

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 5/107

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 5/083 C07K 1/02

C07K 1/06

[21] 申请号 99806071.2

[43] 公开日 2001 年 6 月 20 日

[11] 公开号 CN 1300293A

[22] 申请日 1999.3.16 [21] 申请号 99806071.2

[30] 优先权

[32] 1998.3.16 [33] SE [31] 9800865-9

[86] 国际申请 PCT/SE99/00414 1999.3.16

[87] 国际公布 WO99/47548 英 1999.9.23

[85] 进入国家阶段日期 2000.11.13

[71] 申请人 阿斯特拉曾尼卡有限公司

地址 瑞典南泰利耶

[72] 发明人 H·弗兰岑

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

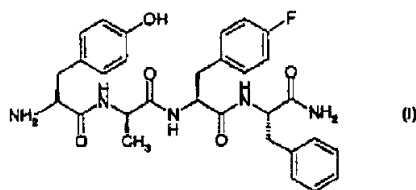
代理人 谭明胜

权利要求书 7 页 说明书 30 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 四肽的制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种新的和改进的制备四肽 H-Tyr-D-Ala-Phe(F)-Phe-NH₂ (它是一种式(1)的肽)或其药学上可接受的盐的方法,以及其制备中的新的中间产物。这种新的方法适用于大规模生产。

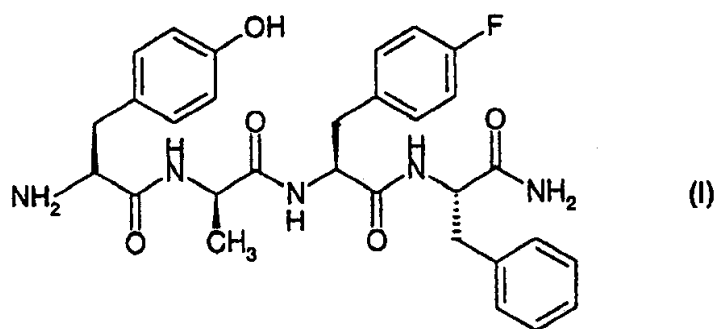


I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权利要求书

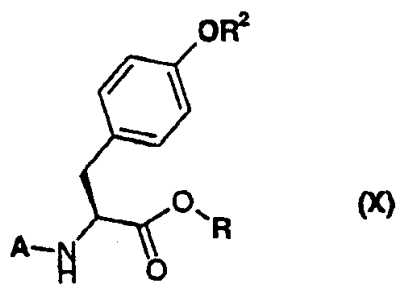
1. 制备式(I)四肽 H-Tyr-D-Ala-Phe(F)-Phe-NH₂ 或其药学上可接受的盐的方法, 包括以下步骤:

5



(i) 一个偶合步骤, 其中在标准条件下, 一种活化酪氨酸衍生物(X), 在溶剂存在下, 与三肽衍生物(9)反应, 提供保护的四肽衍生物(XI), 式(X)、(9)和(XI)化合物的

10 结构式如下:

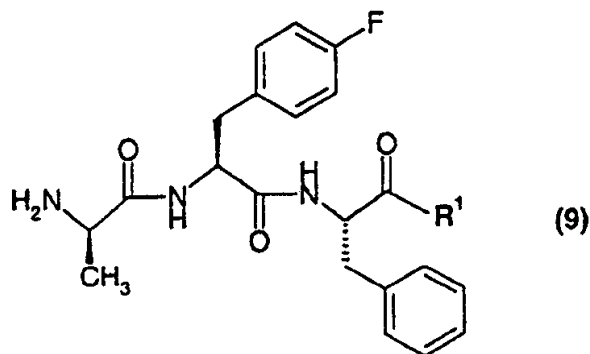


其中

A 是一种氨基保护基团,

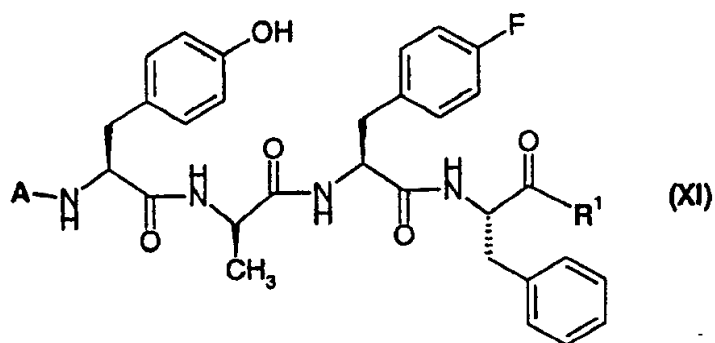
15 R 是一种活化剂残基, 和

R² 是 H 或类似苄基的基团;



其中

R^1 是一种酯或酰胺残基;



5

其中

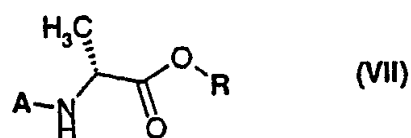
A 是一种氨基保护基, 和

R^1 是一种酯或酰胺残基;

(ii) 一个脱保护步骤, 其中被保护的四肽衍生物(XII), 在标准条件下, 在溶剂存在下, 通过催化氢化作用、碱或酸处理而脱保护, 得到(I).

2. 根据权利要求 1 的方法, 其特征在于包括如下另外的步骤:

(i) 一个偶合步骤, 其中在标准条件下, 一种活化的丙氨酸衍生物(VII)与二肽衍生物(5)在溶剂的存在下反应, 得到被保护的三肽衍生物(VIII), 式(VII)、(5)和(VIII)化合物的结构式如下:

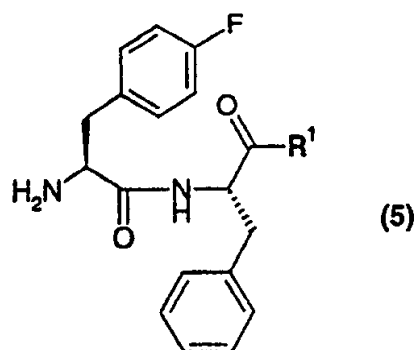


15

其中

A 是一种氨基保护基团, 和

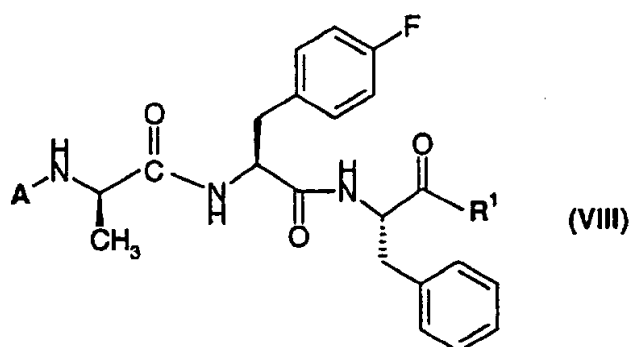
R 是一种活化剂的残基;



5

其中

R¹ 是酯或酰胺残基;



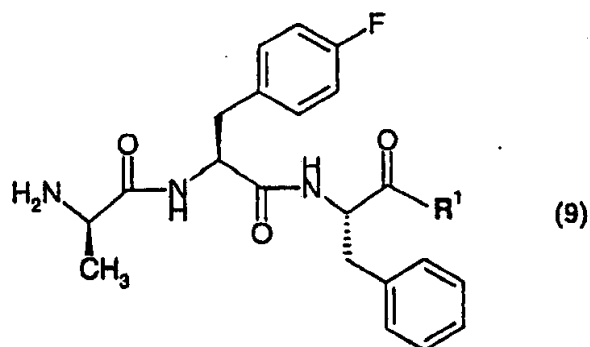
10 其中

A 是一种氨基保护基团, 和

R¹ 是酯或酰胺残基;

(ii) 脱保护步骤, 其中在前面步骤中制备的、被保护的三肽衍生物 (VIII) 在标准的条件下, 在溶剂存在下, 通过催化氢化作用、碱或酸处

15 理被脱保护, 得到三肽衍生物(9):

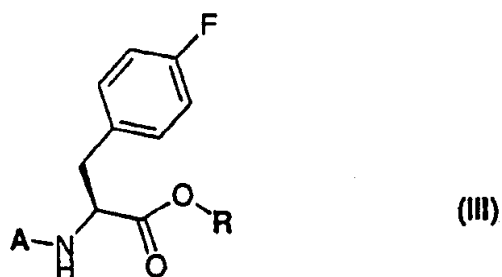


其中

R^1 是酯或酰胺残基。

3. 权利要求 2 的方法，其特征在于包括如下另外的步骤：

- 5 (i) 一个偶合步骤，其中在标准的条件下，在溶剂的存在下，活化的 p-氟苯丙氨酸衍生物(III)与苯丙氨酸的氨基反应，其中羧基作为酯或酰胺被保护，得到被保护的二肽衍生物(IV)，式(III)和(IV)化合物的结构式如下：

