

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99806431.9

[51] Int. Cl.

C07K 1/06 (2006.01)

C07K 5/00 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 100383158C

[22] 申请日 1999.3.22 [21] 申请号 99806431.9

[30] 优先权

[32] 1998.3.23 [33] US [31] 09/045,920

[32] 1998.5.1 [33] US [31] 09/071,877

[86] 国际申请 PCT/US1999/006230 1999.3.22

[87] 国际公布 WO1999/048513 英 1999.9.30

[85] 进入国家阶段日期 2000.11.20

[73] 专利权人 特莱默里斯公司

地址 美国北卡罗莱纳州

[72] 发明人 M·-C·康 B·布雷

M·利克蒂 C·马德尔

G·梅鲁特卡

[56] 参考文献

CN1135237A 1996.11.6

WO9619495A1 1996.6.27

WO9428929A1 1994.12.22

审查员 刘玉玲

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜

权利要求书 11 页 说明书 92 页 附图 5 页

[54] 发明名称

关于肽合成的方法以及组合物

[57] 摘要

本发明首先涉及肽尤其是 T-20 (也称为“DP-178”; SEQ ID NO: 1) 和 T-20 样肽的合成方法。该方法利用固相或液相合成法合成和组合具体肽片段组, 获得目的肽。本发明进一步涉及作为所述目的肽(例如 T-20) 合成中的中间体的各个肽片段。本发明更进一步涉及可一起用来产生全长 T-20 和 T-20 样肽的所述肽中间体片段组。

1. 合成下式肽的方法:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ

ID NO: 1, 该方法包括:

- (a) 使式: Fmoc-EKNEQELLEL-COOH SEQ ID NO: 11 的侧链保护肽与式: NH₂-DKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 18 的侧链保护肽反应, 产生下式侧链保护肽:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12;

- (b) 使在(a)中产生的肽的氨基末端去保护;

- (c) 使在(b)中产生的肽与式: Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH SEQ ID NO: 4 的侧链保护肽反应, 产生下式侧链保护肽:

Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 1;

- (d) 使在(c)中产生的肽的氨基末端修饰为乙酰修饰物; 和

- (e) 使(d)的侧链保护肽的侧链去保护, 产生下式肽:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 1。

2. 合成下式肽的方法:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ

ID NO: 1, 该方法包括:

- (a) 使式: Fmoc-EKNEQELLEL-COOH SEQ ID NO: 11 的侧链保护肽与式: NH₂-DKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 18 的侧链保护肽反应, 产生下式侧链保护肽:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12;

- (b) 使在(a)中产生的肽的氨基末端去保护;

(c) 使在(b)中产生的肽与下式侧链保护肽反应:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH SEQ ID NO: 4,

产生下式侧链保护肽:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 1; 和

(d) 使(c)的侧链保护肽的侧链去保护, 产生下式肽:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 1。

3. 合成下式肽的方法:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 1, 该方法包括:

(a) 使下式侧链保护肽的氨基末端去保护:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12;

(b) 使在(a)中产生的肽与下式侧链保护肽反应:

Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH SEQ ID NO: 4, 产生下式侧链保护肽:

Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 1;

(c) 使在(b)中产生的肽的氨基末端去保护;

(d) 使在(c)中产生的肽的氨基末端修饰为乙酰修饰物; 和

(e) 使(d)的侧链保护肽的侧链去保护, 产生下式肽:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 1。

4. 合成具有以下化学式的肽的方法:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 1, 该方法包括:

(a) 使下式侧链保护肽的氨基末端去保护:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12;

(b) 使在(a)中产生的肽与下式侧链保护肽反应:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH SEQ ID NO: 4, 产生下式侧链保护肽:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 1; 和

(c) 使(b)的侧链保护肽的侧链去保护, 产生下式肽:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 1。

5. 权利要求 1、2、3 或 4 的方法, 其中下式:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12 的侧链保护肽以约 1 千克或 1 千克以上的产量生产。

6. 权利要求 3 或 4 的方法, 其中式: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12 的侧链保护肽用以下方法合成, 该方法包括:

(a) 使下式侧链保护肽与 HPhNH₂ 反应:

Fmoc-DKWASLWNW-COOH SEQ ID NO: 17, 产生下式侧链保护肽:

Fmoc-DKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 18;

(b) 使在(a)中产生的肽的氨基末端去保护; 和

(c) 使在(b)中产生的肽与下侧链保护肽反应式:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 11, 获得下式侧链保护肽:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12。

7. 权利要求 6 的方法, 其中下式:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12 的侧链

保护肽以1千克或1千克以上的产量生产。

8. 权利要求3或4的方法, 其中式: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12的侧链保护肽用以下方法合成, 该方法包括:

(a) 使下式侧链保护肽与HPheNH₂反应:

Fmoc-LELDKWASLWNW-COOH SEQ ID NO: 15, 产生下式侧链保护肽:

Fmoc-LELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 16;

(b) 使在(a)中产生的肽的氨基末端去保护; 和

(c) 使在(b)中产生的肽与下式侧链保护肽反应:

Fmoc-EKNEQEL-COOH SEQ ID NO: 10, 获得下式侧链保护肽:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12。

9. 权利要求8的方法, 其中下式:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12的侧链保护肽以1千克或1千克以上的产量生产。

10. 权利要求3或4的方法, 其中式: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12的侧链保护肽用以下方法合成, 该方法包括:

(a) 使下式肽的氨基末端去保护:

Fmoc-DKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 18; 和

(b) 使在(a)中产生的肽与下式侧链保护肽反应:

Fmoc-EKNEQELLEL-COOH SEQ ID NO: 11, 获得下式侧链保护肽:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12。

11. 权利要求10的方法, 其中下式:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12 的侧链保护肽以 1 千克或 1 千克以上的产量生产。

12. 权利要求 3 或 4 的方法, 其中式: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12 的侧链保护肽用以下方法合成, 该方法包括:

(a) 使下式侧链保护肽与 HPhNH₂ 反应:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNW-COOH SEQ ID NO: 19, 产生下式侧链保护肽:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12。

13. 权利要求 12 的方法, 其中下式:

Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 12 的侧链保护肽以 1 千克或 1 千克以上的产量生产。

14. 权利要求 1 或 3 的方法, 其中式: Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH SEQ ID NO: 4 的侧链保护肽用以下方法合成, 该方法包括:

(a) 使下式侧链保护肽的氨基末端去保护:

Fmoc-IEESQNQQ-COOH SEQ ID NO: 7;

(b) 使在(a)中产生的侧链保护肽与下式侧链保护肽反应:

Fmoc-YTSLIHSL-COOH SEQ ID NO: 2, 获得下式侧链保护肽:

Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH SEQ ID NO: 4。

15. 权利要求 14 的方法, 其中下式:

Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQ-NH₂ SEQ ID NO: 4 的侧链保护肽以 1 千克或 1 千克以上的产量生产。

16. 权利要求 2 或 4 的方法, 其中式: Ac-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH SEQ ID NO: 4 的侧链保护肽用以下方法合成, 该方法包括:

(a) 使下式侧链保护肽与 HGI_nOPNB 反应:

Fmoc-IEESQ_nNQ-COOH SEQ ID NO: 6, 产生下式侧链保护肽:

Fmoc-IEESQ_nQ-OPNB SEQ ID NO: 7;

(b) 使在(a)中产生的侧链保护肽的氨基末端去保护;

(c) 使在(b)中产生的侧链保护肽与下式侧链保护肽反应:

Ac-YTSLIHSL-COOH SEQ ID NO: 2, 产生下式侧链保护肽:

Ac- YTSLIHSLIEESQ_nQ-OPNB SEQ ID NO: 4;

(d) 使在(c)中产生的侧链保护肽的羧基末端去保护, 产生下式侧链保护肽:

Ac-YTSLIHSLIEESQ_nQ-COOH SEQ ID NO: 4。

17. 权利要求 16 的方法, 其中下式:

Ac-YTSLIHSLIEESQ_nQ-COOH SEQ ID NO: 4 的侧链保护肽以 1 千克或 1 千克以上的产量生产。

18. 权利要求 1 或 3 的方法, 其中式: Fmoc-YTSLIHSLIEESQ_nQ-COOH SEQ ID NO: 4 的侧链保护肽用以下方法合成, 该方法包括:

(a) 使下式侧链保护肽与 HGI_nOPNB 反应:

Fmoc-YTSLIHSLIEESQ_nQ-COOH SEQ ID NO: 3, 产生下式侧链保护肽:

Fmoc-YTSLIHSLIEESQ_nQ-OPNB SEQ ID NO: 4; 和

(b) 使在(a)中产生的肽的羧基末端去保护, 产生下式侧链保护肽:

Fmoc-YTSLIHSLIEESQ_nQ-COOH SEQ ID NO: 4。

19. 权利要求 18 的方法, 其中下式:

Ac-YTSLIHSLIEESQ_nQ-COOH SEQ ID NO: 4 的侧链保护肽以 1 千克或 1 千克以上的产量生产。

20. 合成下式肽的方法:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ

ID NO: 1, 该方法包括:

(a) 使下式侧链保护肽的氨基末端去保护:

Fmoc-QEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO:
9;

(b) 使在(a)中产生的肽与下式侧链保护肽反应:

Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQ-COOH SEQ ID NO: 3, 产生下
式侧链保护肽:

Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-
NH₂ SEQ ID NO: 1;

(c) 使在(b)中产生的肽的氨基末端修饰为乙酰修饰物; 和

(d) 使(c)的侧链保护肽的侧链去保护, 产生下式肽:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-
NH₂ SEQ ID NO: 1。

21. 权利要求 20 的方法, 其中式: Fmoc-

QEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 9 的侧链保护肽

用以下方法合成, 该方法包括:

(a) 使下式侧链保护肽与 HPheNH₂ 反应:

Fmoc-QEKNEQELLELDKWASLWNW-NH₂ SEQ ID NO:
8, 产生下式侧链保护肽:

Fmoc-QEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO:
9。

22. 权利要求 21 的方法, 其中下式:

Fmoc-QEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 9 的侧链
保护肽以 1 千克或 1 千克以上的产量生产。

23. 合成下式肽的方法:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ

ID NO: 1, 该方法包括:

(a) 使下式侧链保护肽的氨基末端去保护:

Fmoc-NEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 14;

(b) 使在(a)中产生的肽与下式侧链保护肽反应:

Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQEK-COOH SEQ ID NO: 5, 产生下式侧链保护肽:

Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 1;

(c) 使在(b)中产生的肽的氨基末端修饰为乙酰修饰物; 和

(d) 使(c)的侧链保护肽的侧链去保护, 产生下式肽:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 1.

24. 权利要求 23 的方法, 其中下式:

Fmoc-NEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 14 的侧链保护肽用以下方法合成, 该方法包括:

(a) 使下式侧链保护肽与 HPheNH₂ 反应:

Fmoc-NEQELLELDKWASLWNW-NH₂ SEQ ID NO: 13, 产生下式侧链保护肽:

Fmoc-NEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 14.

25. 权利要求 24 的方法, 其中下式:

Fmoc-NEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 14 的侧链保护肽以 1 千克或 1 千克以上的产量生产。

26. 权利要求 1、2、3、4、20 或 23 的方法, 其中下式:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH₂ SEQ ID NO: 1 的侧链保护肽以 1 千克或 1 千克以上的产量生产。

27. 一组肽片段, 它包括一组选自以下的肽片段:

- (a) YTSLIHSLIEESQNOO (SEQ ID NO:4),
EKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:12);
- (b) YTSLIHSLIEESQNOO, (SEQ ID NO:4),
EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11),
DKWASLWNWF (SEQ ID NO:18);
- (c) YTSLIHSLIEESQNOO (SEQ ID NO:4),
EKNEQELLEL, (SEQ ID NO:11),

- DKWASLWNW (SEQ ID NO:17);
- (d) YTSLIHSL (SEQ ID NO:2),
IEESQNO (SEQ ID NO:6),
EKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:12);
- (e) YTSLIHSL (SEQ ID NO:2),
IEESQNO (SEQ ID NO:6),
EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11),
DKWASLWNWF (SEQ ID NO:18);
- (f) YTSLIHSL (SEQ ID NO:2),
IEESQNO (SEQ ID NO:6),
EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11),
DKWASLWNW (SEQ ID NO:17);
- (g) YTSLIHSL (SEQ ID NO:2),
IEESQNO (SEQ ID NO:7),
EKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:12);
- (h) YTSLIHSL (SEQ ID NO:2),
IEESQNO (SEQ ID NO:7),
EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11),
DKWASLWNWF (SEQ ID NO:18);
- (i) YTSLIHSL (SEQ ID NO:2),
IEESQNO (SEQ ID NO:7),
EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11),
DKWASLWNW (SEQ ID NO:17);
- (j) YTSLIHSLIEESQNO (SEQ ID NO:4),
EKNEQEL (SEQ ID NO:10),
LELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:16);
- (k) YTSLIHSLIEESQNO (SEQ ID NO:4),
EKNEQEL (SEQ ID NO:10),
LELDKWASLWNW (SEQ ID NO:15);
- (l) YTSLIHSL (SEQ ID NO:2),
IEESQNO (SEQ ID NO:6),
EKNEQEL (SEQ ID NO:10),
LELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:16);
- (m) YTSLIHSL (SEQ ID NO:2),
IEESQNO (SEQ ID NO:6),
EKNEQEL (SEQ ID NO:10),
LELDKWASLWNW (SEQ ID NO:15);
- (n) YTSLIHSL (SEQ ID NO:2),
IEESQNO (SEQ ID NO:7),
EKNEQEL (SEQ ID NO:10),
LELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:16);
- (o) YTSLIHSL (SEQ ID NO:2),

- IEESQNNQ (SEQ ID NO:7),
 EKNEQEL (SEQ ID NO:10),
 LEELDKWASLWNW (SEQ ID NO:15);
- (p) YTSLIHSLIEESQNNQ (SEQ ID NO:3),
 QEKNEQELLEELDKWASLWNW (SEQ ID NO:8);
- (q) YTSLIHSLIEESQNNQ (SEQ ID NO:3),
 QEKNEQELLEELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:9);
- (r) YTSLIHSLIEESQNNQEK (SEQ ID NO:5),
 NEQELLEELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:14);
- (s) YTSLIHSLIEESQNNQEK (SEQ ID NO:5),
 NEQELLEELDKWASLWNW (SEQ ID NO:13); 和
- (t) YTSLIHSLIEESQNNQ (SEQ ID NO:4),
 EKNEQELLEELDKWASLWNW (SEQ ID NO:19)。

28. 一种选自下列肽的肽:

YTSLIHSL (SEQ ID NO:2);
 IEESQNNQ (SEQ ID NO:6);
 IEESQNNQ (SEQ ID NO:7);
 QEKNEQELLEELDKWASLWNW (SEQ ID NO:8);
 EKNEQEL (SEQ ID NO:10);
 EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11);
 NEQELLEELDKWASLWNW (SEQ ID NO:13);
 LEELDKWASLWNW (SEQ ID NO:15);
 LEELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:16);
 DKWASLWNW (SEQ ID NO:17);
 DKWASLWNWF (SEQ ID NO:18);
 和
 EKNEQELLEELDKWASLWNW (SEQ ID NO:19)。

关于肽合成的方法以及组合物

1. 前言

本发明首先涉及肽、尤其是 T-20(也称为“DP-178”; SEQ ID NO: 1)和 T-20 样肽的合成方法。该类方法利用固相和液相合成法合成和组合具体肽片段组, 获得目的肽。本发明进一步涉及作为所述目的肽(例如 T-20)合成中的中间体的各个肽片段。本发明更进一步涉及可一起用来产生全长 T-20 和 T-20 样肽的所述肽中间体片段组。本发明更进一步涉及纯化肽(尤其是 T-20 和 T-20 样肽)和纯化用作主题肽合成中的中间体的各个肽片段的方法。

2. 背景

最近鉴定了大量的肽, 它们具有抑制融合相关事件的能力、而更重要的是还具有有效的抗病毒活性。参见例如美国专利第 5,464,933; 5,656,480 号和 PCT 公布号 WO 96/19495T-20。因为这些肽将得到广泛应用, 作为治疗学, 例如需要能够大量合成该类肽。

尽管已有肽合成技术(参见例如 Mergler 等, 1988, Tetrahedron Letters 29: 4005-4008; Mergler 等, 1988, Tetrahedron Letters 29: 4009-4012; Kamber 等(编辑), “Peptides, Chemistry and Biology, ESCOM, Leiden, 1992, 525-526;和 Riniker 等, 1993, Tetrahedron Letters 49: 9307-9320), 但是目前没有可用于大规模、经济生产易于纯化的肽如 T-20 和 T-20 样肽的技术。

3. 发明概述

本发明首先涉及肽、尤其是 T-20(也称为“DP-178”; SEQ ID NO: 1)和 T-20 样肽的合成方法。该类方法利用固相和液相合成法合成和

组合具体肽片段组，获得目的肽。一般来说，本发明方法包括在固相支持体上合成 T-20 或 T-20 样肽的具体侧链保护肽片段中间体，在溶液中偶合所述保护片段，形成保护的 T-20 或 T-20 样肽，然后将侧链去保护，获得最终的 T-20 或 T-20 样肽。本发明方法的优选实施方案包括合成具有 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列的 T-20 肽。

本发明进一步涉及用作所述目的肽(例如 T-20)合成中的中间体的各个肽片段。本发明的肽片段包括但不限于具有下表 1 所示的氨基酸序列的肽片段：

表 1

肽序号	氨基酸序列	T-20 相应的 编码氨基酸序列
1	YTSLIHSL (SEQ ID NO:2)	1-8
2	YTSLIHSLIEESQNQ (SEQ ID NO:3)	1-15
3	YTSLIHSLIEESQNQQ (SEQ ID NO:4)	1-16
4	YTSLIHSLIEESQNQQEK (SEQ ID NO:5)	1-18

肽序号	氨基酸序列	T-20 相应的 编码氨基酸序列
5	IEESQNQ (SEQ ID NO:6)	9-15
6	IEESQNQQ (SEQ ID NO:7)	9-16
7	QEKNEQELLELDKWASLWNW (SEQ ID NO:8)	16-35
8	QEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:9)	16-36
9	EKNEQEL (SEQ ID NO:10)	17-23
10	EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11)	17-26
11	EKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:12)	17-36
12	NEQELLELDKWASLWNW (SEQ ID NO:13)	19-35
13	NEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:14)	19-36
14	LELDKWASLWNW (SEQ ID NO:15)	24-35
15	LELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:16)	24-36
16	DKWASLWNW (SEQ ID NO:17)	27-35
17	DKWASLWNWF (SEQ ID NO:18)	27-36
18	EKNEQELLELDKWASLWNW (SEQ ID NO:19)	17-35

本发明更进一步涉及用作目的肽合成中的中间体的具体肽片段组。本发明的各组肽片段包括但不限于下表 2 所示的 1-20 组。

表 2

<u>组别</u>	<u>氨基酸序列</u>	<u>T-20 相应的 编码氨基酸序列</u>
1	YTSLIHSLIEESQNQQ (SEQ ID NO:4) EKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:12)	1-16 17-36
2	YTSLIHSLIEESQNQQ (SEQ ID NO:4) EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11) DKWASLWNWF (SEQ ID NO:18)	1-16 17-26 27-36
3	YTSLIHSLIEESQNQQ (SEQ ID NO:4) EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11) DKWASLWNW (SEQ ID NO:17)	1-16 17-26 27-35
4	YTSLIHSL (SEQ ID NO:2) IEESQNQ (SEQ ID NO:6) EKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:12)	1-8 9-15 17-36
5	YTSLIHSL (SEQ ID NO:2) IEESQNQ (SEQ ID NO:6) EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11) DKWASLWNWF (SEQ ID NO:18)	1-8 9-15 17-26 27-36
6	YTSLIHSL (SEQ ID NO:2) IEESQNQ (SEQ ID NO:6) EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11) DKWASLWNW (SEQ ID NO:17)	1-8 9-15 17-26 27-35
7	YTSLIHSL (SEQ ID NO:2) IEESQNQQ (SEQ ID NO:7) EKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:12)	1-8 9-16 17-36
8	YTSLIHSL (SEQ ID NO:2) IEESQNQQ (SEQ ID NO:7) EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11) DKWASLWNWF (SEQ ID NO:18)	1-8 9-16 17-26 27-36
9	YTSLIHSL (SEQ ID NO:2) IEESQNQQ (SEQ ID NO:7) EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11) DKWASLWNW (SEQ ID NO:17)	1-8 9-16 17-26 27-35

<u>组别</u>	<u>氨基酸序列</u>	<u>T-20 相应的</u>	<u>编码氨基酸序列</u>
10	YTSLIHSLIEESQNQQ (SEQ ID NO:4) EKNEQEL (SEQ ID NO:10) LELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:16)		1-16 17-23 24-36
11	YTSLIHSLIEESQNQQ (SEQ ID NO:4) EKNEQEL (SEQ ID NO:10) LELDKWASLWNW (SEQ ID NO:15)		1-16 17-23 24-35
12	YTSLIHSL (SEQ ID NO:2) IEESQNQ (SEQ ID NO:6) EKNEQEL (SEQ ID NO:10) LELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:16)		1-8 9-15 17-23 24-36
13	YTSLIHSL (SEQ ID NO:2) IEESQNQ (SEQ ID NO:6) EKNEQEL (SEQ ID NO:10) LELDKWASLWNW (SEQ ID NO:15)		1-8 9-15 17-23 24-35
14	YTSLIHSL (SEQ ID NO:2) IEESQNQQ (SEQ ID NO:7) EKNEQEL (SEQ ID NO:10) LELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:16)		1-8 9-16 17-23 24-36
15	YTSLIHSL (SEQ ID NO:2) IEESQNQQ (SEQ ID NO:7) EKNEQEL (SEQ ID NO:10) LELDKWASLWNW (SEQ ID NO:15)		1-8 9-16 17-23 24-35
16	YTSLIHSLIEESQNQ (SEQ ID NO:3) QEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:9)		1-15 16-36
17	YTSLIHSLIEESQNQ (SEQ ID NO:3) QEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:9)		1-15 16-36
18	YTSLIHSLIEESQNQQEK (SEQ ID NO:5) NEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:14)		1-18 19-36
19	YTSLIHSLIEESQNQQEK (SEQ ID NO:5) NEQELLELDKWASLWNW (SEQ ID NO:13)		1-18 19-35
20	YTSLIHSLIEESQNQQ (SEQ ID NO:4) EKNEQELLELDKWASLWNW (SEQ ID NO:19)		1-16 17-35

本发明的部分基础是，本发明人意外发现某些固相液相合成反应的组合可高物料通过量和高产率地首次大规模生产高纯度 T-20 和 T-20 样肽。尤其是根据本发明的方法可以在 1 千克或 1 千克以上的规模合成 T-20 和 T-20 样肽。已经发现通过选择本发明的具体 T-20 肽片段用于固相合成时，可利用高效率的固相偶合技术而不必使用在固相合成中通常需要的 3 倍、4 倍或甚至 5 倍的过量氨基酸和试剂。本发明方法在固相合成本发明的肽片段时仅使用约 1.5 倍量氨基酸。这种氨基酸和试剂用量的成本节约型降低使得本发明方法适用于大规模合成 T-20 和 T-20 样肽。

此外，本发明人令人惊奇地发现，可以每克固相树脂约 0.8-1 mmol 载荷量固相合成某些肽片段。该载荷量明显高于在固相肽合成中通常达到的每克树脂 0.25-0.4 mmol 的载荷范围。而且，本发明人发现在固相中采用超酸敏感型树脂合成所选定的肽片段可产生非常高纯度的肽片段。不必用色谱技术来纯化按照本发明生产的肽片段；只需要使用前使所述肽片段进行沉淀和/或研制步骤，或作为从所述树脂直接获得的肽片段使用。应用超酸敏感型树脂使本发明合成的保护肽可从该树脂裂解，而不需要同时去除侧链保护基团。这可减少杂质，并可使含有 10 个或 10 个以上氨基酸的肽以高纯度合成。通过偶合按照本发明生产的高纯度肽片段，从而在液相中根据本发明方法合成的 T-20 和 T-20 样肽的杂质类型主要包括未偶合的片段，而不是密切相关的类似物。因此，按照本发明生产的 T-20 和 T-20 样肽较按照常规技术生产的肽纯化容易得多。在下文第 9 和 11 部分中提供的实施例说明 T-20 全长肽的这类组合合成。第 11 部分中给出的实施例说明大规模合成和纯化 T-20 和 T-20 中间体肽。所以，本发明的方法可以以 1 千克或 1 千克以上的规模生产 T-20 和 T-20 肽中间体。

本发明人还意外发现，用在碱性 pH 范围可使用的高载荷量物质，可纯化本文所述的肽(如 T-20 和其它 T-20 样肽)以及某些肽片段。因此，本发明更进一步涉及纯化肽、尤其是 T-20 和 T-20 样肽和纯化

用作主题肽合成中的中间体的各个肽片段的方法。

3.1 定义

本文所用的氨基酸符号为常规符号，具体如下：

常见氨基酸缩写

氨基酸	单字母符号	常见缩写
甘氨酸	A	Ala
天冬酰胺	N	Asn
天冬氨酸	D	Asp
谷氨酰胺	Q	Gln
谷氨酸	E	Glu
组氨酸	H	His
异亮氨酸	I	Ile
亮氨酸	L	Leu
赖氨酸	K	Lys
苯丙氨酸	F	Phe
丝氨酸	S	Ser
苏氨酸	T	Thr
色氨酸	W	Trp
酪氨酸	Y	Tyr

