



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111018963 B

(45) 授权公告日 2023. 11. 24

(21) 申请号 201911378973.8

(22) 申请日 2019.12.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111018963 A

(43) 申请公布日 2020.04.17

(73) 专利权人 中肽生化有限公司
地址 310000 浙江省杭州市经济技术开发区12号大街69号

(72) 发明人 刘宝生 马佳颀 李湘 徐琪

(74) 专利代理机构 浙江英普律师事务所 33238
专利代理师 陈俊志

(51) Int. Cl.
C07K 14/605 (2006.01)
C07K 1/04 (2006.01)
C07K 1/06 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102977204 A, 2013.03.20

CN 103214568 A, 2013.07.24

CN 103288951 A, 2013.09.11

CN 103333239 A, 2013.10.02

CN 109721653 A, 2019.05.07

CN 1904150 A, 2007.01.31

生物化学与生物物理学报. 用片段固相缩合法全合成结晶胰高血糖素. 生物化学与生物物理学报. 1975, 第7卷(第7期), 第119-138页.

审查员 黄炎

权利要求书1页 说明书8页

(54) 发明名称

一种胰高血糖素的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种固相片段法制备胰高血糖素的方法。本发按照序列利用固相合成法逐个连接5-29片段,然后将四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH连接至5-29片段肽树脂上,酸解脱除保护基及切肽得到胰高血糖素粗品,经纯化、冻干后得到胰高血糖素纯品。本发明具有易于合成、杂质含量少且节约成本的优点。

1. 一种合成胰高血糖素的方法,其特征在于,所述方法包含如下步骤:

步骤1) 按照胰高血糖素氨基酸序列C端到N端的顺序,在偶联试剂的作用下利用固相合成法逐个连接5-29片段,得到H-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Ala-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Met-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Wang树脂;

步骤2) 将四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH连接至上述5-29片段肽树脂上,脱除Fmoc保护后,得到H-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Ala-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Met-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Wang树脂,或者,将四肽片段Boc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH连接至上述5-29片段肽树脂上,得到Boc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Ala-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Met-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Wang树脂;

步骤3) 将步骤2)得到的树脂酸解脱除保护基及切肽得到胰高血糖素粗品;

步骤4) 将步骤3)得到的胰高血糖素粗品经制备液相色谱纯化,得到纯化品;

步骤5) 将步骤4)得到的纯化品冻干后得到胰高血糖素的纯品,完成合成;

步骤1) 合成5-29肽树脂片段使用的树脂为Wang树脂,其初始肽树脂Fmoc-Thr(tBu)-Wang树脂取代度为0.2~0.5mmol/g;N端偶联有保护基的Thr(tBu)和Wang树脂的比例为1-6:1;

在步骤1)和步骤2)中,每次延伸偶联时所述氨基酸和对应肽树脂的摩尔比为1-6:1;

步骤2)中,1-4片段主链氨基采用Fmoc或Boc保护,His采用的侧链保护基为三苯甲基,Ser采用的侧链保护基为叔丁基,Gln采用的侧链保护基为三苯甲基。

2. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,在步骤1)中,所述偶联试剂为HOBt,HOAt与DIC的混合物,或PyAop、PyBop与有机碱的混合物,或HBTU、HATU与有机碱的混合物;所述有机碱选自DIPEA、Et₃N、NMM中的一种或多种混合。

3. 根据权利要求2所述方法,其特征在于,在步骤1)中,所述偶联试剂为HOBt与DIC的组合。

4. 根据权利要求2所述方法,其特征在于,所述有机碱为DIPEA、Et₃N或NMM中的一种或几种。

5. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述偶联的反应溶剂采用DMF。

6. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,脱侧链保护基及切肽中所用的裂解试剂为三氟乙酸与茴香硫醚、苯甲醚、三异丙基硅烷、苯酚、1,2-乙二硫醇或水其中一种或几种的组合。

一种胰高血糖素的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及多肽药物制备领域,尤其是涉及一种固相片段法制备胰高血糖素的方法。

