



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0088307
(43) 공개일자 2020년07월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/06 (2006.01) C07K 1/10 (2006.01)
C07K 1/12 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 1/061 (2013.01)
C07K 1/10 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7012194
- (22) 출원일자(국제) 2018년09월27일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년04월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2018/057498
- (87) 국제공개번호 WO 2019/064220
국제공개일자 2019년04월04일
- (30) 우선권주장
201741034314 2017년09월27일 인도(IN)

- (71) 출원인
바이오콘 리미티드
인도 방갈로어 피.오. 560100 일렉트로닉 시티
제20 케이엠 호수르 로드
- (72) 발명자
라무, 바산사쿠말, 강가
인도, 칼나타카 벤가루루 560004, 케이. 알. 로오
드, 오피피. 카베리 핸드룸스. 아브히나브 풀나
팰리스, #40, 지5
파틸, 니틴, 소판라오
인도, 칼나타카 벤가루루 560034, 코라만갈라 3
블록, 53 살자풀 로오드, 비-211 프로리리아 에스
테이트
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 5 항

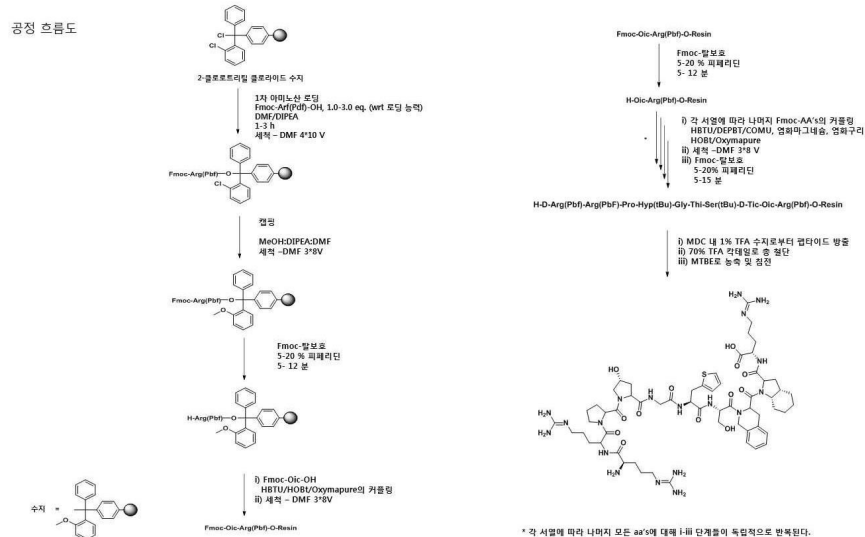
(54) 발명의 명칭 이카티반트의 합성

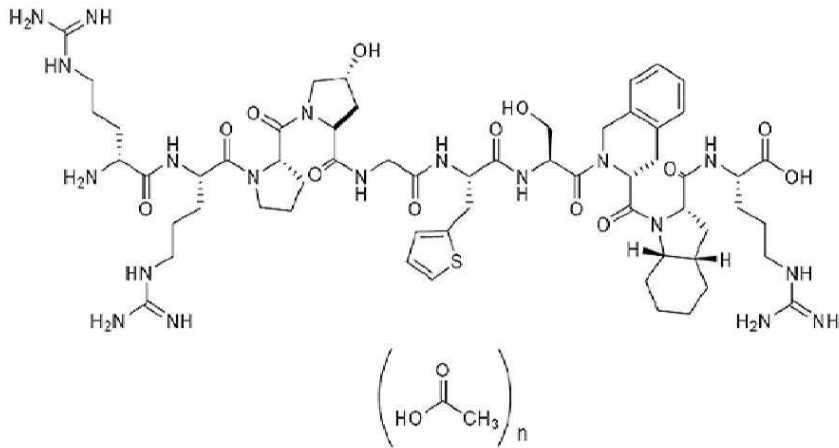
(57) 요약

본 발명은 화학식-I으로 표시되는 이카티반트의 효율적인 고상(solid-phase) 합성에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

대표도





화학식-I

본 발명은 고상 접근을 차용한 순차적 커플링에 의한 이카티반트의 효율적인 제조 방법에 관한 것이다. 이는 이카티반트를 제조하기 위한 보호된 아미노산의 순차적 커플링을 포함한다. 본 발명은 또한 커플링 동안 무기염의 사용을 포함하고, Fmoc-기의 탈보호 후 피페리딘을 확실하게 제거하기 위해 DMF 용액 내 HOBt로 세척하고, 반응이 완료되도록 하고 따라서 추가/결실 서열을 피하고 또한 공정 수율을 개선한다.

