



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201915009 A

(43) 公開日：中華民國 108 (2019) 年 04 月 16 日

(21) 申請案號：106134261

(22) 申請日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 03 日

(51) Int. Cl.:

C07K1/06 (2006.01)

C07K1/12 (2006.01)

C07K7/06 (2006.01)

(71) 申請人：中化合成生技股份有限公司 (中華民國) CHUNGHWA CHEMICAL SYNTHESIS &amp; BIOTECH CO. LTD. (TW)

新北市樹林區東興街 1 號

(72) 發明人：李光宗 LEE, KWANG CHUNG (TW)；謝光展 HSIEH, KUANG CHAN (TW)；鄭惠文 CHENG, HUI WEN (TW)；高嘉穗 KAO, CHIA SUI (TW)；黃雅玲 HUANG, YA LING (TW)；王威斯 WANG, WEI SSU (TW)

(74) 代理人：陳豫宛

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：12 項 圖式數：1 共 24 頁

(54) 名稱

合成依特卡肽 (Etelcalcetide) 或其鹽類之方法

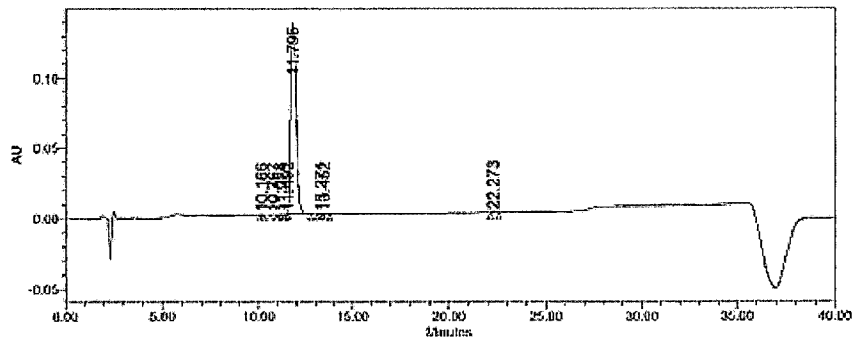
METHOD FOR SYNTHESIZING ETELCALCETIDE OR SALTS THEREOF

(57) 摘要

本發明提供一種合成依特卡肽(Etelcalcetide)或其鹽類之方法，其步驟包括：(a)以 Fmoc 固相合成法，由末端具有胺基的固相支持物為合成起點，依序合成式(I)中之 D 構型胺基酸，並移除 Fmoc 保護基後，形成一 C 端與該固相支持物之胺基結合、並於 N 端乙醯(acetyl, Ac)化且 D-Cys 及 D-Arg 具有側鏈保護基之片段 A；(b)移除該片段 A 中該 D-Cys 的側鏈保護基，形成片段 B；(c)加入(保護基)-L-Cys(保護基)-OH 與該片段 B 形成雙硫鍵，形成片段 C；(d)於該片段 C 中加入裂解液，得到依特卡肽。本發明之合成依特卡肽或其鹽類之方法可縮短製備依特卡肽之製程步驟及時間，提供了高產率與高純度的合成方法。

The present invention provides a method for synthesizing Etelcalcetide or salts thereof, comprising the step of: (a) sequential synthesizing the D-amino acids of formula (I) with a solid support having an amino group at its terminal as a starting point by Fmoc solid phase synthesis so as to form a fragment A with a C-terminal bonded to the amino group of the solid support, a N-terminal acetylated, and D-Cys and D-Arg having a side chain protecting group (pg) after removing the Fmoc protecting group; (b) removing the side chain protecting group of the D-Cys of the fragment A to form fragment B; (c) adding a fragment (pg)-L-Cys(pg)-OH to form a disulfide bond with the fragment B so as to form a fragment C; (d) adding lysis solution in the fragment C to obtain Etelcalcetide. The present invention of the method for synthesizing Etelcalcetide or salts thereof can shorten the steps and the time of a process for preparing Etelcalcetide, and provide a high yield and high purity method for producing Etelcalcetide.

指定代表圖：



通道：ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A；處理通道：ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm；結果儀器偵測：

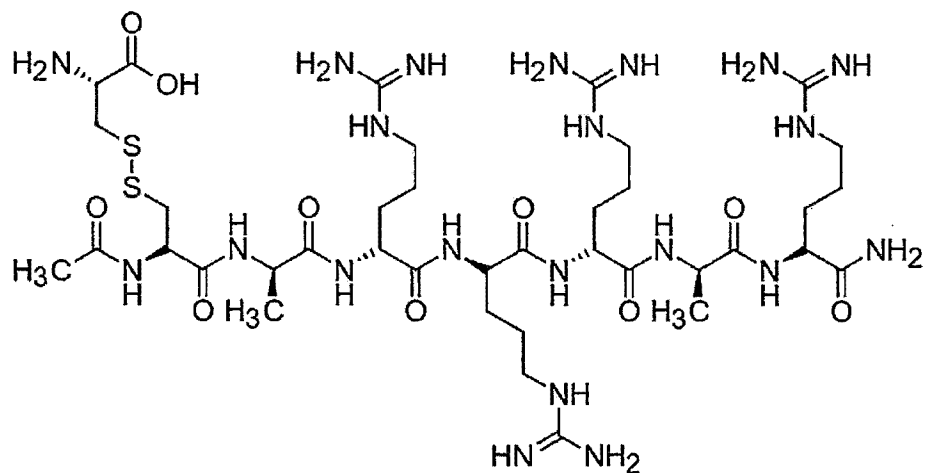
1407；處理方法：amg416

處理通道描述：ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm

	處理通道描述	滯留時間(RT)	面積	%面積
1	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	10.166	100	0.00
2	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	10.767	483	0.02
3	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	11.098	268	0.01
4	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	11.224	253	0.01
5	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	11.492	215	0.01
6	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	11.795	2757386	99.84
7	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	13.271	426	0.02
8	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	13.452	656	0.02
9	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	22.273	2119	0.08

圖 1

特徵化學式：



# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

合成依特卡肽 (Etelcalcetide) 或其鹽類之方法 / METHOD FOR SYNTHESIZING ETELCALCETIDE OR SALTS THEREOF

## 【技術領域】

【0001】 本發明係關於合成一種胜肽化合物的方法，尤其是指合成一種作為鈣離子感受受體抑制劑之依特卡肽(Etelcalcetide)之方法。

## 【先前技術】

【0002】 洗腎患者因為腎功能不全，導致體內血鈣濃度降低、血磷升高以及活性維生素D3缺乏，進而刺激副甲狀腺製造與分泌副甲狀腺素(PTH)來平衡體內鈣磷。但是伴隨著慢性腎臟病的逐步惡化，患者體內血磷濃度升高、血鈣濃度降低以及活性維生素D3缺乏的情況會越來越嚴重，這樣的情況將使得副甲狀腺體不斷受到刺激來製造與分泌PTH，最後便會導致次發性副甲狀腺機能亢進症(secondary hyperparathyroidism，SHPT)的發生。

