



---

(21)申請案號：109146180

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 12 月 25 日

(51)Int. Cl. : **C07K1/06 (2006.01)**

(30)優先權：2019/12/27 日本

2019-238793

(71)申請人：日商中外製藥股份有限公司(日本) CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA  
(JP)

日本

(72)發明人：近藤泰博 KONDO, YASUHIRO (JP)；瀨戶健太郎 SETO, KENTAROU (JP)；小宮志央 KOMIYA, SHIO (JP)；侯增燁 HOU, ZENGYE (CN)；村形政利 MURAKATA, MASATOSHI (JP)

(74)代理人：洪澄文；洪茂

(56)參考文獻：

TW 401421

TW 200626611A

EP 1995254B1

期刊 Shiina et al 4-(Dimethylamino)pyridine N-oxide(DMAPO): an effective nucleophilic catalyst in the peptide coupling reaction with 2-methyl-6-nitrobenzoic anhydride Chem. Asian J. 3.

InterScience 2008 p454-461

審查人員：蔡榮哲

申請專利範圍項數：15 項 圖式數：4 共 106 頁

---

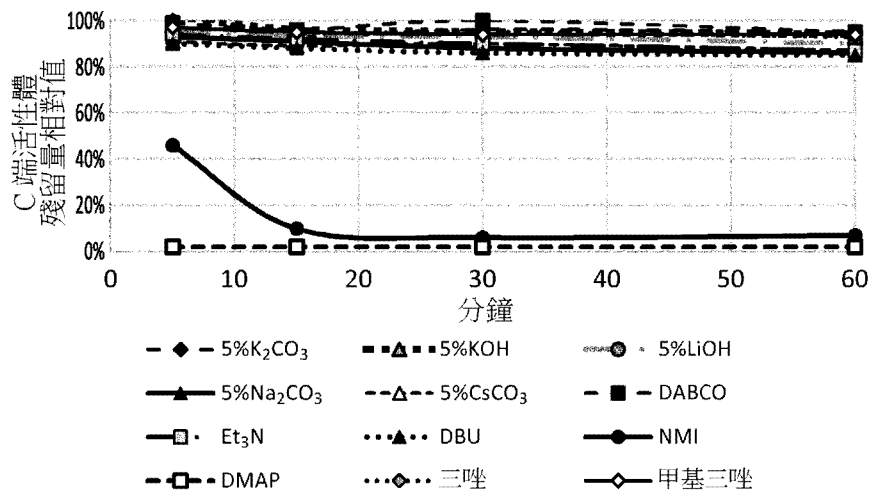
(54)名稱

胜肽化合物的合成法

(57)摘要

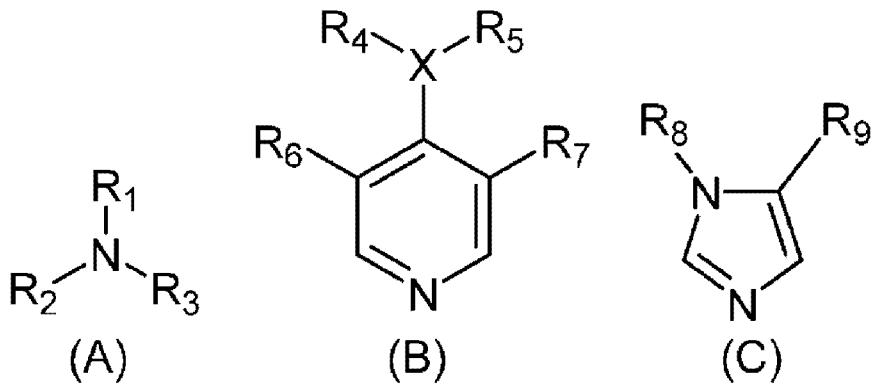
本發明人等了解，在包括使酸成分的 C 端活性體和胺成分縮合的胜肽化合物的合成中，藉由將含有縮合反應後殘留的 C 端活性體的溶液、和三級胺及水或水溶液混合，可去除 C 端活性體。

指定代表圖：



【圖 1】

特徵化學式：





I873263

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 胜肽化合物的合成法

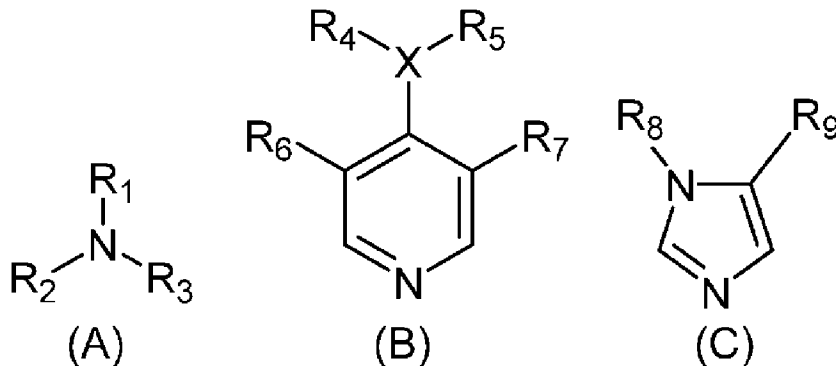
【中文】

本發明人等了解，在包括使酸成分的C端活性體和胺成分縮合的胜肽化合物的合成中，藉由將含有縮合反應後殘留的C端活性體的溶液、和三級胺及水或水溶液混合，可去除C端活性體。

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】



## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 胜肽化合物的合成法

### 【技術領域】

【0001】 本發明關於，有效率地去除在胜肽化合物的合成過程所產生的不期望的C端活性體，而有效率地製造目的胜肽化合物的方法。

### 【先前技術】

【0002】 胜肽的合成，其一形態為，使用使胺基酸或胜肽的C端羧基活化的化合物，以可和胺基酸、胜肽等的胺類反應而形成醯胺鍵。在此情形，當反應結束後的反應溶液中殘留有羧基被活化的化合物時，會造成所生成的胜肽的品質下降的問題。

【0003】 如此的C端被活化的化合物，不僅包含用於胜肽合成反應的使羧基被活化的化合物，也包含該等在反應中，改變為例如吡內酯（azlactone）、NCA（N-羧基酸酐（N-carboxyanhydride））等具有活化狀態、進而可和胺類反應的化合物（之後，這些化合物稱為「C端活性體」）。又，用於胜肽合成反應的C端活性體，不限於例如使用如非專利文獻1或非專利文獻2記載之胜肽縮合劑所合成的活性酯、混合酸酐及醯基異尿素（acylisourea）等，只要能被活化以和胺類反應，可包含任意的化合物。

所生成的胜肽的品質下降之例，已知有因為C端活性體的殘留而導致雜質胜肽的副產物之事，或插入序列的胜肽作為最終產物的雜質而混入之事（專利文獻1、2）。

【0004】 解決此種殘留的C端活性體的問題之方法，已知有以鹼性水處理使活性酯水解，作為對應的胺基酸的鹼性水溶液而去除之方法（專利文獻1）。

然而，此方法必須進行複數次以鹼性水的水解處理，操作繁雜。而且，當鹼性水的處理次數增加，其處理時間增長，推測會引起生成物的差向異構化（epimerization；異構化）等的副反應，損及穩定性。

【0005】 又已知，殘留的C端活性體被N,N-二甲基丙烷-1,3-二胺等的具有一級胺基的多胺捕捉，轉化為鹼性化合物後，以酸性水溶液的水性洗淨，使來自殘留的C端活性體的醯胺化合物移至水層而去除的方法（專利文獻3，非專利文獻3）。但是，一旦使用親核性高的一級胺類，推測目的胜肽的親電子性高的部位和一級胺反應，產生形成共價鍵結的雜質，因此不適合於高純度的胜肽合成。

【0006】 又已知，使殘留的C端活性體和含有具保護基的潛在陰離子的胺的捕捉劑反應，轉化為醯胺化合物而去除之方法（專利文獻2）。然而，此方法由於形成醯胺化合物後，經過水性萃取階段，進行氫解後，必須再次經過水性萃取階段，因此操作繁雜。

【0007】 又當C端活性體殘留時，使所生成的胜肽的N端的保護基脫保護時，也會同時發生該C端活性體的N端保護基的脫保護。殘留的C端活性體的脫保護體是雜質，但是在吸光係數小的情形難以用廣用的HPLC檢出，因此品質管理上較不佳。

〔先前技術文獻〕

〔專利文獻〕

【0008】 專利文獻1：日本專利第5171613號公報

專利文獻2：日本專利第4142907號公報

專利文獻3：日本專利第5212371號公報

〔非專利文獻〕

【0009】 非專利文獻1：Chem. Rev., 2011, 111, 6557.

第 2 頁，共 89 頁(發明說明書)

非專利文獻2：Organic Process Research & Development, 2016, 20, 140.

非專利文獻3：Tetrahedron Lett., 1974, 15, 1785.

### 【發明內容】

〔發明欲解決之課題〕

【0010】 本發明為鑑於如此之狀況而成者，在一方面，以在胜肽化合物的合成中，有效率地去除殘留的C端活性體為課題。

〔為解決課題之手段〕

【0011】 本發明人等了解，在包含使酸成分的C端活性體和胺成分縮合的胜肽化合物的合成中，透過和三級胺作用，可以去除反應混合液中殘留的C端活性體的方法。

【0012】 本發明，在非限定的具體一態樣中，包含下述者。

〔1〕一種製造胜肽化合物的方法，包括

步驟A：獲得含有使溶劑中酸成分的C端活性體和胺成分縮合而得的胜肽化合物之反應混合液的步驟；以及

步驟B：混合上述反應混合液和三級胺及水或水溶液，去除該C端活性體的步驟。

〔2〕一種製造胜肽化合物的方法，包括

步驟A：獲得含有使溶劑中酸成分的C端活性體和胺成分縮合而得的胜肽化合物之反應混合液的步驟；以及

步驟B：混合上述反應混合液和三級胺及水或水溶液，透過使該三級胺和未反應的C端活性體作用，去除該C端活性體的步驟。

〔3〕如〔1〕或〔2〕記載之方法，其中，酸成分為胺基受保護基保護的第1胺基酸，或N端的胺基受保護基保護的第1胜肽。

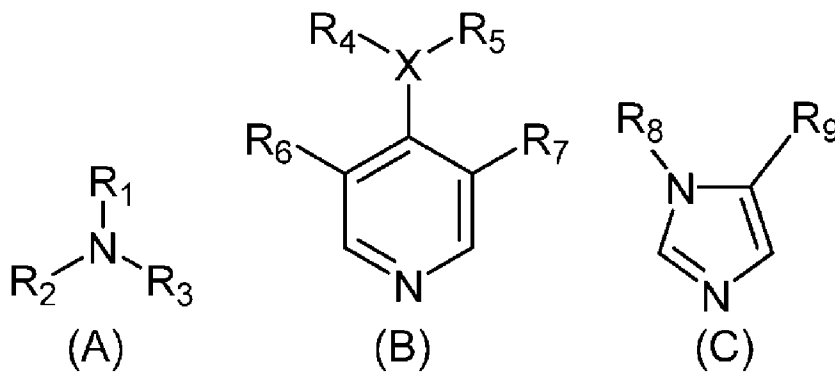
〔4〕如〔1〕～〔3〕任一項記載之方法，其中，胺成分為羧基受保護基保護的第2胺基酸，或C端的羧基受保護基保護的第2胜肽。

〔5〕如〔1〕～〔4〕任一項記載之方法，其中，步驟A在縮合劑存在下進行。

〔6〕如〔1〕～〔5〕任一項記載之方法，其中，該三級胺對該C端活性體具有親核反應性。

〔7〕如〔1〕～〔6〕任一項記載之方法，其中，該三級胺為氮附近的立體障礙小的胺。

〔8〕如〔1〕～〔7〕任一項記載之方法，其中，該三級胺為下式（A）、（B）、或（C）所表示：



式中， $R_1 \sim R_3$ 為，（i） $R_1$ 及 $R_2$ 和該等鍵結的氮原子共同形成5～6員非芳香族雜環，且 $R_3$ 為 $C_1$ - $C_2$ 烷基或 $C_2$ 羥烷基，或者（ii）各自獨立為 $C_1$ - $C_2$ 烷基、或 $C_2$ 羥烷基，

X為N或O，

$R_4$ 及 $R_5$ 各自獨立為 $C_1$ - $C_2$ 烷基、或 $C_2$ 羥烷基，或者和該等鍵結的氮原子共同形成5～6員非芳香族雜環，但是當X為O的情形時， $R_5$ 不存在，

$R_6$ 及 $R_7$ 各自獨立為H、 $C_1$ - $C_2$ 烷基、或甲氧基，

$R_8$ 及 $R_9$ 各自獨立為H、 $C_1$ - $C_2$ 烷基、或 $C_2$ 羥烷基，或者 $R_8$ 鍵結的氮原子和 $R_9$ 鍵結的碳原子共同形成5～6員非芳香族雜環。

〔9〕如〔8〕記載之方法，其中， $R_1 \sim R_3$ 各自獨立為 $C_1-C_2$ 烷基。

〔10〕如〔8〕記載之方法，其中， $X$ 為 $N$ ， $R_4$ 及 $R_5$ 各自獨立為 $C_1-C_2$ 烷基， $R_6$ 及 $R_7$ 為 $H$ 。

〔11〕如〔8〕記載之方法，其中， $R_8$ 及 $R_9$ 各自獨立為 $H$ 或 $C_1-C_2$ 烷基。

〔12〕如〔1〕～〔11〕任一項記載之方法，其中，該三級胺為 $NMI$ 、 $DMAP$ 、或三甲基胺。

〔13〕如〔1〕～〔12〕任一項記載之方法，其中，該胜肽化合物包含1個或複數個非天然胺基酸。

〔14〕如〔1〕～〔13〕任一項記載之方法，其中，使該三級胺和上述 $C$ 端活性體作用時的溫度為 $25^\circ C \sim 60^\circ C$ 。

〔15〕如〔1〕～〔14〕任一項記載之方法，其中，相對於該胺成分，添加該三級胺 $0.5$ 當量以上。

〔16〕如〔1〕～〔15〕任一項記載之方法，其中， $C$ 端活性體殘留率為 $3\%$ 以下。

〔17〕如〔1〕～〔16〕任一項記載之方法，其中，在步驟 $B$ ，更包括使該反應混合液分層為有機層和水層，之後洗淨該有機層，該洗淨後的 $C$ 端活性體的殘留量為 $1.0\%$ 以下。

〔18〕如〔1〕～〔17〕任一項記載之方法，其中，在步驟 $A$ 中的溶劑為甲苯、乙腈、四氫呋喃、 $2$ -甲基四氫呋喃、乙酸異丙酯、乙酸乙酯、甲基 $tert$ -丁基醚、環戊基甲基醚、或 $N,N$ -二甲基甲醯胺、或者其混合溶劑。

〔19〕如〔1〕～〔18〕任一項記載之方法，其中，在步驟 $B$ 中，該水溶液為鹼性水溶液。

〔20〕如〔1〕～〔19〕任一項記載之方法，其中，第 $1$ 胺基酸的側鏈包含 $1$ 個以上的碳原子。

〔21〕如〔20〕記載之方法，其中，該側鏈為可被取代的烷基、可被取代的烯基、可被取代的炔基、可被取代的環烷基、可被取代的烷氧基烷基、可被取代的環烷基烷基、可被取代的芳烷基、或可被取代的雜芳基烷基。

〔22〕如〔1〕～〔21〕任一項記載之方法，其中，該三級胺和該C端活性體作用時的時間為2小時以下。

〔23〕如〔1〕～〔22〕任一項記載之方法，其中，該三級胺和該C端活性體作用時的時間為2分鐘～2小時。

〔24〕如〔1〕～〔23〕任一項記載之方法，其中，該三級胺和該C端活性體作用時的時間為5分鐘～60分鐘。

〔25〕如〔1〕～〔24〕任一項記載之方法，其中，該三級胺和該C端活性體作用時的時間為5分鐘～50分鐘。

〔26〕如〔1〕～〔25〕任一項記載之方法，其中，該C端活性體在縮合劑的存在下形成，該縮合劑包含T3P、HATU、BEP、DMT-MM、EDC和PfpOH的組合、EDC和HOObt的組合、或EDC和HOBt的組合。

〔27〕如〔1〕～〔26〕任一項記載之方法，更包含步驟C：使該胜肽化合物的N端保護基脫保護的步驟。

〔28〕如〔1〕～〔27〕任一項記載之方法，其中，使該C端活性體和該三級胺作用而水解、去除。

〔29〕一種促進C端活性體的水解之方法，包括在含有殘留的C端活性體的溶液追加三級胺及水或水溶液，使該C端活性體和三級胺作用的步驟。

〔30〕一種去除水解物之方法，包括將含有殘留的C端活性體的水解物的溶液水性洗淨的步驟。

〔發明效果〕

【0013】 經由使用本發明之方法，縮合反應後殘留的C端活性體經由1次

第6頁，共89頁(發明說明書)

的水解處理及其之後的水性洗淨，可簡便且短時間地有效率地去除，因此不需柱層析法純化，可純度良好地合成胜肽化合物。

### 【圖式簡單說明】

#### 【0014】

〔圖1〕為顯示C端活性體的殘留量相對值的圖。

〔圖2〕為顯示C端活性體的殘留量相對值的圖。

〔圖3〕為顯示C端活性體的殘留量相對值的圖。

〔圖4〕為顯示C端活性體殘留率的變遷的圖。

### 【實施方式】

〔用以實施發明之形態〕

【0015】 以下說明本揭示之較佳的非限定實施態樣。

【0016】 後述之本實施例所記載所謂的要件（element），不受限於意圖獲得本專利申請案的專利權之國家以限制性解釋實施例記載之內容的專利實務、慣例、法令等的限制，當然被視為在本「為實施發明之形態」中同等記載者而被記載。

【0017】 任意組合本揭示中任何記載之一個或複數個要件（element）的部分或全部者，基於此技術領域之人士之技術常識，只要技術上不矛盾者，也都包含於本揭示，而且為此技術領域之人士當然理解者而被記載。

【0018】 （縮寫）

本說明書中使用的縮寫如下。

胺基酸的縮寫

Aib： $\alpha$ -甲基丙胺酸

Ala：丙胺酸

Arg：精胺酸

Asn：天冬醯胺

Asp：天冬胺酸

Asp (tBu)：O-t-丁基天冬胺酸

Aze：氮雜環丁烷-2-羧酸

Cys：半胱胺酸

Glu：麩胺酸

Gln：麩醯胺酸

Gly：甘胺酸

His：組胺酸

Hph：高苯丙胺酸

Ile：異白胺酸

Leu：白胺酸

Lys：離胺酸

MeAla：N-甲基丙胺酸

MeAsp (tBu)：O-t-丁基天冬胺酸N-甲酯

MeGly：N-甲基甘胺酸

MeIle：N-甲基異白胺酸

MeLeu：N-甲基白胺酸

MePhe：N-甲基苯丙胺酸

MeVal：N-甲基纈胺酸

Met：甲硫胺酸

Phe：苯丙胺酸

Phe-OtBu：O-t-丁基苯丙胺酸

Phe (3-F)：3-氟苯丙胺酸

Pro：脯胺酸

Ser：絲胺酸

Ser (tBu)：O-t-丁基絲胺酸

Thr：蘇胺酸

Thr (tBu)：O-t-丁基-蘇胺酸

Trp：色胺酸

Tyr：酪胺酸

Val：纈胺酸

【0019】 試劑／溶劑的縮寫

BEP：四氟硼酸2-溴-1-乙基吡啶

DABCO：1,4-二氮雜二環〔2.2.2〕辛烷

DBU：1,8-二氮雜二環〔5.4.0〕十一-7-烯

DCM：二氯甲烷

DIPEA：二異丙基二乙胺

DMAP：二甲基胺基吡啶

DMT-MM：4-（4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基）-4-甲基嗎啶鹽酸鹽（4-（4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl）-4-methylmorpholinium chloride）

EDC：1-（3-二甲基胺基丙基）-3-乙基碳二亞胺

HATU：O-（7-氮雜苯并三唑-1-基）-N,N,N',N'-四甲基脲六氟磷酸鹽（O-（7-azabenzotriazol-1-yl）-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate）

HOAt：1-氮雜羥基苯并三唑

HOBt：1-羥基苯并三唑

HOObt : 3,4- 二 氫 -3- 羥 基 -4- 側 氧 基 -1,2,3- 苯 并 三 嗪  
(3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine)

HOSu : N-羥基琥珀醯亞胺

MTBE : 甲基-t-丁基醚

NMI : N-甲基咪唑

NMM : N-甲基嗎啉 (N-methyl morpholine)

T3P : 丙基膦酸酐 (環狀三聚體)

TBAF : 四丁基氟化銨

TsOH : p-甲苯磺酸

**【0020】 官能基的縮寫**

Bn : 苄基

Boc : t-丁氧基羰基

Cbz : 苄氧羰基

Pfp : 五氟苯基

Teoc : 2- (三甲基矽基) 乙氧基羰基

**【0021】 (官能基等的定義)**

本說明書中的「鹵素原子」，例如F、Cl、Br或I。

**【0022】** 本說明書中的「烷基」為從脂肪族烴去除1個任意的氫原子所衍生的1價基，結構骨架中不含有雜原子（指碳及氫原子以外的原子）或不飽和的碳-碳鍵，具有含氫及碳原子的烴基或碳氫化合物基結構的部分集合。烷基不只為直鏈狀，也包含支鏈狀。烷基具體可列舉碳原子數1~20(C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>，以下「C<sub>p</sub>-C<sub>q</sub>」表示碳原子數為p~q個)的烷基，較佳為C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>烷基，更佳為C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基，再更佳為C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>烷基。烷基具體例如甲基、乙基、n-丙基、i-丙基、n-丁基、s-丁基、t-丁基、異丁基(2-甲基丙基)、n-戊基、s-戊基(1-甲基丁基)、t-戊基(1,1-

二甲基丙基)、新戊基(2,2-二甲基丙基)、異戊基(3-甲基丁基)、3-戊基(1-乙基丙基)、1,2-二甲基丙基、2-甲基丁基、n-己基、1,1,2-三甲基丙基、1,2,2-三甲基丙基、1,1,2,2-四甲基丙基、1,1-二甲基丁基、1,2-二甲基丁基、1,3-二甲基丁基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基、1-乙基丁基、2-乙基丁基等。

**【0023】** 本說明書中的「烯基」為具有至少1個雙鍵(2個相鄰 $SP^2$ 碳原子)的一價基。根據雙鍵及取代基(如果存在的話)的配置,雙鍵的幾何學形態可採entgegen (E)或zusammen (Z)、順式或反式配置。烯基不只為直鏈狀,也包含支鏈狀。烯基較佳例如 $C_2$ - $C_{10}$ 烯基,更佳為 $C_2$ - $C_6$ 烯基,具體例如乙烯基、烯丙基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基(包含順式、反式)、3-丁烯基、戊烯基、3-甲基-2-丁烯基、己烯基等。

**【0024】** 本說明書中的「炔基」為具有至少1個三鍵(2個相鄰 $SP$ 碳原子)的一價基。炔基不只為直鏈狀,也包含支鏈狀。炔基較佳例如 $C_2$ - $C_{10}$ 炔基,更佳為 $C_2$ - $C_6$ 炔基,具體例如乙炔、1-丙炔、炔丙基(propargyl)、3-丁炔基、戊炔基、己炔基、3-苯基-2-丙炔基、3-(2'-氟苯基)-2-丙炔基、2-羥基-2-丙炔基、3-(3-氟苯基)-2-丙炔基、3-甲基-(5-苯基)-4-戊炔基等。

**【0025】** 本說明書中的「環烷基」表示飽和或部分飽和的環狀一價脂肪族烴基,包括單環、雙環、螺環。環烷基較佳例如 $C_3$ - $C_8$ 環烷基,具體例如環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基、環辛基、雙環[2.2.1]庚基、螺[3.3]庚基等。

**【0026】** 本說明書中的「芳基」表示一價的芳香族烴環,較佳例如 $C_6$ - $C_{10}$ 芳基。芳基具體例如苯基、萘基(如1-萘基、2-萘基)等。

**【0027】** 本說明書中的「雜環基」表示除碳原子外,還包含1~5個雜原子的非芳香族環狀一價基。雜環基的環中可具有雙鍵及或三鍵,也可使環中的碳

原子氧化形成羰基，也可為單環也可為縮合環。構成環的原子數較佳為4~10（4~10員雜環基），更佳為4~7（4~7員雜環基）。雜環基具體例如氮雜環丁基（azetidinyI）、環氧乙基（oxiranyI）、氧雜環丁基（oxetanyI）、氮雜環丁基、二氫呋喃基（dihydrofuryI）、四氫呋喃基、二氫吡喃基（dihydropyranI）、四氫吡喃基、四氫吡啶基（tetrahydropyridyl）、四氫嘧啶基（tetrahydropyrimidyl）、嗎啉基（morpholinyl）、硫代嗎啉基（thiomorpholinyl）、吡咯啶基（pyrrolidinyl）、哌啶基（piperidinyl）、哌嗪基（piperazinyl）、吡唑啶基（pyrazolidinyl）、咪唑基（imidazolyl）、咪唑啶基（imidazolidinyl）、噁唑啶基（oxazolidinyl）、異噁唑啶基（isoxazolidinyl）、噻唑啶基（thiazolidinyl）、異噻唑啶基（isothiazolidinyl）、1,2-噻嗪（1,2-thiazinane）、噻二唑基（thiadiazolidinyl）、氮雜環丁基、噁唑啶酮（oxazolidone）、苯并二噁烷基（benzodioxanyl）、苯并噁唑基（benzoxazolyl）、二氧戊環基（dioxolanyl）、二噁烷基（dioxanyl）、四氫吡咯并〔1,2-c〕咪唑（tetrahydropyrrolo〔1,2-c〕imidazole）、硫雜環丁基（thietanyl）、3,6-二氮雜二環〔3.1.1〕庚基（3,6-diazabicyclo〔3.1.1〕heptanyl）、2,5-二氮雜二環〔2.2.1〕庚基（2,5-diazabicyclo〔2.2.1〕heptanyl）、3-氧雜-8-氮雜二環〔3.2.1〕辛基（3-oxa-8-azabicyclo〔3.2.1〕octanyl）、磺內醯胺（sultam）、2-氧雜螺〔3.3〕庚基（2-oxaspiro〔3.3〕heptyl）等。