背景技术

[0002] 胰高血糖素(glucagon)是一种由胰脏胰岛 α -细胞分泌的激素,它是由29个氨基酸组成的直链多肽,亦称胰增血糖素或抗胰岛素或胰岛素B,与胰岛素相对抗,起着增加血糖的作用,1953年,胰高血糖素被分离沉淀而取得结晶。其化学结构为H-His¹-Ser²-Gln³-Gly⁴-Thr⁵-Phe⁶-Thr⁷-Ser⁸-Asp⁹-Tyr¹⁰-Ser¹¹-Lys¹²-Tyr¹³-Leu¹⁴-Asp¹⁵-Ser¹⁶-Arg¹⁷-Arg¹⁸-Ala¹⁹-Gln²⁰-Asp²¹-Phe²²-Val²³-Gln²⁴-Trp²⁵-Leu²⁶-Met²⁷-Asn²⁸-Thr²⁹-OH,分子量为3485道尔顿。

[0003] 胰高血糖素是一种比较难制备的29肽,特别是在N端末端几个氨基酸的连接中。迄今为止报道制备胰高血糖素的篇幅很少。专利CN1063795C报道了首先制备胰高血糖素融合蛋白,然后用酶处理并回收以生产胰高血糖素的方法。专利CN103333239B报道了一种胰高血糖素的固相合成方法,该方法以固相合成树脂为起始原料,按照固相合成的方法在较高温度下依次连接具有Fmoc保护基团的氨基酸或多肽,在连接过程中,使用了伪脯氨酸保护二肽进行氨基酸缩合。该专利采用高温技术方案的原因,在于解决合成速度慢、反应时间长的问题,从而更加适合工业化生产。然而在较高温度下的反应,及其可能会引起多肽合成中副反应的大量增加。所以该专利进一步采用了伪脯氨酸保护二肽的技术方案,以期减少副反应。但是,伪脯氨酸保护二肽作为一种特殊氨基酸,价格较普通氨基酸昂贵,对于多肽合成当中的成本控制不利,不利于规模化生产。

[0004] 而且,N端末端几个氨基酸的连接中,由于连接难度的增加,每一个氨基酸的固相合成过程,都会增加副反应,而且与接近末端,副反应越多,这每一个步骤的副反应会步步累积,这样的结果,造成了最终产物纯度低。从另外一个角度来说,末端几个氨基酸连接的难度也很高,而且越接近末端越高,该专利为代表的现有技术没有解决这些问题。

发明内容

[0005] 有鉴于此,开发一种易于合成、杂质含量少且节约成本的胰高血糖素制备方法十分必要。为实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 一种胰高血糖素的制备方法,包括:

[0007] 步骤1) 按照序列利用固相合成法逐个连接5-29片段,得到H-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Ala-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Met-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Wang树脂。

[0008] 步骤2) 将四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH连接至上述5-29片段肽树脂上,脱除Fmoc保护后,得到H-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-Thr(tBu)-

Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Ala-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Met-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Wang树脂。

[0009] 或者,将四肽片段Boc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH连接至上述5-29片段肽树脂上,得到Boc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Ala-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Met-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Wang树脂。

[0010] 步骤3) 酸解脱除保护基及切肽得到胰高血糖素粗品,经纯化、冻干后得到胰高血糖素纯品。

[0011] 作为优选,步骤1) 合成5-29肽树脂片段使用的树脂为Wang树脂,其初始肽树脂Fmoc-Thr(tBu)-Wang树脂取代度为0.2~0.5mmol/g。

[0012] 作为优选,步骤2) 中采用四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH或Boc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH,有效避免了末端几个氨基酸难以连接的问题及His¹位点消旋杂质的问题。

[0013] 作为优选,步骤1) 和步骤2) 中使用的偶联试剂为HOBt、HOAt与DIC的混合物,或PyAop、PyBop与有机碱的混合物,或HBTU、HATU与有机碱的混合物。其中,有机碱选自DIPEA、Et₃N、NMM中的一种。更优选为HOBt与DIC的组合。