【0003】 人體主要透過PTH、維生素D 及抑鈣素(calcitonin)的調節以維持血鈣的恆定：當人體血鈣濃度過低時，副甲狀腺分泌PTH，促使骨骼釋放出鈣，並增進腎臟對於鈣的再吸收；同時也刺激腎臟活化維生素D，以增進小腸對鈣的吸收。然而當血鈣濃度太高時，甲狀腺則會分泌抑鈣素促進血液中過多的鈣儲存於骨骼。

【0004】 腎臟病患者體內排出磷酸的能力下降，相對地，鈣離子濃度下降，則啟動副甲狀腺上的鈣離子感受受體(calcium-sensing receptor，CaSR)並分泌PTH，使得維他命D3代謝且促進小腸內的鈣離子吸收，讓血液中鈣

離子濃度增加，最後抑制了CaSR。另外啟動副甲狀腺上的CaSR並分泌PTH，其促進骨頭生長，骨頭生理代謝釋放了鈣離子，同樣地抑制CaSR。

**【0005】** 依特卡肽(Etelcalcetide)和西那卡塞(cinacalcet)一樣是針對CaSR的抑制劑，雖然依特卡肽的EC<sub>50</sub>為25000 nM，與cinacalcet相差1000倍左右，但是依特卡肽不與細胞色素P450(CYP450)家族作用，即不會在首渡代謝上被消耗，因此，依特卡肽(Etelcalcetide)每日所需劑量介於2.5至10毫克，低於cinacalcet的每日劑量30毫克。

### **【發明內容】**

**【0006】** 目前合成多肽的方法主要有液相合成法和固相合成法，在液相肽合成中，每次接肽後都需要對產物分離純化或結晶以便除去未反應的原料和副產物，這個步驟相當費時間而且麻煩，因操作帶來的損失往往也很大。再者，習知製備依特卡肽的方法需經多次純化步驟，製備流程繁瑣、製備時間長、製備成本高，且最後獲得之依特卡特其純度與產率較低。

**【0007】** 有鑑於此，本發明提供一種合成依特卡肽或其鹽類之方法，以固相肽合成法進行線性肽的製備，獲得高純度與產率的合成依特卡肽或其鹽類之方法。

**【0008】** 本發明之主要目的係在於提供一種合成依特卡肽(Etelcalcetide)(如下式(I))或其鹽類之方法，其步驟包括：

**【0009】** (a)以Fmoc固相合成法，由末端具有胺基的固相支持物為合成起點，依序合成式(I)中之D構型胺基酸，並移除Fmoc保護基後，形成一C端與該固相支持物之胺基結合、並於N端乙醯(acetyl, Ac)化且D-Cys及D-Arg具有側鏈保護基之片段A：

Ac-D-Cys(保護基)-D-Ala-D-Arg(保護基)-D-Arg(保護基)-Arg-(保護基)-D-Ala-D-Arg(保護基)-固相支持物；

【0010】 (b)移除該片段A中該D-Cys的側鏈保護基，形成片段B：

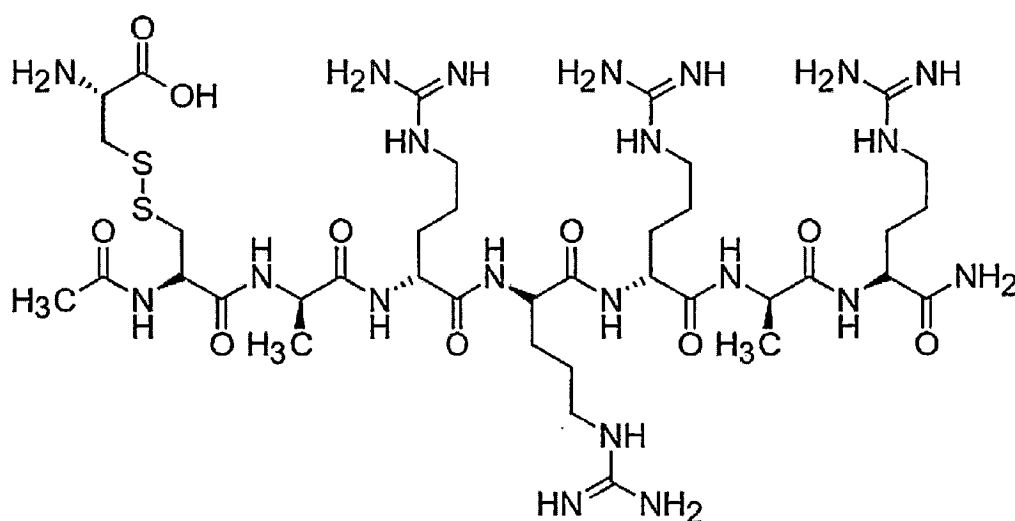
Ac-D-Cys-D-Ala-D-Arg(保護基)-D-Arg(保護基)-Arg-(保護基)-D-Ala-D-Arg(保護基)-固相支持物；

【0011】 (c)加入(保護基)-L-Cys(保護基)-OH與該片段B形成雙硫鍵，形成片段C：

Ac-D-Cys-D-Ala-D-Arg(保護基)-D-Arg(保護基)-Arg-(保護基)-D-Ala-D-Arg(保護基)-固相支持物  
 (保護基)-L-Cys-OH

【0012】 (d)於該片段C中加入裂解液，得到依特卡肽；

式(I)：



【0013】 於一較佳實施例中，該固相支持物係選自由雷克醯胺樹脂(Rink amide resin)、雷克醯胺胺甲基樹脂(Rink amide AM resin)、雷克醯胺4-甲苯氫胺樹脂(Rink amide MBHA resin)、王樹脂(Wang Resin)及2-氯三苯基氯樹脂(2-Chlorotrityl chloride Resin)所組成之群組，且該樹脂之胺基含量為0.1-1.5 mmol/g。

【0014】 於一較佳實施例中，該D-Cys上之側鏈保護基為4-甲基-三苯

甲基(Mtt)，該D-Arg上之側鏈保護基為五甲基二氫苯并呋喃磺醯基(Pbf)。

【0015】 於一較佳實施例中，該步驟(a) 添加四氟硼酸O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎗(TBTU)、N,N'-二異丙基羰二亞胺(DIC)、1-羥基苯並三唑(HOBT)、六氟磷酸O-(苯並三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎗(HBTU)、六氟磷酸O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎗(HCTU)、六氟磷酸(苯并三唑-1-基氧基)三(N-吡咯啉基)鎘(PyBOP)或六氟磷酸(苯並三唑-1-基-氧基)三(二甲基胺基)-鎘(BOP)做為耦合試劑。

