(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
2018 年 9 月 20 日 (20.09.2018)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2018/166146 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 7/16 (2006.01) *C07K 1/06* (2006.01)
C07K 1/20 (2006.01) *C07K 1/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/099882

(22) 国际申请日: 2017 年 8 月 31 日 (31.08.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201710158573.0 2017年3月17日 (17.03.2017) CN

(71) 申请人: 兰州凯博药业股份有限公司(LANZHOU KAIBO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国甘肃省兰州市兰州新区昆仑大道1939号, Gansu 730300 (CN)。

(72) 发明人: 孙鹏程(SUN, Pengcheng); 中国甘肃省兰州市兰州新区昆仑大道1939号, Gansu 730300 (CN)。 胡碧煌(HU, Bihuang); 中国甘肃省兰州市兰州新区昆仑大道1939号, Gansu 730300 (CN)。

(74) 代理人: 北京天奇智新知识产权代理有限公司(BEIJING TIAN QI ZHI XIN INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD); 中国北京市海淀区蓟门里小区1幢316室(政法大厦), Beijing 100088 (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,

(54) **Title:** LIQUID PHASE SYNTHESIS METHOD FOR OXYTOCIN USING POLYPEPTIDES

(54) 发明名称: 一种多肽液相合成缩宫素的方法

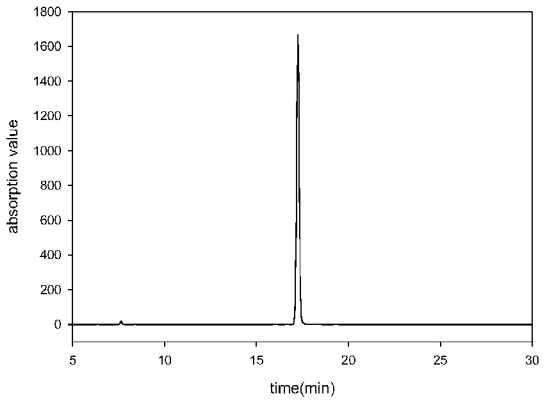


图18

(57) **Abstract:** A liquid phase synthesis method for oxytocin having mild reaction conditions. The method synthesizes three oxytocin fragments: a fragment 1: Boc-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-OH, a fragment 2: H-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe, and a fragment 3: H-Leu-Gly-NH_2. After the fragments are assembled and synthesized into a full-protected oxytocin amino acid sequence, Acm is removed by using iodine, and at meantime, cyclization is performed to form a disulfide bond to obtain a protected cyclic oxytocin; the remaining protecting groups are removed by using trifluoroacetic acid to obtain a oxytocin crude product; and after recrystallization is performed by using ethyl acetate, purification is performed by reverse phase chromatography to obtain a high-purity (the purity of the crude product reaches 95%) and high-titer oxytocin product (588 IU/mg). The method is used in combination with a Boc polypeptide synthesis method and an Fmoc polypeptide synthesis method; all the reactions are performed under mild conditions; the invention neither involves a decapping reaction by using an ammonia and sodium method nor uses poisonous reagents or unsafe reaction conditions to perform the liquid phase synthesis of oxytocin, thus greatly reducing cost in the synthesis of oxytocin and providing a method for industrially producing oxytocin.

WO 2018/166146 A1

[见续页]

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))。

(57) 摘要: 一种反应条件温和的液相合成缩宫素的方法，该方法合成了三个缩宫素片段：片段1：Boc-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-OH，片段2：H-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe，片段3：H-Leu-Gly-NH_2，将片段组装合成全保护的缩宫素氨基酸序列后，用碘脱去Acm并同时环化形成二硫键得到保护的环状缩宫素，最后用三氟乙酸除去剩余的保护基得到缩宫素粗品，用乙酸乙酯重结晶后，经反相色谱纯化得到高纯度(粗品纯度达95%)和高效价的缩宫素产品(588 IU/mg)。该方法结合使用了Boc多肽合成法和Fmoc多肽合成法，所有反应均在温和条件下进行，未使用氨钠法脱帽反应；未使用剧毒试剂或不安全的反应条件进行缩宫素的液相合成，极大降低了缩宫素的合成成本，为工业化生产缩宫素提供了方法。

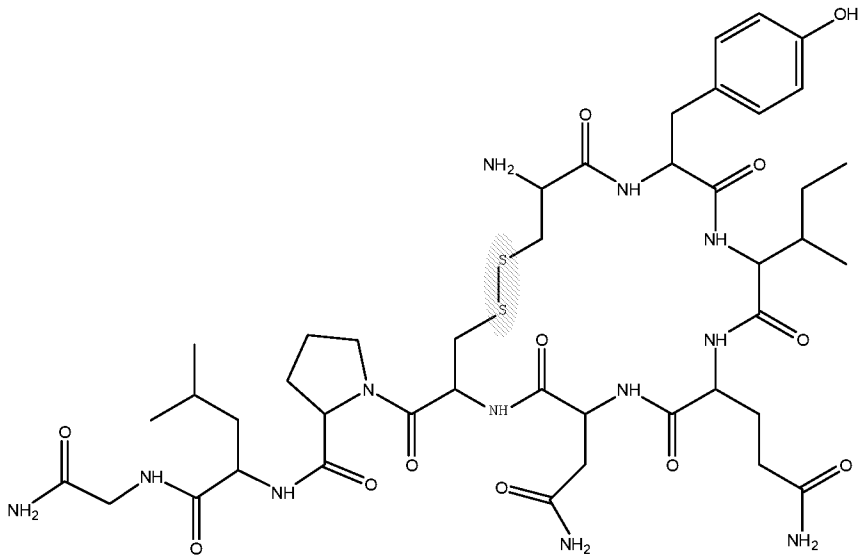
一种多肽液相合成缩宫素的方法

技术领域

本发明涉及多肽类药物的制备，具体其涉及一种液相合成缩宫素的方法，属于多肽液相合成技术领域。

背景技术

缩宫素，也叫催产素，英文名 oxytocin，分子式 $C_{43}H_{66}N_{12}O_{12}S_2$，分子量为 1007.2，化学结构式如下：



缩宫素主要分布在人和哺乳动物的下丘脑垂体后叶，临床上用于催产、产后出血和引产。随着对其研究的逐渐深入，除了缩宫素常见的收缩子宫、泌乳等作用外，人们发现缩宫素还有许多复杂的生理功能，如参与学习、记忆过程、影响药物成瘾性及对社会适应性行为、母性行为、性行为、摄食、痛觉调节以及心血管、体温的调节等。

目前，国内的缩宫素原料药基本上自猪或牛下丘脑垂体后叶中提取，效价 160 IU/ml，而且，动物来源的产品存在生物安全性风险，同时，天然存在的相关杂质，如加压素等，难以被纯化除去。

迄今为止，缩宫素的液相合成法涉及安全难以掌控的反应条件（如氨钠法），反应步骤多，产率低；另一方面，虽然固相合成法的引入简化了缩宫素的合成工艺，但是，从国内外报道的文献来看，固相合成法合成缩宫素的产率、纯度和效价仍不能满足需求，其中 Boc 固相合成法涉及氟化氢等危险化合物在工业上逐渐不被采用，而 Fmoc 固相合成法均采用哌啶作为脱帽试剂。哌啶是一种液体，不易运输和储存，特别是作为受管制的易制毒化学品，对企业的采购、使用和物料管理带来不便。

缩宫素合成的最大的挑战还包括，二硫键的形成，其产率和纯度，不能满足工业生产的需求。

1953 年，Vincent du Vigneaud 首次用多肽液相合成法合成了缩宫素，并证实了其生物活性；随后又将此方法进行了改进。这些两种方法最终均采用金属钠/液氨脱去保护缩宫素的保护基和空气氧化法形成二硫键。其他的脱半胱氨酸保护基和环化形成二硫键的方法，包括，1) Photaki 合成了保护的缩宫素直链序列后，用甲醇钠/甲醇脱去巯基保护基 Bz 或 Z，然后用 1,2-二碘乙烷反应形成二硫键，最后用 HBr/AcOH 脱去其他保护基得到缩宫素粗品，其纯化所得的缩宫素效价 380 IU/mg；Mühlemann 也采用了 1,2-二碘乙烷作为氧化剂形成二硫键，

环化收率 30%；2）Fujii 等分别选用 MBzl 和 Acm 为巯基保护基的半胱氨酸合成了保护的缩宫素直链序列，用三氟乙酸铊盐分别脱去 MBzl 和 Acm 并形成二硫键，得到缩宫素粗品，产率分别为 45%和 39%；3）Akaji 等分别选用 Acm, Tacm 和 But 为巯基保护基的半胱氨酸合成了保护的缩宫素直链序列，用甲基三氯硅烷/二苯基亚砜分别脱去了 Acm, Tacm,和 But 并形成二硫键，环化产率分别是 56%，69%和 64%。Fernando Albericio 等用 Boc/MBHA resin 法和 Fmoc/PAL resin 法进行了缩宫素固相合成的比较研究，还对形成二硫键的方法进行了研究，包括空气氧化法、碘氧化法、三氟乙酸铊盐氧化法。二硫键形成的研究结果表明，三氟乙酸铊盐的效果最佳(产率 72%)，碘氧化法的产率 28%。

目前，国内报道的缩宫素合成方法主要有液相法和 Fmoc 固相法。其中，中国发明专利 ZL2010102549195 公布了一种液相合成缩宫素的方法: 该方法用金属钠/液氨法脱去保护基，然后，用空气氧化法形成二硫键，收率 25%，未见生物效价报道。中国发明专利 ZL2008100849408 公布了一种液相法和固相法结合合成缩宫素的方法: 该方法合成了半胱氨酸巯基用 Fmoc 基团保护的两个片段，进行片段缩合(缩合时间为 10-40 小时)，然后，用哌啶将巯基保护基 Fmoc 脱去后，采用空气氧化法形成二硫键。该方法收率 7-10%，产品的效价为 600 IU/ml，未见报道其纯度。这里用体积计算效价的方法，无法判断缩宫素的真实效价，因为每毫升所含缩宫素的量未知。中国发明专利（专利号 ZL2005101123565）公布了一种固相合成缩宫素的方法: 该方法以 Rink Amide 树脂为固相载体，Fmoc 保护氨基酸为单体，其中半胱氨酸采用 Fmoc-Cys(Trt)-OH，使用哌啶作为脱帽试剂，依次逐个合成了保护缩宫素氨基酸序列，然后，将肽链从树脂上切割下来，乙醚沉淀切肽溶液获得还原性缩宫素后，在偏碱性溶液中（pH7-8）用空气、或双氧水进行氧化，形成二硫键，收率 21%，未见报道效价；中国发明专利（ZL201210256922X）公布了一种固相合成缩宫素的方法: 该方法以 Rink Amide 树脂为固相载体，Fmoc 保护氨基酸为单体，其中 *N* 末端半胱氨酸采用 Boc-Cys(Trt)-OH，使用哌啶作为脱帽试剂，依次逐个合成了保护缩宫素氨基酸序列，然后，将肽链从树脂上切割下来，乙醚沉淀切肽溶液获得未环化的缩宫素后，在偏碱性溶液中用空气、或双氧水进行氧化，形成二硫键，其收率 33%，未见报道效价。这些缩宫素固相合成法的共同点是：1）环化反应均在溶液中进行，均采用空气氧化法、或双氧水氧化法形成二硫键，收率最高为 33%；2）*N* 末端氨基在未保护（游离）状态下进行环化反应；3）脱帽试剂均采用哌啶；4）未见报道缩宫素的生物效价、或可参考的生物效价。