**【0028】** 本說明書中的「雜芳基」表示除碳原子外，還包含1~5個雜原子的芳香族性的環狀一價基。環可以是單環，也可以是和其他環的縮合環，也可以部分飽和。構成環的原子數較佳為5~10（5~10員雜芳基），更佳為5~7（5~7員雜芳基）。雜芳基具體例如呋喃基（furyl）、噻吩基（thienyl）、吡咯基（pyrrolyl）、咪唑基（imidazolyl）、吡唑基（pyrazolyl）、噻唑基（thiazolyl）、異噻唑基（isothiazolyl）、噁唑基（oxazolyl）、異噁唑基（isoxazolyl）、噁二唑基（oxadiazolyl）、噻二唑基（thiadiazolyl）、三唑基（triazolyl）、四唑基

(tetrazolyl)、吡啶基(pyridyl)、嘧啶基(pyrimidyl)、嗒嗒基(pyridazinyl)、吡嗒基(pyrazinyl)、三嗒基(triazinyl)、苯并呋喃基(benzofuranyl)、苯并噻吩基(benzothieryl)、苯并噻二唑基(benzothiadiazolyl)、苯并噻唑基(benzothiazolyl)、苯并噁唑基(benzoxazolyl)、苯并噁二唑基(benzoxadiazolyl)、苯并咪唑基(benzoimidazolyl)、吲哚基(indolyl)、異吲哚基(isoindolyl)、吲唑基(indazolyl)、喹啉基(quinolyl)、異喹啉基(isoquinolyl)、辛啉基(cinnolyl)、喹唑啉基(quinazolyl)、喹噁啉基(quinoxalyl)、苯并1,3-二氧呢基(benzodioxolyl)、吲哚嗒基(indolizyl)、咪唑并吡啶基(imidazopyridyl)等。

**【0029】** 本說明書中的「烷氧基」表示上述定義的「烷基」鍵結的氧基，較佳例如C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基。烷氧基例如甲氧基、乙氧基、1-丙氧基、2-丙氧基、n-丁氧基、i-丁氧基、s-丁氧基、t-丁氧基、戊氧基、3-甲基丁氧基等。

**【0030】** 本說明書中的「烯氧基」表示上述定義的「烯基」鍵結的氧基，較佳例如C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>烯氧基。烯氧基具體例如乙烯氧基、烯丙氧基、1-丙烯氧基、2-丙烯氧基、1-丁烯氧基、2-丁烯氧基(包含順式、反式)、3-丁烯氧基、戊烯氧基、己烯氧基等。

**【0031】** 本說明書中的「環烷氧基」表示上述定義的「環烷基」鍵結的氧基，較佳例如C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>環烷氧基。環烷氧基具體例如環丙氧基、環丁氧基、環戊氧基等。

**【0032】** 本說明書中的「芳氧基」表示上述定義的「芳基」鍵結的氧基，較佳例如C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳氧基。芳氧基具體例如苯氧基、1-萘氧基、2-萘氧基等。

**【0033】** 本說明書中的「胺基」狹義表示-NH<sub>2</sub>，廣義表示-NRR'，此處R及R'獨立選自氫、烷基、烯基、炔基、環烷基、雜環基、芳基、或雜芳基，或者R及R'和該等鍵結的氮原子共同形成環。胺基較佳例如-NH<sub>2</sub>、單C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基胺基、

二C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基胺基、4~8員環狀胺基等。

【0034】 本說明書中的「單烷基胺基」表示上述定義的「胺基」之中，R為氫，且R'為上述定義的「烷基」之基，較佳例如單C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基胺基。單烷基胺基具體例如甲基胺基、乙基胺基、n-丙基胺基、i-丙基胺基、n-丁基胺基、s-丁基胺基、t-丁基胺基等。

【0035】 本說明書中的「二烷基胺基」表示上述定義的「胺基」之中，R及R'獨立表示上述定義的「烷基」之基，較佳例如二C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基胺基。二烷基胺基具體例如二甲基胺基、二乙基胺基等。

【0036】 本說明書中的「環狀胺基」表示上述定義的「胺基」之中，R及R'和該等鍵結的氮原子共同形成環之基，較佳例如4~8員環狀胺基。環狀胺基具體例如1-氮雜環丁基、1-吡咯啉基、1-哌啉基、1-哌嗪基、4-嗎啉基、3-噁唑啉基、1,1-二氧化硫代嗎啉-4-基、3-氧雜-8-氮雜二環〔3.2.1〕辛烷-8-基等。

【0037】 本說明書中的「羥烷基」表示上述定義的「烷基」的1個或複數個的氫被羥基取代之基，較佳為C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>羥烷基，更佳為C<sub>2</sub>羥烷基。羥烷基具體例如羥甲基、1-羥乙基、2-羥乙基、2-羥基-2-甲基丙基、5-羥基戊基等。

【0038】 本說明書中的「鹵烷基」表示上述定義的「烷基」的1個或複數個的氫被鹵素取代之基，較佳為C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>鹵烷基，更佳為C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>氟烷基。鹵烷基具體例如二氟甲基、三氟甲基、2,2-二氟乙基、2,2,2-三氟乙基、3,3-二氟丙基、4,4-二氟丁基、5,5-二氟戊基等。

【0039】 本說明書中的「氰烷基」表示上述定義的「烷基」的1個或複數個的氫被氰基取代之基，較佳為C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>氰烷基。氰烷基具體例如氰甲基、2-氰乙基等。

【0040】 本說明書中的「胺烷基」表示上述定義的「烷基」的1個或複數個的氫被上述定義的「胺基」取代之基，較佳為C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>胺烷基。胺烷基具體例如

1-吡啶基甲基、2-(1-哌啶基)乙基、3-(1-哌啶基)丙基、4-胺基丁基等。

【0041】 本說明書中的「羧烷基」表示上述定義的「烷基」的1個或複數個的氫被羧基取代之基，較佳為C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>羧烷基。羧烷基具體例如羧甲基等。

【0042】 本說明書中的「烯氧羰基烷基」表示上述定義的「烷基」的1個或複數個的氫被上述定義的「烯氧羰基」取代之基，較佳為C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>烯氧羰基C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基，更佳為C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>烯氧羰基C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>烷基。烯氧羰基烷基具體例如烯丙氧羰基甲基、2-(烯丙氧羰基)乙基等。

【0043】 本說明書中的「烷氧基烷基」表示上述定義的「烷基」的1個或複數個的氫被上述定義的「烷氧基」取代之基，較佳為C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基，更佳為C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>烷基。烷氧基烷基具體例如甲氧基甲基、乙氧基甲基、1-丙氧基甲基、2-丙氧基甲基、n-丁氧基甲基、i-丁氧基甲基、s-丁氧基甲基、t-丁氧基甲基、戊氧基甲基、3-甲基丁氧基甲基、1-甲氧基乙基、2-甲氧基乙基、2-乙氧基乙基等。

【0044】 本說明書中的「環烷基烷基」表示上述定義的「烷基」的1個或複數個的氫被上述定義的「環烷基」取代之基，較佳為C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>環烷基C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基，更佳為C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>環烷基C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>烷基。環烷基烷基具體例如環丙基甲基、環丁基甲基、環戊基甲基、環己基甲基等。

【0045】 本說明書中的「環烷氧基烷基」表示上述定義的「烷基」的1個或複數個的氫被上述定義的「環烷氧基」取代之基，較佳為C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>環烷氧基C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基，更佳為C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>環烷氧基C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>烷基。環烷氧基烷基具體例如環丙氧基甲基、環丁氧基甲基等。

【0046】 本說明書中的「雜環基烷基」表示上述定義的「烷基」的1個或複數個的氫被上述定義的「雜環基」取代之基，較佳為4~7員雜環基C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基，更佳為4~7員雜環基C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>烷基。雜環基烷基具體例如2-(四氫-2H-哌喃-4-基)

乙基、2-(氮雜環丁烷-3-基)乙基等。

**【0047】** 本說明書中的「烷基磺醯基烷基」表示上述定義的「烷基」的1個或複數個的氫被上述定義的「烷基磺醯基」取代之基，較佳為C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基磺醯基C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基，更佳為C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基磺醯基C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>烷基。烷基磺醯基烷基具體例如甲基磺醯基甲基、2-(甲基磺醯基)乙基等。

**【0048】** 本說明書中的「胺羰基烷基」表示上述定義的「烷基」的1個或複數個的氫被上述定義的「胺羰基」取代之基，較佳為胺羰基C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基，更佳為胺羰基C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基。胺羰基烷基具體例如甲基胺羰基甲基、二甲基胺羰基甲基、t-丁基胺羰基甲基、1-氮雜環丁基羰基甲基、1-吡咯啉基羰基甲基、1-哌啉基羰基甲基、4-嗎啉基羰基甲基、2-(甲基胺羰基)乙基、2-(二甲基胺羰基)乙基、2-(1-氮雜環丁基羰基)乙基、2-(1-吡咯啉基羰基)乙基、2-(4-嗎啉基羰基)乙基、3-(二甲基胺羰基)丙基、4-(二甲基胺羰基)丁基等。

**【0049】** 本說明書中的「芳氧基烷基」表示上述定義的「烷基」的1個或複數個的氫被上述定義的「芳氧基」取代之基，較佳為C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳氧基C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基，更佳為C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>芳氧基C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>烷基。芳氧基烷基具體例如苯氧基甲基、2-苯氧基乙基等。

**【0050】** 本說明書中的「芳烷基(芳基烷基)」表示上述定義的「烷基」的至少1個氫原子被上述定義的「芳基」取代之基，較佳為C<sub>7</sub>-C<sub>14</sub>芳烷基，更佳為C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>芳烷基。芳烷基具體例如苄基、苯乙基、3-苯基丙基等。

**【0051】** 本說明書中的「雜芳基烷基」表示上述定義的「烷基」的至少1個氫原子被上述定義的「雜芳基」取代之基，較佳為5~10員雜芳基C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基，更佳為5~10員雜芳基C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>烷基。雜芳基烷基具體例如3-噻吩基甲基、4-噻唑基甲基、2-吡啶基甲基、3-吡啶基甲基、4-吡啶基甲基、2-(2-吡啶基)乙基、2-(3-吡啶基)乙基、2-(4-吡啶基)乙基、2-(6-喹啉基)乙基、2-(7-喹啉基)

乙基、2-(6-吡啶基)乙基、2-(5-吡啶基)乙基、2-(5-苯并呋喃基)乙基等。

**【0052】** 本說明書中的「非芳香族雜環」表示構成環的原子中含有1~5個雜原子的非芳香族性的雜環。非芳香族雜環可在環中具有雙鍵或三鍵，也可以是環中的碳原子被氧化形成羰基。又，非芳香族雜環可為單環、也可為縮合環，也可為螺環。構成環的原子數沒有限定，較佳為5~6（5~6員非芳香族雜環）。非芳香族雜環具體例如氮雜環丁烷（azetidine）、氧雜環丁烷（oxetane）、硫環丁烷（thietane）、吡咯啉（pyrrolidine）、四氫呋喃（tetrahydrofuran）、四氫噻吩（tetrahydrothiophene）、咪唑啉（imidazolidine）、吡唑啉（pyrazolidine）、噁唑啉（oxazolidine）、異噁唑啉（isoxazolidine）、四氫噻唑（thiazolidine）、異四氫噻唑（isothiazolidine）、二氧戊環（dioxolane）、二硫戊環（dithiolane）、哌啶（piperidine）、四氫吡喃（tetrahydropyran）、硫代環己烷（thiane）、哌嗪（piperazine）、嗎啉（morpholine）、硫代嗎啉（thiomorpholine）、二噁烷（dioxane）、二硫環己烷（dithiane）、氮雜環庚烷（azepane）、氧雜環庚烷（oxepane）、硫雜環庚烷（thiepane）、二氮雜環庚烷（diazepane）等。

**【0053】** 本說明書中，「胜肽鏈」是指1、2、3、4個或該等以上的天然胺基酸及／或非天然胺基酸經醯胺鍵及／或酯鍵連接的胜肽鏈。

**【0054】** 本說明書中，「可被取代」是指某基可被任意的取代基所取代。

**【0055】** 本說明書中，「1個或複數個」表示1個或2個以上的數。「1個或複數個」在使用於某基的取代基相關的內容時，此用語表示從1個到該基容許的取代基的最大數為止的數。「1個或複數個」具體例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、及／或較此等大的數。

**【0056】** 本說明書中，「C端活性體」不僅是胜肽合成反應所用的羧基被活化的化合物（例如與目的胜肽化合物的製造相關的活性酯），也包含該等在反應中例如可透過轉變為吡內酯（azlactone）、NCA（N-羧酸酐

(N-carboxyanhydride) )等而具有活化狀態，和胺類（例如胺成分）反應，提供目的胜肽化合物之化合物。又，胜肽合成反應所使用的羧基經活化的化合物之C端活性體，不限於例如Chem. Rev., 2011, 111, 6557.或Organic Process Research & Development, 2016, 20 (2), 140.記載之使用胜肽縮合劑所合成的活性酯、混合酸酐及醯基異脲 (acylisourea) 等，也包含被活化而能夠和胺類反應的任意化合物。

**【0057】** 本說明書中，「活性酯」為含有和胺基反應形成醯胺鍵的羰基的化合物，在該羰基和例如OBt、OAt、OSu、OPfp等鍵結的化合物，促進和胺的反應的化合物。

**【0058】** 本說明書中，「胺基酸」包含天然胺基酸及非天然胺基酸。本說明書中的「天然胺基酸」是指Gly、Ala、Ser、Thr、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、His、Glu、Asp、Gln、Asn、Cys、Met、Lys、Arg、Pro。非天然胺基酸沒有特別限定，例如β-胺基酸、γ-胺基酸、D型胺基酸、N取代胺基酸、α,α-二取代胺基酸、側鏈和天然者不同的胺基酸、羧基羧酸等。本說明書中的胺基酸容許任意的立體配置。胺基酸的側鏈的選擇不設特別限制，除氫原子以外，可自由選自例如烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、芳烷基、環烷基，此等基之中的不相鄰的1個或2個亞甲基也可被氧原子、羰基(-CO-)、或磺醯基(-SO<sub>2</sub>-)、磷酸基、磷醯基(phosphonyl)所取代。各自也可賦予取代基，該等取代基也無限制，可從包括例如鹵素原子、O原子、S原子、N原子、B原子、Si原子、或P原子的任意取代基之中，獨立、自由選擇1個或2個以上。亦即，例如可被取代的烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、芳烷基、環烷基等。在非限定的一態樣中，本說明書中的胺基酸可為在同一分子內具有羧基和胺基的化合物。

**【0059】** 胺基酸的主鏈胺基可為非取代(NH<sub>2</sub>基)，也可被取代(亦即，-NHR基：R表示可有取代基的烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、芳烷基、環

烷基，這些基之中不相鄰的1個或2個亞甲基可被氧原子、羰基（-CO-）、或磺醯基（-SO<sub>2</sub>-）所取代，又，也可如脯胺酸，鍵結於N原子的碳鏈和 $\alpha$ 位的碳原子形成環。此種主鏈胺基被取代的胺基酸，在本說明書稱為「N取代胺基酸」。本說明書中的「N取代胺基酸」較佳例如N-烷基胺基酸、N-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基胺基酸、N-C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基胺基酸、N-甲基胺基酸，但不限於此等。

**【0060】** 本說明書中，構成胜肽化合物的「胺基酸」包括各自對應的所有同位素。「胺基酸」的同位素為至少1個原子被原子序（質子數）相同、質量數值（質子數和中子數的和）不同的原子所取代者。構成本發明之胜肽化合物的「胺基酸」所包含的同位素之例有氫原子、碳原子、氮原子、氧原子、磷原子、硫原子、氟原子、氯原子等，分別包含<sup>2</sup>H、<sup>3</sup>H、<sup>13</sup>C、<sup>14</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>17</sup>O、<sup>18</sup>O、<sup>31</sup>P、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>18</sup>F、<sup>36</sup>Cl等。

**【0061】** 本說明書中含有鹵素原子的取代基，例如取代基中具有鹵素的烷基、環烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、芳烷基等，更具體例如氟烷基、二氟烷基、三氟烷基等。

**【0062】** 含有O原子的取代基，例如羥基（-OH）、氧基（-OR）、羰基（-C(=O)-R）、羧基（-CO<sub>2</sub>H）、氧羰基（-C(=O)-OR）、羰氧基（-O-C(=O)-R）、硫羰基（-C(=O)-SR）、羰硫基（-S-C(=O)-R）、胺羰基（-C(=O)-NHR）、羰胺基（-NH-C(=O)-R）、氧羰基胺基（-NH-C(=O)-OR）、磺醯基胺基（-NH-SO<sub>2</sub>-R）、胺基磺醯基（-SO<sub>2</sub>-NHR）、胺磺醯基胺基（-NH-SO<sub>2</sub>-NHR）、硫代羧基（-C(=O)-SH）、羧基羰基（-C(=O)-CO<sub>2</sub>H）等。

**【0063】** 氧基（-OR）之例，如烷氧基、環烷氧基、烯氧基、炔氧基、芳氧基、雜芳氧基、芳烷基氧基等。烷氧基較佳為C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>烷氧基，特別以甲氧基或乙氧基為佳。

【0064】 羰基 ( $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}$ ) 之例，如甲醯基 ( $-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$ )、烷基羰基、環烷基羰基、烯基羰基、炔基羰基、芳基羰基、雜芳基羰基、芳烷基羰基等。

【0065】 氧羰基 ( $-\text{C}(=\text{O})-\text{OR}$ ) 之例，如烷基氧羰基、環烷基氧羰基、烯基氧羰基、炔基氧羰基、芳基氧羰基、雜芳基氧羰基、芳烷基氧羰基等。

【0066】 羰氧基 ( $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}$ ) 之例，如烷基羰氧基、環烷基羰氧基、烯基羰氧基、炔基羰氧基、芳基羰氧基、雜芳基羰氧基、芳烷基羰氧基等。

【0067】 硫羰基 ( $-\text{C}(=\text{O})-\text{SR}$ ) 之例，如烷基硫羰基、環烷基硫羰基、烯基硫羰基、炔基硫羰基、芳基硫羰基、雜芳基硫羰基、芳烷基硫羰基等。

【0068】 羰硫基 ( $-\text{S}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}$ ) 之例，如烷基羰硫基、環烷基羰硫基、烯基羰硫基、炔基羰硫基、芳基羰硫基、雜芳基羰硫基、芳烷基羰硫基等。

【0069】 胺羰基 ( $-\text{C}(=\text{O})-\text{NHR}$ ) 之例，如烷基胺羰基（例如 $\text{C}_1-\text{C}_6$ 或 $\text{C}_1-\text{C}_4$ 烷基胺羰基，其中例如乙基胺羰基、甲基胺羰基等）、環烷基胺羰基、烯基胺羰基、炔基胺羰基、芳基胺羰基、雜芳基胺羰基、芳烷基胺羰基等。除這些外，還例如和 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NHR}$ 中的N原子鍵結的H原子進一步被烷基、環烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、芳烷基所取代的基。

【0070】 羰胺基 ( $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}$ ) 之例，如烷基羰胺基、環烷基羰胺基、烯基羰胺基、炔基羰胺基、芳基羰胺基、雜芳基羰胺基、芳烷基羰胺基等。除這些外，還例如和 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}$ 中的N原子鍵結的H原子進一步被烷基、環烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、芳烷基所取代的基。

【0071】 氧羰基胺基 ( $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OR}$ ) 之例，如烷氧基羰基胺基、環烷氧基羰基胺基、烯基氧羰基胺基、炔基氧羰基胺基、芳基氧羰基胺基、雜芳基氧羰基胺基、芳烷基氧羰基胺基等。除這些外，還例如和 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{OR}$ 中的N原子鍵結的H原子進一步被烷基、環烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、

芳烷基所取代的基。

**【0072】** 磺醯基胺基 ( $-\text{NH}-\text{SO}_2-\text{R}$ ) 之例，如烷基磺醯基胺基、環烷基磺醯基胺基、烯基磺醯基胺基、炔基磺醯基胺基、芳基磺醯基胺基、雜芳基磺醯基胺基、芳烷基磺醯基胺基等。除這些外，還例如和 $-\text{NH}-\text{SO}_2-\text{R}$ 中的N原子鍵結的H原子進一步被烷基、環烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、芳烷基所取代的基。

**【0073】** 胺基磺醯基 ( $-\text{SO}_2-\text{NHR}$ ) 之例，如烷基胺基磺醯基、環烷基胺基磺醯基、烯基胺基磺醯基、炔基胺基磺醯基、芳基胺基磺醯基、雜芳基胺基磺醯基、芳烷基胺基磺醯基等。除這些外，還例如和 $-\text{SO}_2-\text{NHR}$ 中的N原子鍵結的H原子進一步被烷基、環烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、芳烷基所取代的基。

**【0074】** 胺磺醯基胺基 ( $-\text{NH}-\text{SO}_2-\text{NHR}$ ) 之例，如烷基胺磺醯基胺基、環烷基胺磺醯基胺基、烯基胺磺醯基胺基、炔基胺磺醯基胺基、芳基胺磺醯基胺基、雜芳基胺磺醯基胺基、芳烷基胺磺醯基胺基等。而且，和 $-\text{NH}-\text{SO}_2-\text{NHR}$ 中的N原子鍵結的2個H原子也可被獨立選自烷基、環烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、及芳烷基所組成的群組的取代基所取代，又，此等的2個取代基也可形成環。

**【0075】** 含S原子的取代基，例如硫醇基 ( $-\text{SH}$ )、硫基 ( $-\text{S}-\text{R}$ )、亞磺醯基 ( $-\text{S}(=\text{O})-\text{R}$ )、磺醯基 ( $-\text{SO}_2-\text{R}$ )、磺酸基 ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) 等的基。

**【0076】** 硫基 ( $-\text{S}-\text{R}$ ) 之例，如選自烷基硫基、環烷基硫基、烯基硫基、炔基硫基、芳基硫基、雜芳基硫基、芳烷基硫基等之中。

**【0077】** 磺醯基 ( $-\text{SO}_2-\text{R}$ ) 之例，如烷基磺醯基、環烷基磺醯基、烯基磺醯基、炔基磺醯基、芳基磺醯基、雜芳基磺醯基、芳烷基磺醯基等。

**【0078】** 含N原子的取代基，例如疊氮 ( $-\text{N}_3$ ，也稱為「疊氮基」(azido))、

氰基 (-CN)、一級胺基 (-NH<sub>2</sub>)、二級胺基 (-NH-R；也稱為單取代胺基。)、三級胺基 (-NR (R')；也稱為二取代胺基。)、甲脒基 (-C (=NH) -NH<sub>2</sub>)、取代甲脒基 (-C (=NR) -NR'R")、胍基 (-NH-C (=NH) -NH<sub>2</sub>)、取代胍基 (-NR-C (=NR''') -NR'R")、胺羰基胺基 (-NR-CO-NR'R")、吡啶基、哌啶基 (piperidino)、嗎啉基、氮雜環丁基等的基。

**【0079】** 二級胺基 (-NH-R；單取代胺基) 之例，如烷基胺基、環烷基胺基、烯基胺基、炔基胺基、芳基胺基、雜芳基胺基、芳烷基胺基等。

**【0080】** 三級胺基 (-NR (R')；二取代胺基) 之例，如烷基 (芳烷基) 胺基等，具有從烷基、環烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、芳烷基等之中各自獨立選擇的任意2個取代基之胺基，此等的任意2個取代基亦可形成環。具體例如二烷基胺基，特別如C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>二烷基胺基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>二烷基胺基、二甲基胺基、二乙基胺基等。本說明書中，「C<sub>p</sub>-C<sub>q</sub>二烷基胺基」是指在胺基有2個C<sub>p</sub>-C<sub>q</sub>烷基取代之基，兩個C<sub>p</sub>-C<sub>q</sub>烷基可相同，也可不同。

**【0081】** 取代甲脒基 (-C (=NR) -NR'R") 之例，如N原子上的3個取代基R、R'及R"為各自獨立選自烷基、環烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、芳烷基之中的基，例如烷基 (芳烷基) (芳基) 甲脒基等。

**【0082】** 取代胍基 (-NR-C (=NR''') -NR'R") 之例，如R、R'、R"及R'''為各自獨立選自烷基、環烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、芳烷基之中的基，或者此等形成環的基等。

