

(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
2014 年 5 月 8 日 (08.05.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/067084 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/575 (2006.01) *C07K 1/04* (2006.01)
C07K 1/06 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2012/083795
- (22) 国际申请日: 2012 年 10 月 31 日 (31.10.2012)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 深圳翰宇药业股份有限公司 (HYBIO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园中区翰宇生物医药园办公大楼四层, Guangdong 518057 (CN)。
- (72) 发明人: 宓鹏程 (MI, Pengcheng); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园中区翰宇生物医药园办公大楼四层, Guangdong 518057 (CN)。 刘建 (LIU, Jian); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园中区翰宇生物医药园办公大楼四层, Guangdong 518057 (CN)。 马亚平 (MA, Yaping); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园中区翰宇生物医药园办公大楼四层, Guangdong 518057 (CN)。 袁建成 (YUAN, Jiancheng); 中国广东省深圳市南山区高新技术产业园中区翰宇生物医药园办公大楼四层, Guangdong 518057 (CN)。
- (74) 代理人: 深圳市深佳知识产权代理事务所 (普通合伙) (SHENPAT INTELLECTUAL PROPERTY

AGENCY); 中国广东省深圳市国贸大厦 15 楼西座 1521 室, Guangdong 518014 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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, 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, 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))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: METHOD FOR PREPARING EXENATIDE

(54) 发明名称: 一种艾塞那肽的制备方法

(57) Abstract: Disclosed in the present invention is a method for preparing Exenatide. Serine resin is obtained through a first coupling of serine and resin and successively with amino acids through a second coupling to obtain a peptide resin with a sequence as shown by SEQ ID No. 1; Exenatide resin is obtained through a third coupling of histidine containing a protecting group or salts thereof and the peptide resin with a sequence as shown by SEQ ID No. 1, then it is cracked and purified to obtain purified Exenatide peptide. The method for preparing Exenatide of the present invention inhibits the formation of D-His-Exenatide, and thereby improves the yield and purity of Exenatide.

(57) 摘要: 本发明公开了一种艾塞那肽的制备方法。丝氨酸与树脂经第一偶联获得丝氨酸-树脂; 依次与氨基酸经第二偶联获得序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂; 取含有保护基团的组氨酸或其盐与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂经第三偶联, 获得艾塞那肽树脂, 裂解、纯化后即得艾塞那肽精肽。本发明的艾塞那肽的制备方法, 抑制 D-His-艾塞那肽的形成, 从而提高艾塞那肽的产率和纯度。



WO 2014/067084 A1

一种艾塞那肽的制备方法

技术领域

本发明涉及多肽合成领域，特别涉及一种艾塞那肽的制备方法。

5

背景技术

糖尿病，(diabetes)是由遗传因素、免疫功能紊乱、微生物感染及其毒素、自由基毒素、精神因素等等各种致病因子作用于机体导致胰岛功能减退、胰岛素抵抗等而引发的糖、蛋白质、脂肪、水和电解质等一系列代谢紊乱综合征，临床上以高血糖为主要特点，典型病例可出现多尿、多饮、多食、消瘦等表现，即“三多一少”症状，糖尿病(血糖)一旦控制不好会引发并发症，导致肾、眼、足等部位的衰竭病变，且无法治愈。

10

15

20

25

糖尿病分 1 型糖尿病、2 型糖尿病、妊娠糖尿病及其他特殊类型的糖尿病，在糖尿病患者中，2 型糖尿病所占的比例约为 95%。1 型糖尿病 (Type I diabetes)是一种自体免疫疾病(Autoimmune Disease)，由身体的免疫系统对自身作出攻击而成。糖尿病患者的免疫系统对自身分泌胰岛素的胰脏β细胞 (pancreatic beta cells)作出攻击并杀死他们，结果胰脏并不能分泌足够的胰岛素。1 型糖尿病多发生于青少年，因胰岛素分泌缺乏，依赖外源性胰岛素补充以维持生命。2 型糖尿病有更强的遗传性和环境因素，并呈显著的异质性。目前认为发病原因是胰岛素抵抗（主要表现为高胰岛素血症，葡萄糖利用率降低）和胰岛素分泌不足的合并存在，其表现是不均一的，有的以胰岛素抵抗为主伴有胰岛素分泌不足，有的则是以胰岛素分泌不足伴有或不伴有胰岛素抵抗。

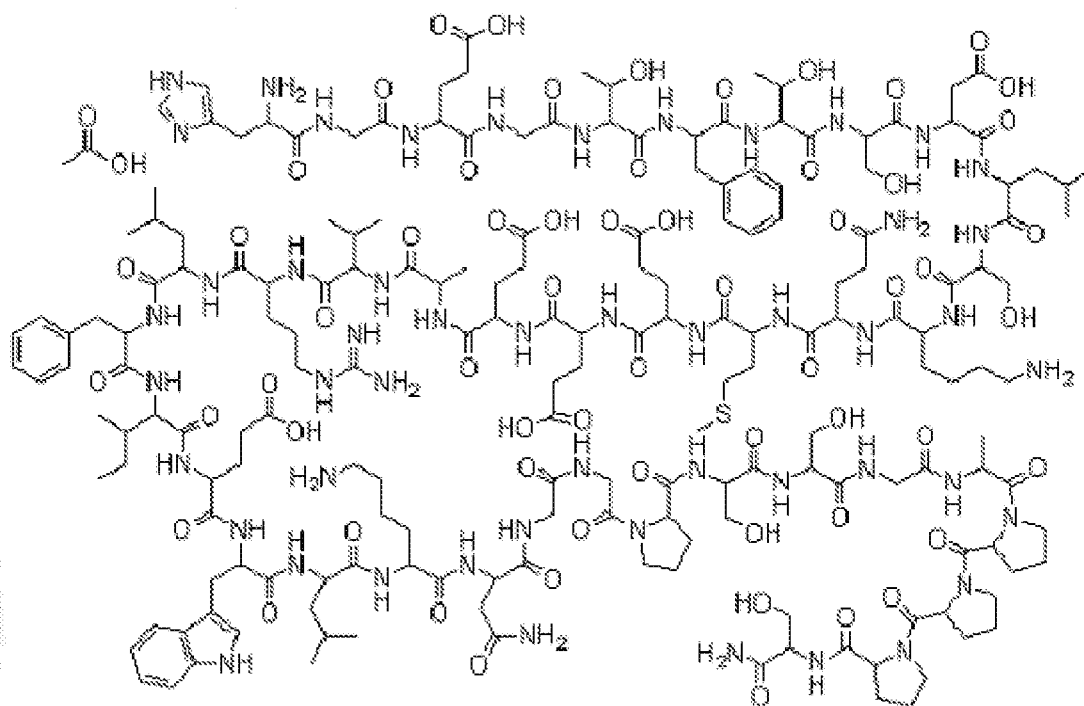
艾塞那肽 (Exenatide)，结构如式 I 所示，氨基酸序列如 SEQ ID No.2 所示，是由美国礼来公司与 Amylin 公司共同研发的第一个肠降血糖素类似物，是人工合成的由 39 个氨基酸组成的多肽，与内源性肠降血糖素如胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 作用相似，具有促进葡萄糖依