【0016】 於一較佳實施例中，該步驟(a) 進一步添加選自由二甲基甲醯胺(dimethylformamide, DMF)、N-甲基吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone, NMP)、二異丙基乙胺(diisopropylethylamine, DIPEA)、N-甲基嗎啡啉(N-methylmorpholine, NMM)、三乙胺(triethylamine, TEA)、吡啶(pyridine)及其組合所組成之群組之鹼性溶液。

【0017】 於一較佳實施例中，該步驟(a)以一去保護溶液移除該Fmoc保護基，該去保護溶液係為哌啶(piperidine)、二乙胺(diethylamine, DEA) 或嗎啡啉(morpholine)等，並以二甲基甲醯胺(dimethylformamide, DMF)、N-甲基吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone, NMP) 或二甲亞砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)稀釋，濃度範圍為5至30%。

【0018】 於一較佳實施例中，該步驟(a)之N端乙醯化係以乙酸酐(acetic anhydride, Ac<sub>2</sub>O)或氯化乙醯(acetyl chloride)進行，該乙醯化之當量數為1至500，並一同加入當量數為1至500的吡啶(pyridine)。

【0019】 於一較佳實施例中，該步驟(b)係添加一酸性溶液以移除該D-Cys的側鏈保護基，且該酸性溶液係包含有三氟醋酸(trifluoroacetate,

TFA)、苯基甲基硫醚(thioanisole)、三異丙基矽烷(triisopropylsilane, TIPS)及二氯甲烷。

**【0020】** 於一較佳實施例中，該步驟(c)係添加選自由以二異丙基乙胺(Diisopropylethylamine, DIPEA)、N-甲基嗎啡啉(N-methylmorpholine, NMM)或三乙胺(triethylamine, TEA)所組成之群組，溶劑為二甲基甲醯胺(dimethylformamide, DMF)或N-甲基吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone, NMP)。

**【0021】** 於一較佳實施例中，該L-Cys上之末端保護基為第三丁氧羰基(Boc)，該L-Cys上之側鏈保護基為3-硝基-2-吡啶亞氧硫基(Npys)，該L-Cys當量數為1至50。

**【0022】** 於一較佳實施例中，該步驟(d)之裂解液係包含有三異丙基矽烷(TIPS)、苯基甲基硫醚(thioanisole)、三氟醋酸(trifluoroacetate, TFA)及水。

**【0023】** 於一較佳實施例中，該依特卡肽進一步加入pH 0.5至2的鹽酸(HCl)溶液中，濃度為0.5-66 mg/mL，之後進行冷凍乾燥，得到依特卡肽鹽酸鹽。

**【0024】** 本發明之合成依特卡肽或其鹽類之方法可縮短製備依特卡肽之製程步驟及時間，因此能提高製程效率，同時也為高產率與高純度的合成方法，適用作為鈣離子感受受體抑制劑，以對抗次發性副甲狀腺機能亢進症，為依特卡肽原料藥及製劑的生產和質量研究提供了保障。

#### **【圖式簡單說明】**

**【0025】** 圖1係本發明一較佳實施態樣之依特卡肽鹽酸鹽

(Etelcalcetide HCl)之高效液相層析(HPLC)圖譜。

### 【實施方式】

【0026】 有關本發明之詳細說明及技術內容，現就配合圖式說明如下。再者，本發明中之圖式，為說明方便，其比例未必照實際比例繪製，該等圖式及其比例並非用以限制本發明之範圍，在此先行敘明。

【0027】 本文中所稱之「包含或包括」意指不排除一或多個其他組件、步驟、操作和/或元素的存在或添加至所述之組件、步驟、操作和/或元素。「約或接近」或「基本上」意指具有接近於允許指定誤差的數值或範圍，以避免被任何不合理之第三方，違法或不公平的使用為理解本發明揭示之精確或絕對數值。「一」意指該物的語法對象為一或一個以上(即，至少為一)。

【0028】 本發明提供一種合成依特卡肽(Etelcalcetide)(如下式(I))或其鹽類之方法，其步驟包括：(a)以Fmoc固相合成法，由末端具有胺基的固相支持物為合成起點，依序合成式(I)中之D構型胺基酸，並移除Fmoc保護基後，形成一C端與該固相支持物之胺基結合、並於N端乙醯(acetyl, Ac)化且D-Cys及D-Arg具有側鏈保護基之片段A：

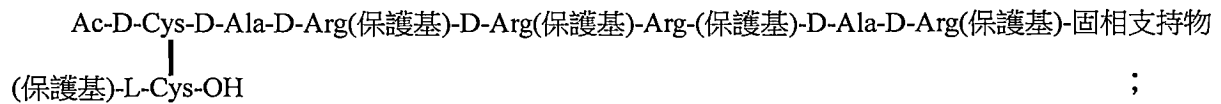
Ac-D-Cys(保護基)-D-Ala-D-Arg(保護基)-D-Arg(保護基)-Arg-(保護基)-D-Ala-D-Arg(保護基)-固相支持物；

(b)移除該片段A中該D-Cys的側鏈保護基，形成片段B：

Ac-D-Cys-D-Ala-D-Arg(保護基)-D-Arg(保護基)-Arg-(保護基)-D-Ala-D-Arg(保護基)-固相支持物；

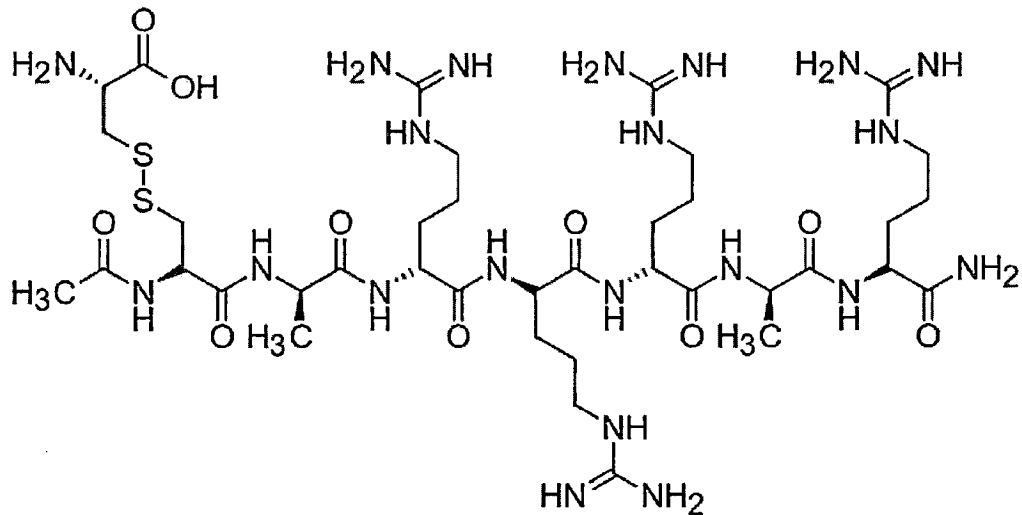
(c)加入(保護基)-L-Cys(保護基)-OH與該片段B形成雙硫鍵，形成片段

C：



(d)於該片段C中加入裂解液，得到依特卡肽；

式(I)：



【0029】 本文所述之「依特卡肽(Etelcalcetide)」係一種擬鈣劑、鈣離子感受受體抑制劑，具有七個D構型胺基酸，並由雙硫鍵連結一個L構型半胱胺酸其具有如上式(I)之結構。

