

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02828348.1

[51] Int. Cl.
C07K 1/30 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 8 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 1272341C

[22] 申请日 2002.12.23 [21] 申请号 02828348.1

[30] 优先权

[32] 2001.12.29 [33] SE [31] 0104462-7

[86] 国际申请 PCT/IB2002/005581 2002.12.23

[87] 国际公布 WO2003/055900 英 2003.7.10

[85] 进入国家阶段日期 2004.8.26

[71] 专利权人 多肽实验室联合股份有限公司

地址 丹麦希勒勒

[72] 发明人 J·H·拉斯姆森

P·H·拉斯姆森

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 2 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

肽的纯化

[57] 摘要

九肽或十肽从残留的有机溶剂中纯化，办法是通过将其溶解在含有水和至少一种 C1 - C3 醇的溶剂中，接着加入剧烈搅拌的由羧酸烷基酯(包含 3 - 6 个碳原子)和一种或多种非极性化合物(选自己烷、庚烷、辛烷、环己烷、甲基环己烷)和任选地高达 5% 的乙酸或丙酸构成的溶剂中进行沉淀，分离沉淀的九肽或十肽，接着用 C3 - C5 酯的混合物洗涤并干燥，条件是含有水和至少一种醇的溶剂的水含量低于 8% (v/v)，溶解溶剂混合物和沉淀溶剂混合物的体积比为 1 : 10 或更高。还叙述了 Ac - D - 2NaI - D - 4ClPhe - D - 3Pal - Ser - MeTyr - D - Asn - Leu - Lys (iPr) - Pro - D - Ala - NH₂ 的单乙酸酯。

1.一种从否则是纯的九肽或十肽中除去残留的有机溶剂的纯化方法,所述方法包含以下步骤:

5 - 将所述的九肽或十肽溶解在溶解溶剂混合物中,该混合物含有水和至少一种选自甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇的醇;

 - 将九肽或十肽在所述溶剂混合物中的溶液加到剧烈搅拌的沉淀溶剂混合物中,该沉淀溶剂混合物由一种或多种极性化合物和一种或多种非极性化合物和任选地高达 5%的乙酸或丙酸组成,所述极性化合物选自乙酸甲酯、乙酸乙酯、丙
10 酸甲酯、丙酸乙酯、乙酸丁酯、乙酸异丁酯、乙酸叔丁酯、甲酸乙酯、甲酸丙酯、甲酸异丙酯,所述非极性化合物选自己烷、庚烷、辛烷、环己烷、甲基环己烷;

 - 分离沉淀的九肽或十肽;

 - 用一种所述的极性化合物或所述的极性化合物的混合物洗涤该分离的九肽或十肽;

15 - 干燥该洗涤过的九肽或十肽,

条件是,所述含有水和至少一种醇的溶剂混合物的水含量低于 8%(v/v),所述溶解溶剂混合物和所述沉淀溶剂混合物的体积比是 1:10 或更高。

2.如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述含有水和至少一种醇的溶剂混合物的水含量低于 5%(v/v)。

20 3.如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述九肽或十肽是 LHRH 拮抗剂。

4.如权利要求 3 所述的方法,其特征在于,所述九肽或十肽是 Ac-D-2NaI-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (I)。

5.如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,Ac-D-2NaI-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (I)是以单乙酸酯的形式得到的。

25 6.如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述溶解溶剂混合物和沉淀溶剂混合物的体积比为至少 15。

7.如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述溶解溶剂混合物中的醇是乙醇。

8.如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述沉淀溶剂混合物中的极性组分是乙酸乙酯。

30 9.如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述沉淀溶剂混合物中的非极性组分

是庚烷。

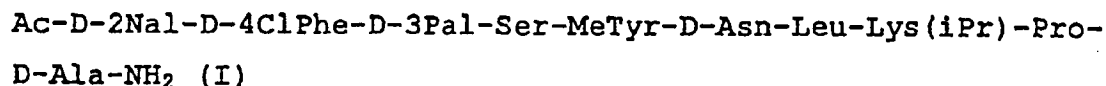
肽的纯化

5 发明领域

本发明涉及肽的纯化，具体涉及中等大小的肽的纯化，更具体涉及九肽和十肽，如 LHRH-拮抗剂的纯化。

发明背景

- 10 大多数中等大小的天然的和合成的肽是无定形物质。它们中的许多具有药理学上感兴趣的性质，诸如许多九肽和十肽，是 LHRH(促黄体激素释放激素)拮抗剂。这类已知的仅以无定形态存在的一个具体的物质就是式(I)的合成的十肽



