



[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 7/16

C07C 101/04

A61K 37/02

[11] CN 87 1 00308 A

CN 87 1 00308 A

[43] 公开日 1987 年 9 月 16 日

(21) 申请号 87 1 00308

(22) 申请日 87.1.16

(30) 优先权

(32) 86.1.16 (33) US (31) 819,336

(71) 申请人 史密丝克莱恩贝曼公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 詹姆斯·弗朗西斯·卡拉汉

威廉·弗朗西斯·赫夫曼

纳尔逊·严志辉

(74) 专利代理机构 中国专利代理有限公司

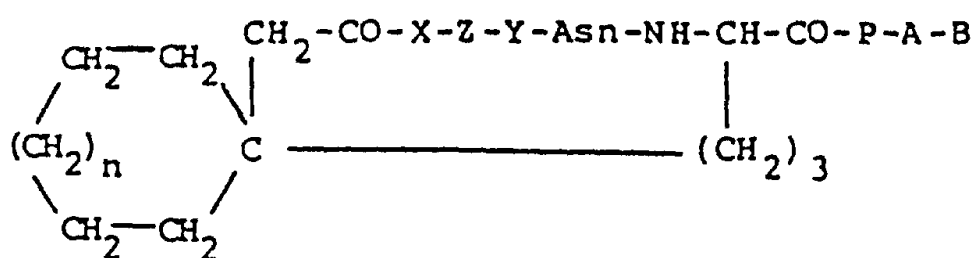
代理人 杨九昌

(54) 发明名称 多肽化合物

(57) 摘要

应用肽键的形成由 1,6-环化作用制备具有 V₂-后叶加压素拮抗活性效能的新化合物。此类新化合物的结构以一个 Pas^{1,6} 或 Tas^{1,6} 环化的单位为其特征。

1. 一种具有下述化学式的化合物的制备方法。



n 是零或1

P是一个单键或Pro、 Δ -Pro、Ala、MeAla、Arg、Lys、HArg、MeArg、Melys或MeHArg的D-或L-异构体；

A是Arg、Lys、HArg、MeArg、MeLys、MeHArg或当B是 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-\text{NH}_2$ 时，A是一个单键；

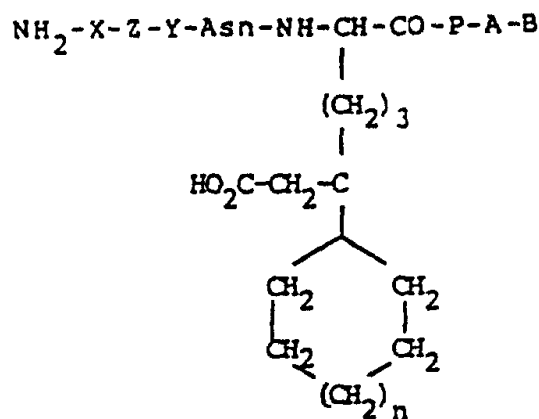
B是OH、 NH_2 、NHAik、GLy(NH_2)、Gy(NHAik)或当A是一个单键时，B是 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-\text{NH}_2$ ；

Z是Phe、Phe(4'-Alk)、Tyr(Alk)、Ile或Tyr；

X是Phe、Phe(4'-Alk)、Val、Nva、Leu、Ile、Pba、Nle、Cha、Abu、Met、Chg、Tyr、Trp或Tyr(Alk)的D-或L-异构体；

Y是Val、Ile、Abu、Ala、Chg、Gln、Lys、Cha、Nle、Thr、Phe、Leu或GLy而 n^1 是2至6或一种可作医药用的盐、光学异构体或其酯代替药物(ester prodrug)。

此法包括环化一个任选的下式的被保护的化合物



在式中 X、Z、Y、P、A、B 及 n 与上文的定义相同，并任选地以下述任何次序，

(a) 除去任何保护基团，

(b) 每当存在 Pas(OH) 或 P(OH) 化合物，其与 A (其定义如前) 反应时，A 总是以被保护的酸或酰胺的形式进行反应的，和

(c) 形成它们的一种可作医药用的盐。

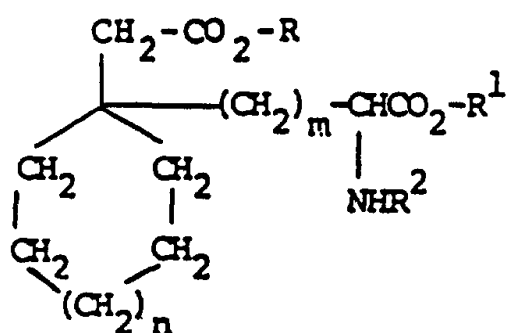
2. 根据权利要求 1 的方法，其中 X 是一种 D-异构物。

3. 根据权利要求 1 的方法，其中 X 是一种 D-Tyr(Alk)，而 Y 是 Val。

4. 根据权利要求 1 的方法，其中 X 是 D-Tyr(Alk)，Y 是 Val，n 是 1 而 P 是一个单键。

5. 根据权利要求 1 的方法，其中 X 是 D-Tyr(乙基)，Y 是 Val，n 是 1 而 B 是 NH₂。

6. 一种具有下式的化合物的制备方法：



式中，

m 是从 2 至 4 的一个整数

n 是零或 1

R 及 R¹ 分别是氢原子或一个羧基保护基团，

R² 是氢或一个氨基保护基团，

此法包括在一个羧酸环烷酯的螺碳原子上，插入一个末端未饱和烃链，使羧酸酯均裂，使支链的未饱和中心官能化，并由此制备一种氨基酸。

多肽化合物

本发明涉及到新的后叶加压素化合物，它们的结构以具有在1-位上有与螺环烷基取代基相结合的1,6-二碳酰桥(dicarba bridge)为特征。这些化合物在活体内及在玻璃试管内部都具有后叶加压素拮抗物活性的效能。

美国专利4,469,679, 4,481,193, 4,481,194 及 4,491,577号有二硫(dithia)或后叶加压素拮抗物的例子。

具有拮抗剂活性的后叶加压素及催产素的碳酰(Carba)类似物，在现有技术如美国专利第3,980,631, 4,285,858, 4,482,486, 4,237,119以及在生物化学生物物理研究通讯122,974(1984) F.Fahrenholz等人的论文中以及生物学化学杂志258 14861(1983),中已反复报导过。已经报导过赖氨酸-及精氨酸-后叶加压素和催产素的二碳酰或1,6-氨基辛二酸类似物有不同的促效药活性。这些现有技术的化合物结构，在1,6-辛二酸上没有取代基而且是促效药，即它们具有与后叶加压素(VSP)或催产素(OXT)相同的生物活性。

