Glu-(2-噻唑基)

将N-Boc-N-(叔丁氧羰基甲基)-D-Cha-Pro-OH(590mg)溶解于无水二甲基甲酰胺(15ml)中。在加毕二异丙基乙胺(416μl)后，将反应混合物放置在氮气下，冷却到-15℃。随后加入氯甲酸异丁基酯(158μl)，让混合物在-15℃下搅拌15分钟。将H-Glu-(2-噻唑基).TFA(300mg)溶解于无水二甲基甲酰胺(10ml)中，并滴加入冷的混合酐溶液中，通过加入二异丙基乙胺保持pH在8.5。将反应混合物在-15℃下搅拌30分钟。将反应混合物蒸发至干。残留物溶解于乙酸乙酯中，依次用水、5%碳酸氢钠水溶液、水、盐水洗涤，经硫酸钠干燥并真空浓缩。残留物在硅胶上(洗脱液：二氯甲烷/甲醇=95/5 v/v%)色谱纯化，产生N-Boc-N-(叔丁氧羰基甲基)-D-

Cha-Pro-Glu-(2-噻唑基)(171mg)。

TLC: Rf=0.50, 硅胶，二氯甲烷/甲醇=9/1 v/v%。

(k) N-(叔丁氧羰基)-S-甲基异硫脲

将S-甲基异硫脲半硫酸盐(10g)悬浮于二氯甲烷(100ml)中。在搅拌下，向此悬浮液中加入4N氢氧化钠溶液(10ml)。反应混合物放置在冰浴上，将于二氯甲烷(100ml)中的二碳酸二叔丁基酯(15.7g)与2N氢氧化钠溶液一起滴加入，以保持pH在11左右。滴加完毕后，反应混合物在室温下搅拌过夜。分离开二氯甲烷层，水层用二氯甲烷萃取两次。合并的有机层用水洗涤，经硫酸钠干燥，过滤并真空蒸发。残留物用在硅胶上(洗脱液：庚烷/乙酸乙酯=4/1 v/v%)色谱纯化，产生9.38g。

TLC: Rf=0.75, 硅胶，乙酸乙酯/庚烷 = 3/1 v/v%。

(l) N-(苄氧羰基)-N'-(叔丁氧羰基)-S-甲基异硫脲

将N-(叔丁氧羰基)-S-甲基异硫脲(2g)溶解于二氯甲烷(20ml)中。在搅拌下，向此溶液中加入4N氢氧化钠溶液(2ml)。反应混合物放置在冰浴上，将于二氯甲烷(20ml)中的N-(苄氧基羰氧基)-琥珀酰亚胺(2.62g)与2N氢氧化钠溶液一起滴加入，以保持pH在11左右。滴加完毕后，反应混合物在室温下搅拌过夜。分离开二氯甲烷层，水层用二氯甲烷洗涤二次。合并的有机层用水洗涤，经硫酸钠干燥，过滤并真空蒸发。残留物在硅胶上(洗脱液：庚烷/乙酸乙酯=3/2 v/v%)色谱纯化，产生3.15g。

TLC: Rf=0.78, 硅胶，乙酸乙酯/庚烷1/1 v/v%。

(m)N-(Cbz)-N'-(t-Boc)-胍

将N-(苄氧羰基)-N'-(叔丁氧羰基)-S-甲基异硫脲(3.15g)溶解于氨的甲醇液(2.4M, 50ml)中。反应混合物在室温下搅拌过夜。混合物真空蒸发，所得的残留物在硅胶上(洗脱液：二氯甲烷/甲醇=95/5 v/v%)色谱纯化，产生1.83g。

TLC: Rf=0.80, 硅胶，二氯甲烷/甲醇=9/1 v/v%。

(n)N-(t-Boc)-胍.盐酸盐

将10%炭载钯(250mg)和3.12ml 2N盐酸溶液加入到N-(Cbz)-N'-(t-Boc)-胍(1.8g)的甲醇(50ml)溶液中。将混合物在室温常压下氢化1小时。过滤去除钯催化剂，通过减压蒸发去除溶剂，定量产生N-(t-Boc)-胍.盐酸盐。

TLC: R_f=0.10, 硅胶，二氯甲烷/甲醇=9/1 v/v%。

(o) N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-Pro-Glu(N-t-Boc)-胍)-(2-噻唑基)

