

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2020年6月25日 (25.06.2020)



(10) 国际公布号  
WO 2020/125045 A1

- (51) 国际专利分类号:  
C07K 5/103 (2006.01) C07K 1/06 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/101597
- (22) 国际申请日: 2019年8月20日 (20.08.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201811555690.1 2018年12月19日 (19.12.2018) CN
- (71) 申请人: 深圳翰宇药业股份有限公司 (HYBIO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园中区翰宇生物医药园办公大楼四层, Guangdong 518057 (CN)。
- (72) 发明人: 陈学明 (CHEN, Xue Ming); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园中区翰宇生物医药园办公大楼四层, Guangdong 518057 (CN)。林欣媛 (LIN, Xin Yuan); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园中区翰宇生物医药园办公大楼四层, Guangdong 518057 (CN)。宓鹏程 (MI, Peng Cheng); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园中区翰宇生物医药园办公大楼四层, Guangdong 518057 (CN)。陶安进 (TAO, An Jin); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园中区翰宇生物医药园办公大楼四层, Guangdong 518057 (CN)。袁建成 (YUAN, Jian Cheng); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园中区翰宇生物医药园办公大楼四层, Guangdong 518057 (CN)。
- (74) 代理人: 北京市诚辉律师事务所 (BEIJING CHENGHUI LAW FIRM); 中国北京市朝阳区朝阳北路99号楼2单元905, Beijing 100123 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条 (3))。

(54) Title: METHOD FOR SYNTHESIZING ROMIDEPSIN

(54) 发明名称: 一种罗米地辛的合成方法

(57) Abstract: Provided is a method for synthesizing romidepsin, comprising the following steps: 1) coupling a solid phase synthetic resin with Fmoc-L-Val-OH under the action of an activator to obtain an intermediate I; 2) according to an Fmoc solid phase synthesis strategy, sequentially using Fmoc-L-Thr-OH, Fmoc-D-Cys(R)-OH, Fmoc-D-Val-OH and (R)-3-tert-butoxy-7-mercapto-4-heptenoic acid in a one-by-one manner to perform polypeptide chain extension coupling to obtain an intermediate V; 3) removing the hydroxyl group on the L-Thr residue side chain of the intermediate V to form a double bond, so as to obtain an intermediate VI; 4) cracking the intermediate VI and removing the resin and side chain protecting groups, so as to obtain an intermediate VII; 5) oxidizing the intermediate VII to form an intramolecular disulfide bond, so as to obtain an intermediate VIII; and 6) subjecting the intermediate VIII to an intramolecular esterification reaction to obtain romidepsin.

(57) 摘要: 提供了一种罗米地辛的合成方法, 包括如下步骤: 1) 在活化剂的作用下, 将固相合成树脂与 Fmoc-L-Val-OH 偶联得到中间体 I; 2) 按照 Fmoc 固相合成策略, 依次逐个将 Fmoc-L-Thr-OH、Fmoc-D-Cys(R)-OH、Fmoc-D-Val-OH、(R)-3-叔丁氧基-7-巯基-4-庚烯酸进行多肽链延伸偶联, 得中间体 V; 3) 中间体 V 脱除 L-Thr 残基侧链上的羟基形成双键, 得到中间体 VI; 4) 中间体 VI 裂解脱除树脂以及侧链保护基, 得到中间体 VII; 5) 中间体 VII 通过氧化形成分子内二硫键, 得到中间体 VIII; 6) 中间体 VIII 经过分子内酯化反应得到罗米地辛。

WO 2020/125045 A1

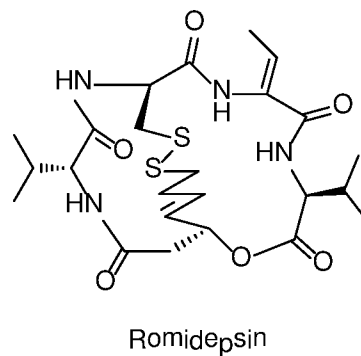
## 一种罗米地辛的合成方法

### 技术领域

本发明涉及药物化学的固相合成领域，具体涉及一种罗米地辛的合成方法。

### 背景技术

罗米地辛，英文名为 Romidepsin，其化学名称为(1S, 4S, 7Z, 10S, 16E, 21R) -7-乙叉基-4, 21-二异丙基-2-氧杂-12, 13-二硫-5, 8, 20, 23-四氮杂双环[8, 7, 6]二十三碳-16-烯-3, 6, 9, 19, 22-五酮，分子式为  $C_{24}H_{36}N_4O_6S_2$ ，是一种双环四肽，具有稳定的疏水结构，其结构中特有的二硫键是发挥活性的关键基团。2009年，罗米地辛获得美国食品药品监督管理局(FDA)批准，用于治疗皮肤 T 细胞淋巴瘤(CTCL)。其化学结构如下：