4. 附图简述

图 1: T-20 四片段方法。该图图示下文 9.1 部分提供的实施例采用的流程，该流程以上表 2 所示第 6 组中间体肽片段为原料合成全长 T-20。

图 2: T-20 四片段方法，途径 2。该图图示另一四片段流程，它偶合上表 2 所示的第 6 组肽中间体以合成全长 T-20。

图 3: T-20 三片段方法。该图图示下文 9.1 部分提供的实施例采

用的流程, 该流程合成全长 T-20。

图 4: T-20 三片段方法, 途径 2。该图图示下文 9.2、9.3、9.4 和 9.5 部分提供的实施例采用的流程, 该流程合成全长 T-20。

图 5: T-20 两片段方法。该图图示偶合上表 2 所示的第 18 组肽中间体以合成全长 T-20 的流程。

5. 发明详述

5.1 全长肽

本发明涉及可用来合成称为 T-20 或 DP-178 的肽的方法、肽片段、肽片段组。T-20 是相当于得自 HIV-1_{LAI} 分离株的跨膜蛋白 gp41 的氨基酸残基 638-673 并具有 36 个氨基酸的序列的肽(从氨基 NH₂ 末端到羧基 COOH 末端认读):

NH₂-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-COOH

应该理解的是, 本发明的方法、片段和片段组以及用于选择所述片段和片段组的技术除了可用来合成 T-20 外还可用来合成 T-20 样肽。本文所用术语“T-20 样”是指美国专利第 5,464,933; 5,656,480 或 PCT 公布号 WO 96/19495 中所列举的任何 HIV 或非 HIV 肽, 其中每一文献通过引用整体结合到本文中。

除了本文所述 T-20 和 T-20 样肽外, 本发明的方法、片段和肽片段组还可用来合成具有修饰氨基和/或羧基末端的肽。以 T-20 为例, 这类肽具有下式结构:

X-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-Z

其中 X 代表氨基;选自苄氧羰基、丹酰基和叔丁氧基羰基的疏水基团; 乙酰基; 9-苄基甲氧基-羧基(FMOC)基团; 或选自脂质-脂肪酸缀合物、聚乙二醇和碳水化合物的大分子载体基团; 而 Z 代表羧基; 酰胺基; 叔丁氧基羰基; 对-硝基苄酯基或选自脂质-脂肪酸缀合物、聚乙二醇和碳水化合物的大分子载体基团。加入该“X”和“Z”基团的技术是本领域技术人员周知的。

在优选的实施方案中, 本发明方法用来合成具有其中 X 为乙酰基而 Z 为酰胺基的上式的肽。下文部分 9 中提供的实施例证明通过偶合下文部分 5.2 中所述的肽中间体成功合成 T-20 肽。在优选的方法中, 可用任何非硅基柱填料(用于使载荷能力最大)纯化 T-20 和 T-20 样肽和中间体, 所述柱填料包括但不限于锆基填料、聚苯乙烯基填料、聚丙烯基填料或其它聚合物基填料, 它们在高 pH (大于 7) 范围下是稳定的。例如 Tosohaus (Montgomeryville, PA) 销售的具有宽 pH 值范围的非硅基柱填料中包括 pH 值大于 7 的柱填料。可以在低、中或高压色谱中使用由该材料填充的柱。参见例如下文部分 10 中给出的纯化方法。

5.2 肽中间体

本发明包括但不限于具有上表 1 中所列具体氨基酸序列的 T-20 和 T-20 样肽的肽片段中间体和表 2 所列的肽片段中间体组。可用所述肽中间体、尤其是下表 2 所列的肽片段组生产 T-20 和 T-20 样肽。

任何一种或多种表 1 或 2 所列的肽片段的氨基酸残基侧链可以用标准保护基团如叔丁基(t-Bu)、三苯甲基(trt)和叔丁氧基羰基(Boc)保护。t-Bu 基团是氨基酸残基 Tyr (Y)、Thr (T)、Ser (S)和 Asp (D)的优选侧链保护基团; trt 基团是氨基酸残基 His (H)、Gln (Q)和 Asn (N)的优选侧链保护基团; 而 Boc 基团是氨基酸残基 Lys (K)和 Trp (W)的优选侧链保护基团。

在合成表 1 所列的片段 1、2、3 和 4 期间, 必须优选三苯甲基(trt)保护基保护组氨酸残基侧链。如果不对其进行保护, 则使用从树脂裂解肽片段的酸与组氨酸残基产生不利反应, 导致所述肽片段的降解。

优选三苯甲基(trt)基团保护本发明肽片段的谷氨酰胺残基。然而, 优选不保护片段 1-16 和 9-16 羧基末端的谷氨酰胺残基。已经发现 1-16 片段的羧基末端的谷氨酰胺残基上保护基团缺失有利 1-16 片

段与 17-36 片段反应, 从而使偶合的片段仅约 2%外消旋化。另外, 如果需要任何本发明肽片段在有机溶剂中溶解性降低, 则可以从所述片段的其它任何一个或多个谷氨酰胺残基中去除三苯甲基保护基。

优选保护本发明每个肽片段的所有天冬酰胺残基。此外, 优选用 Boc 基团保护色氨酸残基。

根据上表 1 所列的肽化学式 1-18 的保护性肽片段包括但不限于下表 3 所列的化合物。

表 3

肽化学式序号	化学式	T-20 相应的 编码氨基酸序列
1a	Ac-YTSLIHSL-COOH (SEQ ID NO:2)	1-8
1b	FMOC-YTSLIHSL-COOH (SEQ ID NO:2)	1-8
3a	Ac-YTSLIHSLIEESQNQQ-OPNB (SEQ ID NO:4)	1-16
3b	FMOC-YTSLIHSLIEESQNQQ-OPNB (SEQ ID NO:4)	1-16
3c	Ac-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO:4)	1-16
3d	FMOC-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO:4)	1-16
5a	Ac-IEESQNQ-COOH (SEQ ID NO:6)	9-15
5b	FMOC-IEESQNQ-COOH (SEQ ID NO:6)	9-15
6a	NH ₂ -IEESQNQQ-OPNB (SEQ ID NO:7)	9-16
6b	FMOC-IEESQNQQ-OPNB (SEQ ID NO:7)	9-16
9a	Ac-EKNEQEL-COOH (SEQ ID NO:10)	17-23
9b	FMOC-EKNEQEL-COOH (SEQ ID NO:10)	17-23
10a	Ac-EKNEQELLEL-COOH (SEQ ID NO:11)	17-26
10b	FMOC-EKNEQELLEL-COOH (SEQ ID NO:11)	17-26

肽化学式序号	化学式	T-20 相应的 编码氨基酸序列
11a	NH ₂ -EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH ₂ (SEQ ID NO:12)	17-36
11b	FMOC-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH ₂ (SEQ ID NO:12)	17-36
14a	Ac-LELDKWASLWNW-COOH (SEQ ID NO:15)	24-35
14b	FMOC-LELDKWASLWNW-COOH (SEQ ID NO:15)	24-35
15a	NH ₂ -LELDKWASLWNWF-NH ₂ (SEQ ID NO:16)	24-36
15b	FMOC-LELDKWASLWNWF-NH ₂ (SEQ ID NO:16)	24-36
16a	Ac-DKWASLWNW-COOH (SEQ ID NO:17)	27-35
16b	FMOC-DKWASLWNW-COOH (SEQ ID NO:17)	27-35
17a	NH ₂ -DKWASLWNWF-NH ₂ (SEQ ID NO:18)	27-36
17b	FMOC-DRWASLWNWF-NH ₂ (SEQ ID NO:18)	27-36
18A	FMOC-EKNEQELLELDKWASLWNW-COOH (SEQ ID NO:19)	17-35

上表3所列肽的任何一个或多个氨基酸残基侧链可用标准侧链保护基如上述 tBu、trt 和 Boc 保护。采用下文 5.4 部分中所讨论的一般技术代表性合成表3的肽见下文第7和第8部分。

5.3 肽合成

如上所述, 本发明某些单个肽片段优选用固相合成技术制备, 而本发明其它肽优选用组合的固相和液相合成技术制备, 所述合成使本文所述的 T-20 或 T-20 样肽的生产达成最大。然而, 应该知道本发明的肽片段可用本领域熟知的技术合成或制备。参见例如 Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman and

Co., NY, 该文献通过引用整体结合到本文中。

本发明肽可交替合成, 使得一个或多个连接所述肽氨基酸残基的键为非肽键。可用本领域熟知的反应形成这些替代非肽键, 包括但不限于所列举但是仅为少数几个的亚氨基、酯、酰肼、氨基脒和偶氮键。

在本发明又一实施方案中, 包括上述序列的 T-20 和 T-20 样肽可用存在于其氨基末端和/或羧基末端的另外的化学基团合成, 使例如所述肽的稳定性、活性和/或溶解性提高。例如, 可将疏水基团如苄氧羰基、丹酰基、乙酰基和叔丁氧基羰基加入所述肽的氨基末端。同样, 可将乙酰基或 9-苄基甲氧基-羰基置于所述肽的氨基末端。(参见上述 T-20 的“X”修饰)。另外, 疏水基团叔丁氧基羰基或酰胺基可加入所述肽的羧基末端。同样, 对硝基苄酯基可位于所述肽的羧基末端。(参见上述 T-20 的“Z”修饰)。引入这类修饰的技术是本领域技术人员熟知的。

进一步, 可合成 T-20 和 T-20 样肽, 以改变其立体构型。可应用所述肽的一种或多种氨基酸残基的 D-异构体而不是常见 L-异构体。

更进一步, 本发明肽的至少一个氨基酸残基可用一个公知的非天然氨基酸残基取代。如上述的改变可用来提高本发明肽的稳定性、活性和/或溶解性。

可合成另外含有共价连接到其氨基和/或羧基末端的大分子载体基团的任何一种 T-20 或 T-20 样肽。这类大分子载体基团可包括例如脂质-脂肪酸缀合物、聚乙二醇、碳水化合物或另外的肽。所以, 上文所述的 T-20 “X”修饰可另外代表共价连接到肽的氨基末端的任何上述大分子载体基团, 优选另外的肽基团。同样, 上述 T-20 “Z”修饰可另外代表任何上述大分子载体基团。

本发明的肽片段优选标准 Fmoc 方案经固相肽合成(SPPS)技术合成。参见例如 Carpino 等, 1970, J. Am. Chem. Soc. 92 (19):

5748-5749; Carpino 等, 1972, *J. Org. Chem.* 37 (22): 3404-3409。在优选的实施方案中, 固相合成本发明的肽片段在超酸敏感型固相支持体上进行, 超酸敏感型固相支持体包括但不限于 2-氯代三苯甲基氯树脂(参见例如, Barlos 等, 1989, *Tetrahedron Letters* 30 (30): 3943-3946) 和 4-羟基甲基-3-甲氧基苯氧基丁酸树脂(参见例如, Seiber, 1987, *Tetrahedron Letters* 28 (49): 6147-6150, 和 Richter 等, 1994, *Tetrahedron Letters* 35 (27): 4705-4706)。2-氯代三苯甲基氯和 4-羟基甲基-3-甲氧基苯氧基丁酸树脂均购自 Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA。

在此描述可用于固相肽合成的一般生产方法和树脂装载。例如通过下列技术可进行树脂装载: 树脂优选超酸敏感型树脂如 2-氯代三苯甲基树脂, 将其装载到反应室。用氯化了的溶剂如二氯甲烷(DCM)洗涤树脂。排干树脂床, 加入 1.5 当量氨基酸和 2.7 当量二异丙基乙胺(DIEA)的约 8-10 体积的二氯乙烷(DCE)溶液。应该优选 Fmoc 保护氨基酸的 N-末端, 必要或合适的情况下应该保护所述氨基酸的侧链。所述混合物用氮气鼓泡搅拌 2 小时。

值得注意的是, 需要氯化了的溶剂来使所述 2-氯代三苯甲基树脂充分膨胀。尽管根据文献资源 DCE 提供更高的载荷效率, 但是可以用 DCM 代替, 而载荷量几乎没有或没有降低。

搅拌后, 排干所述树脂床, 用 DCM 洗涤。用 9: 1 MeOH: DIEA 溶液封端树脂上的活性部位约 20-30 分钟。排干树脂床, 用 DCM 洗涤 4 次, 用氮气吹扫干燥, 获得载荷树脂。

Fmoc 是氨基酸的 N-末端的优选保护基团。根据装载的氨基酸, 可以保护或不保护其侧链。例如当载荷 Trp 时, 应该用 Boc 保护其侧链。同样, 用 trt 可以保护 Gln 侧链。然而当在合成 1-16 肽片段的制备中载荷 Gln 时, 则不应该保护其侧链。不必保护 Leu 的侧链。

根据需要可从 Sean 或 Genzyme 获得具有或没有侧链保护基团的用于装载所述树脂和肽合成的 Fmoc 保护氨基酸。作为上述方法的一

个替代方法，可购买已经装载了合适氨基酸的树脂。

在下文部分 6 中的实施例描述了典型的树脂制备。

例如按照以下技术可实施固相肽合成技术：将荷载树脂加入所述反应室，用溶剂优选二氯甲烷(DCM; 优选约 10 体积)调节，同时氮气搅拌约 15 分钟，使所述树脂珠膨胀。需要 DCM 来充分膨胀 2-氯代三苯甲基树脂。在反应室中的所述树脂体积因为树脂珠膨胀而增加一倍或两倍，所述活性部分未被折叠而易于进行反应。所述树脂膨胀后，从反应室排干溶剂。

用 2 等份 20%哌啶的 N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)溶液每次处理所述树脂约 10 分钟，从而达到从所述末端胺或树脂去除 Fmoc (9-芴基-甲氧基羰基)保护基。所需要的每等份的 20%哌啶的 NMP 溶液的体积取决于正在进行的反应量。然后用等份 NMP(约 10 体积)洗涤树脂 5-7 次，以去除 Fmoc 副产物(即二苯并富烯和其哌啶加合物)和残留的哌啶。

氯醌试验可用来测定去除 Fmoc 副产物和残留的哌啶是否完全。通过向约 1 mL 丙酮中加入一滴氯醌的甲苯饱和溶液，从而制备氯醌试验溶液。通过加入一滴 DMP 洗涤液至氯醌试验溶液中，测试所述洗涤液。出现蓝色或紫色表示存在仲胺，表明仍然存在 Fmoc 副产物和/或残余哌啶。重复 NMP 洗涤直到不能观察到蓝色或紫色时为止。

同时，活化将加入所述树脂的在所述序列中的后续氨基酸，以其羧基末端进行反应。应该用 Fmoc 保护每个氨基酸的胺末端。根据所加入的氨基酸，其侧链可能保护或可能没有保护。优选用 t-Bu 保护 tyr (Y)、Thr (T)、Ser (S)和 Asp (P)的侧链，用 trt 保护 His (H)、Gln (Q)和 Asn (N)的侧链，用 Boc 保护 Lys (K)和 Trp (w)的侧链。然而，如上所述，必须保护 His 的侧链。而且优选不保护片段 1-16 和 9-16 的羧基末端的 Gln 残基的侧链。Len 或 Ile 的侧链的保护不是必需的。

如下活化氨基酸。将 Fmoc-保护的氨基酸(1.5 eq)、1-羟基苯并三

唑水合物(HOBT)(1.5 eq)和二异丙基-乙胺(DIEA)(1.5 eq)在室温下溶解于 NMP (约 7.5 体积)中。将所述溶液冷却至 0-5°C, 然后加入 O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲鎓(uronium)六氟代磷酸盐(HBTU)(1.5 eq), 接着搅拌 5-15 分钟使其溶解。重要的是在低温下进行活化, 以使所述氨基酸的外消旋化最小。HBTU 是加入所述冷却溶液中的最后试剂, 因为活化和外消旋化不能在缺乏它的情况下发生。

将活化的氨基酸溶液加注到排干的树脂中, 用 DCM (约 2.5 体积)洗涤。请注意, 所述氨基酸的活化是在 NMP 中进行, 因为 HBTU 不溶于 DCM 中。然而此时向所述反应物中加入 DCM 以保持所述树脂珠的充分膨胀。用氮气鼓泡搅拌所述反应物约 1 小时。用如下所述的定性茚三酮试验可监测偶合完成情况。

为了用定性茚三酮试验检测所述反应的完成情况, 取出 2-20 mg 树脂样品, 用甲醇洗净。向该样品中加入 3 滴 76%苯酚的乙醇溶液、4 或 5 滴 0.2 mM KCN 的吡啶溶液和 3 滴 0.28 M 茚三酮的乙醇溶液。用乙醇将所述样品稀释至体积约 0.5 mL, 并放置于约 75°C 的加热块中 5-10 分钟。出现蓝色或紫色表示存在游离胺, 说明所述反应仍未完成。可进一步将样品稀释至约 3 mL 体积, 以便更容易判定浓缩样品中的颜色变化程度。

假如 1 小时后观察到阳性茚三酮试验, 则再继续进行所述偶合反应 1 小时。假如 2 小时后仍然存在阳性茚三酮试验, 则排干所述树脂, 在约 10 体积 NMP 中洗涤 3 次, 用 1 当量活化氨基酸重复所述偶合反应。

如果在两个偶合循环之间使所述树脂储存过夜, 则可以排干树脂床, 在氮气层下用 DCM 覆盖。或者排干树脂床, 储存在氮气层下, 然后在进行下一个偶合循环之前用 DCM 洗涤液调适。如果所述完整片段准备在裂解前储存过夜, 则所述树脂应该用 DCM 洗涤使其不含 NMP, 因为在 NMP 中可能发生明显的 Fmoc 去保护。

在判定所述偶合反应完成后,则排干树脂,用3等份(约10体积)NMP洗涤。重复所述肽片段的后续单体的偶合循环。在最后一个偶合反应后,用4等份(约10体积)NMP洗涤所述树脂,然后用4等份(约10体积)DCM洗涤。可用氮气吹扫干燥树脂结合肽。

按照例如以下技术可裂解并分离通过固相合成技术合成的肽:用本领域众所周知的技术从树脂上切除所述肽。可用例如1%或2%三氟乙酸(TFA)的DCM溶液或用1%和2%TFA的DCM溶液的组合切除所述肽。也可用乙酸(HOAc)切除所述肽。裂解所需要的具体裂解试剂、溶剂和时间将取决于所要裂解的特定肽。裂解后使所述裂解部分进行标准处理方法以分离所述肽。通常真空下浓缩合并的裂解部分,然后用溶剂如乙醇、甲醇或庚烷重构。一般是加入水沉淀肽,并真空过滤收集所述肽。或者可在分离所述肽前研制所述产物。

在下文7.1-7.6部分给出的实施例介绍固相合成表1、2和/或3所示的肽中间体。

为了合成全长T-20肽,可将上表1的肽中间体偶合在一起产生T-20肽。例如可将表2所列的各组的肽中间体偶合在一起产生T-20全长肽。在第9部分给出了如此由中间体肽片段合成全长T-20的典型实例,并图示于图1-5中。

在一些实施方案中,可采用四片段法合成T-20。“四片段法”合成是指以合成并可用固相和液相合成技术偶合成全长T-20肽的四个T-20中间体肽片段为原料的T-20合成方案。上表2所示的第5、6、8、9和12-15组中间体肽片段为优选片段组。图1和图2图示利用表2第6组肽中间体合成全长T-20的两个四片段法。对于该片段组,值得注意的是在所述片段偶合过程中单独引入氨基酸残基36(T-20羧基1-末端氨基酸残基)。在9.1部分给出的实施例中证实了示于图1的最佳T-20合成方案。

在另外的实施方案中,可采用三片段法合成T-20。“三片段法”合成是指以合成并用固相和液相合成技术偶合为全长T-20肽的三个

T-20 中间体肽片段为原料的 T-20 合成方案。上表 2 所示的第 2-4、7、10 和 11 组中间体肽片段为优选三片段组。图 3 和图 4 图示利用表 2 第 3 组肽中间体合成全长 T-20 的两个三片段法。对于该片段组，值得注意的是在所述片段偶合过程中单独引入氨基酸残基 36(T-20 羧基 1-末端氨基酸残基)。在下文的 9.1 部分给出的实施例证实了示于图 3 的最佳 T-20 合成方案。在下文的 9.2-9.5 部分给出的实施例证实了示于图 4 的最佳 T-20 合成方案。

在另外的实施方案中，可采用两片段法合成 T-20。“两片段法”合成是指以合成并用固相和液相合成技术偶合为全长 T-20 肽的两个 T-20 中间体肽片段为原料的 T-20 合成方案。上表 2 所示的第 1 和 16-20 组中间体片段为优选片段组。图 5 图示利用表 2 第 20 组肽中间体合成全长 T-20 的两片段法。对于该片段组，值得注意的是在所述片段偶合过程中氨基酸残基(T-20 羧基末端氨基酸残基)单独引入。

可用本领域技术人员周知的液相肽合成技术合成本发明的肽中间体片段。在 8.1-8.11 部分给出的实施例描述表 1、2 和/或 3 所列的肽中间体的典型的液相肽合成法。例如 Tosohaus (Montgomeryville, PA) 销售的具有宽 pH 范围的非硅基柱填料中包括 pH 值大于 7 的柱填料。

6. 实施例：树脂合成

在本文 6.1-6.3 部分描述的实施例中，合成可与固相合成肽和本文所述的肽中间体一起使用的氯代三苯甲基树脂。

6.1 制备 Fmoc-Trp (Boc)-2-氯代三苯甲基树脂

材料:	MW	eq	mmole	g	mL
2-氯代三苯甲基氯树脂	--	1.0	25	25	--
Fmoc-Trp(Boc)-OH	--	526.60	1.5	37.5	19.7
二异丙基乙胺(DIEA)	129.25	1.7	42.5	5.5	7.4
二氯乙烷(DCE)	--	--	--	--	250
二氯甲烷(DCM)	--	--	--	--	6×250
9:1 甲醇: DIEA	--	--	--	--	200

方法:

将 2-氯代三苯甲基氯树脂(25g, 1 eq.)加入 500 mL 肽反应室, 用 250 mL DCM 洗涤。排干树脂床, 加入 Fmoc-Trp (Boc)-OH (1.5 eq)和 DIEA (1.7 eq)的 10 体积 DCE 溶液。氮气鼓泡搅拌该混合物 2 小时。

排干树脂床, 用 250 mL DCM 洗涤。用 200 mL 9: 1 MeOH: DIEA 溶液对树脂上的活性部分进行 20 分钟封端。排干树脂床, 用 4×250 mL DCM 洗涤, 用氮气吹扫干燥, 获得 34.3 g 载荷树脂。

从树脂分离 Fmoc-氨基酸并相对于标准品进行分析, 从而进行定量 HPLC 分析。HPLC 分析所述物质表明所述树脂的载荷量为 0.68 mmol/g.