它是强力的 LHRH 拮抗剂，具有所需要的药理性质。

- 15 为了在药物制剂中应用，LHRH 拮抗剂(I)和类似结构的九肽和十肽必须基本上是纯的。在多步合成的最后一步得到的粗产物通过色谱或其它方法纯化。为了除去从色谱带来的残留溶剂，经这样纯化的产物通常要被溶解在水性介质中并冷冻干燥。这是一个高成本的过程，产生不容易操作的体积庞大的产物。

因此希望有冷冻干燥以外的手段，从否则是纯的肽中除去溶剂的纯化方法。

- 20 WO 0018423 A 揭示了使用环糊精和 LHRH 肽类似物(包括其药学上可接受的盐)的组合物来制备供口服施用的药物组合物。Abarelix 是优选的 LHRH 类似物。D1 的 LHRH 肽拮抗剂的乙酸盐通常也被描述为药学上可接受的。WO 0018423 所述的化合物可用于药物制造。

- 25 WO 0055190 A 揭示了十肽 LHRH 拮抗剂，它被用来制造治疗激素依赖型肿瘤和受激素影响的疾病的药物，它可通过制备型 HPLC 纯化，并冻干。

EP 0955308 A 揭示了在并行一步纯化中通过液相色谱将十肽 LHRH 拮抗剂的盐酸盐转化成其双乙酸盐的方法。

发明目的

- 30 本发明目的是提供从上述种类的否则是纯的肽中除去残留的有机溶剂的纯化方

法, 该方法避免了冷冻干燥。

本发明的另一个目的是提供这样的一种基本上不含残留的有机溶剂的否则是纯的肽, 它不是呈冷沉淀物的形态。

本发明的其它目的通过以下的本发明概要、其优选的实施方案的叙述、以及所附
5 的权利要求书将变得明显。

发明概述

本发明提供否则是纯的肽(具体是九肽或十肽, 更具体是作为 LHRH-拮抗剂的九肽或十肽)中除去残留的有机溶剂的纯化方法, 该方法包含以下步骤:

- 10 - 将所述的否则是纯的肽溶解在含有水和至少一种选自甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇的醇的溶解溶剂混合物中;
 - 将该否则是纯的肽在所述的溶剂混合物中的溶液加到剧烈搅拌的沉淀溶剂混合物中, 该溶剂混合物由一种或多种极性化合物和一种或多种非极性化合物, 和任选的高达 5%的乙酸或丙酸构成, 所述极性化合物选自乙酸甲酯、乙酸乙酯、
15 丙酸甲酯、丙酸乙酯、乙酸丁酯、乙酸异丁酯、乙酸叔丁酯、甲酸乙酯、甲酸丙酯、甲酸异丙酯, 所述非极性化合物选自己烷、庚烷、辛烷、环己烷、甲基环己烷;
 - 分离沉淀的肽;
 - 用一种所述的极性化合物或该极性化合物的混合物, 或相似极性的溶剂或
20 溶剂混合物洗涤该分离的肽;
 - 干燥该洗涤过的肽,

