



(10) 授权公告号 CN 111518009 B

(45) 授权公告日 2023.06.23

(21) 申请号 201910104409.0

CN 1951965 A, 2007.04.25

(22) 申请日 2019.02.01

WO 2013086786 A1, 2013.06.20

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111518009 A

CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS,
OHIO, US. 853788-15-5/CAS RN.《DATEBASE
REGISTRY》. 2005,

(43) 申请公布日 2020.08.11

审查员 费嘉

(73) 专利权人 鲁南制药集团股份有限公司

地址 276005 山东省临沂市红旗路209号

(72) 发明人 张贵民 刘凌宪 林明 翁文桂

(51) Int. Cl.

C07D 207/46 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104428314 A, 2015.03.18

CN 109069569 A, 2018.12.21

CN 106496322 A, 2017.03.15

CN 1829738 A, 2006.09.06

权利要求书2页 说明书17页

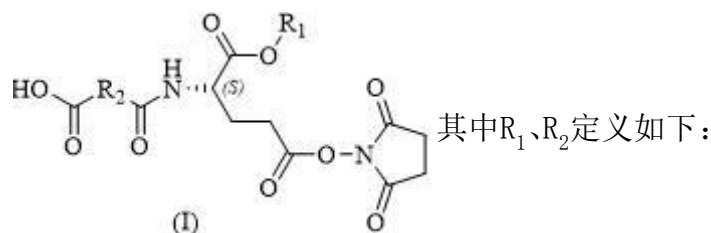
(54) 发明名称

一种脂肪酸衍生物及其合成方法

(57) 摘要

本发明属于药物合成技术领域,涉及了一种脂肪酸衍生物,该脂肪酸衍生物通过蛋白修饰技术制备胰岛素衍生物反应活性高,偶联产率高。本发明还公开了一种该衍生物的合成方法,包括以下步骤:选用碳鎓盐类缩合剂TSTU活化谷氨酸类似物,得到谷氨酸琥珀酰亚胺酯类似物;将长链脂肪二酸琥珀酰亚胺酯与谷氨酸琥珀酰亚胺酯类似物反应,最终得到长链脂肪酸衍生物。该方法操作简便,收率高,更适于工业化生产。

1. 一种如式(I)所示的脂肪酸衍生物的合成方法:



R_1 为苄基时, R_2 为 $-(CH_2)_6-$ 、 $-(CH_2)_{10}-$ 、 $-(CH_2)_{12}-$ 、 $-(CH_2)_{14}-$ 、 $-(CH_2)_{16}-$ 、 $-(CH_2)_{18}-$ 、 $-(CH_2)_{20}-$ 、 $-(CH_2)_{22}-$ 、 $-(CH_2)_{24}-$ 、 $-(CH_2)_{26}-$ 、 $-(CH_2)_{32}-$ 中的一种;

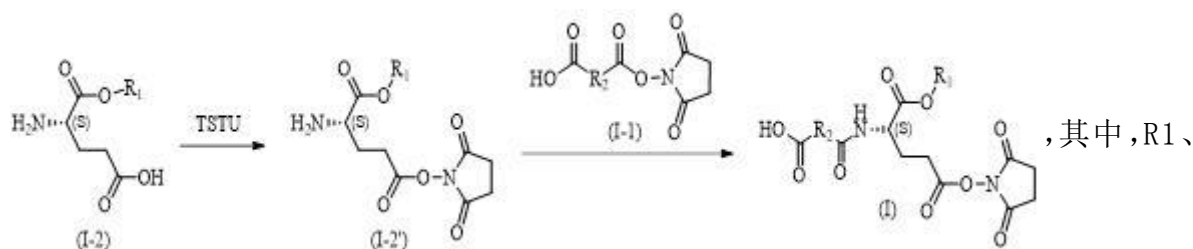
R_1 为甲基时, R_2 为 $-(CH_2)_6-$ 、 $-(CH_2)_8-$ 、 $-(CH_2)_{12}-$ 、 $-(CH_2)_{14}-$ 、 $-(CH_2)_{16}-$ 、 $-(CH_2)_{18}-$ 、 $-(CH_2)_{20}-$ 、 $-(CH_2)_{22}-$ 、 $-(CH_2)_{24}-$ 、 $-(CH_2)_{32}-$ 中的一种;

R_1 为乙基时, R_2 为 $-(CH_2)_6-$ 、 $-(CH_2)_{10}-$ 、 $-(CH_2)_{12}-$ 、 $-(CH_2)_{14}-$ 、 $-(CH_2)_{16}-$ 、 $-(CH_2)_{18}-$ 、 $-(CH_2)_{20}-$ 中的一种;

R_1 为丙基时, R_2 为 $-(CH_2)_7-$ 、 $-(CH_2)_9-$ 、 $-(CH_2)_{11}-$ 、 $-(CH_2)_{14}-$ 、 $-(CH_2)_{15}-$ 、 $-(CH_2)_{18}-$ 、 $-(CH_2)_{20}-$ 中的一种;

R_1 为叔丁基时, R_2 为 $-(CH_2)_6-$ 、 $-(CH_2)_9-$ 、 $-(CH_2)_{10}-$ 、 $-(CH_2)_{12}-$ 、 $-(CH_2)_{14}-$ 、 $-(CH_2)_{16}-$ 、 $-(CH_2)_{18}-$ 、 $-(CH_2)_{20}-$ 、 $-(CH_2)_{22}-$ 、 $-(CH_2)_{24}-$ 、 $-(CH_2)_{26}-$ 、 $-(CH_2)_{28}-$ 、 $-(CH_2)_{32}-$ 中的一种;

其合成路线如下所示:



R_2 如式(I)所定义;

具体合成步骤包括:

步骤(1): 将I-2、缚酸剂加入有机溶剂A中, 控温, 滴加TSTU的有机溶剂A的溶液, 滴加完毕, 控温至反应结束后, 反应液过滤, 得到含有I-2'的溶液, 备用;

步骤(2): 将I-1溶于有机溶剂A中, 滴加步骤(1)中所得I-2'溶液, 滴加完毕, 控温至反应结束后, 减压蒸除溶剂, 所得固体用有机溶剂B溶解后, 洗涤, 干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至恒重即得目标产品I;

其中, 步骤(1)、步骤(2)中所述的有机溶剂A为丙酮, 四氢呋喃, 乙腈, N,N -二甲基甲酰胺, N,N -二甲基乙酰胺, N -甲基吡咯烷酮中的一种或两种;

步骤(2)中所述的有机溶剂B为二氯甲烷, 氯仿, 甲基叔丁基醚, 乙酸乙酯, 乙酸异丙酯, 乙酸丁酯中的一种或两种;

步骤(1)中所述的滴加TSTU的温度和反应温度为 $-10\sim 10^{\circ}\text{C}$, 步骤(2)中所述的滴加I-2'溶液的温度和反应温度为 $15\sim 40^{\circ}\text{C}$ 。

2. 根据权利要求1所述的脂肪酸衍生物的合成方法, 其特征在于, 步骤(1)中所述的缚酸剂为碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸氢钾、一乙胺、二乙胺、三乙胺、吡啶、哌啶、 N,N -二异丙基乙基胺中的一种或两种。

3. 根据权利要求1所述的脂肪酸衍生物的合成方法, 其特征在于, 步骤(1)、步骤(2)中所述的I-1与I-2、缚酸剂、TSTU的投料摩尔比为1:1.2~1.6:2.3~3.0:1.4~2.0。

4. 根据权利要求1所述的脂肪酸衍生物的合成方法, 其特征在于, 步骤(2)中所述的洗涤操作顺序为酸洗涤、纯化水洗涤、饱和食盐水洗涤, 其中酸洗涤过程中所用的洗涤液为稀盐酸和稀硫酸中的一种。

一种脂肪酸衍生物及其合成方法

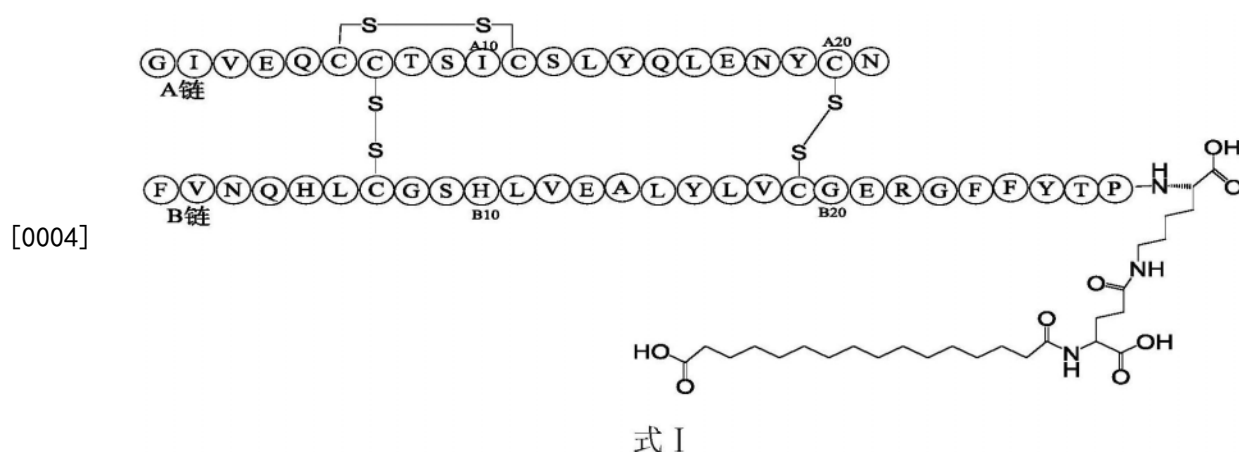
技术领域

[0001] 本发明涉及药物合成技术领域,具体涉及一种脂肪酸衍生物及其合成方法。

背景技术

[0002] 糖尿病是一种全球性的慢性代谢性疾病,需要终生治疗。在遗传或环境因素的作用下,胰岛B细胞无法分泌胰岛素或分泌量不足,就会引发糖尿病。1型糖尿病患者的胰岛B细胞已经丧失,会降解蛋白质和脂肪作为替代的能量来源,很容易导致酮症酸中毒。2型糖尿病患者体内存在胰岛素抵抗,其病情会随着胰岛B细胞功能减少而逐渐恶化。早期2型糖尿病患者会以锻炼、控制饮食及结合口服降糖药为主要治疗手段,但是随着病程的发展,无论1型糖尿病还是2型糖尿病,胰岛素都是必须的治疗手段之一。