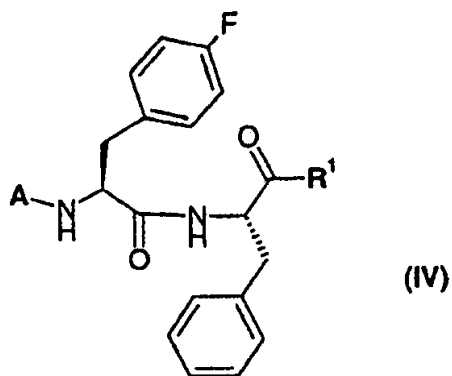


10

其中

A 是氨基保护基团，和

R 是活化剂残基；

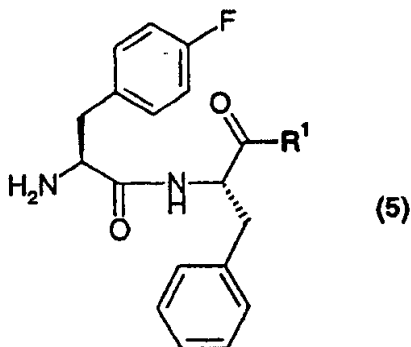


其中

A 是氨基保护基团，和

R¹ 是酯或酰胺残基；

- 5 (ii) 一个脱保护步骤，其中在以上步骤中制备的被保护的二肽衍生物(IV)，在标准的条件下，在溶剂的存在下，通过催化氢化作用、碱或酸处理被脱保护，得到二肽衍生物(5)：



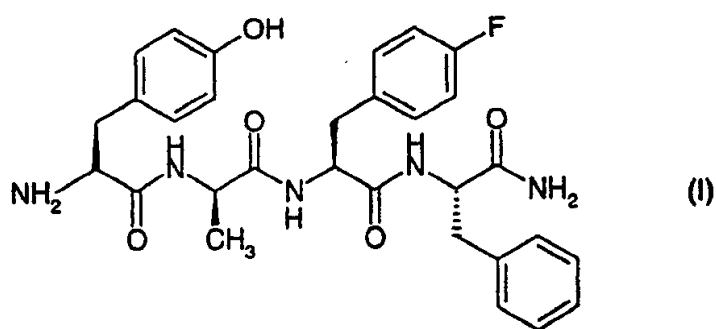
10 其中

R¹ 是酯或酰胺残基。

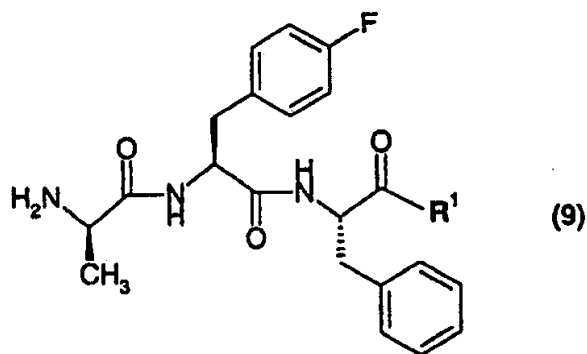
4. 根据权利要求 1-3 的方法，其特征在于所述偶合步骤(i)之一后跟着任选的转化步骤，如果所述氨基酸衍生物的羧基作为酯衍生物被保护，其中酯化合物在有机乙醇中与氨反应进行。

- 15 5. 根据权利要求 1-3 的方法，其特征在于在至少一个偶合步骤中使用的活化氨基酸衍生物选自碳二亚胺、活化酯、叠氮化物或酸酐。

6. 根据权利要求 5 的方法, 其中所述活化剂是氯代甲酸异丁酯。
7. 根据权利要求 1-6 中任何一项的方法, 其特征在于用于至少一个偶合步骤中的溶剂是丙酮、乙腈、NMP、DMP 或 EtOAc。
8. 根据权利要求 1-3 的方法, 其中在偶合步骤中的溶剂是
- 5 DMF。
9. 根据权利要求 1-3 中任何一项的方法, 其特征在于所述脱保护步骤使用披钼木炭进行。
10. 根据权利要求 1-9 中任何一项的方法, 其特征在于至少一个反应是在 0℃ 到 -20℃ 的温度下进行。
- 10 11. 根据权利要求 10 的方法, 其中所述温度为从 -5℃ 到 -15℃。
12. 根据权利要求 1 的方法制备的式 I 肽:



13. 根据权利要求 12 的肽, 为盐酸盐的形式。
- 15 14. 式(9)的肽衍生物:



其中

R^1 是一种酯或酰胺残基。

说明书

四肽的制备方法

5 本发明领域

本发明涉及一种新的制备四肽、更准确地说是四肽 H-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂ 或其药学上可接受盐的方法。在其它方面, 本发明也涉及用于该方法中的新的中间体。

10 背景和现有技术

本发明涉及一种新的用于制备肽 H-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂ 或其药学上可接受的盐的方法。

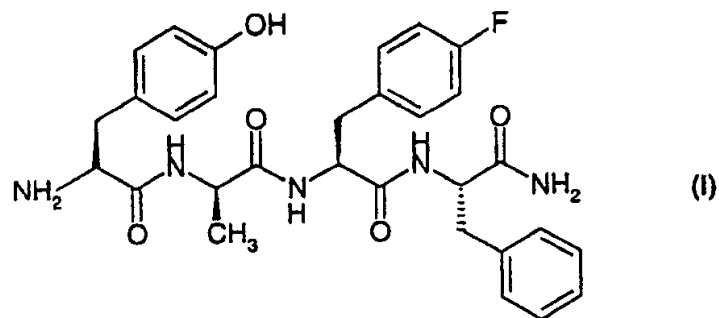
WO 97/07129 公开了一种尤其用于制备肽 H-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂ 的方法。该肽 H-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂ 也公开于 WO 97/07130 中。所述肽显示出外周止痛活性和对阿片样物质受体 μ 亚型的选择性, 并特别适用于疼痛的治疗。此外, 该肽可以采用根据本领域成熟方法的固相合成法制备。固相合成法(一种用于肽合成的常用及成熟的方法)的缺陷在于除了成本昂贵外, 难用于大规模生产。

本发明方法以与本领域已知方法相比成本更低和对环境更有利的方式提供高纯度的四肽 H-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂。此外, 本申请的方法提供更高收率的产品。

因此, 本发明的目地是提供一种适合大规模合成使用的新方法。本方明的另一个目地是提供一个包括尽可能少的反应步骤的方法。

25 本发明概述

本发明提供一种大规模地制备肽 H-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂ 的新方法, 它是一种如式(I)所示的肽或其药学上可接受的盐:

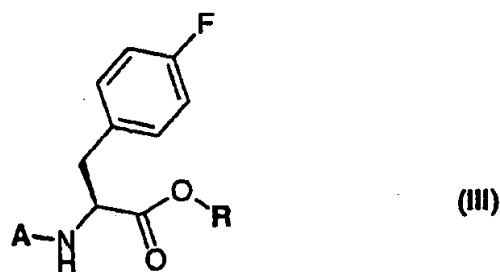


根据本发明制备如上式(I)化合物的方法包括如下反应步骤:

步骤 1

- 5 (i) 一个偶合步骤, 其中通过预先活化步骤或就地产生预先制备的、活化的 p-氟苯丙氨酸衍生物(III)与苯丙氨酸的氨基(其中羧基作为酯或酰胺被保护, 即式 Phe-R¹ 化合物, 其中 R¹ 是酯或酰胺残基)在溶剂的存在下反应, 得到被保护的二肽衍生物(IV), 式(III)和(IV)的结构式如下:

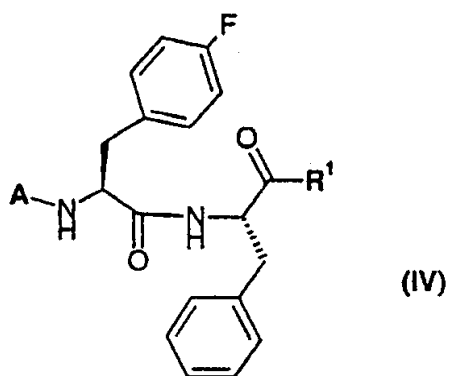
10



其中

A 是氨基保护基团, 和

R 是活化剂残基;

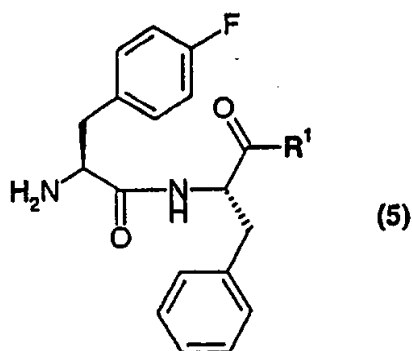


其中

A 是氨基保护基团，和

R¹ 是酯或酰胺残基；

- 5 (ii) 一个脱保护步骤，其中在以上步骤中制备的被保护的二肽衍生物(IV)，根据所用的氨基保护基团，通过催化氢化作用、碱或酸处理来脱保护，得到二肽衍生物(5)：

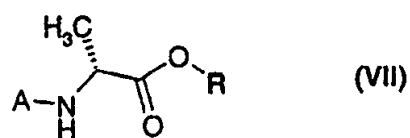


10 其中

R¹ 是酯或酰胺残基；

步骤 2

- 15 (i) 一个偶合步骤，其中通过预活化步骤或就地产生预先制备的活化丙氨酸衍生物(VII)，与步骤 1 的产物即二肽衍生物(5)在溶剂的存在下反应，得到被保护的三肽衍生物(VIII)，式(VII)和(VIII)化合物的结构式如下：