综上所述，目前国内外缩宫素的合成还存在一系列的挑战，如使用易制毒化学品哌啶、乙醚等，剧毒且昂贵的试剂三氟乙酸铊盐等，难以掌控的反应条件（如金属钠/液氨、HF 等），而且，合成所得缩宫素产品的收率和效价都较低。

在本发明中，结合使用了 Boc 多肽合成法和 Fmoc 多肽合成法，所有反应均在温和条件下进行，未使用国内外所有液相合成缩宫素的文献报道的氨钠法脱帽反应；首次未使用剧毒试剂或不安全的反应条件进行缩宫素的液相合成，极大降低了缩宫素的合成成本，为工业化生产缩宫素提供了参考。本发明中所有的化学反应均在温和的条件下进行，不涉及剧烈难以控制的反应条件和剧毒的化学试剂，得到了高纯度（99%以上）、高效价（588 IU/mg，）的缩宫素产品。

发明内容

本发明针对目前缩宫素合成技术存在的问题，提供一种合成效率高、成本较低、环境友好、反应条件温和、纯度和效价高，可以工业化生产的缩宫素液相合成工艺。最终所得的缩宫素纯品，按照欧洲药典（8.0版），含量测定法测定本发明所生产的缩宫素含量为98.1%，效价588 IU/mg。

本发明的方法步骤如下：

分别合成片段1、片段2和片段3，然后片段1和片段2组装合成化合物4，化合物4皂化后

得到化合物5，化合物5和片段3组装得到保护缩宫素氨基酸序列（化合物6），经环化和脱帽反应后，乙酸乙酯结晶得到缩宫素粗品，最后采用C18反相硅胶色谱纯化，得到缩宫素产品。

按照本发明优选的方案：

1. 合成片段1：Boc-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-OH

将Boc-Cys(Acm)-OH(1eq.), HOSu(1.1eq.),用四氢呋喃溶解，-10℃冷浴10min，DCC(1.1eq.)用少量THF溶解，加入以上溶液中，反应20 min后，称H-Tyr(tBu)-OH(1.1eq.) 和$NaHCO_3$(1.1eq.) 用水溶解，加入以上溶液中。15-25℃反应，HPLC监测反应完成后，0.5 M盐酸调pH至中性，过滤掉不溶物，浓缩除去THF，0.5 M盐酸调pH至2得白色固体，过滤，水洗至中性，真空干燥得片段1。

2. 合成片段2：H-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe

（1） 合成化合物2.1：Fmoc-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将Fmoc-Cys(Acm)-OH(1eq.), HOBt(1.1eq.),用THF和少量DMF溶解，-10℃冷浴10min，DCC(1.1eq.) 用少量THF溶解，加入以上溶液中，反应20 min后，称H-Pro-OMe.HCl(1.1eq.)用THF溶解，加入TEA(1.1eq.)，混匀，加入以上反应溶液中。15-25℃反应，HPLC监测反应完全后，过滤除去不溶物，浓缩，用0.1M盐酸析出固体，过滤，水洗至中性，真空干燥得化合物2.1。

（2） 合成化合物2.2：H-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将干燥好的化合物2.1用适量二乙胺溶解，浓缩至少量，加石油醚析出，过滤，石油醚洗涤，真空干燥得化合物2.2。

（3） 合成化合物2.3：Fmoc-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将Fmoc-Asn(Trt)-OH(1.1eq.), HOBt(1.1eq.),用THF和少量DMF溶解，-10℃冷浴10min，DCC(1.1eq.)用少量THF溶解，加入以上溶液中，反应20 min后，称化合物2.2(1eq.)用THF溶解，加入以上反应溶液中。15-25℃反应，HPLC监测反应完全后，过滤除去不溶物，浓缩，用0.1M盐酸析出固体，过滤，水洗至中性，真空干燥得化合物2.3。

（4） 合成化合物2.4：H-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将干燥好的化合物2.3用适量二乙胺溶解，浓缩至少量，加饱和$NaHCO_3$析出，过滤，水洗至中性，真空干燥，然后用石油醚搅拌洗涤三次，过滤，真空干燥得化合物2.4。

（5） 合成化合物2.5：Fmoc-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将Fmoc-Gln(Trt)-OH(1.1eq.), HOBt(1.1eq.),用THF和少量DMF溶解，-10℃冷浴10min，DCC(1.1eq.)用少量THF溶解，加入以上溶液中，反应20 min后，称化合物2.4(1eq.)用THF溶解，加入以上反应溶液中。15-25℃反应，HPLC监测反应完全后，过滤除去不溶物，浓缩，用0.1M盐酸析出固体，过滤，水洗至中性，真空干燥得化合物2.5。

（6） 合成化合物2.6：H-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将干燥好的化合物2.5用适量二乙胺溶解，浓缩至少量，加饱和$NaHCO_3$析出，过滤，水洗至中性，真空干燥，然后用石油醚搅拌洗涤三次，过滤，真空干燥得化合物2.6。

（7） 合成化合物2.7：Fmoc-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将Fmoc-Ile-OH(1.1eq.), HOBt(1.1eq.),用THF和少量DMF溶解，-10℃冷浴10min，

DCC(1.1eq.)用少量THF溶解，加入以上溶液中，反应20 min后，称化合物2.6(1eq.)用THF溶解，加入以上反应溶液中。15-25℃反应，HPLC监测反应完全后，过滤除去不溶物，浓缩，用0.1 M盐酸析出固体，过滤，水洗至中性，真空干燥得化合物2.7。

（8） 合成片段2：H-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将干燥好的化合物2.7用适量二乙胺溶解，浓缩至少量，加饱和$NaHCO_3$析出，过滤，水洗至中性，真空干燥，然后用石油醚搅拌洗涤三次，过滤，真空干燥得化合物2。

3. 合成片段3：H-Leu-Gly-NH_2

称 Fmoc-Leu-OH(1eq.), BOP(1eq.) 用 DMF 溶解，加 DIPEA(1.2eq.)，5min 后，称 H-Gly-NH_2.HCl(1.1eq.)用DMF溶解，加TEA（1.1eq.），倒入以上反应液中，TLC（DCM: MeOH: AcOH=100:6:1）跟踪监测,反应完全后，用0.1M HCl 溶液析出，水洗至中性，真空干燥得产物 Fmoc-Ile-Gly-NH_2.HCl 。将干燥的 Fmoc-Ile-Gly-NH_2.HCl 加入适量二乙胺，TLC（DCM:MeOH:AcOH=100:6:1）跟踪监测，反应完全后，浓缩，石油醚析出，过滤，石油醚洗涤，真空干燥得到片段3。

4. 合成化合物4：

称片段1(1.1eq.), HOBt(1.1eq.)用THF和少量DMF溶解，-10℃冷浴10min，DCC(1.1eq.)用少量THF溶解，加入以上溶液中，反应20 min后，称片段2(1eq.)用THF溶解，加入以上反应溶液中。15-25℃反应，HPLC监测反应完全后，过滤除去不溶物，浓缩，用饱和碳酸氢钠溶液析出固体，过滤，水洗至中性，真空干燥得化合物4。

5. 合成化合物5：

化合物4（1eq.）用THF溶解，-10℃冷浴10min，加入2 M LiOH（5eq.）溶液冰浴反应，HPLC检测反应完全后，0.5M盐酸溶液调pH至中性，浓缩，析出白色固体，过滤，水洗，真空干燥得化合物5。

6. 合成化合物6：

化合物5（1eq.）、BOP(1eq.)用DMF溶解，加入DIPEA(1.1eq.)，5min后，称片段3（1.1eq.）用DMF溶解，投入以上反应液。HPLC检测反应完全后，0.1 M盐酸溶液析出白色固体，过滤，水洗至中性，真空干燥得化合物5。

7. 合成化合物7：

碘（10eq.）用DMF溶解，缓慢加入化合物6（1eq.），HPLC检测反应完全后，0.1 %硫代硫酸钠溶液析出白色固体，过滤，水洗，真空干燥得化合物7。

8. 合成缩宫素粗品：

将化合物7溶于三氟乙酸，10min后，浓缩至少量，加DCM，浓缩至少量，重复三次，加乙酸乙酯冷藏，过夜，过滤，固体真空干燥。

9. 缩宫素粗品纯化：

粗肽的预处理：称取0.5 g 粗肽用10 ml 0.1M NaH_2PO_4溶液溶解，加入乙腈使得乙腈的浓度为15%，然后用0.45 μm 微孔滤膜过滤。

纯化条件与梯度：

制备柱：DAC HB-50，富士硅胶100 Å-10 μm -C18

检测波长：220 nm， 流速：50 ml/min

流动相：A 0.1M NaH_2PO_4溶液，B 50%乙腈/A，0-60min：30%B-50%B

收集纯度99%以上的收集液，25℃浓缩，PS聚合物脱盐，浓缩，冻干，得缩宫素纯品，

HPLC图谱见附图；以欧洲药典标准品为标准物质，按欧洲药典缩宫素含量测定法，本发明所得到的缩宫素含量为98.1%，效价588 IU/mg。

本发明的有益效果：

在本发明中，结合使用了 Boc 多肽合成法和 Fmoc 多肽合成法，所有反应均在温和条件下进行，未使用国内外所有液相合成缩宫素的文献报道的氨钠法脱帽反应；首次未使用剧毒试剂或不安全的反应条件进行缩宫素的液相合成，极大降低了缩宫素的合成成本，为工业化生产缩宫素提供了参考。本发明中所有的化学反应均在温和的条件下进行，不涉及剧烈难以控制的反应条件和剧毒的化学试剂，得到了高纯度（99%以上）、高效价（588 IU/mg）的缩宫素产品。

附图说明：

图 1 是片段 1：Boc-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-OH 的 RP-HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 30-50%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 210nm；

图 2 是片段 1 高酸裂解样品 H-Cys(Acm)-Tyr-OH 的 ESI-MS 图；

图 3 是 Fmoc-Cys(Acm)-Pro-OMe 的 RP-HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 30-90%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 210nm；

