(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119213009 A
(43)申请公布日 2024.12.27

(21)申请号 202380036194.8
(22)申请日 2023.05.02
(30)优先权数据
2022-075743 2022.05.02 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.10.24
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/017114 2023.05.02
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/214577 JA 2023.11.09
(71)申请人 中外制药株式会社
地址 日本
(72)发明人 阴未来 田宫实 金泽纯一朗 野村研一
(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
专利代理师 张毅群
(51)Int.Cl.
C07K 1/04(2006.01)
C07K 1/06(2006.01)

权利要求书2页 说明书98页 附图8页

(54)发明名称

抑制由二酮哌嗪形成引起的缺陷的肽合成方法

(57)摘要

肽的合成存在如下问题:当去除N末端处的保护基团时形成的二酮哌嗪和6元二胺骨架化合物阻碍了所需的延长反应的进行。本发明人发现,在肽的生产中,将其中N末端处的氨基基团被具有Fmoc骨架的保护基团保护的肽在特定溶剂中用在乙腈中作为共轭酸具有23或更大的pKa的碱来处理,并且然后延长肽链,可以解决上述问题。

CN 119213009 A

1.一种用于生产肽的方法,所述方法包括以下步骤:

(1)提供具有含有Fmoc骨架的保护基团且负载于固相上的第一肽;

(2)在步骤(1)后,在含有亚砜溶剂的溶剂中,用至少包括在乙腈中其共轭酸具有23或更大的pKa的碱的一种或多种碱来处理所述第一肽;以及

(3)在步骤(2)后,在溶剂中,在存在或不存在缩合剂的情况下,将所述第一肽与羧酸或羧酸类似物缩合,以得到第三肽。

2.一种用于减少在肽的生产中形成的二酮哌嗪杂质和/或6元环脒骨架化合物杂质的量的方法,所述方法包括以下步骤:

(1)提供具有含有Fmoc骨架的保护基团且负载于固相上的第一肽;以及

(2)在步骤(1)后,在含有亚砜溶剂的溶剂中,用至少包括在乙腈中其共轭酸具有23或更大的pKa的碱的一种或多种碱来处理所述第一肽。

3.一种用于减少在肽的生产中形成的选自由二酮哌嗪杂质、6元环脒骨架化合物杂质和二聚体脲化合物杂质组成的组中的至少一种杂质的量的方法,所述方法包括以下步骤:

(1)提供具有含有Fmoc骨架的保护基团且负载于固相上的第一肽;以及

(2)在步骤(1)后,在含有亚砜溶剂的溶剂中,用至少包括在乙腈中其共轭酸具有23或更大的pKa的碱的一种或多种碱来处理所述第一肽。

4.根据权利要求2或3所述的方法,其进一步包括如下步骤:(3)在步骤(2)后,在溶剂中,在存在或不存在缩合剂的情况下,将所述第一肽与羧酸或羧酸类似物缩合,以得到第三肽。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其通过固相法进行。

6.根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述第一肽为具有含有Fmoc骨架的保护基团并负载于固相上的第一肽。

7.根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其通过液相法进行。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中步骤(2)为去除所述第一肽中的含有Fmoc骨架的保护基团的步骤,和/或将所述第一肽中的含有Fmoc骨架的保护基团转化为氨基甲酸盐的形式的步骤。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其不包括在步骤(2)前用哌啶作为单一碱处理所述第一肽的步骤。

10.根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其不包括用在乙腈中其共轭酸具有小于23的pKa的单一碱处理所述第一肽的步骤。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中由步骤(2)获得的所述第一肽的至少一部分呈氨基甲酸盐的形式。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中在步骤(2)中的所述溶剂含有50v/v%或更多的亚砜溶剂。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述亚砜溶剂为选自由DMSO、二乙基亚砜、甲基乙基亚砜和甲基苯基亚砜组成的组中的一者或多者。

14.根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的所述碱为选自由脒、胍和磷腈组成的组中的至少一者。

15.根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的所述碱为选自由DBU、

MTBD、TMG、P1tBu、P2Et和HP1(dma)组成的组中的至少一者。

16.根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述第一肽含有2至30、2至20、2至15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2个氨基酸残基。

17.根据权利要求1和4至16中任一项所述的方法,其中所述羧酸或羧酸类似物为具有保护基团的氨基酸或第二肽;或者具有保护基团的氨基酸或第二肽的活性酯;或者具有保护基团的氨基酸或第二肽的酰卤;其中所述第一肽和/或具有保护基团的所述第二肽含有一个或多个N-取代的氨基酸,且/或具有保护基团的所述氨基酸为N-取代的氨基酸。

18.根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中来自所述第一肽的N末端的第二个残基处的氨基酸为N-取代的氨基酸。

19.根据权利要求1和4至18中任一项所述的方法,其中步骤(3)中的所述缩合剂呈盐的形式,并且其抗衡阴离子为PF_6^-或BF_4^-,或者所述缩合剂是为碳二亚胺缩合剂。

抑制由二酮哌嗪形成引起的缺陷的肽合成方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种新的肽合成方法,该方法能够在肽的合成中以高纯度和高效率合成肽。

背景技术

[0002] 在肽合成中,Fmoc法因其可靠性和温和的脱保护条件(Fmoc脱保护条件)而被广泛应用。近年来,积极进行了对于含有丰富的N-烷基氨基酸(诸如N-甲基氨基酸)的肽在药物中的应用的研究,并且已知这些分子种类具有酸不稳定性(非专利文献1和专利文献1)。因此,在这些文献中,采用能够在碱性条件下脱保护的Fmoc法,而不是需要酸性条件的Boc法来进行N末端的脱保护。

[0003] 肽合成中二酮哌嗪(DKP)的形成是一个很早以前就被认识到的问题。如果二肽N末端的保护基团通过酯键负载在固相上,从而暴露出游离氨基基团,则可能形成二酮哌嗪。已经报道了一些方法来改善使用Fmoc法的肽合成中二酮哌嗪形成的问题。

[0004] 具体地,已知如下方法:作为容易发生哌嗪二酮形成的位置处的保护基团,使用在中性条件下进行脱保护反应的Alloc基团代替碱来抑制哌嗪二酮的生成(非专利文献2)。

[0005] 另外,已知用于避免在可能进行二酮哌嗪形成的位置处由游离氨基基团形成N-末端的情况的方法,预先合成含有这种序列的二肽,并用于延长肽链(非专利文献3)。

[0006] 另外,已知有如下方法:使用更强的碱DBU或TBAF来代替Fmoc的脱保护中通常使用的哌啶,从而使脱保护所需的时间极短,从而抑制二酮哌嗪的生成(非专利文献4)。

[0007] 所有这些方法都是针对通过酯键负载在固相上的二肽中形成二酮哌嗪的对策。

[0008] 引文列表

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:国际公开号WO 2018/225851 A1

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献1:J.Peptide Res.,2005,65,153-166。

[0013] 非专利文献2:Org.Lett.,2012,14,612-615。

[0014] 非专利文献3:Bachem出版的固相肽合成(https://www.bachem.com/fileadmin/user_upload/pdf/Catalogs_Brochures/Solid_Phase_Peptide_Synthesis.pdf)

[0015] 非专利文献4:Org.Lett.,2008,10,3857-3860。

发明内容

[0016] 技术问题

[0017] 已知在通过酯键负载在固相上的二肽中,如上所述,酯键被裂解形成二酮哌嗪,而当肽序列包括N-取代的氨基酸时,比酯键更强的酰胺键可能被裂解形成二酮哌嗪,导致肽序列中含有N-取代的氨基酸的二肽缺失。已知由于这种缺失可能发生在肽序列中存在N-取代的氨基酸的任何位置,因此可能缺失的二肽不限于负载在固相上的二肽。

[0018] 此外,本发明人发现,当肽序列包括N-取代的氨基酸时,不仅存在二酮哌嗪形成的问题,而且还存在无法进行期望的延长反应,以及在N末端形成具有6元环脒骨架(6元环脒骨架化合物)的杂质而不是目标产物的问题。迄今尚未报道解决这些问题的方法。

[0019] 上述常规技术不仅可以用于抑制以负载在固相上的二肽的酯键进行的二酮哌嗪消除,还可以用于抑制以酰胺键进行的二酮哌嗪消除以及6元环脒骨架化合物的形成。然而,其应用范围受到限制,并且这些技术不能提供足够的解决方案。

[0020] 例如,非专利文献2中描述的方法需要在可用性方面比Fmoc氨基酸通用性差的Alloc氨基酸。

[0021] 在非专利文献3中所述的使用二肽的肽链延长方法中,可进行在C末端侧的二肽的氨基酸的外消旋化。因此,除非C末端侧的二肽片段的氨基酸是非手性的(例如在甘氨酸的情况下)或者不可能进行外消旋化(例如在脯氨酸的情况下),否则本文中描述的方法很难应用。

[0022] 另外,非专利文献4中记载的方法的特征在于,Fmoc脱保护步骤所需的时间非常短,并且该方法需要在一分钟以下(例如10到20秒)的Fmoc脱保护步骤和固体洗涤操作。如此极短的时间操作不可能应用于工业化等的扩大合成。

[0023] 此外,本发明人发现,不仅存在二酮哌嗪形成和/或6元环脒骨架化合物形成的问题,而且还存在形成二聚脲化合物杂质的问题。迄今为止,尚未报道解决二聚脲化合物的形成问题的方法。

[0024] 如上所述,从未提出过抑制二酮哌嗪的实施方法。本发明是鉴于上述情况而完成的,并且在一个方面,本发明的目的在于提供一种能够抑制二酮哌嗪的形成的肽合成方法,其中,(i)含有Fmoc骨架的保护基团用作N末端的保护基团,(ii)序列的应用不受外消旋化的限制,并且(iii)可以用于工业化等的扩大合成。在另一方面,本发明的目的是提供能够抑制6元环脒骨架化合物的形成的肽合成方法。此外,在另一方面,本发明的目的是提供能够抑制二聚脲化合物的形成的肽合成方法。

[0025] 问题的解决方案

[0026] 本发明人发现,在肽的生产中,将具有含有Fmoc骨架的保护基团的肽在特定溶剂中用在乙腈中作为共轭酸具有23或更大的pKa的碱来处理,并且随后通过使用缩合剂生成的诸如酰基氯、活性酯的延长的活性物质与肽反应,可以抑制二酮哌嗪和6元环脒骨架化合物和/或二聚脲化合物的形成,直至延长去除保护基团后的肽链。这样,就完成了本发明。

[0027] 即,本发明包括以下内容。

[0028] [0-1]一种用于生产肽的方法,该方法包括以下步骤:

[0029] (1)提供具有含有Fmoc骨架的保护基团的第一肽;

[0030] (2)在步骤(1)后,在含有亚砜溶剂的溶剂中,用至少包括在乙腈中其共轭酸具有23或更大的pKa的碱的一种或多种碱来处理第一肽;以及

[0031] (3)在步骤(2)后,在溶剂中,在存在或不存在缩合剂的情况下,将第一肽与羧酸或羧酸类似物缩合,以得到第三肽。

[0032] [0-2]一种用于减少肽生产中形成的二酮哌嗪杂质和/或6元环脒骨架化合物杂质的量的方法,该方法包括以下步骤:

[0033] (1)提供具有含有Fmoc骨架的保护基团的第一肽;和

[0034] (2)在步骤(1)后,在含有亚砜溶剂的溶剂中,用至少包括在乙腈中其共轭酸具有23或更大的pKa的碱的一种或多种碱来处理第一肽。

[0035] [0-3]一种用于减少肽生产中形成的选自由二酮哌嗪杂质、6元环脒骨架化合物杂质和二聚脲化合物杂质组成的组中的至少一种杂质的量的方法,该方法包括以下步骤:

[0036] (1)提供具有含有Fmoc骨架的保护基团的第一肽;和

[0037] (2)在步骤(1)后,在含有亚砜溶剂的溶剂中,用至少包括在乙腈中其共轭酸具有23或更大的pKa的碱的一种或多种碱来处理第一肽。

[0038] [0-4]根据[0-2]或[0-3]所述的方法,该方法进一步包括步骤(3):在步骤(2)后,在溶剂中,在存在或不存在缩合剂的情况下,将第一肽与羧酸或羧酸类似物缩合,以得到第三肽。

[0039] [0-5]根据[0-1]至[0-4]中任一项所述的方法,该方法通过固相法进行。

[0040] [0-6]根据[0-1]至[0-4]中任一项所述的方法,其中第一肽是具有含有Fmoc骨架的保护基团并负载于固相上的第一肽。

[0041] [0-7]根据[0-1]至[0-4]中任一项所述的方法,该方法通过液相法进行。

[0042] [1]一种用于通过固相法生产肽的方法,该方法包括以下步骤:

[0043] (1)提供具有含有Fmoc骨架的保护基团且负载于固相上的第一肽;

[0044] (2)在步骤(1)后,在含有亚砜溶剂的溶剂中,用至少包括在乙腈中其共轭酸具有23或更大的pKa的碱的一种或多种碱来处理第一肽;以及

[0045] (3)在步骤(2)后,在溶剂中,在存在或不存在缩合剂的情况下,将第一肽与羧酸或羧酸类似物缩合,以得到第三肽。

[0046] [2]一种用于减少通过固相法的肽生产中形成的二酮哌嗪杂质和/或6元环脒骨架化合物杂质的量的方法,该方法包括以下步骤:

[0047] (1)提供具有含有Fmoc骨架的保护基团且负载于固相上的第一肽;以及

[0048] (2)在步骤(1)后,在含有亚砜溶剂的溶剂中,用至少包括在乙腈中其共轭酸具有23或更大的pKa的碱的一种或多种碱来处理所述第一肽。

[0049] [2-1]一种用于减少肽生产中形成的选自由二酮哌嗪杂质、6元环脒骨架化合物杂质和二聚脲化合物杂质组成的组中的至少一种杂质的量的方法,该方法包括以下步骤:

[0050] (1)提供具有含有Fmoc骨架的保护基团且负载于固相上的第一肽;以及

[0051] (2)在步骤(1)后,在含有亚砜溶剂的溶剂中,用至少包括在乙腈中其共轭酸具有23或更大的pKa的碱的一种或多种碱来处理所述第一肽。

[0052] [3]根据[2]所述的方法,该方法进一步包括步骤(3):在步骤(2)后,在溶剂中,在存在或不存在缩合剂的情况下,将第一肽与羧酸或羧酸类似物缩合,以得到第三肽。

[0053] [4]根据[0-1]至[3]中任一项所述的方法,其中步骤(2)是除去第一肽中含有Fmoc骨架的保护基团的步骤,和/或将第一肽中的含有Fmoc骨架的保护基团转化为氨基甲酸盐的形式的步骤。

[0054] [5]根据[0-1]至[3]中任一项所述的方法,其中除去第一肽中含有Fmoc骨架的保护基团的步骤实质上仅在步骤(2)中进行。

[0055] [6]根据[0-1]至[5]中任一项所述的方法,该方法不包括在步骤(2)前用哌啶作为单一碱处理第一肽的步骤。

[0056] [7]根据[0-1]至[5]中任一项所述的方法,该方法不包括在步骤(2)前将第一肽用在乙腈中作为共轭酸具有小于23的pKa的单一碱来处理的步骤。

[0057] [8]根据[0-1]至[7]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的溶剂为固相树脂溶胀能力为1.5mL/g或更高、2.0mL/g或更高、2.5mL/g或更高、3.0mL/g或更高、3.5mL/g或更高、或者4.0mL/g或更高的溶剂。

[0058] [9]根据[0-1]至[8]中任一项所述的方法,其中由步骤(2)获得的第一肽的至少一部分为氨基甲酸盐的形式。

[0059] [10]根据[9]所述的方法,其中氨基甲酸盐是在乙腈中作为共轭酸的具有23或更大的pKa的碱的盐。

[0060] [11]根据[9]或[10]所述的方法,其中氨基甲酸盐是与选自由脒、胍和磷腈组成的组中的至少一种碱的盐。

[0061] [12]根据[9]至[11]中任一项所述的方法,其中氨基甲酸盐是DBU盐、TMG盐、HP1(dma)盐、MTBD盐、P1-tBu盐或P2-Et盐。

[0062] [13]根据[9]至[12]中任一项所述的方法,其中在步骤(2)中,氨基甲酸盐与脱羧过程中另外形成的胺形式的摩尔比(氨基甲酸盐/胺形式)是0.6或更大、0.8或更大、1.0或更大、2.0或更大、3.0或更大、4.0或更大、4.6或更大、5.0或更大、6.0或更大、8.0或更大或者10.0或更大。

[0063] [13-1]根据[9]至[12]中任一项所述的方法,其中在步骤(2)中,氨基甲酸盐与脱羧过程中另外形成的胺形式的摩尔比(氨基甲酸盐/胺形式)是0.6或更大、0.8或更大、1.0或更大、2.0或更大、3.0或更大、4.0或更大、4.6或更大、5.0或更大、6.0或更大、8.0或更大或者10.0或更大,其由^{1}H-NMR中的质子积分比确定。

[0064] [14]根据[0-1]至[13]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的溶剂含有50v/v%或更多的亚砜溶剂。

[0065] [15]根据[0-1]至[14]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的溶剂含有70v/v%或更多的亚砜溶剂。

[0066] [16]根据[0-1]至[15]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的溶剂含有90v/v%或更多的亚砜溶剂。

[0067] [17]根据[0-1]至[16]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的溶剂进一步含有选自由芳香烃溶剂、卤素溶剂、醚溶剂、酯溶剂、酮溶剂、碳酸酯溶剂、磷酸酯溶剂、酰胺溶剂、脲溶剂和砜溶剂组成的组中的一者或多者。

[0068] [18]根据[0-1]至[16]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的溶剂进一步含有选自由酰胺溶剂、脲溶剂和砜溶剂组成的组中的一者或多者。

[0069] [19]根据[0-1]至[13]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的溶剂由亚砜溶剂组成。

[0070] [20]根据[0-1]至[19]中任一项所述的方法,其中亚砜溶剂是选自由DMSO、二乙基亚砜、甲基乙基亚砜和甲基苯基亚砜组成的组中的一者或多者。

[0071] [21]根据[0-1]至[19]中任一项所述的方法,其中亚砜溶剂是DMSO。

[0072] [22]根据[0-1]至[21]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的碱是选自由脒、胍和磷腈组成的组中的至少一者。

[0073] [23]根据[0-1]至[22]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的碱是选自由DBU、MTBD、TMG、P1tBu、P2Et和HP1(dma)组成的组中的至少一者。

[0074] [24]根据[0-1]至[23]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的碱是DBU、MTBD、TMG、P1tBu、P2Et或HP1(dma)。

[0075] [25]根据[0-1]至[23]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的碱是(i)DBU与哌啶的组合或(ii)DBU与MTBD、HP1(dma)、P1tBu或P2Et的组合。

[0076] [25-1]根据[0-1]至[25]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中,溶剂是DMSO,并且碱是DBU。

[0077] [25-2]根据[0-1]至[25]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中,溶剂是DMSO,并且碱是TMG。

[0078] [25-3]根据[0-1]至[25]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中,溶剂是DMSO,并且碱是DBU和哌啶的组合。

[0079] [26]根据[0-1]至[25]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的碱以1至8v/v%的浓度包含在溶剂中。

[0080] [27]根据[0-1]至[26]中任一项所述的方法,其中步骤(2)进一步包括使溶剂与CO_2接触的步骤。

[0081] [28]根据[1]至[27]中任一项所述的方法,其中步骤(2)进一步包括将溶剂用CO_2鼓泡的步骤。

[0082] [29]根据[0-1]至[26]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的溶剂是预先与CO_2接触的溶剂。

[0083] [30]根据[0-1]至[26]中任一项所述的方法,其中步骤(2)中的溶剂是预先用CO_2鼓泡的溶剂。

[0084] [31]根据[0-1]至[30]中任一项所述的方法,其中重复步骤(2)两次或更多次。

[0085] [32]根据[31]所述的方法,其中当步骤(2)重复两次或更多次时,在步骤(2)的重复中使用相同的溶剂。

[0086] [33]根据[31]所述的方法,其中当步骤(2)重复两次或更多次时,在步骤(2)的重复中使用不同的溶剂。

[0087] [34]根据[31]至[33]中任一项所述的方法,其中当步骤(2)重复两次或更多次时,在步骤(2)的重复中使用相同的碱。

[0088] [35]根据[31]至[33]中任一项所述的方法,其中当步骤(2)重复两次或更多次时,在步骤(2)的重复中使用不同的碱。

[0089] [36]根据[31]至[35]中任一项所述的方法,当步骤(2)重复两次或更多次时,该方法进一步包括在步骤(2)的重复之间排出溶液的步骤。

[0090] [37]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[36]中任一项所述的方法,其中羧酸或羧酸类似物是具有保护基团的氨基酸、具有保护基团的第二肽、C_1-C_8烷基羧酸或C_6-C_{10}芳基羧酸;或者具有保护基团的氨基酸、具有保护基团的第二肽、C_1-C_8烷基羧酸或C_6-C_{10}芳基羧酸的活性酯;或者具有保护基团的氨基酸、具有保护基团的第二肽、C_1-C_8烷基羧酸或C_6-C_{10}芳基羧酸的酰卤;其中C_1-C_8烷基羧酸和C_6-C_{10}芳基羧酸任选地被一个或多个独立地选自由烯基、炔基、烷氧基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、芳基烷基、杂芳基烷基、卤素、硝基、二烷基

氨基、氰基、烷氧基羰基和二烷基氨基羰基组成的组的取代基取代。

[0091] [38]根据[37]所述的方法,其中保护基团是氨基甲酸酯型保护基团、磺酰基型保护基团或酰基型保护基团。

[0092] [39]根据[38]所述的方法,其中氨基甲酸酯型保护基团是含有Fmoc骨架的保护基团、Alloc、Teoc、Boc或Cbz,磺酰型保护基是Ns,并且酰基型保护基团为Tfa。

[0093] [40]根据[37]所述的方法,其中羧酸或羧酸类似物为C_1-C_8烷基羧酸或C_6-C_{10}芳基羧酸、或其活性酯或酰卤,并且C_1-C_8烷基羧酸C_6-C_{10}芳基羧酸任选地被一个或多个独立地选自由烯基、炔基、烷氧基、环烷基和卤素组成的组的取代基取代。

[0094] [41]根据[37]所述的方法,其中羧酸或羧酸类似物是任选被一个或多个独立地选自由烯基、炔基、烷氧基、环烷基和卤素组成的组的取代基取代的C_1-C_8烷基羧酸或其活性酯或酰卤。

[0095] [42]根据[37]所述的方法,其中羧酸或羧酸类似物是C_1-C_8烷基羧酸或其活性酯或酰卤。

[0096] [43]根据[0-1]至[42]中任一项所述的方法,其中第一肽含有2至30、2至20、2至15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2个氨基酸残基。

[0097] [44]根据[0-1]至[43]中任一项所述的方法,其中第一肽为二肽。

[0098] [45]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[44]中任一项所述的方法,其中羧酸或羧酸类似物是具有保护基团的氨基酸或第二肽;或者具有保护基团的氨基酸或第二肽的活性酯;或者具有保护基团的氨基酸或第二肽的酰卤;其中,第一肽和/或具有保护基团的第二肽含有一个或多个N-取代的氨基酸,和/或具有保护基团的氨基酸是N-取代的氨基酸。

[0099] [46]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[45]中任一项所述的方法,其中羧酸或羧酸类似物是具有含有Fmoc骨架的保护基团的氨基酸或第二肽;或者具有含有Fmoc骨架的保护基团的氨基酸或第二肽的活性酯;或者具有含有Fmoc骨架的保护基团的氨基酸或第二肽的酰卤;其中,第一肽和/或具有含有Fmoc骨架的保护基团的第二肽含有一个或多个N-取代的氨基酸和/或具有含有Fmoc骨架的保护基团的氨基酸是N-取代的氨基酸。

[0100] [47]根据[0-1]至[46]中任一项所述的方法,其中第一肽的N末端起第二个残基处的氨基酸是N-取代的氨基酸。

[0101] [48]根据[46]或[47]所述的方法,其中N-取代的氨基酸是N-烷基氨基酸。

[0102] [49]根据[46]或[47]所述的方法,其中N-取代的氨基酸是N-C_1-C_6烷基氨基酸。

[0103] [50]根据[46]或[47]所述的方法,其中N-取代的氨基酸是N-甲基氨基酸。

[0104] [51]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[50]中任一项所述的方法,其中步骤(3)中的缩合剂是盐的形式,并且其抗衡阴离子是PF_6^-或BF_4^-,或者缩合剂是碳二亚胺缩合剂。

[0105] [52]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[50]中任一项所述的方法,其中步骤(3)中的缩合剂是盐的形式,并且其抗衡阴离子为PF_6^-或BF_4^-。

[0106] [53]根据[52]所述的方法,其中步骤(3)中的缩合剂含有选自由PyOxim、PyAOP、PyBOP、COMU、HATU、HBTU、HCTU、TDBTU、HOTU、TATU、TBTU、TCTU和TOTU组成的组的至少一者。

[0107] [54]根据[52]或[53]所述的方法,其中步骤(3)中的缩合剂是PyOxim、PyAOP、PyBOP、COMU、HATU、HBTU、HCTU、TDBTU、HOTU、TATU、TBTU、TCTU或TOTU。

[0108] [55]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[54]中任一项所述的方法,其中步骤(3)在

存在碱的情况下进行。

[0109] [56]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[55]中任一项所述的方法,其中步骤(3)在存在水作为共轭酸中pKa为5至12的碱的情况下进行的。

[0110] [57]根据[55]或[56]所述的方法,其中步骤(3)中的碱是DIPEA。

[0111] [58]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[51]中任一项所述的方法,其中步骤(3)中的缩合剂是碳二亚胺缩合剂。

[0112] [59]根据[58]所述的方法,其中碳二亚胺缩合剂是选自由以下组成的组中的至少一者:二异丙基碳二亚胺(DIC)、二仲丁基碳二亚胺(DsBC)、1-叔丁基-3-乙基碳二亚胺(tBEC)、二叔丁基碳二亚胺(DtBC)和1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)。

[0113] [60]根据[58]或[59]所述的方法,其中碳二亚胺缩合剂是二异丙基碳二亚胺(DIC)或二仲丁基碳二亚胺(DSBC)。

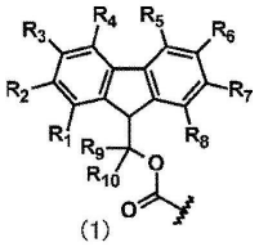
[0114] [61]根据[1]、[51]和[58]至[60]中任一项所述的方法,其中步骤(3)在添加剂存在下进行。

[0115] [62]根据[61]所述的方法,其中添加剂是选自由HOAt、HOBt、HOOBt、Oxyma和Oxyma-B组成的组中的至少一者。

[0116] [63]根据[62]所述的方法,其中添加剂是HOAt或Oxyma。

[0117] [64]根据[0-1]至[63]中任一项所述的方法,其中含有Fmoc骨架的保护基团由下式(1)表示:

[0118] [Chem.1]

[0119] 

[0120] 其中

[0121] R_1至R_8独立地选自由以下组成的组:氢、C_1-C_8烷基、C_1-C_8氟烷基、卤素、磺基和三甲基甲硅烷基;并且

[0122] R_9至R_{10}各自为氢或甲基。

[0123] [65]根据[64]所述的方法,其中含有Fmoc骨架的保护基团为Fmoc(2,7tb)基团、Fmoc(1Me)基团、Fmoc(2F)基团、Fmoc(2,7Br)、mio-Fmoc基团、dio-Fmoc基团、tdf-Fmoc基团、Fmoc(2TMS)基团、Fmoc(2so3h)基团、sm-Fmoc基团或rm-Fmoc基团。

[0124] [66]根据[65]所述的方法,其中含有Fmoc骨架的保护基团是Fmoc基团。

[0125] [67]根据[0-1]、[0-3]至[0-6]和[3]至[66]所述的方法,该方法进一步包括在步骤(2)和步骤(3)之间处理步骤(2)中的混合物的步骤(处理步骤)。

[0126] [67-1]根据[67]所述的方法,其中处理步骤是使酸或盐与混合物接触的步骤。

[0127] [67-2]根据[67]所述的方法,其中处理步骤是向混合物中添加含有酸或盐的亚砜溶剂溶液的步骤。

[0128] [67-3]根据[67]所述的方法,其中处理步骤是向混合物中添加含有酸或盐的DMSO溶液的步骤。

[0129] [68]根据[67]所述的方法,其中处理步骤是洗涤固相合成树脂的步骤。

[0130] [68-1]根据[68]所述的方法,其中洗涤步骤包括用含有亚砜溶剂的溶剂洗涤的步骤。

[0131] [68-2]根据[68]所述的方法,其中洗涤步骤包括用含有DMSO的溶剂洗涤的步骤。

[0132] [68-3]根据[68]所述的方法,其中洗涤步骤包括用DMSO洗涤的步骤。

[0133] [68-4]根据[68]所述的方法,其中洗涤步骤包括用含有碱的亚砜溶剂溶液洗涤的步骤。

[0134] [68-5]根据[68]所述的方法,其中洗涤步骤包括用含有碱的DMSO溶液洗涤的步骤。

[0135] [68-6]根据[68-4]或[68-5]所述的方法,该方法包括用含有为选自由DIPEA、三乙胺、2,6-二甲基吡啶和2,4,6-三甲基吡啶组成的组中的至少一者的碱的DMSO溶液洗涤的步骤。

[0136] [68-7]根据[68-1]至[68-6]中任一项所述的方法,其中洗涤步骤进行两次、三次、四次、五次或六次。

[0137] [68-8]根据[68]至[68-7]中任一项所述的方法,该方法包括在洗涤步骤中的一次或多次洗涤中用含有酸或盐的亚砜溶剂溶液进行洗涤的步骤。

[0138] [68-8-1]根据[68-8]所述的方法,该方法包括在洗涤步骤中的一次或多次洗涤操作中用含有酸的亚砜溶剂溶液进行洗涤的步骤。

[0139] [68-8-2]根据[68-8]所述的方法,该方法包括在洗涤步骤中的一次或多次洗涤操作中用含有酸的DMSO溶液进行洗涤的步骤。

[0140] [68-8-3]根据[68-8]所述的方法,该方法包括在洗涤步骤中的一次或多次洗涤操作中用含有盐的亚砜溶剂溶液进行洗涤的步骤。

[0141] [68-8-4]根据[68-8]所述的方法,该方法包括在洗涤步骤中的一次或多次洗涤操作中用含有盐的DMSO溶液进行洗涤的步骤。

[0142] [68-9]根据[68]至[68-7]中任一项所述的方法,该方法包括在洗涤步骤中的一次或多次洗涤操作中用含有酸和盐的亚砜溶剂溶液进行洗涤的步骤。

[0143] [68-10]根据[68]至[68-7]中任一项所述的方法,该方法包括在洗涤步骤中的一次或多次洗涤操作中用含有酸和盐的DMSO溶液进行洗涤的步骤。

[0144] [68-11]根据[68-8]至[68-11]中任一项所述的方法,其中洗涤步骤中的洗涤操作的次数为1。

[0145] [69]根据[67-1]至[68-3]和[68-8]至[68-11]中任一项所述的方法,其中酸是选自由HOAt、Oxyma、4-硝基苯酚、HOOBt和盐酸组成的组中的至少一者。

[0146] [69-1]根据[67-1]至[68-3]和[68-8]至[68-11]中任一项所述的方法,其中酸是选自由HOAt、Oxyma、4-硝基苯酚和HOOBt组成的组中的至少一者。

[0147] [69-2]根据[67-1]至[68-3]和[68-8]至[68-11]中任一项所述的方法,其中盐是选自由HOAt、Oxyma、4-硝基苯酚、HOOBt和盐酸组成的组中的酸和选自由DIPEA、三乙胺、2,6-二甲基吡啶、2,4,6-三甲基吡啶和吡啶组成的组中的碱形成的盐。

[0148] [69-3]根据[67-1]至[68-3]和[68-8]至[68-11]中任一项所述的方法,其中盐是吡啶盐酸盐。

[0149] [69-4]根据[68-9]或[68-10]所述的方法,其中碱是选自由DIPEA、三乙胺、2,6-二甲基吡啶、2,4,6-二甲基吡啶和吡啶组成的组中的至少一者。

[0150] [70]根据[68]所述的方法,其中洗涤步骤包括以下步骤:

[0151] i)使用预先与CO_2接触的溶剂洗涤固相合成树脂;和/或

[0152] ii)使用预先未与CO_2接触的溶剂洗涤固相合成树脂。

[0153] [71]根据[68]所述的方法,其中洗涤步骤包括以下步骤:

[0154] i)使用预先用CO_2鼓泡的溶剂洗涤固相合成树脂;和/或

[0155] ii)使用未预先用CO_2鼓泡的溶剂洗涤固相合成树脂。

[0156] [72]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[71]中任一项所述的方法,其中步骤(3)中的溶剂与步骤(2)中的溶剂相同。

[0157] [73]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[72]中任一项所述的方法,其中步骤(3)中的溶剂是其中缩合剂是可溶的溶剂。

[0158] [74]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[73]中任一项所述的方法,其中步骤(3)中的溶剂含有选自由芳香烃溶剂、卤素溶剂、醚溶剂、酰胺溶剂、亚砜溶剂、砜溶剂、脲溶剂、酯溶剂、酮溶剂、碳酸酯溶剂和磷酸酯溶剂组成的组中的至少一者。

[0159] [75]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[73]中任一项所述的方法,其中步骤(3)中的溶剂含有50v/v%或更多的选自由芳香烃溶剂、卤素溶剂、醚溶剂、酰胺溶剂、亚砜溶剂、砜溶剂、脲溶剂、酯溶剂、酮溶剂、碳酸酯溶剂和磷酸酯溶剂组成的组中的至少一者。

[0160] [76]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[73]中任一项所述的方法,其中步骤(3)中的溶剂含有70v/v%或更多的选自由芳香烃溶剂、卤素溶剂、醚溶剂、酰胺溶剂、亚砜溶剂、砜溶剂、脲溶剂、酯溶剂、酮溶剂、碳酸酯溶剂和磷酸酯溶剂组成的组中的至少一者。

[0161] [77]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[73]中任一项所述的方法,其中步骤(3)中的溶剂含有90v/v%或更多的选自由芳香烃溶剂、卤素溶剂、醚溶剂、酰胺溶剂、亚砜溶剂、砜溶剂、脲溶剂、酯溶剂、酮溶剂、碳酸酯溶剂和磷酸酯溶剂组成的组中的至少一者。

[0162] [78]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[73]中任一项所述的方法,其中步骤(3)中的溶剂由选自由芳香烃溶剂、卤素溶剂、醚溶剂、酰胺溶剂、亚砜溶剂、砜溶剂、脲溶剂、酯溶剂、酮溶剂、碳酸酯溶剂和磷酸酯溶剂组成的组中的至少一者组成。

[0163] [79]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[78]中任一项所述的方法,其中步骤(3)中的溶剂是芳香烃溶剂、卤素溶剂、醚溶剂、酰胺溶剂、亚砜溶剂、砜溶剂、脲溶剂、酯溶剂、酮溶剂、碳酸酯溶剂或磷酸酯溶剂。

[0164] [80]根据[74]至[79]中任一项所述的方法,其中芳香烃溶剂是选自由苯、甲苯、二甲苯、氯苯、1,2-二氯苯、溴苯、苯甲醚、乙苯、硝基苯和异丙基苯组成的组中的一者或多者,

[0165] 该卤素溶剂是选自由二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷和四氯化碳组成的组中的一者或多者,

[0166] 该醚溶剂是选自由乙醚、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、环戊基甲基醚、4-甲基四氢吡喃、1,3-二氧戊环、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷、二异丙醚、叔丁基甲基醚、二甘醇二甲醚、三甘醇二甲醚和四甘醇二甲醚组成的组中的一者或多者,

[0167] 该酰胺溶剂是选自由DMF、NMP、DMA、NEP、NBP和甲酰胺组成的组中的一者或多者,

[0168] 该亚砜溶剂是选自由DMSO和甲基苯基亚砜组成的组中的一者或多者,

[0169] 该砜溶剂是选自由二苯砜、二甲砜、环丁砜、3-甲基环丁砜、乙基甲基砜和乙基异丙基砜组成的组中的一者或多者，

[0170] 该脲溶剂是选自由DMI和DMPU组成的组中的一者或多者，

[0171] 该酯溶剂是选自由乙酸甲酯、乙酸乙酯、丙酸甲酯、乙酸丁酯、乙酸丙酯、乙酸异丙酯、乙酸异丁酯、乙酸戊酯和γ-戊内酯组成的组中的一者或多者，

[0172] 该酮溶剂是选自由丙酮、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、环己酮、二乙基酮和环戊酮组成的组中的一者或多者，

[0173] 该碳酸酯溶剂是选自由碳酸二甲酯、碳酸二乙酯和碳酸二丁酯组成的组中的一者或多者，并且

[0174] 该磷酸酯溶剂是选自由磷酸三甲酯、磷酸三乙酯和磷酸三丁酯组成的组中的一者或多者。

[0175] [81]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[80]中任一项所述的方法，其中步骤(3)中使用的羧酸是具有含有Fmoc骨架的保护基团的氨基酸或第二肽，并且氨基酸或第二肽中的含有Fmoc骨架的保护基团与步骤(1)中使用的第一肽中的含有Fmoc骨架的保护基团相同或不同。

[0176] [82]根据[0-1]、[0-4]至[0-6]和[3]至[81]中任一项所述的方法，其中步骤(3)中使用的羧酸类似物是具有保护基团的氨基酸、具有保护基团的第二肽、C_1-C_8烷基羧酸或C_6-C_{10}芳基羧酸的酰卤，并且具有含有Fmoc骨架的保护基团的氨基酸的羧基基团、具有含有Fmoc骨架的保护基团的第二肽的C末端的羧基基团、C_1-C_8烷基羧酸的羧基基团或C_6-C_{10}芳基羧酸的羧基基团转化为酰卤基团。

[0177] 尽管[1]至[82]的方法是通过固相法生产肽的方法，但这些方法也可以应用于通过液相法生产肽的方法。即，本发明的另一方面提供以下的[83]至[84-1]。[83]至[84-1]所述的方法可以是[3]至[82]所述的方法，该方法包括除通过固相法的生产方法中固有的特征之外的特征。

[0178] [83]一种用于通过液相法生产肽的方法，该方法包括以下步骤：

[0179] (1)提供具有含有Fmoc骨架的保护基团的第一肽；

[0180] (2)在步骤(1)后，在含有亚砜溶剂的溶剂中，用至少包括在乙腈中其共轭酸具有23或更大的pKa的碱的一种或多种碱处理第一肽；以及

[0181] (3)在步骤(2)后，在溶剂中，在存在或不存在缩合剂的情况下，将所述第一肽与羧酸或羧酸类似物缩合，以得到第三肽。

[0182] [84]一种用于减少通过液相法的肽生产中形成的二酮哌嗪杂质和/或6元环脒骨架化合物杂质的量的方法，该方法包括以下步骤：

[0183] (1)提供具有含有Fmoc骨架的保护基团且负载于固相上的第一肽；和

[0184] (2)在步骤(1)后，在含有亚砜溶剂的溶剂中，用至少包括在乙腈中其共轭酸具有23或更大的pKa的碱的一种或多种碱来处理所述第一肽。

[0185] [84-1]一种用于减少在通过液相法的肽生产中形成的选自由二酮哌嗪杂质、6元环状脒骨架化合物杂质和二聚脲化合物杂质组成的组中的至少一种杂质的量的方法，该方法包括以下步骤：

[0186] (1)提供具有含有Fmoc骨架的保护基团且负载于固相上的第一肽；以及

[0187] (2)在步骤(1)后,在含有亚砜溶剂的溶剂中,用至少包括在乙腈中其共轭酸具有23或更大的pKa的碱的一种或多种碱来处理所述第一肽。

[0188] 该方法能够高效地获得所需的肽。

[0189] 发明效果

[0190] 在肽合成中,本发明确保即使存在其中在常规条件下由于形成二酮哌嗪和/或形成6元环脒骨架化合物而不能充分进行所需的延长反应的氨基酸序列,也可以显著减少此类杂质的形成,从而可以有效地延长肽链以获得具有所需氨基酸序列的肽。由于本发明的方法不需要使用通用性较低的诸如Alloc的特殊保护基团,并且在反应操作方面没有限制,从而实现了极短的反应时间,因此该方法是具有通用性强、可放大的切实可行的合成方法。

附图说明

[0191] [图1]图1显示了将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的Fmoc-Phe-NMe_2(化合物1-4-1)之前和之后在3.6ppm至6.8ppm之间的^{1}H-NMR图谱,以及在此范围内观察到的化合物1-4-1、化合物1-4-2、化合物1-4-3a和二苯富烯的特征^{1}H信号。

[0192] 在图1中,a)显示了通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而获得的溶液的^{1}H-NMR图谱。

[0193] 在图1中,b)显示了N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1的溶液的^{1}H-NMR图谱。

[0194] [图2]图2是在5.4至3.5ppm附近的^{1}H-NMR图谱,其显示通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1形成的化合物1-4-2和化合物1-4-3a进行化学交换,其比率为82:18。

[0195] 在图2中,a)-1显示了通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而获得的溶液的^{1}H-NMR图谱。

[0196] 在图2中,a)-2显示了通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而获得的溶液选择性激发4.82ppm处的^{1}H信号而获得的1D-ROESY图谱。

[0197] 在图2中,a)-3显示了通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而获得的溶液选择性激发3.95ppm处的^{1}H信号而获得的1D-ROESY图谱。

[0198] 在图2中,b)显示了^{1}H-NMR图谱,其显示通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而获得的溶液4.85ppm处的^{1}H信号和3.95ppm处的^{1}H信号之间的积分比。

[0199] [图3]图3显示了在5.2至3.5ppm附近的^{1}H-NMR图谱,其显示通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而形成的化合物1-4-2。

[0200] 在图3中,a)-1显示了N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2的标准品的^{1}H-NMR图谱。

[0201] 在图3中,a)-2显示了通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-

二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而获得的溶液的^{1}H-NMR图谱。

[0202] 在图3中,a)-3显示了通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1并添加3μL化合物1-4-2的标准品而获得的溶液的^{1}H-NMR图谱。

[0203] 在图3中,a)-4显示了通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1并添加3μL化合物1-4-2的标准品而获得的溶液选择性激发4.84ppm处的^{1}H信号而获得的1D-NOESY图谱。

[0204] 在图3中,a)-5显示了通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1并添加3μL化合物1-4-2的标准品而获得的溶液选择性激发3.95ppm处的^{1}H信号而获得的1D-NOESY图谱。

[0205] 在图3中,b)是表示确定通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1并且添加3μL的化合物1-4-2的标准品而获得的溶液的^{1}H-NMR图谱中4.84ppm和3.95ppm处的质子信号的积分值的图以及基于积分值计算的测定的化合物1-4-3和化合物1-4-2之间的丰度比。

[0206] [图4]图4显示了5.1至3.7ppm附近的^{1}H-NMR和1D-NOESY光谱,其表明化合物1-4-3a是通过用$^{13}CO_2$气鼓泡化合物1-4-2并且然后应用N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)形成的。

[0207] 在图4中,a)显示了N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2的标准品的^{1}H-NMR图谱。

[0208] 在图4中,b)显示了通过将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$气鼓泡1分钟而获得的溶液的^{1}H-NMR图谱。

[0209] 在图4中,c)显示了通过对借由将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$气鼓泡1分钟而获得的溶液在4.77ppm处选择性激发^{1}H信号而获得的1D-NOESY图谱。

