



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114478708 A

(43) 申请公布日 2022.05.13

(21) 申请号 202111639215.4

(22) 申请日 2021.12.29

(71) 申请人 南京汉欣医药科技有限公司

地址 210046 江苏省南京市栖霞区仙林街道仙林大学城纬地路9号C5栋

(72) 发明人 年夫宇 罗先明 汤传根 马瑶  
鲍海涛 金波

(74) 专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权  
代理有限公司 23211

专利代理人 裴闪闪

(51) Int.Cl.

C07K 7/23 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

C07K 1/06 (2006.01)

C07K 1/08 (2006.01)

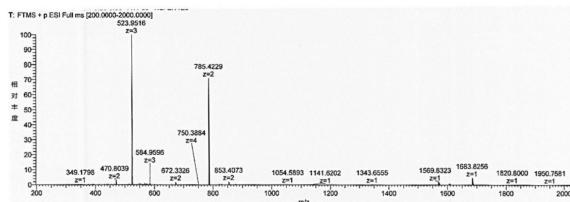
权利要求书2页 说明书12页 附图4页

(54) 发明名称

一种加尼瑞克的片段固相合成方法

(57) 摘要

本发明公开了一种加尼瑞克的片段固相合成方法,属于多肽药物化学合成领域。本发明采用8+2片段合成法,先制备加尼瑞克肽树脂片段A[3-10]和中间体片段B[1-2],再进行偶联反应,切割后得到加尼瑞克粗肽,最后纯化得到加尼瑞克纯品。本发明所用反应试剂不涉及剧毒物料,环保;没有涉及氨基酸侧链的多次脱保护和修饰,反应步骤少;所得粗肽纯度最高可达95%,有利于后期纯化,增加纯化柱的使用寿命,简介节省成本,加尼瑞克纯品纯度可达99.9%,降低产品中差向肽、缺失肽和异构体等杂质;有利于工业化大规模生产,具有广泛的应用前景。



1. 一种加尼瑞克的片段固相合成方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 以Fmoc-D-Ala-Rink AM Amide树脂为固相载体,用脱保护试剂脱除Fmoc,加入相应的Fmoc保护氨基酸进行偶联反应,反应完成后用脱保护试剂脱除Fmoc,再与下一个Fmoc保护氨基酸进行偶联反应;依次分别与Fmoc-Pro-OH、Fmoc-L-HomoArg (Et) 2-OH • HC1、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-D-HomoArg (Et) 2-OH • HC1、Fmoc-Tyr (tBu) -OH、Fmoc-Ser (tBu) -OH、Fmoc-3-(3-Pyridyl)-D-Ala-OH偶联反应,得到加尼瑞克肽树脂片段A[3-10]:Fmoc-D-Pal-Ser (tBu)-Tyr (tBu)-D-HomoArg (Et) 2-Leu-L-HomoArg (Et) 2-Pro-D-Ala-氨基树脂;

(2) 采用2-Chlorotriptyl Chloride Resin树脂为固相载体,加入Fmoc-D-Cpa-OH进行偶联反应,反应完成后用脱保护试剂脱除Fmoc,再与Ac-D-Nal-OH偶联反应,得到中间体片段B[1-2]肽树脂;然后使用切割试剂切割得到中间体片段B[1-2]:Ac-D-Nal-D-Cpa-OH;

(3) 将步骤(1)得到的加尼瑞克肽树脂片段A[3-10]脱除Fmoc保护基后与步骤(2)得到的中间体片段B[1-2]在缩合试剂存在下进行偶联反应,得到加尼瑞克肽树脂Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser (tBu)-Tyr (tBu)-D-HArg (Et) 2-Leu-HArg (Et) 2-Pro-Ala-氨基树脂;

(4) 将步骤(3)得到的加尼瑞克肽树脂经过裂解试剂裂解得到加尼瑞克肽粗品,再经过纯化得到加尼瑞克纯品,其中,所述的裂解试剂为TFA、TIS和EDT的组合物。

2. 根据权利要求1所述的一种加尼瑞克的片段固相合成方法,其特征在于,步骤(1)~步骤(3)所述的偶联反应前,Fmoc保护氨基酸均在冰浴条件下先进行预活化,再过滤得到滤液。

3. 根据权利要求2所述的一种加尼瑞克的片段固相合成方法,其特征在于,步骤(1)~步骤(3)所述的偶联反应前,Fmoc保护氨基酸预活化使用的活化试剂为HOBT/DIC、HOAT/DIC、HBTU/DIC、HATU/DIC、HOBT/DIEA、HOAT/DIEA、HBTU/DIEA、HATU/DIEA、TBTU/DIC、CDI/DIEA、EEDQ/DIEA中的任意一种。

4. 根据权利要求3所述的一种加尼瑞克的片段固相合成方法,其特征在于,步骤(1)所述的偶联反应前,Fmoc保护氨基酸预活化使用的活化试剂与Fmoc-D-Ala-Rink AM Amide树脂的摩尔比为4-6:1。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的一种加尼瑞克的片段固相合成方法,其特征在于,步骤(2)所述的中间体片段B[1-2]用醚类溶剂重结晶纯化得到,所述醚类溶剂包括石油醚、乙醚、二丙醚、异丙醚、甲基叔丁基醚、乙二醇二甲醚中的一种或几种。

6. 根据权利要求1~5任一项所述的一种加尼瑞克的片段固相合成方法,其特征在于,步骤(2)所述的切割试剂为TFE/DCM、TFA/DCM、HFIP/DCM中的任意一种。

7. 根据权利要求1~6任一项所述的片段法固相合成醋酸加尼瑞克的方法,其特征在于,步骤(1)~步骤(3)中所述偶联反应时间为60-240分钟,反应温度15-30℃。

8. 根据权利要求1~7任一项所述的一种加尼瑞克的片段固相合成方法,其特征在于,步骤(1)~(3)中,所述脱保护试剂包括含有有机碱的非质子性有机溶剂,包括以体积比计算含有15-30%哌啶的DCM溶液,15-30%哌啶的DMF溶液,15-30%哌啶的NMP溶液中的任意一种。

9. 根据权利要求1~8任一项所述的一种加尼瑞克的片段固相合成方法,其特征在于,步骤(3)所述的裂解试剂的质量比为TFA:TIS:EDT=90-95:1-5:1-5,优选为TFA:TIS:EDT=95:3:2。

10. 权利要求1~9任一项所述的一种加尼瑞克的片段固相合成方法在药物化学合成领域的应用。

## 一种加尼瑞克的片段固相合成方法

### 技术领域

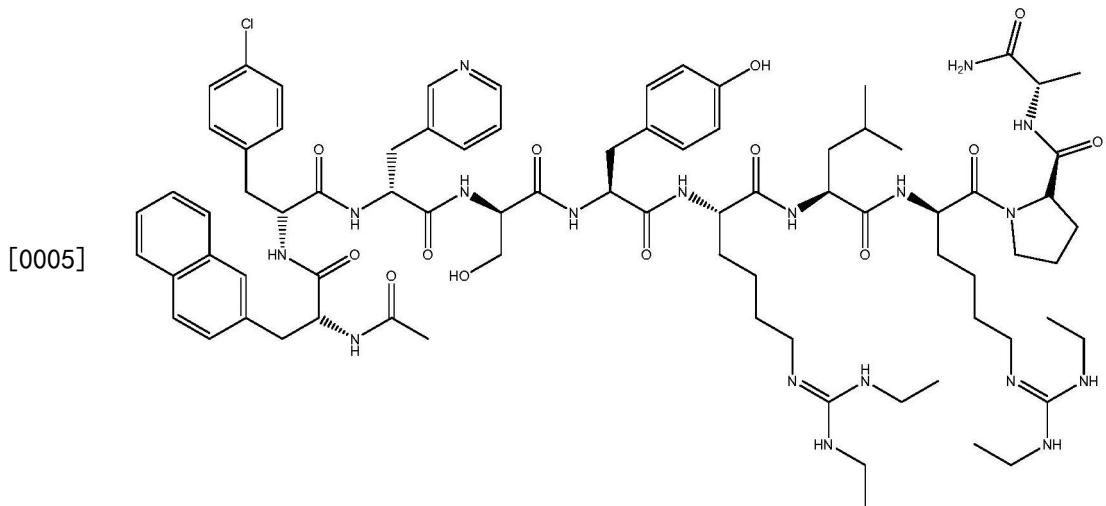
[0001] 本发明涉及多肽药物化学合成领域,具体涉及一种加尼瑞克的片段固相合成方法。

