



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110330552 B

(45) 授权公告日 2021.03.16

(21) 申请号 201910748640.3

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2019.08.14

C07K 7/23 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C07K 1/34 (2006.01)

申请公布号 CN 110330552 A

C07K 1/06 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.10.15

审查员 李颖

(73) 专利权人 凯莱英生命科学技术(天津)有限公司

地址 300457 天津市滨海新区经济技术开发区第七大街71号

(72) 发明人 李九远 李常峰 李邦洪 朱自力 李新勇

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 白雪

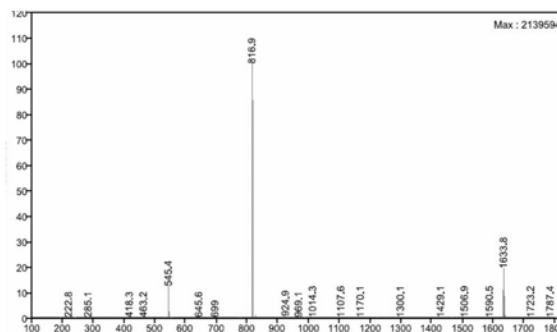
权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

醋酸地加瑞克的合成方法

(57) 摘要

本发明提供了一种醋酸地加瑞克的合成方法。该方法包括:S1,以Rink Amide MBHA树脂为载体,依次与地加瑞克前六个氨基酸进行缩合反应,得到六肽树脂片段III;S2,以CTC树脂为载体,依次与地加瑞克后四个氨基酸进行缩合反应,得到四肽树脂片段I;S3,切割四肽树脂片段I,得到四肽片段II;S4,将六肽树脂片段III与四肽片段II在MYMsA和/或MYTsA的作用下进行缩合反应,得到全肽树脂;S5,切割全肽树脂,得到地加瑞克;S6,对地加瑞克进行醋酸转盐,得到醋酸地加瑞克。本发明有效解决了固相合成法制备醋酸地加瑞克时存在的副反应多、收率低、成本高等问题。



1. 一种醋酸地加瑞克的合成方法,其特征在于,包括:

S1,以Rink Amide MBHA树脂为固相合成的载体,将其按照氨基酸顺序依次与以下六种保护氨基酸Fmoc-D-Ala-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-iLys (Boc) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-D-Aph (Cbm) -OH及Fmoc-Aph (Hor) -OH进行缩合反应,得到六肽树脂片段III;

S2,以CTC树脂为固相合成的载体,将其按照氨基酸顺序依次与以下四种保护氨基酸Fmoc-Ser (tBu) -OH、Fmoc-3- (3-pyridy) -D-Ala-OH、Fmoc-D-Phe (4-Cl) -OH及Fmoc-D-2NaI-OH进行缩合反应,得到四肽树脂片段I;

S3,切割所述四肽树脂片段I的树脂,得到四肽片段II;

S4,将所述六肽树脂片段III与所述四肽片段II在缩合剂MYMsA和/或MYTsA的作用下进行缩合反应,得到全肽树脂;

S5,切割所述全肽树脂的树脂,得到地加瑞克;

S6,对所述地加瑞克进行醋酸转盐,得到所述醋酸地加瑞克。

2. 根据权利要求1所述的合成方法,其特征在于,所述步骤S1包括:

S11,将所述Rink Amide MBHA树脂依次进行溶胀、Fmoc脱保护后,将其与所述Fmoc-D-Ala-OH进行第一次缩合,得到第一缩合产物;

S12,将所述第一缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与所述Fmoc-D-Ala-OH进行第二次缩合,得到第二缩合产物;

S13,将所述第二缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与所述Fmoc-iLys (Boc) -OH进行第三次缩合,得到第三缩合产物;

S14,将所述第三缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与所述Fmoc-Leu-OH进行第四次缩合,得到第四缩合产物;

S15,将所述第四缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与所述Fmoc-D-Aph (Cbm) -OH进行第五次缩合,得到第五缩合产物;

S16,将所述第五缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与所述Fmoc-Aph (Hor) -OH进行第六次缩合,得到第六缩合产物,即为所述六肽树脂片段III。

3. 根据权利要求2所述的合成方法,其特征在于,所述步骤S2包括:

S21,将所述CTC树脂进行溶胀后,与所述Fmoc-Ser (tBu) -OH进行第七次缩合,得到第七缩合产物;

S22,将所述第七缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与所述Fmoc-3- (3-pyridy) -D-Ala-OH进行第八次缩合,得到第八缩合产物;

S23,将所述第八缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与所述Fmoc-D-Phe (4-Cl) -OH进行第九次缩合,得到第九缩合产物;

S24,将所述第九缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与所述Fmoc-D-2NaI-OH进行第十次缩合,得到第十缩合产物,即为所述四肽树脂片段I。

4. 根据权利要求3所述的合成方法,其特征在于,所述第一次缩合至所述第六次缩合步骤中,以及所述第八次缩合至所述第十次缩合步骤中,采用的缩合体系分别独立地选自以下任一种:HOBT/DIC、HOAT/DIC、Oxymapure/DIC、HATU/DIPEA、HBTU/DIPEA、TBTU/DIPEA、PyBOP/DIPEA;所述第七次缩合步骤在碱性环境中进行,且采用的碱为DIPEA;

优选地,各Fmoc脱保护步骤中采用的脱保护试剂均为20wt%哌啶的DMF溶液。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的合成方法,其特征在于,所述步骤S1和所述步骤S2中,各缩合反应过程中采用的反应溶剂为DMF、DCM、THF中的一种或多种。