[0210] 在图4中,d)显示了通过对借由将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$气鼓泡1分钟而获得的溶液在3.96ppm处选择性激发^{1}H信号而获得的1D-NOESY图谱。

[0211] 在图4中,e)显示了通过将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$气鼓泡1分钟并且然后应用1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)而获得的溶液的^{1}H-NMR图谱。

[0212] 在图4中,f)是显示将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$气鼓泡1分钟后4.77ppm处的^{1}H信号和3.96ppm处的^{1}H信号之间的积分比的^{1}H-NMR图谱的图。

[0213] 在图4中,e)是通过将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$气鼓泡1分钟并且然后应用1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)而获得的溶液的^{1}H-NMR图谱中4.83ppm处的放大^{1}H信号的图。仅对于该图,应用使用Sin-bell作为窗函数的转换来提高分辨率。

[0214] [图5]图5显示了164至124ppm附近的^{13}C-NMR图谱,其表明化合物1-4-3a是通过用$^{13}CO_2$气鼓泡化合物1-4-2并且然后应用N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的1,8-二氮杂

双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)形成的。

[0215] 在图5中,a)显示了通过在N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2中用$^{13}CO_2$气体鼓泡而获得的溶液的^{13}C-NMR图谱。

[0216] 在图5中,b)显示了通过将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$气鼓泡并且然后应用1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)而获得的溶液的^{13}C-NMR图谱。

[0217] [图6]图6显示了在6.9至3.6ppm附近的^{1}H-NMR图谱,其表明化合物1-4-3a存在于通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而获得的溶液(溶液B,Sol B)中。

[0218] 在图6中,a)显示了通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而获得的溶液(溶液B)的^{1}H-NMR图谱。

[0219] 在图6中,b)显示了通过将通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而获得的溶液(溶液B)与将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$气鼓泡1分钟并且然后应用1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)而获得的溶液(溶液A)混合而获得的溶液的^{1}H-NMR图谱。

[0220] 在图6中,c)显示了通过将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2用$^{13}CO_2$气鼓泡1分钟并且然后应用1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)而获得的溶液(溶液A)的^{1}H-NMR图谱。

[0221] [图7]图7显示了NH-HSQC(^{15}N[F1]:约97至85ppm和^{1}H[F2]:约5.7至4.7ppm)、NH-HMBC(^{15}N[F1]:约101至83ppm和^{1}H[F2]:约3.04至2.64ppm)和CH-HMBC(^{13}C[F1]:约165至158ppm和^{1}H[F2]:约5.7至4.5ppm)图谱,其显示化合物1-4-3a存在于通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而获得的溶液(溶液B)与将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$气鼓泡1分钟并且然后应用1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)而得到的溶液(溶液A)混合而获得的溶液。

[0222] 在图7中,a)显示了通过将通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而获得的溶液(溶液B)与将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2用$^{13}CO_2$气鼓泡1分钟并且然后应用1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)获得的溶液(溶液A)混合而获得的溶液的NH-HSQC图谱。

[0223] 在图7中,b)显示了通过将通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而获得的溶液(溶液B)与将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2用$^{13}CO_2$气鼓泡1分钟并且然后应用1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)而获得的溶液(溶液A)混合而获得的溶液的NH-HMBC图谱。

[0224] 在图7中,c)显示了通过将通过将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而获得的溶液(溶液B)与将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2用$^{13}CO_2$气鼓泡1分钟并且然后应用1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)而获得的溶液(溶液A)混合而获得的溶液的CH-HMBC图谱。

[0225] [图8]图8是显示通过如下获得的溶液中存在的化合物1-4-3a的氨基甲酸盐部分的所有^{1}H、^{13}C和^{15}N信号的图:将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)应用于N,N-二甲基

甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-1而获得的溶液(溶液B)和将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$鼓泡1分钟并且然后应用1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)而获得的溶液(溶液A)混合。

具体实施方式

[0226] (术语)

[0227] 在本说明书中的“卤素原子”的实例包括F、Cl、Br和I。

[0228] 在本说明书中,“烷基”是通过从脂肪烃中去除任意一个氢原子而衍生的一价基团,并且具有含有氢和碳原子但不含杂原子(其是指除碳和氢原子以外的原子)或骨架中的不饱和碳-碳键的烃基或烃基基团结构的子集。烷基不仅包括直链形式,还包括支链形式。烷基具体为具有1至20个碳原子的烷基(C_1-C_{20};以下,“C_p-C_q”意指碳原子数为p至q的烷基),优选为C_1-C_{10}烷基,更优选为C_1-C_6烷基。烷基的实例具体包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、异丁基(2-甲基丙基)、正戊基、仲戊基(1-甲基丁基)、叔戊基(1,1-二甲基丙基)、新戊基(2,2-二甲基丙基)、异戊基(3-甲基丁基)、3-戊基(1-乙基丙基)、1,2-二甲基丙基、2-甲基丁基、正己基、1,1,2-三甲基丙基、1,2,2-三甲基丙基、1,1,2,2-四甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基、1-乙基丁基和2-乙基丁基。

[0229] 在本说明书中,“烯基”是具有至少一个双键(两个相邻的SP^2碳原子)的一价基团。根据双键和取代基(如果存在)的构象,双键的几何形态可以呈现entgegen(E)或zusammen(Z)以及顺式或反式构象。烯基不仅包括直链形式,还包括支链形式。烯基优选为C_2-C_{10}烯基,更优选为C_2-C_6烯基。其实例具体包括乙烯基、烯丙基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基(包括顺式和反式)、3-丁烯基、戊烯基、3-甲基-2-丁烯基和己烯基。

[0230] 在本说明书中,“炔基”是具有至少一个三键(两个相邻的SP碳原子)的一价基团。炔基不仅包括直链形式,还包括支链形式。炔基优选为C_2-C_{10}炔基,更优选为C_2-C_6炔基。其实例具体包括乙炔基、1-丙炔基、丙炔基、3-丁炔基、戊炔基、己炔基、3-苯基-2-丙炔基、3-(2'-氟苯基)-2-丙炔基、2-羟基-2-丙炔基、3-(3'-氟苯基)-2-丙炔基和3-甲基-(5-苯基)-4-戊炔基。

[0231] 在本说明书中,“环烷基”意指饱和或部分饱和的环一价脂肪族烃基基团,并且包括单环、双环和螺环。环烷基优选为C_3-C_8环烷基。其实例具体包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、双环[2.2.1]庚基和螺[3.3]庚基。

[0232] 在本说明书中,“芳基”意指一价芳香族烃环,并且优选为C_6-C_{10}芳基。芳基的实例具体包括苯基和萘基(例如1-萘基和2-萘基)。

[0233] 在本说明书中,“杂环基”意指含有碳原子以及1至5个杂原子的非芳族环一价基团。杂环基在环中可以具有双键和/或三键。环中的碳原子可以通过氧化形成羰基,并且该环可以是单环或稠环。构成环的原子数优选为4至10个(4元至10元杂环基),更优选为4至7个(4元至7元杂环基)。杂环基的实例具体包括氮杂环丁烷基、环氧乙烷基、氧杂环丁基、二氢呋喃基、四氢呋喃基、二氢吡喃基、四氢吡喃基、四氢吡啶基、四氢嘧啶基、吗啉基、硫代吗啉基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、噁唑烷基、异噁唑烷基、噻唑烷基、异噻唑烷基、1,2-噻嗪烷、噻二唑烷基、噁唑烷酮、苯并二噁烷基、苯并噁唑基、二氧

戊环、二氧杂环己烷基、四氢吡咯并[1,2-c]咪唑、硫杂环丁烷基、3,6-二氮杂双环[3.1.1]庚基、2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚基、3-氧杂-8-氮杂双环[3.2.1]辛基、磺内酰胺和2-氧杂螺[3.3]庚基。

[0234] 在本说明书中,“杂芳基”意指含有碳原子以及1至5个杂原子的芳族环一价基团。该环可以是单环,或者是与其他环的稠合环,并且也可以是部分饱和的。构成环的原子数优选为5至10个(5元至10元杂芳基),更优选为5至7个(5元至7元杂芳基)。杂芳基的具体实例包括呋喃基、噻吩基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、噻唑基、异噻唑基、噁唑基、异噁唑基、噁二唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基、吡嗪基、三嗪基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并噻二唑、苯并噻唑基、苯并噁唑基、苯并噁二唑基、苯并咪唑基、吲哚基、异吲哚基、吲唑基、喹啉基、异喹啉基、噌嗪基、喹唑啉基、喹喔啉基、苯并二氧杂环戊烯基、吲哚嗪基和咪唑并吡啶基。

[0235] 在本说明书中,“烷氧基”意指与上文定义的“烷基”键合的氧基基团,并且优选为C_1-C_6烷氧基。烷氧基的实例具体包括甲氧基、乙氧基、1-丙氧基、2-丙氧基、正丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基和3-甲基丁氧基。

[0236] 在本说明书中,“烯氧基”意指与上文定义的“烯基”键合的氧基基团,并且优选为C_2-C_6烯氧基。烯氧基的实例具体包括乙烯氧基、烯丙氧基、1-丙烯氧基、2-丙烯氧基、1-丁烯氧基、2-丁烯氧基(包括顺式和反式)、3-丁烯氧基、戊烯氧基和己烯氧基。

[0237] 在本说明书中,“环烷氧基”意指与上文定义的“环烷基”键合的氧基基团,并且优选为C_3-C_8环烷氧基。环烷氧基的实例具体包括环丙氧基、环丁氧基和环戊氧基。

[0238] 在本说明书中,“芳氧基”意指与上文定义的“芳基”键合的氧基基团,并且优选为C_6-C_{10}芳氧基。芳氧基的实例具体包括苯氧基、1-萘氧基和2-萘氧基。

[0239] 在本说明书中,“杂芳氧基”意指与上文定义的“杂芳基”键合的氧基基团,并且优选为5元至10元杂芳氧基。

[0240] 在本说明书中,“氨基”在狭义上意指-NH_2,并且在广义上意指-NRR’。在本文中,R和R’各自独立地选自氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳基和杂芳基,或R和R’和与其键合的氮原子一起形成环。氨基的实例优选包括-NH_2、单-C_1-C_6烷基氨基、二-C_1-C_6烷基氨基和4元至8元环氨基。

[0241] 在本说明书中,“单烷基氨基”意指上文定义的“氨基”基团,其中R为氢,并且R’为上文定义的“烷基”,并且优选为单-C_1-C_6烷基氨基。单烷基氨基的实例具体包括甲基氨基、乙基氨基、正丙基氨基、异丙基氨基、正丁基氨基、仲丁基氨基和叔丁基氨基。

[0242] 在本说明书中,“二烷基氨基”意指上文定义的“氨基”基团,其中R和R’各自独立地为上文定义的“烷基”,并且优选为二-C_1-C_6烷基氨基。二烷基氨基的实例具体包括二甲基氨基和二乙基氨基。

[0243] 在本说明书中,“环氨基”意指上文定义的“氨基”基团,其中R和R’和与其键合的氮原子一起形成环,并且优选为4元至8元环状氨基。环氨基的实例具体包括1-氮杂环丁基、1-吡咯烷基、1-哌啶基、1-哌嗪基、4-吗啉基、3-噁唑烷基、1,1-二氧代硫代吗啉基-4-基和3-氧杂-8-氮杂双环[3.2.1]辛-8-基。

[0244] 在本说明书中,“卤代烷基”意指上文定义的“烷基”的一个或多个氢原子被卤素取代的基团,并且优选为C_1-C_8卤代烷基,更优选为C_1-C_6卤代烷基。

[0245] 在本说明书中,“氟代烷基”意指上文定义的“烷基”的一个或多个氟原子被卤素取代的基团,优选地被C_1-C_8卤代烷基取代。卤代烷基的实例具体包括单氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、2,2-二氟乙基、2,2,2-三氟乙基、3,3-二氟丙基、4,4-二氟丁基、5,5-二氟戊基和3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十三氟辛基。

[0246] 在本说明书中,“芳烷基(芳基烷基)”意指上述定义的“烷基”的至少一个氢原子被上文定义的“芳基”取代的基团,并且优选为C_7-C_{14}芳烷基,更优选为C_7-C_{10}芳烷基。芳烷基的实例具体包括苄基、苯乙基和3-苯丙基。

[0247] 在本说明书中,“芳烷氧基”意指与上文定义的“芳烷基”键合的氧基基团,并且优选为C_7-C_{14}芳烷氧基,更优选为C_7-C_{10}芳烷氧基。芳烷氧基的实例具体包括苄氧基、苯乙氧基和3-苯基丙氧基。

[0248] 在本说明书中,“肽链”是指1个或多个天然氨基酸和/或非天然氨基酸通过酰胺键和/或酯键连接的肽链。肽链优选为包含1至15个氨基酸残基的肽链,更优选为由5至12个氨基酸残基组成的肽链。

[0249] 如本文所用,术语“肽化合物”没有特别限制,只要其是其中天然氨基酸和/或非天然氨基酸通过酰胺键或酯键连接的肽化合物即可,并且该肽化合物优选为具有5至30个残基的肽化合物,更优选为具有8至15个残基的肽化合物,还更优选为具有9至13个残基的肽化合物。本发明中合成的肽化合物优选在一个肽中含有至少三个N-取代的氨基酸,更优选至少5个N-取代的氨基酸。N-取代的氨基酸可以连续或不连续地存在于N-取代的环肽化合物中。根据本发明的肽化合物可以是直链的或环的,并且优选环肽化合物。在本说明书中,“肽残基”有时被称为“肽”。

[0250] 本发明中的“环肽化合物”是指将直链肽化合物中的N末端侧的基团和C末端侧的基团环化而得到的环肽化合物。环化可以采用任何形式,诸如通过碳-氮键(如酰胺键)环化、通过碳-氧键(如酯键或醚键)环化、通过碳-硫键(如硫醚键)环化、通过碳-碳键环化、或通过杂环结构环化。其中,优选通过诸如酰胺键或碳-碳键等共价键进行环化,并且更优选通过侧链的羧酸基团和主链的n末端的氨基基团的酰胺键进行环化。用于环化的羧酸基团、氨基基团等的位置可以在主链上或侧链上,并且没有具体限制,只要该位置允许这些基团环化即可。

[0251] 在本说明书中,术语“一个或多个”意指1或2或更大的数。当术语“一个或多个”用在与特定基团的取代基相关的上下文中时,该术语意指从1到该基团接受的取代基的最大数目的数字。术语“一个或多个”的实例具体包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更大的数。

[0252] 在本说明书中,“固相合成树脂”只要能够用于通过固相法合成肽化合物,就没有特别限制。固相合成树脂的实例具体包括可以在酸性条件下除去的树脂,诸如CTC树脂、Wang树脂、SASRIN树脂、三苯甲基氯树脂(Trt树脂)、4-甲基三苯甲基氯树脂(Mtt树脂)和4-甲基三苯甲基氯树脂(Mtt树脂)。树脂可以根据所使用的氨基酸侧的官能团适当地选择。例如,当使用羧酸(以Asp或Glu为代表的主链羧酸或侧链羧酸)或芳香环上的羟基(以Tyr为代表的酚基基团)作为氨基酸侧上的官能团时,优选使用三苯甲基氯树脂(Trt树脂)或2-氯三苯甲基氯树脂(CTC树脂)作为树脂。当使用脂肪族羟基(以Ser或Thr为代表的脂肪族醇基团)作为氨基酸侧的官能团时,优选使用三苯甲基氯树脂(Trt树脂)、2-氯三苯甲基氯树脂(CTC树脂)或4-甲基三苯甲基氯树脂(Mtt树脂)作为树脂。在本说明书中,将树脂(resin)称

为树脂(resin)。纤维素可以用作固相。在本说明书中,术语“固相”可以与“固相合成树脂”互换使用。

[0253] 构成树脂的聚合物的类型没有特别限制。对于由聚苯乙烯组成的树脂,可以使用100至200目的树脂或200至400目的树脂。交联度没有特别限制,并且优选用1% DVB(二乙烯基苯)交联的树脂。构成树脂的聚合物类型的实例包括Tentagel和Chemmatrix。

[0254] 如果在本说明书中描述的化合物的生产中,所定义的基团在实施方法的条件下发生不期望的化学转化,则可以使用诸如官能团的保护或脱保护等方式来产生该化合物。本文中,对于保护基团的选择和脱附的操作,可以提及例如“Greene's,“Protective Groups in Organic Synthesis”(第5版,John Wiley&Sons 2014)”中所述的方法,并且可以根据反应条件合适地使用。如果需要的话,还可以改变反应步骤的顺序,诸如引入取代基。

[0255] 当本说明书中给出修饰语“任选地取代的”时,相关取代基的实例包括烷基、烷氧基、氟烷基、氟烷氧基、氧代、氨基羰基、烷基磺酰基、烷基磺酰氨基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、芳基烷基、杂芳基烷基、卤素、硝基、氨基、单烷基氨基、二烷基氨基、氰基、羧基、烷氧基羰基和甲酰基。

[0256] 可以将取代基添加到每个基团上。这样的取代基没有限制,并且可以是各自独立地自由地选自包括卤素原子、氧原子、硫原子、氮原子、硼原子、硅原子和磷原子的任意取代基中的一个或两个或更多个的取代基。具体地,其实例包括任选地取代的烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、芳烷基和环烷基。

[0257] 本说明书中所述的化合物可以是其盐、或其溶剂化物。作为本说明书中所述的盐的实例包括:盐酸盐;氢溴酸盐;氢碘酸盐;磷酸盐;膦酸盐;硫酸盐;磺酸盐,诸如甲磺酸盐和对甲苯磺酸盐;羧酸盐,诸如乙酸盐、柠檬酸盐、苹果酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐和水杨酸盐;碱金属盐,诸如钠盐和钾盐;碱土金属盐,诸如镁盐和钙盐;以及铵盐,诸如铵盐、烷基铵盐、二烷基铵盐、三烷基铵盐和四烷基铵盐。这些盐例如通过使相关化合物与酸或碱接触来产生。本说明书中所述的化合物的溶剂化物是指由化合物与溶剂形成的分子群,并且只要是由溶剂形成的溶剂化物就没有限制。其实例不仅包括与单一溶剂的溶剂合物,诸如水合物、醇加合物(乙醇加合物、甲醇加合物、1-丙醇加合物、2-丙醇加合物等)和二甲亚砜,而且还包括每个化合物分子与多种溶剂形成的溶剂合物,或每个化合物分子与多种类型的溶剂形成的溶剂化物。当溶剂是水时,溶剂化物是水合物。本发明的化合物的溶剂合物优选为水合物,并且水合物的实例具体包括一水合物至十水合物,优选为一水合物至五水合物,更优选为一水合物至三水合物。

[0258] 本说明书中的术语“氨基酸”包括天然氨基酸和非天然氨基酸。在本说明书中,“天然氨基酸”是指Gly、Ala、Ser、Thr、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、His、Glu、Asp、Gln、Asn、Cys、Met、Lys、Arg或Pro。非天然氨基酸没有特别限制,并且其实例包括β-氨基酸、D-型氨基酸、N-取代的氨基酸、α,α-二取代氨基酸、具有与天然氨基酸的侧链不同的侧链的氨基酸和羟基羧酸。作为本文中的氨基酸,具有任何构象的氨基酸都是可接受的。氨基酸的侧链的选择没有特别限制,并且除了氢原子外,侧链还可以自由地选自烷基基团、烯基基团、炔基基团、芳基基团、杂芳基基团、芳烷基基团、杂芳烷基基团、环烷基基团、螺键环烷基基团等。可以将取代基添加到每个基团上。取代基也没有限制,并且一个或两个或更多个取代基可以独立地自由地选自包括例如卤素原子、O原子、S原子、N原子、B原子、Si原子或P原子的任意取

代基。即,侧链的实例包括烷基基团、烷氧基基团、烯基基团、炔基基团、芳基基团、杂芳基基团、芳烷基基团、或可以被取代的环烷基基团、氧代、氨基羰基和卤素原子。在非限制性方面,本说明书中的氨基酸可以是在同一分子中具有羧基基团和氨基基团的化合物(即使在这种情况下,氨基酸也包括亚氨基酸,诸如脯氨酸和羟脯氨酸)。

[0259] 在本说明书中,含有卤素原子的取代基的实例包括具有卤素作为取代基的烷基基团、环烷基基团、烯基基团、炔基基团、芳基基团、杂芳基基团和芳烷基基团,并且更具体地包括氟烷基、二氟烷基和三氟烷基。

[0260] 含有氧原子的取代基的实例包括羟基(-OH)、氧基(-OR)、羰基(-C(=O)-R)、羧基(-CO_2H)、氧羰基(-C(=O)-OR)、羰氧基(-O-C(=O)-R)、硫代羰基(-C(=O)-SR)、羰硫基(-S-C(=O)-R)、氨基羰基(-C(=O)-NHR)、羰基氨基(-NH-C(=O)-R)、氧羰基氨基(-NH-C(=O)-OR)、磺酰氨基(-NH-SO_2-R)、氨基磺酰基(-SO_2-NHR)、氨磺酰氨基(-NH-SO_2-NHR)、硫代羧基(-C(=O)-SH)和羧基羰基(-C(=O)-CO_2H)。

[0261] 氧基(-OR)的实例包括烷氧基、环烷氧基、烯氧基、炔氧基、芳氧基、杂芳氧基和芳烷氧基。烷氧基优选为C_1-C_4烷氧基、C_1-C_2烷氧基,特别优选甲氧基或乙氧基。

[0262] 羰基(-C(=O)-R)的实例包括甲酰基(-C(=O)-H)、烷基羰基、环烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、芳基羰基、杂芳基羰基和芳烷基羰基。

[0263] 氧基羰基(-C(=O)-OR)的实例包括烷氧基羰基、环烷氧基羰基、烯氧基羰基、炔氧基羰基、芳氧基羰基、杂芳氧基羰基和芳烷氧基羰基。

[0264] 羰氧基(-O-C(=O)-R)的实例包括烷基羰氧基、环烷基羰氧基、烯基羰氧基、炔基羰氧基、芳基羰氧基、杂芳基羰氧基和芳烷基羰氧基。

[0265] 硫代羰基(-C(=O)-SR)的实例包括烷基硫代羰基、环烷基硫代羰基、烯基硫代羰基、炔基硫代羰基、芳基硫代羰基、杂芳基硫代羰基和芳烷基硫代羰基。

[0266] 羰基硫基(-S-C(=O)-R)的实例包括烷基羰基硫基、环烷基羰基硫基、烯基羰基硫基、炔基羰基硫基、芳基羰基硫基、杂芳基羰基硫基和芳烷基羰基硫基。

[0267] 氨基羰基(-C(=O)-NHR)的实例包括烷基氨基羰基(例如C_1-C_6或C_1-C_4烷基氨基羰基,特别是乙基氨基羰基和甲基氨基羰基)、环烷基氨基羰基、烯基氨基羰基、炔基氨基羰基、芳基氨基羰基、杂芳基氨基羰基和芳烷基氨基羰基。其实例还包括其中与-C(=O)-NHR中的N原子键合的H原子进一步被烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基取代的基团。

[0268] 羰基氨基(-NH-C(=O)-R)的实例包括烷基羰基氨基、环烷基羰基氨基、烯基羰基氨基、炔基羰基氨基、芳基羰基氨基、杂芳基羰基氨基和芳烷基羰基氨基。其实例还包括其中与-NH-C(=O)-R中的N原子键合的H原子进一步被烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基取代的基团。

[0269] 氧基羰基氨基(-NH-C(=O)-OR)的实例包括烷氧基羰基氨基、环烷氧基羰基氨基、烯氧基羰基氨基、炔氧基羰基氨基、芳氧基羰基氨基、杂芳氧基羰基氨基和芳烷氧基羰基氨基。其实例还包括其中与-NH-C(=O)-OR中的N原子键合的H原子进一步被烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基取代的基团。

[0270] 磺酰氨基(-NH-SO_2-R)的实例包括烷基磺酰氨基、环烷基磺酰氨基、烯基磺酰氨基、炔基磺酰氨基、芳基磺酰氨基、杂芳基磺酰氨基和芳烷基磺酰氨基。其实例还包括其中

与-NH-SO_2-R中的N原子键合的H原子进一步被烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基取代的基团。

[0271] 氨基磺酰基(-SO_2-NHR)的实例包括烷基氨基磺酰基、环烷基氨基磺酰基、烯基氨基磺酰基、炔基氨基磺酰基、芳基氨基磺酰基、杂芳基氨基磺酰基和芳烷基氨基磺酰基。其实例还包括其中与-SO_2-NHR中的N原子键合的H原子进一步被烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基或芳烷基取代的基团。

[0272] 氨磺酰氨基(-NH-SO_2-NHR)的实例包括烷基氨磺酰氨基、环烷基氨磺酰氨基、烯基氨磺酰氨基、炔基氨磺酰氨基、芳基氨磺酰氨基、杂芳基氨磺酰氨基和芳烷基氨磺酰氨基。与-NH-SO_2-NHR中的N原子键合的两个H原子可以被各自独立地选自由烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基组成的组的取代基取代,并且这两个取代基可以形成环。

[0273] 含有S原子的取代基的实例包括诸如硫醇基(-SH)、硫基(-S-R)、亚磺酰基(-S(=O)-R)、磺酰基(-SO_2-R)和磺基(-SO_3H)的基团。

[0274] 可以选择的硫基(-S-R)的实例包括烷硫基、环烷硫基、烯硫基、炔硫基、芳硫基、杂芳硫基和芳烷硫基等。

[0275] 磺酰基(-SO_2-R)的实例包括烷基磺酰基、环烷基磺酰基、烯基磺酰基、炔基磺酰基、芳基磺酰基、杂芳基磺酰基和芳烷基磺酰基。

[0276] 含有氮原子的取代基的实例包括诸如叠氮化物(-N_3;也称为“叠氮基团”)、氰基(-CN)、伯氨基(-NH_2)、仲氨基(-NH-R;也称为单取代氨基)、叔氨基(-NR(R');也称为二取代氨基)、脒基(-C(=NH)-NH_2)、取代脒基(-C(=NR)-NR'R″)、胍基(-NH-C(=NH)-NH_2)、取代胍基(-NR-C(=NR”')-NR'R″)、氨基羰基氨基(-NR-CO-NR'R″)、吡啶基、哌啶基、吗啉代和氮杂环丁烷基。

[0277] 仲氨基(-NH-R:单取代氨基)的实例包括烷基氨基、环烷基氨基、烯基氨基、炔基氨基、芳基氨基、杂芳基氨基和芳烷基氨基。

[0278] 叔氨基(-NR(R'):二取代氨基)的实例包括具有任意两个各自独立地选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基的取代基的氨基基团,例如,烷基(芳烷基)氨基。这些任意两个取代基可以形成环。其实例具体包括二烷基氨基,具体是C_1-C_6二烷基氨基、C_1-C_4二烷基氨基、二甲基氨基和二乙基氨基。在本说明书中,“C_p-C_q二烷基氨基”是指其中氨基被两个C_p-C_q烷基基团取代的基团。C_p-C_q烷基基团可以相同或不同。

[0279] 取代的脒基(-C(=NR)-NR'R″)的实例包括其中N原子上的三个取代基R、R'和R″各自独立地选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基的基团,例如烷基(芳烷基)(芳基)脒基。

[0280] 取代的胍基(-NR-C(=NR”')-NR'R″)的实例包括其中R、R'、R”和R”'各自独立地选自烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基的基团,以及其中这些取代基形成环的基团。

[0281] 氨基羰基氨基(-NR-CO-NR'R″)的实例包括其中R、R'和R″各自独立地选自氢原子、烷基、环烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基和芳烷基的基团,以及其中这些取代基形成环的基团。

[0282] 在本说明书中,有时将构成肽化合物的“氨基酸残基”简称为“氨基酸”。

[0283] 在本说明书中的术语“N-取代的氨基酸”意指上述定义的氨基酸中主链氨基基团

是N-取代的氨基酸。N-取代的氨基酸的实例具体包括其中氨基酸的主链氨基基团是NHR基团并且R是除氢之外的任何基团的N-取代的氨基酸,例如任选地取代的烷基基团、烯基基团、炔基基团、芳基基团、杂芳基基团、芳烷基基团或环烷基基团,以及其中碳原子与N原子和位置α处的碳原子键合形成环的环状氨基酸(如在脯氨酸中)。其实例包括形成5元环的脯氨酸、形成4元环的氮杂环丁烷和形成6元环的哌啶。每个任选地取代的基团的取代基基团没有特别限制,并且其实例包括卤素基团、醚基团和羟基基团。

[0284] 本发明中的"N-烷基氨基酸"意指上文定义的N-取代氨基酸中主链氨基酸被烷基基团取代的氨基酸。N-烷基氨基酸的实例具体包括N-C_1-C_{10}烷基氨基酸和N-C_1-C_6烷基氨基酸。另外,N-烷基氨基酸的实例具体包括N-甲基氨基酸、N-乙基氨基酸、N-(正丙基)氨基酸和N-(异丙基)氨基酸。

[0285] 本说明书中的"氨基酸"包括各对应的所有同位素。"氨基酸"的同位素是其中至少一个原子被具有相同原子序数(相同质子数)和不同质量数(不同质子数和中子数之和)的原子取代的同位素。本文的"氨基酸"中包括的同位素的实例包括氢原子、碳原子、氮原子、氧原子、磷原子、硫原子、氟原子、氯原子等,并且它们分别包括^{2}H、^{3}H;^{13}C、^{14}C;^{15}N;^{17}O、^{18}O;^{32}P;^{35}S;^{18}F;^{36}Cl等。

[0286] 本说明书中的术语"脯氨酸"意指脯氨酸以及在形成脯氨酸的5元环的任意碳原子上键合有一个或多个任意取代基的化合物的组。当5元环上存在多个取代基时,取代基可以一起形成环,并且该环可以是任何芳香环。"脯氨酸"的实例包括脯氨酸、反式-4-羟基-L-脯氨酸、顺式-4-羟基-L-脯氨酸、反式-4-氟-L-脯氨酸、顺式-4-氟-L-脯氨酸和2-甲基-L-脯氨酸。当脯氨酸具有羟基基团时,羟基基团可以被任意的保护基团保护,或者任意的取代基与羟基基团的氧原子可以形成醚键或酯键。此外,形成5元环的碳原子中的任一者可以被氧原子或硫原子取代。这种化合物的实例具体包括L-硫代脯氨酸。此外,脯氨酸可以在所形成的5元环中具有不饱和键。这种化合物的实例具体包括3,4-脱氢-L-脯氨酸。它们不一定是L型,也可以是D型。

[0287] 在本说明书中,术语"氮杂环丁烷"意指基于以下化合物的环状氨基酸:其中一个氮原子和三个碳原子形成4元环,并且羧基基团与氮原子相邻的碳原子键合。一个或多个任意的取代基可以键合在形成4元环的任意碳原子上。当4元环上存在多个取代基时,取代基可以一起形成环。"氮杂环丁烷"的实例具体包括(S)-氮杂环丁烷-2-羧酸和(R)-氮杂环丁烷-2-羧酸。"氮杂环丁烷"还包括其中羧基基团键合至紧邻氮原子的碳原子形成4元环的化合物。这种化合物的实例包括氮杂环丁烷-3-羧酸。

[0288] 在本说明书中,术语"哌啶"意指基于以下化合物的环状氨基酸:其中一个氮原子和五个碳原子形成6元环,并且羧基基团与氮原子相邻的碳原子键合。一个或多个任意的取代基可以键合在形成6元环的任意碳原子上。当6元环上存在多个取代基时,取代基可以一起形成环,并且该环可以是任何芳香环。"哌啶"的具体实例包括(R)-哌啶-2-羧酸、(S)-哌啶-2-羧酸、(R)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸和(S)-1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸。

[0289] 在本说明书中,芳香族烃溶剂的实例包括苯、甲苯、二甲苯、氯苯、1,2-二氯苯、溴苯、苯甲醚、乙苯、硝基苯和异丙基苯。

[0290] 在本说明书中,卤素溶剂的实例包括二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷和四氯化碳。

[0291] 在本说明书中,醚溶剂的实例包括乙醚、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,4-二噁烷、

1,3-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷、二异丙醚、环戊基甲基醚、叔丁基甲基醚、4-甲基四氢吡喃、二甘醇二甲醚、三甘醇二甲醚和四甘醇二甲醚。

[0292] 在本说明书中,酰胺溶剂的实例包括N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、N,N-二甲基乙酰胺(DMA)、M-乙基吡咯烷酮(NEP)、N-丁基吡咯烷酮(NBP)和甲酰胺。

[0293] 在本说明书中,亚砜溶剂的实例包括二甲基亚砜(DMSO)、二乙基亚砜、甲基乙基亚砜和甲基苯基亚砜。

[0294] 在本说明书中,砜溶剂的实例包括二苯砜、二甲基砜、二乙基砜、环丁砜、3-甲基环丁砜、乙基甲基砜和乙基异丙基砜。

[0295] 在本说明书中,脲溶剂的实例包括1,3-二甲基-2-咪唑烷酮(DMI)和1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2(1H)-嘧啶酮(DMPU)。

[0296] 在本说明书中,酯溶剂的实例包括乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丁酯、丙酸甲酯、乙酸丁酯、乙酸丙酯、乙酸异丙酯、乙酸异丁酯、乙酸戊酯和γ-戊内酯。

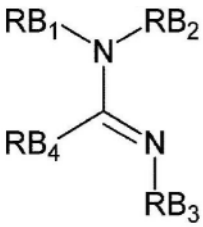
[0297] 在本说明书中,酮溶剂的实例包括丙酮、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、环已酮、环戊酮和二乙基酮。

[0298] 碳酸酯溶剂的实例包括碳酸二甲酯、碳酸二乙酯和碳酸二丁酯。

[0299] 磷酸酯溶剂的实例包括磷酸三甲酯、磷酸三乙酯和磷酸三丁酯。

[0300] 在本说明书中,术语“脒”意指由下式B1表示的碱:

[0301] [Chem.2]

[0302] 

(B1)

[0303] 其中

[0304] RB_1和RB_4各自独立地为C_1-C_4烷基,或RB_1和RB_4和与RB_1键合的氮原子和与RB_4键合的碳原子一起形成5元至8元环。

[0305] RB_2和RB_3各自独立地为C_1-C_4烷基,或者RB_2和RB_3和与RB_2键合的氮原子以及与RB_3键合的氮原子以及与该氮原子键合的碳原子一起形成5元至8元环。

[0306] 当RB_1至RB_4为C_1-C_4烷基时,C_1-C_4烷基优选为甲基或乙基。

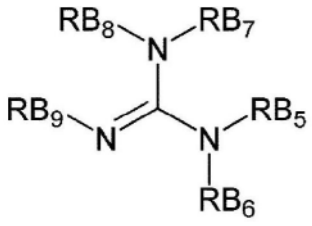
[0307] 当RB_1和RB_4形成5元至8元环时,5元至8元环优选为吡咯烷环、哌啶环、氮杂环庚烷环等。

[0308] 当RB_2和RB_3形成5元至8元环时,5元至8元环优选为1,4,5,6-四氢嘧啶环等。

[0309] 脒的实例具体包括DBU:1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯和DBN:1,5-二氮杂双环[4.3.0]-5-壬烯。

[0310] 在本说明书中,术语“胍”意指由下式B2表示的碱:

[0311] [Chem.3]

[0312] 

(B2)

[0313] 其中

[0314] RB_6为氢或C_1-C_4烷基,

[0315] RB_5和RB_7各自独立地为C_1-C_4烷基,或者和与RB_5和RB_7键合的氮原子以及与氮原子键合的碳原子一起形成5元至8元环,并且

[0316] RB_8为C_1-C_4烷基,或者RB_9为氢、C_1-C_4烷基或苯基,或者RB_8和RB_9和与RB_8和RB_9键合的氮原子以及与氮原子键合的碳原子一起形成5元至8元环,

[0317] 其中,当RB_9为苯基时,两个B2式中可以具有苯基基团的苯环缩合形成的萘。

[0318] 当RB_5至RB_8为C_1-C_4烷基时,C_1-C_4烷基优选为甲基,并且当RB_9为C_1-C_4烷基时,C_1-C_4烷基优选为叔丁基。

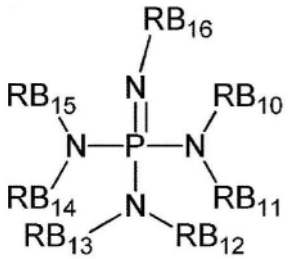
[0319] 当RB_5和RB_7形成5元至8元环时,5元至8元环优选为咪唑烷环、六氢嘧啶环、1,3-二氮杂环庚烷等。

[0320] 当RB_8和RB_9形成5元至8元环时,5元至8元环优选为1,4,5,6-四氢嘧啶环等。

[0321] 胍的实例具体包括TMG:1,1,3,3-四甲基胍,TBD:1,5,7-三氮杂双环[4.4.0]十-5-烯,和MTBD:7-甲基-1,5,7-三氮杂双环[4.4.0]十-5-烯。

[0322] 在本说明书中,术语“磷腈”意指由下式B3或下式B4表示的碱:

[0323] [Chem.4]

[0324] 

(B3)

[0325] 其中

[0326] RB_{10}为C_1-C_4烷基,或者RB_{10}和RB_{11}和与RB_{10}和RB_{11}键合的氮原子一起形成5元至8元环,

[0327] RB_{11}为C_1-C_4烷基,除非RB_{10}和RB_{11}形成5元至8元环,或者RB_{11}和RB_{12}和与RB_{10}和RB_{11}键合的氮原子以及与氮原子键合的磷原子一起形成5元至8元环,

[0328] RB_{12}是C_1-C_4烷基,除非RB_{11}和RB_{12}形成5元至8元环,或者RB_{12}和RB_{13}和与RB_{12}和RB_{13}键合的氮原子一起形成5元至8元环,

[0329] RB_{13}为C_1-C_4烷基,除非RB_{12}和RB_{13}形成5元至8元环,或者RB_{13}和RB_{14}和与RB_{13}和RB_{14}键合的氮原子以及与氮原子键合的磷原子一起形成5元至8元环,

[0330] RB_{14}是C_1-C_4烷基,除非RB_{13}和RB_{14}形成5元至8元环,或者RB_{14}和RB_{15}和与RB_{14}和RB_{15}键合的氮原子一起形成5元至8元环,

[0331] RB_{15}为C_1-C_4烷基,除非RB_{14}和RB_{15}形成5元至8元环,并且

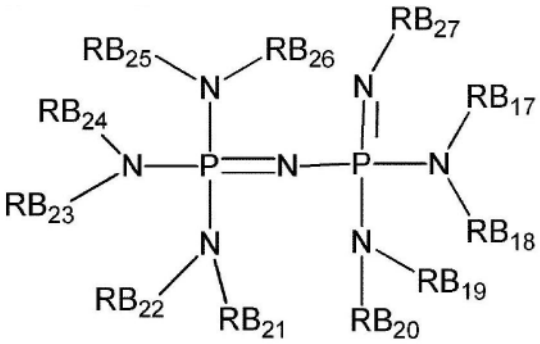
[0332] RB_{16}为氢、C_1-C_8烷基或C_6-C_{10}芳基。

[0333] 当RB_{10}至RB_{15}为C_1-C_4烷基时，C_1-C_4烷基优选为甲基或乙基，并且当RB_{16}为C_1-C_8烷基时，C_1-C_8烷基优选为叔丁基或叔辛基。

[0334] 当RB_{10}和RB_{11}、RB_{12}和RB_{13}、和/或RB_{14}和RB_{15}形成5元至8元环时，5元至8元环优选为吡咯烷环、哌啶环、氮杂环庚烷环等。

[0335] RB_{11}和RB_{12}、和/或RB_{13}和RB_{14}形成5元至8元环，5元至8元环优选为不含有除与RB_{11}、RB_{12}、RB_{13}和RB_{14}键合的氮原子以及与氮原子键合的磷原子以外的杂原子的5元至8元饱和环。

[0336] [Chem.5]

[0337] 

(B4)

[0338] 其中

[0339] RB_{17}独立地为C_1-C_4烷基，或者RB_{17}和RB_{18}和与RB_{17}和RB_{18}键合的氮原子一起形成5元至8元环，

[0340] RB_{18}为C_1-C_4烷基，除非RB_{17}和RB_{18}形成5元至8元环，或者RB_{18}和RB_{19}和与RB_{18}和RB_{19}键合的氮原子以及与氮原子键合的磷原子一起形成5元至8元环，

[0341] RB_{19}是C_1-C_4烷基，除非RB_{18}和RB_{19}形成5元至8元环，或者RB_{19}和RB_{20}和与RB_{19}和RB_{20}键合的氮原子一起形成5元至8元环，

[0342] RB_{20}为C_1-C_4烷基，除非RB_{19}和RB_{20}形成5元至8元环，

[0343] RB_{21}为C_1-C_4烷基，或者RB_{21}和RB_{22}和与RB_{21}和RB_{22}键合的氮原子一起形成5元至8元环，

[0344] RB_{22}为C_1-C_4烷基，除非RB_{21}和RB_{22}形成5元至8元环，或者RB_{22}和RB_{23}和与RB_{22}和RB_{23}键合的氮原子以及与氮原子键合的磷原子一起形成5元至8元环，

[0345] RB_{23}是C_1-C_4烷基，除非RB_{22}和RB_{23}形成5元至8元环，或者RB_{23}和RB_{24}和与RB_{23}和RB_{24}键合的氮原子一起形成5元至8元环，

[0346] RB_{24}为C_1-C_4烷基，除非RB_{23}和RB_{24}形成5元至8元环，或者RB_{24}和RB_{25}和与RB_{24}和RB_{25}键合的氮原子以及与氮原子键合的磷原子一起形成5元至8元环，

[0347] RB_{25}是C_1-C_4烷基，除非RB_{24}和RB_{25}形成5元至8元环，或者RB_{25}和RB_{26}和与RB_{25}和RB_{26}键合的氮原子一起形成5元至8元环，

[0348] RB_{26}为C_1-C_4烷基，除非RB_{25}和RB_{26}形成5元至8元环，

[0349] RB_{27}为C_1-C_4烷基或C_6-C_{10}芳基。

[0350] 当RB_{17}至RB_{26}为C_1-C_4烷基时，C_1-C_4烷基优选为甲基或乙基，并且当RB_{27}为C_1-C_4烷基时，C_1-C_4烷基优选为乙基或叔丁基。

[0351] 当RB_{17}和RB_{18}、RB_{19}和RB_{20}、RB_{21}和RB_{22}、RB_{23}和RB_{24}、和/或RB_{25}和RB_{26}形成5元至8元环

时,5元至8元环优选为吡咯烷环、哌啶环、氮杂环庚烷环等。

[0352] 当RB_{17}和RB_{18}均为C_1-C_4烷基时,优选RB_{19}和RB_{20}均为C_1-C_4烷基,并且优选RB_{17}和RB_{18}形成5元至8元环并且RB_{19}和RB_{20}也形成5元至8元环。

[0353] 当RB_{21}和RB_{22}均为C_1-C_4烷基时,优选RB_{23}、RB_{24}、RB_{25}和RB_{26}全部为C_1-C_4烷基,并且优选RB_{21}和RB_{22}形成5元至8元环并且RB_{23}和RB_{24}以及RB_{25}和RB_{26}分别形成5元至8元环。

[0354] RB_{18}和RB_{19}、和/或RB_{22}和RB_{23}形成5元至8元环,5元至8元环优选为不含有除与RB_{11}、RB_{12}、RB_{13}和RB_{14}键合的氮原子以及与氮原子键合的磷原子以外的杂原子的5元至8元饱和环。