[0014] 作为优选,步骤3) 中所用的裂解试剂包括三氟乙酸,茴香硫醚,苯甲醚,三异丙基硅烷,苯酚,1,2-乙二硫醇,水等。

[0015] 更为优选,裂解试剂的比例为三氟乙酸:苯甲醚:苯酚:1,2-乙二硫醇:水=90:5:3:2。

[0016] 本发明相比现有技术而言,具有以下优点和进步:

[0017] 在研究过程中我们发现,使用固相逐步法多肽合成策略合成胰高血糖素的过程中,当连接至Gly⁴时,氨基酸连接变得困难,特别是末端His¹的连接特别困难,需要增加氨基酸的投料倍数或者延长反应时间,His¹位点的消旋杂质显著增加。这对于后期纯化过程中的杂质分离及最终成品中的杂质控制非常不利。解决胰高血糖素末端几个氨基酸的连接困难问题及控制His¹位点的消旋问题,成为合成过程中的难点。因此本发明经过多次设计和试验,采用了固相逐步法连接5-29片段,再将1-4片段作为四肽,用固相合成方法连接至肽链中。1-4片段可作为四肽起始物料,相应位点的杂质能通过起始物料的质量标准加以控制,从而解决了传统方法中的消旋杂质问题。同时,使用1-4片段的四肽,反应可以在常温下反应,减少了副反应。也无需引入有毒试剂。本发明的方法,反应工艺合理,速度快,副反应少,杂质可控,适合工业化大规模生产。

具体实施方式

[0018] 本发明实施例公开了一种胰高血糖素的制备方法。本领域技术人员可以借鉴本文内容,进行包括分段方法以及缩合条件等工艺参数的改进。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明内。本发明的方法已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范

围内对本文所述的方法进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0019] 实施例1:

[0020] 本实施例采用如下技术方案:

[0021] 步骤1) 按照胰高血糖素序列利用固相合成法逐个连接5-29片段,得到H-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Ala-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Met-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Wang树脂。

[0022] 具体地,本发明所述步骤1) 5-29片段肽树脂的合成方法为:将Fmoc-Thr(tBu)-OH与Wang树脂偶联得到Fmoc-Thr(tBu)-Wang树脂。其中,所述偶联试剂为2,6-二氯苯甲酰氯与吡啶。

[0023] 更具体地,将Fmoc-Thr(tBu)-OH与Wang树脂混合于DCM中溶解,加入吡啶与2,6-二氯苯甲酰氯反应。

[0024] 作为优选,Wang树脂与Fmoc-Thr(tBu)-OH、2,6-二氯苯甲酰氯、吡啶的摩尔比为1:1.2:2.4:4.8。

[0025] 作为优选,偶联反应的条件为室温反应3h。

[0026] 上述偶联反应结束后,然后依次用DMF、甲醇、DMF、甲醇洗涤,真空干燥即得Fmoc-Thr(tBu)-Wang树脂。按照胰高血糖素序列,逐次偶联得到全保护的5-29片段肽树脂H-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Ala-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Met-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Wang树脂

[0027] 其中,上述偶联反应的偶联试剂为HOBt、HOAt与DIC的混合物,或PyAop、PyBop与碱的混合物,或HBTU、HATU与碱的混合物。其中,有机碱选自DIPEA、Et₃N、NMM中的一种。更优选为HOBt与DIC的组合。

[0028] 作为优选,氨基酸与HOBt、DIC的摩尔比为1:1:1,上述步骤所述偶联反应以茚三酮法检测判断每次偶联反应终点。如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需再次偶联。

[0029] 步骤2) 将四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH或Boc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH连接至上述5-29片段肽树脂上。

[0030] 其中,上述偶联反应的偶联试剂为HOBt、HOAt与DIC的混合物,或PyAOP、PyBOP与碱的混合物,或HBTU、HATU与碱的混合物。其中,有机碱选自DIPEA、Et₃N、NMM中的一种。更优选为HOBt与DIC的组合。

[0031] 上述步骤所述偶联反应以茚三酮法检测判断偶联反应终点。如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需再次偶联。

[0032] 若使用四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH,则需在连接完成后脱除Fmoc保护基。