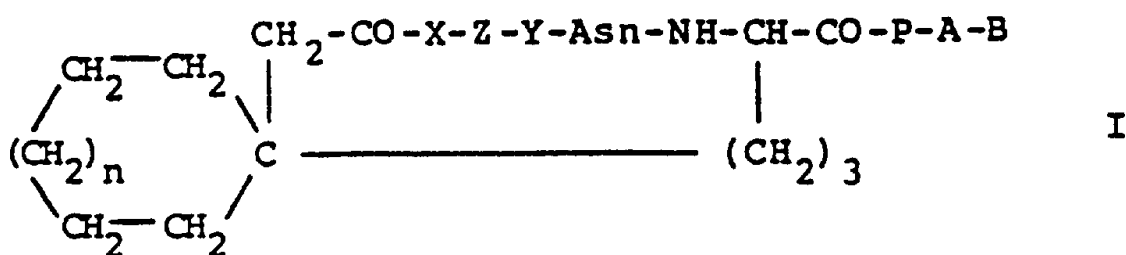
现已发现当1-单位及某些后叶加压素结构的二硫(dithia)的连接物，由一个6,6-螺旋亚烷基辛二酸所代替，所得到的产物即具有效能，甚至是加强了拮抗剂活性，特别是aquaretic活性。在本说明书和权利要求书中所用的名词与多肽及后叶加压素化学技术中所用的名词相同。当没有注明构型时，氨基酸单位的构型是L型的或是天然存在的构型。

现将本文所用的某些多肽的技术符号表示如下：Pas代表6,6-环戊亚甲基-2-氨基辛二酸，Tas代表6,6-环四亚甲基-2-氨基辛二酸：Pas(Bzl)

代表Pas 的 ω -苯甲基酯, Abu代表 α -氨基-正-丁酸: Cad代表尸胺 ($-\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}_2$); Chg 代表环-己基甘氨酸: Cha 代表环己基丙氨酸, Thr代表苏氨酸, Pba代表 α -氨基苯基丁酸, Gln代表谷氨酰胺或谷胺, Pro代表脯氨酸, ΔPro 代表 Δ^3 -脯氨酸, Gly 代表甘氨酸, Tyr代表酪氨酸, Tyr(Alk) 代表酪氨酸的低级烷基醚, Phe 代表苯丙氨酸, Phe(4'-Alk) 代表4'-烷基苯基丙氨酸, MeAla代表N-甲基丙氨酸, Val代表缬氨酸, Ile代表异亮氨酸, Nle代表正亮氨酸, Leu代表亮氨酸, Ala代表丙氨酸, Lys代表赖氨酸, Arg代表精氨酸, HArg代表高精氨酸, MeArg代表甲基精氨酸, MeHArg代表N-甲基高精氨酸, MeLys代表N-甲基赖氨酸, Met代表甲硫氨酸, Asn代表天门冬酰胺, Tos代表甲苯磺酸酯, BHA代表二苯甲基胺, DMAP代表4-二甲基氨基吡啶, DIEA代表二异丙基乙胺, Trp代表色氨酸, HF代表氟化氢, 4-MeBzl代表4-甲基苯甲基, TFA代表三氟乙酸, DCC代表二环己基羰二亚胺, Boc代表叔-丁基氧羰基, Z代表苄氧羰基, VSP代表后叶加压素, HBT代表羟基苯并三唑。在上述诸如MeArg 的定义中, Me表示一个连在有关的肽单位上的酰氨基氮原子上的甲基。如下文所述, 符号Pas^{1,8} 是用来代表环化肽。

“Alk” 代表1-4 个碳原子的低级烷基。例如它们可以任选地连接到式 I 的肽的第 2 位上的一个酪氨酸单位的氧取代基上, 或连到链尾的N-末端氮原子上, 或者连接到式 I 的肽的 2 或 3 位的苯丙氨酸单位的4'-位上。这些烷基取代基包括甲基、乙基、正丙基、异丙基或丁基。较好的是乙基。当应用“后叶加压素”这一名词时, 除另有改变外, 其意思是指L-精氨酸后叶加压素(AVP)。

本发明的二羧(dicarba) - 后叶加压素化合物, 可用下面的结构式来表明:



式中：

n 是零或1

P 是一个单键或Pro、 Δ -Pro、Ala、MeAla、Arg、Lys、HArg、MeArg、MeLys或MeHArg的D或L型异构体；

A 是Arg、Lys、HArg、MeArg、MeLys、MeHArg的一个D或L型异构体，或者当 B 是 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{NH}_2$ 时，则 A 是一个单键；

B 是OH、 NH_2 、 NHAlk 、Gly、Gly(NH_2)、Gly(NHAlk)或当 A 是一个单键时，则 B 是 $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n'}-\text{NH}_2$ ；

Z 是Phe、Phe(4'-Alk)、Tyr(Alk)、Ile或Tyr；

X 是Phe、Phe(4'-Alk)、Val、Nva、Leu、Ile、Pba、Nle、Cha、Abu、Met、Chg、Tyr、Trp或Tyr(Alk)的D或L异构体；及

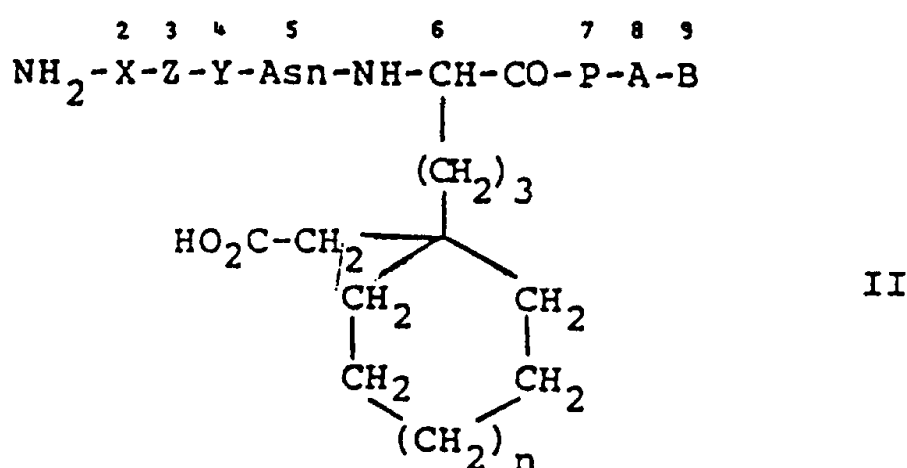
Y 是Val、Ile、Abu、Ala、Chg、Gln、Lys、Cha、Nle、Thr、Phe、Leu、或Gly；而 n 是2至6。

本发明的化合物的次同属的基团包括式I的化合物，式中 P 是一个单键、Pro或Arg， A 是Arg而 B 是 NH_2 。在式I中， n 较好是1而 X 是一个D-异构体单位。

