

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07C 229/12 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02822823.5

[45] 授权公告日 2007 年 3 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1304363C

[22] 申请日 2002.10.22 [21] 申请号 02822823.5

[30] 优先权

[32] 2001.11.15 [33] US [31] 60/331,416

[32] 2002. 3. 28 [33] DE [31] 10215336.1

[86] 国际申请 PCT/EP2002/011779 2002.10.22

[87] 国际公布 WO2003/042163 德 2003.5.22

[85] 进入国家阶段日期 2004.5.17

[73] 专利权人 CIS 生物国际公司

地址 法国萨克雷

[72] 发明人 马克·维卢恩 约翰内斯·普拉策克
埃克哈德·奥托 奥尔林·彼得罗夫
克劳迪娅·博尔姆 迪尔克·欣茨
格雷戈尔·曼
约翰·利斯特-詹姆斯
戴维·M·威尔逊

审查员 杨永明

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 3 页 说明书 15 页

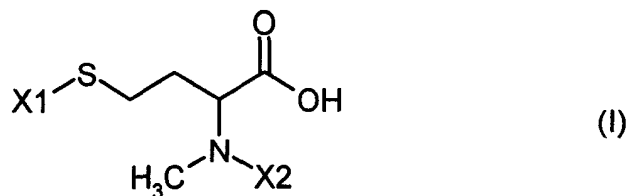
[54] 发明名称

N-甲基-高半胱氨酸及其应用以及制备方法

[57] 摘要

本发明涉及 N-甲基-高半胱氨酸的合成及其应用。

1、通式 I 化合物:



其中:

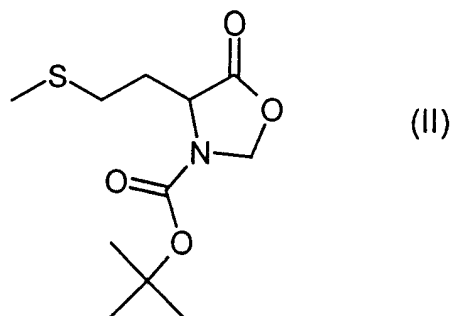
X1 代表硫保护基, 以及

X2 代表氢原子或氮保护基。

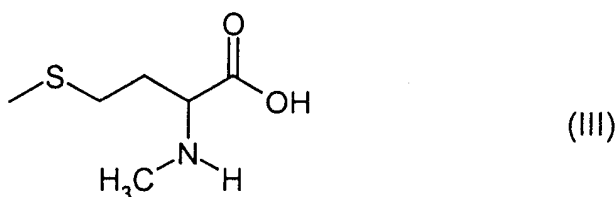
2、如权利要求 1 所述的化合物, 其中 X1 代表苄基、4-甲氧基苄基、二苯基甲基、二(4-甲氧基苯基)甲基、4,4'-二甲氧基三苯基甲基、三苯基甲基、甲氧基甲基、9H-芴-9-基甲基或叔丁基硫化物。

3、如权利要求 1 所述的化合物, 其中 X2 代表 9H-芴-9-基甲基氧基羰基、2,7-二溴-9H-芴-9-基甲基氧基羰基、叔丁基氧基羰基、苄基氧基羰基、三氟乙酰基、2,2,2-三氯乙基氧基羰基、2-三甲基甲硅烷基乙基氧基羰基或 2-三甲基甲硅烷基乙基磺酰基。

4 制备如权利要求 1 所述的通式 I 化合物的方法, 其中在酸存在下用还原剂使式 II 的噁唑烷酮开环,



形成式 III 的 N-甲基蛋氨酸,



然后通过本领域已知的方法引入硫保护基以及任选的氮保护基。

5、如权利要求 4 所述的方法, 其中使用烷基硅烷作为还原剂。

6、如权利要求 4 所述的方法, 其中使用三氟乙酸、五氟丙酸、三氟甲基磺酸或甲磺酸作为所述的酸。

7、如权利要求 1 所述的通式 I 化合物在形成包含 N-甲基-高半胱氨酸的肽以及肽中间体中的应用。

8、如权利要求 1 所述的通式 I 化合物在制备 Fmoc-(N-CH₃)Hcy(Trt)-Tyr(tBu)-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-OH 中的应用。

9、如权利要求 1 所述的通式 I 化合物在制备环-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-(N-CH₃)Hcy中的应用。

10、如权利要求 1 所述的通式 I 化合物在制备环-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-(N-CH₃)Hcy(CH₂CO-β-Dap-Phe(4-NH₂)-Cys-Thr-Ser)中的应用。