6. 根据权利要求5所述的合成方法,其特征在于,所述步骤S1和所述步骤S2中,各缩合反应过程中的反应温度为10~35℃,反应时间为0.5~4h。

7. 根据权利要求5所述的合成方法,其特征在于,所述步骤S1和所述步骤S2中,各缩合反应过程中,保护氨基酸、缩合体系及Fmoc氨基树脂之间的摩尔比为1.5~3:1.5~6:1,其中所述Fmoc氨基树脂的摩尔数以所含Fmoc保护氨基的摩尔数计。

8. 根据权利要求1至4中任一项所述的合成方法,其特征在于,所述Rink Amide MBHA树脂的取代度为0.6~1.0mmol/g,所述CTC树脂的取代度为0.9~1.6mmol/g。

9. 根据权利要求1至4中任一项所述的合成方法,其特征在于,在切割所述四肽树脂片段I的树脂的步骤之前,所述步骤S3还包括对所述四肽树脂片段I依次进行Fmoc脱保护、封端反应的步骤,具体如下:

采用20wt%哌啶的DMF溶液对所述四肽树脂片段I进行Fmoc脱保护,得到脱保护片段I;将所述脱保护片段I与乙酸酐、DIPEA的作用下进行封端反应,得到封端后的所述四肽树脂片段I。

10. 根据权利要求1至4中任一项所述的合成方法,其特征在于,所述步骤S4包括:

S41,将所述六肽树脂片段III进行Fmoc脱保护,得到脱保护片段III;

S42,将所述四肽片段II和所述缩合剂、反应溶剂混合,得到预处理液;

S43,将所述预处理液与所述脱保护片段III进行缩合反应,得到所述全肽树脂。

11. 根据权利要求10所述的合成方法,其特征在于,所述步骤S42中采用的反应溶剂为DMF、DCM、THF中的一种或多种;相对于所述六肽树脂片段III,所述四肽片段II的当量为1.2~1.5eq,所述缩合剂MYMsA和/或MYTsA的当量为1.2~1.5eq。

12. 根据权利要求10所述的合成方法,其特征在于,在得到所述全肽树脂后,所述步骤S43还包括对所述全肽树脂进行洗涤、收缩、氮气吹扫烘干的步骤。

13. 根据权利要求1至4中任一项所述的合成方法,其特征在于,所述步骤S5包括:

采用切割液与所述全肽树脂反应后,过滤,得到滤液;其中所述切割液为95vol%TFA的水溶液;

采用甲基叔丁基醚对所述滤液逼晶,过滤,得到所述地加瑞克的粗产物;

对所述粗产物进行提纯,得到所述地加瑞克。

14. 根据权利要求1至4中任一项所述的合成方法,其特征在于,所述步骤S6包括:采用醋酸水溶液对所述地加瑞克进行转盐,得到所述醋酸地加瑞克。

醋酸地加瑞克的合成方法

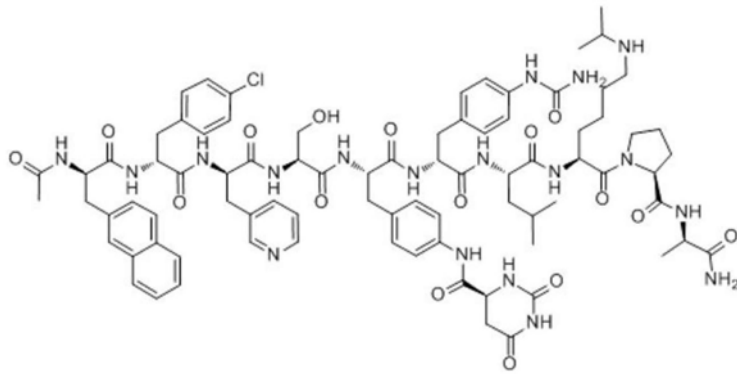
技术领域

[0001] 本发明涉及有机合成技术领域,具体而言,涉及一种醋酸地加瑞克的合成方法。

背景技术

[0002] 醋酸地加瑞克(Degarelix acetate)是治疗前列腺癌的主要用药之一,目前主要通过固相合成得到地加瑞克,然后进行醋酸转盐形成醋酸地加瑞克。地加瑞克结构为Ac-D-2NaI-D-Phe(4-Cl)-D-Ala(3-Pyridyl)-Ser-Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-

Ala-NH₂,化学式如下:



[0003] 地加瑞克的传统固相合成方法如下:通过固相合成载体进行逐个的氨基酸合成,比如专利CN102428097B,CN105085634A等。然而,该方法中Aph(Hor)重复与碱接触,导致二氢尿嘧啶部分转化为乙内酰,导致副反应发生。

[0004] 专利CN102329373A,CN103992392A,CN10292174A,CN102428097B等公开的地加瑞克合成方法中,6位氨基酸残基D-4-Aph(Cbm)在合成中采用了侧链Cbm基团不保护的Fmoc-D-4-Aph(Cbm)-OH或者侧链Cbm用t-Bu保护的Fmoc-D-4-Aph(t-Bu-Cbm)-OH。然而,固相合成中采用侧链不保护的Fmoc-D-4-Aph(Cbm)-OH,如果反应温度控制不当,在最后的乙酰化封端过程中容易产生在侧链Cbm基团上的乙酰化副产物,该副产物难以分离纯化,将影响工艺的效率和质量。采用侧链用叔丁基保护的Fmoc-D-4-Aph(t-Bu-Cbm),在完成连结后需要去除保护基,而Aph(t-Bu-Cbm)侧链上叔丁基的脱除比较困难,需要在强酸水溶液中加热条件下才能完全脱除,加大了产生消旋等杂质的可能性,影响产品质量。

