(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110799520 B
(45)授权公告日 2024.07.12

(21)申请号 201880036609.0
(22)申请日 2018.06.08
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110799520 A
(43)申请公布日 2020.02.14
(30)优先权数据
2017-114073 2017.06.09 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.02
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2018/021998 2018.06.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/225851 JA 2018.12.13
(73)专利权人 中外制药株式会社
地址 日本国东京都
(72)发明人 野村研一 村冈照茂 棚田干将 江村岳
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 张国梁 张莹
(51)Int.Cl.
C07K 1/06(2006.01)
C07K 11/02(2006.01)
A61K 38/12(2006.01)
C40B 50/14(2006.01)
(56)对比文件
EP 2177533 A1,2010.04.21
审查员 马彧博
权利要求书9页 说明书118页 附图21页

(54)发明名称

用于合成含有N-取代氨基酸的肽的方法

(57)摘要

生产本发明的含有N-取代的氨基酸或N-取代的氨基酸类似物的肽的方法,包括以下步骤:制备Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽;通过使用碱,使具有Fmoc保护的氨基酸等的Fmoc骨架的保护基脱保护;和通过添加新的Fmoc保护的氨基酸等,形成酰胺键;以及当通过固相方法生产肽时,在比TFA弱的酸度条件下将获得的肽从固相上切下。此外,所获得的肽的至少一个侧链具有保护基,该保护基在碱性条件下不被脱保护,并且在比TFA弱的酸性条件下被脱保护。

CN 110799520 B

1.生产包含至少一个N-取代的氨基酸或N-取代的氨基酸类似物的肽的方法,其中所述方法包括以下步骤:

1)制备包含以下官能团i)和ii)中至少一个的Fmoc保护的氨基酸、包含以下i)和ii)中至少一个的Fmoc保护的氨基酸类似物、或包含Fmoc保护的氨基酸和Fmoc保护的氨基酸类似物之一或二者的Fmoc保护的肽:

i)被至少一个具有Fmoc骨架的保护基保护的主链氨基;和

ii)至少一个游离羧酸基或活性酯化羧酸基;

2)将步骤1)中制备的Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽支持到固相上;

3)通过使用碱以暴露其氨基,将支持在固相上的Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽的具有Fmoc骨架的保护基脱保护,其中所述碱选自仲胺、具有脒骨架的碱和具有胍骨架的碱;

4)通过添加新的Fmoc保护的氨基酸、新的Fmoc保护的氨基酸类似物或新的Fmoc保护的肽,形成酰胺键;

5)使用含有氟代醇的弱酸性溶液将步骤4)中获得的肽从固相切下,其中,构成步骤4)中获得的肽的Fmoc保护的氨基酸或Fmoc保护的氨基酸类似物的至少一个侧链被保护基保护,所述保护基在碱性条件下不脱保护,但被在氟代醇中具有0至9的水性pKa值的弱酸脱保护;和

6)在步骤5)之前或之后,使用所述在氟代醇中具有0至9的水性pKa值的弱酸使所述保护基脱保护,

其中所述在氟代醇中具有0至9的水性pKa值的弱酸和所述含有氟代醇的弱酸性溶液均为比TFA弱的酸,并且所述在氟代醇中具有0至9的水性pKa值的弱酸的酸度高于所述含有氟代醇的弱酸性溶液的酸度,

其中所述氟代醇是TFE或HFIP,并且

其中,所述侧链保护基选自以下a)-d):

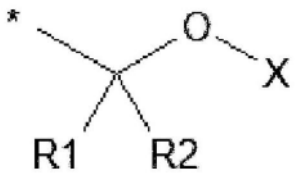
a)当侧链保护基是用于Ser、Thr、Hyp及其衍生物的侧链羟基的保护基时,选自由以下通式表示的MOM骨架、Bn骨架、Dpm骨架、Trt骨架、甲硅烷基骨架和Boc骨架中的任何一种保护基;

b)当侧链保护基是用于Thr及其衍生物的侧链羟基的保护基时,选自由以下通式表示的MOM骨架、Bn骨架、Dpm骨架、Trt骨架、甲硅烷基骨架、Boc骨架和tBu骨架中的任何一种保护基;

c)当侧链保护基是用于His及其衍生物的侧链咪唑环的保护基时,选自由以下通式表示的MOM骨架、Bn骨架和Trt骨架中的任何一种保护基;和

d)当侧链保护基是用于Asp、Glu及其衍生物的侧链羧酸基团的保护基时,选自由以下通式(1)至(8)表示的MOM骨架、Bn骨架、Dpm骨架、Trt骨架、tBu骨架、苯基-EDOTn骨架和其中待保护的羧酸基团的碳原子被三个烷氧基取代的原酸酯骨架中的任何一种保护基:

(1)具有MOM骨架的保护基



其中

R1为H,R2为H,以及X为甲基、苄基、4-甲氧基苄基、2,4-二甲氧基苄基、3,4-二甲氧基苄基或2-三甲基甲硅烷基乙基;

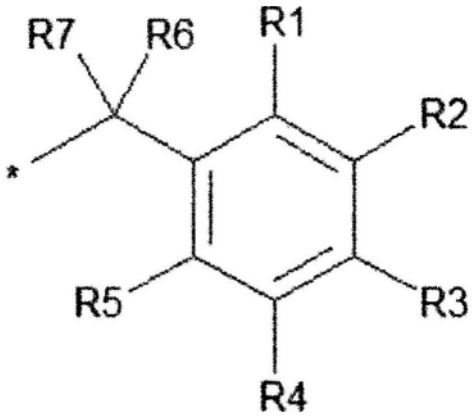
R1为甲基,R2为H,X为乙基;

R1、R2和R3均为甲基;或

R1和X一起形成-CH_2-CH_2-CH_2-或-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-,以及R2是H,

其中当R1、R2和X中任一个为甲基或乙基时,这些基团可进一步被烷基、苄基或芳基取代;

(2)具有Bn骨架的保护基:



其中

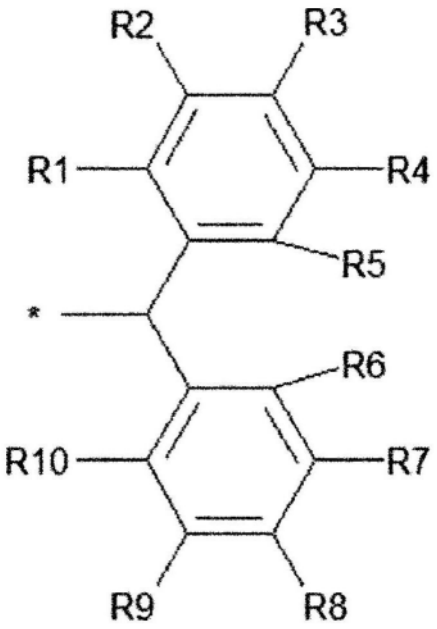
R1至R5各自独立地为H、烷基、芳基或卤素,R6和R7为烷基;

R1、R2、R4和R5各自独立地为H、烷基、芳基或卤素,R3为甲氧基,R6和R7为H;

R1和R3为甲氧基,R2、R4和R5各自独立地为H、烷基、芳基或卤素,R6和R7为H;或

R1、R4和R5各自独立地为H、烷基、芳基或卤素,且R2和R3一起形成-O-CH_2-O-;

(3)具有Dpm骨架的保护基:

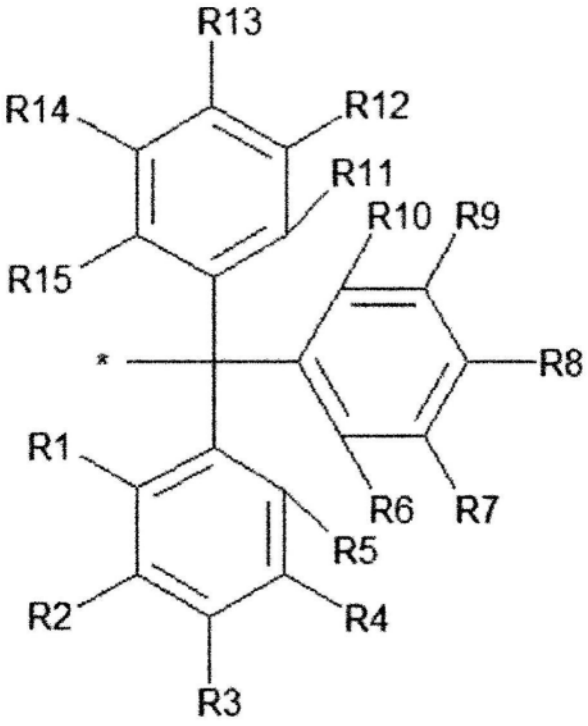


其中

R1至R10各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素;或

R1至R4和R7至R10各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素,且R5和R6一起形成-O-或-CH_2-CH_2-;

(4)具有Trt骨架的保护基



其中

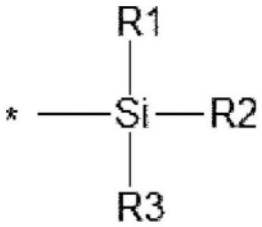
R1至R15各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素;

R1、R2和R4至R15各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素,且R3为甲基或甲氧基;

R1为Cl,且R2至R15各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素;或

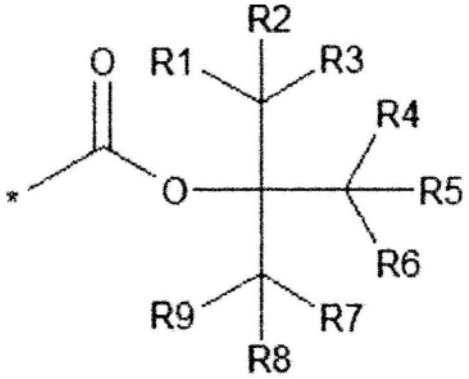
R1至R4和R7至R15各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素,且R5和R6一起形成-O-;

(5)具有甲硅烷基骨架的保护基:



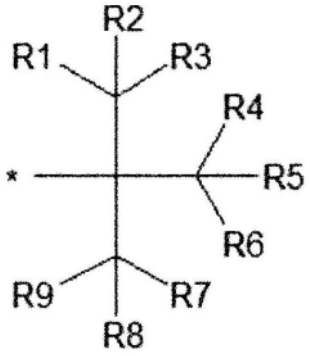
其中R1至R3各自独立地为烷基或芳基;

(6)具有Boc骨架的保护基:



其中R1至R9各自独立地为H、烷基或芳基;

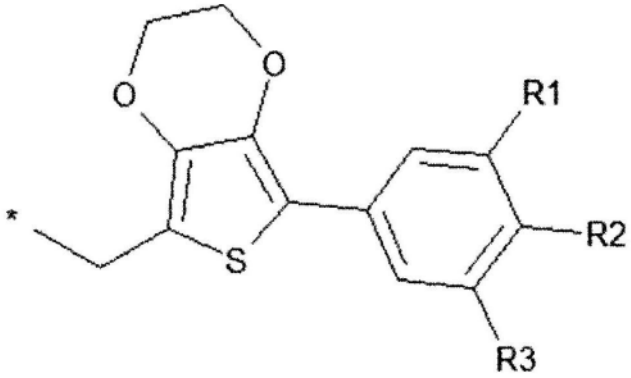
(7)具有tBu骨架的保护基:



其中

R1至R9各自独立地为H、烷基或芳基;和

(8)具有苯基-EDOTn骨架的保护基:



其中R1至R3各自独立地为H或甲氧基。

2.生产包含至少一个N-取代的氨基酸或N-取代的氨基酸类似物的肽的方法,其中所述

方法包括以下步骤:

1)制备包含以下官能团i)和ii)中至少一个的Fmoc保护的氨基酸、包含以下官能团i)和ii)中至少一个的Fmoc保护的氨基酸类似物、或包含Fmoc保护的氨基酸和Fmoc保护的氨基酸类似物之一或二者的Fmoc保护的肽:

i)被至少一个具有Fmoc骨架的保护基保护的主链氨基;和

ii)至少一个游离羧酸基或活性酯化羧酸基;

2)通过使用碱以暴露其氨基,将Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽的具有Fmoc骨架的保护基脱保护,其中所述碱选自仲胺、具有脒骨架的碱和具有胍骨架的碱;

3)通过添加新的Fmoc保护的氨基酸、新的Fmoc保护的氨基酸类似物或新的Fmoc保护的肽形成酰胺键,其中构成在该步骤中获得的肽的氨基酸或氨基酸类似物的至少一个侧链具有保护基,所述保护基在碱性条件下不脱保护,并且在具有比TFA弱的酸性的条件下脱保护;和

4)使用在氟代醇中具有0至9的水性pKa值的弱酸将所述侧链的保护基脱保护,

其中,所述在氟代醇中具有0至9的水性pKa值的弱酸是比TFA弱的酸,

其中,所述氟代醇是TFE或HFIP,并且

其中,所述侧链保护基选自以下a)-d):

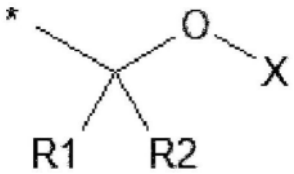
a)当侧链保护基是用于Ser、Thr、Hyp及其衍生物的侧链羟基的保护基时,选自由以下通式表示的MOM骨架、Bn骨架、Dpm骨架、Trt骨架、甲硅烷基骨架和Boc骨架中的任何一种保护基;

b)当侧链保护基是用于Thr及其衍生物的侧链羟基的保护基时,选自由以下通式表示的MOM骨架、Bn骨架、Dpm骨架、Trt骨架、甲硅烷基骨架、Boc骨架和tBu骨架中的任何一种保护基;

c)当侧链保护基是用于His及其衍生物的侧链咪唑环的保护基时,选自由以下通式表示的MOM骨架、Bn骨架和Trt骨架中的任何一种保护基;和

d)当侧链保护基是用于Asp、Glu及其衍生物的侧链羧酸基团的保护基时,选自由以下通式(1)-(8)表示的MOM骨架、Bn骨架、Dpm骨架、Trt骨架、tBu骨架、苯基-EDOTn骨架和其中待保护的羧酸基团的碳原子被三个烷氧基取代的原酸酯骨架中的任何一种保护基:

(1)具有MOM骨架的保护基



其中

R1为H,R2为H,以及X为甲基、苄基、4-甲氧基苄基、2,4-二甲氧基苄基、3,4-二甲氧基苄基或2-三甲基甲硅烷基乙基;

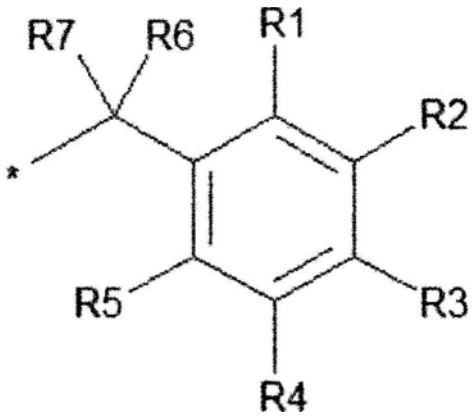
R1为甲基,R2为H,X为乙基;

R1、R2和R3均为甲基;或

R1和X一起形成-CH_2-CH_2-CH_2-或-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-,以及R2是H,

其中当R1、R2和X中任一个为甲基或乙基时,这些基团可进一步被烷基、苄基或芳基取代;

(2)具有Bn骨架的保护基:



其中

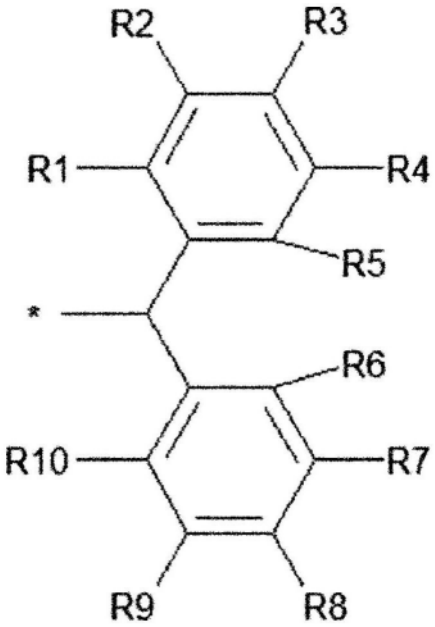
R1至R5各自独立地为H、烷基、芳基或卤素,R6和R7为烷基;

R1、R2、R4和R5各自独立地为H、烷基、芳基或卤素,R3为甲氧基,R6和R7为H;

R1和R3为甲氧基,R2、R4和R5各自独立地为H、烷基、芳基或卤素,R6和R7为H;或

R1、R4和R5各自独立地为H、烷基、芳基或卤素,且R2和R3一起形成-O-CH_2-O-;

(3)具有Dpm骨架的保护基:

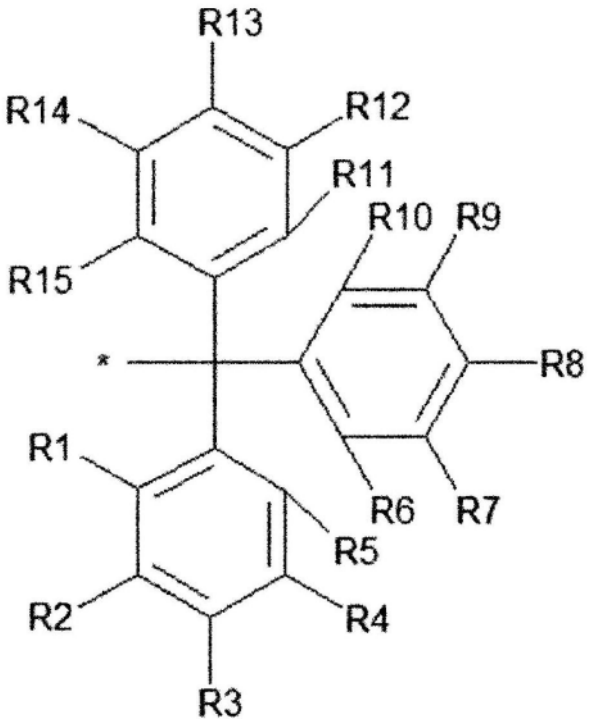


其中

R1至R10各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素;或

R1至R4和R7至R10各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素,且R5和R6一起形成-O-或-CH_2-CH_2-;

(4)具有Trt骨架的保护基



其中

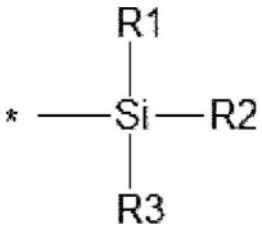
R1至R15各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素；

R1、R2和R4至R15各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素，且R3为甲基或甲氧基；

R1为Cl，且R2至R15各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素；或

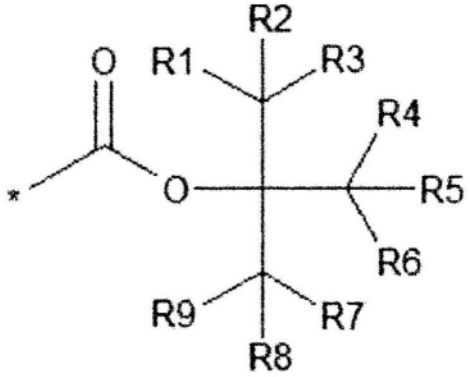
R1至R4和R7至R15各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素，且R5和R6一起形成-O-；

(5)具有甲硅烷基骨架的保护基：



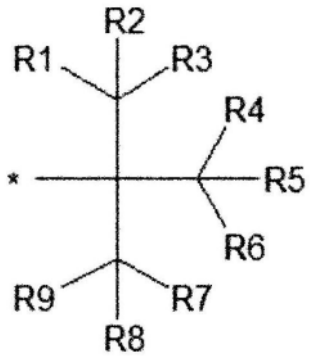
其中R1至R3各自独立地为烷基或芳基；

(6)具有Boc骨架的保护基：



其中R1至R9各自独立地为H、烷基或芳基；

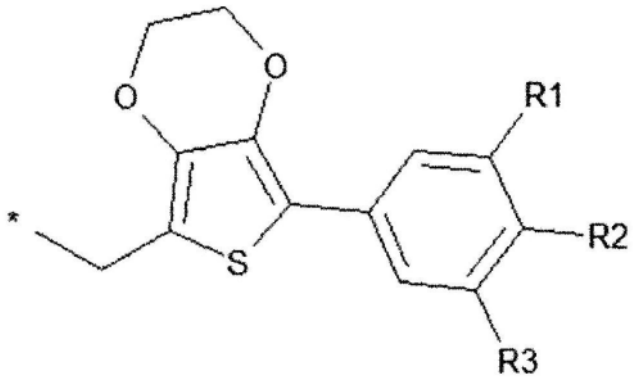
(7)具有tBu骨架的保护基：



其中

R1至R9各自独立地为H、烷基或芳基;和

(8)具有苯基-EDOTn骨架的保护基:



其中R1至R3各自独立地为H或甲氧基。

3.权利要求2的生产方法,其中肽生产是通过固相方法进行的。

4.权利要求3的生产方法,其进一步包括在步骤4)之前或之后,使用含有氟代醇的弱酸性溶液,从固相上切下步骤3)中获得的肽的步骤。

5.权利要求2的生产方法,其中肽生产是通过液相方法进行的。

6.权利要求1-5中任一项的生产方法,其中权利要求1的步骤4)或权利要求3的步骤3)进一步包含以下步骤:

通过使用碱以暴露其氨基,将新添加的Fmoc保护的氨基酸、新添加的Fmoc保护的氨基酸类似物或新添加的Fmoc保护的肽上具有Fmoc骨架的保护基脱保护,其中所述碱选自仲胺、具有脒骨架的碱和具有胍骨架的碱;和

通过进一步添加新的Fmoc保护的氨基酸、新的Fmoc保护的氨基酸类似物或新的Fmoc保护的肽,形成酰胺键,

并且其中这些步骤重复一次或多次。

7.权利要求1-5中任一项的生产方法,其中所制备的肽在其C末端侧包含含有一个反应位点的氨基酸残基或氨基酸类似物残基,并且在其N末端侧包含含有另一个反应位点的氨基酸残基、氨基酸类似物残基或羧酸类似物。

8.权利要求7的生产方法,其进一步包括使所述反应位点和所述另一反应位点键合以环化所述肽的步骤。

9.权利要求8的生产方法,其中具有所述另一反应位点的氨基酸残基、氨基酸类似物残基或羧酸类似物在N末端,且所述键合为酰胺键合。

10.权利要求8的生产方法,其中具有所述另一反应位点的氨基酸残基、氨基酸类似物残基或羧酸类似物在N末端,且所述键合为碳-碳键合。

11.权利要求1-5中任一项的生产方法,其中所述侧链保护基是在pH1至pH7范围内脱保护的保护基,或在10%或更低浓度的TFA中脱保护的保护基。

用于合成含有N-取代氨基酸的肽的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于合成肽的新方法,其允许在合成包含N-取代的氨基酸的肽中以高纯度和高合成效率进行合成。

背景技术

[0002] 肽是非常有价值的化学种类,并且已将40种或更多种类型的肽作为药物投放市场(NPL1)。其中,对于环肽和N-甲基化(或N-烷基化)的非天然肽,已预期改善膜渗透性以改善亲脂性,并改善代谢稳定性以获得对水解酶(水解酶)的抗性(NPL2)。最近,对药物样(药物样:优选地,它表明实现了膜渗透性和代谢稳定性特征二者)的环肽的研究正在发展,药物样是实现向细胞内转移和允许配制为口服剂的关键(NPL3和4)。此外,还公开了阐明药物样环肽所必需的条件的专利文献(PTL1),并且这些肽在药物开发中的重要性和认识正在增加。

[0003] 另一方面,合成包含许多非天然氨基酸(例如以N-烷基氨基酸为代表的氨基酸)的肽的方法的开发进展相对较窄。在大多数情况下,已将针对天然肽建立的技术直接应用于非天然肽。

[0004] Fmoc法和Boc法是广泛已知的肽合成法,并且关于这些方法的大多数发现已经从用于合成天然肽的方法的发展中获得。Fmoc基团对酸稳定;因此,当N-末端氨基被Fmoc基团保护时,其脱保护反应是使用碱例如DBU和哌啶进行的。因此,例如,可以通过酸脱保护的(可脱保护的)保护基团用作肽侧链官能团的保护基团,并且通过选择性地脱保护N-末端氨基来延长肽链。作为常用的保护基,叔丁基(tBu)、三苯甲基(Trt)和在三氟乙酸(TFA)水平上可被酸脱保护的这类基团可用于在Fmoc方法中保护氨基酸侧链,并且将肽从树脂上切割和侧链官能团的保护基脱保护的步骤可在与Boc方法相比更温和的条件下进行。

[0005] 但是,即使在通过Fmoc法的固相合成法中,该方法允许在相对温和的条件下从树脂上切割并将侧链官能团的保护基脱保护,在从树脂上切割或使用TFA将侧链官能团上的保护基脱保护的步骤期间,在合成N-烷基化肽中也已经揭示了以下问题。

[0006] 当通过通常的Fmoc方法合成肽时,通常使用TFA用于从树脂上切割和侧链官能团的保护基脱保护的步骤。在大多数情况下,使用90%TFA水溶液同时进行从树脂的切割反应和侧链官能团的脱保护反应。然而,已知在N-甲基化肽的情况下,特别是在具有连续N-甲基氨基酸的序列的肽的情况下,会发生副反应,其中经由噁唑鎓(oxazolonium)进行酸水解,并且肽链被切割(NPL5和6)。此外,已知在肽序列中包含具有β-羟基的氨基酸如丝氨酸和苏氨酸的肽的情况下,在这些使用TFA的步骤中,除了酸水解外,N-至O-酰基转移反应也可作为副反应进行,这导致形成缩酚肽(depsipeptide)(NPL7和8)。

[0007] 在使用酸的切割步骤和脱保护步骤中,正采取避免水解问题的措施,例如使用低浓度TFA溶液和控制短的反应时间。例如,根据Albericio等的报道,在名为NMe-IB-01212的肽的固相合成中,当在TFA-DCM(1:1)溶液中对N-甲基化环六肽中所包括的氨基上的Boc基团进行脱保护时,观察到N-Me位点处的肽降解。尽管已经进行了改进的尝试,以便通过使用

较低浓度的TFA并将反应时间减少到最短来避免降解,但尚未获得足够的改进(NPL9)。首先,在常规肽合成中广泛使用的保护基已经显示了这样的情况,其中使用低浓度TFA溶液的脱保护步骤导致侧链上的脱保护反应进行得非常缓慢或不进行,而肽从树脂上的切割反应以令人满意的速度进行。

[0008] 此外,为了防止通过与水解高度N-甲基化的肽相同的反应机理进行的N末端Ac-MePhe的切割,Fang等人使用TFA并将反应温度降低到4℃以脱保护Pbf基团,该基团是Arg侧链的保护基(NPL10)。但是,即使通过使用这种降低温度的方法,也难以完全预防Ac-MePhe切割,并且当所需产物的产生水平达到最大时,该方法只能停止反应。

[0009] 除了脱保护过程中的问题之外,在延伸步骤中的低反应性问题也是已知的。当N-甲基氨基酸到达新形成的酰胺键的N末端时,由于其仲胺的体积庞大,与随后的氨基酸的酰胺形成反应(延伸反应)可能不能充分进行(NPL2和5)。

[0010] 对于延伸步骤中的这个问题,已经采取了通过重复相同的反应条件两次或更多次来减少未反应位点的措施(重复两次的方法被称为双偶联)。此外,关于待缩合的氨基酸的活化,已经进行了努力以改进缩合效率,例如通过改变为高活性的酰基卤(NPL11)。然而,重复与双偶合相同的反应条件将使花费的时间和试剂成本加倍或更多;并且使用酰卤进行缩合将需要在使用时制备酰卤,并且还增加了在肽合成步骤期间所产生的酰卤是否可以稳定存在的无人关注的问题。此外,通过该反应产生的HCl和HF引起可能的问题关注,即脱保护反应可能无意地进行。

[0011] 已经尝试了其它用于改善延伸步骤中的低反应性的措施,例如通过减少树脂上的负载量以降低固相上肽链的密度和通过增加反应溶液的浓度来提高缩合效率(NPL9)。最近,人们已经努力通过经由微波辐射提高反应温度来改善缩合效率(NPL12和13)。

[0012] 然而,在N-甲基化肽合成中,没有关于待合成肽的纯度和产率降低的基本解决方案的报道,并且在一些情况下根本不能获得所需产物。

[0013] [现有技术参考文献]

[0014] [专利文献]

[0015] [PTL 1]WO 2013/100132 A1

[0016] [非专利文献]

[0017] [NPL 1]S.R.Gracia等人,Synthesis of chemically modified bioactive peptides:recent advances,challenges and developments for medicinal chemistry.Future Med.Chem.,2009,1,1289.

[0018] [NPL 2]J.Chatterjee等人,N-Methylation of peptides:A new perspective in medicinal chemistry.Acc.Chem.Res.,2008,41,1331.

[0019] [NPL 3]J.E.Bock等人,Getting in Shape:Controlling Peptide Bioactivity and Bioavailability Using Conformational Constraints.ACS Chem.Biol.,2013,8,488.

[0020] [NPL 4]K.Jpsephson等人,mRNAdisplay:from basic principles to macrocycledrug discovery.Drug Discovery Today,DOI:10.1016/j.drudis.2013.10.011

[0021] [NPL 5]M.Teixido等人,Solid-phase synthesis and characterization of N-

methyl-rich peptides.J.Peptide Res.,2005,65,153.

[0022] [NPL 6]J.Urban等人,Lability of N-alkylated peptides towards TFA cleavage.Int.J.Pept.Prot.Res.,1996,47,182.

[0023] [NPL 7]L.A.Carpino等人,Dramatically enhanced N→O acyl migration during the trifluoroacetic acid-based deprotection step in solid phase peptide synthesis.Tetrahedron Lett.,2005,46,1361.

[0024] [NPL 8]H.Eberhard等人,N→O-Acyl shift in Fmoc-based synthesis of phosphopeptides.Org.Biomol.Chem.,2008,6,1349.

[0025] [NPL 9]E.Marcucci等人,Solid-Phase Synthesis of NMe-IB-01212,aHighly N-Methylated Cyclic Peptide.Org.Lett.,2012,14,612.

[0026] [NPL 10]W.-J.Fang等人,Deletion of Ac-NMePhe[1] From[NMePhe[1]]arodyn Under Acidic Conditions,Part 1:Effects of Cleavage Conditions and N-Terminal Functionality.Peptide Science Vol.96,97

[0027] [NPL 11]L.A.Carpino等人,Stepwise Automated Solid Phase Synthesis of Naturally Occurring Peptaibols Using FMOC Amino Acid Fluorides.J.Org.Chem.,1995,60,405.

[0028] [NPL 12]H.Rodriguez等人,Aconvenient microwave-enhanced solid-phase synthesis of short chain N-methyl-rich peptides.J.Pept.Sci.,2010,16,136.

[0029] [NPL 13]R.Roodbeen等人,Microwave Heating in the Solid-Phase Synthesis of N-Methylated Peptides:When Is Room Temperature Better?Eur.J.Org.Chem.,2012,7106.

发明概述

[0030] [本发明要解决的问题]

[0031] 本发明人着眼于可以成为药物样肽的包含N-烷基化氨基酸的环肽,并研究了通过平行合成来合成具有此类特征的肽化合物的方法。结果,本发明人发现,当使用TFA的常规合成方法应用于可能成为药物样肽的包含N-烷基化氨基酸的环肽时,对于已知文献中描述的化合物所发现的上述问题显得突出,并可导致分离环肽失败。具体地,本发明人发现,在包含N-烷基化氨基酸的肽的情况下,难以获得期望的肽,原因在于,在酸性条件下使用TFA作为用于从固相上切断或用于侧链官能团的保护基脱保护的步骤来进行反应的期间,肽链被切断的副反应成为主要反应。本发明人进一步发现,当肽中包括具有β-羟基的氨基酸时,在使用TFA的酸性条件下,在反应过程中也进行N-至O-酰基转移反应,难以获得期望的肽。这些问题在上述已知文献的化合物中发现,但本发明人新发现在许多其它肽中类似地观察到这些问题。除了这些问题,本发明人还发现了以下问题,当在酸性条件下使用TFA使包含在其骨架中具有羟基(不一定在β位)的氨基酸的肽进行反应时,其羟基用TFA酯化。

[0032] 此外,本发明人发现,当考虑到可能成为药物样肽的包含N-烷基化氨基酸的肽合成的工业化时,不仅从脱保护反应或延伸反应本身而且从随后的后处理过程和大规模合成的观点看,常规的利用TFA的脱保护方法在实现工业化方面具有相当大的困难。例如,当通过缩合除去TFA/DCM溶液的溶剂时,TFA浓度随着缩合的进行而增加,并且在缩合的同时出

现诸如水解和N-至O-酰基转移的问题。这可能导致不能获得所需的化合物,或导致产量的显著降低。缩合步骤需要在低温下进行。此外,即使使用低浓度的TFA,也包括与靶分子相比大量过量的TFA;因此,为了通过中和TFA来停止反应,需要加入大量过量的碱,这导致大量过量的盐与所需的肽一起保留,这可能给纯化步骤带来麻烦。此外,尽管TFA本身是有效溶解肽的溶剂,但仅有较低浓度的TFA溶液,肽的溶解度将变低。关于溶解度,不仅在考虑工业化时,而且在一次处理许多不同的肽化合物的平行合成中,需要选择对一组肽具有高溶解度的溶剂。

[0033] 另外,本发明人着眼于通过减小侧链上具有携带保护基的官能团的Fmoc-氨基酸的保护基的空间大小来改善反应性,这迄今为止还没有进行过很大的努力。例如,由于苏氨酸(Thr)具有羟基,为了使随后的酰化反应选择性地在氨基上发生,因此用于羟基的保护基是必需的。然而,由于Thr在β位具有支链仲醇作为其侧链官能团,因此受保护Thr的缩合效率由于其体积庞大而相对较低。在肽合成中通常用于Thr的保护基包括乙酰基(Ac)、tBu基、Trt基、苄基(Bn)和t-叔丁基二甲基甲硅烷基(TBS)(Albert Isidro-Llobet等人,Amino Acid-Protecting Groups.Chem.Rev.,2009,109,2455.;Watanabe Chemical Industries,Ltd.Reagent Catalog,Amino acids&chiral building blocks to new medicine 2012-14)。然而,对于Trt基和TBS基,它们的大体积导致缩合效率降低。此外,即使在可用酸脱保护的tBu基的情况下,高TFA浓度的条件对于脱保护也是必需的;因此,在脱保护期间已经提到的问题变得显而易见。其它保护基不被认为是可以使用酸容易地除去的保护基。总之,有必要发现空间上足够小以便不降低缩合效率并且也可容易地被酸脱保护的保护基,所述酸可避免上述酸水解和N-至O-酰基转移的问题。这同样广泛适用于N-甲基丝氨酸(MeSer)的其它情况,所述N-甲基丝氨酸在β位不具有分支位点,但由于N-取代而具有较高的体积,以及适用于具有羟基作为其官能团的氨基酸。

[0034] 更具体地,本发明的目的是发现新的反应方法,该方法可减少副反应的问题,例如肽酸水解和N-至O-酰基转移,以及在使用TFA的脱保护步骤中羟基的TFA酯化,发现这些问题在包含N-取代氨基酸的肽的平行合成过程中变得显著,并且该方法还可以确保肽的溶解性。此外,本发明的目的是提供通过使用侧链官能团的适当保护基(从减少保护基的体积以改善延伸期间的低反应性的观点来看,为适当的保护基,并且在本发明的脱保护条件下是可脱保护的)以高纯度和高合成产量获得包含N-取代氨基酸的肽的方法。

[0035] 具体地,目的是在进行具有各种序列的含N-取代氨基酸的肽化合物的平行合成中:

[0036] (1)发现在酸加成期间(在从固相的切割反应期间和在侧链脱保护反应期间)抑制水解,特别是抑制源自N-取代的氨基的水解所需要的反应条件;

[0037] (2)发现在酸加成时能够进行实际后处理的反应条件;

[0038] (3)考虑非天然肽化合物的特征溶解性,发现包括溶剂的反应条件;和

[0039] (4)当非天然肽化合物包含官能团例如羟基时,抑制脱保护后的副反应(N-至O-酰基转移和羟基与反应试剂之间的副反应,例如,当使用TFA作为试剂时的TFA酰化反应)。

[0040] 另外,本发明的目的是发现对于氨基酸侧链中各种官能团而言满足上述四个条件的保护基。

[0041] 此外,考虑到包含N-取代氨基酸的肽化合物的工业生产,本发明的目的是找到适

用于特定序列的优化的生产方法。

[0042] [解决问题的方式]

[0043] 为了实现包含N-取代氨基酸的环肽的有效合成,本发明人发现了可解决除了当使用常规肽合成方法(所述常规肽合成方法使用TFA以便合成已知文献中描述的化合物)时观察到的问题之外的许多问题的新方法,例如通过实现水解和N-至O-酰基转移进展的抑制、实际后处理方法的建立、当存在羟基时TFA酯形成的抑制、以及可确保肽溶解度的溶剂的选择,这些问题通过通常进行的改进方法(例如降低TFA浓度的方法或降低反应温度的方法)不能充分解决。在新方法中,根本不使用常规肽合成中使用的TFA,并且本发明人成功地获得了具有高选择性的靶分子。

[0044] 在本发明的一个实施方案中,在从固相切割的步骤中不使用TFA,而使用较弱的酸,例如2,2,2-三氟乙醇(TFE)或六氟-2-丙醇(HFIP)。另外,在本发明的另一个实施方案中,使用在切割步骤中未脱保护的用于侧链官能团的保护基。在使用比TFA弱的酸如TFE或HFIP的切割步骤中,副反应如酰胺键水解的速率足够低,这与使用TFA的情况不同,即使在反应后的浓缩步骤中也是如此。特别是,当使用比TFA弱的酸如TFE或HFIP时,即使对于包含高度N-取代的氨基酸的肽和对副反应敏感的环肽,副反应的速率也是低的。因此,可以得到所需的化合物作为主要产物。在本发明的另一个实施方案中,在切割步骤中使用满足以下条件的试剂:(1)从固相切割的反应平稳进行,同时肽副反应(如水解)被抑制;(2)副反应的速率足够慢,即使进行后处理如浓缩时也是如此;(3)对于高度脂溶性非天然肽也确保了高溶解度;和(4)在保留侧链官能团的保护基的同时,可以裂解。通过使用满足这些条件的试剂,包含许多N-取代氨基酸的肽的合成,特别是包含许多N-烷基基团的药物样肽的合成成为可能。满足这些条件的试剂不仅可在平行合成期间使用,而且还可在工业上合成特定肽时使用。

[0045] 本发明的实施方案提供了肽合成方法,其可以抑制水解和N-至O-酰基转移,并且可以将侧链保护基脱保护,从而促进主要反应,即所需的脱保护反应。对于水解和N-至O-酰基转移的进行,单独的酸强度(质子浓度)可能是重要的。并且,本发明人发现,通过使用具有弱酸性的弱酸代替强酸如TFA,可以抑制水解和N-至O-酰基转移的进行。此外,为了进行所需的脱保护,除了酸强度(质子浓度)之外,将作为阳离子种类(碳阳离子或氧鎓阳离子)的保护基从被保护的官能团上解离的步骤可能是重要的。因此,作为促进作为阳离子种类的保护基的解离步骤的溶剂,本发明人发现,使用具有电离能力的溶剂可以促进上述弱酸的脱保护。

[0046] 另外,为了建立用于合成PTL1中所述的药物样肽的高效方法,本发明人发现了在中性条件下具有小离子化程度侧链的氨基酸侧链官能团的保护基,该保护基在将肽从树脂上切割时所用的弱酸性条件下不脱保护,但在上述弱酸性条件下可以脱保护,并且该官能团是例如羟基,其是氨基酸如Ser和Thr的侧链官能团;烷基醇基团,其在侧链中具有羟基;酚基,其是氨基酸如Tyr的侧链官能团;咪唑基,其是氨基酸如His的侧链官能团;侧链羧酸,其是氨基酸如Asp和Glu的侧链官能团;和肽或氨基酸的主链羧酸。

[0047] 此外,本发明人发现了,对于在延伸反应期间反应性低的氨基酸如β-羟基-α-氨基酸(例如Thr、Ser及其衍生物)具有保护基的情况,在上述弱酸条件下可脱保护并可在延伸反应期间改善低反应性的保护基。

[0048] 更具体地,本发明是:

[0049] [1]生产包含至少一个N-取代的氨基酸或N-取代的氨基酸类似物的肽的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0050] 1)制备包含以下官能团i)和ii)中至少一个的氨基酸(Fmoc保护的氨基酸)、包含以下i)和ii)中至少一个的氨基酸类似物(Fmoc保护的氨基酸类似物)、或包含Fmoc保护的氨基酸和Fmoc保护的氨基酸类似物之一或二者的肽(Fmoc保护的肽):

[0051] i)被至少一个具有Fmoc骨架的保护基保护的主链氨基;和

[0052] ii)至少一个游离羧酸基或活性酯化羧酸基;

[0053] 2)将步骤1)中制备的Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽支持到固相上;

[0054] 3)通过使用碱以暴露其氨基,将支持在固相上的Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽的具有Fmoc骨架的保护基脱保护;

[0055] 4)通过添加新的Fmoc保护的氨基酸、新的Fmoc保护的氨基酸类似物或新的Fmoc保护的肽,形成酰胺键;和

[0056] 5)在比TFA弱的酸性条件下,将步骤4)中获得的肽从固相切下;

[0057] [2][1]的生产方法,其中,构成步骤4)中获得的肽的氨基酸或氨基酸类似物的至少一个侧链被保护基保护,所述保护基在碱性条件下不脱保护,但被第一酸脱保护,并且其中,所述方法进一步包括在步骤5)之前或之后,使用所述第一酸使所述保护基脱保护的步骤;和

[0058] 其中在步骤5)中,使用第二酸将所述肽切下,和

[0059] 其中所述第一酸和所述第二酸均为比TFA弱的酸,并且所述第一酸的酸度高于所述第二酸的酸度;

[0060] [3]生产包含至少一个N-取代的氨基酸或N-取代的氨基酸类似物的肽的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0061] 1)制备包含以下官能团i)和ii)中至少一个的氨基酸(Fmoc保护的氨基酸)、包含以下官能团i)和ii)中至少一个的氨基酸类似物(Fmoc保护的氨基酸类似物)、或包含Fmoc保护的氨基酸和Fmoc保护的氨基酸类似物之一或二者的肽(Fmoc保护的肽):

[0062] i)被至少一个具有Fmoc骨架的保护基保护的主链氨基;和

[0063] ii)至少一个游离羧酸基或活性酯化羧酸基;

[0064] 2)通过使用碱以暴露其氨基,将Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽的具有Fmoc骨架的保护基脱保护;

[0065] 3)通过添加新的Fmoc保护的氨基酸、新的Fmoc保护的氨基酸类似物或新的Fmoc保护的肽形成酰胺键,其中构成在该步骤中获得的肽的氨基酸或氨基酸类似物的至少一个侧链具有保护基,所述保护基在碱性条件下不脱保护,并且在具有比TFA弱的酸性的条件下脱保护;和

[0066] 4)在具有比TFA弱的酸性的条件下,将所述侧链的保护基脱保护;

[0067] [4][3]的生产方法,其中肽生产是通过固相方法进行的;

[0068] [5][4]的生产方法,其进一步包括在步骤4)之前或之后,在比步骤4)中使用的弱酸性条件更弱的条件下,从固相上切下步骤3)中获得的肽的步骤;

[0069] [6][3]的生产方法,其中肽制备是通过液相方法进行的;

[0070] [7][1]至[6]中任何一项的生产方法,其中[1]的步骤4)或[3]的步骤3)进一步包含以下步骤:

[0071] 通过使用碱以暴露其氨基,将新添加的Fmoc保护的氨基酸、新添加的Fmoc保护的氨基酸类似物或新添加的Fmoc保护的肽上具有Fmoc骨架的保护基脱保护;

[0072] 通过进一步添加新的Fmoc保护的氨基酸、新的Fmoc保护的氨基酸类似物或新的Fmoc保护的肽,形成酰胺键,

[0073] 并且其中这些步骤重复一次或多次;

[0074] [8][1]至[7]中任一项的生产方法,其中所制备的肽在其C末端侧包含含有一个反应位点的氨基酸残基或氨基酸类似物残基,并且在其N末端侧包含含有其他反应位点的氨基酸残基、氨基酸类似物残基或羧酸类似物;

[0075] [9][8]的生产方法,其进一步包括使所述反应位点和所述其他反应位点键合以环化所述肽的步骤;

[0076] [10][9]的生产方法,其中具有所述其他反应位点的氨基酸残基、氨基酸类似物残基或羧酸类似物在N末端,且所述键合为酰胺键合。

[0077] [11][9]的生产方法,其中具有所述其他反应位点的氨基酸残基,氨基酸类似物残基或羧酸类似物在N末端,且所述键合为碳-碳键合;

[0078] [12][1]至[11]中任一项的生产方法,其中在具有比TFA弱的酸性条件下进行的步骤是使用弱酸性溶液进行的,该弱酸性溶液包含在具有5到14的水性pKa值且其电离能力值Y_{OTs}为正的溶剂中的具有0到9的水性pKa值的弱酸;

[0079] [13][12]的生产方法,其中所述溶剂是氟代醇;

[0080] [14][13]的生产方法,其中所述氟代醇是TFE或HFIP。

[0081] [15][2]-[14]中任一项的生产方法,其中所述侧链保护基是在pH1至pH7范围内脱保护的保护基,或在10%或更低浓度的TFA中脱保护的保护基;和

[0082] [16][2]-[15]中任一项的生产方法,其中,所述侧链保护基团选自以下a)-d):

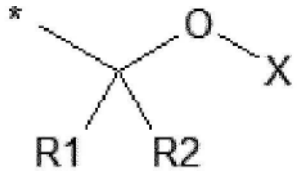
[0083] a)当侧链保护基是用于Ser、Thr、Hyp(羟基脯氨酸)及其衍生物的侧链羟基的保护基时,选自由以下通式表示的MOM骨架、Bn骨架、Dpm骨架、Trt骨架、甲硅烷基骨架和Boc骨架中的任何一种保护基;

[0084] b)当侧链保护基是用于Thr及其衍生物的侧链羟基的保护基时,选自由以下通式表示的MOM骨架、Bn骨架、Dpm骨架、Trt骨架、甲硅烷基骨架、Boc骨架和tBu骨架中的任何一种保护基;

[0085] c)当侧链保护基是用于His及其衍生物的侧链咪唑环的保护基团时,选自由以下通式表示的MOM骨架、Bn骨架和Trt骨架中的任何一种保护基;

[0086] d)当侧链保护基是用于Asp、Glu及其衍生物的侧链羧酸基团的保护基时,选自由以下通式表示的MOM骨架、Bn骨架、Dpm骨架、Trt骨架、tBu骨架、苯基-EDOTn骨架,和原酸酯骨架(其中待保护的羧酸基团的碳原子被三个烷氧基取代)中的任何一种保护基:

[0087] <具有MOM骨架的保护基>

[0088] 

[0089] (其中

[0090] R1为H,R2为H,以及X为甲基、苄基、4-甲氧基苄基、2,4-二甲氧基苄基、3,4-二甲氧基苄基或2-三甲基甲硅烷基乙基;

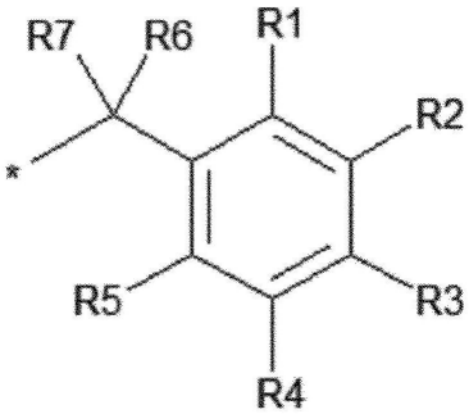
[0091] R1为甲基,R2为H,X为乙基;

[0092] R1、R2和R3均为甲基;或

[0093] R1和X一起形成-CH_2-CH_2-CH_2-或-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-,以及R2是H,

[0094] 其中当R1、R2和X中任一个为甲基或乙基时,这些基团可进一步被烷基、苄基或芳基取代);

[0095] <具有Bn骨架的保护基>

[0096] 

[0097] (其中

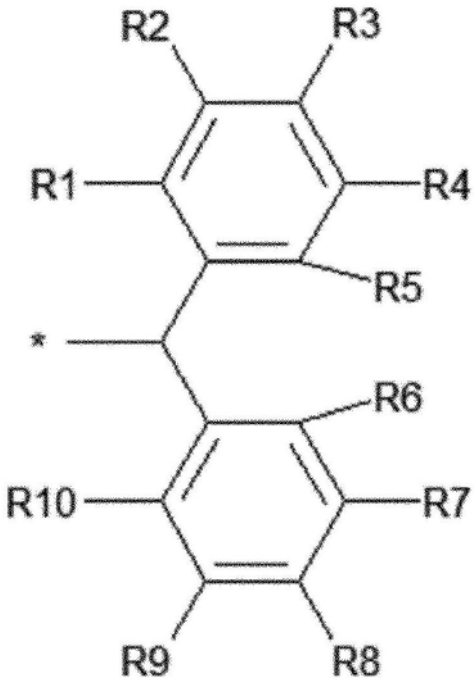
[0098] R1至R5各自独立地为H、烷基、芳基或卤素,R6和R7为烷基;

[0099] R1、R2、R4和R5各自独立地为H、烷基、芳基或卤素,R3为甲氧基,R6和R7为H;

[0100] R1和R3为甲氧基,R2、R4和R5各自独立地为H、烷基、芳基或卤素,R6和R7为H;或

[0101] R1、R4和R5各自独立地为H、烷基、芳基或卤素,且R2和R3一起形成-O-CH_2-O-);

[0102] <具有Dpm骨架的保护基>

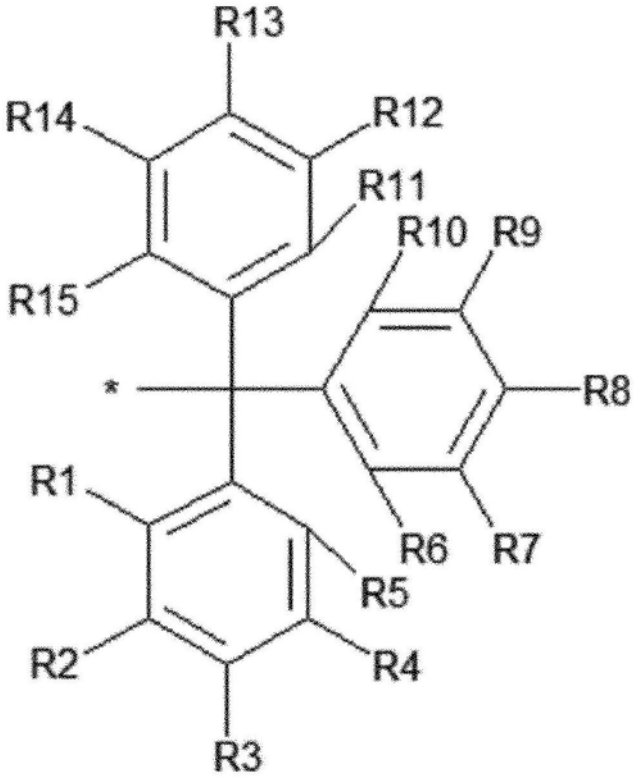
[0103] 

[0104] (其中

[0105] R1至R10各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素;或

[0106] R1至R4和R7至R10各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素,且R5和R6一起形成-O-或-CH_2-CH_2-);

[0107] <具有Trt骨架的保护基>

[0108] 

[0109] (其中

[0110] R1至R15各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素;

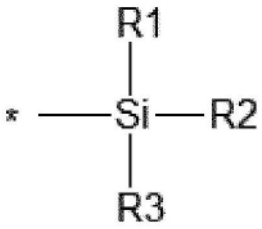
[0111] R1、R2和R4至R15各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素,且R3为甲基或甲氧

基;

[0112] R1为Cl,且R2至R15各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素;或

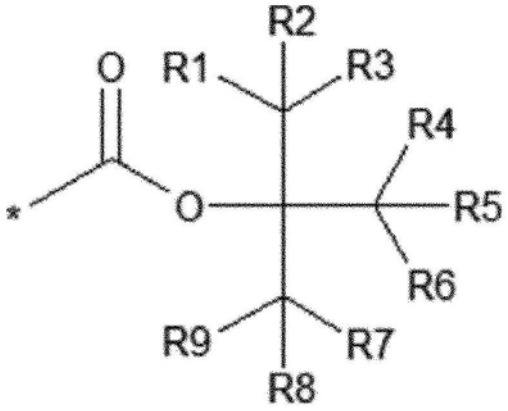
[0113] R1至R4和R7至R15各自独立地为H、烷基、芳基、烷氧基或卤素,且R5和R6一起形成-O-);

[0114] <具有甲硅烷基骨架的保护基>

[0115] 

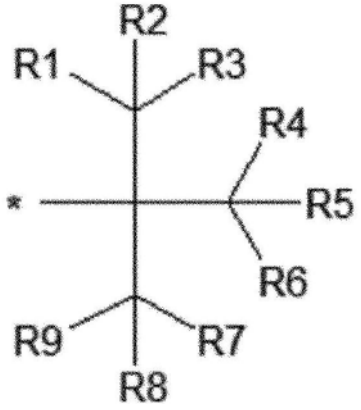
[0116] (其中R1至R3各自独立地为烷基或芳基);

[0117] <具有Boc骨架的保护基>

[0118] 

[0119] (其中R1至R9各自独立地为H、烷基或芳基);

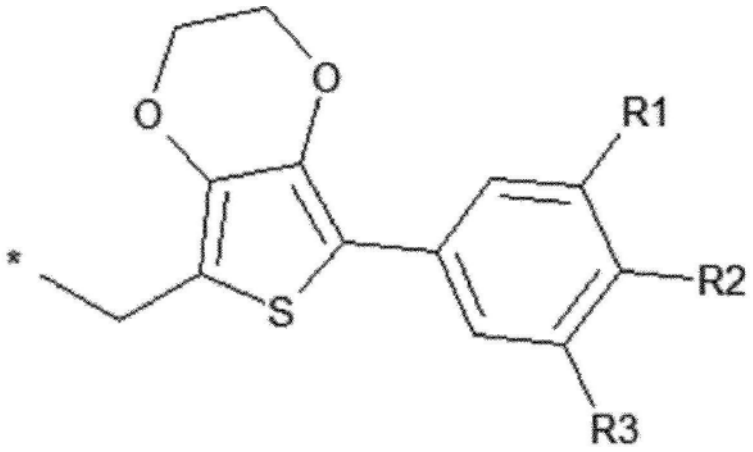
[0120] <具有tBu骨架的保护基>

[0121] 

[0122] (其中

[0123] R1至R9各自独立地为H、烷基或芳基);和

[0124] <具有苯基-EDOTn骨架的保护基>

[0125] 

[0126] (其中R1至R3各自独立地为H或甲氧基)。

[0127] 发明效果

[0128] 通过本发明,可以以高合成效率和高纯度获得包含N-取代氨基酸的肽。

[0129] 例如,在肽序列包含在其侧链上具有保护基的氨基酸的情况下,

[0130] (1)本发明发现的弱于TFA的酸和显示电离能力的溶剂的组合可以运行脱保护,并同时最小化肽链的酸水解,和最小化N-至O-酰基转移,TFA酯化,和这种情况可发生在包含β-羟基-α-氨基酸(例如Ser、Thr及其衍生物)的序列中,和

[0131] (2)当通过酰胺键形成反应延长氨基酸时,与当氨基酸具有用于一般肽合成的保护基时相比,可以提高反应速率和反应效率。

附图简述

[0132] 图1显示了在其序列中包含N-甲基氨基酸的环肽的基本合成路线。

[0133] 图2显示了通过LCMS分析,在使用0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)的脱保护条件下,所需肽(化合物131)、靶分子的水解产物(TM+H_2O)和靶分子通过HFIP的溶剂解产物(TM+HFIP)的检测结果。

[0134] 图3显示了通过LCMS分析,在使用0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)的脱保护条件下,所需肽(化合物131)、靶分子的水解产物(TM+H_2O)和靶分子通过HFIP的溶剂解产物(TM+HFIP)的检测结果。

[0135] 图4显示了通过LCMS分析,在使用0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)的脱保护条件下,所需肽(化合物133)和所需产物的N-至O-酰基转移产物的检测结果。

[0136] 图5显示了通过LCMS分析,在使用0.05M草酸/HFIP溶液(2%TIPS)的脱保护条件下,所需肽(化合物131)、靶分子的水解产物(TM+H_2O)和靶分子通过HFIP的溶剂解产物(TM+HFIP)的检测结果。

[0137] 图6显示了通过LCMS分析,在使用0.05M马来酸/HFIP溶液(2%TIPS)的脱保护条件下,所需肽(化合物131)、靶分子的水解产物(TM+H_2O)和靶分子通过HFIP的溶剂解产物(TM+HFIP)的检测结果。

[0138] 图7显示了通过LCMS分析,在使用0.05M草酸/HFIP溶液(2%TIPS)的脱保护条件下,所需肽(化合物133)和靶分子的N-至O-酰基转移产物的检测结果。

[0139] 图8显示了通过LCMS分析,在使用0.05M马来酸/HFIP溶液(2%TIPS)的脱保护条件

下,所需肽(化合物133)和靶分子的N-至O-酰基转移产物的检测结果。

[0140] 图9显示了通过LCMS分析,在使用0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP(2%TIPS)的脱保护条件下,所需肽(化合物137)和靶分子通过HFIP的溶剂解产物(其中任何一个酰胺键已被HFIP溶剂解的产物)的检测结果。

[0141] 图10显示了通过LCMS分析,在使用0.05M四甲基硫酸氢铵/TFE(2%TIPS)的脱保护条件下,所需肽(化合物137)和靶分子通过TFE的溶剂解产物(其中任何一个酰胺键已被TFE溶剂解的产物)的检测结果。

[0142] 图11显示了当使用0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)作为脱保护条件,并在该溶液中加入碱(DIPEA)使反应停止时,通过LCMS分析的所需肽(化合物135)的检测结果。

[0143] 图12显示了当使用0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)作为脱保护条件,并在该溶液中加入碱(DIPEA)使反应停止时,通过LCMS分析的所需肽(化合物133)的检测结果。

[0144] 图13显示了当添加Fmoc-Thr(Trt)-OH时,通过LCMS分析,所需肽(化合物112)和从所需肽中除去Thr的产物(化合物113)的检测结果。

[0145] 图14显示了当加入Fmoc-Thr(THP)-OH时,通过LCMS分析,所需肽(化合物114)的检测结果。没有检测到从所需肽(化合物114)中缺失Thr的产物(化合物113)。

[0146] 图15显示了当使用Fmoc-MeSer(DMT)-OH.0.75DIPEA进行合成时,通过LCMS分析,所需肽(化合物115)和从所需肽中缺失MeSer的产物(化合物116)的检测结果。

[0147] 图16显示了当使用Fmoc-MeSer(THP)-OH(化合物6)进行合成时,通过LCMS分析,所需肽(化合物115)和从所需肽中缺失MeSer的产物(化合物116)的检测结果。

[0148] 图17显示了在使用5%TFA/DCE(5%TIPS)的脱保护条件下,通过LCMS分析,所需肽(化合物131)和靶分子的水解产物(TM+H_2O)的检测结果。

[0149] 图18显示了通过LCMS分析,在使用5%TFA/DCE(5%TIPS)脱保护条件下,所需肽(化合物133)、靶分子的N-至O-酰基转移产物、其中靶分子的一个羟基被TFA酯化的化合物、和其中靶分子的两个羟基被TFA酯化的化合物的检测结果。

[0150] 图19显示了通过LCMS分析,在使用5%TFA/DCE(5%TIPS)(0℃)脱保护条件下,所需肽(化合物133)、靶分子的N-至O-酰基转移产物、其中靶分子的一个羟基被TFA酯化的化合物、和其中靶分子的两个羟基被TFA酯化的化合物的检测结果。

[0151] 图20显示了通过LCMS分析,在使用5%TFA/DCE(5%TIPS)(25℃)脱保护条件下,所需肽(化合物133)、靶分子的N-至O-酰基转移产物、其中靶分子的一个羟基被TFA酯化的化合物、和其中靶分子的两个羟基被TFA酯化的化合物的检测结果。

