

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl<sup>6</sup>

C07K 7/16

A61K 38/11



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 94192593.5

[45]授权公告日 1998 年 11 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1040648C

[22]申请日 94.6.22 [24]颁证日 98.9.19

[21]申请号 94192593.5

[30]优先权

[32]93.6.29 [33]US[31]08 / 084,847

[73]专利权人 凡林有限公司

地址 瑞典胡丁厄

[72]发明人 B·A·K·拉松 T·B·梅尔白兰特

E·M·B·莫尔斯塔姆

J·A·I·罗斯彻斯特

J·A·舍尔德贝克

[74]专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 吴惠中

[56]参考文献

5047398 1991. 9.10 A61K37 / 34

审查员 00 00

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素的制备方法

[57]摘要

一种制备 1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素 (DDAVP) 的方法, 包括将 MPa(R<sup>1</sup>) -Tyr -Phe -Gln -Asn -Cys (R<sup>2</sup>) -Pro-OH (SEQ ID NO:1) (式中 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 为巯基保护基) 与二肽 (R<sup>3</sup>) -D-Ary(HCl) -Gly-NH<sub>2</sub> (式中 R<sup>3</sup> 为对酸敏感的氨基保护基) 缩合形成 MPa(R<sup>1</sup>) -Tyr -Phe -Gln -Asn -Cys(R<sup>2</sup>) -Pro-D- Ary(HCl) -Gly-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:1), 后者在质子性溶剂中用碘氧化。

Figure 1. Schematic diagram of the experimental setup.

(a) 制备七肽:

(b) 将步骤(a)的七肽与二肽(R<sup>3</sup>)-D-Arg(HCl)-Gly-NH<sub>2</sub>和N'-二环己基碳化二亚胺反应进行缩合;

Mpa (R<sup>1</sup>)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys (R<sup>2</sup>)-Pro-D-Arg-(HCl)-Gly-NH<sub>2</sub> 以及

其中,  $R^1$  和  $R^2$  为巯基保护基, 可以相同或彼此独立, 可选自包  
 酰胺基甲基, 叔丁基, 叔丁基亚磺酰基, 对甲基苄基, 对甲氧基苄  
 基, 2-(3-硝基吡啶亚磺酰基), 乙基氨基甲酰基, 三苯基甲基和 9-芴  
 基的一组基团;  $R^3$  为对酸敏感的氨基的保护基; X 为 Phe 的  
 羧基中取代  $-OH$  的反应性基团。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述的氨基保护基 R<sup>3</sup>为叔丁氧基。

- 1 -

5. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于所述的烷氧基为琥珀酰亚胺基氧基。

6. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于所述的芳氧基为对硝基苯氧基。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于所述的用碘氧化在 pH1.5—4.3 之间进行。

8. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于自步骤(d)得到的含有所述的已被氧化的九肽的反应混合物用经酸平衡的阳离子交换树脂的离子交换色谱法纯化。

# 说明书

## 1-脱氨基-8-D-精氨酸 抗利尿激素的制造方法

本发明涉及一种制造治疗尿频的高纯 1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素的新方法。该方法包括将 MPa(R<sup>1</sup>)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys(R<sup>2</sup>)-Pro-OH(SEQ ID NO:1)与(R<sup>3</sup>)-D-Arg(HCl)-Gly-NH<sub>2</sub> 缩合和氧化所产生的肽。

激素类似物 1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素(1-β-巯基丙酸-8-D-精氨酸)-抗利尿激素或去氨加压素以下简称为“DDAVP”为治疗诸如尿崩症,夜遗尿和尿失禁引起的尿频的重要抗利尿药。

在本申请中 1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素(仍然被称为九肽衍生物)与天然的垂体神经部抗利尿激素不同,它是用 1-β-巯基丙酸代替末端的甲硫氨酸并用 D-精氨酸代替精氨酸而得到的。同样,合成的起始原料和中间体称为 n 肽衍生物,其中 n 为在相应的肽中的氨基酸和假氨酸残基的总数。