(52) CPC특허분류

C07K 1/126 (2013.01)

C07K 1/14 (2013.01)

C07K 7/06 (2013.01)

(72) 발명자

팔레, 벤카타, 라가벤드라찰유루

인도, 테란아나 하이데라바드 500049, 미야폴, 마
디나구다, 미스리 나갈 194/에이

요계사

인도, 칼나타카 마가디 타운 562120, 라마나가람
디스트릭트, 라야빠 갈리 #24

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는 이카티반트의 제조 공정.

- a) 수지 고상(solid-phase) 지지체에 아르기닌 (Pbf)-OH의 로딩.
- b) 미반응 기능 부위의 캡핑.
- c) 커플링제 및 무기염의 존재 하에, 이카티반트를 제조하기 위한 측쇄 보호된 아미노산의 순차적 커플링.
- d) 미가공 이카티반트는 수지로부터 보호기 제거 및 펩타이드 절단에 의해 수득된다.
- e) 선택적으로 미정제 아카티반트 정제.

청구항 2

제1항에 있어서,

하기 단계를 포함하는, 이카티반트의 제조 공정.

- a) 커플링제의 존재 하에 수지 고상 지지체에 아르기닌 (Pbf)의 로딩.
- b) 커플링제, 옥시마퓨어(oxymapure) 및 무기염의 존재 하에, 이카티반트를 제조하기 위한 측쇄 보호된 아미노산의 순차적 커플링.
- c) 미가공 이카티반트는 수지로부터 보호기 제거 및 펩타이드 절단에 의해 수득된다.
- d) 선택적으로 미가공 아카티반트 정제.

청구항 3

상기 청구항들에 있어서, 커플링제는 HBTU, COMU, DEPBT 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 것인, 이카티반트의 제조 공정.

청구항 4

상기 청구항들에 있어서, 커플링 첨가제는 옥시마퓨어, HOBt 또는 이들의 임의의 조합으로부터 선택되는 것인, 이카티반트의 제조 공정.

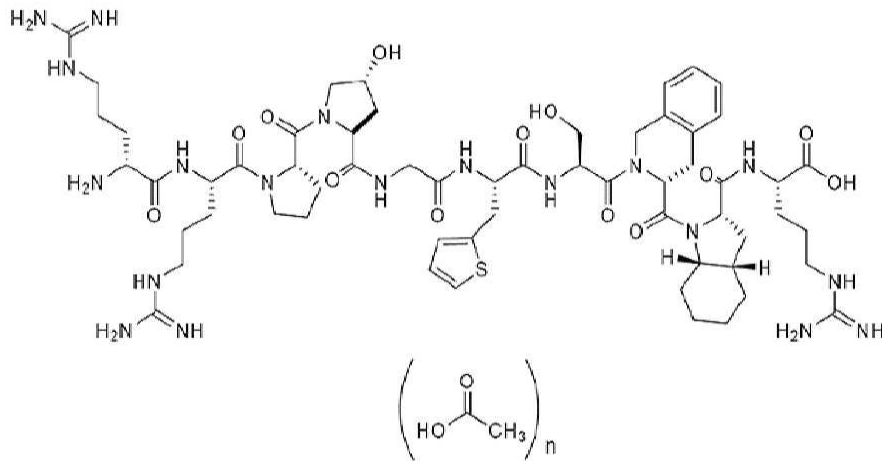
청구항 5

보호기의 탈보호에 이어 DMF 내 0.01 -0.5 M HOBt로 세척 및 TFA: MDC: 페놀: m-크레졸: TIS: H₂O를 사용하여 수지로부터의 총 절단을 포함하는, 이카티반트 제조 공정.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 화학식-I으로 표시되는 이카티반트의 효율적인 고상 합성에 관한 것이다.



화학식-I

[0002]

[0003] 이카티반트 (FIRAZYR ®)는 18세 이상의 성인에서 유전성 혈관부종(hereditary angioedema, HAE)의 급성발작 치료에 적응된다.