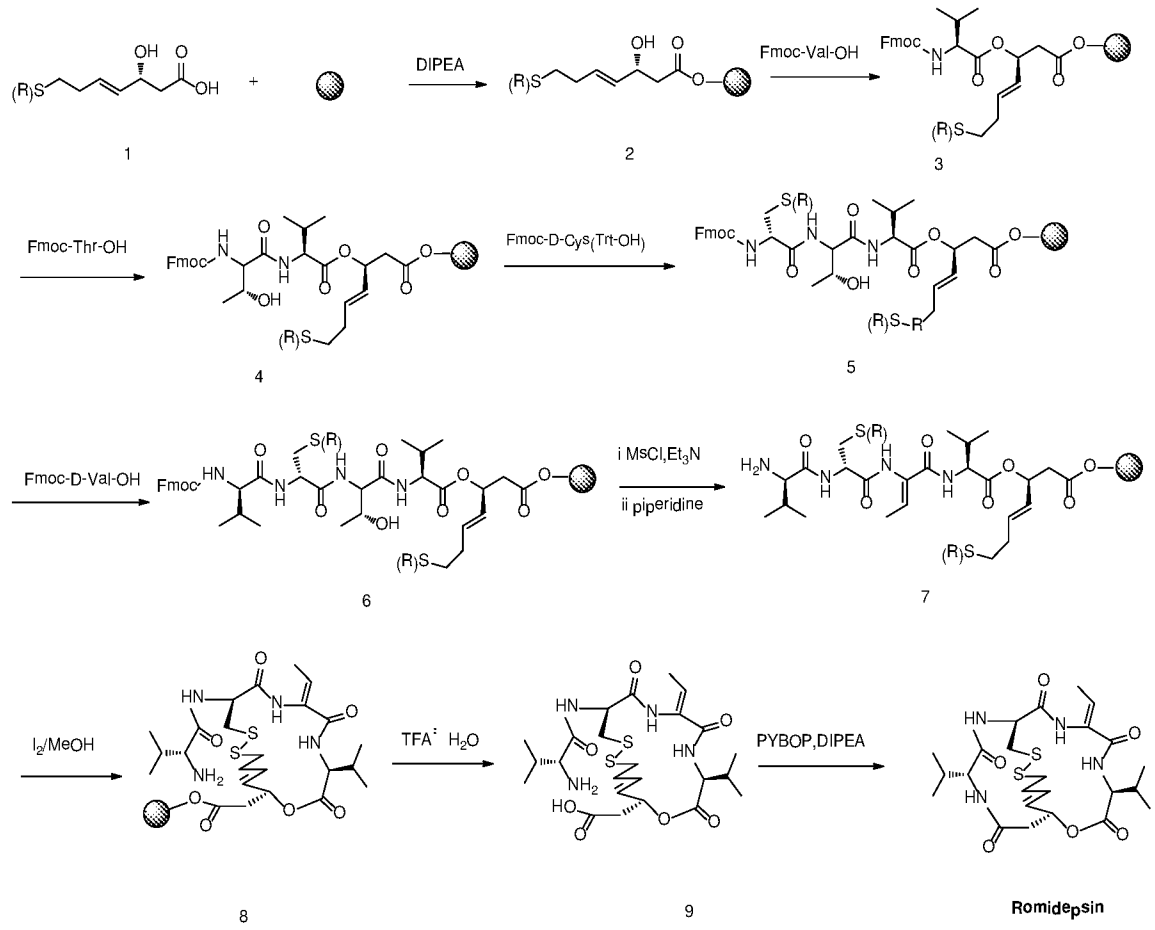


罗米地辛为组蛋白去乙酰化酶(HDACs)抑制剂，透过肿瘤细胞膜进入细胞质，在细胞内二硫键被谷胱甘肽还原成巯基，与锌依赖的 HDACs 中的锌相结合而发挥抑制 HDACs 的作用，从而进一步诱导肿瘤细胞分化和凋亡。

目前，主要有两种方法来制备罗米地辛，一是生物发酵法，二是通过化学合成来制备。关于化学合成有多个文章报道，如 1996 年 Knhn 等人用全液相合成罗米地辛(J.AM.Chem.Soc., 118: 7237-7238)，该文献中的方法采用缬氨酸甲酯为原料，偶联相应的氨基酸，然后用氢氧化锂脱除甲酯，再在 DEAD 和  $PPh_3$  条件下成酯，最后采用碘氧化合成二硫键，共经过 14 步反应合成罗米地辛。但是，这种方法步骤繁琐，不够简便，更为重要的是其液相总收率仅在 18% 左右，这些问题一直是影响罗米地辛生产效率的主要因素。