-2-

赖的胰岛素分泌,恢复第一时相胰岛素分泌,抑制胰高血糖素的分泌,减慢胃内容物的排空,改善胰腺 β 细胞的功能等作用。2004 年 FDA 批准其上市,该药为皮下注射制剂,商品名为百泌达,每天给药两次。

2012 年 1 月 27 日,美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准了艾塞那肽注射液每周一次的缓释剂型的上市申请,2 型糖尿病成人在饮食和锻炼基础上,可使用此制剂改善血糖控制。这是 2 型糖尿病中首个每周一次治疗药物。

专利 US6924264、US7157555、US6902744、CN101357938A 中均采用了纯固相顺序偶联的方法进行肽的合成。以氨基树脂为载体,顺序偶联,最终切割得到艾塞那肽。但是由于 N 末端的氨基酸为 His,采用 Fmoc 固相常规的偶联原料 Fmoc-His (Trt) -OH 及偶联方法会造成 His 的消旋杂质,并且杂质通过纯化方法难以去除。



式 I

发明内容

有鉴于此，本发明提供了一种艾塞那肽的制备方法。该方法通过选用含有保护基团的组氨酸或其盐及片段合成法，在抑制 D-His-艾塞那肽形成的基础上，提高艾塞那肽的产率和纯度。

5 为了实现上述发明目的，本发明提供以下技术方案：

本发明提供了一种艾塞那肽的制备方法，包括如下步骤：

步骤 1：取丝氨酸与树脂经第一偶联获得丝氨酸-树脂；

步骤 2：取所述丝氨酸-树脂依次与氨基酸经第二偶联获得序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂；

10 步骤 3：取含有保护基团的组氨酸或其盐与所述序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂经第三偶联，获得艾塞那肽树脂，裂解、纯化后即得。

作为优选，步骤 3 中含有保护基团的组氨酸或其盐的结构如式 II 所示

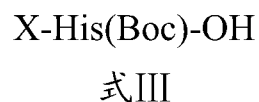


其中，X 选自 Fmoc、Boc 或 Trt；

Y 选自 Trt、Bum、Boc、mtt 或 mmt。

作为优选，步骤 3 中含有保护基团的组氨酸或其盐的结构如式 III 所

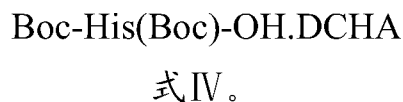
20 示



其中，X 选自 Fmoc、Boc 或 Trt。

作为优选，步骤 3 中含有保护基团的组氨酸或其盐的结构如式 IV 所

25 示



作为优选，第三偶联为预活化偶联或原位偶联。

作为优选，步骤 3 具体为在溶剂中，含有保护基团的组氨酸或其盐与

-4-

序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂在偶联剂、有机碱的存在下经第三偶联, 获得艾塞那肽树脂, 经裂解剂裂解、纯化后即得。

作为优选, 偶联剂为 HATU 和 HOAt。

作为优选, 有机碱为 DIPEA 或 TMP。

5 作为优选, 溶剂为 NMP、DMF、DCM 中的一种或两者以上的混合物。

作为优选, 裂解剂为 TFA、PhSMe、EDT、TIS、水、Phenol 的混合物。

10 作为优选, 裂解剂中 TFA、PhSMe、EDT、TIS、水、Phenol 的体积比为 80~85:2~5: 2~5: 2~5: 0~3: 0~2。

作为优选, 第三偶联的反应温度为 0~30℃。

作为优选, 步骤 2 中具体为在溶剂中, 丝氨酸-树脂与氨基酸在偶联剂、有机碱的存在下, 依次经第二偶联, 获得序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂。

15 作为优选, 偶联剂为 HATU 或 HOAt。

作为优选, 有机碱为 DIPEA 或 TMP。

作为优选, 溶剂为 NMP、DMF、DCM 中的一种或两者以上的混合物。

20 作为优选, 步骤 2 具体为取丝氨酸-树脂依次与 Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Trp(Boc)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Arg(pBf)-OH、Fmoc-Val-OH、Fmoc-Ala-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、
25 Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Met-OH、Fmoc-Gln(Trt)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Glu(OtBu)-OH、Fmoc-Gly-OH 经第二偶联获得序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂。

-5-

作为优选，第二偶联的反应温度为 0~30℃。

作为优选，第一偶联的偶联剂为 HOBt。

作为优选，第一偶联的反应温度为 0~30℃。

作为优选，步骤 1 中树脂为 Rink Amide-MBHA Resin。

- 5 本发明提供了一种艾塞那肽的制备方法。该方法通过选用含有保护基团的组氨酸或其盐，结合原位合成法或预活化法合成艾塞那肽。具体为取丝氨酸与树脂经第一偶联获得丝氨酸-树脂；依次与氨基酸经第二偶联获得序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂；取含有保护基团的组氨酸或其盐与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂经第三偶联，获得艾塞那肽树脂，裂解、
10 纯化后即得艾塞那肽精肽。本发明提供的艾塞那肽的制备方法，在抑制 D-His-艾塞那肽形成的基础上，提高艾塞那肽的产率和纯度。

附图说明

- 图 1 示实施例 34 中对照组制得的精肽 HPLC 谱图；
15 图 2 示实施例 34 中试验组制得的精肽 HPLC 谱图。

具体实施方式

- 本发明公开了一种艾塞那肽的制备方法，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和
20 改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

缩写及英文

含义

DCHA

二环己胺

CHA

环己胺

Bum

叔丁氧甲基

mmt

4-甲氧基三苯甲基

mtt

甲基三苯甲基

-6-

Trt	三苯甲基
HOAt	1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑
Fmoc	9-芴甲氧羰基
DIPCDI	二异丙基碳二亚胺
HOBt	1-羟基苯并三唑
HATU	2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基 脲六氟磷酸酯
HBTU	苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷 酸盐
DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
DCM	二氯甲烷
NMP	N-甲基吡咯烷酮
TMP	2,4,6-三甲基吡啶
TFA	三氟乙酸
PhSMe	苯甲硫醚
TIS	三异丙基硅烷
EDT	乙二硫醇
Phenol	苯酚
SCX-HPLC	强阳离子交换色谱法

实施例 1: 替代度为 0.1mmol/g 的 Fmoc-Ser(tBu)-Rink Amide-MBHA 树脂的合成

5 称取 Rink Amide-MBHA 树脂 100 g, 加入到固相反应柱中, 用 DMF 洗涤 2 次, 用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后, 用 DBLK 脱除 Fmoc 保护, 然后用 DMF 洗涤 6 次。用茚三酮法检测树脂颜色, 树脂有颜色, 表示 Fmoc 已脱除。称取 4.60g Fmoc-Ser(tBu)-OH (12mmol)、1.95g HOBt (14.4mmol) 溶于体积比为 1:1 的 DCM 和 DMF 混合溶液, 冰水浴下加入 2.25 ml DIC (14.4 mmol) 活化 3min 后加入固相反应柱中, 室温

-7-

反应 2 小时。用 DMF 洗涤 3 次，加入封闭液（吡啶/乙酸酐=1:1）封闭 2 小时。用 DMF 洗涤 4 次，DCM 洗 4 次，甲醇收缩抽干，得到 Fmoc-Ser(tBu)-Rink Amide-MBHA 树脂。检测替代度为 0.098mmol/g。

