

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第4272529号
(P4272529)

(45) 発行日 平成21年6月3日(2009.6.3)

(24) 登録日 平成21年3月6日(2009.3.6)

(51) Int.Cl.
C O 7 K 5/08 (2006.01)

F I
C O 7 K 5/08

請求項の数 12 (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願2003-556432 (P2003-556432)	(73) 特許権者	504251241
(86) (22) 出願日	平成14年12月23日 (2002.12.23)		ポリペプチド ラボラトリーズ アーエス
(65) 公表番号	特表2005-516962 (P2005-516962A)		デンマーク国 デーケー 3 4 0 0 ヒレラ
(43) 公表日	平成17年6月9日 (2005.6.9)		ズ ヘレドスフエーイエ 2
(86) 国際出願番号	PCT/IB2002/005583	(74) 代理人	100065651
(87) 国際公開番号	W02003/055902		弁理士 小沢 慶之輔
(87) 国際公開日	平成15年7月10日 (2003.7.10)	(72) 発明者	ラスムツセン, ヨン ハー
審査請求日	平成17年4月1日 (2005.4.1)		デンマーク国 デーケー 2 8 0 0 リング
(31) 優先権主張番号	0104463-5		ビー ブッディングフエイ 6 9
(32) 優先日	平成13年12月29日 (2001.12.29)	(72) 発明者	ラスムツセン, パレ ハー
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		デンマーク国 デーケー 2 8 8 0 バグス
前置審査			フエルト アルダーシュファイレフエイ 1
			2 1 ビー 1
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 LHRH拮抗剤合成の中間体、その製造方法、およびLHRH拮抗剤の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次式 (I)

A c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H (I)

または次式 (I X)

B o c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H (I X)

のトリペプチドおよびその塩等の製造方法であって、 (I) の製造のための以下の連続的な工程：

(a) B o c - D - 4 C l P h e - O H を H O N S u と反応させて B o c - D - 4 C l P h e - O S u (V I I) を形成し、

(b) B o c - D - 4 C l P h e - O S u (V I I) を H - D - 3 P a l - O H と反応させて B o c - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H (V I I I) を形成し、

(c) B o c - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H (V I I I) を、 B o c - D - 2 N a l - O H と H O N S u との反応により製造した B o c - D - 2 N a l - O S u と反応させて B o c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H (I X) を形成し、

(d) B o c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H (I X) を酢酸と反応させて A c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H (I) を形成すること、

または (I X) の製造のための (a) から (c) までの連続的な工程を含む方法。

【請求項2】

LHRH拮抗剤またはその医薬用として許容可能な塩の製造方法であって、

(a) Boc-D-4ClPhe-OHをHONSuと反応させてBoc-D-4ClPhe-OSu(VII)を形成し、

(b) Boc-D-4ClPhe-OSu(VII)をH-D-3Pal-OHと反応させてBoc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH(VIII)を形成し、

(c) Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH(VIII)を、Boc-D-2Nal-OHとHONSuとの反応により製造したBoc-D-2Nal-OSuと反応させてBoc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH(IX)を形成し、

(d) Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH(IX)を酢酸と反応させてAc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH(I)を形成し、

(e) 該Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH(I)を一般式

：
 $P^1 - Ser(P^2) - AA1 - AA2 - Leu - Lys(iPr, P^4) - Pro - D - AlaNH_2$ (IV)

のヘptaペプチド(IV)とカップリングさせることを含む方法(式(IV)において、 P^1 はHまたはアミノ保護基から選ばれ、 P^2 はHまたは-OH保護基であり、 P^4 はHまたはBocのようなアミノ保護基であり、AA1は天然または合成アミノ酸であり、AA2は天然または合成アミノ酸あるいは欠失である)。

【請求項3】

請求項2の方法であって、一般式(IV)の該ヘptaペプチドが一般式：

$P^1 - Ser(P^2) - NMeTyr(P^3) - D - Lys(Nic) - Leu - Lys(iPr, P^4) - Pro - D - AlaNH_2$ (V)

のヘptaペプチドである方法(式(V)において、 P^3 はHまたは-OH保護基である)。

【請求項4】

請求項2の方法であって、一般式(IV)の該ヘptaペプチドが一般式：

$P^1 - Ser(P^2) - NMeTyr(P^3) - D - Asn - Leu - Lys(iPr, P^4) - Pro - D - AlaNH_2$ (Va)