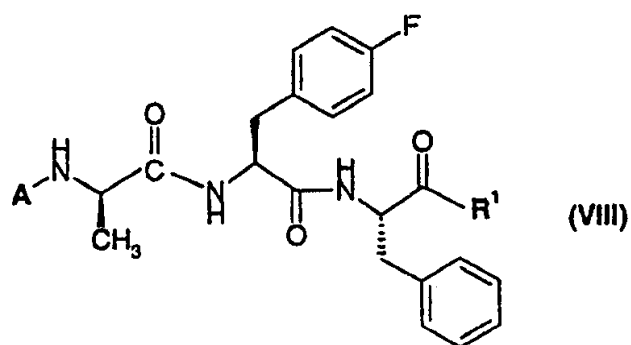


其中

A 是氨基保护基团, 和

R 是活化剂的残基;

5



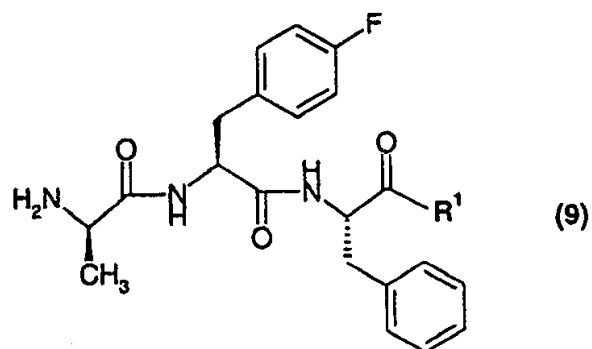
其中

A 是氨基保护基团, 和

R¹ 是酯或酰胺残基;

10

(ii) 脱保护步骤, 其中在前面步骤中制备的、被保护的三肽衍生物(VIII)根据使用的氨基保护基, 通过催化氢化作用或酸处理被脱保护, 得到三肽衍生物(9):



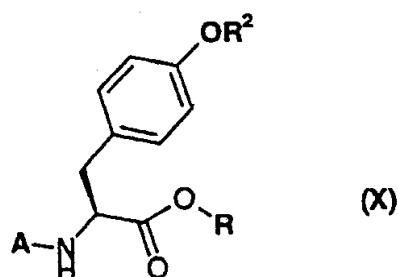
15

其中

R^1 是酯或酰胺残基;

步骤 3

- 5 (i) 一个偶合步骤, 其中通过预先活化步骤或就地产生产物预先制备的一种活化酪氨酸衍生物(X), 在溶剂存在下, 与三肽衍生物(9)(步骤 2 的产物)反应, 提供保护的肽衍生物(XI)。式(X)和(XI)化合物的结构式如下;

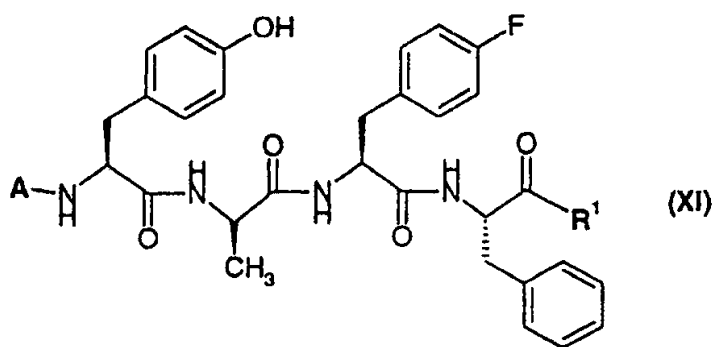


10 其中

A 是一种氨基保护基团,

R 是一种活化剂残基, 和

R^2 是 H 或类似苄基的基团;



15

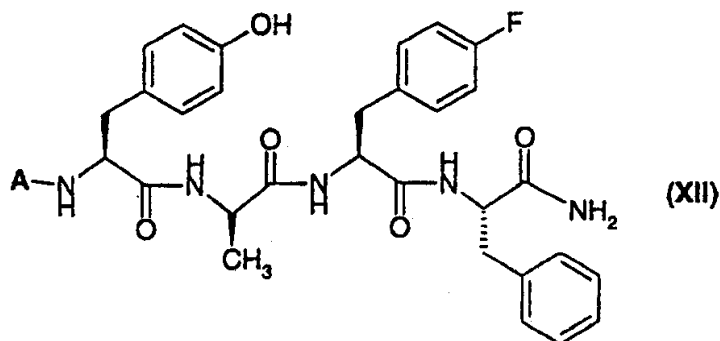
其中

A 是一种氨基保护基, 和

R^1 是一种酯或酰胺残基;

- (ii) 如果在前面步骤(i)中制备的被保护的肽衍生物(XI)是一种

酯, 则进行任选的转化反应, 其中酯化合物(XI)在有机醇中与氨反应, 优选与甲醇中的氨反应, 提供保护的二肽衍生物(XII):



(iii) 一个脱保护步骤, 其中被保护的二肽衍生物(XII), 根据所使用的氨基保护基团, 通过催化氢化作用、碱或酸处理而脱保护, 提供最终的二肽(I), 其可任选转换为二肽(I)的盐。

如果需要, 可以使肽 H-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂(I)与一种药学上可接受的酸如 AcOH、磷酸、柠檬酸、乳酸和盐酸反应。根据本发明, 盐酸是优选使用的酸。可以使用的盐在 S.M.Berge, L.D.Bighley 和 D.C.Monkhouse, J. Pharmaceut.Sci, 66(1977)1-19 中描述。

因此, 根据以上叙述的本发明方法可简述为包括下列步骤:

步骤 1

- (i) 一个偶合步骤,
- (ii) 一个脱保护步骤。

步骤 2

- (i) 一个偶合步骤,
- (ii) 一个脱保护步骤。

步骤 3

- (i) 一个偶合步骤,

(ii)一个任选的转化步骤,

(iii)一个脱保护步骤。

在以上步骤 3(ii)中描述的任选转化步骤可代之以在步骤 1 或步骤 2 中偶合步骤(i)之后进行。优选该转化步骤在步骤 1 中的偶合步骤(i)之后进行。因此, 进行本发明方法的优选方式简述为包括以下步骤:

步骤 1

(i)一个偶合步骤,

(ii)一个任选的转化步骤,

(iii)一个脱保护步骤。

步骤 2

(i)一个偶合步骤,

(ii)一个脱保护步骤。

步骤 3

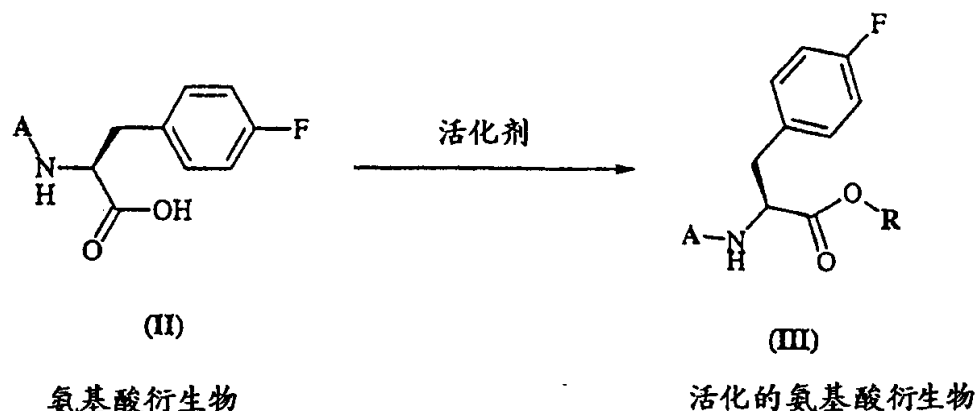
(i)一个偶合步骤,

(ii)一个脱保护步骤。

N^{α} -氨基保护基可以从适合肽合成的任何保护基中选择, 例如, 叔丁氧基羰基(Boc)或苄氧基羰基(经常缩写为 Z-), 仅是提到的两种可能的氨基保护基。然而, 苄氧基羰基特别优选用于本合成, 因为它容易通过催化氧化作用去除,与保护基 Boc 相反, 它不需要中和释放出的胺。本领域的技术人员可了解根据本发明可使用的合适的氨基和羧基保护基。参照 J.Meienhofer in The Peptides, 第 1 卷,编辑: E.Gross & J.Meienhofer,Academic Press, Inc, London, 1979, 264-309 页; The peptides,1-9 卷, E.Gross & J.Meienhofer, 编辑,Academic Press Inc,London,1979-1987;Houben-Weyl,Methoden der organischen Chemie,E.Muller,编辑,15 卷, I-II 部分,Thieme, Stuttgart 1974;和

M.Bodanszky, Principles of peptide Synthesis, Springer Verlag, Berlin 1984.