### 背景技术

[0002] ORGALUTRAN® (通用名称:醋酸加尼瑞克注射液),由默沙东公司研发和生产。2013年经中国国家食品药品监督管理总局批准在中国上市。

[0003] 醋酸加尼瑞克是GnRH拮抗剂,可竞争性阻断垂体促性腺细胞上的GnRH受体,以及其后的转导通路,产生一种快速、可逆的促性腺激素分泌抑制作用,对脑垂体LH分泌的抑制作用强于对FSH的抑制作用。醋酸加尼瑞克不能引起内源性促性腺激素的首次释放,这与拮抗作用一致。Cochrane一项荟萃分析显示拮抗剂方案能够减轻接受辅助生殖技术女性的治疗负担,也能减少严重不良事件如卵巢过度刺激综合症(OHSS)等的发生。

[0004] 加尼瑞克是一种十肽药物,分子量为1568.84,氨基酸序列为N-Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser-Tyr-D-HomoArg (Et)<sub>2</sub>-Leu-HomoArg (Et)<sub>2</sub>-Pro-D-Ala-NH<sub>2</sub>,结构式如下:



[0006] 目前国外关于加尼瑞克的合成专利主要有US5212288A,US5767082A和US4801577A,这些专利主要是BOC固相合成的策略,此种方法每步都需要用TFA脱除Boc,用三乙胺中和游离的氨基末端,然后通过活化、耦联下一个氨基酸,最终脱保护多采用剧毒的HF法或TFMSA(三氟甲磺酸)法,然而该工艺废液多,收率低,成本高,环境污染大,不利于工业化生产。

[0007] 专利技术CN104017058A公开的方法是在肽序第6、8位分别采用Fmoc-D-Lys (Dde) -OH和Fmoc-Lys (Dde) -OH为原料,先将整条序列完成后,在去Dde,然后对侧链进行修饰。该方法去Dde使用到剧毒试剂水合肼,且整个合成周期长,粗肽纯度低,不利于工业化生产。

[0008] 专利技术CN102584945A公开的方法是在肽序第6、8位分别采用Fmoc-D-HomoArg (Et)2-OH • HC1和Fmoc-HomoArg (Et)2-OH • HC1为原料,最后一个氨基酸为Fmoc-D-Nal-OH,直接固相偶联完后去保护再进行乙酰化反应,由于部分氨基酸侧链未保护,在乙酰化过程

中会产生乙酰化杂质,该杂质较难去除,最终影响产品纯度及收率。

[0009] 专利技术CN107056894A使用5+5片段法合成,在肽序第6、8位分别采用Fmoc-D-Lys(X)-OH和Fmoc-Lys(X)-OH氨基酸为原料(X为Mtt或Mmt),然后脱除侧链保护基X后对侧链进行修饰得到醋酸加尼瑞克片段A[6-10]肽树脂:Fmoc-D-HArg(Et)2-Leu-HArg(Et)2-Pro-Ala-氨基树脂,涉及保护基多次脱保护和修饰,操作繁琐,效率低下;另外中间体片段B[1-5]在制备过程中最后一个氨基酸先脱Fmoc保护基,再进行N端乙酰化反应得到;所得粗品纯度仅为93.82%。

[0010] 由于现有技术中存在上述缺陷,因此有必要开发一种新的方法来制备加尼瑞克产品。

## 发明内容

[0011] [技术问题]

[0012] 现有合成加尼瑞克时存在反应周期长、收率低、纯度高或成本高等问题。

[0013] [技术方案]

[0014] 鉴于现有技术中存在的上述问题,本发明提供了一种新的加尼瑞克固相合成工业化生产的方法,本发明采用8+2片段合成法,反应试剂不涉及剧毒物料,大大缩短了反应周期,具有高收率,高纯度,低成本,解决了上述技术难题。

[0015] 为了达到上述目的,本发明提供了以下技术方案:一种加尼瑞克的片段固相合成方法,包括如下步骤:

[0016] (1)以Fmoc-D-Ala-Rink AM Amide树脂为固相载体,用脱保护试剂脱除Fmoc,加入相应的Fmoc保护氨基酸进行偶联反应,反应完成后用脱保护试剂脱除Fmoc,再与下一个Fmoc保护氨基酸进行偶联反应;依次分别与Fmoc-Pro-OH、Fmoc-L-HomoArg(Et)2-OH·HCl、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-D-HomoArg(Et)2-OH·HCl、Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-3-(3-Pyridyl)-D-Ala-OH偶联反应,得到加尼瑞克肽树脂片段A[3-10]:Fmoc-D-Pal-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-D-HomoArg(Et)2-Leu-L-HomoArg(Et)2-Pro-D-Ala-氨基树脂;

[0017] (2)采用2-Chlorotritityl Chloride Resin树脂为固相载体,加入Fmoc-D-Cpa-OH进行偶联反应,反应完成后用脱保护试剂脱除Fmoc,再与Ac-D-Nal-OH偶联反应,得到中间体片段B[1-2]肽树脂;然后使用切割试剂切割得到中间体片段B[1-2]:Ac-D-Nal-D-Cpa-OH;

[0018] (3)将步骤(1)得到的加尼瑞克肽树脂片段A[3-10]脱除Fmoc保护基后与步骤(2)得到的中间体片段B[1-2]在缩合试剂存在下进行偶联反应,得到加尼瑞克肽树脂Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-D-HArg(Et)2-Leu-HArg(Et)2-Pro-Ala-氨基树脂;

[0019] (4)将步骤(3)得到的加尼瑞克肽树脂经过裂解试剂裂解得到加尼瑞克肽粗品,再经过纯化得到加尼瑞克纯品。

[0020] 作为本发明的一种实施方式中,步骤(1)中,所述Fmoc-D-Ala-Rink AM Amide树脂的取代度为0.4-0.6mmol/g。

[0021] 作为本发明的一种实施方式中,步骤(1)中,所述脱保护试剂包括含有有机碱的非质子性有机溶剂;在其中一种实施方式中,脱保护试剂可以为以体积比计算含有15-30%哌啶的DCM溶液,15-30%哌啶的DMF溶液,15-30%哌啶的NMP溶液中的任意一种,更具体为含

有20%哌啶的DMF溶液。

[0022] 作为本发明的一种实施方式中,步骤(2)中,中间体片段B[1-2]制备过程中直接选择Ac-D-Nal-OH作为原料,可以避免肽侧链活性基团乙酰化的副反应,减少一步脱保护及乙酰化步骤,降低成本,提高粗品纯度及收率。

[0023] 作为本发明的一种具体实施方式,步骤(1)~步骤(3)所述的偶联反应前,Fmoc保护氨基酸均在冰浴条件下先进行预活化,再过滤得到滤液。预活化可大大降低产品中差向肽和缺失肽的发生,减少氨基酸消旋,降低产品异构体杂质,利于制备和纯化,提高产品收率及纯度。过滤操作主要是为了除去反应过程中生成的不溶性杂质DIU,该杂质是缩合试剂DIC的副产物,杂质DIU容易将树脂包裹,或者减小树脂孔隙,从而导致反应液接触面减小,不利于反应进行。

[0024] 作为本发明的一种具体实施方式,步骤(1)~步骤(3)所述的偶联反应前,Fmoc保护氨基酸预活化使用的活化试剂为HOBT/DIC、HOAT/DIC、HBTU/DIC、HATU/DIC、HOBT/DIEA、HOAT/DIEA、HBTU/DIEA、HATU/DIEA、TBTU/DIC、CDI/DIEA,EEDQ/DIEA中的任意一种。

[0025] 作为本发明的一种具体实施方式,步骤(1)所述的偶联反应前,Fmoc保护氨基酸预活化使用的活化试剂与Fmoc-D-Ala-Rink AM Amide树脂的摩尔比为4-6:1。

[0026] 作为本发明的一种实施方式中,步骤(2)中,所述2-Chlorotriptyl Chloride Resin树脂的取代度为0.5-1.5mmol/g。

[0027] 作为本发明的一种实施方式中,步骤(2)中,所述脱保护试剂包括含有有机碱的非质子性有机溶剂;在其中一种实施方式中,脱保护试剂可以为以体积比计算含有15-30%哌啶的DCM溶液,15-30%哌啶的DMF溶液,15-30%哌啶的NMP溶液中的任意一种,更具体为含有20%哌啶的DMF溶液。