のヘptaペプチドである方法(式(Va)において、 P^3 はHまたは-OH保護基である)。

【請求項5】

請求項3の方法であって、一般式(V)の該ヘptaペプチドが式：

$H - Ser(tBu) - NMeTyr - D - Lys(Nic) - Leu - Lys(iPr, Boc) - Pro - D - AlaNH_2$ (VI)

のヘptaペプチドである方法。

【請求項6】

請求項4の方法であって、式(VI)の該ヘptaペプチドが式：

$H - Ser(tBu) - NMeTyr - D - Asn - Leu - Lys(iPr, Boc) - Pro - D - AlaNH_2$ (VIa)

のヘptaペプチドである方法。

【請求項7】

LHRH拮抗剤またはその医薬用として許容可能な塩の製造方法であって、

(a) Boc-D-4ClPhe-OHをHONSuと反応させてBoc-D-4ClPhe-OSu(VII)を形成し、

(b) Boc-D-4ClPhe-OSu(VII)をH-D-3Pal-OHと反応させてBoc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH(VIII)を形成し、

(c) Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH(VIII)を、Boc-D-

10

20

30

40

50

2 NaI - OHとHONSuとの反応により製造したBoc - D - 2 NaI - OSuと反応させてBoc - D - 2 NaI - D - 4 ClPhe - D - 3 Pal - OH (IX)を形成し、

(e') 該Boc - D - 2 NaI - D - 4 ClPhe - D - 3 Pal - OH (IX)を一般式：

$P^1 - Ser(P^2) - AA1 - AA2 - Leu - Lys(iPr, P^4) - Pro - D - AlaNH_2$ (IV)

のヘプタペプチド(IV)とカップリングさせることを含む方法(式(IV)において、 P^1 はHまたはアミノ保護基から選ばれ、 P^2 はHまたは-OH保護基であり、 P^4 はHまたはBocのようなアミノ保護基であり、AA1は天然または合成アミノ酸であり、AA2は天然または合成アミノ酸あるいは欠失である)。

10

【請求項8】

請求項7の方法であって、一般式(IV)の該ヘプタペプチドが、一般式：

$P^1 - Ser(P^2) - NMeTyr(P^3) - D - Lys(Nic) - Leu - Lys(iPr, P^4) - Pro - D - AlaNH_2$ (V)

のヘプタペプチド(V)である方法(式(V)において、 P^3 はHまたは-OH保護基である)。

【請求項9】

請求項8の方法であって、一般式(V)の該ヘプタペプチドが、ヘプタペプチド：

$H - Ser(tBu) - NMeTyr - D - Lys(Nic) - Leu - Lys(iPr, Boc) - Pro - D - AlaNH_2$ (VI)

である方法。

20

【請求項10】

請求項7の方法であって、一般式(IV)の該ヘプタペプチドが、一般式：

$P^1 - Ser(P^2) - NMeTyr(P^3) - D - Asn - Leu - Lys(iPr, P^4) - Pro - D - AlaNH_2$ (Va)

のヘプタペプチドであり、引き続き、アシル基、特にアセチル基によるBoc基の置換を行う方法。

【請求項11】

請求項10の方法であって、一般式(IV)の該ヘプタペプチドが、ヘプタペプチド：

$H - Ser(tBu) - NMeTyr - D - Asn - Leu - Lys(iPr, Boc) - Pro - D - AlaNH_2$ (VIa)

であり、引き続き、アシル基、特にアセチル基によるN末端Boc基の置換を行う方法。

30

【請求項12】

トリペプチドBoc - D - 2 NaI - D - 4 ClPhe - D - 3 Pal - OH (IX) またはその塩。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、LHRH拮抗剤合成の中間体、この中間体の製造方法、およびLHRH拮抗剤の製造方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

黄体化ホルモン放出ホルモンLHRHは、卵胞刺激ホルモン(FSH)および黄体化ホルモン(LH)の分泌を制御している。LHRH拮抗剤は、FSHおよびLHの分泌を阻害することができる化合物である。概して、これらは、LHRHの構造の一部または全体のうち、1個または数個のアミノ酸が他の天然アミノ酸および/または自然界にはないアミノ酸によって置換された構造を含むノナペプチドおよびデカペプチド(これらより長短のある場合もある)である。