[0003] 目前应用最为广泛的是短效的人胰岛素,但其存在较多的不足,尤其是皮下注射后吸收和达到峰值速度均较缓慢,与正常个体餐后胰岛素的分泌状态不同,因而控制餐后血糖不甚理想。由于药物浓度的峰值不能与餐后血糖高峰吻合,故易导致餐后高血糖和药物吸收后低血糖的发生。为减少糖尿病不良事件的发生,使胰岛素强化治疗更为安全、有效和方便,新的速效胰岛素类似物不断得以开发,而采用化学修饰的方法是制备长效胰岛素的研究热点。由丹麦诺和诺德公司(Novo Nordisk)研制,并于2004年在欧洲上市,批准用于治疗2型糖尿病的地特胰岛素,将天然人胰岛素B链上排列在第30位的苏氨酸(Thr)去掉,在第29位赖氨酸(Lys)上结合一个14C游离脂肪酸,添加的14C脂肪酸可与血液中的白蛋白结合,形成白蛋白结合体,从而延长其作用时间。CN1829738A、名称为“新型胰岛素衍生物”的发明专利公开了脂肪二酸侧链通过谷氨酸修饰的长效胰岛素类似物——德谷胰岛素,德谷胰岛素分子式如式I所示,是在人胰岛素的基础上,去掉B30位的苏氨酸,通过1个L- γ -谷氨酸连接子,将1个16碳脂肪二酸连接B29位赖氨酸上获得的一种超长效的基础胰岛素类似物。



[0005] 长链脂肪酸衍生物的制备及修饰反应成为了胰岛素类似物制备工艺中的重要环节。CN1829738A发明专利公开的制备连接酰化氨基的长链脂肪酸衍生物方法,选用N,N-二甲基甲酰胺二叔丁基缩醛作为叔丁酯化试剂制备十六烷二酸一叔丁酯,由制得的十六烷二

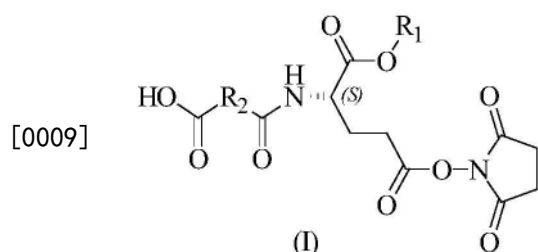
酸一叔丁酯通过TSTU和DIEA处理,得到十六烷二酸琥珀酰亚胺基叔丁基酯;十六烷二酸琥珀酰亚胺基叔丁基酯与L-谷氨酸-1-叔丁酯反应,得到叔丁基十六烷二酰基-L-Glu-OtBu后,经TSTU和DIEA处理得到叔丁基十六烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu。此方法合成胰岛素衍生物侧链步骤繁琐,其中十六烷二酸一叔丁酯收率仅为33%,十六烷二酸琥珀酰亚胺基叔丁基酯的收率为79%;N,N-二甲基甲酰胺二叔丁基缩醛作为叔丁酯化试剂,成本高,不适合工业放大;利用蛋白修饰通用技术,叔丁基十六烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu与Des(B30)人胰岛素反应制备胰岛素衍生物偶联产率为74%。发明专利CN105001140制备十六烷二酸一叔丁酯采用了酰氯和叔丁醇反应代替N,N-二甲基甲酰胺二叔丁基缩醛,虽然成本有所降低,但十六烷二酸一叔丁酯收率仅为40%,由十六烷二酸一叔丁酯制得十六烷二酸琥珀酰亚胺基叔丁基酯收率为77%;此方法得到最终产物十六烷二酰基-L-Glu(OSu)需要六步完成,操作繁琐;利用蛋白修饰通用技术,两端去叔丁基保护的十六烷二酰基-L-Glu(OSu)与Des(B30)人胰岛素反应制备胰岛素衍生物偶联产率为62%。

[0006] 总结现有技术发现,现有的胰岛素衍生物侧链的合成步骤繁琐,总体收率低,得到的最终产物参与胰岛素衍生物制备反应活性较低,偶联产率较低,因此探究一条操作简便、污染性小、收率更高、更适合工业化生产的工艺路线仍然是目前需要解决的问题。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于克服现有技术的缺点与不足,提供了一种脂肪酸衍生物,该脂肪酸衍生物可以通过蛋白修饰通用技术用于胰岛素衍生物的制备,其偶联产率有较大提高。此外,本发明提供了该脂肪酸衍生物的合成方法,该方法操作简便,收率高,更适于工业化生产。

[0008] 本发明的具体技术方案如下:



[0010] 一种如式(I)所示的脂肪酸衍生物:

[0011] R_1 为苄基、C1~C4的烷基; R_2 为通式 $-(CH_2)_m-$ 的基团,其中m为6~32的整数;

[0012] 优选地, R_1 为苄基时, R_2 为 $-(CH_2)_6-$ 、 $-(CH_2)_{10}-$ 、 $-(CH_2)_{12}-$ 、 $-(CH_2)_{14}-$ 、 $-(CH_2)_{16}-$ 、 $-(CH_2)_{18}-$ 、 $-(CH_2)_{20}-$ 、 $-(CH_2)_{22}-$ 、 $-(CH_2)_{24}-$ 、 $-(CH_2)_{26}-$ 、 $-(CH_2)_{32}-$ 中的一种;

[0013] 优选地, R_1 为甲基时, R_2 为 $-(CH_2)_6-$ 、 $-(CH_2)_8-$ 、 $-(CH_2)_{12}-$ 、 $-(CH_2)_{14}-$ 、 $-(CH_2)_{16}-$ 、 $-(CH_2)_{18}-$ 、 $-(CH_2)_{20}-$ 、 $-(CH_2)_{22}-$ 、 $-(CH_2)_{24}-$ 、 $-(CH_2)_{32}-$ 中的一种;

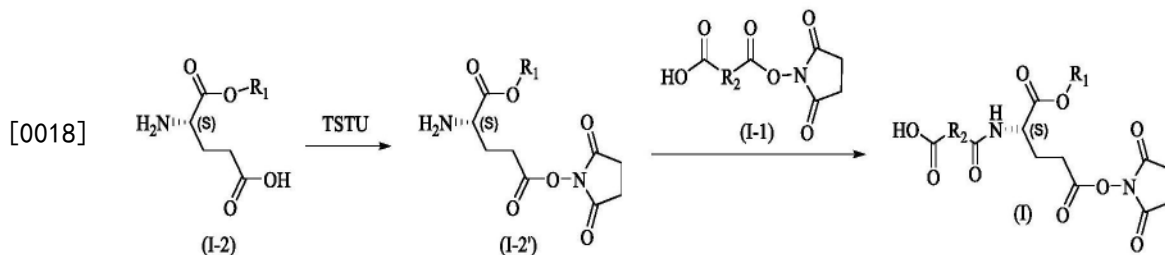
[0014] 优选地, R_1 为乙基时, R_2 为 $-(CH_2)_6-$ 、 $-(CH_2)_{10}-$ 、 $-(CH_2)_{12}-$ 、 $-(CH_2)_{14}-$ 、 $-(CH_2)_{16}-$ 、 $-(CH_2)_{18}-$ 、 $-(CH_2)_{20}-$ 中的一种;

[0015] 优选地, R_1 为丙基时, R_2 为 $-(CH_2)_7-$ 、 $-(CH_2)_9-$ 、 $-(CH_2)_{11}-$ 、 $-(CH_2)_{14}-$ 、 $-(CH_2)_{15}-$ 、 $-(CH_2)_{18}-$ 、 $-(CH_2)_{20}-$ 中的一种;

[0016] 优选地, R_1 为叔丁基时, R_2 为 $-(CH_2)_6-$ 、 $-(CH_2)_9-$ 、 $-(CH_2)_{10}-$ 、 $-(CH_2)_{12}-$ 、 $-(CH_2)_{14}-$ 、

$(\text{CH}_2)_{16}$ 、 $(\text{CH}_2)_{18}$ 、 $(\text{CH}_2)_{20}$ 、 $(\text{CH}_2)_{22}$ 、 $(\text{CH}_2)_{24}$ 、 $(\text{CH}_2)_{26}$ 、 $(\text{CH}_2)_{28}$ 、 $(\text{CH}_2)_{32}$ 中的一种。

[0017] 一种如式(I)所示的脂肪酸衍生物的合成方法,包括如下步骤:



[0019] (1):将I-2,缚酸剂加入有机溶剂A中,控温滴加TSTU的有机溶剂A溶液,滴加完毕,控温至反应结束后,反应液过滤,得到含有I-2'的溶液,备用;