【0030】 本文所述之「固相(多肽)合成法」係指一種多肽和蛋白質的有機合成方法，其利用多孔性且不溶的固體作為支持物使多肽與其連接，之後經溶劑將多肽切斷，該方法可以使多肽固定在固相支持物上並在過濾時被保留下來，而副產物及溶劑則被濾出。本發明採用固相合成法中之芴甲氧羰基化學法(Fmoc chemistry)，是使用芴甲氧羰基(9-fluorenylmethoxycarbonyl group, Fmoc group)作為欲合成目標胺基酸之N端(N-terminal，即胺端)暫時的保護基團，而該Fmoc基團會被二級胺如哌啶(piperidine)所裂解。此策略最大特點是不必純化中間產物，合成過程可連續

進行，也就是先行將欲合成目標短肽之C端(C-terminal，即碳端)胺基酸的羧基以共價鍵形式與一個不溶性的固相支持物相連，然後以這一胺基酸的N端(N-terminal)作為短肽合成的起點，與其他的胺基酸已活化的羧基作用形成肽鍵，不斷重複此一過程，即可得到欲合成之短肽。

**【0031】** 本文所述之「固相支持物」係用於固相合成多肽的高分子載體，通常該固相支持物係不溶性固體且具有多孔性，該固相支持物之非限制性實例包括樹脂或其它高分子物質。於固相合成中常規使用的樹脂載體主要有三類，分別為聚苯乙烯-苯二乙烯交聯樹脂、聚丙烯醯胺、聚乙烯-乙二醇類樹脂及其衍生物，該些樹脂需導入反應基團才能直接連接胺基酸，而根據反應基團的不同，可分為氯甲基樹脂、羧基樹脂、胺基樹脂或醯肼型樹脂。於一實施態樣中，本發明可選擇使用例如但不限於：雷克醯胺樹脂(Rink amide resin)、雷克醯胺胺甲基樹脂(Rink amide AM resin)、雷克醯胺4-甲苯氫胺樹脂(Rink amide MBHA resin)、雷克醯胺聚(丙烯酸醯基-雙(氨丙基)聚乙二醇)樹脂(Rink-Amide-PEGA Resin)、王樹脂(Wang Resin)、2-氯三苯基氯樹脂(2-Chlorotrityl chloride Resin)及其相似物及衍生物；較佳使用雷克醯胺樹脂(Rink amide resin)及雷克醯胺胺甲基樹脂(Rink amide AM resin)。該固相支持物可於末端進行官能化，於一實施態樣中，該固相支持物之末端係進行胺基官能化；於一較佳實施態樣中，該固相支持物之末端係進行胺基官能化，且該胺基含量為0.1-1.5 mmol/g，例如但不限於：0.1 mmol/g、0.3 mmol/g、0.5 mmol/g、0.7 mmol/g、1.0 mmol/g、1.3 mmol/g、1.5 mmol/g。

**【0032】** 本文所述之「耦合/偶合試劑」係指用於固相多肽合成中產

生耦合(或稱縮合、耦聯/偶聯)反應之試劑。於一實施態樣中，本發明之耦合試劑例如但不限於：碳二亞胺型，例如：N,N'-二環己基碳二亞胺(DCC)、N,N'-二異丙基碳二亞胺(DIC)、1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽(EDC)、1-羥基苯並三唑(HOBT)或其水合物存在下之碳二亞胺型試劑等；磷離子型，例如：六氟磷酸(苯並三唑-1-基-氧基)三(二甲基胺基)-磷(BOP)、六氟磷酸(苯并三唑-1-基氧基)三(N-吡咯啉基)磷(PyBOP)、六氟磷酸(7-氮雜苯並三唑-1-基氧基)-三-(N-吡咯啉基)磷(PyAOP)、六氟磷酸溴三(N-吡咯啉基)磷(PyBrOP)及氯化雙(2-側氧基-3-噁唑啉基)磷(BOP-Cl)等；脲鎗型，例如：四氟硼酸O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎗(TBTU)、六氟磷酸O-(苯並三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎗(HBTU)及六氟磷酸O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎗(HCTU)等；；前述耦合試劑還可選擇性的與次要耦合試劑組合，該次要耦合試劑例如但不限於：N-羥基琥珀酸醯亞胺(HOSu)、1-羥基苯並三唑(HOBT)、1-羥基-7-氮雜苯並三唑(HOAt)、3,4-二氫-3-羥基-4-側氧-1,2,3-苯并三唑(HOObt)、N-羥基琥珀酸醯亞胺(NHS)、1-羥基-7-氮雜苯并三唑(HAt)或N-羥基硫琥珀酸醯亞胺(硫NHS)等。於一較佳實施態樣中，本發明於該步驟(a)中添加TBTU、DIC、HOBT、HBTU、HCTU、PyBOP或BOP作為耦合試劑。

**【0033】** 本文所述之「鹼性溶液」係指用於固相多肽合成中產生鹼性環境的試劑。於一較佳實施態樣中，本發明該步驟(a)進一步添加選自由二甲基甲醯胺(dimethylformamide, DMF)、N-甲基吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone, NMP)、二異丙基乙胺(diisopropylethylamine, DIPEA)、N-甲基嗎啡啉(N-methylmorpholine, NMM)、三乙胺(triethylamine,

TEA)及其組合所組成之群組之鹼性溶液，但本發明不限於此等。於一更佳實施態樣中，本發明該步驟(a)係使用DIPEA/NMP作為鹼性溶液。

**【0034】** 本發明該步驟(c)中使用之鹼性溶液，於一較佳實施態樣中，係添加選自由以二異丙基乙胺(Diisopropylethylamine, DIPEA)、N-甲基嗎啡啉(N-methylmorpholine, NMM)或三乙胺(triethylamine, TEA)所組成之群組，溶劑為二甲基甲醯胺(dimethylformamide, DMF)或N-甲基吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone, NMP)，但本發明不限於此等。於一更佳實施態樣中，本發明該步驟(c)係使用TEA/NMP作為鹼性溶液。