【0003】

50

合成 L H R H 拮抗剤は、避妊用に用いることができ、また、前立腺の良性過形成、乳房および卵巣のホルモン依存性腫瘍、月経困難、子宮内膜症その他の症状の治療に使用することができる。この合成 L H R H 拮抗剤は、一般式

$$A c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - S e r - X - N H _2$$

を有する。但し、X は 5 乃至 6 個の天然および / または合成アミノ酸残基である。より詳細には、この拮抗剤は、上記一般式において、X が A A 1 - A A 2 - L e u - A A 3 - P r o - D - A l a であり、このうち、特に、A A 1 が天然または合成アミノ酸、A A 2 が天然または合成アミノ酸あるいは欠失、A A 3 が天然または合成アミノ酸のものである。

【 0 0 0 4 】

L H R H 類似体を製造する合成的な方法は当分野で数多く知られているが、既知の方法で得られる L H R H 類似体の全収率は高くなく、しかもその生成物は大がかりな精製を必要とするので、改良が求められている。さらに、当分野で知られている L H R H 類似体の合成法はかなり費用がかかるものである。

【 0 0 0 5 】

米国特許第 5 , 7 1 0 , 2 4 6 号に開示されている、デカペプチドまたはノナペプチド L H R H 拮抗剤を製造する合成法は、(このペプチドのアミノ末端から数えて) 1 番目から 3 番目までのアミノ酸残基を表す中間体トリペプチドを、それぞれ 4 番目から 1 0 番目および 4 番目から 9 番目のアミノ酸残基を表すヘプタペプチドまたはヘキサペプチドとカップリングさせることを含むものである。米国特許第 5 , 7 1 0 , 2 4 6 A 号に開示されているこの中間体トリペプチドは、エステル $B o c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O - M e$ 、あるいは対応するベンジルまたはアリルエステルである。

【特許文献 1】米国特許 5 , 7 1 0 , 2 4 6 A

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 6 】

従って、本発明の目的は、生成物の収率および / または精製が改善される L H R H 類似体の 3 + 7 および 3 + 6 合成のためのトリペプチド中間体を提供することにある。

【 0 0 0 7 】

さらに、本発明の目的は、このようなトリペプチド中間体の製造方法を提供することにある。

【 0 0 0 8 】

本発明のさらに他の目的は、トリペプチドがヘプタペプチドまたはヘキサペプチドにカップリングされている L H R H 類似体の製造方法を提供することにある。

【 0 0 0 9 】

さらに、本発明の諸目的は、以下の、課題を解決するための手段、発明を実施するための最良の形態、および添付の特許請求の範囲から明らかとなろう。

【 0 0 1 0 】

定義および略語

本出願に用い、本発明の分野で一般に受け入れられている定義および略語については、特に、米国特許第 5 , 7 1 0 , 2 4 6 A 号を参照している。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 1 】

本発明では、L H R H 拮抗剤の 1 番目から 3 番目までのアミノ酸を表すトリペプチドであって、末端アミノ基が B o c または A c により保護され、末端カルボキシル基 (即ち、3 番目アミノ酸の末端基) が保護されていないトリペプチドが提供されている。

【 0 0 1 2 】

本発明による次のトリペプチド (I)

$$A c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H \quad (I)$$

が開示されており、このトリペプチドは、一般式 (I I)

$$A c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - S e r - X - N H _2 \quad (I I)$$

10

20

30

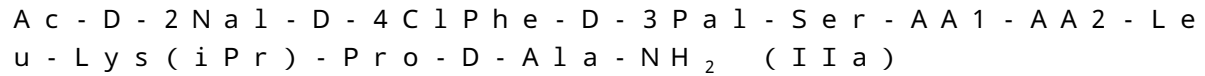
40

50

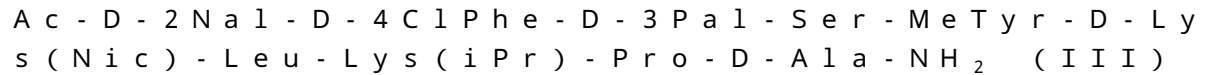
の LHRH 拮抗剤の合成法に有用な中間体である。但し、式 (II) では、X は 5 個乃至 7 個の天然および/または合成アミノ酸残基、より好ましくは、AA1 - AA2 - Leu - AA3 - Pro - D - Ala であり、このうち、特に AA1 が天然または合成アミノ酸、AA2 が天然または合成アミノ酸あるいは欠失、AA3 が天然または合成アミノ酸であるものである。

