



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104812384 B

(45)授权公告日 2020.09.18

(21)申请号 201380059667.2

(73)专利权人 爱勒让治疗公司

(22)申请日 2013.11.01

地址 美国马萨诸塞州

(65)同一申请的已公布的文献号

(72)发明人 K·达拉克 N·卡瓦哈塔

申请公布号 CN 104812384 A

S·A·阿萨姆内

(43)申请公布日 2015.07.29

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所  
11256

(30)优先权数据

代理人 陈文平 侯宝光

61/721,457 2012.11.01 US

61/799,917 2013.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2015.05.14

A61K 31/198(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

(56)对比文件

PCT/US2013/068147 2013.11.01

US 7192713 B1, 2007.03.20

(87)PCT国际申请的公布数据

US 2005245764 A1, 2005.11.03

W02014/071241 EN 2014.05.08

CN 1218454 A, 1999.06.02

WO 2009126292 A2, 2009.10.15

审查员 刘军政

权利要求书3页 说明书31页 附图9页

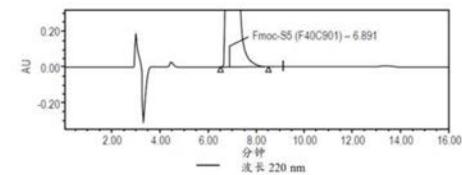
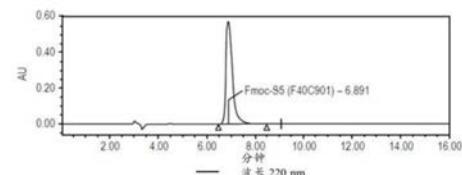
## (54)发明名称

二取代的氨基酸及其制备和使用方法

## (57)摘要

本文提供了在它们的一条侧链上包含末端烯烃的结晶的  $\alpha$ ,  $\alpha$ -二取代的氨基酸及其结晶盐, 以及该  $\alpha$ ,  $\alpha$ -二取代的氨基酸及其盐的任选结晶的卤化和氟化类似物; 它们的制备方法, 以及它们的使用方法。

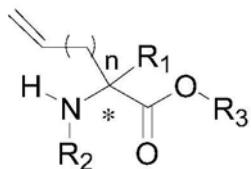
采用的柱: Chiralpak AD-H QC#167  
小瓶: 73 进样: 1  
进样体积: 5.00  $\mu$ l  
样品浓度: 48.0mg/25mLDS  
其他样品信息: 成品  
溶剂 A: 90%乙腈/10%IPA/0.1%TFA  
溶剂 B: 90%乙腈/10%IPA  
溶剂 C: IPA  
溶剂 D: EIOH



以220 nm处理的检测			
峰名称	保留时间	峰面积	%峰面积
1 Fmoc-S5 (F40C901)	6.891	9858806	100.00
2 Fmoc-S5 (F40C902)	9.100		

用户名: 系统 日期: 12/19/2011 2:19:54 PM 第1页, 共1页

## 1. 式(I)化合物的结晶盐：



式(I) ,

其中：

R<sub>1</sub>是C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>氯代烷基或C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>卤代烷基；

\*是立构中心；

n是6；

R<sub>2</sub>是9-芴基甲氧羰基(Fmoc)；且R<sub>3</sub>是-H，

其中所述盐为环己胺盐。

2. 如权利要求1所述的式(I)化合物的结晶盐，其中R<sub>1</sub>是C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基。3. 如权利要求2所述的式(I)化合物的结晶盐，其中R<sub>1</sub>是甲基。

4. 如权利要求1所述的式(I)化合物的结晶盐，其中所述立构中心\*是(S)。

5. 如权利要求1所述的式(I)化合物的结晶盐，其中所述立构中心\*是(R)。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的式(I)化合物的结晶盐，其具有90%至100%的化学纯度，任选地通过HPLC测定。

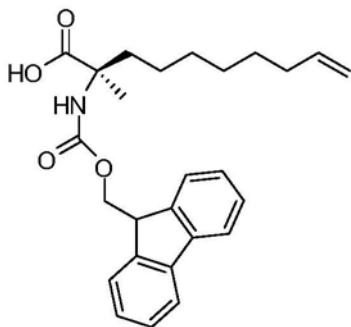
7. 如权利要求1-5中任一项所述的式(I)化合物的结晶盐，其具有90%至100%的光学纯度。

8. 如权利要求1-5中任一项所述的式(I)化合物的结晶盐，其具有95%至100%的光学纯度。

9. 如权利要求1-5中任一项所述的式(I)化合物的结晶盐，其具有90%至100%的对映体过量。

10. 如权利要求1-5中任一项所述的式(I)化合物的结晶盐，其具有95%至100%的对映体过量。

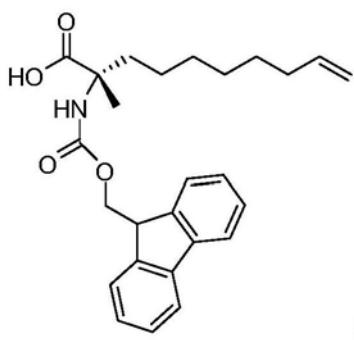
11. 如权利要求1所述的式(I)化合物的结晶盐，其具有式(IIa)：



(IIa) ,

其任选地具有95%至100%的对映体过量。

12. 如权利要求1所述的式(I)化合物的结晶盐，其具有式(IIb)：

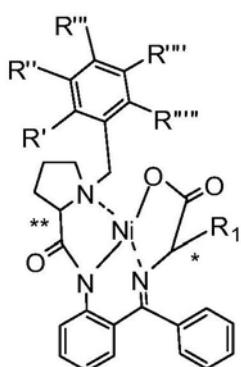


(IIb) ,

其任选地具有95%至100%的对映体过量。

13. 一种制备如权利要求1所述的式(I)化合物的结晶盐的方法,该方法包括进行以下步骤:

1) 从一种或多种溶剂中结晶式(XIb)的金属络合物



(XIb)

其中R<sub>1</sub>是C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>氘代烷基或C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>卤代烷基,\*和\*\*各自独立地是立构中心,且R'、R''、R'''、R''''和R'''''按照从R'至R'''''环绕芳香环的顺序选自以下组合:

H,H,Cl,Cl,H;

F,F,F,F,F;

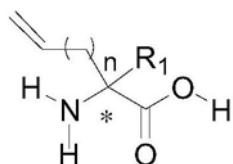
F,F,0iPr,F,F;

F,F,OMe,F,F;

Cl,H,H,H,H;或

H,H,Me,Me,H;

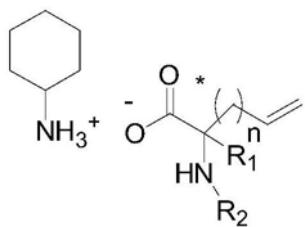
2) 将式(Ia)的化合物作为其HCl盐沉淀:



式(Ia)

其中R<sub>1</sub>是C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>氘代烷基或C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>卤代烷基,n是6,且\*是立构中心,和

3) 形成式(XIVb)的加成盐:



式(XIVb)

其中R<sub>1</sub>是C<sub>1</sub>—C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>—C<sub>3</sub>氘代烷基或C<sub>1</sub>—C<sub>3</sub>卤代烷基,R<sub>2</sub>是9-芴基甲氧羰基(Fmoc),n是6,且\*是立构中心。

14. 如权利要求13所述的方法,其中所述溶剂为氯仿和/或己烷。

15. 如权利要求13所述的方法,其中步骤1) 中式XIb化合物的结晶用甲基叔丁醚进行。

16. 如权利要求13所述的方法,其中步骤1) 中式XIb化合物的结晶用四氢呋喃和甲基叔丁醚进行。

17. 如权利要求13所述的方法,其中步骤1) 中式XIb化合物的结晶用乙酸异丙酯进行。

18. 如权利要求13所述的方法,其中步骤2) 在甲基叔丁醚中进行。

19. 如权利要求13所述的方法,其中步骤2) 在乙腈中进行。

20. 一种制备多肽的方法,其包括用如权利要求1所述的结晶盐制备该多肽。

## 二取代的氨基酸及其制备和使用方法

### [0001] 发明背景

[0002] 在其一条侧链上具有末端烯烃的 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸及其盐(“烯烃 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸”)可用于制备交联的大环肽。例如,国际申请号PCT/US2004/038403(“403申请”)公开了向肽中引入两个各自包含具有末端烯烃的侧链的 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸,并交联该末端烯烃基团,以形成交联的(“钉合的(stapled)”)大环肽。该交联可以,例如,稳定在钉合的大环肽中存在的二级结构(例如, $\alpha$ -螺旋)。

[0003] 国际申请公开号WO2008/121767(“767申请”)公开了使用烯烃 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸来形成拼接的(stitched)多肽(例如,多个及串联的交联的多肽),该多肽具有通过拼接而稳定化的二级结构。“403申请”、“767申请”以及其他申请、公开物和专利公开了钉合的和拼接的大环肽可用于治疗和预防各种疾病,包括癌症。

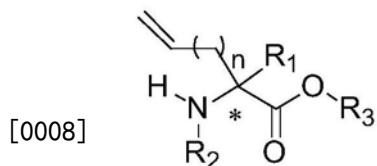
[0004] 因此,烯烃 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸是用于形成拼接的和钉合的多肽及其前体的重要且有用的结构单元。然而,烯烃 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸的应用已经受限于无法以结晶形式提供这些重要的分子。例如,烯烃 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸的市售制剂通常作为预制备的溶液来出售。预制备的溶液限制了每单位体积可运送的 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸的量,限制了可用于与烯烃 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸一同运行的化学反应,使烯烃 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸具有增强的降解速率,并且是环境不友好的。因此,仍然迫切需要结晶的烯烃 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸及其结晶盐,以及制备和使用这些结晶氨基酸的方法。

[0005] 此外,用氘或卤素原子取代烯烃 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸的一个或多个氢原子可以改变氨基酸的一种或多种性质。例如,烯烃 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸的偶极矩、疏水性、亲水性、空间体积(steric bulk)或反应性可以通过用一个或多个氘或卤素原子取代其上的一个或多个氢原子来改变。因此,仍需要其上一个或多个氢原子被氘或卤素取代的任选结晶的烯烃 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸及其任选结晶的盐,以及制备和使用它们的方法。

### 发明内容

[0006] 本文解决了上述及其他需求。在发明内容中提供的发明实施方案仅意在说明并提供关于本文公开的选定的发明实施方案的概述。为说明性和选择性的发明内容并不限制任何权利要求的范围,不提供本文公开的或考虑的发明实施方案的整个范围,并且不应该解释成限制或约束本公开内容或任何请求保护的发明实施方案的范围。

[0007] 本文提供了结晶的式(I)化合物及其结晶盐:



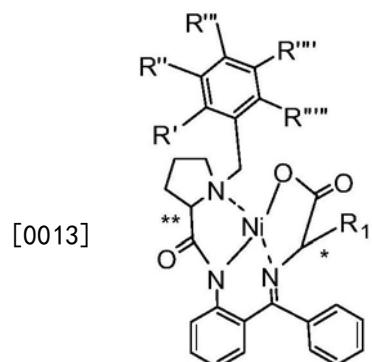
式(I)

[0009] 其中, R<sub>1</sub>是C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>氘代烷基或C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>卤代烷基;\*是立构中心;n是1至20的整数;R<sub>2</sub>是-H或氮保护基团;且R<sub>3</sub>是-H或保护或活化基团。

[0010] 本文还提供了制备多肽的方法,该方法包括用一种或多种结晶的式(I)化合物或其结晶盐制备该多肽。

[0011] 本文进一步提供了制备结晶的式(I)化合物或其结晶盐的方法,该方法包括下列纯化中的至少一个:

[0012] 1)从一种或多种溶剂,任选环醚,任选四氢呋喃和甲基叔丁醚,或任选醇,任选异丙醇,任选酯,任选乙酸异丙酯,任选乙酸乙酯中结晶式(XIb)的金属络合物



(XIb)

[0014] 其中,R<sub>1</sub>是C<sub>1</sub>—C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>—C<sub>3</sub>氘代烷基或C<sub>1</sub>—C<sub>3</sub>卤代烷基,\*和\*\*各自独立地是立构中心,且R'、R''、R'''、R''''和R'''''以从R'至R'''''环绕芳香环的顺序选自

[0015] H,H,Cl,Cl,H;

[0016] F,F,F,F,F;

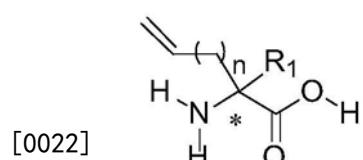
[0017] F,F,0iPr,F,F;

[0018] F,F,OMe,F,F;

[0019] Cl,H,H,H,H;或

[0020] H,H,Me,Me,H;

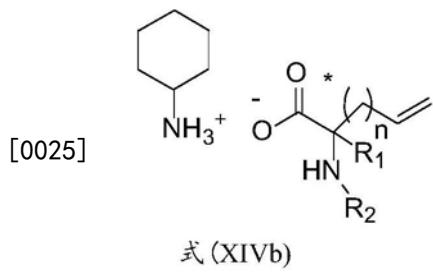
[0021] 2)将式(Ia)的化合物作为其HCl盐沉淀:



式(Ia)

[0023] 其中,R<sub>1</sub>是C<sub>1</sub>—C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>—C<sub>3</sub>氘代烷基或C<sub>1</sub>—C<sub>3</sub>卤代烷基,n是1至20的整数,且\*是立构中心;

[0024] 3)形成式(XIVb)的加成盐:



[0026] 其中,  $R_1$ 是 $C_1-C_3$ 烷基、 $C_1-C_3$ 氘代烷基或 $C_1-C_3$ 卤代烷基,  $R_2$ 是氮保护基团,  $n$ 是1至20的整数,且\*是立构中心;或

[0027] 4) 从一种或多种溶剂,任选氯仿和己烷中结晶式 (I) 的化合物或其盐。

[0028] 在一些实施方案中,式 (XIb) 的化合物在四氢呋喃和甲基叔丁醚的混合物中结晶。在一些实施方案中,四氢呋喃与甲基叔丁醚的比例为1:10至3:10。例如,该比例为1.5:10。

[0029] 在一些实施方案中,式 (I) 的化合物或其盐在氯仿和己烷的混合物中结晶。在一些实施方案中,氯仿与己烷的比例为1:5至1:1。例如,该比例为1:3或1:2。本文还提供了制备多肽的方法,该方法包括用一种或多种结晶的式 (I) 化合物或其结晶盐制备该多肽。

## 附图说明

[0030] 图1是N-Fmoc- (S) - $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基-6-烯酸的手性HPLC迹线。

[0031] 图2是掺杂有N-Fmoc- (R) - $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基-6-烯酸的N-Fmoc- (S) - $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基-6-烯酸的手性HPLC迹线。

[0032] 图3是用设置为215nm的检测器检测的N-Fmoc- (S) - $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基-6-烯酸的HPLC迹线。

[0033] 图4是用设置为254nm的检测器检测的N-Fmoc- (S) - $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基-6-烯酸的HPLC迹线。

[0034] 图5是N-Fmoc- (S) - $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基-6-烯酸标准的HPLC迹线。

[0035] 图6是N-Fmoc- (R) - $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基癸-9-烯酸的手性HPLC迹线。

[0036] 图7是掺杂有N-Fmoc- (S) - $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基癸-9-烯酸的N-Fmoc- (R) - $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基癸-9-烯酸的手性HPLC迹线。

[0037] 图8是用设置为215nm的检测器检测的N-Fmoc- (R) - $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基癸-9-烯酸的HPLC迹线。

[0038] 图9是用设置为254nm的检测器检测的N-Fmoc- (R) - $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基癸-9-烯酸的HPLC迹线。

[0039] 援引并入

[0040] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请都通过引用而整体并入本文。在本文的术语与通过引用而并入的术语之间存在冲突的情况下,以本文中的术语为准。

[0041] 发明详述

[0042] 一个或多个发明实施方案的细节在本文的附图、权利要求书和说明书中进行了阐述。本文公开的和考虑的发明实施方案的其他特征、目的和优点通过说明书和附图以及权利要求书将是显而易见的。

[0043] 初始定义

[0044] 如本文所用的,除非另外指明,冠词“一个”意指一个或多个,除非另有明确地规定。

[0045] 如本文所用的,除非另外指明,诸如“包含”、“含有”、“包括”、“具有”等术语意指“包括”。

[0046] 如本文所用的,除非另外指明,术语“或”可以是连接词或反意连接词(disjunctive)。

[0047] 在本文中,除非另外指明,任何实施方案可以与其他任何实施方案组合。

[0048] 在本文中,除非另外指明,本文中的一些发明实施方案涉及数值范围。当存在范围时,该范围包括所述范围的端点。此外,在该范围内的每个子范围和值如同明确写出那样存在。

[0049] 在本文中,除非另外指明,符号“D”代表氘或其自由基(radical)。

[0050] 在本文中,除非另外指明,术语“卤代”或“卤素”各自是指氟、氯、溴或碘或其自由基。

[0051] 在本文中,除非另外指明,术语“烷基”是指包含指定数目的碳原子的直链或支链的烃链。例如,C<sub>1</sub>–C<sub>3</sub>烷基基团表示该基团在其内具有1至3个(含)碳原子。

[0052] “氘代烷基”是指氘化的烷基链,其中该烷基链的氢原子以至少90%的水平被氘原子替代。

[0053] 在本文中,除非另外指明,术语“卤代烷基”是指卤化的烷基链,其中该烷基链的氢原子被卤素原子替代。在一些实施方案中,卤素原子都是相同的(例如,全部F或全部Cl)。

[0054] 在本文中,除非另外指明,//是双(例如,烯烃)键。

[0055] 如本文所用的,除非另外指明,术语“拟肽大环化合物”或“交联的多肽”是指包含通过多个肽键连接的多个氨基酸残基和至少一个大环形成连接体的化合物,该大环形成连接体在第一天然存在的或非天然存在的氨基酸残基(或类似物)与同一分子内的第二天然存在的或非天然存在的氨基酸残基(或类似物)之间形成大环。拟肽大环化合物包括其中大环形成连接体将第一氨基酸残基(或类似物)的α-碳连接至肽中的第二氨基酸残基(或类似物)的α-碳的实施方案。拟肽大环化合物包含处于一个或多个氨基酸残基和/或氨基酸类似物残基之间的一个或多个非肽键,且除了形成大环化合物的任意残基外,任选地还包含一个或多个非天然存在的氨基酸残基或氨基酸类似物残基。

[0056] 如本文所用的,除非另外指明,当在拟肽大环化合物的背景下提及时,“相应的非交联多肽”被理解为涉及与该大环化合物长度相同并且包含对应于该大环化合物的野生型序列的等同天然氨基酸的多肽。

[0057] 如本文所用的,除非另外指明,术语“氨基酸”是指同时含有氨基和羧基的分子。合适的氨基酸包括,例如,天然存在的氨基酸的D-和L-异构体,以及通过有机合成或其他代谢途径制备的非天然存在的氨基酸。术语氨基酸涉及例如α-氨基酸、天然氨基酸、非天然氨基酸和氨基酸类似物。

[0058] 如本文所用的,除非另外指明,术语“α-氨基酸”是指含有的氨基和羧基都结合到被指定为α-碳原子的碳原子上的分子。

[0059] 如本文所用的,除非另外指明,术语“天然存在的氨基酸”是指在自然界合成的肽中通常发现的20种氨基酸中的任一种,已知其单字母缩写为A、R、N、C、D、Q、E、G、H、I、L、K、M、

F、P、S、T、W、Y和V。

[0060] 在本文中,除非另外指明,术语“氨基酸侧链”是指连接到氨基酸中的 $\alpha$ -碳原子(或另一个骨架原子)上的部分。例如,丙氨酸的氨基酸侧链是甲基,苯丙氨酸的氨基酸侧链是苯甲基,半胱氨酸的氨基酸侧链是硫甲基,天冬氨酸的氨基酸侧链是羧甲基,酪氨酸的氨基酸侧链是4-羟基苯甲基,等等。也包括其他非天然存在的氨基酸侧链,例如,自然产生的氨基酸侧链(例如,氨基酸代谢物)或合成制备的氨基酸侧链(例如, $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸)。