佐拉(Zaoral)等的美国专利 3,497,491 描述了合成 DDAVP 的均相法,库切克 V 和佐拉 M 在 1979, Coll. Czechoslov. Chem Commun. 44:1173—1178 中描述了固相法。然而,用现在已知的工艺方法仅得到无定形的 1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素,因而难以纯化。作为治疗应用,诸如具升压活性的杂质会导致并发症。

在已知技术中收率可能是以牺牲纯度来提高的,反之亦然,且产品分子越大,纯化就越困难成本也越高。医药领域要求高纯的优质品,因此目前一般强调纯度。然而,目前已知的方法要求过多的纯化步骤,不可避免地会使收率减少。提纯需化人工,并使产品收率明显

减少,因而提高了成本。

因此,生产 DDAVP 的合成路线需要有一种工艺使其中合成的最后步骤的收率得到提高。这将减少对中间体和产品的高成本的提纯的要求和提供高收率的优质产品。同时需要有一种 DDAVP 经改进的相对不复杂的生产方法,其中,较少生成具升压或其它不需要的生理作用的杂质,或更易在提纯步骤中除去。

本发明的目的是提供一种高产率地生产高纯度的 1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素的新方法。

另一个目的是提供一种简单、经济的方法,通过在最终步骤中避免复杂、昂贵的提纯过程而高产率地生产高纯度的 DDAVP。

本发明的一种合成 1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素(I)的方法,其特征在于包括下列步骤:

(a) 制备七肽:

MPa(R<sup>1</sup>)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys(R<sup>2</sup>)-Pro-OH(II)(SEQ ID NO:1),或中 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 为巯基保护基,可以相同或者不同;

(b) 将步骤(a)的七肽与二肽(R<sup>3</sup>)-D-Arg(HCl)-Gly-NH<sub>2</sub>(III) 缩合,式中 R<sup>3</sup> 为对酸敏感的氨基保护基;

(c) 形成九肽;

MPa(R<sup>1</sup>)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys(R<sup>2</sup>)-Pro-D-Arg(HCl)-Gly-NH<sub>2</sub>(IV)(SEQ ID NO:1)以及

(d) 将步骤(c)的九肽在质子性溶剂中用碘氧化。

在步骤(a)中制备七肽的较佳方法为通过三肽 MPa(R<sup>1</sup>)-Tyr-Phe-X(V)(式中 X 为在 Phe 的羧基中取代羟基(-OH)的反应性基团)与四肽(R<sup>3</sup>)-Gln-Asn-Cys(R<sup>2</sup>)-Pro-OH(VI)缩合。

巯基保护基 R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 可以相同或彼此独立,可为乙酰胺基甲基(Acm),叔丁基,叔丁基亚磺酸基,对甲基苄基,对甲氧基苄基,2-(3-硝基吡啶亚磺酰基),乙基氨基甲酰基,三苯基甲基或 9-苄基甲基。

本发明的较佳的一个具体实施方案中, 巯基保护基  $R^1$  的  $R^2$  两者为乙酰胺基甲基。在本发明的另一较佳的具体实施方案中, 氨基保护基  $R^3$  为 N-叔丁氧基(BOC)。

更佳的反应基 X 为活化的羧酸酯, 诸如, 对硝基苯酚或羟基琥珀酰亚胺的酯, 或者是非活化的羧酸酯, 诸如, 甲酯、乙酯或苄酯, 或者是叠氮化物, 于是, 反应基 X 可以是烷氧基, 芳氧基或叠氮基, 而较佳的烷氧基为琥珀酰亚胺氧基, 较佳的芳氧基为对硝基苯氧基。

在上述的方法中, 步骤(d)的在低于 pH5.0, 较佳是在 pH2.5—4.3 之间用  $I_2$  进行氧化。

本方法在步骤(d)用  $I_2$  氧化后, 即在所有的合成完成之后, 不经中断即将反应混合物进行提纯。一条较佳的提纯路线为通过离子交换色谱在一种用酸平衡的阳离子交换树脂上进行纯化。纯化所用的较佳的离子交换树脂为含磺酸基的。提纯可以进一步深化例如, 采用附加的凝胶色谱步骤。