[0152] 图21显示了包括液相中的延伸反应的合成方法。

[0153] 实施发明的方式

[0154] 在某些实施方案中,本发明涉及生产包含至少一个N-取代的氨基酸或N-取代的氨基酸类似物的肽的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0155] 1)制备具有以下官能团i)和ii)中至少一个的氨基酸(Fmoc保护的氨基酸)、具有以下i)和ii)中至少一个的氨基酸类似物(Fmoc保护的氨基酸类似物)、或包含Fmoc保护的氨基酸和Fmoc保护的氨基酸类似物之一或二者的肽(Fmoc保护的肽):

[0156] i)被至少一个具有Fmoc骨架的保护基保护的主链氨基;和

[0157] ii)至少一个游离羧酸基或活性酯化羧酸基;

[0158] 2)将步骤1)中制备的Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽支持到固相上;

[0159] 3)通过使用碱以暴露其氨基,将支持在固相上的Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽的具有Fmoc骨架的保护基脱保护;

[0160] 4)通过添加新的Fmoc保护的氨基酸、新的Fmoc保护的氨基酸类似物或新的Fmoc保护的肽,形成酰胺键;和

[0161] 5)在比TFA弱的酸性条件下,将步骤4)中获得的肽从固相切下。

[0162] 在另一个实施方案中,本发明涉及生产包含至少一个N-取代的氨基酸或N-取代的氨基酸类似物的肽的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0163] 1)制备具有以下官能团i)和ii)中至少一个的氨基酸(Fmoc保护的氨基酸)、具有以下官能团i)和ii)中至少一个的氨基酸类似物(Fmoc保护的氨基酸类似物)、或包含Fmoc保护的氨基酸和Fmoc保护的氨基酸类似物之一或二者的肽(Fmoc保护的肽):

[0164] i)被至少一个具有Fmoc骨架的保护基保护的主链氨基;和

[0165] ii)至少一个游离羧酸基或活性酯化羧酸基;

[0166] 2)通过使用碱以暴露其氨基,将Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽的具有Fmoc骨架的保护基脱保护;

[0167] 3)通过添加新的Fmoc保护的氨基酸、新的Fmoc保护的氨基酸类似物或新的Fmoc保护的肽,形成酰胺键,其中构成在该步骤中获得的肽的氨基酸或氨基酸类似物的至少一个侧链具有保护基,所述保护基在碱性条件下不脱保护,并且在具有比TFA弱的酸性的条件下脱保护;和

[0168] 4)在具有比TFA弱的酸性的条件下,将所述侧链的保护基脱保护;

[0169] 上述肽的生产可以通过固相法或液相法进行。

[0170] 本发明中的“肽”,只要是由氨基酸和/或氨基酸类似物的酰胺键合或酯键合形成的肽,就没有特别限定,优选5～30个残基的肽,更优选7～15个残基的肽,甚至更优选9～13个残基的肽。本发明中合成的肽在单个肽中包含至少一个或多个已被N-取代的氨基酸或氨基酸类似物(也称为N-取代的氨基酸),优选包含两个或更多个,更优选三个或更多个,甚至更优选五个或更多个N-取代的氨基酸。这些N-取代的氨基酸可以连续或非连续地存在于肽中。

[0171] 本发明中的肽可以是线性肽或环状肽,优选环状肽。

[0172] 本发明中的“环状肽”可以通过按照本发明的方法合成线性肽,然后将其环化而获得。环化可以是以任何形式,例如通过碳-氮键合如酰胺键合的环化、通过碳-氧键合如酯键合或醚键合的环化、通过碳-硫键合如硫醚键合的环化、通过碳-碳键合的环化或通过构建杂环的环化。虽然没有特别限定,但优选通过诸如碳-碳键合或酰胺键合的共价键合进行环化,并且特别优选通过由侧链羧酸基和N末端主链氨基形成的酰胺键合进行环化。环化中使用的羧酸基、氨基等的位置可以在主链上或在侧链上,并且不特别限定,只要它们在可能环化的位置处即可。

[0173] 本发明中的“N-取代的氨基酸”是指后面所述的“氨基酸”或“氨基酸类似物”的主

链氨基被N-取代的氨基酸或氨基酸类似物,优选为N-烷基化(例如N-甲基化)的氨基酸或氨基酸类似物。N-取代的氨基酸的具体实例包括其中主链氨基为NHR基团的氨基酸或氨基酸类似物,其中R为任选取代的烷基、任选取代的烯基、任选取代的炔基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、任选取代的芳烷基或任选取代的环烷基,或者备选地,其中与N原子键合的碳原子与α位碳原子形成环的那些,例如脯氨酸。对每个任选取代的基团的取代基没有特别限制,并且实例包括卤素基团、醚基团和羟基。

[0174] 具体地,对于这种N-取代的氨基酸,优选使用烷基、芳烷基、环烷基等。

[0175] 本发明中的"氨基酸"是α-、β-和γ-氨基酸,并且不限于天然氨基酸,可以是非天然氨基酸。(本发明中,"天然氨基酸"是指蛋白质中所含的20种氨基酸。具体地,它们是指Gly、Ala、Ser、Thr、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、His、Glu、Asp、Gln、Asn、Cys、Met、Lys、Arg和Pro。)在α-氨基酸的情况下,它们可以是L-氨基酸或D-氨基酸,或者也可以是α,α-二烷基氨基酸。氨基酸侧链的选择没有特别限制,但实例包括氢原子、烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基和环烷基。氨基酸侧链可分别与取代基附接,并且取代基自由地选自任何官能团,包括例如N原子、O原子、S原子、B原子、Si原子或P原子。取代基的数目没有特别限制,并且氨基酸侧链可以具有一个或两个或更多个取代基。

[0176] 本发明中的术语"氨基酸类似物"优选指α-羟基羧酸。与氨基酸一样,α-羟基羧酸的侧链也没有特别限制,其实例包括氢原子、烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基和环烷基。α-羟基羧酸的立体结构可以是与氨基酸的L-或D-形式相对应的那些。侧链没有特别限制,并且可以从携带例如N原子、O原子、S原子、B原子、Si原子或P原子的任意官能团中自由选择。它们可以具有一个或两个或更多个取代基,并且取代基的数目没有特别限制。例如,它们可以具有S原子,并且还可以具有诸如氨基或卤素基团的官能团。与α-氨基酸的情况类似,在β-和γ-氨基酸的情况下,也接受任意立体构型,并且对其侧链的选择也没有特别限制。

[0177] 构成本发明中合成的肽的"氨基酸"或"氨基酸类似物"包括所有它们各自相应的同位素。"氨基酸"或"氨基酸类似物"中的同位素是指其中至少一个原子被相同原子序数(质子数相同)和不同质量数(质子数和中子数的总和不同)的原子取代的同位素。构成本发明的肽化合物的"氨基酸"或"氨基酸类似物"中所含的同位素的实例包括氢原子、碳原子、氮原子、氧原子、磷原子、硫原子、氟原子和氯原子,具体实例包括^{2}H、^{3}H、^{13}C、^{14}C、^{15}N、^{17}O、^{18}O、^{31}P、^{32}P、^{35}S、^{18}F和^{36}Cl。

[0178] 氨基酸或氨基酸类似物可以具有一个或两个或更多个取代基。这种取代基的实例包括,衍生自O原子、N原子、S原子、B原子、P原子、Si原子、和卤素原子的那些取代基。

[0179] 卤素衍生的取代基的实例包括氟(-F)、氯(-Cl)、溴(-Br)和碘(-I)。

[0180] O原子衍生的取代基的实例包括羟基(-OH)、氧基(-OR)、羰基(-C=O-R)、羧基(-CO_2H)、氧基羰基(-C=O-OR)、羰氧基(-O-C=O-R)、硫代羰基(-C=O-SR)、羰硫基(-S-C=O-R)、氨基羰基(-C=O-NHR)、羰基氨基(-NH-C=O-R)、氧基羰基氨基(-NH-C=O-OR)、磺酰基氨基(-NH-SO_2-R)、氨基磺酰基(-SO_2-NHR)、氨磺酰基氨基(-NH-SO_2-NHR)、硫代羧基(-C(=O)-SH)和羧基羰基(-C(=O)-CO_2H)。

[0181] 氧基(-OR)的实例包括烷氧基、环烷氧基、烯氧基、炔氧基、芳氧基、杂芳氧基和芳烷氧基。

[0182] 羰基(-C=O-R)的实例包括甲酰基(-C=O-H)、烷基羰基、环烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、芳基羰基、杂芳基羰基和芳烷基羰基。

[0183] 氧基羰基(-C=O-OR)的实例包括烷氧基羰基、环烷氧基羰基、烯氧基羰基、炔氧基羰基、芳氧基羰基、杂芳氧基羰基和芳烷氧基羰基。

[0184] (-C=O-OR)

[0185] 羰氧基(-O-C=O-R)的实例包括烷基羰氧基、环烷基羰氧基、烯基羰氧基、炔基羰氧基、芳基羰氧基、杂芳基羰氧基和芳烷基羰氧基。

[0186] 硫代羰基(-C=O-SR)的实例包括烷基硫代羰基、环烷基硫代羰基、烯基硫代羰基、炔基硫代羰基、芳基硫代羰基、杂芳基硫代羰基和芳烷基硫代羰基。

[0187] 羰基硫基(-S-C=O-R)的实例包括烷基羰基硫基、环烷基羰基硫基、烯基羰基硫基、炔基羰基硫基、芳基羰基硫基、杂芳基羰基硫基和芳烷基羰基硫基。

[0188] 氨基羰基(-C=O-NHR)的实例包括烷基氨基羰基、环烷基氨基羰基、烯基氨基羰基、炔基氨基羰基、芳基氨基羰基、杂芳基氨基羰基和芳烷基氨基羰基。另外的实例包括通过进一步将与-C=O-NHR中的N原子键合的H原子取代为烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基而产生的化合物。

[0189] 羰基氨基(-NH-C=O-R)的实例包括烷基羰基氨基、环烷基羰基氨基、烯基羰基氨基、炔基羰基氨基、芳基羰基氨基、杂芳基羰基氨基和芳烷基羰基氨基。另外的实例包括通过进一步将与-NH-C=O-R中的N原子键合的H原子取代为烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基而产生的化合物。

[0190] 氧基羰基氨基(-NH-C=O-OR)的实例包括烷氧基羰基氨基、环烷氧基羰基氨基、烯氧基羰基氨基、炔氧基羰基氨基、芳氧基羰基氨基、杂芳氧基羰基氨基和芳烷氧基羰基氨基。另外的实例包括通过进一步将与-NH-C=O-OR中的N原子键合的H原子取代为烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基而产生的化合物。

[0191] 磺酰基氨基(-NH-SO_2-R)的实例包括烷基磺酰基氨基、环烷基磺酰基氨基、烯基磺酰基氨基、炔基磺酰基氨基、芳基磺酰基氨基、杂芳基磺酰基氨基和芳烷基磺酰基氨基。另外的实例包括通过进一步将与-NH-SO_2-R中的N原子键合的H原子取代为烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基而产生的化合物。

[0192] 氨基磺酰基(-SO_2-NHR)的实例包括烷基氨基磺酰基、环烷基氨基磺酰基、烯基氨基磺酰基、炔基氨基磺酰基、芳基氨基磺酰基、杂芳基氨基磺酰基和芳烷基氨基磺酰基。另外的实例包括通过进一步将与-SO_2-NHR中的N原子键合的H原子取代为烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基而产生的化合物。

[0193] 氨磺酰基氨基(-NH-SO_2-NHR)的实例包括烷基氨磺酰基氨基、环烷基氨磺酰基氨基、烯基氨磺酰基氨基、炔基氨磺酰基氨基、芳基氨磺酰基氨基、杂芳基氨磺酰基氨基和芳烷基氨磺酰基氨基。另外,-NH-SO_2-NHR中与N原子键合的两个H原子可被取代基取代,所述取代基独立选自由烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基组成的组;或者这两个取代基可以形成环。

[0194] 对于S原子衍生的取代基,实例包括硫醇(-SH)、硫代(-S-R)、亚磺酰基(-S=O-R)、磺酰基(-$S(O)_2$-R)和磺基(-SO_3H)。

[0195] 硫代(-S-R)的实例选自烷硫基、环烷硫基、烯硫基、炔硫基、芳硫基、杂芳硫基、芳

烷硫基等。

[0196] 亚磺酰基(-S=O-R)的实例包括烷基亚磺酰基、环烷基亚磺酰基、烯基亚磺酰基、炔基亚磺酰基、芳基亚磺酰基、杂芳基亚磺酰基和芳烷基亚磺酰基。

[0197] 磺酰基(-$S(O)_2$-R)的实例包括烷基磺酰基、环烷基磺酰基、烯基磺酰基、炔基磺酰基、芳基磺酰基、杂芳基磺酰基和芳烷基磺酰基。

[0198] 对于N原子衍生的取代基,实例包括叠氮化物(-N_3,也称为“叠氮基”)、氰基(-CN)、伯氨基(-NH_2)、仲氨基(-NH-R)、叔氨基(-NR(R'))、脒基(-C(=NH)-NH_2)、取代的脒基(-C(=NR)-NR'R")、胍基(-NH-C(=NH)-NH_2)、取代的胍基(-NR-C(=NR"')-NR'R")和氨基羰基氨基(-NR-CO-NR'R")。

[0199] 仲氨基(-NH-R)的实例包括烷基氨基、环烷基氨基、烯基氨基、炔基氨基、芳基氨基、杂芳基氨基和芳烷基氨基。

[0200] 叔氨基(-NR(R'))的实例包括具有任意两个取代基的氨基,如烷基(芳烷基)氨基,每个取代基独立地选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基;并且这两个任意的取代基可以形成环。

[0201] 取代的脒基(-C(=NR)-NR'R")的实例包括这样的基团,其中N原子上的三个取代基R、R'和R"各自独立地选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基;并且这样的实例包括烷基(芳烷基)(芳基)脒基。

[0202] 取代的胍基(-NR-C(=NR"')-NR'R")的实例包括这样的基团,其中R、R'、R"和R"'各自独立地选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基;或其中它们形成环的基团。

[0203] 氨基羰基氨基(-NR-CO-NR'R")的实例包括其中R、R'和R"各自独立地选自氢原子、烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基的基团;或其中它们形成环的基团。

[0204] B原子衍生的取代基的实例包括硼基(-BR(R'))和二氧基硼基(-B(OR)(OR'))。这两个取代基R和R'各自独立地选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基;或者它们可以形成环。

[0205] 这样,本发明的氨基酸或氨基酸类似物可以具有一种或两种或更多种通常用于小分子化合物的各种取代基,包括O原子、N原子、S原子、B原子、P原子、Si原子和卤素原子。这些取代基可进一步被其它取代基取代。

[0206] 在本文中,构成本发明中所合成的肽的“氨基酸”和“氨基酸类似物”也分别称为“氨基酸残基”和“氨基酸类似物残基”。

[0207] 在本发明中,“Fmoc保护的氨基酸”和“Fmoc保护的氨基酸类似物”是分别具有以下官能团i)和ii)中至少一个的氨基酸和氨基酸类似物:

[0208] i)被至少一个具有Fmoc骨架的保护基保护的主链氨基;和

[0209] ii)至少一个游离羧酸基或活性酯化羧酸基。

[0210] 本发明中的“具有Fmoc骨架的保护基”是指Fmoc基或在构成Fmoc基的骨架的任意位置上导入任意取代基而形成的基团。具有Fmoc骨架的保护基的具体实例包括,9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)基团、2,7-二叔丁基-Fmoc(Fmoc*)基团、2-氟-Fmoc(Fmoc(2F))基团、2-单异辛基-Fmoc(Mio-Fmoc)基团和2,7-二异辛基-Fmoc(Dio-Fmoc)基团。在本发明中,也可以使用在碱性条件下或通过显示碱性的亲核试剂(例如哌啶或肼)可脱保护的(可被脱保护

的)保护基代替具有Fmoc骨架的保护基。这种保护基的具体实例包括,2-(4-硝基苯基磺酰基)乙氧基羰基(Nsc)基团、(1,1-二氧代苯并[b]噻吩-2-基)甲氧基羰基(Bsmoc)基团、(1,1-二氧代萘并[1,2-b]噻吩-2-基)甲氧基羰基(α-Nsmoc)基团、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环次己-1-基)-3-甲基丁基(1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidine)-3-methylbutyl)(ivDde)基团、四氯邻苯二甲酰基(TCP)基团、2-[苯基(甲基)锍基]乙氧基羰基四氟硼酸盐(Pms)基团、乙磺酰基乙氧基羰基(Esc)基团、2-(4-磺基苯基磺酰基)乙氧基羰基(Sps)基团。此外,也可以使用可通过酸或碱以外的方式脱保护的保护基。这些保护基的具体实例包括,在过渡金属催化剂如钯存在下通过氢化可脱保护的苄氧基羰基(Z)基团、通过钯催化剂和清除剂的组合(例如四(三苯基膦)钯(0)($Pd(PPh_3)_4$)和苯基硅烷的组合)可脱保护的烯丙氧基羰基(Alloc)基团、通过烷基硫醇或芳基硫醇与碱的组合可脱保护的邻硝基苯磺酰基(oNBS,Ns)基团、2,4-二硝基苯磺酰基(dNBS)基团和二硫琥珀酰基(dithiasuccinoyl)(Dts)基团、以及通过还原剂如连二亚硫酸钠($Na_2S_2O_4$)或在过渡金属催化剂存在下通过氢化可还原脱保护的对硝基苄氧基羰基(pNZ)(参考文献:Amino Acid-Protecting Groups,Chem.Rev.2009,109,2455-2504)。

[0211] 在使用Fmoc法的本发明中,可优选使用的Fmoc保护的氨基酸或Fmoc保护的氨基酸类似物是例如其中主链氨基被Fmoc基团保护,侧链官能团在需要时被未被碱如哌啶或DBU切割的保护基保护,和主链羧酸基团不被保护的那些。也可以优选使用Fmoc保护的氨基酸或Fmoc保护的氨基酸类似物,它们具有氨基和羧酸基,其中所述氨基被具有Fmoc骨架的保护基保护,所述羧酸基不具有保护基。

[0212] 在本发明中,当Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽具有侧链官能团时,这些官能团优选被保护基保护。当侧链官能团被保护基团保护时,可以使用在选择的条件下可以脱保护的众所周知的保护基。这样的保护基优选是在碱性条件下不切割并且在具有比TFA弱的酸性条件下脱保护的保护基。在酸性条件下可脱保护的保护基包括在例如pH1至pH7,优选pH2至pH6的范围内可脱保护的保护基。或者,可以使用可通过10%或更低的TFA脱保护的保护基,或具有后面描述的结构的保护基。在本发明中,可以使用公知的保护基作为侧链保护基。例如,在以下文献i)和ii)中描述的保护基中,可将满足上述条件的那些用作侧链保护基。

[0213] NPL i)Greene's Protective Groups in Organic Synthesis,第四版

[0214] NPL ii)Chemical Reviews,2009,109(6),2455-2504

[0215] 本发明的方法可通过平行合成用于肽合成。在这种情况下,保护基并不总是氨基酸侧链所必需的,但是当保护基是侧链所必需的时,优选在本发明的脱保护条件下将所用的保护基迅速脱保护。优选地,侧链保护基在24小时或更短时间内脱保护50%,特别优选地,侧链保护基在4小时或更短时间内脱保护90%。作为满足这些条件的保护基,具有后述的Trt骨架、THP骨架、THF骨架或TBS骨架的保护基是优选的。为了能够容易地用酸脱保护并确保在延伸期间的高反应性,在直接键合到官能团的保护基原子上具有至少一个氢原子取代基的保护基(三维体积小于具有Trt骨架的保护基)是优选的。其中,其中除氢之外的取代基形成环的保护基是更优选的,并且THP和THF是特别优选的。

[0216] 本发明的方法也可以用于工业肽合成。在这种情况下,氨基酸侧链也不总是需要如平行合成的情况下那样具有保护基,但是当侧链具有保护基时,它们优选具有与平行合

成中相同的保护基。对于待合成肽的序列,如果在脱保护期间不存在水解和N-至O-酰基转移的问题,但是由于保护基的体积庞大,延伸反应是有问题的,则通常用于脱保护的强酸如TFA可以用于脱保护。此外,当待合成的肽的延伸反应没有问题时,也可以使用大体积的保护基。

[0217] 在本发明中,“比TFA弱的酸性条件”优选包括使用弱酸性溶液的条件,所述弱酸性溶液包含在具有5至14的水性pKa值且其电离能力值Y_{OTs}为正的溶剂中具有0至9的水性pKa值的弱酸。

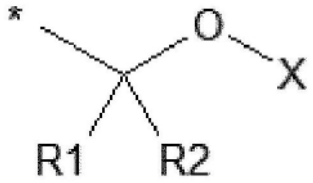
[0218] “具有0至9的水性pKa值的弱酸”更优选为具有1至5的水性pKa的弱酸。这些弱酸具体包括四甲基硫酸氢铵(水性pKa=2.0)、草酸(水性pKa=1.23)和马来酸(水性pKa=1.92)。溶解在溶剂中的弱酸的浓度可以是任何浓度,只要满足显示出比TFA弱的酸性的条件即可。

[0219] “具有5至14的水性pKa值且其电离能力值Y_{OTs}为正的溶剂”优选包括氟代醇。氟代醇是氟原子与构成醇的碳原子中除与羟基键合的碳原子以外的碳原子键合的醇的通用术语。在本发明中,在所述氟代醇中还包括其中羟基键合到芳环上的醇,例如2,3,4,5,6-五氟苯酚。优选的氟代醇是2,2,2-三氟乙醇(TFE)和六氟-2-丙醇(HFIP)。

[0220] 在本发明中,只要满足产生比TFA弱的酸性的条件,就可以将其它有机溶剂(例如二氯甲烷或1,2-二氯乙烷)和阳离子清除剂(例如三异丙基硅烷)等进一步添加至上述弱酸性溶液中。

[0221] 在本发明中,当Fmoc保护的氨基酸或Fmoc保护的氨基酸类似物在其侧链上具有保护基时,这种侧链保护基的优选实例如下所述。

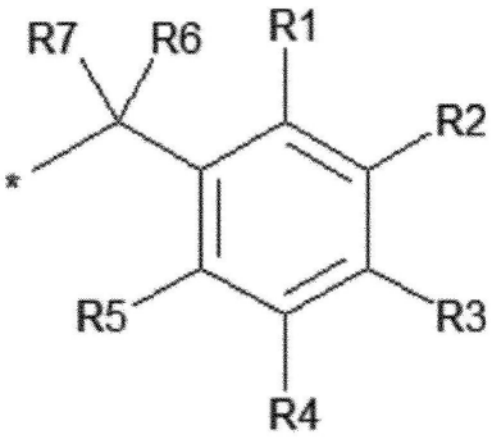
[0222] 当侧链保护基是用于Ser、Thr、Hyp及其衍生物的羟基的那些时,具有MOM骨架、Bn骨架、Dpm骨架、Trt骨架、甲硅烷基骨架或Boc骨架的保护基(其中每一个由以下通式表示)是优选的。

[0223] 

MOM骨架

[0224] 具有MOM骨架的保护基的代表性实例包括MOM(R1=H,R2=H,X=Me)、EE(R1=Me,R2=H,X=Et)、MIP(R1=Me,R2=Me,X=Me)、THP(R2=H,通过R1和X具有四个碳原子的环状结构)、THF(R2=H,通过R1和X具有三个碳原子的环状结构)和SEM(R1=H,R2=H,X=2-三甲基甲硅烷基乙基)。关于骨架上的Me和Et取代基,可以使用被其它取代基如烷基、苄基和芳基取代的骨架。

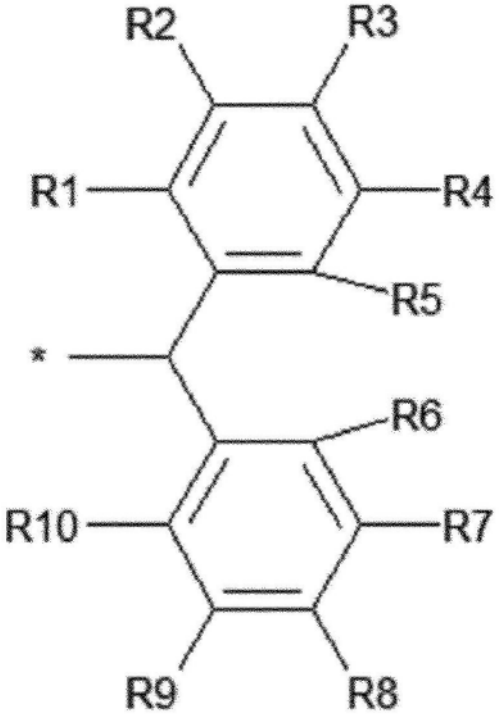
[0225]



Bn 骨架

[0226] 具有Bn骨架的保护基的代表性实例包括,Pis(R6＝Me,R7＝Me,其它R＝H),PMB(R3＝OMe,其它R＝H),和DMB(R1＝OMe,R3＝OMe,其它R＝H)。可以使用另一个烷基代替Me取代基。此外,苯环可以具有取代基,例如烷基、芳基和卤素基团。

[0227]

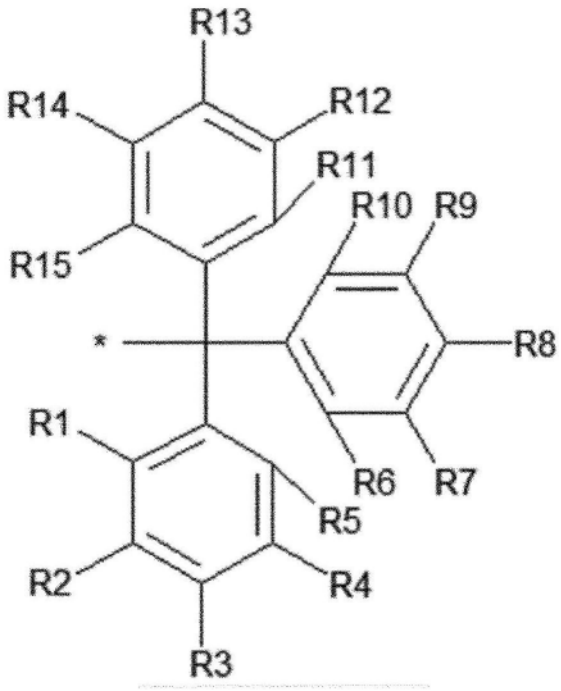


Dpm 骨架

[0228] 具有Dpm骨架的保护基的代表性实例包括Dpm(所有R＝H)。芳环可以具有取代基,例如烷基、芳基、烷氧基和卤素基团。

[0229] 也可使用其中R5和R6桥接的基团,例如其中R5和R6通过氧原子桥接的Xan基团或其中R5和R6通过两个碳原子桥接的二苯并环庚基(dibenzosuberyl)。

[0230]

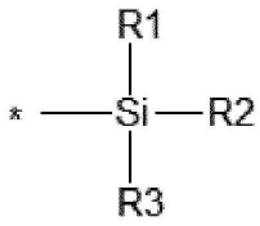


Trt 骨架

[0231] 具有Trt骨架的保护基的代表性实例包括Trt(所有R＝H)、Mmt(R3＝Me,其它R＝H)、Mtt(R3＝OMe,其它R＝H)、Dmt(R3＝OMe,R8＝OMe,其它R＝H)和Clt(R1＝Cl,其它R＝H)。芳环可以具有取代基,例如烷基、芳基、烷氧基和卤素基团。

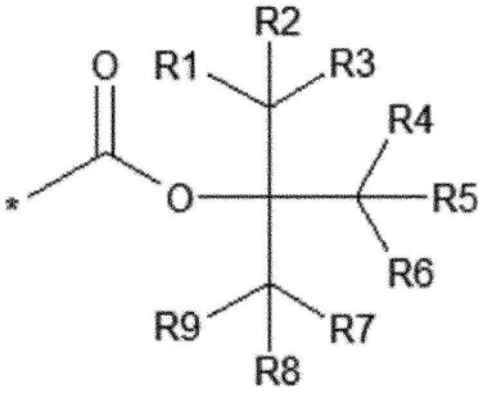
[0232] 此外,也可使用其中R5和R6桥接的基团,例如其中R5和R6通过氧原子桥接的Pixyl基团。

[0233]



甲硅烷基骨架

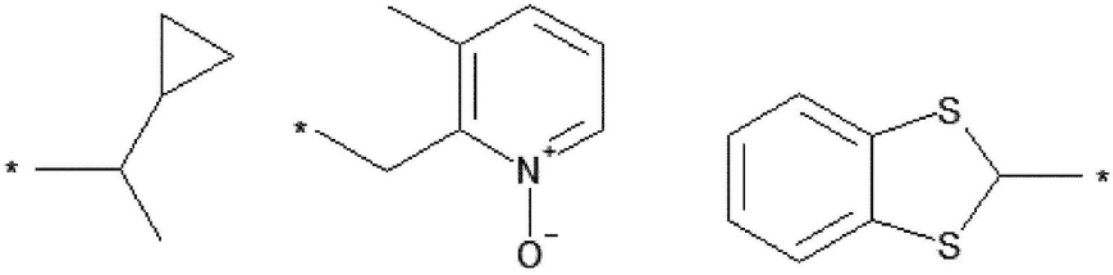
[0234] 具有甲硅烷基骨架的保护基的代表性实例包括TBS(R1＝Me,R2＝Me,R3＝tBu)。代替Me和tBu,其它基团如烷基和芳基可以是取代基。

[0235] 

Boc 骨架

[0236] 具有Boc骨架的保护基的代表性实例包括Boc(所有R＝H),但它可以被其它烷基、芳基等取代。

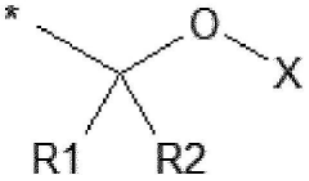
[0237] 另外,也可以使用以下所示的保护基。

[0238] 

MCPM 3-Me-2-甲基吡啶(picolyl) N-氧桥 Bdt

[0239] 在这些保护基中,THP和Trt是特别优选的。另外,当氨基酸残基是Ser时,THP和Trt特别优选作为侧链保护基,当氨基酸残基是Thr时,THP特别优选作为侧链保护基。

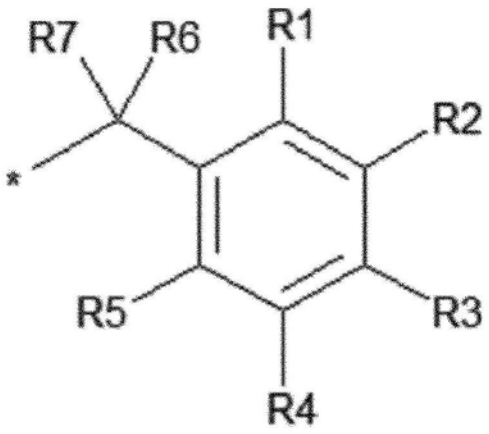
[0240] 当侧链保护基是用于具有带羟基取代基的芳基的氨基酸(例如Tyr、D-Tyr或Tyr(3-F))的那些保护基时,例如,由下列通式表示的具有MOM骨架、Bn骨架、Dpm骨架、Trt骨架、甲硅烷基骨架、Boc骨架或tBu骨架的保护基是优选的。

[0241] 

[0242] MOM骨架

[0243] 具有MOM骨架的保护基的代表性实例包括MOM(R1＝H,R2＝H,X＝Me)、BOM(R1＝H,R2＝H,X＝Bn)、EE(R1＝Me,R2＝H,X＝Et)、THP(R2＝H,通过R1和X具有四个碳原子的环状结构)、THF(R2＝H,通过R1和X具有三个碳原子的环状结构)和SEM(R1＝H,R2＝H,X＝2-三甲基甲硅烷基乙基)。关于骨架上的Me和Et取代基,也可使用被其它取代基如烷基、苄基或芳基取代的骨架。

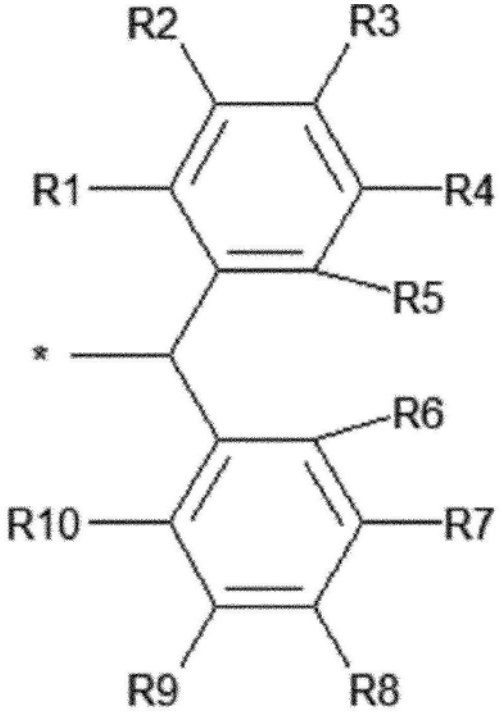
[0244]



Bn 骨架

[0245] 具有Bn骨架的保护基的代表性实例包括Pis(R6＝Me,R7＝Me,其它R＝H),PMB(R3＝OMe,其它R＝H),和DMB(R1＝OMe,R3＝OMe,其它R＝H)。可以使用其他烷基代替Me取代基。此外,苯环可以具有取代基,例如烷基、芳基和卤素基团。

[0246]

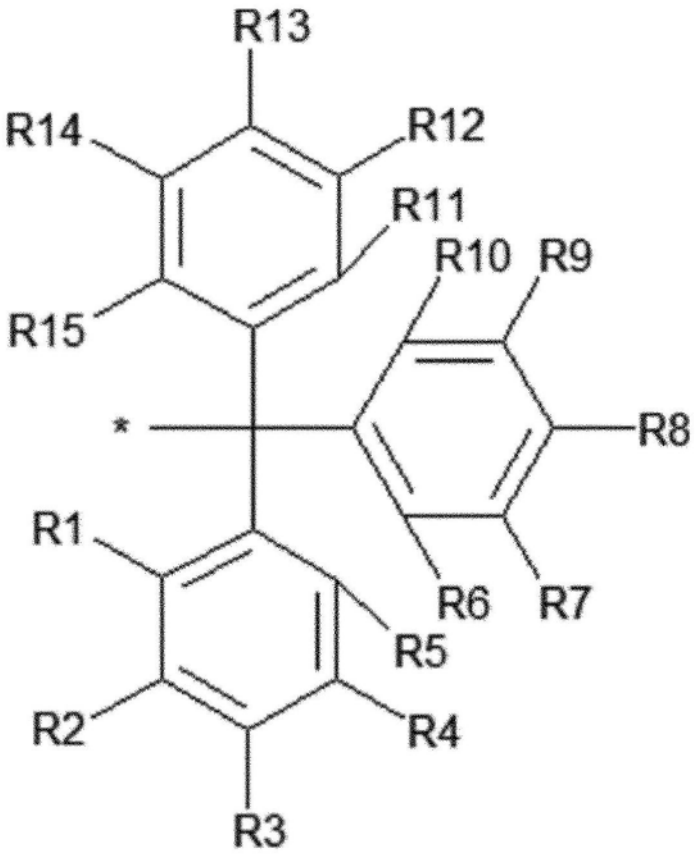


Dpm 骨架

[0247] 具有Dpm骨架的保护基的代表性实例包括Dpm(所有R＝H)。芳环可以具有取代基,例如烷基、芳基、烷氧基和卤素基团。

[0248] 也可使用其中R5和R6桥接的基团,例如其中R5和R6通过氧原子桥接的Xan基团或其中R5和R6通过两个碳原子桥接的二苯并环庚基(dibenzosuberyl)。

[0249]

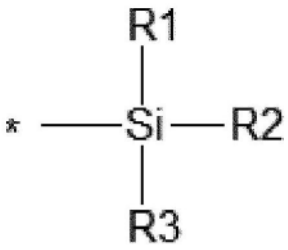


Trt骨架

[0250] 具有Trt骨架的保护基的代表性实例包括Trt(所有R＝H)、Mmt(R3＝Me,其它R＝H)、Mtt(R3＝OMe,其它R＝H)和Clt(R1＝Cl,其它R＝H)。芳环可以具有取代基,例如烷基、芳基、烷氧基和卤素基团。

[0251] 此外,也可使用其中R5和R6桥接的基团,例如其中R5和R6通过氧原子桥接的Pixyl基团。

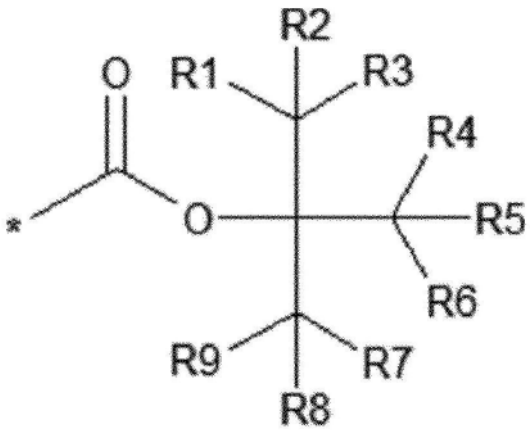
[0252]



甲硅烷基骨架

[0253] 具有甲硅烷基骨架的保护基的代表性实例包括TBS(R1＝Me,R2＝Me,R3＝tBu)。代替Me和tBu,其它基团如烷基和芳基可以是取代基。

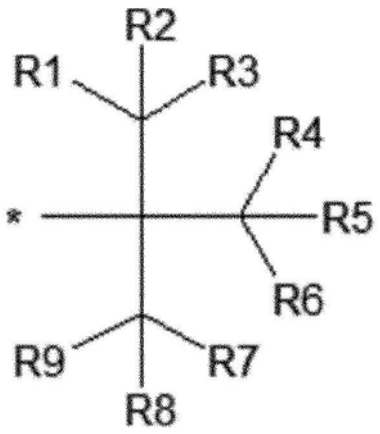
[0254]



Boc 骨架

[0255] 具有Boc骨架的保护基的代表性实例包括Boc(所有R＝H),但它可以被其它基团如烷基、芳基取代。

[0256]



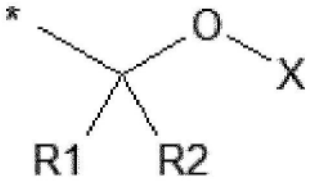
tBU 骨架

[0257] 具有tBu骨架的保护基的代表性实例包括tBu(所有R＝H)。它可以具有取代基如烷基和芳基来代替H。

[0258] 在这些保护基中,tBu、Pis、Trt、Clt、THP和THF是特别优选的。此外,当氨基酸残基是Tyr或D-Tyr时,侧链保护基特别优选为tBu、Trt、Clt或THP,并且当氨基酸残基是Tyr(3-F)时,侧链保护基特别优选为tBu或Pis。

[0259] 当侧链保护基是用于在其侧链上具有咪唑的氨基酸(例如His或MeHis)的那些保护基时,优选使用由下述通式所示的例如具有MOM骨架、Bn骨架或Trt骨架的保护基。

[0260]

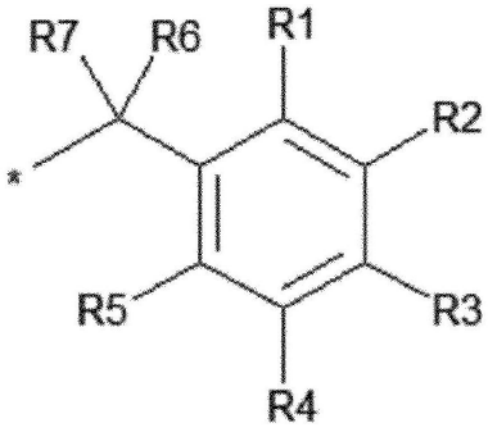


MOM 骨架

[0261] 具有MOM骨架的保护基的代表性实例包括MBom(R1＝H,R2＝H,X＝4-甲氧基苄基)、2,4-DMBom(R1＝H,R2＝H,X＝2,4-二甲氧基苄基)、3,4-DMBom(R1＝H,R2＝H,X＝3,4-二甲

氧基苄基)、EE(R1＝Me,R2＝H,X＝Et)、THP(R2＝H,通过R1和X具有四个碳原子的环状结构)和THF(R2＝H,通过R1和X具有三个碳原子的环状结构)。关于骨架上的Me和Et取代基,也可以使用具有被其它取代基如烷基、苄基或芳基取代的保护基的骨架。

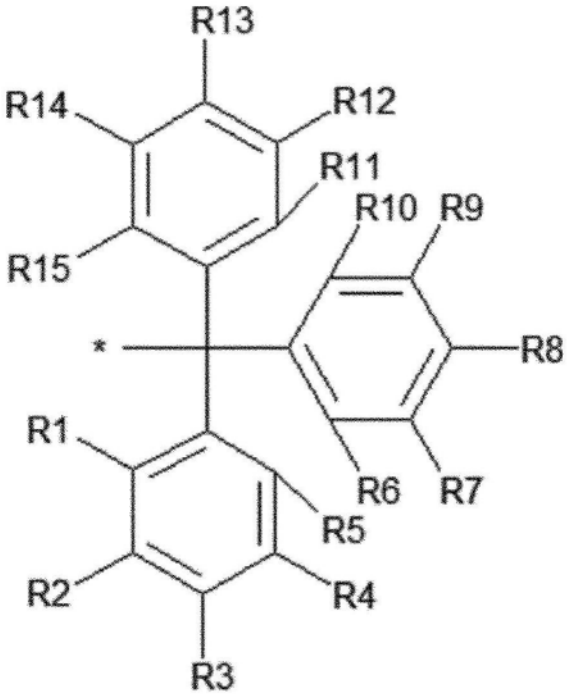
[0262]



Bn骨架

[0263] 具有Bn骨架的保护基的代表性实例包括,Pis(R6＝Me,R7＝Me,其它R＝H),PMB(R3＝OMe,其它R＝H),和DMB(R1＝OMe,R3＝OMe,其它R＝H)。可以使用其他烷基代替Me取代基。此外,苯环可以具有取代基,例如烷基、芳基和卤素基团。

[0264]



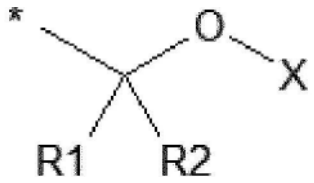
Trt骨架

[0265] 具有Trt骨架的保护基的代表性实例包括Trt(所有R＝H)、Mmt(R3＝Me,其它R＝H)、Mtt(R3＝OMe,其它R＝H)和Clt(R1＝Cl,其它R＝H)。芳环可以具有取代基,例如烷基、芳基、烷氧基和卤素基团。

[0266] 其中,Trt是特别优选的。此外,当氨基酸残基是His或MeHis时,侧链保护基特别优选为Trt。

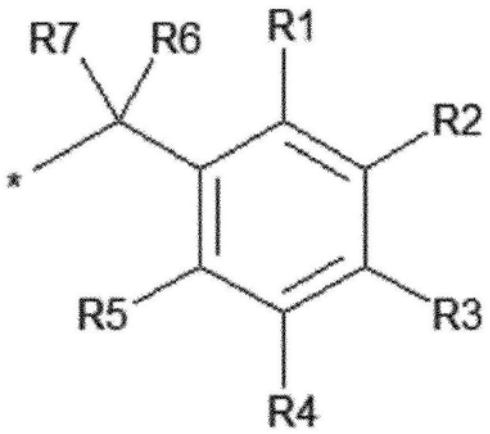
[0267] 此外,可使用由以下通式表示的具有MOM骨架、Bn骨架、Dpm骨架、Trt骨架、tBu骨架

或苯基-EDOTn骨架的保护基,例如,作为Asp、Glu及其衍生物的侧链羧酸基团的保护基(当主链羧酸基团被用作“游离羧酸基团或活性酯化的羧酸基团”时),或者作为主链羧酸基团的保护基(当Asp、Glu及其衍生物的侧链羧酸基团被用作“游离羧酸基团或活性酯化的羧酸基团”时)。此外,其中三个烷氧基键合到羧酸基团衍生的碳原子上的具有原酸酯骨架的保护基也可用作羧酸的保护基。形成这种保护基团的碳原子可以具有取代。

[0268] 

[0269] MOM骨架

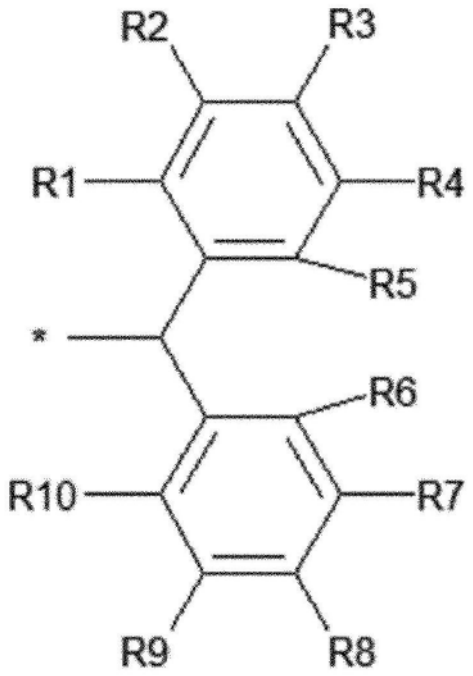
[0270] 具有MOM骨架的保护基的代表性实例包括,BOM(R1=H,R2=H,X=Bn)、THP(R2=H,通过R1和X具有四个碳原子的环状结构)和THF(R2=H,通过R1和X具有三个碳原子的环状结构)。对于骨架上的取代基,也可以使用具有其它取代基如烷基、苄基或芳基的骨架。

[0271] 

Bn骨架

[0272] 具有Bn骨架的保护基的代表性实例包括Pis(R6=Me,R7=Me,其它R=H)、PMB(R3=OMe,其它R=H)、DMB(R1=OMe,R3=OMe,其它R=H)和胡椒基(R2和R3均被氧原子取代,并且那些氧原子通过单个碳原子桥连;其它R=H)。可以使用其他烷基代替Me取代基。此外,苯环可以具有取代基,例如烷基、芳基和卤素基团。

[0273]

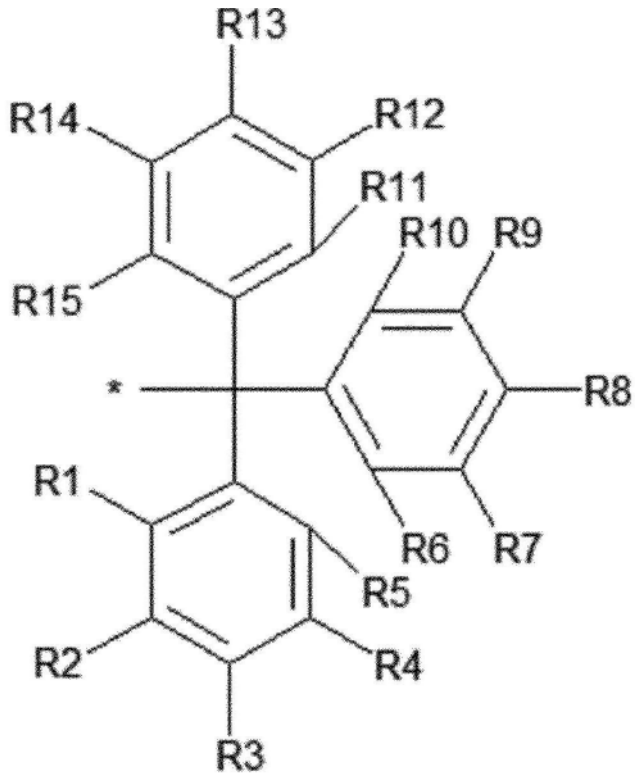


Dpm 骨架

[0274] 具有Dpm骨架的保护基的代表性实例包括Dpm(所有R＝H)。芳环可以具有取代基，例如烷基、芳基、烷氧基和卤素基团。

[0275] 此外，也可以使用其中R5和R6桥接的基团，例如其中R5和R6通过两个碳原子桥接的二苯并环庚基。

[0276]

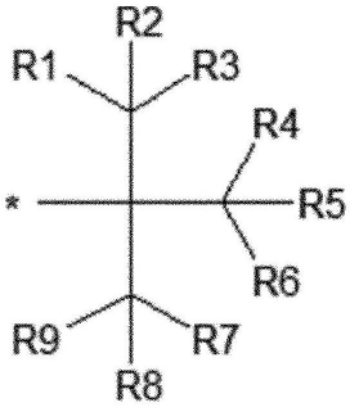


Trt 骨架

[0277] 具有Trt骨架的保护基的代表性实例包括Trt(所有R＝H)、Mmt(R3＝Me，其它R＝

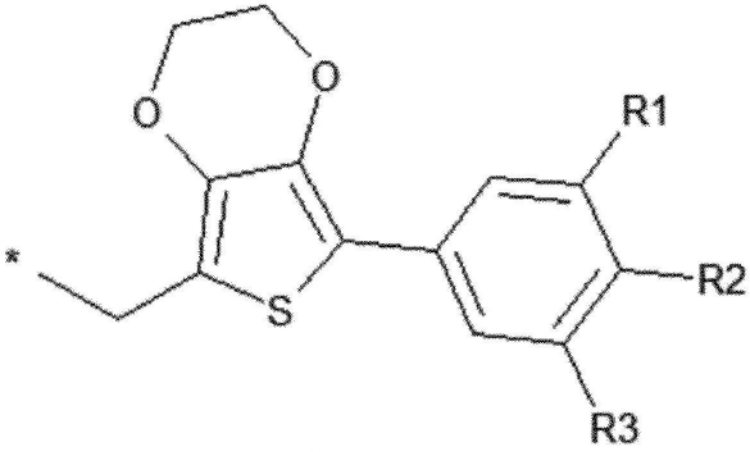
H)、Mtt(R3＝OMe,其它R＝H)和Clt(R1＝Cl,其它R＝H)。芳环可以具有取代基,例如烷基、芳基、烷氧基和卤素基团。

[0278] 此外,也可使用其中R5和R6桥接的基团,例如其中R5和R6通过氧原子桥接的Pixyl基团。

[0279] 

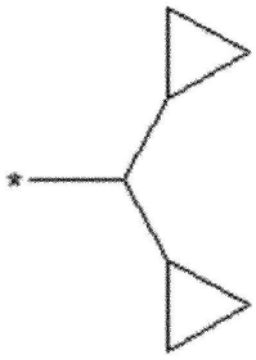
tBu骨架

[0280] 具有tBu骨架的保护基的代表性实例包括tBu(所有R＝H)和Mpe(R1＝Me,R4＝Me,其它R＝H)。它可以具有取代基,例如其它烷基和芳基。

[0281] 

苯基-EDOTn

[0282] 可以使用具有下列取代基组合的苯基-EDOTn:(i)R1＝R2＝R3＝OMe;(ii)R1＝R2＝OMe,R3＝H;(iii)R1＝R2＝H,R3＝Ome;或(iv)R1＝R2＝R3＝H。

[0283] 

二环丙基甲基

[0284] 也可使用二环丙基甲基。

[0285] 其中,tBu、Pis和Trt是特别优选的。

[0286] 在本发明中,“Fmoc保护的肽”是指含有上述“Fmoc保护的氨基酸”和“Fmoc保护的氨基酸类似物”之一或二者的肽。这些肽的实例包括含有总共两个或更多个分子的二肽和寡肽,所述分子包括上述Fmoc保护的氨基酸和Fmoc保护的氨基酸类似物之一或二者。

[0287] 在通过本发明的固相法进行的肽合成中,可以使用树脂将Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽(也称为Fmoc保护的氨基酸等)支持到固相上。在所用树脂中用于与Fmoc保护的氨基酸等键合的基团(树脂键合基团)没有特别限制,只要它们允许肽被酸切下。Fmoc保护的氨基酸等的支持量和支持率也没有特别的限制。在本发明中,例如,可以使用三苯甲基氯树脂(Trt树脂)、2-氯三苯甲基氯树脂(Clt树脂)、4-甲基三苯甲基氯树脂(Mtt树脂)和4-甲氧基三苯甲基氯树脂(Mmt)。特别优选的是,树脂具有树脂键合基团,该基团在固相合成手册(由Merck Co.on于2002年5月1日出版)中被描述并被评价为“H(在DCM中,<5%TFA)”,并且可根据待使用氨基酸上的官能团适当地选择它们。例如,当使用羧酸(由Asp或Glu表示的主链羧酸或侧链羧酸)或芳环上的羟基(由Tyr表示的酚基)作为氨基酸上的官能团时,优选使用三苯甲基氯树脂(Trt树脂)或2-氯三苯甲基氯树脂(Clt树脂)作为树脂。当使用脂肪族羟基(由Ser或Thr表示的脂肪族醇基)作为氨基酸上的官能团时,优选使用三苯甲基氯树脂(Trt树脂)、2-氯三苯甲基氯树脂(Clt树脂)或4-甲基三苯甲基氯树脂(Mtt)作为树脂。

[0288] 此外,构成树脂的聚合物的类型也没有特别限制。对于由聚苯乙烯组成的树脂,可以使用100至200目或200至400目。交联百分比也没有特别限制,但是用1%二乙烯基苯(DVB)交联的那些是优选的。

[0289] 通过在树脂上的键合基团与Fmoc保护的氨基酸或Fmoc保护的氨基酸类似物或位于Fmoc保护的肽的C末端的氨基酸的游离羧酸基团或活性酯化的羧酸基团之间进行化学反应,将Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽支持到树脂上。在这种情况下,游离羧酸可以是氨基酸或氨基酸类似物的主链羧酸,或侧链羧酸(Asp等)。代替羧酸基团,Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或位于Fmoc保护的肽的C末端处的氨基酸的侧链或主链的游离OH基团或游离SH基团也可用于支持到固相上。

[0290] 通过碱将具有Fmoc骨架的保护基脱保护,以暴露其氨基,所述保护基由支持在固相上的Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽携带。这里使用的碱没有特别的限制,可以使用肽合成中常用的脱保护剂(例如,Amino Acid-Protecting Groups(Chem.Rev.2009,109,2455-2504))。这种脱保护剂的实例优选为仲胺、具有脒骨架的碱和具有胍骨架的碱。仲胺的具体实例包括哌啶、吗啉、吡咯烷和哌啶。具有脒骨架的碱的具体实例包括1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一-7-烯(DBU)和1,5-二氮杂双环[4.3.0]-5-壬烯(DBN)。具有胍骨架的碱的具体实例包括1,1,3,3-四甲基胍。

[0291] 上述暴露的氨基和新添加的Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物或Fmoc保护的肽的游离或活性酯化的羧酸基团缩合,以形成肽键。

[0292] 缩合氨基和羧酸基团时所用的缩合剂没有特别限制,只要它们能形成酰胺键即可,并且肽合成中常用的缩合剂是优选的(例如,Peptide Coupling Reagents,More than a Letter Soup(Chem.Rev.2011,111,6557-6602))。这种缩合剂的具体实例包括具有碳二

亚胺骨架的缩合剂。例如,具有碳二亚胺骨架的缩合剂可通过将它们与可形成活性酯的羟基化合物组合而用于缩合反应。具有碳二亚胺骨架的缩合剂的实例包括,N,N’-二环已基碳二亚胺(DCC)、N,N’-二异丙基碳二亚胺(DIC)和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(WSCI HCl)(参见例如,the catalog of Watanabe Chemical:Amino Acids and Chiral Building Blocks to New Medicine)。可形成活性酯的羟基化合物的实例包括1-羟基-1H-苯并三唑(HOBt)、1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HOAt)、乙基2-氰基-2-(肟基)乙酸盐(oxyma)、3,4-二氢-3-羟基-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪(HOOBt或HODhbt)、N-羟基-5-降冰片烯-2,3-二甲酰亚胺(HONB)、2,3,4,5,6-五氟苯酚(HOPfp)、N-羟基琥珀酰亚胺(HOSu)和6-氯-1-羟基-1H-苯并三唑(Cl-HOBt)(参见例如,the catalog of Watanabe Chemical:Amino Acids and Chiral Building Blocks to New Medicine)。此外,也可以使用具有这种骨架的盐,例如K-oxyma,它是oxyma的钾盐。其中,HOBt、HOAt、oxyma和HOOBt是特别优选的。其中,DIC和HOAt的组合使用或者DIC和oxyma的组合使用是优选的。此外,在缩合反应中可以组合使用以下试剂:

[0293] 作为鏻缩合剂和脲鎓缩合剂,可以使用以下任一种:O-(1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N’,N’-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HBTU);O-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N’,N’-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HATU);N-[1-(氰基-2-乙氧基-2-氧代亚乙基氨基氧基)二甲基氨基(吗啉代)]脲鎓六氟磷酸盐(COMU);O-[(乙氧基羰基)氰基亚甲基氨基]-N,N,N’,N’-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HOTU);四氟硼酸O-(1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N’,N’-四甲基脲鎓(TBTU);O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N’,N’-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TATU);六氟磷酸1H-苯并三唑-1-基氧基-三(吡咯烷基)鏻(PyBOP);1H-苯并三唑-1-基氧基-三(二甲基氨基)鏻六氟磷酸盐(BOP);溴代三(吡咯烷基)鏻六氟磷酸盐(PyBroP);氯三(吡咯烷)鏻六氟磷酸盐(PyCloP);(7-氮杂苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷基鏻六氟磷酸盐(PyAOP);溴三(二甲基氨基)鏻六氟磷酸盐(Brop);3-(二乙氧基磷酰氧基)-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮(DEPBT);N,N,N’,N’-四甲基-O-(N-琥珀酰亚胺基)脲鎓四氟硼酸盐(TSTU);N,N,N’,N’-四甲基-O-(N-琥珀酰亚胺基)脲鎓六氟磷酸盐(HSTU);O-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)-N,N,N’,N’-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TDBTU);四甲基硫脲S-(1-氧化-2-吡啶基)-N,N,N’,N’-四氟硼酸盐(TOTT);和O-(2-氧代-1(2H)吡啶基)-N,N,N’,N’-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TPTU),和

[0294] 任何一种碱,N,N-二异丙基乙胺(DIPEA);三乙胺(TEA);2,4,6-三甲基吡啶(2,4,6-colidine);和2,6-二甲基吡啶(2,6-lutidine)。HATU和DIPEA的组合使用,或COMU和DIPEA的组合使用是特别优选的。此外,N,N’-羰基二咪唑(CDI)、1,1’-羰基-二-(1,2,4-三唑)(CDT)、4-(4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基)-4-甲基吗啉盐酸盐(DMT-MM)、丙基膦酸酐(T3P)等也可以用作缩合剂。

[0295] 本发明的生产方法进一步包含以下步骤:

[0296] 通过使用碱以暴露其氨基,将所添加的新的Fmoc保护的氨基酸、新的Fmoc保护的氨基酸类似物或新的Fmoc保护的肽的具有Fmoc骨架的保护基脱保护;和

[0297] 通过进一步添加新的Fmoc保护的氨基酸、新的Fmoc保护的氨基酸类似物或新的Fmoc保护的肽,形成酰胺键。

[0298] 这些步骤可以重复一次或多次。使用本发明的方法,重复具有Fmoc骨架的保护基团的脱保护和与下一个新的Fmoc保护的氨基酸、新的Fmoc保护的氨基酸类似物或新的Fmoc保护的肽的缩合反应,可以获得所需的肽序列。

[0299] 在通过固相方法实施本发明时,将一旦获得的所需肽从固相上切下(切割步骤)。此外,肽的结构转化和环化可以在切割步骤之前进行。在本发明中,在切割时,被保护基保护的侧链官能团可以脱保护或可以不脱保护,并且可以仅将保护基的一部分脱保护。优选地,在侧链官能团仍被保护的同时进行切割步骤。

[0300] 具体地,本发明的切断步骤的反应条件优选为弱酸性条件,并且特别优选为比TFA弱的酸性条件。特别地,对于这些弱酸,显示比TFA的水性pKa值更高的水性pKa值的酸是优选的。更具体地,具有在0-15范围内的pKa值的酸是优选的,并且具有在6-15范围内的水性pKa值的酸是更优选的。在该步骤中使用的具有比TFA弱的酸性的酸的实例包括TFE和HFIP。两种或多种弱酸可以以任何比例组合使用,例如TFE/乙酸。此外,溶剂如DCM、DCE和水可以以任何比例混合。对于弱酸和溶剂的这种组合,TFE和DCM的组合是特别优选的。对于用于切割的溶液,可以添加其它有机溶剂和试剂(例如DIPEA)和阳离子清除剂(例如三异丙基硅烷)。

