



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104045694 B

(45)授权公告日 2017.10.27

(21)申请号 201310082987.1

(22)申请日 2013.03.15

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104045694 A

(43)申请公布日 2014.09.17

(73)专利权人 深圳翰宇药业股份有限公司  
地址 518057 广东省深圳市南山区高新技术工业园中区翰宇生物医药园办公大楼四层

(72)发明人 朱日成 宓鹏程 刘建 马亚平  
袁建成

(74)专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285  
代理人 张广育 姜建成

(51)Int.Cl.

C07K 14/00(2006.01)

C07K 1/06(2006.01)

C07K 1/04(2006.01)

C07K 1/02(2006.01)

(56)对比文件

CN 101709082 A,2010.05.19,

审查员 陈中伟

权利要求书2页 说明书10页  
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种制备艾卡拉肽的方法

(57)摘要

本发明涉及制备艾卡拉肽的固相-液相全合成方法,所述方法收率高且后处理方便,为艾卡拉肽的工业规模生产提供了一种新的思路。

1. 一种制备艾卡拉肽的方法,包括下述步骤:

(1) 以2-CTC树脂为载体分别合成以下肽树脂:肽树脂1,即Fmoc-Gly-CTC树脂;肽树脂2,即Fmoc-Arg (Pbf) -CTC树脂;肽树脂3,即Fmoc-Pro-CTC树脂;肽树脂4,即Fmoc-Ala-CTC树脂;然后采用固相多肽合成方法,将肽树脂1从C端到N端逐一偶联上带有Fmoc保护基的氨基酸,得到Fmoc-Gln (Trt) -Cys (Acm) -Glu (OtBu) -Glu (OtBu) -Phe-Ile-Tyr (tBu) -Gly-CTC树脂,再经裂解液裂解得到多肽片段A:Fmoc-Gln (Trt) -Cys (Acm) -Glu (OtBu) -Glu (OtBu) -Phe-Ile-Tyr (tBu) -Gly-OH;将肽树脂2从C端到N端逐一偶联上带有Fmoc保护基的氨基酸,得到Fmoc-Arg (Pbf) -Trp (Boc) -Phe-Phe-Asn (Trt) -Ile-Phe-Thr (tBu) -Arg (Pbf) -CTC树脂,再经裂解液裂解得到多肽片段B:Fmoc-Arg (Pbf) -Trp (Boc) -Phe-Phe-Asn (Trt) -Ile-Phe-Thr (tBu) -Arg (Pbf) -OH;将肽树脂3从C端到N端逐一偶联上带有Fmoc保护基的氨基酸,得到Fmoc-Pro-Cys (Acm) -Arg (Pbf) -Ala-Ala-His (Trt) -Pro-CTC树脂,再经裂解液裂解得到多肽片段C:Fmoc-Pro-Cys (Acm) -Arg (Pbf) -Ala-Ala-His (Trt) -Pro-OH;将肽树脂1从C端到N端逐一偶联上带有Fmoc保护基的氨基酸,得到Fmoc-Phe-Lys (Boc) -Ala-Asp (OtBu) -Asp (OtBu) -Gly-CTC树脂,再经裂解液裂解得到多肽片段D:Fmoc-Phe-Lys (Boc) -Ala-Asp (OtBu) -Asp (OtBu) -Gly-OH;将肽树脂4从C端到N端逐一偶联上带有Fmoc保护基的氨基酸,得到Fmoc-Glu (OtBu) -Ala-Met-His (Trt) -Ser (tBu) -Phe-Cys (Acm) -Ala-CTC树脂,再经裂解液裂解得到多肽片段E:Fmoc-Glu (OtBu) -Ala-Met-His (Trt) -Ser (tBu) -Phe-Cys (Acm) -Ala-OH;

(2) 以王树脂为载体合成Fmoc-Asp (OtBu) -王树脂,然后采用固相多肽合成方法将其从C端到N端逐一偶联上带有Fmoc保护基的氨基酸,得到肽树脂F,其中带Fmoc保护基的氨基酸依次为Fmoc-Arg (Pbf) -OH、Fmoc-Thr (tBu) -OH、Fmoc-Cys (Acm) -OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Cys (Acm) -OH、Fmoc-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ser (tBu) -OH、Fmoc-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Arg (Pbf) -OH、Fmoc-Asn (Trt) -OH、Fmoc-Gln (Trt) -OH、Fmoc-Asn (Trt) -OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Cys (Acm) -OH和Fmoc-Gly-OH;

(3) 采用固相多肽合成方法,从C端到N端使肽树脂F依次与步骤(1)中带保护基的多肽片段A、B、C、D、E偶联,即从C端到N端F连接A,A再连接B,B再连接C,C再连接D,D再连接E,得到艾卡拉肽线性肽树脂;

(4) 对步骤(3)中的艾卡拉肽线性肽树脂进行裂解,得到包含六个-Cys (Acm) -片段的艾卡拉肽线性肽;

(5) 脱除步骤(4)的产物中-Cys (Acm) -片段上的Acm保护基,得到艾卡拉肽线性肽;

(6) 采用合适的氧化体系使步骤(5)的艾卡拉肽线性肽形成三对二硫键,得到艾卡拉肽,所述氧化体系为由谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽组成的缓冲液。

2. 权利要求1的方法,其中,在步骤(1)中肽树脂1、肽树脂2、肽树脂3和肽树脂4的合成在碱性条件下进行,所述碱为DIPEA或TMP;CTC树脂的替代度为0.5-1.0mmol/g;在步骤(2)中的王树脂的替代度为0.1-0.2mmol/g。

3. 权利要求2的方法,其中所述碱为DIPEA。

4. 权利要求2的方法,其中在步骤(1)中CTC树脂的替代度为0.7mmol/g。

5. 权利要求2的方法,其中在步骤(2)中的王树脂的替代度为0.15mmol/g。

6. 权利要求1的方法,其中,步骤(1)中合成肽树脂1、2、3和4的氨基酸分别为Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Pro-OH和Fmoc-Ala-OH。

7. 权利要求1的方法,其中,在步骤(1)中的偶联剂为DIPCDI和HOBt的组合物,其中各成分的比例以摩尔比计为DIPCDI:HOBt=1:1;步骤(2)中的偶联剂为DIPCDI和化合物a的组合物或DIPEA和化合物a和化合物b的组合物,其中化合物a为HOBt或HOAt,化合物b为PyBOP、PyAOP、HATU、HBTU或TBTU,其中,偶联剂中各成分的比例以摩尔比计为DIPCDI:a=1:1和DIPEA:a:b=2:1:1;在步骤(3)中的偶联剂为DIPCDI和HOBt的组合物或HATU、HOAt和DIPEA的组合物。