柱: Phenomenox Jupiter C18; 299Å; 5μ

流速: 1 mL/min

检测: UV, 260 nm

流动相: A: 0.1% TFA 水溶液

B: 0.1% TFA 的乙腈

65% B 等梯度

保留时间: ~14 分钟

6.2 制备 Fmoc-Gln-2-氯代三苯甲基树脂

<u>材料:</u>	<u>MW</u>	<u>eq</u>	<u>mmole</u>	<u>g</u>	<u>mL</u>
2-氯代三苯甲基氯树脂	--	1.0	25	25	--
FmocGlnOH	368.39	1.5	37.5	13.8	--
二异丙基乙胺(DIEA)	129.25	1.7	42.5	5.5	7.4
二氯乙烷(DCE)	--	--	--	--	75
N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)	--	--	--	--	200
二氯甲烷(DCM)	--	--	--	--	6×250
9:1 甲醇: DIEA	--	--	--	--	200

方法:

用 FmocGlnOH (1.5 eq)和 DIEA (1.7 eq)在 75 mL DCE 和 200 mL DMF 的混合物中的溶液重复在上文 6.1 部分给出的实施例中使用的方法。该反应获得 33.8 g 载荷树脂。推测所述树脂的理论载荷为 0.74 mmol/g, 并在以后使用该物质。

6.3 制备 Fmoc-Leu-2-氯代三苯甲基树脂

<u>材料:</u>	<u>MW</u>	<u>eq</u>	<u>mmole</u>	<u>g</u>	<u>mL</u>
2-氯代三苯甲基氯树脂	--	1.0	250	250	--
FmocLeuOH	353.42	1.5	375	132.5	--
二异丙基乙胺(DIEA)	129.25	1.7	425	55	75
二氯乙烷(DCE)	--	--	--	--	2000
二氯甲烷(DCM)	--	--	--	--	6×1500
9:1 甲醇: DIEA	--	--	--	--	1500

方法:

将所述树脂加入 3 L 肽反应室, 用 1.5 DCM 洗涤。排干树脂床, 加入 FmocLeuOH (1.5 eq)和 DIEA (1.7 eq)的 8 体积 DCE 溶液。氮气鼓泡搅拌该混合物 2 小时。

排干树脂床, 用 1.5 L DCM 洗涤。用 1.5 L 9:1 MeOH: DIEA 溶

液对树脂上的活性部分进行封端 30 分钟。排干树脂床，用 4×1.5 L DCM 洗涤，用氮气吹扫干燥，获得 345 g 载荷树脂。

从树脂分离 Fmoc-氨基酸并相对于标准品进行分析，从而进行定量 HPLC 分析。HPLC 分析所述物质表明所述树脂的载荷量为 0.72 mmol/g。

柱：Phenomenox Jupiter C18; 299Å; 5μ

流速：1 mL/min

检测：UV, 260 nm

流动相：A: 0.1% TFA 水溶液

B: 0.1% TFA 的乙腈溶液

65% B 等梯度

保留时间：~8 分钟

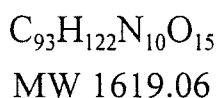
7. 实施例：固相合成肽

在下文 7.1-7.6 部分给出固相合成表 1、2 和/或 3 中所列的肽中间体的实例。

7.1 制备片段 Fmoc-AA(1-8)-OH (片段 1b)

结构：

Fmoc-Tyr (tBu) -Thr (tBu) -Ser (tBu) -Leu-Ile-His (trt)-Ser (tBu)-Leu-OH
(SEQ ID NO: 2)



<u>材料:</u>	<u>MW</u>	<u>eq</u>	<u>mmole</u>	<u>g</u>	<u>mL</u>
Fmoc-Leu-2-氯代三苯甲基树脂	--	1.0	15.6	20.0	--
Fmoc-氨基酸*	--	1.5	23.4	--	--
1-羟基苯并三唑(HOBT) 水合物*	153.15	1.5	23.4	3.6	--
O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基脲六氟代磷酸盐(HBTU)*	379.25	1.5	23.4	8.9	--
二异丙基乙胺(DIEA)*	129.25	1.5	23.4	3.0	4.1
N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)*	--	--	--	--	150
二氯甲烷(DCM)*	--	--	--	--	50
20%哌啶/NMP*	--	--	--	--	2×200
用于冲洗的 NMP*	--	--	--	--	200(每次洗涤)
1%三氟乙酸(TFA)的 DCM 溶液	--	--	--	--	300
0.5% TFA/DCM	--	--	--	--	200
哌啶	--	--	--	--	
乙醇	--	--	--	--	110
水	--	--	--	--	200+100

*每个偶合循环

理论产量: 25.3 g

预期收率: 80-90%

实际产量: 20.0 g

方法:

向 1 L 肽反应室中加入 20.0 g Fmoc-Leu-2-氯代三苯甲基树脂。在 200 mL(约 10 体积)DCM 中用氮气搅拌约 15 分钟调节所述树脂, 膨胀树脂圆珠, 然后排干。

用 2×200 mL 20%哌啶的 NMP 溶液处理, 每次 10 分钟, 达到从所述末端胺去除 Fmoc (9-芴基甲氧基羰基)。然后按阴性氯醌试验测定, 用 200 mL(约 10 体积)NMP 洗涤所述树脂 5-7 次, 去除 Fmoc 副产物(二苯并富烯和其哌啶加合物)和残余哌啶。

同时活化所述序列中的后续氨基酸 Fmoc-Ser (tBu), 以在其羧基

末端反应。将 Fmoc-保护的氨基酸(1.5 eq)、HOBT (1.5 eq)和 DIEA (1.5 eq)在室温下溶解于 150 mL (约 7.5 体积)NMP 中。把该溶液冷却至 0-5°C, 然后加入 HBTU (1.5 eq), 搅拌 1-15 分钟溶解。将活化的酸溶液加入到排干的树脂中, 用 50 mL DCM 洗涤(约 2.5 体积)。氮气鼓泡搅拌所述反应物 1 小时。用定性茚三酮试验监测偶合完成情况。在判定所述偶合反应完成后, 则排干树脂, 用 3×200 mL(1 体积)NMP 洗涤树脂。

用 Fmoc-保护的氨基酸 His (trt)、Ile、Leu、Ser (tBu)、Thr (tBu) 和 Tyr (tBu)各 1.5 当量, 对所述肽片段后续单体重复该操作过程。在最后一个偶合反应后, 用 4×200 mL(10 体积)NMP 洗涤所述树脂, 然后用 4×200 mL(10 体积)DCM 洗涤。用氮气吹扫干燥所述树脂, 获得 42 g 树脂结合肽。

用 300 mL 1% TFA 的 DCM 处理约 2 分钟, 然后用 200 mL 0.5% TFA 的 DCM 处理, 从 21 g 树脂裂解所述肽。将裂解部分收集到吡啶(与 TFA 体积比 1: 1)上。合并裂解洗涤液, 真空下浓缩至约 50 mL 体积, 然后用 110 mL 乙醇重构, 同时继续浓缩以去除残余 DCM 至终体积约 250 mL。加入 200 mL 水沉淀产物。室温下搅拌该淤浆 30 分钟。真空过滤收集所述固体, 用约 100 mL 水洗涤。风干所述产物, 获得 20.0 g (70%) Fmoc-AA (1-8)-OH, 95% HPLC 纯。

柱: Phenomenox Jupiter C18

流速: 1 mL/min

检测: UV, 260 nm

流动相: A: 0.1% TFA 水溶液

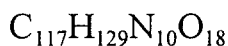
B: 0.1% TFA 的乙腈溶液, 在 20 分钟内梯度为 80%B
-99%B

保留时间: 约 23 分钟

7.2 制备片段 Fmoc-AA(9-15)-OH (片段 5b)

结构:

Fmoc-Ile-Glu (tBu)-Glu (tBu)-Ser (tBu)-Gln (trt)-Asn (trt)-Gln (trt)-OH
(SEQ ID NO: 6)



MW 1963.39

材料:	MW	eq	mmole	g	mL
Fmoc-Gln(trt)-2-氯代三苯甲基树脂	--	1.0	12.0	20.0	--
Fmoc-氨基酸*	--	1.5	18.0	--	--
1-羟基苯并三唑(HOBT) 水合物*	153.15	1.5	18.0	2.8	--
O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基uronium 六氟代磷酸盐(HBTU)*	379.25	1.5	18.0	6.8	--
二异丙基乙胺(DIEA)*	129.25	1.5	18.0	2.3	3.1
N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)*	--	--	--	--	150
二氯甲烷(DCM)*	--	--	--	--	50
20%吡啶/NMP*	--	--	--	--	2×200
用于冲洗的 NMP*	--	--	--	--	200(每次洗涤)
用于裂解的 DCM	--	--	--	--	160
乙酸(HOAc)	--	--	--	--	20
三氟乙醇	--	--	--	--	20
庚烷	--	--	--	--	250+250+100
甲基正丁基醚	--	--	--	--	100
异丙醇	--	--	--	--	60
水	--	--	--	--	60 + 50

*每个偶合循环

理论产量: 23.6 g

预期收率: 89-95%

实际产量: 21.1 g

方法:

用 20.0 g Fmoc-Gln (trt)-2-氯代三苯甲基树脂和 Fmoc-保护氨基酸 Asn (trt)、Gln (trt)、Ser (tBu)、Glu (tBu)、Glu (tBu)和 Ile 重复以上 7.1 部分中给出的实施例中所用的方法。

在最后一个偶合反应后，用 4×200 mL(10 体积)NMP 洗涤所述树脂，然后用 4×200 mL(10 体积)DCM 洗涤。

用 200 mL 8: 1: 1 DCM: TFE: HOAc 处理 2 小时，然后用 2×100 mL DCM 洗液洗涤，从树脂裂解肽。合并洗脱液，真空下浓缩至约 100 mL 体积，用 250 mL 庚烷重构，同时继续浓缩以去除残余 DCM 至终体积约 250 mL。从形成的双相混合物分离庚烷层。加入 250 mL 庚烷和 100 mL MTBE 沉淀产物，然后在室温下研制过夜，获得需要稠度的物质。真空过滤收集该固体，并用约 100 mL 庚烷洗涤。再次加工所述产物，去除残余乙酸。将经过滤的固体在 50℃ 下溶解于 60 mL 异丙醇中。该溶液在冰浴中冷却至 0-5℃，然后快速滴加 60 mL 水。在冰浴中搅拌研制淤浆产物约 1 小时。真空过滤分离所述固体，并用约 50 mL 水洗涤。风干所述产物，获得 21.1 g (90%) Fmoc-AA (9-15)-OH, 95% HPLC 纯。

柱: Phenomenox Jupiter C18

流速: 1 mL/min

检测: UV, 260 nm

流动相: A: 0.1% TFA 水溶液

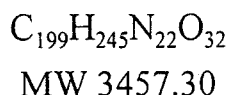
B: 0.1% TFA 的乙腈溶液, 在 20 分钟内梯度为 80%B
-99%B

保留时间: 约 23 分钟

7.3 制备片段 **Fmoc-AA(1-16)-OH (片段 3d)**

结构:

Fmoc-Tyr (tBu)-Thr (tBu)-Ser (tBu)-Leu-Ile-His (trt)-Ser (tBu)-Leu-Ile-Glu (tBu)-Glu (tBu)-Ser (tBu) Gln (trt)-Asn (trt)-Gln (trt)-Gln-OH (SEQ ID NO: 4)



<u>材料:</u>	<u>MW</u>	<u>eq</u>	<u>mmole</u>	<u>g</u>	<u>mL</u>
Fmoc-Gln-2-氯代三苯甲基树脂	--	1.0	24.1	32.5	--
Fmoc-氨基酸*	--	1.5	36.2	--	--
1-羟基苯并三唑(HOBT) 水合物*	153.15	1.5	36.2	5.5	--
O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基uronium 六氟代磷酸盐(HBTU)*	379.25	1.5	36.2	13.7	--
二异丙基乙胺(DIEA)*	129.25	1.5	36.2	4.7	6.3
N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)*	--	--	--	--	200
二氯甲烷(DCM)*	--	--	--	--	75
20%哌啶/NMP*	--	--	--	--	2×250
用于冲洗的 NMP*	--	--	--	--	250(每次洗涤)
1%三氟乙酸/DCM	--	--	--	-	4×50
吡啶	79.10	--	--	--	4×0.5
庚烷	--	--	--	-	150+50
甲醇	--	--	--	-	50
水	--	--	--	-	50+25

*每个偶合循环

理论产量: 48.9 g

预期收率: 89-95%

方法:

用 32.5 g Fmoc-Gln-2-氯代三苯甲基树脂和所需要的 Fmoc-保护氨基酸重复以上 7.1 部分中给出的实施例中所用的方法。按以上 6.1 部分给出的实施例所述进行所述反应，只是如以上材料部分所示使用略微不同的溶剂体积。

在最后一个偶合反应后，用 4×250 mL(8 体积)NMP 洗涤所述树脂，然后用 4×250 mL(8 体积)DCM 洗涤。氮气吹扫干燥所述树脂，获得 97.4 g 结合肽。

在 17.7-g 规模，用 2×190 mL 1% TFA 的 DCM 处理 1-2 分钟，然后用 1×120 mL DCM 处理，从树脂裂解树脂结合肽。将裂解部分

收集到吡啶(与 TFA 体积比 1: 1)上。合并裂解所述部分和洗涤液, 真空下浓缩至约 50 mL 体积, 然后用 200 mL 甲醇复制。继续浓缩以去除残余 DCM 至终体积约 50 mL。加入 250 mL 水沉淀产物, 并在室温下搅拌约 30 分钟。真空过滤收集该固体, 并用约 50 mL 水洗涤。风干所述产物, 获得 12.8 g (84%)。再加工所述产物以去除吡啶盐。将过滤后的固体在室温下溶解于 150 mL 甲醇中。于室温下加入 200 mL 水沉淀所述产物。真空过滤分离所述产物, 并用约 50 mL 水洗涤。风干该物质, 获得 12.8 g (84%) Fmoc-AA (1-16)-OH。

柱: Phenomenox Jupiter C18

流速: 1 mL/min

检测: UV, 260 nm

流动相: A: 0.1% TFA 水溶液

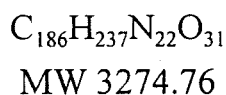
B: 0.1% TFA 的乙腈溶液, 在 20 分钟内梯度为 75%B
-99%B

保留时间: 约 25 分钟

7.4 制备片段 Ac-AA(1-16)-OH (片段 3c)

结构:

Ac-Tyr (tBu)-Thr (tBu)-Ser (tBu)-Leu-Ile-His (trt)-Ser (tBu)-Leu-Ile-Glu (tBu)-Glu (tBu)-Ser (tBu)-Gln (trt)-Asn (trt)-Gln (trt)-Gln-OH (SEQ ID NO: 4)



材料:	MW	eq	mmole	g	mL
Fmoc-Gln-2-氯代三苯甲基树脂	--	1.0	24.1	32.5	--
Fmoc-氨基酸*	--	1.5	36.2	--	--
1-羟基苯并三唑(HOBT) 水合物*	153.15	1.5	36.2	5.5	--
O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基uronium 六氟代磷酸盐(HBTU)*	379.25	1.5	36.2	13.7	--
二异丙基乙胺(DIEA)*	129.25	1.5	36.2	4.7	6.3
N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)*	--	--	--	--	200
二氯甲烷(DCM)*	--	--	--	--	75
20%哌啶/NMP*	--	--	--	--	2×250
用于冲洗的 NMP*	--	--	--	--	250(每次洗涤)
1%三氟乙酸/DCM	--	--	--	--	4×50
吡啶	79.10	--	--	--	4×0.5
庚烷	--	--	--	--	150+50
甲醇	--	--	--	--	50
水	--	--	--	--	50+25

*每个偶合循环

理论产量: 48.9 g

预期收率: 85-90%

方法:

用 32.5 g Fmoc-Gln-2-氯代三苯甲基树脂和所需要的 Fmoc-保护氨基酸和以上材料部分所示的溶剂体积, 重复以上 7.1 部分中给出的实施例中所用的方法。

在最后一个偶合反应后, 用 4×250 mL(8 体积)NMP 洗涤所述树脂, 然后用 4×250 mL(8 体积)DCM 洗涤。氮气吹扫干燥所述树脂, 获得 97.4 g 结合肽。

在 10-g 规模, 用乙酸酐和吡啶(各 5 eq)的 100 mL 3: 1 NMP: DCM 乙酰化所述树脂结合肽 30 分钟, 然后用 2×25 mL DCM 洗涤。用 3×50 mL 1% TFA 的 DCM, 然后用 2×50 DCM 洗液从树脂裂解所述肽。将

裂解部分收集到吡啶(与 TFA 体积比 1: 1)上。合并裂解分离部分和洗涤液, 真空下浓缩至约 100 mL 体积, 然后用分批加入的 3×50 mL 庚烷重构, 同时继续该浓缩以去除残余 DCM 至终体积约 150 mL。最初沉淀的产物具有一定的粘稠度, 但可在 0-5℃ 的冰浴中搅拌研制约 30 分钟成为可过滤的固体。真空过滤收集固体, 并用约 50 mL 庚烷洗涤。再加工该产物以去除吡啶盐。将过滤后的固体在室温下溶解于 50 mL 甲醇中。在冰浴中将所述溶液冷却至 0-5℃, 然后快速滴加 50 mL 水。在冰浴中搅拌研制作为粘性固体的最初沉淀的物质约 1 小时至可过滤稠度。真空过滤分离产物, 并用约 25 mL 水洗涤。风干该产物, 获得 7.0 g (90%) Ac-AA (1-16)-OH。随后如上所述再加工该产物获得 6.2 g (89%收率)96% HPLC 纯的物质。

柱: Zorbax LP C8, 100Å, 20μ

流速: 1 mL/min

检测: UV, 220 nm

流动相: A: 0.1% TFA 水溶液

B: 含有 0.05% TFA 的 1: 1 ACN: IPA, 在 20 分钟内

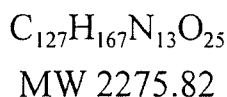
梯度为 80%B -99%B

保留时间: 约 15 分钟

7.5 制备片段 Fmoc-AA(17-26)-OH (片段 10b)

结构:

Fmoc-Glu (tBu)-Lys (Boc)-Asn (trt)-Glu (tBu)-Gln (trt)-Glu (tBu)-Leu-Leu-Glu (tBu)-Leu-OH (SEQ ID NO: 11)



材料:	MW	eq	mmole	g	mL
Fmoc-Leu-2-氯代三苯甲基树脂	--	1.0	19.5	25.0	--
Fmoc-氨基酸*	--	1.5	30.0	--	--
1-羟基苯并三唑(HOBT) 水合物*	153.15	1.5	30.0	4.6	--
O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基uronium 六氟代磷酸盐(HBTU)*	379.25	1.5	30.0	11.4	--
二异丙基乙胺(DIEA)*	129.25	1.5	30.0	3.9	5.2
N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)*	--	--	--	--	200
二氯甲烷(DCM)*	--	--	--	--	75
20%吡啶/NMP*	--	--	--	--	2×250
用于冲洗的 NMP*	--	--	--	--	250(每次洗涤)
1%三氟乙酸/DCM	--	--	--	--	3×400
吡啶	79.10	--	150	--	3×4
乙醇, 变性	--	--	--	--	300
水	--	--	--	--	300

*每个偶合循环

理论产量: 44.4 g

预期收率: 90-105%

实际产量: 46.9 (105%)

方法:

用 25.0 g Fmoc-Leu-2-氯代三苯甲基树脂、所需要的 Fmoc-保护氨基酸和以上材料部分所示的溶剂体积, 重复以上 7.1 部分中给出的实施例中所用的方法。

在最后一个偶合反应后, 用 4×250 mL(10 体积)NMP 洗涤所述树脂, 然后用 4×250 mL(10 体积)DCM 洗涤。

用 3×400 mL(约 15 体积)的 1% TFA 的 DCM, 然后用 1×200 mL(7.5 体积)DCM 从树脂裂解肽。将裂解部分收集到吡啶(与 TFA 体积比 1: 1)上, 然后分析裂解液和洗涤液的产物含量。合并含产物所述部分, 真空浓缩至约 100 mL 体积, 然后用 300 mL 乙醇重构。继续

该浓缩以去除残余 DCM 至终体积约 250 mL。向该搅拌溶液加入 300 mL 水沉淀产物。真空过滤收集固体，并用约 50 mL 水洗涤。风干该产物，获得 46.4 g (105%) 97% HPLC 纯的 Fmoc-AA (17-26)-OH。

柱: Phenomenox Jupiter C18

流速: 1 mL/min

检测: UV, 260 nm

流动相: A: 0.1% TFA 水溶液

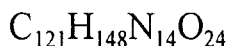
B: 0.1% TFA 的乙腈, 在 20 分钟内梯度为 75%B -99%B

保留时间: 约 25 分钟

7.6 制备片段 Fmoc-AA(27-35)-OH (片段 16b)

结构:

Fmoc-Asp (tBu)-Lys (Boc)-Trp (Boc)-Ala-Ser (tBu)-Leu-Trp (Boc)-Asn (trt)-Trp (Boc)-OH (SEQ ID NO: 17)



MW 2182.61

材料:	MW	eq	mmole	g	mL
Fmoc-Trp(Boc)-2-氯代三苯甲基树脂	--	1.0	22.4	33.0	--
Fmoc-氨基酸*	--	1.5	33.6	--	--
1-羟基苯并三唑(HOBT) 水合物*	153.15	1.5	33.6	5.1	--
O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基uronium 六氟代磷酸盐(HBTU)*	379.25	1.5	33.6	12.7	--
二异丙基乙胺(DIEA)*	129.25	1.5	33.6	4.3	5.8
N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)*	--	--	--	--	225
二氯甲烷(DCM)*	--	--	--	--	75
20%吡啶/NMP*	--	--	--	--	2×250
用于冲洗的 NMP*	--	--	--	--	250(每次洗涤)
三氟乙醇	--	--	--	--	30
用于裂解的 DCM	--	--	--	--	240
乙醇, 变性	--	--	--	--	300, 100
水	--	--	--	--	300, 150
1%三氟乙酸(TFA)的 DCM	--	--	--	--	2×250
吡啶	79.10	--	--	--	2×2.5

*每个偶合循环

理论产量: 48.9 g预期收率: 85-90%方法:

用 33.0 g Fmoc-Trp (Boc)-2-氯代三苯甲基树脂、所需要的 Fmoc-保护氨基酸和以上材料部分所示材料, 重复以上 7.1 部分中给出的实施例中所用的方法。

在最后一个偶合反应后, 用 4×250 mL(7.5 体积)NMP 洗涤所述树脂, 然后用 4×250 mL(7.5 体积)DCM 洗涤。

用 300 mL(约 10 体积) 8: 1: 1 DCM: TFE: HOAc 溶液处理 2 小时从树脂裂解肽。排干树脂, 并用 2×250 mL DCM 洗涤。合并裂解溶

液和洗涤液，并浓缩至约 50 mL 体积，然后用 250 mL 乙醇重构。在冰浴中搅拌冷却溶液至 0-5°C。向该搅拌溶液加入 125 mL 水沉淀产物。真空过滤收集固体，并用约 50 mL 水洗涤。风干该产物，获得 32.0 g (65.4%) 95% HPLC 纯的 Fmoc-AA (27-35)-OH。

用 2×250 mL 1% TFA 的 DCM 溶液处理所述树脂，然后用 100 ML DCM 洗涤树脂。将裂解部分以与 TFA 体积比 1: 1 收集到吡啶上。浓缩合并的洗脱液和水至约 50 mL 体积。向该溶液中加入 100 mL 乙醇后再加入 150 mL 水。真空过滤产物淤浆获得第二收获产物 10.7 g (21.9%) (95% HPLC 纯)，获得的合并总收获率为 87.3%。因为其更有效而体积较小，所以优选 1% TFA/DCM 裂解。

柱: Phenomenox Jupiter C5, 300Å, 5μ

流速: 0.75 mL/min

检测: UV, 260 nm

流动相: A: 0.05% TFA 水溶液

B: 0.1% TFA 的 1: 1 IPA: MeOH, 在 10 分钟内梯度为
70%B -97%B

保留时间: 约 25 分钟

8. 实施例: 液相合成肽片段

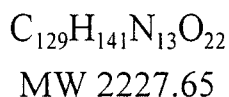
在下文的 8.1-8.11 部分中提供液相合成表 1、2 和/或 3 所列的肽中间体的实例。

8.1 通过偶合谷胺酰胺的对硝基苄酯(OPNB)与

Fmoc-AA9-15OH 制备片段 Fmoc-AA9-16OPNB

结构:

Fmoc-Ile-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ser (tBu)-Gln (trt)-Asn (trt)-Gln (trt)-Gln-OPNB (SEQ ID NO: 7)



材料:	MW	eq	mmole	g	mL
FmocAA9-15OH	1963.39	1	9.7	19	--
HBrGlnOPNB (BaChem.#509709)	362.19	1.1	10.6	3.85	--
HOAT	136	1.1	10.6	1.45	--
HBTU	379.25	1.1	10.6	4.04	--
EtPr ₂ N (d=0.755)	129.25	2.1	20.3	2.62	3.48
NMP	--	--	--	--	200
0.5 N HCl	--	--	--	--	250
乙酸乙酯	--	--	--	--	250
己烷	--	--	--	--	250

理论产量: 21.5 g

预期收率: 90-105%

方法:

将 FmocAA9-15OH(在以上 7.2 部分中合成)、HBrGlnOPNB、HOAT 和 EtPr₂N 合并在一个含有磁性搅拌棒的 1L 圆底烧瓶中, 并加入 NMP (200 mL)。将生成的溶液置于氮气氛下, 并搅拌冷却至 0-5 °C。向该冷却溶液中加入 HBTU。在 0-5 °C 下搅拌该溶液 15 分钟, 去除冰浴, 继续搅拌 2.5 小时(注释 1)。

将反应化合物冷却至 0-5 °C, 并加入 0.5 N 盐酸水溶液(250 mL), 沉淀所保护的肽。真空过滤收集固体, 并在过滤瓶中干燥获得 24 g 粗品 FmocAA9-16OPNB。将该固体溶解于乙酸乙酯(250 mL)中, 经硫酸镁(10 g)干燥, 过滤并浓缩至 100 mL 体积。将该溶液冷却至 0-5 °C, 加入己烷(250 mL)沉淀所述肽。真空过滤收集固体, 并干燥获得 21.5 g FmocAA9-16OPNB, 收率 100%, 91-94%HPLC 纯(注释 2)。

注释:

1. 用薄层层析(TLC)进行生产过程控制

90/10 氯仿/乙醇

UV, 碘检测

Rt FmocAA9-15OH 0.46

Rt FmocAA9-16OPNB 0.57

2. Phenomenox Jupiter C5, 5 μ , 300A

0.75 mL/min, 260 nm

A: 水/0.05% TFA

B: 50% IPA/ MeOH/0.05% TFA,

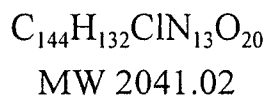
在 10 分钟内 70-97%B , 97%B 8 分钟。

保留时间: 13.3 分钟

8.2 制备盐酸 HAA9-16OPNB 片段

结构:

HCl H-Ile-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ser (tBu)-Gln (trt)-Asn (trt)-Gln (trt)-
Gln-OPNB (SEQ ID NO: 7)



<u>材料:</u>	<u>MW</u>	<u>eq</u>	<u>mmole</u>	<u>g</u>	<u>mL</u>
FmocAA9-16OPNB	2227.65	1	9.43	21	--
哌啶	--	--	--	--	10
THF	--	--	--	--	190
甲基叔丁基醚(MTBE)	--	--	--	--	250
己烷	--	--	--	--	350
甲醇	--	--	--	--	150
0.5 N HCl	--	--	--	--	100
2-丙醇	--	--	--	--	50

理论产量: 19.2 g

预期收率: 85-105%

方法:

在一个含有磁性搅拌棒的 1L 圆底烧瓶中加入 FmocAA9-16OPNB (在以上 8.1 部分中合成)和 20: 1 四氢呋喃/哌啶。将生成的溶液在氮

气氛下于室温搅拌 60 分钟(注释 1)。加入己烷(350 mL)沉淀所述肽。从粘性固体倾析所述溶剂。用 MTBE (200 mL)在室温下研制固体 18 小时。真空过滤收集固体, 干燥获得 18.9 g HAA9-16OPNB (注释 2)。

将所述固体溶解于甲醇(150 mL)中, 搅拌冷却至 0-5℃。加入 0.5 N 盐酸水溶液(100 mL)沉淀所述肽。真空过滤收集固体, 用水(50 mL)然后用 2-丙醇(50 mL)洗涤, 干燥获得 17.7 g 盐酸 HAA9-16OPNB, 收率 92%, 92A%HPLC 纯(注释 3)。

注释:

1. 用 HPLC 进行生产过程控制

Phenomenex Jupiter, C5, 5 μ , 300A

0.75 mL/min, 260 nm

A 水/0.05% TFA

B 50% IPA/ MeOH/0.05% TFA

在 10 分钟内 70-97%B , 97%B 8 分钟

保留时间: FmocAA9-16OPNB, 13.3 分钟; HAA9-16OPNB, 10.7 分钟

2. 此时分离的 HAA9-16OPNB 含有痕量哌啶和苄基富烯哌啶加合物。在与 RAA1-8OH 偶合前均去除。

3. Phenomenex Jupiter, C5, 5 μ , 300A

0.75 mL/min, 260 nm

A 水/0.05% TFA

B 50% IPA/ MeOH/0.05% TFA

在 10 分钟内 80-100%B, 100%B 5 分钟

保留时间: HAA9-16OPNB, 7.2 分钟

TLC 条件:

90/10 二氯甲烷/乙醇

UV, 碘检测

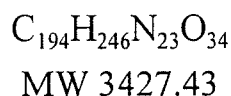
Rf: HAA9-16OPNB, 0.64

8.3 通过液相偶合片段 AcAA1-8OH 和 HAA9-16OPNB

制备片段 AcAA1-16OPNB

结构:

Ac-Tyr (tBu)-Thr (tBu)-Ser (tBu)-Leu-Ile-His (trt)-Ser (tBu)-Leu-Ile-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ser (tBu)-Gln (trt)-Asn (trt)-Gln (trt)-Gln-OPNB (SEQ ID NO: 4)



<u>材料:</u>	<u>MW</u>	<u>eq</u>	<u>mmole</u>	<u>g</u>	<u>mL</u>
AcAA1-8OH	1440.86	1.3	0.13	0.186	--
盐酸 HAA9-16OPNB	2041.02	1	0.10	0.204	--
HBTU	379.25	1.1	0.11	0.042	--
HOAT	136.1	1.1	0.11	0.015	--
EtPr ₂ N	129.25	2.1	0.21	0.027	0.036
DMF	--	--	--	--	4.5
DMSO	--	--	--	--	0.5
水	--	--	--	--	7
MTBE	--	--	--	--	3.5

理论产量: 0.38 g

预期收率: 85-105%

方法:

在 25 mL 含有磁性搅拌棒的圆底烧瓶中加入 AA1-8OH (在以上 7.1 部分中合成)、盐酸 HAA9-16OPNB(在以上 8.2 部分中合成)和 HOAT。将所述固体溶解于含有 EtPr₂N 的 9: 1 DMF: DMSO (5 mL), 然后在氮气氛下冷却至 0-5 °C(注释 1)。向冷却的溶液中加入 HBTU。在 0-5 °C 搅拌反应混合物 15 分钟, 然后温热至室温, 再搅拌 60 分钟(注释 2)。加入水(7 mL)从所述溶液中沉淀肽。真空过滤收集固体, 用水 (10 mL)洗涤, 并干燥获得 0.36 g 粗品 AcAA1-16OPNB。在室温下用 MTBE (3.5 mL)研制所述固体 1.5 小时, 真空过滤收集, 并干燥获得

0.335 g AcAA1-16OPNB, 收率 88%, 82% HPLC 纯(注释 3)。

注释:

1. 重要的是在冷却至 0-5℃和加入 HBTU 之前所有固体在溶液中。
2. 生产过程控制, TLC, HPLC

Phenomenex Jupiter, C5, 5 μ , 300A

0.75 mL/min, 260 nm

A 水/0.05% TFA

B 50% IPA/ MeOH/0.05% TFA

在 10 分钟内 80-100%B, 100%B 5 分钟。

保留时间: HAA9-16OPNB, 7.2 分钟(Ac1-8OH 在 260 nm 的吸光度为 0)。

保留时间: AcAA1-16OPNB, 12.45 分钟

TLC 条件:

90/10 氯仿/乙醇

UV, 碘检测

Rf: HAA9-16OPNB, 0.64

Rf: Ac1-8OH, 0.35

Rf: Ac1-16OH, 0.48

3. Phenomenex Jupiter, C5, 5 μ , 300A

0.75 mL/min, 260 nm

A 水/0.05% TFA

B 50% IPA/ MeOH/0.05% TFA

在 10 分钟内 70-97%B, 97%B 8 分钟

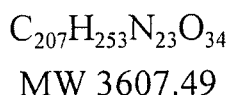
保留时间: Ac1-16OPNB, 16.4。

8.4 通过液相偶合片段 FmocAA1-8OH 和盐酸 HAA9-16OPNB

制备片段 FmocAA1-16OPNB

结构:

Fmoc-Tyr (tBu)-Thr (tBu)-Ser (tBu)-Leu-Ile-His (trt)-Ser (tBu)-Leu-Ile-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ser (tBu)-Gln (trt)-Asn (trt)-Gln (trt)-Gln-OPNB
(SEQ ID NO: 4)



材料:	MW	eq	mmole	g	mL
FmocAA1-8OH	1620.92	1	7.84	12.7	--
盐酸 HAA9-16OPNB	2041.02	1	7.84	16.0	--
HBTU	379.25	1.2	9.42	3.57	--
HOAT	136.1	1.2	9.42	1.28	--
EtPr ₂ N (d=0.755)	129.25	2.5	19.6	2.55	3.36
DMF	--	--	--	--	250
10%氯化钠/水(重量/体积)	--	--	--	--	450
甲醇	--	--	--	--	200
水	--	--	--	--	100

理论产量: 28.3 g

预期收率: 85-100%

方法:

在 1 L 含有磁性搅拌棒的圆底烧瓶中加入 FmocAA1-8OH(在以上 7.1 部分中合成)、盐酸 HAA9-16OPNB(在以上 8.2 部分中合成)、HOAT 和 DMF (250 mL)。向所述溶液中加入 EtPr₂N。将该溶液冷却至 0~5℃ 并加入 HBTU。在 0-5℃ 搅拌反应混合物 15 分钟, 然后温热至室温, 再搅拌 70 分钟(注释 1)。将反应混合物冷却至 0-5℃, 并加入 10%氯化钠/水(200 mL)沉淀所述肽。真空过滤收集固体, 用水(50 mL)洗涤, 并干燥获得 27 g 粗品 FmocAA1-16OPNB。将该固体溶解于甲醇(200 mL)中, 并加入氯化钠水溶液(10%重量/体积, 300 mL)的搅拌溶液中。真空过滤收集固体, 用水(50 mL)洗涤, 干燥获得 26 g

FmocAA1-16OPNB, 收率 92%, 90A% HPLC 纯(注释 1).

注释:

1. 生产过程控制, HPLC

Phenomenex Jupiter, C5, 5 μ , 300A

0.75 mL/min, 260 nm

A 水/0.05% TFA

B 50% IPA/ MeOH/0.05% TFA

在 10 分钟内 80-100%B, 100%B 5 分钟。

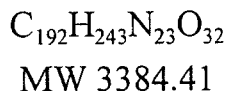
保留时间: HAA9-16OPNB, 7.2 分钟, FmocAA1-8OH, 7.9 分钟。

保留时间: FmocAA1-16OPNB, 14.5 分钟

8.5 制备片段 H-AA1-16OPNB

结构:

H-Tyr (tBu)-Thr (tBu)-Ser (tBu)-Leu-Ile-His (trt)-Ser (tBu)-Leu-Ile-Glu (tBu)-Glu (tBu)-Ser (tBu)-Gln (trt)-Asn (trt)-Gln (trt)-Gln-OPNB (SEQ ID NO: 4)



<u>材料:</u>	<u>MW</u>	<u>eq</u>	<u>mmole</u>	<u>g</u>	<u>mL</u>
FmocAA1-16OPNB	3607.49	1	0.28	1.0	--
吡啶	--	--	--	--	0.6
二氯甲烷	--	--	--	--	11.4
己烷	--	--	--	--	45

理论产量: 0.94 g

预期收率: 90-105%

方法:

在 50 mL 含有磁性搅拌棒的圆底烧瓶中加入 FmocAA1-16OPNB(在以上 8.4 部分中合成)、二氯甲烷(11.4 mL)和吡啶(0.6 mL)。

将该溶液在室温氮气氛下搅拌 90 分钟(注释 1)。将己烷(45 ml)加入反应混合物中, 并经真空蒸馏将所述溶剂体积减少至 25 mL。真空过滤收集生成的固体, 干燥获得 0.96 g HAA1-16OPNB, 收率 102%。HLPC 分析所述固体表明 72A% HAA1-16OPNB 和 18A%富烯和哌啶-富烯加合物。

注释:

1. Phenomenex Jupiter, C5, 5 μ , 300A

0.8 mL/min, 260 nm

A 水/0-05% TFA

B 50% IPA/ MeOH/0.05% TFA

在 10 分钟内 80-100%B, 100%B 5 分钟。

保留时间 FmocAA1-16OPNB, 14.1 分钟

保留时间 HAA1-16OPNB, 11.6 分钟

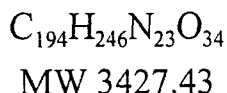
保留时间富烯和哌啶-富烯加合物, 5.5 和 4.8 分钟。

8.6 通过乙酰化 HAA1-16OPNB 的 N-末端

制备片段 Ac-AA1-16OPNB

结构:

Ac-Tyr (tBu)-Thr (tBu)-Ser (tBu)-Leu-Ile-His (trt)-Ser (tBu)-Leu-Ile-Glu (tBu)-Glu (tBu)-Ser (tBu)-Gln (trt)-Asn (trt)-Gln (trt)-Gln-OPNB (SEQ ID NO: 4)



<u>材料:</u>	<u>MW</u>	<u>eq</u>	<u>mmole</u>	<u>g</u>	<u>mL</u>
HAA1-16OPNB	3384.41	1	0.28	0.95	--
乙酸酐(d=1.08)	102.09	3	0.84	0.086	0.080
吡啶(d=0.978)	79.1	3	0.84	0.67	0.068
DMF	--	--	--	--	10
水	--	--	--	--	30
MTBE	--	--	--	--	10
己烷	--	--	--	--	10

理论产量: 0.96 g

预期收率: 80-100%

方法:

在 50 mL 含有磁性搅拌棒的圆底烧瓶中加入 HAA1-16OPNB(在以上 8.5 部分中合成)、DMF (10 mL)、乙酸酐和吡啶。将该反应混合物在室温氮气氛下搅拌 60 分钟(注释 1)。加入水(20 mL) 沉淀所述肽。真空过滤收集固体, 用水(10 mL)洗涤, 干燥获得 0.87 g AcAA1-16OPNB。为了去除残余富烯和吡啶富烯加合物, 在室温下用 1: 1 MTBE/己烷(20 mL)研制所述固体 4.5 小时。真空过滤收集固体, 干燥获得 0.82 g AcAA1-16OPNB, 收率 85%, 高于 90A%HPLC 纯(注释 1)。

注释:

1. 生产过程控制, HPLC

Phenomenex Jupiter, C5, 5 μ , 300A

0.8 mL/min, 260 nm

A 水/0.05% TFA

B 50% IPA/ MeOH/0.05% TFA

在 10 分钟内 80-100%B , 100%B 15 分钟。

保留时间 HAA1-16OPNB, 11.6 分钟

保留时间 AcAA1-16OPNB, 12.1 分钟

TLC, 10%乙醇的二氯甲烷

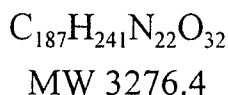
UV, 碘检测

Rf AcAA1-16OPNB, 0.69

8.7 在存在 His (trt)下从 AcAA1-16OPNB 选择性去除 对硝基苄基保护基团制备片段 AcAA1-16OH

结构:

Ac-Tyr (tBu)-Thr (tBu)-Ser (tBu)-Leu-Ile-His (trt)-Ser (tBu)-Leu-Ile-Glu
(OtBu)-Glu (OtBu)-Ser (tBu)-Gln (trt)-Asn (trt)-Gln (trt)-Gln-OH (SEQ
ID NO: 4)



<u>材料:</u>	<u>MW</u>	<u>eq</u>	<u>mmole</u>	<u>g</u>	<u>mL</u>
AcAA1-16OPNB	3424.86	1	0.23	0.80	--
10% Pd/C, Degussa, 50%水	--	--	--	0.30	--
甲酸铵	63.06	15	3.5	0.22	--
DMF	--	--	--	--	15
水	--	--	--	--	120
乙酸乙酯	--	--	--	--	100
己烷	--	--	--	--	44
甲醇	--	--	--	--	10
饱和氯化钠水溶液	--	--	--	--	5
MTBE	--	--	--	--	4

理论产量: 0.76 g

预期收率: 70-85%

方法:

在 25 mL 含有磁性搅拌棒的圆底烧瓶中加入 AcAA1-16OPNB(在以上 8.6 部分中合成)和 DMF (10 mL)。向该溶液中加入甲酸铵水溶液(0.5 mL), 然后加入湿的披钨炭(Degussa, 10%, 50%水)。将该淤浆

在室温氮气氛下搅拌 120 分钟(注释 1)。使该淤浆通过一个紧密装填的 C 盐床过滤到 90 mL 水中。用 DMF (5 mL)洗涤滤饼。用乙酸乙酯 (100 mL)洗涤水悬浮液。然后浓缩乙酸乙酯至 20 mL 体积(注释 2)。加入己烷(40 ml)完成所述沉淀, 从固体倾析所述溶剂。将所述固体溶解于甲醇(10 mL)中, 加入 4: 1 水/饱和氯化钠水溶液(25 mL)沉淀所述肽。真空过滤收集固体, 用水(10 mL)洗涤, 干燥获得 0.62g AcAA1-16OH。用 50% MTBE/己烷(8 mL) 在室温下将所述固体研制 15 小时, 收集固体, 干燥获得 0.59 g AcAA1-16OH, 收率 77%, 90A%HLP 纯(注释 3)。

注释:

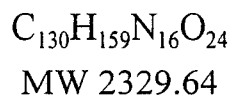
1. 生产过程控制, HPLC
80/20 二氯甲烷/乙醇
UV, 碘检测
Rf: AcAA1-16OPNB, 0.90
Rf: Ac1-16OH, 69
2. 随着所述溶剂体积的减少可以开始沉淀 AcAA1-16OH.
3. Phenomenex Jupiter, C5, 5 μ , 300A
0.8 mL/min, 260 nm
A 水/0.05% TFA
B 50% IPA/ MeOH/0.05% TFA
在 10 分钟内 80-100%B, 100%B 5 分钟。
保留时间: AcAA1-16OH, 10.73 分钟

8.8 通过液相偶合 FmocAA27-35OH 与 HPheNH₂

制备片段 FmocAA27-36NH₂

结构:

Fmoc-Asp (tBu)-Lys (Boc)-Trp (Boc)-Ala-Ser (tBu)-Leu-Trp (Boc)-Asn (trt)-Trp (Boc)-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 18)



<u>材料:</u>	<u>MW</u>	<u>eq</u>	<u>mmole</u>	<u>g</u>	<u>mL</u>
FmocAA27-35OH	2182.61	1	18.4	40.2	--
HPhNH ₂	162.21	1.2	22.1	3.6	
HBTU	379.25	1.2	22.1	8.4	
HOAT	136.1	1.2	22.1	3.0	
EtPr ₂ N (d=0.755)	129.25	2.1	38.7	5.0	6.6
DMF					500

理论产量: 42.8 g

预期收率: 90-105%

方法:

在 2 L 含有磁性搅拌棒的圆底烧瓶中加入 FmocAA27-35OH(在以上 7.6 部分中合成)、HOAT、HpheNH₂ 和 DMF (500 mL)。加入 EtPr₂N, 将该溶液冷却至 0-5 °C, 然后加入 HBTU。将反应混合物在 0-5 °C 搅拌 15 分钟, 然后温热至室温, 再搅拌 70 分钟(注释 1)。将该溶液冷却至 0-5 °C, 加入水(500 mL)沉淀所述肽。真空过滤收集固体, 用水(100 mL)洗涤, 干燥获得 43 g FmocAA27-36NH₂, 收率 100%, 93A%HLPC 纯(注释 2)。

注释:

1. 生产过程控制, TLC
88/12 二氯甲烷/甲醇
UV, 碘检测
Rf: FmocAA27-35OH, 0.49
Rf: FmocAA27-36NH₂, 0.63
2. Phenomenex Jupiter, C18, 5μ, 300A
1.0 mL/min, 260 nm
A 水/0.1% TFA
B ACN

在 20 分钟内 75-99%B ， 99%B 5 分钟。

保留时间: 29.4 分钟

8.9 制备片段 H-AA(27-36)-NH₂

结构:

H-Asp (tBu)-Lys (Boc)-Trp (Boc)-Ala-Ser (tBu)-Leu-Trp (Boc)-Asn (trt)-
Trp (Boc)-NH₂ (SEQ ID NO: 17)



MW 2106.56

材料:	MW	eq	mmole	g	mL
FmocAA(27-36)-NH ₂	2328.8	1.0	9.3	21.7	-
哌啶	85.15	5.0	46.6	4.0	4.6
二氯甲烷(DCM)	-	-	-	-	100
水	-	-	-	-	2×100
甲基叔丁基醚(MTBE)	-	-	-	-	100+30

理论产量: 19.6 g

预期收率: 85-95%

方法:

在 250 mL 配有磁性搅拌器和氮气层的圆底烧瓶中加入在以上 8.8 部分中合成的 Fmoc-片段、二氯甲烷(约 5 体积)和哌啶。将所获得的溶液在室温下搅拌 1.5 小时(注释 1)。

用 2×100 mL 水洗涤所述溶液。分离各层，真空浓缩有机层至约原体积的一半。分批加入 2×50 mL MTBE，同时继续浓缩以去除 DCM 至出现大量沉淀和终罐体积约 150 mL 时为止。

在 0~5℃ 冰浴中搅拌并冷却所述产物淤浆约 1 小时。真空过滤分离固体，用 2×15 mL MTBE 洗涤。风干所述产物，获得 17.6 g (89.6%) H-AA(17-36)NH₂, 95% HPLC 纯(注释 2)。

注释:

1. HPLC 监测反应完成情况:

柱: Phenomenox Jupiter C18; 300Å; 5μ

流速: 1 mL/min

检测: UV, 260 nm

流动相: A: 0.1% TFA 水溶液

B: 0.1% TFA 的乙腈

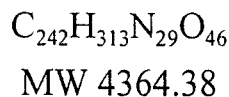
在 20 分钟内的梯度为 75%B-99%B

保留时间: 约 18 分钟

2. 在处理中都有效去除了 Fmoc 副产物和二苯并富烯及其哌啶加合物; 但是, 所述物质在投入使用前应进行使用试验。如果所述物质不能通过使用试验, 则通过溶解所述固体于 DCM(5 体积)中重复所述处理步骤, 然后继续上述的方法。

8.10 通过液相偶合 FmocAA17-26OH 与 HAA27-36NH₂**制备片段 FmocAA17-36NH₂****结构:**

Fmoc-Glu (OtBu)-Lys (Boc)-Asn (trt)-Glu (OtBu)-Gln (trt)-Glu (OtBu)-
Leu-Leu-Glu (OtBu)-Leu-Asp (tBu)-Lys (Boc)-Trp (Boc)-Ala-Ser (tBu)-
Leu-Trp (Boc)-Asn (trt)-Trp (Boc)-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 12)



<u>材料:</u>	<u>MW</u>	<u>eq</u>	<u>mmole</u>	<u>g</u>	<u>mL</u>
FmocAA17-26OH	2275.82	1	9.5	21.6	
HAA27-36NH ₂	2106.56	1	9.5	20	
HOAT	136.1	1.2	11.4	1.55	
HBTU	379.25	1.2	11.4	4.33	
EtPr ₂ N (d=0.755)	129.25	2	19.0	2.46	3.25
DMF					400
水					600
2-丙醇					1100

理论产量: 41.5 g

预期收率: 80-85%

方法:

在 2 L 含有磁性搅拌棒的圆底烧瓶中加入 FmocAA17-26OH(在以上 7.5 部分中合成)、HAA27-36NH₂(在以上 8.9 部分中合成)、HOAT 和 DMF (400 mL)。加入 EtPr₂N, 将该搅拌溶液在氮气氛下冷却至 0-5°C, 加入 HBTU。将反应混合物在 0-5°C 搅拌 15 分钟, 然后温热至室温, 再搅拌 2.5 小时(注释 1)。向该反应混合物中加入水(500 mL)沉淀所述肽(注释 2)。搅拌所生成的淤浆 45 分钟, 真空过滤收集固体, 用水(100 mL)洗涤并干燥。将所述固体返回含有磁性搅拌棒的 2 L 圆底烧瓶中, 加入 60°C 2-丙醇(1.1 L)。在所述淤浆冷却至室温的同时在氮气氛下搅拌(过夜)。真空过滤收集固体, 干燥获得 37.5 g FmocAA17-36NH₂, 收率 90%, 95.5%HLPC 纯(注释 1)。

注释:

1. 生产过程控制, HPLC

Phenomenex Jupiter, C5, 5μ, 300A

0.75 mL/min, 260 nm

A 水/0.05% TFA

B 50% IPA/MeOH/0.05% TFA

在 10 分钟内 80-100%B , 100%B 25 分钟。

保留时间: FmocAA17-26OH, 8.2 分钟, HAA26-36NH₂, 8.4 分钟

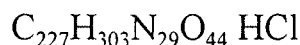
保留时间: FmocAA17-36NH₂, 13.3 分钟

2. 当加入水时将所述反应混合物温热至 38℃。

8.11 制备片段 H-AA(17-36)-NH₂

结构:

H-Glu (OtBu)-Lys (Boc)-Asn (trt)-Glu (OtBu)-Gln (trt)-Glu (OtBu)-Leu-
Leu-Glu (OtBu)-Leu-Asp (tBu)-Lys (Boc)-Trp (Boc)-Ala-Ser (tBu)-Leu-
Trp (Boc)-Asn (trt)-Trp (Boc)-NH₂ (SEQ ID NO: 19)



材料:

	MW	eq	mmole	g	mL
FmocAA(17-36)-NH ₂	4364.36	1.0	5.2	22.5	-
5 N NaOH (aq)	-	-	-	-	55
四氢呋喃(TFH)	-	-	-	-	170
1 N HCl	-	-	-	-	13
饱和氯化钠(水溶液)	-	-	-	-	2×55
庚烷	-	-	-	-	3×25+50, 200+50

理论产量: 21.6 g

预期收率: 95-100%

方法:

向配有空气搅拌器和氮气层的 250 mL 圆底烧瓶中加入在以上 8.10 部分中合成的 Fmoc-片段、THF (约 7.5 体积)和 5 N NaOH(约 2.5 体积)。将所获得的两相溶液在室温下搅拌 10-15 分钟(注释 1)。

分离各层, 用 1 N HCl 将有机相调节至 pH 2-3。然后用 2×55 mL (2.5 体积)饱和盐水溶液洗涤所述溶液(注释 2)。分离各层, 在 15-20 °C 真空下浓缩有机层至约 1/2 原体积。分批加入 3×25 mL 庚烷, 同时继续浓缩以去除 THF 至出现大量沉淀和终罐体积约 100 mL 时为止(注

释 2)。

在室温下搅拌所述产物淤浆约 2 小时。真空过滤分离固体，用约 50 mL 庚烷洗涤。风干所述产物，获得 21.0 g (97.5%) H-AA(17-36)NH₂。

可进行再加工去除残余的二苯并富烯副产物。在 200 mL 庚烷中于室温下淤浆所述产物 3 小时。过滤所述物质，用约 50 mL 庚烷洗涤，风干获得产物 20.8 g (96.6%)，超过 95% HPLC 纯。

注释：

1. HPLC 监测反应完成情况：

柱：Zorbax LP C8; 1 OOA; 2011 流速：1 mL/min

检测：UV, 260 nm

流动相：A: 0.1% TFA 水溶液

B: 0.1% TFA 的 1:1 ACN: IPA

在 20 分钟内的梯度为 80%B-99%B

保留时间：约 18 分钟

2. 所述固体最初沉淀为仍可搅拌的蜡状胶，进一步浓缩研制为可过滤固体。

9. 实施例：合成全长 T-20 肽

在下文 9.1-9.5 部分给出的是利用所述肽中间体片段生产全长 T-20 肽的实施例。

在本部分给出的实施例证实成功联用固相和液相合成技术由肽中间体片段生产全长 T-20 肽。

9.1 通过液相偶合 AcAA1-16OH 与 HAA17-36NH₂

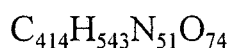
制备片段 AcAA1-36NH₂

在此描述的合成路线代表最好的图 1 和 3 图解的 T-20 四片段法。在其中 AcAA1-16OH 通过固相技术合成的情况下，采用图 1 的方法，

在其中 AcAA1-16OH 通过液相技术合成的情况下, 采用图 3 的方法。注意在此合成的 T-20 全长肽具有在其氨基末端具有乙酰化修饰(即“X”)而在其羧基末端具有酰胺修饰(即“Z”)的 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列。

结构:

Ac-Tyr (tBu)-Thr (tBu)-Ser (tBu)-Leu-Ile-His (trt)-Ser (tBu)-Leu-Ile-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ser (tBu)-Gln (trt)-Asn (trt)-Gln (trt)-Gln-Glu (OtBu)-Lys (Boc)-Asn (trt)-Glu (OtBu)-Gln (trt)-Glu (OtBu)-Leu-Leu-Glu (OtBu)-Leu-Asp (tBu)-Lys (Boc)-Trp (Boc)-Ala-Ser (tBu)-Leu-Trp (Boc)-Asn (trt)-Trp (Boc)-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 1)



MW 7411.95

<u>材料:</u>	<u>MW</u>	<u>eq</u>	<u>mmole</u>	<u>g</u>	<u>mL</u>
AcAA1-1OH	3276.4	1	0.24	0.79	
盐酸 HAA17-36NH ₂	4178.56	1	0.24	1.0	
HOAT	136.1	1.1	0.26	0.036	
HBTU	379.25	1.0	0.95	0.25	
EtPr ₂ N (d=0.755)	129.25	2.8	0.67	0.087	0.115
DMF					20
水					25
饱和氯化钠					5
MTBE					10
己烷					10

理论产量: 1.77 g

预期收率: 85-100%

方法:

在 100 mL 含有磁性搅拌棒的圆底烧瓶中加入 AcAA1-16OH(在以上 7.4 部分通过固相技术或在以上 8.7 部分通过液相技术合成)、HOAT、DMF (20 mL), 然后加入 EtPr₂N (0.074 mL)。在氮气氛下将溶液冷却至 0-5°C, 加入 HBTU。在 0-5°C 搅拌溶液 15 分钟, 加入盐酸 HAA17-36NH₂(在上文 8.11 部分中合成), 再加入 0.041 ml

EtPr₂N。去除冷却浴，搅拌反应混合物 2 小时(注释 1)。加入水(25 mL)和饱和氯化钠水溶液(5 mL)沉淀所述肽。真空过滤收集固体，用水(10 mL)洗涤，干燥获得 1.74 g 粗品 AcAA1-36NH₂ (注释 2)。在室温下用 MTBE/己烷研制所述固体 2.5 小时，真空过滤收集固体，干燥获得 1.70 g 产物，收率 96%，92A% HPLC 纯。

注释:

1. 生产过程控制, HPLC
Phenomenex Jupiter, C5, 5 μ , 300A
0.8 mL/min, 260 nm
A 水/0.05% TFA
B 50% IPA/ MeOH/0.05% TFA
在 10 分钟内 80-100%B, 100%B 15 分钟。
保留时间: AcAA1-16OH, 11.8 分钟。
保留时间: HCl HAA17-36NH₂, 12.7 分钟。
保留时间: AcAA1-36NH₂, 22.9 分钟。
2. 水流出物产生非常精细的沉淀。可能需要两次过滤。

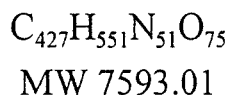
9.2 通过液相偶合 FmocAA1-16OH 与 HAA17-36NH₂

制备片段 FmocAA1-36NH₂ (T-20)

在本部分给出的实施例证实成功联用固相和液相合成技术由肽中间体片段生产 T-20 肽。在此描述的合成路线特别代表图 4 描述的至该图中合成 FmocAA1-36NH₂ 时的 T-20 三片段法, 。

结构:

Fmoc-Tyr (tBu)-Thr (tBu)-Ser (tBu)-Leu-Ile-His (trt)-Ser (tBu)-Leu-Ile-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ser (tBu)-Gln (trt)-Asn (trt)-Gln (trt)-Gln-Glu (OtBu)-Lys (Boc)-Asn (trt)-Glu (OtBu)-Gln (trt)-Glu (OtBu)-Leu-Leu-Glu (OtBu)-Leu-Asp (tBu)-Lys (Boc)-Trp (Boc)-Ala-Ser (tBu)-Leu-Trp (Boc)-Asn (trt)-Trp (Boc)-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 1)



<u>材料:</u>	<u>MW</u>	<u>eq</u>	<u>mmole</u>	<u>g</u>	<u>mL</u>
FmocAA1-16OH	3453.89	1	0.12	0.41	
盐酸 HAA17-36NH ₂	4174.88	1	0.12	0.50	
HOAT	136.1	1.25	0.15	0.020	
HBTU	379.25	1.25	0.15	0.057	
EtPr ₂ N (d=0.755)	129.25	2.5	0.30	0.039	0.051
DMF					10
水					18
2-丙醇					14

理论产量: 0.91 g

预期收率: 85-100%

方法:

在 25 mL 含有磁性搅拌棒的圆底烧瓶中加入 FmocAA1-16OH(在以上 7.3 部分中合成)、HCl HAA17-36NH₂ (在以上 8.11 部分中合成)、HOAT、DMF (10 mL), 然后加入 EtPr₂N。在氮气氛下将溶液冷却至 0-5°C, 加入 HBTU。在 0-5°C 搅拌反应混合物 15 分钟, 然后温热至室温并搅拌 1.5 小时(注释 1)。加入水沉淀肽, 真空过滤收集固体并干燥。用 2-丙醇(14 mL)在室温下研制所述固体 15 小时, 然后加入水 (3 mL)从所述溶液分离所需要的产物。真空过滤所述固体, 干燥获得 0.80 g FmocAA1-36NH₂, 收率 88%, 85A% HPLC 纯。

注释:

1. 生产过程控制, HPLC

Phenomenex Jupiter, C5, 5μ, 300A

0.8 mL/min, 260 nm

A 水/0.05% TFA

B 50% IPA/ MeOH/0.05% TFA

在 10 分钟内 80-100%B, 100%B 15 分钟。

保留时间: FmocAA1-16OH, 11.4 分钟。

保留时间: HCl HAA17-36NH₂, 12 分钟。

保留时间: FmocAA1-36NH₂, 20.4 分钟。

TLC, 9/1 二氯甲烷/乙醇

UV, 碘检测

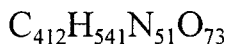
Rft: FmocAA1-36NH₂, 0.71

9.3 制备片段 HAA1-36NH₂ (T-20)

在本部分给出的实施例证实成功联用固相和液相合成技术由肽中间体片段生产 T-20 肽。在此描述的合成路线特别代表图 4 描述的至该图中合成 H-AA1-36NH₂ 时的 T-20 三片段法。

结构:

H-Tyr (tBu)-Thr (tBu)-Ser (tBu)-Leu-Ile-His (trt)-Ser (tBu)-Leu-Ile-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ser (tBu)-Gln (trt)-Asn (trt)-Gln (trt)-Gln-Glu (OtBu)-Lys (Boc)-Asn (trt)-Glu (OtBu)-Gln (trt)-Glu (OtBu)-Leu-Leu-Glu (OtBu)-Leu-Asp (tBu)-Lys (Boc)-Trp (Boc)-Ala-Ser (tBu)-Leu-Trp (Boc)-Asn (trt)-Trp (Boc)-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 1)



MW 7370.94

<u>材料:</u>	<u>MW</u>	<u>eq</u>	<u>mmole</u>	<u>g</u>	<u>mL</u>
FmocAA1-36NH ₂	7593.01	1	0.105	0.80	
哌啶					0.5
DMF					9.5
水					20
饱和氯化钠水溶液					5
MTBE					5
己烷					5

理论产量: 0.77 g

预期收率: 85-95%

方法:

在 25 mL 含有磁性搅拌棒的圆底烧瓶中加入 FmocAA1-36NH₂ (在以上 9.2 部分中合成)、DMF (9.5 mL) 和哌啶 (0.5 mL)。在室温氮气气氛下搅拌该溶液 2 小时 (注释 1、2)。加入水 (20 ml) 和饱和氯化钠水溶液 (5 mL) 沉淀所述保护肽。真空过滤收集固体, 干燥获得 0.77 g 污染有富烯和哌啶-富烯加合物的 HAA1-36NH₂。在室温下用 50% MTBE/己烷研制所述固体 15 小时, 去除富烯和哌啶-富烯加合物。真空过滤固体, 干燥获得 0.73 g HAA1-36NH₂, 收率 95%, 90A% HPLC 纯。

注释:

1. 生产过程控制, HPLC

Phenomenex Jupiter, C5, 5 μ , 300A

0.8 mL/min, 260 nm

A 水/0.05% TFA

B 50% IPA/ MeOH/0.05% TFA

在 10 分钟内 80-100%B, 100%B 15 分钟。

保留时间: FmocAA1-36OH, 20.4 分钟。

保留时间: HCl HAA1-36NH₂, 19.9 分钟。

保留时间: 富烯和哌啶-富烯加合物, 5 分钟。

TLC, 9/1 二氯甲烷/乙醇

UV, 碘检测

Rt: FmocAA1-36NH₂, 0.71

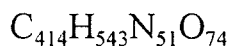
2. 所述产物和原料在 TLC 或反相 HPLC 上完全分开。通过观测富烯和哌啶-富烯加合物跟踪产物组成。

9.4 通过 N-末端乙酰化 HAA1-36NH₂ 制备片段 AcAA1-36NH₂ (T-20)

在本部分给出的实施例证实成功联用固相和液相合成技术由肽中间体片段生产 T-20 肽。在此描述的合成路线特别代表图 4 描述的至该图中合成 Ac-AA1-36NH₂ 时的 T-20 三片段法。

结构:

Ac-Tyr (tBu)-Thr (tBu)-Ser (tBu)-Leu-Ile-His (trt)-Ser (tBu)-Leu-Ile-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ser (tBu)-Gln (trt)-Asn (trt)-Gln (trt)-Gln-Glu (OtBu)-Lys (Boc)-Asn (trt)-Glu (OtBu)-Gln (trt)-Glu (OtBu)-Leu-Leu-Glu (OtBu)-Leu-Asp (tBu)-Lys (Boc)-Trp (Boc)-Ala-Ser (tBu)-Leu-Trp (Boc)-Asn (trt)-Trp (Boc)-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 1)



MW 7411.95

材料:

	MW	eq	mmole	g	mL
HAA1-36NH ₂	7370.94	1	0.096	0.71	
乙酸酐(d=1.08)	102.09	3	0.29	0.029	0.027
吡啶(d=0.978)	79.1	6	0.58	0.046	0.046
DMF					10
水					17.5
饱和氯化钠水溶液					7.5

理论产量: 0.71 g

预期收率: 85-100%

方法:

在 25 mL 含有磁性搅拌棒的圆底烧瓶中加入 HAA1-36NH₂(在以上 9.3 部分中合成)、DMF (10 mL)、吡啶(0.046 mL)和乙酸酐(0.027 mL)(注释 1)。在室温氮气氛下搅拌该溶液 4 小时(注释 2)。加入水(7.5 ml)和饱和氯化钠水溶液(5 mL)沉淀所述保护肽。真空过滤收集固体,用水(10 mL)洗涤,干燥获得 0.65 g AcAA1-36NH₂, 收率 91%, 90A% HPLC 纯(注释 3)。

注释:

1. 对于该反应也可以用二氯甲烷作溶剂。
2. 生产过程控制, HPLC

Phenomenex Jupiter, C5, 5 μ , 300A

0.8 mL/min, 260 nm

A 水/0.05% TFA

B 50% IPA/ MeOH/0.05% TFA

在 10 分钟内 80-100%B, 100%B 15 分钟。

保留时间: HAA1-36OH, 23.3 分钟。

保留时间: AcAA1-36NH₂, 22.7 分钟。

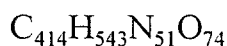
3. 所述产物和原料在 TLC 或反相 HPLC 上不能完全分开。

9.5 通过侧链去保护 AcAA1-36NH₂ 制备 T-20 肽

在本部分给出的实施例证实成功联用固相和液相合成技术由肽中间体片段生产 T-20 肽。在此描述的合成路线特别代表图 4 所示的 T-20 三片段法。

结构:

Ac-Tyr-Thr-Ser-Leu-Ile-His-Ser-Leu-Ile-Glu-Glu-Ser-Gln-Asn-Gln-Gln-Glu-Lys-Asn-Glu-Gln-Glu-Leu-Leu-Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-Leu-Trp-Asn-Trp-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 1)



MW 4492.1

材料:	MW	eq	mmole	g	mL
AcAA1-36NH ₂	7411.95	1	0.035	0.26	
三氟乙酸					2.25
水					15.1
二硫苏糖醇				0.12	
MTBE					170
乙腈					15

理论产量: 157 mg

预期收率: 25-50%

方法:

用氮气对 90: 5: 5 (v/v/wt %) 三氟乙酸/水/二硫苏糖醇溶液脱气,

并冷却至 0-5°C。向该冷却溶液中加入 AcAA1-36NH₂ (在以上 9.4 部分中合成)。在 0-5°C 搅拌所述淤浆直到所述固体溶解(约 5 分钟), 然后温热至室温, 搅拌 2.5 小时。将该溶液加入 0-5°C MTBE (70 mL) 中沉淀所述肽。以 2200 rpm 离心旋转淤浆 5 分钟, 从所述固体倾析 MTBE。将所述固体再悬浮于 MTBE (50 mL) 中, 以 rpm 离心旋转 5 分钟, 倾析 MTBE。重复该过程一次, 然后将固体溶解于含有 1%(体积)乙酸的 1:1 水/乙腈(30 mL)中, 在室温下保存 24 小时(注释 1)。将该溶液冷冻, 然后用冷冻干燥器冷冻干燥获得 155 mg 粗品 T-20。经制备型 HPLC 纯化产生 55 mg 全长 T-20 肽, 95A% HPLC 纯(注释 2)。

注释:

1. 快速去除 Trp (Boc) 的 tBu 侧链, 留下 TrpCOOH。在乙酸水溶液中于室温下 TrpCOOH 的脱羧需要至少 24 小时。

2. 制备型 HPLC

2" YMC, 120A, 10 μ , C18

220 nm, 50 mL/min

A 水/0-1% TFA

B ACN/0.1% TFA

39-49%B/40 分钟

10. 实施例: 纯化 T-20 肽

在此给出的实施例描述可在整体上明显增加肽纯化的条件下纯化 T-20 和 T-20 样肽的方法。

材料

使用的柱: 20×30 cm, 装填有 Amberchrom CG-300S (Tosohaus; Montgomeryville, PA) 35 μ m 颗粒。

缓冲液的制备

缓冲液 A = 用氢氧化铵将 pH 调节至 8.5 的 100 mM 乙酸铵。

缓冲液 B = 乙腈。

1. 用约 6 柱体积 20%B 平衡柱。
2. 将 T-20 以每克肽 50-100 mL 85%A/15%B 溶解。用 2 M 碳酸钾调节 pH 至 8-10。在 T-20 样品中乙腈浓度不大于 15-20%。
3. T-20 溶液以 500 mL/分钟上柱，同时监测柱压力。
4. T-20 溶液上柱后，将 3 倍柱体积(10 L)85%A/15%B 溶液上柱，以洗出层析谱线。
5. 在 303 nm 监测柱洗出液，在整个上柱期间收集洗出液。在层析期间调整波长或衰减使峰值有一定高度。吸光度是波长和测量杯光程长度的函数。
6. 如下开始梯度操作(每小时变化 1.6%B)，并在整个层析期间监测压力。

时间(分钟)	%B	流速(mL/min)
0	15	330
788	36	330

7. 当主峰开始洗出时收集 10 分钟流分(3.3 L)。所有 T-20 应该用 35%B 洗脱。平均收集 35-40 个流分。将流分贮存于 0-5℃直到进行合并流分的测定为止。
8. 收集流分直到检测器吸光度小于 0.1 AU 或在主峰洗出后达到主要拐点时为止。
9. 用分析型反相 HPLC 监测每个流分的纯度。

结果

T-20 肽在 pH 大于 7 时溶解性更高。一般用于纯化肽的柱载体是硅基载体，所以只能在低 pH 范围使用，因为硅基支持物在较高 pH 范围时趋向于溶解。

在此描述的方法使用在宽 pH 范围(pH 1-14)下稳定的聚苯乙烯基树脂载体。该方法显著增加柱容量，T-20 上样量从 10 g 增加到高达 250-450 g(对于 8"直径×30 cm 柱)。

11. 实施例：大规模合成和纯化 T-20 肽载荷树脂

可以以 1.2 mmole/g 原料树脂或更高水平将 FmocTrp (Boc) OH 加样到非常活泼的 2-CTC 树脂上。当载荷水平高于每 g 原料树脂 1.1 mmole FmocTrp (Boc) OH (>0.72 mmol/g 载荷树脂)时, 对于片段的最后三个氨基酸难以获得阴性茚三酮试验。同样, 当 FmocLeuO-树脂载荷量大于 0.85 mmole/g 时难以构建 FmocAA17-26O-树脂, 而当 FmocGlnOH-树脂载荷量大于 0.75 mmole/g 时难以构建 AcAA1-16O-树脂。

当从销售商获得所述树脂时, 对每个将装载的氨基酸用约 1 g 2-CTC 树脂进行应用试验。应用试验的目的是测定装载时将使用的氨基酸量, 以获得所需要的载荷范围。对于每一种使用具有 0.5 当量过量 DIEA 的 0.8、1.0 和 1.5 当量 FmocGlnOH; 1.0、1.2 和 1.5 当量 FmocTrp (Boc) OH 和 0.8、1.0 和 1.5 当量 FmocLeuOH (相对于树脂的报告活性)。如果 1 mole FmocLeuOH 不能载荷在 1 Kg 2-CTC 树脂上, 则不应该从所述销售商接受所述 2-CTC。以下是描述装载 FmocLeuOH、FmocGlnOH 和 FmocTrp (Boc) OH 的目的树脂。

1.0-1.1 mole FmocLeuOH 可装载到 1 Kg 2-CTC 树脂上。计及盐酸损失量, 装载 FmocLeuOH 后的树脂干重应该 1.32 倍或 1.35 倍于原料树脂的重量, 测定的载荷量应该为 0.75-0.81 mmole/g。

0.8-1.0 mole FmocGlnOH 可装载到 1 Kg 2-CTC 树脂上。计及盐酸损失量, 装载 FmocGlnOH 后的树脂干重应该 1.27 倍或 1.33 倍于原料树脂的重量, 测定的载荷量应该为 0.63-0.75。

0.9-1.1 mole FmocTrp (Boc) OH 可装载到 1 Kg 2-CTC 树脂上。计及盐酸损失量, 载荷 Fmoc Trp (Boc) OH 后的树脂干重应该 1.44-1.54 倍于原料树脂的重量, 测定的载荷量应该为 0.63-0.72。

为了进行准确的重量增加分析, 必须测定原料树脂的干燥失重 (LOD)。它不应大于 1%。如果残余溶剂(或 DIEA/HCl)在干燥期间未完全从所述树脂去除(装载后), 则所分离的量将较高, 所测定的载荷

量较低。然而，载荷的总摩尔数(质量×测定的载荷量)应该在上述范围内。对于任何所提及氨基酸来说，如果高端载荷水平(或者每 Kg 原料树脂载荷的总摩尔数)超过 10%，则用少量氨基酸进行使用试验。这对 FmocGlnOH 特别重要。

11.1 大规模制备 Fmoc-AA (Boc)-2-氯代三苯甲基树脂

以下部分的目的是进行大规模装载适合制备大量肽的树脂，以用于固相肽合成(SPPS)。用以下各种装载所述树脂：FmocTrp (Boc) OH、FmocGln (Boc) OH 和 FmocLeu (Boc) OH。每种原料残基装载到约 4 Kg 2-CTC 树脂上。

载荷的 AA	2-CTC(Kg)	载荷量(Kg)	取代(mmol/g) ¹	载荷总摩尔数 ¹
FmocTrp (Boc) OH	3.7	4.493	0.56 (0.56)	2.52 (2.52)
FmocLeu (Boc) OH	2.2	2.436	1.07 (0.647)	2.6 (1.58)
FmocGln (Boc) OH	3.65	3.856	0.55 (0.52)	2.12 (2.0)

1. 第一个数是从相对于 Fmoc-AA 标准的基于重量的 HPLC 分析计算得数。括号内的数值是计及原料 2-CTC 树脂 12% LOD 的情况下由增加的重量计算出的数值。

原料 2-CTC 树脂购自 Colorado BioTech，所报告的载荷量为 1.4 meq/g。以 3.7 公斤 2-CTC 为原料，使用的标准装载方法是 1.5 eq FmocTrp (Boc) OH、1.7 eq DIEA 的 DCM (5 体积)、室温下 2 小时。这产生 4.493 Kg FmocTrp (Boc) O-树脂，该树脂具有在从所述树脂裂解后通过 FmocTrp (Boc) OH 的重量基 HPLC 分析计算为 0.56 mmol/g (总计 2.52 摩尔)的载荷量。根据所述树脂的重量增加，对于所制备的 1.62 摩尔总量，计算的载荷量为 0.36 mmol/g。然而如果计及原料 2-CTC 树脂的 12%LOD，则根据重量增加计算的载荷量对 2.52 摩尔总量同样为 0.56 mmole/g，但远远不足每 4 公斤树脂 4 摩尔 FmocTrp (Boc) OH 的目标载荷量。

采用标准载荷方法在两次操作中由 3.9 Kg 2-CTC 制备总量 4.59 Kg FmocLeuO-树脂。

然而, 所获得的载荷量明显低于预期载荷量。第一批在从所述树脂裂解后根据重量基 HPLC 分析 FmocLeuOH 计算的载荷量为 1.07 mmol/g。这明显是不可能的, 因为计及原料 2-CTC 树脂的 12%LOD 根据增加重量计算的载荷量为 0.647 mmole/g (500 g)。对于 1.577 mole 总载荷量的实际载荷量可能接近 0.647 mmole/g。

由 1.7 Kg 2-CTC 制备的第二批 FmocLeu-O-树脂(2.154 Kg)对于 0.66 mmole/g 增加重量的载荷量具有的计算载荷量为 0.68 mmole/g。

用 3.65 Kg 2-CTC 为原料, 采用 0.8 eq FmocGlnOH 和 1 eq DIEA 的 7 体积的 5/2 DMF/DCM 单批制备 FmocGlnO-树脂总量 3.856 Kg。根据重量基 HPLC 分析计算的取代对于 2.12 摩尔 FmocGlnO-树脂总量为 0.55 mmol/g。计及原料 2-CTC 树脂的 12%LOD, 根据重量增加计算的载荷量对于 2.0 摩尔 FmocGlnO-树脂总量为 0.52 mmol/g。

一般来说, 根据重量增加的载荷量应当大于或等于根据对所载荷的 AA 或去除的富烯的重量基 HPLC 分析计算的载荷量。所述原料 2-CTC 应该小于 1%LOD, 分离的 FmocAAO 树脂可能含有少量 NMP、盐和/或残余 FmocAAOH。

11.1.1 大规模制备 Fmoc-AA (Boc)-2-

氯代三苯甲基树脂的优选方法

FmcoTrp (Boc) OH 和 FmocLeuOH

将空气敏感型 2-氯代三苯甲基氯树脂(1 eq, 3.7 Kg, 5.18 mole)加入 SPPS 室, 用 5 体积 DCM 洗涤。排干溶剂, 加入 FmocTrp (Boc) OH 或 FmocLeu (Boc) OH (1.5 eq)和 DIEA (1.7 eq)的 DCM 溶液(5 体积)(注释 1)。搅拌淤浆 2 小时。排干溶剂, 在所述树脂上保留的活性部位用 9: 1 MeOH: DIEA (5 体积)进行末端封端 30 分钟。排干溶剂, 用 6×5 体积 DCM 洗涤树脂。将树脂干燥至恒重, 然后取样并分析载荷量(注释 2)。相同的方法用于装载 FmocLeuOH。

FmocGluOH

将空气敏感型 2-CTC(3.65 Kg, 1.4 mmole/g)在氮气氛下加入 40 L SPPS 室, 用 DCM (5 体积)洗涤。将 FmocGlnOH (1.506 Kg, 0.8 eq)、DMF (5 体积)和 DIEA (1.0 eq)加入 20 L 反应器。排干 SPPS 室, 加入 DMF 溶液(5 体积)。用 DCM (2 体积)冲洗反应器, 将冲洗液加入 SPPS 室。在氮气氛下在 SPPS 室中搅拌所述树脂 2 小时, 排干。在所述树脂上保留的任何活性部位用 9: 1 MeOH: DIEA (5 体积)进行末端封端 30 分钟。排干所述树脂, 用 DCM (6×5 体积)洗涤, 并干燥至恒重(3.856 Kg)。取样树脂并测试载荷量(注释 2)。

注释:

1. 2-氯代三苯甲基氯树脂对润湿剂非常敏感。水封端所述树脂, 产生盐酸。只要所述溶剂一干, 则 DCE 和 DCM 之间几乎没有区别。
2. 通过从树脂裂解 Fmoc 氨基酸并用定量(wt/wt)HPLC 分析相对于标准品进行分析, 可以测定树脂载荷量。

Phenomenex Jupiter C18, 300A, Sm

1 mL/min, 260 nm

A: 0.1% TFA 水溶液

B: 0.1% TFA 的乙腈

65%B, 等梯度

保留时间: 约 8 分钟

根据所述树脂的重量增加确定载荷量可能不准确, 因为在干燥树脂前使用的洗涤量可能不足以完全从树脂去除 NMP。计算如下:

$$\frac{(\text{Fmoc-AA-OH-树脂重量}-2\text{-CTC 原料重量})}{\text{Fmoc-AA-OH-树脂重量(所载荷 AA 的 MW-盐酸 MW)}}$$

据观测, 本发明的肽片段在 DCM 中的贮存时间(天)延长可明显

增加从树脂的裂解。例如在制备 FmocAA17-26OH 过程中, 两次将部分构建的片段在周末期间贮存在 DCM 中。在完成所述合成并从树脂取出后, 所获得的 FmocAA17-26OH 收率为 8%。怀疑在周末贮存期间在 DCM 中的痕量盐酸从树脂缓慢裂解部分构建片段。

允许 FmocAA17-26O-树脂、AcAA1-16O-树脂和 FrmoAA27-35O-树脂样品在 DCM 和 IPA 中于室温下贮存 1 周。用 HPLC 分析每一种的上清液。尽管未获得定量结果, 但是所有片段在 DCM 中基本上均从树脂裂解, 而在 IPA 中未观察到裂解。如果部分构建的片段需要贮存数天(一个周末内), 最好用 NMP 冲洗所述固体, 排干树脂床, 让其在氮气氛下处于 NMP 饱和状态下。

最后一次洗涤 FmocLeuO-树脂、FmocGlnO-树脂、FmocTrp (Boc) O-树脂、FmocAA17-26O-树脂、AcAA1-16O-树脂和 FrmoAA27-35O-树脂时用 IPA 代替 DCM。将 IPA 饱和的 FmocLeuO-树脂、FmocGlnO-树脂和 FmocTrp (Boc) O-树脂在 40℃ 干燥。由在 4℃ 干燥的载荷树脂构建 FmocAA17-26O-树脂、AcAA1-16O-树脂和 FrmoAA27-35O-树脂。在完成所述合成时, 用 DOM 然后用 IPA 洗净树脂结合片段。分离 IPA 饱和的树脂结合片段, 并在室温和 40℃ 干燥。从树脂裂解所述片段, 并用 HPLC 进行分析。在片段纯度方面未观察到不同。在 40℃ 干燥 IPA 饱和的树脂结合片段不会影响所分离的片段的质或量。