[0301] 当在将合成肽的侧链保护基脱保护之前进行切割步骤时,用于切割的弱酸优选是比用于脱保护反应的酸弱的酸。在这种情况下,预先制备具有比TFA弱的不同酸性的两种酸,并且将两者中较弱的酸用于切割。

[0302] 当在将合成肽的侧链保护基脱保护之后进行切割步骤时,用于切割的弱酸没有特别限制,只要它们是比TFA弱的酸即可。

[0303] 在本发明的侧链保护基的脱保护步骤中,可以通过减少副反应如水解和N-至O-酰基的转移而选择性地进行所需的脱保护反应。侧链保护基的脱保护优选在比TFA弱的酸性条件下进行。脱保护反应可以在任何温度下进行,并且优选在0℃至40℃下进行反应。当脱保护完成时,或当在脱保护期间停止反应时,可以使用碱,例如氨和伯胺至叔胺。此外,也可以使用碱性杂环化合物(例如,吡啶、咪唑及其类似物)等。

[0304] 当进一步改变或修饰通过本发明的生产方法合成的肽时,这些步骤可以在切割步骤之前或之后进行。

[0305] 通过本发明的生产方法所生产的肽可以是在其C末端侧上包含在侧链上具有一个反应位点的氨基酸残基或氨基酸类似物残基,并且在其N末端侧上包含具有另一个反应位点的氨基酸残基、氨基酸类似物残基或羧酸类似物的肽。例如,通过选择原料Fmoc保护的氨基酸、Fmoc保护的氨基酸类似物和Fmoc保护的肽,使得在其侧链上具有一个反应位点的氨基酸残基或氨基酸类似物残基包含在C末端侧,而具有另一个反应位点的氨基酸残基、氨基酸类似物残基或羧酸类似物包含在N末端侧,可以生产这种肽。

[0306] 该肽可以通过在一个反应位点和另一个反应位点之间形成键而环化。本发明的生产方法可包含这样的环化步骤。具体地,环化步骤可以基于WO2013/100132中的描述进行。

[0307] 当在切割步骤之后进行环化步骤时,可以将从切割步骤的反应液(切割液)在减压下得到的浓缩残渣用于环化步骤,或者也可以将所述切割液原样用于环化步骤中。

[0308] 在本发明中,“羧酸类似物”包括具有氨基和羧基两者并且在这两个基团之间具有三个或更多个原子的化合物;各种不具有氨基的羧酸衍生物;由两个至四个残基形成的肽;以及主链氨基通过与羧酸形成酰胺键等而被化学修饰的氨基酸。此外,“羧酸类似物”可具有可用于环化的硼酸盐或硼酸酯部分。此外,“羧酸类似物”可以是具有双键部分或三键部分的羧酸,或者可以是具有酮或卤化物的羧酸。在这些化合物中,除了特定官能团之外的部分可以被取代,并且例如,这种取代基可以选自烷基、芳烷基、芳基、环烷基、杂芳基、烯基、炔基等(自由选择的取代基)。

[0309] 环化步骤包括通过上述两个反应位点形成例如酰胺键、二硫键、醚键、硫醚键、酯键、硫酯键、碳-碳键等而环化的步骤,但并不限定于此。

[0310] 通过酰胺键形成的环化例如为通过在N末端氨基酸残基、N末端氨基酸类似物残基或N末端羧酸类似物(主链氨基或存在于侧链上的氨基)上的反应位点和在氨基酸残基或在其侧链上具有一个羧酸的氨基酸类似物上的反应位点之间形成酰胺键的环化。作为用于这些反应的缩合剂,可以使用与上述肽键结合中所用的那些试剂相似的试剂。具体而言,例如,侧链羧酸和N末端主链氨基,或侧链氨基和C末端主链羧酸可以通过使用HATU和DIPEA的组合或COMU和DIPEA的组合来缩合。在这种情况下,优选地,通过考虑其正交性来选择用于C末端侧羧酸的保护基和用于进行环化的侧链上的羧酸的保护基,或者用于N末端侧主链氨基的保护基和用于进行环化的侧链上的氨基的保护基。在这一系列肽合成中优选的保护基如上所述。

[0311] 通过碳-碳键形成的环化是例如通过在N末端氨基酸残基、N末端氨基酸类似物残基或N末端羧酸类似物上的反应位点和在其侧链上具有一个反应位点的氨基酸残基或氨基酸类似物上的反应位点之间形成碳-碳键的环化。具体而言,例如,通过选择烯基作为N末端氨基酸残基、N末端氨基酸类似物残基或N末端羧酸类似物上的反应位点,并选择烯基作为在其侧链上具有一个反应位点的氨基酸残基或氨基酸类似物残基上的反应位点,环化反应可以通过过渡金属催化的碳-碳键合反应进行。在这种情况下,用作催化剂的过渡金属的实例包括钌、钼、钛和钨。例如,当使用钌时,环化反应可以通过复分解反应进行。此外,通过使用芳基卤和硼酸或硼酸类似物的组合作为N末端氨基酸残基、N末端氨基酸类似物残基或N末端羧酸类似物上的反应位点和在其侧链上具有一个反应位点的氨基酸残基或氨基酸类似物残基上的反应位点的组合,环化反应可以通过过渡金属催化的碳-碳键合反应进行。在这种情况下,用作催化剂的过渡金属包括钯、镍和铁。例如,当使用钯时,环化反应可以通过Suzuki反应进行。此外,通过使用烯基和芳基卤或烯基卤的组合作为N末端氨基酸残基、N末端氨基酸类似物残基或N末端羧酸类似物上的反应位点和在其侧链上具有一个反应位点的氨基酸残基或氨基酸类似物残基上的反应位点的组合,环化反应可以通过过渡金属催化的碳-碳键合反应进行。在这种情况下,用作催化剂的过渡金属包括钯和镍。例如,当使用钯时,环化反应可以通过Heck型化学反应进行。此外,通过选择乙炔基和芳基卤或烯基卤的组合作为N末端氨基酸残基、N末端氨基酸类似物残基或N末端羧酸类似物上的反应位点和在其侧链上具有一个反应位点的氨基酸残基或氨基酸类似物残基上的反应位点的组合,环化反应可以通过过渡金属催化的碳-碳键合反应进行。在这种情况下,用作催化剂的过渡金属包括钯、铜、金和铁。例如,当使用钯和铜的组合时,环化反应可以通过Sonogashira反应进行。

[0312] 在本发明中,根据需要可以纯化所得产物。例如,可以使用诸如反相柱或分子筛柱的常规的肽纯化方法。此外,所获得的产物也可以通过使用适当的溶剂结晶或固化来纯化。在纯化前,在减压下浓缩也是可能的。

[0313] 本文引用的所有现有技术参考文献均通过引用并入本说明书。

实施例

[0314] 本发明将参考以下实施例进一步阐述,但并不限于此。

[0315] 在实施例中使用下列缩写。

[0316] DCM 二氯甲烷

[0317] DCE 1,2-二氯乙烷

[0318] DMF N,N-二甲基甲酰胺

[0319] DIC N,N'-二异丙基碳二亚胺

[0320] DIPEA N,N-二异丙基乙胺

[0321] DBU 1,8-二氮杂二环[5.4.0]-7-十一碳烯

[0322] NMP N-甲基-2-吡咯烷酮

[0323] FA 甲酸

[0324] TFA 三氟乙酸

[0325] TFE 2,2,2-三氟乙醇

[0326] HFIP 1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇

[0327] HOAt 1-羟基-7-氮杂苯并三唑

[0328] HOBt 1-羟基苯并三唑

[0329] WSCI·HCl 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐

[0330] TBME 叔丁基甲醚

[0331] TIPS 三异丙基硅烷

[0332] HATU O-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐

[0333] 用于肽合成和固相合成的反应溶剂是用于肽合成的那些溶剂(购自Watanabe Chemical Industries和Wako Pure Chemical Industries)。实例包括DCM、DMF、NMP、DMF中的2%DBU和DMF中的20%哌啶。此外,对于不添加水作为溶剂的反应,使用脱水溶剂、超脱水溶剂和无水溶剂(购自Kanto Chemical Co,Wako Pure Chemical Industries等)。

[0334] 用于LCMS分析的条件如表1所示。

[0335] [表1]

[0336]

分析条件	装置	柱 (I.D.x长度)(mm)	流动相	梯度 (A/B)	流速 (mL/min)	柱温度 (℃)	波长
SQDAA05	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)10mM $AcONH_4$,H_2O B)MeOH	95/5=> 0/100(1.0 min) 0/100(0.4 min)	1	35	210-400nm PDA 总计
SQDAA50	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)10mM $AcONH_4$,H_2O B)MeOH	50/50=> 0/100(0.7 min)0/100 (0.7 min)	1	35	210-400nm PDA 总计
SQDFA05	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)0.1% FA,H_2O B)0.1% FA,MeCN	95/5=> 0/100(1.0 min) 0/100(0.4 min)	1	35	210-400nm PDA 总计
SQDFA50	Acquity UPLC/SQD	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)0.1% FA,H_2O B)0.1% FA,MeCN	50/50=> 0/100 (0.7 min) 0/100 (0.7 min)	1	35	210-400nm PDA 总计

[0337] [实施例1]在其序列中包含N-甲基氨基酸的环肽的基本合成路线

[0338] 采用Fmoc方法的固相合成用于合成在其序列中包含N-甲基氨基酸的环肽,通过图

1所示的合成路线进行合成,其包括以下五个步骤:

[0339] A)通过Fmoc方法,使用肽合成仪,从支持在2-氯三苯甲基树脂上的Asp的N末端通过其侧链羧酸延伸肽;

[0340] B)将肽从2-氯三苯甲基树脂上切下;

[0341] C)通过Asp的侧链羧酸(空心圆形单元)和肽链N末端的氨基(三角形单元)的缩合,通过酰胺键合,将切割的肽环化;

[0342] D)使肽链中包含的侧链官能团的保护基脱保护;以及

[0343] E)通过分级分离HPLC纯化所述化合物。

[0344] 在实施例中,除非另有特别说明,否则环肽是基于该基本合成路线合成的。

[0345] 用于通过肽合成仪的肽合成的Fmoc氨基酸

[0346] 在实施例中描述的肽合成中,使用以下Fmoc氨基酸,用于通过肽合成仪的合成(上述步骤A)。

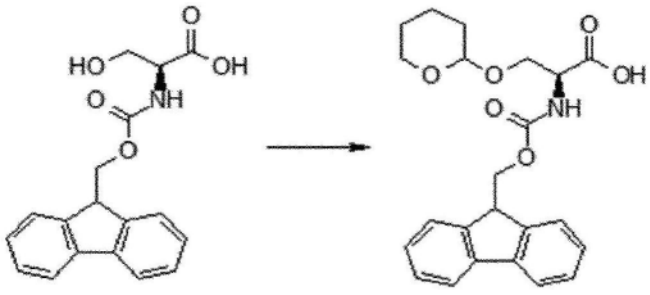
[0347] Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Thr(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Trp-OH、Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-D-Tyr(Clt)-OH、Fmoc-Ser(Trt)-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-MePhe-OH、Fmoc-MeAla-OH、Fmoc-MeGly-OH、Fmoc-MeLeu-OH、Fmoc-Phe(4-CF3)-OH、Fmoc-b-Ala-OH、Fmoc-b-MeAla-OH、Fmoc-Nle-OH、Fmoc-Met(O2)-OH、Fmoc-Phe(3-Cl)-OH、Fmoc-MeVal和Fmoc-Val-OH购自Watanabe Chemical Industries,Chempep Inc.,Chem-Impex International Inc.等。

[0348] Fmoc-MeSer(DMT)-OH、Fmoc-MePhe(3-Cl)-OH、Fmoc-MeAla(4-Thz)-OH、Fmoc-Hyp(Et)-OH和Fmoc-γEtAbu-OH、Fmoc-nPrGly-OH是通过文献中描述的方法合成的(文献:WO2013/100132A1)。

[0349] 如下合成Fmoc-Ser(THP)-OH(化合物1)、Fmoc-Thr(THP)-OH(化合物2)、Fmoc-MeSer(THP)-OH(化合物6)、Fmoc-MeHis(Trt)-OH(化合物7)、Fmoc-D-Tyr(THP)-OH(化合物8)、Fmoc-D-Tyr(Pis)-OH(化合物11)、Fmoc-Tyr(3-F,tBu)-OH(化合物13)、Fmoc-MePhe(4-Cl)-OH(化合物16)和Fmoc-Tyr(3-F,Pis)-OH(化合物22)。这些合成的Fmoc氨基酸不仅用于合成肽,而且用于检查侧链官能团的保护基和C末端羧酸基团的保护基的脱保护。

[0350] 实施例1-1:

[0351] (2S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)丙酸(化合物1,Fmoc-Ser(THP)-OH)的合成

[0352] 

化合物1

[0353] 将甲苯(10mL)加入到(2S)-2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-羟基丙酸(Fmoc-Ser-OH;购自Watanabe Chemical Industries;1.0g,3.06mmol)和对甲苯磺酸吡啶

鎓盐(PPTS;0.038g,0.153mmol)的混合物中,并通过在减压下共沸蒸馏掉甲苯来除去所含的水分。向所得残渣中加入超脱水的四氢呋喃(THF,6.1mL)和3,4-二氢-2H-吡喃(1.9mL,21.3mmol),并将其在50℃和氮气氛下搅拌四小时。在通过LCMS(SQDFA05)确认原料消失后,将混合物冷却至25℃,并加入乙酸乙酯(6mL)。接着,加入饱和氯化钠水溶液(6mL)以洗涤有机层,并使用乙酸乙酯(6mL)萃取水层。将所有得到的有机层混合,并将其进一步用饱和氯化钠水溶液(6mL)洗涤两次。将有机层用硫酸钠干燥,并在减压下蒸馏除去溶剂。

[0354] 将得到的残渣溶解于四氢呋喃(THF,12.2mL)中,然后加入1.0M磷酸盐缓冲液(12.2mL,调节至pH 8.0)。将该混合物在50℃搅拌三小时。将其冷却至25℃后,加入乙酸乙酯(12.2mL),分离有机层和水层。将乙酸乙酯(12.2mL)加入到水层用于萃取,然后将得到的有机层全部混合,并用饱和氯化钠水溶液(12.2mL)洗涤该混合物两次。然后将有机层用硫酸钠干燥,在减压下蒸馏除去溶剂,并使用泵在25℃在减压下进一步干燥所得的材料30分钟。

[0355] 将得到的残渣溶解于二氯甲烷(7mL)中,然后加入庚烷(16.6mL)。在控制的减压(约100hPa)下,仅蒸馏出二氯甲烷,将所得的混合物过滤,得到固体。使用庚烷的该洗涤操作重复两次。使用泵在减压下,将得到的固体在25℃干燥2小时,得到1.40g残渣。

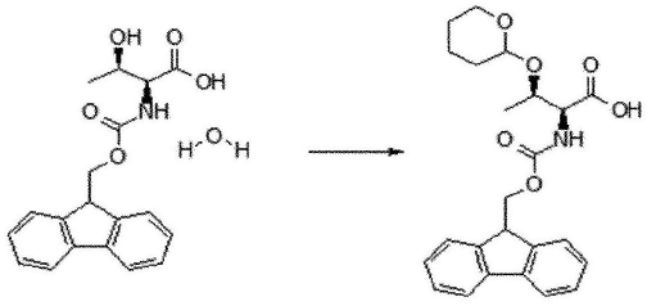
[0356] 将叔丁基甲醚(TBME,25mL)和0.05M磷酸水溶液(70mL;pH 2.1)加入到所得残渣中,在25℃搅拌五分钟后,分离有机层和含水层。将叔丁基甲醚(TBME,25mL)加入到含水层中用于萃取,然后将得到的有机层全部混合,并用饱和氯化钠水溶液(25mL)洗涤该混合物两次。然后将有机层用硫酸钠干燥,并在减压下蒸馏除去溶剂。使用泵在减压下,将残渣在25℃干燥两小时,以产生(2S)-2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)丙酸(化合物1,Fmoc-Ser(THP)-OH,1.22g,剩余30mol%叔丁基甲醚(TBME))。将得到的Fmoc-Ser(THP)-OH保存在-25℃的冰箱中。

[0357] LCMS(ESI)m/z=410.2(M-H)$^-$

[0358] 保留时间:0.81分钟(分析条件SQDFA05)

[0359] 实施例1-2:

[0360] (2S,3R)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)丁酸(化合物2,Fmoc-Thr(THP)-OH)的合成

[0361] 

化合物2

[0362] 将甲苯(50mL)加入到(2S,3R)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-羟基丁酸一水合物(Fmoc-Thr-OH的一水合物;购自Tokyo Chemical Industry;5.0g,13.9mmol)和对甲苯磺酸吡啶鎓盐(PPTS;0.175g,0.70mmol)的混合物中,并通过在减压下共沸蒸馏掉

甲苯来除去所含的水分。向所得残渣中加入超脱水的四氢呋喃(THF,28mL)和3,4-二氢-2H-吡喃(8.8mL,97mmol),并将其在50℃和氮气氛下搅拌四小时。在通过LCMS(SQDFA05)确认原料消失后,将混合物冷却至25℃,并加入乙酸乙酯(30mL)。接着,加入饱和氯化钠水溶液(30mL)以洗涤有机层,并使用乙酸乙酯(30mL)萃取含水层。将所有得到的有机层混合,并将其进一步用饱和氯化钠水溶液(30mL)洗涤两次。将有机层用硫酸钠干燥,并在减压下蒸馏除去溶剂,以产生9.3g粗产物。

[0363] 将4.65g得到的粗产物溶解在四氢呋喃(THF,30mL)中,并向其中加入1.0M磷酸盐缓冲液(30mL;调节至pH 8.0)。将该混合物在50℃搅拌四个小时。冷却至25℃后,加入乙酸乙酯(30mL),分离有机层和含水层。将乙酸乙酯(30mL)加入到含水层用于萃取之后,将得到的有机层全部混合,并用饱和氯化钠水溶液(30mL)洗涤两次。然后将有机层用硫酸钠干燥,在减压下蒸馏除去溶剂。使用泵在减压下,将其进一步在25℃干燥30分钟。

[0364] 将得到的残渣溶解于乙醚(50mL)中,然后加入庚烷(50mL)。在控制的减压(约100hPa)下,仅蒸馏除去乙醚,将所得的混合物过滤,以得到固体。使用庚烷的该洗涤操作重复两次。使用泵在减压下,将得到的固体在25℃干燥2小时,得到Fmoc-Thr(THP)-OH的钠盐(2.80g,6.26mmol)。

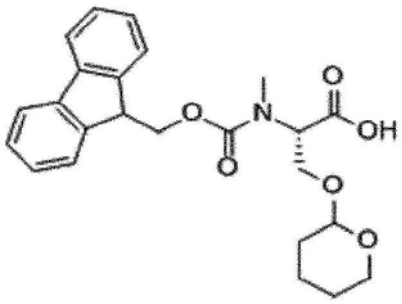
[0365] 向得到的Fmoc-Thr(THP)-OH的钠盐总量中加入乙酸乙酯(50mL)和0.05M磷酸水溶液(140mL;pH 2.1)。将其在25℃搅拌五分钟后,分离有机层和含水层。将乙酸乙酯(50mL)加入到含水层用于萃取,并将得到的有机层全部混合,并用饱和氯化钠水溶液(50mL)洗涤该混合物两次。然后将有机层用硫酸钠干燥,并在减压下蒸馏除去溶剂。使用泵在减压下,将残渣在25℃干燥两小时,然后将得到的固体溶解于叔丁基甲醚(TBME,50mL)中,并在减压下蒸馏除去溶剂。使用泵在减压下,将其进一步在25℃干燥一小时,产生(2S,3R)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)丁酸(化合物2,Fmoc-Thr(THP)-OH,2.70g,残留30mol%叔丁基甲醚(TBME)),其作为由于THP保护基上的不对称碳而形成的非对映异构体。将得到的Fmoc-Thr(THP)-OH保存在-25℃的冰箱中。

[0366] LCMS(ESI)m/z=424.2(M-H)$^-$

[0367] 保留时间:0.84分钟,0.85分钟(分析条件SQDFA05)

[0368] 实施例1-3:

[0369] (2S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(甲基)氨基)-3-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)丙酸(化合物6,Fmoc-MeSer(THP)-OH)的合成

[0370] 

化合物 6

[0371] 通过文献(文献:WO2013/100132A1)中描述的方法,合成(S)-2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(甲基)氨基)-3-羟基丙酸(Fmoc-MeSer-OH)。向(S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧

基)羰基)(甲基)氨基)-3-羟基丙酸(Fmoc-MeSer-OH;15g,43.9mmol)的四氢呋喃(88mL)溶液中加入对甲苯磺酸吡啶鎓盐(PPTS;0.552g,2.197mmol)和3,4-二氢-2H-吡喃(23.85mL),并将其在50℃搅拌四小时。将混合物冷却至25℃,并加入乙酸乙酯(90mL)。接着,用饱和氯化钠水溶液(90mL)洗涤有机层,并用乙酸乙酯(90mL)萃取含水层。将所有得到的有机层混合,并将其进一步用饱和氯化钠水溶液(90mL)洗涤两次。将有机层用硫酸钠干燥,并在减压下蒸馏除去溶剂。

[0372] 将15.0g所得残渣溶解在四氢呋喃(175mL)中,并向其中加入1.0M磷酸盐缓冲液(175mL;调节至pH8.0)。将该混合物在50℃搅拌三小时。冷却至25℃后,加入乙酸乙酯(175mL),分离有机层和含水层。将乙酸乙酯(175mL)加入到含水层用于萃取,并将得到的有机层全部混合,并用饱和氯化钠水溶液(175mL)洗涤两次。然后将有机层用硫酸钠干燥,并在减压下蒸馏除去溶剂。

[0373] 将得到的残渣溶解于二氯甲烷(100mL)中,然后加入庚烷(250mL)。在控制的减压(约100hPa)下,仅蒸馏除去二氯甲烷,并将所得的混合物过滤,以得到固体。使用庚烷的该洗涤操作重复两次。使用泵在减压下,将得到的固体在25℃干燥2小时。

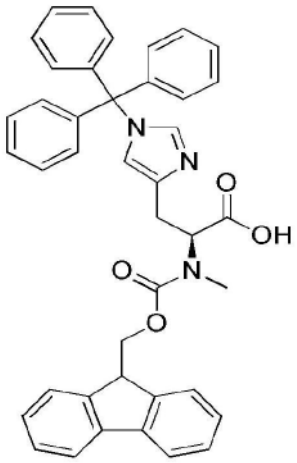
[0374] 向所得残渣中加入叔丁基甲醚(TBME,250mL)和0.05M磷酸水溶液(700mL;pH 2.1)。将其在25℃搅拌五分钟后,分离有机层和含水层。将叔丁基甲醚(TBME,250mL)加入到含水层用于萃取,并将得到的有机层全部混合,并用饱和氯化钠水溶液(250mL)洗涤两次。然后将有机层用硫酸钠干燥,并在减压下蒸馏除去溶剂。使用泵在减压下,将残渣在25℃干燥两小时,以产生(2S)-2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(甲基)氨基)-3-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)丙酸(化合物6,Fmoc-MeSer(THP)-OH,9.0g,残留30mol%叔丁基甲醚(TBME))。将得到的Fmoc-MeSer(THP)-OH保存在-25℃的冰箱中。

[0375] LCMS(ESI)m/z=426.4$(M+H)^+$

[0376] 保留时间:0.86分钟(分析条件SQDFA05)

[0377] 实施例1-4:

[0378] (S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(甲基)氨基)-3-(1-三苯甲基-1H-咪唑-4-基)丙酸(化合物7,Fmoc-MeHis(Trt)-OH)的合成

[0379] 

化合物7

[0380] 将(S)-3-(1H-咪唑-4-基)-2-(甲基氨基)丙酸盐酸盐(75g,364.71mmol)的二氯甲

烷(1000mL)溶液、二氯二甲基硅烷(51g,395.16mmol)和三乙胺(40g,395.30mmol)加入到3000mL烧瓶中。接下来,加入(氯甲烷三苯甲基)三苯(Trt-Cl;111g,398.17mmol)的二氯甲烷(500mL)溶液和三乙胺(40g,395.30mmol)。将得到的反应溶液在回流加热的同时搅拌4小时,并在20℃下进一步搅拌两小时。通过向反应溶液中加入甲醇停止反应,然后在减压下蒸馏除去溶剂。使用三乙胺调节pH至8-8.5,并得到125g固体。

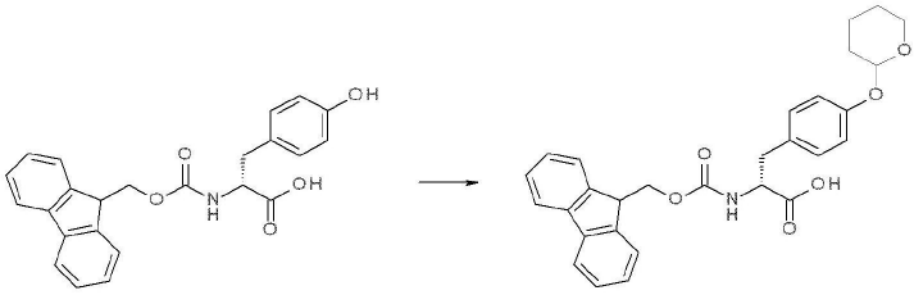
[0381] 向所得固体中加入1,4-二噁烷(1000mL)、碳酸钾(84g,603.39mmol)和水(1000mL)。另外,加入(2,5-二氧基吡咯烷-1-基)(9H-芴-9-基)甲基碳酸酯(Fmoc-OSu;102g,302.38mmol),并将混合物在0℃搅拌两小时。将获得的反应溶液用乙醚(2000mL)洗涤,然后用乙酸将溶液的pH调节至6-7。将所得的固体过滤,以得到(S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(甲基)氨基)-3-(1-三苯甲基-1H-咪唑-4-基)丙酸(化合物7,Fmoc-MeHis(Trt)-OH,155g)。

[0382] LCMS(ESI)m/z=634.4$(M+H)^+$

[0383] 保留时间:1.07分钟(分析条件SQDAA05)

[0384] 实施例1-5:

[0385] (2R)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(4-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)苯基)丙酸(化合物8,Fmoc-D-Tyr(THP)-OH)的合成

[0386] 

化合物 8

[0387] 将甲苯(5.0mL)加入到(R)-2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(4-羟基苯基)丙酸(Fmoc-D-Tyr-OH,购自Watanabe Chemical Industries;500mg,1.24mmol)和催化量的对甲苯磺酸吡啶鎓盐(PPTS;15.6mg,0.062mmol)中,并通过在减压下蒸馏掉甲苯来共沸除去所含的水分。将所得残渣溶解在四氢呋喃(THF)(2.5mL)中,加入3,4-二氢-2H-吡喃(785L,8.68mmol),并将其在50℃氮气氛下搅拌四小时。将反应溶液冷却至25℃,加入乙酸乙酯(3mL)。接着,加入饱和氯化钠水溶液(3mL)以洗涤有机层,并使用乙酸乙酯(3mL)萃取含水层。将所有得到的有机层混合,并将其进一步用饱和氯化钠水溶液(3mL)洗涤两次。有机层用硫酸钠干燥,在减压下蒸馏除去溶剂,并使用泵在减压下进一步干燥所得的材料,得到596mg残渣。

[0388] 将得到的残渣(300mg)溶解于四氢呋喃(THF)(2.5mL)中,然后加入1.0M磷酸水溶液(pH 8.0,2.5mL),并在50℃搅拌三小时。向反应溶液中加入乙酸乙酯(3mL),分离有机层和含水层,并且含水层用乙酸乙酯(3mL)萃取。将所有得到的有机层混合,并将其用饱和氯化钠水溶液(3mL)洗涤两次。将有机层用硫酸钠干燥,然后在减压下蒸馏除去溶剂,并使用泵在减压下进一步干燥所得的材料30分钟。

[0389] 将得到的残渣溶解在二氯甲烷(DCM)(2mL)中,然后加入庚烷(5mL)。使用蒸发器除

去单独的二氯甲烷(DCM),并且过滤收集得到的白色固体。对所得的白色固体重复类似操作两次。使用泵在减压下,将以这种方式获得的白色固体干燥两小时。

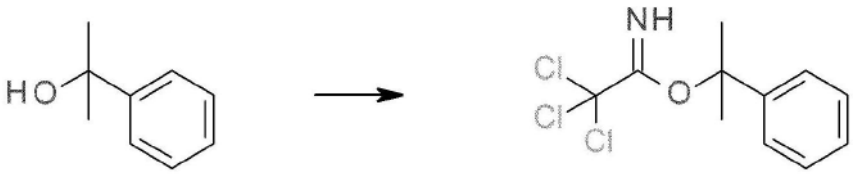
[0390] 向上述白色固体中加入叔丁基甲醚(TBME)(4.6mL)和0.05M磷酸水溶液(pH 2.1,13mL),并在25℃搅拌五分钟。分离有机层后,用叔丁基甲醚(TBME)(4.6mL)萃取含水层。将得到的有机层组合,并将其用饱和氯化钠水溶液(4.6mL)洗涤两次。将有机层用硫酸钠干燥,并在减压下蒸馏除去溶剂。通过反相色谱(Wakosil25C18,10g,水/乙腈)纯化所得到的残渣,以获得(2R)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(4-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)苯基)丙酸(化合物8,Fmoc-D-Tyr(THP)-OH,173mg),产率57%,其作为由于THP保护基上的不对称碳而形成的非对映体。

[0391] LCMS(ESI)m/z=488.4$(M+H)^+$

[0392] 保留时间:0.92分钟(分析条件SQDFA05)

[0393] 实施例1-6:

[0394] 2-苯基丙-2-基2,2,2-三氯乙酰亚氨酸酯(2-phenylpropan-2-yl 2,2,2-trichloroacetoimidate)(化合物9)的合成

[0395] 

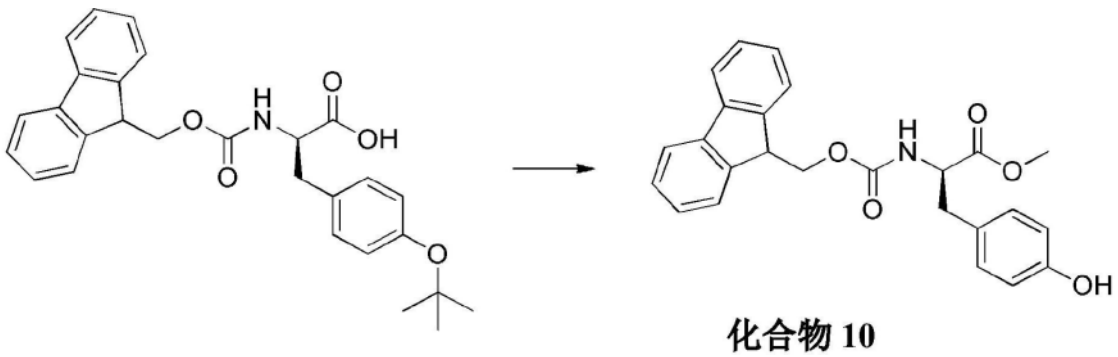
化合物 9

[0396] 在22℃下,将NaHMDS在四氢呋喃(THF)中的1.9M溶液(850μL,1.62mmol)滴加到2-苯基丙-2-醇(购自Wako Pure Chemical Industries;2.0g,14.7mmol)在乙醚(Et_2O)(4.8mL)中的溶液中。将反应溶液在相同温度下搅拌20分钟,然后冷却至0℃,滴加2,2,2-三氯乙腈(1.47mL,14.7mmol)。将反应溶液在0℃下搅拌十分钟后,将温度升高至15℃,并将其再搅拌一小时。用蒸发器浓缩反应液,向所得的残渣中加入己烷(1.8mL)和甲醇(65μL),并将其在15℃下搅拌15分钟。将所得的固体过滤,并用己烷(2.0mL)洗涤三次,以得到4.19g 2-苯基丙-2-基2,2,2-三氯乙酰亚氨酸酯(化合物9)。将其用于反应中而无需进一步纯化。

[0397] ^1H NMR(Varian 400-MR,400MHz,$CDCl_3$)δ1.89(6H,s),7.28(1H,m),7.36(2H,m),7.43(2H,m),8.20(1H,brs)

[0398] 实施例1-7:

[0399] (R)-甲基2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(4-羟基苯基)丙酸酯(化合物10,Fmoc-D-Tyr-OMe)的合成

[0400] 

化合物 10

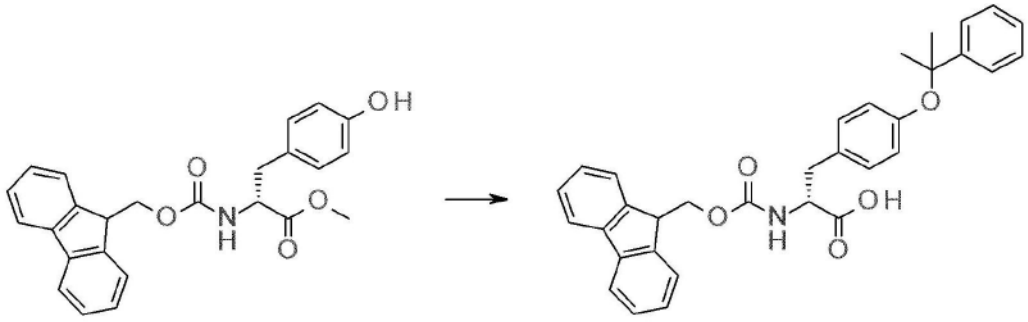
[0401] 在氮气氛下,在0℃下将亚硫酰氯(1.59mL,21.76mmol)滴加到(R)-2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(4-(叔丁氧基)苯基)丙酸(Fmoc-D-Tyr(tBu)-OH,购自Watanabe Chemical Industries;5.0g,10.88mmol)和甲醇(8.80mL,218mmol)的混合物中。将得到的反应溶液在25℃搅拌三小时,然后在减压下蒸馏除去溶剂。将得到的残渣溶解于乙酸乙酯中,并将该溶液用饱和氯化钠水溶液洗涤两次。有机层用硫酸钠干燥,通过过滤除去固体,并在减压下蒸馏除去溶剂,以得到(R)-甲基2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(4-羟基苯基)丙酸酯(化合物10,Fmoc-D-Tyr-OMe,4.50g)。

[0402] LCMS(ESI)m/z=418.3$(M+H)^+$

[0403] 保留时间:0.81分钟(分析条件SQDFA05)

[0404] 实施例1-8:

[0405] (R)-2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(4-((2-苯基丙-2-基)氧基)苯基)丙酸(化合物11,Fmoc-D-Tyr(Pis)-OH)的合成

[0406] 

化合物 10 化合物 11

[0407] 在0℃,向(R)-甲基2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(4-羟基苯基)丙酸酯(化合物10,Fmoc-D-Tyr-OMe;100mg,0.24mmol)的四氢呋喃(THF)溶液(240μL)中,滴加单独制备的10M的2-苯基丙-2-基2,2,2-三氯乙酰亚氨酸酯(化合物9)的环已烷溶液(60μL)和催化量的三氟化硼-乙醚复合物(BF_3-OEt,4.55μL,0.036mmol)。将反应溶液在25℃搅拌1小时之后,再次滴加等量的10M的2-苯基丙-2-基2,2,2-三氯乙酰亚氨酸酯(化合物9)的环已烷溶液(60μL)和三氟化硼-乙醚复合物(BF_3-OEt,4.55μL,0.036mmol),并且将该反应溶液在25℃再次搅拌30分钟。用二氯甲烷(DCM)稀释反应溶液,加入饱和碳酸氢钠水溶液。用二氯甲烷萃取后,用饱和氯化钠水溶液洗涤有机层。将该有机层用硫酸钠干燥,在减压下蒸馏除去溶剂,并使用泵进一步干燥所得的材料。向所得残渣中加入二氯甲烷(DCM)/已烷=1/1的溶液,通过过滤除去沉淀。使用蒸发器浓缩滤液,通过快速柱色谱法(Purif Pack(注册商标)SIZE 20,已烷/乙酸乙酯)纯化获得的残渣,并获得(R)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(4-((2-苯基丙-2-基)氧基)苯基)丙酸酯(Fmoc-D-Tyr(Pis)-OMe)作为混合物。

[0408] 将上述得到的混合物溶解在二氯乙烷(DCE)(535μL)中,加入氢氧化三甲基锡(IV)(Me_3SnOH,58.1mg,0.321mmol),并在60℃将其搅拌七小时。进一步将氢氧化三甲基锡(IV)(Me_3SnOH,29.1mg,0.161mmol)加入反应溶液中,并将其在60℃搅拌15小时。使用蒸发器浓缩反应溶液,加入叔丁基甲醚(TBME)(1mL)和0.05M磷酸水溶液(pH 2.1,2mL),并在25℃搅拌五分钟。分离有机层后,用叔丁基甲醚(TBME,1mL)萃取含水层两次。将有机层用硫酸钠干燥,在减压下蒸馏除去溶剂,并使用泵进一步干燥所得的材料。通过柱色谱(Purif Pack(注

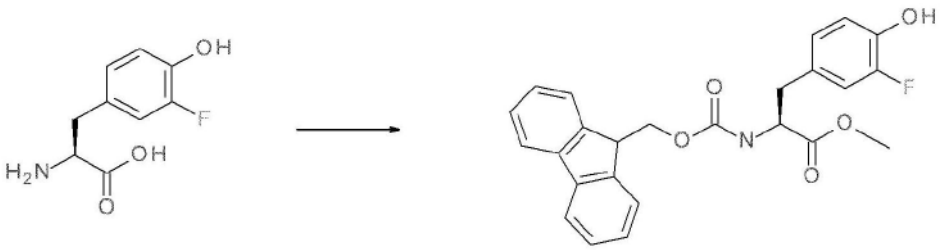
册商标)SIZE 20,二氯甲烷/甲醇)纯化所得到的残渣,以39%的两步产率得到(R)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(4-((2-苯基丙-2-基)氧基)苯基)丙酸(化合物11,Fmoc-D-Tyr(Pis)-OH,33mg)。

[0409] LCMS(ESI)m/z=522.4(M+H)$^+$

[0410] 保留时间:1.00分钟(分析条件SQDFA05)

[0411] 实施例1-9:

[0412] (S)-甲基2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-氟-4-羟基苯基)丙酸酯(化合物12,Fmoc-Tyr(3-F)-OMe)的合成

[0413] 

化合物 12

[0414] 将(S)-2-氨基-3-(3-氟-4-羟基苯基)丙酸(H_2N-Tyr(3-F)-OH,购自Astatech;2.0g,10.0mmol)溶解在10%碳酸钠水溶液中,然后使用滴液漏斗,在0℃加入(2,5-二氧基吡咯烷-1-基)(9H-芴-9-基)甲基碳酸酯(Fmoc-OSu,3.39g,10.0mmol)在1,4-二噁烷(35mL)中的溶液。将反应溶液在25℃搅拌40分钟后,加入水(35mL)和乙醚(70mL),并将反应溶液用乙醚洗涤三次。用5N盐酸水溶液将含水层的pH调节至2-3,然后用乙酸乙酯(100mL×3)萃取三次。将有机层用硫酸镁干燥,在减压下蒸馏除去溶剂,并使用泵进一步干燥所得的材料。将得到的残渣(4.08g)经过进一步纯化用于下一步反应。

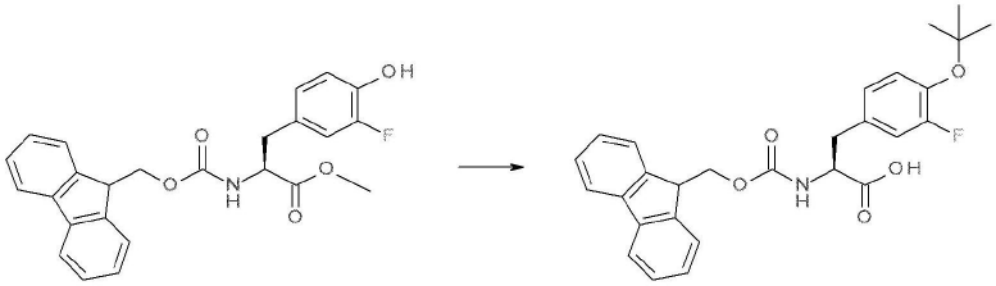
[0415] 将上述残渣(1.04g)溶解在甲醇(10mL)中,在0℃下滴加亚硫酰氯($SOCl_2$,539μL,7.38mmol)。将反应溶液在60℃搅拌一小时,然后冷却至室温,并使用蒸发器蒸馏除去溶剂。向所得残渣中加入乙酸乙酯和水,并使用乙酸乙酯萃取两次。有机层用饱和氯化钠水溶液洗涤,并用硫酸镁干燥,并且在减压下蒸馏除去溶剂,并使用泵进一步干燥。通过快速柱色谱(Purif Pack(注册商标)SIZE 200,己烷/乙酸乙酯)纯化所得到的残渣,以84%的两步产率得到(S)-甲基2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-氟-4-羟基苯基)丙酸酯(化合物12,Fmoc-Tyr(3-F)-OMe;900mg,2.07mmol)。

[0416] LCMS(ESI)m/z=436.4(M+H)$^+$

[0417] 保留时间:0.82分钟(分析条件SQDFA05)

[0418] 实施例1-10:

[0419] (S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(4-(叔丁氧基)-3-氟苯基)丙酸(化合物13,Fmoc-Tyr(3-F,tBu)-OH)的合成

[0420] 

化合物 12 化合物 13

[0421] 在0℃,向(S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-氟-4-羟基苯基)丙酸酯(化合物12,Fmoc-Tyr(3-F)-OMe;300mg,0.689mmol)的四氢呋喃(THF)溶液(690μL)中,滴加叔丁基2,2,2-三氯乙酰亚氨酯(308μL,1.72mmol)和催化量的三氟化硼-乙醚复合物(BF_3-OEt,13.1μL,0.103mmol)。将反应溶液在25℃搅拌1小时之后,再次滴加等量的叔丁基2,2,2-三氯乙酰亚氨酯(308μL,1.72mmol)和三氟化硼-乙醚复合物(BF_3-OEt,13.1μL,0.103mmol),并且将该反应溶液在25℃再次搅拌1小时。用二氯甲烷(DCM)稀释反应溶液,加入饱和碳酸氢钠水溶液。用二氯甲烷萃取后,用饱和碳酸氢钠水溶液和饱和氯化钠水溶液洗涤有机层。将有机层用硫酸钠干燥,在减压下蒸馏除去溶剂,并使用泵进一步干燥所得的材料。通过快速柱色谱(Purif Pack(注册商标)SIZE 60,己烷/乙酸乙酯)纯化所得到的残渣,得到(S)-甲基2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(4-(叔丁氧基)-3-氟苯基)丙酸酯(Fmoc-Tyr(3-F,tBu)-OMe)作为混合物。

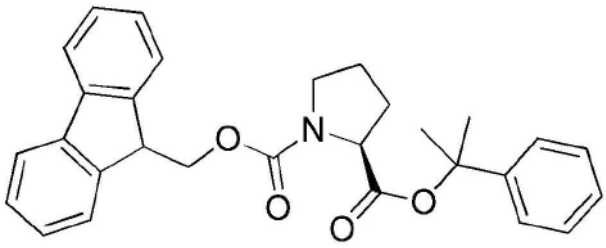
[0422] 将上述得到的混合物(40mg)溶解在二氯乙烷(DCE)(810μL)中,向其中加入氢氧化三甲基锡(IV)(Me_3SnOH,29.4mg,0.163mmol),并将混合物在60℃搅拌一小时。向反应液中加入甲酸(15.35μL,0.407mmol)后,通过反相色谱(Wakosil25C18,10g,0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸的乙腈溶液)对其进行纯化,以便以93%的两步产率得到(S)-2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(4-(叔丁氧基)-3-氟苯基)丙酸(化合物13,Fmoc-Tyr(3-F,tBu)-OH;27mg,56.5μmol)。

[0423] LCMS(ESI)m/z=478.3$(M+H)^+$

[0424] 保留时间:0.94分钟(分析条件SQDFA05)

[0425] 实施例1-11:

[0426] 2-(2-苯基丙-2-基)(S)-1-((9H-芴-9-基)甲基)吡咯烷-1,2-二羧酸酯(化合物14,Fmoc-Pro-OPis)的合成

[0427] 

化合物 14

[0428] 在氮气气氛下,在室温下,在三分钟或更长时间段内向2-苯基-2-丙醇(14.2g,104mmol)和脱水乙醚(35mL)的混合物中滴加1.9M NaHMDS(四氢呋喃溶液;0.85mL,

1.62mmol),然后将其在室温下搅拌30分钟。

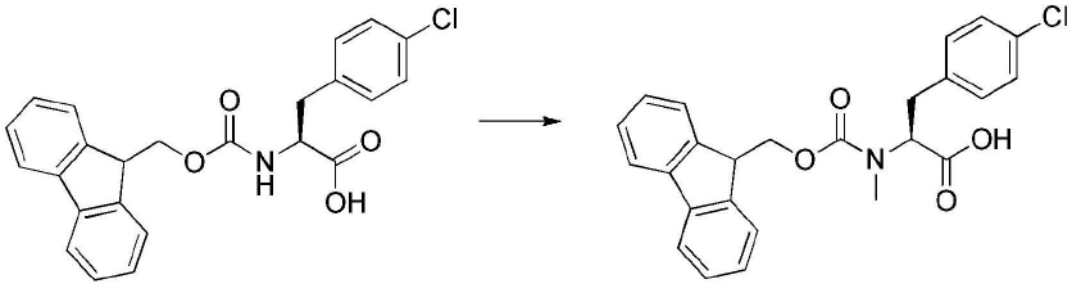
[0429] 随后,将反应溶液在冰上冷却至0℃,并在五分钟或更长的时间段内滴加三氯乙腈(11.5mL,115mmol)。将混合物在0℃搅拌十分钟,然后从其冰浴中取出,并在室温下进一步搅拌一小时。将所得混合物在冰上冷却至0℃,并在15分钟内加入(S)-1-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)吡咯烷-2-羧酸(Fmoc-Pro-OH;42.3g,125mmol)和二氯甲烷(100mL)的混合物。将其在0℃搅拌30分钟,然后过滤,并用已烷-二氯甲烷(5/1)溶液洗涤。然后,在减压下蒸馏除去溶剂。将得到的残渣通过硅胶柱色谱(已烷-乙酸乙酯)纯化,得到2-(2-苯基丙烷-2-基)(S)-1-((9H-芴-9-基)甲基)吡咯烷-1,2-二羧酸酯(化合物14,Fmoc-Pro-OPis;26.3g,57.7mmol)。

[0430] LCMS(ESI)m/z=456.4$(M+H)^+$

[0431] 保留时间:0.76分钟(分析条件SQDAA50)

[0432] 实施例1-12:

[0433] (S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(甲基)氨基)-3-(4-氯苯基)丙酸(化合物16,Fmoc-MePhe(4-Cl)-OH)的合成

[0434] 

化合物 16

[0435] 向(S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(4-氯苯基)丙酸(Fmoc-Phe(4-Cl)-OH;170g,402.96mmol)的甲苯(2.5L)溶液中加入多聚甲醛(48g,1.60mol)和10-樟脑磺酸(CSA;4.6g,19.83mmol),并将其在110℃搅拌16小时。接着,将反应溶液用饱和碳酸氢钠水溶液(1L)洗涤两次,用饱和氯化钠水溶液(1L)洗涤两次。将有机层用硫酸钠干燥,通过过滤除去固体,并在减压下蒸馏除去溶剂,以得到160g(S)-(9H-芴-9-基)甲基4-(4-氯苄基)-5-氧代噁唑啉-3-碳酸酯。

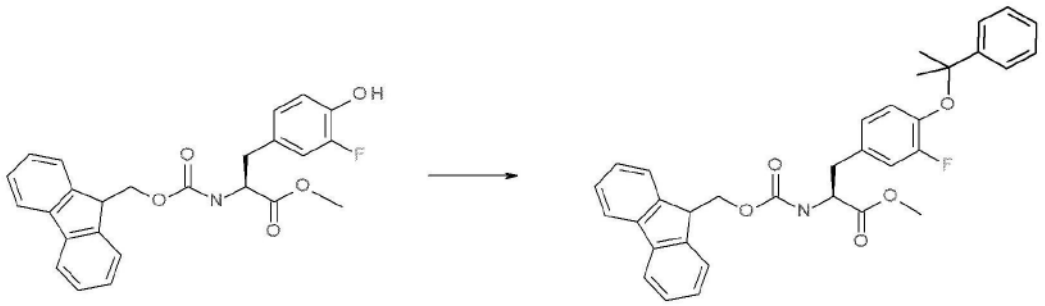
[0436] 向通过混合由类似操作制备的单独批次制备的(S)-(9H-芴-9-基)甲基4-(4-氯苄基)-5-氧代噁唑啉-3-碳酸酯(230g,530.10mmol)的二氯甲烷(2.5L)溶液中,混合三乙基硅烷(881g,7.58mol)和三氟乙酸(TFA;2518g,22.28mol),并将混合物在30℃搅拌12小时。然后,在减压下蒸馏除去溶剂,并通过将得到的残渣在二氯甲烷/已烷(1/10,v/v)中重结晶,得到(S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)(甲基)氨基)-3-(4-氯苯基)丙酸(化合物16,Fmoc-MePhe(4-Cl)-OH,205g)。

[0437] LCMS(ESI)m/z=436.3$(M+H)^+$

[0438] 保留时间:0.99分钟(分析条件SQDAA05)

[0439] 实施例1-13:

[0440] (S)-甲基2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-氟-4-((2-苯基丙-2-基)氧基)苯基)丙酸酯(化合物21,Fmoc-Tyr(3-F,Pis)-OMe)的合成

[0441] 

化合物 12 化合物 21

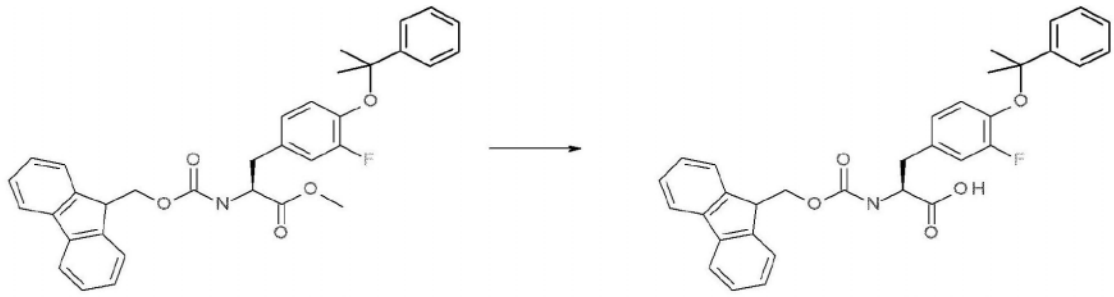
[0442] 将(S)-甲基2-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-氟-4-羟基苯基)丙酸酯(化合物12,Fmoc-Tyr(3-F)-OMe;200mg,0.459mmol)溶于THF(460μL)中,然后于0℃滴加单独制备的2-苯基丙-2-基2,2,2-三氯乙酰亚氨酸酯(化合物9;322mg,1.15mmol)和催化量的三氟化硼-乙醚复合物(BF_3-OEt,8.73μL,0.069mmol)。将反应液于室温搅拌30分钟后,在0℃,滴加等量的2-苯基丙-2-基2,2,2-三氯乙酰亚氨酸酯(322mg,1.15mmol)和催化量的三氟化硼-乙醚复合物(BF3-OEt,8.73μL,0.069mmol)。将反应液于室温再搅拌30分钟后,将其用二氯甲烷稀释,并在冰上冷却的同时添加饱和碳酸氢钠水溶液。用二氯甲烷萃取后,用饱和氯化钠水溶液洗涤有机层。将该有机层用硫酸钠干燥,在减压下蒸馏除去溶剂,并使用泵进一步干燥所得的材料。将得到的残渣用二氯甲烷/已烷=1/1(20mL,10mL)洗涤两次,并通过过滤除去白色固体。浓缩所得的滤液,通过快速柱色谱法(Purif Pack(注册商标)SIZE20,已烷/乙酸乙酯,0.1%二异丙基乙胺(DIPEA))纯化残渣,以83%的产率获得(S)-甲基2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-氟-4-((2-苯基丙-2-基)氧基)苯基)丙酸酯(化合物21,Fmoc-Tyr(3-F,Pis)-OMe;210mg,0.379mmol)。

[0443] LCMS(ESI)m/z=554.4$(M+H)^+$

[0444] 保留时间:1.09分钟(分析条件SQDFA05)

[0445] 实施例1-14:

[0446] (S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-氟-4-((2-苯基丙-2-基)氧基)苯基)丙酸(化合物22,Fmoc-Tyr(3-F,Pis)-OH)的合成

[0447] 

化合物 21 化合物 22

[0448] 将(S)-甲基2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-氟-4-((2-苯基丙-2-基)氧基)苯基)丙酸酯(化合物21,Fmoc-Tyr(3-F,Pis)-OMe;210mg,0.379mmol)溶解在二氯乙烷(DCE)(1.26mL)中,加入氢氧化三甲基锡(IV)(Me_3SnOH,137mg,0.379mmol),并将其在60℃搅拌三小时。使用蒸发器浓缩反应溶液之后,加入叔丁基甲醚(TBME)(2.0mL)和0.05M磷酸水溶液(pH 2.1,4.0mL),并在25℃搅拌15分钟。分离有机层后,用叔丁基甲醚(TBME,1mL)萃取含水层两次。将有机层用硫酸钠干燥,在减压下蒸馏除去溶剂,并使用泵进一步干

燥所得的材料。将得到的残渣溶解于0.1％甲酸的乙腈溶液中,搅拌15分钟,然后将所得的溶液通过反相色谱法(Wakosil25C18,30g,0.1％甲酸水溶液/0.1％甲酸的乙腈溶液)纯化,以93％的产率得到(S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-(3-氟-4-((2-苯基丙-2-基)氧基)苯基)丙酸(化合物22,Fmoc-Tyr(3-F,Pis)-OH;190mg,0.352mmol)。

[0449] LCMS(ESI)m/z＝538.2(M-H)⁻

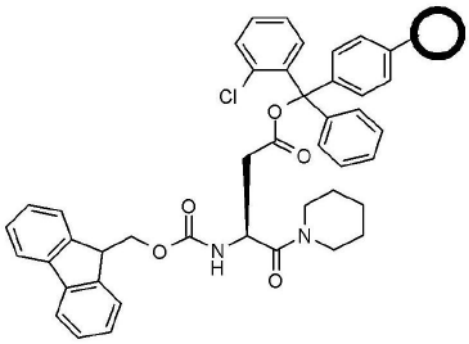
[0450] 保留时间:1.00分钟(分析条件SQDFA05)

[0451] 在Fmoc-氨基酸和用于肽合成仪的肽合成的树脂之间形成的缀合物的合成

[0452] 如下合成缀合物,所述缀合物是在Fmoc-氨基酸和用于肽合成仪的肽合成的树脂之间形成的。

[0453] 实施例1-15:

[0454] (S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-氧代-4-(哌啶-1-基)丁酸-2-氯三苯甲基树脂(化合物50,Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip)的合成

[0455] 

化合物 50

[0456] 通过文献(文献:WO2013/100132A1)中描述的方法,合成(S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-氧代-4-(哌啶-1-基)丁酸-2-氯三苯甲基树脂(化合物50,Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip)。

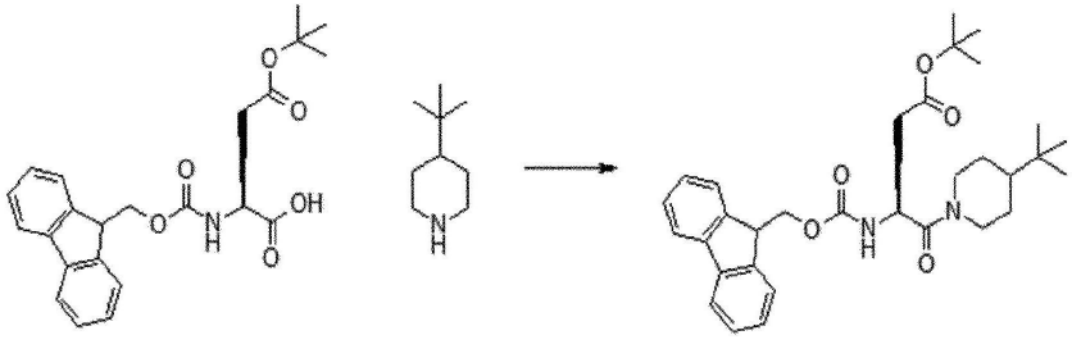
[0457] 在此,当聚合物或树脂与化合物结合时,该聚合物或树脂部分可以由“○”(空心圆)表示。此外,为了阐明树脂部分的反应点,反应位点的化学结构可以通过将其连接到空心圆上来显示。例如,在上述结构(Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物50))中,树脂的2-氯三苯甲基通过酯键与Asp的侧链羧酸连接。此外,pip表示哌啶,在上述结构中,C末端羧酸基团与哌啶形成酰胺键。

[0458] 实施例1-16:

[0459] 化合物(化合物52)的合成,其中Fmoc-Asp-piptBu(化合物51)的侧链羧酸与树脂连接

[0460] 实施例1-16-1:

[0461] (S)-叔丁基3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(4-(叔丁基)哌啶-1-基)-4-氧代丁酸酯(化合物53,Fmoc-Asp(OtBu)-piptBu)的合成(piptBu指4-(叔丁基)哌啶,在此其显示C末端羧酸基团与4-(叔丁基)哌啶形成酰胺键)

[0462] 

化合物 53

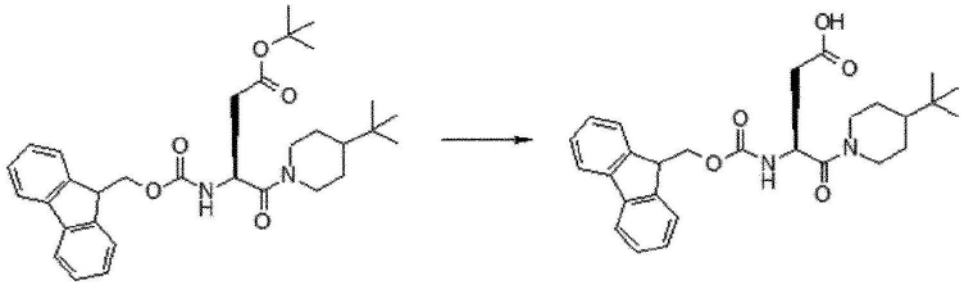
[0463] 将(S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(叔丁氧基)-4-氧代丁酸(10g,24.30mmol)、4-(叔丁基)哌啶盐酸盐(4.10g,23.09mmol)和1-羟基苯并三唑一水合物(HOBt,3.61g)溶解在DMF(80mL)中,然后在0℃下加入1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(WSCI·HCl,5.59g),并将其在0℃下搅拌30分钟。随后,加入4-甲基吗啉(2.54mL),并将其在室温下搅拌一小时。向反应溶液中加入已烷-乙酸乙酯(1/1,v/v,500mL),并将有机层用饱和氯化铵水溶液洗涤两次,用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤两次,用饱和氯化钠水溶液洗涤一次。将得到的有机层用硫酸钠干燥,通过过滤除去固体,并在减压下蒸馏除去溶剂。将得到的残渣通过硅胶柱色谱(流动相:己烷-乙酸乙酯)纯化,以产生(S)-叔丁基3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(4-(叔丁基)哌啶-1-基)-4-氧代丁酸酯(化合物53,Fmoc-Asp(OtBu)-piptBu;11.5g,21.51mmol)。

[0464] LCMS(ESI)m/z=535.4$(M+H)^+$

[0465] 保留时间:1.17分钟(分析条件SQDAA05)

[0466] 实施例1-16-2:

[0467] (S)-3-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(4-(叔丁基)哌啶-1-基)-4-氧代丁酸(化合物51,Fmoc-Asp-piptBu)的合成

[0468] 