[0005] 专利CN103992378A公开的地加瑞克合成方法中,6位氨基酸残基D-4-Aph(Cbm)在合成中采用Fmoc-D-4-Aph(Dde)-OH,最后醋酐封端后用2%水合肼的DMF混合溶液脱去6位D-苯丙氨酸侧链氨基上的Dde,再通过三甲基硅基异氰酸酯DMF溶液引入Cbm,以此来避免醋酐封端过程中Cbm基团的乙酰化副产物。然而,此工艺操作复杂,不适于规模化生产。

[0006] 文献也报道了地加瑞克的Boc固相合成法(2001:880SYNTHLINE)和Boc液相合成法(US6214798B1)。Boc固相合成法需要用HF进行裂解,对人体和环境都会造成很大危害。Boc液相合成法所得地加瑞克纯度较低,只有96~98%(J.Med.Chem.,2005,48,4851)。

[0007] 专利CN109575109A采用6+4的固相片段合成,6位Aph先用MMt保护,然后用1~5%的TFA脱除后,在用L-Hor-OH偶联。然而,在用TFA脱MMt过程中,会使Lys侧链Boc脱除,然后L-Hor-OH连接上,生成杂质,降低了产品的收率,且分离难度很大。

[0008] 另外还有一些固相片段合成方法用以合成地加瑞克,比如专利CN103351428和专利CN107022002采用固相片段缩合的方法合成。然而,固相片段缩合投入的每个片段都是2倍过量,严重浪费肽片段,造成合成成本过高。同时,因固相片段缩合的树脂取代值限制,物料通量降低,浪费溶剂,产生大量废液。

[0009] 除了固相合成方法,专利CN103180335采用3+4+3、专利CN106589071采用6+4的液相片段缩合的方法合成,其中每个片段均是液相合成。然而,因每一步偶合反应都涉及了繁琐的N末端以及C末端的保护和脱保护过程,以及适宜的pH条件的配合,这产生了很大的工作量,废液量也很大,且耗费时间很长。而且液相合成肽片段的效率远低于固相合成肽片段,分离也有很大难度。

发明内容

[0010] 本发明的主要目的在于提供一种醋酸地加瑞克的合成方法,以解决现有技术中采用固相合成法制备醋酸地加瑞克时存在的副反应多、收率低、成本高等问题。

[0011] 为了实现上述目的,根据本发明的一个方面,提供了一种醋酸地加瑞克的合成方法,其包括:S1,以Rink Amide MBHA树脂为固相合成的载体,将其按照氨基酸顺序依次与以下六种保护氨基酸Fmoc-D-Ala-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-iLys (Boc) -OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-D-Aph (Cbm) -OH及Fmoc-Aph (Hor) -OH进行缩合反应,得到六肽树脂片段III;S2,以CTC树脂为固相合成的载体,将其按照氨基酸顺序依次与以下四种保护氨基酸Fmoc-Ser (tBu) -OH、Fmoc-3- (3-pyridyl) -D-Ala-OH、Fmoc-D-Phe (4-Cl) -OH及Fmoc-D-2NaI-OH进行缩合反应,得到四肽树脂片段I;S3,切割四肽树脂片段I的树脂,得到四肽片段II;S4,将六肽树脂片段III与四肽片段II在缩合剂MYMsA和/或MYTsA的作用下进行缩合反应,得到全肽树脂;S5,切割全肽树脂的树脂,得到地加瑞克;S6,对地加瑞克进行醋酸转盐,得到醋酸地加瑞克。

[0012] 进一步地,步骤S1包括:S11,将Rink Amide MBHA树脂依次进行溶胀、Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-D-Ala-OH进行第一次缩合,得到第一缩合产物;S12,将第一缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-D-Ala-OH进行第二次缩合,得到第二缩合产物;S13,将第二缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-iLys (Boc) -OH进行第三次缩合,得到第三缩合产物;S14,将第三缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-Leu-OH进行第四次缩合,得到第四缩合产物;S15,将第四缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-D-Aph (Cbm) -OH进行第五次缩合,得到第五缩合产物;S16,将第五缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-Aph (Hor) -OH进行第六次缩合,得到第六缩合产物,即为六肽树脂片段III。

[0013] 进一步地,步骤S2包括:S21,将CTC树脂进行溶胀后,与Fmoc-Ser (tBu) -OH进行第七次缩合,得到第七缩合产物;S22,将第七缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-3- (3-pyridyl) -D-Ala-OH进行第八次缩合,得到第八缩合产物;S23,将第八缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-D-Phe (4-Cl) -OH进行第九次缩合,得到第九缩合产物;S24,将第九缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-D-2NaI-OH进行第十次缩合,得到第十缩合产物,即为四肽树脂片段I。

[0014] 进一步地,第一次缩合至第六次缩合步骤中,以及第八次缩合至第十次缩合步骤中,采用的缩合体系分别独立地选自以下任一种:HOBT/DIC、HOAT/DIC、Oxymapure/DIC、HATU/DIPEA、HBTU/DIPEA、TBTU/DIPEA、PyBOP/DIPEA;第七次缩合步骤在碱性环境中进行,

且采用的碱为DIPEA;优选地,各Fmoc脱保护步骤中采用的脱保护试剂均为20wt%哌啶的DMF溶液。

[0015] 进一步地,步骤S1和步骤S2中,各缩合反应过程中采用的反应溶剂为DMF、DCM、THF中的一种或多种。

[0016] 进一步地,步骤S1和步骤S2中,各缩合反应过程中的反应温度为10~35℃,反应时间为0.5~4h。

[0017] 进一步地,步骤S1和步骤S2中,各缩合反应过程中,保护氨基酸、缩合体系及Fmoc氨基树脂之间的摩尔比为1.5~3:1.5~6:1,其中Fmoc氨基树脂的摩尔数以所含Fmoc保护氨基的摩尔数计。