**【0083】** 胺羰基胺基 (-NR-CO-NR'R") 之例，如R、R'、及R"為各自獨立選自氫原子、烷基、環烷基、烯基、炔基、芳基、雜芳基、芳烷基之中的基，或者此等形成環的基等。

**【0084】** 本說明書中，構成胜肽化合物的「胺基酸殘基」有簡稱為「胺基酸」之情形。

**【0085】**（胜肽化合物的製造方法）

在一態樣中，本發明關於製造胜肽化合物的方法，該方法包含下列步驟。

步驟A：獲得含有使溶劑中酸成分的C端活性體和胺成分縮合而得的胜肽化合物之反應混合液的步驟；以及

步驟B：混合上述反應混合液和三級胺及水或水溶液，去除該C端活性體的步驟。

**【0086】** 步驟A為，溶劑中使用縮合劑使酸成分和胺成分反應，獲得含有胜肽化合物的反應混合液之步驟。不受限於特定理論，但在步驟A，酸成分和縮合劑反應，形成酸成分的C端活性體，之後經由胺成分對該C端活性體進行親核攻擊，使反應進行，生成胜肽化合物。

**【0087】** 酸成分可使用胺基受保護基保護的胺基酸、或N端的胺基受保護基保護的胜肽。本說明書中，作為酸成分使用的胺基酸稱為「第1胺基酸」，作為酸成分使用的胜肽稱為「第1胜肽」。

**【0088】** 第1胺基酸，無特別限定，可使用任意的天然胺基酸或非天然胺基酸。又，第1胜肽，沒有特別限制，可使用2個以上任意的天然胺基酸及／或非天然胺基酸連結者。

**【0089】** 第1胺基酸較佳列舉例如在其側鏈含有1個以上的碳原子者。如此的胺基酸具體例如，在側鏈具有可被取代的烷基、可被取代的烯基、可被取代的炔基、可被取代的環烷基、可被取代的烷氧基烷基、可被取代的環烷基烷基、可被取代的芳烷基、可被取代的雜芳基烷基等。又，當上述側鏈具有可影響胺基、羧基、羥基等的胜肽鍵的形成反應的官能基時，較佳為此等基受到適當的保護基保護者。雖然非受限於特定理論，但當胺基酸在其側鏈具有體積大的基團時，因為其立體障礙，該胺基酸的殘留C端活性體的水解以習知方法無法充分進行。即使在如此的情形，經由使用本發明之方法，也能迅速且有效率地使殘

留的C端活性體水解。

**【0090】** 第1胜肽所含的C端胺基酸的側鏈也可為和上述第1胺基酸具有相同側鏈者。

**【0091】** 作為第1胺基酸的胺基的保護基、及第1胜肽的N端的胺基的保護基，可使用本技術領域中一般的胺基的保護基。如此的保護基，具體例如Cbz、Boc、Teoc、Fmoc、Tfa、Alloc、對硝基苯磺醯基（nosyl）、二硝基對硝基苯磺醯基（dinitro-nosyl）、t-Bu、三苯甲基（trityl）、及異丙苯基（cumyl）等。

**【0092】** 在一態樣，酸成分至少和胺成分相同當量，較佳為對胺成分以過量使用。具體例如，相對於胺成分，可使用1~1.1當量、1~1.2當量、1~1.3當量、1~1.4當量、1~1.5當量、1~2.0當量、1~3.0當量的酸成分。

**【0093】** 在一態樣，本發明中的酸成分的C端活性體可經由溶劑中使酸成分和縮合劑作用而形成。縮合劑只要是可提高酸成分的羧基的碳的親電子性、可在該酸成分的羧基的羥基部分導入具有脫離能力的基團者，沒有特別限制，具體例如T3P、HATU、BEP、碳二亞胺類（DIC、EDC等）、碳二亞胺類和添加劑（oxyma、HOObt、HOBT等）的組合、DMT-MM、CDI等。

**【0094】** 使C端活性體和胺成分縮合獲得胜肽化合物的步驟（步驟A）可在-20°C~溶劑沸點附近溫度、較佳在0°C~60°C的溫度，攪拌反應混合液1分鐘~48小時、較佳為15分鐘~4小時進行。

**【0095】** 在步驟A，酸成分和胺成分的縮合反應可定量進行。

**【0096】** 胺成分可使用羧基受保護基保護的胺基酸、或者C端的羧基受保護基保護的胜肽。本說明書中，作為胺成分使用的胺基酸稱為「第2胺基酸」，作為胺成分使用的胜肽稱為「第2胜肽」。

**【0097】** 第2胺基酸，無特別限定，可使用任意的天然胺基酸或任意的非天然胺基酸。又，第2胜肽，沒有特別限制，可使用2個以上任意的天然胺基酸

及／或非天然胺基酸連結者。

**【0098】** 第2胺基酸的羧基的保護基、及第2胜肽的C端羧基的保護基可使用本技術領域中一般的羧基的保護基。如此的保護基具體例如甲基、烯丙基、t-丁基、三苯甲基、異丙苯基、苄基、甲氧基三苯甲基、1-哌啶基等。

**【0099】** 在一態樣，本發明中的溶劑，只要是可使縮合反應進行、獲得胜肽化合物者，可使用任意者。如此的溶劑具體例如甲苯、乙腈、四氫呋喃、2-甲基四氫呋喃、乙酸異丙酯、乙酸乙酯、甲基tert-丁基醚、環戊基甲基醚、N,N-二甲基甲醯胺、或者從此等選擇2種以上的溶劑混合的溶劑等。

**【0100】** 在一態樣，本發明中使酸成分的C端活性體和胺成分縮合所獲得的「胜肽化合物」，包含連結2個以上的胺基酸的直鏈狀或環狀的胜肽化合物。又，環狀胜肽化合物和「具有環狀部的胜肽化合物」同義。

**【0101】** 本發明中的「直鏈狀的胜肽化合物」為天然胺基酸及／或非天然胺基酸以醯胺鍵或酯鍵連接所形成者，只要是不具有環狀部的化合物，沒有特別限定。構成直鏈狀的胜肽化合物的天然胺基酸或非天然胺基酸的總數，可為1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30個，較佳的範圍為6~20個、7~19個、7~18個、7~17個、7~16個、7~15個、8~14個、9~13個。

**【0102】** 本發明中的「環狀的胜肽化合物」為天然胺基酸及／或非天然胺基酸以醯胺鍵或酯鍵連接所形成者，只要是具有環狀部的化合物，沒有特別限定。環狀胜肽化合物也可具有1個以上的直鏈部。構成環狀的胜肽化合物的天然胺基酸或非天然胺基酸的總數，可為1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30個，較佳的範圍為6~20個、7~19個、7~18個、7~17個、7~16個、7~15個、8~14個、9~13個。

**【0103】** 構成環狀胜肽化合物的環狀部的胺基酸數沒有限制，例如4以

上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、12以上、20以下、18以下、16以下、15以下、14以下、13以下、12以下、11以下、7、8、9、10、11、12、13、14、15、及16。構成上述環狀部的胺基酸數，較佳為5~15，更佳為5~14、7~14、或8~14，再更佳為8~13、9~13、8~12、8~11、或9~12，特佳為9~11。

【0104】 環狀胜肽的直鏈部的胺基酸數較佳為0~8，更佳為0~5，更佳為0~3。

【0105】 胜肽化合物可包含1個以上、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、或6個以上的非天然胺基酸。又胜肽化合物可包含20個以下、15個以下、14個以下、13個以下、12個以下、10個以下、9個以下的非天然胺基酸。當胜肽化合物包含非天然胺基酸的情形時，非天然胺基酸的比例為例如構成胜肽化合物的總胺基酸數的30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上。

【0106】 胜肽化合物，除了上述天然胺基酸及非天然胺基酸的總數的條件外，或單獨可為含有至少2個（較佳為2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30個，特佳為5、6或7個，較佳範圍為2~30個、3~30個、6~20個、7~19個、7~18個、7~17個、7~16個、7~15個、8~14個、9~13個）的N取代胺基酸、至少1個N未取代的胺基酸之直鏈或環狀胜肽。「N取代」例如鍵結於N原子的氫原子被取代為甲基、乙基、丙基、丁基、己基的取代等，但不限於此等。N取代胺基酸例如，較佳為天然胺基酸所含的胺基被N-甲基化、N-乙基化、N-丙基化、N-丁基化、N-戊基化的胺基酸，這些稱為N-甲基胺基酸、N-乙基胺基酸、N-丙基胺基酸、N-丁基胺基酸、N-戊基胺基酸。將N未取代的胺基酸轉化為N取代的胺基酸稱為N取代化，也稱為N-烷基化、N-甲基化、或N-乙基化。本發明中的胜肽化合物所含的N取代胺基酸數的比例，例如構成胜肽化

化合物的總胺基酸數的30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上。

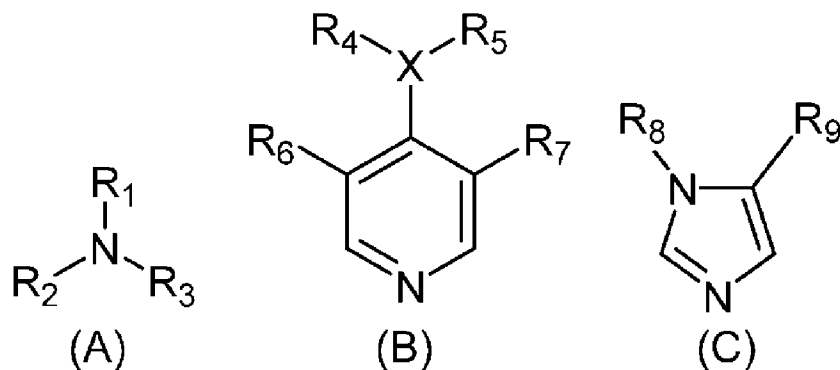
【0107】 胜肽化合物也可包含其鹽、或此等的溶劑合物。

【0108】 本說明書中，「側鏈」使用於胺基酸的側鏈、或環狀胜肽化合物的環狀部的側鏈等的文意，表示不包含於各自的主鏈結構的部分。

【0109】 本說明書中，「胺基酸的數」為構成胜肽化合物的胺基酸殘基的數，表示連接胺基酸的醯胺鍵、酯鍵、及切斷環狀部的鍵結時所產生的胺基酸單元的數。

【0110】 步驟B為去除步驟A所得的反應混合液中所含的未反應的C端活性體之步驟。在一態樣，未反應的C端活性體的去處透過使未反應的C端活性體和三級胺作用來進行。在本說明書，未反應的C端活性體，具體例如在縮合過程未和胺成分反應而殘留在反應混合液中的C端活性體，稱為「殘留的C端活性體」。在步驟B，使步驟A所得的反應混合液和三級胺及水或水溶液混合。當在步驟A中對胺成分使用過量的酸成分的情形時，或者在步驟A未進行充足的縮合反應的情形時，未和胺成分反應所殘留的酸成分的C端活性體在反應溶劑中成為雜質殘留。此殘留的C端活性體，一旦沒有充分被分解而存在反應系中，對後續的胜肽化合物的脫保護步驟、進而對胜肽鏈的延伸反應造成負影響，因此確實地去除是重要的。習知的液相合成法已知使用鹼性水溶液使殘留的活性酯水解的方法等，但是特別當其側鏈有體積大的官能基的胺基酸的殘留C端活性體的情形時，或者在殘留的C端活性體的脫離基的脫離能力沒有容易和水反應那樣的高的情形時，則有該分解不充足的情形，是經本發明人等確認過的。對於此等，經由使用將含有未反應的C端活性體的反應混合液和三級胺及水或水溶液混合、乃至殘留的C端活性體和三級胺接觸、使C端活性體水解的本發明之方法，可解決如此之課題。

【0111】 三級胺可較佳使用對酸成分的殘留C端活性體有親核反應性者。如此的三級胺較佳為氮附近的立體障礙小者的胺。如此的三級胺例如下式 (A)、(B)、或(C) 所表的三級胺。



【0112】 在一態樣，式 (A) 中， $R_1 \sim R_3$  為， $R_1$  及  $R_2$  和該等鍵結的氮原子共同形成 5~6 員非芳香族雜環，且  $R_3$  為  $C_1$ - $C_2$  烷基 (即甲基或乙基) 或  $C_2$  羥烷基。5~6 員非芳香族雜環較佳為吡咯啉、哌啉、或嗎啉， $C_2$  羥烷基較佳為 2-羥乙基。

【0113】 在其他態樣，式 (A) 中， $R_1 \sim R_3$  各自獨立為  $C_1$ - $C_2$  烷基、或  $C_2$  羥烷基。 $C_2$  羥烷基較佳為 2-羥乙基。

【0114】 式 (A) 所表的三級胺，較佳例如  $R_1 \sim R_3$  各自獨立為  $C_1$ - $C_2$  烷基者。

【0115】 式 (A) 所表的三級胺，具體例如三甲基胺、N,N-二甲基乙基胺、N,N-二乙基甲基胺、三乙基胺、三乙醇胺等，這些之中，以三甲基胺特佳。

【0116】 在一態樣，式 (B) 中，X 為 N 或 O。當 X 為 N 時， $R_4$  及  $R_5$  各自獨立為  $C_1$ - $C_2$  烷基、或  $C_2$  羥烷基，或者和該等鍵結的氮原子共同形成 5~6 員非芳香族雜環。當 X 為 O 時， $R_4$  為  $C_1$ - $C_2$  烷基、或  $C_2$  羥烷基， $R_5$  不存在。5~6 員非芳香族雜環較佳為吡咯啉、哌啉、或嗎啉， $C_2$  羥烷基較佳為 2-羥乙基。又，式 (B) 中， $R_6$  及  $R_7$  各自獨立為 H、 $C_1$ - $C_2$  烷基、或甲氧基。

【0117】 式 (B) 所表的三級胺，較佳例如，X 為 N， $R_4$  及  $R_5$  各自獨立為  $C_1$ - $C_2$  烷基，且  $R_6$  及  $R_7$  為 H 者。

【0118】 式 (B) 所表的三級胺，具體例如 DMAP、4-哌啉基吡啉、4-嗎

啉基吡啶等，這些之中，以DMAP特佳。

**【0119】** 在一態樣，式(C)中， $R_8$ 及 $R_9$ 各自獨立為H、 $C_1$ - $C_2$ 烷基、或 $C_2$ 羥烷基，或者 $R_8$ 鍵結的氮原子和 $R_9$ 鍵結的碳原子共同形成5~6員非芳香族雜環。5~6員非芳香族雜環較佳為吡咯啶、哌啶、或嗎啉， $C_2$ 羥烷基較佳為2-羥乙基。

**【0120】** 式(C)所表的三級胺，較佳例如 $R_8$ 及 $R_9$ 各自獨立為H或 $C_1$ - $C_2$ 烷基者，更佳為 $R_8$ 為 $C_1$ - $C_2$ 烷基，且 $R_9$ 為H者。

**【0121】** 式(C)所表的三級胺，具體例如NMI、咪唑-1-乙醇、5,6,7,8-四氫咪唑并〔1,5- $\alpha$ 〕吡啶等，這些之中，以NMI特佳。

**【0122】** 不限於特定理論，但本發明之三級胺經由對殘留的C端活性體進行親核攻擊，可促進殘留的C端活性體的水解。如DIPEA的三級胺由於具有體積大的取代基，親核性低，非所希望者。殘留的C端活性體的水解物由於可移動至水層而去除，所以不經過管柱層析法純化等的另外的純化步驟，即可將所生成的胜肽化合物提供給後續的縮合反應。經由使用本發明之方法，可迅速（例如5分鐘之內）且以少次數（例如僅1次）的水解處理，有效率的去除殘留的C端活性體，在一態樣，可去除殘留的C端活性體的90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%以上。換句話說，根據本發明，可使C端活性體的殘存率成為10%以下、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下。

**【0123】** 三級胺相對於胺成分，可使用觸媒量，也可使用化學計量數以上的量。具體例如，可在反應混合液添加相對於胺成分0.1當量~10當量的三級胺，較佳添加0.5當量~3當量的三級胺。

**【0124】** 在三級胺和殘留的C端活性體作用之時，可在-20°C~溶劑的沸點附近的溫度、較佳為25°C~60°C的溫度，攪拌反應混合液1分鐘~48小時、較佳

為2小時以下，例如2分鐘～2小時、5分鐘～60分鐘、5分鐘～50分鐘、或5～30分鐘。

**【0125】** 在一態樣，在殘留的C端活性體以三級胺處理的步驟，可添加水或水溶液，水溶液可較佳使用鹼性水溶液。如此的鹼性水溶液沒有特別限定，具體例如碳酸鉀水溶液、氫氧化鋰水溶液、碳酸鈉水溶液、氫氧化鈉、氫氧化鉀水溶液、氫氧化鈉水溶液、或碳酸銻水溶液等。這些之中，以具有弱鹼性的碳酸鉀水溶液或碳酸鈉水溶液為佳。

**【0126】** 在一態樣，本發明更包含使三級胺和殘留的C端活性體作用後，使反應混合液分層為有機層和水層，取有機層，之後洗淨該有機層之步驟。做為一個例子，包含以酸性水溶液和鹼性水溶液洗淨有機層。在一態樣，在經過此步驟的情形，可使殘留的C端活性體的殘留量成為1.0%以下、0.5%以下、較佳為0.1%以下。

**【0127】** 在一態樣，本發明更包含使上述胜肽化合物的N端的保護基脫保護之步驟（步驟C）。保護基的脫保護可根據例如「Greene's, "Protective Groups in Organic Synthesis"（第5版, John Wiley & Sons 2014）」所記載的一般方法進行。習知方法因為殘留的C端活性體使脫保護反應無法充分進行，但透過使用本發明之方法，可高產率地獲得生成的胜肽化合物的脫保護體。

**【0128】** 在一態樣，本發明包含重複複數次步驟A和步驟B。又，在一態樣，本發明包含重複複數次步驟A、步驟B及步驟C。經由如此的重複可使胜肽鏈延長，獲得胜肽化合物。

**【0129】** 在一態樣，本發明關於促進殘留的C端活性體的水解之方法，包括在含有殘留的C端活性體的溶液追加三級胺和水或水溶液，使該C端活性體和三級胺作用之步驟。在此態樣，殘留的C端活性體及／或三級胺可使用上述者。在含有殘留的C端活性體的溶液添加水溶液的情形，該水溶液較佳為上述鹼性

水。

**【0130】** 在一態樣，本發明關於去除該水解物的方法，包括將含有殘留的C端活性體的水解物的溶液水性洗淨的步驟。在此態樣，水性洗淨，除了水以外，可實施以鹼性水溶液的洗淨。鹼性水溶液沒有特別限定，較佳為碳酸鉀水溶液或碳酸鈉水溶液。又，在其他態樣，在所使用的鹼與水解物形成鹽而難以移到水層的情形時，也能夠以酸性水溶液洗淨去除該鹼後，以鹼性水溶液洗淨。酸性水溶液沒有特別限定，較佳為硫酸氫鉀水溶液或硫酸氫鈉水溶液。鹼性水溶液較佳為碳酸鉀水溶液或碳酸鈉水溶液。

**【0131】** 又，本說明書中所引用的所有先前技術文獻作為參照併入本說明書。

〔實施例〕

**【0132】** 本發明進一步列舉以下實施例，但不限於下列實施例。

**【0133】** 胜肽化合物（以胜肽合成的目的物）的純度、C端活性體的殘留量使用具有QDA、PDA檢測器的LCMS（管柱：Ascentis Express C18、5 cm × 4.6 mm、2.7μm，移動相：0.5%三氟乙酸水溶液／0.5%三氟乙酸乙腈溶液＝95／5-0／100、1.0 mL／min，檢測器：UV210nm）測量。

C端活性體的殘留量的評估，由於殘留的C端活性體以分析條件（LCMS）可能受到水解，因此將殘留的C端活性體轉化為丙醯胺來進行。

胜肽化合物（以胜肽合成的目的物）的純度以LCMS的峰面積百分比記載。C端活性體殘留率及C端活性體殘留量相對值根據各實施例所記載的算式計算。又，總峰面積以減掉空白峰（blank peak）、溶劑峰的面積值進行校正。

表中的nd表示無法偵測（not detected）之意。

**【0134】** （實施例1）在殘留的C端活性體的水解中添加胺的效果  
（混合酸酐的調製）

將Cbz-Ile-OH 463 mg (1.7 mmol)、五甲苯31 mg (內標準品: 0.21 mmol) 溶解於2-甲基四氫呋喃3.0 mL。在室溫加入二異丙基乙胺1.1 mL (6.2 mmol)、T3P/THF 50%溶液 1.9 mL (3.2 mmol)，在40 °C攪拌1小時，調製混合酸酐(C端活性體)溶液。從調製好的混合酸酐溶液取5 µL，和正丙胺100 µL (1.2 mmol) 反應後，以甲醇0.9 mL稀釋，從LC/MS的峰面積求得轉化為混合酸酐的反應轉化率(轉化率: 97%)。Cbz-Ile-NHPr/MS (ESI) : m/z 307.1 [M+H]<sup>+</sup>。

轉化率 (%) = { Cbz-Ile-NHPr (面積%) / [ Cbz-Ile-OH (面積%) + Cbz-Ile-NHPr (面積%) ] } × 100

**【0135】** (水解處理-未添加胺)

從調製好的混合酸酐溶液的全量(6 mL)取1.0 mL，添加鹼性水(5%氫氧化鋰水溶液、5%碳酸鈉水溶液、5%碳酸鉀水溶液、5%氫氧化鉀水溶液、或5%碳酸銫水溶液) 0.5 mL，在25 °C以攪拌子進行攪拌(1200 rpm)。停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層。取有機層5 µL，加入正丙胺100 µL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，計算峰面積比〔丙醯胺: 五甲苯(內標準品)〕。

**【0136】** (水解處理-添加胺)

從調製好的混合酸酐溶液全量(6 mL)取1.0 mL，加入胺添加劑(0.19 mmol)、及5%碳酸鉀水溶液 0.5 mL，在25 °C以攪拌子進行攪拌(1200 rpm)。停止攪拌、靜置，使有機層和水層分層。取有機層5 µL，加入正丙胺100 µL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，計算峰面積比〔丙醯胺: 五甲苯(內標準品)〕。

**【0137】** (C端活性體的殘留量評估)

使用LC/MS的峰面積比〔丙醯胺/五甲苯(內標準品)〕。下表的C端活性體殘留量相對值為，將未加入胺添加劑、以5%碳酸鉀水溶液處理5分鐘時的峰

面積比〔丙醯胺／五甲苯〕的值3.5作為100 (entry 1的5min的欄位) 時的相對值。

C端活性體殘留量相對值 (%) = { [ 丙醯胺 (面積%) / 五甲苯 (面積%) ] / 3.5 (在entry 1、5 min 的 [ 丙醯胺 (面積%) / 五甲苯 (面積%) ] ) } × 100

【0138】 [表1]

entry	鹼性水溶液	胺	C端活性體殘留量相對值 (%)			
			5min	15min	30min	60min
1	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	無	100	n/a <sup>1</sup>	96	95
2	5%KOH	無	102	96	95	94
3	5%LiOH	無	95	93	93	90
4	5%Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	無	93	91	88	86
5	5%CsCO <sub>3</sub>	無	91	n/a <sup>1</sup>	90	87
6	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DABCO	99	n/a <sup>1</sup>	100	95
7	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Et <sub>3</sub> N	94	92	90	87
8	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DBU	90	88	86	85
9	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	NMI	46	10	6	7
10	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMAP	2	2	2	2
11	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	三唑	103	95	95	93
12	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	甲基三唑	97	95	94	94

1) 不適用

【0139】 表1的C端活性體殘留量相對值，數值越小表示殘留的C端活性體被水解。在只使用鹼性水的情形，即使改變鹼的相對陽離子 (counter cation)，水解速度也幾乎沒有變化，較添加胺的情形水解慢。又發現，在添加的胺之中，DMAP、NMI的添加顯著地促進殘留的C端活性體的水解。

【0140】 (實施例2) 在殘留的C端活性體的水解中添加胺的效果  
(活性酯的調製)

Cbz-Ile-OH 701 mg (2.64 mmol)、五甲苯 46 mg (0.31 mmol) 溶解於2-甲基四氫呋喃7.0 mL。在室溫加入HATU 1.0 g (2.64 mmol)、二異丙基乙胺 1.5 mL (8.79 mmol)，在60 °C攪拌4小時，調製活性酯 (C端活性體) 溶液。從調製好的活性酯溶液取5 μL，和正丙胺100 μL (1.2 mmol) 反應後，以甲醇0.9 mL稀釋，從LC/MS的峰面積求得轉化為活性酯的反應轉化率 (轉化率：94%)。

Cbz-Ile-NHPr/MS (ESI) : m/z 307.1 [M+H]<sup>+</sup>。

轉化率 (%) = { Cbz-Ile-NHPr (面積%) / [ Cbz-Ile-OH (面積%) + Cbz-Ile-NHPr (面積%) ] } × 100

**【0141】** (只使用鹼性水的水解處理)

從調製好的活性酯溶液的全量 (9 mL) 取 1.5 mL, 添加鹼性水 (5%碳酸鉀水溶液) 0.75 mL, 在 25 °C 以攪拌子進行攪拌 (1200 rpm)。停止攪拌後靜置, 使有機層和水層分層。取有機層 5 μL, 加入正丙胺 100 μL (1.2 mmol), 使殘留的 C 端活性體轉化為丙醯胺後, 以甲醇 0.9 mL 稀釋。將此溶液進行 LC/MS 分析, 計算峰面積比 [ 丙醯胺 : 五甲苯 (內標準品) ]。

