



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109715647 A

(43)申请公布日 2019.05.03

(21)申请号 201780053940.9

(72)发明人 乔纳森·M·柯林斯

(22)申请日 2017.04.19

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277

(30)优先权数据

62/383,397 2016.09.03 US

代理人 刘新宇 李茂家

PCT/US2016/058181 2016.10.21 US

(51)Int.Cl.

15/299,931 2016.10.21 US

C07K 1/04(2006.01)

15/490,090 2017.04.18 US

C07K 1/06(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/028254 2017.04.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/044356 EN 2018.03.08

(71)申请人 CEM有限公司

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

地址 美国北卡罗来纳州

(54)发明名称

用于高温固相肽合成的原位溶剂回收方法

(57)摘要

公开了对固相肽合成中脱保护的改进。该方法包括以下步骤：将高浓度和小体积的脱保护组合物添加至偶联溶液、生长肽链和来自先前偶联循环的任何过量活化氨基酸的混合物中；在先前循环的偶联步骤和相继循环的脱保护组合物的添加之间没有任何排液步骤；以及在至少30°C的温度下使用偶联溶液。

1. 一种在固相肽合成中脱保护的方法,其中改进包括:

将高浓度和小体积的脱保护组合物添加至偶联溶液、生长肽链和来自先前偶联循环的任何过量的活化氨基酸的混合物中;并且

在先前循环的偶联步骤和相继循环的所述脱保护组合物的添加之间没有任何排液步骤;并且

在至少30℃下使用所述偶联溶液。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述脱保护组合物是有机碱。

3. 根据权利要求1所述的方法,其使用Fmoc固相肽化学。

4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述脱保护溶液具有至少50体积%的有机碱浓度。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述脱保护组合物的添加量小于所述偶联溶液体积的1/3。

6. 一种在固相肽合成中脱保护的方法,其中改进包括:

将高浓度和小体积的脱保护组合物添加至偶联溶液、生长肽链和来自先前偶联循环的任何过量活化氨基酸的混合物中;并且

在先前循环的偶联步骤和相继循环的所述脱保护组合物的添加之间没有任何排液步骤,所述排液步骤去除先前循环的偶联溶液至少50体积%;并且

在至少30℃的温度下使用所述偶联溶液。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述脱保护组合物是有机碱。

8. 根据权利要求6所述的方法,其使用Fmoc固相肽化学。

9. 根据权利要求6所述的方法,其中所述脱保护溶液的浓度按体积至少为50%。

10. 根据权利要求6所述的方法,其中所述脱保护组合物的添加量小于所述偶联溶液体积的1/3。

用于高温固相肽合成的原位溶剂回收方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是2016年10月21日提交的序列号为15299931的“固相肽合成的改进”的部分延续案。

背景技术

[0003] 通过运用过滤以去除步骤间的试剂,Bruce Merrifield开创的固相肽合成的发展为合成肽链创造了一种有用的方法。该方法涉及重复循环,其包括偶联和脱保护,以及在每个步骤之间的洗涤和过滤(图1)。

[0004] 通常假设在每个步骤之间需要洗涤以完全去除先前使用的试剂,使得它们不会不期望地参与下一步骤。这通常涉及“插入”,其指的是掺入额外的氨基酸。这被认为是通过如下方式发生:通过残留碱去除新近偶联的氨基酸上的保护基团(Fmoc)从而允许第二个氨基酸“插入”;或者通过在随后的脱保护步骤中留下的可以偶联到解封闭(deblock)的位点的残留活性氨基酸,从而“插入”来自先前步骤的额外氨基酸。然而,最近显示,偶联步骤后的洗涤不是成功合成肽所必需的。在该工作中,偶联步骤排液,随后将去保护溶液添加至容器中(J.Collins,K.Porter,S.Singh和G.Vanier,“High-Effective Solid Phase Peptide Synthesis (HE-SPPS)”Org.Lett.,vol.16,pp.940-943,2014)(图2)。

发明内容

[0005] 本发明是一种在固相肽合成中脱保护的方法,其中改进包括将高浓度和小体积的脱保护组合物添加至偶联溶液、生长肽链和来自先前偶联循环的任何过量活化氨基酸的混合物中;在先前循环的偶联步骤和相继循环的脱保护组合物的添加之间没有任何排液步骤;并且使用至少30℃的偶联溶液。

[0006] 另一方面,本发明是一种在固相肽合成中脱保护的方法,其中改进包括将高浓度和小体积的脱保护组合物添加至偶联溶液、生长肽链和来自于先前偶联循环的任何过量的活化氨基酸的混合物中;并且在先前循环的偶联步骤和相继循环的脱保护组合物的添加之间没有任何排液步骤,所述排液步骤去除先前循环偶联溶液的至少50%的体积;并且在至少30℃的温度下使用偶联溶液。

