



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99811970.9

[45] 授权公告日 2004 年 8 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1163504C

[22] 申请日 1999.4.15 [21] 申请号 99811970.9

[30] 优先权

[32] 1998.4.15 [33] US [31] 60/081,897

[86] 国际申请 PCT/US1999/008435 1999.4.15

[87] 国际公布 WO1999/052933 英 1999.10.21

[85] 进入国家阶段日期 2000.10.13

[71] 专利权人 阿温蒂斯药物公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 A·W·斯莱迪斯基

J·J·曼西尔

审查员 张秀丽

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 樊卫民

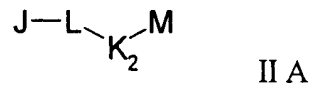
权利要求书 12 页 说明书 73 页

[54] 发明名称 制备与树脂结合的环状肽的方法

[57] 摘要

本发明涉及以片段为基础固相合成与树脂结合的环状肽甲状旁腺激素类似物和甲状旁腺激素相关蛋白类似物的方法，所述类似物含有至少一个在两个不相邻的氨基酸残基侧链之间的桥，本发明还涉及该方法所用的肽片段。

1.制备下式肽的方法



其中

J、L和M是直链肽片段，且

K₂是环状肽片段；

该方法包括如下步骤：

(1)通过向树脂上顺次连接适宜保护的氨基酸残基制备 M— $\text{\textcircled{R}}$ ，制得：



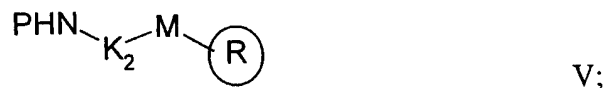
其中 $\text{\textcircled{R}}$ 是适宜的肽合成树脂，M是肽片段；

(2)通过常规的肽合成分别制备式 IV 的 N-末端保护的环状肽



其中 P 是适宜的胺保护基，

(3)将肽 III 与肽 IV 偶联得到式 V 的肽

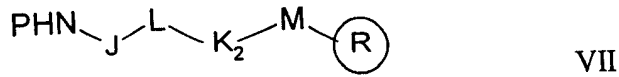


(4) (a)以式 VI 的单个肽的形式制备肽片段 J 和 L



然后将保护基从肽 V 的 N-端移去，将肽 VI 与肽 V 的去保护衍生物偶联

得到式 VII 的肽

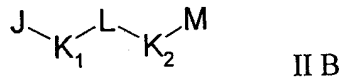


或者, (b)将保护基从肽 V 的 N-端移去, 向式 V 的去保护衍生物顺次加入肽 J 和 L 的保护了的单个氨基酸单元, 其中, 在各个添加之间采用适当的去保护方法,

或者, (c)以肽片段的形式单独制备肽 J 和 L, 并将这些肽片段偶联到从式 V 的肽开始的正在延伸的肽上;

(5) 从树脂上切割所得的肽, 将肽去保护并从反应液中回收。

2. 制备下式肽的方法



其中

J、L 和 M 是直链肽片段,

K₁ 是环状肽片段; 且

K₂ 是环状肽片段;

该方法包括如下步骤:

(1) 通过向树脂上顺次连接适宜保护的氨基酸残基制备 M—R, 制得:



其中 R 是适宜的肽合成树脂, M 是肽片段;

(2) 通过常规的肽合成单独制备式 IV 的 N-末端保护的环状肽片段



其中 P 是适宜的胺保护基,

(3) 将肽 III 与肽 IV 偶联得到式 V 的肽



(4) (a) 用常规肽合成方法单独制备式 VIII 的 N-端保护的环状肽



其中 P 是适宜的胺保护基,

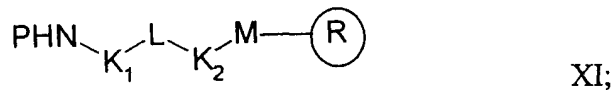
(b) 制备式 IX 的肽



(c) 将保护基从肽 V 的 N-端移去, 将 IX 肽片段与肽 V 的去保护衍生物偶联制备式 X 的肽;



且 (d) 将保护基从肽 X 的 N-端移去, 将环状肽 VIII 与肽 X 的去保护衍生物偶联, 制备式 XI 的肽;



(e) 制备肽 XII;

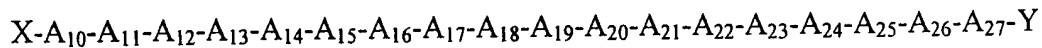


(f) 将保护基从肽 XI 的 N-端移去, 将肽 XII 与肽 XI 的去保护衍生物

偶联；且

(5) 从树脂上切割所得的肽，将肽去保护并从反应液中回收该去保护的肽。

3. 权利要求 1 的方法，其中，式 IIA 的肽是下式的环状肽化合物



其中

X 选自

- (a) $R_{1a}-A_0-A_1-A_2-A_3-A_4-A_5-A_6-A_7-A_8-A_9-$,
- (b) $R_{1a}-A_2-A_3-A_4-A_5-A_6-A_7-A_8-A_9-$,
- (c) $R_{1b}-A_3-A_4-A_5-A_6-A_7-A_8-A_9-$,
- (d) $R_{1a}-A_4-A_5-A_6-A_7-A_8-A_9-$,
- (e) $R_{1a}-A_5-A_6-A_7-A_8-A_9-$,
- (f) $R_{1a}-A_6-A_7-A_8-A_9-$,
- (g) $R_{1a}-A_7-A_8-A_9-$,
- (h) $R_{1a}-A_8-A_9-$,
- (i) $R_{1a}-A_9-$, 和
- (j) $R_{1a}-$;

Y 选自

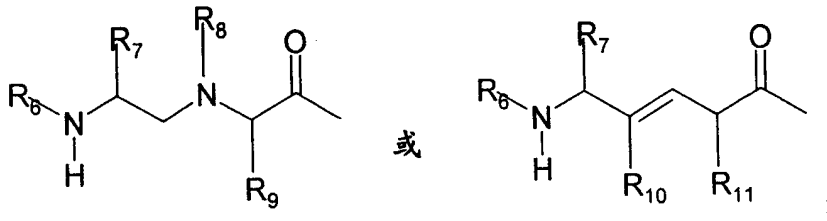
- (a) $-R_3$,
- (b) $-A_{28}-R_3$,
- (c) $-A_{28}-A_{29}-R_3$,
- (d) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-R_3$,
- (e) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-R_3$,
- (f) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-A_{32}-R_3$,

(g) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-A_{32}-A_{33}-R_3$, 和

(h) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-A_{32}-A_{33}-A_{34}-R_3$;

R_{1a} 为 H、烷基、芳烷基或 $-COR_2$;

R_{1b} 为 R_{1a} 或下式的基团



R_2 为烷基、链烯基、炔基、芳基或芳烷基;

R_3 为式 $A_{35}-OR_4$ 或 $A_{35}-NR_4R_5$ 的基团;

R_4 和 R_5 彼此独立地为 H 或低级烷基;

R_6 和 R_9 彼此独立地为 H 或烷基;

R_7 为烷基;

R_8 为 H、烷基或 COR_2 ;

R_{10} 为 H 或卤素;

R_{11} 为烷基或芳烷基;

m 为 1, 2 或 3;

n 为 3 或 4;

A_0 不存在或为 1-6 个氨基酸残基的肽;

A_1 为 Ser、Ala、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸;

A_2 为 Ala、Val 或 Gly 或其等同的氨基酸;

A_3 为 Ala、Ser、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸;

A_4 为 Glu、Ala 或 Gly 或其等同的氨基酸;

A_5 为 Ile、His、Ala 或 Gly 或其等同的氨基酸;

A_6 为 Ala、Gln、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸;

A_7 为 Ala、Leu、Gly 或其等同的氨基酸;

- A₈** 为 Leu、Nle、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸；
- A₉** 为 His、Ala、D-Pro 或 Gly 或其等同的氨基酸；
- A₁₀** 为 Ala、Asn、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、Lys、Orn、Ser、Thr、D-Pro、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-；
- A₁₁** 为 Ala、Gly、Leu 或 Lys 或其等同的氨基酸；
- A₁₂** 为 Ala 或 Gly 或其等同的氨基酸；
- A₁₃** 为 Ala、Asn、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、Lys、Orn、Ser、Thr、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-；
- A₁₄** 为 Ala、Asn、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、His、Lys、Orn、Ser、Thr、D-Pro、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-；
- A₁₅** 为 Ala、Gly、Ile、D-Pro 或 Leu 或其等同的氨基酸；
- A₁₆** 为 Asn、Ala、Gly、D-Pro 或 Gln 或其等同的氨基酸；
- A₁₇** 为 Ala、Asn、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、Lys、Orn、Ser、Thr、D-Pro、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-；
- A₁₈** 为 Asp、Cys、同型 Cys、Glu、His、Leu、Lys、Orn、Nle、Ser、Thr、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-；
- A₁₉** 为 Arg 或 Glu 或其等同的氨基酸；
- A₂₀** 为 Arg 或其等同的氨基酸；
- A₂₁** 为 Arg、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Lys、Orn、Ser、Thr、Val、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-；
- A₂₂** 为 Asp、Cys、同型 Cys、Glu、His、Lys、Orn、Phe、Ser、Thr、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-；
- A₂₃** 为 Leu、Phe 或 Trp 或其等同的氨基酸；
- A₂₄** 为 Leu 或其等同的氨基酸；
- A₂₅** 为 Arg、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、His、Lys、Orn、D-Pro、Ser、Thr、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-；
- A₂₆** 为 Asp、Cys、同型 Cys、Glu、His、Lys、Orn、Ser、Thr、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-；
- A₂₇** 为 Leu 或 Lys 或其等同的氨基酸；

A₂₈ 为 Ile 或 Leu 或其等价的氨基酸;

A₂₉ 为 Ala、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gln、Lys、Orn、Ser、Thr、
-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;

A₃₀ 为 Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、Lys、Orn、Ser、Thr、
-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;

A₃₁ 为 Ile 或 Leu 或 Val 或其等价的氨基酸;

A₃₂ 为 His 或其等价的氨基酸;

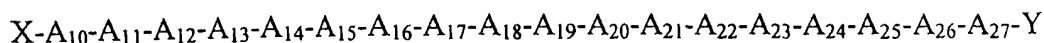
A₃₃ 为 Asn 或 Thr 或其等价的氨基酸;

A₃₄ 为 Ala 或 Phe 或其等价的氨基酸;

A₃₅ 不存在或为 1-4 个氨基酸的肽; 和

至少一个下面的氨基酸残基对的侧链经酰胺键、酯键、二硫键或羊毛硫
氨酸键连接形成一个桥, 这些氨基酸残基对为 A₁₀ 与 A₁₄、A₁₄ 与 A₁₈、
A₁₇ 与 A₂₁、A₁₈ 与 A₂₂、A₂₁ 与 A₂₅、A₂₅ 与 A₂₉。

4. 权利要求 2 的方法, 其中, 式 IIB 的肽是下式的环状肽化合物



其中

X 选自

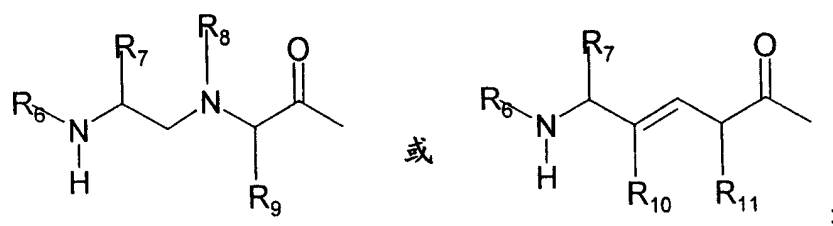
- (a) R_{1a}-A₀-A₁-A₂-A₃-A₄-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-,
- (b) R_{1a}-A₂-A₃-A₄-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-,
- (c) R_{1b}-A₃-A₄-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-,
- (d) R_{1a}-A₄-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-,
- (e) R_{1a}-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-,
- (f) R_{1a}-A₆-A₇-A₈-A₉-,
- (g) R_{1a}-A₇-A₈-A₉-,
- (h) R_{1a}-A₈-A₉-,
- (i) R_{1a}-A₉-, 和
- (j) R_{1a}-;

Y 选自

- (a) $-R_3$,
- (b) $-A_{28}-R_3$,
- (c) $-A_{28}-A_{29}-R_3$,
- (d) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-R_3$,
- (e) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-R_3$,
- (f) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-A_{32}-R_3$,
- (g) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-A_{32}-A_{33}-R_3$, 和
- (h) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-A_{32}-A_{33}-A_{34}-R_3$;

R_{1a} 为 H、烷基、芳烷基或 $-COR_2$;

R_{1b} 为 R_{1a} 或下式的基团



R_2 为烷基、链烯基、炔基、芳基或芳烷基;

R_3 为式 $A_{35}-OR_4$ 或 $A_{35}-NR_4R_5$ 的基团;

R_4 和 R_5 彼此独立地为 H 或低级烷基;

R_6 和 R_9 彼此独立地为 H 或烷基;

R_7 为烷基;

R_8 为 H、烷基或 COR_2 ;

R_{10} 为 H 或卤素;

R_{11} 为烷基或芳烷基;

m 为 1, 2 或 3;

n 为 3 或 4;

- A₀** 不存在或为 1-6 个氨基酸残基的肽;
- A₁** 为 Ser、Ala、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸;
- A₂** 为 Ala、Val 或 Gly 或其等同的氨基酸;
- A₃** 为 Ala、Ser、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸;
- A₄** 为 Glu、Ala 或 Gly 或其等同的氨基酸;
- A₅** 为 Ile、His、Ala 或 Gly 或其等同的氨基酸;
- A₆** 为 Ala、Gln、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸;
- A₇** 为 Ala、Leu、Gly 或其等同的氨基酸;
- A₈** 为 Leu、Nle、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸;
- A₉** 为 His、Ala、D-Pro 或 Gly 或其等同的氨基酸;
- A₁₀** 为 Ala、Asn、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、Lys、Orn、Ser、Thr、D-Pro、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;
- A₁₁** 为 Ala、Gly、Leu 或 Lys 或其等同的氨基酸;
- A₁₂** 为 Ala 或 Gly 或其等同的氨基酸;
- A₁₃** 为 Ala、Asn、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、Lys、Orn、Ser、Thr、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;
- A₁₄** 为 Ala、Asn、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、His、Lys、Orn、Ser、Thr、D-Pro、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;
- A₁₅** 为 Ala、Gly、Ile、D-Pro 或 Leu 或其等同的氨基酸;
- A₁₆** 为 Asn、Ala、Gly、D-Pro 或 Gln 或其等同的氨基酸;
- A₁₇** 为 Ala、Asn、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、Lys、Orn、Ser、Thr、D-Pro、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;
- A₁₈** 为 Asp、Cys、同型 Cys、Glu、His、Leu、Lys、Orn、Nle、Ser、Thr、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;
- A₁₉** 为 Arg 或 Glu 或其等同的氨基酸;
- A₂₀** 为 Arg 或其等同的氨基酸;
- A₂₁** 为 Arg、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Lys、Orn、Ser、Thr、Val、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;
- A₂₂** 为 Asp、Cys、同型 Cys、Glu、His、Lys、Orn、Phe、Ser、Thr、

-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;

A₂₃ 为 Leu、Phe 或 Trp 或其等同的氨基酸;

A₂₄ 为 Leu 或其等同的氨基酸;

A₂₅ 为 Arg、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、His、Lys、Orn、D-Pro、Ser、Thr、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;

A₂₆ 为 Asp、Cys、同型 Cys、Glu、His、Lys、Orn、Ser、Thr、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;

A₂₇ 为 Leu 或 Lys 或其等同的氨基酸;

A₂₈ 为 Ile 或 Leu 或其等同的氨基酸;

A₂₉ 为 Ala、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gln、Lys、Orn、Ser、Thr、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;

A₃₀ 为 Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、Lys、Orn、Ser、Thr、-NHCH[(CH₂)_mNH₂]CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;

A₃₁ 为 Ile 或 Leu 或 Val 或其等同的氨基酸;

A₃₂ 为 His 或其等同的氨基酸;

A₃₃ 为 Asn 或 Thr 或其等同的氨基酸;

A₃₄ 为 Ala 或 Phe 或其等同的氨基酸;

A₃₅ 不存在或为 1-4 个氨基酸的肽; 和

至少一个下面的氨基酸残基对的侧链经酰胺键、酯键、二硫键或羊毛硫氨酸键连接形成一个桥, 这些氨基酸残基对为 A₁₃ 与 A₁₇ 和 A₂₆ 与 A₃₀, 条件是(a)当氨基酸残基 A₁₃ 和 A₁₇ 的侧链连接形成桥时, 至少一个下列氨基酸残基对的侧链也连接形成桥: A₁₇ 与 A₂₁, A₁₈ 与 A₂₂, A₂₁ 与 A₂₅, 以及 A₂₅ 与 A₂₉; (b)当氨基酸残基 A₂₆ 与 A₃₀ 的侧链连接形成一个桥时, 至少一个下面的氨基酸残基对的侧链也连接形成桥: A₁₀ 与 A₁₄、A₁₄ 与 A₁₈、A₁₇ 与 A₂₁、A₁₈ 与 A₂₂、和 A₂₁ 与 A₂₅。

5. 权利要求 1 的方法, 用于制备
环(Lys¹⁸-Asp²²)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
该方法包括如下步骤

(a)制备树脂结合肽片段 A:

Fmoc-Trp(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Leu-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Val-NH- 树脂
(A);

(b)制备环状肽片段 B

Fmoc—Lys—Glu(OtBu)—Arg(Pmc)—Val—Asp—OH (B);

(c)将步骤(a)的肽 A 与步骤(b)的肽 B 偶联形成中间体肽 AB

Fmoc-Lys-Glu-Arg-Val-Asp-Trp(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-
Lys(Boc)-Leu-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Val-NH- 树脂 (AB);

(d)向肽 AB 上顺次加成 Ser(OtBu)、Asn(Trt)、Leu、His(Trt)和 Lys(Boc)形成中间体树脂结合的肽 C:

Fmoc-Lys(Boc)-His(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Ser(OtBu) -Lys-Glu-Arg-Val-Asp-
Trp(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Leu-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Val-NH- 树脂 (C);

(e)制备肽 D:

Fmoc-Ala-Val-Ser(OtBu)-Glu(OtBu)-Ile-Gln(Trt)-Leu-Nle-His(Trt)-Asn(Trt)-Leu-Gly-OH (D);

(f)将肽 C 的 N-端去保护, 将肽 C 的去保护衍生物和肽 D 偶联形成树脂结合肽 E:

Fmoc-Ala-Val-Ser(OtBu)-Glu(OtBu)-Ile-Gln(Trt)-Leu-Nle-His(Trt)-Asn(Trt)-Leu-Gly-
Lys(Boc)-His(Trt)-Leu-Asn(Trt)-Ser(OtBu) -Lys-Glu-Arg-Val-Asp-
Trp(Boc)-Leu-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Leu-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Val-NH-树脂 (E);

和

(g)从树脂上裂解所得肽，该肽去保护，且从反应液中回收环
(Lys¹⁸-Asp²²) [Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31) NH₂.

