



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년07월08일
 (11) 등록번호 10-0844520
 (24) 등록일자 2008년07월01일

(51) Int. Cl.

C07K 5/083 (2006.01) *C07K 5/08* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-7010267

(22) 출원일자 2004년06월28일

심사청구일자 2007년01월22일

번역문제출일자 2004년06월28일

(65) 공개번호 10-2004-0090965

(43) 공개일자 2004년10월27일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2002/005583

국제출원일자 2002년12월23일

(87) 국제공개번호 WO 2003/055902

국제공개일자 2003년07월10일

(30) 우선권주장

0104463-5 2001년12월29일 스웨덴(SE)

(56) 선행기술조사문헌

US05710246 A1

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 정의준

(54) L H R H 길항체 합성용 중간체, 그 제조 방법 및 L H R H 길항체의 제조 방법

(57) 요약

신규의 트리펩타이드 Ac-D-2Nal-D-4ClPh-D-3Pal-OH 및 Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH는, 적합한 헵타펩타이드, 특히 헵타펩타이드 $P^1\text{-Ser}(P^2)\text{-NMeTyr}(P^3)\text{-D-Lys(Nic)}\text{-Leu-Lys(iPr,P^4)\text{-Pro-D-AlaNH}_2}$ 및 $P^1\text{-Ser}(P^2)\text{-NMeTyr}(P^3)\text{-D-Asn-Leu-Lys(iPr,P^4)\text{-Pro-D-AlaNH}_2}$ 와 결합함으로써 LHRH 동족체를 합성하는 데 유용한 중간체이다.

(72) 발명자

박스볼프강오.

독일 38329 비트마르 헌리히-빌 헬름-코크-베크 6

한센슈테판

덴마크 디케이-2000 프레데릭스베르그 2.티브이.
엔디알. 패산베이 194

폼스가드엔스

덴마크 디케이-3520 파룸 빈켈베이 27

특허청구의 범위

청구항 1

하기 일반식 (IX):

Boc-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pa1-OH (IX)

의 트리펩타이드 및 그의 염을 제조하는 방법으로서,

상기 일반식 (IX)의 트리펩타이드를 제조하기 위해, 연속되는 하기 단계:

- (a) Boc-D-4ClPhe-OH를 HONSu와 반응시켜 Boc-D-4ClPhe-OSu (VII)를 형성하는 단계;
- (b) Boc-D-4ClPhe-OSu (VII)를 H-D-3Pa1-OH와 반응시켜 Boc-D-4ClPhe-D-3Pa1-OH (VIII)를 형성하는 단계; 및
- (c) Boc-D-4ClPhe-D-3Pa1-OH (VIII)를, Boc-D-2Na1-OH와 HONSu의 반응에 의해 제조된 Boc-D-2Na1-OSu와 반응시켜 Boc-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pa1-OH (IX)를 형성하는 단계

를 포함하는 제조 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

제1항의 방법에 의해 제조된 트리펩타이드 Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX) 또는 그의 염.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 LHRH 길항제 합성용 중간체, 이들 중간체의 제조 방법 및 LHRH 길항제의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 황체형성 호르몬-방출 호르몬, LHRH(luteinizing hormone-releasing hormone)은 여포자극 호르몬(follicle stimulating hormone; FSH) 및 황체형성 호르몬(LH)의 분비를 조절한다. LHRH 길항제는 FSH 및 LH의 분비를 차단할 수 있는 화합물이다. 이들 물질은 일반적으로 하나 이상의 아미노산이 다른 천연 아미노산 및/또는 천연산이 아닌 아미노산으로 교체된 LHRH 구조의 일부 또는 전부를 포함하는 노나펩타이드 및 데카펩타이드(다소 짧거나 길 수도 있음)이다.

<3> 합성 LHRH 길항제는 피임용 및 양성 전립선 비대증, 유방과 난소의 호르몬 의존성 종양, 월경불순, 자궁내막증, 기타 증상의 치료에 이용될 수 있다. 이들 합성 LHRH 길항제는 하기 일반식을 가진다:

<4> Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-X-NH₂,

<5> 상기 식에서 X는 5 내지 6개의 천연 및/또는 합성 아미노산 잔기이다. 보다 구체적으로, 합성 LHRH 길항제는 상기 일반식을 가지되, X가 AA1-AA2-Leu-AA3-Pro-D-Ala이고 여기서 AA1은 천연 또는 합성 아미노산이고 AA2는 천연 또는 합성 아미노산이거나 제로이고, AA3는 천연 또는 합성 아미노산이다.