检测与 NMP/DCM 相对的在 DMF 中 SPPS 的片段(在两种溶剂体系中 1 g 树脂膨胀为 5 mL)。用 DMF 作溶剂、TBTU 对 HBTU 作偶联剂合成片段 FmocAA27-35OH。分离获得的 FmocAA27-35OH 得率为 77%, 85.5A%纯。

片段 FmocAA17-36NH₂ 和 AcAA1-36NH₂ 的处理方案去除未偶联的片段。在固相合成中在缺失部位乙酰化(封端)这些片段将保证所述缺失片段在液相偶联中不发生偶联。在合成 FmocAA17-36NH₂ 和 AcAA1-36NH₂ 中未偶联的片段应该在 IPA 和 ACN 处理中去除。

11.2 大规模制备片段 Ac-AA (1-16)-OH (片段 3c)

用 SPPS 大规模制备片段 AcAA1-16OH, 在两次运行中由 3.53 Kg FmocGlnOH-树脂产生的树脂结合片段总计为 7.941 Kg。在两次运行中有点过高估计原料 FmocGlnOH-树脂的载荷量, 根据重量基 HPLC 分析获得载荷量值为 0.55 mmol/g, 而不是计及原料 2-CTC 的 12%LOD 根据重量增加获得的更准确的 0.52 mmol/g。除了树脂载荷量低于需要值外, 在 SPPS 期间采用 6%过量的每种氨基酸。

SPPS 采用 2.5 当量在所述树脂上的第一种 FmocGln (trt) OH 和 1.7 当量在所述片段中的每种后续氨基酸(以 0.55 mmol/g 载荷量为标准)。在 8 体积 3: 1 NMP: DCM 中进行所述偶合反应。32 个偶合反应(包括乙酰化)除了两个外所有反应将在 2 小时内完成。所有洗涤都用 5 体积 NMP 进行。

在 3.4 体积(以 AcAA1-16O-树脂的干重为标准)1%TFA/DCM 中于 0-5°C 洗涤树脂-结合片段 5-6 次, 每次洗涤 5 分钟。将每次洗出液收集到 1.36 体积 0.33 M 碳酸氢钠水溶液上, 以中和 TFA。合并三相洗出液, 加入水(2 体积)。蒸馏去除 DCM, 将可过滤沉淀留在碳酸氢钠水溶液中。在蒸馏过程中, 随着 DCM 的最后去除, 所述多相淤浆在崩解为(collapsing into)可过滤淤浆之前变粘呈奶油状。将淤浆冷却至 0-5°C, 用 0.1 N 盐酸将 pH 调节至 3.0。在 0-5°C 搅拌淤浆 1-2 小时, 过滤收集, 洗涤并干燥。在余下的操作中收集固体, 将其返回到所述反应器中用水研制 1-2 小时, 然后收集并干燥。

用 1% TFA 的 DCM 在 4 次操作中完成从所述树脂裂解 AcAA1-16OH。由纯度为 93-96A%的 3.53 Kg FmocGlnO-树脂产生 AcAA1-16OH 总计为 4.814 Kg, 根据由计及 12% LOD 原料 2-CTC (理论值 5.83 Kg)重量增加测定的 0.52 mmol/g 载荷量的总收率为 83%。

AcAA1-16OH 的钠盐不溶于 DMF 和 NMP 中, 所以必需调节 pH 以质子化羧基末端。水洗涤保证从产物去除三氟乙酸钠。按重量/重量计非常微量的三氟乙酸钠将干扰与 HAA17-36NH₂ 的液相偶合。

应该在室温下干燥该片段。观测在 40℃ 干燥湿的 AcAA1-16OH 的稳定性研究表明, 在 3 天内降解约 4%。有趣的是, 该干燥固体在 80℃ 下可稳定 24 小时。

11.2.1 大规模制备片段 Ac-AA (1-16) -OH (片段 3c) 的优选方法

向 40 L 肽反应室加入树脂结合的 FmocGlnOH (1.53 Kg, 0.55 mmol/g, 0.84 摩尔)。在氮气下使树脂在 DCM (5 体积) 中搅拌调适 15 分钟, 然后排干。加入 20% 哌啶的 NMP 溶液(5 体积), 在氮气下搅拌悬浮液 20 分钟。排干溶液, 重复该过程。用 5 体积 NMP 洗涤树脂 5 次, 以按氯醌试验测定除去二苯并富烯和哌啶(注释 1)。

在洗净树脂的哌啶的同时, 将在所述序列中后续氨基酸(1.5 eq)、HOBT (1.5 eq) 和 DIEA (1.5 eq) 合并于 NMP(6-7 体积) 中, 并冷却至 0℃。向该冷却溶液中加入 HBTU (1.5 eq), 搅拌该溶液 10-15 分钟, 以溶解 HBTU。将活化氨基酸的冷却溶液加入树脂, 然后用 DCM(2.5 体积) 冲洗(注释 2)。在氮气吹扫下搅拌悬浮液 2 小时, 然后取出树脂样品进行茚三酮试验(注释 3)。如果茚三酮试验阴性, 则排干容器, 用 3×5 体积 NMP 洗涤(注释 4), 用所述序列中的下一个氨基酸重复该循环。如果茚三酮试验阳性, 则再搅拌悬浮液 1 小时, 并再测试。如果茚三酮试验阴性, 则进行下一个循环。如果茚三酮试验仍然阳性, 再与 1 当量氨基酸和试剂偶合。如果茚三酮试验在 1 小时后为阳性, 则用 5 当量乙酸酐和 5 当量吡啶的 NMP (10 体积) 封端 1 小时。

在完成所述片段合成时, 如上所述从最后的氨基酸去除 Fmoc, 并在乙酸酐和吡啶(各 5 eq) 的 3: 1 NMP: DCM (10 体积) 溶液中搅拌所述树脂 20-30 分钟或直至茚三酮试验为阴性。排干树脂, 用 2×5 体积 NMP 洗涤, 用 5 体积 DCM 洗涤 5 次, 干燥获得 3.49 Kg AcAA1-16O-树脂。

向 40 L SPSS 反应室加入干燥的树脂结合的 AcAA1-16 (3.49

Kg)。用 6×3.4 体积 1% TFA/DCM 从所述树脂裂解树脂结合肽(注释 7)。将每一裂解洗出液收集到 1.36 体积 0.33 M 碳酸氢钠水溶液上。合并双相部分, 用 2 体积水稀释。减压(15 英寸汞柱, 20°C)浓缩双相混合物以去除 DCM。在所述蒸馏期间再加入水(2 体积), 根据需要持续搅拌(注释 6)。当所述 DCM 被去除(数小时)时, 将所述悬浮液冷却至 0°C 并用 1 N 盐酸水溶液将 pH 调节至 3。在 0°C 搅拌淤浆 1 小时并收集。将仍然潮湿的固体返回反应容器, 用水(7 体积)研制去除残留 TFA 和三氟乙酸钠。真空过滤收集固体, 并干燥至恒重(1.12 Kg, 95A%)。根据 0.52 mmol/g 载荷量的 AcAA1-16OH 收率为 86%(注释 7)。

注释:

1. 向约 1 mL 丙酮中加入 1 滴氯醌的甲苯饱和溶液, 然后加入 1 滴流出物。出现蓝色或紫色表示存在吡啶。随着所述树脂床高度的增加, 将需要更大体积的 NMP 洗出吡啶。
2. 加入 DCM 保证所述树脂充分膨胀。
3. 定量茚三酮试验足以检测偶合效率。取出 2-20 mg 树脂样品用甲醇洗净。向该样品中加入 3 滴 76% 苯酚的乙醇、4 滴 0.2 mM KCN 的吡啶和 3 滴 0.28 M 茚三酮的乙醇。用乙醇稀释该溶液至 0.5-1 mL, 并将该溶液置于 75°C 的加热块中 5-10 分钟。蓝色或紫色表示存在游离胺(阳性)。澄明或淡蓝色为阴性结果。 Protocol for Quantitative Ninhydrin Test References: Sarin, V. K., Kent, S. B. H., Tam, J. P., & Merrifield, R. B. (1981) *Analytical Biochem.* iii, 147-157.
4. 如果所述树脂将储存过夜, 用 2×5 体积 NMP 洗涤, 排干并在氮气下储存。不能储存在 DCM 下。这可使所述肽从树脂裂解和导致明显的重量减轻。
5. 在 254 nm 经 TLC 显色测量各个流分的产物含量。在开始的 5 份

洗出液中去除了主要产物。

6. 随着 DCM 的去除, 所述反应物呈糖稀(marshmallow cream)稠度。随着继续蒸馏, 所述悬浮液逐渐成为固体淤浆。重要的是缓慢去除 DCM 以避免产物油的流出。
7. Vydac C8, 5 μ , 300A
1 mL/min, 30 $^{\circ}$ C, 230 nm
A 1000: 1 水/TFA
B 800: 200: 1 IPA: ACN: TFA
60-95%B/30 分钟
保留时间: 13.1 分钟

11.3 大规模制备片段 FmocAA (17-26) -OH (片段 10b)

在两次相同规模的运行中, 由 2.4 Kg FmocLeuO-树脂制备的 FmocAA17-26O-树脂总量为 5.3 Kg。在四次相同规模的运行中由树脂裂解 5.3 Kg FmocLeuO-树脂, 获得 3.184 Kg FmocAA17-26OH, 平均纯度为 94.4A%, 收率为 90%。

采用 1.5 当量相对于载荷系数的各种氨基酸进行所述反应, 导致对于每个偶合循环使用 65%过量氨基酸。所有偶合反应在 2 小时内完成(茚三酮试验阴性)。

用 20%吡啶的 NMP(5 体积)去除 Fmoc 保护基团 20 分钟, 重复该过程。用 5 \times 5 体积 NMP 洗涤液使吡啶从树脂洗出。在 8 体积 3: 1 NMP: DCM 中进行偶合反应。排干偶合溶液, 用 3 \times 5 体积 NMP 洗涤液洗净所述固体。用序列中的下一个氨基酸重复该循环。完成所述片段时, 用 2 \times 5 体积 NMP、5 \times 5 体积 DCM 洗涤树脂床, 并干燥至恒重。

用数份 1%TFA 的 DCM 洗涤液从所述树脂去除所述片段。不必冷却 1%TFA 的 DCM 溶液, 因为该片段在 1%TFA/DCM (1%/天)中的稳定性较 AcAA1-16OH 高得多。当收集含有产物的酸性 DCM 洗

出液时, 用吡啶对其进行中和。蒸馏合并的洗出液去除 DCM, 加入乙醇以保持溶液以及在蒸馏期间驱除残留的 DCM。在去除 DCM(由去除的馏出液的温度升高决定)后, 加入水沉淀所述片段。真空过滤(少于 60 分钟)收集固体。将仍然潮湿的固体转移回反应器, 用 80/20 乙醇/水(5 体积)在 0-5 °C 研制 60 分钟。真空过滤收集所沉淀的 FmocAA17-26OH, 用最少量 80/20 乙醇/水洗涤并干燥(真空, 不加热, 10 天)。

11.3.1 大规模制备片段 FmocAA (17-26)-OH (片段 10b)的优选方法

在 40 L SPPS 反应室中加入 FmocLeuO-树脂(1.2 Kg, 0.776 摩尔), 然后加入 DCM(5 体积)以膨胀所述树脂。需要 DCM 保证干燥的原料树脂完全膨胀。搅拌悬浮液 20-30 分钟, 排干。加入 20%吡啶的 NMP 溶液(5 体积), 搅拌该溶液 20 分钟。排干所述溶剂, 重复所述过程。排干溶剂, 用 5×5 体积 NMP 洗涤树脂, 以去除吡啶(注释 1)。

去保护时, 在机械搅拌下在 20 L 圆底烧瓶中加入所述序列中的下一个氨基酸(1.95 eq)、HOBt (1.95 eq)、DIEA (1.95 eq)和 NMP (6 体积)。搅拌溶液直至固体溶解, 然后冷却至 0-5 °C 并加入 HBTU (1.95 eq)。搅拌溶液直至 HBTU 溶解或所述树脂不含吡啶(无论哪个均是首要的), 然后加入到所述树脂中。用 DCM (2 体积)洗涤反应器, 将该反应转移到 SPPS 反应器。注意: 氨基酸和试剂的化学计量应为 1.5 eq。

将所述树脂悬浮于偶合溶液中并轻轻搅拌。2 小时后, 从 SPPS 反应室取出树脂样品, 进行定性茚三酮试验(注释 2)。如果茚三酮试验阴性, 则排干反应器, 用 3×5 体积 NMP 洗涤, 用所述序列中的下一个氨基酸重复该循环(DCM 膨胀仅用于加载第一个氨基酸序列)。

如果所述茚三酮试验阳性, 再搅拌所述悬浮液 1 小时, 并再测试。如果茚三酮试验阴性, 则进行下一个循环。如果茚三酮试验仍然阳性, 则用 1 当量所述氨基酸和试剂再偶合。如果 1 小时后茚三

酮试验阳性，则用 5 当量乙酸酐和 5 当量吡啶的 NMP(10 体积)封端 1 小时。

在完成所述片段合成时，排干树脂，用 2×5 体积 NMP、5×5 体积 DCM 洗涤，干燥获得 2.67 Kg FmocAA17-26O-树脂。

用 5-6×1.7 体积 1%TFA 的 DCM 从树脂(1.33 Kg)裂解 FmocAA17-26OH，每次 5 分钟。将 1%TFA/DCM 洗出液收集在含有吡啶(在所述洗出液中与 TFA 的体积比为 1: 1)的烧瓶中。合并含有产物的洗出液(约 14 L)，蒸馏去除 DCM 至最小罐体积(约 1/3 原体积)。调节真空以维持罐温度于 15-25℃。加入乙醇(6.5 体积)，继续蒸馏直到去除 DCM 为止(根据馏出液的温度确定，注释 3)。再调节真空维持罐温度于 15-20℃。终罐体积应该为约 8-10 体积。将溶液冷却至 5-10℃，在 30 分钟内加入水(6.5 体积)沉淀 FmocAA17-25OH。真空过滤收集固体，用水(2-3 体积)洗涤。为了去除残余吡啶和/或盐，将仍然潮湿的固体返回反应器，加入预冷至 0℃的 80/20 乙醇/水(5 体积)。在 0℃搅拌悬浮液 60 分钟，真空过滤收集固体，用最小量 80/20 乙醇/水洗涤，干燥至恒重，获得 0.806 Kg FmocAA17-26OH，收率 90.6%，96A%纯(注释 4)。

注释:

1. 向 1 mL 丙酮中加入 1 滴氯醌的甲苯饱和溶液，然后加入 1 滴流出物。出现蓝色或紫色表示存在吡啶。
2. 定量茚三酮试验足以检测偶合效率。取出 2-20 mg 树脂样品用甲醇洗净。向该样品中加入 3 滴 76%苯酚的乙醇、4 滴 0.2 mM KCN 的吡啶和 3 滴 0.28 M 茚三酮的乙醇。用乙醇稀释该溶液至 0.5-1 mL，并将该溶液置于 75℃的加热块中 5-10 分钟。出现蓝色或紫色表示存在游离胺(阳性)。澄明或淡蓝色为阴性结果。
3. 在真空蒸馏 DCM 期间的头馏分温度为 10-15℃。当去除 DCM 时头馏分温度升高至 35℃。

4. Vydac C8, 5 μ , 300A
1 mL/min, 262 nm, 30 $^{\circ}$ C
A 1000:1 水/0.1%TFA
B ACN/0.1% TFA
80-99%B/20 分钟
保留时间: 15.2 分钟

11.4 大规模制备片段 Fmoc-AA (27-35)-OH (片段 16b)

由 4.45 Kg FmocTrp (Boc) O-树脂合成 FmocAA27-35OH 总计 4.694 Kg。分两批进行固相合成，从所述树脂裂解为 4 批。由一批产生的 FmocAA27-35OH 纯度较另一批获得的物质低约 5%。这是因为未鉴定的 5A%杂质，该杂质在对 FmocAA17-36NH₂ 的加工过程中去除。装载到树脂上的 FmocTrp (Boc)OH 总量为 2.5 摩尔。按预期的约 63%的树脂载荷量进行固相合成。所有的偶合反应在第一个 2 小时检测点完成。所述反应和用于 SPPS 的冲洗体积和裂解与在合成 FmocAA17-26OH 中使用的相同。如上所述从所述树脂裂解。快速过滤(15 分钟)。90/10 乙醇/水研制后干燥固体需要 3 天(真空, 不加热)。所述片段在 40 $^{\circ}$ C 干燥是稳定的。

11.4.1 大规模制备片段 Ac-AA (27-35)-OH (片段 16b)

的优选方法

向含有 FmocTrp (Boc)-树脂(1 eq, 2.2 Kg, 1.23 摩尔)的 SPPS 室加入 DCM(5 体积)。搅拌悬浮液 15 分钟并排干。加入 20%吡啶的 NMP 溶液(5 体积)，搅拌悬浮液 10-15 分钟，以去除 Fmoc 保护基团。重复该过程，用 5-7 \times NMP (5 体积)洗涤树脂至氯醌试验阴性(注释 1)。

将后续氨基酸(1.5 eq)、HOBT (1.5 eq)和 DIEA (1.7 eq)合并并在 NMP (6 体积)中，然后冷却至 0-5 $^{\circ}$ C(注释 2)。加入 HBTU，搅拌溶解溶液 10-15 分钟。将活化氨基酸溶液加入所述树脂。用 DCM (2 体积)

洗涤反应器，然后加入到所述树脂(注释 3)。在氮气氛下搅拌悬浮液 1-2 小时。用定性茚三酮试验监测偶合完成情况(注释 4)。如果茚三酮试验阴性，则排干容器，用 3×5 体积 NMP 洗涤，用所述序列中的下一个氨基酸重复该循环(所述 DCM 膨胀仅用于装载第一个氨基酸)。

如果茚三酮试验阳性，则再搅拌悬浮液 1 小时，并再测试。如果茚三酮试验阴性，则进行下一个循环。如果茚三酮试验仍然阳性，再与 1 当量所述氨基酸和试剂偶合。如果茚三酮试验在 1 小时后为阳性，则用 5 当量乙酸酐和 5 当量吡啶的 NMP (10 体积)封端 1 小时。

在完成所述片段合成时，排干树脂，用 2×5 体积 NMP、5×5 体积 DCM 洗涤，干燥获得 4.11 Kg FmocAA27-35O-树脂。

用 6×1.7 体积 1%TFA 的 DCM 从树脂(2.05 Kg)裂解所述片段，每次 5 分钟。将 1%TFA/DCM 洗出液收集在含有吡啶(在所述洗出液中与 TFA 的体积比为 1: 1)的烧瓶中。合并含有产物的洗出液，蒸馏(调节真空以维持罐温度于约 15℃)去除 DCM 至约原罐体积的一半。逐渐加入乙醇(5 体积)，继续蒸馏(调节真空以维持罐温度于 20℃)直到去除 DCM 为止(根据馏出液的温度确定，注释 5)。罐体积应该为约 6-7 体积。将混浊溶液冷却至 10-15℃，在 30 分钟内加入水(3.5 体积)并快速搅拌，以沉淀 FmocAA27-35OH。真空过滤收集固体(15 分钟)，用水(1 体积)洗涤。为了去除残余吡啶，将潮湿的固体返回反应器，加入预冷至 0℃的 90/10 乙醇/水(10 体积)。在 0-5℃搅拌淤浆 60 分钟，真空过滤收集固体，用 90/10 乙醇/水(0.5 体积)洗涤，干燥至恒重，获得 1.19 Kg FmocAA27-35OH，收率 89%，89.2 A%纯(注释 6)。

可通过用 15 体积 9: 1 乙醇/水研制所述固体并搅拌 12 小时，然后收集及干燥，再实施此方案。

注释:

1. 向 1 mL 丙酮中加入 1 滴氯醌的甲苯饱和溶液, 然后加入 1 滴流出物。出现蓝色或紫色表示存在哌啶。
2. 在室温下加入较少量的试剂 HBTU 以促进溶解。将 HBTU 加入预冷的溶液以使外消旋作用最小。
3. 在 NMP 中进行活化, 因为 HBTU 在 DCM 中不溶解。DCM 用来洗涤反应器, 并加入树脂以保持树脂充分膨胀。
4. 定量茚三酮试验足以检测偶合效率。取出 2-20 mg 树脂样品用甲醇洗净。向该样品中加入 3 滴 76% 苯酚的乙醇、4 滴 0.2 mM KCN 的吡啶和 3 滴 0.28 M 茚三酮的乙醇。用乙醇稀释该溶液至 0.5-1 mL, 并将该溶液置于 75°C 的加热块中 5-10 分钟。蓝色或紫色表示存在游离胺(阳性)。澄清或淡蓝色为阴性结果。
5. 在真空蒸馏 DCM 期间的头馏分温度为 10-15°C。当去除 DCM 时头馏分温度升高至 35°C。
6. Vydac C8, 5 μ , 300A
1 mL/min, 262 nm, 30°C
A 水/0.1% TFA
B ACN/0.1% TFA
80-99%B/20 分钟
保留时间: 15.3 分钟

11.5 通过液相偶合 FmocAA (27-35)-OH 与 HPheNH₂**大规模制备片段 FmocAA (27-36)-OH**

在四次运行中由 4.676 Kg FmocAA27-35OH 制备 FmocAA27-36NH₂ 总计 5.226 Kg。残留偶合试剂或溶剂使收率大于 100%。将其在下一阶段中除去。

在该阶段中在水排泄后固体粘着在反应器壁上被认为是一个重要问题。真空过滤分离粗制固体需要 30 分钟。对于所述操作平均干

燥时间(真空, 不加热)为 8 天。需要对在滤器上的所述固体加压, 以在过量的水进入烘炉前将其除去。所述片段在 40℃干燥是稳定的, 真空烘炉需要加热。

用各批原料在 0.5-1 g 规模进行使用试验, 用来帮助确定质量和均一性。薄层色谱法(TCL)和 HPLC 用来监测原料向产物的转化。在片段 FmocAA27-35OH 中发现的主要杂质是三氟乙酸(或其盐)。在 FmocAA27-35OH 中存在的三氟乙酸与苯丙氨酸酰胺的活化和反应是一个快速过程。少量苯丙氨酸酰胺可用来消耗存在的任何三氟乙酸。更重要的是关于所购买的苯丙氨酸酰胺的质量问题。大多数销售商销售其盐酸盐。几批苯丙氨酸酰胺盐酸盐产生在 HPLC 上与原料共洗脱的杂质(5-15A%)。可用 TLC 从原料及产物分离杂质。所述杂质为由存在于苯丙氨酸酰胺的盐酸盐中的氯化铵产生的 FmocAA27-35NH₂。

11.5.1 通过液相偶合 FmocAA (27-35)-OH 与 HPheNH₂

大规模制备片段 FmocAA (27-36)-OH

向具有机械搅拌器的 40 L 夹套式反应器中加入 FmocAA27-35OH (1 eq, 1.185 Kg)、HOAT (1.1 eq)、盐酸 HPheNH₂ (1.15 eq)和 DMF (12.5 体积)。加入 DIEA (2.1 eq), 将溶液冷却至 0-5℃, 加入 HBTU (1.2 eq)。在 0-5℃下搅拌反应混合物 15 分钟, 然后温热至室温, 再搅拌 70 分钟(注释 1, HPLC 用于生产控制)。在用 HPLC 判定反应完成后, 在 15-30 分钟内加入水(12.5 体积), 以沉淀肽。在室温下搅拌淤浆 15 分钟。真空过滤收集固体, 用水(3 体积)洗涤, 干燥获得 FmocAA27-36NH₂ (1.357 Kg, 收率 107%, 87.1A% HPLC 纯(注释 2))。

可通过用 15 体积 9: 1 乙腈/水研制所述固体并搅拌 12 小时, 收集以及干燥, 再次加工所述反应物。

注释:

1. 生产过程控制, TLC:

88/12 二氯甲烷/甲醇

UV, 碘检测

Rf: Fmoc AA27-35OH, 0.49

Rf: FmocAA27-36NH₂, 0.63

Vydac C8, 5 m, 300A

30°C, 1mL/min, 262 nm

A 水/0.1% TFA

B ACN/0.15 TFA

80-99% B/20 分钟

保留时间: FmocAA27-35OH, 15.8

保留时间: FmocAA27-36NH₂, 17.12

2. 除非所分离的固体返回反应器并用水研制, 否则一般获得的收率较理论值高。

11.6 由 FmocAA (27-36)-OH 大规模制备片段 HAA (27-36)-OH

在平均 2 步收率 86.4%的四次运行中由 5.221 Kg FmocAA27-36NH₂ 制备 HAA27-36NH₂ 总计 3.897 Kg。对所述运行观测到的收率为 74-97%，推测它反映从一次操作转入下一操作步骤。

在该阶段的处理及产品分离运行得非常好。如果在 MTBE 中留有适当量的 DCM, 则可以增强所述产物的纯化, 所述固体的物理特性使得快速过滤和干燥。该产物分离过程已经加入下文 11.6.2 部分中所述的新阶段。

DCM 是在对 FmocAA27-36NH₂ 去保护过程中用的溶剂。完成所述去保护时, 用水洗涤有机溶液两次以去除大部分过量吡啶, 然后浓缩至 1/3 原体积。加入 MTBE 沉淀所述片段。继续蒸馏去除大部分残留 DCM 并结束沉淀所述片段。重要的是去除大部分 DCM, 以

避免在沉淀中的重量损失。此外，重要的是留下部分 DCM 在 MTBE 中，以保证产物提纯。二苯并富烯、哌啶/富烯加合物和残留的哌啶可溶于 MTBE。收集并干燥 HAA27-36NH₂。必要时，用 MTBE 第二次研制所述固体(12 小时)去除可存在于 HAA27-36NH₂ 中的残留二苯并富烯和更重要的哌啶/富烯加合物。用己烷研制可去除二苯并富烯但是不会去除哌啶/富烯加合物。从 MTBE 分离固体的干燥时间为 1 天。

因为 HAA27-36NH₂ 和相关杂质在 DCM/MTBE 中的高溶解性，所以需要分析方法来准确检测溶剂交换的终点。已经开发 GC 法分析 MTBE 中的 DCM。当在 MTBE 中的 DCM 含量低于 6%时结束蒸馏。

11.6.1 由 FmocAA (27-36)-OH 大规模制备

片段 HAA(27-36)-OH

向配有机机械搅拌器和温度计的 40 L 玻璃夹套式反应器中加入 FmocAA27-36NH₂ (1 eq, 1.356 Kg)、DCM (5 体积)和哌啶(0.2 体积)。在环境温度下搅拌溶液 1.5 小时(注释 1)。用(2×5 体积)水洗涤有机溶液。通过蒸馏(约 25 mmHg, 夹套温度低于 45℃以避免固体融化)使有机层体积减少至 1/3 原体积。逐渐加入 MTBE(5 体积)至反应容器中，同时继续浓缩至出现大量沉淀而且所述罐体约 5 体积时为止。当 DCM 含量低于 6%时停止溶剂交换。将淤浆冷却至 0-5℃，搅拌 60 分钟，然后真空过滤收集(快速)。用 MTBE(2×0.5 体积)洗涤固体并干燥至恒重，获得 1.022 Kg HAA27-36NH₂，收率 89.2%(2 步)，91.1A% 纯(注释 1)。

可通过用 MTBE(12.5 体积)在 23℃下研制 13 小时，然后真空过滤收集并干燥，再次加工所述反应物。

注释:

1. 用 HPLC 进行生产过程的检测(IPC)和纯度检测

Vydac, C8, 5, 300A

1 mL/min, 262 nm, 30°C

A 水/0.1% TFA

B ACN/0.1% TFA

80-99%B/20 分钟

保留时间: FmocAA27-36NH₂, 16.5; HAA27-36NH₂, 8.4.

