



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115715294 A

(43) 申请公布日 2023. 02. 24

(21) 申请号 202180040700.1

A • 迈因茨

(22) 申请日 2021.06.09

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

(30) 优先权数据

专利代理师 张晓威

20178980.7 2020.06.09 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2022.12.06

C07K 7/56 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/065392 2021.06.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/250059 EN 2021.12.16

(71) 申请人 海德堡医药研究有限责任公司

地址 德国拉登堡

(72) 发明人 H • 格鲁斯 C • 卢茨

R • 苏斯穆特 姚贵阳

C • 克尼特尔 S • 科索尔

权利要求书10页 说明书72页 附图9页

(54) 发明名称

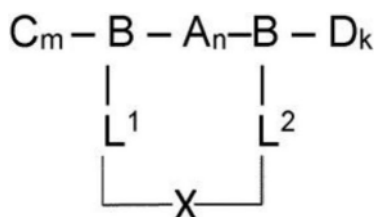
用于合成含硫醚肽的方法

(57) 摘要

本发明涉及在碘处理下固相肽合成中在色氨酸与半胱氨酸之间形成硫桥的方法。本发明还涉及所述方法得到的化合物及其各自的用途。

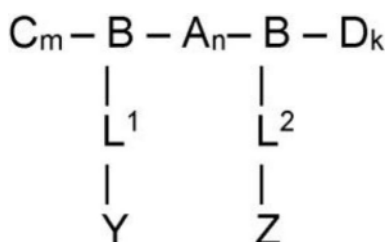


1. 用于制备式 (I) 的化合物的方法,



其中

在反应步骤 (a) 中, 使式 (II) 的化合物



与碘 (I_2)、N-溴代琥珀酰亚胺或N-碘代琥珀酰亚胺、一氯化碘、一溴化碘和双(吡啶)碘鎓四氟硼酸盐, 特别是与碘, 反应, 得到式 (I) 的化合物;

其中

-Z选自SH、S-三苯甲基(STrt)、S-乙酰氨基甲基(SAcM)、S-二苯甲基(SDpm)、S-单甲氧基三苯甲基(SMmt)和S-叔丁基(S^tBu); 特别地Z选自SH、S-三苯甲基(STrt)、S-乙酰氨基甲基(SAcM)、S-二苯甲基(SDpm)、S-单甲氧基三苯甲基(SMmt)和S-叔丁基(S^tBu), 最特别地Z是STrt;

-Y是未取代的或羟基-、卤素-、卤代碳-、炔基-、烯烃-、氰基-保护的羧酸酯和/或羧基酰胺取代的吡啶, 特别是未取代的或羟基-、卤素-、卤代碳-、炔基-、烯烃-、氰基-保护的羧酸酯和/或羧基酰胺取代的吡啶;

- L^1 是未取代的或Me-取代的 C_1 - C_2 烷基连接基, 特别地 L^1 是 CH_2 ;

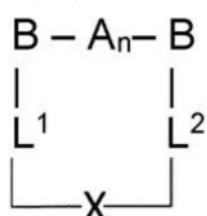
- L^2 是未取代的或Me-取代的 C_1 - C_2 烷基连接基, 特别地 L^2 是 CH_2 或 $-C(CH_3)_2-$;

-B是 α -氨基酸、 β -氨基酸主链、 α -甲基氨基酸, 特别地B是 α -氨基酸主链($NH-CHR-C=O$), 其中R是 L^1 或 L^2 ;

-每个A独立地选自呈L-或D-构象的蛋白原性和非蛋白原性 α -氨基酸或 β -氨基酸, 特别地每个A独立地选自呈L-或D-构象的蛋白原性和非蛋白原性 α -氨基酸;

-n是选自2、3和4的整数;

-条件是环



由14至26个键, 特别是15至21个键, 更特别是18个键组成;

-每个C和D独立地选自呈L-或D-构象的蛋白原性和非蛋白原性 α -氨基酸, 其中式 (II) 的C或D与树脂连接或者具有受保护的N端;

-m和k独立地选自0至4的整数,特别地其中m和k的总和为0至4的整数;

-X是(- (吡啶-S-) 或 (-S-吡啶-)) ,其中吡啶是未取代的或羟基-、卤素-、卤代碳-、炔基-、烯基-、氰基-保护的羧酸酯和/或羧基酰胺取代的吡啶,

其中任选地X的硫原子可以随后被氧化。

2. 权利要求1的方法,其中式(II)的C或D与树脂连接,并与碘(I_2) 反应,特别地以2:1的碘/式(II)的化合物的浓度比与碘反应。

3. 权利要求1的方法,其中式(II)的C或D具有受保护的N端,并与碘(I_2) 反应,特别地以1:1的碘/式(II)的化合物的浓度比与碘反应。

4. 之前权利要求中任一项的方法,其中所述反应步骤(a) 在极性溶剂中进行,特别地在MeOH、DCM、NMP(N-甲基-2-吡咯烷酮) 或DMF中进行,更特别地在极性非质子溶剂中进行,最特别地在DMF中进行。

5. 之前权利要求中任一项的方法,其中碘以1-4mg/ml,特别是2mg/ml的浓度使用。

6. 之前权利要求中任一项的方法,其中n是3。

7. 之前权利要求中任一项的方法,其中A独立地选自蛋白原性或非蛋白原性 α -氨基酸,特别地,A独立地选自未取代的或羟基取代的Gly、Ala、Ile、Leu、Val、Pro、Phe、Lys、Arg、His、D-Pro、D-Ala、L-炔丙基-Gly、Aib、光氨基酸、叠氮氨基酸、炔基氨基酸。

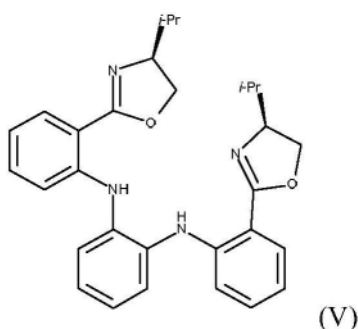
8. 之前权利要求中任一项的方法,其中C和D独立地选自蛋白原性或非蛋白原性 α -氨基酸,特别地,C和D独立地选自Gly、Ala、Ile、Leu、Val、Pro、Phe、Lys、Ser、Cys、Arg、His、Asp、Asn、Gln、Glu、Hyp、L-哌啶甲酸、L-氮杂环丁烷-2-甲酸、(S)-二氢吡啶-2-甲酸、L-4-噻唑烷甲酸、反式-4-Hyp、L-炔丙基-Gly、羟基化氨基酸、光氨基酸、叠氮氨基酸、炔基氨基酸、氟化Pro和氨基-Pro。

9. 之前权利要求中任一项的方法,其中Y的吡啶未被取代或者被一个、两个、三个或四个选自羟基、卤素、CN和氟化碳的基团取代,特别地,Y的吡啶未被取代或者被一个羟基或卤素基团取代。

10. 权利要求1-2或4-9中任一项的方法,其中所述树脂是酸不稳定树脂,特别地是酸不稳定THP树脂、2-氯三苯甲基树脂、Rink酰胺树脂或王氏树脂。

11. 之前权利要求中任一项的方法,其中z的硫原子被氧化,特别地,

i. 使用锰离子,更特别地,使所述化合物与式(V)的化合物,

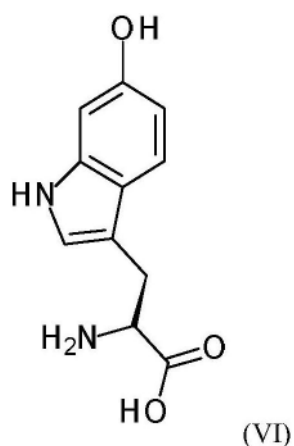


以及与 $Mn(OTf)_2$ 和 H_2O_2 反应,

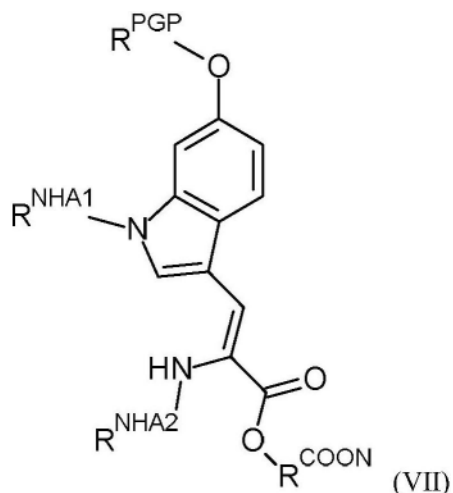
ii 使用PPO、过氧化二苯甲酰、过氧苯甲酸叔丁酯或过氧化月桂酰;或mCPBA;

iii. 使用碘和氧气。

12. 用于制备式(VI)的化合物的方法,



其中在反应步骤(a)中,使式(VII)的化合物



其中

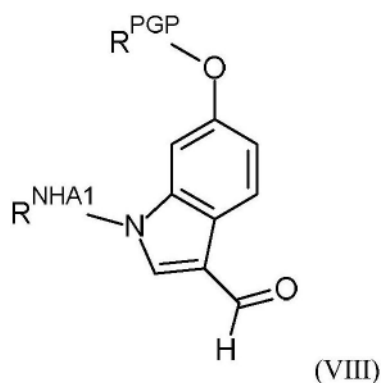
- R^{NHA1}是氨基保护基,特别是可在酸性或还原条件下裂解的氨基保护基,更特别是Boc、Cbz、或三异丙基甲硅烷基(TIPS),最特别是Boc,
- R^{NHA2}是氨基保护基,特别是可在酸性或还原条件下裂解的氨基保护基,更特别是Boc或Cbz,最特别是Boc,
- R^{PGP}是酚OH基团的保护基,特别是可在碱性或还原条件下裂解,更特别是可在还原条件下裂解的酚OH保护基,更特别地R^{PGP}是苄基或乙酰基,最特别地R^{PGP}是苄基;
- R^{COON}是羧基保护基,特别是可在碱性条件下裂解的羧基保护基,更特别是甲基、乙基、苄基或叔丁基,最特别是甲基,

与H₂、有机金属铈或钪络合物和有机磷配体反应,特别地与H₂、有机金属铈络合物和有机磷配体反应,更特别地与H₂和双(1,5-环辛二烯)铈(I)⁺、双(2,2'-联吡啶)铈(I)⁺或双(降冰片二烯)铈(I)⁺与单价阴离子,以及选自(R)-MonoPhos或(1R,1'R,2S,2'S)-DuanPhos或(R,R)-DIPAMP的有机磷配体反应,最特别地与H₂、Rh(COD)₂BF₄和(R)-MonoPhos反应,

并将所述化合物与移除R^{NHA1}、R^{NHA2}、R^{PGP}和R^{COON}的脱保护剂反应,

以得到以(VI)为特征的化合物。

13. 权利要求12的方法,其中在反应步骤(b)中,使式(VIII)的化合物



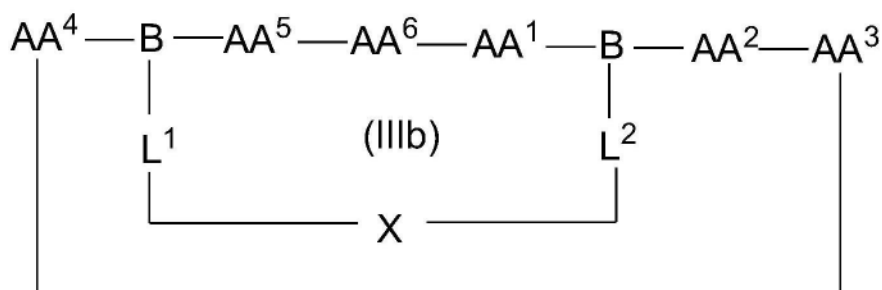
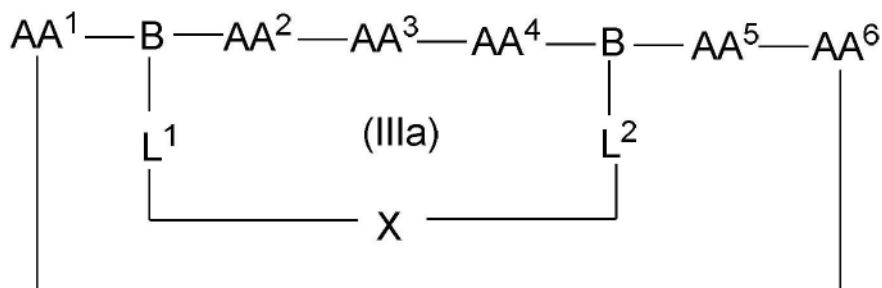
其中

• R^{NHA1} 和 R^{PGP} 具有与权利要求12中所述相同的含义，

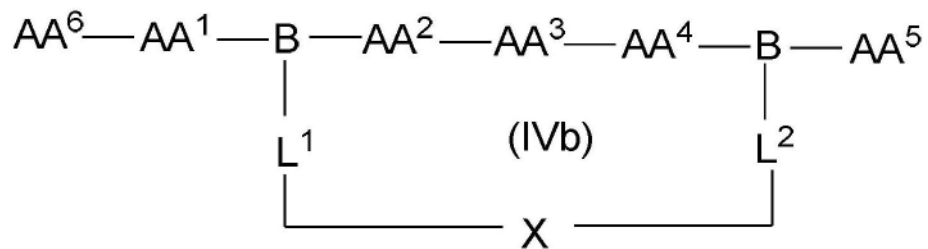
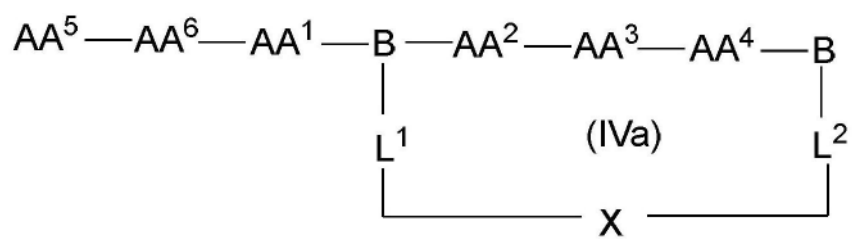
与受保护的2-膦酰甘氨酸-甲基二甲酯在碱性条件下反应，特别地与Boc-2-膦酰甘氨酸-甲基二甲酯、Cbz-2-膦酰甘氨酸-苄基二甲酯或Cbz-2-膦酰甘氨酸-甲基二甲酯在碱性条件下反应，更特别地碱选自DBU和四甲基胍，

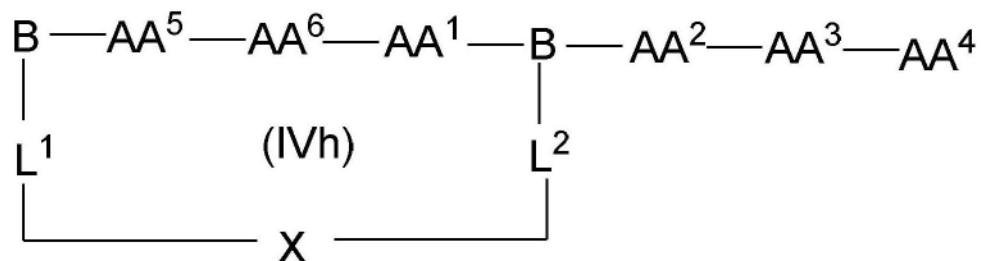
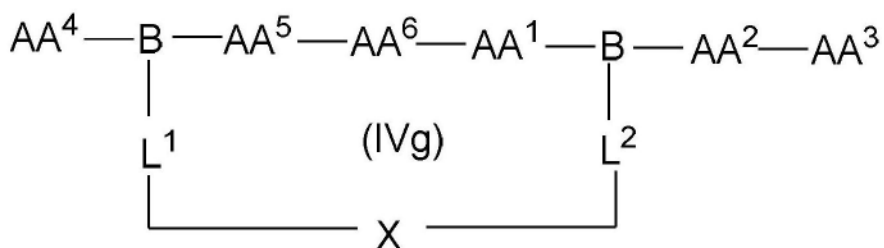
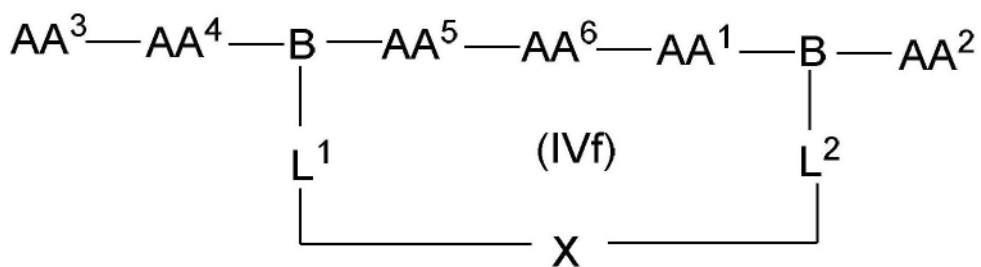
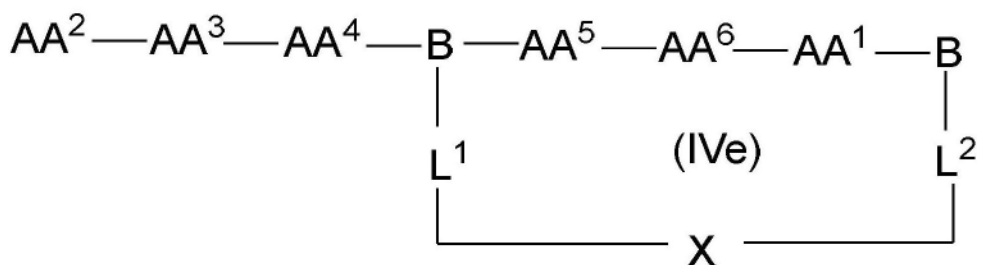
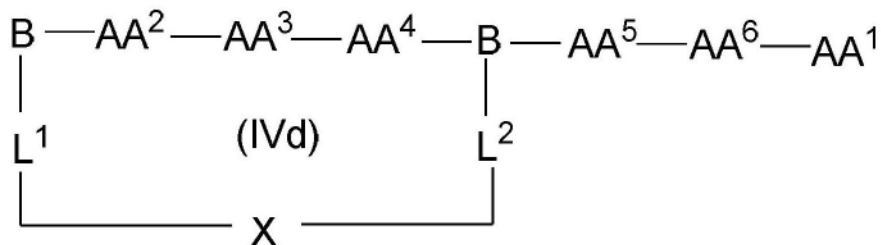
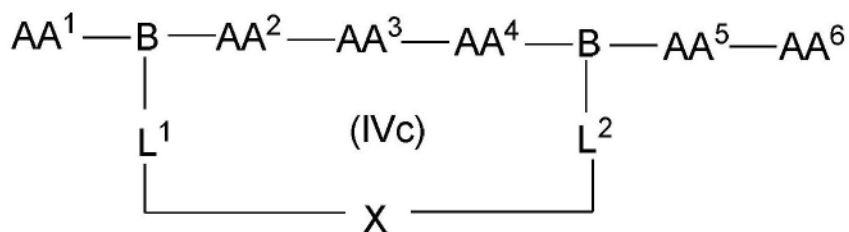
以得到以 (VII) 为特征的化合物。

14. 式 (IIIa) 和 (IIIb) 的化合物，



或者式 (IVa)、(IVb)、(IVc)、(IVd)、(IVe)、(IVf)、(IVg) 或 (IVh) 的化合物，





其中

-X在式[(IVa)、(IVb)、(IVc)和(IVd)]中为式Q-R,或在式[(IVe)、(IVt)、(IVg)和(IVh)]中为R-Q,其中,

-Q是未取代的或 CF_3 -、醇-、烷基-、O-烷基-、羟基-和/或卤素-取代的咪唑或吡啶,更特

别地Q是未取代的或烷基-、O-烷基-、羟基-和/或卤素-取代的吡啶,最特别地Q选自未取代的吡啶、6-OH-吡啶、5-OH-吡啶、5-F-吡啶、5-Me-吡啶、5-OMe-吡啶、4-F-吡啶和5-Br-吡啶;

-R是S、SO或SO₂;

-L¹是未取代的或Me-取代的C₁-C₂烷基连接基,特别地L¹是未取代的C₁烷基连接基;

-L²是未取代的或Me-取代的C₁-C₂烷基连接基;

-B是α-氨基酸主链;

-AA¹选自DHlle (二羟基-异亮氨酸)、Ile、DHLeu (二羟基-亮氨酸)、HVal (羟基-缬氨酸)、HIle (5-羟基-异亮氨酸或4-羟基异亮氨酸)、Gly、D-Pro、L-Pro、D-Ala、Aib (2-氨基异丁酸)和Ala,特别地选自Gly和D-Pro、DHlle (二羟基-异亮氨酸)、Ile、DHLeu (二羟基-亮氨酸)、HVal (羟基-缬氨酸)、HIle (5-羟基-异亮氨酸或4-羟基异亮氨酸);

-AA²选自Gly、D-Pro、D-Ala、Aib (2-氨基异丁酸)、Asn、Asp、Ser、Cys、Arg、Lys、Gln、Glu和L-炔丙基-Gly,特别地选自Asn、Asp、Gln、Glu;以及Ala、Gly和D-Pro;

-AA³选自Ile、Leu、Val、光Leu,以及L-炔丙基-Gly、L-炔丙基-Gly、Pro、Gly、Aib、反式-4-Hyp、Hyp、4-F-Pro、4-NH₂-Pro、光-Pro、L-哌啶甲酸、L-氮杂环丁烷-2-甲酸、(S)-二氢吡啶-2-甲酸、L-4-噻唑烷甲酸、Tie,特别地选自反式-4-Hyp、4-F-Pro和4-NH₂-Pro;最特别地选自Ile,

-AA⁴选自Gly、D-Pro、D-Ala、Aib (2-氨基异丁酸)、Asn、Asp、Ser、Cys、Arg、Lys、Gln、Glu和L-炔丙基-Gly、Sar、Acc,特别地选自Asn、Asp、Gln、Glu;和Ala,最特别地AA²选自Gly和D-Pro;

-AA⁵选自Asn、Asp、Ser、Cys、Arg、Lys、Gln、Glu和L-炔丙基-Gly、D-Pro、D-Ala、Aib (2-氨基异丁酸)和Ala,特别地选自Gly和D-Pro、Asn、Asp、Gln以及Glu;

-AA⁶选自Pro、Gly、Aib、反式-4-Hyp、Hyp、4-F-Pro、4-F₂-Pro、4-NH₂-Pro、光-Pro、L-哌啶甲酸、L-氮杂环丁烷-2-甲酸、(S)-二氢吡啶-2-甲酸、L-4-噻唑烷甲酸、Ile、Leu、Val、光Leu和L-炔丙基-Gly,特别地选自Ile和L-炔丙基-Gly;反式-4-Hyp、4-F-Pro和4-NH₂-Pro;

特别地条件是在式(IIIa)中,AA¹的N端经由酰胺键偶联至AA⁶的C端;且在式(IIIb)中,AA⁴的N或C端经由酰胺键偶联至AA³的N端,

并且在式(IVa)、(IVb)、(IVc)、(IVd)、(IVe)、(IVf)、(IVg)或(IVh)中,C端氨基酸任选地与树脂连接;

特别地,条件是从左至右的方向是从N端至C端或从C端至N端。

15. 权利要求14的化合物,其中所述化合物不由以下组合构成:

- Q是未取代的或烷基-、O-烷基-、羟基-和/或卤素-取代的吡啶;
- R是S、SO或SO₂;
- L¹是CH₂;
- L²是CH₂;
- AA¹选自DHlle (二羟基-异亮氨酸)、Ile和HIle (羟基-异亮氨酸);
- AA²是Gly;
- AA³是Ile;
- AA⁴是Gly;
- AA⁵是Asn或Asp;并且

- AA⁶是Pro或Hyp (羟脯氨酸) ;

或者

- Q是未取代的或烷基-、O-烷基-、羟基-和/或卤素-取代的吡啶;
- R是S、SO或SO₂;
- L¹是CH₂;
- L²是CH₂;
- AA¹是DHlle或Ile;
- AA²和AA⁴中的一者是Gly且另一者是Ala,或者AA²和AA⁴两者均是Ala;
- AA³是Ile;
- AA⁵是Asn;并且
- AA⁶是Hyp (羟脯氨酸) ;

或者

- Q是未取代的或烷基-、O-烷基-、羟基-和/或卤素-取代的吡啶;
- R是S、SO或SO₂;
- L¹是CH₂;
- L²是CH₂;
- AA¹选自DHLeu (二羟基-亮氨酸) 和HVal (羟基-缬氨酸) ;
- AA²是Gly;
- AA³是Ile;
- AA⁴是Gly;
- AA⁵是Asn;并且
- AA⁶是Hyp (羟脯氨酸) 。

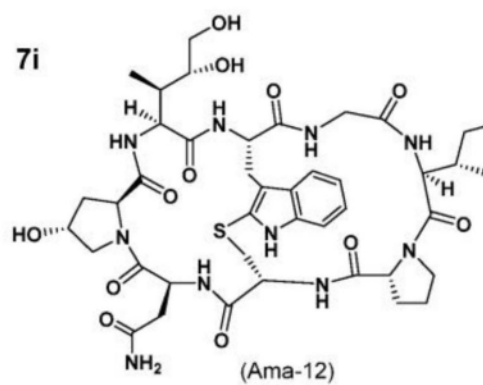
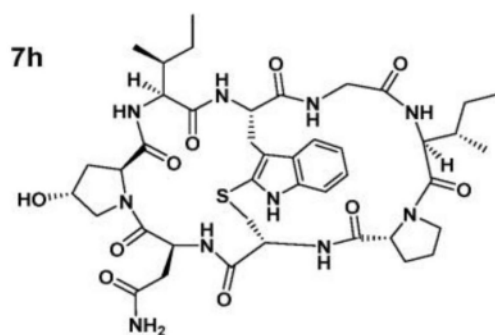
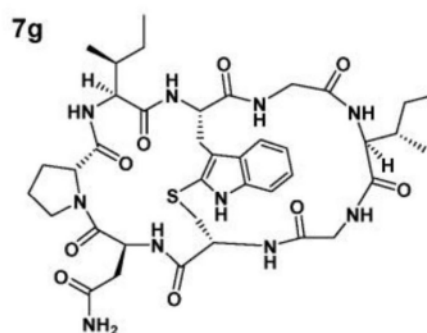
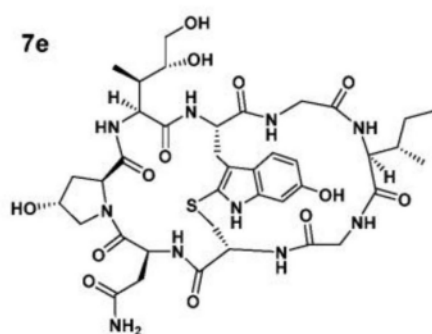
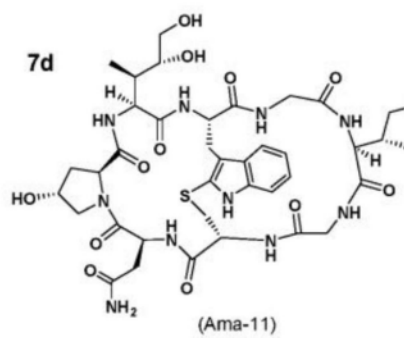
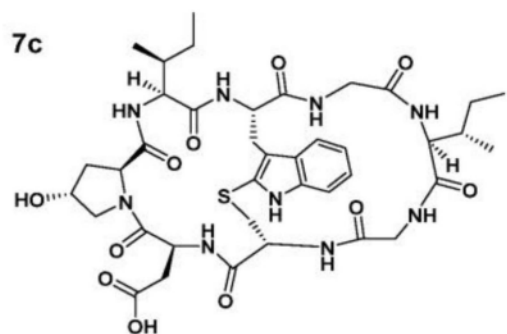
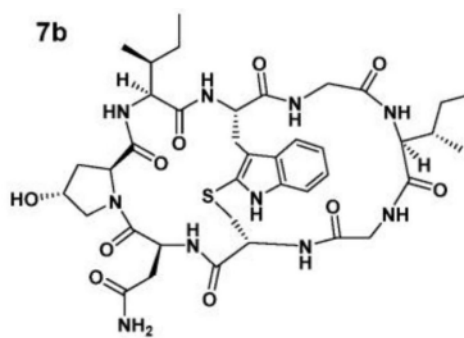
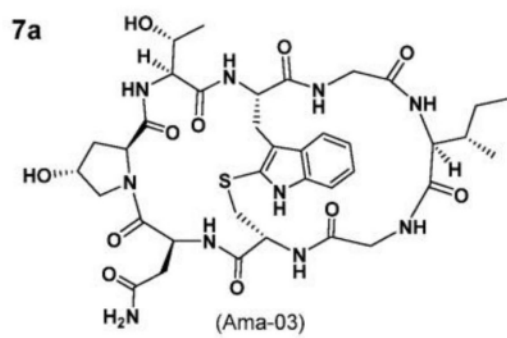
16. 权利要求14或15中任一项的化合物,其中AA²为Gly和/或AA⁴为Gly,特别地其中AA²和AA⁴二者均为Gly。

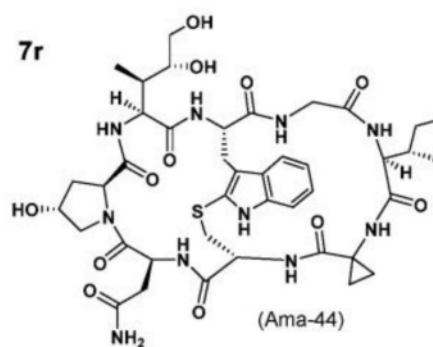
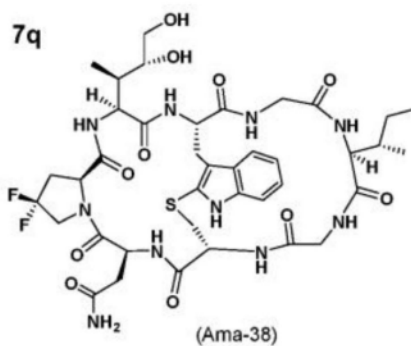
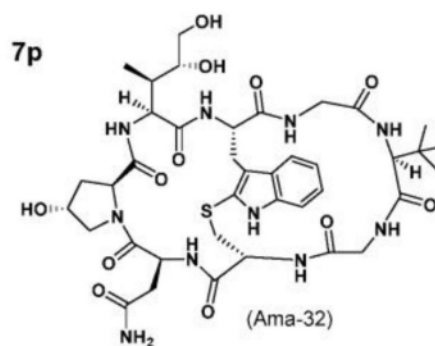
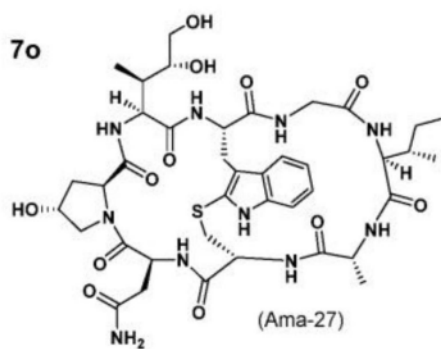
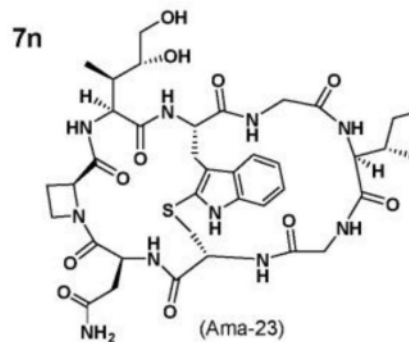
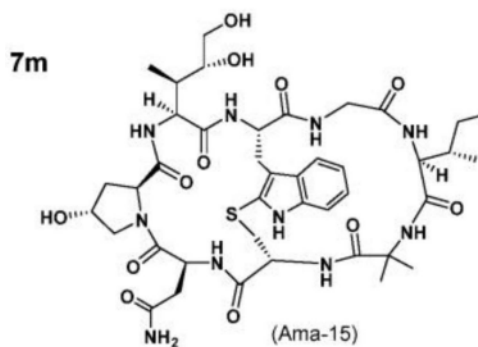
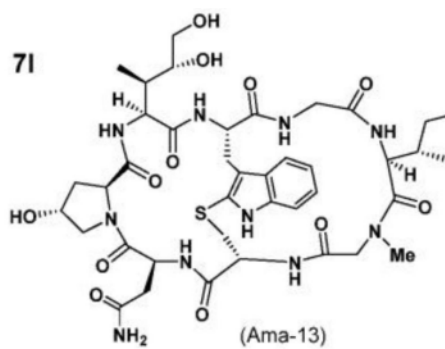
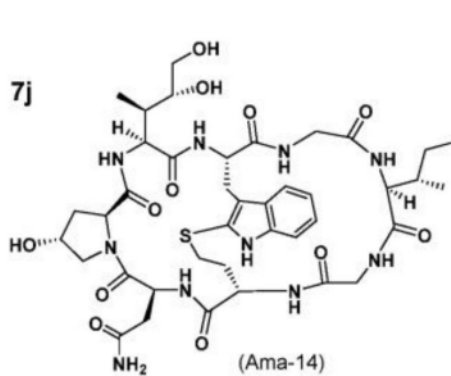
17. 权利要求14或15中任一项的化合物,其中

- AA²为Gly并且AA⁴为D-Pro;或者
- AA²为D-Pro或L-Pro并且AA⁴为Gly。

18. 权利要求14-17中任一项的化合物在制备抗体-药物缀合物中的用途。

19. 权利要求18的用途,其中所述化合物选自包含以下的化合物组:





用于合成含硫醚肽的方法

[0001] 本发明涉及在碘处理下固相肽合成中在色氨酸与半胱氨酸之间形成硫桥的方法。本发明还涉及所述方法得到的化合物。

[0002] 发明背景

[0003] α -鹅膏蕈碱作为一种缓慢作用的毒素 ($LD_{50}=50-100\mu\text{g/kg}$) (T.Wieland, Peptides of Poisonous Amanita Mushrooms (编辑:A.Rich), Wiley-VCH, Weinheim, 1986), 是RNA聚合酶II (Pol II) 的选择性抑制剂。其双环八肽结构含有6-羟基-氨基羧乙基硫色氨酸-(R)-亚砷交联结构(图4A, 图9)。对结构活性关系的研究表明, 氨基羧乙基硫色氨酸交联结构对于该生物活性是必需的, 而Trp的6-羟基和亚砷对于细胞毒性却非必需的。因此, 基于先前的研究, 已经开发出抗体-毒素缀合物(图4B, 图9)用于癌症疗法(Pahl等人, Drug Discov Today: Technol, 2018, 30, 85-89.)。在该方法中, 鹅膏蕈碱组分充当该缀合物的毒性有效载荷, 其被递送至靶细胞并在该处释放。因此, 与鹅膏蕈碱相比具有类似构造的环肽充当抗体-毒素缀合物的毒素组分(图4)收到关注。

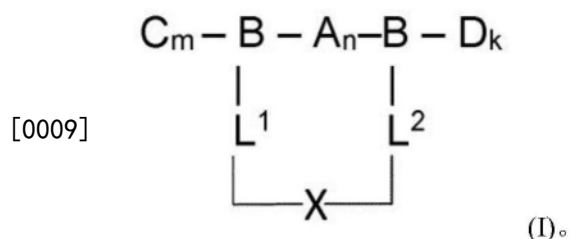
[0004] 多年来已对氨基酸氨基羧乙基硫色氨酸的合成进行了探索, 并且对于其形成有三种基本合成方法。氨基羧乙基硫色氨酸的早期合成包括使吡啶与巯基氯反应(Anderson, A.A.Shelat, R.K.Guy, J Org Chem 2005, 70, 4578-4584)。尽管该方法已被广泛使用, 但是与作为获得氨基羧乙基硫色氨酸部分的额外合成方法的Savigne-Fontana反应(Savigne等人, J.Chem.Soc., Chem.Comm. 1976, 600-601)相比, 所涉及的费力的保护和脱保护策略使其不受欢迎。使用Savigne-Fontana反应, 进行鹅膏蕈碱的各种衍生物的初始构效关系以及 α -鹅膏蕈碱的首次全合成(Zanotti等人, Chem-Eur J 2001, 7, 1479-1485; Matinkhoo等人, J Am Chem Soc 2018, 140, 6513-651)。

[0005] 此前, 碘介导的未保护的Trp侧链和三苯甲基保护的Cys的硫代反应已经在一些模型肽的实例中进行了描述(Sieber等人, Helv Chim Acta 1980, 63, 2358-2363)。该方法已被应用于鬼笔环肽及衍生物的合成(Schuresko等人, Angew Chem Int Edit 2007, 46, 3547-3549; Yao等人, Chem-Eur J 2019, 25, 8030-8034), 但未对鹅膏蕈碱型肽及其衍生的序列进行描述, 因为肽序列的不同长度、次序和分子内氢键会形成不同的结果和收率。

[0006] 基于上文所提及的现有技术, 本发明的目的在于提供在固相肽合成中形成氨基羧乙基硫色氨酸型硫桥的手段和方法, 以用于合成环肽, 特别是合成鹅膏毒素及衍生物。该目的通过本说明书的独立权利要求的主题来获得。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明涉及用于制备式(I)的化合物的方法,



附图说明

[0010] 图1单环五肽的固相肽合成。

[0011] 图2单环肽的固相肽合成。

[0012] 图3单环肽的固相肽合成。

[0013] 图4 (A) α -膏蕈碱以及A环和B环的结构, (B) 抗体-毒素-缀合物的示意性实例。

[0014] 图5单环五肽的溶液相肽合成。

[0015] 图6Fmoc-L-Trp (6-OBn) -OH的合成。a) POCl_3 , DMF; b) $(\text{Boc})_2\text{O}$, DMAP, DCM; c) Boc-2-磷酸甘氨酸-甲基二甲酯, DBU (1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯), DCM, 0°C至室温, 16小时; d) H_2 (20巴), 4摩尔% (R) -MonoPhos, 2摩尔% $[\text{Rh}(\text{COD})_2\text{BF}_4]$, DCM, 3小时, 室温, $ee=99\%$; e) 0.5N LiOH/MeOH/THF (1:1:1), 2小时; t) TFA/DCM (1:1), 2小时; g) Fmoc-OSu, NaHCO_3 , 1,4-二氧杂环己烷/ H_2O , 12小时。

[0016] 图7Cbz-L-Trp (Boc) (6OBn) -OMe的合成。A) Cbz-2-磷酸甘氨酸-甲基二甲酯, DBU, DCM, 0°C至室温, 16小时; b) H_2 (20巴), 4摩尔% (R) -MonoPhos, 2摩尔% $[\text{Rh}(\text{COD})_2\text{BF}_4]$, DCM, 4小时, 室温, $ee=99\%$ 。

[0017] 图8Boc-D-Trp (Boc) (6-OBn) -OMe的合成, H_2 (20巴), 4摩尔% (S) -MonoPhos, 2摩尔% $[\text{Rh}(\text{COD})_2\text{BF}_4]$, DCM, 3小时, 室温, $ee=99\%$ 。

[0018] 图9显示不同鹅膏毒素的结构式。粗体形式的数字(1至8)指定形成鹅膏毒素的八个氨基酸的标准编号。还显示了氨基酸1、3和4中原子的标准编号(分别为希腊字母 α 至 γ , 希腊字母 α 至 δ , 以及1'至7'的数字)。A环和B环被标记。

[0019] 发明详述

[0020] 术语和定义

[0021] 氨基酸序列从氨基端到羧基端给出。序列位置的大写字母是指单字母代码中的L-氨基酸 (Stryer, Biochemistry, 第3版, 第21页)。氨基酸序列位置的小写字母是指相应的D-或(2R)-氨基酸。

[0022] 在本说明书的上下文中, 术语“保护基”涉及与官能团共价连接的部分 (特别是本文所讨论的分子的羧酸部分、氨基部分或羟基部分), 该部分可选择性地与官能团连接并选择性地移除, 而不影响保护基所连接的分子的碳主链的完整性或手性取向, 也不裂解与分子连接的特定其它保护基。

[0023] 在本说明书的上下文中, 术语“脱保护剂”涉及能够裂解某些保护基的物质。技术人员能够根据保护基来选择脱保护剂。可使保护基裂解的条件设立脱保护剂, 例如, 如果保护基可在酸性条件下裂解, 则脱保护剂是酸。

[0024] 现代保护基化学的全面综述, 特别是在其涉及本文所公开的化合物时, 可获得于 Peter G.M. Wuts, Greene's Protective Groups in Organic Synthesis, 第5版, Wiley 2014。

[0025] US 6693178 B2-“Protecting groups useful in the synthesis of polysaccharides, natural products, and combinatorial libraries”和US 20160024143 A1-“Deprotection method”通过援引加入本文。