根据本发明, 同时揭示了按照本发明方法制备的高纯度的 DDAVP 以及将它用于治疗尿崩症、夜遗尿的尿失禁引起的尿频。

本发明将通过不起限定作用的具体实施例, 更详细地加以说明, 其中  $R^1$  和  $R^2$  两者为乙酰胺基甲基,  $R^3$  为 N-叔丁氧基, X 为  $-NHNH_2$ 。

实施例 1:

Boc-Gln-Asn-Cys(Acm)-Pro-OH(X):

BocCys(Acm)ONp 从 BocCys(Acm)OH (Novabiochem, L aufelingen, CH) 和对硝基苯酚通过与 N,N'-二环己基碳化二亚胺(DCC)在乙酸乙酯中反应制得, 无需提纯而将它与 H-Pro-OH 在 DMF/乙酸乙酯/水中于 0℃ 在 pH 中性时加入  $Et_3N$  反应制备 Boc-Cys(Acm)-Pro-OH(XII)。收率 81%。

纯度 > 95% (TLC)。

将 XII 在 HCl/HOAc 中于室温下除去保护基,将由此得到的粗 H-Cys(Acm)-Pro-OH·HCl 溶解在 DMF 中,并用 Et<sub>3</sub>N 中和,并加入 Boc-Asn-ONp(Novabiochem, Läufelingen, CH)于 -5℃ 并保持 pH 为中性。得到 Boc-Asn-Cys(Acm)-Pro-OH(XIII)以 81% 的产率分离得 XIII。[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -77.1°(1g/100ml DMF)。四肽衍生物 X 由 XIII 和 Boc-Gln-ONp(Novabiochem, Laufeligen, CH)以相应于从 XII 和 Boc-Asn-ONp 制备 XIII 的方法来制备。收率 78.5%, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -89.7°(1g/100ml H<sub>2</sub>O)。

## 实施例 2

Mpa(Acm)-Tyr-Phe-NHNH<sub>2</sub>(XI):

通过 H-Tyr-OEt·HCl 与 Mpa(Acm)-OH(Bachem AG, CH) 以及 DCC 在含有 1-羟基苯并三唑(HOBt)的 DMF 中于 0℃ 并维持 pH7(用 Et<sub>3</sub>N)进行反应,制备 Mpa(Acm)-Tyr-OEt(XIV)。收率 48%。通过酯 XIV 与 H-Phe-N<sub>2</sub>H<sub>3</sub> 在 DMF/H<sub>2</sub>O 中用 α-糜蛋白酶催化进行反应,制备酰肼 XI,收率 90%;m. p. 240—242℃。

## 实施例 3

Mpa(Acm)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys(Acm)-Pro-OH(VII)  
(SEQ ID NO:1):

将 Boc-Gln-Asn-Cys(Asm)-Pro-OH(X)(11.7 克)溶于 56ml 三氟乙酸(TFA)中,在室温保持 1 小时后蒸除三氟乙酸。将残留物溶解在 19ml 二甲基甲酰胺(DMF)中并冷却之,用 Et<sub>3</sub>N 调节至 pH7。将 Mpa(Acm)-Tyr-Phe-NHNH<sub>2</sub>(XI; 11.0g)溶解在 115ml DMF 中,将此溶液冷却至 -18℃ 加入 HCl/乙酸乙酯(15.8ml; 3.2M),并将此溶液保持在 -15℃,加入亚硝酸异戊酯(3.5ml),并将此溶液在约 -10℃ 搅拌 15 分钟,冷却至 -20℃ 后将 pH 用 Et<sub>3</sub>N 调节至 7。

加入除去保持基的四肽在 DMF 中的溶液,并于 -5℃ 搅拌。在

反应实际上完全后(用 TLC 确定除去保护基的肽有 99.5%),过滤,除去析出的盐,通过真空蒸发使体积减少至 60ml。加入 EtOH (99.5%, 21.5ml)并得此溶液加热至 60℃。然后冷却至环境温度,将 pH 用浓盐酸调节至 2.5。将沉淀滤出,用 99.5%EtOH 洗涤,干燥得到 17.6 克白色结晶,收率 85%, m. p. 188—191℃。