[0028] 作为本发明的一种具体实施方式,步骤(2)所述的中间体片段B[1-2]用醚类溶剂重结晶。

[0029] 作为本发明的一种具体实施方式,所述醚类溶剂包括石油醚、乙醚、二丙醚、异丙醚、甲基叔丁基醚、乙二醇二甲醚中的一种或几种。

[0030] 作为本发明的一种具体实施方式,本发明中步骤(1)~步骤(3)中每步的偶联反应时间为60-240分钟,反应温度15-30℃,优选反应时间90-150分钟,反应温度20-25℃。

[0031] 作为本发明的一种具体实施方式,步骤(2)所述的切割试剂为TFE/DCM、TFA/DCM、HFIP/DCM中的任意一种。

[0032] 作为本发明的一种具体实施方式,步骤(2)所述的切割试剂优选为TFE/DCM。

[0033] 作为本发明的一种具体实施方式,步骤(3)所述缩合试剂包括HOBT/DIC、HOAT/DIC、HBTU/DIC、HATU/DIC、HOBT/DIEA、HOAT/DIEA、HBTU/DIEA、HATU/DIEA、TBTU/DIC、CDI/DIEA,EEDQ/DIEA中的任意一种,缩合试剂可以与预活化试剂相同或不同

[0034] 作为本发明的一种具体实施方式,步骤(3)所述缩合试剂的用量与步骤(1)中的Fmoc-D-Ala-Rink AM Amide树脂的摩尔比为4-6:1。

[0035] 作为本发明的一种实施方式中,步骤(3)中,所述脱保护试剂包括含有有机碱的非质子性有机溶剂;在其中一种实施方式中,脱保护试剂可以为以体积比计算含有15-30%哌啶的DCM溶液,15-30%哌啶的DMF溶液,15-30%哌啶的NMP溶液中的任意一种,更具体为含有20%哌啶的DMF溶液。

[0036] 作为本发明的一种具体实施方式,步骤(4)所述的裂解试剂为TFA、TIS和EDT的组合。本发明所述的裂解试剂未添加水,可以明显使产品性状更好,没有出现发粘现象。

[0037] 作为本发明的一种具体实施方式,步骤(4)所述的裂解试剂的质量比为TFA:TIS:EDT=90-95:1-5:1-5,优选为TFA:TIS:EDT=95:3:2。

[0038] 作为本发明的一种具体实施方式,步骤(4)中,所述加尼瑞克肽树脂与裂解试剂的质量体积比g/mL为1:5~1:20,或更具体为1:10。

[0039] 作为本发明的一种具体实施方式,步骤(4)中,所述裂解的温度为20-35℃,裂解时间为0.5-2h。

[0040] 作为本发明的一种具体实施方式,将加尼瑞克肽粗品经过装有干燥剂(五氧化二磷、氯化钙等)的真空干燥箱烘干,可以降低水解产生的杂质,提高粗品收率,降低成本。

[0041] 本发明相对现有技术,具有以下优势:

[0042] 本发明采用8+2片段合成法,反应试剂不涉及剧毒物料,更加环保;中间体片段B[1-2]片段短,杂质易分离,容易通过醚类溶剂重结晶纯化,得到纯度达到99%以上;没有涉及氨基酸侧链的多次脱保护和修饰,反应步骤少;所得粗肽纯度最高可达95%,有利于后期纯化,增加纯化柱的使用寿命,节省成本,纯化后加尼瑞克纯品纯度可达99.9%,相对其它片段合成法,大大降低产品中差向肽、缺失肽和异构体等杂质;有利于工业化大规模生产,具有广泛的应用前景。

## 附图说明

[0043] 图1为实施例1所得加尼瑞克粗品的HPLC图谱。

[0044] 图2为实施例1所得加尼瑞克粗品的质谱图。

[0045] 图3为实施例1所得加尼瑞克纯品的HPLC图谱。

[0046] 图4为实施例2所得加尼瑞克粗品的HPLC图谱。

[0047] 图5为实施例2所得加尼瑞克纯品的HPLC图谱。

[0048] 图6为实施例3所得加尼瑞克粗品的HPLC图谱。

[0049] 图7为实施例3所得加尼瑞克纯品的HPLC图谱。

## 具体实施方式

[0050] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0051] 为便于本领域技术人员理解本发明内容,下面将结合具体实施例进一步描述本发明的技术方案,但以下内容不应以任何方式限制本发明权利要求书请求保护的范围。

[0052] 本发明中所用的氨基酸和树脂均采购于吉尔生化有限公司。

[0053] 下列是英文缩写对应的中文名称:

[0054]	DCM	二氯甲烷
[0055]	DMF	N,N-二甲基甲酰胺
[0056]	PIP	哌啶
[0057]	Dde	1,1-二氯-2,2-双(4-氯苯基)乙烯
[0058]	DIC	N,N-二异丙基碳二亚胺
[0059]	DIEA	N,N-二异丙基乙胺

[0060]	HFIP	六氟异丙醇
[0061]	HOAT	N-羟基-7-氮杂苯并三氮唑
[0062]	HOBT	1-羟基苯并三唑
[0063]	HBTU	苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸盐
[0064]	HATU	2-(7-偶氮苯并三氮唑)-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸酯
[0065]	TBTU	O-苯并三氮唑-N,N,N',N'-四甲基脲四氟硼酸
[0066]	TFA	三氟乙酸
[0067]	TFE	三氟乙醇
[0068]	EDT	1,2-乙二硫醇
[0069]	TIS	三异丙基硅烷
[0070]	Fmoc-Pro-OH	N-芴甲氧羰基-L-脯氨酸
[0071]	Fmoc-L-homoArg (Et) 2-OH • HC1	N-芴甲氧羰基-N-(二乙基)-L-高精氨酸盐酸盐
[0072]	Fmoc-D-homoArg (Et) 2-OH • HC1	N-芴甲氧羰基-N-(二乙基)-D-高精氨酸盐酸盐
[0073]	Fmoc-Leu-OH	N-芴甲氧羰基-L-亮氨酸
[0074]	Fmoc-Tyr (tBu)-OH	N-芴甲氧羰基-O-叔丁基-L-络氨酸
[0075]	Fmoc-Ser (tBu)-OH	N-芴甲氧羰基-O-叔丁基-L-丝氨酸
[0076]	Fmoc-D-Pal-OH	N-芴甲氧羰基-3-(3-吡啶基)-D-丙氨酸
[0077]	Fmoc-D-Cpa-OH	N-芴甲氧羰基-D-环丙基丙氨酸
[0078]	Ac-D-Nal-OH	(R)-N-乙酰基-beta-萘基丙氨酸
[0079]	实施例1(缩合试剂是树脂的4倍)	
[0080]	(1) 加尼瑞克片段A[3-10]肽树脂的制备	
[0081]	称取Fmoc-D-Ala-Rink AM Amide树脂4g (2.1mmol, 取代度为0.521mmol/g), 加入固相多肽合成器中, 加入50mL DCM, 氮气鼓吹溶胀树脂5分钟, 抽干。加入50mL配制好的20% PIP/DMF溶液脱保护两次, 分别为10分钟。树脂再用DMF洗涤6次, 每次50mL。称取Fmoc-Pro-OH 2.81g (8.34mmol, 4eq)、1.15g HOBT (8.34mmol, 4eq)、50mL DMF加入到100mL单口烧瓶中溶解完全, 冰浴(0-5℃)5分钟, 加入1.3mL DIC (8.34mmol, 4eq), 预活化30min, 然后过滤得到滤液, 将滤液加入到树脂中, 氮气鼓吹, 25℃反应60min, 取少量树脂用Kaiser试剂检测判断反应终点, 树脂无色透明, 则表示反应完全, 继续反应60min(树脂有色表示未反应完全, 每隔30min检测一次直至树脂无色透明后, 再继续反应60min)。反应达到终点后, 抽干溶剂, 树脂再用DMF洗涤4次, 每次50mL。重复上述步骤, 按照加尼瑞克序列从C端到N端进行逐一缩合, 依次完成与Fmoc-L-HomoArg (Et) 2-OH • HC1、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-D-HomoArg (Et) 2-OH • HC1、Fmoc-Tyr (tBu)-OH、Fmoc-Ser (tBu)-OH、Fmoc-3-(3-Pyridyl)-D-Ala-OH的偶联反应。最后得到加尼瑞克肽树脂片段A[3-10]: Fmoc-D-Pal-Ser (tBu)-Tyr (tBu)-D-HomoArg (Et) 2-Leu-L-HomoArg (Et) 2-Pro-D-Ala-氨基树脂。	
[0082]	(2) 中间体片段B[1-2]的制备	
[0083]	称取2-Chlorotriptyl Chloride Resin树脂20g (20mmol, 取代度为1mmol/g), 加入固相多肽合成器中, 加入250mL DCM, 氮气鼓吹溶胀树脂5分钟, 抽干。加入Fmoc-D-Cpa-OH 14g (40mmol, 2eq), DCM 250mL, DIEA 10.5mL (3eq, 60mmol), 25℃反应120min, 加入75mL甲	