化合物 53 化合物 51

[0469] 将甲苯加入到(S)-叔丁基3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(4-(叔丁基)哌啶-1-基)-4-氧代丁酸酯(化合物53,Fmoc-Asp(OtBu)-piptBu;2.0g,3.74mmol)中,在减压下,通过共沸蒸馏掉溶剂来除去所含的水分。将得到的残渣溶解于二氯甲烷(1.66mL)中,并用卡尔·费歇尔滴定法确认所包括的水分量为110ppm。随后,将溶液在0℃下搅拌五分钟,在0℃下滴加三氟乙酸(TFA,1.66mL),并将其搅拌五分钟。使反应溶液的温度回到室温,并继续搅拌四小时。将混合物冷却至0℃,滴加三乙胺(3.1mL)。用二氯甲烷(30mL)稀释混合物,并用5%磷酸二氢钠水溶液(5%NaH_2PO_4aq,pH 4.4)洗涤。有机层用硫酸钠干燥,通过过滤除去固体,然后在20℃在减压下蒸馏除去溶剂。因为对所得残渣的^{19}FNMR(DMSO-d6)

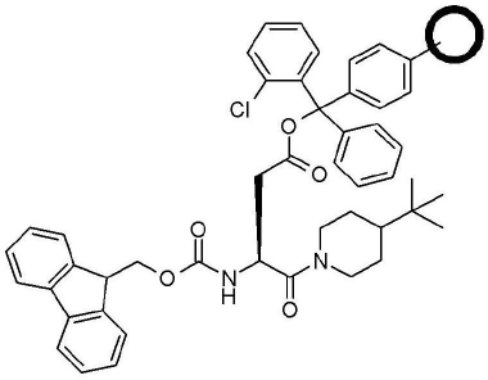
测量证实了残余TFA的存在,将残渣再次稀释于二氯甲烷(30mL)中,并用5%磷酸二氢钠水溶液(5%NaH_2PO_4aq,pH 4.4)洗涤。有机层用硫酸钠干燥,通过过滤除去固体,然后在20℃在减压下蒸馏除去溶剂,以得到(S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(4-(叔丁基)哌啶-1-基)-4-氧代丁酸(化合物51,Fmoc-Asp-piptBu;1.73g)。通过^{19}FNMR证实了残留的TFA低于检测限。

[0470] LCMS(ESI)m/z=479.4$(M+H)^+$

[0471] 保留时间:1.00分钟(分析条件SQDAA05)

[0472] 实施例1-16-3:

[0473] (S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(4-(叔丁基)哌啶-1-基)-4-氧代丁酸-2-氯三苯甲基树脂(化合物52,Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-piptBu)的合成

[0474] 

化合物 52

[0475] 将2-氯三苯甲基氯树脂(1.60mmol/g,100-200目,1%DVB,购自Watanabe Chemical Industries;4.52g,7.23mmol)和脱水二氯甲烷(72mL)置于装有过滤器的反应容器中,并在25℃振荡十分钟。通过施加氮气压力除去二氯甲烷之后,将混合溶液加入到反应容器中,并将其振荡15分钟,其中所述混合溶液是通过将脱水甲醇(1.17mL)和二异丙基乙胺(DIPEA,3.02mL)加入到(S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(4-(叔丁基)哌啶-1-基)-4-氧代丁酸(化合物51,Fmoc-Asp-piptBu;1.73g)和脱水二氯甲烷(72mL)中而产生的。通过施加氮气压力除去反应溶液后,向反应容器中加入混合溶液,并将其振荡90分钟,其中所述混合溶液是通过将脱水甲醇(9.0mL)和二异丙基乙胺(DIPEA,3.02mL)加入到脱水二氯甲烷(72mL)中而产生的。在通过施加氮气压力除去反应溶液之后,将二氯甲烷放置于容器中,并且将其振荡五分钟。通过施加氮气压力除去反应溶液。这个用二氯甲烷洗涤树脂的操作重复五次,并将所得树脂在减压下干燥过夜,以产生(S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(4-(叔丁基)哌啶-1-基)-4-氧代丁酸-2-氯三苯甲基树脂(化合物52,Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-piptBu,5.23g)。

[0476] 将得到的Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-piptBu(化合物52,16.5mg)置于反应容器中,加入20%哌啶/DMF溶液(1mL),并将其在25℃振荡30分钟。从混合的反应溶液中取出30μL,并用DMF(2.97mL)稀释,测量其吸光度(301.2nm)(Shimadzu,UV-1600PC(小室长度:1.0cm)用于测量),并计算Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-piptBu(化合物52)的加载率为0.356mmol/g。

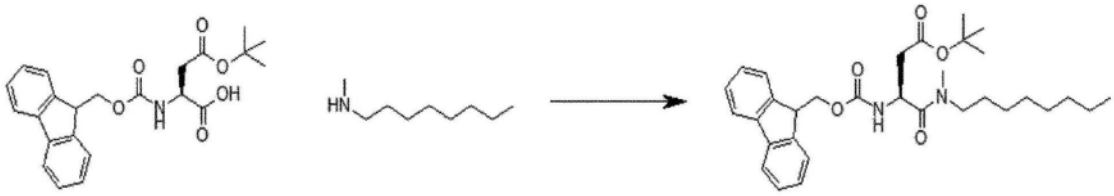
[0477] 相似地合成但具有不同加载率的不同批次也用于肽合成。

[0478] 实施例1-17:

[0479] 化合物(化合物55)的合成,其中Fmoc-Asp-MeOctyl(化合物54)在其侧链羧酸处与树脂连接

[0480] 实施例1-17-1:

[0481] (S)-叔丁基3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(甲基(辛基)氨基)-4-氧代丁酸酯(化合物56,Fmoc-Asp(OtBu)-MeOctyl)的合成(MeOCYL是指N-甲基辛-1-胺,在此其显示C末端羧酸基团与N-甲基辛-1-胺形成酰胺键)

[0482] 

化合物 56

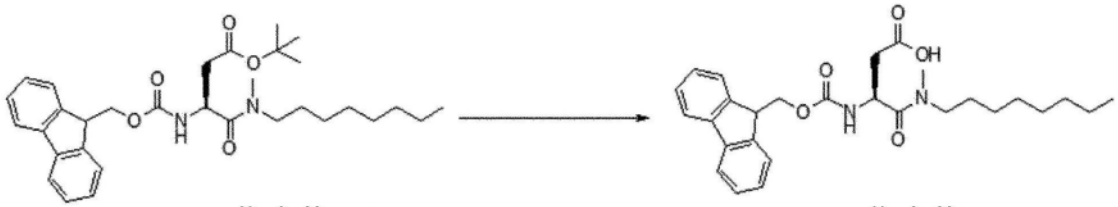
[0483] 将(S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(叔丁氧基)-4-氧代丁酸(Fmoc-Asp(OtBu)-OH;8.00g,19.44mmol)和DMF(65mL)加入到300mL烧瓶中,并在室温下搅拌五分钟。然后,加入4-甲基吗啉(2.57mL)和O-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HATU;8.87g,23.33mmol),并在0℃搅拌五分钟。此外,在两分钟内滴加N-甲基辛-1-胺(3.35mL,18.47mmol),并将所得反应溶液在0℃搅拌30分钟。向该反应溶液中加入己烷-乙酸乙酯(1/1,v/v,400mL),并将其用水(400mL)、饱和氯化铵水溶液(400mL)、50%碳酸氢钠水溶液(400mL)、水(400mL x 2)以及随后的饱和氯化钠水溶液(400mL)洗涤。将得到的有机层用硫酸钠干燥,除去固体,并在减压下蒸馏除去溶剂。将得到的残渣通过硅胶柱色谱法(己烷-乙酸乙酯)纯化,以产生(S)-叔丁基3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(甲基(辛基)氨基)-4-氧代丁酸酯(化合物56,Fmoc-Asp(OtBu)-MeOctyl;10.2g,19.00mmol)。

[0484] LCMS(ESI)m/z=537.5$(M+H)^+$

[0485] 保留时间:0.84分钟(分析条件SQDFA50)

[0486] 实施例1-17-2:

[0487] (S)-3-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(甲基(辛基)氨基)-4-氧代丁酸(化合物54,Fmoc-Asp-MeOccyl)的合成

[0488] 

化合物 56 化合物 54

[0489] 将甲苯加入到(S)-叔丁基3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(甲基(辛基)氨基)-4-氧代丁酸酯(化合物56,Fmoc-Asp(OtBu)-MeOctyl;8.1g,15.09mmol)中,在减压下,通过蒸馏掉溶剂来共沸除去所含的水分。将得到的残渣溶解于二氯甲烷(脱水的,6.7mL)中,并通过卡尔·费歇尔滴定法确认所包括的水分量为380ppm。随后,将溶液在0℃下搅拌五分钟,在0℃在五分钟的时间内滴加三氟乙酸(TFA,6.7mL),并然后将其搅拌五分

钟。使反应溶液的温度回到室温,并继续搅拌四小时。将混合物冷却至0℃,滴加三乙胺(12.62mL)。用二氯甲烷(100mL)稀释混合物,并将其用5%磷酸二氢钠水溶液(5%NaH_2PO_4aq)洗涤。有机层用硫酸钠干燥,通过过滤除去固体,然后在20℃在减压下蒸馏除去溶剂。因为对所得残渣的^{19}FNMR(DMSO-d6)测量证实了残余TFA的存在,将残渣再次溶解于二氯甲烷中,并用5%磷酸二氢钠水溶液(5%NaH_2PO_4aq)洗涤。有机层用硫酸钠干燥,通过过滤除去固体,然后在20℃在减压下蒸馏除去溶剂,以得到(S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(甲基(辛基)氨基)-4-氧代丁酸(化合物54,Fmoc-Asp-MeOctyl;6.61g,13.75mmol)。通过^{19}FNMR证实了残留的TFA低于检测限。

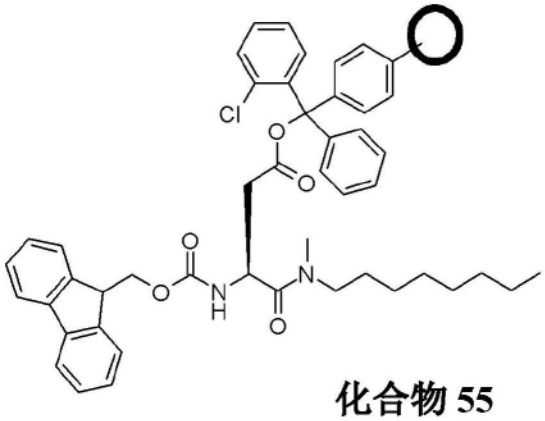
[0490] LCMS(ESI)m/z=481.4$(M+H)^+$

[0491] 保留时间:0.65分钟(分析条件SQDAA50)

[0492] 实施例1-17-3:

[0493] (S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(甲基(辛基)氨基)-4-氧代丁酸-2-氯三苯甲基树脂(化合物55,Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-MeOctyl)的合成

[0494]



化合物 55

[0495] 将2-氯三苯甲基氯树脂(1.60mmol/g,100-200目,1%DVB,购自Watanabe Chemical Industries;16.3g,26.1mmol)和脱水二氯甲烷(261mL)置于装有过滤器的反应容器中,并在25℃振荡十分钟。通过施加氮气压力除去二氯甲烷之后,将混合溶液加入到反应容器中,并将其振荡15分钟,其中所述混合溶液是通过将脱水甲醇(4.23mL)和二异丙基乙胺(DIPEA,10.9mL)加入到(S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(甲基(辛基)氨基)-4-氧代丁酸(化合物54,Fmoc-Asp-MeOctyl;6.28g,13.07mmol)中而产生的。通过施加氮气压力除去反应溶液后,向反应容器中加入混合溶液,并将其振荡90分钟,其中所述混合溶液是通过将脱水甲醇(32.4mL)和二异丙基乙胺(DIPEA,10.9mL)加入到脱水二氯甲烷(261mL)中而产生的。在通过施加氮气压力除去反应溶液之后,将二氯甲烷(261mL)放置于容器中,并且将其振荡五分钟。通过施加氮气压力除去反应溶液。用二氯甲烷洗涤树脂的这个操作重复两次,并将所得树脂在减压下干燥过夜,以产生(S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(甲基(辛基)氨基)-4-氧代丁酸-2-氯三苯甲基树脂(化合物55,Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-MeOctyl;18.2g)。

[0496] 加载率:0.366mmol/g

[0497] 相似地合成但具有不同加载率的不同批次也用于肽合成。

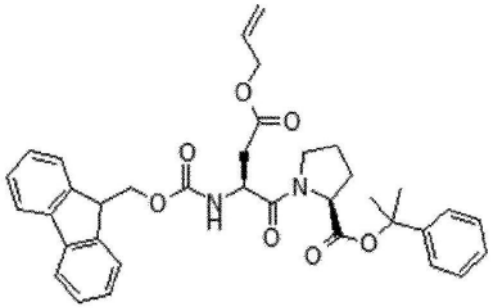
[0498] 实施例1-18:

[0499] 化合物(化合物58)的合成,其中Fmoc-Asp-Pro-OPis(化合物57)在其侧链羧酸处

与树脂连接

[0500] 实施例1-18-1:

[0501] (S)-2-苯基丙-2-基1-((S)-2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(烯丙氧基)-4-氧代丁酰基)吡咯烷-2-羧酸酯(化合物59,Fmoc-Asp(OAll)-Pro-OPis)的合成

[0502] 

化合物 59

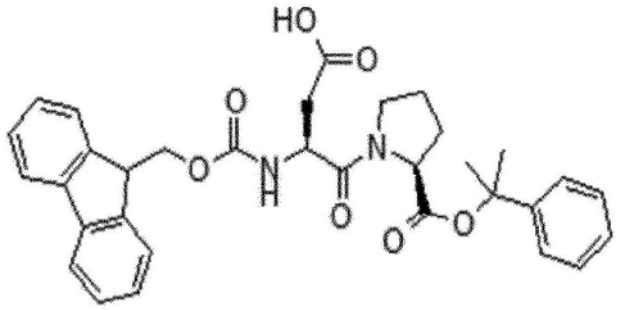
[0503] 将通过上述方法制备的2-(2-苯基丙-2-基)(S)-1-((9H-芴-9-基)甲基)吡咯烷-1,2-二羧酸酯(化合物14,Fmoc-Pro-OPis;20.0g,43.9mmol)的脱水DMF(40mL)溶液用水浴冷却至20℃。在七分钟内向该溶液中滴加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一碳烯(DBU;6.57mL,43.9mmol),并将其在室温下搅拌五分钟。随后,将反应溶液冷却至0℃,加入吡啶盐酸盐(5.07g,43.9mmol),并将其在0℃搅拌十分钟。此后,添加(S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(烯丙氧基)-4-氧代丁酸(Fmoc-Asp(OAll)-OH;17.35g,43.9mmol)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(WSCI HCl;11.8g,61.4mmol)和1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HOAt;7.17g,52.7mmol)的混合物,并且另外,在0℃下在七分钟的时间内滴加二异丙基乙胺(DIPEA;7.6mL,43.9mmol)。将反应溶液在室温下搅拌20分钟。向得到的反应溶液中加入己烷(50mL)、乙醚(50mL)、饱和碳酸氢钠水溶液(10mL)和饱和氯化钠水溶液(50mL),并将含水层用乙醚萃取两次。将所有得到的有机层组合,并用饱和氯化钠水溶液(50mL)洗涤三次,然后将其用硫酸钠干燥。在减压下除去溶剂,并将得到的残渣通过硅胶柱色谱法(流动相:己烷-乙酸乙酯)纯化,以产生(S)-2-苯基丙-2-基1-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(烯丙氧基)-4-氧代丁酰基)吡咯烷-2-羧酸酯(化合物59,Fmoc-Asp(OAll)-Pro-OPis;24.5g,40.1mmol)。

[0504] LCMS(ESI)m/z=611.4$(M+H)^+$

[0505] 保留时间:1.03分钟(分析条件SQDFA05)

[0506] 实施例1-18-2:

[0507] (S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-氧代-4-((S)-2-(((2-苯基丙-2-基)氧基)羰基)吡咯烷-1-基)丁酸(化合物57,Fmoc-Asp-Pro-OPis)的合成

[0508] 

化合物 57

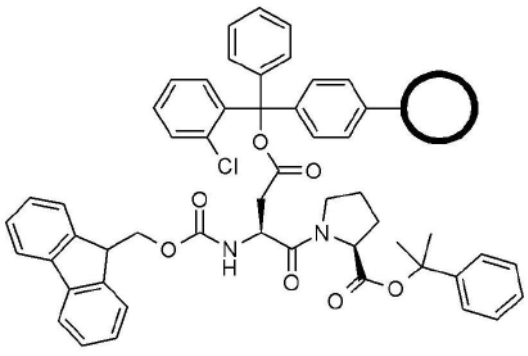
[0509] 将(S)-2-苯基丙-2-基1-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-(烯丙氧基)-4-氧代丁酰基)吡咯烷-2-羧酸酯(化合物59,Fmoc-Asp(OAll)-Pro-OPis;24.16g,39.6mmol)和四(三苯基膦)钯(0)(Pd(PPh_3)$_4$;0.114g,0.099mmol)置于300mL的两颈烧瓶中,并将烧瓶内部用氮取代。然后,加入二氯甲烷(40mL),将其在室温下搅拌,然后在水浴中冷却至14℃。在五分钟内滴加苯基硅烷(3.30mL,26.7mmol),并在14℃-17℃下在氮气氛下搅拌反应溶液35分钟。然后,加入SH二氧化硅(Fuji Silysia制造;5g)和甲醇(32.1mL),然后加入Kieselgel 60(15g)。进一步加入甲醇(30mL)、SH二氧化硅(Fuji Silysia制造;5g)和Kieselgel 60(25g),并将混合物在17℃-24℃下搅拌,直到液相变成无色。将得到的混合物通过硅藻土过滤,用二氯甲烷-甲醇(10/1,v/v)洗涤,在减压下蒸馏除去溶剂,以产生(S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-氧代-4-((S)-2-(((2-苯基丙-2-基)氧基)羰基)吡咯烷-1-基)丁酸(化合物57,Fmoc-Asp-Pro-OPis)作为粗产物(25.38g)。所获得的粗产物不纯化即用于随后的制备树脂支持化合物的过程中。

[0510] LCMS(ESI)m/z＝571.3$(M+H)^+$

[0511] 保留时间:0.88分钟(分析条件SQDFA05)

[0512] 实施例1-18-3:

[0513] (S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-氧代-4-((S)-2-(((2-苯基丙-2-基)氧基)羰基)吡咯烷-1-基)丁酸-2-氯三苯甲基树脂(化合物58,Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-Pro-OPis)的合成

[0514] 

化合物 58

[0515] 将2-氯三苯甲基氯树脂(1.60mmol/g,100-200目,1％DVB,购自Watanabe Chemical Industries;47.8g,76.48mmol)和脱水二氯甲烷(150mL)置于装有过滤器的反应容器中,并在25℃振荡35分钟。通过施加氮气压力除去二氯甲烷之后,将混合溶液加入到反

应容器中,并将其振荡45分钟,其中所述混合溶液是通过将脱水甲醇(3.11mL)和二异丙基乙胺(DIPEA,32.1mL)加入到所制备的(S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-氧代-4-((S)-2-(((2-苯基丙-2-基)氧基)羰基)吡咯烷-1-基)丁酸(化合物57,Fmoc-Asp-Pro-OPis;21.94g,38.4mmol)的脱水二氯甲烷(115mL)溶液中而产生的。通过施加氮气压力除去反应溶液后,向反应容器中加入混合溶液,并将其振荡90分钟,其中所述混合溶液是通过将脱水甲醇(55mL)和二异丙基乙胺(DIPEA,25mL)加入到脱水二氯甲烷(100mL)中而产生的。在通过施加氮气压力除去反应溶液之后,将二氯甲烷(100mL)放置于容器中,并且将其振荡五分钟。通过施加氮气压力除去反应溶液。用二氯甲烷(100mL)洗涤树脂的该操作重复四次,并将所得树脂在减压下干燥15.5小时,以产生(S)-3-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-氧代-4-((S)-2-(((2-苯基丙-2-基)氧基)羰基)吡咯烷-1-基)丁酸-2-氯三苯甲基树脂(化合物58,Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-Pro-OPis;61.55g)。

[0516] 将得到的Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-Pro-OPis(化合物58,12.3mg)置于反应容器中,加入DMF(0.2mL)和哌啶(0.2mL),并将其在25℃下振荡30分钟。向反应容器中加入DMF(1.6mL),然后取出0.4mL反应混合物溶液,并将其用DMF(9.6mL)稀释,并测量其吸光度(301.2nm)(Shimadzu,UV-1600PC(小室长度:1.0cm)用于测量)。根据下列计算公式,计算Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-Pro-OPis(化合物58)的加载率为0.3736mmol/g。

[0517] (吸光度(301.2nm)x 1000x 50)/(树脂重量(mg)x 7800)=(0.717x 1000x50)/(12.3x 7800)=0.3736mmol/g

[0518] 相似地合成但具有不同加载率的不同批次也用于肽合成。

[0519] [实施例2]通过肽合成仪化学合成肽(步骤A至C)

[0520] 除非特别说明,通过上述基本合成路线的肽合成通过以下方法进行。

[0521] 实施例2-1:通过自动合成仪固相合成肽(步骤A)

[0522] 使用肽合成仪(Multipep RS;Intavis制造)通过Fmoc方法进行肽合成。根据合成仪附带的指令进行操作的具体程序。

[0523] 将连接于天冬氨酸(其中其N末端用Fmoc保护)的侧链羧酸部分的2-氯三苯甲基树脂(100mg/柱)的溶液、各种Fmoc-氨基酸(0.6mol/L,在Fmoc-MeHis(Trt)-OH的情况下为0.5mol/L)和1-羟基-7-氮杂苯并三唑(HOAt)或oxyma(0.375mol/L)的NMP溶液,以及二异丙基碳二亚胺(DIC)的N,N-二甲基甲醛(DMF)(10%v/v)溶液置于合成仪中。另外,当所使用的Fmoc-氨基酸为Fmoc-Ser(THP)-OH(化合物1)、Fmoc-Thr(THP)-OH(化合物2)、或Fmoc-MeSer(THP)-OH(化合物6)时,使该Fmoc-氨基酸与oxyma在NMP溶液中共存,并在进一步添加分子筛4A 1/8(Wako Pure Chemical Industries)或分子筛4A 1/16(Wako Pure Chemical Industries)后,将其置于合成仪中。

[0524] 二氮杂双环十一碳烯(DBU)的DMF(2%v/v)溶液用作Fmoc脱保护溶液。用DMF洗涤树脂后,将Fmoc基团脱保护,然后进行与新Fmoc氨基酸的缩合反应。这被定义为单个循环,并且通过将该循环重复多次,肽在树脂表面上被延伸。

[0525] 实施例2-2:从树脂上切割延伸的肽(步骤B)

[0526] 在肽合成仪上除去通过上述方法延伸的肽的N末端的Fmoc基团,然后用DMF洗涤树脂。然后将树脂再次在DCM中溶胀,然后向该树脂中加入TFE/DCM(1/1,v/v,2mL),并将其在室温下振荡两小时。随后,将管中的溶液通过用于合成的柱过滤以除去树脂,并将剩余的树

脂进一步用TFE/DCM(1/1,v/v,1mL)洗涤两次。将得到的全部切割溶液混合,并将其在减压下浓缩。

[0527] 实施例2-3:切割的肽的环化(步骤C)

[0528] 将切割后在减压下通过浓缩得到的残渣溶于DMF/DCM(1/1,v/v,8mL)中。加入0.5M O-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N,N-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HATU)/DMF溶液(体积相当于相对于所用树脂的摩尔数(加载率(mmol/g)乘以所用树脂的量(通常为0.10g))为1.5当量),和DIPEA(相对于所用树脂的摩尔数为1.8当量),并将其在室温下振荡两小时。然后,在减压下蒸馏除去溶剂。通过LCMS分析证实所需环肽的产生。

[0529] 通过上述方法合成肽Pep1-Pep7,所述肽用于下述脱保护反应的检查。Pep1-Pep7的序列、结构和LCMS数据分别示于表2-1、2-2和2-3中。使用含有该方法中所得到的环状肽的残基,评价随后进行的脱保护条件的检查(在脱保护中观察到的水解度和N-至O-酰基转移问题,或者在待检查的溶液中共存的肽)。

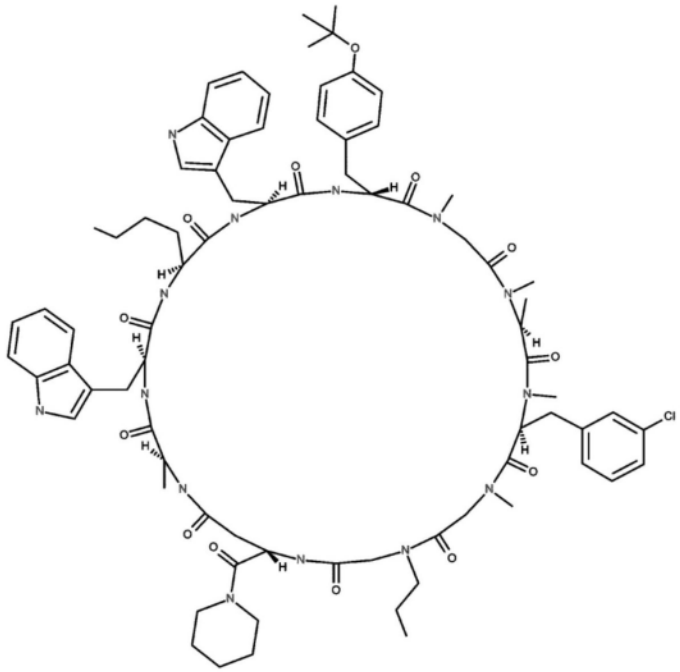
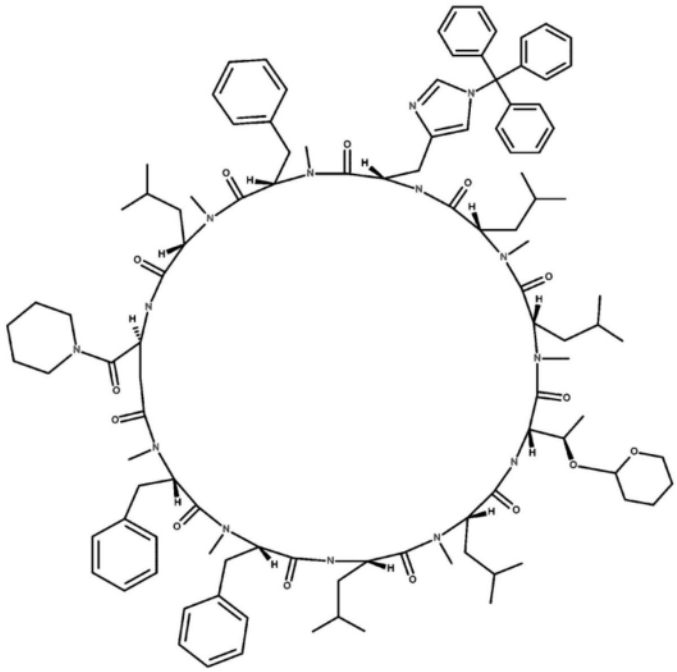
[0530] [表2-1]

[0531]

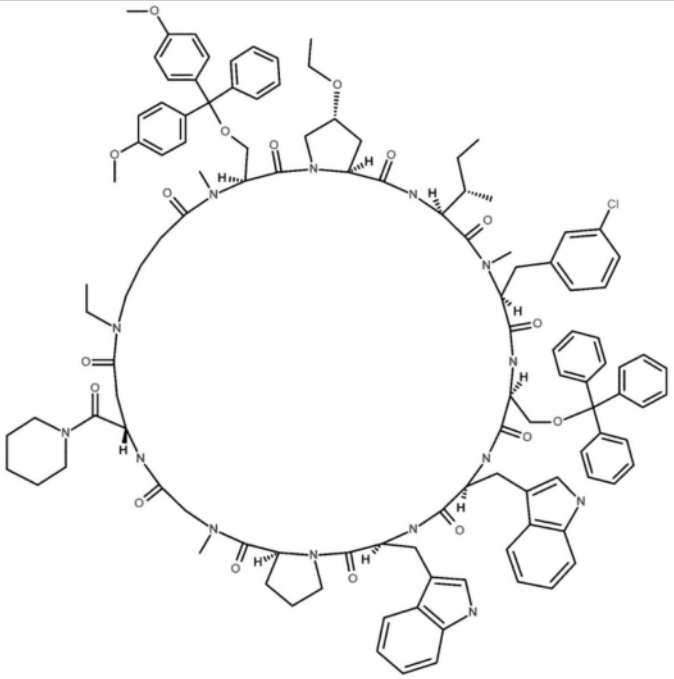
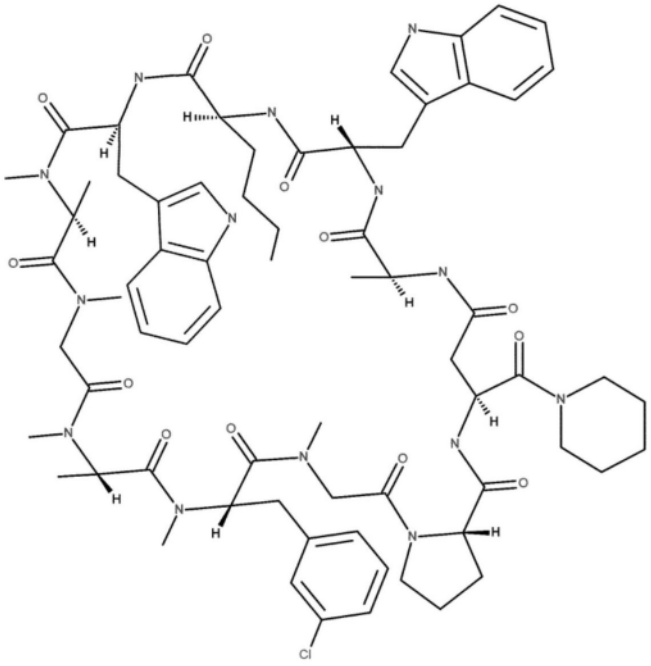
		MW (环化前)	EW (环化前)		11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	使用树脂	树脂加载量
Pep-1	化合物101	1480.2	1478.75		Ala	Trp	Nle	Trp	D-Tyr(tBu)	MeGly	MeAla	MePhe(3-Cl)	MeGly	nPrGly	Asp	pip	化合物50	0.342 mmol/g
Pep-2	化合物102	1852.4	1851.11		MePhe	MePhe	Leu	MeLeu	Thr(THP)	MeLeu	MeLeu	His(1rt)	MePhe	MeLeu	Asp	pip	化合物50	0.366 mmol/g
Pep-3	化合物103	2018.8	2016.97		gEtAbu	MeSer(DMT)	Hyp(Et)	Ile	MePhe(3-Cl)	Ser(Trt)	Trp	Trp	Pro	MeGly	Asp	pip	化合物50	0.316 mmol/g
Pep-4	化合物104	1344.0	1342.66		Ala	Trp	Nle	Trp	MeAla	MeGly	MeAla	MePhe(3-Cl)	MeGly	Pro	Asp	pip	化合物50	0.342 mmol/g
Pep-5	化合物105	1574.3	1572.74		Ala	Trp	Nle	Trp	Ser(Trt)	Gly	MeAla	MePhe(3-Cl)	MeGly	Pro	Asp	pip	化合物50	0.342 mmol/g
Pep-6	化合物106	1775.1	1773.86		gEtAbu	Hyp(Et)	MeAla(4-Thz)	MeAla	MeSer(DMT)	Hyp(Et)	Trp	Trp	Pro	MeGly	Asp	pip	化合物50	0.316 mmol/g
Pep-7	化合物107	1734.0	1732.87		Ala	Phe(4-CF3)	Trp	Trp	MeLeu	MeGly	MeGly	Pro	Hyp(Et)	Ser(Trt)	Asp	pipBu	化合物52	0.356 mmol/g

[0532] [表2-2]

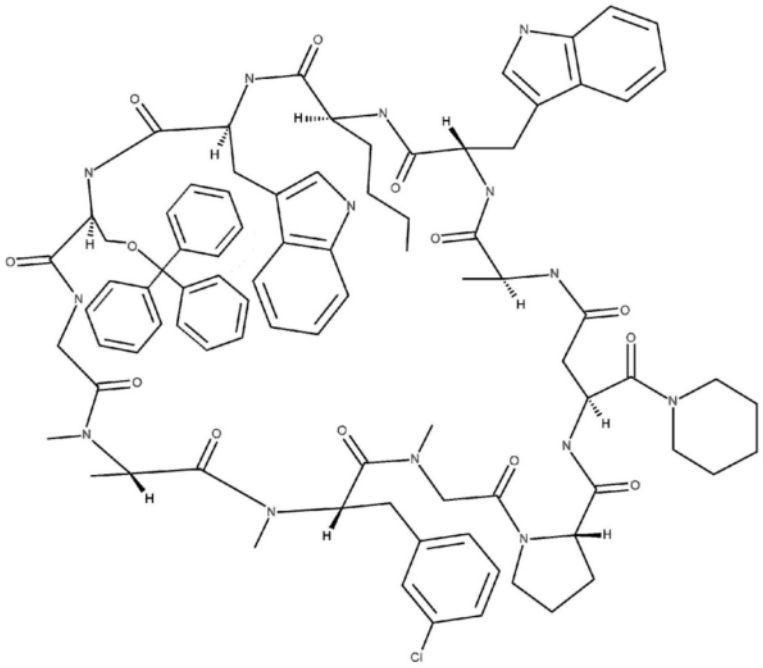
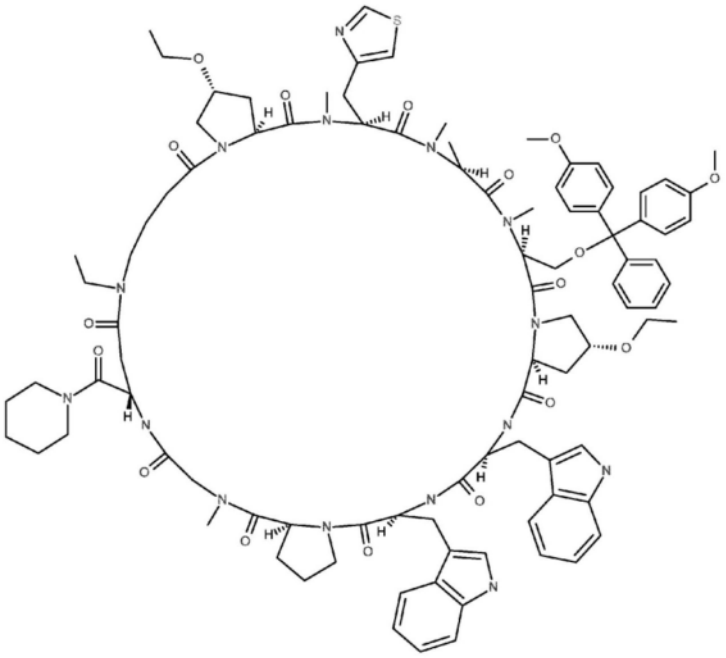
[0533]

Pep-1	化合物 101	
Pep-2	化合物 102	

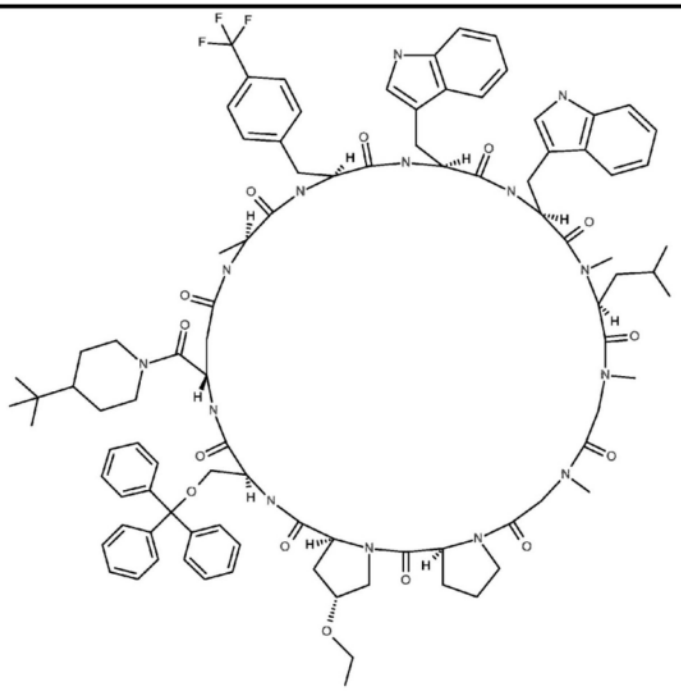
[0534]

Pep-3	化合物 103	
Pep-4	化合物 104	

[0535]

Pep-5	化合物 105	
Pep-6	化合物 106	

[0536]

Pep-7	化合物107	

[0537] [表2-3]

[0538]

		LCMS条件	保留时间(min)	LCMS(ESI)m/z
Pep-1	化合物101	SQDFA05	0.93	1480.1(M+H)+
Pep-2	化合物102	SQDFA50	1.00	1852.3(M+H)+
Pep-3	化合物103	SQDFA05	0.78(30%),1.06(70%)	1474.1,1716.2(M+H)+
Pep-4	化合物104	SQDFA05	0.78	1343.9(M+H)+
Pep-5	化合物105	SQDFA05	1.01	1574.2(M+H)+
Pep-6	化合物106	SQDFA05	0.68	1473.1(M+H)+
Pep-7	化合物107	SQDFA05	1.10	1734.2(M+H)+

[0539] [实施例3]使用由弱酸(具有0至9的水性pKa)和溶剂(具有正Y_{OTs}值、弱酸性(水性pKa为5至14)且具有低亲核性的溶剂)产生的弱酸性溶液,将肽侧链官能团上的保护基脱保护(步骤D)

[0540] 实施例3-1:使用上述弱酸性溶液将Fmoc-氨基酸侧链官能团上的保护基脱保护的可能性

[0541] 检查了以下:在比TFA弱的酸性条件下,在肽合成中使用的Fmoc-氨基酸的侧链官能团的保护基是否可被脱保护,更具体地,是否可在通过将具有0-9的水性pKa的弱酸溶解在具有正Y_{OTs}值、弱酸性(水性pKa为5-14)和具有低亲核性的溶剂中而生产的溶液中脱保护。

[0542] 具体地,使用四甲基硫酸氢铵(pKa 2.0)作为弱酸,并使用HFIP(具有3.82的Y_{OTs}值(基于文献的值:Prog.Phys.Org.Chem.1990,17,121-158),和9.30的pKa)作为溶剂。更具体地,使用0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)或0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)。

[0543] 实施例3-1-1:0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)的制备

[0544] 0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)是通过以下制备的:抽取4mL通过混合

HFIP(11.66mL)、TIPS(0.24mL)和DCE(0.10mL)而产生的溶液,并在该溶液中溶解68.5mg四甲基硫酸氢铵。

[0545] 实施例3-1-2:0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)的制备

[0546] 0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)是通过以下制备的:抽取4mL通过混合HFIP(11.66mL)、TIPS(0.24mL)和DCE(0.10mL)而产生的溶液,并在该溶液中溶解34.3mg四甲基硫酸氢铵。

[0547] 通过下述方法A或方法B,将具有侧链保护基的Fmoc-氨基酸或包含具有侧链保护基的氨基酸残基的肽脱保护。

[0548] 实施例3-1-3:方法A

[0549] 向Fmoc-氨基酸(4.0μmol)和在其侧链上具有保护基的肽(已经合成的环肽Pep1到Pep6中的任何一种(环化后的残基);最大浓度为3.66μmol)的混合物中,加入0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)(0.20mL)或0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)(0.40mL),并振荡三分钟,然后将其在25℃下静置。在给定的时间量后,进行LCMS(FA05)分析。脱保护的进程由脱保护的肽与保护的肽的UV面积比计算。

[0550] 实施例3-1-4:方法B

[0551] 向包含在其侧链上具有保护基的氨基酸残基的肽(已经合成的环肽Pep1至Pep6中的任一种(环化后的残基);最大浓度为3.66μmol)中,加入0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP(2%TIPS)(0.20mL)或0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP(2%TIPS)(0.40mL),并振荡三分钟。将其在25℃静置,并在给定的时间量之后,进行LCMS(FA05)分析。脱保护的进程由脱保护的肽与保护的肽的UV面积比计算。

[0552] 将如下制备的肽用于方法A和方法B:进行延伸,通过已经描述的方法从树脂上切下延伸的肽,并且另外地通过已经描述的方法进行环化反应;然后在减压下将肽浓缩,并将获得的残渣溶解在二氯甲烷中,并将其等分到10个试管中;然后通过在减压下除去溶剂而再次浓缩。

[0553] 评价结果如下表3所示。

[0554] [表3]

[0555]

run	保护的氨基酸	方法	共存的肽	条件	时间(h)	脱保护(%)
1	D-Tyr(tBu)	B	Pep 1 (化合物101)	0.1 M	24	>99%
2		B	Pep 1 (化合物102)	0.05 M	24	81%
3	Tyr(3-F,tBu)	A	Pep 2 (化合物102)	0.1 M	22	65%
4		A	Pep 2 (化合物102)	0.05 M	19	19%
5	MeHis(Trt)	A	Pep 2 (化合物102)	0.05 M	4	>99%
6	Thr(THP)	B	Pep 2 (化合物102)	0.05 M	2	>99%
7	MeSer(DMT)	B	Pep 3 (化合物103)	0.05 M	4	>99%
8	MeSer(THP)	A	Pep 4 (化合物104)	0.05 M	1	>99%
9	Ser(Trt)	B	Pep 5 (化合物105)	0.05 M	4	>99%
10	Ser(THP)	A	Pep 3 (化合物103)	0.05 M	1	>99%
11	Pro-OPis	A	Pep 2 (化合物102)	0.05 M	2	>99%
12	D-Tyr(Clt)	A	Pep 5 (化合物105)	0.05 M	1	>99%
13	D-Tyr(THP)	A	Pep 6 (化合物106)	0.05 M	1.25	>99%
14	D-Tyr(Pis)	A	Pep 6 (化合物106)	0.05 M	1.25	>99%
15	Tyr(3-F,Pis)	A	Pep 3 (化合物103)	0.05 M	1	>99%

[0556] 脱保护后对Fmoc-氨基酸进行的LCMS分析结果如下：

[0557] Fmoc-Tyr(3-F)-OH(试验3、试验4和试验15的脱保护产物)

[0558] LCMS(ESI)m/z＝422.3$(M+H)^+$

[0559] 保留时间:0.73分钟(分析条件SQDFA05)

[0560] Fmoc-MeHis-OH(试验5的脱保护产物)

[0561] LCMS(ESI)m/z＝392.3$(M+H)^+$

[0562] 保留时间:0.47分钟(分析条件SQDFA05)

[0563] Fmoc-MeSer-OH(试验8的脱保护产物)

[0564] LCMS(ESI)m/z＝342.3$(M+H)^+$

[0565] 保留时间:0.67分钟(分析条件SQDFA05)

[0566] Fmoc-Ser-OH(试验10的脱保护产物)

[0567] LCMS(ESI)m/z＝328.2$(M+H)^+$

[0568] 保留时间:0.64分钟(分析条件SQDFA05)

[0569] Fmoc-Pro-OH(试验11的脱保护产物)

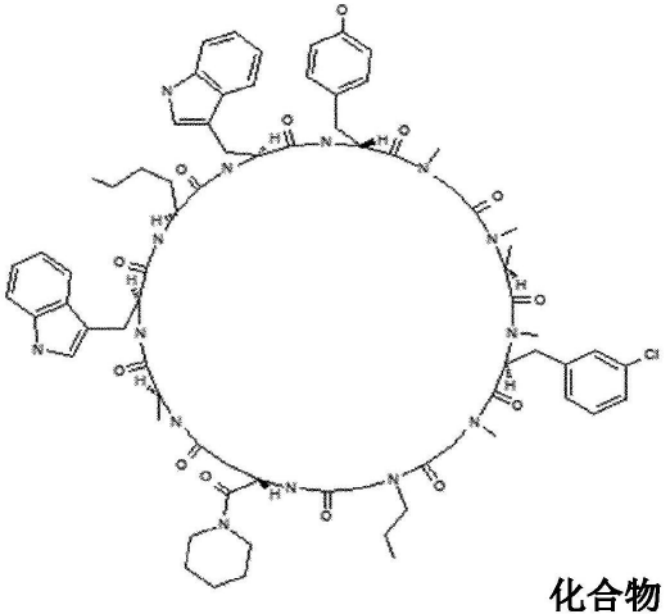
[0570] LCMS(ESI)m/z＝338.3$(M+H)^+$

[0571] 保留时间:0.75分钟(分析条件SQDFA05)

[0572] Fmoc-D-Tyr-OH(试验12-试验14的脱保护产物)

[0573] LCMS(ESI)m/z＝404.3$(M+H)^+$

[0574] 保留时间:0.72分钟(分析条件SQDFA05)

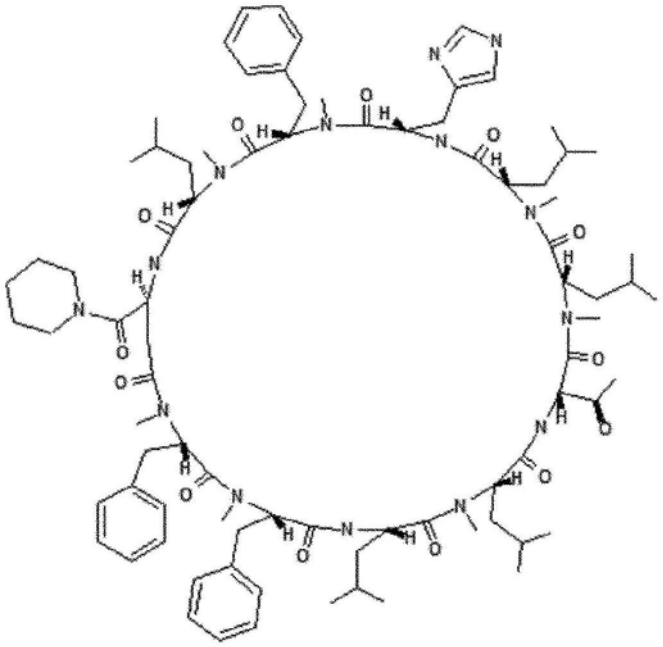
[0575] 

化合物 131

[0576] Pep1(化合物101)的脱保护产物(试验1和试验2的脱保护产物;化合物131)

[0577] LCMS(ESI)m/z＝1424.0(M+H)$^+$

[0578] 保留时间:0.79分钟(分析条件SQDFA05)

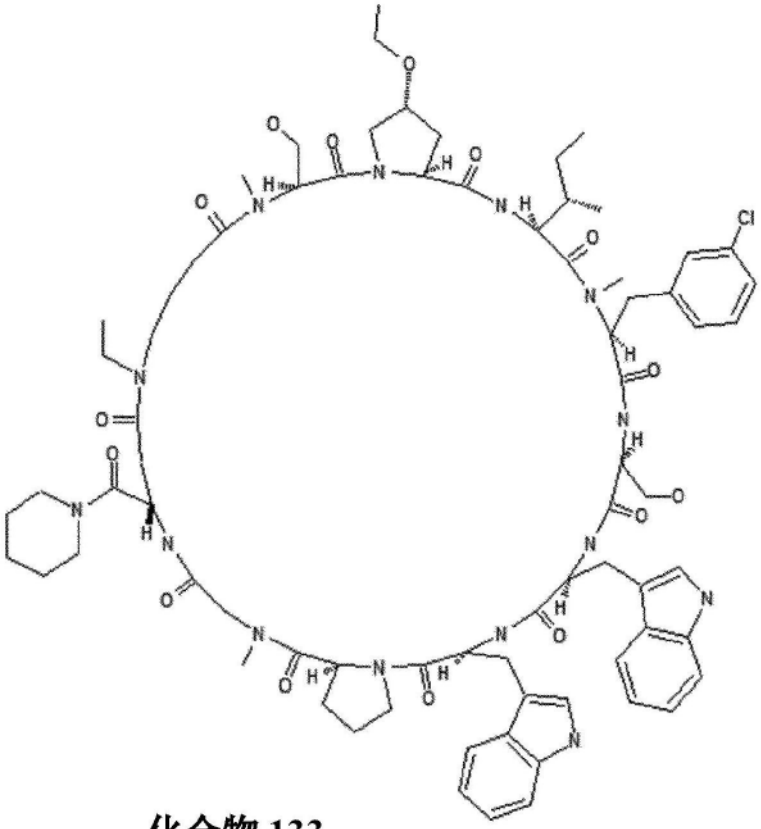
[0579] 

化合物 132

[0580] Pep2(化合物102)的脱保护产物(试验6的脱保护产物;化合物132)

[0581] LCMS(ESI)m/z＝1526.3(M+H)$^+$

[0582] 保留时间:0.89分钟(分析条件SQDFA05)

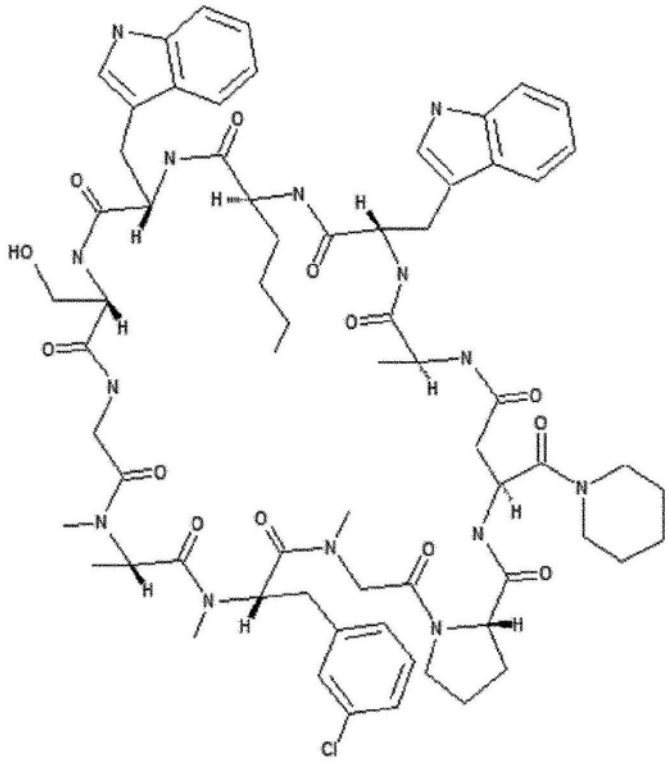
[0583] 

化合物 133

[0584] Pep3(化合物103)的脱保护产物(试验7的脱保护产物;化合物133)

[0585] LCMS(ESI)m/z＝1474.1$(M+H)^+$

[0586] 保留时间:0.78分钟(分析条件SQDFA05)

[0587] 

化合物 135

[0588] Pep5(化合物105)的脱保护产物(试验9的脱保护产物;化合物135)

[0589] LCMS(ESI)m/z＝1331.7(M+H)$^+$

[0590] 保留时间:0.74分钟(分析条件SQDFA05)

[0591] 根据这些结果,确认了这些保护基在0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP(2％TIPS)或0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP(2％TIPS)的条件下进行脱保护。

[0592] 侧链上的保护基不受肽切割条件的影响,所述条件使用TFE-DCM(1/1,v/v)溶液或TFE-DCM(1/1,v/v)/DIPEA(添加通过将所用树脂的加载率乘以所用树脂量而得到的理论摩尔数的1.8当量)溶液。因此,在切割步骤之后的肽主链N末端和Asp侧链羧酸部分的分子内环化中,氨基酸侧链官能团保持为保护形式。结果,可以抑制其中氨基酸侧链官能团用作亲核物质的不需要的环化反应。

[0593] 3-2.抑制水解和N-到O-酰基转移产物生成的可能性,所述水解和N-到O-酰基转移产物生成是在使用上述弱酸性溶液将Fmoc-氨基酸侧链官能团的保护基团脱保护时发生的

实施例3-2-1:

[0594] 通过使用0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2％TIPS)作为去保护条件,环状化合物(化合物101,Pep1)的脱保护,其中在H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键

[0595] 使用Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-Pip(化合物50,树脂加载率:0.342mmol/g,100mg)作为树脂,并通过已描述的方法合成环状化合物(化合物101),其中在H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pip的N-末端氨基与Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键。环化后,将通过在减压下浓缩形成的残渣溶解在二氯甲烷中,然后将其等分到10个试管中,然后通过在减压下除去溶剂而将它们再次浓缩。

[0596] 向等分的10个试管之一,加入0.20mL的0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)(68.5mg的四甲基硫酸氢铵溶解在4mL溶液中,所述溶液是从通过混合HFIP:11.66mL、TIPS:0.24mL和DCE:0.10mL而产生的溶液中抽出的)。用橡胶隔板将试管加盖,振荡三分钟,然后在25℃静置24小时。当通过LCMS(FA05)确认反应时,可以确认侧链脱保护(D-Tyr(tBu)的tBu基团的脱保护)的完成。这里,脱保护的所需肽(化合物131)、溶剂解产物(显示肽的任何酰胺键已经历被溶剂HFIP溶剂解的质谱的化合物)和水解产物(显示肽的任何酰胺键已经历被水溶剂解的质谱的化合物)之间的比例为72:10:18(图2)。在实施例中,"TM+H_2O"代表其中靶分子的任何一个酰胺键已经历水解的化合物,并且"TM+HFIP"代表其中靶分子的任何一个酰胺键已经历被HFIP溶剂解的化合物。

[0597] 图2的数据如下所示:

[0598] 所需肽(化合物131)

[0599] LCMS(ESI)m/z=1424.0$(M+H)^+$

[0600] 保留时间:0.79分钟(分析条件SQDFA05)

[0601] 水解产物(TM+H_2O)

[0602] LCMS(ESI)m/z=1442.0$(M+H)^+$

[0603] 保留时间:0.61分钟(分析条件SQDFA05)

[0604] HFIP(TM+HFIP)的溶剂解产物

[0605] LCMS(ESI)m/z=1592.0$(M+H)^+$

[0606] 保留时间:0.69分钟,0.71分钟(分析条件SQDFA05)

[0607] 实施例3-2-2:

[0608] 通过使用0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)作为脱保护条件,环状化合物(化合物101,Pep1)的去保护,其中在H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键

[0609] 在合成化合物101(Pep1)后,向上述操作中等分的10个试管的另一个中,加入0.40mL的0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)(34.3mg的四甲基硫酸氢铵溶解在4mL溶液中,所述溶液是从通过混合HFIP:11.66mL、TIPS:0.24mL和DCE:0.10mL而产生的溶液中抽出的)。用橡胶隔板将试管加盖,振荡三分钟,然后在25℃静置24小时,然后通过LCMS(FA05)检查反应。结果,侧链脱保护(D-Tyr(tBu)的tBu基团的脱保护)进行了81%,并且此时,脱保护的所需肽(化合物131)、溶剂解产物(显示肽的任何酰胺键都已经历被溶剂HFIP溶剂解的质量的化合物)和水解产物(显示肽的任何酰胺键都已经历被水水解的质量的化合物)之间的比率为93:3:4(图3)。"TM+H_2O"表示其中靶分子的任何一个酰胺键已经历水解的化合物。类似地,"TM+HFIP"代表其中靶分子的任何一个酰胺键已经历被HFIP溶剂解的化合物。

[0610] 图3的数据如下所示:

[0611] 所需肽(化合物131)

[0612] LCMS(ESI)m/z=1424.1$(M+H)^+$

[0613] 保留时间:0.79分钟(分析条件SQDFA05)

[0614] 水解产物

[0615] LCMS(ESI)m/z=1442.0$(M+H)^+$

[0616] 保留时间:0.61分钟(分析条件SQDFA05)

[0617] HFIP的溶剂解产物

[0618] LCMS(ESI)m/z＝1592.0$(M+H)^+$

[0619] 保留时间:0.69分钟,0.71分钟(分析条件SQDFA05)

[0620] 如以下的比较例所述,当在5％TFA/DCE条件下,对其中在H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键的环状化合物(化合物101,Pep1)进行脱保护时,在25℃脱保护2.5小时导致87％的水解进程。

[0621] 另一方面,通过在相同的肽序列上使用0.1M或0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2％TIPS)代替5％TFA,可以显著降低水解产物(和溶剂解产物)的产生。此外,该结果表明这样的可能性:如果可以满足产生比TFA弱的酸度的条件,则可以根据选择来调节弱酸的浓度。

[0622] 实施例3-2-3:

[0623] 通过使用0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2％TIPS)作为脱保护条件,环状化合物(化合物103,Pep3)的脱保护,其中在H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键

[0624] 使用Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物50,加载:0.316mmol/g,100mg)作为树脂,并通过已描述的方法合成环状化合物(化合物103,Pep3),其中在H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N末端氨基与Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键。环化后,将通过在减压下浓缩形成的残渣溶解在二氯甲烷中,然后将其等分到10个试管中,然后通过在减压下除去溶剂而将它们再次浓缩。

[0625] 向等分的10个试管之一,加入0.40mL的0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2％TIPS)(34.3mg的四甲基硫酸氢铵溶解在4mL溶液中,所述溶液是从通过混合HFIP:11.66mL、TIPS:0.24mL和DCE:0.10mL而产生的溶液中抽出的)。用橡胶隔板将试管加盖,振荡三分钟,然后在25℃静置。在四个小时时期,通过LCMS(SQDFA05)检查反应。结果,可以证实侧链脱保护(MeSer(DMT)的DMT基团的脱保护和Ser(Trt)的Trt基团的脱保护)的完成。此处,脱保护的所需肽(化合物133;环状化合物,其中在H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键)和所需肽的N-至O-酰基转移产物(缩肽)的根据LC的UV面积比为96:4。从反应开始,将反应液在25℃下静置22小时后,进行LCMS(SQDFA05)分析,结果得到,脱保护的所需肽(化合物133;环状化合物,其中在H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键)和所需肽的N-至O-酰基转移产物(缩肽)的根据LC的UV面积比为83:17(图4)。

[0626] 图4的数据如下所示:

[0627] 所需肽(化合物133;环状化合物,其中在H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键)

[0628] LCMS(ESI)m/z＝1474.1$(M+H)^+$

[0629] 保留时间:0.78分钟(分析条件SQDFA05)

[0630] N-至O-酰基转移的产物

[0631] LCMS(ESI)m/z＝1474.1(M+H)$^+$

[0632] 保留时间:0.64分钟(分析条件SQDFA05)

[0633] 如下所述,当在5％TFA/DCE条件下,对其中在H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N末端氨基与Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键的环状化合物(化合物103、Pep3)进行脱保护时,在25℃下脱保护两小时导致N-至O-酰基转移的70％进展。

[0634] 另一方面,通过在相同的肽序列上使用0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2％TIPS)代替5％TFA,可以显著降低N-至O-酰基转移产物的产生。

[0635] 实施例3-2-4:

[0636] 通过使用0.05M草酸/HFIP溶液(2％TIPS)作为去保护条件,环状化合物(化合物101,Pep1)的脱保护,其中在H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键

[0637] 在合成化合物101(Pep1)后,向上述操作中等分的10个试管的另一个中,加入0.40mL的0.05M草酸/HFIP溶液(2％TIPS)(18.0mg的草酸溶解在4mL溶液中,所述溶液是从通过混合HFIP:11.66mL、TIPS:0.24mL和DCE:0.10mL而产生的溶液中抽出的)。用橡胶隔板将试管加盖,振荡三分钟,然后在25℃静置四小时,然后通过LCMS(FA05)检查反应。结果,完成了侧链脱保护(D-Tyr(tBu)的tBu基团的脱保护),并且此时,脱保护的所需肽(化合物131)、溶剂解产物(显示肽的任何酰胺键都已经历被溶剂HFIP溶剂解的质量的化合物)和水解产物(显示肽的任何酰胺键都已经历被水水解的质量的化合物)之间的比率为79:17:4(图5)。“TM+H_2O”表示其中靶分子的任何一个酰胺键已经历水解的化合物。类似地,“TM+HFIP”代表其中靶分子的任何一个酰胺键已经历被HFIP溶剂解的化合物。

[0638] 图5的数据如下所示:

[0639] 所需肽(化合物131)

[0640] LCMS(ESI)m/z＝1423.5(M+H)$^+$

[0641] 保留时间:0.79分钟(分析条件SQDFA05)

[0642] 水解产物

[0643] LCMS(ESI)m/z＝1441.5(M+H)$^+$

[0644] 保留时间:0.61分钟(分析条件SQDFA05)

[0645] HFIP的溶剂解产物

[0646] LCMS(ESI)m/z＝1591.5(M+H)$^+$

[0647] 保留时间:0.68分钟,0.71分钟(分析条件SQDFA05)

[0648] 实施例3-2-5:

[0649] 通过使用0.05M马来酸/HFIP溶液(2％TIPS)作为脱保护条件,环状化合物(化合物101,Pep1)的脱保护,其中在H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键