图 4 是 H-Cys(Acm)-Pro-OMe 的 RP-HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 0-10%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 210nm；

图 5 是 Fmoc-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe 的 RP-HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 50-90%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 210nm；

图 6 是 H-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe 的 RP-HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 30-90%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 210nm；

图 7 是 H-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe 的 RP-HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 50-90%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 210nm；

图 8 是 H-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe（片段 2）的 RP-HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 50-90%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 210nm；

图 9 是 H-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe（片段 2）的 ESI-MS 图；

图 10 是 Fmoc-Leu-Gly-NH2 的 RP-HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 60-65%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 210nm；

图 11 是 H-Leu-Gly-NH2（片段 3）的 RP-HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 0-30%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 210nm；

图 12 是 H-Leu-Gly-NH2（片段 3）的 ESI-MS 图；

图 13 是化合物 4 的 RP-HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 75-80%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 210nm；

图 14 是化合物 5 的 RP-HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 80-90%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 210nm；

图 15 是化合物 6 的 RP-HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 80-85%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 210nm；

图 16 是化合物 7 的 RP-HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 80-85%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 210nm；

图17是缩宫素粗品的RP-HPLC图，分析条件：A:0.1 M NaH2PO4/H2O, B:50%CAN/H2O, 30-60%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 220nm；

图18是缩宫素纯品的RP-HPLC图，分析条件：A:0.1 M NaH2PO4/H2O, B:50%CAN/H2O, 30-60%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min,检测波长 220nm；

图 19 是缩宫素纯品的 ESI-MS 图；

图 20 是片段 3 按方案 1 合成的产物 Boc-Leu-Gly-NH2 的 HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 10-50%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min, 检测波长 210nm；

图 21 是片段 3 按方案 1 合成的产物 H-Leu-Gly-NH2 的 HPLC 图，分析条件：A:3%ACN/H2O,0.1%TFA, B:ACN, 0-30%B,0-30min,色谱柱：C18,250x4.6mm,流速 1ml/min, 检测波长 210nm。

具体实施方式

在本发明权利要求书和说明书中出现物质的英文缩写对应的中文名称见表 1

英文缩写	中文名称
Fmoc	9-芴甲氧羰基
Trt	三苯甲基
HOBt	1-羟基苯并三唑
Boc	叔丁氧羰基
tBu	叔丁基
TFA	三氟乙酸
TIS	三异丙基硅烷
DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
IPA	异丙醇
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
Gly	甘氨酸
Leu	亮氨酸
Pro	脯氨酸
Asn	门冬酰胺
Gln	谷氨酰胺
Cys	半胱氨酸
Ile	异亮氨酸
Tyr	酪氨酸
THF	四氢呋喃
DCC	二环己基碳二亚胺
HOOBt	3-羟基-1,2,3-苯并三嗪-4(3H)-酮
TEA	三乙胺
DEA	二乙胺
HOSu	N-羟基琥珀酰亚胺

表 1 本发明中出现物质的英文缩写对应的中文名称

实施例1：

合成片段1：Boc-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-OH

将Boc-Cys(Acm)-OH(100mol,29.2g,1eq.), HOSu(110mmol,12.6g,1.1eq.)，用四氢呋喃200ml溶解，-10℃冷浴10min，DCC (110mmol,22.7g,1.1eq.) 用20ml THF溶解，加入以上溶

液中，反应20 min后，称H-Tyr(tBu)-OH(110mmol,26.1g,1.1eq.)和$NaHCO_3$(110mmol,9.2g,1.1eq.)用150ml水溶解，加入以上溶液中。15-25℃反应，HPLC监测反应完成后，0.5 M盐酸调pH至中性，过滤掉不溶物，浓缩除去THF，0.5 M盐酸调pH至2得白色固体，过滤，水洗至中性，真空干燥得片段1，纯度99.1%，产物47.1g，收率92 %。片段1：Boc-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-OH RP-HPLC图谱见说明书附图1，其高酸裂解样品（H-Cys(Acm)-Tyr-OH m/z calculated.355.4; found 356.3 $[M+H]^+$）的ESI-MS质谱图见附图2。

实施例2：

合成片段2：H-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe

（1）合成化合物2.1：Fmoc-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将Fmoc-Cys(Acm)-OH(100mmol,41.5g,1eq.), HOBt(105 mmol,14.1g,1.05eq.)，用200 ml THF和30 ml DMF溶解，-10℃冷浴10min，DCC (105 mmol,21.6g,1.05eq.)用20ml THF溶解，加入以上溶液中，反应20 min后，称H-Pro-OMe.HCl(105mmol,17.4g,1.05eq.)用100 ml THF溶解，加入TEA(105mmol,14.5ml,1.05eq.)，混匀，加入以上反应溶液中。15-25℃反应，HPLC监测反应完全后，过滤除去不溶物，浓缩，用0.1M盐酸析出固体，过滤，水洗至中性，真空干燥得化合物2.1，纯度95.3%，产物50.9 g，收率97%(产率均按100mmol计算，下同)。HPLC分析图谱见说明书附图3。

（2）合成化合物2.2：H-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将干燥好的化合物2.1用200 ml 二乙胺溶解，浓缩至少量，加石油醚析出，过滤，石油醚洗涤，真空干燥得化合物2.2。纯度98.0%，产物28.8g，产率95%。HPLC分析图谱见说明书附图4。

（3）合成化合物2.3：Fmoc-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将Fmoc-Asn(Trt)-OH (1.1eq.,104.4mmol,62.3g), HOBt(1.1eq.,104.4mmol,14.1g),用DCM 200ml和DMF20ml 溶解，-10℃冷浴10min，DCC(1.1eq.,104.4mmol, 21.5g)用20ml DCM溶解，加入以上溶液中，反应20 min后，称化合物2.2(1eq.94.9 mmol, 28.8g) 用50 ml DMF 溶解，加入以上反应溶液中。15-25℃反应，HPLC监测反应完全后，过滤除去不溶物，旋转蒸发仪浓缩，用0.1M盐酸析出固体，过滤，水洗至中性，真空干燥得化合物2.3。纯度99%，产物75 g，产率85%。HPLC分析图谱见说明书附图5。

（4）合成化合物2.4：H-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将干燥好的化合物2.3用200 ml二乙胺溶解，浓缩至少量，加饱和$NaHCO_3$析出，过滤，水洗至中性，真空干燥，然后用石油醚搅拌洗涤三次，过滤，真空干燥得化合物2.4。纯度96.3%，产物55.7 g，产率84.4%。HPLC分析图谱见说明书附图6。

（5）合成化合物2.5：Fmoc-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将 Fmoc-Gln(Trt)-OH(1.1eq.,92.8mmol,56.7g), HOBt(1.1eq.,92.8mmol,12.5g), 用 150 ml THF和50 ml DMF溶解，-10℃冷浴10min，DCC(1.1eq.,92.8mmol,19.1g)用20ml THF溶解，加入以上溶液中，反应20 min后，称化合物2.4(1eq.,84.4mmol,55.7g)用150 ml THF溶解，加入以上反应溶液中。15-25℃反应，HPLC监测反应完全后，过滤除去不溶物，浓缩，用0.1M盐酸析出固体，过滤，水洗至中性，真空干燥得化合物2.5, 产物106.4g，产率85%。

（6）合成化合物2.6：H-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将干燥好的化合物2.5用150 ml 二乙胺溶解，浓缩至少量，加饱和$NaHCO_3$析出，过滤，水洗至中性，真空干燥，然后用石油醚搅拌洗涤三次，过滤，真空干燥得化合物2.6, 纯度98.3%，产物86.5g，产率84%。HPLC分析图谱见说明书附图7。

（7）合成化合物2.7：Fmoc-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将Fmoc-Ile-OH(1.1eq.,92.4mmol,32.6 g), HOBt(1.1eq.,92.4mmol,12.5g),用150ml THF和50 ml DMF溶解，-10℃冷浴10 min，DCC(1.1eq.,92.4mmol,19g)用少20ml THF溶解，加入以上溶液中，反应20 min后，称化合物2.6(1eq.,84mmol,86.5g)用150ml THF溶解，加入以上反应溶液中。15-25℃反应，HPLC监测反应完全后，过滤除去不溶物，浓缩，用0.1 M盐酸析出固体，过滤，水洗至中性，真空干燥得化合物2.7。纯度90.3%，产物114.4 g，产率83.8%。

（8）合成片段2： H-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

将干燥好的化合物2.7用150 ml 二乙胺溶解，浓缩至少量，加饱和$NaHCO_3$析出，过滤，水洗至中性，真空干燥，然后用石油醚搅拌洗涤三次，过滤，真空干燥得化合物2。纯度94.2%，产物91.5 g，产率80.1 %。HPLC分析图谱见说明书附图8。其高酸裂解样品（H-Ile-Gln-Asn-Cys(Acm)-Pro-OMe m/z calculated.658.3; found 681.1.3 $[M+Na]^+$）的ESI-MS质谱图见附图9。

实施例3：

按方案2合成片段3：H-Leu-Gly-NH_2

称Fmoc-Leu-OH(1eq.,100mmol,35.3g), BOP(1.01eq.,101mmol,44.7g) 用DMF 200ml 溶解，加DIPEA(1.2eq.,120mmol,21ml)，5min后，称H-Gly-NH_2.HCl(1.1eq.,110mmol,12.2g)用DMF100ml 溶解，加TEA（1.1eq.,110mmol,15ml），倒入以上反应液中，TLC（DCM:MeOH:AcOH=100:6:1）跟踪监测,反应完全后，用0.1M HCl 溶液析出，水洗至中性，真空干燥得产物Fmoc-Leu-Gly-NH_2.HCl,纯度97 %，产物43.7g，产率98 %,HPLC分析图谱见说明书附图10。

将干燥的Fmoc-Leu-Gly-NH_2.HCl加入400ml二乙胺，TLC（DCM:MeOH:AcOH=100:6:1）跟踪监测，反应完全后，浓缩，石油醚析出，过滤，石油醚洗涤，真空干燥得到片段3,纯度98.4 %，产物17.9g，产率95.6 %, HPLC分析图谱见说明书附图11，（H-Leu-Gly-NH_2 m/z calculated.187.1; found 210.0 $[M+Na]^+$）ESI-MS质谱图见附图12。

实施例4：

合成化合物4：

称片段1(1.1eq.,88mmol,45g), HOBt(1.1eq.,88mmol,11.9mg)用THF150ml和DMF 60ml 溶解，-10℃冷浴10min，DCC(1.1eq.,88mmol,18.1mg)用20ml THF溶解，加入以上溶液中，反应20 min后，称片段2(1eq.,80mmol,91.5g)用THF100ml 溶解，加入以上反应溶液中。15-25℃反应，HPLC监测反应完全后，过滤除去不溶物，浓缩，用饱和碳酸氢钠溶液析出固体，过滤，水洗至中性，真空干燥得化合物4。纯度86 %，产物115.5g，产率70.6 %, RP-HPLC分析图谱见说明书附图13。