[0061] 在本文中,除非另外指明,术语“ $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸”是指包含的氨基和羧基都结合到碳原子(例如, $\alpha$ -碳原子)上而该碳原子( $\alpha$ -碳原子)也连接到天然和非天然的、连接到两个天然的或连接到两个非天然的氨基酸侧链上的分子或部分。

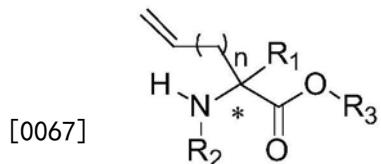
[0062] 在本文中,除非另外指明,术语“多肽”可包括通过共价键(例如,酰胺键)连接的两个或更多个天然或非天然存在的氨基酸。如本文所述的多肽包括全长蛋白质(例如,完全加工的蛋白质)以及较短的氨基酸序列(例如,天然存在的蛋白质的片段或合成的多肽片段)。

[0063] 在本文中,除非另外指明,术语“大环化试剂”或“大环形成试剂”可指任何可以用来通过介导其上的两个反应性烯烃基团之间的反应而制备拟肽大环化合物的试剂。一旦发生反应就将连接体闭合的反应性基团可以是例如氘化的或未氘化的末端烯烃(烯属烃)。

[0064] 大环化试剂或大环形成试剂可以是复分解催化剂,包括但不限于稳定的后过渡金属卡宾络合物催化剂,如VIII族过渡金属卡宾催化剂。例如,这样的催化剂可含有Ru和Os金属中心,其具有+2氧化态、电子计数为16且为五配位的。该催化剂可具有W或Mo中心。各种催化剂在以下文献中公开:Grubbs等人,“Ring Closing Metathesis and Related Processes in Organic Synthesis”Acc.Chem.Res.1995,28,446-452;美国专利号5,811,515;美国专利号7,932,397;美国专利申请公开号2011/0065915;美国专利申请公开号2011/0245477;Yu等人,“Synthesis of Macroyclic Natural Products by Catalyst-Controlled Stereoselective Ring-Closing Metathesis,”Nature 2011,479,88;和Peryshkov等人,“Z-Selective Olefin Metathesis Reactions Promoted by Tungsten Oxo Alkylidene Complexes,”J.Am.Chem.Soc.2011,133,20754。

[0065] 在本文中,除非另外指明,术语“治疗”被定义为向患者应用或施用治疗剂,或者向从患者分离的组织或细胞系应用或施用治疗剂,该患者患有疾病、疾病症状或具有患病倾向,其目的是治愈、恢复、减轻、解除、改变、矫正、缓解、改善或影响该疾病、疾病症状或患病倾向。

[0066] 本文提供了结晶的式(I)化合物或其结晶盐:



式(I),

[0068] 其中,R<sub>1</sub>是C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>氘代烷基或C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>卤代烷基;\*是立构中心;n是1至20的整数;R<sub>2</sub>是-H或氮保护基团;且R<sub>3</sub>是-H或保护或活化基团。

[0069] R<sub>1</sub>

[0070] 在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中, R<sub>1</sub>可以是C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基。R<sub>1</sub>可以是, 例如甲基、乙基、正丙基或异丙基。

[0071] 在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中, R<sub>1</sub>可以是C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>氘代烷基。R<sub>1</sub>可以是, 例如-CD<sub>3</sub>、-CD<sub>2</sub>CD<sub>3</sub>、-CD<sub>2</sub>CD<sub>2</sub>CD<sub>3</sub>或-CD(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>。

[0072] 在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中, R<sub>1</sub>可以是C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>卤代烷基。该卤素可以是, 例如-F、-Cl、-Br或-I。R<sub>1</sub>可以是, 例如-CX<sub>3</sub>、-CX<sub>2</sub>CX<sub>3</sub>、-CX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>3</sub>或-CX(CX<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 其中X是卤素。

[0073] R<sub>2</sub>

[0074] 在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中, R<sub>2</sub>可以是, 例如-H或选自下组的氮保护基团: 9-芴基甲氧羰基(Fmoc)、三苯甲基(Trt)、4-甲氧基三苯甲基(Mmt)、2-(3,5-二甲氧基苯基)丙烷-2-基氧基羰基(Ddz)、2-(对联苯基)-2-丙氧羰基(Bpoc)、2-(4-硝基苯基磺酰基)乙氧羰基(NSC)、(1,1-二氧代苯并[b]噻吩-2-基)甲氧羰基(Bsmoc)、(1,1-二氧代萘并[1,2-b]噻吩-2-基)甲氧羰基( $\alpha$ -Nsmoc)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)-3-甲基丁基(ivDde)、2,-二叔丁基-Fmoc(Fmoc\*)、2-氟-Fmoc(Fmoc(2F))、2-单异辛基-Fmoc(mio-Fmoc)、2,7-二异辛基-Fmoc(dio-Fmoc)、2-[苯基(甲基)锍]乙氧羰基四氟硼酸盐(Pms)、乙烷磺酰基乙氧羰基(Esc)、2-(4-磺基苯基磺酰基)乙氧羰基(2-(4-Sulfophenylsulfonyl)ethoxy carbonyl)(Sps)、叔丁氧羰基(Boc)、苄氧羰基(Z)、烯丙基氧基羰基(Alloc)、2,2,2-三氯乙氧羰基(Troc)、对硝基苄氧羰基(pNZ)、炔丙基氧基羰基(Poc)、邻硝基苯磺酰基(oNBS)、2,4-二硝基苯磺酰基(dNBS)、苯并噻唑-2-磺酰基(Bts)、邻硝基苄氧羰基(oNz)、4-硝基藜芦基氧基羰基(NVCO)、2-(2-硝基苯基)丙氧羰基(NPPOC)、2,(3,4-甲基乙烯二氧基-6-硝基苯基)丙氧羰基(MNPPOC)、9-(4-溴苯基)-9-芴基(BrPhF)、叠氮基甲氧羰基(Azoc)、六氟丙酮(HFA)、2-氯苄氧羰基(C1-Z)、4-甲基三苯甲基(Mtt)、三氟乙酰基(tfa)、(甲基磺酰基)乙氧羰基(Msc)、苯基二硫烷基乙氧羰基(Phenylidisulphanylethylloxycarbonyl)(Phdec)、2-吡啶基二硫烷基乙氧羰基(Pydec)和邻硝基苯磺酰基(0-NBS)。

[0075] 氮保护基团可见于例如Isidro-Llobet, A. 等人, "Amino Acid-Protecting Groups," Chem. Rev. 2455-2504 (2009) 中。

[0076] 在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中, R<sub>2</sub>可以是, 例如, 选自9-芴基甲氧羰基(Fmoc)、三苯甲基(Trt)、4-甲氧基三苯甲基(Mmt)、2-(3,5-二甲氧基苯基)丙烷-2-基氧基羰基(Ddz)、2-(对联苯基)-2-丙氧羰基(Bpoc)、2-(4-硝基苯基磺酰基)乙氧羰基(NSC)、1,1-二氧代苯并[b]噻吩-2-基)甲氧羰基(Bsmoc)、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)-3-甲基丁基(ivDde)、叔丁氧羰基(Boc)、苄氧羰基(Z)、烯丙基氧基羰基(Alloc)、2,2,2-三氯乙氧羰基(Troc)、对硝基苄氧羰基(pNZ)、邻硝基苯磺酰基(oNBS)、2,4-二硝基苯磺酰基(dNBS)、邻硝基苄氧羰基(oNz)、4-硝基藜芦基氧基羰基(NVCO)、2-(2-硝基苯基)丙氧羰基(NPPOC)、6-氟丙酮(HFA)、2-氯苄氧羰基(C1-Z)、4-甲基三苯甲基(Mtt)、三氟乙酰基(tfa)、(甲基磺酰基)乙氧羰基(Msc)和邻硝基苯磺酰基(0-NBS)的氮保护基团。

[0077] 在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中, R<sub>2</sub>可以是选自9-芴基甲氧羰基(Fmoc)、三苯甲基(Trt)、4-甲氧基三苯甲基(Mmt)、2-(3,5-二甲氧基苯基)丙烷-2-基氧基羰基(Ddz)、2-(对联苯基)-2-丙氧羰基(Bpoc)、叔丁氧羰基(Boc)、苄氧羰基(Z)、烯丙基氧基羰基(Alloc)、2,2,2-三氯乙氧羰基(Troc)、邻硝基苯磺酰基(oNBS)、三苯甲基(Trt)、4-甲基三苯甲基(Mtt)和邻硝基苯磺酰基(0-NBS)的氮保护基团。

[0078] 在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中, R<sub>2</sub>可以是, 例如氮保护基团9-芴基甲氧羰基(Fmoc)。

[0079] R<sub>3</sub>

[0080] 在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中, R<sub>3</sub>可以是, 例如-H或选自下组的保护或活化基团: 叔丁基(tBu)、2-氯三苯甲基(2-Cl-Trt)、2,4-二甲氧基苄基(DMB)、苄基(Bn)、2-苯基异丙基(2-Ph i Pr)、5-苯基-3,4-亚乙基二氧基噻吩甲基(5-Ph en y 1-3,4-ethylenedioxyphenyl)、9-芴基甲基(Fm)、4-(N-[1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己亚基)-3-甲基丁基]-氨基)苄基(Dmab)、甲基(Me)、乙基(Et)、氨基甲酰基甲基(Cam)、烯丙基(A1)、苯甲酰甲基(Pac)、对硝基苄基(pNB)、2-三甲基硅烷基乙基(TMSE)、(2-苯基-2-三甲基硅烷基)乙基(PTMSE)、2-(三甲基硅烷基)异丙基(Tmsi)、三甲基硅烷基(TMS)、2,2,2-三氯乙基(Tce)、对羟基苯甲酰甲基(pHP)、4,5-二甲氧基-2-硝基苄基(Dmnb)、1,1-二甲基烯丙基(Dma)、五胺钴(III)、琥珀酰亚胺、对硝基苯基、五氟苯基和2,4,5-三氯苯基。

[0081] 在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中, R<sub>3</sub>可以是, 例如-H。

[0082] n

[0083] 在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中, n的范围可以是, 例如1-20、3-11或3-6。n可以是, 例如3或6或11。n可以是3。n可以是6。n可以是11。

[0084] \*

[0085] 在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中, 立构中心\*可以是(R)。在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中, 立构中心\*可以是(S)。

[0086] 在一个实施方案中, 在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中, R<sub>1</sub>可以是C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基; R<sub>2</sub>可以是9-芴基甲氧羰基(Fmoc); R<sub>3</sub>可以选自-H、叔丁基(tBu)、2-氯三苯甲基(2-Cl-Trt)、2,4-二甲氧基苄基(DMB)、苄基(Bn)、2-苯基异丙基(2-Ph i Pr)、5-苯基-3,4-亚乙基二氧基噻吩甲基、9-芴基甲基(Fm)、4-(N-[1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己亚基)-3-甲基丁基]-氨基)苄基(Dmab)、甲基(Me)、乙基(Et)、氨基甲酰基甲基(Cam)、烯丙基(A1)、苯甲酰甲基(Pac)、对硝基苄基(pNB)、2-三甲基硅烷基乙基(TMSE)、(2-苯基-2-三甲基硅烷基)乙基(PTMSE)、2-(三甲基硅烷基)异丙基(Tmsi)、三甲基硅烷基(TMS)、2,2,2-三氯乙基(Tce)、对羟基苯甲酰甲基(pHP)、4,5-二甲氧基-2-硝基苄基(Dmnb)、1,1-二甲基烯丙基(Dma)、五胺钴(III)、琥珀酰亚胺、对硝基苯基、五氟苯基和2,4,5-三氯苯基; n可以是3至11的整数; 且立构中心\*可以是(R)。

[0087] 在一个实施方案中, 在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中, R<sub>1</sub>可以是C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷基; R<sub>2</sub>可以是9-芴基甲氧羰基(Fmoc); R<sub>3</sub>可以选自-H、叔丁基(tBu)、2-氯三苯甲基(2-Cl-Trt)、2,4-二甲氧基苄基(DMB)、苄基(Bn)、2-苯基异丙基(2-Ph i Pr)、5-苯基-3,4-亚乙基二氧基噻吩甲基、9-芴基甲基(Fm)、4-(N-[1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己亚基)-3-甲基丁基]-氨基)苄基(Dmab)、甲基(Me)、乙基(Et)、氨基甲酰基甲基(Cam)、烯丙基(A1)、苯甲酰甲基(Pac)、对硝基苄基(pNB)、2-三甲基硅烷基乙基(TMSE)、(2-苯基-2-三甲基硅烷基)乙基(PTMSE)、2-(三甲基硅烷基)异丙基(Tmsi)、三甲基硅烷基(TMS)、2,2,2-三氯乙基(Tce)、对羟基苯甲酰甲基(pHP)、4,5-二甲氧基-2-硝基苄基(Dmnb)、1,1-二甲基烯丙基(Dma)、五胺钴(III)、琥珀酰亚胺、对硝基苯基、五氟苯基和2,4,5-三氯苯基; n可以是3至11的整数; 且立构中心\*可以是(S)。

[0088] 在一个实施方案中,在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中,R<sub>1</sub>可以是甲基,R<sub>2</sub>可以是9-芴基甲氧羰基(Fmoc);R<sub>3</sub>可以是-H,n可以是3、6或11,且立构中心\*可以是(R)。

[0089] 在一个实施方案中,在结晶的式(I)化合物或其结晶盐中,R<sub>1</sub>可以是甲基,R<sub>2</sub>可以是9-芴基甲氧羰基(Fmoc);R<sub>3</sub>可以是-H,n可以是3、6或11,且立构中心\*可以是(S)。

#### [0090] 化学纯度

[0091] 在本文中,除非另外指明,任何化合物、其盐、结晶化合物或化合物的结晶盐可具有化学纯度。化学纯度可以被定义为,例如,一种物质未用外来材料稀释或未与外来材料混合的程度,并且一般可表示为百分比。本文的任何化合物、其盐、结晶化合物或化合物的结晶盐可具有例如约90%至100%的化学纯度。化学纯度可以是,例如约92%至100%、约94%至100%、约96%至100%、约98%至100%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%。例如,该百分比可基于该化合物、其盐、结晶化合物或其盐的总重量。该百分比可以例如使用HPLC得到。该百分比可以例如使用NMR,例如质子NMR得到。化学纯度可以例如使用元素分析得到。

#### [0092] 对映体过量

[0093] 在本文中,除非另外指明,任何化合物、其盐、结晶化合物或化合物的结晶盐可以具有对映体过量。对映体过量可以是,例如约80%至100%、约85%至100%、约90%至100%、约95%至100%、约96%至100%、约97%至100%、约98%至100%、约99%至100%、约95%、约96%、约97%、约97.2%、约98%、约99%或100%。对映体过量可以是,例如大于95%、大于96%、大于97%、大于98%或大于99%。在本文中,除非另外指明,对映体过量可以例如通过以下公式来计算:对映体过量(ee) = ((P-S) / (P+S)) x100%,其中P和S分别表示在样品中产生或存在的主要和次主要(subdominant)对映体的摩尔量。例如,如果生成的(R)对映体的摩尔量比(S)对映体的摩尔量多,(R)对映体的摩尔量被指定为R且(S)对映体的摩尔量被指定为S,则对映体过量公式变为:ee(%) = ((R-S) / (R+S)) x100%。在本文中,除非另外指明,生成的对映异构体的量(例如,摩尔量)可以例如通过手性HPLC、通过手性GC或使用NMR光谱法经由手性NMR位移试剂来确定。

#### [0094] 光学纯度

[0095] 在本文中,除非另外指明,任何化合物、其盐、结晶化合物或化合物的结晶盐可以具有光学纯度。光学纯度可以是,例如约80%至100%、约85%至100%、约90%至100%、约95%至100%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%。在本文中,除非另外指明,光学纯度可以使用以下公式来计算:光学纯度(%) = ([α] 观测值 / [α] 最大值) \*100%,其中[α] 观测值是该样品的比旋光度,而[α] 最大值是纯对映体的比旋光度。在本文中,除非另外指明,比旋光度可以被定义为当平面偏振光通过具有1分米的路径长度和1克/毫升的样品浓度的样品时,所观察到的光学旋转的角度α。比旋光度可以例如在20°C和589纳米(例如,钠光D线)的光波长下获得。在本文中,除非另外指明,比旋光度可以例如用旋光计获得。在本文中,除非另外指明,溶解样品的溶剂可以是任何合适的溶剂或溶剂组合,例如乙醇、甲醇、氯仿、二氯甲烷、四氯化碳、水、DMSO、N,N-DMF、乙醚、四氢呋喃、己烷、戊烷、丙酮或其任意组合。

#### [0096] 非对映体过量

[0097] 在本文中,除非另外指明,本文的化合物、盐、结晶化合物或化合物的结晶盐可以是

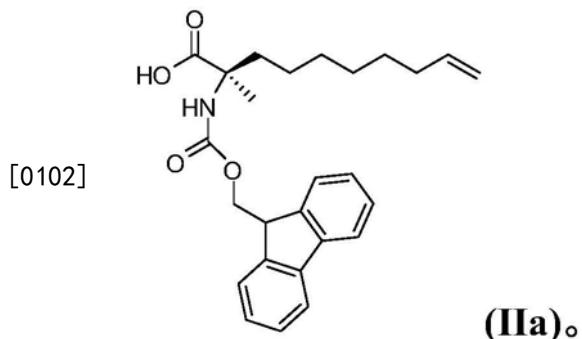
非对映体。如果是这样，则本文的化合物、结晶化合物或化合物的结晶盐可具有例如约80%至100%、约85%至100%、约90%至100%、约95%至100%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%的非对映体过量。在本文中，除非另外指明，非对映体过量，例如，在两种非对映体的混合物中的非对映体过量，可以例如通过以下公式来计算：非对映体过量% = ((D1-D2) / (D1+D2)) \* 100%，其中D1表示例如第一和最丰富的非对映体的摩尔或重量百分比，且D2表示例如第二和最不丰富的非对映体的摩尔或重量百分比，其中，在计算中一致地（例如，单独地）使用摩尔百分比或在计算中一致地（例如，单独地）使用重量百分比。

[0098] 转换的对映体过量或光学纯度

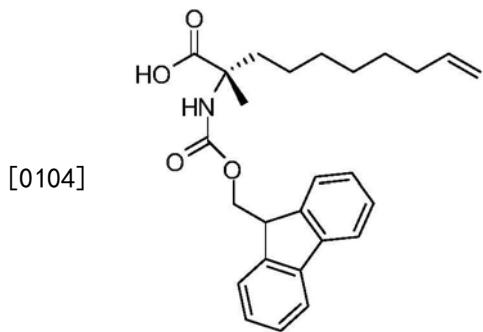
[0099] 除非另外指明，本文中为非对映体的任何化合物、其盐、结晶化合物或其结晶盐可通过例如移除氮保护基团（例如，移除式(I)的结晶化合物或其结晶盐中与立构中心\*一起构成非对映体的氮保护基团R<sub>2</sub>）而转换成具有一个立构中心（例如，式(I)中的\*）的对映体或对映体混合物，于是所得的对映体或对映体混合物可具有如本文所述确定的其对映体过量或光学纯度。在这些情况下，所得的对映体过量或光学纯度被称为转换的对映体过量或转换的光学纯度。转换的对映体过量可以是，例如约80%至100%、约85%至100%、约90%至100%、约95%至100%、约96%至100%、约97%至100%、约98%至100%、约99%至100%、约95%、约96%、约97%、约97.2%、约98%、约99%或100%。转换的对映体过量可以是，例如大于95%、大于96%、大于97%、大于98%或大于99%。转换的光学纯度可以是，例如约80%至100%、约85%至100%、约90%至100%、约95%至100%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或100%。因此，除非另外指明，本文任何任选结晶的非对映体或其任选结晶的盐可以具有转换的对映体过量或转换的光学纯度。