[0033] 步骤3) 酸解脱除保护基及切肽得到胰高血糖素肽粗品,经纯化、冻干后得到胰高血糖素纯品。

[0034] 具体地,将全保护的胰高血糖素肽树脂加入到配制好的切割液中反应,切割完成后过滤,将反应溶液缓慢倒入预先冷却的乙醚里,搅拌后静置析出胰高血糖素粗肽,离心除

去乙醚溶液,得到的固体再次乙醚洗涤、离心,重复三次,最后真空干燥得到胰高血糖素粗品。

[0035] 作为优选,步骤3)中所用的裂解试剂包括三氟乙酸,茴香硫醚,苯甲醚,三异丙基硅烷,苯酚,1,2-乙二硫醇,水等其中几种的组合。更为优选,裂解试剂的比例为三氟乙酸:苯甲醚:苯酚:1,2-乙二硫醇:水=90:5:3:2。

[0036] 作为优选,步骤3)中所用的切割反应温度为0-40℃,更优选为10-35℃。

[0037] 作为优选,步骤3)中所用的切割反应时间为2-7h,更优选为2-4h。

[0038] 作为优选,步骤3)中所用的纯化方法为制备液相色谱法。

[0039] 下面结合实施例,进一步阐述本发明。

[0040] 说明书和权利要求书中所使用的缩写的含义列于下表中:

英文缩写	中文含义
DIC	二异丙基碳二亚胺
[0041] HOAt	1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑
HOBt	1-羟基苯并三唑
HBTU	O-苯并三氮唑-四甲基脒六氟磷酸酯
HATU	2-(7-氧化苯并三氮唑)- <i>N,N,N',N'</i> -四甲基脒六氟磷酸酯
PyAOP	(3H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶-3-氧基)三-1-吡咯烷基磷六氟磷酸盐
PyBOP	六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷
DIPEA	<i>N,N</i> -二异丙基乙胺
NMM	<i>N</i> -甲基吗啉
Et ₃ N	三乙胺
[0042] DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺
DCM	二氯甲烷
Trt	三苯甲基
tBu	叔丁基
OtBu	叔丁氧基
Pbf	2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基
Boc	叔丁氧羰基

[0043] 实例1:取代度为0.23mmol/g的Fmoc-Thr(tBu)-Wang树脂的制备

[0044] 称取取代度为0.79mmol/g的空白Wang树脂50.00g,Fmoc-Thr(tBu)-OH 9.41g,混合后加入DCM溶解,再加入4当量于氨基酸的吡啶7.65mL,最后缓慢加入2,6-二氯苯甲酰氯6.78mL,搅拌反应3h后,转移至反应柱中,抽去反应液,用DMF洗涤3次,甲醇洗涤1次,DMF洗涤3次再用甲醇洗涤3次,抽干溶剂后真空干燥得到Fmoc-Thr(tBu)-Wang树脂,检测取代度为0.23mmol/g。

[0045] 实例2:取代度为0.41mmol/g的Fmoc-Thr(tBu)-Wang树脂的制备

[0046] 称取取代度为0.79mmol/g的空白Wang树脂50.00g,Fmoc-Thr(tBu)-OH 18.83g,混

合后加入DCM溶解,再加入4当量于氨基酸的吡啶15.3mL,最后缓慢加入2,6-二氯苯甲酰氯13.56mL,搅拌反应3h后,转移至反应柱中,抽去反应液,用DMF洗涤3次,甲醇洗涤1次,DMF洗涤3次再用甲醇洗涤3次,抽干溶剂后真空干燥得到Fmoc-Thr(tBu)-Wang树脂,检测取代度为0.41mmol/g。

[0047] 实例3:取代度为0.50mmol/g的Fmoc-Thr(tBu)-Wang树脂的制备

[0048] 称取取代度为0.79mmol/g的空白Wang树脂50.00g,Fmoc-Thr(tBu)-OH 47.05g,混合后加入DCM溶解,再加入4当量于氨基酸的吡啶38.25mL,最后缓慢加入2,6-二氯苯甲酰氯33.9mL,搅拌反应12h后,转移至反应柱中,抽去反应液,用DMF洗涤3次,甲醇洗涤1次,DMF洗涤3次再用甲醇洗涤3次,抽干溶剂后真空干燥得到Fmoc-Thr(tBu)-Wang树脂,检测取代度为0.50mmol/g。