**【0142】** (添加胺的水解處理)

從調製好的活性酯溶液全量 (9 mL) 取 1.5 mL, 加入胺添加劑 (0.44 mmol)、及 5%碳酸鉀水溶液 0.75 mL, 在 25 °C 以攪拌子進行攪拌 (1200 rpm)。停止攪拌、靜置, 使有機層和水層分層, 取有機層 5 μL, 加入正丙胺 100 μL (1.2 mmol), 使殘留的 C 端活性體轉化為丙醯胺後, 以甲醇 0.9 mL 稀釋。將此溶液進行 LC/MS 分析, 計算峰面積比 [ 丙醯胺 : 五甲苯 (內標準品) ]。

**【0143】** (C 端活性體的殘留量評估)

使用 LC/MS 的峰面積比 [ 丙醯胺 / 五甲苯 (內標準品) ]。下表的 C 端活性體殘留量相對值為, 將未添加胺添加劑、以 5%碳酸鉀水溶液處理 5 分鐘時的峰面積比 [ 丙醯胺 / 五甲苯 ] 的值 3.0 作為 100 (entry 1 的 5min 的欄位) 時的相對值。

C 端活性體殘留量相對值 (%) = { [ 丙醯胺 (面積%) / 五甲苯 (面積%) ] / 3.0 (在 entry 1、5 min 的 [ 丙醯胺 (面積%) / 五甲苯 (面積%) ] ) } × 100

**【0144】** [ 表 2 ]

entry	鹼性水溶液	胺	C 端活性體殘留量相對值 (%)			
			5min	15min	30min	60min
1	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	100	84	72	50

2	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DBU	35	20	18	11
3	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Me <sub>3</sub> N	59	33	17	3.2
4	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	NMI	15	2.4	0.7	0.5
5	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMAP	0.5	0.5	0.5	0.4

【0145】 表2的C端活性體殘留量相對值，數值越小表示殘留的C端活性體被水解。發現相較於只使用鹼性水的情形，添加胺者促進殘留的C端活性體水解。亦即認為，DBU、Me<sub>3</sub>N、NMI、DMAP的添加有效果，特別是發現NMI和DMAP的添加有顯著的效果。

【0146】 (實施例3) 在殘留的C端活性體的水解中添加胺的效果

Cbz-MeAla-OH 617 mg (2.6 mmol)、五甲苯46 mg (0.31 mmol) 在2-甲基四氫呋喃4.5 mL所形成的溶液，室溫下加入二異丙基乙胺1.5 mL (8.6 mmol)、T3P/THF 50%溶液 2.6 mL (4.4 mmol)，在40 °C攪拌1小時，調製混合酸酐溶液(C端活性體)。從調製好的混合酸酐溶液取5 μL，和正丙胺100 μL (1.2 mmol) 反應後，以甲醇0.9 mL稀釋，從LC/MS的峰面積求得轉化為混合酸酐的反應轉化率(轉化率：90%)。Cbz-MeAla-NHPr/MS (ESI)：m/z 279.1 [M+H]<sup>+</sup>。

轉化率 (%) = { Cbz-MeAla-NHPr (面積%) / [ Cbz-MeAla-OH (面積%) + Cbz-MeAla-NHPr (面積%) ] } × 100

【0147】 (只使用鹼性水的水解處理)

從調製好的混合酸酐溶液的全量(9 mL)取1.5 mL，添加鹼性水(5%碳酸鈉水溶液、或5%碳酸鉀水溶液)0.75 mL，在25 °C以攪拌子進行攪拌(1200 rpm)。停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層。取有機層5 μL，加入正丙胺100 μL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，計算峰面積比〔丙醯胺：五甲苯(內標準品)〕。

【0148】 (添加胺的水解處理)

從調製好的混合酸酐溶液全量(9 mL)取1.5 mL,加入胺添加劑(0.43 mmol、0.67當量)、及5%碳酸鉀水溶液0.75 mL,在25 °C以攪拌子進行攪拌(1200 rpm)。停止攪拌、靜置,使有機層和水層分層,取有機層5 µL,加入正丙胺100 µL(1.2 mmol),使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後,以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析,計算峰面積比〔丙醯胺:五甲苯(內標準品)〕。

**【0149】** (C端活性體的殘留量評估)

使用LC/MS的峰面積比〔丙醯胺/五甲苯(內標準品)〕。下表的C端活性體殘留量相對值為,將未加入胺添加劑、以5%碳酸鈉水溶液處理5分鐘時的峰面積比〔丙醯胺/五甲苯〕的值1.1作為100(entry 1的5min的欄位)時的相對值。

C端活性體殘留量相對值(%) = { [ 丙醯胺(面積%) / 五甲苯(面積%) ] / 1.1 (在entry 1、5 min的 [ 丙醯胺(面積%) / 五甲苯(面積%) ] ) } ×100

**【0150】** [表3]

entry	鹼性水溶液	胺	C端活性體殘留量相對值(%)			
			5min	15min	30min	60min
1	5%Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	無	100	71	52	31
2	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	無	108	89	74	52
3	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Me <sub>3</sub> N	127	100	89	60
4	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	NMI	2.7	3.0	3.0	3.1
5	5%K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMAP	0	0	0	0

**【0151】** 表3的C端活性體殘留量相對值,數值越小表示殘留的C端活性體被水解。在只使用鹼性水的情形,即使改變鹼的相對陽離子(counter cation),水解速度也幾乎沒有變化。又發現,當添加DMAP、NMI時,相較於只使用鹼性水的情形,殘留的C端活性體的水解受到促進。發現DMAP、NMI的添加即使在5分鐘內也有充分的效果,特別是在DMAP的添加,使殘留的C端活性體完全水解。

**【0152】** (實施例4) Cbz-Ile-Phe-OtBu的合成

(縮合反應)

在由H-Phe-OtBu鹽酸鹽 458 mg (1.8 mmol)、Cbz-Ile-OH 699 mg (2.7 mmol)、及2-甲基四氫呋喃4.5 mL所形成的溶液,在室溫加入二異丙基乙胺1.6 mL (8.9 mmol)、T3P/THF 50%溶液 2.6 mL (4.4 mmol),在40 °C攪拌1小時,進行胜肽鍵的形成反應。從反應溶液取5 μL,和正丙胺100 μL (1.2 mmol) 反應後,以甲醇0.9 mL稀釋,從LC/MS的峰面積求得反應轉化率 (轉化率: 100%)。

轉化率 (%) = { Cbz-Ile-Phe-OtBu (面積%) / [ H-Phe-OtBu (面積%) + Cbz-Ile-Phe-OtBu (面積%) ] } × 100

**【0153】** (只使用鹼性水的水解處理)

從調製好的二胜肽溶液的全量 (9 mL) 取1.5 mL,添加5%碳酸鉀水溶液0.75 mL,在25 °C以攪拌子進行攪拌 (1200 rpm)。停止攪拌後靜置,使有機層和水層分層。取有機層5 μL,加入正丙胺100 μL (1.2 mmol),使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後,以甲醇0.9 mL稀釋,進行LC/MS分析,計算丙醯胺和目的胜肽的峰面積值,計算C端活性體殘留率 (%)。去除剩下的反應液的水層,依序以5%硫酸氫鉀水溶液0.5mL和5%碳酸鉀水溶液0.5mL洗淨有機層。取有機層5 μL,加入正丙胺100 μL (1.2 mmol),使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後,以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析,計算目的胜肽和殘留的C端活性體 (轉化為丙醯胺的轉化體) 的峰面積值。

C端活性體殘留率 (%) = { 丙醯胺 (面積%) / [ 丙醯胺 (面積%) + 二胜肽 (面積%) ] } × 100

**【0154】** (添加胺的水解處理)

從調製好的二胜肽溶液全量 (9 mL) 取1.5 mL,加入胺 (0.15 mmol、0.5

當量，0.30 mmol、1.0當量，或0.89 mmol、3當量：當量為相對於H-Phe-OtBu鹽酸鹽者)、及5%碳酸鉀水溶液 0.75 mL，在25 °C以攪拌子進行攪拌（1200 rpm）。停止攪拌、靜置，使有機層和水層分層。取有機層5 μL，加入丙胺100 μL（1.2 mmol），使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋，進行LC/MS分析，求得丙醯胺和目的胜肽的峰面積值，計算C端活性體殘留率（%）。去除剩下的反應液的水層，依序以5%硫酸氫鉀水溶液0.75mL和5%碳酸鉀水溶液0.75mL洗淨有機層。取有機層5 μL，加入正丙胺100 μL（1.2 mmol），使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，計算目的胜肽和殘留的C端活性體（轉化為丙醯胺的轉化體）的峰面積值。MS（ESI）：m/z 413.3 [M-tBu+H]<sup>+</sup>, 469.3 [M+H]<sup>+</sup>, 491.3 [M+Na]<sup>+</sup>。

C端活性體殘留率（%）= { 丙醯胺（面積%） / [ 丙醯胺（面積%） + 二胜肽（面積%） ] } × 100

【0155】 [表4]

entry	胺 (eq) <sup>1</sup>	水解		分液操作後的有機層面百值 (%) <sup>2</sup>	
		C端活性體殘留率 (%)	處理時間 (min)	殘留的C端活性體 (丙醯胺轉化體)	二胜肽
1	無	18.4	60	4.7	90.4
2	NMI (0.5eq)	5.7	60	Nd	97.8
3	NMI (1.0eq)	3.7	60	Nd	98.1
4	NMI (3.0eq)	3.2	30	Nd	98.4
5	DMAP(0.5eq)	3.7	5	Nd	98.0
6	DMAP(1.0eq)	2.9	5	Nd	97.8
7	DMAP(3.0eq)	2.0	5	Nd	98.0

1) 相對於N端胺基酸衍生物 (H-Phe-OtBu鹽酸鹽) 的當量

2) LCMS的峰面積比率

【0156】 發現添加胺NMI，經由使用相對於N端胺基酸衍生物0.5~3.0當量，較只使用鹼性水處理的水解，更優勢地促進水解。又發現，添加胺DMAP，經由使用相對於N端胺基酸衍生物0.5~3.0當量，較只使用鹼性水處理的水解，更優勢地促進水解。

發現經由添加胺進行1次水解處理後，有機層以5%KHSO<sub>4</sub>、5%K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>洗淨，可完全去除有機層中殘留的C端活性體。此時，目的物胜肽以高純度獲得。另一方面，只使用鹼性水的處理，C端活性體殘留，二胜肽的純度也低。

**【0157】** （實施例5） Cbz-Ile-Phe-OtBu的合成

（縮合反應）

在由H-Phe-OtBu鹽酸鹽 452 mg（1.8 mmol）、Cbz-Ile-OH 702 mg（2.6 mmol）、及2-甲基四氫呋喃4.5 mL所形成的溶液，在室溫加入二異丙基乙胺1.5 mL（8.8 mmol）、T3P/THF 50%溶液 2.6 mL（4.4 mmol），在40 °C攪拌1小時，進行胜肽鍵的形成反應。從反應溶液取5 μL，和正丙胺100 μL（1.2 mmol）反應後，以甲醇0.9 mL稀釋，從LC/MS的峰面積求得反應轉化率（轉化率：100%）。

轉化率（%）= { Cbz-Ile-Phe-OtBu（面積%） / [ H-Phe-OtBu（面積%） + Cbz-Ile-Phe-OtBu（面積%） ] } ×100

**【0158】** （只使用鹼性水的水解處理）

從上述調製好的二胜肽溶液的全量（9 mL）取1.5 mL，添加5%碳酸鉀水溶液0.75 mL，在60°C以攪拌子進行攪拌（1200 rpm）。停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層。取有機層5 μL，加入正丙胺100 μL（1.2 mmol），使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋，進行LC/MS分析，計算丙醯胺和目的胜肽的峰面積值，計算C端活性體殘留率（%）。去除剩下的反應液的水層，依序以5%硫酸氫鉀水溶液0.75mL和5%碳酸鉀水溶液0.75mL洗淨有機層。取有機層5 μL，加入正丙胺100 μL（1.2 mmol），使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，計算目的胜肽和殘留的C端活性體（轉化為丙醯胺的轉化體）的峰面積值。

C端活性體殘留率（%）= { 丙醯胺（面積%） / [ 丙醯胺（面積%） + 二

胜肽（面積%）] } ×100

**【0159】** （添加胺的水解處理）

從調製好的二胜肽溶液全量（9 mL）取1.5 mL，加入胺（0.29 mmol）、及5%碳酸鉀水溶液 0.75 mL，在60 °C以攪拌子進行攪拌（1200 rpm）。停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層。取有機層5 μL，加入丙胺100 μL（1.2 mmol），使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋，進行LC/MS分析，求得丙醯胺和目的胜肽的峰面積值，計算C端活性體殘留率（%）。去除剩下的反應液的水層，依序以5%硫酸氫鉀水溶液0.75mL和5%碳酸鉀水溶液0.75mL洗淨有機層。取有機層5 μL，加入正丙胺100 μL（1.2 mmol），使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，計算目的胜肽和殘留的C端活性體（轉化為丙醯胺的轉化體）的峰面積值。MS（ESI）：  
m/z 413.3 [ M-tBu+H ] +, 469.3 [ M+H ] +, 491.3 [ M+Na ] +。

C端活性體殘留率（%）= { 丙醯胺（面積%） / [ 丙醯胺（面積%） + 二胜肽（面積%） ] } ×100

**【0160】** [ 表5 ]

entry	鹼性水溶液	胺 (1 eq)	水解		分液操作後的有機層面百值 (%) <sup>1</sup>	
			C端活性體殘留率 (%)	水解處理時間 (min)	殘留的C端活性體 (丙醯胺轉化體)	二胜肽
1	5% K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	20.1	60	3.4	89.7
2	5% K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Me <sub>3</sub> N	19.6	60	3.3	89.6
3	5% K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	NMI	5.8	5	nd	97.5
4	5% K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	DMAP	3.4	5	nd	97.6

1) LCMS的峰面積比率

**【0161】** 殘留的C端活性體的水解，即使添加胺在60°C進行，也和目的胜

第 40 頁，共 89 頁(發明說明書)

肽在25°C進行時，獲得同等的高純度。特別是在添加的胺為DMAP及NMI的情形時，較只使用鹼性水的情形，水解快速進行。又發現，在添加的胺為DMAP及NMI的情形時，以1次的水解處理，水解在5分鐘內有效果地進行，在後續的分液操作（5%KHSO<sub>4</sub>、5%K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>洗淨），可從有機層完全去除殘留的C端活性體。

### 【0162】（實施例6）Cbz-MeIle-MePhe-OMe的合成

（縮合反應）

使MePhe-OMe鹽酸鹽 300 mg ( 1.3 mmol )、Cbz-MeIle-OH 442 mg ( 1.6 mmol ) 懸浮於乙腈3.0mL，加入二異丙基乙胺683 μL ( 3.9 mmol )。之後在25°C加入HATU 594 mg ( 1.6 mmol )，在25°C下攪拌30分鐘後，在40°C攪拌3小時，再於60°C攪拌3小時，進行胜肽鍵形成反應。取反應液5 μL，加入正丙胺100 μL ( 1.2 mmol )，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。此溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得轉化率（轉化率：>99%）。

轉化率 (%) = { Cbz-MeIle-MePhe-OMe (面積%) / [ MePhe-OMe (面積%) + Cbz-MeIle-MePhe-OMe (面積%) ] } × 100

### 【0163】（水解處理）

（1）未添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入MTBE 3.0 mL和5%碳酸鉀水溶液3.0 mL，在25°C以攪拌子攪拌30分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5 μL，加入正丙胺100 μL ( 1.2 mmol )，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

C端活性體殘留率 (%) = { 丙醯胺 (面積%) / [ 丙醯胺 (面積%) + 二胜肽 (面積%) ] } × 100

### 【0164】（2）添加胺的情形

第 41 頁，共 89 頁(發明說明書)

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入MTBE 3.0 mL、N-甲基咪唑103  $\mu\text{L}$  (1.3 mmol)、和5%碳酸鉀水溶液3.0 mL，在25°C以攪拌子攪拌30分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5  $\mu\text{L}$ ，加入正丙胺100  $\mu\text{L}$  (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

$$\text{C端活性體殘留率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{丙醯胺 (面積\%)}}{\text{丙醯胺 (面積\%)} + \text{二胜肽 (面積\%)}} \right\} \times 100$$

### 【0165】 (後處理)

停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後依序以10%硫酸氫鉀水溶液3 mL $\times$ 2、5%碳酸鉀水溶液3 mL、普通水1 mL $\times$ 5洗淨有機層。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5  $\mu\text{L}$ ，加入正丙胺100  $\mu\text{L}$  (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋，進行LC/MS分析，計算目的胜肽和殘留的C端活性體（轉化為丙醯胺的轉化體）的峰面積值。使剩下的有機層濃縮，獲得胜肽。經未添加胺的水解所獲得的濃縮物（胜肽）為671.8mg（產率113%；濃縮物中包含雜質（殘留的C端活性體），但作為只含有胜肽者進行計算）。經添加胺的水解所獲得的濃縮物為563.7mg（產率95%）。MS (ESI) :  $m/z$  455.2 [M+H]<sup>+</sup>, 477.2 [M+Na]<sup>+</sup>。

### 【0166】 [表6]

entry	胺	水解處理後立即	分液操作後的有機層		濃縮後
		C端活性體殘留率 (%)	二胜肽 (%) <sup>1</sup>	殘留的C端活性體 (%) <sup>1</sup> (丙醯胺轉化體)	產率 (%)
1	NMI	0	100	Nd	95
2	無	5.7	95.8	4.2	113

1) LCMS的峰面積比率

【0167】 發現只使用鹼性水處理的水解，殘留的C端活性體未完全被水解，即使後續的水性洗淨也無法去除殘留的C端活性體，但當添加NMI進行水解

時，殘留的C端活性體的水解完全地達到，也可使殘留的C端活性體的去完全。再者此時，以100%的純度獲得目的二胜肽（產率95%）。

**【0168】** （實施例7） Cbz-MeVal-MeAsp (tBu) -piperidine的合成  
（縮合反應）

使MeAsp (tBu) -piperidine 303 mg (1.1 mmol)、Cbz-MeVal-OH 448 mg (1.7 mmol) 懸浮於乙腈0.6mL、環戊基甲基醚2.4mL混合溶劑，加入二異丙基乙胺586  $\mu$ L (3.4 mmol)。之後在25°C加入HATU 642 mg (1.7 mmol)，在25°C下攪拌6.5小時，進行胜肽鍵形成反應。取反應液5  $\mu$ L，加入正丙胺100  $\mu$ L (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。此溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得轉化率（轉化率：100%）。

$$\text{轉化率 (\%)} = \left\{ \text{Cbz-MeVal-MeAsp (tBu) -piperidine (面積\%)} \right\} / \left\{ \text{MeAsp (tBu) -piperidine (面積\%)} + \text{Cbz-MeVal-MeAsp (tBu) -piperidine (面積\%)} \right\} \times 100$$

**【0169】** （水解處理）

(1) 未添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入5%碳酸鉀水溶液3.0 mL，在25°C以攪拌子攪拌5分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5  $\mu$ L，加入正丙胺100  $\mu$ L (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

$$\text{C端活性體殘留率 (\%)} = \left\{ \text{丙醯胺 (面積\%)} \right\} / \left\{ \text{丙醯胺 (面積\%)} + \text{二胜肽 (面積\%)} \right\} \times 100$$

**【0170】** （2）添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入DMAP 136 mg (1.1 mmol) 和5%碳酸鉀水溶液3.0 mL，在25°C以攪拌子攪拌5分鐘。停止攪拌，使有機層和水

層分層。取有機層5  $\mu\text{L}$ ，加入正丙胺100  $\mu\text{L}$  (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從LC/MS的峰面積，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

$$\text{C端活性體殘留率 (\%)} = \{ \text{丙醯胺 (面積\%)} / [ \text{丙醯胺 (面積\%)} + \text{二胜肽 (面積\%)} ] \} \times 100$$

**【0171】** (後處理)

停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後依序以10%硫酸氫鉀水溶液3 mL $\times$ 2、5%碳酸鉀水溶液3 mL $\times$ 2、普通水1.5 mL $\times$ 3洗淨有機層。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5  $\mu\text{L}$ ，加入正丙胺100  $\mu\text{L}$  (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋，進行LC/MS分析，計算目的胜肽和殘留的C端活性體（轉化為丙醯胺的轉化體）的峰面積值。使剩下的有機層濃縮，獲得胜肽。經未添加胺的水解所獲得的濃縮物（胜肽）為782.0mg（產率136%：濃縮物中包含雜質（殘留的C端活性體），但作為只含有胜肽者進行計算）。經添加胺的水解所獲得的濃縮物為530.6mg（產率92%）。  
MS (ESI) : m/z 518.4 [ M+H ] +, 540.4 [ M+Na ] +。

**【0172】** [表7]

entry	胺	水解處理後立即	分液操作後的有機層		濃縮後
		C端活性體殘留率 (%)	二胜肽 (%) <sup>1</sup>	殘留的C端活性體 (%) <sup>1</sup> (丙醯胺轉化體)	產率 (%)
1	DMAP	0	100	Nd	92
2	無	23.0	80.4	17.6	136

1) LCMS的峰面積比率

**【0173】** 發現只使用鹼性水處理的水解，殘留的C端活性體未完全被水解，即使後續的水性洗淨也無法去除殘留的C端活性體，但當添加DMAP進行水解，殘留的C端活性體的水解完全地達成，也可使殘留的C端活性體的去完全。再者此時，以100%的純度獲得目的二胜肽（產率92%）。

**【0174】** (實施例8) Cbz-MeVal-MeAsp (tBu) -piperidine的合成  
(縮合反應)

使MeAsp (tBu) -piperidine 299 mg (1.1 mmol)、Cbz-MeVal-OH 458 mg (1.7 mmol) 懸浮於2-MeTHF 4.5 mL溶劑，加入二異丙基乙胺775  $\mu$ L (4.4 mmol)。之後在25°C加入50%T3P/THF溶液1.6 mL (2.8 mmol)，在25°C攪拌15小時，進行胜肽鍵形成反應。取反應液5  $\mu$ L，加入正丙胺100  $\mu$ L (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。此溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得轉化率 (轉化率：100%)。

$$\text{轉化率 (\%)} = \left\{ \text{Cbz-MeVal-MeAsp (tBu) -piperidine (面積\%)} \right\} / \left\{ \text{MeAsp (tBu) -piperidine (面積\%)} + \text{Cbz-MeVal-MeAsp (tBu) -piperidine (面積\%)} \right\} \times 100$$

**【0175】** (水解處理)

(1) 未添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入5%碳酸鉀水溶液3.0 mL，在25°C以攪拌子攪拌5分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5  $\mu$ L，加入正丙胺100  $\mu$ L (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從LC/MS的峰面積，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

$$\text{C端活性體殘留率 (\%)} = \left\{ \text{丙醯胺 (面積\%)} \right\} / \left\{ \text{丙醯胺 (面積\%)} + \text{二胜肽 (面積\%)} \right\} \times 100$$

**【0176】** (2) 添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入DMAP 141 mg (1.1 mmol) 和5%碳酸鉀水溶液3.0 mL，在25°C以攪拌子攪拌5分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5  $\mu$ L，加入正丙胺100  $\mu$ L (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從LC/MS的峰面積值，根據下列算式，

計算C端活性體殘留率。

C端活性體殘留率 (%) = { 丙醯胺 (面積%) / [ 丙醯胺 (面積%) + 二  
 胜肽 (面積%) ] } × 100

**【0177】** (後處理)

停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後依序以10%硫酸氫  
 鉀水溶液3 mL、5%碳酸鉀水溶液3 mL洗淨有機層。停止攪拌，使有機層和水層  
 分層。取有機層5 μL，加入正丙胺100 μL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉  
 化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋，進行LC/MS分析，計算目的胜肽和殘留的  
 C端活性體 (轉化為丙醯胺的轉化體) 的峰面積值。使剩下的有機層濃縮，獲得  
 胜肽。經未添加胺的水解所獲得的濃縮物 (胜肽) 為561.6mg (產率98%：濃縮  
 物中包含雜質 (殘留的C端活性體)，但作為只含有胜肽者進行計算)。經添加  
 胺的水解所獲得的濃縮物為501.1mg (產率87%)。MS (ESI) : m/z 518.4 [   
 M+H ] +, 540.4 [ M+Na ] +。

**【0178】** [表8]

entry	胺	水解處理後立即	分液操作後的有機層		濃縮後
		C端活性體殘留率 (%)	二胜肽 (%) <sup>1</sup>	殘留的C端活性體 (%) <sup>1</sup> (丙醯胺轉化體)	產率 (%)
1	DMAP	2.8	100	Nd	87
2	無	14.0	88.0	6.7	98

1) LCMS的峰面積比率

**【0179】** 發現只使用鹼性水處理的水解，殘留的C端活性體未完全被水  
 解，即使後續的水性洗淨也無法去除殘留的C端活性體，但當添加DMAP進行水  
 解，殘留的C端活性體的水解完全地達成，也可使殘留的C端活性體的去完全。  
 再者此時，以100%的純度獲得目的二胜肽 (產率87%)。

**【0180】** (實施例9) Cbz-Ile-MeVal-MeAsp (tBu) -piperidine的合成  
 (使用不添加胺進行水解處理所得的二胜肽的Cbz脫保護反應)

第 46 頁，共 89 頁(發明說明書)