<6> LHRH 동족체를 제조하기 위한 몇 가지 합성 방법이 종래 기술에 공지되어 있지만, 공지 방법으로 제조된 LHRH 동족체의 총 수율이 높지 않고, 더 나아가 그 생성물이 광범위한 정제를 필요로 할 수 있으므로 개선에 대한 요구가 있다. 또한, 종래 기술에 공지된 LHRH 동족체의 합성 방법은 비용이 매우 많이 듦다.

<7> 미국특허 제5,710,246호에 개시된 데카펩타이드 또는 나노펩타이드 LHRH 길항제를 만들기 위한 합성 전략은, 아미노 잔기가 1~3개(펩타이드의 아미노 말단에서부터의 수)인 중간체 트리펩타이드를 아미노산 잔기가 각각 4~10개 및 4~9개인 헵타펩타이드 또는 헥사펩타이드와 결합시키는 단계를 포함한다. 상기 특허문헌 US 5710246 A에 개시되어 있는 중간체 트리펩타이드는 에스테르, Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-2Pal-O-Me 또는 그에 대응하는 벤질 또는 알릴 에스테르이다.

발명의 상세한 설명

<8> 본 발명의 목적은 생성물의 수율 및/또는 순도가 향상된 LHRH 동족체의 3+7 및 3+6 합성을 위한 트리펩타이드 중간체를 제공하는 것이다.

<9> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 트리펩타이드 중간체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

<10> 본 발명의 또 다른 목적은 트리펩타이드가 헵타펩타이드 또는 헥사펩타이드에 결합되어 있는 LHRH 동족체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

<11> 본 발명의 추가적 목적은 이하에 제시되는 발명의 요약, 바람직한 실시예의 설명 및 첨부된 특허 청구의 범위로부터 명백해질 것이다.

<12> [정의 및 약어]

<13> 본 명세서에 사용되며 본 발명의 관련 분야에서 일반적으로 수용되는 정의 및 약어는 특허문헌 US 5710246 A에 기재되어 있다.

<14> [발명의 요약]

<15> 본 발명에 따르면, LHRH 길항제의 1~3개의 아미노산을 나타내는 트리펩타이드가 제공되며, 그의 말단 아미노기는 Boc-보호되거나 Ac-보호되고, 그의 말단 카르복시기(즉, 제3 아미노산의 말단기)는 보호되지 않는다.

<16> 본 발명에 따르면 하기 트리펩타이드 (I)가 개시되며:

- <17> Ac-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (I)
- <18> 이것은 하기 일반식 (II)의 LHRH 길항제의 합성 공정에서의 유용한 중간체이다:
- <19> Ac-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-X-NH₂ (II)
- <20> 상기 식에서 X는 5 내지 7개의 천연 및/또는 합성 아미노산 잔기이고, 보다 바람직하게는 AA1-AA2--Leu-AA3-Pro-D-Ala이고, 여기서 AA1은 천연 또는 합성 아미노산이고 AA2는 천연 또는 합성 아미노산이거나 제로이고, AA3은 천연 또는 합성 아미노산이다.
- <21> 더욱 바람직하게는, 하기 일반식 (IIa)의 웨타이드의 합성에서 트리펩타이드 (I)를 이용하는 것이다:
- <22> Ac-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-AA1-AA2-Leu(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (IIa),
- <23> 상기 식에서 AA1 및 AA2는 위에서 주어진 의미, 특히 하기 일반식 (III)의 LHRH 길항제:
- <24> Ac-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Lys(Nic)-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (III)
- <25> 또는, 더욱 바람직하게는, 하기식 (IIIa)의 LHRH 길항제이다:
- <26> Ac-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (IIIa).
- <27> 본 발명에 따르면 또한 동일하게 이용되는 하기 트리펩타이드가 개시된다:
- <28> Boc-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX).
- <29> 또한, 본 발명에 따르면 하기 일반식 (I):
- <30> Ac-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (I)
- <31> 또는 하기 일반식 (IX):
- <32> Boc-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX)
- <33> 의 트리펩타이드의 제조 방법으로서,
- <34> 일반식 (I)의 트리펩타이드를 제조하기 위해, 연속되는 하기 단계:
- <35> (a) Boc-D-4ClPhe-OH를 HONSu와 반응시켜 Boc-D-4ClPhe-OSu (VII)를 형성하는 단계;
- <36> (b) Boc-D-4ClPhe-OSu (VII)를 H-D-3Pal-OH와 반응시켜 Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (VIII)를 형성하는 단계;
- <37> (c) Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (VIII)를 Boc-D-2Na1-OH와 HONSu의 반응에 의해 제조된 Boc-D-2Na1-OSu와 반응시켜 Boc-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX)를 형성하는 단계;
- <38> (d) Boc-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX)를 아세트산과 반응시켜 Ac-D-2Na1-4ClPhe-D-3Pal-OH (I)를 형성하는 단계
- <39> 를 포함하거나, 또는 일반식 (IX)의 트리펩타이드를 제조하기 위해, 연속되는 상기 단계 (a) 내지 (c)를 포함하는 제조 방법이 개시된다.
- <40> LHRH 길항제를 제조하기 위한 본 발명의 프로세스는 트리펩타이드 (I)를 하기 일반식의 헵타펩타이드 (IV):
- <41> P¹-Ser(P²)-AA1-AA2-Leu-Lys(iPr,P⁴)-Pro-D-AlaNH₂ (IV)
- <42> (여기서, P⁴는 H 또는 Boc와 같은 아미노 보호기이고, AA1 및 AA2는 전술한 의미를 가짐), 특히 일반식 P¹-Ser(P²)-NMeTyr(P³)-D-Lys(Nic)-Leu-Lys(iPr,P4)-Pro-D-AlaNH₂ (V)(여기서, P¹은 H 또는 아미노 보호기로부터 선택되고, P² 와 P³는 독립적으로 H 및 -OH 보호기로부터 선택되고, P⁴는 전술한 의미를 가짐)와 결합시켜 LHRH 길항제, Ac-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Lys(Nic)-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (III)를 제조하는 단계를 포함하고, 보다 특별하게는 일반식 P¹-Ser(P²)-NMeTyr(P³)-D-Asn-Leu-Lys(iPr,P⁴)-Pro-D-AlaNH₂(Va)(여기서, P¹은 H 또는 아미노 보호기로부터 선택되고, P²와 P³는 독립적으로 H 및 -OH 보호기로부터 선택되고, P⁴는 전술

한 의미를 가짐)와 결합시켜 LHRH 길항제, Ac-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (III)를 제조하는 단계를 포함한다.

<43> 헵타펩타이드 (V)는 특허문현 US 5710246 A에 설명되어 있다. 상기 헵타펩타이드 (Va)를 포함하는 일반식 (I V)의 헵타펩타이드는, LHRH 길항제 (III)도 개시되어 있는 특허문현 WO 94/40757에 설명되어 있는 바와 같이, (V)의 합성 방법의 기계적 변형 또는 대응하는 Boc-아미노산을 펩타이드 합성기(peptide synthesizer) (Beckman 모델 990) 상에서 결합시킴으로써 합성할 수 있다.

<44> 이와 다르게, LHRH 길항제를 제조하기 위한 본 발명의 프로세스는 트리펩타이드 (IX):

<45> Boc-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX)

<46> 를 하기 일반식의 헵타펩타이드 (IV):

<47> P¹-Ser(P²)-AA1-AA2-Leu-Lys(iPr,P⁴)-Pro-D-AlaNH₂ (IV)

<48> (여기서, P¹, P², P⁴, AA1 및 AA2는 전술한 의미를 가짐)

<49> 특히 하기 일반식의 펩타이드 (V):

<50> P¹-Ser(P²)-NMeTyr(P³)-D-Lys(Nic)-Leu-Lys(iPr,P⁴)-Pro-D-AlaNH₂ (V)

<51> 또는 보다 바람직하게, 하기 일반식의 펩타이드 (Va):

<52> P¹-Ser(P²)-NMeTyr(P³)-D-Asn-Leu-Lys(iPr,P⁴)-Pro-D-AlaNH₂ (Va)

<53> (여기서, P¹은 H 또는 아미노 보호기로부터 선택되고, P²와 P³는 독립적으로 H 및 -OH 보호기로부터 선택되고, P⁴는 전술한 의미를 가짐)와 결합시키는 단계, 및 이어서 N-말단 Boc기를 아실기, 특히 아세틸기로 치환하는 단계를 포함한다.