[0018] 进一步地,Rink Amide MBHA树脂的取代度为0.6~1.0mmol/g,CTC树脂的取代度为0.9~1.6mmol/g。

[0019] 进一步地,在切割四肽树脂片段I的树脂的步骤之前,步骤S3还包括对四肽树脂片段I依次进行Fmoc脱保护、封端反应的步骤,具体如下:采用20wt%哌啶的DMF溶液对四肽树脂片段I进行Fmoc脱保护,得到脱保护片段I;将脱保护片段I与乙酸酐、DIPEA的作用下进行封端反应,得到封端后的四肽树脂片段I。

[0020] 进一步地,步骤S4包括:S41,将六肽树脂片段III进行Fmoc脱保护,得到脱保护片段III;S42,将四肽片段II和缩合剂、反应溶剂混合,得到预处理液;S43,将预处理液与脱保护片段III进行缩合反应,得到全肽树脂。

[0021] 进一步地,步骤S42中采用的反应溶剂为DMF、DCM、THF中的一种或多种;相对于六肽树脂片段III,四肽片段II的当量为1.2~1.5eq,缩合剂MYMsA和/或MYTsA的当量为1.2~1.5eq。

[0022] 进一步地,在得到全肽树脂后,步骤S43还包括对全肽树脂进行洗涤、收缩、氮气吹扫烘干的步骤。

[0023] 进一步地,步骤S5包括:采用切割液与全肽树脂反应后,过滤,得到滤液;其中切割液为95vol%TFA的水溶液;采用甲基叔丁基醚对滤液逼晶,过滤,得到地加瑞克的粗产物;对粗产物进行提纯,得到地加瑞克。

[0024] 进一步地,步骤S6包括:采用醋酸水溶液对地加瑞克进行转盐,得到醋酸地加瑞克。

[0025] 本发明提供的醋酸地加瑞克的合成方法中采用了固相合成6+4片段合成法,先以Rink Amide MBHA树脂为固相合成的载体将前六个氨基酸依次缩合形成六肽树脂片段III,再以CTC树脂为固相合成的载体将后四个氨基酸依次缩合形成四肽树脂片段I,其次切割四肽树脂片段I得到四肽片段II,然后将六肽树脂片段III和四肽片段II缩合形成全肽树脂,最后经切割、转盐得到醋酸地加瑞克。氨基酸中易引发副反应的NH₂-Aph(Hor)-OH位于第六个,本发明采用固相合成6+4片段合成法,相当于在缩合过程中Aph(Hor)只与碱进行了一次接触,相比逐一缩合氨基酸反复与碱进行多次接触,有效减少了副反应的发生。而且,本发明在六肽树脂片段III和四肽片段II的缩合过程中使用了缩合剂MYMsA和/或MYTsA,这两种缩合剂无消旋化影响,缩合能力强,且不需要添加任何辅助剂和催化剂,有利于减少片段的消耗量。以上两方面的原因使得醋酸地加瑞克的合成收率明显提高,副反应明显减少,合成成本也相应降低。

附图说明

[0026] 构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0027] 图1示出了根据本发明实施例1制备的醋酸地加瑞克的HPLC测试结果;以及

[0028] 图2示出了根据本发明实施例1制备的醋酸地加瑞克的质谱测试结果。

具体实施方式

[0029] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明。

[0030] 如本发明背景技术部分所描述的,现有技术中采用固相合成法制备地加瑞克时多存在副反应多、收率低、成本高的问题。为了解决这一问题,本发明提供了一种醋酸地加瑞克的合成方法,其包括:S1,以Rink Amide MBHA树脂为固相合成的载体,将其按照氨基酸顺序依次与以下六种保护氨基酸Fmoc-D-Ala-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-iLys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-D-Aph(Cbm)-OH及Fmoc-Aph(Hor)-OH进行缩合反应,得到六肽树脂片段III;S2,以CTC树脂为固相合成的载体,将其按照氨基酸顺序依次与以下四种保护氨基酸Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-3-(3-pyridyl)-D-Ala-OH、Fmoc-D-Phe(4-Cl)-OH及Fmoc-D-2Nal-OH进行缩合反应,得到四肽树脂片段I;S3,切割四肽树脂片段I的树脂,得到四肽片段II;S4,将六肽树脂片段III与四肽片段II在缩合剂MYMsA和/或MYTsA的作用下进行缩合反应,得到全肽树脂;S5,切割全肽树脂的树脂,得到地加瑞克;S6,对地加瑞克进行醋酸转盐,得到醋酸地加瑞克。

[0031] 四肽树脂片段I、四肽片段II、六肽树脂片段III、全肽树脂IV、地加瑞克V的结构如下:

I	Ac-D-2Nal-D-Phe(4-Cl)-D-Ala(3Pyl)-Ser(tBu)-CTC resin 1 2 3 4
II	Ac-D-2Nal-D-Phe(4-Cl)-D-Ala(3Pyl)-Ser(tBu)-OH 1 2 3 4
[0032] III	NH ₂ -Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-Leu-iLys(Boc)-Pro-D-Ala-NH resin 5 6 7 8 9 10
IV	Ac-D-2Nal-D-Phe(4-Cl)-D-Ala(3Pyl)-Ser(tBu)-Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-Leu-iLys(Boc)-Pro-D-Ala-NH resin 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
V	Ac-D-2Nal-D-Phe(4-Cl)-D-Ala(3Pyl)-Ser-Aph(Hor)-D-Aph(Cbm)-Leu-iLys-Pro-D-Ala-NH ₂ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

