

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02824928.3

[51] Int. Cl.

C07K 7/56 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2010 年 1 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 100584859C

[22] 申请日 2002.12.12 [21] 申请号 02824928.3
[30] 优先权

[32] 2001.12.14 [33] FR [31] 01/16230

[86] 国际申请 PCT/FR2002/004308 2002.12.12

[87] 国际公布 WO2003/054001 法 2003.7.3

[85] 进入国家阶段日期 2004.6.14

[73] 专利权人 诺韦克塞尔公司

地址 法国 罗曼维尔

[72] 发明人 P·博费利 A·布鲁亚尔

C·科拉当 S·德鲁 M·埃尔特

D·费鲁 G·勒迈特

J·帕拉迪诺

[56] 参考文献

WO0107468A2 2001.2.1

审查员 唐 慧

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
代理人 黄革生 隗永良

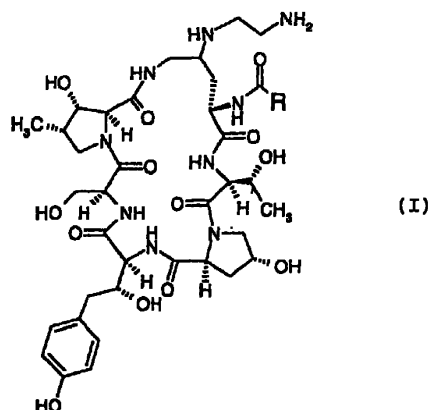
权利要求书 8 页 说明书 21 页

[54] 发明名称

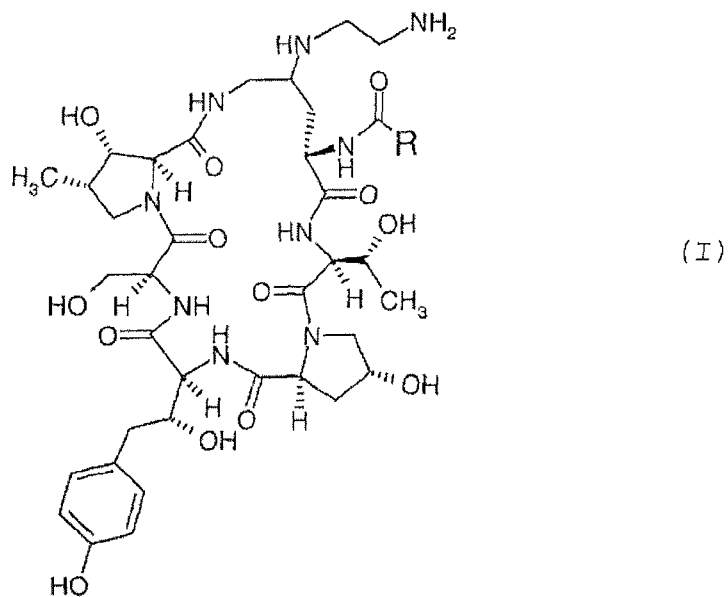
制备棘白菌素衍生物的方法

[57] 摘要

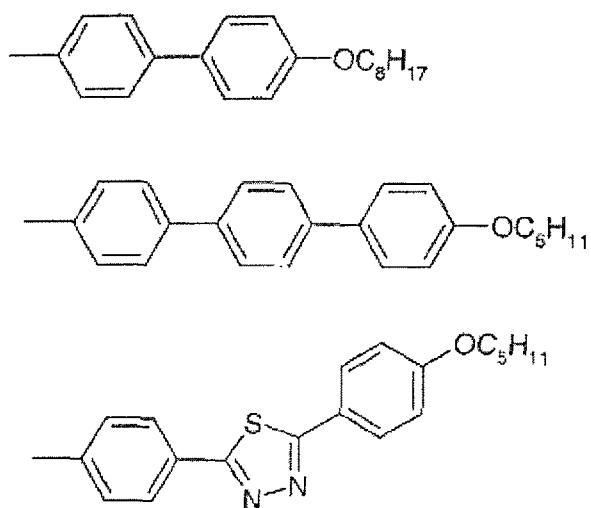
本发明涉及制备式(I)化合物的方法, (见右式)其中 R 如说明书所定义, 以及它们的盐、它们的中间体、它们的二盐酸盐作为药物的用途和含有它们的药物组合物。



1. 制备式(I)化合物的方法,

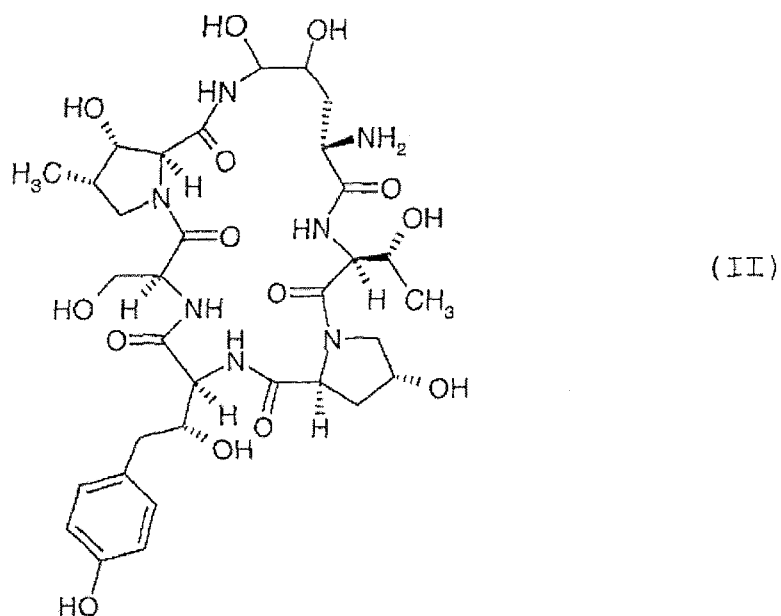


其中 R 代表:

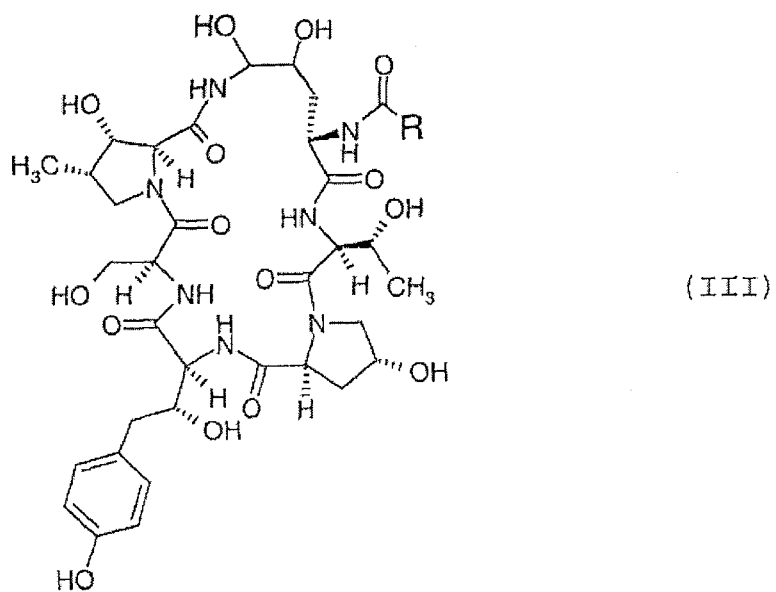


包括下列步骤:

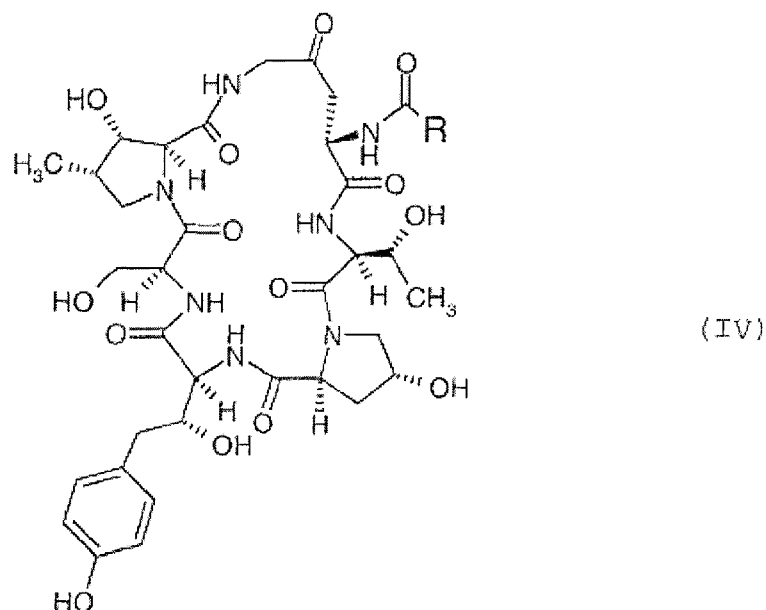
a) 使式(II)化合物,



与式 $R-CO_2H$ 的酸作用，所述酸呈分离或非分离的活化形式，以便得到式 (III) 化合物，



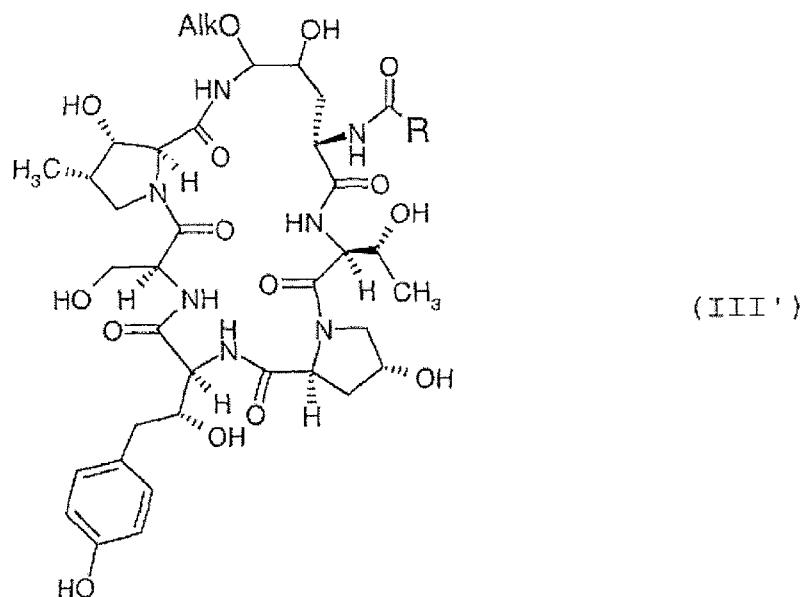
b) 使式(III)化合物进行脱水反应，以便得到式(IV)化合物，



c)使式(IV)化合物在还原剂存在下通过乙二胺的作用而进行还原胺化反应,以便得到如上所定义的式(I)化合物,该化合物中活性异构体之一占多数,然后以任何合适的顺序对所述式(I)化合物进行一个或多个下列操作:

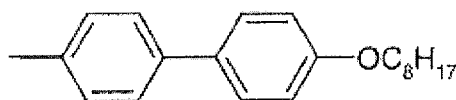
- 色谱分离,
- 结晶,
- 与碱作用,
- 成盐。

2. 权利要求 1 所定义的方法,其中使式(III)化合物在 PPTS 存在下通过式 Alk-OH 醇的作用而在 5 位进行醇的烷基化反应,其中 Alk 代表含有 1 至 4 个碳原子的烷基,以便得到式(III')化合物,

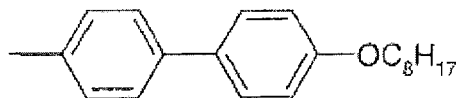


3. 权利要求 1 所定义的方法，其中所述还原剂为路易斯酸存在下的 NaBH_3CN 或 $\text{NaBH}(\text{OCOR}')_3$ ，其中 OCOR' 代表 Boc-L-Pro 或 Bzl-L-Pro。

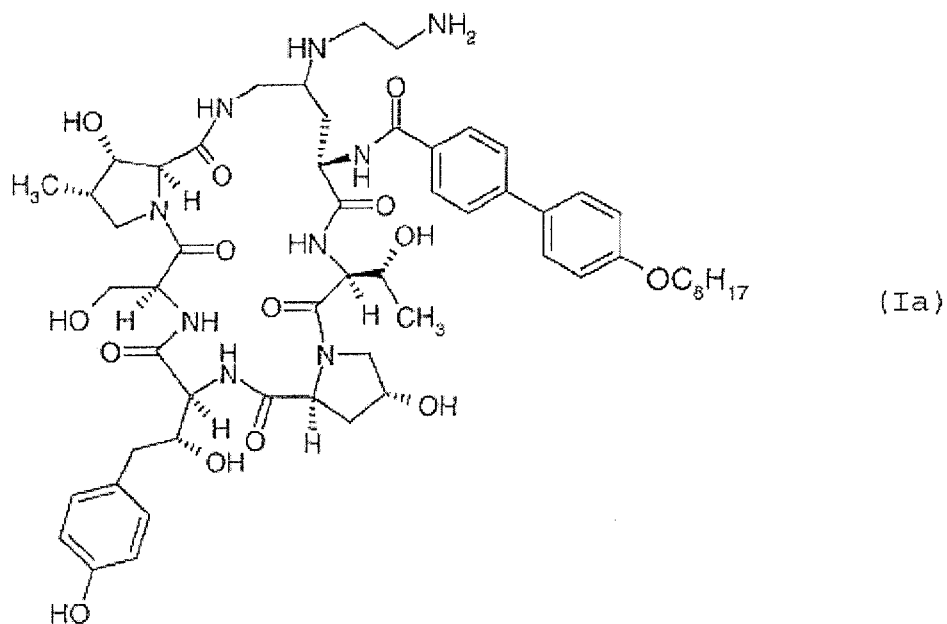
4. 权利要求 1 所定义的方法，其中在式(I)、(III)、(IV)化合物中，R 代表下列基团：



5. 权利要求 2 所定义的方法，其中在式(III')化合物中，R 代表下列基团：

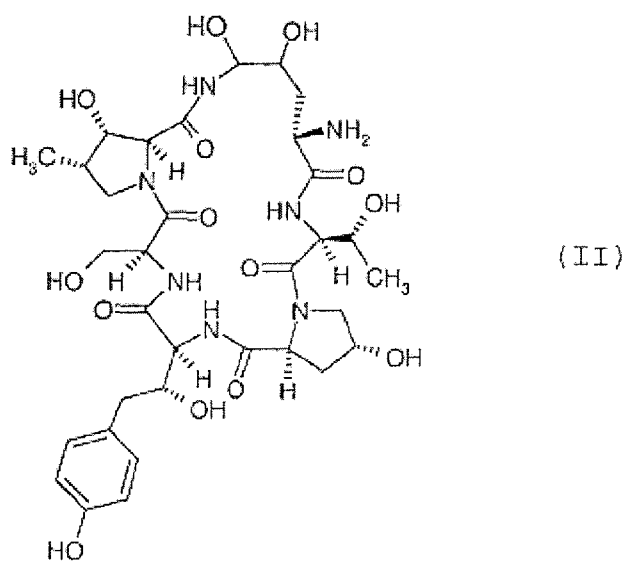


6. 制备式(Ia)化合物的方法：

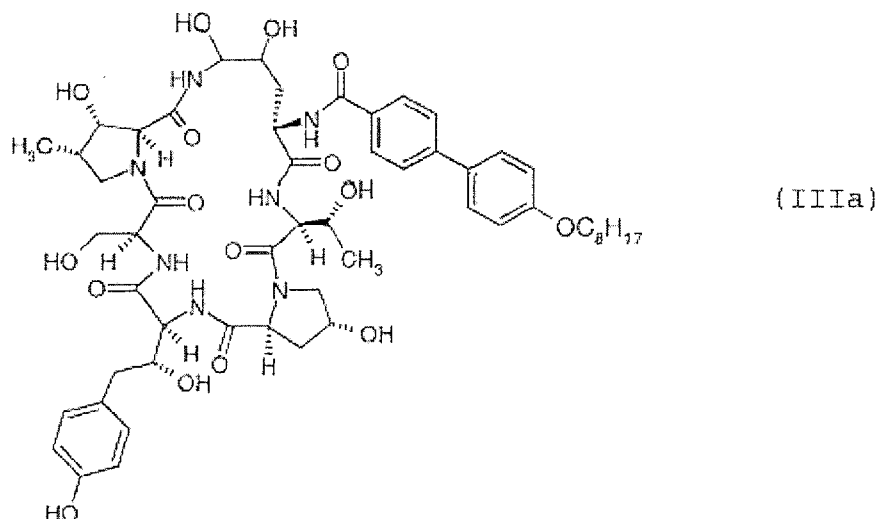


包括下列步骤:

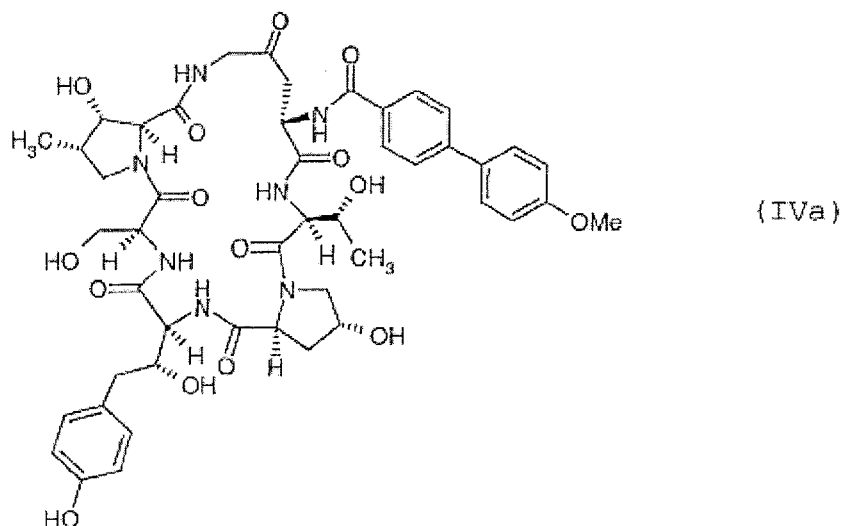
b) 使式(II)化合物,



与式 $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{-O-Ph-Ph-CO}_2\text{H}$ 的酸作用, 所述呈分离或非分离的活化形式, 以便得到式(IIIa)化合物,