배경 기술

[0004]

이카티반트는 유사한 친화도를 가지는 브래디키닌(bradykinin) B2 수용체 선택적인 경쟁적 길항제이다. 유전성 혈관부종은 인자 XII/칼리크레인(kallikrein) 단백질 분해 캐스케이드의 주요 조절제인 C1-에스테라아제(esterase)-억제제의 결핍 또는 기능장애로 인해 발생하며, 이는 브래디키닌의 생성으로 이어진다. 브래디키닌은 국소 종창, 염증 및 통증을 특징으로 하는 HAE 증상에 대한 원인으로 생각되는 혈관확장제이다. 이카티반트는 브래디키닌이 B2 수용체에 결합하는 것을 억제함으로써 HAE의 급성, 유발적 발작의 임상 증상을 치료한다. FIRAZYR ® (이카티반트)는 5가지 비-단백질성 아미노산이 있는 합성 테카펩타이드이다.

[0005]

Shire Orphan Therapies에 의해 개발된 이카티반트 (FIRAZYR ®)는 2011년 미국에서 피하 주사로 최초 승인을 받았다.

[0006]

US 5,648,333 B1은 이카티반트 및 그의 제조 공정을 개시한다.

[0007]

CN102532267은 상이한 아미노산 커플링을 위해 상이한 커플링제를 사용하는 CTC 수지를 이용한 이카티반트 제조 공정을 개시한다.

[0008]

CN103992383은 Boc-D-Arg-OH.2HCl의 액상 합성에 이어 왕(Wang) 수지를 이용한 고상 합성에 의한 나머지 단편들의 커플링이 이어지는 이카티반트의 제조 공정을 개시한다.

[0009]

CN104072585는 고체 지지체로서 왕(Wang) 수지 또는 p-하이드록시메틸페녹시메틸스티렌 수지로 아미노산의 순차적 커플링을 이용한 이카티반트의 제조 공정을 개시한다.

[0010]

W02016157177은 촉매제로서 생물학적으로 적합한 3차 아민 니코틴아미드의 존재 하에 이카티반트의 제조 공정을 개시한다.

[0011]

5473/CHE/2014는 왕(Wang) 수지 상에 아미노산의 순차적 커플링을 이용한 이카티반트의 제조 공정을 개시한다.

[0012]

이카티반트를 제조를 위한 종래의 공정은 단점을 가진다. 이 방법은 복잡한 기술과 높은 비용으로 이카티반트의 대규모 생산에는 적합하지 않다; 따라서, 이 공정은 상업적으로 실행 가능하지 않거나 실행에 문제가 지속된다.

[0013]

고상 합성 동안, 펩타이드 집합체의 견고한 경향이 관찰되었다. 이는 다음과 같은 이유 때문이다:

[0014]

증가하는 펩타이드 서열은 구조의 β-시트 종류를 형성하기 쉬우며, 이는 펩티딜 수지의 붕괴를 초래한다; 이러한 조건에서, 펩티딜 수지 내로의 시약 분산이 제한되고, 커플링 및 탈보호 반응은 느리고 불완전할 것이고, 그로 인해 결실/추가가 생기고, 라세미화 펩타이드 불순물 정제에 어려움 및 낮은 수율을 초래한다. 따라서, 반복

되는 번거롭고 긴 정제 단계를 피함으로써 높은 수율, 확장성, 비용 효율적, 환경 친화적이고 상업적 실행 가능한 이카티반트의 효율적인 제조 공정을 제공할 필요가 남아있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 발명의 목적은 서열 내 각 아미노산을 따라 무기 염, 신규하고 효율적인 커플링 조건, 탈보호 및 세척 조건의 도움으로 화학식 -I의 이카티반트의 제조를 위해 단순한, 견고한 그리고 상업적으로 실행 가능한 순차적 공정을 개발하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 실시에는 다음 단계에 따른 이카티반트의 제조를 위한 합성 공정을 포함한다:

[0017] A) 커플링제의 존재 하에서 수지 고상 지지체에 아르기닌의 로딩

[0018] B) 미반응 기능적 부위의 캡핑

[0019] C) 커플링제 및 무기염의 존재 하에, 이카티반트의 골격을 제조하기 위한 측쇄 보호 아미노산의 순차적 커플링

[0020] D) 천연 이카티반트는 수지로부터 보호기 제거 및 펩타이드 절단에 의해 수득된다.