[0026] 本文遵循有机化学的标准惯例, 据此式中的未指定位置被认为是饱和碳。

[0027] 氨基酸残基序列从氨基端到羧基端给出。序列位置的大写字母是指单字母代码中

的L-氨基酸(Stryer, Biochemistry, 第3版, 第21页)。氨基酸序列位置的小写字母是指相应的D-或(2R)-氨基酸。序列以从氨基端到羧基端的方向从左到右书写。根据标准命名法, 氨基酸残基序列用如下所指示的三字母或单字母代码命名: 丙氨酸(Ala, A)、精氨酸(Arg, R)、天冬酰胺(Asn, N)、天冬氨酸(Asp, D)、半胱氨酸(Cys, C)、谷氨酰胺(Gln, Q)、谷氨酸(Glu, E)、甘氨酸(Gly, G)、组氨酸(His, H)、异亮氨酸(Ile, I)、亮氨酸(Leu, L)、赖氨酸(Lys, K)、甲硫氨酸(Met, M)、苯丙氨酸(Phe, F)、脯氨酸(Pro, P)、丝氨酸(Ser, S)、苏氨酸(Thr, T)、色氨酸(Trp, W)、酪氨酸(Tyr, Y)和缬氨酸(Val, V)。如果未指明, 则氨基酸是L-氨基酸。

[0028] 当在本文中以最狭隘的意义使用时, 术语未取代的 C_n 烷基涉及部分 $-C_nH_{2n}-$ (如果用作分子的各部分之间的桥), 或 $-C_nH_{2n+1}$ (如果用于末端部分的语境中)。

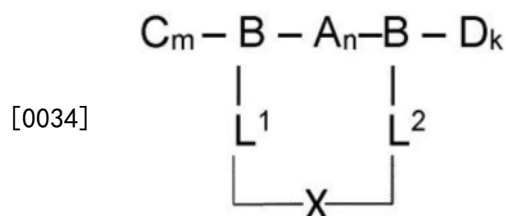
[0029] 当在化学式的语境中使用时, 可以使用以下缩写: Me是甲基 CH_3 , Et是乙基 $-CH_2CH_3$, Prop是丙基 $-(CH_2)_2CH_3$ (正丙基, n-pr) 或 $-CH(CH_3)_2$ (异丙基, i-pr), but是丁基 $-C_4H_9$ 、 $-(CH_2)_3CH_3$ 、 $-CHCH_3CH_2CH_3$ 、 $-CH_2CH(CH_3)_2$ 或 $-C(CH_3)_3$ 。

[0030] 在本说明书的上下文中, 术语杂芳基涉及包含至少一个杂原子(例如N、O、S), 特别是一个或数个氮、氧和/或硫原子的环状芳族 C_5-C_{10} 烃。杂芳基的实例包括但不限于吡咯、噻吩、呋喃、咪唑、吡唑、噻唑、噁唑、吡啶、嘧啶、噻嗪、喹啉、苯并呋喃和吲哚。在本说明书的上下文中, 杂芳基可额外被一个或多个烷基取代。

[0031] 术语取代的杂芳基在其最广泛的意义上是指如上在最广泛的意义上所定义的杂芳基, 其共价连接至不是碳或氢的原子, 特别是选自N、O、F、B、Si、P、S、Cl、Br和I的原子, 其本身如果适用可以连接至该基团的一个或数个其它原子, 或氢, 或者不饱和或饱和烃(在其最广泛的意义上为烷基或芳基)。在最狭隘的意义上, 取代的杂芳基是指如上在最广泛的意义上所定义的杂芳基, 其在一个或数个碳原子上被选自以下的基团取代: 胺 NH_2 、烷基胺 NHR 、酰亚胺 NH 、烷基酰亚胺 NR 、氨基(羧烷基) $NHCOR$ 或 $NRCOR$ 、羟基 OH 、氧烷基 OR 、氧基(羧烷基) $OCOR$ 、羰基 O 及其缩酮或缩醛 $(OR)_2$ 、腈 CN 、异腈 NC 、氰酸酯 CNO 、异氰酸酯 NCO 、硫氰酸酯 CNS 、异硫氰酸酯 NCS 、氟化物 F 、氯化物 Cl 、溴化物 Br 、碘化物 I 、磷酸酯 PO_3H_2 、 PO_3R_2 、磷酸酯 OPO_3H_2 和 OPO_3R_2 、巯基 SH 、硫烷基 SR 、亚砷 SOR 、磺酰基 SO_2R 、硫烷基酰胺 SO_2NHR 、硫酸基 SO_3H 和硫酸酯 SO_3R , 其中不同于在本说明书正文中指定给R的其它用途, 如本段中所用的R取代基在其最广泛的意义上本身是未取代或取代的 C_1 至 C_{12} 烷基, 并且在较狭隘的意义上, R是甲基、乙基或丙基, 除非另外指明。

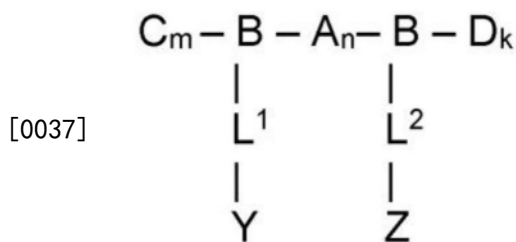
[0032] 本发明的方法涉及固相肽合成, 其中在氧化条件下, 特别是在碘处理下形成硫桥。

[0033] 本发明的第一方面涉及用于制备式(I)的化合物的方法,



[0035] 其中

[0036] 在反应步骤(a)中, 使式(II)的化合物



[0038] 与碘 (I_2)、一氯化碘 (ICl)、一溴化碘 (IBr)、N-溴代琥珀酰亚胺、N-碘代琥珀酰亚胺或双(吡啶)碘鎓四氟硼酸盐(特别是与碘)反应,得到式(I)的化合物;

[0039] 其中

[0040] -Z选自SH、S-三苯甲基(STrt)、S-乙酰氨基甲基(SAcm)、S-二苯甲基(SDpm)、S-单甲氧基三苯甲基(SMmt)和S-叔丁基(S^tBu),特别地Z选自SH、S-三苯甲基(STrt)、S-乙酰氨基甲基(SAcm)、S-二苯甲基(SDpm)、S-单甲氧基三苯甲基(SMmt)和S-叔丁基(S^tBu),最特别地Z是STrt;

[0041] -Y是未取代的或羟基-、卤素-、卤代碳-、炔基-、烯烃-、氰基-保护的羧酸酯和/或羧基酰胺取代的吡啶,特别是未取代的或羟基-、卤素-、卤代碳-、炔基-、烯烃-、氰基-保护的羧酸酯和/或羧基酰胺取代的吡啶;

[0042] - L^1 是未取代的或Me-取代的 C_1 - C_2 烷基连接基,特别地 L^1 是 CH_2 ;

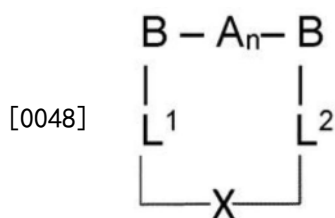
[0043] - L^2 是未取代的或Me-取代的 C_1 - C_2 烷基连接基,特别地 L^2 是 CH_2 或 $-C(CH_3)_2-$;

[0044] -B是 α -氨基酸、 β -氨基酸主链、 α -甲基氨基酸,特别地B是 α -氨基酸主链($NH-CHR-C=O$,其中R是 L^1 或 L^2);

[0045] -每个A独立地选自呈L-或D-构象的蛋白原性和非蛋白原性 α -氨基酸或 β -氨基酸,特别地每个A独立地选自呈L-或D-构象的蛋白原性和非蛋白原性 α -氨基酸;

[0046] -n是选自2、3和4的整数;

[0047] -条件是环



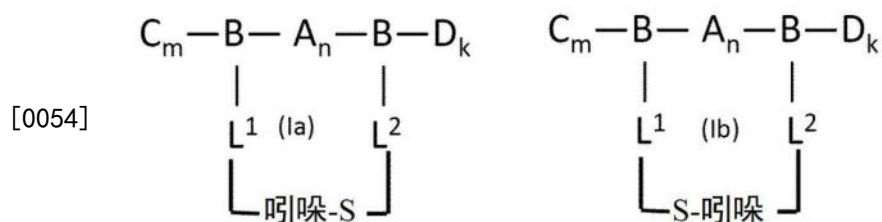
[0049] 由14至26个键,特别是15至21个键,更特别是18个键组成;

[0050] -每个C和D独立地选自呈L-或D-构象的蛋白原性和非蛋白原性 α -氨基酸,其中式(II)的C或D与树脂连接或者具有受保护的N端;

[0051] -m和k独立地选自0至4的整数,特别地其中m和k的总和为0至4的整数;

[0052] -X是(-(-吡啶-S-)或(-S-吡啶-)-),其中吡啶是未取代的或羟基-、卤素-、卤代碳-、炔基-、烯烃-、氰基-保护的羧酸酯和/或羧基酰胺取代的吡啶,其中任选地x的硫原子可以随后被氧化。

[0053] 所述化合物可由式(Ia)或式(Ib)表示,

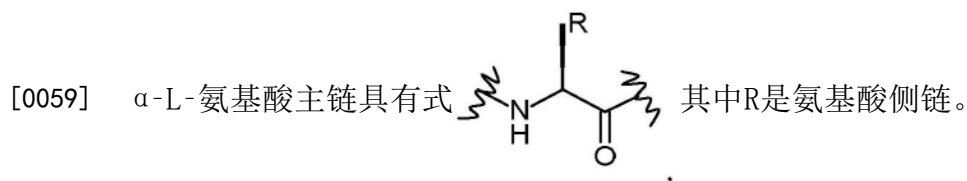


[0055] 特别地,条件是从左至右的方向是从N端至C端或从C端至N端。

[0056] 如果没有不同说明,与碘的反应如“I₂-介导的环化”下的材料和方法部分中所述进行。作为碘源试剂,已经成功地使用一氯化碘 (CAS:7790-99)、一溴化碘 (CAS:7789-33-5)、双(吡啶)碘鎓四氟硼酸盐 (CAS:15656-28-7)、N-碘代琥珀酰亚胺 (NIS) 和N-溴代琥珀酰亚胺 (NBS)。

[0057] 固相肽合成在固体载体上进行。固体载体由用反应性基团官能化的小聚合物树脂珠组成。本发明的硫桥形成可以在肽仍然与树脂连接时或者在从树脂上裂解后进行。如果在裂解后进行,肽的N端用氨基保护基保护。

[0058] 在某些实施方案中,树脂载量为约0.3mmol/g。在较高的树脂载量下,会促进副反应。



[0060] 在某些实施方案中,式 (II) 的C或D与树脂连接,并与碘 (I₂) 反应。在某些实施方案中,式 (II) 的C或D与树脂连接,并以2:1的碘/式 (II) 的化合物的浓度比与碘反应。

[0061] 在某些实施方案中,式 (II) 的C或D具有受保护的N端,并与碘 (I₂) 反应。在某些实施方案中,式 (II) 的C或D具有受保护的N端,并以1:1的碘/式 (II) 的化合物的浓度比与碘反应。

[0062] 如果线性肽与树脂偶联,则2当量的碘可以加速固相上的反应。固体载体可以使得与过量的试剂和溶剂一同起作用。因此,就副反应而言,两当量不是关键的。

[0063] 相比之下,对于溶液中的肽,仅使用一当量的碘来防止副反应。

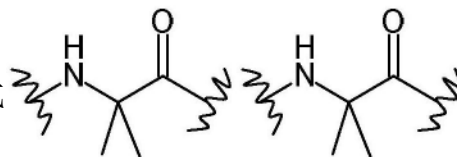
[0064] 在某些实施方案中,反应步骤(a)在极性溶剂中进行。在某些实施方案中,反应步骤(a)在MeOH、DCM、NMP (N-甲基-2-吡咯烷酮) 或DMF中进行。在某些实施方案中,反应步骤(a)在极性非质子溶剂中进行。在某些实施方案中,反应步骤(a)在DMF中进行。在某些实施方案中,反应步骤(a)在温和酸性条件下(如在DCM中含有TFA(低浓度,如1%)、TFE(三氟乙醇)、AcOH或HFIP(六氟异丙醇)的溶剂混合物)进行。

[0065] 在某些实施方案中,碘以1-4mg/ml,特别是2mg/ml的浓度使用。

[0066] 在某些实施方案中,n是3。

[0067] 在某些实施方案中,A独立地选自呈L-或D-构象的蛋白原性或非蛋白原性 α -氨基酸。在某些实施方案中,A独立地选自未取代的或羟基取代的Gly、Ala、Ile、Leu、Val、Pro、

Phe、Lys、Arg、His、D-Pro、D-Ala、L-炔丙基-Gly、Aib (式



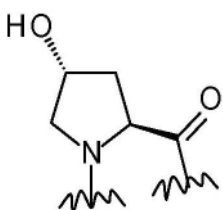
的氨基异丁酸)、光氨基酸(photo amino acid) (特别是光-Leu)、叠氮氨基酸、炔基氨基酸。

[0068] 光氨基酸包含式  的二氮杂环丙烯基团。光氨基酸的实例是光-Leu、光-Met和光-Phe。

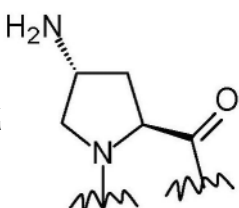
[0069] 叠氮氨基酸包含叠氮基(-N₃)。

[0070] 炔基氨基酸包含式  的炔基。

[0071] 在某些实施方案中,C和D独立地选自呈L-或D-构象的蛋白原性或非蛋白原性α-氨基酸。在某些实施方案中,C和D独立地选自Gly、Ala、Ile、Leu、Val、Pro、Phe、Lys、Ser、Cys、Arg、His、Asp、Asn、Gln、Glu、Hyp、L-哌啶甲酸(3105-95-1)、L-氮杂环丁烷-2-甲酸(2133-34-8)、(S)-二氢吡啶-2-甲酸(79815-20-6)、L-4-噻唑烷甲酸(34592-47-7)、反式-4-Hyp

(式 )、L-炔丙基-Gly、羟基化氨基酸、光氨基酸(特别是光-Pro或光-Leu)、

叠氮氨基酸(特别是叠氮基-Pro)、炔基氨基酸(特别是炔基Pro)、氟化Pro(特别是4-F-

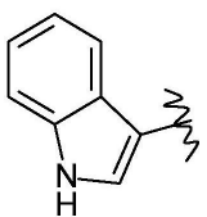
Pro)、氨基-Pro(特别是式  的4-氨基-Pro)。

[0072] 羟基化氨基酸包含至少一个OH基团。

[0073] 在某些实施方案中,Y的吡啶未被取代或者被一个、两个、三个或四个选自羟基、卤素、CN和氟化碳(CF₃、CHF₂或CH₂F)的基团取代。在某些实施方案中,Y的吡啶未被取代或者被一个羟基或卤素基团取代。

[0074] 如果Y包含羟基,则该基团可以脱保护或者用羟基保护基保护,优选地保护。

[0075] 在某些实施方案中,Y的吡啶是未取代的吡啶。在某些实施方案中,吡啶经由其3-

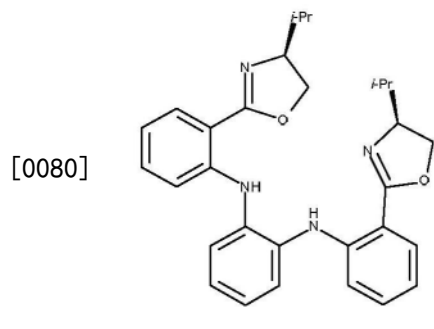
位  连接至连接基L¹。

[0076] 在某些实施方案中,吡唑经由其2-位连接至硫原子。

[0077] 在某些实施方案中,树脂是酸不稳定树脂。在某些实施方案中,树脂是2-氯三苯甲基树脂、Rink酰胺树脂、1,3-二氢-2H-吡喃-2-基-甲氧基甲基树脂(THP树脂)或王氏树脂。

[0078] 在某些实施方案中,Z的硫原子是氧化的。在某些实施方案中,Z的硫原子通过如下方式氧化:

[0079] i. 使用锰离子,特别地,使化合物与式(V)的化合物,

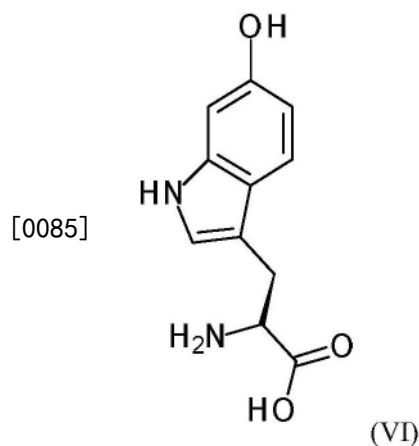


[0081] 以及与 $\text{Mn}(\text{OTf})_2$ 和 H_2O_2 反应,

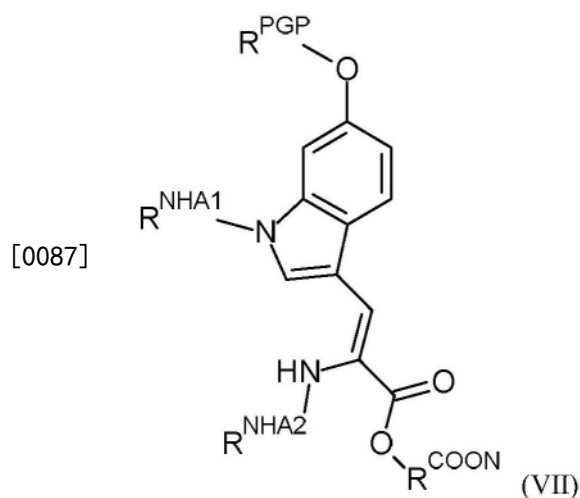
[0082] ii 使用PPO、过氧化二苯甲酰、过氧苯甲酸叔丁酯或过氧化月桂酰;或mCPBA;

[0083] iii. 使用碘和氧气。

[0084] 本发明的第二方面涉及用于制备式(VI)的化合物的方法,



[0086] 其中在反应步骤(a)中,使式(VII)的化合物



[0088] 其中

[0089] • R^{NHA1} 是氨基保护基,特别是可在酸性或还原条件下裂解的氨基保护基,更特别是Boc、Cbz、或三异丙基甲硅烷基(TIPS),优选地Boc,

[0090] • R^{NHA2} 是氨基保护基,特别是可在酸性或还原条件下裂解的氨基保护基,更特别是Boc或Cbz,最特别是Boc,

[0091] • R^{PGP} 是酚OH基团的保护基,特别是可在碱性或还原条件下裂解,更特别是可在还原条件下裂解的酚OH保护基,更特别地 R^{PGP} 是苄基或乙酰基,最特别地 R^{PGP} 是苄基;

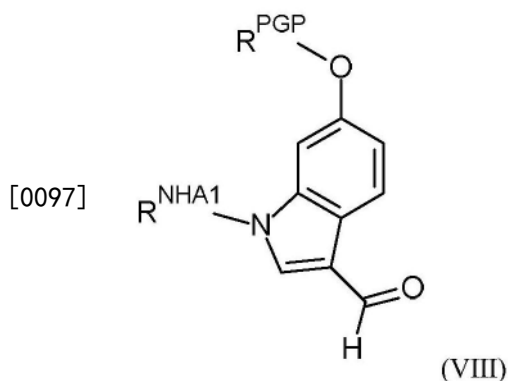
[0092] • R^{COON} 是羧基保护基,特别是可在碱性条件下裂解的羧基保护基,更特别是甲基、乙基、苄基或叔丁基,最特别是甲基,

[0093] 与 H_2 、有机金属铑或钌络合物和有机磷配体反应,特别地与 H_2 、有机金属铑络合物和有机磷配体反应,更特别地与 H_2 和双(1,5-环辛二烯)铑(I)⁺、双(2,2'-联吡啶)铑(I)⁺或双(降冰片二烯)铑(I)⁺与选自三氟甲磺酸根($CF_3SO_3^-$)、六氟磷酸根(PF_6^-)、氯离子和四氟硼酸根(BF_4^-)的阴离子,以及选自(R)-MonoPhos[(R)-(-)-(3,5-二氧杂-4-磷杂环庚并[2,1-a:3,4-a']联萘-4-基)二甲胺]或(1R,1'R,2S,2'S)-DuanPhos[(1R,1'R,2S,2'S)-2,2'-二叔丁基-2,3,2',3'-四氢-1H,1'H-(1,1)联异磷杂]或(R,R)-DIPAMP[(R,R)-1,2-双[(2-甲氧基苯基)(苯基膦基)]乙烷]的有机磷配体反应,最特别地与 H_2 、Rh(COD)₂BF₄(双(1,5-环辛二烯)四氟硼酸铑(I))和(R)-MonoPhos[(R)-(-)-(3,5-二氧杂-4-磷杂环庚并[2,1-a:3,4-a']联萘-4-基)二甲胺]反应,并将化合物与移除 R^{NHA1} 、 R^{NHA2} 、 R^{PGP} 和 R^{COON} 的脱保护剂反应,以得到以(VI)为特征的化合物。

[0094] 对于 R^{NHA2} ,酸不稳定和还原不稳定基团是合适的,因为碱不稳定基团会在 R^{COON} 基团的水解期间裂解。

[0095] 对于 R^{PGP} ,酸不稳定基团会在Vilsmeier-Haack反应期间裂解。相比之下,还原不稳定基团是合适的。如果 R^{COON} 基团是还原不稳定的,则碱不稳定基团是可行的。

[0096] 在某些实施方案中,在反应步骤(b)中,使式(VIII)的化合物



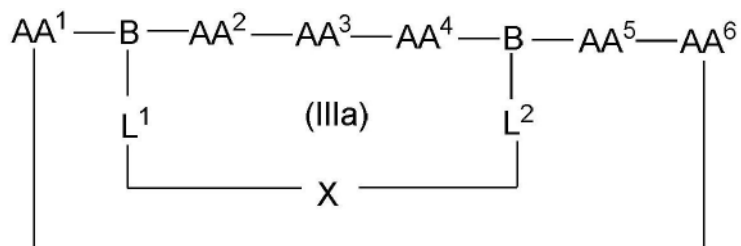
[0098] 其中

[0099] • R^{NHA1} 和 R^{PGP} 具有与第二方面所述相同的含义,

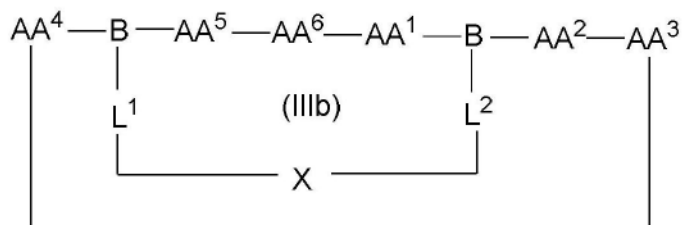
[0100] 与受保护的2-磷酸甘氨酸-甲基二甲酯在碱性条件下反应,特别地与Boc-2-磷酸甘氨酸-甲基二甲酯、Cbz-2-磷酸甘氨酸-苄基二甲酯或Cbz-2-磷酸甘氨酸-甲基二甲酯在碱性条件下反应,更特别地碱选自DBU(1,8-二氮杂双环(5.4.0)十一碳-7-烯)和四甲基胍(CAS 80-70-6),

[0101] 以得到以(VII)为特征的化合物。

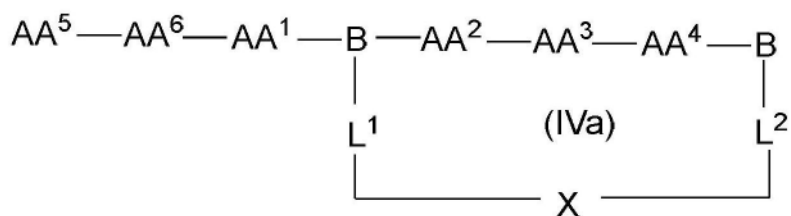
[0102] 本发明的第三方面涉及式 (IIIa) 和 (IIIb) 的化合物，



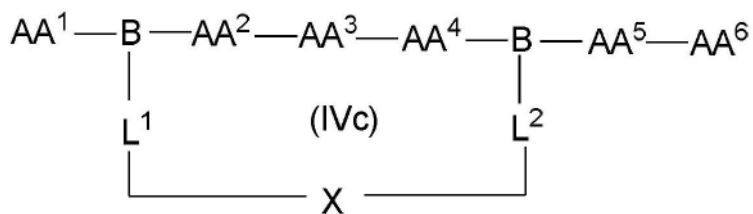
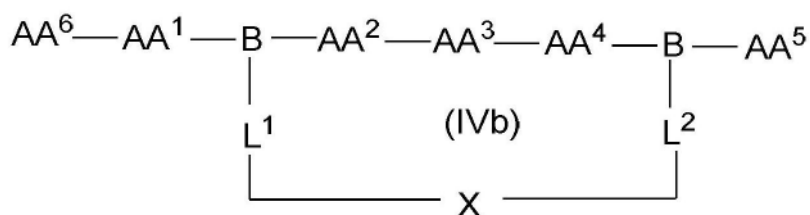
[0103]

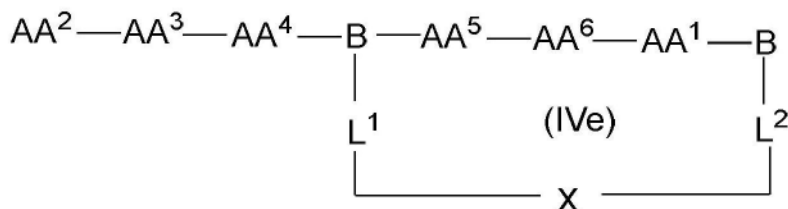
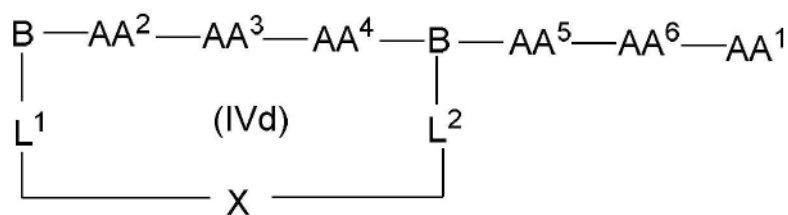


[0104] 或者式 (IVa)、(IVb)、(IVc)、(IVd)、(IVe)、(IVf)、(IVg) 或 (IVh) 的化合物，

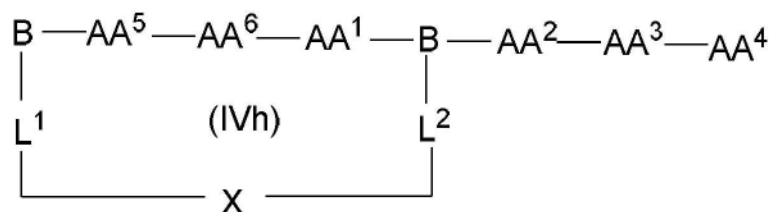
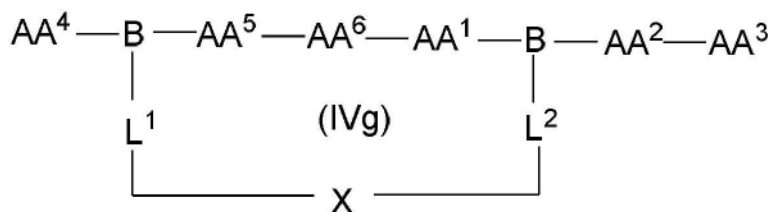
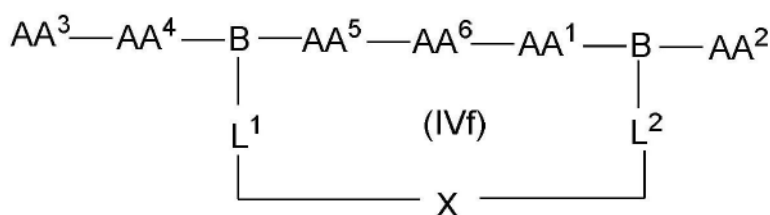


[0105]





[0106]



[0107] 其中

[0108] -X在式[(IVa)、(IVb)、(IVc)和(IVd)]中为式Q-R,或在式[(IVe)、(IVf)、(IVg)和(IVh)]中为R-Q,

[0109] -Q是未取代的或CF₃-、醇-、烷基-、0-烷基-、羟基-和/或卤素-取代的咪唑或吡唑,更特别地Q是未取代的或烷基-、0-烷基-、羟基-和/或卤素-取代的吡唑,最特别地Q选自未取代的吡唑、6-OH-吡唑、5-OH-吡唑、5-F-吡唑、5-Me-吡唑、5-OMe-吡唑、4-F-吡唑和5-Br-吡唑;

[0110] -R是S、S0或SO₂;

[0111] -L¹是未取代的或Me-取代的C₁-C₂烷基连接基,特别地L¹是未取代的C₁烷基连接基;

[0112] -L²是未取代的或Me-取代的C₁-C₂烷基连接基;

[0113] -B是α-氨基酸主链;

[0114] -AA¹选自DHIle(二羟基-异亮氨酸)、Ile、DHLeu(二羟基-亮氨酸)、HVal(羟基-缬氨酸)、HIle(5-羟基-异亮氨酸或4-羟基异亮氨酸)、Gly、D-Pro、L-Pro、D-Ala、Aib(2-氨基异丁酸)和Ala,特别地选自Gly和D-Pro、DHIle(二羟基-异亮氨酸)、Ile、DHLeu(二羟基-亮氨酸)、HVal(羟基-缬氨酸)、HIle(5-羟基-异亮氨酸或4-羟基异亮氨酸);

[0115] -AA²选自Gly、D-Pro、D-Ala、Aib (2-氨基异丁酸)、Asn、Asp、Ser、Cys、Arg、Lys、Gln、Glu和L-炔丙基-Gly,特别地选自Asn、Asp、Gln、Glu;以及Ala、Gly和D-Pro;

[0116] -AA³选自Ile、Leu、Val、光Leu,以及L-炔丙基-Gly、L-炔丙基-Gly、Pro、Gly、Aib、反式-4-Hyp、Hyp、4-F-Pro、4-NH₂-Pro、光-Pro、L-哌啶甲酸、L-氮杂环丁烷-2-甲酸、(S)-二氢吡啶-2-甲酸、L-4-噻唑烷甲酸、Tle,特别地选自反式-4-Hyp、4-F-Pro和4-NH₂-Pro;最特别地选自Ile,

[0117] -AA⁴选自Gly、D-Pro、D-Ala、Aib (2-氨基异丁酸)、Asn、Asp、Ser、Cys、Arg、Lys、Gln、Glu和L-炔丙基-Gly、Sar、Acc,特别地选自Asn、Asp、Gln、Glu;和Ala,最特别地AA²选自Gly和D-Pro;

[0118] -AA⁵选自Asn、Asp、Ser、Cys、Arg、Lys、Gln、Glu和L-炔丙基-Gly、D-Pro、D-Ala、Aib (2-氨基异丁酸)和Ala,特别地选自Gly和D-Pro、Asn、Asp、Gln以及Glu;

[0119] -AA⁶选自Pro、Gly、Aib、反式-4-Hyp、Hyp、4-F-Pro、4-NH₂-Pro、光-Pro、L-哌啶甲酸、L-氮杂环丁烷-2-甲酸、(S)-二氢吡啶-2-甲酸、L-4-噻唑烷甲酸、Ile、Leu、Val、光Leu和L-炔丙基-Gly,特别地选自Ile和L-炔丙基-Gly、反式-4-Hyp、4-F-Pro、4-F₂-Pro和4-NH₂-Pro;

[0120] 特别地条件是在式(IIIa)中,AA¹的N端经由酰胺键偶联至AA⁶的C端;且在式(IIIb)中,AA⁴AA¹的N或C端经由酰胺键偶联至AA⁶;AA³的N端,

[0121] 并且在式(IVa)、(IVb)、(IVc)、(IVd)、(IVe)、(IVf)、(IVg)或(IVh)中,C端氨基酸任选地与树脂连接;

[0122] 特别地,条件是从左至右的方向是从N端至C端或从C端至N端。

[0123] 在根据本发明的化合物的具体实施方案中,所述化合物不由以下组合构成:

[0124] • Q是未取代的或烷基-、O-烷基-、羟基-和/或卤素-取代的吡啶;

[0125] • R是S、SO或SO₂;

[0126] • L¹是CH₂;

[0127] • L²是CH₂;

[0128] • AA¹选自DHIle (二羟基-异亮氨酸)、Ile和HIle (羟基-异亮氨酸);

[0129] • AA²是Gly;

[0130] • AA³是Ile;

[0131] • AA⁴是Gly;

[0132] • AA⁵是Asn或Asp;并且

[0133] • AA⁶是Pro或Hyp (羟脯氨酸);

[0134] 或者

[0135] • Q是未取代的或烷基-、O-烷基-、羟基-和/或卤素-取代的吡啶;

[0136] • R是S、SO或SO₂;

[0137] • L¹是CH₂;

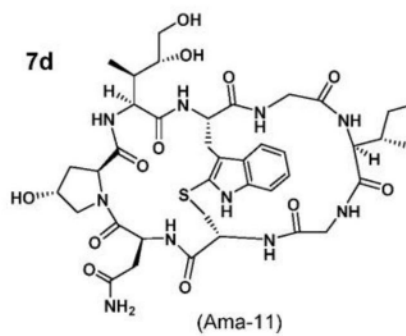
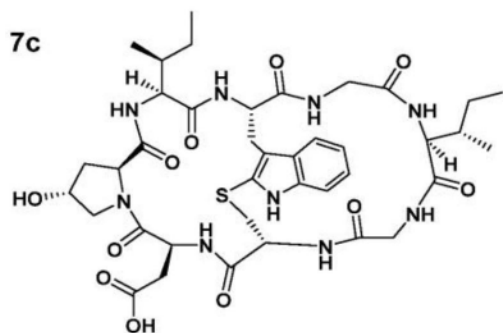
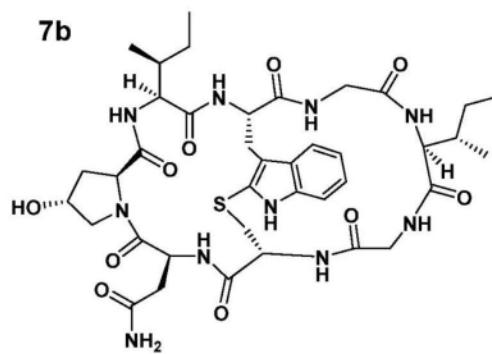
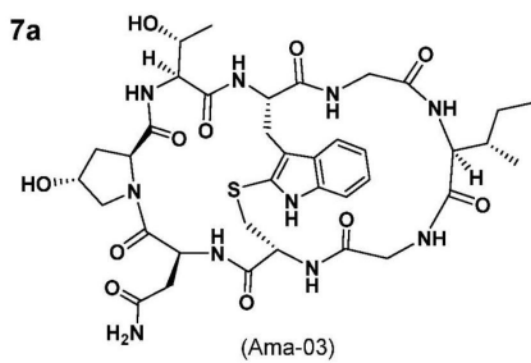
[0138] • L²是CH₂;

[0139] • AA¹是DHIle或Ile;

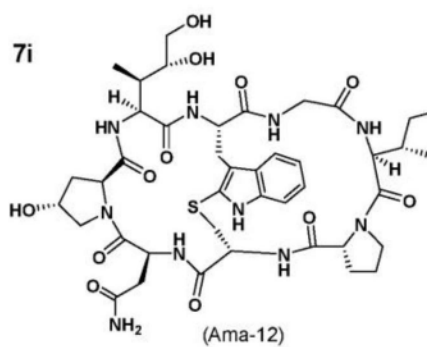
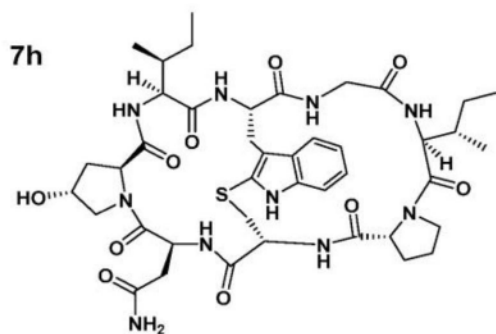
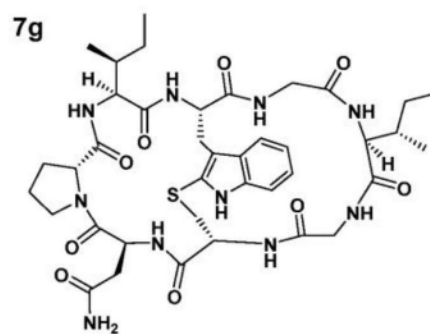
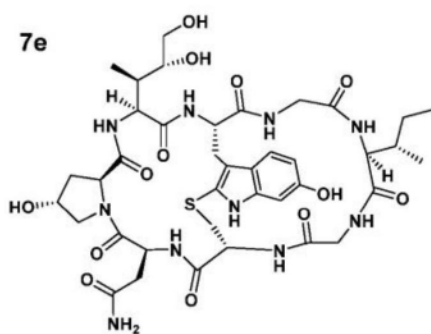
[0140] • AA²和AA⁴中的一者是Gly且另一者是Ala,或者AA²和AA⁴两者均是Ala;

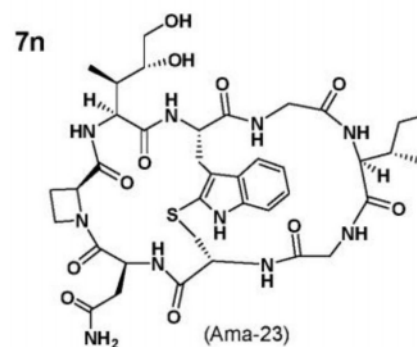
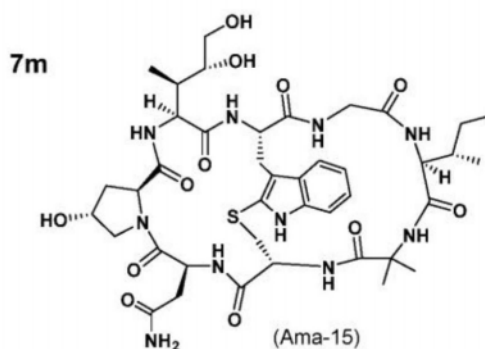
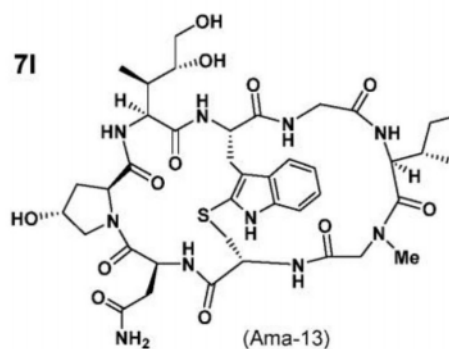
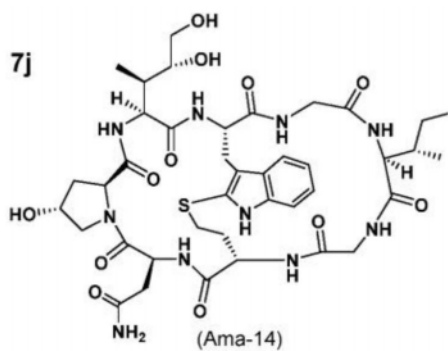
[0141] • AA³是Ile;

- [0142] • AA⁵是Asn;并且
- [0143] • AA⁶是Hyp (羟脯氨酸);
- [0144] 或者
- [0145] • Q是未取代的或烷基-、O-烷基-、羟基-和/或卤素-取代的吡啶;
- [0146] • R是S、SO或SO₂;
- [0147] • L¹是CH₂;
- [0148] • L²是CH₂;
- [0149] • AA¹选自DHLeu (二羟基-亮氨酸) 和HVal (羟基-缬氨酸);
- [0150] • AA²是Gly;
- [0151] • AA³是Ile;
- [0152] • AA⁴是Gly;
- [0153] • AA⁵是Asn;并且
- [0154] • AA⁶是Hyp (羟脯氨酸)。
- [0155] 在某些实施方案中,吡啶经由其3-位连接至连接基L¹。在某些实施方案中,吡啶经由其2-位连接至硫原子。
- [0156] 在一些实施方案中,本发明提供可通过如本文所公开的本发明方法获得的化合物。
- [0157] 在一些实施方案中,可通过如上所公开的本发明方法获得的化合物用于制备抗体药物缀合物(ADC)。
- [0158] 根据一个实施方案,本发明涉及可通过如本文所公开的本发明方法获得的化合物在制备抗体-药物缀合物中的用途,其中所述化合物选自包含以下的化合物组:

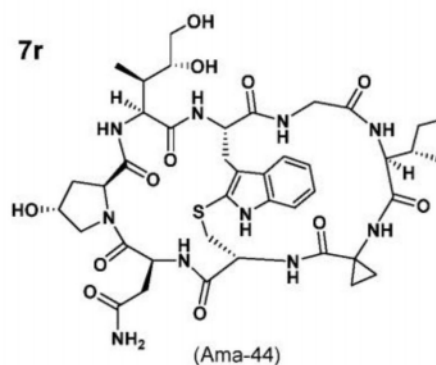
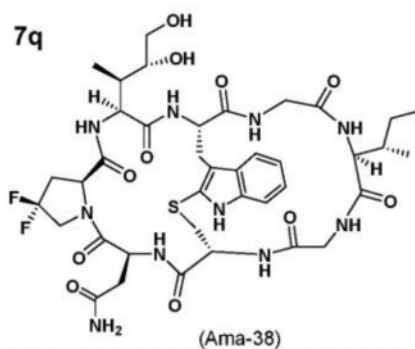
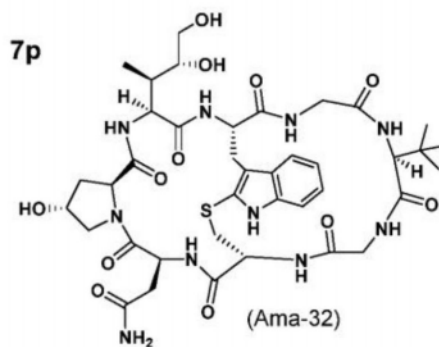
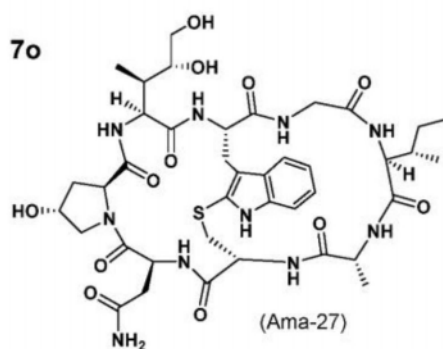


[0159]





[0160]



[0161] 根据一个实施方案,本发明涉及如上所公开的本发明化合物作为ADC有效载荷的用途。如本发明中所用,术语“有效载荷”是指生物活性细胞毒性(抗癌)药物,例如可通过本发明方法获得的化合物,例如本发明的化合物7a-7r,其缀合至(i)抗体,优选单克隆抗体,

(ii) 其抗原结合片段, 优选可变域 (Fv)、Fab 片段或 F(ab) 2 片段, (iii) 其抗原结合衍生物, 优选单链 Fv (scFv), 以及 (iv) 抗体样蛋白。

[0162] 如本文所用, 术语“抗体”应当指由免疫球蛋白基因或免疫球蛋白基因片段或其衍生的 cDNA 编码的一条或多条多肽链组成的蛋白质。所述免疫球蛋白基因包括轻链 κ 、 λ 以及重链 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 恒定区基因, 以及多种不同可变区基因中的任一种。

[0163] 基本免疫球蛋白 (抗体) 结构单元通常是由两对相同的多肽链即轻链 (L, 分子量为约 25kDa) 和重链 (H, 分子量为约 50-70kDa) 构成的四聚体。每条重链由重链可变区 (缩写为 VH 或 VH) 和重链恒定区 (缩写为 CH 或 CH) 构成。重链恒定区由三个域组成, 即 CH1、CH2 和 CH3。每条轻链含有轻链可变区 (缩写为 VL 或 VL) 和轻链恒定区 (缩写为 CL 或 CL)。VH 和 VL 区可进一步细分为超变区, 也称为互补决定区 (CDR), 散布有称为框架区 (FR) 的更保守区域。每个 VH 和 VL 区由从氨基端到羧基端以 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 的次序布置的三个 CDR 和四个 FR 构成。重链和轻链的可变区形成与抗原相互作用的结合域。

[0164] CDR 对于抗体或其抗原结合部分的结合最为重要。只要是抗原结合所需的三维结构得到保留, 则 FR 可被其它序列替代。构建体的结构变化最常导致与抗原的充分结合丧失。

[0165] 术语 (单克隆) 抗体的“抗原结合片段”是指保留以其天然形式特异性结合其抗原的能力的抗体的一个或多个片段。抗体的抗原结合部分的实例包括 Fab 片段、由 VL、VH、CL 和 CH1 域组成的单价片段、F(ab') 2 片段、包含在铰链区处经二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段、由 VH 和 CH1 域组成的 Fd 片段、由抗体的单臂的 VL 和 VH 域组成的 Fv 片段, 以及由 VH 域和分离的互补决定区 (CDR) 组成的 dAb 片段。

[0166] 根据本发明的抗体或其抗体片段或抗体衍生物可以是单克隆抗体。如本文所用, 术语“单克隆抗体” (“mAb”) 是指针对特定表位有单一结合特异性和亲和力的抗体分子的制剂, 代表同质抗体群体, 即, 由全免疫球蛋白或其片段或衍生物组成的同质群体。优选地, 这样的抗体选自 IgG、IgD、IgE、IgA 和/或 IgM、或其片段或衍生物, 优选地本发明的单克隆抗体为 IgG 同种型, 例如 IgG1 或 IgG4, 更优选地为 IgG1 同种型。

[0167] 如本文所用, 术语“片段”或“抗原结合片段”应当指保留靶结合能力的这样的抗体的片段, 例如 CDR (互补决定区)、高变区、可变域 (Fv)、IgG 重链 (由 VH、CH1、铰链区、CH2 和 CH3 区组成)、IgG 轻链 (由 VL 和 CL 区组成), 和/或 Fab 和/或 F(ab) 2。

[0168] 如本文所用, 术语“衍生物”或“抗原结合衍生物”应指在结构上不同于普遍抗体概念, 但仍与普遍抗体概念具有一些结构关系的蛋白质构建体, 例如 scFv、Fab 和/或 F(ab) 2, 以及双特异性、三特异性或更高特异性的抗体构建体, 所有这些都具有与本发明的单克隆抗体大致相同的靶结合特异性。

[0169] 技术人员已知的其他抗体衍生物是双抗体、骆驼抗体、域抗体、具有由 scFv、IgA 组成的两条链的二价同源二聚体 (由 J 链和分泌片连接的两个 IgG 结构)、鲨鱼抗体 (IgNAR)、由新世界灵长类框架加上非新世界灵长类 CDR 组成的抗体、包含 CH3+VL+VH 的二聚化构建体、包含 CDR 的其它支架蛋白形式, 以及抗体缀合物 (例如, 与药物、毒素、细胞因子、适体、核酸如脱氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA)、治疗性多肽、放射性同位素或标记连接的抗体或其片段或衍生物)。

[0170] 如本文中所使用, 术语“抗体样蛋白”是指经工程改造 (例如, 通过诱变 Ig 环) 后与靶向分子特异性结合的蛋白。通常, 此类抗体样蛋白包含至少一个在两端与蛋白骨架连接

的可变肽环。该双结构约束大大增加了抗体样蛋白的结合亲和力,使其水平与抗体的相当。所述可变肽环的长度通常由10-20个氨基酸组成。所述支架蛋白可以是任何具有良好溶解度特性的蛋白。优选地,所述支架蛋白为小的球状蛋白。抗体样蛋白包括但不限于affilin蛋白、亲和体、抗运载蛋白(anti-calix)和设计的锚蛋白重复蛋白(Binz等人,2005)。抗体样蛋白可以来源于大型的突变文库,例如通过从大型噬菌体展示文库中淘选,并且可以类似于常规抗体进行分离。同时,通过对球状蛋白中表面暴露残基的组合诱变,可以获得抗体样结合蛋白。

[0171] 根据一个实施方案,如上所公开的本发明的化合物可以例如直接经由键或经由连接基,优选地经由连接基与(i)抗体,优选单克隆抗体,(ii)其抗原结合片段,优选可变域(Fv)、Fab片段或F(ab)2片段,(iii)其抗原结合衍生物,优选单链Fv(scFv),以及(iv)抗体样蛋白中的任一种偶联。如本发明的上下文中所用,术语“连接基”是指使两个组分连接的结构,每个组分与连接基的一端连接。

[0172] 在特定实施方案中,连接基增加两个组分之间的距离,并且减轻这些组分之间(如在本发明的情况下,抗体与本发明的化合物之间)的空间干扰。在特定实施方案中,所述连接基在其主链中具有1至30个原子(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、或30个原子)的连续链,即,连接基的长度被定义为如由本发明化合物部分与以下之间的原子或键的数量所测量的最短连接:(i)抗体,优选单克隆抗体,(ii)其抗原结合片段,优选可变域(Fv)、Fab片段或F(ab)2片段,(iii)其抗原结合衍生物,优选地单链Fv(scFv),或(iv)抗体样蛋白,其中连接基主链的一侧已经与本发明的化合物反应,而另一侧可用于反应,或者已经与例如抗体反应。在本发明的上下文中,连接基是例如任选取代的 C_{1-20} -亚烷基、 C_{1-20} -亚杂烷基、 C_{2-20} -亚烯基、 C_{2-20} -亚杂烯基、 C_{2-20} -亚炔基、 C_{2-20} -亚杂炔基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基、亚杂芳基、亚芳烷基或亚杂芳烷基。连接基可以例如含有一种或多种结构元件,如甲酰胺、酯、醚、硫醚、二硫化物、脲、硫脲、烃部分等。连接基还可以含有这些结构元件中的两种或更多种的组合。这些结构元件中的每一者可以在连接基中存在超过一次,例如两次、三次、四次、五次或六次。在一些实施方案中,连接基可以包含二硫键。应当理解,连接基必须在单个步骤中或在两个或更多个后续步骤中连接至本发明化合物以及例如抗体或其抗原结合片段、或以上所公开的任何结合部分。为此,连接基包含优选地处在近端和远端的两个基团,其可以(i)与待连接的组分之一中存在的基团,优选地与本发明化合物或抗体或其抗原结合片段上的活化基团形成共价键,或者(ii)被或者可以被活化以与鹅膏毒素(如本发明的化合物)上的基团形成共价键。因此,优选的是化学基团处在连接基的远端和近端,它们是这种偶联反应的结果,例如酯、醚、氨基甲酸酯、肽键等。

[0173] 在特定实施方案中,连接基可以是1至20个独立地选自C、O、N和S的原子,特别是2至18个原子,更特别是5至16个原子,并甚至更特别是6至15个原子的直链。在特定实施方案中,直链中至少60%的原子是C原子。在特定实施方案中,直链中的原子经由单键连接。

[0174] 在特定实施方案中,连接基可以是亚烷基、亚杂烷基、亚烯基、亚杂烯基、亚炔基、亚杂炔基、亚环烷基、亚杂环烷基、亚芳基、亚杂芳基、亚芳烷基或包含1至4个选自N、O和S的杂原子的亚杂芳烷基,其中所述连接基任选地被取代。

[0175] 术语“亚烷基”是指具有1至20个碳原子的二价直链饱和烃基,包括具有1至10个碳

原子的基团。在某些实施方案中,亚烷基可以是低级亚烷基。术语“低级亚烷基”是指具有1至6个碳原子,并且在某些实施方案中1至5个或1至4个碳原子的亚烷基。亚烷基的实例包括但不限于亚甲基($-\text{CH}_2-$)、亚乙基($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)、亚正丙基、亚正丁基、亚正戊基和亚正己基。

[0176] 术语“亚烯基”是指具有2至20个碳原子的二价直链基团,其中至少一个碳-碳键是双键,而其它键可以是单键或另一些双键。本文中的术语“亚炔基”是指具有2至20个碳原子的基团,其中至少一个碳-碳键是三键,而其它键可以是单键、双键或另一些三键。亚烯基的实例包括亚乙烯基($-\text{CH}=\text{CH}-$)、1-亚丙烯基、2-亚丙烯基、1-亚丁烯基、2-亚丁烯基、3-亚丁烯基等。亚炔基的实例包括亚乙炔基、1-亚丙炔基、2-亚丙炔基等。

[0177] 如本文所用,“亚环烷基”旨在指作为任何稳定的单环或多环体系的一部分的二价环,其中这样的环具有3至12个碳原子,但不含杂原子,并且其中这样的环是完全饱和的,并且术语“亚环烯基”旨在指作为任何稳定的单环或多环体系的一部分的二价环,其中这样的环具有3至12个碳原子,但不含杂原子,并且其中这样的环是至少部分不饱和的(但任何亚芳基环除外)。亚环烷基的实例包括但不限于亚环丙基、亚环丁基、亚环戊基、亚环己基和亚环庚基。亚环烯基的实例包括但不限于亚环戊烯基和亚环己烯基。

[0178] 如本文所用,术语“亚杂环烷基”和“亚杂环烯基”旨在指作为任何稳定的单环或多环体系的一部分的二价环,其中这样的环具有3至约12个原子,并且其中这样的环由碳原子和至少一个杂原子(特别是至少一个独立地选自N、O和S的杂原子)组成,其中亚杂环烷基是指完全饱和的环,并且亚杂环烯基是指至少部分不饱和的环(但任何亚芳基或亚杂芳基环除外)。

[0179] 术语“亚芳基”旨在意指作为任何稳定的单环或多环体系的一部分的二价环或环系,其中这样的环或环系具有3至20个碳原子,但不具有杂原子,该环或环系由如通过“ $4n+2$ ” π 电子规则所定义的芳族部分组成,包括亚苯基。

[0180] 如本文所用,术语“亚杂芳基”是指作为任何稳定的单或多环体系的一部分的二价环或环系,其中这样的环或环系具有3至20个原子,该环或环系由如通过“ $4n+2$ ” π 电子规则所定义的芳族部分组成并且含有碳原子以及一个或多个氮、硫和/或氧杂原子。

[0181] 在本发明的上下文中,术语“取代的”旨在指示在连接基的主链中存在的一个或多个氢被指定基团的选择所替代,条件是不超过所指定原子的正常化合价或被取代的基团的适当原子的化合价,并且取代产生了稳定的化合物。术语“任选取代的”旨在意指连接基是未取代的或者如本文所定义被一个或多个如本文所定义的取代基取代。当取代基是酮基(或氧代,即=O)、硫基或亚氨基等时,则连接基主链原子上的两个氢被替代。示例性取代基包括例如烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基、芳烷基、杂芳烷基、酰基、芳酰基、杂芳酰基、羧基、烷氧基、芳氧基、酰氧基、芳酰氧基、杂芳酰氧基、烷氧羰基、卤素、(硫代)酯、氰基、磷酰基、氨基、亚氨基、(硫代)酰胺基、巯基、烷硫基、酰硫基、磺酰基、硫酸酯、磺酸酯、氨基磺酰基、磺酰胺基、硝基、叠氮基、卤代烷基(包括全氟烷基(如三氟甲基))、卤代烷氧基、烷基硫烷基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、烷基磺酰基氨基、芳基磺酰基氨基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、亚膦酸酯、烷基羧基、烷基羧基酰胺、氧代、羟基、巯基、氨基(任选地单或二取代的,例如被烷基、芳基或杂芳基)、亚氨基、甲酰胺、氨基甲酰基(任选地单或二取代的,例如被烷基、芳基或杂芳基)、脒基、氨基磺酰基、酰基氨基、芳酰基氨基、(硫代)脒基、(芳基硫代)脒基、烷基(硫代)脒基、环烷基(硫代)脒基、芳氧基、芳烷氧基或 $-\text{O}(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$ 、-

$O(CH_2)_n-NH_2$ 、 $-O(CH_2)_nCOOH$ 、 $-(CH_2)_nCOOH$ 、 $-C(O)O(CH_2)_nR$ 、 $-(CH_2)_nN(H)C(O)OR$ 或 $-N(R)S(O)_2R$,其中n是1-4,并且R独立地选自氢、-烷基、-烯基、-炔基、-环烷基、-环烯基、-(C-连接的-杂环烷基)、-(C-连接的-杂环烯基)、-芳基和-杂芳基,其中允许多取代度。本领域技术人员会理解,如果适当,取代基如杂环烷基、芳基、杂芳基、烷基等,或官能团如-OH、-NHR等本身可以被取代。本领域技术人员还会理解,取代的部分本身也可以在适当时被取代。

[0182] 在特定实施方案中,连接基L包含选自以下部分之一的部分:二硫化物(-S-S-)、醚(-O-)、硫醚(-S-)、胺(-NH-)、酯(-O-C(=O)-或-C(=O)-O-)、甲酰胺(-NH-C(=O)-或-C(=O)-NH-)、氨基甲酸酯(-NH-C(=O)-O-或-O-C(=O)-NH-)和脲部分(-NH-C(=O)-NH-)。

[0183] 在本发明的特定实施方案中,连接基L包含m个选自以下列表的基团:亚烷基、亚烯基、亚炔基、亚环烷基、亚杂烷基、亚杂烯基、亚杂炔基、亚杂环烷基、亚芳基、亚杂芳基、亚芳烷基和亚杂芳烷基,其中各基团可任选地是独立取代的,连接基还包含n个独立地选自以下部分之一的部分:二硫化物(-S-S-)、醚(-O-)、硫醚(-S-)、胺(-NH-)、酯(-O-C(=O)-或-C(=O)-O-)、甲酰胺(-NH-C(=O)-或-C(=O)-NH-)、氨基甲酸酯(-NH-C(=O)-O-或-O-C(=O)-NH-)和脲部分(-NH-C(=O)-NH-),其中 $m=n+1$ 。在特定实施方案中,m是2且n是1,或者m是3且n是2。在特定实施方案中,连接基包含2或3个未取代的亚烷基,以及1或2个分别连接未取代的亚烷基的二硫化物、醚、硫醚、胺、酯、甲酰胺、氨基甲酸酯或脲部分。

[0184] 在特定实施方案中,直链中的C原子独立地为任选取代的亚甲基(CH_2-)的一部分。在特定此类实施方案中,任选的取代基独立地选自卤素和 C_{1-6} -烷基,特别是甲基。

[0185] 所述连接基可以例如缀合到如本文所公开的本发明的化合物的羟脯氨酰残基(Hyp),或者本发明的化合物的DHI1e(二羟基-异亮氨酸)残基。连接基与本发明化合物的Hyp残基的缀合可以例如根据如EP3735987A1(将其内容援引加入)中所公开的方法进行,连接基与本发明化合物的DHI1e(二羟基-异亮氨酸)的缀合可以根据W02020234461 A1(将其内容援引加入)中所公开的方法进行。

[0186] 根据一些实施方案,与如本文所公开的本发明化合物缀合的连接基可以是不可裂解的(稳定的)或可裂解的连接基。在本发明的上下文中,术语“稳定的连接基”是指(i)在存在酶,特别是溶酶体肽酶(如组织蛋白酶B)的情况下,以及(ii)在细胞内还原环境中稳定的连接基。

[0187] 根据一个实施方案,稳定的连接基不含有(i)酶可裂解亚结构,特别是不含可由组织蛋白酶B裂解的二肽序列,和/或(ii)二硫化物基团。在具体此类实施方案中,连接基具有多至12个原子,特别地2至10,更特别地4至9,并且最特别地6至8个原子的长度。

[0188] 在本发明的上下文中,“可裂解连接基”被理解为包含至少一个裂解位点。如本文所用,术语“裂解位点”应当指在特定条件下,在限定位置处易受特定裂解影响的部分。所述条件是例如特定酶或特定机体或细胞区室中的还原性环境。根据本发明的酶可裂解部分也可称为“可被酶裂解”。连接基的酶促裂解导致胞内释放与如本文所公开的靶向部分或抗体缀合的毒素载物、或其内化后的代谢物(参见Dubowchik等人,Bioconjug Chem.13(2002)855-69)。

[0189] 所述可裂解连接基可以选自酶促可裂解连接基,优选地蛋白酶促可裂解连接基,以及化学可裂解连接基,优选地包含二硫桥的连接基。

[0190] 根据本发明的优选实施方案,所述裂解位点是包含两个或更多个氨基酸的酶促可

裂解部分。优选地,所述酶促可裂解部分包含缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala)、缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)、缬氨酸-赖氨酸(Val-Lys)、缬氨酸-精氨酸(Val-Arg)二肽、苯丙氨酸-赖氨酸-甘氨酸-脯氨酸-亮氨酸-甘氨酸(Phe Lys Gly Pro Leu Gly)或丙氨酸-丙氨酸-脯氨酸-缬氨酸(Ala Ala Pro Val)肽或 β -葡萄糖苷酸或 β -半乳糖苷。

[0191] 根据一些实施方案,所述裂解位点可以被选自半胱氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶的至少一种蛋白酶裂解。

[0192] 半胱氨酸蛋白酶(也称为硫醇蛋白酶)是具有共同的催化机制的蛋白酶,所述机制涉及催化三联体或二联体中的亲核半胱氨酸硫醇。

[0193] 金属蛋白酶是其催化机理涉及金属的蛋白酶。大多数金属蛋白酶需要锌,但有些使用钴。金属离子经由三个配体与蛋白质配位。配位金属离子的配体可随组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸和精氨酸而变化。第四配位位置由不稳定的水分子占据。

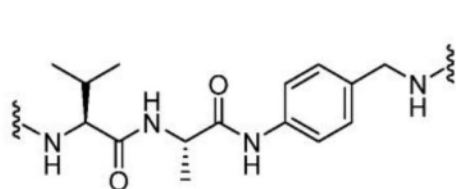
[0194] 丝氨酸蛋白酶是裂解蛋白质中的肽键的酶,丝氨酸在(酶的)活性位点充当亲核氨基酸。丝氨酸蛋白酶根据其结构分为两大类:胰凝乳蛋白酶样(胰蛋白酶样)或枯草杆菌蛋白酶样。

[0195] 苏氨酸蛋白酶是在活性位点内携带苏氨酸(Thr)残基的蛋白水解酶家族。这类酶的原型成员是蛋白酶体的催化亚单位,然而,酰基转移酶趋同地演化出相同的活性位点几何结构和机理。

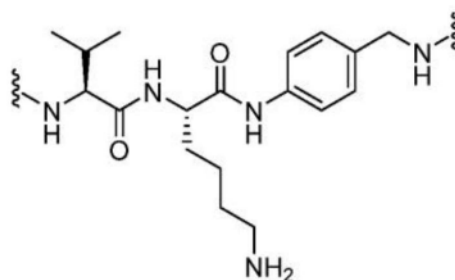
[0196] 天冬氨酸蛋白酶是一种催化类型的蛋白酶,其使用与一个或多个天冬氨酸残基结合的活化水分子来催化其肽底物。通常,它们在活性位点中具有两个高度保守的天冬氨酸,并且在酸性pH下具有最佳活性。胃蛋白酶抑制剂抑制几乎所有已知的天冬氨酸蛋白酶。

[0197] 在本发明的具体实施方案中,所述裂解位点被选自以下中的至少一种物质裂解:组织蛋白酶A或B、基质金属蛋白酶(MMP)、弹性蛋白酶、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶和 β -半乳糖苷酶,优选组织蛋白酶B。

[0198] 在特别优选的实施方案中,根据本发明的酶促可裂解的连接基包含选自Phe-Lys、Val-Lys、Phe-Ala、Val-Ala、Phe-Cit和Val-Cit的二肽,特别是其中可裂解的连接基进一步包含二肽和可通过本发明方法获得的本发明化合物之间的对氨基苄基(PAB)间隔基,例如上文公开的化合物7a、7b、7c、7d、7e、7g、7h、7i、7j、7l、7m、7n、7o、7p、7q、7r中的一种,通过PAB部分连接或缀合至本发明的化合物:

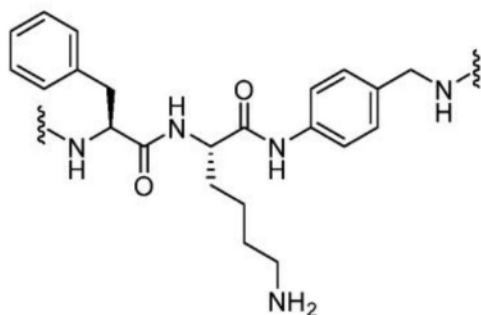


Val-Ala-PAB

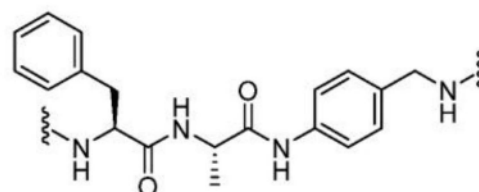


Val-Lys-PAB

[0199]



Phe-Lys-PAB



Phe-Ala-PAB

[0200] 如本文所公开的根据本发明的连接基-化合物缀合物与抗体,优选单克隆抗体、其抗原结合片段如可变域(Fv)、Fab片段或F(ab)2片段、或其抗原结合衍生物的缀合可以通过缀合至反应性赖氨酸或半胱氨酸残基(参见例如Jain等人,Pharm Res (2015) 32:3526-3540),优选通过缀合至反应性半胱氨酸残基来进行,以得到抗体-药物缀合物(ADC)。

[0201] 根据一些实施方案,本发明化合物与反应性赖氨酸残基的偶联或缀合可以使用包含以下反应性基团之一的连接基进行:1) SPDB二硫化物,2) MCC(马来酰亚胺基甲基环己烷-1-羧酸酯),3) 增加有带电极性基团的磺基-SPDB,以及4) 脲。相应的缀合可例如如Peeters等人,J Immunol Methods.1989年6月2日;120(1):133-43,或Carlsson等人,Biochem J.1978;173:723-37中所述进行。

[0202] 根据优选的实施方案,如上所公开的本发明的连接基包含硫醇反应性基团,其选自溴乙酰胺、碘乙酰胺、甲基磺酰基苯并噻唑、4,6-二氯-1,3,5-三嗪-2-基氨基基团甲基-磺酰基苯基四唑或甲基磺酰基苯基噁二唑、吡啶-2-硫醇、5-硝基吡啶-2-硫醇、甲烷硫代磺酸酯或马来酰亚胺,优选马来酰亚胺(马来酰亚胺基残基)。使用基于马来酰亚胺基的缀合来与反应性半胱氨酸残基缀合可以例如如W02016/142049中所公开进行。

[0203] 根据一个实施方案,如上所公开的抗体-药物-缀合物包含经由如本文所公开的连接基与抗体的反应性赖氨酸残基或半胱氨酸残基偶联的约1至约10,优选约1、2至约4、5、6、7、8个如本文所公开的本发明的化合物。

[0204] 根据一个优选的实施方案,如上所公开的根据本发明的连接基-化合物缀合物可以例如通过半胱氨酸缀合经由位点特异性缀合而缀合至包含根据EU编号系统的重链118Cys或重链256Cys的半胱氨酸工程化抗体(Edelman等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA;63(1969)),如W02016/142049 A1中所公开,其内容通过援引加入本文。使用所述半胱氨酸工程化抗体可特别有利地获得包含如本文所公开的本发明化合物的抗体-药物缀合物,其具有约2的受控的药物与抗体比率(DAR)(例如,抗体的每条重链有一个连接基-化合物缀合

物),其例如可导致与DAR较高的ADC相比更好的所述ADC的治疗指数,或者包含DAR为约1至约6、8、或10的ADC物质的混合物的ADC制剂。如本文所用,术语“治疗指数”是药物的相对安全性的定量量度,并且可以例如定义为 $TI = TD_{50} : ED_{50}$,其中 TD_{50} 是指50%个体中药物的毒性剂量, ED_{50} 是指50%个体中的有效剂量。因此,较高治疗指数优选于较低治疗指数,因为例如需要其的个体必须服用比引起治疗效果所服用的剂量高得多的剂量的本发明ADC以达到毒性阈值。

[0205] 根据一个实施方案,如上所公开的半胱氨酸工程化抗体可额外在其Fc区中包含氨基酸取代L234A、L235A (根据EU编号系统),如W0 2020/086776 A1中所公开,其内容通过援引加入本文。使用这种工程化抗体可例如有利于进一步改善抗体-药物缀合物的治疗指数(TI),所述抗体-药物缀合物包含可通过本发明方法获得的化合物,例如,如本文所公开的化合物7a、7b、7c、7d、7e、7g、7h、7i、7j、7l、7m、7n、7o、7p、7q、7r之一。

[0206] 根据一些实施方案,本发明涉及包含可通过本发明方法获得的本发明化合物或包含如上所公开的本发明化合物的抗体-药物缀合物。例如,根据本发明的ADC可以包含约1、2、4至约6、8、10,或约2、4、6、8,或约2至约4,或约2种如本文所公开的本发明化合物7a、7b、7c、7d、7e、7g、7h、7i、7j、7l、7m、7n、7o、7p、7q、7r,其可以例如经由如本文所公开的稳定或可裂解连接基缀合至抗体,由此给定的ADC会不包含如上所公开的本发明化合物的混合物。

[0207] 无论在本文何处将单个可分离特征(例如,氨基酸或氧化方法)的替代方案列为“实施方案”,应理解,此类替代方案均可自由组合,以形成本文所公开的本发明的离散实施方案。因此,氨基酸的任何替代实施方案可以与本文所提及的氧化方法的任何替代实施方案组合。

[0208] 通过以下实施例和附图进一步说明本发明,从中可以得出进一步的实施方案和优点。这些实施例意在说明本发明而非限制其范围。

实施例

[0209] 表1:通过碘环化的结合至固体载体的肽的氨基酸序列。在从树脂上裂解并通过制备型HPLC纯化后计算分离收率(参见图1)。

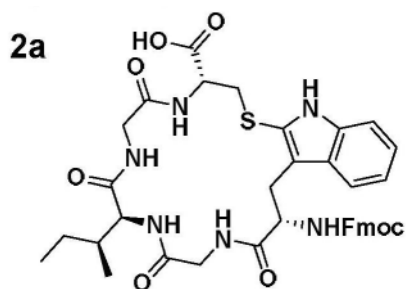
[0210]

条目	结合至树脂的肽 (氨基酸序列)	化合物	分离收率
1	Fmoc-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	2a	20%
2	Fmoc-D-Trp-Gly-D-Ile-Gly-D-Cys(Trt)-O-树脂	2b	18%
3	Fmoc-D-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	2c	15%
4	Fmoc-Trp-Gly-Tle-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	2d	18%
5	Fmoc-Trp-Gly-Phe-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	2e	15%
6	Fmoc-Trp-Gly-Glu(O ^t Bu)-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	2f	28%
7	Fmoc-Trp-Gly-Trp-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	2g	14%
8	Fmoc-Trp-Gly-Lys(Boc)-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	2h	29%
9	Fmoc-Trp(5-OMe)-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	2i	13%
10	Fmoc-Trp(5-OTBS)-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	2j	15%
11	Teoc-Trp(6-OBn)-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	2k	16%
12	Fmoc-Trp(4-F)-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	2l	12%
13	Fmoc-Trp-Gly-Ile-Gly-HomoCys(Trt)-O-树脂	2m	18%
14	Fmoc-Trp(Me)-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	2n	15%
15	Fmoc-Trp-Gly-Ile-D-Pro-Cys(Trt)-O-树脂	2o	20%
16	Fmoc-Trp-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	2p	13%

[0211]	17	Fmoc-Ile-Trp-Gly-Cys(S ^t Bu)-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-O-树脂	2q	38%
	18	Fmoc-Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-O-树脂	2r	50%
	19	Fmoc-Ile-Trp-Ile-Gly-Ile-Cys(Trt)-Asn(Trt)-O-树脂	2s	40%

[0212] 分析数据:

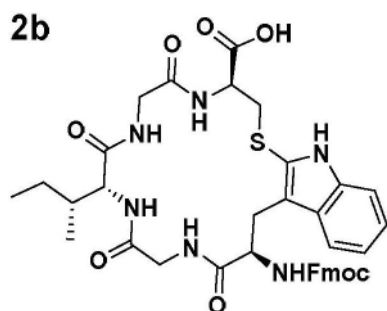
[0213] 化合物2a:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.26\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{43}N_6O_8S^+[M+Na]^+755.2858$,实测值777.2681.收率(RP-HPLC纯化后):22mg.



[0214]

单环五肽

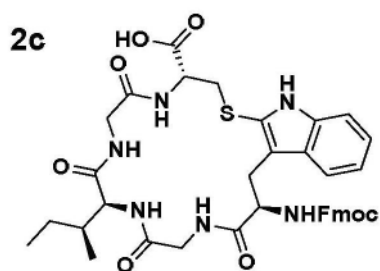
[0215] 化合物2b:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.50\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{43}N_6O_8S^+[M+H]^+755.2858$,实测值755.2864.收率(RP-HPLC纯化后):20mg.



[0216]

对映异构体

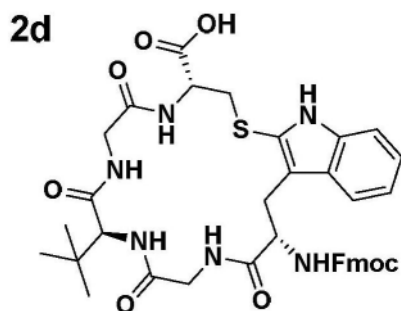
[0217] 化合物2c:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.59\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{43}N_6O_8S^+[M+H]^+755.2858$,实测值755.2861.收率(RP-HPLC纯化后):16.5mg.



[0218]

D-Trp-单环五肽

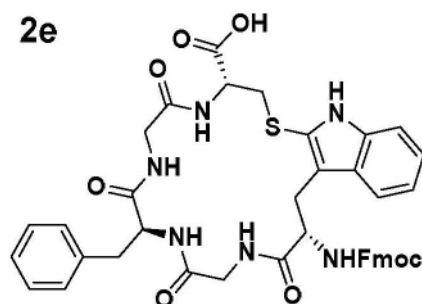
[0219] 化合物2d:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.53\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{43}N_6O_8S^+[M+H]^+755.2858$,实测值755.2863.收率(RP-HPLC纯化后):20mg.



[0220]

Tle-单环五肽

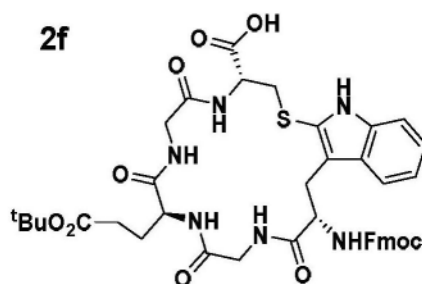
[0221] 化合物2e:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.74\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{42}H_{41}N_6O_8S^+[M+H]^+789.2701$,实测值789.2706.收率(RP-HPLC纯化后):17mg.



[0222]

Phe-单环五肽

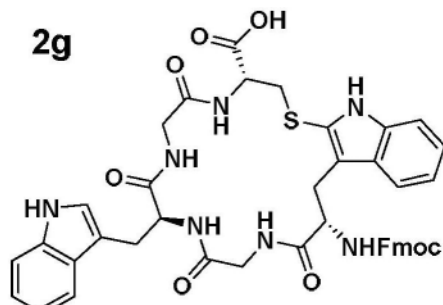
[0223] 化合物2f:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.86\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{42}H_{47}N_6O_{10}S^+[M+H]^+827.3069$,实测值827.3073.收率(RP-HPLC纯化后):34mg.



[0224]

Glu-单环五肽

[0225] 化合物2g:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.67\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{44}H_{42}N_6O_8S^+[M+H]^+828.2610$,实测值828.2614.收率(RP-HPLC纯化后):17mg.



[0226]

Trp-单环五肽

[0227] 化合物2h:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.82\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{44}H_{52}N_7O_{10}S^+[M+H]^+870.3491$,实测值870.3520.收率(RP-HPLC纯化后):37mg.

[0228]



[0229] 化合物2i:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.37\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{40}H_{45}N_6O_9S^+[M+H]^+785.2963$,实测值785.2977.收率(RP-HPLC纯化后):15mg.

[0230]



[0231] 化合物2j:HPLC-MS:保留时间 $R_t=7.54\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{43}N_6O_9S^+[M+H]^+771.2807$,实测值771.2817.收率(RP-HPLC纯化后):17mg.

[0232]

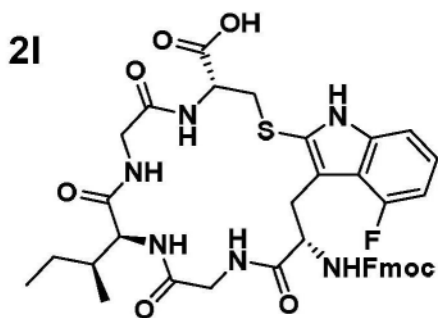


[0233] 化合物2k:HPLC-MS:保留时间 $R_t=9.20\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{37}H_{51}N_6O_9SSi^+[M+H]^+783.3202$,实测值783.3230.收率(RP-HPLC纯化后):18mg.

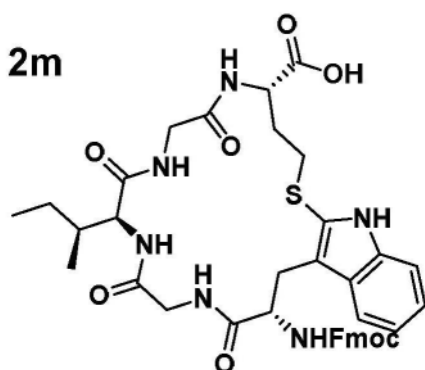
[0234]



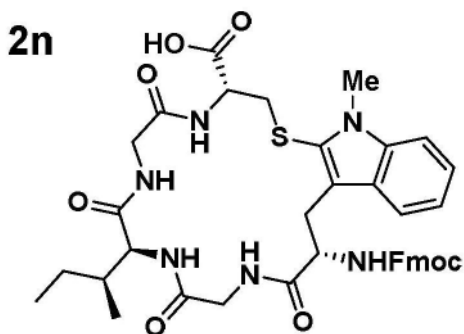
[0235] 化合物2l:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.54\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{42}FN_6O_8S^+[M+H]^+773.2763$,实测值773.2770.收率(RP-HPLC纯化后):14mg.

**4-F-Trp-单环五肽**

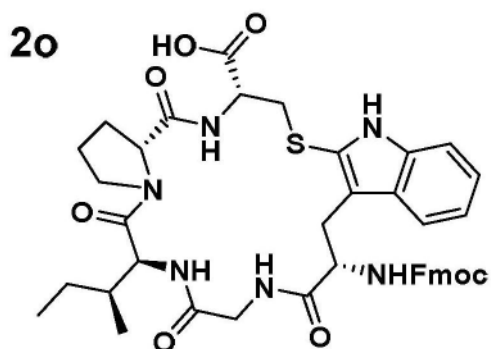
[0237] 化合物2m:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.80\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{40}H_{45}N_6O_8S^+[M+H]^+$ 769.3014,实测值769.3020.收率(RP-HPLC纯化后):20mg.

**HomoCys-单环五肽**

[0239] 化合物2n:HPLC-MS:保留时间 $R_t=7.76\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{40}H_{44}N_6NaO_8S^+[M+Na]^+$ 791.2834,实测值791.7598.收率(RP-HPLC纯化后):17mg.

**Trp(Me)-单环五肽**

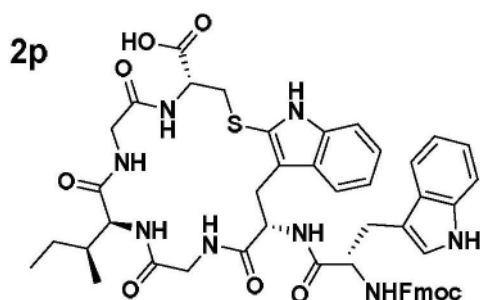
[0241] 化合物2o:HPLC-MS:保留时间 $R_t=9.04\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{42}H_{47}N_6O_8S^+[M+H]^+$ 795.3171,实测值795.3177.收率(RP-HPLC纯化后):24mg.



[0242]

D-Pro-单环五肽

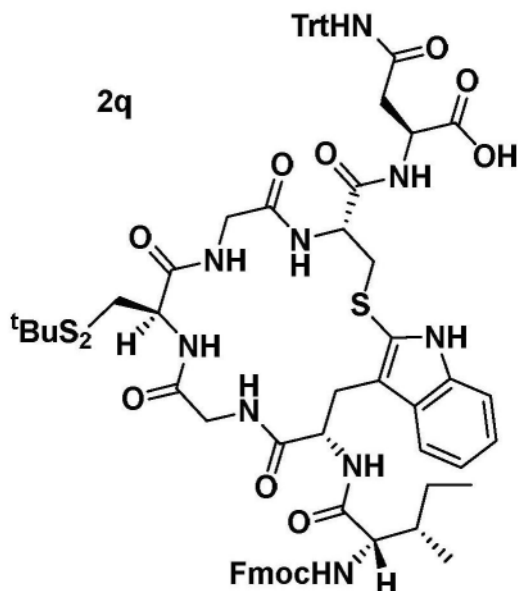
[0243] 化合物2p:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.68\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{51}H_{57}N_8O_9S^+[M+H]^+957.3964$,实测值957.3619.收率(RP-HPLC纯化后):37mg.