8. 权利要求7的方法,所述化合物b为HATU。

9. 权利要求7的方法,所述步骤(3)中的偶联剂为HATU、HOAt和DIPEA的组合物,其中偶联剂中各成分的比例以摩尔比计为HATU:HOAt:DIPEA=1.0:1.2:2.0。

10. 权利要求1的方法,其中,在步骤(1)中的裂解过程是在裂解液的存在下进行的,所述裂解液是三氟乙醇:二氯甲烷的体积比为20:80的混合物,用量为1g肽树脂对应10-20ml裂解液,裂解时间为2-5小时。

11. 权利要求10的方法,其中裂解液用量为1g肽树脂对应15ml裂解液。

12. 权利要求1的方法,其中,步骤(4)的裂解过程是在裂解液的存在下进行的,所述裂解液为三氟乙酸、苯甲硫醚、苯酚、1,2-乙二硫醇、水和三异丙基硅烷的混合物,其中,各成分的配比以体积比计为:三氟乙酸71-79%、苯甲硫醚7-10%、苯酚7-10%、三异丙基硅烷1-3%、1,2-乙二硫醇4-8%、其余为水,各组分总和为100%。

13. 权利要求12的方法,所述裂解液各成分的配比以体积比计为三氟乙酸:苯甲硫醚:苯酚:水:1,2-乙二硫醇:三异丙基硅烷=72:8:8:6:4:2。

14. 权利要求1的方法,其中,在步骤(5)中,脱除Acm保护基团在酸性的条件下进行,采用的试剂为AgOTf、Hg(OAc)<sub>2</sub>或Ti(TFA)<sub>3</sub>,反应的pH值为3-4。

15. 权利要求14的方法,其中所述试剂为0.1mmol/L的Hg(OAc)<sub>2</sub>。

16. 权利要求1的方法,其中,在步骤(6)中所述氧化体系为由谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽组成的缓冲液,其中线性肽和氧化体系中各成分的加入浓度的比例为线性肽:谷胱甘肽:氧化型谷胱甘肽=1:100~150:10,其中线性肽的浓度以mg/mL计,谷胱甘肽的浓度以mmol/L计,氧化型谷胱甘肽的浓度以mmol/L计。

17. 权利要求16的方法,其中线性肽和氧化体系中各成分的加入浓度的比例为线性肽:谷胱甘肽:氧化型谷胱甘肽=1:100:10,其中线性肽的浓度以mg/mL计,谷胱甘肽的浓度以mmol/L计,氧化型谷胱甘肽的浓度以mmol/L计。

18. 权利要求1-17中任一项的方法,还包括艾卡拉肽的纯化步骤。

19. 权利要求18的方法,其中纯化步骤采用反相高压液相色谱法,包括:以反相十八烷基硅烷为固定相,以0.1%三氟乙酸水溶液、乙腈分别为流动相,收集目的峰馏分,浓缩冻干。

## 一种制备艾卡拉肽的方法

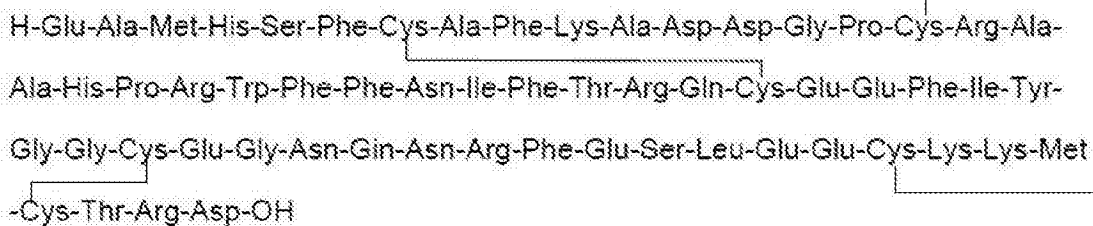
### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种制备多肽的方法，具体涉及一种制备Ecallantide(艾卡拉肽)的方法。

### 背景技术

[0002] Ecallantide(后文称为“艾卡拉肽”)为一种长链多肽，其由60个氨基酸顺序构成，并含有三对二硫键。艾卡拉肽的序列如SEQ ID NO.:1所示：

[0003]



SEQ ID NO.:1

[0004] 美国食品药品监督管理局于2009年12月1日批准Oyax公司新药艾卡拉肽(商品名：Kalbitor)用于遗传性血管水肿(HAE)突发或致命性积液的治疗。艾卡拉肽是在美国上市的第二种治疗HAE发作的药物。该药为皮下注射剂，适用于16岁及16岁以上有HAE发作史的患者

[0005] 但是，在2012年6月14日，Dyax公司发布了艾卡拉肽用于治疗血管紧张素转化酶(ACE)抑制物所致血管神经性水肿II期临床试验的中期分析结果。基于其中期结果不是非常理想，Dyax公司决定中断此药的临床研究，转向基于艾卡拉肽的进一步深度研究和开发。

[0006] 虽然，艾卡拉肽在随机、双盲、安慰剂对照的II期临床试验中表现没有预期的良好，但是其为治疗遗传性血管水肿提供了一个有前景的方向，可以预见，以后在艾卡拉肽的基础上将会衍生出许多新的药品用于治疗遗传性血管水肿，因此，需要建立一种制备艾卡拉肽的方法以满足不断增加的科研需要。

[0007] 由于艾卡拉肽的肽序较长并且其中含有三对二硫键，在合成过程中肽链容易发生卷曲，反应位点不易裸露，故鲜有化学合成的方法报道。目前，艾卡拉肽相关的专利主要集中于药理活性和治疗方面，例如W02007/106746A2、US2007/0213275A1和EP20070758271中记载的。迄今为止，尚没有对艾卡拉肽进行化学全合成的报道。

### 发明内容

[0008] 现有技术的固相多肽合成中，常规的逐个偶联方法在进行长肽的偶联时，往往随着偶联氨基酸的个数增多而易使肽链发生折叠卷曲，反应位点裸露不足，导致偶联效果越来越差。此外，由于艾卡拉肽的肽链中包含三对二硫键，常规方法由于采用了多对二硫键逐对的进行定向氧化方法，使用了多种侧链脱除和氧化试剂，每一个步骤必然带来杂质的增