[0033] 本发明提供的醋酸地加瑞克的合成方法中采用了固相合成6+4片段合成法,先以RinkAmide MBHA树脂为固相合成的载体将前六个氨基酸依次缩合形成六肽树脂片段III,再以CTC树脂为固相合成的载体将后四个氨基酸依次缩合形成四肽树脂片段I,其次切割四肽树脂片段I得到四肽片段II(采用CTC树脂为固相合成的载体,最终可得到纯度达98~99%的四肽片段II),然后将六肽树脂片段III和四肽片段II缩合形成全肽树脂,最后经切割、转盐得到醋酸地加瑞克。氨基酸中易引发副反应的NH₂-Aph(Hor)-OH位于第六个,本发明采用固相合成6+4片段合成法,相当于在缩合过程中Aph(Hor)只与碱进行了一次接触(在Aph(Hor)缩合后只需在碱性环境中进行脱保护),相比逐一缩合氨基酸反复与碱进行多次

接触,有效减少了副反应的发生。而且,本发明在六肽树脂片段III和四肽片段II的缩合过程中使用了缩合剂MYMsA和/或MYTsA,这两种缩合剂无消旋化影响,缩合能力强,且不需要添加任何辅助剂和催化剂,有利于减少片段的消耗量。以上两方面的原因使得醋酸地加瑞克的合成收率明显提高,副反应明显减少,合成成本也相应降低。

[0034] 具体地,采用本发明方法制备醋酸地加瑞克,氨基酸Aph (Hor) 侧链重排杂质小于0.1%,粗肽纯度可达93~95%,提纯后纯度能够达到99.94%以上,总收率可达到80%以上。同时,该路线后处理操作简单,两个片段可以同时生产,然后组装成终产品,提高了生产放大的效率。能够应用于工业化生产。

[0035] 在一种优选的实施方式中,上述步骤S1包括:S11,将Rink Amide MBHA树脂依次进行溶胀、Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-D-Ala-OH进行第一次缩合,得到第一缩合产物;S12,将第一缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-D-Ala-OH进行第二次缩合,得到第二缩合产物;S13,将第二缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-iLys (Boc) -OH进行第三次缩合,得到第三缩合产物;S14,将第三缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-Leu-OH进行第四次缩合,得到第四缩合产物;S15,将第四缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-D-Aph (Cbm) -OH进行第五次缩合,得到第五缩合产物;S16,将第五缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-Aph (Hor) -OH进行第六次缩合,得到第六缩合产物,即为六肽树脂片段III。这样通过逐步的脱保护、缩合,将前六个氨基酸连接至Rink Amide MBHA树脂上,且Fmoc-Aph (Hor) -OH位于最末端,与碱进行了一次接触。

[0036] 在一种优选的实施方式中,上述步骤S2包括:S21,将CTC树脂进行溶胀后(CTC树脂不用去保护,可以直接和氨基酸在碱性环境下反应,反应生成的一分子HCl与碱中和),与Fmoc-Ser (tBu) -OH进行第七次缩合,得到第七缩合产物;S22,将第七缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-3-(3-pyridyl)-D-Ala-OH进行第八次缩合,得到第八缩合产物;S23,将第八缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-D-Phe (4-Cl) -OH进行第九次缩合,得到第九缩合产物;S24,将第九缩合产物进行Fmoc脱保护后,将其与Fmoc-D-2Na1-OH进行第十次缩合,得到第十缩合产物,即为四肽树脂片段I。

[0037] 为了提高缩合效率,进一步减少副反应发生,在一种优选的实施方式中,第一次缩合至第六次缩合步骤中,以及第八次缩合至第十次缩合步骤中,采用的缩合体系分别独立地选自以下任一种:HOBT/DIC、HOAT/DIC、Oxymapure/DIC、HATU/DIPEA、HBTU/DIPEA、TBTU/DIPEA、PyBOP/DIPEA;第七次缩合步骤在碱性环境中进行,且采用的碱为DIPEA。(DIPEA只是提供碱性环境,捕获脱下来的HCl,该步骤中不需要缩合剂)。这里的缩合体系中,DIC是活化剂,HOBT、HOAT、Oxymapure是消旋抑制剂,DIPEA是碱,前面的HATU,HBTU,TBTU,PyBoP是活化剂。优选地,各Fmoc脱保护步骤中采用的脱保护试剂均为20wt%哌啶的DMF溶液。

[0038] 在一种优选的实施方式中,上述步骤S1和步骤S2中,各缩合反应过程中采用的反应溶剂为DMF、DCM、THF中的一种或多种。上述几种溶剂对氨基酸有较好的溶解性,能够提供更稳定的缩合反应环境。且为了进一步提高各氨基酸缩合反应的效率,在一种优选的实施方式中,上述步骤S1和步骤S2中,各缩合反应过程中的反应温度为10~35℃,反应时间为0.5~4h。

[0039] 在一种优选的实施方式中,上述步骤S1和步骤S2中,各缩合反应过程中,保护氨基酸、缩合体系及Fmoc氨基树脂之间的摩尔比为1.5~3:1.5~6:1,其中Fmoc氨基树脂的摩尔

数以所含Fmoc保护氨基的摩尔数计。这里的保护氨基酸指的是每次氨基酸缩合反应过程中的Fmoc保护氨基酸,比如第一次缩合步骤中的Fmoc-D-Ala-OH,第二次缩合步骤中的Fmoc-D-Ala-OH。Fmoc氨基树脂指的是各缩合反应过程中的树脂一方,比如第一次缩合步骤中的Rink Amide MBHA树脂,第二次缩合步骤中的第一缩合产物,且Fmoc氨基树脂的摩尔数以所含Fmoc保护氨基的摩尔数计,相当于按照能够进行反应的位点数目计。将保护氨基酸、缩合体系及Fmoc氨基树脂之间的摩尔比控制在上述范围,既有利于提高反应效率、转化率,也能够减少原料浪费。