实施例5：

合成化合物5：

化合物4（1eq.,115.5g）用THF 800 ml溶解，-10℃冷浴10 min，加入1.5 M NaOH（5eq.,353mmol）溶液235 ml 冰浴反应，HPLC检测反应完全后，0.5M盐酸溶液调pH至中性，浓缩，析出白色固体，过滤，水洗，真空干燥得化合物5。纯度93 %，产物106.2g，产率65.5 %, RP-HPLC分析图谱见说明书附图14。

实施例6：

合成化合物6：

化合物5（1eq.,65.5mmol,106.2g）、BOP(1.05eq.,68.8mmol,30.4g)用DMF150ml溶解，加入DIPEA(1.1eq.,72mmol,12.5ml)，5min后，称片段3（1.1eq.,72mmol,13.4g）用DMF100ml溶解，投入以上反应液。HPLC检测反应完全后，0.1 M盐酸溶液析出白色固体，过滤，水洗至中性，真空干燥得化合物5。纯度88.6 %，产物107.5g，产率60 %, RP-HPLC分析图谱见说明书附图15。

实施例7：

合成化合物7：

碘（10eq.,600mmol,152g）用DMF 1200 ml溶解，缓慢加入化合物6（1eq.,60mmol,107.5g），HPLC检测反应完全后，0.1 %硫代硫酸钠溶液析出白色固体，过滤，水洗，真空干燥得化合物7。纯度95%，产物96.5g，产率58.6 %, RP-HPLC分析图谱见说明书附图16。

实施例8：

合成缩宫素粗品：

将化合物7溶于三氟乙酸裂解液（TFA:TIS:H_2O=95:5:5）200ml，5min后，浓缩至少量，加DCM，浓缩至少量，重复三次，加乙酸乙酯冷藏，10h后，过滤，固体真空干燥。得到缩宫素粗品，纯度94.5%，产物称重26.6g，产率26.4%， RP-HPLC分析图谱见说明书附图17。

实施例9：

缩宫素粗品纯化：

粗肽的预处理：称取0.5 g 粗肽用10 ml 0.1M NaH_2PO_4溶液溶解，加入乙腈使得乙腈的浓度为15%，然后用0.45 μm 微孔滤膜过滤。

纯化条件与梯度：

制备柱：DAC HB-50，富士硅胶100 Å-10 μm -C18

检测波长：220 nm， 流速：50 ml/min

流动相：A 0.1M NaH_2PO_4溶液，B 50%乙腈/A，0-60min：30%B-50%B

收集纯度99%以上的收集液，25℃浓缩，PS聚合物脱盐，加乙酸，浓缩，冻干，得缩宫素10.6 g，HPLC图谱见附图18，ESI-MS图见附图19（oxytocin m/z calculated.1006.4; found 1007.5 $[M+H]^+$）；以欧洲药典标准品作为标准物质，按欧洲药典缩宫素含量测定法，除去水分和醋酸，含量为98.2%，效价为588 IU/mg。

实施例 10

用方案1合成片段3：

称Boc-Leu-OH（1eq.,100mmol,23.1g）和BOP(1.01eq.,101mmol,44.7g)，并用 用DCM 200ml 和 DMF 20ml 溶解，加 DIPEA(1.2eq.,120mmol,21ml)， 5min 后， 称 H-Gly-NH_2.HCl(1.1eq.,110mmol,12.2g)用DMF 100ml溶解，加TEA（1.1eq.,110mmol,15ml），倒入以上反应液中，TLC（DCM:MeOH:AcOH=100:20:1）跟踪监测,反应完全后，用0.5 M HCl溶液析出白色稠状物质，EA溶解，萃取，水洗涤3遍，饱和氯化钠洗涤1遍，无水$MgSO_4$干燥30min，过滤，浓缩至干，纯度99.1%，HPLC分析图谱见附图20。

将上述产物加 200 ml 30% TFA/DCM(三氟乙酸/二氯甲烷)溶液，反应30min，浓缩至干，真空干燥得产物 H-Leu-Gly-NH_2。纯度96 %，产物25.6g，产率85 %。HPLC分析图谱见附图21。

权利要求书

1. 一种多肽液相合成缩宫素的方法，其特征在于，包括如下步骤：

（1） 合成片段1：Boc-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-OH；

（2） 合成片段2：H-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe；

（3） 合成片段3：H-Leu-Gly-NH_2；

（4） 合成化合物4：Boc-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe；

（5） 合成化合物5：Boc-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OH；

（6） 合成化合物6：

Boc-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-Leu-Gly-NH_2；

（7） 合成化合物7：

Boc-Cys-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys-Pro-Leu-Gly-NH_2；

（8） 将化合物7用三氟乙酸进行脱帽反应，浓缩，得到缩宫素粗品溶液；

（9） 粗品用C18反相硅胶色谱纯化，制备得到缩宫素纯品。

2. 根据权利要求1所述的一种多肽液相合成缩宫素的方法，其特征在于，所述步骤（1）中的片段1为：Boc-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-OH；合成片段1的氨基酸单元为Boc-Cys(Acm)-OH和H-Tyr(tBu)-OH；缩合剂为DIC或DCC，活化剂为HOSu或HOBt；溶剂为THF和水，THF和水的比例为1:1—5:1，其中，所述溶剂还可以为DMF或DMSO。

3. 根据权利要求1所述的一种多肽液相合成缩宫素的方法，其特征在于，所述步骤（2）中的片段2为：H-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe；合成片段2包括如下步骤：

（1） 合成化合物2.1：Fmoc-Cys(Acm)-Pro-OMe：

Fmoc-Cys(Acm)-OH 与 H-Pro-OMe.HCl 的物质的量之比为 1:1.05-1:1.5；缩合剂为 DIC 或 DCC，缩合剂与 H-Pro-OMe.HCl 的物质的量之比为 1:1；活化剂为 HOSu 或 HOBt 或 HOOBt，活化剂与 H-Pro-OMe.HCl 的物质的量之比为 1:1；碱为三乙胺（TEA）、二异丙基乙胺（DIPEA）或 N-甲基吗啉（NMM），碱与 H-Pro-OMe.HCl 的物质的量之比为 1:1；溶剂为 DMF、DMSO、DCM 或 THF；

（2） 合成化合物2.2：H-Cys(Acm)-Pro-OMe：

化合物2.1的脱帽反应，脱帽试剂为二乙胺（DEA）或5%哌嗪/DCM；脱帽完成后，浓缩，用石油醚析出产物，过滤，真空干燥得到化合物2.2；

（3） 合成化合物2.3：Fmoc-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

化合物2.2与Fmoc-Asn(Trt)-OH的物质的量之比为1:1.05-1:1.5；缩合剂为DIC或DCC，缩合剂与Fmoc-Asn(Trt)-OH的物质的量之比为1:1；活化剂为HOSu、HOOBt或HOBt，活化剂与Fmoc-Asn(Trt)-OH的物质的量之比为1:1；溶剂为DMF、DMSO、DCM或THF；

（4） 合成化合物2.4：H-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

化合物2.3的脱帽反应，脱帽试剂为二乙胺（DEA）、5%哌嗪/DMF；脱帽完成后，浓缩，饱和$NaHCO_3$溶液析出，过滤，水洗至中性，真空干燥，然后石油醚搅拌洗涤，过滤，真空干燥得化合物2.4；

（5） 合成化合物2.5：Fmoc-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

化合物2.4与Fmoc-Gln(Trt)-OH的物质的量之比为1:1.05-1:1.5；缩合剂为DIC或DCC，缩

合剂与Fmoc-Gln(Trt)-OH的物质的量之比为1:1；活化剂为HOSu、HOOBt或HOBt，活化剂与Fmoc-Gln(Trt)-OH的物质的量之比为1:1；溶剂为DMF、DMSO、DCM或THF；

（6） 合成化合物2.6：H-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

化合物2.5的脱帽反应，脱帽试剂为二乙胺（DEA）或5%哌嗪/DMF；脱帽完成后，浓缩，饱和$NaHCO_3$溶液析出，过滤，水洗至中性，真空干燥，然后石油醚搅拌洗涤，过滤，真空干燥得化合物2.6；

（7） 合成化合物2.7：Fmoc-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

化合物2.6与Fmoc-Ile-OH的物质的量之比为1:1.05-1:1.5；缩合剂为DIC或DCC，缩合剂与Fmoc-Ile-OH的物质的量之比为1:1；活化剂为HOSu、HOOBt或HOBt，活化剂与Fmoc-Ile-OH的物质的量之比为1:1；溶剂为DMF、DMSO、DCM或THF；

（8） 合成片段2：H-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe：

化合物2.7的脱帽反应，脱帽试剂为二乙胺（DEA）或5%哌嗪/DMF；脱帽完成后，浓缩，饱和$NaHCO_3$溶液析出，过滤，水洗至中性，真空干燥，然后石油醚搅拌洗涤，过滤，真空干燥得片段2。

4. 根据权利要求1所述的一种多肽液相合成缩宫素的方法，其特征在于，所述步骤（3）中的片段3为：H-Leu-Gly-NH_2；合成片段3可以选择方案1或者方案2进行：

方案1：氨基酸单元为Boc-Leu-OH、H-Gly-NH_2.HCl；缩合剂为BOP、HBTU、TBTU、DIC或DCC/HOBt或HOSu；碱为TEA、NMM或DIPEA；溶剂为DMF、DMSO、THF或DCM；合成Boc-Leu-Gly-NH_2后，用TFA脱去Boc得到H-Leu-Gly-NH_2；

方案2：氨基酸单元为Fmoc-Leu-OH、H-Gly-NH_2.HCl；缩合剂为BOP、HBTU、TBTU、DIC或DCC/HOBt或HOSu；碱为TEA、NMM或DIPEA；溶剂为DMF、DMSO、THF或DCM；合成Fmoc-Leu-Gly-NH_2后，脱去Fmoc保护基得到H-Leu-Gly-NH_2；脱帽试剂为二乙胺（DEA）或5%哌嗪/DCM。

5. 根据权利要求1所述的一种多肽液相合成缩宫素的方法，其特征在于，所述步骤（4）中的化合物4为：Boc-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OMe；

合成化合物4包括如下步骤：片段1与片段2的物质的量之比为1.05-1.5:1；缩合剂为BOP、DCC、DIC或叠氮试剂，缩合剂与片段1的物质的量之比为1:1；活化剂为HOSu或HOBt，活化剂与片段1的物质的量之比为1:1；溶剂为DCM、THF、DMF或DMSO。