醇封头,30min后,抽干,250mL DMF洗涤4次,加入250mL配制好的20%PIP/DMF溶液脱保护两次,分别为10分钟。树脂再用DMF洗涤6次,每次250mL。称取Ac-D-Na1-OH10.3g (40mmol, 2eq)、1.35gHOBT (40mmol, 2eq)加入到500mL单口烧瓶中,加入250mL DMF溶解完全,冰浴(0-5℃)5分钟,加入6.5mL DIC (40mmol, 2eq),预活化30min,过滤得到滤液,将滤液加入到树脂中,氮气鼓吹,25℃反应60min,取少量树脂用Kaiser试剂检测判断反应终点,树脂无色透明,则表示反应完全,继续反应60min(树脂有色表示未反应完全,每隔30min检测一次直至树脂无色透明后,再继续反应60min)。反应达到终点后,抽干溶剂,树脂再用DMF洗涤4次,每次250mL。树脂肽用甲醇洗涤两次,每次250mL,水泵抽干直至树脂呈流沙状,得到中间体片段B[1-2]肽树脂:Ac-D-Na1-D-Cpa树脂。配制30%三氟乙醇/DCM溶液500mL,25℃切割120min,过滤掉树脂,旋干溶剂,石油醚重结晶得到中间体片段B[1-2]:Ac-D-Na1-D-Cpa-OH,纯度99.5%,得到8.6g,收率8.6/(20\*438.13/1000)=98.1%。

[0084] (3) 加尼瑞克肽树脂的制备

[0085] 将上述得到的加尼瑞克片段A[3-10]肽树脂加入50mL配制好的20%PIP/DMF溶液脱保护两次,分别为10分钟。树脂再用DMF洗涤6次,每次50mL。称取中间体片段B[1-2]3.65g (8.34mmol, 4eq)、1.15gHOBT (8.34mmol, 4eq)、50mL DMF加入到100mL单口烧瓶中溶解完全,冰浴(0-5℃)5分钟,加入1.3mL DIC (8.34mmol, 4eq),预活化30min,加入到树脂中,氮气鼓吹,25℃反应60min,取少量树脂用Kaiser试剂检测判断反应终点,树脂无色透明,则表示反应完全,继续反应60min(树脂有色表示未反应完全,每隔30min检测一次直至树脂无色透明后,再继续反应60min)。反应达到终点后,抽干溶剂,树脂再用DMF洗涤4次,每次50mL。树脂肽用甲醇洗涤两次,每次50mL,水泵抽干直至树脂呈流沙状,得到加尼瑞克肽树脂Ac-D-Na1-D-Cpa-D-Pa1-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-D-HArg(Et)2-Leu-HArg(Et)2-Pro-Ala-氨基树脂。

[0086] (4) 加尼瑞克肽粗品的制备

[0087] 配制裂解液TFA:TIS:EDT=95:3:2(质量比,下同)对树脂肽进行裂解,(1g树脂10mL裂解液)温度为25℃,裂解1.5h,过滤掉树脂,加甲基叔丁基醚析晶,(裂解液与甲基叔丁基醚体积比为1:10)离心,固体用甲基叔丁基醚洗涤两次,离心,真空干燥箱烘干,得到加尼瑞克粗品白色粉末3.78g,收率3.78/(4\*0.521\*1568.84/1000)=115.6%,纯度95.47%(如图1所示),LC-MS:[3M+3H]<sup>+</sup>=1571.85,[2M+2H]<sup>+</sup>=1570.84(如图2所示)。

[0088] (5) 加尼瑞克肽纯品的制备

[0089] 将加尼瑞克粗肽3.78g,用乙腈:水=(4:1)溶液共200mL溶解过滤后,滤液通过C8反相柱制备纯化。制备条件:色谱柱:50\*250mm,流速:100mL/min,流动相A为0.5%TFA/水,流动相B为乙腈,梯度程序为流动相B 50分钟内由8%到50%,检测波长为280nm,收集目标峰馏分。转盐色谱条件:色谱柱:50\*250mm,流速:100mL/min,流动相A为0.5%乙酸/水,流动相B为乙腈,梯度程序为流动相B30分钟内由5%到50%,上样体积为800mL,检测波长为280nm,收集目标峰馏分。目标馏分通过冻干机冻干得到白色粉末2.71g,纯度为99.96%的加尼瑞克肽纯品,最大单杂为0.02%(如图3所示),总收率为2.71/(4\*0.521\*1568.84/1000)=82.99%。

[0090] 实施例2(相对实施例1,步骤1和3中的缩合试剂是树脂的5倍)

[0091] (1) 加尼瑞克片段A[3-10]肽树脂的制备

[0092] 称取Fmoc-D-Ala-Rink AM Amide树脂4g (2.1mmol,取代度为0.521mmol/g),加入

固相多肽合成器中,加入50mL DCM,氮气鼓吹溶胀树脂5分钟,抽干。加入50mL配制好的20% PIP/DMF溶液脱保护两次,分别为10分钟。树脂再用DMF洗涤6次,每次50mL。称取Fmoc-Pro-OH 3.51g (10.43mmol, 5eq)、1.44g HOBT (10.43mmol, 5eq)、50mL DMF加入到100mL单口烧瓶中溶解完全,冰浴 (0-5°C) 5分钟,加入1.6mL DIC (10.43mmol, 5eq),预活化30min,然后过滤得到滤液,将滤液加入到树脂中,氮气鼓吹,25°C反应60min,取少量树脂用Kaiser试剂检测判断反应终点,树脂无色透明,则表示反应完全,继续反应60min (树脂有色表示未反应完全,每隔30min检测一次直至树脂无色透明后,再继续反应60min)。反应达到终点后,抽干溶剂,树脂再用DMF洗涤4次,每次50mL。重复上述步骤,按照加尼瑞克序列从C端到N端进行逐一缩合,依次完成与Fmoc-L-HomoArg (Et) 2-OH • HCl、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-D-HomoArg (Et) 2-OH • HCl、Fmoc-Tyr (tBu) -OH、Fmoc-Ser (tBu) -OH、Fmoc-3-(3-Pyridyl)-D-Ala-OH的偶联反应。最后得到加尼瑞克肽树脂片段A[3-10] : Fmoc-D-Pal-Ser (tBu) -Tyr (tBu) -D-HomoArg (Et) 2-Leu-L-HomoArg (Et) 2-Pro-D-Ala-氨基树脂。

[0093] (2) 中间体片段B[1-2]的制备

[0094] 称取2-Chlorotrityl Chloride Resin树脂20g (20mmol, 取代度为1mmol/g), 加入固相多肽合成器中,加入250mL DCM,氮气鼓吹溶胀树脂5分钟,抽干。加入Fmoc-D-Cpa-OH 14g (40mmol, 2eq), DCM 250mL, DIEA 10.5mL (3eq, 60mmol), 25°C反应120min,加入75mL甲醇封头,30min后,抽干,250mL DMF洗涤4次,加入250mL配制好的20% PIP/DMF溶液脱保护两次,分别为10分钟。树脂再用DMF洗涤6次,每次250mL。称取Ac-D-Na1-OH 10.3g (40mmol, 2eq)、1.35g HOBT (40mmol, 2eq) 加入到500mL单口烧瓶中,加入250mL DMF溶解完全,冰浴 (0-5°C) 5分钟,加入6.5mL DIC (40mmol, 2eq),预活化30min,过滤得到滤液,将滤液加入到树脂中,氮气鼓吹,25°C反应60min,取少量树脂用Kaiser试剂检测判断反应终点,树脂无色透明,则表示反应完全,继续反应60min (树脂有色表示未反应完全,每隔30min检测一次直至树脂无色透明后,再继续反应60min)。反应达到终点后,抽干溶剂,树脂再用DMF洗涤4次,每次250mL。树脂肽用甲醇洗涤两次,每次250mL,水泵抽干直至树脂呈流沙状,得到中间体片段B[1-2]肽树脂:Ac-D-Na1-D-Cpa树脂。配制30%三氟乙醇/DCM溶液500mL,25°C切割120min,过滤掉树脂,旋干溶剂,石油醚重结晶得到中间体片段B[1-2] : Ac-D-Na1-D-CpaOH, 纯度99.6%, 得到8.5g, 收率8.5 / (20\*438.13/1000) = 97.0%。