在本发明中还包括加成盐、配合物或代替药物(prodrugs)，例如当 B 是OH时本发明的化合物的酯类，特别是无毒的可作医药用的酸加成盐。酸加成盐是用标准的方法在一种适合的溶剂中，从母体化合物及一种过量的酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、乙酸、丙二酸、丁二酸、乙烷二磺酸或甲烷磺酸来制备的。式I的某些终产物(例如 $\text{Arg}^7\text{-Arg}^8$ 化

合物)在其结构中具有两个强碱性基团,因此很易制备成它们的酸加成盐衍生物。至于终产物的酸形式的酯衍生物,例如甲基、乙基或苯甲基酯则可按已知的技术来制备。

本发明的终产物(I),可由相应的线型肽的环化作用来制备。



在式中X、Z、Y、P、A、B及n与上述定义相同,以及如下述的被保护的任何化学的反应活性中心。此外还包括上述式I的终产物的任何加成盐形式。应该强调指出的是,只有在游离碱的形式下,线型中间结构II才可被环化。除了在中间物的特性鉴定及分离作用中盐的形式是重要的衍生物外,当以盐的形式存在时,不会发生环作作用。

环化作用包括在结构II的2位上的X单位的 α -氨基与在6位上的6,6-取代的2-氨基辛二酸单位上游离 ω -羧基之间形成酰胺键。应用了形成酰胺的任何化学方法,例如应用二环己基羰二亚胺加羟基苯并三唑或4-二甲基氨基吡啶的反应,应用二苯基磷酰叠氮化物(DPPA)与碱,1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺(EDC)的甲碘化物或氯化氢的反应,羧酸的叠氮衍生物的反应,一种混合的酐如苯甲酰,三甲基乙酰,或含有与辛二酸形成酐的异戊酰基的反应,乙氧基乙炔或N-乙基-5-苯基-isoxazolium-3-磺酸酯的反应。所有这些一般合成方法,在

M. Bodanszky 所著的肽合成 (John Wiley, 1976, 191页及表3, 116-121 页) 一书中已作了叙述。这些偶合反应通常是在水或者有机溶剂中进行直至反应完成。其中较好的溶剂是二甲基甲酰胺、二甲基乙酰胺, 二氯甲烷、乙腈或它们组合物。反应通常在室温下及在稀溶液中进行, 以减低线型反应。

二苯基磷酰叠氮化物 (DPPA) 是特别有用的环化剂。在室温下, 在无水的二甲基甲酰胺及三乙胺中, 用过量的 DPPA 处理线型肽 (II) 至薄层层析监控显示反应完成为止。所需要的产物可用蒸发作用来分离, 并用硅胶过滤及高效液相色谱法提纯。

由树脂支承的线型肽 (II) 的肽链, 通常是逐步建立的, 由 B 单位开始通过线型产品的 6 位上的新的 Pas 或 Tas 单位向 X 单位运行。每个单位均用肽技术中已知的和下面所述的方法适当地进行保护。可在 Beckman 990B 肽合成器或其等效装置中方便地进行反应的各个步骤而不必分离每一个肽中间物。

在下文的工作实施例中将叙述制备所需的产物的详细步骤

连续不断地加到树脂支承的链上的各种氨基酸 (AA), 可用已知的技术进行保护。例如 Boc 保护基团被用于保护一种氨基酸, 特别是在 α - 位置上, 一种任选地取代的苯甲基用于保护 Pas 或 Tas 单位的羧基, 甲苯磺酰基用于保护 Arg、HArg 或 MeArg 单位, 而一种任选地取代的苄氧羰基 (Z) 用于保护 Tyr 或 Lys 单位。最适宜的保护基团是那些用混和的酸处理不容易被除去 (例如除去 Boc 基团) 的保护基团。为了除去苄基或苄氧羰基, 一般宁愿应用 HF、钠- 液体氨或催化氢化作用。

通常, 未环化的, 树脂支承的式 II 的多肽, 是以大量合成的环被合成的, 使短肽中间物得到充分的供应, 以改变上述的链。

组合好的, 树脂- 支承的肽是用过量的无水氢氟酸及以及一种适当的清除剂 (如苯甲醚) 加以处理, 以得到高产率的式 II 的线型肽中间物。

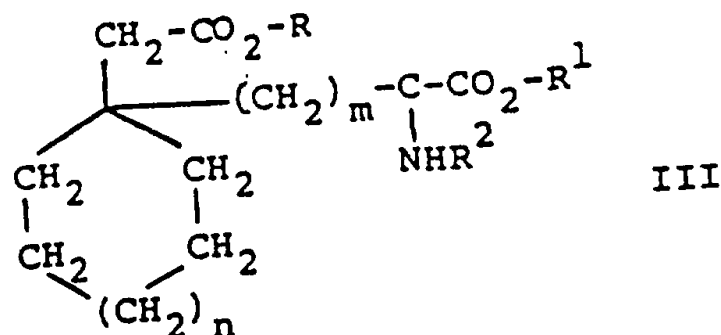
式 I 的化合物也可由环化的Pas、Pro或Arg 羧酸或其衍生物，分别以末端为酸酯或酰胺的PAB、AB或A的一种保护形式进行反应，应用标准的肽的中间物合成法及反应条件来制备。这些用作原料的酸例如式 I 的化合物（式中 P 是一个定义如前的似精氨酸的单位，而 A 是羟基）可用上述的树脂支承的或溶液反应步骤来制备。

合成式 I 的化合物的关键以及它们的生物学活性的发现，使 6,6-螺环亚烷基-2-氨基辛二酸具有使用价值，在上文讨论到的式 II 的中间物的肽合成中必须应用这种化合物。在以前，应用Kolbe 电解作用作为合成作用的关键步骤，制备出 2-氨基及 2,7-二氨基辛二酸〔R.Nutt 等，有机化学杂志 45 3078, (1980 年)〕。

在所需要的 2-氨基辛二酸的 6,6-位上存在体积庞大的螺环亚烷基取代基，使这些中间物的制备及式 II 的线型肽的环化，在本发明之前是不能预料到的。

6,6-螺环亚烷基-2-氨基辛二酸及相应的 7,7-取代的壬二酸以及 5,5-取代的庚二酸的合成制备包括(1)在环烷烃羧酸酯的螺碳原子上插入一条末端未饱和烃链，(2)使羧酸酯均裂，(3)使支链的不饱和中心的官能化及(4)由此处制备氨基酸。详细的制备方法将在实施例 1 中叙述。

螺环亚烷基-2-氨基链烷双酸中间物可用下式表示：



在式中：

m 是 2 - 4 ；

n 是零或 1

R 及 R' 各为氢或一个羧基保护基；和

R'' 是氢或一个氨基保护基。

用于式 III 的 R 或 R' 的羧基保护基团在肽技术中是众所熟知的（肽合成法，见上述引文 49-57）。有代表性的基团是：1 至 8 个碳原子的低级烷基、苄基、二苯甲基、苯基所有这些基都可形成酯衍生物，但是用现有技术中已知的方法都易于将它们除去。所选择的除去方法最好是在已制备成式 II 的线型肽后必须是有效的。