制备与树脂结合的环状肽的方法

技术领域

本发明涉及以片段为基础制备与树脂结合的环状肽甲状旁腺激素类似物和甲状旁腺激素相关蛋白类似物的方法，所述类似物含有至少一个在两个不相邻的氨基酸残基侧链之间的桥。更具体地讲，本发明涉及固相合成所述环状肽类似物的方法以及该方法所用的肽片段。

发明背景

环状肽亚单位存在于多种具有有用的生物学活性的肽中，包括甲状旁腺激素类似物和甲状旁腺激素相关的蛋白类似物、血管活性肽类似物、缩胆囊肽类似物、肿瘤坏死因子(TNF)衍生的肽、降钙素类似物、促生长素抑制素类似物、细胞粘着调节剂、生长激素释放因子(GRF)类似物、缓激肽拮抗剂、酪氨酸活化基元类似物(TAM模拟物)和糊精激动剂。特别感兴趣的是环状肽甲状旁腺激素(hPTH)类似物和甲状旁腺激素相关蛋白(hPTHrP)类似物。

人甲状旁腺激素(hPTH)为钙体内稳态的主要调节物，是一个 84 个氨基酸的蛋白质。甲状旁腺激素相关蛋白(hPTHrP)为与 hPTH 具有 N 末端同源性的 139-171 个氨基酸的蛋白质。hPTH 和 hPTHrP 的 N 末端片段，尤其是由氨基酸 1-34 组成的那些保留了亲代激素的全部生物学活性。

hPTH(1-34)具有下面的氨基酸序列：

Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-Ser-Met-
Glu-Arg-Val-Glu-Trp-Leu-Arg-Lys-Lys-Leu-Gln-Asp-Val-His-Asn-Phe.

hPTHrP(1-34)具有下面的氨基酸序列：

Ala-Val-Ser-Glu-His-Gln-Leu-Leu-His-Asp-Lys-Gly-Lys-Ser-Ile-Gln-Asp-Leu-Arg-Arg-Arg-Phe-Phe-Leu-His-His-Leu-Ile-Ala-Glu-Ile-His-Thr-Ala.

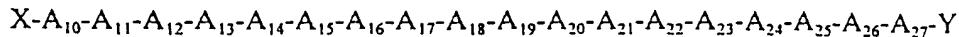
hPTH 的生物学活性反映在第二信使系统的活化中：G-蛋白偶联的腺苷酸环化酶(AC)活性和 G-蛋白偶联和未偶联蛋白激酶 C(PKC)活性。就人和卵巢切除的大鼠中的骨形成而言，N 末端片段 hPTH(1-34)OH 和 hPTH(1-34)NH₂ 已分别被证实是合成代谢的。这种骨生长的增加已证实与腺苷酸环化酶活性的刺激相偶联。这些 N 末端片段的类似物对于治疗与骨细胞钙调节相关的生理疾病具有显著的治疗功效：包括低血钙；骨质疏松；骨质减少；和与骨质疏松和骨质减少相关的疾病，如甲状旁腺功能亢进、甲状旁腺功能减退和库欣综合症；糖皮质激素和免疫抑制诱导的骨质减少；骨折和骨再折术恢复。

还已证实从 hPTH(1-34)的 N 末端缺失多达 6 个氨基酸残基明显降低得到的类似物刺激腺苷酸环化酶的能力，同时对受体结合几乎没有影响。因此，在 N 末端截短高达 6 个氨基酸残基的 hPTH(1-34)类似物抑制 PTH 的作用，可用于治疗特征为 PTH 过量的疾病，如甲状旁腺过量亢进和与甲状旁腺功能减退相关的高血钙危象、恶性高血钙疾病、肾衰竭和高血压。

hPTH(1-27)-(1-34)的无环类似物公开在美国专利号 4,086,196 中。hPTH(1-34)和 hPTHrP(1-34)的无环类似物公开在美国专利号 5,589,452 中。[Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴ 或 Phe³⁴]hPTH(1-34)公开在美国专利号 4,656,250 中。[Nle⁸, Nle¹⁸, Tyr³⁴]hPTH(1-34)和其 N 末端截短衍生物公开在美国专利号 4,771,124 和 4,423,037 中。PTH(1-34)的其它无环类似物公开美国专利号 5,723,577 和 5,434,246, WO 97/02834、EPA 561412-A1、EPA 747817-A2、WO-94/02510、WO 9603437 和 WO9511988-A1 中。hPTH(1-28)NH₂ 至 hPTH(1-31)NH₂ 和 [Leu²⁷]hPTH(1-28)NH₂ 至 [Leu²⁷] hPTH(1-33)NH₂ 的类似物描述在美国专利号 5,556,940 中。包括 PTH 的 N 末端截短类似物的 PTH 受体的无环拮抗剂公开在美国专利号 5,446,130、5,229,489、4,771,124 和 4,423,037 中。

公开了 hPTH 和 hPTHrP 的单环和双环类似物。环(Lys²⁶-Asp³⁰)[Leu²⁷]hPTH(1-34)NH₂ 和环(Lys²⁷-Asp³⁰)hPTH(1-34)NH₂ 公开在美国专利号 5,556,940 中。Barbier 等(药物化学杂志 1997, 40, 1373)描述了环(Lys²⁶-Asp³⁰)[Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂、环(Glu²²-Lys²⁶)[Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂ 和环(Lys²⁷-Asp³⁰)hPTH(1-31)NH₂。hPTH(1-34)或 hPTHrP(1-34)的单环和双环衍生物公开在专利文件 WO96/40193、DE19508672-A2 和 A.Bisello 等, 生物化学 1997, 36, 3293 中。M.Chorev 等, 生物化学 1991, 30, 5698 公开了一种 PTH 受体的可能的拮抗剂, 环(Lys¹³-Asp¹⁷) hPTH(7-34)NH₂。且 Kanmera 等, “肽化学 1993: Okada, Y., 编: 蛋白质研究基础, Osaka, 1994, 321-324” 描述了 hPTHrP 的一系列含酰胺的类似物。

WO 98/51324 公开了式 I 的环肽化合物:



I

或其可药用盐或前药, 其中

X 选自

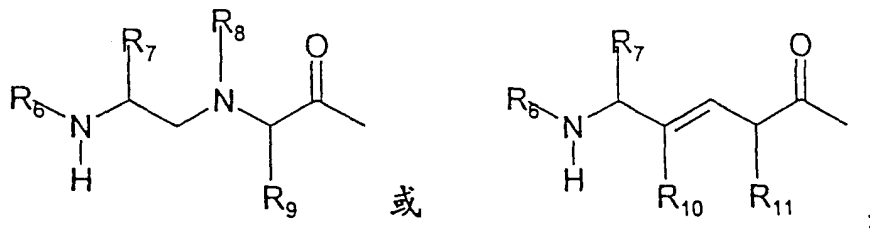
- (a) R_{1a}-A₀-A₁-A₂-A₃-A₄-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-,
- (b) R_{1a}-A₂-A₃-A₄-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-,
- (c) R_{1b}-A₃-A₄-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-,
- (d) R_{1a}-A₄-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-,
- (e) R_{1a}-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-,
- (f) R_{1a}-A₆-A₇-A₈-A₉-,
- (g) R_{1a}-A₇-A₈-A₉-,
- (h) R_{1a}-A₈-A₉-,
- (i) R_{1a}-A₉- 和
- (j) R_{1a}-;

Y 选自

- (a) $-R_3$,
- (b) $-A_{28}-R_3$,
- (c) $-A_{28}-A_{29}-R_3$,
- (d) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-R_3$,
- (e) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-R_3$,
- (f) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-A_{32}-R_3$,
- (g) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-A_{32}-A_{33}-R_3$, 和
- (h) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-A_{32}-A_{33}-A_{34}-R_3$;

R_{1a} 为 H、烷基、芳烷基或 $-COR_2$;

R_{1b} 为 R_{1a} 或下式的基团



R_2 为烷基、链烯基、炔基、芳基或芳烷基;

R_3 为式 $A_{35}-OR_4$ 或 $A_{35}-NR_4R_5$ 的基团;

R_4 和 R_5 彼此独立地为 H 或低级烷基;

R_6 和 R_9 彼此独立地为 H 或烷基;

R_7 为烷基;

R_8 为 H、烷基或 COR_2 ;

R_{10} 为 H 或卤素;

R_{11} 为烷基或芳烷基;

m 为 1, 2 或 3;

n 为 3 或 4;

A_0 不存在或为 1-6 个氨基酸残基的肽;

A_1 为 Ser、Ala、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸;

A_2 为 Ala、Val 或 Gly 或其等同的氨基酸;

- A_3 为 Ala、Ser、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸；
 A_4 为 Glu、Ala 或 Gly 或其等同的氨基酸；
 A_5 为 Ile、His、Ala 或 Gly 或其等同的氨基酸；
 A_6 为 Ala、Gln、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸；
 A_7 为 Ala、Leu、Gly 或其等同的氨基酸；
 A_8 为 Leu、Nle、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸；
 A_9 为 His、Ala、D-Pro 或 Gly 或其等同的氨基酸；
 A_{10} 为 Ala、Asn、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、Lys、Orn、Ser、Thr、D-Pro、 $-\text{NHCH}(\text{CH}_2)_m\text{NH}_2\text{CO}-$ 或 $-\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}]\text{CO}-$ ；
 A_{11} 为 Ala、Gly、Leu 或 Lys 或其等同的氨基酸；
 A_{12} 为 Ala 或 Gly 或其等同的氨基酸；
 A_{13} 为 Ala、Asn、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、Lys、Orn、Ser、Thr、 $-\text{NHCH}(\text{CH}_2)_m\text{NH}_2\text{CO}-$ 或 $-\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}]\text{CO}-$ ；
 A_{14} 为 Ala、Asn、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、His、Lys、Orn、Ser、Thr、D-Pro、 $-\text{NHCH}(\text{CH}_2)_m\text{NH}_2\text{CO}-$ 或 $-\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}]\text{CO}-$ ；
 A_{15} 为 Ala、Gly、Ile、D-Pro 或 Leu 或其等同的氨基酸；
 A_{16} 为 Asn、Ala、Gly、D-Pro 或 Gln 或其等同的氨基酸；
 A_{17} 为 Ala、Asn、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、Lys、Orn、Ser、Thr、D-Pro、 $-\text{NHCH}(\text{CH}_2)_m\text{NH}_2\text{CO}-$ 或 $-\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}]\text{CO}-$ ；
 A_{18} 为 Asp、Cys、同型 Cys、Glu、His、Leu、Lys、Orn、Nle、Ser、Thr、 $-\text{NHCH}(\text{CH}_2)_m\text{NH}_2\text{CO}-$ 或 $-\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}]\text{CO}-$ ；
 A_{19} 为 Arg 或 Glu 或其等同的氨基酸；
 A_{20} 为 Arg 或其等同的氨基酸；
 A_{21} 为 Arg、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Lys、Orn、Ser、Thr、Val、 $-\text{NHCH}(\text{CH}_2)_m\text{NH}_2\text{CO}-$ 或 $-\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}]\text{CO}-$ ；
 A_{22} 为 Asp、Cys、同型 Cys、Glu、His、Lys、Orn、Phe、Ser、Thr、 $-\text{NHCH}(\text{CH}_2)_m\text{NH}_2\text{CO}-$ 或 $-\text{NHCH}[(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}]\text{CO}-$ ；
 A_{23} 为 Leu、Phe 或 Trp 或其等同的氨基酸；
 A_{24} 为 Leu 或其等同的氨基酸；

A₂₅ 为 Arg、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、His、Lys、Orn、D-Pro、Ser、Thr、-NHCH(CH₂)_mNH₂)CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;

A₂₆ 为 Asp、Cys、同型 Cys、Glu、His、Lys、Orn、Ser、Thr、-NHCH(CH₂)_mNH₂)CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;

A₂₇ 为 Leu 或 Lys 或其等同的氨基酸;

A₂₈ 为 Ile 或 Leu 或其等同的氨基酸;

A₂₉ 为 Ala、Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gln、Lys、Orn、Ser、Thr、-NHCH(CH₂)_mNH₂)CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;

A₃₀ 为 Asp、Cys、同型 Cys、Glu、Gly、Lys、Orn、Ser、Thr、-NHCH(CH₂)_mNH₂)CO-或-NHCH[(CH₂)_nCO₂H]CO-;

A₃₁ 为 Ile 或 Leu 或 Val 或其等同的氨基酸;

A₃₂ 为 His 或其等同的氨基酸;

A₃₃ 为 Asn 或 Thr 或其等同的氨基酸;

A₃₄ 为 Ala 或 Phe 或其等同的氨基酸;

A₃₅ 不存在或为 1-4 个氨基酸的肽; 和

至少一个下面的氨基酸残基对的侧链经酰胺键、酯键、二硫键或羊毛硫氨酸键连接形成一个桥, 这些氨基酸残基对为 A₁₀ 与 A₁₄、A₁₃ 与 A₁₇、A₁₄ 与 A₁₈、A₁₇ 与 A₂₁、A₁₈ 与 A₂₂、A₂₁ 与 A₂₅、A₂₅ 与 A₂₉ 和 A₂₆ 与 A₃₀, 并且下面各个氨基酸残基的侧链最多导致形成一个桥, 这些氨基酸残基为 A₁₀、A₁₃、A₁₄、A₁₇、A₁₈、A₂₁、A₂₂、A₂₅、A₂₆、A₂₉ 和 A₃₀; 条件是当下面的氨基酸残基对 A₁₃ 与 A₁₇ 或 A₂₆ 与 A₃₀ 的侧链经酰胺键、二硫键或羊毛硫氨酸键连接形成一个桥时, 至少一个下面的氨基酸残基对 A₁₀ 与 A₁₄、A₁₄ 与 A₁₈、A₁₇ 与 A₂₁、A₁₈ 与 A₂₂、A₂₁ 与 A₂₅ 和 A₂₅ 与 A₂₉ 的侧链也经酰胺键、酯键、二硫键或羊毛硫氨酸键连接。

式 I 的肽化合物的一个优选亚组包括如下肽化合物, 其中:

X 选自

(a) R_{1a}-A₀-A₁-A₂-A₃-A₄-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-,

(b) R_{1a}-A₂-A₃-A₄-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-,

(c) R_{1b}-A₃-A₄-A₅-A₆-A₇-A₈-A₉-,

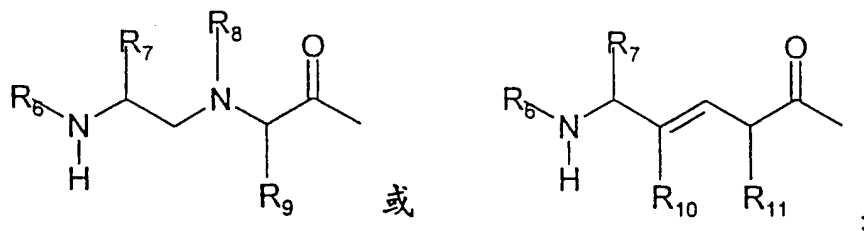
- (d) $R_{1a}-A_4-A_5-A_6-A_7-A_8-A_9-$,
 (e) $R_{1a}-A_5-A_6-A_7-A_8-A_9-$,
 (f) $R_{1a}-A_6-A_7-A_8-A_9-$,
 (g) $R_{1a}-A_7-A_8-A_9-$,
 (h) $R_{1a}-A_8-A_9-$,
 (i) $R_{1a}-A_9-$, 和
 (j) $R_{1a}-$;