[0244]

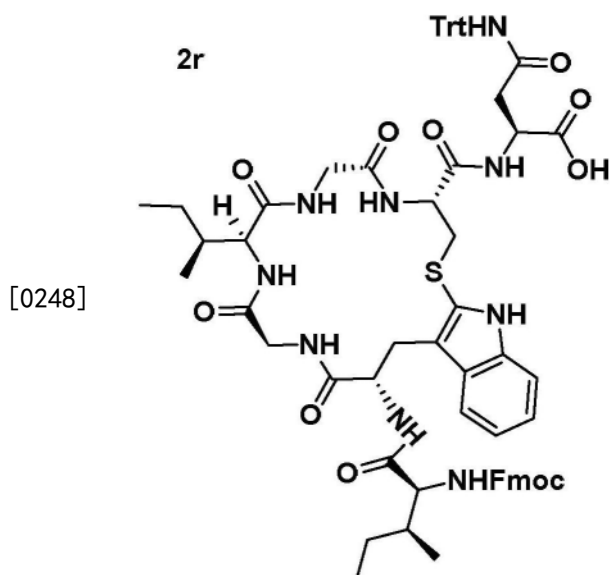
单环六肽

[0245] 化合物2q:HPLC-MS:保留时间 $R_t=11.55\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{69}H_{76}N_9O_{11}S_3^+[M+H]^+1302.4821$,实测值1302.4819.收率(RP-HPLC纯化后):74mg.

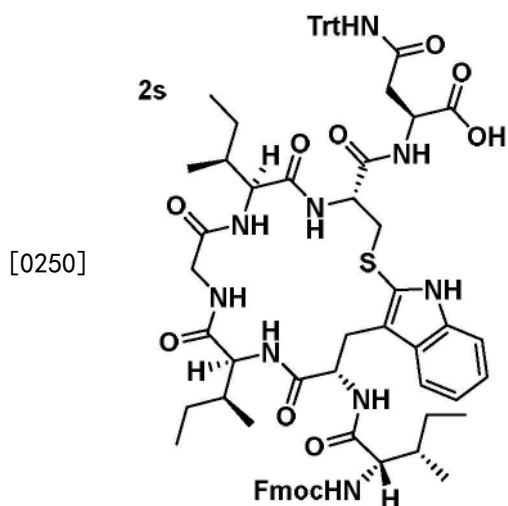


[0246]

[0247] 化合物2r:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.16\text{min}$ (梯度C);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{68}H_{74}N_9O_{11}S^+[M+H]^+1224.5223$,实测值1224.5250.收率(RP-HPLC纯化后):91mg.



[0249] 化合物2s:HPLC-MS:保留时间 $R_t=10.79\text{min}$ (梯度C);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{72}H_{82}N_9O_{11}S^+[M+H]^+1280.5849$,实测值1280.5831.收率(RP-HPLC纯化后):76mg.



[0251] 表2:通过碘环化的结合至固体载体的肽的氨基酸序列。在移除Fmoc基团、从树脂上裂解并通过制备型HPLC纯化后计算分离收率。该表显示经由鹅膏蕈碱的B环(N端Trp和C端Cys)进行环化的实施例(参见图2)。

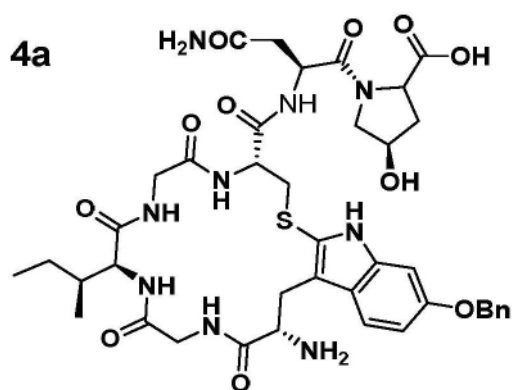
[0252]

条目	结合至树脂的肽 (氨基酸序列)	化合物	分离收率
1	Fmoc-Trp(6OBn)-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn-Hyp(OTBS)-O-树脂	4a	30%
2	Fmoc-Pro-Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-O-树脂	4b	42%
3	Fmoc-Hyp-Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-O-树脂	4c	50%
4	Fmoc-Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-Hyp(OTBS)-O-树脂	4d	45%
5	Fmoc-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-Hyp-Ile-O-树脂	4e	25%
6	Fmoc-Asn(Trt)-Hyp-Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	4f	27%
7	Fmoc-DhIle(OTBS) ₂ -Trp-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn-Hyp(OTBS)-O-树脂	4g	49%
8	Fmoc-DhIle(OTBS) ₂ -Trp(6-OBn)-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn-Hyp(OTBS)-O-树脂	4h	38%
9	Fmoc-Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asp('Bu)-Hyp(OTBS)-O-树脂	4i	42%
10	Fmoc-DhIle(OTBS) ₂ -Trp-Gly-Ile-D-Pro-Cys(Trt)-Asn-Hyp(OTBS)-O-树脂	4j	40%
11	Fmoc-DhIle(OTBS) ₂ -Trp-Gly-Ile-Gly-HomoCys(Trt)-Asn-Hyp(OTBS)-O-树脂	4k	40%
12	Fmoc-Ile-Trp-Gly-Ile-D-Pro-Cys(Trt)-Asn-Hyp(OTBS)-O-树脂	4l	41%
13	Fmoc-Thr('Bu)-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn-Hyp(OTBS)-O-树脂	4m	42%
14	Fmoc-Pen(Trt)-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-Hyp(OTBS)-O-树脂	4n	30%
15	Fmoc-Ile-Trp-D-Pro-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-Hyp(OTBS)-O-树脂	4o	43%
16	Fmoc-Ile-Trp-L-Pro-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-Hyp(OTBS)-O-树脂	4p	45%
17	Fmoc-DhIle(OTBS) ₂ -Trp-D-Pro-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-Hyp(OTBS)-O-树脂	4q	38%
18	Fmoc-DhIle(OTBS) ₂ -Trp-L-Pro-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-Hyp(OTBS)-O-树脂	4r	40%
19	Fmoc-DhIle(OTBS) ₂ -Trp-Gly-Ile-Sar-Cys(Trt)-Asn-Hyp(OTBS)-O-树脂	4s	40%
20	Fmoc-DhIle(OTBS) ₂ -Trp-Gly-Ile-Aib-Cys(Trt)-Asn-Hyp(OTBS)-O-树脂	4t	38%
21	Fmoc-DhIle(OTBS) ₂ -Trp-Gly-Phe-Gly-Cys(Trt)-Asn-Hyp(OTBS)-O-树脂	4u	35%
22	Fmoc-Trp-Gly-Thr('Bu)-Gly-Cys(Trt)-Asn-Hyp(OTBS)-O-树脂	4v	20%

[0253] 分析数据:

[0254] 化合物4a:HPLC-MS:保留时间 $R_t=4.45\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{40}H_{52}N_9O_{11}S^+[M+H]^+866.3502$.,实测值866.3494.收率(RP-HPLC纯化后):77mg.

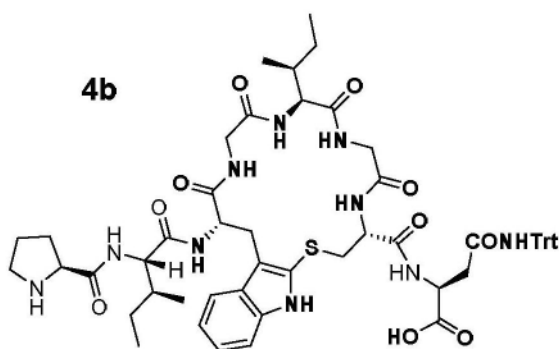
[0255]



6-OBn-Trp-单环七肽

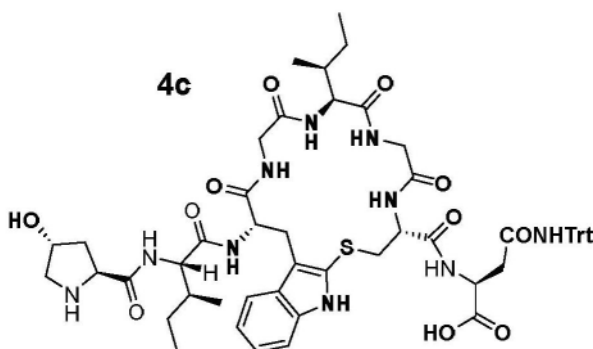
[0256] 化合物4b:HPLC-MS:保留时间 $R_t=7.11\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{58}H_{71}N_{10}O_{10}S^+[M+H]^+1099.5070$.,实测值1099.5079.收率(RP-HPLC纯化后):138mg.

[0257]



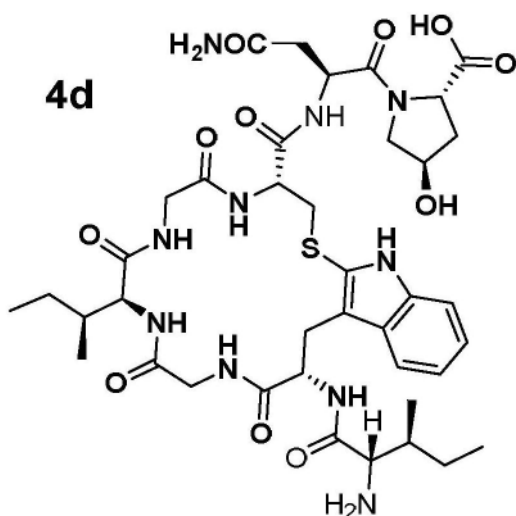
[0258] 化合物4c:HPLC-MS:保留时间 $R_t=6.98\text{min}$ (梯度A);HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{58}H_{71}N_{10}O_{11}S^+[M+H]^+1115.5019$,实测值1115.5009.收率(RP-HPLC纯化后):167mg.

[0259]



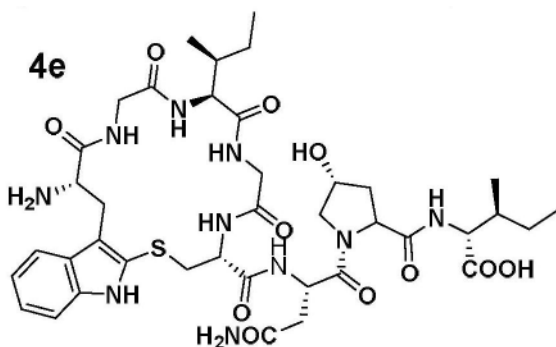
[0260] 化合物4d:HPLC-MS:保留时间 $R_t=7.72\text{min}$ (梯度B);HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{57}N_{10}O_{11}S^+[M+H]^+873.3923$,实测值873.3926.收率(RP-HPLC纯化后):117mg.

[0261]



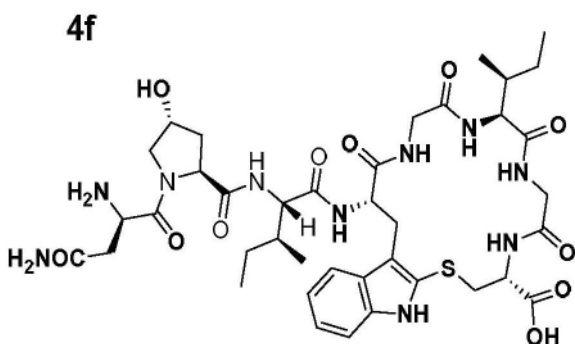
[0262] 化合物4e:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.19\text{min}$ (梯度B);HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{57}N_{10}O_{11}S^+[M+H]^+873.3923$,实测值873.3922.收率(RP-HPLC纯化后):65mg.

[0263]



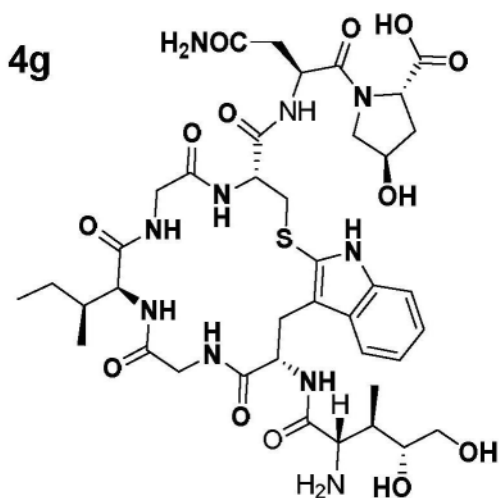
[0264] 化合物4f:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.33\text{min}$ (梯度B);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{57}N_{10}O_{11}S^+[M+H]^+873.3923$,实测值873.3921.收率(RP-HPLC纯化后):70mg.

[0265]



[0266] 化合物4g:HPLC-MS:保留时间 $R_t=9.20\text{min}$ (梯度B);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{57}N_{10}O_{13}S^+[M+H]^+905.3822$,实测值905.3833.收率(RP-HPLC纯化后):133mg.

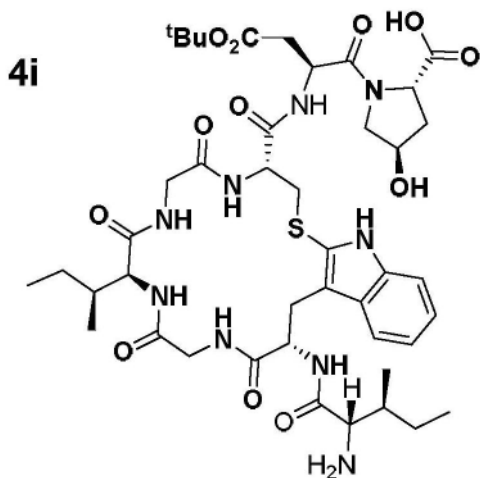
[0267]



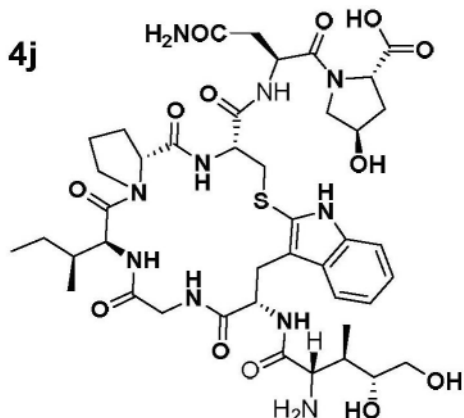
[0268] 化合物4h:HPLC-MS:保留时间 $R_t=9.43\text{min}$ (梯度B);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{46}H_{63}N_{10}O_{14}S^+[M+H]^+1011.4240$,实测值1011.4235.收率(RP-HPLC纯化后):115mg.



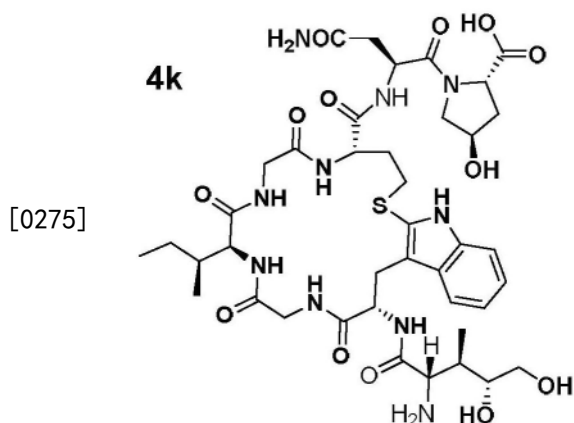
[0271]



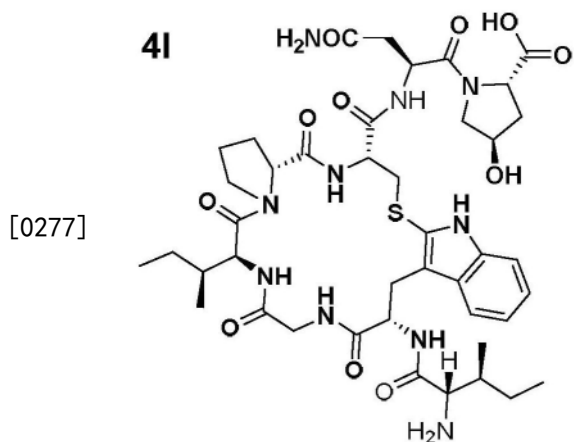
[0273]



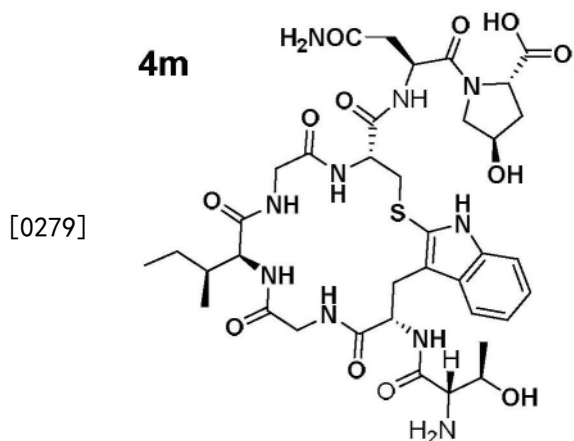
42



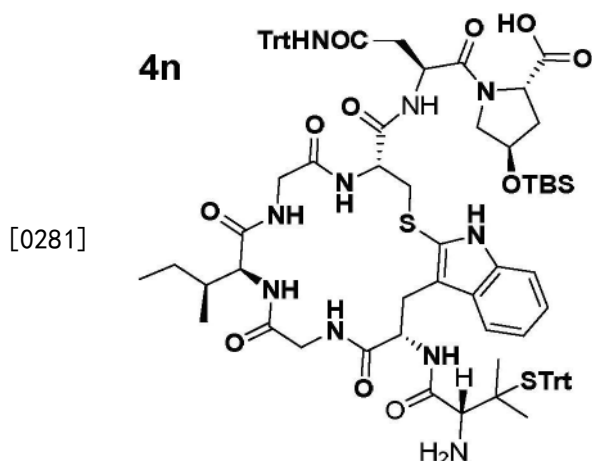
[0276] 化合物4l:HPLC-MS:保留时间 $R_t=9.62\text{min}$ (梯度B);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{42}H_{61}N_{10}O_{11}S^+[M+H]^+913.4236$,实测值913.4240.收率(RP-HPLC纯化后):112mg.



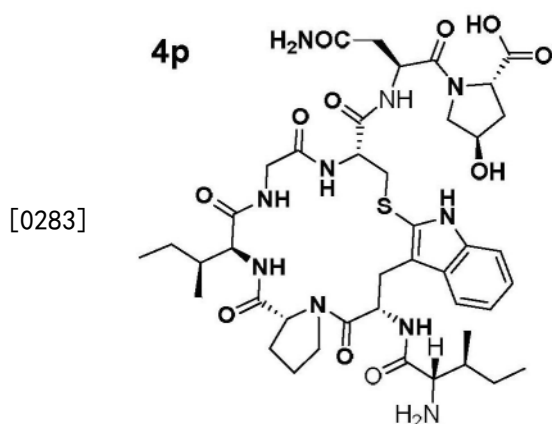
[0278] 化合物4m:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.81\text{min}$ (梯度B);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{37}H_{53}N_{10}O_{12}S[M+H]^+$,861.3560实测值861.3563.收率(RP-HPLC纯化后):108mg.



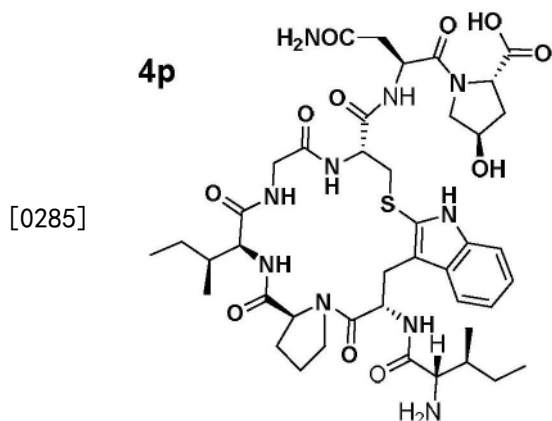
[0280] 化合物4n:HPLC-MS:保留时间 $R_t=10.41\text{min}$ (梯度A);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{82}H_{97}N_{10}O_{11}S_2Si^+[M+H]^+1489.6543$,实测值1489.6553.收率(RP-HPLC纯化后):134mg.



[0282] 化合物4o: HPLC-MS: 保留时间 $R_t=9.72\text{min}$ (梯度B); HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{42}H_{61}N_{10}O_{11}S^+[M+H]^+913.4236$, 实测值913.4237. 收率 (RP-HPLC纯化后): 95mg.

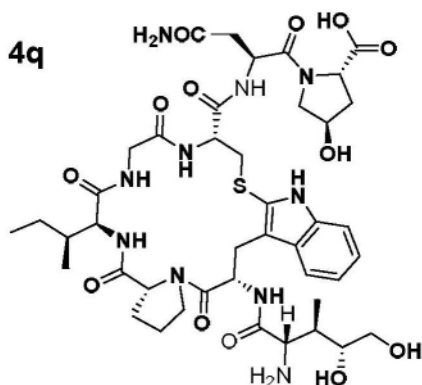


[0284] 化合物4p: HPLC-MS: 保留时间 $R_t=9.00\text{min}$ (梯度B); HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{42}H_{61}N_{10}O_{11}S^+[M+H]^+913.4236$, 实测值913.4232. 收率 (RP-HPLC纯化后): 101mg.



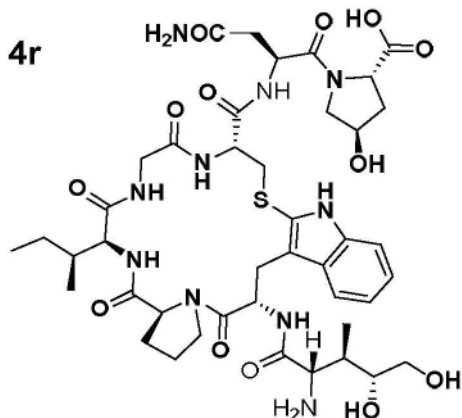
[0286] 化合物4q: HPLC-MS: 保留时间 $R_t=6.19\text{min}$ (梯度B); HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{42}H_{61}N_{10}O_{13}S^+[M+H]^+945.4135$, 实测值945.4139. 收率 (RP-HPLC纯化后): 107mg.

[0287]



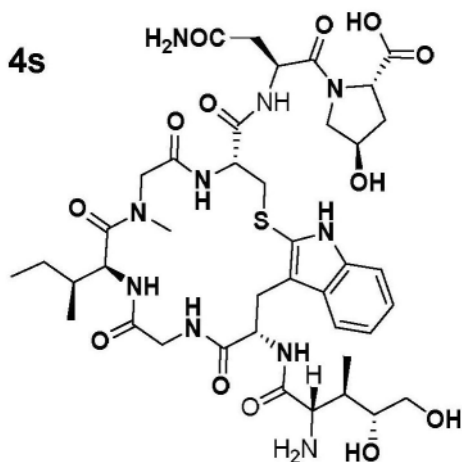
[0288] 化合物4r:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.37\text{min}$ (梯度B);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{42}H_{61}N_{10}O_{13}S^+[M+H]^+945.4135$,实测值945.4134.收率(RP-HPLC纯化后):113mg.

[0289]

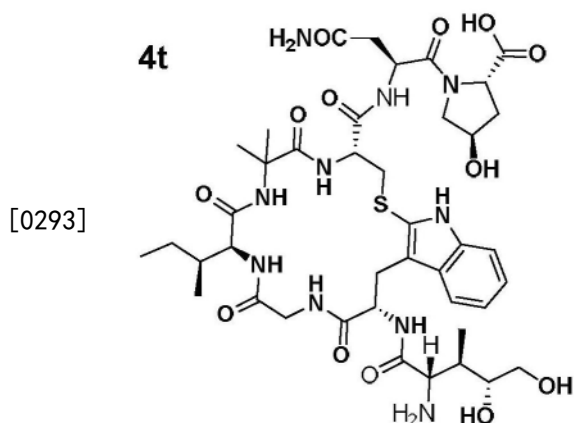


[0290] 化合物4s:HPLC-MS:保留时间 $R_t=6.20\text{min}$ (梯度B);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{40}H_{59}N_{10}O_{13}S^+[M+H]^+919.3978$,实测值919.3980.收率(RP-HPLC纯化后):110mg.

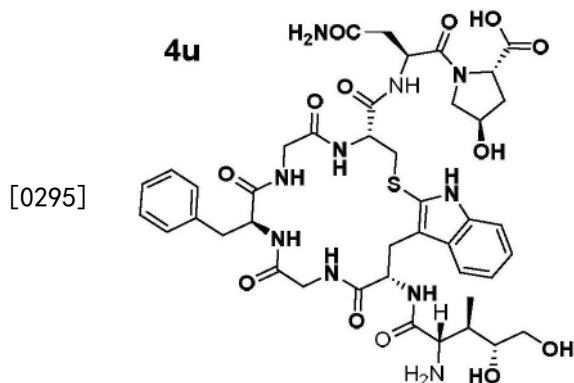
[0291]



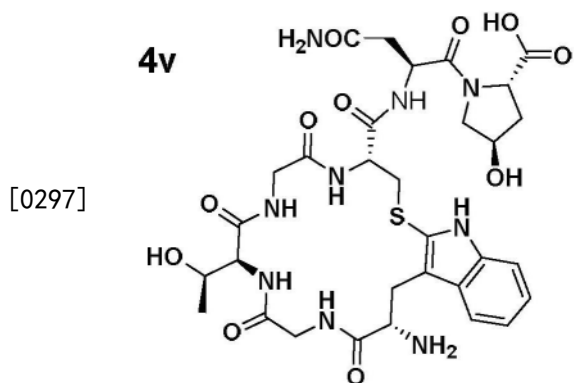
[0292] 化合物4t:HPLC-MS:保留时间 $R_t=7.95\text{min}$ (梯度B);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{41}H_{61}N_{10}O_{13}S^+[M+H]^+933.4135$,实测值933.4134.收率(RP-HPLC纯化后):106mg.



[0294] 化合物4u: HPLC-MS: 保留时间 $R_t = 7.40\text{min}$ (梯度B); HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{42}H_{55}N_{10}O_{13}S^+[M+H]^+ 939.3665$, 实测值939.3658. 收率 (RP-HPLC纯化后): 98mg.



[0296] 化合物4v: HPLC-MS: 保留时间 $R_t = 2.30\text{min}$ (梯度B); HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{31}H_{42}N_9O_{11}S^+[M+H]^+ 748.2719$, 实测值748.2714. 收率 (RP-HPLC纯化后): 44mg.



[0298] 表3. 通过碘环化的结合至固体载体的肽的氨基酸序列. 该表显示经由A环 (N端Cys和C端Trp) 进行环化的实施例 (参见图3)。

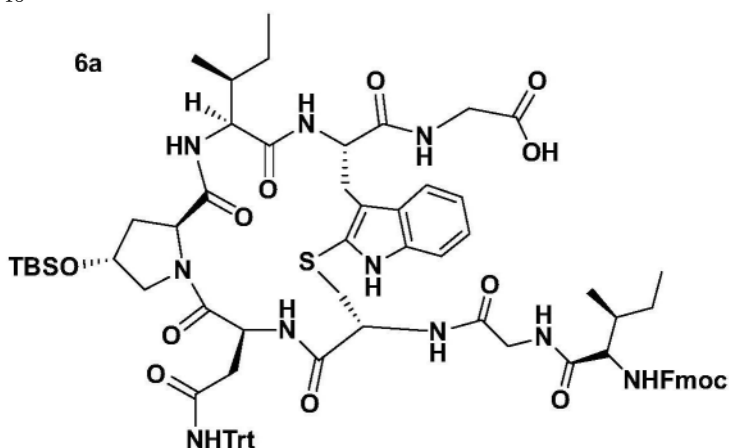
[0299]

条目	结合至树脂的肽 (氨基酸序列)	化合物
1	Fmoc-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-Hyp(OTBS)-Ile-Trp-Gly-O-树脂	6a
2	Fmoc-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-Ile-Hyp(OTBS)-Trp-Gly-O-树脂	6b
3	Fmoc-Ile-Gly-Cys(Trt)-Ile-Hyp(OTBS)-Asn(Trt)-Trp-Gly-O-树脂	6c
4	Fmoc-Ile-Cys(Trt)-Gly-Ile-Gly-Trp-Asn(Trt)-O-树脂	6d
5	Fmoc-Cys(Trt)-Asn(Trt)-trans-Hyp(OTBS)-Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-O-树脂	6e
6	Fmoc-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-trans-Hyp(OTBS)-Ile-Trp-Gly-Ile-O-树脂	6f
7	Fmoc-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-trans-Hyp(OTBS)-Ile-Trp-O-树脂	6g
8	Fmoc-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)-cis-Hyp(OTBS)-Ile-Trp-Gly-O-树脂	6h

[0300] 分析数据:

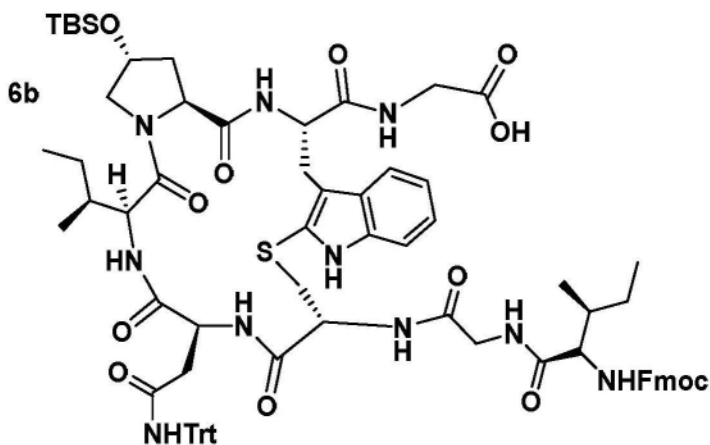
[0301] 化合物6a:HPLC-MS:保留时间 $R_t=10.92\text{min}$ (梯度C);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{79}H_{95}N_{10}O_{13}SSi^+[M+H]^+1451.6565$ 实测值1451.6564.

[0302]



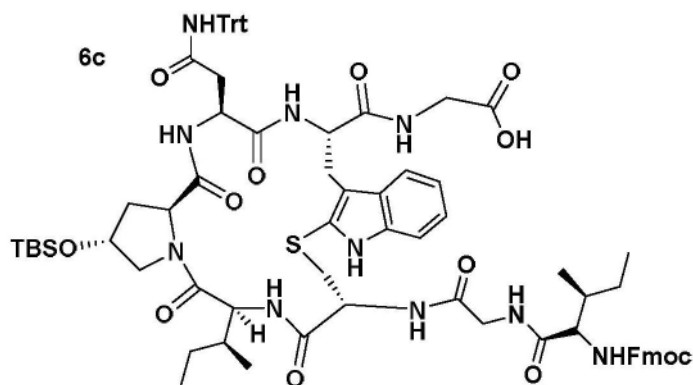
[0303] 化合物6b:HPLC-MS:保留时间 $R_t=10.93\text{min}$ (梯度C);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{79}H_{95}N_{10}O_{13}SSi^+[M+H]^+1451.6565$ 实测值1451.6548.

[0304]



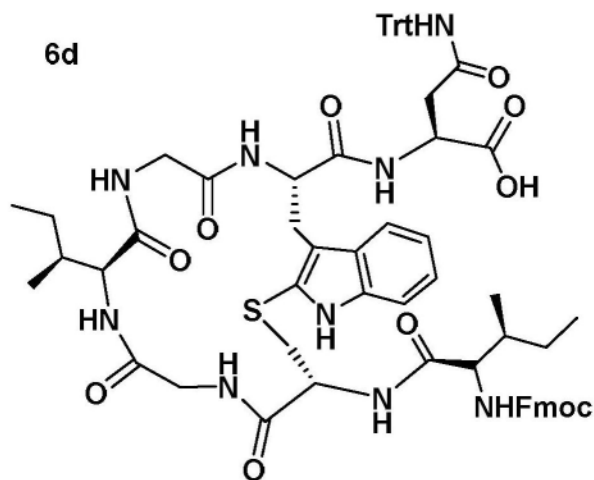
[0305] 化合物6c:HPLC-MS:保留时间 $R_t=11.21\text{min}$ (梯度C);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{79}H_{95}N_{10}O_{13}SSi^+[M+H]^+1451.6565$ 实测值1451.6559.

[0306]



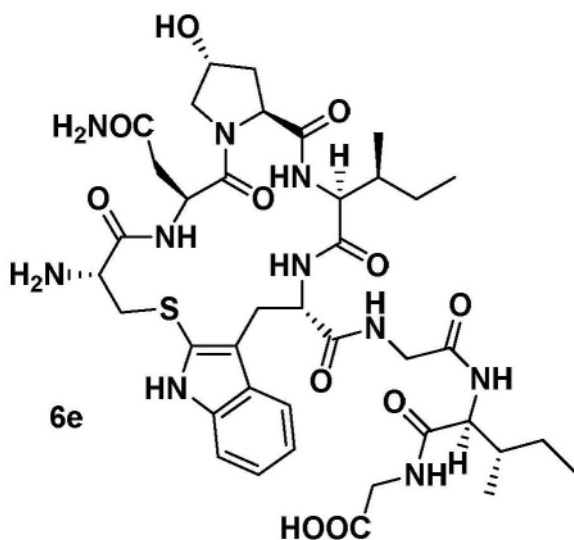
[0307] 化合物6d:HPLC-MS:保留时间 $R_t=7.70\text{min}$ (梯度C);HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{68}H_{74}N_{9}O_{11}S[M+H]^+$ 1224.5223实测值1224.5222.

[0308]



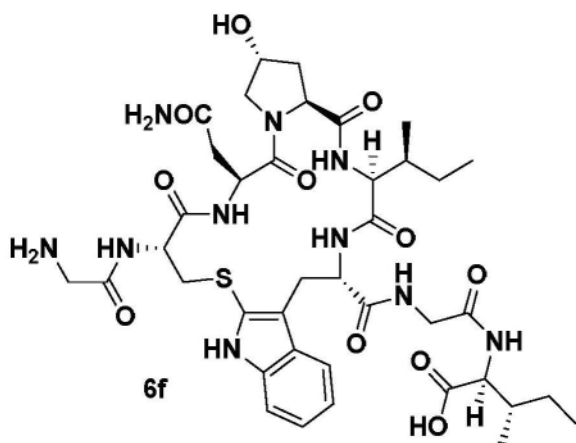
[0309] 化合物6e:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.72\text{min}$ (梯度B);HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{57}N_{10}O_{11}S^+[M+H]^+$ 873.3923,实测值873.3910.

[0310]



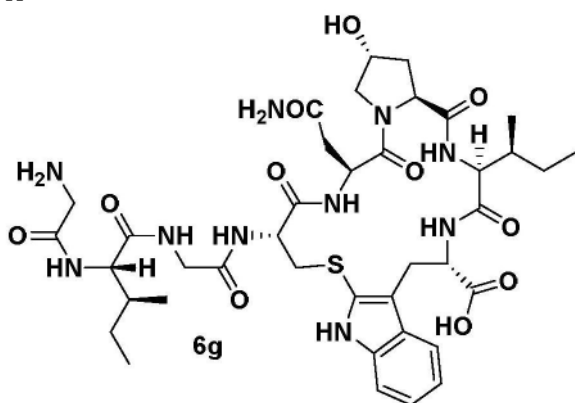
[0311] 化合物6f:HPLC-MS:保留时间 $R_t=7.68\text{min}$ (梯度B);HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{57}N_{10}O_{11}S^+[M+H]^+$ 873.3923,实测值873.3914.

[0312]



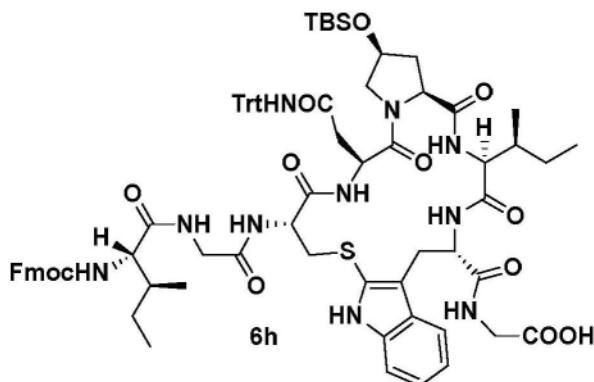
[0313] 化合物6g:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.08\text{min}$ (梯度B);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{57}N_{10}O_{11}S^+[M+H]^+873.3923$,实测值873.3909.

[0314]

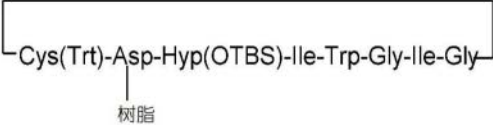


[0315] 化合物6h:HPLC-MS:保留时间 $R_t=11.23\text{min}$ (梯度C);HRMS(ESI): m/z 计算值: $C_{79}H_{95}N_{10}O_{13}SSi^+[M+H]^+1451.6565$ 实测值1451.6526.