应用于式 III 的 R'' 的氨基保护基团也是众所熟知的（肽合成法，见上述引文中 18-48）。特别有用的是：苄酯基、叔-丁氧羰基、对-甲苯磺酰基、三氟乙酰基、芳基亚磺酰基或甲酰基。

在式 III 中还包括光学活性异构体。应用手性碱的盐的分部结晶法，可将这些光学活性异构体从异构体的混合物中分离成手性的纯 D- 型及 L- 型异构体。

本发明的终化合物具有后叶加压素拮抗的活性。已经知道后叶加压素对于在肾脏内对抗利尿的机能的作用具有影响。当这些化合物的作用对天然的抗利尿的激素 (ADH) 起拮抗作用时，由于肾小管的末端部份的渗透性增加而使身体排泄水份。作用的机制是发生在固定于某些肾的上皮细胞的质膜上的后叶加压素受体 (V_2 -受体) 上。本发明的 ADH 拮抗剂的最显著的药效是一种水利尿剂而不是象氢氯噻嗪那样的促尿钠排泄剂。

任何患有不适当的抗利尿激素分泌的综合症 (SIADH) 或者处于一种不良的水肿情况下的病人，是本发明权利要求的化合物的治疗对象。说明本发明的化合物的临床情况的实施例，可包括高血压、肝硬化、低钠血、充血性心脏衰竭、由严重的受伤或疾病所导致的任何创伤的情况的

组元。

第二类后叶加压素受体位点是在心血管系统本身内部的血管加压位点 (V_1 - 受体)。本发明的化合物对这些位点表现出某些拮抗性。从而引起抗加压或降压的活性。

因此，在病人需要此种治疗时，特别用本发明的化合物来诱发抗高血压或利尿的活性。其施药方式包括内服，不经肠道的、向颊的或用吹入法，施用无毒性但有效量的所选择的化合物，以分散在一种药用载体中施用较好。活性成分的剂量单位的选择范围由0.01至10毫克/公斤的碱（按病人体重70公斤计算）。每日 1至 5次按剂量单位施于人或动物患者。

含有式 I 的活性拮抗剂成份的医药复合物，含有溶解于或悬浮于标准液相载体（如等渗的盐水）中的一个剂量单位，而且装入针剂瓶或复合剂量的小玻璃中，以适用于非肠道的注射，例如静脉注射，经皮或肌肉注射投药等。用于吹入法的组合物可以是相似的，但通常是以有计量的剂量施药器或吸入器来投药。研碎的粉末组合物也可以与油制剂、凝胶、用于等渗制剂的缓冲液、颊锭剂、经皮肤的斑 (trans-dermal patches) 及乳剂或喷雾剂一起使用。

对于天然的抗利尿激素（抗-ADH活性）的 V_2 - 拮抗活性，是在玻璃试管内用猪的髓组织（ K_b 在下文的表 I 中）或人类的肾脏，以及在缺水的老鼠体内确定的。F.Stassen 等人在药理学及实验治疗学杂志 .223, 50-54(1982) 中叙述了在玻璃试管内分析后叶加压素刺激的腺嘌呤核苷酸环化酶活化 (K_i) 或后叶加压素的结合活性 K_{bind} 。 V_1 - 拮抗的活性是通过应用老鼠胸主动脉组织及鼠肝的质膜的方法而确定的。这些方法在上述 Stassen 发表的文章中及利尿剂的第一次国际会议（佛罗里达州，迈阿密 1984 年 3 月）公报中均作了叙述。W.Sawyer 等人（内分泌学 10681, 1979 年）叙述了氧化毒素拮抗作用的测定。

现将失水老鼠的活体内抗ADH 活性分析记录叙述如下：

失水的老鼠鉴别

在试验前约18小时，除去雄鼠体内的水份及食物，每一代谢笼放入4只雄鼠，开始时，将试验的化合物对试验动物组进行腹膜内投药，而等量的赋形剂则施用于两个对照组（快速的及非快速的）。每小时量度尿量及渗透性，量度4小时。记录排泄尿的毫升数（积累的）毫克当量 / 鼠排泄的电解质，毫克 / 鼠排泄的尿素及渗透重量克分子数（用渗透毫克分子表示） / 公斤水作为试验值。应用一种耐量试验以决定显著度。ED₃₀₀ 的定义是化合物的剂量（将尿素渗透重量克分子数降至300渗透毫克分子 / 公斤所需的微克 / 公斤数）。

表 I

	K _b (猪)	K _i (猪)	ED ₃₀₀ (鼠)
A.	12	3.9	10.1
B.	170	—	73.6
C.	7.1	4.3	12.2
D.	72	—	30.8

A. [1-(β-巯基-β, β-环戊亚甲基丙酸)-2-(O-乙基-D-酪氨酸)-4-缬氨酸-8-精氨酸-9-脱甘氨酸] 后叶加压素

B. [1-(β-巯基-β, β-环戊亚甲基丙酸)-2-(O-乙基-D-酪氨酸)-4-(缬氨酸-6-D-半胱氨酸-8-精氨酸-9-脱甘氨酸)] 后叶加压素

C. [1,6-(6,6-环戊亚甲基-2-氨基-L-辛二酸)-2-(O-乙基-D-酪氨酸)-4-缬氨酸-8-精氨酸-9-脱甘氨酸] - 后叶加压素。

D. [1,6-(6,6-环戊亚甲基-2-氨基-辛二酸)-2-(O-乙基-D-酪氨酸)-4-缬氨酸-8-精氨酸-9-脱甘氨酸] - 后叶加压素

在化合物 C 和 D 中的PAS 单位的立体化学是根据这两个化合物的生

物学活性来确定的。表 I 中的代表性数据显示, PAS^{1,6} 化合物具有相等的或基本上高于现有技术中与它们相应的二硫(dithia)化合物的生物学活性。

下述的实施例意图说明本发明的制备法及用途。所有温度都以摄氏度表示。名词和符号都是化学及肽技术中所通常应用的。

实施例1

螺环亚烷基-2- 氨基烷二酸的合成

(A) 1-(5- 戊烯-1- 基) 环己烷羧酸甲酯

将 2.7克分子的正丁基锂(己烷)(37.0毫升,100毫克分子)在 -78℃及氩气氛中加入二异丙胺(15.0毫升,109毫克分子)的干四氢呋喃(170毫升)溶液中,然后将所得到的混合物在 -78℃下搅拌20分钟,制得二异丙酰胺锂的溶液。将环己烷羧酸甲酯(13.0毫升,91毫克分子)加入上述溶液并将此反应混合物在 -78℃下搅拌30分。加入5-碘戊-1- 烯(18克,91.8毫克分子),将所应继续保持在 -78℃下10分钟,然后使此混合物缓慢地升至室温。将反应混合物用水稀释并用3N盐酸酸化(pH=2)然后用乙醚萃取。用饱和的硫代硫酸钠(水溶液)洗涤乙醚萃取物,用硫酸镁干燥并在减压下蒸发而得到16克的1-(5- 戊烯-1- 基)环己烷羧酸甲酯。