Y 选自

- (a) $-R_3$,
 (b) $-A_{28}-R_3$,
 (c) $-A_{28}-A_{29}-R_3$,
 (d) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-R_3$,
 (e) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-R_3$,
 (f) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-A_{32}-R_3$,
 (g) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-A_{32}-A_{33}-R_3$, 和
 (h) $-A_{28}-A_{29}-A_{30}-A_{31}-A_{32}-A_{33}-A_{34}-R_3$;

R_{1a} 为 H、烷基、芳烷基或 $-COR_2$;

R_{1b} 为 R_{1a} 或式



R_2 为烷基、链烯基、炔基、芳基或芳烷基;

R_3 为式 $A_{35}-OR_4$ 或 $A_{35}-NR_4R_5$;

- R_4 和 R_5 彼此独立地为 H 或低级烷基;
- R_6 和 R_9 彼此独立地为 H 或烷基;
- R_7 为烷基;
- R_8 为 H、烷基或 COR_2 ;
- R_{10} 为 H 或卤素;
- R_{11} 为烷基或芳烷基;
- A_0 不存在或为 1-6 个氨基酸残基的肽;
- A_1 为 Ser、Ala、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸;
- A_2 为 Ala、Val 或 Gly 或其等同的氨基酸;
- A_3 为 Ala、Ser、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸;
- A_4 为 Glu、Ala 或 Gly 或其等同的氨基酸;
- A_5 为 Ile、His、Ala 或 Gly 或其等同的氨基酸;
- A_6 为 Ala、Gln、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸;
- A_7 为 Ala、Leu、Gly 或其等同的氨基酸;
- A_8 为 Leu、Nle、Gly 或 D-Pro 或其等同的氨基酸;
- A_9 为 His、Ala、Gly、D-Pro 或其等同的氨基酸;
- A_{10} 为 Ala、Asn、Gly、Asp 或 D-Pro 或其等同的氨基酸;
- A_{11} 为 Ala、Gly、Leu 或 Lys 或其等同的氨基酸;
- A_{12} 为 Ala 或 Gly 或其等同的氨基酸;
- A_{13} 为 Ala、Gly、Lys 或其等同的氨基酸;
- A_{14} 为 Ala、His、Asp、Gly、Lys、Ser、D-Pro 或其等同的氨基酸;
- A_{15} 为 Ala、Gly、Ile、D-Pro 或 Leu 或其等同的氨基酸;
- A_{16} Asn、Ala、Gly、D-Pro 或 Gln 或其等同的氨基酸;
- A_{17} 为 Ala、Asp、Gly、Lys、Ser、D-Pro 或其等同的氨基酸;
- A_{18} 为 Lys 或其等同的氨基酸;
- A_{19} 为 Arg 或 Glu 或其等同的氨基酸;
- A_{20} 为 Arg 或其等同的氨基酸;
- A_{21} 为 Arg、Asp、Lys、Val 或其等同的氨基酸;
- A_{22} 为 Asp、Glu、Lys、Orn 或其等同的氨基酸;

- A₂₃ 为 Leu、Phe 或 Trp 或其等同的氨基酸；
A₂₄ 为 Leu 或其等同的氨基酸；
A₂₅ 为 Arg、Asp、Glu、His、Lys 或其等同的氨基酸；
A₂₆ 为 His、Lys 或其等同的氨基酸；
A₂₇ 为 Leu 或 Lys 或其等同的氨基酸；
A₂₈ 为 Ile 或 Leu 或其等同的氨基酸；
A₂₉ 为 Ala、Asp、Glu、Gln 或其等同的氨基酸；
A₃₀ 为 Asp、Glu、Lys 或其等同的氨基酸；
A₃₁ 为 Ile 或 Leu 或 Val 或其等同的氨基酸；
A₃₂ 为 His 或其等同的氨基酸；
A₃₃ 为 Asn 或 Thr 或其等同的氨基酸；
A₃₄ 为 Ala 或 Phe 或其等同的氨基酸；
A₃₅ 不存在或为 1-4 个氨基酸的肽。

上述肽化合物公开于 WO 98/51324，它们具有有用的特性，更具体地说为药理学特性。它们特别适用于治疗能够通过可与甲状旁腺激素受体结合的伴随或不伴随刺激腺苷酸环化酶活性的化合物来调节的疾病。本发明涉及合成这些肽化合物的改进的方法。

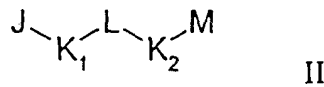
环状肽的固相合成通常包括，在肽合成树脂上顺次加成氨基酸以得到与树脂结合的具有所需环肽的全部或部分氨基酸序列的肽。然后将准备环化的氨基酸侧链残基脱保护并进行环化。如果环化在整个氨基酸序列完成之前进行，则加入剩余的氨基酸，然后将完成了的肽从树脂上裂解并进行纯化。

但是，制备肽和环肽的线性方法通常不很有效，因此在大量制备肽时成本很高。当以线性方式装配肽时，随着肽中氨基酸残基数量的增加，肽的纯化会越来越困难。此外，对于环肽，在合成接近结束时制备侧链桥将会给整个肽带来与制备侧链桥有关的问题，包括收率低、副反应和杂质的去除。因此，在长肽中掺入环状单元增加了直链肽合成的难度。上文中所描述的公开于 WO 98/51324 中的那些环状 hPTH 类似物的商业可行性合成需要克服了长的和环状成分的复杂因

素，并且就药物生产而言能够进行商业有用量的制备的合成方法。本发明涉及通过使用桥接和非桥接片段的方法更有效地制备环状 hPTH 和 HRPHeP 类似物。

发明概述

本发明涉及制备下式的环状 hPTH 和 HRPHeP 类似物的方法



其中

J、L 和 M 是线性肽片段，

K₁ 不存在或为环状肽片段，且

K₂ 是环状肽片段；

该方法包括如下步骤：

(1) 通过向树脂上顺次连接适宜保护的氨基酸残基制备 M—(R)，制得：



其中 (R) 是适宜的肽合成树脂，M 是多肽片段；

(2) 通过常规的肽合成单独制备式 IV 的 N-末端保护的环状多肽片段



其中 P 是适宜的胺保护基，

(3) 将 III 与 IV 偶联得到式 V 的肽

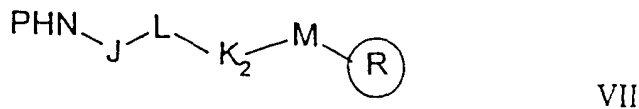


(4) 如果 K₂ 不存在，则 (a) 以式 VI 的单个多肽的形式制备多肽片段 J 和

L



然后将多肽 VI 与肽 V 偶联得到式 VII 的肽



或者, 选择性地, (b) 向式 V 的肽片段中顺次加入多肽 J 和 L 的保护了的单个氨基酸单元,

或者, 选择性地, (c) 以多肽片段的形式单独制备 J 和/或 L, 并偶联到从式 V 的片段开始的正在延伸的肽上,

(5) 当存在环肽 K_1 时, 则 (a) 通过常规的肽合成方法单独制备式 VIII 的多肽片段



其中 P 是适宜的胺保护基,

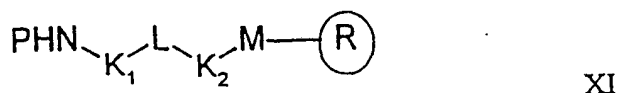
(b) 制备式 IX 的肽片段



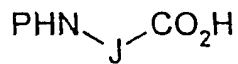
并与肽片段 V 偶联得到式 X 的肽片段



(c) 将环状肽片段 VIII 与式 X 的肽片段偶联得到式 XI 的肽片段



(d)制备式 XII 的肽片段



XII

并将片段 XII 与片段 XI 偶联，然后
(6)将树脂裂解并脱保护。

在本文所述的方法中，单独制备环状肽片段用于和树脂或与树脂结合的肽偶联。通过单独制备环状肽片段，可以进行与树脂结合的环肽的会聚合成，从而提高了所生成的环肽的收率和产量。与制备桥接片段有关的困难被局限在了较小的肽亚单位，所述肽亚单位可以在和固相合成树脂偶联之前进行纯化。该技术在某些优选的 hPTH 和 hPTHrP 类似物中的实践需要合成新的肽片段和新的操作顺序。

发明详述

若无另外说明，如上面以及整个说明书所使用的下列术语将被理解为具有下面的含义。

术语的定义

“烷基”指链中含有约 1-约 20 个碳原子的直链或支链脂族烃基团。支链指一个或多个低级烷基基团与直链烷基链相连。“低级烷基”指在可为直链或支链的链中含有约 1-4 个碳原子。烷基基团实例为甲基、乙基、正丙基和异丙基、正、仲、异和叔丁基等。

“链烯基”指包含碳-碳双键的脂族烃基基团，其可为在链中含有约 2-约 20 个碳原子的直链或支链。“低级链烯基”指在可为直链或支链的链中含有约 2-4 个碳原子。作为实例的链烯基基团包括乙烯基、丙烯基、正丁烯基、异丁烯基、3-甲基丁-2-烯基、正戊烯基、庚烯基、

辛烯基、环己基丁烯基和癸烯基。

“炔基”指包含碳-碳三键的脂族烃基基团，其可为在链中含有约2-约20个碳原子的直链或支链。“低级炔基”指在可为直链或支链的链中含有约2-4个碳原子。作为实例的炔基基团包括乙炔基、丙炔基、正丁炔基、3-甲基丁-2-炔基、正戊炔基、庚炔基、辛炔基和癸烯基。

“亚烷基”指通过除去两个氢原子而从直链或支链饱和烃衍生的二价基团，例如亚甲基、1,2-亚乙基、1,1-亚乙基、1,3-亚丙基、2,2-二甲基亚丙基等。

“苯基烷基”指经亚烷基与母体分子部分相连的苯基。亚烷基优选含有约1至约7个碳原子。代表性的苯基烷基包括苄基、2-苯基乙基、2-苯基丙基等。

“胺保护基”指本领域已知的易于除去的基团，该基团可以防止氨基在合成过程中发生不利的反应并且可以被选择性地除去。N-保护基的使用是防止基团在合成过程中发生不利反应的本领域中熟知的，并且许多这种保护基是已知的，参见，例如 T.H. Greene 和 P.G.M Wuts, 有机合成中的保护基，第2版，John Wiley & Sons, New York (1991)，该文献引入本文作为参考。优选的 N-保护基是酰基，包括甲酰基、乙酰基、氯乙酰基、三氯乙酰基、邻-硝基苯乙酰基、邻-硝基苯氧基乙酰基、三氟乙酰基、乙酰乙酰基、4-氯丁酰基、异丁酰基、邻-硝基硝基肉桂酰基、吡啶甲酰基、酰基异硫氰酸酯、氨基己酰基、苯甲酰基等，以及酰氧基，包括甲氧羰基、9-苄基甲氧羰基、2,2,2-三氟乙氧羰基、2-三甲基硅烷基乙氧羰基、乙烯氧羰基、烯丙氧羰基、叔丁氧羰基(BOC)、1,1-二甲基丙炔氧羰基、苄氧羰基(CBZ)、对-硝基苯基亚磺酰基、对-硝基苄氧羰基、2,4-二氯苄氧羰基、烯丙氧羰基(Alloc)等。

“氨基酸”指如本文所定义的选自天然和非天然氨基酸的氨基酸。取决于侧链的取代基，氨基酸可为中性、带正电或带负电。“中性氨基酸”指包含不带电荷的侧链取代基的氨基酸。作为实例的中性氨基酸包括丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和半胱氨酸。“带正电

的氨基酸”指在生理 pH 下侧链取代基带正电的氨基酸。作为实例的带正电的氨基酸包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸。“带负电的氨基酸”指在生理 pH 下侧链取代基带净负电的氨基酸。作为实例的带负电的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。优选的氨基酸为 α -氨基酸。最优的氨基酸为在 α -碳原子上具有 L-立体化学的 α -氨基酸。

“氨基酸残基”指掺入到肽或肽片段中的各氨基酸单元。

“天然氨基酸”指选自丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、甲硫氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的 α -氨基酸。

“非天然氨基酸”指没有核酸密码子的氨基酸。非天然氨基酸的实例包括例如上述天然 α -氨基酸的 D-异构体; Aib(氨基丁酸)、bAib(3-氨基异丁酸)、Nva(正缬氨酸)、 β -Ala、Aad(2-氨基己二酸)、bAad(3-氨基己二酸)、Abu(2-氨基丁酸)、Gaba(γ -氨基丁酸)、Acp(6-氨基己酸)、Dbu(2,4-二氨基丁酸)、 α -氨基庚二酸、TMSA(三甲基硅基-Ala)、alle(别异亮氨酸)、Nle(正亮氨酸)、叔亮氨酸、Cit(瓜氨酸)、Orn、Dpm(2,2'-二氨基庚二酸)、Dpr(2,3-二氨基丙酸)、 α -或 β -Nal、Cha(环己基-Ala)、羟基脯氨酸、Sar(肌氨酸)等; 环状氨基酸; N^{α} -烷基化的氨基酸, 如 MeGly(N^{α} -甲基甘氨酸)、EtGly(N^{α} -乙基甘氨酸)和 EtAsn(N^{α} -乙基天冬酰胺); 和 α 碳原子具有两个侧链取代基的氨基酸。

“等同的氨基酸”指在根据本发明的肽中可被另一个氨基酸替换而没有任何显著的功能丧失的氨基酸。在进行这些改变中, 根据侧链取代基的相对相似性进行类似氨基酸的替换, 例如考虑如本文所描述的大小、电荷、亲水性、hydropathicity 和疏水性。

如被本文引作参考的美国专利号 4,554,101 所详细描述, 氨基酸残基被确定具有下面的亲水性值: Arg(+3.0); Lys(+3.0); Asp(+3.0); Glu(+3.0); Ser(+0.3); Asn(+0.2); Gln(+0.2); Gly(0); Pro(-0.5); Thr(-0.4); Ala(-0.5); His(-0.5); Cys(-1.0); Met(-1.3); Val(-1.5); Leu(-1.8); Ile(-1.8); Tyr(-2.3); Phe(-2.5)和 Trp(-3.4)。应理解一个氨基酸残基可替换具有类

似亲水性值的另一个氨基酸(例如在+或-2.0 的值之间), 并且仍获得生物学等同的多肽。

用类似的方法, 可根据亲水性指数的相似性进行替换。根据其疏水性和电荷特性各氨基酸残基被确定了一个亲水性值。那些亲水性指数为: Ile(+4.5); Val(+4.2); Leu(+3.8); Phe(+2.8); Cys(+2.5); Met(+1.9); Ala(+1.8); Gly(-0.4); Thr(-0.7); Ser(-0.8); Trp(-0.9); Tyr(-1.3); Pro(-1.6); His(-3.2); Glu(-3.5); Gln(-3.5); Asp(-3.5); Asn(-3.5); Lys(-3.9)和 Arg(-4.5)。在根据亲水性指数进行替换中, 优选+或-2.0 之间的值。


“肽”和“多肽”指单体为经酰胺键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。本发明优选的肽化合物为包含 α -氨基酸的那些。首选的本发明的肽含有在 α -碳具有L立体化学的 α -氨基酸。

“环肽”指含有一个或多个本文所定义的环肽片段的肽。

“肽片段”指母肽的肽亚单位。肽片段可以包括靶肽的直链的、支链的或环状的亚单位。

“直链的肽”指其中的氨基酸是通过一个氨基酸的N-末端与另一个氨基酸的C-末端之间的酰胺键彼此连接的肽或多肽。

“支链的肽”指其中的一个或多个带有羧基或胺侧链的组成氨基酸通过这些侧链与其它肽取代基连接的肽或多肽。

“环状肽片段”指本文所定义的肽片段, 其中, 一个氨基酸残基上的取代基与肽片段中另一个氨基酸残基上的取代基相连。连接优选是在肽片段中的两个氨基酸残基的侧链之间, 优选通过酯键、酰胺键、二硫键或羊毛硫氨酸键连接。两个氨基酸侧链之间的键在此指定为 。

连接环肽的两个氨基酸残基的酯键、酰胺键、二硫键或羊毛硫氨酸键在侧链功能基之间形成。因此, 酰胺键在酸性氨基酸残基的侧链羧基和碱性氨基酸残基的侧链氨基之间形成; 酯键在酸性氨基酸残基的侧链羧基和含羟基氨基酸残基的侧链羟基之间形成; 二硫键由含有侧链巯基的氨基酸残基形成; 羊毛硫氨酸桥通过将相应的二硫化物脱硫形成。

由按照以上描述形成的酰胺键、酯键、二硫键或羊毛硫氨酸键所产生的桥中的原子数量将根据侧链的长度和键的类型(即酰胺键、酯键、二硫键或羊毛硫氨酸键)而改变。所述的桥优选含有 2-12 个原子,更优选 6-10 个原子。桥中所含原子的最优选的数量为 7,该桥优选含有 Lys 和 Asp 残基的侧链功能基之间的酰胺键。