[0020] (2):将I-1溶于有机溶剂A中,滴加步骤(1)中所得I-2'溶液,滴加完毕,控温至反应结束后,减压蒸除溶剂,所得固体用有机溶剂B溶解后,洗涤,干燥,过滤,滤液减压浓缩至恒重即得目标产品I。

[0021] 步骤(1)中所述化合物I-2为加入保护基 R_1 的谷氨酸类似物, R_1 为苄基、C1~C4的烷基中的一种。

[0022] 步骤(1)中所述的缚酸剂为碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸氢钾、一乙胺、二乙胺、三乙胺、吡啶、哌啶、N,N-二异丙基乙基胺中的一种或两种。

[0023] 步骤(1)、步骤(2)中所述的有机溶剂A为丙酮,四氢呋喃,乙腈,N,N-二甲基甲酰胺,N,N-二甲基乙酰胺,N-甲基吡咯烷酮中的一种或两种。

[0024] 步骤(1)中所述的滴加TSTU的温度和反应温度为 $-10\sim 10^\circ\text{C}$,其中特别优选 $0\sim 5^\circ\text{C}$;控温反应时间为2~8h。

[0025] 步骤(2)中所述的有机溶剂B为二氯甲烷,氯仿,甲基叔丁基醚,乙酸乙酯,乙酸异丙酯,乙酸丁酯中的一种或两种。

[0026] 步骤(2)中所述的滴加I-2'溶液的温度和反应温度为 $15\sim 40^\circ\text{C}$,其中特别优选 $20\sim 25^\circ\text{C}$;控温反应时间为4~10h。

[0027] 步骤(1)、步骤(2)中所述的I-1与I-2、缚酸剂、TSTU的投料摩尔比为 $1:1.2\sim 1.6:2.3\sim 3.0:1.4\sim 2.0$ 。

[0028] 在一优选方案中,步骤(2)所述的洗涤操作顺序为酸洗涤、纯化水洗涤、饱和食盐水洗涤,其中酸洗涤过程中所用的洗涤液为稀盐酸和稀硫酸中的一种,特别优选稀盐酸。

[0029] 一种如式(I)所示的本发明所定义的任一脂肪酸衍生物在制备胰岛素类似物中的用途。

[0030] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0031] (1)本发明提供的合成方法路线简便,操作简单,反应条件易控,适于工业化生产。

[0032] (2)本发明相较现有技术,省去了长链脂肪二酸酯化步骤,简化操作,提高了收率,节约生产成本。

[0033] (3)本发明合成的脂肪酸衍生物,在参与制备胰岛素类似物的反应中,反应活性高,其偶联产率在85%以上。

具体实施方式

[0034] 下面通过实施例来进一步说明本发明。应该正确理解的是：本发明的实施例仅仅是用于说明本发明，而不是对本发明的限制，所以，在本发明的方法前提下对本发明的简单改进均属本发明要求保护的范围。

[0035] 本发明书和实施例中使用的缩写：

[0036] TSTU: O-(N-琥珀酰亚胺基)-1,1,3,3,-四甲基脒鎓四氟硼酸盐

[0037] Glu: 谷氨酸

[0038] tBu: 叔丁基

[0039] Bzl: 苄基

[0040] Me: 甲基

[0041] Et: 乙基

[0042] nPr: 丙基

[0043] DIEA: N,N-二异丙基乙基胺

[0044] THF: 四氢呋喃

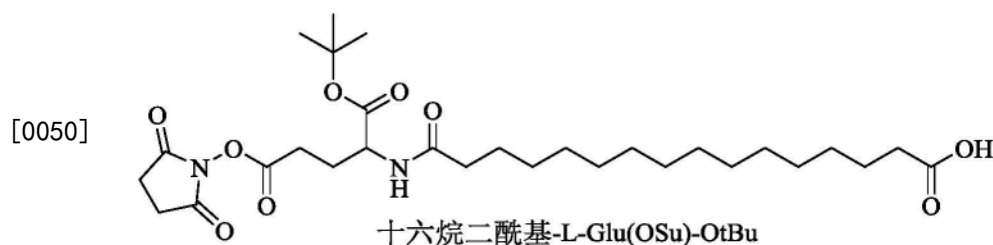
[0045] DMF: N,N-二甲基甲酰胺

[0046] Su: 琥珀酰亚胺基=2,5-二氧代-吡咯烷-1-基

[0047] 实验所用物料：化合物I-1为长链脂肪二酸琥珀酰亚胺酯可购买，也可参照现有技术中的公开方法制备， R_2 为通式 $-(CH_2)_m-$ 的基团，其中m为6~32整数；Des (B30) 人胰岛素可购买，也可参照现有技术公开方法制备。其他实验所用物料可市场购买或者参照现有技术公开的方法制备得到。

[0048] 实施例1

[0049] 十六烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu的合成

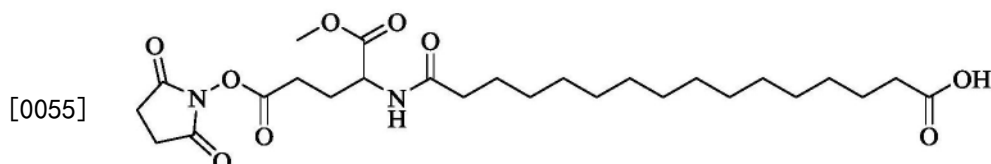


[0051] 将L-谷氨酸-1-叔丁酯(L-Glu-OtBu, 14.21g, 0.07mol)，三乙胺(13.15g, 0.13mol)加入丙酮(100mL)中，控温0~5℃滴加TSTU(25.58g, 0.085mol)的丙酮(100mL)溶液，1h滴加完毕后，控温0~5℃反应5h，反应结束后，反应液过滤，滤液即为L-Glu(OSu)-OtBu溶液，备用。将十六烷二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(19.15g, 50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中，控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OtBu溶液，1.5h滴加完毕后，控温20~25℃反应7h，反应结束后，减压蒸除溶剂，所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后，稀盐酸(100mL×2)洗涤，纯化水(100mL×2)洗涤，饱和食盐水(100mL)洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤，滤液减压浓缩至恒重，得到十六烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu，收率98.8%，HPLC纯度99.2%。

[0052] ESI-TOF-MS(m/z): 567.7010[M-H]⁻，与理论值符合。

[0053] 实施例2

[0054] 十六烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe的合成



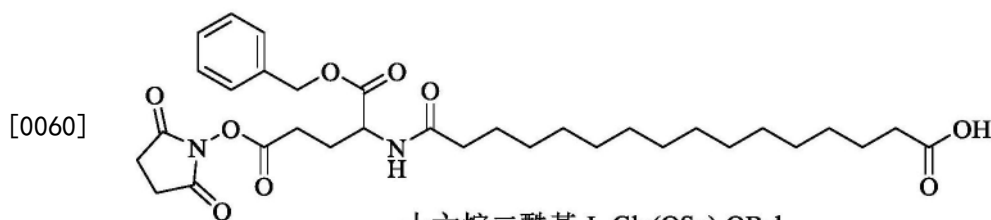
十六烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe

[0056] 将L-谷氨酸-1-甲酯(L-Glu-OMe, 8.05g, 0.05mol), 三乙胺(11.12g, 0.11mol)加入丙酮(100mL)中, 控温0~5℃滴加TSTU(19.56g, 0.065mol)的丙酮(100mL)溶液, 1h滴加完毕后, 控温0~5℃反应5h, 反应结束后, 反应液过滤, 滤液即为L-Glu(OSu)-OMe溶液, 备用。将十六烷二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(19.15g, 50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中, 控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OMe溶液, 1.5h滴加完毕后, 控温20~25℃反应7h, 反应结束后, 减压蒸除溶剂, 所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后, 稀盐酸(100mL×2)洗涤, 纯化水(100mL×2)洗涤, 饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至恒重, 得到十六烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe, 收率91.3%, HPLC纯度97.5%。

[0057] ESI-TOF-MS(m/z): 525.6196[M-H]⁻, 与理论值符合。

[0058] 实施例3

[0059] 十六烷二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl的合成



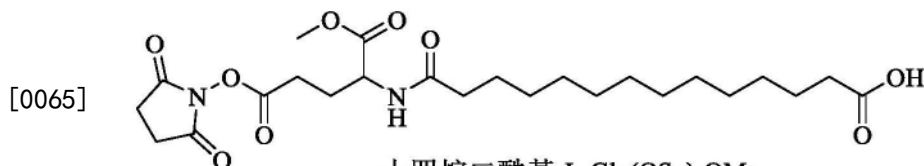
十六烷二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl

[0061] 将L-谷氨酸-1-苄酯(L-Glu-OBzl, 21.32g, 0.09mol), 三乙胺(16.15g, 0.16mol)加入丙酮(100mL)中, 控温0~5℃滴加TSTU(33.11g, 0.11mol)的丙酮(100mL)溶液, 1h滴加完毕后, 控温0~5℃反应6h, 反应结束后, 反应液过滤, 滤液即为L-Glu(OSu)-OBzl溶液, 备用。将十六烷二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(19.15g, 50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中, 控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OBzl溶液, 1.5h滴加完毕后, 控温20~25℃反应7h, 反应结束后, 减压蒸除溶剂, 所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后, 稀盐酸(100mL×2)洗涤, 纯化水(100mL×2)洗涤, 饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至恒重, 得到十六烷二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl, 收率95.2%, HPLC纯度92.8%。