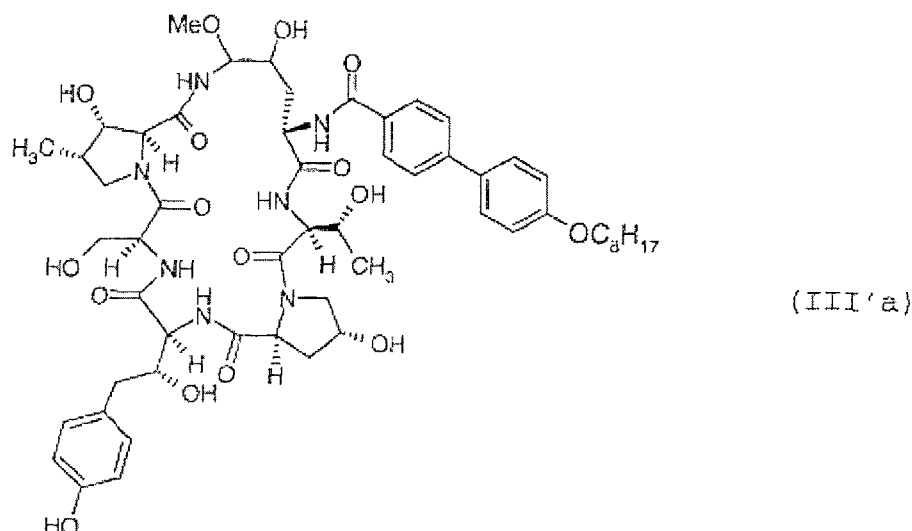
b) 使式(IIIa)化合物进行脱水反应, 以便得到式(IVa)化合物,



c) 使式(IVa)化合物在还原剂存在下通过乙二胺的作用而进行还原胺化反应, 以便得到如上所定义的式(Ia)化合物, 该化合物中活性异构体之一占多数, 对所述式(Ia)化合物进行一个或多个下列操作:

- 色谱分离,
- 结晶,
- 与碱作用,
- 与盐酸作用而成盐。

7. 根据权利要求6的方法, 其中使式(IIIa)化合物在PPTS存在下通过甲醇的作用而在5位进行醇的烷基化反应, 以便得到式(IIIa')化合物,



8. 根据权利要求6的方法，其中所述还原剂为与 TiCl_4 偶联的 NaBH_3CN 、 $\text{NaH}(\text{Boc-L-pro})_3$ 或 $\text{NaH}(\text{Bzl-L-Pro})_3$ 。

9. 根据权利要求6的方法，其特征在于：对式(Ia)化合物接连进行下列操作：

d) 使用有机溶剂、水和三氟乙酸的混合物经硅胶色谱、然后经反相色谱纯化，以便得到式(Ia)化合物的三氟乙酸盐；

e) 与碱作用、例如与碳酸氢钠水溶液作用，以便得到碱形式的式(Ia)化合物；

f) 与盐酸作用而成盐，以便得到相应的盐，即式(Ia)化合物的二盐酸盐。

10. 根据权利要求9的方法，其中所述碱作用为碳酸氢钠水溶液作用。

11. 根据权利要求1至10中任一项的方法，其特征在于：酸的活化反应在五氟苯酚、N-羟基琥珀酰亚胺或任选N-羟基苯并三唑存在下进行。

12. 根据权利要求1至10中任一项的方法，其特征在于：在分离的活化酸存在下的酰化反应在二异丙基乙基胺存在下进行。

13. 根据权利要求1至10中任一项的方法，其特征在于：活化反应和随后在非分离的活化酸存在下的酰化反应在N-甲基吡咯烷酮和DMTMM存在下进行。

14. 根据权利要求1至10中任一项的方法，其特征在于：脱水反应在AIBB和 MgI_2 存在下进行。

15. 根据权利要求 1 至 12 中任一项的方法，其特征在于：脱水反应在 HBr-AcOH 和 MgI_2 存在下进行。

16. 根据权利要求 14 或 15 的方法，其特征在于：得自脱水作用的产物通过从 DMF/丙酮或 DMF/AcOEt 混合物中结晶而纯化。

17. 根据权利要求 1 至 10 中任一项的方法，其特征在于：还原胺化反应在选自与 $TiCl_4$ 偶联的 $NaBH_3CN$ ， $NaBH(Boc-L-pro)_3$ 和 $NaBH(Bzl-L-Pro)_3$ 的还原剂存在下进行。

18. 通过权利要求 1 至 8 和 17 中任一项所定义的式(IV)或(IVa)化合物的还原胺化反应而制备式(I)或(Ia)化合物的方法。

制备棘白菌素衍生物的方法

本发明的主题是制备棘白菌素衍生物的方法、中间体、所得产物和它们作为抗真菌药物的用途。

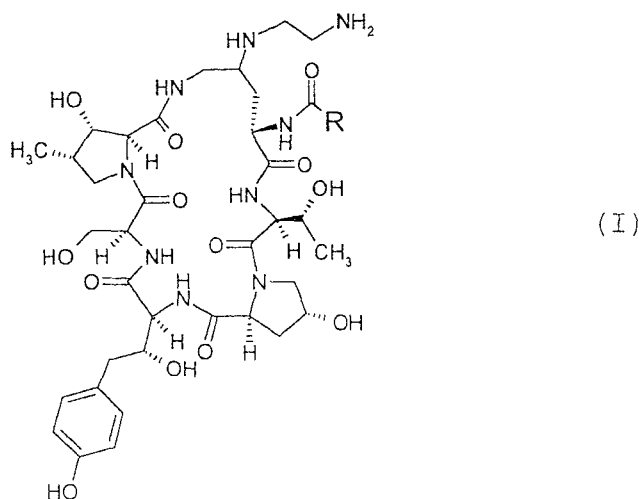
现有技术中已知多种具有抗真菌活性的化合物。具体而言，可提及国际申请 WO 99/29716 中所定义的棘白菌素衍生物。

本发明的目的是提供制备棘白菌素衍生物的新方法并得到后者的新盐。

棘白菌素可以以两种称作异构体 A 和异构体 B 的差向异构体形式存在，这两种异构体对应于 4 位取代基的 R 和 S 构型。本发明的主题之一是在该方法中主要得到这两种异构体之一，即至少大于 50% (称作 A 型的异构体，对应于式(I)的药理学活性化合物)，这与 WO 99/29716 的方法不同，在后者中，经色谱柱纯化前在方法中所得的活性异构体 A 占少数。

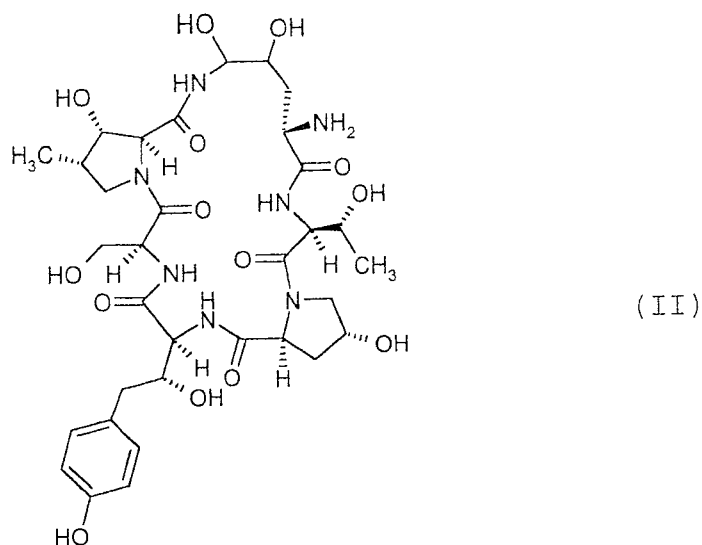
此外，本发明的另一目的是避免中间产物的色谱纯化并得到结晶产物，这使得产率显著改进。

