



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104774161 B

(45)授权公告日 2017.08.25

(21)申请号 201410013357.3

CN 102180807 A,2011.09.14,

(22)申请日 2014.01.13

US 5672662 A,1997.09.30,

(65)同一申请的已公布的文献号

Cristina Visintin et al.Membrane

申请公布号 CN 104774161 A

Receptor Probes: Solid-Phase Synthesis of Biotin-Asp-PEG-arvanil Derivatives.

(43)申请公布日 2015.07.15

《Organic Letters》.2005,第7卷(第9期),

(73)专利权人 成都福瑞康生物科技有限公司

高勇等.合成8-氨基-3,6-二氧杂辛酸前体的新方法.《应用化学》.2006,第23卷(第8期),

地址 610041 四川省成都市高新区科园南路88天府生命科学园C座815

Stefanie Keil et al.Towards the

(72)发明人 罗前东 胡德银

Development of Antitumor Vaccines: A

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理

Synthetic Conjugate of a Tumor-Associated

事务所(普通合伙) 11371

MUC1 Glycopeptide Antigen and a Tetanus

代理人 吴开磊

Toxin Epitope.《Angew. Chem. Int. Ed》

(51)Int.Cl.

.2001,第40卷(第2期),

C07C 271/16(2006.01)

Tobias Platen et al.Synthesis and

C07C 269/04(2006.01)

Antibody Binding of Highly Fluorinated

(56)对比文件

Amphiphilic MUC1 Glycopeptide Antigens.

CN 1374875 A,2002.10.16,

《European Journal of Organic Chemistry》

WO 2007080114 A2,2007.07.19,

.2011,第21-22卷

WO 2010089129 A1,2010.08.12,

审查员 陆悠玲

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

多肽、蛋白质PEG修饰剂合成方法

(57)摘要

本发明公开了多肽、蛋白质PEG修饰剂的合成路线和操作方法,PEG修饰剂一是用在多肽方面,二是用于药物结构修饰,该方法原料便宜,且能明确聚乙二醇的数量。

1. R-NH-PEG-CH₂CH₂COOH的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:以二甘醇胺为起始原料,使用保护基R₁对二甘醇胺的氨基进行保护,得到中间体2R₁-NH-DEG,其结构为HOCH₂CH₂OCH₂CH₂NHR₁,中间体2与甲基磺酰氯反应得到中间体3R₁-NH-DEG-MS,其结构为MSOCH₂CH₂OCH₂CH₂NHR₁;取乙二醇或三甘醇或四甘醇在催化条件下与中间体3反应得到中间体4R₁-NH-PEG,其结构为HO[CH₂CH₂O]_nCH₂CH₂OCH₂CH₂NHR₁,R₁-NH-PEG在催化剂的催化下与溴丙酸反应得到R₁-NH-PEG-CH₂CH₂COOH,其结构为R₁-NH-[CH₂CH₂O]_{n+2}CH₂CH₂COOH,再脱保护基,与二碳酸二叔丁酯,芴甲氧羰酰琥珀酰亚胺,苯甲氧羰酰琥珀酰亚胺在碱水条件下反应得R-NH-PEG-CH₂CH₂COOH,其结构为R-NH-[CH₂CH₂O]_{n+2}CH₂CH₂COOH;

其中,R代表芴甲氧羰酰、叔丁氧羰基或甲酸苄酯基;R₁为叔丁氧羰基或甲酸苄酯基;“n”的数值取决于乙二醇、三甘醇或四甘醇中乙氧基的个数。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,R₁-NH-DEG-MS与乙二醇或三甘醇或四甘醇反应所用到的催化剂为:金属钠、钠氢、叔丁醇钾、叔丁醇钠。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,R₁-NH-DEG-MS与乙二醇或三甘醇或四甘醇的投料比例为:1:1-1:10。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,R₁-NH-PEG在催化下与溴丙酸反应得到R₁-NH-PEG-CH₂CH₂COOH所用到的催化剂为:金属钠、氢化钠、氢化钾、叔丁醇钾、叔丁醇钠。

多肽、蛋白质PEG修饰剂合成方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,为多肽药物的间隔剂,提高多肽药物的溶解性。多肽和蛋白经PEG修饰后可以降低它们的免疫原性;保护由RES系统吸收的中间体;阻止蛋白水解酶的识别和降解;并且能增加多肽的表面积,因此降低肾脏的过滤,改变生物分布,具体涉及到R-NH-PEGn-OH合成路线和精致方法。