<54> 보다 특별하게, 일반식 (V)의 헵타펩타이드는 하기 헵타펩타이드 (VI):

<55> H-Ser(tBu)-NMeTyr-D-Lys(Nic)-Leu-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-AlaNH₂ (VI), 또는 보다 바람직하게는 하기 헵타펩타이드 (VIa):

<56> H-Ser(tBu)-NMeTyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr,boc)Pro-D-AlaNH₂ (VIa)이다.

<57> 본 발명의 방법에 따른 특별한 이점은 에스테르 H-Pal-OR · 2HCl 대신에 저가인 출발 물질, H-D-Pal-OH · 2HCl을 사용할 수 있으며, 상기 출발 물질의 보호기를 제거하지 않아도 되는 점이다. 따라서, 본 발명의 합성 방법은 1단계가 단축됨으로써 추가 단계에서의 재료의 손실을 피할 수 있다. 또 다른 이점은 비누화 단계에서의 불순물 형성을 피할 수 있는 점이다. 그러한 불순물의 형성은 잘 알려진 사실이다. 예를 들면, 에스테르 가수분해 단계에서의 염기성 조건은 D-Pal의 부분적 라세미화(racemization)를 일으킨다. 촉매 방식 수소첨가 반응(알릴 또는 벤질 에스테르기의 경우)에 의해 에스테르기를 제거하는 종래의 다른 대안적 방법은 4ClPhe로부터 C1의 손실을 야기하여 Phe를 생성하게 될 우려가 있다. 알릴기는 다른 반응제에 의해 제거될 수 있지만, 완전한 제거는 제어가 어렵다.

<58> 이하에서, 바람직한 실시예를 참조하여 본 발명의 더욱 구체적으로 설명한다.

실시예

<59> Ac-D-2Na1-4ClPhe-D-3Pal-OH (I)의 합성

<60> 실시예 1. Boc-D-4ClPhe-OSu.

<61> Boc-D-4ClPhe-OH(299.75g; 1.0 당량) 및 HONSu(184.1g; 1.6 당량)을 2-프로판올(4.5ℓ) 중에 용해시킨다. 상기 혼합물을 0℃로 냉각하고 DIC(164.1g; 1.3 당량)를 첨가한다. 상기 혼합물을 실온까지 온도를 올리면서 16시간 동안 교반한다. 생성물을 여과하고, 2-프로판올(1.5ℓ)로 세척하고 건조한다. 수율: 85%. HPLC 순도: 98.8%

<62> 실시예 2. Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH.

<63> H-D-3Pal-OH, 2HC1(251.1g; 1.05 당량) 및 Boc-D-4ClPhe-OSu(396.8g; 1.0 당량)을 DMSO(3.33 ℥)에 용해하고 NMM(318.8g; 3.15 당량)을 첨가한다. 상기 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반한다. 물(17 ℥)을 첨가하고 생성물이 침전되도록 pH를 4~4.5 범위로 조절한다. 혼합물을 여과하고, 생성물을 물(3×5 ℥)로 세척하여 미량의 DMSO, H-D-3Pal-OH 및 Boc-D-4ClPhe-OH를 제거한다. 얻어진 생성물을 건조한다. 수율: 80%. HPLC 순도: 97.8%.

<64> 실시예 3. Boc-D-2Na1-OSu.

<65> Boc-D-2Na1-OH(315.4g; 1.0 당량)을 -10°C에서 2-프로판올(6.8 ℥)에 용해하고, IBC(157g; 1.15 당량) 및 NMM(116g; 1.15 당량)을 첨가한다. 5~10분간 교반한 후, 2-프로판올(1.4 ℥) 중의 HONSu(230.1g; 2.0 당량)의 혼합물을 첨가한다. 추가로 NMM(10.1g; 0.1 당량)을 첨가한다. 30분 후, 침전된 NMM·HCl을 용해하기 위해 물(0.82 ℥)을 첨가한다. 여과에 의해 생성물을 분리하고, 2-프로판올(1 ℥)로 세척한 후 건조한다. 수율: 90%. HPLC 순도: 98.3%.

