



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0073850
(43) 공개일자 2024년05월27일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 1/04 (2006.01) C07K 1/06 (2006.01)
C07K 1/08 (2006.01) C07K 1/10 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 1/04 (2013.01)
C07K 1/063 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2024-7004392</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년07월14일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2024년02월06일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/SE2022/050713</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2023/287345
국제공개일자 2023년01월19일</p> <p>(30) 우선권주장
2130202-1 2021년07월16일 스웨덴(SE)</p> | <p>(71) 출원인
폴리펩티드 레브리토리즈 홀딩 (피피엘) 에이비
스웨덴 림한 (우편번호 에스이-200 61) 림한스바
겐 108</p> <p>(72) 발명자
파블라스 안
덴마크 1817 프레데릭스베르 씨 칼 베른하르스 바
이 13
뤼데망-옹부르제 올리비에
프랑스 67410 로르빌레 뤼 드 라 빼 1</p> <p>(74) 대리인
특허법인코리아나</p> |
|---|--|

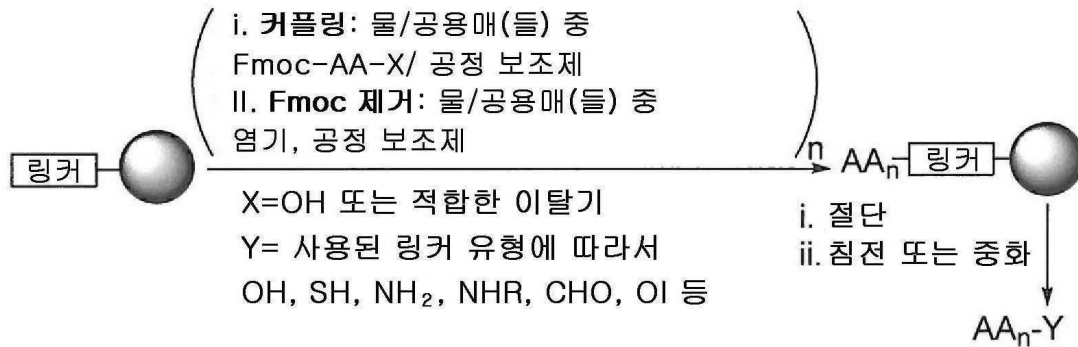
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 수성 고체상 펩티드 합성

(57) 요약

본 발명은 아미노산의 커플링이 수산화성인 적어도 하나의 유기 공용매를 포함하는 수성 용액에서 수행되는 고체상 펩티드 합성(SPPS)에 관한 것이다. 수성 용액은 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 또는 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편을 충분히 용해시킬 수 있고, 수지는 약 4 mLg^{-1} 초과로 수성 용액의 존재 하에서 팽윤될 수 있다. 본 발명은 또한 SPPS로부터 소모된 수성 용액의 재생을 위한 방법을 포괄한다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 1/08 (2013.01)

C07K 1/10 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

고체상 펩티드 합성 방법으로서,

활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티 및 수지에 결합된 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편의 제공 단계;

수지에 결합된 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편을 탈보호시키는 단계;

활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티와 탈보호된 수지에 결합된 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편을 커플링하여서 펩티드 결합을 형성시키는 단계

를 포함하고;

아미드 (펩티드) 커플링은 수산화성인 적어도 하나의 유기 공용매를 포함하는 수성 용액에서 수행되고, 수성 용액은 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티를 충분히 용해시킬 수 있고, 수지는 약 4 mLg^{-1} (수지 중량 기반) 초과로 수성 용액의 존재 하에서 팽윤될 수 있어서, 수지에 결합된 아미노산 단편을 연장시키는 것인 합성 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 공용매는 극성 비양자성 공용매인 합성 방법.

청구항 3

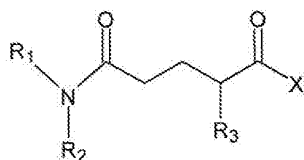
제1항 또는 제2항에 있어서, 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티는 커플링에 선행하는 별도 단계에서 활성화되거나, 또는 활성화는 제자리에서 형성되고; 아미드-커플링은 적어도 커플링제 (CA)의 존재 하에서 수행되는 것인 합성 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 아미드-커플링은 적합하게 피리딘의 알킬 유도체 예컨대 피롤린, 루티딘 및 콜리딘으로부터 선택되는 피리딘의 알킬 유도체 및 이의 임의의 위치이성질체로부터 선택되는 염기, 특히 피리딘의 메틸 유도체의 존재 하에서 수행되는 것인 합성 방법.

청구항 5

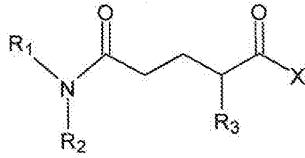
제1항에 있어서, 유기 공용매는 N-메틸피롤리돈 (NMP), N-에틸피롤리돈 (NEP), N-프로필피롤리돈 (NPP), N-부틸피롤리돈 (NBP), N-펜틸피롤리돈 (NPeP), N-헥실피롤리돈 (NHP), N-헵틸피롤리돈 (NHep), N-옥틸피롤리돈 (NOP), 디메틸포름아미드 (DMF), 디에틸포름아미드 (DEF), 디프로필포름아미드 (DPF), N-포르밀피롤리딘 (NFP), N-포르밀모르폴린 (NFM), N-메틸카프로락탐 (MCL), 1,3-디메틸-2-이미다졸리딘 (DMI), 1,3-디메틸-3,4,5,6-테트라히드로-2-피리미딘 (DMPU), 디메틸설폭사이드 (DMSO), 디에틸설폭사이드 (DESO), 술폴란, (1R)-7,8-디옥사바이시클로[3.2.1]옥탄-2-온 (디히드로레보글루코세논 [cyrene®], N,N-디메틸아세트아미드 (DMA), N,N,N',N'-테트라에틸 술폰아미드 (TES), 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 클로라이드 (BMIMCl), 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 브로마이드 (BMIMBr), 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 요오다이드 (BMIMI), 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 테트라플루오로보레이트 (BMIMBF₄), 및 하기 화학식 (1)의 공용매 또는 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 합성 방법:



(상기 식에서, R₁, R₂, 및 R₃ 은 1 내지 3개 탄소 원자를 갖는 알킬로부터 독립적으로 선택되고, X가 산소 원자라면, 1 내지 3개 탄소 원자를 포함하는 1개 알킬 기는 산소 원자에 결합되고; X가 질소 원자라면, 2개 알킬 기는 질소 원자에 결합하고; 알킬 기(들)는 1 내지 3개 탄소 원자를 갖는 것으로부터 독립적으로 선택됨).

청구항 6

제2항에 있어서, 극성 비양자성 공용매는 하기 화학식 (1)의 공용매로부터 선택되는 것인 합성 방법:



(상기 식에서, R₁, R₂, 및 R₃ 은 1 내지 3개 탄소 원자를 갖는 알킬로부터 독립적으로 선택되고, X가 산소 원자라면, 1 내지 3개 탄소 원자를 포함하는 1개 알킬 기는 산소 원자에 결합하고; X가 질소 원자라면, 2개 알킬 기는 질소 원자에 결합하고, 알킬 기(들)는 1 내지 3개 탄소 원자를 갖는 것으로부터 독립적으로 선택됨).

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, R₁, R₂, 및 R₃ 은 모두 메틸 기이고, 산소 또는 질소에 결합된 알킬 기(들)는 메틸 기인 합성 방법.

청구항 8

제2항에 있어서, 공용매는 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트를 포함하는 것인 합성 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서, 수지는 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 것인 합성 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 항에 있어서, 수지는 폴리스티렌 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 것인 합성 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 하나의 항에 있어서, 수지는 폴리스티렌-폴리에틸렌 글리콜 그래프트 공중합체인 합성 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 있어서, 수지는 가교된 폴리스티렌 및 가교된 폴리스티렌에 에테르-연결을 통해 결합된 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 폴리스티렌-폴리에틸렌 그래프트 공중합체인 합성 방법.

청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜은 1000 Da 내지 5000 Da 범위의 MW를 갖는 것인 합성 방법.

청구항 14

제9항 내지 제13항 중 어느 하나의 항에 있어서, 수지의 총 중량에 대한 폴리에틸렌 글리콜의 비율은 약 50 wt% 초과인 합성 방법.

청구항 15

제3항에 있어서, CA는 카르보다이미드, N-히드록실아민-기반 CA, 우로늄 (아미듐) 기반 CA, 포스포늄 기반 CA, 산을 산 클로라이드로 전환시키는 화합물, 카르복실산을 상응하는 아실 플루오라이드로 전환시키는 화합물, 및

트리아진-기반 CA로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 합성 방법.

청구항 16

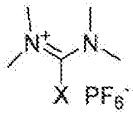
제3항 또는 제15항에 있어서, CA는 DIC, DCC, EDCxHCl, HOBt, Cl-HOBt, HOAt, HOPO, Oxyma, Oxyma-B, HOSu, HBTU, TBTU, HOTU, TOTU, HCTU, TCTU, HATU, TATU, COMU, HDMA, HDMB, HDMC, BOP, PyBOP, PyOxim, PyClock, TCFH, DMCH, Pyclop, TFFH, 테트라메틸암모늄 트리플루오로메탄티올레이트 ((Me₄N)SCF₃), CDMT, DMTMMC1, DMTMMBF4 및 DMT-Ams로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 합성 방법.

청구항 17

제3항에 있어서, CA는 화합물 COMU, HDCM, DMCH, TCFH 및 TFFH로부터 선택되는 것인 합성 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, CA는 하기 화학식의 화합물로부터 선택되는 것인 합성 방법:



X=Cl, F

청구항 20

제4항에 있어서, 염기는 지방족 아민, 방향족 아민, 피리딘의 트리메틸 유도체, 이미다졸, N-메틸이미다졸 (NMI) 및 무기 염기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 합성 방법.

청구항 21

제4항에 있어서, 염기는 디이소프로필에틸아민 (DIEA), N-메틸모르폴린 (NMM), 피리딘의 트리메틸 유도체, 피리딘, 루티딘, 및 그들 리튬, 소듐, 포타슘, 칼슘 또는 테트라알킬암모늄 형태의 포스페이트, 카보네이트, 술페이트, 아세테이트, 보레이트를 포함하는 무기 염기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 합성 방법.

청구항 22

제4항에 있어서, 염기는 피리딘의 트리메틸 유도체 예컨대 피콜린, 루티딘 및 콜리딘인 합성 방법.

청구항 23

고체상 펩티드 합성 방법으로서,

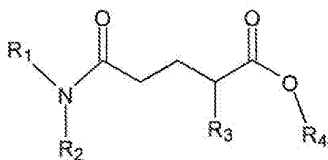
활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티 및 수지에 결합된 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편의 제공 단계;

수지에 결합된 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편을 탈보호시키는 단계;

활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티를 탈보호된 수지에 결합된 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편과 커플링시켜서, 펩티드 결합을 형성하는 단계

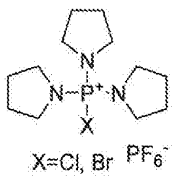
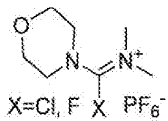
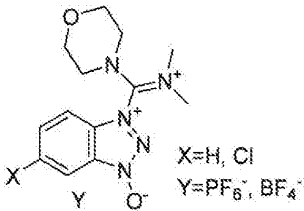
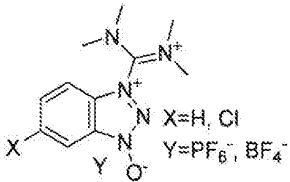
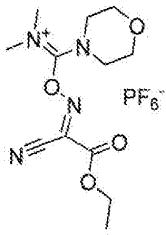
를 포함하고;

아미드 (펩티드) 커플링은 수혼화성인 적어도 하나의 유기 공용매를 포함하는 수성 용액에서 수행되고, 수성 용액은 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 또는 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편을 충분히 용해시킬 수 있고, 수지는 약 4 mLg⁻¹ (수지 중량 기반) 초과로 수성 용액의 존재 하에서 팽윤될 수 있어서, 수지에 결합된 연장된 펩티드 단편을 형성할 수 있고; 보호된 아미노산의 활성화는 커플링제 및 염기의 존재 하에서 수행되고, 유기 공용매는 하기 화학식의 구조를 갖고;

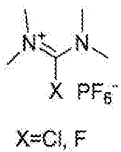


(상기 식에서, R₁, R₂, R₃ 및 R₄ 는 1 내지 3개 탄소를 갖는 알킬로부터 독립적으로 선택됨);

커플링제는 하기 화학식의 구조를 갖는 화합물로부터 선택되고:



및



염기는 피리딘의 트리메틸 유도체로부터 선택되고;

수지는 스티렌 및 에틸렌 글리콜의 공중합체로부터 선택되는 것인 합성 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 하나의 항에 있어서, 수성 용액은 약 2:1 내지 약 8:1 (약 3:1 내지 약 6:1; 약 3:1 내지 약 5:1) 범위의 물 대 유기 공용매의 비율을 갖는 것인 합성 방법.

청구항 25

제3항 또는 제23항에 있어서, 커플링제 대 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 또는 커플링제 대 Fmoc- α -아민 보호

된 펩티드 단편의 비율은 0.5 내지 1.5 범위인 합성 방법.

청구항 26

제4항, 제23항 내지 제25항 중 어느 하나의 항에 있어서, 염기 대 커플링제 또는 염기 대 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 또는 염기 대 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편의 몰 비율은 적어도 약 2.0인 합성 방법.

청구항 27

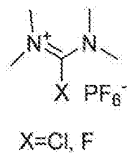
제23항 내지 제26항 중 어느 하나의 항에 있어서, Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 또는 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편의 양 대 수지에 결합된 총 펩티드 단편의 양은 약 5.0 미만, 적합하게 약 3.0 미만, 및 바람직하게 약 2.0 미만, 약 1.7 미만인 합성 방법.

청구항 28

제23항 내지 제27항 중 어느 하나의 항에 있어서, X는 F 또는 Cl로부터 선택되는 것인 합성 방법.

청구항 29

제23항 내지 제28항 중 어느 하나의 항에 있어서, 커플링제는 하기 화학식의 화합물로부터 선택되는 것인 합성 방법:



청구항 30

제23항 내지 제29항 중 어느 하나의 항에 있어서, 염기는 메틸피리딘 (피콜린), 디메틸피리딘 (루티딘), 트리메틸 피리딘 (콜리딘) 및 이의 임의의 위치이성질체로부터 선택되는 것인 합성 방법.

청구항 31

제23항 내지 제30항 중 어느 하나의 항에 있어서, 펩티드 단편은 최종 미정제 표적 펩티드의 탈커플링을 촉진하는 유기 링커에 의해서 수지에 결합되는 것인 합성 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 링커는 방향족 유기 링커인 합성 방법.

청구항 33

제23항 내지 제32항 중 어느 하나의 항에 있어서, 수지에 결합된 펩티드 단편의 Fmoc 기는 2차 아민 예컨대 피페리딘, 4-메틸피페리딘, 3-메틸피페리딘, 2-메틸피페리딘, 모르폴린, 피페라진 및 피롤리딘으로부터 선택되는 화합물을 포함하는 수성 용액의 첨가에 의해 제거되는 것인 합성 방법.

청구항 34

제1항 또는 제23항에 있어서, 수성 용액을 수지로부터 분리시키는 단계, 및 수성 용액에 대해서 재생 작업을 수행하여서 아미드-결합의 형성, Fmoc 제거 단계를 비롯하여 간헐적 세척 단계에서 재사용할 수 있는 재생된 수성 용액을 형성시키는 단계를 더 포함하는 것인 합성 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 재생은 제1항 내지 제34항 중 어느 하나의 항에 정의된 바와 같은 방법의 다양한 단계를 파괴할 수 있는 본질적으로 모든 염기성 및 산 화합물을 제거할 수 있는 적어도 하나의 단위 작업을 포함하는 것인 합성 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 단위 작업은

- a) 적어도 이온 교환 수지로서, 음이온 및 양이온 작용기를 포함하는 것인 수지, 또는
 - b) 적어도 2종의 이온 교환 수지로서, 음이온 작용기를 포함하는 하나의 제1 수지, 및 양이온 작용기를 포함하는 제2 수지
- 를 포함하는 것인 합성 방법.

청구항 37

펩티드의 합성을 위한 방법으로서, 제1항 내지 제36항 중 어느 하나의 항에 따른 아미드 결합의 연속 형성 및 일시적 α-아미노 보호 Fmoc 기의 제거 단계를 포함하는 것인 합성 방법.

청구항 38

제1항 또는 제23항에 있어서, 수성 용액을 분리하여서 소모된 수성 용액을 수득하는 단계를 더 포함하는 것인 합성 방법.

청구항 39

제38항에 정의된 바와 같은 방법으로 수득된 소모된 수성 용액.

청구항 40

제39항에 정의된 바와 같은 소모된 수성 용액의 재생을 위한 방법으로서, 제1항 내지 제38항 중 어느 하나의 항에 정의된 바와 같은 방법에서 다양한 단계를 파괴할 수 있는 본질적으로 모든 염기성 및 산 화합물을 제거할 수 있는 적어도 하나의 단위 작업을 포함하는 것인 재생 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 단위 작업은

- a) 적어도 이온 교환 수지로서, 음이온 및 양이온 작용기를 포함하는 것인 수지, 또는
 - b) 적어도 2종의 이온 교환 수지로서, 음이온 작용기를 포함하는 하나의 제1 수지 및 양이온 작용기를 포함하는 제2 수지
- 를 포함하는 것인 재생 방법.

청구항 42

제36항 또는 제41항에 있어서, 양이온 작용기는 술폰산 기이고, 음이온 작용기는 트리메틸암모늄 기인 방법.

청구항 43

제40항에 정의된 바와 같은 소모된 수성 용액의 사용을 포함하는 고체상 펩티드 합성 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 펩티드 커플링 동안 수성 용액의 사용 및 일시적 α-아민 보호기의 제거를 포함하는 고체상 펩티드 합성 (SPPS) 방법에 관한 것이다. 공용매를 포함하는 수성 용액은 적절하게 활성화된 Fmoc-보호된 아미노산 및 펩티드 단편을 용해시킬 수 있다. 더 나아가서, 기본 수지는 수성 용액 중에서 적어도 4 mL⁻¹ 로 팽윤되는 특징을 갖는다. 수성 용액은 또한 재생에 적합하고, 따라서, 본 발명은 또한 SPPS에서 사용을 위해 소모된 수성 용액 및 소모된 용액을 재생시키기 위한 방법을 포괄한다.

배경 기술

[0001]

- [0002] 펩티드는 몇개 아미노산에서 최대 대략 60개 아미노산을 포함하는 천연 발생 및 변형된 아미노산을 포함하는 유기 분자이다. 펩티드로서, 단백질은 또한 아미노산을 포함한다. 펩티드로부터 단백질을 기술하는데 사용되는 한 가지 측정법은 아미노산의 개수이다. 경계에 대한 합의는 없지만, 60개 이상의 아미노산을 갖는 분자는 일반적으로 단백질이라고 하는 반면, 최대 약 60개 아미노산의 분자는 펩티드라고 한다. 본 명세서에 개시된 방법 및 재생은 최대 약 60개 아미노산을 포함하는 펩티드에 관한 것이다.
- [0003] 펩티드의 아미노산은 종종 펩티드 결합이라고 하는 아미드 결합을 통해서 연결된다. 아미드 결합은 전형적으로 한 아미노산의 카르복실기와 다른 아미노산의 아미노기의 축합 반응에 의해 형성되지만, 또 다른 화학 반응 기전이 또한 아미드 결합을 형성할 수 있다. 펩티드의 합성을 위해 유용한 방법은 액체상 펩티드 합성(LPPS) 및 고체상 펩티드 합성(SPPS) 및 LPPS 및 SPPS의 조합을 포함한다. SPPS 방법은 1960년대에 Bruce Merrifield가 개척하였다. SPPS는 불용성 지지체 상에서 아미노산 유도체의 연속적인 반응을 통해서 펩티드 사슬의 편리한 조립을 허용한다.
- [0004] 불용성 지지체에 펩티드 잔기의 커플링은 몇가지 중요한 물리적 및 화학적 공정 작업, 예컨대 아미드 결합의 형성을 위한 반응 단계 사이에 여과 및 세척 단계의 도입을 허용한다.
- [0005] 아민과 카르복실산 간 아미드-결합의 형성은 열역학적으로 유리하지 않다. 커플링하려는 아미노산의 α -카르복실기의 반응성에 영향을 미치는 화합물(예컨대, 커플링제, CA)의 존재없이, 아미드-결합 형성은 종종 상업적 적용을 위해서는 너무 느리다. 반응(펩티드-결합 형성)을 구동시키기 위한 추가의 중요한 방법론은 과량의 반응물 및 시약을 적용하여서 생산물 쪽으로 반응을 밀어냈었고 지금도 여전히 그러하다. 과량의 반응물 및 시약의 사용은 성장하는 펩티드가 불용성 지지체/수지에 결합하여서, 과량의 반응물 및 시약이 예를 들어, 여과를 통해서 쉽게 제거될 수 있기 때문에 실현가능하게 된다.
- [0006] SPPS가 수율 증가를 위해서 열역학적으로 유리한 조건을 생성하는 과량 반응물의 적용을 허용하지만, 이러한 전략은 또한 동시에 반응물의 과잉 소비에 대한 책임이 있다. 각각의 사이클이 적어도 하나의 세척 단위 작업, 및 반응 용액의 제거를 함유하는, 일련의 사이클에 의한 지지체에 결합된 펩티드의 연속 확장은 상당한 부피의 소모된 반응 용액을 생성시킨다.
- [0007] SPPS에서 아미노산의 α -아민은 지지체에 결합된 펩티드 단편과 아미드-커플링의 형성 전에 보호되어야만 하는데 그렇지 않으면 비제어적인 자가-중합으로 인해서 표적 펩티드의 형성을 제어하는 것이 불가능해진다. 더 나아가서, 아미노산의 반응성 측쇄, 특히 아민-기를 포함하는 측쇄는 또한 관례적으로 보호된다.
- [0008] SPPS에서 수년 간 지배적인 전략은 9-플루오레닐메톡시카르보닐(Fmoc)기로 아미노산의 α -아민을 차단하는 것이었다(J. Pept. Sci. 2003, Sep 9(9): 545-52). Fmoc 기는 제거를 위해서 단지 약한/중간 염기만을 요구한다. 아미노산의 다른 반응성 기, 예컨대 작용화된 측쇄는 전형적으로 산 불안정성 보호기 예컨대 트리틸(Trt) 및 tert-부틸(tBu)에 의해 보호된다. Fmoc 전략은 산성 조건, 일반적으로, 바람직하게 트리플루오로아세트산(TFA)을 사용한 강한 산분해를 사용하여 수지로부터 미정제 표적 펩티드가 절단되어질 때 측쇄 보호기가 동시에 절단되도록 허용한다.
- [0009] 아미노산의 α -아민에 Fmoc의 공유 연결은 Fmoc 보호된 아미노산의 가용성에 영향을 미친다. Fmoc는 소수성 방향족 플루오렌 모이어티를 포함한다. 따라서, Fmoc 보호성 아미노산은 비-보호된 아미노산에 비해서 보다 소수성이 된다. 반응 용액은 활성화된 Fmoc 보호된 아미노산을 용해시킬 수 있어야 한다.
- [0010] SPPS의 추가적인 중요한 측면은 펩티드 수지의 적절한 팽윤이다. 용매는 수지의 용매화에 중요한 영향을 미친다. 따라서, 팽윤 관점에서 용매 및 수지의 선택에 주의를 기울여야만 한다. 추가로, 용매(반응 용액)는 또한 몇가지 다른 기준/치수 예컨대 그 자체 또는 그들 활성화된 형태로서 보호된 아미노산의 가용성을 충족해야만 한다. SPPS가 성공적으로 구현되기 위해서, 반응 용액 및 수지(몇가지만 언급)는 몇개가 본 명세서에 설명된 몇몇 인자와 관련하여 다수의 기준을 충족할 필요가 있다. 한 차원(예를 들어, 가용화)의 개선은 다른 유의한 차원(예를 들어, 수지 팽윤성)의 악화를 나타낼 수 있다는 문제가 있다. 반응 용액, α -아미드 보호기 및 수지의 적절한 조합을 찾는 것은 간단하지 않다(J. Pept. Sci. 2016; 22, 4-27).
- [0011] Fmoc-보호된 아미노산의 가용화가 설명된 이유로 중요하기 때문에, Fmoc SPPS의 용매는 어느 정도, Fmoc 보호된 아미노산을 적절하게 가용화하는 그들 능력을 기반으로 선택되었었다. 표시된 바와 같이, Fmoc 기는 소수성이고, Fmoc 보호된 아미노산을 점차적으로 소수성으로 만든다. 선택된 용매는 유기 극성 비양자성 용매, 주로 메틸렌 클로라이드(DCM) N-메틸피롤리돈(NMP), NN-디메틸포름아미드(DMF) 및 NN-디메틸아세트아미드(DMA)로부터 선택된다. SPPS에서 일반적으로 적용되는 모든 유기 극성 비양자성 용매는 어느 정도로 발암성, 돌

연변이성이거나 또는 생식을 방해한다 (CMR 물질).