[0355] 磷腈的具体实例包括P2tBu:1-叔丁基-2,2,4,4,4-五(二甲基氨基)-2λ^5,4λ^5-连二(磷腈),P2Et:四甲基(三(二甲基氨基)正膦亚基)磷酸三酰胺-乙亚胺,HP1(dma):亚氨基-三(二甲基氨基)膦,BTPP:叔丁基亚氨基-三(吡咯烷)膦,P1tBu:叔丁基亚氨基-三(二甲氨基)膦和BEMP:2-叔丁基氨基-2-二乙基氨基-1,3-二甲基全氢-1,3,2-二氮杂膦。

[0356] 在本说明书中,术语“和/或”意在包括术语“和”和“或”适当组合的每种组合。具体地,例如,术语“A、B和/或C”包括以下七种变体:

[0357] (i)A,(ii)B,(iii)C,(iv)A和B,(v)A和C,(vi)B和C,以及(vii)A、B和C。

[0358] (生产方法)

[0359] 本发明涉及一种用于通过固相法生产肽的方法,该方法包括以下步骤(1)至(3):

[0360] (1)提供具有含有Fmoc骨架的保护基团且负载于固相上的第一肽;

[0361] (2)在步骤(1)后,将第一肽在含有亚砜溶剂的溶剂中用在乙腈中作为共轭酸的一种或多种碱(至少包括具有23或更大的pKa的碱)来处理;和

[0362] (3)在步骤(2)后,在溶剂中,在存在或不存在缩合剂的情况下,将第一肽与羧酸或羧酸类似物缩合,以得到第三肽。

[0363] 步骤(2)中的术语“第一肽”意指具有含有Fmoc骨架的保护基团的第一肽。

[0364] 步骤(1)

[0365] 本发明中的步骤(1)是提供具有含有Fmoc骨架的保护基团且负载于固相上的第一肽的步骤。

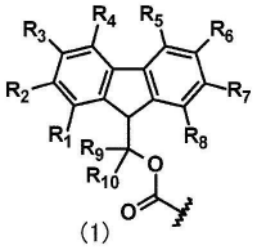
[0366] 步骤(1)中的“具有含有Fmoc骨架的保护基团并负载在固相上的第一肽”通常通过其C末端氨基酸残基中的官能团(例如羧基)负载在固相合成树脂上,但可以通过C末端以外的氨基酸残基中的官能团(例如羧基)负载在固相上。在“具有含有Fmoc骨架的保护基团并负载于固相上的第一肽”的N末端的氨基酸残基的氨基被含有Fmoc骨架的保护基团保护。

[0367] 作为负载第一肽的固相,可以使用相关领域中已知的任何固相,并且通常,树脂与第一肽的预定氨基酸残基(例如C末端处的氨基酸残基)连接。特别优选的是,树脂具有按照固相合成手册(Merck发行,2002年5月1日出版)中描述的酸敏感性分级为“H(DCM中TFA＜5%)”的树脂键合基团,并且可以根据所使用的氨基酸侧的官能团适当地选择树脂。

[0368] 例如,当使用羧酸(以Asp或Glu为代表的主链羧酸或侧链羧酸)或芳香环上的羟基(以Tyr为代表的酚基基团)作为氨基酸侧上的官能团时,优选使用三苯甲基氯树脂(Trt树脂)或2-氯三苯甲基氯树脂(Clt树脂)作为树脂。当使用脂肪族羟基(以Ser或Thr为代表的脂肪族醇基团)作为氨基酸侧的官能团时,优选使用三苯甲基氯树脂(Trt树脂)、2-氯三苯甲基氯树脂(Clt树脂)或4-甲基三苯甲基氯树脂(Mtt树脂)作为树脂。

[0369] 在本发明中,“含有Fmoc骨架的保护基团”意指在Fmoc基团或构成Fmoc基团的骨架上的任意位置引入任意取代基的基团。含有Fmoc骨架的这样的保护基团的实例具体包括可以由下述式(1)表示的保护基团:

[0370] [Chem.6]

[0371] 

[0372] 其中

[0373] R_1至R_8独立地选自由以下组成的组:氢、C_1-C_8烷基、C_1-C_8氟烷基、卤素、磺基和三甲基甲硅烷基;并且

[0374] R_9至R_{10}各自为氢或甲基。

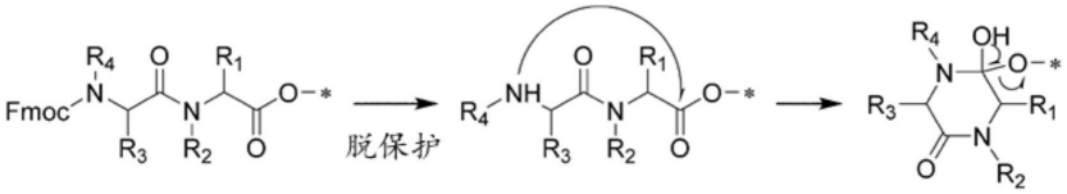
[0375] 含有Fmoc骨架的保护基团的实例更具体地包括9-芴基甲氧基羰基(Fmoc)基团、2,7-二叔丁基-Fmoc(Fmoc(2,7tb))基团、1-甲基-Fmoc(Fmoc(1Me))基团、2-氟-Fmoc(Fmoc(2F))基团、2,7-二溴-Fmoc(Fmoc(2,7Br))基团、2-单异辛基-Fmoc(mio-Fmoc)基团、2,7-二异辛基-Fmoc(dio-Fmoc)基团、2,7-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-十三氟辛基)-Fmoc(tdf-Fmoc)基团、2,7-双(三甲基甲硅烷基)-Fmoc(Fmoc(2TMS))基团、(2-磺基-9H-芴-9-基)甲氧基羰基基团(Fmoc(2so3h))、[(1S)-1-(9H-芴-9-基)乙氧基]羰基(sm-Fmoc)和[(1R)-1-(9H-芴-9-基)乙氧基]羰基基团(rm-Fmoc)。含有Fmoc骨架的这样的保护基团,优选为Fmoc基团。这样的含有Fmoc骨架的保护基团可以使用可商购试剂等通过公知的方法引入。

[0376] 在本发明中,构成第一肽的氨基酸残基的类型和数量不受限制,并且具有包括2个或更多个氨基酸残基的任何氨基酸序列的肽,例如2至30、2至20、2至15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2个氨基酸残基可用作第一肽。对于氨基酸,可以使用天然氨基酸和/或非天然氨基酸。优选的是,第一肽含有一个或多个N-取代的氨基酸。

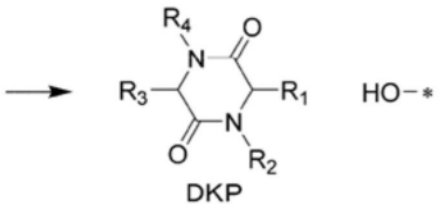
[0377] 步骤(1)中提供的具有含有Fmoc骨架的保护基团的第一肽(例如含有Fmoc骨架的保护基团并负载在固相上的第一肽)可以由商业供应商获得,或通过应用相关领域已知的方法生产,例如WO 2013/100132或WO 2018/225864中所示的方法。

[0378] 在某些方面,第一肽是二肽。在这种情况下,二肽的C末端的氨基酸残基例如通过酯键负载在固相上,并且如以下方案所示,去除保护基团而产生游离氨基基因为N末端的氨基酸残基可能与酯键中的羰基基团反应,导致形成不良的DKP。通过使用本发明的方法,可以抑制由于DKP消除而导致的目标肽产率的降低。

[0379] [Chem.7]



[0380]

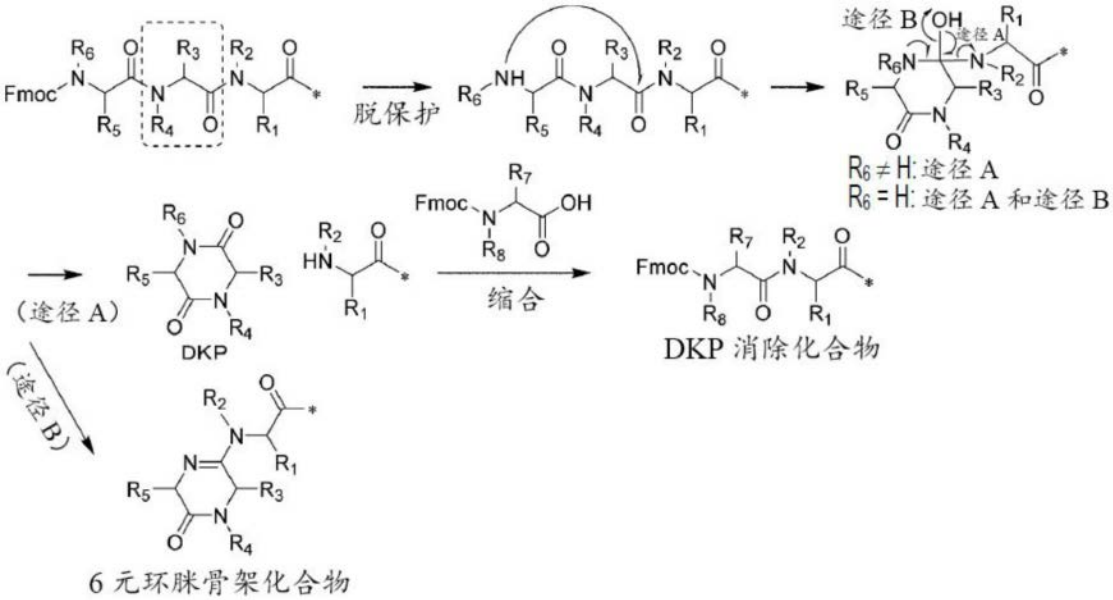


[0381] 其中R_1至R_4各自表示任意原子或基团,并且*表示与固相合成树脂键合的位置。

[0382] 在某些方面,第一肽是其中从其N末端起的第二个残基处的氨基酸是“N-取代的氨基酸”的肽。在这种情况下,如下方案所示,去除N末端氨基酸残基的保护基团而产生的游离氨基基团可以与N末端起的第二个残基和第三个残基的氨基酸之间的肽键中的羰基基团反应,使得可以形成不希望的DKP、DKP消除化合物或具有脒骨架的杂质(6元环脒骨架化合物)。通过使用本发明的方法,可以抑制DKP、DKP消除化合物和6元环脒骨架化合物的形成,从而防止目标肽的产率降低。

[0383] [Chem.8]

[0384]



[0385] 其中R_4表示除氢外的任意原子或基团,R_1至R_3和R_5至R_8各自表示任意原子或基团,并且*表示与相邻氨基酸残基或固相键合的位置,其中当R_6为氢时,可以通过该方案中的途径A和途径B,当R_6不为氢时,可以仅通过途径A。

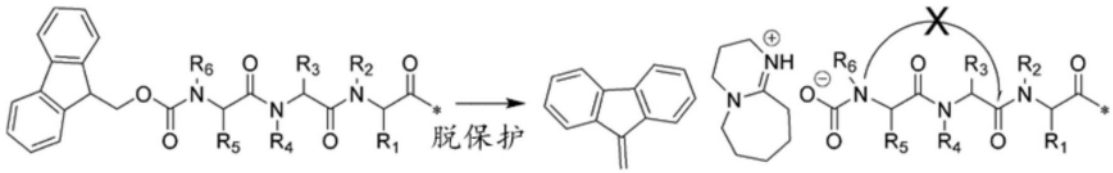
[0386] 作为本发明中的“N-取代的氨基酸”,优选列举通过诸如N-甲基化等N-烷基化而得到的N-烷基氨基酸以及诸如脯氨酸和氮杂环丁烷等环状氨基酸。

[0387] 步骤(2)

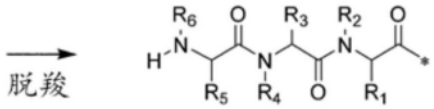
[0388] 本发明的步骤(2)是将在步骤(1]中提供的第一肽在含有亚砜溶剂的溶剂中用在乙腈中作为共轭酸的一种或多种碱(至少包括具有23或更大的pKa的碱)来处理步骤。

[0389] 在某些方面,步骤(2)中获得的第一肽的至少一部分是氨基甲酸盐的形式。不受特定理论的束缚,在步骤(2)中,在第一肽的至少部分中没有进行脱羧以除去含有Fmoc骨架的保护基团的情况下形成二苯富烯,因此N末端的氨基与衍生自保护基团的C(=O)O⁻形成氨基甲酸盐离子(-NRC(=O)O⁻,其中R为氢或氨基基团的任意取代基),并且氨基甲酸盐离子与系统中质子化的碱形成氨基甲酸盐(以下为显示当Fmoc用作含有Fmoc骨架的保护基团并且以DBU用作碱时形成氨基甲酸盐的示意图)。

[0390] [Chem.9]



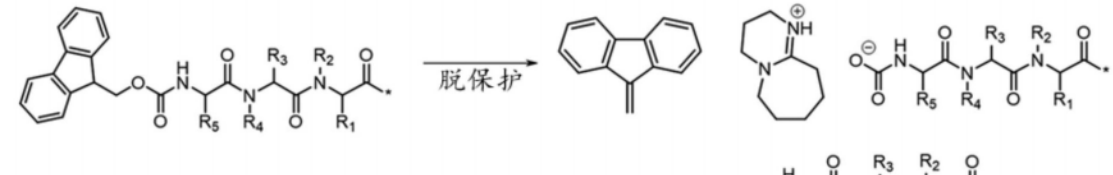
[0391]



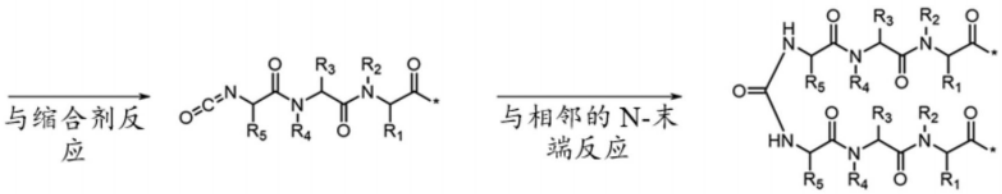
[0392] 当形成氨基甲酸盐时,可以抑制末端氨基基团的分子内亲核反应,因此即使在碱性脱保护条件下,也可以抑制6元环中间体的形成,从而减少作为副产物的DKP消除化合物和6元环脒骨架化合物的形成。

[0393] 在某些方面,步骤(2)中获得的第一肽的至少一部分是氨基甲酸盐的形式。不受特定理论的束缚,认为当氨基甲酸盐稳定地存在直至步骤(3)时,通过缩合剂与氨基甲酸阴离子反应形成的异氰酸酯经历相邻N末端的氨基基团的亲核攻击,从而发生分子间的反应(本文中,即使分子负载在同一固相上,也使用术语“分子间”),以形成二聚脲化合物。

[0394] [Chem.10]



[0395]



[0396] 因此,在步骤(2)中处理混合物的步骤(例如,洗涤固相合成树脂的步骤)中,可以将氨基甲酸盐分解并转化为胺化合物,以减少步骤(3)中的二聚脲化合物的形成。

[0397] 在本发明的方法中,其中在步骤(2)中使用在乙腈中作为共轭酸具有23或更大的pKa的碱,第一肽可以氨基甲酸盐的形式存在,这能够显著减少DKP消除化合物和6元环脒骨架化合物的形成。例如,在本发明的方法中,可以以使得氨基甲酸盐与随着脱羧的进行而额外形成的胺形式的摩尔比(氨基甲酸盐/胺)为0.6或更大、0.8或更大、1.0或更大、2.0或更大、3.0或更大、4.0或更大、4.6或更大、5.0或更大、6.0或更大、8.0或更大或10.0或更大的量形成氨基甲酸盐。这样的摩尔比率如可以由使用第一个肽中在N末端含有Fmoc骨架的保护基团的氨基酸的酰胺化合物(例如二甲基酰胺化合物)用碱处理后的溶液的^{1}H-NMR中的

质子积分比来确定。

[0398] 氨基甲酸盐是在乙腈中作为共轭酸具有23或更大的pKa的任意碱的盐。这种盐的实例具体包括DBU盐、TMG盐、HP1(dma)盐、MTBD盐、P1-tBu盐和P2-Et盐。

[0399] 在某些方面,步骤(2)中使用的溶剂可以含有亚砜溶剂,并且可以是单一溶剂或混合溶剂。在混合溶剂的情况下,优选溶剂含有50v/v%或更多、70v/v%或更多、或者90v/v%或更多的亚砜溶剂。

[0400] 步骤(2)中使用的亚砜溶剂的实例具体包括二甲基亚砜(DMSO)、二乙基亚砜、甲基乙基亚砜和甲基苯基亚砜,其中优选DMSO。

[0401] 当步骤(2)中使用的溶剂为混合溶剂时,除亚砜溶剂外,该混合溶剂可以含有选自由芳香烃溶剂、卤素溶剂、醚溶剂、酯溶剂、酮溶剂、碳酸酯溶剂、磷酸酯溶剂、酰胺溶剂、脲溶剂和砜溶剂组成的组中的一种或多种溶剂。

[0402] 在某些方面,当步骤(2)中使用的溶剂为混合溶剂时,除了亚砜溶剂外,混合溶剂还可含有选自由酰胺溶剂、脲溶剂和砜溶剂组成的组中的一种或多种溶剂。

[0403] 当步骤(2)中使用芳族烃溶剂时,溶剂的实例具体包括苯、甲苯、二甲苯、氯苯、1,2-二氯苯、溴苯、苯甲醚、乙苯、硝基苯和异丙基苯,其中优选甲苯和异丙基苯。

[0404] 当步骤(2)中使用卤素溶剂时,溶剂的实例具体包括二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷和四氯化碳,其中优选二氯甲烷。

[0405] 当步骤(2)中使用醚溶剂时,溶剂的实例具体包括二乙醚、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,4-二噁烷、1,3-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷(DME)、二异丙醚、环戊基甲基醚(CPME)、叔丁基甲基醚、4-甲基四氢吡喃、二甘醇二甲醚、三甘醇二甲醚和四甘醇二甲醚,其中优选四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,2-二甲氧基乙烷和1,3-二氧戊环。

[0406] 当步骤(2)中使用酯溶剂时,溶剂的实例具体包括乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丁酯、丙酸甲酯、乙酸丁酯、乙酸丙酯、乙酸异丙酯、乙酸异丁酯、乙酸戊酯和γ-戊内酯,其中优选乙酸丁酯和丙酸甲酯。

[0407] 当步骤(2)中使用酮溶剂时,溶剂的实例具体包括丙酮、甲基乙基酮(MEK)、甲基异丁基酮、环己酮、环戊酮和二乙基酮(3-戊酮),其中优选甲基乙基酮和二乙基酮。

[0408] 当步骤(2)中使用碳酸酯溶剂时,溶剂的实例具体包括碳酸二甲酯、碳酸二乙酯和碳酸二丁酯,其中优选碳酸二甲酯。

[0409] 当步骤(2)中使用磷酸酯溶剂时,溶剂的实例具体包括磷酸三甲酯、磷酸三乙酯和磷酸三丁酯,其中优选磷酸三丁酯。

[0410] 当步骤(2)中使用酰胺溶剂时,溶剂的实例具体包括N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、N,N-二甲基乙酰胺(DMA)、M-乙基吡咯烷酮(NEP)、N-丁基吡咯烷酮(NBP)和甲酰胺。

[0411] 当步骤(2)中使用尿素溶剂时,溶剂的实例具体包括1,3-二甲基-2-咪唑烷酮(DMI)和1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2(1H)-嘧啶酮(DMPU)。

[0412] 当步骤(2)中使用砜溶剂时,溶剂的实例具体包括二苯砜、二甲砜、二乙砜、环丁砜、3-甲基环丁砜、乙基甲基砜和乙基异丙基砜。

[0413] 在某些方面,用于步骤(2)的溶剂的固相树脂溶胀能力优选为1.5mL/g或更高、2.0mL/g或更高、2.5mL/g或更高、3.0mL/g或更高、3.5mL/g或更高或者4.0mL/g或更高。作为

各溶剂的固相树脂溶胀能力的指标,采用"Tetrahedron Lett.,1998,39,8951-8954","Org.Process Res Dev.2018,22,494-503"或"RSC Adv.,2020,10,42457-42492"中所述的值。固相树脂溶胀能力(mL/g)具体如下:DMI:8.5;DMPU:8.0;NMP:6.4;THF:6.0;DMA:5.8;$CHCl_3$:5.6;CPME:5.6;CH_2Cl_2:5.4;2-甲基四氢呋喃:5.4;DMF:5.2;乙酸丁酯:5.2;DME:4.8;MEK:4.4;甲苯:4.0;AcOEt:4.2;二甲苯:3.0;Et2O:2.8;碳酸二甲酯:2.8;MTBE:2.4;CH_3CN:2.0;磷酸三丁酯:1.6;MeOH:1.6;和H_2O:1.6。另外,可以采用"Green Chem.,2017,19,952-962"中描述的表、"Green Chem.,2020,22,996-1018"中的表2等中的估计。

[0414] 在步骤(2)中,使用一种或多种碱,其至少包括在乙腈中作为共轭酸具有23或更大的pKa的碱。当仅使用一种碱时,该碱是在乙腈中作为共轭酸具有23或更大的pKa的碱。另一方面,当使用多种碱时,至少一种碱是在乙腈中作为共轭酸具有23的pKa的碱,并且其他碱可以是在乙腈中作为共轭酸具有23或更大,或者小于23的pKa的碱。

[0415] 步骤(2)中使用的在乙腈中作为共轭酸具有23或更大的pKa的碱可以是pKa为34或更小、优选为30或更小、更优选为28或更小的碱。

[0416] pKa是碱性程度的指标,并且pKa越大,碱性越高。作为本发明中的在乙腈中作为共轭酸的有机碱的pKa(pKa(CH_3CN)),采用"New J.Chem.2009,33,588"[1],"Sigma-Aldrich,Phosphazene Bases:https://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemical-synthesis/technology-spotlights/phosphazenes.html"[2],或"Eur.J.Org.Chem.2019,6735-6748"等中所示的值。

[0417] 作为在乙腈中作为共轭酸具有23或更大的pKa的碱的实包括脒、胍、磷腈,并且例如下述的碱均具有23或更大的pKa。

[0418] DBU:pKa[1]=24.3

[0419] DBN:pKa[1]=23.8

[0420] TMG:pKa[1]=23.3

[0421] TBD:pKa[1]=26.0

[0422] MTBD:pKa[1]=25.5

[0423] P2tBu:pKa[1]=33.5

[0424] P2Et:pKa[1]=32.9

[0425] HP1(dma):pKa[1]=25.9

[0426] BTPP:pKa[2]=28.4

[0427] P1tBu:pKa[1]=27.0

[0428] BEMP:pKa[2]=27.6

[0429] 当在该步骤中使用在乙腈中作为共轭酸具有23或更大的pKa的多种碱时,例如两种或多种,可以组合使用选自脒、胍和磷腈的两种碱。作为此类碱的具体组合,优选列举DBU与MTBD、DBU与HP1(dma)、DBU与P1tBu、DBU与P2Et等的组合。

[0430] 当在该步骤中组合使用在乙腈作为共轭酸具有23或更大的pKa的碱和小于23的pKa的碱时,在乙腈中作为共轭酸具有23或更大的pKa的碱可以选自例如脒、胍和磷腈。在乙腈中作为共轭酸具有小于23的pKa的碱优选选自哌啶、哌嗪和吗啉。作为此类碱的具体组合,优选列举DBU与哌啶的组合。

[0431] 在某些方面,步骤(2)可以在步骤(3)前重复两次或更多次。在这种情况下,在重复

步骤(2)时,可以使用相同的溶剂和/或相同的碱,或者可以使用不同的溶剂和/或不同的碱。在本发明中,术语“相同溶剂”意指溶剂的类型和混合比相同,术语“不同溶剂”意指溶剂的类型和混合比之一不同或两者均不同。在本发明中,术语“相同的碱”意指碱的类型和溶剂中碱的浓度相同,术语“不同的碱”意指碱的类型和溶剂中碱的浓度之一不同或两者均不同。

[0432] 在某些方面,本发明的方法可以包括当步骤(2)重复两次或更多次时,在步骤(2)的重复之间排出溶液的步骤。这使得能够将在前一次步骤(2)的重复中使用的溶剂和/或碱替换为在下一次步骤(2)的重复中使用的溶剂和/或碱。

[0433] 在某些方面,步骤(2)是除去含有Fmoc骨架的保护基团的步骤,和/或将第一肽中含有Fmoc骨架的保护基团转化为氨基甲酸盐形式的步骤。

[0434] 在某些方面,除去第一肽中含有Fmoc骨架的保护基团的步骤基本上仅在步骤(2)中进行。

[0435] 在某些方面,本发明的方法不包括在步骤(2)前用在乙腈中作为共轭酸具有小于23的pKa的单一碱例如哌啶来处理第一肽的步骤。具体地,本发明可以排除其中步骤(1)中提供的具有含有Fmoc骨架的保护基团的第一肽在任何溶剂中(例如在DMF中)使用在乙腈中作为共轭酸(例如哌啶)具有小于23的pKa的碱进行处理的方面,并且随后进行本发明的步骤(2)(例如用DBU或DBU与哌啶的组合在含有DMSO的溶剂中处理)。

[0436] 在某些方面,用于步骤(2)的碱可以以使得该步骤的反应能够进行的任何浓度包含在溶剂中。具体地,浓度范围为例如为0.25至20v/v%、0.5至20v/v%、1至20v/v%、1至15v/v%、1至10v/v%、1至9v/v%、1至8v/v%、1至7v/v%、1至6v/v%、1至5v/v%、1至4v/v%、1至3v/v%或1至2v/v%,优选地1至8v/v%。

[0437] 在某些方面,步骤(2)可以进一步包括使溶剂与CO_2接触的步骤。在某些方面,用于步骤(2)的溶剂可以是在该步骤前与CO_2接触的溶剂。可以通过例如用CO_2使溶剂鼓泡来使溶剂与CO_2接触。通过在步骤(2)期间或步骤(2)前使溶剂与CO_2接触,可以将CO_2引入到反应系统中。不受特定理论的束缚,在步骤(2)中,N末端氨基基团在第一肽的至少部分中与用衍生自保护基团中的C(=O)O⁻质子化的碱形成氨基甲酸盐,并且通过将CO_2掺入到反应系统中,可以更容易地将反应系统中的胺形式转化为氨基甲酸盐。因此,通过向反应系统中通入CO_2,可以进一步减少反应过程中胺形式的量,以进一步抑制末端氨基基团的分子内亲核反应,使得即使在碱性脱保护条件下,也能进一步抑制6元环中间体形成,以进一步减少作为副产物的DKP消除化合物和6元环脒骨架化合物的形成。

[0438] 在某些方面,步骤(2)的反应可以在-100℃至接近溶剂沸点的温度、优选0℃至50℃进行。步骤(2)的反应可以进行1分钟至1周,优选1分钟至3小时、3分钟至3小时或5分钟至3小时,更优选1分钟至20分钟、3分钟至20分钟或5分钟至20分钟。

[0439] 步骤(3)

[0440] 本发明的步骤(3)是在步骤(2)后,在溶剂中,在存在或不存在缩合剂的情况下,将第一肽与羧酸或羧酸类似物缩合,得到第三肽的步骤。在该步骤中,第一肽的N末端的氨基基团与羧酸的羧基基团缩合,合成第三肽。

[0441] 在某些方面,用于步骤(3)的羧酸可以是具有保护基团的氨基酸、具有保护基团的第二肽、C_1-C_8烷基羧酸或C_6-C_{10}芳基羧酸。

[0442] 在某些方面,用于步骤(3)的羧酸类似物可以是羧酸的活性酯或羧酸的酰卤。

[0443] 通过使用具有保护基团的氨基酸的活性酯、具有保护基团的第二肽、C_1-C_8烷基羧酸或C_6-C_{10}芳基羧酸,步骤(3)的缩合反应可以在不存在缩合剂的情况下进行。活性酯的实例具体包括:其中上述化合物中的羰基基团(特别是当该化合物为第二肽时,第二肽的C末端的氨基酸残基中含有的羰基基团)与能够促进与胺的反应的基团键合的酯,例如O-(苯并三唑-1-基)基团(OBt)、O-(7-氮杂苯并三唑-1-基)基团(OAt)、N-羟基琥珀酰亚胺基基团(OSu)、五氟苯氧基基团(OPfp)、S-R_{11}(其中R_{11}表示氢原子、任选地具有取代基的烷基基团、任选地具有取代基的芳基基团、任选地具有取代基的芳烷基基团、任选地具有取代基的环烷基基团、任选地具有取代基的杂芳基基团、任选地具有取代基的烯基基团或任选地具有取代基的亚烷基基团)等。

[0444] 通过使用具有保护基团的氨基酸的酰卤、具有保护基团的第二肽、C_1-C_8烷基羧酸或C_6-C_{10}芳基羧酸,步骤(3)的缩合反应可以在不存在缩合剂的情况下进行。酰卤的实例具体包括其中的羧基基团(特别是当该化合物为第二肽时,将第二肽的C末端的氨基酸残基中所含的羧基基团)转化为氯羰基基团、氟羰基基团、溴羰基基团、碘羰基基团的酰卤。

[0445] 当步骤(3)中使用的羧酸或羧酸类似物,例如氨基酸或第二肽具有保护基团时,所述保护基团可以是氨基甲酸酯型保护基团、磺酰基型保护基团或酰基型保护基团。

[0446] 在本说明书中,术语"氨基甲酸酯型保护基团"在指构成氨基甲酸酯结构的保护基团,并且包括例如具有Fmoc骨架的保护基团、Alloc、Teoc、Boc、Cbz和2,2,2-三氯乙氧基羰基基团(Troc)。术语"磺酰基型保护基团"意指具有磺酰基结构的保护基团,并且包括例如甲磺酰基(Ms)基团、对甲苯磺酰基(Ts)基团、2-硝基苯磺酰基(Ns)基团、三氟甲磺酰基(Tf)基团和(2-三甲基甲硅烷基)-乙磺酰基(SES)基团。术语"酰基型保护基"意指具有酰基结构的保护基,并且包括例如乙酰基基团、新戊酰基基团、苯甲酰基基团、三氟乙酰基(Tfa)基团。

[0447] 在某些方面,当步骤(3)中使用的羧酸或羧酸类似物是具有含有Fmoc骨架的保护基团的氨基酸时,用含有Fmoc的保护基团保护的任何天然或非天然氨基酸可以是用于具有含有Fmoc骨架的保护基团的氨基酸。

[0448] 在某些方面,当步骤(3)中使用的羧酸或羧酸类似物是具有含有Fmoc骨架的保护基团的第二肽时,构成具有含有Fmoc骨架的保护基团的第二肽的氨基酸残基的类型和数量不受限制,只要该肽的N末端氨基酸被含有Fmoc骨架的保护基保护,以及具有包括两个或更多个天然和/或非天然氨基基酸残基的任何氨基酸序列的肽。优选的是,第二肽含有一个或多个N-取代的氨基酸。

[0449] 在某些方面,当用于步骤(3)的羧酸或羧酸类似物是C_1-C_8烷基羧酸、C_6-C_{10}芳基羧酸或其活性酯或酰卤时,这种化合物任选地被独立地选自由以下组成的组的一个或多个取代基取代:烯基、炔基、烷氧基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环基、芳基烷基、杂芳基烷基、卤素、硝基、二烷基氨基、氰基、烷氧基羰基和二烷基氨基羰基。C_1-C_8烷基羧酸或其活性酯或酰卤优选为C_1-C_4烷基羧酸或其活性酯或酰卤,并且其实例具体包括乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、及其活性酯或酰卤。C_6-C_{10}芳基羧酸或其活性酯或酰卤的实例具体包括苯甲酸、萘甲酸及其活性酯或酰卤。

[0450] 在步骤(3)中,可以使用相对于第一肽为1至20当量、优选地2至10当量的具有含有

Fmoc骨架的保护基团的氨基酸,或具有含有Fmoc骨架的保护基的第二肽。

[0451] 在某些方面,优选地,第一肽和/或具有含有Fmoc骨架的保护基团的第二肽含有至少一个N-取代的氨基酸。具有含有Fmoc骨架的保护基团的氨基酸优选为N-取代的氨基酸。

[0452] 在某些方面,用于步骤(3)的氨基酸或第二肽中的含有Fmoc骨架的保护基团可以与用于步骤(1)的第一肽中的含有Fmoc骨架的保护基团相同或不同。

[0453] 在某些方面,步骤(3)中使用的溶剂可含有芳香烃溶剂、卤素溶剂、醚溶剂、酰胺溶剂、亚砜溶剂、砜溶剂、脲溶剂、酯溶剂、酮溶剂、碳酸酯溶剂和磷酸酯溶剂中的至少一者,并且可以是单一溶剂或混合溶剂。当步骤(3)中使用的溶剂为混合溶剂时,优选该溶剂含有芳香烃溶剂、卤素溶剂、醚溶剂、酰胺溶剂、亚砜溶剂、砜溶剂、脲溶剂、酯溶剂、酮溶剂、碳酸酯溶剂和磷酸酯溶剂中的至少一者,含量为25v/v%或更多、50v/v%或更多、或者75v/v%或更多。

[0454] 当步骤(3)中使用芳族烃溶剂时,溶剂的实例具体包括苯、甲苯、二甲苯、氯苯、1,2-二氯苯、溴苯、苯甲醚、乙苯、硝基苯和异丙基苯,其中优选甲苯和异丙基苯。

[0455] 当步骤(3)中使用卤素溶剂时,溶剂的实例具体包括二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷和四氯化碳,其中优选二氯甲烷。

[0456] 当步骤(3)中使用醚溶剂时,溶剂的实例具体包括二乙醚、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,4-二噁烷、1,3-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷、二异丙醚、环戊基甲基醚、叔丁基甲基醚、4-甲基四氢吡喃、二甘醇二甲醚、三甘醇二甲醚和四甘醇二甲醚,其中优选四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、1,2-二甲氧基乙烷和1,3-二氧戊环。

[0457] 当步骤(3)中使用酰胺溶剂时,溶剂的实例具体包括N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、N,N-二甲基乙酰胺(DMA)、M-乙基吡咯烷酮(NEP)、N-丁基吡咯烷酮(NBP)和甲酰胺,其中优选DMF和NMP。

[0458] 当步骤(3)中使用亚砜溶剂时,溶剂的实例具体包括二甲基亚砜(DMSO)、二乙基亚砜、甲基乙基亚砜和甲基苯基亚砜,其中优选DMSO。

[0459] 当步骤(3)中使用砜溶剂时,溶剂的实例具体包括二苯砜、二甲砜、二乙砜、环丁砜、3-甲基环丁砜、乙基甲基砜和乙基异丙基砜。

[0460] 当步骤(3)中使用尿素溶剂时,溶剂的实例具体包括1,3-二甲基-2-咪唑烷酮(DMI)和1,3-二甲基-3,4,5,6-四氢-2(1H)-嘧啶酮(DMPU),其中优选DMI。

[0461] 当步骤(3)中使用酯溶剂时,溶剂的实例具体包括乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丁酯、丙酸甲酯、乙酸丁酯、乙酸丙酯、乙酸异丙酯、乙酸异丁酯、乙酸戊酯和γ-戊内酯,其中优选乙酸乙酯、乙酸丁酯和丙酸甲酯。

[0462] 当步骤(3)中使用酮溶剂时,溶剂的实例具体包括丙酮、甲基乙基酮、甲基异丁基酮、环己酮、环戊酮和二乙基酮,其中优选甲基乙基酮和二乙基酮。

[0463] 当步骤(3)中使用碳酸酯溶剂时,溶剂的实例具体包括碳酸二甲酯、碳酸二乙酯和碳酸二丁酯,其中优选碳酸二甲酯。

[0464] 当步骤(3)中使用磷酸酯溶剂时,溶剂的实例具体包括磷酸三甲酯、磷酸三乙酯和磷酸三丁酯,其中优选磷酸三丁酯。

[0465] 当步骤(3)中使用的溶剂为混合溶剂时,该混合溶剂可以包括选自芳香烃溶剂、卤素溶剂、醚溶剂、酰胺溶剂、亚砜溶剂、砜溶剂、脲溶剂、酯溶剂、酮溶剂、碳酸酯溶剂和磷酸

酯溶剂的两种或多种溶剂,并且可以含有其他溶剂。

[0466] 当步骤(3)中使用的溶剂为单一溶剂时,该溶剂优选为甲苯、异丙基苯、1,2-二氯苯、苯、苯甲醚、二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、环戊基甲基醚、4-甲基四氢吡喃、1,4-二噁烷、1,2-二甲氧基乙烷、1,3-二噁烷、DMF、NMP、DSMO、DMI、DMPU、乙酸乙酯、乙酸异丙酯、乙酸丁酯、丙酸甲酯、丙酮、甲基乙基酮、二乙基酮、碳酸二甲酯、碳酸二乙酯、磷酸三甲酯、磷酸三丁酯、环丁砜或3-甲基环丁砜。

[0467] 在某些方面,步骤(3)中使用的溶剂可以与步骤(2)中使用的溶剂相同。

[0468] 作为步骤(3)中使用的溶剂,优选使用可溶解缩合剂的溶剂。在本发明中,步骤(2)中使用的碱可以残留,并且残留的碱可能导致氨基酸或肽过度延长的副产物的形成。当步骤(3)中使用可溶解缩合剂的溶剂时,可以抑制这种过度延长化合物的形成。

[0469] 在某些方面,步骤(3)中使用的缩合剂是盐的形式,并且其抗衡阴离子是PF_6^-或BF_4^-。这种缩合剂的实例具体包括PyOxim([乙基氰基(羟基亚氨基)乙酸根合-O^2]三-1-吡咯烷基鏻六氟磷酸酯)、PyAOP((7-氮杂苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷鏻六氟磷酸酯)、PyBOP(苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷鏻六氟磷酸鏻)、COMU((1-氰基-2-乙氧基-2-氧亚乙基氨基氧基)二甲基氨基吗啉碳鎓六氟磷酸酯)、HATU(O-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯)、HBTU(1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-苯并三唑鎓3-氧化物六氟磷酸酯、HCTU(O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯)、TDBTU(O-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯)、HOTU(O-[(乙氧基羰基)氰基亚甲基氨基]-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯)、TATU(1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物四氟硼酸酯)、TBTU(1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-苯并三唑鎓3-氧化物四氟硼酸酯)、TCTU(O-(6-氯-1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯)和TOTU(O-[乙氧基羰基)氰基亚甲基氨基]-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯)。

[0470] 在某些方面,优选地,用于步骤(3)的缩合剂含有选自由PyOxim、PyAOP、PyBOP、COMU、HATU、HBTU、HCTU、TDBTU、HOTU、TATU、TBTU、TCTU和TOTU组成的组中的至少一者,并且更优选使用这些化合物中的任何一者。

[0471] 在某些方面,步骤(3)的缩合反应可以在碱存在下进行。碱的种类只要有助于缩合反应的进行即可,没有特别限制,优选在水作为共轭酸中的pKa为5至12的碱。这种碱的实例具体包括DIPEA、三乙胺、2,6-二甲基吡啶、2,4,6-三甲基吡啶和吡啶。在步骤(3)中,可以使用相对于第一肽为1至20当量、优选2至10当量的碱。作为共轭酸的碱在水中的pKa,可以使用根据例如Advanced Chemistry Development(ACD/Labs)软件V11.02((c)1994-2020ACD/Labs)等计算的值。

[0472] 在某些方面,用于步骤(3)的缩合剂是碳二亚胺缩合剂。缩合剂的实例具体包括二异丙基碳二亚胺(DIC)、二仲丁基碳二亚胺(DsBC)、1-叔丁基-3-乙基碳二亚胺(tBEC)、二叔丁基碳二亚胺(DtBC)和1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC),优选二异丙基碳二亚胺(DIC)或二仲丁基碳二亚胺(DsBC)。

[0473] 当步骤(3)中使用的缩合剂为碳二亚胺缩合剂时,步骤(3)中的缩合反应可以在添加剂的存在下进行。添加剂的类型不受限制,只要其有助于缩合反应的进行即可,并且添加剂的实例具体包括HOAt、HOBt、HOOBt、Oxyma和Oxyma-B,其中优选HOAt和Oxyma。

[0474] 在步骤(3)中,可以使用相对于第一肽为1至20当量、优选2至10当量的缩合剂。

[0475] 在某些方面,本发明还进一步包括在步骤(2)和步骤(3)之间处理步骤(2)中的混合物的步骤(处理步骤)。在某些方面,处理步骤是使酸或盐与混合物接触的步骤。在使酸或碱与混合物接触的步骤中,可以使酸或碱与混合物直接接触,或者可以将含有酸或碱的溶液添加到混合物中。对于溶液,可以使用任何溶剂。例如,优选使用步骤(2)中使用的溶剂,更优选使用亚砜溶剂,并且进一步优选使用DMSO。处理步骤可以是分解步骤(2)中生成的氨基甲酸盐的步骤。

[0476] 作为处理步骤中使用的酸,可以举出HOAt、Oxyma、4-硝基苯酚、HOOBt和盐酸。其中,优选HOAt、Oxyma、4-硝基苯酚和HOOBt。作为用于处理步骤的盐,选自由HOAt、Oxyma、4-硝基苯酚、HOOBt和盐酸组成的组中的至少一种酸和选自由DIPEA、三乙胺、2,6-二甲基吡啶、2,4,6-三甲基吡啶和吡啶组成的组中的至少一种碱形成盐,并且优选例举吡啶盐酸盐。

[0477] 在某些方面,步骤(2)中处理混合物的步骤可以是洗涤固相合成树脂的步骤。为了洗涤树脂,可以使用任何溶剂。对于溶液,可以使用任何溶剂。例如,优选使用步骤(2)中使用的溶剂,更优选使用亚砜溶剂,并且进一步优选使用DMSO。在某些方面,用于洗涤固相合成树脂的步骤的溶剂可以是含有碱的溶液。作为碱,例如可以举出DIPEA、三乙胺、2,6-二甲基吡啶和2,4,6-三甲基吡啶等。树脂可以用相同溶剂或不同溶剂洗涤两次或更多次(例如两次、三次、四次、五次或六次)。

[0478] 在某些方面,洗涤固相合成树脂的步骤是洗涤含有酸或盐的亚砜溶剂溶液的步骤。作为用于洗涤树脂的酸,优选HOAt、Oxyma、4-硝基苯酚、HOOBt和盐酸。其中,优选HOAt、Oxyma、4-硝基苯酚和HOOBt。作为用于洗涤树脂的盐,选自由HOAt、Oxyma、4-硝基苯酚、HOOBt和盐酸组成的组中的至少一种酸和选自由DIPEA、三乙胺、2,6-二甲基吡啶、2,4,6-三甲基吡啶和吡啶组成的组中的至少一种碱形成盐,并且优选例举吡啶盐酸盐。

[0479] 在某些方面,在洗涤固相合成树脂的步骤中,可以使用在该步骤前与CO_2接触的溶剂(例如用CO_2气鼓泡的溶剂),也可以使用未与CO_2接触的溶剂。可以组合使用与CO_2接触的溶剂与未与CO_2接触的溶剂。当进行两次或多次洗涤时,优选用预先与CO_2接触的溶剂将树脂洗涤一次或多次,并且然后用未预先与CO_2接触的溶剂将树脂洗涤一次或多次。

[0480] 在某些方面,步骤(3)的反应可以在-100℃至接近溶剂沸点的温度、优选0℃至60℃进行。步骤(3)的反应可以进行1分钟至1周,优选地30分钟至20小时。