向冷(0℃)的N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-Pro-Glu-(2-噻唑基)(170mg)的二氯甲烷(5ml)溶液依次加入二环己基碳化二亚胺(123mg)、N-(t-Boc)-胍.HCl(75mg)和三乙胺(53μl)。将混合物在0℃下搅拌1小时，并再在室温下保持另一小时。将混合物冷却到-20℃，过滤去除二环己脲。将滤液蒸发至干。残留物在硅胶上用二氯甲烷/甲醇=95/5(v/v%)作洗脱液色谱。含有N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-Pro-Glu(N-t-Boc)-胍)-(2-噻唑基)的级分合在一处，并蒸发。产量: 173mg。

TLC: R_f=0.50, 硅胶，二氯甲烷/甲醇=9/1 v/v%。

(p) HOOC-CH_2-D-Cha-Pro-Glu(胍)-(2-噻唑基)

在室温下将N-(叔丁氧羰基甲基)-N-Boc-D-Cha-Pro-Glu((N-t-Boc)-胍)-(2-噻唑基)用90%三氟乙酸/水(10ml)处理2.5小时。反应混合物真空浓缩，残留物溶解于水中，直接装填到制备HPLC DeltaPak RP-C18上，使用20%A/80%B至20%A/45%B/35%C梯度洗脱体系，历时40分钟，流速50ml/min(A: 0.5M磷酸缓冲液pH 2.1，B: 水，C: 乙腈/水=6/4)。产量: 22mg HOOC-CH_2-D-Cha-Pro-Glu（胍）-(2-噻唑基)。R_t(LC): 35.04分钟;20%A，80%B，0%C至20%A，20%B，60%C，经40分钟。

实施例3

(4aR,8aR)-全氢异喹啉-1(R,S)-羰基-Pro-Glu(胍)-(2-噻唑基)

(a) 2-Cbz-(4aR,8aR)-全氢异喹啉-1(R,S)-羧酸

如EP 0643073,实施例1所述，合成出2-Cbz-(4aR,8aR)-全氢异喹啉-1(R,S)-羧酸。

TLC: Rf=0.85，硅胶上，乙酸乙酯/吡啶/乙酸/水63/20/6/11。

(b) 2-Cbz-(4aR,8aR)-全氢异喹啉-1(R,S)-羰基-Pro-OtBu

向2-Cbz-(4aR,8aR)-全氢异喹啉-1(R,S)-羧酸(500mg)的二甲基甲酰胺(5ml)的冷溶液(0℃)中依次加入DCCI(1,3-二环己基碳化二亚胺；342mg)、HOBT(1-羟基苯并三唑水合物；319mg)、H-Pro-OtBu(270mg)和三乙胺(0.55ml)。反应混合物在0℃下搅拌1小时，之后保持在室温下过夜。将反应混合物冷却到-20℃，通过过滤去除DCU(1,3-二环己基脲)。滤液真空浓缩，残留物溶解于乙酸乙酯中。此溶液依次用5%碳酸氢钠水溶液、3%柠檬酸水溶液、水和盐水洗涤，经硫酸钠干燥，并真空浓缩。残留物在硅胶上(洗脱液：庚烷/乙酸乙酯4/1 v/v%)色谱纯化，产生2-Cbz-(4aR,8aR)-全氢异喹啉-1(R,S)-羰基-Pro-O-tBu)(634mg)。

TLC: Rf=0.90，硅胶上，乙酸乙酯/吡啶/乙酸/水63/20/6/11。

(c) 2-Cbz-(4aR,8aR)-全氢异喹啉-1(R,S)-羰基-Pro-OH

在室温下，将2-Cbz-(4aR,8aR)-全氢异喹啉-1(R,S)-羰基-Pro-O-叔丁基酯(600mg)在二氯甲烷(1ml)、三氟乙酸(3ml)、苯甲醚(0.15ml)的混合物中搅拌1小时。反应混合物在低温下真空浓缩，残留物溶解于pH为9.5的水中。水相用乙醚洗涤，之后水相通过2M盐酸溶液酸化至pH 2.5。水层用乙酸乙酯萃取，有机相用盐水洗涤，经硫酸钠干燥，真空浓缩，产生2-Cbz-(4aR,8aR)-全氢异喹啉-1(R,S)-羰基-Pro-OH(588mg)。