[0062] ESI-TOF-MS(m/z): 601.7176[M-H]⁻, 与理论值符合。

[0063] 实施例4

[0064] 十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe的合成



十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe

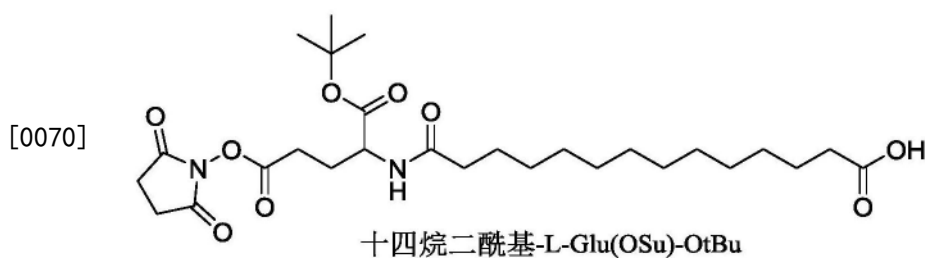
[0066] 将L-谷氨酸-1-甲酯(L-Glu-OMe, 11.25g, 0.07mol), 哌啶(11.06g, 0.13mol)加入N,N-二甲基乙酰胺(100mL)中, 控温0~5℃滴加TSTU(25.59g, 0.085mol)的丙酮(100mL)溶液, 1h滴加完毕后, 控温0~5℃反应5h, 反应结束后, 反应液过滤, 滤液即为L-Glu(OSu)-OMe

溶液,备用。将十四烷二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(17.75g,50.00mmol)溶于N,N-二甲基乙酰胺(150mL)中,控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OMe溶液,1.5h滴加完毕后,控温20~25℃反应8h,反应结束后,减压蒸除溶剂,所得固体用氯仿(300mL)溶解后,稀硫酸(100mL×2)洗涤,纯化水(100mL×2)洗涤,饱和食盐水(100mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩至恒重,得到十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe,收率97.9%,HPLC纯度99.2%。

[0067] ESI-TOF-MS(m/z):497.5655[M-H]⁻,与理论值符合。

[0068] 实施例5

[0069] 十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu的合成

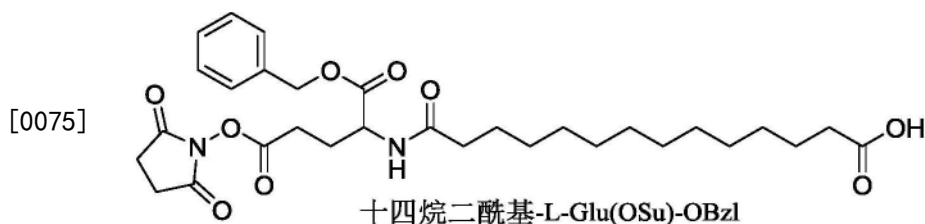


[0071] 将L-谷氨酸-1-叔丁酯(L-Glu-OtBu,12.18g,0.06mol),三乙胺(12.12g,0.12mol)加入丙酮(100mL)中,控温0~5℃滴加TSTU(21.06g,0.07mol)的丙酮(100mL)溶液,1h滴加完毕后,控温0~5℃反应5h,反应结束后,反应液过滤,滤液即为L-Glu(OSu)-OtBu溶液,备用。将十四烷二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(17.75g,50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中,控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OtBu溶液,1.5h滴加完毕后,控温20~25℃反应7h,反应结束后,减压蒸除溶剂,所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后,稀盐酸(100mL×2)洗涤,纯化水(100mL×2)洗涤,饱和食盐水(100mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩至恒重,得到十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu,收率96.5%,HPLC纯度98.7%。

[0072] ESI-TOF-MS(m/z):539.6465[M-H]⁻,与理论值符合。

[0073] 实施例6

[0074] 十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl的合成

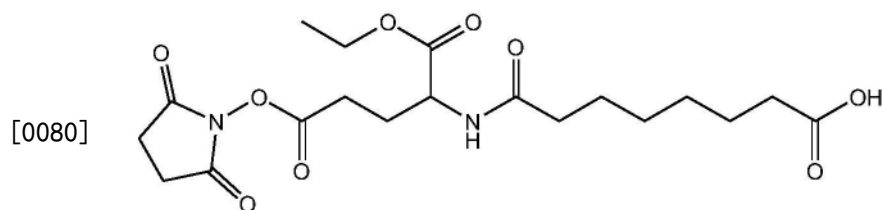


[0076] 将L-谷氨酸-1-苄酯(L-Glu-OBzl,18.96g,0.08mol),三乙胺(15.15g,0.15mol)加入丙酮(100mL)中,控温0~5℃滴加TSTU(30.12g,0.1mol)的丙酮(100mL)溶液,1h滴加完毕后,控温0~5℃反应5h,反应结束后,反应液过滤,滤液即为L-Glu(OSu)-OBzl溶液,备用。将十四烷二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(17.75g,50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中,控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OBzl溶液,1.5h滴加完毕后,控温20~25℃反应7h,反应结束后,减压蒸除溶剂,所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后,稀盐酸(100mL×2)洗涤,纯化水(100mL×2)洗涤,饱和食盐水(100mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩至恒重,得到十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl,收率97.3%,HPLC纯度97.7%。

[0077] ESI-TOF-MS(m/z):573.6635[M-H]⁻,与理论值符合。

[0078] 实施例7

[0079] 辛二酰基-L-Glu(OSu)-OEt的合成



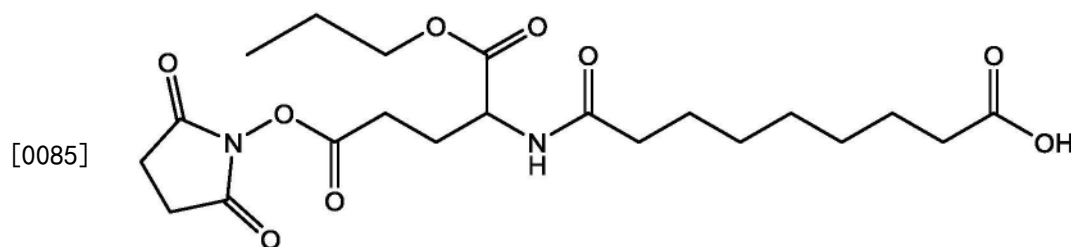
辛二酰基-L-Glu(OSu)-OEt

[0081] 将L-谷氨酸-1-乙酯(L-Glu-OEt, 12.24g, 0.07mol), 三乙胺(13.13g, 0.13mol)加入丙酮(100mL)中, 控温 $-10\sim-8^{\circ}\text{C}$ 滴加TSTU(25.58g, 0.085mol)的丙酮(100mL)溶液, 1h滴加完毕后, 控温 $-10\sim-8^{\circ}\text{C}$ 反应6h, 反应结束后, 反应液过滤, 滤液即为L-Glu(OSu)-OEt溶液, 备用。将辛二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(13.55g, 50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中, 控温 $20\sim25^{\circ}\text{C}$ 滴加L-Glu(OSu)-OEt溶液, 1.5h滴加完毕后, 控温 $20\sim25^{\circ}\text{C}$ 反应10h, 反应结束后, 减压蒸除溶剂, 所得固体用甲基叔丁基醚(300mL)溶解后, 稀硫酸(100mL \times 2)洗涤, 纯化水(100mL \times 2)洗涤, 饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至恒重, 得到辛烷二酰基-L-Glu(OSu)-OEt, 收率97.8%, HPLC纯度98.5%。

[0082] ESI-TOF-MS(m/z): 427.5626 $[M-H]^{-}$, 与理论值符合。

[0083] 实施例8

[0084] 壬二酰基-L-Glu(OSu)-OnPr的合成



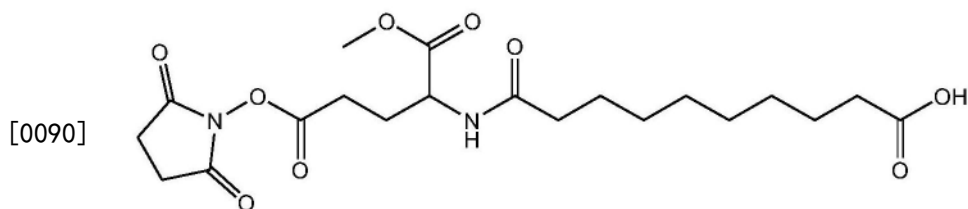
壬二酰基-L-Glu(OSu)-OnPr

[0086] 将L-谷氨酸-1-丙酯(L-Glu-OnPr, 13.22g, 0.07mol), 三乙胺(13.13g, 0.13mol)加入丙酮(100mL)中, 控温 $8\sim10^{\circ}\text{C}$ 滴加TSTU(25.58g, 0.085mol)的丙酮(100mL)溶液, 1h滴加完毕后, 控温 $8\sim10^{\circ}\text{C}$ 反应5h, 反应结束后, 反应液过滤, 滤液即为L-Glu(OSu)-OnPr溶液, 备用。将壬二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(14.24g, 50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中, 控温 $20\sim25^{\circ}\text{C}$ 滴加L-Glu(OSu)-OnPr溶液, 1.5h滴加完毕后, 控温 $20\sim25^{\circ}\text{C}$ 反应7h, 反应结束后, 减压蒸除溶剂, 所得固体用乙酸丁酯(300mL)溶解后, 稀盐酸(100mL \times 2)洗涤, 纯化水(100mL \times 2)洗涤, 饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至恒重, 得到壬二酰基-L-Glu(OSu)-OnPr, 收率97.3%, HPLC纯度98.3%。

