

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 197**

51 Int. Cl.:

**C07K 5/06** (2006.01)

**C07K 5/08** (2006.01)

**C07K 5/10** (2006.01)

**C07K 7/06** (2006.01)

**C07K 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2006 PCT/JP2006/315174**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2007 WO07099656**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2006 E 06782052 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019 EP 1995254**

54 Título: **Método de producción de péptidos**

30 Prioridad:

**01.03.2006 JP 2006055094**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**30.10.2019**

73 Titular/es:

**KANEKA CORPORATION (100.0%)  
2-3-18, Nakanoshima, Kita-ku  
Osaka, JP**

72 Inventor/es:

**MURAO, HIROSHI;  
MORIO, KEN-ICHIRO y  
MITSUDA, MASARU**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 729 197 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método de producción de péptidos

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de producción de un péptido tal como se expone en las reivindicaciones, que es capaz de producir eficazmente un compuesto peptídico con alta pureza con un procedimiento sencillo.

10

**Antecedentes de la técnica**

Un péptido es un compuesto que se compone de una pluralidad de aminoácidos condensados entre sí a través de un enlace peptídico, y tiene diversas propiedades basadas en los aminoácidos como componentes constituyentes, tales como hidrofiliidad, hidrofobicidad, acidez y basicidad. Además, un péptido tiene una conformación intrínseca que depende de la secuencia de aminoácidos. Debido a estas características, un péptido tiene diversas funciones tales como expresión de una bioactividad por medio de una interacción con una proteína o similar.

15

Por ejemplo, un compuesto peptídico que tiene una bioactividad puede desarrollarse para dar un producto farmacéutico. En la actualidad, se ha aprobado y comercializado un gran número de productos farmacéuticos peptídicos en el mercado. Por tanto, ha aumentado la expectativa de desarrollo de un método de síntesis sencillo, eficaz y ampliamente usado de un compuesto peptídico.

20

Un péptido se sintetiza repitiendo una reacción de deshidratación-condensación entre un grupo amino de un componente de aminoácido y un grupo carboxilo de otro componente de aminoácido, es decir una reacción de alargamiento de cadena peptídica, dependiendo de la secuencia de aminoácidos del péptido. De los dos componentes de aminoácido implicados en esta formación de enlace peptídico, el componente que proporciona el grupo amino se denomina componente de amina, y el componente que proporciona el grupo carboxilo se denomina componente de ácido.

25

30

En un método de síntesis química de péptidos, se activa un componente de ácido mediante cualquiera de diversos métodos de éster activo o con un reactivo de acoplamiento tipificado por diciclohexilcarbodiimida (DCC), anhídrido propanofosónico (T3P) o similar, y se hace reaccionar con un componente de amina, de ese modo se forma un enlace peptídico. En el método de síntesis química, un grupo funcional que no debe participar en una reacción de condensación, tal como un grupo carboxilo de un componente de amina o un grupo amino de un componente de ácido, se protege; y se lleva a cabo una reacción de condensación; y entonces, el grupo protector para el grupo amino N-terminal del producto condensado resultante se retira para formar un nuevo componente de amina; de modo que la reacción se controla con el fin de obtener un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos deseada. En este método de síntesis química de péptidos, hay principalmente un método en fase sólida en el que una cadena peptídica se alarga sobre un soporte de fase sólida y un método en fase líquida en el que se lleva a cabo una reacción en una fase líquida.

35

40

En el método en fase sólida, se usa un componente de amina cuyo grupo carboxilo C-terminal se protege de una forma tal que el grupo carboxilo C-terminal se une a un soporte de fase sólida insoluble que se compone de, por ejemplo poliestireno, por medio de un ligador; se lleva a cabo una reacción de alargamiento sucesiva mientras que el grupo carboxilo C-terminal está unido al soporte de fase sólida; el grupo carboxilo C-terminal se escinde del soporte de fase sólida tras completarse una secuencia deseada para obtener un péptido o. La automatización completa del método en fase sólida es fácil de lograr, puesto que pueden sintetizarse diversos péptidos casi independientemente de sus secuencias mediante el método.

45

50

Sin embargo, generalmente es difícil en el método en fase sólida hacer reaccionar completamente todos los componentes de amina sobre el soporte de fase sólida, puesto que se lleva a cabo una reacción no homogénea de un sistema de dos fases sólida-líquida y el sitio de reacción del componente de amina está ocupado estéricamente sobre el soporte de fase sólida. Cuando una parte de los componentes de amina unidos al soporte de fase sólida permanecen en un estado sin reaccionar en la reacción de condensación, es necesario hacer reaccionar completamente los componentes de amina usando un gran exceso de reactivos tales como un componente de ácido y un reactivo de acoplamiento.

