



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106928341 B

(45) 授权公告日 2021.06.01

(21) 申请号 201710091006.8

C07K 1/06 (2006.01)

(22) 申请日 2011.03.30

C07K 1/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106928341 A

(56) 对比文件

CN 101125207 A, 2008.02.20

KR 20070115602 A, 2007.12.06

(43) 申请公布日 2017.07.07

CN 1363559 A, 2002.08.14

(62) 分案原申请数据
201110078314.X 2011.03.30

CN 1745091 A, 2006.03.08

Jin Zhou et al..Preparation and

(73) 专利权人 上海仁会生物制药股份有限公司
地址 201321 上海市浦东新区周浦红桥村
水门3组紫萍路916号

PEGylation of exendin-4 peptide secreted from yeast *Pichia pastoris*.《European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics》.2009, 第72卷第412-417页.

(72) 发明人 岳鹏

姜忠义等.蛋白质和肽类分子的聚乙二醇化

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202
代理人 戴建波

化学.《有机化学》.2003, 第23卷(第12期), 第1340-1347页.

审查员 吴志琳

(51) Int. Cl.

C07K 14/575 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

C07K 1/107 (2006.01)

序列表1页 附图4页

(54) 发明名称

定点单取代聚乙二醇化Exendin类似物及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种可以在Exendin类似物结构中的任意氨基上定点单取代聚乙二醇化的化合物、其制备方法以及用途。本发明的方法通过采用更稳定的保护基Dde (N- α -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己亚基)), 避免了使用不稳定保护基所带来的多取代副反应, 从而可以以低的反应摩尔比制备高得率的单取代的聚乙二醇化Exedin类似物。

1. 一种制备定点单取代聚乙二醇化Exendin类似物的方法,该方法包括如下的步骤:

(1) 合成Exendin类似物的多肽原料,该多肽原料的部分位点的Lys残基上带有Dde保护基,其中,Dde为N- α -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己亚基);该多肽原料具有如下的结构:

(X) His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y₁-Gln-Z-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Y₂-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Y₃-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Y₄,

其中,X是Fmoc或Dde;Z为Leu或Ile; Y₁-Y₄为Lys或(Dde)Lys,而且只有Y₁-Y₃中一个位点的Lys不带有Dde保护基;

(2) 将上述的多肽原料与聚乙二醇化试剂在偏碱性的有机溶剂中反应,使得该多肽原料中不带有Dde保护基的Lys残基上连接有聚乙二醇基团;

(3) 脱除步骤(2)所得产物上的保护基,并分离纯化,得到定点单取代聚乙二醇化Exendin类似物。

2. 如权利要求1所述的方法,其中,在Y₁-Y₄中,只有Y₂-Y₃中的一个为Lys,其余均为(Dde)Lys。

3. 如权利要求1所述的方法,其中,Y₂为Lys,Y₁、Y₃和Y₄为(Dde)Lys。

定点单取代聚乙二醇化Exendin类似物及其制备方法

[0001] 分案声明

[0002] 本申请是2011年03月30日提交的申请号为201110078314.X、发明名称为“定点单取代聚乙二醇化Exendin类似物及其制备方法”的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种定点单取代聚乙二醇化Exendin类似物、其制备方法和医药用途。

背景技术

[0004] 早在上世纪60年代,麦金太尔和埃尔里克等人就发现,口服葡萄糖对胰岛素分泌的促进作用明显高于静脉注射,这种额外的效应被称为“肠促胰素效应”。而珀利等人进一步研究证实,这种“肠促胰素效应”所产生的胰岛素占进食后胰岛素总量的50%以上。1986年,璘克等人发现,2型糖尿病患者肠促胰素作用减退。这提示,肠促胰素系统异常可能是2型糖尿病的发病机制之一。

[0005] 随着细胞和分子生物学的发展,肠促胰素这层神秘的面纱被慢慢揭开。研究证实,肠促胰素是人体内一种肠源性激素。在进食后,该类激素可促进胰岛素分泌,发挥葡萄糖浓度依赖性降糖作用。肠促胰素主要由GLP-1和糖依赖性胰岛素释放肽(GIP)组成,其中GLP-1在2型糖尿病的发生发展中起着更为重要的作用,它能够通过促进胰岛素分泌、刺激胰岛β细胞增生、阻止胰岛β细胞凋亡、抑制胰高血糖素的释放、抑制胃肠道蠕动和胃液分泌、延迟胃排空、产生饱胀感和食欲下降等多重途径来控制血糖。但是由于其在体内会迅速被DPP-IV降解,半衰期只有1-2分钟,限制了其应用开发。

[0006] exendin-4是从美洲毒蜥的唾液中分离得到的含有39个氨基酸序列的GLP-1类似物,其与GLP-1有53%的结构同源性,能够与GLP-1受体结合。通过与GLP-1受体结合发挥促胰岛素分泌的作用,有效降低空腹和餐后血糖的作用,用于治疗二型糖尿病。与GLP-1相比由于其第二位的丙氨酸改为了甘氨酸,避免了体内二肽酶(DPP-IV)的降解,半衰期较GLP-1的1-2min提高到2-4h,使得其得以被开发成上市产品(Byetta, Amylin公司),每日给药两次。

[0007] 然而频繁的注射给药病人顺应性很低,因此对于此类药物缓释剂型的研究和开发从未停止:NoVo Nordisk开发的liraglutide(NN-2211)每天给药一次。Amylin研究开发的exenatide LAR(PLGA微球),每周给药一次。因此,研究开发长效制剂或者非注射途径给药的制剂是该类药物发展的趋势。

