

(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
2019 年 5 月 9 日 (09.05.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/085178 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 1/08 (2006.01) *C07K 7/06* (2006.01)
C07K 1/04 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/116234
- (22) 国际申请日: 2017 年 12 月 14 日 (14.12.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
2017110655143.5 2017 年 11 月 2 日 (02.11.2017) CN
- (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: 陈学明 (CHEN, Xueming); 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)。 梁思思 (LIANG, Sisi); 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)。 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)。 陶安进 (TAO, Anjin); 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: 北京市诚辉律师事务所 (BEIJING CHENGHUI LAW FIRM); 中国北京市朝阳区朝阳北路 99 号楼 2 单元 905, Beijing 100123 (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

(54) Title: METHOD FOR SOLID PHASE SYNTHESIS OF VASOPRESSIN RECEPTOR PEPTIDE AGONIST SELEPRESSIN

(54) 发明名称: 一种固相合成血管升压素受体肽激动剂 SELEPRESSIN 的方法

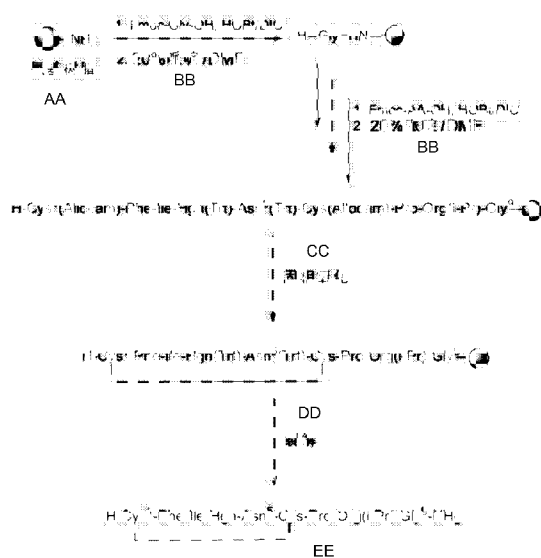


图 1

AA Amino resin
BB 20% piperidine/DMF
CC Solid phase oxidation
DD Cleavage
EE Selepressin

(57) Abstract: Provided is a method for solid phase synthesis of a vasopressin receptor peptide agonist selepressin. The method comprises the following steps: 1) sequentially coupling a solid-phase resin with amino acids protected by amino groups to synthesize a polypeptide resin H-Cys(allocam)-Phe-Ile-Hgn(Trt)-Asn(Trt)-Cys(allocam)-Pro-Arg(i-Pr)-Gly-resin; 2) under solid phase conditions, removing the protective group allocam of cysteine with a ternary catalytic oxidation system and oxidizing the mercapto group into a disulfide bond; and 3) removing the resin and the protecting groups of side chains of Hgn and Asn from the cleavage broth, and purifying same. The method of the present invention does not use an iodine catalyst, greatly reduces post-processing issues, and has the advantages of simple operation, a simplified process, environmental friendliness, high economic efficiency and being suitable for large-scale production, etc.

PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, ST, 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, KM, 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))。

(57) 摘要: 提供了一种固相合成血管升压素受体肽激动剂SELEPRESSIN的方法, 其包括如下步骤: 1) 固相树脂依次偶联氨基保护的氨基酸, 合成多肽树脂H-Cys(allocam)-Phe-Ile-Hgn(Trt)-Asn(Trt)-Cys(allocam)-Pro-Arg(i-Pr)-Gly-树脂; 2) 固相条件下, 以三元催化氧化体系脱除半胱氨酸的保护基allocam并氧化巯基为二硫键; 3) 裂解液脱除树脂及并Hgn和Asn侧链保护基, 并纯化。本发明的方法没有使用碘催化剂, 极大的降低了后续处理的问题, 具有操作简单、工艺简化、环境友好、经济效益高、可规模化生产等优点。

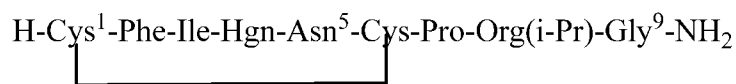
一种固相合成血管加压素受体肽激动剂 **SELEPRESSIN** 的方法

技术领域

本发明属于制药技术领域，尤其是涉及一种固相法合成 **Selepressin** 的方法。

背景技术

Selepressin，即 **FE-202158**，是一种血管加压素受体肽激动剂，由辉凌公司开发的一种治疗化脓性休克的多肽类药物，目前处于临床 III 期。**Selepressin** 为人工合成的九肽化合物，C 端为酰胺，含有一对二硫键（1-6），肽序见式 I，**Cas: 876296-47-8**。



式 I

到目前为止，专利 **CN1964732B** 公开报道了制备 **Selepressin** 的方法：使用氨基树脂，通过标准的 **Fmoc** 固相肽合成制备粗肽，然后在液相中在醋酸甲醇溶液中碘氧化二硫键，反向高效液相法纯化得到 **Selepressin** 精肽。此方法的缺点在于用碘氧化二硫键时，杂质较多，产率与纯度不高，同时过量的碘很难除掉。

发明内容

为了解决上述问题，本发明的目的是提供一种高效环保的 **Selepressin** 合成方法。本发明先使用氨基树脂和便宜的氨基酸原料，通过 **Fmoc/tBu** 策略固相合成线性肽，然后使用本发明特定的三元催化氧化体系在固相中催化氧化二硫键，高效液相纯化制备得到目标肽。该方法新颖、合成条件温和、工艺简单且工艺稳定。

本发明一个方面提供了一种血管加压素受体肽激动剂 **Selepressin** 的合成方法，其包括如下步骤：

1) 固相树脂依次偶联氨基保护的氨基酸，合成多肽树脂 **H-Cys(allocam)-Phe-Ile-Hgn(R₁)-Asn(R₂)-Cys(allocam)-Pro-Org(i-Pr)-Gly-** 树脂；

2) 固相条件下，以三元催化氧化体系脱除半胱氨酸的保护基 **allocam** 并氧

化巯基为二硫键；

3) 裂解液脱除树脂及并 Hgn 和 Asn 侧链保护基，并纯化；

其中，步骤 1) 中的 R_1 为 Hgn 的侧链保护基，优选为 Trt； R_2 为 Asn 的侧链保护基，优选为 Trt。

其中，步骤 2) 脱除半胱氨酸的保护基 allocam 并氧化二硫键的反应条件为步骤 1) 所得多肽树脂中的三元催化氧化体系为二价钯盐催化剂、捕获剂以及溶剂形成的反应体系。

步骤 2) 中所述二价钯盐催化剂选自 $Pd(OAc)_2$ 、 $PdCl_2$ 、 $PdSO_4$ 、 $Pd(OTf)_2$ 中的一种或多种的组合，优选 $Pd(OAc)_2$ ；

所述捕获剂选自 NMM、苯硅烷、三乙胺中的一种或多种的组合，优选为 NMM；

步骤 2) 中所用溶剂为乙酸与二甲亚砜的混合液，优选比例为：乙酸：二甲亚砜=1:100—1:1（体积比），更优选 1:10—1:70；最优选 1:18-1:20。

步骤 2) 反应温度为 $0^{\circ}C$ - $100^{\circ}C$ ，优选 $20^{\circ}C$ - $40^{\circ}C$ ；

步骤 2) 二价钯盐催化剂的用量为 0.5-10 当量，优选 1.0-1.5 当量。

本发明步骤 2) 中不使用碘或碘相关试剂作催化剂。

步骤 1) 中所述树脂为氨基树脂，优选为 Rink Amide 树脂、Rink Amide-AM 树脂、MBHA 树脂、PAL 树脂，树脂替代度为 0.1-2.0mmol/g，优选 0.5-1.5 mmol/g，更优选 0.5-1.0 mmol/g。

步骤 1) 中所述的氨基保护的氨基酸中氨基保护基为 Fmoc 或 tBu，偶联氨基酸依次为 Gly、Org(i-Pr)、Pro、Cys(Allocam)、Asn(Trt)、Hgn(Trt)、Ile、Phe、Cys(Allocam)。

所述固相多肽合成方法包括以下步骤：

i) 脱除氨基保护，至完全；

ii) 将待偶联的氨基保护的氨基酸和偶联剂溶解并活化后，一起加入到固相反应柱中，直至反应完全；

iii) 重复 i) 和 ii) 直至形成完整的多肽树脂。

其中，脱除 Fmoc 的试剂为 20% 的哌啶/DMF 溶液 (DBLK)，即哌啶：DMF（体积比）为 1:4 的混合溶液。

本发明步骤 2) 中的偶联剂为 DIC 和化合物 A 的组合物、DIC 和化合物 A 和化合物 B 的组合物、DIPCDI 和化合物 A 的组合物或 DIPEA 和化合物 A 和化合物 B 的组合物, 其中化合物 A 为 HOBt 或 HOAt, 化合物 B 为 PyBOP、PyAOP、HATU、HBTU 或 TBTU, 优选为 DIC 和化合物 A 的组合物。

进一步地, 偶联剂中各成分的比例以摩尔比计为 DIC:A=1.2:1.1、DIC:A:B=2.0:1.1:1.0、DIPEA:A=1.2:1.1、DIPEA:A:B=2.0:1.1:1.0。

在本发明中, 固相反应在固相反应柱中进行。本发明对固相反应柱无特别限制, 可为可实现此目的的任何固相反应柱。

此外, 每种氨基酸进行偶联反应的时间通常为 1.5-4 小时, 优选 2-3 小时; 压力优选为常压, 也可在适当提高或降低的压力下进行; 温度优选为室温 (即 $20\pm 5^{\circ}\text{C}$), 也可在适当提高或降低的温度下进行。

步骤 1) 的反应优选将树脂在偶联之前进行溶胀, 所述洗涤和溶胀的步骤本领域可采用实现该目的的任何试剂进行, 包括 DMF、NMP、二氯甲烷等, 优选 DMF。

在本发明中, 每一步反应均可以采用检测方法监测反应终点, 反应中应用的检测方法是本领域已知的可实现此目的的任何方法, 例如色谱法或化学标定法, 优选使用可判定反应终点的试剂, 优选茚三酮, 当使用茚三酮时, 若树脂显色则说明多肽中有游离的胺, 即胺上无保护基。

步骤 3) 所述的裂解液为 TFA、 H_2O 、PhOMe、苯甲硫醚的不同比例混合物; 优选地, 各组分比例为 TFA : H_2O : PhOMe : 苯甲硫醚 90:5:4:1。

步骤 4) 所述纯化步骤采用反相高压液相色谱法。进一步地, 所述反相高压液相色谱法包括: 以反相十八烷基硅烷为固定相, 以体积比 0.1% 醋酸水溶液/乙腈为流动相, 流动相体积比 0.1% 醋酸水溶液/乙腈的比例优选为 98:2 至 50:50, 更优选 80:20 至 60:40, 最优选 70:30。收集目的峰馏分, 浓缩冻干。

在本发明中, 本发明的英文缩写及中文含义, 如下表所示。

缩写及英文	含义
HOAt	1-羟基-7-偶氮苯并三氮唑
Fmoc	9-芴甲氧羰基
DIC	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'-四甲基脒六氟磷酸酯
HBTU	苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒六氟磷酸盐
DIPEA	N,N-二异丙基乙胺
EDC·HCl	1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐
PyBOP	苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基六氟磷酸盐
PyAOP	(3H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶-3-氧基)三-1-吡咯烷基磷六氟磷酸盐.
TBTU	O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脒四氟硼酸
DMF	N,N-二甲基甲酰胺
DCM	二氯甲烷
THF	四氢呋喃
TFA	三氟乙酸
TA	苯甲硫醚
PhOMe	苯甲醚
EDT	乙二硫醇
DMAP	4, 4-二甲氨基吡啶
DBLK	20%哌啶/DMF(V/V)溶液
tBu	叔丁基
NMP	N-甲基吡咯烷酮
Hgn	高谷氨酸酰胺
Org	鸟氨酸
i-Pr	异丙基
Allocam	烯丙氧羰基氨基甲基
NMM	N-甲基吗啉
DMF	N, N-二甲基甲酰胺
Acm	乙酰胺甲基
Trt	三苯甲基

有益效果

本方法采用固相氧化二硫键，反应体系采用特殊的三元催化氧化体系，反应效率高，没有使用碘，从而提交了后续纯化的步骤。具有操作简单、工艺简化、环境友好、经济效益高、可规模化生产等优点。

附图说明

图 1 为本发明的合成路线图。

具体实施方式

下面通过具体实施案例对本发明做进一步说明，本发明的技术方案和保护范围不受下述实施案例的任何限制。

实施例 1 多肽树脂的制备

称取替代度为 1.0mmol/g 的 Rink Amide 树脂 50g 于固相反应柱中，加入 50mLDMF，氮气鼓泡溶胀 60 分钟；然后用 50mL DBLK 脱保护 6min+8min，100mLDMF 洗涤 6 次。称取 74.3g(250mmol) Fmoc-Gly-OH 和 33.8g(250mmol)HOBt 用 150mL DMF 溶解，冰水浴下加入 31.5 g(210mmol) DIC 活化 3min 后，将混合液加入到反应柱中，室温反应 2 小时，以茚三酮检测反应终点（如树脂无色透明则终止反应；如树脂显色则延长反应 1 小时）。反应结束，用 150mLDMF 洗涤树脂 3 次，加入 150mLDBLK 脱保护 6min+8min，150mLDMF 洗涤树脂 6 次，茚三酮检测树脂有颜色。重复上述偶联操作，按照肽序继续依次偶联 Fmoc-Arg(i-Pr)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Cys(Allocam)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Cys(Allocam)-OH。每种氨基酸、HOBt 及 DIC 每次分别投料 210mmol。反应结束后，用 DMF 洗涤 6 次，每次 100mL，然后用 200mL 甲醇收缩树脂，抽干，得到多肽树脂 127.6 克。肽树脂增重 88.8 克，增重率为 98%。计算公式： $88.8/(50 \times 1812 \times 0.001) \times 100\%$ 。

实施例 2 多肽树脂的制备

称取替代度为 1.0mmol/g 的 Rink Amide-AM 树脂 50g 于固相反应柱中，加入 50mLDMF，氮气鼓泡溶胀 60 分钟；然后用 50mL DBLK 脱保护 6min+8min，100mLDMF 洗涤 6 次。称取 74.3g(250mmol) Fmoc-Gly-OH 和 33.8g(250mmol)HOBt 用 150mL DMF 溶解，冰水浴下加入 31.5 g(210mmol)

DIC 活化 3min 后, 将混合液加入到反应柱中, 室温反应 2 小时, 以茚三酮检测反应终点 (如树脂无色透明则终止反应; 如树脂显色则延长反应 1 小时)。反应结束, 用 150mLDMF 洗涤树脂 3 次, 加入 150mLDBLK 脱保护 6min+8min, 150mLDMF 洗涤树脂 6 次, 茚三酮检测树脂有颜色。重复上述偶联操作, 按照肽序继续依次偶联 Fmoc-Arg(i-Pr)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Cys(Allocam)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Hgn(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Cys(Allocam)-OH。每种氨基酸、HOBT 及 DIC 每次分别投料 210mmol。反应结束后, 用 DMF 洗涤 6 次, 每次 100mL, 然后用 200mL 甲醇收缩树脂, 抽干, 得到多肽树脂 113.6 克。肽树脂增重 73.4 克, 增重率为 81%。计算公式: $73.4/(50 \times 1812 \times 0.001) \times 100\%$ 。

实施例 3 多肽树脂的制备

称取替代度为 1.0mmol/g 的 MBHA 树脂 50g 于固相反应柱中, 加入 50mLDMF, 氮气鼓泡溶胀 60 分钟; 然后用 50mL DBLK 脱保护 6min+8min, 100mLDMF 洗涤 6 次。称取 74.3g(250mmol) Fmoc-Gly-OH 和 33.8g(250mmol)HOBT 用 150mL DMF 溶解, 冰水浴下加入 31.5 g(210mmol) DIC 活化 3min 后, 将混合液加入到反应柱中, 室温反应 2 小时, 以茚三酮检测反应终点 (如树脂无色透明则终止反应; 如树脂显色则延长反应 1 小时)。反应结束, 用 150mLDMF 洗涤树脂 3 次, 加入 150mLDBLK 脱保护 6min+8min, 150mLDMF 洗涤树脂 6 次, 茚三酮检测树脂有颜色。重复上述偶联操作, 按照肽序继续依次偶联 Fmoc-Arg(i-Pr)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Cys(Allocam)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Hgn(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Cys(Allocam)-OH。每种氨基酸、HOBT 及 DIC 每次分别投料 210mmol。反应结束后, 用 DMF 洗涤 6 次, 每次 1000mL, 然后用 200mL 甲醇收缩树脂, 抽干, 得到全保护多肽树脂 128.9 克。计算公式: $90.6/(50 \times 1812 \times 0.001) \times 100\%$ 。

实施例 4 固相氧化二硫键

将按照实施例 3 制得的 128.9 克肽树脂中, 依次加入 1.5L 二甲亚砜、80mL 乙酸、75mmol 醋酸钡、1.5mol N-甲基吗啉, 然后 25°C 反应。反应结束后, 用 DMF 洗 6 次, 每次 1000mL, 然后用 200mL 甲醇收缩树脂, 抽干, 得到环肽树

脂 121.9 克。肽树脂增重 71.9 克，增重率为 92%。计算公式： $71.9/(50 \times 1578 \times 0.001) \times 100\%$ 。

实施例 5 固相氧化二硫键

将按照实施例 3 制得的 128.9 克肽树脂中，依次加入 1.5L 二甲亚砷、80mL 乙酸、75mmol 氯化钡、1.5mol N-甲基吗啉，然后 25°C 反应。反应结束后，用 DMF 洗 6 次，每次 1000mL，然后用 200mL 甲醇收缩树脂，抽干，得到环肽树脂 120.2 克。肽树脂增重 70.2 克，增重率为 89%。计算公式： $70.2/(50 \times 1578 \times 0.001) \times 100\%$ 。

实施例 6 固相氧化二硫键

将按照实施例 3 制得的 128.9 克肽树脂中，依次加入 1.5L 二甲亚砷、80mL 乙酸、75mmol 硫酸钡、1.5mol N-甲基吗啉，然后 25°C 反应。反应结束后，用 DMF 洗 6 次，每次 1000mL，然后用 200mL 甲醇收缩树脂，抽干，得到环肽树脂 118.9 克。肽树脂增重 68.9 克，增重率为 87%。计算公式： $68.9/(50 \times 1578 \times 0.001) \times 100\%$ 。

实施例 7 固相氧化二硫键

将按照实施例 3 制得的 128.9 克肽树脂中，依次加入 1.5L 二甲亚砷、80mL 乙酸、75mmol 醋酸钡、1.5mol 苯硅烷，然后 25°C 反应。反应结束后，用 DMF 洗 6 次，每次 1000mL，然后用 200mL 甲醇收缩树脂，抽干，得到环肽树脂 120.9 克。肽树脂增重 70.9 克，增重率为 90%。计算公式： $70.9/(50 \times 1578 \times 0.001) \times 100\%$ 。

实施例 8 粗肽的制备

将实施例 4 得到的环肽树脂 121.9g 加入到 3L 三口瓶中，加入预先配置好的 TFA: H₂O: PhOMe: 苯甲硫醚=90: 5: 4: 1 (V:V) 1200mL，室温反应 2 小时，减压过滤树脂，收集滤液。用少量 TFA 洗涤树脂，合并滤液。将滤液缓慢加入 12L 冰乙醚中沉淀，离心，冰乙醚 5L 洗涤 5 次，减压干燥得到粗肽 46.1 克，收率 88% (收率计算公式： $46.1/(50 \times 0.001 \times 1048) \times 100\%$)，纯度 87%。

实施例 9 粗肽的制备

将实施例 5 得到的环肽树脂 120.2g 加入到 3L 三口瓶中，加入预先配置好的 TFA: H₂O: PhOMe: 苯甲硫醚=90: 5: 4: 1 (V:V) 1200mL，室温反应 2 小时，减压过滤树脂，收集滤液。用少量 TFA 洗涤树脂，合并滤液。将滤液缓慢加入

12L 冰乙醚中沉淀，离心，冰乙醚 5L 洗涤 5 次，减压干燥得到粗肽 40.3 克，收率 77%（收率计算公式： $40.3 / (50 \times 0.001 \times 1048) \times 100\%$ ），纯度 82%。

实施例 10 粗肽的制备

将实施例 6 得到的环肽树脂 118.9g 加入到 3L 三口瓶中，加入预先配置好的 TFA: H₂O: PhOMe: 苯甲硫醚=90: 5: 4: 1 (V:V) 1200mL，室温反应 2 小时，减压过滤树脂，收集滤液。用少量 TFA 洗涤树脂，合并滤液。将滤液缓慢加入 12L 冰乙醚中沉淀，离心，冰乙醚 5L 洗涤 5 次，减压干燥得到粗肽 38.1 克，收率 73%（收率计算公式： $38.1 / (50 \times 0.001 \times 1048) \times 100\%$ ），纯度 78%。

实施例 11 粗肽的制备

将实施例 7 得到的环肽树脂 120.9g 加入到 3L 三口瓶中，加入预先配置好的 TFA: H₂O: PhOMe: 苯甲硫醚=90: 5: 4: 1 (V:V) 1200mL，室温反应 2 小时，减压过滤树脂，收集滤液。用少量 TFA 洗涤树脂，合并滤液。将滤液缓慢加入 12L 冰乙醚中沉淀，离心，冰乙醚 5L 洗涤 5 次，减压干燥得到粗肽 42.1 克，收率 80%（收率计算公式： $42.1 / (50 \times 0.001 \times 1048) \times 100\%$ ），纯度 70%。

实施例 12 Selepressin 的制备

将实施例 8 得到的粗肽 46.1 克加入到 1000ml 反应瓶中，加入乙腈水溶液（体积比 1:1）500ml 溶解，上样 15cm×25cm 制备柱高效液相纯化制备。以反相十八烷基硅烷为固定相，以体积比 0.1%醋酸水溶液/乙腈为流动相，比例为 70:30；等梯度洗脱制备；流速：70-80ml/min；检测波长：280 nm；收集目的峰馏分，浓缩冻干，得纯品 36.2g，纯度为 99.5%，总收率 69%。总收率计算公式 $36.2 \div (50 \times 0.001 \times 1048) \times 100\%$ 。MS[M+H]⁺理论值 1048.5，实验值 1048.5。

对比实验：利用碘固相氧化二硫键制备 Selepressin

实施例 13 多肽树脂的制备

称取替代度为 1.0mmol/g 的 MBHA 树脂 50g 于固相反应柱中，加入 50mL DMF，氮气鼓泡溶胀 60 分钟；然后用 50mL DBLK 脱保护 6min+8min，100mL DMF 洗涤 6 次。称取 74.3g (250mmol) Fmoc-Gly-OH 和 33.8g (250mmol) HOBt 用 150mL DMF 溶解，冰水浴下加入 31.5 g (210mmol) DIC 活化 3min 后，将混合液加入到反应柱中，室温反应 2 小时，以茚三酮检测反应终点（如树脂无色透明则终止反应；如树脂显色则延长反应 1 小时）。反应结束，用 150mL DMF 洗涤树脂 3 次，加入 150mL DBLK 脱保护 6min+8min，150mL DMF

洗涤树脂6次，茚三酮检测树脂有颜色。重复上述偶联操作，按照肽序继续依次偶联Fmoc-Arg(i-Pr)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Cys(Trt)-OH。每种氨基酸、HOBt及DIC每次分别投料210mmol。反应结束后，用DMF洗涤6次，每次1000mL，然后用200mL甲醇收缩树脂，抽干，得到全保护多肽树脂151.1克。肽树脂增重101.1克，增重率为98%。计算公式： $101.1/(50 \times 2064 \times 0.001) \times 100\%$ 。

实施例14 固相氧化二硫键

将按照实施例13制得的151.1克肽树脂中，依次加入1.5LDMF、12.7g碘，然后25℃反应。反应结束后，用DMF洗6次，每次1000mL，然后用200mL甲醇收缩树脂，抽干，得到环肽肽树脂119.2克。肽树脂增重69.2克，增重率为88%。计算公式： $69.2/(50 \times 1578 \times 0.001) \times 100\%$ 。

实施例15 粗肽的制备

将实施例14得到的环肽肽树脂119.2g加入到3L三口瓶中，加入预先配置好的TFA: H₂O: PhOMe:苯甲硫醚=90: 5: 4: 1 (V:V) 1200mL，室温反应2小时，减压过滤树脂，收集滤液。用少量TFA洗涤树脂，合并滤液。将滤液缓慢加入12L冰乙醚中沉淀，离心，冰乙醚5L洗涤5次，减压干燥得到粗肽26.2克，收率50%（收率计算公式： $26.2/(50 \times 0.001 \times 1048) \times 100\%$ ），纯度55%。

实施例16 Selepressin的制备

将实施例15得到的粗肽26.2克加入到1000ml反应瓶中，加入乙腈水溶液（体积比1:1）500ml溶解，上样15cm×25cm制备柱高效液相纯化制备。以反相十八烷基硅烷为固定相，以体积比0.1%醋酸水溶液/乙腈为流动相，比例为70:30；等梯度洗脱制备；流速：70-80ml/min；检测波长：280 nm；收集目的峰馏分，浓缩冻干，得纯品14.0g，纯度为99.5%，总收率27%。总收率计算公式 $14.0/(50 \times 0.001 \times 1048) \times 100\%$ 。

实施例17 多肽树脂的制备

称取替代度为1.0mmol/g的MBHA树脂50g于固相反应柱中，加入50mLDMF，氮气鼓泡溶胀60分钟；然后用50mL DBLK脱保护6min+8min，100mLDMF洗涤6次。称取 74.3g(250mmol) Fmoc-Gly-OH和33.8g(250mmol)HOBt用150mL DMF溶解，冰水浴下加入31.5 g(210mmol) DIC

活化3min后,将混合液加入到反应柱中,室温反应2小时,以茚三酮检测反应终点(如树脂无色透明则终止反应;如树脂显色则延长反应1小时)。反应结束,用150mLDMF洗涤树脂3次,加入150mLDBLK脱保护6min+8min,150mLDMF洗涤树脂6次,茚三酮检测树脂有颜色。重复上述偶联操作,按照肽序继续依次偶联Fmoc-Arg(i-Pr)-OH、Fmoc-Pro-OH、Fmoc-Cys(Acm)-OH、Fmoc-Asn(Trt)-OH、Fmoc-Hgn(Trt)-OH、Fmoc-Ile-OH、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Cys(Acm)-OH。每种氨基酸、HOBt及DIC每次分别投料210mmol。反应结束后,用DMF洗涤6次,每次1000mL,然后用200mL甲醇收缩树脂,抽干,得到全保护多肽树脂135.2克。肽树脂增重85.2克,增重率为99%。计算公式:
$$85.2/(50 \times 1722 \times 0.001) \times 100\%$$

实施例18 固相氧化二硫键

将按照实施例17制得的135.2克肽树脂中,依次加入1.5LDMF、12.7g碘,然后25℃反应。反应结束后,用DMF洗6次,每次1000mL,然后用200mL甲醇收缩树脂,抽干,得到环肽肽树脂119.2克。肽树脂增重68.5克,增重率为87%。计算公式: $68.5/(50 \times 1578 \times 0.001) \times 100\%$ 。

实施例19 粗肽的制备

将实施例18得到的环肽肽树脂119.2g加入到3L三口瓶中,加入预先配置好的TFA: H₂O: PhOMe:苯甲硫醚=90: 5: 4: 1 (V:V) 1200mL,室温反应2小时,减压过滤树脂,收集滤液。用少量TFA洗涤树脂,合并滤液。将滤液缓慢加入12L冰乙醚中沉淀,离心,冰乙醚5L洗涤5次,减压干燥得到粗肽25.1克,收率48% (收率计算公式: $25.1/(50 \times 0.001 \times 1048) \times 100\%$), 纯度59%。

实施例20 Selepressin的制备

将实施例19得到的粗肽25.1克加入到1000ml反应瓶中,加入乙腈水溶液(体积比1:1)500ml溶解,上样15cm×25cm制备柱高效液相纯化制备。以反相十八烷基硅烷为固定相,以体积比0.1%醋酸水溶液/乙腈为流动相,比例为70:30;等梯度洗脱制备;流速:70-80ml/min;检测波长:280nm;收集目的峰馏分,浓缩冻干,得纯品13.9g,纯度为99.5%,总收率26.5%。总收率计算公式 $13.9/(50 \times 0.001 \times 1048) \times 100\%$ 。

由以上实验结果可以得知,采用传统的Fmoc-Cys(Trt)-OH、Fmoc-Cys(Acm)-OH为原料,固相碘氧化制备Selepressin,产率较低(总收率

分别为 27%和 26.5%)，且产品颜色发黄；而采用 Fmoc-Cys(Allocam)-OH 为原料，并以本发明所述的三元催化体系固相氧化制备 Selepressin，产率和纯度较高，总收率接近 70%。

以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换，都应当视为属于本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1、一种血管升压素受体肽激动剂 **Selepressin** 的合成方法，其包括如下步骤：

1) 固相树脂依次偶联氨基保护的氨基酸，合成多肽树脂 **H-Cys(allocam)-Phe-Ile-Hgn(R₁)-Asn(R₂)-Cys(allocam)-Pro-Arg(i-Pr)-Gly-** 树脂；

2) 固相条件下，以三元催化氧化体系 脱除半胱氨酸的保护基 **allocam** 并氧化巯基为二硫键；

3) 裂解液脱除树脂及并 **Hgn** 和 **Asn** 侧链保护基，并纯化；

其中，步骤 1) 中的 **R₁** 为 **Hgn** 的侧链保护基，优选为 **Trt**；**R₂** 为 **Asn** 的侧链保护基，优选为 **Trt**；

其中，步骤 2) 脱除半胱氨酸的保护基 **allocam** 并氧化二硫键的反应条件为步骤 1) 所得多肽树脂中的三元催化氧化体系为二价钯盐催化剂、捕获剂以及溶剂形成的反应体系。

2、根据权利要求 1 所述的合成方法，其中，步骤 2) 中所述二价钯盐催化剂选自 **Pd(OAc)₂**、**PdCl₂**、**PdSO₄**、**Pd(OTf)₂** 中的一种或多种的组合，优选 **Pd(OAc)₂**。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的合成方法，其中，所述捕获剂选自 **NMM**、苯硅烷、三乙胺中的一种或多种的组合，优选为 **NMM**。

4、根据权利要求 1-3 任一项所述的合成方法，其中，步骤 2) 反应温度为 0℃ -100℃，优选 20℃-40℃。

5、根据权利要求 1-4 任一项所述的合成方法，其中，固相多肽合成方法包括以下步骤：

i) 脱除氨基保护，至完全；

ii) 将待偶联的氨基保护的氨基酸和偶联剂溶解并活化后，一起加入到固相反应柱中，直至反应完全；

iii) 重复 i) 和 ii) 直至形成完整的多肽树脂；

优选地，步骤 1) 中所述树脂为氨基树脂，优选为 **Rink Amide** 树脂、**Rink Amide-AM** 树脂、**MBHA** 树脂、**PAL** 树脂，树脂替代度为 0.1-2.0mmol/g，优选 0.5-1.5 mmol/g，更优选 0.5-1.0 mmol/g。

6、根据权利要求 5 所述的合成方法，其中，步骤 1) 中所述的氨基保护的氨基酸中氨基保护基为 **Fmoc** 或 **tBu**，偶联氨基酸依次为 **Gly**、**Arg(i-Pr)**、**Pro**、

Cys(Allocam)、Asn(Trt)、Hgn(Trt)、Ile、Phe、Cys(Allocam)。

7、根据权利要求5所述的合成方法，其中，脱除 Fmoc 的试剂为 20%的哌啶/DMF 溶液（DBLK），即哌啶：DMF（体积比）为 1:4 的混合溶液。

8、根据权利要求5所述的合成方法，本发明步骤2)中的偶联剂为 DIC 和化合物 A 的组合物、DIC 和化合物 A 和化合物 B 的组合物、DIPCDI 和化合物 A 的组合物或 DIPEA 和化合物 A 和化合物 B 的组合物，其中化合物 A 为 HOBt 或 HOAt，化合物 B 为 PyBOP、PyAOP、HATU、HBTU 或 TBTU，优选为 DIC 和化合物 A 的组合物；

进一步地，偶联剂中各成分的比例以摩尔比计为 DIC:A=1.2:1.1、DIC:A:B=2.0:1.1:1.0、DIPEA:A=1.2:1.1、DIPEA:A:B=2.0:1.1:1.0。

