

(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.

C07K 5/08 (2006.01)

F 1

C07K 5/08

請求項の数 12 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2003-556432 (P2003-556432)
 (86) (22) 出願日 平成14年12月23日 (2002.12.23)
 (65) 公表番号 特表2005-516962 (P2005-516962A)
 (43) 公表日 平成17年6月9日 (2005.6.9)
 (86) 國際出願番号 PCT/IB2002/005583
 (87) 國際公開番号 WO2003/055902
 (87) 國際公開日 平成15年7月10日 (2003.7.10)
 審査請求日 平成17年4月1日 (2005.4.1)
 (31) 優先権主張番号 0104463-5
 (32) 優先日 平成13年12月29日 (2001.12.29)
 (33) 優先権主張国 スウェーデン(SE)

前置審査

(73) 特許権者 504251241
 ポリペプチド ラボラトリーズ アーエス
 デンマーク国 デーケー3400 ヒレラ
 ズ ヘレドスフェイエン 2
 (74) 代理人 100065651
 弁理士 小沢 慶之輔
 (72) 発明者 ラスムツセン, ヨン ハー
 デンマーク国 デーケー2800 リング
 ビー ブッディングフェイ 69
 (72) 発明者 ラスムツセン, パレ ハー
 デンマーク国 デーケー2880 バグス
 フエルト アルダーシュフイレフエイ 1
 21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(IX)

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

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續的な工程：

(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 (VII) を形成し、

(b) B o c - D - 4 C l P h e - O S u (VII) 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 (VIII) を形成し、

(c) B o c - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H (VIII) 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 (IX) 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 (IX) 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(IX)の製造のための(a)から(c)までの連續的な工程を含む方法。

10

20

【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-4C1Phe-OHをHONSuと反応させてBoc-D-4C1Phe-Osu(VII)を形成し、
 (b) Boc-D-4C1Phe-Osu(VII)をH-D-3Pal-OHと反応させてBoc-D-4C1Phe-D-3Pal-OH(VIIII)を形成し、
 (c) Boc-D-4C1Phe-D-3Pal-OH(VIIII)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-4C1Phe-D-3Pal-OH(IX)を形成し、
 (d) Boc-D-2Nal-D-4C1Phe-D-3Pal-OH(IX)を酢酸と反応させてAc-D-2Nal-D-4C1Phe-D-3Pal-OH(I)を形成し、

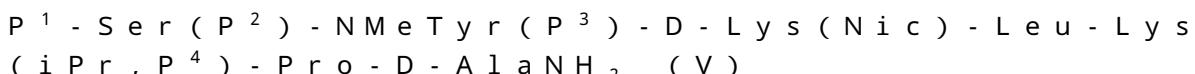
(e) 該Ac-D-2Nal-D-4C1Phe-D-3Pal-OH(I)を一般式：



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、P¹はHまたはアミノ保護基から選ばれ、P²はHまたは-OH保護基であり、P⁴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】

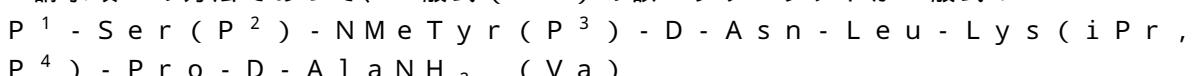
請求項2の方法であって、一般式(IV)の該ヘプタペプチドが一般式：



のヘプタペプチドである方法(式(V)において、P³はHまたは-OH保護基である)。

【請求項 4】

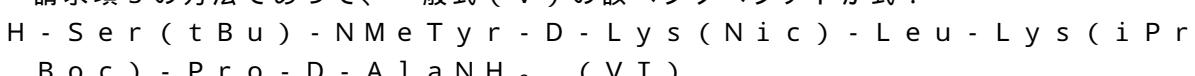
請求項2の方法であって、一般式(IV)の該ヘプタペプチドが一般式：



のヘプタペプチドである方法(式(Va)において、P³はHまたは-OH保護基である)。

【請求項 5】

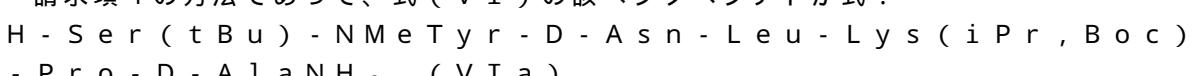
請求項3の方法であって、一般式(V)の該ヘプタペプチドが式：



のヘプタ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)の該ヘプタペプチドが式：



のヘプタ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-4C1Phe-OHをHONSuと反応させてBoc-D-4C1Phe-Osu(VII)を形成し、
 (b) Boc-D-4C1Phe-Osu(VII)をH-D-3Pal-OHと反応させてBoc-D-4C1Phe-D-3Pal-OH(VIIII)を形成し、
 (c) Boc-D-4C1Phe-D-3Pal-OH(VIIII)を、Boc-D-

10

20

30

40

50

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、

(e') 該 B o c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H (I X) を一般式：

P¹ - S e r (P²) - A A 1 - A A 2 - L e u - L y s (i P r , P⁴) - P r o - D - A l a N H₂ (I V)