[0481] 在某些方面,通过本发明的方法产生的肽含有通过步骤(1)至(3)产生的第三肽。在这种情况下,通过本发明的方法产生的肽除了第三肽之外进一步含有任意数量的任意氨基酸。

[0482] 在某些方面,通过本发明的方法产生的肽可以含有通过步骤(1)至(3)产生的第三肽。

[0483] 在某些方面,通过本发明的方法产生的肽可以含有至少一个、或两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个、或者五个或更多个N-取代的氨基酸。N-取代的氨基酸可以是N-烷基氨基酸,优选地为N-甲基氨基酸。

[0484] 在某些方面,本发明的方法可以包括在延长肽链的步骤后从固相合成树脂分离肽的步骤。对于分离步骤,可以使用本领域已知的方法或实例中描述的方法。

[0485] 在某些方面,本发明还涉及用于减少肽生产(例如,通过固相法的肽生产)中形成

的二酮哌嗪杂质和/或6元环脒骨架化合物杂质的量的方法,该方法包括步骤(1)和步骤(2)。该方法可以进一步包括步骤(3):在步骤(2)后,在溶剂中,在存在或不存在缩合剂的情况下,将第一肽与羧酸或羧酸类似物缩合,以得到第三肽。

[0486] 在某些方面,本发明还涉及用于减少肽生产(例如,通过固相法的肽生产)中形成的选自由二酮哌嗪杂质、6元环脒骨架化合物杂质和二聚脲化合物杂质组成的组中的至少一种杂质的量的方法,该方法包括步骤(1)和步骤(2)。该方法可以进一步包括步骤(3):在步骤(2)后,在溶剂中,在存在或不存在缩合剂的情况下,将第一肽与羧酸或羧酸类似物缩合,以得到第三肽。

[0487] 本文引用的所有参考文献均通过引用并入本文。

[0488] 实例

[0489] 通过实例、比较实例和参考实例对本发明进行更详细的描述,但本发明不限于实例。所有起始材料和试剂均获自商业供应商,或使用已知方法合成。

[0490] 在实例中,使用以下缩写。

[0491] AA:乙酸铵

[0492] Ac:乙酰基基团

[0493] Alloc:烯丙氧基羰基基团

[0494] Boc:叔丁氧基羰基基团

[0495] Cbz:苄氧基羰基基团

[0496] COMU:(1-氰基-2-乙氧基-2-氧代亚乙基氨基氧基)二甲基氨基吗啉碳鎓六氟磷酸酯

[0497] DBU:1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯

[0498] DCM:二氯甲烷

[0499] DCE:1,2-二氯乙烷

[0500] DMF:N,N-二甲基甲酰胺

[0501] DKP:二酮哌嗪

[0502] DIC:N,N'-二异丙基碳二亚胺

[0503] DIPEA:N,N'-二异丙基乙胺

[0504] DMSO:二甲基亚砜

[0505] DsBC:N,N'-二仲丁基碳二亚胺

[0506] EDCI·HCI:1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐

[0507] EtOAc:乙酸乙酯

[0508] FA:甲酸

[0509] Fmoc:9-芴基甲氧基羰基基团

[0510] HOAt:1-羟基-7-氮杂苯并三唑

[0511] HOBt:1-羟基苯并三唑

[0512] HOOBt:3,4-二氢-3-羟基-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪

[0513] HATU:O-(7-氮杂-1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯

[0514] HBTU:O-(1H-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯

[0515] HCTU:O-(1H-6-氯-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲六氟磷酸酯

[0516] HOTU:O-[(乙氧基羰基)氰基亚甲基氨基]-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯

[0517] HP1(dma):亚氨基-三(二甲基氨基)正膦

[0518] MTBD:7-甲基-1,5,7-三氮杂双环[4.4.0]十-5-烯

[0519] NMP:N-甲基-2-吡咯烷酮

[0520] Ns:2-硝基苯磺酰基基团

[0521] Oxyma:氰基(亚氨基)乙酸乙酯

[0522] pip:哌啶

[0523] P1tBu:叔丁基亚氨基-三(二甲基氨基)正膦

[0524] P2Et:三酰胺四甲基(三(二甲基氨基)正膦亚基)磷酸酯-乙亚胺

[0525] PyAOP:(7-氮杂苯并三唑-1-基氧基)三吡咯烷鏻六氟磷酸酯

[0526] PyBOP:苯并三唑-1-基氧基-三-吡咯烷基-鏻六氟磷酸酯

[0527] PyOxim:[乙基氰基(羟基亚氨基)乙酸酯-O2]三-1-吡咯烷基鏻六氟磷酸酯

[0528] Teoc:2-三甲基甲硅烷基乙氧基羰基基团

[0529] TES:三乙基硅烷

[0530] Tfa:三氟乙酰基基团

[0531] TFA:三氟乙酸

[0532] TFE:2,2,2-三氟乙醇

[0533] THF:四氢呋喃

[0534] TMG:1,1,3,3-四甲基胍

[0535] TATU:(1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶鎓3-氧化物四氟硼酸酯

[0536] TBTU:1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-苯并三唑鎓3-氧化物四氟硼酸酯

[0537] TCTU:O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯

[0538] TDBTU:O-(3,4-二氢-4-氧代-1,2,3-苯并三嗪-3-基)-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯

[0539] TOTU:O-[(乙氧基羰基)氰基亚甲基氨基]-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯LCMS的分析条件如表1所示。

[0540]

[表 1]

分析条件	装置	柱（I.D.×长度）(mm)	流动相	梯度 (A/B)	流速（mL/分钟）	柱温 (℃)	波长
SQDAA05	Acquity UPLC/SQD 或 Acquity UPLC/SQD2	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)10mM $AcONH_4$,H_2O B)MeOH	95/5（初始） => 0/100（1.0 分钟） => 0/100（0.4 分钟）	1.0	35	210-400nm PDA (总)
SQDAA50	Acquity UPLC/SQD 或 Acquity UPLC/SQD2	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)10mM $AcONH_4$,H_2O B)MeOH	50/50（初始） => 0/100（0.7 分钟） => 0/100（0.7 分钟）	1.0	35	210-400nm PDA (总)
SQDFA05	Acquity UPLC/SQD 或 Acquity UPLC/SQD2	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)0.1% FA,H_2O B)0.1% FA,MeCN	95/5（初始） => 0/100（1.0 分钟） => 0/100（0.4 分钟）	1.0	35	210-400nm PDA (总)
SQDFA50	Acquity UPLC/SQD 或 Acquity UPLC/SQD2	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)0.1% FA,H_2O B)0.1% FA,MeCN	50/50（初始） => 0/100（0.7 分钟） => 0/100（0.7 分钟）	1.0	35	210-400nm PDA (总)
SQDFA05long	Acquity UPLC/SQD2	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)0.1% FA,H_2O B)0.1% FA,MeCN	95/5（初始） => 0/100（4.5 分钟） => 0/100（0.5 分钟）	1.0（0-4.5 分钟） 0.1（4.5-5 分钟）	35	210-400nm PDA (总)
SQDAA05long	Acquity UPLC/SQD2	Ascentis Express C18 (2.1x50)	A)10mM $AcONH_4$,H_2O B)MeOH	95/5（初始） => 0/100（4.5 分钟） => 0/100（0.5 分钟）	1.0（0-4.5 分钟） 0.1（4.5-5 分钟）	35	210-400nm PDA (总)

[0541] 实例1:实例中使用的氨基酸、树脂负载肽等的制备

[0542] 实例1-1:Fmoc-氨基酸用于通过全自动肽合成仪合成肽

[0543] 在本说明书中记载的肽合成中,使用表2至表4所示的Fmoc-氨基酸,通过全自动肽合成仪进行合成。

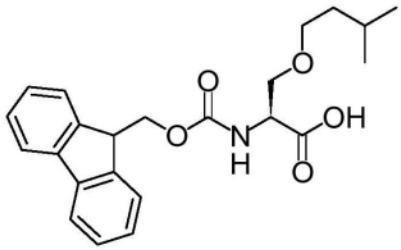
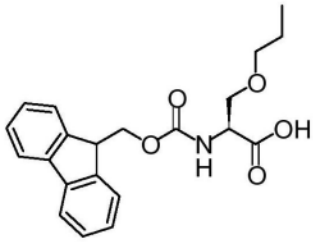
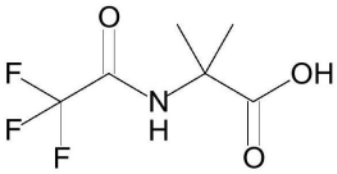
[0544] 表2中所示的Fmoc-氨基酸是根据WO 2018/225864和WO 2021/090856中所述的方法合成的。

[0545] 表3中所示的Fmoc-氨基酸购自商业供应商。

[0546] 表4中所示的Fmoc-氨基酸是根据下面所示的方案合成的。

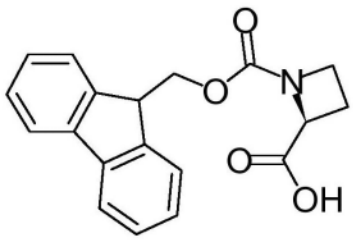
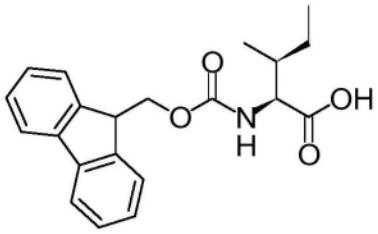
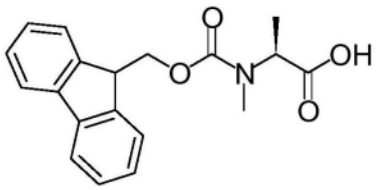
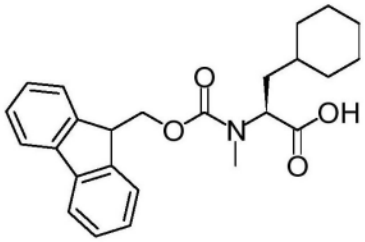
[0547] [表2]

[0548]

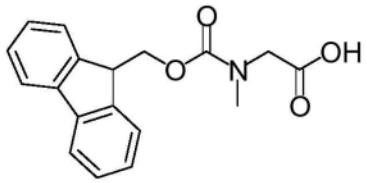
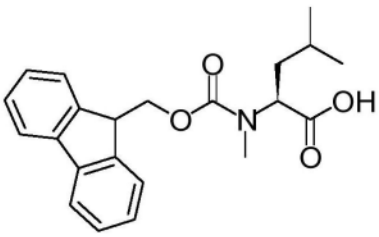
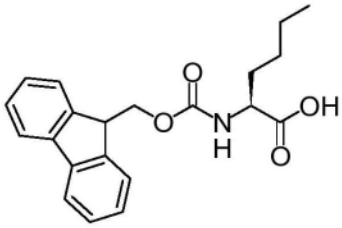
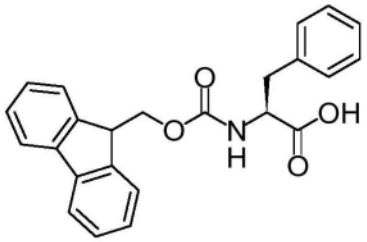
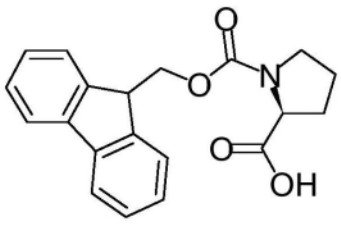
化合物编号	缩写	结构式	名称
aa1-1	Fmoc-Ser(iPen)-OH		(2S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-3-(3-甲基丁氧基)丙酸
aa1-2	Fmoc-Ser(nPr)-OH		(2S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-3-丙氧基丙酸
aa1-3	Tfa-Aib-OH		2-甲基-2-[(2,2,2-三氟乙酰基)氨基]丙酸

[0549] [表3]

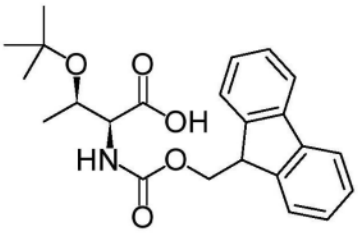
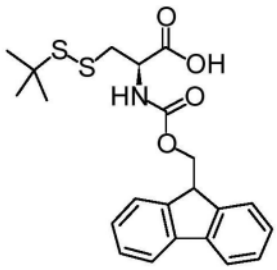
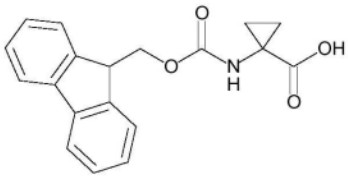
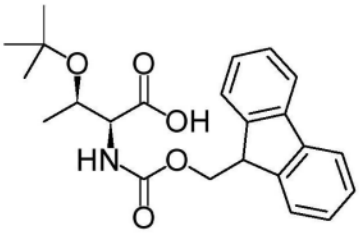
[0550]

化合物编号	缩写	结构式	名称	CAS编号
aa2-1	Fmoc-Aze(2)-OH		(2S)-1-(9H-芴-9-基甲氧基羰基)氮杂环丁烷-2-羧酸	136552-06-2
aa2-2	Fmoc-Ile-OH		(2S,3S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-3-甲基戊酸	71989-23-6
aa2-3	Fmoc-MeAla-OH		(2S)-2-[9H-芴-9-基甲氧基羰基(甲基)氨基]丙酸	84000-07-7
aa2-4	Fmoc-MeCha-OH		(2S)-3-环己基-2-[9H-芴-9-基甲氧基羰基(甲基)氨基]丙酸	148983-03-3

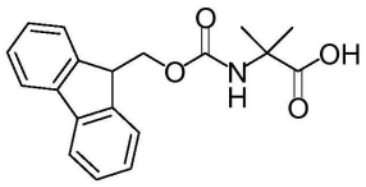
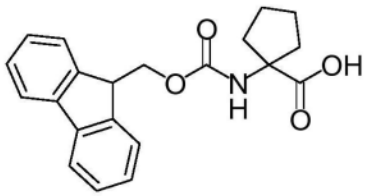
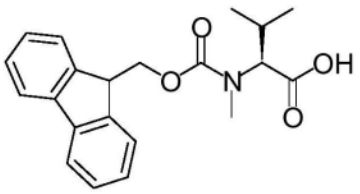
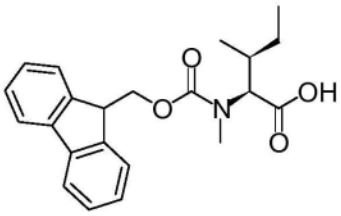
[0551]

aa2-5	Fmoc-MeGly-OH		2-[9H-芴-9-基甲氧基羰基(甲基)氨基]乙酸	77128-70-2
aa2-6	Fmoc-MeLeu-OH		aa2-6 (2S)-2-[9H-芴-9-基甲氧基羰基(甲基)氨基]-4-甲基戊酸	103478-62-2
aa2-7	Fmoc-Nle-OH		(2S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)己酸	77284-32-3
aa2-8	Fmoc-Phe-OH		(2S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-3-苯基丙酸	35661-40-6
aa2-9	Fmoc-Pro-OH		(2S)-1-(9H-芴-9-基甲氧基羰基)吡咯烷-2-羧酸	71989-31-6

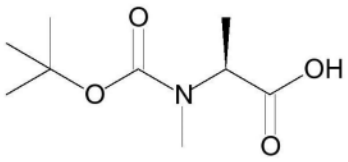
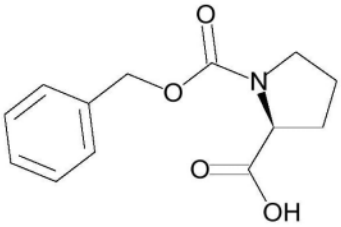
[0552]

aa2-10	Fmoc-Thr(tBu)-OH		(2S,3R)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-3-(2-甲基-2-丙氧基)丁酸	71989-35-0
aa2-11	Fmoc-Cys(StBu)-OH		(2S)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-3-(2-甲基-2-丙基二硫基)丙酸	73724-43-3
aa2-12	Fmoc-1-ACPrC-OH		1-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)环丙羧酸	126705-22-4
aa2-13	Fmoc-Tyr(tBu)-OH		(2S,3R)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-3-(2-甲基-2-丙氧基)丁酸	71989-35-0

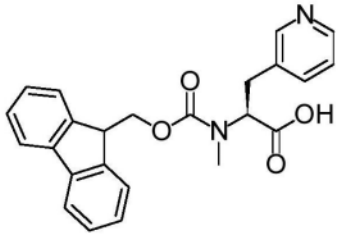
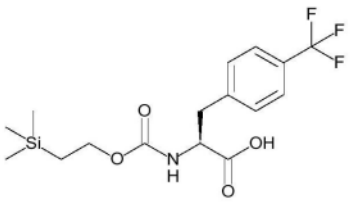
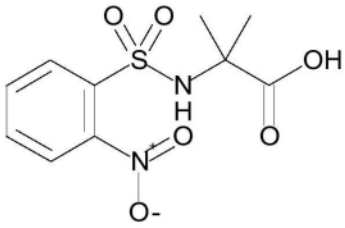
[0553]

aa2-14	Fmoc-Aib-OH		2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-2-甲基丙酸	94744-50-0
aa2-15	Fmoc-cLeu-OH		1-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)环戊烷-1-羧酸	117322-30-2
aa2-16	Fmoc-MeVal-OH		(2S)-2[9H-芴-9-基甲氧基羰基(甲基)氨基]-3-甲基丁酸	84000-11-3
aa2-17	Fmoc-MeIle-OH		(2S,3R)-2-(9H-芴-9-基甲氧基羰基(甲基)氨基)-3-甲基戊酸	138775-22-1

[0554]

aa2-18	Boc-MeAla-OH		(2S)-2-[叔丁氧基羰基(甲基)氨基]丙酸	16948-16-6
aa2-19	Cbz-Pro-OH		(2S)-1-苄氧羰基吡咯烷-2-羧酸	1148-11-4

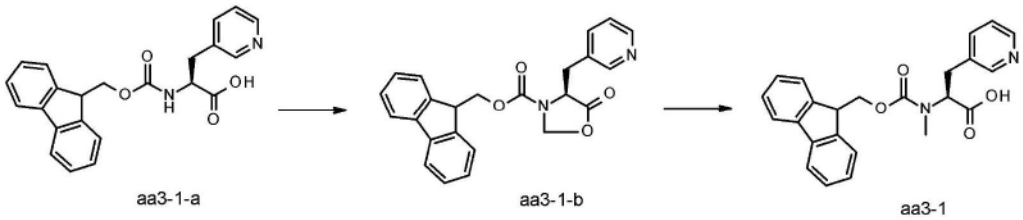
[0555] [表4]

化合物编号	缩写	结构式	名称
aa3-1	Fmoc-MeAla(3-Pyr)-OH		(2S)-2-[9H-芴-9-基甲氧基羰基(甲基)氨基]-3-吡啶-3-基丙酸
aa3-2	Teoc-Phe(4-CF3)-OH		(2S)-3-[4-(三氟甲基)苯基]-2-(2-三甲基甲硅烷基乙氧基羰基氨基)丙酸
aa3-3	Ns-Aib-OH		2-甲基-2-[(2-硝基苯基)磺酰基氨基]丙酸

[0556]

[0557] 化合物aa3-1的合成:(2S)-2-[9H-芴-9-基甲氧基羰基(甲基)氨基]-3-吡啶-3-基丙酸(Fmoc-MeAla(3-Pyr)-OH)

[0558] [Chem.11]

[0559] 

[0560] 在氮气氛下,将多聚甲醛(696mg,23.17mmol)和三氟乙酸(TFA)(5.36mL,69.5mmol)添加至可商购的(2S)-2-[9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基]-3-吡啶-3-基丙酸(Fmoc-Ala(3-Pyr)-OH,化合物aa3-1-a)(3g,7.72mmol)的甲苯(10.5mL)溶液中,并将混合物在40℃搅拌2小时。将反应溶液减压浓缩,用二氯甲烷(DCM)稀释,然后用饱和碳酸氢钠水溶液洗涤,经无水硫酸镁干燥,然后过滤。将得到的溶液减压浓缩,得到作为粗产物的化合物aa3-1-b(2.95g,95%)。该化合物不经进一步纯化而用于下一反应。

[0561] LCMS(ESI)m/z=401(M+H)+

[0562] 保留时间:0.64分钟(分析条件SQDFA05)

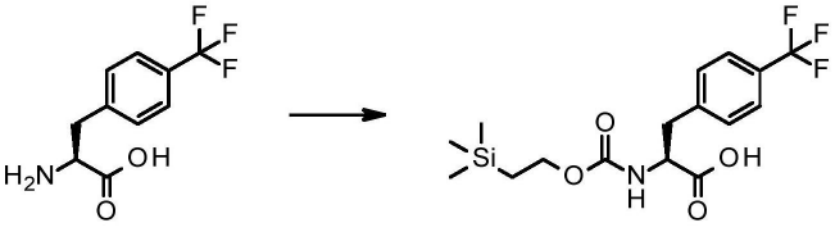
[0563] 在室温下,在氮气氛下,将三乙基硅烷(TES)(10.59mL,66.3mmol)和三氟乙酸(TFA)(15.32mL,199mmol)添加至化合物aa3-1-b(2.95g)的1,2-二氯乙烷(DCE)(15.5mL)溶液中,并且将混合物在70℃搅拌5小时。将反应溶液冷却至室温,减压蒸馏除去溶剂,将由此得到的粗产物溶解于乙酸乙酯中,添加叔丁基甲基醚/正已烷=9/1(40mL),并且搅拌混合物。将该混合物在冰箱中冷却30分钟,然后过滤得到的固体,用叔丁基甲基醚/正已烷=9/1(30mL)洗涤三次,并且然后减压干燥。将得到的粗品悬浮于DCM(50mL)中,添加3mol/L磷酸二氢钠水溶液(45mL,包括氯化钠1.5mol/L),搅拌混合物,除去水层,并且然后将有机层用3mol/L磷酸二氢钠水溶液(45mL,包括氯化钠1.5mol/L)洗涤两次。将有机层经无水硫酸镁干燥,然后减压蒸馏除去溶剂,并且将由此得到的残余物通过反相柱色谱法(水/乙腈)纯化,得到化合物aa3-1:(2S)-2-[9H-芴-9-基甲氧基羰基(甲基)氨基]-3-吡啶-3-基丙酸(Fmoc-MeAla(3-Pyr)-OH)(2.67g,90%)。

[0564] LCMS(ESI)m/z=403(M+H)+

[0565] 保留时间:0.53分钟(分析条件SQDFA05)

[0566] 化合物aa3-2的合成:(2S)-3-[4-三氟甲基)苯基]-2-(2-三甲基甲硅烷基乙氧基羰基氨基)丙酸(Teoc-Phe(4-CF3)-OH)

[0567] [Chem.12]

[0568] 

[0569] 在氮气氛下,将商购的(S)-2-氨基-3-(4-(三氟甲基)苯基)丙酸(H-Phe(4-CF3)-OH,化合物aa3-2-a)(2.00g,8.58mmol)溶解于水(12.0mL)中,然后添加三乙胺(2.38mL,17.15mmol)和1,4-二噁烷(10.0mL)的混合溶液,并且将混合物在室温下搅拌10分钟。然后,添加2,5-二氧代吡咯烷-1-基(2-(三甲基甲硅烷基)乙基)碳酸酯(2.45g,9.43mmol),并将

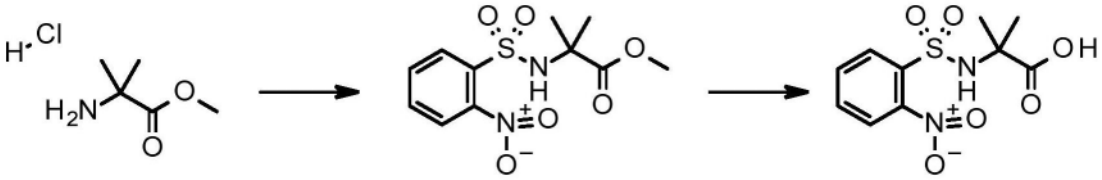
混合物在室温下搅拌1小时。向反应溶液中添加2-甲基四氢呋喃(5mL),并且将混合物用10％碳酸钠水溶液(10mL)洗涤。将得到的有机层用饱和硫酸氢钾水溶液(10mL)洗涤,然后用10％氯化钠水溶液洗涤,经无水硫酸镁干燥,并且然后过滤。将得到的溶液减压浓缩,得到化合物aa3-2:2S)-3-[4-三氟甲基)苯基]-2-(2-三甲基甲硅烷基乙氧基羰基氨基)丙酸(Teoc-Phe(4-CF3)-OH)。(2.88g,89％)

[0570] LCMS(ESI)m/z＝376(M-H)-

[0571] 保留时间:0.87分钟(分析条件SQDFA05)

[0572] 化合物aa3-3的合成:2-甲基-2-[(2-硝基苯基)磺酰基氨基]丙酸(Ns-Aib-OH)

[0573] [Chem.13]

[0574] 

aa3-3-a aa3-3-b aa3-3

[0575] 将2-硝基苯磺酰氯(6.93g,31.2mmol)的DCM(30.0mL)溶液添加至可商购的2-氨基-2-甲基丙酸甲酯盐酸盐(4.0g,26.0mmol)和DIPEA(10.92mL,62.5mmol)在DCM(22.1mL)的溶液中,伴随在冰浴中冷却,并将混合物在0℃搅拌5分钟,并且然后在室温搅拌2小时。将反应混合物减压浓缩,得到粗产物aa3-3-b。

[0576] LCMS(ESI)m/z＝301(M-H)-

[0577] 保留时间:0.64分钟(分析条件SQDFA05)

[0578] 在冰浴冷却下,将5N氢氧化钠水溶液(26mL)添加至得到的粗产物aa3-3-b(3.63g)的THF/甲醇(1/1,52mL)溶液中,并且将混合物在0℃搅拌5分钟,并且然后在室温搅拌5小时。将反应混合物减压浓缩,将得到的残余物溶解于4N盐酸(30mL)中,并蒸馏除去溶剂。将混合物用乙酸乙酯萃取两次,然后将有机层经无水硫酸钠干燥,然后过滤,并将溶液减压浓缩。将得到的粗品用反相柱色谱(0.1％含甲酸的乙腈/0.1％含甲酸的蒸馏水)纯化两次,得到化合物aa3-3:2-甲基-2-[(2-硝基苯基)磺酰基氨基]丙酸(Ns-Aib-OH)(2.46g,71％)。

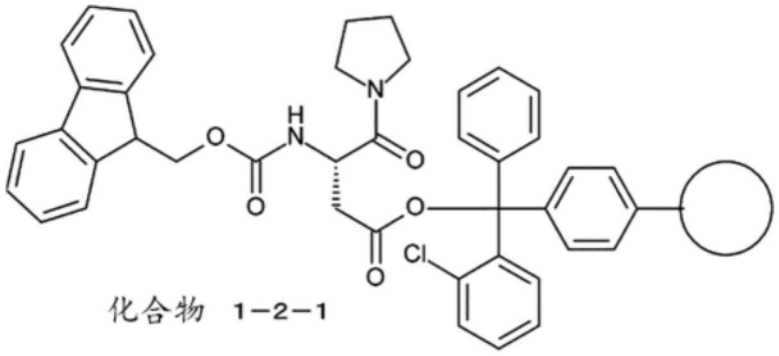
[0579] LCMS(ESI)m/z＝287(M-H)-

[0580] 保留时间:0.53分钟(分析条件SQDFA05)

[0581] 实例1-2:实例中使用的树脂负载氨基酸和肽等的制备

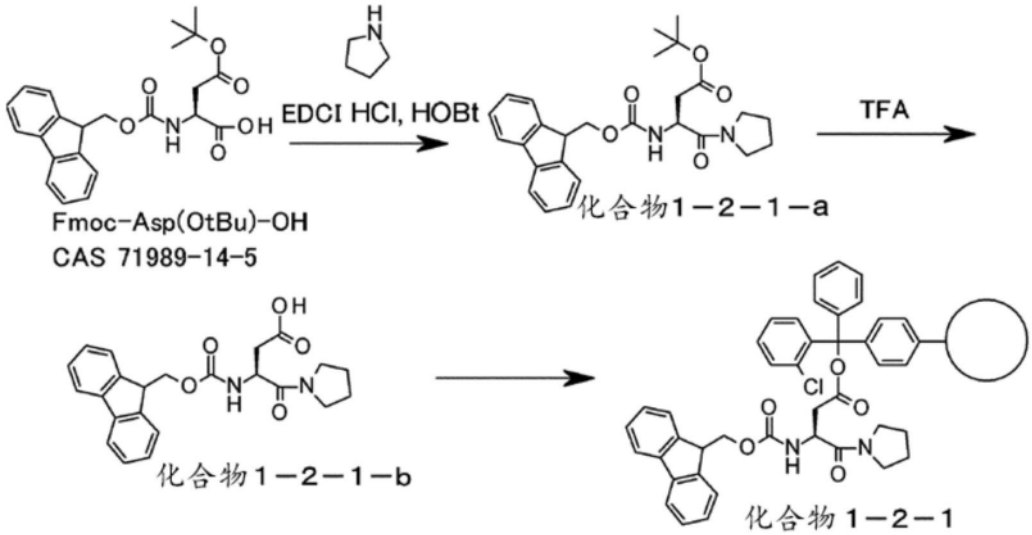
[0582] 实例1-2-1:(3S)-3-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-4-氧代-4-吡咯烷-1-基丁酸-2-氯三苯甲基树脂(Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-吡咯,化合物1-2-1)的合成

[0583] [Chem.14]

[0584] 

[0585] 在本说明书中,当聚合物或树脂与化合物键合时,可以将聚合物或树脂部分绘制为○。为了明确树脂部分的反应点,可用连接至○的化合物画出反应部分的化学结构。例如,在上述结构(Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-吡咯(化合物1-2-1))中,树脂的2-氯三乙基基团通过酯键键合至Asp的侧链上的羧酸。术语"吡咯"意指吡咯烷,并且在上述结构中,C末端的羧酸基团与吡咯烷形成酰胺键。

[0586] [Chem.15]

[0587] 

[0588] 在0℃下,在氮气氛下,将EDCI·HCl(67.1g,350mmol)、HOBt(43.3g,321mmol)和Fmoc-Asp(OtBu)-OH(120g,2929mmol)依次添加至DMF(600mL)中,并且将混合物在0℃搅拌1小时。在0℃下,向反应溶液中添加乙酸乙酯(10v)和0.5mol/L盐酸水溶液(2V),并分离有机层。将得到的有机层用0.5mol/L盐酸水溶液、水、饱和碳酸氢钠水溶液/水(1/1(v/v))、和饱和氯化钠水溶液/水(1/1(v/v))洗涤(按此顺序),并且经无水硫酸钠干燥,并且然后减压蒸馏除去溶剂,得到呈粗产物的化合物1-2-1-a。(137.1g,定量)

[0589] LCMS(ESI)m/z=465(M+H)+

[0590] 保留时间:1.05分钟(分析条件SQDAA05)

[0591] 在冰冷却下将TFA(271mL)缓慢添加至化合物1-2-1-a(137g,395mmol)的DCM(137mL)溶液中,使得内部温度不超过10℃。将混合物在室温下搅拌1小时,然后分四份添加二异丙醚(3.4L),并且通过过滤收集沉淀的固体,并且干燥,得到化合物1-2-1-b((3s)-3-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-4-氧代-4-吡咯烷-1-基丁酸,Fmoc-Asp-吡咯)。(108.4g,90%)

[0592] LCMS(ESI)m/z=409(M+H)+

[0593] 保留时间:0.83分钟(分析条件SQDAA05)

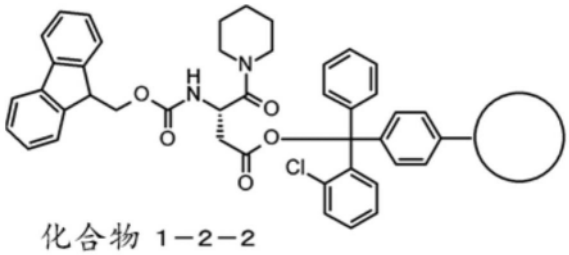
[0594] 将Fmoc-氨基酸负载于树脂的反应按照WO 2013/100132或WO 2018/225864中所述的方法进行。向带有过滤器的反应容器中添加2-氯三苯甲基氯树脂(1.60mmol/g,100至200目,1% DVB,48.7g)和脱水二氯甲烷(500mL),并且将混合物在室温下摇动20分钟。施加氮气压力以除去二氯甲烷,向化合物1-2-1-b(15.91g)和脱水二氯甲烷(350mL)中添加脱水甲醇(12.63mL)和二异丙基乙胺(DIPEA)(32.6mL)而获得混合溶液,然后将其添加到反应容器中,并且将混合物摇动60分钟。施加氮气压力以除去反应溶液,向无水二氯甲烷(350mL)中添加脱水甲醇(97.3mL)和二异丙基乙胺(DIPEA)(32.6mL)而获得混合溶液,然后将其添加到反应容器中,并且将混合物摇动1小时30分钟。施加氮气压力以除去反应溶液,然后将二氯甲烷(350mL)放入反应容器中,将混合物摇动5分钟,然后施加氮气压力以除去反应溶液。重复用二氯甲烷洗涤树脂五次,并且将得到的树脂减压干燥过夜,得到(3S)-3-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)-4-氧代-4-吡咯烷-1-基丁酸-2-氯三苯甲基树脂(Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-吡咯,化合物1-2-1,59.79g)。

[0595] 为了测定负载率,将获得的化合物1-2-1(12.6mg)放入反应容器中,添加DMF(2mL),并将混合物在室温下摇动1小时。此后,添加DBU(40μL),并将混合物在30℃下摇动30分钟。此后,将DMF(8mL)添加到反应混合溶液中,并将所得溶液的1mL用DMF(11.5mL)稀释。测量得到的稀释溶液的吸光度(294nm)(使用Shimadzu,UV-1600PC(细胞长度:1.0cm)),并且计算出化合物1-2-1的负载率为0.464mmol/g。

[0596] 类似合成的另一批具有不同负载率的批次也用于肽合成、研究等。

[0597] 实例1-2-2:(S)-3-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-氧代-4-(哌啶-1-基)丁酸-2-氯三苯甲基树脂(Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip,化合物1-2-2)的合成

[0598] [Chem.16]

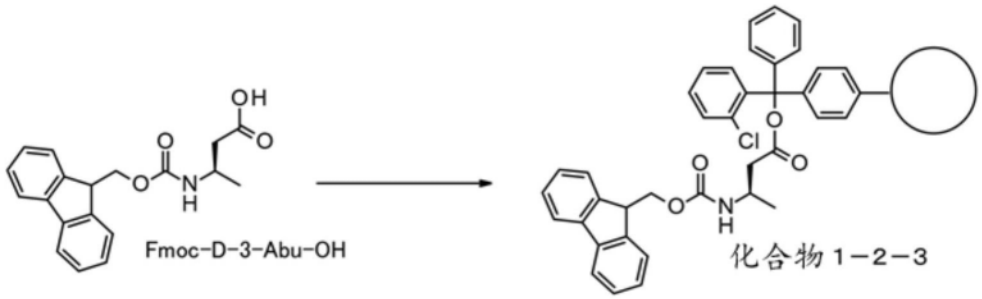
[0599] 

化合物 1-2-2

[0600] 通过文献中描述的方法合成(S)-3-(((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-4-氧代-4-(哌啶-1-基)丁酸-2-氯三苯甲基树脂(化合物1-2-2、Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip)(文献:国际公开号WO 2013/100132 A1)。术语“pip”是指哌啶,并且在上述结构中,C末端的羧酸基团与哌啶形成酰胺键。

[0601] 实例1-2-3:(3R)-3-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)丁酸-2-氯三苯甲基树脂(Fmoc-D-3-Abu-O-Trt(2-Cl)-树脂,化合物1-2-3)

[0602] [Chem.17]

[0603] 

[0604] 使用(3R)-3-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)丁酸(Fmoc-D-3-Abu-OH)(7.1g,21.82mmol)和2-氯三苯甲基氯树脂(1.6mmol/g,100to 200mesh,1％DVB,27.25g,43.6mmol)(购自商业供应商),按照与化合物1-2-1的合成相同的步骤得到化合物1-2-3:(3R)-3-(9H-芴-9-基甲氧基羰基氨基)丁酸-2-氯三苯甲基树脂(Fmoc-D-3-Abu-O-Trt(2-Cl)-树脂)。(33.44g,负载率:0.598mmol/g)

[0605] 类似合成的另一批具有不同负载率的批次也用于本实例中的肽合成。

[0606] 实例1-2-4:实例中使用的固相负载肽化合物(化合物1-2-4至1-2-12)的制备

[0607] 本实例中使用的化合物1-2-4至1-2-12的制备通过使用全自动肽合成仪(Multipep RS;Intavis AG制造)的Fmoc法进行。详细操作流程与全自动肽合成仪附带的手册一致。

[0608] 将构成目标肽的Fmoc保护的氨基酸(0.6mol/L)和作为羧酸活化剂的HOAt、Oxyma或HOOBt(0.375mol/L)溶解在NMP中以制备溶液1。在Fmoc保护的氨基酸或HOOBt难溶的情况下,用添加至20％的DMSO来制备溶液1。将N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)(10v/v％)与N,N-二甲基甲酰胺(DMF)混合,制备溶液2。

[0609] 2-氯三苯甲基树脂与N末端用Fmoc基团保护的天冬氨酸侧链上的羧酸部分或N末端用Fmoc保护的β氨基酸主链上的羧酸部分键合(化合物1-2-1、1-2-2或1-2-3)(每柱100mg),其已在实例1-2-1、1-2-2或1-2-3中制备,将其添加至固相反应容器中,并将反应容器设置于全自动肽合成仪中。向该树脂(100mg)中添加二氯甲烷(DCM)(1.0mL),并将混合物静置约30分钟以使树脂溶胀。将溶液1和溶液2设置于全自动肽合成仪,并且开始通过全自动肽合成仪进行自动合成。将溶液从玻璃料中排出,随后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤两次。

[0610] Fmoc脱保护步骤

[0611] 添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的DMF溶液(2v/v％,每柱0.7mL),并在室温下进行Fmoc基团的脱保护。使混合物在第一个残基处的脱保护中反应4.5分钟,并在第二个和随后的残基处的脱保护中反应10分钟,随后从玻璃料中排出溶液。随后,将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤两次,用DIPEA(0.14mol/L)和HOAt(0.14mol/L)的DMF溶液(每柱0.7mL)洗涤一次,并用DMF(每柱0.7mL)洗涤两次。

[0612] 延长步骤

[0613] 通过全自动肽合成仪的混合瓶将溶液1(每柱0.3mL)与溶液2(每柱0.36mL)混合,并且将混合物添加到树脂中。在难以延长序列的情况下,将固相反应容器加热至40℃-60℃,并且在难以延长序列的情况下,使混合物反应2.5小时至14小时,以进行树脂上的氨基基团与Fmoc保护的氨基酸发生缩合反应,随后从玻璃料中排出溶液。在延长效率低的情况

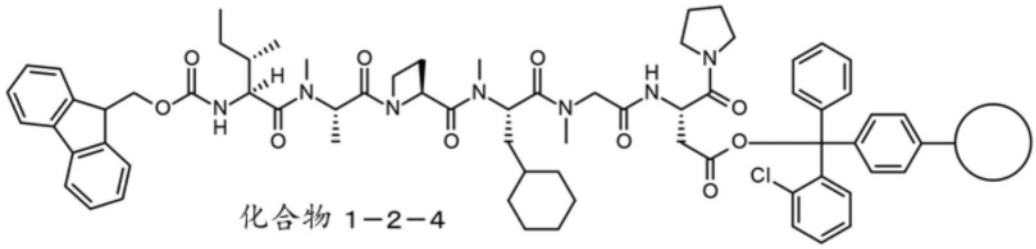
下,进一步重复Fmoc保护氨基酸的缩合反应一次或两次。随后,将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤三次。

[0614] 将Fmoc基团的脱保护反应后的Fmoc氨基酸的缩合反应设为一个循环,重复该循环,使树脂表面的肽延长。最后一个氨基酸延长后,不进行Fmoc脱保护步骤,并且将树脂用DCM(每柱1.0mL)洗涤四次,干燥,并且然后用于后续研究。使用该方法作为标准条件,制备了以下固相负载的肽化合物(化合物1-2-4至1-2-12)。

[0615] 如上所述,虽然每柱使用100mg的化合物1-2-1、1-2-2或1-2-3中的每一者来制备肽化合物,但同样地用每序列排列的多个柱来制备肽化合物。

[0616] Fmoc-Ile-MeAla-Aze(2)-MeCha-MeGly-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-吡咯(化合物1-2-4)

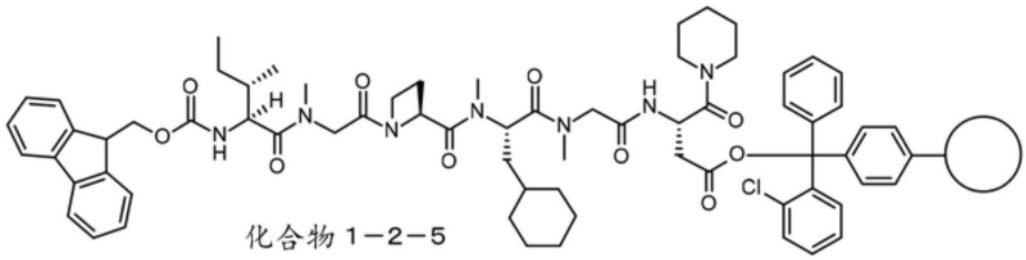
[0617] [Chem.18]

[0618] 

[0619] 该化合物由Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-吡咯(化合物1-2-1,0.552mmol/g)制备。

[0620] Fmoc-Ile-MeGly-Aze(2)-MeCha-MeGly-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物1-2-5)

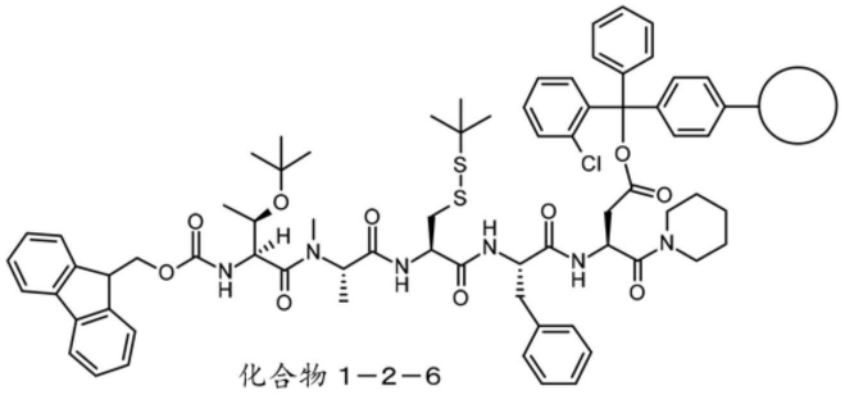
[0621] [Chem.19]

[0622] 

[0623] 该化合物由Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物1-2-2,0.452mmol/g)制备。

[0624] Fmoc-Thr(tBu)-MeAla-Cys(StBu)-Phe-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物1-2-6)

[0625] [Chem.20]