[0316]



[0317] 表4.未通过碘环化的结合至固体载体的肽的氨基酸序列。

条目	结合至树脂的肽 (氨基酸序列)	简短说明
1	Fmoc-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)- Hyp(OH) -Ile-Trp-Gly-O-树脂	Hyp 的未保护羟基
2	Fmoc-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)- Hyp(OH) -Ile-Trp-Gly-Ile-O-树脂	Hyp 的未保护羟基
3	Fmoc-Cys(Trt)-Asn(Trt)- Hyp(OH) -Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-O-树脂	Hyp 的未保护羟基
4	Fmoc-Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)- Hyp(OH) -Ile-Trp-O-树脂	Hyp 的未保护羟基
[0318] 5	Fmoc-Ile-Gly-Cys(Trt)-Asn(Trt)- Pro -Ile-Trp-Gly-OH	痕量的环化产物
6	Fmoc-Trp-Gly- Cys(Trt) -Gly-Cys(Trt)-O-树脂	两个 Cys 之间形成的二硫键
7	Fmoc-Trp-Gly-Ile- L-Pro -Cys(Trt)-O-树脂	Pro 的立体化学
8	Fmoc- Trp(Boc) -Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	Trp 的 Boc 保护的侧链
9	Fmoc-Trp-Gly-Ile-Gly- Pen(Trt) -O-树脂	青霉素替代 Cys
10	Fmoc-Gly- Trp-Cys(Trt) -Gly-O-树脂	小得多的环大小
11	Fmoc- 5-OHTrp -Gly-Ile-Gly-Cys(Trt)-O-树脂	Trp 的未保护羟基
12		大环内酰胺的硫醚构建

[0319] 对于表4中包含的化合物,环化肽的收率低于5%。

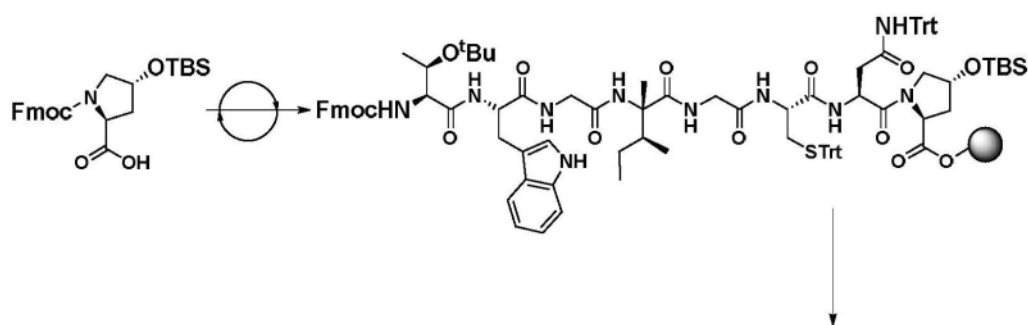
[0320] 表5:由单环前体合成的双环肽

条目	肽 (线性氨基酸序列)	鹅膏毒素
1	H ₂ N-Thr-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys-Asn-Hyp-OH	7a
2	H ₂ N-Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys-Asn-Hyp-OH	7b
3	H ₂ N-Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys-Asp-Hyp-OH	7c
4	H ₂ N-DhIle-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys-Asn-Hyp-OH	7d
5	H ₂ N-DhIle-Trp(6-OH)-Gly-Ile-Gly-Cys-Asn-Hyp-OH	7e
6	α -鹅膏蕈碱	7f
[0321] 7	H ₂ N-Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys-Asn-d-Pro-OH	7g
8	H ₂ N-Ile-Trp-Gly-Ile-d-Pro-Cys-Asn-Hyp-OH	7h
9	H ₂ N-DhIle-Trp-Gly-Ile-d-Pro-Cys-Asn-Hyp-OH	7i
10	H ₂ N-DhIle-Trp-Gly-Ile-Gly-HomoCys-Asn-Hyp-OH	7j
11	H ₂ N-DhIle-Trp(6-OBn)-Gly-Ile-Gly-Cys-Asn-Hyp-OH	7k
12	H ₂ N-DhIle-Trp-Gly-Ile-Sar-Cys-Asn-Hyp-OH ^(#)	7l
13	H ₂ N-DhIle-Trp-Gly-Ile-Aib-Cys-Asn-Hyp-OH ^(§)	7m
14	H ₂ N-DhIle-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys-Asn-Aze-OH ^(*)	7n
15	H ₂ N-DhIle-Trp-Gly-Ile-d-Ala-Cys-Asn-Hyp-OH	7o
[0322] 16	H ₂ N-DhIle-Trp-Gly-Tle-Gly-Cys-Asn-Hyp-OH ^(**)	7p
17	H ₂ N-DhIle-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys-Asn-4-(F ₂)Pro-OH	7q
18	H ₂ N-DhIle-Trp-Gly-Ile-Acc-Cys-Asn-Hyp-OH ^(***)	7r

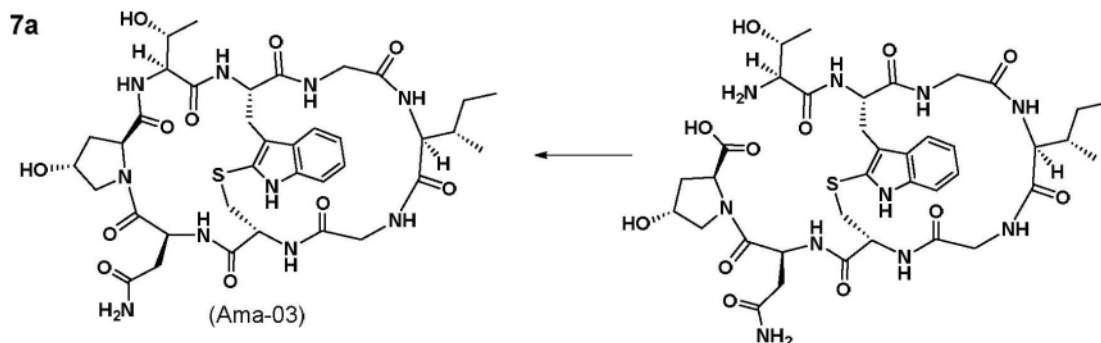
[0323] #:Sar:肌氨酸;§:Aib: α -氨基异丁酸;(*):aze:氮杂环丁烷;(**)Tle:-叔-亮氨酸;(***)Acc:氨基环丙烷-1-羧酸

[0324] 分析数据:

[0325] 化合物7a:HPLC-MS:保留时间 $R_t=8.34\text{min}$ (梯度B);HRMS(ESI):m/z计算值: $C_{37}H_{51}N_{10}O_{11}S^+[M+H]^+843.3454$ 实测值843.3461。



[0326]

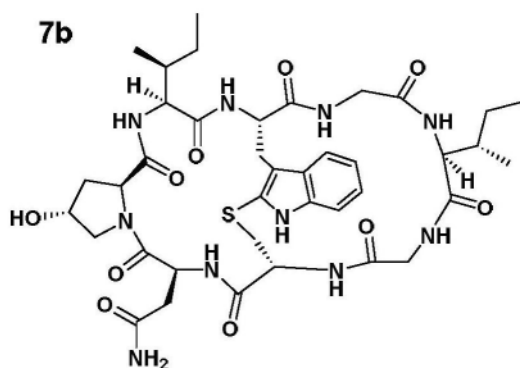


[0327] 化合物7a的合成:

[0328] 使2-CTC树脂(1g, 0.98mmol/g)负载如所述的Fmoc-L-反式-Hyp(OTBS)-OH(参见材料和方法)。树脂载量测定为0.30mmol/g。根据方法A移除Fmoc基团。根据方法A和B,使以下肽序列Fmoc-L-Asn(Trt)-OH(4当量)、Fmoc-L-Cys(Trt)-OH(4当量)、Fmoc-Gly-OH(4当量)、Fmoc-L-Ile-OH(4当量)、Fmoc-Gly-OH(4当量)、Fmoc-L-Trp-OH(4当量)和Fmoc-L-(2S, 3R, 4R)-(TBS)₂-DHIle-OH(2当量)与脱保护的树脂偶联。氨基羧乙基硫色氨酸形成根据本文所公开的操作(参见材料和方法)进行。在移除Fmoc基团并随后使用TFA/TIS/H₂O(95:2.5:2.5)从树脂上裂解之后,粗制肽未经进一步纯化即用于下一步骤。将所获得的单环八肽(86mg, 100μmol, 1.0当量)溶解于DMF(50mL)中。然后,在0℃下添加DIPEA(2.2当量)和HATU(2.0当量)。使反应混合物温热至室温维持12小时并减压浓缩。使用制备型HPLC纯化粗产物,以获得呈白色粉末状的双环八肽化合物7a(32mg, 收率:38%)。

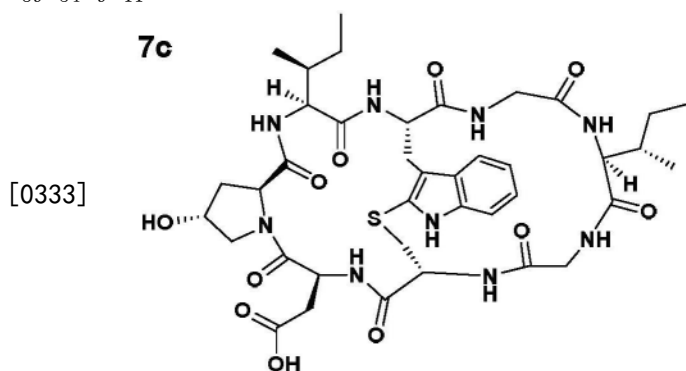
[0329] 化合物7b:HPLC-MS:保留时间 $R_t=5.73$ 分钟(梯度A); $C_{39}H_{55}N_{10}O_{10}S^+[M+H]^+$ 的HRMS(ESI): m/z 计算值:855.3878,实验值855.3839。

[0330]



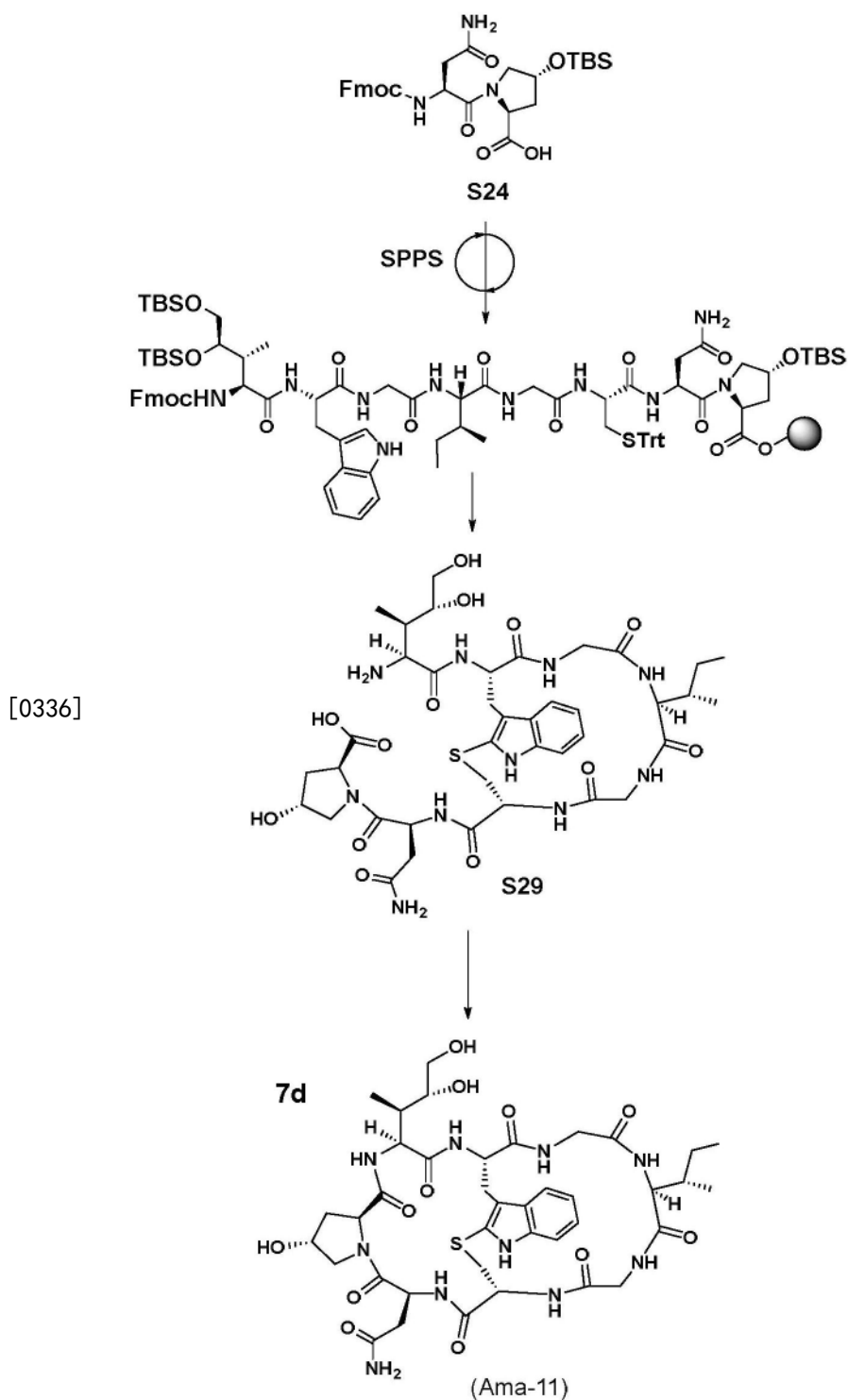
[0331] 化合物7b的合成与如上所公开的化合物7a类似的方式使用相应的Fmoc保护的氨基酸进行。使用制备型HPLC纯化粗产物,以获得呈白色粉末状的双环八肽7b(20mg, 68%)。

[0332] 化合物7c:HPLC-MS:保留时间 $R_t=6.75\text{min}$ (梯度B);HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{54}N_9O_{11}S^+[M+H]^+856.3658$ 实测值856.3660.



[0334] 化合物7c的合成以与化合物7a (Ama-03) 的合成类似地使用相应的Fmoc保护的氨基酸进行。使用制备型HPLC纯化粗产物,以获得呈白色粉末状的双环八肽7c (30mg,60%)。

[0335] 化合物7d:HPLC-MS:保留时间 $R_t=6.76\text{min}$ (梯度B);HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{55}N_{10}O_{12}S^+[M+H]^+887.3716$ 实测值887.3727.

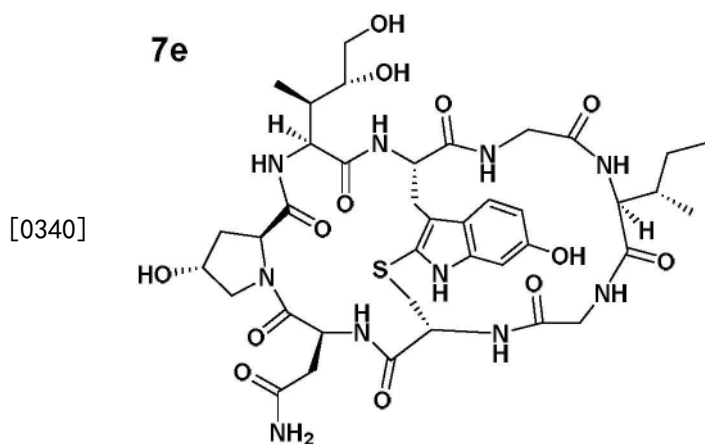


[0337] 化合物7d的合成:

[0338] 使2-CTC树脂(1g, 0.98mmol/g)负载如所述的S24(参见材料和方法)。树脂载量测定为0.30mmol/g。根据方法A移除Fmoc基团。根据方法B, 使Fmoc-Cys(Trt)-OH(4当量)与脱保护的树脂偶联。根据方法A移除所得的树脂的Fmoc基团。根据方法A和B, 使以下肽序列Fmoc-Gly-OH(4当量)、Fmoc-L-Ile-OH(4当量)、Fmoc-Gly-OH(4当量)、Fmoc-L-Trp-OH(4当量)和Fmoc-L-(2S, 3R, 4R)-(TBS)₂-DHIle-OH(2当量)与脱保护的树脂偶联。氨基羧乙基硫色氨酸形成在固体载体上进行(参见材料和方法)。在使用方法A移除Fmoc基团并随后使用

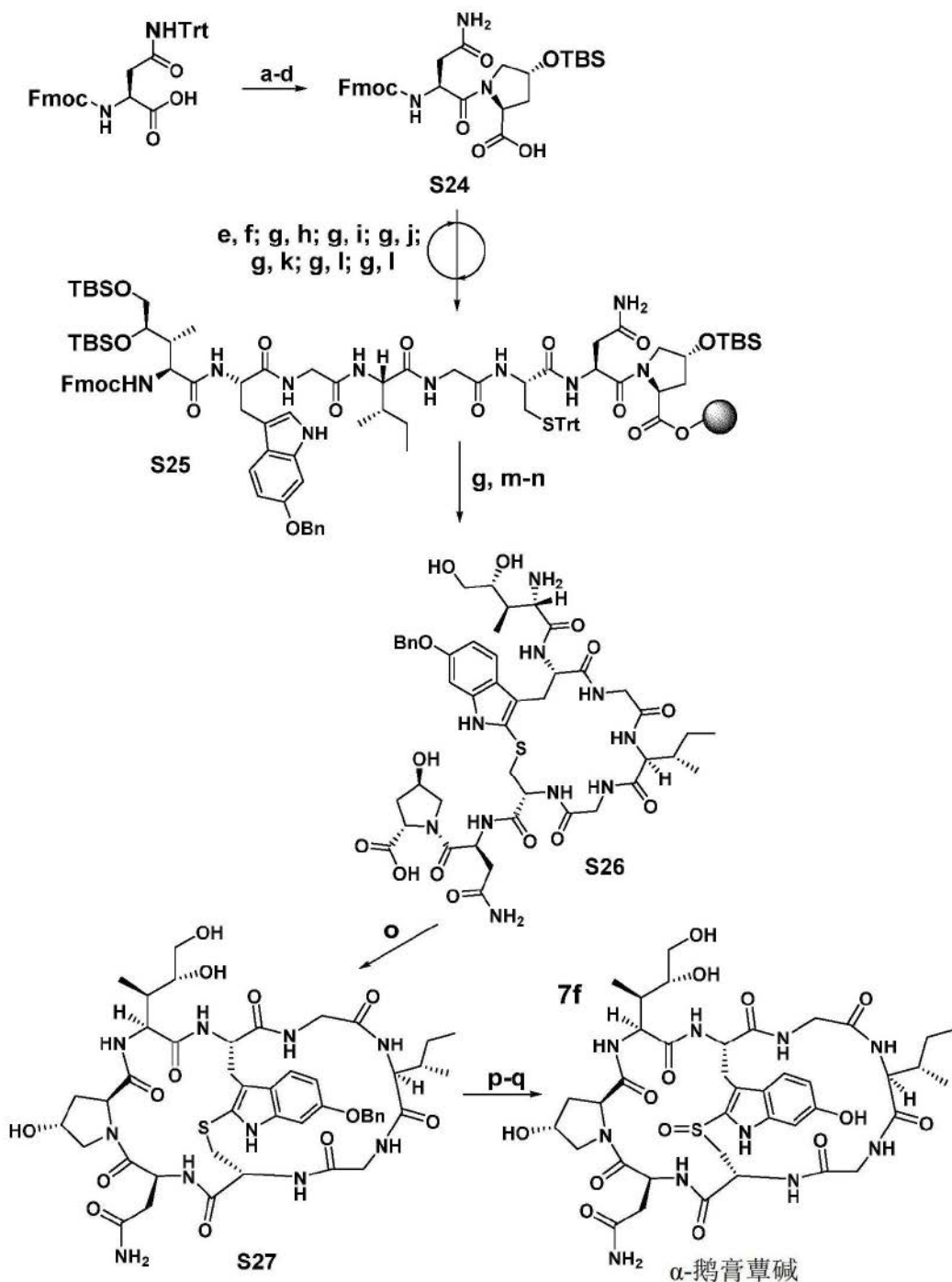
条件B从树脂上裂解之后,在用含TBAF的THF (10当量) 脱甲硅基后获得125mg粗制单环肽S29 (参见材料和方法)。后续HPLC纯化获得46%总收率的S29。

[0339] 化合物7e:HPLC-MS:保留时间 $R_t=6.70\text{min}$ (梯度B);HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{55}N_{10}O_{13}S^+[M+H]^+903.3665$ 实测值903.3662.



[0341] 化合物7e的合成是7f (α -鹅膏蕈碱)的全合成的一部分并且在本文中公开。

[0342] 化合物7f:HPLC-MS:保留时间 $R_t=6.36\text{min}$ (梯度B);HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{39}H_{55}N_{10}O_{14}S^+[M+H]^+919.3614$ 实测值919.3632.



[0344] α -鹅膏蕈碱的全合成

[0345] a) DCC, NHS, DCM; b) H-Hyp-OH, NaHCO_3 , 二氧杂环己烷/ H_2O ; c) TFA/DCM (1:1), 1h; d) TBDMSTf, 二甲基吡啶, DCM, 16h; e) 2-CTC-树脂, DCM, DIPEA; f) MeOH/DIPEA/DCM (1:1:8); g) 哌啶/DMF (1:4); h) Fmoc-L-Cys-OH, TBTU, DIPEA, DMF; i) Fmoc-Ile-OH, TBTU, DIPEA, DMF; j) Fmoc-Gly-OH, TBTU, DIPEA, DMF; k) Fmoc-L-6-OBn-Trp-OH (15), TBTU, DIPEA, DMF; l) Fmoc-L-(2S, 3R, 4R)-(TBS)₂-DHIle-OH (16), TBTU, DIPEA, DMF; m) TFE/HOAc/DCM (1:1:8); n) TBAF, THF; o) HATU, DIPEA, DMF/DCM; p) $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, EtSH q) mCPBA.

[0346] 使2-CTC树脂(1g, 0.98mmol/g)负载如所述的S24(参见材料和方法)。树脂载量测定为0.30mmol/g。根据方法A移除Fmoc基团。根据方法B, 使Fmoc-Cys(Trt)-OH(4当量)与脱

保护的树脂偶联。根据方法A移除所得的树脂的Fmoc基团。根据方法A和B,使以下肽序列Fmoc-Gly-OH(4当量)、Fmoc-L-Ile-OH(4当量)、Fmoc-Gly-OH(4当量)、Fmoc-L-6-OBn-Trp-OH(4当量)和Fmoc-L-(2S,3R,4R)-(TBS)₂-DHIle-OH(2当量)与脱保护的树脂偶联。氨基羧乙基硫色氨酸的形成使用方法C在固体载体上进行。在使用方法A移除Fmoc基团并随后使用条件B从树脂上裂解之后,在用含TBAF的THF(10当量)脱甲硅基后获得120mg S26(参见材料和方法)。后续HPLC纯化获得40%总收率的S26。

[0347] HRMS(ESI):m/z C₄₆H₆₂N₁₀O₁₄S计算值(M+H)⁺1011.4240,实测值1011.4242。

[0348] HPLC-MS:保留时间R_t=8.78min(梯度C)。

[0349] 将单环八肽S26(80mg,79μmol,1.0当量)溶解于DMF(40mL)中。然后,在0℃下添加DIPEA(30μL,2.2当量)和HATU(20mg,2.0当量)。使反应混合物温热至室温维持12小时并减压浓缩。使用制备型HPLC纯化粗产物,以获得呈白色粉末状的双环八肽S27(52mg,68%)。

[0350] ¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆) δ=11.03(s,1H),8.83(s,1H),8.51(d,J=3.8Hz,1H),8.42(d,J=3.2Hz,1H),8.13(s,1H),8.08(d,J=8.2Hz,1H),7.99(d,J=10.0Hz,1H),7.95(d,J=9.6Hz,1H),7.87(d,J=7.9Hz,1H),7.49-7.38(m,8H),7.33(t,J=7.3Hz,1H),6.81(d,J=1.9Hz,1H),6.77(dd,J=8.8,2.2Hz,1H),5.25(s,1H),5.10(s,2H),4.98-4.90(m,1H),4.83(s,1H),4.71(dd,J=6.9,3.3Hz,1H),4.55(dd,J=17.3,8.3Hz,1H),4.45(dd,J=9.3,5.7Hz,1H),4.40(s,1H),4.28(dd,J=11.4,7.0Hz,1H),4.18(dd,J=18.8,8.4Hz,1H),3.91(dd,J=17.3,7.7Hz,1H),3.82-3.68(m,2H),3.08-2.90(m,3H),2.76(d,J=7.7Hz,1H),2.25-2.15(m,2H),1.88(t,J=10.7Hz,1H),1.60-1.55(m,1H),1.26-1.22(m,1H),1.17(t,J=7.2Hz,3H),1.14-1.07(m,1H),0.89(d,J=7.0Hz,3H),0.88-0.84(m,1H),0.83(t,J=7.2Hz,3H),0.79(d,J=6.6Hz,3H)。

[0351] HRMS(ESI):m/z计算值:C₄₆H₆₁N₁₀O₁₃S⁺[M+H]⁺993.4135,实测值993.4134。

[0352] HPLC-MS:保留时间R_t=10.24min(梯度B)。

[0353] 将双环八肽S27(16mg,16μmol,1.0当量)溶解于EtSH(2mL)中,并在剧烈搅拌下用BF₃-OEt₂(45μL,20.0当量)处理2小时,之后在Et₂O中沉淀完全脱保护的双环八肽。在HPLC纯化后,以80%收率获得呈白色固体粉末状的11mg的纯6-OH-S-脱氧-鹅膏蕈碱(化合物7e)。

[0354] ¹H NMR(700MHz,DMSO-d₆) δ=10.80(s,1H),8.82(s,1H),8.52(s,1H),8.44(d,J=3.0Hz,1H),8.20(s,1H),8.13(s,1H),8.08(d,J=8.2Hz,1H),8.02(d,J=10.1Hz,1H),7.99-7.94(m,2H),7.86(d,J=8.0Hz,1H),7.35(dd,J=16.9,8.6Hz,1H),7.48(s,1H),7.44(t,J=3.5Hz,1H),6.60(d,J=1.4Hz,1H),6.55(dt,J=8.6,2.0Hz,1H),4.94-4.85(m,1H),4.72-4.68(m,1H),4.60-4.50(m,1H),4.48(dd,J=13.8,7.1Hz,1H),4.45(dd,J=9.4,5.8Hz,1H),4.43-4.38(m,2H),4.28(dd,J=11.3,7.2Hz,1H),4.22-4.15(m,1H),4.01-3.98(m,1H),3.91(dd,J=17.2,7.4Hz,1H),3.80-3.70(m,3H),3.39-3.25(m,3H),3.22-3.17(m,1H),3.04-2.91(m,2H),2.76-2.72(m,1H),2.20-2.16(m,2H),1.95-1.86(m,1H),1.61-1.52(m,2H),1.14-1.07(m,1H),0.91-0.86(m,1H),0.88(d,J=6.9Hz,3H),0.83(t,J=7.2Hz,3H),0.79(d,J=6.2Hz,3H)。

[0355] ¹³C NMR(HSQC,176MHz,DMSO-d₆) δ=130.7,129.9,121.3,110.1,96.3,75.9,72.8,69.1,66.4,64.0,62.3,59.5,56.3,56.2,55.5,55.1,52.9,53.9,51.0,44.1,42.8,42.6,42.3,42.1,41.8,39.6,39.0,38.1,34.9,34.5,30.8,29.3,25.7,15.3,14.1,11.0ppm。

[0356] HRMS (ESI) :m/z计算值: $C_{39}H_{55}N_{10}O_{13}S^+[M+H]^+$ 903.3665,实测值903.3669.

[0357] HPLC-MS:保留时间 $R_t=6.66\text{min}$ (梯度B).

[0358] 将所获得的白色粉末6-OH-S-脱氧-鹅膏蕈碱(化合物7e)(8mg,8.8 μmol ,1.0当量)溶解于2mL的i-PrOH/EtOH混合物(2:1)中。然后,滴加mCPBA(0.7当量)的i-PrOH/EtOH(2:1)溶液。将所得的溶液搅拌30分钟,然后通过添加水(1mL)终止反应。经由制备型HPLC纯化粗产物,得到呈白色粉末状的 α -鹅膏蕈碱(3mg,38%,化合物7f)。

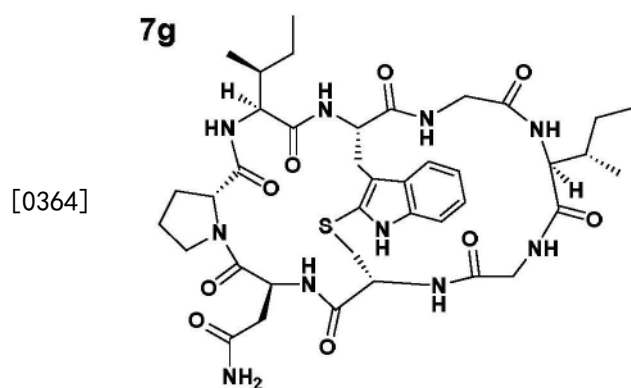
[0359] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) $\delta=11.25$ (s, 1H), 9.20 (s, 1H), 8.74 (t, $J=5.0\text{Hz}$, 1H), 8.50 (d, $J=3.0\text{Hz}$, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.30 (d, $J=10.5\text{Hz}$, 1H), 7.97 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.89 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.80 (d, $J=9.8\text{Hz}$, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.44 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 1H), 6.75 (d, $J=2.2\text{Hz}$, 1H), 6.60 (dd, $J=8.7, 2.1\text{Hz}$, 1H), 5.17 (d, $J=3.0\text{Hz}$, 1H), 4.98-4.88 (m, 2H), 4.70 (d, $J=5.1\text{Hz}$, 1H), 4.65 (dd, $J=6.3, 3.5\text{Hz}$, 1H), 4.41 (dd, $J=9.7, 7.2\text{Hz}$, 1H), 4.39-4.35 (m, 2H), 4.30 (dd, $J=16.9, 7.5\text{Hz}$, 1H), 4.26 (dd, $J=11.7, 6.6\text{Hz}$, 1H), 3.91 (dd, $J=17.6, 7.2\text{Hz}$, 1H), 3.80 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 3.73 (d, $J=11.3\text{Hz}$, 1H), 3.67 (d, $J=6.5\text{Hz}$, 1H), 3.52-3.43 (m, 2H), 3.21 (dd, $J=15.1, 7.3\text{Hz}$, 1H), 3.08 (t, $J=13.3\text{Hz}$, 1H), 2.98-2.92 (m, 2H), 2.78-2.69 (m, 1H), 2.19 (dd, $J=12.7, 6.6\text{Hz}$, 1H), 2.10 (dd, $J=13.8, 6.8\text{Hz}$, 1H), 1.85 (t, $J=10.6\text{Hz}$, 1H), 1.58-1.53 (m, 1H), 0.87 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.86-0.82 (m, 1H), 0.83 (t, $J=7.3\text{Hz}$, 3H), 0.80 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 3H).

[0360] ^{13}C NMR (HSQC, 126MHz, DMSO- d_6) $\delta=122.7, 111.2, 97.0, 72.6, 69.1, 63.9, 62.2, 59.6, 59.4, 56.1, 55.7, 53.4, 51.2, 50.7, 42.8, 38.5, 35.1, 29.2, 25.7, 15.3, 13.9, 11.3$, ppm.

[0361] HRMS (ESI) :m/z计算值: $C_{39}H_{55}N_{10}O_{14}S^+[M+H]^+$ 919.3614,实测值919.3639.

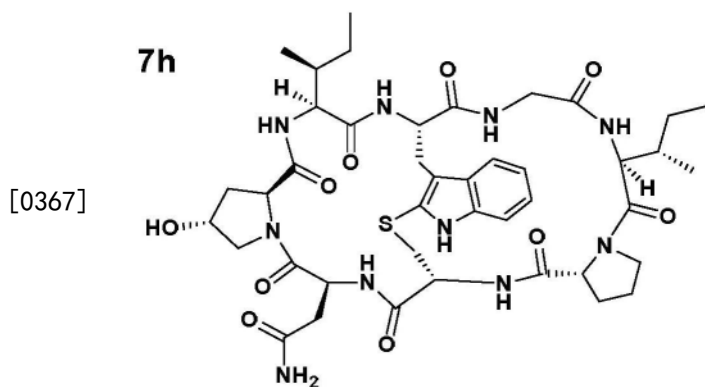
[0362] HPLC-MS:保留时间 $R_t=5.93\text{min}$ (梯度B).

[0363] 化合物7g:HPLC-MS:保留时间 $R_t=6.24\text{min}$ (梯度A);HRMS (ESI) :m/z计算值: $C_{39}H_{55}N_{10}O_9S^+[M+H]^+$ 839.3869实测值839.3902.



[0365] 化合物7g的合成以与如上所公开的化合物7a类似的方式使用相应的Fmoc保护的氨基酸进行,并用Fmoc-D-Pro-OH进行2-CTC-树脂的初始负载。使用制备型HPLC纯化粗产物,以获得呈白色粉末状的双环八肽7g(25mg,63%)。

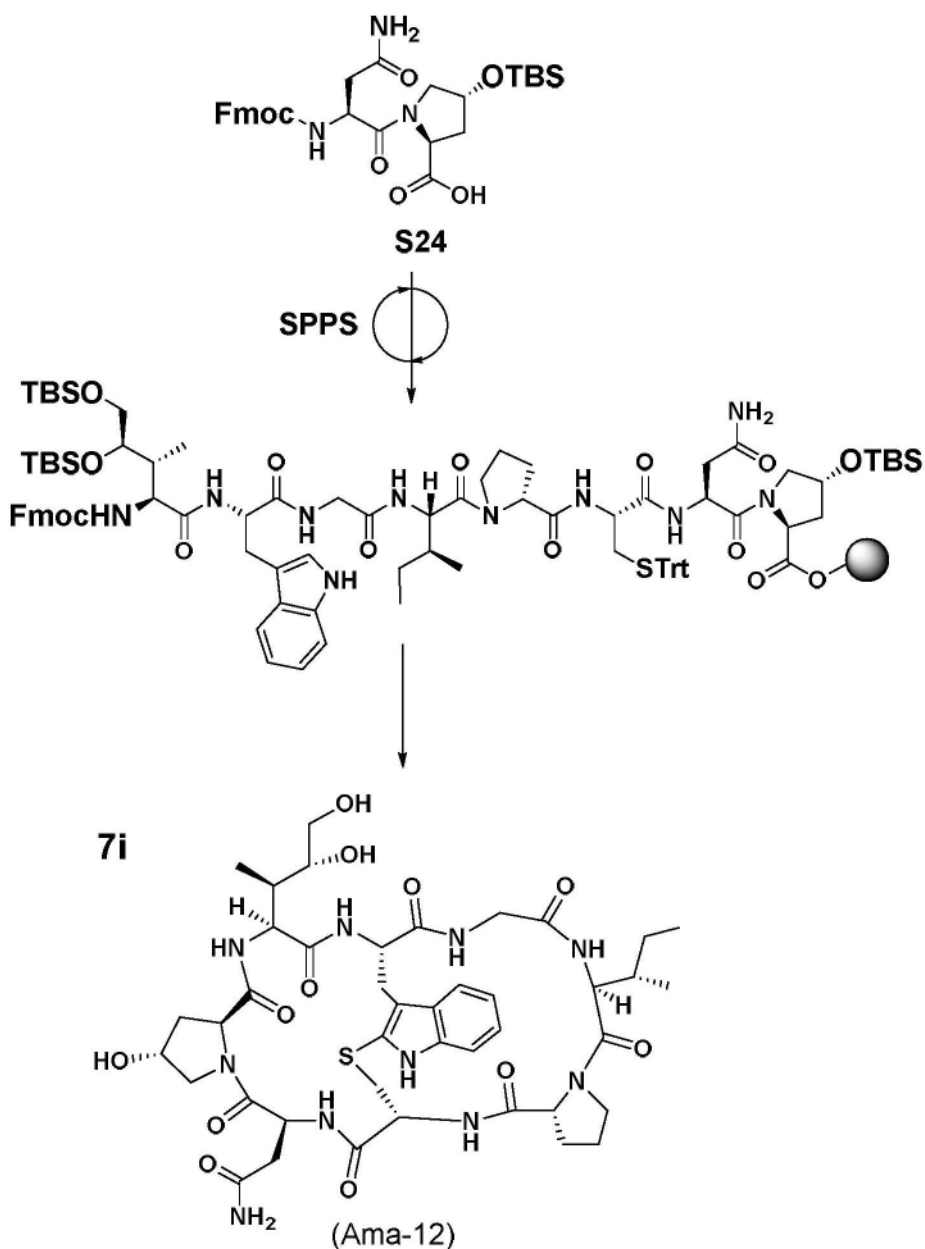
[0366] 化合物7h:HPLC-MS:保留时间 $R_t=10.75\text{min}$ (梯度B);HRMS (ESI) :m/z计算值: $C_{42}H_{59}N_{10}O_{10}S^+[M+H]^+$ 895.4131实测值895.4134.



[0368] 化合物7h的合成:

[0369] 化合物7h的合成以与如上所公开的化合物7a类似的方式使用相应的Fmoc保护的氨基酸进行。使用制备型HPLC纯化粗产物,以获得呈白色粉末状的双环八肽化合物7h (Ama-02) (22mg, 64%)。

[0370] 化合物7i: HPLC-MS: 保留时间 $R_t = 10.10\text{min}$ (梯度B); HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{42}H_{59}N_{10}O_{12}S^+[M+H]^+ 927.4029$ 实测值 927.4031。



[0371]

[0372] 化合物7i的合成:

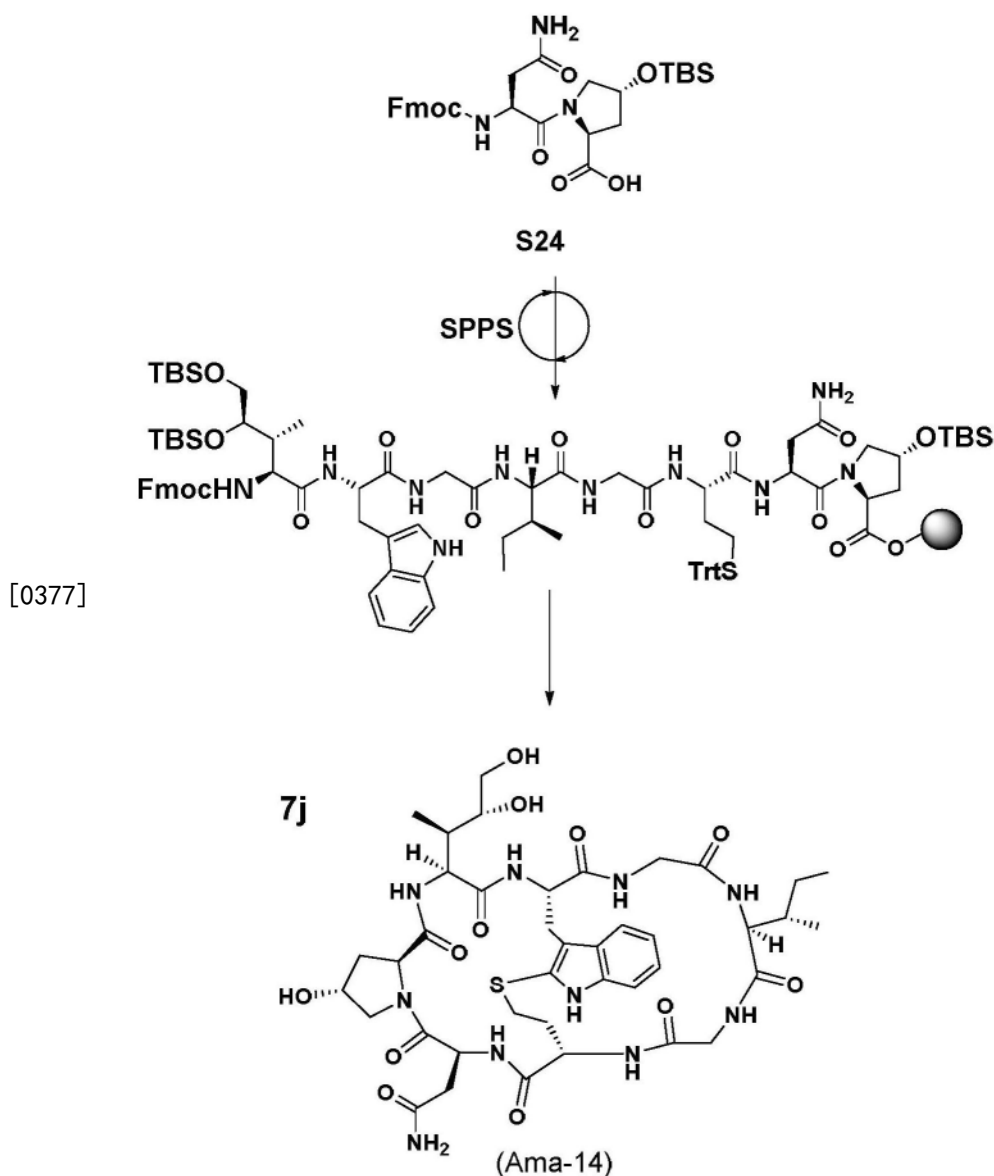
[0373] 从肽基树脂S24开始,在位置4处使用Fmoc-D-Pro-OH代替Fmoc-Gly-OH来安置线性前体。根据在S29的合成中使用的相同操作,在RP-HPLC纯化之后获得呈白色固体粉末状的化合物7i (Ama-12)。

[0374] ^1H NMR (700MHz, DMSO- d_6) δ = 11.26 (s, 1H), 8.39 (d, J = 3.9Hz, 1H), 8.24 (d, J = 3.5Hz, 1H), 8.07 (d, J = 7.9Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.58 (d, J = 9.1Hz, 1H), 7.57 (d, J = 7.2Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.25 (d, J = 8.2Hz, 1H), 7.11 (t, J = 7.5Hz, 1H), 7.02 (t, J = 7.5Hz, 1H), 5.03-4.96 (m, 1H), 4.80 (dd, J = 8.0, 3.8Hz, 1H), 4.53-4.47 (m, 1H), 4.45-4.42 (m, 1H), 4.41 (s, 1H), 4.34-4.28 (m, 2H), 4.01 (dd, J = 8.0, 3.8Hz, 1H), 3.89 (t, J = 7.8Hz, 1H), 3.84 (dd, J = 10.9, 3.0Hz, 1H), 3.74 (d, J = 10.9Hz, 1H), 3.54-3.47 (m, 2H), 3.07-3.02 (m, 2H), 2.97 (dd, J = 14.7, 6.1Hz, 1H), 2.90 (dd, J = 16.2, 5.6Hz, 1H), 2.81 (dd, J = 11.0, 2.8Hz, 1H), 2.25-2.19 (m, 2H), 1.92-1.85 (m, 2H), 1.82-1.78 (m, 1H), 1.66-

1.60 (m, 1H), 1.59-1.54 (m, 1H), 1.19-1.13 (m, 1H), 0.90 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 3H), 0.85 (d, $J=6.9\text{Hz}$, 3H), 0.86-0.83 (m, 1H), 0.83 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 3H) .

[0375] ^{13}C NMR (HSQC, 176MHz, DMSO- d_6) $\delta=122.7, 122.0, 120.6, 119.1, 111.6, 73.0, 71.4, 69.1, 64.0, 62.4, 60.6, 61.5, 57.3, 56.7, 56.2, 53.9, 51.0, 52.8, 55.5, 47.5, 41.9, 40.3, 38.8, 38.7, 38.3, 37.9, 36.4, 35.5, 34.5, 30.4, 29.8, 29.3, 27.2, 24.3, 25.0, 15.0, 14.3, 11.3\text{ppm}$.