[0008] 目前研究最充分的,使用的最广泛的多肽蛋白药物长效制剂技术即是聚乙二醇化技术,其使用活化的聚乙二醇试剂与多肽蛋白上特殊的氨基酸残基发生反应,形成新的分子,利用聚乙二醇的水溶性大分子特点增加多肽蛋白的溶解度,降低其免疫原性,减少肾小球滤过从而延长体内半衰期,达到延长药物作用时间的目的,提高病人顺应性。

[0009] 聚乙二醇化技术一般使用活化的聚乙二醇化试剂与多肽或蛋白结构上的活泼残基(按活性顺序一般为巯基,氨基,羧基等)进行反应,形成化学键稳定的聚乙二醇化产物。

但是结构上具有多个活泼残基时,一般生成不同位点的单取代混合物,并且在聚乙二醇摩尔比例较高时还会继续形成多取代产物。一般多取代物会显著影响药物活性,进而影响体内药效,而且多取代物的质量控制也比较困难,因此上市的聚乙二醇化药物基本都是单取代物。

[0010] 由于单取代的位置对于多肽或者蛋白类药物的活性影响非常显著,因此制备活性位点最佳的单取代聚乙二醇化产品很有必要。

[0011] 现有技术中,定点化聚乙二醇化的常用技术有两类:

[0012] 一类是控制结构上能够反应的残基数。这类技术中,比较多的方法是在位置最佳处突变产生或者合成中加入一个半胱氨酸,然后利用能够与巯基反应的聚乙二醇化试剂(如聚乙二醇化马来酰亚胺)进行反应,在半胱氨酸上结合聚乙二醇。然而这种方法的缺点一方面是药物结构改变造成对其药效及毒性的影响不清楚,二是引入了半胱氨酸,对于其稳定性会有不利影响,比如说半胱氨酸易氧化。另外的定点方法则是采用赖氨酸氨基作为聚乙二醇化位点,将其其它位点的赖氨酸全部替换为碱性精氨酸,仅留下需要反应位点的赖氨酸。这样的方法缺点同样是结构改变会对药效及毒性产生明显影响,本申请的发明人在实验中即有明确发现这样改变结构的新多肽药效受到很大影响。

[0013] 另一类技术则是在偏酸性条件下使用聚乙二醇丙醛试剂对N端氨基进行聚乙二醇化修饰。有研究者发现N端氨基pKa值小于赖氨酸残基上的氨基,也就是说碱性更强。因此,赖氨酸上的氨基需要在微碱性条件下(pH7-8)发生聚乙二醇化反应,而N端氨基可在偏酸性条件下(pH 5-6)即发生聚乙二醇化反应,而此时赖氨酸上的氨基不能反应。因此有研究者利用多肽或者蛋白的上述性质,在偏酸性条件下对N端氨基进行定点的聚乙二醇化反应。但是这种方法有两个缺点,一是不适用于N端为活性位点的药物;二是此反应得率低,在聚乙二醇试剂使用摩尔比高达5甚至10的条件下,而产率也仅有50%-60%,导致生产成本太高,不具备生产的可能。

[0014] 对Exendin-4类似物进行聚乙二醇化修饰时,由于Exendin-4类似物的结构中没有半胱氨酸,因此无法使用聚乙二醇马来酰亚胺进行定点聚乙二醇化反应;其次,由于其结构的N端是活性位点(参见British Journal of Pharmacology,2003,140,339-346),因此无法使用聚乙二醇丙醛进行N端定点聚乙二醇化反应。

[0015] 然而,当使用聚乙二醇琥珀酰亚胺试剂对Exendin-4类似物侧链氨基进行修饰时,由于Exendin-4类似物中含有最多4个赖氨酸,加上N端氨基总共将有5个潜在反应位点,因此在聚乙二醇化过程中不可避免会出现上面所提到的多取代物和单取代物混合物出现的情况,而所有这些产物中只有一个是活性最佳的目标产物。

[0016] Youn等人提出了使用Fmoc(9-芴基甲氧羰基)保护基对多肽结构中不希望发生反应的氨基进行保护的方法(Biocomjugate Chem,2007,18,500-506),但该方法有一个显著的缺点,即在碱性环境下多肽的Fmoc保护基很容易脱落。实际上,在很多多肽合成实验中,就是采用碱(20%哌啶)来脱除Fmoc保护基的。Exendin-4类似物中氨基的聚乙二醇化反应需要在一定程度的碱性条件下才能发生。这两个矛盾的事实使得Fmoc保护的多肽在偏碱性条件下进行聚乙二醇化修饰时,Fmoc保护基很容易脱落,从而不可避免地造成相当数量的多取代物副反应物的生成。

[0017] 因此,有必要提供一种制备定点单取代聚乙二醇化Exendin-4类似物的方法。

发明内容

[0018] 本发明的目的是提供一种制备定点单取代聚乙二醇化Exendin类似物的方法以及由该方法所制备的单取代聚乙二醇化Exendin类似物。

[0019] 为实现本发明上述的发明目的,一方面,本发明提供了一种制备定点单取代聚乙二醇化Exendin类似物的方法,该方法包括如下的步骤:

[0020] (1) 合成Exendin类似物的多肽原料,该多肽原料的部分位点的Lys残基上带有Dde保护基,其中,Dde为N- α -1-(4,4-二甲基-2,6-二氧化环己亚基)(其英文名称为(N- α -1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene));

[0021] (2) 将上述的多肽原料与聚乙二醇化试剂在偏碱性的有机溶剂中反应,使得该多肽原料中不带有Dde保护基的Lys残基上连接有聚乙二醇基团;

[0022] (3) 脱除步骤(2)所得产物上的保护基,并分离纯化,得到聚乙二醇化Exendin类似物。

[0023] 在本发明的方法中,由于采用了相对Fmoc耐受碱性条件强的多得多的Dde作为保护基,避免了Fmoc不稳定性(脱落)所导致的多取代反应,从而使得反应的副产物大大减少,使得大规模制备成为可能。

[0024] 在上述的制备方法中,其多肽原料中应当至少有一个位点的Lys残基上不带有Dde保护基,以便连接聚乙二醇基团;优选地,上述多肽原料中只有一个位点的Lys残基上不带有Dde保护基,从而制备定点的、单取代的聚乙二醇化Exendin类似物。

[0025] 在上述的制备方法中,其多肽原料的N端可以带有Dde保护基或Fmoc保护基;单纯从药物纯度的角度来看,多肽原料的N端带有Dde保护基为佳,但如果结合成本的角度来开,可以选择N端带有Fmoc保护基,因为从反应活性的实际考察来看,N端使用Fmoc保护基并不会带来较多的多取代的聚乙二醇化Exendin类似物。

[0026] 例如,在上述的制备方法中,其具体的多肽原料可以具有如下的结构:

[0027] (X) His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Y₁-Gln-Z-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Y₂-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Y₃-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Y₄,其中,X是Fmoc或Dde;Z为Leu或Ile;Y₁-Y₄为Lys或(Dde)Lys,而且Y₁-Y₄中至少一个为Lys;优选地,在Y₁-Y₄中,只有Y₂-Y₄中的一个为Lys,其余均为(Dde)Lys;更优选地,Y₂为Lys,Y₁、Y₃和Y₄为(Dde)Lys。

[0028] 但是,本发明的方法并不只限于制备上述结构的聚乙二醇化Exendin类似物;在所有的Exendin类似物,包括Exendin-4类似物中,只要其多肽序列中有多于一个的Lys残基(两个以及以上的Lys残基),都特别适合采用本发明的上述制备方法来制备单取代的聚乙二醇化Exendin类似物。本发明中采用了具有4个Lys残基的多肽序列来制备单取代的聚乙二醇化Exendin类似物,因为具有4个Lys残基的Exendin类似物是结构比较复杂的Exendin类似物。本发明的方法适于制备申请人在其中国专利申请CN 101125207A中所公开的所有Exendin类似物的聚乙二醇化制剂;CN 101125207A的所有公开内容合并入本申请中。

[0029] 在本发明的制备方法中,PEG试剂(聚乙二醇化试剂)的聚乙二醇分子量可以为20,000-60,000道尔顿;进一步地,在本发明的制备方法中,可以采用CN 101125207A中所公开的具有支链结构的聚乙二醇基团。

[0030] 例如,本发明方法中一种实施方式为:

[0031] 按照如下步骤制备并分离纯化定点单取代聚乙二醇化Exendin-4类似物:

[0032] 1、合成带有保护基的Exendin-4类似物

[0033] 如聚乙二醇化位点为N端氨基,合成结构如下的带有保护基的Exendin-4类似物:

[0034] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser- (Dde) Lys-Gln-Z-Glu-Glu-Glu-Ala-Val- (Dde) Lys-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu- (Dde) Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser- (Dde) Lys

[0035] 如聚乙二醇化位点为Lys¹²侧链氨基,合成结构如下的带有保护基的Exendin-4类似物:

[0036] (Fmoc) His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Z-Glu-Glu-Glu-Ala-Val- (Dde) Lys-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu- (Dde) Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser- (Dde) Lys或

[0037] (Dde) His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Z-Glu-Glu-Glu-Ala-Val- (Dde) Lys-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu- (Dde) Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser- (Dde) Lys;

[0038] 如聚乙二醇化位点为Lys²⁰侧链氨基,合成结构如下的带有保护基的Exendin-4类似物:

[0039] (Fmoc) His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser- (Dde) Lys-Gln-Z-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Lys-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu- (Dde) Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser- (Dde) Lys或

[0040] (Dde) His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser- (Dde) Lys-Gln-Z-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Lys-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu- (Dde) Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser- (Dde) Lys;

[0041] 如聚乙二醇化位点为Lys²⁷侧链氨基,合成结构如下的带有保护基的Exendin-4类似物:

[0042] (Fmoc) His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser- (Dde) Lys-Gln-Z-Glu-Glu-Glu-Ala-Val- (Dde) Lys-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser- (Dde) Lys或

[0043] (Dde) His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser- (Dde) Lys-Gln-Z-Glu-Glu-Glu-Ala-Val- (Dde) Lys-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser- (Dde) Lys;

[0044] 如聚乙二醇化位点为Lys⁴⁰侧链氨基,合成结构如下的带有保护基的Exendin-4类似物:

[0045] (Fmoc) His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser- (Dde) Lys-Gln-Z-Glu-Glu-Glu-Ala-Val- (Dde) Lys-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu- (Dde) Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys或

[0046] (Dde) His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser- (Dde) Lys-Gln-Z-Glu-Glu-Glu-Ala-Val- (Dde) Lys-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu- (Dde) Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys;