TLC: Rf=0.54，硅胶上，乙酸乙酯/吡啶/乙酸/水60/3/1/2。

(d) (4aR,8aR)-全氢异喹啉-1(R,S)-羰基-Pro-Glu-(2-噻唑基)

根据实施例2中描述的步骤，将混合酐偶合在2-Cbz-(4aR,8aR)-全氢异喹啉-1(R,S)-羰基-Pro-OH和H-Glu-(2-噻唑基).TFA间，脲化，脱保护和纯化。产量：64.7mg。

R_t(LC): 28.93分钟，20%A，80%B至20%A,20%B和60%C，经40分钟。

实施例4

乙基SO_2-D-Cha-Pro-Glu(脲)-(2-噻唑基)

(a) Boc-D-Cha-Pro-OPAc

类似于实施例1中描述的方法，使用Boc-D-Cha-OH和H-Pro-OPAc，制备Boc-D-Cha-Pro-OPAc。

TLC: R_f=0.5，硅胶上，二氯甲烷/甲醇95/5。

(b) 乙基SO_2-D-Cha-Pro-OPAc

将Boc-D-Cha-Pro-OPAc(3.8g)溶解于50%TFA/二氯甲烷(25ml)中，并在室温下搅拌30分钟。将反应混合物真空蒸发。粗制的胺溶解于二氯甲烷(50ml)中，并在-78℃下加入乙磺酰氯(0.8ml)。在反应期间，加入三乙胺，保持pH在8。在0℃下，将混合物搅拌3小时，之后加入水(25ml)。再于室温下另外搅拌30分钟之后，反应混合物真空浓缩。残留物溶解于乙醚中，用1N盐酸溶液、水、5%碳酸氢钠溶液和盐水洗涤，经硫酸钠干燥，过滤并真空蒸发。用甲醇研磨粗制的物质，产生乙基SO_2-D-Cha-Pro-OPAc(3.0g)。

TLC: R_f=0.6，硅胶上，二氯甲烷/甲醇95/5。

(c) 乙基SO_2-D-Cha-Pro-OH

向乙基SO_2-D-Cha-Pro-OPAc(10g)的四氢呋喃(250ml)溶液中加入氯化四丁铵在四氢呋喃(84ml)中的1M溶液。反应混合物在室温下搅拌30分钟，并倒入水(1l)中。水溶液用乙酸乙酯萃取。合并的有机层依次用1N盐酸溶液和水洗涤，经硫酸钠干燥，并真空浓缩。残留物用乙酸乙酯/二异丙醚结晶来纯化，产生乙基SO_2-D-Cha-Pro-OH(6.0g)。

TLC: R_f=0.2，硅胶上，乙酸乙酯/吡啶/乙酸/水163/20/6/11。

(d) 乙基SO_2-D-Cha-Pro-Glu(胍)-(2-噻唑基)

根据实施例2中描述的步骤，将混合酐偶合在乙基SO_2-D-Cha-Pro-OH和H-Glu-(2-噻唑基).TFA间，胍化，脱保护和纯化。产量: 83mg。

R_t(LC): 28.33分钟，20%A，60%B和20%C至20%A和80%C，经30分钟。

实施例5

N-Ac-D-Phe-2-Nal-Glu(胍)-(2-噻唑基)

类似于实施例2描述的方式，使用N-Ac-D-Phe-OH和H-2-Nal-OMe制备N-Ac-D-Phe-2-Nal-OMe。

(a) N-Ac-D-Phe-2-Nal-OH

在室温下，将N-Ac-D-Phe-2-Nal-OMe(1.55g)的20ml二噁烷/水=9/1(v/v)溶液用足量的6N氢氧化钠处理，保持其pH在12持续1小时。酸化后，将混合物倒入水中，用二氯甲烷萃取。有机层用水洗涤，经硫酸钠干燥。滤液蒸发，产生1.7g粗制的N-Ac-D-Phe-2-Nal-OH.