**【0035】** 本文所述之「去保護溶液」係指於固相多肽合成中使保護基脫離的試劑。於一較佳實施態樣中，本發明該步驟(a)以一去保護溶液移除該Fmoc保護基，該去保護溶液例如但不限於：哌啶(piperidine)、二乙胺(diethylamine, DEA)或嗎啡啉(morpholine)等；溶劑例如但不限於：二甲基甲醯胺(dimethylformamide, DMF)、N-甲基吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone, NMP)或二甲亞砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)。於一更佳實施態樣中，本發明該步驟(a)以一去保護溶液移除該Fmoc保護基，該去保護溶液為piperidine/NMP。於一較佳實施態樣中，本發明該去保護溶液之濃度範圍為5至30%，例如5%、7%、10%、13%、15%、17%、20%、23%、25%、27%或30%等。於一更佳實施態樣中，該去保護溶液係piperidine/NMP，濃度為20%。

**【0036】** 本文所述之「乙醯化」係指於固相多肽合成中，使一結構加入乙醯官能基。於一較佳實施態樣中，本發明該步驟(a)之N端乙醯化係以乙醯酐(acetic anhydride)或氯化乙醯(acetyl chloride)進行，該乙醯化之當量數為

1至500，例如：1、5、10、50、100、150、200、250、300、350、400、450或500當量數。

**【0037】** 本文所述之「酸性溶液」係指用於固相多肽合成中產生酸性環境的試劑。於一較佳實施態樣中，本發明該步驟(b)係添加一酸性溶液以移除該D-Cys的側鏈保護基，且該酸性溶液係包含三氟醋酸(trifluoroacetate, TFA)、苯基甲基硫醚(thioanisole)及三異丙基矽烷(triisopropylsilane, TIPS)。於另一較佳實施態樣中，該酸性溶液係包含1-15%之三氟醋酸(trifluoroacetate, TFA)，例如：1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%或15%；1-10%之苯基甲基硫醚(thioanisole)，例如：1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%；及1-15%之三異丙基矽烷(triisopropylsilane, TIPS)，例如：1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%或15%。於一更佳實施例中，本發明該步驟(b)係添加3：10：2.5：84.5(體積比)之TFA/TIPS/thioanisole/DCM作為酸性溶液以移除該D-Cys的側鏈保護基。

**【0038】** 本文所述之「裂解液」係指於固相多肽合成中使該多肽脫離保護基或該固相支持物之試劑。於一實施例中，該裂解液可以係包含三異丙基矽烷(TIPS)、1,2-乙二硫醇(EDT)、苯基甲基硫醚(thioanisole)及/或三氟醋酸(trifluoroacetate, TFA)之溶液。於一較佳實施例中，該裂解液係包含有三異丙基矽烷(TIPS)、苯基甲基硫醚(thioanisole)及三氟醋酸(trifluoroacetate, TFA)。於另一較佳實施例中，該裂解液係包含有1-15%三異丙基矽烷(TIPS)、1-10%苯基甲基硫醚(thioanisole)及75-99%三氟醋酸(trifluoroacetate, TFA)；其中該TIPS濃度例如為1%、2%、3%、4%、5%、

6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%或15%；該thioanisole濃度例如為1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%；該TFA濃度例如為75%、77%、79%、81%、83%、85%、87%、89%、91%、93%、95%、97%或99%。於一更佳實施例中，該裂解液係TFA/TIPS/thioanisole/H<sub>2</sub>O，且體積比例為85：10：2.5：2.5。

**【0039】** 本文所述之「D構型胺基酸」係於本發明合成依特卡肽之步驟中加入之D-Cys、D-Ala及D-Arg胺基酸，其中D-Cys及D-Arg上具有側鏈保護基，於該較佳實施例中，D-Cys上之側鏈保護基為4-甲基-三苯甲基(Mtt)，該D-Arg上之側鏈保護基為五甲基二氫苯并呋喃磺醯基(Pbf)。因此，合成依特卡肽之步驟中，加入之D構型的胺基酸為Fmoc-D-Cys(MTT)-OH、Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH和Fmoc-D-Ala-OH。

**【0040】** 本文所述之「L-Cys」係於本發明合成依特卡肽之步驟中加入之L-Cys，於一較佳實施態樣中，該L-Cys具有末端保護基為第三丁氧羰基(Boc)，該L-Cys上之側鏈保護基為3-硝基-2-吡啶亞氧硫基(Npys)，且該L-Cys當量數為1至50，例如但不限於：1、5、10、15、20、25、30、35、40、45或50當量數。

**【0041】** 本發明也提供一種合成依特卡肽鹽類之方法，本發明合成之依特卡肽也可製備為任何藥學上可接受之鹽類，其對於患者不會引起顯著的不良反應，例如但不限於：鹽酸鹽、氫溴酸鹽、硫酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、硝酸鹽、乙酸鹽、戊酸鹽、硬脂酸鹽、苯甲酸鹽或甲苯磺酸鹽等。於一實施態樣中，該依特卡肽進一步加入pH 0.5至2的鹽酸(HCl)溶液中，濃度為0.5-66 mg/mL，之後進行冷凍乾燥，得到依特卡肽鹽酸鹽。於一實施態

樣中，該鹽酸為pH 0.5、pH 0.7、pH 1、pH 1.3、pH 1.5、pH 1.7或pH 2。於另一實施態樣中，該濃度為0.5 mg/mL、1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、15 mg/mL、20 mg/mL、25 mg/mL、30 mg/mL、35 mg/mL、40 mg/mL、45 mg/mL、50 mg/mL、55 mg/mL、60 mg/mL或66 mg/mL。

**【0042】 實施態樣-逐步固相多肽合成法(Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis)**

**【0043】** 本實施態樣之合成策略是先將線性胺基酸逐步從碳端合成至胺端，且合成的過程中胺基酸皆鍵結於固相支持物上，以利於由簡單過濾、沖洗之方式去除雜質和剩餘試劑；合得線性胺基酸序列後，再嘗試進行雙硫鍵的合成反應以得到產物。

**【0044】** 將固相支持物置入反應管柱中，以NMP或DMF浸泡1小時，目的是使反應位向露出；隨後濾除該NMP或該DMF，加入去保護溶液進行該固相支持物或胺基酸上Fmoc保護基的切除，並利用紫外光分光光譜儀監測此去保護的反應；反應完後，以NMP或DMF沖洗樹脂，則完成去保護的動作。

**【0045】** 加入胺基酸、鹼與耦合試劑，並以NMP為溶劑，於室溫下進行反應；以凱薩試劑(Kaiser reagent)偵測反應，如為負向結果(溶液與固體為淡黃色)則反應結束，相反地，正向結果(溶液與固體為深藍色)則反應尚未結束。如此，當作完成胺基酸合成的步驟。