[0047] 2、将上述带有保护基的Exendin-4类似物及一定摩尔比例的分子量范围在20,

000-60,000道尔顿的聚乙二醇化试剂(优选40KD Y型PEG-NHS酯)溶解于适量有机溶剂中(优选DMSO),当其完全溶解后加入适量不与聚乙二醇化试剂发生反应但却更够提供足够碱性环境的有机碱,一般可用三乙胺(TEA)、二异丙基乙胺(DIEA)、4-二甲基氨基吡啶(DMAP)、2,4,6-三甲基吡啶(colidine)、二甲基吡啶(lutidine)、吡啶(pyridine)等。

[0048] 3、上述溶液体系在一定温度下(不超过40℃)保温一段时间,聚乙二醇化反应即已完成,然后加入足够量的试剂(优选联胺)脱除Fmoc和Dde保护基,在一定温度下(不超过40℃)保温一段时间,所有保护基即可完全脱除。

[0049] 4、将上述终反应液用纯水稀释10倍并立即用HCL或醋酸调pH致5.0-6.0以保证样品的稳定性,然后使用SOURCE 30RPC填料,使用含有20mM醋酸的水:乙腈或者水:乙醇系统进行线性梯度分离纯化,收集目标产物聚乙二醇化Exendin-4类似物。

[0050] 5、将上述SOURCE纯化的含有一定有机溶剂(乙腈或乙醇)的聚乙二醇化Exendin-4类似物样品,使用阳离子交换树脂,使用10mM柠檬酸缓冲盐1.5M NaCl洗脱液进行性梯度分离纯化,除去有机溶剂,收集目标产物聚乙二醇化Exendin-4类似物。

[0051] 6、将上述离子交换纯化的聚乙二醇化Exendin-4类似物用10KD超滤膜进行超滤浓缩,然后将样品用分子筛色谱,使用纯水进行脱盐处理,得到的聚乙二醇化Exendin-4类似物纯水溶液进行冻干处理,最终得到聚乙二醇化Exendin-4类似物原料药。

[0052] 另一方面,为了实现本发明的目的,本发明还提供了一种按上述方法制备的聚乙二醇化Exedin类似物。

[0053] 再一方面,为了实现本发明的目的,本发明还提供了一种聚乙二醇化Exedin类似物,其中,该Exedin类似物具有如下的序列结构:

[0054] His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Z-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Lys-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys,其中,Z是Leu(SEQ ID No.1)或Ile(SEQ ID No.2),并且上述结构中有一个Lys残基上的氨基连接有聚乙二醇基团。

[0055] 优选地,在上述的序列结构中的Lys²⁰残基或Lys²⁷残基的氨基上连接有聚乙二醇基团。

[0056] 又一方面,为了实现本发明的目的,本发明还提供了聚乙二醇化Exedin类似物在制备治疗糖尿病或肥胖症药物方面的用途。

[0057] 本发明的方法中由于采用稳定性更好的保护基Dde作为主要保护基,避免了Fmoc不稳定所带来的多取代副反应,从而可以以低的反应摩尔比制备高得率的单取代的聚乙二醇化Exedin类似物,降低了生产成本。本发明的聚乙二醇化Exedin类似物中副产物少,是一种定点的单取代的Exedin类似物,避免了副产物所带来的各种副作用。

[0058] 为了更详细的说明本发明,下面结合附图,通过具体的实施方式,来详细地说明本发明。但本发明的范围并非局限于这些具体的实施方式上。

附图说明

[0059] 图1是定点保护Exendin-4类似物MALDI-TOF质谱图;

[0060] 图2是定点保护Exendin-4类似物聚乙二醇化前后HPLC色谱图;

[0061] 图3是聚乙二醇化Exendin-4类似物SOURCE纯化色谱图;

- [0062] 图4是聚乙二醇化Exendin-4类似物SP阳离子交换纯化色谱图；
- [0063] 图5是聚乙二醇化Exendin-4类似物分子筛除盐色谱图；
- [0064] 图6显示了HYBR-003-peg单取代物在C57BL/6小鼠腹腔糖耐受试验 (n=8), 图中, a P<0.01V.S blank, b P<0.01V.S control。

具体实施方式

[0065] 实施例1

[0066] (1) 合成所用的氨基酸单体

[0067] Fmoc-His (Trt) -OH, Dde-His (Trt) -OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu (OtBu) -OH, Fmoc-Thr (tBu) -OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser (tBu) -OH, Fmoc-Asp (OtBu) -OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys (Boc) -OH, Fmoc-Lys (Dde) -OH, Fmoc-Gln (Trt) -OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Trp (Boc) -OH, Fmoc-Asn (Trt) -OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Cys (Trt) -OH

[0068] 上面缩写为: Fmoc 9-芴基甲氧羰基; Boc叔丁氧羰基; Trt三苯甲基; OtBu叔丁基氧基; tBu叔丁基; Dde N-[1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己亚基)

[0069] (2) 试剂: N,N-二异丙基乙胺、二异丙基碳二亚胺 (DIC)、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、二氯甲烷、六氢吡啶、1-羟基苯并三唑、Rink Amide树脂、茚三酮、甲醇、三异丙基硅烷、三氟乙酸。