<66> 실시예 4. Boc-Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-OH.

<67> (a) 탈보호(deprotection)

<68> Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH(447.93g; 1.0 당량)을 0°C에서 에틸아세테이트(3.4 ℥), 아세트산(675m1) 및 MSA(454m1; 7.0 당량)의 혼합물 중에 용해시키고, 이 온도에서 2시간 동안 유지시킨다. TEA(1669m1; 12 당량)을 첨가한다.

<69> (b) 축합

<70> 실온에서, Boc-D-Na1-OSu(412.4g; 1.0 당량)을 중화시킨 탈보호 혼합물에 첨가한다. 상기 반응 혼합물을 실온에서 2~4시간 동안 유지한다. NH₃ 25% 수용액(154m1; 2.0 당량)을 첨가하여 잔류한 하이드록시숙신이미드 애스테르를 희석시킨다. 이어지는 추출 과정에서 침전을 방지하기 위해 1-부탄올(4.5 ℥)을 첨가한다.

<71> (c) 정제 및 분리

<72> 상기 반응 혼합물을 pH 6에서 2회 추출(2×4.5 ℥ 물)하여 TEA를 제거하고, pH 9에서 추출(4.5 ℥ 물)하여 MSA를 제거하고, 마지막으로 pH 7에서 추출(4.5 ℥ 물)한다. 상기 추출 과정은 침전을 방지하기 위해 40~45°C에서 실행한다. 얻어진 유기상에 아세트산(4.5 ℥ ; 1 vol.)을 첨가하고 혼합물을 진공 중에 농축하고, 아세트산(4.5 ℥)과 함께 공증발(co-evaporation)시켜 고체를 얻는다.

<73> 실시예 5. Boc-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-ONa.

<74> (a) 탈보호

<75> 상기 고체 Boc-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-OH에 물(90m1), 아세트산(1.8 ℥) 및 MSA(454m1; 7.0 당량)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1~2시간 동안 교반한다. 혼합물을 0°C로 냉각하고 TEA(1071m1; 7.7 당량)로 중화시킨다. 상기 용액을 진공 중에서 농축하고 툴루엔(2×2.5 ℥)과 함께 2회 공증발시켜 오일을 얻는다.

<76> (b) 아세틸화

<77> 상기 탈보호 단계에서 얻어진 오일을 툴루엔(2.0 ℥) 중에 용해하고 아세틸이미다졸(132.14g)을 첨가한다. 상기 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반한 다음 물(100m1)을 첨가하여 잔류하는 아세틸이미다졸을 희석시킨다.

<78> (d) 정제

<79> 상기 아세틸화 단계에서 얻어진 혼합물을 30~35°C로 가열하고, 침전을 방지하기 위해 1-부탄올(4.5 ℥)을 첨가한다. 혼합물을 pH 5에서 2회(2×2.6 ℥ 물) 추출하고, NaOH를 사용하여 pH를 11로 조절하여 pH 11에서 2회(2×2.6 ℥ 물) 추출한다. 침전을 방지하기 위해 최종 추출물에 메탄올(2.25 ℥)을 첨가한다. 수상에서의 생성물 손실을 최소로 하기 위해 1차 추출액 및 최종 추출액에 NaCl(130g)을 첨가한다.

<80> (e) 분리

<81> 상기 추출 과정에서 얻어진 유기상을 강하게 교반하면서 헵탄(15 ℥)을 첨가하고, 얻어지는 혼탁액을 교반하면서 실온에서 1시간 동안 방치한다. 상기 혼합물을 여과하고 생성물을 헵탄으로 2회(2×3.5 ℥) 세척한 후 건조한다. 수율: 75%(Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH로부터). HPLC 순도: 92%. 아미노산 분석: 2Na1: 1.1; 4ClPhe:

1.0; 3Pal: 0.9. MS: MW 586. Na: 4.6%

<82> 실시예 6. Ac-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-OH · DCHA.