9、根据权利要求1-8任一项所述的合成方法，步骤3)所述的裂解液为 TFA、H₂O、PhOMe、苯甲硫醚的不同比例混合物；优选地，各组分的比例为 TFA : H₂O : PhOMe : 苯甲硫醚 90: 5: 4: 1。

10、根据权利要求1-9任一项所述的合成方法，步骤4)所述纯化步骤采用反相高压液相色谱法；

优选地，所述反相高压液相色谱法包括：以反相十八烷基硅烷为固定相，以体积比 0.1%醋酸水溶液/乙腈为流动相，流动相体积比 0.1%醋酸水溶液/乙腈的比例为 98:2 至 50:50，收集目的峰馏分，浓缩冻干；更优选体积比 0.1%醋酸水溶液/乙腈为 80:20 至 60:40，最优选体积比 0.1%醋酸水溶液/乙腈为 70:30。

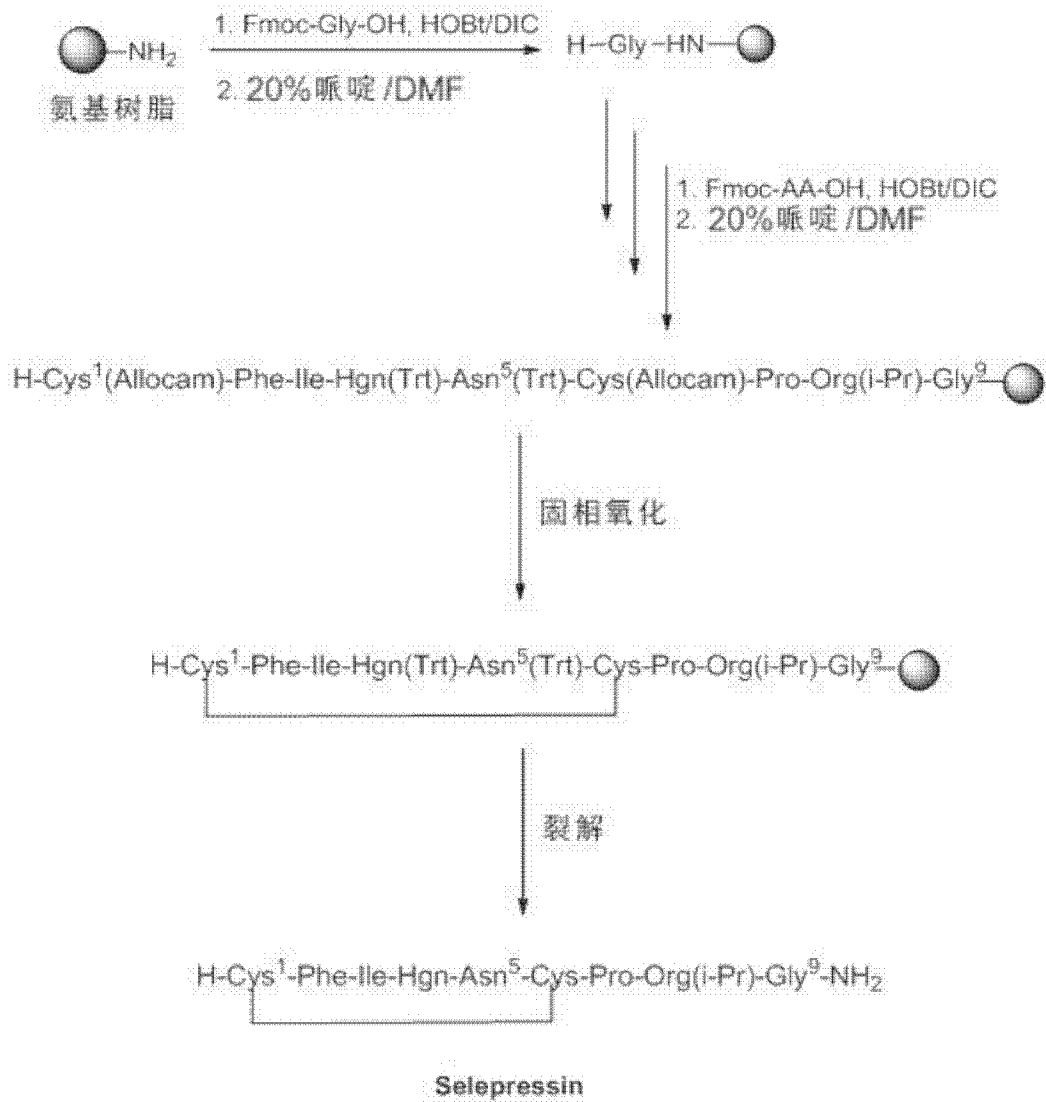


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/116234

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 1/08 (2006.01) i; C07K 1/04 (2006.01) i; C07K 7/06 (2006.01) i

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)

C07K; A61K

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; CNPAT and Keywords: 血管加压素受体肽激动剂, 激动剂, 血管加压素, 合成, Selepressin, FE-202158, vasopressin, V1A DWPI; CPEA; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER; ISI of Web science and Keywords: Selepressin, FE-202158, vasopressin, V1A, receptor, agonist, syntheses+ GENBANK; EMBL; Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: Cys-Phe-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Orn-Gly

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1964732 A (FERRING B.V.) 16 May 2007 (16.05.2007), entire document	1-10
A	US 2016122386 A1 (FERRING B.V.) 05 May 2016 (05.05.2016), entire document	1-10
A	RUSSELL, James A. et al. Selepressin, a Novel Selective Vasopressin V1A Agonist, is an Effective Substitute for Norepinephrine in a Phase IIa Randomized, Placebo-controlled Trial in Septic Shock Patients. Critical Care. 15 July 2017 (15.07.2017), 21(1), pages 213-222	1-10