[0376] 化合物7j: HPLC-MS: 保留时间 $R_t=8.95\text{min}$ (梯度B); HRMS (ESI): m/z 计算值: $\text{C}_{40}\text{H}_{57}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{S}^+[\text{M}+\text{H}]^+901.3873$ 实测值901.3866.



[0378] 化合物7j的合成:

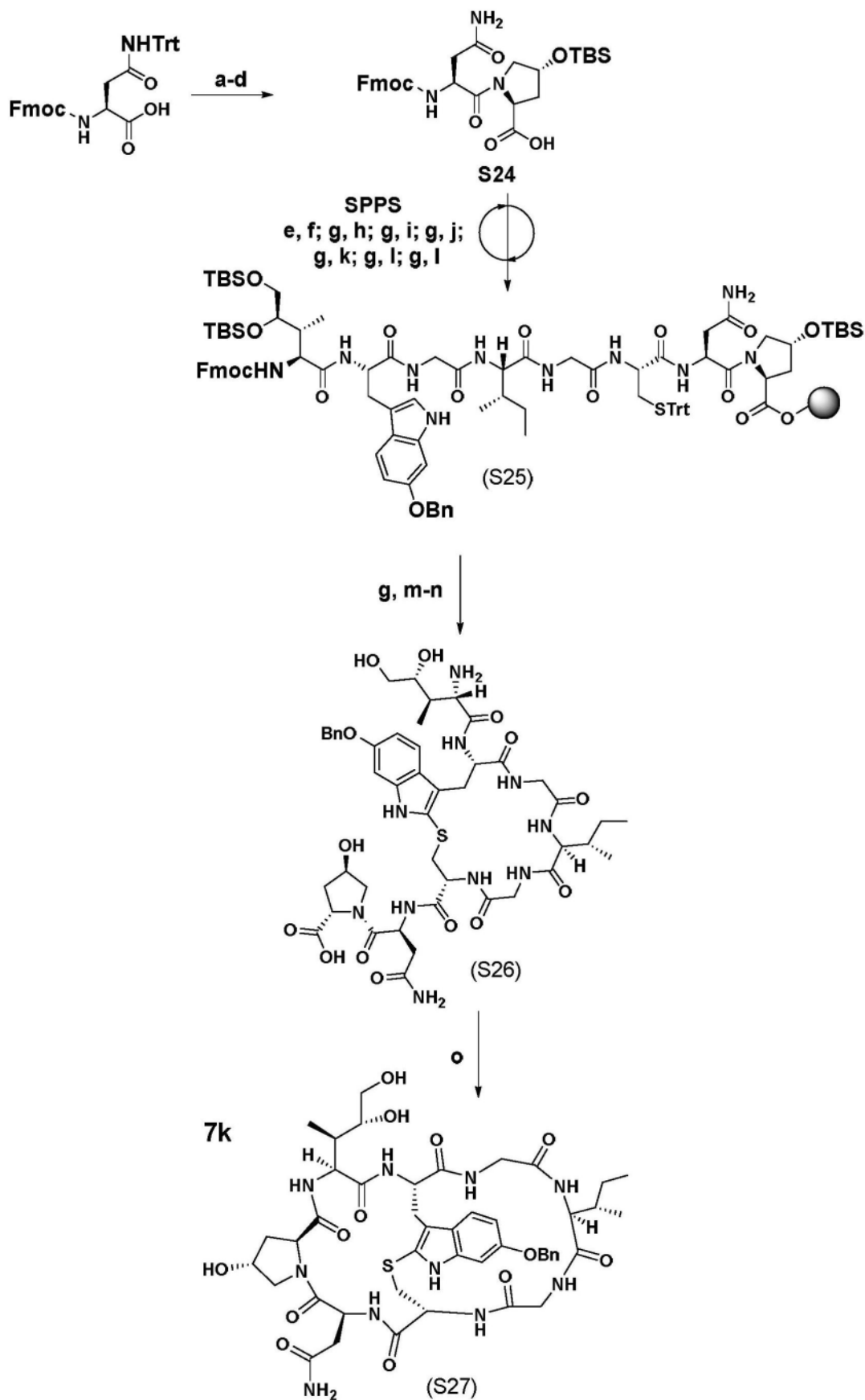
[0379] 从肽基树脂S24开始, 使用Fmoc-L-HomoCys (Trt) -OH代替Fmoc-L-Cys (Trt) -OH来安置线性前体。根据在S29的合成中使用的相同操作, 在RP-HPLC纯化之后获得呈白色固体粉末状的化合物7i (Ama-14)。

[0380] ^1H NMR (700MHz, DMSO- d_6) $\delta=11.11$ (s, 1H), 9.00 (t, $J=6.2\text{Hz}$, 1H), 8.42 (d, $J=4.9\text{Hz}$, 1H), 8.05 (d, $J=3.7\text{Hz}$, 1H), 8.02 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 8.00 (d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 7.78 (s,

1H), 7.52 (d, J=7.0Hz, 1H), 7.40 (d, J=8.3Hz, 1H), 7.38 (d, J=9.6Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.27 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.12 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.02 (t, J=7.3Hz, 1H), 5.26 (s, 1H), 4.81 (s, 1H), 4.66 (dd, J=10.1, 5.2Hz, 1H), 4.40-4.30 (m, 4H), 4.27 (dd, J=10.5, 7.3Hz, 1H), 3.86 (dd, J=17.1, 6.9Hz, 1H), 3.81 (dd, J=8.6, 4.8Hz, 1H), 3.78 (dd, J=10.6, 3.4Hz, 1H), 3.68 (s, 1H), 3.66 (s, 1H), 3.57 (dd, J=10.3, 5.6Hz, 1H), 3.45 (d, J=14.0Hz, 1H), 3.43 (s, 1H), 3.42-3.39 (m, 2H), 2.94-2.86 (m, 2H), 2.72 (dd, J=15.1, 6.0Hz, 1H), 2.37 (d, J=7.6Hz, 1H), 2.21-2.14 (m, 2H), 2.01 (dd, J=15.2, 7.7Hz, 1H), 1.91-1.85 (m, 1H), 1.78-1.76 (m, 1H), 1.67-1.63 (m, 1H), 1.61-1.56 (m, 1H), 1.48-1.41 (m, 1H), 1.21-1.15 (m, 1H), 0.92 (d, J=7.0Hz, 3H), 0.87-0.84 (m, 4H), 0.84 (d, J=6.9Hz, 3H).

[0381] ^{13}C NMR (HSQC, 176MHz, DMSO- d_6) δ =122.6, 119.2, 118.6, 111.5, 73.1, 68.9, 64.1, 61.8, 59.3, 56.0, 55.5, 54.8, 52.1, 50.6, 43.1, 42.3, 40.3, 39.2, 38.7, 38.4, 38.2, 37.5, 35.6, 35.1, 31.4, 29.6, 29.2, 25.7, 15.6, 14.1, 11.8, 11.1ppm

[0382] 化合物7k: HPLC-MS: 保留时间 R_t =10.24min (梯度B); HRMS (ESI): m/z 计算值: $\text{C}_{46}\text{H}_{61}\text{N}_{10}\text{O}_{13}\text{S}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 993.4135 实测值 993.4138.



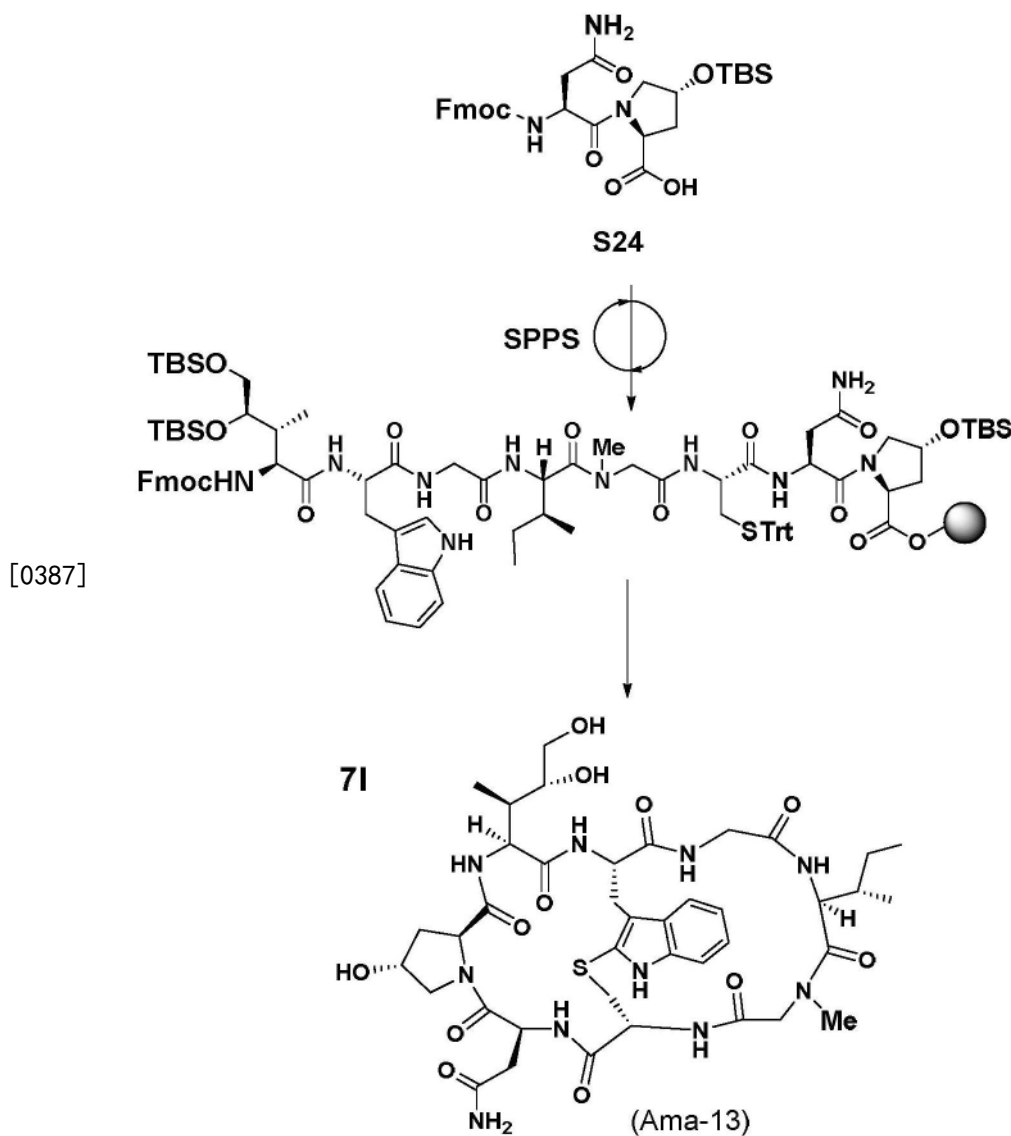
[0383]

[0384] 化合物7k的合成:

[0385] a) DCC, NHS, DCM; b) H-Hyp-OH, NaHCO₃, 二氧杂环己烷/H₂O; c) TFA/DCM (1:1), 1h; d)

TBDMSOTf, 二甲基吡啶, DCM, 16h; e) 2-CTC-树脂, DCM, DIPEA; t) MeOH/DIPEA/DCM (1:1:8); g) 哌啶/DMF (1:4); h) Fmoc-L-Cys-OH, TBTU, DIPEA, DMF; i) Fmoc-Gly-OH, TBTU, DIPEA, DMF; j) Fmoc-Ile-OH, TBTU, DIPEA, DMF; k) Fmoc-Gly-OH, TBTU, DIPEA, DMF; l) Fmoc-L-6-OBn-Trp-OH (15), TBTU, DIPEA, DMF; m) Fmoc-L-(2S,3R,4R)-(TBS)₂-DHlle-OH (16), TBTU, DIPEA, DMF; n) TFA/HOAc/DCM (1:1:8); o) TBAF, THF; o) HATU, DIPEA, DMF/DCM;

[0386] 化合物71: 保留时间 $R_t=8.49\text{min}$ (梯度A); HRMS (ESI): m/z 计算值: $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{N}_{11}\text{O}_{12}\text{S}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 901.3873, 实测值901.3890.



[0388] 化合物71的合成:

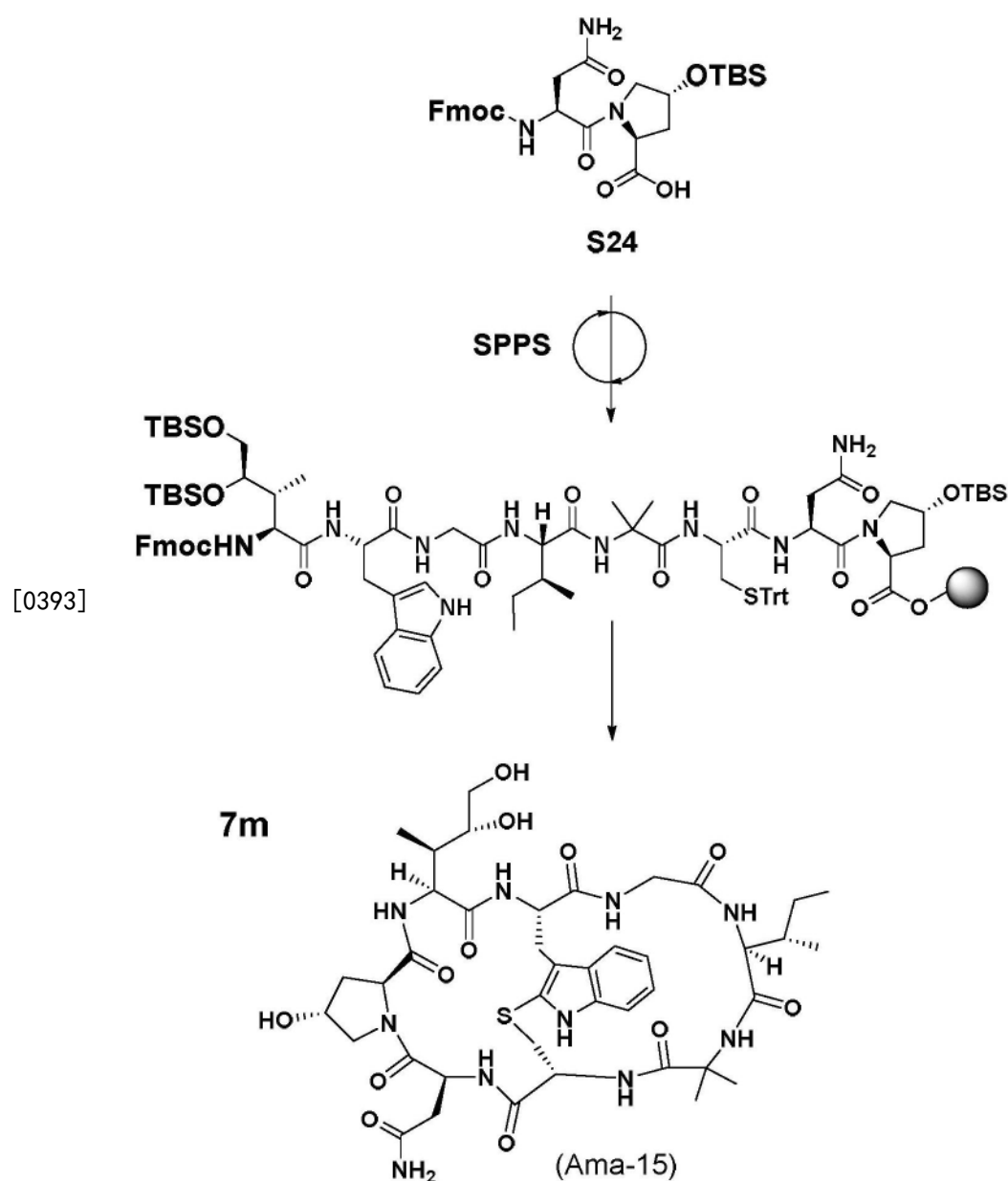
[0389] 从肽基树脂S24开始, 在位置4处使用Fmoc-Sar-OH代替Fmoc-Gly-OH来安置线性前体。根据在S29的合成中使用的相同操作, 在RP-HPLC纯化之后获得呈白色固体粉末状的化合物71 (Ama-13)。

[0390] ^1H NMR (700MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta=11.25$ (s, 1H), 8.51 (d, $J=3.6\text{Hz}$, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.07 (d, $J=7.0\text{Hz}$, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.93 (d, $J=9.4\text{Hz}$, 1H), 7.92 (d, $J=10.8\text{Hz}$, 1H), 7.61 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.54 (d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.25 (d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.12 (t, $J=7.5\text{Hz}$, 1H), 7.02 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 1H), 5.28 (s, 1H), 4.96-4.89 (m, 1H), 4.78 (s, 1H), 4.60-4.54

(m, 1H), 4.48 (d, $J=17.4\text{Hz}$, 1H), 4.42 (dd, $J=10.3, 5.2\text{Hz}$, 1H), 4.41 (s, 1H), 4.31 (dd, $J=11.4, 6.8\text{Hz}$, 1H), 4.28 (d, $J=6.9\text{Hz}$, 1H), 4.19 (dd, $J=18.6, 8.1\text{Hz}$, 1H), 3.83 (dd, $J=11.3, 3.6\text{Hz}$, 1H), 3.72 (d, $J=10.3\text{Hz}$, 1H), 3.55-3.51 (m, 1H), 3.44 (d, $J=17.2\text{Hz}$, 1H), 3.39 (d, $J=11.4\text{Hz}$, 1H), 3.24 (d, $J=16.8\text{Hz}$, 1H), 3.19 (s, 3H), 3.13-3.09 (m, 2H), 2.95 (dd, $J=14.3, 5.6\text{Hz}$, 1H), 2.91 (dd, $J=16.4, 5.9\text{Hz}$, 1H), 2.86 (dd, $J=11.0, 2.7\text{Hz}$, 1H), 2.24-2.19 (m, 2H), 2.01 (dd, $J=15.4, 7.3\text{Hz}$, 1H), 1.92-1.86 (m, 1H), 1.65-1.60 (m, 2H), 1.29 (d, $J=20.1\text{Hz}$, 1H), 0.91 (d, $J=7.1\text{Hz}$, 3H), 0.87-0.82 (m, 7H).

[0391] ^{13}C NMR (HSQC, 176MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta=130.1, 122.7, 120.3, 119.2, 111.6, 73.0, 69.1, 63.9, 62.4, 56.2, 55.5, 54.3, 52.8, 52.1, 51.0, 46.2, 37.8, 35.7, 27.1, 29.2, 14.8, 14.3, 11.4, 11.3$, ppm.

[0392] 化合物7m: 保留时间 $R_t=9.29\text{min}$ (梯度A); HRMS (ESI): m/z 计算值: $\text{C}_{41}\text{H}_{59}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{S}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 915.4029, 实测值915.4059.



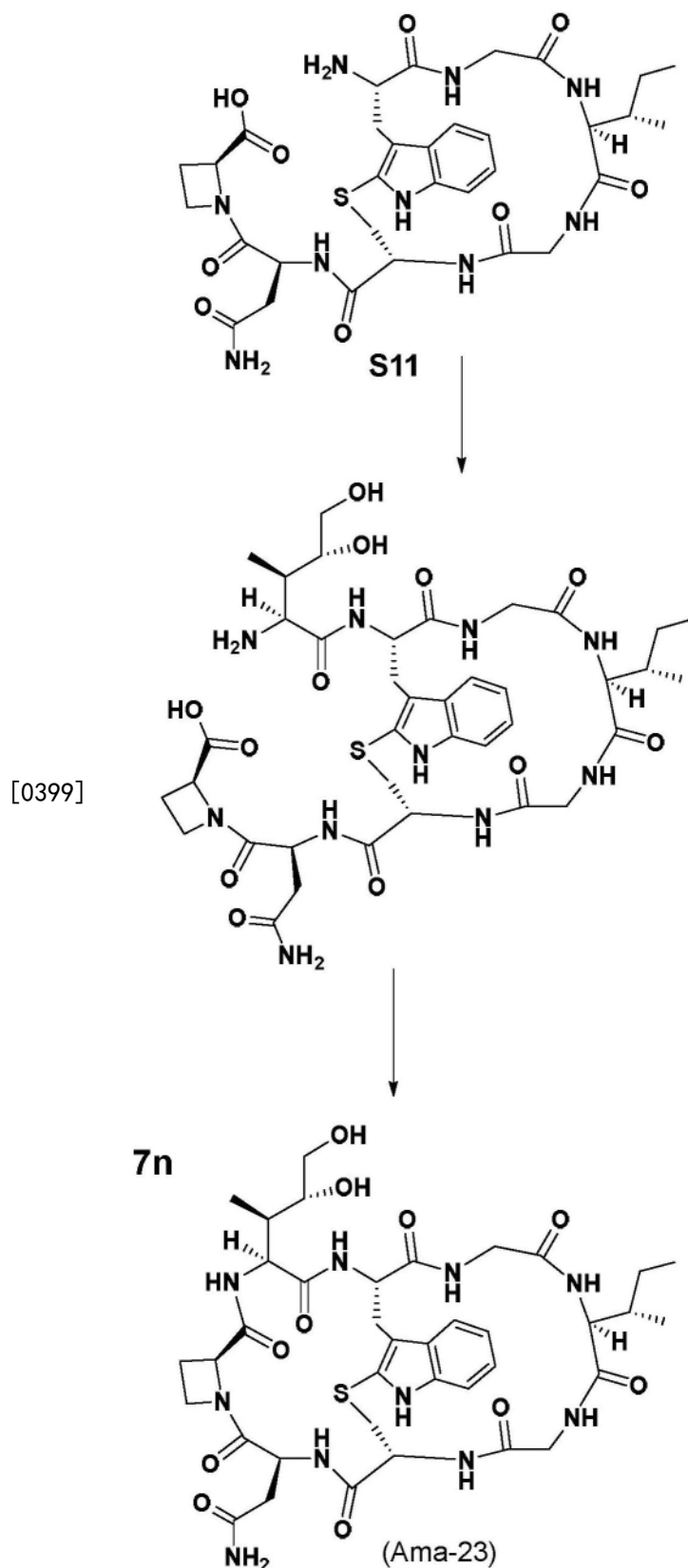
[0394] 化合物7m的合成:

[0395] 从肽基树脂S24开始,在位置4处使用Fmoc-Aib-OH (N- α -Fmoc- α -氨基异丁酸) 代替Fmoc-Gly-OH来安置线性前体。根据在S29的合成中使用的相同操作,在RP-HPLC纯化之后获得呈白色固体粉末状的化合物7m (Ama-15)。

[0396] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ =11.24 (s, 1H), 8.38 (s, 2H), 8.29 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.14 (d, J=8.6Hz, 1H), 7.96 (d, J=9.6Hz, 1H), 7.91 (d, J=8.2Hz, 1H), 7.82 (d, J=9.8Hz, 1H), 7.60 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.25 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.11 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.01 (t, J=7.3Hz, 1H), 5.20 (s, 1H), 5.10-5.00 (m, 1H), 4.76 (s, 1H), 4.47-4.41 (m, 2H), 4.40 (d, J=1.6Hz, 1H), 4.33-4.25 (m, 2H), 3.82 (d, J=8.7Hz, 1H), 3.75 (d, J=11.0Hz, 1H), 3.67-6.62 (m, 1H), 3.51 (dd, J=9.8, 6.2Hz, 1H), 3.27-3.22 (m, 2H), 3.04 (dd, J=14.8, 6.4Hz, 1H), 2.99-2.91 (m, 2H), 2.79 (d, J=7.7Hz, 1H), 2.26-2.16 (m, 2H), 1.87 (t, J=10.7Hz, 1H), 1.54-1.48 (m, 2H), 1.42 (s, 3H), 1.24 (s, 3H), 1.14-1.10 (m, 1H), 0.89 (d, J=6.9Hz, 3H), 0.85-0.79 (m, 7H)。

[0397] ^{13}C NMR (HSQC, 126MHz, DMSO- d_6) δ =122.7, 121.1, 119.1, 111.6, 72.8, 69.1, 63.9, 62.4, 59.0, 56.2, 55.6, 53.8, 53.4, 51.1, 41.8, 41.6, 38.4, 38.1, 35.3, 34.5, 34.6, 30.6, 28.4, 26.8, 25.9, 25.7, 22.9, 21.3, 15.3, 14.1, 11.0, ppm

[0398] 化合物7n: HPLC-MS: 保留时间 R_t =8.73min (梯度A); HRMS (ESI): m/z 计算值 $\text{C}_{38}\text{H}_{53}\text{N}_{10}\text{O}_{11}\text{S}^+ [\text{M}+\text{H}]^+$ 857.3610, 实测值857.3605。



[0400] 化合物7n的合成:

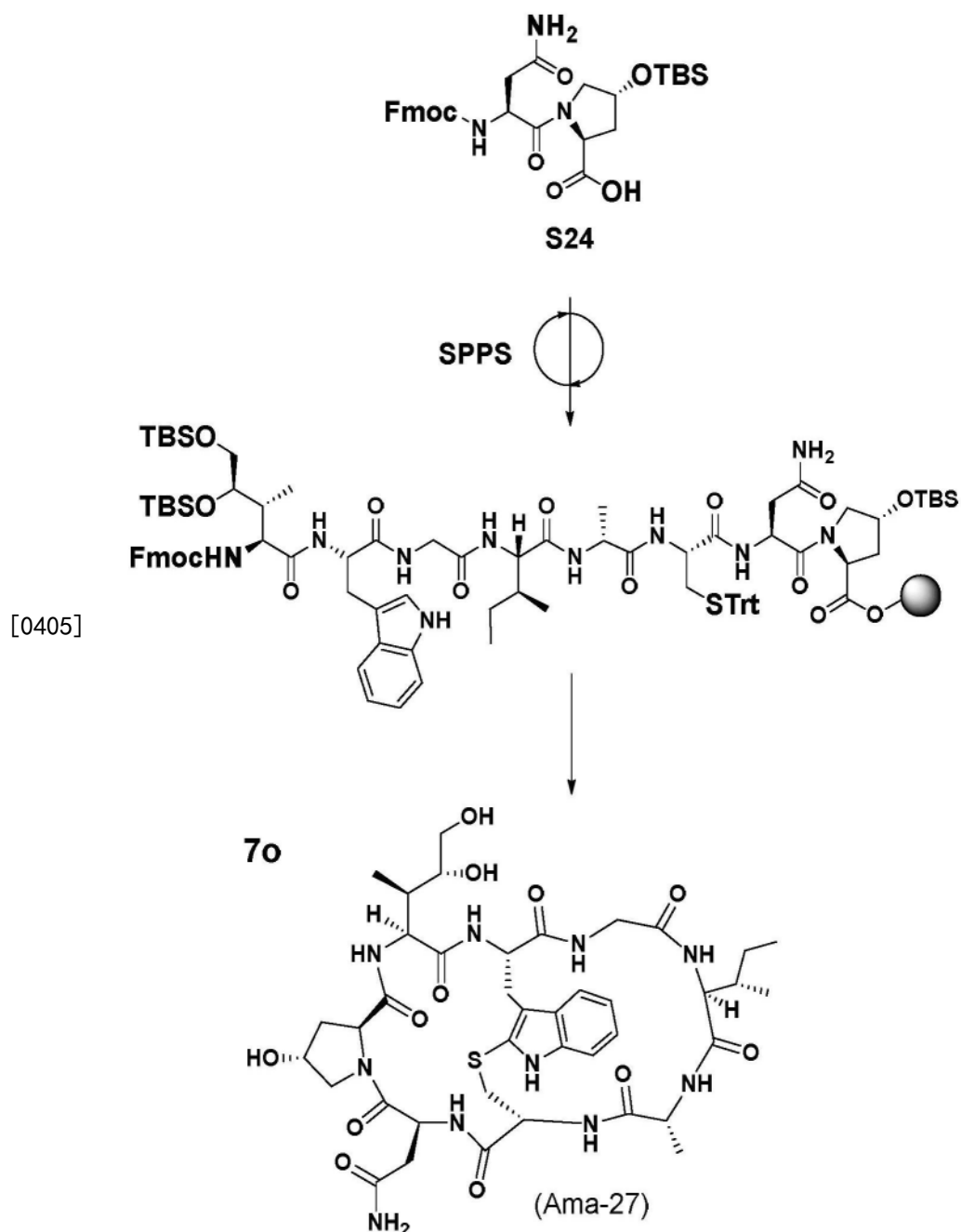
[0401] 使2-CTC树脂(1g, 0.98mmol/g)负载如所述的Fmoc-L-Aze-OH(参见材料和方法)。树脂载量测定为0.30mmol/g。根据方法A移除Fmoc基团。根据方法B, 使Fmoc-Asn(Trt)-OH(4当量)与脱保护的树脂偶联。进行氯醌测试以证实偶联完成。根据方法A移除所得的树脂的

Fmoc基团。根据方法A和B,使以下肽序列Fmoc-L-Cys(Trt)-OH(4当量)、Fmoc-Gly-OH(4当量)、Fmoc-L-Ile-OH(4当量)、Fmoc-Gly-OH(4当量)和Fmoc-L-Trp-OH(4当量)与脱保护的树脂偶联。在固体载体上进行碘介导的环化(参见材料和方法)并使用条件A将肽从树脂上裂解之后,获得呈白色固体粉末状的37.2mg肽S11,在后续纯化后的收率为17%。向Fmoc-DHIle(TBS)₂-OH(34mg,0.06mmol,1.10当量)和DIPEA(25μL,0.14mmol,2.60当量)的DMF(2mL)溶液中添加COMU(25mg,0.06mmol,1.1当量),并将所得的溶液在0℃下搅拌30分钟。将完全脱保护的单环七肽S11(40mg,0.055mmol,1.0当量)溶解于DMF(1mL)中并添加到以上溶液中。将溶液在室温下搅拌6小时,然后用DCM(50mL)稀释并用10%柠檬酸(2×10mL)和饱和NaHCO₃(2×10mL)洗涤。将有机相用盐水(2×20mL)洗涤,经NaSO₄干燥并减压蒸发。将粗产物溶解于MeCN(2mL)中。添加Et₂NH(2mL)并在室温下搅拌15分钟。减压移除溶剂,并将沉淀再溶解于THF(3mL)中。然后,添加TBAF的THF(1M,1.5mL,10当量)溶液并将反应混合物在室温下搅拌2小时。使粗制肽在乙醚中沉淀并再溶解于水中。在冻干后,粗制肽未经任何进一步纯化即提交至下一步骤。将粗制单环八肽溶解于DMF(30mL)中。然后,在0℃下添加DIPEA(2.20当量)和HATU(2.0当量)。使反应混合物温热至室温并搅拌过夜。在减压浓缩后,使用制备型HPLC纯化粗产物,以获得呈白色粉末状的双环八肽化合物7n(Ama-23)(16mg,35%收率)。

[0402] ¹H NMR(500MHz,DMSO-d₆):δ=11.24(s,1H),8.84(t,J=6.35Hz,1H),8.45(d,J=4.28Hz,1H),8.34(d,J=3.92Hz,1H),8.25(d,J=10.69Hz,1H),8.19(bs,1H),8.00(d,J=7.94Hz,1H),7.88(d,J=10.10Hz,1H),7.81(d,J=8.30Hz,1H),7.57(d,J=7.58Hz,,1H),7.51(br,1H),7.25(d,J=8.1Hz,1H),7.11(t,J=7.77Hz,1H),7.01(t,J=7.70Hz,1H),4.95-5.04(m,1H),4.75(t,J=8.33Hz,1H),4.64-4.69(m,1H),4.55-4.63(m,2H),4.43-4.51(m,1H),4.34-4.41(m,1H),4.17(dd,J=18.74,7.74Hz,1H),3.90(dd,J=17.65,7.26Hz,1H),3.28-3.35(m,2H),3.12(t,J=11.6Hz,1H),3.00(dd,J=14.92,6.31Hz,1H),2.89(dd,J=15.49,4.78Hz,1H),2.78(dd,J=10.90,3.06Hz,1H),2.58-2.66(m,1H),2.26-2.34(m,1H),1.50-1.63(m,2H),1.06-1.17(m,1H),0.92(d,J=7.2Hz,3H),0.83(t,J=7.4Hz,3H),0.80ppm(d,J=6.7Hz,3H)。

[0403] ¹³C NMR(HSQC,126MHz,DMSO-d₆):δ=122.7,120.6,119.1,111.6,72.7,64.1,62.3,59.3,55.5,53.5,49.4,42.6,42.1,41.8,39.1,34.8,34.2,30.4,25.6,21.2,15.4,14.1,10.9ppm

[0404] 化合物7o:HPLC-MS:保留时间R_t=8.80min(梯度A)。HRMS(ESI):m/z计算值:C₄₀H₅₇N₁₀O₁₂S⁺[M+H]⁺901.3873,实测值901.3885。



[0406] 化合物7o的合成:

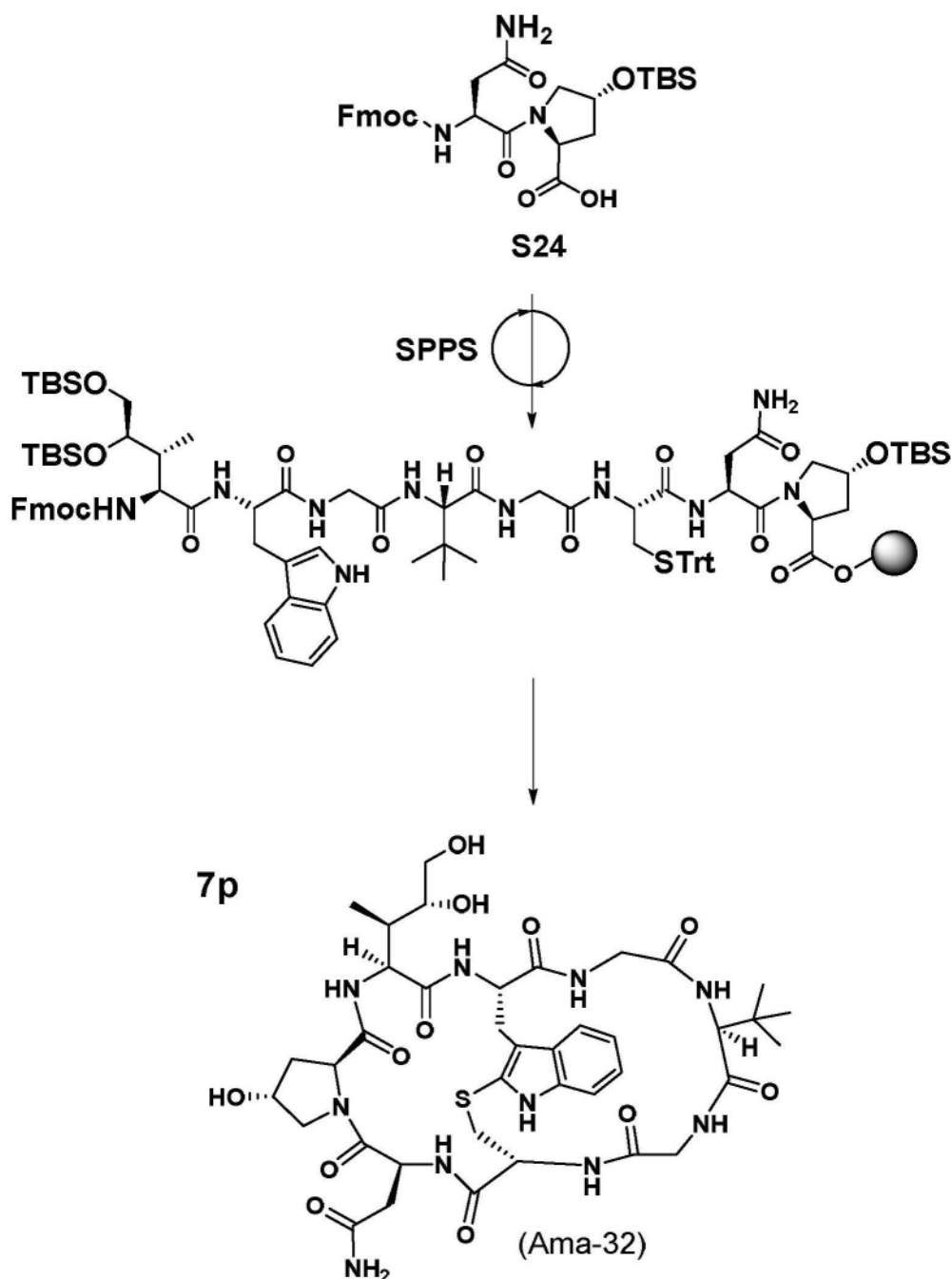
[0407] 从肽基树脂S24开始,在位置4处使用Fmoc-D-Ala-OH代替Fmoc-Gly-OH来安置线性前体。根据在S29的合成中使用的相同操作,在RP-HPLC纯化之后获得呈白色固体粉末状的化合物7o (Ama-27)。

[0408] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ = 11.23 (s, 1H), 8.71 (d, J = 7.6Hz, 1H), 8.48 (d, J = 4.6Hz, 1H), 8.47 (d, J = 3.4Hz, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.10 (d, J = 8.0Hz, 1H), 8.00 (d, J = 9.8Hz, 1H), 7.97 (d, J = 9.3Hz, 1H), 7.91 (d, J = 8.1Hz, 1H), 7.58 (d, J = 7.8Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.25 (d, J = 8.2Hz, 1H), 7.11 (t, J = 7.2Hz, 1H), 7.01 (t, J = 7.5Hz, 1H), 5.00-4.93 (m, 1H), 4.73 (dd, J = 7.7, 3.8Hz, 1H), 4.57-4.50 (m, 1H), 4.46 (dd, J = 9.4, 5.9Hz, 1H), 4.41 (s, 1H), 4.28 (dd, J = 11.4, 6.9Hz, 1H), 4.18 (dd, J = 18.6, 8.3Hz, 2H), 4.12-4.06 (m, 1H), 3.70 (dd, J = 7.9, 3.5Hz, 1H), 3.52 (dd, J = 10.4, 6.4Hz, 1H), 3.37 (dd, J = 11.1, 3.7Hz, 1H), 3.31 (dd, J

=11.8, 4.7Hz, 1H), 3.09 (t, J=11.4Hz, 1H), 3.04 (dd, J=14.9, 6.4Hz, 1H), 2.93 (dd, J=15.9, 4.6Hz, 1H), 2.79 (dd, J=10.8, 3.3Hz, 1H), 2.25-1.15 (m, 2H), 1.88 (td, J=12.4, 3.4Hz, 1H), 1.59-1.53 (m, 2H), 1.24 (d, J=7.4Hz, 4H), 1.18-1.07 (m, 1H), 0.89 (d, J=7.1Hz, 3H), 0.84-0.82 (m, 1H), 0.83 (t, J=7.3Hz, 3H), 0.80 (d, J=6.7Hz, 3H).

[0409] ^{13}C NMR (HSQC, 126MHz, DMSO- d_6) δ =122.7, 120.8, 119.1, 111.6, 72.8, 69.1, 63.9, 62.4, 59.3, 56.3, 56.2, 55.6, 55.5, 53.8, 53.1, 51.1, 49.2, 41.8, 41.7, 40.3, 38.6, 38.3, 38.1, 37.9, 34.8, 34.6, 30.6, 30.5, 25.7, 25.6, 25.5, 17.5, 15.2, 14.1, 10.9, ppm

[0410] 化合物7p: HPLC-MS: 保留时间 R_t =7.98min (梯度A); HRMS (ESI): m/z 计算值: $\text{C}_{39}\text{H}_{55}\text{N}_{10}\text{O}_{12}\text{S}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 887.3716, 实测值 887.3726.