[0021] E) 천연 이카티반트의 정제

[0022] 공정에 대한 개략적인 설명은 도-1에 나타난 바와 같다.

[0023] 사용된 접근법은 순차적 접근에 의한 이카티반트의 고상 펩타이드 합성이며, 정규적(regular) 커플링제 및 첨가제와 함께 커플링을 하는 동안 무기염을 포함한다. 상기 방법은 커플링 및 탈보호 반응의 완료 및 라세미화의 감소를 제공하여 표적 분자에 매우 가까운 이성질체 불순물을 제어해 펩타이드의 정제 과정을 용이하게 한다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1: 본 발명에 따른 이카티반트 (화학식-I)의 고상 합성 방법에 대한 흐름도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 고상(solid-phase) 접근법을 이용하여 개별 아미노산의 순차적 커플링을 통한 이카티반트의 효율적인 제조 공정에 관한 것이다. 본 발명에서 채용한 접근법은 고체 지지체로 2-염화 클로로트리틸(2-chlorotrityl chloride)을 사용한 고상 매뉴얼 펩타이드 합성으로서, Fmoc-/tBu 접근 및 위치 특이적 효율적인 커플링제 및 커플링 동안 정규적 커플링제 및 첨가제로 사용되는 무기염을 포함한다. 그리고 15 - 20% 피페리딘을 사용하여 Fmoc-기의 탈보호 후, 피페리딘을 확실하게 제거하기 위해 본래의 DMF 대신 0.01- 0.5 M HOBt/DMF로 펩타이드 수지를 세척하였고, 이는 삼입 불순물을 피하는데 유리하다. 완전한 합성은 순차적 접근을 통해 달성된다. 상기 방법은 커플링 및 탈보호 반응의 완료 및 라세미화의 감소를 제공하고 표적 분자에 매우 가까운 이성질체 불순물을 제어하여 펩타이드의 정제 공정을 용이하게 한다.

[0026] **약어**

[0027] ACN: 아세토니트릴 (Acetonitrile)

[0028] Boc: *tert*-부틸옥시카보닐 (*tert*-Butyloxycarbonyl)

[0029] COMU: 1-시아노-2-에톡시-2-옥소에틸이덴아미노옥시)디메틸아미노-몰포리노-카르베늄 헥사플루오로포스페이트 (1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate)

[0030] CuCl₂: 염화구리 (Copper chloride)

[0031] DEPBT: 3-(디에톡시포스포릴옥시)-1,2,3-벤조트리아진-4(3H)-온 (3-(Diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one)

[0032] DIC: *N,N'*-디이소프로필카보디이미드 (*N,N'*-diisopropylcarbodiimide)