☐ 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 14 June 2018	Date of mailing of the international search report 29 June 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer YUE, Lixi Telephone No. (86-10) 62411096

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/116234

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1964732 A	16 May 2007	SI EP1776133 T1	29 July 2011
		EP 1776133 A4	31 December 2008
		ZA 200700772 B	25 September 2008
		AU 2005274070 A1	23 February 2006
		CN 1964732 B	02 March 2011
		HK 1100280 A1	16 December 2011
		IL 178690 A	31 October 2013
		US 2009054309 A1	26 February 2009
		MX 2007001396 A	19 April 2007
		WO 2006020491 A1	23 February 2006
		NO 20071314 A	10 May 2007
		IL 178690 D0	11 February 2007
		SA 2004 B1	19 May 2008
		TW 200612976 A	01 May 2006
		EP 1776133 A1	25 April 2007
		US 8148319 B2	03 April 2012
		CA 2567797 A1	23 February 2006
		SI 1776133 T1	29 July 2011
		ES 2366702 T3	24 October 2011
		US 2012196808 A1	02 August 2012
		KR 20070029183 A	13 March 2007
		RU 2007101238 A	20 September 2008
		EP 1776133 B1	18 May 2011
		CA 2567797 C	10 July 2012
		DK 1776133 T3	18 July 2011
		KR 100884323 B1	18 February 2009
		RU 2355701 C2	20 May 2009
		AU 2005274070 B2	07 February 2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/116234

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		JO 2937 B	15 March 2016
		JP 2008509221 A	27 March 2008
		JP 4664363 B2	06 April 2011
		AT 509944 T	15 June 2011
		AR 050914 A1	06 December 2006
		ZA 200700772 A	25 September 2008
		US 8778881 B2	15 July 2014
		NZ 550707 A	30 July 2010
		BR PI0511466 A	26 December 2007
		PT 1776133 E	02 September 2011
		TW I364291 B	21 May 2012
US 2016122386 A1	05 May 2016	US 9388214 B2	12 July 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/116234

A. 主题的分类 C07K 1/08(2006.01)i; C07K 1/04(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i 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) C07K; A61K 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; CNPAT和检索词: 血管升压素受体肽激动剂, 激动剂, 血管升压素, 合成, Selepressin, FE-202158, vasopressin, V1A DWPI; CPEA; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ELSEVIER; ISI of Webscience 和检索词: Selepressin, FE-202158, vasopressin, V1A, receptor, agonist, synthes+ GENBANK; EMBL; 中国专利生物序列检索系统: Cys-Phe-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Orn-Gly		
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
A	CN 1964732 A (辉凌公司) 2007年 5月 16日 (2007 - 05 - 16) 全文	1-10
A	US 2016122386 A1 (FERRING BV) 2016年 5月 5日 (2016 - 05 - 05) 全文	1-10
A	RUSSELL, James A. 等. "Selepressin, a novel selective vasopressin V1A agonist, is an effective substitute for norepinephrine in a phase IIa randomized, placebo-controlled trial in septic shock patients" Critical Care, 第21卷, 第1期, 2017年 7月 15日 (2017 - 07 - 15), 第213-222页	1-10
☐ 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 2018年 6月 14日		国际检索报告邮寄日期 2018年 6月 29日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 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 岳礼溪 电话号码 86-(010)-62411096

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/116234

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	1964732	A	2007年 5月 16日	SI	EP1776133	T1	2011年 7月 29日
				EP	1776133	A4	2008年 12月 31日
				ZA	200700772	B	2008年 9月 25日
				AU	2005274070	A1	2006年 2月 23日
				CN	1964732	B	2011年 3月 2日
				HK	1100280	A1	2011年 12月 16日
				IL	178690	A	2013年 10月 31日
				US	2009054309	A1	2009年 2月 26日
				MX	2007001396	A	2007年 4月 19日
				WO	2006020491	A1	2006年 2月 23日
				NO	20071314	A	2007年 5月 10日
				IL	178690	D0	2007年 2月 11日
				SA	2004	B1	2008年 5月 19日
				TW	200612976	A	2006年 5月 1日
				EP	1776133	A1	2007年 4月 25日
				US	8148319	B2	2012年 4月 3日
				CA	2567797	A1	2006年 2月 23日
				SI	1776133	T1	2011年 7月 29日
				ES	2366702	T3	2011年 10月 24日
				US	2012196808	A1	2012年 8月 2日
				KR	20070029183	A	2007年 3月 13日
				RU	2007101238	A	2008年 9月 20日
				EP	1776133	B1	2011年 5月 18日
				CA	2567797	C	2012年 7月 10日
				DK	1776133	T3	2011年 7月 18日
				KR	100884323	B1	2009年 2月 18日
				RU	2355701	C2	2009年 5月 20日
				AU	2005274070	B2	2008年 2月 7日
				JO	2937	B	2016年 3月 15日
				JP	2008509221	A	2008年 3月 27日
				JP	4664363	B2	2011年 4月 6日
				AT	509944	T	2011年 6月 15日
				AR	050914	A1	2006年 12月 6日
				ZA	200700772	A	2008年 9月 25日
				US	8778881	B2	2014年 7月 15日
				NZ	550707	A	2010年 7月 30日
				BR	PI0511466	A	2007年 12月 26日
				PT	1776133	E	2011年 9月 2日
				TW	I364291	B	2012年 5月 21日
US	2016122386	A1	2016年 5月 5日	US	9388214	B2	2016年 7月 12日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)