TLC: R_f=0.50，硅胶，乙酸乙酯/吡啶/乙酸/水=63/20/6/11 v/v/v/v%。

(b) N-Ac-D-Phe-2-Nal-Glu(胍)-(2-噻唑基)

根据实施例2中描述的步骤，将混合酐偶合在N-Ac-D-Phe-2-Nal-OH和H-Glu-(2-噻唑基).TFA间，胍化，脱保护和纯化。产量：218mg。

Rt(LC)：29.97分钟，20%A，60%B和20%C至20%A和80%C，经30分钟。

实施例6

N-Me-D-Cha-Pro -Glu(胍)-(2-噻唑基)

类似于实施例2描述的方式，使用Boc-(N-Me)-D-Cha-OH和H-Pro-OBzl制备Boc-(N-Me)-D-Cha-Pro-OH。

H-(N-Me)-D-Cha-Pro -Glu(胍)-(2-噻唑基)

根据实施例2中描述的步骤，将混合酐偶合在Boc-(N-Me)-D-Cha-Pro-OH和H-Glu-(2-噻唑基).TFA间，胍化，脱保护和纯化。产量：85mg。

Rt(LC)：32.27分钟，20%A和80%B至20%A,20%B和60%C，经40分钟。

实施例7

N-Ac-D-Phe-Phe-Glu(胍)-(2-噻唑基)

用类似于实施例5中所述的步骤制备标题化合物。产量：112mg。

Rt(LC)：42.97分钟，20%A,80%B至20%A,20%B和60%C，经40分钟。

实施例8

N-Me-D-Phe-Pro-Glu(胍)-(2-噻唑基)

类似于实施例2描述的方式，使用Boc-(N-Me)-D-Cha-OH和H-Pro-OMe制备Boc-(N-Me)-D-Phe-Pro-OMe。

类似于实施例5描述的方式，使用Boc-(N-Me)-D-Phe-Pro-OMe制备Boc-(N-Me)-D-Phe-Pro-OH。

Rt(LC): 28.0分钟，20%A,80%B至20%A,20%B和60%C，经40分钟。

H-(N-Me)-D-Phe-Pro-Glu(胍)-(2-噻唑基)

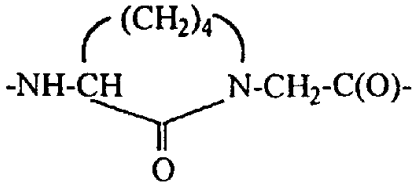
根据实施例2中描述的步骤，将混合酐偶合在Boc-(N-Me)-D-Phe-Pro-OH和H-Glu-(2-噻唑基).TFA之间，胍化，脱保护和纯化。产量: 79.3mg。

Rt(LC): 28.28分钟，20％A，80％B至20％A，20％B和60％C，经40分钟。

实施例9

BzlSO2-正Leu(环)-Gly-Glu(胍)-(2-噻唑基)

正Leu(环)-Gly是指下式的结构片断



(a) Boc-正Leu(环)-OH

向搅拌着的L-α-氨基-ε-己内酰胺(10g)的二噁烷/水(2/1 v/v)(30ml)的溶液中加入1N氢氧化钠溶液(7.8ml)，接着加入碳酸二叔丁基酯(18.8g)。将混合物在室温下搅拌16小时，并真空浓缩。残留物溶解于乙酸乙酯中，用水和盐水洗涤，经硫酸钠干燥，过滤并真空蒸发。粗制的物质用己烷

研磨，过滤，并真空干燥，产生Boc-正Leu(环)-OH (16g).

TLC: Rf=0.85，硅胶上，乙酸乙酯/庚烷1/1。

(b) Boc-正Leu(环)-Gly-OMe

将Boc-正Leu（环）-OH (10g)溶解于二氯甲烷(100ml)中。在-20℃下，缓慢加入双(三甲基甲硅烷基)酰胺在THF/环己烷(1/1 v/v)中的1M溶液(1当量)，并将混合物搅拌30分钟。随后加入溴乙酸甲酯(4ml)，并将混合物在室温下搅拌2小时。加入另一份双(三甲基甲硅烷基)酰胺在THF/环己烷（1/1 v/v）中的溶液，迫使反应完毕。混合物用二氯甲烷稀释，用0.1N盐酸溶液、水、5%碳酸氢钠水溶液和盐水洗涤，经硫酸钠干燥，过滤并真空蒸发。残留物在硅胶上(洗脱液：庚烷/乙酸乙酯/ 6/4 v/v%)色谱纯化，产生Boc-正Leu(环)-Gly-OMe(12g).