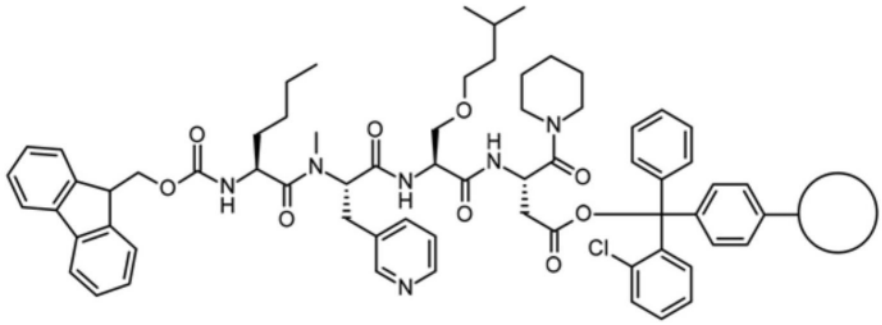
[0626] 

化合物 1－2－6

[0627] 该化合物由Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物1-2-2,0.452mmol/g)/制备

[0628] Fmoc-Nle-MeAla(3-Pyr)-Ser(iPen)-Asp-(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物1-2-7)

[0629] [Chem.21]

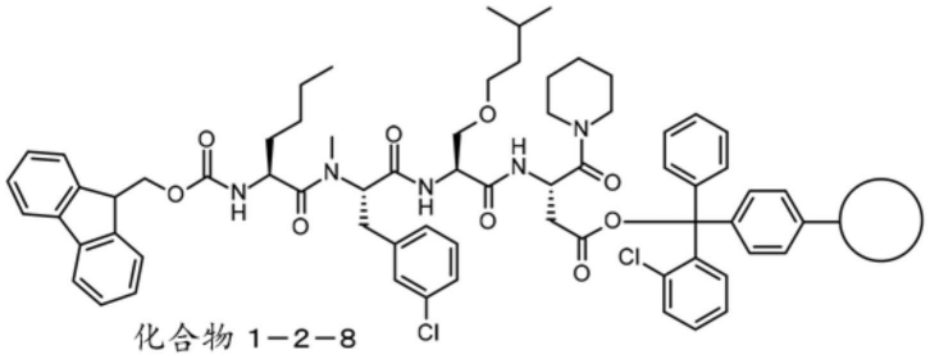
[0630] 

化合物 1－2－7

[0631] 该化合物由Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物1-2-2,0.452mmol/g)制备。

[0632] Fmoc-Nle-MePhe(3-Cl)-Ser(iPen)-Asp-(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物1-2-8)

[0633] [Chem.22]

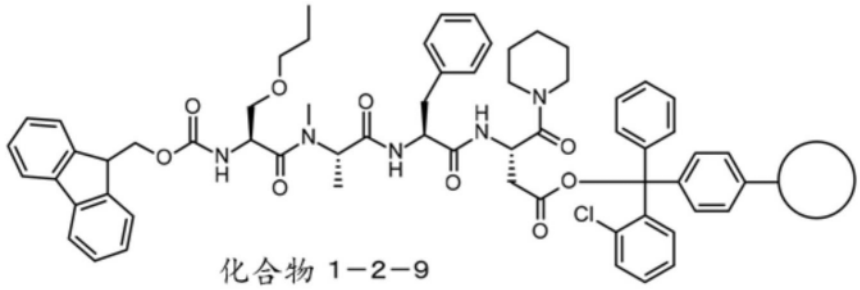
[0634] 

化合物 1－2－8

[0635] 该化合物由Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物1-2-2,0.452mmol/g)制备。

[0636] Fmoc-Ser(nPr)-MeAla-Phe-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物1-2-9)

[0637] [Chem.23]

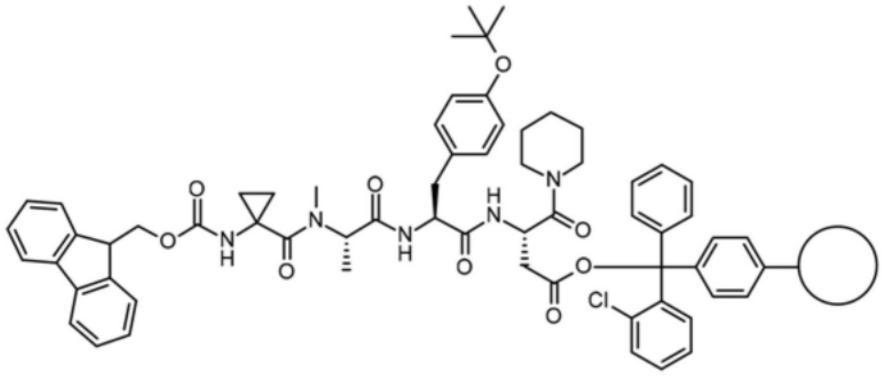
[0638] 

化合物 1-2-9

[0639] 该化合物由Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物1-2-2,0.452mmol/g)制备。

[0640] Fmoc-1-ACPrC-MeAla-Tyr(tBu)-Asp-(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物1-2-10)

[0641] [Chem.24]

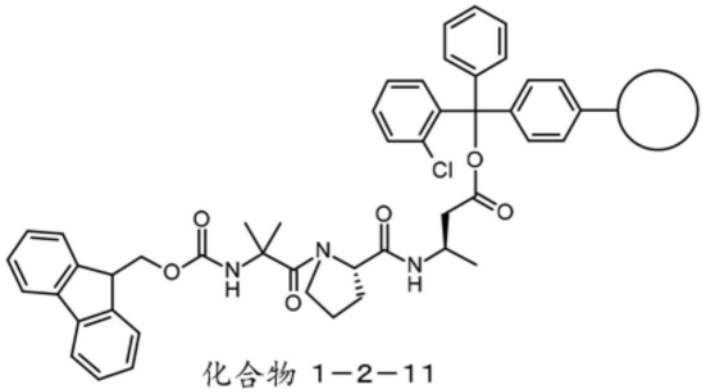
[0642] 

化合物 1-2-10

[0643] 该化合物由Fmoc-Asp(O-Trt(2-Cl)-树脂)-pip(化合物1-2-2,0.452mmol/g)制备。

[0644] Fmoc-Aib-Pro-D-3-Abu-O-Trt(2-Cl)-树脂(化合物1-2-11)

[0645] [Chem.25]

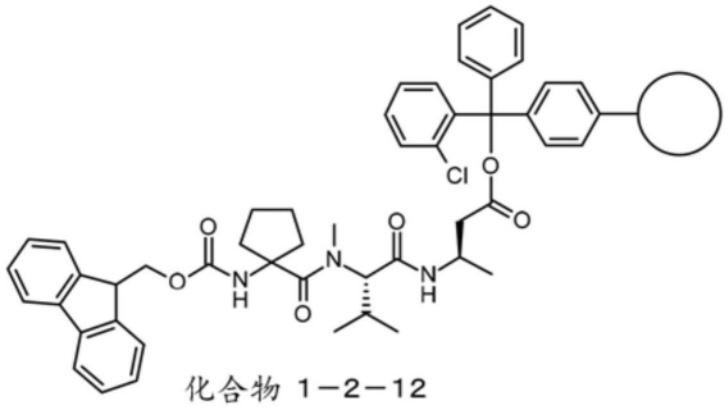
[0646] 

化合物 1-2-11

[0647] 该化合物由Fmoc-D-3-Abu-O-Trt(2-Cl)-树脂(化合物1-2-3,0.558mmol/g)制备。

[0648] Fmoc-cLeu-MeVal-D-3-Abu-O-Trt(2-Cl)-树脂(化合物1-2-12)

[0649] [Chem.26]

[0650] 

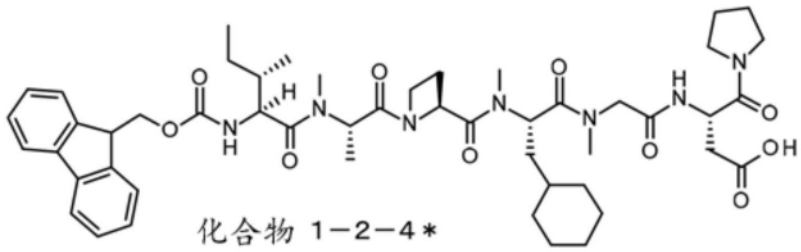
化合物 1－2－12

[0651] 该化合物由Fmoc-D-3-Abu-O-Trt(2-Cl)-树脂(化合物1-2-3,0.558mmol/g)制备。

[0652] 例如,为了确认得到化合物1-2-4,用含有DIPEA(0.045mol/L)的TFE/DCM溶液(1/1(v/v))从得到的树脂的一部分分离肽。通过LCMS分析分离溶液,并且结果显示形成目标肽(化合物1-2-4*)。对于化合物1-2-5至1-2-12,通过与化合物1-2-4相同的方法确认了目标肽(化合物1-2-5*至1-2-12*)的形成。在本实例中,化合物编号中添加的*表示用从树脂分离的肽检查的化合物以检查反应。化合物1-2-4*表示化合物1-2-4中所含的肽的羧酸与树脂的2-氯三苯甲基基团之间的键断裂的肽化合物。

[0653] Fmoc-Ile-MeAla-Aze(2)-MeCha-MeGly-Asp-吡咯(化合物1-2-4*)

[0654] [Chem.27]

[0655] 

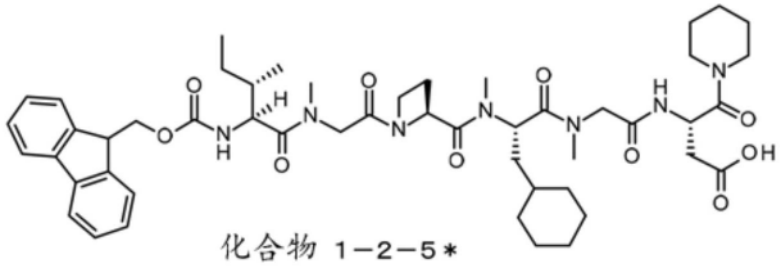
化合物 1－2－4＊

[0656] LCMS(ESI)m/z＝928.69(M+H)+

[0657] 保留时间:0.85分钟(分析条件SQDFA05)

[0658] Fmoc-Ile-MeGly-Aze(2)-MeCha-MeGly-Asp-pip(化合物1-2-5*)

[0659] [Chem.28]

[0660] 

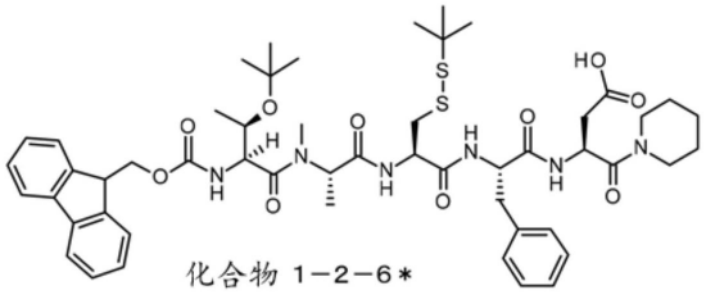
化合物 1－2－5＊

[0661] LCMS(ESI)m/z＝928.80(M+H)+

[0662] 保留时间:0.87分钟(分析条件SQDFA05)

[0663] Fmoc-Thr(tBu)-MeAla-Cys(StBu)-Phe-Asp-pip(化合物1-2-6*)

[0664] [Chem.29]

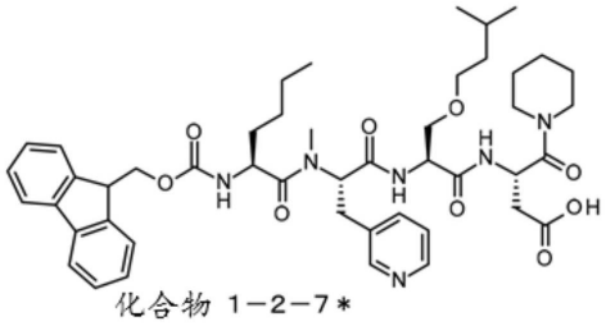
[0665] 

[0666] LCMS(ESI)m/z＝1003.80(M+H)+

[0667] 保留时间:1.06分钟(分析条件SQDFA05)

[0668] Fmoc-Nle-MeAla(3-Pyr)-Ser(iPen)-Asp-pip(化合物1-2-7*)

[0669] [Chem.30]

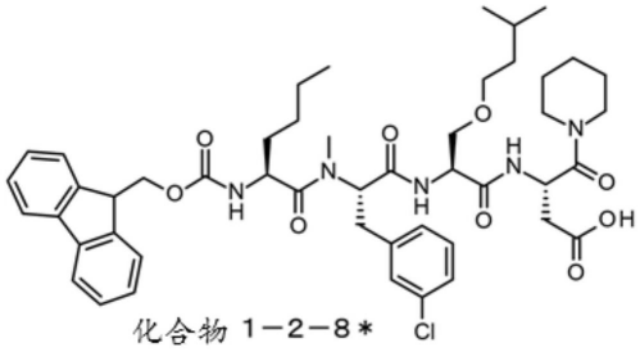
[0670] 

[0671] LCMS(ESI)m/z＝855.73(M+H)+

[0672] 保留时间:0.76分钟(分析条件SQDFA05)

[0673] Fmoc-Nle-MePhe(3-Cl)-Ser(iPen)-Asp-pip(化合物1-2-8*)

[0674] [Chem.31]

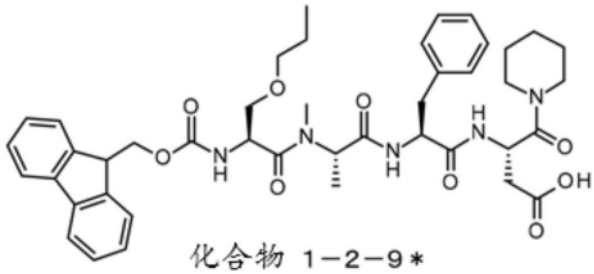
[0675] 

[0676] LCMS(ESI)m/z＝888.67(M+H)+

[0677] 保留时间:1.05分钟(分析条件SQDFA05)

[0678] Fmoc-Ser(nPr)-MeAla-Phe-Asp-pip(化合物1-2-9*)

[0679] [Chem.32]

[0680] 

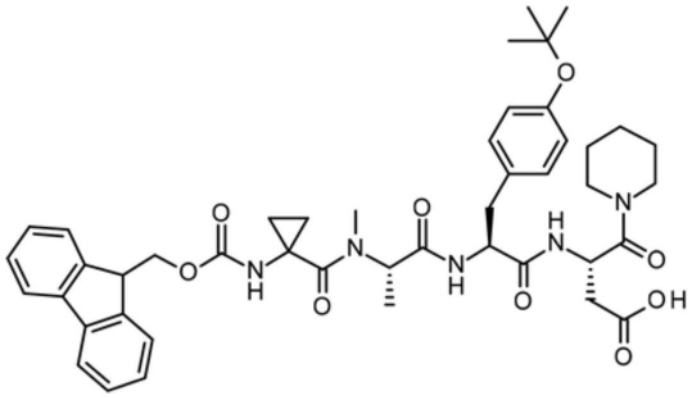
化合物 1－2－9＊

[0681] LCMS(ESI)m/z＝784.66(M+H)+

[0682] 保留时间:0.86分钟(分析条件SQDFA05)

[0683] Fmoc-1-ACPrC-MeAla-Tyr(tBu)-Asp-pip(化合物1-2-10*)

[0684] [Chem.33]

[0685] 

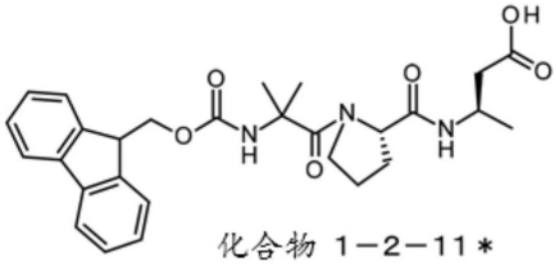
化合物 1－2－10＊

[0686] LCMS(ESI)m/z＝810.44(M+H)+

[0687] 保留时间:2.60分钟(分析条件SQDFA05long)

[0688] Fmoc-Aib-Pro-D-3-Abu-OH(化合物1-2-11*)

[0689] [Chem.34]

[0690] 

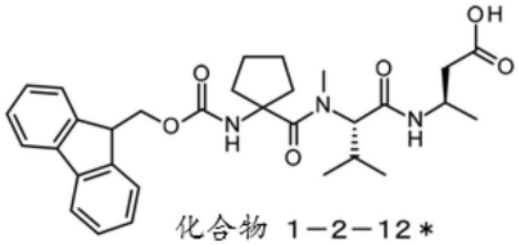
化合物 1－2－11＊

[0691] LCMS(ESI)m/z＝508.47(M+H)+

[0692] 保留时间:0.66分钟(分析条件SQDFA05)

[0693] Fmoc-cLeu-MeVal-D-3-Abu-OH(化合物1-2-12*)

[0694] [Chem.35]

[0695] 

[0696] LCMS(ESI)m/z＝326.41(M-H)-

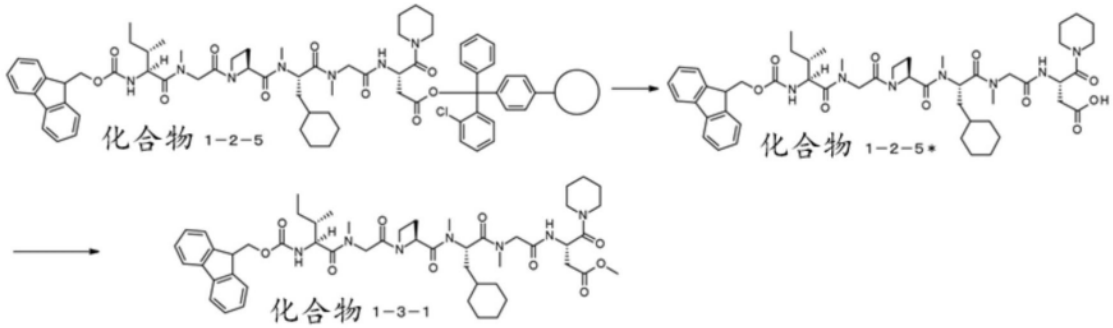
[0697] 检测为不含Fmoc保护的片段的MS((M-H-Fmoc)-)

[0698] 保留时间:0.79分钟(分析条件SQDFA05)

[0699] 实例1-3:实例中使用的线性肽的制备

[0700] 实例1-3-1:Fmoc-Ile-MeGly-Aze(2)-MeCha-MeGly-Asp(OMe)-pip,化合物1-3-1的合成

[0701] [Chem.36]

[0702] 

[0703] 将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(实例1-2-4中由化合物1-2-2(以0.452mmol/g)制备的化合物1-2-5)放入固相反应容器中,添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出。随后,添加TFE/DCM溶液(1/1(v/v),2.0mL),并且将混合物在室温下摇动2小时。此后,将溶液从玻璃料排出到茄形烧瓶中。随后,将树脂用TFE/DCM溶液(1/1(v/v),1.0mL)洗涤两次,并且将排出的溶液收集在茄形烧瓶中。对七个固相反应器进行同样的操作,合并排出的溶液,并且然后减压蒸馏除去溶剂。将所得残余物溶解于DCE(5mL)中,并且减压蒸馏除去溶剂两次,得到作为粗产物的化合物1-2-5*(209.2mg,71%)。该化合物不经进一步纯化而用于下一反应。

[0704] LCMS(ESI)m/z＝928.78(M+H)+

[0705] 保留时间:0.88分钟(分析条件SQDFA05)

[0706] 在氮气氛下,将三甲基甲硅烷基重氮甲烷的己烷溶液(0.6M,0.75mL,0.45mmol)在室温下逐滴添加到通过将化合物1-2-5*(209.2mg,0.23mmol)溶解在甲苯(0.75mL)和甲醇(1.50mL)中而获得的溶液中。将混合物在室温下搅拌5分钟,然后添加乙酸(0.013mL,0.23mmol),减压蒸馏除去溶剂,并且通过正相柱色谱法(DCM/甲醇)纯化由此获得的残余物,得到化合物1-3-1,Fmoc-Ile-MeGly-Aze(2)-MeCha-MeGly-Asp(OMe)-pip(175.9mg,83%)。

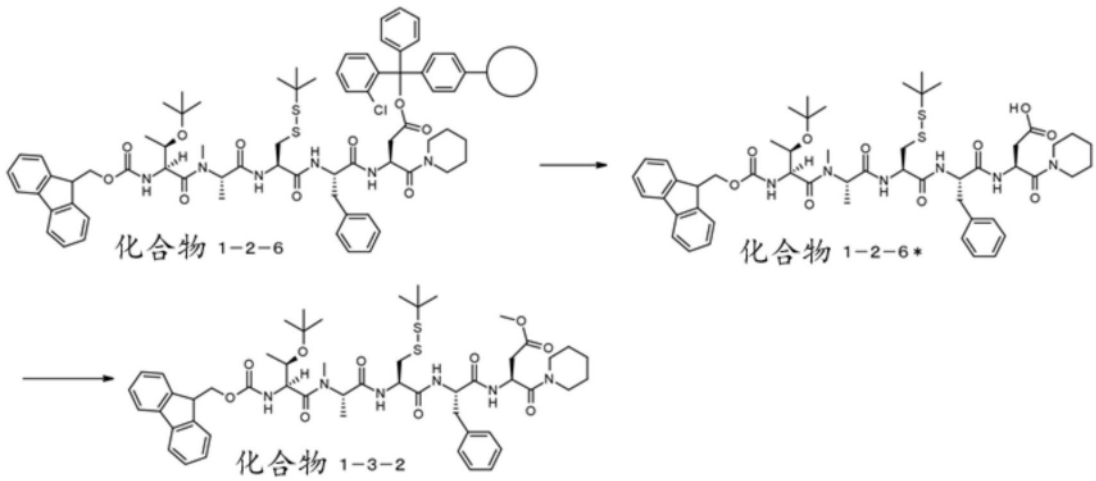
[0707] LCMS(ESI)m/z＝942.63(M+H)+

[0708] 保留时间:0.94分钟(分析条件SQDFA05)

[0709] 实例1-3-3:Fmoc-Thr(tBu)-MeAla-Cys(StBu)-Phe-Asp(OMe)-pip,化合物1-3-2

的合成

[0710] [Chem.37]

[0711] 

[0712] 将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(实例1-2-4中由化合物1-2-2(以0.452mmol/g)制备的化合物1-2-6)放入固相反应容器中,添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出。随后,添加TFE/DCM溶液(1/1(v/v),2.0mL),并且将混合物在室温下摇动2小时。此后,将溶液从玻璃料排出到茄形烧瓶中。随后,将树脂用TFE/DCM溶液(1/1(v/v),1.0mL)洗涤两次,并且将排出的溶液收集在茄形烧瓶中。对七个固相反应器进行同样的操作,合并排出的溶液,并且减压蒸馏除去溶剂。将所得残余物溶解于DCE(5mL)中,并且然后减压蒸馏除去溶剂两次,得到作为粗产物的化合物1-2-6*(202.8mg,64%)。该化合物不经进一步纯化而用于下一反应。

[0713] LCMS(ESI)m/z=1003.70(M+H)+

[0714] 保留时间:1.06分钟(分析条件SQDFA05)

[0715] 在氮气氛下,将三甲基甲硅烷基重氮甲烷的己烷溶液(0.6M,0.67mL,0.40mmol)在室温下逐滴添加到通过将化合物1-2-6*(202.8mg,0.20mmol)溶解在甲苯(0.67mL)和甲醇(1.35mL)中而获得的溶液中。将混合物在室温下搅拌5分钟,然后添加乙酸(0.012mL,0.20mmol),减压蒸馏除去溶剂,并且通过正相柱色谱法(乙酸乙酯/己烷)纯化由此获得的残余物,得到化合物1-3-2,Fmoc-Thr-(tBu)-MeAla-Cys(StBu)-Phe-Asp(OMe)-pip(168.1mg,82%)。

[0716] LCMS(ESI)m/z=1017.61(M+H)+

[0717] 保留时间:1.12分钟(分析条件SQDFA05)

[0718] 实例2:检查肽固相合成中试剂和溶剂对Fmoc脱保护步骤、树脂洗涤步骤和延长步骤影响的实验

[0719] 在肽的固相合成中,在Fmoc脱保护和树脂洗涤后进行氨基酸延长。在本实例中,使用化合物1-2-4作为肽负载固相树脂,改变各步骤中的试剂和溶剂,并且比较减少肽合成中形成的杂质的程度(二酮哌嗪消除化合物、6-元环脒骨架化合物和过度延长化合物)以确定一系列合适的条件。

[0720] 基本操作A(表5,运行1至7、14至15和29至30)

[0721] 将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(化合物1-2-4)放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此

后,将溶液从玻璃料中排出,并且随后将树脂用Fmoc脱保护期间使用的溶剂(每柱0.7mL)洗涤两次。添加Fmoc脱保护液(每柱0.7mL),在室温下混合物反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。Fmoc脱保护溶液通过将表5所示的碱以表5所示的体积百分比浓度(v/v%)溶解在Fmoc脱保护溶剂中来制备。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用洗涤溶剂(每柱0.7mL)洗涤六次。

[0722] 向如上所述获得的树脂中添加通过将Fmoc-MeLeu-OH(0.6mol/L)和Oxyma或HOAt(0.375mol/L)在延长溶剂(每柱0.3mL)中的溶液和DIC(10v/v%)或DsBC(12v/v%)在延长溶剂(每柱0.36mL)中的溶液混合而获得的溶液,并且将混合物在40℃下摇动2.5小时。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。

[0723] 例如,在表5中的运行5中,根据基本操作A进行以下程序。

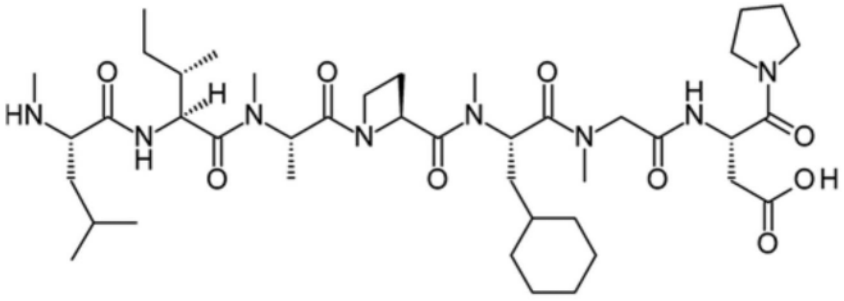
[0724] 将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(实例1-2-4中由化合物1-2-1(以0.552mmol/g)制备的化合物1-2-4)放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出,并且随后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤两次。添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的DMSO溶液(2v/v%,每柱0.7mL),并且将混合物在室温下反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤六次。

[0725] 向如上所述获得的树脂中添加通过将Fmoc-MeLeu-OH(0.6mol/L)和Oxyma(0.375mol/L)在DMSO(0.3mL)中的溶液和DIC(10v/v%)在DMSO(0.36mL)中的溶液混合而获得的溶液,并且将混合物在40℃下摇动2.5小时。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。

[0726] 为了检查反应进度,取出所得的树脂的一部分,用DCM溶胀,并且用DMF洗涤两次,然后添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的DMF溶液(2v/v%),并且使混合物在室温下反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。将溶液从玻璃料中排出,将树脂用DMF洗涤四次,并且用DCM洗涤四次,然后用含有DIPEA(0.045mol/L)的TFE/DCM溶液(1/1(v/v))分离肽。通过LCMS(SQDAA05 long)分析分离的溶液,以确认目标肽化合物(TM)(2-1*)、二酮哌嗪(DKP)消除化合物(化合物2-2*)、6元环脒骨架化合物(化合物2-3*)和MeLeu过度延长化合物(化合物2-4*)的形成。

[0727] 目标肽化合物(TM),H-MeLeu-Ile-MeAla-Aze(2)-MeCha-MeGly-Asp-吡咯(化合物2-1*)

[0728] [Chem.38]

[0729] 

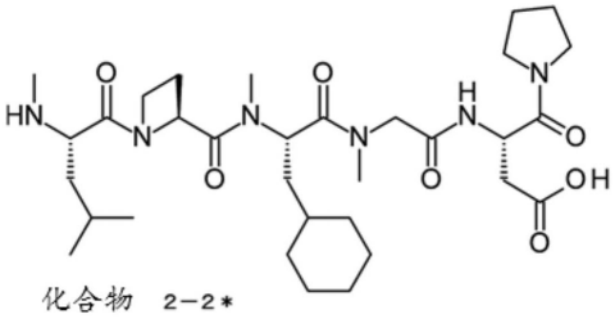
化合物 2-1*

[0730] LCMS(ESI)m/z=833.58(M+H)+

[0731] 保留时间:2.72分钟(分析条件SQDAA05 long)

[0732] 二酮哌嗪消除化合物,H-MeLeu-Aze(2)-MeCha-MeGly-Asp-吡咯(化合物2-2*)

[0733] [Chem.39]

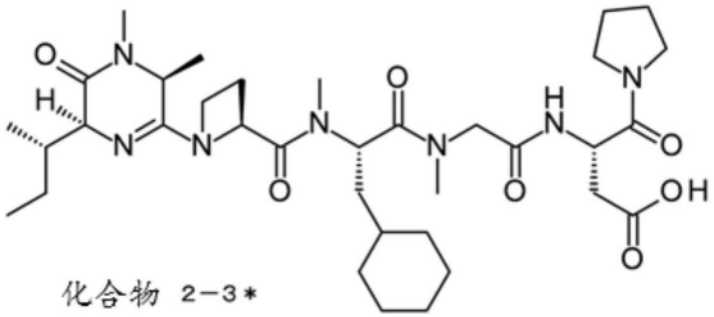
[0734] 

[0735] LCMS(ESI)m/z=635.45(M+H)+

[0736] 保留时间:2.24分钟(分析条件SQDAA05 long)

[0737] 6元环脒骨架化合物(化合物2-3*)

[0738] [Chem.40]

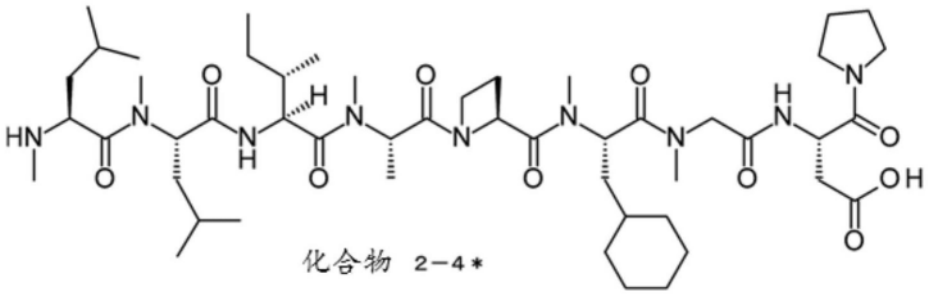
[0739] 

[0740] LCMS(ESI)m/z=688.47(M+H)+

[0741] 保留时间:2.52分钟(分析条件SQDAA05 long)

[0742] MeLeu过度延长化合物,H-MeLeu-MeLeu-Ile-MeAla-Aze(2)-MeCha-MeGly-Asp-吡咯(化合物2-4*)

[0743] [Chem.41]

[0744] 

[0745] LCMS(ESI)m/z=960.66(M+H)+

[0746] 保留时间:3.19分钟(分析条件SQDAA05 long)

[0747] 基本操作B(表5,运行8至13、16至23和25至28)

[0748] 将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(化合物1-2-4)放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出,并且随后将树脂用Fmoc脱保护期间使用的溶剂(每柱0.7mL)洗

涤两次。添加Fmoc脱保护液(每柱0.7mL),在室温下混合物反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。Fmoc脱保护溶液通过将表5所示的碱以表5所示的体积百分比浓度(v/v%)溶解在Fmoc脱保护溶剂中来制备。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用洗涤溶剂(每柱0.7mL)洗涤六次。

[0749] 向如上所述获得的树脂中添加通过将Fmoc-MeLeu-OH(4当量)在延长溶剂(0.25mL)中的溶液、脲类缩合剂或鏻类缩合剂(4当量)在延长溶剂(0.25mL)中和DIPEA(6当量)混合并将混合物静置约1至2分钟而获得的溶液,并且将混合物在室温下摇动4小时。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。

[0750] 例如,在表5中的运行8中,根据基本操作B进行以下程序。

[0751] 将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(实例1-2-4中由化合物1-2-1(以0.552mmol/g)制备的化合物1-2-4)放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出,并且随后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤两次。添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的DMSO溶液(2v/v%,每柱0.7mL),并且将混合物在室温下反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤六次。

[0752] 向如上所述获得的树脂中添加通过将Fmoc-MeLeu-OH(0.221mmol,4当量)的DMSO(0.25mL)溶液、[乙基氰基(亚氨基)乙酸根合-O2)三1-吡咯烷基鏻六氟磷酸酯(PyOxim)(0.221mmol,4当量)的DMSO(0.25mL)溶液和DIPEA(0.057mL,0.331mmol,6当量)混合并将混合物静置约1至2分钟而获得的溶液,并且将混合物在室温下摇动4小时。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。

[0753] 为了检查反应进度,取出所得的树脂的一部分,用DCM溶胀,并且用DMF洗涤两次,然后添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的DMF溶液(2v/v%),并且使混合物在室温下反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。将溶液从玻璃料中排出,将树脂用DMF洗涤四次,并且用DCM洗涤四次,然后用含有DIPEA(0.045mol/L)的TFE/DCM溶液(1/1(v/v))分离肽。通过LCMS(SQDAA05 long)分析分离的溶液。

[0754] 基本操作C(表5,运行24)

[0755] 将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(实例1-2-4中由化合物1-2-1(以0.552mmol/g)制备的化合物1-2-4)放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出,并且随后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤两次。添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的DMSO溶液(2%v/v,每柱0.7mL),并且将混合物在室温下反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤六次。

[0756] 向如上所述获得的树脂中添加Fmoc-MeLeu-Cl(稍后描述)(0.221mmol,4当量)的NMP(0.7mL)溶液和2,4,6-三甲基吡啶(0.55mmol,10当量)的混合物,并且将混合物在40℃下摇动1.5小时。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。Fmoc-MeLeu-Cl按以下方式制备。将(2S)-2-[9H-芴-9-基甲氧基羰基(甲基)氨基]-4-甲基戊酸(Fmoc-MeLeu-OH)(0.081g,0.22mmol)溶解在

二氯甲烷(0.44mL)中,并且逐滴添加DMF(0.017mL,0.22mmol),同时将溶液在冰浴中冷却。接下来,添加亚硫酰氯(0.024mL,0.33mmol)。将得到的反应混合物在室温搅拌30分钟,然后减压浓缩。向获得的残余物中添加甲苯(0.81mL,10v/w),并将混合物减压浓缩两次。将所得粗产物溶解于NMP(0.7mL)中,并将该溶液用于上述反应。

[0757] 为了检查反应进度,取出所得的树脂的一部分,用DCM溶胀,并且用DMF洗涤两次,然后添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的DMF溶液(2v/v%),并且使混合物在室温下反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。将溶液从玻璃料中排出,将树脂用DMF洗涤四次,并且用DCM洗涤四次,然后用含有DIPEA(0.045mol/L)的TFE/DCM溶液(1/1(v/v))分离肽。通过LCMS(SQDAA05 long)分析分离的溶液。

[0758] 二酮哌嗪消除化合物的形成是肽合成中众所周知的副反应。6元环脒骨架化合物的形成此前未见报道,并且是本申请发明人发现的新的肽合成问题。不受特定理论的束缚,当N-末端的氨基基团亲核攻击羰基基团,从N-末端形成第二个酰胺键,从而形成6元环,随后通过消除形成酰胺键的原始氨基基团时,形成二酮哌嗪消除化合物。另一方面,当类似地形成6元环时,进行6元环状脒骨架化合物的形成,随后消除通过亲核攻击形成的源自羰基基团的羟基基团。即,二酮哌嗪消除化合物的形成和6元脒骨架化合物的形成是由6元环的形成引起的共同的肽合成问题。

[0759] 下表5示出了获得的结果(化合物2-1*、化合物2-2*、化合物2-3*和化合物2-4*在各自条件下的LCMS中UV面积的相对比率以百分比表示)。

[0760]

[表 5]

运行	反应条件					面积%			
	Fmoc 脱保护		洗涤	延长		TM-DKP（化合物 2-2*）	脒化合物（化合物 2-3*）	TM（化合物 2-1*）	MeLeu 过度延长（化合物 2-4*）
	碱基	溶剂	溶剂	缩合剂	溶剂				
1	20% pip	DMF	DMF x 6	DIC/oxyma	DMF	7.56	8.05	84.39	0.00
2	2% DBU	DMF	DMF x 6	DIC/oxyma	DMF	2.42	5.41	90.18	2.00
3	20% pip	DMSO	DMSO x 6	DIC/oxyma	DMSO	2.16	1.65	96.19	0.00
4	4% TMG	DMSO	DMSO x 6	DIC/oxyma	DMSO	0.29	0.57	99.02	0.12
5	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	DIC/oxyma	DMSO	0.65	0.95	98.06	0.34
6	4% MTBD	DMSO	DMSO x 6	DIC/oxyma	DMSO	0.54	1.00	98.28	0.18
7	4% HP1(dma)	DMSO	DMSO x 6	DIC/oxyma	DMSO	0.58	0.83	98.49	0.10
8	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	PyOxim/DIPEA	DMSO	0.21	0.74	99.05	0.00
9	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	PyOxim/DIPEA	DMF	0.10	0.31	99.20	0.39
10	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	TATU/DIPEA	DMSO	0.25	1.32	98.04	0.39
11	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	HATU/DIPEA	DMSO	0.25	1.51	97.77	0.47
12	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	TOTU/DIPEA	DMSO	0.23	1.41	98.00	0.36
13	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	HOTU/DIPEA	DMSO	0.24	1.38	97.92	0.46
14	2% DBU	DMSO	DMF x 6	DIC/oxyma	DMSO	0.71	1.11	97.85	0.33
15	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	DIC/oxyma	DMF	0.67	2.00	86.59	10.74
16	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	PyAOP/DIPEA	DMSO	0.73	1.60	97.31	0.36
17	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	PyBOP/DIPEA	DMSO	0.57	1.48	97.75	0.20
18	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	COMU/DIPEA	DMSO	0.62	2.01	97.37	0.00
19	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	HBTU/DIPEA	DMSO	0.73	2.14	96.98	0.15

[0761]

20	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	HCTU/DIPEA	DMSO	0.54	1.64	97.27	0.55
21	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	TDBTU/DIPEA	DMSO	0.40	1.44	97.34	0.82
22	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	TBTU/DIPEA	DMSO	0.51	2.09	96.94	0.46
23	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	TCTU/DIPEA	DMSO	0.69	1.87	96.79	0.65
24	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	Fmoc-MeLeu-Cl/ 2,4,6-三甲基吡啶	NMP	0.17	1.96	95.87	2.00
25	2% DBU/2% pip	DMSO	DMSO x 6	PyOxim/DIPEA	DMSO	0.32	0.74	98.94	0.00
26	2% DBU/4% HP1(dma)	DMSO	DMSO x 6	PyOxim/DIPEA	DMSO	0.24	1.36	98.40	0.00
27	2% DBU/4% P1-tBu	DMSO	DMSO x 6	PyOxim/DIPEA	DMSO	0.18	1.67	98.15	0.00
28	2% DBU/4% P2-Et	DMSO	DMSO x 6	PyOxim/DIPEA	DMSO	0.18	2.84	96.98	0.00
29	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	DsBC/oxyma	DMSO	0.90	1.63	97.24	0.23
30	2% DBU	DMSO	DMSO x 6	DIC/HOAt	DMSO	1.38	3.31	85.75	9.56

[0762] 运行1和运行2包括Fmoc脱保护步骤、树脂洗涤步骤和延长步骤,这些步骤在普通肽合成中进行(比较实验)。例如,在运行2的条件下,Fmoc脱保护步骤中使用的碱是DBU,

Fmoc脱保护步骤、树脂洗涤步骤和延长步骤中使用的溶剂是DMF。确认了在此条件下,形成了约2%的缺乏两个残基的二酮哌嗪(DKP)消除化合物,并且形成了约5%的6元环脒骨架化合物。另一方面,确认了通过在Fmoc脱保护工序、树脂洗涤步骤和延长工序中使用DMSO作为溶剂,能够抑制二酮哌嗪消除化合物和6元环状脒骨架化合物的形成,并且能够抑制如在运行5中MeLeu过度延长化合物的形成。如运行3所示的结果,确认了在使用哌啶(pip)的条件下,哌啶(pip)是Fmoc脱保护中最常用的碱(pKa 19.35(在乙腈中),参考Eur.J.Org.Chem.2019,6735-6748)并且在Fmoc脱保护步骤、树脂洗涤步骤和延长步骤中的溶剂为DMSO,分别形成约2%的二酮哌嗪消除化合物和6元环状脒骨架化合物。另一方面,如运行4至7所示,确认了使用在共轭酸中pKa为23或更大的更强的碱能够抑制二酮哌嗪消除化合物和6元环脒骨架化合物的形成。

[0763] 如运行8、运行10至13、运行16至23所示的结果,确认了即使在Fmoc脱保护步骤、树脂洗涤步骤和延长步骤中使用DMSO作为溶剂的条件下进行延长反应中使用各种鏻/脲缩合剂,也能够抑制二酮哌嗪消除化合物和6元环脒骨架化合物的形成。

[0764] 如运行9所示的结果,确认了即使在Fmoc脱保护步骤和树脂洗涤步骤中使用DMSO溶剂,也能够抑制二酮哌嗪消除化合物和6元环脒骨架化合物的形成,并且在延长步骤中使用PyOxim作为缩合剂和除DMSO以外的溶剂。

[0765] 在Fmoc脱保护步骤中使用DMSO溶剂以及在树脂洗涤步骤和延长步骤之一中使用DMSO溶剂以及在另一步骤中使用DMF溶剂的结果显示在运行14和15中。与在所有三个步骤中使用DMSO溶剂的运行5相比,当使用DIC/Oxyma作为缩合剂时,仅在延长步骤中使用DMF溶剂导致6元环脒骨架化合物的形成略有增加。另一方面,确认了当仅在树脂洗涤步骤中使用DMF溶剂时,可以以与其中所有三个步骤均使用DMSO溶剂情况相同的程度抑制二酮哌嗪消除化合物和6元环脒骨架化合物的形成。

[0766] 在本发明中,在延长工序中可以使用酰基氯。例如,如运行24所示,确认了即使在Fmoc脱保护步骤和树脂洗涤步骤中在使用DMSO的条件下进行延长反应中在2,4,6-三甲基吡啶存在下将单独制备的酰基氯应用于NMP中,也可以抑制二酮哌嗪消除化合物和6元环状脒骨架化合物的形成。

[0767] 在本发明中,在Fmoc脱保护步骤中,两种或更多种碱基可以同时共存。在两种碱共存的情况下,例如,即使当通常已知的与Fmoc脱保护步骤中形成的二苯富烯给出加合物的哌啶共存时,也可以抑制二酮哌嗪消除化合物和6元环状脒骨架化合物的形成,只要将最佳碱(此处为DBU)用作运行25中的碱之一即可。

[0768] 确认了即使当碱性比DBU更强的HP1(dma)、P1tBu和P2Et共存时,也可以抑制二酮哌嗪消除化合物和6元环状脒骨架化合物的形成。

[0769] 如运行29和30所示的结果,确认了即使在Fmoc脱保护步骤、树脂洗涤步骤和延长步骤中使用DMSO的条件下进行延长反应中使用DsBC和HOAt,也能够抑制二酮哌嗪消除化合物和6元环脒骨架化合物的形成。