[0049] 实例4:5-29片段肽树脂H-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Ala-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Met-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Wang树脂的制备。

[0050] 称取取代度为0.41mmol/g的Fmoc-Thr(tBu)-Wang树脂67.1g(27.5mmol),加入到固相反应柱中,用DMF洗涤2次,并用DMF溶胀树脂1.5h。加入三倍树脂体积的20%哌啶的DMF溶液反应30min脱去Fmoc保护。抽去脱保护液,再加入DMF洗涤树脂5次。称取49.2g Fmoc-Asn(Trt)-OH(82.5mmol),11.1g HOBt(82.5mmol),溶于DMF中,冰水浴下加入12.8mL DIC(82.5mmol)活化10min后加入固相反应柱中,室温反应。以茚三酮法检测判断反应终点。反应结束后抽干反应液,加入DMF洗涤树脂3次。重复上述脱除Fmoc保护和加入相应氨基酸偶联的步骤,按照胰高血糖素肽序,从C端到N端依次完成5-29片段的偶联,反应结束后用三倍树脂体积的20%哌啶的DMF溶液反应30min脱去Fmoc保护,再加入DMF洗涤树脂5次,甲醇收缩,树脂真空干燥过夜得5-29片段肽树脂。

[0051] 实例5:1-4四肽片段Boc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH的连接

[0052] 称取实例4中得到的5-29片段肽树脂2.5mmol,加入到固相反应柱中,用DMF洗涤2次,并用DMF溶胀树脂1.5h。称取13.34g Boc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH(12.5mmol),1.68g HOBt(12.5mmol),溶于DMF中,冰水浴下加入1.95mL DIC(12.5mmol)活化10min后加入固相反应柱中,室温反应。以茚三酮法检测判断反应终点。反应结束后抽干反应液,加入DMF洗涤树脂5次,甲醇收缩,树脂真空干燥过夜得1-29片段肽树脂。

[0053] 实例6:1-4四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH的连接

[0054] 称取实例4中得到的5-29片段肽树脂2.5mmol,加入到固相反应柱中,用DMF洗涤2次,并用DMF溶胀树脂1.5h。称取14.87g Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH(12.5mmol),1.68g HOBt(12.5mmol),溶于DMF中,冰水浴下加入1.95mL DIC(12.5mmol)活化10min后加入固相反应柱中,室温反应。以茚三酮法检测判断反应终点。反应结束后抽干反应液,加入DMF洗涤树脂3次。用三倍树脂体积的20%哌啶的DMF溶液反应30min脱去Fmoc保护,再加入DMF洗涤树脂5次,甲醇收缩,树脂真空干燥过夜得1-29片段肽树脂。

[0055] 实例7:1-4四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH的连接

[0056] 称取实例4中得到的5-29片段肽树脂2.5mmol,加入到固相反应柱中,用DMF洗涤2次,并用DMF溶胀树脂1.5h。称取14.87g Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH

(12.5mmol), 1.70g HOAt(12.5mmol), 溶于DMF中, 冰水浴下加入1.95mL DIC(12.5mmol) 活化10min后加入固相反应柱中, 室温反应。以茚三酮法检测判断反应终点。反应结束后抽干反应液, 加入DMF洗涤树脂3次。用三倍树脂体积的20%哌啶的DMF溶液反应30min脱去Fmoc保护, 再加入DMF洗涤树脂5次, 甲醇收缩, 树脂真空干燥过夜得1-29片段肽树脂。