TLC: Rf=0.55，硅胶上，乙酸乙酯/庚烷6/4。

(c) BzlSO2-正Leu(环)-Gly-OMe

将Boc-正Leu(环)-Gly-OMe(3g)溶解于50%TFA/二氯甲烷(30ml)中，并在室温下搅拌1小时。反应混合物真空蒸发。粗制的胺溶解于二氯甲烷(25ml)中，在0℃下，缓慢加入苄基磺酰氯(2.25g)的二氯甲烷(10ml)溶液。加入三乙胺，在反应期间保持pH为8。混合物在室温下搅拌1小时，之后将混合物真空浓缩。将残留物溶解于乙酸乙酯中，用5%碳酸氢钠溶液、水和盐水洗涤，经硫酸钠干燥，过滤，并真空浓缩。残留物在硅胶上（洗脱液：二氯甲烷/乙酸乙酯 95/5 v/v%）色谱纯化，产生BzlSO2-正Leu(环)-Gly-OMe(3.9g)。

TLC: Rf=0.40，硅胶，二氯甲烷/甲醇9/1。

(d) BzlSO2-正Leu(环)-Gly-OH

将BzlSO2-正Leu(环)-Gly-OMe(3.9g)的100ml二噁烷/水9/1的溶液用足够量的1N氢氧化钠处理，在室温下保持pH在13持续2小时。酸化后，混合物倒入水中，用二氯甲烷萃取。有机层用水洗涤，经硫酸钠干燥。

蒸发滤液，给出标题化合物(3.6g)。

TLC: Rf=0.60，硅胶上，乙酸乙酯/吡啶/乙酸/水63/20/6/11。

(e) $BzlSO_2$-正Leu(环)-Gly-Glu(胍)-(2-噻唑基)

根据实施例2中描述的步骤，将混合酐偶合在$BzlSO_2$-正Leu(环)-Gly-OH和H-Glu-(2-噻唑基).TFA间，胍化，脱保护和纯化。产量：34.6mg。

R_t(LC): 21.42分钟，20%A,60%B和20%C至20%A和80%C，经30分钟。

实施例10

在Kaiser肟树脂上制备酰基胍

向4.0g Kaiser肟树脂(NovaBiochem, 1.10mmol/g)的80ml二氯甲烷/二甲基甲酰胺(3:2 v/v)的悬浮液中加入Boc-β-Ala-OH(3.3g, 17.6mmol)、N-羟基苯并三唑(3.0g, 22.0mmol)和N,N-二异丙基碳化二亚胺(3.4ml, 22.0mmol)。在室温将此悬浮液震荡16小时。滤出树脂，用二氯甲烷/二甲基甲酰胺(3:2 v/v)、二甲基甲酰胺、2-丙醇和二氯甲烷洗涤(各三次)。未反应的肟基团通过用80ml乙酸酐/二异丙基乙胺/N-甲基吡咯烷酮(3:1: 12 v/v/v)在室温下处理树脂30分钟来封端。反应混合物通过过滤去除，树脂用N-甲基吡咯烷酮、2-丙醇/二氯甲烷(1:3 v/v)和二氯甲烷洗涤(各三次)。所得的衍生树脂(4.96g)真空干燥。

50mg此树脂分批转移入有机合成机器人(robot)的24个反应器中。树脂用二氯甲烷/二甲基甲酰胺(3:2 v/v)和二氯甲烷洗涤(二次)来溶胀。

i) Boc-基团的脱保护

将树脂用1ml 25%的三氟乙酸的二氯甲烷液预处理，随后在断续用氮气

鼓气泡的情况下，与2ml 25%三氟乙酸反应30分钟．树脂用二氯甲烷、2-丙醇和二氯甲烷(各二次)洗涤。

ii) 第一结构单元(A)的偶合

将树脂用二氯甲烷/二甲基甲酰胺(3:2 v/v)洗涤来溶胀。向此树脂中加入1ml的0.2M结构单元(A)(Boc-Pro-OH、Boc-(N-甲基)-Gly-OH、Boc-Gly-OH或Boc-Phe-OH)在二氯甲烷/(3： 2 v/v)中的0.2M溶液，0.5ml 0.44M TBTU在二甲基甲酰胺中的溶液和0.5ml 0.44M二异丙基乙胺在二氯甲烷中的溶液。树脂在室温下温育60分钟，断续用氮气通气泡。在去除溶剂后，树脂用二氯甲烷/二甲基甲酰胺(3:2 v/v)、二甲基甲酰胺、2-丙醇和二氯甲烷洗涤(各二次)。

iii) Boc-基团的脱保护

使用描述于i)中的步骤，去除结构单元A的Boc基团。

iv) 第二结构单元(B)的偶合

使用结构单元B(Boc-D-Cha-OH或Boc-D-Phe-OH)在二氯甲烷/二甲基甲酰胺(3： 2 v/v)中的0.2M溶液，使用与描述于iii)中的相同步骤，偶合第二结构单元B.