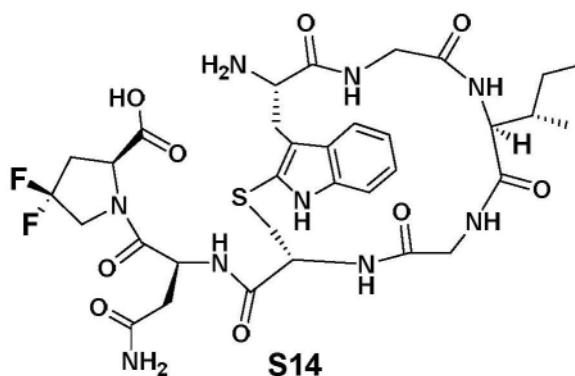
[0412] 化合物7p的合成:

[0413] 从肽基树脂S24开始,在位置3处使用Fmoc-L-Tle-OH代替Fmoc-L-Ile-OH来安置线性前体。根据在S29的合成中使用的相同操作,在RP-HPLC纯化之后获得呈白色固体粉末状的化合物7p (Ama-32)。

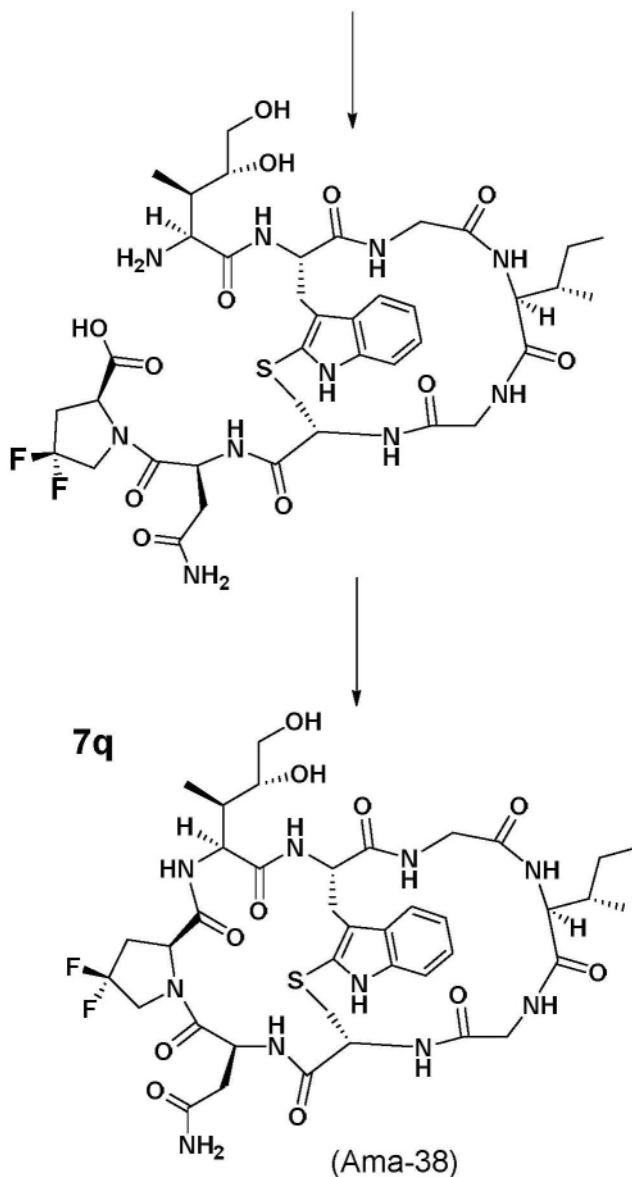
[0414] ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ =11.22 (s, 1H), 8.75 (t, J =6.0Hz, 1H), 8.43 (d, J =3.6Hz, 1H), 8.19 (d, J =4.3Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.09 (d, J =9.4Hz, 1H), 8.03 (d, J =9.8Hz, 1H), 7.96 (d, J =9.4Hz, 1H), 7.91 (d, J =8.1Hz, 1H), 7.58 (d, J =7.8Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.26 (d, J =8.1Hz, 1H), 7.12 (t, J =7.1Hz, 1H), 7.02 (t, J =7.5Hz, 1H), 5.00-4.93 (m, 1H), 4.71 (dd, J =7.7, 3.9Hz, 1H), 4.71 (dd, J =7.7, 3.9Hz, 1H), 4.61-4.54 (m, 1H), 4.45 (dd, J =9.3, 5.9Hz, 1H), 4.41 (s, 1H), 4.31-4.24 (m, 3H), 3.92 (dd, J =17.3, 7.4Hz, 1H), 3.83-3.78 (m, 1H), 3.76-3.72 (m, 2H), 3.52 (dd, J =10.4, 6.5Hz, 1H), 3.45 (d, J =17.5Hz, 1H), 3.42-3.28 (m, 3H), 3.09 (t, J =11.4Hz, 1H), 3.04 (dd, J =14.7, 6.2Hz, 1H), 2.94 (dd, J =15.8, 4.5Hz, 1H), 2.78 (dd, J =10.8, 3.4Hz, 1H), 2.23-2.16 (m, 2H), 1.88 (td, J =12.5, 3.4Hz, 1H), 0.99-0.95 (m, 1H), 0.93 (s, 9H), 0.90 (d, J =7.1Hz, 3H)。

[0415] ^{13}C NMR (HSQC, 126MHz, DMSO- d_6) δ =122.6, 120.8, 119.1, 111.5, 72.8, 69.1, 64.0, 63.8, 63.6, 62.4, 56.2, 55.6, 53.9, 52.8, 50.9, 42.9, 42.0, 41.9, 39.0, 38.9, 36.2, 34.7, 30.4, 29.5, 26.9, 25.3, 14.1ppm

[0416] 化合物7q: HPLC-MS: 保留时间 R_t =9.03min (梯度A)。HRMS (ESI): m/z 计算值: $\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{F}_2\text{N}_{10}\text{O}_{11}\text{S}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 907.3579, 实测值907.3572。



[0417]



[0418] 化合物7q的合成:

[0419] 根据S11的合成,但使用Fmoc-L-4-Pro(F₂)-OH代替Fmoc-L-Aze-OH来装配线性肽。在固体载体上进行碘介导的环化并使用条件A将肽从树脂上裂解之后,获得呈白色固体粉末状的37.4mg肽S14,在后续纯化后的收率为16%。

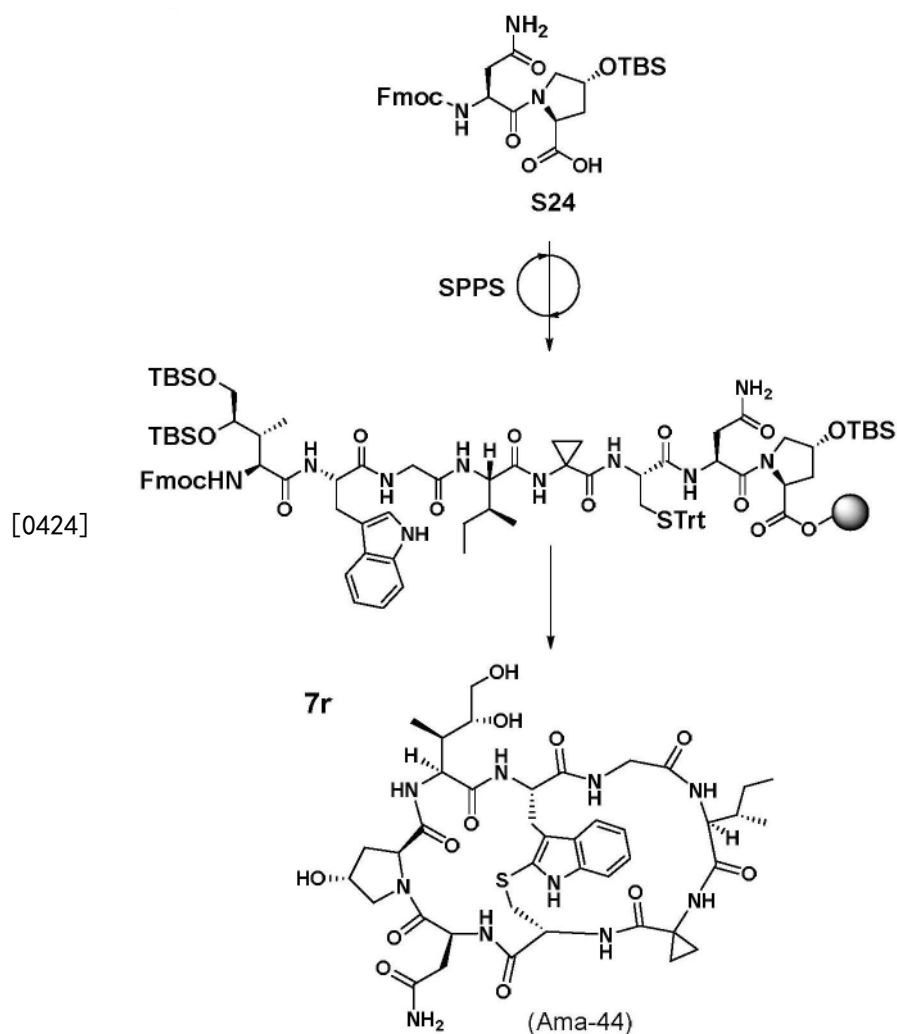
[0420] 向Fmoc-DHIle(TBS)₂-OH(30mg,0.053mmol,1.10当量)和DIPEA(22μL,2.6当量)的

DMF (2mL) 溶液中添加COMU (22mg, 1.1当量), 并将所得的溶液在0℃下搅拌30分钟。将完全脱保护的单环七肽S14 (37mg, 0.048mmol, 1.0当量) 溶解于DMF (1mL) 中并添加到以上溶液中。将溶液在室温下搅拌6小时, 然后用DCM (50mL) 稀释并用10% 柠檬酸 (2×10mL) 和饱和NaHCO₃ (2×10mL) 洗涤。将有机相用盐水 (2×20mL) 洗涤, 经NaSO₄干燥并减压蒸发。将粗产物溶解于MeCN (2mL) 中。添加Et₂NH (2mL) 并在室温下搅拌15分钟。减压移除溶剂, 并将沉淀再溶解于THF (3mL) 中。然后, 添加TBAF的THF (1M, 1.5mL, 10当量) 溶液, 并将反应混合物在室温下搅拌2小时。使粗制肽在乙醚中沉淀并再溶解于水中。在冻干后, 粗制肽未经任何进一步纯化即提交至下一步骤。将粗制单环八肽溶解于DMF (30mL) 中。然后, 在0℃下添加DIPEA (2.20当量) 和HATU (2.0当量)。使反应混合物温热至室温并搅拌过夜。在减压浓缩后, 使用制备型HPLC纯化粗产物, 以获得呈白色粉末状的双环八肽化合物7q (Ama-38) (16mg, 37%收率)。

[0421] ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ=11.22 (s, 1H), 8.85 (t, J=5.4Hz, 1H), 8.45 (d, J=4.4Hz, 1H), 8.41 (d, J=3.0Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 8.06 (d, J=9.2Hz, 1H), 7.97 (d, J=10.2Hz, 1H), 7.89 (t, J=9.1Hz, 2H), 7.57 (d, J=8.3Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.25 (d, J=8.2Hz, 1H), 7.11 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.01 (t, J=7.3Hz, 1H), 4.95-4.87 (m, 1H), 4.83 (q, J=5.0Hz, 1H), 4.61-4.54 (m, 1H), 4.47 (dd, J=9.1, 5.9Hz, 1H), 4.45-4.41 (m, 1H), 4.23 (dd, J=18.3, 8.8Hz, 1H), 3.90 (dd, J=17.3, 7.4Hz, 1H), 3.70 (dd, J=8.3, 4.0Hz, 1H), 3.56 (dd, J=10.8, 6.5Hz, 1H), 3.47-3.41 (m, 2H), 3.09 (t, J=11.4Hz, 1H), 3.06-3.00 (m, 2H), 2.96 (d, J=11.4Hz, 1H), 2.80 (d, J=7.5Hz, 1H), 2.21-2.15 (m, 1H), 1.61-1.53 (m, 3H), 1.14-1.08 (m, 1H), 0.91 (d, J=7.0Hz, 3H), 0.83 (t, J=7.3Hz, 4H), 0.80 (d, J=6.8Hz, 3H)。

[0422] ¹³C NMR (HSQC, 126MHz, DMSO-d₆) δ=122.7, 120.7, 119.2, 111.5, 72.7, 64.0, 64.0, 61.2, 59.3, 55.8, 52.9, 52.8, 51.0, 38.4, 35.2, 29.3, 13.9, 15.3, 11.2ppm

[0423] 化合物7r: HPLC-MS: 保留时间R_t=8.64min (梯度A); HRMS (ESI): m/z 计算值: C₄₁H₅₇N₁₀O₁₂S⁺[M+H]⁺913.3873, 实测值913.3883。



[0425] 化合物7r的合成:

[0426] 从肽基树脂S24开始,在位置4处使用Fmoc-Acc-OH代替Fmoc-Gly-OH来安置线性前体。根据在S29的合成中使用的相同操作,在RP-HPLC纯化之后获得呈白色固体粉末状的化合物7r (Ama-44)。

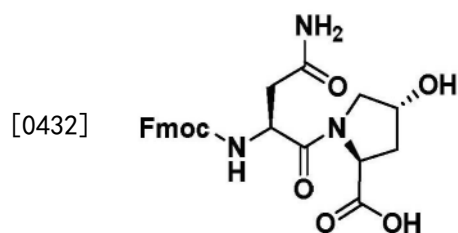
[0427] ^1H NMR (500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ =11.22 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.47 (d, J =3.7Hz, 1H), 8.44 (d, J =3.4Hz, 1H), 8.24 (d, J =10.1Hz, 1H), 8.14 (d, J =3.7Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.96 (d, J =9.4Hz, 1H), 7.91 (d, J =8.1Hz, 1H), 7.59 (d, J =7.9Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.26 (d, J =8.1Hz, 1H), 7.11 (t, J =7.4Hz, 1H), 7.02 (t, J =7.5Hz, 1H), 4.97 (m, 1H), 4.75-4.67 (m, 1H), 4.64-4.54 (m, 1H), 4.46 (dd, J =9.4, 5.9Hz, 1H), 4.42-4.37 (m, 1H), 4.30 (dd, J =11.4, 6.9Hz, 1H), 4.23 (dd, J =18.7, 8.3Hz, 1H), 4.02-3.97 (m, 1H), 3.60 (dd, J =8.8, 4.2Hz, 1H), 3.52 (dd, J =10.5, 6.4Hz, 1H), 3.43-3.27 (m, 3H), 3.08 (dd, J =20.7, 9.1Hz, 1H), 2.94 (dd, J =15.8, 4.6Hz, 1H), 2.79 (dd, J =13.3, 5.8Hz, 1H), 2.26-2.15 (m, 2H), 1.94, 1.84 (m, 1H), 1.58-1.48 (m, 2H), 1.44 (dt, J =26.2, 9.6Hz, 1H), 1.07 (m, 2H), 0.90 (d, J =7.0Hz, 3H), 0.85-0.75 (m, 2H), 0.81 (t, J =7.3Hz, 3H), 0.71 (d, J =6.7Hz, 3H)。

[0428] ^{13}C NMR (HSQC, 126MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ =122.7, 120.8, 119.1, 111.6, 72.8, 69.1, 63.9, 62.4, 59.2, 56.3, 56.2, 55.5, 53.9, 53.4, 51.0, 41.8, 41.8, 38.9, 38.8, 38.1, 38.0, 36.5, 34.6, 30.6, 35.0, 29.5, 25.9, 25.8, 17.9, 15.1, 14.0, 10.9ppm

[0429] 前体合成

[0430] 二肽S24的合成

[0431] (2S,4R)-1-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)-L-天冬酰胺酰基)-4-羟基吡咯烷-2-甲酸



[0433] 在0℃下,将Fmoc-Asn(Trt)-OH(6g,10mmol)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,1.15g,10mmol)添加到干燥DMF(25mL)中。在该温度下,缓慢添加DCC(2.16g,10.5mmol),由此形成白色沉淀。将反应混合物温热至室温,并搅拌12小时。将反应物倾注到冰水(20mL)上,用EtOAc萃取两次,并将有机萃取物用盐水洗涤,干燥(Na_2SO_4),并减压浓缩,以得到粗产物Fmoc-Asn(Trt)-OH的NHS酯,而无需进一步纯化。将粗产物溶解于干燥THF(30mL)中,并在室温下用DIPEA(1.8mL,10mmol)和反式-L-4-羟脯氨酸(1.3g,10mmol)处理。在搅拌12小时后,使THF和DIPEA蒸发,并随后在含50%TFA的DCM(30mL)中进行Trt基团的脱保护。在移除TFA后,通过硅胶色谱法(DCM/MeOH)纯化粗产物,以获得呈白色固体状的二肽。

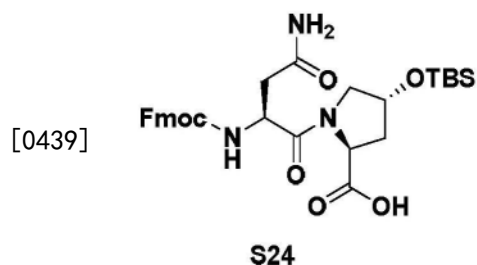
[0434] ^1H NMR(500MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ =12.44(s,1H),7.89(d, J =7.5Hz,3H),7.72(d, J =7.4Hz,2H),7.62(d, J =8.2Hz,1H),7.42(t, J =7.2Hz,2H),7.43-7.38(m,2H),7.36-7.32(m,3H),7.30(s,2H),6.94(s,1H),4.67(dd, J =13.7,7.8Hz,1H),4.38-4.33(m,1H),4.31-4.16(m,3H),3.67(dd, J =10.4,4.6Hz,1H),3.58-3.51(m,1H),3.48-3.29(m,2H),2.42-2.37(m,2H),2.13-2.06(m,1H),1.95-1.88(m,1H)。

[0435] ^{13}C NMR(126MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ =173.6,171.3,170.7,156.2,144.3,141.2,128.6,128.1,127.6,125.8,120.6,69.3,66.2,58.2,54.9,50.0,47.1,40.3,37.5,37.1ppm。

[0436] HRMS(ESI): m/z 计算值: $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_7^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 468.1765,实测值468.1767。

[0437] HPLC-MS:保留时间 R_t =6.22min(梯度A)。

[0438] S24:(2S,4R)-1-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)-L-天冬酰胺酰基)-4-((叔丁基二甲基甲硅烷基)氧基)吡咯烷-2-甲酸



[0440] 在0℃下,将以上所获得的二肽(2g,4.2mmol)和DIPEA(1.5mL,8.5mmol)添加到干燥DMF(25mL)中。在该温度下,缓慢添加叔丁基二甲基甲硅烷基三氟甲磺酸酯(1.95mL,8.5mmol)。将反应混合物温热至室温,并搅拌12小时。将反应物倾注到冰水(20mL)上,用EtOAc萃取两次,并将有机萃取物用盐水洗涤,干燥(Na_2SO_4),并减压浓缩,以得到粗产物。通过硅胶色谱法(DCM/MeOH)获得正交保护的S24。

[0441] ^1H NMR (500MHz, MeOD- d_4) δ =7.68 (d, J =7.5Hz, 2H), 7.54 (dd, J =7.5, 3.4Hz, 2H), 7.28 (t, J =7.4Hz, 2H), 7.21 (t, J =7.1Hz, 2H), 4.50 (s, 1H), 4.40 (s, 1H), 4.24-4.15 (m, 2H), 4.10 (d, J =7.0Hz, 1H), 3.83-3.69 (m, 1H), 3.23 (dt, J =3.3, 1.6Hz, 1H), 2.60 (s, 1H), 2.48 (d, J =8.4Hz, 1H), 2.12 (s, 1H), 1.99 (s, 1H), 0.77 (s, 9H), -0.00 (s, 6H).

[0442] ^{13}C NMR (126MHz, MeOD- d_4) δ =173.8, 156.6, 143.9, 143.8, 141.2, 127.4, 126.8, 124.9, 119.5, 70.8, 66.8, 55.1, 49.8, 46.9, 37.9, 24.8, 19.4, 17.4, -6.2ppm.

[0443] HRMS (ESI): m/z 计算值: $\text{C}_{30}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_7\text{Si}^+[\text{M}+\text{H}]^+$ 582.2630, 实测值 582.2632.

[0444] HPLC-MS: 保留时间 R_t =9.90min (梯度A).

[0445] Trp-OH的合成

[0446] Fmoc-L-Trp (6-OBn)-OH 15 作为鹅膏蕈碱的关键构建单元以及有限的商业可得性, 其合成是高度需要的。进行吡啶氨基甲酸酯的 Vilsmeier-Haack 甲酰化以形成醛, 随后使其转化为 Boc 保护的吡啶 9。随后进行 Horner-Wadsworth 烯化以形成脱氢氨基酸 10。使用 $\text{Rh}(\text{COD})_2\text{BF}_4$ 和作为配体的 (R)-MonoPhos, 将保护的 6-OH-Trp 衍生物 10 立体选择性地氢化 (优异的收率 (95%) 和 99% ee)。在水解为 13 并且 Boc 脱保护为 14 之后, 获得保护的 6-OH-Trp 15, 随后进行 Fmoc-保护。

[0447] 1) Horner-Wadsworth 烯化

[0448] 对于该步骤, 通过使用 Boc-2-膦酰甘氨酸-甲基二甲酯和 DBU 来合成 (Z)-二脱氢氨基酸。存在一种替代方法, 其使用四甲基胍 (CAS 80-70-6) 作为碱在 THF 中在 -70°C 至室温下进行。

[0449] 2) 氢化

[0450] 对于该步骤, 通过使用 $\text{Rh}(\text{COD})_2\text{BF}_4$ 和作为配体的 (R)-MonoPhos, 获得 99% ee 的 (S)-氨基酸。还通过使用 $\text{Rh}(\text{COD})_2\text{BF}_4$ 和 (S)-MonoPhos 作为配体获得 99% ee 的 (R)-氨基酸 (参见图 6)。

[0451] 醛 10 的合成

[0452] 在 0°C 下, 将三氯氧磷 (1.5mL, 15mmol) 滴加到干燥 DMF (5mL) 中。在该温度下, 缓慢添加含 6-OBn 吡啶 (2.23g, 10mmol) 的干燥 DMF (5mL), 由此形成亮黄色沉淀。将反应混合物温热至 45°C, 并搅拌 2 小时。将反应物倾注到冰水 (20mL) 上, 用乙醚萃取两次, 并弃去醚萃取物。然后将水层用氢氧化钠水溶液处理直至溶液呈碱性, 并用乙醚萃取。将有机萃取物用盐水洗涤, 干燥 (Na_2SO_4) 并减压浓缩, 以得到粗产物 9, 而无需进一步纯化。将粗产物溶解于二氯甲烷 (10mL) 中, 并在室温下用 DMAP (120mg, 1mmol) 和二碳酸二叔丁酯 (2.64g, 12mmol) 处理。在搅拌 1 小时后, 添加 1N HCl 溶液 (10mL) 并使二氯甲烷蒸发。将水层用乙醚分批萃取, 并将合并的有机萃取物用 1N HCl、水、1N NaHCO_3 和盐水洗涤。将有机层干燥 (Na_2SO_4) 并减压浓缩, 以得到呈白色固体状的醛 10 (2.73g, 7.8mmol, 78%, 经两步)。

[0453] 脱氢氨基酸 11 的合成

[0454] 向 Schmidt 的膦酰甘氨酸酯 (Boc-2-膦酰甘氨酸-甲基二甲酯) (3.04g, 9.1mmol) 的二氯甲烷 (10mL) 溶液中添加 DBU (1.15mL, 7.7mmol)。在搅拌 10 分钟后, 缓慢添加含醛 10 (2.45g, 7mmol) 的二氯甲烷 (10mL)。在将反应混合物搅拌 16 小时后, 使溶剂在减压下蒸发。将残余物溶解于乙酸乙酯 (40mL) 中。然后, 将有机溶液用 1N HCl (2×10mL) 和盐水洗涤, 干燥 (NaSO_4) 并浓缩。通过快速色谱法 (乙酸乙酯/己烷: 1/5) 纯化粗产物, 以得到黄色固体

(3g, 5.74mmol, 82%)。

[0455] 用于氨基酸12合成的氢化

[0456] 在氩气气氛下,向11 (1.04g, 2mmol) 的干燥脱气DCM (10mL) 溶液中添加16mg (0.04mmol) $[\text{Rh}(\text{COD})_2\text{BF}_4]$ 和27.9mg (0.08mmol) (R)-MonoPhos®的干燥脱气DCM (10mL) 溶液。将所得的混合物置入高压釜中,并将氩气用 H_2 (20巴) 替换。在室温下搅拌3小时后,TLC显示完全转化,并减压移除溶剂,以得到呈无色固体状的氨基酸12 (0.996g, 1.9mmol, 95%)。

[0457] Fmoc-L-Trp (6-OBn) -OH 15的合成

[0458] 在0℃下,向甲酯12 (1.07g, 2.04mmol) 的MeOH (4mL) 和THF (4mL) 溶液中添加0.5M LiOH水溶液 (4mL)。使混合物温热至室温维持2小时,并在TLC显示原料完全消耗后真空移除溶剂。将残余物溶解于水中并用DCM洗涤。然后,将水层使用1M KHSO_4 水溶液酸化,然后用DCM (3×30mL) 萃取。将所得的有机层合并、干燥 (Na_2SO_4), 并移除溶剂。获得呈无色固体状的游离酸13 (1.04g, 2.04mmol, 定量), 其不经进一步纯化即使用。在0℃下,将所得产物溶解于DCM (15mL) 中,随后添加三氟乙酸 (15mL)。将反应混合物在室温下搅拌1小时。使溶液浓缩,并将所得的脱保护的色氨酸14直接用于下一步骤。将粗产物直接溶解于 NaHCO_3 水溶液 (15mL) 中。然后,在0℃下,将含Fmoc-OSu (704mg, 2.09mmol, 1.02当量) 的二氧杂环己烷 (15mL) 添加到该溶液中。将所得的溶液在室温下搅拌5小时,然后减压浓缩,用 H_2O (20mL) 稀释,用1N盐酸水溶液酸化至pH4,并用EtOAc (2×40mL) 萃取。将有机层合并,并相继用 H_2O (2×40mL) 和饱和NaCl (10mL) 溶液洗涤,经无水 Na_2SO_4 干燥,过滤并浓缩。通过硅胶色谱法 (己烷/EtOAc, 5:1) 纯化粗产物,以获得呈无色油状的15 (683mg, 63%, 经三步)。

[0459] 为了测试不同的schmidt磷酰甘氨酸酯,也进行了Cbz保护的6-OBn-Trp的合成。

[0460] 脱氢氨基酸16的合成

[0461] 向schmidt的磷酰甘氨酸酯 (Cbz-2-磷酰甘氨酸-甲基二甲酯) (3.01g, 9.1mmol) 的二氯甲烷 (10mL) 溶液中添加DBU (1.15mL, 7.7mmol)。在搅拌10分钟后,缓慢添加含醛10 (2.45g, 7mmol) 的二氯甲烷 (10mL)。在将反应混合物搅拌16小时后,使溶剂在减压下蒸发。将残余物溶解于乙酸乙酯 (40mL) 中。然后,将有机溶液用1N HCl (2×10mL) 和盐水洗涤,干燥 (NaSO_4) 并浓缩。通过快速色谱法 (乙酸乙酯/己烷:1/5) 纯化粗产物,以得到黄色固体 (3.2g, 5.74mmol, 82%)。

[0462] 氨基酸17的合成

[0463] 在氩气气氛下,向16 (1.11g, 2mmol) 的干燥脱气DCM (10mL) 溶液中添加16mg (0.04mmol) $[\text{Rh}(\text{COD})_2\text{BF}_4]$ 和27.9mg (0.08mmol) (R)-MonoPhos®的干燥脱气DCM (10mL) 溶液。将所得的混合物置入高压釜中,并将氩气用 H_2 (20巴) 替换。在室温下搅拌3小时后,TLC显示完全转化,并减压移除溶剂,以得到呈无色固体状的氨基酸17 (1.06g, 1.9mmol, 95%)。

[0464] 用于氨基酸18合成的氢化

[0465] 在氩气气氛下,向11 (1.04g, 2mmol) 的干燥脱气DCM (10mL) 溶液中添加16mg (0.04mmol) $[\text{Rh}(\text{COD})_2\text{BF}_4]$ 和27.9mg (0.08mmol) (S)-MonoPhos®的干燥脱气DCM (10mL) 溶液。将所得的混合物置入高压釜中,并将氩气用 H_2 (20巴) 替换。在室温下搅拌3小时后,TLC显示完全转化,并减压移除溶剂,以得到呈无色固体状的氨基酸12 (0.996g, 1.9mmol, 95%)。

[0466] 材料和方法

[0467] HPLC-MS:

[0468] 在与配备有C₁₈柱(50×2mm,粒度3μm)的Agilent 1200系列HPLC系统(Agilent Technologies,Waldbronn,Germany)联用的QTrap LTQ XL(Thermo Fisher Scientific,Waltham,Massachusetts,USA)上,记录HPLC-HRMS波谱。HPLC-HRMS色谱图用含0.1%甲酸的水(溶剂A)和含0.1%甲酸的乙腈(溶剂B)的溶剂梯度获得。

[0469] 溶剂梯度为梯度A、梯度B或梯度C:

[0470] 梯度A:0-10分钟10%-50%B,10-13分钟100%B,13-16分钟20%B,

[0471] 梯度B:0-10分钟20%-100%B,10-13分钟100%B,13-16分钟20%B。

[0472] 梯度C:0-10分钟50%-100%B,10-13分钟100%B,13-16分钟20%B。

[0473] 通过固相肽(SPPS)合成制备线性肽

[0474] 树脂负载:使2-CTC树脂(1g,0.98mmol/g)在含有玻璃料的固相肽合成容器(10mL)的DCM中预溶胀20分钟。在排干溶剂后,将含Fmoc-氨基酸(根据氨基酸序列选择)Fmoc-Axx-OH或二肽Fmoc-Asn-Hyp(OTBS)-OH(0.3mmol)和DIPEA(4.5mmol)的DCM(3mL)添加到树脂中。将混合物搅拌2小时,然后排干溶剂。用DMF(4×3mL)洗涤树脂。然后,添加MeOH/DIPEA/DCM的混合物(1:1:8)以封闭与树脂结合的剩余2-氯三苯甲基氯。将混合物搅拌0.5小时。然后排干溶剂并用DMF(4×3mL)洗涤树脂。优选地,树脂用于进一步的肽合成,其中氨基酸的载量<0.30mmol/g。使用以下方案:

[0475] 方法A) Fmoc基团的移除.将20%哌啶的DMF(3mL)溶液添加到树脂(1g;载量<0.30mmol/g)中,并将所得的悬浮液振荡10分钟。然后从树脂中移除溶液。再次,将20%哌啶的DMF(3mL)溶液添加到树脂中,并将所得的悬浮液再振荡10分钟。排干溶液并用DMF(6×3mL)洗涤树脂。

[0476] 方法B) 氨基酸偶联.将氨基酸(4.0当量)和TBTU(4.0当量)溶解于干燥DMF(3mL)中。将DIPEA(12当量)滴加到DMF溶液中。在活化1分钟后,将所得的溶液添加到Fmoc脱保护的树脂(1g;载量<0.30mmol/g)中。将混合物振荡直至偶联反应完成。然后,排干溶液并用DMF(4×3mL)冲洗树脂。

[0477] 所有具有不同氨基酸序列的线性肽均使用该方案以Fmoc-脱保护(方法A)和氨基酸偶联(方法B)的交替顺序合成。

[0478] I₂-介导的环化

[0479] A) 固相环化

[0480] 硫醚桥(氨基羧乙基硫色氨酸基序)由线性树脂结合肽(1当量;(500mg;载量<0.30mmol/g))根据以上方法合成。在保护气氛(Ar或氮气)下,通过添加新鲜制备的碘的DMF(2当量,2mg/ml)溶液实现硫醚的形成。将混合物在氮气或氩气气氛下振荡2.5小时以完成硫醚的形成。如果需要,也应用更长的反应时间(测试裂解的HPLC-MS控制)。然后,排干溶液并用DMF(4×3mL)冲洗树脂。

[0481] B) 溶液相环化

[0482] 在氩气或氮气气氛下,向新鲜制备的碘的DMF(1当量,2mg/ml)溶液中添加线性肽(1当量)。然后,将溶液搅拌12小时以完成硫醚的形成(HPLC-MS控制!)

[0483] 从固体载体上裂解

[0484] 条件A) 将树脂(500mg;载量<0.30mmol/g)用10mL的TFA/TIS/H₂O的混合物(95:2.5:2.5)在室温和温和搅拌下处理1小时。将树脂过滤并用含1%TFA的DCM(2×5mL)冲洗。

合并冲洗液和滤液并蒸发至干。

[0485] 条件B) 将树脂(500mg; 载量 $<0.30\text{mmol/g}$)用10mL的TFE/HOAc/DCM的混合物(1:1:8)在室温和温和搅拌下处理2小时。将树脂过滤并用DCM($2\times 5\text{mL}$)冲洗。合并冲洗液和滤液并蒸发至干。

[0486] 条件C) (测试裂解): 为了探索裂解反应的完成, 从反应混合物中取出1-2mg树脂, 将其提交至配备有玻璃料的塑料移液管。然后将树脂分别用1-2mL的DMF($2\times$)、DCM($2\times$)洗涤并干燥。将TFA(0.25mL)添加到树脂中并温育5分钟。然后真空移除TFA并将残余物用于HPLC-MS分析。

[0487] 大内酰胺化

[0488] 在 0°C 下, 向DIPEA(5当量)的DMF溶液中的单环肽(1当量)溶液中添加HATU(2当量)。将溶液搅拌12小时, 随后进行制备型HPLC纯化。将分离的产物冻干, 以得到白色固体。

[0489] 保护基的脱保护

[0490] 去苄基化: 将最终的苄基保护的鹅膏蕈碱或衍生物溶解于EtSH(10mg/mL)中并用 N_2 吹扫, 随后添加 $\text{BF}_3/\text{Et}_2\text{O}$ (10当量)并搅拌30分钟。然后, 将反应混合物减压蒸发, 随后将粗产物通过制备型HPLC纯化, 以得到最终的S-脱氧鹅膏蕈碱。

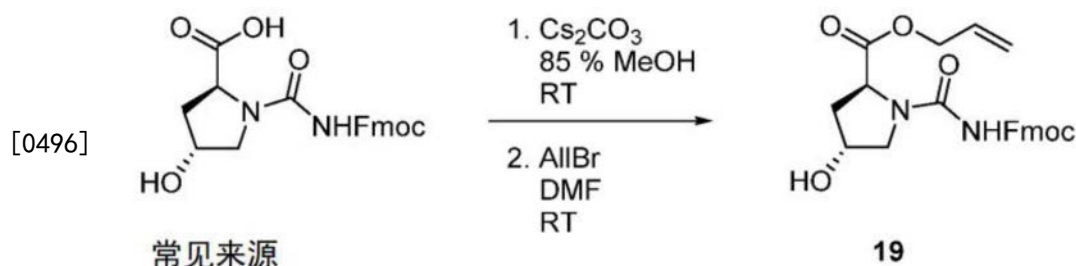
[0491] 脱甲硅基: 方法A: 向含TBDMS-保护的S-脱氧鹅膏蕈碱或衍生物的MeCN(10mg/mL)中添加 $\text{BF}_3/\text{Et}_2\text{O}$ (10当量)并搅拌10-30分钟。然后, 将得到的粗产物直接通过制备型HPLC纯化, 并将分离的产物冻干, 以得到白色粉末。方法B: 向含保护的TBDMS-S-脱氧鹅膏蕈碱的THF(10mg/mL)中添加TBAF(10当量)并搅拌30分钟-2小时。对所得粗产物移除溶剂, 随后在 Et_2O 中沉淀。在离心后, 将沉淀直接通过制备型HPLC纯化, 并将分离的产物冻干, 以得到白色粉末。

[0492] 氧化

[0493] 将含有氨基羧乙基硫色氨酸的肽溶解于iPrOH/EtOH 2:1(50 μL)中。在室温下, 向所得的溶液中添加mCPBA(1.0当量)。通过HPLC-ESI-MS监测反应进程。在反应完成后(30分钟), 将粗反应混合物用HPLC缓冲液稀释并在HPLC上直接纯化, 以得到(R)-亚砷和(S)-亚砷的混合物(基于HPLC峰积分), 其可通过制备型HPLC分离。

[0494] 使用THP树脂通过 I_2 介导的环化制备氨基羧乙基硫色氨酸桥

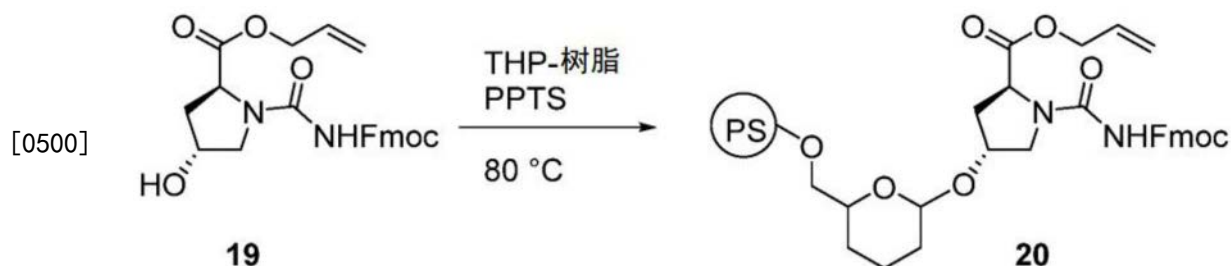
[0495] 步骤1: Fmoc-Hyp-OA11 (19)



[0497] 使Fmoc-Hyp-OH(10.00g, 28.3mmol)悬浮于100mL 80% MeOH中并添加 Cs_2CO_3 (4.62g, 14.1mmol)。将悬浮液在室温下搅拌15分钟直至完全溶解。使反应混合物浓缩至干并悬浮于100mL DMF中。滴加烯丙基溴(2.6mL, 3.6g, 29.7mmol), 并将反应物在室温下搅拌过夜。蒸馏出DMF, 并将残余物悬浮于叔丁基甲基醚中。将沉淀过滤, 并在柱色谱法之前使澄清溶液吸收在硅藻土上。采用正己烷/乙酸乙酯梯度在330g硅胶上对化合物进行纯化。

[0498] 收率:9.85g,89%

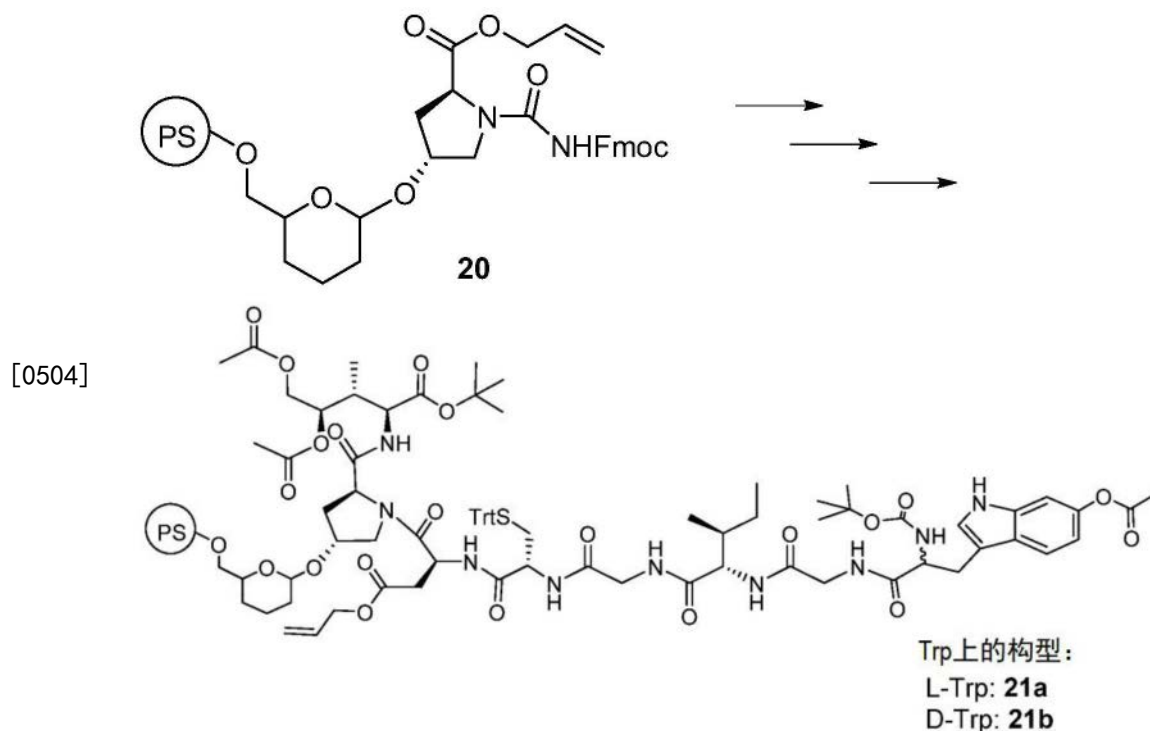
[0499] 步骤2:THP树脂负载



[0501] 将氨基酸19 (9.85g, 25.0mmol)、4-甲苯磺酸吡啶 (2.62g, 10.4mmol) 添加到1,3-二氢-2H-吡喃-2-基-甲氧基甲基树脂 (10.0g, 0.77mmol/g THP树脂) 在80ml二氯乙烷中的悬浮液中。将反应物在80℃下搅拌过夜。在冷却后,将树脂过滤,并用二氯乙烷、二甲基甲酰胺、乙腈、二氯甲烷和叔丁基甲基醚充分洗涤。