技术背景

[0002] PEG修饰技术从70年代已经开始,起初是对蛋白模型的任一位置进行氨基的PEG修饰,目前FDA已经批准22种经PEG化的药物上市,且还有多个品种处于临床研究阶段,这些年已经提出了许多PEG修饰方法,最近研究比较热门的是修饰位点的选择,第二代PEG修饰剂多为一端是氨基,另外一端是羧基的非天然氨基酸。目前我国处于三期临床阶段第四代长效抗艾新药艾拉博特(专利ZL03816434.5),就在多肽的药物的某个氨基酸通过Fmoc-NH-PEG2-OH与马来酰亚胺丙酸耦合与gp41肽片断和修饰。表一:

[0003] 表1gp41肽片断和修饰的类似物

[0004]

Ac-SLEQIWNMT WEEWDREINN YTELIHELIE ESQNGQEKNE QELL-NH2 FB005	(SBQ ID NO:1)
Ac-WEEWDREINN YTKLIHELIE ESQNGQEKNE QELL-NH2 FB006	(SBQ ID NO:2)
Ac-WEEWDREINN YTKLIHELIE ESQNGQEENE QELL-NH2 FB066	(SBQ ID NO:7)
Ac-WQE WEQKITALLE QAGIQQEKNE YELQKLDKWA SLWFW-NH2 T-1249	(SBQ ID NO:3)
Ac-YTSLIHSLIE ESQNGQEKNE QELLELDKWA SLWFW-NH2 T-20	(SBQ ID NO:4)
Ac-WMEWDREINN YTSLIHSLIE ESQNGQEKNE QELL-NH2 C-34	(SBQ ID NO:5)

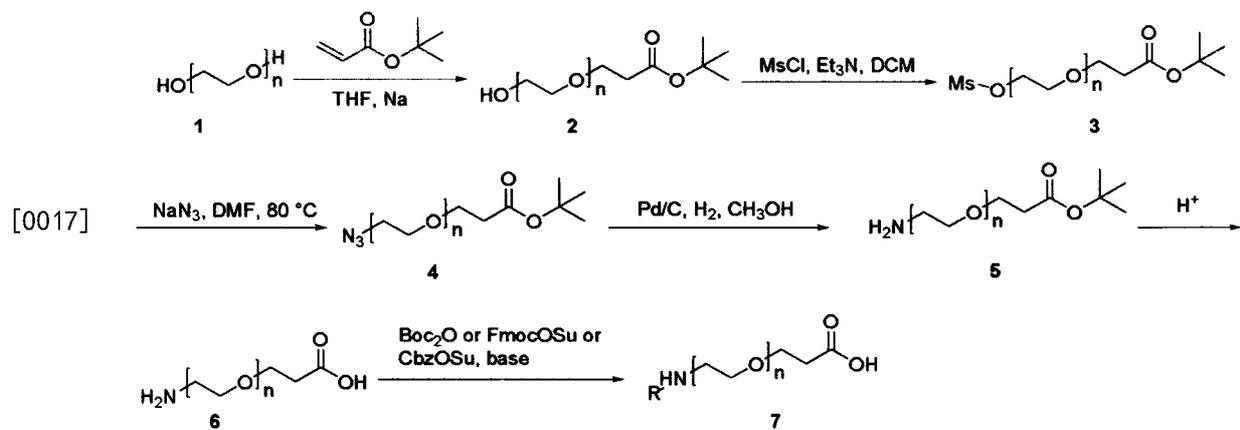
[0012] 本发明以廉价的二甘醇胺(简称DEG)为起始原料,对氨基进行保护,所用到的保护剂有(Boc₂O or Cbz-OSu),得到中间体2R₁-二甘醇胺(以下简称R₁-DEG),R₁-DEG与甲基磺酰氯反应得到中间体3R₁-NH-DEG-MS;取乙二醇或三甘醇或四甘醇在钠氢的催化条件下与中间体3反应得到中间体4R₁-NH-PEGn(“n”的数值取决于您最终产品PEG的个数),R₁-NH-PEGn在钠氢的催化下与溴乙酸或者溴丙酸反应得到R₁-NH-PEG-CH₂COOH或R₁-PEG-CH₂CH₂COOH。再脱保护基,与Boc₂O \ Fmoc-OSU \ Cbz-OSU在碱水条件下反应得R-NH-PEG-CH₂CH₂COOH见路线二