v) Boc基团的脱保护

使用描述于i)中的步骤，去除结构单元B的Boc基团，除了预处理步骤中用三氟乙酸。

vi) 第三结构单元(C)的偶合

将树脂用二氯甲烷/二甲基甲酰胺(3:2 v/v)洗涤，随后用2ml的二异丙基乙胺的二氯甲烷/二甲基甲酰胺(3:2 v/v) 的0.11M溶液洗涤二次。向树脂中加入1ml二氯甲烷/二甲基甲酰胺(3:2 v/v)、0.5ml的0.44M的磺酰氯C(苯基磺酰氯、4-氯苯基磺酰氯或7-甲氧基萘基磺酰氯)的二氯甲烷/二甲

基甲酰胺(3:2 v/v)溶液和0.5ml的0.44M二异丙基乙胺的二氯甲烷溶液。树脂在室温下反应60分钟，断续用氮气通气泡。在去除反应混合物后，树脂用二氯甲烷/二甲基甲酰胺(3:2 v/v)、二甲基甲酰胺、2-丙醇和二氯甲烷洗涤(各二次)。

vii) 从树脂上切割产物

在加入1.8ml的0.2M胍.HCl的二甲基甲酰胺溶液和0.2ml二异丙基乙胺前，将树脂用二甲基甲酰胺洗涤二次。树脂在室温下温育64小时，断续用氮气通气泡。滤出树脂，滤液收集于玻璃管中。树脂用二甲基甲酰胺洗涤二次。将收集的滤液蒸发至干。

特征鉴定

所有的化合物用反相液相色谱在Supelcosil LC-18-DB(4.6mm x 25cm)柱上，使用如下条件进行鉴定：流速：1.0ml/min；缓冲液A:水，B:乙腈/水(9：1 v/v)，C：0.5M磷酸缓冲液pH=2.1；梯度液1：0->30分钟，55%A-25%B-20%C->15%A-65%B-20%C。210nm下UV检测。保留时间以分钟给出在表I中。

另外，所有的化合物通过电子喷雾离子化质谱法分析。表I显示在正方式(positive mode)检测出的M+H值。所有的化合物的实测值与预期值相吻合。

表I: 在Kaiser肟树脂上制备的酰基胍的特征(在反相HPLC上的保留时间。在电子喷雾质谱仪上的M+H峰)

X:	苯基-SO_2-	4-氯苯基-SO_2-	7-甲氧基萘基-SO_2-
X-D-Cha-Pro-β-Ala-胍	r.t = 16.9 min M+H = 521.4	r.t = 20.1 min M+H = 555.4	r.t = 22.1 min M+H = 601.4
X-D-Phe-Pro-β-Ala-胍	r.t = 13.4 min M+H = 515.4	r.t = 17.0 min M+H = 549.2	r.t = 19.3 min M+H = 595.4
X-D-Cha-(N-甲基)-Gly-β-Ala-胍	r.t = 15.8 min M+H = 495.4	r.t = 18.9 min M+H = 529.4	r.t = 20.9 min M+H = 575.4
X-D-Phe-(N-甲基)-Gly-β-Ala-胍	r.t = 11.7 min M+H = 489.2	r.t = 15.5 min M+H = 523.2	r.t = 17.7 min M+H = 569.4
X-D-Cha-Gly-β-Ala-胍	r.t = 14.0 min M+H = 481.2	r.t = 17.2 min M+H = 515.2	r.t = 19.4 min M+H = 561.4
X-D-Phe-Gly-β-Ala-胍	r.t = 10.1 min M+H = 475.2	r.t = 14.1 min M+H = 509.2	r.t = 16.4 min M+H = 555.4
X-D-Cha-Phe-β-Ala-胍	r.t = 21.7 min M+H = 571.4	r.t = 24.2 min M+H = 605.2	r.t = 26.0 min M+H = 651.4
X-D-Phe-Phe-β-Ala-胍	r.t = 17.6 min M+H = 565.4	r.t = 20.8 min M+H = 599.4	r.t = 22.6 min M+H = 645.4