6. 根据权利要求1所述的一种多肽液相合成缩宫素的方法，其特征在于，所述步骤（5）中的化合物5为：Boc-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-OH；

合成化合物5包括如下步骤：皂化试剂为LiOH或NaOH，其物质的量为化合物4的5-15当量，浓度为0.05-0.2M；溶剂为THF、DMF、甲醇、乙腈或DMSO。

7. 根据权利要求1所述的一种多肽液相合成缩宫素的方法，其特征在于，所述步骤（6）中的化合物6为：

Boc-Cys(Acm)-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys(Acm)-Pro-Leu-Gly-NH_2；

合成化合物6包括如下步骤：化合物5与片段3的物质的量之比为：1:1.05-2；

缩合剂为DCC、DIC、BOP或叠氮试剂；活化剂为HOSu、HOOBt或HOBt；溶剂为THF、DMF或DMSO。

8. 根据权利要求1所述的一种多肽液相合成缩宫素的方法，其特征在于，所述步骤（7）：

合成化合物7，所用试剂为碘，其物质的量为化合物6的5-10当量，浓度为0.1-0.5M；溶剂为DMF；反应完成后，用0.1%硫代硫酸钠溶液析出固体，水洗，真空干燥得到化合物7。

9. 根据权利要求8所述的一种多肽液相合成缩宫素的方法，其特征在于：所述化合物7的氨基酸序列为：

Boc-Cys-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Cys-Pro-Leu-Gly-NH_2。

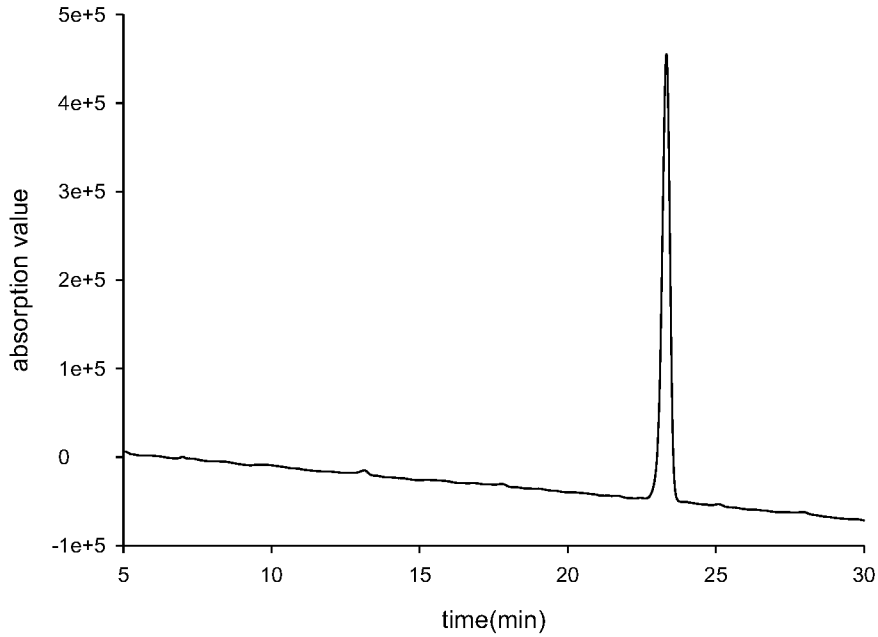

5e+5
4e+5
3e+5
2e+5
1e+5
0
-1e+5
absorption value
5
10
15
20
25
30
time(min)

图1

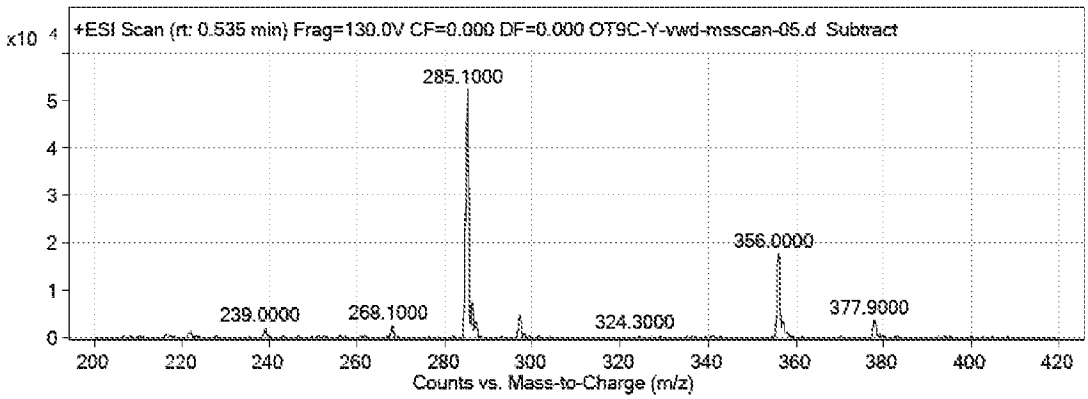

x10 4
+ESI Scan (rt: 0.535 min) Frag=130.0V CF=0.000 DF=0.000 OT9C-Y-vwd-msscan-05.d Subtract
285.1000
356.0000
239.0000
268.1000
324.3000
377.9000
Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)

图2

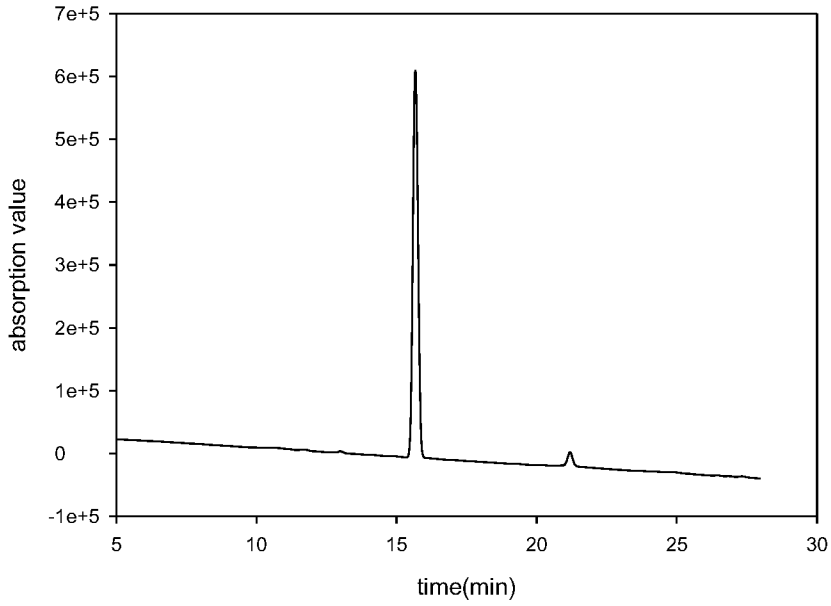

7e+5
6e+5
5e+5
4e+5
3e+5
2e+5
1e+5
0
-1e+5
absorption value
5
10
15
20
25
30
time(min)

图3

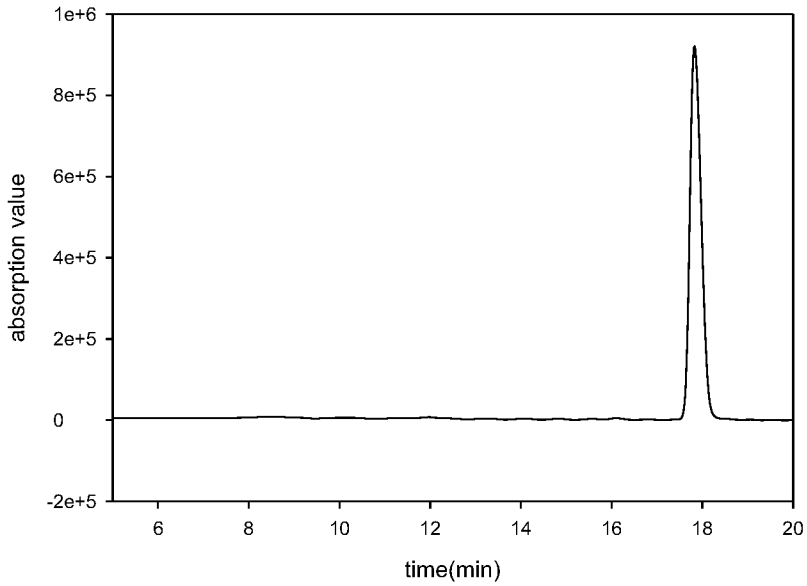

1e+6
8e+5
6e+5
4e+5
2e+5
0
-2e+5
absorption value
6
8
10
12
14
16
18
20
time(min)

图4

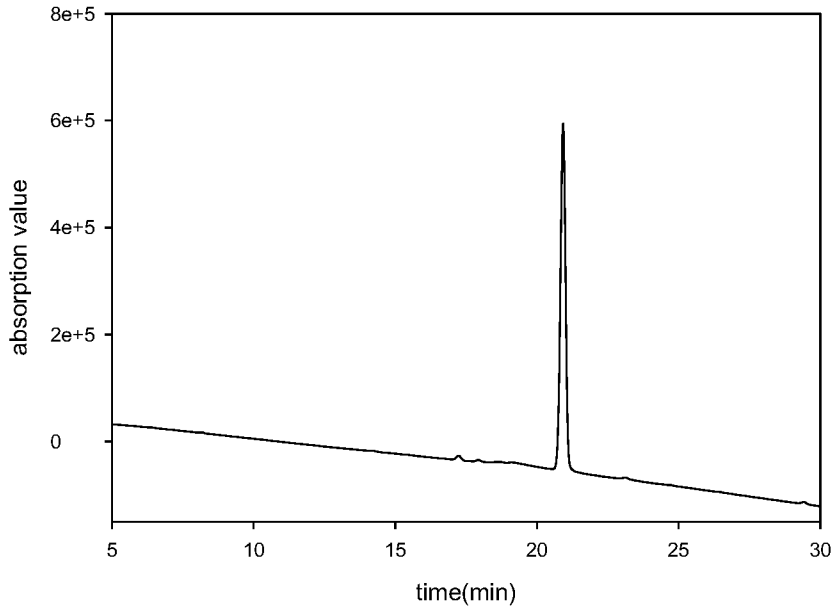

8e+5
6e+5
4e+5
2e+5
0
absorption value
5
10
15
20
25
30
time(min)