5 实施例 2：替代度为 0.2mmol/g 的 Fmoc-Ser(tBu)-Rink Amide-MBHA 树脂的合成

称取 Rink Amide-MBHA 树脂 100 g，加入到固相反应柱中，用 DMF 洗涤 2 次，用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后，用 DBLK 脱除 Fmoc 保护，然后用 DMF 洗涤 6 次。用茚三酮法检测树脂颜色，树脂有颜色，表示 Fmoc 已脱除。称取 9.20g Fmoc-Ser(tBu)-OH (24mmol)、3.89g HOBT (28.8mmol) 溶于体积比为 1:1 的 DCM 和 DMF 混合溶液，冰水浴下加入 4.50 ml DIC (28.8 mmol) 活化 3min 后加入固相反应柱中，室温反应 2 小时。用 DMF 洗涤 3 次，加入封闭液（吡啶/乙酸酐=1:1）封闭 2 小时。用 DMF 洗涤 4 次，DCM 洗 4 次，甲醇收缩抽干，得到 Fmoc-Ser(tBu)-Rink Amide-MBHA 树脂。检测替代度为 0.192mmol/g。

实施例 3：替代度为 0.3mmol/g 的 Fmoc-Ser(tBu)-Rink Amide-MBHA 树脂的合成

称取 Rink Amide-MBHA 树脂 100 g，加入到固相反应柱中，用 DMF 洗涤 2 次，用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后，用 DBLK 脱除 Fmoc 保护，然后用 DMF 洗涤 6 次。用茚三酮法检测树脂颜色，树脂有颜色，表示 Fmoc 已脱除。称取 13.8g Fmoc-Ser(tBu)-OH (36mmol)、5.84g HOBT (43.2mmol) 溶于体积比为 1:1 的 DCM 和 DMF 混合溶液，冰水浴下加入 6.75 ml DIC (43.2 mmol) 活化 3min 后加入固相反应柱中，室温反应 2 小时。用 DMF 洗涤 3 次，加入封闭液（吡啶/乙酸酐=1:1）封闭 2 小时。用 DMF 洗涤 4 次，DCM 洗 4 次，甲醇收缩抽干，得到 Fmoc-Ser(tBu)-Rink Amide-MBHA 树脂。检测替代度为 0.302mmol/g。

实施例 4: 序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂的合成

称取替代度为 0.192mmol/g 的 Fmoc-Ser(tBu)-Rink Amide-MBHA 树脂 78.1g, 加入到固相反应柱中, 用 DMF 洗涤 2 次, 用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后, 用 DBLK 脱除 Fmoc 保护, 然后用 DMF 洗涤 6 次, 用茚三酮法
5 检测树脂颜色, 树脂有颜色, 表示 Fmoc 已脱除。取 20.24 g Fmoc-Pro-OH (60 mmol), 9.73 g HOBt (72 mmol), 溶于体积比为 1:1 的 DCM 和 DMF 混合溶液, 冰水浴下加入 11.26 ml DIC (72 mmol) 活化 3min 后加入固相反应柱中, 室温反应 2 小时。以茚三酮法检测判断反应终点, 如果树脂无色透明, 则表示反应完全; 树脂显色, 则表示反应不完全, 需再偶联反应
10 1 小时, 此判断标准适用于后续内容中以茚三酮法检测判断反应终点。重复上述脱除 Fmoc 保护和加入相应氨基酸偶联的步骤, 按照艾塞那肽主链肽序, 从 C 端到 N 端依次完成 2-39 片段的偶联, 反应结束后用甲醇收缩, 树脂真空干燥过夜, 称重得到艾塞那肽 (2-39) -Rink Amide-MBHA 树脂 160.3g。

15

实施例 5: 序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂的合成

称取替代度为 0.098mmol/g 的 Fmoc-Ser(tBu)-Rink Amide-MBHA 树脂 153.1 g, 加入到固相反应柱中, 用 DMF 洗涤 2 次, 用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后, 用 DBLK 脱除 Fmoc 保护, 然后用 DMF 洗涤 6 次, 用茚三酮法
20 检测树脂颜色, 树脂有颜色, 表示 Fmoc 已脱除。取 20.24 g Fmoc-Pro-OH (60 mmol), 9.73 g HOBt (72 mmol), 溶于体积比为 1:1 的 DCM 和 DMF 混合溶液, 冰水浴下加入 11.26 ml DIC (72 mmol) 活化 3min 后加入固相反应柱中, 室温反应 2 小时。以茚三酮法检测判断反应终点, 如果树脂无色透明, 则表示反应完全; 树脂显色, 则表示反应不完全, 需再偶联反应
25 1 小时, 此判断标准适用于后续内容中以茚三酮法检测判断反应终点。重复上述脱除 Fmoc 保护和加入相应氨基酸偶联的步骤, 按照艾塞那肽主链肽序, 从 C 端到 N 端依次完成 2-39 片段的偶联, 反应结束后用甲醇收缩, 树脂真空干燥过夜, 称重得到艾塞那肽 (2-39) -Rink Amide-MBHA 树脂 233.9。

实施例 6: 序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂的合成

称取替代度为 0.302mmol/g 的 Fmoc-Ser(tBu)-Rink Amide-MBHA 树脂 49.7g, 加入到固相反应柱中, 用 DMF 洗涤 2 次, 用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后, 用 DBLK 脱除 Fmoc 保护, 然后用 DMF 洗涤 6 次, 用茚三酮法
5 检测树脂颜色, 树脂有颜色, 表示 Fmoc 已脱除。取 20.24 g Fmoc-Pro-OH (60 mmol), 9.73 g HOBt (72 mmol), 溶于体积比为 1:1 的 DCM 和 DMF 混合溶液, 冰水浴下加入 11.26 ml DIC (72 mmol) 活化 3min 后加入固相反应柱中, 室温反应 2 小时。以茚三酮法检测判断反应终点, 如果树脂无色透明, 则表示反应完全; 树脂显色, 则表示反应不完全, 需再偶联反应
10 1 小时, 此判断标准适用于后续内容中以茚三酮法检测判断反应终点。重复上述脱除 Fmoc 保护和加入相应氨基酸偶联的步骤, 按照艾塞那肽主链肽序, 从 C 端到 N 端依次完成 2-39 片段的偶联, 反应结束后用甲醇收缩, 树脂真空干燥过夜, 称重得到艾塞那肽 (2-39) -Rink Amide-MBHA 树脂 131.3g。

15

实施例 7: Boc-His(Boc)-OH.DCHA 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 4 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中, 用 DMF 洗涤 2 次, 用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 32.22g
20 Boc-His(Boc)-OH.DCHA (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中, 加 500ml NMP 溶液, 搅拌反应 5min 后, 滴加 15.86ml TMP (120mmol), 在 0℃ 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点, 如果树脂无色透明, 则表示反应完全; 树脂显色, 则表示反应不完全, 需再偶联反应 1 小时。

25

实施例 8: Boc-His(Boc)-OH.DCHA 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 5 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中, 用 DMF 洗涤 2 次, 用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 32.22g