实施例11

另外，可以用本发明的方法制备下列化合物：

-HOOC-CH_2-D-Cha-(1-氨基环己基羧基)-β-Ala-胍；

-(HOOC-CH_2)2-D-Cha-Pro-β-Ala-胍；

-HOOC-CH_2-N-Me-D-Cha-Pro-β-Ala-胍；

-HOOC-CH_2-N-烯丙基-D-Cha-Pro-β-Ala-胍；

-HOOC-CH_2-N-炔丙基-D-Cha-Pro-β-Ala-胍；

-HOOC-CH_2-N-苄基-D-Cha-Pro-β-Ala-胍；

-HOOC-CH_2-N-环丙基-D-Cha-Pro-β-Ala-胍；

-HOOC-CH_2-N-环丁基-D-Cha-Pro-β-Ala-胍；

-HOOC-CH_2-N-环戊基-D-Cha-Pro-β-Ala-胍；

-HOOC-CH_2-N-环己基-D-Cha-Pro-β-Ala-胍；

-2-丙基-戊酰基-Asp(OMe)-Pro-β-Ala-胍；

-2-丙基-戊酰基-Asp-Pro-β-Ala-胍；

-乙基SO_2-D-Cha-Pro-β-Ala-胍；

-乙基SO_2-D-Phe-Pro-β-Ala-胍；

-[2-(BzlSO_2-NH)-吡啶基-1-CH_2-CO]-β-Ala-胍；

-[3-(BzlSO_2-NH)-吡啶-2-酮-1-CH_2-CO]-β-Ala-胍；

-BzlSO_2-正Leu(环)-Gly-β-Ala-胍；

-N-Me-D-Phe-Pro-Glu(胍)-COOH；

-N-Me-D-Phe-Pro-Glu(胍)-(2-噁唑基)；

-N-Me-D-Cha-Pro-Glu(胍)-COOH；

-N-Me-D-Cha-Pro-Glu(胍)-(2-噻唑基)；

-N-Me-D-Cha-Pro-Glu(胍)-(2-噁唑基)；

-HOOC-CH_2-D-Phe-Pro-Glu(胍)-COOH；

-HOOC-CH_2-D-Phe-Pro-Glu(胍)-(2-噻唑基)；

-HOOC-CH_2-D-Phe-Pro-Glu(胍)-(2-噁唑基)；

-HOOC-CH_2-D-Cha-Pro-Glu(胍)-COOH；

-HOOC-CH_2-D-Cha-Pro-Glu(胍)-(2-噁唑基)；

-乙基SO_2-D-Phe-Pro-Glu(胍)-COOH;

-乙基SO_2-D-Phe-Pro-Glu(胍)-(2-噻唑基);

-乙基SO_2-D-Phe-Pro-Glu(胍)-(2-噁唑基);

-乙基SO_2-D-Cha-Pro-Glu(胍)-COOH;

-乙基SO_2-D-Cha-Pro-Glu(胍)-(2-噁唑基);

-1-Piq-Pro-Glu(胍)-COOH;

-1-Piq-Pro-Glu(胍)-(2-噁唑基);

-HOOC-CH_2-D-Cha-(N-环戊基)-Gly-Glu(胍)-(2-噻唑基);

N-Me-D-Phe-(N-环戊基)-Gly-Glu(胍)-(2-噻唑基);

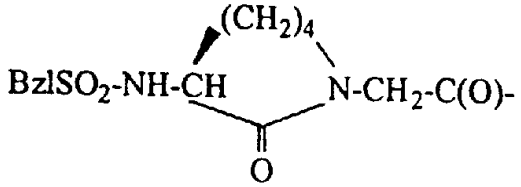
-2-丙基-戊酰基-Asp(OMe)-Pro-Glu(胍)-(2-噻唑基);

-2-羟基-3-环己基-丙酰基-Pro-Glu(胍)-(2-噻唑基);