【0013】

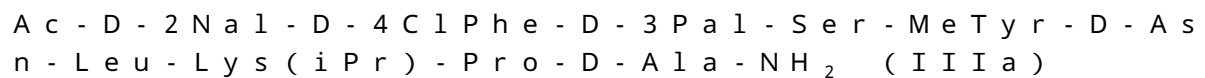
さらに好ましくは、一般式 (IIa)



(この場合、AA1 および AA2 は前記の意味を有する) のペプチド、特に、式 (III)



または、さらに好ましくは、式 (II Ia)



の LHRH 拮抗剤の合成にトリペプチド (I) が用いられる。

【0014】

また、本発明による、同じ有用性を有するトリペプチド



も開示されている。

【0015】

さらに、本発明による、式 (I)



または式 (IX)



のトリペプチドの製造方法が開示されており、この方法は、(I) の製造に関する以下の連続的な工程:

(a) Boc - D - 4ClPhe - OH を HONSu と反応させて Boc - D - 4ClPhe - OSu (VII) を形成し、

(b) Boc - D - 4ClPhe - OSu (VII) を H - D - 3Pal - OH と反応させて Boc - D - 4ClPhe - D - 3Pal - OH (VIII) を形成し、

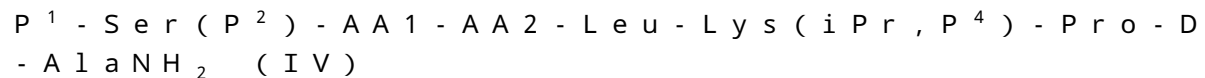
(c) Boc - D - 4ClPhe - D - 3Pal - OH (VIII) を、Boc - D - 2Nal - OH と HONSu との反応により合成した Boc - D - 2Nal - OSu と反応させて Boc - D - 2Nal - D - 4ClPhe - D - 3Pal - OH (IX) を形成し、

(d) Boc - D - 2Nal - D - 4ClPhe - D - 3Pal - OH (IX) を酢酸と反応させて Ac - D - 2Nal - 4ClPhe - D - 3Pal - OH (I) を形成すること、

または、(IX) の製造に関する (a) から (c) までの連続的な工程を含む。

【0016】

LHRH 拮抗剤を製造する本発明の方法は、トリペプチド (I) を、一般式



(式中、P⁴ は H または Boc のようなアミノ保護基であり、AA1 および AA2 は前述の意味を有する。) のヘプタペプチド (IV)、特に、一般式 P¹ - Ser(P²) - NMeTyr(P³) - D - Lys(Nic) - Leu - Lys(iPr, P⁴) - Pro - D - AlaNH₂ (V) (式中、P¹ は H またはアミノ保護基から選ばれ、P² および P³ は独立に H および -OH 保護基から選ばれ、P⁴ は上記の意味を有する。) のヘプタペプチド (V) とカップリングさせて、LHRH 拮抗剤 Ac - D - 2Nal - D - 4Cl

10

20

30

40

50

Phe - D - 3 Pal - Ser - MeTyr - D - Lys (Nic) - Leu - Lys (iPr) - Pro - D - Ala - NH₂ (III) を製造する、より詳細には、一般式 P¹ - Ser (P²) - NMeTyr (P³) - D - Asn - Leu - Lys (iPr, P⁴) - Pro - D - AlaNH₂ (Va) (式中、P¹ は H または アミノ保護基から選ばれ、P² および P³ は独立に H および - OH 保護基から選ばれ、P⁴ は上記の意味を有する。) のヘプタペプチド (Va) とカップリングさせて、LHRH拮抗剤 Ac - D - 2 Nal - D - 4 ClPhe - D - 3 Pal - Ser - MeTyr - D - Asn - Leu - Lys (iPr) - Pro - D - Ala - NH₂ (III) を製造する工程を含む。

【0017】

ヘプタペプチド (V) は米国特許第 5710246 A 号に開示されている。ヘプタペプチド (Va) を含む一般式 (IV) のヘプタペプチドは、(V) の合成法の通常改良により、または、LHRH拮抗剤が開示されている国際公開第 WO94/40757 号に記載されているように、ペプチド合成機 (ベックマン (Beckman) モデル 990) を用いて対応する Boc アミノ酸をカップリングさせることにより合成することができる。