-10-

Boc-His(Boc)-OH.DCHA (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中, 加 500ml NMP 溶液, 搅拌反应 5min 后, 滴加 20.86ml DIPEA (120mmol), 在 0℃ 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点, 如果树脂无色透明, 则表示反应完全; 树脂显色, 则表示反应不完全, 需再偶联反应 1 小时。

实施例 9: Boc-His(Boc)-OH.DCHA 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 6 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中, 用 DMF 洗涤 2 次, 用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 32.22g Boc-His(Boc)-OH.DCHA (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中, 加 500ml DCM 溶液, 搅拌反应 5min 后, 滴加 15.86ml TMP (120mmol), 在 0℃ 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点, 如果树脂无色透明, 则表示反应完全; 树脂显色, 则表示反应不完全, 需再偶联反应 1 小时。

实施例 10: Boc-His(Boc)-OH.DCHA 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 4 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中, 用 DMF 洗涤 2 次, 用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 32.22g Boc-His(Boc)-OH.DCHA (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中, 加 500ml DMF/DCM (1:1) 溶液, 搅拌反应 5min 后, 滴加 15.86ml TMP (120mmol), 在 0℃ 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点, 如果树脂无色透明, 则表示反应完全; 树脂显色, 则表示反应不完全, 需再偶联反应 1 小时。

实施例 11: Boc-His(Boc)-OH.DCHA 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 6 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入

-11-

到固相反应柱中,用 DMF 洗涤 2 次,用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 32.22g Boc-His(Boc)-OH.DCHA (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中,加 500ml NMP 溶液,搅拌反应 5min 后,滴加 15.86ml TMP (120mmol), 在 25℃ 环境下反应 2h。以茚三酮法检测判断
5 反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需再偶联反应 1 小时。

实施例 12: Boc-His(Boc)-OH.DCHA 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

10 称取实施例 5 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中,用 DMF 洗涤 2 次,用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 32.22g Boc-His(Boc)-OH.DCHA (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中,加 500ml DCM 溶液,搅拌反应 5min 后,滴加 15.86ml TMP (120mmol), 在 25℃ 环境下反应 2h。以茚三酮法检测判断
15 反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需再偶联反应 1 小时。

实施例 13: Boc-His(Boc)-OH.DCHA 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

20 称取实施例 6 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中,用 DMF 洗涤 2 次,用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 32.22g Boc-His(Boc)-OH.DCHA (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中,加 500ml DMF/DCM (1:1) 溶液,搅拌反应 5min 后,滴加 15.86ml TMP (120mmol), 在 25℃ 环境下反应 2h。以茚三酮法
25 检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需再偶联反应 1 小时。

-12-

实施例 14: Boc-His(Boc)-OH.DCHA 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 5 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中,用 DMF 洗涤 2 次,用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 32.22g Boc-His(Boc)-OH.DCHA (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中,加 500ml NMP/DCM (1:1) 溶液,搅拌反应 5min 后,滴加 15.86ml TMP (120mmol), 在 25℃ 环境下反应 2h。以茚三酮法检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需再偶联反应 1 小时。

10

实施例 15: Boc-His(Boc)-OH.DCHA 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 4 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中,用 DMF 洗涤 2 次,用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 32.22g Boc-His(Boc)-OH.DCHA (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中,加 500ml NMP 溶液,搅拌反应 5min 后,滴加 15.86ml TMP (120mmol), 在 30℃ 环境下反应 2h。以茚三酮法检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需再偶联反应 1 小时,此判断标准适用于后续内容中以茚三酮法检测判断反应终点。

20

实施例 16: Boc-His(Boc)-OH.DCHA 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 5 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中,用 DMF 洗涤 2 次,用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 32.22g Boc-His(Boc)-OH.DCHA (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中,加 500ml DCM 溶液,搅拌反应 5min 后,滴加 15.86ml TMP (120mmol), 在 30℃ 环境下反应 2h。以茚三酮法检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应

25

不完全，需再偶联反应 1 小时。

实施例 17: Boc-His(Boc)-OH.DCHA 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

5 称取实施例 4 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中，用 DMF 洗涤 2 次，用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 32.22g Boc-His(Boc)-OH.DCHA (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中，加 500ml DMF 溶液，搅拌反应 5min 后，滴加 15.86ml TMP (120mmol)，在 30℃ 环境下反应 2h。以茚三酮法检测判断
10 反应终点，如果树脂无色透明，则表示反应完全；树脂显色，则表示反应不完全，需再偶联反应 1 小时。

实施例 18: Boc-His(Boc)-OH.DCHA 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

15 称取实施例 6 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中，用 DMF 洗涤 2 次，用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 32.22g Boc-His(Boc)-OH.DCHA (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中，加 500ml DMF/DMF(1:1)溶液，搅拌反应 5min 后，滴加 15.86ml TMP (120mmol)，在 30℃ 环境下反应 2h。以茚三酮法
20 检测判断反应终点，如果树脂无色透明，则表示反应完全；树脂显色，则表示反应不完全，需再偶联反应 1 小时。

实施例 19: Boc-His(Boc)-OH.DCHA 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂预活化法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

25 称取实施例 6 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中，用 DMF 洗涤 2 次，用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 32.22g Boc-His(Boc)-OH.DCHA (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中，用 500ml DMF 溶解，冰水浴下加入 15.86 ml TMP (120mmol) 活化 5 分钟，将混合液加入到反应柱中，室温反应 2 小时，

-14-

以茚三酮检测反应终点.如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需再偶联反应 1 小时。

实施例 20: Fmoc-His(Boc)-OH. DCHA 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 4 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中,用 DMF 洗涤 2 次,用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 34.56g Fmoc-His(Boc)-OH. CHA (60mmol), 22.81g HATU (60mmol), 9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中,加 500ml NMP 溶液,搅拌反应 5min 后,滴加 15.86ml TMP (120mmol), 在 0℃ 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需再偶联反应 1 小时。用 DBLK 脱除 Fmoc 保护,然后用 DMF 洗涤 6 次。用茚三酮法检测树脂颜色,树脂有颜色,表示 Fmoc 已脱除。

实施例 21: Fmoc-His(Bum)-OH 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 5 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中,用 DMF 洗涤 2 次,用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 27.81g Fmoc-His(Bum)-OH (60mmol), 22.81g HATU (60mmol), 9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中,加 500ml NMP 溶液,搅拌反应 5min 后,滴加 15.86ml TMP (120mmol), 在 0℃ 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需再偶联反应 1 小时。用 DBLK 脱除 Fmoc 保护,然后用 DMF 洗涤 6 次。用茚三酮法检测树脂颜色,树脂有颜色,表示 Fmoc 已脱除。

25

实施例 22: Fmoc-His(mmt)-OH 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 5 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中,用 DMF 洗涤 2 次,用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 38.98g

-15-

Fmoc-His(mmt)-OH (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中，加 500ml NMP 溶液，搅拌反应 5min 后，滴加 15.86ml TMP (120mmol)，在 0℃ 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点，如果树脂无色透明，则表示反应完全；树脂显色，则表示反应不完全，需再偶联反应 1 小时。用 DBLK 脱除 Fmoc 保护，然后用 DMF 洗涤 6 次。用茚三酮法检测树脂颜色，树脂有颜色，表示 Fmoc 已脱除。