“树脂”指用活泼基团修饰的固体载体,从而该固体载体可以和本文所定义的氨基酸、肽或环肽片段的羧基或 N-末端偶联。代表性的树脂包括 Merrifield 树脂(氯甲基化的聚苯乙烯)、羟甲基树脂、2-氯三苯甲基氯化物树脂、三苯甲基氯化物树脂、Rink 酸树脂(4-苄氧基-2',4'-二甲氧基二苯基甲醇树脂)、三苯甲醇树脂、PAM 树脂(4-羟基甲基-苯基乙酰氨基甲基树脂)、Wang 树脂(对-苄氧基苄醇树脂)、MBHA 树脂(对-甲基二苯基胺树脂)、BHA 树脂(二苯基胺树脂)、Rink 酰胺树脂(4-(2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基甲基)苄氧基树脂)和 PAL 树脂(5-(4-Fmoc-氨基甲基-3,5-二甲氧基苯氧基)戊酸-MBHA 树脂)。优选的树脂是氯代三苯甲基树脂、Rink 酸树脂和 Rink 酰胺树脂。

“固体载体”指对本文所述的反应物和反应条件呈惰性,并且在所用的溶媒中基本不溶的底物。代表性的固体载体包括无机底物如硅藻土、硅胶和可控孔度玻璃;有机聚合物,包括聚苯乙烯,包括 1-2% 共聚苯乙烯二乙烯基苯(凝胶形式)和 20-40% 共聚苯乙烯二乙烯基苯(大孔形式)、聚丙烯、聚乙二醇、聚丙烯酰胺、纤维素等;复合无机/聚合物组合物如固定在硅藻土颗粒基质内聚丙烯酰胺。参见, J.M. Stewart 和 J.D. Young, 固相肽合成, 第 2 版, Pierce Chemical Co. (Chicago, IL, 1984)。

此外,“固体载体”还包括固定在第二种惰性载体上的上述固体载体,所述第二种惰性载体是,例如技术手册, MultipinTM SPOC, Chiron Technologies(1995)和其中的参考文献中所描述的针,所述的针含有基于聚乙烯或聚丙烯的接有氨基功能基化的甲基丙烯酸酯共聚物的可检测的头和惰性的干。

此外,“固体载体”还包括聚合物载体,例如 Janda 等,美国国

家科学院院报, 92, 6419-6423(1995)和 S. Brenner, WO 95/16918 中记载的聚乙二醇载体, 该载体可溶于多种溶剂, 但可以通过加入导致沉淀的溶剂析出沉淀。

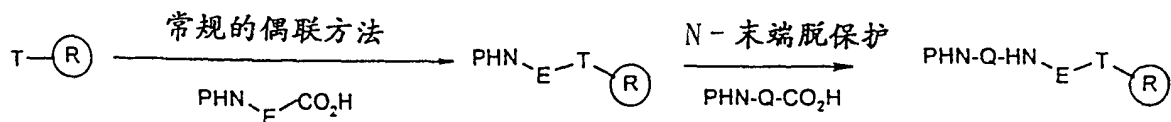
本文使用的天然和非天然氨基酸和其残基的名称遵循由 IUPAC 有机化学命名委员会建议的和 IUPA-IUB 生物化学命名委员会在“ α -氨基酸命名法(推荐, 1974)”生物化学, 14(2), (1975)中提出的命名规则。鉴于用于本发明说明书和所附权利要求中的氨基酸和其残基的命名和缩写不同于所述的那些, 不同的名称和缩写将使所述内容变得清楚。

如本发明方法中制备的代表性的肽化合物指例如环(Lys¹⁸-Asp²²)[Ala¹, Nle⁸, Lys¹⁸, Asp²², Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂, 相连的氨基酸残基位于“环”后面的圆括号中, 取代的天然序列的氨基酸放置在方括号中。hPTH 代表人 PTH, PTHrP 代表人甲状旁腺激素相关蛋白。第二个圆括号中的数字指从 N 末端开始氨基酸残基在肽化合物中的数目(即 hPTH 的前 31 个氨基酸)。

优选的实施方案

如反应方案 1 所示, 与树脂结合的环肽的制备涉及将环状和无环的肽片段与树脂、树脂结合的氨基酸或树脂结合的肽偶联。

反应方案 1



(R)是适于肽合成的树脂。

T 是 H₂N、氨基酸或环状或无环的肽;

E 和 Q 均是或彼此独立地是 N 末端保护的氨基酸, 或 N 末端保护的环状或无环的肽片段。

偶联优选在肽片段的羧基末端和树脂、树脂结合的氨基酸或树脂

结合的肽之间完成。当肽片段与树脂结合的氨基酸或肽偶联时，偶联优选通过环肽片段的羧基末端和与树脂结合的氨基酸或肽的 N 末端之间的酰胺键来完成。

为了使偶联反应进行，必需将肽片段的羧基活化。有多种活化方法可用于本发明的实践，包括，例如预形成的对称酸酐(PSA)、预形成的混合酸酐(PMA)、酰氯、活泼酯；以及将羧酸就地活化的方法，参见 Fields & Noble, 1990, “利用 9-苄基甲氧羰基氨基酸进行固相肽合成”，国际肽与蛋白质研究杂志(Int. J. Pept. Protein Res.), 35: 161-214。

代表性的活化试剂包括，氯甲酸异丙酯、二异丙基碳二亚胺(DIC)、DIC 与 1-羟基苯并三唑(HOBT)的混合物、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、二(2-氧代-3-恶唑烷基)磷酰氯(BOP-Cl)、苯并三唑-1-基氧基-三((二甲氨基)磷)六氟磷酸盐(BOP)、苯并三唑-1-基氧基-三-吡咯烷基-磷六氟磷酸盐(PyBOP)、溴代-三-吡咯烷基-磷六氟磷酸盐(PyBROP)、O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HATU)、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓四氟硼酸盐(TBTU)、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)、2-[2-氧代-1-(2H)-吡啶基]-1,1,3,3-二亚戊基脲鎓四氟硼酸盐(TOPPipU)、N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、DCC 与 HOBT 的混合物等。用于偶联反应的适宜溶剂包括二氯甲烷、DMF、DMSO、甲苯、THF 等。偶联时间为约 1 至约 48 小时，这取决于待偶联的树脂和羧酸衍生物、活化试剂、溶剂和温度。偶联在约 -10℃ 至约 50℃ 下进行，优选在大约室温下进行。

为了防止干扰上述的偶联反应，将环肽部分的 N 末端用对酸或碱敏感的基团保护。所述保护基应当在酰胺键形成的条件下是稳定的，同时又很容易被除去而不会破坏伸长的肽链，或使其中所含的任何手性中心外消旋化。适宜的保护基是 9-苄基甲氧羰基(Fmoc)、叔丁氧羰基(Boc)、苄氧羰基(Cbz)、二苄基异丙氧羰基、叔戊氧羰基、异冰片基氧羰基、(α,α)二甲基-3,5-二甲氧基苄氧羰基、邻硝基苯基亚磺酰基、2-氟基-叔丁氧羰基等。优选 9-苄基甲氧羰基(Fmoc)保护基。

同样，对环肽片段中的活泼侧链功能基也需要进行保护。特别优选的侧链保护基是，对于赖氨酸和精氨酸的侧链氨基基团为：2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基(pmc)、硝基、对甲苯磺酰基、4-甲氧基苯基磺酰基、Cbz、Boc、Alloc(烯丙基氧羰基)和金刚烷基氧羰基；对于酪氨酸：苄基、邻溴苄基氧羰基、2,6-二氯苄基、异丙基、叔丁基(t-Bu)、环己基、环戊基和乙酰基(Ac)；对于丝氨酸：叔丁基、苄基和四氢吡喃基；对于组氨酸：三苯甲基、苄基、Cbz、对甲苯磺酰基和2,4-二硝基苯基；对于色氨酸：甲酰基和Boc；对于天冬酰胺和谷氨酰胺：Trt(三苯甲基)；对于天冬氨酸和谷氨酸：O-t-Bu和O-烯丙基和O-苄基。

片段与树脂或树脂结合肽的偶联优选在约室温下、用约2摩尔当量(相对于树脂)Fmoc-保护的、用约等摩尔量的苯并三唑基氧基-三[吡咯烷基]-磷六氟乙酸盐(PyBOP)和羟基苯并三唑水合物活化的环肽片段在约4当量二异丙基乙基胺的存在下在二甲基甲酰胺中于约16-48小时内完成。

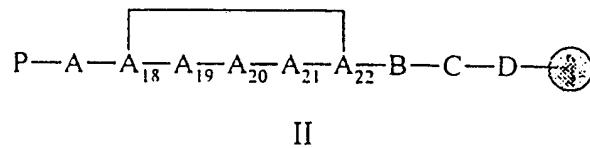
必需对偶联的完成程度进行评估。本领域技术人员对于公知的监测试验是熟知的，例如茚三酮(Kaiser试验)、苦味酸、2,4,6-三硝基-苯磺酸(TNBS)、荧光胺和氯醌试验，这些试验是基于试剂与游离氨基反应生成发色化合物。如果使用亚氨基酸(例如Pro和Hyp)，优选的方法是靛红监测。Fields & Noble, 文献出处同上。在反应过程中可以对反应的完成程度进行定量，参见，例如Salisbury等(国际专利公开文本WO 91/03485)。

对于Fmoc合成，优选Kaiser和TNBS试验。在Kaiser试验中，可以将树脂肽样品用来自Pierce Chemical的茚三酮试剂按照Sarin等提出的方法(1981, 分析生物化学, 117: 147-157)进行试验。同样，也可将树脂肽样品用可从Fluka获得的三硝基苯磺酸(TNBS)按照Takajashi提出的方法(1984, 化学通讯, 1: 127)进行试验。

如果有试验表明偶联反应未完成，则可以通过本领域技术人员熟知的多种方法强行使反应结束，包括，(a)用1-5倍过量的保护的氨基

酸重复进行偶联, (b)用不同的或添加的溶剂(例如三氟乙烷)重复进行偶联, 或者 (c)加入离液序列高的盐如 NaClO_4 或 LiBr (Klis & Stewart, 1990, “肽: 化学, 结构和生物学”, Rivier & Marshall 编, ESCOM Publ., p. 904-906).

优选的树脂结合环肽片段具有式 II 的结构:



其中

⊙ 是树脂;

P 是胺保护基;

A 不存在或是式 $\text{---A}_{13}-\text{A}_{14}-\text{A}_{15}-\text{A}_{16}-\text{A}_{17}$ 的基团;

B 是式 $-\text{A}_{23}-\text{A}_{24}-\text{A}_{25}$ 的基团;


C 是式 $-\text{A}_{26}-\text{A}_{27}-\text{A}_{28}-\text{A}_{29}-\text{A}_{30}$ 的基团;

D 是 $-\text{A}_{31}$ 、 $-\text{A}_{31}-\text{A}_{32}$ 、 $-\text{A}_{31}-\text{A}_{32}-\text{A}_{33}$ 或 $-\text{A}_{31}-\text{A}_{32}-\text{A}_{33}-\text{A}_{34}$;


其中

□ 是内酰胺、酯、二硫化物或羊毛硫氨酸桥; A_{13} 、 A_{17} 、 A_{18} 和 A_{22} 是氨基酸残基; A_{14} 是 His(Trt)或 Ser(tBu); A_{15} 和 A_{28} 彼此独立地是 Ile 或 Leu; Ser(tBu)或 Leu; A_{16} 是 Asn(Trt)或 Gln(Trt); A_{19} 是 Arg(Pmc)或 Glu(OtBu); A_{20} 是 Arg(Pmc); A_{21} 是 Arg(Pmc)或 Val; A_{23} 是 Phe 或 TrP(Boc); A_{24} 是 Leu; A_{25} 是 Arg(Pmc)或 His(Trt); A_{26} 和 A_{30} 是氨基酸残基, 其中 A_{26} 和 A_{30} 的侧链选择性地通过酰胺、二硫化物或羊毛硫氨酸键结合; A_{27} 是 Leu 或 Lys(Boc); A_{29} 是 Ala 或 Gln(Trt); A_{31} 是 Ile 或 Val; A_{32} 是 His(Trt); A_{33} 是 Asn(Trt)或 Thr(tBu); A_{34} 是 Ala 或 Phe.

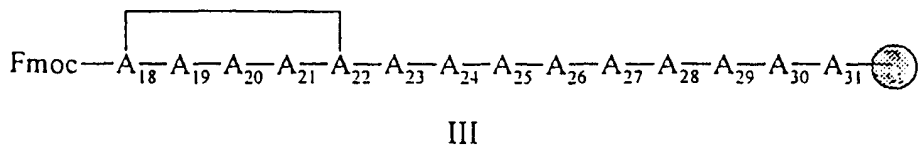
另一种优选的树脂结合环肽片段具有式 II 的结构, 其中,

 是内酰胺桥，并且 A₂₆ 和 A₃₀ 的侧链选择性地通过酰胺键结合。

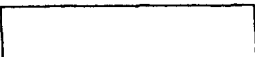
另一种优选的树脂结合环肽具有式 II 的结构，其中，

 是内酰胺桥；A₁₃ 和 A₁₈ 是 Lys；A₁₇ 和 A₂₂ 是 Asp；A₂₆ 是 Lys(Boc)；A₃₀ 是 Asp(OtBu)；或者 A₂₆ 和 A₃₀ 的侧链选择性地通过酰胺键结合。

另一种优选的树脂结合环肽片段具有式 III 的结构



其中，

 是内酰胺桥；
A₁₈ 是 Lys；A₁₉ 是 Glu(OtBu)；A₂₀ 是 Arg(Pmc)；A₂₁ 是 Val；A₂₂ 是 Asp；A₂₃ 是 Trp(Boc)；A₂₄ 是 Leu；A₂₅ 是 Arg(Pmc)；A₂₆ 是 Lys(Boc)；A₂₇ 是 Leu；A₂₈ 是 Leu；A₂₉ 是 Gln(Trt)；A₃₀ 是 Asp(OtBu)；A₃₁ 是 Val。

按照以上描述制得的树脂结合肽还可以进行进一步的加工，例如与一个或多个另外的环肽片段偶联、与一个或多个肽片段偶联、顺次加成单个的氨基酸或以上描述的各种组合。

然后将完成的环肽从树脂上裂解并纯化。可以在从树脂上裂解之前、之后或同时除去保护基。可将完全脱保护的肽通过以下方法之一或其组合进行纯化：酸-碱提取、重结晶、冷冻干燥、采用以下类型之一或其全部的一系列色谱步骤：在乙酸盐形式的弱碱性树脂上进行离子交换；在未衍生化的聚苯乙烯-二乙烯基苯(例如 AMBERLITE® XAD)上进行疏水性吸附色谱；硅胶吸附色谱；在羧甲基纤维素上进行离子交换色谱；在例如 SEPHADEX® G-25、LH-20 上进行分配色谱或进行逆流分配；高效液相色谱(HPLC)、特别是在辛基-或十八烷基硅烷基-硅胶结合相柱填料上进行反相 HPLC。

肽片段的制备

所述片段通过合成肽主链进行制备，所述肽主链使构成片段的氨基酸以其适当的顺序装配。片段的肽主链可以通过本领域技术人员已知的各种方法进行合成。对于固相肽合成，多种技术的综述可以参见 J.M. Stewart 和 J.D. Young, 固相肽合成, W.H. Freeman Co. (San Francisco), 1963 和 J. Meienhofer, 激素蛋白和肽, 第 2 卷, 46 页, Academic Press (New York), 1973. 对于经典的溶液合成, 可以参见 G. Schroder 和 K. Lupke, 肽, 第 1 卷, Academic Press (New York), 1965.