(B) 1-(0- 甲苯磺酰) 羧甲基-1-(5-戊-1- 烯) 环己烷

将甲基酯(A) (16克,76.0毫克分子)在室温下加入含有氢化铝锂(4.6克,120.9毫克分子)的四氢氢呋喃(205毫升)溶液中,将所得到的混合物加热回流 3小时。然后将后应冷却至 0℃,依次用水(5毫升)、3N氢氧化钠溶液(5毫升)及水(15毫升)处理然后过滤。用硫酸镁干燥滤液,过滤并蒸发而得到本标题的醇。HNMR(CDCl₃) δ 7.5-6.0(m,1H), 5.20-4.80(m,2H), 3.40(s,2H)及2.43-0.80(m,17H)。

将此醇溶于吡啶(89毫升)中并在 0℃时用对- 甲苯磺酰氯(27克,

142.5毫克分子) 处理 4小时。将反应混合物倒入水中并用石油醚、石油醚: 乙醚(1:1) 及乙醚处理。用0.5N的盐酸(水溶液), 饱和碳酸氢钠(水溶液) 及水洗涤合并的有机萃取液, 用硫酸镁干燥, 过滤并蒸发得到30.0克的1-(0- 甲苯磺酰) 羟甲基-1-(5-戊-1- 烯) 环己烷:

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: 7.98-7.20(m, 4H), 6.03-5.53(m, 1H), 5.13-4.78(m, 2H), 3.82(s, 2H), 2.43(s, 3H) 和 2.23-0.73(m, 16H)。

(C) 1-氰基甲基-1-(5-戊-1- 烯) 环己烷

将甲苯硫酸酯(B) (30克) 溶于二甲基亚砷(219毫升) 和氰化钠(13.6克, 279毫克分子) 中。将所得到的混合物在 150°C 下加热18小时。然后将反应混合物冷却, 倒入饱和氯化铵(水溶液) 中并用石油醚萃取。干燥有机萃取液, 过滤并蒸发。应用快速色谱分离法(硅胶, 15% 乙酸乙酯/ 己烷) 提纯残余物而得到 9.9克的1-氰基甲基-1-(5-戊-1- 烯) 环己烷(从环己烷羧酸甲酯计, 产率57%) : $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: 6.12-5.57(m, 1H), 5.20-4.87(m, 2H), 2.30(s, 2H), 2.23-1.82(m, 2H) 及 1.50(brs, 14H)。

(D) 1-氰基甲基-1-(4-丁醛-1- 基) 环己烷

将腈(C) (4.9克, 25.6毫克分子) 溶于甲醇(80毫升) 中。将所得到的溶液冷却至 -78°C 并用臭氧(用Welsbach臭氧发生器) 处理, 直至有剩余的臭氧(蓝色) 留在溶液中。在 -78°C 用二甲硫(20毫升) 处理臭氧化物, 然后缓慢地温热至室温。18小时后, 在减压下除去溶剂, 用快速色谱分离法(硅胶, 20% 乙酸乙酯/ 己烷) 提纯, 得到 3.1克(63%) 的1-氰基甲基-1-(4-丁醛-1- 基) 环己烷: $\text{NMR}(\text{CDCl}_3)$: 9.80(brs, 1H), 2.63-2.38(m, 2H), 2.23(s, 2H) 及 1.47(brs, 14H)。

(E) 2-D,L-氨基-5-(1-羧甲基) 环己基- 戊酸

将醛(D) (3.1克, 16毫克分子) 溶于60% 的含水乙醇(30毫升) 中, 用氰化钠(860毫克, 17.6毫克分子) 和碳酸铵(4.0克, 41.6毫克分

子)。将所得溶液回流加热18小时。不用冷凝器在90℃加热混合物1小时以除去过量的碳酸盐。在减压下除去剩余的溶剂。将粗产品溶于热乙醇中，过滤并于减压下蒸发，得到粗的乙内酰脲： $MS:(M+H)^+=264$ 。将未提纯的乙内酰脲悬浮于含有氢氧化钡六水合物(12.0克，38毫克分子)的水中并在一个封闭的钢瓶中在170℃下加热96小时。将反应混合物冷却，用水稀释并过滤。将滤液通过一个BioRad AG 50w-X8离子交换柱，用1N氢氧化铵(水溶液)将期望得到的产品由柱中洗脱，蒸发氢氧化铵洗脱液得到1.1克的本标题氨基酸(E)： $MS:(M+H)^+=258$ 。此化合物也就是俗称的6,6-环戊亚甲基-2-氨基辛二酸(Pas)。

(F) 2-D,L-Boc-氨基-5-(1-羧甲基)环己基戊酸

将氨基酸(E)溶于1N的氢氧化钠溶液(45毫升)和叔丁醇(45毫升)中，在室温下用二碳酸二叔丁酯(980毫克，4.5毫克分子)处理该混合物48小时。用己烷洗涤反应混合物，用硫酸氢钠酸化并用乙酸乙酯萃取。使合并的有机萃取物干燥，过滤并蒸发而得到1.5克的标题化合物。

(G) 2-D,L-Boc-氨基-5-(1-羧甲氧甲基)环己基戊酸甲酯

将boc-二酸(F)(1.5克)溶于二氯甲烷中并在0℃用过量的乙醚化的二氯甲烷处理。

用乙酸使过量的二氯甲烷骤冷后，在减压下蒸发溶液。用快速的色谱分离法(硅胶，20%乙酸乙酯/己烷)提纯该粗酯而得到900毫克(56%)的标题产物： $^1H NMR(CDCl_3)$: 5.23-4.87(m, 1H), 4.50-4.10(m, 1H), 3.77(s, 3H), 3.67(s, 3H), 2.30(s, 2H), 1.47(s, 9H) 和 1.42(br s, 16H)。

(H) 2-D,L-Boc-氨基-5-(1-羧甲氧甲基)环己基戊酸。

将boc-二酯(G)(1.135克，2.94毫克分子)溶于二氧杂环己烷(16毫升)中，在5℃下用3.2毫升1N NaOH(水溶液)处理该溶液。立即将反应混合物加热至室温并搅拌4小时。用3N盐酸酸化反应混合物