<83> (a) 탈보호

<84> 고체 Boc-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-OH에 물(90ml), 아세트산(1.8 ℥) 및 MSA(454ml; 7.0 당량)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1~2시간 동안 교반한다. 혼합물을 0℃로 냉각하고 TEA(1071ml; 7.7 당량)로 중화시킨다. 상기 용액을 진공 중에서 농축하고 톨루엔(2×2.5 ℥)과 함께 2회 공증발시켜 오일을 얻는다.

<85> (b) 아세틸화

<86> 상기 탈보호 단계에서 얻어진 오일을 톨루엔(2.0 ℥) 중에 용해하고 아세틸이미다졸(132.14g)을 첨가한다. 상기 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반한 다음 물(100ml)을 첨가하여 잔류하는 아세틸이미다졸을 회석시킨다.

<87> (c) 정제

<88> 상기 혼합물을 30~35℃로 가열하고, 침전을 방지하기 위해 1-부탄올(4.5 ℥)을 첨가한다. 혼합물을 pH 7에서 2회(2×2.6 ℥ 물) 추출하되, 한 번은 pH 9~9.5에서(2.6 ℥ 물), 또 한 번은 pH 7(2.6 ℥ 물)에서 행한다. DCHA(디사이클로헥실아민)을 첨가하고 혼합물을 진공 중에서 농축한다. 생성물을 50℃에서 1-부탄올(4.5 ℥) 중에 혼탁시키고, 강하게 교반하는 헵탄(27 ℥)에 서서히 첨가한다. 혼합물을 0℃에서 철야 교반하고, 여과하여 생성물을 1-부탄올/헵탄으로 2회(1:3; 2×4.8 ℥) 세척하고, 헵탄으로 2회(2×4.5 ℥) 세척한다. 수율: 65%(Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH로부터). HPLC 순도: 94.2%. 아미노산 분석: 2Na1: 1.1; 4ClPhe: 1.0; 3Pal: 0.9. MS: MW 586(유리 웨타이드).

<89> 실시예 7. Ac-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-OH.

<90> (a) 탈보호

<91> 고체 Boc-D-2Na1-D-4ClPhe-D-3Pal-OH에 물(90ml), 아세트산(1.8 ℥) 및 MSA(454ml; 7.0 당량)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1~2시간 동안 교반한다. 혼합물을 0℃로 냉각하고 TEA(1071ml; 7.7 당량)로 중화시킨다. 상기 용액을 진공 중에서 농축하고 톨루엔(2×2.5 ℥)과 함께 2회 공증발시켜 오일을 얻는다.

<92> (b) 아세틸화

<93> 상기 탈보호 단계에서 얻어진 오일을 톨루엔(2.0 ℥) 중에 용해하고 아세틸이미다졸(132.14g)을 첨가한다. 상기 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반한 다음 물(100ml)을 첨가하여 잔류하는 아세틸이미다졸을 회석시킨다.

<94> (c) 정제

<95> 상기 아세틸화 공정에서 얻어진 혼합물을 30~35℃로 가열하고, 침전을 방지하기 위해 1-부탄올(4.5 ℥)을 첨가한다. 혼합물을 pH = 7에서 2회(2×2.6 ℥ 물) 추출하되, 한 번은 pH = 9~9.5에서(2.6 ℥ 물), 또 한 번은 pH = 7(2.6 ℥ 물)에서 행한다. 상기 혼합물을 진공 중에서 농축하여 오일을 얻고, 아세트산(750ml)에 용해시켜 농축하고, 다시 아세트산(750ml)에 용해시켜 강하게 교반되고 있는 헵탄/에틸아세테이트(3:1; 3.6 ℥)에 서서히 첨가한다. 상기 혼합물을 0℃에서 철야 교반한다. 혼합물을 여과하고, 생성물을 에틸아세테이트/헵탄으로 2회(1:3; 2×3.6 ℥), 헵탄으로 2회(2×3.6 ℥) 세척한다. 수율: 70%(Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH로부터). HPLC 순도: 93.9%. 아미노산 분석: Na1: 1.1; 4ClPhe: 1.0; 3Pal: 0.9. MS: MW 586(유리 웨타이드).