因此，本发明的主题是制备式(I)化合物的方法，

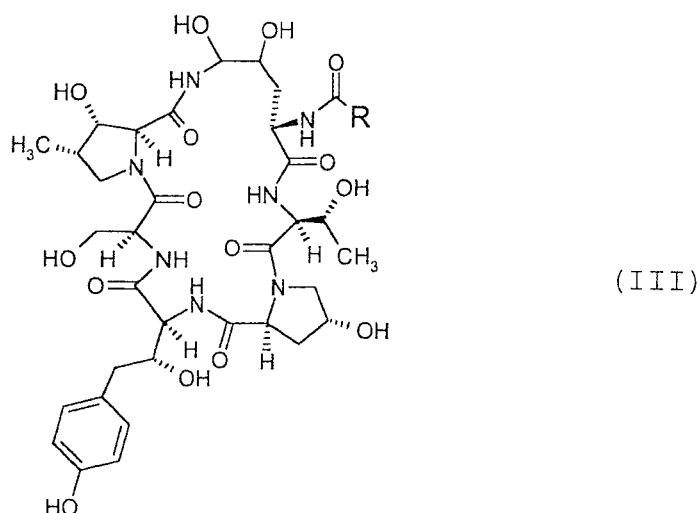


其中 R 代表含有至多 30 个碳原子的直链或支链或环状链，任选含有一个或多个杂原子和一个或多个杂环，包括下列步骤：

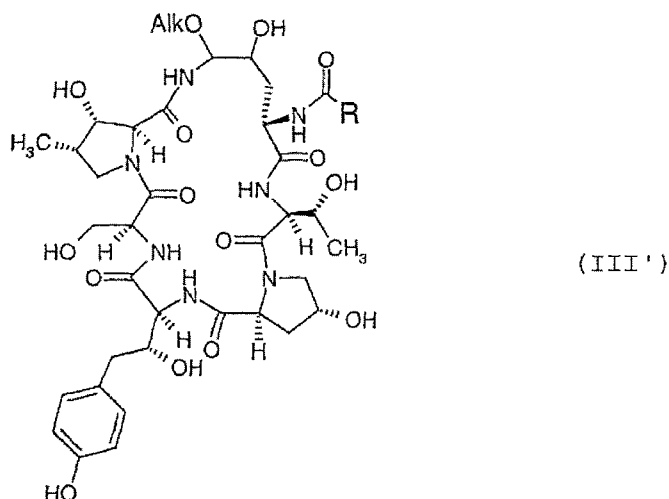
a) 使式(II)化合物,



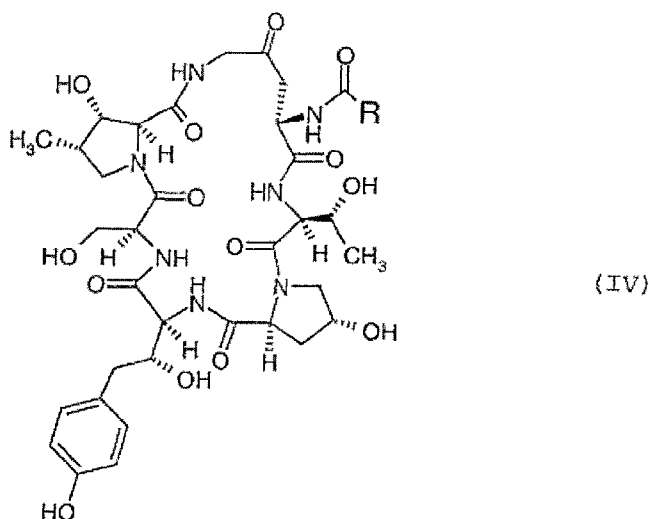
与式 $R-CO_2H$ 的酸进行作用, 其中 R 如上所定义, 所述酸视情况而定呈分离或非分离的活化形式, 以便得到式(III)化合物,



b) 视情况而定使式(III)化合物在 PPTS 存在下通过式 $Alk-OH$ 醇的作用而在 5 位进行醇的烷基化反应, 其中 Alk 为含有 1 至 4 个碳原子的烷基, 以便得到式(III')化合物,



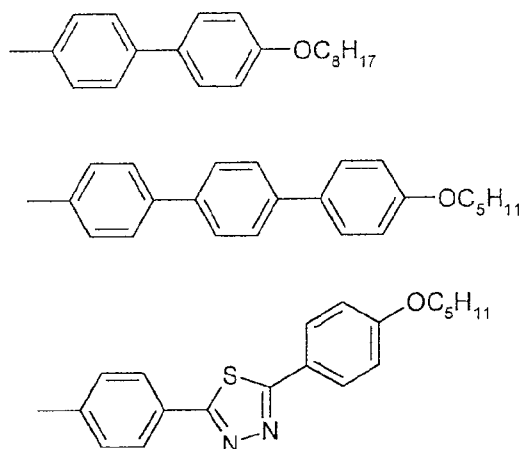
c) 使式(III)或(III')化合物进行脱水反应, 以便得到式(IV)化合物,



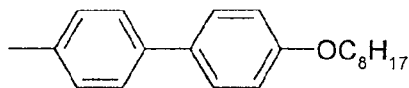
d) 使式(IV)化合物在还原剂如路易斯酸存在下的 NaBH_3CN , 或 $\text{NaBH}(\text{OCOR}')_3$ 存在下通过乙二胺的作用而进行还原胺化反应, 其中 OCOR' 代表 Boc-L-Pro 、 Bzl-L-Pro 或任何其它光学活性氨基酸以及任何其它手性或非手性羧酸, 以便得到如上所定义的式(I)化合物, 该化合物中活性异构体之一占多数, 然后视情况而定以任何合适的顺序对所述式(I)化合物进行一个或多个下列操作:

- 色谱纯化,
- 结晶纯化,
- 与碱作用,
- 成盐。

优选地,本发明的主题是前面所定义的方法,其中式(I)、(III)、(III')或(IV)化合物含有代表下列基团的 R 基团:



优选地,本发明的主题是前面所定义的方法,其中式(I)、(III)、(III')或(IV)化合物含有代表下列基团的 R 基团:



式(II)化合物根据国际申请 WO 99/29716 第 18 页(制备 2, “去氧牟伦多菌素核”)中所述方法制备。

式 $\text{R-CO}_2\text{H}$ 酸的活化根据本领域熟练技术人员已知的标准方法进行(Journet M.等人, J. Org. Chem. (1999), 64, 2411-2417; Pöchiauer P.等人, Tetrahedron 54 (1998) 3489-3494; Kunushima 等人, Tetrahedron (1999) 55 13159-13170)。具体地使用了五氟苯酚,以得到活化的五氟苯酚酯,将该酯在用于胺的酰化反应之前分离。另一方法是使用 N-羟基琥珀酰亚胺(任选 N-羟基苯并三唑),以得到活化的 N-羟基琥珀酰亚胺(任选羟基苯并三唑)酯,也将该酯分离。

接下来为得到式(III)化合物的酰化步骤在碱存在下根据本领域熟练技术人员已知的方法进行,并且在下文所述实施例中阐述。还可在不分离活性酯和不添加碱的情况下通过在氯化 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基-吗啉鎓(DMTMM)存在下操作而进行该酰化。该后一替代方案的优点在于省去了分离步骤,从而改进了产率。

为得到式(IV)化合物的式(III)化合物的脱水步骤可按以下方式进行:

- 脱水步骤在氢卤酸如 HBr 存在下、在 MgI_2 存在下进行。该情况下,不必经由式(III')中间体。
- 通过方法变型,可期望在进行脱水步骤之前将 5 位的羟基烷基化。例如甲基化可以用甲醇在 PPTS(对甲苯磺酸吡啶鎓)存在下进行,以便得到式(III')化合物,其中 Alk 代表甲基。
- 最后,该脱水反应还可在 α -乙酰氧基异丁酰溴(AIBB)存在下于二氧杂环己烷中进行。在后一种情况下,该操作可在 MgI_2 存在下对式(III')化合物或直接对式(III)化合物进行。

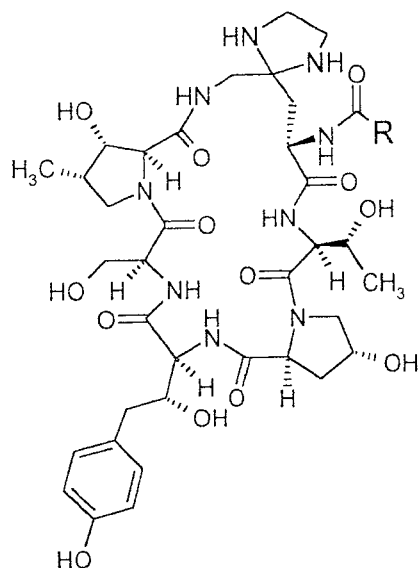
优选地,然后将脱水反应后得到的化合物从 DMF(二甲基甲酰胺)/MeCN(乙腈)混合物中结晶纯化。还可使用下列溶剂的混合物: DMF/丙酮和 DMF/AcOEt(乙酸乙酯)。

为得到式(I)棘白菌素的式(IV)化合物的还原胺化反应根据文献所述且本领域熟练技术人员已知的方法进行(Yamada K.等人, J. Chem. Soc. Perkin Trans I (1983) 265-270; Hutchins R.等人, Org. prep. Proc. Int. 11(5) (1979) 201-246)。具体地在与 $TiCl_4$ 或任何其它路易斯酸偶联的 $NaBH_3CN$ 存在下或在 $NaBH(OCOR'_3)$ 存在下使用乙二胺,其中 $OCOR'$ 代表 Boc-L-Pro、Bzl-L-Pro 或任何其它光学活性氨基酸以及任何其它手性或非手性羧酸。

将还原剂 $NaBH_3CN$ 与路易斯酸、尤其是 $TiCl_4$ 偶联对于选择性而言是必备要素,从而得到其中活性异构体 A 占多数的异构体 A 和异构体 B 的混合物。通常,得到的异构体 A 的比例大于 70%、具体地为 80 至 85%。该情形与上述其它试剂相似。

特别地,对于式(Ia)化合物,在该步骤中得到的异构体 A/异构体 B 比例分别为 80 至 85%/20 至 15%,而 WO 97/29716 所述方法得到的混合物中异构体 A 占少数或半数(外消旋 A 和 B 混合物)。