11.6.2 通过液相偶合 FmocAA (27-36)-OH 和 HPhNH₂

改进制备片段 HAA (27-36)-OH

开发了组合 11.5-11.6.1 部分、直接采用 FmocAA27-35OH 至 HAA27-36NH₂ 的新方法。该新方法消除了与分离 FmocAA27-36NH₂ 和干燥时间长有关的问题。以下进行详细描述。新方法去除了所述合成途径中的长干燥时间和分段。

向具有磁性搅拌器和氮气入口的 100 mL 圆底烧瓶中加入 FmocAA27-35OH (5.0 g, 1 eq)、HOAT (0.459, 1.2 eq) 和 Phe-NH₂ (0.389, 1.2 eq)。向所述烧瓶加入 10 体积 NMP (50 mL) 和 DIEA (0.45 g, 1.5 eq)，并在氮气氛下搅拌直到固体溶解为止。将溶液冷却至 0-5°C，然后加入 HBTU (1.04 g, 1.2 eq)。在 0-5°C 的氮气氛下搅拌 30 分钟。将反应混合物温热至 20°C 并继续搅拌。加入 HBTU 后 90 分钟进行操作过程的检测(IPC)(注释 1)。

在所述操作过程的检测(IPC)表明反应完成时，加入哌啶(1.379, 7 eq)至反应混合物中，在氮气氛下搅拌 1.5 小时。进行 IPC (注释 1)。如果 Fmoc 去除完成时，再搅拌 30 分钟并进行 IPC。

结束时在不超过 35°C 的条件下，将反应混合物以一定比率加入到 5% 乙酸水溶液(30 体积)中。搅拌所生成淤浆 1-2 小时，真空过滤收集(注释 2)。用 10 体积(50 mL)水洗涤固体。

将潮湿的固体返回所述反应器中，加入 20 体积水(100 mL)，在环境温度下搅拌 1-2 小时。真空过滤收集固体，用 10 体积水(50 mL)

洗涤并干燥(注释 3)。

用 MTBE(20 体积)在环境温度下研制所述干燥(注释 4)固体 2-5 小时, 以去除二苯并富烯和二苯并富烯哌啶加合物。真空过滤收集固体并干燥至恒重, 获得 4.55 g (94.3%) HAA27-36NH₂, 85-90A%纯(注释 1)。

在该方法中一般性除去 Fmoc 副产物(二苯并富烯和其哌啶加合物), 然而如果有必要重复加工, 则于 20°C 在 10 体积 MTBE 中搅拌所述固体 2-3 小时, 然后收集并干燥。

注释:

1. 用反相 HPLC 进行操作过程的检测:

柱: Vydac C8, 300A, 5 μ , 30°C

流速: 1 mL/min

检测: UV, 262 nm

流动相: A. 水/0.1% TFA

B. 乙腈/0.1% TFA

方法: 在 20 分钟内 80-99%B

保留时间:

FmocAA27-36NH₂ (16.5 min). HAA27-36NH₂ (8.4 min)

2. 总过滤时间为 10 分钟。

3. 潮湿的过滤饼必须返回反应器, 用水立即进行洗涤, 避免所述固体的油化或胶化。

4. 所述粗产物必须彻底干燥, 以保证 MTBE 研制除去二苯并富烯副产物。

11.7 通过液相合成融合 FmocAA (17-26)-OH 与 HAA (27-36)-OH

大规模制备片段 FmocAA (17-36)-OH

在四次运行中由 2.993 Kg HAA27-36NH₂ 和 3.176 Kg

FmocAA17-26OH 制备 FmocAA17-36NH₂ 总计 5.115 Kg。平均收率 84.3%。在水从反应混合物流出后过滤粗品固体平均需要 40-50 分钟。

在 1-2 g 规模进行使用试验，测试在进行偶合反应之前将使用的片段和 HBTU。根据使用试验确定原料和试剂的化学计量。在使用试验中还要记录下原料的溶解性。浑浊溶液可表示在 FmocAA17-26OH 中存在盐，并成为用水对片段进行洗涤的根据。必不可少的是加入 HBTU 之前反应混合物中所有组分都确实在溶液中，以确保原料完全转化为产物并且外消旋化和副产物形成最少。

通过用 IPA 沉淀显著增加了从流出的水溶液中分离的粗品 FmocAA17-36NH₂ 的纯度。FmocAA17-36NH₂ 部分溶解于 IPA。用约 15 体积预温至 60-70°C 的 95/5 的 IPA/水研制 FmocAA17-36NH₂，然后搅拌并在数小时内冷却至室温，这可提高片段的纯度。FmocAA17-26OH 的原料以及哌啶酰胺和 HAA27-36NH₂ 的烯胺脲加合物可溶于 95% IPA。延长用 95% IPA 在室温下研制粗品 FmocAA17-36NH₂ 的时间对于去除杂质不那么有效。已在 60-70°C 完成稳定性研究。不把 IPA 溶液加热至 52°C 以上似乎对所分离的产物的质量影响最小。

11.7.1 改进通过液相合成融合 FmocAA (17-36)-OH

和 HAA (27-36)-OH 大规模制备

片段 FmocAA (17-36)-OH 的优选方法

向配有机械搅拌器和氮气入口的 40 L 夹套式反应器中加入 FmocAA17-26OH (1 eq., 0.770 Kg)、HAA27-36NH₂ (1 eq., 0.720 Kg)、HOAT (1.5 eq.) 和 DMF (12.5 相对于 FmocAA17-26OH 的体积)。加入 EtPr₂N (1.5 eq.) 并在室温下搅拌悬浮液直到固体溶解(肉眼观察)。将溶液在氮气氛下冷却至 0-5°C，加入 HBTU (1-1.05 eq.)。在 0-5°C 搅拌反应混合物直到 HBTU 溶解(肉眼观察，约 15 分钟)。将反应混合物温热至 25°C 并搅拌 2 小时(注释 1)。将 DMF 溶液冷却至 0-5°C，加入

冷冻工艺水(12.5 体积), 其加入速率使得溶液温度不超过 25℃。搅拌所得的淤浆 1-24 小时, 真空过滤收集固体并用水(3×4 体积)洗涤。在滤膜上干燥固体 16-24 小时至约 2 倍理论重量。将 95/5 异丙醇/水(25 体积)加入所述 40 L 反应器并温热至 45℃。快速搅拌下将半干燥的 FmocAA17-36NH₂ 加入到所述 IPA 溶液。将该悬浮液温热至 52℃, 然后搅拌 12-16 小时同时冷却至室温(注释 2)。真空过滤收集固体, 用最少量 IPA 洗涤并干燥获得 1.261 Kg FmocAA17-36NH₂, 收率 85%, 90.SA% HPLC 纯(注释 1)。可通过重复所述 95/5 IPA/水的研制再加工所述反应物。

注释:

1. 生产过程控制和纯度, HPLC

Vydac C8, 5μ, 300A

1 mL/min, 262 nm, 30℃

A 水/0.1% TFA

B 80/20 IPA/ACN/0.1% TFA

60-95%B/20 分钟

保留时间: HAA27-36NH₂, 6.73 分钟

FmocAA17-26OH, 10.67 分钟

FmocAA17-36NH₂, 20.2 分钟

2. 在该温度 FmocAA17-36NH₂ 将不能完全溶解于该体积中。收集固体前, 停止搅拌并使固体沉淀。取出滤液样品并进行 HPLC 分析。如果滤液含有显著量 FmocAA17-36NH₂, 则在收集固体前冷却至 0℃。

11.8 由 FmocAA (17-36)-OH 大规模制备片段 HAA (17-36)-OH

在四次运行中由 5.112 Kg FmocAA17-36NH₂ 制备的 HAA17-36NH₂ 总量为 4.965 Kg。所述分离产量和 HPLC 痕量表示存在二苯并

富烯和可能的溶剂。由于用碳酸钾除去二苯并富烯而不是吡啶，因此存在的二苯并富烯将不影响下一步偶合反应，所以二苯并富烯的吡啶加合物在化学上不是问题。

存在数个与该过程有关的问题。在 12 体积 DMF 中进行该反应。除去 Fmoc 基团的碱是 1 体积 1.1 M 碳酸钾，碳酸钾不能与二苯并富烯形成难于除去的碱加合物。于室温下在约 90 分钟内进行去保护。

加入预冷至 0°C 的 1: 1 饱和氯化钠水溶液: 水的溶液，以共沉淀所述片段和二苯并富烯。产生需要数小时(5-8)过滤的精细牛奶状固体。分离后必须完全干燥(低于 1% LOD)潮湿固体，以除去二苯并富烯杂质。干燥需要 10 天(真空，不加热)。干燥后，将所述固体返回所述反应器，用 3: 1 庚烷: MTBE (20 体积)在环境温度下研制 18 小时，以除去二苯并富烯。研制较短时间不能完全除去二苯并富烯，如果在所述固体上存在任意量的水，则不能除去二苯并富烯。如果二苯并富烯仍存在则可用 3: 1 庚烷: MTBE (20 体积)重复加工。

为了解决这些问题，开发以下新方法。将 FmocAA17-36NH₂ (2.0 g, 1eq.)和庚烷(8 体积)加入到配有磁性搅拌器、温度控制器和回流冷凝器的 100 mL 圆底烧瓶中。加入 2 体积 MTBE (4 mL)并将淤浆加热至 45-50°C(注释 1)。加入吡啶(10 eq.)。在 45-50°C 氮气氛下搅拌 24-36 小时(注释 2)。在 45-50°C 加热过滤所述反应混合物(注释 3)，然后用 5 体积(10 mL) 60: 40 庚烷: MTBE 洗涤滤饼。

注释:

1. 如果使 MTBE 逸出反应器，由此改变庚烷: MTBE 比，将使反应减慢，反应温度高于 50°C 可能使反应固体胶化。在 5 小时内主要去除 Fmoc。
2. 用反相 HPLC 监测反应完成情况:
柱: Vydac C8, 300A, 5 μ , 30°C
流速: 1 mL/min

检测: UV, 262 nm

流动相: A. 水/0.1% TFA

B. 80:20 IPA: ACN 0.1% TFA

方法: 在 30 分钟内 60-95%B

3. 热过滤帮助除去二苯并富烯的哌啶加合物。

11.8.1 由 FmocAA (17-36)-OH 大规模制备片段 HAA (17-36)-OH

在室温下将 FmocAA17-36NH₂ (1 eq, 1.26 Kg)和 DMF (12 体积)加入 40 L 夹套式反应器中。立即加入 1.11 M 碳酸钾水溶液(1 体积, 5 eq)(注释 1)。在室温下搅拌该反应混合物 3.5 小时(注释 2)。将反应混合物缓慢加至预冷至 0°C 的 1: 1 饱和氯化钠水溶液/水(10 体积)的溶液中(约 1-2 小时), 其加入速率使得溶液温度不超过 10°C。真空过滤收集固体, 用橡皮挡板将水从滤饼压出(注释 3)。将湿滤饼转移回反应容器, 并用水(10 体积)研制(搅拌)1-2 小时以除去残留无机盐。真空过滤收集固体, 用橡皮挡板挤压, 然后转移到真空烘箱干燥至恒重。用 3: 1 庚烷: MTBE (20 体积)在室温下研制所述干燥固体(注释 4)至少 14 小时, 以除去二苯并富烯。真空过滤收集固体, 用庚烷(2 体积)洗涤, 干燥获得 1.20 Kg HAA17-36NH₂, 收率 99.5%, 75A%纯。HAA17-36NH₂ 含有 5A%二苯并富烯。通过重复所述庚烷: MTBE 研制再加工所述反应物。

注释:

1. 当加入碳酸钾水溶液时溶液变浑浊, 但是继续搅拌又变澄清。注意温度升高 4-5°C。
2. HPLC 用于 IPC 和纯度测定
Vydac C8, 260 nm
1 mL/min, 262 nm, 30°C
A 水/0.1% TFA

B 80:20 IPA/乙腈/0.1% TFA

60-95%B/30 分钟

3. 产物沉淀为细颗粒，导致过滤缓慢。
4. 所述物质必须不含水以便庚烷有效除去二苯并富烯。

11.9 通过液相合成由 AcAA (1-16)-OH 和 FmocAA (17-36)-OH

大规模制备片段 AcAA (1-36)-OH

用 HOAT 和 DIEA 将 AcAA1-16OH 溶解于 DMF 中，冷却至 0 °C 并加入 HBTU。搅拌 15 分钟或直到 HBTU 溶解为止，然后加入 HAA17-36NH₂。在不存在 HAA17-36NH₂ 的情况下预活化 AcAA1-16OH 是一种保护措施，后来发现并不是必要的。此外，证明将 HAA17-36NH₂ 溶解入含有活化 AcAA1-16OH 的 0 °C DMF 溶液中在较大规模时速度缓慢。

在四次运行中由 3.92 Kg AcAA1-16OH 和 4.96 Kg HAA17-36NH₂ 制备的 AcAA1-36NH₂ 总量为 6.972 Kg，平均收率 80.1%。在此期间的两次操作平均收率为 87%，而另两次操作的平均收率为 73%。

在 1-2 g 规模进行使用试验，测试在进行偶合反应之前将使用的片段和 HBTU。根据使用试验确定原料和试剂的化学计量。在使用试验中还要记录下原料的溶解性。浑浊溶液可表示在 AcAA1-16OH 中存在盐，并成为用水对片段进行洗涤的依据。必不可少的是加入 HBTU 之前反应混合物中所有组分都确实存在于溶液中，以确保原料完全转化为产物并且外消旋化和副产物形成最少。

将片段 AcAA1-16OH 和 HAA17-36NH₂ 以及试剂 HOAT 和 DIEA 溶解于 DMF 中，冷却至 0 °C 并加入 HBTU。其中一次操作需要再加入等量的 DIEA 以拾取 HAA17-36NH₂ 上的 HCl。从所述反应混合物和水流出物(过滤时间 10 分钟)中分离粗品产物。将仍然潮湿的固体返回含有预温至 55 °C 的乙腈的反应器中，然后快速搅拌同时在 3 小时内冷却至 35 °C，然后冷却至 20 °C 过夜。将所述淤浆冷却至 0-5 °C，

再搅拌 1-2 小时，真空过滤收集固体。在该过程中，在 55℃ 下 AcAA1-36NH₂ 几乎成为溶液。随着溶液的冷却，AcAA1-36NH₂ 从溶液中沉淀出来(油)。随着溶液的冷却，所述油固化甚至成为精致的白色固体。在该变化过程中，大量固体可能沉集到反应器壁和搅拌轴上。其中大部分随着在 20℃ 搅拌淤浆过夜而脱落。收集固体后，将容器装以足量的水以淹没任何粘着在反应器或搅拌轴的固体。搅拌淤浆直到所有残留的固体均脱离反应器壁和搅拌轴(约 1 小时)，然后用作对所述滤饼的洗液。乙腈洗涤去除未反应的原料和任何截短的小于 20 个氨基酸的片段。

11.9.1 通过液相合成由 AcAA (1-16)-OH 和 FmocAA (17-36)-OH 大规模优选制备片段 AcAA (1-36)-OH

向反应器中加入 AcAA1-16OH (938 g, 1 eq)、HAA17-36NH₂ (1.19 Kg, 1eq)、HOAT (1 eq)、DMF (19 体积, 相对于 AcAA1-16OH)和 DIEA (1 eq)。搅拌淤浆直到固体溶解，然后冷却至 0-5℃ 并加入 HBTU (1.03 eq)。在 0-5℃ 搅拌溶液 15 分钟或直到固体溶解，温热至 20℃ 并搅拌 2 小时。取样反应混合物进行 IPC (注释 1)。当判定反应完成时，以使得溶液温度不超过 35℃ 的速率加入水(19 体积)(注释 2)。

搅拌淤浆 1-24 小时，然后真空过滤收集固体(10 分钟)，用水(2×3 体积)洗涤。挤压滤饼尽可能除去水。同时向反应器中加入 95%乙腈/水(30 体积, 相对于 AcAA1-16OH 装料)，搅拌下温热至 55℃。

分批将潮湿的固体加入反应器中以避免成块。搅拌淤浆，同时在 3 小时内冷却至 35℃，然后冷却至 20℃ 过夜。冷却至 0-5℃，搅拌 2 小时，停止搅拌并取样溶液。

真空过滤收集固体。用 90%乙腈/水(3.6 体积)洗涤反应器和管道(line)。

向反应器中加入足量水以淹没任何粘附在反应器壁或搅拌轴上的固体(约 30 体积)。在环境温度下搅拌直到固体不再粘附在反应器

壁和搅拌轴上(约 1 小时)。收集所述固体和其余部分并干燥至恒重 (1.83 Kg, 收率 86%)。

用 90/10 乙腈/水重复研制所述干燥固体。

注释:

1. IPC 和纯度测定, HPLC

YMC ODS-A, 150×4.6 mm, 5 μ , 120A

1 mL/min, 260 nm, 30°C

A 水/0.1% TFA

B THF/0.1% TFA

60-90%B/30 分钟, 90-95%B/1 分钟, 95%B/5 分钟。

AcAA1-16OH: 6.37 分钟

HAA17-36NH₂: 8.91 分钟

AcAA1-36NH₂: 18.07 分钟

2. 如果在加入水期间温度高于 35°C, 沉淀出的固体可能熔化, 导致成块和/或沉集在反应器壁上。

11.10 去保护 AcAA (1-36)-OH 的侧链

本实验的目的是在沉淀中改变 MTBE 加入速率, 以保持温度小于 20°C, 而且还分离并脱羧粗品 T-20 固体(即除去溶液脱羧作用)。

在加样到 HPLC 柱之前通过沉淀从 ACN/水分离粗品固体 T-20。用基于重量的 HPLC 分析检测所述固体的 T-20 百分含量。

在 90/5/5 TFA/水/二硫苏糖醇中除去侧链保护基后, 将溶液冷却至 0°C 并加入 MTBE (45 体积, 相对于 AcAA1-36NH₂ 装料)。这是保证完全沉淀 T-20 所需要的最小 MTBE 量。混合时温度升高, 最初的 5 体积必须缓慢加入以保持温度低于 20°C (约 60 分钟)。随着加入 MTBE 的增加, 加入速率可以加快。在沉淀期间保持温度低于 20°C 防止固体随着从溶液沉淀出来而发生成块。

目前的裂解/纯化方法包括在适应色谱纯化的规模进行去保护。将从去保护的混合物分离的粗品 T-20 的 TFA 盐溶解于 pH 5 乙腈/水中，过滤并静置 15 小时以实现色氨酸的脱羧。在脱羧完成后，稀释溶液并转移到纯化装置(purification suite)准备上柱。在稀释期间，所述溶液总是变成雾状，将该雾浊溶液泵入柱上。这使得固体沉积在柱的上端并在纯化进行期间逐渐消蚀柱效能。使 T-20 在 pH 5 的乙腈/水中脱羧数小时，以形成几乎不溶的聚集体。

已研制避免在溶液中脱羧的方法。将在室温真空下对从 MTBE 沉淀中作为 TFA 盐分离的粗品 T-20 进行脱羧 5-7 天。发现在 40°C 真空下 3 天后完成脱羧。所分离固体的 TFA 含量为 9%。所述物质可在 0°C 保存长至 1 个月，损失 1%(wt/wt)。

从 MTBE 分离 T-20-TFA 后可在乙醇/水(1: 9)与 HOAc 中进行盐交换。粗品 T-20 的乙酸盐明显更稳定并可优选。两种分离方法中的任何一种都将允许在较大规模进行侧链去保护，T-20 将不暴露于用于脱羧的乙腈/水/HOAc 条件，已知该条件引起聚集。

去保护 AcAA (1-36)OH 的侧链的新方法:

制备 90/5/5 TFA/水/二硫苏糖醇溶液(13 体积)并用氮气吹扫 3 分钟。在环境温度的氮气氛下将 AcAA1-36NH₂ 分批加入到 90/5/5 TFA/水/二硫苏糖醇(13 体积)中。一旦加入在溶液中，就在环境温度下搅拌 4 小时，然后冷却至 0°C。为了沉淀 T-20，缓慢滴加冷却至 0-5°C 的 MTBE (45 体积)，开始时将温度保持在 20°C 以下(加入时间约 1-2 小时)。真空过滤收集固体(注释 1)。立即用 3×5 体积 MTBE 洗涤反应器、管道和滤饼。取出固体，取样进行 t = 0 IPC (注释 2)，真空干燥 5 天或直到 HPLC 显示无变化。

注释:

1. 在该过滤过程中避免吸引空气通入所述固体，因为所述去保护溶液是吸湿性的。在洗出 TFA 溶液前吸引空气通入固体可产生粘

性或油性固体。

2. 采用 HPLC 法 TM2-0003-01 (TFA 法)。乙酸铵法(TM2-0006-01)不能分离各种羧化中间体。

去保护 AcAA (1-36)OH 的侧链

在 12 次运行中去保护的 AcAA1-36NH₂ 总量为 7.226 Kg。仅制得 6.972 Kg AcAA1-36NH₂，说明所述中间体是吸湿性的。将从 MTBE 流出物分离的固体溶解于 10 体积 1: 1 ACN/水中，过滤并用碳酸氢钠调节 pH 至 3.5。加入乙酸(1.5 体积%)(pH 4.5-5)，在环境温度下搅拌溶液 15 小时实现脱羧基作用。用 25 体积水稀释溶液获得总计为 40 体积的 85/15 水/ACN 溶液。在所有情况下该溶液均为浑浊液，而且在部分情况下出现精细固体(聚集的 T-20)。取样进行 IPC，将所述溶液转移到所述纯化装置。用 wt/wt HPLC 分析计算所述运行的粗品 T-20 产量。

在室温下在 90/5/5 TFA/水/DTT 中 4-5 小时后完成 AcAA1-36NH₂ 去保护。在 8 小时时已发生显著的降解(2%)。在 5℃ 在相同混合物中，在 8 小时时去保护未完成，而是在 23 小时完成去保护。在室温下 5 小时后与在 5℃ 下 23 小时所获得的粗品 T-20 的纯度无差别。因为分离体积(约 55 体积)较反应(去保护)体积(13 体积)大得多，所以必需将 AcAA1-36NH₂ 溶解在 20 L 坛中的 TFA 溶液中，然后将该溶液转移到 40 L 反应器中。

用 MTBE 沉淀达到从去保护混合物中分离粗品羧化型 T-20(为 TFA 盐)。沉淀所述肽需要的 MTBE 量 3-4 倍于去保护混合物的量。使用体积分两次(或更少)的 MTBE 的裂解混合物使肽沉淀。MTBE 加入所述裂解混合物使过滤固体容易，而把所述混合物加入 MTBE 产生难于过滤的精细沉淀。在 MTBE 加入 TFA 溶液期间温度从 5℃ 升高至 40-45℃。温度升高对所分离的粗品 T-20 的纯度没有影响(187/117, 119)。在加入 MTBE 期间有部分成块的固体。搅拌淤浆 1-

2 小时以分散所述团块。在 MTBE 加入期间将温度维持在 20°C 以下产生更好过滤的更均一的固体(196/31)。此后将控制加入 MTBE 速率。在氮气氛下过滤收集粗品 T-20。在洗出 TFA 之前,如果在过滤期间固体暴露于潮湿的空气,所述固体将变粘。洗出 TFA 后,所述固体对空气是稳定的。

操作方法:

在 20 L 坛中制备 90/5/5 TFA/水/二硫苏糖醇溶液(13 体积),然后用氮气吹扫 3 分钟。分批加入 AcAA1-36NH₂ (650 g)以防止成块。一旦所述固体在溶液中,将所述溶液转移到 70 L 反应器中。用最小量 90/5/5 TFA/水/二硫苏糖醇洗涤所述坛和管道。在环境温度下的氮气氛下搅拌溶液 4 小时,然后冷却至 0-5°C。以使内部温度低于 30°C 的速率加入 MTBE (45 体积)。在氮气流下真空过滤收集固体。用 2×2 体积 MTBE 洗涤反应器、管道和固体,干燥至恒重(594 g, 70A%)。