正如本领域普通技术人员所知的, 在固体载体上进行肽合成通常涉及从羧基或 C-末端开始构建肽, 其中, α -氨基被保护了的 C-末端氨基酸与固相聚合物相连。然后裂解掉 N-保护基, 将同样是 N-保护的下一个氨基酸通过与连接在上述固体载体上的氨基酸之 α -氨基之间的肽键偶联。重复前一氨基酸的脱保护和下一氨基酸的偶联的循环, 直至肽完成。将氨基酸的所有活泼侧链通过能够经受得住偶联和 N^α -脱保护过程但可以在合成结束时被除去的化学基团进行保护。当用固相方法制备肽片段时, 通过从树脂上裂解得到用于与其它片段偶联的片段。

环肽片段按照类似的方式制备。但是, 在主链装配后进行(1)将待环化的侧链功能基选择性地脱保护, (2)环化, 和(3)选择性地除去所有剩余的保护基。

使用 Fmoc 氨基酸是肽合成的一种策略。Boc(叔丁氧羰基保护的氨基)策略还可用于制备与固体载体结合的肽(例如 Geysen 等, 1987, 免疫学方法杂志 102:259-274.)。

用于肽合成的氨基酸可以是 Merrifield(1963, 美国化学会志 85: 2149-2154)所描述的常规的 Boc(N^α -氨基保护的 N^α -叔丁氧羰基)氨基酸, 或是 Carpino 和 Han (1972, 有机化学杂志 37:3403-3409)所描述的对碱不稳定的 9-芴基甲氧羰基(Fmoc)氨基酸。Fmoc 和 Boc N^α -氨基保护的氨基酸均可以从 Fluka、Bachem、Advanced Chemtech、Sigma、Cambridge Research Biochemical、Bachem 或 Peninsula Labs 或本领域

技术人员熟知的其它化学品公司得到。此外，本发明的方法也可以使用本领域技术人员熟知的其它 N^α -保护基。固相肽合成可以通过本领域技术人员熟知的方法完成(参见 Stewart 和 Young, 1984, 固相合成, 第 2 版, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; Fields 和 Noble, 1990, 国际肽、蛋白研究杂志, 35: 161-214), 或用例如 ABS 所售的自动合成仪合成。

尽管 C-末端至 N-末端肽合成是常规的, 但本领域技术人员可以理解, 也可以从 N-末端至 C-末端来合成肽片段。

内酰胺桥的制备

内酰胺桥接的环肽片段通过在以上所述的活化剂的存在下, 在酸性氨基酸残基的侧链羧基和碱性氨基酸残基的侧链氨基之间形成酰胺键制得。优选的酸性氨基酸残基包括 Asp、Glu、 $-NHCH[(CH_2)_3CO_2H]CO-$ 和 $-NHCH[(CH_2)_4CO_2H]CO-$ 。首选 Asp。优选的碱性氨基酸残基包括 His、Lys、Orn、 $-NHCH(CH_2NH_2)CO-$ 和 $-NHCH[(CH_2)_2NH_2]CO-$, 首选 Lys。

当环肽片段的肽前体含有一个以上的酸性或碱性氨基酸残基时, 应对环肽片段中其它的酸性或碱性氨基酸的保护基进行选择, 以便使待环化的氨基酸可以被选择性地脱保护。优选所需的酸性和碱性氨基酸残基同时被脱保护。此外, 除了对用于脱保护选定的碱性和酸性氨基酸残基所用的试剂稳定外, 其余氨基酸残基上的保护基还应对所用的环化条件是稳定的。

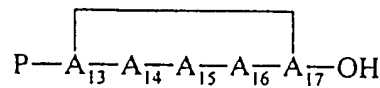
当用于指侧链保护基时, 术语“正交性”指如本文所述的在分子上具有两种或多种类型保护基, 每一种在特定的条件下被最佳地除去, 而同时对用来除去其它类型保护基的条件保持稳定的情况。因此, 可除去一种类型的所有保护基, 而保持所有其它保护基的完整性。

优选的具有所需正交性的保护基为: 对于待环化的酸性氨基酸残基: 烯丙基; 对于待环化的碱性氨基酸残基: 烯丙基氧羰基(alloc); 对于任何其它酸性氨基酸残基: 叔丁基(tBu); 对于任何其它碱性氨基酸

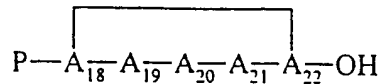
残基：叔丁基氧羰基(Boc)。

在用固相或液相技术合成了环肽片段的肽主链后，通过用钯，优选四(三苯基膦)钯(0)在 N-甲基苯胺的存在下处理，同时除去烯丙基和烯丙氧羰基保护基。接着如本文对酰胺键形成所描述的完成酰胺桥的形成。

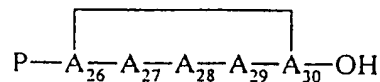
用于制备本发明的树脂结合环肽的优选的环肽片段具有式 XV、XVI 或 XVII 的结构，



XV



XVI



XVII

其中

$\overbrace{\hspace{10em}}$ 是内酰胺、二硫化物或羊毛硫氨酸桥；

P 是胺保护基；

A₁₃、A₁₇、A₁₈、A₂₂、A₂₆ 和 A₃₀ 是氨基酸残基；A₁₄ 是 His(Trt)或 Ser(tBu)；A₁₅ 是 Ser(tBu)或 Leu；A₁₆ 是 Asn(Trt)或 Gln(Trt)；A₁₉ 是 Arg(Pmc)或 Glu(OtBu)；A₂₀ 是 Arg(Pmc)；A₂₁ 是 Arg(Pmc)或 Val；A₂₇ 是 Leu 或 Lys(Boc)；A₂₈ 是 Ile 或 Leu；A₂₉ 是 Ala 或 Gln(Trt)。

更优选的环肽片段具有式 IV、V 或 VI 的结构，

其中

$\overbrace{\hspace{10em}}$ 是内酰胺桥；

P 是 Fmoc；

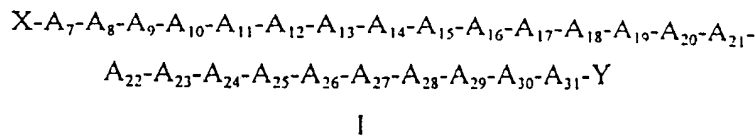
A₁₃、A₁₈和A₂₆是Lys; A₁₇、A₂₂和A₃₀是Asp; A₁₄是His(Trt)或Ser(tBu); A₁₅是Ser(tBu)或Leu; A₁₆是Asn(Trt)或Gln(Trt); A₁₉是Arg(Pmc)或Glu(OtBu); A₂₀是Arg(Pmc); A₂₁是Arg(Pmc)或Val; A₂₇是Leu或Lys(Boc); A₂₈是Ile或Leu; A₂₉是Ala或Gln(Trt)。

用于制备本发明的树脂结合环肽的仍更优选的环肽片段是 Fmoc-环(Lys-Asp)Lys-Glu(OtBu)-Arg(Pmc)-Val-Asp-OH。

适于用本发明的方法制备的环状肽甲状旁腺激素类似物和甲状旁腺激素相关蛋白类似物公开于:

1. Condon 等, U.S.系列号 60/046,472 (1997年5月14日申请);
2. Willick 等, U.S.专利号 5,556,940 (1997年9月17日);
3. Chorev 等, U.S.专利号 5,717,062(1998年2月10日);
4. Vickery 等, WO 96/40775 (1996年12月19日公开)。

适于用本发明的方法制备的优选的环肽具有式 I 的结构:



其中:

X 选自 (a) R_{1a}-A₁-A₂-A₃-A₄-A₅-A₆⁻, (b)R_{1b}-A₂-A₃-A₄-A₅-A₆⁻, (c)R_{1b}-A₃-A₄-A₅-A₆⁻, (d)R_{1b}-A₄-A₅-A₆⁻, (e)R_{1b}-A₅-A₆⁻, (f)R_{1b}-A₆⁻和(g)R_{1b}⁻, 其中 R_{1a}选自(1)H, (2)由1-6个氨基酸组成的肽, (3)烷基, (4)苯基烷基, (5)-COR₂, 其中 R₂选自烷基、链烯基、链炔基、苯基、萘基和苯基烷基, R_{1b}选自(1)H, (2)烷基, (3)苯基烷基和(4)-COR₂, 其中 R₂选自烷基、链烯基、链炔基、苯基、萘基和苯基烷基, A₁选自Ser和Ala或其等同的氨基酸残基, A₂、A₃、A₄和A₆是氨基酸残基, A₅选自Ile和His或其等同的氨基酸残基;

A₇、A₉、A₁₁和A₁₂是氨基酸残基;

A₈是Leu或Nle或其等同的氨基酸残基;

A₁₀是Asp或Asn或其等同的氨基酸残基;

A₁₃和A₁₇是氨基酸残基, 其中A₁₃和A₁₇的侧链通过酰胺键连接;

- A₁₄ 是 His 或 Ser 或其等同的氨基酸残基；
 A₁₅ 和 A₂₈ 彼此独立地是 Ile 或 Leu 或其等同的氨基酸残基；
 A₁₆ 是 Asn 或 Gln 或其等同的氨基酸残基；
 A₁₈ 和 A₂₂ 是氨基酸残基，其中 A₁₈ 和 A₂₂ 的侧链通过酰胺键连接；
 A₁₉ 是 Arg 或 Glu 或其等同的氨基酸残基；
 A₂₀ 是 Arg 或其等同的氨基酸残基；
 A₂₁ 是 Arg 或 Val 或其等同的氨基酸残基；
 A₂₃ 是 Phe 或 Trp 或其等同的氨基酸残基；
 A₂₄ 是 Leu 或其等同的氨基酸残基；
 A₂₅ 是 Arg 或 His 或其等同的氨基酸残基；
 A₂₆ 和 A₃₀ 是氨基酸残基，其中 A₂₆ 和 A₃₀ 的侧链通过酰胺键连接；
 A₂₇ 是 Leu 或 Lys 或其等同的氨基酸残基；
 A₂₉ 是 Ala 或 Gln 或其等同的氨基酸残基；
 A₃₁ 是 Ile 或 Val 或其等同的氨基酸残基；

Y 选自 (a) R₃, (b) A₃₂-R₃, (c) -A₃₂-A₃₃-R₃ 和 (d) -A₃₂-A₃₃-A₃₄-R₃-, 其中 R₃ 是 -OH 或 -NR₄R₅, 其中 R₄ 和 R₅ 彼此独立地选自氢和低级烷基, A₃₂ 是 His 或其等同的氨基酸残基, A₃₃ 是 Asn 或 Thr 或其等同的氨基酸残基, A₃₄ 是 Ala 或 Phe 或其等同的氨基酸残基。

式 I 的肽具有有用的药物特性。它们特别适用于治疗能够通过可与甲状旁腺激素受体结合的伴随或不伴随刺激 cAMP 酶活性的化合物来调节的疾病。参见 U.S. 系列号 60/046,472。

适于用本发明方法制备的代表性的优选环肽包括但不限于，

- 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,2},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,3},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,4},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,5},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,6},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,7},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,8},Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂

环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,10},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,11},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,12},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,13},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,14},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,15},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,16},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 二环 (Lys¹³-Asp¹⁷,Lys¹⁸-Asp²²)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp^{17,22},Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 二环 (Lys¹⁸-Asp²²,Lys²⁶-Asp³⁰)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-34)NH₂
 二环 (Lys¹³-Asp¹⁷,Lys¹⁸-Asp²²)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp^{17,22},Leu²⁷]hPTH(1-34)NH₂
 二环 (Lys¹⁸-Asp²²,Lys²⁶-Asp³⁰)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-34)NH₂
 环 (Lys^{18,4}-Asp²²)[Lys¹⁸,Asp²²]hPTHrP(1-34)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Lys^{18,26,30},Asp²²,Leu^{23,28,31},Glu^{25,29}]hPTHrP(1-34)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(7-34)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Lys¹⁸,Asp²²]hPTHrP(7-34)NH₂
 二环 (Lys¹³,Asp¹⁷,Lys¹⁸-Asp²²)[Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(7-34)NH₂, 和
 二环 (Lys¹⁸-Asp²²,Lys²⁶-Asp³⁰)[Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(7-34)NH₂.

适于用本发明方法制备的另一种优选的环肽具有式 I 的结构, 其中的氨基酸残基是在 α -碳上具有 L 立体化学的 α -氨基酸残基。

适于用本发明方法制备的另一种优选的环肽具有式 I 的结构, 其中的 X 选自 (a) R_{1a}-A₁-A₂-A₃-A₄-A₅-A₆⁻, 其中 R_{1a} 是 H 或 Pro, A₁ 是 Ser 或 Ala, A₂ 是 Val, A₃ 是 Ser, A₄ 是 Glu, A₅ 是 Ile 或 His, A₆ 是 Gln, (b) R_{1b}-A₂-A₃-A₄-A₅-A₆⁻, 其中 A₂、A₃、A₄、A₅ 和 A₆ 如上所定义, R_{1b} 是 H, (c) R_{1b}-A₃-A₄-A₅-A₆⁻, 其中 R_{1b}、A₃、A₄、A₅ 和 A₆ 如上所定义, (d) R_{1b}-A₄-A₅-A₆⁻, 其中 R_{1b}、A₄、A₅ 和 A₆ 如上所定义, (e) R_{1b}-A₅-A₆⁻, 其中 R_{1b}、A₅ 和 A₆ 如上所定义, (f) R_{1b}-A₆⁻, 其中 R_{1b} 和 A₆ 如上所定义,

(g) R_{1b} -, 其中 R_{1b} 如上所定义, A_7 是 Leu; A_8 是 Leu 或 Nle; A_9 是 His; A_{10} 是 Asp 或 Asn; A_{11} 是 Leu; A_{12} 是 Gly; A_{13} 、 A_{17} 、 A_{18} 、 A_{22} 和 A_{30} 彼此独立地选自 Ser、Thr、Lys、Cys、同型-Cys、Orn、Asp、Glu、-NHCH(CH₂NH₂)CO-、-NHCH[(CH₂)₂NH₂]CO-、-NHCH[(CH₂)₃]CO₂H]CO-和-NHCH[(CH₂)₄CO₂H]CO-; A_{14} 是 His 或 Ser; A_{15} 是 Ser 或 Leu; A_{16} 是 Asn 或 Gln; A_{19} 是 Arg 或 Glu; A_{20} 是 Arg; A_{21} 是 Arg 或 Val; A_{23} 是 Phe 或 Trp; A_{24} 是 Leu; A_{25} 是 Arg 或 His; A_{26} 是 His 或彼此独立地选自 Ser、Thr、Lys、Cys、同型-Cys、Orn、Asp、Glu、-NHCH(CH₂NH₂)CO-、-NHCH[(CH₂)₂NH₂]CO-、-NHCH[(CH₂)₃]CO₂H]CO-和-NHCH[(CH₂)₄CO₂H]CO-; A_{27} 是 Leu 或 Lys; A_{28} 是 Ile 或 Leu; A_{29} 是 Ala 或 Gln; A_{31} 是 Ile 或 Val; Y 选自(a)- R_3 , 其中 R_3 是-OH 或-NR₄R₅, 其中 R_4 和 R_5 彼此独立地选自氢和 1-4 个碳原子的烷基, (b)- A_{32} - R_3 , 其中 R_3 如上所定义, A_{32} 是 His, (c) - A_{32} - A_{33} - R_3 , 其中 R_3 和 A_{32} 如上所定义, A_{33} 是 Asn 或 Thr 和(d)- A_{32} - A_{33} - A_{34} , 其中 A_{34} 是 Ala 或 Phe。

适于用本发明方法制备的另一种优选的环肽具有式 I 的结构, 其中

- (i) A_{18} 和 A_{22} 的侧链通过酰胺键连接,
- (ii) A_{13} 和 A_{17} 的侧链通过酰胺键连接, 并且
 A_{18} 和 A_{22} 的侧链通过酰胺键连接,
- (iii) A_{18} 和 A_{22} 的侧链通过酰胺键连接, 并且
 A_{26} 和 A_{30} 的侧链通过酰胺键连接, 或
- (iv) A_{13} 和 A_{17} 的侧链通过酰胺键连接,
 A_{18} 和 A_{22} 的侧链通过酰胺键连接, 并且
 A_{26} 和 A_{30} 的侧链通过酰胺键连接。

适于用本发明的方法制备的另一种优选的环肽具有式 I 的结构, 其中 A_{13} 选自 Lys 和 Ala, A_{17} 选自 Ser 和 Asp, A_{18} 是 Lys, A_{22} 是 Asp, A_{26} 是 Lys, A_{30} 是 Asp。

适于用本发明的方法制备的另一种优选的环肽具有式 I 的结构, 其中 X 是 R_{1a} - A_1 - A_2 - A_3 - A_4 - A_5 - A_6 -。

适于用本发明的方法制备的另一种优选的环肽具有式 I 的结构, 其中 A₁ 是 Ala, A₈ 是 Nle, A₂₇ 是 Leu。

适于用本发明的方法制备的另一种优选的环肽具有式 I 的结构, 其中 R_{1a} 是 H, Y 是 NH₂。

适于用本发明的方法制备的另一种优选的环肽具有式 I 的结构, 其中 R_{1a} 是 H, Y 是 -A₃₂-A₃₃-A₃₄-NH₂。

适于用本发明的方法制备的另一种优选的环肽具有式 I 的结构, 其中 X 选自 (a)R_{1b}-A₂-A₃-A₄-A₅-A₆-, (b)R_{1b}-A₃-A₄-A₅-A₆-, (c)R_{1b}-A₄-A₅-A₆-, (d)R_{1b}-A₅-A₆-, (e)R_{1b}-A₆-和 (f)R_{1b}-。

适于用本发明的方法制备的另一种优选的环肽具有式 I 的结构, 其中 A₈ 是 Nle, A₂₇ 是 Leu。

适于用本发明的方法制备的另一种优选的环肽具有式 I 的结构, 其中 X 是 H, Y 是 -A₃₂-A₃₃-A₃₄-NH₂。

适于用本发明的方法制备的更优选的环肽选自

- 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,2},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,3},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,4},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,5},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,6},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,7},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,8},Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,10},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,11},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,12},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,13},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,14},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,15},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 环 (Lys¹⁸-Asp²²)[Ala^{1,16},Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 二环 (Lys¹³-Asp¹⁷,Lys¹⁸-Asp²²)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp^{17,22},Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂
 二环 (Lys¹⁸-Asp²²,Lys²⁶-Asp³⁰)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂

适于用本发明方法制备的仍更优选的环肽选自：

环(Lys¹⁸-Asp²²)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂

二环(Lys¹³-Asp¹⁷,Lys¹⁸-Asp²²)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp^{17,22},Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂

二环(Lys¹⁸-Asp²²,Lys²⁶-Asp³⁰)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂

适于用本发明方法制备的仍更优选的环肽是：

环(Lys¹⁸-Asp²²)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂.