[0057] 实例8:1-4四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH的连接

[0058] 称取实例4中得到的5-29片段肽树脂2.5mmol, 加入到固相反应柱中, 用DMF洗涤2次, 并用DMF溶胀树脂1.5h。称取14.87gFmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH(12.5mmol), 6.52g PyAOP(12.5mmol) 加入树脂中, 加入DMF溶解固体, 搅拌5min后, 滴加4.08mLDIPEA(25.0mmol) 室温反应。以茚三酮法检测判断反应终点。反应结束后抽干反应液, 加入DMF洗涤树脂3次。用三倍树脂体积的20%哌啶的DMF溶液反应30min脱去Fmoc保护, 再加入DMF洗涤树脂5次, 甲醇收缩, 树脂真空干燥过夜得1-29片段肽树脂。

[0059] 实例9:1-4四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH的连接

[0060] 称取实例4中得到的5-29片段肽树脂2.5mmol, 加入到固相反应柱中, 用DMF洗涤2次, 并用DMF溶胀树脂1.5h。称取14.87gFmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH(12.5mmol), 6.50g PyBOP(12.5mmol) 加入树脂中, 加入DMF溶解固体, 搅拌5min后, 滴加4.08mLDIPEA(25.0mmol) 室温反应。以茚三酮法检测判断反应终点。反应结束后抽干反应液, 加入DMF洗涤树脂3次。用三倍树脂体积的20%哌啶的DMF溶液反应30min脱去Fmoc保护, 再加入DMF洗涤树脂5次, 甲醇收缩, 树脂真空干燥过夜得1-29片段肽树脂。

[0061] 实例10:1-4四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH的连接

[0062] 称取实例4中得到的5-29片段肽树脂2.5mmol, 加入到固相反应柱中, 用DMF洗涤2次, 并用DMF溶胀树脂1.5h。称取14.87gFmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH(12.5mmol), 4.74g HBTU(12.5mmol) 加入树脂中, 加入DMF溶解固体, 搅拌5min后, 滴加4.08mLDIPEA(25.0mmol) 室温反应。以茚三酮法检测判断反应终点。反应结束后抽干反应液, 加入DMF洗涤树脂3次。用三倍树脂体积的20%哌啶的DMF溶液反应30min脱去Fmoc保护, 再加入DMF洗涤树脂5次, 甲醇收缩, 树脂真空干燥过夜得1-29片段肽树脂。

[0063] 实例11:1-4四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH的连接

[0064] 称取实例4中得到的5-29片段肽树脂2.5mmol, 加入到固相反应柱中, 用DMF洗涤2次, 并用DMF溶胀树脂1.5h。称取14.87gFmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH(12.5mmol), 4.75g HATU(12.5mmol) 加入树脂中, 加入DMF溶解固体, 搅拌5min后, 滴加4.08mLDIPEA(25.0mmol) 室温反应。以茚三酮法检测判断反应终点。反应结束后抽干反应液, 加入DMF洗涤树脂3次。用三倍树脂体积的20%哌啶的DMF溶液反应30min脱去Fmoc保护, 再加入DMF洗涤树脂5次, 甲醇收缩, 树脂真空干燥过夜得1-29片段肽树脂。

[0065] 实例12:1-4四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH的连接

[0066] 称取实例4中得到的5-29片段肽树脂2.5mmol, 加入到固相反应柱中, 用DMF洗涤2次, 并用DMF溶胀树脂1.5h。称取14.87gFmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH(12.5mmol), 6.52g PyAOP(12.5mmol) 加入树脂中, 加入DMF溶解固体, 搅拌5min后, 滴加2.75mL NMM(25.0mmol) 室温反应。以茚三酮法检测判断反应终点。反应结束后抽干反应液, 加入DMF洗涤树脂3次。用三倍树脂体积的20%哌啶的DMF溶液反应30min脱去Fmoc保护, 再加入DMF洗涤树脂5次, 甲醇收缩, 树脂真空干燥过夜得1-29片段肽树脂。

[0067] 实例13:1-4四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH的连接

[0068] 称取实例4中得到的5-29片段肽树脂2.5mmol,加入到固相反应柱中,用DMF洗涤2次,并用DMF溶胀树脂1.5h。称取14.87gFmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH(12.5mmol),6.50g PyBOP(12.5mmol)加入树脂中,加入DMF溶解固体,搅拌5min后,滴加2.75mL NMM(25.0mmol)室温反应。以茚三酮法检测判断反应终点。反应结束后抽干反应液,加入DMF洗涤树脂3次。用三倍树脂体积的20%哌啶的DMF溶液反应30min脱去Fmoc保护,再加入DMF洗涤树脂5次,甲醇收缩,树脂真空干燥过夜得1-29片段肽树脂。