將實施例7之以不添加胺的條件所合成的Cbz-MeVal-MeAsp(tBu)-piperidine 782 mg (包含殘留的C端活性體17.6面積%) 溶解於環戊基甲基醚4.2mL。在5%Pd/C (50%wet) 115 mg及氫氣中進行氫解反應。由於反應幾乎不進行，因此使用過濾器濾掉Pd/C後，濃縮乾燥，再次溶解於環戊基甲基醚4.2mL，加入5%Pd/C (50%wet) 105 mg，再次進行氫解反應。但是，即使以總計3小時進行反應，反應幾乎不進行(反應轉化率：1.6%)。取反應液5 μL，以乙腈1.0mL稀釋後，經過過濾器過濾的溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率}(\%) = \left\{ \text{MeVal-MeAsp(tBu)-piperidine (面積\%)} \right\} / \left\{ \text{MeVal-MeAsp(tBu)-piperidine (面積\%)} + \text{Cbz-MeVal-MeAsp(tBu)-piperidine (面積\%)} \right\} \times 100$$

**【0181】** (使用添加胺進行水解處理所得的二胜肽的Cbz脫保護反應)

將實施例7之以添加胺的條件所合成的Cbz-MeVal-MeAsp(tBu)-piperidine 543 mg (1.0 mmol) 溶解於環戊基甲基醚4.3mL。在5%Pd/C (50%wet) 124 mg及氫氣中進行氫解反應。在室溫攪拌2小時，獲得脫Cbz體的MeVal-MeAsp(tBu)-piperidine (轉化率100%)。取反應液5 μL，以乙腈1.0mL稀釋後，經過過濾器過濾的溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。MS(ESI): m/z 384.3 [M+H]<sup>+</sup>。

$$\text{轉化率}(\%) = \left\{ \text{MeVal-MeAsp(tBu)-piperidine (面積\%)} \right\} / \left\{ \text{MeVal-MeAsp(tBu)-piperidine (面積\%)} + \text{Cbz-MeVal-MeAsp(tBu)-piperidine (面積\%)} \right\} \times 100$$

**【0182】** (縮合反應)

以過濾器過濾反應液，濾掉Pd/C後，濃縮乾燥。將乾燥物溶解於2-甲基四氫呋喃4.3mL，加入Cbz-Ile-OH 362 mg (1.3 mmol)、二異丙基乙胺 715 μL (4.1

mmol)。之後在25°C加入50%T3P/THF溶液 1.4 mL (2.4 mmol)，在40°C攪拌7小時、再到室溫攪拌14小時，進行胜肽鍵形成反應(轉化率：100%)。在調製好的反應溶液加入N-甲基咪唑81  $\mu$ L (1.0 mmol)、20%碳酸鉀水溶液2.6 mL，在25 °C以攪拌子攪拌45分鐘。停止攪拌後、靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後依序以10%硫酸氫鉀水溶液5.2mL、5%碳酸鉀水溶液5.2 mL $\times$ 2洗淨有機層。將所得的有機層5  $\mu$ L加入正丙胺100  $\mu$ L，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，求得目的胜肽和殘留的C端活性體的峰面積百分比。目的胜肽Cbz-Ile-MeVal-MeAsp (tBu) -piperidine為95.1%，未檢測出來自殘留的C端活性體的Cbz-Ile-NHPr。使剩下的有機層濃縮，獲得濃縮物542.7 mg (產率82%)。MS (ESI) : m/z 631.5 [M+H]<sup>+</sup>、653.4 [M+Na]<sup>+</sup>。

**【0183】** 可清楚知道，當使用只以鹼性水處理、C端活性體殘留的胜肽溶液，Cbz脫保護反應幾乎不進行。另一方面發現，如果使用添加DMAP進行處理所得的、殘留的C端活性體完全地去除的胜肽溶液，則Cbz脫保護反應平順地進行，能夠進行後續的胜肽合成反應。亦即了解，經由使用本發明之方法，所生成的胜肽化合物的N端的保護基的還原去除反應能夠不停滯地進行。藉此，能夠有效率地製造具有所期望的胺基酸序列的高純度胜肽化合物。

**【0184】** (實施例10) Cbz-Phe (3-F) -Phe-OtBu的合成

使Phe-OtBu鹽酸鹽 200 mg (0.8 mmol)、Cbz-Phe (3-F) -OH 297 mg (0.9 mmol) 懸浮於甲苯 3.0 mL，加入二異丙基乙胺407  $\mu$ L (2.3 mmol)。之後在25 °C加入50%T3P/THF溶液 0.9 mL (1.6 mmol)，室溫下攪拌30分鐘，進行胜肽鍵形成反應(轉化率：100%)。取反應液5  $\mu$ L，加入正丙胺100  $\mu$ L，以甲醇0.9 mL稀釋的溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率(%) = { Cbz-Phe (3-F) -Phe-OtBu (面積%) / [ Phe-OtBu (面積%) + Cbz-Phe (3-F) -Phe-OtBu (面積%) ] }  $\times$ 100

【0185】 在上述反應溶液加入DMAP 95 mg (0.8 mmol)、5%碳酸鉀水溶液2.0 mL，在25 °C以攪拌子攪拌5分鐘。停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後，依序以10%硫酸氫鉀水溶液1 mL、5%碳酸鉀水溶液1 mL、普通水1 mL洗淨有機層。將所得的有機層5  $\mu$ L加入正丙胺100  $\mu$ L，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，求得目的胜肽和殘留的C端活性體的峰面積百分比。目的胜肽Cbz-Phe (3-F) -Phe-OtBu為純度100%，未檢測出來自殘留的C端活性體的Cbz-Phe (3-F) -NHPr。使剩下的有機層濃縮，獲得濃縮物387.2mg (產率96%)。MS (ESI) : m/z 465.2 [ M-tBu+H ] +, 521.1 [ M+H ] +, 543.2 [ M+Na ] +。

【0186】 當添加DMAP進行水解時，殘留的C端活性體的去完全地達成，能夠以100%的純度獲得目的二胜肽 (產率96%)。

【0187】 (實施例11) Cbz-Ser (OtBu) -Phe-OtBu的合成

使Phe-OtBu鹽酸鹽 300 mg (1.2 mmol)、Cbz-Ser (OtBu) -OH 450 mg (1.5 mmol) 懸浮於2-甲基四氫呋喃3.6 mL，加入二異丙基乙胺610  $\mu$ L (3.5 mmol)。之後在25°C加入50%T3P/THF溶液 1.4 mL (2.3 mmol)，室溫下攪拌1小時，進行胜肽鍵形成反應 (轉化率：100%)。取反應液5  $\mu$ L，加入正丙胺100 $\mu$ L，以甲醇0.9mL稀釋的溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { Cbz-Ser (tBu) -Phe-OtBu (面積%) / [ Phe-OtBu (面積%) + Cbz-Ser (tBu) -Phe-OtBu (面積%) ] }  $\times$  100

【0188】 在上述反應溶液加入DMAP 143 mg (1.2 mmol)、20%碳酸鉀水溶液1.5 mL，在25 °C以攪拌子攪拌5分鐘。停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後，依序以10%硫酸氫鉀水溶液3.0 mL $\times$ 2、5%碳酸鉀水溶液3.0 mL、普通水3.0 mL洗淨有機層。將所得有機層5  $\mu$ L加入正丙胺100  $\mu$ L，以

甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，求得目的胜肽和殘留的C端活性體的峰面積百分比。目的胜肽Cbz-Ser (OtBu) -Phe-OtBu為純度100%，未檢測到來自殘留的C端活性體的Cbz-Ser (OtBu) -NHPr。使剩下的有機層濃縮，獲得濃縮物556.4mg (產率96%)。MS (ESI) : m/z 387.1 [ M-2tBu+H ]<sup>+</sup>, 499.3 [ M+H ]<sup>+</sup>, 521.2 [ M+Na ]<sup>+</sup>。

**【0189】** 當添加DMAP進行水解時，殘留的C端活性體的去完全地達成，能夠以100%的純度獲得目的二胜肽 (產率96%)。

**【0190】** (實施例12) Boc-MeVal-Phe-piperidine的合成  
(Boc脫保護反應)

將Boc-Phe-piperidine 471 mg (1.4 mmol) 溶解於二氯甲烷4.7 mL，加入甲磺酸180 μL (2.8 mmol)。在35 °C攪拌2小時，進行脫Boc反應 (轉化率100%)。取反應液5 μL，以乙腈1.0mL稀釋的溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{Phe-piperidine (面積\%)}}{\text{Boc-Phe-piperidine (面積\%)} + \text{Phe-piperidine (面積\%)}} \right\} \times 100$$

**【0191】** (縮合反應)

在上述反應溶液加入二異丙基乙胺742 μL (4.3 mmol) 後，餾去溶劑。之後加入乙腈1.4 mL、2-甲基四氫呋喃3.3 mL、二異丙基乙胺742 μL (4.3 mmol)、Boc-MeVal-OH 492 mg (2.1 mmol)。在25 °C加入HATU 804 mg (2.2 mmol)，在室溫攪拌1小時，進行胜肽鍵形成反應 (轉化率：100%)。取反應液5 μL，加入正丙胺100μL，以甲醇0.9mL稀釋的溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{Boc-MeVal-Phe-piperidine (面積\%)}}{\text{Phe-piperidine (面積\%)} + \text{Boc-MeVal-Phe-piperidine (面積\%)}} \right\} \times 100$$

【0192】 在上述調製好的反應溶液，加入DMAP 168 mg (1.4 mmol)、5%碳酸鉀水溶液4.6 mL，在25 °C以攪拌子攪拌5分鐘。停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後，依序以10%硫酸氫鉀水溶液4.6 mL、5%碳酸鉀水溶液4.6 mL、普通水1.5 mL×6洗淨有機層。將所得的有機層5 μL加入正丙胺100 μL，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，求得目的胜肽和殘留的C端活性體的峰面積百分比。目的胜肽Boc-MeVal-Phe-OtBu為純度99.7%，未檢測到來自殘留的C端活性體的Boc-MeVal-NHPr。使剩下的有機層濃縮，獲得濃縮物542.3mg (產率86%)。MS (ESI) : m/z 346.2 [M-Boc+H]<sup>+</sup>, 446.3 [M+H]<sup>+</sup>, 468.3 [M+Na]<sup>+</sup>。

【0193】 當添加DMAP進行水解時，殘留的C端活性體的去完全地達成，即使N端的保護基為Boc，也可獲得99.7%的純度的目的二胜肽 (產率86%)。

【0194】 (實施例13) Cbz-Ile-MeAla-Aze-MePhe-MeGly-OtBu / 序列識別號：1 (5 mer) 的合成例

(Cbz-MePhe-MeGly-OtBu的合成)

(縮合反應)

使MeGly-OtBu鹽酸鹽 2.0 g (11.0 mmol) 懸浮於乙酸異丙酯16 mL、乙腈4 mL，加入二異丙基二乙胺7.7 mL (44.0 mmol)、Cbz-MePhe-OH 3.6 g (11.5 mmol)。使反應液冷卻至0°C，加入T3P/乙酸乙酯溶液 9.7 mL (16.5 mmol) 後，在室溫攪拌30分鐘，進行胜肽鍵形成反應 (轉化率：100%)。取反應液3 μL，以甲醇1.0 mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { 目的化合物 (面積%) / [原料 (面積%) + 目的化合物 (面積%)] } × 100

【0195】 之後，加入NMI 1.7 mL (22.0 mmol)、5%碳酸鈉水溶液 20 mL，

在50°C攪拌5分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。去除水層，剩下的有機層以5%硫酸鉀水溶液、5%碳酸鉀水溶液×2洗淨後，使所得的有機層濃縮，獲得濃縮物 5.0g（產率 quant.）。將此濃縮物進行 LC / MS 分析，求得目的 Cbz-MePhe-MeGly-OtBu 的峰面積百分比（100面積%）。MS（ESI）：m/z 441.2 [M+H]<sup>+</sup>, 463.2 [M+Na]<sup>+</sup>。

**【0196】** （Cbz-Aze-MePhe-MeGly-OtBu的合成）

（Cbz脫保護反應）

以上述方法所得的 Cbz-MePhe-MeGly-OtBu 全量溶解於乙酸異丙酯 75 mL，在 10%Pd/C（3% wet）0.98 g 和氫氣進行氫解反應。在室溫攪拌 2 小時，獲得脫 Cbz 化體（轉化率：100%）。取反應液 3 μL，以甲醇 1.0 mL 稀釋的溶液進行 LC / MS 分析，從 LC / MS 的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率}(\%) = \left\{ \frac{\text{目的化合物}(\text{面積}\%)}{[\text{原料}(\text{面積}\%) + \text{目的化合物}(\text{面積}\%)]} \right\} \times 100$$

**【0197】** （縮合反應）

以過濾器過濾反應液，加入甲苯進行共沸脫水。使濃縮物溶解於乙酸異丙酯 39 mL、乙腈 9.7 mL，冷卻至 0°C。加入 Cbz-Aze-OH 2.6 g（11.0 mmol）、50%T3P / 乙酸乙酯溶液 13.0 mL（22.0 mmol）、二異丙基乙胺 7.7 mL（44.0 mmol）後，在室溫攪拌 30 分鐘，進行胜肽鍵形成反應（轉化率：>99%）。取反應液 3 μL，以甲醇 1.0 mL 稀釋後，進行 LC / MS 分析，從 LC / MS 的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率}(\%) = \left\{ \frac{\text{目的化合物}(\text{面積}\%)}{[\text{原料}(\text{面積}\%) + \text{目的化合物}(\text{面積}\%)]} \right\} \times 100$$

**【0198】** 之後，加入 NMI 1.7 mL（22.0 mmol）、5%碳酸鈉水溶液 34 mL，在 50°C 攪拌 5 分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。去除水層，剩下的有機層

以5%硫酸鉀水溶液34 mL、5%碳酸鉀水溶液34 mL洗淨後，使所得的有機層濃縮，獲得濃縮物5.5g（產率96%）。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的Cbz-Aze-MePhe-MeGly-OtBu的峰面積百分比（99.8面積%）。MS（ESI）： $m/z$  546.2 [M+Na]<sup>+</sup>。

**【0199】**（Cbz-MeAla-Aze-MePhe-MeGly-OtBu/序列識別號：2的合成）  
（Cbz脫保護反應）

以上述方法所得的Cbz-Aze-MePhe-MeGly-OtBu 5.5 g（10.6 mmol）溶解於乙酸異丙酯75 mL，在10%Pd/C（3% wet）0.95 g和氫氣進行氫解反應。在50°C攪拌2小時，獲得脫Cbz化體（轉化率：100%）。取反應液3  $\mu$ L，以甲醇1.0mL稀釋的溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率（%）= { 目的化合物（面積%） / [原料（面積%） + 目的化合物（面積%）] }  $\times$  100

**【0200】**（縮合反應）

以過濾器過濾反應液，加入甲苯進行共沸脫水2次。使濃縮物溶解於乙酸異丙酯32.8 mL、乙腈8.2 mL。加入Cbz-MeAla-OH 2.7 g（11.1 mmol）、二異丙基乙胺7.4 mL（42.3 mmol）後，加入50%T3P/乙酸乙酯溶液12.5 mL（21.1 mmol）、二異丙基乙胺7.4 mL（42.3 mmol）。在室溫攪拌2小時後，追加Cbz-MeAla-OH 0.39 g（1.7 mmol）、T3P/乙酸乙酯溶液 1.9 mL（3.2 mmol）、二異丙基乙胺 1.1 mL（6.3 mmol），再於室溫攪拌2小時，進行胜肽鍵形成反應（轉化率：97%）。取反應液3  $\mu$ L，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率（%）= { 目的化合物（面積%） / [原料（面積%） + 目的化合物（面積%）] }  $\times$  100

**【0201】** 之後，加入NMI 1.7 mL（21.1 mmol）、5%碳酸鈉水溶液 41 mL，

第 53 頁，共 89 頁(發明說明書)

在50°C攪拌5分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。去除水層，剩下的有機層以5%硫酸鉀水溶液41 mL、5%碳酸鉀水溶液41 mL洗淨後，使所得有機層濃縮，獲得濃縮物5.8g（產率91%）。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的Cbz-MeAla-Aze-MePhe-MeGly-OtBu（序列識別號：2）的峰面積百分比（99.5面積%）。MS（ESI）：m/z 609.3 [M+H]<sup>+</sup> 631.3 [M+Na]<sup>+</sup>。

**【0202】**（Cbz-Ile-MeAla-Aze-MePhe-MeGly-OtBu/序列識別號：1的合成）

（Cbz脫保護反應）

使以上述方法所得的Cbz-MeAla-Aze-MePhe-MeGly-OtBu（序列識別號：2）5.8 g（9.6 mmol）溶解於乙酸異丙酯88 mL，在10%Pd/C（3% wet）0.93 g和氫氣進行氫解反應。在室溫攪拌5小時後，以過濾器濾過反應液（轉化率：100%）。取反應液3 μL，以甲醇1.0mL稀釋的溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率（%）= { 目的化合物（面積%） / [ 原料（面積%） + 目的化合物（面積%） ] } × 100

**【0203】**濃縮濾液，獲得濃縮液4.4g（產率97%）。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的MeAla-Aze-MePhe-MeGly-OtBu（序列識別號：3）的峰面積百分比（99.7面積%）。MS（ESI）：m/z 475.3 [M+H]<sup>+</sup>。

**【0204】**（縮合反應）

使上述濃縮物 1.5 g（3.2 mmol）和Cbz-Ile-OH 1.3 g（4.7 mmol）溶解於乙酸異丙酯18 mL、乙腈4.5 mL。加入二異丙基乙胺2.2 mL（12.6 mmol）、HATU 2.4 g（6.3 mmol），在室溫攪拌30分鐘，進行胜肽鍵形成反應（轉化率：>99%）。取反應液3 μL，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { 目的化合物 (面積%) / [ 原料 (面積%) + 目的化合物 (面積%) ] } × 100

【0205】 之後，加入NMI 0.75 mL (9.5 mmol)、5%碳酸鈉水溶液 22.5 mL，在50°C攪拌20分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。去除水層，剩下的有機層以5%硫酸鉀水溶液22.5 mL×2、5%碳酸鉀水溶液22.5 mL×3洗淨後，使所得的有機層濃縮，獲得濃縮物2.4g (產率quant.)。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的Cbz-Ile-MeAla-Aze-MePhe-MeGly-OtBu (序列識別號：1)的峰面積百分比 (99.1面積%)。MS (ESI) : m/z 744.3 [ M+Na ]<sup>+</sup>。

【0206】 經由添加NMI、進行1次水解，接著水性洗淨，可達到殘留的C端活性體的完全去除，以99.1%的純度獲得目的五胜肽。其產率，從最初的胺基酸合計計算，為87%。此結果顯示，在連續的液相胜肽合成中，經由使用胺添加劑而完全去除殘留的C端活性體，可以高產率地達成高純度的五胜肽的合成。

【0207】 (實施例14)

Cbz-MeAla-MePhe-Leu-MeLeu-Val-MeGly-MeIle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine / 序列識別號：4 (11 mer) 的合成

(Cbz-MeVal-Asp (tBu) -piperidine的合成)

(縮合反應)

使Asp (tBu) -piperidine 8.6 g (33.5 mmol) 溶解於環戊基甲基醚108 mL。加入Cbz-MeVal-OH 9.79 g (36.9 mmol)、二異丙基乙胺17.6 mL (101 mmol)。使BEP 13.8 g (50.3 mmol) 溶解於乙腈21.5 mL後，加入反應液，室溫攪拌3分鐘，進行胜肽鍵形成反應 (轉化率：>99%)。取反應液5 μL，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { 目的化合物 (面積%) / [ 原料 (面積%) + 目的化合物 (面積%) ] } × 100

**【0208】** 以10%硫酸氫鉀水溶液 150 mL洗淨反應液後，加入5%碳酸鉀水溶液 150 mL和三甲基胺鹽酸鹽9.52 g (101 mmol)，在40°C攪拌90分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。去除水層，剩下的有機層以5%碳酸鉀水溶液150 mL洗淨後，使所得有機層濃縮，獲得濃縮物17g (產率：quant.)。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的胜肽Cbz-MeVal-Asp (tBu) -piperidine的峰面積百分比 (99.7面積%)。

**【0209】** (Cbz-MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine的合成)

(Cbz脫保護反應)

將上述方法所得的Cbz-MeVal-Asp (tBu) -piperidine 9.5 g (9.6 mmol) 溶解於環戊基甲基醚50 mL，在10%Pd/C (3% wet) 1.9 g和氫氣進行氫解反應，在35°C攪拌2小時 (轉化率：100%)。取反應液5 μL，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { 目的化合物 (面積%) / [ 原料 (面積%) + 目的化合物 (面積%) ] } × 100

**【0210】** 再次進行相同的操作，合併反應液以過濾器過濾。濃縮濾液，獲得濃縮液14.0g (產率：quant.)。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的MeVal-Asp (tBu) -piperidine的峰面積百分比 (99.5面積%)。

**【0211】** (縮合反應)

使上述濃縮物溶解於環戊基甲基醚126 mL、乙腈14 mL。加入Cbz-MePhe-OH 13.0 g (41.7 mmol)、二異丙基乙胺52.9 mL (303 mmol)。加入50%T3P/乙酸乙酯溶液 67.0 mL (114 mmol)，在室溫攪拌1小時，進行胜肽鍵形成反應 (轉化率：>99%)。取反應液5 μL，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { 目的化合物 (面積%) / [ 原料 (面積%) + 目的化合物

(面積%) ] } ×100

**【0212】** 以5%硫酸氫鉀水溶液 140 mL洗淨反應液後，加入5%碳酸鉀水溶液 140 mL和三甲基胺鹽酸鹽10.9 g (114 mmol)，在室溫攪拌30分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。去除水層，剩下的有機層以5%碳酸鉀水溶液140 mL洗淨後，使所得的有機層濃縮，獲得濃縮物24.1g (產率96%)。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的Cbz-MePhe-MeVal-Asp (tBu)-piperidine的峰面積百分比 (99.6面積%)。

**【0213】** (Cbz-Ser (tBu)-MePhe-MeVal-Asp (tBu)-piperidine/序列識別號：5的合成)

(Cbz脫保護反應)

使上述方法所得的Cbz-MePhe-MeVal-Asp(tBu)-piperidine 11.5 g (9.6 mmol)溶解於環戊基甲基醚58 mL，在10%Pd/C 2.3 g和氫氣進行氫解反應，在35°C攪拌2小時 (轉化率：100%)。取反應液5 μL，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { 目的化合物 (面積%) / [原料 (面積%) + 目的化合物 (面積%) ] } ×100

**【0214】** 再次進行相同的操作，合併反應液以過濾器過濾。濃縮濾液，獲得濃縮物18.1g (產率99%)。

**【0215】** (縮合反應)

使上述濃縮物 17.3 g (32.6 mmol)溶解於環戊基甲基醚153 mL、乙腈17 mL。加入Cbz-Ser(tBu)-OH 10.6 g (35.9 mmol)、二異丙基乙胺45.5 mL (261 mmol)。加入50%T3P/乙酸乙酯溶液 57.6 mL (98.0 mmol)，在室溫攪拌15分鐘，進行胜肽鍵形成反應 (轉化率：>99%)。取反應液5 μL，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { 目的化合物 (面積%) / [ 原料 (面積%) + 目的化合物 (面積%) ] } × 100

**【0216】** 以5%硫酸氫鉀水溶液 170 mL洗淨反應液後，加入5%碳酸鉀水溶液 170 mL和三甲基胺鹽酸鹽9.4 g (98.0 mmol)，在室溫攪拌2小時。停止攪拌，使有機層和水層分層。去除水層，剩下的有機層以5%碳酸鉀水溶液170 mL洗淨後，使所得的有機層濃縮，獲得濃縮物26.5g (產率：quant.)。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的Cbz-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine (序列識別號：5)的峰面積百分比(98.9面積%)。MS (ESI) : 830.4 [M+Na]<sup>+</sup>。

**【0217】** (Cbz-Melle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine / 序列識別號：6的合成)

(Cbz脫保護反應)

使Cbz-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine (序列識別號：5) 12.0 g (14.9 mmol) 溶解於環戊基甲基醚60 mL，在10%Pd/C 2.4 g和氫氣進行氫解反應，在35°C攪拌2小時(轉化率：>98%)。取反應液5 μL，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { 目的化合物 (面積%) / [ 原料 (面積%) + 目的化合物 (面積%) ] } × 100

**【0218】** 再次進行相同的操作，合併反應液以過濾器過濾。濃縮濾液，獲得濃縮物19.5g (產率97%)。

**【0219】** (縮合反應)

使上述濃縮物 16.0 g (23.7 mmol) 溶解於環戊基甲基醚200 mL。加入Cbz-Melle-OH 7.3 g (26.1 mmol)、二異丙基乙胺12.4 mL (71.2 mmol)。使BEP 9.8 g (35.6 mmol) 溶解於乙腈40 mL後，加入反應液，在室溫攪拌5分鐘，

進行胜肽鍵形成反應（轉化率：>99%）。取反應液5  $\mu$ L，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率}(\%) = \{ \text{目的化合物}(\text{面積}\%) / [\text{原料}(\text{面積}\%) + \text{目的化合物}(\text{面積}\%)] \} \times 100$$

**【0220】** 以10%硫酸氫鈉水溶液 240 mL洗淨反應液後，加入5%碳酸鉀水溶液 240 mL和三甲基胺鹽酸鹽6.7 g（71.2 mmol），在40°C攪拌1.5小時。停止攪拌，使有機層和水層分層。去除水層，剩下的有機層以5%碳酸鉀水溶液240 mL洗淨後，使所得的有機層濃縮，獲得濃縮物22.2g（產率：quant.）。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的Cbz-MeIle-Ser（tBu）-MePhe-MeVal-Asp（tBu）-piperidine（序列識別號：6）的峰面積百分比（99.4面積%）。