[0007] 基于以下结合附图的详细描述,本发明的前述和其他目的和优点以及实现本发明的方式将变得更加清楚。

附图说明

[0008] 图1显示了传统的SPPS循环。

[0009] 图2显示了更近期的高效固相肽合成(HE-SPPS)的SPPS循环。

[0010] 图3说明了用于固相肽合成的原位溶剂的再循环方法。

具体实施方式

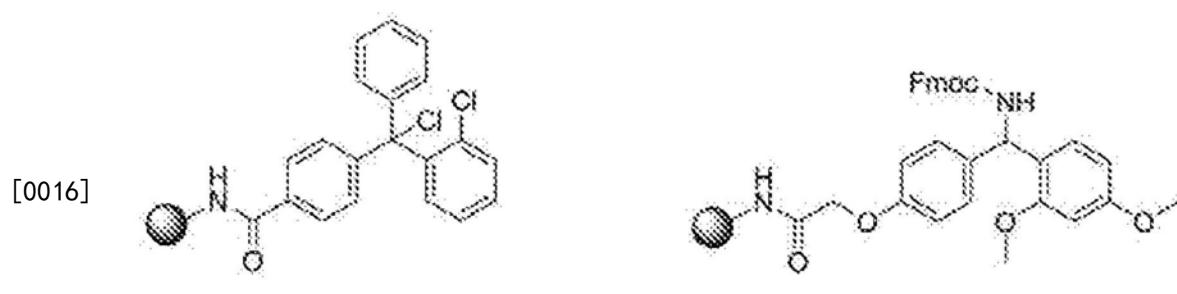
[0011] 本发明提出了一种新方法,其中偶合和脱保护步骤在相同溶剂中进行。在该方法中,在用于偶联发生所需的一段时间后,将浓缩的碱直接添加至树脂偶联溶液中。然后脱保护步骤在添加碱时立即开始。因此,脱保护步骤是在偶联步骤之后立即开始的而没有任何时间延迟。

[0012] 另外,仅需要少量碱,因为它可以使用偶联反应中存在的溶剂。这需要一个复杂的试剂递送系统用于精确地以非常小的体积(0.5mL)快速递送碱。通常,在溶剂中的20%的碱(哌啶)溶液用于脱保护步骤。过量的碱浓度可以增加碱催化的副反应,因此需要大量的溶剂。这意味着通过向偶联溶剂中添加浓缩碱可以从该方法中节省大量溶剂。

[0013] 为了证明这种新方法的有效性,使用经修改的自动肽合成仪装配了一个批次的24种肽,以在每个循环期间进行原位溶剂再循环步骤。

[0014] 材料和方法:

[0015] 使用LIBERTY BLUE™ PRIME™系统(CEM Corp., Matthews, NC, USA)合成所有肽,允许自动原位溶剂再循环和基于蒸发的洗涤。使用基于CarboMAX™偶联氨基酸/碳二亚胺/乙基2-氯基-2-(羟基亚氨基)乙酸酯(AA/DIC/Oxyma)(1:2:1)在90℃激活100秒,以10当量氨基酸按0.05mmol的规模合成肽(E. Atherton, NL Benoiton, E. Brown, R. Sheppard和B.J. Williams, "Racemization of Activated, Urethane-protected Amino-acids by p-Dimethylaminopyridine. Significance in Solid Phase Peptide Synthesis," J.C.S.Chem.Comm., pp. 336-337, 1981)。基于TentaGel®技术的ProTide树脂(CEM公司)用于与Rink Amide接头或C1-TCP(C1)接头合成,其中第一氨基酸与DIEA在90℃下未活化负载5分钟。脱保护步骤在95℃下进行50秒,并通过将0.5mL 50%吡咯烷直接添加至偶联溶液中引发。在脱保护和偶联步骤之间使用单次1×4mL洗涤。使用RAZOR™切割系统(CEM公司)在38℃下以三氟乙酸(TFA)/三异丙基硅烷/水/2,2'-((亚乙二氧基)二乙硫醇(TFA/TIS/H₂O/DODt)(92.5:2.5:2.5:2.5)切割肽30分钟。



[0017] 结果和讨论:

[0018]

| # | 肽 | 疾病领域 | 所用树脂 | UPLC 纯度 | 合 成 时 间 |
|---|---|---------------|-----------------|------------|------------|
| 1 | GRP <i>VPLPAGGGTVLTKMYPRGNHWAvgHLM-NH₂</i> | 调节胃泌素 释放 | RA ProTide | 81 | 1:22 |
| 2 | 胰高血糖素 <i>H-HSQGTFTSDYSKYLDSSRRAQDFVQWLMNT-NH₂</i> | 低血糖 | RA ProTide | 75 | 1:28 |
| 3 | 比伐卢定 <i>H-fPRPGGGNGDFEEIPEEYL-OH</i> | 血液稀释剂 | C1-2-C1- Trt | 71 | 1:05 |
| 4 | 血管紧张素 <i>H-NRVVVHPF-OH</i> | 血管收缩剂 | C1-2-C1- Trt | 82 | 0:30 |
| 5 | PTH 1-34 <i>H-SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLKKLQDVHN F-NH₂</i> | 骨质疏松 | RA ProTide | 70 | 1:43 |
| 6 | 戈那瑞林 <i>pEHWSYGLRPG-NH₂</i> | 生育能力 | RA ProTide | 91 | 0:35 |
| 7 | 曲普瑞林 <i>pEHWSYwLRPG-NH₂</i> | 乳腺癌， 前列腺癌， | RA ProTide | 73 | 0:35 |
| 8 | 利拉鲁肽 <i>H-HAEGTFTSDVSSYLEGQAAK(γ-E-十六酰)EFIAWL VRGRG-NH₂</i> | 糖尿病 | RA ProTide | 80 | 1:31 |