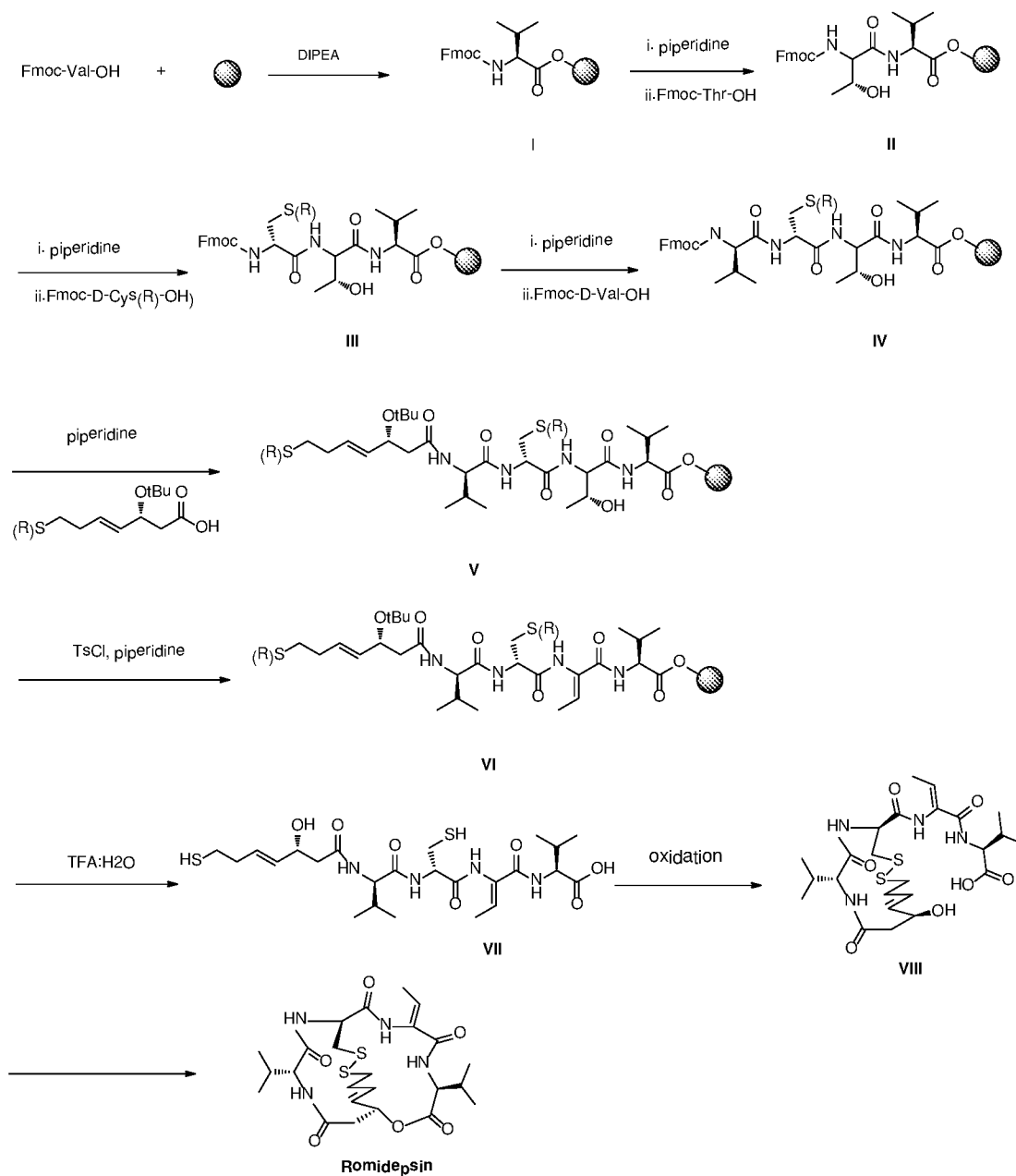
在专利 CN103897029A 中，公开了一种基于固相合成罗米地辛的制备方法：首先让树脂与 3-羟基-7-巯基-4-庚烯酸上的羧基偶联，而后将罗米地辛上 4 个氮

氨基酸按顺序依次偶联，随后脱除羟基、环化成二硫键、酰胺键，形成罗米地辛。  
合成路线如下：



## 发明内容

本发明的合成路线如下所示



本发明包括以下步骤:

- 1) 在活化剂的作用下, 将固相合成树脂与 Fmoc-L-Val-OH 偶联得到中间体 **I**;
- 2) 按照 Fmoc 固相合成策略, 依次逐个将 Fmoc-L-Thr-OH、Fmoc-D-Cys(R)-OH、Fmoc-D-Val-OH、(R)-3-叔丁氧基-7-巯基-4-庚烯酸进行多肽链延伸偶联, 得中间体 **V**;
- 3) 中间体 **V** 脱除 L-Thr 残基侧链上的羟基形成双键, 得到中间体 **VI**;
- 4) 中间体 **VI** 裂解脱除树脂以及侧链保护基, 得到中间体 **VII**;
- 5) 中间体 **VII** 通过氧化形成分子内二硫键, 得到中间体 **VIII**;

6) 中间体 **VIII** 经过分子内酯化反应得到罗米地辛。

本发明所述各保护基是在涉及氨基酸合成领域常用的保护氨基酸主链以及侧链上氨基、羧基、巯基等干扰合成的基团的保护基团，防止氨基、羧基、巯基等在制备目标产物过程中发生反应，生成杂质，对于本发明中需要保护侧链的氨基酸来说，本领域技术人员公知其侧链结构以及知晓采用常用保护基来保护氨基酸侧链上的氨基、羧基、巯基等基团，其中，所述 R 为巯基保护基，所述 Fmoc 为氨基酸 N 端保护基。Fmoc-L-Val-OH 是指在 N 端偶联有 Fmoc 保护基 L-Val，Fmoc-L-Thr-OH 是指在 N 端偶联有 Fmoc 保护基的 L-Thr，Fmoc-D-Cys (R)-OH 是指在 N 端偶联有 Fmoc 保护基、在侧链巯基处偶联有 R 保护基的 D-Cys，Fmoc-D-Val-OH 指在 N 端偶联有 Fmoc 保护基的 D-Val，上述简式表示为本领域常用形式。

作为优选，所述巯基保护基为三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基或二苯甲基，更优选为三苯甲基。

作为优选，所述固相合成树脂为 CTC Resin (CTC 树脂)或 Wang Resin(王树脂)，更优选为 CTC Resin，最优选为替代度为 0.5mmol/g 的 CTC Resin。

在本发明制备方法的步骤 1) 中，活化剂为 DIPEA、二乙胺、三乙胺、吗啉和 N-甲基吗啉中的一种或多种的组合，优选 DIPEA。

在本发明制备方法的步骤 1) 中，作为优选，所述树脂、活化剂和 Fmoc-L-Val-OH 的摩尔比为 1:2-10:10-60，优选为 1: 6: 30。

作为优选方案，步骤 1) 为：

Fmoc-L-Val-OH 溶解后加入 DIPEA 活化，然后和经洗涤、溶胀后的树脂进行偶联得到中间体 **I**。其中，本步骤用于溶解、洗涤和溶胀树脂的溶剂优选为 DMF。

在本发明制备方法的步骤 2) 中，所述多肽链延伸偶联是指在 Fmoc-L-Val-OH 与树脂偶联后，剩余氨基酸及 3-叔丁氧基-7-(R)-巯基-4-庚烯酸按照其在罗米地辛结构中的连接顺序逐个和前一个偶联的氨基酸发生缩合反应(主链氨基和羧基的缩合反应)进行偶联。在多肽链延伸偶联中，由于每个氨基酸 N 端都有保护基，因此需要先脱除 N 端保护基再偶联，这对本领域技术人员来说是公知常识，本发明优选用 DBLK 脱除 N 端保护基。

在本发明的技术方案中，步骤 2) 为：

将中间体 I 脱除 Fmoc 保护基，然后偶联 Fmoc-L-Thr-OH，接着重复脱除 Fmoc 保护基并偶联的步骤，依次逐个完成 Fmoc-D-Cys(R)-OH、Fmoc-D-Thr-OH、3-叔丁氧基-7-(R)-巯基-4-庚烯酸的偶联得到中间体 V。

优选地，步骤 2) 为中间体 I 用 DBLK 脱除 Fmoc 保护基，然后加入 Fmoc-L-Thr-OH、偶联剂和 DMAP 进行偶联。接着重复上述操作，依次逐个完成 Fmoc-D-Cys(R)-OH、Fmoc-D-Thr-OH、3-叔丁氧基-7-(R)-巯基-4-庚烯酸的偶联得到中间体 V。

其中，所述偶联剂优选为 HOBt/DIC 双体系偶联剂、PyBOP/HOBt 双体系偶联剂或 TBTU/HOBt 双体系偶联剂，最优选为 PyBOP/HOBt 双体系偶联剂。对于这些多体系的偶联剂，其各组分的配比在本领域中是一定的且是公知的，在此不再赘述。

步骤 2) 中所述用于溶解的溶剂优选为 DMF、DCM、NMP、DMSO 中的一种和两种，更优选为采用体积比 DMF：NMP 为 1：1 的混合溶剂。

步骤 2) 中所述偶联剂的用量，以摩尔计，偶联剂：步骤 1) 中固相合成树脂的用量比为 2-4:1，优选为 3：1，

步骤 2) 中所述 DMAP 的用量，以摩尔计，DMAP：步骤 1) 中固相合成树脂的用量比为 0.1-0.5:1，优选为 0.2:1。

在本发明制备方法的步骤 3) 为：

向中间体 V 中加入哌啶和溶解后的 DMAP 活化，然后加入对甲苯磺酰氯反应至完全，接着再加入溶解后的 DABCO 反应脱除羟基形成双键，得到中间体 VI。

在步骤 3) 中，反应时间为 1-5 小时，优选为 2 小时；反应的温度优选为 -5℃ 至 100℃，更优选为 30℃。

在步骤 3) 中，所述用于溶解的溶剂优选为 DMF、DCM 或 THF。

在步骤 3) 中，所述哌啶的用量以摩尔计，哌啶：步骤 1) 中固相合成树脂用量比为 1-3:1，优选为 2:1。

在步骤 3) 中，所述对甲苯磺酰氯的用量以摩尔计，对甲基苯磺酰氯：步骤 1) 中固相合成树脂用量比为 1-2:1，优选为 1.5:1。

在步骤 3) 中, 所述 DMAP 的用量以摩尔计, DMAP: 步骤 1) 中固相合成树脂用量比为 0.1-1:1, 优选为 0.2 : 1。

在步骤 3) 中, 所述 DABCO 的用量以摩尔计, DABCO: 步骤 1) 中固相合成树脂为 1-5:10, 优选为 2: 10。

在本发明制备方法的步骤 4) 中,

向中间体 **VI** 中加入裂解试剂反应 2 小时, 过滤, 滤液用乙醚沉淀, 收集沉淀得粗肽, 经反相高相液相纯化得到中间体 **VII**。

在步骤 4) 中, 所述裂解试剂 TFA 的水溶液, 优选为体积比 TFA: H<sub>2</sub>O 为 95: 5 的混合裂解液、体积比 TFA: EDT: PhOH: H<sub>2</sub>O 为 95: 5: 3: 2 的混合裂解液或体积比 TFA: EDT: TIS: PhOH: H<sub>2</sub>O 为 80: 5: 5: 5: 5 的混合裂解液。

在本发明制备方法的步骤 5) 中, 中间体 **VII** 溶解后, 加入氧化剂反应至完全, 得到中间体 **VIII**。

在步骤 5) 中, 所述反应时间均 1-10 小时, 优选为 5 小时。

在步骤 5) 中, 反应的温度优选为-5℃至 100 ℃, 更优选为 35℃。

在步骤 5) 中, 所述氧化剂为过氧化氢、辣根过氧化物酶、DMSO、六水合氯化铁、空气、过硫酸铵, 优选六水合氯化铁。

在步骤 5) 中, 所用溶剂为甲醇、乙醇、丙酮、四氢呋喃、乙腈以及上述溶剂与水的不同比例的混合溶液; 优选乙腈与水的混合液。

在步骤 6) 中, 中间体 **VIII** 溶解后, 加入偶联剂, 反应 1-10 小时, 纯化制备得到罗米地辛。

在步骤 6) 中, 所述反应时间均优选为 3 小时; 所述反应的温度优选为-5℃至 100 ℃, 更优选为 35℃。

在步骤 6) 中, 所述偶联剂优选为 DIAD、PPh<sub>3</sub> 和 TsOH。

在步骤 6) 中, 所述溶剂为甲醇、乙醇、丙酮、四氢呋喃、乙腈; 优选为四氢呋喃。

在步骤 6) 中, 纯化为以反相高压液相色谱法进行纯化, 优选地, 所述反相高压液相色谱法包括: 以反相十八烷基硅烷为固定相, 以 0.2%醋酸水溶液/乙腈为流动相, 流动相的比例优选为 98: 2 至 50: 50, 更优选 80: 20 至 60: 40, 最

优选 70: 30。收集目的峰馏分，浓缩冻干。

本发明公开了一种罗米地辛的制备方法，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。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。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化合物和制备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。

在本发明具体实施方式中，所有偶联有保护基的氨基酸均可通过市售获得，本发明中的保护氨基酸购自于上海吉尔生化有限公司，所用 CTC Resin (CTC 树脂)和 Wang Resin(王树脂)购自于天津南开和成有限公司。

### 缩写及英文含义

缩写及英文	含义
HOAt	1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑
Fmoc	9-芴甲氧羰基
DIPCDI	二异丙基碳二亚胺
HOBt	1-羟基苯并三唑
HATU	2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸酯
HBTU	苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐
DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
EDC·HCl	1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐
PyBOP	苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基六氟磷酸盐
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.
TBTU	O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒四氟硼酸
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
DCM	二氯甲烷
THF	四氢呋喃
TFA	三氟乙酸
TA	苯甲硫醚
PhOMe	苯甲醚
EDT	乙二硫醇
DBLK	20%哌啶/DMF(V/V)溶液

tBu	叔丁基
Trt	三苯甲基
Acm	乙酰胺甲基
Mmt	4-甲氧基三苯甲基
PHOH	苯酚
TIS	三异丙基硅烷
TsCl	对甲苯磺酰氯
DABCO	1,4-二氮杂二环[2.2.2]辛烷
DIAD	偶氮二甲酸二异丙酯
TsOH	对甲苯磺酸

有益效果

本发明方法步骤简单，合成效率高，可以将罗米地辛的总收率提高到 40% 左右。

## 具体实施方式

### 实施例 1 中间体 I 的制备

称取替代度为0.5mmol/g的CTC Resin 2g（合成规模1mmol），加入到固相反应柱中，用DMF洗涤2次，用DMF溶胀树脂30分钟后，称取1.01g Fmoc-Val-OH、0.38 g HOBt、0.03gDMAP用DMF溶解，冰水浴下加入0.6mL DIPEA活化后，加入上述装有树脂的反应柱中，反应2小时反应结束，用DMF洗涤6次，得到中间体I。

### 实施例 2 中间体 V 的制备

固相反应柱中中间体 I 用 20%DBLK 脱除 Fmoc 保护基团，然后用 DMF 洗涤 6 次，取少量树脂进行茚三酮试验，树脂显色。称取 1.02g Fmoc-Thr-OH、0.38 g HOBt、0.03gDMAP 溶于体积比为 1:1 的 DMF 和 NMP 混合溶液，冰水浴下加入 0.3mL DIC 活化后，加入到固相反应柱，室温反应 2 h（反应终点以茚三酮法检测为准，如果树脂无色透明，则反应完全，树脂显色，表示反应不完全，需再偶联反应 1h）。重复上述脱除 Fmoc 保护和加入相应氨基酸偶联的步骤，依次完成 Fmoc-D-Cys(Trt)-OH、Fmoc-D-Val-OH 和 (R)-3-叔丁氧基-7-巯基-4-庚烯酸得到中间体 V。

### 实施例 3 中间体 VI 的制备

称取 0.03g DMAP、0.20g 对甲苯磺酰氯用 10mL 二氯甲烷溶解后，加入 0.60ml 哌啶。然后将混合液加入到含有中间体 V 的固相反应柱中，反应 2 小时，反应结束后用 DMF 洗涤 6 次，再用甲醇收缩 3 次，真空干燥得到 3.0g 中间体 VI。

#### **实施例 4 中间体 VII 的制备**

将实施例 3 中得到的 3.0g 中间体 VI 树脂加入到 50ml 烧瓶中，配置裂解试剂（体积比，TFA: EDT: PhOH: H<sub>2</sub>O=95: 5: 3: 2），将裂解试剂 30mL 倒入烧瓶中，室温反应 2 小时。反应结束，过滤树脂，收集滤液。滴加至 300ml 乙醚试剂中，离心、无水乙醚洗涤、真空干燥，得到 0.70g 中间体 VII，纯度 80.52%。

#### **实施例 5 中间体 VIII 的制备**

将实施例 4 得到的 0.70g 中间体 VII 溶于 5mL 70% 的乙腈水溶液，加入六水合氯化铁 0.20g，35℃ 反应 5 小时。反应结束后加入饱和氯化铵溶液 10mL，然后用二氯甲烷萃取三次，依次用饱和食盐水洗、水洗，无水硫酸钠干燥、过滤、浓缩，得 0.60g 中间体 VIII，纯度 75.5%。

#### **实施例 6 罗米地辛的制备**

在 1000mL 的反应瓶中，依次加入 3.8g 三苯基膦、0.6g 对甲苯磺酸、2.2mL 偶氮二甲酸二异丙酯和 500mL 四氢呋喃。混合液室温搅拌 30 分钟，然后冷却至 0℃，滴加溶有实施例五制得的 0.60g 中间体 VIII 的四氢呋喃溶液 100mL，两小时滴完。0℃ 反应三小时后，浓缩得油状物。此油状物用水稀释 10 倍采用 RP-HPLC 系统，波长 230nm，色谱柱为 50×250 mm 反相 C18 柱，0.2% 醋酸水溶液/乙腈溶液流动相纯化，收集目的峰馏分，旋转蒸发浓缩，冻干得到罗米地辛醋酸盐精肽 0.25g，HPLC 纯度 98.5%，总收率 40.5%。

以上所述仅是本发明的优选实施方式，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，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

## 权利要求书

1、一种罗米地辛的合成方法，其包括如下步骤：

- 1) 在活化剂的作用下，将固相合成树脂与 Fmoc-L-Val-OH 偶联得到中间体 I；
- 2) 按照 Fmoc 固相合成策略，依次逐个将 Fmoc-L-Thr-OH、Fmoc-D-Cys(R)-OH、Fmoc-D-Val-OH、(R)-3-叔丁氧基-7-巯基-4-庚烯酸进行多肽链延伸偶联，得中间体 V；
- 3) 中间体 V 脱除 L-Thr 残基侧链上的羟基形成双键，得到中间体 VI；
- 4) 中间体 VI 裂解脱除树脂以及侧链保护基，得到中间体 VII；
- 5) 中间体 VII 通过氧化形成分子内二硫键，得到中间体 VIII；
- 6) 中间体 VIII 经过分子内酯化反应得到罗米地辛；

其中，所述 R 为巯基保护基；优选为三苯甲基、4-甲氧基三苯甲基或二苯甲基，更优选为三苯甲基。

2、根据权利要求 1 所述的合成方法，步骤 1) 中，活化剂为 DIPEA、二乙胺、三乙胺、吗啉和 N-甲基吗啉中的一种或多种的组合，优选 DIPEA。

3、根据权利要求 1 所述的合成方法，步骤 2) 为：

将中间体 I 脱除 Fmoc 保护基，然后偶联 Fmoc-L-Thr-OH，接着重复脱除 Fmoc 保护基并偶联的步骤，依次逐个完成 Fmoc-D-Cys(R)-OH、Fmoc-D-Thr-OH、(R)-3-叔丁氧基-7-巯基-4-庚烯酸的偶联得到中间体 V。

4、根据权利要求 1 所述的合成方法，所述偶联剂优选为 HOBt/DIC 双体系偶联剂、PyBOP/HOBt 双体系偶联剂或 TBTU/HOBt 双体系偶联剂，最优选为 PyBOP/HOBt 双体系偶联剂。

5、根据权利要求 1 所述的合成方法，步骤 3) 为：向中间体 V 中加入哌啶和溶解后的 DMAP 活化，然后加入对甲苯磺酰氯反应至完全，接着再加入溶解后的 DABCO 反应脱除羟基形成双键，得到中间体 VI。

6、根据权利要求 1 所述的合成方法，步骤 4) 为向中间体 VI 中加入裂解试剂反应 2 小时，过滤，滤液用乙醚沉淀，收集沉淀得粗肽，经反相高相液相纯化

得到中间体 VII;

优选地,所述裂解试剂为 TFA 的水溶液,更优选为体积比 TFA: H<sub>2</sub>O 为 95: 5 的混合裂解液、体积比 TFA: EDT: PhOH: H<sub>2</sub>O 为 95: 5: 3: 2 的混合裂解液或体积比 TFA: EDT: TIS: PhOH: H<sub>2</sub>O 为 80: 5: 5: 5: 5 的混合裂解液。

7、根据权利要求 1 所述的合成方法,步骤 5) 为中间体 VII 溶解后,加入氧化剂反应至完全,得到中间体 VIII;

优选地,所述氧化剂为过氧化氢、辣根过氧化物酶、DMSO、六水合氯化铁、空气、过硫酸铵,更优选六水合氯化铁。

8、根据权利要求 1 所述的合成方法,在步骤 6) 中,中间体 VIII 溶解后,加入偶联剂,反应 1-10 小时,纯化制备得到罗米地辛,

优选所述偶联剂为 DIAD、PPh<sub>3</sub> 和 TsOH。

9、根据权利要求 1 所述的合成方法,在步骤 6) 中,纯化为以反相高压液相色谱法进行纯化,

优选地,所述反相高压液相色谱法包括:以反相十八烷基硅烷为固定相,以 0.2%醋酸水溶液/乙腈为流动相,流动相的比例优选为 98: 2 至 50: 50,

更优选 80: 20 至 60: 40,最优选 70: 30。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/101597

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C07K 5/103(2006.01)i; C07K 1/06(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNPAT, CNKI, EPODOC, WPI, 百度学术, BAIDU, 谷歌学术, GOOGLE, REGISTRY, CAPLUS, CASREACT: 罗米地辛, 罗米迪司肽, 缩酯环肽, HDAC, solid phase, RESIN, ROMIDEPSIN, FK228, FR901228, NSC630176, ISTODAX, 128517-07, SECONDARY ALCOHOL, CARBOXYLIC, 官能团检索, functional group search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	李蕾 (LI, Lei). "多肽及其衍生物的化学合成 (Chemical Synthesis of Peptides and Their Derivatives)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑 (Medicine & Public Health, China Master's Theses Full-Text Database), 15 January 2009 (2009-01-15), pp. 19-25, 34, 35, and 49-63	1-9
Y	LI, K. W. et al. "Total Synthesis of the Antitumor Depsipeptide FR-901, 228" <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , Vol. 118, No. 30, 31 December 1996 (1996-12-31), pp. 7237 and 7238	1-9
Y	CN 102241736 A (JASUN PHARMCHEM CO., LTD.) 16 November 2011 (2011-11-16) description, pp. 4-7, and embodiments	1-9
Y	GRESHOCK, T. J. et al. "Improved Total Synthesis of the Potent HDAC Inhibitor FK228 (FR-901228)" <i>ORGANIC LETTERS</i> , Vol. 10, No. 4, 19 January 2008 (2008-01-19), pp. 613-616	1-9
A	CN 103897029 A (SHENZHEN HYBIO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 02 July 2014 (2014-07-02) entire document	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>07 November 2019</b>		Date of mailing of the international search report <b>19 November 2019</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer   Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107778350 A (CHENGDU SHENGNUO BIOPHARM CO., LTD.) 09 March 2018 (2018-03-09) entire document	1-9
A	MARO, S. D. et al. "Development of an Efficient Solid-Phase Synthetic Methodology to Construct a Combinatorial Library of a Potent HDAC Inhibitor" <i>Advances in Experimental Medicine and Biology</i> , Vol. 611, 31 December 2009 (2009-12-31), pp. 17 and 18	1-9
A	MARO, S. D. et al. "Efficient Solid-Phase Synthesis of FK228 Analogs as Potent Antitumoral Agents" <i>Journal of Medicinal Chemistry</i> , Vol. 51, No. 21, 08 October 2008 (2008-10-08), pp. 6639-6641	1-9

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/CN2019/101597</b>
---

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102241736	A	16 November 2011	CN	102241736	B	26 June 2013
CN	103897029	A	02 July 2014	WO	2014101828	A1	03 July 2014
				CN	103897029	B	03 August 2016
CN	107778350	A	09 March 2018	None			

<b>A. 主题的分类</b> C07K 5/103 (2006.01)i; C07K 1/06 (2006.01)i  按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
<b>B. 检索领域</b> 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K  包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献  在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNPAT, CNKI, EPODOC, WPI, 百度学术, 谷歌学术, REGISTRY, CAPLUS, CASREACT; 罗米地辛, 罗米迪司肽, 缩酯环肽, HDAC, solid phase, RESIN, ROMIDEPSIN, FK228, FR901228, NSC630176, ISTODAX, 128517-07-7, SECONDARY ALCOHOL, CARBOXYLIC, 官能团检索		
<b>C. 相关文件</b>		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	李蕾. "多肽及其衍生物的化学合成" 《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》, 2009年 1月 15日 (2009 - 01 - 15), 19-25、34-35、49-63页	1-9
Y	LI Khan W. 等. "Total Synthesis of the Antitumor Depsipeptide FR-901, 228" 《J. Am. Chem. Soc.》, 第118卷, 第30期, 1996年 12月 31日 (1996 - 12 - 31), 7237-7238页	1-9
Y	CN 102241736 A (江苏江神药物化学有限公司) 2011年 11月 16日 (2011 - 11 - 16) 说明书第4-7页, 实施例	1-9
Y	GRESHOCK T. J. 等. "Improved Total Synthesis of the Potent HDAC Inhibitor FK228 (FR-901228)" 《ORGANIC LETTERS》, 第10卷, 第4期, 2008年 1月 19日 (2008 - 01 - 19), 613-616页	1-9
A	CN 103897029 A (深圳翰宇药业股份有限公司) 2014年 7月 2日 (2014 - 07 - 02) 全文	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期	
2019年 11月 7日	2019年 11月 19日	
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员	
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	康蕾	
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(10)-53962326	

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 107778350 A (成都圣诺生物制药有限公司) 2018年 3月 9日 (2018 - 03 - 09) 全文	1-9
A	SALVATORE Di Maro 等. "Development of an Efficient Solid-Phase Synthetic Methodology to Construct a Combinatorial Library of a Potent HDAC Inhibitor" 《Advances in Experimental Medicine and Biology》, 第611卷, 2009年 12月 31日 (2009 - 12 - 31), 17-18页	1-9
A	SALVATORE Di Maro 等. "Efficient Solid-Phase Synthesis of FK228 Analogs as Potent Antitumoral Agents" 《Journal of Medicinal Chemistry》, 第51卷, 第21期, 2008年 10月 8日 (2008 - 10 - 08), 6639-6641页	1-9

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/101597

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102241736	A	2011年 11月 16日	CN	102241736	B	2013年 6月 26日
CN	103897029	A	2014年 7月 2日	WO	2014101828	A1	2014年 7月 3日
				CN	103897029	B	2016年 8月 3日
CN	107778350	A	2018年 3月 9日	无			