[0040] 为了进一步促进缩合反应的进行,提高反应效率和各缩合反应过程中的产物收率,在一种优选的实施方式中,Rink Amide MBHA树脂的取代度为0.6~1.0mmol/g,CTC树脂的取代度为0.9~1.6mmol/g。

[0041] 在一种优选的实施方式中,在切割四肽树脂片段I的树脂的步骤之前,步骤S3还包括对四肽树脂片段I依次进行Fmoc脱保护、封端反应的步骤,具体如下:采用20wt%哌啶的DMF溶液对四肽树脂片段I进行Fmoc脱保护,得到脱保护片段I;将脱保护片段I与乙酸酐、DIPEA的作用下进行封端反应,得到封端后的四肽树脂片段I。这样可以将四肽树脂片段I中未参与缩合反应的氨基封端,避免其参与后续反应,从而可以进一步减少副反应的发生。

[0042] 在一种优选的实施方式中,上述步骤S4包括:S41,将六肽树脂片段III进行Fmoc脱保护,得到脱保护片段III;S42,将四肽片段II和缩合剂、反应溶剂混合,得到预处理液;S43,将预处理液与脱保护片段III进行缩合反应,得到全肽树脂。Fmoc脱保护后,六肽树脂片段III中末端氨基露出,然后与四肽片段II的末端羟基发生缩合反应,该过程中,六肽树脂片段III的末端Aph(Hor)第二次与碱接触,反应后即可形成全肽树脂,极大地降低了副反应发生的几率。

[0043] 为了提供更稳定的反应环境,同时提高反应效率,在一种优选的实施方式中,上述步骤S42中采用的反应溶剂为DMF、DCM、THF中的一种或多种;相对于六肽树脂片段III,四肽片段II的当量为1.2~1.5eq,缩合剂MYMsA和/或MYTsA的当量为1.2~1.5eq。更优选地,在得到全肽树脂后,步骤S43还包括对全肽树脂进行洗涤、收缩、氮气吹扫烘干的步骤。

[0044] 在一种优选的实施方式中,上述步骤S5包括:采用切割液与全肽树脂反应后,过滤,得到滤液;其中切割液为95vol%TFA的水溶液;采用甲基叔丁基醚对滤液逼晶,过滤,得到地加瑞克的粗产物;对粗产物进行提纯,得到地加瑞克。采用上述切割工序,能够将全肽树脂中的线性肽链完整分离。且为了进一步提高提纯效果,优选地,上述提纯过程采用反向高效液相色谱法,具体采用AQ填料,A相采用0.05wt%TFA的水溶液,B相采用0.05wt%TFA的乙腈溶液。更优选地,上述步骤S6包括:采用醋酸水溶液对地加瑞克进行转盐,得到醋酸地加瑞克。具体地,可以在反向高效液相色谱法提纯后,以1wt%AcOH的水溶液与乙腈作为流动相梯度洗脱并转盐,后冻干,得到醋酸地加瑞克产品。

[0045] 上述缩写代表的试剂如下:

[0046]

Fmoc	9-芴甲氧基羰基
Boc	叔丁基羰基
tBu	叔丁基
Ala	丙氨酸
Pro	脯氨酸
iLys	异丙基-赖氨酸

	Leu	亮氨酸
	Aph(Cbm)	4-[(氨基羰基)氨基]-苯丙氨酸
	Aph(Hor)	4-[[[(4S)-六氢-2,6-二氧代-4-嘧啶基]羰基]氨基]-苯丙氨酸
	Ser	丝氨酸
	3-pyridy	3-吡啶
	Phe	苯丙氨酸
	Nal	2-萘基丙甘酸
	HOBT	1-羟基苯并三氮唑
	HOAT	1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑
	Oxymapure	2-2-脲氰乙酸乙酯
[0047]	HATU	2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯
	HBTU	2-(7-偶氮苯并三氮唑)-四甲基脲六氟磷酸酯
	TBTU	O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸酯
	PyBOP	六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧化三吡咯烷基
	DIC	二异丙基碳二亚胺
	DIPEA	N-乙基二异丙胺
	TFA	三氟乙酸
	MYTsA	$\begin{array}{c} \text{Ts} \\ \diagdown \\ \text{N} \equiv \text{H} \\ \diagup \\ \text{Me} \end{array}$
	MYMsA	$\begin{array}{c} \text{Me} \\ \diagdown \\ \text{N} \equiv \text{H} \\ \diagup \\ \text{Me} \end{array}$

[0048] 以下结合具体实施例对本申请作进一步详细描述,这些实施例不能理解为限制本申请所要求保护的范围。

[0049] 实施例1

[0050] 该实施例1中合成了醋酸地加瑞克,具体工艺如下:

[0051] 六肽树脂片段III的合成:

[0052] 反应柱中依次加入取代度为0.68mmol/g的Reink amide MBHA树脂100g,使用DMF溶胀30min后抽滤除去溶剂,然后在反应柱中加入20wt%哌啶的DMF溶液进行Fmoc脱保护,反应30min后滤除溶液,树脂使用DMF洗涤六遍。

[0053] 四口瓶中加入42.3g Fmoc-D-Ala-OH(136mmol), 19.3g Oxymapure(136mmol), 控温0~5℃加入17.2g DIC(136mmol)活化氨基酸5~10min。活化后的溶液转移至多肽反应釜中用氮气鼓泡反应, 控温20~25℃反应2h后使用茚三酮显色法进行反应跟踪, 树脂无色透明则反应完全, 树脂颗粒显色则未反应完全, 需要延长反应直至树脂无色透明。重复上述脱保护步骤及缩合步骤按照肽链顺序分别缩合连接Fmoc-Pro-OH, Fmoc-iLys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-D-Aph(Cbm)-OH, Fmoc-Aph(Hor)-OH, 得到六肽树脂片段III。