[0100] 具体示例的结晶化合物及其结晶盐

[0101] 在本文中，除非另外指明，结晶的式(I)化合物或其结晶盐可以是式(IIa)的化合物或其结晶盐：

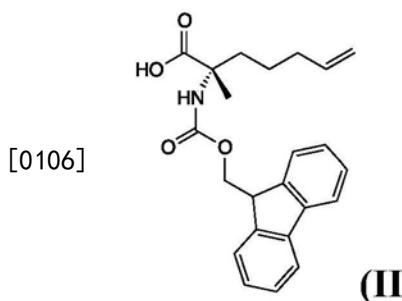


[0103] 在本文中，除非另外指明，结晶的式(I)化合物或其结晶盐可以是式(IIb)的化合物或其结晶盐：



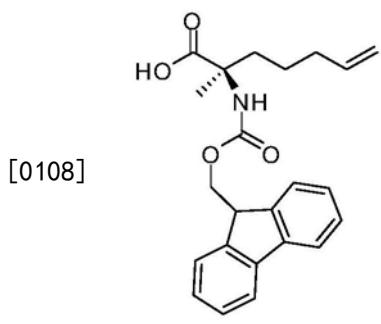
(IIb)。

[0105] 在本文中,除非另外指明,结晶的式(I)化合物或其结晶盐可以是式(IIIa)的化合物或其结晶盐:



(IIIa)。

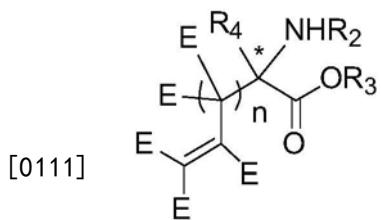
[0107] 在本文中,除非另外指明,结晶的式(I)化合物或其结晶盐可以是式(IIIb)的化合物或其结晶盐:



(IIIb)。

[0109] 氙化和卤化的化合物及其盐

[0110] 除非另外指明,本文还提供了式(IV)的任选结晶的化合物及其任选结晶的盐:



式(IV) ,

[0112] 其中,R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、n和\*与式(I)的结晶化合物或其结晶盐中的相同,各个E独立地选自氘和卤素,并且R<sub>4</sub>选自C<sub>1</sub>–C<sub>3</sub>烷基、C<sub>1</sub>–C<sub>3</sub>氘代烷基和C<sub>1</sub>–C<sub>3</sub>卤代烷基。

[0113] 氕

[0114] 在本文中,除非另外指明,对于任何氘化的:化合物、其盐、结晶化合物或其结晶

盐；大于90%、大于92%、大于94%、大于96%或大于98%的氘化的：化合物、其盐、结晶化合物或其结晶盐，在氘化的：化合物、其盐、结晶化合物或其结晶盐中被指定为氘(D)的各个位置处具有氘原子。

[0115] 制备方法

[0116] 本文的化合物及其盐可通过本文公开的方法方便地制备，该方法导致下列优点中的至少一个：

[0117] -所产生的化合物或其盐是结晶的；

[0118] -化合物及其盐(这两者都可以是结晶的)以高收率方便地生成；

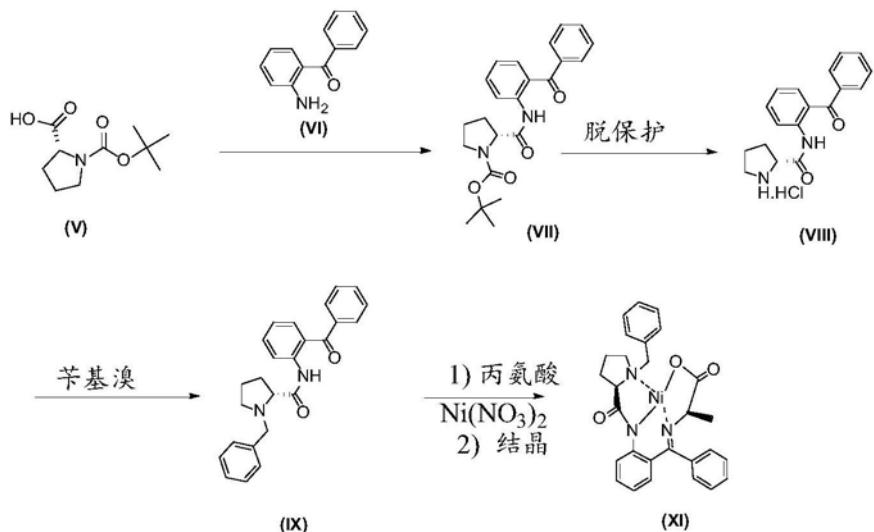
[0119] -化合物及其盐(这两者都可以是结晶的)以高化学纯度方便地生成；

[0120] -化合物及其盐(这两者都可以是结晶的)以高对映体过量、光学纯度、非对映体过量、高转换的对映体过量或高转换的光学纯度方便地生成；或者

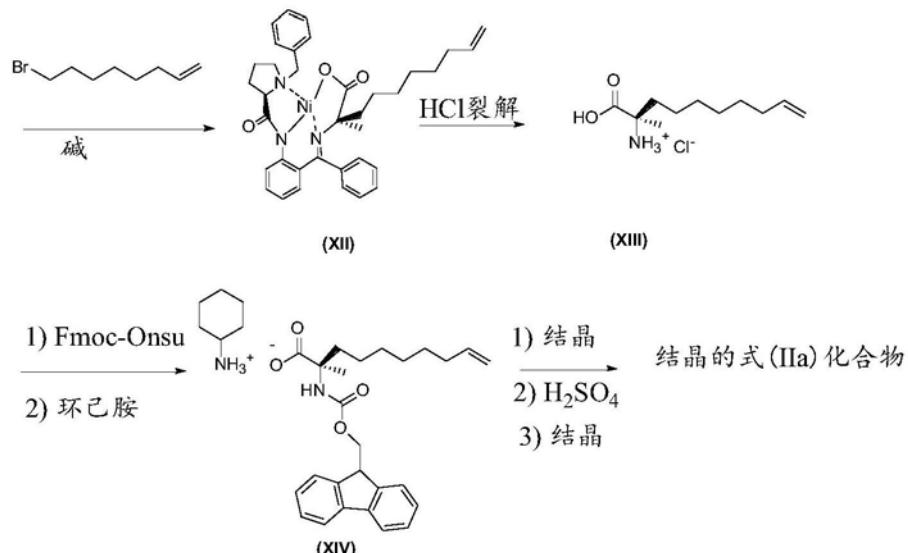
[0121] -化合物及其盐(这两者都可以是结晶的)在未经色谱纯化(例如，未进行色谱法)的情况下生成。

[0122] 除非另外指明，本文的化合物、其盐、结晶化合物及其结晶盐可使用例如示例性方案I(具有对熟练技术人员而言将是显而易见的修改)来生成。方案I描述了结晶的N-Fmoc-(R)- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基癸-9-烯酸(即，结晶的式(IIa)化合物)的形成。顺序I从Boc-D-脯氨酸(即，式(V)的化合物)开始。应当理解，通过从Boc-L-脯氨酸开始，可以生成具有与式(IIa)化合物相反的立体化学的化合物(例如，可以生成式(IIb)的化合物)。还应当理解，用于形成金属络合物的氨基酸(例如，方案I中用于形成式(XI)的金属络合物的丙氨酸)的立体化学对于所得结晶化合物(例如，式(IIa)的化合物)或其结晶盐的立体化学不是决定性的。

[0123] 方案I

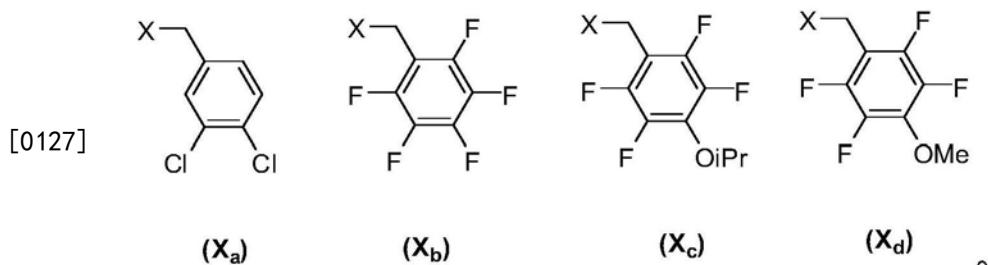


[0124]



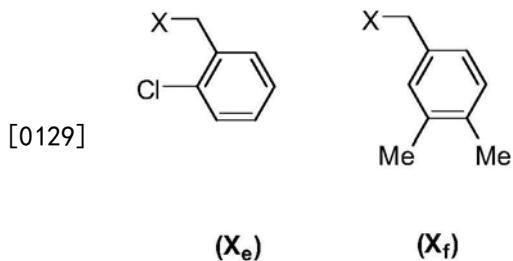
[0125] 在方案I中, Boc-D-脯氨酸(式(V)的化合物)首先与2-氨基二苯甲酮(式(VI)的化合物)反应,以形成式(VII)的化合物。接下来,对式(VII)的化合物进行脱保护,以形成式(VIII)的化合物的HCl盐。熟练的技术人员将容易理解:该合成方案考虑使用除盐酸之外的酸,包括有机酸和无机酸,例如硝酸、磷酸、硫酸、硼酸、氢氟酸、氢溴酸和高氯酸。

[0126] 然后,式(VIII)化合物的盐与苄基溴和例如碱反应,以形成式(IX)的化合物。熟练的技术人员将容易理解:可采用取代的苄基卤化物来代替苄基溴。例如,可采用下列苄基卤化物,其中X=Cl、Br或I:



[0128] 代表性的苄基卤化物见于Belocon, Y.N.等人, "Halo-substituted (S)-N-(2-benzoylphenyl)-1-benzylpyrrolidine-2-carboxamides as new chiral auxiliaries

for the asymmetric synthesis of (S)- $\alpha$ -amino acids,"Russian Chemical Bulletin, International Edition, 51 (8) :1593-1599 (2002) 中。也可以使用另外的且不同的苄基卤化物:

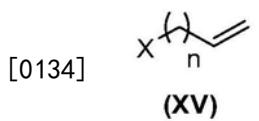


[0130] 这些代表性的苄基卤化物见于Saghiyan, A.S.等人,"New chiral Ni(II) complexes of Schiff's bases of glycine and alanine for efficient asymmetric synthesis of  $\alpha$ -amino acids,"*Tetrahedron: Asymmetry* 17:455-467 (2006) 中。

[0131] 接下来,式(IX)的化合物与L-丙氨酸和Ni (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>反应,以形成式(XI)的金属络合物。熟练的技术人员将会理解:方案I可采用丙氨酸以外的其他氨基酸。例如,可以采用例如其D或L形式的甘氨酸、2-氨基丁酸、2-氨基戊酸和缬氨酸。Ni (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>可以是水合物,例如六水合物。该反应可以在醇溶剂例如甲醇中进行。该反应可以在升高的温度例如约40℃至约60℃下运行。该反应可以在碱,例如氢氧化物,例如无机氢氧化物,例如氢氧化钾的存在下运行。也考虑其他氢氧化物,包括氢氧化钠、氢氧化铯、氢氧化锂、氢氧化镁和氢氧化铵。

[0132] 为了提高来自方案I的最终产物的纯度,式(XI)的金属络合物可以从一种或多种溶剂例如环醚和非环醚中结晶一次或多次。在一个实施方案中,该溶剂是四氢呋喃和甲基叔丁醚。在一些情况下,环醚与非环醚的比例至多为0.5:10、1.0:10、1.5:10、2.0:10、2.5:10、3.0:10、3.5:10、4.0:10、4.5:10或5:10。在其他情况下,环醚与非环醚的比例至少为0.5:10、1.0:10、1.5:10、2.0:10、2.5:10、3.0:10、3.5:10、4.0:10、4.5:10或5:10。例如,在一些情况下,式(XI)的金属络合物从比例至多为0.5:10、1.0:10、1.5:10、2.0:10、2.5:10、3.0:10、3.5:10、4.0:10、4.5:10或5:10的四氢呋喃和甲基叔丁醚的混合物中结晶出来。在其他情况下,四氢呋喃与甲基叔丁醚的比例至少为0.5:10、1.0:10、1.5:10、2.0:10、2.5:10、3.0:10、3.5:10、4.0:10、4.5:10或5:10。在一些情况下,四氢呋喃与甲基叔丁醚的比例是1.5:10。式(XI)的金属络合物也可以用诸如乙酸乙酯或乙酸异丙酯的酯结晶。式(IX)的产物或结晶产物可以替代地或额外地从溶剂,例如醇,例如异丙醇中结晶或再结晶。也考虑其他醇,包括甲醇、乙醇、正丙醇、丁醇、正丁醇、异丁醇、仲丁醇和叔丁醇。

[0133] 然后,式(XI)的金属络合物用8-溴辛-1-烯进行烷基化,以形成式(XII)的烷基化的金属络合物。熟练的技术人员将会理解:可使用包括其他卤代烷基烯烃在内的其他烷基化试剂来代替8-溴辛-1-烯。例如,可以使用式(XV)的烷基化试剂:



[0135] 其中X是Cl、Br或I,且n是1到20的整数。例如,n可以是3至11、3至6,或者3或6。在式(XV)的化合物中存在的一些或所有氢原子可以被氘原子或卤素原子替代。烷基化可以在一种或多种溶剂,例如极性非质子溶剂,例如N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中进行。烷基化可以例

如在低于20°C, 例如低于20°C至5°C, 低于20°C至10°C或在约10°C的温度下进行。熟练的技术人员也将会理解: 当使用甘氨酸形成金属络合物时, 可先后进行两次烷基化。例如, 可以使用具有离去基团如卤素的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷烃(例如, 溴甲烷、溴乙烷、溴正丙烷)或具有离去基团如卤素的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>氘代烷烃(例如, CD<sub>3</sub>Br、CD<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>Br、CD<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>CD<sub>2</sub>Br)或具有离去基团如比卤代烷烃中的其他卤素反应性更强的卤素的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>卤代烷烃(例如, CF<sub>3</sub>Br、CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>Br、CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>Br)进行第一烷基化。然后, 可以使用式(XV)的烷基化试剂来进行第二烷基化。第一和第二烷基化的顺序可以颠倒。

[0136] 式(XII)的纯化可以通过从包括环醚和非环醚、酯、己烷和庚烷在内的一种或多种溶剂中结晶一次或多次来实现。例如, 可以使用乙酸乙酯和己烷、乙酸乙酯和庚烷、乙酸异丙酯和己烷、乙酸异丙酯和庚烷、甲基叔丁醚和己烷、甲基叔丁醚和庚烷或者乙酸异丙酯和甲基叔丁醚的组合来实现结晶。

[0137] 然后, 使用一种或多种溶剂, 例如醚, 例如环醚, 例如四氢呋喃, 用酸例如HCl裂解式(XII)的金属络合物, 以形成式(XIII)的氨基酸HCl盐。熟练的技术人员将会理解: 除了HCl外还考虑其他酸, 例如有机酸或无机酸, 例如硝酸、磷酸、硫酸、硼酸、氢氟酸、氢溴酸或高氯酸。式(XIII)的盐可以通过用一种或多种溶剂结晶一次或多次来进一步纯化。该溶剂可以是任何合适的溶剂, 包括四氢呋喃、甲基叔丁醚、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、乙醇、甲醇、异丙醇、乙腈或其组合。在一个实施方案中, 该溶剂是乙腈。

[0138] 继而, 式(XIII)的氨基酸盐用氮保护基团(在这种情况下为Fmoc基团)进行氮保护, 并且形成受保护的氨基酸的环己胺加成盐, 从而得到式(XIV)的受保护的氨基酸环己胺盐。式(XIV)的盐的形成可以在包括乙腈、甲基叔丁醚、四氢呋喃或其组合在内的任何合适的溶剂中实现。在一个实施方案中, 该溶剂是甲基叔丁醚。熟练的技术人员将会理解: 可考虑其他胺, 例如其他环胺, 例如环丙胺、环丁胺、环戊胺、环庚胺和环辛胺。本领域技术人员也将容易地理解: 可以考虑其他氮保护基团, 例如, 用于本文的结晶的式(I)化合物或其结晶盐中的R<sub>2</sub>的氮保护基团。

[0139] 式(XIV)的受保护的氨基酸环己胺盐继而可以从一种或多种醚, 例如两种醚, 例如环醚和非环醚, 例如四氢呋喃和甲基叔丁醚中结晶出来。

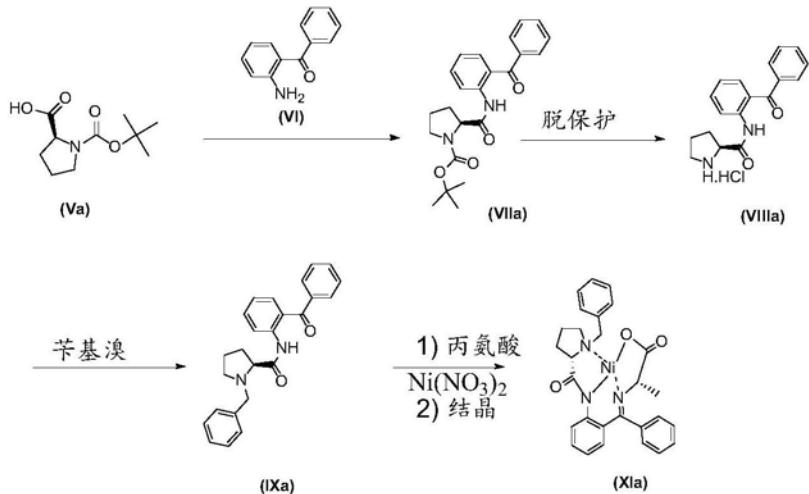
[0140] 结晶的式(XIV)的氨基酸环己胺盐继而用硫酸进行处理, 随后结晶, 以形成结晶的式(IIa)化合物。熟练的技术人员将会理解: 可考虑硫酸以外的酸, 例如有机酸或无机酸, 例如硝酸、磷酸、硫酸、硼酸、氢氟酸、氢溴酸或高氯酸。可以使用一种或多种溶剂, 例如两种溶剂, 例如烷烃和卤代烷烃, 例如己烷和氯仿进行结晶。在一些情况下, 烷烃与卤代烷烃的比例至少为6:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:10。在一些情况下, 烷烃与卤代烷烃的比例至多为6:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:10。例如, 结晶的式(IIa)化合物可通过从比例至少为6:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1的己烷和氯仿的混合物中结晶而获得。结晶的IIa还可通过从比例至多为6:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1的己烷和氯仿的混合物中结晶而获得。在一些情况下, 己烷与氯仿的比例为3:1。

[0141] 结晶可在例如约-5°C至约-20°C、约-10°C至约-20°C或约-15°C至-20°C的温度下进行。

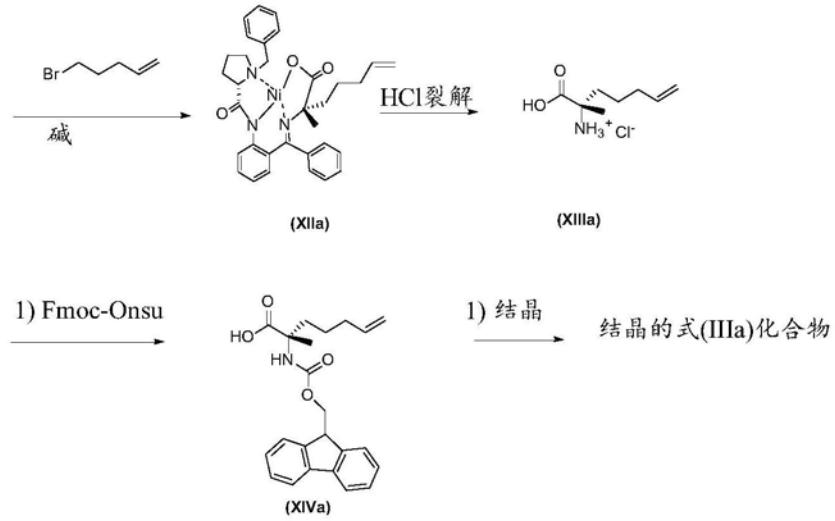
[0142] 熟练的技术人员将会理解: 例如, 结晶的式(IIa)化合物可以在其羧酸官能团处用例如结晶的式(I)化合物或其结晶盐的保护基团或活化基团R<sub>3</sub>进一步活化或保护。除非另