**【0221】** （Cbz-MeGly-MeIle-Ser（tBu）-MePhe-MeVal-Asp（tBu）-piperidine/序列識別號：7的合成）

（Cbz脫保護反應）

使Cbz-MeIle-Ser（tBu）-MePhe-MeVal-Asp（tBu）-piperidine（序列識別號：6）9.5 g（10.2 mmol）溶解於環戊基甲基醚48 mL，在10%Pd/C 1.9 g和氫氣進行氫解反應，在35°C攪拌2小時。再次進行相同的操作，合併反應液以過濾器過濾。濃縮濾液，獲得濃縮物15.6g（產率96%）。

**【0222】** （縮合反應）

使上述濃縮物 15.3 g（19.1 mmol）溶解於環戊基甲基醚138 mL、乙腈15mL。加入Cbz-MeGly-OH 4.7 g（21.0 mmol）、二異丙基乙胺26.7 mL（153 mmol）。加入50%T3P/乙酸乙酯溶液 33.8 mL（57.3 mmol），在室溫攪拌15分鐘，進行胜肽鍵形成反應（轉化率：>99%）。取反應液5  $\mu$ L，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率}(\%) = \{ \text{目的化合物}(\text{面積}\%) / [\text{原料}(\text{面積}\%) + \text{目的化合物}(\text{面積}\%)] \}$$

(面積%) ] } ×100

**【0223】** 以5%硫酸氫鉀水溶液 153 mL洗淨反應液後，加入5%碳酸鉀水溶液 153 mL，在室溫攪拌5分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層，去除水層後，加入5%碳酸鉀水溶液153 mL，在室溫攪拌1小時。去除水層後，使所得的有機層濃縮，獲得濃縮物19.5g（產率：quant.）。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的Cbz-MeGly-Melle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine（序列識別號：7）的峰面積百分比（99.6面積%）。

**【0224】** （Cbz-Val-MeGly-Melle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine／序列識別號：8的合成）

（Cbz脫保護反應）

使Cbz-MeGly-Melle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine（序列識別號：7）9.5 g（10.2 mmol）溶解於環戊基甲基醚48 mL，在10%Pd/C 1.9 g和氫氣進行氫解反應，在35°C攪拌3小時（轉化率：100%）。取反應液5 μL，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率（%）= { 目的化合物（面積%） / [原料（面積%） + 目的化合物（面積%）] } ×100

**【0225】** 再次進行相同的操作，合併反應液以過濾器過濾。濃縮濾液，獲得濃縮物16.3g（產率99%）。

**【0226】** （縮合反應）

使上述濃縮物 16.0 g（18.4 mmol）溶解於環戊基甲基醚144 mL、乙腈16 mL。加入Cbz-Val-OH 5.1 g（20.2 mmol）、二異丙基乙胺25.6 mL（147 mmol）。加50%T3P/乙酸乙酯溶液 32.4 mL（55.0 mmol），在室溫攪拌30分鐘，進行胜肽鍵形成反應（轉化率：>99%）。取反應液5 μL，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { 目的化合物 (面積%) / [ 原料 (面積%) + 目的化合物 (面積%) ] } × 100

**【0227】** 以5%硫酸氫鉀水溶液 160 mL洗淨反應液後，加入5%碳酸鉀水溶液 153 mL、三甲基胺鹽酸鹽5.3 g (55.0 mmol)，在60°C攪拌1小時。停止攪拌，使有機層和水層分層，去除水層後，所得的有機層以5%碳酸鉀水溶液160 mL洗淨、濃縮，獲得濃縮物20.0g (產率：99%)。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的Cbz-Val-MeGly-MeIle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine (序列識別號：8) 的峰面積百分比 (99.6面積%)。

**【0228】** ( Cbz-MeLeu-Val-MeGly-MeIle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine / 序列識別號：9的合成)  
( Cbz脫保護反應)

使Cbz-Val-MeGly-MeIle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine (序列識別號：8) 9.2 g (8.3 mmol) 溶解於環戊基甲基醚46 mL，在10%Pd/C 1.8 g和氫氣進行氫解反應，在35°C攪拌6小時，再於45°C攪拌4小時(轉化率：100%)。取反應液5 μL，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { 目的化合物 (面積%) / [ 原料 (面積%) + 目的化合物 (面積%) ] } × 100

**【0229】** 再次進行相同的操作，合併反應液以過濾器過濾。濃縮濾液，獲得濃縮物 15.9g (產率98%)。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的Val-MeGly-MeIle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine (序列識別號：10) 的峰面積百分比 (97.9面積%)。

**【0230】** (縮合反應)

使上述濃縮物 14.5 g (14.9 mmol) 溶解於環戊基甲基醚181 mL。加入

第 61 頁，共 89 頁(發明說明書)

Cbz-MeLeu-OH 4.6 g (16.4 mmol)、二異丙基乙胺7.8 mL (44.8 mmol)。使BEP 4.9 g (17.9 mmol) 溶解於乙腈36 mL後，將所得的BEP溶液加入反應液，在40°C攪拌1分鐘，進行胜肽鍵形成反應（轉化率：>99%）。取反應液5 μL，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{目的化合物 (面積\%)}}{\left[ \text{原料 (面積\%)} + \text{目的化合物 (面積\%)} \right]} \right\} \times 100$$

**【0231】** 以10%硫酸氫鈉水溶液 128 mL洗淨反應液後，加入5%碳酸鉀水溶液 128 mL、三甲基胺鹽酸鹽4.2 g (44.8 mmol)，在40°C攪拌30分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層，去除水層後，所得的有機層以5%碳酸鉀水溶液128 mL洗淨、濃縮，獲得濃縮物18.0g (產率98%)。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的Cbz-MeLeu-Val-MeGly-Melle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine (序列識別號：9)的峰面積百分比(96.0面積%)。

**【0232】** (Cbz-Leu-MeLeu-Val-MeGly-Melle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine/序列識別號：11的合成)

(Cbz脫保護反應)

使 Cbz-MeLeu-Val-MeGly-Melle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine (序列識別號：9) 8.0 g (6.5 mmol) 溶解於環戊基甲基醚40 mL，在10%Pd/C 1.6 g和氫氣進行氫解反應，在45°C攪拌4小時(轉化率：100%)。取反應液5 μL，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{目的化合物 (面積\%)}}{\left[ \text{原料 (面積\%)} + \text{目的化合物 (面積\%)} \right]} \right\} \times 100$$

**【0233】** 再次進行相同的操作，合併反應液以過濾器過濾。濃縮濾液，獲得濃縮物14.3g (產率quant.)。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的

MeLeu-Val-MeGly-MeIle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine (序列識別號：12) 的峰面積百分比 (95.8面積%)。MS (ESI) : m/z 1098.6 [M+H]<sup>+</sup>。

**【0234】** (縮合反應)

使上述濃縮物 13.0 g (11.8 mmol) 溶解於環戊基甲基醚 117 mL、乙腈 13 mL。加入 Cbz-Leu-OH 3.5 g (13.0 mmol)、二異丙基乙胺 16.5 mL (95.0 mmol)。在反應液加入 50%T3P/乙酸乙酯溶液 20.9 mL (35.5 mmol)，在室溫攪拌 30 分鐘，進行胜肽鍵形成反應 (轉化率：>99%)。取反應液 5 μL，以甲醇 1.0 mL 稀釋後，進行 LC/MS 分析，從 LC/MS 的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { 目的化合物 (面積%) / [ 原料 (面積%) + 目的化合物 (面積%) ] } × 100

**【0235】** 以 5% 硫酸氫鉀水溶液 130 mL 洗淨反應液後，加入 5% 碳酸鉀水溶液 130 mL、三甲基胺鹽酸鹽 3.4 g (35.5 mmol)，在 60°C 攪拌 45 分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層，去除水層後，所得有機層以 5% 碳酸鉀水溶液 130 mL 洗淨、濃縮，獲得濃縮物 15.6 g (產率 98%)。將此濃縮物進行 LC/MS 分析，求得目的 Cbz-Leu-MeLeu-Val-MeGly-MeIle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine (序列識別號：11) 的峰面積百分比 (97.2面積%)。

**【0236】** ( Cbz-MePhe-Leu-MeLeu-Val-MeGly-MeIle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine / 序列識別號：12 的合成)  
(Cbz 脫保護反應)

使 Cbz-Leu-MeLeu-Val-MeGly-MeIle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine (序列識別號：11) 10.0 g (7.4 mmol) 溶解於環戊基甲基醚 50 mL，在 10% Pd/C 2.0 g 和氫氣進行氫解反應，在 45°C 攪拌 4 小時 (轉化率：100%)。反應液以過濾器過濾後，濃縮濾液，獲得濃縮物 8.9 g (產率 99%)。取反應液 5 μL，

以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。MS (ESI) :  $m/z$  1211.7 [M+H]<sup>+</sup>、1233.7 [M+Na]<sup>+</sup>。

轉化率(%) = { 目的化合物(面積%) / [原料(面積%) + 目的化合物(面積%)] } × 100

**【0237】** (縮合反應)

使上述濃縮物 7.0 g (5.8 mmol) 溶解於環戊基甲基醚87.5 mL。加入Cbz-MePhe-OH 2.0 g (6.4 mmol)、二異丙基乙胺3.0 mL (17.3 mmol)。使BEP 1.9 g (17.9 mmol) 溶解於乙腈17.5 mL後，將所得的BEP溶液加入反應液，在室溫攪拌3分鐘，進行胜肽鍵形成反應(轉化率：>99%)。取反應液5 μL，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率(%) = { 目的化合物(面積%) / [原料(面積%) + 目的化合物(面積%)] } × 100

**【0238】** 以10%硫酸氫鈉水溶液 105 mL洗淨反應液後，加入5%碳酸鉀水溶液 105 mL、三甲基胺鹽酸鹽1.7 g (17.3 mmol)，在40°C攪拌30分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層，去除水層，所得的有機層以5%碳酸鉀水溶液105 mL洗淨、濃縮，獲得濃縮物8.6g(產率：99%)。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的Cbz-MePhe-Leu-MeLeu-Val-MeGly-Melle-Ser(tBu)-MePhe-MeVal-Asp(tBu)-piperidine(序列識別號：12)的峰面積百分比(97.0面積%)。

**【0239】** (Cbz-MeAla-MePhe-Leu-MeLeu-Val-MeGly-Melle-Ser(tBu)-MePhe-MeVal-Asp(tBu)-piperidine/序列識別號：4的合成)

(Cbz脫保護反應)

使Cbz-MePhe-Leu-MeLeu-Val-MeGly-MeLe-Ser(tBu)-MePhe-MeVal-Asp(tBu)-piperidine(序列識別號：12) 7.6 g (5.0 mmol) 溶解於環戊基甲基醚38 mL，在10%Pd/C 2.0 g和氫氣進行氫解反應，在45°C攪拌4小時(轉化率：

100%)。將反應液以過濾器過濾後，濃縮濾液，獲得濃縮物6.8g (產率98%)。取反應液5  $\mu$ L，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率 (\%)} = \{ \text{目的化合物 (面積\%)} / [ \text{原料 (面積\%)} + \text{目的化合物 (面積\%)} ] \} \times 100$$

**【0240】** (縮合反應)

使上述濃縮物 500 mg (0.4 mmol) 溶解於環戊基甲基醚4.5 mL、乙腈0.5 mL。加入Cbz-MeAla-OH 95.0 mg (0.4 mmol)、二異丙基乙胺509  $\mu$ L (2.9 mmol)。加入50%T3P/乙酸乙酯溶液 644  $\mu$ L (1.1 mmol) 後，在室溫攪拌2小時，進行胜肽鍵形成反應 (轉化率：>99%)。取反應液5  $\mu$ L，以甲醇1.0mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率 (\%)} = \{ \text{目的化合物 (面積\%)} / [ \text{原料 (面積\%)} + \text{目的化合物 (面積\%)} ] \} \times 100$$

**【0241】** 以10%硫酸氫鈉水溶液 5.0 mL洗淨反應液後，加入5%碳酸鉀水溶液 5.0 mL、三甲基胺鹽酸鹽104 mg (1.1 mmol)，在室溫攪拌1小時。停止攪拌，使有機層和水層分層，去除水層後，所得的有機層以5%碳酸鉀水溶液5.0 mL洗淨、濃縮，獲得濃縮物 555mg (產率 96%，Cbz-MeAla-MePhe-Leu-MeLeu-Val-MeGly-Melle-Ser (tBu) -MePhe-MeVal-Asp (tBu) -piperidine (序列識別號：4) 為95.3面積%)。MS (ESI)：m/z 1591.9 [M+H]<sup>+</sup>, 1613.9 [M+Na]<sup>+</sup>。

**【0242】** 經由添加三甲基胺進行1次水解、接著水性洗淨，可達成殘留的C端活性體的完全去除，能夠以高純度95.3%獲得由11個胺基酸所構成的胜肽。該產率從最初的胺基酸合計計算為75.3%。此結果顯示，在連續的液相胜肽合成中，經由使用胺添加劑去除殘留的C端活性體，可達成高純度的多胜肽合成。

**【0243】** (實施例15) Teoc-MeLeu-Phe-OtBu的合成

(Teoc-MeLeu-Opfp的合成)

使MeLeu-OH 2.35 g (16.2 mmol) 溶解於1,4-二噁烷(1,4-dioxane) 23.5 mL, 加入Teoc-OSu 4.61 g (17.8 mmol)、水23.5 mL、三乙胺 4.5 mL (32.4 mmol)。在室溫攪拌1小時, 進行Teoc化反應。加入5%硫酸氫鉀水溶液, 使反應液成酸性後, 以乙酸乙酯50 mL萃取, 有機層以飽和食鹽水洗淨。將所得有機層濃縮乾燥, 使濃縮物溶解於二氯甲烷30 mL。加入Pfp-OH 3.10 g (16.2 mmol)、EDC鹽酸鹽 4.53 g (24.3 mmol), 在室溫攪拌30分鐘, 進行Pfp化反應。反應溶液以飽和食鹽水洗淨後, 水層以乙酸乙酯50 mL萃取。使合併的有機層濃縮, 所得濃縮物以管柱層析法(乙酸乙酯/庚烷)純化, 獲得Teoc-MeLeu-OPfp 6.63g (產率: 90%)。

**【0244】** (縮合反應)

使Phe-OtBu鹽酸鹽 201 mg (0.8 mmol)、Teoc-MeLeu-OPfp 536 mg (1.2 mmol) 懸浮於乙酸異丙酯3.0 mL, 加入4-甲基嗎啉(4-methylmorpholine) 257  $\mu$ L (2.3 mmol), 在25 °C攪拌3小時, 進行胜肽鍵形成反應。取反應液5 $\mu$ L, 加入丙胺100 $\mu$ L (1.2 mmol), 使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後, 以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析, 從LC/MS的峰面積值求得轉化率(轉化率: 100%)。

$$\text{轉化率}(\%) = \left\{ \text{Teoc-MeLeu-Phe-OtBu}(\text{面積}\%) \right\} / \left[ \text{Phe-OtBu}(\text{面積}\%) + \text{Teoc-MeLeu-Phe-OtBu}(\text{面積}\%) \right] \times 100$$

**【0245】** (水解處理)

(1) 未添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液, 加入5%碳酸鈉水溶液2.0 mL, 在25 °C以攪拌子進行攪拌20分鐘。停止攪拌, 使有機層和水層分層。取有機層5  $\mu$ L,

加入丙胺100  $\mu\text{L}$  (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從 LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

$$\text{C端活性體殘留率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{丙醯胺 (面積\%)}}{\text{丙醯胺 (面積\%)} + \text{二胜肽 (面積\%)}} \right\} \times 100$$

#### 【0246】 (2) 添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入DMAP 95 mg (0.8 mmol)、5%碳酸鈉水溶液2.0 mL，在25 °C以攪拌子進行攪拌20分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5  $\mu\text{L}$ ，加入丙胺100  $\mu\text{L}$  (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從 LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

$$\text{C端活性體殘留率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{丙醯胺 (面積\%)}}{\text{丙醯胺 (面積\%)} + \text{二胜肽 (面積\%)}} \right\} \times 100$$

#### 【0247】 (後處理)

停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後依序以10%硫酸氫鉀水溶液2 mL $\times$ 2、5%碳酸鈉水溶液2 mL洗淨有機層。再重複3次以5%碳酸鉀水溶液1 mL、普通水1 mL $\times$ 2洗淨。取所得的有機層5  $\mu\text{L}$ ，加入丙胺100  $\mu\text{L}$  (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋，進行LC/MS分析，計算目的胜肽和殘留的C端活性體（轉化為丙醯胺的轉化體）的峰面積。經未添加胺的水解所獲得的濃縮物（胜肽）為576.6mg（產率150%：濃縮物中包含雜質（殘留的C端活性體），但作為只含有胜肽者進行計算）。經添加胺的水解所獲得的濃縮物為369.6mg（產率96%）。MS (ESI) : m/z 437.3 [ M-tBu + H ]<sup>+</sup>, 493.3 [ M+H ]<sup>+</sup>, 515.3 [ M+Na ]<sup>+</sup>。

#### 【0248】 [表9]

entry	水解處理後立即	分液操作後的有機層	濃縮後

	胺	C端活性體殘留率 (%)	二胜肽 (%) <sup>1</sup>	殘留的C端活性體 (%) <sup>1</sup> (丙醯胺轉化體)	產率 (%)
1	DMAP	0	96.3	nd	96
2	無	9.1	90.0	8.9	150

1) LCMS的峰面積比率

**【0249】** 在保護基為Teoc、C端活性體部位為Pfp的殘留的C端活性體之在只使用鹼性水處理的水解，殘留的C端活性體未完全地水解，即使後續的水性洗淨也無法去除殘留的C端活性體。另一方面發現，當添加DMAP進行水解，殘留的C端活性體的水解完全地達成，殘留的C端活性體的去除也可完全。以96.3%的純度獲得目的二胜肽（產率96%）。

**【0250】** （實施例16）Cbz-Aib-MeLeu-Phe-OtBu的合成

（使用未添加胺進行水解處理所得的二胜肽的Teoc脫保護反應）

使實施例15之以未添加胺條件所合成的Teoc-MeLeu-Phe-OtBu 576.6 mg（含有殘留的C端活性體8.9面積%）溶解於2-甲基四氫呋喃2.0 mL。加入TBAF的8.4%含水四氫呋喃溶液 1.5 mL（1.5 mmol）後，在50°C攪拌2.5小時。由於反應沒完成，因此加入TBAF的8.4%含水四氫呋喃溶液 0.75 mL（0.75 mmol），攪拌2.5小時。再加入TBAF的8.4%含水四氫呋喃溶液 0.75 mL（0.75 mmol），攪拌30分鐘，獲得脫Teoc體的MeLeu-Phe-OtBu（轉化率100%）。取反應溶液5 μL，以乙腈1.0 mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { MeLeu-Phe-OtBu (面積%) / [ Teoc-MeLeu-Phe-OtBu (面積%) + MeLeu-Phe-OtBu (面積%) ] } × 100

**【0251】** （縮合反應）

使內含量濃縮至約1 mL後，加入2-甲基四氫呋喃2 mL。再重複此操作2次，在所得的2-甲基四氫呋喃溶液，加入乙腈0.5 mL、Cbz-Aib-OH 276 mg（1.1 mmol）、二異丙基乙胺0.66 mL（3.8 mmol）。之後在25°C加入HATU 441 mg（1.1

mmol)，在室溫攪拌14小時。加入HATU 579 mg (1.5 mmol)，在40°C攪拌1小時後，加入HATU 684 mg (1.8 mmol)，升溫至60°C，攪拌4.5小時。再加入HATU 455 mg (1.1 mmol)，在60°C攪拌2小時、室溫攪拌12小時、60°C攪拌2小時，但沒有觀察到縮合反應的進行(轉化率0%)。取反應液5 μL，加入丙胺100 μL，以甲醇0.9 mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率}(\%) = \{ \text{Cbz-Aib-MeLeu-Phe-OtBu (面積\%)} / [ \text{MeLeu-Phe-OtBu (面積\%)} + \text{Cbz-Aib-MeLeu-Phe-OtBu (面積\%)} ] \} \times 100$$

**【0252】** (使用添加胺進行水解處理所得的二胜肽的Teoc脫保護反應)

使實施例15之以添加胺條件所合成的Teoc-MeLeu-Phe-OtBu 369.6 mg (0.75 mmol) 溶解於2-甲基四氫呋喃2.0 mL。加入TBAF的8.4%含水四氫呋喃溶液1.5 mL (1.5 mmol) 後，在50°C攪拌2.5小時，獲得脫Teoc體的MeLeu-Phe-OtBu (轉化率100%)。取反應溶液5 μL，以乙腈1.0 mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率}(\%) = \{ \text{MeLeu-Phe-OtBu (面積\%)} / [ \text{Teoc-MeLeu-Phe-OtBu (面積\%)} + \text{MeLeu-Phe-OtBu (面積\%)} ] \} \times 100$$

**【0253】** (縮合反應)

使內含量濃縮至約1 mL後，加入2-甲基四氫呋喃2 mL。再重複此操作2次，在所得的2-甲基四氫呋喃溶液，加入乙腈0.5 mL、Cbz-Aib-OH 273 mg (1.1 mmol)、二異丙基乙胺0.66 mL (3.8 mmol)。之後在25°C加入HATU 439 mg (1.1 mmol)，在室溫攪拌14小時。加入HATU 579 mg (1.5 mmol)，在40°C攪拌5.5小時。再加入HATU 452 mg (1.1 mmol)，在60°C攪拌2小時、室溫攪拌12小時、60°C攪拌2小時(轉化率86%)。取反應溶液5 μL，加入丙胺100 μL，以甲醇0.9 mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { Cbz-Aib-MeLeu-Phe-OtBu (面積%) / [ MeLeu-Phe-OtBu (面積%) + Cbz-Aib-MeLeu-Phe-OtBu (面積%) ] } × 100

【0254】 在調製好的反應液加入DMAP 92 mg (0.75 mmol)、10%碳酸鉀水溶液4.0 mL，在25 °C以攪拌子進行攪拌1小時。停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。取所得的有機層5 μL，加入丙胺100 μL，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，求得目的胜肽和殘留的C端活性體的峰面積百分比。目的胜肽Cbz-Aib-MeLeu-Phe-OtBu為86.7%，原料MeLeu-Phe-OtBu為13.3%，未檢測到來自殘留的C端活性體的Cbz-Aib-NHPr。使剩下的有機層濃縮，獲得上述組成的濃縮物295.6 mg。MS (ESI) : m/z 568.4 [ M+H ]<sup>+</sup>, 590.4 [ M+Na ]<sup>+</sup>。

【0255】 清楚了解到，當N端受保護的胜肽溶液有C端活性體殘留時，以含水氟試劑使胜肽N端的保護基 (Teoc) 進行脫保護之時，必須要大量過量的試劑。推測是因為脫保護試劑也和殘留的C端活性體反應。

又清楚，接著脫保護之後，在後續步驟和其他C端活性體的縮合反應 (胜肽鍵形成反應) 完全未進行。推測大概是在前步驟 (N端的脫保護) 所使用的過剩的試劑使C端活性體分解。發現到，如此當C端活性體殘留，則在N端的脫保護之時必須要大量過量的試劑，此事會導致妨礙後續的縮合反應的進行。另一方面發現到，如果使用已完全去除殘留C端活性體的胜肽溶液作為原料，則以適量的脫保護試劑完成脫保護反應，後續步驟的縮合反應也可實施。

【0256】 (實施例17) Cbz-MeAla-Phe-OtBu的合成

(縮合反應)

使Phe-OtBu鹽酸鹽 302 mg (1.2 mmol)、Cbz-MeAla-OH 417 mg (1.7 mmol)、HOObt 290 mg (1.8 mmol) 懸浮於乙腈0.9 mL、MTBE 3.6 mL，加入二異丙基乙胺1.0 mL (5.8 mmol)。之後加入EDC鹽酸鹽 443 mg (2.3 mmol)，在25 °C

第 70 頁，共 89 頁(發明說明書)

攪拌30分鐘，進行胜肽鍵形成反應。取反應液5  $\mu\text{L}$ ，加入丙胺100  $\mu\text{L}$  (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得轉化率（轉化率：100%）。

$$\text{轉化率 (\%)} = \{ \text{Cbz-MeAla-Phe-OtBu (面積\%)} / [ \text{Phe-OtBu (面積\%)} + \text{Cbz-MeAla-Phe-OtBu (面積\%)} ] \} \times 100$$

### 【0257】 (水解處理)

#### (1) 未添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入5%碳酸鈉水溶液3.0 mL，在25  $^{\circ}\text{C}$ 以攪拌子進行攪拌5分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5  $\mu\text{L}$ ，加入丙胺100  $\mu\text{L}$  (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

$$\text{C端活性體殘留率 (\%)} = \{ \text{丙醯胺 (面積\%)} / [ \text{丙醯胺 (面積\%)} + \text{二胜肽 (面積\%)} ] \} \times 100$$