上述步骤 1-3 前的预活化步骤, 或就地产生活化的活性氨基酸衍生物, 可通过一种氨基酸在叔胺和有机溶剂的存在下, 与一种活化剂反应完成, 其中所述氨基酸的氨基官能团通过合适的保护基保护, 例如叔丁氧基羰基(Boc)或苄氧基羰基(Z)(这些保护基可以购买到或通过本领域已知技术获得), 提供活化的氨基酸衍生物。预先活化步骤可简略表示如下:



其中

A 是一种氨基保护基, 和

R 是一种活化剂残基;

对于上述 1-3 步骤中的偶合步骤而言, 只要所述氨基成分为基本上可溶的并可与活化的肽衍生物直接反应, 可使用各种强的溶剂。用于偶合步骤的合适的溶剂的实例为丙酮、乙腈、DMF、N-甲基吡咯烷酮(NMP)和 EtOAc, 或它们的混合物。

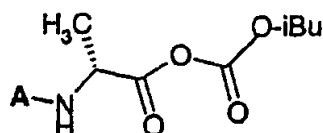
这里所用术语“类似苄基的基团”, 表示任何取代或未取代的苄基, 它们在类似的反应条件下, 作为苄氧基羰基被氢解。

术语“pF”表示对位氟取代基。

在每个步骤中可能的以及优选的反应物和反应条件如下。

预活化步骤:

合适的活化剂可选自那些产生常用的活化氨基酸衍生物的活化剂, 包括(但不限于)碳二亚胺、活化酯、叠氮化物或酸酐。氯代甲酸异丁酯($i\text{BuOCOCI}$)是优选的活化剂。当氯代甲酸异丁酯($i\text{BuOCOCI}$)为活化剂时, 活化的肽衍生物具有以下结构, 以 D-丙氨酸为例:



叔胺可选自任何叔胺。然而, 优选 NMM(N-甲基吗啉)、二异丙基乙胺和三乙胺。另外, 也可使用位阻的仲胺。

有机溶剂可以是本领域中技术人员所知的在肽化学中合适的任何有机溶剂。然而, 在预活化步骤中优选乙酸乙酯、乙腈、丙酮和四氢呋喃。

偶合步骤:步骤 1(i)、步骤 2(i)和步骤 3(i):

用于偶合步骤的溶剂可以从许多溶剂中选择, 只要氨基成分基本上可溶和可与活化氨基酸残基直接反应即可。用于偶合步骤合适的溶剂的实例为丙酮、乙腈、DMF, N-甲基吡咯烷酮(NMP)和 EtOAc , 或它们的混合物, 其中优选丙酮、 EtOAc 、NMP 和 DMF。

当活化氨基酸衍生物不降解或反应速度不是太慢时, 任何温度都可使用。优选的温度范围是 0°C 至 -20°C , 特别优选的温度是从 -5°C 至 -15°C 。调节加料的速度以便维持优选的温度。

脱保护步骤:步骤 1(ii)、步骤 2(ii)和步骤 3(iii):

用于氢化的催化剂可以从许多本领域技术人员所知的催化剂中选择。然而, 优选 5%的拔钨碳。可以使用任何至少可溶解一些肽的溶剂, 除了酮(例如丙酮)或使催化剂中毒的或与反应成分起反应的溶

剂之外。本领域技术人员了解溶剂的选择。DMF 是优选的溶剂。

只有在步骤 3(i)中制备的保护的四肽衍生物(XI)是一种酯的情况下,才需要任选步骤 3(ii)。因此,如果使用苯丙氨酸的酰胺,步骤 3(ii)将从合成流程中省去。

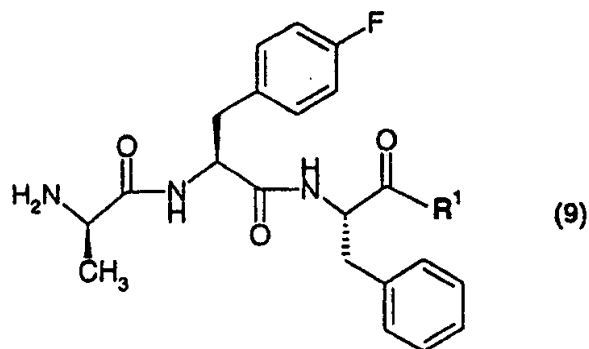
5 如果使用酸来除去 α -保护基,则需要等摩尔量的碱,以使肽衍生物的氨基脱质子化。

 在本发明优选的实施方案中,将保护的氨基酸(优选用苄氧羰基作为 Na-氨基保护基)用异丁氧基碳酰氯或类似类型的氯代甲酸酯以混合酐的形式活化。使用的方法基于 J.Meienhofer 在下列文献中所综
10 述的通用方法: The Peptides, 第一卷, 编辑: E.Gross & J. Meienhofer, Academic Press, Inc, London 1979, 264-309 页。

 我们已惊奇地发现,活化时间在 0 到-15℃ 的温度下可延长至少 30 分钟,而建议的活化时间在-15℃ 温度下为 1-2 分钟。我们也发现
15 尽管其它情况下推荐,严格的无水条件是不必要的。这使本方法可用于大规模生产,其中较长的反应时间使得可以进行安全的和可重复的过程。立体化学的完整性全部保留,化学纯度和收率一般在 90%以上。生成的混合酐在约 0 至-15℃ 温度范围内与缓慢加入的氨基成分(氨基酸/肽酰胺或酯)偶合,然后,在产物开始直接从该反应混合物中结晶前,使反应混合物在大约 30-60 分钟内或更长时间达到 20-30℃。

20 我们还惊奇地发现当使用本方法时,如果使用适当选择的溶剂混合物,则不需要结晶前的单独的洗涤步骤。优选使用 DMF、乙睛、EtOAc 和水。控制结晶,不但可以达到高度纯化,而且还可以在后续处理中缩短过滤或离心的时间,如果需要干燥的中间产物,还可缩短干燥的时间。一个重要的因素是产生足够量的、不阻塞过滤装置或离心布的相对窄的粒度分布。这尤其对于产生几乎不可能过滤的凝胶或
25 无定形结晶的肽是很常见的。

 三肽衍生物(9)是一个用于制备目标化合物(I)的有用的中间产物:



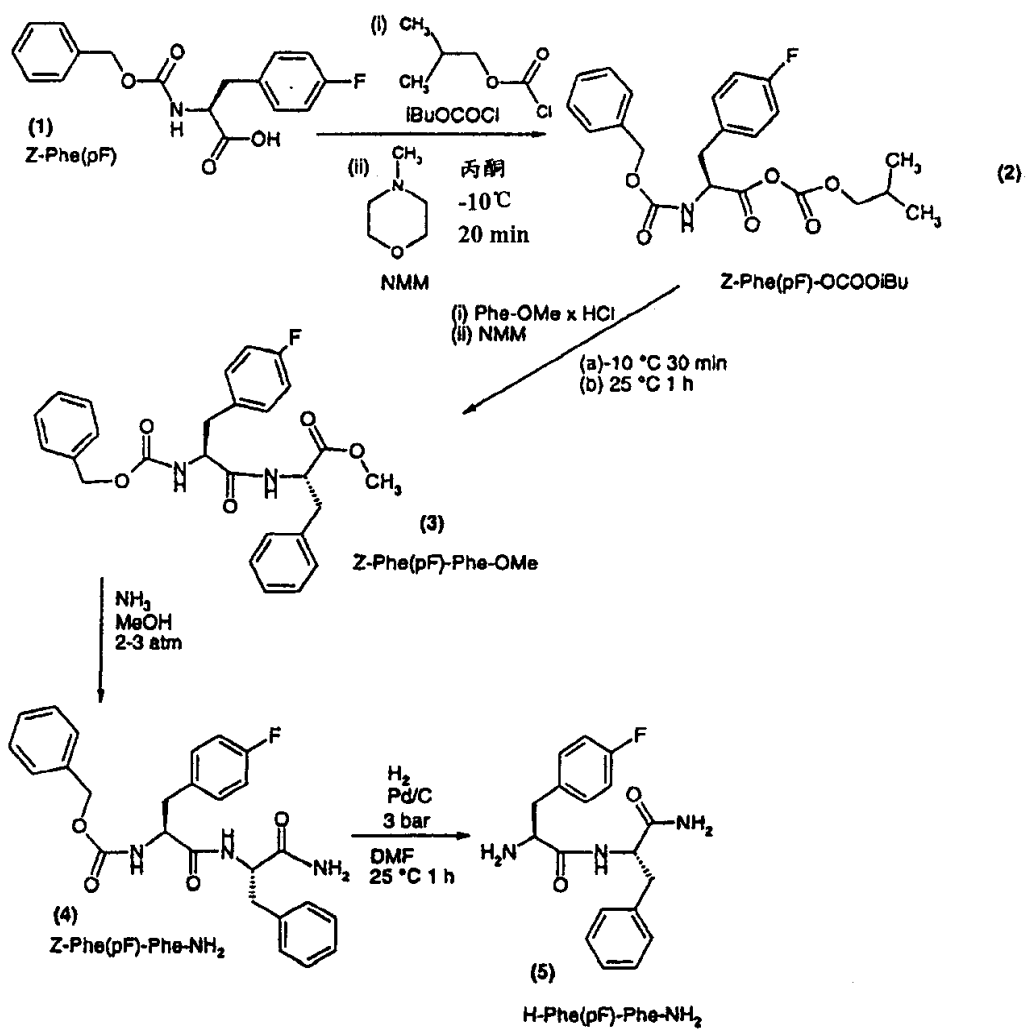
其中

R^1 是一种酯或酰胺残基。

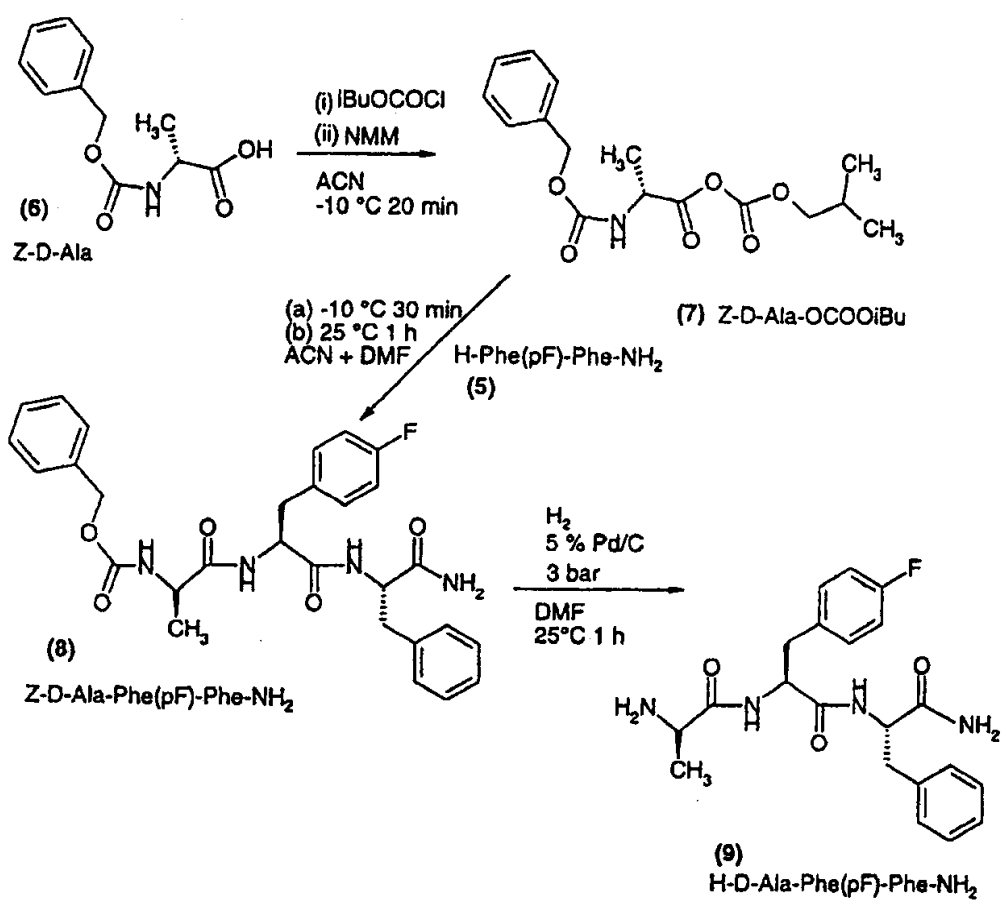
本发明的详细说明

- 5 现在通过下面的实施例更详细地介绍肽 H-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂ 或其药学上可接受的盐的制备，然而该实施例不认为是对本发明的限制。另外，以下方案 1 提供用一种其中羧基作为酯被保护的苯丙氨酸衍生物制备根据本发明的式(I)肽的合成途径的详细综述。以下方案 2 提供用一种其中羧基作为酰胺被保护苯丙氨酸衍生物制备根据本发明的式(I)肽的合成途径的详细综述。参照以下实施例详细的合成描述中的化合物编号，与方案 1 和 2 中化合物的编号一致。
- 10

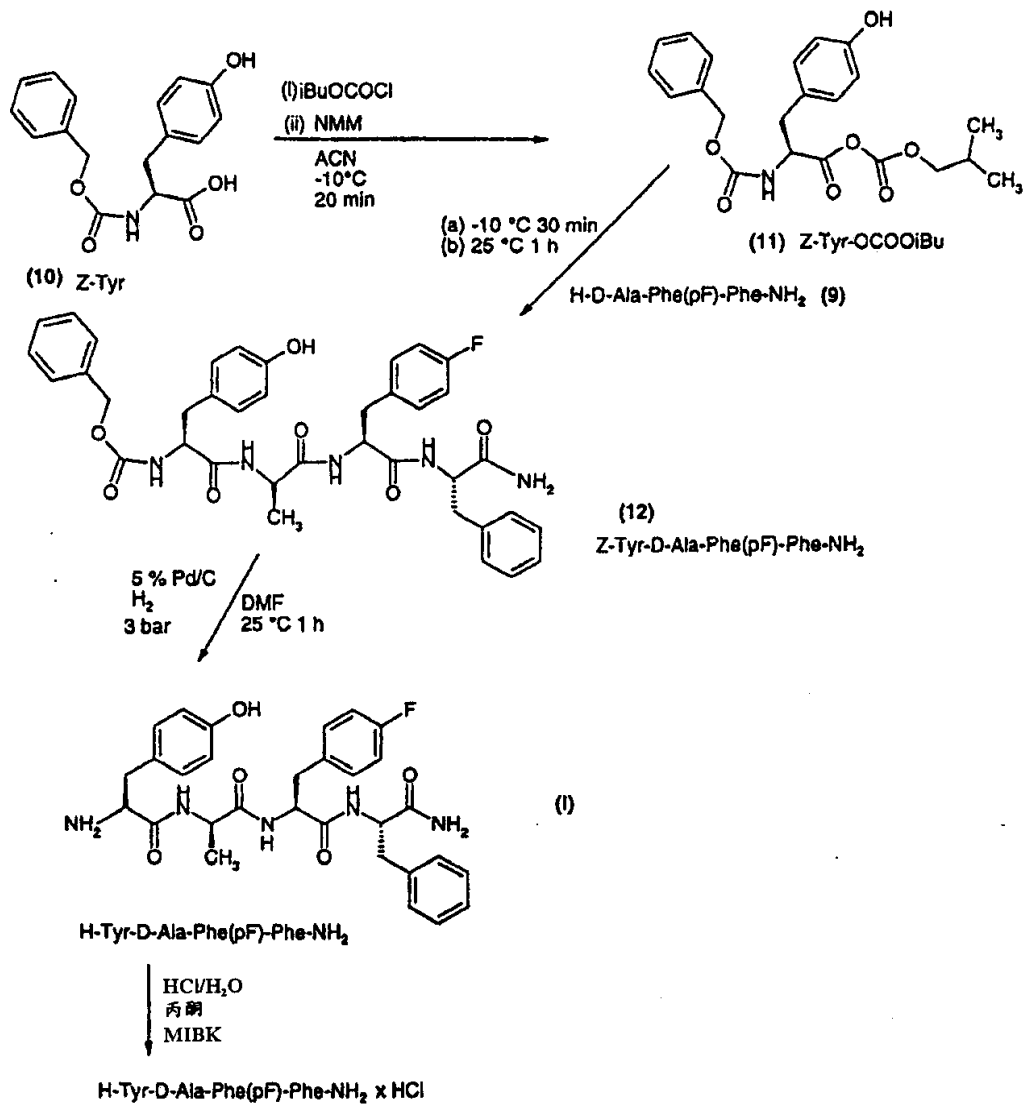
方案 1



方案 1(续)



方案 1(续)



步骤 1

(i) Z-Phe(pF)-Phe-OMe(方案 1 中化合物 3)的制备:

3.5 摩尔规模

5 先将 Z-Phe(pF)(化合物 1)(1 当量)溶于丙酮(4.7L/摩尔)中, 冷却, 然后加入 IBK(0.9-1.2 当量)(实际 1 当量)。然后根据加入 NMM(N-甲基吗啉)(0.9-1.2 当量)(实际 1 当量)的速度(约 20 分钟)控制反应。推荐反应温度为 0 到-15℃之间(实际为-9℃到-14℃),其中加入 NMM 后立即反应, 然而防止混合酐迅速分解。

10 同时将 H-Phe-Ome x HCl(0.9-1.3 当量)(实际 1.04 当量)与丙酮(2.6L/摩尔)混合, 用 NMM(0.9-1.5 当量)(实际 1.04 当量)中和, 冷却至 0 到-20℃(实际大约-10℃)。在活化完成后, 以保持温度在约-10℃(实际从-8℃到-13℃)的速度(大约 30 分钟)加入该悬浮液。然后加入 EtOAc(4L/摩尔), 用水(2X2 升/摩尔)洗涤有机相, 然后从 ACN 中共沸蒸馏, 于下一步骤前溶解于 MeOH 中。在甲醇悬浮液中纯度为 92%。

15

化学移位	峰裂数	积分(Integral)H
8.5	d	1
7.49	d	1
7.31	m	7
7.24	m	5
7.08	m	2
4.93	m	2
4.5	m	1
4.26	m	1
3.58	s	3
2.99	m	3
2.67	m	1

(ii) Z-Phe(pF)-Phe-NH₂(方案 1 中产物 4)的制备:

2.3 到 3.3 摩尔规模

5 将氨加入在前面步骤中制备的化合物 3 溶液(大约 8 升 MeOH/摩尔)中, 压力在 1 到 5 巴之间, 在 15-40℃下持续 5 个小时以上或直到反应接近完成为止(实际转换率 99%)。到反应完成时, 蒸发氨, 在过滤或离心前冷却反应物。产物用 MeOH 洗涤, 在 20-50℃下真空干燥。由化合物 1(Z-Phe(pF))计算的收率为 74%, 纯度为 100%。

化学移位	峰裂数	积分 H
8.05	d	1
7.49	d	1
7.24	m	11
7.07	m	3
4.94	m	2
4.46	m	1
4.21	m	1
3.00	m	1
2.88	m	1
2.66	m	1