外指明,本文的化合物、其盐、结晶化合物及其结晶盐可使用示例性方案II(具有对熟练技术人员而言将是显而易见的修改)来生成。方案II描述了结晶的N-Fmoc-(S)- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基庚-6-烯酸(即,结晶的式(IIIa)化合物)的形成。顺序II从Boc-L-脯氨酸(即,式(Va)的化合物)开始。应当理解,通过从Boc-D-脯氨酸开始,可以生成具有与式(IIIa)化合物相反的立体化学的化合物(例如,可以生成式(IIIb)的化合物)。还应当理解,用于形成金属络合物并且其 $\alpha$ 碳原子随后被卤代烯烃进行烷基化的氨基酸(例如,式(XIa)中的丙氨酸)的立体化学对于所得结晶化合物(例如,式(IIIa)的化合物)或其结晶盐的立体化学不是决定性的。

[0143] 方案II

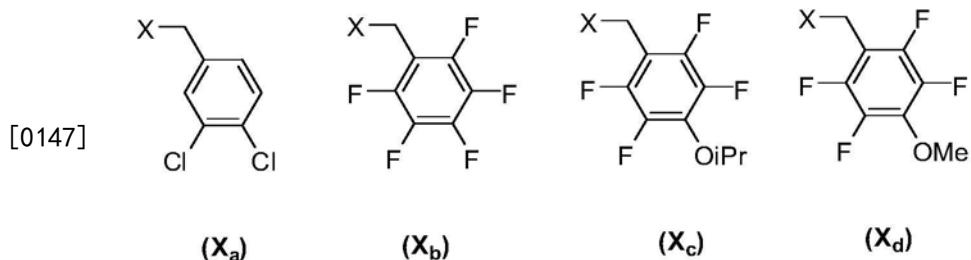


[0144]

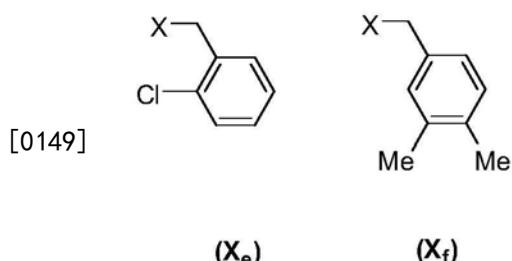


[0145] 在方案II中,Boc-L-脯氨酸(式(Va)的化合物)首先与2-氨基二苯甲酮(式(VI)的化合物)反应,以形成式(VIIa)的化合物。接下来,对式(VIIa)的化合物进行脱保护,以形成式(VIIIa)化合物的HCl盐。熟练的技术人员将容易理解:合成方案考虑使用除HCl以外的酸,包括有机酸和无机酸,例如硝酸、磷酸、硫酸、硼酸、氢氟酸、氢溴酸和高氯酸。

[0146] 接着,式(VIIa)的化合物的盐与苄基溴和例如碱反应,以形成式(IXa)的化合物。熟练的技术人员将容易理解:可采用取代的苄基卤化物来代替苄基溴。例如,可采用下列苄基卤化物,其中X=Cl、Br或I:



[0148] 代表性的苄基卤化物见于Belokon, Y.N.等人,“Halo-substituted (S)-N-(2benzoylphenyl)-1-benzylpyrrolidine-2-carboxamides as new chiral auxiliaries for the asymmetric synthesis of (S)- $\alpha$ -amino acids,”Russian Chemical Bulletin, International Edition, 51 (8) :1593-1599 (2002) 中。也可以采用另外的且不同的苄基卤化物:



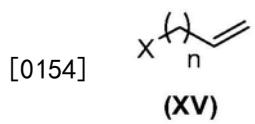
[0150] 这些代表性的苄基卤化物见于Saghiyan, A.S.等人,“New chiral Ni<sup>II</sup> complexes of Schiff's bases of glycine and alanine for efficient asymmetric synthesis of  $\alpha$ -amino acids,”Tetrahedron:Asymmetry 17:455-467 (2006) 中。

[0151] 随后,式(IXa)的化合物与L-丙氨酸和Ni (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>反应,以形成式(XIa)的金属络合物。熟练的技术人员将会理解:方案II中可采用除丙氨酸以外的其他氨基酸。例如,可以采用例如其D或L形式的甘氨酸、2-氨基丁酸、2-氨基戊酸和缬氨酸。Ni (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>可以是水合物,例如六水合物。该反应可以在醇溶剂例如甲醇中进行。该反应可以在升高的温度,例如约40℃至约60℃下运行。该反应可以在碱,例如氢氧化物,例如无机氢氧化物,例如氢氧化钾的存在下运行。也考虑其他氢氧化物,包括氢氧化钠、氢氧化锂、氢氧化铯和氢氧化镁。

[0152] 为了提高来自方案II的最终产物的纯度,式(XIa)的金属络合物可以从一种或多种溶剂,例如环醚和非环醚,例如四氢呋喃和甲基叔丁醚中结晶一次或多次。在一些情况下,环醚与非环醚的比例至多为0.5:10、1.0:10、1.5:10、2.0:10、2.5:10、3.0:10、3.5:10、4.0:10、4.5:10或5:10。在其他情况下,环醚与非环醚的比例至少为0.5:10、1.0:10、1.5:10、2.0:10、2.5:10、3.0:10、3.5:10、4.0:10、4.5:10或5:10。例如,在一些情况下,式(XIa)的金属络合物从比例至多为0.5:10、1.0:10、1.5:10、2.0:10、2.5:10、3.0:10、3.5:10、4.0:10、4.5:10或5:10的四氢呋喃和甲基叔丁醚的混合物中结晶出来。在其他情况下,四氢呋喃与甲基叔丁醚的比例是至少0.5:10、1.0:10、1.5:10、2.0:10、2.5:10、3.0:10、3.5:10、4.0:10、4.5:10或5:10。在一些情况下,四氢呋喃与甲基叔丁醚的比例是1.5:10。式(IXa)的产物或结晶产物可以从溶剂,例如醇,例如异丙醇中结晶或再结晶。也考虑其他醇,包括甲醇、乙醇、正丙醇、丁醇、正丁醇、异丁醇、仲丁醇和叔丁醇。适于结晶或再结晶式(XIa)化合物的其他溶剂包括酯,例如乙酸乙酯或乙酸异丙酯。

[0153] 然后,式(XIa)的金属络合物用5-溴戊-1-烯进行烷基化,以形成式(XIIa)的烷基

化的金属络合物。熟练的技术人员将会理解:可使用包括其他卤代烷基烯烃在内的其他烷基化试剂来代替5-溴戊-1-烯。例如,可以使用式(XV)的烷基化试剂:



[0155] 其中X是Cl、Br或I,且n是1至20的整数。例如,n可以是3至11、3至6,或者3或6。在式(XV)的化合物中存在的一些或所有氢原子可以被氘原子或卤素原子替代。烷基化可以在一种或多种溶剂,例如极性非质子溶剂,例如N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中进行。烷基化可以例如在低于20℃,例如低于20℃至5℃、低于20℃至10℃或在约10℃的温度下进行。熟练的技术人员也将会理解:当使用甘氨酸形成金属络合物时,先后进行两次烷基化。例如,可以使用具有离去基团如卤素的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>烷烃(例如,溴甲烷、溴乙烷、溴正丙烷)或具有离去基团如卤素的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>氘代烷烃(例如,CD<sub>3</sub>Br、CD<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>Br、CD<sub>3</sub>CD<sub>2</sub>CD<sub>2</sub>Br)或具有离去基团如比卤代烷烃中的其他卤素反应性更强的卤素的C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>卤代烷烃(例如,CF<sub>3</sub>Br、CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>Br、CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>Br)进行第一烷基化。然后,可以使用式(XV)的烷基化试剂来进行第二烷基化。第一和第二烷基化的顺序可以颠倒。

[0156] 式(XIIa)的纯化可以通过从包括环醚和非环醚、酯、己烷和庚烷在内的一种或多种溶剂中结晶一次或多次来实现。例如,可以通过使用乙酸乙酯和己烷、乙酸乙酯和庚烷、乙酸异丙酯和己烷、乙酸异丙酯和庚烷、甲基叔丁醚和己烷、甲基叔丁醚和庚烷或者乙酸异丙酯和甲基叔丁醚的组合来实现结晶。

[0157] 然后,使用一种或多种溶剂,例如醚,例如环醚,例如四氢呋喃,用酸例如HCl裂解式(XIIa)的金属络合物,以形成式(XIIIa)的氨基酸HCl盐。熟练的技术人员将会理解:除了HCl外还考虑其他酸,例如有机酸或无机酸,例如硝酸、磷酸、硫酸、硼酸、氢氟酸、氢溴酸或高氯酸。

[0158] 式(XIIIa)的盐可以通过用一种或多种溶剂结晶一次或多次来进一步纯化。该溶剂可以是任何合适的溶剂,包括四氢呋喃、甲基叔丁醚、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、乙醇、甲醇、异丙醇、乙腈或其组合。在一个实施方案中,该溶剂是乙腈。

[0159] 继而,式(XIIIa)的氨基酸盐用氮保护基团(在这种情况下为Fmoc基团)进行氮保护,得到式(XIVa)的受保护的氨基酸。在一些情况下,式(XIVa)的化合物以其原样进行结晶步骤。在其他实施方案中,在结晶前将式(XIVa)的化合物转换成盐。可在包括乙腈、甲基叔丁醚、四氢呋喃或其组合在内的任何合适的溶剂中实现式(XIVa)的盐的形成。本领域技术人员也将容易地理解:可以考虑其他氮保护基团,例如,用于在本文的结晶的式(I)化合物或其结晶盐中的R<sub>2</sub>的氮保护基团。式(XIVa)的受保护的氨基酸环己胺盐继而可以从一种或多种醚,例如两种醚,例如环醚和非环醚,例如四氢呋喃和甲基叔丁醚中结晶出来。

[0160] 然后,式(XIVa)的受保护的氨基酸环己基胺盐可以进行结晶,以形成式(IIIa)的结晶化合物。

[0161] 可以使用一种或多种溶剂,例如两种溶剂,例如烷烃和卤代烷烃,例如己烷和氯仿进行结晶。在一些情况下,烷烃与卤代烷烃的比例至少为6:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:10。在一些情况下,烷烃与卤代烷烃的比例至多为6:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:10。例如,结晶的式(IIIa)化合物可通过从比例至少为6:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1的己烷和氯仿的混合物中

结晶而获得。结晶的IIIa还可通过从比例至多为6:1、5:1、4:1、3:1、2:1或1:1的己烷和氯仿的混合物中结晶而获得。在一些情况下,己烷与氯仿的比例是2:1。

[0162] 结晶可在例如约-5°C至约-20°C、约-10°C至约-20°C或约-15°C至-20°C的温度下进行。在本文中,除非另外指明,任何化合物或其盐可以是结晶的。在本文中,除非另外指明,在例如约0°C或更低、约-5°C或更低、约-10°C或更低、约-15°C或更低、约-20°C或更低、约-5°C、约-6°C、约-7°C、约-8°C、约-9°C、约-10°C、约-11°C、约-12°C、约-13°C、约-14°C、约-15°C、约-16°C、约-17°C、约-18°C、约-19°C或约-20°C的温度下,任何化合物或其盐可以是结晶的。

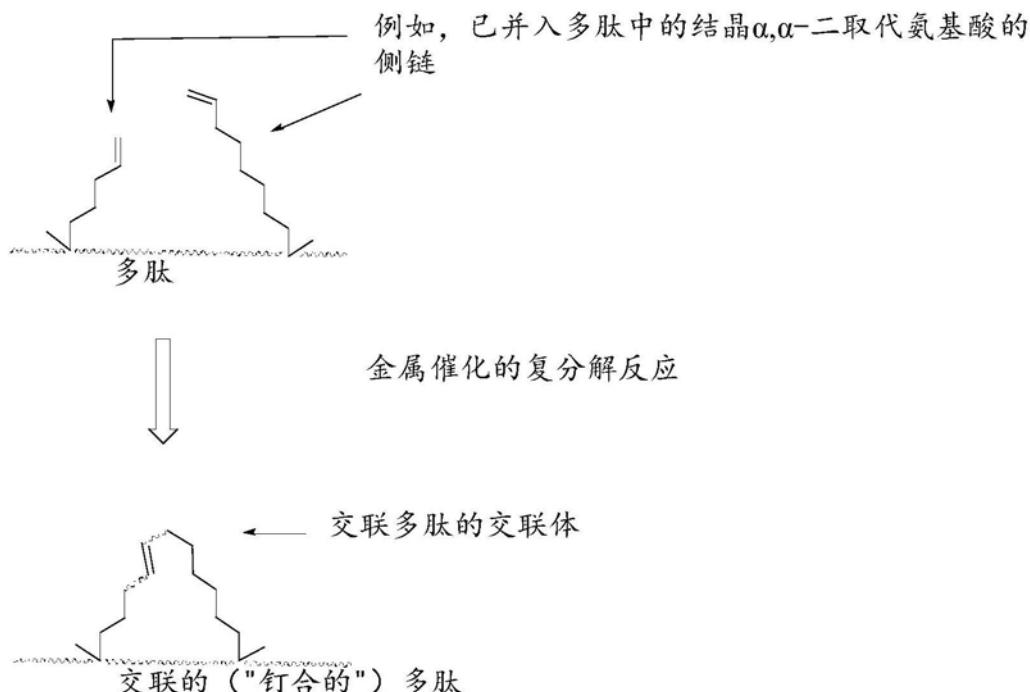
[0163] 熟练的技术人员将会理解:例如,结晶的式(IIIa)化合物可以在其羧酸官能团处用例如结晶的式(I)化合物或其结晶盐的保护或活化基团R<sub>3</sub>进一步活化或保护。

[0164] 钉合的和拼接的多肽

[0165] 式(I)的结晶化合物及其结晶盐,包括式(IIa)、(IIb)、(IIIa)和(IIIb)的结晶化合物及其结晶盐以及式(IV)的任选结晶化合物及其任选结晶盐,可用于合成在治疗和预防疾病中有用的肽、多肽和交联的多肽。

[0166] 交联多肽可包含二级结构,诸如螺旋,例如 $\alpha$ 螺旋。相对于在其他方面相同但非交联的多肽,交联体可稳定二级结构。并且可通过例如连接例如本文的两个结晶烯烃 $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸或其结晶盐的末端烯烃侧链来形成交联体,这两个结晶烯烃 $\alpha,\alpha$ -二取代氨基酸或其结晶盐通过例如金属催化的烯烃复分解反应而并入多肽中(例如,形成钉合的肽)。该过程示于以下的方案III中:

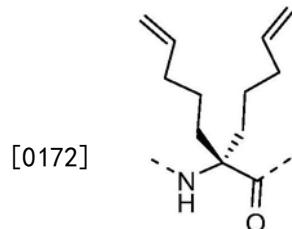
[0167] 方案III



[0169] 钉合的多肽的实例尤其见于,例如,国际申请号PCT/US2004/038403中。

[0170] 式(I)的结晶化合物及其结晶盐,包括式(IIa)、(IIb)、(IIIa)和(IIIb)的结晶化合物及其结晶盐以及式(IV)的任选结晶化合物及其任选结晶盐,可用于合成在治疗和预防疾病中有用的肽、多肽和拼接的多肽。

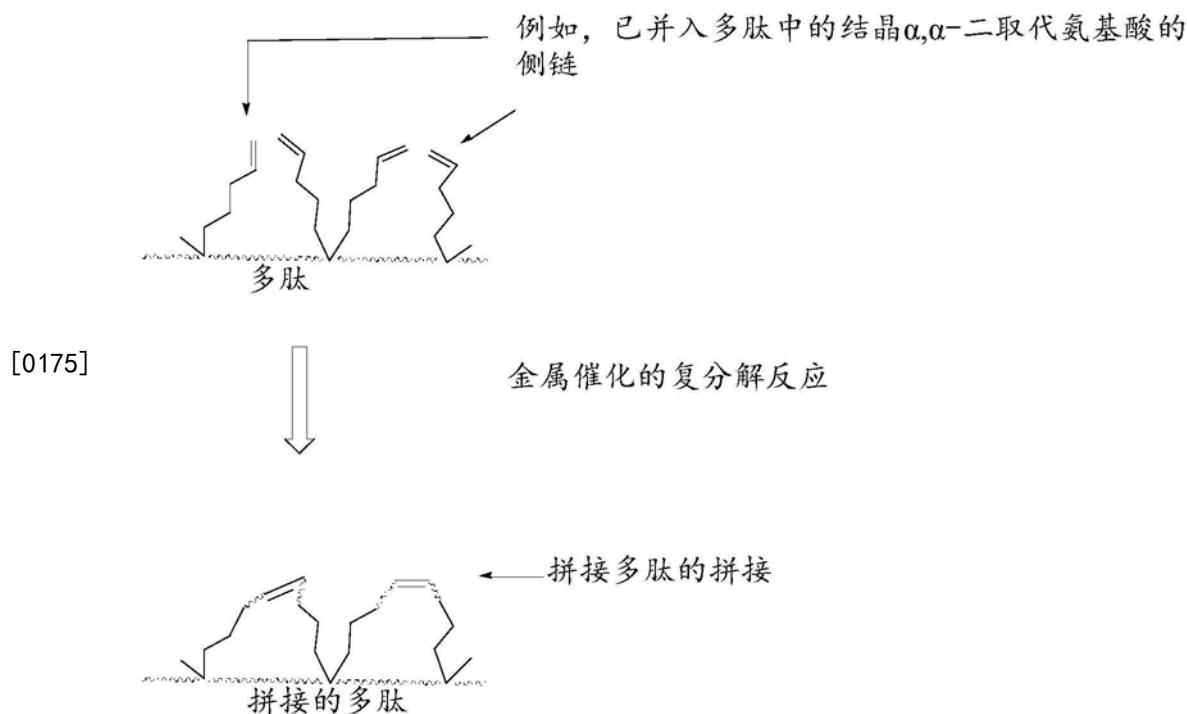
[0171] 例如,如方案IV所示,可将两个式(I)的结晶化合物及其结晶盐与 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸一起并入多肽主链中,该 $\alpha,\alpha$ -二取代的氨基酸在其每条侧链上具有末端烯烃,例如式(XVI)的化合物:



(XVI)。

[0173] 金属催化的烯烃复分解反应产生拼接的肽。

[0174] 方案IV



[0175] 拼接的多肽的实例见于,例如国际申请公开号W02008/121767中。

[0177] 可以使用本领域已知的用于实现拟肽大环化合物形成的方法。例如, Schafmeister等人, J. Am. Chem. Soc. 122: 5891-5892 (2000); Schafmeister和Verdine, J. Am. Chem. Soc. 122: 5891 (2005); Walensky等人, Science 305: 1466-1470 (2004); 美国专利号7,192,713和国际专利申请公开号W0 2008/121767中描述了拟肽大环化合物的制备。