N-甲基-高半胱氨酸及其应用以及制备方法

技术领域

本发明涉及权利要求中表征的主题，即、通式 I 和 II 的 N-甲基-高半胱氨酸及其应用和制备方法。

背景技术

N-甲基-氨基酸在合成化学中是有用的中间产物。主要的药物化学都非常频繁地使用此等成分，这是因为许多高效力和选择性的药物都包含 N-甲基-氨基酸。

旋光性 N-甲基-氨基酸都天然地为单个化合物（例如 N-甲基-色氨酸；*Liebigs Ann. Chem.* **1935**, 520, 31-34），但也发现作为许多天然生物活性物质中的组分，如多拉司他汀（G. R. Pettit 等人, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 2989-2990; *Tetrahedron* **1993**, 41, 9151-9170）或者 didemnins（K. L. Rinehart 等人, *J. Nat. Prod.* **1988**, 51, 1-21; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 6846-6848; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3734-3748）。其他例子是 jasplakinolide（*J. Org. Chem.* **1991**, 56, 5196-5202）以及其他细胞毒性肽（*J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 617-627; *Tetrahedron* **1995**, 51, 10653-10662; *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 736-738）。具有免疫抑制活性的环孢菌素也包含 N-甲基-氨基酸（例如参见：R. M. Wenger, *Helv. Chim. Acta* **1983**, 66, 2672-2702; S. L. Schreiber 等人, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 6577-6580）。N-甲基-氨基酸还具有神经药物活性（J. C. Watkins, *J. Med. Pharm. Chem.* **1962**, 5, 1187-1199）。

另一方面，在药物研究中通常利用在生物活性肽中加入 N-甲基-氨基

酸,以研究构象和生物活性(例如参见:*J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3436-3440; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *46*, 47-55; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *27*, 617-632)。H. Kessler, *Angew. Chem.* **1982**, *94*, 509-520, 以及 G. R. Marshall 等人, *Ann. Rep. Med. Chem.* **1978**, *13*, 227-238 提供了对肽构象研究以及生物活性研究的综述。

此外,用相应的 N-甲基化合物取代肽中的氨基酸也被用于增加肽配体的活性或选择性(例如参见:*J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 769-780; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1995**, *46*, 47-55)。与非甲基化的肽键相比, N-甲基-肽键在蛋白水解方面经常表现出更高的稳定性,这可导致口服利用度增加以及作用的延长(R. H. Mazur 等人, *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 758-763)。对于通过加入 N-甲基-氨基酸或者通过其他改性来设计肽,可参见 W. F. Degrado, *Adv. Protein Chem.* **1988**, *39*, 51-124, 以及 J. Rizo, L. M. Gierasch, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *61*, 387-418。对于有关肽模拟物(peptidomimetics)的综述,可参见 A. Giannis 等人, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1303-1326 以及 J. Gante, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1780-1802。

在 WO 01/44177 中描述了一种在环 6 分生部分序列中包含 N-甲基-高半胱氨酸的肽。与金属离子结合序列的结合是通过高半胱氨酸中的硫原子进行的。通过螯合放射性核素如 ^{99m}Tc 或 ^{186}Re , 在癌症的诊断和治疗中作为放射诊断剂或放射治疗剂的应用是可能的(参见 US 6,056,940, US 6,022,857, US 6,017,509)。

在 WO 01/44177 中,肽的合成是在一步一步的合成过程中通过 N-甲基化来完成的(例如参见:*J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2301-2302)。C 端连接在固相上的 4 分生肽与氨基酸 N-Fmoc-S-三苯甲基高半胱氨酸(Fmoc=9H-芴-9-基甲基氧基羰基)反应,后者可在 3 个步骤中由蛋氨酸得到(*J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1361-1371),以形成 5 分生肽。在脱除保护基后,高半胱氨酸的端氨基与 2-硝基苯磺酰氯反应以形成磺酰胺。

接着用 MTBD (1,3,4,6,7,8-六氢-1-甲基-2H-嘧啶并[1,2-a]嘧啶) 进行甲基化, 并随后用 2-巯基乙醇脱除磺酰基。然后进一步增加肽序列。但是, 该合成法具有反应不完全并需要额外纯制肽的缺陷。

产生包含 N-甲基-氨基酸的肽序列通常通过部分序列与 Fmoc-保护的 N-甲基-氨基酸反应来实现 (例如参见: *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1361-1371)。因此, WO 01/44177 中的肽序列所需要的氨基酸 N-Fmoc-N-甲基-S-三苯甲基高半胱氨酸不能预先制备。