[0070] (3) 操作

[0071] A合成: 以0.25mmol规模为例, 称取0.5g Rink Amide树脂置于反应器中, 将氨基酸称取1mmol, 用DIC/HOBt方法活化, 按照多肽序列从C端到N端依次进行合成。反应在25℃室温条件下进行, 按照下列步骤进行操作:

[0072] 1、用20%六氢吡啶的DMF溶液脱保护基Fmoc, 每次10分钟;

[0073] 2、用10mL DMF洗三次, 抽干;

[0074] 3、称取保护的氨基酸 (1mmol), HOBt (1mmol), 溶于10mLDMF中, 加入DIC (1mmol) 活化10分钟;

[0075] 4、将此活化的氨基酸溶液加入反应器内, 振摇反应1小时;

[0076] 5、用DMF洗树脂三次, 抽干;

[0077] 6、如果茚三酮反应显阴性, 进行下一循环, 重复步骤1到5;

[0078] 如果茚三酮反应显阳性, 重复步骤3到5。

[0079] 多肽链逐步合成完毕后, 用甲醇洗树脂, 晾干。

[0080] B脱保护基及切除多肽

[0081] 将带有多肽的树脂1g置于反应器中, 加入裂解液 (比例苯甲醚2mL; 甲醇2mL; 三异丙基硅烷2mL; 三氟乙酸6mL)。

[0082] 室温振摇2小时后, 过滤, 收集滤液, 树脂用少量醋酸洗涤, 合并收集液, 浓缩后, 加入乙醚产生沉淀, 过滤沉淀, 再用少乙醚洗涤后, 得粗品。

[0083] C制备型HPLC分离纯化, 冻干

[0084] 将得到的粗品溶于少量10%醋酸溶液, 上柱, 经制备型HPLC分离纯化, 冻干的产品, 所得多肽经质谱测定证明为所求化合物。

[0085] 色谱柱: Boston C18, 5um, 100A, 波长214nm, Waters制备型HPLC

- [0086] 梯度:10%0.05%TFA/CAN-45%0.05%TFA/CAN 20min,45%0.05%TFA/CAN维持10min。
- [0087] 图1是定点保护Exendin-4类似物MALDI-TOF质谱图
- [0088] 实施例2
- [0089] 定点保护Exendin-4类似物聚乙二醇化的方法
- [0090] 本实施例用常规的氨基聚乙二醇化修饰试剂如(SC-PEG,SS-PEG,NHS-PEG等)对定点保护Exendin-4类似物上唯一游离的可被聚乙二醇化反应的侧链氨基进行结合修饰。其中,聚乙二醇化试剂优选40KD Y型NHS-PEG,定点保护Exendin-4类似物优选
- [0091] (Fmoc)His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-(Dde)Lys-Gln-Z-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Lys-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-(Dde)Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-(Dde)Lys或者
- [0092] (Fmoc)His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-(Dde)Lys-Gln-Z-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-(Dde)Lys-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-(Dde)Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys。
- [0093] 取定点保护Exendin-4类似物2g,40KD Y型NHS-PEG 26g(与多肽摩尔比约1.5:1)溶解于400mL DMSO,40℃保温搅拌促溶。待样品完全溶解后,加入三乙胺(TEA)200uL(0.05%)促发聚乙二醇化反应,并于40℃继续保温搅拌。2h后聚乙二醇化反应基本完成(90%以上,按定点保护Exendin-4类似物计),加入联氨8mL(2%),40℃保温搅拌1h至保护基全部脱除反应结束。终反应溶液用纯水稀释10倍并立即用6M HCL调pH至6.0 4℃冷藏保存。
- [0094] 图2是定点保护Exendin-4类似物聚乙二醇化前后HPLC色谱图。
- [0095] 实施例3
- [0096] 聚乙二醇化Exendin-4类似物分离纯化方法
- [0097] 定点保护Exendin-4类似物聚乙二醇化终反应液分别经反相HPLC,离子交换,超滤浓缩,分子筛及冷冻干燥可获得纯的聚乙二醇化Exendin-4类似物原料药。
- [0098] A、SOURCE反相HPLC纯化
- [0099] 流动相:A相A相20mM HAc 5%乙腈;B相20mM HAc 50%乙腈
- [0100] 色谱柱:GE Fineline Pilot 35
- [0101] 填料:SOURCE 30RPC 175mL
- [0102] 流速:30mL/min
- [0103] 洗脱梯度:上样后平衡2个柱体积,0-30%5min,30%-100%5min
- [0104] 图3是聚乙二醇化Exendin-4类似物SOURCE纯化色谱图。
- [0105] B、SP阳离子交换纯化
- [0106] 流动相:A相 10mM pH3.5CBS
- [0107] B1相 10mM pH3.5CBS+0.15M NaCl
- [0108] B2相 10mM pH3.5CBS+1.5M NaCl
- [0109] 色谱柱:GE XK 50
- [0110] 填料:SP sepharose Fast Flow 600mL
- [0111] 流速:30mL/min