**【0046】** 重複完成上述步驟，即可完成線性胜肽序列。最後，以乙醯基取代Fmoc保護基，並完成雙硫鍵的生成，則可完成Etelcalcetide的製備。

**【0047】** 下文中，將進一步以詳細說明與實施例描述本發明。然而，

應理解這些實施例僅用於幫助可更加容易理解本發明，而非用於限制本發明之範圍。除非另有說明，實施例中使用的試劑和儀器均為普通的市售產品。

**【0048】 [實施例1]-依特卡肽製備**

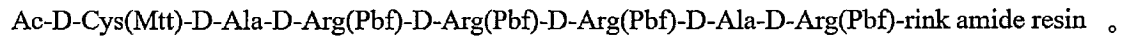
**【0049】 I. 步驟(a)**

**【0050】** 秤取16.502克的rink醯胺樹脂(負荷比0.606 mmol/g)作為固相支持物，加入具有過濾板的反應瓶中，以100 mL之N-甲基吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone, NMP)浸泡1小時。過濾NMP後，加入400 mL之20% piperidine/NMP溶液，反應10分鐘後移除溶劑，重複操作五次，再以400 mL之NMP清洗該樹脂五次。以凱薩試劑檢測，確認為正向結果，即Fmoc保護基移除成功。秤取6.49克的Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH和13.27克的BOP，以400 mL之NMP溶解，並加入5.25 mL之DIPEA，待全部混合溶解後，與該樹脂在室溫下反應一小時。以凱薩試劑檢測，確認為負向結果，即胺基酸合成成功；如果為正向結果，反應則再增加一小時，後續反應步驟如同此操作。

**【0051】** 反應結束後，以400 mL之NMP清洗該樹脂五次。加入400 mL之20% piperidine/NMP溶液，反應10分鐘後移除溶劑，重複操作五次，再以400 mL之NMP清洗該樹脂五次。秤取3.11克的Fmoc-D-Ala-OH和13.27克的BOP，以400 mL之NMP溶解，並加入5.25 mL之DIPEA，待全部混合溶解後，與該樹脂在室溫下反應一小時。

**【0052】** 按照相同的操作步驟，依式(I)結構順序合成D構型胺基酸，即完成含有4個D構型的Arg、2個D構型的Ala和1個D構型的Cys的主鏈胜肽。並且利用400 mL之20% piperidine/NMP溶液移除Fmoc保護基，以400 mL

之NMP清洗該樹脂五次後，再加入NMP/Ac<sub>2</sub>O/吡啶(pyridine)比例為50：1：1，反應一小時；過濾溶液後，以400 mL之NMP清洗該樹脂五次。此步驟獲得N端乙醯化的片段A：



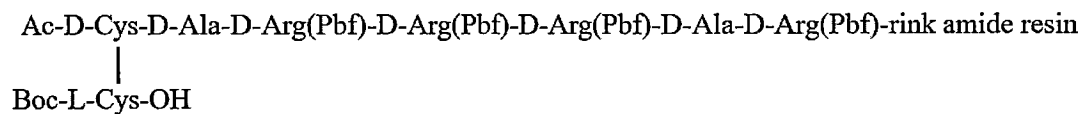
### 【0053】 II. 步驟(b)

【0054】 於片段A中，加入300 mL之TFA/triisopropylsilane/thioanisole/DCM體積比例為3：10：2.5：84.5，反應10分鐘移除溶劑，重複操作五次。過濾溶液後，以300 mL之NMP清洗該樹脂三次。此步驟獲得N端乙醯化並移除片段A中D-Cys側鏈Mtt保護基的片段B：



### 【0055】 III. 步驟(c)

【0056】 於片段B中，加入4.505克的Boc-L-Cys(NPys)-OH，以300 mL之NMP溶解，並加入6.3 mL的三乙胺，待全部混合溶解後，與該樹脂在室溫下反應二小時，即可獲得形成雙硫鍵的片段C：



### 【0057】 IV. 步驟(d)

【0058】 於片段C中，加入300 mL之TFA/TIPS/thioanisole/H<sub>2</sub>O體積比例為85：10：2.5：2.5，在室溫下反應一小時，切除側鏈保護基和樹脂。收集濾液，並且滴入600 mL之異丙醚(isopropylether)沉澱出固體，經乾燥後得到白色固體10.302克，粗產物依特卡肽的收率為98.3%。純度為72.9%之粗產物依特卡肽：

Ac-D-Cys(L-Cys)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH<sub>2</sub> 。

**【0059】** 取前述之粗產物依特卡肽10.302克，以製備型液相層析儀(MPLC)系統純化，分段收集後，以高效液相層析儀(HPLC)分析(如圖1所示)且收集純度高於99%的樣品，低於99%的樣品則進行再次純化；經濃縮與凍乾後，可以得到依特卡肽白色固體5.5克，純度為95-99%，總收率為50-60%。

**【0060】 [實施例2]-依特卡肽鹽酸鹽製備**

**【0061】** 取實施例1獲得之產物依特卡肽5.5克，溶解於pH 2的鹽酸水溶液，其濃度為每毫克產物溶於0.15毫升鹽酸水溶液，即每毫升鹽酸水溶液含有6.67毫克之依特卡肽；於室溫下，靜置10分鐘後，進行冷凍乾燥；重複操作四次，可以獲得依特卡肽鹽酸鹽(Etelcalcetide HCl)。

**【0062】** 於上述實施例所製備出之Etelcalcetide HCl的副產物如C端為羧基、N端未保護的胺基和雙聚合物，其各含量均小於0.1%。

**【0063】** 綜上所述，本發明之合成依特卡肽或其鹽類之方法可縮短製備依特卡肽之製程步驟及時間，提供了高產率與高純度的合成方法，適用作為鈣離子感受受體抑制劑，以對抗次發性副甲狀腺機能亢進症，為依特卡肽原料藥及製劑的生產和質量研究提供了保障。

**【0064】** 以上已將本發明做一詳細說明，惟以上所述者，僅惟本發明之一較佳實施例而已，當不能以此限定本發明實施之範圍，即凡依本發明申請專利範圍所作之均等變化與修飾，皆應仍屬本發明之專利涵蓋範圍內。

**【符號說明】**

**【0065】** 無。

**【生物材料寄存】**

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】無。

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】無。

【序列表】(請換頁單獨記載) 無。

## 發明摘要

※ 申請案號：106134261

※ 申請日：106/10/03

※IPC 分類： C07K 1/06 (2006.01)  
C07K 1/12 (2006.01)  
C07K 7/06 (2006.01)