[0178] 在本文中,除非另外指明,术语“肽合成”涵盖两个或更多个氨基酸借助于偶联剂的偶联。肽合成可在“液体”或“溶液”相中进行,其中氨基酸的偶联在溶剂系统中进行。或者可替代地,肽合成也可以在“固相”上进行,其中氨基酸通过氨基酸的N-或C-末端的共价键而附接至聚合的或固态的支持体上。例如,肽可通过化学合成方法来制备,诸如Fields等人, *Synthetic Peptides: A User's Guide* 中的第3章, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., New York, N.Y., 1992, 第77页和Goodman, M. 等人, *Houben-Weyl Methods in Organic Chemistry: Synthesis of Peptides and Peptidomimetics*, Thieme Publishers, 第1-5

卷, (1994) 中所述的那些方法。例如, 可以使用自动化的Merrifield固相合成技术来合成肽, 其中在合成中使用的氨基酸的氨基基团例如由t-Boc或Fmoc保护基团保护。自动化的肽合成仪(例如, Applied Biosystems (Foster City, CA), 430A、431或433型) 可用于制备肽。

[0179] 在本文中, 除非另外指明, 可以使用固相肽合成法(SPPS) 产生本文描述的拟肽前体和拟肽大环化合物以及它们的盐, 其中, 例如, 经由与连接体的酸或碱不稳定的键, C-末端氨基酸附接到交联的聚苯乙烯树脂上。该树脂可以例如不溶于用于合成的溶剂, 从而使得洗去过量的试剂和副产物相对简单和快速。添加至生长的肽链上的每个氨基酸的N-末端可以例如用在酸中稳定、但可用碱去除的Fmoc基团来保护。必要或需要时, 例如可用碱稳定的、酸不稳定的基团来保护侧链官能团。

[0180] 在本文中, 除非另外指明, 可以使用例如高通量多通道组合合成仪(例如, 来自CreoSalus, Louisville, KY的Thuramed TETRAS多通道肽合成仪或来自AAPTEC, Inc., Louisville, KY的Apex 396型多通道肽合成仪), 例如以高通量的组合方式制备拟肽前体。

[0181] 在本文中, 除非另外指明, 溶液肽合成可以按以下方式进行: 其中, 试剂完全或部分地溶解于例如适当的溶剂, 例如极性非质子溶剂中。在使用例如具有可去除保护基团(例如, 叔丁氧羰基、苄氧羰基、芴基甲氧羰基)的固体结晶的N-末端保护的烯烃氨基酸和具有可选择性去除的酯(例如, 甲酯、苄酯、叔丁酯)的C-保护的氨基酸的代表性情况下, 该氨基酸可完全或部分地溶解于溶剂中并且添加活化剂, 以完成氨基酸间的肽键形成。溶液肽合成也可以采用首先形成N-保护的烯烃氨基酸的活性酯(例如, N-羟基琥珀酰胺、对硝基苯酯、2,4,6-三氯苯酯、五氟苯酯), 随后进行活化的氨基酸与未保护的或C-保护的氨基酸的反应。烯烃氨基酸的活性酯可以例如通过在缩合剂(例如, 二环己基碳二亚胺)的帮助下使固体的N-保护的烯烃氨基酸与适当的醇反应来制备。例如, 当待反应的一个或两个氨基酸分别为例如一个或两个肽的一部分并且并入一个或两个肽中时, 也可以使用这些相同的程序。

[0182] 在例如无水条件下, 通过干固体烯烃氨基酸与适当的醇(例如, 甲醇、乙醇、苄醇)反应可容易地促进C末端保护的烯烃氨基酸的形成。烯烃氨基酸位于C-末端位置的肽的形成可通过例如类似的方式实现。肽制备的溶液法可以容易地适应处理规模。在此处制备本文的任何化合物中使用的以及如上下文所公开的起始材料和试剂, 除非另外指明, 例如, 可以获自商业来源, 如Aldrich、Sigma或Bachem, 或者可以通过本领域技术人员已知的方法按照例如在参考文献中阐述的程序来制备, 该参考文献例如是:Fieser和Fieser的Reagents for Org. Syn. 第1-17卷, Organic Reactions 第1-40卷, March的Advanced Organic Synthesis, Larock的Comprehensive Organic Transformations, Bodansky和Bodansky的The Practice of Peptide Synthesis, Greene的Protective Groups in Organic Synthesis, Wei, Q. 等人, Tetrahedron 56:2577-2582 (2000), Belokon, Y. N. 等人, Tetrahedron: Asymmetry 9:4249-4252 (1998), Belokon, Y., Pure&App. Chem. 64 (12): 1917-1924 (1992), Ueki, H. 等人, J. Org. Chem. 68: 7104-7107 (2003)。

[0183] 本文中的这些方案阐述了一些方法, 通过这些方法可以合成本文的化合物及其盐(它们可以是结晶的), 并且可以对这些方案进行各种修改, 本领域技术人员参考本公开内容将会想到这些修改。

[0184] 在此处及如上所公开的, 本文中任何实施方案的反应的起始材料和中间体, 除非

另外指明,如果需要可使用常规技术来分离和纯化,这些技术包括但不限于过滤、蒸馏、结晶、色谱法、快速色谱法、HPLC、MPLC、**Chromatotron®**、离子交换色谱法、使用Mosher酸或Mosher酯的结晶等。这样的材料可以使用常规手段来表征,这些手段包括物理构建和光谱数据,例如质子NMR、碳NMR、IR光谱法、旋光法、原子吸收、元素分析、紫外光谱法、FTIR光谱法等。在此处及如上所述的任何实施方案中,除非另外指明,在制备任何化合物或其盐中可以排除色谱法。

[0185] 除非有相反的规定,例如,可以在约0.001至约100个大气压(atm),例如约0.001atm、约0.01atm、约0.1atm、约1atm、约2atm、约3atm、约4atm、约5atm、约10atm、约20atm、约50atm或约100atm下进行本文所述的反应。

[0186] 除非另外指明,在本文的任何实施方案中的反应可以在以下气氛下进行,除非另外规定,例如,向大气开放,或在惰性气体气氛下,例如氮气或氩气。

[0187] 除非另外指明,在本文的任何实施方案中的反应可以在以下温度下进行,除非另外规定,例如约-78°C至约150°C,例如约-78°C、约-50°C、约-20°C、约0°C、约10°C、约20°C、约23°C、约25°C、约27°C、约30°C、约40°C、约50°C、约100°C、约125°C、约150°C、约环境温度或约室温。

[0188] 除非另外指明,本文的反应可以具有以下的收率,除非另有明确说明,基于理论收率,例如,约1%至约99%。该收率可以是,例如约99%、约98%、约97%、约96%、约95%、约90%、约85%、约80%、约75%、约70%、约65%、约60%、约55%、约50%、约45%、约40%、约35%、约30%、约25%、约20%、约15%、约10%或约5%。

[0189] 除非另外指明,本文的反应可以进行以下的时间,除非另外规定,例如约0.1至约96小时的时间,例如约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时、约24小时、约48小时、约72小时或约96小时。

[0190] 交联拟肽大环化合物(拼接的和钉合的肽)的选择性用途

[0191] 例如用式(I)的结晶化合物及其结晶盐(包括式(IIa)、(IIb)、(IIIa)和(IIIb)的结晶化合物及其盐以及式(IV)的任选结晶的化合物及其任选结晶盐)中的至少一种制备的交联拟肽大环化合物(拼接的或钉合的肽)可用于治疗或预防疾病。例如,交联拟肽大环化合物(拼接的或钉合的肽)可用于治疗或预防癌症。癌症的所选择的实例包括,例如,纤维肉瘤、肌肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、胃癌、食管癌、直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、头颈癌、皮肤癌、脑癌、鳞状细胞癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯肿瘤(Wilm's tumor)、宫颈癌、睾丸癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑脊膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病、淋巴瘤或卡波西肉瘤。

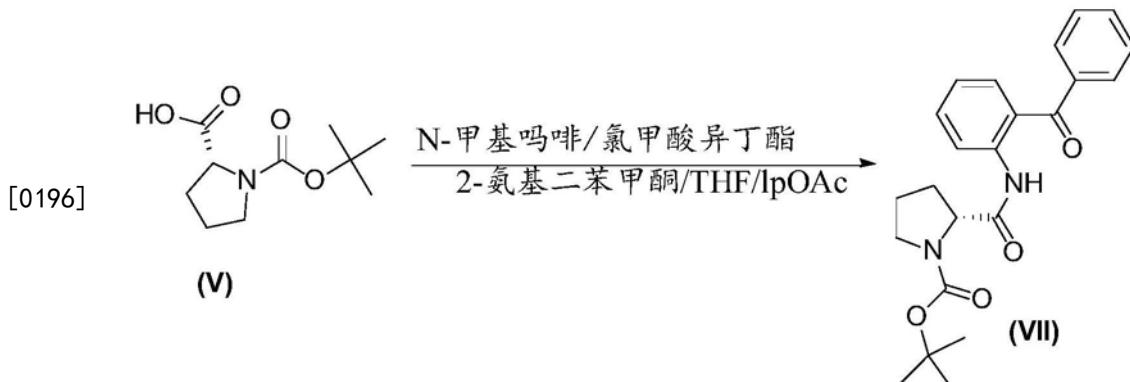
[0192] 可用拼接的或钉合的肽治疗的疾病可见于,例如,国际申请号PCT/US2004/038403(“403申请”)和国际申请公开号WO2008/121767(“767申请”)中。

[0193] 尽管本文已经示出和描述了发明实施方案,但这些实施方案仅以举例的方式提供。本领域技术人员在不背离本文的发明公开内容的情况下现将会想到许多变化、改变和替换。以下实施例是说明性的并且不应被解释为限制。

## 实施例

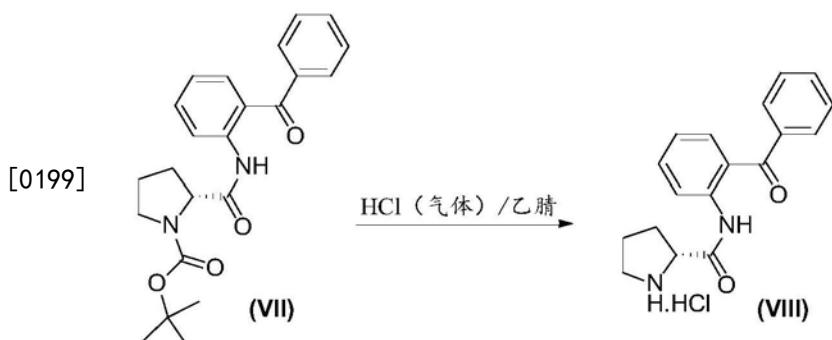
[0194] 实施例1:结晶的N-Fmoc-(R)- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基癸-9-烯酸的制备

[0195] 实施例1a: (R)-2-[N-(N'-Boc-脯氨酰基)氨基]二苯甲酮的制备



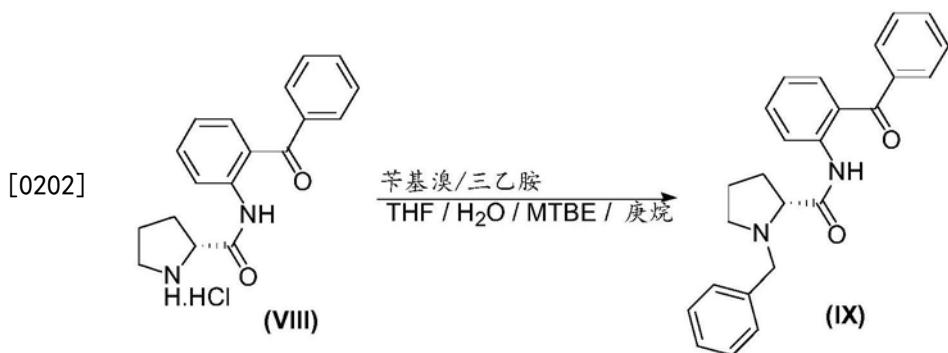
[0197] 将四氢呋喃和9.6kg (1.0当量) 的Boc-D-脯氨酸 (V) 加至反应器中并冷却至-5℃。在保持内部温度<5℃的同时,添加5.3kg (1.15当量) 的N-甲基吗啉随后缓慢加入6.1kg (1.0当量) 的在四氢呋喃中的氯甲酸异丁酯。在20-25℃下,将混合物搅拌45-60分钟,然后通过TLC分析其完成情况。添加8.2kg (0.9当量) 的2-氨基二苯甲酮/四氢呋喃的溶液,并且在20-25℃下搅拌混合物直至认为反应完全。将该混合物浓缩至1/2体积并添加乙酸异丙酯。继而,用5%碳酸氢钠溶液洗涤有机产物层,加水,然后用25%硫酸将pH调节至2.0-2.5。分离各层,并用水再次洗涤有机产物层。随后,浓缩该有机产物溶液,并从乙酸异丙酯中结晶且用甲基叔丁醚洗涤。分离产物 (VII),并且在热和真空下将其干燥。收率:12kg,66.7%。

[0198] 实施例1b:D-脯氨酸-2-氨基二苯甲酮酰胺的制备



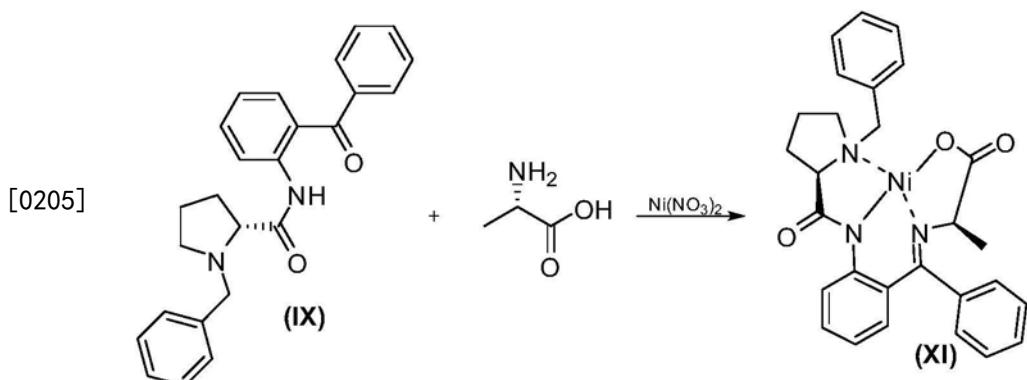
[0200] 将12.0kg (1.0当量) 的Boc-D-脯氨酸-2-氨基二苯甲酮 (VII) 酰胺溶解于乙腈中。然后将2.2kg (2.0当量) 的氯化氢气体充入/鼓入该溶液中。然后在20-25℃下搅拌所得混合物直至反应完全。加入甲基叔丁醚,并将固体产物从反应溶液中分离出来并用额外的甲基叔丁醚洗涤。产物 (VIII) 在热和真空下干燥。收率:9.1kg,100%。

[0201] 实施例1c: (R)-2-[N-(N'-苄基脯氨酰基)氨基]二苯甲酮 (D-BPB) 的制备



[0203] 将9.1kg (1.0当量) 的D-脯氨酸-2-氨基二苯甲酮酰胺·HCl (VIII) 溶于四氢呋喃和水中。然后添加8.1kg (2.4当量) 的三乙胺, 随后缓慢加入7.9kg (1.4当量) 的苄基溴。然后在20-25℃下搅拌该混合物直至反应完全。加入甲基叔丁醚和水, 并且用1N盐酸溶液将所得溶液的pH调节至2.0-2.5。浓缩该混合物, 以除去所有四氢呋喃。然后, 分离产物浆液并用甲基叔丁醚洗涤。产物 (IX) 在热和真空下干燥。收率: 10.5kg, 82.7%。

[0204] 实施例1d: (R)-Ala-Ni-BPB的制备



[0206] 将10.5kg (1.0当量) 的D-BPB (IV)、14.1kg (1.78当量) 的六水合硝酸镍 (II)、4.9kg (2.0当量) 的L-丙氨酸和甲醇添加至反应器中。将该混合物加热至40℃, 并且在保持内部温度<50℃的同时缓慢加入12.2kg (8.0当量) 的氢氧化钾/甲醇的溶液。继而将该反应混合物加热到60℃, 并将其在该温度下搅拌直到反应完全。然后, 将该混合物冷却至20-25℃, 且在保持内部温度<35℃的同时缓慢添加8.2kg (5.0当量) 的乙酸。将该反应溶液浓缩成固体。然后, 加入四氢呋喃和乙酸异丙酯以溶解固体, 并且用水洗涤有机产物层2次。继而再次浓缩该溶液, 材料随后从四氢呋喃和甲基叔丁醚中结晶出来。分离产物, 用额外的甲基叔丁醚漂洗并分析纯度。为了提高纯度, 使产物 (XI) 从异丙醇中再结晶出来, 然后分离, 并在热和真空下干燥。收率: 6.8kg, 48.6%。

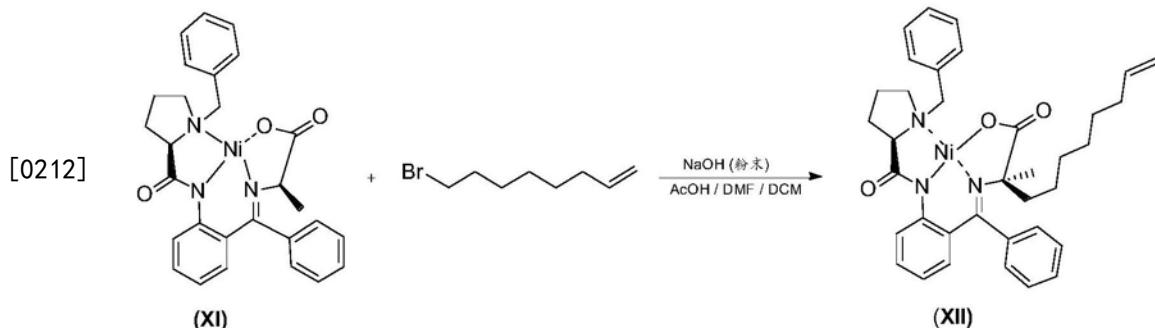
[0207] 再结晶程序

[0208] 将THF加至粗产物中 (每10g起始材料 (D-BPB) 加入15mL), 并将所得混合物加热至50℃。该混合物在50℃保持1小时, 然后加入甲基叔丁醚 (每10g起始材料 (D-BPB) 加入50mL)。该混合物在50℃再维持1小时, 此后将其冷却至35℃。过滤该混合物并用甲基叔丁醚洗涤所得固体 (每10g起始材料 (D-BPB) 使用20mL), 以获得结晶产物XI。

[0209] 备选的再结晶程序

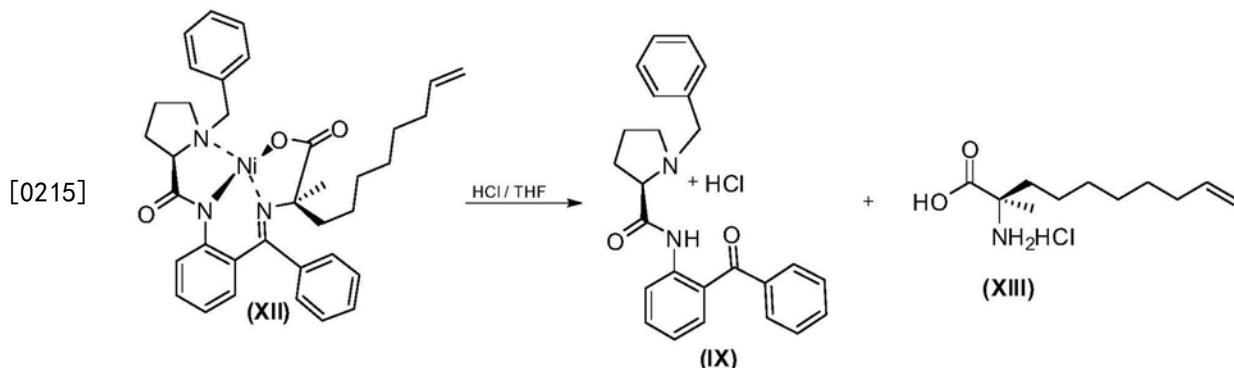
[0210] 将乙酸异丙酯加至粗产物中 (每4g起始材料 (D-BPB) 加入40mL), 并将所得混合物在室温下保持30分钟。然后, 过滤该混合物, 以获得结晶产物XI。