- [0112] 洗脱梯度:0%—100%B1相20min,100%B1相-100%B2相0min
- [0113] 图4是聚乙二醇化Exendin-4类似物SP阳离子交换纯化色谱图。
- [0114] C、超滤
- [0115] 装置:10KD PALL剪切式超滤膜
- [0116] 滤前样品体积2400mL滤后体积400mL
- [0117] 一般重复超滤3次(1000mL—400mL)
- [0118] D、G25脱盐
- [0119] 流动相:纯水
- [0120] 色谱柱:GE XK 50
- [0121] 填料:G25;900mL
- [0122] 流速:30mL/min,
- [0123] 上样量:200mL
- [0124] 图5是聚乙二醇化Exendin-4类似物分子筛除盐色谱图。
- [0125] E、冻干
- [0126] 聚乙二醇化Exendin-4类似物纯水溶液共熔点约在-5℃左右,因此冻干步骤一次干燥设定温度为-10℃,二次干燥设定温度为5℃。其它参数(冻干时间及出箱温度等)按照样品量的多少,冻干机的效能及具体气候条件酌情设定。
- [0127] 实施例4
- [0128] 正常C57小鼠腹腔注射糖耐量实验(IPTT)
- [0129] (1) 实验材料
- [0130] 实验动物:C57小鼠,购自于上海斯莱克实验动物有限责任公司,SPF级。饲养于公司临时动物房,CL级。数量:60性别:公
- [0131] 试剂:Exendin-4类似物(0.125ug/ml);聚乙二醇化Exendin-4类似物(3.125ug/ml,按裸肽计);葡萄糖试剂盒;20%葡萄糖注射液;注射用生理盐水。
- [0132] (2) 实验方法
- [0133] 给药组,每只小鼠给予聚乙二醇化Exendin-4类似物(3.125ug/ml,按裸肽计)0.2mL/20g;空白组,每只小鼠给予注射用生理盐水0.2mL/20g;对照组,每只小鼠给予Exendin-4类似物(0.125ug/ml)0.2mL/20g。糖负荷为测血糖前半小时腹腔注射20%葡萄糖水溶液0.2ml/20g b.w.于给药后24h和72h,观察受试动物的降糖作用维持时间。
- [0134] (3) 实验结果
- [0135] 各个聚乙二醇化Exendin-4类似物降糖作用维持时间效果见图6。