[0650] 在合成化合物101(Pep1)后,向上述操作中等分的10个试管的另一个中,加入0.40mL的0.05M马来酸/HFIP溶液(2％TIPS)(23.2mg的马来酸溶解在4mL溶液中,所述溶液

是从通过混合HFIP:11.66mL、TIPS:0.24mL和DCE:0.10mL而产生的溶液中抽出的)。用橡胶隔板将试管加盖,振荡三分钟,然后在25℃静置四小时,然后通过LCMS(FA05)检查反应。结果,完成了侧链脱保护(D-Tyr(tBu)的tBu基团的脱保护),并且此时,脱保护的所需肽(化合物131)、溶剂解产物(显示肽的任何酰胺键都已经历被溶剂HFIP溶剂解的质量的化合物)和水解产物(显示肽的任何酰胺键都已经历被水水解的质量的化合物)之间的比率为81:12:7(图6)。"TM+H_2O"表示其中靶分子的任何一个酰胺键已经历水解的化合物。类似地,"TM+HFIP"代表其中靶分子的任何一个酰胺键已经历被HFIP溶剂解的化合物。

[0651] 图6的数据如下所示:

[0652] 所需肽(化合物131)

[0653] LCMS(ESI)m/z=1423.5$(M+H)^+$

[0654] 保留时间:0.79分钟(分析条件SQDFA05)

[0655] 水解产物

[0656] LCMS(ESI)m/z=1441.5$(M+H)^+$

[0657] 保留时间:0.61分钟(分析条件SQDFA05)

[0658] HFIP的溶剂解产物

[0659] LCMS(ESI)m/z=1591.4$(M+H)^+$

[0660] 保留时间:0.68分钟,0.71分钟(分析条件SQDFA05)

[0661] 实施例3-2-6:

[0662] 通过使用0.05M草酸/HFIP溶液(2%TIPS)作为脱保护条件,环状化合物(化合物103,Pep3)的脱保护,其中在H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键

[0663] 在合成化合物103(Pep3)后,向上述操作中等分的10个试管的另一个中,加入0.40mL的0.05M草酸/HFIP溶液(2%TIPS)(18.0mg的草酸溶解在4mL溶液中,所述溶液是从通过混合HFIP:11.66mL、TIPS:0.24mL和DCE:0.10mL而产生的溶液中抽出的)。用橡胶隔板将试管加盖,振荡三分钟,然后在25℃静置四小时,然后通过LCMS(SQDFA05)检查反应。结果,可以证实侧链脱保护(MeSer(DMT)的DMT基团的脱保护和Ser(Trt)的Trt基团的脱保护)的完成。此时,脱保护的所需肽(化合物133;环状化合物,其中在H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键)和所需肽的N-至O-酰基转移产物(缩肽)的根据LC的UV面积比为86:14(图7)。

[0664] 图7的数据如下所示:

[0665] 所需肽(化合物133;环状化合物,其中在H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键)

[0666] LCMS(ESI)m/z=1473.5$(M+H)^+$

[0667] 保留时间:0.78分钟(分析条件SQDFA05)

[0668] N-至O-酰基转移的产物

[0669] LCMS(ESI)m/z=1473.5$(M+H)^+$

[0670] 保留时间:0.64分钟(分析条件SQDFA05)

[0671] 实施例3-2-7:

[0672] 通过使用0.05M马来酸/HFIP溶液(2%TIPS)作为脱保护条件,环状化合物(化合物103,Pep3)的脱保护,其中在H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键

[0673] 在合成化合物103(Pep3)后,向上述操作中等分的10个试管的另一个中,加入0.40mL的0.05M马来酸/HFIP溶液(2%TIPS)(23.2mg的马来酸溶解在4mL溶液中,所述溶液是从通过混合HFIP:11.66mL、TIPS:0.24mL和DCE:0.10mL而产生的溶液中抽出的)。用橡胶隔板将试管加盖,振荡三分钟,然后在25℃静置四小时,然后通过LCMS(SQDFA05)检查反应。结果,可以证实侧链脱保护(MeSer(DMT)的DMT基团的脱保护和Ser(Trt)的Trt基团的脱保护)的完成。此时,脱保护的所需肽(化合物133;环状化合物,其中在H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键)和所需肽的N-至O-酰基转移产物(缩肽)的根据LC的UV面积比为86:14(图8)。

[0674] 图8的数据如下所示:

[0675] 所需肽(化合物133;环状化合物,其中在H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键)

[0676] LCMS(ESI)m/z=1473.5$(M+H)^+$

[0677] 保留时间:0.79分钟(分析条件SQDFA05)

[0678] N-至O-酰基转移的产物

[0679] LCMS(ESI)m/z=1473.5$(M+H)^+$

[0680] 保留时间:0.64分钟(分析条件SQDFA05)

[0681] 这些结果表明,即使当使用草酸(pKa 1.23)或马来酸(pKa 1.92)代替四甲基硫酸氢铵(pKa 2.0)作为弱酸时,也可以进行脱保护,同时抑制水解、溶剂解和N-至O-酰基的转移。

[0682] 实施例3-2-8:

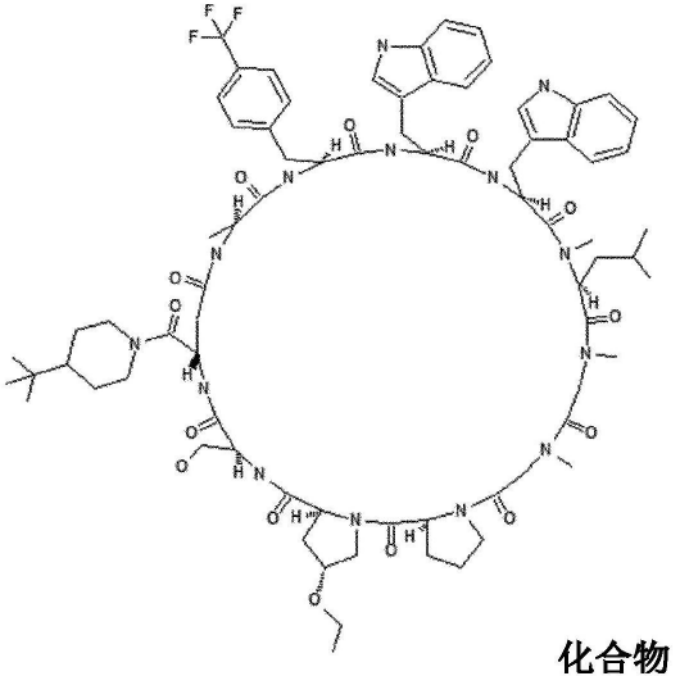
[0683] 在环状化合物(化合物107,Pep7)的脱保护中,使用0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP(2%TIPS)作为脱保护条件以及使用0.05M四甲基硫酸氢铵/TFE(2%TIPS)作为脱保护条件之间的比较,其中在所述环状化合物中,在H-Ala-Phe(4-CF3)-Trp-Trp-MeLeu-MeGly-MeGly-Pro-Hyp(Et)-Ser(Trt)-Asp-pip(tBu)的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键

[0684] 使用Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-piptBu(化合物52,加载:0.356mmol/g,100mg)作为树脂,通过已描述的方法合成环状化合物(化合物107),其中在环状化合物中,在H-Ala-Phe(4-CF3)-Trp-Trp-MeLeu-MeGly-MeGly-Pro-Hyp(Et)-Ser(Trt)-Asp-pip(tBu)的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键。环化后,将通过在减压下浓缩产生的残渣溶解在二氯甲烷中,然后将其等分到10个试管中,然后再次在减压下蒸馏除去溶剂。

[0685] 向等分的10个试管之一,加入0.40mL的0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)(通过将205.8mg四甲基硫酸氢铵溶解在通过混合HFIP:23.32mL,TIPS:0.48mL和DCE:0.20mL而产生的溶液中而产生的溶液)。用橡胶隔板将试管加盖,然后在25℃静置四小时,

并通过LCMS(FA05)检查反应。作为结果,发现侧链脱保护(Ser(Trt)的Trt基团的脱保护)完成,并且此时,脱保护的所需肽(化合物137)和溶剂解产物(显示肽的任何酰胺键已经历被溶剂HFIP溶剂解的质量的化合物)之间的UV面积比为53:47(图9)。"TM+HFIP"代表其中靶分子的任何一个酰胺键已经历被HFIP溶剂解的化合物。

[0686]



化合物 137

[0687] 图9的数据如下所示:

[0688] 所需肽(化合物137)

[0689] LCMS(ESI)m/z=1492.1(M+H)$^+$

[0690] 保留时间:0.90分钟(分析条件SQDFA05)

[0691] HFIP的溶剂解产物(其中任何一个酰胺键已经历被HFIP溶剂解的产物)

[0692] LCMS(ESI)m/z=1660.1(M+H)$^+$

[0693] 保留时间:0.78分钟(分析条件SQDFA05)

[0694] 向等分的10个试管中的另一个试管中,加入0.40mL的0.05M四甲基硫酸氢铵/TFE溶液(2%TIPS)(通过将205.8mg四甲基硫酸氢铵溶解在通过混合HFIP:23.32mL,TIPS:0.48mL和DCE:0.20mL而产生的溶液中而产生的溶液)。用橡胶隔板将试管加盖,然后在25℃静置,并通过LCMS(FA05)检查反应。作为结果,四小时后,侧链脱保护(Ser(Trt)的Trt基团的脱保护)已进行了96%,并且此时,溶剂解产物(显示其中肽的任何酰胺键都已经历被溶剂TFE溶剂解的质量的化合物)为LCMS的检测极限或更低。当在20小时后检查反应时,侧链脱保护(Ser(Trt)的Trt基团的脱保护)完成,并且此时,脱保护的所需肽(化合物137)和溶剂解产物(显示其中肽的任何酰胺键已经历被溶剂TFE溶剂解的质量的化合物)的UV面积比为97:3(图10)。本实施例中所述的"TM+TFE"代表其中靶分子(TM)已经历被TFE溶剂解的化合物(其中任何一个酰胺键已经历被TFE溶剂解的化合物)。

[0695] 图10的数据如下所示:

[0696] 所需肽(化合物137)

[0697] LCMS(ESI)m/z=1492.2(M+H)$^+$

[0698] 保留时间:0.90分钟(分析条件SQDFA05)

[0699] TFE的溶剂解产物(其中任何酰胺键已经历被TFE溶剂解的产物)

[0700] LCMS(ESI)m/z＝1592.0$(M+H)^+$

[0701] 保留时间:0.75分钟(分析条件SQDFA05)

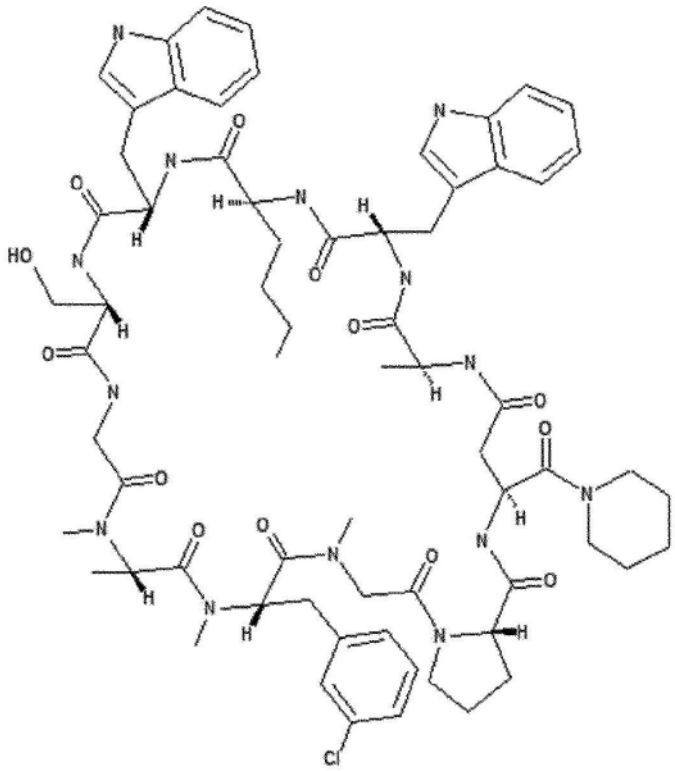
[0702] 上述结果表明,可使用TFE代替HFIP作为用于溶解弱酸的溶剂。这些结果还表明了这样的可能性:只要满足以下条件,就可以使用任何溶剂:Y_{OTs}值为正,溶剂本身为弱酸性(水性pKa为5-14),并且亲核性低。

[0703] 实施例3-2-9:

[0704] 使用0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)作为脱保护条件进行脱保护,并通过向该溶液中加入碱(DIPEA)使反应停止

[0705] 使用Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物50,加载:0.342mmol/g,100mg)作为树脂,并通过已描述的方法合成环状化合物(化合物105,Pep5),其中在所述环状化合物中,在H-Ala-Trp-Nle-Trp-Ser(Trt)-Gly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-Pro-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键。环化后,将通过在减压下浓缩产生的残渣溶解在二氯甲烷中,然后将其等分到10个试管中,然后通过在减压下除去溶剂而将它们再次浓缩。

[0706] 向等分的10个试管中的两个,分别加入0.40mL的0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS)(68.5mg的四甲基硫酸氢铵溶解在4mL溶液中,所述溶液是从通过混合HFIP:11.66mL、TIPS:0.24mL和DCE:0.10mL而产生的溶液中抽出的)。分别用橡胶隔板将试管加盖,振荡三分钟,然后在25℃静置四小时,并通过LCMS(SQDFA05)检查反应。结果,完成了侧链脱保护(Ser(Trt)的Trt基团的脱保护),并且此时,没有检测到显示除脱保护的所需肽(化合物135)以外的化合物的质量的峰,所述化合物是溶剂解产物(显示其中肽的任何酰胺键都已经历被溶剂HFIP溶剂解的质量的化合物)和水解产物(显示其中肽的任何酰胺键都已经历被水溶剂解的质量的化合物)(图11)。向这些反应混合物中的每一种加入二异丙基乙胺(DIPEA,14μL,相对于四甲基硫酸氢铵为两个当量),并将其中一个试管在25℃静置18小时,将其他试管在减压下进行浓缩。当进行LCMS(SQDFA05)分析时,在该点也没有检测到显示除脱保护的所需肽以外的化合物(其为溶剂解产物和水解产物)的质量的峰(图11)。

[0707] 

化合物 135

[0708] 图11的数据如下所示：

[0709] 所需肽(化合物135)

[0710] LCMS(ESI)m/z＝1331.9$(M+H)^+$

[0711] 保留时间:0.74分钟(分析条件SQDFA05)

[0712] 实施例3-2-10:

[0713] 使用0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2％TIPS)作为脱保护条件进行脱保护,并通过向该溶液中加入碱(DIPEA)使反应停止

[0714] 使用Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物50,加载:0.316mmol/g,100mg)作为树脂,通过已描述的方法合成环状化合物(化合物103,Pep3),其中在所述环状化合物中,在H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键。环化后,将通过在减压下浓缩产生的残渣溶解在二氯甲烷中,然后将其等分到10个试管中,然后通过在减压下除去溶剂而将它们再次浓缩。

[0715] 向等分的10个试管中的两个,分别加入0.40mL的0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2％TIPS)(68.5mg的四甲基硫酸氢铵溶解在4mL溶液中,所述溶液是从通过混合HFIP:11.66mL、TIPS:0.24mL和DCE:0.10mL而产生的溶液中抽出的)。分别用橡胶隔板将试管加盖,振荡三分钟,然后在25℃静置四小时,并通过LCMS(FA05)检查反应。结果,完成了侧链脱保护(MeSer(DMT)的DMT基团的脱保护和Ser(Trt)的Trt基团的脱保护),并且脱保护的所需肽(化合物133)和所需肽的N-至O-酰基转移产物(缩肽)的根据LC的UV面积比为93:7。

[0716] 向这些反应混合物中的每一种加入二异丙基乙胺(DIPEA,14μL,相对于四甲基硫酸氢铵为两个当量),并将其中一个试管在25℃静置18小时,在DIPEA加入之后立即将其他

试管在减压下进行浓缩。当进行LCMS(FA05)分析时,静置18小时的混合物没有显示所需肽与其N-至O-酰基转移产物的UV面积比的变化;而在减压下被浓缩的混合物具有98:2的所需肽与其N-至O-酰基转移产物的UV面积比(图12)。

[0717] 图12的数据如下所示:

[0718] 所需肽(化合物133)

[0719] LCMS(ESI)m/z=1474.1(M+H)+

[0720] 保留时间:0.78分钟(分析条件SQDFA05)

[0721] N-至O-酰基转移产物

[0722] LCMS(ESI)m/z=1474.1(M+H)+

[0723] 保留时间:0.64分钟(分析条件SQDFA05)

[0724] 上述结果表明,在这样的条件下后处理(work-up)是可能的,所述条件为通过在脱保护反应完成后(或希望停止反应时)加入DIPEA来抑制水解(溶剂解)和N-至O-酰基转移的问题。

[0725] [实施例4]当使用THP基团作为侧链羟基的保护基时,Thr和MeSer的反应性

[0726] 当使用THP基团作为用于Thr和MeSer(对于它们,在延伸反应过程的低反应性是令人关注的)的侧链羟基的保护基时,进行了以下的实验。

[0727] 实施例4-1:

[0728] Fmoc-Thr(Trt)-OH和Fmoc-Thr(THP)-OH(化合物2)对在其N-末端具有N-甲基氨基的化合物(H-MePhe(3-Cl)-D-Tyr(tBu)-Trp-MePhe-Trp-MePhe-Ile-Asp(O-2-Cl-Trt-树脂)-pip)的延伸反应性的比较评价,所述化合物是在树脂上延伸的肽

[0729] 使用在其N末端具有MePhe(3-Cl)的序列进行延伸反应性的比较评价,该序列由于空间位阻而具有低的氨基反应性。

[0730] 通过使用由上述方法制备的Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物50,加载:0.329mmol/g,100mg)作为树脂,通过上述方法合成Fmoc-MePhe(3-Cl)-D-Tyr(tBu)-Trp-MePhe-Trp-MePhe-Ile-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物108)。

[0731] 向得到的Fmoc-MePhe(3-Cl)-D-Tyr(tBu)-Trp-MePhe-Trp-MePhe-Ile-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物108)中加入二氯甲烷(600μL),并将其静置30分钟以使树脂溶胀。除去液相后,用DMF(600μL)洗涤树脂三次。向所得树脂中加入2%DBU/DMF(v/v,600μL),将其振荡20分钟,并除去液相。用DMF(600μL)洗涤树脂三次。

[0732] 向该树脂中加入通过混合0.60M Fmoc-Thr(Trt)-OH/0.375M oxyma的NMP溶液(300μL)和10%(v/v)DIC/DMF(300μL)而产生的溶液,或通过混合0.60M Fmoc-Thr(THP)-OH(化合物2)/0.375M oxyma的NMP溶液(300μL)和10%(v/v)DIC/DMF(300μL)而产生的溶液,并将其振荡。在振荡的同时,在分别振荡一小时、两小时和四小时的阶段收集约10mg反应树脂,用DMF(600μL)将收集的树脂洗涤三次,另外加入2%DBU/DMF(v/v,600μL),并将其振荡20分钟,并除去液相。将树脂用DMF(600μL)洗涤三次,然后用二氯甲烷(600μL)洗涤三次。

[0733] 向所得树脂中加入TFE/DCM(1/1,v/v,1mL),将其振荡十分钟。在过滤除去树脂之后,在减压下浓缩液相。通过LCMS分析残渣(分析条件SQDFA05)。结果显示在表4中。

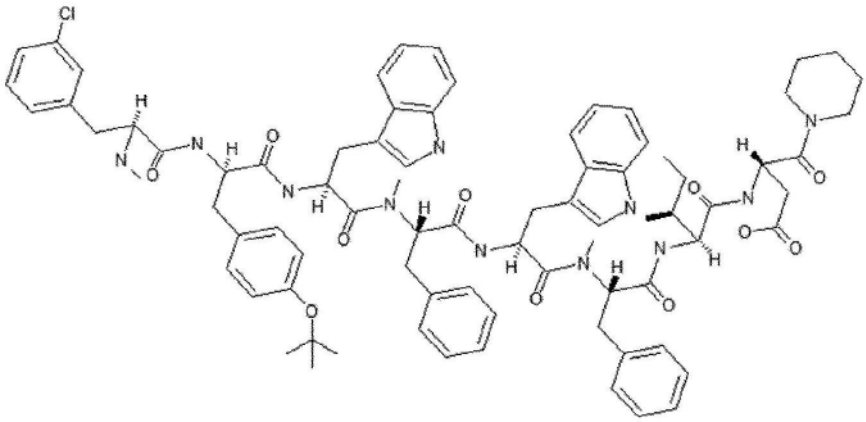
[0734] [表4]

[0735]

延伸的氨基酸残基	1 h (未反应形式/延伸形式)	2 h (未反应形式/延伸形式)	4 h (未反应形式/延伸形式)
Thr(Trt)	99/1	97/3	88/12
Thr(THP)	84/16	69/31	22/78

[0736] 表中未反应形式/延伸形态的比例显示根据LC的UV面积比。在表中,未反应的形式是指H-MePhe(3-Cl)-D-Tyr(tBu)-Trp-MePhe-Trp-MePhe-Ile-Asp-pip(化合物109),并且延伸的形式是指H-Thr(Trt)-MePhe(3-Cl)-D-Tyr(tBu)-Trp-MePhe-Trp-MePhe-Ile-Asp-pip(化合物110;当加入Fmoc-Thr(Trt)-OH时)或H-Thr(THP)-MePhe(3-Cl)-D-Tyr(tBu)-Trp-MePhe-Trp-MePhe-Ile-Asp-pip(化合物111;当加入Fmoc-Thr(THP)-OH时)。

[0737]



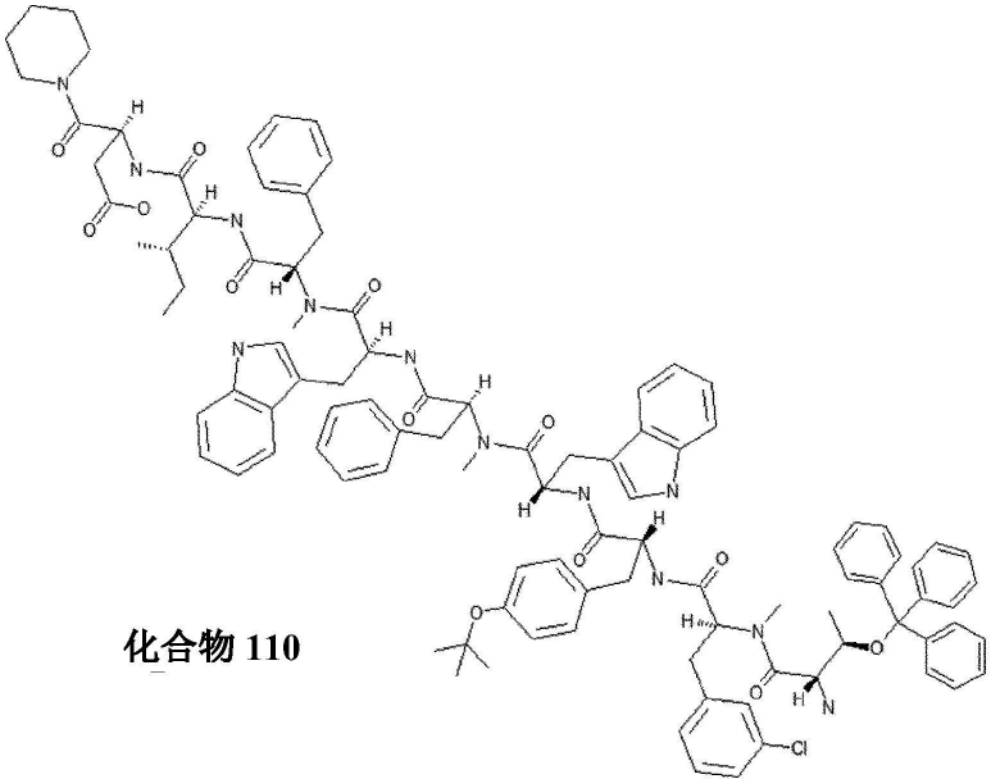
化合物 109

[0738] 未反应的形式(化合物109)

[0739] LCMS(ESI)m/z＝1422.9$(M+H)^+$

[0740] 保留时间:0.77分钟(分析条件SQDFA05)

[0741]

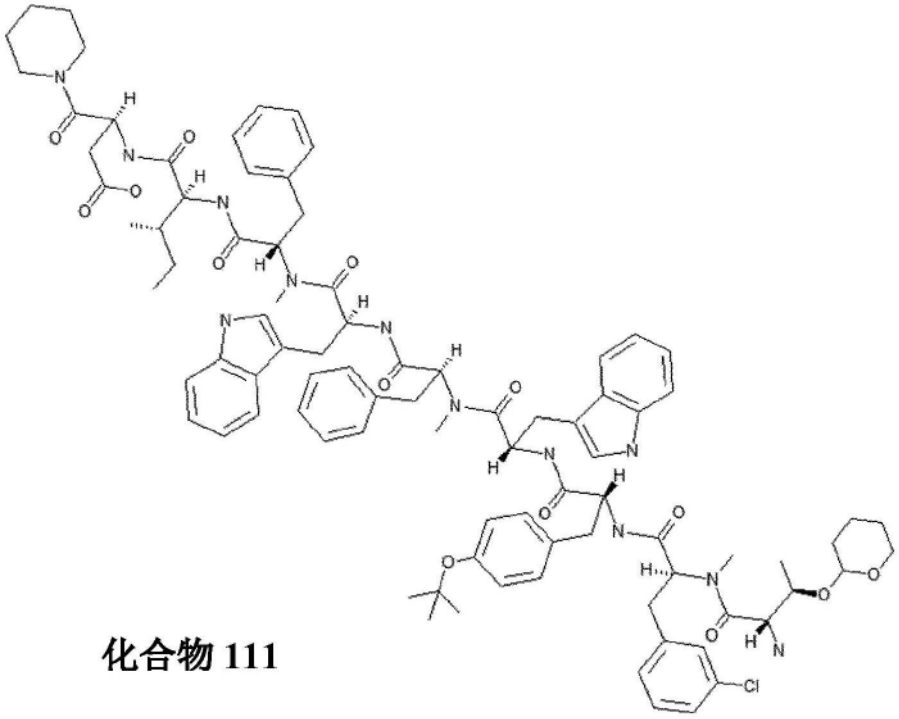


化合物 110

[0742] 延伸的形式(Thr(Trt))(化合物110)

[0743] LCMS(ESI)m/z＝1766.2(M+H)$^+$

[0744] 保留时间:0.92分钟(分析条件SQDFA05)

[0745] 

化合物 111

[0746] 延伸的形式(Thr(THP))(化合物111)

[0747] LCMS(ESI)m/z＝1608.1(M+H)$^+$

[0748] 保留时间:0.80分钟(分析条件SQDFA05)

[0749] 实施例4-2:

[0750] 当通过合成仪合成H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu-Thr(PG)-MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip时,Fmoc-Thr(Trt)-OH或Fmoc-Thr(THP)-OH(化合物2)的延伸反应性

[0751] 通过将Thr延伸到在其N末端具有MePhe的序列(其由于空间位阻而具有低反应性)和延伸到在其N末端具有MeLeu(相对于Thr的氨基,其是空间上大体积的)的序列来测试延伸反应性。

[0752] 根据肽合成方法,使用实施例中已经描述的Fmoc方法,通过使用由已经描述的方法制备的Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物50,100mg)作为树脂,进行H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu-Thr(PG)-MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(其中,Thr侧链上的PG代表保护基,并且在本实验中,它代表通过Trt或THP的保护)的肽延伸。在这种情况下,在Thr延伸中使用Fmoc-Thr(Trt)-OH或Fmoc-Thr(THP)-OH(化合物2)。

[0753] 在肽延伸后,在肽合成仪上进行N-末端Fmoc基团的除去,并用DMF和DCM洗涤树脂。

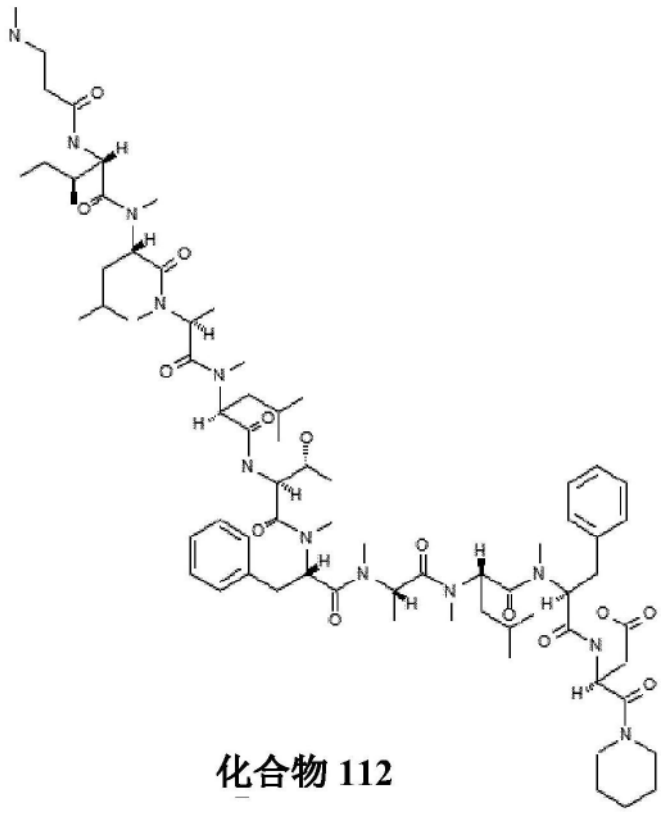
[0754] 再次用DCM溶胀树脂之后,将TFE/DCM(1/1,v/v,2mL)加入到树脂中,将其在室温下振荡两小时,并将肽从树脂上切下。然后,通过将管内的溶液穿过用于合成的柱过滤而除去树脂,并将剩余的树脂进一步用TFE/DCM(1/1,v/v,1mL)洗涤两次。

[0755] 切割之后,当使用Fmoc-Thr(Trt)-OH时,通过使用由混合4N HCl/1,4-二噁烷(19.5μL)、TIPS(0.25mL)和DCM(0.73mL)而产生的溶液,将Thr(Trt)的Trt基团脱保护,并将

混合物在25℃振荡五分钟。然后通过加入DIPEA(24μL)将酸中和,并通过LCMS测试延伸反应性。

[0756] 产物的LCMS结果示于图13中。在0.69分钟的相同保留时间处,观察到所需肽(化合物112,H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu-Thr-MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp-pip)和其中Thr从所需肽中丢失的化合物(化合物113,H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu-MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp-pip)。此外,根据MS(阴性模式),以大约30%的比例包括Thr丢失的肽。

[0757]



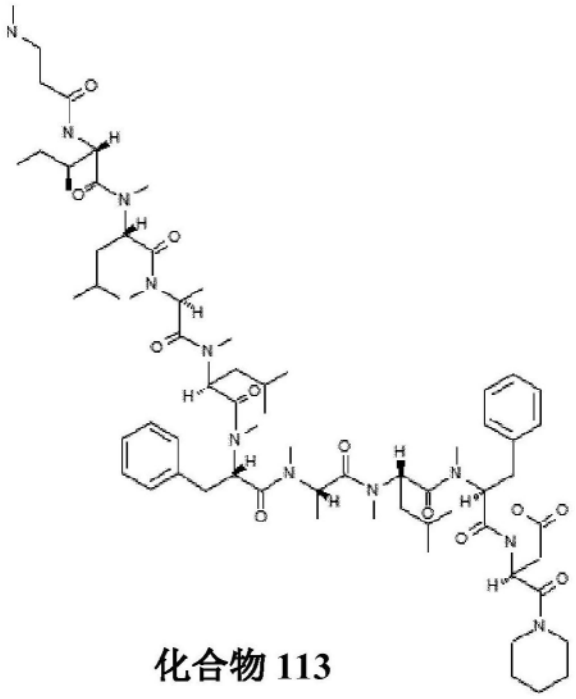
化合物 112

[0758] 图13的数据如下所示:

[0759] 靶分子(化合物112,H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu-Thr-MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp-pip)

[0760] LCMS(ESI)m/z=1373.6$(M+H)^+$

[0761] 保留时间:0.69分钟(分析条件SQDAA50)

[0762] 

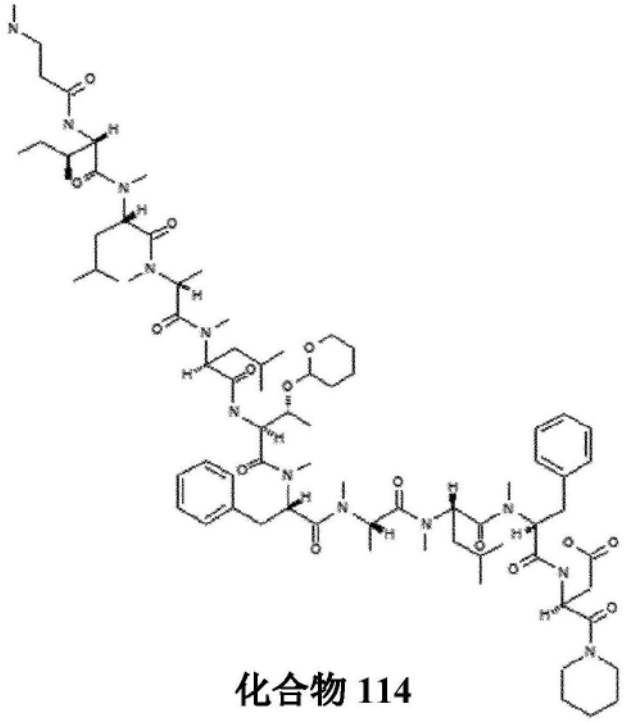
化合物 113

[0763] 靶分子-Thr(化合物113,H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu-MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp-pip)

[0764] LCMS(ESI)m/z＝1272.6$(M+H)^+$

[0765] 保留时间:0.69分钟(分析条件SQDAA50)

[0766] 这一产物的LCMS结果示于图14中。与加入Fmoc-Thr(Trt)-OH时的情况相反,当加入Fmoc-Thr(THP)-OH时,没有检测到其中从所需肽(化合物114,H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu-Thr(THP)-MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp-pip)中丢失Thr的肽(化合物113,H-b-MeAla-Ile-MeLeu-MeAla-MeLeu-MePhe-MeAla-MeLeu-MePhe-Asp-pip)。当使用Fmoc-Thr(THP)-OH(化合物2)时,在从树脂上切割之后不进行脱保护操作,并且将切割溶液直接进行LCMS分析;因此,保留了Thr侧链的THP保护。

[0767] 

化合物 114

[0768] 图14的数据如下所示：

[0769] 靶分子(化合物114)

[0770] LCMS(ESI)m/z＝1458.1(M+H)+

[0771] 保留时间:0.73分钟(分析条件SQDFA05)

[0772] 上述结果表明,与标准肽合成中用于Thr延伸的Fmoc-Thr(Trt)-OH相比,Fmoc-Thr(THP)-OH(化合物2)具有更高的反应性。特别是,当从N-烷基化的N末端的大体积氨基延伸时,显示出了高的缩合效率是可以实现的。另外,在随后的延伸反应中,可以确认的是,相对于Thr(THP)的N-末端氨基为大体积的Fmoc-氨基酸(在这种情况下是Fmoc-MeLeu-OH)的延伸没有任何问题地进行。

[0773] 实施例4-2:

[0774] 在通过合成仪的H-MeSer(PG)-MeVal-MeHis(Trt)-Tyr(3-F,tBu)-Pro-MeHis(Trt)-Pro-Trp-MePhe(4-Cl)-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-Pro-OPis的合成中,当使用Fmoc-MeSer(DMT)-OH或Fmoc-MeSer(THP)-OH(化合物6)时,MeSer的延伸反应性的确认

[0775] 根据肽合成方法,使用实施例中已经描述的Fmoc方法,通过使用由已经描述的方法制备的Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-Pro-OPis(化合物58,加载率:0.3736mmol/g,100mg)作为树脂,进行H-MeSer(PG)-MeVal-MeHis(Trt)-Tyr(3-F,tBu)-Pro-MeHis(Trt)-Pro-Trp-MePhe(4-Cl)-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-Pro-OPis(其中MeSer侧链上的PG代表保护基,并且在本实验中,它代表通过DMT或THP的保护)的肽延伸。在这种情况下,在MeSer延伸中使用Fmoc-MeSer(DMT)-OH或Fmoc-MeSer(THP)-OH(化合物6)。

[0776] 在肽延伸之后,在肽合成仪上除去N-末端Fmoc基团,并用DMF和DCM洗涤树脂。

[0777] 在减压下将得到的树脂干燥之后,分别收集每种树脂30mg。将收集的30mg树脂中的每一个再次用DCM溶胀,然后将TFE/DCM(1/1,v/v,2mL)加入到树脂中,将其在室温振荡两小时,并将肽从树脂上切下。然后,通过将管内的溶液穿过用于合成的柱过滤而除去树脂,

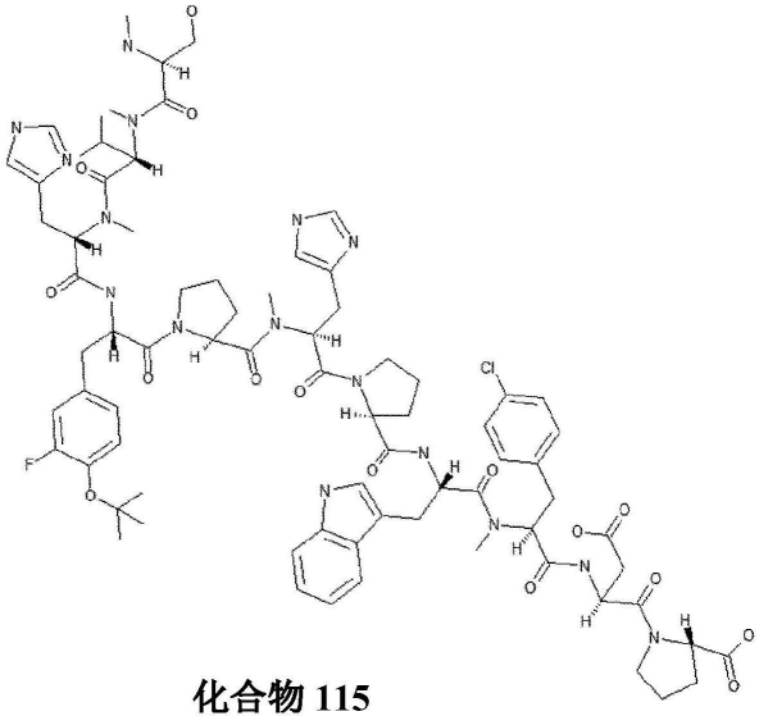
并将剩余的树脂进一步用TFE/DCM(1/1,v/v,1mL)洗涤两次。将所有获得的切割溶液混合,并在减压下浓缩。

[0778] 向所得残渣中加入1.3mL由上述方法制备的0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS),以溶解所述残渣,然后将其在室温静置一小时。将除Tyr(3-F)侧链的tBu保护(MeSer侧链的DMT或THP保护和Me His侧链的Trt保护)和主链C-末端Pis保护之外的侧链保护基脱保护,并通过LCMS分析检查反应。

[0779] 图15示出了当使用Fmoc-MeSer(DMT)-OH•0.75DIPEA进行合成时LCMS的结果。在0.50分钟的相同保留时间处,观察到所需肽(化合物115,H-MeSer-MeVal-MeHis-Tyr(3-F,tBu)-Pro-MeHis-Pro-Trp-MePhe(4-Cl)-Asp-Pro-OH)和其中MeSer从所需肽中丢失的化合物(化合物116,H-MeVal-MeHis-Tyr(3-F,tBu)-Pro-MeHis-Pro-Trp-MePhe(4-Cl)-Asp-Pro-OH)。

[0780] 此外,根据MS(阴性模式),发现MeSer丢失的肽(化合物116,H-MeVal-MeHis-Tyr(3-F,tBu)-Pro-MeHis-Pro-Trp-MePhe(4-Cl)-Asp-Pro-OH)以50%的比例被包括。

[0781]



化合物 115

[0782] 图15的数据如下所示:

[0783] 靶分子(化合物115)

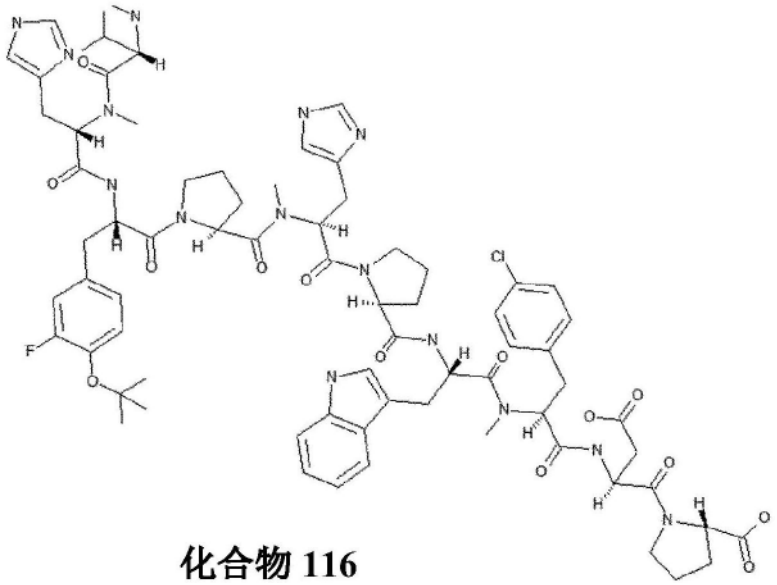
[0784] LCMS(ESI)m/z=1559.7(M+H)$^+$

[0785] 保留时间:0.50分钟(分析条件SQDFA50)

[0786] 靶分子-MeSer(化合物116)

[0787] LCMS(ESI)m/z=1458.8(M+H)$^+$

[0788] 保留时间:0.50分钟(分析条件SQDFA50)

[0789] 

化合物116

[0790] 相反,图16显示了当使用Fmoc-MeSer(THP)-OH(化合物6)进行合成时LCMS的结果。在0.50分钟的相同保留时间处,观察到所需肽(化合物115,H-MeSer-MeVal-MeHis-Tyr(3-F,tBu)-Pro-MeHis-Pro-Trp-MePhe(4-Cl)-Asp-Pro-OH)和其中MeSer从所需肽中丢失的化合物(化合物116)。然后,根据MS(阴性模式),发现MeSer丢失的肽(化合物116,H-MeVal-MeHis-Tyr(3-F,tBu)-Pro-MeHis-Pro-Trp-MePhe(4-Cl)-Asp-Pro-OH)以10%或更低的比例被包括。

[0791] 图16的数据如下所示:

[0792] 靶分子(化合物115)

[0793] LCMS(ESI)m/z=1559.7$(M+H)^+$

[0794] 保留时间:0.50分钟(分析条件SQDFA50)

[0795] 所需肽-MeSer(化合物116)

[0796] LCMS(ESI)m/z=1458.7$(M+H)^+$

[0797] 保留时间:0.50分钟(分析条件SQDFA50)

[0798] 上述结果表明,与Fmoc-MeSer(DMT)-OH相比,Fmoc-MeSer(THP)-OH(化合物6)具有更高的反应性,并且当从N-甲基化的N末端的氨基进行延伸时,可以实现高的缩合效率。

[0799] 5.在5%TFA中,环化肽的脱保护(比较例)

[0800] 比较例1:

[0801] 化合物(化合物101,Pep-1)的侧链保护基的脱保护(D-Tyr(tBu)的tBu保护的脱保护),其中在所述化合物中,在H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键(当使用5%TFA/DCE(5%TIPS)时)

[0802] 使用由已经描述的方法合成的Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物50,树脂加载率:0.373mmol/g,100mg),在合成仪上进行肽延伸,以得到H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip。

[0803] 然后,再次用DCM溶胀树脂之后,将TFE/DCM(1/1,v/v,2mL)加入到树脂中,将其在室温下振荡两小时,然后将肽从树脂上切下。然后,通过将管内的溶液穿过用于合成的柱过

滤而除去树脂,并将剩余的树脂进一步用TFE/DCM(1/1,v/v,1mL)洗涤两次。将所有获得的切割溶液混合,并在减压下浓缩。

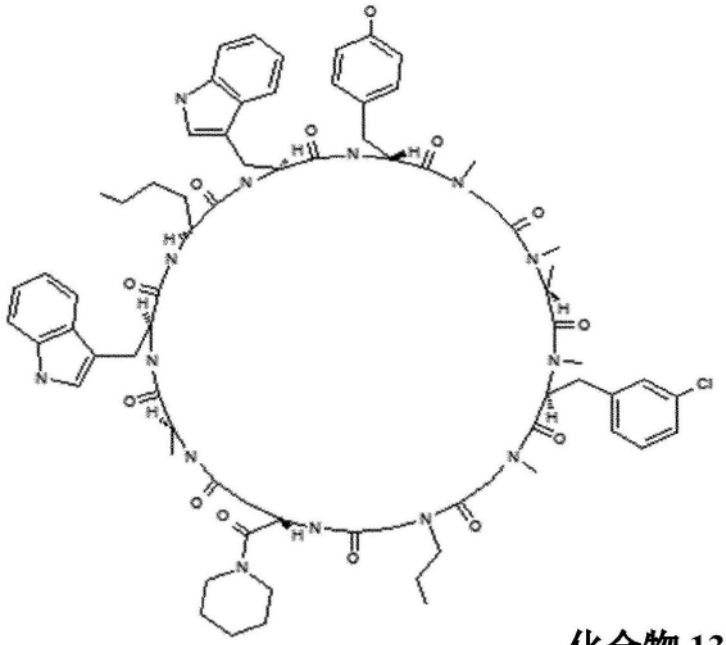
[0804] 将得到的残渣溶解在DMF/DCM(1/1,v/v,8mL)中,加入O-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N,N-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HATU,21mg)/DMF溶液(0.5M)和DIPEA(12μL)/DMF(88μL)溶液,并将其在室温搅拌两小时。通过LCMS分析(分析条件SQDFA05)检查反应,并且确认了化合物(化合物101、Pep-1)的生成,其中在所述化合物中,在H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr(tBu)-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pip的N末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键。

[0805] LCMS(ESI)m/z=1480.0$(M+H)^+$

[0806] 保留时间:0.93分钟(分析条件SQDFA05)

[0807] 然后,在减压下蒸馏除去溶剂,向所得残渣中加入5%TFA/DCE(5%TIPS)(8mL,通过卡尔·费歇尔滴定法确认水分<200ppm),并将其搅拌2.5小时。在减压下蒸馏除去溶剂,并且当对残渣进行LCMS(FA05)分析时,确认了作为靶分子的化合物(化合物131)及其水解物(其中任意酰胺键被水解的产物)对应的质量,其中在所述化合物中,在H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pip的N末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键,并且它们对应的UV面积比为13:87(图17)。LC分析结果示于图17中。在本实施例中,"TM+H_2O"表示其中靶分子的任何一个酰胺键已经历水解的化合物。

[0808]



化合物 131

[0809] 图17的数据如下所示:

[0810] 靶分子(化合物131,其中在H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键的化合物)

[0811] LCMS(ESI)m/z=1424.0$(M+H)^+$

[0812] 保留时间:0.79分钟(分析条件SQDFA05)

[0813] 水解产物(其中化合物的任何酰胺键都已经历水解的产物,其中在H-Ala-Trp-Nle-Trp-D-Tyr-MeGly-MeAla-MePhe(3-Cl)-MeGly-nPrGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp侧

链的羧酸之间形成酰胺键的化合物)

[0814] LCMS(ESI)m/z＝1442.0(M+H)$^+$

[0815] 保留时间:0.61分钟(分析条件SQDFA05)

[0816] 这些结果证实,在使用5％TFA/DCE(5％TIPS)的脱保护中,在具有高度N-甲基化的序列(特别是具有连续N-甲基氨基酸的序列)的环肽的情况下,大约90％的靶分子被水解,并且获得靶分子变得困难。

[0817] 比较例2:

[0818] 化合物(化合物103、Pep3)的侧链保护基的脱保护(MeSer侧链的DMT保护和Ser侧链的Trt保护),其中在所述化合物中,在H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键(当使用5％TFA/DCE(5％TIPS)时)

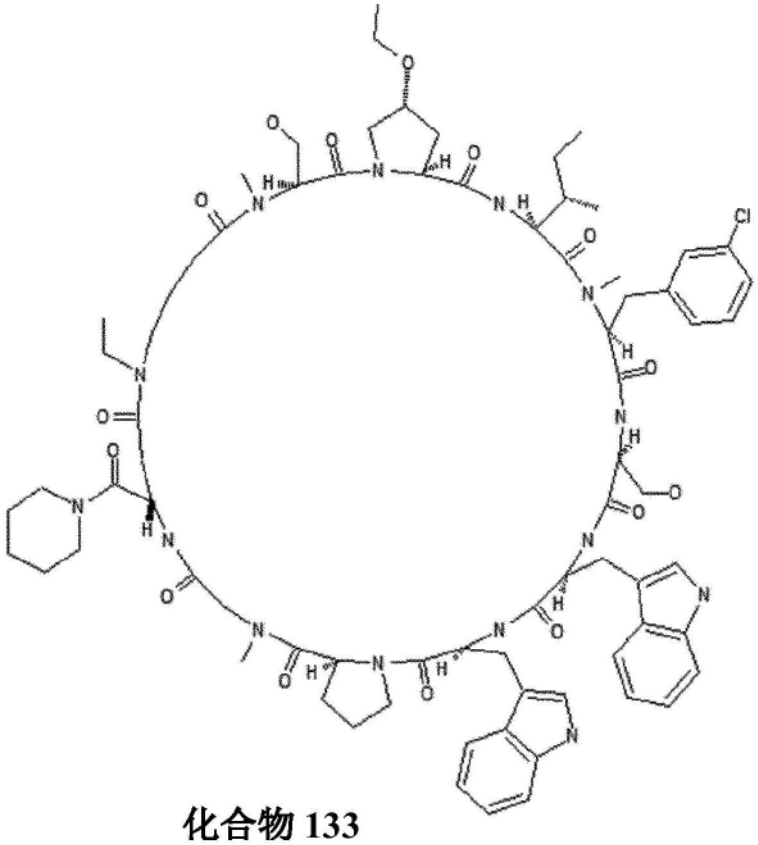
[0819] 使用由已经描述的方法合成的Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物50,树脂加载率:0.316mmol/g,100mg),在合成仪上进行肽延伸,以得到H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip。

[0820] 然后,再次用DCM溶胀树脂之后,将TFE/DCM(1/1,v/v,2mL)加入到树脂中,将其在室温下振荡两小时,然后将肽从树脂上切下。然后,通过将管内的溶液穿过用于合成的柱过滤而除去树脂,并将剩余的树脂进一步用TFE/DCM(1/1,v/v,1mL)洗涤两次。

[0821] 将肽从树脂上切下的操作重复两次,将所有获得的切割溶液混合,并且然后在减压下浓缩。

[0822] 将得到的残渣溶解在DMF/DCM(1/1,v/v,8mL)中,加入O-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N,N-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HATU,18mg)/DMF溶液(0.5M)和DIPEA(9.9μL)/DMF(39.6μL)溶液,并将其在室温搅拌两小时。通过LCMS分析(SQDFA05)检查反应,并且证实了下列化合物:70％的通过从化合物(化合物103,Pep3)中除去MeSer侧链的DMT保护而形成的化合物,其中在所述化合物中,在H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸(LCMS(ESI)m/z＝1716.2(M+H)+;保留时间:1.06分钟)之间形成酰胺键,和30％的其中MeSer侧链的DMT保护和Ser侧链的Trt保护均从化合物103中除去的化合物(LCMS(ESI)m/z＝1474.1(M+H)+;保留时间:0.78分钟)。根据LC由UV面积比计算百分比。然后,在减压下蒸馏除去溶剂,将残渣溶解于二氯甲烷中,并将其等分到10个试管中。将这些在减压下浓缩以除去二氯甲烷。上述实施例中使用的“环化后的残渣”是指将其等分至10个试管中后,通过在减压下浓缩而获得的残渣。

[0823] 向这些试管中的一个加入5％TFA/DCE(5％TIPS)(0.8mL,通过卡尔·费歇尔滴定法确定的水含量为32.5ppm),并振荡三分钟,然后在25℃静置两小时。在减压下蒸馏除去溶剂,并且当残渣进行LCMS(FA05)分析时,确认了作为靶分子的化合物(化合物133)、靶分子的N-至O-酰基转移产物、其中靶分子的一个羟基被TFA酯化的产物、以及其中靶分子的两个羟基被TFA酯化的产物具有17:46:32:5的UV面积比,其中在所述化合物中,在H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键。LC分析结果示于图18中。

[0824] 

化合物 133

[0825] 图18的数据如下所示：

[0826] 所需肽(化合物133,其中在H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键的化合物)

[0827] LCMS(ESI)m/z＝1473.8(M+H)+

[0828] 保留时间:0.79分钟(分析条件SQDFA05)

[0829] 靶分子的N-至O-酰基转移产物(其中在靶分子的两个羟基中的一个或两个上进行N-至O-酰基转移的化合物)

[0830] LCMS(ESI)m/z＝1473.8$(M+H)^+$

[0831] 保留时间:0.62分钟(分析条件SQDFA05)

[0832] 其中靶分子的一个羟基被TFA酯化的化合物

[0833] LCMS(ESI)m/z＝1569.8$(M+H)^+$

[0834] 保留时间:0.89分钟(分析条件SQDFA05)

[0835] 其中靶分子的两个羟基被TFA酯化的化合物

[0836] LCMS(ESI)m/z＝1665.9$(M+H)^+$

[0837] 保留时间:0.99分钟(分析条件SQDFA05)

[0838] 这些结果证实了,当序列中包括含β-羟基的氨基酸如MeSer和Ser时,使用5％TFA/DCE(5％TIPS)的脱保护导致N-至O-酰基转移进行。此外,证实了在该条件下的脱保护导致TFA酯化在两个侧链羟基的一个或两个上发生。证实了由于这些不需要的反应,获得靶分子变得困难。

[0839] 为了抑制N-至O-酰基转移产物的产生和抑制羟基的TFA酯化,进行了其中将反应温度降低至0℃的检验和其中将TFA浓度降低的检验。

[0840] 比较例3:

[0841] 化合物(化合物103、Pep3)的侧链保护基的脱保护(MeSer侧链的DMT保护和Ser侧链的Trt保护),其中在所述化合物中,在H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键(当在0℃使用5%TFA/DCE(5%TIPS)进行脱保护时)

[0842] 上述环化之后,在0℃下将5%TFA/DCE(5%TIPS)(0.8mL,通过卡尔·费歇尔滴定法所确定的水分含量为36.6ppm)加入到10个等分的试管中的一个,将其振摇一分钟,然后在0℃静置四小时。当对反应溶液进行LCMS(FA05)分析时,证实了作为靶分子的化合物(化合物133)、靶分子的N-至O-酰基转移产物、其中靶分子的一个羟基被TFA酯化的产物、以及其中靶分子的N-至O-酰基转移产物的一个羟基被TFA酯化的产物具有56:12:21:11的UV面积比,其中在所述化合物中,在H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键。LC分析结果示于图19中。

[0843] 图19的数据如下所示:

[0844] 所需肽(化合物133,其中在H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键的化合物)

[0845] LCMS(ESI)m/z=1473.7$(M+H)^+$

[0846] 保留时间:0.78分钟(分析条件SQDFA05)

[0847] 靶分子的N-至O-酰基转移产物(其中在靶分子的两个羟基中的一个或两个上进行N-至O-酰基转移的化合物)

[0848] LCMS(ESI)m/z=1473.7$(M+H)^+$

[0849] 保留时间:0.65分钟(分析条件SQDFA05)

[0850] 其中靶分子的一个羟基被TFA酯化的化合物

[0851] LCMS(ESI)m/z=1569.7$(M+H)^+$

[0852] 保留时间:0.89分钟(分析条件SQDFA05)

[0853] 其中靶分子的N-至O-酰基转移产物的一个羟基被TFA酯化的化合物

[0854] LCMS(ESI)m/z=1569.7$(M+H)^+$

[0855] 保留时间:0.73分钟(分析条件SQDFA05)

[0856] 比较例4:

[0857] 化合物(化合物103、Pep3)的侧链保护基的脱保护(MeSer侧链的DMT保护和Ser侧链的Trt保护),其中在所述化合物中,在H-g-EtAbu-MeSer(DMT)-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser(Trt)-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键(当在25℃并使用2%TFA/DCE(5%TIPS)进行脱保护时)

[0858] 上述环化之后,在25℃下将2%TFA/DCE(5%TIPS)(0.8mL,通过卡尔·费歇尔滴定法所确定的水含量为30.1ppm)加入到10个等分的试管中的一个,将其振摇一分钟,然后在室温静置四小时。当对反应溶液进行LCMS(FA05)分析时,证实了作为靶分子的化合物(化合物133)、靶分子的N-至O-酰基转移产物、其中靶分子的一个羟基被TFA酯化的产物、其中靶分子的两个羟基被TFA酯化的产物、以及其中靶分子的N-至O-酰基转移产物的一个羟基被TFA酯化的产物具有30:34:24:3:9的UV面积比,其中在所述化合物中,在H-g-EtAbu-MeSer-

Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键。LC分析结果示于图20中。

[0859] 图20的数据如下所示：

[0860] 所需肽(化合物133,其中在H-g-EtAbu-MeSer-Hyp(Et)-Ile-MePhe(3-Cl)-Ser-Trp-Trp-Pro-MeGly-Asp-pip的N-末端氨基和Asp的侧链羧酸之间形成酰胺键的化合物)

[0861] LCMS(ESI)m/z＝1473.8$(M+H)^+$

[0862] 保留时间:0.78分钟(分析条件SQDFA05)

[0863] 靶分子的N-至O-酰基转移产物(其中在靶分子的两个羟基中的一个或两个上进行N-至O-酰基转移的化合物)

[0864] LCMS(ESI)m/z＝1473.8$(M+H)^+$

[0865] 保留时间:0.65分钟(分析条件SQDFA05)

[0866] 其中靶分子的一个羟基被TFA酯化的化合物

[0867] LCMS(ESI)m/z＝1569.8$(M+H)^+$

[0868] 保留时间:0.89分钟(分析条件SQDFA05)

[0869] 其中靶分子的两个羟基被TFA酯化的化合物

[0870] LCMS(ESI)m/z＝1665.7$(M+H)^+$

[0871] 保留时间:0.99分钟(分析条件SQDFA05)

[0872] 其中靶分子的N-至O-酰基转移产物的一个羟基被TFA酯化的化合物

[0873] LCMS(ESI)m/z＝1569.8$(M+H)^+$

[0874] 保留时间:0.73分钟(分析条件SQDFA05)

[0875] 根据上述结果,仅通过降低反应温度和通过使用较低浓度的TFA溶液,不能完全解决N-至O-酰基转移的问题和化合物中所包含的羟基的TFA酯化的问题。

[0876] [实施例6]在本发明的平行合成(固相法)中的应用

[0877] 实施例6-1:

[0878] 其中在天冬氨酸的N末端氨基和侧链羧酸基之间通过酰胺键进行环化的一组肽的合成

[0879] 合成了一组肽,其中在天冬氨酸的N末端主链氨基和侧链羧酸基之间通过酰胺键进行环化,其中脯氨酸键合至所述天冬氨酸的C末端或所述天冬氨酸的C末端被酰胺化(通过哌啶、4-(叔丁基)哌啶和N-甲基辛-1-胺中的任一种酰胺化)。