55

Además, en el método en fase sólida resulta difícil monitorizar la calidad o razón de conversión de la reacción. Además, el péptido impuro no puede retirarse en absoluto hasta que se completa la secuencia deseada y se escinde del soporte de fase sólida, puesto que el péptido impuro producido como subproducto está unido al soporte de fase sólida junto con el péptido objetivo. Generalmente resulta difícil retirar el péptido impuro, puesto que el péptido impuro tiene una propiedad similar a la del péptido objetivo debido a una estructura parcial común entre los péptidos. Por los motivos anteriores, el método en fase sólida es incompleto particularmente como método de síntesis de un compuesto peptídico de alta pureza.

60

65

Además, cuando se aplica el método en fase sólida a la producción de un compuesto peptídico a escala industrial, hay una restricción en cuanto a la instalación de producción y similar; y se usan un soporte de fase sólida relativamente caro y una gran cantidad de reactivos y un disolvente; y también se genera una gran cantidad de desechos en proporción a la cantidad del reactivo o disolvente usado; por tanto, se requiere un alto coste para la eliminación de materias primas y líquidos de desecho. Por consiguiente, es difícil decir que el método en fase sólida es un método económicamente ventajoso.

Por otro lado, el método en fase líquida es un método en el que se llevan a cabo una reacción de condensación para formar un enlace peptídico y una reacción de desprotección para retirar un grupo protector para el grupo amino N-terminal del producto condensado resultante para formar un nuevo componente de amina en una fase líquida (disolución) usando un grupo protector capaz de hacer que el producto condensado resultante sea soluble en un disolvente de reacción como grupo protector para un grupo carboxilo de un componente de amina. En el método en fase líquida, puede retirarse un péptido impuro mediante purificación en la fase central del alargamiento de la cadena peptídica. Sin embargo, cuando no se protege un grupo funcional de cadena lateral de un aminoácido, se requieren procedimientos de purificación complicados tales como cromatografía purificación de un producto intermedio, un procedimiento de cristalización y un procedimiento de lavado de cristales con una pluralidad de disolvente sistemas para las respectivas etapas de condensación (se hace referencia al documento no de patente 1). Además, incluso cuando un aminoácido cuyo grupo funcional de cadena lateral está completamente protegido, el método tiene la desventaja de que se produce como subproducto un péptido impuro y la pureza del péptido objetivo disminuye, puesto que el éster activo que queda en la disolución no puede descomponerse completamente (se hace referencia al documento no de patente 2).

A partir de las circunstancias anteriores, se demanda el desarrollo de un método de síntesis de péptidos en fase líquida en el que se omitan los procedimientos de purificación para un producto intermedio en la medida de lo posible y pueda obtenerse un péptido objetivo con alta pureza mediante un procedimiento sencillo. Recientemente, se ha desarrollado un método de síntesis de péptidos en fase líquida continuo en el que los respectivos procedimientos para la síntesis de péptidos se simplifican al tiempo que se mantiene alta la pureza del péptido objetivo.

Como uno de los métodos de síntesis continuos, existe el siguiente método de síntesis en fase líquida notificado por Carpino *et al.* (se hace referencia al documento no de patente 3 y documento de patente 1). En el método, tras un reacción de condensación de péptidos usando una cantidad en exceso de un componente de ácido cuyo grupo amino N-terminal está protegido por un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y un componente de amina cuyo grupo carboxilo C-terminal está protegido por un grupo t-butilo, el éster activo que queda en la disolución se convierte en una forma de amida para hacer que el éster activo sea inocuo usando un eliminador tal como tris-(2-aminoetil)amina; y al mismo tiempo, se retira el grupo protector para el grupo amino del éster activo. Además, también se permite que se realice la retirada del grupo protector para el grupo amino N-terminal del producto condensado objetivo, y la descomposición del éster activo y la retirada del grupo protector para el grupo amino N-terminal se completan al mismo tiempo usando el eliminador mencionado anteriormente. Un compuesto generado mediante esta reacción de descomposición de éster activo se retira fácilmente en una fase acuosa lavando con una disolución acuosa débilmente ácida. Repitiendo dicha serie de procedimientos, puede sintetizarse de manera continua un compuesto peptídico objetivo de alta pureza.