在文献中有许多用于制备 N-甲基-氨基酸的方法, 通常由相应的非甲基化氨基酸起始, 这些非甲基化氨基酸可大量地以手性天然物质市售得到。

根据 E. Fischer 首先合成非外消旋的 N-甲基-氨基酸。在此情况下, 氨基酸的 N-甲苯磺酰基衍生物用氢氧化钠溶液和碘甲烷进行甲基化。之后, 用沸腾的盐酸脱除甲苯磺酰基 (*Ann. Chem.* **1913**, *398*, 96-125; *Ber. dt. chem. Ges.* **1915**, *48*, 360-378)。描述到, 用该方法可进行部分的外消旋化 (A. H. Cook 等人, *J. Chem. Soc.* **1949**, 1022-1028)。

Fischer 的另一个方法是 2-溴羧酸与甲基胺的反应 (*Ber dt. chem. Ges.* **1916**, *49*, 1355-1366; 对于应用可参考 A. H. Cook 等人, *J. Chem. Soc.* **1949**, 1022-1028)。在此情况下, 也可产生部分外消旋化的产物 (参见: P. Quitt 等人, *Helv. Chim Acta* **1963**, *46*, 327-333)。我们用 2-溴-4-甲基sulfanyl-丁酸与甲基胺的反应证实了该论断。在该文献中描述了通过以下方法制备 N-甲基-L-蛋氨酸: 对 D-蛋氨酸进行重氮化, 随后在保留中用溴化物替换, 然后在转化中用甲基胺替换 (N. Izumiya, A. Nagamatsu, *Kyushu. Mem. Med. Sci.* **1953**, *4*, 1-16)。未测定产物的对映体纯度。我们可证实, 即使如其所述在温和条件下使用 Ellman 的重氮化法 (*Synthesis* **1999**, 583-585), 反应顺序仅形成 75% 的对映体过量。因此, 该方法不适合于制备对映体纯的 N-甲基-高半胱氨酸。

非常常用的方法是根据 Benoiton 用氢化钠和碘甲烷在 THF 或 DMF 中直接进行甲基化 (*Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 1915-1919. *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 906-910)。该方法是标准地用于制备 Z-和 Boc-保护的 N-甲基-氨基酸 (例如参见: *Tetrahedron* **1995**, *51*, 10653-10662, D. L. Boger 等人, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6197-6205, H. Waldmann 等人, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 227-236)。Boc-保护的蛋氨酸酰胺与甲基化试剂如碘甲烷的反应在我们的情况下导致硫原子的甲基化并形成铊离子 (参见: S. J. F. Macdonald 等人, *J. Med. Chem.* **1999**, *64*, 5166-5175)。因此, 该方法不能用于制备 N-甲基-高半胱氨酸。

有许多方法由氨基酸酯起始制备 N-甲基-氨基酸。这些方法包括用硼烷选择性还原 N-甲酰基氨基酸酯 (*Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 3315-3318, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5196-5202) 以及氨基酸酯的 Schiff 碱与硫酸二甲酯或三氟甲磺酸甲酯 (triflate) 的反应并随后水解 (M. J. O'Donnell 等人, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 3651-3654)。但是, 皂化氨基酸酯以形成氨基酸时, 会发生部分外消旋化 (S. T. Cheung, N. L. Benoiton, *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 906-910)。因此, 这些方法也是不合适的。

氨基酸也可在还原性烷基化反应中与醛反应。中间形成的 Schiff 碱在氢和催化剂存在下原位进行还原 (R. E. Bowman 等人 *J. Chem. Soc.* **1950**, 1342-1345 and 1346-1349) 或者用硼氢化钠进行还原 (K. A. Schellenberg, *J. Org. Chem.* **1963**, *28*, 3259-3261)。该方法可在溶液 (例如参见: *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3849-3862; *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6776-6784) 以及固相 (例如参见: *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6720-6722, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4943-4946, *Bioorg Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 47-50) 中进行。根据该方法, 二肽和三肽已根据 Bowman (*J. Chem. Soc.* **1950**, 1349-1351) 进行全甲基化。根据该方法, 用甲醛进行选择性的单甲基化是不可能的, 而是产生未甲基化、单甲基化和二甲基化氨基酸的

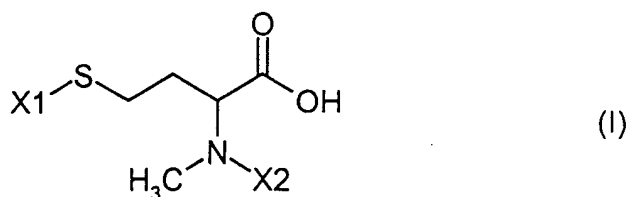
混合物，该混合物不能被分离（Quitt 等人, *Helv. Chim. Acta* **1963**, *46*, 327-333; 还参见 R. E. Bowman, H. H. Stroud, *J. Chem. Soc.* **1950**, 1342-1345)。