参照以下实施例可以更好地理解以上的描述，给出这些实施例是为了说明，而并非想要限定本发明的范围。

实施例 1

环(Lys¹⁸-Asp²²)[Ala¹,Nle⁸,Lys¹⁸,Asp²²,Leu²⁷]hPTH(1-31)NH₂ 的制备

Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Nle-His-Asn-Leu-Gly-Lys-His-Leu-Asn-



Ser-Lys-Glu-Arg-Val-Asp-Trp-Leu-Arg-Lys-Leu-Leu-Gln-Asp-Val-NH₂

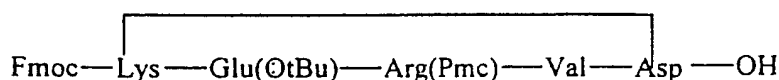
步骤 1:

Fmoc-Trp(Boc)-Leu-Arg(Pmc) -Lys(Boc)-Leu-Leu-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Val-NH-树脂

将 5g (0.64 mmole/g, 3.2 mmole)Rink Amide MBHA 树脂(0.5-0.7 毫当量/g 滴度, Nova Biochem, LaJolla, CA, 美国)通过振摇用 60mL 二甲基甲酰胺溶胀, 然后将树脂晾干并用每份 60mL 的二甲基甲酰胺洗涤两次。然后将树脂用 60mL 20%哌啶/二甲基甲酰胺处理 20 分钟除去 9-芴基甲氧羰基(FMOC), 然后将树脂用每份 60mL 的二甲基甲酰胺洗涤 4 次(TNBS: 阳性)。将 Fmoc-Val-OH(2.17g, 6.4mmole)和 2.43g (6.4mmole) O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐(HBTU)

的 150mL 二甲基甲酰胺溶液用 32mL(12.8mmole) N-甲基吗啉在 0℃ 下处理 10 分钟, 然后将混合物加入到树脂肽中, 并将混合物室温振摇约 1.3 小时。将树脂茈干, 然后用每份 150mL 的二甲基甲酰胺洗涤 3 次 (TNBS: 阴性)。将树脂用乙醚洗涤两次然后干燥过夜; 由偶联所引起的重量增加为 0.88g, 意味着加成了 2.75mmole Val)。依次用各 5.6 摩尔的 Fmoc-Asp(OtBu)、Fmoc-Gln(Trt)、Fmoc-Leu、Fmoc-Leu、Fmoc-Lys(BOC)、Fmoc-Arg(PMC)、Fmoc-Leu 和 Fmoc-Trp(BOC) 进行去除 Fmoc(如上所述)和偶联(如上所述)的步骤继续进行合成, 在每次偶联时使用 5.6 摩尔当量的 HBTU、11.2 毫摩尔 N-甲基吗啉和 50mL 二甲基甲酰胺。最终的重量增加为 5.8g。将一部分裂解得到保留有 Fmoc 但侧链脱保护的标题肽, 纯度 86A%。LC-MS: 1390.6; 计算值 1390.8)。

步骤 2: Fmoc-环(Lys-Asp)Lys-Glu(OtBu)-Arg(Pmc)-Val-Asp-OH



方法 A: 固相合成

a. 顺序装配: Fmoc-Lys(Alloc)-Glu(OtBu)-Arg(Pmc)-Val-Asp(O-烯丙基)-氯代三苯甲基树脂的合成。

用 7.89g(18.9mmole) Fmoc-Asp(O-烯丙基)-OH、82g(39.9mmole) 苯并三唑基氧基-三[吡咯烷基]-磷六氟乙酸盐 (PyBOP) 和 10.2g(78.8mmole) 二异丙基乙基胺在 150mL 二氯甲烷中完成 Fmoc-Asp(O-烯丙基)-OH 与 15g 1.05 毫当量/g 填充量(共 15.75 mmole)的 1% 交联氯代三苯甲基树脂的偶联。将混合物振摇, 然后茈干并将树脂用每份 150 mL 的二氯甲烷/甲醇/二异丙基乙基胺(17:2:1)洗涤 3 次, 然后用每份 150 mL 的二氯甲烷洗涤 3 次。将树脂的样品进行 TNBS 试验, 试验呈阴性。将 Fmoc-保护的树脂结合的氨基酸用 150mL 5% 吡啶在二氯甲烷-二甲基甲酰胺(1:1)中的溶液处理 10 分钟, 然后用 150mL

20%哌啶的二甲基甲酰胺溶液处理 30 分钟，除去 N-末端 9-芴基甲氧羰基。将树脂结合的氨基酸按照以上描述进行洗涤。将 Fmoc-Val-OH、Fmoc-Arg(Pmc)-OH (在该步骤后取出 10%)、Fmoc-Glu(OtBu)-OH 和 Fmoc-Lys(ϵ -Alloc)-OH 分别按照相同的方式偶联，并采用相同的操作顺序，但在 TNBS 试验之前用 3 至 5 次的二甲基甲酰胺洗涤代替 3 次的二氯甲烷洗涤。无需重复偶联。将最终的树脂结合肽用 150mL 四氢呋喃和 150mL 乙醚洗涤，然后真空干燥得到 27.23 g。

b. Lys¹⁸ 和 Asp²² 的烯丙基和 Alloc 的脱除：Fmoc-Lys-Glu(OtBu)-Arg(Pmc)-Val-Asp-氯代三苯甲基树脂的合成。

将 10g 以上制得的 Fmoc-(Lys-Alloc)-Glu(OtBu)-Arg(Pmc)-Val-Asp(O-烯丙基)树脂用 100 mL 二甲亚砜/二甲基甲酰胺/二氯甲烷(1:1:0.2 v/v/v)振荡 20 分钟使其溶胀，然后将树脂小心地茺干。加入 2.9g 四(三苯膦)钨(0)在 240mL 二甲亚砜/二甲基甲酰胺(1:1, v:v)中的溶液，然后加入 60mL 二氯甲烷和 16.2g(150mmole) N-甲基苯胺，然后将混合物振荡 2 小时。将树脂茺干并用每份 100 mL 的二氯甲烷洗涤 3 次。将树脂用 100mL 二甲亚砜/二甲基甲酰胺(1:1 v:v)溶胀，然后小心地茺干并直接用于 Lys¹⁸-Asp²³ 环化。

c. Lys¹⁸-Asp²² 内酰胺桥的形成：Fmoc-环(Lys-Asp)Lys-Glu(OtBu)-Arg(Pmc)-Val-Asp-氯代三苯甲基树脂的合成。

将以上实施例的树脂肽用 5.2 g(10mmole)苯并三唑基氧基-三[吡咯烷基]-磷六氟乙酸盐(PyBOP)和 2.6g(20mmole)二异丙基乙基胺在 100mL 二甲亚砜/二甲基甲酰胺(1:1 v:v)中处理，然后将混合物振荡 4 小时。将树脂茺干并用每份 100mL 的二甲基甲酰胺洗涤 3 次，然后取出一部分茺干的树脂进行 TNBS 试验(阴性)。将树脂用四氢呋喃和乙醚各 100mL 洗涤，然后真空干燥。

d. Fmoc-环(Lys-Asp)Lys-Glu(OtBu)-Arg(Pmc)-Val-Asp-OH 的树脂裂

解和产物分离。

将以上 Lys¹⁸-Asp²² 内酰胺桥形成实施例中制得的树脂肽在振荡器中用 130mL 乙酸/二氯甲烷/2,2,2-三氟乙醇(1: 8: 1)处理 20 分钟。将液体部分与树脂分离, 并用 500mL 甲基叔丁基醚和 100mL 乙醚处理, 然后将混合物离心。除去上清液, 向残余物中加入乙醚, 然后离心。除去上清液并将残余物干燥过夜得到 2.77g 黄色固体(MS: 1172; 41% 化学计量学收率, 粗品)。将其通过快速色谱纯化(85:15 至 60:40 二氯甲烷: 甲醇)得到 1g Fmoc-环(Lys-Asp)Lys-Glu(OtBu)-Arg(Pmc)-Val-Asp-OH(15%收率, 以树脂计), 纯度为 85A%。

方法 B: 在溶液中合成

a. 顺序装配

Boc-Asp(O-烯丙基)-OBzl 的合成

室温下, 向 3L 的三颈烧瓶中加入 1,1-二甲基乙氧羰基-(L)-天冬氨酸苄酯(50g, 154.5mmol)、二氯甲烷(96mL)、烯丙醇(9.438, 162.3mmol)和 4-N,N-二甲氨基吡啶(10mg)。将反应混合物冷却至 8℃, 然后在 8-11℃ 下于 1.5 小时内加入二环己基碳二亚胺(32g, 154.5mmol)的二氯甲烷(100mL)溶液。加入二环己基碳二亚胺溶液的同时, 析出二环己基脲的沉淀。将反应混合物于 11-12℃ 搅拌 2 小时, 此时 HPLC 显示原料消失。滤出二环己基脲并将滤液浓缩。将油状残余物加入甲基叔丁基醚(250 mL)中, 然后将溶液过滤除去残余的二环己基脲, 用 30mL 0.2N 盐酸、30mL 水、20mL 饱和碳酸氢钠水性溶液、30mL 水和 2 × 50mL 盐水洗涤, 干燥(硫酸镁), 过滤然后浓缩得到 55.88g 油状的 BOC-(L)AsP(O-烯丙基)-OBzl。 (M_{计算值} 363.4; M+I_{实测值} 364)。

HCl-Asp(O-烯丙基)-OBzl 的合成

在装有机械搅拌器的 3L 三颈烧瓶中, 将 BOC-Asp(O-烯丙基)-OBzl (110.5g, 302.7mmol)的 500 mL 乙酸乙酯溶液冷却至 5℃, 并向反应混合物中通入氯化氢气体 2.5 小时, 在此期间内反应温度达到约 22℃。

HPLC 显示无原料存在。向溶液中通入氮气过夜，形成白色沉淀，过滤收集沉淀并用 100mL 乙酸乙酯洗涤。将残余物真空干燥得到 84g 白色结晶固体状(显微镜观察)HCl·Asp(O-烯丙基)-OBzl. ($M_{\text{计算值}}$ 263; $M+1_{\text{实测值}}$ 264)。

BOC-Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl 的合成

向 BOC-Val-OH(25.4g, 116.7mmol)的乙酸乙酯(85mL)溶液中加入羟基苯并三唑水合物(16.55g, 122.5mmol)的二甲基甲酰胺(122.3mL)溶液。将混合物冷却至 5℃，然后在 1 小时内加入二环己基碳二亚胺(25.2g, 122.5mmol)的乙酸乙酯(58.7mL)溶液，在此期间内，温度升至约 18℃ 并有二环己基脲沉淀生成。停止冷却并将混合物搅拌 2 小时，然后在 25 分钟内加入 HCl·H₂N-Asp(OAll)-OBzl(35g, 116.7mmol)的 189mL 二甲基甲酰胺溶液。在 0.5 小时内缓慢加入 N-甲基吗啉(12.8mL)使反应混合物的 pH 达到 7，然后将混合物室温搅拌 36 小时。将反应混合物过滤除去二环己基脲，将滤液用甲基叔丁基醚稀释，搅拌 2 小时然后过滤。将滤液用 100mL 水、100mL 0.5M 柠檬酸水溶液、100mL 水、100mL 饱和碳酸氢钠水溶液、100mL 盐水洗涤，干燥(硫酸镁)，过滤然后浓缩得到 41.3g 油状的 BOC-Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl. ($M_{\text{计算值}}$ 462; $M+1_{\text{实测值}}$ 463)。

HCl·Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl 的合成

向 2-4℃ 的 BOC-Val-Asp(OAll)-OBzl (31.7g, 68.5mmol)的乙酸乙酯(300mL)溶液中通入氯化氢气体 2 小时。停止冷却并将混合物搅拌 48 小时。向溶液中剧烈地通入氮气 1 小时。将反应混合物在旋转蒸发仪上浓缩得到 38.3g 白色固体，将其用乙酸乙酯结晶得到 24.2g HCl·Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl. ($M_{\text{计算值}}$ 362 $M+1_{\text{实测值}}$ 363)。

FMOC-Arg(PMC)-Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl 的合成

在装有机械搅拌器的 3L 三颈烧瓶中加入 17.25 g(26mmol)

FMOC-Arg(PMC)和 300mL 乙腈，然后将混合物室温搅拌直至形成透明的溶液。加入苯并三唑基氧基-三[吡咯烷基]-磷六氟乙酸盐(PyBOP)，将溶液冷却至 2℃，加入 2.6g(26mmol) N-甲基吗啉，形成白色的焦油。缓慢加入二甲基甲酰胺(52 mL)直至焦油溶解，然后将混合物于 3℃ 搅拌 30 分钟。在 2-3℃ 下于 20 分钟内加入 HCl.Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl (10.4g, 26mmol)的 39mL 二甲基甲酰胺溶液，然后加入 N-甲基吗啉(7.5 mL)达到 pH 7。停止冷却，将混合物搅拌 2.5 小时。然后将混合物用 250 mL 水和 250mL 乙酸乙酯稀释。分出乙酸乙酯层，用水(2 x 100mL)和盐水(2 x 100mL)洗涤然后浓缩得到白色固体，将其用 175mL 乙酸乙酯结晶，得到 18.5g FMOC-Arg(PMC)-Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl (95A%)。将乙酸乙酯滤液浓缩并将胶状残余物用乙酸乙酯研制另外得到 3.12g 产物。(M_{计算值} 1007; M+1_{实测值} 1008)。

Arg(PMC)-Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl 的合成

室温下，向 FMOC-Arg(PMC)-Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl (16g, 15.9mmol) 的二氯甲烷(267mL)溶液中加入哌啶(23g, 27mmol, 26.7mL)。将反应液搅拌 2.5 小时然后用水(2 x 60mL)和盐水(2 x 60mL)洗涤，干燥(硫酸镁)，过滤然后浓缩得到半固体。将所述半固体加入 400mL 乙酸乙酯中，将溶液搅拌 3 天然后过滤。将滤液用水洗涤(2 x 60mL)，干燥(硫酸镁)，过滤然后浓缩得到 23.5g 含有哌啶-亚甲基茛加合物杂质的产物(MS 分析)。将固体溶于 400mL 乙酸乙酯，过滤，用水洗涤(2 x 60mL)，干燥(硫酸镁)然后浓缩得到固体，将其真空干燥过夜得到 12.55g 白色固体状 Arg(PMC)-Val-Asp(OAll)-OBzl。(M_{计算值} 784 M+1_{实测值} 785)。

FMOC-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl 的合成

2℃ 下，向 FMOC-Glu(tBu) (6.73g, 15.8mmol)和苯并三唑基氧基-三[吡咯烷基]-磷六氟乙酸盐(PyBOP, 8.18 g, 15.8 mmol)的 105 mL 乙腈溶液中加入 N-甲基吗啉(1.58 g, 15.8 mmol)并将反应混合物于 2-4℃ 搅

拌 30 分钟。在 2℃ 下于 20 分钟内加入 L)Arg(PMC)-Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl (12.4 g, 15.8 mmole) 的 70 mL 乙腈溶液。然后加入 N-甲基吗啉达到 pH 7。停止冷却，使混合物升温至室温，然后继续搅拌共 3 小时。将乳状的反应混合物过滤(慢)并将白色残余物在滤纸上干燥过夜得到 10.8g Fmoc-Glu(OBut)-Arg(PMC)-Val-Asp(烯丙基)-OBzl。将滤液浓缩得到胶状物，将其加入 30mL 乙腈中并放置 48 小时，另外得到 3.45g 产物。Fmoc-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl 的总收率为 14.3 g。(M_{计算值} 1192; M+1_{实测值} 1192.4)。

Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl 的合成

室温下，向 Fmoc-Glu(OBut)-Arg(PMC)-Val-Asp(OAll)-OBzl (12.3g, 10.3 mmol) 的 105mL 二氯甲烷溶液中加入哌啶(3.5g, 41.3mmol)。将混合物搅拌 2 小时，然后用庚烷稀释，浓缩至一半的体积，然后在冰箱中放置过夜。从油状残余物中萃取液体，然后将残余物加入二氯甲烷中。将溶液用 0.5M 柠檬酸水溶液、水和盐水洗涤，干燥(硫酸镁)，过滤然后浓缩。将粗品固体用庚烷研制两次然后过滤得到 9.0g 白色粉末状 Glu(OtBu)-(L)Arg(PMC)-Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl。(M_{计算值} 970.2; M+1_{实测值} 971)。