Además, en el método DioRaSSP de Diosynth (se hace referencia al documento de patente 2) que es un método de síntesis continuo similar, tras la condensación usando una cantidad en exceso de un componente de ácido cuyo grupo amino N-terminal está protegido por un grupo benciloxicarbonilo (Z) y un componente de amina cuyo grupo carboxilo C-terminal está protegido por un grupo t-butilo, el éster activo que queda en la disolución se convierte en una forma de amida para hacer que el éster activo sea inocuo usando éster bencílico de  $\beta$ -alanina como eliminador. La forma de amida generada por la reacción de descomposición de éster activo se convierte en un producto descompuesto con una alta solubilidad en agua retirando ambos grupos protectores en el extremo N-terminal y el extremo C-terminal en la reacción de desprotección del grupo amino N-terminal del producto condensado a través de la hidrogenación catalítica posterior; por tanto, el producto descompuesto resultante se retira fácilmente en una fase acuosa mediante un procedimiento de lavado. Repitiendo dicha serie de procedimientos, puede sintetizarse de manera continua un péptido objetivo de alta pureza.

Estos métodos son capaces de obtener un compuesto peptídico objetivo con pureza relativamente alta al tiempo que simplifican los procedimientos de purificación complicados en las respectivas etapas de condensación, que eran los problemas en el método de síntesis en fase líquida convencional. Además, puede decirse que el método de síntesis en fase líquida continuo tiene alta utilidad en la síntesis química de péptidos.

Sin embargo, el grupo protector para un péptido objetivo está restringido en tanto el método de Carpino *et al.* como el método DioRaSSP por el tipo de eliminador para descomponer un éster activo. Además, es necesario usar una amina cara o derivado de aminoácido no natural como eliminador. Por consiguiente, se ha demandado el desarrollo de un método de descomposición de un éster activo que pueda usarse más ampliamente y tenga una eficacia económica excelente sin depender del tipo de aminoácido protegido que va a usarse y además sin usar un reactivo caro.

Es ideal en el método en fase líquida que un compuesto peptídico objetivo y péptido intermedio del mismo se disuelvan en una fase líquida, y se prefiere que al menos tales péptidos estén dispersados homogéneamente en un medio de fase líquida. Incluso cuando una disolución en disolvente orgánico de los péptidos está en un estado de una emulsión o un gel, no surge un problema en la reacción y el tratamiento posterior si los péptidos están en un estado homogéneamente dispersado en el medio de fase líquida. Por otro lado, cuando los compuestos peptídicos se agregan y se forman para dar un agregado o similar, surge el problema de que se incorpora un componente de amina sin reaccionar en el agregado y la reacción no se completa o no puede llevarse a cabo un procedimiento de separación de líquido en el momento del tratamiento posterior. Por consiguiente, se ha demandado en el método en fase líquida desarrollar un medio novedoso ampliamente usado (sistema de disolvente) capaz de dispersar homogéneamente una amplia gama de compuestos peptídicos en un medio de fase líquida independiente de sus secuencias de aminoácidos.

Tal como se describió anteriormente, no se ha establecido completamente un método de síntesis química ampliamente usado capaz de sintetizar eficazmente un compuesto peptídico con alta pureza que tiene una secuencia de aminoácidos deseada. Por consiguiente, se ha demandado particular e intensamente el desarrollo de un método de descomposición eficaz de un éster activo que afecta enormemente a la calidad de un péptido y un sistema de disolvente con una alta solubilidad para péptidos que son adecuados para los respectivos procedimientos tales como separación de líquidos en un método en fase líquida continuo.

Documento de patente 1: US 5516891

Documento de patente 2: JP-A-2003-55396

Documento no de patente 1: Izumiya *et al.*, "Pepuchido Gosei no Kiso to Jikken" (Conceptos básicos y experimentos de síntesis de péptidos), Maruzen Co., Ltd. (1985)

Documento no de patente 2: Bull. Chem. Soc. Jpn., 55, 2165 (1982)

Documento no de patente 3: Org. Proc. Res. Dev., 7, 28 (2003)

## Divulgación de la invención

### PROBLEMAS QUE VAN A SOLUCIONARSE MEDIANTE LA INVENCION

En vista de las circunstancias anteriores, un objeto de la presente invención es proporcionar un método de descomposición de un éster activo, que se use ampliamente y sea sencillo y no dependa de los tipos de grupos protectores para el grupo amino N-terminal y el grupo carboxilo C-terminal, y un método de síntesis de péptidos en fase líquida continuo que utiliza el método de descomposición y es eficaz y con una eficiencia económica excelente.