[0880] 使用100mg的化合物50(用于支持化合物48(Fmoc-Asp-Pip)的2-氯三苯甲基树脂)、化合物52(用于支持化合物51(Fmoc-Asp-piptBu)的2-氯三苯甲基树脂)、化合物55(用于支持化合物54(Fmoc-Asp-MeOctyl)的2-氯三苯甲基树脂)、化合物58(用于支持化合物57(Fmoc-Asp-Pro-OPis)的2-氯三苯甲基树脂)中的任一种,使用Fmoc氨基酸Fmoc-MeVal-OH、Fmoc-MePhe(3-Cl)-OH(化合物15)、Fmoc-MePhe(4-Cl)-OH(化合物16)、Fmoc-MeHis(Trt)-OH(化合物7)、Fmoc-MePhe-OH、Fmoc-MeSer(DMT)-OH(化合物5)、Fmoc-MeSer(THP)-OH(化合物6)、Fmoc-MeAla-OH、Fmoc-nPrGly-OH(化合物20)、Fmoc-MeGly-OH,Fmoc-Hyp(Et)-OH(化合物18)、Fmoc-Pro-OH,Fmoc-Thr(THP)-OH(化合物2)、Fmoc-Ile-OH,Fmoc-Val-OH、Fmoc-Trp-OH、Fmoc-Tyr(3-F,tBu)-OH(化合物13)、Fmoc-Phe(4-CF3)-OH、Fmoc-Phe(3-Cl)-OH、Fmoc-Ser(Trt)-OH、Fmoc-Met(O2)-OH、Fmoc-b-Ala-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Gly-OH,进行肽

延伸。(在MeSer延伸中,将Fmoc-MeSer(DMT)-OH(化合物5)用于PS-53和PS-54(表5-1),而将Fmoc-MeSer(THP)-OH(化合物6)用于其它情况)。通过实施例中已经描述的Fmoc方法,根据肽合成方法进行肽延伸。在肽延伸之后,在肽合成仪上除去N-末端Fmoc基团,并且然后用DMF洗涤树脂。

[0881] 然后,在再次用DCM溶胀树脂后,将TFE/DCM(1/1,v/v,2mL)和二异丙基乙胺(DIPEA,以相对于所用树脂的摩尔数(由加载率(mmol/g)乘以所用树脂的量(通常为0.10g)得到的摩尔数)为1.8当量的量)加入树脂中,将其在室温振荡两小时,然后将肽从树脂上切下。然后,通过将管内的溶液穿过用于合成的柱过滤而除去树脂,并将剩余的树脂进一步用TFE/DCM(1/1,v/v,1mL)洗涤两次。将所有获得的切割溶液混合,并在减压下浓缩。

[0882] 将得到的残渣溶解在DMF/DCM(1/1,v/v,8mL)中,加入0.5M O-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N,N-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HATU)/DMF溶液(以相对于所用树脂的摩尔数(由树脂的加载率(mmol/g)乘以所用树脂的量(0.1g)得到的摩尔数)为1.5当量的量),和DIPEA(相对于所用树脂的摩尔数为1.8当量),并将其在室温搅拌两小时。然后,在减压下蒸馏除去溶剂。

[0883] 对得到的残渣如下进行脱保护。

[0884] 当序列包括Tyr(3-F,tBu)时,加入2mL通过已经描述的方法制备的0.1M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS),以溶解残渣,然后将其在室温或30℃静置24小时。当序列中不含Tyr(3-F)时,加入4mL通过已经描述的方法制备的0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP溶液(2%TIPS),以溶解残渣,然后将其在室温静置四小时。在使反应静置一定量的时间之后,加入二异丙基乙胺(DIPEA,70μL),并在减压下蒸馏除去溶剂。

[0885] 在减压下蒸馏除去溶剂之后,将所得物质溶于DMF中。在通过过滤除去不溶物后,通过制备型HPLC对其进行纯化,并得到标题中的酰胺环化的环状肽(PS-1至PS-54)。PS-1至PS-54的序列如表5-1所示,它们的结构如表5-2所示。表5-3示出了每种所得到的肽的质谱值、液相色谱保留时间、纯度和产量。

[0886] [表5-1]

[0887]

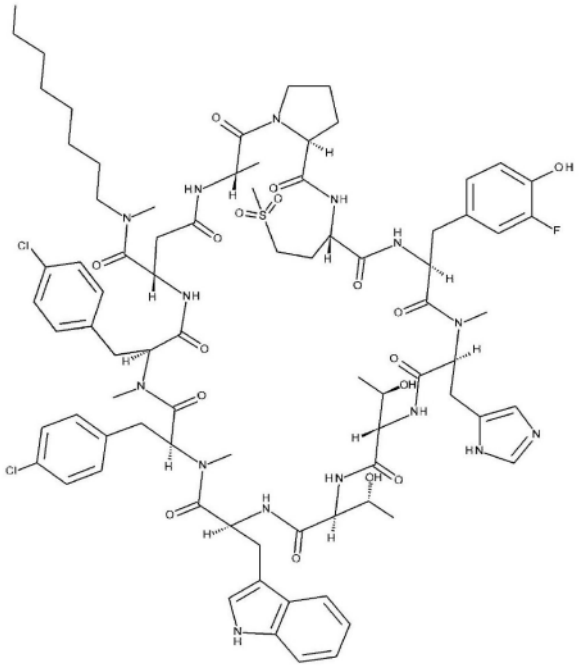
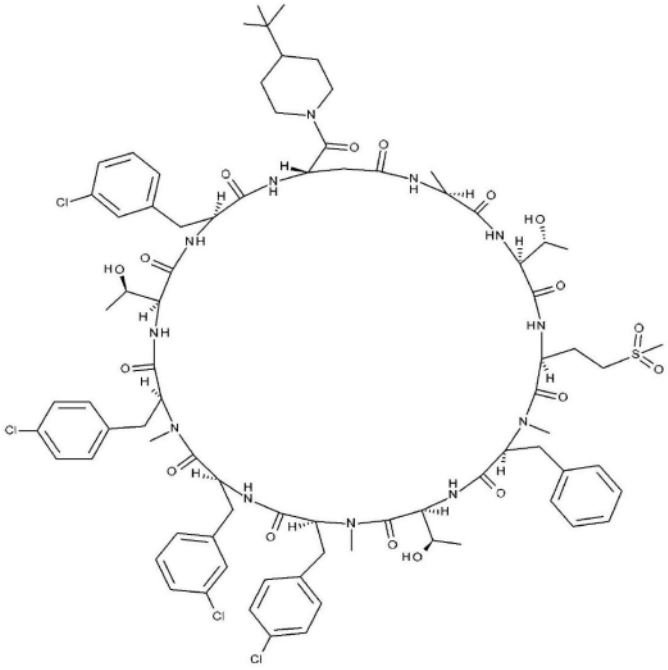
	MW	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	H-1	使用的树脂	树脂加载量
PS-1	1683.8	Ala	Pro	Met(O2)	Tyr(3-F)	MeHis	Thr	Thr	Trp	MePhe(4-Cl)	MePhe(4-Cl)	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-2	1691.6	Ala	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	MePhe(4-Cl)	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g
PS-3	1727.8	Ala	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Tyr(3-F)	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g
PS-4	1652.2	Ala	Thr	Phe(3-Cl)	MeAla	Met(O2)	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g
PS-5	1699.8	Ser	Pro	Met(O2)	Tyr(3-F)	MeHis	Thr	Thr	Trp	MePhe(4-Cl)	MePhe(4-Cl)	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-6	1707.6	Ser	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	MePhe(4-Cl)	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g
PS-7	1745.8	Ser	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Tyr(3-F)	Phe(3-Cl)	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-8	1655.6	Ala	Pro	Met(O2)	Tyr(3-F)	MeHis	Thr	Thr	Trp	MePhe(4-Cl)	MePhe(4-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-9	1665.5	Ala	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	MePhe(4-Cl)	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-10	1701.7	Ala	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Tyr(3-F)	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-11	1626.1	Ala	Thr	Phe(3-Cl)	MeAla	Met(O2)	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-12	1671.6	Ser	Pro	Met(O2)	Tyr(3-F)	MeHis	Thr	Thr	Trp	MePhe(4-Cl)	MePhe(4-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-13	1681.5	Ser	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	MePhe(4-Cl)	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-14	1717.7	Ser	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Tyr(3-F)	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-15	1642.1	Ser	Thr	Phe(3-Cl)	MeAla	Met(O2)	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-16	1543.09	Ala	MePhe(3-Cl)	MePhe(3-Cl)	Met(O2)	Hyp(Et)	Thr	MePhe(3-Cl)	nPrGly	bAla	MeGly	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g
PS-17	1590.3	Ala	Met(O2)	MePhe	Trp	Pro	MeGly	MePhe(4-Cl)	Met(O2)	MeVal	Trp	Asp	pip	化合物50	0.330 mmol/g
PS-18	1808.4	Ala	Met(O2)	Met(O2)	MePhe	Met(O2)	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-19	1664.23	Ala	Ile	Phe(3-Cl)	MeAla	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Met(O2)	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g
PS-20	1561.11	Ser	MePhe(3-Cl)	MePhe(3-Cl)	Met(O2)	Hyp(Et)	Thr	MePhe(4-Cl)	nPrGly	bAla	MeGly	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-21	1664.43	Ser	Met(O2)	MePhe	Trp	Pro	MeGly	MePhe(4-Cl)	Met(O2)	MeVal	Trp	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-22	1824.4	Ser	Met(O2)	Met(O2)	MePhe	Met(O2)	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-23	1680.23	Ser	Ile	Phe(3-Cl)	MeAla	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Met(O2)	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.356 mmol/g
PS-24	1516.97	Ala	MePhe(3-Cl)	MePhe(3-Cl)	Met(O2)	Hyp(Et)	Thr	MePhe(3-Cl)	nPrGly	bAla	MeGly	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-25	1620.29	Ala	Met(O2)	MePhe	Trp	Pro	MeGly	MePhe(4-Cl)	Met(O2)	MeVal	Trp	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-26	1780.26	Ala	Met(O2)	Met(O2)	MePhe	Met(O2)	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-27	1638.11	Ala	Ile	Phe(3-Cl)	MeAla	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Met(O2)	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-28	1532.97	Ser	MePhe(3-Cl)	MePhe(3-Cl)	Met(O2)	Hyp(Et)	Thr	MePhe(3-Cl)	nPrGly	bAla	MeGly	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-29	1636.29	Ser	Met(O2)	MePhe	Trp	Pro	MeGly	MePhe(4-Cl)	Met(O2)	MeVal	Trp	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-30	1796.26	Ser	Met(O2)	Met(O2)	MePhe	Met(O2)	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-31	1654.11	Ser	Ile	Phe(3-Cl)	MeAla	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe	Met(O2)	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-32	1575.57	Ala	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	MeSer	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-33	1676.5	Ala	Met(O2)	Phe(3-Cl)	MeSer	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-34	1608.04	Ala	Thr	Met(O2)	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-35	1513.95	Ala	Ile	Gly	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-36	1379.94	Ser	bAla	Met(O2)	Gly	MePhe(3-Cl)	Pro	bAla	Met(O2)	MeSer	MePhe	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-37	1591.57	Ser	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	MeSer	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-38	1692.5	Ser	Met(O2)	Phe(3-Cl)	MeSer	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-39	1624.04	Ser	Thr	Met(O2)	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-40	1529.95	Ser	Ile	Gly	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.3885 mmol/g
PS-41	1392.08	Ala	bAla	Met(O2)	Gly	MePhe(3-Cl)	Pro	bAla	Met(O2)	MeSer	MePhe	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-42	1603.7	Ala	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	MeSer	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g

[0888]

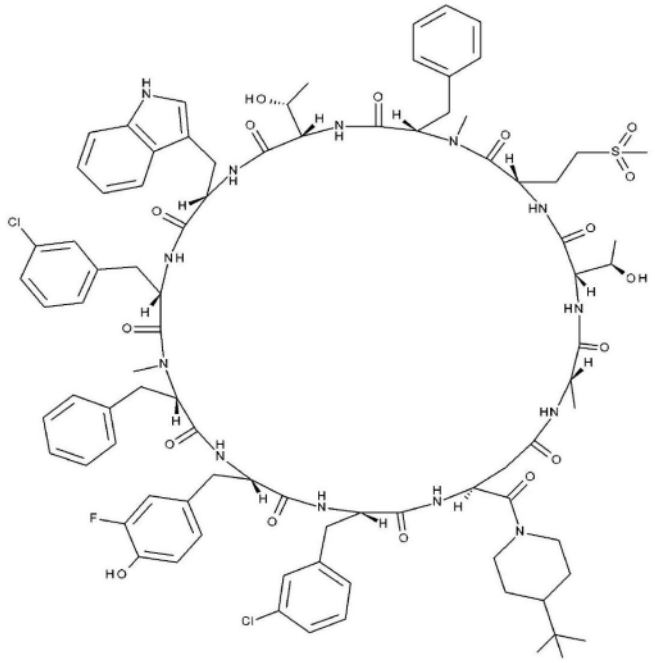
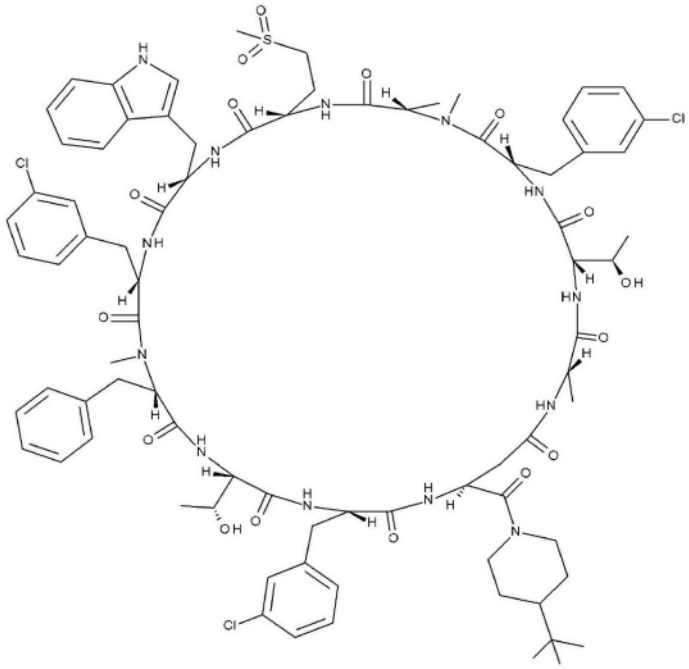
PS-43	1702.62	Ala	Met(O2)	Phe(3-Cl)	MeSer	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.361 mmol/g
PS-44	1619.7	Ser	Thr	Met(O2)	MePhe	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	MeSer	Asp	MeOctyl	化合物55	0.366 mmol/g
PS-45	1718.62	Ser	Met(O2)	Phe(3-Cl)	MeSer	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.361 mmol/g
PS-46	1650.16	Ser	Met(O2)	MeSer	MeVal	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.361 mmol/g
PS-47	1634.16	Ala	Thr	Met(O2)	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.361 mmol/g
PS-48	1483.97	Ala	Ile	Gly	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	pip	化合物50	0.320 mmol/g
PS-49	1650.16	Ser	Thr	Met(O2)	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.361 mmol/g
PS-50	1556.07	Ser	Ile	Gly	Ile	Thr	Trp	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	Thr	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.361 mmol/g
PS-51	1397.47	Ala	Pro	bAla	Phe(4-CF3	Thr	Ser	bAla	Trp	Trp	Val	Asp	Pro	化合物58	0.3573 mmol/g
PS-52	1579.00	Ala	Phe(3-Cl)	MePhe(4-Cl)	MeHis	MeGly	Phe(3-Cl)	MePhe	Thr	MeHis	Thr	Asp	Pro	化合物58	0.3573 mmol/g
PS-53	1789.9	Ala	Met(O2)	Phe(3-Cl)	MeSer	Met(O2)	Trp	MePhe	MePhe	Tyr(3-F)	Phe(3-Cl)	Asp	piptBu	化合物52	0.361 mmol/g
PS-54	1763.8	Ala	Met(O2)	Phe(3-Cl)	MeSer	Met(O2)	Trp	MePhe	MePhe	Tyr(3-F)	Phe(3-Cl)	Asp	Pro	化合物58	0.375 mmol/g

[0889] [表5-2]

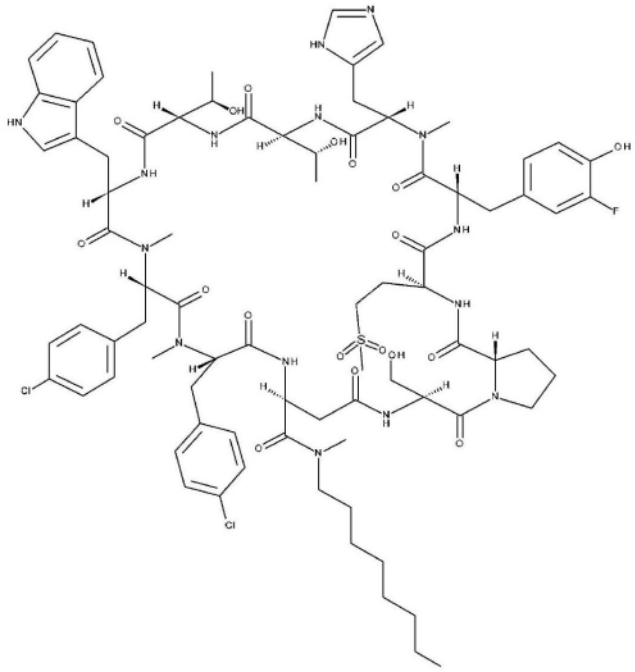
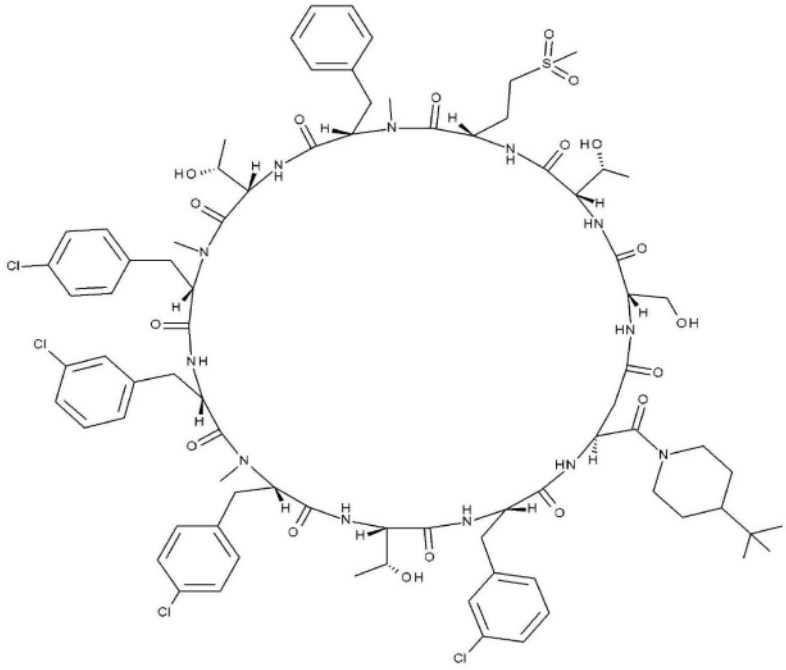
[0890]

PS-1	
PS-2	

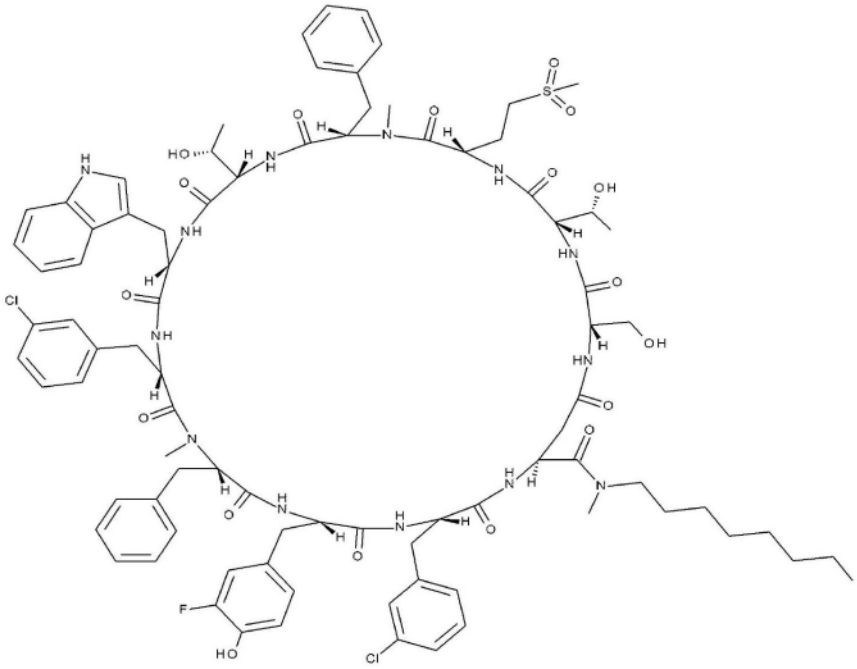
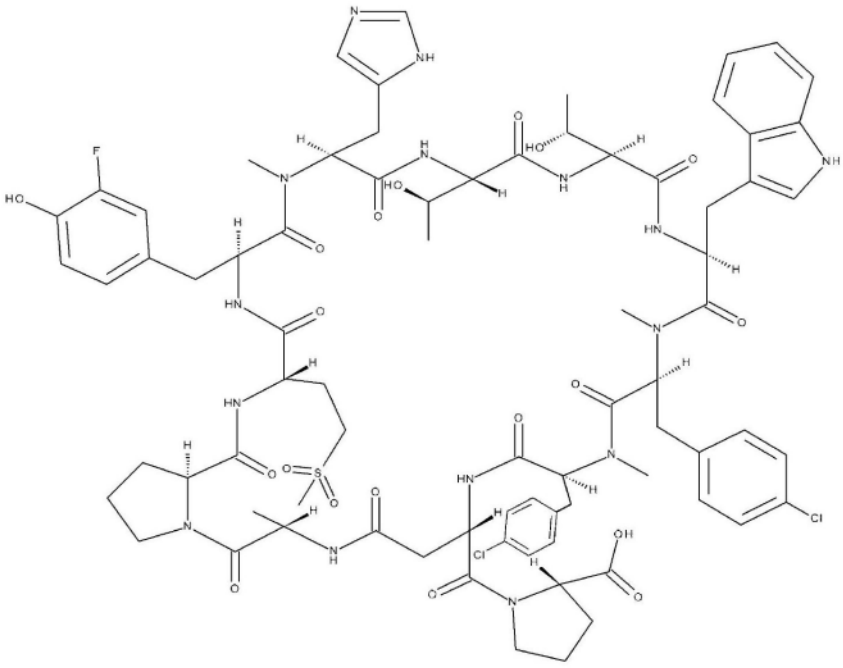
[0891]

PS-3	
PS-4	

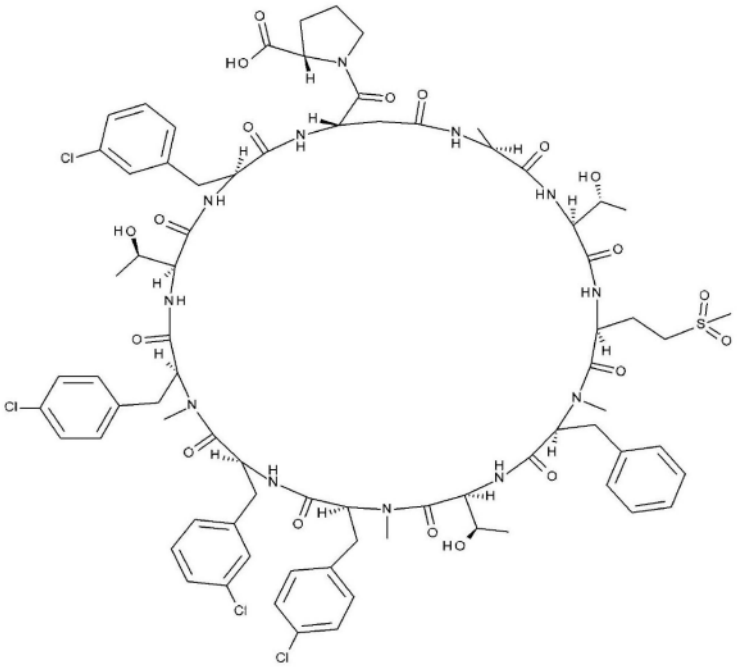
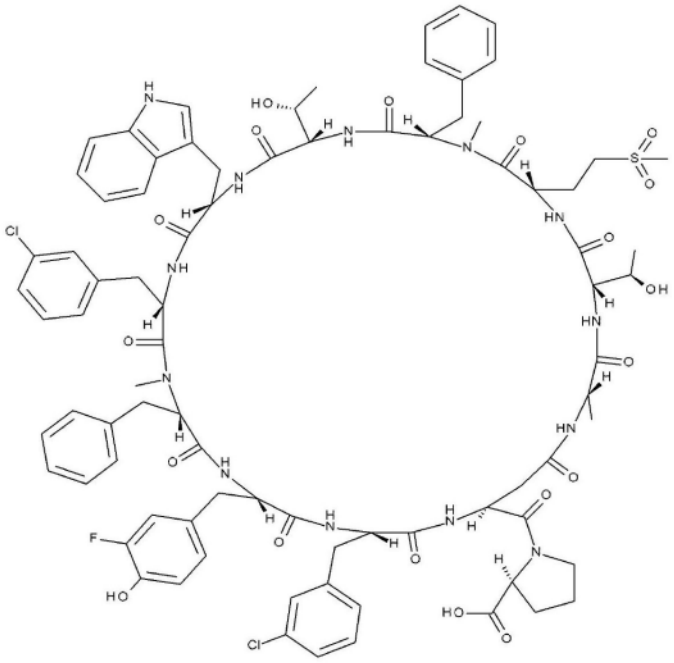
[0892]

PS-5	
PS-6	

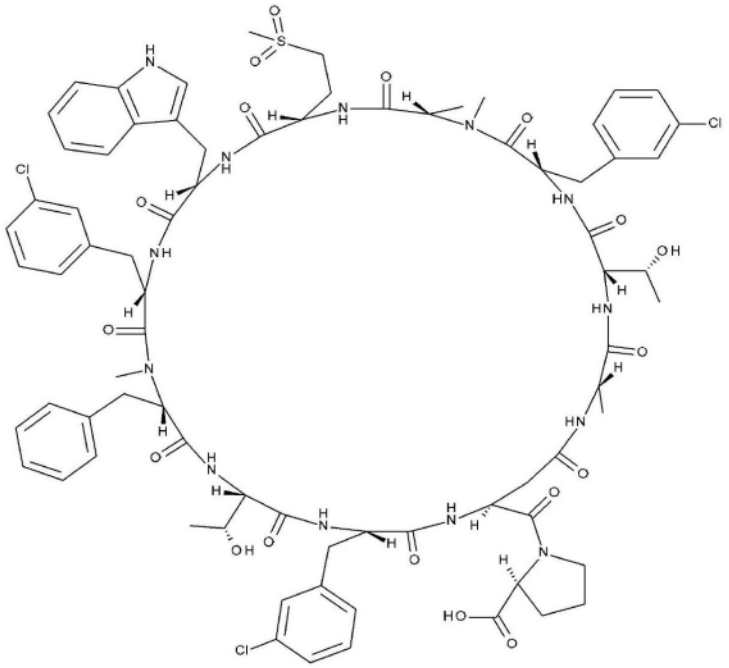
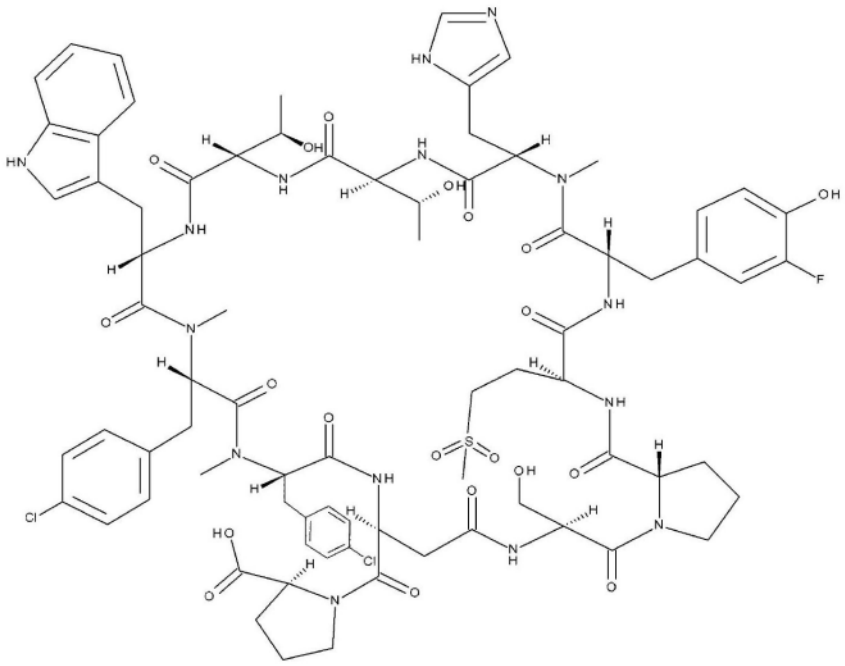
[0893]

PS-7	
PS-8	

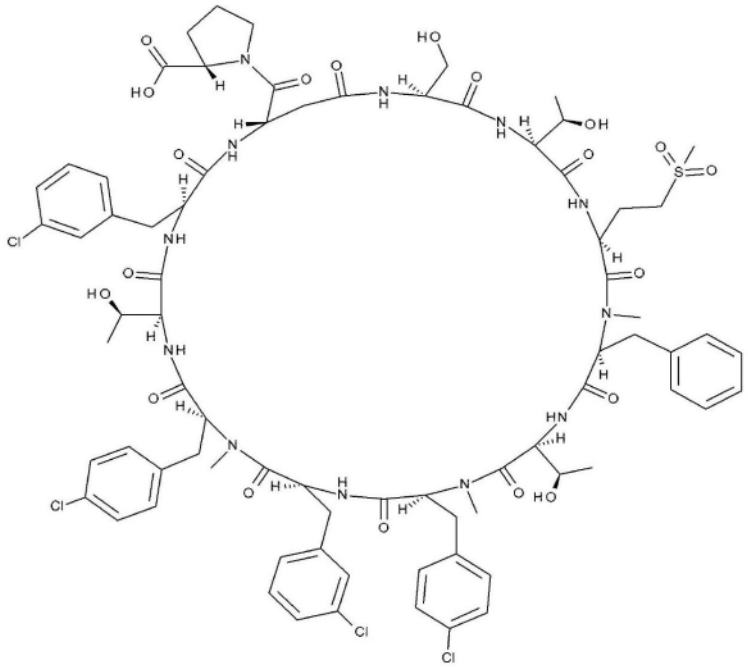
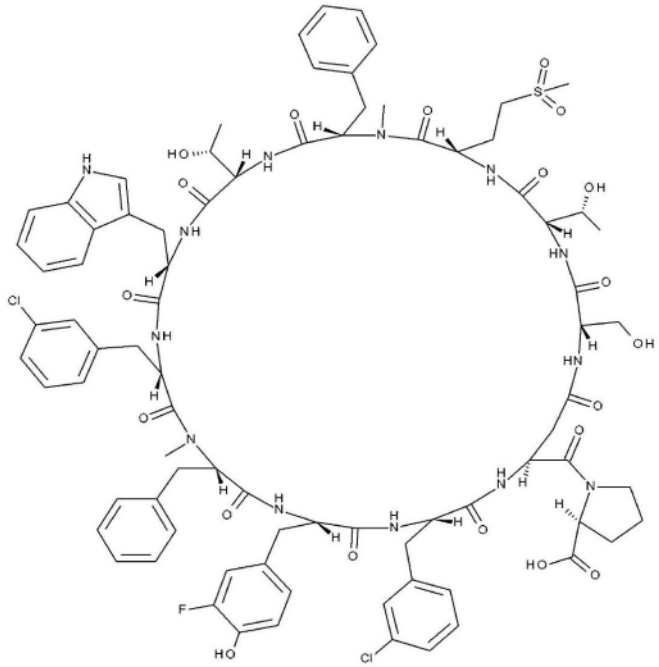
[0894]

PS-9	
PS-10	

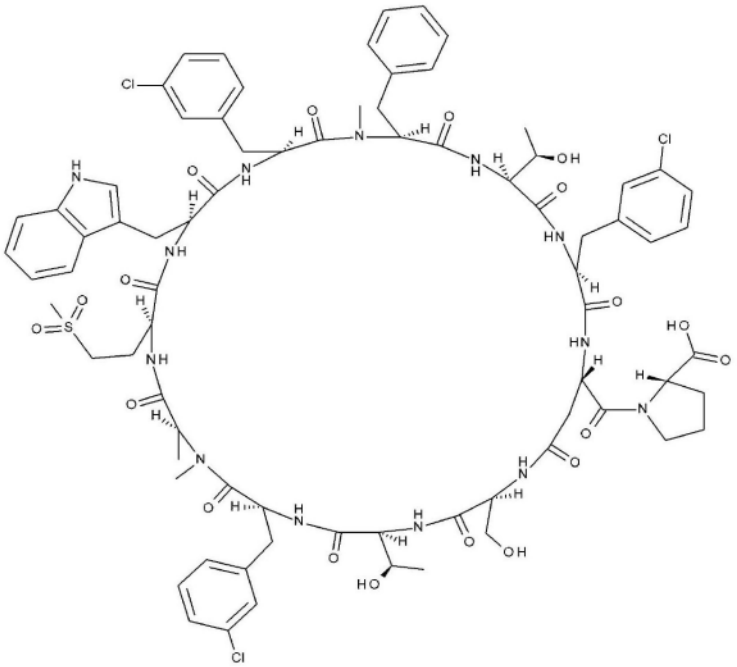
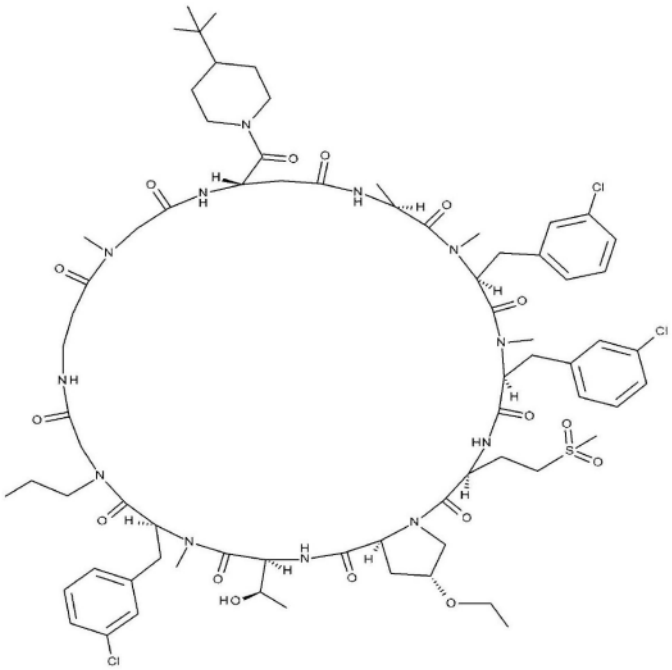
[0895]

PS-11	
PS-12	

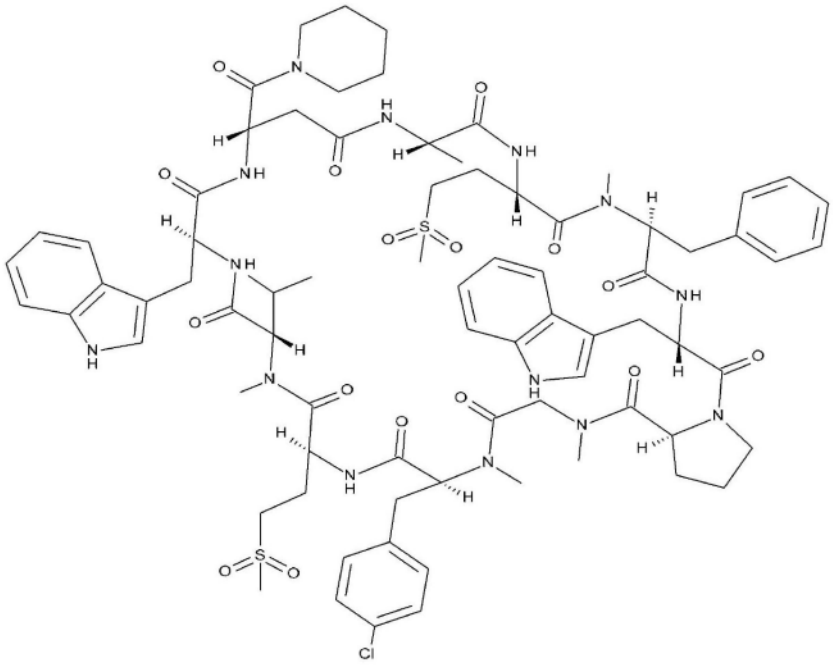
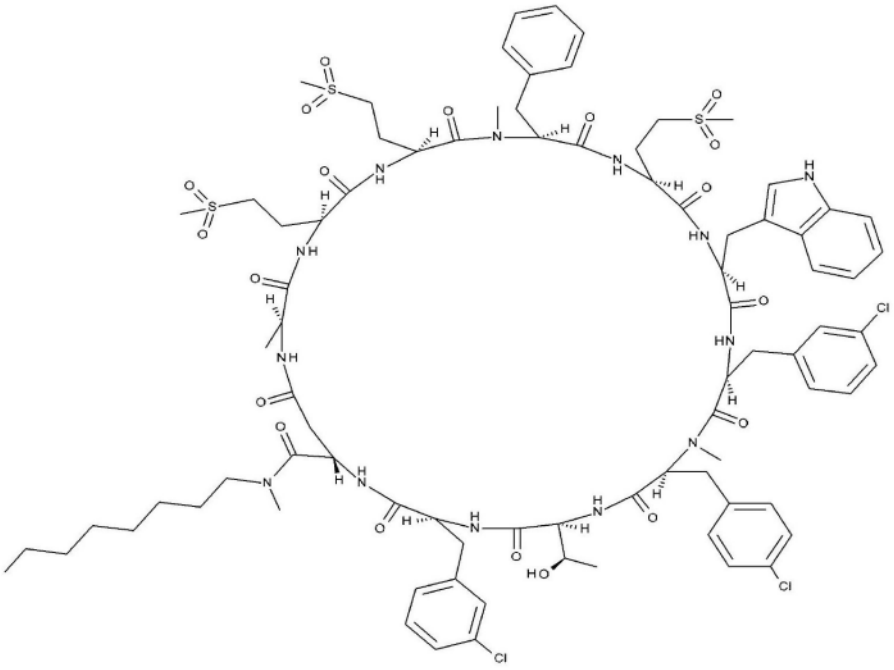
[0896]

PS-13	
PS-14	

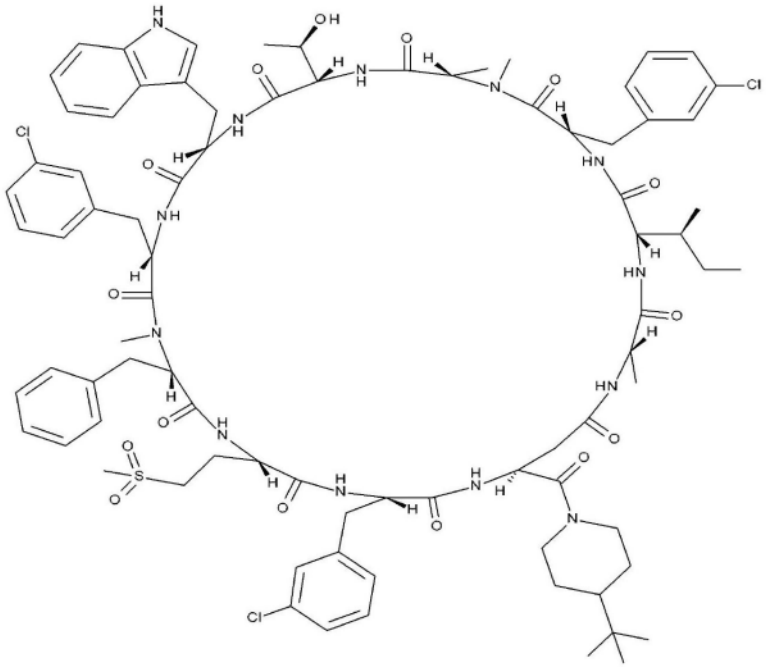
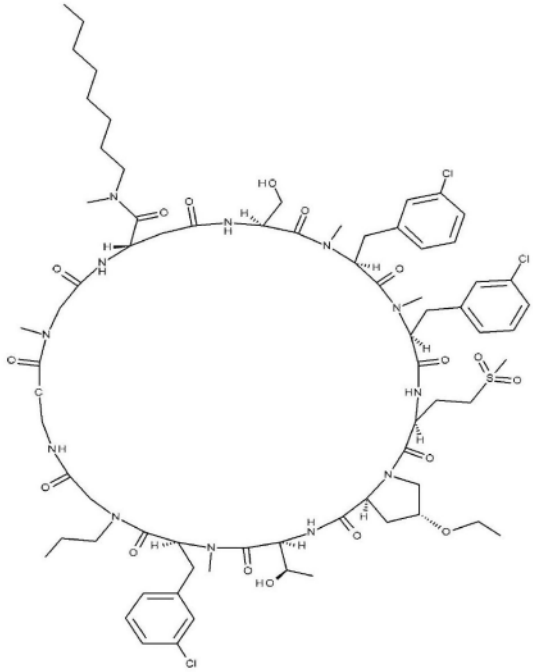
[0897]

PS-15	
PS-16	

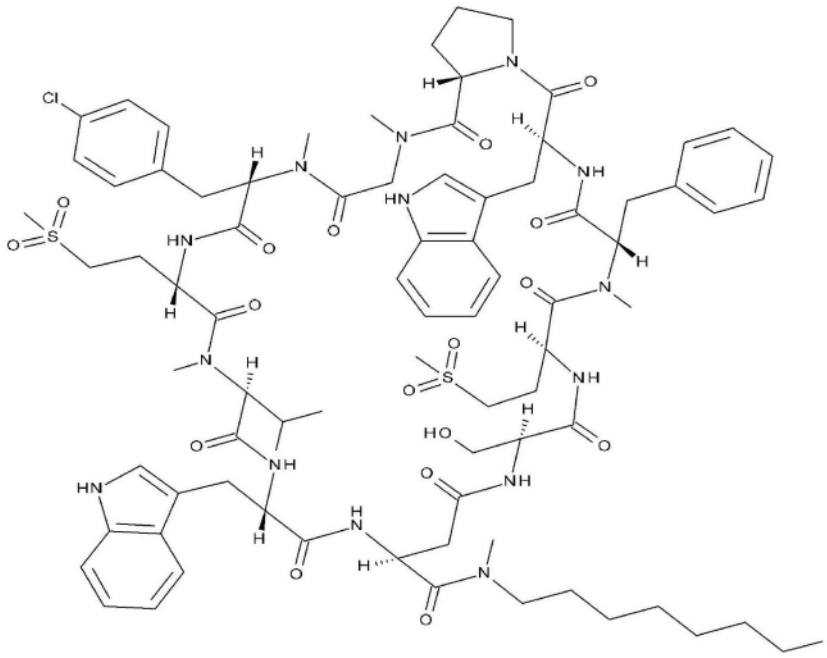
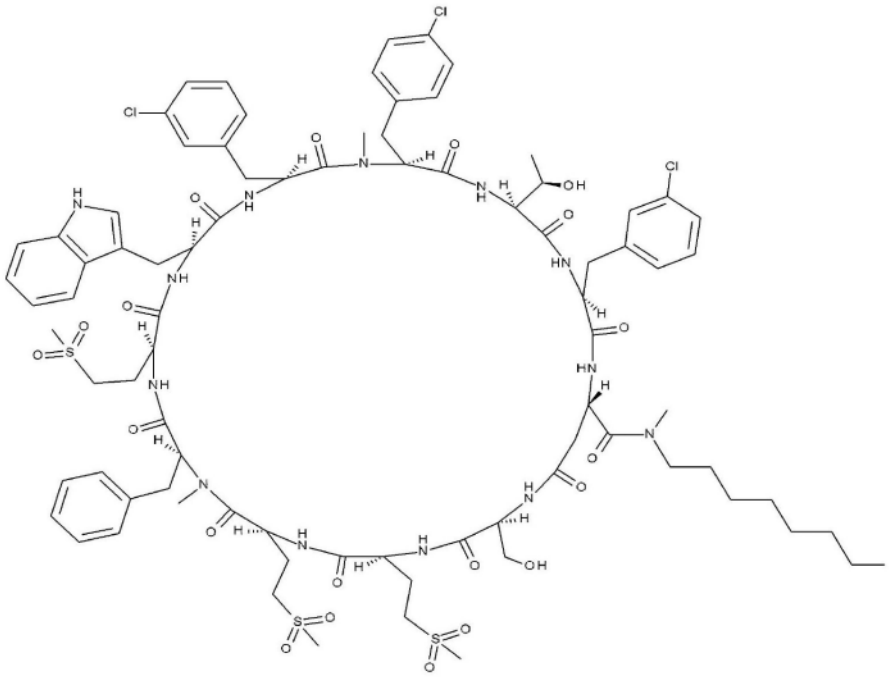
[0898]

PS-17	
PS-18	

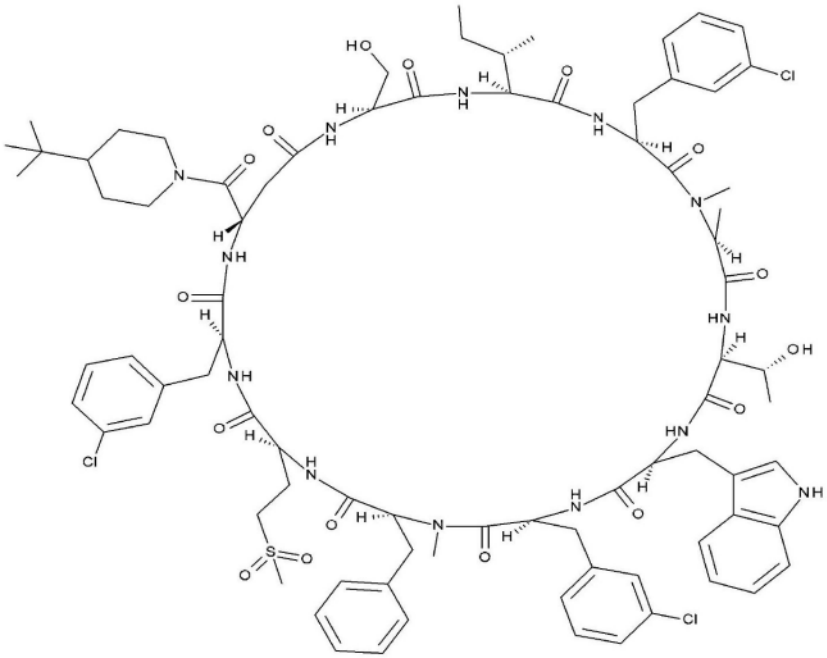
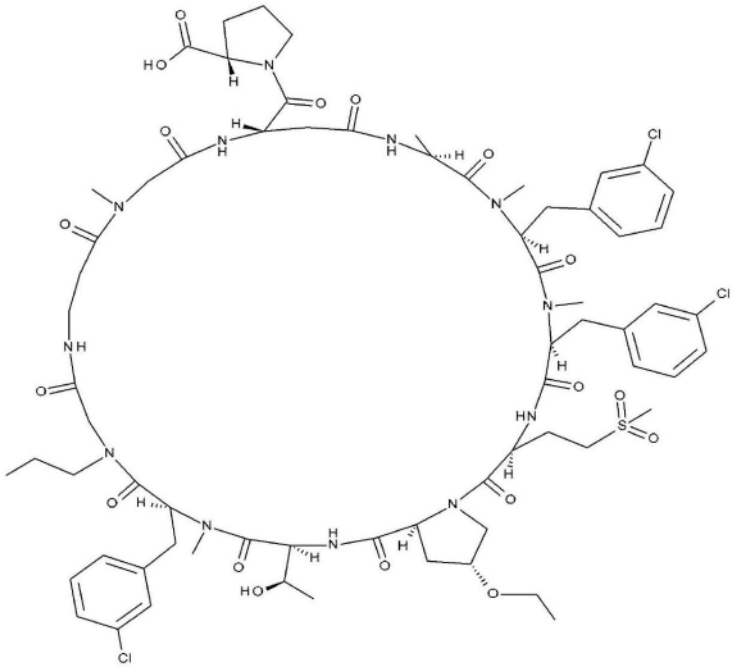
[0899]

PS-19	
PS-20	

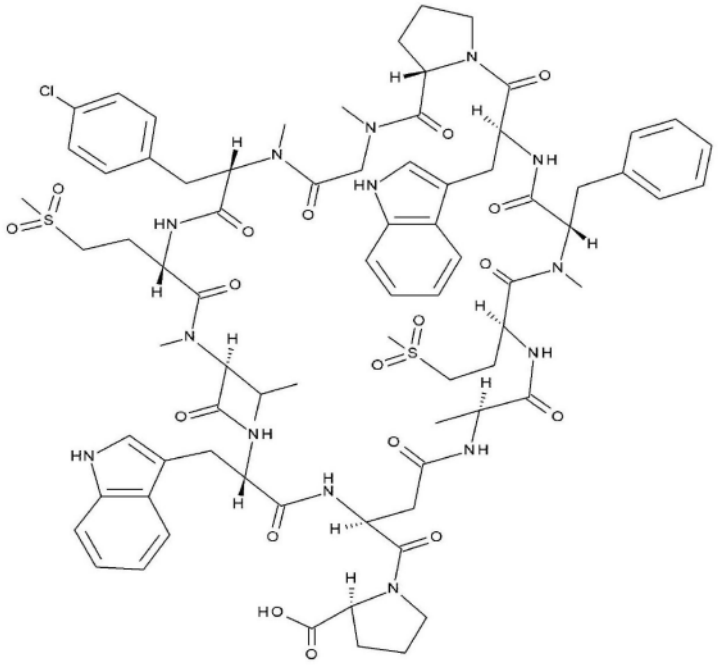
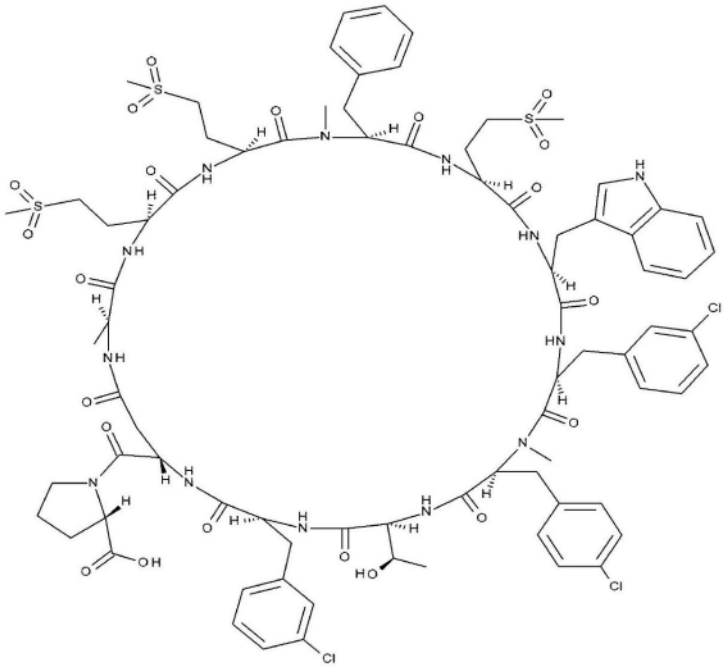
[0900]

PS-21	
PS-22	

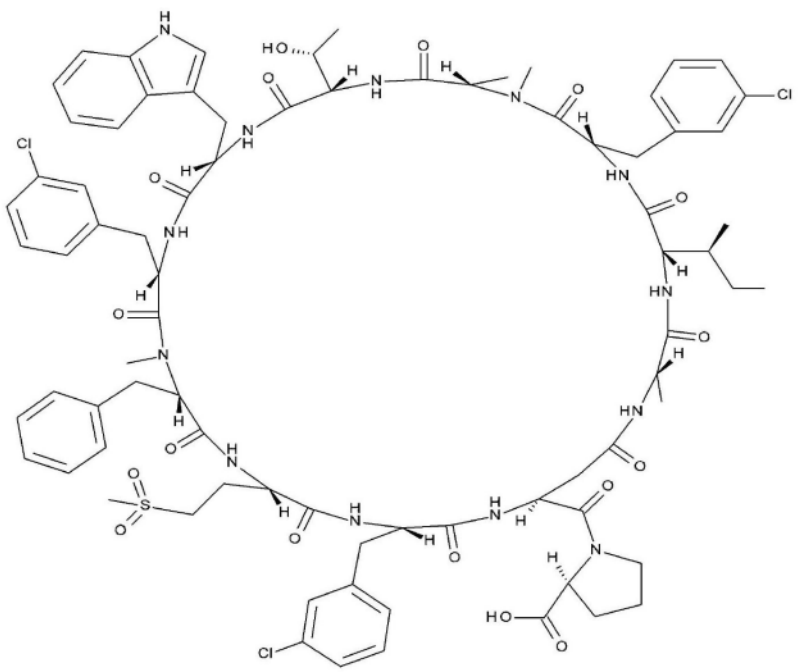
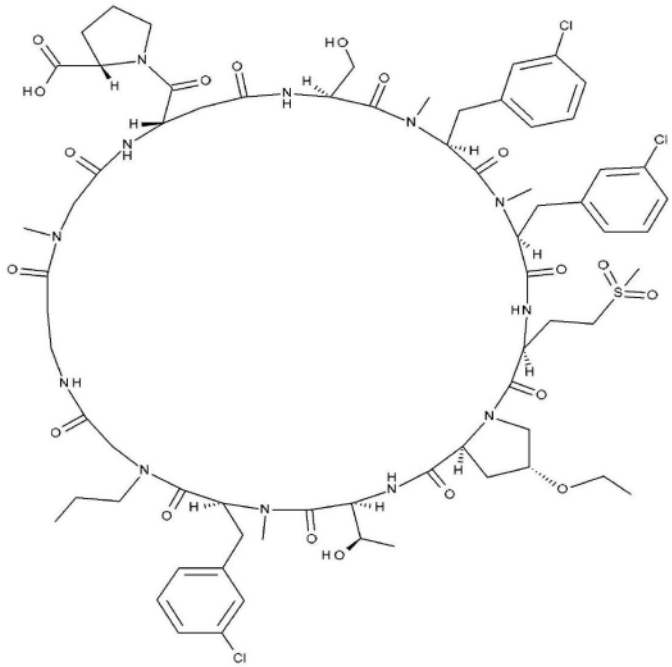
[0901]

PS-23	
PS-24	

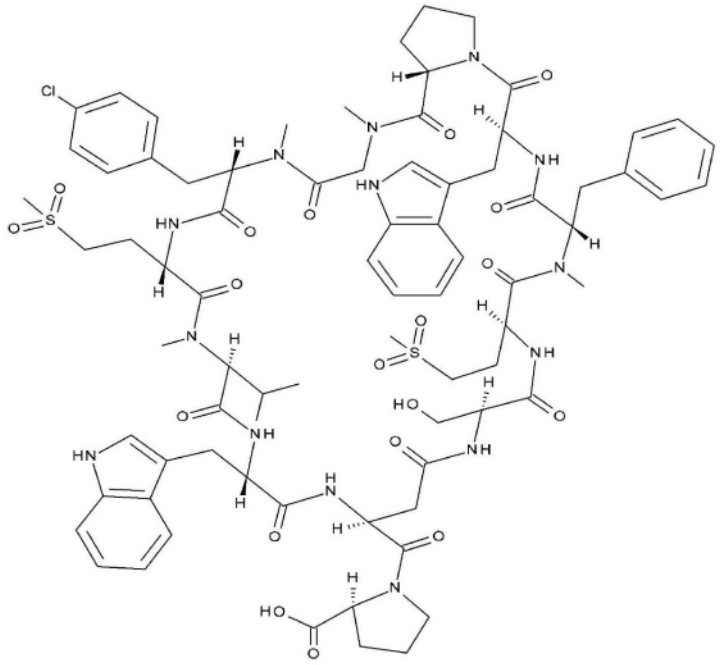
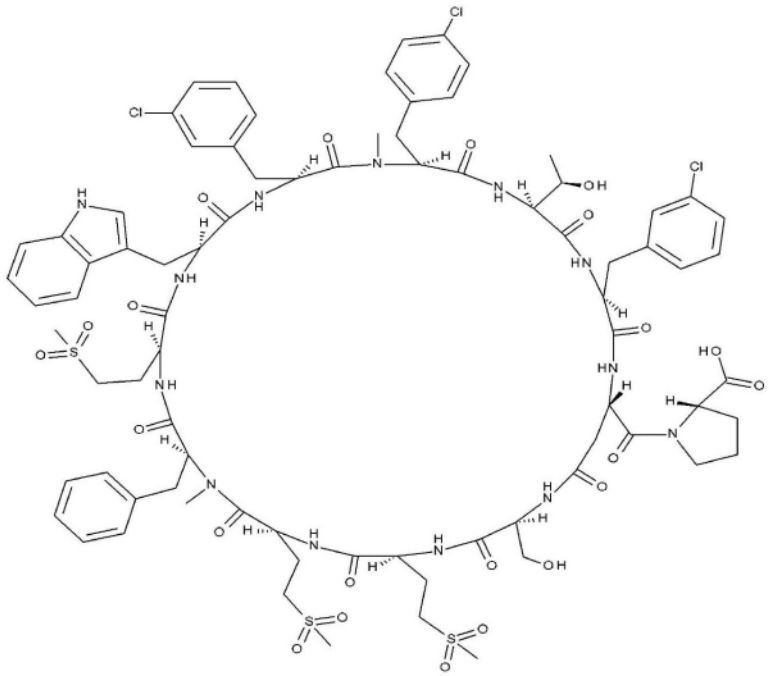
[0902]

PS-25	
PS-26	

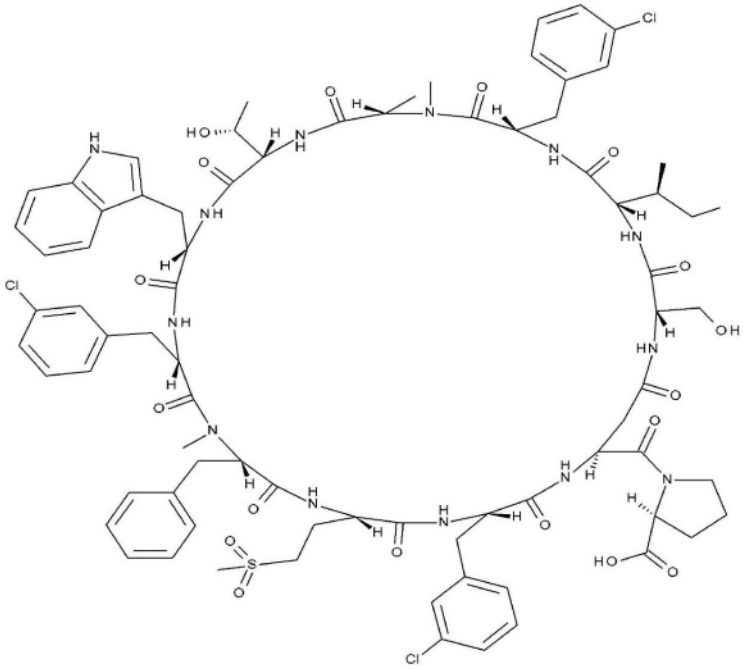
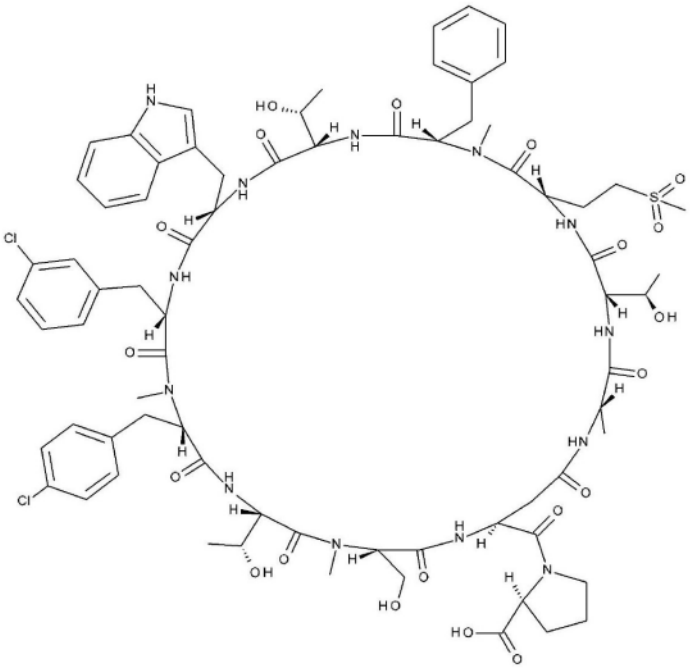
[0903]