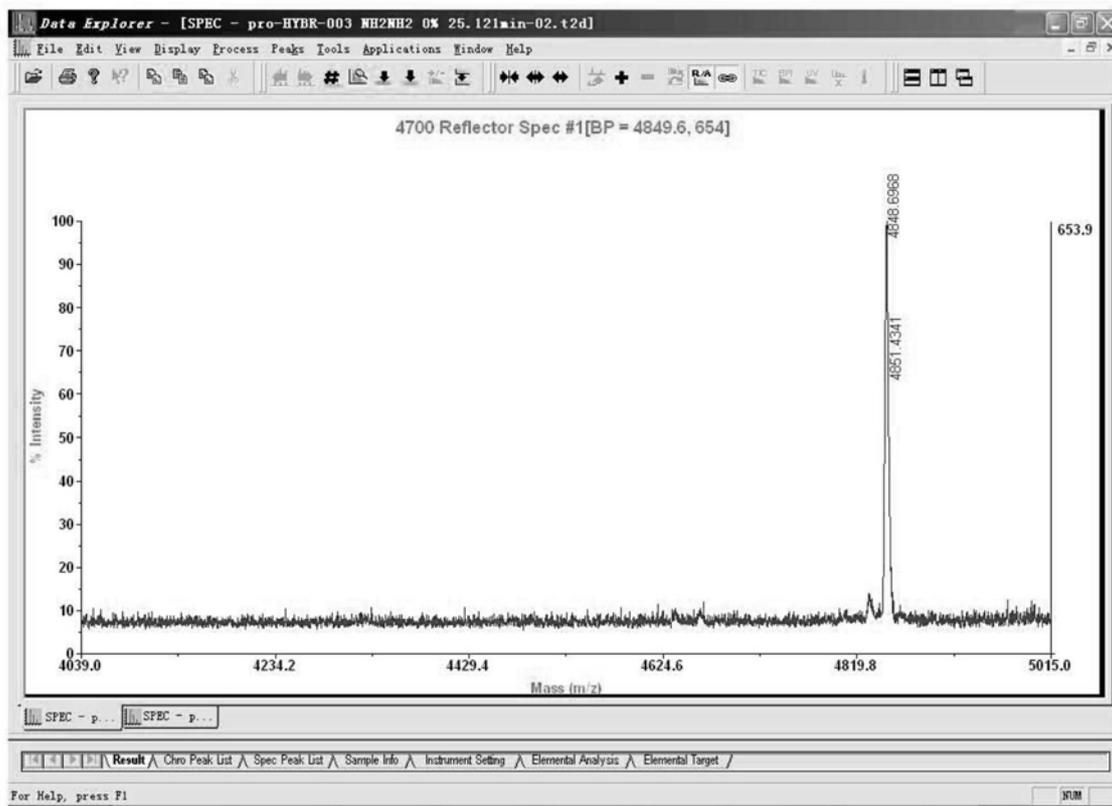


图1

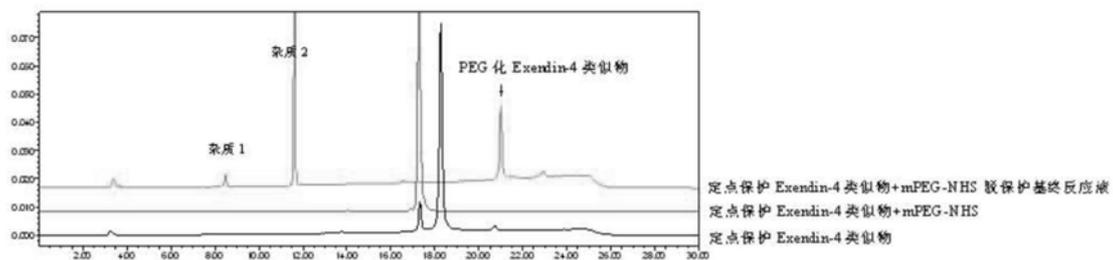


图2

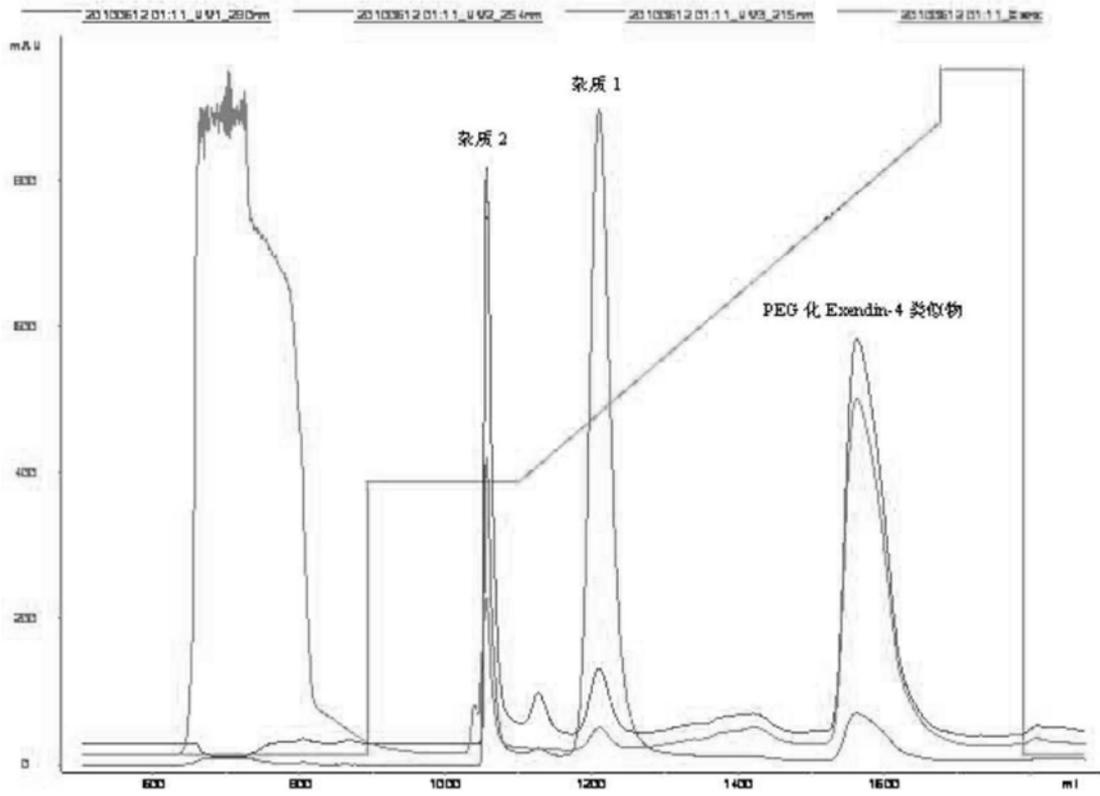


图3