- [0033] DMAP: 디메틸아미노 피리딘 (Dimethylamino pyridine)
- [0034] DMF: *N,N'*-디메틸포름아마이드 (*N,N'*-Dimethylformamide)
- [0035] DIPEA: 디이소프로필에틸아민 (Diisopropylethylamine)
- [0036] Fmoc: 9-fluorenylmethoxycarbonyl (9-플루오레닐메톡시카보닐)
- [0037] HBTU: 0-벤조트리아아졸-*N,N,N',N'*-테트라메틸 우로늄 헥사플루오로포스페이트 (0-Benzotriazole-*N,N,N',N'*-tetramethyl uronium hexafluorophosphate)
- [0038] HOBt: *N*-하이드록시벤조트리아아졸 (*N*-Hydroxybenzotriazole)
- [0039] HFIP: 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로-2-프로판올 (1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol)
- [0040] Mtt: 메틸트리틸 (Methyltrityl)
- [0041] MeOH: 메탄올 (Methanol)
- [0042] MgCl₂: 염화마그네슘 (Magnesium Chloride)
- [0043] NMM: *N*-메틸모르폴린 (*N*-methylmorpholine)
- [0044] NMP: *N*-메틸-2-피롤리돈 (*N*-Methyl-2-pyrrolidone)
- [0045] TES: 트리에틸실란 (Triethylsilane)
- [0046] TFE: 트리플루오로에탄올 (Trifluoroethanol)
- [0047] TFA: 트리플루오로아세트산 (Trifluoroacetic acid)
- [0048] Pbf: 2,2,4,6,7-펜타메틸디하이드로벤조퓨란 (2,2,4,6,7-Pentamethyl-dihydrobenzofurane)
- [0049] RT: 실온
- [0050] ^tBu: *tert*-부틸 (*tert*-Butyl)
- [0051] TIS: 트리아이소프로필 실란 (Triisopropyl Silane)
- [0052] Trt: 트리틸(Trityl)
- [0053] TMP: 2,4,6-트리메틸피리딘 (2,4,6-Trimethylpyridine)
- [0054] 본 발명은 하기 실시예로 나타내어진다. 이들 실시예는 단지 예시를 위한 것으로 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0055] **실시예 1:** 치환을 가진 CTC 수지 (10 g) 1.22 mmol/g를 고상 펩타이드 합성 용기에 넣었다. 수지의 팽윤은 DMF (80-100 mL)에서 1시간 동안 수행되고 배출되었다. Fmoc-Arg(Pbf)-OH (7.9g, 1.0 eq.)를 DMF (80-100 mL)에 용해시키고 팽윤된 수지에 첨가하였다. DIPEA, NMM, 및 TMP (2.0-4.0 eq.), 바람직하게 DIPEA를 교반 하에서 첨가하였다. 실온에서 2-3시간 동안 계속 교반하고 반응 혼합물을 배출시켰다. 수지를 DMF (80-100 mL)로 세척하였다. 첫번째 아미노산 로딩 추정을 수행하였고 이는 0.61 mmol/g로 밝혀졌다. 수지의 미반응 부위의 캡핑은 DMF (86 mL) 내 메탄올(10%), DIPEA(4%)를 사용하여 수행되었다. 수지를 DMF (80-100 mL*3)로 세척하였다. Fmoc의 디블로킹은 5 - 15분의 기간 동안 DMF에서 5-20% 피페리딘으로 수지를 2회 처리함으로써 수행되었다. DMF (100mL *2) 중 0.01 - 0.5 M HOBt 용액에 이어서 DMF (80-100mL *2)로 수지를 세척하였다.
- [0056] Fmoc-Oic-OH (2.0-4.0 eq.) 및 HOBt (2.0-4.0 eq.)를 DMF (80-100 mL)에 용해시키고 반응 용기에 첨가하였다. 반응물을 교반하고 DMF(20 mL)에 용해된 HBTU (2.0-4.0 eq.)를 첨가하였다. DIPEA (4.0-6.0 eq)를 첨가하고 질소 대기 하에서 1.0 - 2.0 시간 동안 위 물질을 교반하였다. Kaiser 테스트를 통해 커플링의 완료를 모니터링하였다. 커플링 완료 후, 수지를 DMF (80-100 mL*3)로 세척하고 Fmoc의 디블로킹을 위해 취하였다. 서열 내 아미노산 커플링의 나머지는 HBTU/HOBt를 사용하여 수행되었다. Fmoc의 서열 탈보호에 따라 모든 아미노산의 커플링이 수행된 후, 펩티드 수지를 DMF, DCM, 메탄올 및 MTBE로 세척하였다. 각 세척은 3분 동안 2회 수행되었다. 펩티드 수지는 전체 절단을 위해 건조되고 취해졌다. 펩티드 수지 (30g)는 실온에서 90 : 5 : 5 비율의 TFA: TIS : 물로 처리되었다. 3시간 동안 교반하고, 여과한 후 여과액의 부피를 절반으로 농축시키고 MTBE를 사용하여 고

체를 분리하였다. 분리된 미가공 펩타이드 (14.4g)의 순도는 68.69%이다. 0.88 RRT 불순물은 3.55%, 0.97 RRT 불순물은 1.46% 이고 1.09 RRT 불순물은 0.15% 였다.

[0057] **실시예 2:** 펩타이드의 합성은 실시예 1과 유사하게 수행되었지만, 모든 커플링 및 탈보호는 약 38 ° C에서 수행되었다. 모든 절단 또한 실시예 1과 유사하게 수행되었고, 순도 67.08%의 미가공 펩타이드를 결과로 하였다. 0.88 RRT 불순물은 4.51%, 0.97 RRT 불순물은 2.61 % 및 1.09 RRT 불순물은 0.80% 였다.