[0019]

| | | | | | |
|----|--|----------|---------------|-----|------|
| 9 | 艾塞那肽 H-HGEGTFTSDL SKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAP PPS-NH ₂ | 糖尿病 | RA ProTide | 74 | 1:58 |
| 10 | MOG (35-55) H-MEVGVYRSPFSRWHLYRNGK-NH ₂ | 多发性硬化症 | RA ProTide | 71 | 1:05 |
| 11 | 促胰液素 H-HDGTFTSELSRLRDSARLQRLLQGLV-NH ₂ | 渗透调节 | RA ProTide | 70 | 1:19 |
| 12 | 特立帕肽 H-SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHN F-NH ₂ | 骨质疏松 | RA ProTide | 60 | 1:43 |
| 13 | GLP-1 (7-37) H-HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG-NH ₂ | 糖尿病 | RA ProTide | 74 | 1:34 |
| 14 | 爪蟾素 1 H-GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS-NH ₂ | 抗生素 | RA ProTide | 79 | 1:11 |
| 15 | 替可克肽 H-SYSMEHFRWGKPVGKKRRPVKVYP-NH ₂ | 肾上腺皮质兴奋剂 | RA ProTide | 77 | 1:13 |
| 16 | [Arg8]-加压素 H-CYFQNCPRG-NH ₂ | 激素(血管) | RA ProTide | 94 | 0:32 |
| 17 | 泛素 MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPP DQ | 蛋白质信号传导剂 | RA ProTide | ≥60 | 3:44 |
| 18 | 鮀鱼抗菌肽 I H-KGRGKQGGKVRAKAKTRSS-NH ₂ | 抗生素 | RA ProTide | 87 | 0:59 |
| 19 | 强啡肽 A H-YGGFLRRIRPKLKWDNQ-NH ₂ | 阿片类药物研究 | RA ProTide | 71 | 0:53 |
| 20 | ACP H-VQAAIDYING-NH ₂ | 脂肪酸合成 | RA ProTide | 92 | 0:32 |
| 21 | BAM 3200 H-YGGFMRRVGRPEWWMDYQKRYGGFL-NH ₂ | 阿片类药物研究 | RA ProTide | 70 | 1:16 |
| 22 | HIV-TAT (47-57) Fmoc-YGRKKRRQRRR-NH ₂ | 艾滋病研究 | RA ProTide | 93 | 0:31 |
| 23 | HIV-TAT (48-60) Fmoc-GRKKRRQRRPPQ-NH ₂ | 艾滋病研究 | RA ProTide | 88 | 0:39 |
| 24 | 普兰林肽 KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGPILPPTNVGSNT Y-- | 糖尿病 | RA ProTide | 72 | 1:52 |

[0020] 表1 24种肽的自动顺序批量合成

[0021] 表1中合成的所有肽都给出了所需的靶标作为主峰,标准循环时间为2分58秒。原位溶剂再循环方法允许将0.5mL浓缩的吡咯烷(BP 87°C)溶液添加至偶联步骤的末端(不排液)。这种设置的一个优点是立即进行的脱保护非常接近所需温度(95°C),原因是偶联溶液已经在90°C。在脱保护过程中,施加真空并蒸发吡咯烷,吡咯烷随后在废物容器中冷凝。这使得在脱保护步骤结束时仅需要单个洗涤步骤(1×4mL)。

[0022] 整个批次的总合成时间:32.6小时

[0023] 这一新方法大大缩短了标准循环时间(2分57秒),这是因为(a)-消除了偶联排液

时间,(b) -消除了步骤之间脱保护的递送时间,以及(c) -消除了脱保护步骤的温度升高时间,从而允许使用更短的脱保护时间。此外,在每个循环期间完全避免脱保护溶剂,可以显著节省溶剂。

[0024] 在附图和说明书中已经阐述了本发明的优选实施例,并且虽然已经采用了特定术语,但它们仅以一般性和描述性意义使用而非用于限制的目的,本发明的范围在权利要求中限定。



现有技术：常规SPPS循环

图1



现有技术——更近期的SPPS循环：高效固相肽合成 (HE-SPPS)

图2



用于固相肽合成的原位溶剂再循环方法

图3