[0054] 四肽片段II的合成:

[0055] 反应柱中依次加入取代度为1.15mmol/g的CTC树脂85g, 使用DMF溶胀30min后抽滤除去溶剂, 四口瓶加入112.4g Fmoc-Ser(tBu)-OH(293.2mmol), DMF 850ml溶解氨基酸, 加入DIPEA 75.8g(586.4mmol)搅拌10min后体系转移至多肽反应柱中用氮气鼓泡反应2h后滤除反应液。DMF洗涤树脂6次, 然后反应柱依次加入DMF, 甲醇(85ml), DIPEA 75.8g(586.4mmol)。控温20~25℃反应2h以对剩余的活性位点进行封端, 反应完后DMF洗涤树脂6遍, 甲醇二氯甲烷交替洗涤收缩树脂。得到Fmoc-Ser(tBu)-CTC resin树脂120g, 取代度0.80mmol/g。

[0056] 称取120g取代度为0.80mmol/g的Fmoc-Ser(tBu)-CTC resin树脂(96mmol)加入固相反应器中, 用DMF溶胀30min后抽滤除去DMF, 然后反应柱中加入20wt%哌啶的DMF溶液进行Fmoc脱保护, 反应30min后滤除溶液, 树脂使用DMF洗涤六遍。

[0057] 称取Fmoc-3-(3-pyridyl)-D-Ala-OH(74.6g, 192.1mmol), Oxymapure(27.3g, 192.1mmol)加入DMF溶解, 控温0~5℃加入DIC(24.2g, 191.6mmol), 加毕搅拌5~10min后转移至反应釜进行反应。反应2h后使用茚三酮显色法进行反应跟踪, 直至树脂无色透明则反应完全。重复上述脱保护步骤及缩合步骤按照肽链顺序分别缩合连接Fmoc-D-Phe(4-Cl)-OH和Fmoc-D-2NaI-OH。

[0058] 连接完肽链后, 继续加入20wt%哌啶的DMF溶液进行Fmoc脱保护, 反应30min后滤除溶液, 树脂使用DMF洗涤六遍。其次, 加入乙酸酐/DIPEA=3:6(eq)反应1h进行封端反应。反应完, 用甲醇/二氯甲烷收缩树脂并干燥, 得到四肽树脂片段I。

[0059] 使用0.5wt%TFA/DCM溶液对四肽树脂片段I进行切割反应2h, 滤液浓缩后使用甲基叔丁基醚逼晶, 过滤, 得到四肽片段II, 共计66.6g, 收率95%。

[0060] 全肽树脂的合成:

[0061] 向反应柱的六肽树脂片段III中加入20wt%哌啶的DMF溶液进行Fmoc脱保护, 反应30min后滤除溶液, 树脂使用DMF洗涤六遍。

[0062] 称取四肽片段II(59.6g, 1.2eq), 加入DMF溶解, 控温20~25℃加入MYMsA(10.85g, 1.2eq)活化四肽片段II形成活性中间体, 加毕搅拌2~3h后转移至反应柱进行反应。反应2h后使用茚三酮显色法进行反应跟踪, 树脂有颜色则继续反应。无色透明则反应完全。反应完后抽去溶剂, 树脂使用DMF洗涤6遍。

[0063] 树脂使用甲醇与二氯甲烷交替洗涤收缩, 收缩完毕氮气吹扫烘料至恒重后收料, 得到全肽树脂。

[0064] 地加瑞克粗产物的制备:

[0065] 连接完毕的全肽树脂使用95vol%TFA/5vol%H₂O比例切割液反应3~5h, 滤液浓缩后使用甲基叔丁基醚逼晶, 过滤, 得到终产品104.3g, 粗肽收率94%, 纯度95%。

[0066] 纯化、转盐:

[0067] 采用反向液相色谱法纯化:用AQ的填料,A相:0.05wt%TFA的水溶液;B相:0.05wt%TFA的乙腈溶液制备纯化,转盐使用1wt%AcOH的水溶液与乙腈作为流动相梯度洗脱后冻干,得到最终产品醋酸地加瑞克。HPLC测纯度,见图1,纯度为99.94%,最大单杂含量为0.06%, $<0.1\%$ 。质谱测量结果见图2,目标产物分子量 $M=1632.3$,下图中 $1633.8=M+1$, $816.9=(M/2)+1$, $545.4=(M/3)+1$,换算为醋酸地加瑞克的总收率为80.8%。

[0068] 实施例2

[0069] 与实施例1的区别为:各缩合反应步骤中,保护氨基酸、相应的缩合体系及Fmoc氨基树脂的物质质量之比为3:1.5:1,且缩合体系中各成分比例不变。产品的收率为86%,纯度为82%。

[0070] 实施例3

[0071] 与实施例1的区别为:各缩合反应步骤中,保护氨基酸、相应的缩合体系及Fmoc氨基树脂的物质质量之比为1.5:3:1,且缩合体系中各成分比例不变。产品的收率为87%,纯度为83%。

[0072] 实施例4

[0073] 与实施例1的区别为:各缩合反应步骤中,保护氨基酸、相应的缩合体系及Fmoc氨基树脂的物质质量之比为1.2:1.2:1,且缩合体系中各成分比例不变。产品的收率为85%,纯度为79%。

[0074] 实施例5

[0075] 与实施例1的区别为:六肽树脂片段III和四肽树脂片段II合成过程各缩合反应步骤中,相应的缩合体系为DIC/HOBT,其他成份比例不变,粗肽收率为93%,纯度为94%。