[0095] (3) 加尼瑞克肽树脂的制备

[0096] 将上述得到的加尼瑞克片段A[3-10]肽树脂加入50mL配制好的20% PIP/DMF溶液脱保护两次,分别为10分钟。树脂再用DMF洗涤6次,每次50mL。称取中间体片段B[1-2] 4.56g (10.43mmol, 5eq)、1.44g HOBT (10.43mmol, 5eq)、50mL DMF加入到100mL单口烧瓶中溶解完全,冰浴 (0-5°C) 5分钟,加入1.6mL DIC (10.43mmol, 5eq),预活化30min,加入到树脂中,氮气鼓吹,25°C反应60min,取少量树脂用Kaiser试剂检测判断反应终点,树脂无色透明,则表示反应完全,继续反应60min (树脂有色表示未反应完全,每隔30min检测一次直至树脂无色透明后,再继续反应60min)。反应达到终点后,抽干溶剂,树脂再用DMF洗涤4次,每次50mL。树脂肽用甲醇洗涤两次,每次50mL,水泵抽干直至树脂呈流沙状,得到加尼瑞克肽树脂Ac-D-Na1-D-Cpa-D-Pal-Ser (tBu) -Tyr (tBu) -D-HArg (Et) 2-Leu-HArg (Et) 2-Pro-Ala-氨基树脂。

[0097] (4) 加尼瑞克肽粗品的制备

[0098] 配制裂解液TFA:TIS:EDT=95:3:2对树脂肽进行裂解, (1g树脂10mL裂解液) 温度为25℃, 裂解1.5h, 过滤掉树脂, 加甲基叔丁基醚析晶, (裂解液与甲基叔丁基醚体积比为1:10) 离心, 固体用甲基叔丁基醚洗涤两次, 离心, 真空干燥箱烘干, 得到加尼瑞克粗品白色粉末, 3.83g, 收率117.1%, 纯度94.75% (如图4所示),  $[3\text{M}+3\text{H}]^+ = 1571.85$ ,  $[2\text{M}+2\text{H}]^+ = 1570.84$ 。

[0099] (5) 加尼瑞克肽纯品的制备

[0100] 将加尼瑞克粗肽3.83g, 用乙腈:水=(4:1) 溶液共200mL溶解过滤后, 滤液通过C8反相柱制备纯化。制备条件: 色谱柱: 50\*250mm, 流速: 100mL/min, 流动相A为0.5%TFA/水, 流动相B为乙腈, 梯度程序为流动相B 50分钟内由8%到50%, 检测波长为280nm, 收集目标峰馏分。转盐色谱条件: 色谱柱: 50\*250mm, 流速: 100mL/min, 流动相A为0.5%乙酸/水, 流动相B为乙腈, 梯度程序为流动相B30分钟内由5%到50%, 上样体积为800mL, 检测波长为280nm, 收集目标峰馏分。目标馏分通过冻干机冻干得到2.65g, 纯度为99.90%的加尼瑞克肽纯品, 最大单杂为0.08% (如图5所示), 总收率为81.04%。

[0101] 实施例3(相对实施例1, 裂解试剂比例不同)

[0102] (1) 加尼瑞克片段A[3-10]肽树脂的制备

[0103] 称取Fmoc-D-Ala-Rink AM Amide树脂4g (2.1mmol, 取代度为0.521mmol/g), 加入固相多肽合成器中, 加入50mL DCM, 氮气鼓吹溶胀树脂5分钟, 抽干。加入50mL配制好的20% PIP/DMF溶液脱保护两次, 分别为10分钟。树脂再用DMF洗涤6次, 每次50mL。称取Fmoc-Pro-OH 2.81g (8.34mmol, 4eq)、1.15g HOBT (8.34mmol, 4eq)、50mL DMF加入到100mL单口烧瓶中溶解完全, 冰浴(0-5℃)5分钟, 加入1.3mL DIC (8.34mmol, 4eq), 预活化30min, 然后过滤得到滤液, 将滤液加入到树脂中, 氮气鼓吹, 25℃反应60min, 取少量树脂用Kaiser试剂检测判断反应终点, 树脂无色透明, 则表示反应完全, 继续反应60min (树脂有色表示未反应完全, 每隔30min检测一次直至树脂无色透明)。反应达到终点后, 抽干溶剂, 树脂再用DMF洗涤4次, 每次50mL。重复上述步骤, 按照加尼瑞克序列从C端到N端进行逐一缩合, 依次完成与Fmoc-L-HomoArg (Et) 2-OH • HC1、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-D-HomoArg (Et) 2-OH • HC1、Fmoc-Tyr (tBu) -OH、Fmoc-Ser (tBu) -OH、Fmoc-3-(3-Pyridyl)-D-Ala-OH的偶联反应。最后得到加尼瑞克肽树脂片段A[3-10]: Fmoc-D-Pal-Ser (tBu) -Tyr (tBu) -D-HomoArg (Et) 2-Leu-L-HomoArg (Et) 2-Pro-D-Ala--氨基树脂。

[0104] (2) 中间体片段B[1-2]的制备

[0105] 称取2-Chlorotrityl Chloride Resin树脂20g (20mmol, 取代度为1mmol/g), 加入固相多肽合成器中, 加入250mL DCM, 氮气鼓吹溶胀树脂5分钟, 抽干。加入Fmoc-D-Cpa-OH14g (40mmol, 2eq), DCM 250mL, DIEA 10.5mL (3eq, 60mmol), 25℃反应120min, 加入75mL甲醇封头, 30min后, 抽干, 250mL DMF洗涤4次, 加入250mL配制好的20%PIP/DMF溶液脱保护两次, 分别为10分钟。树脂再用DMF洗涤6次, 每次250mL。称取Ac-D-Na1-OH10.3g (40mmol, 2eq)、1.35g HOBT (40mmol, 2eq) 加入到500mL单口烧瓶中, 加入250mL DMF溶解完全, 冰浴(0-5℃)5分钟, 加入6.5mL DIC (40mmol, 2eq), 预活化30min, 过滤得到滤液, 将滤液加入到树脂中, 氮气鼓吹, 25℃反应60min, 取少量树脂用Kaiser试剂检测判断反应终点, 树脂无色透明, 则表示反应完全, 继续反应60min (树脂有色表示未反应完全, 每隔30min检测一次直至树脂无色透明)。反应达到终点后, 抽干溶剂, 树脂再用DMF洗涤4次, 每次250mL。树脂肽用甲

CN 114478708 A

醇洗涤两次,每次250mL,水泵抽干直至树脂呈流沙状,得到中间体片段B[1-2]肽树脂:Ac-D-Nal-D-Cpa树脂。配制30%三氟乙醇/DCM溶液500mL,25℃切割120min,过滤掉树脂,旋干溶剂,石油醚重结晶得到中间体片段B[1-2]:Ac-D-Nal-D-CpaOH,纯度99.5%,得到8.6g,收率98.1%。

[0106] (3) 加尼瑞克肽树脂的制备

[0107] 将上述得到的加尼瑞克片段A[3-10]肽树脂加入50mL配制好的20%PIP/DMF溶液脱保护两次,分别为10分钟。树脂再用DMF洗涤6次,每次50mL。称取中间体片段B[1-2]3.65g(8.34mmol,4eq)、1.15gHOBt(8.34mmol,4eq)、50mL DMF加入到100mL单口烧瓶中溶解完全,冰浴(0-5℃)5分钟,加入1.3mL DIC(8.34mmol,4eq),预活化30min,加入到树脂中,氮气鼓吹,25℃反应60min,取少量树脂用Kaiser试剂检测判断反应终点,树脂无色透明,则表示反应完全,继续反应60min(树脂有色表示未反应完全,每隔30min检测一次直至树脂无色透明)。反应达到终点后,抽干溶剂,树脂再用DMF洗涤4次,每次50mL。树脂肽用甲醇洗涤两次,每次50mL,水泵抽干直至树脂呈流沙状,得到加尼瑞克肽树脂Ac-D-Nal-D-Cpa-D-Pal-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-D-HArg(Et)2-Leu-HArg(Et)2-Pro-Ala-氨基树脂。