- [0012] 표시된 이유때문에, 물로 부분 대체하여서 SPPS의 유기 용매 부피를 감소시키는 것이 바람직하다. 사용되는 임의의 유기 공용매는 인간 건강에 유해하지 않은 것, 예를 들어 상기 언급된 CMR 물질에 속하는 것 예컨대 DMF, NMP, DCM 또는 DMA인 것이 또한 바람직할 것이다. 더 나아가서, Fmoc-아미노산 전략을 적용하면서 물로 유기 용매의 일부를 대체하는 것이 바람직하다.
- [0013] US 2017/0218010 A1은 물 또는 알코올의 용매 또는 물 또는 알코올의 혼합물을 사용한 SPPS를 개시한다. Fmoc 및 Boc 아미노산 보호기는 소수성이고 물에 용해되지 않는다. α-아미노 보호기로서 Fmoc 및 Boc의 도입은 아미노산을 더 소수성으로 만들어서 반응성 측쇄가 소수성 특징을 갖는 기로 보호되는 경우더라도 배합된다. US 2017/0218010 A1의 제안은 보호기를 덜 소수성하게 만드는 친수성 모이어티를 도입시켜 α-아민 보호기를 변형시키는 것이다. US 2017/0218010 A1은 용매 조성물이나 수지에 대한 상세한 경로에 대해 언급하지 않는다.
- [0014] 유사한 맥락에서, Hojo 등 (2003)은 수성 용액 중 고체상 펩티드 합성을 위해, 새로운 수용성 보호제, 2-[페닐(메틸)술포니오]에틸-4-니트로-페닐카보네이트 테트라플루오로보레이트 (Pms-ONp)의 제공을 분석한다. 아민 보호된 아미노산이 Met-엔케팔린의 합성에서 수평용성 가교 에톡실레이트 수지 (CLEAR®)를 포함한 SPPS에서 사용된다. Hojo 등은 수산화성 유기 공용매를 포함하는 수성 용액을 제안하지 않는다. 수용성 2-[페닐(메틸)술포니오]에틸-4-니트로-페닐카보네이트 테트라플루오로보레이트로 아미노산을 보호하여서, 용매로서 물과 사용할 수 있는 수용성 보호된 아미노산의 제공에 집중한다.
- [0015] 더 나아가서, Hojo 등 (2007)은 Fmoc 보호된 아미노산을 사용하여 유기 용매가 생략된 수성 SPPS를 개시한다. Fmoc는 소수성이고, Fmoc로 보호된 아미노산을 수성 용액 중에서 난용성으로 만든다. Fmoc 보호된 아미노산은 Fmoc 보호된 아미노산을 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하는 분산물로 전환시켜서 수지-결합된 펩티드 단편과 반응에 더 접근가능하게 만든다. Fmoc 보호된 아미노산의 분산물은 지르코늄 옥시드 비드를 함유하는 유성형 불밀을 사용하여 Fmoc 보호된 아미노산 및 PEG의 수성 용액을 격렬하게 혼합시켜서 형성된다. 광범위한 밀링 (495 rpm, 2시간) 이후에, 비드를 제거하여 265 +/- 10 nm의 입자 크기를 갖는 분산물이 제공된다. 분산물의 형태로 Fmoc 보호된 아미노산을 제공하는 대신에, 본 발명은 4 mL/g⁻¹ 초과로 팽윤할 수 있는 수지 및 적어도 하나의 공용매를 포함하는 수성 용액에서 아미노산의 커플링을 수행하는 SPPS 방법을 제안하고, 여기서 수성 용액은 Fmoc 보호된 아미노산을 용해시킬 수 있다.
- [0016] US 2012/0157563 A1은 또한 β 불포화 술포, 예컨대 Bsmoc (예, 1,1-디옥소벤조[b]티오펜-2-일메틸옥시카르보닐) 및 Nsmoc (예, 1,1-디옥소나프토[1,2-b]티오펜-2-메틸옥시카르보닐)을 포함하는 아미노산 보호기 및 상기 보호기를 포함하는 아미노산의 탈보호 및 물, 에탄올 또는 에탄올의 수성 용액의 용액으로 고정 지지체에 결합된 탈보호된 펩티드의 후속 세척을 탐구한다. 중요한 측면은 수용성 보호기의 제공이다.
- [0017] JP 2008056577 A는 아미드 커플링의 형성 하에서 수성 용매의 사용을 포함하는 고체상 펩티드 합성 프로토콜을 개시한다. 더욱 설명하는 바와 같이, 통상의 아미노 보호기는 난용성이어서 아미드 형성을 방해한다. 수성 용매에서 아미드 형성의 속도를 증가시키기 위한 해결책은 수성 용매에 N-말단 보호된 아미노산을 분산시키는 것이다. 보호된 아미노산의 수성 분산물은 분산제의 존재 하에서 최대 750 nm 범위의 평균 입자 크기까지 보호된 아미노산을 습식 분쇄하여 형성된다. PEG가 분산제로서 예시된다. 저급 알코올 예컨대 메탄올 및 에탄올이 유용한 비-수성 용매로서 언급된다.
- [0018] 본 발명의 중요한 한 측면은 펩티드가 수성 용액에서 형성되지만 표준 Fmoc α-아민 보호 전략이 사용되는 SPPS의 제공이다. Fmoc는 1990대 중반 이후로 SPPS를 사용한 펩티드의 합성 생산의 우세한 전략이다 (Curr Protoc Protein Sci. 2002 February; CHAPTER: Unit-18.1. doi:10.1002/0471140864.ps1801s26). 고품질 Fmoc 빌딩 블록 (아미노산 및 단편)은 상업적으로 적절한 가격으로 쉽게 입수가 가능하다. 많은 변형된 유도체가 Fmoc 빌딩 블록으로서 상업적으로 입수가 가능하여서, 광범위한 펩티드 유도체에 대한 합성적 접근을 간단하게 상업적으로 실현할 수 있게 만든다.
- [0019] 본 발명의 한 목적은 SPPS, 특히 Fmoc SPPS에서 유해한 유기 용매의 감소이다.
- [0020] 추가 목적은 SPPS로부터 유출되는 소모된 용매의 재생이다.
- [0021] 또 다른 목적은 SPPS에서 용매의 소비를 감소시키는 것이다.
- [0022] 추가 목적은 상업적으로 유용한 1차 수율을 여전히 유지하면서, 특히 Fmoc SPPS에서 과량의 α-아민 보호된 아

미노산 및 단편의 감소를 제공하는 것이다.

[0023] 추가 목적은 알칼리 조건 하에서 α-아민의 절단을 포함하는 아민 보호 전략을 적용하면서 수성 SPPS를 제공하는 것이다.

[0024] 또한 추가 목적은 쉽게 입수가능하고 상업적으로 관련된 α-아민 보호기, 특히 Fmoc α-아민 보호기의 구현을 포함한 아민 보호 전략을 적용하면서 수성 SPPS를 제공하는 것이다.

발명의 내용

[0025] 본 발명은 일시적 α-아미노 보호기의 제거 및 펩티드 결합의 후속 형성 동안 적어도 하나의 공용매를 포함하는 수성 용액의 사용을 포함하는 고체상 펩티드 합성 (SPPS)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 SPPS 동안 사용된 수성 용액의 재생을 위한 방법을 포괄한다.

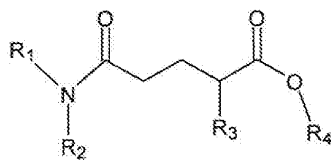
[0026] 보다 특히, 본 발명은 고체상 펩티드 합성 (SPPS) 방법에 관한 것으로서, 방법은 활성화된 Fmoc-α-아민 보호된 아미노산 모이어티 및 수지에 결합된 Fmoc-α-아민 보호된 펩티드 단편의 제공 단계; 수지에 결합된 Fmoc-α-아민 보호된 펩티드 단편을 탈보호시키는 단계; 활성화된 Fmoc-α-아민 보호된 아미노산 모이어티와 탈보호된 수지에 결합된 Fmoc-α-아민 보호된 펩티드 단편을 커플링하여서, 펩티드 결합을 형성시키는 단계를 포함하고, 아미드 (펩티드) 커플링은 수혼화성인 적어도 하나의 유기 공용매를 포함하는 수성 용액에서 수행되고, 수성 용액은 활성화된 Fmoc-α-아민 보호된 아미노산 모이어티를 충분히 용해시킬 수 있고, 수지는 수성 용액의 존재 하에서 약 4 mLg⁻¹ (기본 수지 중량 기반) 초과로 팽윤될 수 있어서, 수지에 결합된 연장된 펩티드 단편을 형성시킬 수 있는 것인 수지로부터 선택된다.

[0027] 본 발명의 구현예에 따라서, 본 발명은 고체상 펩티드 합성 방법에 관한 것으로서, 방법은 활성화된 Fmoc-α-아민 보호된 아미노산 모이어티 및 수지에 결합된 Fmoc-α-아민 보호된 펩티드 단편을 제공하는 단계;

[0028] 수지에 결합된 Fmoc-α-아민 보호된 펩티드 단편을 탈보호시키는 단계;

[0029] 활성화된 Fmoc-α-아민 보호된 아미노산 모이어티를 탈보호된 수지에 결합된 Fmoc-α-아민 보호된 펩티드 단편과 커플링시켜서 펩티드 결합을 형성시키는 단계를 포함하고;

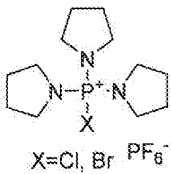
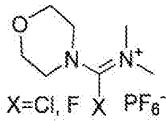
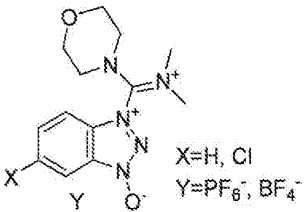
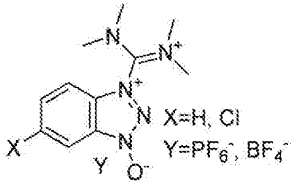
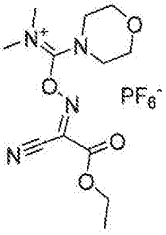
[0030] 아미드 (펩티드) 커플링은 수혼화성인 적어도 하나의 유기 공용매를 포함하는 수성 용액에서 수행되고, 수성 용액은 Fmoc-α-아민 보호된 아미노산 모이어티를 충분히 용해시킬 수 있고, 수지는 수성 용액의 존재 하에서 약 4 mL/g-1 (수지 중량 기반) 초과로 팽윤될 수 있어서, 수지에 결합된 연장된 펩티드 단편을 형성할 수 있는 것인 수지로부터 선택되고; 보호된 아미노산의 활성화는 커플링제 및 염기의 존재 하에서 수행되며, 유기 공용매는 하기 화학식 구조를 갖는다:



[0031]

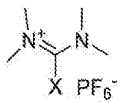
[0032] 상기 식에서, R₁, R₂, R₃ 및 R₄ 는 1 내지 3개 탄소를 갖는 알킬로부터 독립적으로 선택되고;

[0033] 커플링제는 하기 화학식의 구조를 갖는 화합물로부터 선택된다:



[0034]

[0035] 및



[0036]

[0037] 염기는 피리딘의 트리메틸 유도체로부터 선택되고;

[0038] 수지는 스티렌 및 에틸렌 글리콜의 공중합체로부터 선택된다.

[0039] 본 발명의 다른 추가 구현에는 고체상 펩티드 합성 방법으로 구성되고, 방법은 각각의 사이클이 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티 및 수지에 결합된 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편; 수지에 결합된 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편을 탈보호시키는 단계를 포함하는 것인 반복적 사이클 단계를 포함하고;

[0040] 아미드 (펩티드) 커플링은 수산화성인 적어도 하나의 유기 공용매를 포함하는 수성 용액에서 수행되고, 수성 용액은 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티를 충분히 용해시킬 수 있고, 수지는 수성 용액의 존재

하에서 약 4 mLg⁻¹ (수지 중량 기반) 초과로 팽윤될 수 있어서, 수지에 결합된 아미노산 단편을 연장시키는 것인 수지로부터 선택된다.

[0041] 더 나아가서, 수성 반응 용액은 성공적으로 재생될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 SPPS 공정으로부터의 수성 용액의 재생을 위한 방법을 포괄한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 일반적 언급

[0043] 본 발명에서, Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티가 사용된다. 용어 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티는 Fmoc- α -아민 보호된 천연 아미노산, Fmoc- α -아민 보호된 변형된 천연 아미노산, Fmoc- α -아민 보호된 합성 아미노산 및 임의의 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 단편을 포함한다. Fmoc- α -아민 보호된 개별 아미노산 이외에도, 또한 단편이 성장하는 펩티드 잔기에 삽입될 수 있다. 아미노산 펩티드 단편은 둘 이상의 개별 아미노산의 화합물 (펩티드)을 의미한다. 용어 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산, Fmoc 보호된 아미노산 또는 Fmoc 아미노산이 사용될 때 달리 명시하지 않으면 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티가 또한 고려된다.

[0044] 본 발명의 한가지 특성은 수산화성인 적어도 하나의 유기 공용매를 포함하는 수성 용액의 제공으로서, 수성 용액은 그 자체로 또는 다양한 커플링제의 작용을 통해 얻은 그들의 활성화된 형태로서, Fmoc- α -아민 보호된 아미노산을 충분히 용해시킨다. 아마이드 (펩티드)-결합 형성이 열역학적으로 유리하지 않기 때문에, 지지체에 결합된 아미노산 또는 단편에 아미노산의 커플링은 일반적으로 열역학적으로 보다 유리한 반응 조건을 생성시키고, 증가된 수율에 기여하는 화합물의 존재 하에서 수행될 필요가 있다. 열역학적으로 유리한 반응을 제공할 수 있는 화합물은 여기서 커플링제라고 한다. 커플링제는 Fmoc 보호된 α -아민 아미노산의 카르복실산 작용성에 영향을 미친다. 조건, 예컨대 pH에 따라서, 카르복실산 작용성은 또한 탈양자화된 카르복실레이트로서 제공될 수 있다. 커플링제는 열역학적으로 유리한 반응 조건을 제공하는데 관여되는 유일한 화합물일 수 있다. 그러나, 종종 커플링제는 본 명세서에서 커플링 첨가제라고 하는, 적어도 추가 화합물과 상호작용한다. 커플링제 및 일정 화합물이 관여되는 일부 화학은 라세미화 경향이 있다. 라세미화 위험은 라세미화 억제 첨가제 (커플링 첨가제)를 도입하여서 감소되거나 또는 제거될 수 있다. 트리아졸 1-히드록시-벤조트리아졸 (HOBt) 및 1-히드록시-7-아자-벤조트리아졸 (HOAt)은 특히 카르보디이미드 예컨대 디스클로헥실카르보디이미드 (DCC) 및 디소프로필카르보디이미드 (DIC)와 조합하여, 일반적으로 적용되는 라세미화 억제 첨가제이다. 상세하게, Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 또는 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 단편의 카르복실산 작용성은 일반적으로 펩티드-결합 형성의 유용한 속도를 제공하기 위해 활성화될 필요가 있다. 활성화 화학에 따라서, 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산은 더 또는 덜 안정할 수 있다. 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산이 충분한 안정성을 나타내면 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산의 활성화는 별개의 활성화 단계에서 적합한 커플링제의 존재 하에서 수행될 수 있다. 그렇다면, 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산은 적어도 유기 공용매를 포함하는 수성 용액에 전달된다.

[0045] Fmoc- α -아민 보호된 아미노산의 활성화에 대한 대안적인 몇가지 공정이 존재한다. 한가지 가능성은 수성 용액에 이미 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산의 첨가 및 후속 가용화이다. 대안적인 가능성은 적합한 용액, 예컨대 본 발명의 수성 용액 중에서 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산의 활성화, 및 탈보호된 연장된 펩티드 단편을 갖는 수지에 용액의 형태로 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산의 첨가이다. 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산이 제한된 안정성을 갖는 경우에 유용할 수 있는, 추가의 대안은 적어도 유기 공용매를 포함하는 수성 용액, 및 관련 커플링제 하에서, 탈보호된 연장된 펩티드 단편을 갖는 수지로 제자리에서 Fmoc- α -보호된 아미노산을 활성화시키는 것이다. 2개 아미노산에서 펩티드 결합으로의 반응 기전은 일반적으로 중간체의 형성을 포함한다. 본 발명의 상황에서, 중간체는 Fmoc- α -보호된 아미노산과 수지에 결합된 연장된 펩티드 단편 간에 반응 절차에서 형성된 임의의 화합물 또는 일시적 (유사) 화합물이다. 본 발명의 상황에서, 활성화된 Fmoc- α -보호된 아미노산은 중간체 중 어느 하나일 수 있다. 용어 'Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 및 단편을 충분히 용해시킬 수 있는'은 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 및/또는 임의의 중간체의 가용화를 포함한다. 본 명세서에 개시된 수성 용액은 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 및/또는 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산의 적합한 유형을 용해시킨다.

[0046] Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티는 비-활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 또는 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편을 의미한다.

- [0047] 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산은 브라운 운동을 통해 수지에 결합된 아미노산 단편을 찾기 위해서 개별 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산에 대해 적절하게 용해되어야만 한다. 본 발명의 상황에서 가용화란 펩티드 결합의 형성에 도움이 되는 임의 현상으로 이해한다. 한가지 현상은 유용한 많은 개별 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산이 수지-결합된 펩티드 단편의 반응성 부위에 충분히 가깝게 올 수 있게 하는 조건을 제공하는 수성 용액의 능력이다.
- [0048] 성공적인 SPPS는 반응물에 대한 성장하는 수지-결합된 펩티드 단편의 접근가능성에 의존한다. 용매화는 다양한 매개변수, 예컨대 용매, 수지 및 표적 펩티드의 유형에 의존하는 복잡한 개념이다. 기본 수지의 팽윤은 수지 상의 아미노 기에 대한 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산의 접근가능성 및 반응성의 예측을 비롯하여, 수지 결합된 Fmoc 기의 효율적인 탈보호에 유용하다. 기본 수지란 결합된 펩티드 (단편) 또는 선택적 링커가 없는 수지로 이해해야 한다. 기본 수지는 아미노산 또는 링커의 결합을 촉진하는 화학 변형을 포함할 수 있다. 본 발명의 상황에서, 팽윤은 수지의 중량 당 팽윤된 수지의 부피로서 정의된다. 수지 중량 당 팽윤된 수지의 부피는 수지의 결정 중량을 용매와 혼합시키고 수지/용매 혼합물을 실온 (rt)에서 1시간 동안 진탕시킨 이후에, 수지/용매 혼합물을 1시간 동안 정치시킨 다음 팽윤된 수지의 부피를 측정하는 것을 포함하는 절차를 통해 생성된다.
- [0049] SPPS에서 표적 펩티드는 수지에 결합된 펩티드 단편과 아민 보호된 아미노산/단편의 단계식 커플링에 의해 형성된다. (본 명세서에서 사용되는) 용어 수지에 결합된 펩티드 단편은 또한 수지에 결합된 하나의 아미노산을 포함한다. 따라서, 하나의 단일 Fmoc- α -보호된 아미노산 (제1 아미노산)이 아마도 Fmoc- α -보호된 아미노산과 수지 간 링커에 의해서 수지에 결합되면, 수지에 결합 (연결)된 단일 아미노산은 또한 용어 수지에 결합된 펩티드 단편에 포괄된다.
- [0050] SPPS는 각각의 사이클이 적어도 Fmoc- α -보호된 아미노산 또는 단편의 커플링, 및 수지로부터 적어도 과량의 반응물의 분리를 포함하는 반복적 사이클을 포함하는 방법론이다. 다음의 아민 보호된 아미노산 또는 단편의 첨가를 포함하는 다음 사이클이 시작하기 전에, 펩티드 결합 형성에 관여되는 경향이 있는 선행 사이클의 단편의 아미노산의 함량 (잔류 아미노산)은 비-표적 펩티드 변이체의 형성을 최소화하여서 1차 수율 (반응 후 수율 증가 작업 예컨대 분리 전 수율)을 증가시키기 위해 가능한 낮게 감소되어야 한다. 이전 사이클의 잔류 아미노산은 잔류 아미노산을 펩티드 사슬 연장할 수 없는 변형된 화합물로 변환시키는 화학적 변형 (예를 들어, 카르복실산 에스테르로 카르복실산의 아세틸화)에 의해 중화될 수 있고, 화학적 변형을 포함하지 않는 공정 (예를 들어, 추가 화학 화합물과 회합 예컨대 복합체화)에 의해 중화될 수 있다. 더 나아가서, 잔류 아미노산은 제거, 예컨대 여과, 배수 및 배수후 원치않는 화합물 특히 아미노산이 없는 봉액으로 배수된 액체의 교체에 의해 중화될 수 있다. 종종 사이클은 배수 및/또는 세척이 후속된다. SPPS 분야에서 배수 및 세척은 명확한 의미를 갖지 않는다. 본 명세서에서 사용시 배수는 불용성 미세-입자 특히 수지 입자로부터 수성 용액 및 용질을 분리하는 작업을 의미한다. 세척 작업은 적어도 배수 및 수성 용액의 후속 첨가를 포함하는 작업으로 이해한다. 본 발명의 방법 (또는 사이클)은 수지의 배수를 포함할 수 있다. 배수 후에 본 발명의 방법의 수성 용액 또는 대체 용액을 첨가할 수 있다. 대체 용액이 배수된 수지에 첨가되면, 대체 용액은 수지로부터 배수된다. 각각의 사이클은 본 발명의 수성 용액 또는 대체 용액의 다수 첨가를 의미하는 반복적 배수를 함유할 수 있다. 사이클은 배수 단계 (과량의 반응물 제거 경우)에 이어서 본 발명의 수성 용액의 첨가 및 새로운 반응물의 첨가를 함유할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 일 양태에 따라서 본 발명은 각각의 사이클이 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 또는 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편 및 수지에 결합된 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편; 수지에 결합된 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편을 탈보호시키는 단계를 포함하는 것인 반복적 사이클을 포함하는 고체상 펩티드 합성 방법으로 구성될 수 있고;
- [0052] 여기서 아미드 (펩티드) 커플링은 수산화성인 적어도 하나의 유기 공용매를 포함하는 수성 용액에서 수행되고, 수성 용액은 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 또는 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편을 충분히 용해시킬 수 있고, 수지는 약 4 mLg^{-1} (수지 중량 기반) 초과로 팽윤될 수 있어서, 수지에 결합된 아미노산 단편을 연장시킬 수 있는 것인 수지로부터 선택된다.
- [0053] 반복적 사이클은 적어도 2회 사이클에서 표적 펩티드의 제공에 필요한 임의 횟수를 포함한다.
- [0054] 본 개시의 상황에서 반응물은 아미노산, 수지에 결합된 펩티드 단편에 커플링시키려는 아미노산, 아미노산 단편이 고려된다. 시약은 반응물로서 정의되지 않은 임의의 다른 화합물 및 반응 용액 그 자체가 고려된다.

시약의 예에는 커플링제, 커플링 첨가제, 염기가 포함되지만 계면활성제는 아니다. 용어 수지에 결합된 펩티드 단편은 수지에 직접적으로 결합된 수지에 공유적으로 결합된 펩티드 단편 및 또한 펩티드 단편과 수지 사이에서 임의 유형의 링커에 의해 수지에 결합된 펩티드 단편을 포함한다.

[0055] 산성 조건은 7 미만의 pH를 갖는 용액이다. 염기성 조건은 7 초과인 pH를 갖는 용액이다.

[0056] **본 발명의 구현예**

[0057] 아마이드 결합 (펩티드 결합)이 형성되는 반응 용액은 수산화성인 적어도 하나의 유기 공용매를 포함하는 수성 용액이다. 수성 용액이란 물을 포함하는 용액으로 이해한다. 바람직하게, 수성 용액은 적어도 50 wt% 물, 적어도 55 wt% 물, 적어도 60 wt% 물, 적어도 65 wt% 물, 적어도 70 wt% 물, 적어도 75 wt% 물, 적어도 80 wt% 물을 포함한다. 용어 '물'은 음용 수도물부터 다양한 품질의 정제수에 이르는 범위의 임의의 품질을 포괄한다. 수성 용액은 물에서 혼화성이고, 의도하는 공용매의 물 비율(들)에서 적어도 혼화성인 적어도 하나의 유기 공용매를 포함하는 것이 추가로 필수적이다. 본 명세서에서 수산화성이란 균질한 용액을 형성하도록 서로 혼합되는 둘 이상의 액체 (용매)의 능력을 의미한다. 유기 공용매는 물과 완전하게 (또는 전적으로) 혼화성일 수 있고, 즉 유기 용매는 임의의 공용매/물 비율 (공용매 중량 대 최종 용액 중량)에서 혼화성이다. 유기 공용매가 물과 전적으로 혼화성이면, 공용매의 혼화성은 100% (공용매 wt 대 최종 용액의 wt)이다. 공용매는 물과 전적으로 혼화성이 아닐 수 있다. 공용매가 물과 전적으로 혼화성이 아닌 경우에, 공용매와 물의 비율은 완전하게 물에 혼화성이라도 공용매에 적용된다. 공용매가 물과 100% 혼화성을 나타내지 않더라도, 유기 공용매는 균질한 용액을 형성할 수 있는 정도로 물과 혼화성이면 충분하다.

[0058] 일 양태에 따라서 아마이드 커플링은 임의의 분산제 부재 하에서 수행된다.

[0059] 추가 양태에 따라서, 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티는 분산되지 않거나 또는 분산물의 형태로 제공된다. 보다 특히, Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티는 입자화, 예컨대 분쇄되지 않는다.

[0060] 추가 양태에 따라서 (활성화된) Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티는 적어도 하나의 유기 공용매를 포함하는 수성 용액에 용해되며, 개별 (활성화된) Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티가 용해된다는 것을 의미하고, 즉 개별 (활성화된) Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티는 용매 분자 (물 및 공용매)의 층에 의해 둘러싸이거나 또는 용매화된다는 것을 의미한다. 개별 (활성화된) Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티의 크기는 Fmoc 기의 크기와 조합하여 개별 아미노산 모이어티의 크기에 의해 좌우된다. 개별 (활성화된) Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 모이어티의 크기는 일반적으로 약 5 nm 미만이다. 대부분의 비-보호된 천연 발생 아미노산은 1 nm 미만의 크기를 갖는다.

[0061] 본 발명의 일 양태에 따라서 반응물 (Fmoc- α -보호된 아미노산 및 단편)의 용해도는 표면-활성 화합물 (계면활성제)의 존재에 의해 증강될 수 있다.

[0062] SPPS의 성공적인 상업적 적용을 위해 몇가지 매개변수의 섬세한 상호작용이 존재한다. SPPS의 한가지 요건은 지지체 (수지)에 결합된 성장하는 펩티드 단편을 연장시키는데 사용되는 아미노산 또는 아미노산 단편의 α -아민 작용성이 보호된다는 것이고, 그렇지 않으면, 표적 펩티드를 형성하는 것이 불가능하다. 본 발명에서 사용된 아미노산 또는 아미노산 단편의 α -아민 작용성은 Fmoc 기에 의해 보호된다. Fmoc-모이어티 (플루오레닐메틸옥시카르보닐)는 삼환식 방향족 카바메이트로서 Fmoc 보호된 아미노산 또는 아미노산 단편의 소수성을 증가시킨다. 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 또는 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편이 충분히 용해되는 것은 유용한 반응 속도의 제공에 중요하다. 가용화의 상황에서 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 또는 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편이란 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산과 수지에 결합된 성장 펩티드 단편 간에 펩티드 결합의 형성까지 임의의 비-활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 또는 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산의 임의의 일시적 (활성화된) 형태를 의미한다.

[0063] 일반적으로, Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 또는 Fmoc- α -아민 보호된 펩티드 단편의 카르복실산 작용성 또는 카르복실레이트 음이온은 하나 또는 몇개의 활성화 화합물 (본 명세서에서는 커플링제, CA라고도 함)을 포함한 적합한 활성화 화학에 의해 활성화된다.

[0064] 본 발명의 상황에서 가용화는 개별 활성화된 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산을 지지체에 결합된 성장하는 펩티드 단편의 반응 부위에 충분히 가깝게 성공적으로 수송하는 수성 용액의 능력이고, 바람직하게 (펩티드 결합 형성의) 속도 제한 단계는 확산/브라운 운동이 아니라, 화학 반응의 속도에 의해서 주로 좌우된다.

[0065] 상기 설명된 이유 때문에, Fmoc 보호된 아미노산은 수성 용액에 용해되는 것이 어렵다. 유기 비양자성 극성

용매, 특히 DMF는 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산을 사용하는 SPPS에서 선택된 용매이고, Fmoc- α -아민 보호된 아미노산을 용해시키는 능력이 한 이유이다. 수성 용액 중에 유기 공용매의 존재에 의해서, Fmoc- α -아민 보호된 아미노산 또는 그들 활성화된 형태의 충분한 가용화가 얻어진다.

[0066] SPPS의 상업적으로 성공적인 적용을 위한 추가의 중요한 매개변수는 수지의 팽윤이다. 본 발명에서 적용되는 수지는 수혼화성인 적어도 하나의 유기 공용매를 포함하는 선택된 수성 용액 중에서 적어도 4 mLg⁻¹로 팽윤되는 기본 수지로부터 선택된다. 팽윤 기준을 정량하기 위한 보다 상세한 개시는 실험 부분에서 설명된다. 일 양태에 따라서, 수지는 약 4 mLg⁻¹ 내지 약 8 mLg⁻¹ 범위의 팽윤을 나타내는 능력을 갖는다.

[0067] 보호 Fmoc 기는 염기-불안정성이고, 따라서 Fmoc 기는 염기성 조건 하에서 절단가능하다. Fmoc이 염기-불안정하므로, 반응성 아미노산 측쇄는 전형적으로 산-불안정성 보호기 (예컨대 tert-부틸)에 의해 보호된다. 따라서, 사슬 연장은 일반적으로 중성 내지 알칼리 조건 하에서 수행된다. 수지에 결합된 표적 펩티드가 형성되었을 때 표적 펩티드는 수지로부터 절단된다. 전형적으로, 펩티드의 절단은 산성 조건 하에서 수행된다. 추가 양태에 따라서 수지는 또한 수지로부터 미정제 표적 펩티드의 절단 동안 과도하게 팽윤되지 않는 특징을 갖는다. 따라서, 방법에서 사용되는 기본 수지는 전형적으로 수지로부터 절단 동안 산 조건 하에서 과도하게 팽윤되지 않으면서 적어도 약 4 mLg⁻¹로 팽윤되는 능력을 가져야 한다. 팽윤은 어느 정도까지 절단에 사용되는 용매와 상관있다. 일반적으로, 다소 강산이 절단에 사용된다.

[0068] 일 양태에 따라서, 기본 수지는 펩티드 수지 절단 조건 하에서, 수성 용액의 존재 하에 약 4 mLg⁻¹ 초과 및 약 12 mLg⁻¹ 미만, 적합하게 약 10 mLg⁻¹ 미만으로 팽윤될 수 있는 것을 특징으로 한다.

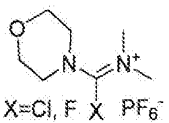
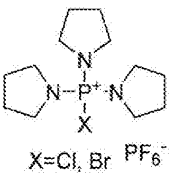
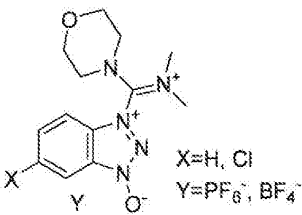
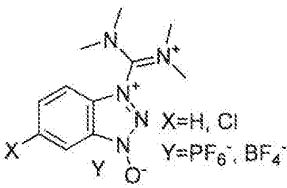
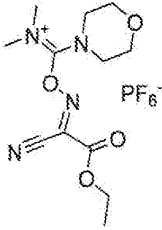
[0069] 본 발명의 일 구현예는 아미드-커플링을 적어도 활성화/커플링제 (CA)의 존재 하에서 수행한다. 본 발명의 일 양태에 따라서 커플링제는 임의로 N-히드록실아민-기반 커플링 첨가제, 우로늄 (아미늄) 기반 CA, 포스포늄 기반 CA, 산을 산 클로라이드로 전환시키는 화합물, 카르복실산을 상응하는 아실 플루오라이드로 전환시키는 화합물, 및 트리아진-기반 화합물의 존재 하에서, 카르보디이미드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0070] 본 발명의 추가 양태에 따라서, 커플링제는 디이소프로필카르보디이미드 (DIC), 디시클로헥실카르보디이미드 (DCC), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 (EDCxHCl) (임의로 커플링 첨가제 존재 하에 예컨대 1-히드록시벤조트리아졸 (HOBt), 6-클로로-1-히드록시벤조트리아졸 (Cl-HOBt), 1-히드록시-7-아자-벤조트리아졸 (HOAt), 2-히드록시피리딘-N-옥시드 (HOPO), 에틸 시아노히드록시이미노아세테이트 (Oxyrna), Oxyrna-B, N-히드록시숙신이미드 (HOSu), N-히드록시-5-노르보르넨-2,3-디카르복실산 이미드 (HONB), 헥사플루오로포스페이트 벤조트리아졸 테트라메틸 우로늄 (HBTU), 0-(벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트 [0-[N,N,N',N'-테트라메틸-0-(1H-벤조트리아졸-1-일)우로늄 헥사플루오로포스페이트] (TBTU), 0-[(에톡시카르보닐)시아노메틸렌아미노]-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트 (HOTU), 0-[(에톡시카르보닐)시아노메틸렌아미노]-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트 (TOTU), 0-(1H-6-클로로벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트 (HCTU), 0-(6-클로로벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트 (TCTU), 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리딘 3-옥시드 헥사플루오로포스페이트, 헥사플루오로포스페이트 아자벤조트리아졸 테트라메틸 우로늄 (HATU), 0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트 (TATU), 1-시아노-2-에톡시-2-옥소에틸리덴아미노옥시)디메틸아미노-모르폴리노-카르베늄 헥사플루오로포스페이트 (COMU), 1-[(디메틸아미노)(모르폴리노)메틸렌]-1H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-b]피리딘-1-이움 3-옥시드 헥사플루오로포스페이트 (HDMA), HDMB, 6-클로로-1-((디메틸아미노)(모르폴리노)-메틸렌)-1H-벤조트리아졸리움 (HDMC), 벤조트리아졸-1-일옥시트리스(디메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (BOP), (벤조트리아졸-1-일옥시)트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyBOP), [에틸 시아노(히드록시이미노)아세테이트-⁰]트리-1-피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyOxim), 6-클로로-벤조트리아졸-1-일옥시-트리스-피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyClock), N,N,N',N'-테트라메틸클로로포름아미디늄 헥사플루오로포스페이트 (TCFH), N-(클로로(모르폴리노)메틸렌)-N-메틸메탄아미늄 헥사플루오로포스페이트 (DMCH), 클로로트리피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (Pyclop), 테트라메틸플루오로포름아미디늄 헥사플루오로포스페이트 (TFFH), 테트라메틸암모늄 트리플루오로메탄티올레이트 ((Me₄N)SCF₃), 2-클로로-4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진 (CDMT), 2,4-디클로로-6-메톡시-1,3,5-트리아진 (DCMT), 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드 (DMTMMCl), 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 테트라플루오로보레이트 (DMTMMBF₄) 및 2-

(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아지닐)트리알킬암모늄 염 (DMT-Ams)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

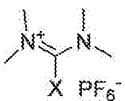
[0071] 또한 추가 양태에 따라서, 커플링제는 COMU, HDCM, 6-클로로-1-((디메틸아미노)(모르폴리노)-메틸렌)-1H-벤조트리아졸리움 핵사플루오로포스페이트 3-옥시드 (HDMC), 클로로-N,N,N',N'-테트라메틸포름아미디늄 핵사플루오로포스페이트 (TCFH), 및 테트라메틸플루오로포름아미디늄 핵사플루오로포스페이트 (TFFH)로 이루어진 군으로부터의 화합물로부터 선택된다.

[0072] 또 다른 양태는 하기 화학식의 구조를 갖는 화합물로 이루어진 군으로부터의 커플링제를 선택하는 것이다:



[0073]

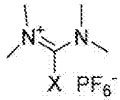
[0074] 및



[0075]

X=Cl, F

[0076] 본 발명의 추가 양태는 하기 화학식의 화합물로부터의 커플링제를 선택하는 것이다:



X=Cl, F

[0077]

[0078] **공용매**

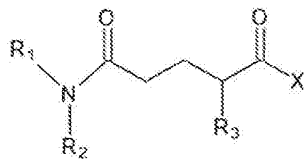
[0079] 방법의 기준을 충족하는, 즉, 적어도 4 mLg⁻¹로 수지를 또한 팽윤시키면서 Fmoc- α -아민 보호된 아미노산을 그 자체로 또는 그들 활성화된 형태로 충분히 용해시키는 수혼화성인 임의의 유기 공용매가 공용매로서 사용에 고려될 수 있다. 수성 용액은 또한 임의의 수 및 비율의 공용매를 포함할 수 있다. 쌍극성 비양자성 공용매가 특히 바람직하고, 특히 Fmoc 치환된 아미노산을 잘 용해시키는 쌍극성 비양자성 공용매이다.

[0080] 일 양태에 따라서, 공용매는 약 0,2 내지 약 0,5의 극성을 갖는다. 공용매의 극성의 하한값은 약 0,21, 약 0,22, 약 0,23, 약 0,24, 약 0,25, 약 0,26, 약 0,27, 약 0,28, 약 0,29, 약 0,30일 수 있다. 공용매의 극성의 상한값은 약 0,49, 약 0,48, 약 0,47, 약 0,46, 약 0,45, 약 0,44, 약 0,43, 약 0,42, 약 0,42, 약 0,40일 수 있다. 극성의 임의의 하한 및 상한 수준은 조합될 수 있다.

[0081] 일 양태에 따라서 공용매는 수혼화성 유기 공용매, 바람직하게 유기 극성 비양자성 공용매로서, 본 명세서에 개시된 상한 또는 하한 극성 값의 임의의 조합으로 제공되는 임의의 범위의 극성을 갖는 것을 추가의 특징으로 한다.

[0082] 바람직한 쌍극성 비양자성 공용매는 다음과 같다: RhodiaSolv® PolarClean (PC)로도 알려진 화합물의 혼합물의 우세한 성분으로서 또는 이의 순(순수) 형태로, N-메틸피롤리돈 (NMP), N-에틸피롤리돈 (NEP), N-프로필피롤리돈 (NPP), N-부틸피롤리돈 (NBP), N-펜틸피롤리돈 (NPeP), N-헥실피롤리돈 (NHP), N-헵틸피롤리돈 (NHep), N-옥틸피롤리돈 (NOP), 디메틸포름아미드 (DMF), 디에틸포름아미드 (DEF), 디프로필포름아미드 (DPF), N-포르밀피롤리딘 (NFP), N-포르밀모르폴린 (NFM), N-메틸카프로락탐 (MCL), 1,3-디메틸-2-이미다졸리딘 (DMI), 1,3-디메틸-3,4,5,6-테트라히드로-2-피리미딘 (DMPU), 디메틸설폭사이드 (DMSO), 디에틸설폭사이드 (DESO), 술폴란, (1R)-7,8-디옥사바이시클로[3.2.1]옥탄-2-온 (디히드로레보글루코세논, cyrene®), N,N-디메틸아세트아미드 (DMA), N,N,N',N'-테트라에틸 설페아미드 (TES), 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 클로라이드 (BMIMCl), 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 브로마이드 (BMIMBr), 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 요오다이드 (BMIMI), 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 테트라플루오로보레이트 (BMIMBF₄), 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트.

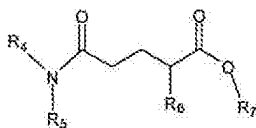
[0083] 본 발명의 일 양태에 따라서, 유기 공용매는 하기 화학식 (1)의 구조를 갖는 공용매 또는 이의 혼합물로부터 선택된다:



[0084]

[0085] 상기 식에서, R1, R2, 및 R3은 1 내지 3개 탄소 원자를 갖는 알킬로부터 독립적으로 선택되고, 단 X가 산소 원자라면, 1 내지 3개 탄소 원자를 포함하는 1개 알킬 기는 산소 원자에 결합하거나; 또는 단 X가 질소 원자라면, 2개 알킬 기는 질소 원자에 결합되고; 알킬 기(들)는 1 내지 3개 탄소 원자로부터 독립적으로 선택된다.

[0086] 추가 양태에 따라서, 유기 공용매는 하기 화학식 (2)의 구조를 갖는 공용매로부터 선택된다:



[0087]

[0088] 상기 식에서, R4, R5, R6 및 R7 은 1 내지 3개 탄소 원자를 갖는 알킬로부터 독립적으로 선택된다. 일 양태에 따라서 화학식 (2)의 구조의 R4, R5, R6 및 R7 은 메틸이다.

[0089] 공용매는 용액의 총 부피를 기반으로 바람직하게 10% v/v과 90% v/v 사이, 바람직하게 20% v/v와 50% v/v 사이의 임의 비율로 수성 용액에 존재할 수 있다.

[0090] 일 양태에 따라서 공용매는 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트를 포함한다. 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트는 상업적으로 입수가능한 용매 PolarClean® 또는 Rhodiasolv PolarClean®의 주요 성분이다. 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트를 포함하는 공용매는 2-메틸글루타로니트릴 (부타디엔의 히드로시안화 동안의 부산물)에서 출발하는 공정에 의해 형성될 수 있다. 2-메틸글루타로니트릴은 가수분해를 겪어서 2-메틸글루타르산을 생산하고, 이것은 고리화되어서 2-메틸글루타르산 무수물을 형성한다. 상이한 순서로 2개 카르보닐 기의 에스테르화 및 아미드화는 궁극적으로 주로 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트뿐만 아니라 또한 메틸 4-(디메틸아미노)-2-에틸-4-옥소부타노에이트의 위치 이성질체 및 보다 적은 양으로 2-N,N,N',N'-펜타메틸글루타르아미드 및 디메틸 2-메틸글루타레이트의 형성을 야기한다.

[0091] PolarClean®은 약 80-90 wt%의 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트, 6-12 wt%의 메틸 4-(디메틸아미노)-2-에틸-4-옥소부타노에이트의 위치이성질체, 3-7 wt%의 2-N,N,N',N'-펜타메틸글루타르아미드 및 0.5-3 wt%의 디메틸 2-메틸글루타레이트를 함유한다.

[0092] 추가 양태에 따라서 공용매는 80-90 wt%의 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트, 6-12 wt%의 메틸 4-(디메틸아미노)-2-에틸-4-옥소부타노에이트의 위치이성질체, 3-7 wt%의 2-N,N,N',N'-펜타메틸글루타르아미드 및 0.5-3 wt%의 디메틸 2-메틸글루타레이트를 포함한다.

[0093] **커플링제**

[0094] 아미드 결합 형성 반응을 위한 커플링제로서 여겨지는 임의의 공정 보조제 (참조: 예를 들어, Chem. Rev. 2011, 111, 6557-6602)는 본 발명의 수성 SPPS에서 사용에 고려될 수 있다. 보다 특히 대규모 펩티드 제조와 관련하여, 대규모 적용에 적합하고 (참조: 예를 들어, Org. Process Res. Dev. 2016, 20, 140-177), 적합한 열 안정성 프로파일을 갖는 (참조: 예를 들어, Org. Process Res. Dev. 2018, 22, 1262-1275) 펩티드 커플링 시약의 사용이 특히 유리하다. 추가로, 수성 용액에서 적절하게 작용하는 것으로 확인된 펩티드 커플링 시약 (참조: 예를 들어, Tetrahedron Lett. 2017, 58, 4391-4394)은 본 발명의 수성 SPPS에서 사용에 특히 유리하다. 상기 펩티드 커플링제는 예를 들어, N-히드록실아민 기반 화합물 예컨대 트리아졸 1-히드록시-벤조트리아졸 (HOBt), Cl-HOBt, 1-히드록시-7-아자-벤조트리아졸 (HOAt), 2-히드록시피리딘-N-옥시드 (HOPO), 에틸 시아노히드록시이미노아세테이트 (Oxyrna), 5-(히드록시이미노)1,3-디메틸피리미딘-2,4,6-(1H,3H,5H)-트리온 (Oxyrna-B), HOSu 및 N-히드록시-5-노르보르넨-엔도-2,3-디카르복시이미드 (HONB)를 기반으로 하는 소위 커플링 첨가제의 존재 하에서, 또는 그 자체로, 카르보디이미드 예컨대 디이소프로필카르보디이미드 (DIC), 디시클로헥실카르보디이미드 (DCC) 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 (EDC)xHCl를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 추가로, 임의의 소위 우로늄 (아미디늄) 커플링제, 예를 들어, HBTU, TBTU, HOTU, TOTU, HCTU, TCTU, HATU, TATU, COMU, HDMA, HDMB, HDMC가 역시 수성 SPPS에서 사용될 수 있다. 더 나아가서, 포스포늄 시약 예컨대 BOP, PyBOP, PyOxim 및 PyClock이 역시 사용될 수 있다. 또한, 산을 산 클로라이드로 전환시키는 임의의 시약 (참조: 예를 들어, Tetrahedron 2015, 71, 2785-2832), 예를 들어 TCFH, DMCH 및 PyClOP가 역시 이용될 수 있다. 또한, 카르복실산을 상응하는 아실 플루오라이드로 전환시키는 공정 보조제 예컨대 TFFH 및 테트라메틸암모늄 트리플루오로메탄티올레이트 ((Me₄N)SCF₃) (Org. Lett. 2017, 19, 5740-5743)가 역시 본 발명의 수성 SPPS에서 사용될 수 있다. 또한, 트리아진 기반 커플링 시약 예컨대 CDMT, DMTMMCl, DMTMMBF₄ 및 DMT-Ams (Molecules, 2021, 26, 191)가 역시 사용될 수 있다. 당업자는 상기 커플링제가 본 발명의 수성 SPPS의 상황에서 펩티드 결합 형성의 속도 또는 화학선택성을 증강시키기 위해서 임의의 다른 커플링제와 조합하여 사용될 수 있다는 것을 알게 될 것이다. 더 나아가서, 당업자는 또한 상기 커플링제가 수성 Fmoc/t-Bu SPPS의 상황에서 Fmoc α-아미노 치환된 아미노산을 제자리에서 (즉, SPPS에서) 성장하는 펩티드 사슬의 아미노 말단과 반응할 수 있는 그들의 활성화된 대응물로 전환시킴으로써 뿐만 아니라, 또한 활성화된 종이 적합한 용액 중에서 미리만들어진 별도 용기에서 사용될 수 있고, 수성 Fmoc/t-Bu SPPS의 상황에서 그 자체로 사용되거나, 또는 활성화된 α-아미노 치환된 종을 분리할 수 있고, 상기 활성화된 종이 이어서 SPPS 반응기에, 그 자체로 또는 적절한 공용매(들)와 물의 적합한 용액으로, 첨가될 수 있다는 것을 알게 될 것이다.

[0095] **커플링 첨가제**

[0096] 커플링 첨가제는 아마이드 결합 형성의 속도, 아마이드 결합 형성의 화학선택성, 또는 둘 모두를 증가시키려는 목적으로 커플링제와 함께 사용되는 임의 시약이다. 수많은 표준 커플링 첨가제가 본 발명에서 고려될 수 있고 (참조: 예를 들어, Chem. Rev. 2011, 111, 6557-6602), 특히 히드록실아민-기반 커플링 첨가제 예컨대 HOBt, C1-HOBt, HOAt, 2-히드록시피리딘-N-옥시드 (HOPO), Oxyma, Oxyma-B, HOSu 및 HONB 또는 2-머캅토벤조티아졸 (2-MBT)이 사용될 수 있다.

[0097] **커플링 염기**

[0098] 더 나아가서, 당업자는 Fmoc- α -아미노 치환된 아미노산을 그들 활성화된 대응물로 전환시키는 상기 언급된 수단이 수성 Fmoc/t-Bu SPPS의 상황에서 아마이드 결합 형성 반응의 속도 및/또는 화학선택성에 유리한 효과를 가질 수 있는 임의의 유기 또는 무기 염기 또는 이의 조합의 존재 하에서, 또는 임의의 염기 부재 하에서 수행될 수 있다는 것을 알게 될 것이다.

[0099] 따라서, 추가 구현예에 따라서, 아마이드 커플링은 염기 존재 하에서 수행된다.

[0100] 일 양태에 따라서 염기 (커플링 염기)는 피리딘의 알킬 유도체로부터 선택된다. 보다 특히, 염기는 피리딘의 알킬, 디알킬 및 트리알킬 유도체로부터 선택되고, 알킬은 1 내지 3개 탄소 원자를 포함하고, 바람직하게 알킬은 1 또는 2개 탄소 원자를 포함한다. 바람직하게, 알킬은 메틸이다. 염기는 피리딘의 메틸 유도체로부터 선택될 수 있다. 염기는 피롤린, 루티딘 및 콜리딘 및 이의 임의의 위치이성질체로부터 선택될 수 있다.

[0101] 추가 양태에 따라서, 염기는 콜리딘 및 이의 임의의 위치이성질체로부터 선택된다.

[0102] 상기 염기는 지방족 아민 예컨대 디소프로필에틸아민 (DIEA) 및 N-메틸모르폴린 (NMM), 방향족 아민 예컨대 피리딘, 피롤린 (2-메틸피리딘 또는 이의 임의의 위치이성질체), 루티딘 (2,6-디메틸피리딘 또는 이의 임의의 위치이성질체), 콜리딘 (2,4,6-트리메틸피리딘 또는 이의 임의의 위치이성질체), 이미다졸 또는 N-메틸이미다졸 (NMI) 및 무기 염기 예컨대 예를 들어, 임의의 포스페이트, 카보네이트, 술페이트, 아세테이트, 보레이트 예를 들어, 그들의 리튬, 소듐, 포타슘, 칼슘 또는 테트라알킬암모늄 형태를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 상기 언급된 커플링제 및 염기가 수성 Fmoc/t-Bu SPPS의 상황에서 적합한 속도 및 화학선택성을 얻는다는 관점에서 임의의 비율 및 당량 및 임의 온도에서 Fmoc α -아미노 치환된 아미노산과 조합될 수 있다는 것을 알게 될 것이다. 상기 아마이드 결합 형성 공정을 위한 반응 시간은 수 초 내지 16시간, 보다 바람직하게 10분 내지 2시간일 수 있다. 필요하다면, 아마이드 결합 형성 단계는 반복 (소위 재커플링)될 수 있고, 적절하게 여겨지면, 아마이드 결합 형성 반응은 소위 캡핑 반응을 수행하여 종료될 수 있으며, 여기서 불용성 중합체 결합된 펩티드 수지 상의 임의의 잔류하는 유리 아미노기는 임의의 적합한 커플링제의 존재 하에서, 적합한 유기 산 무수물 예컨대 아세트산 무수물 또는 적합한 유기 산 예컨대 아세트산 또는 페닐아세트산의 형태로 적합한 캡핑제에 의해서 캡핑된다.

[0103] **표면 활성화제, 계면활성제**

[0104] 본 발명의 일 구현예에 따라서, 표면 활성 화합물 (계면활성제)은 펩티드 결합의 형성 동안 또는 일시적 α -아미노 보호기의 제거 동안 수성 용액에 존재할 수 있다. 유용한 계면활성제는 PEG를 포함하는 비이온성 표면 활성 화합물 예컨대 (2R)-2,5,7,8-테트라메틸-2-[(4R,8R)-4,8,12-트리메틸트리데실]-3,4-디히드로-2H-1-벤조피란-6-올 (α -토코페롤) 또는 폴리(옥시-1,2-에탄디일), α -[[[(2S)-1-(1-옥소도데실)-2-피롤리디닐]카르보닐]- ω -메톡시-(PS-750-M)로부터 유래되는, 폴리에틸렌 글리콜 p-(1,1,3,3-테트라메틸부틸)-페닐 에테르 (triton-x) 기반의 계면활성제를 포함한다. 계면활성제는 사용되는 물의 양을 기반으로 10% v/v 미만의 양으로, 바람직하게 사용되는 물의 양을 기반으로 <5% v/v로 수성 용액에 존재할 수 있다.

[0105] **수지**

[0106] 본 발명의 한 목적은 유기 용매, 특히 위험한 유기 용매의 감소이다. 유기 용매를 감소시키기 위한 수단은 유기 공용매를 포함하는 수성 용액의 도입이다. 본 발명에 따라서 선택된 수지는 수성 용액 중에서 적어도 4 mLg⁻¹의 팽윤성을 갖는다. 일 양태에 따라서 수지는 예를 들어, 수지로부터 펩티드를 절단하는데 사용되는 수성 용액 중에서 적어도 4 mLg⁻¹이지만 10 mLg⁻¹ 미만의 팽윤성을 갖는다.

[0107] 본 명세서에 개시된 바와 같은 팽윤 특징, 즉 선택된 수성 용액 중에서 약 4 ml/g 초과의 팽윤 특징을 갖는 다양한 수지가 구현될 수 있다.

- [0108] 일 양태에 따라서 수지는 스티렌-기반 수지, 아미드-기반 수지 예컨대 폴리아크릴아미드-기반 수지 (즉, 아미드기를 포함하는 중합체), 폴리에틸렌 기반 수지, 아크릴레이트 기반 수지, 아크릴레이트 에톡실레이트 기반 수지, 아미노산 기반 수지 및 에틸렌 아미드 기반 수지, 폴리에스테르-기반 수지, 폴리에테르-기반 수지, 아크릴아미드-기반 수지로부터 선택된다.
- [0109] 폴리아크릴아미드 기반 수지는 또한 적어도 3개의 결합 부위를 포함하는 중합된 아미노산을 포함하는 수지를 포함한다. 이러한 아미노산-기반 수지는 리신 유사체 예컨대 디아미노프로피온산, 디아미노부티르산 및 디아미노펜탄산, 디아미노헥산산 중 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0110] 또 다른 양태에 따라서, 수지는 친수성 잔기를 포함하고, 적절하게 수지는 본 명세서에 개시된 수성 용액 중에서 약 4 ml/g 초과로 수지를 팽윤시킬 수 있는 비율로 친수성 잔기를 포함한다. 적절한 소수성 단량체 또는 올리고머는 알킬렌 글리콜 및 폴리알킬렌 글리콜 예컨대 에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜이다. 친수성 잔기 (단량체(올리고머)는 수지의 총 중량을 기반으로 약 30% 초과, 약 40% 초과, 약 45% 초과, 약 50% 초과, 약 60% 초과, 약 65% 초과)의 비율로 친수성 잔기를 포함하는 수지에 존재한다. 일부 수지는 약 95 wt% 초과, 약 99 wt% 초과)의 비율로 친수성 잔기를 포함한다. ChemMatrix®는 99 wt% 초과)의 PEG를 포함하는 폴리에틸렌 글리콜 수지의 일례이다.
- [0111] 종종 수지는 적절한 올리고머 및/또는 중합체 (예를 들어, PEG)에 의해 화학적으로 변형될 수 있는, 코어 중합체 매트릭스, 및 링커를 포함한다. 예를 들어, 폴리스티렌 기반 수지 (및 임의의 다른 언급된 유형의 수지)는 본질적으로 폴리스티렌을 포함하는 코어 중합체 매트릭스를 포함하는 수지로서 이해되어야 한다.
- [0112] 추가 양태에 따라서 임의의 본 명세서에 개시된 수지 유형의 코어 또는 수지 매트릭스는 소수성 모이어티 예컨대 친수성 단량체, 올리고머 및/또는 중합체에 의해 변형된다. 예시적인 친수성 모이어티는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다.
- [0113] 또한 추가 양태에 따라서 본 명세서에 개시된 임의의 수지 유형의 중합체 매트릭스는 가교된다. 예를 들어, 폴리스티렌 기반 수지는 바람직하게 0.2 mol% 내지 5 mol% DVB의 양으로 디비닐벤젠 (DVB)과 가교된다.
- [0114] 또한 추가 양태에 따라서 수지는 PEG를 포함한다. 올리고머 및/또는 중합체로서 존재하는 PEG는 중합체 매트릭스 상에 그래프트될 수 있다. PEG 모이어티는 약 250 g/mol 내지 약 10000 g/mol, 전형적으로 약 300 g/mol 내지 약 5000 g/mol의 분자량을 갖는 소수의 PEG 단량체/단위 내지 수백개 단량체를 포함할 수 있다.
- [0115] 추가 양태에 따라서 수지는 가교된 폴리스티렌 매트릭스 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 공중합체로부터 선택된다. 적절하게, PEG는 바람직하게 에틸 에테르기를 통해서 매트릭스에 그래프트된다.
- [0116] 아미노산 기반 수지는 디카르복실산, 예를 들어, 세박산과 적절하게 가교된 폴리-3-리신 기반 수지를 포함한다.
- [0117] 폴리에틸렌 기반 수지는 본질적으로 PEG (PEG-단위/단량체) 예컨대 ChemMatrix® 및 NovaPEG로 이루어지는 중합체 매트릭스를 포함하는 수지를 포함한다.
- [0118] PEG를 포함하는 수지는 폴리스티렌, 폴리아크릴아미드, 또는 에틸렌 아미드를 기반으로 하는 중합체 매트릭스를 포함할 수 있다. PEG를 포함하는 예시적인 수지는 NovaSyn® TG 수지, PEGA 수지, 및 가교된 에톡실레이트 아크릴레이트 수지 (CLEAR) 수지이다. 일 양태에 따라서 수지는 트리메틸올프로판 에톡실레이트 트리아크릴레이트의 중합으로 수득된 중합체 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하는 중합체로부터 선택된다.
- [0119] 또한 추가 양태에 따라서 수지는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하는 중합체로부터 선택된다. 수지는 적절하게 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하는 공중합체이다.
- [0120] 추가 양태에 따라서 수지는 폴리스티렌 (PS) 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하는 공중합체로부터 선택된다. 적절한 수지는 또한 폴리스티렌 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하는 미립자 형태의 중합체로서 정의될 수 있다.
- [0121] 일 양태에 따라서 수지는 폴리스티렌 및 PEG를 포함하는 수지로서, PEG는 수지의 총 중량을 기반으로 약 40% 초과, 약 45% 초과, 약 50% 초과, 약 60% 초과, 약 65% 초과)의 비율로 존재한다. 폴리스티렌 및 PEG를 포함하는 수지는 수지의 총 중량을 기반으로 약 95% 미만, 적절하게 수지의 총 중량을 기반으로 약 90% 미만, 약 85% 미만의 비율로 PEG를 갖는다.
- [0122] 추가 양태에 따라서 수지는 폴리스티렌 상에 그래프트된 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하는 가교된 폴리스티렌으로부터 선택된다. 이들 수지는 또한 폴리스티렌 (PS) 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 그래프트 공중합체라고

할 수 있다.

- [0123] 폴리스티렌 (PS) 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 그래프트 공중합체는 전형적으로 가교된 폴리스티렌의 코어 또는 매트릭스를 갖는다. PS 매트릭스는 변형되어서 PEG 모이어티를 도입시킬 수 있고, 예를 들어, POE-PS라고 하는, 음이온 그래프트 공중합 예컨대 테트라에틸렌 글리콜 상에 에틸렌 옥사이드의 음이온 그래프트 중합에 의해서, 또는 $N\omega$ -Boc 또는 Fmoc-폴리에틸렌 글리콜 산 또는 폴리에틸렌 글리콜 이산을 아미노 작용화된 폴리스티렌 (PEG:PS)에 커플링시켜서, PS 매트릭스에 PEG를 그래프트할 수 있다. 최종 PS-PEG 공중합체는 PEG가 그래프트/연결된 PS-매트릭스를 포함한다.
- [0124] PEG는 링커를 통해서 폴리스티렌 골격에 적합하게 부착된다. 이러한 링커는 알킬 및/또는 벤질 에테르로부터 선택될 수 있다.
- [0125] 수지 매트릭스 예컨대 PS는 적합하게 약 1000 내지 약 5000 달톤, 약 1500 내지 약 4500 달톤, 약 2000 내지 약 4000 달톤 범위의 평균 분자량을 갖는 PEG로 그래프트된다. 수지 매트릭스 예컨대 PS-PG 그래프트 공중합체는 40 내지 80% (w/w), 적합하게 50 내지 70%의 양으로 PEG를 포함할 수 있다.
- [0126] 수지에 결합된 펩티드 단편은 링커에 의해서 수지에 공유적으로 결합된 펩티드 단편을 포괄한다. 링커는 산-불안정성이 바람직함에도, 링커가 산 조건 하에서 펩티드 단편의 절단을 촉진한다는 것을 의미한다.
- [0127] 가장 일반적으로 사용되는 링커 예컨대 Rink, Rink 아미드, Ramage, Sieber, 2-클로로트리틸 클로라이드, 4-메틸벤즈히드릴, Wang, 히드록시메틸벤조일 (HMBA), 히드록시메틸페녹시아세틸 (HMPA) 및 히드라지노벤조일 (HZB)를 포함하여, 다양한 링커가 수성 Fmoc (t-Bu) SPPS에 사용될 수 있다. 당업자는 Fmoc/t-Bu SPPS에 일반적으로 사용되는 임의의 링커 (참조: 예를 들어, Chem. Rev. 2000, 100, 2091-2158)가 본 명세서에 개시된 수성 Fmoc/ SPPS에 사용될 수 있다는 것을 알게 될 것이다.
- [0128] **수지로부터 미정제 펩티드의 절단**
- [0129] Fmoc/t-Bu SPPS의 일 양태는 불용성 중합체 지지체로부터 표적 펩티드의 탈착이다. 소정 표적 분자의 합성 상황에서 사용되는 합성 전략에 따라서, 지지체로부터 펩티드의 이러한 탈착은 아미노산 측쇄 보호기의 제거가 동반될 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있다. 각각 통상적인 Fmoc/t-Bu SPPS 및 수성 Fmoc/t-Bu SPPS로부터 얻어지는 최종 펩티드 수지가 비슷한 속성이므로, 표준 Fmoc/t-Bu SPPS에서 불용성 지지체로부터 펩티드의 탈착에 사용되는 임의의 방법 또는 프로토콜 (J. Pept. Sci. 2016, 22, 4)은 본 명세서에 개시된 수성 SPPS의 상황에서 사용될 수 있다. 전형적으로, 합성 순서의 완료 시에 수성 Fmoc/t-Bu SPPS로부터의 펩티드 수지는 무해 유기 용매 (예컨대, 알콜 예컨대 i-PrOH, 에테르 예컨대 디에틸에테르 또는 알칸 예컨대 헵탄 또는 석유 에테르)를 사용해 철저히 세척되고, 향량으로 진공 건조되고, 이렇게 얻어진 수지는 절단 동안 형성된 임의의 반응성 종을 차단하기 위해 사용되는 다양한 공정 보조제 (소위 스캐빈저)의 존재 하에서 적합한 유기 산 예컨대 트리플루오로아세트산 (TFA)에 의해 절단된다. 이후에, 표적 미정제 펩티드는 예를 들어, 적합한 반응매 예컨대 예를 들어, Et₂O, i-Pr₂O, tert-부틸 메틸 에테르 (MTBE), 시클로헥실 메틸 에테르 (CPME), 2-메틸테트라하이드로퓨란 (2-MeTHF), 4-메틸테트라하이드로피란 (4-MeTHP), EtOAc, 헥산, 헵탄, 석유 에테르(들) 또는 임의의 조합을 사용하는 침전을 통해서 분리된다. 대안적으로, 표적 미정제 펩티드는 예를 들어, 소정 표적 펩티드의 물리화학적 속성의 관점에서 적절하다고 여겨지는 대로 적합한 수산화성 유기 공용매 예컨대 아세토니트릴 (MeCN), EtOH 또는 이소프로필 알콜 (i-PrOH)이 첨가될 수 있는 적합한 강도의 적합한 염 예컨대 예를 들어, 암모늄 아세테이트 또는 암모늄 포르메이트의 수성 용액을 사용하여, 산 절단 용액을 함유하는 표적 펩티드를 적합하게 중화시켜서 분리될 수 있다.
- [0130] **Fmoc 탈보호**
- [0131] Fmoc α-아미노 보호기의 반복적인, 고수율 및 고도의 화학선택적 제거는 임의의 성공적인 Fmoc/t-Bu SPPS 방법론의 중요한 측면이다 (J. Pept. Sci. 2016, 22, 4). 상기 Fmoc 제거는 다양한, 전형적으로 염기성, 공정 보조제에 의해 실행될 수 있고, 수성 Fmoc/t-Bu SPPS의 상황에서, 임의의 이들 공정 보조제 또는 임의의 조합이 사용될 수 있다.
- [0132] 일 양태에 따라서 Fmoc 기는 2차 환식 아민 및 2차 비-환식 아민으로부터 선택되는 Fmoc 제거 화합물의 적용에 의해 절단된다.
- [0133] Fmoc 제거 화합물은 또한 단환식 2차 아민 및 보다 특히 질소 원자가 환형 고리 구조의 일부를 형성하는 단환식 2차 아민으로부터 선택될 수 있다.

[0134] Fmoc 제거 화합물은 또한 피페리딘, 4-메틸피페리딘, 3-메틸피페리딘, 2-메틸피페리딘, 모르폴린, 피페라진, 피롤리딘으로부터 선택될 수 있다.

[0135] 이들 공정 보조제는 피페리딘, 4-메틸피페리딘, 3-메틸피페리딘, 2-메틸피페리딘, 모르폴린, 피페라진, 피롤리딘, 디에틸아민, 1,8-디아자바이시클로[5.4.0]운데크-7-엔 (DBU), 테트라부틸암모늄 플루오라이드 (TBAF), 에탄올아민, 암모니아, 리튬 히드록시드, 소듐 히드록시드 및 포타슘 히드록시드를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 추가로 유용한 염기는 4-(아미노메틸)피페리딘 (4-AMP) 및 tris(2-아미노에틸)아민 (TAEA) 2-(아미노에톡시)에탄올 (AEE)을 포함한다. 당업자는 상기 언급된 Fmoc 탈보호제가 사용될 수 있거나 또는 불용성 중합체 지지체 상에서 성장하는 펩티드의 몰량과 비교하여 임의의 당량으로 조합될 수 있다는 것을 알게 될 것이고, 당업자는 또한 Fmoc 탈보호제(들)가 Fmoc 탈보호 반응의 속도 및 화학선택성 관점에서 적절하다고 여겨지면 Fmoc 탈보호 과정 전반에서, 또는 시작 시 한번에 모두가 첨가될 수 있고, 상기 Fmoc 탈보호는 Fmoc 탈보호 전환 및 화학선택성 관점에서 적절하게 여겨지는 임의 온도에서 수행될 수 있다는 것을 알게 될 것이다.

상기 탈보호의 반응 시간은 수 초 내지 약 60분, 바람직하게 약 1분 내지 약 30분으로 다양할 수 있다. 추가로 특히 상기 Fmoc 탈보호의 화학선택성 관점에서, Fmoc 탈보호 반응의 과정 전반에서 전형적으로 발생하는 부반응을 억제하는데 통상적으로 사용되는 임의의 방법 또는 접근법이 수성 Fmoc/t-Bu SPPS의 상황에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 아스파티미드 관련 불순물의 형성에 집중되는 Fmoc/t-Bu SPPS의 광범위한 일반적인 부반응의 발생 (참조: 예를 들어, Tetrahedron 2011, 67, 8595-8606)은 예를 들어, 산 작용제, 예컨대 HOBt, Oxyma 또는 포름산의 첨가 (Org. Lett. 2012, 14, 5218-5221), Fmoc 탈보호에 대한 공정 보조제로서 더 약한 염기 예컨대 피페라진의 사용 (Lett. Pept. Sci., 2000, 7, 107-112, RSC Adv., 2015, 5, 104417-104425), 적절하게 측쇄 보호된 Fmoc-Asp(X)-OH 유도체 예컨대 Fmoc-Asp(OBno)-OH (J. Pept. Sci. 2015, 21, 680-687) 또는 (S,Z)-4-(((9H-플루오렌-9-일)메톡시)카르보닐)아미노-4-카르복시-1-시아노-1-(디메틸솔포니오)부트-1-엔-2-올레이트 (Fmoc-Asp(CSY)-OH)의 사용 (Nature Comm. 2020, 11, 982) 또는 골격 보호된 디펩티드 예컨대 Fmoc-Asp(OtBu)-(Dmb)AA-OH 또는 Fmoc-Asp(OtBu)-(Hmb)AA-OH를 함유하는, 적합한 Fmoc-Asp(OtBu)-OH의 사용을 통해서 억제될 수 있다. 더 나아가서, 당업자는 Fmoc 기의 제거는 Fmoc 탈보호 반응 과정 동안 방출되는 디벤조플렌 (DBF)을 청소하게 되는 적합한 공정 보조제에 의해 보조될 수 있고, Fmoc 탈보호 반응 동안 방출되는 DBF의 청소에 효율적인 유용한 작용제는 전형적으로 티올 예컨대 DTT, 티오페놀, 티오살리실산 (Tetrahedron Lett. 2000, 41, 5329), 1-옥탄에티올 (J. Peptide Sci. 2002, 8, 529-542), DODT, N-아세틸 시스테인, 머캅토 프로피온산 (Angew. Chem. Int. Ed. 2017, 56, 7803-7807) 또는 티오말산 (Angew. Chem. Int. Ed. 2021, 60, 7786-7795)이라는 것을 알게 될 것이다.

[0136] **세척**

[0137] 본 명세서에 상술되는 바와 같이, SPPS는 반복적 사이클을 포함하고, 사이클은 세척 단계를 포함한다. 임의의 Fmoc/t-Bu SPPS 방법론의 한 측면은 Fmoc/t-Bu SPPS 동안 대부분의 용매 소비가 상기 언급된 세척 단계 동안 일어나므로, Fmoc 탈보호와 커플링 사이의 세척을 비롯하여 커플링과 Fmoc 탈보호 사이의 세척을 수행하는 방법이다. 수성 Fmoc/t-SPPS의 한가지 장점은 용매 전형적으로 세척 매질로서 사용되는 위험한 용매 (예를 들어, DMF 및 NMP)가 상기 명시된 바와 같은 적절한 공용매(들)와 조합하여 사용되는, 온화하고 저렴한 물로 대체된다는 것이다. 당업자는 세척에 사용되는 물/공용매(들) 비율이 세척 효율을 최적화할 뿐만 아니라 세척 비용을 최소화하기 위해서 각각 커플링 및 Fmoc 제거에서 사용되는 물/공용매(들) 비율과 서로 다를 수 있고, 상기 간헐적 세척은 높은 세척 효율 및 최소화된 비용을 달성한다는 관점에서 임의 온도에서 수행될 수 있다는 것을 알게 될 것이다. 또한, 당업자는 세척 효율을 증가시키기 위해서 세척 용액에 다양한 염, 산 및 염기를 첨가할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 언급된 세척은 최적 세척 효율을 얻기 위해서, 회분식, 흐름식 또는 이의 임의 조합으로 수행될 수 있다는 것을 알게 될 것이다. 더 나아가서, 당업자는 임의 유형의 정제수, 증류수 또는 일반수가 수성 Fmoc/t-Bu SPPS의 상황에서 사용될 수 있다는 것을 알게 될 것이다. 또한, 세척 단계는 커플링 및 탈보호에 선택된 작업 조건 및 예상 순도에 따라서, 몇몇 회분식 세척의 반복부터 수지의 단순 배수까지 다양하게, 다소간 집약적일 수 있다. 커플링 이후 세척은 편리하게 생략될 수 있고, 예를 들어, 잔류 활성화된 아미노산 유도체 및 캡핑제의 켄칭으로 대체될 수 있다 (Green Chem. 2019, 21, 2594-2600). 원 포트 커플링/탈보호는 당업자에게 공지된 일정 조건 하에서 가능하다 (W02017/070512).

[0138] **재생**

[0139] 본 발명의 추가 구현에는 본 명세서에 기술된 고체상 펩티드 합성 방법으로부터 발생하는 소모된 용액의 재생을 위한 과정에 관한 것이다. 소모된 반응 용액이란 표적 펩티드를 형성하는 반복 사이클 과정 동안 수지로부터

터 분리된 임의 용액을 의미한다.

- [0140] 보다 특히, 재생 과정은 본 명세서에 개시된 Fmoc SPPS의 다양한 단계에 부정적으로 영향을 미칠 수 있는 본질적으로 모든 염기 및 산 화합물을 제거할 수 있는 단위 작업을 포함한다. 본질적으로 모든이란 Fmoc SPPS의 다양한 단계에 부정적으로 영향을 미칠 수 있는 염기 및 산 화합물의 적어도 약 80 wt%, 보다 특히 적어도 약 90 wt%, 적합하게 적어도 약 95 wt%, 전형적으로 적어도 약 99 wt%를 의미한다.
- [0141] 단위 작업은 증류, 여과, 막 분리 및 이온 교환 중 어느 하나 또는 조합을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0142] 적합하게, 재생 과정은 전하를 기반으로 하는 제거/분리인, 이온 교환을 포함한다. 바람직하게, 이온 교환은 음이온 및 양이온 작용기를 포함하는 수지를 포함한다. 이온 교환은 음이온 및 양이온 작용기를 포함하는 적어도 하나의 수지를 포함할 수 있다. 그러나, 이온 교환은 또한 음이온 작용기가 없이 양이온 작용기를 포함하는 하나의 제1 수지, 및 양이온 기를 갖지 않지만 음이온 작용기를 포함하는 하나의 제2 수지의, 적어도 2종 수지를 포함할 수 있다.
- [0143] 수성 유기 합성으로 생산된 폐기물의 관리는 도전적이다 (Org. Process Res. Dev. 2021, 25, 900-915). 그러므로, 수성 SPPS의 상황에서 형성된 폐기물의 재활용 및 재사용을 위한 단순하고, 저렴하며, 에너지 효율적인 과정의 개발은 진정한 친환경적이고, 비용-효율적인 수성 펩티드 합성 방법론을 가능하게 하는데 가장 중요하다. 이러한 목적을 위해서, 수성 Fmoc/t-Bu SPPS의 영역 내에서 생성되는 액체 폐기물은 단순한 합성 후 처리 방법론에 의해 재활용되고, 이 때 최종 수성 용액은 버진 수성 용매에서 생성된 미정제 펩티드와 비교하여 재활용된 폐기물에서 생성된 미정제 펩티드에 대한 임의의 부정적 효과없이 수성 Fmoc/t-Bu SPPS에서 재사용된다는 개념을 고안하였다 (도 2). 특히, 수성 SPPS 폐기물을 적합한 이온 교환 (IEX) 고정상(들)을 통해 통과시키는 방법론이 개발되었고, 이러한 처리 단계는 수성 Fmoc/t-Bu SPPS 방법의 다양한 단계를 파괴할 수 있는 모든 산을 비롯하여 염기성 화합물을 제거한다. 보다 특히, 수성 폐기물은 양이온 교환 (CEX) 및 음이온 교환 (AEX) 수지 또는 혼합 IEX 수지를 통해 통과된다. 이후에, 유기 공용매의 함량은 폐기물이 IEX 수지(들)를 통해 통과할 때 변화될 수 있으므로, 유기 공용매의 함량은 물/공용매 비율이 수성 Fmoc/t-Bu SPPS에서 사용되는 버진 물/공용매 혼합물에서와 동일하도록 조정된다. 이렇게 처리된 SPPS 폐기물 스트림은 이후에 임의의 추가 처리 또는 조작없이 합성에서 재사용된다. IEX 고정상은 IEX 보조된 펩티드 및 단백질의 하류 처리에서 통상적인 방법에 의해서 재조건화되고, 이렇게 재조건화된 IEX 고정상은 수성 Fmoc/t-Bu SPPS로부터의 폐기물 스트림을 재활용하는데 다시 사용된다. 대안적으로, 수성 Fmoc/t-Bu SPPS에서 생성된 폐기물 스트림은 수성 폐기물의 재활용에서 통상적으로 사용되는 다른 방법에 의해서, 예를 들어, 증류 기반 방법론 (참조: 예를 들어, Molecules, 2020, 25, 5264) 및 막 분리 (참조: 예를 들어, ACS Macro Lett. 2020, 9, 1709) 기술을 사용하여 재활용될 수 있다.
- [0144] 재생 과정은 Fmoc SPPS에서 성공적으로 사용될 수 있는 재생된 수성 용액을 생성시킬 수 있다.
- [0145] 따라서, 또한 추가 구현예에 따라서, 본 발명은 또한 본 발명에 의해 정의된 바와 같은 SPPS 방법에서 사용을 위한 재생된 수성 용액에 관한 것이다.
- [0146] **도면의 설명**
- [0147] 도 1: 수성 Fmoc/t-Bu SPPS의 개략도.
- [0148] 도 2: 수성 Fmoc/t-Bu SPPS의 상황에서 SPPS 폐기물 스트림의 재활용 및 재사용의 개략도.
- [0149] 도 3: 활성화/커플링제의 선택: A: COMU (1-시아노-2-에톡시-2-옥소에틸리덴아미노옥시)디메틸아미노-모르폴리노-카르베늄 헥사플루오로포스페이트); B: HDMC (6-클로로-1-((디메틸아미노)(모르폴리노)-메틸렌)-1H-벤조트리아졸리움 TFFH 헥사플루오로포스페이트 3-옥시드); C: DMCH (N-(클로로(모르폴리노)메틸렌)-N-메틸메탄아미늄 헥사플루오로포스페이트); D: TCFH (N,N,N',N'-테트라메틸클로로포름아미디늄 헥사플루오로포스페이트); E: TFFH (테트라메틸플루오로포름아미디늄 헥사플루오로포스페이트).
- [0150] 도 4: H₂O/PC (4:1)에서 합성된 미정제 Leu-엔케팔린 아미드의 HPLC 크로마토그램. 상단: 블랭크 (10% AcOH/40% MeCN), 하단: Leu-엔케팔린 아미드.
- [0151] 도 5: 미정제 Leu-엔케팔린 아미드의 LC-HRMS 분석의 UV 크로마토그램. 상단 기록, 블랭크 (10% AcOH/40% MeCN), 하단 기록, Leu-엔케팔린 아미드.

- [0152] 도 6: 도 5 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드에 대한 주요 피크 (Rt 13.87분)의 MS 스펙트럼 $[M+H]^+$, calcd MS $[M+H]^+$ 555.2926, 관측치 555.2923.
- [0153] 도 7: 용매 (MeCN)의 HPLC 크로마토그램.
- [0154] 도 8: MeCN (1.0 mL) 중 50 μ L 버진 PC/H₂O (1:4)의 HPLC 크로마토그램. PC의 주요 성분, 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트 (Rt=10.2분)의 통합 면적은 156.2 mAU^xmin였다.
- [0155] 도 9: MeCN (1.0 mL) 중 50 μ L SPPS 폐기물의 HPLC 크로마토그램. PC의 주요 성분인, 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트 (Rt=10.2분)의 통합 면적은 123.6 mAUxmin였다. SPPS 폐기물 중 PC의 함량은 대략 16% (v/v)로 추정되었다. SPPS 폐기물은 표 4, 항목 2 Fmoc-Gly-OH+TentaGel S NH₂ 커플링과 같이 사용되었다.
- [0156] 도 10: MeCN (1.0 mL) 중 SP-Toyopearl-650C IEX 수지를 통해 여과된 50 μ L SPPS 폐기물의 HPLC 크로마토그램. PC의 주요 성분인, 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트 (Rt=10.2분)의 통합 면적은 148.0 mAUxmin이었고, 이 재활용된 SPPS 폐기물 중 PC의 함량은 대략 19% (v/v)로 추정되었다. 이러한 재활용된 SPPS 폐기물 중 PC의 함량은 표 4, 항목 3 Fmoc-Gly-OH+TentaGel S NH₂ 커플링에서 사용 전에 20% (v/v)로 조정되었다.
- [0157] 도 11: MeCN (1.0 mL) 중 QAE-Toyopearl-550C IEX 수지를 통해 여과된 50 μ L SPPS 폐기물의 HPLC 크로마토그램. PC의 주요 성분인, 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트 (Rt=10.2분)의 통합 면적은 84.6 mAUxmin이었고, 이러한 재활용된 SPPS 폐기물 중 PC의 함량은 대략 11% (v/v)로 추정되었다. 이러한 재활용된 SPPS 폐기물 중 PC의 함량은 표 4, 항목 4 Fmoc-Gly-OH+TentaGel S NH₂ 커플링에서 사용 전에 20% (v/v)로 조정되었다.
- [0158] 도 12: MeCN (1.0 mL) 중 SP-Toyopearl-650C 및 QAE-Toyopearl-550C IEX 수지를 통해 여과된 50 μ L SPPS 폐기물의 HPLC 크로마토그램. PC의 주요 성분인, 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트 (Rt=10.2분)의 통합 면적은 56.7 mAUxmin이었고, 이러한 재활용된 SPPS 폐기물 중 PC의 함량은 대략 7% (v/v)로 추정되었다. 이러한 재활용된 SPPS 폐기물 중 PC의 함량은 표 4, 항목 5 Fmoc-Gly-OH+TentaGel S NH₂ 커플링에서 사용 전에 20% (v/v)로 조정되었다.
- [0159] 도 13: MeCN (1.0 mL) 중 Amberlite MB-6113 IEX 수지를 통해 여과된 50 μ L SPPS 폐기물의 HPLC 크로마토그램. PC의 주요 성분인, 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트 (Rt=10.2분)의 통합 면적은 106.2 mAUxmin이었고, 이러한 재활용된 SPPS 폐기물 중 PC의 함량은 대략 14% (v/v)로 추정되었다. 이러한 재활용된 SPPS 폐기물 중 PC의 함량은 표 4, 항목 6 Fmoc-Gly-OH+TentaGel S NH₂ 커플링에서 사용 전에 20% (v/v)로 조정되었다.
- [0160] 도 14: 재활용된 SPPS 폐기물에서 합성된 미정제 Leu-enk 아마이드의 HPLC 크로마토그램. 상단: 블랭크 (10% AcOH/40% MeCN); 하단: Leu-enk 아마이드.
- [0161] 도 15: 완전하게 로딩된 기준 Fmoc-Gly TentaGel S 수지 상에서 Fmoc 함량의 결정에 의한 DBF 피크 (18.25분)의 통합 면적 (48.4 mAUxmin). 표 2에 표시된 커플링 실험의 전환은 수득된 Fmoc-Gly TentaGel S 수지 상의 Fmoc 함량을 기준 Fmoc-Gly TentaGel S 수지 상의 Fmoc 함량과 비교하여 계산되었다.
- [0162] 도 16: TG S NH₂ 수지 상에서 H₂O/NBP (4:1) 중에 합성된 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드의 HPLC 크로마토그램. 상단 블랭크 (10% AcOH/40% MeCN), 하단, Leu-엔케팔린 아마이드.
- [0163] 도 17: TG S NH₂ 수지 상에서 H₂O/MeCN (4:1) 중에 합성된 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드의 HPLC 크로마토그램. 상단, 블랭크 (10% AcOH/40% MeCN), 하단, Leu-엔케팔린 아마이드.
- [0164] 도 18: TG S NH₂ 수지 상에서 H₂O/DMPU (4:1) 중에 합성된 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드의 HPLC 크로마토그램. 상단, 블랭크 (10% AcOH/40% MeCN), 하단, Leu-엔케팔린 아마이드.
- [0165] 도 19: TG S NH₂ 수지 상에서 H₂O/DMSO (4:1) 중에 합성된 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드의 HPLC 크로마토그램. 상단, 블랭크 (10% AcOH/40% MeCN), 하단, Leu-엔케팔린 아마이드.

- [0166] 도 20: TG S NH₂ 수지 상에서 H₂O/NBP (4:1) 중에 합성된 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드의 LC-MS 분석의 UV 크로마토그램. 상단 다이어그램, 블랭크 (10% AcOH/40% MeCN), 하단 다이어그램, Leu-엔케팔린 아마이드.
- [0167] 도 21: 도 20 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드에 대한 주요 피크 (Rt 9.74분)의 MS 스펙트럼 [M+H]⁺, calcd MS [M+H]⁺ 555.2926, 관측치 555.2.
- [0168] 도 22: TG S NH₂ 수지 상에서 H₂O/MeCN (4:1) 중에 합성된 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드의 LC-MS 분석의 UV 크로마토그램. 블랭크 (10% AcOH/40% MeCN) 경우, 도 20 참조.
- [0169] 도 23: 도 22 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드에 대한 주요 피크 (Rt 9.75분)의 MS 스펙트럼 [M+H]⁺, calcd MS [M+H]⁺ 555.2926, 관측치 555.2.
- [0170] 도 24: TG S NH₂ 수지 상에서 H₂O/DMPU (4:1) 중에 합성된 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드의 LC-MS 분석의 UV 크로마토그램. 블랭크 (10% AcOH/40% MeCN) 경우, 도 20 참조.
- [0171] 도 25: 도 24 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드에 대한 주요 피크 (Rt 9.74분)의 MS 스펙트럼 [M+H]⁺, calcd MS [M+H]⁺ 555.2926, 관측치 555.2.
- [0172] 도 26: TG S NH₂ 수지 상에서 H₂O/DMSO (4:1) 중에 합성된 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드의 LC-MS 분석의 UV 크로마토그램. 블랭크 (10% AcOH/40% MeCN) 경우, 도 20 참조.
- [0173] 도 27: 도 20 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드에 대한 주요 피크 (Rt 9.76분)의 MS 스펙트럼 [M+H]⁺, calcd MS [M+H]⁺ 555.2926, 관측치 555.1.
- [0174] 도 28: TG S NH₂ 수지 상에서 H₂O/PC (4:1) 중에 합성된 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드의 LC-HRMS 분석의 UV 크로마토그램. 상단 기록, 블랭크 (10% AcOH/40% MeCN), 하단 기록, Leu-엔케팔린 아마이드.
- [0175] 도 29: 도 28 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드에 대한 주요 피크 (Rt 13.87분)의 MS 스펙트럼 [M+H]⁺, calcd MS [M+H]⁺ 555.2926, 관측치 555.2923.
- [0176] **실험 섹션**
- [0177] 1. 일반 정보
- [0178] 모든 시약, 반응물, 및 용매는 펩티드 합성을 위한 원재료의 표준 공급사에서 구입하여 그대로 사용하였다. PolarClean™은 Solvay의 것이다. 사용된 추가 공용매는 NBP, MeCN, DMPU 및 DMSO였다. 모든 커플링 시약은 Luxembourg Bio Technologies의 것이었다. 수돗물이 전체적으로 사용되었다. 시험된 SPPS 수지는 하기 공급사의 것들이었다: Agilent (0.44 mmol/g AM PS/DVB 수지 및 0.76 mmol/ AmphiSpheres NH₂ 수지), Rapp Polymere GmbH (0.27 mmol/g TentaGel S NH₂ 수지), Sigma Aldrich (1.00 mmol/g JandaJel NH₂ 수지), Hecheng (0.55 mmol/g DEG AM 수지), Aapptec (0.34 mmol/g NH₂ OctaGel 수지) 및 PCAS BioMatrix (1.30 mmol/g ChemMatrix NH₂ 수지).
- [0179] SPPS 폐기물 재활용 실험에서 조사된 IEX 수지는 Tosoh Bioscience (SP-Toyopearl-650C 및 QAE-Toyopearl-550C) 및 Supelco (Amberlite MB-6113)의 것이었다.
- [0180] 모든 커플링 및 Fmoc 제거 실험을 비롯하여 Leu-엔케팔린 합성은 온도 제어된 PLS4x6 Activo-PLS 병렬 반응 합성기 (Activotec) 상의 밀봉된 소결 시린지에서 수행되었다. 모든 실험에서 반응물의 교반은 350 rpm에서 진탕하여 수행되었다.
- [0181] 모든 HPLC 분석은 Waters XSelect CSH130 C18 2.5 μ 4.6x150mm 컬럼, 완충액으로서 TFA/H₂O (0.1:100, A), TFA/MeCN (0.08:100 B), 15분 농도구배에서 100% B, 0.5 mL/분의 흐름, 220 nm에서 검출 및 30°C의 컬럼 온도를 사용하여 Waters Alliance 장비에서 수행되었다.
- [0182] LC-MS 분석은 Q-Exactive orbitrap 질량 분광 시스템 (Thermo, Waltham, Massachusetts, U.S)에 연결된 가변 파장 검출기가 구비된 Horizon 고성능 액상 크로마토그래피 시스템 (Thermo, Waltham, Massachusetts, U.S)에서 수행되었다. 질량 분광 시스템은 시스 ESI, 질량 정확도 5 ppm, 최대 140 000 ppm 분해능을 사용한 포지

티브 방식으로 작동되었다. 하기의 소스 설정이 사용되었다: 시스 가스 유속 35, aux 가스 유속 10, 스윙 가스 유속 1, 분무 전압 (kV) 3.50, 모세관 온도 250℃, S-렌즈 RF 수준 50,0 및 Aux 가스 히터 온도 200℃.

[0183] 실험 조건: 컬럼: Waters CSH 2.5 um 4.6 x 150 mm; 컬럼 온도: 20℃; 주입 부피: 1 μL; 샘플러 온도: 10℃; MS 방식: 포지티브 50-3200; DAD: 220 nm; 데이터 속도: 10Hz; 검출기 셀: 표준 셀 1 uL; 흐름: 0.2 ml/분; 제트 워머: V150 믹서; 이동상 A: 90% 물/MeCN 중 0.3% TFA, 이동상 B: 10% 물/MeCN 중 0.30% TFA. 구배 (시간(분), %B): 0, 0; 1, 0; 42, 100; 47, 100; 47.1, 0; 58, 0.

[0184] LC-MS 분석은 하기 실험 조건을 사용하여 Dionex UltiMate 3000와 결합된 포지티브 방식 (ESI)의 ThermoScientific MSQ Plus에서 수행되었다: Waters XSelect Peptide CSH130 C18 XP 2.5 μ 4.6x150mm 컬럼, 완충액으로서 TFA/H₂O (0.1:100, A), TFA/MeCN (0.1:100 B), 10분 구배에서 5% B 내지 90% B, 2.0 mL/분의 흐름, 220 nm에서 검출 및 30℃의 컬럼 온도.

[0185] 2. 상이한 용매 중 SPPS 수지의 팽윤

[0186] 10 mL 소결 시린지 중에 rt (실온)에서, 1.0 g의 각각의 수지를 적합한 양의 명시된 용매 중에서 팽윤시켰다. ChemMatrix 수지의 팽윤을 결정하기 위해서 0.5 g이 이 중합체 지지체의 높은 팽윤성으로 인해서 사용되었다. 시린지를 밀봉하고 rt에서 1시간 동안 진탕하였고, 이후에 팽윤된 수지가 있는 시린지를 1시간 동안 rt에 정치시키고 팽윤된 수지가 차지하는 부피를 결정하였다.

[0187] 시험된 수지 목록:

[0188] AM PS/DVB: 아미노메틸 (AM) PS/디비닐벤젠 (DVB)

[0189] JandaJel NH₂: 디에틸렌 글리콜 (DEG) 함유 PS 수지

[0190] DEG AM: 디에틸렌 글리콜 (DEG) 함유 PS 수지

[0191] TG S NH₂: TentaGel S NH₂ 수지

[0192] AmphiSpheres NH₂

[0193] NH₂-OctaGel

[0194] ChemMatrix NH₂

[0195] 시험된 공용매 목록

[0196] PolarClean(TM) Solvay

[0197] NBP

[0198] MeCN

[0199] DMPU

[0200] DMSO

표 1

표 1: SPPS 수지의 팽윤 (mL g^{-1}).

항목	수지	공용매	공용매/ H_2O 비율		
			1:0	1:1	0:1
1	AM PS/DVB	NBP	8.0	1.8	1.8
2	AM PS/DVB	PC	8.0	3.1	1.8
3	JandaJel NH_2	PC	9.0	2.0	2.0
4	DEG AM	PC	5.5	1.7	1.7
5	TG S NH_2	PC	1.9	4.9	3.3
6	TG S NH_2	NBP	2.2	5.1	3.3
7	TG S NH_2	MeCN	4.4	5.0	3.3
8	AmphiSpheres NH_2	PC	6.5	2.0	2.0
9	NH_2 -OctaGel	PC	6.5	2.5	2.0
10	ChemMatrix NH_2	PC	3.6	15.0	15.8

[0201]

[0202]

3. TentaGel S NH_2 수지 상에서 Fmoc-Gly-OH의 모델 커플링

[0203]

일반 프로토콜: 1.0 g의 0.27 mmol/g TentaGel S NH_2 수지 (0.27 mmol)를 소결 시린지에 칭량해 넣었다. 표 2에 명시된 반응 용매 (8 mL)를 수지에 첨가하였고, 최종 슬러리는 rt에서 1시간 동안 진탕하고 배수하였다.

다음으로, Fmoc-Gly-OH, 커플링제 및 염기를 표 2에 명시된 양으로 첨가하였고 이후 표 2에 명시된 용매 (5 mL)를 첨가하였다. 시린지를 밀봉하였고, 최종 슬러리는 표 2에 명시된 온도에서 1시간 동안 진탕하여 교반하였다. 표 2, 항목 5 실험에서, COMU 및 콜리딘의 각각의 명시된 양을 명시된 간격에서 커플링 실험 동안 첨가하였다.

커플링 실험의 완료 시에, 수지를 배수하였고, 반응 용매 (3 x 10 mL), NBP (5 x 10 mL) 및 i-PrOH (5 x 10 mL)로 세척하고, 항량까지 진공 건조하였다. 표 2에 제공되는 커플링 전환은 강염기 1,8-디아자바이시클로[5.4.0]운데크-7-엔 (DBU)의 작용에 의해서 Fmoc 함유 수지로부터 방출된 디벤조플렌 (DBF)을 이전에 적용한 프로토콜로 정량하는 펩티드 수지 상의 Fmoc 함량의 결정을 위한 방법을 사용하여 기준으로서 완전하게 커플링된 Fmoc-Gly TentaGel S 수지를 사용해 계산되었다. 따라서, 완전하게 커플링된 Fmoc-Gly TentaGel S 수지의 샘플은 1.0 g의 0.27 mmol/g TentaGel S NH_2 수지 (0.27 mmol)를 4 equiv Fmoc-Gly-OH 및 4 equiv DIC/Oxyrna (1:1)과 5 mL DMF 중에서 1시간 동안 rt에서 커플링한 다음에 DMF (5 x 10 mL) 및 i-PrOH (5 x 10 mL)로 세척하고, 항량까지 진공 건조하여 수득하였다.

이러한 기준 Fmoc-Gly TentaGel S 수지 상의 Fmoc 함량은 50.0 mg의 수지를 칭량하고, 2% (v/v) DBU/DMF (2 mL)와 30분 동안 교반하고, 반응 혼합물을 10.0 mL 까지 MeCN으로 희석하여 결정되었다. 이렇게 수득된 용액은 HPLC 방법으로 분석되었다. 디벤조플렌 (DBF)에 대한 피크를 통합하였고 (도 15) 표 2에 표시된 커플링 실험에서 수득된 Fmoc-Gly TentaGel S 수지의 샘플의 DBF 피크에 대한 기준 표준 (100% 전환율)으로서 사용하였다. 표 2에 표시된 커플링 실험의 완료는 또한 정량적 (닌히드린) 발색 시험을 사용해 평가하였다.

표 2

표 2: Fmoc-Gly-OH 와 TG S NH₂ 수지^[a]의 커플링의 평가.



항목	용매	CA	염기	Equiv Fmoc-Gly-OH	Fmoc-Gly-OH/CA/염기	Conv. (%) ^[b]
1	H ₂ O	COMU	콜리딘	1.1	1:1:3	37.1
2	H ₂ O/PC (4:1)	COMU	콜리딘	1.1	1:1:3	53.1
3	H ₂ O/PC (1:4)	COMU	콜리딘	1.1	1:1:3	56.4
4	PC	COMU	콜리딘	1.1	1:1:3	14.1
5	H ₂ O/PC (4:1)	COMU ^[d]	콜리딘	1.1	1:1:3	65.1
6	H ₂ O/PC (4:1)	COMU ^[e]	콜리딘	1.1	1:1:3	57.3
7	H ₂ O/PC (4:1)	COMU	콜리딘	4.4	1:1:3	>99 ^[c]
8	H ₂ O/PC (4:1)	HDMC	콜리딘	1.1	1:1:3	26.3
9	H ₂ O/PC (4:1)	DMCH	콜리딘	1.1	1:1:3	85.0
10	H ₂ O/PC (4:1)	TCFH	콜리딘	1.1	1:1:3	83.3
11	H ₂ O/PC (4:1)	TFFH	콜리딘	1.1	1:1:3	41.5
12	H ₂ O/PC (4:1)	TCFH	없음	1.5	1:1:0	8.1
13	H ₂ O/PC (4:1)	TCFH	콜리딘	1.5	1:1:1.5	50.0
14	H ₂ O/PC (4:1)	TCFH	콜리딘	1.5	1:1:3	>99 ^[c]
15	H ₂ O/PC (4:1)	TCFH	콜리딘	1.5	1:1:4.5	>99 ^[c]

[0204]

16	H ₂ O/PC (4:1)	TCFH	DIEA	1.5	1:1:3	29.5
17	H ₂ O/PC (4:1)	TCFH	NMM	1.5	1:1:3	32.0
18	H ₂ O/PC (4:1)	TCFH	NMI	1.5	1:1:3	40.4
19	H ₂ O/PC (4:1)	TCFH	콜리딘	1.3	1:1:3	>99 ^[c]
20	H ₂ O/PC (4:1)	TCFH	콜리딘	1.2	1:1:3	90.6

^[a] 모든 CA 의 명칭 및 구조는 도 3 을 참조함; ^[b] Fmoc-Gly TG S 수지 상의 Fmoc 함량을 정량하여 결정됨; ^[c] 음성 (닌히드린) 발색 시험에 따라 완료; ^[d] COMU 및 콜리딘은 t= 0, 15, 30 및 45 분에 4 등분으로 첨가됨; ^[e] 40 °C 에서 수행됨.

[0205]

[0206]

[0207]

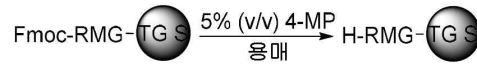
4. Fmoc-RMG TentaGel S 수지의 Fmoc 탈보호 (RMG: Ramage 링커)

Fmoc-RMG TentaGel S 수지는 DIC 및 Oxyma를 커플링제로서 적용하는 이전에 보고된 프로토콜 (Green Chem. 2019, 21, 2594)에 따라서 TentaGel S NH₂ 수지 및 Ramage 링커 (Fmoc-RMG-OH)로부터 제조되었다. 다음으로, 표 3에 기재된 Fmoc 탈보호 실험을 다음과 같이 수행하였다: 1.0 g의 0.18 mmol/g Fmoc-RMG TentaGel S 수지 (0.18 mmol)를 소결 시린지에 칭량해 넣었다. 표 3에 명시된 반응 용매 (8 mL)를 수지에 첨가하였고, 최종 슬러리를 rt에서 1시간 동안 진탕하고 배수하였다. 표 3에 명시된 용매 중 10 mL의 5% (v/v) 4-메틸피페리딘 (4-MP)을 첨가하였고, 시린지를 밀봉하고, 최종 슬러리를 15분 동안 표 3에 명시된 온도에서 진탕 교반하였다. 표 3, 항목 5에 기재된 실험 경우에, Fmoc 제거 처리를 반복하였다. Fmoc 제거 실험의 완료시에, 수지를 배수하였고, 반응 용매 (3 x 10 mL), NBP (5 x 10 mL) 및 i-PrOH (5 x 10 mL)로 세척하고, 항량까지 진공 건조하였다. 표 3에 명시된 Fmoc 제거 전환율은 펩티드 수지 상의 Fmoc 함량을 결정하는 방법을 사용하여서 기준으로서 출발 Fmoc-RMG TentaGel S 수지를 사용해 계산되었다. 따라서, 기준 Fmoc-RMG TentaGel S 수지 상의 Fmoc 함량은 50 mg의 수지를 칭량해 넣고, 2% (v/v) DBU/DMF (2 mL)와 30분 동안 교반하

고, 반응 혼합물을 10.0 mL까지 MeCN으로 희석하여 결정되었다. 이렇게 수득된 용액은 HPLC 방법으로 분석되었다. 디벤조플렌 (DBF)에 대한 피크를 통합하였고 표 3에 표시된 Fmoc 제거 실험에서 수득된 H-RMG TentaGel S 수지 생성물의 샘플에 대한 기준 표준으로서 사용되었다. Fmoc 제거 전환율 (%)은 100x(H-RMG 수지 생성물에 대한 DBF 면적/Fmoc-RMG 수지 출발 물질에 대한 DBF 면적)으로서 계산되었다.

표 3

표 3: Fmoc RMG TG S 수지로부터 Fmoc 제거.



항목	용매	시간 (분)	온도	Conv. (%) ^[a]
1	H ₂ O	15	rt	71.5
2	H ₂ O/PC (4:1)	15	rt	94.7
3	H ₂ O/PC (1:4)	15	rt	90.9
4	PC	15	rt	88.0
5	H ₂ O/PC (4:1)	2 x 15	rt	99.8
6	H ₂ O/PC (4:1)	15	40 °C	99.2

^[a] H-RMG TG S 수지 상의 Fmoc 함량을 정량하여 결정됨.

[0208]

[0209]

5. H₂O/공용매 (4:1) 중 Leu-엔케팔린 아미드의 SPPS

[0210]

고전적인 Leu 엔케팔린 아미드는 출발 수지로서 RMG TG S, 용매로서 H₂O/공용매 (4:1) 및 커플링을 위한 1.3 equiv의 Fmoc-AA-OH/TCFH/콜리딘 (1:1:3) 및 Fmoc 제거를 위한 4-MP (5% v/v)를 적용하여, 기질로서 사용되었다 (반응식 1).

[0211]

공용매는 NBP, PC, MeCN, DMPU 및 DMSO로부터 선택되었다.

[0212]

1.0 g의 0.18M Fmoc-RMG TentaGel S 수지 (0.18 mmol)를 소결 시린지에 칭량해 넣고, 10 mL H₂O/공용매 (4:1)를 첨가하였다. 시린지를 밀봉하였고, 최종 슬러리는 rt에서 1시간 동안 진탕하고 배수하였다. 다음으로, 4회의 아미노산 (AA) 사이클을 다음과 같이 반응식 1에 요약한 대로 수행하였다:

[0213]

i) 공용매/H₂O (1:4) 중 10 mL 5% 4-MP (v/v)를 사용해 2 x 15분 동안 40°C에서 Fmoc 탈보호;

[0214]

ii) 4 x 10 mL H₂O/공용매 (4:1) 세척, 각 5분씩. 처음 3회 세척은 40°C에서 수행하였고, 4번째는 rt에서 수행하였다;

[0215]

iii) AA 커플링은 1.3 equiv Fmoc-AA-OH (0.23 mmol) 및 TCFH (0.23 mmol, 65.6 mg)를 칭량해 넣은 후 3.9 equiv 콜리딘 (0.70 mmol, 92.8 μL) 및 5 mL H₂O/공용매 (4:1)를 첨가하여 수행되었다. 시린지를 밀봉하였고, 최종 슬러리는 rt에서 1시간 동안 교반하고, 배수하였다. 사용된 AA의 양은 다음과 같았다: 제1 AA 사이클, Fmoc-Leu-OH, 81.3 mg; 제2 AA 사이클, Fmoc-Phe-OH, 90.7 mg; 제3 AA 사이클, Fmoc-Gly-Gly-OH, 85.1 mg; 제4 AA 사이클, Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH, 107.5 mg;

[0216]

iv) 1 x 10 mL 공용매/H₂O (1:4) 세척, rt에서 5분.

[0217]

다음으로, Fmoc 탈보호 및 4 x 10 mL H₂O/공용매 (4:1) 세척은 i) & ii)에 기재된 대로 수행한 후에 4 x 10 mL i-PrOH 세척하였다. 최종 수지는 항량까지 진공 건조하였다.

[0218]

H₂O/NBP (4:1) (표 4, 항목 1)에서 수행된 합성으로 0.96 g의 Leu-엔케팔린 RMG TentaGel S 펩티드 수지를 얻었다. 합성 동안, 모든 커플링 및 Fmoc 탈보호의 진행은 정량적 비색 시험 (닌히드린)으로 모니터링하여서, 수득된 펩티드 수지의 총량이 약간 감소하였다. 100 mg의 Leu-엔케팔린 아미드 수지를 소결 시린지에 칭량해 넣고, 1.0 mL의 TFA/TIS/H₂O (90:5:5)를 첨가하고, 최종 슬러리를 rt에서 2시간 동안 진탕하였다. 소모된 수지를 여과하였고, 2 x 0.5 mL TFA로 세척하였다. 배합된 휘발물은 진공 하에서 제거하였고, 미정제 펩

티드를 2 x 20 mL 디에틸 에테르 (Et₂O)로 침전시켜서 10.9 mg (88%)의 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드를 얻었다.

[0219] H₂O/PC (4:1) (표 4, 항목 2)에서 수행된 합성은 1.06 g의 Leu-엔케팔린 RMG TentaGel S 펩티드 수지를 제공하였다. 100 mg의 Leu-엔케팔린 아마이드 수지를 소결 시린지에 칭량해 넣고, 1.0 mL의 TFA/TIS/H₂O (90:5:5)를 첨가하였고, 최종 슬러리는 rt에서 2시간 동안 진탕하였다. 소모된 수지는 여과하였고, 2 x 0.5 mL TFA로 세척하였다. 배합된 휘발물을 진공 하에 제거하였고, 미정제 펩티드를 2 x 20 mL 디에틸 에테르 (Et₂O)로 침전시켜서 9.7 mg (85%)의 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드를 얻었다.

[0220] H₂O/MeCN (4:1) (표 4, 항목 3)에서 수행된 합성은 0.98 g의 Leu-엔케팔린 RMG TentaGel S 펩티드 수지를 제공하였다. 합성 동안, 모든 커플링 및 Fmoc 탈보호의 진행은 정량적 비색 시험 (닌히드린)으로 모니터링하였으므로, 수득된 펩티드 수지의 총량이 약간 감소되었다. 100 mg의 Leu-엔케팔린 아마이드 수지를 소결 시린지에 칭량해 넣고, 1.0 mL의 TFA/TIS/H₂O (90:5:5)를 첨가하고, 최종 슬러리는 rt에서 2시간 동안 진탕하였다. 소모된 수지는 여과하였고, 2 x 0.5 mL TFA로 세척하였다. 배합된 휘발물을 진공 하에서 제거하였고, 미정제 펩티드는 2 x 20 mL 디에틸 에테르 (Et₂O)로 침전시켜서 10.8 mg (88%)의 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드를 얻었다.

[0221] H₂O/DMPU (4:1) (표 4, 항목 4)에서 수행된 합성은 0.97 g의 Leu-엔케팔린 RMG TentaGel S 펩티드 수지를 제공하였다. 합성 동안, 모든 커플링 및 Fmoc 탈보호의 진행은 정량적 비색 시험 (닌히드린)으로 모니터링하였으므로, 수득된 펩티드 수지의 총량이 약간 감소되었다. 100 mg의 Leu-엔케팔린 아마이드 수지를 소결 시린지에 칭량해 넣고, 1.0 mL의 TFA/TIS/H₂O (90:5:5)를 첨가하고, 최종 슬러리는 rt에서 2시간 동안 진탕하였다. 소모된 수지는 여과하였고, 2 x 0.5 mL TFA로 세척하였다. 배합된 휘발물은 진공 하에서 제거하였고, 미정제 펩티드는 2 x 20 mL 디에틸 에테르 (Et₂O)로 침전시켜서 8.7 mg (70%)의 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드를 얻었다.

[0222] H₂O/DMSO (4:1) (표 4, 항목 5)에서 수행된 합성은 0.96 g의 Leu-엔케팔린 RMG TentaGel S 펩티드 수지를 제공하였다. 합성 동안, 모든 커플링 및 Fmoc 탈보호의 진행은 정량적 비색 시험 (닌히드린)으로 모니터링하였으므로, 수득된 펩티드 수지의 총량이 약간 감소되었다. 100 mg의 Leu-엔케팔린 아마이드 수지를 소결 시린지에 칭량해 넣고, 1.0 mL의 TFA/TIS/H₂O (90:5:5)를 첨가하였고, 최종 슬러리는 rt에서 2시간 동안 진탕하였다. 소모된 수지는 여과하였고, 2 x 0.5 mL TFA로 세척하였다. 배합된 휘발물은 진공 하에서 제거하였고, 미정제 펩티드는 2 x 20 mL 디에틸 에테르 (Et₂O)로 침전시켜서 11.1 mg (88%)의 미정제 Leu-엔케팔린 아마이드를 얻었다.

표 4

표 4 TentaGel S NH₂ 수지 상에서 H₂O/공용매 (4:1) 중 Leu enk NH₂의 SPSS 개요.

항목	공용매	H ₂ O/공용매(4:1) 중 TG S NH ₂ 팽윤 (mL g ⁻¹)	Leu enk NH ₂ HPLC 순도 (%)	주요 피크의 LC-MS 질량 ^a
1	NBP	5.0	86	555.2 ^b
2	PC	4.5	86	555.2923 ^c
3	MeCN	4.5	86	555.2 ^b
4	DMPU	4.0	86	555.2 ^b
5	DMSO	3.7	44	555.1 ^b

^acalcd MS [M+H]⁺ 555.2926; ^bLC-MS 로 결정됨; ^cLC-HRMS 로 결정됨.

[0223]

[0224] 생성된 H₂O/PC 함유 SPSS 폐기물의 총량은 약 370 mL이었다. 최종 펩티드 수지의 i-PrOH 세척에 의한 세척물은 H₂O/PC 함유 SPSS 폐기물과 함께 풀링하지 않았다. 100 mg의 Leu-엔케팔린 아마이드 수지를 소결 시린지

에 칭량해 넣고, 1.0 mL의 TFA/TIS/H₂O (90:5:5)를 첨가하였고, 최종 슬러리는 rt에서 2시간 동안 진탕하였다.

소모된 수지는 여과하였고, 2 x 0.5 mL TFA로 세척하였다. 배합된 휘발물은 진공 하에서 제거하였고, 미정제 펩티드는 2 x 20 mL 디에틸 에테르 (Et₂O)로 침전시켜서 9.7 mg (85%)의 미정제 Leu-엔케팔린 아미드를 얻었다. 미정제 생산물의 HPLC 순도는 86% (도 4 및 표 6)였고, 표적 펩티드의 정체는 LC-HRMS를 통해 확인하였다 (도 5 및 6 및 표 15).

표 5

표 5. 도 16 미정제 Leu-엔케팔린 아미드의 통합 피크 (공용매: NBP).

피크 번호	체류 시간 분	양	상대 면적 %	면적 mAU*분	높이 mAU	유형	너비(50% 분)	Asym. EP	Resol. EP	플레이트 EP
1	8.751	n.a.	0.41	0.8893	11.46	BMB*	0.073	1.17	1.55	78930
2	8.954	n.a.	0.50	1.0756	12.52	BMB*	0.082	1.29	n.a.	66822
3	9.246	n.a.	0.80	1.7221	24.23	BM *	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4	9.343	n.a.	1.54	3.2978	40.04	MB*	0.078	n.a.	1.86	80033
5	9.566	n.a.	0.06	0.1392	2.14	BMB*	0.064	1.15	1.17	122803
6	9.687	n.a.	0.02	0.0495	0.82	BMB*	0.058	1.50	n.a.	153196
7	10.037	n.a.	0.55	1.1824	14.68	BM *	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
8	10.134	n.a.	1.24	2.6542	34.79	M *	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
9	10.313	n.a.	86.33	185.3885	1665.83	M *	0.103	1.04	n.a.	55959
10	10.575	n.a.	1.49	3.2019	37.18	MB*	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
11	10.706	n.a.	0.03	0.0592	1.55	BMB*	0.038	1.50	0.73	445384
12	10.808	n.a.	0.34	0.7378	6.93	BMB*	0.128	1.85	1.14	39779
13	11.027	n.a.	0.36	0.7690	8.00	BMB*	0.099	0.99	0.99	68105
14	11.163	n.a.	0.31	0.6577	10.09	BMB*	0.062	1.37	2.03	178188
15	11.357	n.a.	0.06	0.1258	2.52	BMB*	0.051	1.26	1.01	276781
16	11.459	n.a.	0.03	0.0628	0.78	BMB*	0.069	2.67	2.21	154576
17	11.760	n.a.	0.13	0.2811	3.07	BMB*	0.092	0.79	0.71	90029
18	11.881	n.a.	0.08	0.1702	1.66	BMB*	0.108	2.32	5.52	66799
19	12.672	n.a.	0.06	0.1320	2.17	BMB*	0.061	0.90	3.30	240633
20	13.497	n.a.	5.66	12.1557	47.58	BMB*	0.234	1.18	n.a.	18422
총합		0.0000	100.00	214.7519	1928.03					

[0225]

표 6

표 6. 도 4 미정제 Leu-엔케팔린 아미드의 통합 피크 (공용매: PC).

번호	피크명	체류 시간 분	면적 mAU*분	양	유형	높이 mAU	상대 면적 %	분해능
1	n.a.	8,881	0,0328	n.a.	BMB*	0,570	0,22	2,04
2	n.a.	9,081	0,0153	n.a.	BMB*	0,263	0,10	2,07
3	n.a.	9,301	0,1583	n.a.	BMB*	2,293	1,07	3,69
4	n.a.	9,739	0,2928	n.a.	BMB*	3,688	1,99	2,23
5	n.a.	10,024	0,0660	n.a.	BMB*	0,757	0,45	2,02
6	n.a.	10,257	0,0566	n.a.	BMB*	0,930	0,38	1,58
7	n.a.	10,435	12,7271	n.a.	BMB*	158,313	86,43	2,31
8	n.a.	10,715	0,1501	n.a.	BMB*	2,123	1,02	1,64
9	n.a.	10,897	0,1027	n.a.	BMB*	1,693	0,70	1,35
10	n.a.	11,065	0,0413	n.a.	BMB*	0,471	0,28	1,61
11	n.a.	11,419	0,3194	n.a.	BMB*	1,935	2,17	2,39
12	n.a.	12,012	0,1509	n.a.	BMB*	1,149	1,03	2,72
13	n.a.	12,483	0,0401	n.a.	BMB*	0,445	0,27	6,02
14	n.a.	13,594	0,5716	n.a.	BMB*	4,156	3,88	n.a.
합계:			14,7247	0,0000		178,785	100,00	

[0226]

표 7

표 7. 도 17 미정제 Leu-엔케팔린 아미드의 통합 피크 (공용매 MeCN).

피크 번호	체류 시간 분	양	상대 면적 %	면적 mAU*분	높이 mAU	유형	너비 (50%) 분	Asym. EP	Resol. EP	플레이트 EP
1	8.945	n.a.	0.79	1.7067	21.19	BMB*	0.075	1.40	3.15	78703
2	9.338	n.a.	2.26	4.8800	57.31	BMB*	0.072	0.86	n.a.	92725
3	9.935	n.a.	0.48	1.0420	8.38	BM *	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4	10.124	n.a.	1.09	2.3529	33.42	M *	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
5	10.313	n.a.	86.14	188.0708	1995.65	M *	0.082	1.12	1.66	86742
6	10.571	n.a.	3.49	7.5489	70.68	M *	0.101	n.a.	1.51	61111
7	10.794	n.a.	0.67	1.4415	18.59	MB*	0.073	n.a.	1.60	120217
8	11.007	n.a.	0.06	0.1383	1.62	BMB*	0.084	0.93	1.20	95483
9	11.158	n.a.	0.22	0.4651	6.83	BMB*	0.064	1.27	2.87	167143
10	11.459	n.a.	0.04	0.0773	1.31	BMB*	0.059	1.07	1.42	206063
11	11.590	n.a.	0.02	0.0370	0.76	BMB*	0.049	0.98	1.16	307734
12	11.755	n.a.	0.17	0.3580	3.20	BMB*	0.119	0.87	5.26	54061
13	13.463	n.a.	4.58	9.8908	32.20	BMB*	0.264	1.61	n.a.	14397
총합		0.0000	100.00	216.0093	2251.14					

[0227]

표 8

표 8. 도 18 미정제 Leu-엔케팔린 아미드의 통합 피크 (공용매 DMPU).

피크 번호	체류 시간 분	양	상대 면적 %	면적 mAU*분	높이 mAU	유형	너비 (50%) 분	Asym. EP	Resol. EP	플레이트 EP
1	8.736	n.a.	0.10	0.2113	2.95	BMB*	0.069	1.34	1.55	89334
2	8.945	n.a.	0.25	0.5331	5.99	BMB*	0.090	1.36	n.a.	54493
3	9.236	n.a.	1.00	2.1654	29.83	BM *	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4	9.333	n.a.	2.80	6.0752	74.79	MB*	0.076	n.a.	n.a.	84379
5	9.983	n.a.	0.49	1.0717	8.55	BM *	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
6	10.119	n.a.	1.20	2.6162	36.68	M *	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
7	10.304	n.a.	86.15	187.0543	1785.20	M *	0.095	1.07	n.a.	65367
8	10.561	n.a.	2.79	6.0536	57.53	M *	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
9	10.658	n.a.	0.33	0.7064	9.77	M *	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
10	10.784	n.a.	0.39	0.8565	10.63	MB*	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
11	11.143	n.a.	0.24	0.5267	7.21	BMB*	0.068	1.32	3.20	149701
12	11.697	n.a.	0.12	0.2641	1.83	BMB*	0.137	1.55	5.62	40647
13	13.487	n.a.	4.14	8.9903	35.12	BMB*	0.239	1.37	n.a.	17611
총합		0.0000	100.00	217.1250	2066.08					

[0228]

표 9

표 9. 도 19 미정제 Leu-엔케팔린 아미드의 통합 피크 (공용매 DMSO).

피크 번호	체류 시간 분	양	상대 면적 %	면적 mAU*분	높이 mAU	유형	너비 (50%) 분	Asym. EP	Resol. EP	플레이트 EP
1	7.862	n.a.	0.94	1.2884	15.69	BMB*	0.080	1.14	3.88	53168
2	8.741	n.a.	1.36	1.8723	11.93	BMB*	0.187	0.94	0.82	12093
3	8.954	n.a.	2.07	2.8502	23.83	BM *	0.121	n.a.	0.96	30394
4	9.110	n.a.	0.80	1.1026	15.99	MB*	0.070	n.a.	1.90	92583
5	9.401	n.a.	16.80	23.0839	189.73	BMB*	0.111	0.82	3.38	39847
6	9.930	n.a.	10.58	14.5303	178.08	BM *	0.074	1.33	1.54	99558
7	10.124	n.a.	4.17	5.7331	71.03	M *	0.075	n.a.	1.47	100691
8	10.313	n.a.	44.44	61.0512	693.01	M *	0.077	1.11	2.01	98890
9	10.575	n.a.	7.77	10.6786	116.80	M *	0.077	n.a.	1.53	104947
10	10.789	n.a.	0.44	0.5992	6.96	MB*	0.088	n.a.	9.24	83131
11	13.483	n.a.	10.62	14.5896	49.88	BMB*	0.256	1.50	n.a.	15385
총합		0.0000	100.00	137.3794	1372.94					

[0229]

표 10

표 10. 도 20 미정제 Leu-엔케팔린 아미드의 통합 피크 (공용매 NBP).

번호	피크명	체류 시간 분	면적 mAU*분	양	유형	높이 mAU	상대 면적 %	분해능
1	n.a.	8.543	0.3571	n.a.	BMB*	7.497	0.46	2.57
2	n.a.	8.730	0.3631	n.a.	BM *	8.387	0.47	n.a.
3	n.a.	8.790	0.0398	n.a.	MB*	1.175	0.05	n.a.
4	n.a.	8.857	0.0101	n.a.	BMB*	0.401	0.01	1.48
5	n.a.	8.947	0.6983	n.a.	BM *	14.624	0.90	1.07
6	1	9.027	1.0477	n.a.	MB*	23.749	1.35	2.79
7	n.a.	9.213	0.0492	n.a.	BMB*	1.340	0.06	1.32
8	n.a.	9.300	0.0288	n.a.	BMB*	0.704	0.04	2.79
9	n.a.	9.510	0.5033	n.a.	BMB*	9.980	0.65	n.a.
10	n.a.	9.627	1.1762	n.a.	BM *	26.198	1.51	n.a.
11	n.a.	9.740	67.1712	n.a.	M *	1023.329	86.51	n.a.
12	n.a.	9.843	0.2356	n.a.	MB*	6.169	0.30	n.a.
13	n.a.	9.973	0.5089	n.a.	BMB*	11.893	0.66	n.a.
14	n.a.	10.107	0.2301	n.a.	BM *	5.313	0.30	n.a.
15	n.a.	10.153	0.1876	n.a.	MB*	4.222	0.24	n.a.
16	n.a.	10.230	0.1181	n.a.	BMB*	3.307	0.15	1.36
17	n.a.	10.343	0.4681	n.a.	BMB*	7.535	0.60	1.43
18	n.a.	10.477	0.0822	n.a.	BMB*	1.748	0.11	9.01
19	n.a.	11.290	0.1030	n.a.	BMB*	1.710	0.13	5.12
20	n.a.	12.387	4.2637	n.a.	BMB*	19.854	5.49	n.a.
합계:			77.6422	0.0000		1179.133	100.00	

[0230]

표 11

표 11. 도 22 미정제 Leu-엔케팔린 아미드의 통합 피크 (공용매 MeCN).

번호	피크명	체류 시간 분	면적 mAU*분	양	유형	높이 mAU	상대 면적 %	분해능
1	n.a.	8.547	0.1180	n.a.	BMB*	2.679	0.14	1.29
2	n.a.	8.643	0.0900	n.a.	BM *	2.053	0.11	1.18
3	n.a.	8.730	0.7378	n.a.	M *	16.544	0.87	n.a.
4	n.a.	8.787	0.0571	n.a.	MB*	1.791	0.07	n.a.
5	n.a.	8.853	0.0217	n.a.	BMB*	0.677	0.03	2.79
6	1	9.030	1.9630	n.a.	BMB*	38.991	2.31	2.59
7	n.a.	9.317	0.0825	n.a.	BMB*	0.981	0.10	1.43
8	n.a.	9.493	0.3760	n.a.	BMB*	6.614	0.44	n.a.
9	n.a.	9.630	1.0411	n.a.	BM *	23.461	1.22	n.a.
10	n.a.	9.750	75.2823	n.a.	MB*	1399.253	88.40	n.a.
11	n.a.	9.923	0.1379	n.a.	BM *	4.524	0.16	n.a.
12	n.a.	9.973	1.5029	n.a.	MB*	29.147	1.76	1.57
13	n.a.	10.103	0.6086	n.a.	BMB*	10.310	0.71	2.96
14	n.a.	10.357	0.2320	n.a.	BMB*	4.273	0.27	4.39
15	n.a.	10.723	0.0437	n.a.	BMB*	0.940	0.05	3.35
16	n.a.	10.993	0.0457	n.a.	BMB*	0.942	0.05	3.07
17	n.a.	11.293	0.1078	n.a.	BMB*	1.538	0.13	4.84
18	n.a.	12.400	2.7108	n.a.	BMB*	12.662	3.18	n.a.
합계:			85.1588	0.0000		1557.378	100.00	

[0231]

표 12

표 12. 도 24 미정제 Leu-엔케팔린 아미드의 통합 피크 (공용매: DMPU).

번호	피크명	채류 시간 분	면적 mAU*분	양	유형	높이 mAU	상대 면적 %	분해능
1	n.a.	8.543	0.0985	n.a.	BMB*	2.215	0.12	1.41
2	n.a.	8.640	0.0147	n.a.	BMB*	0.395	0.02	1.36
3	n.a.	8.730	0.1814	n.a.	BM *	4.376	0.22	n.a.
4	n.a.	8.790	0.0419	n.a.	MB*	1.071	0.05	n.a.
5	n.a.	8.857	0.0275	n.a.	BMB*	0.899	0.03	1.34
6	n.a.	8.947	0.8268	n.a.	BM *	17.375	1.02	1.08
7	1	9.030	2.1646	n.a.	MB*	47.372	2.68	5.88
8	n.a.	9.510	0.3830	n.a.	BMB*	6.919	0.47	n.a.
9	n.a.	9.630	1.2136	n.a.	BM *	25.485	1.50	n.a.
10	n.a.	9.743	70.4756	n.a.	M *	1105.018	87.14	n.a.
11	n.a.	9.843	0.2877	n.a.	M *	6.929	0.36	n.a.
12	n.a.	9.903	0.3056	n.a.	M *	6.556	0.38	n.a.
13	n.a.	9.973	1.0246	n.a.	MB*	19.950	1.27	1.64
14	n.a.	10.103	0.1936	n.a.	BMB*	4.230	0.24	3.08
15	n.a.	10.353	0.2122	n.a.	BMB*	3.998	0.26	9.23
16	n.a.	12.397	3.4278	n.a.	BMB*	15.178	4.24	n.a.
합계:			80.8792	0.0000		1267.964	100.00	

[0232]

표 13

표 13. 도 26 미정제 Leu-엔케팔린 아미드의 통합 피크 (공용매: DMSO).

번호	피크명	채류 시간 분	면적 mAU*분	양	유형	높이 mAU	상대 면적 %	분해능
3	n.a.	8.643	0.2050	n.a.	BMB*	5.220	0.42	1.22
4	n.a.	8.733	0.7436	n.a.	BM *	17.021	1.54	n.a.
5	n.a.	8.787	0.5139	n.a.	M *	11.606	1.06	n.a.
6	n.a.	8.853	0.5017	n.a.	MB*	11.490	1.04	n.a.
7	n.a.	9.030	3.2103	n.a.	BM	57.823	6.64	n.a.
8	1	9.097	5.6914	n.a.	MB	113.589	11.78	2.01
9	n.a.	9.280	0.2623	n.a.	BMB*	4.291	0.54	2.31
10	n.a.	9.487	5.2885	n.a.	BMB	107.994	10.95	1.89
11	n.a.	9.630	1.5699	n.a.	BMB*	35.157	3.25	1.53
12	n.a.	9.760	21.4668	n.a.	bMB*	357.771	44.43	2.35
13	n.a.	9.973	3.2578	n.a.	BMB*	57.717	6.74	10.54
14	n.a.	12.407	5.0417	n.a.	BMB	20.079	10.43	n.a.
합계:			48.3177	0.0000		812.123	100.00	

[0233]

표 14

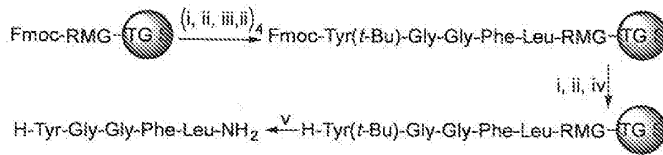
표 14. 도 28 미정제 Leu-엔케팔린 아미드의 통합 피크

피크	Rt	면적	RRT	면적 %
1	8,79	0,190	0,63	0,34
2	10,26	0,723	0,74	1,29
3	10,41	0,236	0,75	0,42
4	11,93	1,281	0,86	2,29
5	12,33	0,174	0,89	0,31
6	12,91	0,164	0,93	0,29
7	13,27	0,203	0,95	0,36
8	13,39	0,102	0,96	0,18
9	13,58	1,260	0,98	2,25
10	13,87	45,450	1,00	81,19
11	14,21	0,507	1,02	0,91
12	14,41	0,166	1,03	0,30
13	14,52	0,608	1,04	1,09
14	14,93	0,531	1,07	0,95
15	15,59	0,174	1,12	0,31
16	15,69	0,293	1,13	0,52
17	15,89	0,114	1,14	0,20
18	16,92	0,108	1,22	0,19
19	18,92	0,232	1,36	0,41
20	19,14	0,396	1,38	0,71
21	20,75	0,164	1,49	0,29
22	22,53	0,162	1,62	0,29
23	23,77	2,741	1,71	4,90

[0234]

[0235]

반응식 1. H₂O/공용매 (4:1) 중 Leu-엔케팔린 아미드의 SPPS. 시약 및 조건: i. 5% 4-MP, 2 x 15분, 40°C; ii. 용매 세척; iii. 1.3 equiv Fmoc-AA-OH/TCFH/콜리딘 (1:1:3), 1시간, rt; iv. i-PrOH 세척 및 진공 건조; v. a) TFA/TIS/H₂O (90:5:5), 2시간, rt, b) Et₂O 침전



[0236]

표 15

표 15. 도 5 미정제 Leu-엔케팔린 아미드의 통합 피크.

피크	Rt	면적	RRT	면적 %
1	8,79	0,190	0,63	0,34
2	10,26	0,723	0,74	1,29
3	10,41	0,236	0,75	0,42
4	11,93	1,281	0,86	2,29
5	12,33	0,174	0,89	0,31
6	12,91	0,164	0,93	0,29
7	13,27	0,203	0,95	0,36
8	13,39	0,102	0,96	0,18
9	13,58	1,260	0,98	2,25
10	13,87	45,450	1,00	81,19
11	14,21	0,507	1,02	0,91
12	14,41	0,166	1,03	0,30
13	14,52	0,608	1,04	1,09
14	14,93	0,531	1,07	0,95
15	15,59	0,174	1,12	0,31
16	15,69	0,293	1,13	0,52
17	15,89	0,114	1,14	0,20
18	16,92	0,108	1,22	0,19
19	18,92	0,232	1,36	0,41
20	19,14	0,396	1,38	0,71
21	20,75	0,164	1,49	0,29
22	22,53	0,162	1,62	0,29
23	23,77	2,741	1,71	4,90

[0237]

[0238] 6. 활용된 SPPS 폐기물 중에서 Fmoc-Gly-OH와 TentaGel S NH₂ 수지의 커플링

[0239] 실험 부분의 섹션 5에 기술된 Leu-엔케팔린 아미드 합성으로부터의 SPPS 폐기물의 재활용:

[0240] 존재하는 임의의 불용성 물질을 제거하기 위해서, SPPS 폐기물은 진공 흡입 하에 셀라이트 패드를 통해 여과시켰다. 다음으로, 5.0 g의 IEX 수지를 부호너 깔대기에 넣고 물로 세척하였다 (3 x 50 mL). 20 mL 분취량의 SPPS 폐기물을 이어서 세척된 IEX 수지에 도포하였고, 진공 흡입 하에서 여과시켰다. 4회 실험을 수행하였다:

[0241] i) SPPS 폐기물을 SP-Toyopearl-650C IEX 수지를 통해 여과시켰다 (표 16, 항목 3).

[0242] ii) SPPS 폐기물을 QAE-Toyopearl-550C IEX 수지를 통해 여과시켰다 (표 16, 항목 4).

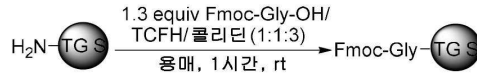
[0243] iii) SPPS 폐기물을 SP-Toyopearl-650C 및 QAE-Toyopearl-550C IEX 수지를 통해 여과시켰다 (표 4, 항목 5).

[0244] iv) SPPS 폐기물을 Amberlite MB-6113 IEX 수지를 통해 여과시켰다 (표 16, 항목 6).

[0245] 실험 i) - iv)에서 얻은 여과물을 HPLC를 통해 분석하였고 이렇게 수득된 크로마토그램 (도 10 - 13)은 각각 버진 H₂O/PC (도 8) 및 SPPS 폐기물 (도 9)의 크로마토그램과 비교하였다. IEX 수지를 통해 여과된 SPPS 폐기물 샘플 중 PC의 함량은 기준 표준으로서 버진 PC/H₂O의 샘플 (도 8)을 사용하여서, PC의 주요 성분인, 메틸-5-(디메틸아미노)-2-메틸-5-옥소펜타노에이트의 양을 정량하여 결정되었다. Fmoc-Gly-OH와 TentaGel S NH₂ 수지의 시험 커플링에서 SPPS 폐기물의 재활용된 샘플을 사용하기 전에, PC의 함량은 버진 H₂O/PC (4:1)에서와 동일한 함량으로 조정되었다.

표 16

표 16: 재활용 폐기물 중 TG S NH₂ 수지와 Fmoc-Gly-OH의 커플링.^[a]



항목	용매	Conv. (%) ^[a]
1	버진 H ₂ O/PC (4:1)	>99 ^[b]
2	SPPS 폐기물	31.6
3	SPPS 폐기물 -CEX 수지-> H ₂ O/PC ^[c]	80.6
4	SPPS 폐기물 -AEX 수지-> H ₂ O/PC ^[c]	85.5
5	SPPS 폐기물 -CEX 및 AEX 수지-> H ₂ O/PC ^[c]	>99 ^[b]
6	SPPS 폐기물 -혼합 IEX 수지-> H ₂ O/PC ^[c]	>99 ^[b]

^[a] Fmoc-Gly TG S 수지 상의 Fmoc 함량을 정량하여 결정됨; ^[b] 음성 (닌히드린) 발색 시험에 따라 커플링 완료; ^[c] H₂O/PC 비율은 4:1로 조정됨.

[0246]

[0247]

7. 재활용된 SPPS 폐기물에서 Leu-엔케팔린 아미드의 SPPS

[0248]

섹션 5에 기술된 바와 동일한 방식으로 합성을 수행하였다. 사용된 규모는 본래 규모의 50%로서, 즉 0.5 g의 0.18M Fmoc-RMG TentaGel S 출발 수지 (0.09 mmol)가 사용되었다. 시약, 반응물, 및 용매의 모든 양은 그에 따라 규모 축소된 반면 반응 시간 및 온도는 동일하게 유지되었다. 필요한 PC/H₂O (1:4)는 섹션 6에 기술된 절차에 따라서 수득되었다. 합성 완료 시에 최종 수지를 i-PrOH로 세척하였고, 진공 하에서 항량까지 건조하여서 0.53 g의 Leu-엔케팔린 아미드 RMG TentaGel S 펩티드 수지를 얻었다. H₂O/PC 함유 SPPS 폐기물의 총량은 약 185 mL이었다. 100 mg의 Leu-엔케팔린 아미드 수지는 소결 시린지에 칭량해 넣었고, 1.0 mL의 TFA/TIS/H₂O (90:5:5)를 첨가하였으며, 최종 슬러리를 rt에서 2시간 동안 진탕하였다. 소모된 수지를 여과해 버리고 2 x 0.5 mL TFA로 세척하였다. 배합된 휘발물은 진공 하에 제거하였고, 미정제 펩티드를 2 x 20 mL 디에틸 에테르 (Et₂O)로 침전시켜서 9.6 mg (84%)의 미정제 Leu-엔케팔린 아미드를 얻었다. 미정제 생산물의 HPLC 순도는 86%였다 (도 13 및 표 17).

표 17

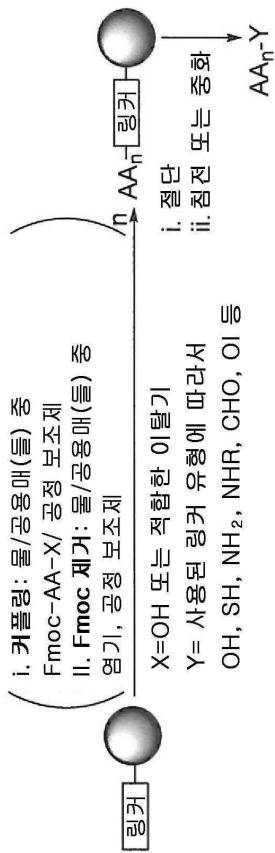
표 17. 도 14 미정제 Leu-엔케팔린 아미드의 통합 피크.

번호	피크명	체류 시간 분	면적 mAU*분	양	유형	높이 mAU	상대 면적 %	분해능
1	n.a.	9,095	0,0236	n.a.	BMB*	0,318	0,18	1,77
2	n.a.	9,305	0,2220	n.a.	BMB*	2,999	1,69	3,54
3	n.a.	9,735	0,4301	n.a.	BMB*	5,340	3,28	2,37
4	n.a.	10,024	0,0382	n.a.	BMB*	0,515	0,29	2,15
5	n.a.	10,262	0,0375	n.a.	BMB*	0,616	0,29	1,49
6	n.a.	10,430	11,3343	n.a.	BMB*	138,777	86,36	2,30
7	n.a.	10,696	0,0511	n.a.	BMB*	0,792	0,39	1,74
8	n.a.	10,897	0,1951	n.a.	BM*	2,535	1,49	1,12
9	n.a.	11,041	0,0972	n.a.	M*	1,158	0,74	n.a.
10	n.a.	11,149	0,0448	n.a.	MB*	0,541	0,34	n.a.
11	n.a.	13,585	0,6510	n.a.	BMB*	4,169	4,96	n.a.
합계:			13,1249	0,0000		157,759	100,00	

[0249]

도면

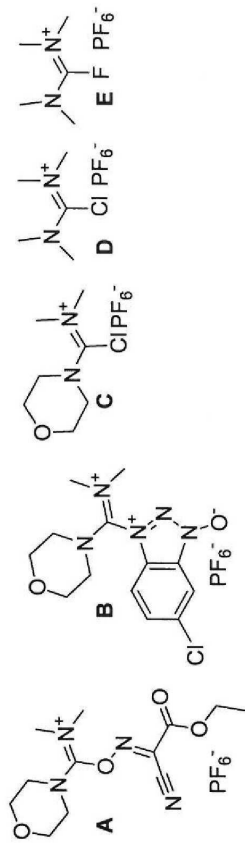
도면1



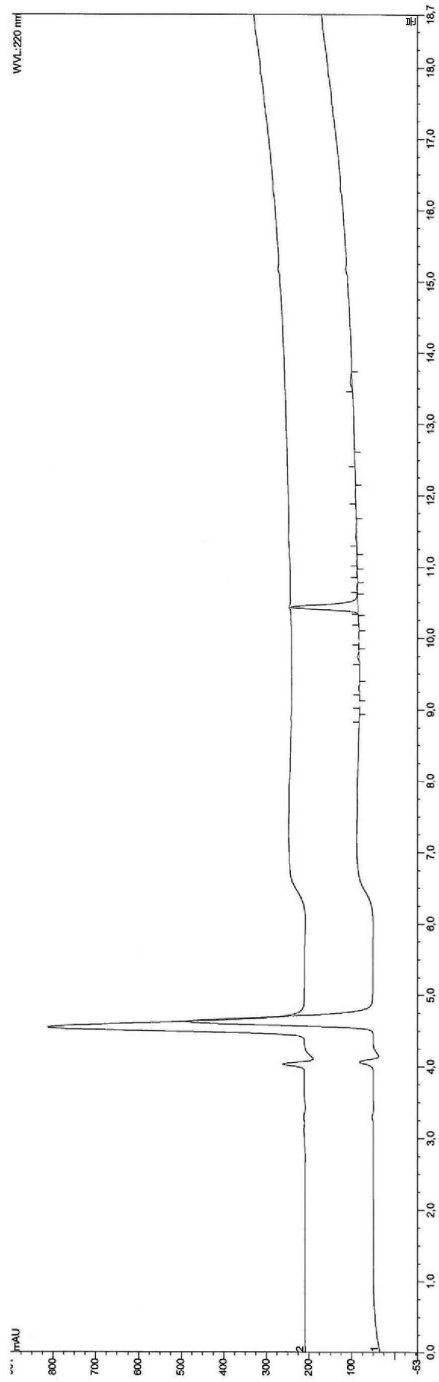
도면2



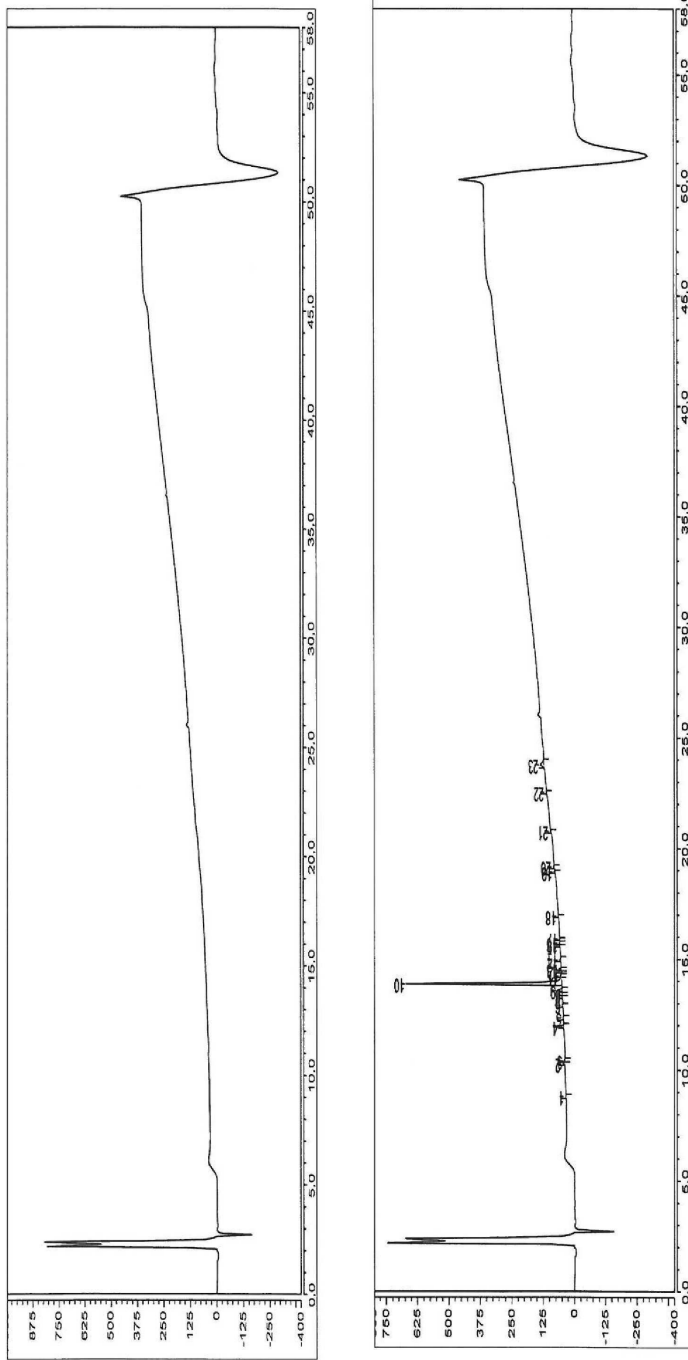
도면3



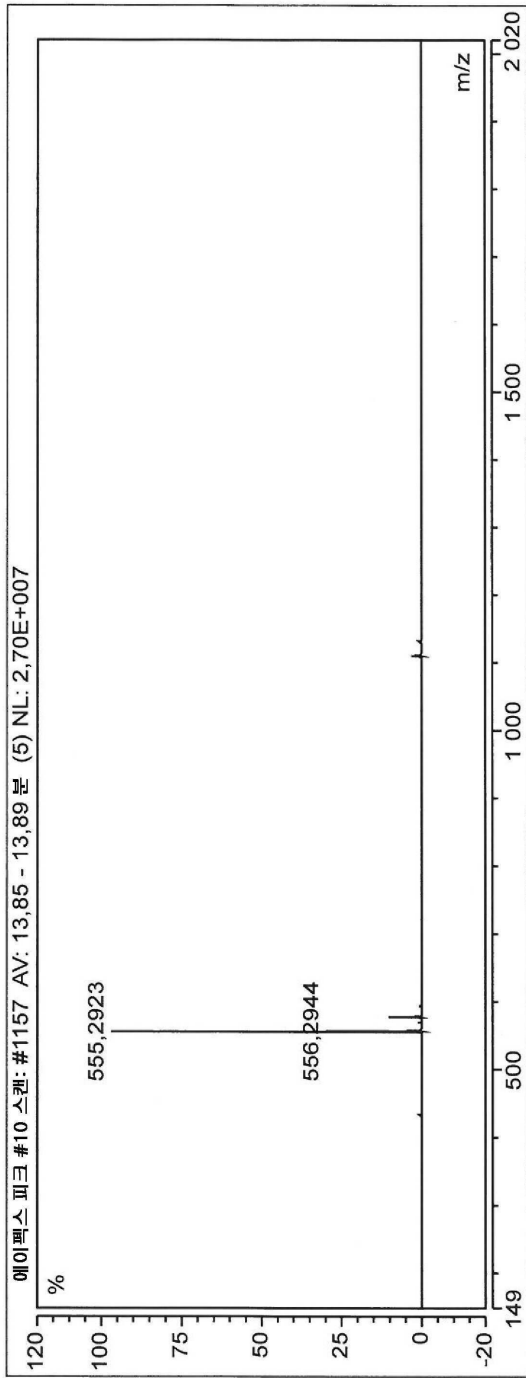
도면4



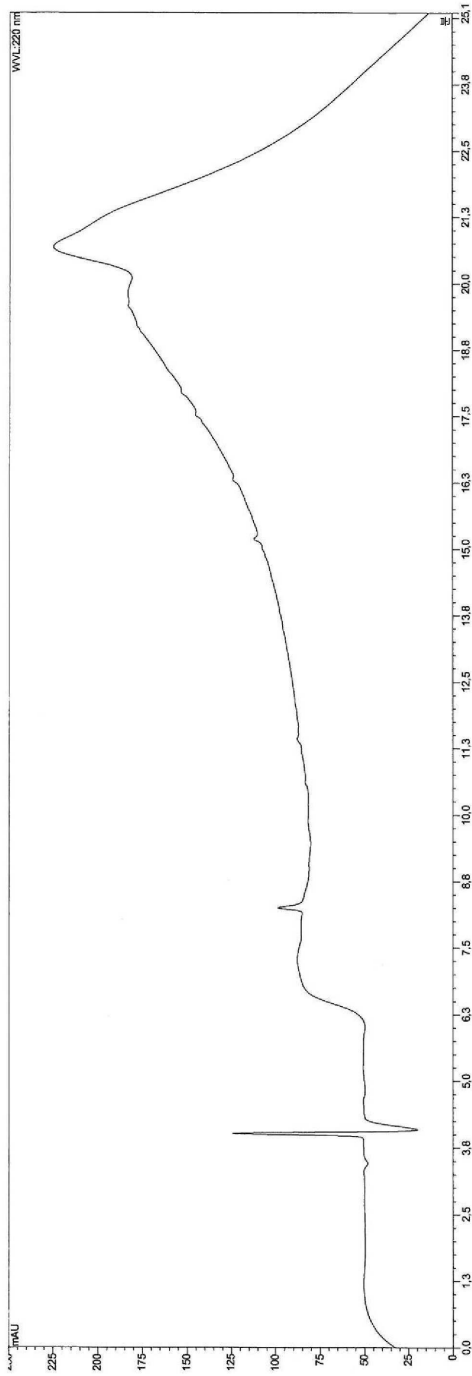
도면5



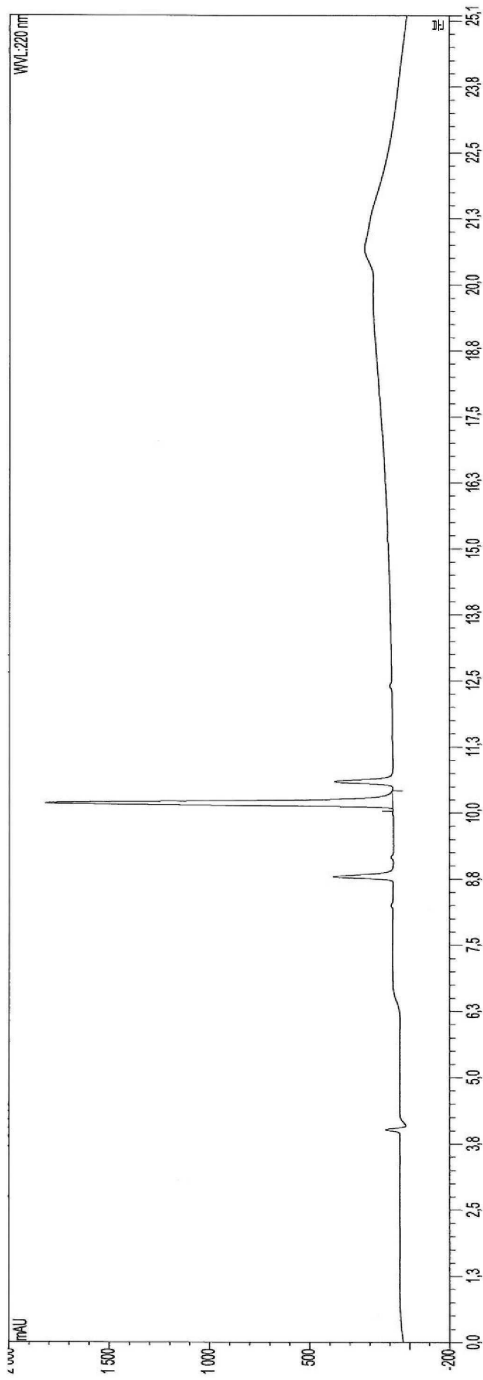
도면6



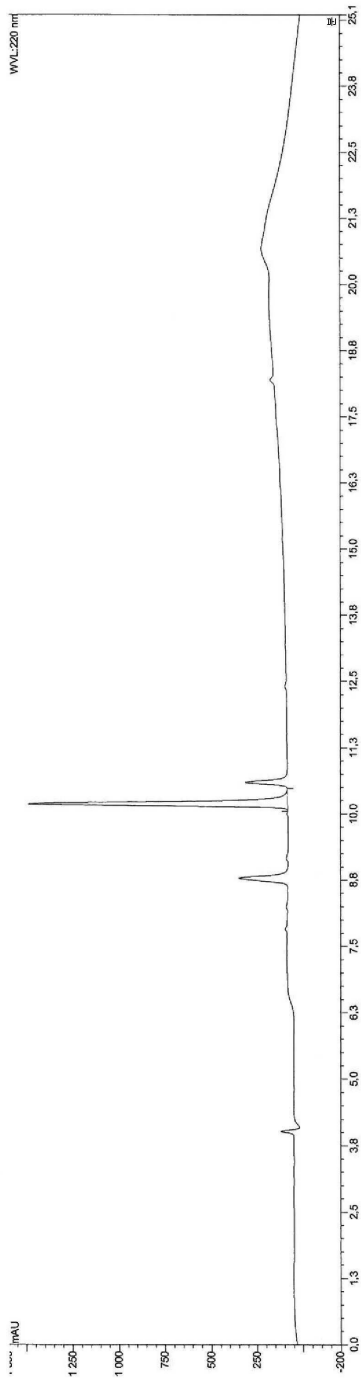
도면7



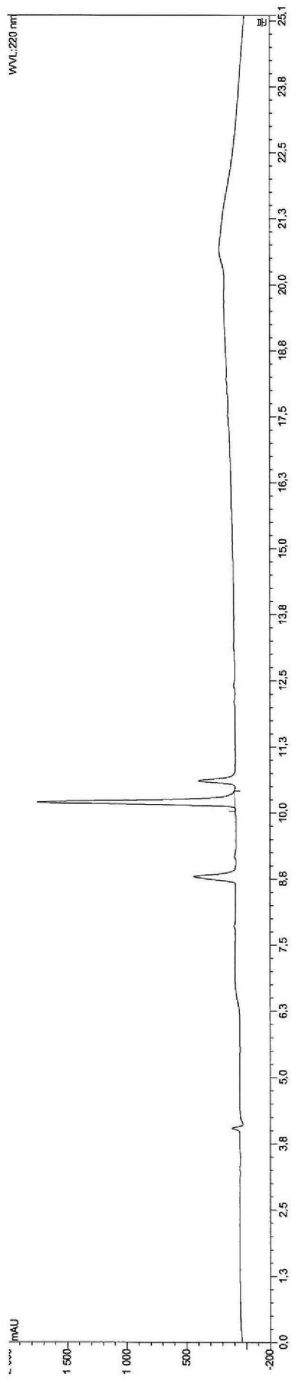
도면8



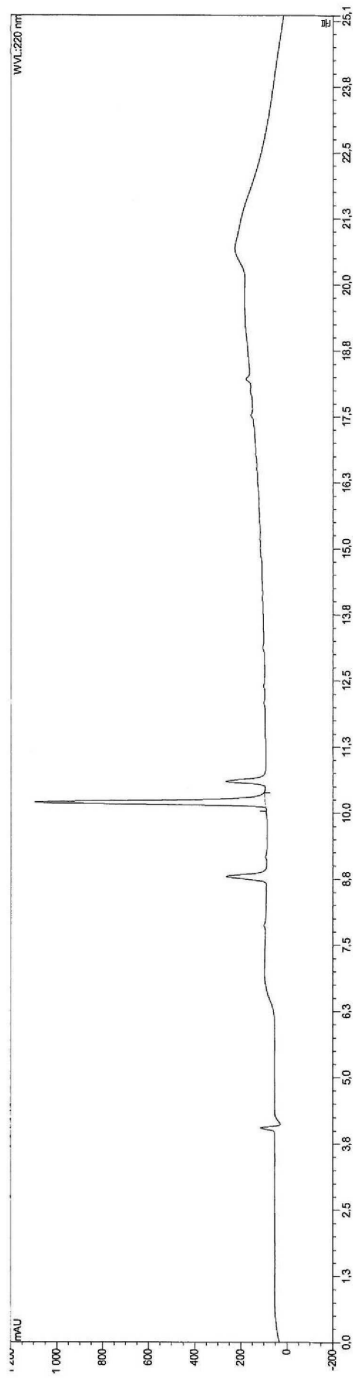
도면9



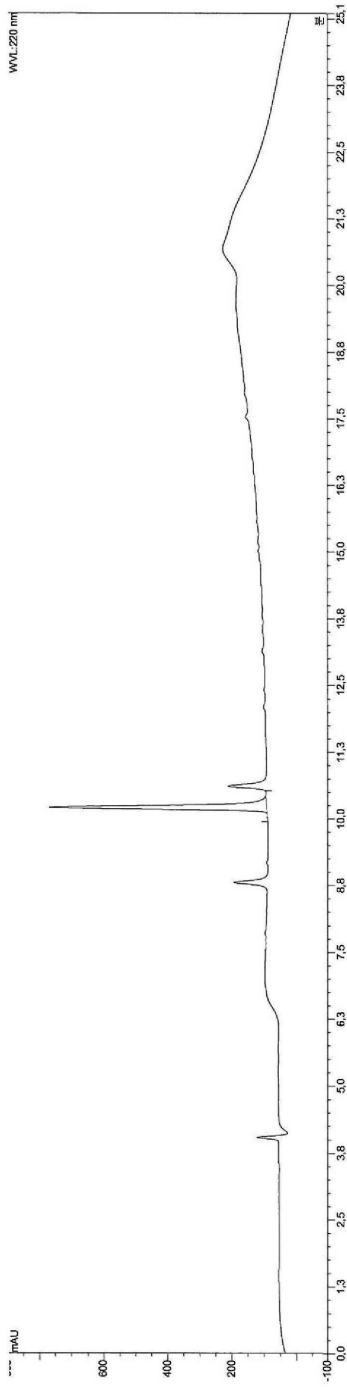
도면10



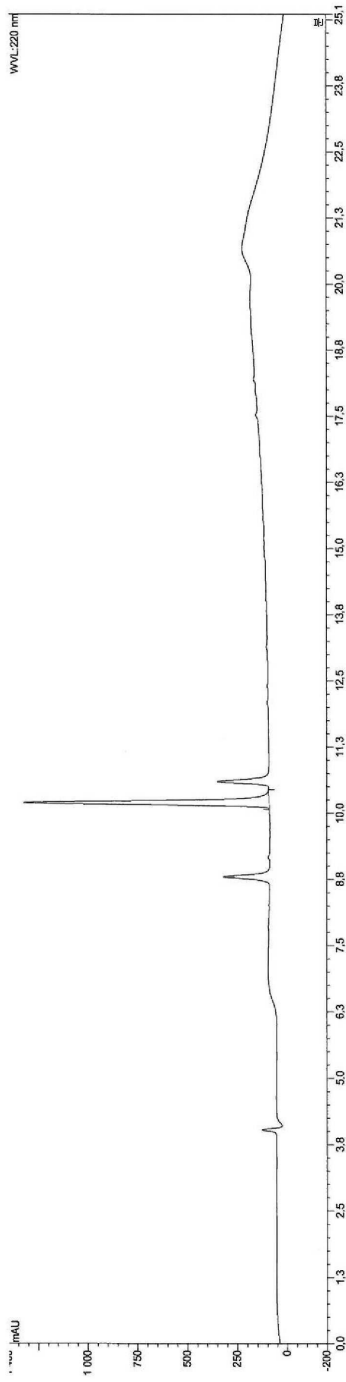
도면11



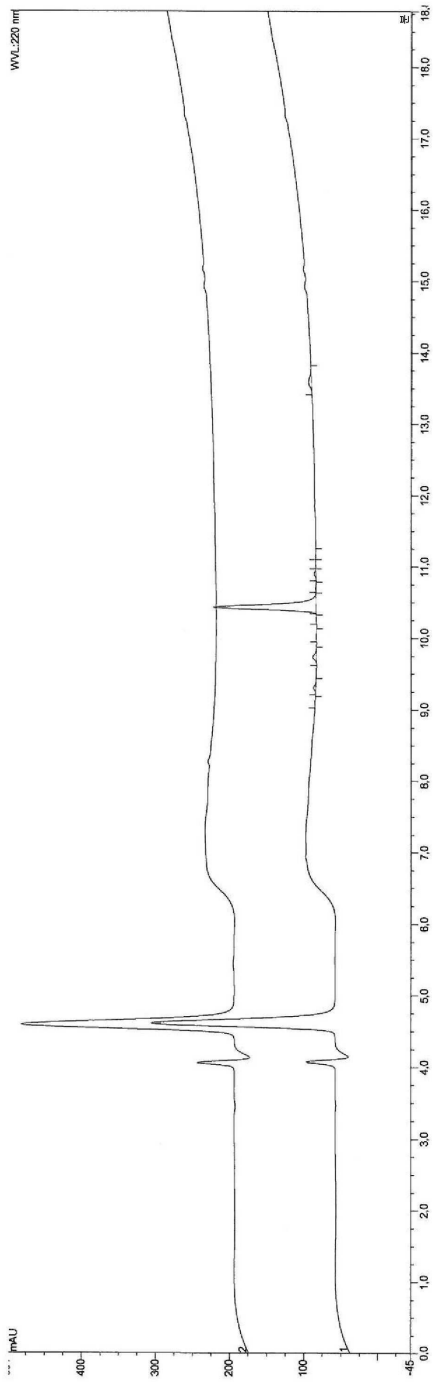
도면12



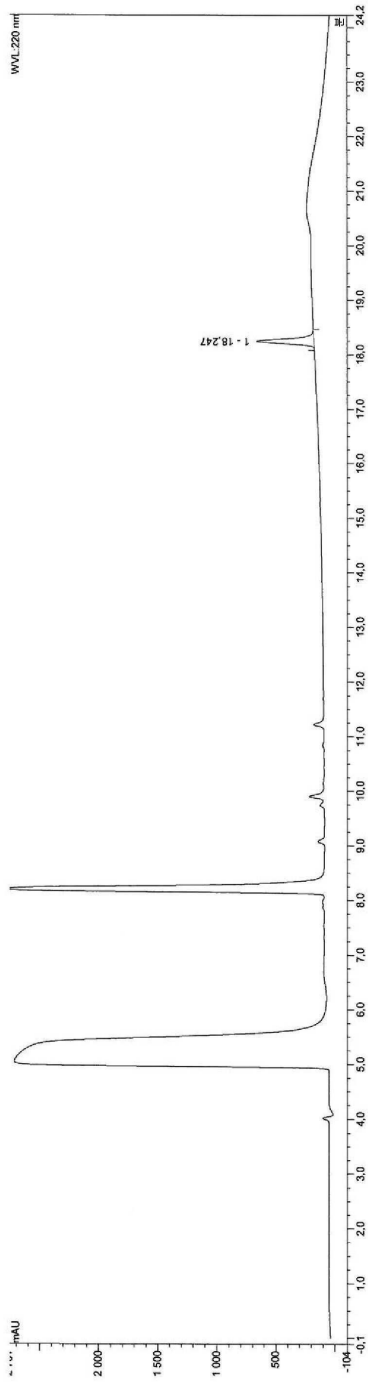
도면13



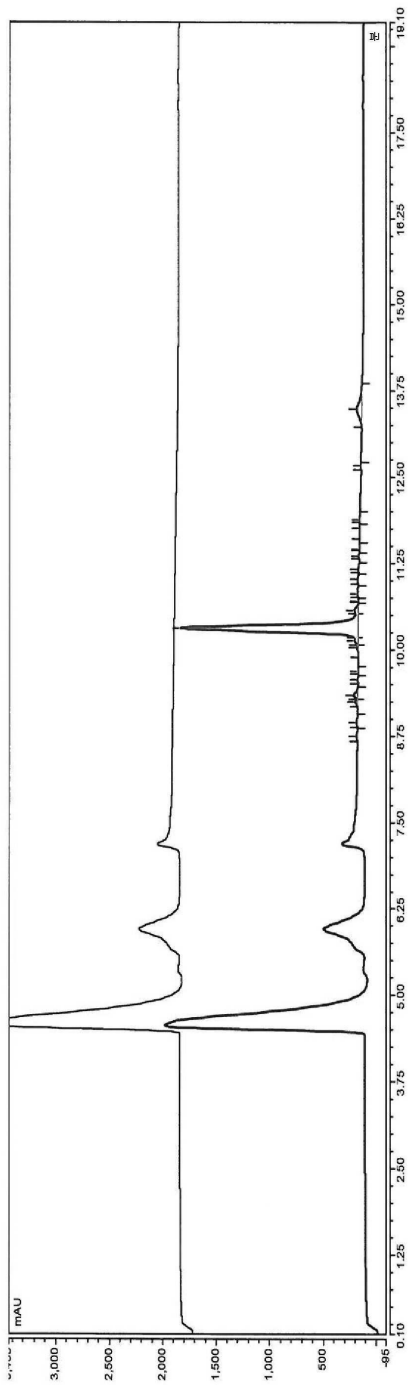
도면14



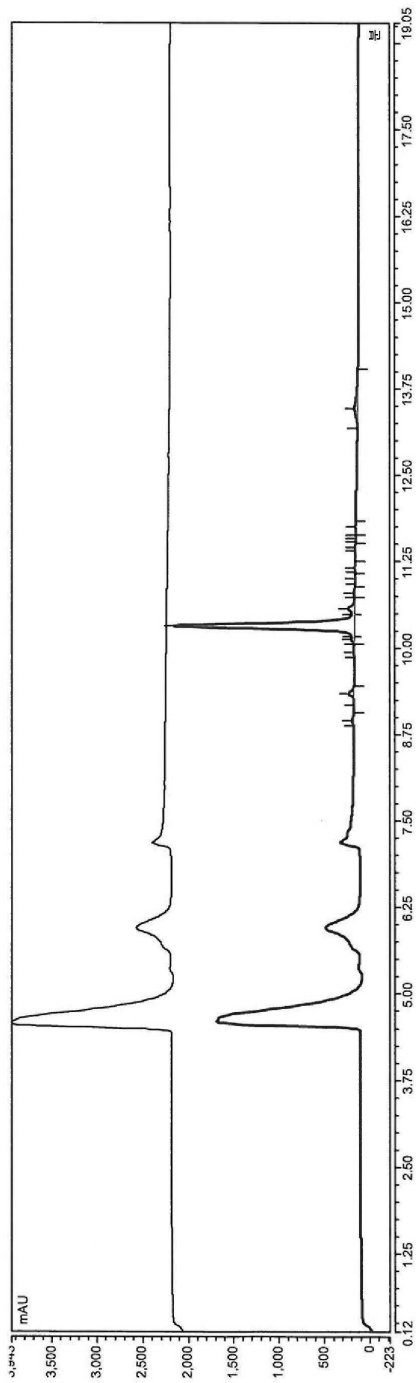
도면15



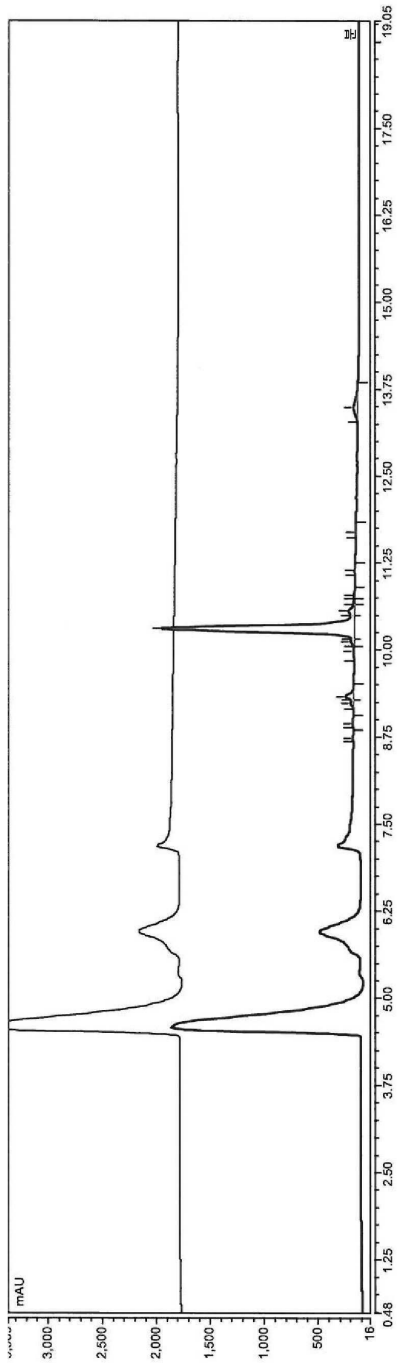
도면16



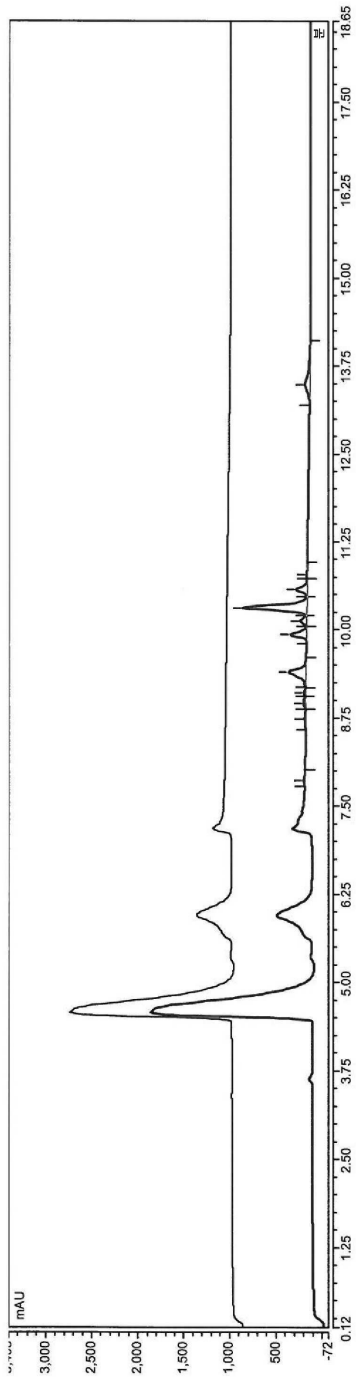
도면17



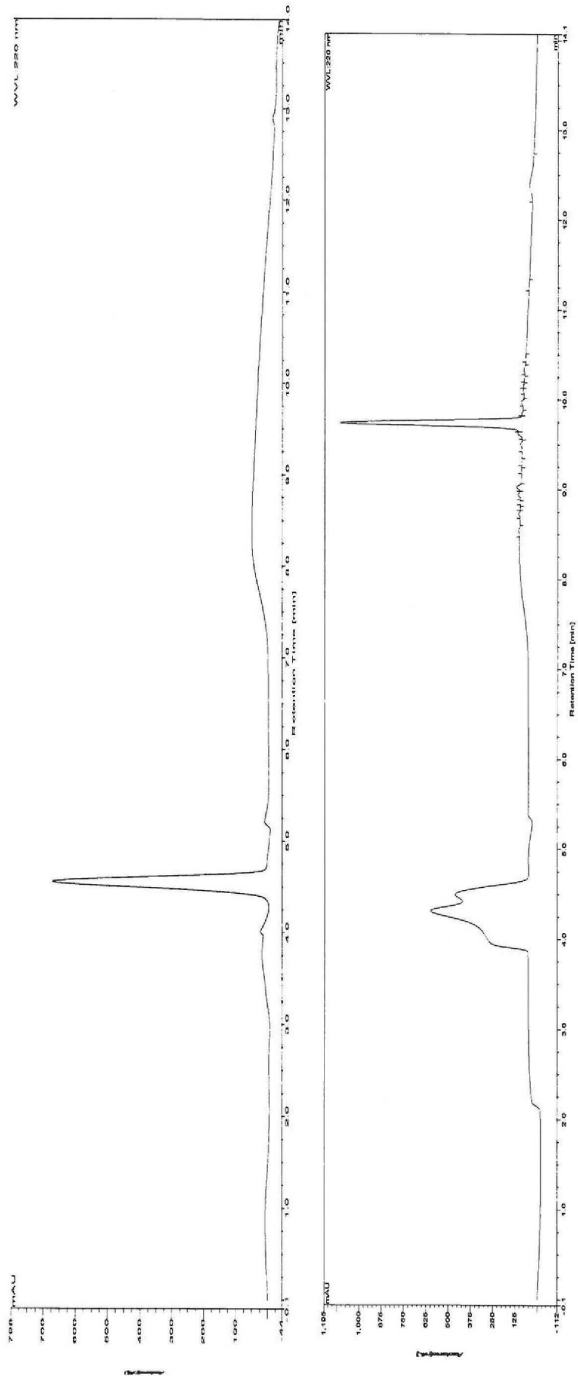
도면18



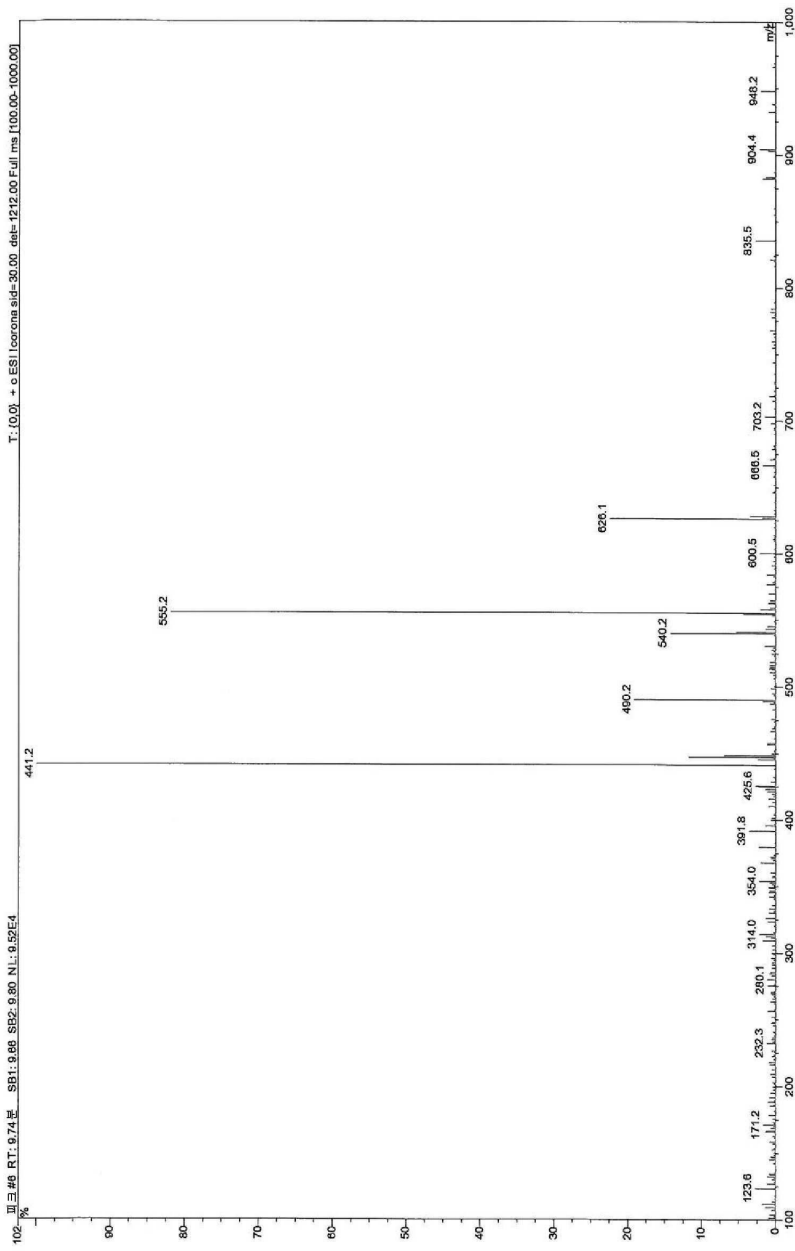
도면19



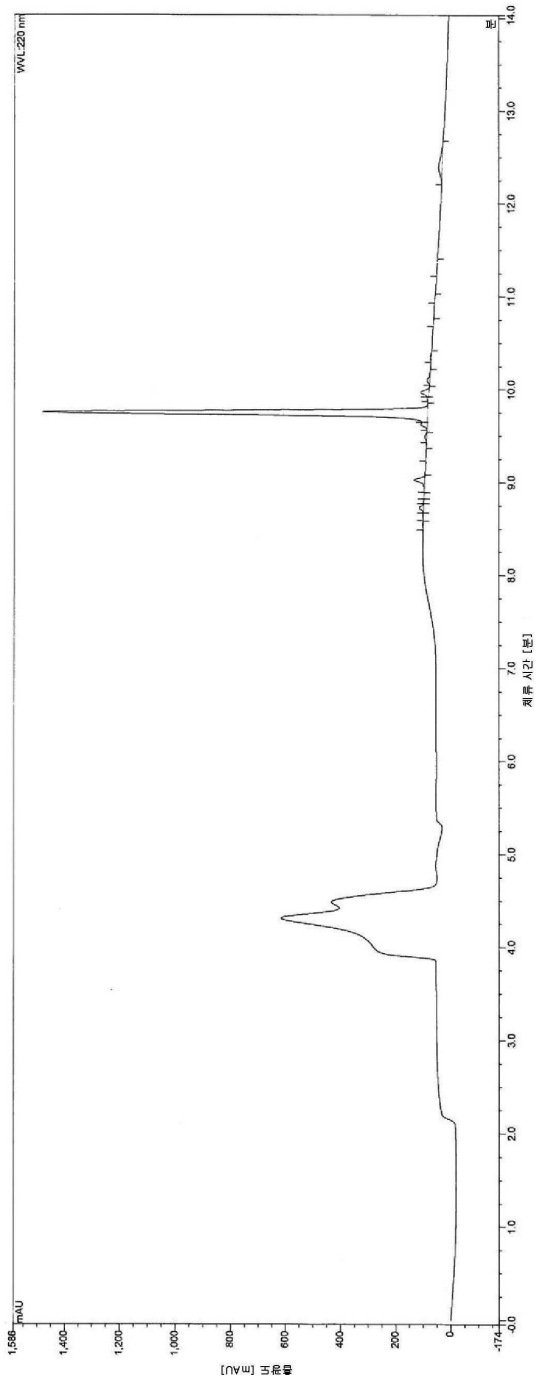
도면20



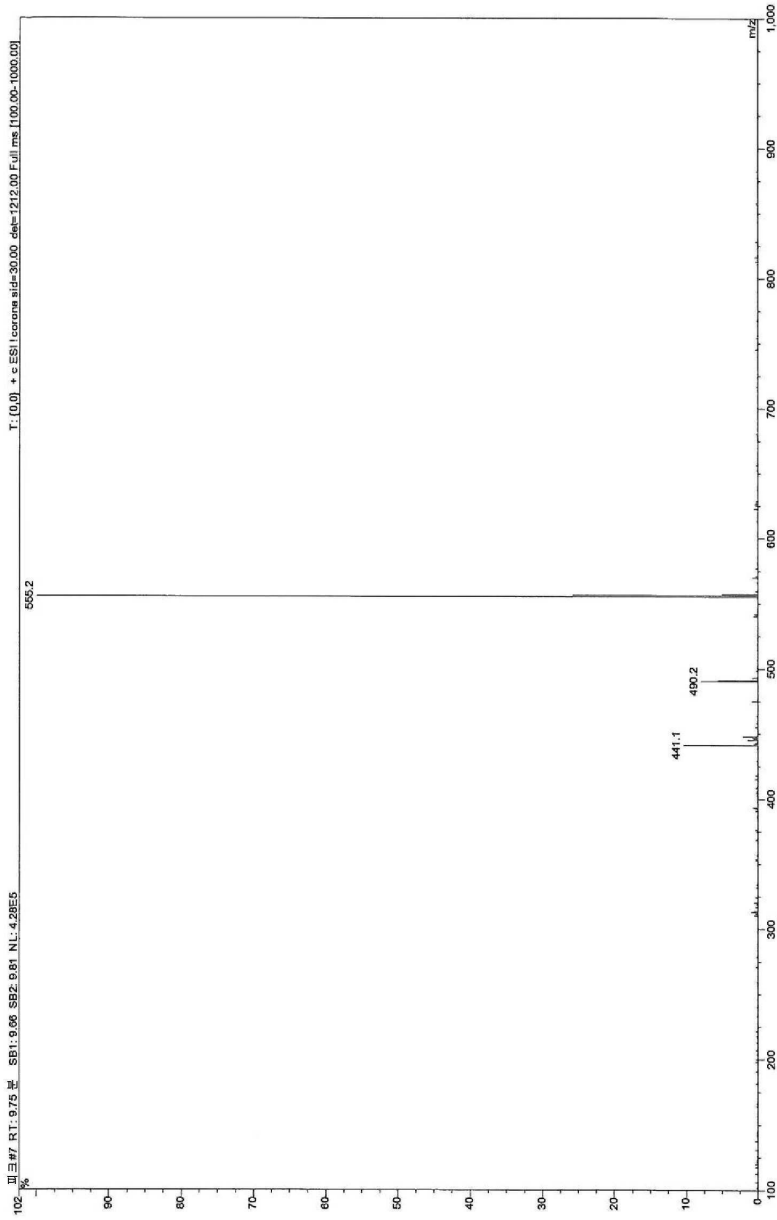
도면21



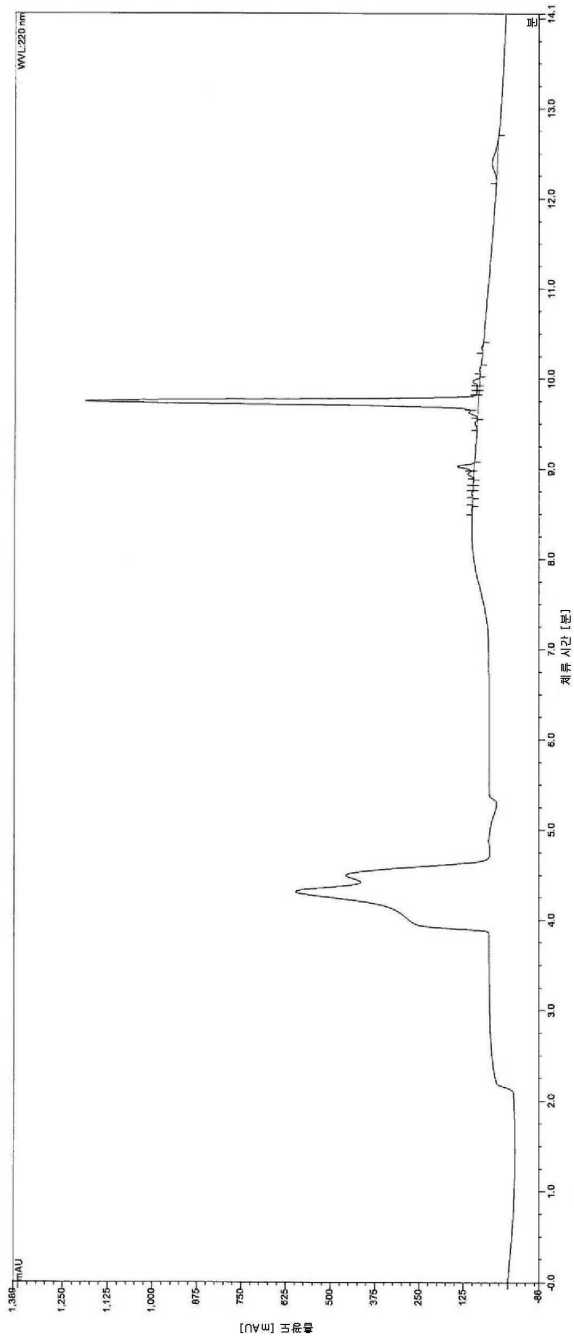
도면22



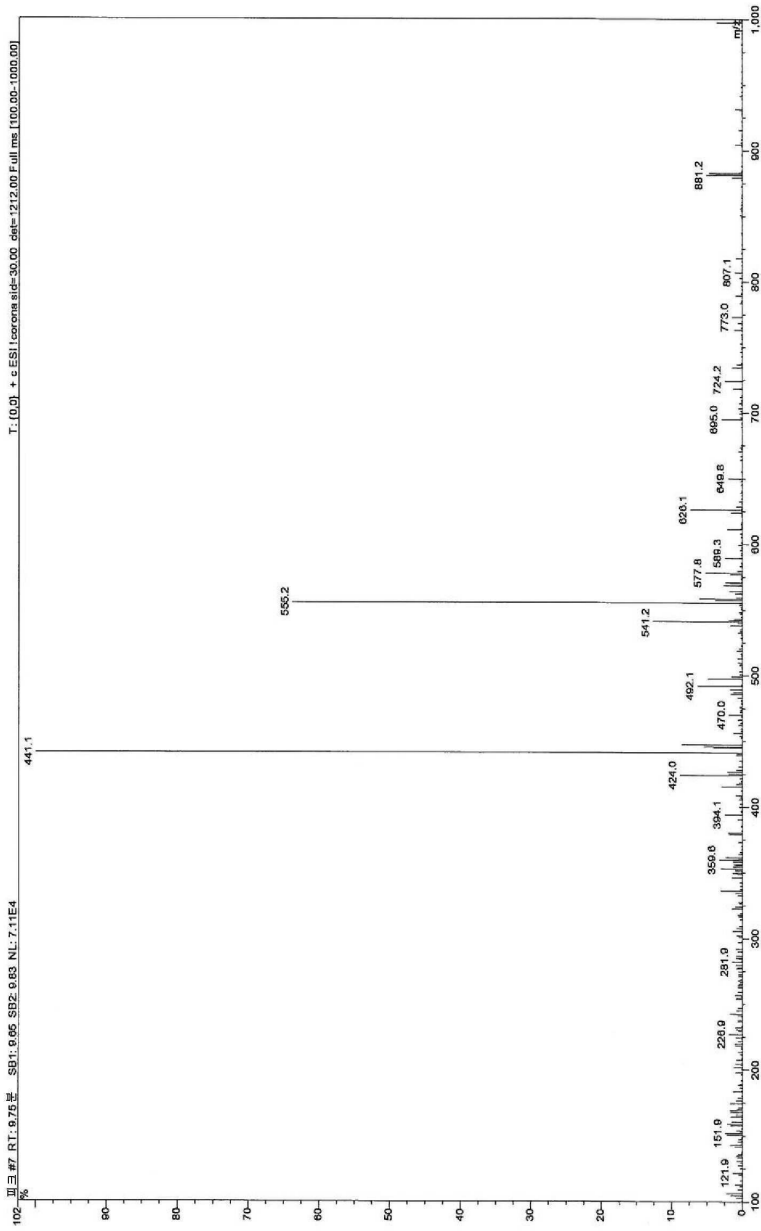
도면23



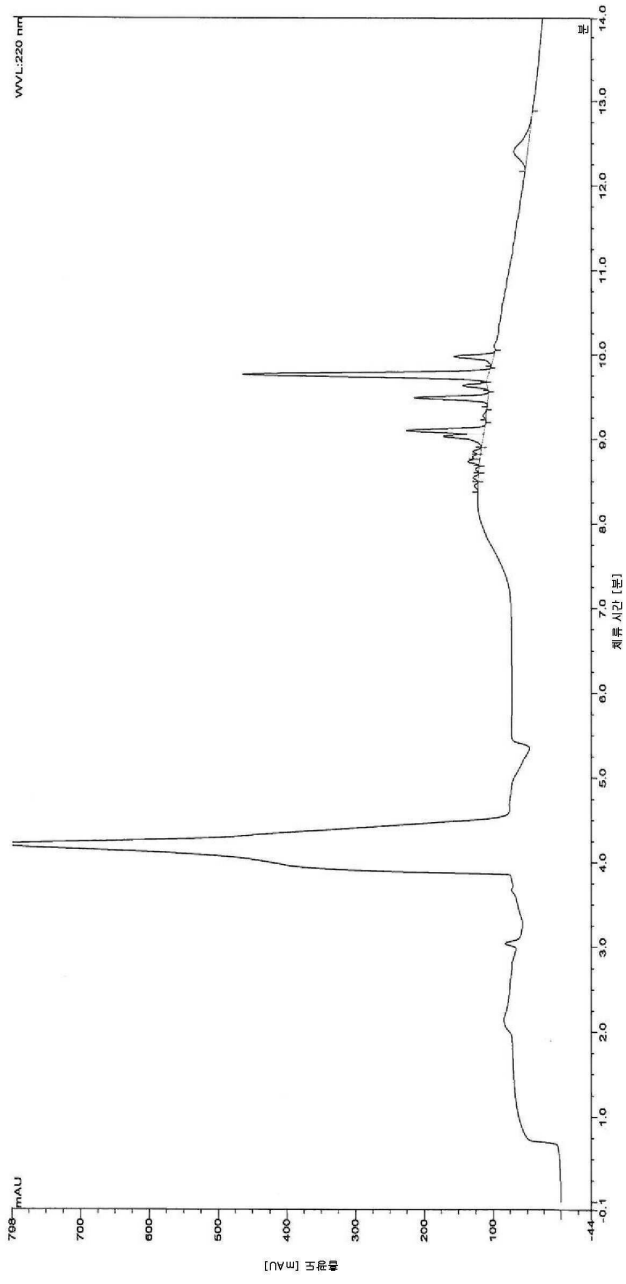
도면24



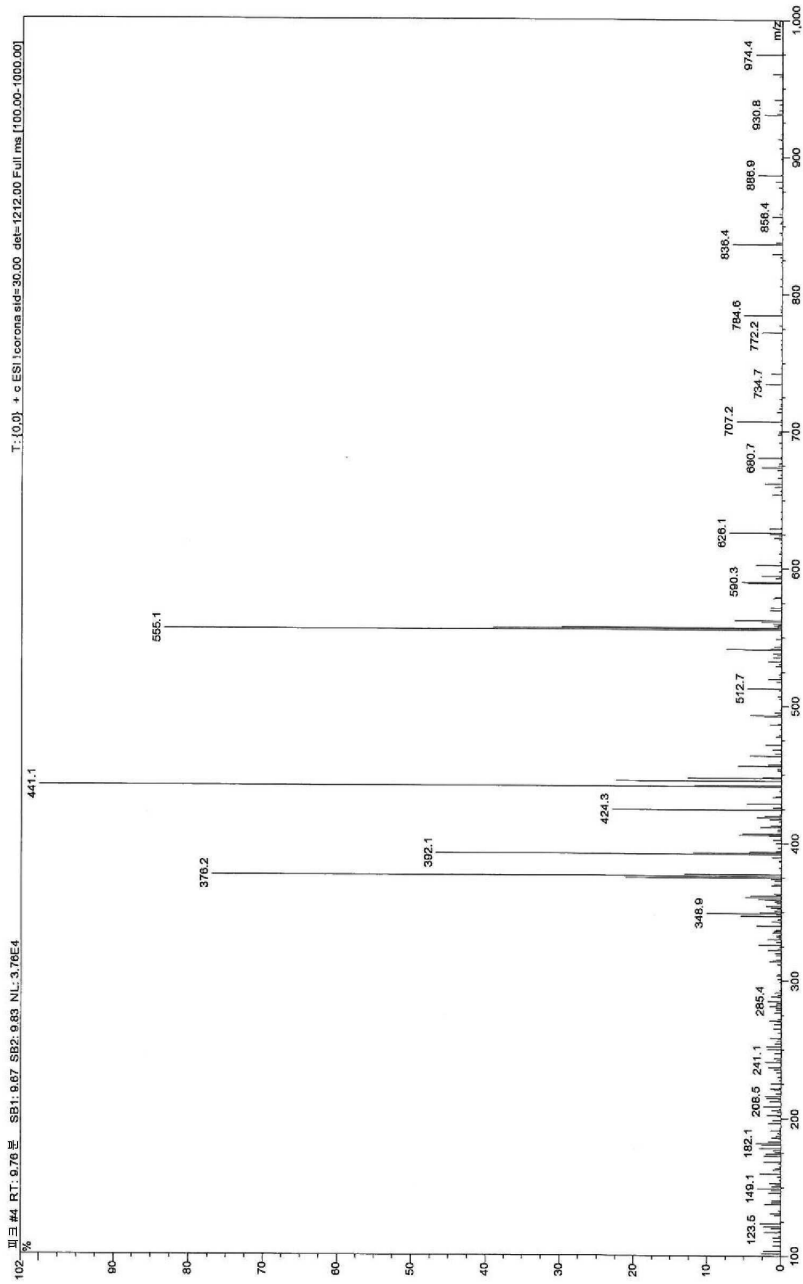
도면25



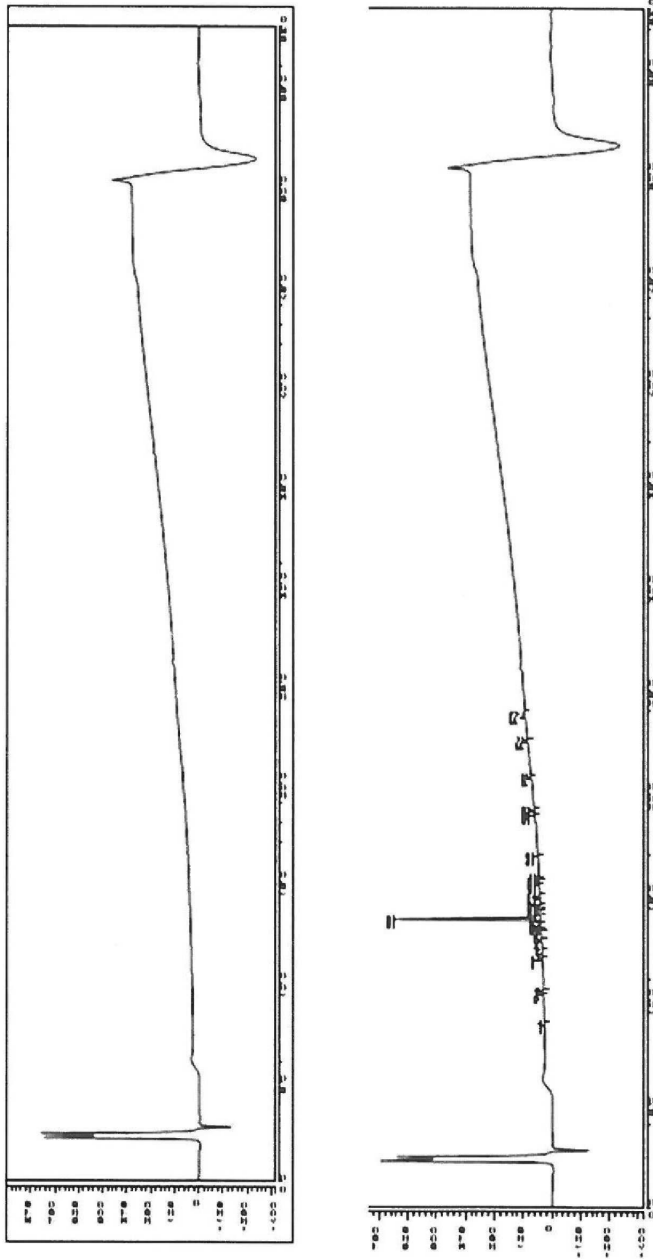
도면26



도면27



도면28



도면29