在合成 Fmoc 保护的 N-甲基-氨基酸时, Freidinger 的方法 (*J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 77-81) 是最常用的。该方法由两个步骤组成：在第一步中，通过氨基酸与甲醛的反应形成噁唑烷酮，然后在第二步中在酸性条件下用三乙基硅烷还原为 N-甲基化合物。在 Friedinger 法中，Fmoc-L-蛋氨酸与甲醛反应形成噁唑烷酮的产率为 88%，但用三乙基硅烷还原为 Fmoc-N-甲基-L-蛋氨酸的反应即使在 5 天后仍未完全，而且产率仅为 22% (*J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 77-81)。

发明内容

因此，本发明的目的是提供可用于形成包含 N-甲基化高半胱氨酸的肽序列并避免在固相上进行 N-甲基化的化合物及其制备方法。

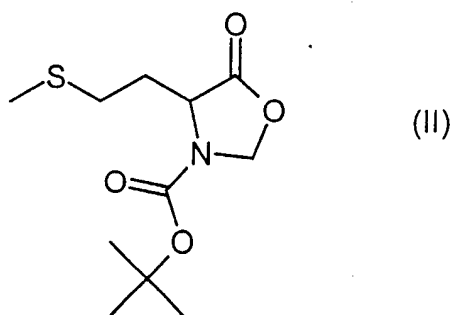
本发明的目的是通过通式 I 的 N-甲基-高半胱氨酸来实现的，该化合物可以是对映体纯的和外消旋的：



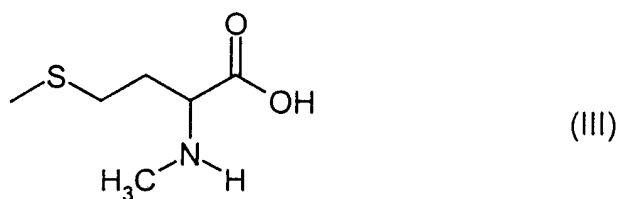
其中 X1 代表硫保护基，而 X2 代表氢原子或者代表氮保护基。X1 优选代表苄基 (Bn)、4-甲氧基苄基 (Mob)、二苯基甲基、二 (4-甲氧基苯基) 甲基、4,4'-二甲氧基三苯基甲基 (DMT)、三苯基甲基 (三苯甲基)、甲氧基甲基 (MOM)、9H-芴-9-基甲基或叔丁基硫化物 (T. W. Greene, P. G. M. Wuts, 有机合成中的保护基, 第 2 版, J. Wiley & Sons, New York 1991), 优选代表苄基 (Bn)、4-甲氧基苄基 (Mob)、二苯基甲基、二 (4-甲氧基苯基) 甲基、4,4'-二甲氧基三苯基甲基 (DMT) 或三苯基甲基 (三

苯甲基), 特别优选为三苯基甲基(三苯甲基), 而 X2 在是保护基时优选代表 9H-芴-9-基甲基氧基羰基(Fmoc)、2,7-二溴-9H-芴-9-基甲基氧基羰基、叔丁基氧基羰基(Boc)、苄基氧基羰基(Cbz 或 Z)、三氟乙酰基、2,2,2-三氯乙基氧基羰基(Troc)、2-三甲基甲硅烷基乙基氧基羰基(Teoc)或 2-三甲基甲硅烷基乙基磺酰基(T. W. Greene, P. G. M. Wuts, 见上), 优选代表叔丁基氧基羰基(Boc)、苄基氧基羰基(Cbz 或 Z)或 9H-芴-9-基甲基氧基羰基(Fmoc), 特别优选代表 9H-芴-9-基甲基氧基羰基(Fmoc)。

根据本发明之通式 I 化合物的制备如下进行: 在还原剂存在下用酸使根据文献方法(Ben-Ishai, *J. Am. Chem. Soc.* 1957, 79, 5736-5738; M. A. Blaskovich, M. Kahn, *Synthesis* 1998, 379-380; G. V. Reddy 等人, *Synth. Commun.* 1999, 29, 4071-4077)由蛋氨酸制得的(见实施例 1)式 II 噁唑烷酮开环,



以形成式 III 的 N-甲基蛋氨酸,



然后按照本领域已知的方法引入硫保护基和任选的氮保护基(参见: T. W. Greene, P. G. M. Wuts, 同上)。优选使用烷基硅烷作为还原剂, 更优选三