图5

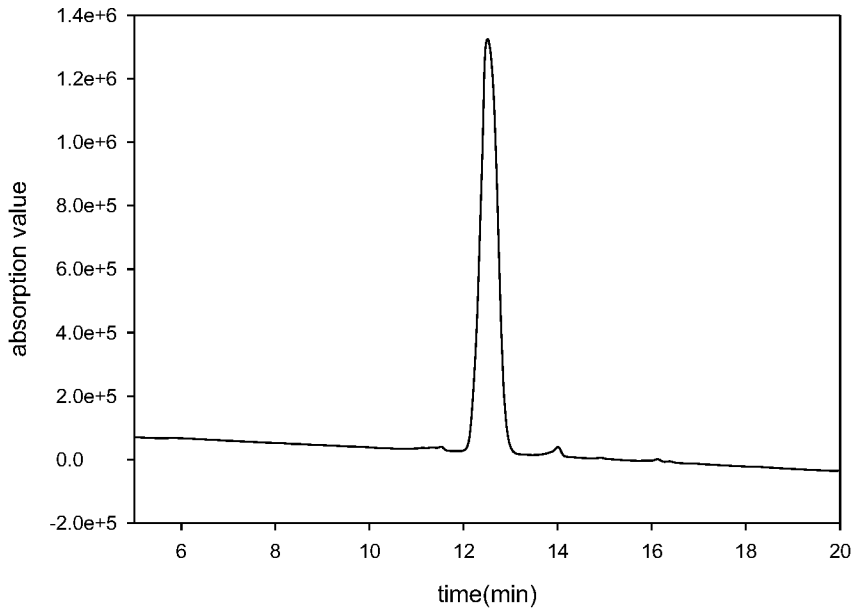

1.4e+6
1.2e+6
1.0e+6
8.0e+5
6.0e+5
4.0e+5
2.0e+5
0.0
-2.0e+5
absorption value
6
8
10
12
14
16
18
20
time(min)

图6

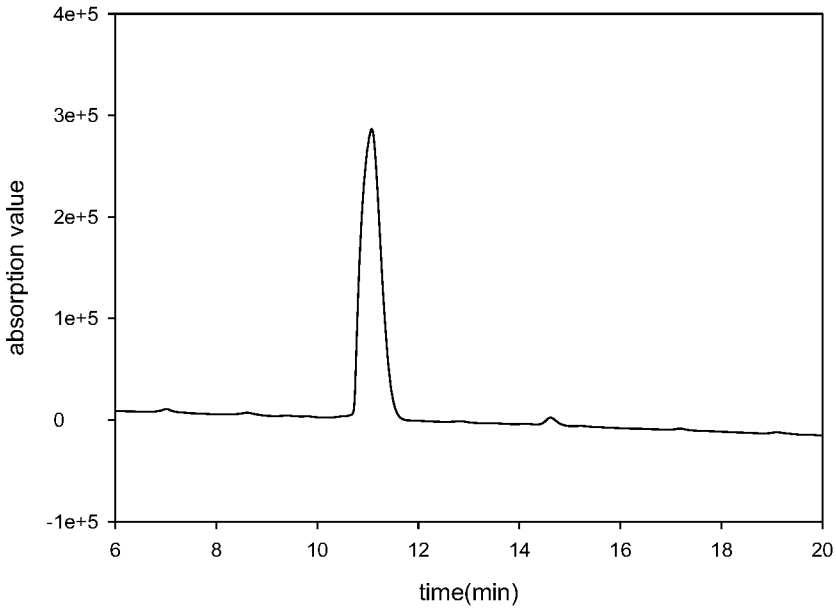

4e+5
3e+5
2e+5
1e+5
0
-1e+5
absorption value
6
8
10
12
14
16
18
20
time(min)

图7

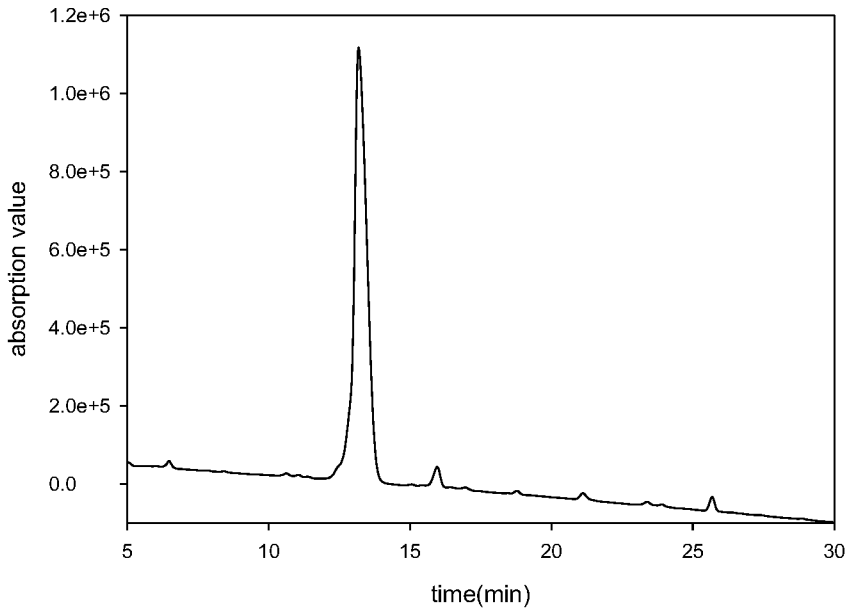

1.2e+6
1.0e+6
8.0e+5
6.0e+5
4.0e+5
2.0e+5
0.0
absorption value
5
10
15
20
25
30
time(min)

图8

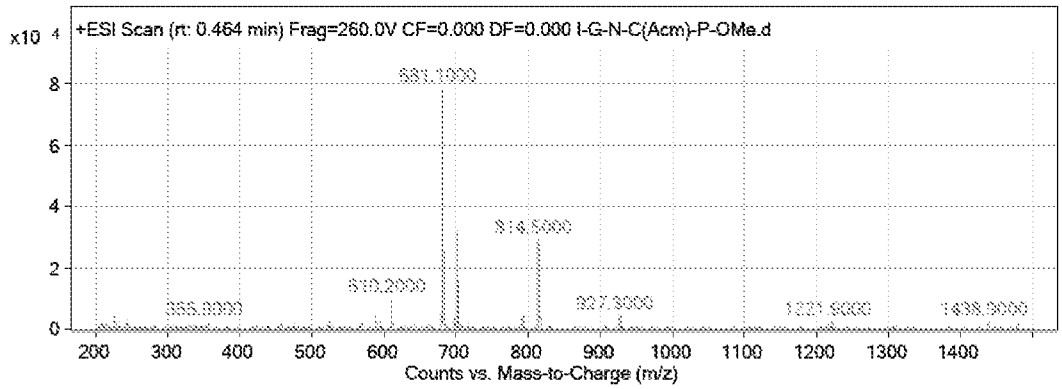

x10 4
+ESI Scan (rt: 0.464 min) Frag=260.0V CF=0.000 DF=0.000 I-G-N-C(Acm)-P-OMe.d
881.1000
814.5000
610.2000
827.3000
355.8000
1221.9000
1438.9000
Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)

图9

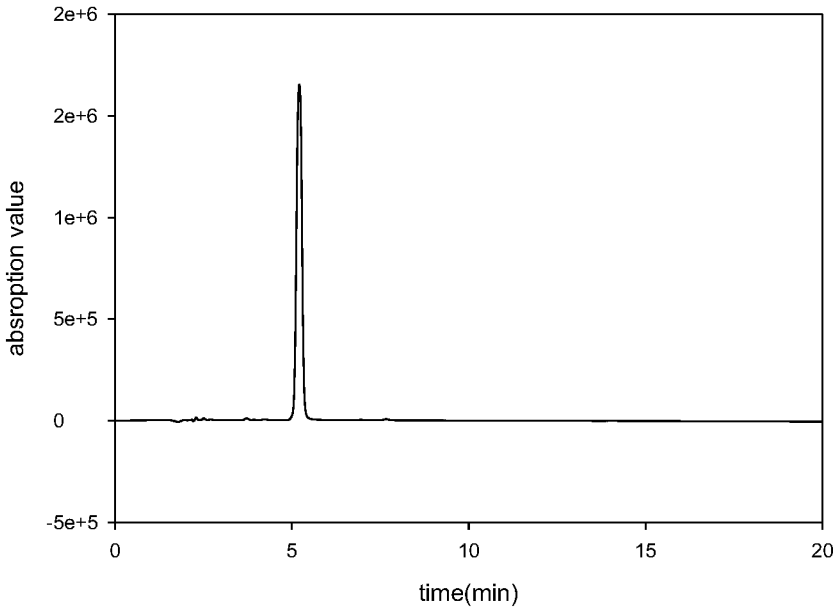

absroption value
time(min)

图10

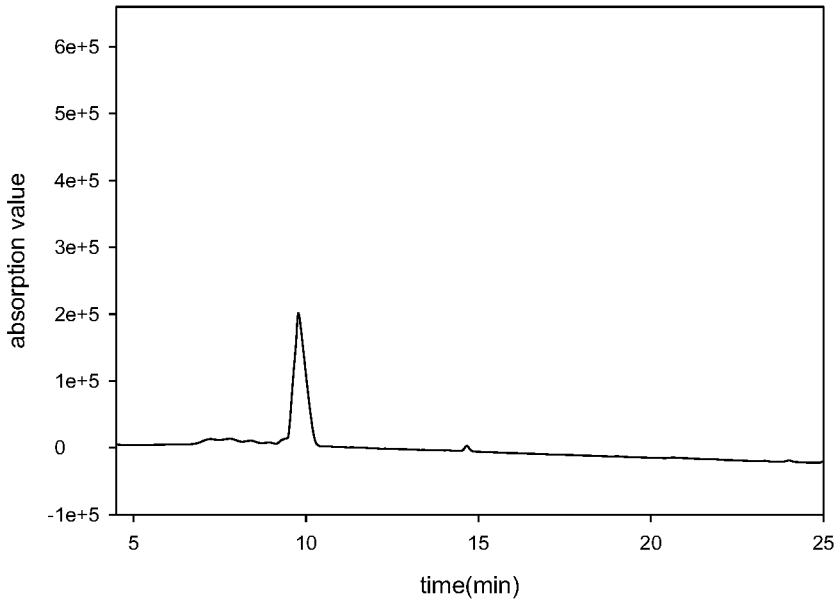

6e+5
5e+5
4e+5
3e+5
2e+5
1e+5
0
-1e+5
absorption value
5
10
15
20
25
time(min)