[0069] 实例14:1-4四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH的连接

[0070] 称取实例4中得到的5-29片段肽树脂2.5mmol,加入到固相反应柱中,用DMF洗涤2次,并用DMF溶胀树脂1.5h。称取14.87gFmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH(12.5mmol),4.74g HBTU(12.5mmol)加入树脂中,加入DMF溶解固体,搅拌5min后,滴加2.75mL NMM(25.0mmol)室温反应。以茚三酮法检测判断反应终点。反应结束后抽干反应液,加入DMF洗涤树脂3次。用三倍树脂体积的20%哌啶的DMF溶液反应30min脱去Fmoc保护,再加入DMF洗涤树脂5次,甲醇收缩,树脂真空干燥过夜得1-29片段肽树脂。

[0071] 实例15:1-4四肽片段Fmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH的连接

[0072] 称取实例4中得到的5-29片段肽树脂2.5mmol,加入到固相反应柱中,用DMF洗涤2次,并用DMF溶胀树脂1.5h。称取14.87gFmoc-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-OH(12.5mmol),4.75g HATU(12.5mmol)加入树脂中,加入DMF溶解固体,搅拌5min后,滴加2.75mL NMM(25.0mmol)室温反应。以茚三酮法检测判断反应终点。反应结束后抽干反应液,加入DMF洗涤树脂3次。用三倍树脂体积的20%哌啶的DMF溶液反应30min脱去Fmoc保护,再加入DMF洗涤树脂5次,甲醇收缩,树脂真空干燥过夜得1-29片段肽树脂。

[0073] 实例16:胰高血糖素粗品肽的制备

[0074] 将实例6制备的5.10gH-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Ala-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Met-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Wang树脂置于裂解反应器中,以15mL/g树脂的比例加入裂解试剂(三氟乙酸/1,2-乙二硫醇/茴香硫醚/苯酚/水=87.5/2.5/5/2.5/2.5)室温搅拌3h。反应液用砂芯漏斗过滤,收集滤液,树脂再用少量TFA洗涤3次,将合并后的滤液加入至预冷的无水乙醚中,离心收集沉淀,用无水乙醚洗涤3次,真空干燥得到固体,即胰高血糖素粗品肽2.90g,HPLC纯度为52.45%。

[0075] 实例17:胰高血糖素粗品肽的制备

[0076] 将实例6制备的5.10gH-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Ala-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Met-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Wang树脂置于裂解反应器中,以15mL/g树脂的比例加入裂解试剂(三氟乙酸/三异丙基硅烷/水=95/2.5/2.5)室温搅拌3h。反应液用砂芯漏斗过滤,收集滤液,树脂再用少量TFA洗涤3次,将合并后的滤液加入至预冷的无水乙醚中,离心收集沉淀,用无水乙醚洗涤3次,真空干燥得到固体,即胰高血糖素粗品肽2.70g,HPLC纯度为39.20%。

[0077] 实例18:胰高血糖素粗品肽的制备

[0078] 将实例6制备的5.10gH-His(Trt)-Ser(tBu)-Gln(Trt)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Ala-Gln(Trt)-Asp(OtBu)-Phe-Val-Gln(Trt)-Trp(Boc)-Leu-Met-Asn(Trt)-Thr(tBu)-Wang树脂置于裂解反应器中,以15mL/g树脂的比例加入裂解试剂(三氟乙酸/苯甲醚/苯酚/1,2-乙二硫醇=90/5/3/2)室温搅拌3h。反应液用砂芯漏斗过滤,收集滤液,树脂再用少量TFA洗涤3次,将合并后的滤液加入至预冷的无水乙醚中,离心收集沉淀,用无水乙醚洗涤3次,真空干燥得到固体,即胰高血糖素粗品肽2.93g,HPLC纯度为48.24%。

[0079] 以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。