[0087] ESI-TOF-MS(m/z): 427.8622 $[M-H]^{-}$, 与理论值符合。

[0088] 实施例9

[0089] 癸二酰基-L-Glu(OSu)-OMe的合成



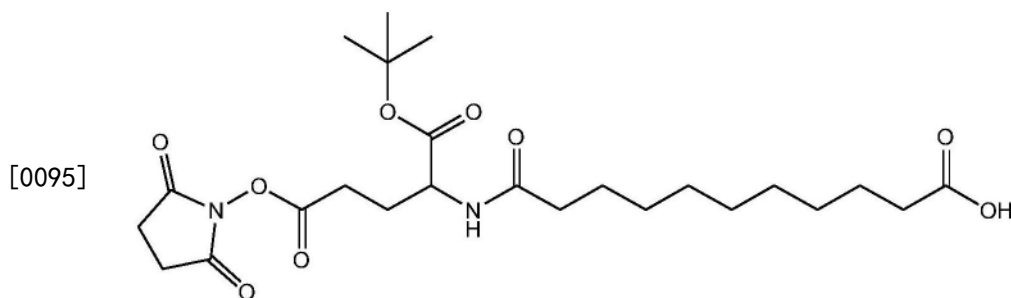
葵二酰基-L-Glu(OSu)-OMe

[0091] 将L-谷氨酸-1-甲酯(L-Glu-OMe, 11.25g, 0.07mol), 三乙胺(13.13g, 0.13mol) 加入丙酮(100mL)中, 控温0~5℃滴加TSTU(25.58g, 0.085mol)的丙酮(100mL)溶液, 1h滴加完毕后, 控温0~5℃反应5h, 反应结束后, 反应液过滤, 滤液即为L-Glu(OSu)-OMe溶液, 备用。将葵二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(14.94g, 50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中, 控温15~20℃滴加L-Glu(OSu)-OMe溶液, 1.5h滴加完毕后, 控温15~20℃反应8h, 反应结束后, 减压蒸除溶剂, 所得固体用乙酸乙酯(300mL)溶解后, 稀盐酸(100mL×2)洗涤, 纯化水(100mL×2)洗涤, 饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至恒重, 得到葵二酰基-L-Glu(OSu)-OMe, 收率97.8%, HPLC纯度98.5%。

[0092] ESI-TOF-MS(m/z): 441.3450[M-H]⁻, 与理论值符合。

[0093] 实施例10

[0094] 十一烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu的合成



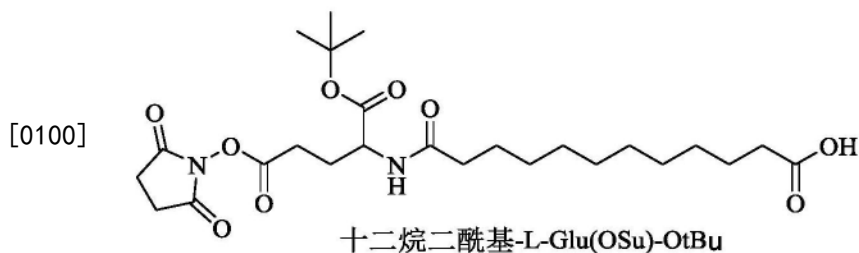
十一烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu

[0096] 将L-谷氨酸-1-叔丁酯(L-Glu-OtBu, 14.22g, 0.07mol), 碳酸氢钠(10.94g, 0.13mol)加入丙酮(100mL)中, 控温0~5℃滴加TSTU(25.59g, 0.085mol)的丙酮(100mL)溶液, 1h滴加完毕后, 控温0~5℃反应5h, 反应结束后, 反应液过滤, 滤液即为L-Glu(OSu)-OtBu溶液, 备用。将十一烷二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(15.65g, 50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中, 控温35~40℃滴加L-Glu(OSu)-OtBu溶液, 1.5h滴加完毕后, 控温35~40℃反应10h, 反应结束后, 减压蒸除溶剂, 所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后, 稀盐酸(100mL×2)洗涤, 纯化水(100mL×2)洗涤, 饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至恒重, 得到十一烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu, 收率97.3%, HPLC纯度98.4%。

[0097] ESI-TOF-MS(m/z): 497.63232[M-H]⁻, 与理论值符合。

[0098] 实施例11

[0099] 十二烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu的合成

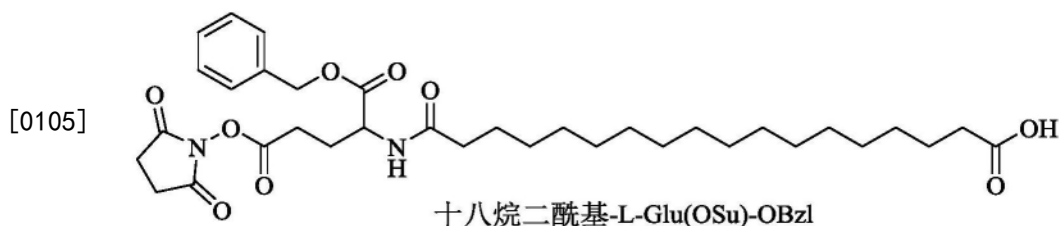


[0101] 将L-谷氨酸-1-叔丁酯(L-Glu-OtBu, 14.22g, 0.07mol), 一乙胺(5.86g, 0.13mol)加入N-甲基吡咯烷酮(100mL)中, 控温0~5℃滴加TSTU(25.59g, 0.085mol)的丙酮(100mL)溶液, 1h滴加完毕后, 控温0~5℃反应2h, 反应结束后, 反应液过滤, 滤液即为L-Glu(OSu)-OtBu溶液, 备用。将十二烷二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(16.35g, 50.00mmol)溶于N-甲基吡咯烷酮(150mL)中, 控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OtBu溶液, 1.5h滴加完毕后, 控温20~25℃反应8h, 反应结束后, 减压蒸除溶剂, 所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后, 稀盐酸(100mL×2)洗涤, 纯化水(100mL×2)洗涤, 饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至恒重, 得到十二烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu, 收率96.2%, HPLC纯度98.7%。

[0102] ESI-TOF-MS(m/z): 511.5925[M-H]⁻, 与理论值符合。

[0103] 实施例12

[0104] 十八烷二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl的合成

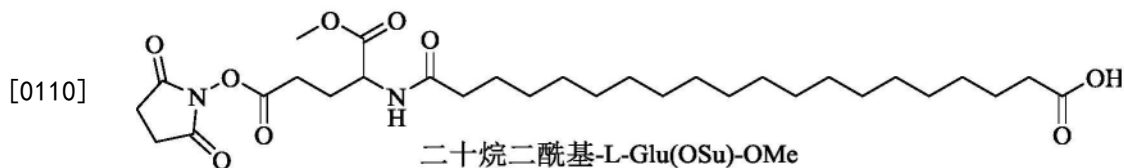


[0106] 将L-谷氨酸-1-苄酯(L-Glu-OBzl, 16.59g, 0.07mol), 碳酸钠(13.78g, 0.13mol)加入DMF(100mL)中, 控温0~5℃滴加TSTU(25.59g, 0.085mol)的DMF(100mL)溶液, 1h滴加完毕后, 控温0~5℃反应4h, 反应结束后, 反应液过滤, 滤液即为L-Glu(OSu)-OBzl溶液, 备用。将十八烷二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(20.55g, 50.00mmol)溶于DMF(150mL)中, 控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OBzl溶液, 1.5h滴加完毕后, 控温20~25℃反应7h, 反应结束后, 减压蒸除溶剂, 所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后, 稀硫酸(100mL×2)洗涤, 纯化水(100mL×2)洗涤, 饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至恒重, 得到十八烷二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl, 收率97.8%, HPLC纯度99.3%。

[0107] ESI-TOF-MS(m/z): 629.7715[M-H]⁻, 与理论值符合。

[0108] 实施例13

[0109] 二十烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe的合成



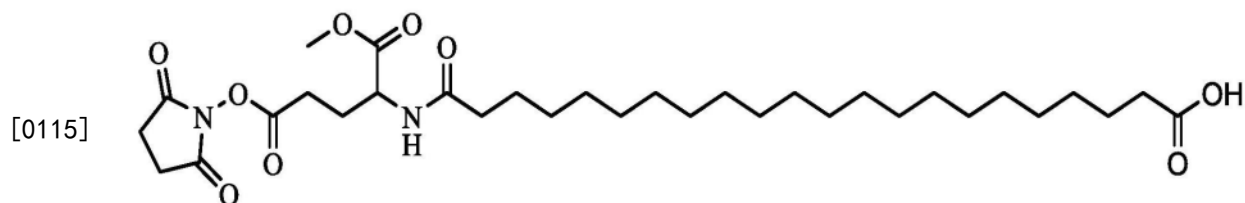
[0111] 将L-谷氨酸-1-甲酯(L-Glu-OMe, 11.26g, 0.07mol), 吡啶(10.27g, 0.13mol)加入THF(100mL)中, 控温0~5℃滴加TSTU(25.58g, 0.085mol)的THF(100mL)溶液, 1h滴加完毕

后,控温0~5℃反应5h,反应结束后,反应液过滤,滤液即为L-Glu(OSu)-OMe溶液,备用。将二十烷二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(21.95g,50.00mmol)溶于THF(150mL)中,控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OMe溶液,1.5h滴加完毕后,控温20~25℃反应7h,反应结束后,减压蒸除溶剂,所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后,稀硫酸(100mL×2)洗涤,纯化水(100mL×2)洗涤,饱和食盐水(100mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩至恒重,得到二十烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe,收率97.5%,HPLC纯度98.8%。