将所述固体(594 g)溶解于 50% ACN/水(8 体积,相对于 AcAA1-36NH₂ 装料)并过滤。用 50% ACN/水(2 体积)洗涤所述容器和管道。用碳酸氢钠调节溶液 pH 至 3.5-4.0,然后加入乙酸(0.18 体积)将 pH 调节至 4.9。在环境温度下搅拌溶液 15 小时(IPC, 注释 1),然后用 1 M 碳酸钾调节 pH 至 9-9.5。加入水(25 体积)稀释所述溶液成为 85/15 水/ACN。对生成的浑浊溶液取样进行 wt/wt HPLC 分析,并转移到所述纯化装置。

注释:

1. 方法 TM2-0003-01
2. 方法 TM2-0006-01

11.11 纯化 HAA (1-36)-OH

分为纯化、冷冻干燥和包装三个阶段:

$\%(\text{wt}/\text{wt}) = 100 - \text{杂质}\% - \text{乙酸盐}\% - \text{水}\% - \text{TFA}\%$ 。在各批中的乙酸盐含量为 6-8%。

从 6.97 Kg AcAA1-36NH₂ 分离的 T-20 总量为 2.08 Kg(净重)。这表示 AcAA1-36NH₂ 的产率为 49.3%。T-20 的色谱纯收率平均为 55%。单独运行的收率变化范围为 41-55%。最低的收率是因为柱或泵故障导致多次通过。一般来说, 如果采用色谱法, 收率范围为 50-55%。所分离的 T-20 的纯度为 93-95A%。

在纯化期间检查四个梯度, 是为了比较目的在于最小化操作时间的方法:

1. 15-22% ACN/60 分钟, 22-36% ACN/525 分钟, 330 mL/分钟。
2. 16-26% ACN/60 分钟, 26-40% ACN/525 分钟, 330 mL 分钟。
3. 第二个三联梯度(Second Trimeris gradient)。15-36% ACN/1788 分钟, 330 mL/分钟。
4. 原三联梯度(Original Trimeris gradient), 20-23% ACN/112 分钟, 23-36% ACN/488 分钟, 330 mL/分钟。

用 Amberchrom 树脂(35 cm 床高)填充(轴向压缩)20 厘米(cm)柱。在溶液中对各批 500-700 g AcAA1-36NH₂ 进行去保护和脱羧。该规模产生含有约 400 g 肽(约 75A% T-20)的柱原料。所述原料溶液通常是混浊的并可能含有悬浮固体。用 15%B 以 500 mL/min 将混浊溶液加样在柱上。对于任何操作在柱加样期间都没有压力产生。流速减少到 330 mL/min, 在指定的时间内运行特定梯度。收集流分, 合并含有超过 78%的 T-20 的流分(100-110L), 用水稀释使乙腈含量约 15-20%(约 140 L)。洗涤柱, 然后用 15% B 平衡。将含 T-20 的溶液以 900 mL/min 加样回所述 8 英寸柱上。所述%B 增加至 50%, 冲洗出柱的 T-20 约 25L。

将所述溶液在 1 L 钟罩中冷冻并冻干成粉。所分离的 T-20 通常为 92-94A% HPLC, 并含有 6-8%乙酸盐和 3-4%水。

优选方法:

将 T-20 的 85/15 水/乙腈溶液(27 L)(pH 9.2)以 500 mL/min 泵入 8 英寸 HPLC 柱。在 30 分钟内流速降低至 330 mL/min (每 5 分钟递增 30-40 mL/min)。开始线性梯度, 在 600 分钟内为 20%B-36%B。收集流分直到吸光度低于 0.2 AUFS 为止。用 HPLC(注释 1)分析流分中的含量。用 80%B 以 900 mL/min 洗涤柱 10 分钟, 然后降回至 15%B 并以 900 mL/min 平衡。合并含有 78A%以上的 T-20 的流分(113 L), 用缓冲液(28.2 L)稀释使所述乙腈浓度为 15-20%。以 900 mL/min 将溶液泵至所述柱上。%B 增至 50%, 以 900 mL/min 将 T-20 从所述柱洗脱出约 25L。T-20 浓度约为 9-10 mg/mL。将溶液转移至 1 L 冻干罐中, 冷冻并冻干获得 216.29 T-20, 收率 54.9%, 94.1A%纯。

注释:

1. 用 HPLC 分析流分的含量和纯度。

YMC ODS-A, 150×4.6 mm, 5 μ m, 120A

1 mL/min, 220 nm, 30 $^{\circ}$ C

A 70/30 50 mM NH₄OAc (pH 7, 用氢氧化铵调节): ACN

B 5:95 50 mM NH₄OAc (pH 7, 用氢氧化铵调节): ACN

0-15%B/50 分钟, 15-100%B/2 分钟, 100%B/3 分钟。

T-20 保留时间: 29.0 分钟

11.12 肽的热稳定性

进行一系列试验以特征鉴定所述中间体 T-20 片段的热稳定性。用水饱和 T-20 片段, 过滤, 然后置于密封容器中并暴露于高温。在数个时间点收集样品并用 HPLC 法分析获得纯度变化。用热解重量分析法(TGA)也可特征鉴定干燥 T-20 片段的稳定性。

除了 AcAA1-16OH 外所有片段均可以在 40 $^{\circ}$ C 干燥 3 天。只在两种片段 FmocAA27-35OH (3%)和 FmocAA27-36NH₂ (1.4%)中在 80 $^{\circ}$ C 24

小时后观察到一般程度的降解。片段 AcAA1-16OH 开始为 97A% 纯。在 40°C 3 天后，它为 93.4A% 纯并干燥。再在 80°C 24 小时后，它仍然为 93.9A%。应该在环境温度下干燥潮湿的 AcAA1-16OH。

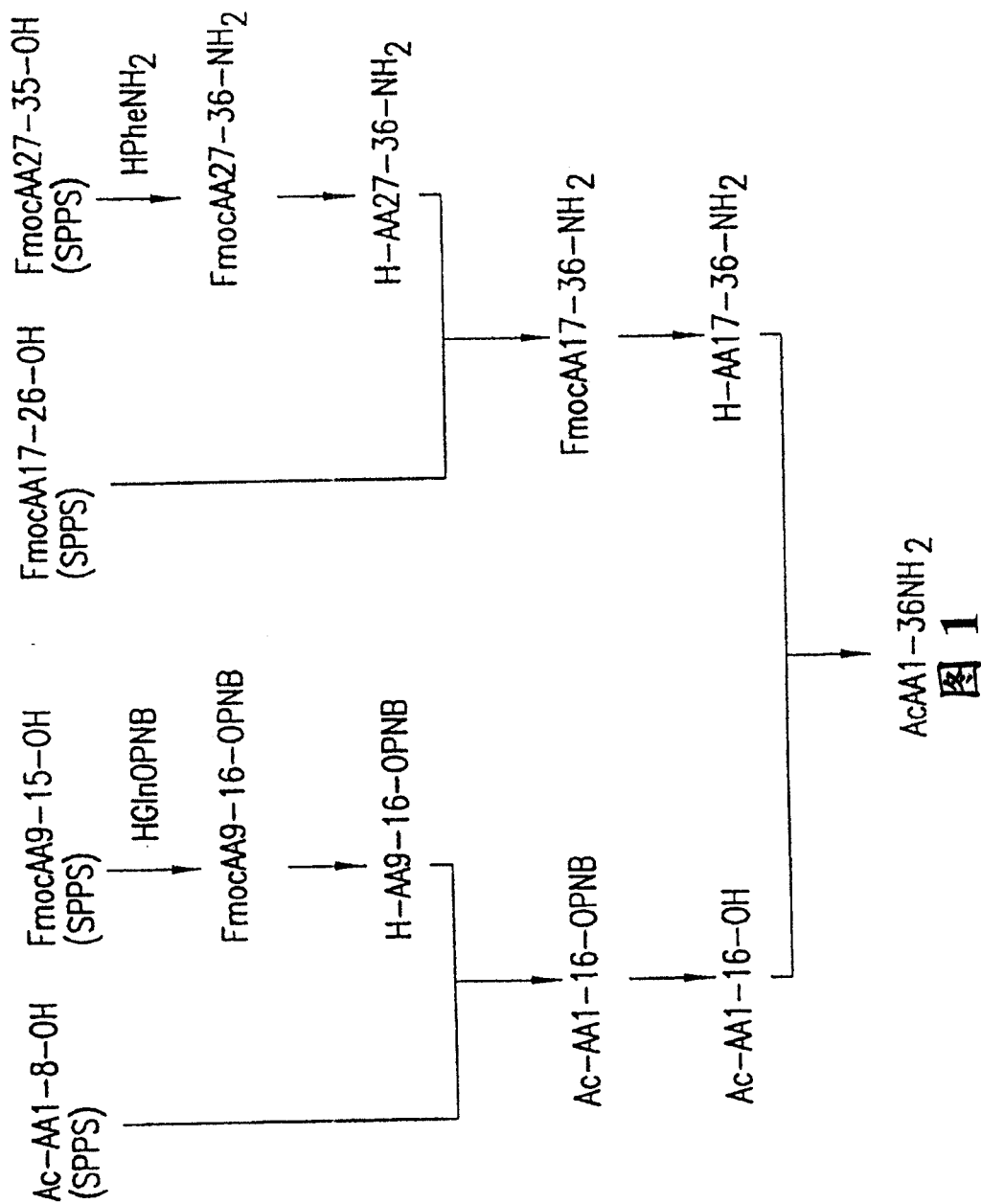
稳定性研究的目的是确定所述片段是否可在 40°C 而不是在环境温度下干燥。所述研究表明所述片段在 40°C 干燥是稳定的。这将显著降低干燥时间。

已完成在模拟其分离和纯化的不同溶剂和温度条件下检测片段 Ac(1-16)-OH、Fmoc(27-35)-OH、Fmoc(17-26)-OH、Fmoc(27-36)-NH₂、Fmoc(17-36)-NH₂、H(17-36)-NH₂ 和 Ac(1-36)-NH₂ 的研究。所有片段在其分离和/或纯化的溶剂体系中是稳定的，用 X 表示稳定性：

中间体	储存液	开始	时间			
			1 小时	6 小时	1 天	3 天
F(27-35)-OH	9: 1 EtOH: H ₂ O, 40 °C	X	X	X	X	X
F(17-26)-OH	80: 20 EtOH/H ₂ O, 40 °C	X	X	X	X	X
F(27-36)-NH ₂	1: 1 NMP/H ₂ O, 40 °C	X	X	X	X	X
Ac(1-16)-OH	0.01 M HCl, 5-10 °C	X	X	X	X	X
F(17-36)-NH ₂	95% IPA/H ₂ O, 60-65 °C	X	X	X	X	X
	50%H ₂ O/NMP, 50 °C	X	X	X	X	X
	90: 10 EtOH/H ₂ O, 40 °C	X	X	X	X	X
H(17-36)-NH ₂	1.5: 1 H ₂ O/DMF, 40 °C	X	X	X	X	X
Ac(1-36)-NH ₂	9: 1 CAN/H ₂ O, 50 °C	X	X	X	X	X
	50%H ₂ O/NMP, 50 °C	X	X	X	X	X
	85: 15 EtOH:H ₂ O, 70 °C	X	X	X	X	X

X = HPLC 含量和杂质、肉眼检测外观

本发明范围不限于本文所述的具体实施方案的范围，所述具体实施方案仅用来说明本发明的各个方面，而且作用上等同的方法和组分均属于本发明范围。实际上，根据以上的描述和附图，除了本文指明和描述的之外，对本发明进行的各种改进对本领域技术人员来说将是显而易见的。这类改进属于后附权利要求书范围。



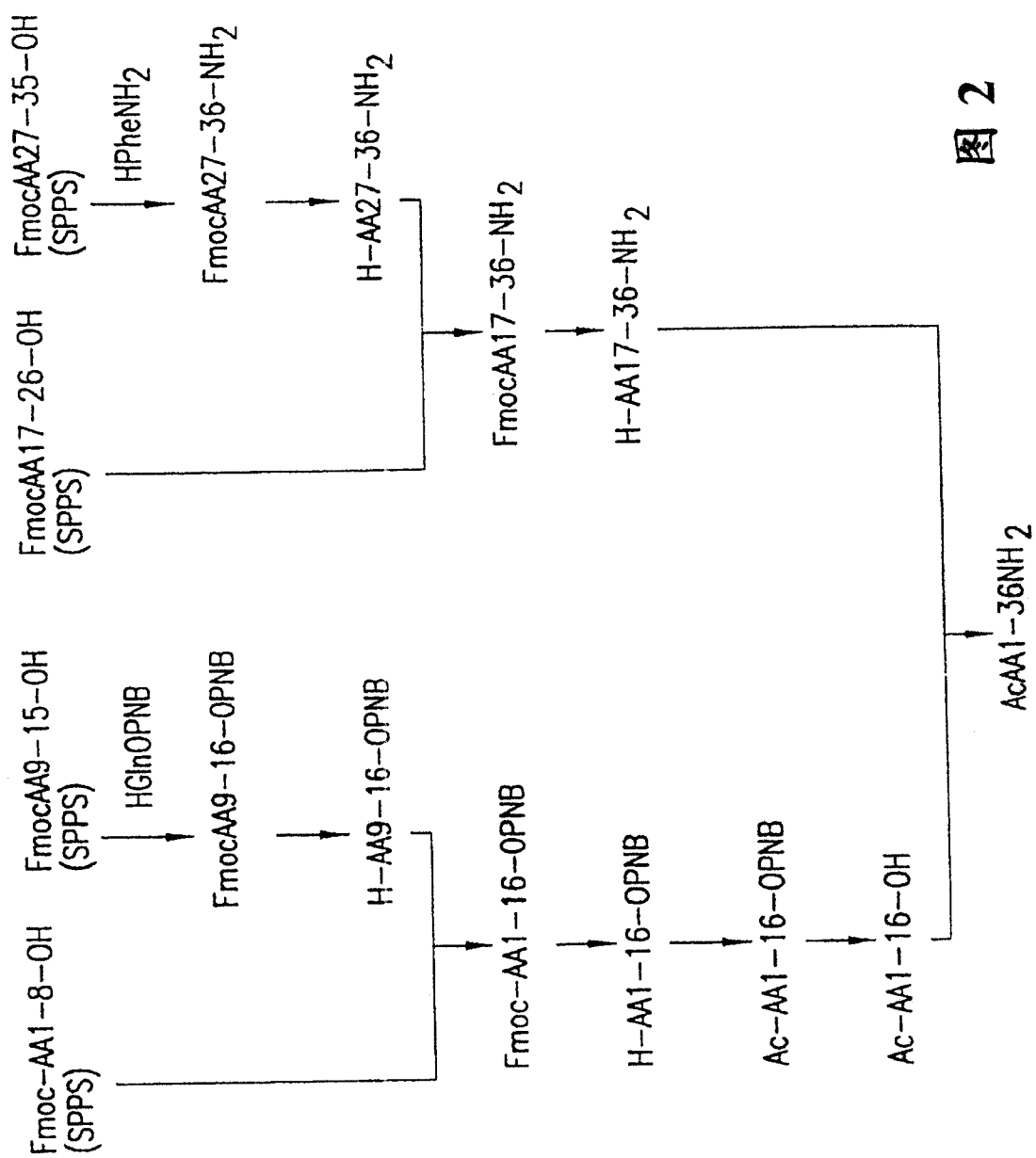


图 2

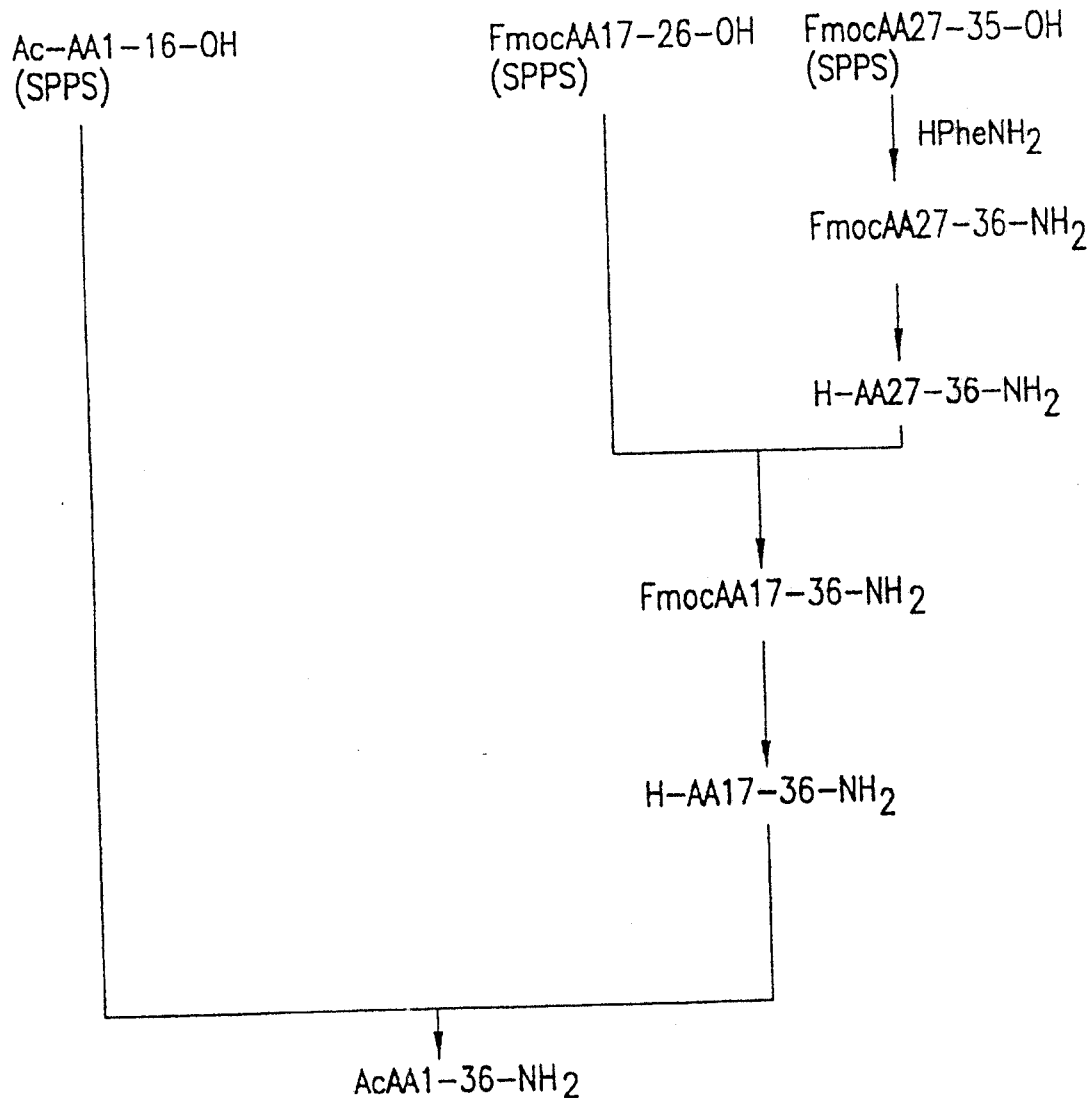


图 3

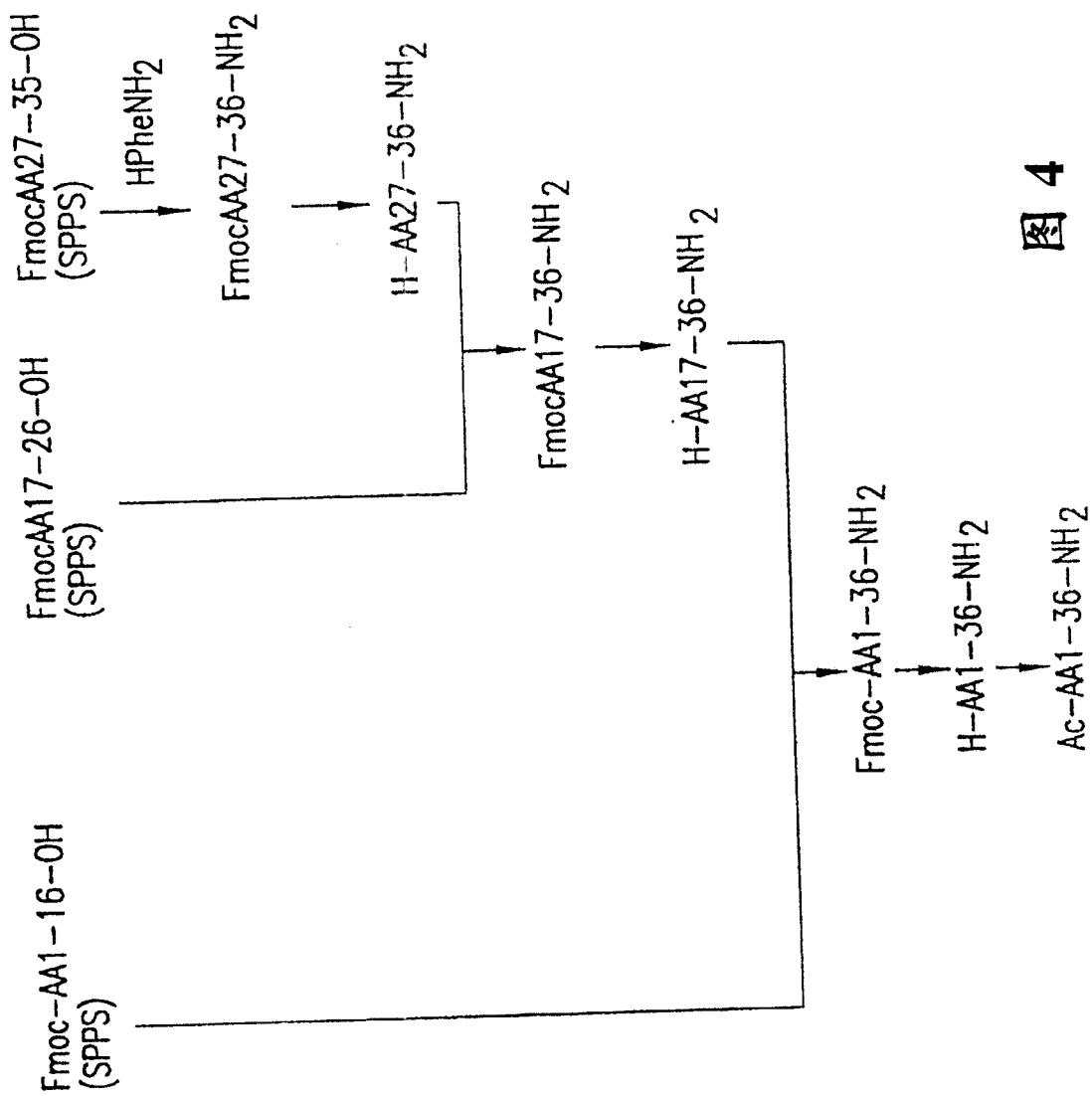


图 4

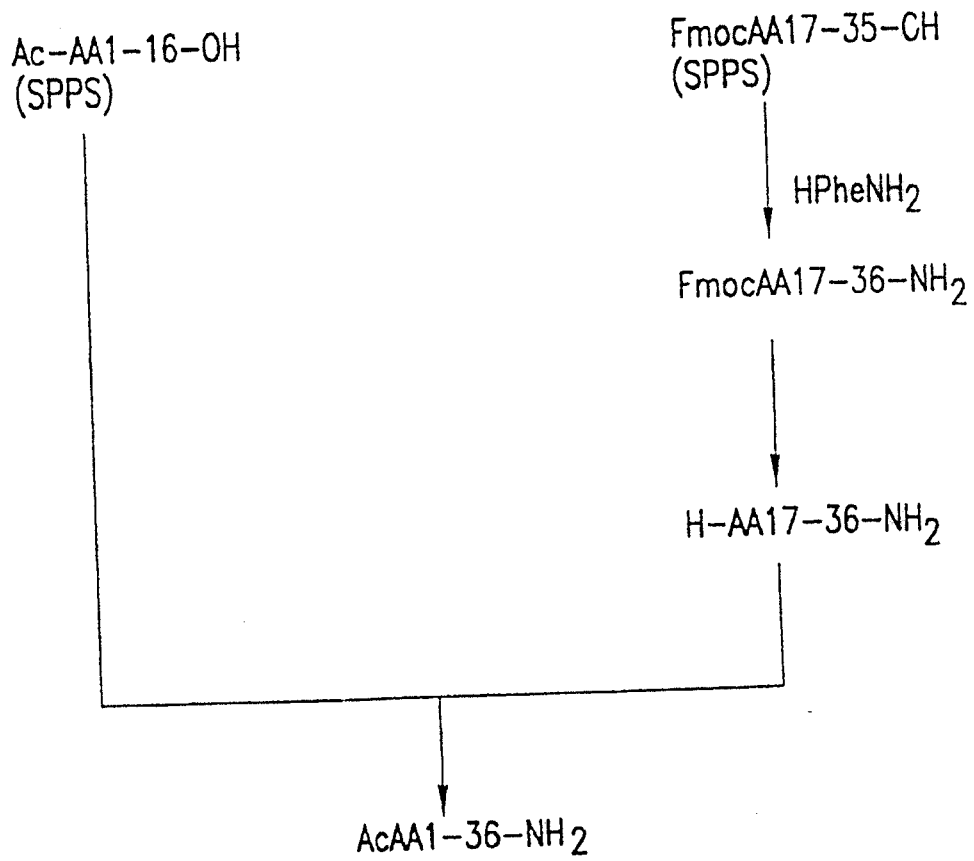


图 5