#### 实施例 4

Boc-D-Arg(HCl)-Gly-NH<sub>2</sub>(VIII):

将 H-Gly-NH<sub>2</sub>·HCl(2.6g)和 1-羟基苯并三唑(HOBt; 3.3g)悬浮在 34ml DMF 中,并将此溶液冷却至 10℃。加入 Et<sub>3</sub>N(2.0ml),将此混合物搅拌 15 分钟。加入 Boc-D-精氨酸(HCl)(6.8g),并将温度降至 0℃。将溶解在 4.5ml DMF 中的 DCC(4.5g)加入,并用 Et<sub>3</sub>N 调节 pH 至 6.0,转化完全后,过滤除去形成的沉淀,滤液真空蒸发之。

将残留物溶解在 80ml 水中,将此溶液冷却至 0℃,并用 1M HCl 调节 pH 至 3。通过过滤除去 HOBt 后,该溶液用二氯甲烷萃取。将水相在真空下与丁醇(4X)共沸蒸馏浓缩至 20ml 的体积,加入 BuOH 使它的体积成为 68ml。此溶液用含 10% NaCl (w/w)和 5% 丁醇(v/v)的 0.1M HCl 萃取,然后通过蒸馏将体积减少至一半。

用丁醇重复共沸蒸馏,并通过过滤除去 NaCl 后,将此溶液倾入过量八倍(v/v)的醋酸异丙酯中,通过过滤收集沉淀并用醋酸异丙酯洗涤。得到的化合物 VIII 为白色无定形粉末;产量 6.8 克(90%),  $[\alpha]_D^{20}=4.3^\circ$ 。

#### 实施例 5

Mpa(Acm)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys(Acm)-Pro-D-Arg(HCl)-Gly-NH<sub>2</sub>(IX), (SEQ ID NO. 1):

将 Boc-D-Arg(HCl)-Gly-NH<sub>2</sub>(VIII)(6.8g)溶解在 23ml 乙酸中,并加入 20ml HCl/HOAc (2.2M),于室温下搅拌 1.5 小时后,在

减压下蒸发此溶液,将残留物溶解在 30ml DMF 中。通过加入二甲苯(31ml)使除去保护基的二肽以油滴析出。倾滗去上层清液后,残留物用二甲苯洗涤,并在真空下除去残存的溶剂。将残留物溶在 110ml DMF 中,并将此溶液冷却至  $-10^{\circ}\text{C}$ ,通过加入  $\text{Et}_3\text{N}$  将 pH 调节至 7.5。

将 Mpa(Acm)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys(Acm)-Pro-OH(VII)(SEQ ID NO:1)(14g)和 2.1g HOBt 溶解于 65ml DMF 中,并将在前一步骤中得到的在 DMF 中的除去保护基的二肽 H-D-Arg(HCl)-Gly-NH<sub>2</sub> 和计算量的 DCC 加入。在 90%转化(TLC)后滤除 DCU,将滤液体积减少至 100ml,加热至  $60^{\circ}\text{C}$ ,倾入 310ml EtOH/EtOAc(85:15, v/v)中。

过滤收集沉淀并用 EtOH/EtOAc(85:15)洗涤。得到的化合物 IX 为白色粉末(产量 15.5 克,84.9%),m. p.  $182-185^{\circ}\text{C}$ (纯度 94.5% (HPCL))。

#### 实施例 6

1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素:

Mpa-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-D-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>(I)(醋酸盐)(SEQ ID NO:2):

将 10 克 Mpa(Acm)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys(Acm)-Pro-D-Arg(HCl)-Gly-NH<sub>2</sub>(IX)(SEQ ID NO:1)溶解在 10 立升乙酸/水(1:9, v/v)中。通过滚柱泵加入溶于 80ml 乙醇的 2 克碘将被保护的九肽衍生物 IX 于室温下氧化,进料速度通过紫外监测器控制,以保持反应介质中游离碘的量很低。IX 的转化率通过高速 HPLC 监控。在 IX 全部消耗后黄色将持续。