[0112] ESI-TOF-MS(m/z):581.7275[M-H]⁻,与理论值符合。

[0113] 实施例14

[0114] 二十二烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe



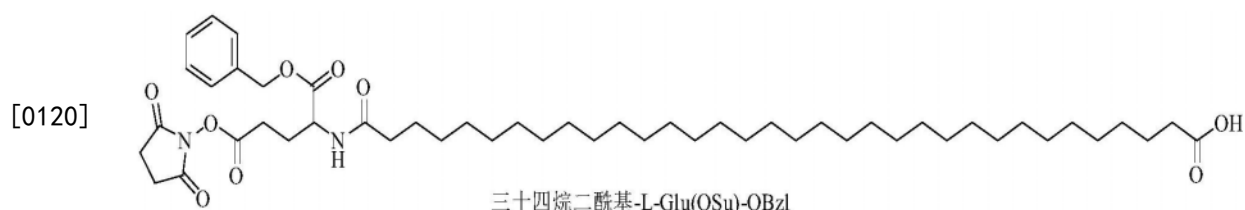
二十二烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe

[0116] 将L-谷氨酸-1-甲酯(L-Glu-OMe,11.26g,0.07mol),二乙胺(9.48g,0.13mol)加入丙酮(100mL)中,控温0~5℃滴加TSTU(25.58g,0.085mol)的丙酮(100mL)溶液,1h滴加完毕后,控温0~5℃反应6h,反应结束后,反应液过滤,滤液即为L-Glu(OSu)-OMe溶液,备用。将二十二烷二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(23.35g,50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中,控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OMe溶液,1.5h滴加完毕后,控温20~25℃反应10h,反应结束后,减压蒸除溶剂,所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后,稀盐酸(100mL×2)洗涤,纯化水(100mL×2)洗涤,饱和食盐水(100mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩至恒重,得到二十二烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe,收率98.5%,HPLC纯度99.0%。

[0117] ESI-TOF-MS(m/z):609.4518[M-H]⁻,与理论值符合。

[0118] 实施例15

[0119] 三十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl的合成



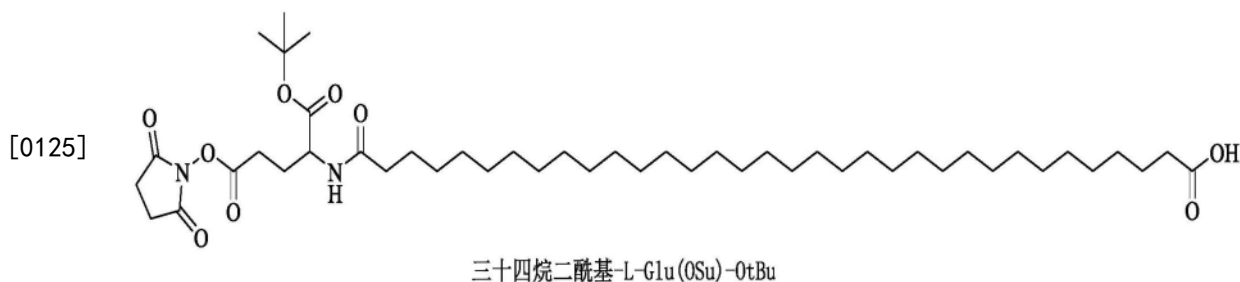
三十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl

[0121] 将L-谷氨酸-1-苄酯(L-Glu-OBzl,16.59g,0.07mol),DIEA(16.76g,0.13mol)加入乙腈(100mL)中,控温0~5℃滴加TSTU(25.59g,0.085mol)的乙腈(100mL)溶液,1h滴加完毕后,控温0~5℃反应5h,反应结束后,反应液过滤,滤液即为L-Glu(OSu)-OBzl溶液,备用。将三十四烷二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(31.75g,50.00mmol)溶于乙腈(150mL)中,控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OBzl溶液,1.5h滴加完毕后,控温20~25℃反应7h,反应结束后,减压蒸除溶剂,所得固体用乙酸异丙酯(300mL)溶解后,稀盐酸(100mL×2)洗涤,纯化水(100mL×2)洗涤,饱和食盐水(100mL)洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩至恒重,得到三十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl,收率97.2%,HPLC纯度99.1%。

[0122] ESI-TOF-MS(m/z):853.5488[M-H]⁻,与理论值符合。

[0123] 实施例16

[0124] 三十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu的合成

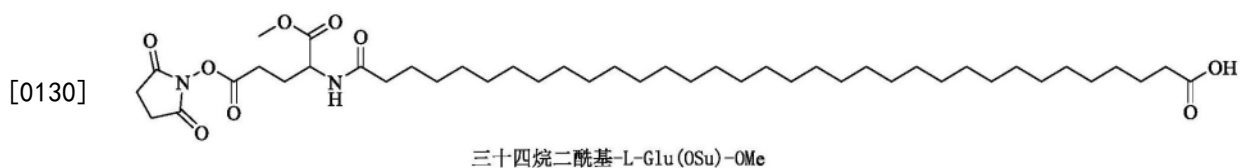


[0126] 将L-谷氨酸-1-叔丁酯(L-Glu-OtBu, 14.22g, 0.07mol), 三乙胺(13.14g, 0.13mol)加入丙酮(100mL)中, 控温0~5℃滴加TSTU(25.58g, 0.085mol)的丙酮(100mL)溶液, 1h滴加完毕后, 控温0~5℃反应5h, 反应结束后, 反应液过滤, 滤液即为L-Glu(OSu)-OtBu溶液, 备用。将三十四烷二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(31.74g, 50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中, 控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OtBu溶液, 1.5h滴加完毕后, 控温20~25℃反应7h, 反应结束后, 减压蒸除溶剂, 所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后, 稀盐酸(100mL×2)洗涤, 纯化水(100mL×2)洗涤, 饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至恒重, 得到三十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu, 收率98.5%, HPLC纯度99.3%。

[0127] ESI-TOF-MS(m/z): 819.6202[M-H]⁻, 与理论值符合。

[0128] 实施例17

[0129] 三十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe的合成



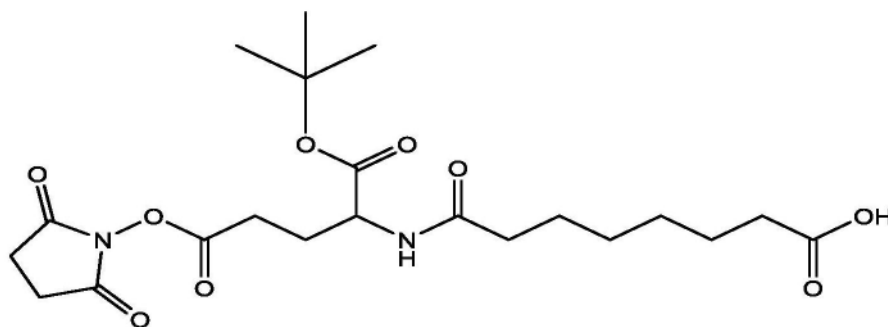
[0131] 将L-谷氨酸-1-甲酯(L-Glu-OMe, 11.23g, 0.07mol), 三乙胺(13.16g, 0.13mol)加入丙酮(100mL)中, 控温0~5℃滴加TSTU(25.56g, 0.085mol)的丙酮(100mL)溶液, 1h滴加完毕后, 控温0~5℃反应5h, 反应结束后, 反应液过滤, 滤液即为L-Glu(OSu)-OMe溶液, 备用。将三十四烷二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(31.75g, 50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中, 控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OMe溶液, 1.5h滴加完毕后, 控温20~25℃反应7h, 反应结束后, 减压蒸除溶剂, 所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后, 稀盐酸(100mL×2)洗涤, 纯化水(100mL×2)洗涤, 饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至恒重, 得到三十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe, 收率98.2%, HPLC纯度99.2%。

[0132] ESI-TOF-MS(m/z): 777.7356[M-H]⁻, 与理论值符合。

[0133] 实施例18

[0134] 辛二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu的合成

[0135]



辛二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu

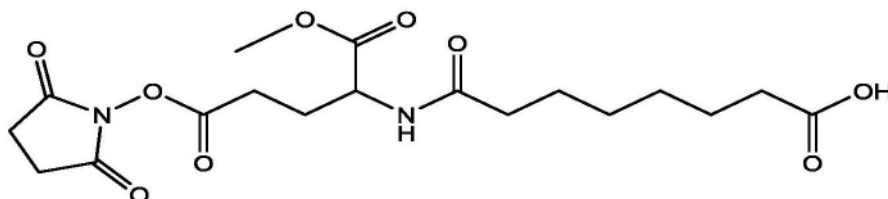
[0136] 将L-谷氨酸-1-叔丁酯(L-Glu-OtBu, 14.20g, 0.07mol), 三乙胺(13.15g, 0.13mol)加入丙酮(100mL)中, 控温0~5℃滴加TSTU(25.57g, 0.085mol)的丙酮(100mL)溶液, 1h滴加完毕后, 控温0~5℃反应5h, 反应结束后, 反应液过滤, 滤液即为L-Glu(OSu)-OtBu溶液, 备用。将辛二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(13.54g, 50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中, 控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OtBu溶液, 1.5h滴加完毕后, 控温20~25℃反应7h, 反应结束后, 减压蒸除溶剂, 所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后, 稀盐酸(100mL×2)洗涤, 纯化水(100mL×2)洗涤, 饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至恒重, 得到辛二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu, 收率98.2%, HPLC纯度99.4%。