### 【0258】 (2) 添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入DMAP 147 mg (1.1 mmol)、5%碳酸鈉水溶液3.0 mL，在25  $^{\circ}\text{C}$ 以攪拌子進行攪拌5分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5  $\mu\text{L}$ ，加入丙胺100  $\mu\text{L}$  (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

$$\text{C端活性體殘留率 (\%)} = \{ \text{丙醯胺 (面積\%)} / [ \text{丙醯胺 (面積\%)} + \text{二胜肽 (面積\%)} ] \} \times 100$$

### 【0259】 (後處理)

停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後依序以10%硫酸氫鈉水溶液3 mL $\times$ 2、5%碳酸鈉水溶液3 mL洗淨有機層。將所得的有機層5  $\mu\text{L}$ 加入

丙胺100  $\mu\text{L}$ ，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，求得目的胜肽和殘留的C端活性體的峰面積百分比。MS (ESI) :  $m/z$  385.2 [ M-tBu + H ]<sup>+</sup>, 441.3 [ M + H ]<sup>+</sup>, 463.2 [ M + Na ]<sup>+</sup>。

【0260】 [表10]

entry	胺	水解處理後立即	分液操作後的有機層	
		C端活性體殘留率 (%)	二胜肽 (%) <sup>1</sup>	殘留的C端活性體 (%) <sup>1</sup> (丙醯胺轉化體)
1	DMAP	0	98.4	nd
2	無	17.0	83.8	13.8

1) LCMS的峰面積比率

【0261】 即使是取代基小的胺基酸之丙胺酸，只使用鹼性水處理的水解，殘留的C端活性體也未完全被水解，即使在後續的分液操作（水性洗淨）也無法充分去除殘留的C端活性體。另一方面了解到，當添加DMAP進行水解時，殘留的C端活性體的水解完全被達成，殘留的C端活性體的去除也能完全。而且，此時以98.4%的純度獲得目的二胜肽。

【0262】 (實施例18) Cbz-Hph-MeAla-Phe-OtBu的合成

(使用未添加胺進行水解處理所得的二胜肽的Cbz脫保護反應)

將實施例17之以未添加胺條件所合成的Cbz-MeAla-Phe-OtBu的MTBE溶液置換濃縮為2-甲基四氫呋喃。在5%Pd/C (50%wet) 101 mg和氫氣進行氫解反應。在25°C攪拌6小時，但反應沒有完成（轉化率35%）。取反應液5  $\mu\text{L}$ ，以乙腈1.0 mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { MeAla-Phe-OtBu (面積%) / [ Cbz-MeAla-Phe-OtBu (面積%) + MeAla-Phe-OtBu (面積%) ] } × 100

【0263】 (使用添加胺進行水解處理所得的二胜肽的Cbz脫保護反應)

將實施例17之以添加胺條件所合成的Cbz-MeAla-Phe-OtBu的MTBE溶液以2-甲基四氫呋喃置換濃縮。在5%Pd/C (50%wet) 102 mg和氫氣進行氫解反應。

在25°C攪拌3小時，獲得脫Cbz化體MeAla-Phe-OtBu（轉化率100%）。取反應液5  $\mu$ L，以乙腈1.0 mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。MS (ESI) : m/z 307.2 [M+H]<sup>+</sup>。

轉化率(%) = { MeAla-Phe-OtBu (面積%) / [ Cbz-MeAla-Phe-OtBu (面積%) + MeAla-Phe-OtBu (面積%) ] } ×100

**【0264】** (縮合反應)

將添加胺進行水解處理所得的二胜肽的Cbz脫保護體反應液以過濾器過濾，濾掉Pd/C後，濃縮乾燥。將乾燥物溶解於2-甲基四氫呋喃2.5 mL，加入Cbz-Hph-OH 474 mg (1.5 mmol)、二異丙基乙胺 610  $\mu$ L (3.5 mmol)。之後加入T3P/2-甲基四氫呋喃溶液 1.37 mL (2.33 mmol)，在25°C攪拌1.5小時，進行胜肽鍵形成反應（轉化率：100%）。將反應液5  $\mu$ L加入丙胺100  $\mu$ L，以甲醇0.9 mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率(%) = { Cbz-Hph-MeAla-Phe-OtBu (面積%) / [ MeAla-Phe-OtBu (面積%) + Cbz-Hph-MeAla-Phe-OtBu (面積%) ] } ×100

**【0265】** 在調製好的反應溶液，加入DMAP 74 mg (0.6 mmol)、5%碳酸鈉水溶液3.0 mL，在25 °C攪拌15分鐘。停止攪拌、靜置後，使有機層和水層分層，去除水層。之後依序以10%硫酸氫鈉水溶液3 mL、5%碳酸鈉水溶液3 mL、普通水3 mL洗淨有機層。將所得的有機層5  $\mu$ L加入丙胺100  $\mu$ L，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，求得目的胜肽和殘留的C端活性體的峰面積百分比。目的胜肽Cbz-Hph-MeAla-Phe-OtBu為99.0%，未檢測到來自殘留的C端活性體的Cbz-Hph-NHPr。使剩下的有機層濃縮，獲得濃縮物618.4 mg（從實施例17的Phe-OtBu的產率88%）。MS (ESI) : m/z 602.4 [M+H]<sup>+</sup>, 624.4 [M+Na]<sup>+</sup>。

**【0266】** 清楚知道，當來自EDC及HOObt的C端活性體殘留時，胜肽延長

後的Cbz脫保護反應幾乎不進行。另一方面了解到，如果使用完全去除殘留的C端活性體的胜肽溶液作為原料，則Cbz脫保護反應平順地進行，能夠進行胜肽合成反應。亦即了解到，和實施例9的情形相同，經由使用本發明之方法，所生成的胜肽化合物的N端保護基的還原去除反應能夠不停滯的進行。

**【0267】** （實施例19） Cbz-Aib-D-Val-OBn的合成

（縮合反應）

使D-Val-OBn TsOH鹽 502 mg ( 1.3 mmol )、Cbz-Aib-OH 478 mg ( 2.0 mmol ) 懸浮於2-MeTHF 6.0 mL，加入二異丙基乙胺1.2 mL ( 6.9 mmol )。接著在25°C加入50%T3P/2-甲基四氫呋喃溶液 1.9 mL ( 3.3 mmol )，在25°C攪拌15小時，進行胜肽鍵形成反應。取反應液5 μL，加入丙胺100 μL ( 1.2 mmol )，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積求得轉化率（轉化率：100%）。

$$\text{轉化率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{Cbz-Aib-D-Val-OBn (面積\%)}}{\text{[ D-Val-OBn (面積\%) + Cbz-Aib-D-Val-OBn (面積\%) ]}} \right\} \times 100$$

**【0268】** （水解處理）

（1）未添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入5%碳酸鉀水溶液5.0 mL，在25°C以攪拌子進行攪拌30分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5 μL，加入丙胺100 μL ( 1.2 mmol )，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從 LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

$$\text{C端活性體殘留率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{丙醯胺 (面積\%)}}{\text{[ 丙醯胺 (面積\%) + 二胜肽 (面積\%) ]}} \right\} \times 100$$

**【0269】** （2）添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入DMAP 484 mg ( 4.0 mmol ) 和

5%碳酸鉀水溶液5.0 mL，在25 °C以攪拌子進行攪拌30分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5 μL，加入丙胺100 μL（1.2 mmol），使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

$$\text{C端活性體殘留率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{丙醯胺 (面積\%)}}{\left[ \text{丙醯胺 (面積\%)} + \text{二胜肽 (面積\%)} \right]} \right\} \times 100$$

**【0270】** （後處理）

停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後依序以10%硫酸氫鉀水溶液5 mL和5%碳酸鉀水溶液2.5 mL洗淨有機層。取有機層5 μL，加入丙胺100 μL（1.2 mmol），使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋，進行LC/MS分析，求得目的胜肽和殘留的C端活性體（轉化為丙醯胺的轉化體）的峰面積值。使剩下的有機層濃縮，獲得胜肽。經未添加胺的水解所獲得的濃縮物（胜肽）為653.8mg（產率116%：濃縮物中包含雜質（殘留的C端活性體），但作為只含有胜肽者進行計算）。經添加胺的水解所獲得的濃縮物為549.4mg（產率97%）。MS（ESI）：m/z 427.3 [M+H]<sup>+</sup>, 449.2 [M+Na]<sup>+</sup>。

**【0271】** [表11]

entry	胺	水解處理後立即	分液操作後的有機層		濃縮後
		C端活性體殘留率 (%)	二胜肽 (%) <sup>1</sup>	殘留的C端活性體 (%) <sup>1</sup> (丙醯胺轉化體)	產率 (%)
1	DMAP	0	98.6	nd	97
2	無	16.2	83.4	13.7	116

1) LCMS的峰面積比率

**【0272】** 發現到，在只使用鹼性水處理的水解，殘留的C端活性體未完全被水解，即使後續的水性洗淨也無法充分去除殘留的C端活性體，但當添加DMAP進行水解時，殘留的C端活性體的水解完全地達成，也可完全地去除殘留的C端活性體。此時，以純度98.6%獲得目的二胜肽（產率97%）。

第 75 頁，共 89 頁(發明說明書)

**【0273】** (實施例20) Cbz-Thr (tBu) -Phe-OtBu的合成

(縮合反應)

使Phe-OtBu鹽酸鹽 300 mg (1.2 mmol)、Cbz-Thr (tBu) -OH二環己胺鹽 855 mg (1.7 mmol)、HOBt 237 mg (1.8 mmol) 懸浮於2-MeTHF 4.2 mL、乙腈 0.9 mL，加入二異丙基乙胺813  $\mu$ L (4.6 mmol)。接著在25°C加入EDC 鹽酸鹽447 mg (2.3 mmol)，在25°C攪拌3小時，進行胜肽鍵形成反應。取反應液5  $\mu$ L，加入丙胺100  $\mu$ L (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積求得轉化率(轉化率：100%)。

$$\text{轉化率}(\%) = \{ \text{Cbz-Thr (tBu) -Phe-OtBu (面積\%)} / [ \text{Phe-OtBu (面積\%)} + \text{Cbz-Thr (tBu) -Phe-OtBu (面積\%)} ] \} \times 100$$
**【0274】** (水解處理)

(1) 未添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入5%碳酸鉀水溶液3.0 mL，在25°C以攪拌子攪拌5分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5  $\mu$ L，加入丙胺100  $\mu$ L (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

$$\text{C端活性體殘留率}(\%) = \{ \text{丙醯胺 (面積\%)} / [ \text{丙醯胺 (面積\%)} + \text{二胜肽 (面積\%)} ] \} \times 100$$
**【0275】** (2) 添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入DMAP 142 mg (1.2 mmol) 和5%碳酸鉀水溶液3.0 mL，在25°C以攪拌子攪拌5分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5  $\mu$ L，加入丙胺100  $\mu$ L (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計

算C端活性體殘留率。

C端活性體殘留率 (%) = { 丙醯胺 (面積%) / [ 丙醯胺 (面積%) + 二  
 胜肽 (面積%) ] } × 100

**【0276】** (後處理)

停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後依序以10%硫酸氫  
 鉀水溶液3 mL、5%碳酸鉀水溶液3 mL、普通水1.5 mL洗淨有機層。取有機層5  
 μL，加入丙胺100 μL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲  
 醇0.9 mL稀釋，進行LC/MS分析，計算目的胜肽和殘留的C端活性體 (轉化為  
 丙醯胺的轉化體) 的峰面積值。使剩下的有機層濃縮，獲得胜肽。MS (ESI) :  
 m/z 401.2 [ M-2tBu+H ]<sup>+</sup>、457.2 [ M-tBu+H ]<sup>+</sup>、513.3 [ M+H ]<sup>+</sup>、535.3  
 [ M+Na ]<sup>+</sup>。

**【0277】** [表12]

entry		水解處理後立即	分液操作後的有機層	
	胺	C端活性體殘留率 (%)	二胜肽 (%) <sup>1</sup>	殘留的C端活性體 (%) <sup>1</sup> (丙醯胺轉化體)
1	DMAP	0	98.4	nd
2	無	8.8	86.8	3.2

1) LCMS的峰面積比率

**【0278】** 發現到，在只使用鹼性水處理的水解，殘留的C端活性體未完全  
 被水解，即使後續的水性洗淨也無法充分去除殘留的C端活性體，但當添加  
 DMAP進行水解時，殘留的C端活性體的水解完全被達成，可完全地去除殘留的  
 C端活性體。此時，以純度98.4%獲得目的二胜肽。

**【0279】** (實施例21) Cbz-Leu-Thr (tBu) -Phe-OtBu的合成

(使用未添加胺進行水解處理所得的二胜肽的Cbz脫保護反應)

將實施例20之以未添加胺條件所合成的Cbz-Thr (tBu) -Phe-OtBu的MTBE

／2-MeTHF溶液置換濃縮為2-甲基四氫呋喃。在5%Pd/C (50%wet) 99 mg和氫氣進行氫解反應。在25°C攪拌1小時，但反應沒有完成（轉化率53%）。取反應液5 μL，以乙腈1.0 mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率}(\%) = \{ \text{Thr}(\text{tBu})\text{-Phe-OtBu}(\text{面積}\%) / [ \text{Cbz-Thr}(\text{tBu})\text{-Phe-OtBu}(\text{面積}\%) + \text{Thr}(\text{tBu})\text{-Phe-OtBu}(\text{面積}\%) ] \} \times 100$$

**【0280】** (使用添加胺進行水解處理所得的二胜肽的Cbz脫保護反應)

將實施例20之以添加胺條件所合成的Cbz-Thr(tBu)-Phe-OtBu的MTBE／2-MeTHF溶液置換濃縮為2-甲基四氫呋喃。在5%Pd/C (50%wet) 104 mg和氫氣進行氫解反應。在25°C攪拌1小時，獲得脫Cbz化體Thr(tBu)-Phe-OtBu（轉化率100%）。取反應液5 μL，以乙腈1.0 mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率}(\%) = \{ \text{Thr}(\text{tBu})\text{-Phe-OtBu}(\text{面積}\%) / [ \text{Cbz-Thr}(\text{tBu})\text{-Phe-OtBu}(\text{面積}\%) + \text{Thr}(\text{tBu})\text{-Phe-OtBu}(\text{面積}\%) ] \} \times 100$$

**【0281】** (縮合反應)

將添加胺進行水解處理所得的二胜肽的Cbz脫保護體反應液以過濾器過濾，濾掉Pd/C後，濃縮乾燥。將乾燥物溶解於2-甲基四氫呋喃5.0 mL，加入Cbz-Leu-OH 382 mg (1.4 mmol)、二異丙基乙胺814 μL (4.7 mmol)。之後加入50%T3P／2-甲基四氫呋喃溶液 1.37 mL (2.33 mmol)，在25°C攪拌30分鐘，進行胜肽鍵形成反應（轉化率：100%）。將反應液5 μL加入丙胺100 μL，以甲醇0.9 mL稀釋後，進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率}(\%) = \{ \text{Cbz-Leu-Thr}(\text{tBu})\text{-Phe-OtBu}(\text{面積}\%) / [ \text{Thr}(\text{tBu})\text{-Phe-OtBu}(\text{面積}\%) + \text{Cbz-Leu-Thr}(\text{tBu})\text{-Phe-OtBu}(\text{面積}\%) ] \} \times 100$$

**【0282】** 在調製好的反應溶液，加入DMAP 139 mg (1.1 mmol)、10%

第 78 頁，共 89 頁(發明說明書)

碳酸鈉水溶液3.0 mL，在25 °C攪拌5分鐘。停止攪拌、靜置後，使有機層和水層分層，去除水層。之後依序以10%硫酸氫鈉水溶液3 mL×2、5%碳酸鈉水溶液3 mL、普通水3 mL洗淨有機層。將所得的有機層5 μL加入丙胺100 μL，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶劑進行LC/MS分析，求得目的胜肽和殘留的C端活性體的峰面積百分比。目的胜肽Cbz-Leu-Thr (tBu) -Phe-OtBu為98.3%，未檢測到來自殘留的C端活性體的Cbz-Leu-NHPr。使剩下的有機層濃縮，獲得濃縮物638.0 mg（從實施例20的Phe-OtBu的產率88%）。MS (ESI) : m/z 514.3 [ M-2tBu+H ]<sup>+</sup>、570.3 [ M-tBu+H ]<sup>+</sup>、626.5 [ M+H ]<sup>+</sup>、648.4 [ M+Na ]<sup>+</sup>。

【0283】 了解到，當殘留來自EDC及HOBt的C端活性體時，和完全去除殘留的C端活性體的情形相比，Cbz脫保護反應進行慢。發現到，如果使用完全去除殘留的C端活性體的胜肽溶液作為原料，則Cbz脫保護反應平順地進行，能夠進行胜肽合成反應。亦即了解到，經由使用本發明之方法，和實施例9、實施例18的情形相同，所生成的胜肽化合物的N端的保護基的還原去除反應能夠不停滯的進行。因此，能夠有效率地製造具有所期望的胺基酸序列的高純度的胜肽化合物。

【0284】 （實施例22） Cbz-Ile-Phe-OtBu的合成

（縮合反應）

使Phe-OtBu鹽酸鹽 301 mg（1.2 mmol）、Cbz-Ile-OH 465 mg（1.8 mmol）懸浮於MTBE 3.6 mL、乙腈 0.9 mL，加入二異丙基乙胺610 μL（3.5 mmol）。接著在25°C加入BEP 479 mg（1.8 mmol），在25°C攪拌45分鐘，進行胜肽鍵形成反應。取反應液5 μL，加入丙胺100 μL（1.2 mmol），使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積求得轉化率（轉化率：100%）。

$$\text{轉化率 (\%)} = \{ \text{Cbz-Ile-Phe-OtBu (面積\%)} / [ \text{Phe-OtBu (面積\%)} +$$

第 79 頁，共 89 頁(發明說明書)

Cbz-Ile-Phe-OtBu (面積%) ] } ×100

**【0285】** (水解處理)

(1) 未添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入5%碳酸鉀水溶液3.0 mL，在25 °C以攪拌子進行攪拌3分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5 μL，加入丙胺100 μL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從 LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

C端活性體殘留率 (%) = { 丙醯胺 (面積%) / [ 丙醯胺 (面積%) + 二胜肽 (面積%) ] } ×100

**【0286】** (2) 添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入DMAP 139 mg (1.1 mmol) 和5%碳酸鉀水溶液3.0 mL，在25 °C以攪拌子進行攪拌3分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5 μL，加入丙胺100 μL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從 LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

C端活性體殘留率 (%) = { 丙醯胺 (面積%) / [ 丙醯胺 (面積%) + 二胜肽 (面積%) ] } ×100

**【0287】** (後處理)

停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後依序以10%硫酸氫鉀水溶液3 mL、5%碳酸鉀水溶液3 mL洗淨有機層。加入2-MeTHF 2 mL後，以水1.5 mL洗淨。取有機層5 μL，加入丙胺100 μL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋，進行LC/MS分析，求得目的胜肽和殘留的C端活性體(轉化為丙醯胺的轉化體)的峰面積值。使剩下的有機層濃縮，獲得胜肽。MS (ESI) : m/z 413.3 [ M-tBu+H ]<sup>+</sup>, 469.3 [ M+H ]<sup>+</sup>, 491.3 [

$M + Na]^{+}$ 。

【0288】 [表13]

entry		水解處理後立即	分液操作後的有機層	
		C端活性體殘留率 (%)	二胜肽 (%) <sup>1</sup>	殘留的C端活性體 (%) <sup>1</sup> (丙醯胺轉化體)
1	DMAP	0	96.3	nd
2	無	4.8	91.5	3.2

1) LCMS的峰面積比率

【0289】 發現到，在只使用鹼性水處理的水解，殘留的C端活性體未完全被水解，即使後續的水性洗淨也無法充分去除殘留的C端活性體，但當添加DMAP進行水解，殘留的C端活性體的水解完全地達成，也可完全地去除殘留的C端活性體。此時，以純度96.3%獲得目的二胜肽。

【0290】 (實施例23) Cbz-Phe-MeGly-Phe-piperidine

(Boc脫保護反應)

使Boc-Phe-piperidine<sup>1</sup> 334 mg (1.0 mmol) 溶解於二氯甲烷3.4 mL，加入甲磺酸 131 μL (2.0 mmol)。在35 °C攪拌3小時，進行脫Boc反應 (轉化率: 100%)。取反應液5 μL，以乙腈1.0 mL 稀釋的溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

$$\text{轉化率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{Phe-piperidine (面積\%)}}{\text{Boc-Phe-piperidine (面積\%)} + \text{Phe-piperidine (面積\%)}} \right\} \times 100$$

【0291】 (縮合反應)

在上述反應溶液加入二異丙基乙胺528 μL (3.0 mmol) 後，餾去溶劑。之後加入乙腈1.0 mL、2-甲基四氫呋喃3.4 mL、二異丙基乙胺528 μL (3.0 mmol)、Cbz-Phe-MeGly-OH<sup>2</sup> 505 mg (1.5 mmol)、HOObt 256 mg (1.6 mmol)。在25°C 加入EDC鹽酸鹽 388 mg (2.0 mmol)，在25°C攪拌1小時，進行胜肽鍵形成反應。取反應液5 μL，加入丙胺100 μL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯

胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積求得轉化率（轉化率：100%）。

$$\text{轉化率 (\%)} = \left\{ \text{Cbz-Phe-MeGly-Phe-piperidine (面積\%)} \right\} / \left[ \text{Phe-piperidine (面積\%)} + \text{Cbz-Phe-MeGly-Phe-piperidine (面積\%)} \right] \times 100$$

**【0292】** 在上述調製好的反應溶液，加入DMAP 128 mg (1.0 mmol)、5%碳酸鉀水溶液3.5 mL，在25 °C以攪拌子進行攪拌3分鐘。停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後以10%硫酸鉀水溶液3.5 mL×2、5%碳酸鉀水溶液3.5 mL稀釋有機層。將此溶液進行LC/MS分析，求得目的胜肽和殘留的C端活性體的峰面積百分比。目的胜肽Cbz-Phe-MeGly-Phe-piperidine為純度94.6%，未檢測到來自殘留的C端活性體的Cbz-Phe-MeGly-NHPr。使剩下的有機層濃縮，獲得濃縮物520.4mg（產率94%）。

**【0293】** 當添加DMAP進行水解時，來自胜肽片段的殘留C端活性體的分解、去除完全地達成，能夠以94.6%的純度獲得目的三胜肽（產率94%）。

**【0294】** 1) J. Org. Chem., 2003, 68, 7505-7508.

2) Bull. Chem. Soc. Jpn., 2004, 77, 1187-1193.

**【0295】** （實施例24） Cbz-Val-Phe-OtBu的合成

（縮合反應）

使Phe-OtBu鹽酸鹽 200 mg (0.8 mmol)、Cbz-Val-OH 294 mg (1.2 mmol) 懸浮於2-甲基四氫呋喃 2.4 mL、乙腈 0.6 mL，加入N-乙基嗎啉294 μL (2.3 mmol)。接著在25°C加入HATU 447 mg (1.2 mmol)，在25°C攪拌2.5小時，進行胜肽鍵形成反應。取反應液5 μL，加入丙胺100 μL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。此溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積求得轉化率（轉化率：100%）。MS (ESI) : m/z 399.3 [M-tBu + H]<sup>+</sup>、455.3 [M + H]<sup>+</sup>

轉化率 (%) = { Cbz-Val-Phe-OtBu (面積%) / [ Phe-OtBu (面積%) + Cbz-Val-Phe-OtBu (面積%) ] } × 100

**【0296】** (水解處理)

(1) 未添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入5%碳酸鉀水溶液2.0 mL，在25 °C以攪拌子進行攪拌。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5 μL，加入丙胺100 μL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率(下表)。

C端活性體殘留率 (%) = { 丙醯胺 (面積%) / [ 丙醯胺 (面積%) + 二胜肽 (面積%) ] } × 100

**【0297】** (2) 添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入下表所示的胺添加劑(0.8 mmol)和5%碳酸鉀水溶液2.0 mL，在25 °C以攪拌子進行攪拌。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5 μL，加入丙胺100 μL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。將此溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率(下表)。

C端活性體殘留率 (%) = { 丙醯胺 (面積%) / [ 丙醯胺 (面積%) + 二胜肽 (面積%) ] } × 100

**【0298】** [表14]

C端活性體殘留率的變遷

entry	胺添加劑	C端活性體殘留率 (%)			
		5min	15min	30min	60min
1	無	20.1	17.8	14.1	10.5
2	DIPEA	19.2	15.8	10.7	6.7

3	DMAP	0.0	0.0	0.0	0.0
4	NMI	7.1	2.6	1.1	0.0

【0299】 DIPEA的添加，較不添加胺、只使用鹼性水的情形，稍微地促進殘留的C端活性體的水解，但是未見大的效果。另一方面清楚知道，DMAP和NMI的添加，較DIPEA的添加，顯著地促進殘留的C端活性體的水解，特別是使用DMAP時，在5分鐘內殘留的C端活性體完全地被水解。因此，清楚了解到，和如DIPEA在氮附近有立體障礙的胺相比，如DMAP在氮附近的立體障礙小的胺較能促進殘留的C端活性體的水解。

【0300】 （實施例25） Cbz-Ile-Val-OBn的合成

（縮合反應）

使Val-OBn 鹽酸鹽 300 mg（1.2 mmol）、Cbz-Ile-OH 495 mg（1.9 mmol）懸浮於環戊基甲基醚 3.0 mL、乙腈 0.9 mL，加入二異丙基乙胺859  $\mu$ L（4.9 mmol）。接著在25°C加入HATU 705 mg（1.9 mmol），在25°C攪拌1小時，進行胜肽鍵形成反應。取反應液5  $\mu$ L，加入丙胺100  $\mu$ L（1.2 mmol），使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。此溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積求得轉化率（轉化率：100%）。

轉化率（%） = { Cbz-Ile-Val-OBn（面積%） / [ Val-OBn（面積%） + Cbz-Ile-Val-OBn（面積%） ] }  $\times$  100

【0301】 （水解處理）

（1）未添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液加入中性水3.0 mL，在25°C以攪拌子攪拌5分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5  $\mu$ L，加入丙胺100  $\mu$ L（1.2 mmol），使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

C端活性體殘留率 (%) = { 丙醯胺 (面積%) / [ 丙醯胺 (面積%) + 二  
 胜肽 (面積%) ] } ×100

**【0302】** (2) 添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入DMAP 91 mg (0.7 mmol) 和中  
 性水3.0 mL，在25°C以攪拌子攪拌5分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取  
 有機層5 μL，加入丙胺100 μL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺  
 後，以甲醇0.9 mL稀釋。從LC/MS的峰面積值，根據下列算式，計算C端活性  
 體殘留率。

C端活性體殘留率 (%) = { 丙醯胺 (面積%) / [ 丙醯胺 (面積%) + 二  
 胜肽 (面積%) ] } ×100

**【0303】** (後處理)

停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後依序以10%硫酸氫  
 鈉水溶液3 mL和5%碳酸鈉水溶液3 mL×2、普通水1.5 mL×3洗淨有機層。取有機  
 層5 μL，加入丙胺100 μL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，  
 以甲醇0.9 mL稀釋，進行LC/MS分析，計算目的胜肽和殘留的C端活性體（轉  
 化為丙醯胺的轉化體）的峰面積值。使剩下的有機層濃縮，獲得胜肽。經未添  
 加胺的水解所獲得的濃縮物（胜肽）為744mg（產率132%：濃縮物中包含雜質  
 （殘留的C端活性體），但作為只含有胜肽者進行計算）。經添加胺的水解所獲  
 得的濃縮物為528mg（產率94%）。MS (ESI) : m/z 455.3 [ M+H ]<sup>+</sup>, 477.3 [ M+Na ]<sup>+</sup>。

**【0304】** [ 表15 ]

entry		水解處理後立即	分液操作後的有機層		濃縮後
	胺	C端活性體殘留率 (%)	殘留的C端活性體 (%) <sup>1</sup> (丙醯胺轉化體)	二胜肽 (%) <sup>1</sup>	產率 (%)
1	DMAP	0	nd	99.5	94

2	無	19.5	17.1	81.2	132
---	---	------	------	------	-----

1) LCMS的峰面積比率

**【0305】** 發現到，只以中性水處理的水解，殘留的C端活性體未完全被水解，即使後續的水性洗淨也無法去除殘留的C端活性體，但當添加DMAP進行水解時，殘留的C端活性體的水解完全地達成，殘留的C端活性體的去除也可完全。此時，以99.5%的純度獲得目的二胜肽（產率94%）。

**【0306】** （實施例26） Cbz-MeAla-Phe-OtBu的合成  
（縮合反應）

使Phe-OtBu鹽酸鹽 200 mg（0.8 mmol）、Cbz-MeAla-OH 260 mg（1.2 mmol）懸浮於2-甲基四氫呋喃 2.4 mL、乙腈 0.6 mL，加入二異丙基乙胺271  $\mu$ L（1.6 mmol）。接著在25°C加入DMT-MM-n水合物（4-（4,6-二甲氧基-1,3,5-三嗪-2-基）-4-甲基嗎啉鹽酸鹽n水合物）265 mg（0.8 mmol，13w%含水），在25°C攪拌1小時後，加入DMT-MM-n水合物119 mg（0.4 mmol，13w%含水），在25°C攪拌1小時，進行胜肽鍵形成反應。取反應液5  $\mu$ L，加入丙胺100  $\mu$ L（1.2 mmol），使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。此溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積求得轉化率（轉化率：100%）。

轉化率（%）= { Cbz-MeAla-Phe-OtBu（面積%） / [ Phe-OtBu（面積%） + Cbz-MeAla-Phe-OtBu（面積%） ] }  $\times$ 100

**【0307】** （水解處理）

（1）未添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入5%碳酸鉀水溶液2.0 mL，在25°C以攪拌子進行攪拌10分鐘。停止攪拌，使有機層和水層分層。取有機層5  $\mu$ L，加入丙胺100  $\mu$ L（1.2 mmol），使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從LC/MS的峰面積，根據下列算式，計算C端活性體殘留率。

C端活性體殘留率 (%) = { 丙醯胺 (面積%) / [ 丙醯胺 (面積%) + 二  
 胜肽 (面積%) ] } × 100

**【0308】** (2) 添加胺的情形

在含有上述調製好的胜肽的反應溶液，加入DMAP 96 mg (0.8 mmol) 和5%  
 碳酸鉀水溶液2.0 mL，在25 °C以攪拌子進行攪拌10分鐘。停止攪拌，使有機層  
 和水層分層。取有機層5 μL，加入丙胺100 μL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性  
 體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9 mL稀釋。從 LC/MS的峰面積值，根據下列算式，  
 計算C端活性體殘留率。

C端活性體殘留率 (%) = { 丙醯胺 (面積%) / [ 丙醯胺 (面積%) + 二  
 胜肽 (面積%) ] } × 100

**【0309】** (後處理)

停止攪拌後靜置，使有機層和水層分層，去除水層。之後依序以10%硫酸氫  
 鉀水溶液2 mL和5%碳酸鉀水溶液2 mL、普通水1mL×2洗淨有機層。取有機層5 μL  
 加入丙胺100 μL (1.2 mmol)，使殘留的C端活性體轉化為丙醯胺後，以甲醇0.9  
 mL稀釋，進行LC/MS分析，求得目的胜肽和殘留的C端活性體（轉化為丙醯胺  
 的轉化體）的峰面積值。使剩下的有機層濃縮，獲得胜肽。經未添加胺的水解  
 所獲得的濃縮物（胜肽）為387mg（產率114%：濃縮物中包含雜質（殘留的C  
 端活性體），但作為只含有胜肽者進行計算）。經添加胺的水解所獲得的濃縮  
 物為336mg（產率98%）。MS (ESI) : m/z 385.2 [ M-tBu+H ]<sup>+</sup>, 441.3 [ M  
 +H ]<sup>+</sup>, 463.3 [ M+Na ]<sup>+</sup>。

**【0310】** [ 表16 ]

entry		水解處理後立即	分液操作後的有機層		濃縮後
	胺	C端活性體殘留 率 (%)	殘留的C端活性體 (%) <sup>1</sup> (丙醯胺轉化體)	二胜肽 (%) <sup>1</sup>	產率 (%)
1	DMAP	0.0	0	98.6	98

2	無	8.1	6.3	88.8	114
---	---	-----	-----	------	-----

1) LCMS的峰面積比率

**【0311】** 發現到，在使用DMA-MM作為縮合劑的情形，在只使用鹼性水處理的水解，殘留的C端活性體未完全被水解，即使後續的水性洗淨也無法去除殘留的C端活性體，但當添加DMAP進行水解，殘留的C端活性體的水解完全被達成，殘留的C端活性體的去除了可完全。此時，以98.6%的純度獲得目的二肽（產率98%）。由即使在含水溶劑中也可使用的縮合劑DMT-MM所生成的C端活性體，已知較難以被水解。但是發現，如果使用胺添加劑，即使是使用DMT-MM所調製的殘留的C端活性體，也可在短時間且一次的處理就完全水解，在之後的水性洗淨完全地去除。

**【0312】** 參考例1：MeAsp (tBu) -piperidine的合成法

（縮合反應）

使Cbz-MeAsp (tBu) -OH二環己胺鹽10.2 g (19.6 mmol) 懸浮於乙酸乙酯100 mL，加入二異丙基乙胺20.6 mL (118 mmol)、哌啶9.7 mL (98.0 mmol)。在3~10°C以45分鐘滴入50%T3P/乙酸乙酯溶液 35.0 mL (58.9 mmol)。滴入結束後，取反應液5 μL，以甲醇1.0 mL稀釋的溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率（轉化率：100%）。

$$\text{轉化率}(\%) = \left\{ \text{Cbz-MeAsp (tBu) -piperidine (面積\%)} \right\} / \left[ \text{Cbz-MeAsp (tBu) -OH (面積\%)} + \text{Cbz-MeAsp (tBu) -piperidine (面積\%)} \right] \times 100$$

**【0313】** 將反應液以10%硫酸氫鉀水溶液 100 mL、10%碳酸鉀100 mL洗淨後，所得的有機層以硫酸鎂乾燥、過濾、濃縮。MS (ESI) m/z 349.1 [M-tBu + H]<sup>+</sup>、405.2 [M+H]<sup>+</sup>、427.3 [M+Na]<sup>+</sup>。

**【0314】** （Cbz脫保護反應）

將上述濃縮液溶解於環戊基甲基醚100 mL，在5%Pd/C (50% wet) 2.0 g

和氫氣進行氫解反應。在室溫攪拌5小時，獲得目的物MeAsp (tBu) -piperidine (轉化率100%)。取反應液5  $\mu$ L，以乙腈1.0mL稀釋的溶液進行LC/MS分析，從LC/MS的峰面積值求得反應轉化率。

轉化率 (%) = { MeAsp (tBu) -piperidine (面積%) / [ Cbz-MeAsp (tBu) -piperidine (面積%) + MeAsp (tBu) -piperidine (面積%) ] }  $\times$ 100

**【0315】** 將反應液以過濾器過濾後，濃縮濾液，獲得濃縮物5.69 g (產率 quant.)。將此濃縮物進行LC/MS分析，求得目的MeAsp (tBu) -piperidine的峰面積百分比 (99.2面積%)。MS (ESI) : m/z 215.1 [ M-tBu+H ]<sup>+</sup>, 271.1 [ M+H ]<sup>+</sup>。

[ 產業可利用性 ]

**【0316】** 本發明可在製造胜肽化合物之時，經由有效率地去除縮合反應後殘留的C端活性體，能夠不進行管柱層析法純化，製造高純度的胜肽化合物。

#### 【符號說明】

無。

## 序列表

- <110> 中外製藥股份有限公司(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)
- <120> 胜肽化合物的合成法
- <130> C1-A1926P
- <150> JP 2019-238793
- <151> 2019-12-27
- <160> 12
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 人工合成序列
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(1)
- <223> Xaa = Cbz-Ile
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (2)..(2)
- <223> Xaa = MeAla
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (3)..(3)
- <223> Xaa = Aze
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (4)..(4)
- <223> Xaa = MePhe
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (5)..(5)
- <223> Xaa = MeGly-OtBu
- <400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 2  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa = Cbz-MeAla

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa = Aze

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa = MePhe

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa = MeGly-OtBu

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Xaa  
1

<210> 3  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = MeAla

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = Aze

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa = MePhe

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa = MeGly-OtBu

<400> 3

Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工合成序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = Cbz-MeAla

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = MePhe

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa = MeLeu

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa = MeGly

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa = MeIle

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa = Ser(tBu)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa = MePhe

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa = MeVal

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa = Asp(tBu)-piperidine

<400> 4

Xaa Xaa Leu Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工合成序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = Cbz-Ser(tBu)

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa = MePhe

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa = MeVal

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa = Asp(tBu)-piperidine

<400> 5

Xaa Xaa Xaa Xaa  
1

<210> 6  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa = Cbz-MeIle

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa = Ser(tBu)

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa = MePhe

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa = MeVal

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa = Asp(tBu)-piperidine

<400> 6

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 7  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa = Cbz-MeGly

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa = MeIle

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa = Ser(tBu)

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa = MePhe

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa = MeVal

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa = Asp(tBu)-piperidine

<400> 7

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = Cbz-Val

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa = MeGly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = MeIle

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa = Ser(tBu)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa = MePhe

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa = MeVal

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa = Asp(tBu)-piperidine

<400> 8

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工合成序列

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa = Cbz-MeLeu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = MeGly

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa = MeIle

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa = Ser(tBu)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa = MePhe

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa = MeVal

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa = Asp(tBu)-piperidine

<400> 9

Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 10  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工合成序列

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa = MeGly

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa = MeIle

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa = Ser(tBu)

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa = MePhe

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa = MeVal

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa = Asp(tBu)-piperidine

<400> 10

Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5

<210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工合成序列

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = Cbz-Leu

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa = MeLeu

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa = MeGly

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa = MeIle

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa = Ser(tBu)

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa = MePhe

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa = MeVal

<400> 11

Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp  
 1 5

<210> 12  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工合成序列  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa = Cbz-MePhe  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa = MeLeu  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Xaa = MeGly  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Xaa = MeIle  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Xaa = Ser(tBu)  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa = MePhe  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa = MeVal  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa = Asp(tBu)-piperidine  
  
 <400> 12

Xaa Leu Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1                      5                                      10

## 【發明申請專利範圍】

**【請求項1】** 一種製造胜肽化合物的方法，包括

步驟A：獲得含有使溶劑中酸成分的C端活性體和胺成分縮合而得的胜肽化合物之反應混合液的步驟；以及

步驟B：混合上述反應混合液和三級胺及水或鹼性水溶液，去除該C端活性體的步驟，其中該三級胺不包括DABCO、三唑和甲基三唑之任一者。

**【請求項2】** 如請求項1所述之製造胜肽化合物的方法，其中，該三級胺對該C端活性體具有親核反應性。

**【請求項3】** 如請求項1或2所述之製造胜肽化合物的方法，其中，該三級胺為氮附近的立體障礙小的胺。

**【請求項4】** 如請求項1或2所述之製造胜肽化合物的方法，其中，該三級胺為NMI、DMAP、或三甲基胺。

**【請求項5】** 如請求項1或2所述之製造胜肽化合物的方法，其中，該胜肽化合物包含1個或複數個非天然胺基酸。

**【請求項6】** 如請求項1或2所述之製造胜肽化合物的方法，其中，該三級胺和上述C端活性體作用時的溫度為25°C~60°C。

**【請求項7】** 如請求項1或2所述之製造胜肽化合物的方法，其中，相對於該胺成分，添加該三級胺0.5當量以上。

**【請求項8】** 如請求項1或2所述之製造胜肽化合物的方法，其中，該C端活性體和該三級胺作用而水解、去除。

**【請求項9】** 如請求項1或2所述之製造胜肽化合物的方法，其中，在步驟B，更包括使該反應混合液分層為有機層和水層，之後洗淨該有機層，該洗淨後的C端活性體的殘留量為1.0%以下。

**【請求項10】** 如請求項1或2所述之製造胜肽化合物的方法，其中，在步驟

A中的溶劑為甲苯、乙腈、四氫呋喃、2-甲基四氫呋喃、乙酸異丙酯、乙酸乙酯、甲基tert-丁基醚、或環戊基甲基醚、N,N-二甲基甲醯胺、或者其混合溶劑。

【請求項11】 如請求項1或2所述之製造胜肽化合物的方法，其中，在步驟B中，該鹼性水溶液為碳酸鉀水溶液或碳酸鈉水溶液。

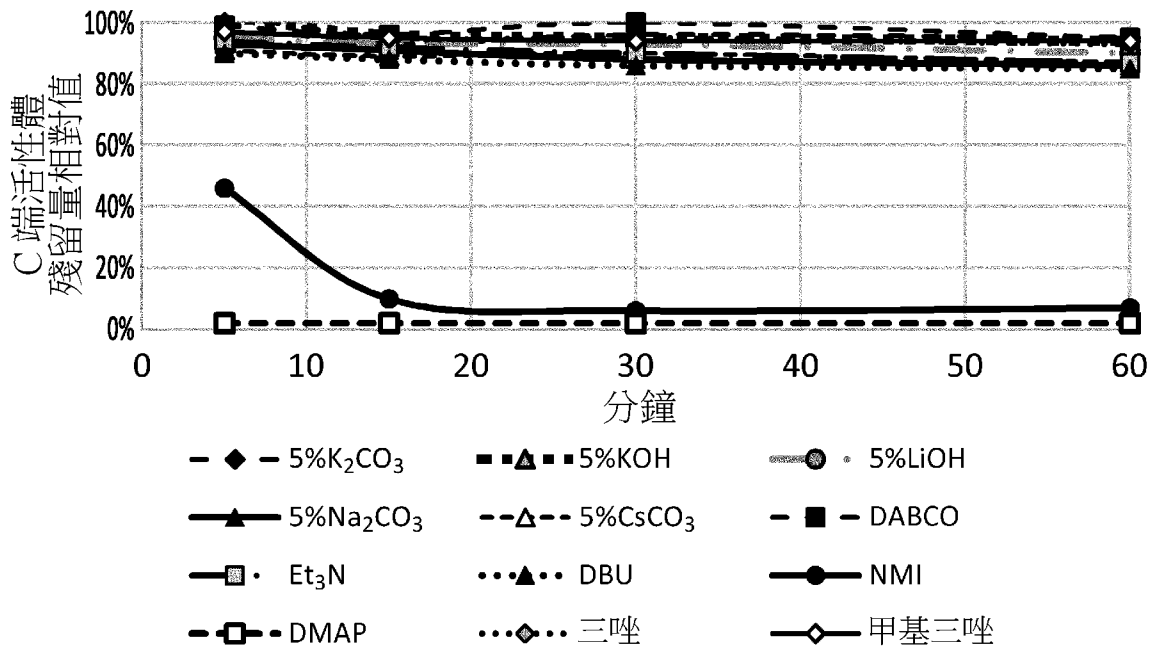
【請求項12】 如請求項1或2所述之製造胜肽化合物的方法，其中，該酸成分為胺基受保護基保護的第1胺基酸，該第1胺基酸的側鏈包含1個以上的碳原子。

【請求項13】 如請求項12所述之製造胜肽化合物的方法，其中，該側鏈為可被取代的C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基、可被取代的C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>烯基、可被取代的C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>炔基、可被取代的C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>環烷基、可被取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、可被取代的C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>環烷基C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基、可被取代的芳C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基、或可被取代的雜芳基C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>烷基。

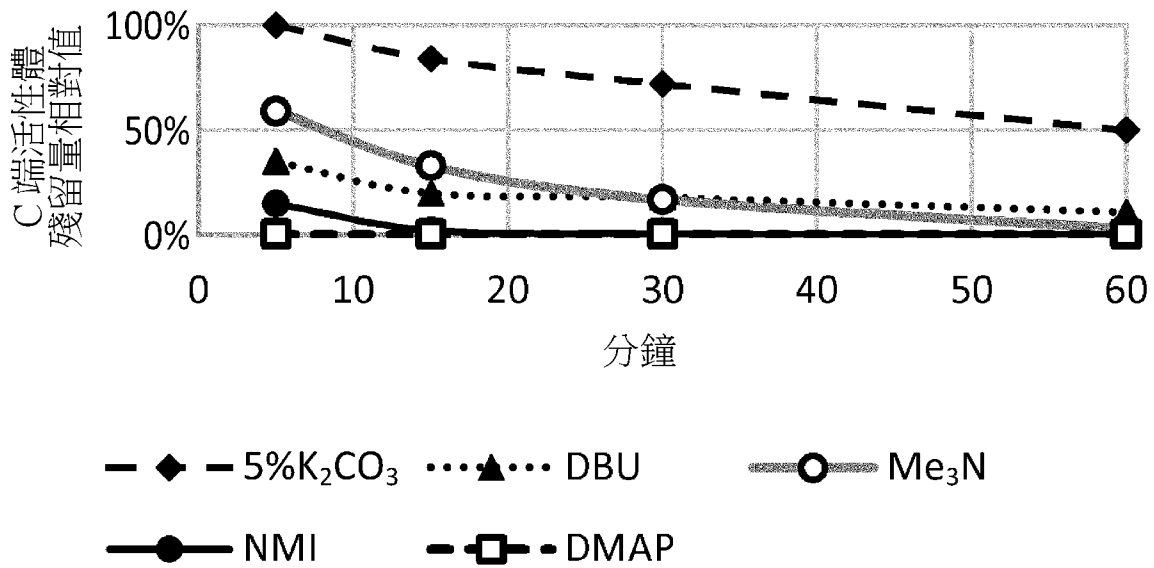
【請求項14】 如請求項1或2所述之製造胜肽化合物的方法，其中，該三級胺和該C端活性體作用時的時間為2小時以下。

【請求項15】 如請求項1或2所述之製造胜肽化合物的方法，其中，該C端活性體在縮合劑的存在下形成，該縮合劑包含T3P、HATU、BEP、DMT-MM、EDC和PfpOH的組合、EDC和HOObt的組合、或EDC和HOBt的組合。

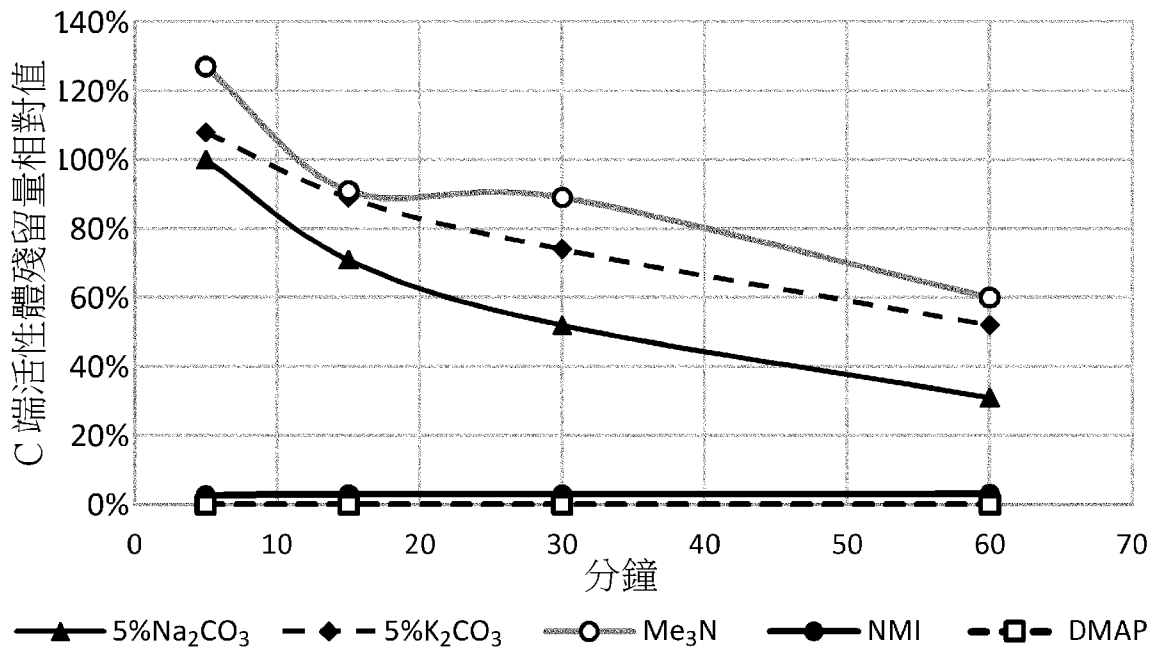
【發明圖式】



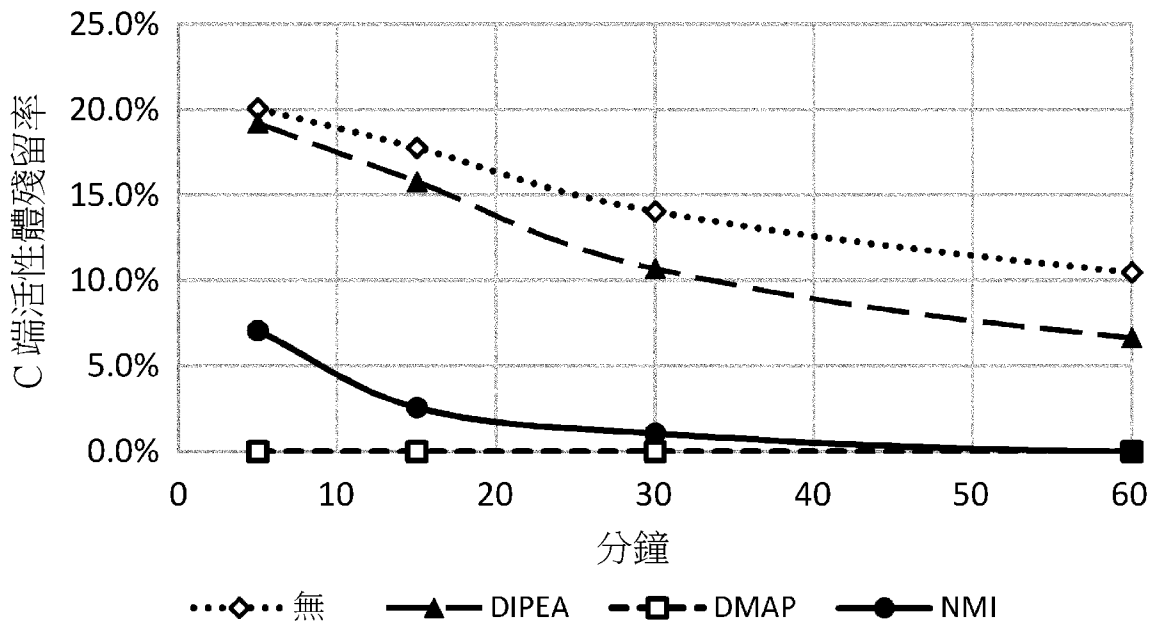
【圖 1】



【圖 2】



【圖 3】



【圖 4】