Fmoc-Lys(Alloc)-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl 的合成。

5℃ 下，将 Fmoc-Lys(Alloc) (4.2g, 9.3mmol) 和苯并三唑基氧基-三[吡咯烷基]-磷六氟乙酸盐(PyBOP, 4.8g, 9.3mmol) 在 69mL 乙腈中的悬浮液用 N-甲基吗啉(0.94g, 9.3mmol) 处理，然后将形成的溶液于 5℃ 搅拌 30 分钟。加入 Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp(烯丙基)-OBzl (9g, 9.3mmole) 在 52mL 乙腈中的悬浮液，使反应混合物变成白色混浊液。加入 N-甲基吗啉直至反应混合物达到 pH 7，然后将反应混合物升温至室温并搅拌 1.33 小时。将混合物过滤并将固体残余物用乙腈洗涤(2 x 40mL)，然后在氮气流下真空干燥过夜得到 12.8g 灰白色硬的固体，将

其用 200mL 甲基叔丁基醚研制，过滤收集并真空干燥得到 9.7g Fmoc-Lys(Alloc)-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl. (M_{计算值} 1404.7; M+1_{实测值} 1406).

b. 从 Lys¹⁸ 和 Asp²² 上脱除 Alloc 和烯丙基: Fmoc-Lys-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp-OBzl 的合成。

室温下，向装有机械搅拌器并通氮气流的 1L 三颈烧瓶中加入 167 mL 二氯甲烷和 1.37g(1.18 mmol, 0.2 当量) Pd(PPh₃)₄。向橙色的溶液中通入氮气 2 分钟，然后加入 8.3g(5.91mmol, 1.0 当量) Fmoc-Lys(Alloc)-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp(O-烯丙基)-OBzl 的 66.4mL 二甲基甲酰胺溶液，然后加入 13.3g,(124 mmol, 21 当量) 甲基苯胺。将溶液室温搅拌 1 小时。将混合物用 700mL 甲基叔丁基醚稀释导致固体形成。将悬浮液搅拌 1 小时然后过滤。将固体残余物用 200mL 甲基叔丁基醚研制，过滤然后干燥得到 5.0 浅黄色固体。由滤液得到 1.1g 浅黄色固体状的第二批产物，总收率 6.1g Fmoc-Lys-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp-OBzl. (M_{计算值} 1280.6; M+1_{实测值} 1281).

c. Lys¹⁸-Asp²² 内酰胺桥的形成: Fmoc-环(Lys-Asp)Lys-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp-OBzl 的合成。

室温及氮气氛下，将 6.0g(4.69mmol) Fmoc-Lys-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp-OBzl 在 1L 三颈烧瓶中溶于 300mL 二甲基甲酰胺，然后加入 3.44g(6.61mmol, 1.41 当量) 苯并三唑基氧基-三[吡咯烷基]-磷六氟乙酸盐(PyBOP)、0.89g(6.57mmol, 1.40 当量) 羟基苯并三唑水合物和 1.73g(13.4mmol; 2.85 当量) 二异丙基乙基胺。将橙色溶液室温搅拌 1 小时，然后用 300mL 水稀释形成油状残余物。离心出混浊的液体(主要含杂质)。将油状残余物在 100mL 水中搅拌过夜，过滤收集形成的硬的固体，得到 4.2g 浅黄色固体。由滤液得到 1.0g 黄色固体状第二批产物，总收率 5.2g Fmoc-环(Lys-Asp)Lys-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp-OBzl. (M_{计算值} 1262 M+1_{实测值} 1262.5).

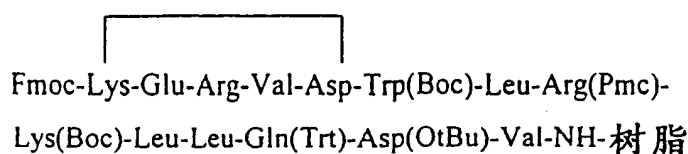
d. 苄酯的脱除：Fmoc-环(Lys-Asp)Lys-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp-OH的合成。

将 5.9g (4.7mmol) Fmoc-环(Lys-Asp)Lys-Glu-Arg-Val-Asp-OBzl 的 25 mL 二甲基甲酰胺溶液用 5.9g 木炭处理并过滤，然后用 0.59g 10% Pd/C 处理并在 Parr 装置中置于 50psig 氢气下。1.5 小时后，将混合物过滤，再次用木炭处理，过滤，再次加入 0.59g 10% Pd/C 并和置于 50psig 氢气下 2 小时。将混合物过滤并将滤液用 50mL 水稀释，用 3 × 200 mL 二氯甲烷萃取。将合并的二氯甲烷萃取液浓缩得到 1.2g 油状的 Fmoc-环(Lys-Asp)Lys-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp-OH。($M_{\text{计算值}}$ 1171; $M+1_{\text{实测值}}$ 1172.3)。

3. 纯化

将 400mg Fmoc-环(Lys-Asp)Lys-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp-OH 样品溶于 10mL 1:1 三氟乙醇/异丙醇。将样品分成两个 5mL 栓注射到用 55% B (A = 0.1% v/v 三氟乙酸水溶液; B = v/v 75% 乙腈/25% 异丙醇+0.1 % 三氟乙酸)平衡的制备 HPLC 柱(Microsorb MV C 18, 300Å, 8μ, 41.4 X 250mm)上。将填料以 70 mL/分钟的流速洗脱，洗脱梯度为在 30 分钟内从 55% B 至 65% B，在 1 分钟内从 65%B 至 95%B，然后用 95%B 进行恒溶剂成分柱洗脱 10 分钟。用 UV 在 210nm 监测流出液。收集纯度为 93.5% 或更高的馏份，并通过旋转蒸发进行浓缩。将残余物冷冻干燥得到 200mg Fmoc-环(Lys-Asp)Lys-Glu-Arg-Val-Asp-OH ($M_{\text{计算值}}$ 1171; $M+1_{\text{实测值}}$ 1172.6)。

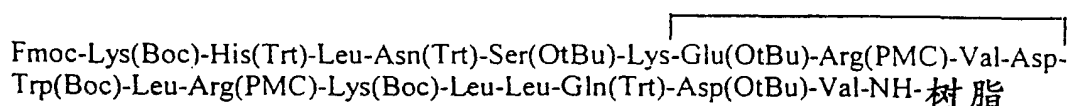
步骤 3:



将 Fmoc-[Trp²³(BOC), Arg²⁵(PMC), Lys²⁶(BOC), Leu²⁷,

Gln²⁹(Trt)]HPTH(23-31)-氯代三苯甲基树脂(1g, 0.185mmole)在 10mL 二甲基甲酰胺中振摇 30 分钟进行溶胀, 然后茺干, 用 10mL 20%哌啶/二甲基甲酰胺(v/v)处理并振摇 30 分钟。将树脂茺干并用 3 × 20 mL 二甲基甲酰胺洗涤。加入 240mg(0.205mmole, 1.1 当量) FMOC-环(Lys¹⁸-Asp²²)Lys-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp-OH、312 mg(0.6mmole, 3 当量) 苯并三唑基氧基-三[吡咯烷基]-磷六氟乙酸盐(PyBOP)和 156mg(1.2 mmole, 6 当量)二异丙基乙基胺的 10 mL 二甲基甲酰胺溶液, 并将混合物搅拌 16 小时。将树脂茺干并用 3 × 20 mL 二甲基甲酰胺洗涤(TNBS 阳性), 再次用 FMOC-环(Lys¹⁸-Asp²²)Lys-Glu(OtBu)-Arg(PMC)-Val-Asp-OH/PyBOP/iPr₂NEt 处理 16 小时, 然后将树脂茺干并用 3 × 10mL 二甲基甲酰胺洗涤(TNBS: 阴性)。按照方法 A 步骤 2 中的描述用试剂 K 将一部分标题肽从树脂上裂解下来, 得到侧链脱保护了的肽片段。(LC-MS: M_{计算值} 2001; M_{实测值} 2000.5)。剩余的物质用于步骤 4。

步骤 4:



所需的树脂结合肽通过将 1.38g(0.244mmole, 以 Trp²³ 的滴度计) 步骤 3 的树脂结合肽按照步骤 1 除去 Fmoc 保护基, 然后按照步骤 1 顺次进行 FMOC 脱除和用各 0.5 毫摩尔的 FMOC-Ser(OtBu)-OH、FMOC-Asn(Trt)-OH、FMOC-Leu-OH、FMOC-His(Trt)-OH 和 FMOC-Lys(BOC)-OH 偶联的循环, 在每次偶联时使用 190mg(0.5mmole) O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐(HBTU)和 2mmole N-甲基吗啉的 25mL 二甲基甲酰胺溶液。偶联在室温下进行约 1 小时。将最终的树脂肽用每份 25mL 的二甲基甲酰胺、四氢呋喃和乙醚洗涤, 然后真空干燥(1.93g)。将一部分标题肽按照以下描述从树脂上裂解(试剂 K)得到侧链脱保护了的肽片段(LC-MS: M_#

算值 2579.4; M_{实测值} 2580.7), 纯度 52A%。

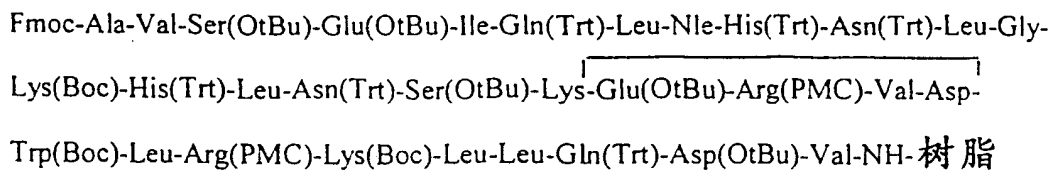
步骤 5:

Fmoc-Ala-Val-Ser(OtBu)-Glu(OtBu)-Ile-Gln(Trt)-Leu-Nle-His(Trt)-Asn(Trt)-Leu-Gly-OH

FMOC-[Ala¹, Ser²(OtBu), Glu⁴(OtBu), Gln⁶(Trt), His⁹(Trt), Asn¹⁰(Trt)Nle⁸]hPTH(1-12)

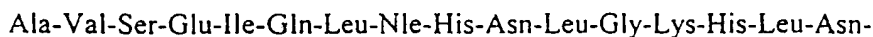
标题肽通过将 2.65g(5mmole) Fmoc-Leu-OH 与 5g(3mmole) 1% 交联的 0.6 毫当量/g 的 Gly-2-氯代三苯甲基树脂用 3.9g(7.5mmole) 苯并三唑基氧基-三[吡咯烷基]-磷六氟乙酸盐(PyBOP)、1.94g(15mmole) 二异丙基乙基胺在 50mL 二甲基甲酰胺/四氢呋喃(v/v) 中振摇 0.5 小时偶联制得。将树脂晾干, 然后用二甲基甲酰胺/四氢呋喃洗涤 5 次并用甲醇洗涤 1 次(茚三酮: 阴性)。将树脂用二甲基甲酰胺洗涤一次, 然后用 60mL 20% 哌啶/二甲基甲酰胺处理 2 次, 每次 15 分钟, 在各次处理之间用 3 × 60mL 二甲基甲酰胺和 1 × 60mL 甲醇处理。在第二次处理后, 茚三酮呈强阳性。重复该循环, 每次循环采用单次的 0.5 小时哌啶二甲基甲酰胺处理, 并使用各 2.5 摩尔当量的 FMOC-Asn(Trt)、FMOC-His(Trt)、FMOC-Nle、FMOC-Leu、FMOC-Gln(Trt)、FMOC-Ile、FMOC、Glu(OtBu)、FMOC-Ser(OtBu)、FMOC-Val 和 FMOC-Ala 以及各 2.5 摩尔当量的 PyBOP 和二异丙基乙基胺。通过与 100 mL 乙酸/三氟乙烯/和二氯甲烷 (1 : 1 : 8) 一起振摇 1 小时将树脂裂解。从树脂中离心出液体, 然后将树脂用 200mL 二氯甲烷洗涤; 然后将洗涤液与液体的主要部分合并。将其依次从己烷、乙酸乙酯和异丙醇中蒸发。将残余物用乙醚研制, 然后干燥(真空, 过夜)得到 2.24g 标题肽(HPLC: 83A% 纯度)。将树脂再次在裂解条件下处理, 将液体按照第一次裂解后的方式处理, 最后得到 2.75g 第二批的标题肽, 总收率为 4.95 g (2.1 mmole, 70% 收率, 以树脂计)。[LC-MS (M_{计算值} 1514.8; M_{实测值} 1514.7)。该物质直接用于步骤 6。

步骤 6:



将步骤 5 制得的肽(900 mg, 0.114mmole)在振摇下在 15mL 二甲基甲酰胺中溶胀 40 分钟, 然后将树脂萋干并用 15mL 20%哌啶/二甲基甲酰胺(v/v)处理 45 分钟。将树脂萋干并用 3 × 30mL 二甲基甲酰胺处理(树脂 TNBS 试验: 阳性)。向其中加入 15mL 二甲基甲酰胺、775 mg(0.33 mmole, 以 23 位的滴度计, 为 2.7 摩尔当量) Fmoc-[Ala¹, Ser³(OtBu), Glu⁴(OtBu), Gln⁶(Trt), His⁹(Trt), Asn¹⁰(Trt)Nle⁸]hPTH(1-12) (由步骤 4 制得)、151 mg (0.29mmole, 0.2 摩尔当量)苯并三唑基氧基-三[吡咯烷基]-磷六氟乙酸盐(PyBOP)、39mg (0.25 摩尔)羟基苯并三唑水合物和 75mg(0.58mmole)二异丙基乙基胺, 然后将混合物振摇 3 天。将树脂萋干, 用 3 × 30 mL 二甲基甲酰胺洗涤(TNBS, 弱阳性和阴性小珠的混合物), 然后用 15mL 20%哌啶/二甲基甲酰胺(v/v)处理, 萋干, 用每份 15mL 的二甲基甲酰胺、四氢呋喃和乙醚各洗涤 3 次, 然后干燥并按照步骤 7 从树脂上脱保护、裂解。

步骤 7:



将步骤 6 制得的树脂按照方法 A 步骤 1 的描述处理以除去 Ala¹ 上的 Fmoc, 然后在 33/2/2/1/2 三氟乙酸、苯酚、茴香硫醚、乙二硫醇和水的混合物(试剂 K, 总稀释度 10mL/g 树脂-肽)中同时进行裂解和脱保护 3 小时。将树脂萋干, 将反应混合物加入到冷的叔丁基甲基醚(50mL/g 树脂-肽)中使产物从滤液中沉淀出来。将混合物放置 15 分钟, 然后离心(2000 rpm, 5 分钟)。萋析出液体, 将剩余的固体用乙醚洗涤,

通过离心分离混合物的上清液并将上清液除去。将得到的固体在 0.1% 三氟乙酸水溶液(6 mL/g 树脂肽)中搅拌 1 小时, 以确保完全除去对酸敏感的基团。将溶液冷冻干燥得到 414mg 白色固体状标题肽(37A% 纯度, 26.3% 纯度(wt/wt), 以 Trp²³ 计, 26.3% 收率)。(LC-MS: M_{计算值} 3632.0; M+1_{实测值} 3633.4)。

步骤 8: 纯化

将 1g 以上制得的物质溶于 10mL 水并将该溶液注射到 2" X 25cm 预先用 75/5/20 0.1% 三氟乙酸水溶液(A)/0.1% 三氟乙酸的乙腈溶液(B)/异丙醇(C)平衡的制备 HPLC(10 微米, 120A 或 300A)上。将柱子以 115mL 每分钟, 以在 30 分钟内从 75A/5B/20C 到 60A/20B/20C 的梯度洗脱, 然后用 30%A, 60%B, 20%C 冲洗并再次用 75A/5B/20C 平衡。用 UV 在 280nm 检测流出液。将含有大约 75 面积百分比纯度的标题肽的馏份合并, 然后在旋转蒸发仪上(约 35°C)浓缩。将浓缩的含水溶液泵到相同的制备柱上并再次用相同的 30 分钟梯度洗脱。将含有 90A% 或更高的面积百分比纯度标题肽的馏份合并, 然后在旋转蒸发仪上(约 35°C)浓缩。然后将浓缩的溶液泵到预先用 75% 0.1M 乙酸铵水溶液(用乙酸调至 pH6)(D)/15% 乙腈(E)/10% 异丙醇(C)平衡的制备柱上。将柱子以 115mL/分钟, 以在 30 分钟内从 75D/15E/10C 至 60D/30E/10C 的梯度洗脱, 然后用 30D/60E/20C 冲洗。将含有 95A% 或更高的面积百分比纯度标题肽的馏份合并然后冷冻干燥, 得到固体状乙酸盐形式的纯化产物(从 1g 粗品得到约 100-200 mg @ 大约 95A% 纯度)。在每一阶段, 用分析 HPLC 在 C18 柱(4.6mm x 25cm, 5 微米, 120A 或 300A)上分析馏份的含量和纯度, 梯度为 30 分钟内 25-40%B(A = 0.1% 三氟乙酸/水; B = 0.1% 三氟乙酸/乙腈), 流速为 1mL/分钟, 用 UV 在 220nm 检测。

<223> Nle

<220>

<221> 肽

<222> (18)..(22)

<223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>

<221> 肽

<222> (31)

<223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 2

Ala Ala Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

<210> 3

<211> 31

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Nle

<220>

<221> 肽

<222> (18)..(22)

<223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>

<221> 肽

<222> (31)

<223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 3

Ala Val Ala Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

<210> 4

<211> 31

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Nle

<220>

<221> 肽

<222> (18)..(22)

<223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>

<221> 肽

<222> (31)

<223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 6

Ala Val Ser Glu Ile Ala Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

<210> 7

<211> 31

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Nle

<220>

<221> 肽

<222> (18)..(22)

<223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>

<221> 肽

<222> (31)

<223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 7

Ala Val Ser Glu Ile Gln Ala Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

<210> 8

<211> 31

<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 肽
<222> (18)..(22)
<223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
<221> 肽
<222> (31)
<223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 8
Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Ala His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15
Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

<210> 9
<211> 31
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)
<223> Nle

<220>
<221> 肽
<222> (18)..(22)
<223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
<221> 肽
<222> (31)
<223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 9
Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Ala Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15
Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

<210> 10
<211> 31
<212> PRT
<213> 未知

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Nle

<220>

<221> 肽

<222> (18)..(22)

<223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>

<221> 肽

<222> (31)

<223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 10

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Ala Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

<210> 11

<211> 31

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Nle

<220>

<221> 肽

<222> (18)..(22)

<223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>

<221> 肽

<222> (31)

<223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 11

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Ala Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

<210> 12

<211> 31

<212> PRT.