PS-27	
PS-28	

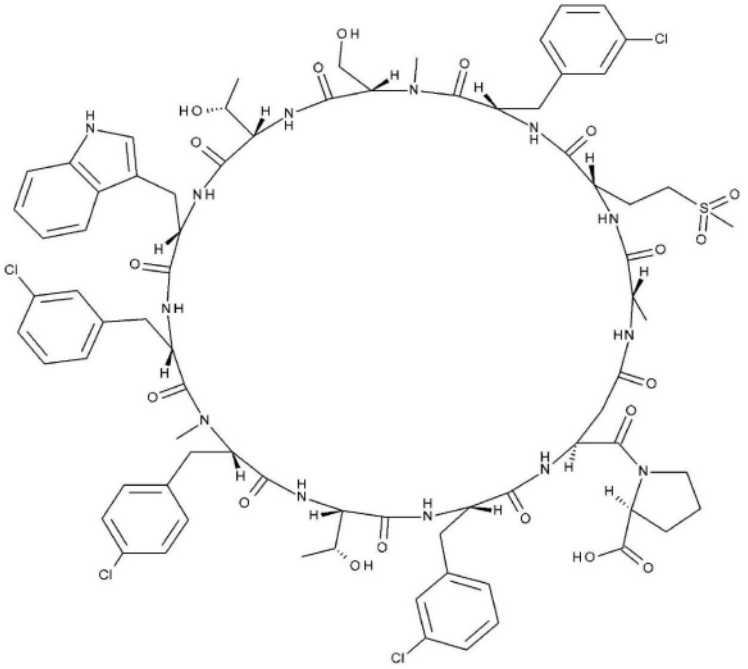
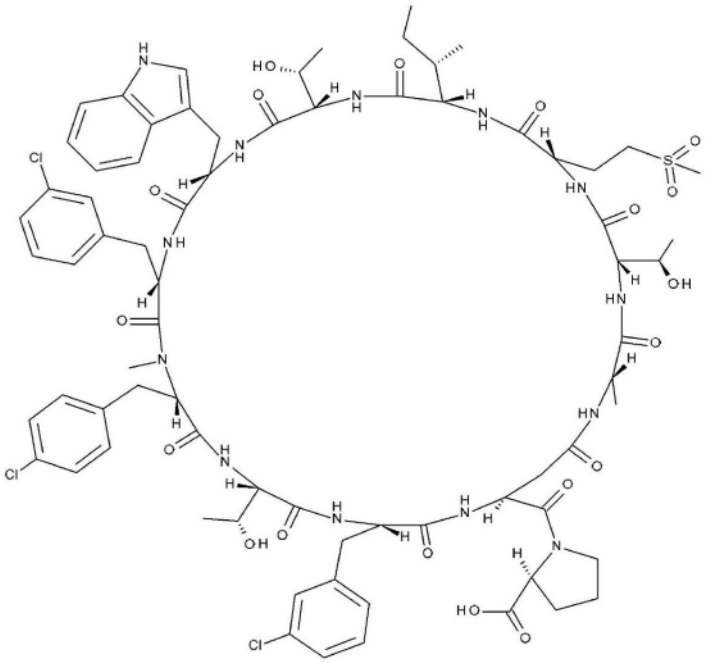
[0904]

PS-29	
PS-30	

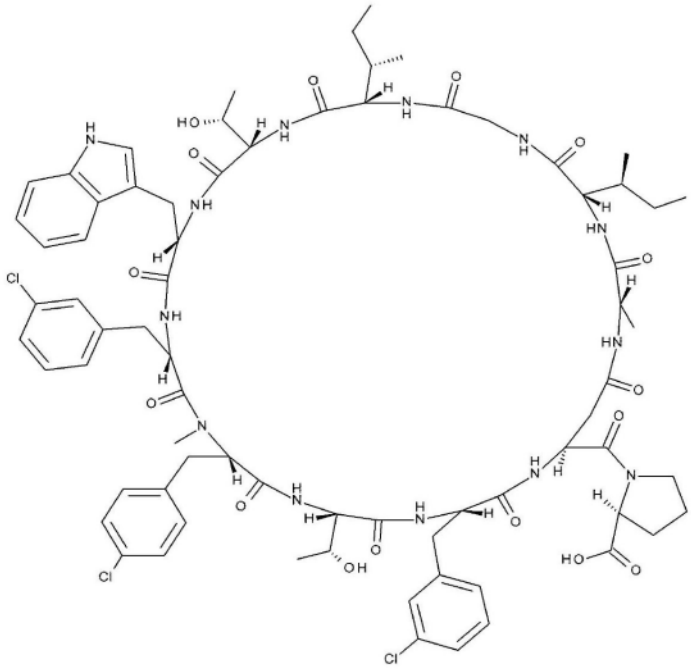
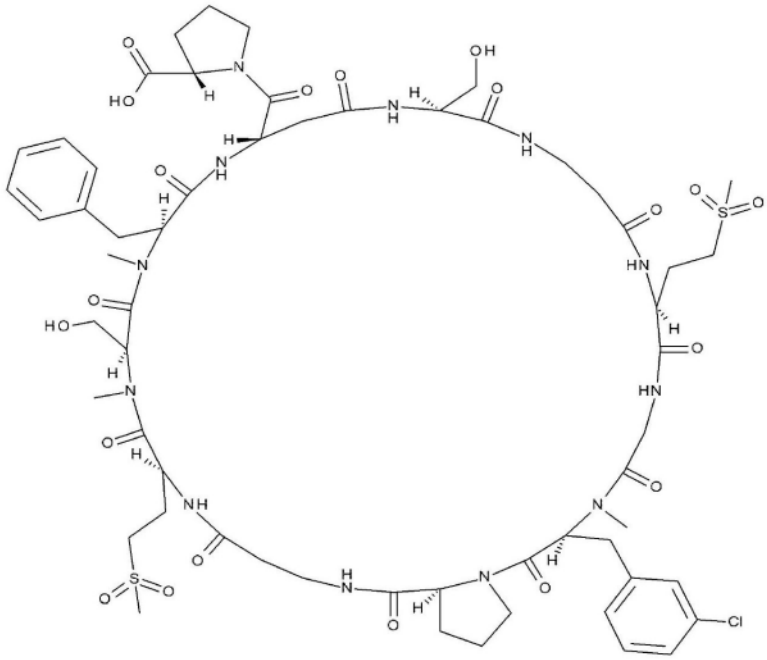
[0905]

PS-31	
PS-32	

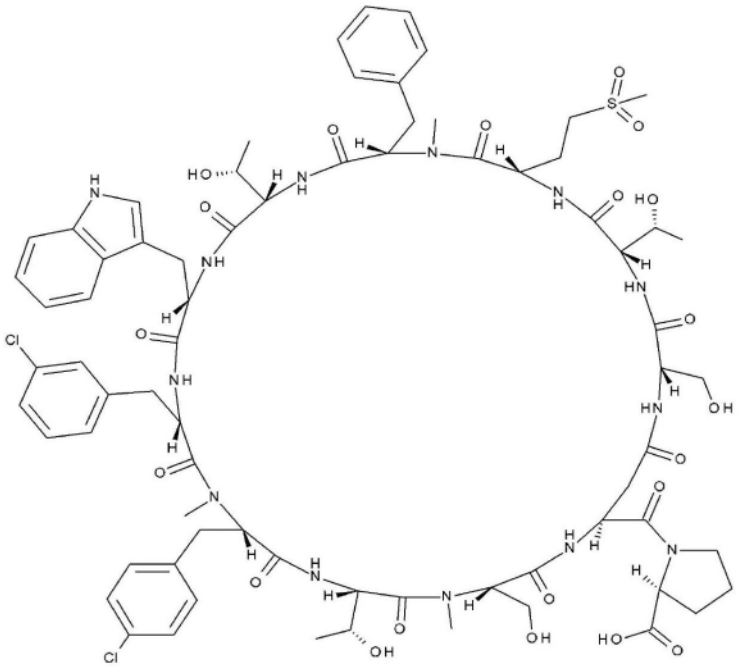
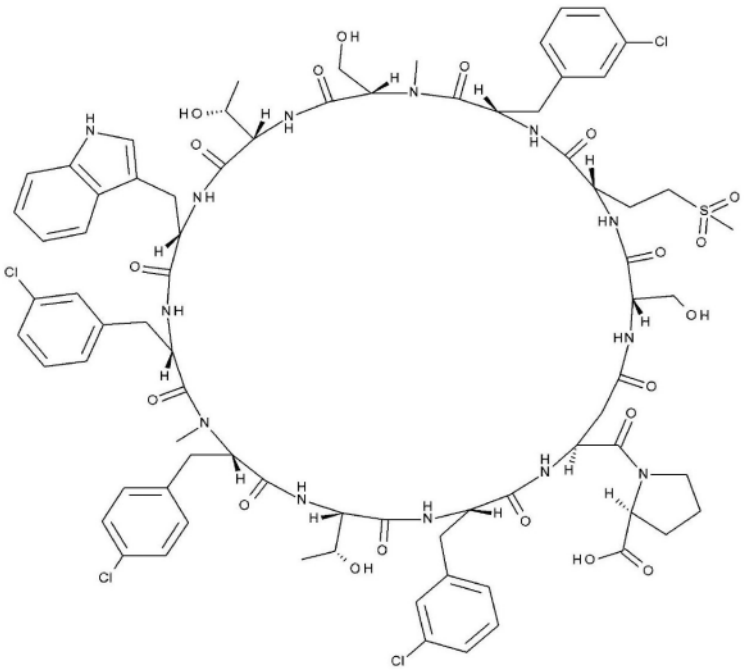
[0906]

PS-33	
PS-34	

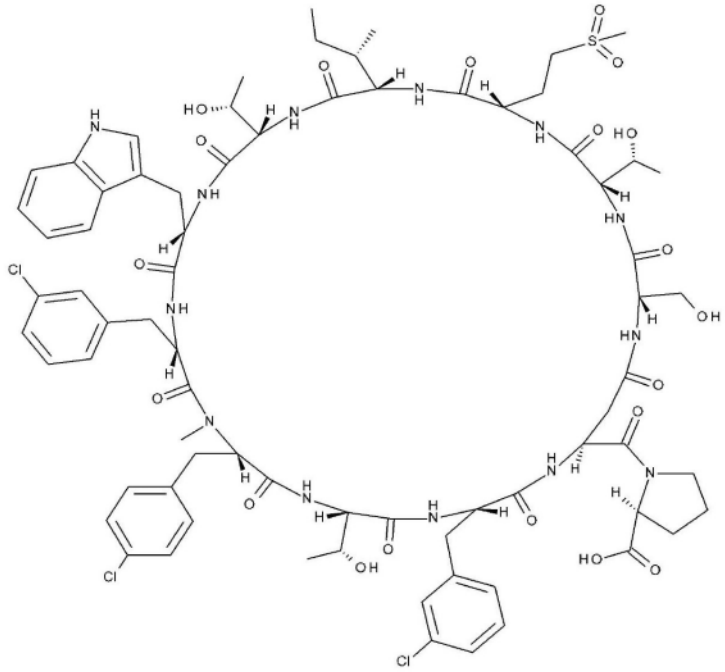
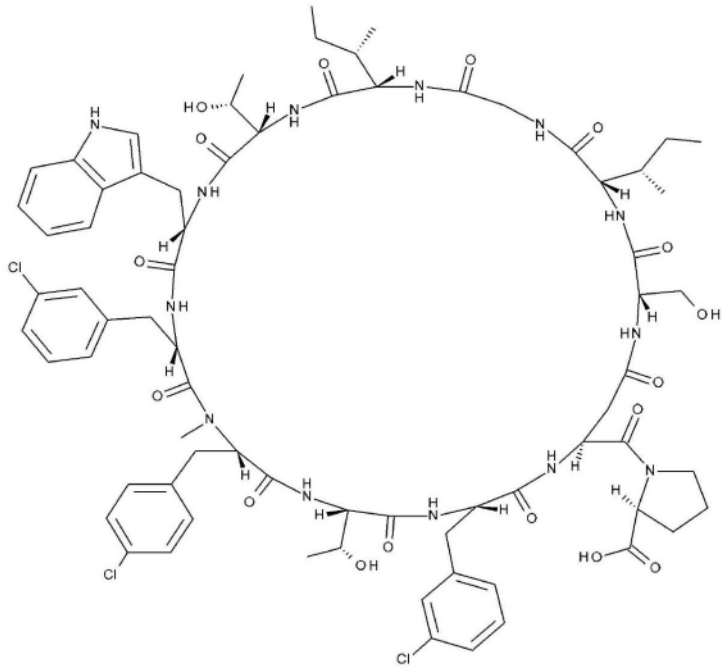
[0907]

PS-35	
PS-36	

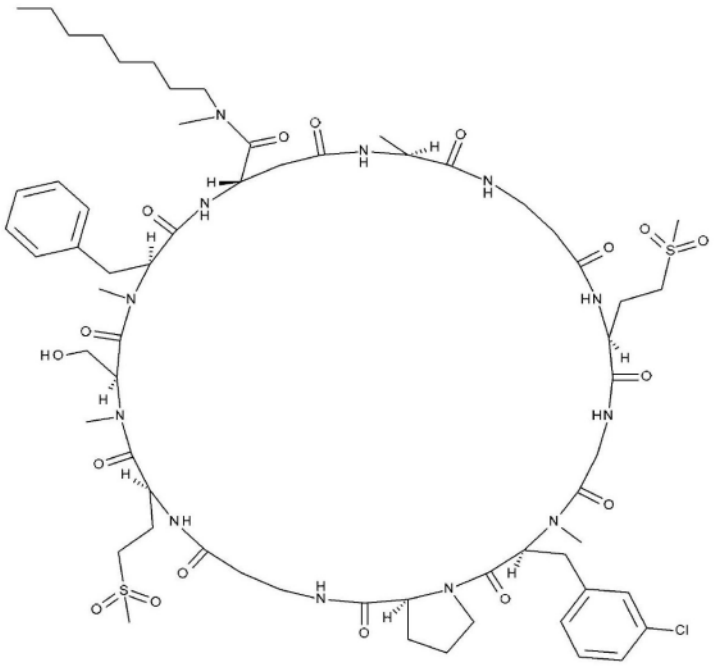
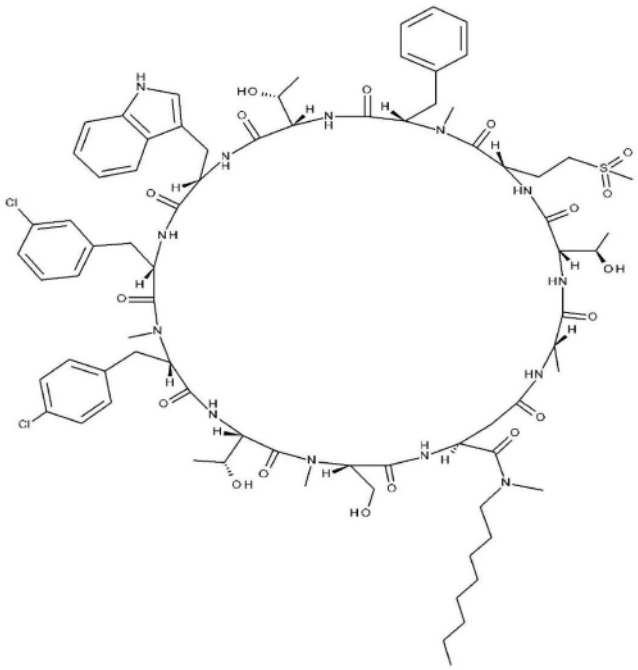
[0908]

PS-37	
PS-38	

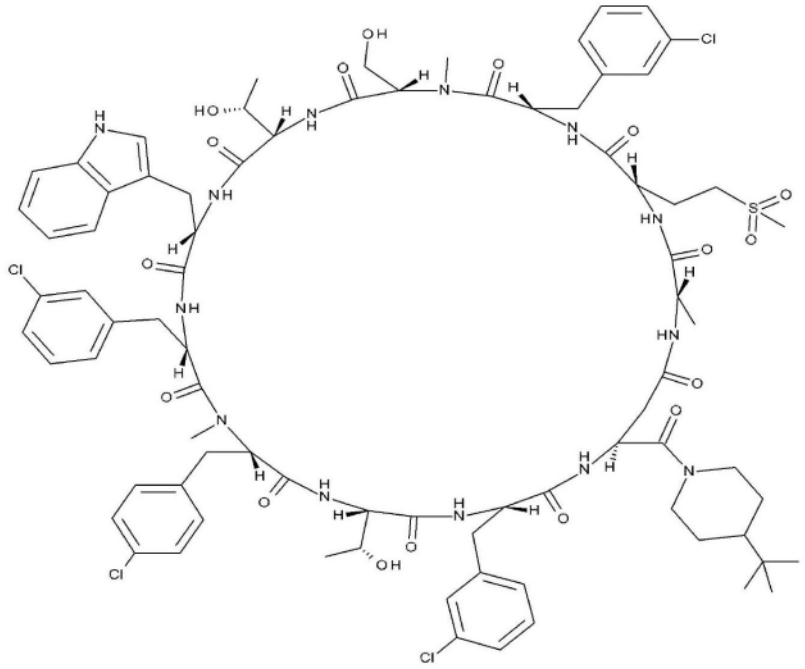
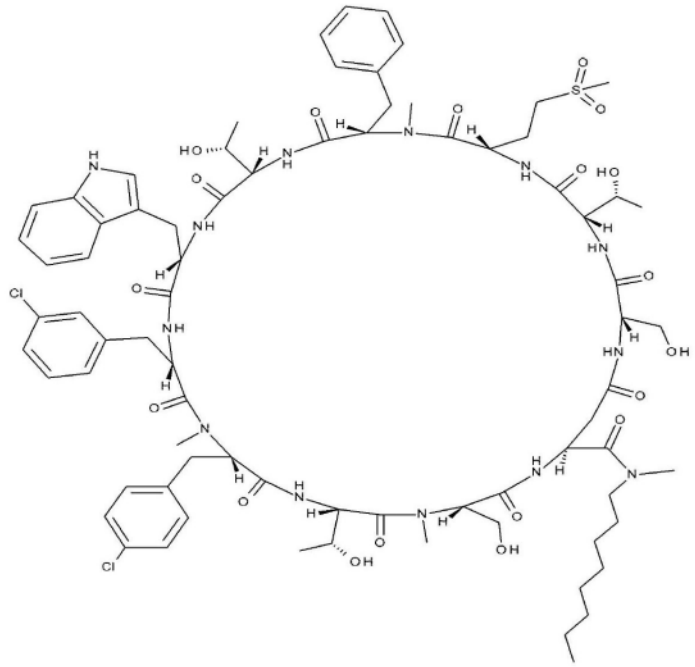
[0909]

PS-39	
PS-40	

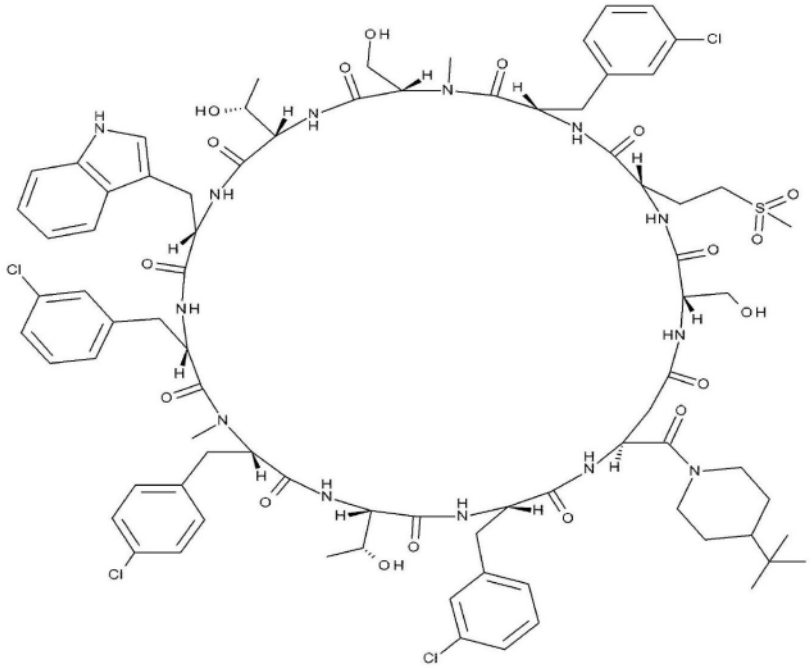
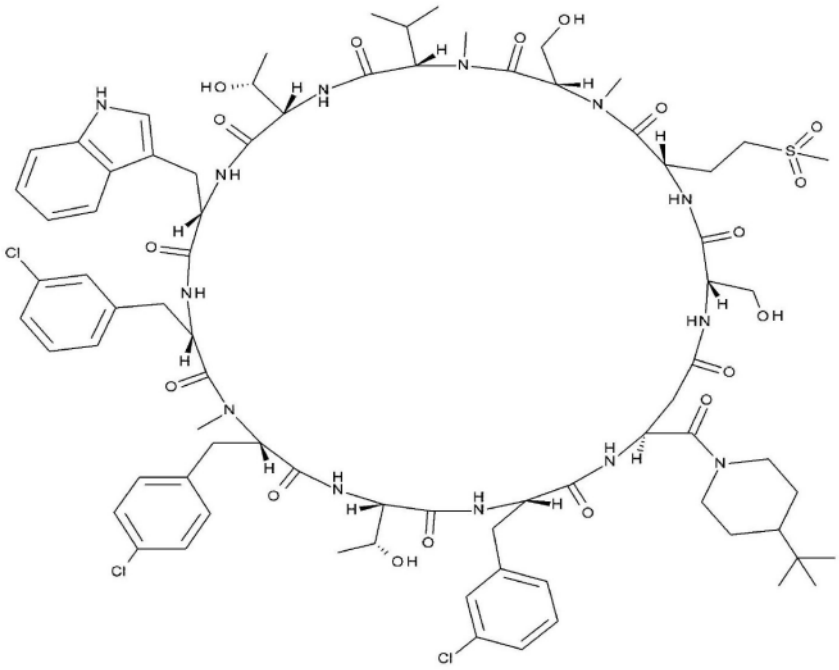
[0910]

PS-41	
PS-42	

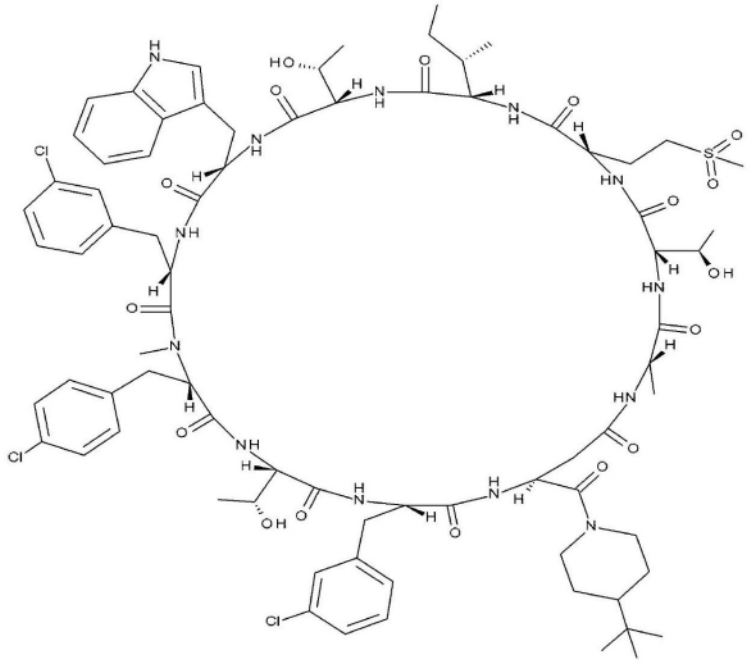
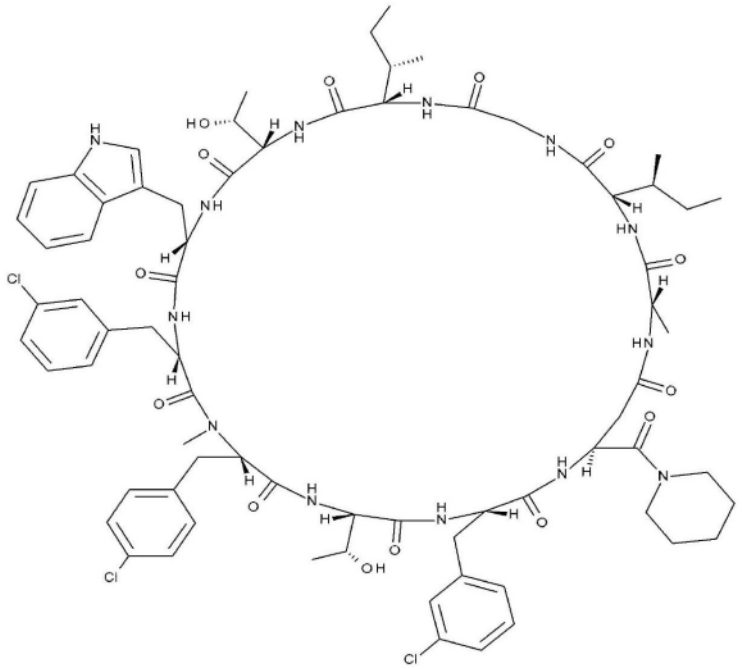
[0911]

PS-43	
PS-44	

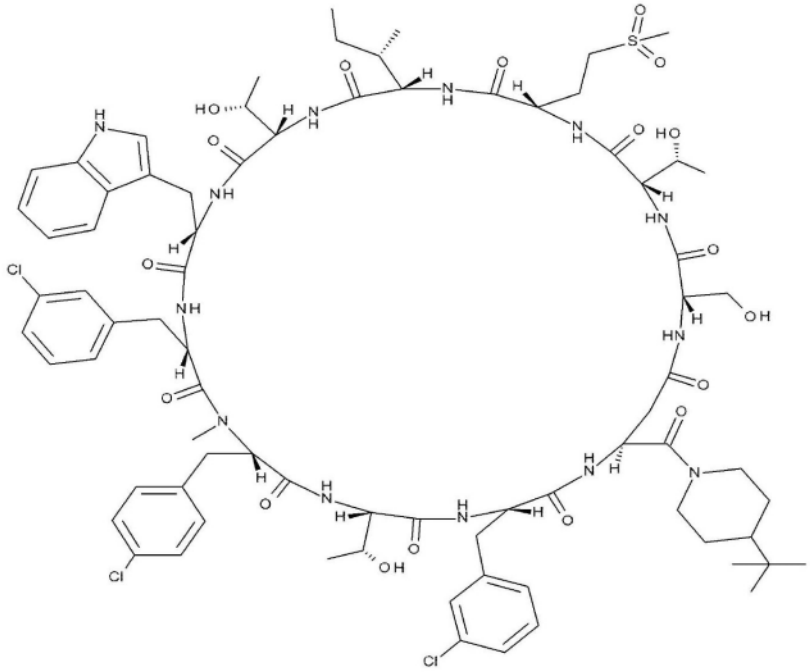
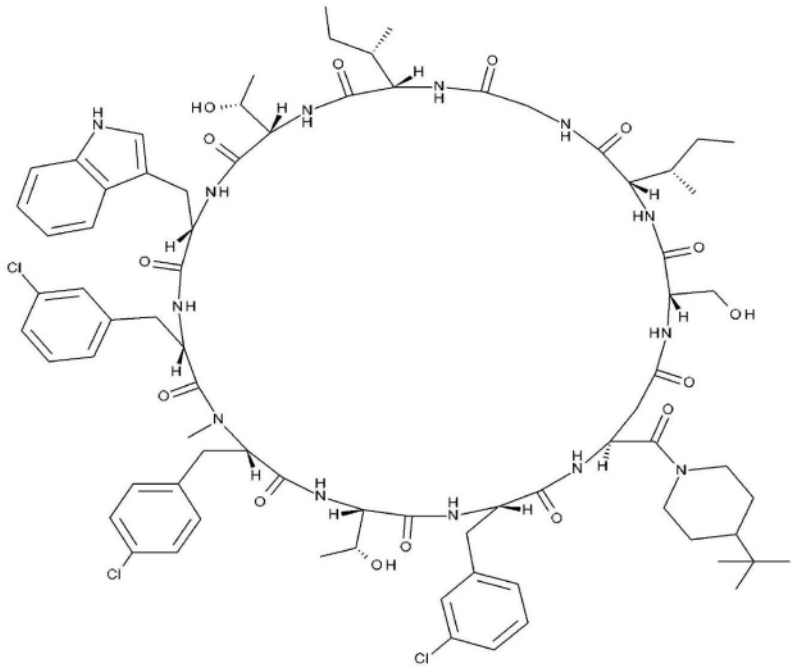
[0912]

PS-45	
PS-46	

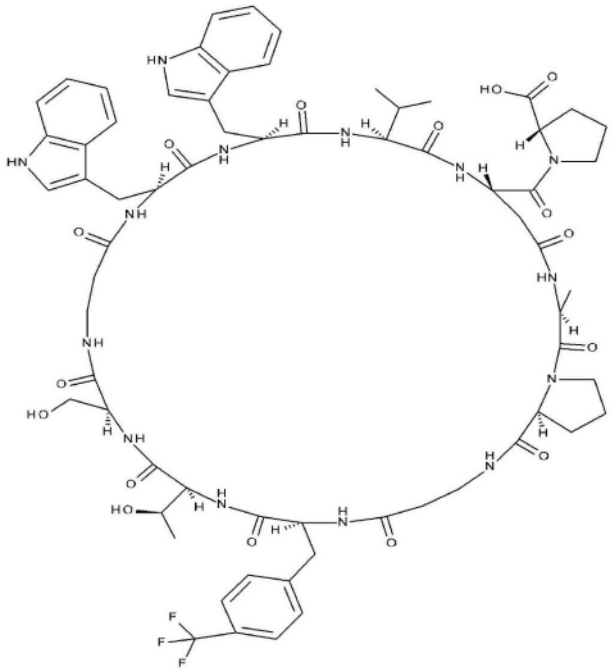
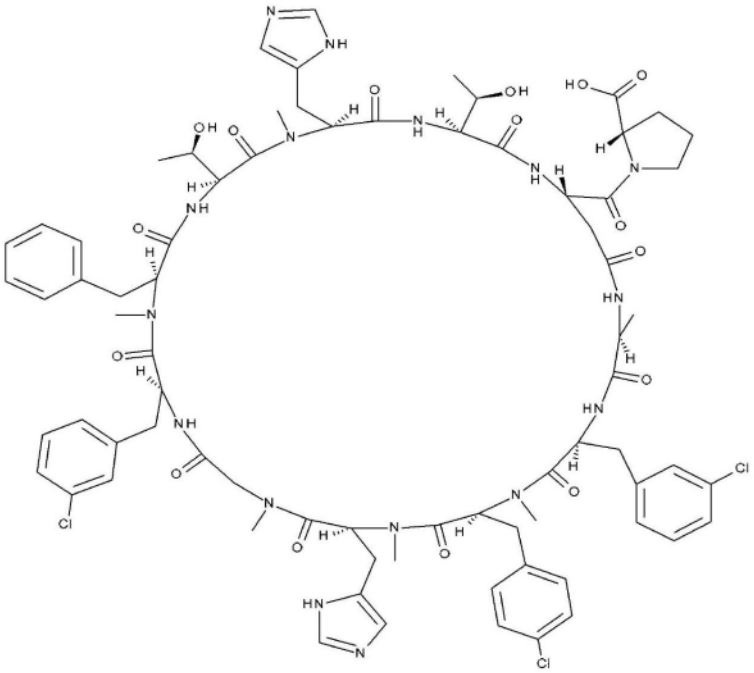
[0913]

PS-47	
PS-48	

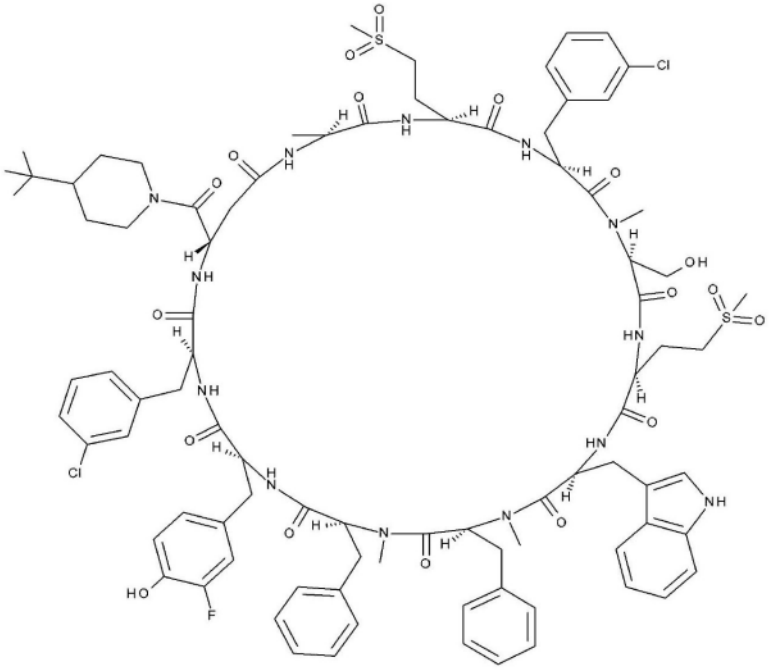
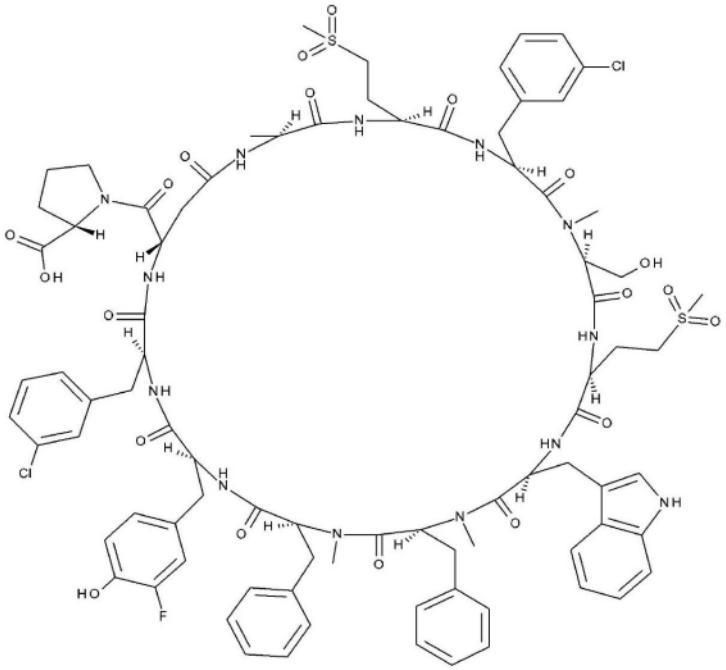
[0914]

PS-49	
PS-50	

[0915]

PS-51	
PS-52	

[0916]

PS-53	
PS-54	

[0917] [表5-3]

[0918]

	LCMS条件	保留时间(min)	LCMS(ESI) m/z		纯度(%)	产量(mg)
PS-1	SQDFA05	0.75	1682.8	(M+H)+	85	4.81
PS-2	SQDFA05	1.09	1689.7	(M+H)+	95	5.15
PS-3	SQDFA05	0.98	1726.7	(M+H)+	90	8.08
PS-4	SQDFA05	1.04	1650.8	(M+H)+	95	13.82
PS-5	SQDFA05	0.74	1698.8	(M+H)+	95	4.9
PS-6	SQDFA05	1.08	1705.9	(M+H)+	95	10.61
PS-7	SQDFA05	1.02	1744.7	(M+H)+	95	6.53
PS-8	SQDFA05	0.57	1654.7	(M+H)+	95	8.86
PS-9	SQDFA05	0.93	1663.5	(M+H)+	95	9.09
PS-10	SQDFA05	0.84	1700.7	(M+H)+	90	10.5
PS-11	SQDFA05	0.89	1624.7	(M+H)+	95	11.32
PS-12	SQDFA05	0.58	1670.7	(M+H)+	95	3.32
PS-13	SQDFA05	0.92	1679.6	(M+H)+	95	8.71
PS-14	SQDFA05	0.83	1716.7	(M+H)+	95	7.4
PS-15	SQDFA05	0.88	1640.7	(M+H)+	95	7.9
PS-16	SQDFA05	0.99	1541.9	(M+H)+	70	4.94
PS-17	SQDFA05	0.81	1589.9	(M+H)+	85	11.3
PS-18	SQDFA05	1.06	1806.8	(M+H)+	90	11.94
PS-19	SQDFA05	1.08	1662.8	(M+H)+	90	13.25
PS-20	SQDFA05	1.02	1559.7	(M+H)+	60	1.77
PS-21	SQDFA05	0.93	1663.9	(M+H)+	90	4.33
PS-22	SQDFA05	1.05	1822.8	(M+H)+	90	11.56
PS-23	SQDFA05	1.07	1678.8	(M+H)+	95	6.02
PS-24	SQDFA05	0.79	1515.7	(M+H)+	75	3.52
PS-25	SQDFA05	0.76	1619.9	(M+H)+	70	8.35
PS-26	SQDFA05	0.88	1778.5	(M+H)+	80	11.88
PS-27	SQDFA05	0.91	1636.8	(M+H)+	80	13.93
PS-28	SQDFA05	0.77	1531.7	(M+H)+	70	6.43
PS-29	SQDFA05	0.73	1635.7	(M+H)+	91	3.78
PS-30	SQDFA05	0.87	1794.7	(M+H)+	95	11.86
PS-31	SQDFA05	0.91	1652.7	(M+H)+	83	10.83
PS-32	SQDFA05	0.74	1574.7	(M+H)+	95	13.75
PS-33	SQDFA05	0.86	1674.6	(M+H)+	94	15.42
PS-34	SQDFA05	0.84	1606.6	(M+H)+	95	12.53
PS-35	SQDFA05	0.89	1512.7	(M+H)+	95	16.18
PS-36	SQDFA05	0.53	1379.7	(M+H)+	80	2.12
PS-37	SQDFA05	0.73	1590.7	(M+H)+	95	15.65
PS-38	SQDFA05	0.85	1690.4	(M+H)+	95	11.25
PS-39	SQDFA05	0.82	1622.6	(M+H)+	95	11.33
PS-40	SQDFA05	0.87	1528.7	(M+H)+	94	11.61
PS-41	SQDFA05	0.73	1391.7	(M+H)+	90	2.32
PS-42	SQDFA05	0.92	1602.7	(M+H)+	90	6.54
PS-43	SQDFA05	1.02	1700.6	(M+H)+	90	5.83
PS-44	SQDFA05	0.91	1618.9	(M+H)+	90	4.85
PS-45	SQDFA05	1.00	1716.7	(M+H)+	90	3.93
PS-46	SQDFA05	0.98	1648.7	(M+H)+	90	4.77
PS-47	SQDFA05	0.99	1632.7	(M+H)+	90	3.64
PS-48	SQDFA05	0.96	1482.7	(M+H)+	90	4.81
PS-49	SQDFA05	0.97	1648.7	(M+H)+	90	3.15
PS-50	SQDFA05	1.05	1554.8	(M+H)+	90	6.01
PS-51	SQDFA05	0.62	1396.7	(M+H)+	71	2.98
PS-52	SQDFA05	0.56	1577.6	(M+H)+	95	6.4
PS-53	SQDFA05	0.93	1788.7	(M+H)+	89	7.4
PS-54	SQDFA05	0.78	1762.7	(M+H)+	85	2.8

[0919] [实施例7]本发明在液相法中的应用包括通过液相法的延伸反应的合成如下所示。

[0920] 部分应用于液相法

[0921] 环肽(化合物154,其中在H-Ala-Trp-Nle-Trp-Ser-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis-

MeGly-Pro-Asp-Pro-OH的主链N-末端氨基和Asp的侧链羧酸基团之间形成酰胺键的环肽)的合成,其包括在液相中将Fmoc-Ala-OSu(化合物152)与H-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis(化合物151)偶联

[0922] 通过图21中描述的合成路线合成了肽,该合成路线包括通过液相法的延伸反应。

[0923] 实施例7-1:

[0924] H-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis(化合物151)的合成

[0925] 

化合物 151

[0926] 使用通过已记载的方法合成的Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-Pro-OPis(化合物58,加载率:0.3736mmol/g,200mg),通过实施例中已经记载的Fmoc法,根据肽合成法进行肽延伸。在肽延伸后,在肽合成仪上进行N末端Fmoc基团的除去,并用DMF洗涤树脂。

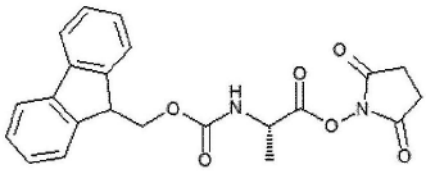
[0927] 然后,再次用DCM溶胀树脂之后,将TFE/DCM(1/1,v/v,4mL)和二异丙基乙胺(24μL)加入到树脂中,将其在室温下振荡两小时,并将肽从树脂上切下。然后,通过将管内的溶液通过用于合成的柱过滤而除去树脂,并将剩余的树脂进一步用TFE/DCM(1/1,v/v,2mL)洗涤两次。将所有得到的切割溶液混合,在减压下浓缩,并得到标题化合物(化合物151,H-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis;113.8mg)。其无需纯化即可用于下一步骤。

[0928] LCMS(ESI)m/z=1860.9$(M+H)^+$

[0929] 保留时间:0.72分钟(分析条件SQDFA05)

[0930] 实施例7-2:

[0931] (S)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)丙酸酯(化合物152,Fmoc-Ala-OSu)的合成

[0932] 

化合物 152

[0933] 将(S)-2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)丙酸(Fmoc-Ala-OH;1.00g,3.21mmol)、1-羟基吡咯烷-2,5-二酮(HOSu;0.554g,4.82mmol)和二氯甲烷(6.4mL)在氮气氛下混合。将该混合物在冰上冷却至0℃,加入1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(WSCI盐酸,0.924g,4.82mmol),并将得到的反应溶液在0℃搅拌一小时,在室温搅拌15小时。接着,在减压下蒸馏除去溶剂,并将得到的残渣通过反相硅胶色谱法(0.1%甲酸水溶

液/0.1％甲酸乙腈溶液)纯化,以得到(S)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)丙酸酯(化合物152,Fmoc-Ala-OSu,1.05g)

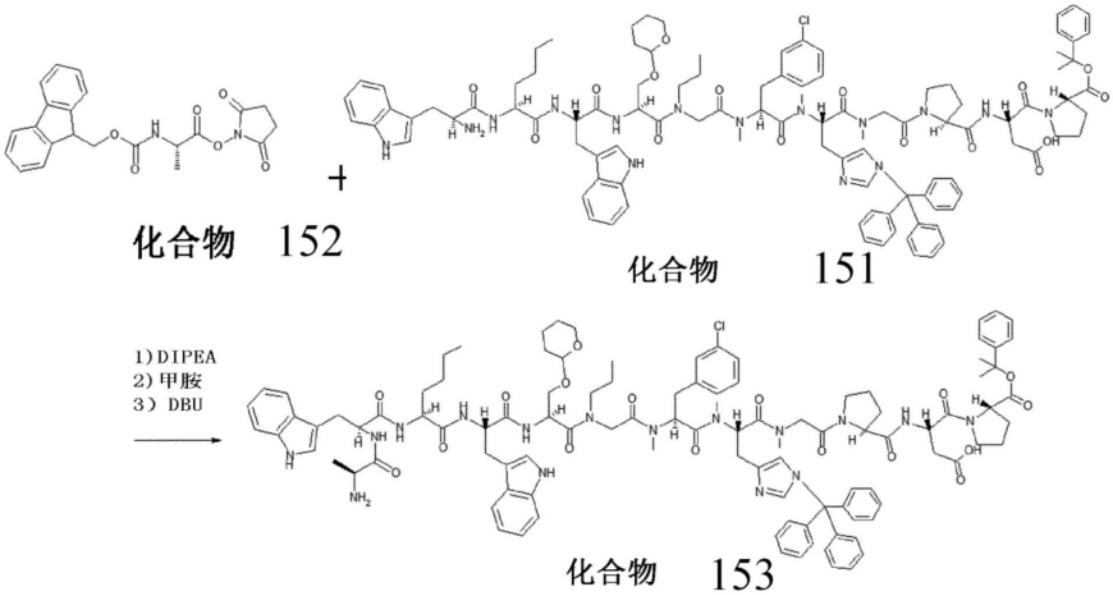
[0934] LCMS(ESI)m/z＝409.3(M+H)$^+$

[0935] 保留时间:0.80分钟(分析条件SQDFA05)

[0936] 实施例7-3:

[0937] (S)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基2-(((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)丙酸酯(化合物152,Fmoc-Ala-OSu)和H-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis(化合物151)之间的偶联,以及随后的Fmoc去除反应

[0938]



[0939] 将(S)-2,5-二氧代吡咯烷-1-基2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)丙酸酯(化合物152,Fmoc-Ala-OSu,26.2mg)和二异丙基乙胺(DIPEA,12.8μL)加入到所得的H-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis(化合物151,113.8mg)的二氯甲烷(245μL)溶液中,并将其在25℃搅拌一小时。然后,将甲胺(40％甲醇溶液,11.9μL)加入反应溶液中,将其搅拌30分钟。然后,加入DBU(11.1μL),并将其再搅拌30分钟。将得到的反应溶液通过反相硅胶柱色谱法(0.1％甲酸水溶液/0.1％甲酸的乙腈溶液)纯化,并将得到的级分冷冻干燥。将得到的残渣溶解于二氯甲烷中,并将其用饱和碳酸氢钠水溶液和饱和氯化钠水溶液洗涤,以得到H-Ala-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis(化合物153;79.3mg,0.041mmol)。

[0940] LCMS(ESI)m/z＝1931.8(M+H)$^+$

[0941] 保留时间:0.73分钟(分析条件SQDFA05)

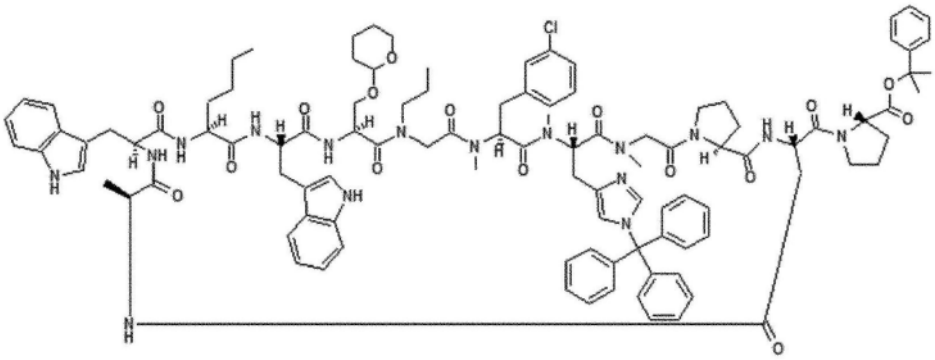
[0942] 实施例7-4:

[0943] 其中在H-Ala-Trp-Nle-Trp-Ser-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis-MeGly-Pro-Asp-Pro-OH的N末端氨基和Asp的侧链羧酸基之间完成酰胺环化的化合物(化合物154)的合成(化合物153的环化反应和随后的脱保护反应)

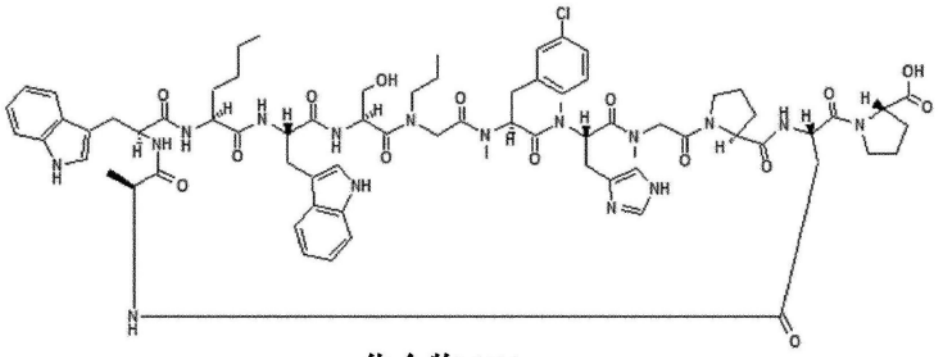


化合物 153

[0944] 环化



脱保护



化合物 154

[0945] 将所得到的H-Ala-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis(化合物153;79.3mg,0.041mmol)溶解于DMF(20mL)中,并加入二氯甲烷(20mL)、HATU(17.2mg,0.045mmol)和二异丙基乙胺(10.8μL,0.062mmol),并将其在25℃搅拌两小时。随后,在减压下蒸馏除去溶剂。然后,加入0.05M四甲基硫酸氢铵/HFIP(2%TIPS)溶液(通过实施例中已经描述的方法制备,8mL),并将其在25℃静置一小时。向所得反应溶液中加入二异丙基乙胺(140μL),并在减压下蒸馏除去溶剂。将得到的残渣通过反相硅胶柱色谱法(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸的乙腈溶液)纯化,并将得到的级分冷冻干燥,以得到其中在H-Ala-Trp-Nle-Trp-Ser-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis-MeGly-Pro-Asp-Pro-OH的N末端氨基和Asp的侧链羧酸基之间完成酰胺环化的化合物(化合物154;59mg,0.040mmol,98%)。

[0946] LCMS(ESI)m/z=1469.7$(M+H)^+$

[0947] 保留时间:0.61分钟(分析条件SQDFA05)

[0948] 如上述在液相中包括片段偶联的肽合成中,本发明的合成方法也可以应用于液相方法。

[0949] 工业适用性

[0950] 根据本发明,可以以高纯度和高合成效率合成预期被用作药物的含有N-取代氨基酸的肽。本发明可用于诸如工业生产包含N-取代氨基酸的肽(其可以成为药物的原料)的领域中。

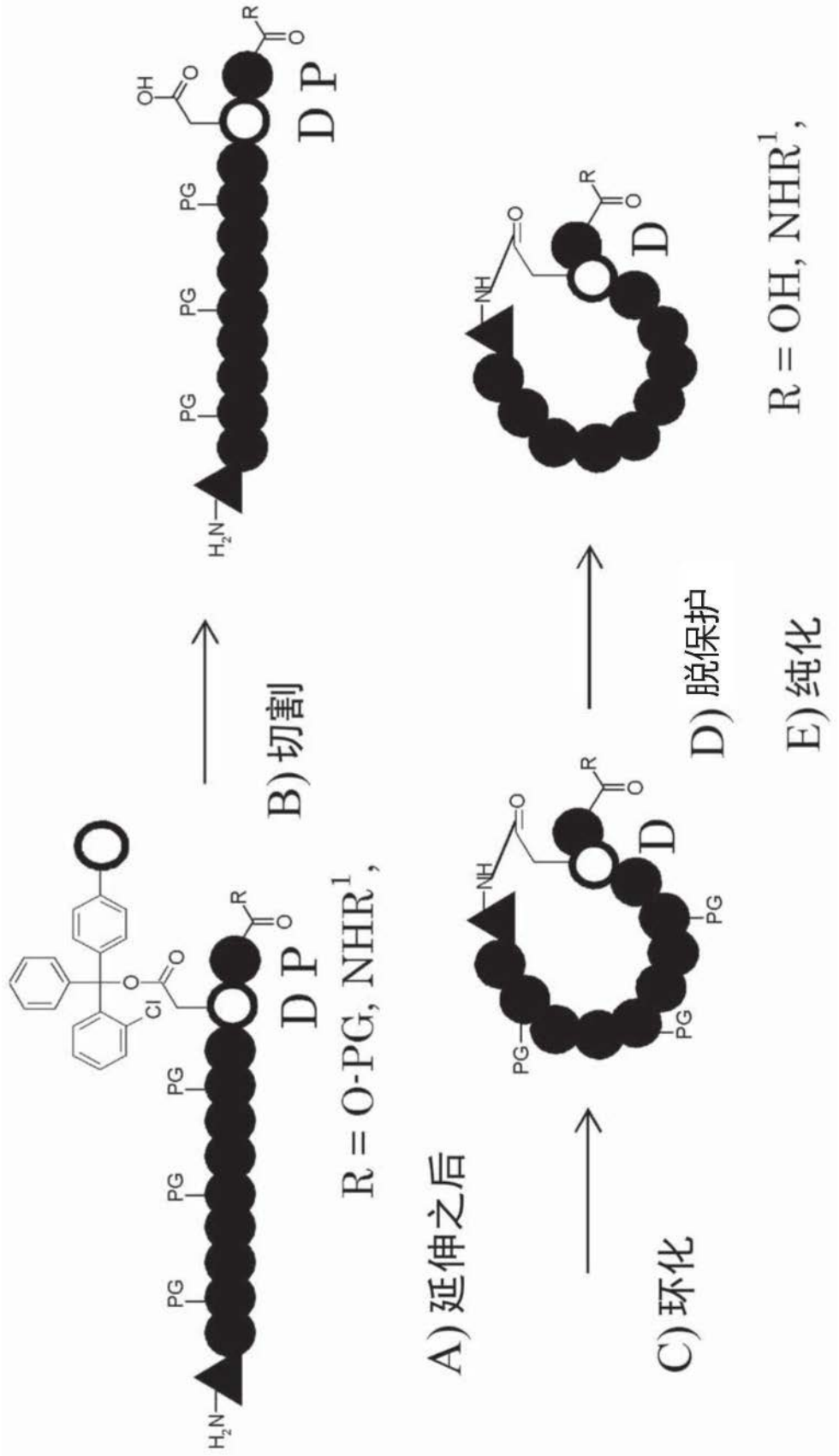


图1

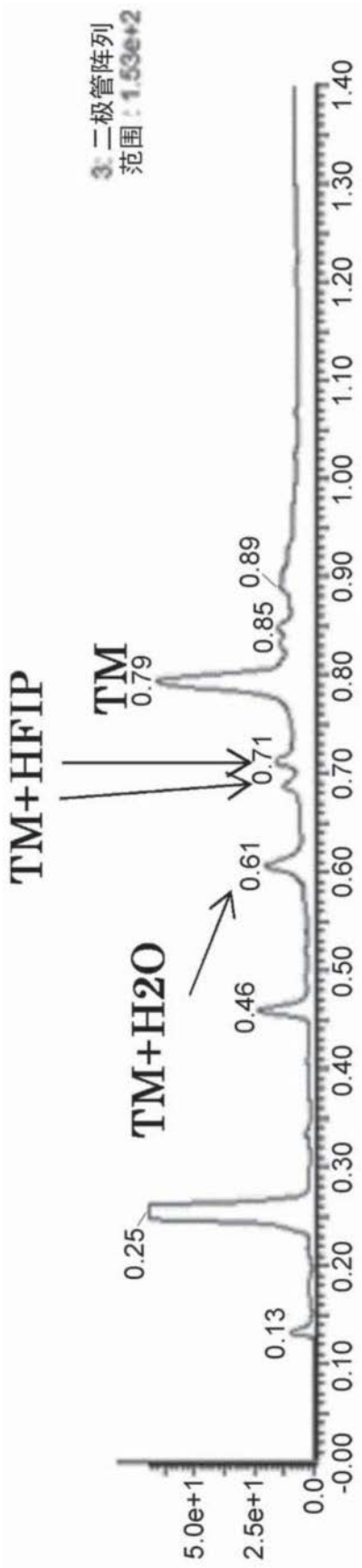

3: 二极管阵列
范围 : 1.53e+2
TM+HFIP
TM
TM+H2O
0.25
0.13
0.46
0.61
0.71
0.79
0.85
0.89
5.0e+1
2.5e+1
0.0
-0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
0.70
0.80
0.90
1.00
1.10
1.20
1.30
1.40

图2

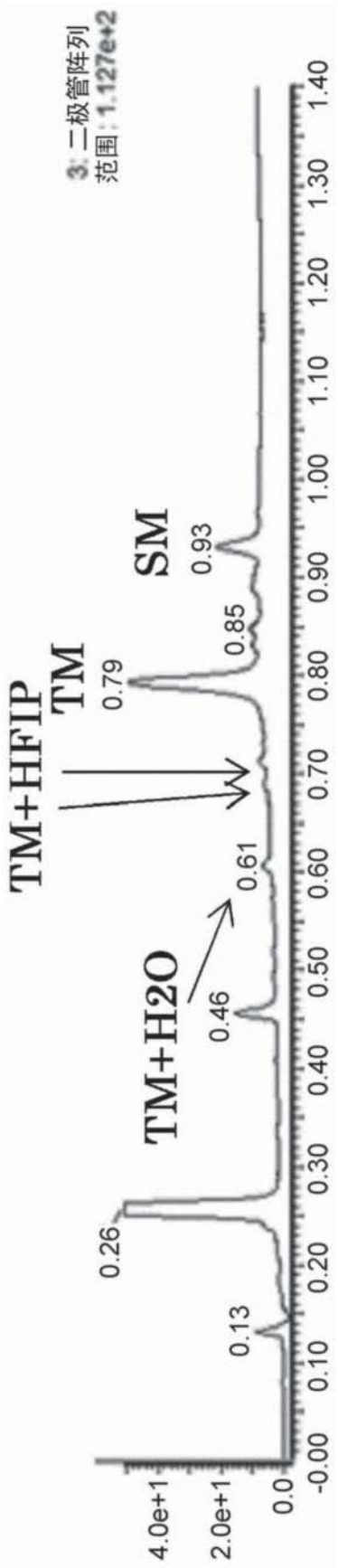

3: 二极管阵列
范围: 1.127e+2
TM+HFIP
TM
SM
TM+H2O
0.26
0.13
0.46
0.61
0.79
0.85
0.93
4.0e+1
2.0e+1
0.0
-0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
0.70
0.80
0.90
1.00
1.10
1.20
1.30
1.40

图3

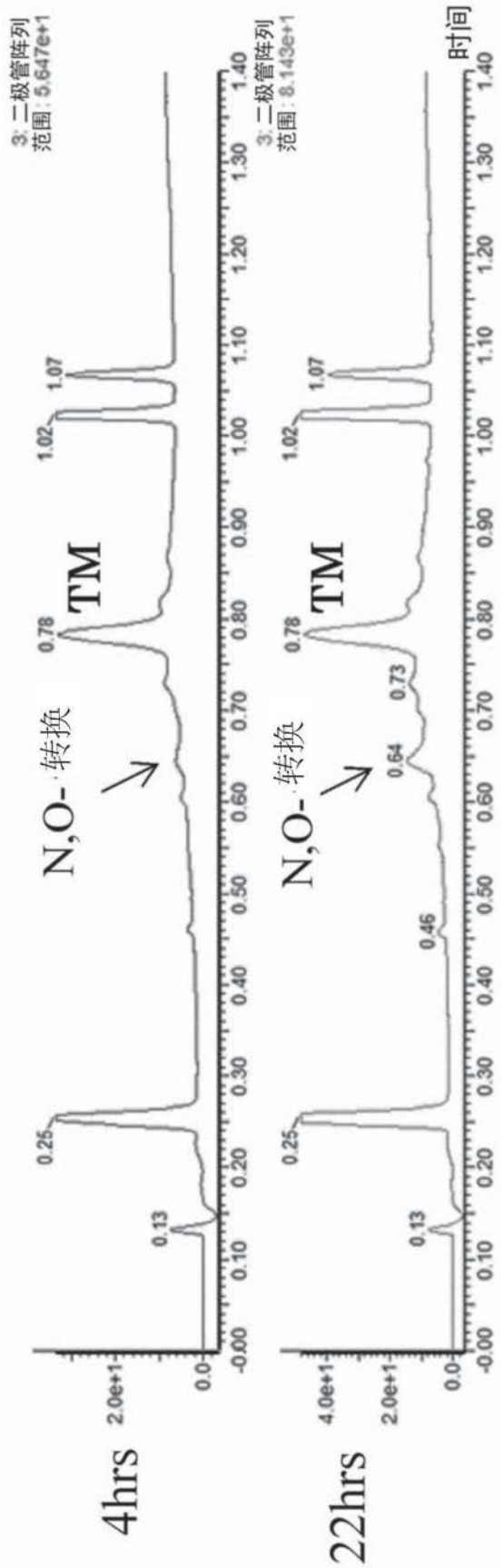

3: 二极管阵列
范围: 5.647e+1
3: 二极管阵列
范围: 8.143e+1
时间
N,O-转换
TM
4hrs
22hrs
0.13
0.25
0.46
0.64
0.73
0.78
1.02
1.07