10 H-Phe(pF)-Phe-NH₂(方案 1 中产物 5)的制备

4.3 摩尔规模

15 将在前面步骤中制备的化合物 4 与 DMF(4.2 升/摩尔)混合, 加入 Pd/C 催化剂(Pd 实际含量 5%)(0.2-10%w/w/LEF-581)(实际 7%), 将得到的混合物在 25℃、3 巴 H₂ 压力下氢化 0.5 小时以上(实际 1.2 小时)。然后过滤反应混合物, 在下一步骤前冷却至大约-15℃。在溶液中的纯度为 99.6%。

步骤 2

(i) Z-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂(方案 1 中化合物 8)的制备

4.4 摩尔规模

5 将 Z-D-Ala(化合物 6)(1 当量)溶解在乙腈(ACN)(2.3L/摩尔)中，在加入 IBK(0.9-1.2 当量)(实用 1 当量)前冷却。然后以上述的制备化合物 3 同样的方式加入 NMM(0.9-1.2 当量)(实用 1 当量)。在大约 30 分钟内加入化合物 5(24.5 升)的溶液，维持温度在约-10℃(实际从-8℃到-14℃)。偶合完成后，通过慢慢加入水(3 x 3.6 升/摩尔 + 1 x 1.3 升/摩尔)，每次加水间隔时间为约 25 分钟，开始温度大约为 30℃，结束温度大约为 20℃，从反应混合物中结晶出产物。然后离心结晶，在 10 20-50℃ 下真空干燥前用水/乙腈(4:1)洗涤。收率为 90%，纯度为 99.5%。

化学移位	峰裂数	积分 H
8.14	d	1
8.05	d	1
7.43	d	1
7.29	m	12
7.05	m	2
5.01	m	2
4.44	m	2
4.01	m	1
2.92	m	3
2.73	m	1
0.96	d	3

15 H-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂(方案 1 中化合物 9)的制备:

将在前面步骤中制备的化合物 8 与 DMF(4.2 升/摩尔)混合，加入 Pd/C 催化剂(Pd 实际含量 5%)(0.2-10% w/w/化合物 3)(实际 7%)，将得到的混合物在 25℃ 和 3 巴 H₂ 压力下氢化 0.5 小时以上(实际 1.2

小时)。然后过滤反应混合物，在下一步骤前冷却至约-15℃。纯度为97%，原料转化率大于98%。

步骤 3

5 (i).Z-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂(方案 1 中化合物 12)的制备:

4.1 摩尔规模

10 使用与前面两次偶合同样的方法偶合。将 Z-Tyr(化合物 10)(1 当量)溶解于 ACN(2.3L/摩尔)中，在加入 IBK(0.9-1.2 当量)前冷却。然后，以上述化合物 3 时同样的方式加入 NMM(0.9-1.2 当量)。在大约 30 分钟内加入从前步骤中得到的化合物 3 的溶液，维持温度在约-10℃(实际从-7℃到-14℃)。偶合完成后，通过缓慢加入乙腈和水(2 升/摩尔 ACN+ 0.3 升/摩尔 25%氨的水溶液)，放置 2 小时，加入 1.5 升/摩尔 CAN:水(1:1),放置 1 小时，升温到 35℃，加入晶种(大约 1% w/w)，放置 1 小时，加入 1.3L/摩尔 CAN:水(1:1),放置 1 小时，加入 1.2 升/摩尔水并在 35℃下放置 0.5 小时，加入 1.2 升/摩尔水并在 20℃下放置 2 小时，加 1.2 升/摩尔水并在 20℃下放置 1 小时，加 1.2L/摩尔水并在 20℃下放置 0.5 小时，从反应混合物中结晶出产物。离心，先水洗然后用 ACN 洗，然后在 20-50℃真空干燥。

15 由化合物 8 计算的收率为 81%,纯度为 98.4%。

20

25

30

化学移位	峰裂数	积分 H
9.18	S	1
8.18	d	1
8.11	d	1
8.05	d	1
7.43	d	1
7.24	m	12
7.04	m	4
6.63	d	2
4.92	m	2
4.45	m	2
4.22	m	2
3.00	m	1
2.83	m	1
2.64	m	1
0.89	d	3

(ii)H-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂(方案 1 中化合物 1)的制备:

3.1 和 3.2 摩尔规模

5 将化合物 4 与 DMF(实际操作 2-2.6 升/摩尔)混合,加入 5%的 Pd/C 催化剂(实际含量)(0.2-10% w/w/化合物 3)(实际 6-7%),将得到的混合物在 20-40℃(实际操作 20-25℃)、3 巴 H₂ 压力下氢化 0.5 小时以上(实际操作 1-2 小时)。然后,过滤反应混合物以除去 Pd/c,加入 EtOAc(一般 10 升/摩尔)直至使所有物质结晶。经过过滤或离心作用分离固体,用 EtOAc 洗涤,在 20-50℃下真空干燥。

10

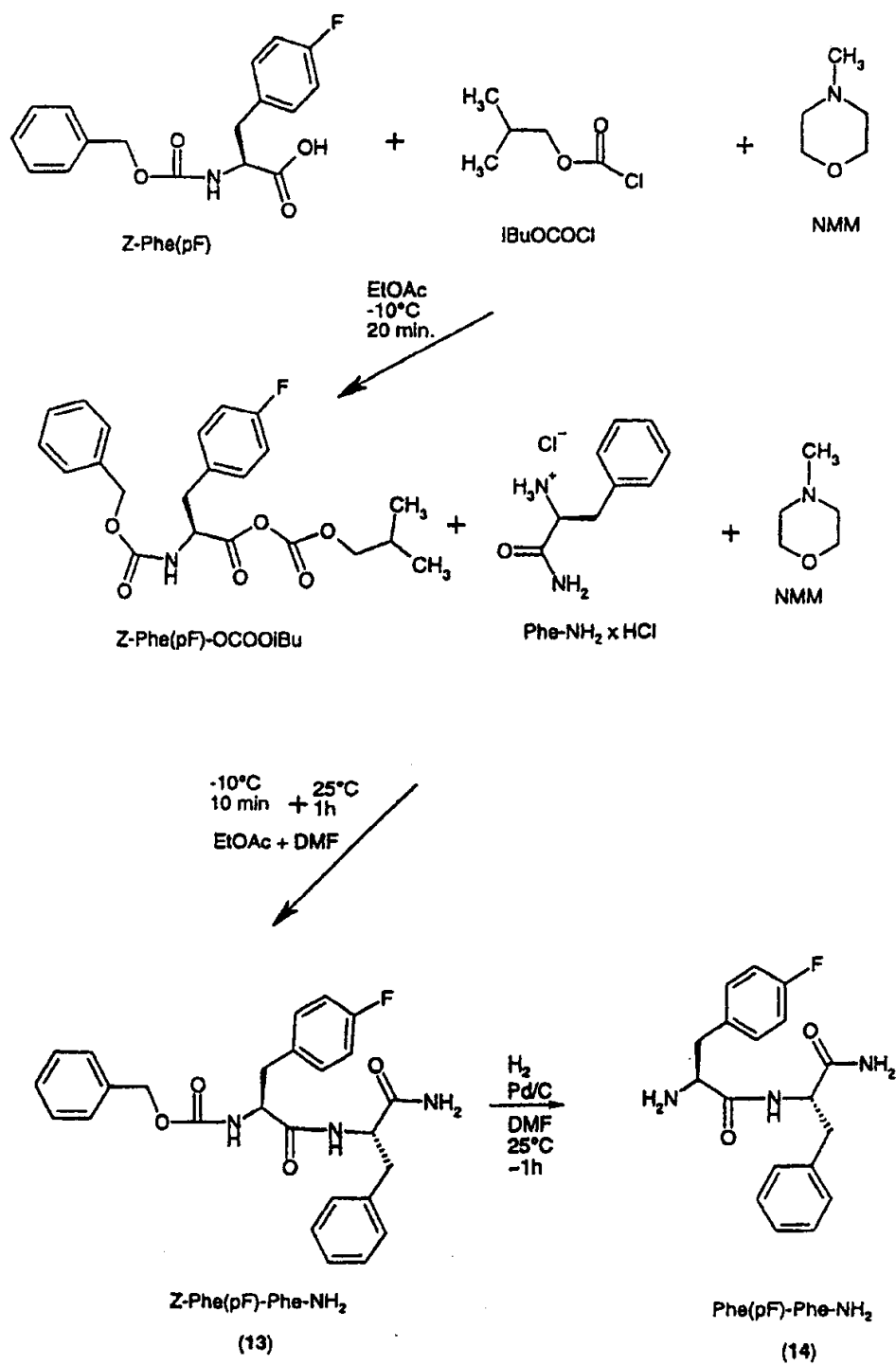
H-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂ 盐酸盐的制备