将含有该产物的反应溶液通过装有 1.6 立升用含水乙酸平衡的 S-Sepharose FF (Pharmacia, 瑞典)的短玻璃柱。用 0.08M NH<sub>4</sub>Ac/AcOH 缓冲液(24 立升, pH4.1;各流份用 HPLC 监测)洗提 1-脱氨

基-8-D-精氨酸抗利尿激素(I)。将含 DDAVP(I) 纯度  $>99\%$  (不计缓冲液的成分) 的流份合并。含有纯的标题化合物的醋酸盐的溶液通过反渗透浓缩, 并冷冻干燥。得到白色松散粉末。

DDAVP(I) 在 Sephadex G25 上 (0.1M 乙酸) 经凝胶过滤进一步纯化。接着用 HPLC 分析各个流分, 含纯产品的流份合并后冷冻干燥。得到纯度  $>99\%$  的 DDAVP(I) 的二醋酸盐产量约 5 克, 为白色松散粉末, 收率 53%。

#### 实施例 7

将按照实施例 1—6 制备的 DDAVP 与用已知的均相工艺制备的 1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素进行比较试验。

按照美国专利 3,497,491 的均相方法, DDAVP 的合成总收率 (从  $\beta$ -巯基丙酸起) 为 5.0%。按照本发明方法制备的 1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素(I) 的总收率 [包括 Mpa(Acm)-OH 的制备] 为 7.0%, 提高 40%。按照本发明的方法, 采用自  $\beta$ -巯基丙酸起始的合成路线 [包括制备 Boc-Cys(Acm)-OH] 生产 1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素(I) 的总收率为 10.7%。

更重要的是根据本发明在最后三步中得到高的收率: 即化合物 X 为 38% 和化合物 VIII 为 45%。在已知的典型工艺中最后三个步骤的收率约为 8.5%—17% 或约 10—20% 的范围, 在工艺的经济性方面, 在最终几步损失的产物比初始阶段更值钱, 因此本发明的方法降低成本为更有效。

根据本发明的方法提供的 DDAVP 不仅在收率上比已知的均相法高得多, 而且在纯度上也高得多。

在美国专利 3,497,491 中缺少最终产品纯度的精确信息, 它没有提供最终产品纯 DDAVP 的含量, 而仅给出用于确证结构的元素和氨基酸分析的结果。另外, 旋光度原则上可以很精确地测量, 但其中所述的值  $[\alpha]_D^{25} = -65 \pm 2^\circ$  并无用处。

然而,在美国专利 3,497,491 的表中第 3 栏中关于升压反应的信息可用于纯度的估计。按照美国专利 3,497,491 制备的 1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素(I)据说具有可测量的升压副反应。最近的研究表明如果经过仔细纯化,1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素(I)实际上不具有这种升压活性。然而,按照目前已知的方法进一步进行这种提纯,可能在收率上作出牺牲。

依照已知方法制备的产品中含有的杂质导致的升压副反应,包括药理学并发症如高血压。因此,“纯度”包括二个方面,首先是在最终产物中活性 DDAVP 的实际含量,其次是没有医学上有害的杂质。按照本发明的方法制备的 1-脱氨基-8-D-精氨酸抗利尿激素(I),实际上是没有这类潜在的有害杂质的。

在此已详细说明了本发明,本领域的技术人员可以变更本工艺中的各个步骤,所用的试剂和各种反应条件,并得到类似的结果,而这类变更包括在本发明的范围和精神之内。

序列表:

(i) 一般信息

(ii) 顺序数: 2

SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 顺序特征：

(A) 长度: 4 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 形状:线状

(ii) 分子类型: 肽

(iii) 顺序说明: SEQ ID NO:1:

Tyr-Phe-Gln-Asn

SEQ ID NO:2 的信息:

(i) 顺序特征：

(A) 长度:6 个氨基酸

(B) 类型:氨基酸

(C) 形状:线状

(ii) 分子类型:肽

(iii) 顺序描述: SEQ ID NO:2:

Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro