



(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 201311717 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：101121237

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 06 月 14 日

(51)Int. Cl.：

C07K1/02 (2006.01)

C07K1/34 (2006.01)

B01D11/04 (2006.01)

(30)優先權：2011/06/16

歐洲專利局

11170094.4

2011/06/16

美國

61/497,642

2011/06/17

美國

61/498,100

(71)申請人：隆沙有限公司 (瑞士) LONZA LTD. (CH)

瑞士

隆沙布萊恩公司 (比利時) LONZA BRAINE S. A. (BE)

比利時

(72)發明人：莫乃 狄迪爾 MONNAIE, DIDIER (BE)；佛倪 路希亞諾 FORNI, LUCIANO

(IT)；格歐 梅堤修 GIRAUD, MATHIEU (FR)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：8 共 116 頁

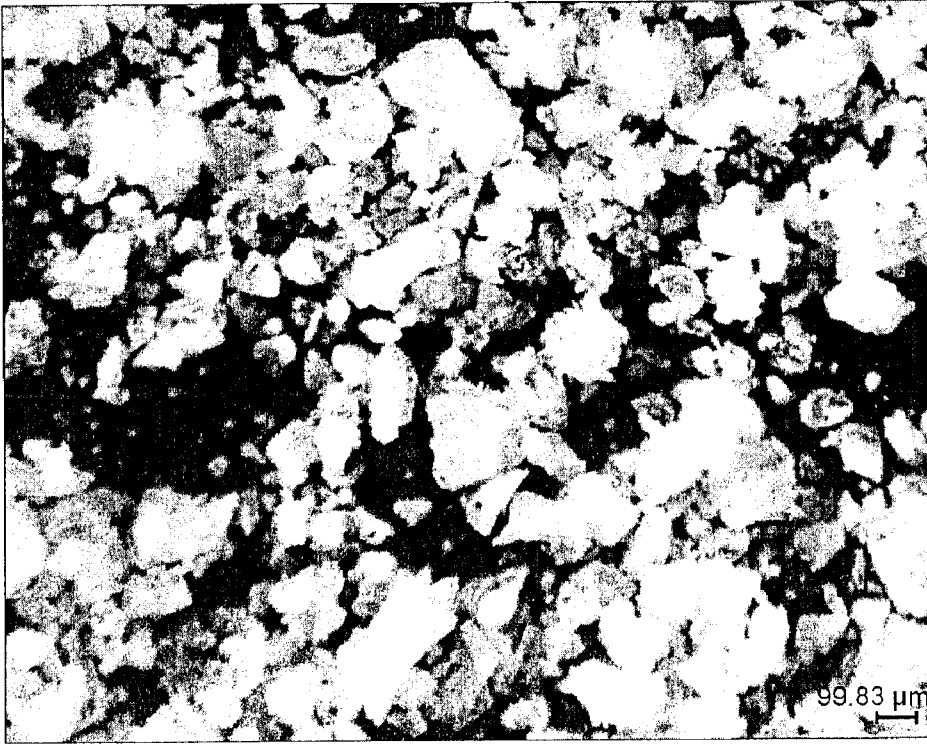
(54)名稱

萃取胜肽之方法及其於液相胜肽合成之應用

A PROCESS FOR EXTRACTION OF PEPTIDES AND ITS APPLICATION IN LIQUID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS

(57)摘要

本發明係關於一種自由胜肽偶合反應所產生之反應混合物中萃取胜肽之方法，該反應混合物含有該胜肽及選自由 N,N-二甲基甲醯胺、N,N-二甲基乙醯胺及 N-甲基-2-吡咯啉酮組成之群的極性非質子性溶劑，其中該方法包含步驟 a) 及步驟 b)：步驟 a) 包含向該反應混合物中添加組分 a1) 及組分 a2)，其中：組分 a1) 為 2-甲基四氫呋喃，且組分 a2) 為水，以至於獲得具有有機層及水層之兩相系統；步驟 b) 包含隨後分離含有該胜肽之該有機層與該水層。在本發明之一個尤其較佳的具體實例中，對該萃取方法使用 2-甲基四氫呋喃與選自由正庚烷、甲苯、乙酸乙酯、乙酸異丙酯、乙腈及四氫呋喃組成之群的有機溶劑 1 之組合。該萃取步驟較佳用於在液相中製備胜肽之方法中。





(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 201311717 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 03 月 16 日

(21)申請案號：101121237

(22)申請日：中華民國 101 (2012) 年 06 月 14 日

(51)Int. Cl.：

C07K1/02 (2006.01)

C07K1/34 (2006.01)

B01D11/04 (2006.01)

(30)優先權：2011/06/16

歐洲專利局

11170094.4

2011/06/16

美國

61/497,642

2011/06/17

美國

61/498,100

(71)申請人：隆沙有限公司 (瑞士) LONZA LTD. (CH)

瑞士

隆沙布萊恩公司 (比利時) LONZA BRAINE S. A. (BE)

比利時

(72)發明人：莫乃 狄迪爾 MONNAIE, DIDIER (BE)；佛倪 路希亞諾 FORNI, LUCIANO

(IT)；格歐 梅堤修 GIRAUD, MATHIEU (FR)

(74)代理人：閻啟泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：25 項 圖式數：8 共 116 頁

(54)名稱

萃取胜肽之方法及其於液相胜肽合成之應用

A PROCESS FOR EXTRACTION OF PEPTIDES AND ITS APPLICATION IN LIQUID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS

(57)摘要

本發明係關於一種自由胜肽偶合反應所產生之反應混合物中萃取胜肽之方法，該反應混合物含有該胜肽及選自由 N,N-二甲基甲醯胺、N,N-二甲基乙醯胺及 N-甲基-2-吡咯啉酮組成之群的極性非質子性溶劑，其中該方法包含步驟 a) 及步驟 b)：步驟 a) 包含向該反應混合物中添加組分 a1) 及組分 a2)，其中：組分 a1) 為 2-甲基四氫呋喃，且組分 a2) 為水，以至於獲得具有有機層及水層之兩相系統；步驟 b) 包含隨後分離含有該胜肽之該有機層與該水層。在本發明之一個尤其較佳的具體實例中，對該萃取方法使用 2-甲基四氫呋喃與選自由正庚烷、甲苯、乙酸乙酯、乙酸異丙酯、乙腈及四氫呋喃組成之群的有機溶劑 1 之組合。該萃取步驟較佳用於在液相中製備胜肽之方法中。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：(01121237) C07K1/02 (2006.01)
 ※申請日：101.6.14 ※IPC 分類：C07K1/34 (2006.01)
 B01D11/04 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

萃取胜肽之方法及其於液相胜肽合成之應用

A process for extraction of peptides and its application
 in liquid phase peptide synthesis

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種自由胜肽偶合反應所產生之反應混合物中萃取胜肽之方法，該反應混合物含有該胜肽及選自由 *N,N*-二甲基甲醯胺、*N,N*-二甲基乙醯胺及 *N*-甲基-2-吡咯啉酮組成之群的極性非質子性溶劑，其中該方法包含步驟 a) 及步驟 b)：

步驟 a) 包含向該反應混合物中添加組分 a1) 及組分 a2)，其中：

組分 a1) 為 2-甲基四氫呋喃，且

組分 a2) 為水，

以至於獲得具有有機層及水層之兩相系統；

步驟 b) 包含隨後分離含有該胜肽之該有機層與該水層。

在本發明之一個尤其較佳的具體實例中，對該萃取方法使用 2-甲基四氫呋喃與選自由正庚烷、甲苯、乙酸乙酯、乙酸異丙酯、乙腈及四氫呋喃組成之群的有機溶劑 1 之組

合。

該萃取步驟較佳用於在液相中製備胜肽之方法中。

三、英文發明摘要：

The present invention relates to a process for extraction of a peptide from a reaction mixture resulting from a peptide coupling reaction, the reaction mixture containing the peptide and a polar aprotic solvent selected from the group consisting of *N,N*-dimethylformamide, *N,N*-dimethylacetamide and *N*-methyl-2-pyrrolidone, whereby the process comprises a step a) and a step b):

step a) comprises the addition of a component a1) and a component a2), whereby

component a1) is 2-methyltetrahydrofuran and

component a2) is water,

to the reaction mixture, so that a biphasic system with an organic layer and an aqueous layer is obtained;

step b) comprises the subsequent separation of the organic layer containing the peptide from the aqueous layer.

In a particularly preferred embodiment of the present invention, a combination of 2-methyltetrahydrofuran and an organic solvent 1 selected from the group consisting of *n*-heptane, toluene, ethylacetate, isopropylacetate, acetonitrile and tetrahydrofuran is used for the process for extraction.

The extraction step is preferably used in a process for preparation of a peptide in liquid phase.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：圖 8。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種自由胜肽偶合反應所產生之反應混合物中萃取胜肽之方法。此方法較佳用於液相胜肽合成 (LPPS) 方法中。自反應混合物中萃取胜肽之方法亦可用於其他類型之胜肽合成中，例如用於由固相胜肽合成 (SPPS) 所製備之合成胜肽的裂解後分離。此方法亦適用於混合型固相-液相胜肽合成。此外，該萃取胜肽之方法可用於自諸如酵母或細菌之天然來源分離胜肽，尤其用於分離重組表現之胜肽。

本發明之背景

在本申請案之正文中，若未另外陳述，則根據「Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides」, Pure & Appl. Chem. 1984, 第 56 卷, 第 5 期, 第 595-624 頁使用胺基酸及胜肽之命名。

若未另外陳述，則以下縮寫具有以下清單中所提供之含義：

ACN	乙腈
Boc	第三丁氧基羰基
Bsmoc	1,1-二側氧基苯并[b]噻吩-2-基甲氧基羰基
Bzl	苯甲基
Cbz	苯甲氧羰基
DCC	<i>N,N'</i> -二環己基碳化二亞胺

DCE	二氯乙烷
DCM	二氯甲烷
DCU	<i>N,N'</i> -二環己基脲
DEA	二乙胺
DIPE	二異丙醚
DIPEA	<i>N,N</i> -二異丙基乙胺
DMA	<i>N,N</i> -二甲基乙醯胺
DMF	<i>N,N</i> -二甲基甲醯胺
DOE	實驗設計
EDC	1-乙基-3-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺
eq	當量
EtOAc	乙酸乙酯
Fmoc	芴基-9-甲氧羰基
h	小時
HOBt	1-羥基苯并三唑
HOBt·H ₂ O	單水合 1-羥基苯并三唑
HPLS	高效液相層析
LPPS	液相勝肽合成
MeTHF	2-甲基四氫呋喃
min	分鐘
MS	質譜
NMP	<i>N</i> -甲基-2-吡咯啉酮
OMe	甲氧基
O <i>t</i> Bu	第三丁氧基

PG	保護基
PyBOP	六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基-參(吡咯啉基)-鎘
RM	反應混合物
SPPS	固相胜肽合成
TAEA	參(2-胺基乙基)胺
TBTU	四氟硼酸 <i>O</i> -(苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲錄
<i>t</i> Bu	第三丁基
TEA	三乙胺
TFA	三氟乙酸
THF	四氫呋喃
TLC	薄層層析
TOTU	四氟硼酸 <i>O</i> -[氰基(乙氧基羰基)亞甲基胺基]-1,1,3,3-四甲錄
Trt	三苯甲基
UV	紫外線

萃取胜肽之方法一般用於各種類型之胜肽合成，諸如液相胜肽合成 (LPPS)、固相胜肽合成 (SPPS) 以及混合型固相-液相胜肽合成。

LPPS 尤其常用於胜肽之工業大規模製備。LPPS 典型地涉及使兩種部分受保護之胺基酸或胜肽偶合，其中一者攜帶未受保護之 C 末端羧酸基，而另一者攜帶未受保護之 N 末端胺基。在完成偶合步驟之後，所得胜肽之 N 末端胺基

或者 C 末端羧酸基可藉由特異性裂解其保護基 (PG) 之一而脫除保護基，以便可進行後續偶合步驟。LPPS 通常以整體脫除保護基之步驟來結束，在該步驟中移除所有剩餘 PG。

在 LPPS 期間對胜肽，尤其攜帶未受保護之 C 末端羧酸基及/或未受保護之 N 末端胺基之胜肽的處置往往因為胜肽在普通有機溶劑中之不良溶解度而受影響。一般而言，胜肽在普通有機溶劑中之溶解度隨胜肽鏈之長度而降低。

二氯甲烷 (DCM) 通常在 LPPS 中用作適合反應溶劑。DCM 具有良好溶劑性質、低沸點，且其與水之有限混溶性允許藉由用水溶液萃取來處理反應混合物。然而，按工業規模使用 DCM 由於環境原因而成問題，且一般由於其高密度而受限制，此使得用水溶液萃取 DCM 層耗時又費錢。

此外，一些最近開發且高度有效之偶合試劑，諸如六氟磷酸苯并三唑-1-基氧基-參(吡咯啶基)-磷 (PyBOP) 及四氟硼酸 O-(苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲錫 (TBTU)，在 DCM 中之溶解性不良。此等偶合試劑尤其有利於偶合兩個較大胜肽片段，據悉其在使用其他偶合試劑時產率較低。

此外，許多胜肽僅在中性及鹼性條件下在 DCM 中展現不良溶解度，且僅足以溶於極性非質子性溶劑中，諸如 *N,N*-二甲基甲醯胺 (DMF)、*N,N*-二甲基乙醯胺 (DMA) 或 *N*-甲基-2-吡咯啶酮 (NMP)。因此，此等極性非質子性溶劑慣常單獨或呈與較低極性之溶劑 (諸如四氫呋喃 (THF)) 的混合物形式用作 LPPS 中之反應溶劑。

另一方面，對 LPPS 使用極性非質子性溶劑存在許多缺

點。因為極性非質子性溶劑具有高沸點，因此難以藉由蒸發來濃縮反應混合物。此外，不可能藉由用水溶液萃取來直接處理反應混合物，因為極性非質子性溶劑可與水混溶。

當按工業規模進行 LPPS 時，通常藉由在各偶合步驟之後自反應混合物中直接沈澱來分離中間物胜肽，以便可分離雜質，諸如未反應之起始物質、副產物以及過量偶合試劑及鹼等。在完成胜肽偶合反應之後，典型地將反應混合物傾入反溶劑（諸如乙醚或水）中，藉此發生胜肽沈澱析出現象。不幸的是，已獲悉將反應混合物轉移至反溶劑中會引發凝膠形成問題。

此外，極性非質子性溶劑通常干擾胜肽沈澱過程，以至於所獲得之沈澱胜肽呈黏稠膠狀固體形式，其難以過濾且難以乾燥。在有些情況下，不可能過濾沈澱胜肽或甚至不可能將沈澱胜肽轉移至過濾器上。特定言之，按工業規模進行之胜肽沈澱通常難以進行且極其耗時，其中過濾時間決定前置時間（lead time）。此問題可藉由在沈澱過程中增加反溶劑：極性非質子性溶劑之體積比來部分克服，以至於實際上需要大量適合反溶劑來獲得呈可過濾形式之沈澱胜肽。

此外，已知沈澱胜肽中所存在之極性非質子性溶劑殘餘物干擾後續脫除保護基之步驟，該步驟涉及三氟乙酸（TFA）。因此，在可使酸可裂解型 PG（諸如第三丁氧基羰基（Boc）、三苯甲基（Trt）、第三丁基（*t*Bu）及第三丁氧基（*Ot*Bu））裂解之前，必需另一藉由用更具揮發性之溶劑

洗滌沈澱胜肽來移除極性非質子性溶劑殘餘物之步驟。

【先前技術】

WO 2005/081711 係有關藥物-連接子-配位體結合物及藥物-連接子化合物以及使用其治療癌症、自體免疫疾病或傳染病之方法。該文獻尤其揭示製備基於胜肽之藥物的方法以及使用乙酸乙酯、二氯甲烷及 *t*BuOH/CHCl₃ 混合物萃取胜肽之方法。

US 5,869,454 係有關精胺酸酮醯胺酶抑制劑。該文獻尤其揭示此等抑制劑之合成及用乙酸乙酯萃取。

US 2005/0165215 係關於合成胜肽之方法及在合成過程中分離胜肽之方法。該文獻進一步關於大規模合成胜肽之改良。該文獻提出，適用於胜肽萃取之溶劑包括鹵化有機溶劑，諸如二氯丙烷、二氯乙烷、二氯甲烷、三氯甲烷、氟氣碳化物、氯氣煙及其混合物。較佳溶劑為二氯甲烷。

C. H. Schneider 等人 (Int. J. Peptide Protein Res. 1980, 15, 第 411 至 419 頁) 描述一種基於用於純化中間物之液-液萃取 (雙相法) 在溶液中合成胜肽之程序。該等胜肽萃取採用二氯甲烷作為溶劑。

J. W. van Nispen (Pure and Appl. Chem. 1987, 第 59 卷, 第 3 期, 第 331-344 頁) 提供關於 (聚) 胜肽之合成及分析的概述。該文獻教示，為了發現胜肽組分之最佳分離法，有可能嘗試具有廣泛不同的性質之溶劑的許多組合。為此目的，通常採用所謂 Craig 機器，其中在乘法分佈時，下層相保持其位置，而上層相則可移動。

US 2010/0184952 揭示一種自藉由經 Fmoc 基團保護之胺基酸化合物與胺反應所獲得之反應混合物中移除二苯富烯及/或二苯富烯胺加合物以脫除保護基的方法，該方法包含攪拌該反應混合物且使其分配在碳數為 5 或 5 以上之烴溶劑與不可與該烴溶劑混溶之極性有機溶劑（不包括有機鹼胺溶劑）之間，且移除烴溶劑層，其中二苯富烯及/或二苯富烯胺加合物係溶解於該烴溶劑層中。在此方法期間，將胺基酸酯或胜肽轉移至極性有機溶劑中。該等極性有機溶劑之實例包括乙腈、甲醇、丙酮及其類似物及其混合溶劑，較佳為乙腈及甲醇。

L. A. Carpino 等人（Organic Process Research & Development 2003, 7, 第 28-37 頁）描述一種快速連續的溶液相胜肽合成。據顯示，在參(2-胺基乙基)胺存在下脫除胜肽片段之 Fmoc 及 Bsmoc 保護基的方法適用於以公克規模快速連續地在溶液中合成短胜肽以及合成相對較長（22 聚體）之片段（hPTH 13-34）。在後一情況下，據報導，粗產物與經由固相方案獲得之樣品相比具有顯著更大的純度。藉由一項新技術優化 Bsmoc 方法，該技術涉及在各偶合脫除保護基週期中經由短矽膠柱過濾逐漸部分脫除保護基之胜肽。

然而，由 L. A. Carpino 等人所述之方法具有若干限制性。此方法採用 DCM 作為反應溶劑且因此，無法應用於製備在 DCM 中顯示不良溶解度之胜肽。此外，其採用大量高成本的參(2-胺基乙基)胺（TAEA），此進一步限制此方法工

業規模化之適用性。

因此，強烈需要一種用於製備胜肽（尤其按工業規模製備胜肽）之具時間及成本效益的合成方法。該方法必須克服由在 LPPS 期間使用 DCM 及極性非質子性溶劑（諸如 DMF、DMA 及 NMP）所產生之缺點。

【發明內容】

本發明之作者意外發現大量結構不同之胜肽在較佳與選自由正庚烷、甲苯、乙酸乙酯、乙酸異丙酯、乙腈或四氫呋喃組成之群（此群組稱為有機溶劑 1）的有機溶劑組合之 2-甲基四氫呋喃中具有極佳溶解度。尤其是，胜肽在 2-甲基四氫呋喃與有機溶劑 1 之組合中的溶解度一般高於在純 2-甲基四氫呋喃中之溶解度。此外，其發現常用極性非質子性溶劑在很大程度上分配於包含水及 2-甲基四氫呋喃或 2-甲基四氫呋喃與有機溶劑 1 之組合的兩相系統中的水層中。

因此，水及純 2-甲基四氫呋喃或 2-甲基四氫呋喃與有機溶劑 1 之組合非常適用於自含有極性非質子性溶劑之混合物中萃取消肽。在本發明具體實例之一中，將含有胜肽之所得有機層部分蒸發，且在添加適合反溶劑（此溶劑群組稱為有機溶劑 2）後使其中所溶解之胜肽沈澱。因為在胜肽沈澱過程中實質上不存在極性非質子性溶劑，因此可容易地過濾所得胜肽。藉由應用本發明之萃取方法，可顯著減少胜肽過濾所需之時間。因此，藉由應用此種萃取方法，可成功克服在 LPPS 期間使用極性非質子性溶劑所致之缺

點。

本發明係關於一種自由胜肽偶合反應所產生之反應混合物中萃取消肽之方法，該反應混合物含有該胜肽及選自由 *N,N*-二甲基甲醯胺、*N,N*-二甲基乙醯胺及 *N*-甲基-2-吡咯啉酮組成之群的極性非質子性溶劑，其中該方法包含步驟 a) 及步驟 b)：

步驟 a) 包含向該反應混合物中添加組分 a1) 及組分 a2)，其中：

組分 a1) 為 2-甲基四氫呋喃；

組分 a2) 為水；

以至於獲得具有有機層及水層之兩相系統；

步驟 b) 包含分離含有該胜肽之有機層與水層，其中：

步驟 a) 中所獲得之該兩相系統的特徵在於以下體積比：

極性非質子性溶劑:2-甲基四氫呋喃=1:20 至 1:2；且

極性非質子性溶劑:水=1:20 至 1:2。

本發明之較佳具體實例之一係關於一種自由胜肽偶合反應所產生之反應混合物中萃取消肽之方法，該反應混合物含有該胜肽及選自由 *N,N*-二甲基甲醯胺、*N,N*-二甲基乙醯胺及 *N*-甲基-2-吡咯啉酮組成之群的極性非質子性溶劑，其中該方法包含步驟 a) 及步驟 b)：

步驟 a) 包含添加組分 a1)、組分 a2) 及組分 a3)，其中：

組分 a1) 為 2-甲基四氫呋喃；

組分 a2) 為水；

組分 a3) 為有機溶劑 1，該有機溶劑 1 係選自由正庚烷、
甲苯、乙酸乙酯、乙酸異丙酯、乙腈及四氫呋喃組成之群；
以至於獲得具有有機層及水層之兩相系統；

步驟 b) 包含分離含有該胜肽之有機層與水層，其中：

步驟 a) 中所獲得之該兩相系統的特徵在於以下體積
比：

極性非質子性溶劑:2-甲基四氫呋喃=1:20 至 1:2；

極性非質子性溶劑:有機溶劑 1=1:5 至 30:1；

極性非質子性溶劑:水=1:20 至 1:2；且

2-甲基四氫呋喃:有機溶劑 1=50:1 至 1:1。

在一個較佳具體實例中，步驟 a) 中所獲得之該兩相系
統的特徵在於以下體積比：

極性非質子性溶劑:2-甲基四氫呋喃=1:6 至 1:3；

極性非質子性溶劑:有機溶劑 1=1:1 至 4:1；

極性非質子性溶劑:水=1:5 至 1:3；且

2-甲基四氫呋喃:有機溶劑 1=10:1 至 2:1。

在一個尤其較佳的具體實例中，極性非質子性溶劑為
N,N-二甲基甲醯胺或 *N*-甲基-2-吡咯啉酮。

在本發明之又一具體實例中，兩相系統中不存在有機
溶劑 1。

在本發明之較佳具體實例之一中，萃取消肽而不是使
其沈澱。作為替代，使胜肽之一個或若干個保護基裂解，

且萃取所產生之部分未受保護之胜肽，且將包含該胜肽之有機層用於後續胜肽偶合反應。因此，本發明提供一種用於連續 LPPS 之有效合成方法，該方法適合於按工業規模製備胜肽。

本發明之連續 LPPS 非常適用於在使用 Boc、Fmoc 及 Bzl 作為保護基時之胜肽合成，正如下文之實施例所說明。

萃取方法

本發明係關於一種自由胜肽偶合反應所產生之反應混合物中萃取胜肽之方法，該反應混合物含有該胜肽及極性非質子性溶劑，其中該方法包含步驟 a) 及步驟 b)：

步驟 a) 包含向該反應混合物中添加組分 a1) 及組分 a2)，其中：

組分 a1) 為 2-甲基四氫呋喃；

組分 a2) 為水；

以至於獲得具有有機層及水層之兩相系統；

步驟 b) 包含隨後分離含有該胜肽之有機層與水層。

本發明之較佳具體實例之一係關於一種自由胜肽偶合反應所產生之反應混合物中萃取胜肽之方法，該反應混合物含有該胜肽及選自由 DMF、DMA 及 NMP 組成之群的極性非質子性溶劑，其中該方法包含步驟 a) 及步驟 b)：

步驟 a) 包含添加組分 a1)、組分 a2) 及組分 a3)，其中：

組分 a1) 為 2-甲基四氫呋喃；

組分 a2) 為水；

組分 a3) 為有機溶劑 1, 該有機溶劑 1 係選自由正庚烷、甲苯、乙酸乙酯、乙酸異丙酯、乙腈及四氫呋喃組成之群;

以至於獲得具有有機層及水層之兩相系統;

步驟 b) 包含分離含有該胜肽之有機層與水層。

視情況將組分 a1)、組分 a2) 及組分 a3) 彼此混合, 其中此步驟可以任何順序進行。三種組分亦可以兩種組分或所有組分之預混合混合物形式添加, 只要在萃取過程中不發生胜肽沈澱即可。

含有極性非質子性溶劑之混合物較佳為由胜肽偶合反應所產生之粗反應混合物。此混合物較佳不含可充當界面活性劑且在萃取過程中干擾相分離的任何化合物。在一個尤其較佳的具體實例中, 該混合物不含先前技術中已知的任何界面活性劑, 諸如陽離子型表面活性劑及非離子型表面活性劑。

向含有胜肽及極性非質子性溶劑之混合物中添加組分 a1)、組分 a2) 及組分 a3) 可以任何順序進行, 只要在萃取過程中不發生胜肽沈澱即可。舉例而言, 可能組合含有胜肽及極性非質子性溶劑之混合物與 2-甲基四氫呋喃, 向其中添加水, 且最後添加有機溶劑 1。亦可能將含有胜肽及極性非質子性溶劑之混合物轉移至水及 2-甲基四氫呋喃中, 然後向其中添加有機溶劑 1。

在本發明之尤其較佳的具體實例中, 將含有胜肽及極性非質子性溶劑之混合物與 2-甲基四氫呋喃及有機溶劑 1 組合, 其中可以任何順序添加 2-甲基四氫呋喃及有機溶劑

1。隨後向其中添加水。

應瞭解，所添加之水（組分 a2）可含有溶解之組分，諸如鹽，例如無機鹽。

較佳的是用力攪拌所獲得之兩相系統。可使用技術現狀下已知且常用於萃取之混合設備，來進行攪拌所獲得之兩相系統的過程。舉例而言，在分批萃取的情況下，可採用噴射型或攪拌器型混合器來攪拌兩相系統。

適合萃取設備之選擇主要視所進行之萃取方法的規模以及萃取溫度而定。可藉由使用分批萃取或連續萃取來進行萃取過程。需要時亦可重複萃取過程若干次，以至於達成對胜肽之最佳萃取。

在進行攪拌過程之後，較佳允許進行相分離，其中形成兩個液體層：有機層及水層。有機層與水層相比具有低密度。可使用沈降槽或利用離心來實現相分離。相分離所需之時間視所進行之萃取方法之規模及所用設備而定。相分離較佳需要不到 1 小時，更佳為不到 10 分鐘，尤其較佳為不到 1 分鐘。

在進行相分離之後，胜肽主要位於有機層中，有機層另外含有 2-甲基四氫呋喃及視情況存在之有機溶劑 1。將含有胜肽之上層有機層與水層分離。在萃取過程之後，超過 90 重量%之胜肽位於有機層中，且少於 10 重量%之胜肽位於水層中為較佳。在萃取過程之後，超過 98 重量%之胜肽位於有機層中，且少於 2 重量%之胜肽位於水層中為甚至更佳。在萃取過程之後，超過 99 重量%之胜肽位於有機層中，

且少於 1 重量%之胜肽位於水層中為尤其較佳。

本發明之萃取方法允許自由胜肽偶合反應所產生之粗反應混合物中有效萃取消肽。極性非質子性溶劑在有機層中之溶解度顯著低於在水層中之溶解度。因此，在萃取之後，含有胜肽之有機層僅另外含有低量極性非質子性溶劑。

在萃取過程之後，少於 15 體積%極性非質子性溶劑位於有機層中，且超過 85 體積%極性非質子性溶劑位於水層中為較佳。然而，在萃取過程之後，少於 5 體積%極性非質子性溶劑位於有機層中且超過 95 體積%極性非質子性溶劑位於水層中為更佳。在萃取過程之後，少於 2 體積%極性非質子性溶劑位於有機層中且超過 98 體積%極性非質子性溶劑位於水層中為尤其較佳。此可能需要重複萃取。

重要的是，根據本發明之萃取方法不僅允許使胜肽與很大一部分的極性非質子性溶劑分離，而且可與起源於偶合試劑（脲類、四氟硼酸鹽等）之鹽及副產物分離。若在添加疏水性反溶劑（諸如正庚烷或乙醚）後自由胜肽偶合反應所產生之粗反應混合物中直接沈澱，則通常無法移除此等鹽及副產物。然而，已知此等鹽及副產物會降低用於胜肽下游處理之層析管柱的容量。若所製備之胜肽用作活性醫藥成分，則有必要藉由管柱層析法進行此額外純化。

因此，在有需要時，隨後可藉由管柱層析法來純化沈澱胜肽。在胜肽用作活性醫藥成分的情況下，使用該等額外純化步驟。因此，根據本發明之萃取方法與使用自反應混合物中直接沈澱的方法相比允許以更高純度分離胜肽。

在萃取過程中所獲得之兩相系統之組成對胜肽及極性非質子性溶劑在有機層與水層之間的分佈係數有極大影響。在下文中，以體積:體積比率形式提供比率。

極性非質子性溶劑:2-甲基四氫呋喃之體積比在 1:20 至 1:2 範圍內為較佳。此體積比在 1:10 至 1:2 範圍內為較佳。此體積比在 1:6 至 1:3 範圍內為尤其較佳。

據顯示，胜肽在 2-甲基四氫呋喃與有機溶劑 1 之組合中的溶解度高於在純 2-甲基四氫呋喃中之溶解度。因此，當有機溶劑 1 之用量足夠高時，在萃取過程中所獲得之胜肽在有機層中的溶解度尤其高。極性非質子性溶劑:有機溶劑 1 之體積比在 1:5 至 30:1 範圍內為較佳。此體積比在 1:3 至 10:1 範圍內為較佳。此體積比在 1:1 至 4:1 範圍內為尤其較佳。

2-甲基四氫呋喃:有機溶劑 1 之體積比在 50:1 至 1:1 範圍內為較佳。此體積比在 20:1 至 2:1 範圍內為較佳。此體積比在 10:1 至 2:1 範圍內為尤其較佳。

極性非質子性溶劑:水之體積比對萃取過程之效率及胜肽於水層中之溶解度有顯著影響。詳言之，若兩相系統中之極性非質子性溶劑:水體積比高於 1:2，亦即若水層含有超過 34 體積%極性非質子性溶劑，則胜肽在水層中具有顯著較高的溶解度。因此，極性非質子性溶劑:水之體積比在 1:20 至 1:2 範圍內為較佳。此體積比在 1:10 至 1:3 範圍內為較佳。此體積比在 1:5 至 1:3 範圍內為尤其較佳。

含有胜肽之混合物中所存在之極性非質子性溶劑較佳

係選自由 DMF 及 NMP 組成之群。

因此，純 2-甲基四氫呋喃及 2-甲基四氫呋喃與有機溶劑 1 之組合尤其適用於胜肽萃取方法。2-甲基四氫呋喃為容易再循環之環境友好型溶劑，其可來源於多種農業副產物。因此，本發明提供一種環境友好型胜肽萃取方法。

若有機溶劑 1 係選自由正庚烷、甲苯、乙酸乙酯 (EtOAc)、乙酸異丙酯、乙腈 (ACN) 及四氫呋喃 (THF) 組成之群，更佳選自由 EtOAc、乙酸異丙酯、ACN 及 THF 組成之群，尤其較佳選自由 ACN 及 THF 組成之群，則胜肽在 2-甲基四氫呋喃與有機溶劑 1 之組合中的溶解度尤其高。在胜肽萃取方法之一個尤其較佳的具體實例中，有機溶劑 1 係選自由 ACN 及 THF 組成之群。

對胜肽萃取方法所用之組分 a2) 可僅由水組成。然而，若組分 a2) 另外含有至少一種無機鹽，則會顯著降低組分 a2) 中之 2-甲基四氫呋喃及有機溶劑 1 之可混溶性，且因此顯著降低胜肽於水層中之溶解度。此外，若組分 a2) 含有至少一種無機鹽，則降低有機層中之水含量。

在較佳具體實例之一中，組分 a2) 含有至少一種選自由氯化鈉、硫酸氫鈉、硫酸氫鉀、碳酸氫鈉及磷酸氫鈉組成之群的無機鹽。在其他具體實例中，組分 a2) 亦可含有其他化合物，諸如酸。

特定而言，組分 a2) 可含有在 2 至 11 之 pH 值範圍內不充當緩衝劑的無機鹽。添加該等無機鹽可降低胜肽於水層中之溶解度且減少萃取過程中之相分離所需之時間。舉

例而言，組分 a2) 可含有氯化鈉或硫酸鈉。組分 a2) 中所存在之無機鹽之濃度較佳在 1 重量%至 20 重量%範圍內，甚至更佳為 5 重量%至 15 重量%。使用鹽（如氯化鈉）來促進兩相分離，且使用充當緩衝劑之鹽來選擇性地萃取水層中之酸或鹼。

組分 a2) 之 pH 值可對胜肽之溶解度以及水層中有些雜質之溶解度具有極大影響。此外，組分 a2) 之 pH 值之選擇視胜肽之化學穩定性以及其 PG 之化學穩定性而定。組分 a2) 之 pH 值較佳在 2 至 11 範圍內，尤其較佳為 5 至 8，以至於用於胜肽偶合反應之三級鹼在萃取過程中主要留在水層中。可藉由添加酸或鹼及/或使用緩衝劑來調節組分 a2) 之 pH 值。

可用於調節組分 a2) 之 pH 值之酸的選擇不受特別限制，只要組分 a2) 中所存在之酸不干擾胜肽萃取過程且不引起胜肽降解即可。舉例而言，布氏酸 (Brønsted acid) 可用於此目的，諸如有硫酸、鹽酸、磷酸、三氟乙酸或檸檬酸。

可用於調節組分 a2) 之 pH 值之鹼的選擇不受特別限制，只要組分 a2) 中所存在之鹼不干擾胜肽萃取過程且不引起胜肽降解即可。舉例而言，鹼金屬氫氧化物適用於調節組分 a2) 之 pH 值，諸如有氫氧化鈉、氫氧化鉀及氫氧化鋰。

組分 a2) 較佳含有緩衝劑，以便在萃取過程中將水層之 pH 值保持在所要範圍內。緩衝劑較佳選自由氯化銨、硫

酸氫鈉、硫酸氫鉀、碳酸氫鈉、碳酸鈉、磷酸氫鈉、磷酸二氫鈉及磷酸鈉組成之群。組分 a2) 中所存在之緩衝劑之濃度較佳在 1 重量%至 10 重量%範圍內，甚至更佳為 3 重量%至 8 重量%。

所獲得之含有胜肽之有機層視情況可另外用水溶液洗滌至少一次。用於此目的之水溶液之 pH 值較佳在 2 至 11 範圍內。

視胜肽偶合反應條件及所用試劑而定，有機層可含有呈雜質形式之具有自由一級胺基、二級胺基或三級胺基之化合物，例如具有不受保護之 *N* 末端胺基之胜肽或三級鹼。在該等情況下，較佳用 pH 值為 2 至 7 之水溶液洗滌有機層。

在其他情況下，有機層可含有具有自由羧酸基之化合物，例如具有不受保護之 *C* 末端羧酸基之胜肽。在此等情況下，較佳用 pH 值為 7 至 11 之水溶液洗滌有機層。

宜進行胜肽萃取過程所處之溫度（在下文中稱為萃取溫度）視所用溶劑之選擇以及胜肽之性質而定。萃取溫度對所用溶劑之可混溶性及胜肽於有機層及水層中之溶解度具有極大影響。因此，以一定方式選擇萃取溫度，以至於在萃取過程中形成兩相系統且胜肽於有機層中之溶解度足夠高。胜肽萃取過程較佳在 0°C 至 60°C 之萃取溫度下進行。萃取溫度在 20°C 至 30°C 範圍內尤其較佳。

視胜肽偶合反應條件及所用偶合試劑而定，可在萃取過程之前及/或期間形成固體。舉例而言，若使用碳化二亞胺作為偶合試劑，則可能如此。為此，可能需要在組合含

有胜肽、極性非質子性溶劑之混合物、2-甲基四氫呋喃、視情況選用之有機溶劑 1 及組分 a2) 之後，對所獲得之兩相系統進行過濾。因此，在本發明具體實例之一中，在分離含有胜肽之有機層之前對兩相系統進行過濾。

藉由本發明萃取方法萃取之胜肽可為任何胜肽。藉由該萃取方法萃取之胜肽較佳包含 100 或 100 個以下胺基酸殘基，更佳包含 50 或 50 個以下胺基酸殘基，最佳包含 20 或 20 個以下胺基酸殘基。胜肽之胺基酸可為 D- α -胺基酸及/或 L- α -胺基酸、D- β -胺基酸及/或 L- β -胺基酸以及含有至少一個一級胺基及/或二級胺基及至少一個羧酸基之其他有機化合物。胺基酸較佳為 α -胺基酸，甚至更佳為 L- α -胺基酸，其中蛋白型胺基酸尤其較佳。

製備胜肽

本發明之另一態樣係關於一種在液相中製備胜肽之方法，該方法包含步驟 aa)、步驟 bb) 及步驟 cc)：

在步驟 aa) 中，在存在偶合試劑及視情況選用之三級鹼的情況下，在選自由 *N,N*-二甲基甲醯胺、*N,N*-二甲基乙醯胺及 *N*-甲基-2-吡咯啉酮組成之群的極性非質子性溶劑中進行胜肽偶合反應；

在步驟 bb) 中，根據上述方法萃取所產生之胜肽；及

在步驟 cc) 中，將步驟 bb) 中所獲得之有機層的至少一部分蒸發。

作為用於根據步驟 aa) 之胜肽偶合反應的起始物質，採用兩種部分受保護之胺基酸的組合、兩種部分受保護之

胜肽的組合或部分受保護之胺基酸與部分受保護之胜肽的組合。

根據本發明之在液相中製備胜肽之方法非常適合液相胜肽合成 (LPPS)。在本發明具體實例之一中，根據步驟 aa) 之胜肽偶合反應採用藉由 SPPS 製備之兩種部分受保護之胜肽的組合。因此，本發明方法允許偶合胜肽片段且可與 SPPS 組合使用。

使用典型用於胜肽偶合反應之習知過程參數及試劑進行根據步驟 aa) 之胜肽偶合反應。

胜肽偶合反應習知在極性非質子性溶劑中且使用一或多種偶合試劑，較佳在存在一或多種偶合添加劑的情況下且較佳在存在一或多種三級鹼的情況下來進行。

以一定方式選擇用於胜肽偶合反應之偶合試劑，以至於偶合試劑在胜肽偶合反應條件下不與極性非質子性溶劑反應，且與活性羧酸基相鄰之立體對稱中心不發生實質性差向異構化。因此，較佳偶合試劑為 *O*-1*H*-苯并三唑之磷鹽或鎳鹽及碳化二亞胺偶合試劑。

磷鹽及鎳鹽較佳選自由以下組成之群：

BOP (六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基-參-(二甲基胺基)-磷)；

PyBOP (六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基-參吡咯啶鎳)；

HBTU (六氟磷酸 *O*-(1*H*-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲鎳)；

HCTU (六氟磷酸 *O*-(1*H*-6-氯-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲鎳)；

TCTU (四氟硼酸 *O*-(1*H*-6-氯苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲錫);

HATU (六氟磷酸 *O*-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲錫);

TATU (四氟硼酸 *O*-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲錫);

TBTU (四氟硼酸 *O*-(苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲錫);

TOTU (四氟硼酸 *O*-[氰基(乙氧羰基)亞甲基胺基]-1,1,3,3-四甲錫);

HAPyU (六氟磷酸 *O*-(苯并三唑-1-基)氧基雙-(吡咯啉基)-錫);

PyAOP (六氟磷酸 苯并三唑-1-基-氧基-參-吡咯啉鎂);

COMU (六氟磷酸 1-[(1-(氰基-2-乙氧基-2-側氧基亞乙基胺基氧基)-二甲基胺基-嗎啉基亞甲基)]-甲鎂);

PyClock (六氟磷酸 6-氯-苯并三唑-1-基-氧基-參-吡咯啉鎂);

PyOxP (六氟磷酸 *O*-[(1-氰基-2-乙氧基-2-側氧基亞乙基)胺基]-氧基三(吡咯啉-1-基)-鎂); 及

PyOxB (四氟硼酸 *O*-[(1-氰基-2-乙氧基-2-側氧基亞乙基)胺基]-氧基三(吡咯啉-1-基)-鎂)。

選自鎂或錫偶合試劑之較佳偶合試劑為 TBTU、TOTU 及 PyBOP。

碳化二亞胺偶合試劑較佳選自由二異丙基碳化二亞胺 (DIC)、二環己基碳化二亞胺 (DCC) 及諸如 1-乙基-3-(3-

二甲基氨基丙基)-碳化二亞胺 (EDC) 之水溶性碳化二亞胺 (WSCDI) 組成之群。

水溶性碳化二亞胺作為碳化二亞胺偶合試劑尤其較佳，其中 EDC 最佳。

胜肽偶合反應中所用之三級鹼較佳與胜肽及偶合試劑相容，且藉由充當界面活性劑而不干擾萃取過程。

胜肽偶合反應中所用之該三級鹼之共軛酸較佳具有 7.5 至 15、更佳為 7.5 至 10 之 pKa 值。該三級鹼較佳選自由以下組成之群：三烷基胺，諸如 *N,N*-二異丙基乙胺 (DIPEA) 或三乙胺 (TEA)；另外有 *N,N*-二- C_{1-4} 烷基苯胺，諸如 *N,N*-二乙苯胺；2,4,6-三- C_{1-4} 烷基吡啶，諸如柯林鹼 (2,4,6-三甲基吡啶)；或 *N*- C_{1-4} 烷基嗎啉，諸如 *N*-甲基嗎啉，其中任何 C_{1-4} 烷基相同或不同且彼此獨立地為直鏈或分支鏈 C_{1-4} 烷基。DIPEA、TEA 及 *N*-甲基嗎啉作為用於胜肽偶合反應之三級鹼尤其較佳。

偶合添加劑較佳為能夠形成活性酯、更佳具有酸性親核性 *N*-羥基官能基之親核性羥基化合物，其中 N 為醯亞胺或為 *N*-醯基或 *N*-芳基取代之三氮烯基，該三氮烯基型偶合添加劑較佳為 *N*-羥基苯并三唑衍生物 (或 1-羥基苯并三唑衍生物) 或 *N*-羥基苯并三吡啶衍生物。該等偶合添加劑已描述於 WO 94/07910 及 EP 0 410 182 中。

較佳偶合添加劑係選自由以下組成之群：*N*-羥基丁二醯亞胺 (HOSu)、6-氯-1-羥基苯并三唑 (Cl-HOBt)、*N*-羥基-3,4-二氮-4-側氧基-1,2,3-苯并三吡啶 (HOObt)、1-羥基-7-

氮雜苯并三唑 (HOAt)、1-羥基苯并三唑 (HOBt) 及 2-氰基-2-羥基亞胺基乙酸乙酯 (CHA)。CHA 可以商標名 OXYMAPURE[®] 獲得。CHA 已被證明是有效耦合添加劑，因為與基於苯并三唑之耦合添加劑相比，對活性羧酸立體對稱中心之差向異構化的抑製程度更高。此外，CHA 與例如 HOBt 或 Cl-HOBt 相比爆炸性較低，以至於其處理較為有利，且作為另一優勢，可藉由反應混合物之顏色變化在視覺上監測耦合進展情況。HOBt 較佳用作胜肽耦合反應之耦合添加劑。

在本發明之較佳具體實例中，胜肽耦合反應中之試劑組合係選自由 TBTU/HOBt/DIPEA、PyBOP/TEA、EDC/HOBt 及 EDC/HOBt/DIPEA 組成之群。

用於胜肽耦合反應之反應溶劑係選自由 DMF、DMA、NMP 或其混合物組成之群。胜肽耦合反應之尤其較佳的反應溶劑係選自由 DMF 及 NMP 組成之群。

反應溶劑較佳實質上不含水。反應溶劑較佳含有少於 1 重量%之水，更佳含有少於 0.1 重量%之水，甚至更佳含有少於 0.01 重量%之水，且尤其較佳含有少於 0.001 重量%之水。溶劑中之水含量可藉由卡爾費雪滴定 (Karl Fischer titration) 根據先前技術中已知的標準測試方法 ASTM E203-8 來測定。

用於胜肽耦合反應之反應溶劑較佳實質上不含選自由一級胺及二級胺、羧酸及脂族醇組成之群的雜質。若以低於化學計算量之量或化學計算量使用之任何起始物質中少

於 1 莫耳%在胜肽偶合反應期間與此等雜質發生不需要之反應，則用於胜肽偶合反應之反應溶劑被視為實質上不含此等雜質。

適當反應溫度之選擇視所用偶合試劑以及胜肽穩定性而定。胜肽偶合反應較佳在 -15°C 至 50°C 、更佳為 -10°C 至 30°C 、甚至更佳為 0°C 至 25°C 之反應溫度下進行。

胜肽偶合反應較佳在大氣壓下進行。然而，亦可在高於大氣壓或稍低於大氣壓之壓力下進行胜肽偶合反應。

較佳在環境氛圍下進行胜肽偶合反應。然而，諸如氮氣或氫氣之保護性氣體氛圍亦較佳。

在本申請案中，術語「反應時間」係指直至實質上完成反應轉化所需之時間。以低於化學計算量之量或化學計算量使用之起始物質之量降至其初始量之 5 莫耳%以下、較佳降至其初始量之 2 莫耳%以下之後，認為反應轉化實質上完成。可藉由此項技術中已知之分析方法來監測反應進展情況，例如有分析型高效液相層析 (HPLC)、薄層層析 (TLC)、質譜 (MS) 或 HPLC-MS，其中 HPLC 尤其適宜用於此目的。

胜肽偶合反應之反應時間較佳在 15 分鐘至 20 小時範圍內，更佳為 30 分鐘至 5 小時，甚至更佳為 30 分鐘至 2 小時。

在有關胜肽偶合反應之反應條件的描述中，術語「份」意謂用作胜肽偶合反應之起始物質的胜肽及/或胺基酸之總重量的重量份數因子。較佳使用 1 至 30 份，更佳使用 5 至

10 份反應溶劑。

較佳使用 0.9 至 5 莫耳當量，更佳使用 1 至 1.5 莫耳當量之偶合試劑，莫耳當量係基於反應性 C 末端羧酸基之莫耳數。

較佳使用 0.1 至 5 莫耳當量，更佳使用 0.5 至 1.5 莫耳當量之偶合添加劑，莫耳當量係基於偶合試劑之莫耳數。

較佳使用 1 至 10 莫耳當量，更佳使用 2 至 3 莫耳當量之三級鹼，莫耳當量係基於偶合試劑之莫耳數。

任何胜肽均可藉由本發明之在液相中製備胜肽之方法來獲得。

由本發明之在液相中製備胜肽之方法所獲得的胜肽較佳包含 100 或 100 個以下胺基酸殘基，更佳包含 50 或 50 個以下胺基酸殘基，最佳包含 20 或 20 個以下胺基酸殘基。胜肽之胺基酸可為 D- α -胺基酸及 L- α -胺基酸、D- β -胺基酸及 L- β -胺基酸以及含有至少一個一級胺基及/或二級胺基及至少一個羧酸基之其他有機化合物。由本發明之在液相中製備胜肽之方法所獲得的胜肽之胺基酸較佳為 α -胺基酸，甚至更佳為 L- α -胺基酸，其中蛋白型胺基酸尤其較佳。

在萃取過程之後，較佳將含有胜肽之有機層部分蒸發。在本申請案中，所獲得之層因此被稱為「經部分蒸發之有機層」。進行部分蒸發所處之溫度不受特別限制，且可根據胜肽之熱穩定性以及 2-甲基四氫呋喃或 2-甲基四氫呋喃與有機溶劑 1 之混合物的性質加以選擇。較佳在 30°C 至 50°C 之溫度下部分蒸發有機層。在有需要時在 20 毫巴至

1000 毫巴 (20 hPa 至 1000 hPa) 之減壓下部分蒸發有機層。熟習此項技術者知道，較佳根據所要蒸發溫度來調節部分蒸發有機層所處之壓力。

因為 2-甲基四氫呋喃及有機溶劑 1 具有足夠揮發性，因此可容易地部分蒸發含有胜肽之有機層。

在本發明具體實例之一中，直接蒸發含有胜肽之有機層直至乾燥，且將剩餘殘餘物溶解於與 2-甲基四氫呋喃及有機溶劑 1 不同的溶劑中。然而，若含有胜肽之有機層包含超過 60 體積%之選自由 MeTHF 及 THF 組成之群的溶劑，則出於安全原因較佳避免完全蒸發直至乾燥。作為替代，可部分蒸發含有胜肽之有機層，接著添加甲苯，隨後蒸發直至乾燥。

由於有機層中所存在之 2-甲基四氫呋喃與水形成共沸物，因此在部分蒸發過程中有效移除含有胜肽之有機層中的痕量水。

在較佳具體實例之一中，在組合經部分蒸發之有機層與有機溶劑 2 時，較大部分胜肽沈澱。

在本發明之另一較佳具體實例中，直接蒸發含有胜肽之有機層直至乾燥，且將剩餘殘餘物溶解於與 2-甲基四氫呋喃及有機溶劑 1 不同的溶劑中。隨後將所獲得之溶液與有機溶劑 2 組合，藉此發生胜肽沈澱。

在胜肽沈澱過程中所用之經部分蒸發之有機層:有機溶劑 2 的體積比對沈澱過程之完成程度及沈澱胜肽之性質具有極大影響。在下文中，以體積:體積比率形式提供比率。

經部分蒸發之有機層:有機溶劑 2 的體積比在 1:20 至 1:1 範圍內較佳。此體積比在 1:12 至 1:2 範圍內較佳。此體積比在 1:6 至 1:3 範圍內尤其較佳。

有機溶劑 2 較佳選自在大氣壓下之沸點低於 160°C 的有機溶劑。胜肽在有機溶劑 2 中之溶解度較佳低於在 2-甲基四氫呋喃及/或 2-甲基四氫呋喃與有機溶劑 1 之混合物中的溶解度。有機溶劑 2 較佳選自由乙腈、乙醚、二異丙醚、正庚烷及甲苯組成之群，更佳選自由乙腈、乙醚、二異丙醚及甲苯組成之群，尤其較佳選自由二異丙醚、正庚烷及甲苯組成之群。

由於經部分蒸發之含有胜肽之有機層實質上不含極性非質子性溶劑，因此使胜肽沈澱所需之有機溶劑 2 的量顯著低於先前技術之沈澱方法，先前技術之沈澱方法使用由胜肽偶合反應所產生之粗反應混合物。此外，與先前技術之沈澱方法相反，沈澱胜肽為無黏性固體物質。

在沈澱過程中，經部分蒸發之有機層中所存在之胜肽的至少 80 重量%以固體物質形式沈澱析出為較佳。經部分蒸發之有機層中所存在之胜肽的至少 90 重量%以固體物質形式沈澱析出為甚至更佳。經部分蒸發之有機層中所存在之胜肽的至少 95 重量%以固體物質形式沈澱析出為甚至更佳。經部分蒸發之有機層中所存在之胜肽的至少 98 重量%以固體物質形式沈澱析出為尤其較佳。

進行沈澱過程所處之溫度（此溫度在下文中稱為沈澱溫度）視經部分蒸發之有機層的組成、有機溶劑 2 之選擇

及胜肽之性質而定。

沈澱溫度對胜肽沈澱之完全程度及沈澱胜肽之物理性質具有極大影響。較佳在 -10°C 至 60°C 之沈澱溫度下進行沈澱過程，其中 -10°C 至 30°C 之沈澱溫度甚至更佳。然而，沈澱溫度在 -10°C 至 0°C 範圍內尤其較佳。

由於經部分蒸發之含有胜肽之有機層實質上不含極性非質子性溶劑，因此可容易地藉由過濾來分離沈澱胜肽。因此，顯著縮短過濾過程所需之時間。較佳藉由過濾分離沈澱胜肽且在減壓下乾燥。

然而，亦可藉由離心來分離沈澱胜肽。

必要時可對過濾期間所收集之濾液再次進行部分蒸發，隨後沈澱，以至於可收集第二批沈澱胜肽。

在本發明之另一具體實例中，直接用可裂解胜肽之一或若干個 PG 之試劑處理經部分蒸發之含有胜肽之有機層。由於經部分蒸發之含有胜肽之有機層實質上不含極性非質子性溶劑，因此用於裂解胜肽之一或若干個 PG 之試劑的選擇不受特別限制。舉例而言，可用酸解試劑處理經部分蒸發之含有胜肽之有機層，其中未發生酸解試劑與極性非質子性溶劑之間的不需要之反應或未對裂解有抑制。若胜肽之 *N* 末端 PG 為第三丁氧基羰基 (Boc)，則本發明之此具體實例尤其較佳。

在本發明之其他具體實例中，經部分蒸發之有機層用於進行其他反應，諸如二硫橋形成。

在本發明之另一具體實例中，直接向由胜肽偶合反應

所產生之反應混合物中添加可裂解胜肽之一或若干個 PG 的試劑。在目標 PG 之裂解完成之後，自反應混合物中萃取所產生之胜肽。若胜肽之 *N* 末端 PG 為芴基-9-甲氧基羰基 (Fmoc)，則本發明之此具體實例尤其適合。

在一個特定具體實例中，在 PG 裂解之後用 MeTHF 或用 MeTHF 與有機溶劑 1 之混合物萃取消胜肽。此典型地為經 Fmoc 保護之胜肽難以保持在不含 NMP 或 DMF 之溶液中的情況。在 Fmoc 裂解之後，可將此等胜肽萃取於含有 MeTHF 及視情況存在之有機溶劑 1 的有機層中。

在經 Boc 保護之胜肽的情況下，相反的是，必須在 Boc 裂解之前移除 NMP 及 DMF，但此等胜肽通常在存在 TFA>5 體積%的情況下可溶於甲苯、乙酸乙酯或可能存在之庚烷中。

在本發明之又一具體實例中，如上文所述將含有胜肽之有機層蒸發直至乾燥，將剩餘殘餘物溶解於與 2-甲基四氫呋喃及有機溶劑 1 不同的溶劑中，然後向其中添加可裂解胜肽之一或若干個 PG 之試劑。

保護基

出於本發明之目的，將用於保護胺基酸或胜肽側鏈中之官能基或用於保護胺基酸或胜肽之 *N* 末端胺基或 *C* 末端羧基的保護基 (PG) 分類為 4 個不同群組：

1. 可在鹼性裂解條件下裂解之 PG，在下文中稱為「鹼型 PG」；

2. 可在強酸性裂解條件下裂解而在中等酸性裂解條件

下不可裂解之 PG，在下文中稱為「強型 PG」；

3. 可在中等酸性裂解條件下裂解之 PG，在下文中稱為「弱型 PG」；

4. 可在還原性裂解條件下裂解之 PG，在下文中稱為「還原型 PG」；及

5. 可在皂化裂解條件下裂解之 PG，在下文中稱為「皂化型 PG」。

習知用於本發明之在液相中製備胜肽之方法的 PG 及用於裂解 PG 之典型反應條件、參數及試劑在此項技術中為已知的，例如 T. W. Greene, P. G. M. Wuts 「Greene's Protective Groups in Organic Synthesis」 John Wiley & Sons 公司，2006；或 P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, 「Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins」 CRC: Boca Raton, Florida, 1997。

鹼性裂解條件涉及用鹼性裂解溶液處理胜肽。鹼性裂解溶液較佳由鹼性試劑及溶劑組成。用於本發明之鹼性試劑較佳為二級胺，鹼性試劑更佳選自由二乙胺 (DEA)、哌啶、4-(胺基甲基)哌啶、參(2-胺基乙基)胺 (TAEA)、嗎啉、二環己胺、1,3-環己烷雙(甲胺)-哌啶、1,8-二氮雜雙環 [5.4.0] 十一碳-7-烯及其混合物組成之群。本發明之在液相中製備胜肽之方法中所用的鹼性試劑甚至更佳選自由 DEA、TAEA 及哌啶組成之群。

鹼性裂解溶液亦可包含較佳選自由 6-氯-1-羥基-苯并三唑、1-羥基-7-氮雜苯并三唑、1-羥基苯并三唑及 2-氯基-2-

羥基亞胺基乙酸乙酯及其混合物組成之群的添加劑。

鹼性裂解溶液之溶劑較佳與胜肽偶合反應所採用之極性非質子性溶劑相同。因此，鹼性裂解溶液之溶劑較佳選自由 DMF、DMA 及 NMP 組成之群。或者，藉由自由胜肽偶合反應所產生之反應混合物中萃取消肽之方法所獲得的含有胜肽之有機層可如上文所述被蒸發直至乾燥。可將剩餘殘餘物溶解於選自由 DMF、DMA、吡啶、NMP、乙腈或其混合物組成之群的溶劑之一中，隨後用鹼性裂解溶液處理。可能必需用 DMF 或 NMP 將胜肽以溶液形式保持在 Fmoc 裂解反應混合物中，如實施例 1 中所示。

在有關鹼性、強酸性、中等酸性及還原性裂解條件之描述中，術語「份」及「重量%」意謂為攜帶正被裂解之相應基團 PG 的胜肽之重量份數因子。舉例而言，表述「使用 5 份鹼性裂解溶液」意謂使用 5 g 鹼性裂解溶液來處理各 1 g 攜帶鹼型 PG 之胜肽。

較佳使用 5 至 20 份、更佳為 5 至 15 份鹼性裂解溶液。鹼性試劑之量較佳在 1 重量%至 30 重量%範圍內，更佳為 10 重量%至 25 重量%，甚至更佳為 15 重量%至 20 重量%，其中重量%係基於鹼性裂解溶液之總重量。

如本發明中所定義之強酸性裂解條件涉及用強酸性裂解溶液處理胜肽。強酸性裂解溶液包含酸解試劑。酸解試劑較佳選自由以下組成之群：布氏酸，諸如 TFA、鹽酸 (HCl)、鹽酸水溶液 (HCl)、液體氫氟酸 (HF) 或三氟甲磺酸；路易斯酸 (Lewis acid)，諸如三氟硼酸乙醚加合物

或溴化三甲基矽烷；及其混合物。

強酸性裂解溶液較佳包含一或多種選自由二硫蘇糖醇、乙二硫醇、二甲基硫醚、三異丙基矽烷、三乙基矽烷、1,3-二甲氧基苯、苯酚、苯甲醚、對甲酚及其混合物組成之群的清除劑。強酸性裂解溶液亦可包含水、溶劑或其混合物，該溶劑在強裂解條件下穩定。

強酸性裂解溶液之溶劑較佳與經部分蒸發之含有胜肽之有機層中所存在的溶劑相同。因此，強酸性裂解溶液之溶劑為 2-甲基四氫呋喃或 2-甲基四氫呋喃與有機溶劑 1 之組合。或者，可如上文所述將含有胜肽之有機層蒸發直至乾燥且可將剩餘殘餘物溶解於選自由 ACN、甲苯、DCM、TFA 及其混合物組成之群的溶劑之一中。因為 2-甲基四氫呋喃及有機溶劑 1 具有足夠揮發性，因此可容易地蒸發有機層。

較佳使用 10 至 30 份、更佳為 15 至 25 份、甚至更佳為 19 至 21 份強酸性裂解溶液。酸解試劑之量較佳在 30 重量%至 350 重量%範圍內，更佳為 50 重量%至 300 重量%，甚至更佳為 70 重量%至 250 重量%，尤其為 100 重量%至 200 重量%，其中重量%係基於強酸性裂解溶液之總重量。較佳使用佔總量之 1 重量%至 25 重量%、更佳為 5 重量%至 15 重量%的清除劑，其中重量%係基於強酸性裂解溶液之總重量。

根據本發明之中等酸性裂解條件涉及用弱酸性裂解溶液處理胜肽。弱酸性裂解溶液包含酸解試劑。酸解試劑較

佳選自由以下組成之群：布氏酸，諸如 TFA、三氟乙醇、鹽酸 (HCl)、乙酸 (AcOH)、其混合物及/或與水之混合物。

弱酸性裂解溶液亦可包含水、溶劑或其混合物，該溶劑在弱裂解條件下穩定。弱酸性裂解溶液之溶劑較佳與經部分蒸發之含有胜肽之有機層中所存在的溶劑相同。因此，弱酸性裂解溶液之溶劑為 2-甲基四氫呋喃或 2-甲基四氫呋喃與有機溶劑 1 之組合。或者，可如上文所述將含有胜肽之有機層蒸發直至乾燥且可將剩餘殘餘物溶解於選自由 ACN、甲苯、DCM、TFA 及其混合物組成之群的溶劑之一中。

較佳使用 4 至 20 份、更佳為 5 至 10 份弱酸性裂解溶液。酸解試劑之量較佳在 0.01 重量%至 5 重量%範圍內，更佳為 0.1 重量%至 5 重量%，甚至更佳為 0.15 重量%至 3 重量%，其中重量%係基於弱酸性裂解溶液之總重量。

本發明具體實例之一中所用之還原性裂解條件涉及用還原性裂解混合物處理胜肽。還原性裂解混合物包含催化劑、還原劑及溶劑。

用於還原性裂解條件之催化劑係選自由 Pd(0)衍生物、Pd(II)衍生物及含有金屬鈀之催化劑組成之群，更佳選自由 Pd[PPh₃]₄、PdCl₂[PPh₃]₂、Pd(OAc)₂ 及鈀/碳 (Pd/C) 組成之群。Pd/C 尤其較佳。

還原劑較佳選自由 Bu₄N⁺BH₄⁻、NH₃BH₃、Me₂NHBH₃、*t*Bu-NH₂BH₃、Me₃NBH₃、HCOOH/DIPEA、亞磺酸 (包含 PhSO₂H、tolSO₂Na 及 *i*-BuSO₂Na) 及其混合物以及分子氫

組成之群；還原劑更佳為 NaSO_2 或分子氫。

在還原性裂解條件下所用之溶劑較佳與經部分蒸發之含有胜肽之有機層中所存在的溶劑相同。因此，在還原性裂解條件下所用之溶劑較佳為 2-甲基四氫呋喃或 2-甲基四氫呋喃與有機溶劑 1 之組合。或者，可如上文所述將含有胜肽之有機層蒸發直至乾燥且可將剩餘殘餘物溶解於選自由 NMP、DMF、DMA、吡啶、ACN 及其混合物組成之群的溶劑之一中；溶劑更佳為 NMP、DMF 或其混合物。胜肽較佳可溶且將其溶解於還原性裂解條件下所用之溶劑中。

較佳使用 4 至 20 份、更佳為 5 至 10 份還原性裂解溶液。

皂化裂解條件涉及用皂化裂解溶液處理胜肽。皂化裂解溶液較佳由皂化試劑及溶劑組成。本發明所用之皂化試劑較佳為鹼金屬及鹼土金屬之氫氧化物，皂化試劑更佳選自由氫氧化鈉、氫氧化鋰及氫氧化鉀組成之群。本發明之在液相中製備胜肽之方法中所用的皂化試劑甚至更佳為氫氧化鈉。

皂化裂解溶液之溶劑較佳包含水與選自由 THF、MeTHF、乙醇、甲醇及二噁烷組成之群的溶劑之混合物。

根據本發明，鹼型 PG 在強酸性或中等酸性裂解條件下不可裂解。鹼型 PG 較佳在強酸性裂解條件、弱裂解條件或還原性裂解條件下不可裂解。

術語「強型 PG」應理解為在中等酸性裂解條件或鹼性裂解條件下不可裂解之保護基。強型 PG 較佳在中等酸性裂

解條件、鹼性裂解條件或還原性裂解條件下不可裂解。強酸性 PG (如 Bzl) 通常藉由氫化來裂解。典型地藉由在非常溫和之條件下進行氫化來整體脫除胜肽之保護基。

弱型 PG 在鹼性裂解條件下不可裂解，但其可在強酸性裂解條件下裂解。弱型 PG 較佳在鹼性裂解條件或還原性裂解條件下不可裂解，但其可在強酸性裂解條件下裂解。

根據本發明具體實例之一，鹼型 PG 較佳為 Fmoc。強型 PG 較佳選自由 Boc、*t*Bu、*Ot*Bu 及 Cbz 組成之群。弱型 PG 較佳選自由 Trt 及 2-氯苯基二苯基甲基組成之群。還原型 PG 較佳選自由 Bzl、*N*-甲基-9*H*-二苯并哌喃-9-胺基及 Cbz 組成之群。皂化型 PG 較佳為 OMe。

在本發明之在液相中製備胜肽之方法中，在脫除保護基之反應中移除胜肽之 *N* 末端 PG，接著進行後續胜肽偶合反應。根據本發明，*N* 末端 PG 較佳為 Fmoc 及 Boc。

在本發明具體實例之一中，Fmoc 在 LPPS 中作為 *N* 末端 PG 極佳，因為其可在鹼性條件下容易地移除。此外，Fmoc 作為胜肽 *N* 末端之 PG 與側鏈 PG 相容以表示正交系統。術語「正交系統」定義於 G. Baranay 及 R. B. Merrifield (JACS, 1977, 99, 22, 第 7363-7365 頁) 中。

在本發明之又一具體實例中，Boc 作為胜肽 *N* 末端 PG 用於在液相中製備胜肽之方法極佳。其移除可在強酸性條件下進行。使用 *N* 末端 Boc PG 亦與側鏈 PG 相容以表示正交系統。

根據本發明，在最終脫除保護基之步驟中移除胜肽之 *C*

末端 PG。

較佳 C 末端 PG 為 *OtBu*、*Bzl*、*OMe*、 NH_2 以及 2-氯苯基-二苯基甲酯或 *N*-甲基-9*H*-二苯并哌喃-9-醯胺。

在本發明具體實例之一中，*Bzl* 作為 C 末端 PG 用於在液相中製備胜肽之方法極佳，因為其可在上述還原性裂解條件下容易地移除。此外，C 末端 *Bzl* PG 與側鏈 PG 相容以表示正交系統。

在本發明之另一具體實例中，*OtBu* 作為 C 末端 PG 用於在液相中製備胜肽之方法。其移除可在如上文所述之強酸性裂解條件下進行。使用 C 末端 *OtBu* PG 亦與側鏈 PG 相容以表示正交系統。

在本發明之另一具體實例中，*OMe* 作為 C 末端 PG 用於在液相中製備胜肽之方法。*OMe* 可藉由皂化容易地裂解且若胜肽之 *N* 末端 PG 為 *Boc*，則尤其適用。

在本發明之又一具體實例中，可另外藉由對胜肽 C 末端使用疏水性 PG 來增加胜肽在有機層中之溶解度。為此目的，胜肽之 C 末端羧酸基可用弱型 PG 加以保護，該等弱型 PG 可在中等酸性條件下裂解，諸如 2-氯苯基二苯基甲酯或 *N*-甲基-9*H*-二苯并哌喃-9-醯胺。此等 PG 尤其適用於合成胜肽片段，而胜肽片段又可用於彙集型胜肽合成。此等 C 末端羧酸保護基具有另一重要優勢：其在中等酸性條件下裂解，從而允許液相合成受保護之胜肽，作為 SPPS 之一項替代方案，該等受保護之胜肽可用作彙集型合成策略中之胜肽片段。實際上，2-氯苯基二苯基甲酯及 *N*-甲基-9*H*-二苯

并哌喃-9-醯胺之化學功能為用作 SPPS 樹脂上之連接子以用於合成受保護之胜肽片段。

根據本發明，需要用適合 PG 保護藉由在液相中製備胜肽之方法所獲得之胜肽的胺基酸側鏈之羥基-、胺基-、硫基-及羧酸基，以便避免不需要之副反應。此外，使用側鏈 PG 一般可改良胜肽在極性非質子性溶劑中以及在 2-甲基四氫呋喃中或/及在 2-甲基四氫呋喃與有機溶劑 1 之組合中的溶解度。

一般而言，以一定方式選擇側鏈 PG，以至於其在於液相中製備胜肽之方法中的脫除 *N* 末端胺基保護基之期間不會被移除。因此，*N* 末端胺基或 *C* 末端羧酸基之 PG 及任何側鏈 PG 典型地不同，較佳為其表示正交系統。

根據本發明，較佳側鏈基團為 *t*Bu、Trt、Boc、OtBu 及 Cbz。

一旦藉由在液相中製備胜肽之方法所獲得之胜肽的胺基酸序列與目標胜肽之胺基酸序列一致後，較佳移除 *N* 末端 PG、*C* 末端 PG 及任何側鏈 PG 以便獲得不受保護之目標胜肽。此步驟稱為整體脫除保護基。在液相中製備胜肽之方法中所用之 PG 較佳經選擇以允許在如上文所定義之中等酸性、強酸性或還原性裂解條件下進行整體脫除保護基，此視 PG 之本質而定。

典型地保留任何側鏈 PG，直至 LPPS 結束。整體脫除保護基可在適用於已使用之各種側鏈 PG 的條件下進行。在選擇不同類型之側鏈 PG 的情況下，其可相繼裂解；例如此

為合成分枝胜肽時之情況。宜用使側鏈 PG 可同時裂解且更宜伴隨由 LPPS 製備之胜肽之 *N* 末端 PG 或 *C* 末端 PG 之方式選擇側鏈 PG。

在本發明具體實例之一中，可直接移除經部分蒸發之有機層中之胜肽的 *N* 末端 PG。因此，在此情況下，不需要使用有機溶劑 2 來使胜肽沈澱，且可在不分離中間物胜肽的情況下進行本發明之 LPPS，例如呈連續 LPPS 形式。

視胜肽 *N* 末端 PG 之本質而定，可針對此步驟選擇適當裂解條件。

若胜肽之 *N* 末端 PG 為如上文所定義之強型 PG 或弱型 PG，則較佳用 TFA 或 HCl 處理含有胜肽之有機層。由於含有胜肽之有機層實質上不含極性非質子性溶劑，因此移除胜肽之 *N* 末端 PG 不因 TFA 或 HCl 與極性非質子性溶劑之間不合需要的反應而受抑制。在本發明具體實例之一中，胜肽之 *N* 末端 PG 為 Boc 基團。

若胜肽之 *N* 末端 PG 為如上文所定義之鹼型 PG，則胜肽可使用有機鹼來脫除保護基，如先前技術中所知。為此目的，較佳直接用選自由 DEA、TAEA 及哌啶組成之群的鹼性試劑處理由胜肽偶合反應所產生之反應混合物，且自此反應混合物中萃取具有不受保護之 *N* 末端的胜肽。或者，用鹼性試劑處理含有胜肽之有機層。或者，可如上文所述將含有胜肽之有機層蒸發直至乾燥且可將剩餘殘餘物溶解於選自由 DMF、DMA、吡啶、NMP 或其混合物組成之群的溶劑之一中，隨後用鹼性試劑處理。

在本發明較佳具體實例之一中，胜肽之 *N* 末端 PG 為芴基-9-甲氧基羰基 (Fmoc)。胜肽之 Fmoc 基團裂解伴隨二苯富烯形成。若使用 DEA 或哌啶作為鹼性試劑且鹼性裂解溶液之溶劑為乙腈，則隨後用烴（諸如正庚烷）洗滌含有具有不受保護之 *N* 末端之胜肽的所得溶液，以便實質上移除二苯富烯。若使用 TAEA 作為裂解 Fmoc 基團之鹼性試劑，則隨後對所得溶液進行本發明之萃取方法。因此，含有具有不受保護之 *N* 末端之胜肽的溶液在進行後續胜肽偶合反應之前實質上不含二苯富烯。

在使胜肽 *N* 末端 PG 裂解之後，可將含有具有不受保護之 *N* 末端之胜肽的溶液至少部分蒸發且用於後續胜肽偶合反應，或者用於整體脫除保護基之步驟。

因此，本發明提供連續 LPPS 方法，該方法與常用 SPPS 方法相比具有許多優勢。

在本發明之連續 LPPS 的情況下，在胜肽偶合反應及脫除保護基之反應期間反應混合物中所存在之試劑濃度高於 SPPS 之情況。因此，相應反應時間較短，且可使用具有較小容量之分批反應器來合成指定量之目標胜肽。藉由本發明之連續 LPPS 來合成胜肽所需之總時間與使用 SPPS 進行其合成時所需之總時間幾乎相同。因此，使用本發明之連續 LPPS 可降低操作成本。

與 SPPS 中之相應胜肽偶合反應（1.5 當量或 1.5 當量以上）相比，本發明 LPPS 中之胜肽偶合反應需要較低過量之胺基酸或具有不受保護之 *C* 末端羧基之胜肽（1.1 當量

至 1.2 當量)。此外，SPPS 另外需要大量溶劑用於在各胜肽偶合步驟之後沖洗樹脂。因此，在 SPPS 情況下所需之溶劑量顯著高於本發明連續 LPPS 之情況。因此，與使用 SPPS 相比，使用本發明之連續 LPPS 可顯著降低材料成本。

除此以外，已知按比例擴大本發明之連續 LPPS 方法之規模與按比例擴大相應 SPPS 方法之規模相比更容易，且藉由本發明之連續 LPPS 製備之目標胜肽與由 SPPS 製備之相應胜肽相比具有更高純度。

總之，本發明之連續 LPPS 與先前技術中已知的其他胜肽合成方法相比提供許多優勢，且尤其適用於按工業規模製備胜肽。

【實施方式】

實施例

以下非限制性實施例將詳細說明本發明之代表性具體實例。

若未另外規定，則所有實驗均在 $20\pm 3^\circ\text{C}$ 之室溫及 $1013\pm 50\text{ kPa}$ 之大氣壓力下進行。

方法描述

A) HPLC 分析

利用 UV 光電二極體陣列偵測器來進行 HPLC 方法 A 中之偵測。

步驟 1 樣品製備：

移動相 A：0.1 體積% TFA/水

移動相 B：0.085 體積% TFA/ACN

步驟 2 層析條件：

方法 MIH-009-3TG9

管柱： Phenomenex Luna C8(2) 5 μ m 250 \times 4.6
mm

爐溫： 40 $^{\circ}$ C

流速： 1.50 mL/min

偵測器波長： 215 nm

梯度運作時間： 30 min

梯度組成： 22%至 52% B，15 min；52%至 82% B，
5 min；82%至 98% B，5 min；98% B，
5 min

方法 MIH-009-2TG11

管柱： Purospher Star RP18 55 \times 4 mm

爐溫： 40 $^{\circ}$ C

流速： 2.0 mL/min

偵測器波長： 215 nm

梯度運作時間： 15 min

梯度組成： 2%至 78% B，5 min；78%至 98% B，
10 min

方法 MIH-009-RTTG1

管柱： Purospher Star RP18 55 \times 4 mm

爐溫： 40 $^{\circ}$ C

流速： 2.0 mL/min

偵測器波長： 215 nm

梯度運作時間： 15 min

梯度組成： 2%至 98% B， 5 min； 98% B， 5 min

方法 MIH-009-025TG3

管柱： XBridgeC18 5 μ 150 \times 4.6 mm

爐溫： 40 $^{\circ}$ C

流速： 1.5 mL/min

偵測器波長： 215 nm

梯度運作時間： 20 min

梯度組成： 2%至 98% B， 15 min； 98% B， 5 min

方法 MIH-009-397TG3

管柱： Vydac 214TP54 C4 250 \times 4.6 mm

爐溫： 40 $^{\circ}$ C

流速： 1.5 mL/min

偵測器波長： 215 nm

梯度運作時間： 25 min

梯度組成： 43%至 78% B， 25 min

方法 MIH-009-397TG15

管柱： Vydac 214TP5415 C4 250 \times 4.6 mm

爐溫： 40 $^{\circ}$ C

流速： 1.5 mL/min

偵測器波長： 215 nm

梯度運作時間： 2 min

梯度組成： 33%至 78% B， 25 min

步驟 3 層析圖分析：

藉由量測所有層析峰之面積來確定所分離產物之組成。預期產物之所測定純度對應於相應產物峰之面積%。

1. 裝置及設備

氣相層析儀： 裝備火焰電離偵測器及自動注射器系統且與採集軟體耦合之 GC

分析型 GC 管柱： 熔融二氧化矽管柱，長度 50 m；
0.53 mm 內徑；固定相：CP SIL 8CB
DF=5.0 μm

試劑： 甲醇（分析級）

2. 樣品製備

測試溶液及參考溶液

在 10 mL 容量瓶中，精確添加 400 μL 樣品且用甲醇補足體積。

3. 層析條件

載氣： 氮氣 30 kPa

爐溫： 35 $^{\circ}\text{C}$ ，14 分鐘，5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，55 $^{\circ}\text{C}$ ，3
分鐘，5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，110 $^{\circ}\text{C}$ ，5 分鐘，
10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，225 $^{\circ}\text{C}$ ，5 分鐘

注射器溫度： 225 $^{\circ}\text{C}$

偵測器溫度： 260 $^{\circ}\text{C}$

注射體積： 1 μL

注射模式： 分流

分流流速： 85 mL/min

比率： 24

過濾性量測

將含有沈澱胜肽之混合物轉移至裝備 20 μm 孔徑過濾器之 2.7 cm 直徑過濾管柱中。在 20°C 下在 50 毫巴之壓力下進行過濾。量測流速及濾餅高度且如下計算過濾性係數 K：

$$K = \frac{\text{母液體積 (mL)} \times \text{濾餅高度 (cm)}}{\text{過濾器表面 (cm}^2\text{)} / \text{壓力 (巴)} / \text{過濾時間 (min)}}。$$

實驗設計

使用 Stat-Ease 公司之 DOE 套裝軟體 Design-Expert[®] 8 進行實驗設計 (DOE)。

a) 萃取系統 MeTHF/水及 MeTHF/NaCl 溶液中之 NMP

本實施例展示有機層之體積及其 NMP 含量視兩相系統 NMP/MeTHF/水及 NMP/MeTHF/NaCl 溶液之組成而定。用所設計之兩相系統來驗證此依賴性，其中在保持總體積恆定的同時，NMP 及 MeTHF 之體積分數以及水中之 NaCl 含量在二次型設計模式中系統性地發生改變。為研究水中之 NaCl 含量的影響，用純水（參看表 1a）及 150 g/L NaCl 溶液（參看表 1b）製備同一組之兩相系統。在攪拌此等兩相系統之後，使其在計量容器中完成相分離且量測有機層之體積。藉由氣相層析量測有機層之 NMP 含量。開發統計學模型以確定有機層之體積及其 NMP 含量與總體兩相系統組成中之 NMP、MeTHF 及水之體積分數（此等體積分數共計為 1）的數學函數關係。

a) 在不存在 NaCl 時，有機層中之 NMP 含量 L_n (g/L)

由二次型混合模型給出 (其中 $R^2=0.954$) :

$$\ln(\text{有機層中之 NMP}) = 5.7 * \text{MeTHF 體積分數} - 17.1 * \text{NMP 體積分數} - 6.9 * \text{H}_2\text{O 體積分數} + 102.8 * \text{NMP 體積分數} * \text{H}_2\text{O 體積分數}。$$

此三元混合物 NMP/MeTHF/水模型圖解表示為圖 1 中所示之等高線圖。

b) 不存在 NaCl 時之有機層體積由線性混合模型給出 (其中 $R^2=0.992$) :

$$\text{有機層體積 (mL)} = 22.6 * \text{MeTHF 體積分數} - 10.4 * \text{NMP 體積分數} - 4.7 * \text{H}_2\text{O 體積分數}。$$

此三元混合物 NMP/MeTHF/水模型圖解表示為圖 2 中所示之等高線圖。

混合物編號	NMP 體積 (mL)	MeTHF 體積 (mL)	H ₂ O 體積 (mL)	水層體積 (mL)	有機層體積 (mL)	有機層中之 NMP (mg/mL)	水層中 NMP 之分數
1	2	9.0	9.0	13	7	12.8	0.95
2	5.0	9.0	6.0	14	6.5	52.9	0.93
3	5.0	9.0	6.0	14	6.5	66.2	0.91
4	3.0	10.0	7.1	12	8	26.0	0.93
5	2.0	12.0	6.0	9	11	17.1	0.90
6	4.1	7.8	8.1	15	5	37.7	0.95
7	6.0	6.0	8.0	19	1	460.0	0.92
8	4.0	6.0	10.0	18	2.5	282.4	0.81
9	2.0	7.5	10.5	15	5	8.0	0.98
10	2.0	12.0	6.0	9	11	13.0	0.92
11	2.0	6.0	12.0	17	3	7.0	0.99
12	6.0	6.0	8.0	18	2	443.2	0.84

表 1a. 不存在 NaCl 時兩相系統 NMP/MeTHF/水中之 NMP 的萃取。

c) 在存在含有 150 g/L NaCl 之水溶液時，有機層中之

NMP 含量 L_n' (g/L) 由線性混合模型給出 (其中 $R^2=0.958$):

$$L_n' (\text{有機層中之 NMP}) = 25.1 * \text{MeTHF 體積分數} + 297.3 * \text{NMP 體積分數} - 43.0 * \text{NaCl 溶液體積分數}。$$

此三元混合物 NMP/MeTHF/NaCl 溶液模型圖解表示為圖 3 中所示之等高線圖。

d) 在含有 150 g/L NaCl 之水溶液存在下，有機層之體積由線性混合模型給出 (其中 $R^2=0.991$):

$$\text{有機層體積} = 20.5 * \text{MeTHF 體積分數} - 1.05 * \text{NMP 體積分數} - 1.08 * \text{NaCl 溶液體積分數}。$$

此三元混合物 NMP/MeTHF/NaCl 溶液模型圖解表示為圖 4 中所示之等高線圖。

混合物編號	NMP 體積 (mL)	MeTHF 體積 (mL)	H ₂ O 體積 (mL)	水層體積 (mL)	有機層體積 (mL)	有機層中之 NMP (mg/mL)	水層中 NMP 之分數
1	2.0	9.0	9.0	12	8.5	21.1	0.91
2	5.0	9.0	6.0	12	8.5	81.1	0.85
3	5.0	9.0	6.0	12	8.5	74.0	0.87
4	3.0	10.0	7.1	11	9.5	47.4	0.84
5	2.0	12.0	6.0	8	12	28.7	0.82
6	4.1	7.8	8.1	13	7.5	49.7	0.91
7	6.0	6.0	8.0	15	5.5	82.3	0.92
8	4.0	6.0	10.0	15	5.5	42.2	0.94
9	2.0	7.5	10.5	13	7.5	17.2	0.93
10	2.0	12.0	6.0	8	12	27.7	0.83
11	2.0	6.0	12.0	15	5	16.0	0.96
12	6.0	6.0	8.0	15	5.5	71.8	0.93

表 1b. 兩相系統 NMP/MeTHF/NaCl 溶液 (150 g/L NaCl) 中之 NMP 的萃取。

為了自含有胍之有機層中有效移除 NMP，需要有機層中之 NMP 含量足夠低，較佳低於 50 g/L 且甚至更佳低於

20 g/L。該等條件可在圖 1 至圖 4 中所示之三元混合圖解底部獲悉。若不存在 NaCl，則可在低 NMP 體積分數下獲得有機層中之最低 NMP 含量。另一方面，MeTHF 體積分數較低使得有機層體積較小。因此，除非相關胜肽高度可溶於 MeTHF 中，否則僅對應於三元圖解左下角之條件適用於萃取胜肽之方法。

在 NaCl 存在下，MeTHF 與水之可混溶性顯著降低，以至於有機層之體積較大。此外，存在 NaCl 可增加水層密度，以至於相分離過程較快。

因此，可得出如下結論：一般較佳在 NaCl 存在下進行萃取胜肽之過程且用新製 NaCl 溶液重複萃取以在 MeTHF 層中達到極低 NMP 含量。

b) 萃 取 系 統 NMP/MeTHF/NaCl 溶 液 中 之 H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂

對以下實施例 6 中所述之五胜肽 H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 之萃取方法進行中心複合 DoE。自具有 200 mg/mL 濃度之 NMP 溶液中量測此胜肽之萃取產率。系統性地改變 MeTHF 及水之相對體積以及水中之 NaCl 含量。對各邊界條件進行一次實驗且對中心點進行三次實驗。所獲得之結果示於以下表 2 中。

混合物編號	MeTHF Vx	H ₂ O Vx	水中之 NaCl (g/L)	萃取產率 (%)
1	2	2	0	90.7
2	3.5	3.5	100	100.0
3	3.5	5	100	100.0
4	5	3.5	100	99.4

5	2	3.5	100	99.7
6	3.5	2	100	96.7
7	5	2	0	57.8
8	5	5	200	100.0
9	3.5	3.5	100	100.0
10	3.5	3.5	100	100.0
11	2	2	200	98.1
12	5	5	0	100.0
13	3.5	3.5	0	97.9
14	5	2	200	98.9
15	2	5	0	99.8
16	2	5	200	100.0
17	3.5	3.5	200	100.0

表 2. H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 之萃取產率與有機層及水層之組成的函數關係。MeTHF V_x 表示 MeTHF:反應混合物 (RM) 之體積比。H₂O V_x 表示 H₂O:反應混合物 (RM) 之體積比。

獲得良好數學模型 ($R^2=0.93$): 胜肽之萃取產率可根據與水:反應混合物 (RM) 之體積比及水中之 NaCl 含量的函數關係而計算:

$$\text{萃取產率 (\%)} = 0.77 + 0.089 * (\text{水/RM}) + 0.00059 * \text{NaCl (g/L)} - 0.00012 * (\text{水/RM}) * \text{NaCl (g/L)} - 0.0087 (\text{水/RM})^2。$$

此模型可由圖 5 中所提供之等高線圖加以圖解表示。最小水:反應混合物體積比需要足夠高以達到高於 99% 之萃取產率。然而, 此最小水:反應混合物體積比亦視水層中之 NaCl 含量而定。實際上, 水層中之 NaCl 含量較高使得 MeTHF 與水層之可混溶性較低。因此, 胜肽於水層中之溶解度較低。若水層中不存在 NaCl, 則需要水:反應混合物之體積比高於 4, 以便達到高於 99% 之萃取產率。在水層中存

在 150 g/L NaCl 時，水:反應混合物比率=2.7 即足夠。

可認為，產生 99%以上萃取產率之必需的水:反應混合物體積比由下式提供：

$$\text{水:反應混合物} > 4 - 0.00974 * \text{NaCl (g/L)}$$

另一方面，MeTHF:反應混合物之體積比=2 始終足以使萃取產率高於 99%。

c) 萃取系統 DCM/NaCl 溶液、EtOAc/NaCl 溶液及 MeTHF/NaCl 溶液中之 NMP

將 MeTHF (根據本發明) 之萃取性質與 EtOAc 及 DCM (比較) 之萃取性質相比較。EtOAc 及 DCM 為常用於萃取胜肽之溶劑。用含有 150 g/L NaCl 之水溶液進行實驗。本實施例之系統中不存在胜肽。

體積比如下：

$$\text{NMP:DCM:NaCl 溶液} = 1:3:3$$

$$\text{NMP:EtOAc:NaCl 溶液} = 1:3:3$$

$$\text{NMP:MeTHF:NaCl 溶液} = 1:3:3$$

在萃取之後，藉由 GC 測定水層中之 NMP 分數。實驗結果匯總於以下表 3 中。

溶劑	水層中之 NMP 分數
DCM	0.555
EtOAc	0.935
MeTHF	0.962

表 3. 使用 DCM、EtOAc 或 MeTHF 自 NaCl 水溶液 (150 g/L NaCl) 中萃取 NMP。

如自以上表 3 中可注意到，與使用 DCM 或 EtOAc 進行

萃取相比，用 MeTHF 萃取使得水層中之 NMP 分數更高。因此，與在用 DCM 或 EtOAc 萃取之後相比，在用 MeTHF 萃取之後有機層中之 NMP 含量較低。

此結果指示，與採用常用溶劑 EtOAc 或 DCM 之比較萃取相比，用 MeTHF 萃取胜肽一般可更有效地分離極性非質子性溶劑，諸如 NMP。

d) 萃取系統 MeTHF/THF/NaCl 溶液中之 NMP

以下實施例係關於由 NMP、MeTHF、THF 及含有 150 g/L NaCl 之水溶液組成的混合物。特定而言，研究相分離後有機層中之 NMP 含量 (g/L) 與混合物組成之間的相依性。本實施例之系統中不存在胜肽。

MeTHF:NMP 體積比為 3，其中 NaCl 溶液:NMP 體積比自 2 至 10 變化，且 THF:NMP 體積比自 0 至 3 變化。此等實驗之目標在於說明此四種組分之間的相互作用，因此用純溶劑進行此等實驗。然而，值得注意的是，胜肽之存在可能改變 NMP 分佈。所獲得之結果呈現於圖 6 中。

由圖 6 中可看出，若 THF:NMP 體積比低於 2，則有機層中之 NMP 含量在 10 g/L 至 20 g/L 範圍內，即使水:NMP 體積比較低亦然。典型地，若 NMP:MeTHF:THF:NaCl 溶液體積比=1:3:2:5，則 90% NMP 位於水層中。然而，若 THF:NMP 體積比大於 2，則 NMP 萃取產率較低。

然而，已在 NMP:MeTHF:THF:NaCl 溶液體積比=1:3:3:3 時可對許多胜肽達成超過 99% 之高萃取產率，而將總 NMP 之 80% 移入水層中。

e) 萃 取 系 統 MeTHF/THF/NaCl 溶 液 及 EtOAc/THF/NaCl 溶 液 中 之 NMP

將溶劑組合 MeTHF/THF (根據本發明) 之萃取性質與組合 EtOAc/THF (比較) 相比較。用含有 150 g/L NaCl 之水溶液進行實驗。本實施例之系統中不存在胜肽。

體積比如下：

NMP:EtOAc:THF:NaCl 溶液=1:3:3:3

NMP:MeTHF:THF:NaCl 溶液=1:3:3:3

藉由 GC 測定水層中之 NMP 分數。實驗結果匯總於表 4 中。

溶劑組合	水層中之 NMP 分數
EtOAc/THF	0.857
MeTHF/THF	0.881

表 4.兩相系統 NMP/溶劑組合/NaCl 溶液(150 g/L NaCl) 中之 NMP 的萃取。

如自以上表 4 中可注意到，與用 EtOAc/THF 進行萃取相比，用溶劑組合 MeTHF/THF 萃取使得水層中之 NMP 分數較高。因此，與在用 EtOAc/THF 萃取之後相比，在用 MeTHF/THF 萃取之後有機層中之 NMP 含量較低。

此結果指示，與採用含有 EtOAc 之溶劑組合之比較萃取相比，用含有 MeTHF 之溶劑組合萃取胜肽一般可更有效地分離極性非質子性溶劑，諸如 NMP。

實施例 1 利用 Fmoc 作為保護基使用連續 LPPS 合成 H-Phe-Ile-Glu(OtBu)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gl

γ -Pro-Thr(*t*Bu)-Gly-Ser(*t*Bu)-NH₂**實施例 1.1 LPPS**

在 20 °C 下，在 NMP (2.5 mL) 中組合 Fmoc-Phe-Ile-Glu(O*t*Bu)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gly-OH (0.5 g , 0.28 mmol)、H-Pro-Thr(*t*Bu)-Gly-Ser(*t*Bu)-NH₂ (0.15 g , 0.32 mmol) 及 HOBt (0.044 g , 0.28 mmol)。在室溫下攪拌混合物 10 分鐘直至所有固體溶解，接著冷卻至 0 °C。依序添加 TBTU(0.093 g , 0.28 mmol) 及 DIPEA (46 μ L , 0.28 mmol)，且在此溫度下攪拌反應混合物。2 小時後，反應完畢，如藉由 HPLC 所測定。藉由以下方法監測反應進展：根據上述方法 MIH-009-3TG9 對在 NMP 中稀釋 50 倍之 5 μ L 反應混合物樣品進行分析。

實施例 1.2 脫除 Fmoc 保護基

在室溫下向根據實施例 1.1 製備之溶液 (4 mL) 中添加 DEA (0.4 mL , 3.9 mmol)。在 Fmoc 裂解完畢 (如藉由 HPLC 所測定) 之後，藉由與 ACN (3 \times 1 mL) 一起在 30 °C 及 60 毫巴下共同蒸發來消除揮發性物質。藉由以下方法監測反應進展：根據上述方法 MIH-009-3TG9 對在 NMP 中稀釋 50 倍之 5 μ L 反應混合物樣品進行分析。

實施例 1.3 用 MeTHF/THF 萃取並分離

將根據實施例 1.2 製備之溶液 (4 mL) 與 MeTHF (12 mL)、THF (8 mL) 及含有 100 g/L NaCl 及 25 g/L Na₂CO₃ 之水溶液 (20 mL) 組合。在充分混合且進行相分離 (約 4

分鐘) 之後, 移除下層水層。藉由添加 THF (8 mL) 以及含有 100 g/L NaCl 及 25 g/L Na₂CO₃ 之水溶液 (20 mL) 進一步淨化胜肽溶液。在充分混合且進行層分離之後, 移除下層。在 30°C、60 毫巴下將有機層蒸發至殘餘體積為約 4 mL。藉由與 ACN (4×10 mL) 一起進行四次共同蒸發來移除 MeTHF 及 THF, 從而引發胜肽沈澱。藉由向第四次共同蒸發之殘餘物 (4 mL) 中添加 ACN (10 mL) 及 DIPE (30 mL) 來完成胜肽沈澱過程。藉由過濾分離固體, 用 DIPE (3×10 mL) 洗滌且在減壓下乾燥。

本實施例顯示, 在蒸發有機層期間可能發生胜肽沈澱, 且可藉由過濾容易地分離沈澱胜肽。在 DMF 或 NMP 存在下, 將不可能形成此種胜肽沈澱物。

實施例 2 利用 Boc 作為保護基使用連續 LPPS 合成 Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl

實施例 2.1 Boc-Tyr(Bzl)-Leu-Obzl 之 LPPS

在 20°C 下將 Boc-Tyr(Bzl)-OH (4.7 g, 12.7 mmol) 及 H-Leu-OBzl·Tos (5.0 g, 12.7 mmol) 溶解於 DMF (25 mL) 中。將反應混合物冷卻至 -8°C, 接著添加 HOBt·H₂O (2.0 g, 13.1 mmol, 1.0 當量) 及 EDC·HCl (2.8 g, 14.6 mmol)。將反應溫度保持在 -5°C 至 -10°C 範圍內直至反應完成, 如藉由 HPLC 所測定。藉由以下方法監測反應進展: 根據上述方法 MIH-009-2TG11 對在乙酸:水 (9:1) 中稀釋 50 倍之 5 μL 反應混合物樣品進行分析。

實施例 2.2 Boc 裂解: H-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl

向根據實施例 2.1 製備之混合物中添加甲苯 (90 mL) 且用以下各物相繼萃取反應混合物：

- 1) 含有 20 g/L NaCl 之水溶液 (90 mL)
- 2) 含有 150 g/L NaCl 及 50 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (90 mL)
- 3) 含有 20 g/L NaCl 及 50 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (90 mL)
- 4) 含有 20 g/L NaCl 及 50 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (90 mL)
- 5) 含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (90 mL)。

接著在減壓下在 35°C 下濃縮所合併之有機層，以便將所合併之有機層的體積減至 20 mL。

藉由在 15°C 下添加苯酚 (0.25 g, 2.6 mmol) 及 TFA (20 mL) 來移除 Boc 保護基。在反應完成 (如藉由 HPLC 所測定) 之後，在減壓下在 35°C 下蒸發反應混合物。藉由與甲苯 (3×25 mL) 一起共同蒸發來移除殘餘 TFA。藉由以下方法監測反應進展：將 5 μL 反應混合物樣品在甲醇中稀釋 30 倍且根據上述方法 MIH-009-2TG11 進行分析。

實施例 2.3 Boc-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl

將 DMF (25 mL)、DIPEA (2.3 mL, 13.9 mmol)、Boc-Glu(OBzl)-OH (4.3 g, 12.7 mmol) 及 HOBt (2.0 g, 13.0 mmol) 添加至根據實施例 2.2 製備之物質中。在溶解完成之後，在 -5°C 下添加 EDC·HCl (2.8 g, 14.6 mmol) 且在 -7°C 至 -3°C 之溫度下進行肽偶合反應直至反應完成，如藉由 HPLC 所測定。藉由以下方法監測反應進展：根據上述方法 MIH-009-2TG11 對在乙酸:水(9:1)中稀釋 50 倍之 5 μL

反應混合物樣品進行分析。

藉由過濾分離固體物質，隨後用 DMF (5 mL) 洗滌。向所合併之濾液 (20 mL) 中添加 MeTHF (50 mL)。用以下各物相繼萃取所產生之混合物：

- 1) 含有 20 g/L NaCl 之水溶液 (50 mL)
- 2) 含有 20 g/L NaCl 及 50 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (50 mL)
- 3) 含有 20 g/L NaCl 及 50 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (50 mL)
- 4) 含有 20 g/L NaCl 之水溶液 (50 mL)。

接著在 30°C 下在減壓下蒸發有機層。

實施例 2.4 H-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl

在 15°C 下藉由向蒸發殘餘物中添加甲苯 (20 mL)、苯酚 (0.25 g) 及 TFA (16 mL) 來進行 Boc 裂解。如藉由 HPLC 所驗證 (根據上述方法 MIH-009-2TG11, 對在 ACN 中稀釋 30 倍之 5 µL 反應混合物樣品進行分析), Boc 裂解反應完成之後, 在減壓下蒸發反應混合物。藉由與甲苯 (3×25 mL) 一起共同蒸發來移除殘餘 TFA。

胜肽在蒸發結束時沈澱且其在向蒸發殘餘物中添加 DMF (10 mL) 後溶解。隨後添加 MeTHF (50 mL)。用以下各物相繼萃取此合併之有機層：

- 1) 含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (50 mL)
- 2) 含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (50 mL)
- 3) 含有 20 g/L NaCl 及 50 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (50 mL)
- 4) 含有 20 g/L NaCl 及 50 g/L KHSO₄ 之水溶液 (50 mL)
- 5) 含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (50 mL)

6) 含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (50 mL)。

在 30°C 下在減壓 (60 毫巴) 下蒸發有機層。

實施例 2.5 Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl

將 DMF (25 mL)、DIPEA (2.3 mL, 13.9 mmol)、Boc-Glu(OBzl)-OH (4.3 g, 12.7 mmol) 及 HOBt (2.0 g, 13.0 mmol) 添加至根據實施例 2.4 獲得之蒸發殘餘物中。在完全溶解之後，在 -7°C 至 -3°C 之反應溫度下用 EDC·HCl (2.8 g, 14.6 mmol) 進行胜肽偶合反應。藉由以下方法監測反應進展：將 5 μ L 反應混合物樣品在乙酸:水 (9:1) 中稀釋 50 倍且根據上述方法 MIH-009-2TG11 進行分析。

藉由過濾分離固體物質且用 DMF (10 mL) 洗滌。合併所得濾液。

隨後，將 MeTHF (50 mL) 添加至所合併之濾液中且用以下各物相繼萃取所得混合物：

- 1) 用含有 20 g/L NaCl 之水溶液萃取兩次 (50 mL)
- 2) 用含有 20 g/L NaCl 及 50 g/L NaHCO₃ 之水溶液萃取一次 (50 mL)
- 3) 用含有 20 g/L NaCl 及 50 g/L KHSO₄ 之水溶液萃取一次 (50 mL)
- 4) 用含有 20 g/L NaCl 之水溶液萃取三次 (50 mL)。

接著在 30°C 下在減壓下蒸發有機層且傾入 DIPE (150 mL) 中以便沈澱。過濾之後，再用 DIPE (3×50 mL) 將所收集之固體洗滌三次。最終在減壓下乾燥所得固體。

實施例 3 自反應混合物中萃取

H-Ser(*t*Bu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-Glu(*t*Bu)-Glu(*t*Bu)-Glu(*t*Bu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-Leu-Phe-Ile-Glu(O*t*Bu)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gly-Gly-Pro-Ser(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(*t*Bu)-NH₂

在 20°C 下，在 NMP (94 mL) 與 THF (70 mL) 之混合物中組合 Fmoc-Ser(*t*Bu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-Glu(*t*Bu)-Glu(*t*Bu)-Glu(*t*Bu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-Leu-OH (11.5 g, 4 mmol)、H-Phe-Ile-Glu(O*t*Bu)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gly-Gly-Pro-Ser(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(*t*Bu)-NH₂ (10 g, 4 mmol) 及 HOBt (1.5 g, 8.8 mmol)。在室溫下攪拌混合物 10 分鐘直至所有固體溶解，接著冷卻至 0°C。依序添加 TOTU (1.5 g, 4.6 mmol) 及 DIPEA (4 mL, 23 mmol)，且在此溫度下攪拌反應混合物。2 小時後，反應完畢，如藉由 HPLC 所測定。藉由以下方法監測反應進展：根據方法 MIH-009-397TG3 分析在 NMP 中稀釋 50 倍之 5 μL 反應混合物樣品。

因此，根據實施例 1.2 中所述之程序，藉由向反應混合物中添加二乙胺 (10 mL) 來裂解 Fmoc 保護基。如藉由 HPLC 方法 MIH-009-397TG3 所驗證，Fmoc 裂解完成之後，藉由隨後與乙腈 (4×50 mL) 一起共同蒸發四次來移除揮發性物質。

將蒸發殘餘物 (120 mL) 分成 6 等份且用於比較處理實驗。

體積比如下：

b) NMP 溶液:MeTHF:NaCl 溶液=1:3:3

c) NMP 溶液:EtOAc:NaCl 溶液=1:3:3

d) NMP 溶液:DCM:NaCl 溶液=1:3:3

e) NMP 溶液:EtOAc:NaCl 溶液=1:6:3

f) NMP 溶液:DCM:NaCl 溶液=1:6:3

a) 在 DIPE 中沈澱

將蒸發殘餘物 (20 mL) 與 THF (20 mL) 一起共同蒸發兩次，接著藉由在 25°C 下在攪拌下轉移至 DIPE (135 mL) 中來使產物沈澱。產物在 24 小時內呈現無法過濾之膠狀固體形式。

b) 用 MeTHF 萃取

將 MeTHF (60 mL) 添加至蒸發殘餘物 (20 mL) 中。用含有 NaCl (15% w/v) 及 Na₂CO₃ (2.5% w/v) 之水溶液 (60 mL) 將此混合物萃取三次。所有傾析耗時不到 2 分鐘。將有機層蒸發至殘餘體積為 9 mL。藉由與 THF (20 mL) 一起共同蒸發兩次來交換 MeTHF。將混合物蒸發至最終體積 9 mL，且藉由在 25°C 下在攪拌下轉移至 DIPE (135 mL) 中來使產物沈澱。可藉由在 15 秒內過濾來分離固體且最終乾燥。對沈澱母液之 HPLC 分析顯示，胜肽沈澱產率高於 99.9%。沈澱物不黏稠，無產物損失於玻璃器皿表面上。

c) 用 3 倍體積之 EtOAc 進行萃取

將 EtOAc (60 mL) 添加至蒸發殘餘物 (20 mL) 中。用含有 NaCl (15% w/v) 及 Na₂CO₃ (2.5% w/v) 之水溶液 (60 mL) 將此混合物萃取兩次。在第二次萃取時，胜肽形

成呈出現在有機層與水層之間的不透明層形式的凝膠。此中間層在 48 小時之後不消失。

d) 用 3 倍體積 DCM 進行萃取

將 DCM (60 mL) 添加至蒸發殘餘物 (20 mL) 中。用含有 NaCl (15% w/v) 及 Na₂CO₃ (2.5% w/v) 之水溶液 (60 mL) 將此混合物萃取三次。所有傾析耗時不到 10 分鐘。將有機層蒸發至殘餘體積為 8 mL。藉由與 THF (20 mL) 一起共同蒸發兩次來進行溶劑交換。將混合物蒸發至最終體積 8 mL。在 25°C 下，在攪拌下將此蒸發殘餘物轉移至 DIPE (135 mL) 中，但未觀察到沈澱。作為替代，觀察到相分離且在底部油相中發現胜肽。

e) 用 6 倍體積 EtOAc 進行萃取

將 EtOAc (120 mL) 添加至蒸發殘餘物 (20 mL) 中。用含有 NaCl (15% w/v) 及 Na₂CO₃ (2.5% w/v) 之水溶液 (60 mL) 將此混合物萃取三次。所有傾析耗時不到 2 分鐘。將有機層蒸發至殘餘體積為 9 mL。藉由與 THF (20 mL) 一起共同蒸發兩次來交換 EtOAc。將混合物蒸發至最終體積 9 mL，且藉由在 25°C 下在攪拌下轉移至 DIPE (135 mL) 中來使產物沈澱。藉由在 17 分鐘內 (代替 MeTHF 萃取方法中之 15 秒) 過濾來分離固體。沈澱物非常黏稠，且超過 15% 產物損失在玻璃器皿表面上。

f) 用 6 倍體積 DCM 進行萃取

將 DCM (120 mL) 添加至蒸發殘餘物 (20 mL) 中。用含有 NaCl (15% w/v) 及 Na₂CO₃ (2.5% w/v) 之水溶液

(60 mL) 將此混合物萃取三次。所有傾析耗時不到 10 分鐘。將有機層蒸發至殘餘體積為 8 mL。藉由與 THF (20 mL) 一起共同蒸發兩次來進行溶劑交換。藉由在 25°C 下在攪拌下轉移至 DIPE (135 mL) 中來使產物沈澱。產物以無法藉由過濾 12 小時來分離之膠狀物形式沈澱。

在實驗 b) 及實驗 d) 至實驗 f) 中，分離有機層且在 25°C 下逐滴添加至 135 mL DIPE 中。在 b)、d)、e) 及 f) 情況下，將有機層部分蒸發至殘餘體積為 9±1 mL。藉由過濾分離實驗 b)、實驗 e) 及實驗 f) 中之產物。

藉由分析型 HPLC 來測定萃取之後水層中之胜肽含量以及過濾步驟之後濾液中之胜肽含量。在 40°C 下在減壓下乾燥所分離之產物隔夜，隨後測定產物產率。

實驗 a) 至實驗 f) 之結果匯總於表 5 中。

編號	萃取			產物在沈澱後之外觀	過濾		分離之產物產率
	溶劑	相分離時間	水層中之胜肽含量		過濾時間	濾液中之胜肽含量	
a)	無	無	無	膠狀物	>12 小時	<0.1%	0%
b)	MeTHF (3 倍體積)	<2 分鐘	<0.1%	可過濾固體	15 秒	NA	84%
c)	EtOAc (3 倍體積)	>48 小時	NA	NA	NA	<0.1%	0%
d)	DCM (3 倍體積)	<2 分鐘	<0.1%	NA	5 秒	100%	0%
e)	EtOAc (6 倍體積)	<2 分鐘	<0.1%	可過濾固體	17 分鐘	<0.1%	69%
f)	DCM (6 倍體積)	<2 分鐘	<0.1%	膠狀物	>12 小時	<0.1%	36%

表 5.

H-Ser(*t*Bu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-Glu(*t*Bu)-Glu(*t*Bu)-Glu(*t*Bu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-Leu-Phe-Ile-Glu(O*t*Bu)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gly-Gly-Pro-Ser(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(*t*Bu)-NH₂ 之萃取

結果

在二異丙醚中直接沈澱（實驗 a））產生不能過濾，亦即過濾時間大於 12 小時之膠狀物。因此，無法分離產物。

試圖用 3 倍體積之 EtOAc 進行萃取（實驗 c））產生穩定乳液，亦即觀察到相分離時間超過 48 小時。用 6 倍體積 EtOAc 萃取（實驗 e））獲得成功，但需要溶劑之體積大於 MeTHF（實驗 b））。此外，實驗 e）所獲得之產物的過濾時間相當長。

用 3 倍體積 DCM 萃取（實驗 d））獲得成功，但接下來無法使胜肽沈澱。用 6 倍體積 DCM 萃取（實驗 f））產生無法過濾之膠狀沈澱物。此等結果指示，在兩個實驗中，在 DCM 萃取後的產物含有大量 NMP。

因此，在實驗 b）（用粗體突顯）中達成最佳結果，其中採用 MeTHF 進行萃取。此外，實驗 b）中之分離之產物產率與其他實驗相比顯著更高。

實 施 例 4 自 反 應 混 合 物 中 萃 取
Boc-His(Trt)-Gly-Glu(O*t*Bu)-Gly-Thr(*t*Bu)-Phe-Thr(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Asp(O*t*Bu)-Leu-Ser(*t*Bu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-

Glu(*t*Bu)-Glu(*t*Bu)-Glu(*t*Bu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-Leu-Phe-Ile-Glu(*Ot*Bu)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gly-Gly-Pro-Ser(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(*t*Bu)-NH₂

在 20 °C 下，在 NMP (210 mL) 中組合 Boc-His(Trt)-Gly-Glu(*Ot*Bu)-Gly-Thr(*t*Bu)-Phe-Thr(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Asp(*Ot*Bu)-Leu-OH (6.94 g , 4.11 mmol)、H-Ser(*t*Bu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-Glu(*t*Bu)-Glu(*t*Bu)-Glu(*t*Bu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-Leu-Phe-Ile-Glu(*Ot*Bu)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gly-Gly-Pro-Ser(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(*t*Bu)-NH₂ (20 g , 4.32 mmol) 及 HOBt (0.63 g , 4.11 mmol)。在室溫下攪拌混合物 10 分鐘直至所有固體溶解，接著冷卻至 0 °C。依序添加 TOTU (2.7 g , 8.22 mmol) 及 DIPEA (6 mL , 42 mmol)，且在此溫度下攪拌反應混合物。2 小時後，反應完畢，如藉由 HPLC 所測定。藉由以下方法監測反應進展：根據方法 MIH-009-397TG15 分析在 NMP 中稀釋 50 倍之 5 μL 反應混合物樣品。

將所獲得之反應混合物分成相等樣品 (樣品體積：5 mL) 且直接用於萃取測試 1 至測試 17。在各情況下，如表 6 中所匯總將反應混合物樣品 (5 mL) 與不同有機溶劑混合，接著用 15 mL 20% NaCl 水溶液萃取。針對相分離 (傾析) 時間及胜肽萃取產率 (有機層中之胜肽比率) 比較此等實驗條件。

在測試 4、測試 6 及測試 11 中，胜肽在有機層中溶解不良；發現其呈緩慢沈降於有機層與水層之間的凝膠形式。

在測試 1、測試 2、測試 7、測試 8、測試 15 至測試 17 中，觀察到兩個透明層快速分離（在不到 2 分鐘內）。分離兩層且藉由 HPLC 測定各層中之胜肽含量。

在測試 3 至測試 6、測試 9 至測試 14 中，萃取產生不透明混合物。若干分鐘（超過 60 分鐘）之後，系統開始分離，但在水層與有機層之間形成較厚胜肽凝膠層。從未觀察到各層明顯分離。然而，在 120 分鐘後，自傾析容器中移除水層。實際上不可能分離胜肽凝膠與有機層（密度差過小）。用 NMP 溶解胜肽凝膠及有機層，且藉由 HPLC 測定胜肽含量。因此，表 6 中所示之胜肽萃取產率更為指示胜肽凝膠間之傾析品質，而不是在水層與有機層之間的實際分配。

用於萃取測試 1 至測試 17 之組分的體積比及觀察結果匯總於以下表 6 中。

測試編號	DCM 體積 (mL)	EtOAc 體積 (mL)	MeTHF 體積 (mL)	THF 體積 (mL)	ACN 體積 (mL)	傾析時間 (分鐘)	胜肽萃取產率 (%)
1	15	0	0	0	0	<2	98.8
2	30	0	0	0	0	<2	98.9
3	0	15	0	0	0	120	70.3*
4	0	30	0	0	0	120	95.2*
5	0	0	15	0	0	120	85.2*
6	0	0	30	0	0	120	97.8*
7	15	15	0	0	0	<2	52.1
8	15	0	0	0	7.5	<2	69.0
9	0	15	15	0	0	120	95.3*
10	0	15	0	0	5	120	53.3*
11	0	15	0	0	7.5	120	97.5*
12	0	15	0	0	10	120	96.7*
13	0	15	0	0	15	120	88.5*
14	0	0	15	0	5	120	89.6*
15	0	0	15	0	7.5	<2	99.3
16	0	0	15	0	10	<2	98.7
17	0	0	15	0	15	<2	98.9

*凝膠相中之胜肽包括在萃取產率中

表 6.

Boc-His(Trt)-Gly-Glu(O*t*Bu)-Gly-Thr(*t*Bu)-Phe-Thr(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Asp(O*t*Bu)-Leu-Ser(*t*Bu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-Glu(*t*Bu)-Glu(*t*Bu)-Glu(*t*Bu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-Leu-Phe-Ile-Glu(O*t*Bu)-Trp(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gly-Gly-Pro-Ser(*t*Bu)-Ser(*t*Bu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(*t*Bu)-NH₂ 之萃取

結果

在用純 DCM 萃取 (測試 1 及測試 2) 時, 觀察到快速相分離及高胜肽萃取產率。然而, 如實施例 c) (表 3) 及比較實施例 5.1 (表 7) 中所示, 用純 DCM 萃取使得有機層中之極性非質子性溶劑含量高。因此, 經萃取胜肽之後續沈澱變得困難。藉由實施例 3、測試 d) 及測試 f) 來說明此缺點。因此, 用純 DCM 進行胜肽萃取存在嚴重缺點。

與用純 EtOAc 萃取 (測試 3 及測試 4) 相比, 用純 MeTHF 萃取 (測試 5 及測試 6) 顯示更高胜肽萃取產率。

在測試 14 至測試 17 中, 研究混合物 MeTHF/ACN 之萃取性質。與用純 MeTHF 萃取 (測試 5 及測試 6) 相比, 在測試 14 至測試 17 中所觀察到之相分離時間較短, 且胜肽萃取產率較高。比較用 MeTHF/ACN 萃取 (測試 14 至測試 17) 與用 EtOAc/ACN 萃取 (測試 10 至測試 13) 之結果顯示, MeTHF/ACN 混合物與相應 EtOAc/ACN 混合物相比具有較佳萃取性質。特定言之, 用 MeTHF/ACN 混合物萃取使

得相分離時間較短而胜肽萃取產率較高。

實施例 5 使用連續 LPPS 在不使中間物沈澱的情況下進行兩種胜肽之偶合及 Boc 裂解。製備 Boc-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(Bzl)-Phe-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr-Leu(OBzl)

實施例 5.1

Boc-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr-Leu(OBzl)

在 20°C 下將 Boc-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-OH (3.5 g, 5.5 mmol) 及 H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr-Leu(OBzl) (5.0 g, 5.5 mmol) 溶解於 DMF (25 mL) 中。將所得混合物冷卻至 -8°C，接著添加 HOBt·H₂O (0.88 g, 5.75 mmol)、EDC·HCl (1.21 g, 6.31 mmol)，且將反應溫度維持在 -4°C 至 -8°C 範圍內直至藉由 HPLC 量測證實完全轉化。藉由以下方法監測反應進展：將 5 μL 反應混合物樣品在乙酸:水 (9:1) 中稀釋 50 倍且根據上述方法 MIH-009-2TG11 進行分析。

向上文所製備之反應混合物中添加 MeTHF (90 mL) 且用以下各物相繼萃取反應混合物：

- 1) 含有 20 g/L NaCl 之水溶液 (90 mL)
- 2) 含有 20 g/L NaCl 之水溶液 (90 mL)
- 3) 含有 20 g/L NaCl 及 50 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (90 mL)
- 4) 含有 20 g/L NaCl 及 50 g/L KHSO₄ 之水溶液 (90 mL)
- 5) 含有 20 g/L NaCl 之水溶液 (90 mL)。

接著在 30°C 下在減壓下蒸發有機層。

比較實施例 5.1

Boc-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl 之萃取

將 Boc-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-OH (3.5 g) 、 H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl (5.0 g) 及 HOBt (0.88 g) 溶解於 DMF (20 mL) 中。在 -6°C 至 0°C 下，在攪拌下用 EDC·HCl (1.2 g) 及 TEA (1.5 mL) 進行偶合反應隔夜。藉由 HPLC (方法 MIH-009-2TG11) 驗證反應完成。過濾反應混合物以移除不溶性鹽。將 1 mL 反應混合物樣品與如以下表 7 中所示之有機溶劑混合，接著用 3 mL NaCl (15% w/v) 及 Na₂CO₃ (2.5% w/v) 水溶液萃取。

在所有萃取測試中，觀察到兩個透明層快速分離。藉由 GC 測定有機層中之 DMF 含量。

測試編號	DCM 體積 (mL)	EtOAc 體積 (mL)	MeTHF 體積 (mL)	THF 體積 (mL)	ACN 體積 (mL)	DMF% (v/v)
1	3	0	0	0	0	5,8
2	6	0	0	0	0	5,3
3	0	3	0	0	0	2,0
4	0	6	0	0	0	2,3
5	0	0	3	0	0	1,9
6	0	0	6	0	0	1,7
7	3	3	0	0	0	3,5
8	0	0	3	3	0	2,4
9	0	3	3	0	0	2,3
10	0	3	0	3	0	2,5
11	0	0	3	0	3	2,1

表 7.

Boc-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl 之萃取

結果

與用純 DCM (測試 1 及測試 2) 或純 EtOAc (測試 3 及測試 4) 萃取相比, 用純 MeTHF 萃取 (測試 5 及測試 6) 使得有機層中之 DMF 含量較低。此外, 與用混合物 EtOAc/DCM (測試 7) 或 EtOAc/THF (測試 10) 萃取相比, 用含有 MeTHF 之溶劑混合物萃取 (測試 8、測試 9 及測試 11) 在有機層中提供較低 DMF 含量。

實施例 5.2 移除 Boc 保護基。 H-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr-Leu(OBzl)

在 15°C 下藉由向實施例 5.1 中所獲得之物質中添加甲苯 (20 mL)、苯酚 (0.25 g) 及 TFA (16 mL) 來進行 Boc 裂解。如藉由 HPLC 所測定, 反應完成之後, 在 30°C 下在減壓下蒸發反應混合物。藉由以下方法監測反應進展: 根據上述方法 MIH-009-2TG11 分析在 ACN 中稀釋 20 倍之 5 μ L 反應混合物樣品。

藉由隨後在 30°C 下在減壓下與甲苯 (2 \times 20 mL) 一起共同蒸發來進一步移除揮發性物質。將 MeTHF (50 mL) 添加至蒸發殘餘物中且用含有 20 g/L NaCl 之水溶液 (6 \times 50 mL) 將有機溶液萃取 6 次。在 30°C 下在減壓下蒸發有機層。

比較實施例 5.2 殘餘 DMF 對移除 Boc 保護基之影響。 H-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl

進一步處理來自比較實施例 5.1 之測試 1、測試 3 及測

試 5 之產物。分離有機層且藉由與甲苯一起共同蒸發三次 (浴液溫度=40°C, 壓力=50 毫巴) 來交換溶劑。在完全蒸發揮發性溶劑之後, 向蒸發殘餘物中添加甲苯 (4 mL) 及苯酚 (0.05 g)。在 0°C 下藉由添加 3.5 mL TFA 來進行 Boc 裂解。藉由 HPLC (方法 MIH-009-2TG11) 監測反應。

所獲得之結果匯總於表 8 中且圖解呈現於圖 7 中。

時間 (分鐘)	轉化率 (%)		
	測試 1	測試 3	測試 5
0	0	0	0
60	30,6	95,6	93,3
105	53,7	99,9	99,9
270	81,8		
330	88,6		
450	98		

表 8. 脫除

Boc-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl 之保護基

結果

比較實施例 5.1 中所獲得之物質中的痕量 DMF 顯著抑制 Boc 保護基之移除。因此, 與在藉由用 EtOAc 及 MeTHF 萃取所獲得之物質的情況下相比, 藉由用 DCM 萃取所獲得之物質的 Boc 裂解顯著較慢。在此特定情況下, 在藉由 EtOAc 及 MeTHF 萃取所獲得之物質之間未觀察到顯著差異。

實施例 5.3 藉由使用 LPPS 在不使中間物沈澱的情況下使 Boc-Phe-OH 與

H-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr-Leu(OBzl)偶合

在 20°C 下將 Boc-Phe-OH (1.53 g, 5.8 mmol) 溶解於 DMF (25 mL) 中且添加至實施例 5.2 中所獲得之反應混合物中。向其中添加 HOBt·H₂O (0.89 g, 5.8 mmol) 及 EDC·HCl (1.2 g, 6.3 mmol)，且將反應混合物冷卻至 5°C。將反應混合物保持在此溫度下直至藉由 HPLC 證實完全轉化。藉由以下方法監測反應進展：將 5 μL 反應混合物樣品在乙酸：水 (9:1) 中稀釋 50 倍且根據上述方法 MIH-009-2TG11 進行分析。

接著添加 MeTHF (90 mL) 且用以下各物相繼萃取反應混合物：

- 1) 含有 50 g/L NaCl 之水溶液 (90 mL)
- 2) 含有 50 g/L NaCl 之水溶液 (90 mL)
- 3) 含有 20 g/L NaCl 及 50 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (90 mL)
- 4) 含有 20 g/L NaCl 及 50 g/L KHSO₄ 之水溶液 (90 mL)
- 5) 含有 50 g/L NaCl 之水溶液 (90 mL)
- 6) 含有 50 g/L NaCl 之水溶液 (90 mL)。

接著在 35°C 下在減壓下蒸發有機層。

接著將實施例 5.2 之方法應用於所獲得之物質，唯一差異在於，用 NaCl 水溶液萃取殘餘物 7 次而不是 6 次。

實施例 5.4 使 Boc-Ser(Bzl)-OH 與 H-Phe-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr-Leu(OBzl)偶合

使 Boc-Ser(Bzl)-OH (1.62 g , 5.5 mmol) 與 H-Phe-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr-Leu(OBzl) 胜肽 (根據實施例 5.3 使用其中所述之程序製備) 偶合。

a) 萃取及在 DIPE 中沈澱

將 25 mL 由實施例 5.4 產生且含有 5 g Boc-Ser(Bzl)-Phe-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu(OBzl) 之反應混合物與 MeTHF (75 mL) 及含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (75 mL) 組合。在充分混合且進行相分離 (約 4 分鐘) 之後，移除下層水層。用含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (3×75 mL) 將上層有機層再萃取三次。最後分離有機層且在 30°C、60 毫巴下部分蒸發至殘餘體積為 10 mL。在 0°C 下，在攪拌下將經部分蒸發之有機層逐滴添加至 DIPE (250 mL) 中，其中發生胜肽沈澱。將所得混合物轉移至裝備 20 μm 孔徑過濾器之 2.7 cm 直徑過濾管柱中。在 50 毫巴之壓力下進行過濾。在 3 分鐘 45 秒內過濾全部的沈澱母液 (260 mL)。過濾後之濾餅高度為 3.5 cm，得到過濾性係數 $K=848$ 。收集固體且在減壓下乾燥。分離呈固體物質形式之 4.5 g 胜肽。

分離之胜肽的影像如圖 8 中所示 (40 倍放大)。

藉由 HPLC 分析由萃取過程產生之水層及沈澱母液。其中所偵測之胜肽量低於由實施例 5.4 產生之 25 mL 反應混合物中所存在之胜肽總量的 0.5 重量%。

b) 比較實施例：向沈澱母液中添加 DMF 的影響

如以上 a) 所述進行萃取及沈澱程序，但在進行胜肽過

濾之前向沈澱混合物中添加 DMF (2.5 mL)。固體沈澱物立即變成不可過濾之膠狀固體。

c) 比較實施例：在 DIPE 中直接沈澱

在 0°C 下，在攪拌下將實施例 5.4 中所獲得之含有 5 g Boc-Ser(Bzl)-Phe-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu(OBzl) 之 25 mL 反應混合物逐滴添加至 DIPE (250 mL) 中以進行沈澱。肽以黏稠膠狀固體形式沈澱。傾析之後，將清液抽出且用第二批 DIPE (250 mL) 代替。將所得混合物攪拌 1 小時以便將黏稠膠狀固體解聚集。傾析之後，再次用第三批 DIPE (250 mL) 代替清液。將混合物再攪拌 1 小時且最後將其轉移至過濾管柱中。然而，大部分固體仍呈黏稠膠狀固體形式黏著於沈澱容器上且因此無法轉移。在 2 分鐘 30 秒內過濾母液，產生 1.75 cm 高之濾餅。此獲得過濾係數 $K=636$ 。在減壓下乾燥所收集之固體。

分離 2.45 g 肽。

d) 比較實施例：在水中直接沈澱。

在 0°C 下，在攪拌下將由實施例 5.4 產生且含有 5 g Boc-Ser(Bzl)-Phe-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu(OBzl) 之 25 mL 反應混合物逐滴添加至水 (250 mL) 中以進行沈澱。此產生極薄沈澱物，隨後將其轉移至過濾管柱中。過濾速率極低 (<3 mL/h)，大量沈澱物在過濾初期通過過濾器且在約 65 分鐘之後，過濾器明顯堵塞。此外，未明顯傾析沈澱物。因此，不可能收集所獲得之沈澱物。

實施例 5.5**Boc-Ser(Bzl)-Phe-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr-Leu(OBzl)之 Boc 裂解**

將 Boc-Ser(Bzl)-Phe-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu(OBzl) (5 g) 置於甲苯 (20 mL)、苯酚 (0.2 g) 及 TFA (16 mL) 之混合物中。如藉由 HPLC 所測定 (根據 HPLC 方法 MIH-009-2TG11 對在乙腈中稀釋 30 倍之 5 μ L 反應物進行分析), 反應完成之後在減壓下蒸發反應混合物且獲得殘餘油。藉由與甲苯 (2 \times 30 mL) 一起共同蒸發兩次來進一步移除殘餘 TFA。將 MeTHF (50 mL) 添加至所產生之共同蒸發殘餘物中且用含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (3 \times 50 mL) 將此混合物萃取 3 次。分離所獲得之有機層且在 35 $^{\circ}$ C 下在減壓下蒸發。

實施例 5.6 使 Boc-Gly-Gly-Gly-Gly-OH 與 H-Ser(Bzl)-Phe-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr-Leu(OBzl) 偶合且萃取產物

在 20 $^{\circ}$ C 下將 Boc-Gly-Gly-Gly-Gly-OH (1.27 g, 2.8 mmol)、H-Ser(Bzl)-Phe-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu(OBzl) (5.0 g, 2.7 mmol) 及 HOBt \cdot H₂O (0.43 g, 2.8 mmol) 溶解於 DMF (25 mL) 中且將所獲得之溶液添加至以上實施例 5.5 中所獲得之反應混合物中。將反應混合物之溫度調節至 6 \pm 2 $^{\circ}$ C, 且向其中添加 EDC \cdot HCl (0.6 g, 3.1 mmol)。將反應混合物保持在此溫度下直至藉由 HPLC 證實完全轉化。藉由以下方法監測反應進展:

根據上述方法 MIH-009-2TG11 對在乙酸:水 (9:1) 中稀釋 50 倍之 3 μ L 反應混合物樣品進行分析。

接著，添加 MeTHF (90 mL) 及 THF (30 mL)，且用以下各物相繼萃取混合物：

- 1) 含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (100 mL)
- 2) 含有 100 g/L NaCl 及 25 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (100 mL)
- 3) 含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (100 mL)
- 4) 含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (100 mL)。

接著在 35°C 下在減壓下蒸發所獲得之有機層。

實施例 5.7 Boc 裂解

將甲苯 (20 mL)、苯酚 (0.2 g) 及 TFA (16 mL) 添加至以上實施例 5.6 中所獲得之蒸發殘餘物中。如藉由 HPLC 所測定 (根據 HPLC 方法 MIH-009-2TG11 對在乙腈中稀釋 30 倍之 5 μ L 反應物進行分析)，反應完成之後在減壓下蒸發反應混合物，藉此獲得殘餘油。藉由隨後與甲苯 (2 \times 3 mL) 一起共同蒸發兩次來移除殘餘 TFA。將 MeTHF (60 mL) 及 THF (50 mL) 添加至蒸發殘餘物中，且用含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (3 \times 100 mL) 將所得溶液萃取 3 次。在 35°C 下在減壓下蒸發所獲得之有機層。

實 施 例 5.8 使 Boc-Gly-OH 與 H-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(Bzl)-Phe-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr-Leu(OBzl) 偶合

將 DMF (25 mL) 添加至以上實施例 5.7 中所獲得之蒸

發殘餘物中。在 $6\pm 2^\circ\text{C}$ 下將 Boc-Gly-OH (0.5 g, 2.8 mmol)、HOBt·H₂O (0.43 g, 2.8 mmol) 及 EDC·HCl (0.6 g, 3.1 mmol) 添加至所得混合物中。將反應混合物保持在此溫度下直至藉由 HPLC 證實完全轉化。藉由以下方法監測反應進展：根據上述方法 MIH-009-2TG11 對在乙酸:水 (9:1) 中稀釋 50 倍之 3 μL 反應混合物樣品進行分析。

隨後，添加 MeTHF (90 mL) 及 THF (30 mL)，且用以下各物相繼萃取所得混合物：

- 1) 含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (100 mL)
- 2) 含有 100 g/L NaCl 及 25 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (100 mL)
- 3) 含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (100 mL)
- 4) 含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (100 mL)
- 5) 含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (100 mL)。

在 35°C 下在減壓下蒸發所得有機層。

實施例 6 利用 Fmoc 作為保護基在液相中連續合成 H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂

實施例 6.1 Fmoc-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 之 LPPS

在 20°C 下將 H-Ser(*t*Bu)-NH₂ (2.0 g, 12.5 mmol) 及 Fmoc-Asn(Trt)-OH (6.77 g, 11.3 mmol) 添加至 NMP (30.0 mL) 中。將混合物攪拌 15 分鐘直至固體完全溶解且冷卻至 10°C 。添加 PyBOP (6.52 g, 12.5 mmol)，接著添加 TEA (2.25 mL, 16.0 mmol)。在 10°C 下進行反應，且如藉由 HPLC 所證實，在 14 小時後完成轉化。藉由以下方法監測反應進展：

根據上述方法 MIH-009-RTTG1 對在 NMP 中稀釋 50 倍之 3 μL 反應混合物樣品進行分析。

實施例 6.2 移除 Fmoc 保護基且分離 Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂

向根據實施例 6.1 製備之混合物中添加 TAEA (8 mL)，且藉由 HPLC，使用與實施例 6.1 中相同之方法來確定 Fmoc 裂解完成。

接著添加 MeTHF (140 mL) 且用以下各物相繼萃取反應混合物：

- 1) 用含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (140 mL) 萃取一次
- 2) 用含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (40 mL) 萃取三次
- 3) 用含有 100 g/L KHSO₄ 之水溶液 (25 mL) 萃取四次
- 4) 用含有 50 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (40 mL) 萃取兩次
- 5) 用含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (40 mL) 萃取兩次。

實施例 6.3 使 Fmoc-Val-OH 與 H-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 偶合

將 NMP (40 mL) 添加至實施例 6.2 中所獲得之有機層中，且在 30°C 下在減壓下蒸發所合併之混合物。

向此溶液中添加 Fmoc-Val-OH (3.85 g, 11.3 mmol)、PyBOP (6.5 g, 12.5 mol) 及 TEA (2 mL)。在室溫下進行反應直至藉由 HPLC 偵測到完全轉化。藉由以下方法監測反應進展：根據上述方法 MIH-009-RTTG1 對在 DMF 中稀釋 50 倍之 3 μL 反應混合物樣品進行分析。

實 施 例 6.4 移 除 Fmoc 保 護 基 。**Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂**

藉由向實施例 6.3 中所獲得之反應混合物中添加 TAEA (5 mL) 來進行 Fmoc 裂解。如藉由 HPLC 所測定 (方法與上文相同), 反應完成之後, 向反應混合物中添加 MeTHF (100 mL)。萃取所合併之有機層:

- 1) 用含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (120 mL) 萃取一次
- 2) 用含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (40 mL) 萃取三次
- 3) 用含有 100 g/L KHSO₄ 之水溶液 (40 mL) 萃取五次
- 4) 用含有 50 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (40 mL) 萃取兩次

- 5) 用含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (40 mL) 萃取兩次。

向有機層中添加 NMP (45 mL), 接著在 30°C 下, 在減壓下進行蒸發。

實 施 例 6.5 使 Fmoc-Trp(Boc)-OH 與 H-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 偶合

在室溫下將 Fmoc-Trp(Boc)-OH (6.0 g, 11.3 mmol) 及 PyBOP (6.5 g, 12.5 mmol) 添加至實施例 6.4 中所獲得之胜肽溶液中。藉由添加 TEA (2.75 mL) 來中和反應混合物且攪拌直至藉由 HPLC (方法與實施例 6.3 中相同) 證實胜肽偶合反應完成。

實 施 例 6.6 移 除 Fmoc 保 護 基 。**H-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂**

藉由向實施例 6.5 中所獲得之反應混合物中添加 TAEA

(5 mL) 來進行 Fmoc 裂解。如藉由 HPLC (方法與實施例 6.3 中相同) 所測定, 反應完成之後, 向反應混合物中添加 MeTHF (150 mL)。萃取所合併之有機層:

- 1) 用含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (150 mL) 萃取一次
- 2) 用含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (50 mL) 萃取三次
- 3) 用含有 100 g/L KHSO₄ 之水溶液 (50 mL) 萃取四次
- 4) 用含有 50 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (50 mL) 萃取兩次
- 5) 用含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (50 mL) 萃取兩次。

向所獲得之有機層中添加 NMP (50 mL), 接著在 30°C 下, 在減壓下進行蒸發。

實施例 6.7 藉由 LPPS 使 Fmoc-Leu-OH 與 H-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 偶合

將 Fmoc-Leu-OH (4.0 g, 11.3 mmol) 及 PyBOP (6.5 g, 12.5 mmol) 添加至實施例 6.6 中所獲得之胜肽溶液中。藉由添加 TEA (2.75 mL) 來中和反應混合物且在室溫下攪拌直至藉由 HPLC (方法與實施例 6.3 中相同) 確定胜肽偶合反應完成。

實施例 6.8 移除 Fmoc 保護基。 H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂

藉由向實施例 6.7 中所獲得之反應混合物中添加 TAEA (10 mL) 來進行 Fmoc 裂解。如藉由 HPLC (方法與實施例 6.3 中相同) 所測定, 反應完成之後, 向反應混合物中添加 MeTHF (150 mL)。萃取所合併之有機層:

- 1) 用含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (150 mL) 萃取一次

- 2) 用含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (75 mL) 萃取三次
- 3) 用含有 100 g/L KHSO₄ 之水溶液 (50 mL) 萃取四次
- 4) 用含有 50 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (50 mL) 萃取兩次
- 5) 用含有 150 g/L NaCl 之水溶液 (50 mL) 萃取兩次。

在 30°C 下在減壓下蒸發有機層，且藉由 HPLC (方法與實施例 6.3 中相同) 測定所分離產物之組成。

分離 9.5 g H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 且產物純度為 79%。

a) 比較實施例：

H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 在 DIPE (70 mL) 中直接沈澱

將在反應完成之後且在添加 MeTHF 之前獲得並且含有 H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ (3 g) 的實施例 6.8 之反應混合物 (15 mL) 部分蒸發以使其體積減至 7 mL。隨後將所獲得之殘餘物轉移至 DIPE (70 mL) 中以進行胜肽沈澱。此形成難以轉移至過濾器且不可過濾之凝膠。

b) 比較實施例：

H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 在 DIPE (100 mL) 中直接沈澱

將實施例 6.8 之含有 H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ (3 g) 之反應混合物 (7 mL) 部分蒸發以使其體積減至 6 mL，接著轉移至 DIPE (100 mL) 中以進行胜肽沈澱。

在 2.5 cm 直徑、20 μm 孔徑過濾器上過濾沈澱固體耗

時 15 分鐘，且產生 4.6 cm 高之濾餅，對應於 K 值為 11.8。胜肽定量(藉由 HPLC 方法 MIH-009-RTTG1 分析 3 μ L 濾液)指示沈澱母液中剩餘 310 mg 胜肽，亦即 10.3%粗物質。

總之，H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 在 DIPE 中直接沈澱之方法難以蒸發 DMF，需要較長過濾時間且需要較大體積之 DIPE 來使產物沈澱。此外，胜肽之分離產率相當低，因為沈澱母液中之 DMF 含量過高，從而增加胜肽在水層中之溶解度。

c) 實施例：在於 MeTHF 中萃取之後 H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 於 DIPE (70 mL) 中沈澱

將實施例 6.8 之含有 H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ (3 g) 之反應混合物 (15 mL) 添加至 MeTHF (50 mL) 中。用含有 20 g/L NaCl 之水溶液 (50 mL) 將此混合物萃取三次。分離有機層，隨後在減壓下部分蒸發至殘餘體積為 12 mL。最後將經部分蒸發之有機層轉移至 DIPE (70 mL) 中。

在 2.5 cm 直徑、20 μ m 孔徑過濾器上過濾沈澱固體耗時 5.5 分鐘，且產生 4.0 cm 高之濾餅，對應於 K 值為 21.6。胜肽定量(藉由 HPLC 方法 MIH-009-RTTG1 分析 3 μ L 濾液)指示沈澱母液中存在 16 mg 胜肽，亦即 0.5%粗物質。

實施例 7 使 Boc-MeLeu-OH 與 HCl·Ala-Ome 偶合

在 20°C 下將 HCl·Ala-OMe (4.6 g, 33.1 mmol) 溶解於 DMF (35 mL) 中。將所獲得之溶液冷卻至 -5°C，且向其中

添加 Boc-MeLeu-OH (7.1 g, 28.8 mmol)、HOBt (3.9 g, 0.29 mmol) 及 EDC·HCl (5.5 g, 28.8 mmol)。將反應混合物保持在 -5°C 直至反應完成，如藉由以下方法所監測：根據上述方法 MIH-009-025TG3 對在乙酸/甲醇中稀釋 10 倍之 5 μL 反應混合物樣品進行分析。

反應完成之後，添加 MeTHF (130 mL) 且用以下各物萃取混合物：

- 1) 用水 (130 mL) 萃取一次
- 2) 用含有 50 g/L NaCl 之水溶液 (40 mL) 萃取一次
- 3) 用含有 10 g/L KHSO₄ 之水溶液 (40 mL) 萃取三次。

隨後，向有機層中添加正庚烷 (10 mL) 且用以下各物萃取所合併之層：

- 1) 用含有 50 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (25 mL) 萃取一次
- 2) 用水 (25 mL) 萃取一次。