2.1 摩尔规模

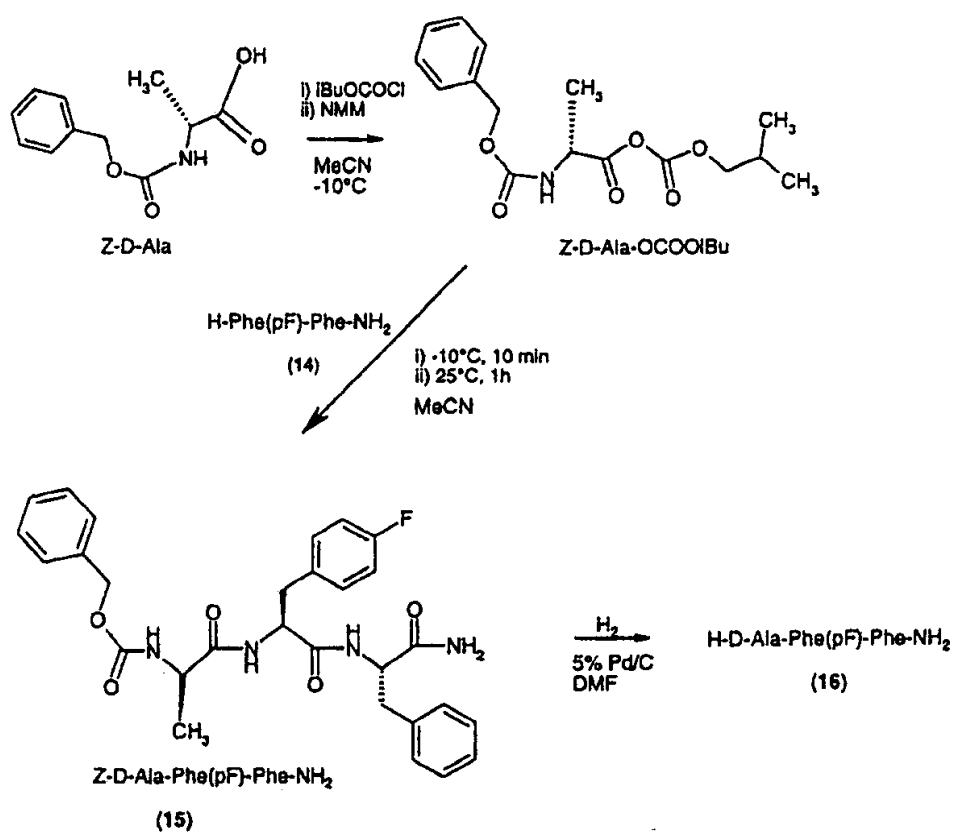
将游离碱化合物 I 溶解于加有 1 当量氯化氢的水和丙酮的混合液中并过滤(在实际操作中 146 克/摩尔 25%氯化氢/水, 2 升丙酮/摩尔)。

此盐在丙酮中的溶解度有限，因此，用额外量的丙酮/水(95:5)的混合液(0.5 升/摩尔)洗涤一次。在高速搅拌下，通过缓慢加入丙酮(3.4 升/摩尔)，然后加入至少 1% w/w 晶种，诱发结晶。30 分钟后，缓慢加入第一份 MIBK(3l/mde)，缓慢搅拌下放置直到配料明显变稠。分三次再加入 MIBK(3 升/摩尔)，每次间隔 30-60 分钟，同时维持反应器内部温度在约 20℃。然后，经过离心或过滤分离该固体，用 MIBK 洗涤，然后在 20-50℃下真空干燥 16 小时以上或直到溶剂含量低于规定的技术规范的要求。

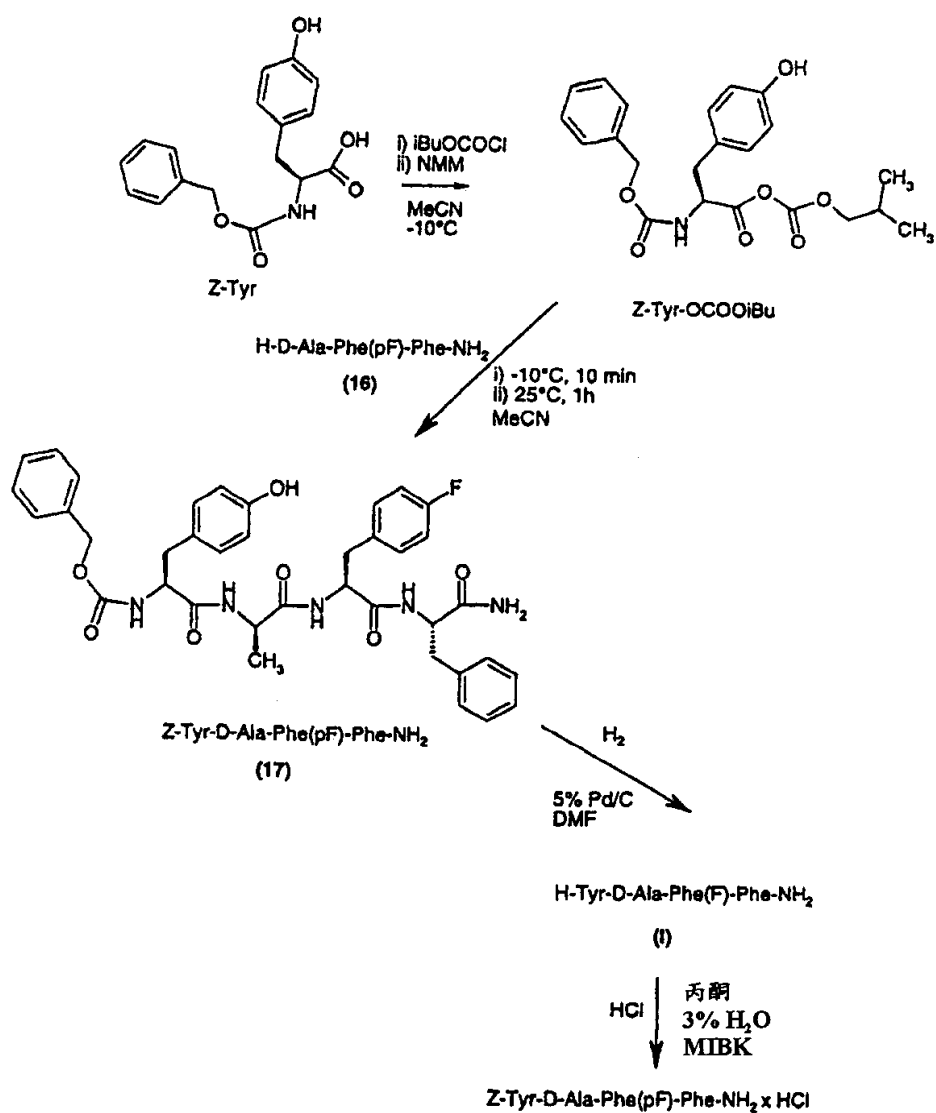
方案 2



方案 2 (续)



方案 2 (续)



步骤 1

(i) Z-Phe(pF)-Phe-NH₂(方案 2 中化合物 13)的制备:

6.7 摩尔规模

首先将 Z-Phe(pF)(1 当量)溶解于乙腈(EtOAc)(1.7 升/摩尔)中,在加入氯代甲酸异丁酯(0.9-1.2 当量)(实际 1.05 当量)前冷却。然后,通过加入 N-甲基吗啉(0.9-2.0 当量)(实际 1.4 当量)的速度(大约 20 分钟,实际 15 分钟)控制反应。推荐反应温度为 0 到-15℃(实际从-8℃到-11℃),其中,加入 N-甲基吗啉后反应立即发生,然而防止混合酐迅速分解。

同时将 H-Phe-NH₂ x HCl(0.9-1.3 当量)(实际 1.04 当量)溶解于 DMF(4.0 升/摩尔)中,用 N-甲基吗啉(0.9-1.5 当量)(实际 1.04 当量)中和并冷却至 0 到-20℃(实际大约-10℃)。在活化完成后,以维持温度在大约-10℃(实际从-6℃到-13℃)的速度(大约 15 分钟)实际 8 分钟加入该悬浆液。

偶合完成后,通过缓慢加入 50%乙醇/水(3.6 升/摩尔),由反应混合物中结晶出产物。等待 30 分钟后,于约 20℃下,分三部分加入总量为 2.85 升/摩尔的水,每次加入间隔大约 25 分钟。大约 17 小时后,过滤或离心结晶,用 50%乙醇/水、随后用若干份的乙腈洗涤,然后在 20-60℃下真空干燥。收率为 90%,纯度为 99.9%。

H-Phe(pF)-Phe-NH₂(方案 2 中化合物 14)的制备:

6.7 摩尔规模

将在前面步骤中制备的 Z-Phe(pF)-Phe-NH₂与 DMF(3.5 升/摩尔)混合,加入 Pd/C 催化剂(Pd 实际含量为 5%)(0.2-10% w/w/LEF-582),在 25-30℃、大约 3 巴 H₂ 压力下氢化得到的混合物 0.5 小时以上(实际 1.3 小时)。然后过滤反应混合物,在下一步骤前冷却至约-15℃。在溶液中的纯度为 99.6%,原料转化率大于 99%。

步骤 2

(i) Z-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂(方案 2 中化合物 15)的制备:

5.9 摩尔规模

将 Z-D-Ala-OH(化合物 x)(实用 1.03 当量)溶于乙腈(1.9 升/摩尔)中, 冷却, 然后加入氯代甲酸异丁酯(0.9-1.2 当量)(使用 1.07 当量)。以上述的制备 Z-Phe(pF)-Phe-NH₂ 的类似方式加入 N-甲基吗啉(0.9-2.0 当量)(使用 1.2 当量)。然后在大约 15 分钟内(实际 8 分钟内)加入 H-Phe(pF)-Phe-NH₂(25 升)溶液, 维持温度在-10℃左右(实际从-8℃到-11℃)。偶合完成后, 通过于约 20℃温度下缓慢加入水(4 x 1.9 升/摩尔), 每次加入间隔大约 15-30 分钟, 使产物从混合物中结晶。然后, 过滤或离心结晶, 用水/乙腈(4:1)、随后用乙腈洗涤, 然后任选在 20-60℃真空干燥。由 Z-Phe(pF)-Phe-NH₂ 计算的收率为 93.8%, 纯度为 99.6%。