在还原胺化步骤中,可视情况而定在还原前将反应中间体分离,因此该中间体也是本发明的主题。它是式(IV')或(IV'a)的咪唑烷,

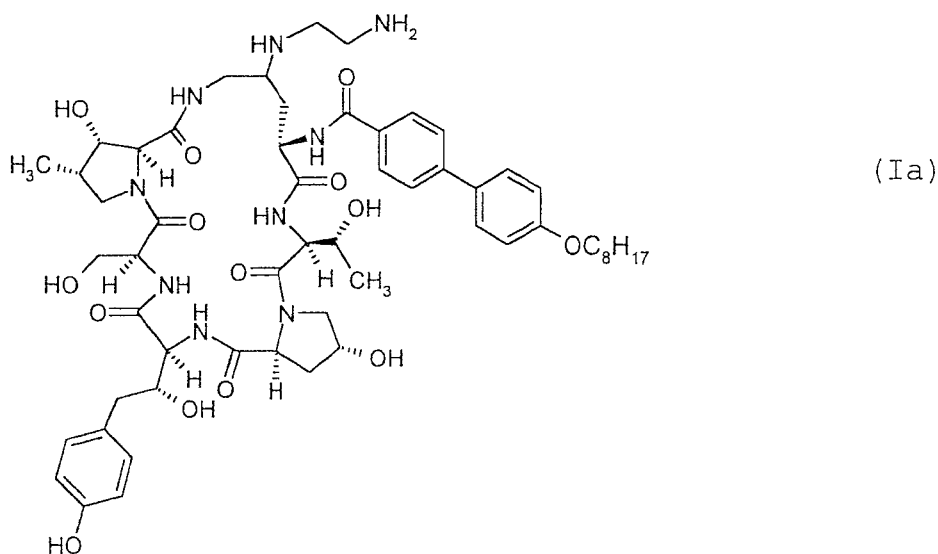


此时 R 代表 -Ph-Ph-O-C₈H₁₇ 基团。

可以期望通过色谱法或通过重结晶将所得一种或多种产物纯化。该操作根据本领域熟练技术人员已知的常规方法进行。当所得产物在色谱分离之后具体地为三氟乙酸盐形式时，可以期望通过碱的作用消除该盐，以便得到碱形式的式(I)化合物。

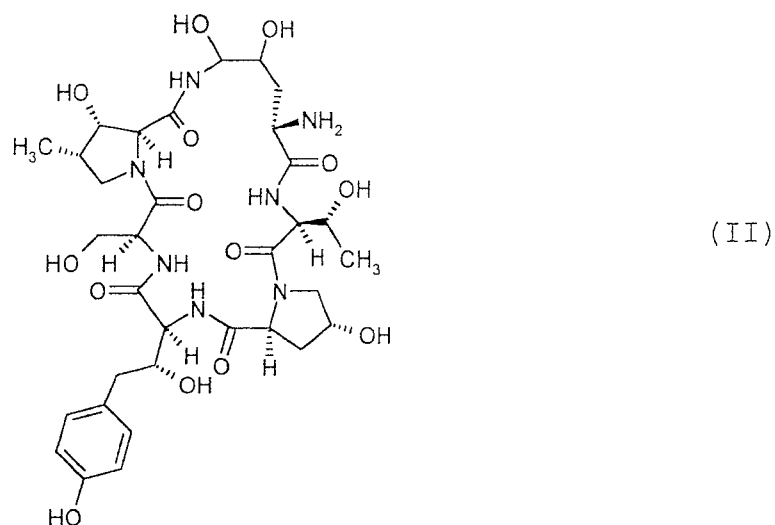
成盐反应根据本领域熟练技术人员已知的常规方法进行。盐酸盐或二盐酸盐的制备在盐酸存在下于甲醇中进行。

非常特别的是，本发明的主题是制备式(Ia)化合物的方法：

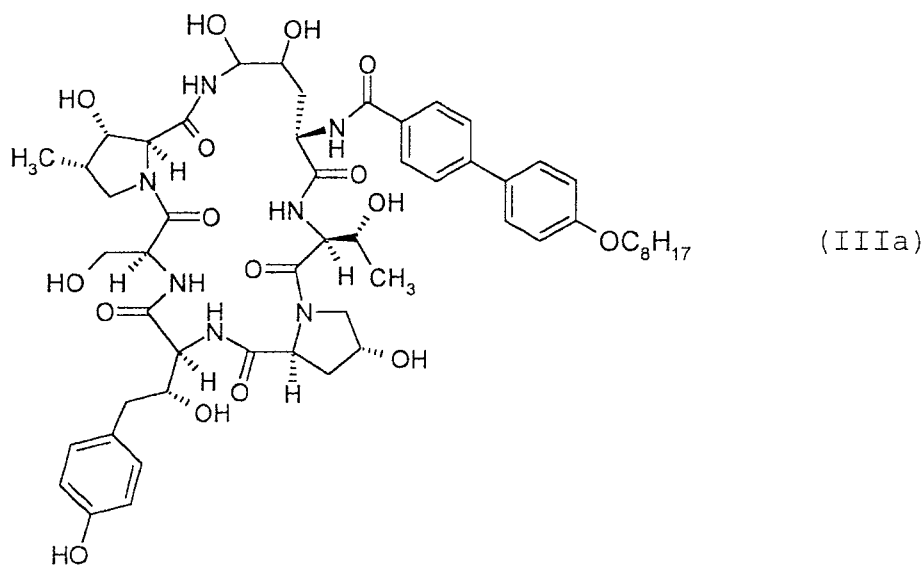


包括下列步骤：

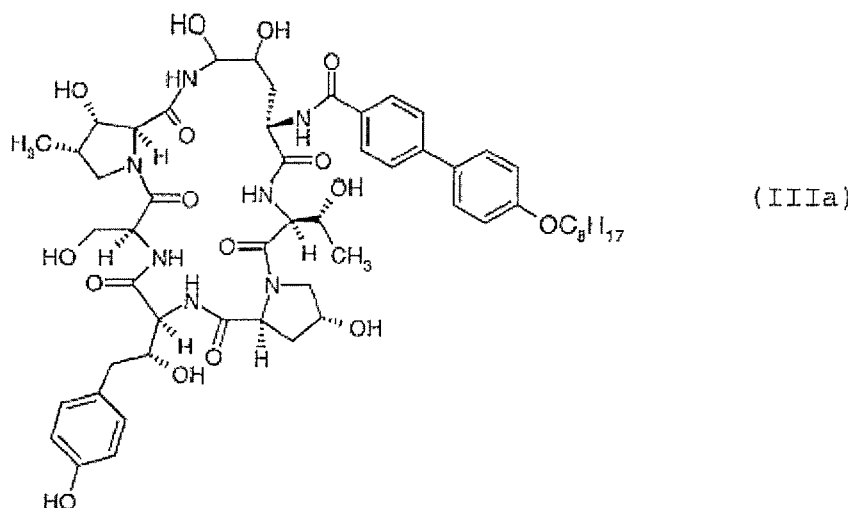
a) 使式(II)化合物,



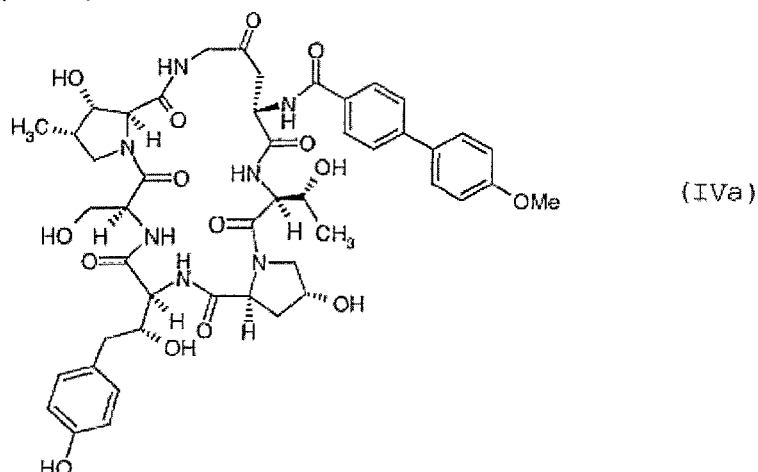
与式 $C_8H_{17}-O-Ph-Ph-CO_2H$ 的酸进行作用, 所述酸视情况而定为活化的分离或非分离形式, 以便得到式(IIIa)化合物,



b) 视情况而定使式(IIIa)化合物在 PPTS 存在下通过甲醇的作用而在 5 位进行醇的烷基化反应, 以便得到式(IIIa')化合物,



c) 使式(IIIa)或(IIIa')化合物进行脱水反应, 以便得到式(IVa)化合物,



d) 使式(IVa)化合物在还原剂如与 TiCl_4 偶联的 NaBH_3CN , $\text{NaBH}(\text{Boc-L-pro})_3$ 和 $\text{NaBH}(\text{Bzl-L-Pro})_3$ 存在下通过乙二胺的作用而进行还原胺化反应, 以便得到如上所定义的式(Ia)化合物, 该化合物中活性异构体之一占多数, 以合适的顺序对所述式(Ia)化合物进行一个或多个下列操作:

- 色谱纯化,
- 结晶,
- 与碱作用,
- 与盐酸作用而成盐。

可发现式(Ia)化合物为称作异构体 A 或异构体 B 的两种差向异构体(4位的不对称碳)的混合物形式。根据如上所定义的方法得到的式(I)化合物可以以约 70-85 %/30-15 % 的异构体 A/异构体 B 混合物的形式存在。

在还原胺化反应之后进行的纯化/结晶和成盐步骤可选择性地得到式(Ia)化合物的活性差向异构体 A。

优选地, 式(Ia)化合物经硅胶色谱、然后经反相色谱、使用有机溶剂、水和三氟乙酸的混合物纯化, 以便得到式(Ia)化合物的三氟乙酸盐。然后使该盐与碱作用例如与碳酸氢钠水溶液作用, 以便得到碱形式的式(Ia)化合物。然后, 使所得碱与盐酸作用而成盐, 以便得到相应的盐, 即式(Ia)化合物的二盐酸盐。

因此, 本发明的非常特别主题是前面所定义的方法, 其特征在于: 对式(Ia)化合物接连进行下列操作:

- a) 使用有机溶剂、水和三氟乙酸的混合物经硅胶色谱纯化、然后经反相色谱纯化, 以便得到式(Ia)化合物的三氟乙酸盐;
- b) 与碱作用例如与碳酸氢钠水溶液作用, 得到碱形式的式(Ia)化合物;
- c) 与盐酸作用而成盐, 得到相应的盐, 即式(Ia)化合物的二盐酸盐。

因此, 本发明非常特别的主题是前面所定义的方法, 其特征在于: 酸的活化反应在五氟苯酚、N-羟基琥珀酰亚胺或任选 N-羟基苯并三唑存在下进行。

因此, 本发明非常特别的主题是前面所定义的方法, 其特征在于: 在分离的活化酸存在下的酰化反应在二异丙基乙基胺存在下进行。

因此, 本发明非常特别的主题是前面所定义的方法, 其特征在于: 活化反应和随后在分离的活化酸存在下的酰化反应在 N-甲基吡咯烷酮和 DMTMM 存在下进行。

因此, 本发明非常特别的主题是前面所定义的方法, 其特征在于: 脱水反应在 AIBB 和视情况而定的 MgI_2 存在下进行。

因此, 本发明非常特别的主题是前面所定义的方法, 其特征在于: 脱水反应在 $HBr-AcOH$ 和 MgI_2 存在下进行。

因此, 本发明非常特别的主题是前面所定义的方法, 其特征在于: 得自脱水作用的产物通过从二甲基甲酰胺(DMF)/乙腈、DMF/丙酮或DMF/AcOEt混合物中结晶而纯化。

因此, 本发明非常特别的主题是前面所定义的方法, 其特征在于: 还原胺化反应在选自与 TiCl_4 偶联的 NaBH_3CN , $\text{NaBH}(\text{Boc-L-pro})_3$ 和 $\text{NaBH}(\text{Bzl-L-Pro})_3$ 的还原剂存在下进行。

因此, 本发明的主题还有 4S 或 4R 形式或两种立体异构体混合物形式的 1-[4-[(2-氨基乙基)氨基]-N2-[[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-丝氨酸棘白菌素 B 的二盐酸盐。

前述方法使得通过色谱法分离各异构体之前可得到占多数的式(I)或(Ia)化合物的异构体 A。

因此, 本发明的主题还有由前述方法得到的活性异构体 A 形式的 1-[4-[(2-氨基乙基)氨基]-N2-[[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-丝氨酸棘白菌素 B 的二盐酸盐。

本发明的主题还有作为药物并尤其作为抗真菌药物的、4S 或 4R 形式或两种立体异构体混合物形式的 1-[4-[(2-氨基乙基)氨基]-N2-[[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-丝氨酸棘白菌素 B 的二盐酸盐。

最后, 本发明的主题是含有 4S 或 4R 形式或两种立体异构体混合物形式的 1-[4-[(2-氨基乙基)氨基]-N2-[[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-S-L-丝氨酸棘白菌素 B 的二盐酸盐和可药用载体的药物组合物。

在 WO 99/29716 中, 制备了碱或三氟乙酸盐形式的 1-[4-[(2-氨基乙基)氨基]-N2-[[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-丝氨酸棘白菌素 B(实施例 14)。该二盐酸盐的优点是具有更好的稳定性和水中的溶解性。而且, 该二盐酸盐是优选的可药用盐, 即为本发明的主题。

实施例 1

1-[4-[(2-氨基乙基)氨基]-N2-[[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-丝氨酸棘白菌素 B 的二盐酸盐

I) 第一阶段：将式(II)化合物酰化，得到式(III)化合物

1-[(4R,5R)-4,5-二羟基-N2-[[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-丝氨酸棘白菌素 B

路线 1：经由分离的五氟苯酚的活化酯

步骤 1：活化酯的制备

4'-辛氧基-联苯基-4-甲酸五氟苯基酯

将 100g 4-辛氧基联苯基-4'-甲酸和 62g 五氟苯酚引入 1L 二氯甲烷中。搅拌 15 分钟，并在 15 分钟内加入 69.6g N,N'-二环己基碳二亚胺的 500mL 二氯甲烷溶液。将深褐色的悬液在室温下搅拌 20 分钟。过滤二环己基脲并浓缩滤液。通过规律添加乙醇至蒸气温度为 74℃，蒸馏至恒定体积。将反应介质冷却至室温，然后搅拌 1 小时，过滤，之后用乙醇洗涤。干燥后，得到晶体形式的 145.7g 期望产物。

产率：96.5 %

NMR(CDCl₃) : 8.23-7.72(AA'BB')4H ; 7.01-7.60(AA'BB')4H ; 4.02(t)2H; 1.82(五重峰)2H; 1.48(五重峰)2H; 1.32(m)8H; 0.89(t)3H。

步骤 2：酰化

引入 60mL DMF 中的 23.2g 式(II)化合物(根据 WO 99/29716 的制备 2 制备的“去氧牟伦多菌素核”)和 14.1g 以上所得的酯。将 6.7mL 二异丙基乙基胺引入该悬液中，并在氮气氛围和室温下搅拌 24 小时。将该均相反应介质在 10 分钟内倾入 1L 水中，同时适度搅拌，将该悬液搅拌 2 小时，过滤并用水洗涤固体。将该固体在真空和室温下干燥，然后于 100mL 二氯甲烷中在氮气氛围下回流，同时搅拌 2 小时(40℃)，之后在 1 小时内冷却至室温，搅拌 1 小时，过滤固体，将该固体用二氯甲烷冲洗三次，并在真空和室温下干燥。得到米色固体形式的 26.9g 期望产物。

产率：91.5 %

TLC: Rf: 0.13 硅胶板; UV 254 nm 显影; 洗脱剂: CH₂Cl₂-MeOH-水: 86-13-1

NMR: (DMSO)

苏氨酸: 8.16(1H), 4.85(1H), 4.41(1H), 1.13(3H); γ -羟基脯氨酸: 4.42(1H), 1.92-2.28(2H), 4.44(1H), 3.86-3.70(2H); β -羟基高酪氨酸 7.36(1H), 4.23(1H), 4.20(1H), 2.53-2.46(2H), 6.98(2H), 6.68(2H); 丝氨酸: 7.40(1H), 4.86(1H), 3.66-3.60(2H); β -羟基- γ -甲基脯氨酸: 4.27(1H), 4.03(1H), 2.38(1H), 0.99(3H), 3.25-3.93(2H); 鸟氨酸: 7.98(1H), 5.16(1H), 3.96(1H), 8.54(1H), 4.44(1H), 1.98(2H); 芳族和辛氧基链: 7.98(2H), 7.71(2H), 7.68(2H), 7.02(2H), 4.00(2H), 1.72(2H), 1.41(2H), 1.28(2H), 1.25(2H), 1.31(2H), 1.27(2H), 0.86(3H)。

路线 2: 经由分离的 HOSu 的活化酯

步骤 1: 活化酯的合成

4'-辛氧基-联苯基-4-甲酸 2,5-二氧化-吡咯烷酯

引入 9.3g 辛氧基联苯基甲酸、93mL 二氯甲烷、3.8g N-羟基琥珀酰亚胺和 6.3g EDC, 并在室温下搅拌 3 小时。加入 6mL 水, 搅拌 10 分钟, 之后淬析并用 45mL 二氯甲烷反萃取。将有机相用水洗涤(3 × 45mL)并经硫酸钠干燥。真空干燥后, 得到晶体形式的 12.05g 期望产物。

产率: 99.9 %

NMR: CDCl₃: 8.2-7.65(AA'BB')4H; 7.6-6.97(AA'BB')4H; 4.02(t,2H); 2.93(宽)4H; 1.83(五重峰 2H); 1.45(m)2H; 1.3(m)8H; 0.9(t)3H。

步骤 2: 酰化

将 1.43g 如上制备的琥珀酰亚胺酯溶解于 6mL DMF 中。引入 2.42g “去氧牟伦多菌素核” (根据 WO 99/29716 的制备 2 制备) 和 0.66mL 二异丙基乙基胺。将该溶液在室温下搅拌 18 小时。引入 35mL 水并在室温下搅拌 2 小时。过滤后, 在反应容器中搅拌 2 小时将固体溶于 30mL 水中, 之后过滤并用水冲洗。将固体在真空和室温下干燥, 得到米色固体形式的 2.75g

期望产物。

产率：98.2 %

路线 3: 用 DMTMM 直接活化的合成法

将 2.8g 去氧牟伦多菌素(根据 WO 99/29716 的制备 2 制备)溶解于 8.3mL N-甲基吡咯烷酮中。加入 1.12g 辛氧基联苯基甲酸和 0.95g 氯化 4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基-吗啉鎓(DMTMM)。在室温下搅拌 24 小时后,在搅拌下将反应介质倾入 133mL 水中。搅拌 20 分钟,将固体过滤并用水冲洗三次(3 × 7mL)。在真空和 40℃下干燥后,得到米色固体形式的 2.66g 期望产物。

产率：73.5 %

II)第二阶段: 脱水(得到式(IVa)化合物)

1-[N2-[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-4-氧代-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-色氨酸-棘白菌素 B

路线 1: 经由式(IIIa')化合物

步骤 1: 烷基化

1-[(4R,5R)-4-羟基-5-甲氧基-N2-[[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-丝氨酸棘白菌素 B(IIIa')