## [0211] 实施例1e:R8-Ni-BPB的制备



[0213] 将6.8kg (1.0当量) 的(R)-Ala-Ni-BPB (XI) 加入到反应器中并溶解于二甲基甲酰胺中且冷却至10℃。然后将1.4kg (2.4当量) 的氢氧化钠(粉末)加入到同一反应器中,该混合物用氮气吹扫并搅拌,直到在10℃下形成溶液。将5.2kg (2.0当量) 的8-溴-1-辛烯加至反应器中同时保持内部温度<20℃。然后,在20-25℃下搅拌该混合物直至反应完全。一旦反应完全,就将该溶液冷却至10℃,并且添加0.5kg (0.6当量) 的乙酸,同时保持内部温度<25℃。随后加水,接着加入甲基叔丁醚并洗涤有机层。然后用水洗涤该有机层2次,继而浓缩。该油状产物然后用二氯甲烷共反萃(co-stripped)并溶解于额外的二氯甲烷中。产物(XII)溶液进入下一个处理步骤。

## [0214] 实施例1f: (R)-2-氨基-2-甲基-癸-9-烯酸的制备



[0216] 将R8-Ni-BPB (XII) /DCM溶液加至50-L化学玻璃反应器中并反萃成油状物。然后,加入四氢呋喃并在20-25℃下搅拌该混合物,直至形成溶液。在保持内部温度<30℃的同时缓慢地加入7.8kg (5.0当量) 的32%盐酸。然后,将该混合物在环境温度下搅拌6-8小时。随后浓缩该混合物以除去四氢呋喃,得到浆液。加入额外的水并在环境温度下搅拌该浆液1-2小时。通过过滤分离固体BPB盐并用额外的水漂洗,随后用甲基叔丁醚漂洗。然后,将产物的滤液重新添加至反应器中,得到三相溶液。将最下层与上面两层分离。合并的两个有机层继而用水洗涤3次并浓缩成油状物。随后加入乙腈,并将混合物升温至70℃30分钟。继而将该混合物冷却至25-30℃并分离固体产物。固体滤饼用乙腈和甲基叔丁醚洗涤,然后分析纯度。然后将产物从额外的乙腈中再次形成浆液,并用乙腈和甲基叔丁醚洗涤。分离材料(XIII)并在热和真空下干燥。收率:1.55kg,48%。

## [0217] 再结晶程序

[0218] 将乙腈(每10g起始材料((R)-Ala-Ni-BPB (XI) 的油状物)加入23mL)加至粗产物中,并将所得混合物加热至70℃30分钟,此后将其冷却至20℃。过滤该混合物并用乙腈

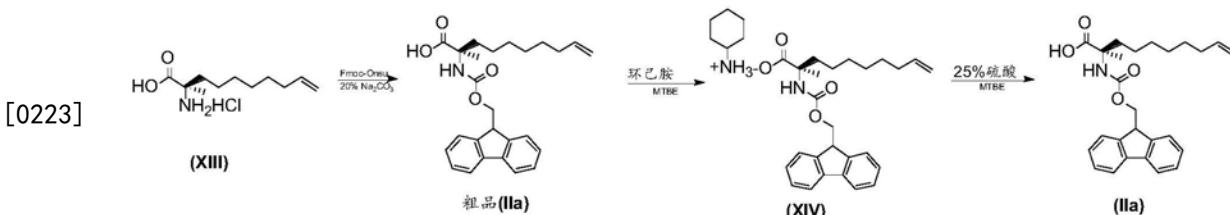
(5mL) 和甲基叔丁醚 (8.5mL) 洗涤所得的固体, 以得到结晶产物XIII。

### [0219] 制备XIII的备选再结晶程序-I

[0220] 将乙腈(每10g起始材料((R)-Ala-Ni-BPB(XI)的油状物)加入30mL)加至粗产物，并在60℃下加热所得混合物30分钟，随后冷却至30℃。然后，过滤该混合物并用5mL乙腈洗涤，得到结晶产物XIII。制备XIII的备选再结晶程序-II

[0221] 将乙腈(每10g起始材料(*R*)-Ala-Ni-BPB(XI)的油状物)加入23mL)加至粗产物中,并在40℃下加热所得混合物30分钟,随后冷却至室温。然后,过滤该混合物并用5mL乙腈洗涤两次,得到结晶产物XIII。

[0222] 实施例1g:结晶的N-Fmoc- (R) - $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基癸-9-烯酸的制备



[0224] 将1.55kg (1.0当量) 的2-氨基-2-甲基-癸-9-烯酸·HCl (XIII) 悬浮于水中并精细过滤 (polished filtered), 以从该溶液中除去痕量的D-BPB·HCl。加入甲基叔丁醚并用甲基叔丁醚萃取该水性产物层一次。再次充入该水性产物层并加入四氢呋喃。将20% 碳酸钠水溶液 (2.75当量) 加入到该混合物中, 随后加入Fmoc-OSu (0.89当量)。使该混合物在20–25 °C下反应, 同时用额外量的20% 碳酸钠溶液将pH保持在8.5–9.0直到反应完全。用浓盐酸将混合物的pH下调至pH 2.0–2.5。蒸馏出四氢呋喃并加入甲基叔丁醚。分离各层, 有机层用额外的水洗涤3次。该有机层然后在真空下浓缩并用甲基叔丁醚共反萃。所得粗油状物再溶于甲基叔丁醚中, 并缓慢加入环己胺 (1.10当量), 以获得8.5–9.0的pH范围。在环境温度 (20–25 °C) 下搅拌该浆液3小时, 并通过过滤分离固体产物盐 (XIV)。该固体用额外的甲基叔丁醚洗涤两次, 并且将固体湿饼再次加至干净的反应器中。将该湿饼从四氢呋喃和甲基叔丁醚中再结晶, 以提高纯度。将固体盐悬浮于甲基叔丁醚和水中, 并用25% 硫酸将pH调节至2.0–2.5。用水洗涤有机产物层直到除去所有环己胺。浓缩该有机产物层并将其用己烷共反萃成松散的油状物。然后, 将产物 (IIa) 从氯仿和己烷中结晶出来, 并在1.0cfm氮气吹扫下在<0 °C下干燥。收率: 1.12kg, 41.5%。

## [0225] 再结晶程序

[0226] 将甲基叔丁醚(每36g起始材料XIII加入800mL)加至粗产物中,并在20℃下用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>将所得混合物的pH调节至8-9。该混合物在20℃下混合并在1小时后开始形成晶体。加入额外的甲基叔丁醚(200mL)并混合所得浆液18小时。过滤该混合物并用甲基叔丁醚(200mL和8.5mL)洗涤所得固体两次,得到结晶产物XIII。分析该产物的手性纯度,并且如果Fmoc-R8比Fmoc-S8的结果小于95%,则通过将干FmocR/S(50g)溶解在THF(50mL)中进行再结晶来提高手性纯度。一旦FmocR/S溶解,就加入甲基叔丁醚(900mL)并在20℃下将混合物混合18小时。然后,过滤该混合物并用甲基叔丁醚(每次100mL)洗涤两次。所得结晶产物XIV的手性纯度为约97.8%。

### [0227] 用于XIV的备选再结晶程序-I

[0228] 将甲基叔丁醚(每47g起始材料XIII加入1500mL)加至粗产物中，并在20℃下用CHA

将所得混合物的pH调节至8-9。在该温度下将该混合物混合3小时,此后对其过滤,并用甲基叔丁醚(250mL)洗涤所得固体。

[0229] 用于XIV的备选再结晶程序-II

[0230] 将甲基叔丁醚(每20g起始材料XIII加入400mL)加至粗产物中,并在20℃下用CHA将所得混合物的pH调节至8-9。加入额外200mL的甲基叔丁醚,并且在该温度下将该混合物混合2小时,此后对其过滤,并用甲基叔丁醚(10mL)洗涤所得固体。

[0231] 用于XIV的备选再结晶程序-III

[0232] 将甲基叔丁醚(每4g起始材料XIII加入50mL)加至粗产物中,并在20℃下用CHA将所得混合物的pH调节至8-9。在该温度下将该混合物混合45分钟,此后对其过滤,并用甲基叔丁醚(10mL)洗涤所得固体。

[0233] 用于IIa的再结晶程序

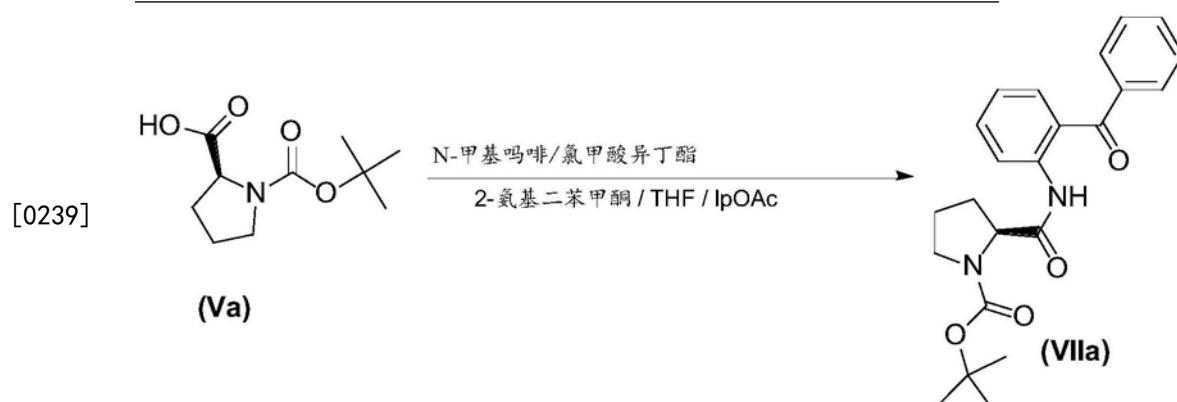
[0234] 将氯仿(70mL)加至粗产物(25g)中,并将所得混合物冷却至0℃。然后缓慢加入己烷(210mL),以将温度保持在0℃。该混合物在该温度下进一步保持1小时,此后对其过滤冷却,并在真空和0℃下干燥所得固体。

[0235] 用于IIa的备选再结晶程序-I

[0236] 将氯仿(2200mL)加至粗产物(1100g)中。然后缓慢加入己烷(6600mL),并将所得混合物冷却至低于0℃。该混合物在低于0℃的温度下进一步混合1小时,此后在低于0℃下对其过滤,并在真空和低于0℃的温度下干燥所得固体。

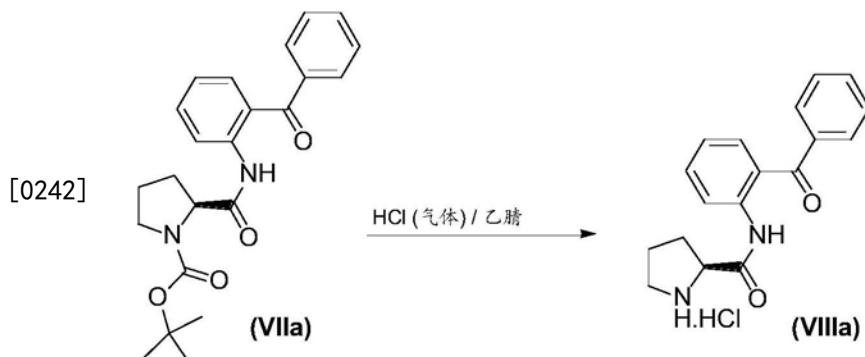
[0237] 实施例2:结晶的N-Fmoc-(S)- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基庚-9-烯酸的制备

[0238] 实施例2a:(S)-2-[N-(N'-Boc-脯氨酰基)氨基]二苯甲酮的制备



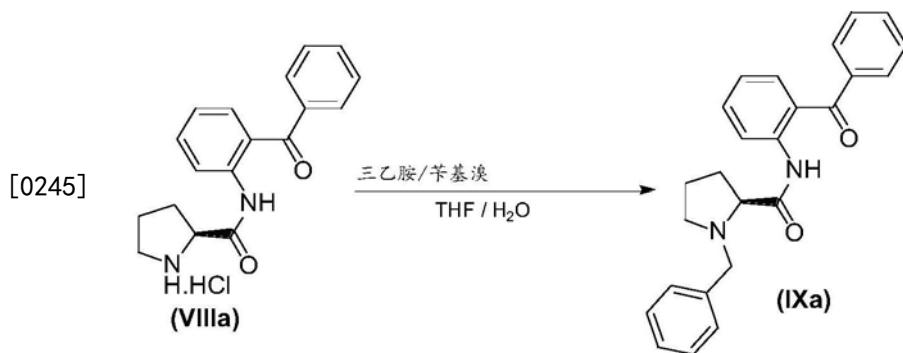
[0240] 将四氢呋喃和7.5kg(1.0当量)的Boc-L-脯氨酸(Va)加入到反应器中,并将所得溶液冷却至-5℃。添加4.2kg(1.05当量)的N-甲基吗啉,随后缓慢加入5.3kg(1.0当量)的在四氢呋喃中的氯甲酸异丁酯,同时保持内部温度<5℃。在20-25℃下将混合物搅拌45-60分钟,然后通过TLC分析其完成情况。加入6.2kg(0.9当量)的2-氨基二苯甲酮/四氢呋喃的溶液,并且将该混合物在20-25℃下搅拌,直至TLC显示反应完全。将该混合物浓缩至1/2体积并加入乙酸异丙酯。有机产物层然后用5%碳酸氢钠溶液洗涤,添加水,继而用25%硫酸将pH调节至2.0-2.5。分离各层并用水再次洗涤有机产物层。然后浓缩有机产物溶液/层,并且使其从乙酸异丙酯中结晶,并用甲基叔丁醚洗涤。然后,分离产物(VIIa)并在热和真空下干燥。收率:9.3kg,75%。

[0241] 实施例2b:L-脯氨酸-2-氨基二苯甲酮酰胺的制备



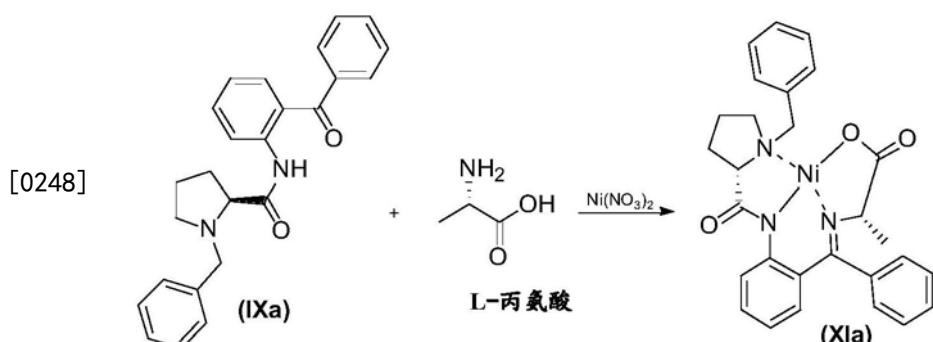
[0243] 将9.4kg (1.0当量) 的Boc-L-脯氨酸-2-氨基二苯甲酮酰胺 (VIIa) 溶解在乙腈中。然后,将1.7kg (2.0当量) 的氯化氢气体充入/鼓入该溶液中。在20–25℃下将此混合物搅拌,直至TLC表明反应完全。加入甲基叔丁醚,并将固体产物从反应溶液中分离出来,并用额外的甲基叔丁醚洗涤。产物 (VIIIa) 在热和真空下干燥。收率:7.0kg,100%。

[0244] 实施例2c: (S)-2-[N-(N'-苄基脯氨酰基)氨基]二苯甲酮 (L-BPB) 的制备



[0246] 将7.1kg (1.0当量) 的L-脯氨酸-2-氨基二苯甲酮酰胺·HCl (VIIIa) 溶解于四氢呋喃和水中。然后,加入5.8kg (2.4当量) 的三乙胺,随后缓慢加入5.9kg (1.4当量) 的苄基溴。继而在20–25℃下将该混合物搅拌,直至反应完全。加入甲基叔丁醚和水,并用1N盐酸溶液将溶液pH调至2.0–2.5。浓缩该混合物以除去所有四氢呋喃。然后,分离产物浆液,并用甲基叔丁醚洗涤。产物 (IXa) 在热和真空下干燥。收率:7.7kg,84.0%。

[0247] 实施例2d: (S)-Ala-Ni-BPB的制备



[0249] 将7.9kg (1.0当量) 的L-BPB (IXa)、12.1kg (1.78当量) 六水合硝酸镍 (II)、3.7kg (2.0当量) 的L-丙氨酸和甲醇加入到反应器中。将该混合物加热至40℃,并在保持内部温度<50℃的同时缓慢加入8.2kg (8.0当量) 的氢氧化钾/甲醇的溶液。将反应混合物加热到60℃,并在该温度下将其搅拌,直到反应完全。随后将该混合物冷却至20–25℃,并在保持内部温度<35℃的同时缓慢添加8.9kg (5.0当量) 的乙酸。该反应溶液继而浓缩成固体。加入四氢

呋喃和乙酸异丙酯以溶解该固体，并用水洗涤有机产物层两次。再次浓缩该溶液，且材料从四氢呋喃和甲基叔丁醚中结晶出来。分离产物，用额外的甲基叔丁醚漂洗，并分析纯度。为了提高纯度，产物(XIa)从异丙醇中再结晶出来，然后分离，并在热和真空下干燥。收率：6.0kg, 56.0%。

### [0250] 用于XIa的再结晶程序

[0251] 将甲基叔丁醚(每50g起始材料L-BPB加入550mL)加至粗产物(S)-Ala-Ni-BPB中,然后将该浆液加热至50℃随后将其冷却至20℃。在20℃下将该混合物混合16小时。过滤该混合物并用甲基叔丁醚(100mL)洗涤所得固体,以获得结晶产物XIa。

## [0252] 用于XIa的备选再结晶程序-I

[0253] 将甲基叔丁醚(每50g起始材料L-BPB加入600mL)加至粗产物(S)-Ala-Ni-BPB中,然后将该浆液加热至50-60℃并在该温度下保持1小时。然后在35℃下过滤该混合物并用甲基叔丁醚(100mL)洗涤,以获得结晶产物XIa。

### [0254] 用于XIa的备选再结晶程序-II

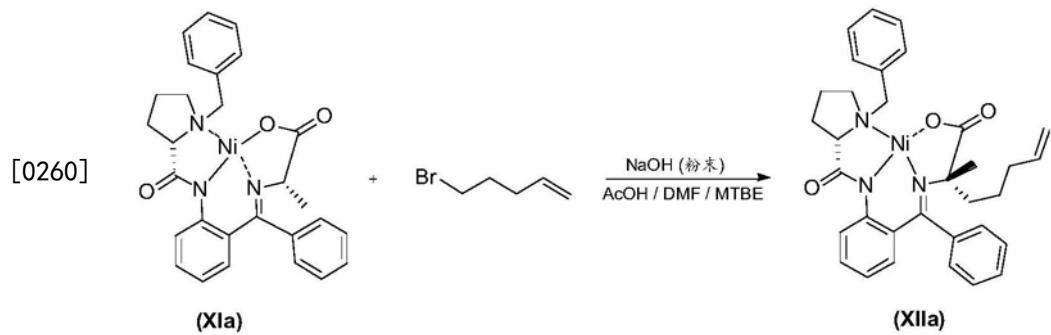
[0255] 将甲基叔丁醚(每50g起始材料L-BPB加入500mL)加至粗产物(S)-Ala-Ni-BPB中,然后将该浆液加热至45-50℃并在该温度下保持1小时。然后在35℃下过滤该混合物并用甲基叔丁醚(100mL)洗涤,以获得结晶产物XIa。

[0256] 备选再结晶程序-III

[0257] 将甲基叔丁醚(每280g起始材料L-BPB加入2000mL)加至粗产物(S)-Ala-Ni-BPB中,然后将该浆液加热至45-50℃并在该温度下保持30min。然后将该混合物冷却至20℃并在该温度下混合8小时。然后过滤所得固体并用甲基叔丁醚(100mL)洗涤。