实施例 23: Fmoc-His(mtt)-OH 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

10 称取实施例 4 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中，用 DMF 洗涤 2 次，用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 38.02g Fmoc-His(mtt)-OH (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中，加 500ml NMP 溶液，搅拌反应 5min 后，滴加 15.86ml TMP (120mmol)，在 0℃ 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点，如果树脂无色透明，则表示反应完全；树脂显色，则表示反应不完全，需再偶联反应 1 小时。用 DBLK 脱除 Fmoc 保护，然后用 DMF 洗涤 6 次。用茚三酮法检测树脂颜色，树脂有颜色，表示 Fmoc 已脱除。

实施例 24: Boc-His(Trt)-OH 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

20 称取实施例 6 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中，用 DMF 洗涤 2 次，用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 29.86g Boc-His(Trt)-OH (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中，加 500ml NMP 溶液，搅拌反应 5min 后，滴加 15.86ml TMP (120mmol)，在 0℃ 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点，如果树脂无色透明，则表示反应完全；树脂显色，则表示反应不完全，需再偶联反应 1 小时。

实施例 25: Boc-His(Bum)-OH 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 4 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中,用 DMF 洗涤 2 次,用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 20.49g Boc-His(Bum)-OH (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中,加 500ml NMP 溶液,搅拌反应 5min 后,滴加 15.86ml TMP (120mmol),在 0℃ 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需再偶联反应 1 小时。

10

实施例 26: Boc-His(mmt)-OH 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 5 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中,用 DMF 洗涤 2 次,用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 31.66g Boc-His(mmt)-OH (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中,加 500ml NMP 溶液,搅拌反应 5min 后,滴加 15.86ml TMP (120mmol),在 0℃ 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需再偶联反应 1 小时。

20

实施例 27: Boc-His(mtt)-OH 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 6 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中,用 DMF 洗涤 2 次,用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 30.70g Boc-His(mtt)-OH (60mmol)、22.81g HATU (60mmol)、9.80g HOAt (72mmol) 加入树脂中,加 500ml NMP 溶液,搅拌反应 5min 后,滴加 15.86ml TMP (120mmol),在 0℃ 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点,如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需再偶联反应 1 小时。

25

实施例 28: Trt-His(Trt)-OH 与序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂原位法合成序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂

称取实施例 5 制备的序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 15mmol 加入到固相反应柱中,用 DMF 洗涤 2 次,用 DMF 溶胀树脂 30 分钟。取 38.39g Trt-His(Trt)-OH(60mmol)、22.81g HATU(60mmol)、9.80g HOAt(72mmol) 加入树脂中,加 500ml NMP 溶液,搅拌反应 5min 后,滴加 15.86ml TMP (120mmol), 在 0℃ 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点, 如果树脂无色透明,则表示反应完全;树脂显色,则表示反应不完全,需再偶联反应 1 小时。

10

实施例 29: 艾塞那肽肽树脂的裂解

取实施例 7~28 中的任意一项实施例制备获得的肽树脂 100g 置于裂解反应器中,以 10ml/g 树脂的比例加入裂解试剂 TFA: PhSMe: EDT: TIS: H₂O: Phenol=80:5:5:5:3:2 (V:V), 室温搅拌 2h。反应物用砂芯漏斗过滤,收集滤液,树脂再用少量 TFA 洗涤 3 次,合并滤液。加入冰冻的无水乙醚沉淀(无水乙醚用量为 100ml/g 树脂),将沉淀离心,用无水乙醚洗涤 3 次,真空干燥得到白色粉末固体,即艾塞那肽粗肽。

15

实施例 30: 艾塞那肽肽树脂的裂解

取实施例 7~28 中的任意一项实施例制备获得的肽树脂 100g 置于裂解反应器中,以 10ml/g 树脂的比例加入裂解试剂 TFA: PhSMe: EDT: TIS: H₂O: Phenol=85:4:4:4:2:1 (V:V), 室温搅拌 2h。反应物用砂芯漏斗过滤,收集滤液,树脂再用少量 TFA 洗涤 3 次,合并滤液。加入冰冻的无水乙醚沉淀(无水乙醚用量为 100ml/g 树脂),将沉淀离心,用无水乙醚洗涤 3 次,真空干燥得到白色粉末固体,即艾塞那肽粗肽。

20

25

实施例 31: 艾塞那肽肽树脂的裂解

取实施例 7~28 中的任意一项实施例制备获得的肽树脂 100g 置于裂解反应器中,以 10ml/g 树脂的比例加入裂解试剂 TFA: PhSMe: EDT:

TIS: H₂O: Phenol=81.5:5:5:5:2.5:1 (V:V), 室温搅拌 2h。反应物用砂芯漏斗过滤, 收集滤液, 树脂再用少量 TFA 洗涤 3 次, 合并滤液。加入冰冻的无水乙醚沉淀 (无水乙醚用量为 100ml/g 树脂), 将沉淀离心, 用无水乙醚洗涤 3 次, 真空干燥得到白色粉末固体, 即艾塞那肽粗肽。

5

实施例 32: 艾塞那肽精肽醋酸盐的制备

称取实施例 29~31 中任意一项实施例制备获得的艾塞那肽粗肽 20.0 g 用 2000 ml 水溶解后, 采用 Waters 2545 RP-HPLC 系统, 波长 230nm, 色谱柱为 50×250 mm 反相 C18 柱, 常规 0.2%TFA/乙腈流动相纯化, 收集目的峰馏分, 得到纯度大于 98.5%精肽。将精肽溶液采用 Waters 2545 RP-HPLC 系统, 色谱柱为 50×250 mm 反相 C18 柱, 0.2%醋酸溶液/乙腈流动相转盐, 收集目的峰馏分, 旋转蒸发浓缩, 冻干得到艾塞那肽醋酸盐精肽 4.2g, HPLC 纯度 98.5%。采用 SCX-HPLC 方法检测其中 D-His-艾塞那肽小于 0.5%。

15

实施例 33: 艾塞那肽精肽醋酸盐的规模化制备

称取 Rink Amide-MBHA 树脂 1000 g, 加入到固相反应柱中, 用 DMF 洗涤 2 次, 用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后, 用 DBLK 脱除 Fmoc 保护, 然后用 DMF 洗涤 6 次。用茚三酮法检测树脂颜色, 树脂有颜色, 表示 Fmoc 已脱除。称取 92.0g Fmoc-Ser(tBu)-OH(240mmol)、38.9g HOBt(288mmol) 溶于体积比为 1:1 的 DCM 和 DMF 混合溶液, 冰水浴下加入 45 ml DIC(288 mmol) 活化 3min 后加入固相反应柱中, 室温反应 2 小时。用 DMF 洗涤 3 次, 加入封闭液 (吡啶/乙酸酐=1:1) 封闭 2 小时。用 DMF 洗涤 4 次, DCM 洗 4 次, 甲醇收缩抽干, 得到 Fmoc-Ser(tBu)-Rink Amide-MBHA 树脂。检测替代度为 0.189mmol/g。