多,因此不利于得到高纯度,高收率的产物,也不利于工艺的放大。

[0009] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种艾卡拉肽的全合成方法,具体提供一种艾卡拉肽的固相-液相全合成方法,其包括下述步骤:

[0010] (1)以2-CTC树脂为载体分别合成以下肽树脂:1、Fmoc-Gly-CTC树脂;2、Fmoc-Arg (Pbf)-CTC树脂;3、Fmoc-Pro-CTC树脂;4、Fmoc-Ala-CTC树脂;然后采用固相多肽合成方法分别将肽树脂1、2、3、1和4从C端到N端逐一偶联上带有Fmoc保护基的氨基酸,再经裂解液裂解得到相应的多肽片段A、B、C、D和E,其中

[0011] 多肽片段A为

[0012] Fmoc-Gln (Trt)-Cys (Acm)-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Phe-Ile-Tyr (tBu)-Gly-OH;

[0013] 多肽片段B为

[0014] Fmoc-Arg (Pbf)-Trp (Boc)-Phe-Phe-Asn (Trt)-Ile-Phe-Thr (tBu)-Arg (Pbf)-OH;

[0015] 多肽片段C为

[0016] Fmoc-Pro-Cys (Acm)-Arg (Pbf)-Ala-Ala-His (Trt)-Pro-OH;

[0017] 多肽片段D为

[0018] Fmoc-Phe-Lys (Boc)-Ala-Asp (OtBu)-Asp (OtBu)-Gly-OH;

[0019] 多肽片段E为

[0020] Fmoc-Glu (OtBu)-Ala-Met-His (Trt)-Ser (tBu)-Phe-Cys (Acm)-Ala-OH;

[0021] (2)以王树脂为载体合成Fmoc-Asp (OtBu)-王树脂,然后采用固相多肽合成方法将其从C端到N端逐一偶联上带有Fmoc保护基的氨基酸,得到肽树脂F,其中带Fmoc保护基的氨基酸依次为Fmoc-Arg (Pbf)-OH、Fmoc-Thr (tBu)-OH、Fmoc-Cys (Acm)-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Lys (Boc)-OH、Fmoc-Lys (Boc)-OH、Fmoc-Cys (Acm)-OH、Fmoc-Glu (OtBu)-OH、Fmoc-Glu (OtBu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ser (tBu)-OH、Fmoc-Glu (OtBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Arg (Pbf)-OH、Fmoc-Asn (Trt)-OH、Fmoc-Gln (Trt)-OH、Fmoc-Asn (Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Glu (OtBu)-OH、Fmoc-Cys (Acm)-OH和Fmoc-Gly-OH;

[0022] (3)将步骤(1)中带保护基的多肽片段按照A、B、C、D和E的顺序依次与肽树脂F以固相多肽合成方法偶联得到艾卡拉肽线性肽树脂;

[0023] (4)对步骤(3)中的艾卡拉肽线性肽树脂进行裂解,得到包含六个-Cys (Acm)-片段的艾卡拉肽线性肽;

[0024] (5)脱除步骤(4)的产物中-Cys (Acm)-片段上的Acm保护基,得到艾卡拉肽线性肽;

[0025] (6)采用合适的氧化体系将步骤(5)的艾卡拉肽线性肽的三对二硫键环化,得到艾卡拉肽。

[0026] 本发明制备艾卡拉肽的固相-液相全合成方法是迄今艾卡拉肽的唯一的化学全合成方法,其操作简单、反应条件温和、后处理容易、原料易得,为艾卡拉肽的大规模生产提供了一种全新的思路。

## 附图说明

[0027] 图1为本发明艾卡拉肽制备方法的合成路线图。

[0028] 图2为艾卡拉肽粗肽经过RP-HPLC纯化的色谱图,在该谱图中,保留时间 $t=14.108$ 分钟处为艾卡拉肽的信号峰,峰面积为99.13%。

### 具体实施方式

[0029] 术语解释

[0030] 本文通篇的术语“固相多肽合成方法”是指多肽合成领域已知的Fmoc固相合成方法,例如记载于Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis:A Practical Approach, W.C.Chan, Peter D.White著, March 2, 2000 (ISBN-10:0199637245), 英国Oxford University Press。

[0031] 本文通篇的术语“肽树脂”是指多肽的C端连有树脂、N端的氨基连有Fmoc保护基的多肽树脂。

[0032] 本文通篇的术语“多肽片段”是指上文提及的“肽树脂”脱除C端树脂露出游离羧基、N端的氨基连有Fmoc保护基的多肽。

[0033] 本文通篇的术语“艾卡拉肽线性肽”是指上文提及的“肽树脂”脱除C端树脂露出游离羧基并且其分子结构中二硫键没有环合的艾卡拉肽多肽。

[0034] 说明书和权利要求书中所使用英文缩写的含义列于下表中:

[0035]

<b>Fmoc</b>	<b>9-芴甲氧羰基</b>
<b>2-CTC 树脂</b>	<b>2-三苯甲基氯树脂</b>
<b>tBu</b>	<b>叔丁基</b>
<b>Acm</b>	<b>乙酰胺甲基</b>
<b>OtBu</b>	<b>叔丁氧基</b>
<b>Boc</b>	<b>叔丁氧羰基</b>
<b>Pbf</b>	<b>2,2,4,6,7-五甲基苯并咪唑-5-磺酰基</b>
<b>Trt</b>	<b>三苯甲基</b>
<b>DCM</b>	<b>二氯甲烷</b>
<b>DBLK</b>	<b>20%六氢吡啶/DMF 溶液</b>
<b>DIPEA</b>	<b>N,N-二异丙基乙胺</b>
<b>DTT</b>	<b>二硫苏糖醇</b>
<b>HOBt</b>	<b>1-羟基苯并三唑</b>
<b>HOAt</b>	<b>1-羟基-7-偶氮苯并三唑</b>
<b>PyBOP</b>	<b>六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基</b>
<b>PyAOP</b>	<b>(3H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶-3-氧基)三-1-</b>

[0036]