[0058] **실시예 3:** 펩타이드의 합성은 실시예 1과 유사하게 수행되었다. 아미노산들의 커플링 반응 특히 Fmoc-Oic-OH, Fmoc-D-Tic-OH, Fmoc-Thi-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Hyp (tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH는 DIPEA 및 염화구리(II)/염화 마그네슘의 촉매량 존재 하에 HBTU/HOBt를 사용하여 수행되었다. 그리고, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH 및 Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH의 커플링 반응은 DIPEA, NMM, TMP 바람직하게는 DIPEA 및 염화구리(II)/염화 마그네슘의 촉매량 존재 하에 DEPBT/ 옥시마퓨어(Oxymapure)를 사용하여 수행되었다. 서열에 따른 모든 아미노산의 커플링 이후, Fmoc-기의 탈블록킹이 수행되었고, 펩티딜 수지는 DMF, DCM, 메탄올 및 MTBE로 세척되었다. 각 세척은 3분 주기로 2회 수행되었다. 펩티딜 수지는 전체 절단을 위해 건조되고 취해졌다. 펩티딜 수지 (30g)는 실온에서 90:5:5 비율의 TFA: TIS : 물로 처리되었다. 3시간 동안 교반하고, 여과한 후 여과액의 부피를 절반으로 농축시키고 MTBE를 사용하여 고체를 분리한 후 진공에서 건조시켰다. 순도: 72.38%, 0.88 RRT 불순물은 0.26% 였다.

[0059] **실시예 4:** 펩타이드의 합성은 실시예 3과 유사하게 수행되었다. 서열이 완료되면, 보호된 펩타이드는 MDC 내 1% TFA를 사용하여 수지로부터 방출되었다. 펩티딜 수지 (12 g)는 MDC (120 mL*12 세척)내 1% TFA로 처리되었다. 각 세척은 5분 주기로 수행되었다. 합쳐진 세척물은 모아지고 건조물로 농축되었다. 수득된 잔류물은 실온에서 3시간 동안 70:10:10:5:5 비율의 TFA: MDC: 페놀: m- 크레졸 : TIS 칵테일 (120 mL)로 처리되었다. 미가공 펩타이드 (5.6 g)는 MTBE를 사용하여 분리되었다. 순도는 약 77.92% , 0.88 RRT 불순물은 0.17% 였다.

[0060] **실시예 5:** 펩타이드의 합성은 실시예 1과 유사하게 수행되었다. 아미노산들의 커플링 반응 특히 Fmoc-Oic-OH, Fmoc-D-Tic-OH, Fmoc-Thi-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Hyp(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 및 Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH는 DIPEA 및 염화구리(II)/염화 마그네슘의 촉매량 존재 하에 HBTU/HOBt를 사용하여 수행되었다. 그리고, Fmoc-Ser(tBu)-OH 커플링은 DIPEA, NMM, TMP 바람직하게 DIPEA 및 염화구리(II)/염화 마그네슘의 촉매량의 존재 하에 DIC/HOBt를 사용하여 수행되었다. 서열에 따른 모든 아미노산의 커플링 이후, Fmoc-기의 탈블록킹이 수행되었고, 펩티딜 수지는 DMF, DCM, 메탄올 및 MTBE로 세척되었다. 각 세척은 3분 주기로 2회 수행되었다. 상기 펩티딜 수지는 건조되고 절단을 위해 MDC 내 1% TFA를 사용하여 취해졌다. 펩티딜 수지 (12g)는 MDC (120mL *12 세척) 내 1% TFA로 처리되었다. 각 세척은 5분 주기로 수행되었다. 합쳐진 여과액은 건조물로 농축되고 70:10:10:5:5 비율의 TFA: MDC: 페놀: m-크레졸: TIS 칵테일 (120 mL)로 3시간 동안 실온에서 처리되었다. 미가공 펩타이드는 MTBE를 사용하여 분리되었다. 순도: 64.97%, 0.88 RRT 불순물은 0.97% 였다.