H-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂(方案 2 中化合物 16)的制备:

15 5.5 摩尔规模

将前面步骤制备的 Z-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂ 与 DMF(2.9 升/摩尔)混合, 加入 Pd/C 催化剂(Pd 实际含量为 5%)(0.2-10% w/w/化合物 3)(实际 5%), 在 25-35℃及大约 3 巴 H₂ 压力下, 将得到的混合物氢化 0.5 小时以上(实际 3 小时)。然后过滤反应混合物, 在下一步骤前冷却至约-15℃。纯度为 99.4%, 原料转化率大于 99%。

步骤 3

(i) Z-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂(方案 2 中化合物 17)的制备:

5.5 摩尔规模

使用与前两次偶合类似的方法偶合。将 Z-Tyr(化合物 x)(1.05 当量)溶于 MeCN(1.9 升/摩尔)中, 冷却, 加入氯代甲酸异丁酯(0.9-1.2 当量)(实际 1.05 当量)。以上述制备 Z-Phe(pF)-Phe-NH₂ 的类似的方式加入 N-甲基吗啉(0.9-2.0 当量)(实际 1.3 当量)。在大约 20 分钟(实际

6 分钟)内加入从前一步骤得到的 H-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂ 溶液, 维持温度在-10℃左右(实际从-8℃到-9℃)。偶合步骤完成后, 通过缓慢加入乙腈和水(3.4 升/摩尔 MeCN + 0.9 升/摩尔 15%氨水), 放置 5 分钟, 加入晶种, 放置 4-24 小时, 然后分四份加入总量为 13.9 升/摩尔的水, 在每次加入之间放置大约 30 分钟或以上, 使产物从反应混合物中结晶。过滤或离心, 用水洗, 然后用 MeCN 洗涤, 任选在 20-60℃下真空干燥。由 Z-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂ 的收率为 87.7%, 纯度为 95.1%。

经发现, 通过加热反应物到大约 60℃并加入氨, 使 pH 为 9 左右 2 小时可增加收率及纯度。这可以将主要的杂质 Z-Tyr(O-(异丁氧基羰基))-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂ 转化为产物

(ii) H-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂(方案 2 中化合物 I)的制备

5.4 摩尔规模

将 Z-Tyr-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂ 与 DMF(实际操作 2.6 升/摩尔)混合, 加入 5% 的 Pd/C 催化剂(实际含量)(0.2-10% w/w/化合物 3)(实际 6.4%), 在 20-40℃(实际操作 20-25℃)和大约 3 巴 H₂ 压力下, 氢化得到的混合物 0.5 小时以上(实际操作 1.8 小时)。过滤反应混合物以除去 Pd/C, 然后通过加入 EtOAc 直到所有物质结晶(一般为约 14 升/摩尔)为止, 使产物结晶。经过滤或离心分离固体, 用 EtOAc 洗涤, 然后在 20-50℃下真空干燥。纯度为 96.7%。原料转化率大于 99%。

H-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂ 盐酸盐的制备

4.6 摩尔规模

将游离碱 H-Tyr-D-Ala-Phe(pF)-Phe-NH₂ 溶解于加有 1 当量氯化氢的水和丙酮混合液中, 过滤(在实际操作中 146 克/摩尔 25%氯化氢/水, 2 升/丙酮/摩尔)。该盐几乎不溶于乙酮中, 因此, 过滤器用额外量的丙酮/水(95:5)的混合物(0.5 升/摩尔)洗涤一次。通过高速搅拌下, 缓慢加入丙酮(3.4 升/摩尔), 然后加入大约 1% w/w 的晶种, 诱发结晶。

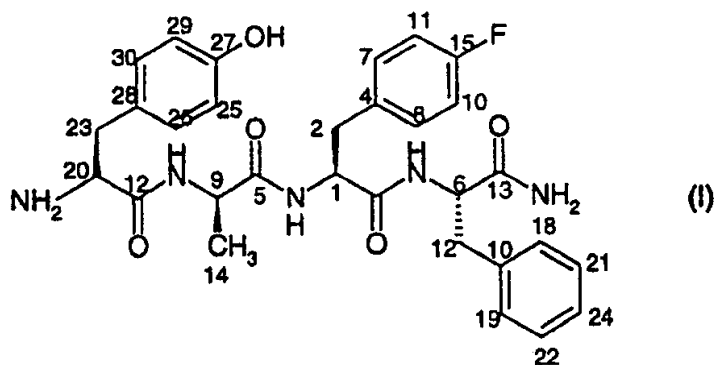
30 分钟后, 缓慢加入第一份 MIBK(3 升/摩尔), 缓慢搅拌下放置直到配料明显变稠。再分三次加入 MIBK(3 升/摩尔), 间隔 30-60 分钟, 同时维持反应器内部温度在大约 20℃ 左右。然后, 经离心或过滤使固体分离, 用 MIBK 洗涤, 在 20-50℃ 下真空干燥 16 小时以上或直到溶剂含量低于规定的技术规范的要求。收率为 95.8%, 纯度为 99.8%。

后处理:

没有达到药用物质技术要求的产物可通过上述结晶化合物 I 同样方法进行重结晶, 但不加入氯化氢。

H-Tyr-D-Ala-Phe(F)-Phe-NH₂ x HCl 即化合物 I 的盐酸盐形式的 NMR 光谱确定

36mg 所述化合物在大约 0.7ml DMSO-d₆(99.95%原子-D)中的溶液, 在 27℃ 下, 在 Varian UNITY 加 400MHz 仪上获得 NMR 光谱。对于质子光谱化学位移参考标准为 2.49ppm 的 DMSO-d₆ 的多峰的中间峰值。对于碳谱化学位移参考标准为 39.5ppm 的 DMSO-d₆ 的多峰的中间峰值。



在确定中使用的原子编号是任意的, 参考上图

质子光谱:

一维质子光谱用于 α 位质子(3.9-4.4 ppm)、苜基-CH₂(2.6-3.1 ppm)、酰胺-NH 和酚-OH(8.2-8.5 ppm)的以组确定(groupwise assignment), 也用于 Ala-CH₃ (14-CH₃) (0.74 ppm)专门确定(specific assignment).

二维 DQFCOSY 光谱用于对每个氨基酸残基中自旋系统(α 位、 β 位和 NH 质子)以组确定, 每个芳环中的芳基质子以组确定。所有 Ala 残基中的质子也可专门确定。

碳谱

一维碳谱用于 α 位碳、苜基-CH₂、羰基和芳基碳的组确定, 当然用于 C-14 的专门确定。APT 谱用于对每个碳的 CH-峰裂数的确定。由于 C-F 偶合引起的谱线裂分用于氟代芳环中碳的专门确定。

二维异型相关谱:

二维碳-质子相关谱(HMQC)产生质子化的碳与所有直接连接的质子间的相关性。可以专门确定所有 Ala 残基中的质子化碳。

二维碳-质子多键相关谱(HMBC)产生碳与相隔 2-3 个键的质子间的相关性。这使得借助 α 氢和以及借助 NH 和邻接氨基酸残基的羰基(三键相关), 以及借助 NH 和邻接氨基酸残基(二键相关)确定氨基酸顺序。类似, 苜基-CH₂ 和芳基碳之间以及芳基质子和苜基-CH₂ 之间的二-和三-键相关使得可以专门确定各芳香氨基酸的芳基质子和碳。

用这种方法, 可以以确定的方式专门确定所有四种氨基酸残基中的所有(不能互换的)质子和碳。

表 1
质子确定

化学位移(ppm)	积分	峰裂数	确定
9.4	1H	s	30OH
8.48	1H	d	9NH
8.37	1H	d	1NH
8.35	1H	d	8NH
8.26	2H	s	
7.53	1H	s	
7.28	2H	m	18H,19H
7.26	2H	m	21H,22H
7.22	2H	m	6H,7H
7.18	1H	m	24H
7.12	1H	s	
7.04	2H	m	10H,11H
6.98	2H	m	26H,27H
6.68	2H	m	28H,29H
4.43	1H	m	1H
4.39	1H	m	8H
4.26	1H	m	9H
3.96	1H	m	20H
3.39			HDO
3.02	1H	m	12Hb
2.99	1H	m	2Hb
2.87	2H	m	23Ha,23Hb
2.85	1H	m	12Ha
2.67	1H	m	2Ha
0.74	3H	d	14H

表 2
碳确定

化学位移(ppm)	峰裂数	确定	J_{C-F}
172.99	s	13	
171.08	s	5	
170.81	s	3	
167.39	s	17	
162.11	s	15	241Hz
159.70	s	15	241Hz
156.50	s	30	
137.98	s	16	
133.96	s	4	3.1Hz
133.93	s	4	3.1Hz
131.16	d	6.7	8.4Hz
131.08	d	6.7	8.4Hz
130.46	d	26.27	
129.26	d	18.19	
128.09	d	21.22	
126.30	d	24	
124.73	s	25	
115.16	d	28.29	
114.63	d	10.11	21.3Hz
114.41	d	10.11	21.3Hz
54.33	d	8	
54.01	d	1	
53.37	d	20	
47.96	d	9	
37.57	t	12	
36.83	t	2	
36.17	t	23	
18.45	q	14	