25

称取替代度为 0.189mmol/g 的 Fmoc-Ser(tBu)-Rink Amide-MBHA 树脂 1005.3 g (190mmol), 加入到固相反应柱中, 用 DMF 洗涤 2 次, 用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后, 用 DBLK 脱除 Fmoc 保护, 然后用 DMF 洗涤 6 次, 用茚三酮法检测树脂颜色, 树脂有颜色, 表示 Fmoc 已脱除。取 256.42 g

-19-

- Fmoc-Pro-OH (760 mmol), 123.21 g HOBt (912 mmol), 溶于体积比为 1:1 的 DCM 和 DMF 混合溶液, 冰水浴下加入 142.57 ml DIC (912 mmol) 活化 3min 后加入固相反应柱中, 室温反应 2 小时。以茚三酮法检测判断反应终点, 如果树脂无色透明, 则表示反应完全; 树脂显色, 则表示反应不完全, 需再偶联反应 1 小时, 此判断标准适用于后续内容中以茚三酮法检测判断反应终点。重复上述脱除 Fmoc 保护和加入相应氨基酸偶联的步骤, 按照艾塞那肽主链肽序, 从 C 端到 N 端依次完成 2-39 片段的偶联, 取 408.12g Boc-His(Boc)-OH.DCHA (760mmol)、 288.95g HATU (760mmol)、124.12g HOAt(912mmol)加入树脂中, 加 5000ml NMP/DCM (1:1) 溶液, 搅拌反应 5min 后, 滴加 200.9ml TMP (1520mmol), 在 0℃ 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点, 如果树脂无色透明, 则表示反应完全; 树脂显色, 则表示反应不完全, 需再偶联反应 1 小时。反应结束后用甲醇收缩, 树脂真空干燥过夜, 称重得到序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 2029.6g。
- 15 将序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 2029.6g 置于裂解反应器中, 以 10ml/g 树脂的比例加入裂解试剂 TFA: PhSMe: EDT: TIS: H₂O: Phenol=81.5:5:5:5:2.5:1 (V:V), 室温搅拌 2h。反应物用砂芯漏斗过滤, 收集滤液, 树脂再用少量 TFA 洗涤 3 次, 合并滤液。加入冰冻的无水乙醚沉淀 (无水乙醚用量为 100ml/g 树脂), 将沉淀离心, 用无水乙醚洗涤 3 次, 真空干燥得到白色粉末固体, 即艾塞那肽粗肽 836.97g, 重量收率为 105.2%, 粗肽纯度为 55.9%。
- 20 将艾塞那肽粗肽经过纯化转盐, 最终得到艾塞那肽精肽 173.68g, HPLC 纯度为 98.9%, 采用 SCX-HPLC 检测 D-His-艾塞那肽为 0.19%。

25 实施例 34

对照组:

称取替代度为 0.15mmol/g 的 Fmoc-Ser(tBu)-Rink Amide-MBHA 树脂 10g, 加入到固相反应柱中, 用 DMF 洗涤 2 次, 用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后, 用 DBLK 脱除 Fmoc 保护, 然后用 DMF 洗涤 6 次, 用茚三酮法检

-20-

测树脂颜色，树脂有颜色，表示 Fmoc 已脱除。取 2.02 g Fmoc-Pro-OH (6 mmol), 0.97 g HOBt (7.2 mmol), 溶于体积比为 1:1 的 DCM 和 DMF 混合溶液，冰水浴下加入 1.13 ml DIC (7.2 mmol) 活化 3min 后加入固相反应柱中，室温反应 2 小时。以茚三酮法检测判断反应终点，如果树脂无色透明，则表示反应完全；树脂显色，则表示反应不完全，需再偶联反应 1 小时，此判断标准适用于后续内容中以茚三酮法检测判断反应终点。重复上述脱除 Fmoc 保护和加入相应氨基酸偶联的步骤，按照艾塞那肽主链肽序，从 C 端到 N 端依次完成剩余氨基酸的偶联，其中 N 端第 1 位氨基酸采用 Fmoc-His(Trt)-OH，反应结束后用甲醇收缩，树脂真空干燥过夜，称重得到艾塞那肽树脂 19.3g。

将得到的肽树脂加入裂解试剂 TFA: PhSMe: EDT: TIS: H₂O: Phenol=85:4:4:4:2:1 (V:V) 193ml，室温搅拌 2h。反应物用砂芯漏斗过滤，收集滤液，树脂再用少量 TFA 洗涤 3 次，合并滤液。加入冰冻的无水乙醚沉淀（无水乙醚用量为 100ml/g 树脂），将沉淀离心，用无水乙醚洗涤 3 次，真空干燥得到白色粉末固体，即艾塞那肽粗肽。

得到的艾塞那肽粗肽采用 RP-HPLC 方法纯化，转盐，得到醋酸艾塞那肽 1.75 克，HPLC 纯度 94.3%。

SCX-HPLC 方法检测，液相色谱谱图如图 1 所示，RT21.523 为 D-His-艾塞那肽 2.73%。

试验组:

称取 Rink Amide-MBHA 树脂 1000 g，加入到固相反应柱中，用 DMF 洗涤 2 次，用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后，用 DBLK 脱除 Fmoc 保护，然后用 DMF 洗涤 6 次。用茚三酮法检测树脂颜色，树脂有颜色，表示 Fmoc 已脱除。称取 92.0g Fmoc-Ser(tBu)-OH (240mmol), 38.9g HOBt (288mmol) 溶于体积比为 1:1 的 DCM 和 DMF 混合溶液，冰水浴下加入 45 ml DIC (288 mmol) 活化 3min 后加入固相反应柱中，室温反应 2 小时。用 DMF 洗涤 3 次，加入封闭液（吡啶/乙酸酐=1:1）封闭 2 小时。用 DMF 洗涤 4 次，DCM 洗 4 次，甲醇收缩抽干，得到 Fmoc-Ser(tBu)-Rink Amide-MBHA 树

-21-

脂。检测替代度为 0.193mmol/g。

- 称取替代度为 0.193mmol/g 的 Fmoc-Ser(tBu)-Rink Amide-MBHA 树脂 984.5g (190mmol)，加入到固相反应柱中，用 DMF 洗涤 2 次，用 DMF 溶胀树脂 30 分钟后，用 DBLK 脱除 Fmoc 保护，然后用 DMF 洗涤 6 次，
- 5 用茚三酮法检测树脂颜色，树脂有颜色，表示 Fmoc 已脱除。取 256.42 g Fmoc-Pro-OH (760 mmol)，123.21 g HOBt (912 mmol)，溶于体积比为 1:1 的 DCM 和 DMF 混合溶液，冰水浴下加入 142.57 ml DIC (912 mmol) 活化 3min 后加入固相反应柱中，室温反应 2 小时。以茚三酮法检测判断反应终点，如果树脂无色透明，则表示反应完全；树脂显色，则表示反应不完全，需再偶联反应 1 小时，此判断标准适用于后续内容中以茚三酮法检测判断反应终点。重复上述脱除 Fmoc 保护和加入相应氨基酸偶联的步骤，按照艾塞那肽主链肽序，从 C 端到 N 端依次完成 2-39 片段的偶联，
- 10 取 408.12g Boc-His(Boc)-OH.DCHA (760mmol)、288.95g HATU (760mmol)、124.12g HOAt(912mmol)加入树脂中，加 5000ml NMP/DCM (1:1) 溶液，搅拌反应 5min 后，滴加 200.9ml TMP (1520mmol)，在 0°C 环境下反应 3h。以茚三酮法检测判断反应终点，如果树脂无色透明，则表示反应完全；树脂显色，则表示反应不完全，需再偶联反应 1 小时。反应结束后用甲醇收缩，树脂真空干燥过夜，称重得到序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 1998.7g。
- 20 将序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂 1998.7g 置于裂解反应器中，以 10ml/g 树脂的比例加入裂解试剂 TFA: PhSMe: EDT: TIS: H₂O: Phenol=81.5:5:5:5:2.5:1 (V:V)，室温搅拌 2h。反应物用砂芯漏斗过滤，收集滤液，树脂再用少量 TFA 洗涤 3 次，合并滤液。加入冰冻的无水乙醚沉淀 (无水乙醚用量为 100ml/g 树脂)，将沉淀离心，用无水乙醚洗涤
- 25 3 次，真空干燥得到白色粉末固体，即艾塞那肽粗肽 846.9g，重量收率为 106.5%，粗肽纯度为 56.7%。