[0061] **실시예 6:** 펩타이드의 합성은 실시예 1과 유사하게 수행되었다. 아미노산들의 커플링 반응 특히 Fmoc-Oic-OH, Fmoc-D-Tic-OH, Fmoc-Thi-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Hyp(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 및 Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH는 DIPEA 및 염화구리(II)/염화 마그네슘의 촉매량 존재 하에 HBTU/HOBt를 사용하여 수행되었다. 그리고, Fmoc-Ser(tBu)-OH 커플링은 DIPEA, NMM, TMP 바람직하게 DIPEA 및 염화구리(II)/염화 마그네슘의 촉매량의 존재 하에 HATU/HOBt를 사용하여 수행되었다. 서열에 따른 모든 아미노산의 커플링 이후, Fmoc-기의 탈블록킹이 수행되었고, 펩티딜 수지는 DMF, DCM, 메탄올 및 MTBE로 세척되었다. 각 세척은 3분 주기로 2회 수행되었다. 상기 펩티딜 수지는 건조되고 절단을 위해 MDC 내 1% TFA를 사용하여 취해졌다. 펩티딜 수지 (12g)는 MDC (120mL *12 세척) 내 1% TFA로 처리되었다. 각 세척은 5분 주기로 수행되었다. 합쳐진 여과액은 건조물로 농축되고 70:10:10:5:5 비율의 TFA: MDC: 페놀: m-크레졸: TIS 칵테일 (120 mL)로 3시간 동안 실온에서 처리되었다. 미가공 펩타이드는 MTBE를 사용하여 분리되었다. 순도: 74.54%, 0.88 RRT 불순물은 1.55% 였다.

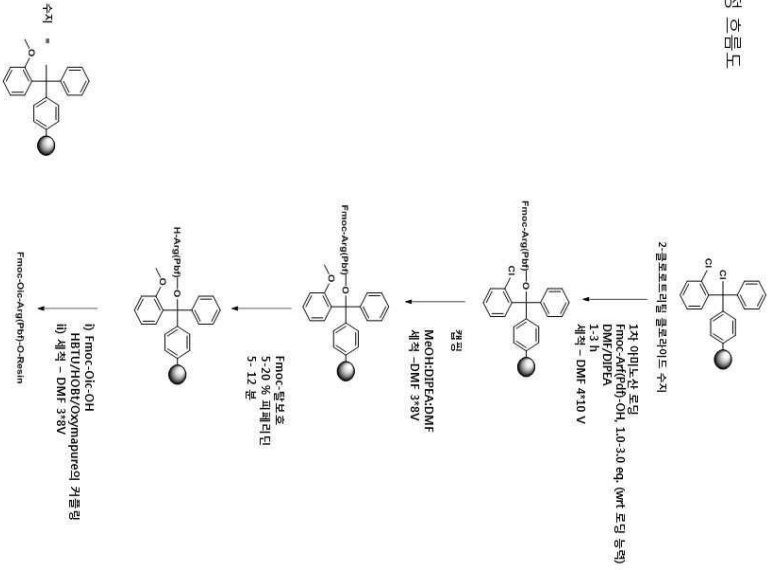
[0062] **실시예 7:** 펩타이드의 합성은 실시예 1과 유사하게 수행되었다. 아미노산들의 커플링 반응 특히 Fmoc-Oic-OH, Fmoc-D-Tic-OH, Fmoc-Thi-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Hyp(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 및 Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH는 DIPEA 및 염화구리(II)/염화 마그네슘의 촉매량 존재 하에 HBTU/HOBt/Oxymapure를 사용하여 수행되었다. 그리고, Fmoc-Ser(tBu)-OH 커플링은 DIPEA, NMM, TMP 바람직하게 DIPEA 및 염화구리(II)/염화 마그네슘의 촉매량의 존재 하에 PyBOP/HOBt/Oxymapure를 사용하여 수행되었다. 서열에 따른 모든 아미노산의 커플링 이후, Fmoc-기의 탈블록킹이 수행되었고, 펩티딜 수지는 DMF, DCM, 메탄올 및 MTBE로 세척되었다. 각 세척은 3분 주기로 2회 수행되었다. 상기 펩티딜 수지는 건조되고 절단을 위해 MDC 내 1% TFA를 사용하여 취해졌다. 펩티딜 수지 (12g)는 MDC (120mL *12 세척) 내 1% TFA로 처리되었다. 각 세척은 5분 주기로 수행되었다. 합쳐진

여과액은 건조물로 농축되고 70:10:10:5:5 비율의 TFA: MDC: 페놀: m-크레졸: TIS 각테일 (120 mL)로 3시간 동안 실온에서 처리되었다. 미가공 펩타이드는 MTBE를 사용하여 분리되었다.