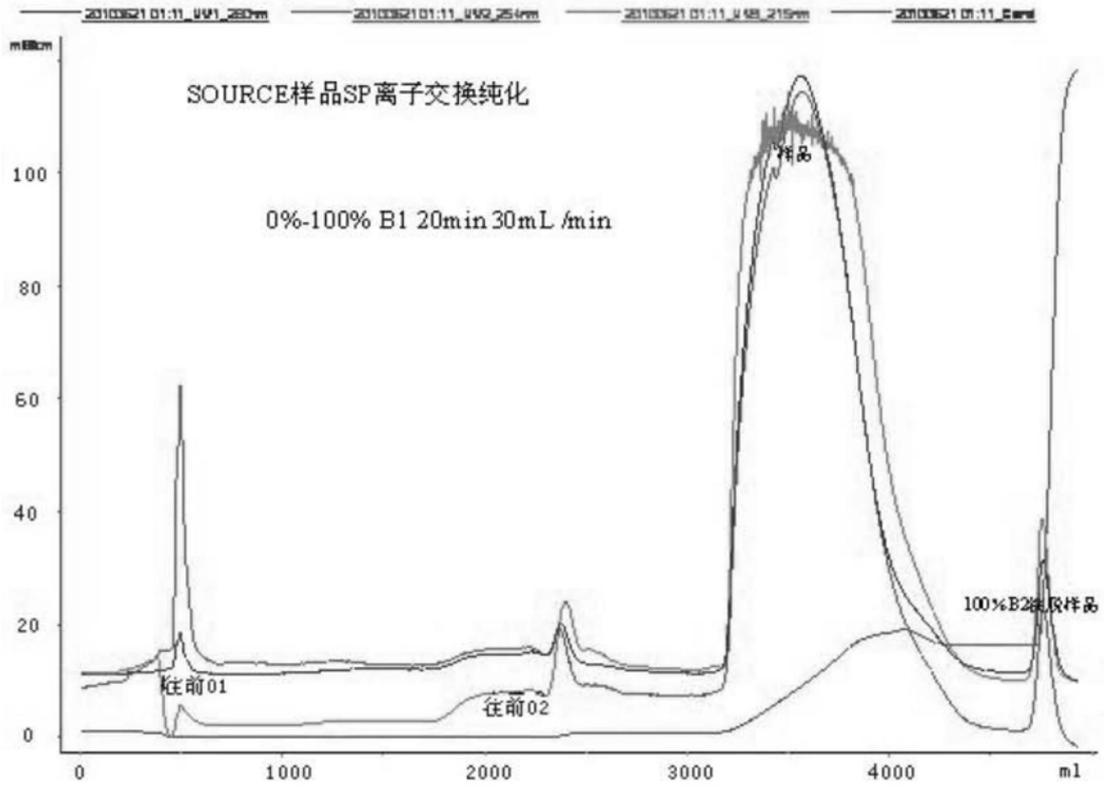


图4

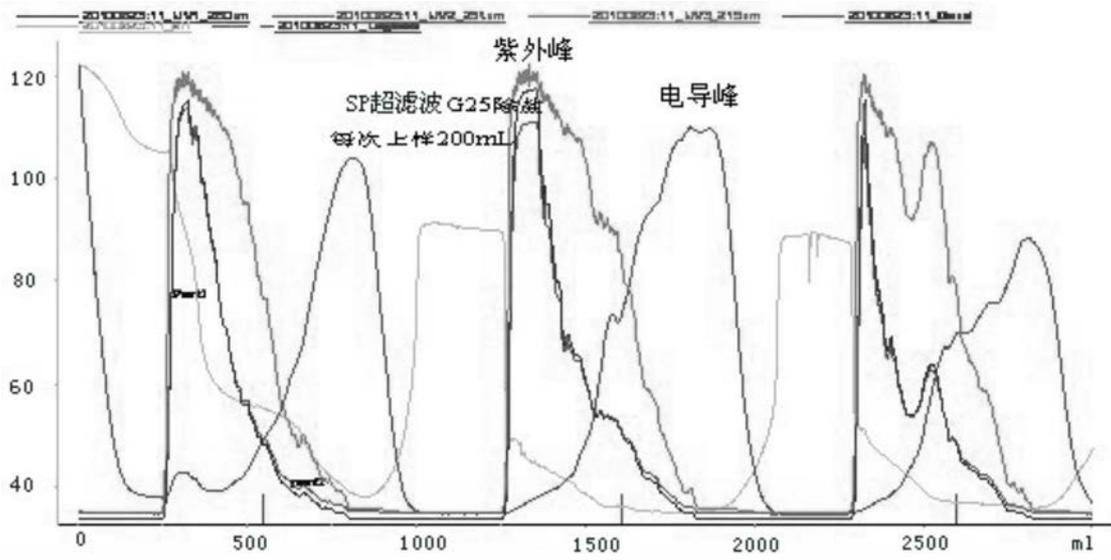


图5

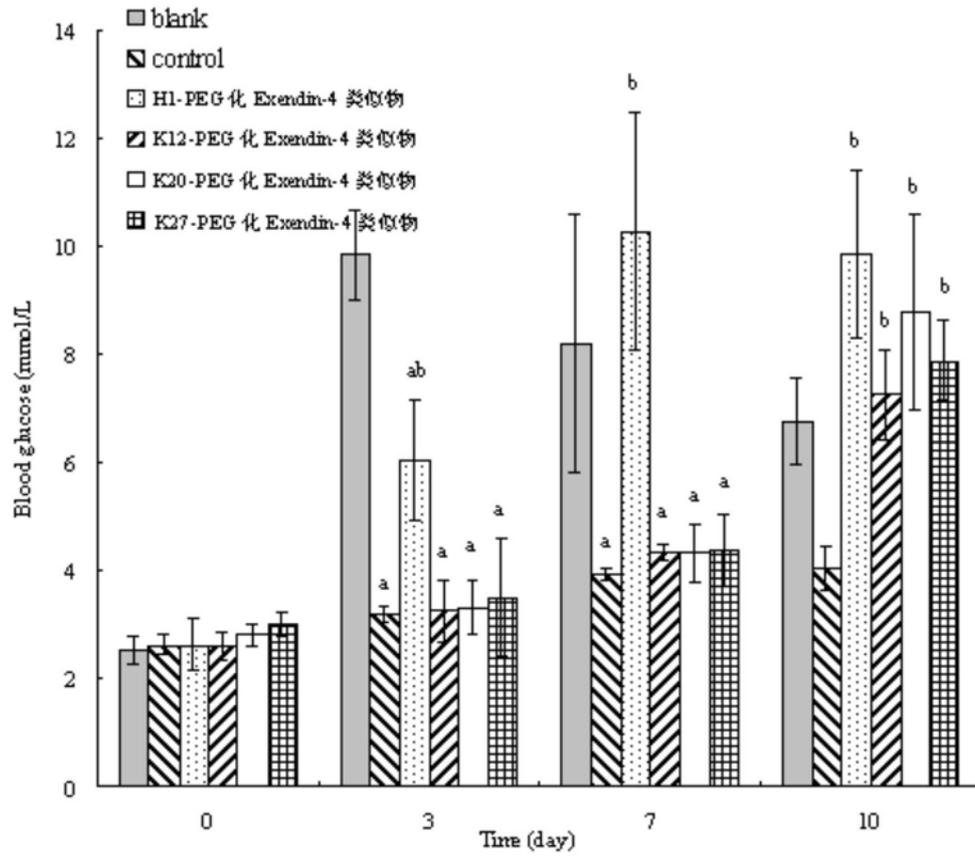


图6