图4

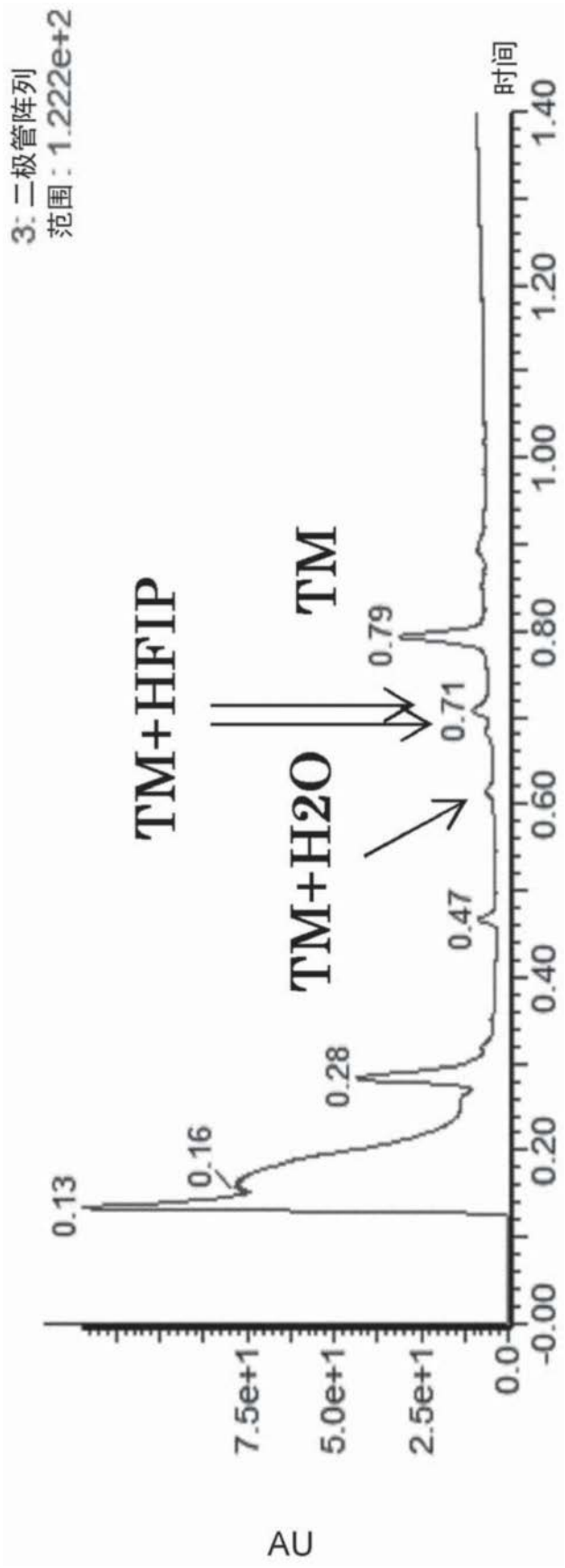

3: 二极管阵列
范围 : 1.222e+2
TM+HFIP
TM
TM+H2O
0.13
0.16
0.28
0.47
0.71
0.79
时间
-0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
0.0
2.5e+1
5.0e+1
7.5e+1
AU

图5

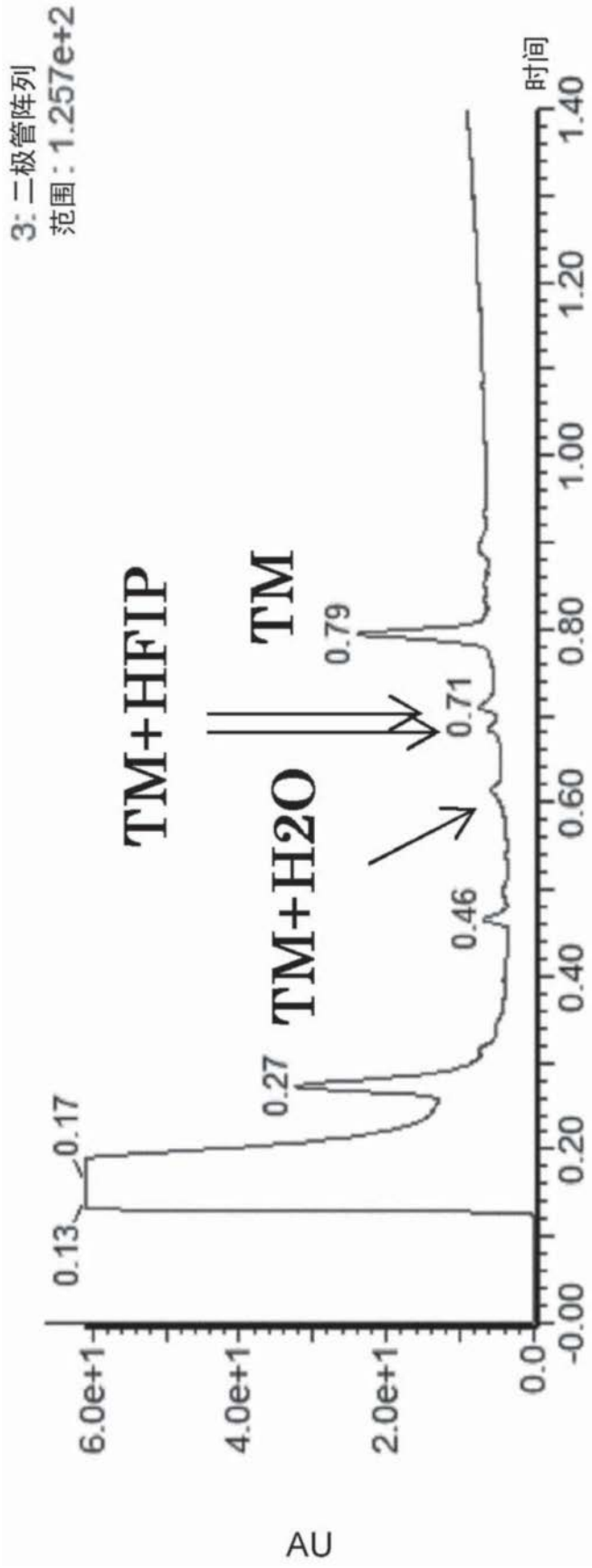

3: 二极管阵列
范围 : 1.257e+2
TM+HFIP
TM
TM+H2O
0.13
0.17
0.27
0.46
0.71
0.79
6.0e+1
4.0e+1
2.0e+1
0.0
-0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
时间
AU

图6

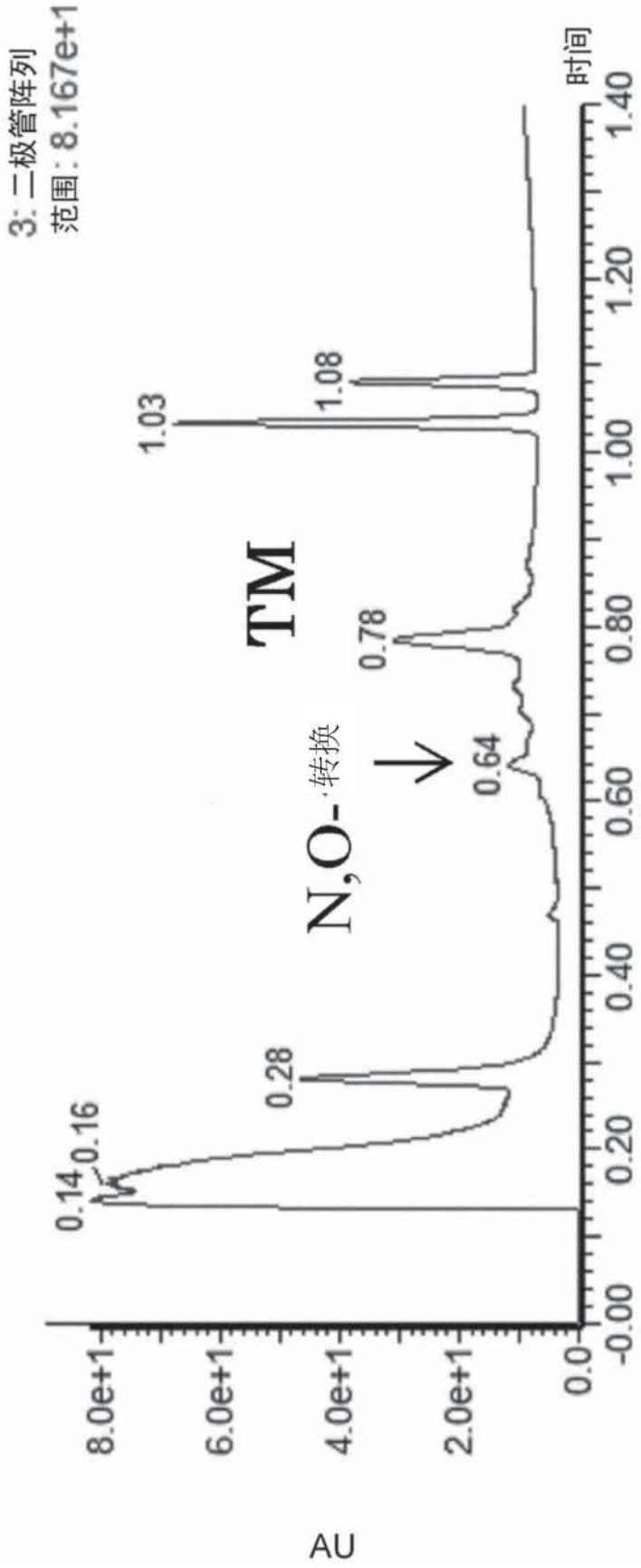

3:二极管阵列
范围:8.167e+1
时间
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
-0.00
0.0
2.0e+1
4.0e+1
6.0e+1
8.0e+1
AU
0.14
0.16
0.28
0.64
0.78
1.03
1.08
TM
N,O-转换

图7

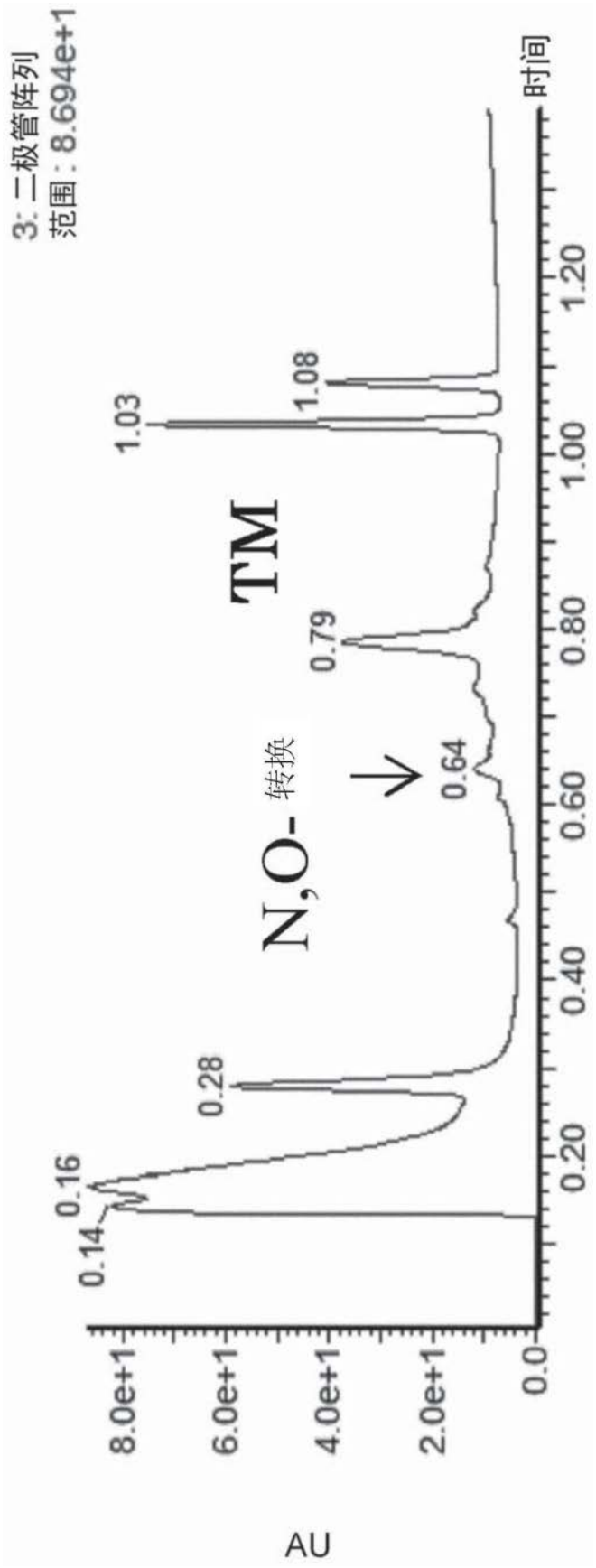

3:二极管阵列
范围：8.694e+1
时间
AU
8.0e+1
6.0e+1
4.0e+1
2.0e+1
0.0
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
0.14
0.16
0.28
0.64
0.79
1.03
1.08
N,O-
转换
TM

图8

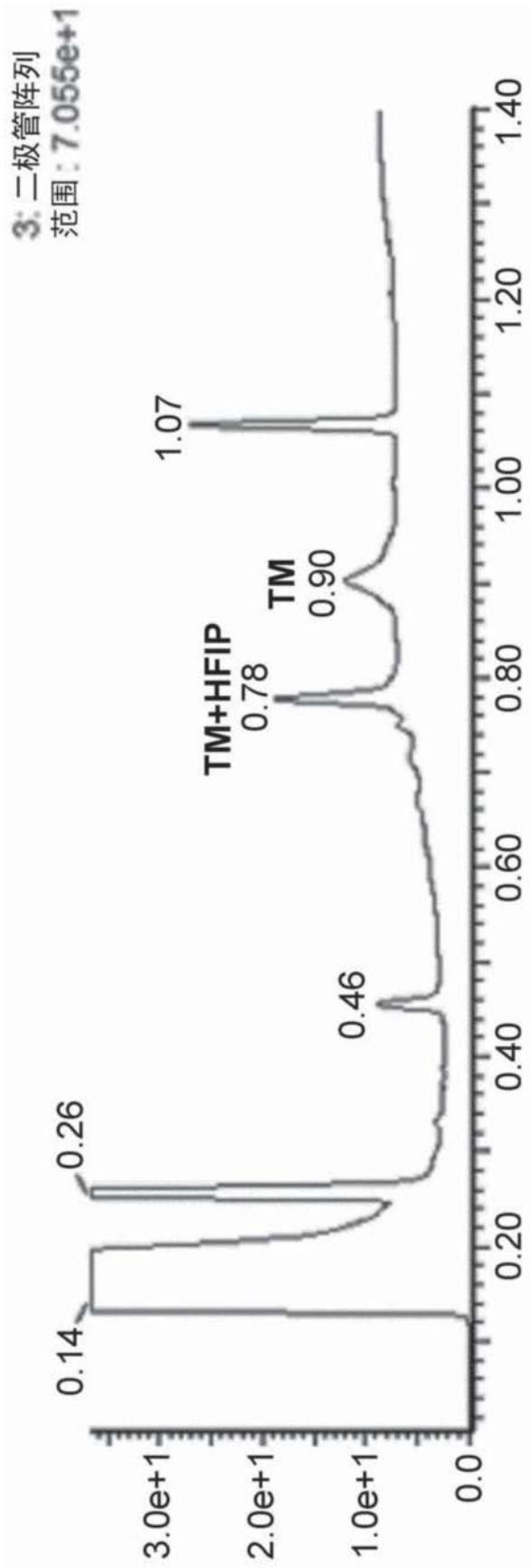

3:二极管阵列
范围:7.055e+1
0.14
0.26
0.46
TM+HFIP
0.78
TM
0.90
1.07
3.0e+1
2.0e+1
1.0e+1
0.0
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40

图9

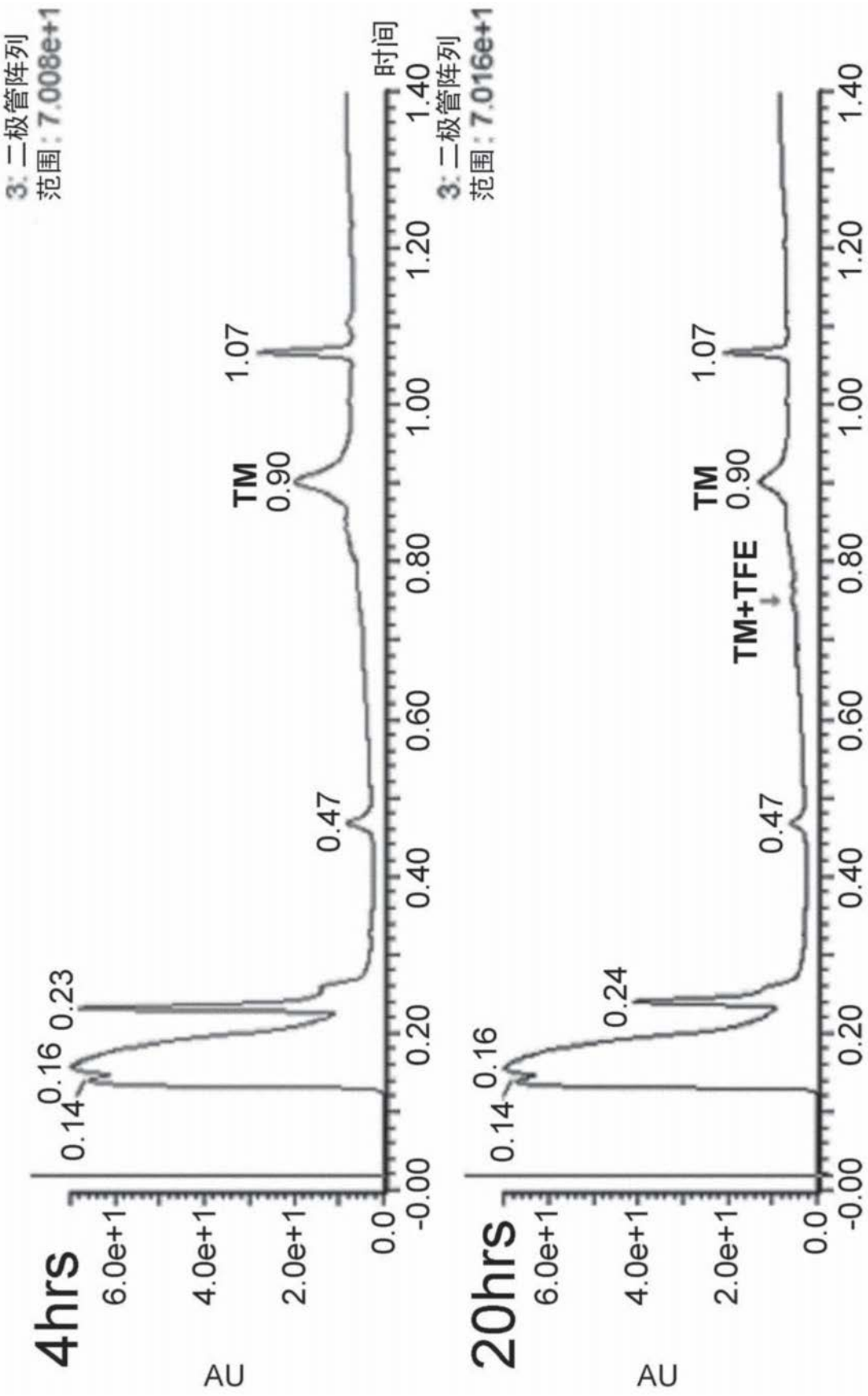

3:二极管阵列
范围：7.008e+1
时间
4hrs
AU
6.0e+1
4.0e+1
2.0e+1
0.0
-0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
0.14
0.16
0.23
0.47
TM
0.90
1.07
3:二极管阵列
范围：7.016e+1
20hrs
AU
0.14
0.16
0.24
0.47
TM
0.90
TM+TFE
1.07

图10

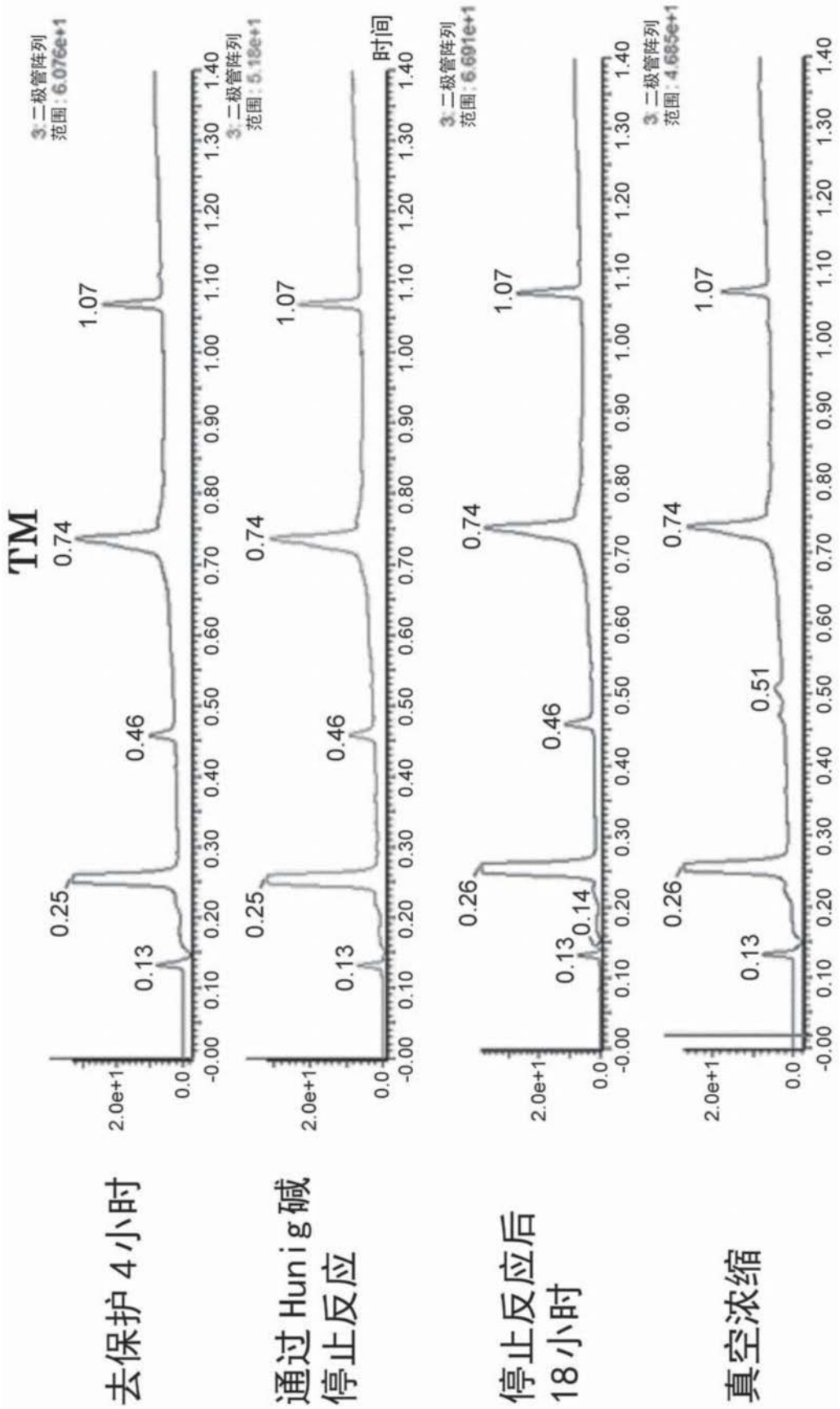

TM
3:二极管阵列
范围:6.076e+1
3:二极管阵列
范围:5.186e+1
3:二极管阵列
范围:6.691e+1
3:二极管阵列
范围:4.685e+1
时间
0.13
0.25
0.46
0.74
1.07
0.14
0.26
0.51
去保护4小时
通过Hunig碱
停止反应
停止反应后
18小时
真空浓缩

图11

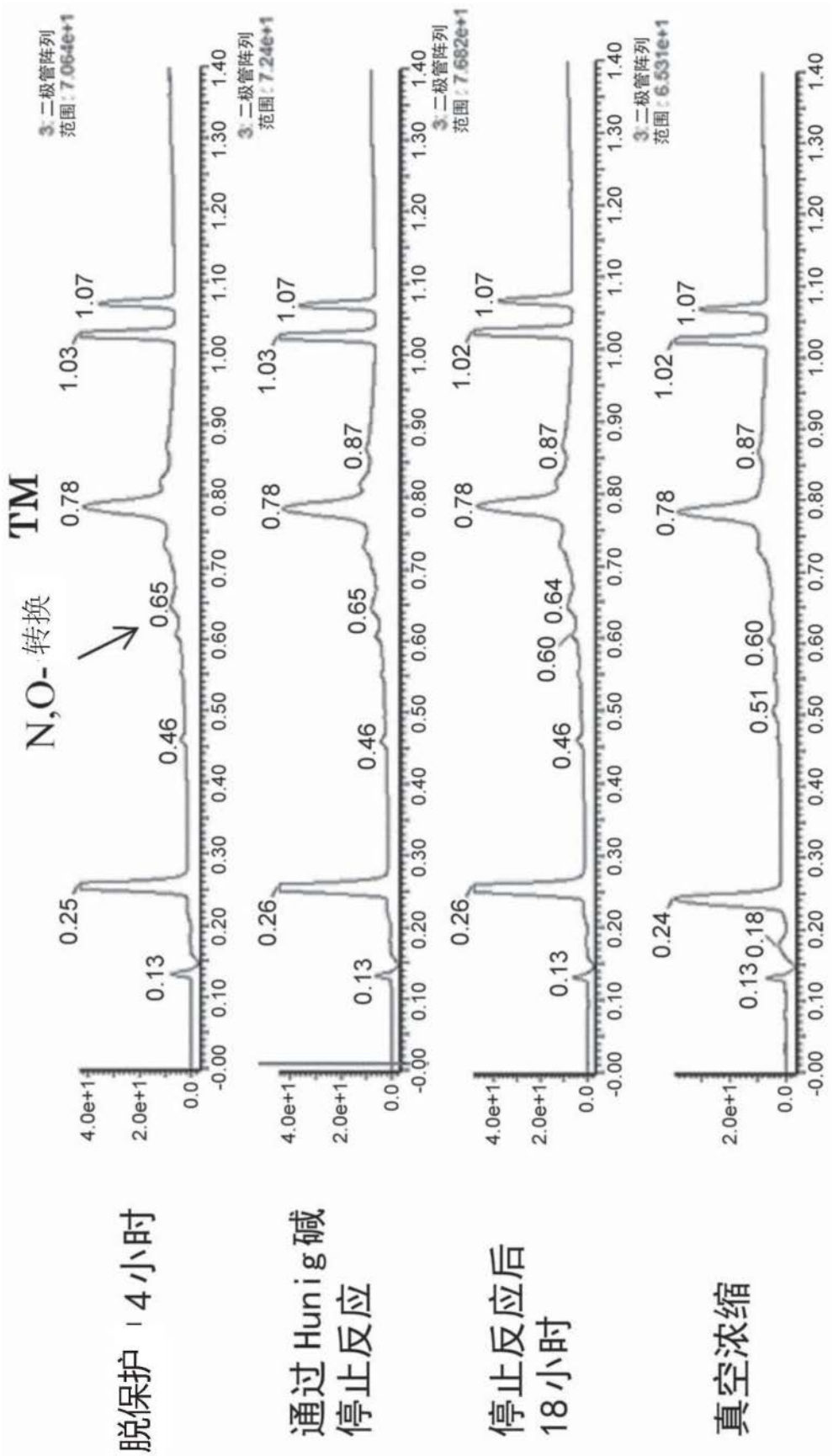

脱保护 | 4小时
通过Hunig碱
停止反应
停止反应后
18小时
真空浓缩
N,O- 转换
TM
3: 二极管阵列
范围: 7.064e+1
3: 二极管阵列
范围: 7.24e+1
3: 二极管阵列
范围: 7.682e+1
3: 二极管阵列
范围: 6.531e+1

图12

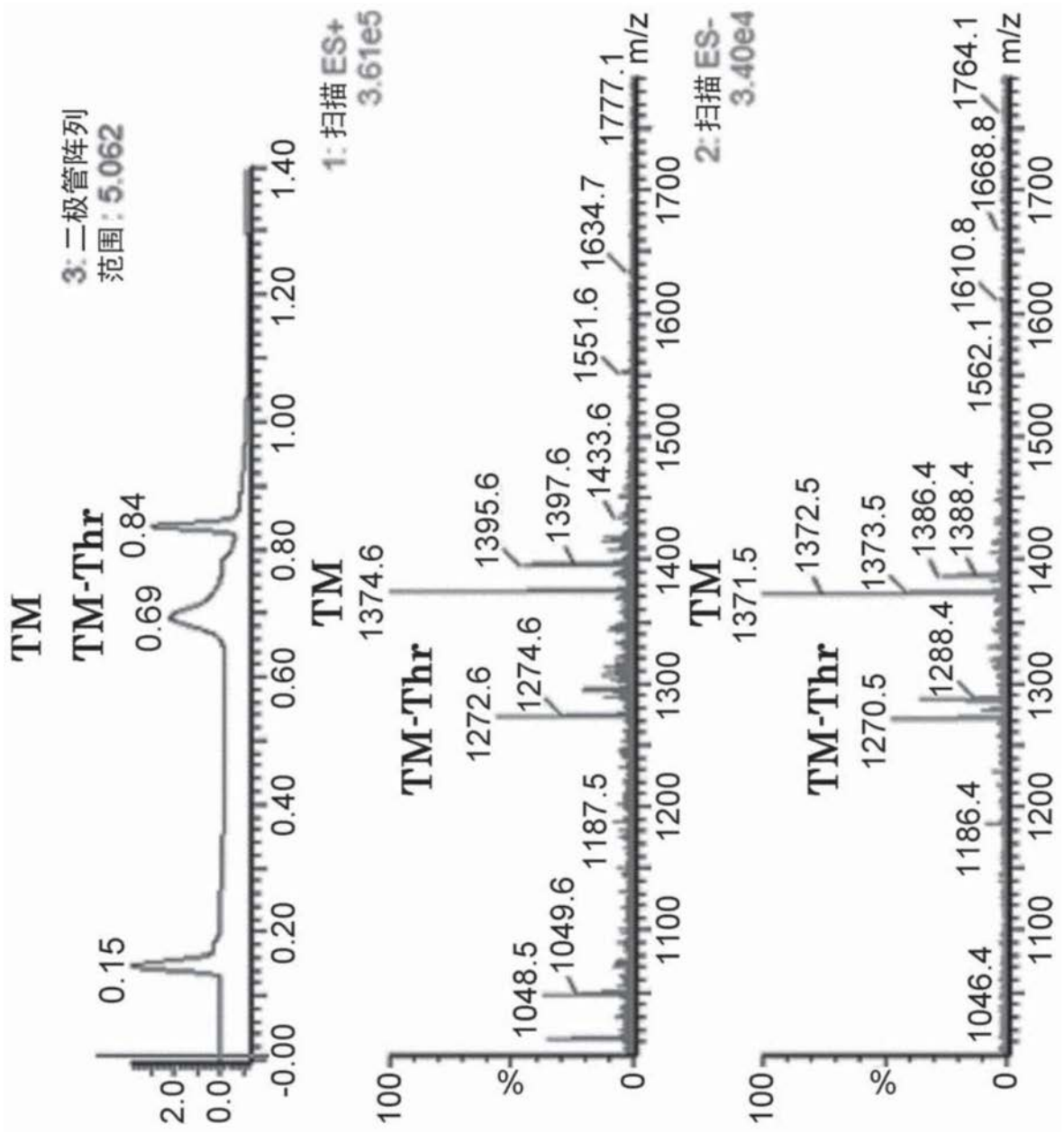

TM
TM-Thr
3: 二极管阵列
范围 : 5.062
0.15
0.69
0.84
1: 扫描 ES+
3.61e5
TM
1374.6
TM-Thr
1272.6
1274.6
1395.6
1397.6
1433.6
1551.6
1634.7
1777.1
1048.5
1049.6
1187.5
2: 扫描 ES-
3.40e4
TM
1371.5
TM-Thr
1270.5
1288.4
1372.5
1373.5
1386.4
1388.4
1562.1
1610.8
1668.8
1764.1
1046.4
1186.4
m/z
%

图13

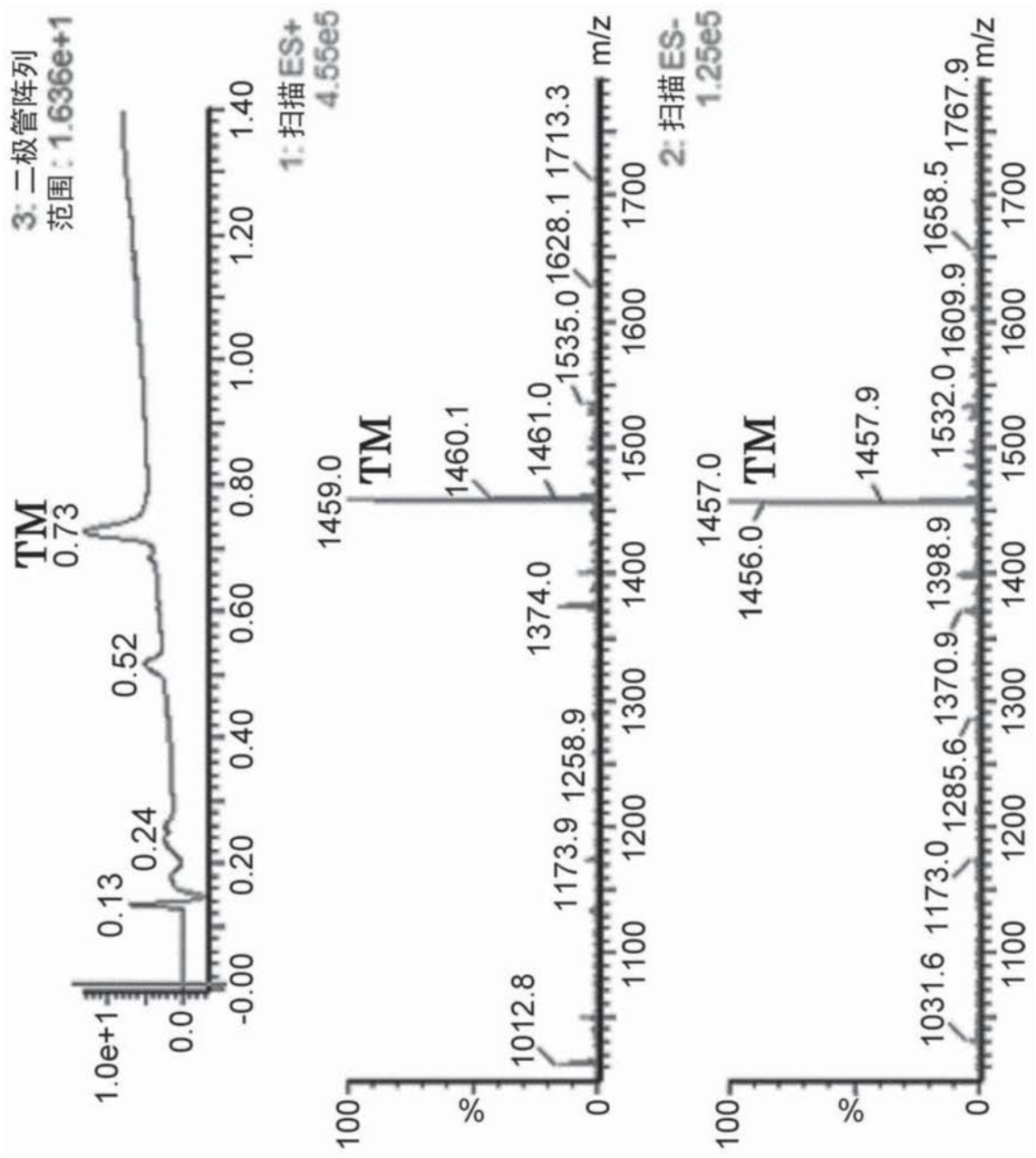

3: 二极管阵列
范围 : 1.636e+1
TM
0.73
0.52
0.24
0.13
1.0e+1
0.0
-0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
1: 扫描 ES+
4.55e5
1459.0
1460.1
1461.0
1535.0
1628.1
1713.3
1374.0
1258.9
1173.9
1012.8
100
%
0
1100
1200
1300
1400
1500
1600
1700
m/z
2: 扫描 ES-
1.25e5
1457.0
1456.0
1457.9
1532.0
1609.9
1658.5
1767.9
1398.9
1370.9
1285.6
1173.0
1031.6

图14

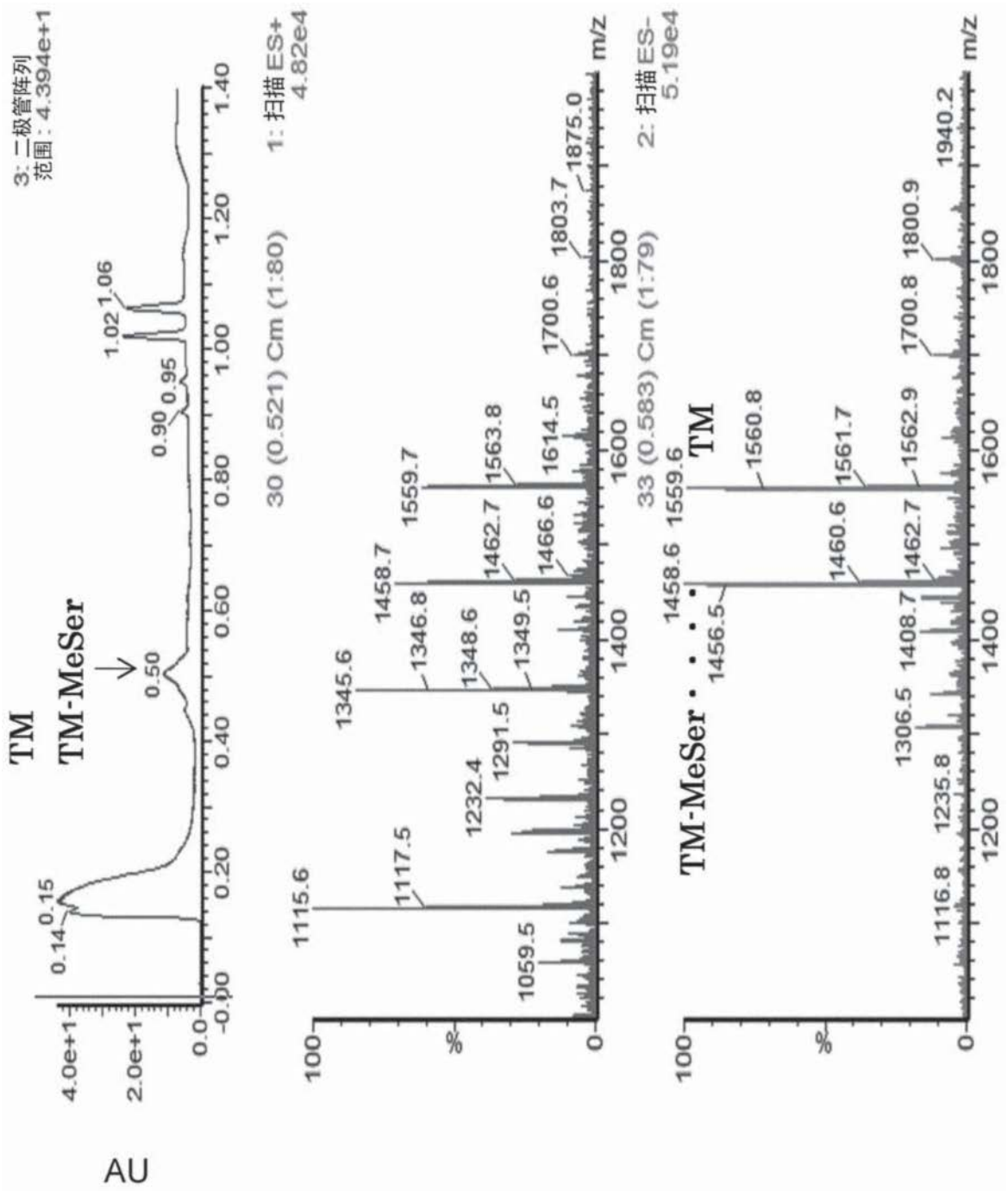

3: 二极管阵列
范围: 4.394e+1
TM
TM-MeSer
AU
4.0e+1
2.0e+1
0.0
0.14
0.15
0.50
0.90
0.95
1.02
1.06
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
-0.00
1: 扫描 ES+
4.82e4
30 (0.521) Cm (1:80)
1115.6
1117.5
1059.5
1232.4
1291.5
1345.6
1346.8
1348.6
1349.5
1458.7
1462.7
1466.6
1559.7
1563.8
1614.5
1700.6
1803.7
1875.0
m/z
2: 扫描 ES-
5.19e4
33 (0.583) Cm (1:79)
TM
TM-MeSer
1116.8
1235.8
1306.5
1408.7
1456.5
1458.6
1460.6
1462.7
1559.6
1560.8
1561.7
1562.9
1700.8
1800.9
1940.2
m/z

图15

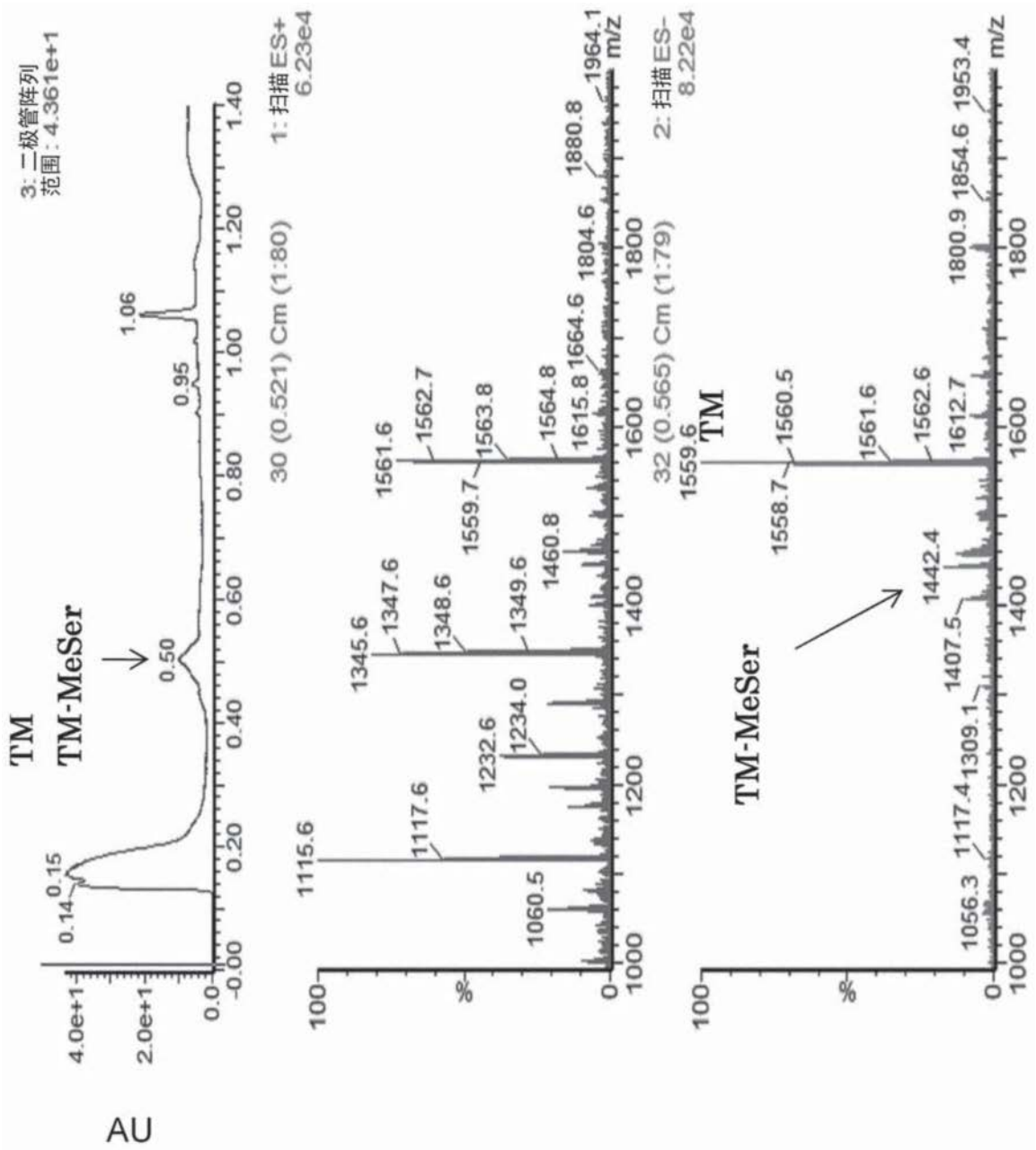

3: 二极管阵列
范围 : 4.361e+1
TM
TM-MeSer
AU
0.14
0.15
0.50
0.95
1.06
4.0e+1
2.0e+1
0.0
-0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40
30 (0.521) Cm (1:80)
1: 扫描 ES+
6.23e4
1115.6
1117.6
1060.5
1232.6
1234.0
1345.6
1347.6
1348.6
1349.6
1460.8
1559.7
1561.6
1562.7
1563.8
1564.8
1615.8
1664.6
1804.6
1880.8
1964.1
m/z
32 (0.565) Cm (1:79)
2: 扫描 ES-
8.22e4
1559.6
1558.7
1560.5
1561.6
1562.6
1612.7
1800.9
1854.6
1953.4
1442.4
1407.5
1309.1
1117.4
1056.3
%

图16

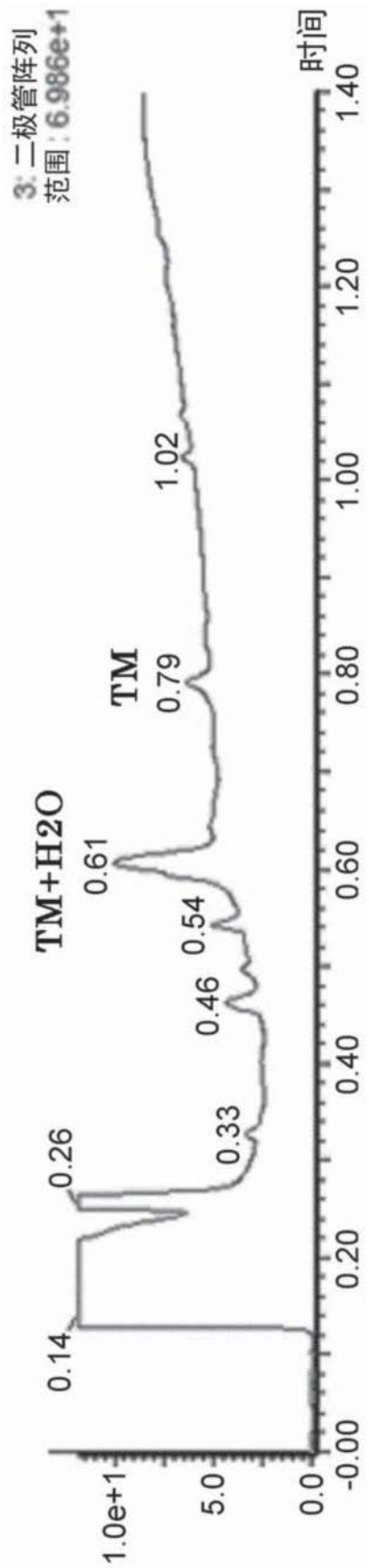

3:二极管阵列
范围:6.986e+1
时间
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
-0.00
0.0
5.0
1.0e+1
0.14
0.26
0.33
0.46
0.54
0.61
TM+H2O
0.79
TM
1.02

图17

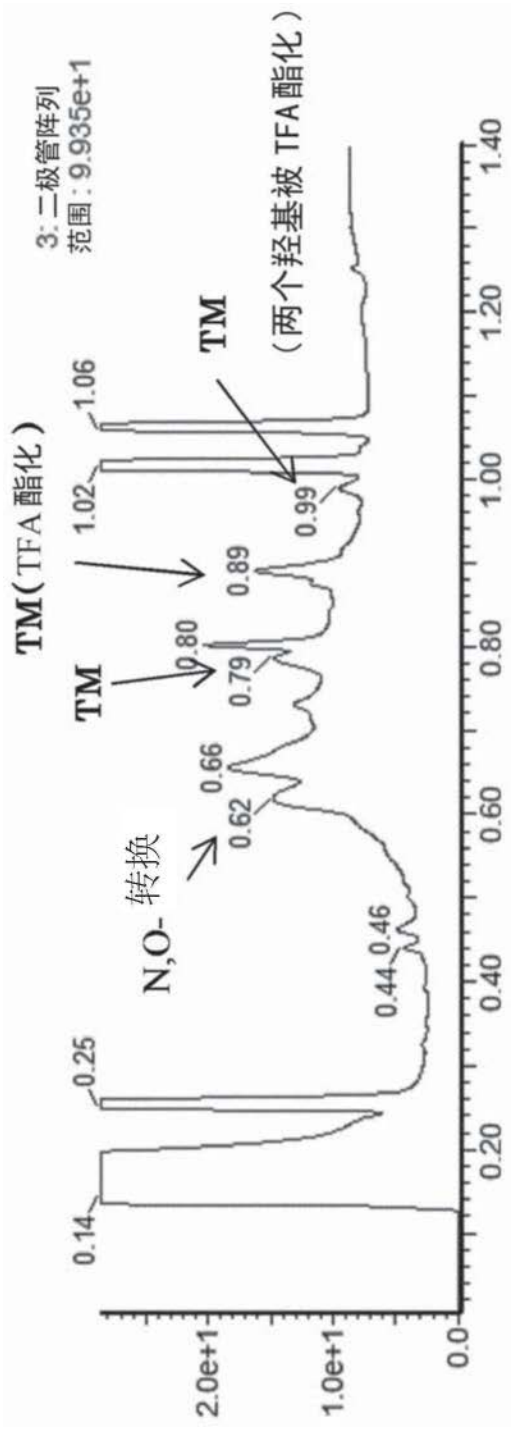

3:二极管阵列
范围:9.935e+1
TM(TFA酯化)
TM
N,O-转换
TM
(两个羟基被 TFA酯化)
0.14
0.25
0.44
0.46
0.62
0.66
0.79
0.80
0.89
0.99
1.02
1.06
2.0e+1
1.0e+1
0.0
0.20
0.40
0.60
0.80
1.00
1.20
1.40

图18

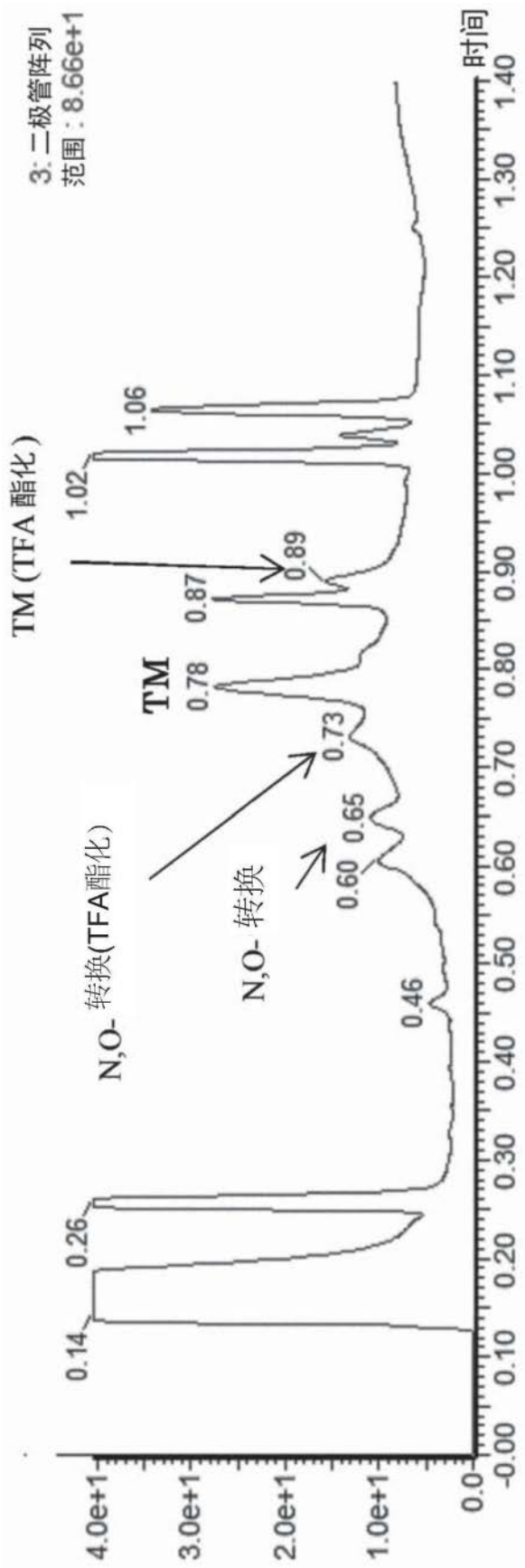

3:二极管阵列
范围：8.66e+1
TM (TFA 酯化)
N,O- 转换(TFA酯化)
N,O- 转换
TM
0.14
0.26
0.46
0.60
0.65
0.73
0.78
0.87
0.89
1.02
1.06
时间
4.0e+1
3.0e+1
2.0e+1
1.0e+1
0.0
-0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
0.70
0.80
0.90
1.00
1.10
1.20
1.30
1.40

图19

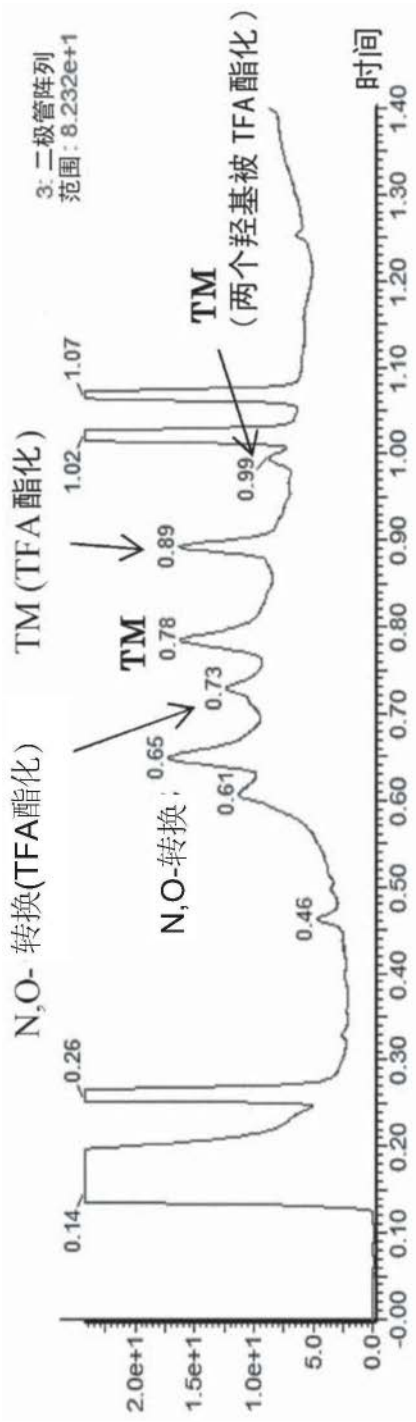

3: 二极管阵列
范围: 8.232e+1
TM (TFA酯化)
N,O- 转换(TFA酯化)
TM
(两个羟基被 TFA酯化)
TM
N,O-转换
0.14
0.26
0.46
0.61
0.65
0.73
0.78
0.89
0.99
1.02
1.07
2.0e+1
1.5e+1
1.0e+1
5.0
0.0
-0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
0.70
0.80
0.90
1.00
1.10
1.20
1.30
1.40
时间

图20

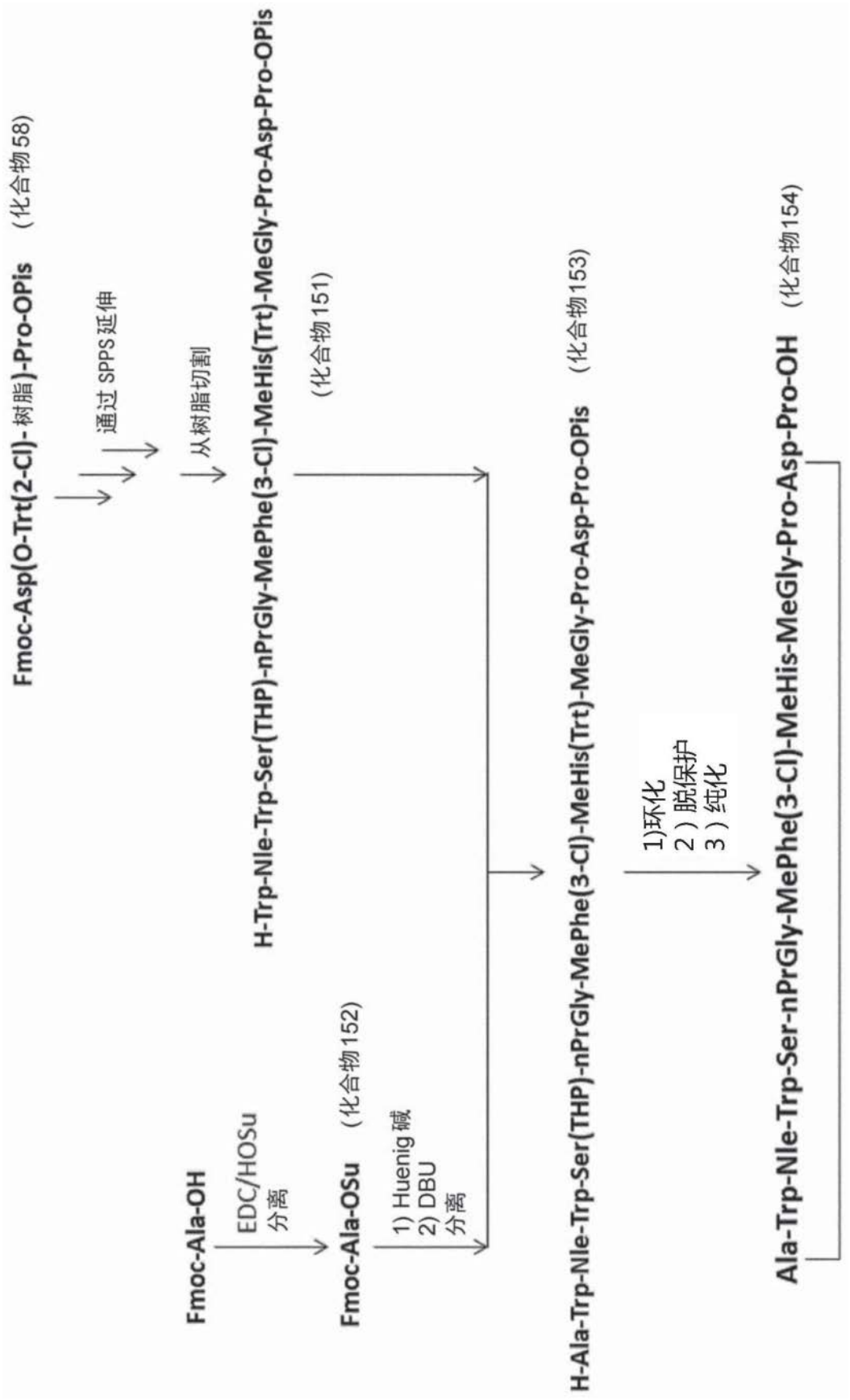

Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)- 树脂)-Pro-OPis (化合物58)
通过 SPPS 延伸
从树脂切割
H-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis
(化合物151)
Fmoc-Ala-OH
EDC/HOSu
分离
Fmoc-Ala-OSu (化合物152)
1) Huenig 碱
2) DBU
分离
H-Ala-Trp-Nle-Trp-Ser(THP)-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis(Trt)-MeGly-Pro-Asp-Pro-OPis (化合物153)
1)环化
2）脱保护
3）纯化
Ala-Trp-Nle-Trp-Ser-nPrGly-MePhe(3-Cl)-MeHis-MeGly-Pro-Asp-Pro-OH (化合物154)

图21