得到的艾塞那肽粗肽采用 RP-HPLC 方法纯化，转盐，得到醋酸艾塞那肽 176.84 克，HPLC 纯度 99.01%。SCX-HPLC 方检测，采用本发明提供的方法合成的典型图谱如图 2 所示。RT21.547 为 D-His-艾塞那肽 0.20%。

—22—

以上对本发明所提供的一种艾塞那肽的制备方法进行了详细介绍。本文应用了具体个例对本发明的原理及实施方式进行了阐述,以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想。应当指出,对于本技术领域技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以对本发明进行若干改进和修饰,这些改进和修饰也落入本发明权利要求的保护范围内。

5

-23-

权 利 要 求

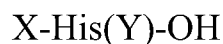
1、一种艾塞那肽的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

步骤 1：取丝氨酸与树脂经第一偶联获得丝氨酸-树脂；

5 步骤 2：取所述丝氨酸-树脂依次与氨基酸经第二偶联获得序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂；

步骤 3：取含有保护基团的组氨酸或其盐与所述序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂经第三偶联，获得序列如 SEQ ID No.2 所示的肽树脂，裂解、纯化后即得。

10 2、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 3 中所述含有保护基团的组氨酸或其盐的结构如式 II 所示

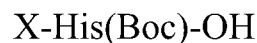


式 II

其中，X 选自 Fmoc、Boc 或 Trt；

15 Y 选自 Trt、Bum、Boc、mtt 或 mmt。

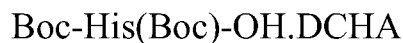
3、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 3 中所述含有保护基团的组氨酸或其盐的结构如式 III 所示



式 III

20 其中，X 选自 Fmoc、Boc 或 Trt。

4、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 3 中所述含有保护基团的组氨酸或其盐的结构如式 IV 所示



式 IV。

25 5、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述第三偶联为预活化偶联或原位偶联。

6、根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，步骤 3 具体为在溶剂中，含有保护基团的组氨酸或其盐与所述序列如 SEQ ID No.1 所示的肽树脂在偶联剂、有机碱的存在下经第三偶联，获得艾塞那肽树脂，经裂

—24—

解剂裂解、纯化后即得。

7、根据权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于，所述偶联剂为 HATU 和 HOAt。

8、根据权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于，所述有机碱为
5 DIPEA 或 TMP。

9、根据权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于，所述溶剂为 NMP、DMF、DCM 中的一种或两者以上的混合物。

10、根据权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于，所述裂解剂为 TFA、PhSMe、EDT、TIS、水、Phenol 的混合物。

10 11、根据权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于，所述裂解剂中 TFA、PhSMe、EDT、TIS、水、Phenol 的体积比为 80 ~ 85:2 ~ 5: 2 ~ 5: 2 ~ 5: 0 ~ 3: 0 ~ 2。

- 1/1 -

附 图

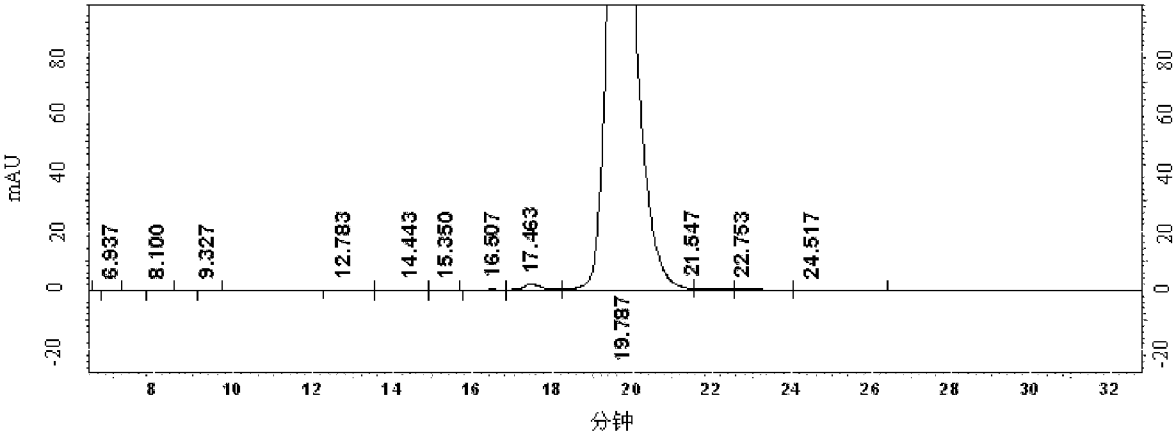


图 1

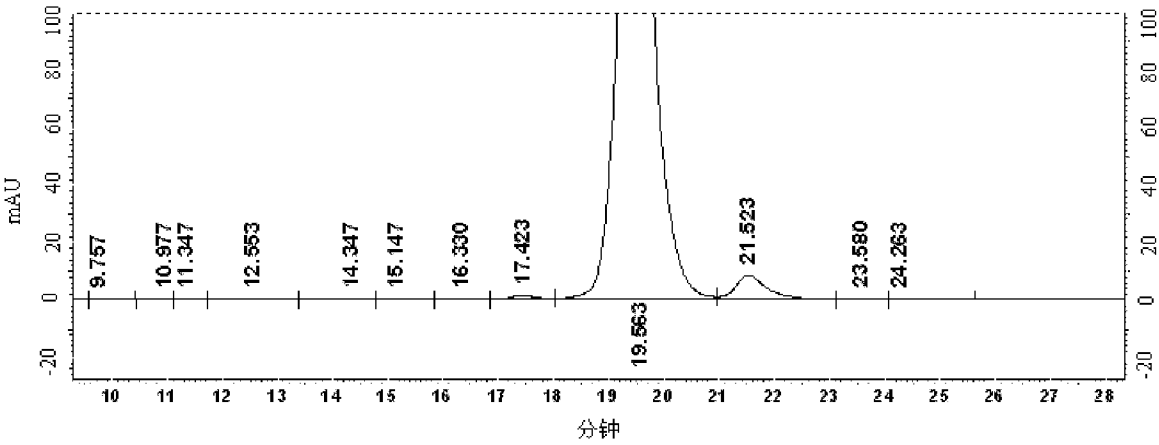


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/083795**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

See the extra sheet

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)

IPC: C07K, A61P

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)

CNKI; CNABS; CNTXT and search terms: exenatide, solid phase, synthesis, couplage etc.