	吡咯烷基磷六氟磷酸盐
<b>HATU</b>	O-(7-偶氮苯并三氮唑-1-氧)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟磷酸盐
<b>HBTU</b>	O-(苯并三唑-1-氧)-N,N,N',N'-四甲基脲鎓六氟硼酸盐
<b>TIS</b>	三异丙基硅烷
<b>DMF</b>	N,N-二甲基甲酰胺
<b>TMP</b>	2,4,6-三甲基吡啶
<b>DMAP</b>	4-二甲氨基吡啶
<b>HPLC</b>	高效液相色谱法
<b>EDT</b>	1, 2-乙二硫醇
<b>TFA</b>	三氟乙酸
<b>TFE</b>	三氟乙醇
<b>GSH</b>	还原型谷胱甘肽
<b>GSSG</b>	氧化型谷胱甘肽

[0037] 本发明提供了一种艾卡拉肽的固相-液相全合成方法,包括下述步骤:

[0038] (1)以2-CTC树脂为载体分别合成肽树脂1、Fmoc-Gly-CTC树脂;2、Fmoc-Arg (Pbf) -CTC树脂;3、Fmoc-Pro-CTC树脂;4、Fmoc-Ala-CTC树脂,然后采用固相多肽合成方法分别将1、2、3、1和4肽树脂从C端到N端逐一偶联上带有Fmoc保护基的氨基酸,再经裂解液裂解得到相应的多肽片段A、B、C、D和E,其中

[0039] 多肽片段A为

[0040] Fmoc-Gln (Trt) -Cys (Acm) -Glu (OtBu) -Glu (OtBu) -Phe-Ile-Tyr (tBu) -Gly-OH;

[0041] 多肽片段B为

[0042] Fmoc-Arg (Pbf) -Trp (Boc) -Phe-Phe-Asn (Trt) -Ile-Phe-Thr (tBu) -Arg (Pbf) -OH;

[0043] 多肽片段C为

[0044] Fmoc-Pro-Cys (Acm) -Arg (Pbf) -Ala-Ala-His (Trt) -Pro-OH;

[0045] 多肽片段D为

[0046] Fmoc-Phe-Lys (Boc) -Ala-Asp (OtBu) -Asp (OtBu) -Gly-OH;

[0047] 多肽片段E为

[0048] Fmoc-Glu (OtBu) -Ala-Met-His (Trt) -Ser (tBu) -Phe-Cys (Acm) -Ala-OH;

[0049] (2)以王树脂为载体合成Fmoc-Asp (OtBu) -王树脂,然后采用固相多肽合成方法将其从C端到N端逐一偶联上带有Fmoc保护基的氨基酸,得到肽树脂F,其中带Fmoc保护基的氨基酸依次为Fmoc-Arg (Pbf) -OH、Fmoc-Thr (tBu) -OH、Fmoc-Cys (Acm) -OH、Fmoc-Met-OH、

Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH、Fmoc-Cys (Acm) -OH、Fmoc-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ser (tBu) -OH、Fmoc-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Arg (Pbf) -OH、Fmoc-Asn (Trt) -OH、Fmoc-Gln (Trt) -OH、Fmoc-Asn (Trt) -OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Cys (Acm) -OH和Fmoc-Gly-OH;

[0050] (3) 将步骤(1)中带保护基的多肽片断按照A、B、C、D和E的顺序依次与肽树脂F以固相多肽合成方法偶联得到艾卡拉肽线性肽树脂;

[0051] (4) 对步骤(3)中的艾卡拉肽线性肽树脂进行裂解,得到包含六个-Cys (Acm) -片段的艾卡拉肽线性肽;

[0052] (5) 脱除步骤(4)的产物中-Cys (Acm) -片段上的Acm保护基,得到艾卡拉肽线性肽;

[0053] (6) 采用合适的氧化体系将步骤(5)的艾卡拉肽线性肽的三对二硫键环化,得到艾卡拉肽。

[0054] 其中,在步骤(1)中肽树脂1、2、3和4的合成在碱性条件下进行,所述碱为DIPEA或TMP,优选DIPEA;CTC树脂的替代度为0.5-1.0mmol/g,优选0.7mmol/g;在步骤(2)中的王树脂的替代度为0.1-0.2mmol/g,优选0.15mmol/g。

[0055] 在步骤(1)中合成肽树脂1、2、3和4的氨基酸分别为Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Arg (Pbf) -OH、Fmoc-Pro-OH和Fmoc-Ala-OH;合成多肽片断A的氨基酸依次(按照反应顺序)为:Fmoc-Tyr (tBu) -OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Glu (OtBu) -OH、Fmoc-Cys (Acm) -OH和Fmoc-Gln (Trt) -OH;合成多肽片断B的氨基酸依次(按照反应顺序)为:Fmoc-Thr (tBu) -OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Asn (Trt) -OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Trp (Boc) -OH和Fmoc-Arg (Pbf) -OH;合成多肽片断C的氨基酸依次(按照反应顺序)为:Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Arg (Pbf) -OH、Fmoc-Cys (Acm) -OH和Fmoc-Pro-OH;合成多肽片断D的氨基酸依次(按照反应顺序)为:Fmoc-Asp (OtBu) -OH、Fmoc-Asp (OtBu) -OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Lys (Boc) -OH和Fmoc-Phe-OH;合成多肽片断E的氨基酸依次(按照反应顺序)为:Fmoc-Cys (Acm) -OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Ser (tBu) -OH、Fmoc-His (Trt) -OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Ala-OH和Fmoc-Glu (OtBu) -OH;上述氨基酸均为市售可用,例如购自吉尔生化上海有限公司;

[0056] 在步骤(2)中的肽树脂F为:

[0057] Fmoc-Gly-Cys (Acm) -Glu (OtBu) -Gly-Asn (Trt) -Gln (Trt) -Asn (Trt) -Arg (Pbf) -Phe-Glu (OtBu) -Ser (tBu) -Leu-Glu (OtBu) -Glu (OtBu) -Cys (Ac m) -Lys (Boc) -Lys (Boc) -Met-Cys (Acm) -Thr (tBu) -Arg (Pbf) -Asp (OtBu) -王树脂,所使用的氨基酸均为市售可用,例如购自吉尔生化上海有限公司。

[0058] 在步骤(1)中以及下文用到固相多肽合成方法的步骤中所述的固相多肽合成方法包括:1)脱除Fmoc,接着用溶剂洗涤树脂,直至用检测方法检测到完全脱除Fmoc为止;2)将合适量的待偶联氨基酸和偶联剂在溶剂中溶解并活化后,一起加入到固体反应柱中,直至用检测方法检测到反应终止为止;3)重复1)和2)。