条件是, 所述的含有水和至少一种醇的溶剂混合物的水含量低于 8%(v/v), 溶解溶剂混合物和沉淀溶剂混合物的体积比为 1:10 或更高。

术语“否则是纯的肽”指对于药物应用是非常纯的肽, 只是其挥发性的杂质需要
25 除去或其含量需要显著地降低。该否则是纯的肽一般是已经经过色谱纯化的物质。

优选地, 该否则是纯的肽是

Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (I)。

按照本发明的第一优选方面, 溶解溶剂混合物的水含量低于 5%(v/v)。

按照本发明的第二优选方面, 溶解溶剂混合物和沉淀溶剂混合物的体积比为至少

15, 特别是至少 20。

按照本发明的第三优选方面, 溶解溶剂混合物的醇是乙醇。

按照本发明的第四优选方面, 沉淀溶剂混合物的极性组分是乙酸乙酯。

按照本发明的第五优选方面, 沉淀溶剂混合物的非极性组分是庚烷。

5 以下本发明将通过参照其优选的实施方案更详细地叙述, 但这不应该被理解为对本发明的限制。

优选实施方案的叙述

实施例 1

10 用制备型 HPLC 将合成产物纯化所得到的含纯化合物(1)(共 100 克)在乙醇-水-乙酸(40:59:1, v/v/v)中的级份收集起来并真空浓缩, 所产生的油状产物用乙醇共蒸发两次。产生的固体溶解在 440 毫升乙醇中, 所得到的澄清溶液在 20 分钟时间内加入 8.8 升乙酸乙酯/庚烷 1:1(v/v)中。继续搅拌 1 小时, 过滤。无定形产物用 3 升乙酸乙酯洗涤; 发现这一步除去了几乎全部的庚烷。洗涤过的产物在真空烘箱中 40℃在 0.3 巴干燥
15 干燥 48 小时。干燥产物的元素分析表明得到了(I)的单乙酸酯。相反, 冷沉淀产生相应的二乙酸酯。在下表中, 按照本发明产生的单乙酸酯的分析参数与相应的冷冻干燥产物(二乙酸酯)的分析参数做比较。

表. 所有的百分数都是重量百分数

	冷冻干燥产物	沉淀产物
水	3.4%	3.0%
乙醇	<0.024%	<0.024%
乙酸乙酯	<0.024%	<0.024%
庚烷	<0.024%	<0.024%
乙酸(作为乙酸酯)	7.5%	3.9%
HPLC 纯度	99.8%	99.8%
肽含量	88.8%	94.9%
滤液中的损失	-	0.3%

实施例 2

改变沉淀溶剂或溶剂混合物的组成；其它方面和实施例 1 的程序相同。在纯乙酸乙酯中沉淀造成约 3-5 重量%的肽损失。在纯庚烷中沉淀造成粘性产物，难以过滤。乙酸乙酯-己烷(1:1, v/v)混合物给出的产物容易过滤和干燥；在重复实验中肽的损失总低于 0.5 重量%。

5

实施例 3

改变在溶解溶剂(绝对乙醇)中油性产物的溶液的水含量；其它按照实施例 1 的程序。10%(v/v)的水含量在沉淀时产生粘性产物，难以过滤。15%(v/v)的水含量在沉淀时产生油性产物。为了得到满意的结果，水含量必须不超过 8%(v/v)，最好应该保持在 5%(v/v)以下。低于 5%的水含量可以通过将从色谱得到的油性产物—乙醇共蒸发两次达到。

实施例 4

改变沉淀的温度；其它方面按照实施例 1。沉淀温度证明不是关键性的。可从 0°C 改变到 20°C 而在产物的产率和形态上没有可察觉的不同。

实施例 5

改变(I)在溶解溶剂中的浓度；其它方面按照实施例 1。发现，从色谱得到又经过用乙醇共蒸发两次的油性产物在溶解溶剂中的浓度应该尽可能高。甚至可以使用 330 克(重量)的浓度。

实施例 6

改变溶解溶剂和沉淀溶剂之间的比；其它方面按照实施例 1。发现最佳的比为约 1:20。从 1:15 到 1:30 的比都可给出满意的结果。1:10 的比产生粘性的产物。沉淀过程是非常快的。可以在溶解的物质最后加入的 30 分钟以后过滤虚浮液。用乙酸乙酯洗涤不会造成产物的损失，但能有效除去庚烷。