[0137] ESI-TOF-MS(m/z): 456.5822[M-H]⁻, 与理论值符合。

[0138] 实施例19

[0139] 辛二酰基-L-Glu(OSu)-OMe的合成

[0140]



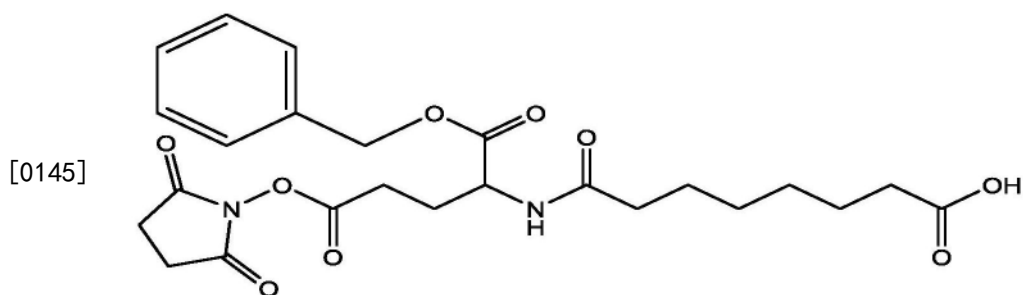
辛二酰基-L-Glu(OSu)-OMe

[0141] 将L-谷氨酸-1-甲酯(L-Glu-OMe, 11.24g, 0.07mol), 三乙胺(13.16g, 0.13mol)加入丙酮(100mL)中, 控温0~5℃滴加TSTU(25.58g, 0.085mol)的丙酮(100mL)溶液, 1h滴加完毕后, 控温0~5℃反应5h, 反应结束后, 反应液过滤, 滤液即为L-Glu(OSu)-OMe溶液, 备用。将辛二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(13.55g, 50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中, 控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OMe溶液, 1.5h滴加完毕后, 控温20~25℃反应7h, 反应结束后, 减压蒸除溶剂, 所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后, 稀盐酸(100mL×2)洗涤, 纯化水(100mL×2)洗涤, 饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至恒重, 得到辛二酰基-L-Glu(OSu)-OMe, 收率97.7%, HPLC纯度99.0%。

[0142] ESI-TOF-MS(m/z): 414.6326[M-H]⁻, 与理论值符合。

[0143] 实施例20

[0144] 辛二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl的合成



辛二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl

[0146] 将L-谷氨酸-1-苄酯(L-Glu-OBzl, 16.58g, 0.07mol), 三乙胺(13.16g, 0.13mol)加入丙酮(100mL)中, 控温0~5℃滴加TSTU(25.58g, 0.085mol)的丙酮(100mL)溶液, 1h滴加完毕后, 控温0~5℃反应5h, 反应结束后, 反应液过滤, 滤液即为L-Glu(OSu)-OBzl溶液, 备用。将辛二酸琥珀酰亚胺酯(I-1)(13.57g, 50.00mmol)溶于丙酮(150mL)中, 控温20~25℃滴加L-Glu(OSu)-OBzl溶液, 1.5h滴加完毕后, 控温20~25℃反应7h, 反应结束后, 减压蒸除溶剂, 所得固体用二氯甲烷(300mL)溶解后, 稀盐酸(100mL×2)洗涤, 纯化水(100mL×2)洗涤, 饱和食盐水(100mL)洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 滤液减压浓缩至恒重, 得到辛二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl, 收率97.2%, HPLC纯度99.0%。

[0147] ESI-TOF-MS(m/z): 490.7324[M-H]⁻, 与理论值符合。

[0148] 实施例21

[0149] LysB29(Nε-十六烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的制备

[0150] 将Des(B30)人胰岛素(5.00g, 0.88mmol)加入水(80mL)中, 冰浴搅拌, 待温度降至3℃时, 加三乙胺调节pH值至11.0。将实施例1得到的十六烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu(0.60g, 1.06mmol)加入N-甲基-2-吡咯烷酮(20mL)中, 搅拌溶解。用蠕动泵将十六烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu的N-甲基-2-吡咯烷酮溶液缓慢均匀地加入冰浴搅拌的Des(B30)人胰岛素溶液中, 30min滴加完毕。加入40%甲胺水溶液(0.3mL)终止反应。盐酸调节pH值至5.5, 离心收集沉淀。

[0151] HPLC分析表明形成了88%的目的偶联产物。将偶联产物溶于TFA(50mL)中, 保持1小时后, 加入纯化水(500mL)沉淀蛋白, 离心收集沉淀, 沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.8%的LysB29(Nε-十六烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素。

[0152] ESI-TOF-MS(m/z): 1221.7176[M+5H]⁵⁺/5, 1526.8062[M+4H]⁴⁺/4, 1018.1482[M+6H]⁶⁺/6, 与理论值符合。

[0153] 实施例22

[0154] LysB29(Nε-辛二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的制备

[0155] 按照与实施例21类似的方式, 将实施例7得到的辛二酰基-L-Glu(OSu)-OEt, 按辛二酰基-L-Glu(OSu)-OEt:Des(B30)人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0156] HPLC分析表明形成了85%的目的偶联产物, 将偶联产物溶于TFA(50mL)中, 保持1小时后, 加入纯化水(500mL)沉淀蛋白, 离心收集沉淀, 沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.7%的LysB29(Nε-辛二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素。

[0157] ESI-TOF-MS(m/z): 1199.3450[M+5H]⁵⁺/5, 11498.8380[M+4H]⁴⁺/4, 999.4794[M+6H]⁶⁺/6, 与理论值符合。

[0158] 实施例23

[0159] LysB29(Nε-壬二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的制备

[0160] 按照与实施例21类似的方式,将实施例8得到的壬二酰基-L-Glu(OSu)-OnPr,按壬二酰基-L-Glu(OSu)-OnPr:Des(B30)人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0161] HPLC分析表明形成了86%的目的偶联产物,将偶联产物溶于TFA(50mL)中,保持1小时后,加入纯化水(500mL)沉淀蛋白,离心收集沉淀,沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.7%的LysB29(Nε-壬二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素。

[0162] ESI-TOF-MS(m/z):1202.1664[M+5H]⁵⁺/5,1502.3136[M+4H]⁴⁺/4,1001.7994[M+6H]⁶⁺/6,与理论值符合。

[0163] 实施例24

[0164] LysB29(Nε-癸二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的制备

[0165] 按照与实施例21类似的方式,将实施例9得到的癸二酰基-L-Glu(OSu)-OMe,按癸二酰基-L-Glu(OSu)-OMe:Des(B30)人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0166] HPLC分析表明形成了85%的目的偶联产物,将偶联产物溶于TFA(50mL)中,保持1小时后,加入纯化水(500mL)沉淀蛋白,离心收集沉淀,沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.6%的LysB29(Nε-癸二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素。

[0167] ESI-TOF-MS(m/z):1204.9574[M+5H]⁵⁺/5,1565.8588[M+4H]⁴⁺/4,1004.1443[M+6H]⁶⁺/6,与理论值符合。

[0168] 实施例25

[0169] LysB29(Nε-十一烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的制备

[0170] 按照与实施例21类似的方式,将实施例10得到的十一烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu,按十一烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu:Des(B30)人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0171] HPLC分析表明形成了87%的目的偶联产物,将偶联产物溶于TFA(50mL)中,保持1小时后,加入纯化水(500mL)沉淀蛋白,离心收集沉淀,沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.7%的LysB29(Nε-十一烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素。

[0172] ESI-TOF-MS(m/z):1207.7744[M+5H]⁵⁺/5,1509.3642[M+4H]⁴⁺/4,1006.4795[M+6H]⁶⁺/6,与理论值符合。

[0173] 实施例26

[0174] LysB29(Nε-十二烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的制备

[0175] 按照与实施例21类似的方式,将实施例11得到的十二烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu,按十二烷二酰基-L-Glu(OSu)-OtBu:Des(B30)人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0176] HPLC分析表明形成了88%的目的偶联产物,将偶联产物溶于TFA(50mL)中,保持1小时后,加入纯化水(500mL)沉淀蛋白,离心收集沉淀,沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.7%的LysB29(Nε-十二烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素。

[0177] ESI-TOF-MS(m/z):1210.5064[M+5H]⁵⁺/5,1512.8120[M+4H]⁴⁺/4,1008.8210[M+6H]⁶⁺/6,与理论值符合。

[0178] 实施例27

[0179] LysB29(Nε-十四烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的制备

[0180] 按照与实施例21类似的方式,将实施例4得到的十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe,按十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe:Des(B30)人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0181] HPLC分析表明形成了86%的目的偶联产物,将偶联产物溶于TFA (50mL) 中,保持1小时后,加入纯化水(500mL)沉淀蛋白,离心收集沉淀,沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.6%的LysB29(Nε-十四烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的。

[0182] ESI-TOF-MS (m/z): 1216.1764[M+5H]⁵⁺/5, 1519.8642[M+4H]⁴⁺/4, 1013.4975[M+6H]⁶⁺/6,与理论值符合。

[0183] 实施例28

[0184] LysB29(Nε-十八烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的制备

[0185] 按照与实施例21类似的方式,将实施例12得到的十八烷二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl,按十八烷二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl:Des(B30)人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0186] HPLC分析表明形成了85%的目的偶联产物,将偶联产物溶于TFA (50mL) 中,保持1小时后,加入纯化水(500mL)沉淀蛋白,离心收集沉淀,沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.7%的LysB29(Nε-十八烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的。

[0187] ESI-TOF-MS (m/z): 1227.3510[M+5H]⁵⁺/5, 1533.8163[M+4H]⁴⁺/4, 1022.8162[M+6H]⁶⁺/6,与理论值符合。