[0108] (4) 加尼瑞克肽粗品的制备

[0109] 配制裂解液TFA:TIS:EDT=95:4:1对树脂肽进行裂解,(1g树脂10mL裂解液)温度为25℃,裂解1.5h,过滤掉树脂,加甲基叔丁基醚析晶,(裂解液与甲基叔丁基醚体积比为1:10)离心,固体用甲基叔丁基醚洗涤两次,离心,真空干燥箱烘干,得到加尼瑞克粗品白色粉末,3.64g,收率111.3%纯度95.09%(如图6所示),[3M+3H]+=1571.85,[2M+2H]+=1570.84。

[0110] (5) 加尼瑞克肽纯品的制备

[0111] 将加尼瑞克粗肽3.64g,用乙腈:水=(4:1)溶液共200mL溶解过滤后,滤液通过C8反相柱制备纯化。制备条件:色谱柱:50\*250mm,流速:100mL/min,流动相A为0.5%TFA/水,流动相B为乙腈,梯度程序为流动相B 50分钟内由8%到50%,检测波长为280nm,收集目标峰馏分。转盐色谱条件:色谱柱:50\*250mm,流速:100mL/min,流动相A为0.5%乙酸/水,流动相B为乙腈,梯度程序为流动相B30分钟内由5%到50%,上样体积为800mL,检测波长为280nm,收集目标峰馏分。目标馏分通过冻干机冻干得到2.71g,纯度为99.94%的加尼瑞克肽纯品,最大单杂为0.04%(如图7所示),总收率为82.99%。

[0112] 实施例4

[0113] (1) 加尼瑞克片段A[3-10]肽树脂的制备

[0114] 称取Fmoc-D-Ala-Rink AM Amide树脂4g(2.1mmol,取代度为0.521mmol/g),加入固相多肽合成器中,加入50mL DCM,氮气鼓吹溶胀树脂5分钟,抽干。加入50mL配制好的20%PIP/DCM溶液脱保护两次,分别为10分钟。树脂再用DMF洗涤6次,每次50mL。称取Fmoc-Pro-OH 2.81g(8.34mmol,4eq)、3.16g HBTU(8.34mmol,4eq)、50mL DMF加入到100mL单口烧瓶中溶解完全,冰浴(0-5℃)5分钟,加入1.5mL DIEA(8.34mmol,4eq),预活化30min,然后过滤得到滤液,将滤液加入到树脂中,氮气鼓吹,25℃反应60min,取少量树脂用Kaiser试剂检测判断反应终点,树脂无色透明,则表示反应完全,继续反应60min(树脂有色表示未反应完全,每隔30min检测一次直至树脂无色透明后,再继续反应60min)。反应达到终点后,抽干溶剂,树脂再用DMF洗涤4次,每次50mL。重复上述步骤,按照加尼瑞克序列从C端到N端进行逐一缩

合,依次完成与Fmoc-L-HomoArg (Et) 2-OH • HCl、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-D-HomoArg (Et) 2-OH • HCl、Fmoc-Tyr (tBu) -OH、Fmoc-Ser (tBu) -OH、Fmoc-3-(3-Pyridyl)-D-Ala-OH的偶联反应。最后得到加尼瑞克肽树脂片段A[3-10] : Fmoc-D-Pal-Ser (tBu) -Tyr (tBu) -D-HomoArg (Et) 2-Leu-L-HomoArg (Et) 2-Pro-D-Ala--氨基树脂。

[0115] (2) 中间体片段B[1-2]的制备

[0116] 称取2-Chlorotriyl Chloride Resin树脂20g (20mmol, 取代度为1mmol/g), 加入固相多肽合成器中, 加入250mL DCM, 氮气鼓吹溶胀树脂5分钟, 抽干。加入Fmoc-D-Cpa-OH14g (40mmol, 2eq), DCM 250mL, DIEA 10.5mL (3eq, 60mmol), 25℃反应120min, 加入75mL甲醇封头, 30min后, 抽干, 250mL DMF洗涤4次, 加入250mL配制好的20% PIP/DCM溶液脱保护两次, 分别为10分钟。树脂再用DMF洗涤6次, 每次250mL。称取Ac-D-Na1-OH10.3g (40mmol, 2eq)、1.35gHOBT (40mmol, 2eq) HBTU (8.34mmol, 4eq) 加入到500mL单口烧瓶中, 加入250mL DMF溶解完全, 冰浴(0-5℃) 5分钟, 加入6.5mL DIC (40mmol, 2eq), 预活化30min, 过滤得到滤液, 将滤液加入到树脂中, 氮气鼓吹, 25℃反应60min, 取少量树脂用Kaiser试剂检测判断反应终点, 树脂无色透明, 则表示反应完全, 继续反应60min (树脂有色表示未反应完全, 每隔30min检测一次直至树脂无色透明后, 再继续反应60min)。反应达到终点后, 抽干溶剂, 树脂再用DMF洗涤4次, 每次250mL。树脂肽用甲醇洗涤两次, 每次250mL, 水泵抽干直至树脂呈流沙状, 得到中间体片段B[1-2]肽树脂: Ac-D-Na1-D-Cpa树脂。配制30%三氟乙醇/DCM溶液500mL, 25℃切割120min, 过滤掉树脂, 旋干溶剂, 石油醚重结晶得到中间体片段B[1-2] : Ac-D-Na1-D-Cpa-OH, 纯度99.7%, 得到8.5g, 收率8.5 / (20\*438.13/1000) = 97.0%。

[0117] (3) 加尼瑞克肽树脂的制备

[0118] 将上述得到的加尼瑞克片段A[3-10]肽树脂加入50mL配制好的20% PIP/DCM溶液脱保护两次, 分别为10分钟。树脂再用DMF洗涤6次, 每次50mL。称取中间体片段B[1-2]3.65g (8.34mmol, 4eq)、3.16g HBTU (8.34mmol, 4eq)、50mL DMF加入到100mL单口烧瓶中溶解完全, 冰浴(0-5℃) 5分钟, 加入1.5mL DIEA (8.34mmol, 4eq), 预活化30min, 加入到树脂中, 氮气鼓吹, 25℃反应60min, 取少量树脂用Kaiser试剂检测判断反应终点, 树脂无色透明, 则表示反应完全, 继续反应60min (树脂有色表示未反应完全, 每隔30min检测一次直至树脂无色透明后, 再继续反应60min)。反应达到终点后, 抽干溶剂, 树脂再用DMF洗涤4次, 每次50mL。树脂肽用甲醇洗涤两次, 每次50mL, 水泵抽干直至树脂呈流沙状, 得到加尼瑞克肽树脂Ac-D-Na1-D-Cpa-D-Pal-Ser (tBu) -Tyr (tBu) -D-HArg (Et) 2-Leu-HArg (Et) 2-Pro-Ala-氨基树脂。

[0119] (4) 加尼瑞克肽粗品的制备

[0120] 配制裂解液TFA:TIS:EDT=95:3:2 (质量比, 下同) 对树脂肽进行裂解, (1g树脂10mL裂解液) 温度为25℃, 裂解1.5h, 过滤掉树脂, 加甲基叔丁基醚析晶, (裂解液与甲基叔丁基醚体积比为1:10) 离心, 固体用甲基叔丁基醚洗涤两次, 离心, 真空干燥箱烘干, 得到加尼瑞克粗品白色粉末3.75g, 收率3.75 / (4\*0.521\*1568.84/1000) = 114.7%, 纯度95.42%。

[0121] (5) 加尼瑞克肽纯品的制备

[0122] 将加尼瑞克粗肽3.75g, 用乙腈:水 = (4:1) 溶液共200mL溶解过滤后, 滤液通过C8反相柱制备纯化。制备条件: 色谱柱: 50\*250mm, 流速: 100mL/min, 流动相A为0.5% TFA/水, 流动相B为乙腈, 梯度程序为流动相B 50分钟内由8%到50%, 检测波长为280nm, 收集目标

峰馏分。转盐色谱条件:色谱柱:50\*250mm,流速:100mL/min,流动相A为0.5%乙酸/水,流动相B为乙腈,梯度程序为流动相B30分钟内由5%到50%,上样体积为800mL,检测波长为280nm,收集目标峰馏分。目标馏分通过冻干机冻干得到白色粉末2.72g,纯度为99.92%的加尼瑞克肽纯品,最大单杂为0.02%,总收率为 $2.72/(4*0.521*1568.84/1000) = 83.19\%$ 。