[0059] 其中脱除Fmoc的试剂可为本领域已知的可实现该目的的任何试剂,优选20%的哌啶/DMF溶液(DBLK),即哌啶:DMF(体积比)为1:4的混合溶液。

[0060] 在步骤(1)中的偶联剂为DIPCDI和HOBT的组合物,其中各成分的比例以摩尔比计为DIPCDI:HOBT=1:1;步骤(2)中的偶联剂为DIPCDI和化合物a的组合物或DIPEA和化合物a



和化合物b的组合物,其中化合物a为HOBt或HOAt,化合物b为PyBOP、PyAOP、HATU、HBTU或TBTU,优选HATU,其中偶联剂中各成分的比例以摩尔比计为DIPCDI:a=1:1和DIPEA:a:b=2:1:1;在步骤(3)中的偶联剂为DIPCDI和HOBT的组合物或HATU、HOAt和DIPEA的组合物,优选HATU、HOAt和DIPEA的组合物,其中偶联剂中各成分的比例以摩尔比计为HATU:HOAt:DIPEA=1.0:1.2:2.0。

[0061] 上文提及的固相多肽合成方法在固相反应柱中进行。对固相反应柱无特别限制,可为可实现此目的的任意固相反应柱。此外,每种氨基酸进行偶联反应的时间通常为1.5-4小时,优选2-3小时;压力优选为常压,也可在适当提高或降低的压力下进行;温度优选为室温(即 $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ),也可在适当提高或降低的温度下进行。

[0062] 上文提及的固相多肽合成方法优选将树脂在偶联之前进行溶胀,所述洗涤和溶胀的步骤本领域可采用实现该目的的任何试剂进行,优选DMF。所述反应中应用的检测方法是本领域已知的可实现此目的的任意方法,例如色谱法或化学标定法,优选使用可判定反应终点的试剂,优选茚三酮,当使用茚三酮时,若树脂显色则说明多肽中有游离的酰胺,即酰胺氮上无保护基。

[0063] 在步骤(1)中的裂解过程是在裂解液的存在下进行的。所述裂解液为TFE:DCM=20:80(V/V)的混合液,用量为1g肽树脂对应10-20ml裂解液,优选1g肽树脂对应15ml裂解液,裂解时间为2-5小时。

[0064] 在步骤(4)中的裂解过程是在裂解液的存在下进行的。所述裂解液为三氟乙酸、苯甲硫醚、苯酚、1,2-乙二硫醇(EDT)、水和三异丙基硅烷的混合物,其中,混合物中各成分的配比为:TFA71-79%(V/V)、苯甲硫醚7-10%(V/V)、苯酚7-10%(V/V)、TIS1-3%(V/V)、EDT4-8%(V/V)、其余为水,各组分总和为100%。所述配比优选为TFA:苯甲硫醚:苯酚:水:EDT:TIS=72:8:8:6:4:2(V/V)。

[0065] 本发明的步骤(5)中,脱除脱除Acm保护基团在酸性的条件下进行,采用的试剂可以为AgOTf、 $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ 或 $\text{Ti}(\text{TFA})_3$ ,优选0.1mmol/L的醋酸汞,反应的pH值为3-4。

[0066] 本发明所述步骤(6)中氧化体系为 $\text{O}_2$ /DTT/醋酸铵、DMSO/硫酸铵或谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽(GSH/GSSG)缓冲液,优选GSH/GSSG/缓冲液,其中线性肽和氧化体系中各成分加入的浓度(质量浓度或摩尔浓度,即每mL或每L缓冲液所加入各成分的质量(mg)或摩尔量(mmol))的比例为线性肽:GSH:GSSG=1:100~150:10,优选为线性肽:GSH:GSSG=1:100:10,其中线性肽的浓度以mg/mL计,GSH的浓度以mmol/L计,GSSG的浓度以mmol/L计,此缓冲体系温和,可防止肽链中的Met被氧化,有利于提高收率。;

[0067] 本发明的制备方法先采用固相合成带Acm保护基团的线性艾卡拉肽,直接“一锅法”一次性形成三对二硫键,避免使用体积庞大的Trt保护基团,便于长肽链的空间舒展而有利于偶联反应的进行

[0068] 本发明优选还包括艾卡拉肽的纯化步骤。所述纯化步骤可采用本领域已知的任意多肽纯化技术进行,优选采用反相高压液相色谱法。进一步地,所述反相高压液相色谱法包括:以反相十八烷基硅烷为固定相,以0.1%三氟乙酸/水,乙腈分别为流动相,收集目的峰馏分,浓缩冻干。

[0069] 实施例

[0070] 为了进一步理解本发明,下面结合具体实施例对本发明进行详细说明,应理解,下

述实施例意在说明,不对本发明构成限制。

[0071] 在本说明书中使用的王树脂和2-CTC树脂购自天津南开和成有限公司,各种带保护基的氨基酸购自吉尔生化上海有限公司,偶联试剂购自苏州天马有限公司,其它溶剂和试剂为普通市售品。

[0072] 实施例1:替代度0.5mmol/g-1.0mmol/g的Fmoc-Gly-CTC树脂的制备

[0073] 替代度为0.7mmol/g的Fmoc-Gly-CTC树脂的制备

[0074] 称取替代度为1.0mmol/g的2-CTC树脂300g(300mmol),加入到固相反应柱中,用DMF洗涤2次,用DMF溶胀树脂30分钟后,取160.4g(540mmol)Fmoc-Gly-OH用DMF溶解,冰水浴下加入116.6g(900mmol)DIPEA活化后,加入上述装有树脂的反应柱中,反应2小时后,加入360ml无水甲醇封闭30min。用DMF洗涤3次,DCM洗3次,甲醇收缩抽干,得到Fmo-Gly-CTC树脂,检测替代度为0.705mmol/g。

[0075] 替代度为0.5mmol/g的Fmoc-Gly-CTC树脂的制备

[0076] 称取替代度为1.0mmol/g的2-CTC树脂300g(300mmol),加入到固相反应柱中,用DMF洗涤2次,用DMF溶胀树脂30分钟后,取133.8g(450mmol)Fmoc-Gly-OH用DMF溶解,冰水浴下加入116.6g(900mmol)DIPEA活化后,加入上述装有树脂的反应柱中,反应2小时后,加入360ml无水甲醇封闭30min。用DMF洗涤3次,DCM洗3次,甲醇收缩抽干,得到Fmo-Gly-CTC树脂,检测替代度为0.505mmol/g。