[0076] 实施例6

[0077] 与实施例1的区别为:六肽树脂片段III和四肽树脂片段II合成过程各缩合反应步骤中,相应的缩合体系为HBTU/DIPEA,其他成份比例不变,粗肽收率为92%,纯度为95%。

[0078] 实施例7

[0079] 与实施例1的区别为:六肽树脂片段III和四肽树脂片段II合成过程各缩合反应步骤中,相应的缩合体系为PyBoP/DIPEA,其他成份比例不变,粗肽收率为95%,纯度为93%。

[0080] 对比例1

[0081] 与实施例1的区别为:全肽树脂缩合体系为HATU/DIPEA,粗肽收率为75%,纯度为81%。

[0082] 对比例2

[0083] 与实施例1的区别为:全肽树脂缩合体系为PyBOP/DIPEA。粗肽收率为77%,纯度为79%。

[0084] 对比例3

[0085] 与实施例1的区别为:全肽树脂缩合体系为DIC/HOBT。粗肽收率为86%,纯度为82%。

[0086] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修

改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

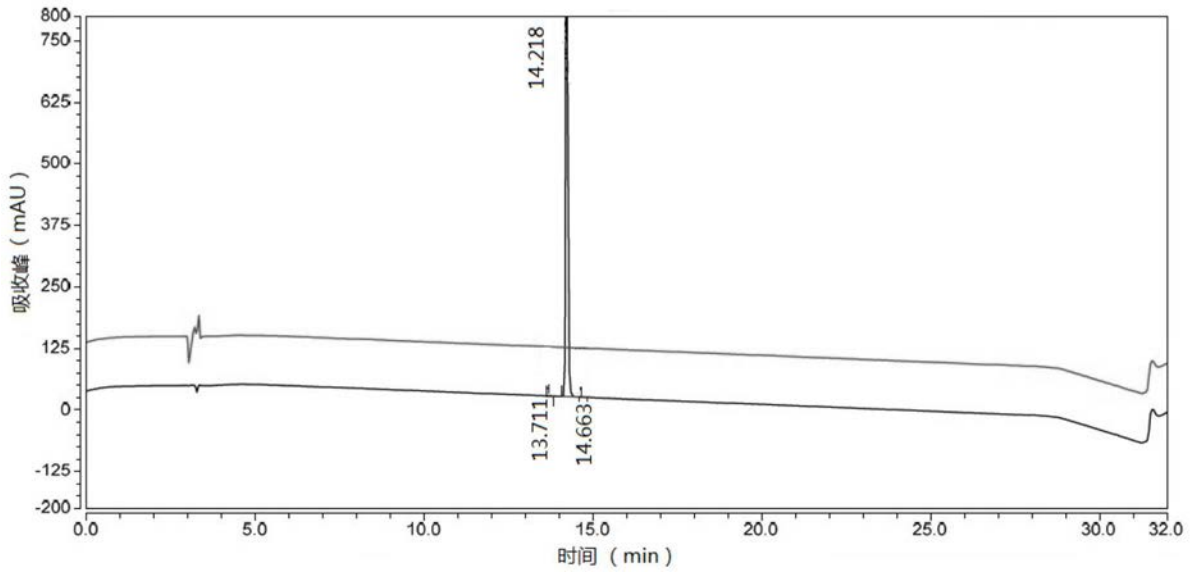


图1

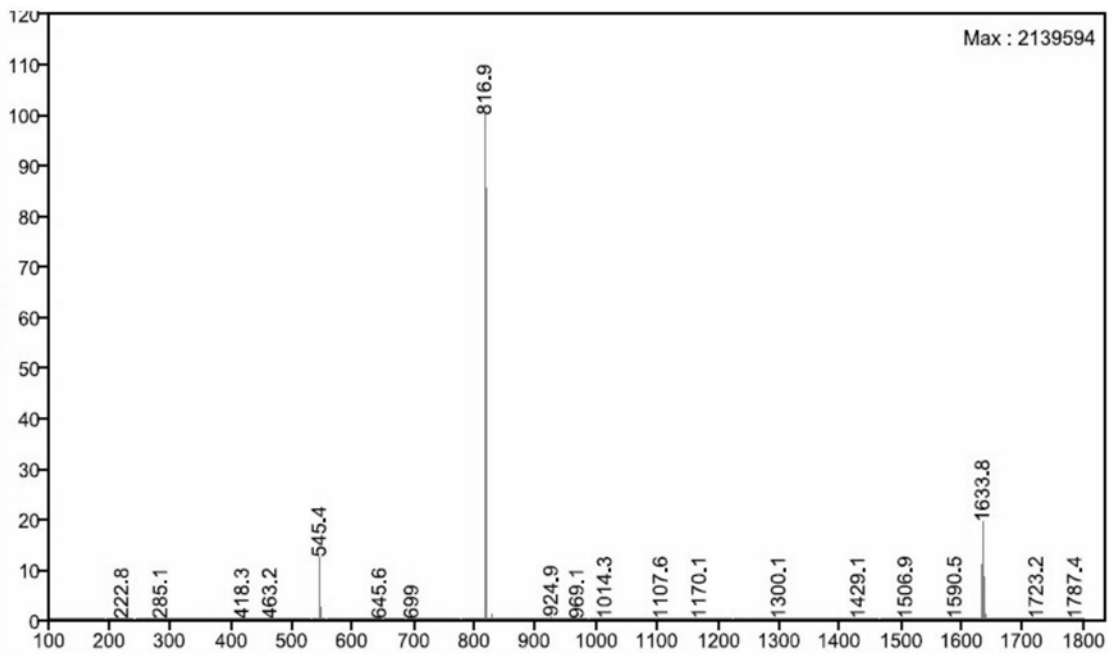


图2