图11

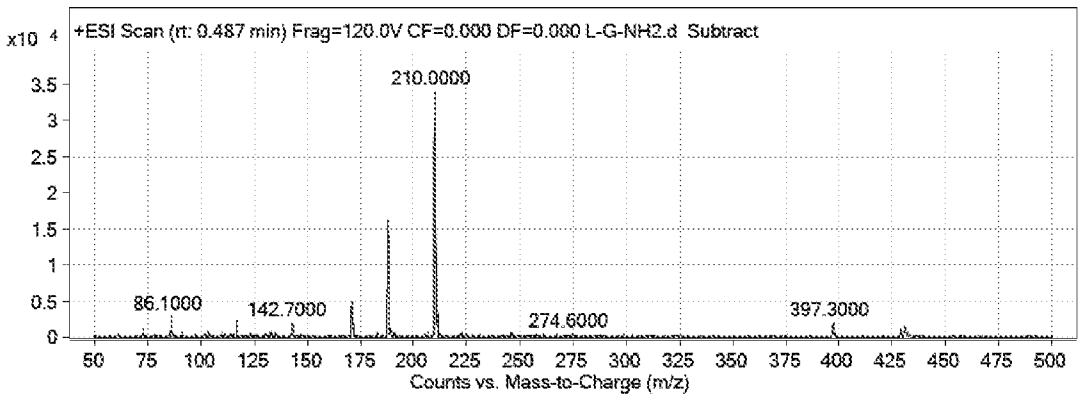

x10 4
+ESI Scan (rt: 0.487 min) Frag=120.0V CF=0.000 DF=0.000 L-G-NH2.d Subtract
210.0000
86.1000
142.7000
274.6000
397.3000
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
50 75 100 125 150 175 200 225 250 275 300 325 350 375 400 425 450 475 500
Counts vs. Mass-to-Charge (m/z)

图12

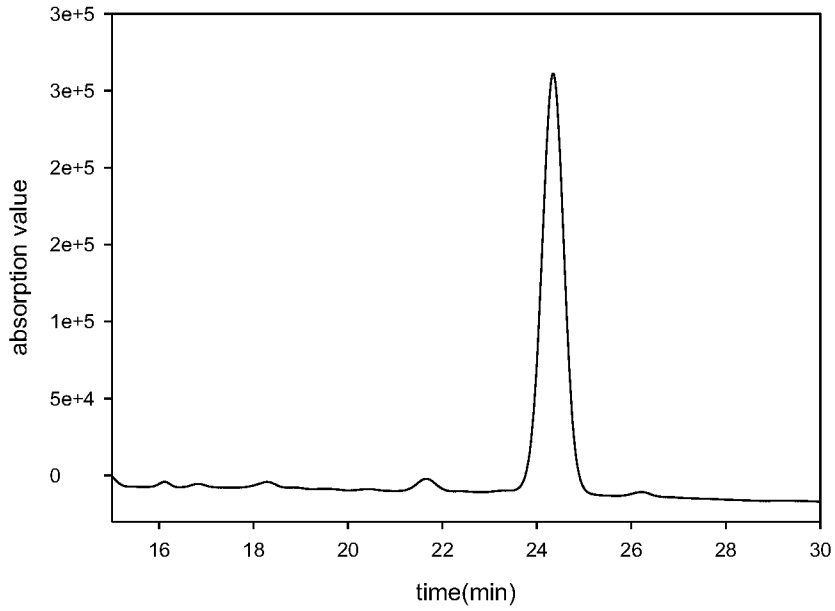

3e+5
3e+5
2e+5
2e+5
1e+5
5e+4
0
absorption value
16
18
20
22
24
26
28
30
time(min)

图13

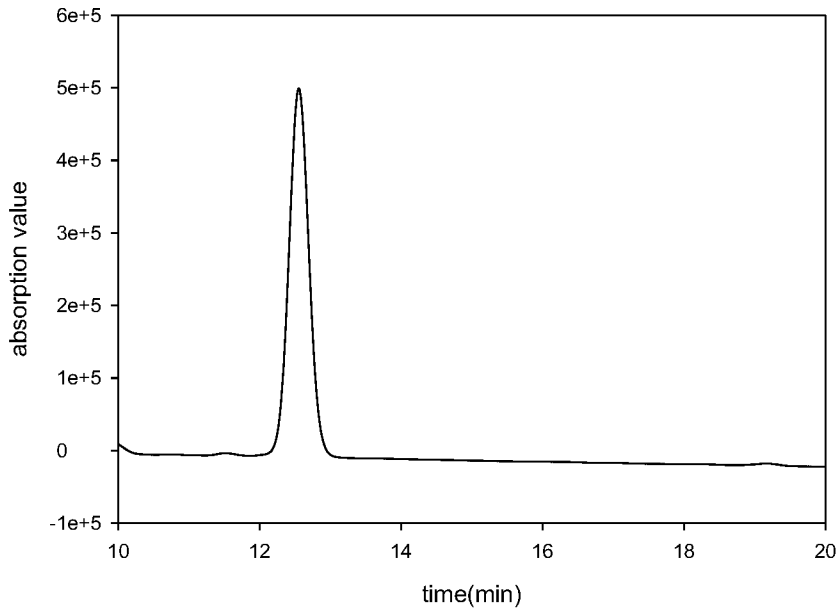

6e+5
5e+5
4e+5
3e+5
2e+5
1e+5
0
-1e+5
absorption value
10
12
14
16
18
20
time(min)

图14

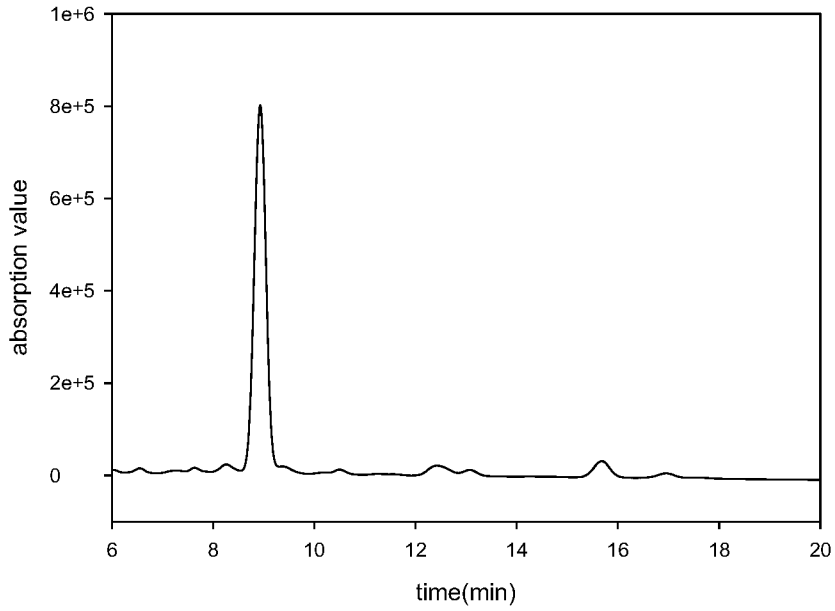

1e+6
8e+5
6e+5
4e+5
2e+5
0
absorption value
6
8
10
12
14
16
18
20
time(min)

图15

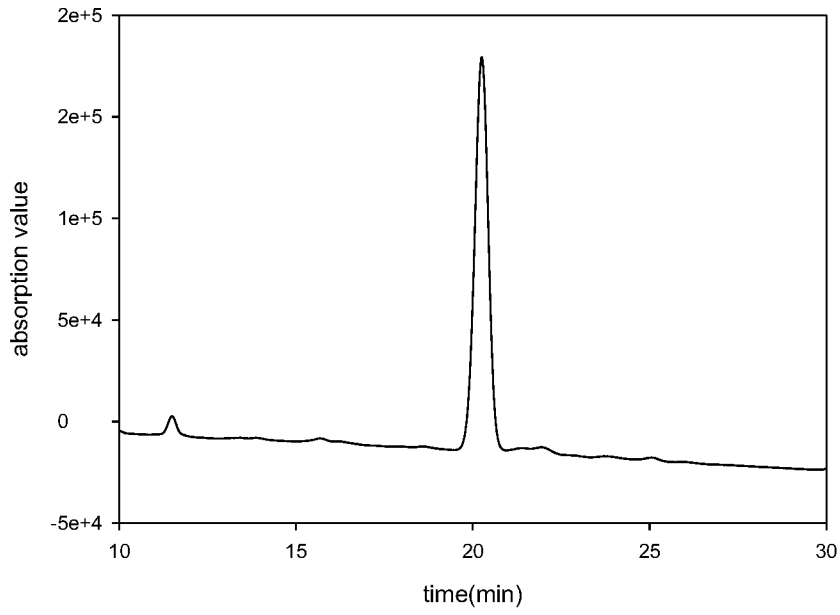

2e+5
2e+5
1e+5
5e+4
0
-5e+4
absorption value
10
15
20
25
30
time(min)

图16

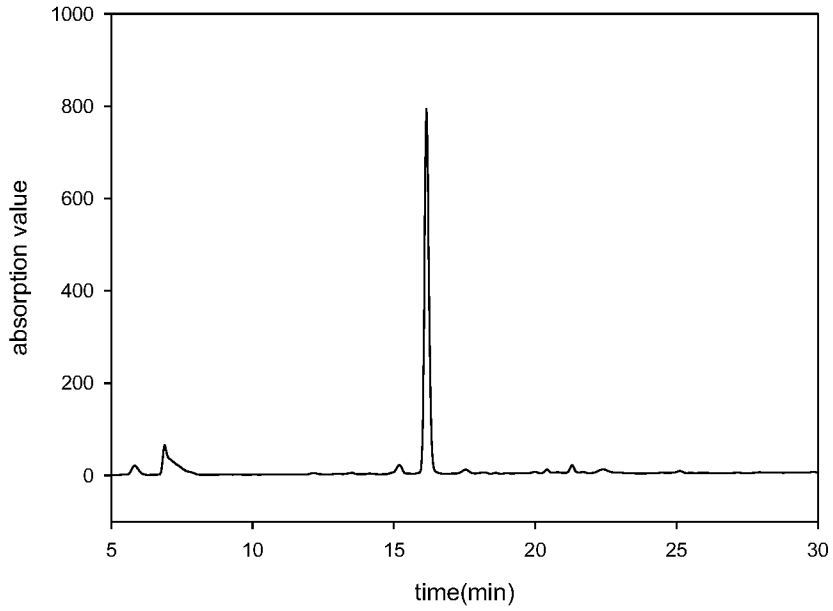

1000
800
600
400
200
0
absorption value
5
10
15
20
25
30
time(min)

图17

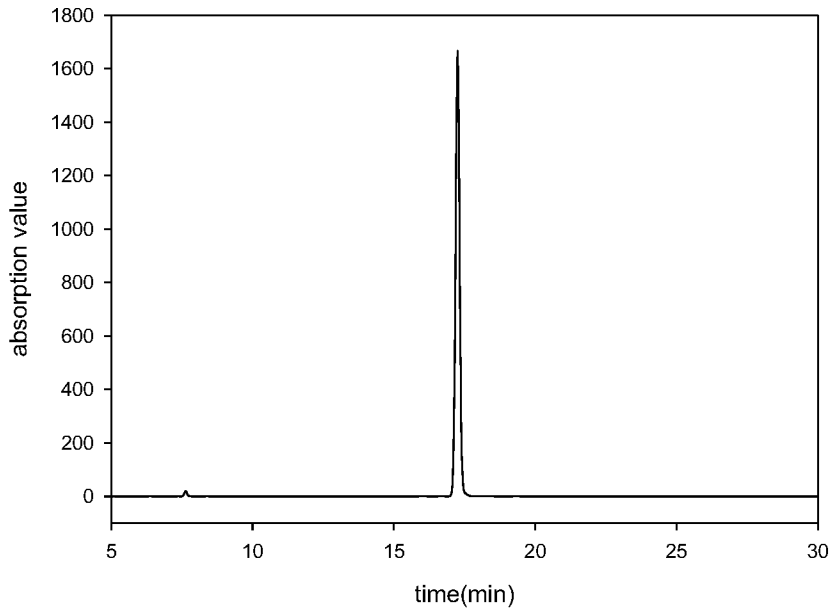

1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
absorption value
5
10
15
20
25
30
time(min)

图18

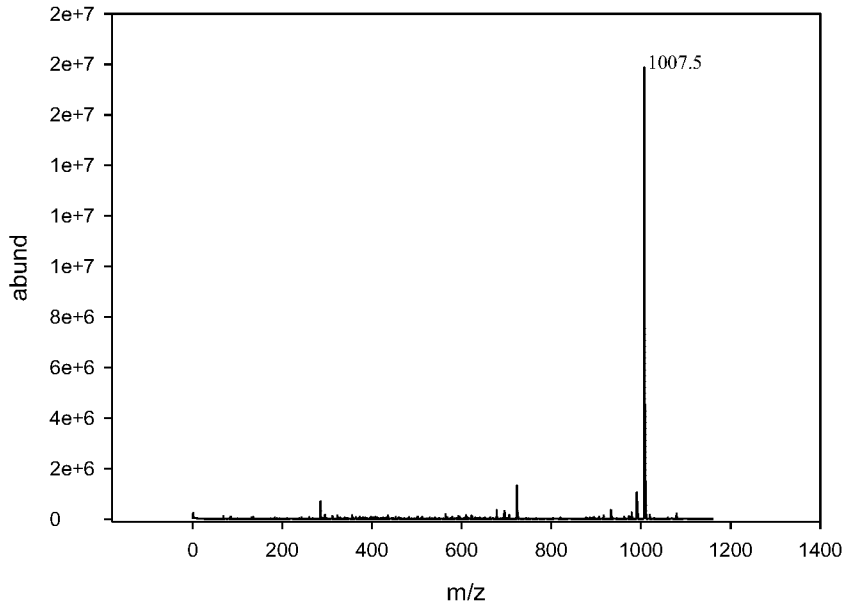

2e+7
2e+7
2e+7
1e+7
1e+7
1e+7
8e+6
6e+6
4e+6
2e+6
0
abund
1007.5
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
m/z

图19

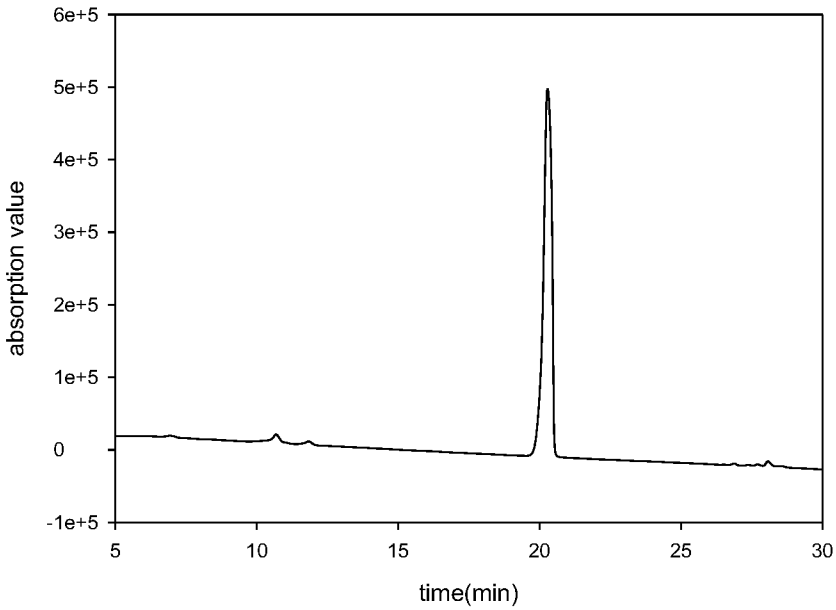

6e+5
5e+5
4e+5
3e+5
2e+5
1e+5
0
-1e+5
absorption value
5
10
15
20
25
30
time(min)

图20

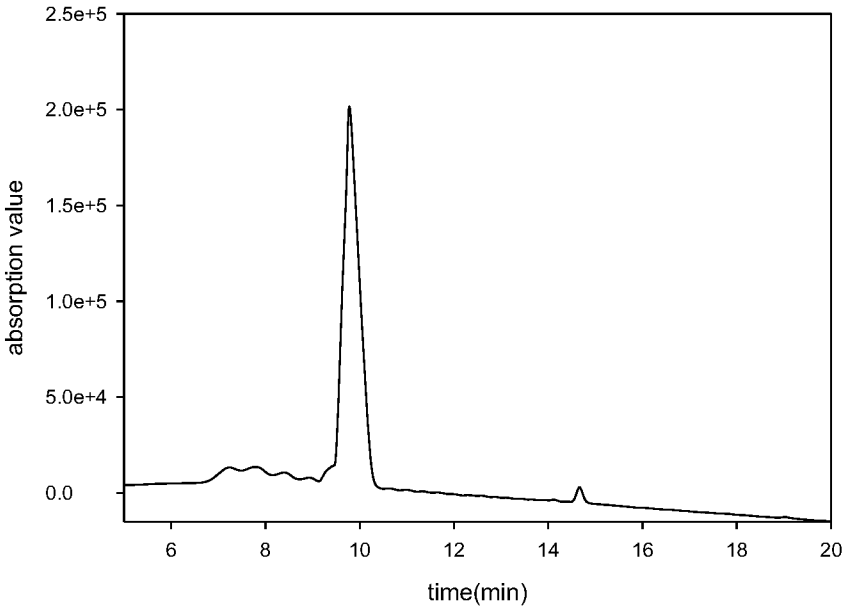

2.5e+5
2.0e+5
1.5e+5
1.0e+5
5.0e+4
0.0
absorption value
6
8
10
12
14
16
18
20
time(min)

图21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/099882

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/16 (2006.01) i; C07K 1/20 (2006.01) i; C07K 1/06 (2006.01) i; C07K 1/02 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

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)

DWPI; VEN; CNABS; CNKI; PubMed; ISI web of knowledge; 申请人/发明人, 缩宫素, 催产素, 液相, 合成, 叔丁氧羰基, 芴甲氧羰基, 三氟乙酸, oxytocin, pitocin, liquid phase, synthesis, Boc, Fmoc, TFA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106967155 A (LANZHOU KAIBO PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 21 July 2017 (21.07.2017), claims 1-9	1-9
Y	CN 102477082 A (HANGZHOU HEJIN TECHNOLOGY CO., LTD.), 30 May 2012 (30.05.2012), abstract, and description, paragraphs [0025]-[0034], [0037] and [0102]-[0103]	1-9
Y	CN 101914136 A (ANHUI HONGYE PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.), 15 December 2010 (15.12.2010), abstract, and description, paragraphs [0003]-[0004]	1-9
Y	CN 101235081 A (WUXI KAILI PHARMCEUTICAL CO., LTD.), 06 August 2008 (06.08.2008), claims 1-3	1-9
Y	CA 798320 A (HOECHST AG.), 05 November 1968 (05.11.1968), claims 1-8, and description, page 4, lines 1-20 and page 8, lines 1-10, and embodiments 1-5	1-9
Y	CN 101412752 A (HANGZHOU SINOPEP PHARMACEUTICAL INC.), 22 April 2009 (22.04.2009), claims 1-9	1-9
A	CN 105348367 A (JINAN KANGHE PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.), 24 February 2016 (24.02.2016), entire document	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 November 2017	01 December 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer PAN, Hao Telephone No. (86-10) 52871050

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/099882

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 106967155 A	21 July 2017	None	
CN 102477082 A	30 May 2012	None	
CN 101914136 A	15 December 2010	CN 101914136 B	04 July 2012
CN 101235081 A	06 August 2008	CN 101235081 B	07 July 2010
CA 798320 A	05 November 1968	None	
CN 101412752 A	22 April 2009	CN 101412752 B	07 December 2011
CN 105348367 A	24 February 2016	None	

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2017/099882

A. 主题的分类

C07K 7/16(2006.01)i; C07K 1/20(2006.01)i; C07K 1/06(2006.01)i; C07K 1/02(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. 检索领域

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））

DWPI; VEN; CNABS; CNKI; PubMed; ISI web of knowledge; 申请人/发明人, 缩宫素,催产素,液相,合成,叔丁氧羰基,芴甲氧羰基,三氟乙酸,oxytocin,pitocin,liquid phase,synthesis,Boc,Fmoc,TFA

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
PX	CN 106967155 A (兰州凯博药业股份有限公司) 2017年 7月 21日 (2017-07-21) 权利要求1-9	1-9
Y	CN 102477082 A (杭州和锦科技有限公司) 2012年 5月 30日 (2012-05-30) 摘要、说明书第[0025]-[0034]， [0037]， [0102]-[0103]段	1-9
Y	CN 101914136 A (安徽宏业药业有限公司等) 2010年 12月 15日 (2010-12-15) 摘要、说明书第[0003]-[0004]段	1-9
Y	CN 101235081 A (无锡市凯利药业有限公司) 2008年 8月 6日 (2008-08-06) 权利要求1-3	1-9
Y	CA 798320 A (HOECHST AG.) 1968年 11月 5日 (1968-11-05) 权利要求1-8，说明书第4页第1-20行、第8页第1-10行，实施例1-5	1-9
Y	CN 101412752 A (杭州诺泰制药技术有限公司) 2009年 4月 22日 (2009-04-22) 权利要求1-9	1-9
A	CN 105348367 A (济南康和医药科技有限公司) 2016年 2月 24日 (2016-02-24) 全文	1-9

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 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
2017年 11月 8日	2017年 12月 1日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	潘浩
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)52871050

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2017/099882

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	106967155	A	2017年 7月 21日	无			
CN	102477082	A	2012年 5月 30日	无			
CN	101914136	A	2010年 12月 15日	CN	101914136	B	2012年 7月 4日
CN	101235081	A	2008年 8月 6日	CN	101235081	B	2010年 7月 7日
CA	798320	A	1968年 11月 5日	无			
CN	101412752	A	2009年 4月 22日	CN	101412752	B	2011年 12月 7日
CN	105348367	A	2016年 2月 24日	无			