将 283g 第一阶段中所得的产物 IIIa 溶解于 5.67L 甲醇中。在搅拌下一次性加入 22.7g 对甲苯磺酸吡啶鎓,并在回流(42℃)下搅拌 6 小时,在室温下搅拌 12 小时。真空浓缩至两个残余物体积,然后加入 1.2 升水。将悬液搅拌 18 小时。过滤固体并用水冲洗两次。在烘箱中于真空和室温下干燥后,得到米色粉末形式的 270.5g 期望产物。

产率：94.2 %

NMR: (DMSO)

苏氨酸: 8.11(1H), 4.84(1H), 4.41(1H), 1.11(3H); γ -羟基脯氨酸: 4.40(1H), 1.91-2.27(2H), 4.42(1H), 3.67-3.87(2H); β -羟基-高酪氨酸:

7.32(1H), 4.22(1H), 4.18(1H), 2.51-2.44(2H), 6.96(2H), 6.65(2H), 9.03(1H); 丝氨酸: 7.36(1H), 4.87(1H), 3.58-3.63(2H); β -羟基- γ -甲基脯氨酸: 4.32(1H), 4.05(1H), 2.37(1H), 1.00(3H), 3.27-3.94(2H); 鸟氨酸: 7.88(1H), 4.94(1H), 4.06(1H), 8.50(1H), 4.43(1H), 3.16(3H); 1.93-2.03(2H); 芳族和辛氧基链: 7.97(2H), 7.70(2H), 7.65(2H), 7.02(2H), 4.00(2H), 1.73(2H), 1.43(2H), 1.32(2H), 1.27-1.28(6H), 0.87(3H)。

步骤 2: 脱水

将 265.3g 以上所得的甲氧基化产物(IIIa')溶解于 5.3L 二氧杂环己烷中。在 20 分钟内加入 71.8mL α -乙酰氧基异丁酰溴(AIBB)。将该介质搅拌 7 小时。在 15 分钟内加入 4.1L 饱和碳酸氢钠(NaHCO_3)水溶液。搅拌 15 分钟, 并在真空和不超过 30℃ 的温度下蒸馏二氧杂环己烷。加入 3.2L 水并在室温下搅拌 15 小时。过滤固体并用水冲洗 2 次。在烘箱中真空干燥后, 得到赭色固体形式的 251.2g 期望产物。

产率: 97.5 %

将该产物根据下述制备法结晶。

路线 2: 从第一阶段中所得产物(IIIa)开始, 与 AIBB/ MgI_2 /二氧杂环己烷作用

将 23.26g 无水碘化镁悬浮于 500mL 二氧杂环己烷中并搅拌 30 分钟。引入 12.25mL α -乙酰氧基异丁酰溴(AIBB), 并将赭色悬液在室温下搅拌 45 分钟。在 1 小时内加入 50g 第一阶段中所得产物(IIIa)溶解于 400mL 二氧杂环己烷中的溶液, 并用 25mL 二氧杂环己烷冲洗该添加漏斗。将该悬液在室温下搅拌 19 小时。在 30 分钟内引入 5g 碳酸氢钠溶解于 50mL 水中的溶液(添加结束时 pH 为 5-6)。搅拌 2 小时, 之后在内部温度低于 35℃ 下真空蒸馏至残余体积为 250mL。重新使氮压达到大气压, 加入 200mL 二甲基甲酰胺, 之后真空蒸馏至残余体积为 250mL, 并将该溶液在室温下倾入 2.8L 水中。用 DMF 冲洗后, 搅拌 1 小时。过滤固体并用水冲洗。将固体在真空和 30℃ 下干燥 24 小时。得到米色固体形式的 46g 期望产物。

产率: : 98.6 %

然后将该产物根据下述方法结晶。

路线 3: 从第一阶段中得到的产物 IIIa 开始, 与 HBr-AcOH/MgI₂/MEK 作用

将 10g 阶段 I) 所得的产物溶解于 180mL 甲乙酮(MEK) 中。引入 4.65g 无水碘化镁和 10mL MEK。在室温下搅拌 35 分钟, 然后冷却至 20℃。引入 3mL 33 % 的 HBr 的 AcOH 溶液。将该悬液在 20℃ 下搅拌 4 小时。加入 10mL 饱和 NaHCO₃(碳酸氢钠) 水溶液。在 20℃ 下搅拌 1 小时(溶解)。将该溶液在 2 小时内倾入 700mL 水中, 同时在真空和 40℃ 下蒸馏 MEK。蒸馏进行至残余体积为 430mL。加入 100mL 水, 继续蒸馏至残余体积为 430mL。重复该操作两次。使该悬液达到室温并搅拌过夜。将固体过滤并用水洗涤 3 次, 每次用 50mL。在真空和室温下干燥后, 得到米色粉末形式的 9.3g 期望产物。

将该产物根据下述方法结晶纯化。

产率: 94.5 %, 不考虑溶剂。

以上所得式(IVa)产物(路线 1、2 或 3)的结晶

将 10g 1-[N2-[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-4-氧代-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-色氨酸-棘白菌素 B(以上路线 1、2 或 3 所得)在 1 小时内在搅拌和室温下溶解于 30mL 二甲基甲酰胺(DMF) 中。引入 51 mg 引发剂(根据路线 1、2 或 3 得到产物的晶体)并搅拌 2 小时。然后在 2 小时内逐步引入 67mL 乙腈。在引入结束时, 搅拌 19 小时, 之后过滤并用乙腈冲洗三次, 每次用 10mL。在真空和室温下干燥后, 得到白色晶体形式的 7.10g 期望产物。

产率: 71 %

TLC: R_f = 0.28

硅胶 60F₂₅₄, UV 254 nm

流动相: CH₂Cl₂/MeOH/水 86/13/1

NMR: (DMSO)

苏氨酸: 7.94(1H), 4.50(1H), 4.25(1H), 1.18(3H); γ -羟基脯氨酸: 4.39(1H), 1.93-2.20(2H), 4.40(1H), 3.85-3.71(2H); β -羟基高酪氨酸: 7.53(1H), 4.06(1H), 4.25(1H), 2.44-2.53(2H), 6.96(2H), 6.66(2H), 9.06(1H); 丝氨酸: 7.74(1H), 4.96(1H), 3.72(2H); β -羟基- γ -甲基脯氨酸: 4.33(1H), 3.98(1H), 2.31(1H), 0.99(3H), 3.26-4.0(2H); 鸟氨酸: 8.37(1H), 3.84-3.64(2H), 8.11(1H), 4.83(1H), 2.82-3.11(2H); 芳族和辛氧基链: 7.91(2H), 7.69(2H), 7.66(2H), 7.02(2H), 4.02(2H), 1.74(2H), 1.43(2H), 1.32-1.28(6H), 1.28(2H), 0.87(3H)。

III: 第三阶段: 将式(IVa)化合物还原胺化, 得到式(Ia)化合物

1-[4-[(2-氨基乙基)氨基]-N2-[[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-丝氨酸棘白菌素 B

路线 1:

将8g根据阶段II得到的式(IVa)化合物和 2.52mL 乙二胺溶解于80mL 四氢呋喃(THF)中, 同时在氮气和室温下搅拌 30 分钟至 1 小时。在 30 分钟内引入 0.36g 四氯化钛溶解于 80mL THF 中的溶液。搅拌 1 小时, 之后冷却至 5℃。加入溶解于 16mL THF 中的 3.2mL 冰醋酸。在 5℃下搅拌 1 小时, 然后冷却至 0℃, 在 15 分钟内加入 1.04g 氰基硼氢化钠溶解于 24mL THF 中的溶液。使反应介质在 30 分钟内升温至 5℃并在该温度下搅拌 30 分钟。然后升温至室温, 同时搅拌 3 小时, 之后真空蒸馏至体积为 40mL, 加入 7.2g 碳酸氢钠溶解于 80mL 水中的溶液, 真空蒸馏至残余体积为 80mL, 然后加入 32mL 甲醇和 128mL 乙酸乙酯。搅拌 10 分钟, 之后淬析, 用乙酸乙酯/甲醇混合物对水相进行反萃取, 并在真空下蒸馏所有有机相至残余体积为 40mL。引入 40mL DMF, 继续蒸馏至残余体积为 60mL。将该溶液在 20 分钟内倾入 320mL 水中, 并在室温下搅拌 15 小时。必要时用稀苏打将 pH 调节至 9-9.5, 之后过滤并用 1.2g 碳酸氢钠的水溶液(pH 9-9.5)

冲洗。将固体于烘箱中在真空和 30℃ 下干燥 18 小时后，得到白色固体形式的 8.55g 期望的粗碱。

产率：100 %

异构体比例 A/B = 80/20

路线 2:

在搅拌和氮气氛下将 10g 阶段 II) 所得的式(IV)产物引入 600mL THF 中。然后依次加入 20g 3Å 分子筛、3.16mL 乙二胺和 110.4g 三-苄基-L-脯氨酸硼氢化钠。将该均相溶液在室温下搅拌 6 小时，之后将分子筛过滤并用 THF 冲洗。将滤液在真空和低于 40℃ 的内部温度下蒸馏至干。将 600mL 饱和碳酸氢钠水溶液缓慢加至所得树脂上，同时搅拌。将 20g Hyflosupercel Kieselgühr 过滤剂加入该悬液中，并在室温下搅拌 16 小时，之后过滤并用水洗涤。通过使 100mL 甲醇通过四次将滤饼溶解。将甲醇滤液在真空和不超过 40℃ 的温度下浓缩至干。得到 21.25g 期望产物。

路线 3:

还原胺化反应的中间体(式 IV'a)的分离

1-[4-[N,N'-咪唑烷]-N2-[[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-L-鸟氨酸]-4-[4-(4 羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-丝氨酸棘白菌素 B

将阶段 II) 中所得的式(IVa)产物在 40mL 二氯甲烷和 0.32mL 乙二胺中的悬液搅拌 18 小时。加入 80mL 乙醚并搅拌 5 小时。将固体过滤并用乙醚冲洗几次。于烘箱中在真空和室温下干燥 15 小时后，得到白色固体形式的 0.76g 期望化合物。然后使该中间体进行前面路线 1 或 2 的还原反应。该分离的化合物是新化合物并且构成本发明的组成部分。

产率：73 %

MASS: (FAB) MH^+ 1100; MNa^+ : 1122

NMR: 苏氨酸: 8.51(1H), 4.72(1H), 4.38(1H), 1.20(3H); γ -羟基脯氨酸: 4.37(1H), 1.90-2.22(2H), 4.42(1H), 3.88-3.66(2H); β -羟基-高酪氨酸: 7.46(1H), 4.17(1H), 4.17(1H), 2.46(2H), 6.96(2H), 6.65(2H); 丝氨酸: 7.47(1H), 4.84(1H), 3.65-3.60(2H); β -羟基- γ -甲基脯氨酸: 4.22(1H),

3.93(1H), 2.29(1H), 0.95(3H), 3.22-3.90(2H); 鸟氨酸: 7.45(1H), 2.72-3.51(2H), 9.55(1H), 4.28(1H), 1.63-2.12(2H); 咪唑烷: 2.63-2.94(2H); 2.78-3.02(2H); 芳族和辛氧基链: 7.87-7.72(2H, 2H), 7.66(2H), 7.03(2H), 4.02(2H), 1.72(2H), 1.27、1.32、1.43(4 × 2H), 1.29(2H), 0.88(3H)。

IV): 第四阶段: 前面所得的式(Ia)化合物(根据路线 1、2 或 3)的色谱纯化和两种异构体 A 和 B(A 或 B 对应于 4 位的立体异构体 R 或 S)的分离

1-[4-[(2-氨基乙基)氨基]-N2-[[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-丝氨酸棘白菌素 B 的二-三氟乙酸盐

利用二氯甲烷(43)-乙腈(50)-甲醇(7)-水(5)-三氟乙酸(1)混合物作为流动相, 以将 2.5g Merck 11763 硅胶填充 Prochrom LC 200 柱并使之平衡。将 24g 以上所得的化合物(阶段 III, 路线 1)溶解于 126mL 由乙腈(50)-甲醇(7)-水(5)-TFA(1)组成的混合物中。将该溶液过滤并加入 86mL 二氯甲烷。将该溶液注入柱中。以 76 L/h 的流速并在 14 巴的压力下洗脱。在 280 nm 处进行检测, 之后在真空和不超过 40℃的内部温度下蒸馏收集的各级分。得到 36.75g 产物, 为固体二-TFA 盐的形式。

异构体比例 A/B = 99.3/0.7

V): 第五阶段: 二-三氟乙酸盐的色谱纯化(除去其它盐)

利用水(90)-乙腈(10)-三氟乙酸(0.1)混合物作为流动相, 以 300g 反相 Daisogel SP 120 n° 5/1502 硅胶填充 Prochrom LC 50 柱并使之平衡。将以上第一次色谱分离中所得的 36.75g 盐溶解于含 57.3mL 水(90)-乙腈(10)-三氟乙酸(0.1)和 26.8mL 纯乙腈的混合物中。将该溶液过滤并将其注入柱中。首先用水(90)-乙腈(10)-三氟乙酸(0.1)洗脱以除去无机盐, 然后用水(50)-乙腈-(50)-三氟乙酸(0.1)洗脱以除去产物。将收集的各级分在真空和不超过 40℃的内部温度下蒸馏。将所得的清澈水溶液冻干。得到 15.59g 期望产物, 为絮状白色固体的二-TFA 盐的形式。

异构体比例 A/B = 99.4/0.6

两次色谱分离的累积产率: 53.8 %

氨基还原的产率: 28.7 %

VI)第六阶段: 返回到碱

1-[4-[(2-氨基乙基)氨基]-N2-[[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-丝氨酸棘白菌素 B

将 14.37g 以上所得的冻干的二-三氟乙酸盐形式的化合物溶解于 143.7mL 水中。在氮气下搅拌 15 分钟,并在 15 分钟内在室温下加入 57.5mL 饱和碳酸氢钠水溶液。搅拌 17 小时。加入 430mL 乙酸乙酯/甲醇的 8/2 混合物并搅拌 15 分钟。滗出上层有机相并用 288mL 乙酸乙酯(8)-甲醇(2)混合物对水相进行反萃取。将各有机相合并、小心滗析并在真空和不超过 35℃ 的温度下蒸馏至干。向干萃取物中加入 143.7mL 水,并将该悬液搅拌 30 分钟,之后过滤并用水洗涤,直至不再有氟化物。在将固体于真空和 40℃ 下干燥后,得到白色粉末形式的 10.91g 期望产物。

产率: 91.6 %

微量分析: (水: 8.8 %)

%	理论值	实测值
C	61.020	55.3-55.1
H	07.224	7.5-7.4
N	11.437	10.3-10.3
F	0	未检测

VII): 第七阶段: 成盐(盐酸)

1-[4-[(2-氨基乙基)氨基]-N2-[[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-丝氨酸棘白菌素 B 的二盐酸盐

将 10.53g 前面阶段得到的化合物溶解于 263mL 甲醇中,同时在室温下搅拌 30 分钟,之后过滤并用 31.6mL 甲醇冲洗 2 次。在搅拌、氮气氛和室温下加入 2.1mL 36 % 的盐酸。搅拌 30 分钟,之后在真空和不超过 35℃

的温度下蒸馏至干。将干萃取物溶解于 105.3mL 二异丙基醚中。将所得悬液搅拌 2 小时。之后过滤并用二异丙基醚洗涤 2 次, 每次用 21.1mL。在将固体于烘箱中在真空和 40℃ 下干燥后, 得到白色粉末形式的 10.52g 期望产物。

产率: 93.7 %

微量分析: (水 5.75 %)

%	理论值	实测值
C	57.2	54.3
H	6.95	7.4
N	10.73	9.8
Cl	6.03	5.95
F	0	未检测

VIII: 第八阶段: 盐酸盐的结晶

1-[4-[(2-氨基乙基)氨基]-N2-[[4'-(辛氧基)-[1,1'-联苯基]-4-基]羰基]-L-鸟氨酸]-4-[4-(4-羟基苯基)-L-苏氨酸]-5-L-丝氨酸棘白菌素 B 的二盐酸盐

将 2.75g 根据阶段 VII 所得的化合物溶解于 235.4mL 乙腈和 14.8mL 去除矿物质水的混合物中, 同时加热回流(77.4℃)。在 77℃ 下搅拌 15 分钟, 然后将反应介质在 45 分钟内冷却至 +50℃。用 41.25 mg 结晶化合物引发, 之后在 30 分钟内逐步冷却至 20℃, 并搅拌 2 小时 15 分钟, 使结晶得以发展。将该悬液真空浓缩至残余体积为 55mL, 同时使温度从 5℃ 升至 20℃。重新建立常压氮气, 之后在 20 分钟内冷却至 0℃, 在 0℃ 下搅拌 17 小时, 在氮气压下过滤并用 11mL 乙腈冲洗。在将结晶固体于烘箱中在真空和 40℃ 下干燥后, 得到白色结晶固体形式的 2.29g 期望产物。

产率: 83.3 %

HPLC: Rt = 5.8(异构体 A); Rt = 7.1(异构体 B)

Kromasil C18, 15cm, 4.6 mm, 5µm

流动相: 乙腈-水-TFA 50/50/0.1

210 nm, 35°C, 1mL/min.

NMR: CDCl₃

9.07(m)1H; 8.48(d, j=8)1H; 8.00(d, j=8)2H; 7.96(d, j=8.5)2H; 7.71(d, j=8.5)2H; 7.64(d, j=8.5)2H; 7.60(d, j=9)1H; 7.37(d, j=9.5)1H; 7.02(d, j=8.5)2H; 6.97(d, j=8.5)2H; 6.65(d, j=8.5)2H; 4.90(m)1H; 4.77(m)1H; 4.66(m)1H; 4.45(m)1H; 4.42(m)1H; 4.39(m)1H; 4.34(s)1H; 4.26(m)1H; 4.22(m)1H; 4.08(m)1H; 4.01(t, j=6.5)2H; 3.88(m)3H; 3.70(m)2H; 3.51(m)2H; 3.48(m)1H; 3.31(m)2H; 3.28(m)1H; 3.16(m)2H; 2.53(dd, j=6 和 13.5)1H; 2.44(dd, j=7.5 和 13.5)1H; 2.27(m)1H; 2.25(m)1H; 2.15(m)2H; 1.94(m)1H; 1.74(m)2H; 1.44(m)2H; 1.22-1.40(m)8H; 1.13(d, j=6)3H; 0.99(d, j=6.5)3H; 0.88(t, j=7)3H.

实施例 2: 药物组合物

制备含有如下组分的片剂:

实施例 1 的产物	150 mg
-----------	--------

赋形剂 s.q.f.	1g
------------	----

赋形剂的具体实例: 淀粉、滑石、硬脂酸镁。