[0013] 关于此类化合物近年来的研究很多,如Hoffmann-Roeder[European Journal of Organic Chemistry;nb.20-21;(2011);p.3878-38871]以及ARDELYX,INC.[W02012/6474]都有类似化合物的合成报道,均是由以PEGn做原料,“n”代表乙二醇的数量,在金属钠的催化作用下与丙烯酸叔丁酯反应,得到PEG-CH₂COOTBU,接着将底物上另一醇羟基做成甲磺酸酯或对甲苯磺酸酯,再与叠氮钠在DMF中加热反应上叠氮基,经氢化,水解后上相应的保护基得产品。由于其采用的试剂叠氮钠剧毒且易爆,属于高危险品,使得此方法在大规模生产上的应用受限。

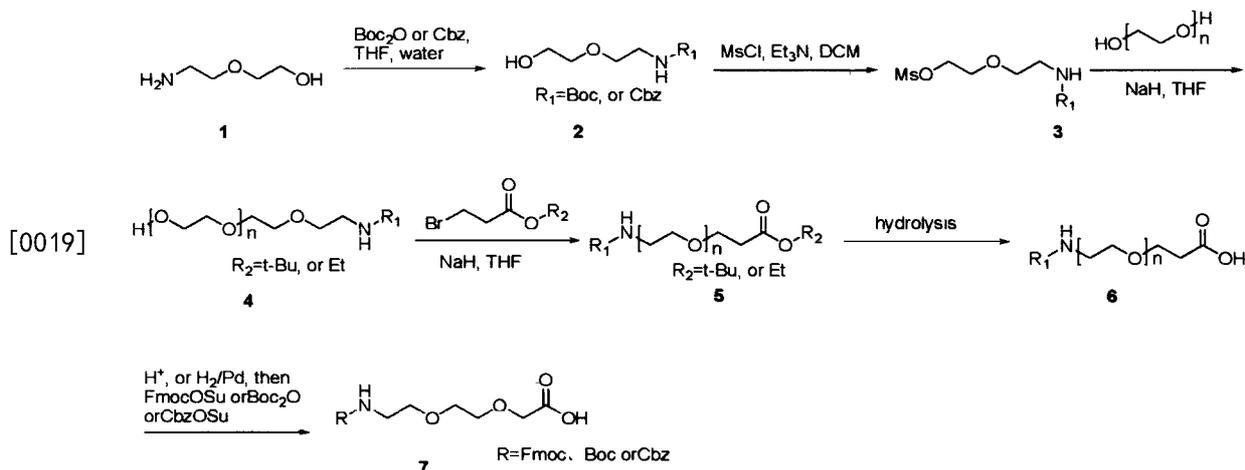
[0014] 相对于路线一,我们改用二甘醇胺为起始原料,先上Boc保护氨基,进而成甲磺酸酯在钠氢作用下与多聚乙醇反应,增加乙二醇链单元,然后与溴丙酸作用,再水解,脱保护,上各种保护基得相应产品。

[0015] 此路线完全避开了路线一的不足,采用更为安全,环保的试剂,后处理方便,适合工业化生产。

[0016] 路线一、



[0018] 路线二:



具体实施方案

[0020] 实施例1

[0021] 第一步称取二甘醇胺 (105.1g, 1.0mol) 于1L水中, 加入100毫升四氢呋喃, 在搅拌条件下, 缓慢滴加二碳酸二叔丁酯 (196.2g, 0.9mol), 反应8小时后, TLC确定反应完毕 (展开剂石油醚: 乙酸乙酯=1:1), 用乙酸乙酯萃取萃取2次, 干燥乙酸乙酯层, 减压回收后得Boc-DEG170.8g (收率为85%);

[0022] 第二步取Boc-DEG (102.5g 0.5mol) 于1L三口瓶中, 加入1.5倍量三乙胺 (75.7g, 0.75mol) 和500毫升二氯甲烷, 降温至 -5° , 缓慢滴加甲基磺酰氯 (68.4g, 0.6mol), 控制反应温度为 0° 左右, 滴加完毕, 室温反应3小时, 用水洗涤2次反应液, 干燥二氯甲烷层, 减压回收得Boc-DEG-MS134克 (收率为95%)。

[0023] 第三步称取乙二醇 (93g 1.5mol) 于三口瓶中, 加入500ml干燥的四氢呋喃, 冷却至 0° 以下, 少量多次加入钠氢 (24克, 1mol), 反应1小时后, 冷却至 -5° , 缓慢滴加Boc-DEG-MS (141.2g 0.5mol), 滴加完成后于 50° 加热反应24小时, TLC确定反应完毕 (展开剂石油醚: 乙酸乙酯=1:1), 加入1L水, 用乙酸乙酯萃取2次, 合并乙酸乙酯层, 干燥, 减压回收得BOC-NH-PEG389.6g (收率为72%)。