<213> 未知

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Nle

<220>

<221> 肽

<222> (18)..(22)

<223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>

<221> 肽

<222> (31)

<223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 12

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Ala His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

<210> 13

<211> 31

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Nle

<220>

<221> 肽

<222> (18)..(22)

<223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>

<221> 肽

<222> (31)

<223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 13

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys Ala Leu Asn
1 5 10 15

Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

<210> 14

<211> 31

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Nle

<220>

<221> 肽

<222> (18)..(22)

<223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>

<221> 肽

<222> (31)

<223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 14

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys His Ala Asn
1 5 10 15

Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

<210> 15

<211> 31

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Nle

<220>

<221> 肽

<222> (18)..(22)

<223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>

<221> 肽

<222> (31)

<223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 15

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Ala
1 5 10 15

Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

<210> 16
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)
 <223> Nle

<220>
 <221> 肽
 <222> (13)..(17)
 <223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (18)..(22)
 <223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (31)
 <223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 16
 Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
 1 5 10 15

Asp Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
 20 25 30

<210> 17
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)
 <223> Nle

<220>
 <221> 肽
 <222> (18)..(22)
 <223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (26)..(30)
 <223> “在 26 位的 Lys 与在 30 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>

<221> 肽

<222> (31)

<223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 17

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
20 25 30

<210> 18

<211> 34

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Nle

<220>

<221> 肽

<222> (18)..(22)

<223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>

<221> 肽

<222> (34)

<223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 18

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe

<210> 19

<211> 34

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Nle

<220>
 <221> 肽
 <222> (13)..(17)
 <223> “在 13 位的 Lys 与在 17 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (18)..(22)
 <223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (34)
 <223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 19
 Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
 1 5 10 15
 Asp Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His
 20 25 30
 Asn Phe

<210> 20
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <221> 肽
 <222> (18)..(22)
 <223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (34)
 <223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 20
 Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln
 1 5 10 15
 Asp Lys Arg Arg Arg Asp Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His
 20 25 30
 Thr Ala

<210> 21

<211> 34
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <221> 肽
 <222> (18)..(22)
 <223> “在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (34)
 <223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<400> 21
 Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln
 1 5 10 15
 Asp Lys Arg Arg Arg Asp Leu Leu Glu Lys Leu Leu Glu Lys Leu His
 20 25 30

Thr Ala

<210> 22
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <221> 肽
 <222> (12)..(16)
 <223> “在 12 位的 Lys 与在 16 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (28)
 <223> “此 C-末端氨基酸为酰胺，即 CONH₂”

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)
 <223> Nle

<400> 22
 Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser Lys Glu Arg Val Asp
 1 5 10 15
 Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His Asn Phe
 20 25

<210> 23

<211> 28
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <221> 肽
 <222> (12)..(16)
 <223> “在 12 位的 Lys 与在 16 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (28)
 <223> “此 C-末端氨基酸为酰胺, 即 CONH₂”

<400> 23
 Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln Asp Lys Arg Arg Arg Asp
 1 5 10 15
 Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His Thr Ala
 20 25

<210> 24
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)
 <223> Nle

<220>
 <221> 肽
 <222> (7)..(11)
 <223> “在 7 位的 Lys 与在 11 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (12)..(16)
 <223> “在 12 位的 Lys 与在 16 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (28)
 <223> “此 C-末端氨基酸为酰胺, 即 CONH₂”

<400> 24
 Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Asp Lys Glu Arg Val Asp
 1 5 10 15
 Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His Asn Phe
 20 25

<210> 25
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)
 <223> N1e

<220>
 <221> 肽
 <222> (12)..(16)
 <223> “在 12 位的 Lys 与在 16 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (20)..(24)
 <223> “在 20 位的 Lys 与在 24 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (28)
 <223> “此 C-末端氨基酸为酰胺, 即 CONH₂”

<400> 25
 Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn Ser Lys Glu Arg Val Asp
 1 5 10 15

Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His Asn Phe
 20 25

<210> 26
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> 未知

<400> 26
 Ser Val Ser Glu Ile Gln Leu Met His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
 1 5 10 15

Ser Met Glu Arg Val Glu Trp Leu Arg Lys Lys Leu Gln Asp Val His
 20 25 30

Asn Phe

<210> 27
 <211> 34
 <212> bRT
 <213> 未知

<400> 27

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln
 1 5 10 15

Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His
 20 25 30

Thr Ala

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> 未知

<220>

<221> 肽

<222> (1)

<223> FMOC-Trp(BOC)

<220>

<221> 肽

<222> (3)

<223> Arg(PMC)

<220>

<221> 肽

<222> (4)

<223> Lys(BOC)

<220>

<221> 肽

<222> (7)

<223> Gln(Trt)

<220>

<221> 肽

<222> (8)

<223> Asp(OtBu)

<220>

<221> 肽

<222> (9)

<223> “此 C-末端氨基酸通过酰胺键与氯三苯甲基树脂键合”

<400> 28

Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
 1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> 未知

<221> 肽
 <222> (3)
 <223> Arg (PMC)

<220>
 <221> 肽
 <222> (1)..(5)
 <223> “在 1 位的 Lys 与在 5 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<400> 30
 Lys Glu Arg Val Asp
 1 5

<210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <221> 肽
 <222> (1)
 <223> FMOC-Lys

<220>
 <221> 肽
 <222> (1)..(5)
 <223> “在 1 位的 Lys 与在 5 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (2)
 <223> Glu(OtBu)

<220>
 <221> 肽
 <222> (3)
 <223> Arg (PMC)

<220>
 <221> 肽
 <222> (1)..(5)
 <223> “在 1 位的 Lys 与在 5 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (6)
 <223> Trp (BOC)

<220>
 <221> 肽
 <222> (8)
 <223> Arg (PMC)

<220>

<221> 肽
 <222> (9)
 <223> Lys(BOC)

<220>
 <221> 肽
 <222> (12)
 <223> Gln(Trt)

<220>
 <221> 肽
 <222> (13)
 <223> Asp(OtBu)

<220>
 <221> 肽
 <222> (14)
 <223> “此 C-末端氨基酸通过酰胺键与 Rink 酰胺 MBHA 树脂键合”

<400> 31
 Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val
 1 5 10

<210> 32
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 未知

<220>
 <221> 肽
 <222> (1)
 <223> FMOC-Lys(BOC)

<220>
 <221> 肽
 <222> (2)
 <223> His(Trt)

<220>
 <221> 肽
 <222> (4)
 <223> Asn(Trt)

<220>
 <221> 肽
 <222> (5)
 <223> Ser(OtBu)

<220>
 <221> 肽
 <222> (6)..(10)
 <223> “在 6 位的 Lys 与在 10 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽

<221> 肽
 <222> (14)
 <223> Lys(BOC)

<220>
 <221> 肽
 <222> (17)
 <223> Gln(Trt)

<220>
 <221> 肽
 <222> (18)
 <223> Asp(OtBu)

<220>
 <221> 肽
 <222> (6)..(10)
 <223> “合成肽：在6位的Lys与在10位的Asp的侧链之间通过酰胺键连接”

<400> 30
 Lys His Leu Asn Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu
 1 5 10 15

Gln Asp Val

<210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 肽
 <222> (1)
 <223> Fmoc-Ala

<220>
 <221> 肽
 <222> (3)
 <223> Ser(OtBu)

<220>
 <221> 肽
 <222> (4)
 <223> Glu(OtBu)

<220>
 <221> 肽
 <222> (6)
 <223> Gln(Trt)

<220>
 <221> 肽
 <222> (9)

<223> His(Trt)

<220>

<221> 肽

<222> (10)

<223> Asn(Trt)

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)

<223> Nle

<400> 31

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly

1

5

10

<210> 32

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 肽

<222> (1)

<223> FMOC-Ala

<220>

<221> 肽

<222> (3)

<223> Ser(OtBu)

<220>

<221> 肽

<222> (4)

<223> Glu(OtBu)

<220>

<221> 肽

<222> (6)

<223> Gln(Trt)

<220>

<221> 肽

<222> (9)

<223> His(Trt)

<220>

<221> 肽

<222> (10)

<223> Asn(Trt)

<220>

<221> 肽

<222> (13)

<223> Lys(BOC)

<220>
<221> 肽
<222> (14)
<223> His (Trt)

<220>
<221> 肽
<222> (16)
<223> Asn (Trt)

<220>
<221> 肽
<222> (17)
<223> Ser (OtBu)

<220>
<221> 肽
<222> (18)..(22)
<223> “合成肽：在 18 位的 Lys 与在 22 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
<221> 肽
<222> (19)
<223> Glu (PtBu)

<220>
<221> 肽
<222> (20)
<223> Arg (PMC)

<220>
<221> 肽
<222> (22)..(30)
<223> “合成肽：在 13 位的 Lys 与在 30 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
<221> 肽
<222> (23)
<223> Trp (BOC)

<220>
<221> 肽
<222> (25)
<223> Arg (PMC)

<220>
<221> 肽
<222> (26)
<223> Lys (BOC)

<220>
<221> 肽
<222> (29)

<220>
<221> 肽
<222> (1)
<223> “N-末端氨基酸是以盐酸盐的形式”

<220>
<221> 肽
<222> (2)
<223> Asp(OAllyl)

<220>
<221> 肽
<222> (2)
<223> “此 C-末端氨基酸是以与苄醇形成的酯的形式”

<400> 34
Val Asp
1

<210> 35
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 肽
<222> (1)
<223> FMOC-Arg(PMC)

<220>
<221> 肽
<222> (3)
<223> Asp(OAllyl)

<220>
<221> 肽
<222> (3)
<223> “此 C-末端氨基酸是以与苄醇形成的酯的形式”

<400> 35
Arg Val Asp
1

<210> 36
<211> 3
<212> PRT
<213> 未知

<220>
<221> 肽
<222> (1)
<223> Arg(PMC)

<220>
<221> 肽
<222> (3)
<223> Asp(OAllyl)

<220>
<221> 肽
<222> (3)
<223> “此 C-末端氨基酸是以与苄醇形成的酯的形式”

<400> 36
Arg Val Asp
1

<210> 37
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 肽
<222> (1)
<223> FMOC-Glu(OtBu)

<220>
<221> 肽
<222> (2)
<223> Arg(PMC)

<220>
<221> 肽
<222> (4)
<223> Asp(OAllyl)

<220>
<221> 肽
<222> (4)
<223> “此 C-末端氨基酸是以与苄醇形成的酯的形式”

<400> 37
Glu Arg Val Asp
1

<210> 38
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 肽
<222> (1)
<223> Glu(OtBu)

<220>
 <221> 肽
 <222> (2)
 <223> Arg(PMC)

<220>
 <221> 肽
 <222> (4)
 <223> Asp(OAllyl)

<220>
 <221> 肽
 <222> (4)
 <223> “此 C-末端氨基酸是以与苺醇形成的酯的形式”

<400> 38
 Glu Arg Val Asp
 1

<210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 肽
 <222> (1)
 <223> FMOC-Lys(Alloc)

<220>
 <221> 肽
 <222> (2)
 <223> Glu(OtBu)

<220>
 <221> 肽
 <222> (3)
 <223> Arg(PMC)

<220>
 <221> 肽
 <222> (5)
 <223> Asp(OAllyl)

<220>
 <221> 肽
 <222> (5)
 <223> “此 C-末端氨基酸是以与苺醇形成的酯的形式”

<400> 39
 Lys Glu Arg Val Asp
 1 5

<210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 肽
 <222> (1)
 <223> Fmoc-Lys

<220>
 <221> 肽
 <222> (2)
 <223> Glu(OtBu)

<220>
 <221> 肽
 <222> (3)
 <223> Arg(PMC)

<220>
 <221> 肽
 <222> (5)
 <223> “此 C-末端氨基酸是以与苄醇形成的酯的形式”

<400> 40
 Lys Glu Arg Val Asp
 1 5

<210> 41
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 肽
 <222> (1)
 <223> Fmoc-Lys

<220>
 <221> 肽
 <222> (1)..(5)
 <223> “合成肽：在 1 位的 Lys 与在 5 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>
 <221> 肽
 <222> (2)
 <223> Glu(OtBu)

<220>
 <221> 肽
 <222> (3)

<223> Arg (PMC)

<220>

<221> 肽

<222> (1)

<223> “合成肽：在 1 位的 Lys 与在 5 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>

<221> 肽

<222> (5)

<223> “此 C-末端氨基酸是以与苄醇形成的酯的形式”

<400> 41

Lys Glu Arg Val Asp

1 5

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 肽

<222> (1)

<223> FMOC-Lys

<220>

<221> 肽

<222> (1) .. (5)

<223> “合成肽：在 1 位的 Lys 与在 5 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<220>

<221> 肽

<222> (2)

<223> Glu(OtBu)

<220>

<221> 肽

<222> (3)

<223> Arg (PMC)

<220>

<221> 肽

<222> (5)

<223> “合成肽：在 1 位的 Lys 与在 5 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<400> 42

Lys Glu Arg Val Asp

1 5

<210> 43
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 肽
 <222> (1)
 <223> FMOC-Lys(Alloc)

<220>
 <221> 肽
 <222> (2)
 <223> Glu(OtBu)

<220>
 <221> 肽
 <222> (3)
 <223> Arg(PMC)

<220>
 <221> 肽
 <222> (5)
 <223> Asp(OAllyl)

<220>
 <221> 肽
 <222> (5)
 <223> “C-末端 Asp 与氯三苯甲基树脂键合”

<400> 43
 Lys Glu Arg Val Asp
 1 5

<210> 44
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 肽
 <222> (1)
 <223> FMOC-Lys

<220>
 <221> 肽
 <222> (2)
 <223> Glu(OtBu)

<220>
 <221> 肽
 <222> (3)
 <223> Arg(PMC)

<220>
<221> 肽
<222> (5)
<223> “C-末端 Asp 与氯三苯甲基树脂键合”

<400> 44
Lys Glu Arg Val Asp
1 5

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 肽
<222> (1)
<223> Fmoc-Lys

<220>
<221> 肽
<222> (1)
<223> “C-末端 Asp 与氯三苯甲基树脂键合”

<220>
<221> 肽
<222> (2)
<223> Glu(OtBu)

<220>
<221> 肽
<222> (3)
<223> Arg(PMC)

<220>
<221> 肽
<222> (5)
<223> “C-末端 Asp 与氯三苯甲基树脂键合”

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(5)
<223> “合成肽：在 1 位的 Lys 与在 5 位的 Asp 的侧链之间通过酰胺键连接”

<400> 45
Lys Glu Arg Val Asp
1 5

<210> 46
<211> 34

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: HPTH 类似物

<220>
<221> 肽
<222> (1)
<223> 产品= Ala

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)
<223> Xaa= 正亮氨酸 (Nle)

<220>
<221> 肽
<222> (18)
<223> 产品= Lys

<220>
<221> 肽
<222> (18)
<223> Lys 的侧链通过酰胺桥与 Asp 的侧链键合

<220>
<221> 肽
<222> (22)
<223> 产品= Asp

<220>
<221> 肽
<222> (22)
<223> Asp 的侧链通过酰胺桥与 Lys 的侧链键合

<220>
<221> 肽
<222> (26)
<223> 产品= Lys

<220>
<221> 肽
<222> (26)
<223> Lys 的侧链通过酰胺桥与 Asp 的侧链键合

<220>
<221> 肽
<222> (27)
<223> 产品= Leu

<220>
<221> 肽
<222> (30)

<223> 产品= Asp

<220>

<221> 肽

<222> (30)

<223> Asp 的侧链通过酰胺桥与 Lys 的侧链键合

<400> 46

Ala Val Ser Glu Ile Gln Leu Xaa His Asn Leu Gly Lys His Leu Asn
1 5 10 15

Ser Lys Glu Arg Val Asp Trp Leu Arg Lys Leu Leu Gln Asp Val His
20 25 30

Asn Phe