【0018】

あるいは、LHRH拮抗剤を製造する本発明の方法は、トリペプチド (IX)

Boc - D - 2 Nal - D - 4 ClPhe - D - 3 Pal - OH (IX)

を、一般式

P¹ - Ser (P²) - AA1 - AA2 - Leu - Lys (iPr, P⁴) - Pro - D - AlaNH₂ (IV)

(式中、P¹、P²、P⁴、AA1 および AA2 は、前記の意味を有する) のヘプタペプチド (IV)、特に、一般式

P¹ - Ser (P²) - NMeTyr (P³) - D - Lys (Nic) - Leu - Lys (iPr, P⁴) - Pro - D - AlaNH₂ (V)

のヘプタペプチド (V)、さらに好ましくは、一般式 (Va)

P¹ - Ser (P²) - NMeTyr (P³) - D - Asn - Leu - Lys (iPr, P⁴) - Pro - D - AlaNH₂ (Va)

(式中、P¹ は H または アミノ保護基から選ばれ、P² および P³ は独立に H および - OH 保護基から選ばれ、P⁴ は前述の意味を有する。) のヘプタペプチドとカップリングさせ、次いで、N 末端 Boc 基をアシル基、特にアセチル基によって置換する工程を含む。

【0019】

さらに詳細には、一般式 (V) のヘプタペプチドは、ヘプタペプチド (VI)

H - Ser (tBu) - NMeTyr - D - Lys (Nic) - Leu - Lys (iPr, Boc) - Pro - D - AlaNH₂ (VI)

または、さらに好ましくは、ヘプタペプチド (VIa)

H - Ser (tBu) - NMeTyr - D - Asn - Leu - Lys (iPr, Boc) - Pro - D - AlaNH₂ (VIa)

である。

【0020】

本発明の方法の特に有利な点は、エステル H - Pal - OR · 2 HCl の代わりに、より安価な出発原料 H - D - Pal - OH · 2 HCl を用いることができ、この出発原料の保護基を除去する必要がないことである。従って、本発明の合成法では、1 工程少なく済み、余分な工程で原料をロスすることを避けることができる。他の利点として、けん化の工程で不純物が生じるのを防止することができる。このような不純物の生成についてはよく知られている。例えば、このエステル加水分解は塩基性条件下で行うと、D - Pal が一部ラセミ化する。このエステル基 (アリルまたはベンジルエステル基の場合) を接触水素添加により除去する他の従来技術による代替法では、4 ClPhe から Cl がはずれて Phe を生じる虞がある。さらに別の試薬によってアリル基を除去することもできるが、完全に除去するには制御が困難である。次に、好ましい実施態様を説明することによって、本発明をさらに詳述する。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0021】

Ac-D-2Na1-4ClPhe-D-3Pal-OH(I)の合成

【実施例1】

【0022】

Boc-D-4ClPhe-OSu: Boc-D-4ClPhe-OH(299.75g; 1.0当量)およびHONSu(184.1g; 1.6当量)を2-プロパノール(4.5L)に溶解させる。この混液を0℃に冷却し、DIC(164.1g; 1.3当量)を加える。混液を室温まで加温しながら、16時間攪拌する。生成物は、2-プロパノール(1.5L)でろ過、洗浄し、乾燥させた。収率: 85%、HPLC純度: 98.8%

10

【実施例2】

【0023】

Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH: H-D-3Pal-OH·2HCl(251.1g; 1.05当量)およびBoc-D-4ClPhe-OSu(396.8g; 1.0当量)をDMSO(3.33L)に溶解させ、NMM(318.8g; 3.15当量)を加える。この混液を室温で16時間攪拌する。次いで、水(17L)を加え、pHを4乃至4.5に調整して生成物を沈殿させる。混液をろ過し、生成物を水(3×5L)で洗浄して微量のDMSO、H-D-3Pal-OHおよびBoc-D-4ClPhe-OHを除去する。得られた生成物は乾燥する。収率: 80%、HPLC純度: 97.8%