[0024] 第四步称取钠氢 (7.2g 0.3mol) 于三口瓶中, 加入200毫升四氢呋喃, 冷却至 0° 以下, 缓慢滴加BOC-NH-PEG3 (24.9g 0.1mol), 控制反应温度为 0° 左右。1小时后, 继续降温至 -5° , 缓慢滴加3-溴代丙酸 (15.3克, 0.1mol) 控制反应问在 0° 以下, 滴加完毕后室温反应24小时, 用稀盐酸调PH值为3-4, 乙酸乙酯萃取三次, 合并萃取液干燥, 减压回收得Boc-NH-PEG3-CH₂CH₂COOH (20.2g收率63%)。

[0025] 第五步将Boc-NH-PEG3-CH₂CH₂COOH (6.42g, 0.020mol) 溶于50mL四氢呋喃中, 慢慢加入2mol/L的盐酸溶液 (20mL), 再于室温下搅拌过夜。次日, 加入50mL乙酸乙酯, 分相, 再用乙酸乙酯萃洗水相一次, 水相蒸干得NH₂PEG3-CH₂CH₂COOH的盐酸盐粗品, 再经乙酸乙酯结晶得浅黄色晶体 (3.35g, Yield: 65%)

[0026] 第六步将NH₂PEG3-CH₂CH₂COOH.HCL (33.5g, 0.13mol) 溶于80mL四氢呋喃和120mL水中, 加入NaHCO₃ (27.3g, 0.33mol), 于室温搅拌20分钟后, 冷至 0°C , 分批加入Fmoc-OSu (43.9g, 0.13mol)。加毕后于室温下搅拌过夜, 次日分相, 用乙酸乙酯萃洗水相一次。水相用1mol/L的盐酸酸化至pH=3, 再用乙酸乙酯萃取三次, 合并有机相, 用饱和食盐水洗两次, 干

干燥Fmoc-NH-PEG3-CH₂CH₂COOH粗品(46.04克收率80%),将粗品20克在加热条件下用50毫升乙酸乙酯溶解,冷却后自然结晶,抽滤得固体16克,收率为80%,HPLC检测含量为99.1%。

[0027] 实施例2

[0028] 称取二甘醇(159g1.5mol)于三口瓶中,加入500ml干燥的四氢呋喃,冷却至0°以下,少量多次加入钠氢(24克,1mol),反应1小时后,冷却至-5°,缓慢滴加Boc-DEG-MS(141.5g0.5mol),滴加完成后于50°加热反应24小时,TLC确定反应完毕(展开剂石油醚:乙酸乙酯=1:1),加入1L水,用乙酸乙酯萃取2次,合并乙酸乙酯层,干燥,减压回收得Boc-NH-PEG4105g(收率为72%)

[0029] 称取钠氢(7.2g0.3mol)于三口瓶中,加入200毫升四氢呋喃,冷却至0°以下,缓慢滴加Boc-NH-PEG4(29.3g0.1mol),控制反应温度为0°左右。1小时后,继续降温至-5°,缓慢滴加3-溴代丙酸(15.3克,0.1mol)控制反应在0°以下,滴加完毕后室温反应24小时,用稀盐酸调PH值为3-4,乙酸乙酯萃取三次,合并萃取液干燥,减压回收得Boc-NH-PEG4-CH₂CH₂COOH(23g收率63%)。

[0030] 将Boc-NH-PEG4-CH₂CH₂COOH(7.3g,0.020mol)溶于50mL四氢呋喃中,慢慢加入2mol/L的盐酸溶液(20mL),再于室温下搅拌过夜。次日,加入50mL乙酸乙酯,分相,再用乙酸乙酯萃洗水相一次,水相蒸干得NH₂PEG4-CH₂CH₂COOH的盐酸盐粗品,再经乙酸乙酯结晶得浅黄色晶体(3.92g,Yield:65%)

[0031] 将NH₂PEG4-CH₂CH₂COOH.HCL(39.2g,0.13mol)溶于80mL四氢呋喃和120mL水中,加入NaHCO₃(27.3g,0.33mol),于室温搅拌20分钟后,冷至0°C,分批加入Fmoc-OSu(43.9g,0.13mol)。加毕后于室温下搅拌过夜,次日分相,用乙酸乙酯萃洗水相一次。水相用1mol/L的盐酸酸化至pH=3,再用乙酸乙酯萃取三次,合并有机相,用饱和食盐水洗两次,干燥蒸干Fmoc-PEG4-CH₂CH₂COOH粗品(50.64克收率80%),将粗品20克在加热条件下用50毫升乙酸乙酯溶解,冷却后自然结晶,抽滤得固体16克,收率为80%,HPLC检测含量为99.1%。