[0770] 因此,根据实例2的结果,确定了能够抑制二酮哌嗪消除化合物和6元环状脒骨架化合物的形成的各步骤(Fmoc脱保护步骤、树脂洗涤步骤和延长步骤)的概要条件。在抑制二酮哌嗪消除化合物和6元环脒骨架化合物的形成时,反应条件的组合不限于实例2中所示的条件。

[0771] 实例3:在已找到的肽序列条件下检验肽合成过程中二酮哌嗪消除减少作用的普遍性的实验

[0772] 在本实例中,对于实例1-2-4中制备的各种肽序列(肽序列),通过常见的常规方法(条件-1)和本发明的方法(条件-2)延长了核心1中所述的氨基酸(表6中化合物1-2-5至1-2-9肽序列被延长至核心2),并且比较了所形成的二酮哌嗪消除化合物的量。

[0773] 条件-1(传统方法)

[0774] 将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(化合物1-2-5至1-2-9(分别对应于表6中的运行1至5))放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出,并且随后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤两次。添加哌啶的DMF溶液(20v/v%,每柱0.7mL),并且将混合物在室温下反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤八次。

[0775] 向如上所述获得的树脂中添加通过将Fmoc保护的氨基酸(0.6mol/L)和HOAt(0.375mol/L)在DMF(0.3mL)中的溶液与DIC(10v/v%)在DMF(0.36mL)中溶液混合而获得的溶液,并且将混合物在40℃下摇动4小时。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。

[0776] 条件-2(本发明的方法)

[0777] 将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(化合物1-2-5至1-2-9(分别对应于表6中的运行1至5))放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出,并且随后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤两次。添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的DMSO溶液(2v/v%,每柱0.7mL),并且将混合物在室温下反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤六次。

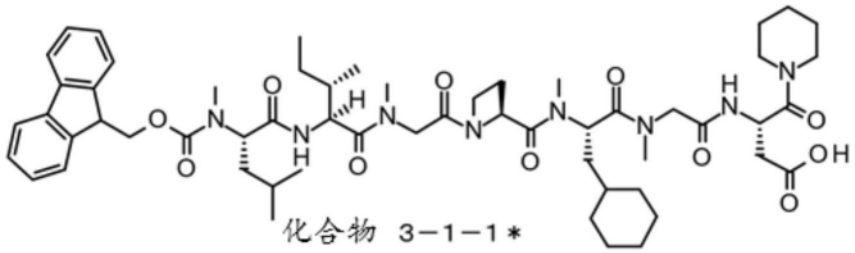
[0778] 向如上所述获得的树脂中添加通过将Fmoc保护的氨基酸(4当量)的DMSO(0.25mL)溶液、[乙基氰基(羟基亚氨基)乙酸根合-O2]三1-吡咯烷基鏻六氟磷酸酯(PyOxim)(4当量)的DMSO(0.25mL)溶液和DIPEA(6当量)混合并将混合物静置约1至2分钟而获得的溶液,并且将混合物在室温下摇动4小时。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。

[0779] 为了检查反应进度,取出所得的各树脂的一部分,并且用DCM溶胀,并且然后用含有DIPEA(0.045mol/L)的TFE/DCM溶液(1/1(v/v))分离肽。通过LCMS(SQDFA05 long)分析分离的溶液,以确认目标肽(TM)(化合物3-1-1*至3-1-5*)和二酮哌嗪消除化合物(化合物3-2-1*至3-2-5*)的形成。

[0780] 表6显示了对于每个序列和每个条件形成的二酮哌嗪(DKP)消除化合物的量。当LCMS中目标肽(TM)和二酮哌嗪(DKP)消除化合物的总UV面积百分比为100%时,表6中所示的二酮哌嗪(DKP)消除化合物的形成量是二酮哌嗪(DKP)消除化合物的UV面积百分比。

[0781] 目标肽化合物(TM),Fmoc-MeLeu-Ile-MeGly-Aze(2)-MeCha-MeGly-Asp-pip(运行1)(化合物3-1-1*)

[0782] [Chem.42]

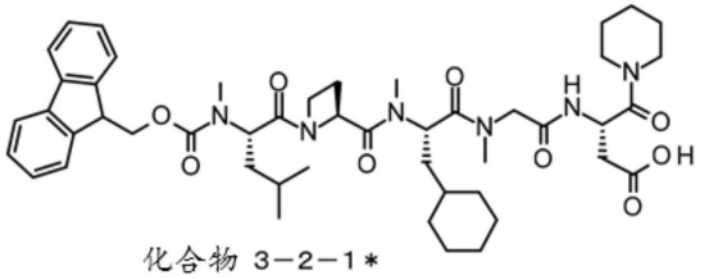
[0783] 

[0784] LCMS(ESI)m/z＝1055.68(M+H)+

[0785] 保留时间:3.10分钟(分析条件SQDFA05 long)

[0786] 二酮哌嗪消除化合物,Fmoc-MeLeu-Aze(2)-MeCha-MeGly-Asp-pip(运行1)(化合物3-2-1*)

[0787] [Chem.43]

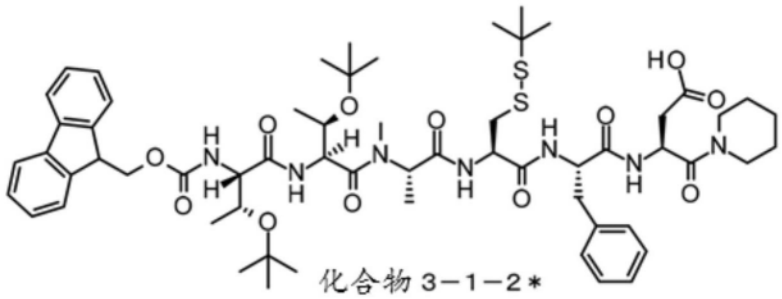
[0788] 

[0789] LCMS(ESI)m/z＝871.61(M+H)+

[0790] 保留时间:2.97分钟(分析条件SQDA05 long)

[0791] 目标肽化合物(TM),Fmoc-Thr(tBu)-Thr(tBu)-MeAla-Cys(StBu)-Phe-Asp-pip(运行2)(化合物3-1-2*)

[0792] [Chem.44]

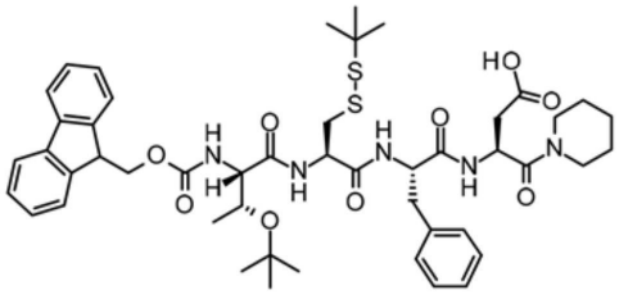
[0793] 

[0794] LCMS(ESI)m/z＝1160.61(M+H)+

[0795] 保留时间:3.81分钟(分析条件SQDA05 long)

[0796] 二酮哌嗪消除化合物,Fmoc-Thr(tBu)-Cys(StBu)-Phe-Asp-pip(运行2)(化合物3-2-2*)

[0797] [Chem.45]

[0798] 

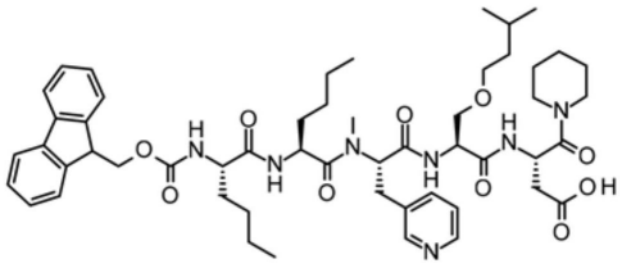
化合物 3-2-2*

[0799] LCMS(ESI)m/z＝918.44(M+H)+

[0800] 保留时间:3.49分钟(分析条件SQDA05 long)

[0801] 目标肽化合物(TM),Fmoc-Nle-MeAla(3-Pyr)-Ser(iPen)-Asp-pip(运行3)(化合物3-1-3*)

[0802] [Chem.46]

[0803] 

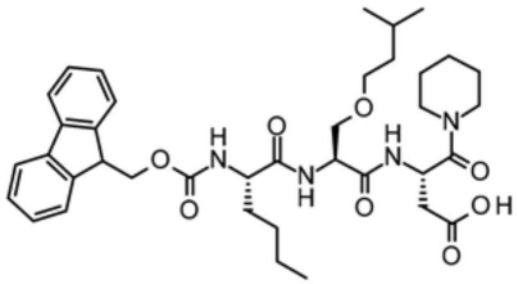
化合物 3-1-3*

[0804] LCMS(ESI)m/z＝968.59(M+H)+

[0805] 保留时间:2.50分钟(分析条件SQDA05 long)

[0806] 二酮哌嗪消除化合物,Fmoc-Nle-Ser(iPen)-Asp-pip(运行3)(化合物3-2-3*)

[0807] [Chem.47]

[0808] 

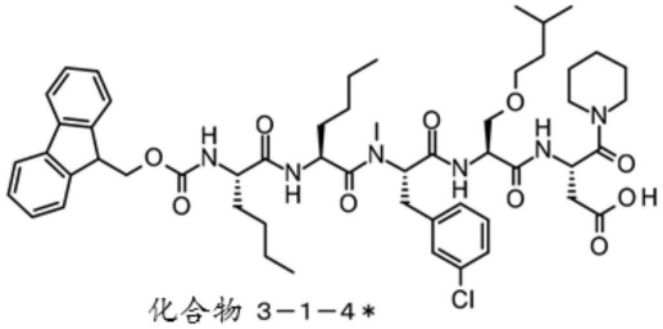
化合物 3-2-3*

[0809] LCMS(ESI)m/z＝693.72(M+H)+

[0810] 保留时间:2.88分钟(分析条件SQDA05 long)

[0811] 目标肽化合物(TM),Fmoc-Nle-MePhe(3-Cl)-Ser(iPen)-Asp-pip(运行4)(化合物3-1-4*)

[0812] [Chem.48]

[0813] 

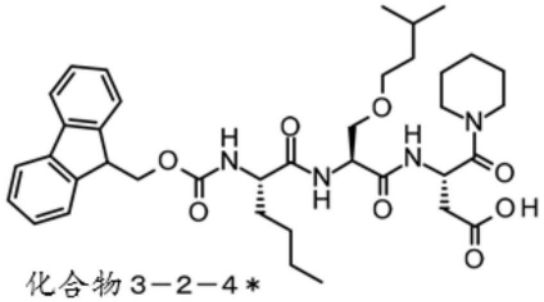
化合物 3－1－4＊

[0814] LCMS(ESI)m/z＝1001.54(M+H)+

[0815] 保留时间:3.55分钟(分析条件SQDA05 long)

[0816] 二酮哌嗪消除化合物,Fmoc-Nle-Ser(iPen)-Asp-pip(运行4)(化合物3-2-4*)

[0817] [Chem.49]

[0818] 

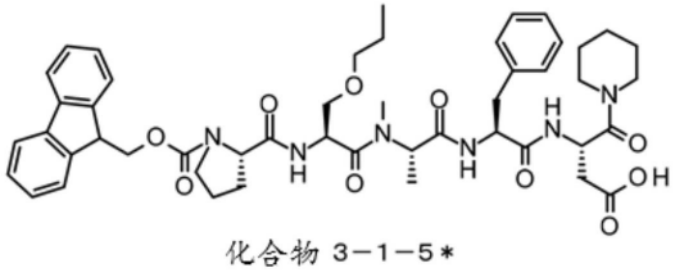
化合物 3－2－4＊

[0819] LCMS(ESI)m/z＝693.42(M+H)+

[0820] 保留时间:2.88分钟(分析条件SQDA05 long)

[0821] 目标肽化合物(TM),Fmoc-Pro-Ser(nPr)-MeAla-Phe-Asp-pip(运行5)(化合物3-1-5*)

[0822] [Chem.50]

[0823] 

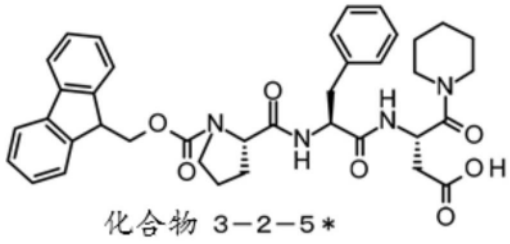
化合物 3－1－5＊

[0824] LCMS(ESI)m/z＝881.47(M+H)+

[0825] 保留时间:2.60分钟(分析条件SQDA05 long)

[0826] 二酮哌嗪消除化合物,Fmoc-Pro-Phe-Asp-pip(运行5)(化合物3-2-5*)

[0827] [Chem.51]

[0828] 

化合物 3－2－5＊

[0829] LCMS(ESI)m/z＝667.38(M+H)+

[0830] 保留时间:2.44分钟(分析条件SQDA05 long)

[0831]

[表 6]

运行	核心 01 中氨基酸延长前以固相负载的肽化合物为原料	TM	DKP 消除化合物	核心 01	核心 02	核心 03	核心 04	核心 05	核心 06	核心 07	核心 cterm	条件	条件-1 传统方法	条件-2 发明方法
1	化合物 1-2-5	化合物 3-1-1*	化合物 3-2-1*	MeLeu	Ile	MeGly	Aze(2)	MeCha	MeGly	Asp	pip	DKP 消除化合物的形成量	10.27%	0.43%
2	化合物 1-2-6	化合物 3-1-2*	化合物 3-2-2*	Thr(tBu)	Thr(tBu)	MeAla	Cys(StBu)	Phe	Asp		pip		5.93%	0.19%
3	化合物 1-2-7	化合物 3-1-3*	化合物 3-2-3*	Nle	Nle	MeAla(3-Pyr)	Ser(iPen)	Asp			pip		0.70%	0%
4	化合物 1-2-8	化合物 3-1-4*	化合物 3-2-4*	Nle	Nle	MePhe(3-Cl)	Ser(iPen)	Asp			pip		1.14%	0.54%
5	化合物 1-2-9	化合物 3-1-5*	化合物 3-2-5*	Pro	Ser(nPr)	MeAla	Phe	Asp			pip		4.88%	0.16%

[0832] 因此,根据实例3的结果,确认了在各种肽以及特定肽序列的合成中,与普通的常规方法相比,当通过本发明的方法进行延长时,表现出二酮哌嗪消除化合物抑制效果。

[0833] 实例4:除了二酮哌嗪消除的问题之外,在WO2022/097540的条件下检查中和步骤和用酸洗涤对于形成二聚脲化合物的顺序的影响的实验

[0834] 化合物1-2-10具有二酮哌嗪容易消除的序列。当应用WO2022/097540中的方法时,可以显著抑制二酮哌嗪的消除,但另一方面,已证实形成源自氨基甲酸盐的二聚脲化合物作为额外的副产物。不受特定理论的束缚,认为当氨基甲酸盐稳定地存在时,通过缩合剂与氨基甲酸阴离子反应形成的异氰酸酯经历相邻N末端的氨基基团的亲核攻击,从而发生分子间的反应,以形成二聚脲化合物。在本实例中,使用化合物1-2-10作为固相负载肽序列,添加中和步骤,在树脂洗涤步骤中添加酸和碱,并且确定在肽合成中形成杂质(二酮哌嗪化合物和二聚脲化合物)的减少程度消除,以确定一系列能够缓解这两个问题的适当条件。

[0835] 基本操作D(表7,运行1和4)

[0836] 将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(化合物1-2-10)放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出,并且随后将树脂用Fmoc脱保护中使用的溶剂(每柱0.7mL)洗涤两次。添加Fmoc脱保护液(每柱0.7mL),在室温下混合物反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。Fmoc脱保护溶液通过将表7所示的碱以表7所示的体积百分比浓度(v/v%)溶解在Fmoc脱保护溶剂中来制备。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂在运行1中用DMF洗涤八次,在运行4中用DMSO洗涤六次,其中溶剂的用量为每柱0.7mL。

[0837] 向如上所述获得的树脂中添加通过将Fmoc-MeAla-OH(0.6mol/L)和HOAt或Oxyma(0.375mol/L)溶解在延长溶剂中获得的溶液(每柱0.3mL)和通过将DIC(10v/v%)溶解在延长溶剂中获得的溶液(每柱0.36mL)的混合物,并且将混合物在40℃下摇动2.5小时。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。

[0838] 例如,在表7中的运行4中,根据基本操作D进行以下程序。

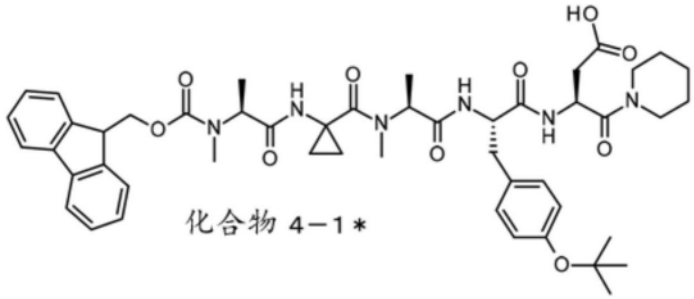
[0839] 将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(实例1-2-4中由化合物1-2-2(以0.452mmol/g)制备的化合物1-2-10)放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出,并且随后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤两次。添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的DMSO溶液(2%v/v,每柱0.7mL),并且将混合物在室温下反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤六次。

[0840] 向如上所述获得的树脂中添加Fmoc-MeAla-OH(0.6mol/L)和Oxyma(0.375mol/L)在DMSO(0.3mL)中的溶液和DIC(10v/v%)在DMSO(0.36mL)中的溶液的混合物,并且将混合物在40℃下摇动2.5小时。将溶液从玻璃料中排出,并且将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。

[0841] 为了检查反应进度,取出所得的树脂的一部分,并且用DCM溶胀,从玻璃料中排出溶液,并且然后用含有DIPEA(0.045mol/L)的TFE/DCM溶液(1/1(v/v))分离肽。通过LCMS(SQDFA05long)分析分离的溶液,以确认目标肽化合物(TM)(4-1*)、二酮哌嗪(DKP)消除化合物(化合物4-2*)和二聚脲(化合物4-3*)的形成。

[0842] 目标肽化合物(TM),Fmoc-MeAla-1-ACPrC-MeAla-Tyr(tBu)-Asp-pip(化合物4-1*)

[0843] [Chem.52]

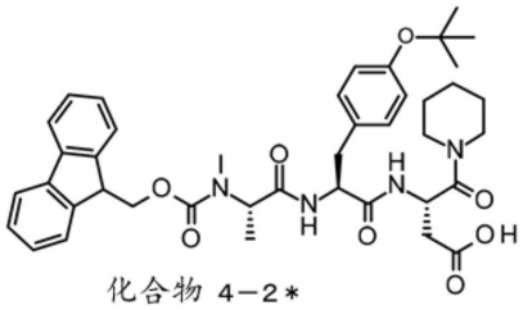
[0844] 

[0845] LCMS(ESI)m/z＝895.61(M+H)+

[0846] 保留时间:2.66分钟(分析条件SQDFA05long)

[0847] 二酮哌嗪消除化合物,Fmoc-MeAla-Tyr(tBu)-Asp-pip(化合物4-2*)

[0848] [Chem.53]

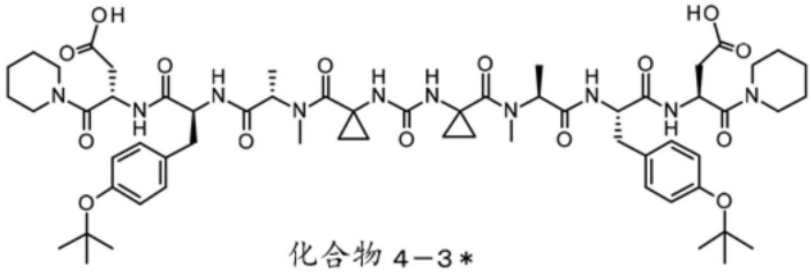
[0849] 

[0850] LCMS(ESI)m/z＝727.52(M+H)+

[0851] 保留时间:2.81分钟(分析条件SQDFA05long)

[0852] 二聚脲化合物(化合物4-3*)

[0853] [Chem.54]

[0854] 

[0855] LCMS(ESI)m/z＝1201.77(M+H)+

[0856] 保留时间:2.18分钟(分析条件SQDFA05long)

[0857] 基本操作E(表7,运行2、3和6至25)

[0858] 将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(化合物1-2-10)放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出,并且随后将树脂用Fmoc脱保护中使用的溶剂(每柱0.7mL)洗涤两次。添加Fmoc脱保护液(每柱0.7mL),在室温下混合物反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。Fmoc脱保护溶液通过将表7所示的碱以表7所示的体积百分比浓度(v/v%)溶解在

Fmoc脱保护溶剂中来制备。将溶液从玻璃料中排出,然后将树脂用表7中所示的洗涤溶剂(每柱0.7mL)洗涤。使用相同溶剂或不同溶剂或与酸洗组合进行多次洗涤操作。表7显示了洗涤操作的顺序和次数。

[0859] 向如上所述获得的树脂中添加通过将Fmoc-MeAla-OH(4当量)在延长溶剂(0.25mL)中的溶液、鏻缩合剂(4当量)在延长溶剂(0.25mL)中的溶液和DIPEA(6当量)混合并将混合物静置约1至2分钟而获得的溶液,并且将混合物在室温下摇动4小时。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。

[0860] 例如,在表7中的运行17中,根据基本操作E进行以下程序。将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(实例1-2-4中由化合物1-2-2(以0.452mmol/g)制备的化合物1-2-10)放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出,并且随后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤两次。添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的DMSO溶液(2%v/v,每柱0.7mL),并且将混合物在室温下反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DIPEA(2当量)的DMSO溶液(每柱0.7mL)洗涤两次。随后,将树脂用HOAt(2当量)和DIPEA(2当量)的DMSO溶液(每柱0.7mL)洗涤一次,并且然后用DIPEA(2当量)的DMSO溶液(每柱0.7mL)洗涤三次。

[0861] 向如上所述获得的树脂中添加通过将Fmoc-MeAla-OH(0.181mmol,4当量)的DMSO(0.25mL)溶液、[乙基氰基(羟基氨基)乙酸根合-O2]三1-吡咯烷基鏻六氟磷酸酯(PyOxim)(0.181mmol,4当量)的DMSO(0.25mL)溶液和DIPEA(0.047mL,0.271mmol,6当量)混合并将混合物静置约1至2分钟而获得的溶液,并且将混合物在室温下摇动4小时。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。

[0862] 为了检查反应进度,取出所得的树脂的一部分,并且用DCM溶胀,从玻璃料中排出溶液,并且然后用含有DIPEA(0.045mol/L)的TFE/DCM溶液(1/1(v/v))分离肽。通过LCMS(SQDFA05long)分析分离的溶液。

[0863] 基本操作F(表7,运行5)

[0864] 将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(实例1-2-4中由化合物1-2-2(以0.452mmol/g)制备的化合物1-2-10)放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出,并且随后将树脂用表7中所示的用于Fmoc脱保护中使用的溶剂(每柱0.7mL)洗涤两次。添加Fmoc脱保护液(每柱0.7mL),在室温下混合物反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。Fmoc脱保护溶液通过将表7所示的碱以表7所示的体积百分比浓度(v/v%)溶解在Fmoc脱保护溶剂中来制备。随后,作为中和步骤,添加0.4mL HOAt(0.25mol/L)(相对于固相负载肽约2当量)的DMSO溶液,并且将混合物静置5分钟。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用表7中所示的洗涤溶剂(每柱0.7mL)洗涤六次。向如上所述获得的树脂中添加通过将Fmoc-MeAla-OH(0.181mmol,4当量)的DMSO(0.3mL)溶液、[乙基氰基(羟基氨基)乙酸根合-O2]三1-吡咯烷基鏻六氟磷酸酯(PyOxim)(0.181mmol,4当量)的DMSO(0.3mL)溶液和DIPEA(0.047mL,0.271mmol,6当量)混合并将混合物静置约1至2分钟而获得的溶液,并且将混合物在室温下

摇动4小时。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。

[0865] 例如,在表7中的运行5中,根据基本操作F进行以下程序。将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(实例1-2-4中由化合物1-2-2(以0.452mmol/g)制备的化合物1-2-10)放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出。随后,将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的DMSO溶液(2v/v%,每柱0.7mL)添加到树脂中,并且将混合物静置10分钟,以进行Fmoc脱保护。随后,作为中和步骤,添加0.4mL HOAt(0.5mol/L)(相对于固相负载肽约4当量)的DMSO溶液,并且将混合物静置5分钟。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤六次。

[0866] 向如上所述获得的树脂中添加通过将Fmoc-MeAla-OH(0.181mmol,4当量)的DMSO(0.3mL)溶液、[乙基氰基(羟基氨基)乙酸根合-O2]三1-吡咯烷基鏻六氟磷酸酯(PyOxim)(0.181mmol,4当量)的DMSO(0.3mL)溶液和DIPEA(0.047mL,0.271mmol,6当量)混合并将混合物静置约1至2分钟而获得的溶液,并且将混合物在室温下摇动4小时。将溶液从玻璃料中排出,并且将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。

[0867] 为了检查反应进度,取出所得的树脂的一部分,并且用DCM溶胀,从玻璃料中排出溶液,并且然后用含有DIPEA(0.045mol/L)的TFE/DCM溶液(1/1(v/v))分离肽。通过LCMS(SQDFA05long)分析分离的溶液。

[0868] 下表12示出了获得的结果(化合物4-1*、化合物4-2*和化合物4-3*在各自条件下的LCMS中UV面积的相对比率以百分比表示)。

[0869]

[表 7]

运行	反应条件							面积%		
	Fmoc 脱保护		中和	酸洗涤	洗涤（酸洗涤以外的洗涤）	延长		二聚脲（化合物 4-3*）	TM（化合物 4-1*）	TM-DKP（化合物 4-2*）
	碱	溶剂	HOAt		溶剂	缩合剂	溶剂			
1	20% pip	DMF	-		DMF x 8	DIC/HOAt	NMP	0.00	24.75	75.25
2	2% DBU	甲苯	-		甲苯 x 2 + DCM x 2	PyOxim/DIPEA	DCM	28.35	67.82	3.83
3	2% DBU	DMSO	-		DMSO x 6	PyOxim/DIPEA	DMSO	6.87	83.14	9.99
4	2% DBU	DMSO	-		DMSO x 6	DIC/oxyma	DMSO	0.47	63.47	36.06
5	2% DBU	DMSO	2 当量	-	DMSO x 6	PyOxim/DIPEA	DMSO	4.27	88.04	7.69
6	2% DBU	DMSO	-	仅在第六次中，HOAt（2 当量）/DMSO（20 秒）	DMSO（第一次至第五次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	0.47	94.38	5.15
7	2% DBU	DMSO	-	仅在第六次中，HOAt（2 当量）/DMSO（5 分钟）	DMSO（第一次至第五次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	0.34	89.93	9.73
8	2% DBU	DMSO	-	仅在第六次中，HOAt（2 当量）/DMSO（10 分钟）	DMSO（第一次至第五次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	0.30	88.24	11.46
9	2% DBU	DMSO	-	仅在第六次中，HOAt-DIPEA（2 当量-2 当量）/DMSO（5 分钟）	DMSO（第一次至第五次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	0.47	92.86	6.67
10	2% DBU	DMSO	-	仅在第六次中，HOAt-DIPEA（2 当量-3 当量）/DMSO（5 分钟）	DMSO（第一次至第五次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	1.24	93.12	5.64
11	2%	DMSO	-	仅在第六次中，HOAt-DIPEA	DMSO（第一次至第五	PyOxim/DIPEA	DMSO	4.44	90.77	4.79

[0870]

	DBU			（2 当量-2 当量）/DMSO（20 秒）	次）					
12	2% DBU	DMSO	-	仅在第六次中，HOAt-DIPEA（2 当量-3 当量）/DMSO（20 秒）	DMSO（第一次至第五次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	3.89	91.91	4.20
13	2% DBU	DMSO	-	仅在第一次中，HOAt-DIPEA（2 当量-2 当量）/DMSO（20 秒）	DMSO（第二次至第六次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	9.74	86.14	4.12
14	2% DBU	DMSO	-	仅在第一次中，HOAt-DIPEA（2 当量-3 当量）/DMSO（20 秒）	DMSO（第二次至第六次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	5.84	89.70	4.46
15	2% DBU	DMSO	-	仅在第三次中，HOAt-DIPEA（2 当量-2 当量）/DMSO（20 秒）	DMSO（第一次至第二次，第四次至第六次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	1.73	93.64	4.63
16	2% DBU	DMSO	-	仅在第三次中，HOAt-DIPEA（2 当量-3 当量）/DMSO（20 秒）	DMSO（第一次至第二次，第四次至第六次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	3.38	92.36	4.26
17	2% DBU	DMSO	-	仅在第三次中，HOAt-DIPEA（2 当量-2 当量）/DMSO（20 秒）	DIPEA（2 当量）/DMSO（第一次至第二次，第四次至第六次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	4.20	94.05	1.75
18	2% DBU	DMSO	-	仅在第六次中，HOAt-DIPEA（2 当量-2 当量）/DMSO（20 秒）	DIPEA（2 当量）/DMSO（第一次至第五次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	3.85	93.80	2.35
19	2% DBU	DMSO	-	仅在第三次中，Oxyma-DIPEA（2 当量-2 当量）/DMSO（20 秒）	DIPEA（2 当量）/DMSO（第一次至第二次，第四次至第六次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	2.55	95.45	2.00
20	2% DBU	DMSO	-	仅在第三次中，4-硝基苯酚-DIPEA（2 当量-2 当量）/DMSO（20 秒）	DIPEA（2 当量）/DMSO（第一次至第二次，第四次至第六次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	2.71	94.73	2.56

[0871]

21	2% DBU	DMSO	-	仅在第三次中，HOOBt-DIPEA（2当量-2当量）/DMSO（20秒）	DIPEA（2当量）/DMSO（第一次至第二次，第四次至第六次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	3.00	94.06	2.94
22	2% DBU	DMSO	-	仅在第三次中，HOAt-Et3N（2当量-2当量）/DMSO（20秒）	Et3N（2当量）/DMSO（第一次至第二次，第四次至第六次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	7.41	87.68	4.91
23	2% DBU	DMSO	-	仅在第三次中，HOAt-2,6-二甲基吡啶（2当量-2当量）/DMSO（20秒）	2,6-二甲基吡啶（2当量）/DMSO（第一次至第二次，第四次至第六次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	2.98	92.08	4.94
24	2% DBU	DMSO	-	仅在第三次中，HOAt-2,4,6-三甲基吡啶（2当量-2当量）/DMSO（20秒）	2,4,6-三甲基吡啶（2当量）/DMSO（第一次至第二次，第四次至第六次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	2.57	93.20	4.23
25	2% DBU	DMSO	-	仅在第三次中，吡啶-HCl盐（2当量）/DMSO（20秒）	DIPEA（2当量）/DMSO（第一次至第二次，第四次至第六次）	PyOxim/DIPEA	DMSO	4.27	93.61	2.12

[0872] 运行1包括Fmoc脱保护步骤、树脂洗涤步骤和延长步骤,这些步骤通常在普通肽合成中进行(比较实验)。哌啶(pip)用作Fmoc脱保护步骤中的碱,并且DMF用作Fmoc脱保护步

骤、树脂洗涤步骤和延长步骤中的溶剂。在此条件下,形成了约75%的缺乏两个残基的二酮哌嗪(DKP)消除化合物,并形成了约25%的目标产物。另一方面,当使用WO 2022/097540中的方法时,可以将二酮哌嗪消除化合物的形成抑制至约4%,但形成约30%的二聚脲化合物作为额外的副产物,并且形成的目标产物率约为68%,如运行2中所示的结果。

[0873] 另一方面,如运行3所示,在所有Fmoc脱保护步骤、树脂洗涤步骤和延长步骤中使用DMSO作为溶剂将二酮哌嗪消除化合物的形成减少至约10%,并将二聚脲化合物的形成减少至约7%,并且将目标产物的形成增加至约83%。

[0874] 为了抑制二酮哌嗪消除化合物和二聚脲化合物的形成,将缩合固定为PyOxim,并且研究了Fmoc脱保护步骤后的树脂洗涤步骤的条件。

[0875] 首先,当在Fmoc脱保护步骤后进行添加2当量HOAt的中和步骤时,可以将二酮哌嗪消除化合物的形成抑制至约8%,将二聚脲化合物的形成抑制至约4%,如运行5所示。不受特定理论的束缚,能够减少二聚脲化合物形成的本结果可能是由于通过中和步骤进行了氨基甲酸盐的分解。当仅在六个树脂洗涤步骤中的第六个中,出于与中和步骤相同的目的而用含有2当量的HOAt的DMSO溶液进行洗涤时,与如运行6所示使用中和步骤的情况相比,可以进一步抑制二酮哌嗪消除化合物和二聚脲化合物的形成。

[0876] 另一方面,如运行6至8所示,随着暴露于含有2当量HOAt的DMSO溶液的时间变长,二酮哌嗪消除化合物的形成增加,但与运行1(代表通用方法)相比,仍然表现出优异的效果。

[0877] 即使当暴露于洗涤溶剂的时间较长时,通过将DIPEA添加到含有酸的洗涤溶剂中,也能够将二酮哌嗪消除化合物和二聚脲化合物的形成抑制至与短时间暴露情况相同的程度,如运行9至12所示。这证明了对于涉及增加每个步骤所需的时间(诸如洗涤时间)的扩大规模的适用性。

[0878] 确认了当在六次树脂洗涤步骤中的第一次中进行用含有HOAt和DIPEA的DMSO溶液的洗涤时,与运行13和14中所示在第六次树脂洗涤中进行相关洗涤的情况相比,二聚脲化合物的形成略有增加,而当在第三次树脂洗涤步骤中进行相关清洗时,可以将二酮哌嗪消除化合物和二聚脲化合物的形成抑制到运行15和16中所示在第六次树脂洗涤步骤中进行相关洗涤的情况相同的程度。

[0879] 另外,如运行17和18所示,确认了在六次树脂洗涤中,除了用含有HOAt和DIPEA的DMSO溶液洗涤以外的其他五次树脂洗涤步骤中,也进行了用含有2当量DIPEA的DMSO溶液洗涤的情况下,与在其他五个树脂清洗工序中仅用DMSO进行清洗的情况相比,能够进一步抑制二酮哌嗪消除化合物的生成。

[0880] 如运行19至25所示,确认了即使当使用Oxyma、4-硝基苯酚、HOOBt、三乙胺、2,6-二甲基吡啶、2,4,6-三甲基吡啶和盐酸吡啶作为用含有酸和碱的DMSO溶液进行洗涤中和用含有碱的DMSO溶液进行洗涤中以及其他五个树脂洗涤步骤中的酸和碱时,能够抑制二酮哌嗪消除化合物和二聚脲化合物的生成。

[0881] 因此,根据实例4的结果,确定了能够抑制二酮哌嗪消除化合物和二聚脲化合物形成的步骤的范围(Fmoc脱保护步骤、树脂洗涤步骤和延长步骤),其中肽序列中二酮哌嗪消除化合物成为问题,并且在WO 2022/097540的条件下形成二聚脲化合物成为另外的问题。关于抑制二酮哌嗪消除化合物和二聚脲化合物的形成,该实例是本发明的一部分,并且本

发明不限于实例4所示的反应条件的组合。

[0882] 实例5:用于检验在实例4中针对肽序列的条件下肽合成中二酮哌嗪消除的降低作用的普遍性的实验

[0883] 在本实例中,对于实例1-2-4中制备的各种肽序列通过常见的常规方法(条件-1)、实例3中所述的本发明方法(条件-2)和发明实例4中发现的方法(条件-3)延长核心1中所述的氨基酸(表8中延长至核心2的肽序列,化合物1-2-4至1-2-9和化合物1-2-11至1-2-12),并且比较了所形成的二酮哌嗪消除化合物和氨基甲酸盐衍生的副产物的量。

[0884] 在运行1中,核心1中所述的氨基酸通过实例2、表5、运行1中所述的方法作为常见的常规方法进行延长。

[0885] 条件3(实例4中的方法)

[0886] 将100mg实例1-2-4中制备的负载肽的固相树脂(化合物1-2-4至1-2-9、1-2-11和1-2-12(分别对应于表6中的运行1至8))放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出,并且随后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤两次。添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的DMSO溶液(2%v/v,每柱0.7mL),并且将混合物在室温下反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DIPEA(2当量)的DMSO溶液(每柱0.7mL)洗涤两次。随后,将树脂用HOAt(2当量)和DIPEA(2当量)的DMSO溶液(每柱0.7mL)洗涤一次,并且然后用DIPEA(2当量)的DMSO溶液(每柱0.7mL)洗涤三次。

[0887] 向如上所述获得的树脂中添加Fmoc保护的氨基酸(4当量)的DMSO(0.25mL)溶液、[乙基氰基(羟基氨基)乙酸根合-02]三1-吡咯烷基鏻六氟磷酸酯(PyOxim)(4当量)的DMSO(0.25mL)溶液和DIPEA(6当量)并将混合物静置约1至2分钟而获得的溶液,并且将混合物在室温下摇动4小时。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。

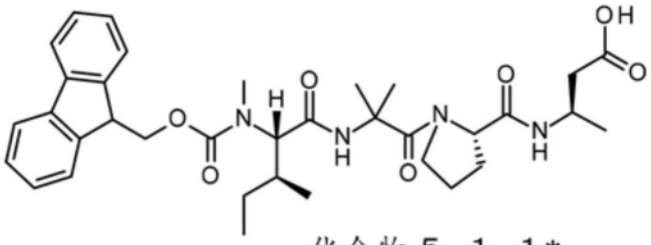
[0888] 为了检查反应进度,取出所得的各树脂的一部分,并且用DCM溶胀,并且然后用含有DIPEA(0.045mol/L)的TFE/DCM溶液(1/1(v/v))分离肽。通过LCMS(SQDFA05 long)分析分离的溶液,以确认目标肽(TM)(化合物3-1-1*至3-1-5*和化合物5-1-1*至5-1-2*)和二酮哌嗪消除化合物(化合物3-2-1*至3-2-5*和化合物5-2-1*至5-2-2*)的形成。

[0889] 在运行1中,为了检查反应进度,取出一部分获得的树脂,用DCM溶胀,并且用DMF洗涤两次,然后添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的DMF溶液(2v/v%),并且使混合物在室温下反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。将溶液从玻璃料中排出,将树脂用DMF洗涤四次,并且用DCM洗涤四次,并且然后用含有DIPEA(0.045mol/L)的TFE/DCM溶液(1/1(v/v))分离肽。通过LCMS(SQDAA05long)分析分离的溶液,以确认目标肽(TM)(化合物2-1*)、二酮哌嗪消除化合物(化合物2-2*)和6元环脒骨架化合物(化合物2-3*)的形成。

[0890] 表8显示了对于每个序列和每个条件形成的二酮哌嗪(DKP)消除化合物的量。当LCMS中目标肽(TM)、二酮哌嗪(DKP)消除化合物和氨基甲酸盐衍生的副产物的总UV面积百分比为100%时,表8中所示的二酮哌嗪(DKP)消除化合物的形成量是二酮哌嗪(DKP)消除化合物的UV面积百分比。表8显示了的运行1中形成的二酮哌嗪(DKP)消除化合物的量包括形成的6元环状脒骨架化合物的量。

[0891] 目标肽化合物(TM),Fmoc-MeIle-Aib-Pro-D-3-Abu-OH(运行7)(化合物5-1-1*)

[0892] [Chem.55]

[0893] 

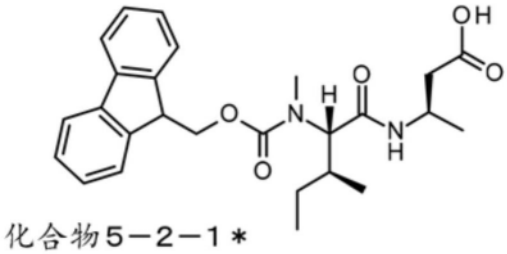
化合物 5－1－1＊

[0894] LCMS(ESI)m/z＝633.42(M-H)-

[0895] 保留时间:2.41分钟(分析条件SQDA05 long)

[0896] 二酮哌嗪消除化合物,Fmoc-MeIle-D-3-Abu-OH(运行7)(化合物5-2-1*)

[0897] [Chem.56]

[0898] 

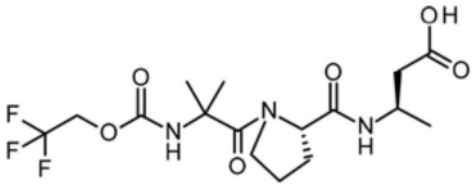
化合物5－2－1＊

[0899] LCMS(ESI)m/z＝453.55(M+H)+

[0900] 保留时间:2.46分钟(分析条件SQDFA05 long)

[0901] 氨基甲酸盐衍生的副产物(运行7)(化合物5-3-1*)

[0902] [Chem.57]

[0903] 

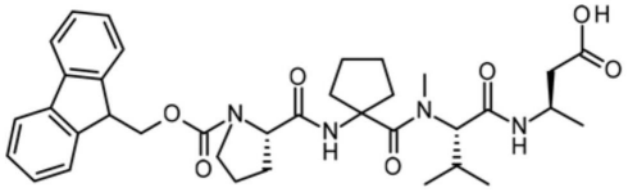
化合物 5－3－1＊

[0904] LCMS(ESI)m/z＝412.23(M+H)+

[0905] 保留时间:1.03分钟(分析条件SQDFA05 long)

[0906] 目标肽化合物(TM),Fmoc-Pro-cLeu-MeVal-D-3-Abu-OH(运行8)(化合物5-1-2*)

[0907] [Chem.58]

[0908] 

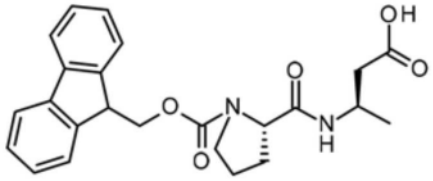
化合物 5－1－2＊

[0909] LCMS(ESI)m/z＝645.41(M-H)-

[0910] 保留时间:2.39分钟(分析条件SQDFA05 long)

[0911] 二酮哌嗪消除化合物,Fmoc-Pro-D-3-Abu-OH(运行8)(化合物5-2-2*)

[0912] [Chem.59]

[0913] 

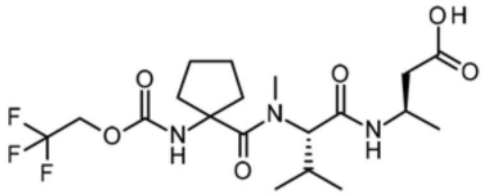
化合物 5－2－2＊

[0914] LCMS(ESI)m/z＝423.53(M+H)+

[0915] 保留时间:1.87分钟(分析条件SQDFA05 long)

[0916] 氨基甲酸盐衍生的副产物(运行8)(化合物5-3-2*)

[0917] [Chem.60]

[0918] 

化合物 5－3－2＊

[0919] LCMS(ESI)m/z＝452.24(M-H)-

[0920] 保留时间:1.58分钟(分析条件SQDFA05 long)

[0921]

[表 8]