20

【実施例3】

【0024】

Boc-D-2Na1-OSu: Boc-D-2Na1-OH(315.4g; 1.0当量)を-10℃で2-プロパノール(6.8L)に溶解させ、IBC(157g; 1.15当量)およびNMM(116g; 1.15当量)を加える。5乃至10分間攪拌後、2-プロパノール(1.4L)にHONSu(230.1g; 2.0当量)を溶かした混液を加える。次いで、さらにNMM(10.1g; 0.1当量)を加える。0.5時間後、水(0.82L)を加えて、沈殿したNMM·HClを溶かす。得られた生成物は、ろ過により単離して2-プロパノール(1L)で洗浄し、乾燥させる。収率: 90%、HPLC純度: 98.3%

30

【実施例4】

【0025】

Boc-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-OH:

(a)脱保護: Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH(447.93g; 1.0当量)を、酢酸エチル(3.4L)、酢酸(675ml)およびMSA(454ml; 7.0当量)の混液に0℃で溶解させ、2時間この温度に保つ。次いで、TEA(1669ml; 12当量)を加える。

【0026】

(b)縮合: 上記中和脱保護混液に室温でBoc-D-Na1-OSu(412.4g; 1.0当量)を加える。この反応混液をこの温度で2乃至4時間保つ。次いで、25%NH₃水溶液(154ml; 2.0当量)を加えて、残存するヒドロキシスクシンイミド・エステルを冷却する。次に、以後の抽出で沈殿を生じないように、1-ブタノール(4.5L)を加える。

40

【0027】

(c)精製および単離: この反応混液について、TEAを除去するためpH6(2×4.5Lの水)で2度抽出し、MSAを除去するためpH9(4.5Lの水)で抽出し、最後にpH7(4.5Lの水)で抽出する。沈殿を生じないように、抽出は40乃至45で行う。得られた有機相に酢酸(4.5L; 1容積)を加え、この混液を減圧濃縮し、酢酸(4.5L)と共蒸発させて固体を得る。

50

【実施例 5】

【0028】

Ac - D - 2 Na1 - D - 4 Cl Phe - D - 3 Pal - ONa

(a) 脱保護：固体 Boc - D - 2 Na1 - D - 4 Cl Phe - D - 3 Pal - OH に水 (90 ml)、酢酸 (1.8 L) および MSA (454 mL; 7.0 当量) を加え、この混液を室温で 1 乃至 2 時間攪拌する。混液を 0 に冷却し、TEA (1071 mL; 7.7 当量) で中和する。得られた溶液を減圧濃縮し、トルエン (2 × 2.5 L) と 2 度共蒸発させて油を得る。

【0029】

(b) アセチル化：脱保護工程からの油をトルエン (2.0 L) に溶解させ、これにアセチルイミダゾール (132.14 g) を加える。この混液を室温で 1 時間攪拌した後、水 (100 ml) を加えて残存するアセチルイミダゾールを冷却する。

【0030】

(d) 精製：アセチル化工程からの混液を 30 乃至 35 まで加熱し、沈殿を生じないように 1 - ブタノール (4.5 L) を加える。この混液を pH 5 (2 × 2.6 L の水) で 2 度、NaOH で調整して pH 11 (2 × 2.6 L の水) で 2 度抽出を行う。最後の抽出液にはメタノール (2.25 L) を加えて沈殿を防止する。また、最初と最後の抽出液には NaCl (130 g) を加えて、水相中の生成物のロスをできるだけ抑える。

【0031】

(e) 単離：激しく攪拌した抽出液の有機相にヘプタン (15 L) を加え、得られた懸濁液を少なくとも 1 時間攪拌しながら室温で置いておく。この混液をろ過し、生成物をヘプタン (2 × 3.5 L) で 2 度洗浄した後、乾燥させる。収率：75% (Boc - D - 4 Cl Phe - D - 3 Pal - OH から)。HPLC 純度：92%。アミノ酸分析値：2 Na1 : 1.1; 4 Cl Phe : 1.0; 3 Pal : 0.9。MS : MW 586。Na : 4.6%

【実施例 6】

【0032】

Ac - D - 2 Na1 - D - 4 Cl Phe - D - 3 Pal - OH · DCHA

(a) 脱保護：固体 Boc - D - 2 Na1 - D - 4 Cl Phe - D - 3 Pal - OH に水 (90 ml)、酢酸 (1.8 L) および MSA (454 mL; 7.0 当量) を加え、この混液を室温で 1 乃至 2 時間攪拌する。混液を 0 に冷却し、TEA (1071 mL; 7.7 当量) で中和する。得られた溶液を減圧濃縮し、トルエン (2 × 2.5 L) と 2 度共蒸発させて油を得る。