(pH=2), 然后在减压下蒸发。用水稀释残余物并用乙酸乙酯萃取。使合并的有机萃取液干燥, 过滤并蒸发, 用快速色谱分离法(硅胶, 5-10% 甲醇/氯仿)提纯残余物, 而得到 836毫克(77%)的标题化合物。
MS: $(M+M)^+ = 372$; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: 8.02(br s, 1H), 5.28-5.00(m, 1H), 4.47-4.07(m, 1H), 3.65(s, 3H), 2.30(s, 2H), 1.47(s, 9H)和2.00-1.23(m, 16H)。

(I) 2-D,L-boc-氨基-5-(1-羧苯氧甲基, 环己基戊酸苯甲酯

在室温下用苯甲醇(1.94毫升, 18.75毫克分子), 二甲基氨基吡啶(1.01克, 8.25毫克分子)和N,N'-二环己基羰基二亚酰胺(1.70克, 8.25毫克分子)处理在二氯甲烷(30毫升)中的Boc-二酸(F)(1.34克, 3.75下克分子), 在室温下搅拌该混合物72小时。然后将反应混合物过滤, 在减压下蒸发, 将残余物溶于用3N盐酸洗涤过的乙酸乙酯中, 用硫酸镁干燥并在减压下蒸发。用快速色谱分离法(硅胶、15% 乙酸乙酯/己烷)得到1.27克(63%)的(I): $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: 7.35(s, 10H), 5.15(d, J=2.4Hz, 2H), 5.07(s, 2H) 5.05-4.70(m, 1H), 4.50-4.05(m, 1H), 2.27(s, 2H), 1.45(s, 9H)和2.00-1.03(m, 16H)。

(J) 2-Boc-D,L-氨基-5-(1-羧苯氧甲基) 环己基戊酸

将Boc-二酯(I)(1.27克, 2.36毫克分子)溶于二氧杂环己烷(15毫升)中并在室温下及氩气氛中用2.6毫升1N氢氧化钠溶液处理4小时。用3N盐酸酸化反应混合物至pH=2并在减压下蒸发。将残余物溶于乙酸乙酯中, 用3N盐酸洗涤, 用硫酸镁干燥并在减压下蒸发。用快速色谱分离法(硅胶, 5% 甲醇/氯仿)提纯残余物, 得到1.03克的标题产物: MS: MH⁺ 448; $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: 7.339s, 5H), 5.07(s, 2H), 5.20-4.80(m, 1H), 4.42-4.05(m, 1H), 2.32(s, 2H), 1.43(s, 9H)和2.08-1.07(m, 16H)。

(K) 2-D,L-boc-氨基-5-(1-羧甲基) 环己基戊酸甲酯

将Boc-苯甲基酯(J)(4毫克分子)溶于二氯甲烷中并在室温下用过量的二氯甲烷处理。用乙酸骤冷残余的二氯甲烷并将溶液在减压下蒸

发。将粗的二酯溶于甲醇中并用10%的披钨碳进行氢化，经快速色谱分离（硅胶）后，得到标题化合物。

（L）综合的

用环戊烷羧酸甲酯按上述反应顺序进行，可得2-D,L-氨基-5-(1-羧基-甲基)-环戊基戊酸和2-D,L-boc-氨基-5-(1-羧苯氧甲基)环戊基-戊酸。应用4-碘丁-1-烯或6-碘己-1-烯代替上文详述的反应步骤的第一步的5-碘戊-1-烯，可得到2-D,L-氨基-4-(1-羧甲基)环己基丁酸，2-D,L-氨基-6-(1-羧甲基)环己基-己酸以及它们的N-boc和1-苯甲基酯衍生物。技术熟练者会认识到后两个氨基酸是2-D,L-氨基-螺环戊亚甲基壬二酸及庚二酸。

实施例2

（A）2-Boc-氨基-5-(1-羧苯氧甲基)环己基戊酰脯氨酰基-（N-Tos）精氨酰-BHA树脂。

在手动的肽合成器的30毫升反应容器内，使0.5克分子的BHA-树脂在25毫升的二氯甲烷中膨胀4小时。然后在作为溶剂的二甲基甲酰胺和二氯甲烷的混合物中，应用DCC及HBT、或DMAP（4-二甲基氨基吡啶）作为偶合剂，顺序地与受保护的精氨酸及脯氨酸与2-D,L-boc-氨基-5-(1-羧苯氧甲基)环己基戊酸偶合。

在本实验中所用的每一个试剂数量与克分子比表示如下：

氨基酸		偶合剂	
Boc-Arg (Tos)	642毫克	DCC5毫升 / 0.3M溶液	HBT405毫克
Boc-Pro	390毫克	DCC5毫升 / 0.3M	HBT405毫克
Boc-D,L-Pas (Bzl)	900毫克	DCC5毫升 / 0.3M	DMAP183毫克

在顺序的偶合环之后，用乙酸酐处理肽树脂（A）处理1小时（为了使任何未反应的氨基乙酰化）。

（B）Boc-(0-乙基)-D-酪氨酰)-苯丙酰-缬氨酰-天门冬氨酰

-(OBzl)-6,6-环戊亚甲基-2-D,L- 氨基辛二酸- 脯氨酸-(N-Tos)精氨酸-BHA 树脂。

在手动的肽合成器中，用 CH_2Cl_2 /DMF作为溶剂和用DCC/HBT 作为偶合剂，将上述过程中所得到的三单位树脂(A)进一步相继地以Boc-Asn Boc-Val、Boc-Phe 及Boc-D-Tyr(乙氧)偶合到四个环中。用定性的水合茚三酮试验监测每一个偶合过程的完成。当试验是阳性时再重复进行偶合作用。

所用的试剂的量表示如下：

氨基酸		DCC	HBT
Boc-Asn	560毫克	496毫克	621毫克
Boc-Val	521毫克	8微升 / 0.3M溶液	621毫克
Boc-Phe	636毫克	496毫克	621毫克
Boc-D-Tyr(乙基)	672毫克	496毫克	621毫克

然后，在真空中干燥该肽树脂以得到标题的中间物。

(C) $\text{H}_2\text{N-D-Tyr(乙基)-Phe-Val-Asn-D,L-Pas-Pro-ArgNH}_2$

在 0°C 以20毫升无水氟化氢处理肽树脂(B)，并加入 1.5毫升的苯甲醚作清除剂，经 1小时的作用以使肽从支承的树脂上分离，并同时发生氨基及羧基的脱保护作用。

在 0°C 及减压下将氟化氢蒸发。将残余物在乙醚中研碎，弃去乙醚，并彻底地用二甲基甲酰胺萃取 3次(每次用10毫升)，再用30%的乙酸水溶液萃取 3次(每次用10毫升)。合并各次萃取液并在减压下蒸发以生成一种油，将此种油溶于 5%的醋酸水溶液中并冷冻干燥，得到 195毫克的白色粉末。