运行	核心 01 中氨基酸延长前以固相负载的肽化合物为原料	TM	DKP 消除化合物	核心 01	核心 02	核心 03	核心 04	核心 05	核心 06	核心 07	核心 cterm	条件	条件-1 传统方法（比较实例）		条件-2 实例 3 的方法		条件-3 实例 4 中的方法	
													氨基甲酸盐衍生的副产物	DKP 消除化合物	氨基甲酸盐衍生的副产物	DKP 消除化合物	氨基甲酸盐衍生的副产物	DKP 消除化合物
1	化合物 1-2-4	化合物 2-1*	化合物 2-2*	MeLeu	Ile	MeAla	Aze (2)	MeCha	MeGly	Asp	吡咯		0%	15.61%*	0%	1.11%**	0%	1.69%***
2	化合物 1-2-5	化合物 3-1-1*	化合物 3-2-1*	MeLeu	Ile	MeGly	Aze (2)	MeCha	MeGly	Asp	pip		0%	10.27%	0%	0.43%	0%	0.73%
3	化合物 1-2-6	化合物 3-1-2*	化合物 3-2-2*	Thr (tBu)	Thr (tBu)	MeAla	Cys (StBu)	Phe	Asp		pip		0%	5.93%	0%	0.19%	0%	0.26%
4	化合物 1-2-7	化合物 3-1-3*	化合物 3-2-3*	Nle	Nle	MeAla (3-Pyr)	Ser (iPen)	Asp			pip		0%	0.70%	0%	0%	0%	0%
5	化合物 1-2-8	化合物 3-1-4*	化合物 3-2-4*	Nle	Nle	MePhe (3-Cl)	Ser (iPen)	Asp			pip		0%	1.14%	0%	0.54%	0%	0.23%
6	化合物 1-2-9	化合物 3-1-5*	化合物 3-2-5*	Pro	Ser (nPr)	MeAla	Phe	Asp			pip		0%	4.88%	0%	0.16%	0%	0%
7	化合物 1-2-11	化合物 5-1-1*	化合物 5-2-1*	MeIle	Aib	Pro	D-3-Abu				无		0%	33.88%	29.14%	0%	0%	0.23%

[0922]

8	化合物 1-2-12	化合物 5-1-2*	化合物 5-2-2*	Pro	cLeu	MeVal	D-3-Abu			无								
												0%	0.89%	7.45%	0%	0%	0%	

含哚化合物（化合物 2-3）8.05%
**含哚化合物（化合物 2-3*）0.90%
***含哚化合物（化合物 2-3*）1.14%

[0923] 从运行1至6的结果,确认了在各种肽以及实例4中描述的序列的合成中,当通过实例4中发现的方法(条件-3)进行延长时表现出二酮哌嗪消除化合物抑制效果与常见的常规

方法比较。

[0924] 在运行7和8中,确认了当将实例3(条件2)的方法应用于这些序列时,与常规方法相比,可以抑制二酮哌嗪消除化合物的形成,但形成氨基甲酸盐衍生的副产物(化合物5-3-1*和化合物5-3-2*)。不受特定理论的束缚,副产物的形成可能是因为当氨基甲酸盐稳定存在时,通过缩合剂与氨基甲酸阴离子反应形成的异氰酸酯受到分离过程中使用的TFE产生的亲核攻击。

[0925] 确认了当通过本发明实例4(条件-3)中发现的方法对这些序列进行延长时,可以抑制氨基甲酸盐衍生的副产物和二酮哌嗪消除化合物的形成(运行7和8)。能够减少源自氨基甲酸盐的副产物的本结果可能是由于通过用酸洗涤氨基甲酸盐进行了分解。

[0926] 因此,根据实例5的结果确认了在各种肽以及特定肽序列的合成中,与常见的常规方法相比,当通过实例4中的方法进行延长时,可以普遍地抑制二酮哌嗪消除化合物和氨基甲酸盐衍生的副产物的形成。

[0927] 实例6:用于检验在实例4中的条件下对于待延长的羧酸底物在肽合成过程中二酮哌嗪消除的降低作用的普遍性的实验

[0928] 在本实例中,核心1中描述的各种羧酸通过实例4(条件-4)中针对实例1-2-4中制备的肽序列(化合物1-2-10)中发现的方法进行延长,并且比较了形成的二酮哌嗪消除化合物和二聚脲化合物的量。

[0929] 条件4(实例4中的方法)

[0930] 将100mg实例1-2-2中制备的负载肽的固相树脂(实例1-2-4中由化合物1-2-2(以0.452mmol/g)制备的化合物1-2-10)放入固相反应容器中,在用氮气吹扫的手套箱内添加DCM(1.0mL),并且将混合物静置10分钟以使树脂溶胀。此后,将溶液从玻璃料中排出,并且随后将树脂用DMSO(每柱0.7mL)洗涤两次。添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的DMSO溶液(2v/v%,每柱0.7mL),并且将混合物在室温下反应10分钟,以进行Fmoc基团的脱保护。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DIPEA(2当量)的DMSO溶液(每柱0.7mL)洗涤两次。随后,将树脂用HOAt(2当量)和DIPEA(2当量)的DMSO溶液(每柱0.7mL)洗涤一次,并且然后用DIPEA(2当量)的DMSO溶液(每柱0.7mL)洗涤三次。

[0931] 向如上所述获得的树脂中添加通过将待延长的羧酸(0.181mmol,4当量)(表9中描述的)在DMSO(0.25mL)中的溶液、[乙基氰基(羟基氨基)乙酸根合-02]三1-吡咯烷基鏻六氟磷酸酯(PyOxim)(0.181mmol,4当量)的DMSO(0.25mL)溶液和DIPEA(0.047mL,0.271mmol,6当量)混合并将混合物静置约1至2分钟而获得的溶液,并且将混合物在室温下摇动4小时。将溶液从玻璃料中排出,并且然后将树脂用DMF(每柱0.7mL)洗涤四次并且用DCM(每柱0.7mL)洗涤四次,并且干燥。

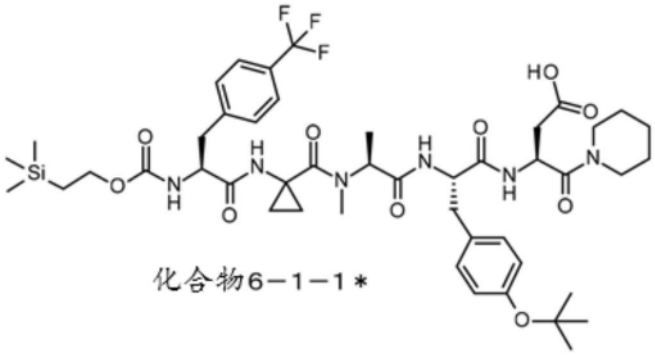
[0932] 为了检查反应进度,取出所得的各树脂的一部分,并且用DCM溶胀,并且然后用含有DIPEA(0.045mol/L)的TFE/DCM溶液(1/1(v/v))分离肽。通过LCMS(SQDFA05long或SQDAA05long)分析分离的溶液,以确认目标肽(TM)(化合物6-1-1*至3-1-6*)、二酮哌嗪消除化合物(化合物6-2-1*至6-2-6*)和二聚脲化合物(化合物4-3*)的形成。

[0933] 表9显示了对于每个序列形成的二酮哌嗪消除化合物(TM-DKP)和二聚脲化合物的量。当LCMS中的目标肽(TM)、二酮哌嗪(DKP)消除化合物和二聚脲化合物的总UV面积百分比为100%时,表9中所示的二酮哌嗪(DKP)消除化合物和二聚脲化合物各自形成的量是二酮

哌嗪(DKP)消除化合物和二聚脲化合物各自的UV面积百分比。

[0934] 目标肽化合物(TM),Teoc-Phe(4-CF3)-1-ACPrC-MeAla-Tyr(tBu)-Asp-pip(运行1)(化合物6-1-1*)

[0935] [Chem.61]

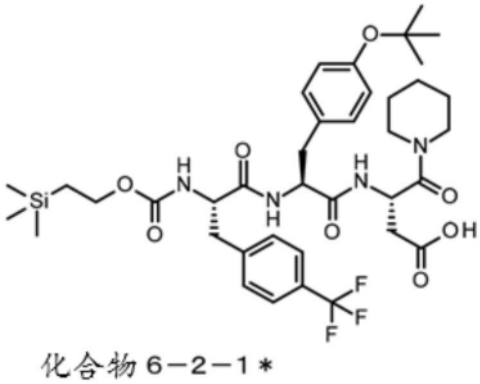
[0936] 

[0937] LCMS(ESI)m/z＝947.60(M+H)+

[0938] 保留时间:2.99分钟(分析条件SQDFA05long)

[0939] 二酮哌嗪消除化合物,Teoc-Phe(4-CF3)-Tyr(tBu)-Asp-pip(运行1)(化合物6-2-1*)

[0940] [Chem.62]

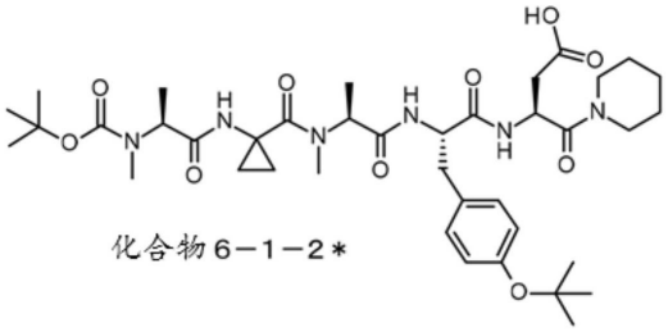
[0941] 

[0942] LCMS(ESI)m/z＝779.53(M+H)+

[0943] 保留时间:3.11分钟(分析条件SQDFA05long)

[0944] 目标肽化合物(TM),Boc-MeAla-1-ACPrC-MeAla-Tyr(tBu)-Asp-pip(运行2)(化合物6-1-2*)

[0945] [Chem.63]

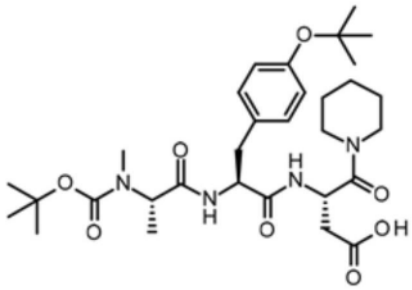
[0946] 

[0947] LCMS(ESI)m/z＝773.62(M+H)+

[0948] 保留时间:2.18分钟(分析条件SQDFA05long)

[0949] 二酮哌嗪消除化合物,Boc-MeAla-Tyr(tBu)-Asp-pip(运行2)(化合物6-2-2*)

[0950] [Chem.64]

[0951] 

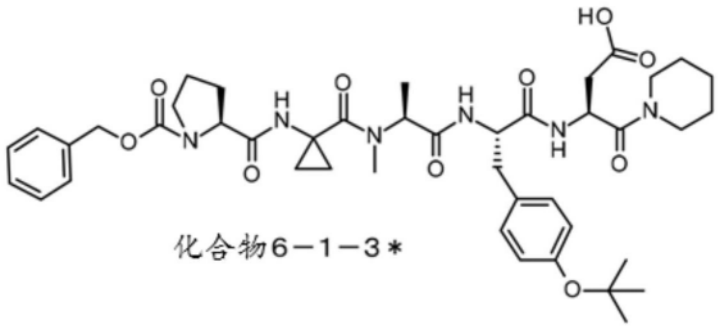
化合物6-2-2*

[0952] LCMS(ESI)m/z＝603.58(M-H)-

[0953] 保留时间:2.29分钟(分析条件SQDFA05long)

[0954] 目标肽化合物(TN),Cbz-Pro-1-ACPrC-MeAla-Tyr(tBu)-Asp-pip(运行3)(化合物6-1-3*)

[0955] [Chem.65]

[0956] 

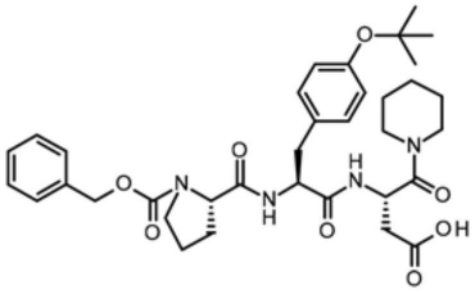
化合物6-1-3*

[0957] LCMS(ESI)m/z＝819.58(M+H)+

[0958] 保留时间:2.16分钟(分析条件SQDFA05long)

[0959] 二酮哌嗪消除化合物,Cbz-Pro-Tyr(tBu)-Asp-pip(运行3)(化合物6-2-3*)

[0960] [Chem.66]

[0961] 

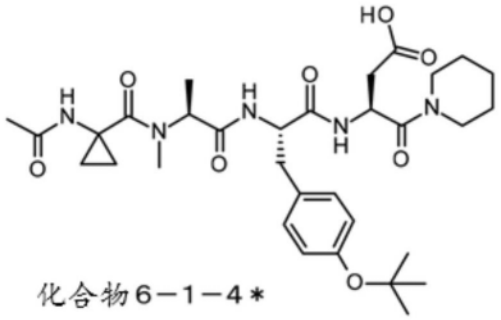
化合物6-2-3*

[0962] LCMS(ESI)m/z＝649.61(M+H)+

[0963] 保留时间:2.27分钟(分析条件SQDFA05long)

[0964] 目标肽化合物(TM),Ac-1-ACPrC-MeAla-Tyr(tBu)-Asp-pip(运行4)(化合物6-1-4*)

[0965] [Chem.67]

[0966] 

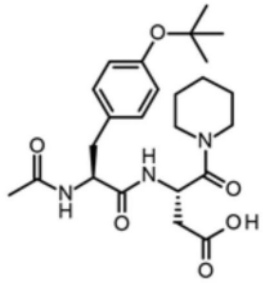
化合物6－1－4＊

[0967] LCMS(ESI)m/z＝630.50(M+H)+

[0968] 保留时间:2.21分钟(分析条件SQDFA05long)

[0969] 二酮哌嗪消除化合物,Ac-Tyr(tBu)-Asp-pip(运行4)(化合物6-2-4*)

[0970] [Chem.68]

[0971] 

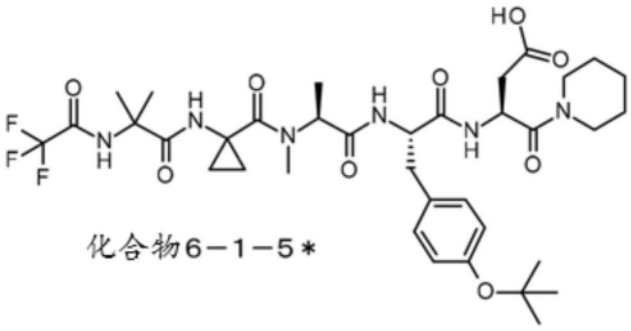
化合物6－2－4＊

[0972] LCMS(ESI)m/z＝462.42(M+H)+

[0973] 保留时间:2.17分钟(分析条件SQDFA05long)

[0974] 目标肽化合物(TM),Tfa-Aib-1-ACPrC-MeAla-Tyr(tBu)-Asp-pip(运行5)(化合物6-1-5*)

[0975] [Chem.69]

[0976] 

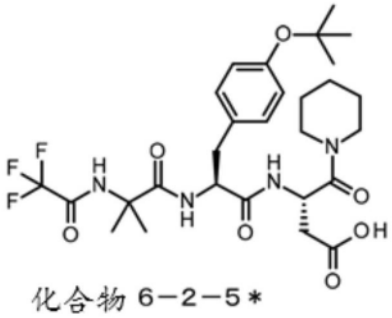
化合物6－1－5＊

[0977] LCMS(ESI)m/z＝769.56(M+H)+

[0978] 保留时间:1.90分钟(分析条件SQDFA05long)

[0979] 二酮哌嗪消除化合物,Tfa-Aib-Tyr(tBu)-Asp-pip(运行5)(化合物6-2-5*)

[0980] [Chem.70]

[0981] 

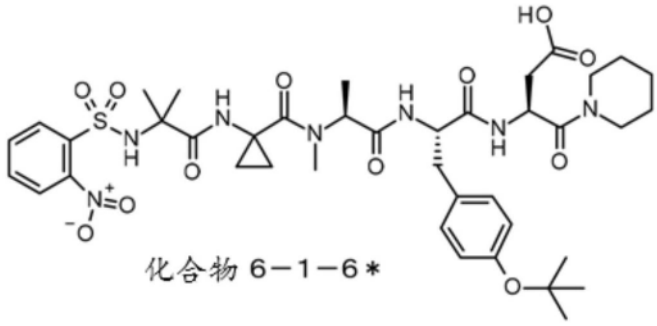
化合物6-2-5*

[0982] LCMS(ESI)m/z＝601.54(M+H)+

[0983] 保留时间:1.98分钟(分析条件SQDFA05long)

[0984] 目标肽化合物(TM),Ns-Aib-1-ACPrC-MeAla-Tyr(tBu)-Asp-pip(运行6)(化合物6-1-6*)

[0985] [Chem.71]

[0986] 

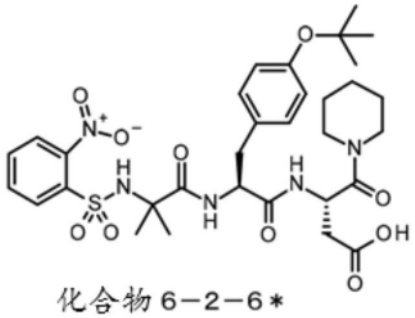
化合物6-1-6*

[0987] LCMS(ESI)m/z＝858.54(M+H)+

[0988] 保留时间:2.09分钟(分析条件SQDFA05long)

[0989] 二酮哌嗪消除化合物,Ns-Aib-Tyr(tBu)-Asp-pip(运行6)(化合物6-2-6*)

[0990] [Chem.72]

[0991] 

化合物6-2-6*

[0992] LCMS(ESI)m/z＝690.41(M+H)+

[0993] 保留时间:2.17分钟(分析条件SQDFA05long)

[0994] [表9]

[0995]

				面积%		
运行	羧酸被延长	TM	TM-DKP	二聚脲（化合物4-3*）	TM-DKP	TM
1	Teoc-Phe(4-CF3)-OH	化合物 6-1-1*	化合物 6-2-1*	4.52	1.10	94.38
2	Boc-MeAla-OH	化合物 6-1-2*	化合物 6-2-2*	8.97	2.09	88.94
3	Cbz-Pro-OH	化合物 6-1-3*	化合物 6-2-3*	6.18	1.67	92.15
4	AcOH	化合物 6-1-4*	化合物 6-2-4*	4.17	4.05	91.78
5	Tfa-Aib-OH	化合物 6-1-5*	化合物 6-2-5*	16.37	1.25	82.38
6	Ns-Aib-OH	化合物 6-1-6*	化合物 6-2-6*	25.14	1.69	73.17

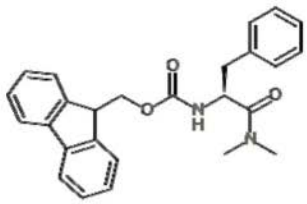
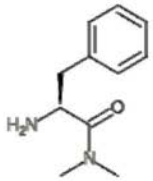
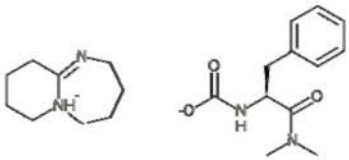
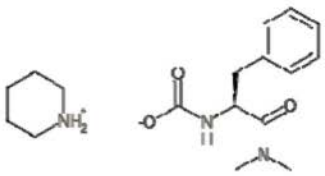
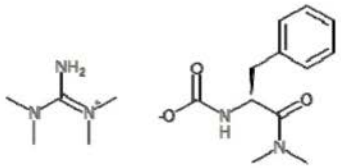
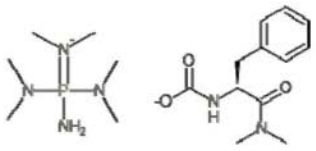
[0996] 因此,根据实例6的结果确认了在各种羧酸以及特定Fmoc氨基酸的延长中,可以抑制在通过本发明的方法进行延长时合成目标肽的二酮哌嗪消除化合物和二聚脲化合物的形成。

[0997] 实例7:Fmoc脱保护步骤中氨基甲酸盐的存在的检查以及对二酮哌嗪消除的影响的检查

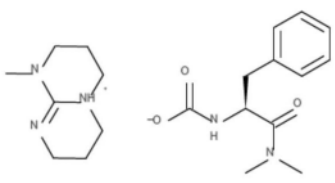
[0998] 下表显示实例中描述的化合物。

[0999] [表10]

[1000]

化合物编号	缩写	结构式	名称
1-4-1	Fmoc-Phe-NMe2		9H-芴-9-基甲基 N-[(1S)-1-苄基-2-(二甲基氨基)-2-氧基-乙基]氨基甲酸酯
1-4-2	H-Phe-OH		(2S)-2-氨基-N,N-二甲基-3-苯基-丙酰胺
1-4-3a	DBU·HOCO-Phe-NMe2		N-[(1S)-1-苄基-2-(二甲基氨基)-2-氧代-乙基]氨基甲酸酯 DBU 盐
1-4-3b	哌啶·HOCO-Phe-NMe2		N[(1S)-1-苄基-2-(二甲基氨基)-2-氧代-乙基]氨基甲酸酯哌啶鎓盐
1-4-3c	TMG·HOCO-Phe-NMe2		N-[(1S)-1-苄基-2-(二甲基氨基)-2-氧代-乙基]氨基甲酸酯 TMG 盐
1-4-3d	HP1(dma)·HOCO-Phe-NMe2		N-[(1S)-1-苄基-2-(二甲基氨基)-2-氧代-乙基]氨基甲酸酯 HP1 (dma) 盐

[1001]

1-4-3e	MTBD·HOCO-Phe-NMe2		N-[(1S)-1-苄基-2-(二甲基氨基)-2-氧代-乙基]氨基甲酸酯 MTBD 盐

[1002] 在实例中,使用以下缩写。

[1003] NMR:核磁共振

[1004] ROESY:旋转框架欧沃豪效应光谱

[1005] NOESY:核欧沃豪斯效应光谱

[1006] HSQC:异核单量子相关

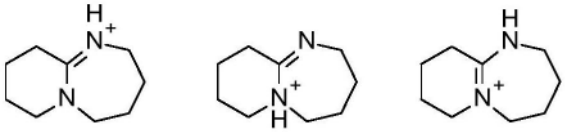
[1007] HMBC:异核多键相关

[1008] cpd.:化合物

[1009] 使用Bruker制造的AVANCE III 600Cryo-TCI或AVANCE III HD 600BBFO在298K下进行NMR测量。

[1010] 当含有多个氮原子的碱质子化成阳离子以与体系中的阴离子形成盐时,其中任何氮原子被质子化的阳离子可以给出阳离子源。例如,在1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)的情况下,下面所示的三种阳离子可以给出阳离子源,并且在本说明书中,由任何阳离子与相应的阴离子形成的盐没有区别,并且均称为DBU盐(图1)。其他碱也同样如此。例如,类似地由1,1,3,3-四甲基胍(TMG)或亚氨基三(二甲基氨基)正膦(HP1(dma))形成的盐各自称为TMG盐、HP1(dma)盐或MTBD盐。

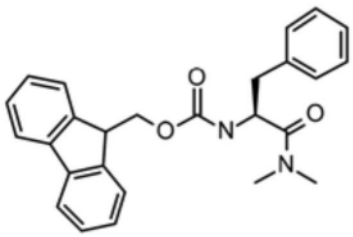
[1011] [Chem.73]

[1012] 

[1013] 化合物1-4-1的合成:9H-芴-9-基甲基N-[(1S)-1-苄基-2-(二甲氨基)-2-氧代-乙基]氨基甲酸酯(Fmoc-Phe-NMe_2)

[1014] 向可商购的N-(9-芴基甲氧基羰基)-L-苯丙氨酸(Fmoc-Phe-OH,CAS:35661-40-6,化合物aa2-12)(2.0g,5.16mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(14mL)和二氯甲烷(DCM)(4mL)的混合溶液中添加1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDCI·HCl)(1.19g,6.19mmol)和1-羟基苯并三唑(HOBt)(0.767g,5.68mmol),然后进一步添加二甲胺的四氢呋喃(THF)溶液(2.0M,2.84mL,5.68mmol),并且将混合物搅拌15分钟。向该溶液中加入乙酸异丙酯(20mL),并将有机相用1M盐酸(20mL)洗涤两次,用水(50mL)洗涤一次,用半饱和碳酸氢钠水溶液(20mL)洗涤两次,并且用半饱和氯化钠水溶液(20mL)洗涤两次。将得到的有机相经硫酸钠干燥,并且然后过滤,并且减压蒸馏除去得到的母液的溶剂。将得到的粗产物与甲苯共沸蒸馏,并且然后在5℃冷却,得到化合物1-4-1的白色晶体(1.88g,88%)。

[1015] [Chem.74]

[1016] 

化合物1-4-1

[1017] ^{1}H-NMR(600M Hz,甲苯-d8,298K)δ7.51(d,2H,J=7.2Hz),7.43(d,2H,J=7.3Hz),

7.21-7.16(m,2H),7.14-7.07(m,2H),7.05-7.00(m,4H),7.00-6.95(m,1H),6.00(d,1H,J＝8.4Hz,NH),4.88(ddd,1H,J＝8.4,8.4,6.0Hz),4.32(dd,1H,J＝10.5,7.4Hz),4.23(dd,1H,J＝10.5,7.4Hz),4.03(t,1H,J＝7.4Hz),2.93(dd,1H,J＝13.0,8.4Hz),2.86(dd,1H,J＝13.0,6.0Hz),2.49(s,3H),2.02(s,3H)。

[1018] ^{13}C-NMR(151M Hz,甲苯-d8,298K)δ171.1,155.9,144.6,141.8,129.9,128.5,127.8(与溶剂峰重叠,通过CH-HSQC检测),127.3,127.0,125.6,125.4,120.2,67.2,52.3,47.7,40.2,36.0,35.0。

[1019] LCMS(ESI)m/z＝415.44(M+H)+

[1020] 保留时间:0.89分钟(分析条件SQDFA05)

[1021] 实例7-1:当用DBU处理化合物1-4-1时检查DBU·HOCO-Phe-NMe$_2$的存在

[1022] 实例7-1-1:在N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)溶液中用DBU处理化合物1-4-1得到的产物

[1023] 测量化合物1-4-1(12.9mg,0.031mmol)在N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)(0.5mL)中的溶液的^{1}H-NMR(图1-b))。然后,向相关溶液中添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)(5.11μL,0.034mmol),并且剧烈搅拌混合物,随后测量^{1}H-NMR(图1-a)和1D-ROESY((图2-a)-2)和(图2-a)-3))。结果,从NMR图谱确认了主要形成了三种化合物。即,确认了三种化合物:二苯富烯、化合物1-4-2(H-Phe-NMe$_2$)和N-[(1S)-1-苄基-2-(二甲基氨基)-2-氧代-乙基]氨基甲酸DBU盐(化合物1-4-3a和DBU·HOCO-Phe-NMe$_2$)存在于相关溶液中,并且化合物1-4-2和化合物1-4-3a进行化学交换。相关溶液中化合物1-4-2(H-Phe-NMe$_2$)的鉴定和化合物1-4-3a的鉴定分别详细描述于本实例(实例7-1-1)和实例7-1-3。

[1024] 确认对在DMF-d7中的化合物1-4-1应用DBU形成的化合物1-4-2(H-Phe-NMe$_2$)和化合物1-4-3a的化学交换及其比率

[1025] 测量相关溶液的1D-ROESY(分别选择性激发4.84ppm和3.95ppm处的^{1}H信号,图2-a)-2和图2-a)-3),并且结果显示化合物1-4-3a在4.84ppm处的^{1}H信号和化合物1-4-2的对应于的α-次甲基的质子在3.95ppm处^{1}H信号在系统中进行了化学交换((图2-a)-2)和(图2-a)-3))。即,由当选择性激发4.84ppm的^{1}H信号时3.95ppm处的^{1}H信号(图2-a)-2)和由当选择性激发3.95ppm的^{1}H信号时4.85ppm处的^{1}H信号(图2-a)-3),观察到与选择性激发信号同相的ROESY信号,并且因此确认这些信号发生了化学交换(图2-a))。另外,根据^{1}H-NMR中的^{1}H信号的积分比,确认化合物1-4-3a与化合物1-4-2的存在比为82:18(图2-b))。

[1026] 在相关溶液中检查化合物1-4-2(H-Phe-NMe$_2$)的存在

[1027] 将三个(3)μL单独提供的化合物1-4-2的标准品与相关溶液混合,随后测量^{1}H-NMR(图3-a)-3和图3-b))和1D-NOSEY(图3-a)-4和图3-a)-5)。

[1028] 1)测量将3μL化合物1-4-2的标准品添加到相关溶液中而获得的溶液的^{1}H-NMR,并且观察显示相关溶液的^{1}H-NMR中观察到3.95ppm处的^{1}H信号(图3-a)-2)和化合物1-4-2的标准品(图3-a)-1)的结果为3.94ppm处的^{1}H信号观察为3.95ppm三重态^{1}H信号,两个信号完全重合,没有分离(图3-a)-3)。

[1029] 2)测量通过向相关溶液中添加3μL化合物1-4-2的标准品而获得的溶液的1D-NOESY(在4.84ppm和3.95ppm处分别选择性激发^{1}H信号),并且结果表明:当选择性激发4.84ppm处的^{1}H信号时3.95ppm处的^{1}H信号(图3-a)-4);和当选择性激发3.95ppm处的^{1}H信号

时4.85ppm处的^{1}H信号(图3-a)-5),观察到与选择性激发信号同相且与原始信号(4.85ppm:双三重峰和3.95ppm:三重峰)形状相同的NOESY信号。

[1030] 3)在相关溶液中添加3μL的化合物1-4-2的标准品,将化合物1-4-3a在4.84ppm处的^{1}H信号与化合物1-4-2在3.95ppm处的^{1}H信号的积分比从82:18(添加化合物1-4-2前的积分比[图2-b])改变为61:39(图3-b))。

[1031] 根据上述1)至3)三点,确认了相关溶液中存在化合物1-4-2。

[1032] 实例7-1-2:喷洒$^{13}CO_2$将DBU应用于化合物1-4-2形成的化合物1-4-3a的鉴定

[1033] 以下实例7-1-2中的实验操作均在手套箱中进行(在氮气气氛下的脱水条件下)。使用通过使用用微波加热至高温然后在真空中(×2)允许冷却以被活化的MS4A将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)干燥12小时或更长时间,将其用作溶将样品收集到用于NMR的低压/真空管中,手套箱中带有阀门,并且完全防止与外部空气接触,用于测量NMR。

[1034] 溶液A(SolA)的制备

[1035] 向在N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)(0.5mL)中的化合物1-4-2(4.64mg,0.024mmol)的溶液鼓泡$^{13}CO_2$气体1分钟,随后测量^{1}H-NMR(图4-b))、^{13}C-NMR(图5-a))和1D-NOESY(分别选择性激发4.77ppm和3.96ppm处的^{1}H信号,(图4-c)和(图4-d))。此后,添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)(3.97μL,0.027mmol)以制备含有化合物1-4-3a(DBU·HOCO-Phe-NMe_2)的溶液A,并且测量^{1}H-NMR(图4-e))和^{13}C-NMR(图5-b))。

[1036] 溶液A中化合物1-4-3a的鉴定

[1037] 化合物1-4-3a的结构可以由^{1}H-NMR、^{13}C-NMR和1D-NOESY的测量结果可以毫无矛盾地解释。

[1038] 4)测量通过将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)(0.5mL)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$气鼓泡1分钟而获得的溶液的^{1}H-NMR,并且结果显示在4.76ppm处存在新的^{1}H信号,该信号在作为原料的化合物1-4-2的^{1}H-NMR中未观察到(图4-a))(图4-b))(氨基甲酸盐阴离子或氨基甲酸的形成,见图5-a))。

[1039] 5)测量了将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)(0.5mL)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$气鼓泡1分钟而获得的溶液的^{1}H-NMR中观察到的4.76ppm处的^{1}H信号与化合物1-4-2的α-亚甲基对应的3.96ppm处的^{1}H信号的积分比,并且结果显示积分比为52:48(图4-f)。

[1040] 6)测量了将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)(0.5mL)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$气体作用1分钟而获得的溶液的1D-NOESY,并且结果表明由当选择性激发4.76ppm处的^{1}H信号时的3.96ppm处的^{1}H信号(图4-c))和当选择性激发3.96ppm处的^{1}H信号时的4.76ppm处的^{1}H信号,观察到同相的NOESY信号(图4-d)),因此确认两个信号都进行了化学交换。

[1041] 7)测量通过将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)(0.5mL)中的化合物1-4-2的溶液中用$^{13}CO_2$鼓泡1分钟然后添加DBU而获得的溶液的^{1}H-NMR,并且结果表明,添加DBU前观察到的4.76ppm的^{1}H信号在添加DBU时在高磁场下移动到4.83ppm(图4-e))(证实了化合物1-4-3a的形成)。

[1042] 8)测量通过将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)(0.5mL)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$气体鼓泡1分钟并且然后添加DBU而获得的溶液的^{1}H-NMR,并且结果表明,4.83ppm处的α-次甲基的^{1}H信号与161.5ppm处^{13}C-标记的羰基的^{13}C信号之间存在2.7Hz的$^{3}J_{CH}$耦合(图

5-b))(图4-g))。

[1043] 9)测量将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)(0.5mL)中的化合物1-4-2的溶液用$^{13}CO_2$气体鼓泡1分钟而得到的溶液的^{13}C-NMR(图5-a)),测量向上述溶液中添加DBU而得到的溶液的^{13}C-NMR(图5-b)),将前一测量结果与后一测量结果进行比较,并且结果表明通过添加DBU,对应于^{13}C标记的羰基的^{13}C信号在高磁场下从157.1ppm移动到161.5ppm(确认化合物1-4-3a的形成)。

[1044] 根据4)至9)的六点,确认了在溶液A(Sol A)的制备中,化合物1-4-2的伯胺与$^{13}CO_2$气反应,以形成氨基甲酸盐或氨基甲酸,并且向其中应用1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)形成化合物1-4-3a(DBU·HOCO-Phe-NMe_2)。根据上述实验,毫无矛盾地认为形成了化合物1-4-3a(DBU·HOCO-Phe-NMe_2)。对于该结构,在实例7-1-3中进行了更详细的鉴定。

[1045] 实例7-1-3:溶液A+溶液B(SolA+SolB)中存在的化合物1-4-3a的结构演示

[1046] 以下实例7-1-3中描述的实验操作均在手套箱中进行(在氮气气氛下的脱水条件下)。使用通过使用用微波加热至高温然后在真空中(×2)允许冷却以被活化的MS4A将N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)干燥12小时或更长时间,将其用作溶将样品收集到用于NMR的低压/真空管中,手套箱中带有阀门,并且完全防止与外部空气接触,用于测量NMR。

[1047] 溶液B(SolB)的制备

[1048] 向N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)(0.5mL)中的化合物1-4-1(11.5mg,0.028mmol)的溶液中添加1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)(4.56μL,0.031mmol),制备溶液B,并且测量^1H-NMR(溶液B、图6-a))。

[1049] 溶液A+溶液B(SolA+Sol B)的制备

[1050] 将溶液B(Sol B)(0.15mL,图6-a),0.0084mmol)与溶液A(Sol A)(0.35mL,Sol A,图6-c),0.0168mmol)混合,并且测量^1H-NMR(图6-b))、^{13}C-NMR、CH-HMBC(图7-c))、CH-HSQC、NH-HMBC(图7-b))和NH-HSQC(图7-a))。

[1051] 在溶液B(Sol B)中检查化合物1-4-3a的存在

[1052] 确认了在溶液A的^1H-NMR中观察到的4.83ppm处对应于化合物1-4-3a的α-次甲基的^1H信号(图6-c))和在溶液B的^1H-NMR中观察到的4.85ppm处的^1H信号(图6-a))彼此完全一致,同时各自移动到4.84ppm处的^1H信号(图6-b))。即,确认了当将溶液B与溶液A混合时,在溶液B中观察到4.85ppm处的^1H信号中不耦合的低磁场侧峰(图6-a)中虚线包围的峰)和在溶液A中观察到的4.83ppm处的^1H信号中可识别地与^{13}C(2.7Hz)耦合的低磁场侧峰(图6-b)中圆圈包围的峰)一起移动并转换成具有宽形状的中间峰(图6-b)中圆圈包围的峰)。这些结果显示(Sol B)中存在化合物1-4-3a(^1H信号)。

[1053] 溶液A+溶液B(SolA+Sol B)中化合物1-4-3a的结构演示

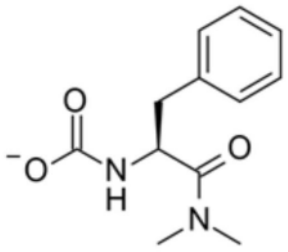
[1054] 通过分析^1H-NMR(图6-b))、^{13}C-NMR、CH-HMBC(图7-c))、CH-HSQC、NH-HMBC(图7-b))和NH-HSQC(图7-a)),可以毫无矛盾地解释溶液A+溶液B(Sol A+Sol B)中的化合物1-4-3a的结构是氨基甲酸的DBU盐。

[1055] 10)测定溶液A(Sol A)+溶液B(Sol B)的混合溶液的CH-HMBC,并且结果发现4.84ppm处α-次甲基的^1H信号和161.5ppm处^{13}C-标记^{13}C信号(其高于溶剂的^{13}C信号)之间的CH-HMBC交叉峰(图7-c))。即,由于CH-HMBC相关性和^{13}C信号的值,并且由于^{13}C源自实验上鼓泡的$^{13}CO_2$气体,因此将毫无矛盾地将161.5ppm处的^{13}C信号确定为氨基甲酸盐的羰基。

[1056] 11)测量溶液A(Sol A)+溶液B(Sol B)的混合溶液的NH-HSQC,并且结果表明,在5.30ppm处识别出的NH的^{1}H信号和91.4ppm处识别出^{15}N信号之间的NH-HSQC相关性,因此91.4ppm处的^{15}N信号被识别为氨基甲酸酯的氮原子(图7-a))。还证实,2.91/2.83ppm处的苄基亚甲基的^{1}H信号与对应于氨基甲酸盐的氮原子的91.4ppm处的^{15}N信号之间存在NH-HMBC相关性(图7-b)),并且根据^{15}N信号,可以毫无矛盾地解释91.4ppm处的^{15}N信号是氨基甲酸盐的氮原子。

[1057] 根据10)和11)两点,确认了当制备溶液A+溶液B(Sol A+Sol B)时,化合物1-4-3a存在于系统中。如下所述,化合物1-4-3a的氨基甲酸酯部分的NMR信号可以全部归因(图8),并且所有NMR信号的值可以毫无矛盾地解释化合物1-4-3a的结构。

[1058] [Chem.75]

[1059] 

化合物1－4－3a

[1060] ^{1}H-NMR(600M Hz,DMF-d7,298K)δ7.29-7.23(m,4H),7.22-7.11(m,1H),5.30(brs,1H,NH),4.90(ddd,1H,J＝6.8,6.2Hz,$^{3}J_{CH}$＝2.7Hz),2.91(dd,1H,J＝13.3,6.8Hz),2.87(s,3H),2.83(dd,1H,J＝13.3,6.2Hz),2.78(s,3H)。

[1061] ^{13}C-NMR(151M Hz,DMF-d7,298K)δ173.6(qC),161.5(qC),139.4(qC),129.7(CH x2),128.3(CH x2),126.3(CH),53.0(CH),40.0(CH2),36.4(CH3),34.8(CH3)。

[1062] ^{15}N-NMR(61M Hz,DMF-d7,298K,由NH-HSQC和NH-HMBC指定)δ96,91。

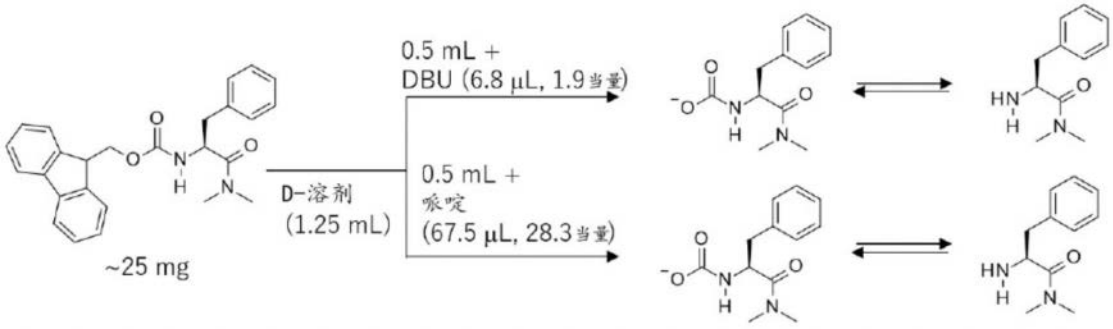
[1063] 上述结果表明,当Fmoc保护的氨基基团用DBU处理时,氨基基团没有完全暴露,随后进行脱羧以消除二苯富烯,但其大部分以DBU·HOCO-Phe-NMe_2存在。还表明可以通过^{1}H-NMR检查其存在和丰度比。

[1064] 实例7-2:当化合物1-4-1在各种溶剂中用DBU或哌啶处理时检查氨基甲酸盐的存在

[1065] 基本操作

[1066] 制备化合物1-4-1(约25mg)在重溶剂(1.25mL,四氢呋喃-d8(THF-d8)[条目1]、甲苯-d8[条目2]、二环甲烷-d2(DCM-d2)[条目3]、N,N-二甲基甲酰胺-d7(DMF-d7)[条目4])或二甲基亚砜-d6(DMSO-d6)[条目5]中的溶液,并且然后将1.0mL相关溶液分成两部分(0.5mL)。将1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)(6.8μL)施加至一部分,并将哌啶(67.5μL)施加至另一部分。测量各部分的NMR,由^{1}H-NMR中的质子积分比确定化合物1-4-3a与化合物1-4-2的比例(表11)。本实验中使用的化合物1-4-1的量为:条目1为25.1mg,条目2为24.8mg,条目3为25.0mg,条目4为25.3mg,以及条目5为25.2mg。

[1067] [Chem.76]

[1068] 

[1069] [表11]

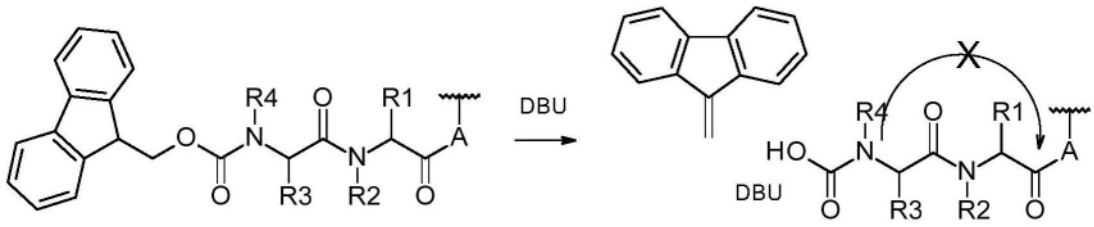
[1070]

条目	溶剂	碱	
		DBU（1.9 当量）	哌啶（28.3 当量）
		化合物 1-4-3a：化合物 1-4-2	
1	THF-d8	53:47	0:100
2	甲苯-d8	65:35	0:100
3	DCM-d2	76:24	0:100
4	DMF-d7	84:16	0:100
5	DMSO-d6	92:8	0:100

[1071] 根据以上结果确认了当用DBU处理Fmoc保护的氨基基团时,在任意溶剂中氨基甲酸盐的存在比例均为50％或更高。另一方面,确认了当用吡啶进行处理时,在任何溶剂中都没有检测到氨基甲酸盐,并且甚至进行脱羧,使得氨基基团完全暴露。

[1072] 为了讨论基于该发现的固体表面上的实验结果,不受具体理论的束缚,可以解释为,如下面的方案所示,形成6元环,其导致二酮哌嗪消除等由于氨基甲酸盐的存在而被阻止,从而产生还原作用。