乙基硅烷。所述酸优选使用三氟乙酸、五氟丙酸、三氟甲磺酸或甲磺酸，更优选三氟乙酸。反应优选在氯化溶剂、二噁烷、THF、二甲氧基乙烷中进行，优选在二氯甲烷或氯仿中。反应进行的温度为-2℃至+100℃，优选为 0—40℃。反应时间为 5 分钟—10 小时，优选 0.5—2 小时。得到 N-甲基蛋氨酸的产率为 70—95%。

根据本领域技术人员已知的方法（参见：M. Goodman (编辑), Houben-Weyl, 第 E22 卷, Synthesis of Peptide and Peptidomimetics. Thieme, 2001), 可用通式 I 的化合物制备包含 N-甲基-高半胱氨酸的肽以及肽中间体, 优选用于制备 Fmoc-(N-CH₃)Hcy(Trt)-Tyr(tBu)-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-OH、环-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-(N-CH₃)Hcy 以及环-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Phe-(N-CH₃)Hcy(CH₂CO-β-Dap-Phe(4-NH₂)-Cys-Thr-Ser)。

实施例 1

a) 叔丁基-(S)-4-[2-(甲基 sulfanyl)乙基]-5-氧代噁唑烷酮-3-羧酸酯

100 g 的 N-(叔氧基羰基)-L-蛋氨酸(0.4 mol)、100 g 的低聚甲醛 (3.3 mol)、200 g 的无水硫酸镁(1.7 mol)和 4 g 的对甲苯磺酸 (0.02 mol)在 1L 甲苯中的混合物加热 3 小时至 90℃。冷却至 20℃，然后向其中添加 800 ml 的饱和碳酸氢钠溶液，同时用冷却冰。过滤，残留物用 400 ml 的乙酸乙酯洗涤。有机相用 300 ml 的水萃取，在硫酸钠上干燥，然后真空蒸发至干。粗产物溶解在 150 ml 的己烷/乙酸乙酯 1: 3 中，然后在硅胶上过滤，并用 500 ml 的己烷/乙酸乙酯 1: 3 重新洗涤。真空蒸发至干，得到 85.3 g (0.33 mmol, 理论值的 83%) 黄色油。

计算值: C 50.56 H 7.33 N 5.36 S 12.27

实测值: C 50.38 H 7.24 N 5.43 S 12.10

IR: 2980, 2920, 1800, 1715, 1390, 1170, 1050

NMR (CDCl₃): 1.5 (9H), 2.1 (3H), 2.15-2.35 (2H), 2.5-2.68 (2H), 4.33 (1H), 5.21 (1H), 5.48 (1H)

MS (EI): m/z 261, 205, 188, 116, 100, 57

b) N-甲基-L-蛋氨酸

在 0℃ 下将 45 ml 的三氟乙酸和 40 ml 的三乙基硅烷(0.25 mol)滴加至 19.4 g 叔丁基-(S)-4-[2-(甲基 sulfanyl)乙基]-5-氧代噁唑烷酮-3-羧酸酯(0.074 mol)在 65 ml 二氯甲烷中的溶液内。再搅拌 1 小时,同时用冷却冰,然后在 20℃ 下再 1 小时。反应溶液真空蒸发至干。残留物用 100 ml 的二氯甲烷溶解 3 次,并重新蒸发至干。残留物溶解在 100 ml 的水中,并用 50 ml 的 MTBE 萃取 3 次。含水相真空蒸发至干。残留物重新用 50 ml 的乙醇溶解 3 次,并重新蒸发至干。残留物与 150 ml 的 MTBE 混合,然后在 20℃ 下搅拌 2 小时。过滤,并用 50 ml 的 MTBE 重新洗涤。干燥后,得到 9.6 g (0.059 mol, 理论值的 80%) 的无色固体。

实测值: C 44.15 H 8.03 N 8.58 S 19.64

计算值: C 44.01 H 7.83 N 8.72 S 19.80

IR: 3440, 3010, 2920, 2830, 2420, 1735, 1675, 1580, 1205, 1140, 800, 720

NMR (DMSO): 2.01-2.08 (5H), 2.5-2.65 (5H), 3.74-3.78 (1H)

MS (FAB): m/z 164

CD (水): 200 nm, $\Delta \epsilon$ 1.64

c) N-甲基-S-三苯甲基-L-高半胱氨酸

引入 7.5 g (0.046 mol)的 N-甲基-L-蛋氨酸,并在 MeOH/干冰冷却下冷凝 200 ml 的氨。在-35℃,于 1 小时的时间内分批添加 5.2 g (0.23 mol)