のヘプタペプチド (I V) とカップリングさせることを含む方法 (式 (I V)) において、 P¹ は H またはアミノ保護基から選ばれ、 P² は H または - O H 保護基であり、 P⁴ は H または B o c のようなアミノ保護基であり、 A A 1 は天然または合成アミノ酸であり、 A A 2 は天然または合成アミノ酸あるいは欠失である) 。

【請求項 8】

請求項 7 の方法であって、一般式 (I V) の該ヘプタペプチドが、一般式：

P¹ - S e r (P²) - N M e T y r (P³) - D - L y s (N i c) - L e u - L y s (i P r , P⁴) - P r o - D - A l a N H₂ (V)

のヘプタペプチド (V) である方法 (式 (V)) において、 P³ は H または - O H 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 - S e r (t B u) - N M e T y r - D - L y s (N i c) - L e u - L y s (i P r , B o c) - P r o - D - A l a N H₂ (V I)

である方法。

【請求項 10】

請求項 7 の方法であって、一般式 (I V) の該ヘプタペプチドが、一般式：

P¹ - S e r (P²) - N M e T y r (P³) - D - A s n - L e u - L y s (i P r , P⁴) - P r o - D - A l a N H₂ (V a)

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 B o c 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 (I V) の該ヘプタペプチドが、ヘプタペプチド：

H - S e r (t B u) - N M e T y r - D - A s n - L e u - L y s (i P r , B o c) - P r o - D - A l a N H₂ (V I a)

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

【請求項 12】

トリペプチド B o c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H (I X)
またはその塩。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

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

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

黄体化ホルモン放出ホルモン L H R H は、卵胞刺激ホルモン (F S H) および黄体化ホルモン (L H) の分泌を制御している。 L H R H 拮抗剤は、 F S H および L H 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、 L H R H 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。

【 0 0 0 3 】

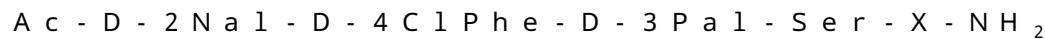
10

20

40

50

合成LHRH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LHRH拮抗剤は、一般式



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AA1-AA2-Leu-AA3-Phe-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のものである。

【0004】

LHRH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LHRH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LHRH類似体の合成法はかなり費用がかかるものである。 10

【0005】

米国特許第5,710,246号に開示されている、デカペプチドまたはノナペプチドLHRH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10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ティングさせることを含むものである。米国特許第5,710,246A号に開示されているこの中間体トリペプチドは、エステルのBoc-D-2Nal-D-4C1Phe-3Pal-O-Me、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。 20

【特許文献1】米国特許5,710,246A

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

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LHRH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。

【0007】

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。 30

【0008】

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ティングされているLHRH類似体の製造方法を提供することにある。

【0009】

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。

【0010】

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5,710,246A号を参照している。 40

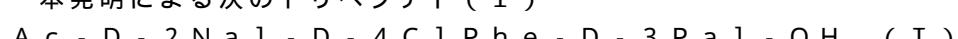
【課題を解決するための手段】

【0011】

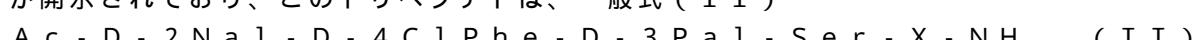
本発明では、LHRH拮抗剤の1番目から3番目までのアミノ酸を表すトリペプチドであって、末端アミノ基がBocまたはAcにより保護され、末端カルボキシル基(即ち、3番目アミノ酸の末端基)が保護されていないトリペプチドが提供されている。

【0012】

本発明による次のトリペプチド(I)



が開示されており、このトリペプチドは、一般式(II)



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)

Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-AA1-AA2-Leu-Lys(ipr)-Pro-D-Ala-NH₂ (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) 10

Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MetYr-D-Lys(Nic)-Leu-Lys(ipr)-Pro-D-Ala-NH₂ (III)

または、さらに好ましくは、式(IIIA)

Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MetYr-D-Asn-Leu-Lys(ipr)-Pro-D-Ala-NH₂ (IIIA)

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

Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX) 20

も開示されている。

【0015】

さらに、本発明による、式(I)

Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-Pal-OH (I)

または式(IX)

Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (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、 30

(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。 40

【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

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

(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 50

Phe - D - 3Pal - Ser - Met Tyr - D - Lys (Nicc) - 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 - 2Nal - D - 4ClPhe - D - 3Pal - Ser - Met Tyr - 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5710246A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) の合成法の通常の改良により、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 (Beckmann) 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 - 2Nal - D - 4ClPhe - D - 3Pal - 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 (Nicc) - 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 (Nicc) - 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 · 2HClの代わりに、より安価な出発原料H - D - Pal - OH · 2HCl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工程少なくて済み、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、4ClPhe からC1 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】