### MEDIOS PARA SOLUCIONAR LOS PROBLEMAS

Los presentes inventores realizaron estudios intensivos dirigidos a establecer un método de descomposición eficaz y segura de un éster activo sin usar un eliminador con el fin de lograr los objetos anteriores. Como resultado, los inventores encontraron que un punto de control importante es mantener el sistema de reacción en una condición básica cuando se descompone un componente de ácido éster activo sin reaccionar poniendo en contacto la mezcla de reacción tras una reacción de condensación con una base, y por tanto, se ha completado el método de descomposición de un éster activo de la presente invención tal como se expone en las reivindicaciones.

Además, la presente divulgación se refiere a un sistema de disolvente con una alta solubilidad para péptidos, que puede aplicarse también a un método de síntesis en fase líquida continuo y puede disolver diversos compuestos peptídicos. Específicamente, se encontró que un disolvente de tipo amida que tiene alta hidrofobicidad y es inmisible con agua, tiene una alta solubilidad para péptidos y tiene una propiedad ideal para un método de síntesis en fase líquida, particularmente un método de síntesis en fase líquida continuo; y por tanto, se ha establecido el sistema de disolvente con una alta solubilidad para péptidos de la presente divulgación.

La presente invención es un método de producción de un péptido mediante un método de síntesis en fase líquida tal como se expone en la reivindicación 1.

Además, se divulga un segundo método de producción de un péptido mediante un método de síntesis en fase líquida, caracterizado porque comprende las etapas de:

etapa A: una etapa de hacer reaccionar un éster activo de un componente de ácido con un componente de amina para obtener un compuesto condensado;

etapa B: una etapa de purificar el compuesto condensado eliminando una impureza en una mezcla de reacción

obtenida en la etapa A;

etapa C: una etapa de retirar un grupo protector para un grupo amino N-terminal del compuesto condensado obtenido en la etapa B; y

etapa D: una etapa de purificar el compuesto condensado desprotegido en el grupo amino N-terminal eliminando una impureza en una mezcla de reacción obtenida en la etapa C, si es necesario;

en el que se usa un disolvente de tipo amida inmisible con agua en al menos una de las etapas.

## EFFECTO DE LA INVENCION

Según el método de producción de un péptido de la invención de la presente solicitud, el éster activo que queda en la disolución tras la reacción de condensación puede descomponerse mediante un método sencillo y eficaz sin usar un eliminador caro que se ha usado en un método de síntesis en fase líquida continuo convencional. En el caso en el que el éster activo que queda en la disolución se descomponga para disminuir la cantidad del éster activo hasta el 1% o menos, la producción como subproducto de un compuesto peptídico impuro se reduce notablemente y puede obtenerse el compuesto peptídico objetivo con alta pureza en la reacción de alargamiento de péptido posterior; por tanto, puede producirse industrialmente de manera ventajosa un compuesto peptídico con alta pureza que tiene una secuencia de aminoácidos deseada.

Además, según el segundo método de producción de un péptido divulgado en la presente solicitud, el intervalo de aplicación del número de aminoácidos y la secuencia de aminoácidos en el método de síntesis de péptidos en fase líquida puede ampliarse.

## MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

A continuación en el presente documento, se describe en detalle la presente invención.

El péptido según la presente invención es un compuesto que tiene una estructura en la que una pluralidad de aminoácidos se condensan entre sí formando un enlace amida de ácido, es decir un enlace peptídico entre un grupo amino y un grupo carboxilo. El aminoácido no está particularmente limitado siempre que el aminoácido sea un compuesto que tiene uno o más grupo aminos y grupo carboxilos, respectivamente, en una molécula. De los dos componentes de aminoácido implicados en la formación del enlace peptídico, el componente que proporciona el grupo carboxilo se denomina componente de ácido y el componente que proporciona el grupo amino se denomina componente de amina.