**【發明名稱】(中文/英文)**

合成依特卡肽 (Etelcalcetide) 或其鹽類之方法 / METHOD FOR  
SYNTHESIZING ETELCALCETIDE OR SALTS THEREOF

**【中文】**

本發明提供一種合成依特卡肽(Etelcalcetide)或其鹽類之方法，其步驟包括：(a)以Fmoc固相合成法，由末端具有胺基的固相支持物為合成起點，依序合成式(I)中之D構型胺基酸，並移除Fmoc保護基後，形成一C端與該固相支持物之胺基結合、並於N端乙醯(acetyl, Ac)化且D-Cys及D-Arg具有側鏈保護基之片段A；(b)移除該片段A中該D-Cys的側鏈保護基，形成片段B；(c)加入(保護基)-L-Cys(保護基)-OH與該片段B形成雙硫鍵，形成片段C；(d)於該片段C中加入裂解液，得到依特卡肽。本發明之合成依特卡肽或其鹽類之方法可縮短製備依特卡肽之製程步驟及時間，提供了高產率與高純度的合成方法。

**【英文】**

The present invention provides a method for synthesizing Etelcalcetide or salts thereof, comprising the step of: (a) sequential synthesizing the D-amino acids of formula (I) with a solid support having an amino group at its terminal as a starting point by Fmoc solid phase synthesis so as to form a fragment A with a C-terminal bonded to the amino group of the solid support, a N-terminal acetylated, and D-Cys and D-Arg having a side chain protecting group (pg) after

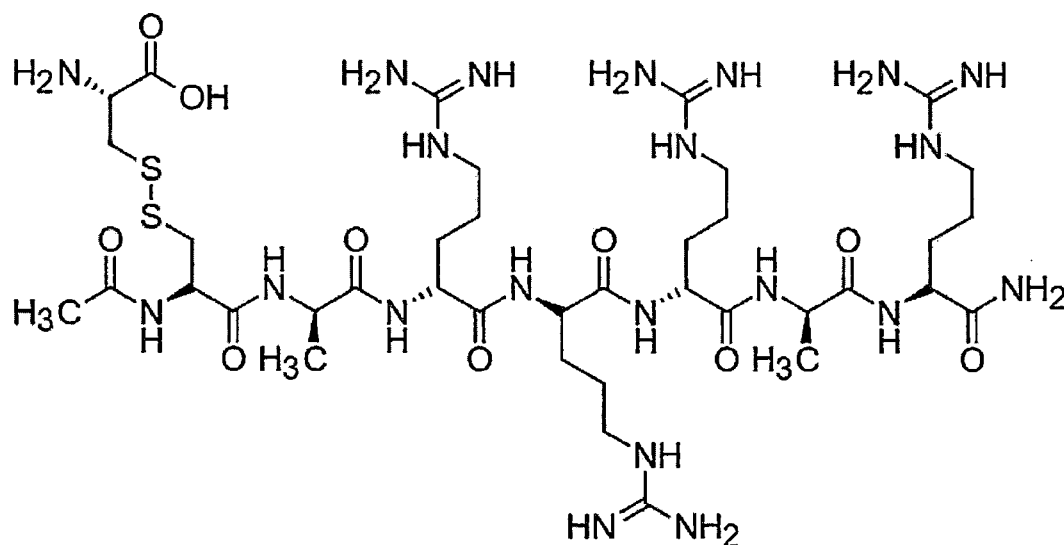
removing the Fmoc protecting group; (b) removing the side chain protecting group of the D-Cys of the fragment A to form fragment B; (c) adding a fragment (pg)-L-Cys(pg)-OH to form a disulfide bond with the fragment B so as to form a fragment C; (d) adding lysis solution in the fragment C to obtain Etecalcetide. The present invention of the method for synthesizing Etecalcetide or salts thereof can shorten the steps and the time of a process for preparing Etecalcetide, and provide a high yield and high purity method for producing Etecalcetide.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】：**圖1。

**【本代表圖之符號簡單說明】：**無。

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：**



## 申請專利範圍

1. 一種合成依特卡肽(Etelcalcetide)(如下式(I))或其鹽類之方法，其步驟包括：

(a)以Fmoc固相合成法，由末端具有胺基的固相支持物為合成起點，依序合成式(I)中之D構型胺基酸，並移除Fmoc保護基後，形成一C端與該固相支持物之胺基結合、並於N端乙醯(acetyl, Ac)化且D-Cys及D-Arg具有側鏈保護基之片段A：

Ac-D-Cys(保護基)-D-Ala-D-Arg(保護基)-D-Arg(保護基)-Arg-(保護基)-D-Ala-D-Arg(保護基)-固相支持物；

(b)移除該片段A中該D-Cys的側鏈保護基，形成片段B：

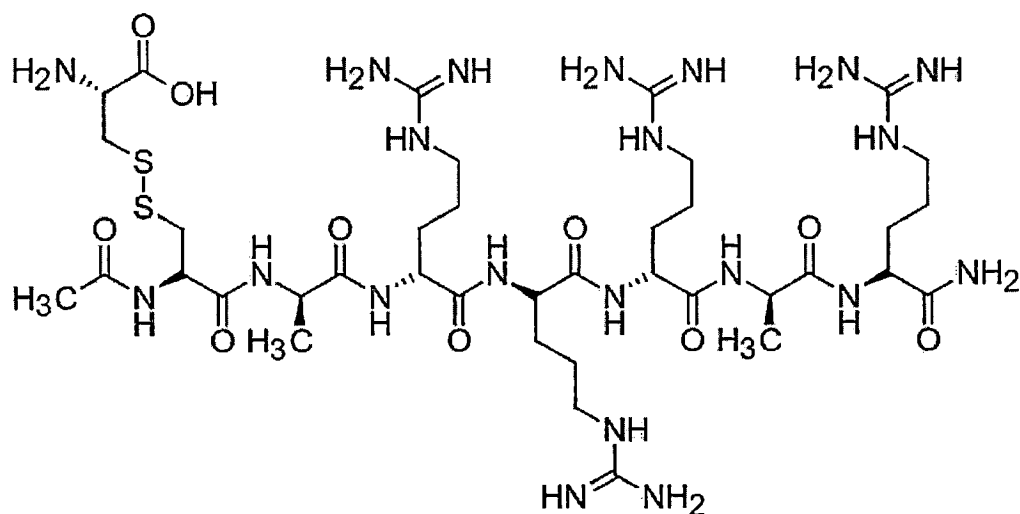
Ac-D-Cys-D-Ala-D-Arg(保護基)-D-Arg(保護基)-Arg-(保護基)-D-Ala-D-Arg(保護基)-固相支持物；