[0258] (S)-Ala-Ni-BPB (300g) 通过溶解在 THF (450mL) 中再结晶。将混合物加热至 50°C 1 小时，随后加入 50°C 的甲基叔丁醚 (1500mL)。在该温度下混合所得混合物额外 1 小时。继而将浆液冷却至 20°C 并在 20°C 下混合 1 小时。然后，过滤所得固体并用甲基叔丁醚 (300mL) 洗涤，以得到结晶产物 XIa。

### [0259] 实施例2e:S5-Ni-BPB的制备



[0261] 将5.8kg (1.0当量) 的 (S)-Ala-Ni-BPB (XIa) 加至反应器中并且溶解到二甲基甲酰胺中并冷却至10℃。随后将1.2kg (2.5当量) 的氢氧化钠(粉末) 加至同一反应器中, 将该混合物用氮气吹扫并搅拌, 直到在10℃下形成溶液。然后向反应器中加入3.3kg (2.0当量) 的5-溴-1-戊烯, 保持内部温度<20℃。在20-25℃下将该混合物搅拌, 直至反应完全。一旦反应完全, 就将该溶液冷却至10℃, 并加入0.4kg (1.5当量) 的乙酸, 保持内部温度<25℃。然后加水, 接着加入甲基叔丁醚, 并洗涤有机层。该有机层然后用水洗涤2次, 然后浓缩。产物 (XIIa) 从乙酸异丙酯中结晶出来, 分离, 并在热和真空下干燥。收率: 2.2kg, 32.4%。

[0262] 再结晶程序

[0263] 将乙酸异丙酯(每12.5g起始材料XIa加入200mL)加至粗产物S5-Ni-BPB中,并在20℃下混合该混合物30分钟,然后加入己烷(500mL)。该混合物进一步混合30分钟,随后将其过滤,得到结晶产物XIIa。

[0264] 备选再结晶程序-I

[0265] 将乙酸异丙酯(每39g起始材料XIa加入80mL)加至粗产物S5-Ni-BPB中,并在20℃下混合该混合物2小时。过滤该混合物并用乙酸异丙酯(35mL)洗涤。合并滤液和洗过液并加入庚烷(170mL)。混合所得浆液1小时,继而过滤,并用庚烷(360mL)洗涤,以得到结晶产物XIIa。

[0266] 备选再结晶程序-II

[0267] 将乙酸异丙酯(每205g起始材料XIa加入1000mL)加至粗产物S5-Ni-BPB中,并在70-80℃下溶解该混合物。将该溶液冷却至20℃,并在该温度下混合该混合物1小时,在此期间未观察到结晶。该混合物经硅藻土(celite)过滤并在真空和40℃下除去溶剂。加入甲基叔丁醚(1000mL),并将该混合物加热至60℃随后冷却至20℃并混合24小时。过滤该固体并用甲基叔丁醚(300mL)洗涤,以获得结晶产物XIIa。

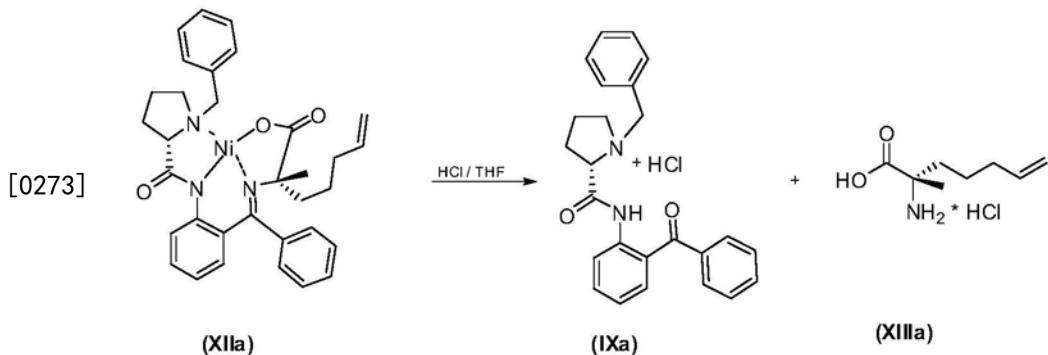
[0268] 备选再结晶程序-III

[0269] 将乙酸乙酯(每12.5g起始材料XIa加入100mL)加至粗产物S5-Ni-BPB中,并在20℃下将该混合物混合30分钟。加入己烷(500mL)并将所得浆液再混合30分钟,之后对其过滤,以获得结晶产物XIIa。

[0270] 备选再结晶程序-IV

[0271] 将甲基叔丁醚(每12.5g起始材料XIa加入100mL)加至粗产物S5-Ni-BPB中,并将该混合物加热至45-50℃。在45-50℃下加入庚烷(400mL)。将所得浆液冷却至20℃并过滤,以获得结晶产物XIIa。

[0272] 实施例2f: (S)-2-氨基-2-甲基-庚-6-烯酸的制备



[0274] 将2.2kg(1.0当量)的S5-Ni-BPB(XIIa)加至化学玻璃反应器中。加入四氢呋喃,并在20-25℃下搅拌该混合物直至形成溶液。在保持内部温度<30℃的同时缓慢地加入1.8kg(4.5当量)的32%盐酸。然后,将该混合物在环境温度下搅拌6-8小时。浓缩该混合物以除去四氢呋喃,得到浆液。加入额外的水,并在环境温度下搅拌该浆液1-2小时。通过过滤分离固体BPB盐,并用额外的水漂洗,随后用甲基叔丁醚漂洗。然后,将产物的滤液再添加至反应器中,得到三相溶液。将最下层与上面两层分离。合并的两个有机层继而用水洗涤3次并浓缩成油状物。加入乙腈,并将该混合物升温至70℃30分钟。继而将该混合物冷却至25-30℃并

分离该固体产物。固体滤饼用乙腈和甲基叔丁醚洗涤，然后分析化学纯度。然后将产物从额外的乙腈中再次形成浆液，并用乙腈和甲基叔丁醚洗涤。分离材料(XIIIa)并在热和真空下干燥。收率：0.585kg, 80%。

### [0275] 用于XIIIa的再结晶程序

[0276] 将乙腈 (每20g起始材料S5-Ni-BPB (XIIa) 加入100mL) 加入粗产物中，并在20℃下混合该混合物1小时。然后过滤该混合物并用乙腈 (40mL) 洗涤，以得到结晶产物XIIa。

[0277] 用于XIIIa的备选再结晶程序-I

[0278] 将乙腈(每185g起始材料XIIa加入500mL)加至粗产物S5-Ni-BPB中，并在45–50°C下溶解该浆液。在真空和45–50°C下除去溶剂，加入500mL乙腈，并将所得混合物加热至45–50°C。然后，将该混合物冷却至35°C，过滤，并用乙腈(50mL)洗涤，以获得结晶产物XIIa。

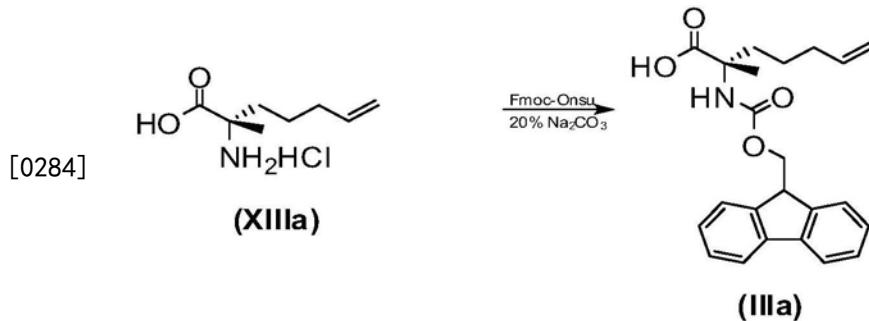
[0279] 用于XIIIa的备选再结晶程序-II

[0280] 加入乙腈(每35g起始材料XIIa加入270mL),并将该浆液加热至45-50℃。然后将该混合物冷却至20℃,并在该温度下混合2小时。继而过滤该混合物并用乙腈(50mL)和甲基叔丁醚(50mL)洗涤,以获得结晶产物XIIIf。

### [0281] 用于XIIIa的备选再结晶程序-III

[0282] 加入乙酸异丙酯(每15g XIIa加入60mL),并将该混合物加热至70℃。加入乙腈(180mL),并将所得混合物冷却至20℃。过滤该混合物并用乙腈(50mL)洗涤所得固体,以获得结晶产物XIIa。

### [0283] 实施例2g:N-Fmoc-(S)- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基庚-9-烯酸的制备



[0285] 将0.585kg (1.0当量) 的2-氨基-2-甲基-庚-6-烯酸·HCl (IIIa) 悬浮于水中并精细过滤, 以从该溶液中除去痕量的L-BPB·HCl。加入甲基叔丁醚, 并用甲基叔丁醚萃取水性产物层一次。再次充入水性产物层并加入四氢呋喃。将20% 碳酸钠水溶液 (2.75当量) 加入到该混合物中, 随后加入Fmoc-0nsu (0.95当量)。使该混合物在20-25℃下反应, 同时用额外量的20% 碳酸钠溶液将pH保持在8.5-9.0直到反应完全。用浓盐酸将混合物的pH下调至pH 2.0-2.5。蒸馏出四氢呋喃并加入甲基叔丁醚。分离各层, 并用额外的水洗涤有机层3次。然后将有机层在真空下浓缩并用甲基叔丁醚共反萃。浓缩有机产物层并用己烷共反萃成松散的油状物。然后, 将产物 (IIIa) 从氯仿和己烷中结晶出来, 并在1.0cfm氮气吹扫下在<0℃下干燥。收率: 0.831kg, 76.0%。

### [0286] 用于IIIa的再结晶程序

[0287] 将氯仿(每9g起始材料XIIIa加入30mL)加至粗产物中。加入己烷(100mL)并将该混合物冷却至0℃。在0℃下过滤所得固体并用冷己烷洗涤,以获得结晶产物IIIa。

### [0288] 用于IIIa的环己胺盐的再结晶程序

[0289] 将乙腈(每19.04g起始材料IIIa加入300mL)加至粗产物中,并在20℃下用环己胺将pH调节至8-9。在20℃下将所得混合物混合2小时,然后过滤,并用乙腈(50mL)洗涤,以获得结晶的IIIa的环己胺盐。

[0290] 用于IIIa的环己胺盐的备选再结晶程序-I

[0291] 将甲基叔丁醚(每5g起始材料IIIa加入200mL)加至粗产物中,并在20℃下用环己胺将pH调节至8-9。在20℃下将所得混合物混合1小时,然后过滤,并用甲基叔丁醚(50mL)洗涤,以获得结晶的IIIa的环己胺盐。

采用的柱: Chiralpak AD-H QC#167

小瓶: 73 进样: 1

进样体积: 5.00  $\mu$ l

样品浓度: 48.0mg/25mL DS

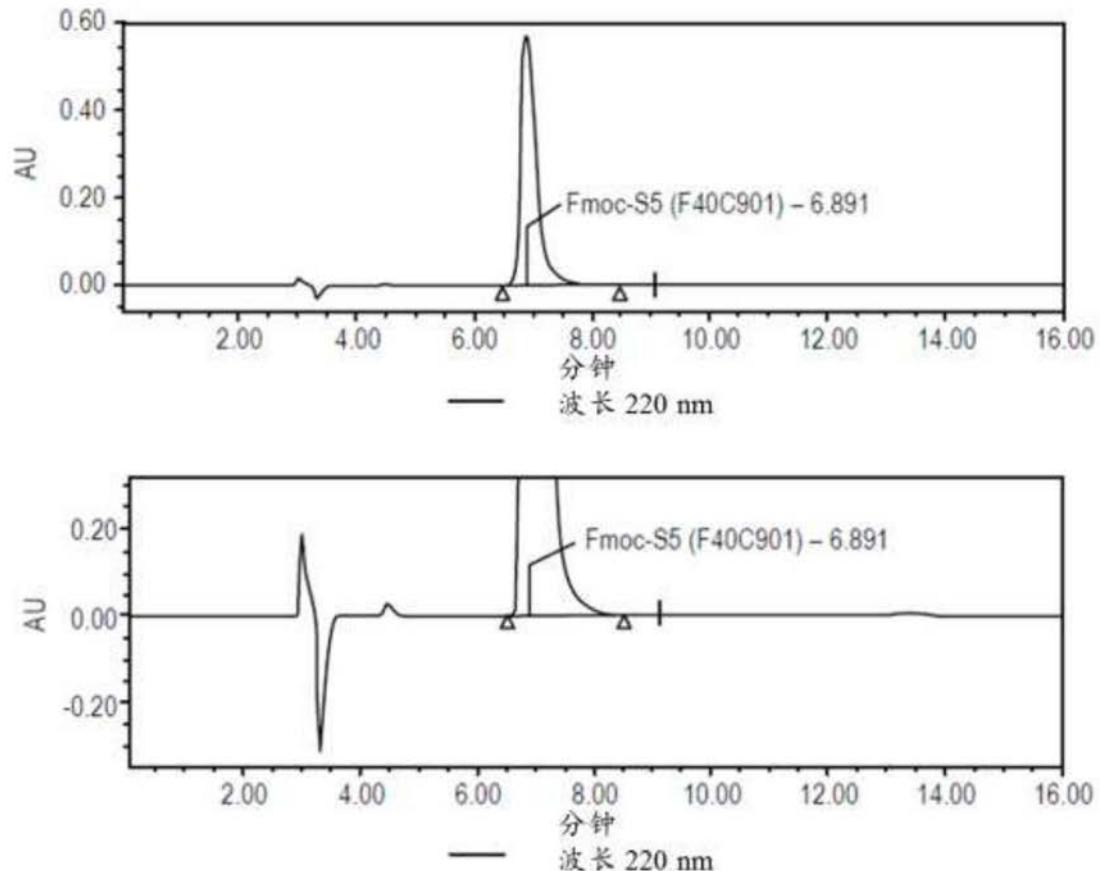
其他样品信息: 成品

溶剂 A: 90% 己烷 / 10% IPA / 0.1% TFA

溶剂 B: 90% 己烷 / 10% IPA

溶剂 C: IPA

溶剂 C: EtOH



以220 nm处理的结果

	峰名称	保留时间	峰面积	%峰面积		峰名称	保留时间	峰面积	%峰面积
1	Fmoc-55 (F40C901)	6.891	9858806	100.00		2	Fmoc-55 (F40C902)	9.100	

用户名: 系统

当前日期: 12/19/2011 2:19:54 PM

第1页, 共1页

图1

采用的柱: Chiraldak AD-H QC#167

小瓶: 74 进样: 1

进样体积: 5.00 ul

样品浓度: 48.0mg/25mL DS + 0.5% R5

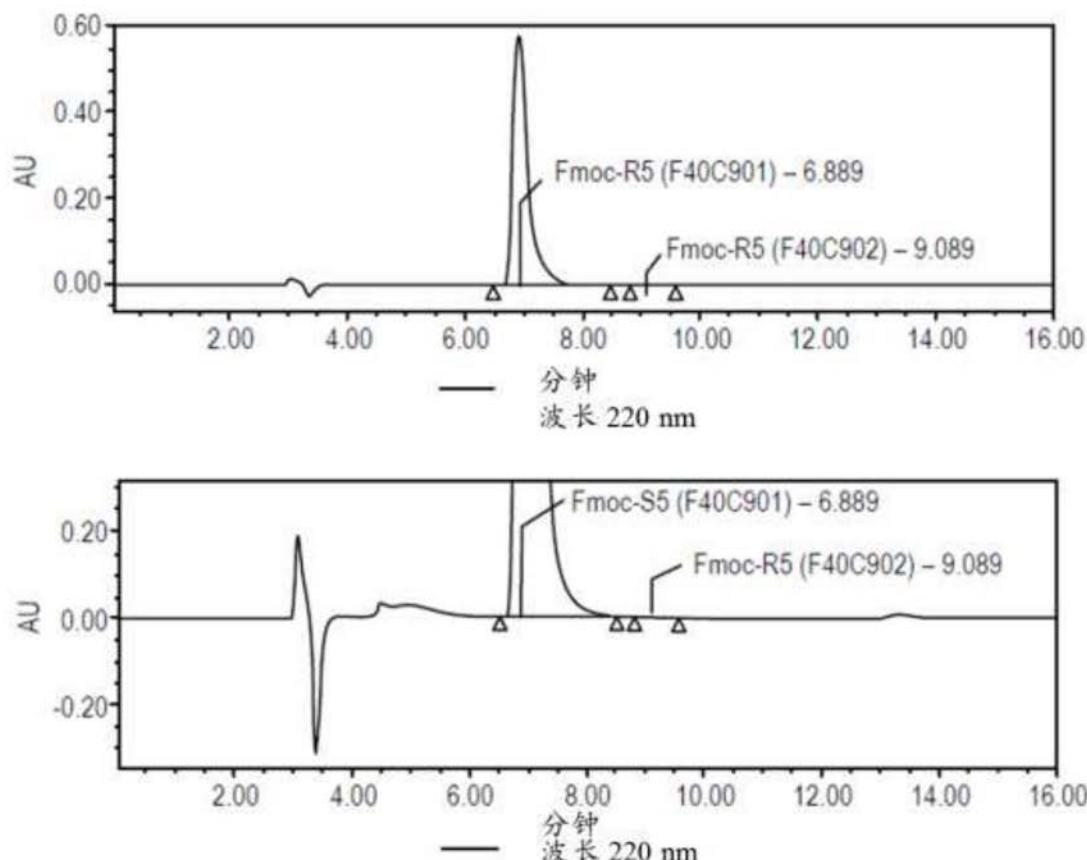
其他样品信息: 样品 + 0.5% R5

溶剂A: 90% 己烷 / 10% IPA / 0.1% TFA

溶剂B: 90% 己烷 / 10% IPA

溶剂C: IPA

溶剂C: EtOH



以220 nm处理的结果

	峰名称	保留时间	峰面积	%峰面积		峰名称	保留时间	峰面积	%峰面积
1	Fmoc-55 (F40C901)	6.889	9847318	99.83	2	Fmoc-55 (F40C902)	9.089	16328	0.17

用户名: 系统

当前日期: 12/19/2011 2:41:41 PM

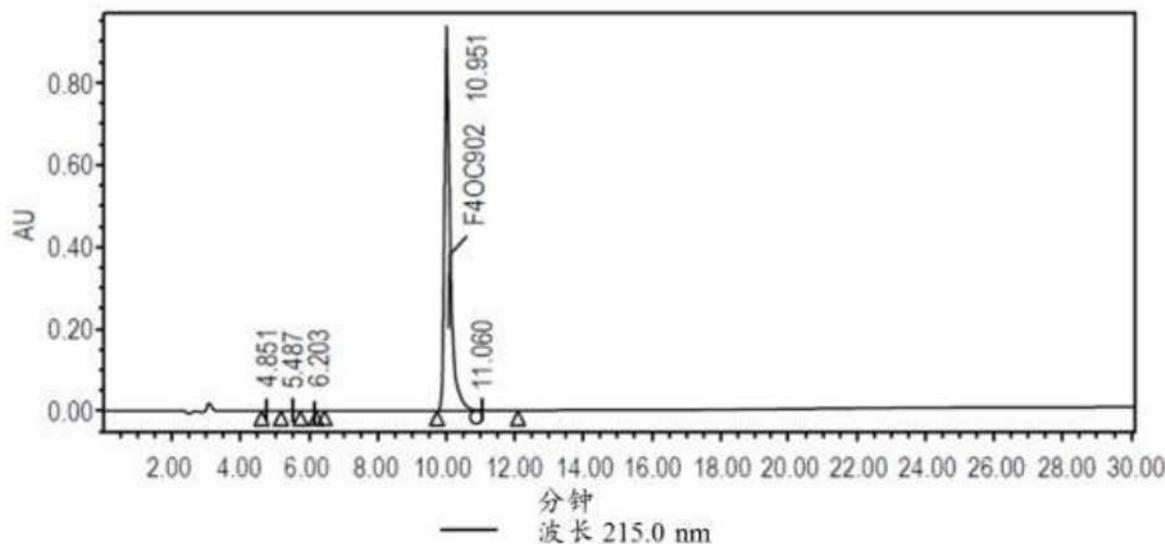
第1页, 共1页

图2

采用的柱: Waters Spherisorb ODS2#131  
小瓶: 35 进样: 1  
进样体积: 5.00  $\mu$ l

获取方法的设置: F40C902\_60to80in25min  
获取日期: 12/20/2011 1:53:06 PM  
处理方法 F40C902\_60to80in25min  
处理日期: 12/20/2011 3:21:49 PM