[0502] 载量为0.60mmol/g (通过脱保护后的茚甲基的UV光谱来测定)。

[0503] 步骤3:固相合成线性前体肽



[0505] 树脂预处理:

[0506] 将负载的树脂20 (3.20g, 1.92mmol) 用N,N-二甲基巴比妥酸 (5.51g, 35.3mmol) 和 Pd(PPh₃)₄ (1.50g, 1.30mmol) 处理。将树脂在室温下振荡过夜。此后,将树脂用二氯甲烷、DMF、乙腈、二氯甲烷和叔丁基甲基醚充分洗涤并减压干燥。

[0507] 偶联操作:

[0508] 将所有反应物和试剂溶解于二氯甲烷/DMF (1:1, v/v) 中,并使用CEM Liberty Blue肽合成仪以0.5mmol规模进行线性肽的合成。使用氨基酸/HOBt (各0.3N)、PyBOP (0.5N) 和DIEA (2N) 的储备溶液。使用2-5当量的氨基酸以1:1:1:2的比率使用氨基酸:HOBt:PyBOP:DIEA。肽偶联通过微波照射 (50W, CEM微波反应器) 在50℃下进行10分钟,并在偶联后用DMF

洗涤。

[0509] Fmoc-脱保护:

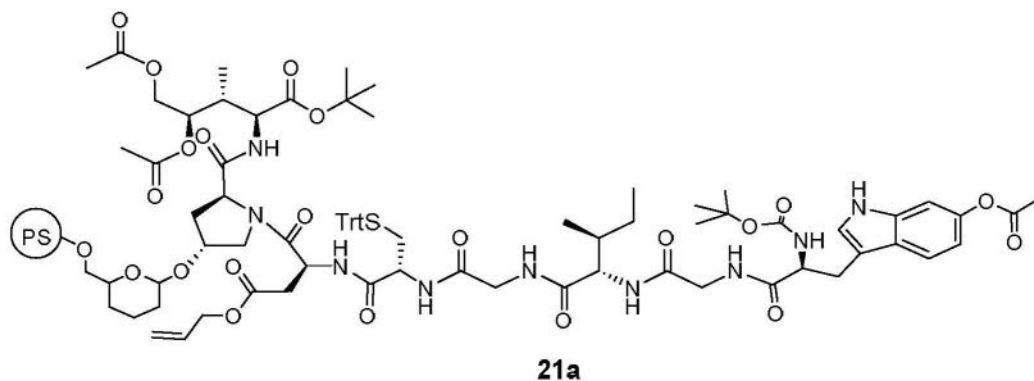
[0510] 通过在50℃下添加10.0ml20%哌啶的N,N-二甲基甲酰胺维持10分钟来进行脱保护。将树脂用DMF洗涤(在偶联最终氨基酸后未脱保护,因为其用作N^d-Boc-保护的衍生物)。

[0511] 在完成,将树脂最终转移到具有底部玻璃料的注射器中,用DCM洗涤并在减压下干燥。

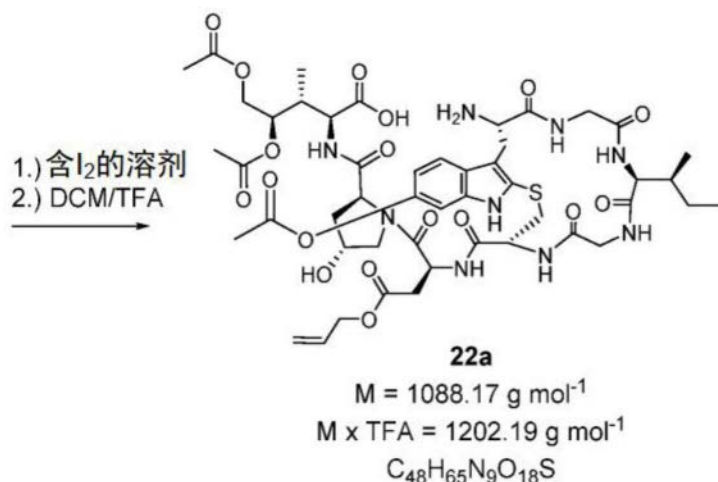
[0512] 步骤4:碘介导的氨基羧乙基硫色氨酸形成

[0513] 碘介导的脱氧-鹅膏蕈碱前体的环化的一般操作

[0514] 脱氧-L-6-乙酰氧基色氨酸-鹅膏蕈碱前体22a



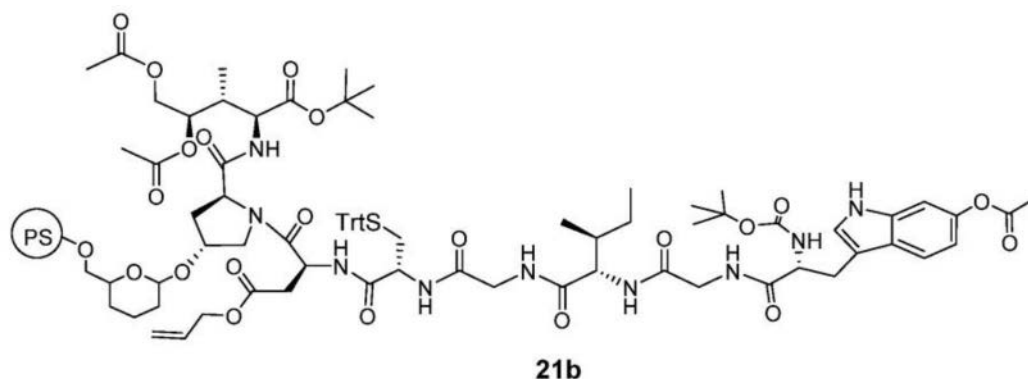
[0515]



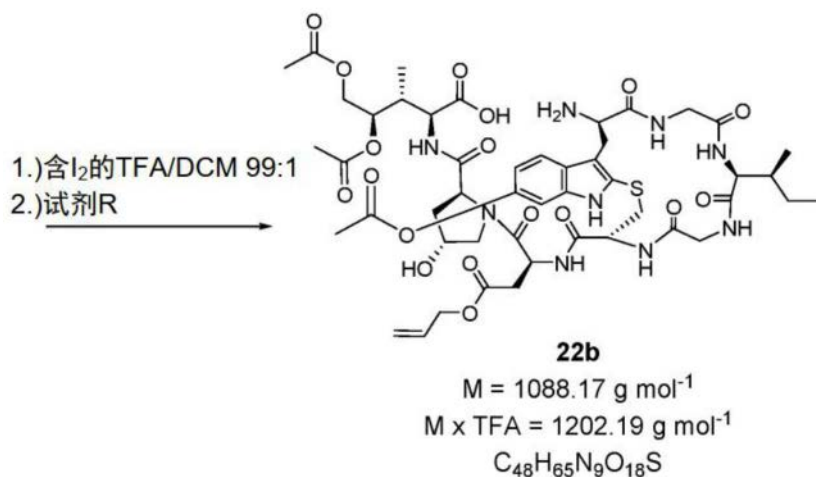
[0516] 使THP树脂结合的线性前体肽21a (100μmol, 1.0当量) 在溶剂 (15.6mL TFE/水9:1 或96mL DCM/TFA 95:1) 中溶胀,并在空气中5分钟的时段内将碘 (100μmol, 1.0当量) 的DCM (4.0mL) 溶液分批添加到所得的悬浮液中。将悬浮液在室温下搅拌2小时 (溶剂=DCM/TFA) 或19小时 (溶剂=TFE/水)。添加乙二硫醇 (85μL, 1.0mmol, 10当量, EDT) 以淬灭反应,并将悬浮液过滤。将树脂用二氯甲烷 (3×1分钟) 洗涤,并将合并的有机层真空浓缩。将残余物在室温下用5.0mL DCM/TFA (1:1) 处理3小时。将淡褐色悬浮液滴入冰冷的甲基-叔丁基醚/己烷溶液 (1:1, 45mL) 中。将醚-肽-悬浮液在-20℃下温育30分钟,将悬浮液离心并将沉淀用冰冷的甲基-叔丁基醚/己烷 (1:1, 80mL) 洗涤一次。将分离的沉淀溶解在5.0mL的乙腈/水3:1 (+ 0.05% TFA) 中,并通过离心移除不溶性颗粒。将沉淀如刚才所述再处理两次,并将合并的滤液冷冻干燥。通过制备型RP-HPLC纯化所得的粗制肽,获得呈无色TFA-盐的单环肽22a (溶剂 TFE/水:34.7mg, 28.9μmol, 29% 或溶剂DCM/TFA:31.6mg, 26.3μmol, 26%, 基于初始树脂载

量)。获得副产物 (28.8-31.9mg), 并表征为脱保护的二硫化物。RP-HPLC: $t_R = 12.3$ 分钟, 89.5-99.9% 纯度 (210nm)。MS (ESI, 正离子模式): 计算值: $m/z = 1088.4 [M+H]^+$, 实测值: $m/z = 1089.2 [M+H]^+$

[0517] 脱氧-D-6-乙酰氧基色氨酸-鹅膏蕈碱前体21b



[0518]



[0519] 使THP树脂结合的线性前体肽21b (250 μmol , 1.0当量) 在二氯甲烷 (240mL) 中溶胀, 并小心地滴加三氟乙酸 (TFA, 2.5mL)。在空气中, 在5分钟时段内, 向所得的黄色悬浮液中分批添加碘 (64.3mg, 250 μmol , 1.0当量) 的二氯甲烷 (10mL) 溶液。所得的肽浓度为1mM。将悬浮液在室温下搅拌2小时。随后, 添加乙二硫醇 (50 μL , 594 μmol , 2.3当量) 和TIS (250 μL) 以淬灭反应。将悬浮液过滤, 并将树脂用二氯甲烷 (3 $\times$ 1分钟) 洗涤。将合并的有机层真空浓缩, 并将残余物在室温下用4.0mL的试剂R (TFA: 苯甲硫醚: EDT: 苯甲醚 90:5:3:2) 处理60分钟。将悬浮液滴入冰冷的甲基叔丁基醚/己烷溶液 (1:1, 80mL) 中, 并在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下温育30分钟。将悬浮液离心并将沉淀用冰冷的甲基-叔丁基醚/己烷 (1:1, 80mL) 洗涤一次。将分离的沉淀溶解在乙腈/水 3:1 (+0.05% TFA) 中, 并通过离心移除不溶性颗粒。将沉淀如刚才所述再处理两次, 并将合并的滤液冷冻干燥。通过制备型RP-HPLC纯化所得的粗制肽 (262.4mg), 获得呈无色TFA-盐的单环肽22b (95.1mg, 79.1 μmol , 32%, 基于初始树脂载量)。获得副产物 (28.0mg, 25.6 μmol , 10%), 并表征为脱保护的线性肽, 由裂解的二硫化物副产物生成。RP-HPLC: $t_R = 12.2$ 分钟。MS (ESI, 正离子模式): 计算值: $m/z = 1088.4 [M+H]^+$, 实测值: $m/z = 1089.0 [M+H]^+$

[0520] 分析型RP-HPLC

[0521] 柱: Luna 10 μm C18 (2), 100A, 250 $\times$ 4.6mm

[0522] 梯度:溶剂A=水(+0,05%TFA);溶剂B=乙腈

[0523] 0至25min:由5%至81%B;25至25.2min:由81%至100%B;25.2至27.5min:100%B;27.5至28min:由100%至5%B;28至30min:5%B

[0524] 制备型RP-HPLC

[0525] 柱:Luna 10 μ m C18 (2),100A,250x21.2mm

[0526] 梯度:溶剂A=水(+0,05%TFA);溶剂B=乙腈

[0527] 0至20min:由5%至46%B;20至20.2min:由46%至100%B;20.2至22.5min:100%B;22.5至25min:5%B.

[0528] 细胞毒性评估

[0529] 使用RNA聚合酶II抑制测定并通过在HEK细胞和HEK-OATP1B3细胞上的细胞生存力分析中评估细胞毒性,对本发明化合物的细胞毒性进行评估,其结果示出于表6中。

[0530] RNA聚合酶II测定

[0531] 体外RNA Pol II测定使用 HeLaScribe® 进行。使用核提取物体外转录体系(Promega,#E3092)来比较 6.4×10^{-11} M至 1×10^{-6} M(1:5系列稀释)的七种浓度下的鹅膏蕈碱类似物对RNA Pol II的抑制效果。作为阳性对照,使用来自CMV立即早期启动子的模板失控转录物(Promega,#E3092)。逆转录后进行实时PCR以定量mRNA产物。RNA检测使用QuantiFast Probe RT-PCR Plus试剂盒(Qiagen)进行。PCR产物通过在Real Time PCR CFX Connect Real Time系统(Bio-Rad Laboratories Inc.)上测定荧光来监测。将 α -鹅膏蕈碱、类似物和未经处理的对照各自一式三份进行分析。将阴性对照、阳性对照和非靶对照一式两份进行分析。使用 Δ_{CT} 方法来计算归一化为未经处理对照的测试项对转录的抑制效应。

[0532] 细胞生存力测定(HEK和HEK-OATP1B3细胞)

[0533] 在人胚肾HEK293细胞和过表达有机阴离子转运多肽1B3(OATP1B3)的HEK293-OATP1B3细胞中,测定本发明化合物的体外毒性,以评估OATP1B3是否介导鹅膏蕈碱类似物向细胞中主动转运。将野生型HEK293(ATCC,Manassas,VA)和HEK293-OATP1B3细胞(参见:Pahl等人,Cytotoxic Payloads for Antibody-Drug Conjugates In:Amatoxins as RNA Polymerase II Inhibiting Antibody-Drug Conjugate(ADC)Payloads CHAPTER 19,The Royal Society of Chemistry 2019,ISBN:978-1-78801-077-1,或例如Bowman等人,Drug Metab Dispos 48:18-24,2020年1月)与化合物7f(α -鹅膏蕈碱)或如表6中所公开的化合物一起温育。细胞毒性通过BrdU分析进行测定。将HEK293和HEK-OATP1B3细胞以 2.5×10^3 个细胞/孔铺板到聚-D-赖氨酸包被的96孔板上的Ham的F12与含有10%活性炭处理的FCS的DMEM的1:1混合物中,并生长24小时。随后,将细胞与8种不同浓度(1×10^{-6} M至 1.28×10^{-11} M,1:5系列稀释)的鹅膏蕈碱衍生物一起温育。在药物暴露96小时后,通过BrdU掺入测定(Cell Proliferation ELISA,BrdU,Roche)测定细胞生存力,并使用FLUOstar Optima读板器(BMG LABtech)测量化学发光。用GraphPad Prism 9.0(GraphPad Software,Inc.,La Jolla,CA)软件进行数据分析以绘制曲线拟合。

[0534] 表6:细胞毒性

	化合物	修饰位点	RNAP II 抑制 IC ₅₀ (M)	对 HEK-293 细胞 的细胞毒性 EC ₅₀ (M)	对 HEK-OATP1B3 细胞的细胞毒性 EC ₅₀ (M)
[0535]	7f (α-鹅膏蕈碱)		2.7 x 10 ⁻⁹	2.1 x 10 ⁻⁷	5.2 x 10 ⁻⁹
	7d (Ama-11)	-	6.8 x 10 ⁻⁹	8.1 x 10 ⁻⁸	2.3 x 10 ⁻¹⁰
	7i (Ama-12)	D-Pro ⁷	1.2 x 10 ⁻⁸ (20%)*	> 1 x 10 ⁻⁶	2.1 x 10 ⁻⁷
	7l (Ama-13)	Sar ⁷	1.5 x 10 ⁻⁸ (10%)*	> 1 x 10 ⁻⁶	2.9 x 10 ⁻⁸
	7m (Ama-15)	Aib ⁷	7.1 x 10 ⁻⁸ (15%)*	> 1 x 10 ⁻⁶	1.2 x 10 ⁻⁷
	7n (Ama-23)	Aze ²	1.6 x 10 ⁻⁷ (40%)*	> 1 x 10 ⁻⁶	> 1 x 10 ⁻⁷
	7o (Ama-27)	D-Ala ⁷	1.4 x 10 ⁻⁹	> 1 x 10 ⁻⁶	2.8 x 10 ⁻⁸
	7p (Ama-32)	Tle ⁶	2.5 x 10 ⁻⁸	> 1 x 10 ⁻⁶	1.6 x 10 ⁻⁸
	7q (Ama-38)	4-(F ₂)Pro ²	1.1 x 10 ⁻⁷ (10%)*	> 1 x 10 ⁻⁶	4.9 x 10 ⁻⁸
	7r (Ama-44)	Acc ⁷	2.6 x 10 ⁻⁸	> 1 x 10 ⁻⁶	1.0 x 10 ⁻⁸

[0536] (*) 表明在所测试的最高浓度下的残留RNAP II活性

[0537] 文献

[0538] 1.T.Wieland, Peptides of Poisonous Amanita Mushrooms (Eds.: A. Rich), Wiley-VCH, Weinheim, 1986.

[0539] 2.A.Pahl等人 Drug Discov Today: Technol. 2018, 30, 85-89.

[0540] 3.M.O.Anderson, A.A.Shelat, R.K.Guy, J Org Chem 2005, 70, 4578-4584.

[0541] 4.W.E., Savige, A. Fontana, J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1976, 600-601.

[0542] 5.G.Zanotti, L. Falcigno, M. Saviano, G. D'Auria, B.M. Bruno, T. Campanile, L. Paolillo, Chem-Eur J 2001, 7, 1479-1485.

[0543] 6.K. Matinkhoo, A. Prvyima, M. Todorovic, B.O. Patrick, D.M. Perrin, J Am Chem Soc 2018, 140, 6513-651.

[0544] 7.P. Sieber, B. Kamber, B. Riniker, W. Rittel, Helv Chim Acta 1980, 63, 2358-2363.

[0545] 8.L.A. Schuresko, R.S. Lokey, Angew Chem Int Edit 2007, 46, 3547-3549.

[0546] 9.G. Yao, J.O. Joswig, B.G. Keller, R.D. Süssmuth, Chem-Eur J 2019, 25, 8030-8034.

[0547] 10. Edelman, G.M. 等人, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)

[0548] 11. Andreas Pahl, Christian Lutz, Torsten Hechler: Amatoxins as RNA Polymerase II Inhibiting Antibody-Drug Conjugate (ADC) Payloads, CHAPTER 19, The Royal Society of Chemistry 2019, ISBN: 978-1-78801-077-1 doi: 10.1039/9781788012898-00398

[0549] 12. Bowman等人 Drug Metab Dispos 48:18-24, 2020年1月

[0550] 13. Binz等人 Nat Biotechnol 2005 Oct; 23(10): 1257-68

[0551] 14. Jain等人 Pharm Res (2015) 32: 3526-3540

[0552] 15. Dubowchik等人, Bioconjug Chem. 13 (2002) 855-69

[0553] 16. Peeters等人 J Immunol Methods. 1989 Jun 2; 120(1): 133-43

[0554] 17. Carlsson等人 Biochem J. 1978; 173: 723-37.

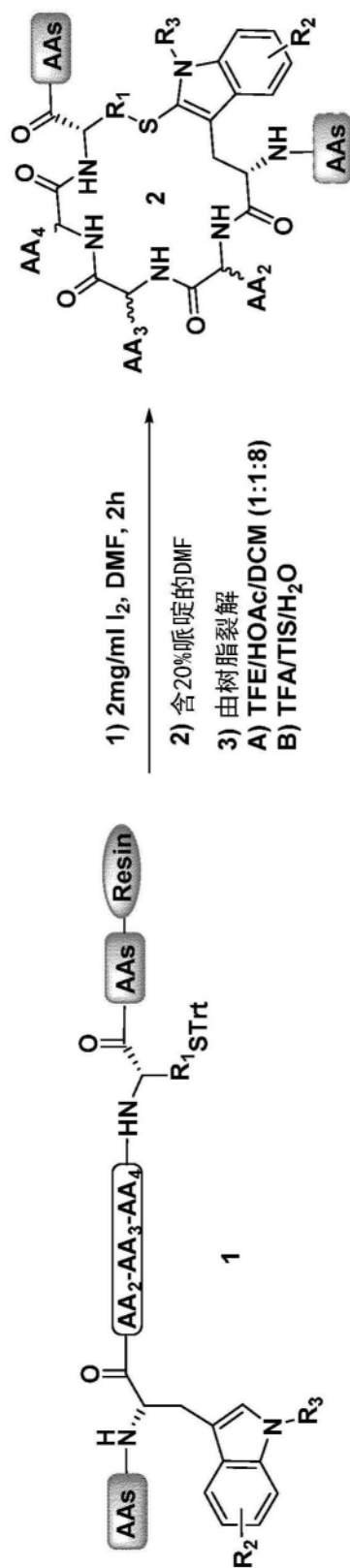


图1

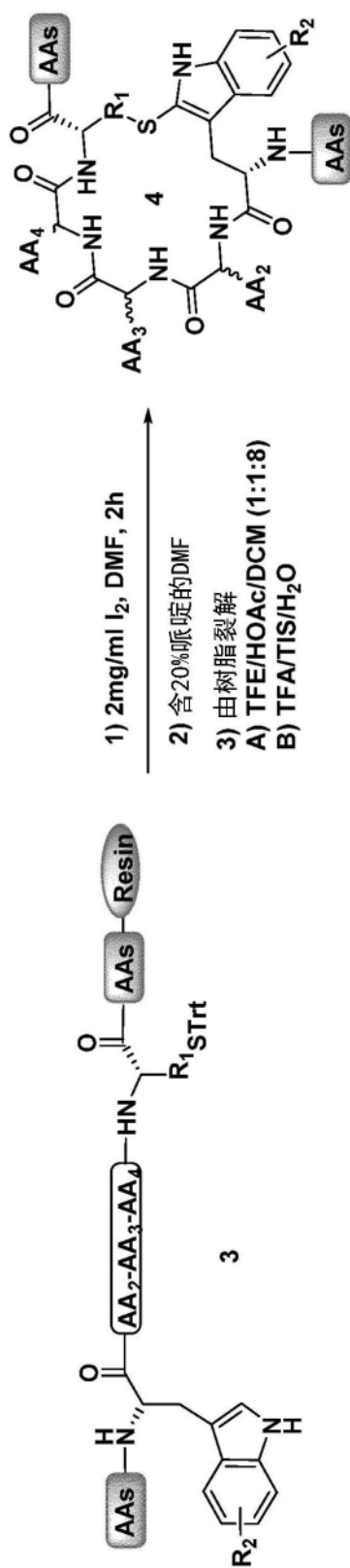


图2

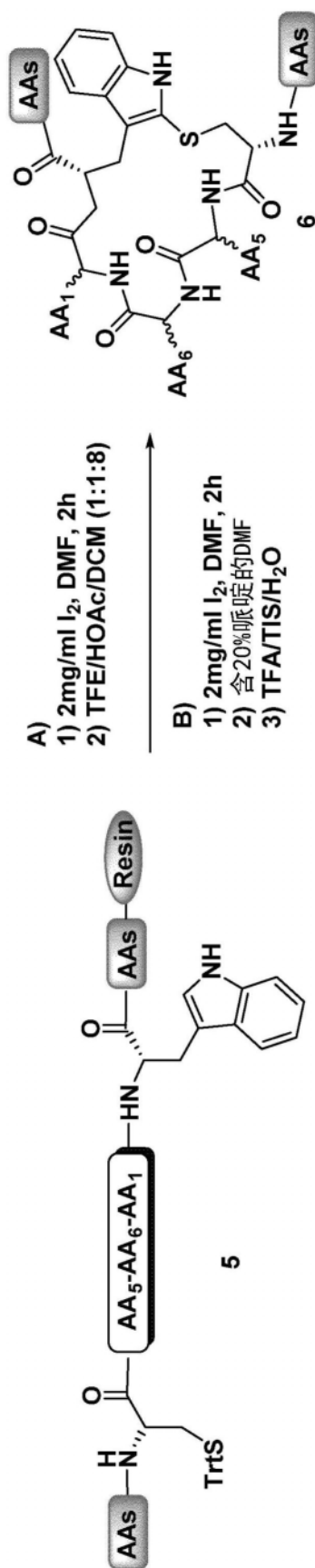


图3

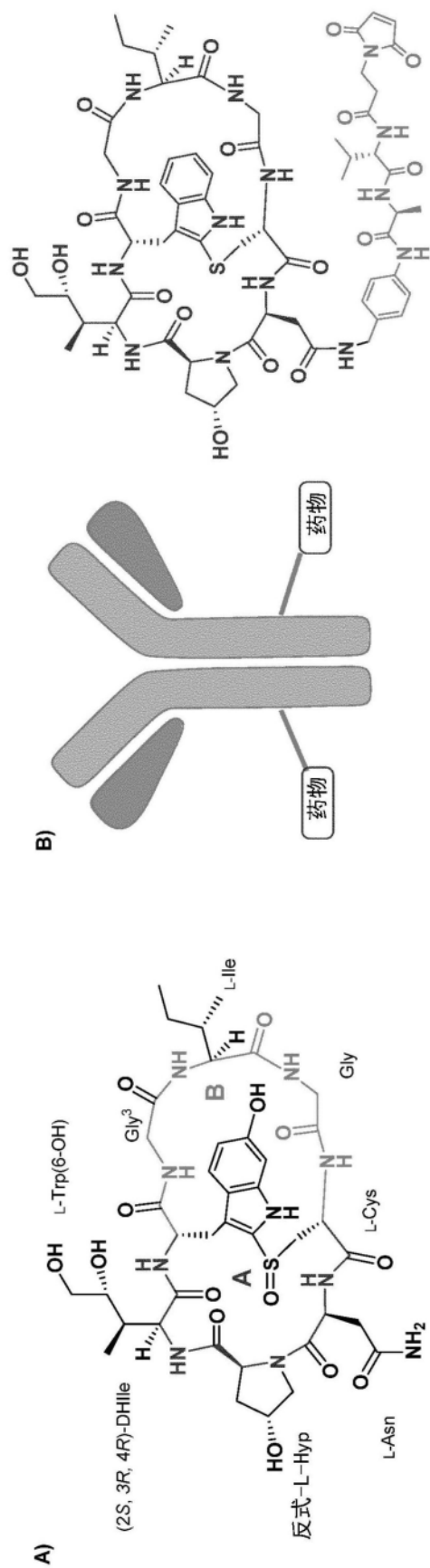
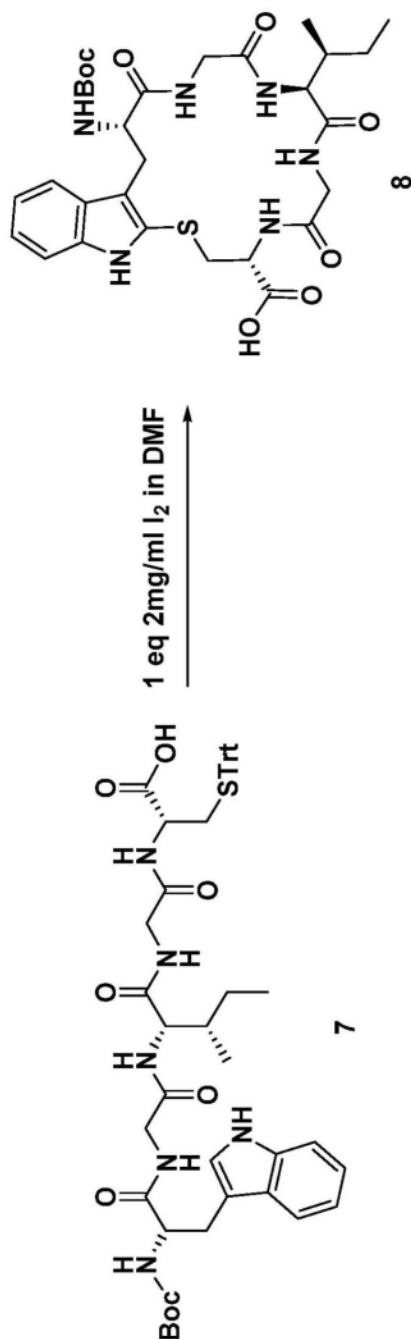


图4



化合物 8: HPLC-MS: 保留时间 $R_t=6.85$ min (梯度 B); HRMS (ESI): m/z 计算值: $C_{29}H_{41}N_6O_8S^+ [M+H]^+$ 633.2701 实测值 633.2706.

图5

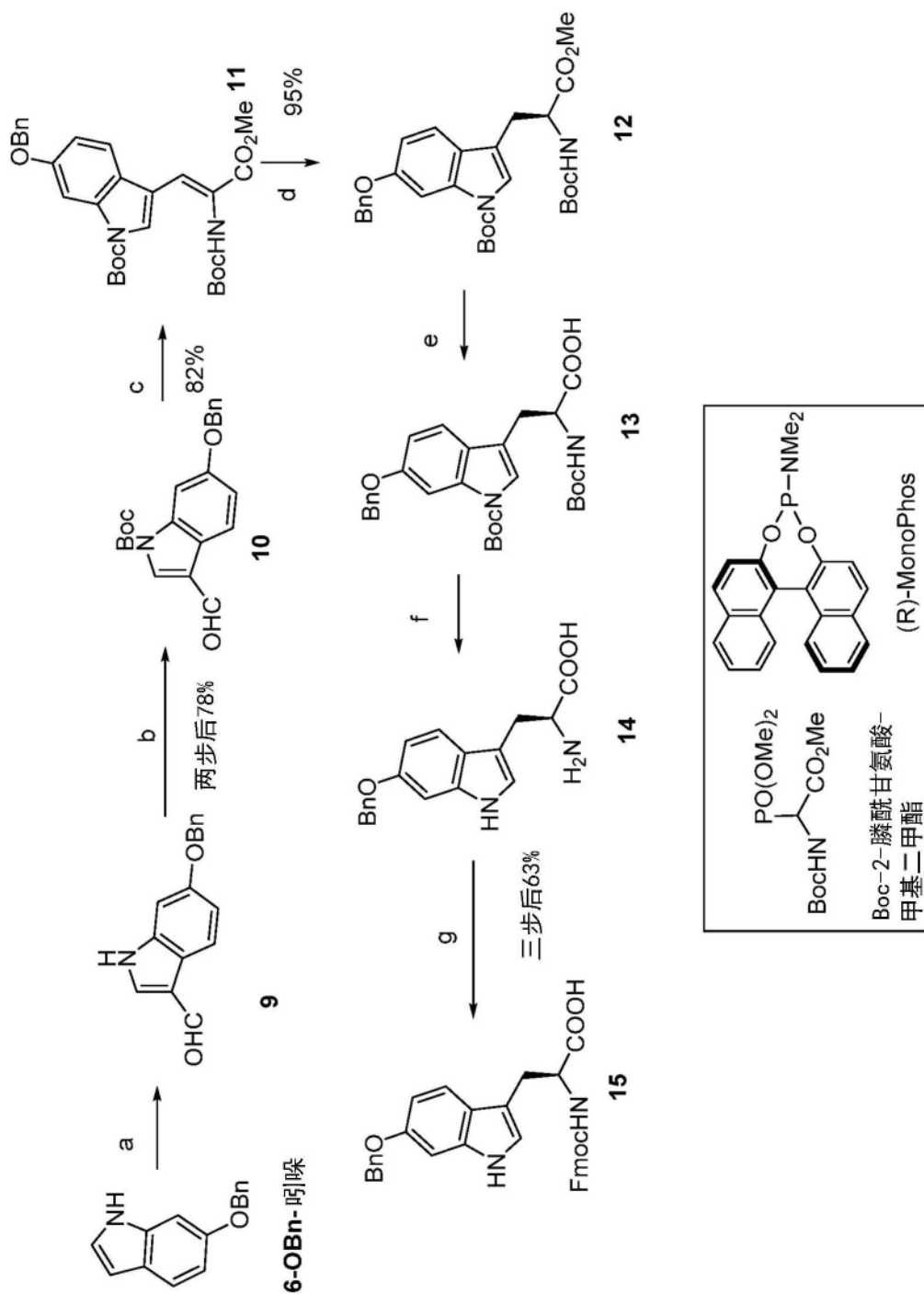


图6

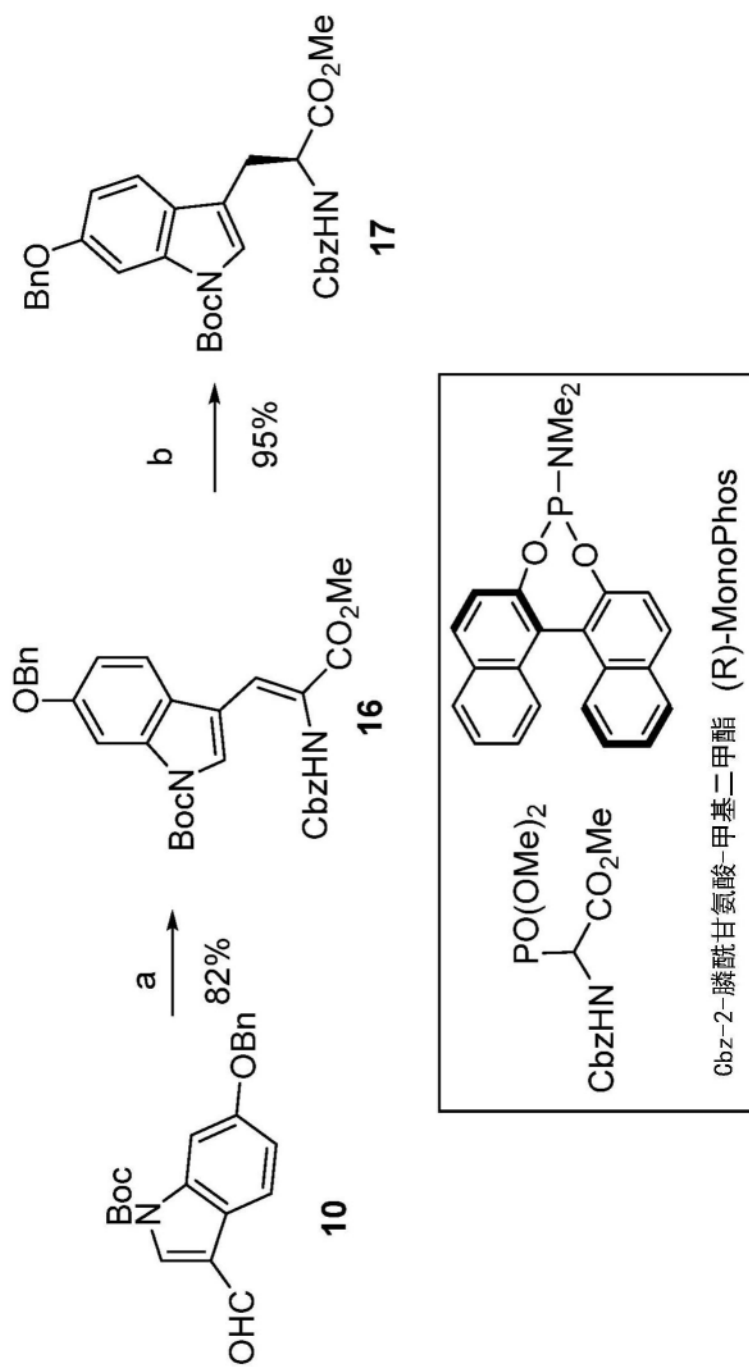


图7

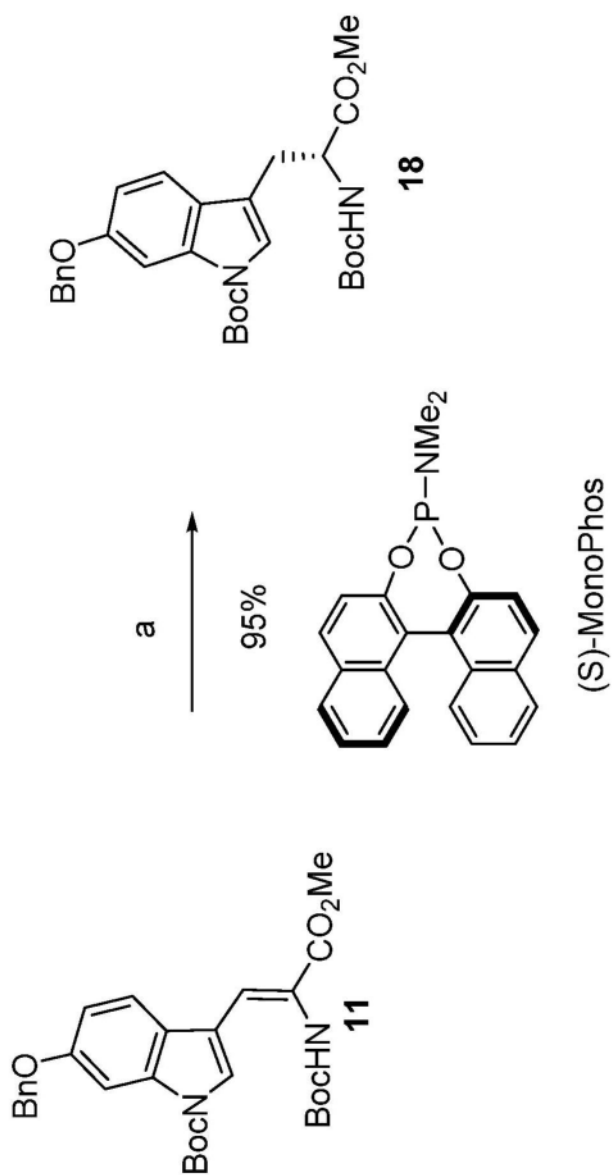


图8

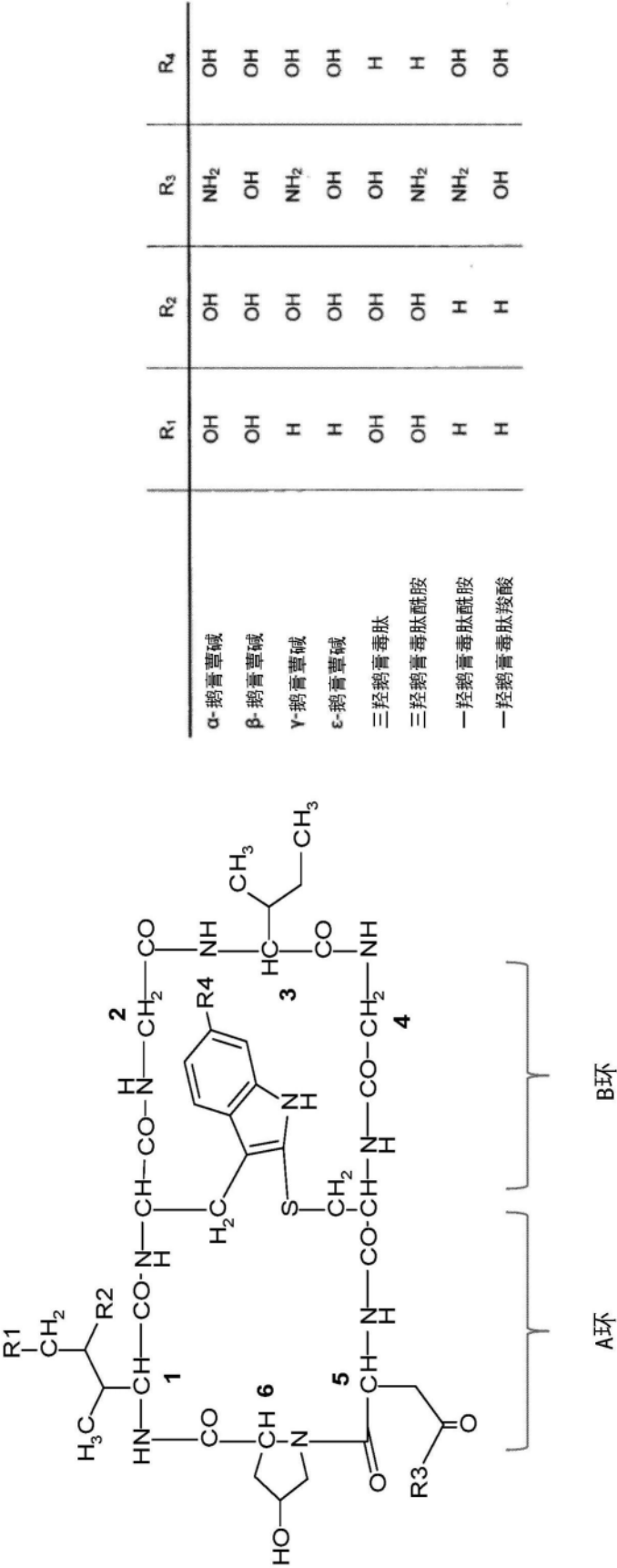


图9