接著在減壓下蒸發有機層。向殘餘物中添加正庚烷 (140 mL) 且再次在減壓下蒸發混合物，藉此使胜肽發生結晶。18 小時之後，藉由過濾分離固體且用正庚烷沖洗兩次。

在 40°C 下將所收集之產物再溶解於正庚烷 (45 mL) 中且讓其隔夜以進行再結晶。

由於 HCl·H-Ala-OMe 極易水解，因此其通常含有一些 HCl·H-Ala-OH。因此，胜肽偶合反應之後所分離之物質通常含有呈雜質形式之 Boc-MeLeu-Ala-Ala-Ome。一般而言，已知序列中具有雙 Ala 之雜質難以在胜肽合成完成之後藉由層析來移除。

本實施例中所用之再結晶可減少 Boc-MeLeu-Ala-Ala-OMe 之量，Boc-MeLeu-Ala-Ala-OMe 呈雜質形式以 1.2 莫耳%至 0.2 莫耳%存在於所分離胜肽中。此再結晶僅可在不存在 DMF 的情況下進行。

實施例 8 使用連續 LPPS 在不使中間物沈澱的情況下逐步進行胜肽組裝。製備 H-Pro-Ala-Gly-Phe-Ser(*t*Bu)-二苯并哌喃醯胺

實施例 8.1 偶合 Fmoc-Phe-OH 與 H-Ser(*t*Bu)-二苯并哌喃醯胺

在 20°C 下將 H-Ser(*t*Bu)-二苯并哌喃醯胺 (2.5 g, 7.7 mmol) 及 Fmoc-Phe-OH (3.0 g, 7.7 mmol) 溶解於 NMP (20 mL) 中。添加 TBTU (2.6 g, 8.1 mmol) 及 TEA (2 mL)，且藉由以下方法監測反應進展：根據方法 MIH-009-RTTG1 對在 DMF 中稀釋 50 倍之 1 μ L 反應混合物樣品進行分析。

反應完成之後，向反應混合物中添加 MeTHF (75 mL) 及 THF (25 mL)。用含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (75 mL) 萃取所獲得之有機層。在劇烈攪拌所得混合物且分離有機層之後，在減壓下蒸發有機層。藉由向蒸發殘餘物中添加乙腈 (100 mL) 來使胜肽沈澱。藉由過濾分離所得固體且在減壓下乾燥。

實施例 8.2 Fmoc-Phe-Ser(*t*Bu)-二苯并哌喃醯胺之 Fmoc 裂解

將實施例 8.1 中所獲得之 Fmoc-Phe-Ser(*t*Bu)-二苯并哌喃醯胺 (2 g) 溶解於 NMP (15 mL) 與 TAEA (2 mL) 之

混合物中。如藉由以上實施例 6.1 中所說明之方法所測定，反應完成之後，向反應混合物中添加 MeTHF (100 mL) 及 THF (100 mL)。接著對其進行萃取：

- 1) 用含有 100 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (30 mL) 萃取三次
- 2) 用含有 10 g/L KHSO₄ 之水溶液 (30 mL) 萃取五次
- 3) 用含有 20 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (30 mL) 萃取五次
- 4) 用含有 150 g/L NaHCO₃ 之水溶液 (30 mL) 萃取兩次。

添加 NMP (30 mL) 且在減壓下蒸發所得有機層。

實施例 8.3 偶合 Fmoc-Gly-OH 與 H-Phe-Ser(*t*Bu)-二苯并哌喃醯胺

將 Fmoc-Gly-OH (0.92 g, 3.1 mmol)、TBTU (1.0 g, 3.1 mmol) 及 TEA (0.9 mL) 添加至實施例 8.2 中所獲得之蒸發殘餘物中。如以上實施例 8.1 中所述驗證反應完成。

實施例 8.4 Fmoc-Gly-Phe-Ser(*t*Bu)-二苯并哌喃醯胺之 Fmoc 裂解

將 TAEA (3 mL) 添加至實施例 8.3 中所獲得之反應混合物中。藉由以上實施例 8.1 中所說明之方法證實完全轉化之後，向反應混合物中添加 MeTHF (100 mL)。接著對其進行萃取：

- 1) 用含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (100 mL) 萃取一次
- 2) 用含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (21 mL) 與 NMP (3.7

mL) 之混合物萃取四次

- 3) 用含有 200 g/L NaCl 之水溶液 (25 mL) 萃取一次。添加 NMP (30 mL) 且在減壓下蒸發所得有機層。

實施例 8.5 偶合 Fmoc-Ala-OH 與 H-Gly-Phe-Ser(*t*Bu)-二苯并哌喃醯胺

將 Fmoc-Ala-OH (0.97 g, 3.1 mmol)、TBTU (1.0 g, 3.1 mmol) 及 TEA (0.8 mL) 添加至以上實施例 8.4 中所獲得之蒸發殘餘物中。藉由以上實施例 8.1 中所說明之方法驗證反應完成。

實施例 8.6 Fmoc-Ala-Gly-Phe-Ser(*t*Bu)-二苯并哌喃醯胺之 Fmoc 裂解

將 TAEA (3 mL) 添加至實施例 8.5 中所獲得之偶合反應混合物中。如藉由以上實施例 8.1 中所說明之方法所測定，反應完成之後，向反應混合物中添加 MeTHF (100 mL)。接著對其進行萃取：

- 1) 用含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (100 mL) 萃取一次
- 2) 用含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (21 mL) 與 NMP (4 mL) 之混合物萃取四次
- 3) 用含有 200 g/L NaCl 之水溶液 (25 mL) 萃取一次。添加 NMP (30 mL) 且在減壓下蒸發所得有機層。

實施例 8.7 偶合 Fmoc-Pro-OH 與 H-Ala-Gly-Phe-Ser(*t*Bu)-二苯并哌喃醯胺

將 Fmoc-Pro-OH (1.05 g, 3.1 mmol)、TBTU (1.0 g, 3.1 mmol) 及 TEA (0.8 mL) 添加至以上實施例 8.6 中所獲

得之蒸發殘餘物中。藉由實施例 8.1 中所說明之方法驗證反應完成。

實施例 8.8 Fmoc-Pro-Ala-Gly-Phe-Ser(*t*Bu)-二苯并哌喃醯胺之 Fmoc 裂解

將 TAEA (3 mL) 添加至實施例 8.7 中所獲得之偶合反應混合物中。藉由以上實施例 8.1 中所述之方法驗證反應完成之後，向反應混合物中添加 MeTHF (100 mL)。接著對其進行萃取：

- 1) 用含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (100 mL) 萃取一次
- 2) 用含有 100 g/L NaCl 之水溶液 (42 mL) 與 NMP (8 mL) 之混合物萃取四次
- 3) 用含有 200 g/L NaCl 之水溶液 (25 mL) 萃取一次。

向所獲得之有機層中添加 ACN (50 mL) 且在減壓下蒸發所得混合物以引發胜肽沈澱。與 ACN (3×30 mL) 一起再共同蒸發三次之後，藉由過濾分離所獲得之固體胜肽且在減壓下乾燥。

比較實施例 1 使用 Sieber 樹脂且使用 Fmoc 及 *t*-Bu 作為保護基進行 H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 之 SPPS

使用 Sieber 樹脂 (2.3 g) 以 0.61 meq/g 之負載量按 10 mmol 之規模人工進行 SPPS。胜肽合成期間所消耗之物質列於以下表 7 之左列中。

使 Sieber 樹脂在 DCM (20 mL) 中膨脹 18 小時，接著用 DMF 洗滌六次。接著對各胺基酸併入使用以下程序將胜

肽組裝至樹脂上：

1. Fmoc 裂解：用哌啶/DMF 混合物 (15 mL, v/v = 2/8) 處理 3 次，每次 15 分鐘。

2. 胜肽-樹脂洗滌：用 DMF (10 mL) 洗滌 6 次。

3. 胺基酸偶合：Fmoc-胺基酸 (2.1 mmol, 1.5 當量)，用 PyBOP (2.1 mmol) 在 DMF (10 mL) 及 TEA (0.7 mL) 中。藉由 Kaiser 測試驗證反應完成程度。

4. 胜肽-樹脂洗滌：用 DMF (10 mL) 洗滌 6 次。

最終 Fmoc 裂解之後，用 DMF (10 mL) 洗滌樹脂 8 次，接著用 DCM (10 mL) 洗滌 6 次。用 DCM/TFA (v/v=95/5) 相繼處理 4 次持續 10 分鐘使胜肽裂解脫離樹脂。合併所得溶液，在減壓下蒸發且在 DIPE (20 mL) 中沈澱。在減壓下乾燥所獲得之固體。

分離 605 mg (毛產率=33%) H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂，且產物純度經測定為 57%。

在藉由 SPPS 相對於 LPPS 進行之 10 mmol 合成規模下提供以下表 9 中之值。

比較實施例 1		實施例 6	
Sieber 樹脂	16.5 g		
DCM	142.86 mL	MeTHF	540 mL
DMF	8100.00 mL	NMP	165 mL
哌啶	257.14 mL	TAEA 或 DEA	28 mL
PyBOP	39.29 g	PyBOP	26.02 g
TEA	21.43 mL	TEA	9.75 mL
Fmoc-Ser(<i>t</i> Bu)-OH	5.75 g	H-Ser(<i>t</i> Bu)-NH ₂	2.0 g
Fmoc-Asn(Trt)-OH	8.93 g	Fmoc-Asn(Trt)-OH	6.77 g
Fmoc-Val-OH	5.09 g	Fmoc-Val-OH	3.85 g
Fmoc-Trp(Boc)-OH	7.86 g	Fmoc-Trp(Boc)-OH	6.0 g
Fmoc-Leu-OH	5.36 g	Fmoc-Leu-OH	4.0 g

		含有 150 g/L NaCl 之水溶液	1565 mL
		含有 100 g/L KHSO ₄ 之水溶液	700 mL
		含有 50 g/L NaHCO ₃ 之水溶液	360 mL

表 9 根據實施例 6 及比較實施例 1 之方法合成 H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 期間所消耗之物質。

總之，實施例 6 中進行連續 LPPS 所需之時間與比較實施例 1 中進行 SPPS 所需之時間幾乎相同。除此以外，與比較實施例 1 之情況相比，實施例 6 中所製備之目標胜肽的純度及產率較高，而溶劑及試劑之消耗量顯著較低。

比較實施例 2：根據 Carpino 氏方法之 H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 之連續 LPPS

比較實施例 2.1 Fmoc-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 之 LPPS 在 20°C 下將 H-Ser(*t*Bu)-NH₂ (2.0 g, 12.5 mmol) 及 Fmoc-Asn(Trt)-OH (6.8 g, 11.3 mmol) 添加至 DCM (50.0 mL) 中。將混合物攪拌 15 分鐘直至固體完全溶解，且進一步冷卻至 10°C。添加 DCC (2.34 g, 11.3 mmol) 及 HOBT (1.74 g, 11.3 mmol)。在 10°C 下進行反應，且如 HPLC 所證實，在 14 小時後完成轉化。藉由以下方法監測反應進展：根據上述方法 MIH-009-RTTG1 對在 NMP 中稀釋 50 倍之 3 μL 反應混合物樣品進行分析。

比較實施例 2.2 移除 Fmoc 保護基且分離 Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂

向根據比較實施例 2.1 製備之混合物中添加 TAEA (25 mL) 且在室溫下攪拌反應混合物。藉由 HPLC，使用與實施例 4.1 中相同之方法確定 Fmoc 裂解完成。

藉由過濾分離 DCU，其中過濾過程耗時 6 分鐘。用 DCM 將所得濾液稀釋至總體積為 250 mL，隨後用含有 100 g/L NaH_2PO_4 及 Na_2HPO_4 之水溶液 (pH 5.5, 100 mL) 萃取 3 次。

比較實施例 2.3 偶合 Fmoc-Val-OH 與 H-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂

在 30°C 下在減壓下將比較實施例 2.2 中所獲得之有機層蒸發至殘餘體積為 80 mL。

添加 Fmoc-Val-OH (3.85 g, 11.3 mmol)、DCC (2.34 g, 11.3 mmol) 及 HOBt (1.74 g, 11.3 mmol)。在室溫下進行反應。18 小時之後，添加 Fmoc-Val-OH (0.77 g, 2.3 mmol)、DCC (0.47 g, 2.3 mmol) 及 DCM (25 mL) 以完成反應。藉由以下方法監測反應進展：根據上述方法 MIH-009-RTTG1 對在 DMF 中稀釋 50 倍之 3 μL 反應混合物樣品進行分析。

比較實施例 2.4 移除 Fmoc 保護基。 H-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂

藉由向比較實施例 2.3 中所獲得之反應混合物中添加 TAEA (25 mL) 來進行 Fmoc 裂解。藉由 HPLC，使用與比較實施例 2.3 中相同之方法驗證反應完成。

藉由過濾分離 DCU 且用 DCM (2×25 mL) 沖洗兩次。

合併所獲得之濾液且用 DCM 稀釋至總體積為 200 mL。用含有 100 g/L NaH_2PO_4 及 Na_2HPO_4 之水溶液 (pH 5.5, 3×100 mL) 將溶液萃取 3 次。

在 30 °C 下在減壓下將有機層蒸發至殘餘體積為 100 mL。

比較實施例 2.5 偶合 Fmoc-Trp(Boc)-OH 與 H-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂

將 Fmoc-Trp(Boc)-OH (6.0 g, 11.3 mmol)、DCC (2.34 g, 11.3 mmol) 及 HOBt (1.74 g, 11.3 mmol) 添加至比較實施例 2.4 中所獲得之胜肽溶液中。在室溫下進行偶合反應且反應時間為 18 小時。藉由 HPLC, 使用與比較實施例 2.3 中相同之方法證實反應完成。

比較實施例 2.6 移除 Fmoc 保護基。 H-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂

藉由向比較實施例 2.5 中所獲得之反應混合物中添加 TAEA (25 mL) 來進行 Fmoc 裂解。藉由 HPLC, 使用與比較實施例 2.3 中相同之方法確定反應完成。

藉由過濾分離 DCU 且用 DCM (2×25 mL) 沖洗兩次。合併所得濾液且用 DCM 稀釋至總體積為 200 mL。用含有 100 g/L NaH_2PO_4 及 Na_2HPO_4 之水溶液 (pH 5.5, 3×100 mL) 將溶液萃取 3 次。

由於有機層在萃取過程中變得混濁, 因此再向有機層中添加 DCM, 以使其體積達到 400 mL。然而, 在萃取過程中存在一些不溶產物。因此, 難以分離各層且一些產物損

失在水層中。

比較實施例 2.7 藉由 LPPS 偶合 Fmoc-Leu-OH 與 H-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂

將 Fmoc-Leu-OH (4.0 g, 11.3 mmol)、DCC (2.34 g, 11.3 mmol) 及 HOBt (1.74 g, 11.3 mmol) 添加至比較實施例 2.6 中所獲得之胜肽溶液中。在室溫下進行偶合反應且反應時間為 18 小時。藉由 HPLC, 使用與比較實施例 2.3 中相同之方法確定反應完成。

比較實施例 2.8 移除 Fmoc 保護基。
H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂

藉由向比較實施例 2.5 中所獲得之反應混合物中添加 TAEA (25 mL) 來進行 Fmoc 裂解。藉由 HPLC, 使用與比較實施例 2.3 中相同之方法確定反應完成。

藉由過濾分離 DCU 且用 DCM (2×25 mL) 沖洗兩次。合併所得濾液且用 DCM 稀釋至總體積為 200 mL。用含有 100 g/L NaH₂PO₄ 及 Na₂HPO₄ 之水溶液 (pH 5.5, 3×100 mL) 將溶液萃取 3 次。

由於有機層在萃取過程中變得混濁, 因此再向有機層中添加 DCM, 以使其體積達到 400 mL。然而, 在萃取過程中存在一些不溶產物。因此, 難以分離各層且一些產物損失在水層中。

在 30°C 下在減壓下蒸發所得有機層。將所獲得之殘餘油轉移至正庚烷 (100 mL) 中以進行沈澱。藉由過濾分離所得固體, 用正庚烷 (3×10 mL) 沖洗 3 次且在減壓下乾燥。

分離 2.6 g H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ (產率=31%) 且最終產物純度為 49%。

總之，L. A. Carpino 等人所述之合成方法顯示若干缺點。由於胜肽 H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 及 H-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 在 DCM 中之溶解度不足，因此大量此等胜肽在萃取過程中沈澱在有機層與水層之間的界面處。儘管將有機層之體積增至 400 mL，但僅能以中等產率分離產物。

除此以外，與實施例 6 相比，偶合反應之反應時間較長。此外，顯示藉由過濾分離所得 DCU 較為耗時。

【圖式簡單說明】

圖 1 展示說明具有三元混合物 NMP/MeTHF/水之有機層中之 NMP 含量 (g/L) 的等高線圖 (黑色圓圈表示實驗混合物之組成，以一式兩份製備者用「2×」標記)。

圖 2 展示說明具有三元混合物 NMP/MeTHF/水之有機層之體積 (mL) 的等高線圖 (黑色圓圈表示實驗混合物之組成，以一式兩份製備者用「2×」標記)。

圖 3 展示說明具有三元混合物 NMP/MeTHF/NaCl 溶液之有機層中之 NMP 含量 (g/L) 的等高線圖 (黑色圓圈表示實驗混合物之組成，以一式兩份製備者用「2×」標記)。

圖 4 展示說明具有三元混合物 NMP/MeTHF/NaCl 溶液之有機層之體積 (mL) 的等高線圖 (黑色圓圈表示實驗混合物之組成，以一式兩份製備者用「2×」標記)。

圖 5 展示實例 6 中所述之五胜肽

H-Leu-Trp(Boc)-Val-Asn(Trt)-Ser(*t*Bu)-NH₂ 在水中之萃取產率與系統 MeTHF/NMP/水之相對組成的函數關係的計算等高線圖 (黑色圓圈表示實驗混合物之組成, 以一式三份製備者用「3×」標記)。

圖 6 展示呈現有機層中之 NMP 濃度與系統 NMP/MeTHF/THF/水之組成之函數依賴關係的圖。

圖 7 說明殘餘 DMF 對胜肽 Boc-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl 之 Boc 保護基之移除速率的影響。

測試 1: 使用 DCM 萃取來分離 Boc-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl。

測試 3: 使用 EtOAc 萃取來分離 Boc-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl。

測試 5: 使用 MeTHF 萃取來分離 Boc-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl。

圖 8 展示根據本發明方法分離之胜肽 Boc-Ser(Bzl)-Phe-Pro-Ile-Leu-Pro-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu(OBzl)的影像。

【主要元件符號說明】

無

序列表

- <110> 隆沙有限公司
隆沙布萊恩公司
- <120> 萃取胜肽之方法及其於液相胜肽合成之應用
- <130> LP2295TW00
- <150> EP 11170094
- <151> 2011-06-16
- <150> US 61/497,642
- <151> 2011-06-16
- <150> US 61/498,100
- <151> 2011-06-17
- <160> 22
- <170> PatentIn 第3.5版
- <210> 1
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 人工胜肽
- <400> 1
- Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly
1 5
- <210> 2
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 人工胜肽
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (4)-(4)
- <223> 醯胺化
- <400> 2
- Pro Thr Gly Ser
1
- <210> 3
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 人工胜肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> 醯胺化

<400> 3

Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Pro Thr Gly Ser
 1 5 10

<210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工胜肽

<400> 4

Glu Glu Tyr Leu
 1

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工胜肽

<400> 5

Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu
 1 5 10

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工胜肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> 醯胺化

<400> 6

Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro
 1 5 10 15

Pro Ser

<210> 7
 <211> 29

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工胜肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)..(29)
<223> 醯胺化

<400> 7

Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu
1 5 10 15

Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
20 25

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工胜肽

<400> 8

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu
1 5 10

<210> 9
<211> 29
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工胜肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (29)..(29)
<223> 醯胺化

<400> 9

Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu
1 5 10 15

Lys Asn Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
20 25

<210> 10
<211> 39
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
 <223> 人工胜肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> 醯胺化

<400> 10

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工胜肽

<400> 11

Pro Ile Leu Pro Pro
 1 5

<210> 12
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工胜肽

<400> 12

Glu Glu Tyr Leu
 1

<210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工胜肽

<400> 13

Pro Ile Leu Pro Pro Glu Glu Tyr Leu
 1 5

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工胜肽

<400> 14

Phe Pro Ile Leu Pro Pro Glu Glu Tyr Leu
1 5 10

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工胜肽

<400> 15

Ser Phe Pro Ile Leu Pro Pro Glu Glu Tyr Leu
1 5 10

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工胜肽

<400> 16

Gly Gly Gly Gly
1

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工胜肽

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Phe Pro Ile Leu Pro Pro Glu Glu Tyr Leu
1 5 10 15

<210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工胜肽

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Phe Pro Ile Leu Pro Pro Glu Glu Tyr Leu
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工胜肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> 醯胺化

<400> 19

Trp Val Asn Ser
 1

<210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工胜肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> 醯胺化

<400> 20

Leu Trp Val Asn Ser
 1 5

<210> 21
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工胜肽

<400> 21

Ala Gly Phe Ser
 1

<210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

201311717

<223> 人工胜肽

<400> 22

Pro Ala Gly Phe Ser
1 5

七、申請專利範圍：

1. 一種自由胜肽偶合反應所產生之反應混合物中萃取胜肽之方法，該反應混合物含有該胜肽及選自由 *N,N*-二甲基甲醯胺、*N,N*-二甲基乙醯胺及 *N*-甲基-2-吡咯啉酮組成之群的極性非質子性溶劑，其中該方法包含步驟 a) 及步驟 b)：

步驟 a) 包含向該反應混合物中添加組分 a1) 及組分 a2)，其中：

組分 a1) 為 2-甲基四氫呋喃；

組分 a2) 為水；

以至於獲得具有有機層及水層之兩相系統；

步驟 b) 包含分離含有該胜肽之該有機層與該水層，其中：

步驟 a) 中所獲得之該兩相系統的特徵在於以下體積比：

極性非質子性溶劑:2-甲基四氫呋喃=1:20 至 1:2；及

極性非質子性溶劑:水=1:20 至 1:2。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中在步驟 a) 中，向該反應混合物中添加另一組分 a3)，

組分 a3) 為有機溶劑 1，該有機溶劑 1 係選自由正庚烷、甲苯、乙酸乙酯、乙酸異丙酯、乙腈及四氫呋喃組成之群；

以至於獲得具有有機層及水層之兩相系統；

其中

步驟 a) 中所獲得之該兩相系統的特徵在於以下體積比：

極性非質子性溶劑:2-甲基四氫呋喃=1:20 至 1:2 ;

極性非質子性溶劑:有機溶劑 1=1:5 至 30:1 ; 及

極性非質子性溶劑:水=1:20 至 1:2 。

3.如申請專利範圍第 2 項之方法，其中步驟 a) 中所獲得之該兩相系統的特徵在於以下體積比：

極性非質子性溶劑:2-甲基四氫呋喃=1:6 至 1:3 ;

極性非質子性溶劑:有機溶劑 1=1:1 至 4:1 ; 及

極性非質子性溶劑:水=1:5 至 1:3 。

4.如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項之方法，其中該極性非質子性溶劑係選自由 *N,N*-二甲基甲醯胺及 *N*-甲基-2-吡咯啉酮組成之群。