的钠，然后再搅拌 2 小时。分批添加 9.7 g (0.18 mol) 的氯化铵，撤除冷却，用氮气排出氨过夜。添加 14.0 g (0.054 mol) 的三苯基甲醇。在用冰冷却下，添加 50 ml 的二氯甲烷和 90 ml 的三氟乙酸。在室温下再搅拌 1 小时，然后蒸发至干。残留物悬浮在 200 ml 水中，并用氢氧化钠溶液使 pH 为 13。再搅拌 1 小时后，抽滤，并将固体悬浮在 500 ml 的水中。添加柠檬酸，由此将 pH 调节为 4。添加 600 ml 的 MTBE，并搅拌 30 分钟。抽滤，并分别用 100 ml 的 MTBE 洗涤 2 次。残留物与 100 ml 的二氯甲烷混合，添加 20 ml 的乙醇，然后滴加 500 ml 的 MTBE。再搅拌 1 小时，抽滤并用 MTBE 洗涤。干燥后，得到 12.6 g (0.032 mol, 理论值的 70%) 的无色固体。

计算值: C 73.62 H 6.44 N 3.58 S 8.19

实测值: C 73.40 H 6.30 N 3.71 S 8.02

IR: 3440, 3055, 2850, 2400, 1615, 1485, 1445, 1395, 740, 700

NMR (CDCl₃): 1.28-1.62 (2H), 2.12 (3H), 2.25-2.45 (2H), 2.84-2.92 (1H), 7.12-7.41 (15H)

MS (EI): m/z 243, 165

d) N-(9H-芴-9-基甲基氧基羰基)-N-甲基-S-三苯甲基-L-高半胱氨酸

将 16.6 g (0.042 mol) 的 N-甲基-S-三苯甲基-L-高半胱氨酸悬浮在 90 ml 的水和 100 ml 的 THF 中，然后添加 12.58 g (0.12 mol) 的碳酸钠。在 10°C 下，滴加 14.88 g (0.044 mol) 芴基甲基琥珀酰亚胺基碳酸酯在 50 ml THF 中的溶液，然后再搅拌 3 小时。接着与 80 ml 的水和 130 ml 的乙酸乙酯混合，搅拌 10 分钟，然后用柠檬酸使 pH 为 4。有机相分别用 100 ml 的水洗涤 2 次，并用 100 ml 的食盐溶液洗涤 1 次。含水相随后用 100 ml 的乙酸乙酯重新萃取。在旋转蒸发器中蒸发浓缩合并的有机相，与 260 ml

的乙酸乙酯混合，然后在旋转蒸发器中蒸发浓缩得到 29.2 g 的泡沫，其用二氯甲烷/丙酮 6: 4 进行色谱纯制。得到 22.4 g (0.036 mol, 理论值的 86%) 的产物。

计算值: C 76.32 H 5.75 N 2.28 S 5.22

实测值: C 76.11 H 5.52 N 2.40 S 5.38

IR: 3430, 3060, 2950, 1740, 1710, 1175, 740, 700

NMR (CDCl₃): 1.46-2.35 (4H), 2.66-2.73 (3H), 4.13-4.6 (4H), 7.13-7.79 (23H)

MS (FAB): m/z 614, 636

实施例 2

如上所述，使用 N-(叔氧基羰基)-D-蛋氨酸替代 N-(叔氧基羰基)-L-蛋氨酸，可类似地得到实施例 1d 之标题化合物中的对映体化合物。

a) 叔丁基-(R)-4-[2-(甲基 sulfanyl)乙基]-5-氧代噁唑烷酮-3-羧酸酯

计算值: C 50.56 H 7.33 N 5.36 S 12.27

实测值: C 50.30 H 7.51 N 5.50 S 12.41

IR: 2980, 2920, 1800, 1715, 1390, 1175, 1050

NMR (CDCl₃): 1.5 (9H), 2.08 (3H), 2.15-2.35 (2H), 2.5-2.68 (2H), 4.33 (1H), 5.21 (1H), 5.48 (1H)

MS (EI): m/z 261, 205, 188, 116, 100, 57

b) N-甲基-D-蛋氨酸

计算值: C 44.15 H 8.03 N 8.58 S 19.64

实测值: C 43.98 H 7.81 N 8.70 S 19.82

IR: 3430, 3010, 2920, 2830, 2420, 1630, 1580, 1395

NMR (D₂O): 2.13 (3H), 2.12-2.22 (2H), 2.55-2.68 (2H), 2.74 (3H),
3.68-3.73 (1H)