DWPI; CPEA; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; ELSEVIER; EMBASE and search terms: exenatide, solid w phase, synthesis, Boc w His w Boc, coupl+ etc.

GENBANK; EMBL; National Bio-sequence Database of Chinese Patent and searched sequences: sequences 1-2

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101538324 A (HYBIO PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 23 September 2009 (23.09.2009), claims 1-9, and embodiments 3-4	1, 2, 5-9
Y	Claims 1-9, and embodiments 3-4	3, 4, 10, 11
X	CN 101357938 A (ZHOU, Yiming et al.), 04 February 2009 (04.02.2009), embodiment 1	1, 2, 5, 6, 9
Y	Embodiment 1	3, 4, 10, 11

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

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search
06 July 2013 (06.07.2013)Date of mailing of the international search report
15 August 2013 (15.08.2013)Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451Authorized officer
LI, Chen
Telephone No.: (86-10) **62411100**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/083795

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/083795

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102655883 A (NOVO NORDISK A/S), 05 September 2012 (05.09.2012), abstract, and description, paragraph [0618]	3, 4
Y	CN 101790538 A (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION), 28 July 2010 (28.07.2010), description, paragraph [0177]	3, 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2012/083795

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101538324 A	23.09.2009	CN 101538324 B	16.01.2013
CN 101357938 A	04.02.2009	None	
CN 102655883 A	05.09.2012	WO 2011080102 A2	07.07.2011
		WO 2011080102 A3	09.09.2011
		EP 2513141 A2	24.10.2012
		CN 102791731 A	21.11.2012
		US 2013053311 A1	28.02.2013
		JP 2013514323 A	25.04.2013
		WO 2011073328 A1	23.06.2011
		US 2011166321 A1	07.07.2011
		TW 201127396 A	16.08.2011
		EP 2512518 A1	24.10.2012
		US 2012329711 A1	27.12.2012
		JP 2013514322 A	25.04.2013
		WO 2011080103 A1	07.07.2011
		MX PA 12006634 A	30.06.2012
		AU 2010338387 A1	31.05.2012
		CA 2784757 A1	07.07.2011
		KR 20120103650 A	19.09.2012
		EP 2513140 A1	24.10.2012
		CN 102686607 A	19.09.2012
		JP 2013514324 A	25.04.2013
CN 101790538 A	28.07.2010	WO 2008101017 A2	21.08.2008
		WO 2008101017 A3	18.12.2008
		TW 200848423 A	16.12.2008
		AU 2008216265 A1	21.08.2008
		EP 2111414 A2	28.10.2009
		KR 20090119876 A	20.11.2009
		CA 2677932 A1	21.08.2008
		MXPA 09008241 A	31.10.2009
		INDELNP 200905128 E	19.03.2010
		US 2010190701 A1	29.07.2010
		PH 12009501546 A	21.08.2008
		VN 22954 A	25.06.2010
		JP 2011511753 A	14.04.2011
		ZA 200905521 A	26.10.2011
		NZ 578948 A	30.03.2012

International application No.
PCT/CN2012/083795

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/083795

CONTINUATION: CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/575 (2006.01) i

C07K 1/06 (2006.01) i

C07K 1/04 (2006.01) i

A61P 3/10 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/083795

A. 主题的分类

见附加页

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)

IPC: C07K, A61P

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))

CNKI;CNABS; CNTXT 和检索词: 艾塞那肽, 固相, 合成, 偶联等;

DWPI;CPEA;SIPOABS;EPTXT;WOTXT;USTXT;JPTXT;ELSEVIER;EMBASE 和检索词: exenatide, solid w phase, synthesis, Boc w His w Boc, coupl+等;

GENBANK;EMBL;中国专利生物序列检索系统和检索的序列: 序列 1-2

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
X	CN 101538324 A(深圳市翰宇药业有限公司) 23.9 月 2009(23.09.2009) 权利要求 1-9, 实施例 3-4	1, 2, 5-9
Y	权利要求 1-9, 实施例 3-4	3, 4, 10, 11
X	CN 101357938 A(周逸明等) 04.2 月 2009(04.02.2009) 实施例 1	1, 2, 5, 6, 9
Y	实施例 1	3, 4, 10, 11

☒ 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
06.7 月 2013(06.07.2013)

国际检索报告邮寄日期
15.8 月 2013 (15.08.2013)

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

受权官员

李晨
电话号码: (86-10) **62411100**

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1、关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是在下列基础上进行的:

a. 序列表的提交或提供

☐ 纸件形式

☒ 电子形式

b. 提交或提供时间

☒ 包含在申请提交时的国际申请中

☐ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2、☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/083795

C(续). 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
Y	CN 102655883 A(诺沃-诺迪斯克有限公司) 05.9 月 2012(05.09.2012) 摘要, 说明书第[0618]段	3, 4
Y	CN 101790538 A(印第安纳大学研究与科学公司) 28.7 月 2010(28.07.2010) 说明书第[0177]段	3, 4

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/083795

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 101538324 A	23.09.2009	CN 101538324 B	16.01.2013
CN 101357938 A	04.02.2009	无	
CN 102655883 A	05.09.2012	WO 2011080102 A2	07.07.2011
		WO 2011080102 A3	09.09.2011
		EP 2513141 A2	24.10.2012
		CN 102791731 A	21.11.2012
		US 2013053311 A1	28.02.2013
		JP 2013514323 A	25.04.2013
		WO 2011073328 A1	23.06.2011
		US 2011166321 A1	07.07.2011
		TW 201127396 A	16.08.2011
		EP 2512518 A1	24.10.2012
		US 2012329711 A1	27.12.2012
		JP 2013514322 A	25.04.2013
		WO 2011080103 A1	07.07.2011
		MX PA12006634 A	30.06.2012
		AU 2010338387 A1	31.05.2012
		CA 2784757 A1	07.07.2011
		KR 20120103650 A	19.09.2012
		EP 2513140 A1	24.10.2012
		CN 102686607 A	19.09.2012
		JP 2013514324 A	25.04.2013
CN 101790538 A	28.07.2010	WO 2008101017 A2	21.08.2008
		WO 2008101017 A3	18.12.2008
		TW 200848423 A	16.12.2008
		AU 2008216265 A1	21.08.2008
		EP 2111414 A2	28.10.2009
		KR 20090119876 A	20.11.2009
		CA 2677932 A1	21.08.2008
		MXPA 09008241 A	31.10.2009
		INDELNP 200905128 E	19.03.2010
		US 2010190701 A1	29.07.2010
		PH 12009501546 A	21.08.2008
		VN 22954 A	25.06.2010
		JP 2011511753 A	14.04.2011
		ZA 200905521 A	26.10.2011
		NZ 578948 A	30.03.2012

关于同族专利的信息

PCT/CN2012/083795

续：主题的分类

C07K 14/575 (2006.01) i

C07K 1/06 (2006.01) i

C07K 1/04 (2006.01) i

A61P 3/10 (2006.01) i