[0123] 实施例5

[0124] 参照实施例1的方法,步骤(2)选择乙醚、二丙醚、异丙醚、甲基叔丁基醚、乙二醇二甲醚分别替换石油醚作为重结晶溶剂对中间体片段B[1-2]进行重结晶,结果如下:

[0125] 重结晶溶剂为乙醚、二丙醚、异丙醚、甲基叔丁基醚、乙二醇二甲醚时,获得的中间体片段B[1-2]的纯度分别为98.2%、98.5%、98.3%、99.0%、98.8%,收率分别为98.8%、98.5%、98.7%、97.7%、98.0%,而用石油醚重结晶得到中间体片段B[1-2]纯度更佳,为99.5%。故重结晶溶剂优选为石油醚。

[0126] 对比实施例1

[0127] 参照实施例1方法,区别是采用5+5的片段固相合成法,分别制备加尼瑞克片段A[6-10]肽树脂Fmoc-D-HomoArg(Et)2-Leu-L-HomoArg(Et)2-Pro-D-Ala-氨基树脂,加尼瑞克片段B[1-5]肽树脂Ac-D-Na1-D-Cpa-D-Pa1-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-NH2,然后偶联反应,裂解后得到加尼瑞克粗品Ac-D-Na1-D-Cpa-D-Pa1-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-D-HomoArg(Et)2-Leu-HomoArg(Et)2-Pro-Ala-NH2。

[0128] 具体的:

[0129] 步骤(1)中,依次完成与Fmoc-Pro-OH、Fmoc-L-HomoArg(Et)2-OH•HCl、Fmoc-Leu-OH和Fmoc-D-HomoArg(Et)2-OH•HCl的偶联反应,其他操作步骤与实施例1一致;

[0130] 步骤(2)中,依次完成与Fmoc-Tyr(tBu)-OH、Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-3-(3-Pyridyl)-D-Ala-OH、Fmoc-D-Cpa-OH和Ac-D-Na1-OH的偶联反应,其他操作步骤与实施例1一致;

[0131] 步骤(3)~(5)同实施例1。

[0132] 步骤(4)得到的加尼瑞克粗品纯度仅为90%,经过进一步纯化后,纯度仅为98%,总收率为80%。

[0133] 对比实施例2

[0134] 参照实施例1方法,区别是采用6+4的片段固相合成法,分别制备加尼瑞克片段A[5-10]肽树脂Fmoc-Tyr(tBu)-D-HArg(Et)2-Leu-HArg(Et)2-Pro-Ala-氨基树脂,加尼瑞克片段B[1-4]肽树脂Ac-D-Na1-D-Cpa-D-Pa1-Ser(tBu)-NH2,然后偶联反应,裂解后得到加尼瑞克粗品Ac-D-Na1-D-Cpa-D-Pa1-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-D-HomoArg(Et)2-Leu-HomoArg(Et)2-Pro-Ala-NH2。

[0135] 具体的:

[0136] 步骤(1)中,依次完成与Fmoc-Pro-OH、Fmoc-L-HomoArg(Et)2-OH•HCl、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-D-HomoArg(Et)2-OH•HCl和Fmoc-Tyr(tBu)-OH的偶联反应,其他操作步骤与实施例1一致;

[0137] 步骤(2)中,依次完成与Fmoc-Ser(tBu)-OH、Fmoc-3-(3-Pyridyl)-D-Ala-OH、Fmoc-D-Cpa-OH和Ac-D-Na1-OH的偶联反应,其他操作步骤与实施例1一致;

[0138] 步骤(3)~(5)同实施例1。

[0139] 步骤(4)得到的加尼瑞克粗品纯度仅为87%，经过进一步纯化后，纯度仅为94%，总收率为79%。

[0140] 对比实施例3

[0141] 参照实施例1方法，区别是采用7+3的片段固相合成法，分别制备加尼瑞克片段A[4-10]肽树脂Fmoc-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-D-HArg(Et)2-Leu-HArg(Et)2-Pro-Ala-氨基树脂，加尼瑞克片段B[1-3]肽树脂Ac-D-Na1-D-Cpa-D-Pa1-NH2，然后偶联反应，裂解后得到加尼瑞克粗品Ac-D-Na1-D-Cpa-D-Pa1-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-D-HomoArg(Et)2-Leu-HomoArg(Et)2-Pro-Ala-NH2。

[0142] 具体的：

[0143] 步骤(1)中，依次完成与Fmoc-Pro-OH、Fmoc-L-HomoArg(Et)2-OH•HCl、Fmoc-Leu-OH、Fmoc-D-HomoArg(Et)2-OH•HCl、Fmoc-Tyr(tBu)-OH和Fmoc-Ser(tBu)-OH的偶联反应，其他操作步骤与实施例1一致；

[0144] 步骤(2)中，依次完成与Fmoc-3-(3-Pyridyl)-D-Ala-OH、Fmoc-D-Cpa-OH和Ac-D-Na1-OH的偶联反应，其他操作步骤与实施例1一致；

[0145] 步骤(3)～(5)同实施例1。

[0146] 步骤(4)得到的加尼瑞克粗品纯度仅为88%，经过进一步纯化后，纯度仅为95%，总收率为78%。

[0147] 对比实施例4

[0148] 参照实施例1方法，区别是裂解液为TFA:TIS:水=95:3:2，粗品出现发粘现象，纯度仅为86%，可能与产品发粘包裹杂质有关，经过进一步纯化后，纯度仅为94%，总收率为78%。

[0149] 对比实施例5

[0150] 参照实施例1方法，区别是所有步骤中涉及的预活化过程是室温下进行，而非冰浴条件，其他操作均同实施例1，步骤(4)得到的加尼瑞克粗品纯度仅为92.15%，经过进一步纯化后，纯度仅为97.25%，杂质含量更高，总收率为80%。因此预活化在冰浴条件下进行能够明显提高最终产品纯度，减少杂质含量。

[0151] 对比实施例6

[0152] 参照实施例1方法，区别是步骤(4)中的裂解液选择TFA:TIS=95:5，其他操作均同实施例1，步骤(4)得到的加尼瑞克粗品纯度仅为93.01%，经过进一步纯化后，纯度仅为97.56%，杂质含量更高，总收率为79%。

[0153] 因此选择合适的裂解液对最终产品的纯度影响至关重要，TFA:TIS:EDT这3种成分的组合相对TFA:TIS这两种成分能够有效提升粗肽纯度和反应转化率，转化率至少提高1.7%，因此具有明显的经济效益，可以有效降低生产成本。