[1073] [Chem.77]

[1074] 

[1075] 例如,在固相实验中对已确认生成氨基甲酸盐的用DBU脱保护和NMR中未确认生成氨基甲酸盐的用哌啶脱保护进行了比较,并且检查了氨基甲酸盐生成效果。使用表12中的运行1和2所示的试剂和溶剂,通过与实例2中所述的基本操作B相同的方法进行反应。下表12示出了获得的结果(化合物2-1*、化合物2-2*、化合物2-3*和化合物2-4*在各自条件下的LCMS中UV面积的相对比率以百分比表示)。

[1076] [表12]

[1077]

	反应条件					面积%			
	Fmoc 脱保护		洗涤	延长					
运行	碱	溶剂	溶剂	缩合剂	溶剂	TM-DKP（化合物 2-2*）	脒化合物（化合物 2-3*）	TM（化合物 2-1*）	MeLeu 过度延长（化合物 2-4*）
1	2% DBU	THF	THF x 6	PyOxim/ DIPEA	DCM	0.59	0.91	98.50	0
2	20% pip	THF	THF x 6	PyOxim/ DIPEA	DCM	9.27	8.06	82.67	0

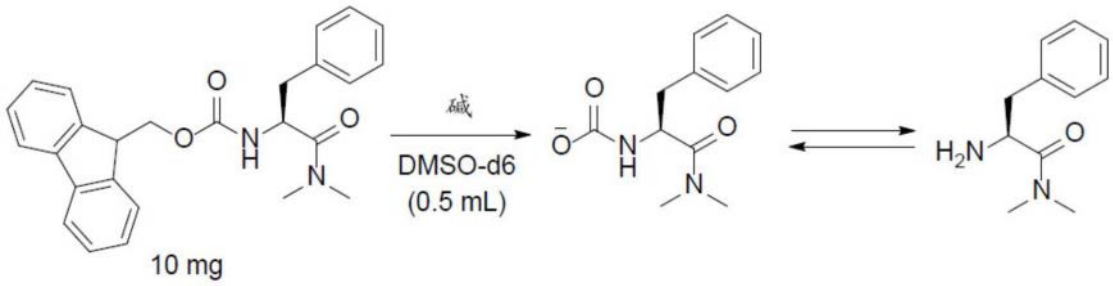
[1078] 不受特定理论的束缚,从表12中的运行1(2% DBU)和运行2(20%哌啶)之间的比较,可以毫无矛盾地解释为什么当用DBU进行处理时可以显著抑制二酮哌嗪消除化合物和6元环状脒骨架化合物的形成,这是因为由于氨基甲酸盐的存在防止了导致二酮哌嗪消除的6元环的形成。

[1079] 实例7-3:当化合物1-4-1在DMSO中用各种碱处理时,检查化合物1-4-3a的存在

[1080] 基本操作

[1081] 制备化合物1-4-1(约10mg,0.24mmol)的二甲基亚砜-d6(DMSO-d6)(0.5mL)溶液五份,然后将哌啶(67.5μL,条目1)、1.1.3.3-四甲基胍(TMG)(13.5μL,条目2)、1,8-二氮杂双环[5.4.0]-7-十一烯(DBU)(6.8μL,条目3)、7-甲基-1,5,7-三氮杂双环[4.4.0]十-5-烯(MTBD)(13.5μL,条目4)和亚氨基三(二甲基氨基)正膦(HP1(dma)(13.5μL,条目5)四种碱分别应用于溶液中。测量各溶液的NMR,由^{1}H-NMR中的质子积分比确定化合物1-4-3a与化合物1-4-2的比例(表13)。本实验中使用的化合物1-4-1的量为:条目1为10.1mg,条目2为10.0mg,条目3为10.1mg,条目4为10.1mg,以及条目5为10.1mg。

[1082] [Chem.78]

[1083] 

[1084] [表13]

[1085]

条目	碱	pKa*	等效物	化合物1-4-3a:化合物1-4-2
1	哌啶	19.35	28.3(20%)	0:100
2	TMG	23.35	4.47(4%)	91:9
3	DBU	24.31	1.88(2%)	92:8
4	MTBD	25.47	3.91(4%)	93:7
5	HP1(dma)	25.85	3.08(4%)	93:7

[1086] 根据以上结果,确认了当用共轭酸中的pKa为23或更大的碱处理Fmoc保护的氨基

基团时,氨基甲酸盐的存在比例为90%或更多。

[1087] 为了讨论基于该发现的固体表面上的实验结果,不限于特定理论,在实例2中,与运行2相比,在运行4至7的条件下可以减少二酮哌嗪等的消除的原因是由于如上所述的氨基甲酸盐的存在,防止了引起二酮哌嗪消除等的6元环的形成。

[1088] 因此,不受特定理论的限制,当用碱处理Fmoc保护时,由于N末端氨基基团作为氨基甲酸盐的存在,可以减少二酮哌嗪消除等。由实例7-3的结果,确定可以作为氨基甲酸盐存在的碱的范围。

[1089] 实例8:在已知条件下考察液相法肽合成过程中二酮哌嗪消除的降低效果的实验

[1090] 在本实例中,对于实例1至3中制备的直链肽,通过本发明的方法(条件-X)延长表14中所述的Fmoc保护的氨基酸,并且对液相法中形成的二酮哌嗪消除化合物和二聚脲化合物的量进行了比较。

[1091] 条件-X

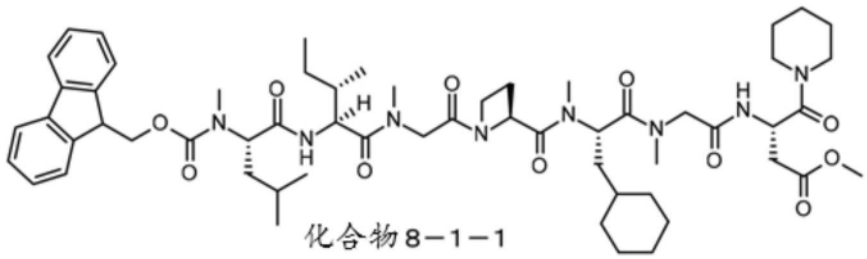
[1092] 将DBU(0.091mL,0.061mmol,1当量)添加至实例1-3中制备的直链肽(化合物1-3-1和1-3-2)(0.061mmol)的DMSO(0.20mL)溶液中,并且将混合物在室温下搅拌5分钟。向反应溶液中添加HOAt(16.52mg,0.121mmol,2当量)和DIPEA(0.021mL,0.121mmol,2当量)的DMSO(0.1mL)溶液,并且将混合物在室温下搅拌3分钟获得溶液A。

[1093] 将DIPEA(0.019mL,0.109mmol,1.8当量)添加至表14中所述的Fmoc保护的氨基酸(0.073mmol,1.2当量)和[乙基氰基(羟基氨基)乙酸根合-02]三1-吡咯烷基鏻六氟磷酸酯(PyOxim)(38.4mg,0.073mmol,1.2当量)的DMSO(0.20mL)溶液中(在另一个反应容器中),将混合物在室温下搅拌3分钟,并且然后向其中逐滴添加单独制备的溶液A。将混合物在室温下搅拌1小时,然后通过LCMS(SQDFA05long)分析部分反应溶液,以确认目标肽(TM)(化合物8-1-1至8-1-2)和二酮哌嗪消除化合物(化合物8-2-1至8-2-2)的形成。

[1094] 表14显示了每个肽序列的二酮哌嗪消除化合物(TM-DKP)的量。当LCMS中目标肽(TM)和哌嗪二酮消除化合物(TM-DKP)的总UV面积百分比为100%时,表14中所示形成的二酮哌嗪消除化合物(TM-DKP)的量是哌嗪二酮消除化合物(TM-DKP)的UV面积百分比。

[1095] 目标肽化合物(TM),Fmoc-MeLeu-Ile-MeGly-Aze(2)-MeCha-MeGly-Asp(OMe)-pip(运行1)(化合物8-1-1)

[1096] [Chem.79]

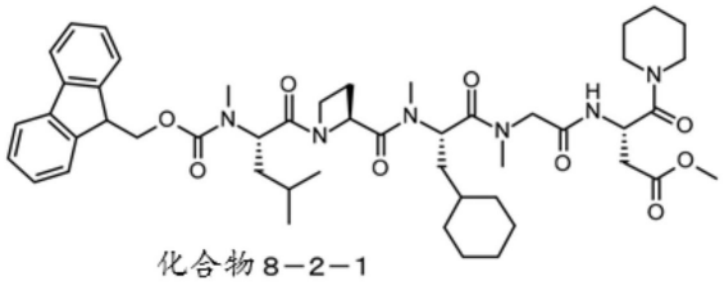
[1097] 

[1098] LCMS(ESI)m/z=1069.97(M+H)+

[1099] 保留时间:3.35分钟(分析条件SQDFA05long)

[1100] 二酮哌嗪消除化合物,Fmoc-MeLeu-Aze(2)-MeCha-MeGly-Asp(OMe)-pip(运行1)(化合物8-2-1)

[1101] [Chem.80]

[1102] 

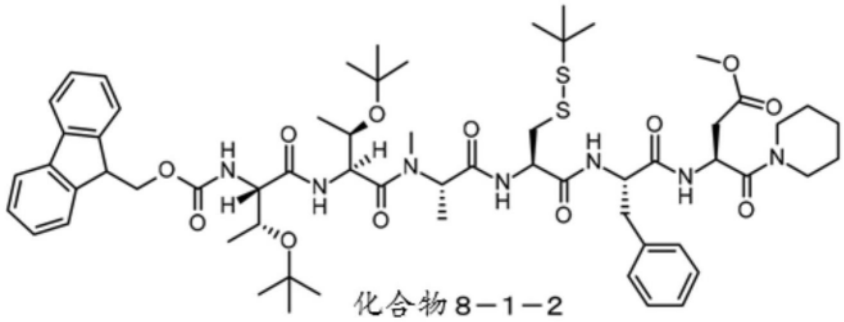
化合物8-2-1

[1103] LCMS(ESI)m/z＝885.78(M+H)+

[1104] 保留时间:3.26分钟(分析条件SQDFA05long)

[1105] 目标肽化合物(TM),Fmoc-Thr(tBu)-Thr(tBu)-MeAla-Cys(StBu)-Phe-Asp(OMe)-pip(运行2)(化合物8-1-2)

[1106] [Chem.81]

[1107] 

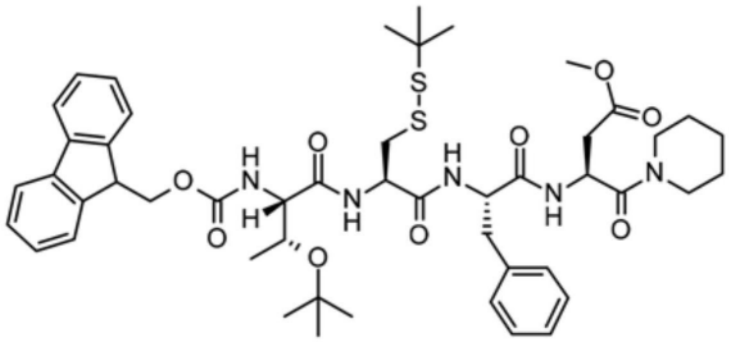
化合物8-1-2

[1108] LCMS(ESI)m/z＝1074.90(M+H)+

[1109] 保留时间:4.05分钟(分析条件SQDFA05long)

[1110] 二酮哌嗪消除化合物,Fmoc-Thr(tBu)-Cys(StBu)-Phe-Asp(OMe)-pip(运行2)(化合物8-2-2)

[1111] [Chem.82]

[1112] 

化合物8-2-2

[1113] LCMS(ESI)m/z＝932.69(M+H)+

[1114] 保留时间:3.76分钟(分析条件SQDFA05long)

[1115] [表14]

[1116]

运行	待延长的氨基酸	原料线性肽		TM	TM-DKP	TM-DKP	TM
1	Fmoc-MeLeu-OH	Fmoc-Ile-MeGly-Aze(2)-MeCha-MeGly-Asp(OMe)-pip	化合物1-3-1	化合物8-1-1	化合物8-2-1	2.95	97.05
2	Fmoc-Thr(tBu)-OH	Fmoc-Thr(tBu)-MeAla-Cys(StBu)-Phe-Asp(OMe)-pip	化合物1-3-2	化合物8-1-2	化合物8-2-2	0.57	99.43

[1117] 因此,根据实例8的结果,确认了本发明的方法即使在通过液相法的合成中也能够抑制二酮哌嗪消除化合物的形成以合成目标肽。

[1118] 工业实用性

[1119] 发现根据本发明,可以抑制副产物诸如二酮哌嗪和6元环脒骨架化合物的形成,从而在肽生产中有效地延长肽链。本发明用于肽合成的领域。

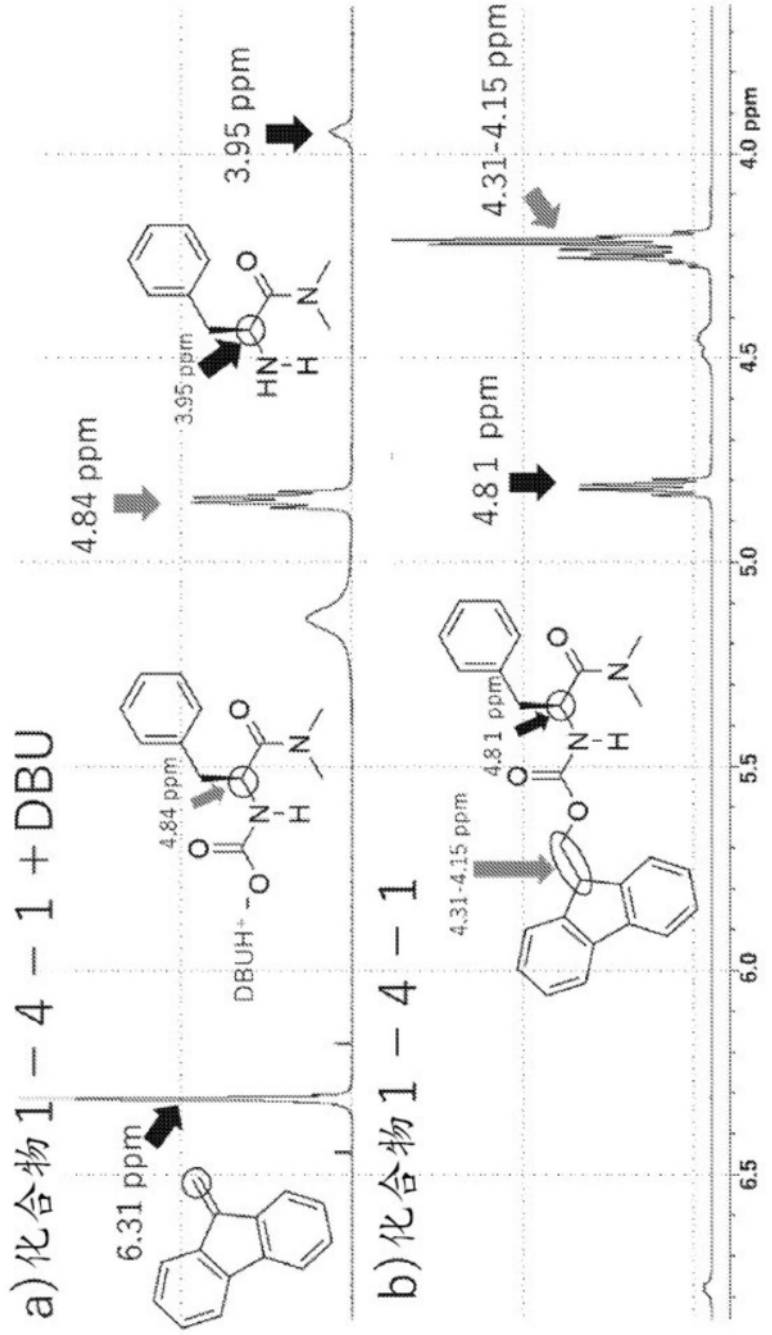

a)化合物1－4－1+DBU
6.31 ppm
4.84 ppm
3.95 ppm
DBUH+
b)化合物1－4－1
4.81 ppm
4.31-4.15 ppm
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0 ppm

图1

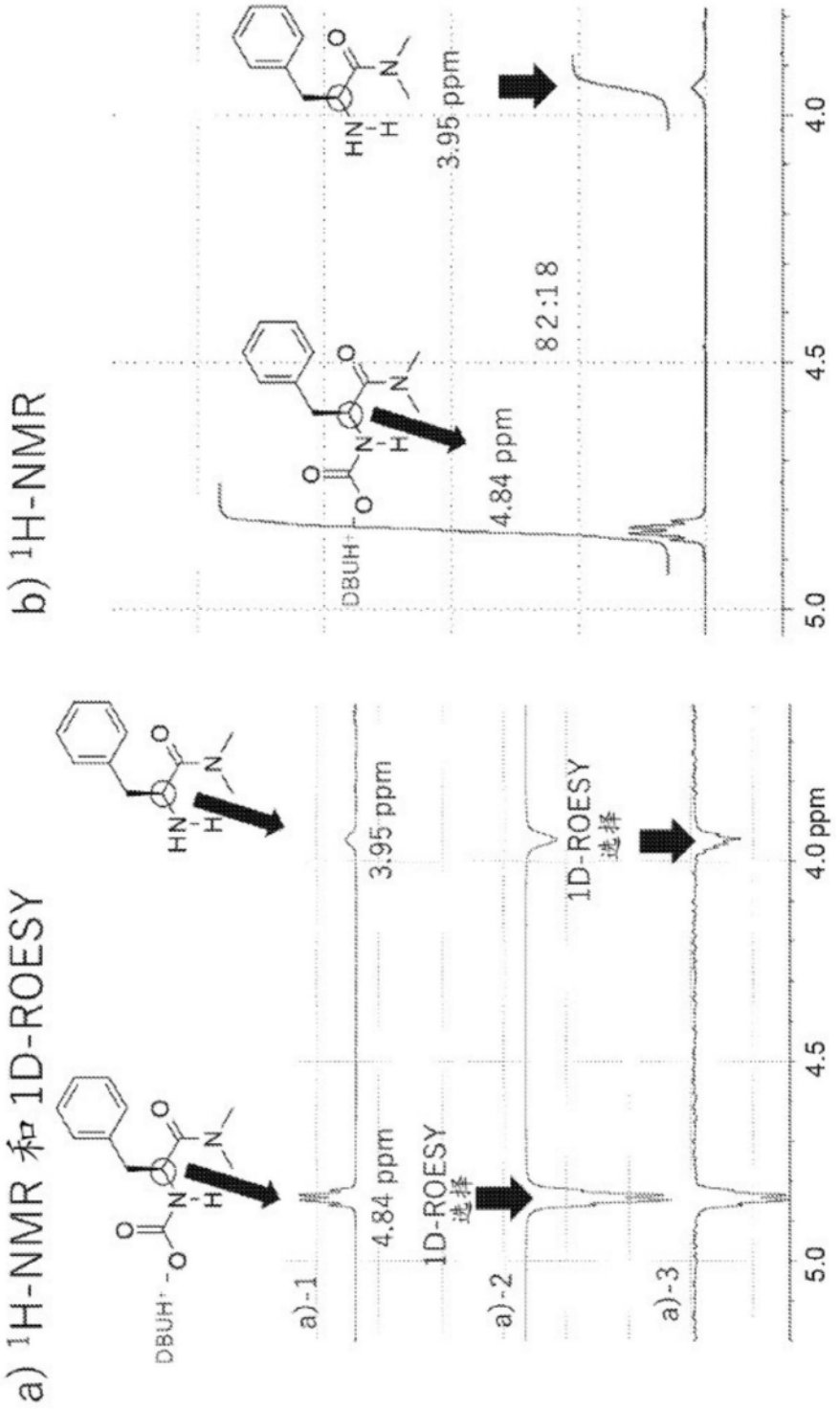

a) 1H-NMR 和 1D-ROESY
DBUH+
a)-1
3.95 ppm
4.84 ppm
1D-ROESY
选择
a)-2
1D-ROESY
选择
a)-3
5.0
4.5
4.0 ppm
b) 1H-NMR
DBUH+
4.84 ppm
82:18
3.95 ppm
5.0
4.5
4.0

图2

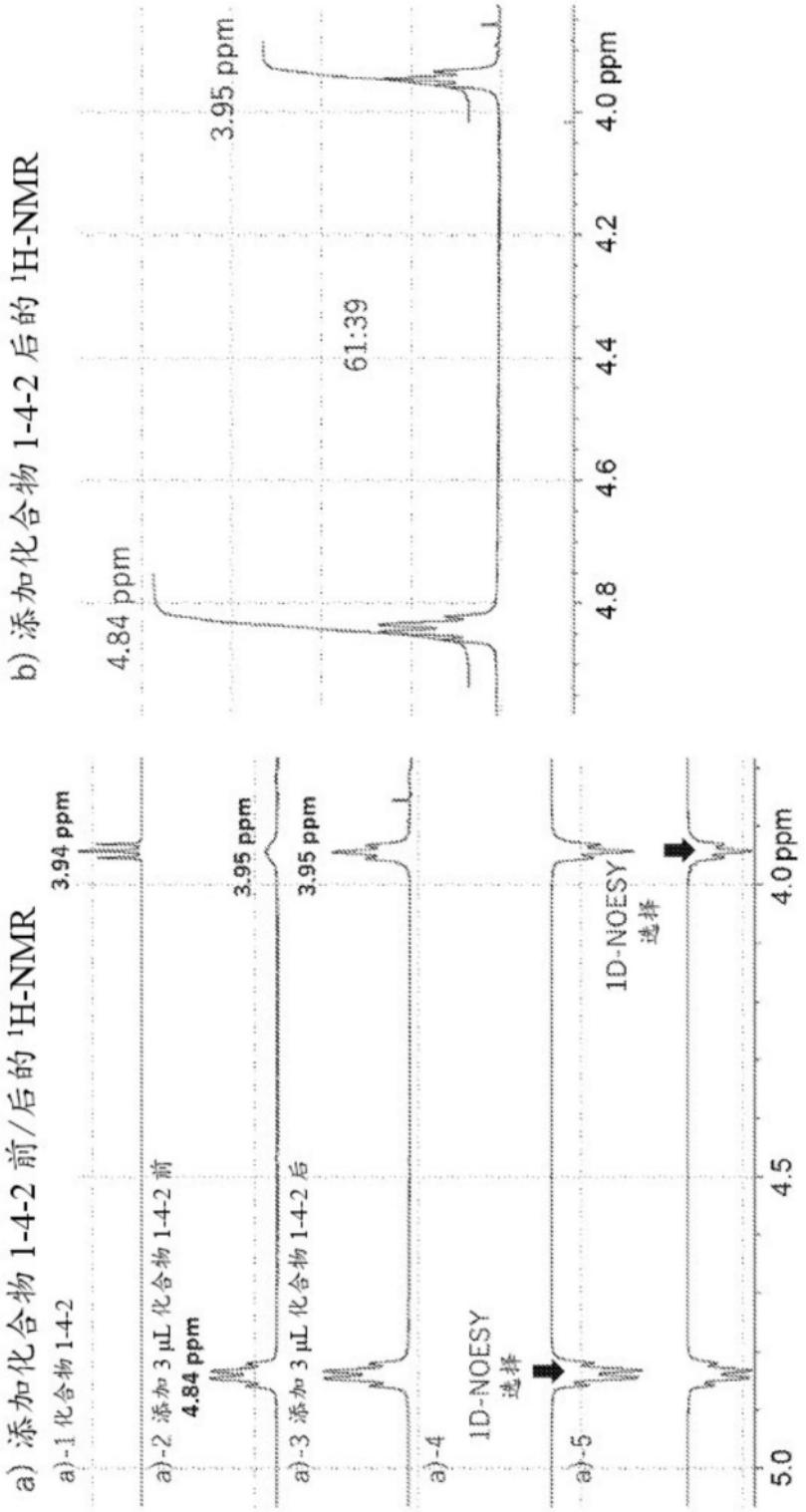

a) 添加化合物 1-4-2 前/后的 ¹H-NMR
a)-1 化合物 1-4-2
3.94 ppm
a)-2 添加 3 μL 化合物 1-4-2 前
4.84 ppm
3.95 ppm
a)-3 添加 3 μL 化合物 1-4-2 后
3.95 ppm
a)-4
1D-NOESY
选择
a)-5
1D-NOESY
选择
5.0
4.5
4.0 ppm
b) 添加化合物 1-4-2 后的 ¹H-NMR
4.84 ppm
3.95 ppm
61:39
4.8
4.6
4.4
4.2
4.0 ppm

图3

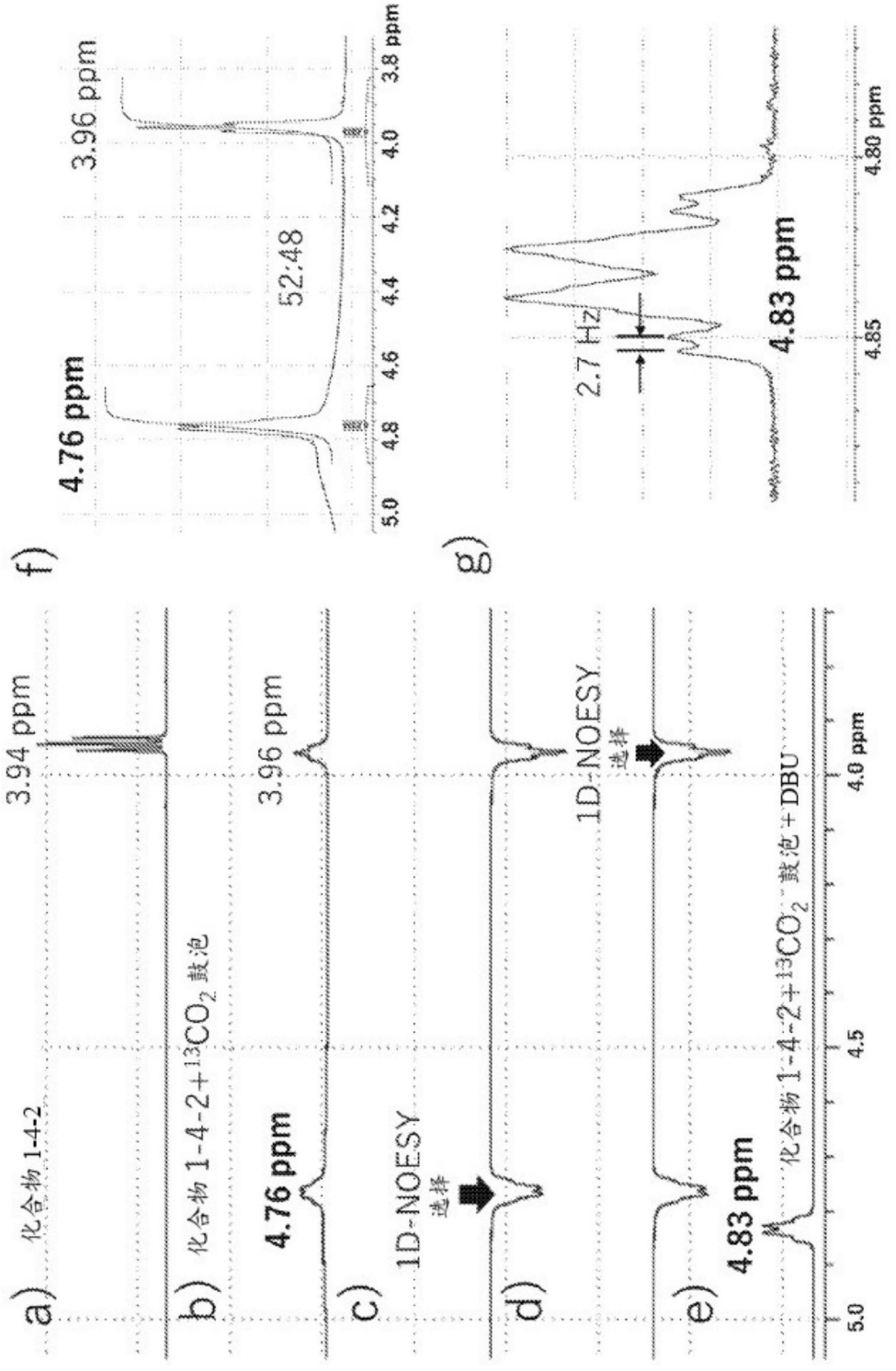

a)
化合物 1-4-2
3.94 ppm
b)
化合物 1-4-2+$^{13}CO_2$ 鼓泡
4.76 ppm
3.96 ppm
c)
1D-NOESY
选择
d)
1D-NOESY
选择
e)
4.83 ppm
化合物 1-4-2+$^{13}CO_2$ 鼓泡+DBU
5.0
4.5
4.0 ppm
f)
4.76 ppm
3.96 ppm
52:48
5.0
4.8
4.6
4.4
4.2
4.0
3.8 ppm
g)
2.7 Hz
4.83 ppm
4.85
4.80 ppm

图4

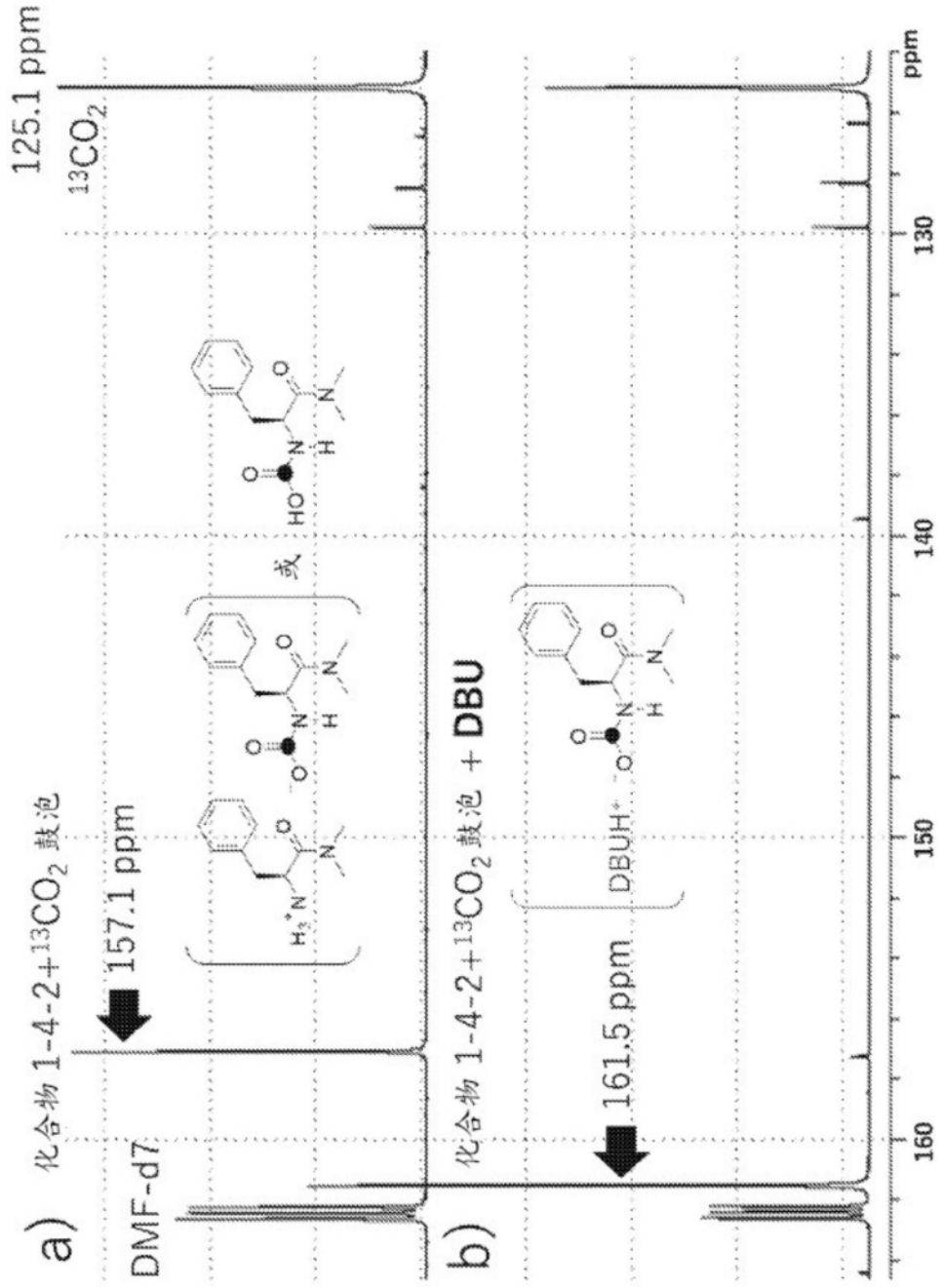

125.1 ppm
$^{13}CO_2$
a) 化合物 1-4-2+$^{13}CO_2$ 鼓泡
157.1 ppm
DMF-d7
或
b) 化合物 1-4-2+$^{13}CO_2$ 鼓泡 + DBU
161.5 ppm
DBUH+
ppm
130
140
150
160

图5

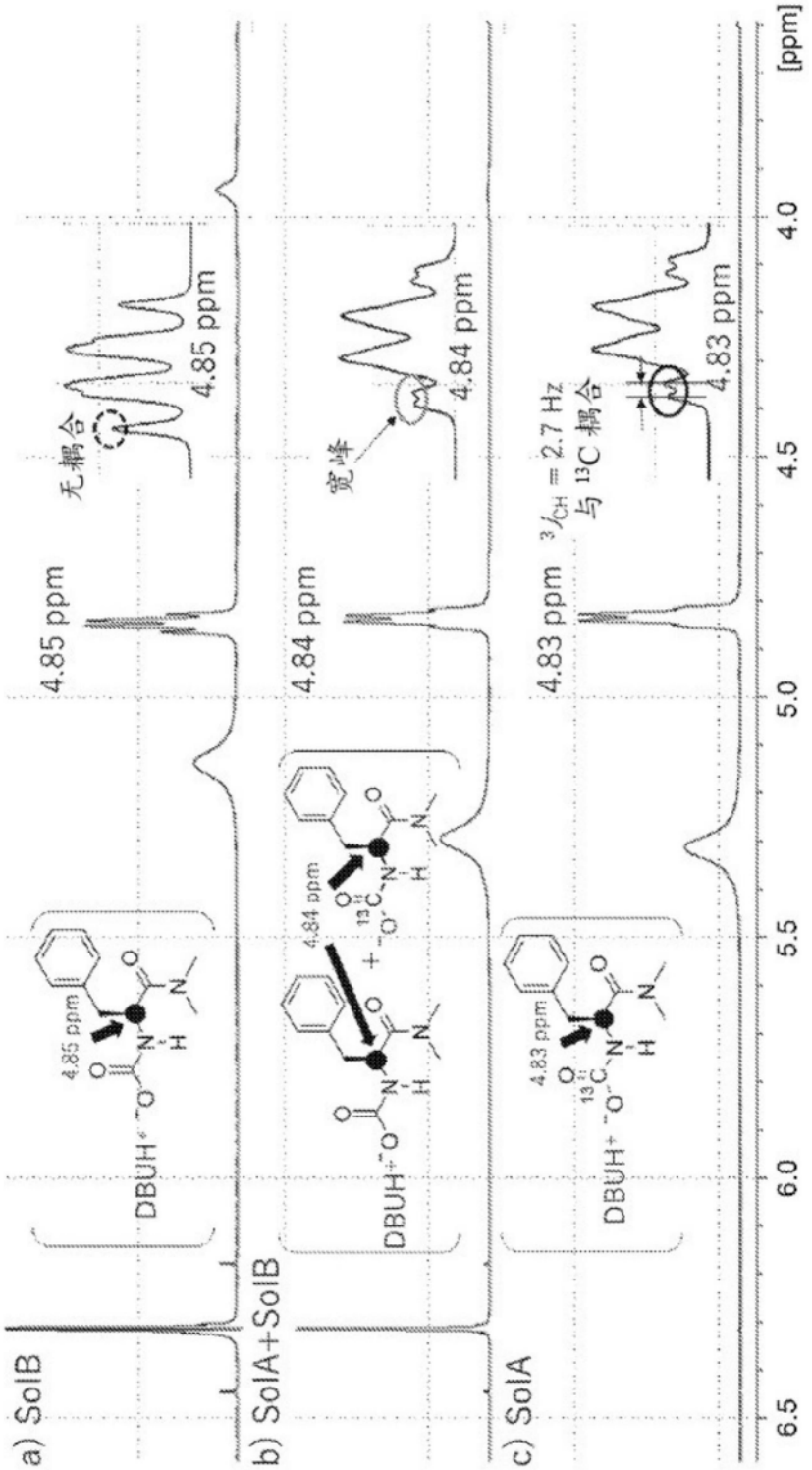

a) SolB
b) SolA+SolB
c) SolA
4.85 ppm
4.84 ppm
4.83 ppm
无耦合
宽峰
$^{3}J_{CH}$ = 2.7 Hz
与 ^{13}C 耦合
DBUH+
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
[ppm]

图6

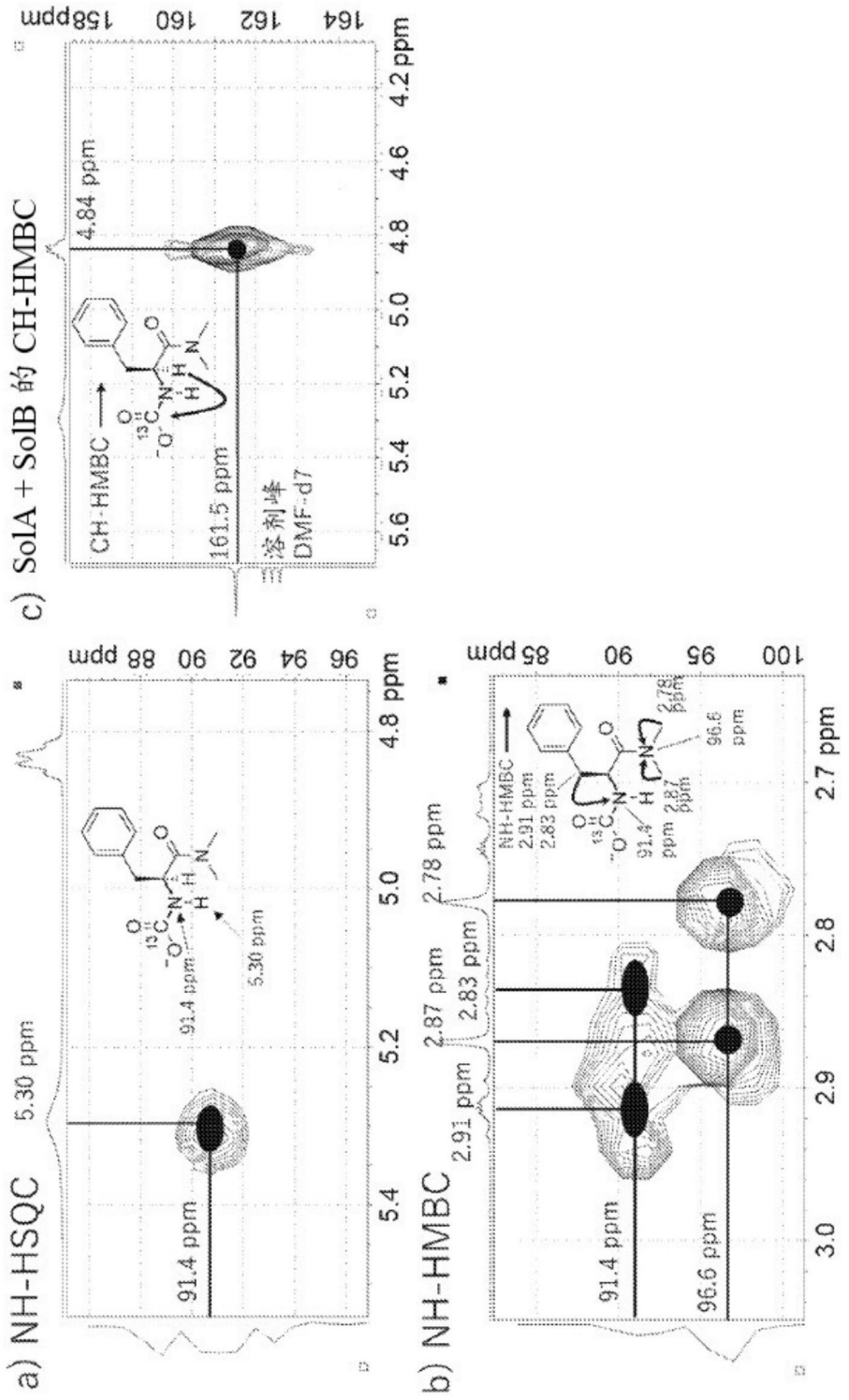

c) SolA + SolB 的 CH-HMBC
4.84 ppm
CH-HMBC
161.5 ppm
溶剂峰
DMF-d7
a) NH-HSQC
5.30 ppm
91.4 ppm
b) NH-HMBC
NH-HMBC
2.91 ppm
2.83 ppm
2.87 ppm
2.78 ppm
91.4 ppm
96.6 ppm

图7

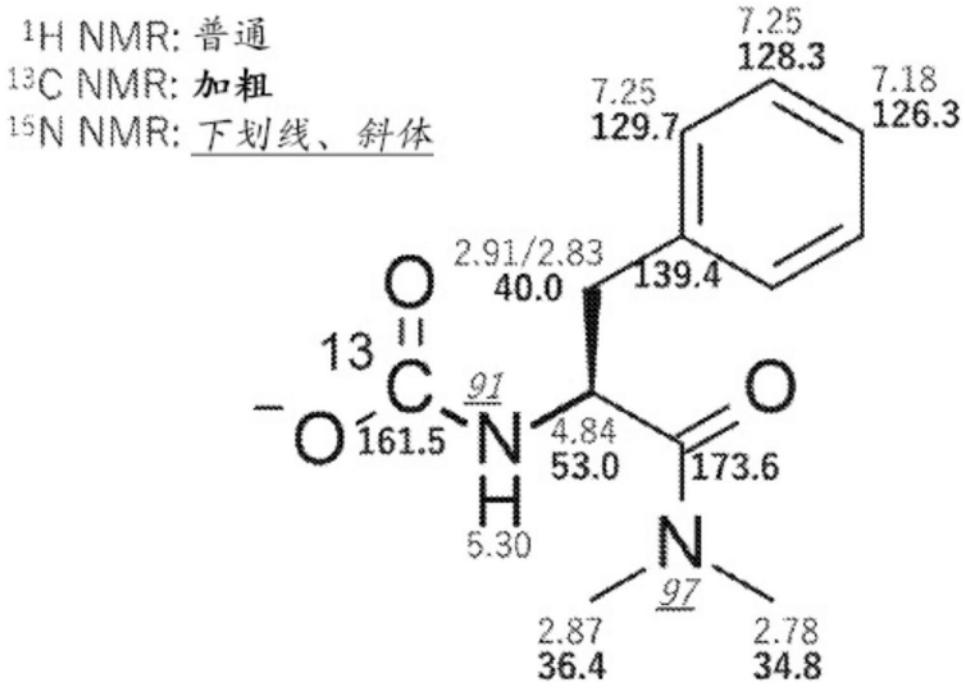

1H NMR: 普通
13C NMR: 加粗
15N NMR: 下划线、斜体
7.25
128.3
7.25
129.7
7.18
126.3
2.91/2.83
40.0
139.4
O
13
C
91
O
161.5
N
H
5.30
4.84
53.0
O
173.6
N
97
2.87
36.4
2.78
34.8

图8