[0188] 实施例29

[0189] LysB29(Nε-二十烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的制备

[0190] 按照与实施例21类似的方式,将实施例13得到的二十烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe,按二十烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe:Des(B30)人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0191] HPLC分析表明形成了86%的目的偶联产物,将偶联产物溶于TFA (50mL) 中,保持1小时后,加入纯化水(500mL)沉淀蛋白,离心收集沉淀,沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.8%的LysB29(Nε-二十烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的。

[0192] ESI-TOF-MS (m/z): 1232.9714[M+5H]⁵⁺/5, 1540.7860[M+4H]⁴⁺/4, 1027.4952[M+6H]⁶⁺/6,与理论值符合。

[0193] 实施例30

[0194] LysB29(Nε-二十二烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的制备

[0195] 按照与实施例21类似的方式,将实施例14得到的二十二烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe,按二十二烷二酰基-L-Glu(OSu)-OMe:Des(B30)人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0196] HPLC分析表明形成了85%的目的偶联产物,将偶联产物溶于TFA (50mL) 中,保持1小时后,加入纯化水(500mL)沉淀蛋白,离心收集沉淀,沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.8%的LysB29(Nε-二十二烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的。

[0197] ESI-TOF-MS (m/z): 1238.5578[M+5H]⁵⁺/5, 1547.8317[M+4H]⁴⁺/4, 1032.1431[M+6H]⁶⁺/6,与理论值符合。

[0198] 实施例31

[0199] LysB29(Nε-三十四烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的制备

[0200] 按照与实施例21类似的方式,将实施例15得到的三十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl,按三十四烷二酰基-L-Glu(OSu)-OBzl:Des(B30)人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0201] HPLC分析表明形成了86%的目的偶联产物,将偶联产物溶于TFA (50mL) 中,保持1小时后,加入纯化水(500mL)沉淀蛋白,离心收集沉淀,沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.8%的LysB29(Nε-三十四烷二酰基-γ-谷氨酰基)脱(B30)人胰岛素的。

[0202] ESI-TOF-MS (m/z): 1272.1526 $[M+5H]^{5+}/5$, 1589.8359 $[M+4H]^{4+}/4$, 1060.1477 $[M+6H]^{6+}/6$, 与理论值符合。

[0203] 实施例32

[0204] LysB29 (N ϵ -三十四烷二酰基- γ -谷氨酰基) 脱 (B30) 人胰岛素的制备

[0205] 按照与实施例21类似的方式, 将实施例16得到的三十四烷二酰基-L-Glu (OSu) -OtBu, 按三十四烷二酰基-L-Glu (OSu) -OtBu:Des (B30) 人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0206] HPLC分析表明形成了87%的目的偶联产物, 将偶联产物溶于TFA (50mL) 中, 保持1小时后, 加入纯化水 (500mL) 沉淀蛋白, 离心收集沉淀, 沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.8%的LysB29 (N ϵ -三十四烷二酰基- γ -谷氨酰基) 脱 (B30) 人胰岛素。

[0207] ESI-TOF-MS (m/z): 1272.1516 $[M+5H]^{5+}/5$, 1589.8534 $[M+4H]^{4+}/4$, 1060.2136 $[M+6H]^{6+}/6$, 与理论值符合。

[0208] 实施例33

[0209] LysB29 (N ϵ -三十四烷二酰基- γ -谷氨酰基) 脱 (B30) 人胰岛素的制备

[0210] 按照与实施例21类似的方式, 将实施例17得到的三十四烷二酰基-L-Glu (OSu) -OMe, 按三十四烷二酰基-L-Glu (OSu) -OMe:Des (B30) 人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0211] HPLC分析表明形成了86%的目的偶联产物, 将偶联产物溶于TFA (50mL) 中, 保持1小时后, 加入纯化水 (500mL) 沉淀蛋白, 离心收集沉淀, 沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.7%的LysB29 (N ϵ -三十四烷二酰基- γ -谷氨酰基) 脱 (B30) 人胰岛素。

[0212] ESI-TOF-MS (m/z): 1272.3428 $[M+5H]^{5+}/5$, 1589.4358 $[M+4H]^{4+}/4$, 1060.6422 $[M+6H]^{6+}/6$, 与理论值符合。

[0213] 实施例34

[0214] LysB29 (N ϵ -辛二酰基- γ -谷氨酰基) 脱 (B30) 人胰岛素的制备

[0215] 按照与实施例21类似的方式, 将实施例18得到的辛二酰基-L-Glu (OSu) -OtBu, 按辛二酰基-L-Glu (OSu) -OtBu:Des (B30) 人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0216] HPLC分析表明形成了88%的目的偶联产物, 将偶联产物溶于TFA (50mL) 中, 保持1小时后, 加入纯化水 (500mL) 沉淀蛋白, 离心收集沉淀, 沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.8%的LysB29 (N ϵ -辛二酰基- γ -谷氨酰基) 脱 (B30) 人胰岛素。

[0217] ESI-TOF-MS (m/z): 1199.6528 $[M+5H]^{5+}/5$, 11498.4326 $[M+4H]^{4+}/4$, 999.5482 $[M+6H]^{6+}/6$, 与理论值符合。

[0218] 实施例35

[0219] LysB29 (N ϵ -辛二酰基- γ -谷氨酰基) 脱 (B30) 人胰岛素的制备

[0220] 按照与实施例21类似的方式, 将实施例19得到的辛二酰基-L-Glu (OSu) -OMe, 按辛二酰基-L-Glu (OSu) -OMe:Des (B30) 人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0221] HPLC分析表明形成了86%的目的偶联产物, 将偶联产物溶于TFA (50mL) 中, 保持1小时后, 加入纯化水 (500mL) 沉淀蛋白, 离心收集沉淀, 沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.7%的LysB29 (N ϵ -辛二酰基- γ -谷氨酰基) 脱 (B30) 人胰岛素。

[0222] ESI-TOF-MS (m/z): 1199.4866 $[M+5H]^{5+}/5$, 11498.5786 $[M+4H]^{4+}/4$, 999.7342 $[M+6H]^{6+}/6$, 与理论值符合。

[0223] 实施例36

[0224] LysB29 (N ϵ -辛二酰基- γ -谷氨酰基) 脱 (B30) 人胰岛素的制备

[0225] 按照与实施例21类似的方式, 将实施例20得到的辛二酰基-L-Glu (OSu) -OBzl, 按辛二酰基-L-Glu (OSu) -OBzl:Des (B30) 人胰岛素摩尔比为1.2:1进行反应。

[0226] HPLC分析表明形成了85%的目的偶联产物, 将偶联产物溶于TFA (50mL) 中, 保持1小时后, 加入纯化水 (500mL) 沉淀蛋白, 离心收集沉淀, 沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为99.6%的LysB29 (N ϵ -辛二酰基- γ -谷氨酰基) 脱 (B30) 人胰岛素。

[0227] ESI-TOF-MS (m/z): 1199.5424 [M+5H]⁵⁺/5, 11498.6586 [M+4H]⁴⁺/4, 999.3482 [M+6H]⁶⁺/6, 与理论值符合。

[0228] 对比实施例1

[0229] 将Des (B30) 人胰岛素 (5.00g, 0.88mmol) 加入水 (80mL) 中, 冰浴搅拌, 待温度降至3℃时, 加三乙胺调节pH值至11.0。将叔丁基十六烷二酰基-L-Glu (OSu) -OtBu (0.66g, 1.06mmol) 加入N-甲基-2-吡咯烷酮 (20mL) 中, 搅拌溶解。用蠕动泵将叔丁基十六烷二酰基-L-Glu (OSu) -OtBu的N-甲基-2-吡咯烷酮溶液缓慢均匀地加入冰浴搅拌的Des (B30) 人胰岛素溶液中, 30min滴加完毕。加入40%甲胺水溶液 (0.3mL) 终止反应。盐酸调节pH值至5.5, 离心收集沉淀。

[0230] HPLC分析表明形成了74%的目的偶联产物, 将偶联产物溶于TFA (50mL) 中, 保持1小时后, 加入纯化水 (500mL) 沉淀蛋白, 离心收集沉淀, 沉淀复溶后进行纯化制备。纯化后得到纯度为98.9%的胰岛素类似物。

[0231] 对比实施例2

[0232] 将Des (B30) 人胰岛素 (5.00g, 0.88mmol) 加入水 (80mL) 中, 冰浴搅拌, 待温度降至3℃时, 加三乙胺调节pH值至11.0。将十六烷二酰基-L-Glu (OSu) (0.54g, 1.06mmol) 加入N-甲基-2-吡咯烷酮 (20mL) 中, 搅拌溶解。用蠕动泵将十六烷二酰基-L-Glu (OSu) 的N-甲基-2-吡咯烷酮溶液缓慢均匀地加入冰浴搅拌的Des (B30) 人胰岛素溶液中, 30min滴加完毕。加入40%甲胺水溶液 (0.3mL) 终止反应。盐酸调节pH值至5.5, 离心收集沉淀。

[0233] HPLC分析表明形成了62%的目的偶联产物, 纯化后得到纯度为99.5%的胰岛素类似物。

[0234] 上述实施例21及之后的实施例所述的纯化可以参照现有技术, 采用RP-HPLC进行纯化, 其中反相柱为Kromasil C8-100-10, 250×4.6nm; 流动相A为乙腈, 流动相B为0.1mol乙酸铵; 以1mL/min的流速进行梯度洗脱, 收集目标产物得纯化液, 洗脱梯度如下表:

[0235]

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0	15	85
5	32	68
55	40	60