【0033】

(b) アセチル化：脱保護工程からの油をトルエン (2.0 L) に溶解させ、これにアセチルイミダゾール (132.14 g) を加える。この混液を室温で 1 時間攪拌した後、水 (100 ml) を加えて残存するアセチルイミダゾールを冷却する。

【0034】

(c) 精製：この混液を 30 乃至 35 まで加熱し、1 - ブタノール (4.5 L) を加えて沈殿を防止する。この混液を pH 7 (2 × 2.6 L の水) で 2 度、pH 9 乃至 9.5 (2.6 L の水) で 1 度、さらに pH 7 (2.6 L の水) で 1 度抽出する。これに DCHA (ジシクロヘキシルアミン) を加え、混液を減圧濃縮する。得られた生成物を 50 で 1 - ブタノール (4.5 L) に懸濁し、激しく攪拌したヘプタン (27 L) にゆっくりと加える。この混液を 0 で一夜攪拌した後、ろ過し、生成物を 1 - ブタノール / ヘプタン (1 : 3; 2 × 4.8 L) で 2 度、ヘプタン (2 × 4.5 L) で 2 度洗浄する。収率：65% (Boc - D - 4 Cl Phe - D - 3 Pal - OH から)。HPLC 純度：94.2%。アミノ酸分析値：2 Na1 : 1.1; 4 Cl Phe : 1.0; 3 Pal : 0.9。MS : MW 586 (遊離ペプチド)。

【実施例 7】

【0035】

10

20

30

40

50

A c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H

(a) 脱保護：固体 Boc - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H に水 (9 0 m l)、酢酸 (1 . 8 L) および M S A (4 5 4 m l ; 7 . 0 当量) を加え、この混液を室温で 1 乃至 2 時間攪拌する。混液を 0 に冷却し、T E A (1 0 7 1 m l ; 7 . 7 当量) で中和する。得られた溶液を減圧濃縮し、トルエン (2 × 2 . 5 L) と 2 度共蒸発させて油を得る。

【 0 0 3 6 】

(b) アセチル化：脱保護工程からの油をトルエン (2 . 0 L) に溶解させ、これにアセチルイミダゾール (1 3 2 . 1 4 g) を加える。この混液を室温で 1 時間攪拌した後、水 (1 0 0 m l) を加えて残存するアセチルイミダゾールを冷却する。

10

【 0 0 3 7 】

(c) 精製：アセチル化工程からの混液を 3 0 乃至 3 5 まで加熱し、1 - ブタノール (4 . 5 L) を加えて沈殿を防止する。この混液を p H = 7 (2 × 2 . 6 L の水) で 2 度、p H = 9 乃至 9 . 5 (2 . 6 L の水) で 1 度、さらに p H = 7 (2 . 6 L の水) で 1 度抽出する。この混液を油になるまで減圧濃縮した後、酢酸 (7 5 0 m l) に溶かして濃縮し、酢酸 (7 5 0 m l) 再溶解させて、激しく攪拌したヘプタン / 酢酸エチル (3 : 1 ; 3 . 6 L) にゆっくりと加える。この混液は 0 で一夜攪拌しておく。次いで、混液をろ過し、生成物を、酢酸エチル / ヘプタン (1 : 3 ; 2 × 3 . 6 L) で 2 度、ヘプタン (2 × 3 . 6 L) で 2 度洗浄する。収率：7 0 % (Boc - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H から)。H P L C 純度：9 3 . 9 %。アミノ酸分析値：N a l : 1 . 1 ; 4 C l P h e : 1 . 0 ; 3 P a l : 0 . 9。M S : M W 5 8 6 (遊離ペプチド)。

20

フロントページの続き

- (72)発明者 ワツハス, ウォルフガング オー
デンマーク国 38329 ウィットマー ヒンリッヒ・ウイルヘルム・コプフーウエーク 6
- (72)発明者 ハンセン, シュテファン
デンマーク国 デーケー2000 フレデリクスベルク 2テーフアオ エヌデーエル ファサン
フエイ 194
- (72)発明者 フォムスガールト, イエンス
デンマーク国 デーケー3520 ファルム ファインケルフエイ 27

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 特表2000-507243(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 5/00

C12N 15/00

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)