样品浓度: 26.1mg/25mL DS  
其他样品信息: 样品



来自 215 nm 色谱图的数据

	峰名称	保留时间	高度( $\mu$ V)	%高度	峰面积	%峰面积
1		4.851	3099	0.33	24138	0.20
2		5.487	1580	0.17	21810	0.18
3		6.203	6569	0.71	62741	9.52
4	F40C902	10.054	925370	98.56	11863328	98.49
5		11.060	2192	0.23	73331	0.61

图3

采用的柱: Waters Spherisorb ODS2#131

获取日期: 12/20/2011 1:53:06 PM

小瓶: 35 进样: 1

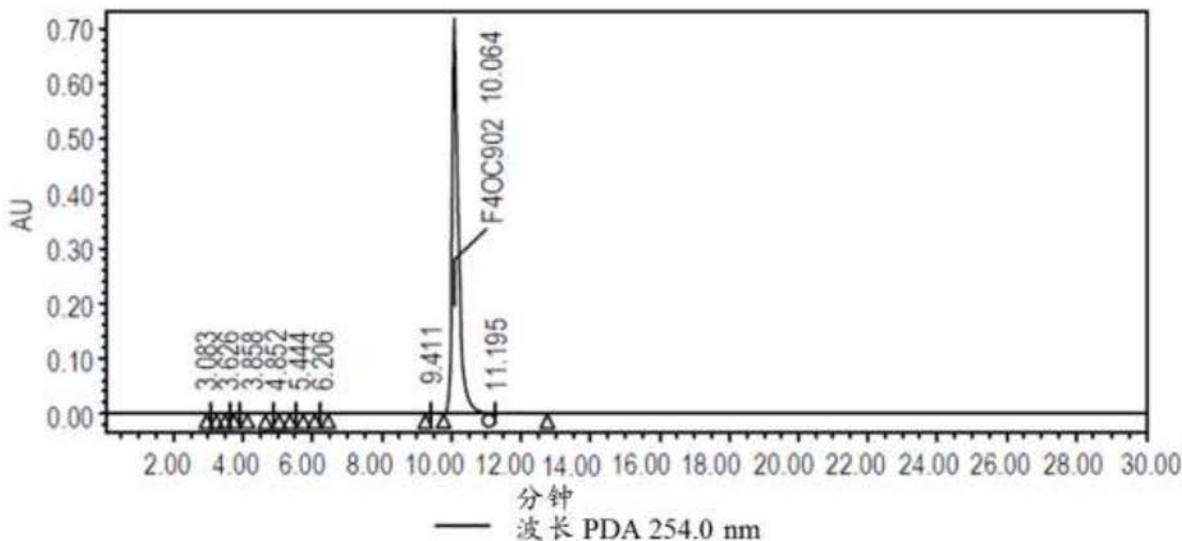
处理方法 F40C902\_60to80in25min

进样体积: 5.00 ul

处理日期: 12/20/2011 3:19:31 PM

样品浓度: 26.1mg/25mL DS

其他样品信息: 样品



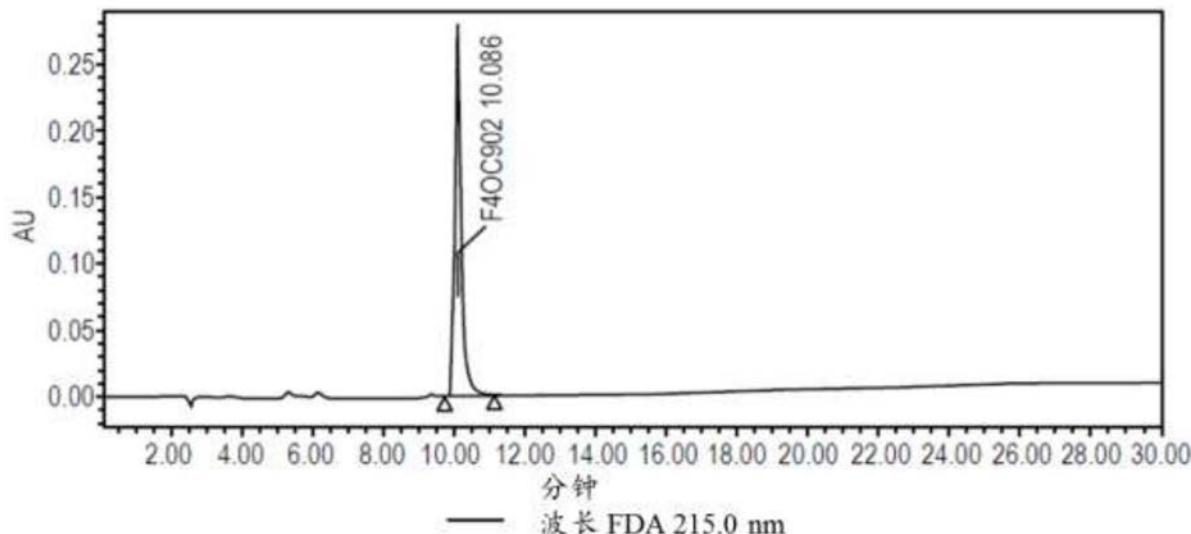
来自 254 nm 色谱图的数据

	峰名称	保留时间	高度(μV)	%高度	峰面积	%峰面积
1		3.083	914	0.13	5380	0.06
2		3.626	379	0.05	2548	0.03
3		3.858	612	0.09	7057	0.08
4		4.852	2303	0.32	17314	0.19
5		5.484	967	0.14	8412	0.09
6		6.206	2206	0.31	20714	0.23
7		9.411	1420	0.20	14463	0.16
8	F40C902	10.054	698574	98.50	8845126	98.36
9		11.195	1818	0.26	71822	0.80

图4

采用的柱: Waters Spherisorb ODS2 #131  
 小瓶: 36 进样: 1  
 进样体积: 5.00 ul  
 样品浓度: 0.5mg/25mL DS  
 其他样品信息: 客户对照

获取日期: 12/20/2011 2:44:05 PM  
 处理方法: F40C902\_60to80in25min  
 处理日期: 12/20/2011 3:24:26 PM



来自 215 nm 色谱图的数据

	峰名称	保留时间	高度(μV)	%高度	峰面积	%峰面积
1	F40C902	10.086	273598	100.00	3562385	100.05

图5

采用的柱: Chiralpak AD-H QC#167

小瓶: 86 进样: 1

进样体积: 20.00  $\mu$ l

样品浓度: 25.5mg (N: 干燥) / 25mL IPA

其他样品信息:

N-Fmoc-(R)- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基癸-9-烯酸; 样品: 100%

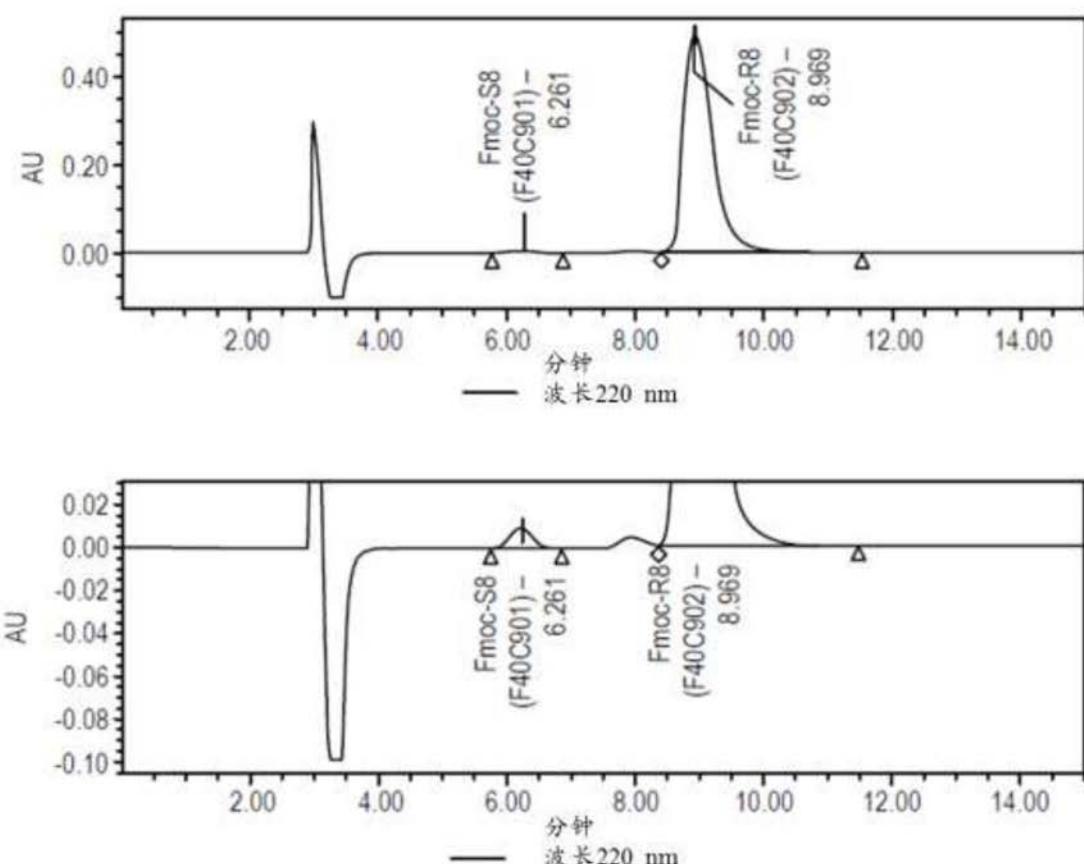
MP-A: 1.0mL/min; 25 C; 730 psi;

溶剂A: 90%己烷/10%IPA/0.1%TFA

溶剂B: 90%己烷/10%IPA

溶剂C: IPA

溶剂D: EtOH



以220 nm处理的结果

	峰名称	保留时间	峰面积	%峰面积		峰名称	保留时间	峰面积	%峰面积
1	Fmoc-S8 (F40C901)	6.261	215326	1.37	2	Fmoc-S8 (F40C902)	8.969	15530958	98.63

图6

采用的柱: CHiralpak AD-H QC#167

小瓶: 87 进样: 1

进样体积: 20.00  $\mu$ l样品浓度: 50  $\mu$ L S8 RSTD/10mL Sx Soln.

其他样品信息:

N-Fmoc-(R)- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基癸-9-烯酸; 样品; 100%MP-A: 1.0mL/min; 25  $^{\circ}$ C; 730 psi;

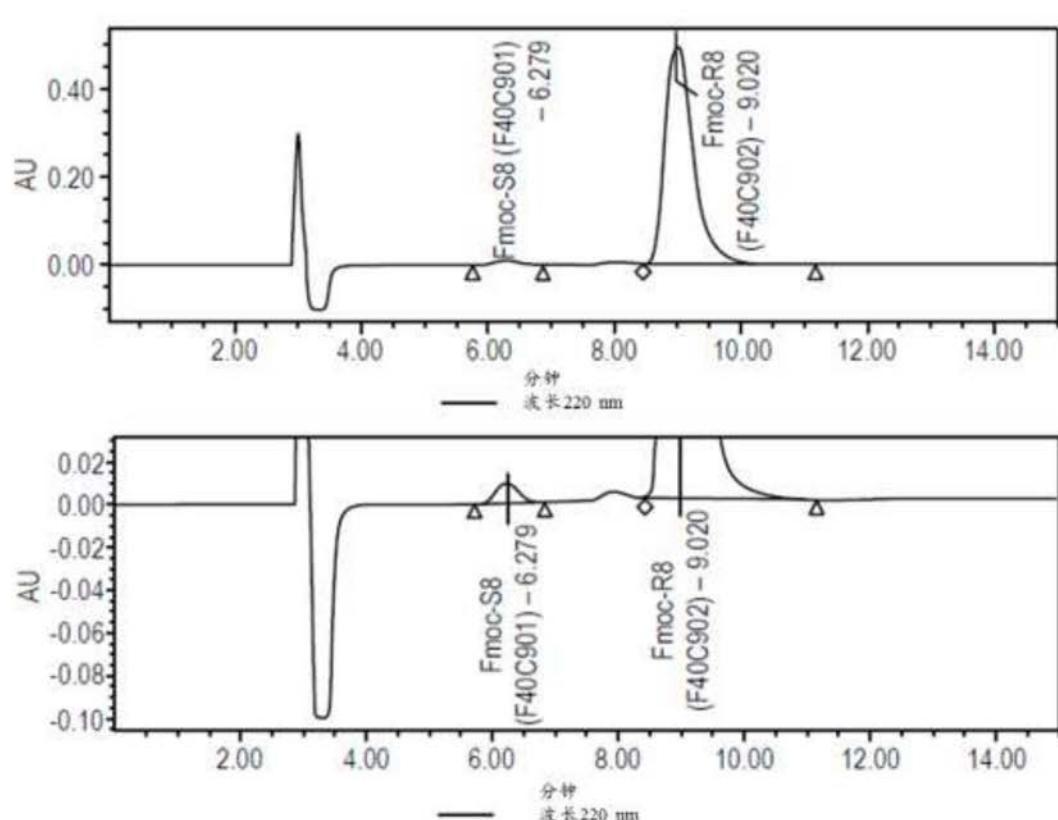
处理日期: 11/17/2011 7:38:20 AM

溶剂A: 90% 己烷/10%IPA/0.1%TFA

溶剂B: 90% 己烷/10%IPA

溶剂C: IPA

溶剂D: EtOH



以220 nm处理的结果

	峰名称	保留时间	峰面积	%峰面积		峰名称	保留时间	峰面积	%峰面积
1	Fmoc-S8 (F40C901)	6.279	236343	1.48	2	Fmoc-S8 (F40C902)	9.020	15717883	98.52

用户名: 系统

当前日期: 11/17/2011 7:38:49 PM

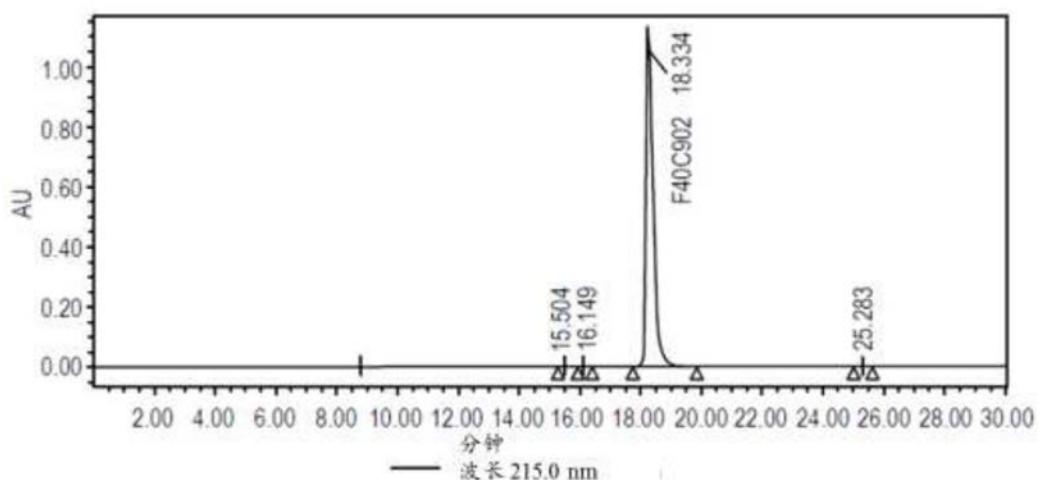
第1页, 共1页

图7

采用的柱: Waters Spherisorb ODS2 #131  
 小瓶: 46 造样: 1  
 造样体积: 5.00  $\mu$ l

处理日期: 11/16/2011 7:19:45 PM  
 处理方法 F40C902 60to80in25min  
 处理日期: 11/17/2011 4:04:32 PM

样品浓度: 14.6mg/10mL DS  
 其他样品信息: N-Fmoc-(R)- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基癸  
 -9-烯酸; FP;



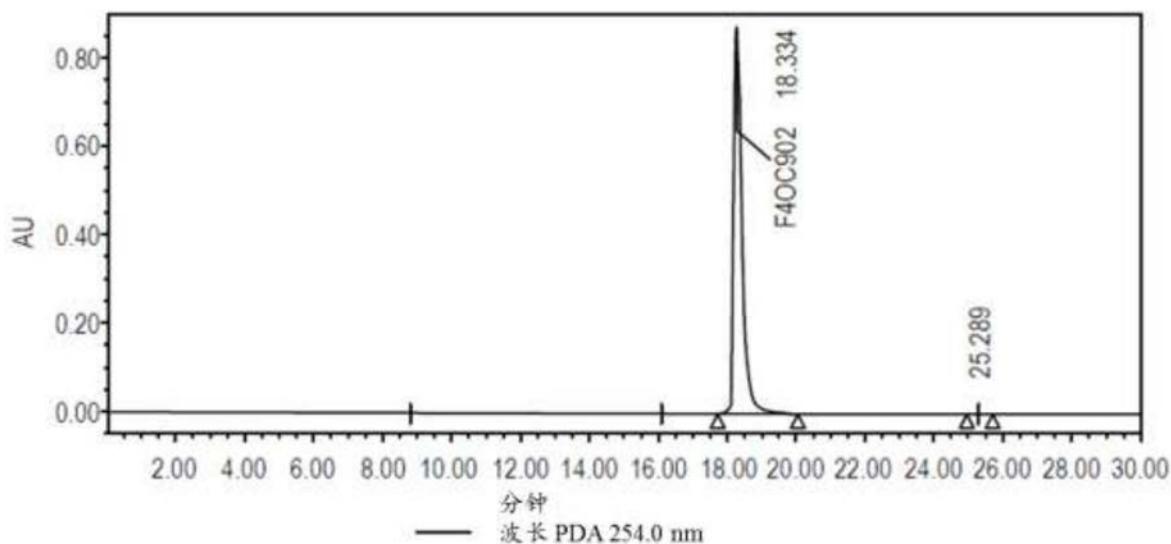
	峰名称	保留时间	高度(μV)	%高度	峰面积	%峰面积
1	Fmoc-OnSu	8.800				
2		15.504	494	0.04	9432	0.05
3	40C902	16.100				
4		16.149	1013	0.09	13695	0.08
5	F40C902	18.334	1106791	99.81	17679588	99.82
6		25.283	552	0.05	8025	0.05

图8

采用的柱: Waters Spherisorb ODS2 #131  
 小瓶: 46 进样: 1  
 进样体积: 5.00  $\mu$ l

获取日期: 11/16/2011 7:19:45 PM  
 处理方法: F40C902\_60to80in25min  
 处理日期: 11/17/2011 6:11:21 PM

样品浓度: 14.6mg/10mL DS  
 其他样品信息: N-Fmoc-(R)- $\alpha$ -甲基- $\alpha$ -氨基癸  
 -9-烯酸; FP;



来自 254 nm 色谱图的数据

	峰名称	保留时间	高度( $\mu$ V)	%高度	峰面积	%峰面积
1	Fmoc-OnSu	8.800				
2	40C902	16.100				
3	F40C902	18.334	856815	99.96	13404558	99.95
4		25.289	382	0.04	7053	0.05

图9