5.如申請專利範圍第 2 項或第 3 項之方法，其中該有機溶劑 1 係選自由乙腈及四氫呋喃組成之群。

6.如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項之方法，其中該組分 a2) 含有至少一種選自由氯化鈉、硫酸氫鈉、硫酸氫鉀、碳酸氫鈉及磷酸氫鈉組成之群的無機鹽。

7.如申請專利範圍第 4 項之方法，其中該組分 a2) 含有至少一種選自由氯化鈉、硫酸氫鈉、硫酸氫鉀、碳酸氫鈉及磷酸氫鈉組成之群的無機鹽。

8.如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該組分 a2) 含有至少一種選自由氯化鈉、硫酸氫鈉、硫酸氫鉀、碳酸氫鈉及磷酸氫鈉組成之群的無機鹽。

9.如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項之方法，其中該組分 a2) 之 pH 值在 5 至 8 範圍內。

10.如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項之方法，其中在步驟 b) 之前對步驟 a) 中所獲得之該兩相系統進行過濾。

11.如申請專利範圍第 4 項之方法，其中在步驟 b) 之前對步驟 a) 中所獲得之該兩相系統進行過濾。

12.如申請專利範圍第 5 項之方法，其中在步驟 b) 之前對步驟 a) 中所獲得之該兩相系統進行過濾。

13.如申請專利範圍第 6 項之方法，其中在步驟 b) 之前對步驟 a) 中所獲得之該兩相系統進行過濾。

14.如申請專利範圍第 7 項之方法，其中在步驟 b) 之前對步驟 a) 中所獲得之該兩相系統進行過濾。

15.如申請專利範圍第 8 項之方法，其中在步驟 b) 之前對步驟 a) 中所獲得之該兩相系統進行過濾。

16.如申請專利範圍第 9 項之方法，其中在步驟 b) 之前對步驟 a) 中所獲得之該兩相系統進行過濾。

17.如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項之方法，其中在 20°C 至 30°C 之溫度下進行步驟 a) 及步驟 b)。

18.一種在液相中製備胜肽之方法，該方法包含步驟 aa)、步驟 bb) 及步驟 cc):

在步驟 aa) 中，在選自由 *N,N*-二甲基甲醯胺、*N,N*-二甲基乙醯胺及 *N*-甲基-2-吡咯啉酮組成之群的極性非質子性溶劑中且在存在偶合試劑的情況下進行胜肽偶合反應；

在步驟 bb) 中，根據如申請專利範圍第 1 項至第 18 項中任一項之方法萃取所產生之胜肽；及

在步驟 cc) 中，將步驟 bb) 中所獲得之有機層之至少一部分蒸發。

19. 如申請專利範圍第 18 項之方法，其中該偶合試劑係選自由 *O*-1*H*-苯并三唑之鎳鹽、鎘鹽及碳化二亞胺偶合試劑組成之群。

20. 如申請專利範圍第 18 項之方法，其中三級鹼係選自由 *N,N*-二異丙基乙胺、三乙胺及 *N*-甲基嗎啉組成之群，且該三級鹼存在於步驟 aa) 之該胜肽偶合反應中。

21. 如申請專利範圍第 19 項之方法，其中三級鹼係選自由 *N,N*-二異丙基乙胺、三乙胺及 *N*-甲基嗎啉組成之群，且該三級鹼存在於步驟 aa) 之該胜肽偶合反應中。

22. 如申請專利範圍第 18 項至第 21 項中任一項之方法，其另外包含進一步的步驟 dd)、步驟 ee) 及步驟 ff)，其中

在步驟 dd) 中，將步驟 cc) 中所獲得之該有機層與選自由乙腈、乙醚、二異丙醚及甲苯組成之群的有機溶劑 2 組合；

在步驟 ee) 中，使至少很大一部分之該胜肽沈澱；及在步驟 ff) 中，藉由過濾分離該沈澱之胜肽。

23. 如申請專利範圍第 18 項至第 21 項中任一項之方法，其中在該胜肽之 *N* 末端保護基為第三丁氧基羰基保護基的情況下，用三氟乙酸處理步驟 cc) 中所獲得之該有機層，該第三丁氧基羰基保護基係藉由該三氟乙酸處理來移除。

24.如申請專利範圍第 18 項至第 21 項中任一項之方法，其中在該胜肽之 *N* 末端保護基為苈基-9-甲氧基羰基保護基的情況下，用哌啶處理由該胜肽偶合反應產生且在步驟 aa) 中獲得之該反應混合物，該苈基-9-甲氧基羰基保護基係藉由該哌啶處理來移除。

25.如申請專利範圍第 18 項至第 21 項中任一項之方法，其中該胜肽之 *C* 末端羧酸基經保護而呈 2-氯苯基二苯基甲酯或 *N*-甲基-9*H*-二苯并哌喃-9-醯胺形式。

八、圖式：

(如次頁)

24.如申請專利範圍第 18 項至第 21 項中任一項之方法，其中在該胜肽之 *N* 末端保護基為苈基-9-甲氧基羰基保護基的情況下，用哌啶處理由該胜肽偶合反應產生且在步驟 aa) 中獲得之該反應混合物，該苈基-9-甲氧基羰基保護基係藉由該哌啶處理來移除。

25.如申請專利範圍第 18 項至第 21 項中任一項之方法，其中該胜肽之 *C* 末端羧酸基經保護而呈 2-氯苯基二苯基甲酯或 *N*-甲基-9*H*-二苯并哌喃-9-醯胺形式。

八、圖式：

(如次頁)

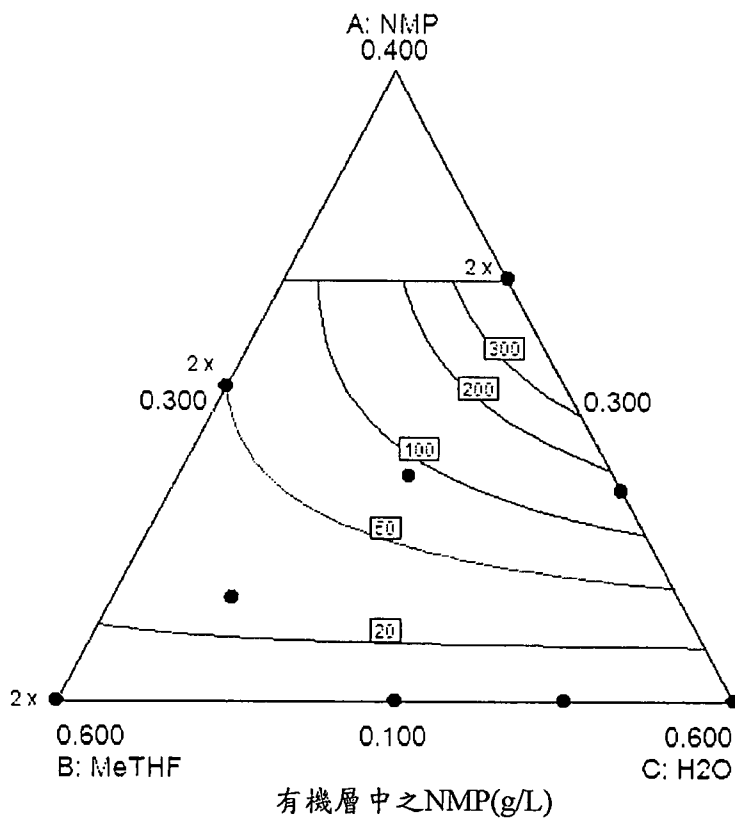


圖 1

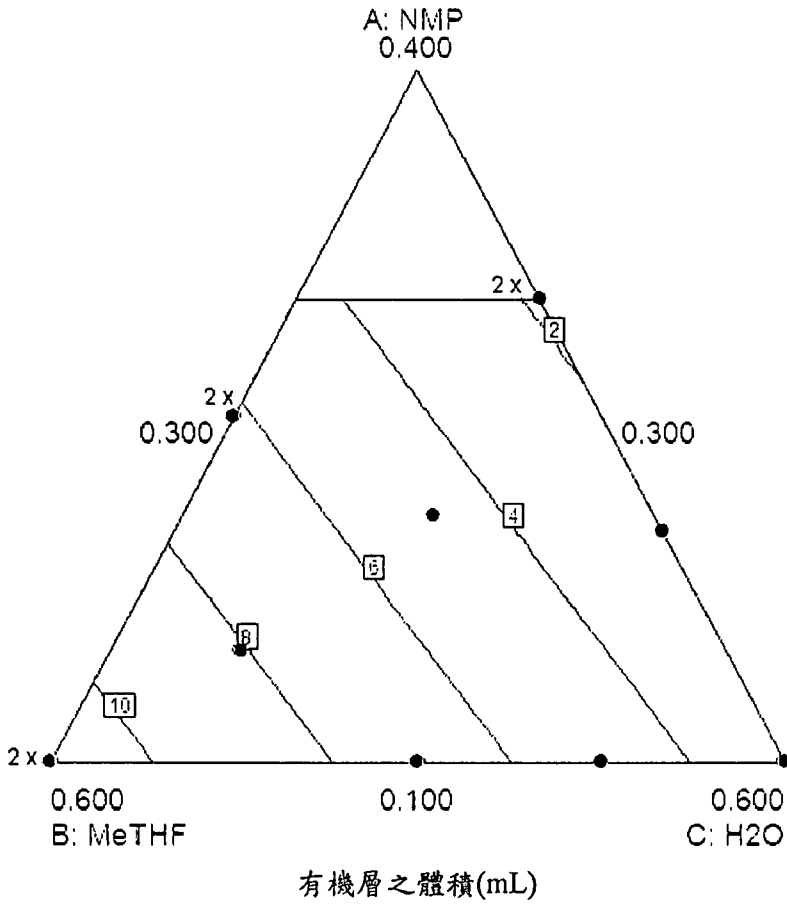


圖2

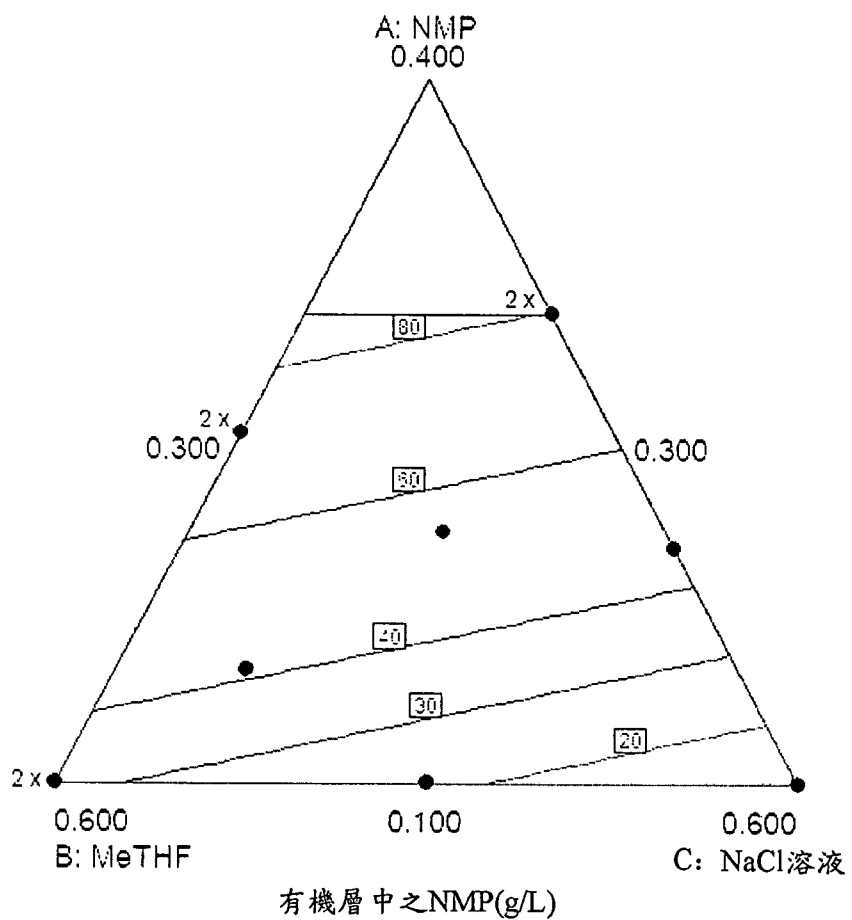
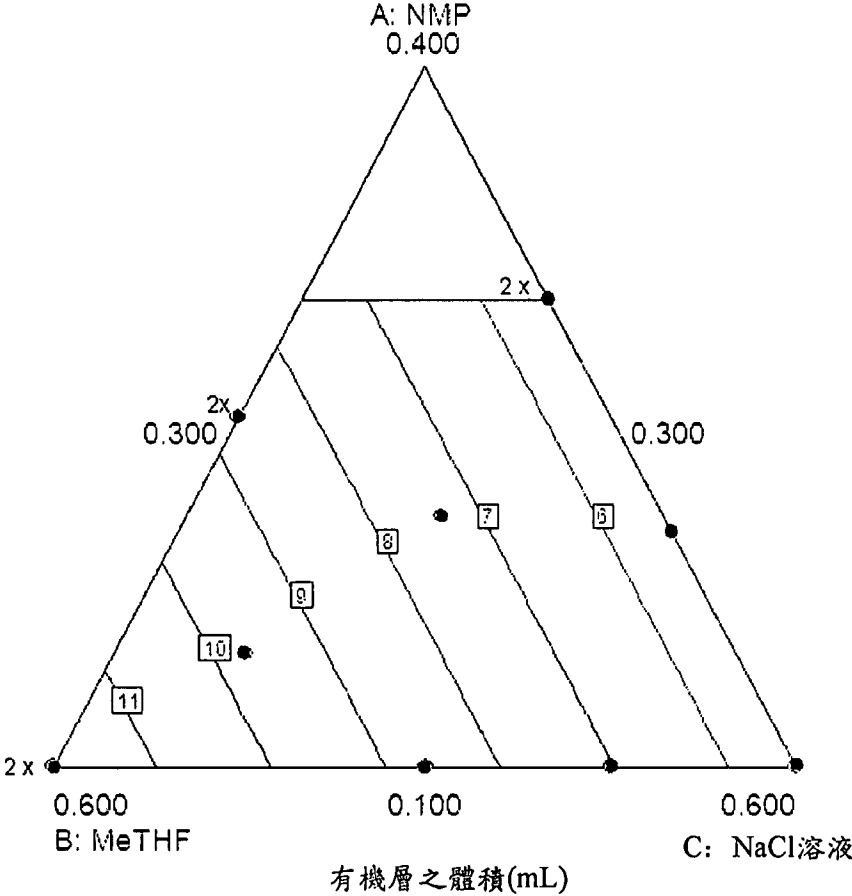


圖3



有機層之體積(mL)

圖4

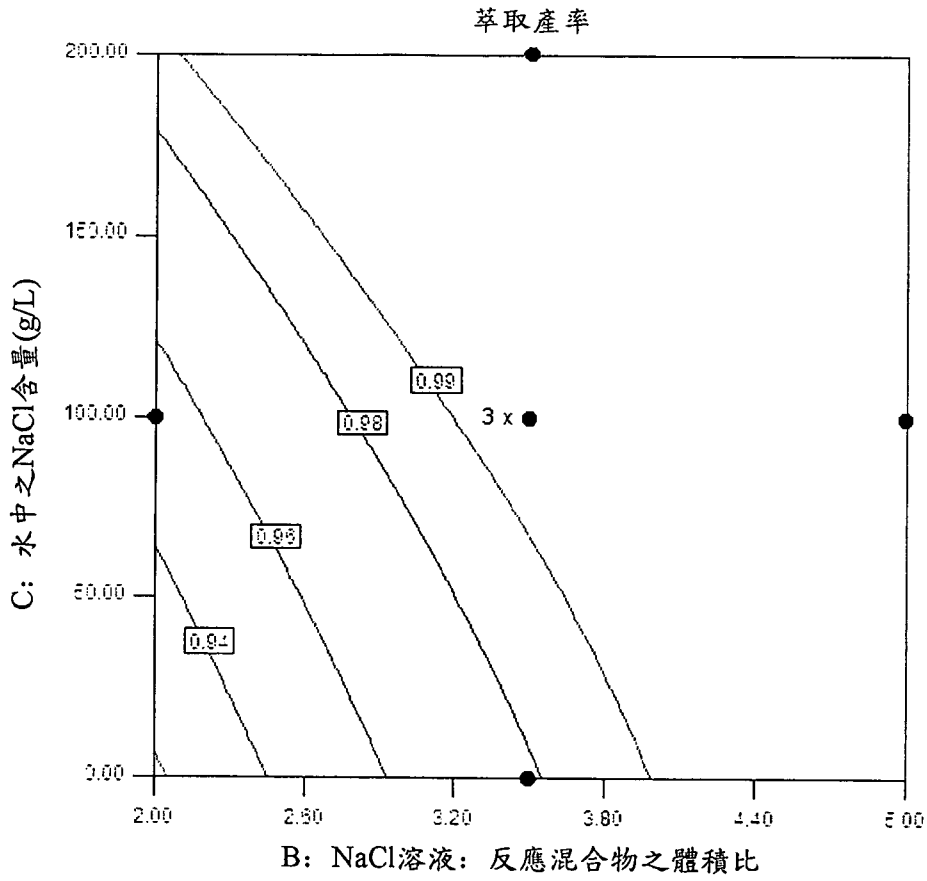


圖5

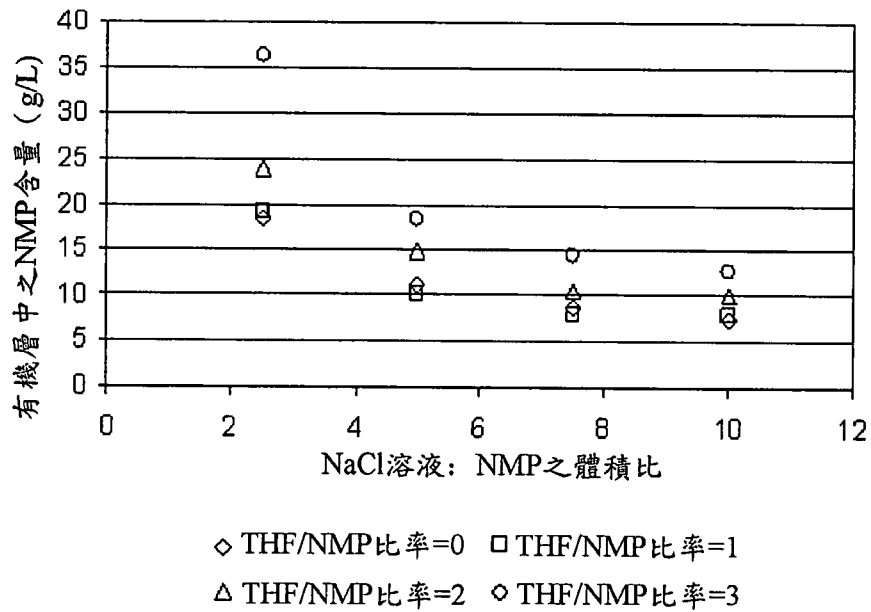


圖6

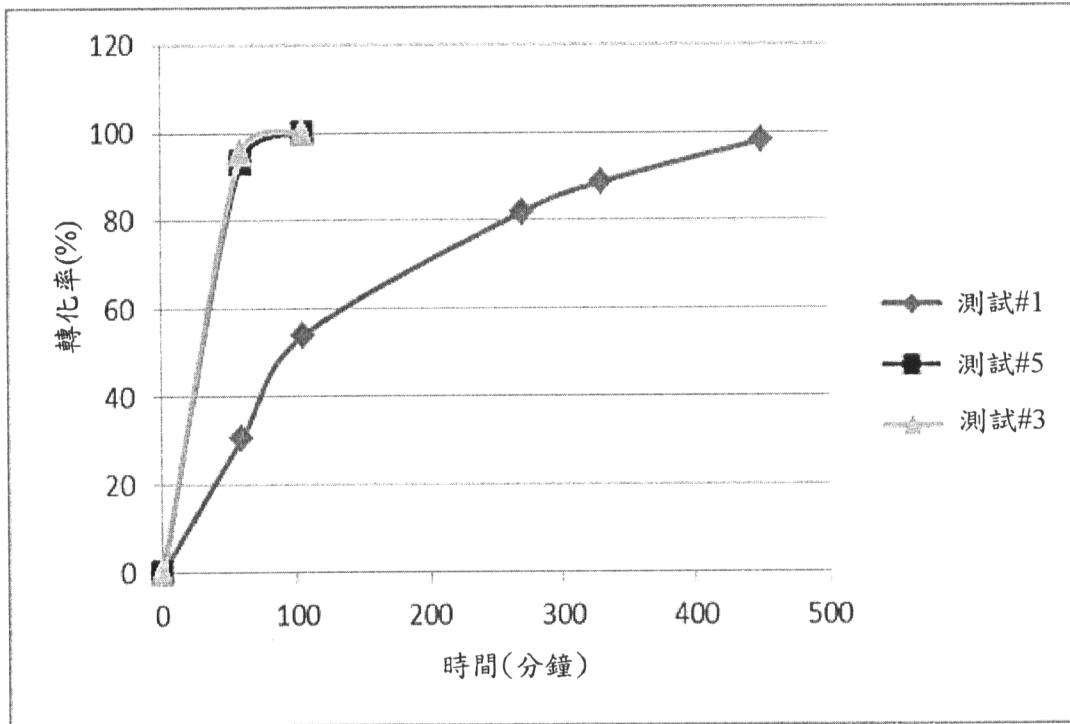


圖7

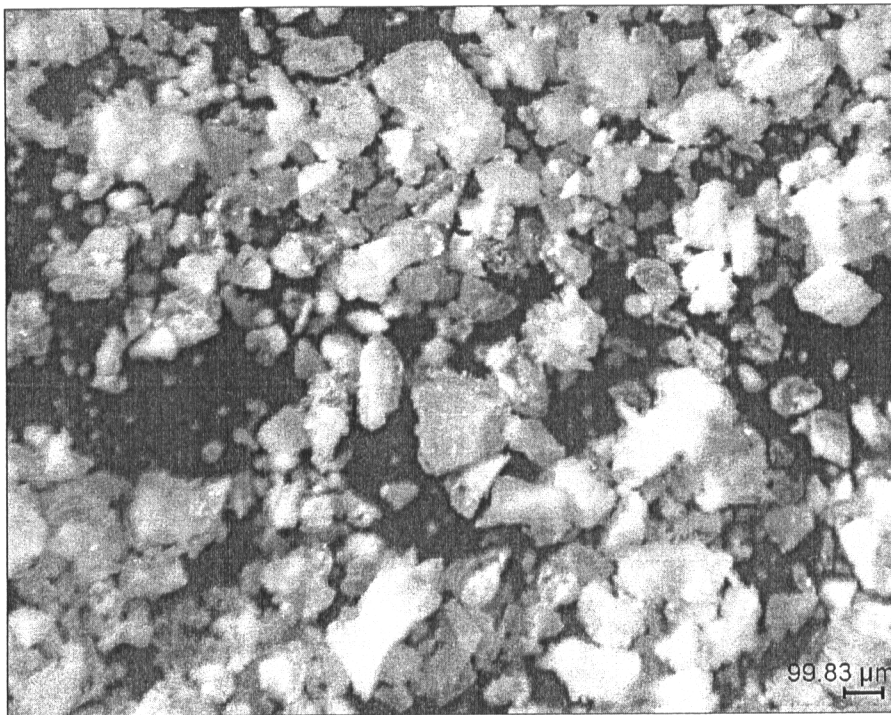


圖8