(c)加入(保護基)-L-Cys(保護基)-OH與該片段B形成雙硫鍵，形成片段C：

Ac-D-Cys-D-Ala-D-Arg(保護基)-D-Arg(保護基)-Arg-(保護基)-D-Ala-D-Arg(保護基)-固相支持物  
 (保護基)-L-Cys-OH

(d)於該片段C中加入裂解液，得到依特卡肽；

式(I)：



2. 如請求項1之合成依特卡肽或其鹽類之方法，其中該固相支持物係選自由

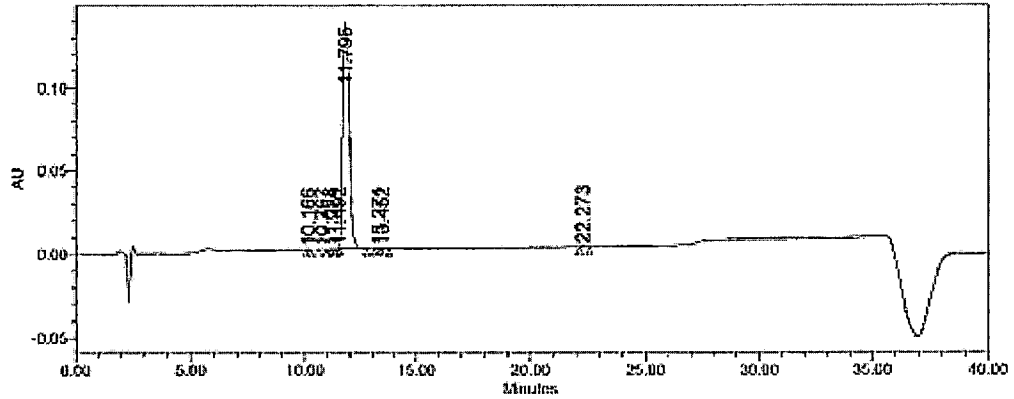
雷克醯胺樹脂(Rink amide resin)、雷克醯胺胺甲基樹脂(Rink amide AM resin)、雷克醯胺4-甲苯氫胺樹脂(Rink amide MBHA resin)、王樹脂(Wang Resin)及2-氯三苯基氯樹脂(2-Chlorotrityl chloride Resin)所組成之群組，且該樹脂之胺基含量為0.1-1.5 mmol/g。

3. 如請求項1之合成依特卡肽或其鹽類之方法，其中該D-Cys上之側鏈保護基為4-甲基-三苯甲基(Mtt)，該D-Arg上之側鏈保護基為五甲基二氫苯并呋喃磺醯基(Pbf)。
4. 如請求項1之合成依特卡肽或其鹽類之方法，其中該步驟(a)添加四氟硼酸O-(苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎗(TBTU)、N,N'-二異丙基羰二亞胺(DIC)、1-羥基苯並三唑(HOBT)、六氟磷酸O-(苯並三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎗(HBTU)、六氟磷酸O-(6-氯苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲基脲鎗(HCTU)、六氟磷酸(苯并三唑-1-基氧基)三(N-吡咯啶基)鎗(PyBOP)或六氟磷酸(苯並三唑-1-基-氧基)三(二甲基胺基)-鎗(BOP)做為耦合試劑。
5. 如請求項1至4任一項之合成依特卡肽或其鹽類之方法，其中該步驟(a)進一步添加選自由二甲基甲醯胺(dimethylformamide, DMF)、N-甲基吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone, NMP)、二異丙基乙胺(diisopropylethylamine, DIPEA)、N-甲基嗎啡啉(N-methylmorpholine, NMM)、三乙胺(triethylamine, TEA)、吡啶(pyridine)及其組合所組成之群組之鹼性溶液。
6. 如請求項1至4任一項之合成依特卡肽或其鹽類之方法，其中該步驟(a)以一去保護溶液移除該Fmoc保護基，該去保護溶液係為哌啶(piperidine)、

- 二乙胺(diethylamine, DEA)或嗎啡啉(morpholine), 並以二甲基甲醯胺(dimethylformamide, DMF)、N-甲基吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone, NMP)或二甲亞砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)稀釋, 濃度範圍為5至30%。
7. 如請求項1至4任一項之合成依特卡肽或其鹽類之方法, 其中該步驟(a)之N端乙醯化係以乙酸酐(acetic anhydride, Ac<sub>2</sub>O)或氯化乙醯(acetyl chloride)進行, 該乙醯化之當量數為1至500, 並一同加入當量數為1至500的吡啶(pyridine)。
  8. 如請求項1至4任一項之合成依特卡肽或其鹽類之方法, 其中該步驟(b)係添加一酸性溶液以移除該D-Cys的側鏈保護基, 且該酸性溶液係包含有三氟醋酸(trifluoroacetate, TFA)、苯基甲基硫醚(thioanisole)及三異丙基矽烷(triisopropylsilane, TIPS)及二氯甲烷。
  9. 如請求項1至4任一項之合成依特卡肽或其鹽類之方法, 其中該步驟(c)係添加選自由以二異丙基乙胺(Diisopropylethylamine, DIPEA)、N-甲基嗎啡啉(N-methylmorpholine, NMM)或三乙胺(triethylamine, TEA)所組成之群組, 溶劑為二甲基甲醯胺(dimethylformamide, DMF)或N-甲基吡咯烷酮(N-methyl-2-pyrrolidone, NMP)。
  10. 如請求項1至4任一項之合成依特卡肽或其鹽類之方法, 其中該L-Cys上之末端保護基為第三丁氧羰基(Boc), 該L-Cys上之側鏈保護基為3-硝基-2-吡啶亞氧硫基(Npys), 該L-Cys當量數為1至50。
  11. 如請求項1至4任一項之合成依特卡肽或其鹽類之方法, 其中該步驟(d)之裂解液係包含有三異丙基矽烷(TIPS)、苯基甲基硫醚(thioanisole)及三氟醋酸(trifluoroacetate, TFA)及水。

12.如請求項1至4任一項之合成依特卡肽或其鹽類之方法，其中該依特卡肽進一步加入pH 0.5至2的鹽酸(HCl)溶液中，濃度為0.5-66 mg/mL，之後進行冷凍乾燥，得到依特卡肽鹽酸鹽。

## 圖式



通道：ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A；處理通道：ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm；結果儀器偵測：

1407；處理方法：amg416

## 處理通道描述：ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm

	處理通道描述	滯留時間(RT)	面積	%面積
1	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	10.166	100	0.00
2	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	10.767	483	0.02
3	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	11.098	268	0.01
4	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	11.224	253	0.01
5	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	11.492	215	0.01
6	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	11.795	2757386	99.84
7	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	13.271	426	0.02
8	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	13.452	656	0.02
9	ACQUITY 可調式紫外線(TUV)偵測器通道 A 220nm	22.273	2119	0.08

圖 1