这种粗的线型肽， $\text{H}_2\text{N-D-Tyr(乙基)-Phe-Val-Asn-D,L-Pas-ArgNH}_2$ 作为乙酸盐，用高效液相色谱(Ultrasphe ODS[®] 柱，50% 乙腈水溶液与 0.1% 三氟乙酸)及薄层色谱(硅胶 / 正丁醇 / 乙酸乙酯 / 乙酸 / 水

1:1:1:1)显示它是两个主要的组份的混合物并含有微量的其他组份。

此粗肽用逆流分配法在BAW(丁醇 / 乙酸 / 水)4:1:5中以 240次转移提纯之。用薄层色谱法检查各流份并汇集适当的流份,在减压下蒸发并从 1% 的乙酸水溶液中冷冻干燥以产生:

流份(I) 28.5毫克

流份(II) 110毫克

流份(III) 35毫克

等浓度高效薄层色谱分析(Ultrasphere ODS[®], 40% 乙腈水溶液与 0.1% 三氟乙酸, 流速为 1.5毫升 / 分) 显示两个高峰, 持续时间分别为5.09及7.80分钟。流份 I 所含主要成份是5.09分钟的异构体(约占90%), 流份 II 含有相等份量的两种异构体而流份 III 含有大部份是7.08分钟异构体。FAB-质谱证实有预期的肽($MH^+ = 1061$, $MH^- = 1059$) 存在于所有的三种流份中。

这些结果指示出两个高峰是预期的本标题的两个线型肽中间物(C) 的D-及L-异构体。

实施例3

$\overline{D-Tyr(乙基)-Phe-Val-Asn-Pas^{1,6}}-Pro-ArgNH$

将在实施例2 中得到的线性肽(C) (50毫克) 用溶于冰醋酸中的 1N盐酸处理, 然后在真空中蒸发至干。将此过程重复三次。将残余物溶于无水二甲基甲酰胺并在真空中蒸发。将此过程重复 3次(此过程是要将在氨基及胍基上的乙酸盐转变成在该位置上相应的较强的盐酸盐, 从而消除了由于释放出乙酸而在D-酪氨酸的 α - 氨基上发生的乙酰化副反应, 此种转变也可以用离子交换柱色谱法以物质的某些损耗来达到)。

将处理过的残余物溶于 7.5毫升的无水二甲基甲酰胺中, 然后在搅拌下加入12.5微升的三乙胺, 接着再加入20微升的二苯基磷酰基叠氮(DPPA)。在室温下和在氩气氛中将所得到的混合物搅拌过夜。用等浓度

高效能薄层色谱法或薄层色谱法监测环化反应的完成。

将反应混合物蒸发至干并再溶于30%的乙酸中。用G-15 Sephadex 凝胶过滤柱除去盐。用制备型的高效能薄层色谱法在 C_{18} 柱中应用45%的乙腈水溶液与0.1%的三氟乙酸作为流动相使产物进一步纯化并分离成D-及L-异构体,以得到8.5毫克的上述表I的化合物C以及5毫克的化合物D。

化合物 C:

FAB-质谱 $(M+H)^+ = 1043$, $(M-H)^- = 1041$

高效能薄层色谱 单峰 持续时间 = 9.72分。氨基酸分析:

氨基酸分析:	天门冬氨酸	1.00	酪氨酸	0.97
	脯氨酸	0.69	苯丙氨酸	0.98
	缬氨酸	0.95	精氨酸	1.10

化合物 D:

FAB-质谱 $(M+H)^+ = 1043$, $(M-H)^- = 1041$

高效能薄层色谱 单峰 持续时间 = 16.24分。氨基酸分析:

氨基酸分析:	Psp	1.00	Tyr	0.92
	Pro	0.76	Phe	0.97
	Val	0.77	Arg	1.22

实施例4

$\overline{\text{D-Tyr(乙基)-Phe-Val-Asn-Pas-Arg-Arg(NH}_2\text{)}}$

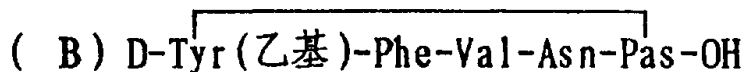
如上述,被保护的肽中间物树脂, D-Tyr(乙基)-Phe-Val-Asn-Pas (Bzl)-Arg(Tos)-Arg(Tos)-BHA 是在1.0毫克分子的二苯甲基胺树脂上合成。按上述步骤进行HF分裂及用DPPA环化而得到部份纯化的肽。

实施例5

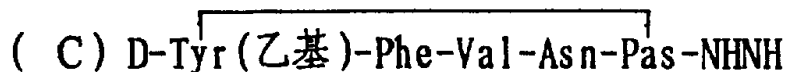
末端偶合的方法

(A) $\overline{\text{D-Tyr(乙基)-Phe-Val-Asn-Pas-OCH}_3}$

在一振荡器中，用于手工操作合成被保护的肽中间物树脂，即 Boc-D-Tyr(乙基)-Phe-Val-Asn-Pas-OCH₂-C₆H₄-树脂-OCH₃。Boc-Pas(OCH₂-C₆H₄-树脂)OCH₃是由Pas-OCH₃铯盐与氯甲基树脂制成，或用 DMAP/DCC在DMF中以0.35毫克当量/克的取代作用直接与羟甲基树脂偶合。被保护的肽-树脂中间体是由应用1:1 三氟乙酸:二氯甲烷将Boc-基团脱保护并应用DCC/HBT作为活性剂及催化剂(在0.1毫克分子级)与适当的Boc-氨基酸依次地偶合来逐步合成，以生成树脂偶合中间物。在0℃在3.0毫升的苯甲醚存在下，应用HF30毫升，而得到由树脂上分裂出的本标题的肽，在真空中蒸发至干之后，用无水乙醚洗涤残余物并用脱气的二甲基甲酰胺及40%的乙酸萃取，合并萃取液，在真空中蒸发至干，溶于10%的乙酸水溶液并冷冻干燥而得到粗的线型肽。如上述，应用DPPA使此肽，H₂N-D-Tyr(乙基)-Phe-Val-Asn-Pas-OCH₃环化，得到本标题化合物的甲基酯。



在室温下将上述0.1毫克分子的甲基酯(A)悬浮在1:1二氧杂环己烷-10%碳酸钾(水溶液)中搅拌8小时。将反应混合物用水稀释并用冰醋酸酸化至pH=4。将所得到的溶液的真空中蒸发而其残余物则用凝胶色谱法提纯。



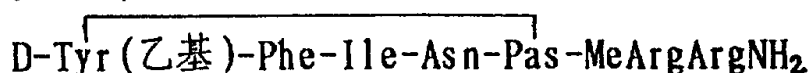
将上述的甲基酯(A)(100毫克)在室温下用含无水肼的甲醇处理，经蒸发后得到本标题化合物酰肼。