[0077] 替代度为1.0mmol/g的Fmoc-Gly-CTC树脂的制备

[0078] 称取替代度为1.2mmol/g的2-CTC树脂250g(300mmol),加入到固相反应柱中,用DMF洗涤2次,用DMF溶胀树脂30分钟后,取267.6g(900mmol)Fmoc-Gly-OH用DMF溶解,冰水浴下加入116.6g(900mmol)DIPEA活化后,加入上述装有树脂的反应柱中,反应2小时后,加入360ml无水甲醇封闭30min。用DMF洗涤3次,DCM洗3次,甲醇收缩抽干,得到Fmo-Gly-CTC树脂,检测替代度为0.989mmol/g。

[0079] 本发明的方法中使用的肽树脂2、3和4依照实施例1的方法进行。

[0080] 实施例2:多肽片段A肽树脂的制备

[0081] 称取替代度为0.705mmol/g的Fmoc-Gly-CTC树脂156g(110mmol),加入到固相反应柱中,用DMF洗涤2次,用DMF溶胀Fmoc-Gly-CTC树脂30分钟后,用DBLK脱除Fmoc保护,然后用DMF洗涤6次。将151.6g Fmoc-Tyr(tBu)-OH(330mmol),53.6gHOBt(396mmol),50.1g DIC(396mmol)溶于DMF溶液,加入固相反应柱中,室温反应2h(反应终点以茚三酮法检测为准,如果树脂无色透明,则反应完全,树脂显色,表示反应不完全,需再偶联反应1hrs。得到Fmoc-Tyr(tBu)-Gly-CTC Resin。重复上述脱除Fmoc保护和加入相应氨基酸偶联的步骤,按照片段的顺序,顺次完成Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Cys(Acm)-OH和Fmoc-Gln(Trt)-OH的偶联,得到343g多肽片段A肽树脂:

[0082] Fmoc-Gln(Trt)-Cys(Acm)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Tyr(tBu)-Gly-CTC树脂。

[0083] 多肽片段B、C、D和E肽树脂的制备同实施例2的方法。

[0084] 实施例3:多肽片段A:

[0085] Fmoc-Gln(Trt)-Cys(Acm)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Tyr(tBu)-Gly-OH的制备

[0086] 将343g多肽片段A肽树脂置于裂解反应瓶中,以15ml/g树脂的比例加入裂解试剂(TFE:DCM=20:80(V/V)),室温搅拌2.5h。反应物用砂芯漏斗过滤,收集滤液,树脂再用少量DCM洗涤3次,合并滤液后减压浓缩。加入冰冻的无水乙醚沉淀,用无水乙醚洗涤3次,真空干燥得到白色粉末固体,即多肽片段A粗肽188.7g。重量收率为99.5%,RP-HPLC纯度为96.4%,质谱信号为1723.912。

[0087] 接下来,采用与实施例3相同的原料摩尔数和反应物当量比,用相同的方法制备多肽片段B、C、D和E得到多肽片段B粗肽269.7g。重量收率为101.7%,RP-HPLC纯度为97.4%,质谱信号为2413.125;多肽片段C粗肽178.4g。重量收率为105.3%,RP-HPLC纯度为96.5%,质谱信号为1540.935;多肽片段D粗肽124.21g。重量收率为100.7%,RP-HPLC纯度为97.4%,质谱信号为1122.512;多肽片段E粗肽289.4g。重量收率为102.9%,RP-HPLC纯度为95.4%,质谱信号为25567.325。

[0088] 实施例4:替代度为0.15mmol/g的Fmoc-Asp(OtBu)-王树脂的制备

[0089] 称取替代度为0.6mmol/g的王树脂333.3g(200mmol),加入固相反应柱中,用DMF洗涤2次,用DMF溶胀树脂30分钟后,取246.9g(600mmol)Fmoc-Asp(OtBu)-OH、97.3g(720mmol)HOBt、90.86g(720mmol)DIC、7.32g(60mmol)DMAP溶于体积比为1:1的DCM和DMF混合溶液,加入固相反应柱中,室温反应2h。反应结束后用DMF洗涤4次,DCM洗2次。然后加入316.4g吡啶和408.4g乙酸酐混合液封闭树脂6h。用DMF洗涤4次,DCM洗涤2次后,甲醇收缩抽干,得到Fmoc-Asp(OtBu)-王树脂367.5g,检测替代度为0.153mmol/g。

[0090] 实施例5:多肽片段F肽树脂的制备

[0091] 称取替代度为0.153mmol/g的Fmoc-Asp(OtBu)-王树脂392.2g(60mmol),加入固相反应柱中,用DMF洗涤2次,用DMF溶胀树脂30分钟后,用DBLK脱除Fmoc保护,然后用DMF洗涤4次,DCM洗2次。将116.8g Fmoc-Arg(Pbf)-OH(180mmol),29.1g HOBt(216mmol),27.3g DIPCDI(216mmol)溶于体积比为1:1的DCM和DMF混合溶液,加入固相反应柱中,室温反应2h(反应终点以茚三酮法检测为准,如果树脂无色透明,则反应完全,树脂显色,表示反应不完全,需再偶联反应1h。重复上述脱除Fmoc保护和加入相应氨基酸偶联的步骤,按照片段的顺序,采用偶联剂为DIPCDI和化合物HOBt的组合物或DIPEA和HOAt和HATU的组合物,其中偶联剂中各成分的比例以摩尔比计为DIPCDI:HOBt=1:1和DIPEA:HOAt:HATU=2:1:1,依次完成Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Cys(Acm)-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Cys(Acm)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Arg(Pbf)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Cys(Acm)-OH和Fmoc-Gly-OH的偶联。反应结束后用甲醇收缩,树脂真空干燥过夜,称重多肽片段F肽树脂:Fmoc-Gly-Cys(Acm)-Glu(OtBu)-Gly-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pbf)-Phe-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Cys(Acm)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Met-Cys(Acm)-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Asp(OtBu)-王树脂685.2g。

[0092] 实施例6:艾卡拉肽树脂的制备

[0093] 称取685.2g的多肽片段F肽树脂,加入到固相反应柱中,用DMF洗涤2次,用DMF溶胀树脂30分钟后,用DBLK脱除Fmoc保护,然后用DMF洗涤6次。将310.2g多肽片段A(180mmol),29.4g HOAt(216mmol),68.4g HATU(180mmol)和59.5ml DIPEA(360mmol)溶于DMF中,加入