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

【実施例1】

【0022】

B o c - D - 4 C l P h e - O S u : B o c - D - 4 C l P h e - O H (2 9 9 . 7 5 g ; 1 . 0 当量) および H O N S u (1 8 4 . 1 g ; 1 . 6 当量) を 2 - プロパノール (4 . 5 L) に溶解させる。この混液を 0 °C に冷却し、 D I C (1 6 4 . 1 g ; 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 . 5 L) でろ過、洗浄し、乾燥させた。収率 : 85 %、 H P L C 純度 : 98 . 8 %。
10

【実施例2】

【0023】

B o c - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H : H - D - 3 P a l - O H · 2 H C l (2 5 1 . 1 g ; 1 . 0 5 当量) および B o c - D - 4 C l P h e - O S u (3 9 6 . 8 g ; 1 . 0 当量) を D M S O (3 . 3 3 L) に溶解させ、 N M M (3 1 8 . 8 g ; 3 . 1 5 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 (1 7 L) 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 × 5 L) で洗浄して微量の D M S O 、 H - D - 3 P a l - O H および B o c - D - 4 C l P h e - O H を除去する。得られた生成物は乾燥する。収率 : 80 %、 H P L C 純度 : 97 . 8 %。
20

【実施例3】

【0024】

B o c - D - 2 N a l - O S u : B o c - D - 2 N a l - O H (3 1 5 . 4 g ; 1 . 0 当量) を -10 °C で 2 - プロパノール (6 . 8 L) に溶解させ、 I B C (1 5 7 g ; 1 . 1 5 当量) および N M M (1 1 6 g ; 1 . 1 5 当量) を加える。5 乃至 10 分間攪拌後、 2 - プロパノール (1 . 4 L) に H O N S u (2 3 0 . 1 g ; 2 . 0 当量) を溶かした混液を加える。次いで、さらに N M M (1 0 . 1 g ; 0 . 1 当量) を加える。0 . 5 時間後、水 (0 . 8 2 L) を加えて、沈殿した N M M · H C l 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 (1 L) で洗浄し、乾燥させる。収率 : 90 %、 H P L C 純度 : 98 . 3 %。
30

【実施例4】

【0025】

B o c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H :

(a) 脱保護 : B o c - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H (4 4 7 . 9 3 g ; 1 . 0 当量) を、酢酸エチル (3 . 4 L) 、酢酸 (6 7 5 m L) および M S A (4 5 4 m L ; 7 . 0 当量) の混液に 0 °C で溶解させ、2 時間この温度に保つ。次いで、 T E A (1 6 6 9 m L ; 1 2 当量) を加える。

【0026】

(b) 縮合 : 上記中和脱保護混液に室温で B o c - D - N a l - O S u (4 1 2 . 4 g ; 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、 2 5 % N H ₃ 水溶液 (1 5 4 m L ; 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 . 5 L) を加える。
40

【0027】

(c) 精製および単離 : この反応混液について、 T E A を除去するため pH 6 (2 × 4 . 5 L の水) で 2 度抽出し、 M S A を除去するため pH 9 (4 . 5 L の水) で抽出し、最後に pH 7 (4 . 5 L 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 . 5 L ; 1 容積) を加え、この混液を減圧濃縮し、酢酸 (4 . 5 L) と共に蒸発させて固体を得る。
50

【実施例 5】

【0028】

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

(a) 脱保護：固体 B o c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H に水 (90 ml)、酢酸 (1.8 L) および M S A (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、T E A (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、N a O H 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 N a C l (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% (B o c - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H から)。H P L C 純度：92%。アミノ酸分析値：2 N a l : 1.1 ; 4 C l P h e : 1.0 ; 3 P a l : 0.9。M S : M W 586。N a : 4.6%

【実施例 6】

【0032】

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

(a) 脱保護：固体 B o c - D - 2 N a l - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H に水 (90 ml)、酢酸 (1.8 L) および M S A (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、T E A (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、p H 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 D C H A (ジシクロヘキシリルアミン) 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% (B o c - D - 4 C l P h e - D - 3 P a l - O H から)。H P L C 純度：94.2%。アミノ酸分析値：2 N a l : 1.1 ; 4 C l P h e : 1.0 ; 3 P a l : 0.9。M S : M W 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 1 P h e - D - 3 P a l - O H

(a) 脱保護：固体 B o c - D - 2 N a l - D - 4 C 1 P h e - D - 3 P a l - O H に水 (90 ml)、酢酸 (1.8 L) および M S A (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、T E A (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。

【0036】

(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。

10

【0037】

(c) 精製：アセチル化工程からの混液を 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。この混液を油になるまで減圧濃縮した後、酢酸 (750 ml) に溶かして濃縮し、酢酸 (750 ml) 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：70% (B o c - D - 4 C 1 P h e - D - 3 P a l - O H から)。H P L C 純度：93.9%。アミノ酸分析値：N a l : 1.1; 4 C 1 P h e : 1.0; 3 P a l : 0.9。M S : M W 586 (遊離ペプチド)。

20

フロントページの続き

(72)発明者 ワツバス , 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テーファオ エヌデーエル フアサン
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 フアルム フインケルフエイ 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/WPI/IDS(STN)