-1-Piq-(N-环戊基)-Gly-Glu(胍)-(2-噻唑基);

-二苯基丙酰基-Pro-Glu(胍)-(2-噻唑基);

-其中残基:



偶合到-Glu(胍)-COOH、-Glu(胍)-(2-噻唑基)或Glu(胍)-(2-噁唑基)的化合物;

-9-羟基-芴-9-羧基-Pro-β-Ala-胍;

-9-羟基-芴-9-羧基-(N-环戊基)-Gly-β-Ala-胍;

-9-羟基-芴-9-羧基-氮杂环丁烷-2-羧基-β-Ala-胍。

实施例12

抗凝血酶试验

凝血酶(凝血因子IIa)是一种凝血级联中的因子。

本发明化合物的抗凝血酶活性通过分光光度测定由凝血酶对生色底物s-2238的水解速率来评价。此在缓冲体系中的抗凝血酶活性试验用来评

价试验化合物的IC_{50}值。

试验介质：缓血酸胺-NaCl-聚乙二醇6000(TNP)缓冲液。参照化合物:I2581(Kabi) 载体：TNP缓冲液。增溶作用可以借助于二甲基亚砜、甲醇、乙醇、乙腈或叔丁醇，它们在终反应混合物浓度达2.5%时，无有害作用。

技术

试剂*：1. 缓血酸胺-NaCl(TN)缓冲液。该缓冲液组成如下：缓血酸胺(Tris) 6.057g (50mmol)，NaCl 5.844g(100mmol)，水至1升。溶液的pH在37℃用HCl(10mmol/l)调节至7.4。2.TNP缓冲液：聚乙二醇6000溶解于TN缓冲液中，给出3g/l的浓度。3. S-2238溶液：一小瓶的S-2238(25mg, Kabi, Diagnostica, 瑞典)溶解于20ml TN缓冲液中，给出1.25mg/ml(2mmol/l)的浓度。4. 凝血酶溶液：人凝血酶(16 000nKat/小瓶; Centraal Laboratorium voor Bloedtransfusie，阿姆斯特丹，荷兰)溶解于TNP缓冲液中，给出835nKat/ml的备用溶液。在使用前一刻，将此溶液用TNP缓冲液稀释，给出3.34nKat/ml的浓度。

-*所用的成分均为分析级

-对于水溶液，使用超纯水(Milli-Q品级)

试验和参照化合物溶液的制备

试验参照化合物溶解于Milli-Q水中，给出10^{-2}mol/l的备用浓度。每一种浓度再逐级用载体稀释，给出10^{-3}、10^{-4}和10^{-5}mol/l的浓度。稀释液，包括备用溶液，用于试验(在反应混合物中的终浓度：分别为$3x10^{-3}$、10^{-3}、$3x10^{-4}$、10^{-4}、$3x10^{-5}$、10^{-5}、$3x10^{-6}$和10^{-6}mol/l)。

步骤

在室温下，将0.075ml和0.025ml试验化合物或参照化合物的溶液或载体分别移液至微量滴定板的孔中，这些溶液分别用0.115ml和0.0165ml

TNP缓冲液稀释。向每一孔中加入一等份量的0.030ml S-2238溶液，并将此滴定板预热和在37℃下温箱(Amersham)中震荡下预温育10分钟。预温育之后，通过向每孔中加入0.030ml凝血酶来开始S-2238的水解。此滴定板在37℃下温育(震荡30秒钟)。温育1分钟之后，使用动力学微量滴定板读数器(Twinreader plus, Flow Laboratories)，每2分钟测定一次每种样品在405nm下的吸光度，持续90分钟。

所有的数据使用LOTUS-MEASUER收集在IBM个人计算机中。对于每一化合物浓度(以mol/l反应混合物表达)和对于空白，相对于以分钟计的反应时间画出吸光度曲线图。

应答的评价：对于每一终浓度，由试验曲线图计算出最大吸光率。根据Hafner等(Arzneim.-Forsch./Drug Res. 1977;27(II);1871-3)的方法，使用对数值变换分析法，计算IC_{50}-值(终浓度，以μmol/l表达，造成空白的最大吸光度的50%抑制)。

在下列表格中，列出本发明化合物的IC_{50}-值：

实施例	IC_{50}-值(μM)
1	0.24
2	0.034
4	2.59
6	0.32