固相反应柱中,室温反应2h(反应终点以茚三酮法检测为准,如果树脂无色透明,则反应完全,树脂显色,表示反应不完全,需再偶联反应1h)。反应结束后用甲醇收缩,肽树脂真空干燥过夜,得到788.1g以下序列的多肽肽树脂:Fmoc-Gln(Trt)-Cys(Acm)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Tyr(tBu)-Gly-Gly-Cys(Acm)-Glu(OtBu)-Gly-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pbf)-Phe-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Cys(Acm)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Met-Cys(Acm)-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Asp(OtBu)-王树脂。

[0094] 接下来,按照上述方法,依次偶联实施例3中制备的多肽片段B、C、D和E,最终得到1241.1g艾卡拉肽肽树脂:

[0095] Fmoc-Phe-Lys(Boc)-Ala-Asp(OtBu)-Asp(OtBu)-Gly-Phe-Lys(Boc)-Ala-Asp(OtBu)-Asp(OtBu)-Gly-Pro-Cys(Acm)-Arg(Pbf)-Ala-Ala-His(Trt)-Pro-Arg(Pbf)-Trp(Boc)-Phe-Phe-Asn(Trt)-Ile-Phe-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Gln(Trt)-Cys(Acm)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Tyr(tBu)-Gly-Gly-Cys(Acm)-Glu(OtBu)-Gly-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Arg(Pbf)-Phe-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Cys(Acm)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Met-Cys(Acm)-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Asp(OtBu)-王肽树脂。

[0096] 实施例7:带Acm保护基团的艾卡拉肽线性粗肽的制备

[0097] 将1241.1g艾卡拉肽肽树脂肽树脂置于裂解反应其中,以15ml/g树脂的比例加入裂解试剂(TFA:苯甲硫醚:苯酚:水:EDT:TIS=72:8:8:6:4:2(V/V)),室温搅拌3.0h。反应物用砂芯漏斗过滤,收集滤液,树脂再用少量TFA洗涤3次,合并滤液后减压浓缩。加入冰冻的无水乙醚沉淀,用无水乙醚洗涤3次,真空干燥得到白色粉末固体,即带Acm保护基的艾卡拉肽线性粗肽532.2g。重量收率为100.5%,HPLC纯度为82.1%,质谱信号为8820.726。

[0098] 实施例8:脱离艾卡拉肽线性粗肽的Acm保护基团

[0099] 将200.0g含有Acm基团的艾卡拉肽线性粗肽用10%醋酸配制成浓度为7-12mg/ml的溶液。用冰醋酸将溶液的pH精确的调至3.5。加入0.1mmol/L醋酸汞(12eq./Acm),用醋酸或氨水将pH重新调至3.5。充氮气,在室温下温和搅拌反应。加入β-巯基乙醇(25eq./Acm),放置3h。离心,除去沉淀,将上清液用HPLC除盐。真空干燥,最终得到艾卡拉肽线性粗肽174.9g,质谱信号为8387.625。

[0100] 实施例9:艾卡拉肽粗肽的制备

[0101] 将150g艾卡拉肽线性粗肽溶解于150L的缓冲体系中,该缓冲体系为0.1mM醋酸铵、3倍量于线性粗肽(物质的量)的DTT的水溶液,pH为7.8,敞口置于室温中,搅拌36小时,加冰乙酸调节pH=3~5淬灭,即得到艾卡拉肽粗肽溶液,并参照实施例12的方法进行纯化制备并冻干,得到白色精肽固体35.7g,环化收率为23.8%,质谱信号为8387.654。

[0102] 实施例10:艾卡拉肽粗肽的制备

[0103] 将150g艾卡拉肽线性粗肽溶解于150L的缓冲体系中,该缓冲体系为0.2mM硫酸铵/5%DMSO水溶液,pH为8.2,敞口置于室温中,搅拌24小时,加冰乙酸调节pH=3~5淬灭,并参照实施例12的方法进行纯化制备并冻干,得到白色精肽固体37.1g,环化收率为24.7%,质谱信号为8387.627。。

[0104] 实施例11:艾卡拉肽粗肽的制备

[0105] 将150g艾卡拉肽线性粗肽溶解于150L的缓冲体系中,该缓冲体系为0.1mM磷酸铵与GSH/GSSG(100:10,以mmol/L计)水溶液,pH为8.2,敞口置于室温中,搅拌24小时,加冰乙

酸调节pH=3~5淬灭,按照实施例12纯化制备,白色精肽固体40.78g,收率为27.19%,质谱信号为8387.637。

[0106] 实施例12:艾卡拉肽粗肽的纯化

[0107] 取实施例11制备得到的艾卡拉肽粗肽,采用NOVASEP RP-HPLC系统,波长220nm,色谱柱为反相C18柱,常规0.1%TFA/水、乙腈分别为流动相纯化,除盐,收集目的峰馏分,旋转蒸发浓缩,冻干得到白色精肽固体40.78g,收率为27.19%,质谱信号为8387.637。HPLC纯度99.54%。具体的精肽的谱图及数据参见图2

[0108] 虽然已参照特定实施方案对本发明进行了说明,但本领域技术人员应认识到的是,在不偏离本发明主旨和范围的情况下,可对所述实施方案进行改变或改进,本发明范围通过所附权利要求书限定。

[0001]

## 序 列 表

&lt;110&gt; 深圳翰宇药业股份有限公司

&lt;120&gt; 一种制备艾卡拉肽的方法

&lt;130&gt; CP1121900/CB

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 1

Glu	Ala	Met	His	Ser	Phe	Cys	Ala	Phe	Lys	Ala	Asp	Asp	Gly	Pro	Cys
1				5					10					15	

Arg	Ala	Ala	His	Pro	Arg	Trp	Phe	Phe	Asn	Ile	Phe	Thr	Arg	Gln	Cys
			20					25					30		

Glu	Glu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Gly	Cys	Glu	Gly	Asn	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu
		35					40					45			