[0154] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。



图1

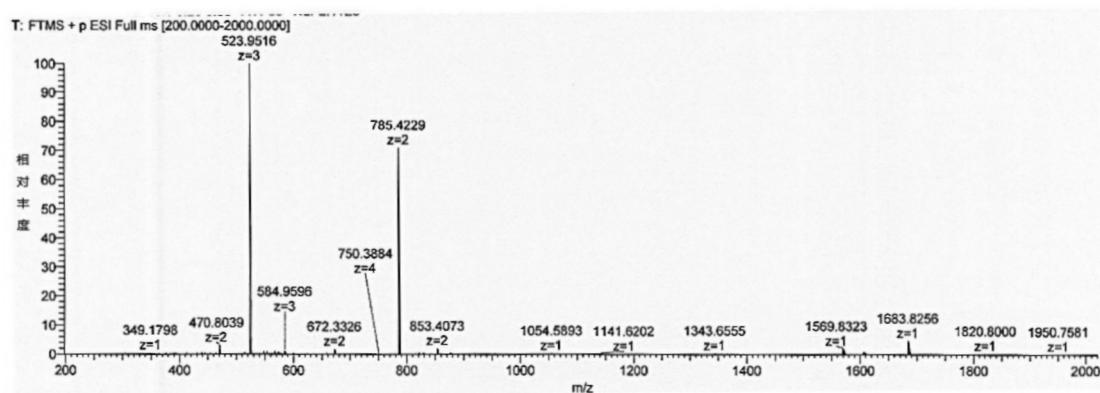
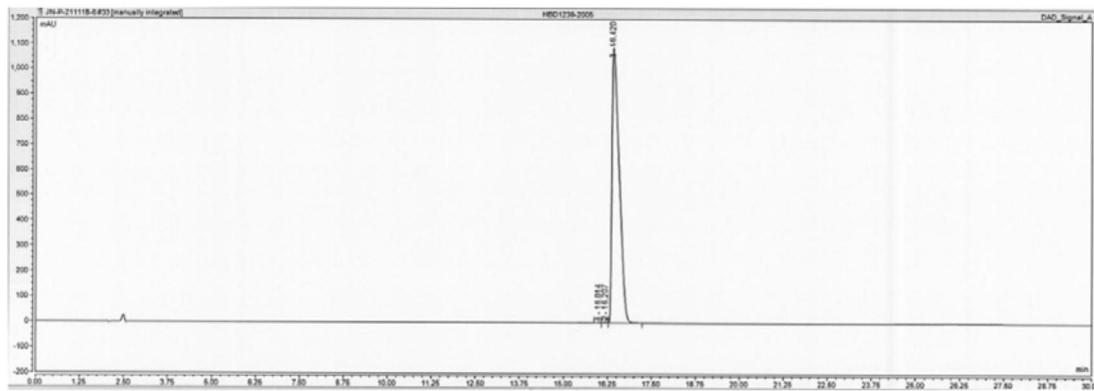
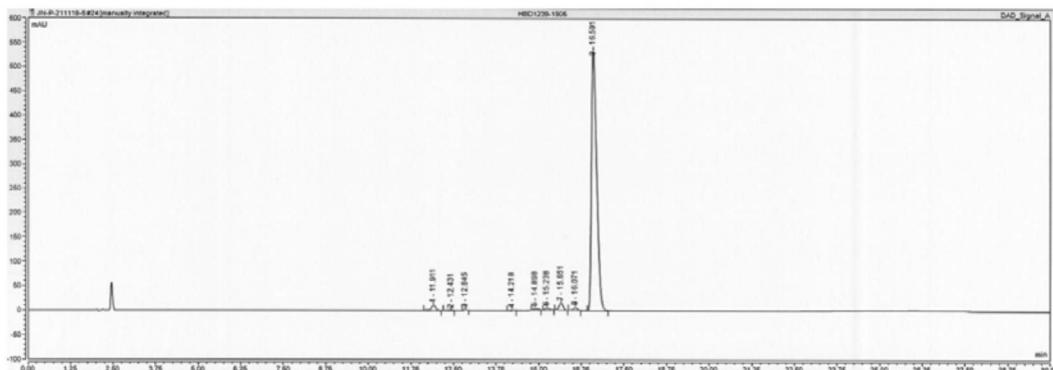


图2



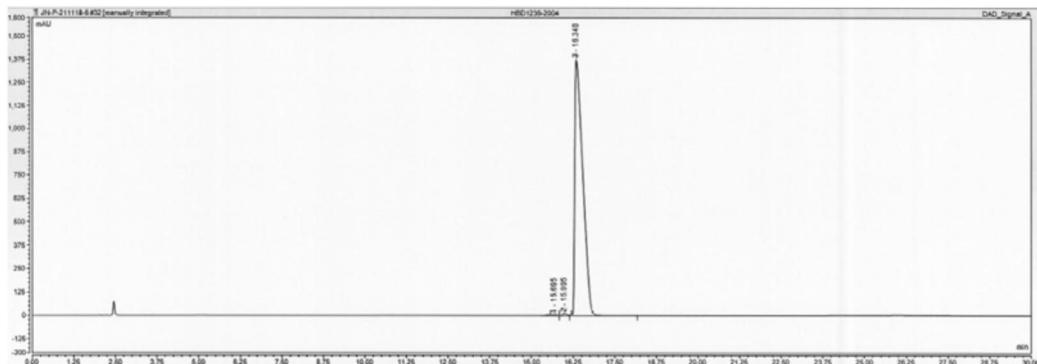
序号	峰名称	保留时间 (min)	相对面积 %	面积 mAU*min	峰高 mAU
1		16.014	0.067	0.1728	1.25
2		16.207	0.096	0.2493	1.80
3		16.42	99.837	258.1011	1090.16

图3



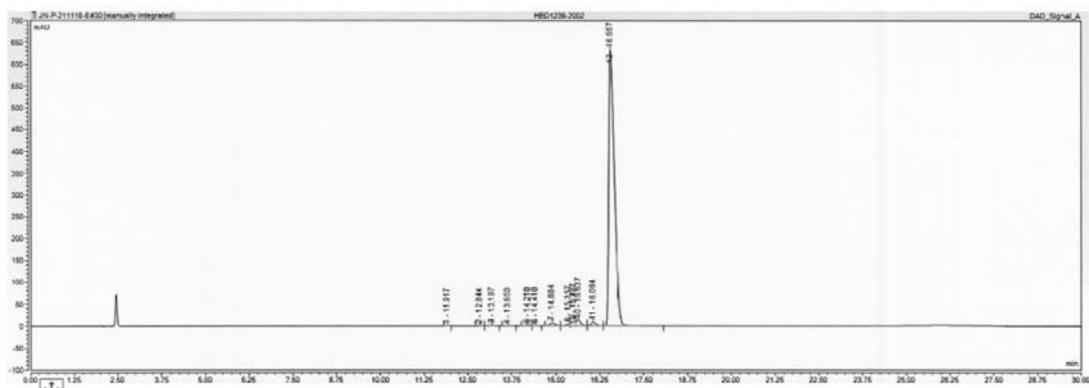
序号	峰名称	保留时间 (min)	相对面积 %	面积 mAU*min	峰高 mAU
1		11.911	1.622	1.6246	11.42
2		12.431	0.130	0.1301	0.85
3		12.845	0.130	0.1299	1.27
4		14.218	0.164	0.1644	1.36
5		14.898	0.676	0.6767	3.37
6		15.238	0.636	0.6370	4.74
7		15.651	1.985	1.9878	14.47
8		16.071	0.816	0.8175	6.06
9		16.591	93.842	93.9937	532.73

图4



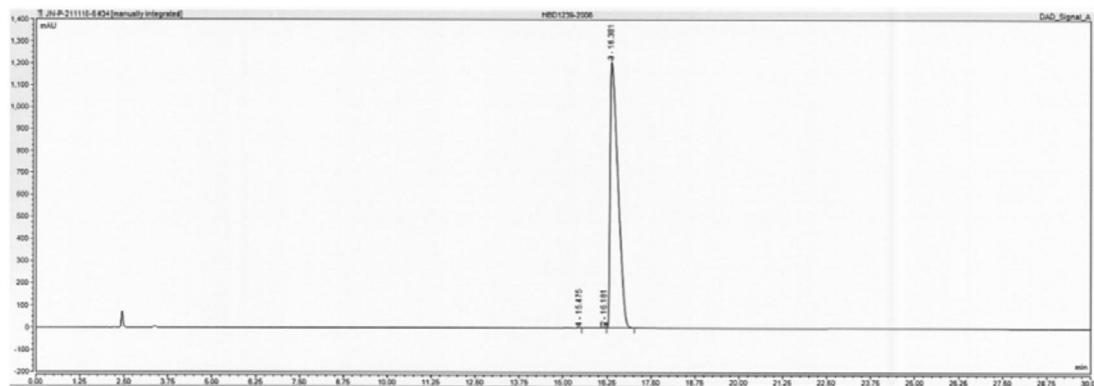
序号	峰名称	保留时间 (min)	相对面积 %	面积 mAU*min	峰高 mAU
1		15.695	0.156	0.5933	3.48
2		15.995	0.316	1.2002	8.62
3		16.348	99.528	378.5870	1374.43

图5



序号	峰名称	保留时间 (min)	相对面积 %	面积 mAU*min	峰高 mAU
1		11.917	0.084	0.1055	0.95
2		12.844	0.031	0.0395	0.29
3		13.197	0.178	0.2243	1.45
4		13.650	0.027	0.0337	0.21
5		14.210	0.194	0.2442	1.84
6		14.410	0.077	0.0965	0.70
7		14.884	0.981	1.2323	6.98
8		15.357	0.494	0.6211	5.03
9		15.497	1.116	1.4025	10.50
10		15.637	1.575	1.9795	12.81
11		16.064	1.141	1.4336	9.15
12		16.557	94.101	118.2432	632.50

图6



序号	峰名称	保留时间 (min)	相对面积 %	面积 mAU*min	峰高 mAU
1		15.475	0.018	0.0543	0.70
2		16.181	0.050	0.1521	1.44
3		16.381	99.933	305.7432	1208.42

图7