[0063] **실시예 8:** 펩타이드의 합성은 실시예 1과 유사하게 수행되었다. 아미노산들의 커플링 반응 특히 Fmoc-Oic-OH, Fmoc-D-Tic-OH, Fmoc-Thi-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Hyp(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 및 Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH는 DIPEA 및 염화구리(II)/염화 마그네슘의 촉매량 존재 하에 HBTU/HOBt를 사용하여 수행되었다. 그리고, Fmoc-Ser(tBu)-OH 커플링은 DIPEA, NMM, TMP 바람직하게 DIPEA 및 염화구리(II)/염화 마그네슘의 촉매량의 존재 하에 COMU/Oxymapure를 사용하여 수행되었다. 서열에 따른 모든 아미노산의 커플링 이후, Fmoc-기의 탈블록킹이 수행되었고, 펩티딜 수지는 DMF, DCM, 메탄올 및 MTBE로 세척되었다. 각 세척은 3분 주기로 2회 수행되었다. 상기 펩티딜 수지는 건조되고 절단을 위해 MDC 내 1% TFA를 사용하여 취해졌다. 펩티딜 수지 (12g)는 MDC (120mL *12 세척) 내 1% TFA로 처리되었다. 각 세척은 5분 주기로 수행되었다. 합쳐진 여과액은 건조물로 농축되고 70:10:10:5:5 비율의 TFA: MDC: 페놀: m-크레졸: TIS 각테일 (120 mL)로 3시간 동안 실온에서 처리되었다. 미가공 펩타이드는 MTBE를 사용하여 분리되었다.

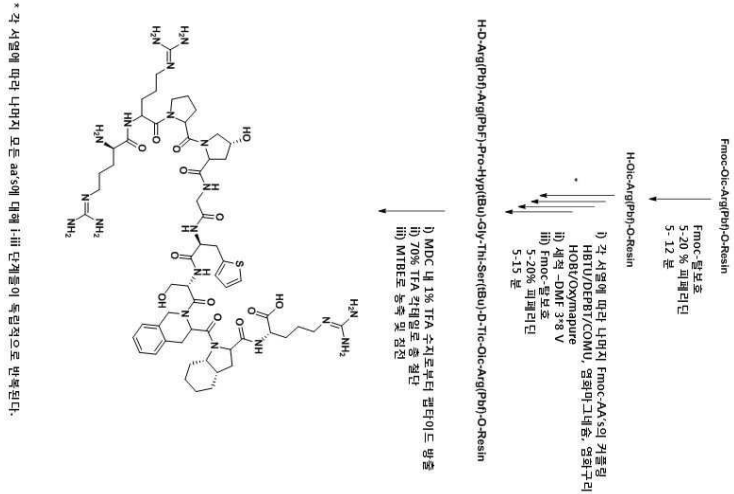
[0064] **실시예 9:** 펩타이드의 합성은 35mmol 규모로 실시예 1과 유사하게 수행되었다. 모든 아미노산의 커플링은 DIPEA 및 염화구리(II)/염화 마그네슘의 촉매량 존재 하에 HBTU/Oxymapure를 사용하여 수행되었고, 서열이 완료에 따라 펩티딜 수지는 DMF, DCM, 메탄올 및 MTBE로 세척되고, 펩티딜 수지는 진공 하에 건조되고 MDC 내 1% TFA를 사용하여 보호된 펩타이드가 방출되었다. 펩티딜 수지 (130g)는 MDC 내 1% TFA로 처리되었다 (1.3 L * 15 세척). 각 세척은 5분 주기로 수행되었다. 합쳐진 여과액은 건조물로 농축되고 70:10:5:5:5:5 비율의 TFA: MDC: 페놀: m-크레졸: TIS: H₂O 각테일로 3시간 동안 실온에서 처리되었다. 미가공 펩타이드는 순도 76.8% 및 68%의 수율로 MTBE를 사용하여 분리되었다.

양정 합성도



도면

도면1



* 각 시열에 따라 나머지 모든 aa's에 대해 1:1 단계들이 독립적으로 반복된다.