



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월12일

(11) 등록번호 10-2177642

(24) 등록일자 2020년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 5/083 (2006.01) C07K 1/02 (2006.01)

C07K 1/06 (2006.01) C07K 1/12 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 5/0806 (2013.01)

C07K 1/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0168440

(22) 출원일자 2018년12월24일

심사청구일자 2018년12월24일

(65) 공개번호 10-2020-0078999

(43) 공개일자 2020년07월02일

(56) 선행기술조사문헌

CN103665102 A*

CN107098950 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

웰웍 주식회사

인천광역시 남동구 함박외로347번길 162 (남촌동)

(72) 발명자

김종민

광주광역시 광산구 임방울대로 727-5, 306동 302호 (월계동, 첨단3차라인아파트)

권영익

서울특별시 서초구 현릉로8길 58, 108동 1603호 (내곡동, 서초더샵포레)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유한) 해담

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 문명순

(54) 발명의 명칭 트리펩타이드의 제조방법

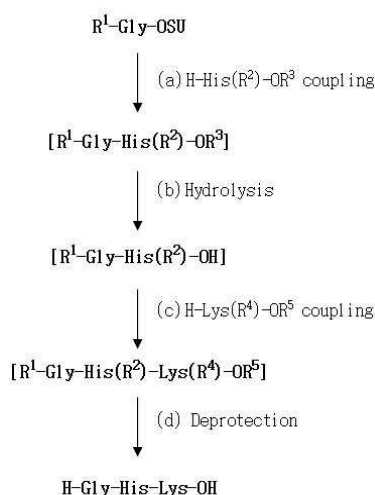
(57) 요약

본 발명은 트리펩타이드 (Tripeptide, H-Gly-His-Lys-OH)의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 제조방법은 액체상 (Solution-phase) 합성 방법으로 목적 펩타이드를 합성한다.

본 발명은 중간 단계에서 중간체를 분리하지 않고 연속된 공정으로 진행하므로 공정이 신속히 진행될뿐아니라 불순물의 제거가 용이하여 반응이 종료된 후 목적물의 분리 및 정제가 용이하여 상업적 대량 생산에 적합하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 1/061 (2013.01)

C07K 1/12 (2013.01)

(72) 발명자

김형식

경기도 화성시 수노을1로 147 105동 802호 (
 새솔동, 요진와이시티)

김선명

광주광역시 광산구 월계로 170 부영아파트, 103동
 405호 (산월동, 부영1차아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 트리펩타이드의 제조방법:

- (a) 액체상 (solution-phase) 합성 방법으로 Boc-Gly-His(Trt)-OMe를 수득하는 단계;
- (b) 상기 단계 (a)에서 수득된 Boc-Gly-His(Trt)-OMe를 가수분해하여 Boc-Gly-His(Trt)-OH를 얻는 단계;
- (c) 상기 단계 (b)에서 수득된 Boc-Gly-His(Trt)-OH를 액체상 (solution-phase) 합성 방법으로 H-Lys(Boc)-OtBu와 결합 반응시켜 Boc-Gly-His(Trt)-Lys(Boc)-OtBu를 수득하는 단계; 및
- (d) 상기 단계 (c)에서 수득한 Boc-Gly-His(Trt)-Lys(Boc)-OtBu에서 탈 보호화 반응을 수행하여 H-Gly-His-Lys-OH를 수득하는 단계.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 단계 (a)와 (c)의 액체상 합성 방법에서 사용되는 유기용매는 디클로로메탄 (Dichloromethane), 1,2-디클로로에탄 (1,2-Dichloroethane), 클로로포름 (Chloroform), N,N-디메틸포름아미드 (N,N-Dimethylformamide), N,N-디메틸아세트아미드 (N,N-Dimethylacetamide), 테트라하이드로퓨란 (Tetrahydrofuran), N-메틸피롤리돈 (N-Methylpyrrolidone), 1,4-디옥산 (1,4-Dioxane), 아세토니트릴 (Acetonitrile), 에틸 아세테이트 (Ethyl acetate), 메틸 아세테이트 (Methyl acetate), 메탄올 (Methanol), 에탄올 (Ethanol), 이소프로판올 (Isopropanol) 및 톨루엔 (Toluene)으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 용매인 것을 특징으로 하는 트리펩타이드의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 단계 (a)와 (c)의 액체상 합성 방법에서 결합 시 사용하는 염기로는 트리에틸아민 (Triethylamine, TEA), 피리딘 (Pyridine), N,N-디이소프로필에틸아민 (N,N-Diisopropylethylamine, DIEA), 디에틸아민 (diethylamine), 피페리딘 (Piperidine), 피롤리딘 (Pyrrolidine), N-메틸몰포린 (N-Methylmorpholine), 2,6-루티딘 (2,6-Lutidine), 4-디메틸아미노피리딘 (4-Dimethylaminopyridine, DMAP), 이미다졸 (Imidazole), 1,8-디아자비시클로[5.4.0]운데크-7-엔 (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene, DBU) 및 2,4,6-콜리딘 (2,4,6-Collidine)으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 염기인 것을 특징으로 하는 트리펩타이드의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 단계 (b)의 가수분해시 사용되는 용매는 메탄올 (Methanol), 에탄올 (Ethanol), 프로판올

(Propanol), 이소프로판올 (Isopropanol), 아세토니트릴 (Acetonitrile), 테트라히드로퓨란 (Tetrahydrofuran), N,N-디메틸포름아미드 (N,N-Dimethylformamide), N,N-디메틸아세트아미드 (N,N-Dimethylacetamide), N-메틸피롤리돈 (N-Methylpyrrolidone), 1,4-디옥산 (1,4-Dioxane) 및 이들의 수용액으로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 용매인 것을 특징으로 하는 트리펩타이드의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 단계 (b)의 가수분해시 사용되는 무기 염기는 포타슘 히드록시드 (Potassium hydroxide, KOH), 소듐 히드록시드 (Sodium hydroxide, NaOH), 칼슘 히드록시드 (Calcium hydroxide, $\text{Ca}(\text{OH})_2$), 리튬 히드록시드 (Lithium hydroxide, LiOH) 및 세슘 히드록시드 (Cesium hydroxide, CsOH)로 구성된 군에서 선택되는 1 이상의 무기 염기인 것을 특징으로 하는 트리펩타이드의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 단계 (c)의 H-Lys(Boc)-OtBu와의 결합 반응에서 수산기 활성화 시약은 메틸 클로로포르메이트 (Methyl chloroformate), 에틸 클로로포르메이트 (Ethyl chloroformate), 티오닐 클로라이드 (Thionyl chloride, SOCl_2), 옥사릴 클로라이드 (Oxalyl chloride, $(\text{COCl})_2$), 포스포러스 펜타클로라이드 (Phosphorous pentachloride, PCl_5), 파라-톨루엔설포닐 클로라이드 (p-Toluenesulfonyl chloride), 메탄설포닐 클로라이드 (Methanesulfonyl chloride), 비스(2-옥소-3-옥사졸리디닐)포스피닉 클로라이드 (Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic Chloride, BOP-Cl), DIC/HOBt, DIC/HOAt, DIC, ClHOBt 및 EDC·HCl로 구성된 군에서 선택되는 1 이상인 것을 특징으로 하는 트리펩타이드의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 단계 (d)의 탈 보호화 반응은 (i) 트리플루오로아세트산 (Trifluoroacetic acid), 물 (H_2O), 페놀 (Phenol), 티오아니솔 (Thioanisole) 및 1,2-에탄디티올 (1,2-Ethanedithiol)의 혼합물; (ii) 트리플루오로아세트산 (Trifluoroacetic acid), 트리이소프로필실란 (Triisopropylsilane) 및 물 (H_2O)의 혼합물; (iii) 트리플루오로아세트산 (Trifluoroacetic acid), 트리이소프로필실란 (Triisopropylsilane), 물 (H_2O) 및 1,2-에탄디티올 (1,2-Ethanedithiol)의 혼합물; (iv) 염산 (HCl) 수용액 및 메탄올 (MeOH)의 혼합액; (v) 술폰산 (Sulfonic acid) 또는 이의 수용액; 또는 (vi) 트리플루오로아세트산 (Trifluoroacetic acid) 및 디클로로메탄 (Dichloromethane) 혼합물 하에서 수행하는 것을 특징으로 하는 트리펩타이드의 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 단계 (c)에서의 반응 온도는 $-10 \sim 30^\circ\text{C}$ 인 것을 특징으로 하는 트리펩타이드의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 트리펩타이드의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

구리 펩타이드 (GHK-Cu), Pal-트리펩타이드, Biotin-트리펩타이드 등의 트리펩타이드는 상처치유나, 보습, 노화 방지 기능을 가진 펩타이드 화장품 소재의 중요한 전구물질이다.

특히 구리 펩타이드 (GHK-Cu)는 구리 이온에 높은 친화성을 갖는 자연적으로 발생된 작은 단백질 단편이다. 인간 혈장에서 GHK-Cu의 농도는 20 세에 약 $200 \mu\text{g} / \text{ml}$ 존재하는데, 60세까지는 $80 \mu\text{g} / \text{ml}$ 로 떨어진다. 사람

에서 트리 펩티드, GHK-Cu는 상처 치유, 면역 세포의 끌어 당김, 항산화 및 항염증 효과의 촉진, 피부 섬유 아 세포의 콜라겐 및 글리코사미노글라이칸 합성 촉진 및 혈관 성장을 촉진할 수 있다. 또한, 최근의 연구에서는 많은 수의 인간 유전자의 발현을 조절하는 능력을 보여 주었으며, 일반적으로 유전자 발현을 건강한 상태로 되 돌려 놓았다. 따라서 합성 GHK-Cu는 화장품에서 피부재생 및 노화 방지 성분으로 사용될 수 있다.

[0004] 트리펩타이드 합성방법에는 고체상 합성 방법과 액체상 합성 방법이 있다. 고체상 합성 방법에는 아미노산 서열을 고체 지지체 (Resin)에 부착시켜 조립을 완료한 후에 상기 지지체로부터 서열을 유리한다. 이 방법은 반응속도가 빠르고 부산물이 적고 또한 자동화가 용이하다는 장점이 있으나 과량의 원료를 사용해야 하는 단점이 있다. 반면 액상 합성 방법은 통상의 유기 합성 방법으로서 시약과 재료의 비용이 적게 드는 장점이 있지만 반응 단계수가 많고 각 단계별로 중간체를 유리해야 하고 또한 이성체가 생길 가능성이 있어 정제가 어려운 단점이 있다.

[0005] 트리펩타이드를 제조하기 위한 종래의 제조방법은 다음과 같다.

[0006] 중국특허 "CN 107098950A"에는 액체상 합성방법으로 트리펩타이드를 제조하는 기술을 기재하고 있다. 그러나 상기 제조방법은 각 단계의 중간체를 분리할 뿐만 아니라 아미노산에 삼불화초산을 결합하는 공정이 포함되어 공정 시 탈착되거나 과도한 불순물이 발생되는 문제점이 있어 대량 생산 시 적용이 용이하지 않는 문제점을 내포하고 있다.

[0007] 논문 "Amino Acids 13(2):155-161, June 1997"에는 전 공정을 고체상 반응으로 트리펩타이드를 제조하는 기술을 기재하고 있다. 그러나 동 제조방법의 경우, 아미노산 보호기로 Mtt(4-methyltrityl)을 사용하고, 고가의 시약을 사용하는 등 상업적 대량 생산에 적용이 어려운 단점이 있다.

[0008] 이상에서 언급한 바와 같이 트리펩타이드의 제조를 위한 종래의 기술들은 상업적 대량 생산으로 적용하는데 있어 많은 문제점들을 내포하고 있다. 따라서 트리펩타이드를 효과적으로 제조하는 방법에 대한 연구는 관련 산업에 있어서 매우 중요한 개발 과제라 할 수 있다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 노력한 결과, 유기용매 내에서 중간체를 분리함이 없이 액체상 (solution-phase) 합성 방법으로 보호화된 트리펩타이드를 수득하고, 탈보호화 과정에서 강산의 사용량을 최소화할 경우, 불순물의 함량을 최소화하면서 트리펩타이드를 안정적으로 대량 제조할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 불순물의 함량을 최소화하면서 트리펩타이드를 안정적으로 대량 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 액체상 (solution-phase) 합성 방법으로 아미노산 유도체를 사용하여 하기 화학식 I로 표시되는 보호화된 펩타이드를 수득하는 단계; (b) 상기 단계 (a)에서 수득된 보호화된 펩타이드를 가수분해하여 하기 화학식 II로 표시되는 보호화된 펩타이드를 얻는 단계; (c) 상기 단계 (b)에서 수득된 보호화된 펩타이드를 액체상 (solution-phase) 합성 방법으로 라이신 유도체와 결합 반응시켜 하기 화학식 III으로 표시되는 보호화된 펩타이드를 수득하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)에서 수득한 펩타이드에서 탈 보호화 반응을 수행하여 하기 화학식 IV로 표시되는 트리펩타이드를 수득하는 단계를 포함하는 트리펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[0012] [화학식 I]

[0013] $R^1\text{-Gly-His}(R^2)\text{-OR}^3$

[0014] [화학식 II]

[0015] $R^1\text{-Gly-His}(R^2)\text{-OH}$

[0016] [화학식 III]

[0017] R^1 -Gly-His(R^2)-Lys(R^4)-OR⁵

[0018] [화학식 IV]

[0019] H-Gly-His-Lys-OH

[0020] 상기 화학식에서, R^1 및 R^4 는 아민기 보호기, R^2 는 이민기 보호기, R^3 및 R^5 는 수산기 보호기다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 트리펩타이드의 제조방법을 이용하면 불순물의 발생 및 누적을 최소화할 수 있고, 반응종료 후 트리펩타이드의 분리 및 정제가 용이하므로, 고순도의 트리펩타이드를 상업적 대량 생산이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명에 따른 트리펩타이드를 제조하는 전체 공정을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 명세서에서 특별한 표시가 없는 한, 아미노산 및 보호기의 지정에 사용되는 약어는 IUPAC-IUB의 생화학 용어 위원회 (Commission of Biochemical Nomenclature)에서 권장하는 용어에 기초한다 (*Biochemistry*, 11:1726-1732(1972); *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 56, No. 5, pp. 595-624, 1984).

[0024] 본 명세서에서 사용한 보호기 및 아미노산의 약어는 다음과 같다:

[0025] t-Bu: 터트-부틸 (*tert*-Butyl)

[0026] Fmoc: 9-플루오레닐옥시카보닐 (9-Fluorenyloxycarbonyl)

[0027] Trt: 트리페닐메틸 (또는 트리틸) (Triphenylmethyl or Trityl)

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

[0029] Cbz: 벤질옥시카보닐 (Benzyloxycarbonyl)

[0030] Me: 메틸 (Methyl)

[0031] Gly: 글라이신 (Glycine)

[0032] His: 히스티딘 (Histidine)

[0033] Lys: 라이신 (Lysine)

[0034] 본 발명에서는 유기용매 내에서 중간체를 분리함이 없이 액체상 (solution-phase) 합성 방법으로 보호화된 트리펩타이드를 수득하고, 탈보호화 과정에서 강산의 사용량을 적게 사용할 경우, 불순물의 함량을 최소화하면서 트리펩타이드를 안정적으로 대량 제조할 수 있다는 것을 확인하고자 하였다.

[0035] 본 발명에서는 화학식 III으로 표시되는 보호화된 트리펩타이드를 수득할 때까지의 전체 공정을 중간체의 분리없이 액상으로 진행하고, 최종 탈보호화 반응시 사용하는 강산 (삼불화 초산)을 10~50%의 비율로 적게 사용하여 화학식 IV로 표시되는 트리펩타이드를 제조하였다. 그 결과, 고순도의 트리펩타이드 (순도 : 97.5%)를 상업적 대량 생산이 가능할 정도의 고수율 (85.5%)로 수득할 수 있음을 확인하였다.

[0036] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) 액체상 (solution-phase) 합성 방법으로 아미노산 유도체를 사용하여 하기 화학식 I로 표시되는 보호화된 펩타이드를 수득하는 단계; (b) 상기 단계 (a)에서 수득된 보호화된 펩타이드를 가수분해하여 하기 화학식 II로 표시되는 보호화된 펩타이드를 얻는 단계; (c) 상기 단계 (b)에서 수득된 보호화된 펩타이드를 액체상 (solution-phase) 합성 방법으로 라이신 유도체와 결합 반응시켜 하기 화학식 III으로 표시되는 보호화된 펩타이드를 수득하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)에서 수득한 펩타이드에서 탈 보호화 반응을 수행하여 하기 화학식 IV로 표시되는 트리펩타이드를 수득하는 단계를 포함하는 트리펩타이드에 관한 것이다.

[0037] [화학식 I]

- [0038] R^1 -Gly-His(R^2)-OR³
- [0039] **[화학식 II]**
- [0040] R^1 -Gly-His(R^2)-OH
- [0041] **[화학식 III]**
- [0042] R^1 -Gly-His(R^2)-Lys(R^4)-OR⁵
- [0043] **[화학식 IV]**
- [0044] H-Gly-His-Lys-OH
- [0045] 상기 화학식에서, R^1 및 R^4 는 아민기 보호기, R^2 는 이민기 보호기, R^3 및 R^5 는 수산기 보호기다.
- [0046] 상기 화학식 I 내지 III에서, R^1 및 R^4 는 당 업계에서 통상적으로 이용하는 아민기 보호기를 이용할 수 있다. 상기 아민기 보호기는 수소 (H), 터트-부틸옥시카보닐 (*tert*-Butyloxycarbonyl)기, 터트-부틸 (*tert*-Butyl)기, 벤조일 (Benzoyl)기, 트리틸 (Trityl)기, 디페닐메틸 (Diphenylmethyl)기, 벤질 (Benzyl)기, 파라-메톡시벤질 (*p*-Methoxybenzyl)기, 벤질옥시카보닐 (Benzyloxycarbonyl)기, 파라-니트로벤질 (*p*-Nitrobenzyl)기, 파라-메톡시벤질옥시카보닐 (*p*-Methoxybenzyloxycarbonyl)기, 아세트아미노메틸 (Acetaminomethyl)기, 알릴 (Allyl)기, 디메틸실릴 (Dimethylsilyl)기, 터트-부틸디메틸실릴 (*tert*-Butyldimethylsilyl)기, 트리이소프로필실릴 (Triisopropylsilyl)기, 알킬 (Alkyl, 탄소수 10개 이하)기 등을 예시할 수 있으며, 터트-부틸옥시카보닐 (*tert*-Butyloxycarbonyl)기 또는 파라-메톡시벤질옥시카보닐 (*p*-Methoxybenzyloxycarbonyl)기가 바람직하며, 터트-부틸옥시카보닐 (*tert*-Butyloxycarbonyl)기를 이용하는 것이 보다 바람직하다.
- [0047] 상기 화학식 I 내지 III에서, R^2 는 당 업계에서 통상적으로 이용하는 이민기 보호기를 이용할 수 있다. 상기 이민기 보호기는 파라-메톡시벤질 (*p*-Methoxybenzyl)기, 메톡시메틸 (Methoxymethyl)기, 벤질옥시메틸 (Benzyloxymethyl)기, 테트라히드로피란 (Tetrahydropyran)기, 테트라히드로퓨란 (Tetrahydrofuran)기, 터트-부틸 (*tert*-Butyl)기, 트리페닐메틸 (Triphenylmethyl)기, 디페닐메틸 (Diphenylmethyl)기, 2-클로로트리틸 (2-Chlorotrityl)기, 벤질 (Benzyl)기, 4-메톡시벤질 (4-Methoxybenzyl)기, 알릴 (Allyl)기, 터트-부틸디메틸실릴 (*tert*-Butyldimethylsilyl)기, 트리페닐실릴 (Triphenylsilyl)기, 트리이소프로필실릴 (Triisopropylsilyl)기, 터트-부틸옥시카보닐 (*tert*-Butyloxycarbonyl)기, 아세틸 (Acetyl)기, 벤조일 (Benzoyl)기 등을 예시할 수 있으며, 2-클로로트리틸 (2-Chlorotrityl)기 또는 트리페닐메틸 (Triphenylmethyl)기가 바람직하며, 트리페닐메틸 (Triphenylmethyl)기를 이용하는 것이 보다 바람직하다.
- [0048] 상기 화학식 I 내지 III에서, R^3 및 R^5 는 당 업계에서 통상적으로 이용하는 수산기 보호기를 이용할 수 있다. 상기 수산기 보호기는 메틸 (Methyl)기, 에틸 (Ethyl)기, 이소프로필 (Isopropyl)기 등의 알킬기 (Alkyl)와 벤질 (Benzyl)기, 파라-메톡시벤질 (*p*-Methoxybenzyl)기, 메톡시메틸 (Methoxymethyl)기, 벤질옥시메틸 (Benzyloxymethyl)기, 테트라히드로피란 (Tetrahydropyran)기, 테트라히드로퓨란 (Tetrahydrofuran)기, 터트-부틸 (*tert*-Butyl)기, 트리페닐메틸 (Triphenylmethyl)기, 디페닐메틸 (Diphenylmethyl)기, 2-클로로트리틸 (2-Chlorotrityl)기, 알릴 (Allyl)기, 터트-부틸디메틸실릴 (*tert*-Butylmethylsilyl)기, 트리페닐실릴 (Triphenylmethyl)기, 트리이소프로필실릴 (Triisopropylsilyl)기 등을 예시할 수 있으며, 메틸 (Methyl)기, 벤질 (Benzyl)기, 터트-부틸 (*tert*-Butyl)기, 디페닐메틸 (Diphenylmethyl)기가 바람직하며, 수산기 보호기가 R^3 의 경우는 메틸 (Methyl)기, R^5 의 경우는 터트-부틸 (*tert*-Butyl)기를 이용하는 것이 보다 바람직하다.
- [0049] 상기 작용기에 대한 보호기는 "Protecting Groups in Organic Synthesis (Greene and Wuts, John Wiley & Sons, 1991)"에 상세히 기재되어 있다.
- [0050] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다.
- [0051] 도 1을 참조로 하여 본 발명의 제조방법을 각각의 단계별로 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0052] **(a)~(c) 화학식 I 내지 III으로 표시되는 펩타이드의 수득**

- [0053] 화학식 III으로 표시되는 펩타이드는 당 업계에서 통상적으로 사용하는 액체상 (solution-phase) 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 즉, 알파-아미노가 보호화된 글라이신 석시니미드에스터를 히스티딘(보호기) 메틸 에스터와의 반응으로 화학식 I로 표시되는 보호화된 글라이신-히스티딘(보호기) 메틸 에스터를 얻은 다음 가수분해를 통해 화학식 II로 표시되는 엑시드를 만들고, 이어서 라이신(Boc) 터트-부틸 에스터를 결합하여 용매중에 존재하는 화학식 III으로 표시되는 보호화된 중간체를 얻는다.
- [0054] 적절한 보호기의 선택은 보호되는 작용기, 보호기가 노출되는 조건 및 그 분자 내에 존재할 수 있는 다른 작용기에 따라 달라진다. 보호기는 합성 각 단계에서 (i) 알파-아미노 보호기를 제거하기 위해 선택한 반응조건 및 시약에 대해 안정해야 하고, (ii) 결합반응에서 탈 보호화 반응이 일어나지 않아야 하며, (iii) 원하는 아미노산 사슬을 포함하는 합성이 완결되었을 때까지 안정하여야 한다.
- [0055] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 화학식 IV의 펩타이드를 합성하는 과정은 액체상으로 진행하는 것을 특징으로 한다. 즉, 각 중간체를 결정화하여 분리하지 않고, 용매중에서 합성한 다음, 공정을 연속적으로 수행하여 화학식 III으로 표시되는 보호화된 트리펩타이드를 합성한다.
- [0056] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 단계 (a)와 (c)의 액상반응에서 사용되는 유기용매는 디클로로메탄 (Dichloromethane), 1,2-디클로로에탄 (1,2-Dichloroethane), 클로로포름 (Chloroform), N,N-디메틸포름아미드 (N,N-Dimethylformamide), N,N-디메틸아세트아미드 (N,N-Dimethylacetamide), 테트라하이드로퓨란 (Tetrahydrofuran), N-메틸피롤리돈 (N-Methylpyrrolidone), 1,4-디옥산 (1,4-Dioxane), 아세토니트릴 (Acetonitrile), 에틸 아세테이트 (Ethyl acetate), 메틸 아세테이트 (Methyl acetate); 메탄올 (Methanol), 에탄올 (Ethanol), 이소프로판올 (Isopropanol) 등의 알코올 (Alcohol) 류; 톨루엔 (Toluene) 등을 예시할 수 있고, 디클로로메탄 (Dichloromethane) 및 N,N-디메틸포름아미드 (N,N-Dimethylformamide)을 사용하는 것이 바람직하며, 디클로로메탄 (Dichloromethane)을 이용하는 것이 보다 바람직하다.
- [0057] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 단계 ((a)와 (c)의 액상반응에서 결합 시 사용하는 염기로는 트리에틸아민 (Triethylamine, TEA), 피리딘 (Pyridine), N,N-디이소프로필에틸아민 (N,N-Diisopropylethylamine, DIEA), 디에틸아민 (diethylamine), 피페리딘 (Piperidine), 피롤리딘 (Pyrrolidine), N-메틸몰포린 (N-Methylmorpholine), 2,6-루티딘 (2,6-Lutidine), 4-디메틸아미노피리딘 (4-Dimethylaminopyridine, DMAP), 이미다졸 (Imidazole), 1,8-디아자비시클로[5.4.0]운데크-7-엔 (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene, DBU), 2,4,6-콜리딘 (2,4,6-Collidine) 등의 유기 염기를 예시할 수 있고, 피리딘 (Pyridine), 트리에틸아민 (Triethylamine) 및 N,N-디이소프로필에틸아민 (N,N-Diisopropylethylamine)을 사용하는 것이 바람직하며, N,N-디이소프로필에틸아민 (N,N-Diisopropylethylamine)을 이용하는 것이 보다 바람직하다.
- [0058]
- [0059] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 단계 (b)의 가수분해시 사용되는 용매는 메탄올 (Methanol), 에탄올 (Ethanol), 프로판올 (Propanol), 이소프로판올 (Isopropanol) 등의 알코올 (Alcohol)류 용매와 아세토니트릴 (Acetonitrile), 테트라하이드로퓨란 (Tetrahydrofuran), N,N-디메틸포름아미드 (N,N-Dimethylformamide), N,N-디메틸아세트아미드 (N,N-Dimethylacetamide), N-메틸피롤리돈 (N-Methylpyrrolidone), 1,4-디옥산 (1,4-Dioxane) 등의 수용성 용매 및 이의 수용액을 예시할 수 있고, 메탄올 (Methanol), 에탄올 (Ethanol), 테트라하이드로퓨란 (Tetrahydrofuran) 및 N,N-디메틸포름아미드 (N,N-Dimethylformamide)을 사용하는 것이 바람직하며, 메탄올 (Methanol)을 이용하는 것이 보다 바람직하다.
- [0060] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 단계 (b)의 가수분해시 사용되는 무기 염기로는 포타슘 히드록시드 (Potassium hydroxide, KOH), 소듐 히드록시드 (Sodium hydroxide, NaOH), 칼슘 히드록시드 (Calcium hydroxide, Ca(OH)₂), 리튬 히드록시드 (Lithium hydroxide, LiOH), 세슘 히드록시드 (Cesium hydroxide, CsOH) 등의 무기 염기를 예시할 수 있고, 포타슘 히드록시드 (Potassium hydroxide, KOH)와 소듐 히드록시드 (Sodium hydroxide, NaOH)을 사용하는 것이 바람직하며, 포타슘 히드록시드 (Potassium hydroxide, KOH)를 이용하는 것이 보다 바람직하다.
- [0061] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 단계 (c)의 라이신 유도체와의 결합 반응에서 수산기 활성화 시약은 메틸 클로로포르메이트 (Methyl chloroformate), 에틸 클로로포르메이트 (Ethyl chloroformate), 티오닐 클로라이드 (Thionyl chloride, SOCl₂), 옥사릴 클로라이드 (Oxalyl chloride, (COCl)₂), 포스포러스 펜타클로라이드 (Phosphorous pentachloride, PCl₅), 파라-톨루엔설포닐 클로라이드 (p-Toluenesulfonyl chloride), 메탄설포

닐 클로라이드 (Methanesulfonyl chloride), 비스(2-옥소-3-옥사졸리디닐)포스피닉 클로라이드 (Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic Chloride, BOP-Cl), DIC/HOBt, DIC/HOAt, DIC, ClHOBt, EDC·HCl 등을 예시할 수 있고, 메틸 클로로포르메이트 (Methyl chloroformate), 클로라이드 (Bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic Chloride, BOP-Cl) 및 포스포러스 펜타클로라이드 (Phosphorous pentachloride, PCl_5)를 사용하는 것이 바람직하며, 메틸 클로로포르메이트 (Methyl chloroformate)를 이용하는 것이 보다 바람직하다.

[0062] 상기 결합 반응의 반응 온도는 $-20 \sim 50^\circ\text{C}$ 이고, 바람직하게는 $-10 \sim 30^\circ\text{C}$ 이다.

[0063] (d) 화학식 IV로 표시되는 트리펩타이드의 수득

[0064] 트리펩타이드는 상기 단계 (c)에서 수득한 펩타이드로부터 당 업계에서 통상적으로 이용하는 강산 조건하에서 탈 보호화 반응을 수행하여 얻을 수 있다.

[0065] 탈 보호화 반응은 (i) 트리플루오로아세트산 (Trifluoroacetic acid), 물 (H_2O), 페놀 (Phenol), 티오아니솔 (Thioanisole) 및 1,2-에탄디티올 (1,2-Ethanedithiol)의 혼합물; (ii) 트리플루오로아세트산 (Trifluoroacetic acid), 트리아이소프로필실란 (Triisopropylsilane) 및 물 (H_2O)의 혼합물; (iii) 트리플루오로아세트산 (Trifluoroacetic acid), 트리아이소프로필실란 (Triisopropylsilane), 물 (H_2O) 및 1,2-에탄디티올 (1,2-Ethanedithiol)의 혼합물; (iv) 염산 (HCl) 수용액 및 메탄올 (MeOH)의 혼합액; (v) 술폰산 (Sulfonic acid) 또는 이의 수용액; (vi) 트리플루오로아세트산 (Trifluoroacetic acid) 및 디클로로메탄 (Dichloromethane) 혼합물 하에서 수행될 수 있으며, 트리플루오로아세트산 (Trifluoroacetic acid)(10~50%)과 디클로로메탄 (Dichloromethane) 혼합물 하에서 수행되는 것이 바람직하다.

[0066] [실시예]

[0067] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0068] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 한 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0069] **실시 예 1 : 화학식 III으로 표시되는 보호화된 중간체의 제조**

[0070] **1-1: 화학식 I로 표시되는 펩타이드의 제조**

[0071] [화학식 I]

[0072] Boc-Gly-His(Trt)-OMe

[0073] Round bottom flask에 Boc-Gly-OSu (분자량: 272.25 g/mol, 30 g, 0.11 mol)를 넣고 디클로로메탄 500 mL을 투입하여 용해한 다음 Ice bath에서 $0\sim 5^\circ\text{C}$ 로 냉각하였다. H-His(Trt)-OMe·HCl (분자량: 448.0 g/mol, 59.14 g, 0.132 mol)와 N,N-디이소프로필에틸아민 (DIEA) (분자량: 129.25 g/mol, 밀도: 0.742 g/mL, 21.33 g, 0.165 mol)를 디클로로메탄 200 mL에 용해한 액을 용해액에 서서히 적가한 다음 동 온도에서 30분 동안 교반하고 상온으로 올려 2시간 동안 교반하였다. TLC나 HPLC로 반응의 진행상황을 확인하여 출발물질이 1% 이하일 경우 반응을 멈추었다. 0.05% 염산 수용액 500 mL으로 유기층을 3회 교반하여 세척한 다음 유기층을 분리하고, 무수 Na_2SO_4 100g으로 탈수한 다음 여과하여 "Boc-Gly-His(Trt)-OMe" 액상을 수득하고, 그대로 다음 반응에 사용하였다.

[0074] **1-2: 화학식 II로 표시되는 펩타이드의 제조**

[0075] [화학식 II]

[0076] Boc-Gly-His(Trt)-OH

[0077] 실시예 1-1의 수득액 (Boc-Gly-His(Trt)-OMe, 분자량: 568.66 g, 62.6 g, 0.11mol)을 감압 하에서 농축하고 메탄올 500 mL을 넣어 2회 더 용해시킨 다음 농축하였다. 메탄올 500 mL을 더하여 "Boc-Gly-His(Trt)-OMe"를 용해시킨 다음 $0\sim 4^\circ\text{C}$ 에서 KOH (분자량: 56.11 g/mol, 7.41 g, 0.132 mol) 용해액 (Ethanol 100 mL)을 서서히 적가한 다음 30분 동안 교반한 후 상온으로 온도를 올려 1시간 동안 교반하였다.

- [0078] TLC나 HPLC로 반응의 진행상황을 체크하고 출발물질이 1% 이하로 남을 경우 반응을 멈추었다. 0.1% 염산 수용액으로 중화시킨 다음 디클로로메탄 500 mL을 더하여 생성물을 용해시키고 유기층을 0.1% 염산 수용액으로 2회, 5% NaCl 수용액으로 3회 세척하였다. 유기층을 분리하여 무수 Na_2SO_4 100g으로 유기층을 탈수한 다음 여과하여 "Boc-Gly-His(Trt)-OH" 액상을 수득하고, 그대로 다음 반응에 사용하였다.
- [0079] **1-3: 화학식 III으로 표시되는 펩타이드의 제조**
- [0080] [화학식 III]
- [0081] Boc-Gly-His(Trt)-Lys(Boc)-OtBu
- [0082] Round bottom flask에 1-2에서 수득한 Boc-Gly-His(Trt)-OH (분자량: 554.64 g/mol, 61.0 g, 0.11 mol) 액상을 넣고, 아세톤/Ice bath에서 $-10^\circ\text{C} \sim -5^\circ\text{C}$ 로 냉각하였다. 액상에 메틸 클로로포르메이트 (분자량: 94.49 g/mol, 밀도: 1.223 g/mL, 12.5 g, 0.132 mol)/이소프로필에틸아민 (DIEA) (분자량: 129.25 g/mol, 밀도: 0.742 g/mL, 17.06 g, 0.132 mol)을 서서히 적가한 다음 동 온도에서 30분 동안 교반하였다. H-Lys(Boc)-OtBu (분자량: 338.91 g/mol, 44.74 g, 0.132 mol)와 N,N-디이소프로필에틸아민 (DIEA) (분자량: 129.25 g/mol, 밀도: 0.742 g/mL, 17.06 g, 0.132 mol)를 디클로로메탄 200 mL에 용해한 액을 질소분위기 하에서 반응 혼합액에 서서히 적가한 다음 동 온도에서 30분 동안 교반하고 상온으로 올려 2시간 동안 교반하였다. TLC나 HPLC로 반응이 완결됨을 확인한 다음 0.5% 염산수용액 500 mL으로 3회, 5% NaCl 수용액 500 mL로 3회 유기 용매층을 세척하였다. 유기층을 분리하여 Na_2SO_4 무수물 100 g으로 유기층을 건조시킨 다음, 여과하고 여과액을 1/2로 감압 농축하여 터트-부틸메틸에테르 500mL로 결정화 시켰다. 동 온도에서 30분 동안 교반한 다음 생성물을 여과하고 진공 건조시켜 "Boc-Gly-His(Trt)-Lys(Boc)-OtBu" (분자량: 839.03 g/mol, 90.5 g, 수율: 98.0%, 순도: 96.3%)를 수득하였다.
- [0083] **실시예 2 : 화학식 IV로 표시되는 트리펩타이드의 제조**
- [0084] [화학식 IV]
- [0085] H-Gly-His-Lys-OH
- [0086] 실시예 1에서 얻은 "Boc-Gly-His(Trt)-Lys(Boc)-OtBu" 90.5 g (0.11 mol)을 삼불화초산 : 디클로로메탄 = 50 : 50 (1000 mL) 혼합 용액에 넣고, 2시간 동안 탈 보호화 반응을 수행하였다. 반응액을 감압 농축하여 1/3로 전체 부피를 줄이고 터트-부틸메틸에테르 (500 mL)를 서서히 적가하여 탈 보호화된 트리 펩타이드를 석출시킨 다음, 고체를 여과하여 크루드 트리펩타이드 35.5 g (분자량: 340.38 g/mol) (수율: 94.8%, 순도: 93.5%)을 수득하였다. 역상 HPLC (220 nm, 10 ml/분, 10 미크론 C18 컬럼에서 20분 내에 0.1% 아세트산 내 아세토니트릴 초기농도 12%에서 28%로 증가)로 정제하여 "H-Gly-His-Lys-OH" 32.0 g (수율: 85.5%, 순도: 97.5%)을 수득하였다.
- [0087] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