(D) 缩合作用

在DCC, HBT及含有1当量三乙胺的二甲基甲酰胺存在下，使由上述B得到的6-Pas酸(20毫克)与1当量的N^E-BocLys-Arg(NH₂)₂HCl反应，接着用三氟乙酸处理以生成D-Tyr(乙基)-Phe-Val-Asn-Pas^{1,6}-Lys-Arg(NH₂)。

同样地，可应用精氨酸或脯氨酸由酰肼（C）衍生的酰基叠氮反应制得相应的7-Arg 酸环化的肽及7-Pro 环化肽酸同类物。在需要时，可将每一种酸化合物以钾盐的形式分离出来。应用DCC/HBT 将 1当量的 Arg-NH₂2HCl 与按上述方法制得的相应的7-D-Pro 酸偶合而生成7-D-Pro-Arg-NH₂。

实施例6

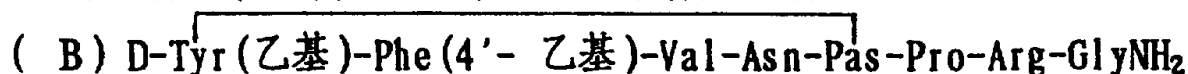


应用固相法在二苯甲胺树脂上制备被保护的肽中间物树脂Boc-D-Tyr-(乙基)-Phe-Val-Asn-Pas(Bzl)-N-MeArg(Tos)-Arg(Tos)-BHA。在一振荡器上，应用 0.5毫克分子的BHA 树脂，所有的氨基酸在氮原子上受到叔-丁氧羰基的保护，在应用DMAP使Pas(Bzl)被偶合的同时，应用DCC/HBT 依次地进行偶合。在 0℃应用无水HF(20毫升)及苯甲醚(2毫升)处理60分钟，肽从树脂上裂开以及进行支链保护基的脱保护作用。用HOAC/DMF水溶液从树脂上萃取肽。在真空中蒸发至干后，用无水乙醚洗涤肽残余物并如上述的用DPPA进行环化而得到本标题化合物。

实施例7

(A) Boc-D-Tyr(乙基)-Phe(4-乙基)-Val-Asn-Pas(Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Gly-BHA-树脂

用上述方法制备(3毫克分子) Boc-Val-Asn-Pas(Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Gly-BHA-树脂。应用 3毫克分子的氨基酸及 3毫克分子DCC 的3 及6 克分子的1-羟基苯并三唑作为催化剂，将所制备的肽树脂 1毫克分子依次地与Boc-Phe-(4'-乙基)及Boc-D-Tyr(乙基)进一步偶合。用二氯甲烷洗涤最后的肽树脂并真空干燥而得到本标题产物。



用氟化氢处理得自 A的Boc-D-Tyr(乙基)-Phe(4'-乙基)-Val-Asn-Pas(Bzl)-Pro-Arg(Tos)-Gly-BHA-树脂1.55克，接着按上述的方法用过

量的DPPA进行环化而得到本标题的化合物。

实施例8

D-Tyr(乙基)-Phe-Val-Asn-Pas-Pro-Cad

将二环己基羰基二亚酰氨(10.3毫克, 0.05毫克分子)及1-羟基苯并三唑水合物(13.4毫克, 0.1毫克分子)加至如上述实施例5中所述方法制备的Pro-酸(0.033毫克分子)及含有单一Boc-1,5-二氨基戊烷)20.2毫克, 0.0996毫克分子)的二甲基甲酰胺(400微升)的溶液中。在室温下将反应混合物搅拌19小时。然后, 在真空下除去二甲基甲酰胺。用三氟乙酸在0℃下处理残余物2小时。之后, 在真空下除去三氟乙酸, 并将其残余物加到1%的乙酸中然后使其通过BioRex70(H⁺)离子交换柱, 用吡啶缓冲液(水/吡啶/乙酸, 66:30:4)将碱性产物从离子交换柱上洗脱并蒸发。最后用制备型高效能薄层色谱(5 μ Ultrasphere ODS[®])提纯, 得到以碱或乙酸盐形式存在的本标题化合物。

实施例9

用上文详述的合成法, 制备出下列有特效的化合物:

A. [(1,6-(6,6-环戊亚甲基-2-氨基壬二酸)-2-(0-乙基-D-酪氨酸)-4-缬氨酸-7-脱脯氨酸-8-精氨酸)-后叶加压素,

B. [(1,6-(6,6-环戊亚甲基-2-氨基壬二酸)-2-D-缬氨酸-3-(0-乙基酪氨酸)-4-缬氨酸-8-精氨酸)-后叶加压素

C. [(1,6-(6,6-环戊亚甲基-2-氨基壬二酸)-2-D-环己基丙氨酸-7-脱脯氨酸-8-精氨酸)后叶加压素

D. [(1,6-(6,6-环戊亚甲基-2-氨基壬二酸)-2-甲硫氨酸-4-丙氨酸-7-D-(N-甲基丙氨酸)-8-精氨酸-9-脱甘氨酸)后叶加压素

F. [(1,6-(6,6-环四亚甲基-2-氨基壬二酸)-2-正亮氨酸-3-异亮氨酸-4-环己基甘氨酸-8-精氨酸)-后叶加压素。

G. [(1,6-(6,6-环戊亚甲基-2-氨基壬二酸)-2-(0-甲基酪氨酸)

-4- 缬氨酸-7- 脱脯氨酸-8,9- 双- 高精氨酸) 后叶加压素

H. [1,6-(6,6- 环戊亚甲基-2- 氨基壬二酸-2-(0-乙基-D- 酪氨酸)-4-缬氨酸-7- 脱脯氨酸-8- 精氨酸) - 后叶加压素;

I. [1,6-(6,6- 环戊亚甲基-2- 氨基壬二酸)-2-L-酪氨酸)-4-缬氨酸-7- 脱脯氨酸) 后叶加压素

实施例10

非肠道的剂量单位组合物:

含有 0.1毫克的实施例3 的肽作为非肠道注射用的无菌干粉末制剂, 其制备如下: 将 0.5毫克的肽溶于含有20毫克的甘露糖醇的 1毫升水溶液中。在无菌的条件下将该溶液过滤入一支 2毫升的安瓿中并冷冻干燥。该重新制成的溶液, 在必要时施用于需要后叶加压素 V_2 - 拮抗物处理的病人, 每日注射 1至 5次, 或以相等的量连续的静脉滴注注射。

鼻的剂量单位组合物

将本发明的肽(例如实施例3 的产物)2.5毫克研成细末并将其悬浮于由75毫克的苯甲醇及 1.395克的一种悬浮剂(例如一种半合成的高级脂肪酸甘油酯的商用混合物) 组成的混合物中, 将此悬浮液放置在一个 10毫升喷雾容器内(该喷雾容器由计量的阀门封闭) 并加入喷雾喷射剂。容器内含有 100单位剂量, 在患者需要aquaretic 治疗时, 施用于鼻内, 每日 1至 6次。