MS (EI): m/z 163, 145, 118, 88, 70, 61

CD (水): 200 nm, $\Delta \epsilon$ 1.87

c) N-甲基-S-三苯甲基-D-高半胱氨酸

计算值: C 73.62 H 6.44 N 3.58 S 8.19

实测值: C 73.45 H 6.25 N 3.78 S 8.15

IR: 3440, 3055, 2850, 2400, 1615, 1485, 1445, 1395, 740, 700

NMR (CDCl₃): 1.28-1.62 (2H), 2.12 (3H), 2.25-2.45 (2H), 2.84-2.92
(1H), 7.12-7.41 (15H)

MS (EI): m/z 243, 165

d) N-(9H-芴-9-基甲基氧基羰基)-N-甲基-S-三苯甲基-D-高半胱氨酸

计算值: C 76.32 H 5.75 N 2.28 S 5.22

实测值: C 76.15 H 5.58 N 2.41 S 5.30

IR: 3440, 3055, 2950, 2600, 1740, 1705, 1445, 1170, 740, 700

NMR (CDCl₃): 1.45-2.35 (4H), 2.65-2.73 (3H), 4.14-4.62 (4H),
7.13-7.81 (23H)

MS (FAB): m/z 636, 614

实施例 3

N-苄基氧基羰基-N-甲基-S-三苯甲基-L-高半胱氨酸

将 16.6 g (0.042 mol) 的 N-甲基-S-三苯甲基-L-高半胱氨酸 (实施例 1c 的标题化合物) 悬浮在 90 ml 的水和 100 ml 的 THF 中, 然后添加 12.58 g (0.12 mol) 的碳酸钠。在 10℃ 下, 滴加 10.97 g (0.044 mol) N-苄基氧基羰基氧基琥珀酰亚胺在 50 ml THF 中的溶液, 并在 10℃ 下再搅拌 3 小时。接着与 80 ml 的水和 130 ml 的乙酸乙酯混合, 在室温下搅拌 10 分钟, 然后用柠檬酸使 pH 为 4。有机相分别用 100 ml 的水洗涤 2 次, 并用 100 ml 的食盐溶液洗涤 1 次。含水相随后用 100 ml 的乙酸乙酯再萃取 1 次。合并的有机相真空蒸发至干; 残留物在硅胶上进行色谱纯制 (流动溶剂: 二氯甲烷/丙酮 6: 4)。得到 22.08 g (理论值的 87%) 固体无色泡沫状的产物。

元素分析:

计算值: C 73.12 H 5.94 N 2.66 S 6.10

实测值: C 72.87 H 6.08 N 2.60 S 5.98

实施例 4

N-叔丁基氧基羰基-N-甲基-S-三苯甲基-L-高半胱氨酸

将 16.6 g (0.042 mol) 的 N-甲基-S-三苯甲基-L-高半胱氨酸 (实施例 1c 的标题化合物) 悬浮在 90 ml 的水和 100 ml 的 THF 中, 然后添加 12.58 g (0.12 mol) 的碳酸钠。在 10℃ 下滴加 9.60 g (0.044 mol) 二叔丁基二碳酸酯在 50 ml THF 中的溶液, 并在 10℃ 下搅拌 3 小时。接着与 80 ml 的水和 130 ml 的乙酸乙酯混合, 在室温下搅拌 10 分钟, 然后用柠檬酸使 pH 为 4。合并的有机相分别用 100 ml 的水洗涤 2 次, 并用 100 ml 的食盐溶液洗涤 1 次。含水相随后用 100 ml 的乙酸乙酯再萃取 1 次。合并的有机相真空蒸发至干; 残留物在硅胶上进行色谱纯制 (流动溶剂: 二氯甲烷/

丙酮 6: 4)。得到 17.14 g (理论值的 83%) 固体无色泡沫状的产物。

元素分析:

计算值: C 70.85 H 6.77 N 2.85 S 6.52

实测值: C 70.68 H 6.91 N 2.74 S 6.42

实施例 5

a) N-甲基-S-(4,4'-二甲氧基-三苯甲基)-L-高半胱氨酸

引入 7.5 g (0.046 mol)的 N-甲基-L-蛋氨酸 (实施例 1b 的标题化合物), 然后在 MeOH/干冰冷却冷凝 200 ml 的氨。在-35℃下于 1 小时的时间内分批添加 5.2 g (0.23 mol)的钠, 并继续搅拌 2 小时。分批添加 9.7 g (0.18 mol)的氯化铵, 撤除冷却, 并用氮气排出氨过夜。添加 17.3 g (0.054 mol)的二(4-甲氧基苯基)-苯基-甲醇(DMT)。在用冰冷却下添加 50 ml 的二氯甲烷和 90 ml 的三氟乙酸。在室温下搅拌 1 小时并蒸发至干。残留物悬浮在 200 ml 的水中, 并用氢氧化钠溶液使 pH 达到 13。再搅拌 1 小时后抽滤, 然后将固体悬浮在 500 ml 的水中。添加柠檬酸, 由此将 pH 设定为 4。添加 600 ml 的 MTBE 并搅拌 30 分钟。抽滤, 并分别用 100 ml 的 MTBE 洗涤 2 次。残留物与 100 ml 的二氯甲烷混合, 添加 20 ml 的乙醇, 然后滴加 500 ml 的 MTBE。再搅拌 1 小时, 抽滤, 并用 MTBE 洗涤。干燥后, 得到 13.92 g (理论值的 67%) 的无色固体。

元素分析:

计算值: C 69.15 H 6.47 N 3.10 S 7.10

实测值: C 68.98 H 6.63 N 3.01 S 7.02

b) N-(9H-芴-9-基甲基氧基羰基)-N-甲基-S-(4,4'-二甲氧基三苯甲基)-L-高半胱氨酸

将 18.97 g (0.042 mol)的 N-甲基-S-4,4'-二甲氧基三苯甲基-L-高半胱

氨酸（实施例 5a 的标题化合物）悬浮在 90 ml 的水和 100 ml 的 THF 中，然后添加 12.58 g (0.12 mol) 的碳酸钠。在 10℃ 下添加 14.88 g (0.044 mol) 苄基甲基琥珀酰亚胺基碳酸酯在 50 ml THF 中的溶液，并在 10℃ 下再搅拌 3 小时。接着与 80 ml 的水和 130 ml 的乙酸乙酯混合，在室温下搅拌 10 分钟，然后用柠檬酸使 pH 为 4。有机相分别用 100 ml 的水洗涤 2 次，并用 100 ml 的食盐溶液洗涤 1 次。含水相随后用 100 ml 的乙酸乙酯再萃取 1 次。合并的有机相真空蒸发至干；残留物在硅胶上进行色谱纯制（流动溶剂：二氯甲烷/丙酮 6: 4）。得到 22.92 g（理论值的 81%）固体无色泡沫状的产物。

元素分析：

计算值：C 73.08 H 5.83 N 2.08 S 4.76

实测值：C 72.95 H 5.94 N 2.01 S 4.68

实施例 6

Fmoc-(N-CH₃)Hcy(Trt)-Tyr(tBu)-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-ClTrt- 固相

将如 WO 01/44177（实施例 1，步骤 1—3）中所述制得的负载于固相上的肽 Fmoc-Tyr(tBu)-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-ClTrt 固相用 5% 哌啶在 1: 1 NMP/DCM (75 ml) 中的溶液处理 10 分钟，然后与 20% 哌啶在 NMP (75 ml) 中的溶液反应 15 分钟。用 NMP (3×75 ml×1 分钟) 和 DCM (3×75 ml×1 分钟) 顺序洗涤固相。在小的固相样品上进行的茚三酮分析表明反应结束，固相用 NMP (75 ml) 洗涤。小部分的载体树脂用 HFIPA 处理，并通过 HPLC 进行分析（见 Diatide 的 HPLC 方法 1）。没有检测到 Fmoc-Tyr(tBu)-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-OH 在 21.7 分钟处的峰，但检测到 H-Tyr(tBu)-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-OH 在 12.7 分钟处的峰。在一个单独的容器中，将 N-α-Fmoc-N-α-甲基-S-三苯甲基-

高半胱氨酸 (9.20 g, 15 mmol)、HATU 试剂 (5.70 g, 15 mmol) 和 HOAt (2.04 g, 15 mmol) 溶解在 50 ml 的 NMP 中。将 DIEA (6.96 ml, 40 mmol) 添加至经保护的 N-甲基高半胱氨酸的溶液中。搅拌 1 分钟, 然后将混合物添加至固相反应物中。反应物在轻的氩气流中摇晃 4 小时。分离溶液, 固相顺序地用 NMP (3×75 ml×1 分钟) 和 DCM (3×75 ml×1 分钟) 洗涤。在小的固相样品上进行的茚三酮分析表明反应结束。小部分的载体树脂用 HFIPA 处理, 并通过 HPLC 进行分析 (见 Diatide 的 HPLC 方法 1)。没有检测到 H-Tyr(tBu)-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-OH 在 12.7 分钟处的峰, 但检测到 Fmoc-(N-CH₃)Hcy(Trt)-Tyr(tBu)-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(tBu) OH 在 26.7 分钟处的峰。