Ser	Leu	Glu	Glu	Cys	Lys	Lys	Met	Cys	Thr	Arg	Asp
	50					55					60

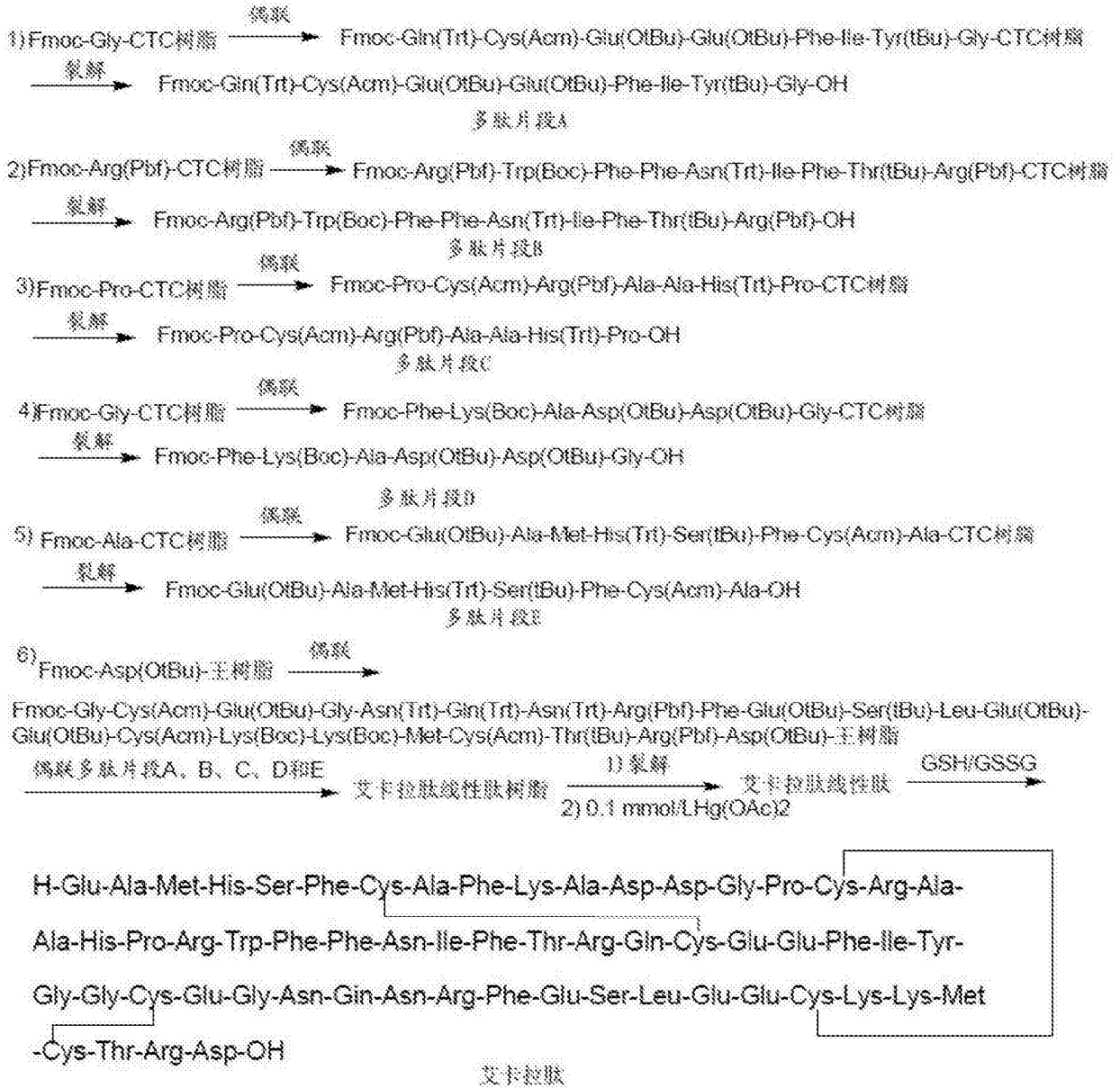
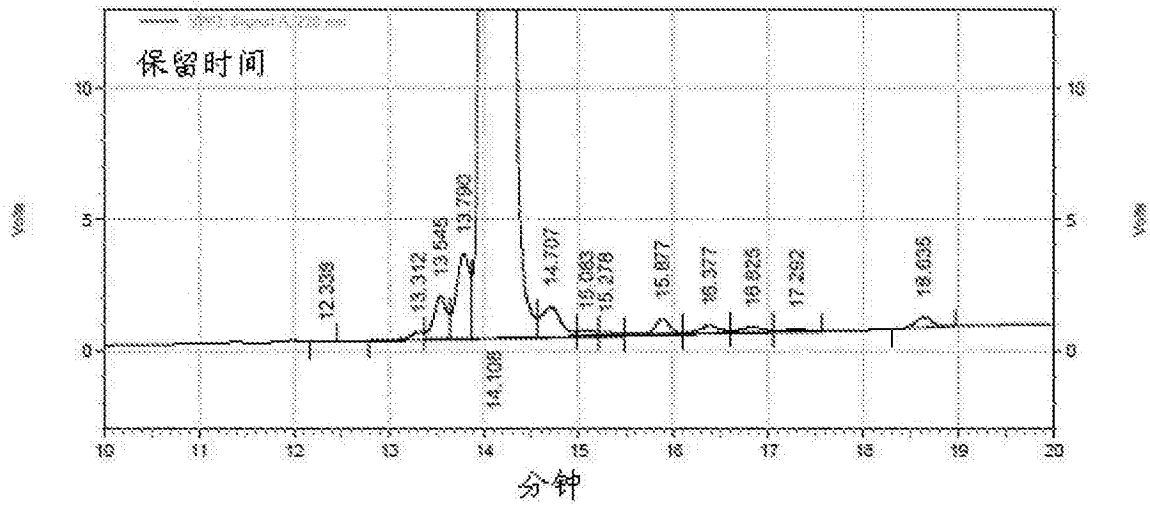


图1



VWD: 信号A

220 nm 结果

保留时间	面积	面积%	高度	高度%
12.338	3054	0.03	353	0.03
13.312	52078	0.03	4647	0.02
13.543	362135	0.14	27417	0.15
13.790	544080	0.30	54031	0.29
14.108	180497621	99.13	18732845	99.26
14.707	277592	0.15	19181	0.10
15.083	45272	0.02	4069	0.02
15.278	25301	0.01	2226	0.01
15.877	116054	0.06	10094	0.05
16.377	80158	0.04	4805	0.03
16.825	63334	0.03	3571	0.02
17.292	30551	0.02	1768	0.01
18.635	87833	0.05	7012	0.04

图2