El componente de ácido según la presente invención no está particularmente limitado y cualquiera de una variedad de derivados de aminoácido puede usarse como componente de ácido. Además, puede usarse también un compuesto peptídico en el que un grupo amino de un derivado de aminoácido se condensa además con otro aminoácido a través de un enlace peptídico. Cuando un compuesto peptídico objetivo tiene, por ejemplo, un sustituyente de tipo acilo como grupo protector para un grupo amino en el extremo N-terminal, puede introducirse también un grupo acilo deseado usando un derivado de ácido carboxílico correspondiente al sustituyente de tipo acilo en lugar de un derivado de aminoácido como componente de ácido.

El componente de amina según la presente invención no está particularmente limitado y puede usarse cualquiera de una variedad de derivados de aminoácido. Además, puede usarse también un compuesto peptídico en el que un grupo carboxilo del derivado de aminoácido se condensa además con otro aminoácido a través de un enlace peptídico. Además, un producto condensado obtenido mediante una reacción de condensación es también uno de los tipos de compuestos peptídicos, y puede usarse como componente de amina para una reacción de alargamiento adicional (una reacción de condensación) tras la desprotección del extremo N-terminal. Cuando un compuesto peptídico objetivo tiene, por ejemplo, un sustituyente de tipo amida como grupo protector para un grupo carboxilo en el extremo C-terminal, puede introducirse también un grupo amida deseado usando un derivado de amina correspondiente al sustituyente de tipo amida en lugar de un derivado de aminoácido como componente de amina.

El grupo protector para el grupo amino N-terminal en el componente de ácido y el grupo protector para el grupo carboxilo C-terminal en el componente de amina cooperan para formar un enlace peptídico deseado. Por tanto, una combinación de los grupos protectores para el grupo amino N-terminal y el grupo carboxilo C-terminal está restringida en un determinado grado. Es decir, cuando una cadena peptídica no se alarga adicionalmente, el grupo protector para el grupo amino N-terminal en el componente de ácido no está particularmente restringido; sin embargo, cuando una cadena peptídica se alarga adicionalmente, es necesario retirar el grupo protector para convertir el producto condensado en el nuevo componente de amina. Un grupo protector de este tipo se denomina grupo protector temporal. Por otro lado, se requiere que el grupo protector para el grupo carboxilo C-terminal en el componente de amina se retenga hasta que se completa una secuencia de aminoácidos deseada sin retirarse incluso en la condición para la desprotección en el grupo amino N-terminal del producto condensado de manera que el componente de amina no participe en la formación del enlace peptídico comportándose como componente de

ácido. Un grupo protector de este tipo se denomina grupo protector semipermanente.

Los ejemplos del grupo protector para el grupo carboxilo C-terminal en el componente de amina pueden incluir un grupo protector de tipo éster, un grupo protector de tipo amida y un grupo protector de tipo hidrazida descrito en "Pepuchido Gosei no Kiso to Jikken" (Conceptos básicos y experimentos de síntesis de péptidos), Maruzen Co., Ltd. (1985), "Protective Grupos in Organic Synthesis, the third edition", John Wiley & Sons Inc. (1999) y similares.

Como grupo protector de tipo éster, se usan preferiblemente un éster alquílico sustituido o no sustituido y un éster aralquílico sustituido o no sustituido. Como éster alquílico sustituido o no sustituido, se usan preferiblemente un éster metílico, un éster etílico, un éster t-butílico, un éster ciclohexílico, un éster tricloroetílico, un éster fenacílico y similares. Como éster aralquílico sustituido o no sustituido, se usan preferiblemente un éster bencílico, un éster p-nitrobencílico, un éster p-metoxibencílico, un éster difenilmetílico, un éster 9-fluorenilmetílico (Fm), un éster 4-picolílico (Pic) y similares.

Como grupo protector de tipo amida, se usan preferiblemente una amida primaria tal como una amida no sustituida, una N-metilamida, una N-etilamida y una N-bencilamida; una amida secundaria tal como una N,N-dimetilamida, una pirrolidinilamida y una piperidinilamida y similares.

Como grupo protector de tipo hidrazida, se usan preferiblemente una hidrazida no sustituida, N-fenilhidrazida, N,N'-diisopropilhidrazida y similares.

Es necesario usar un grupo protector adecuado como grupo protector para el grupo carboxilo C-terminal descrito anteriormente bajo la restricción relacionada con la combinación con el grupo protector para el grupo amino N-terminal descrito a continuación. Sólo es necesario que el grupo protector no permita que el grupo carboxilo participe en la formación del enlace peptídico comportándose como componente de ácido. Por ejemplo, cuando un compuesto peptídico objetivo es un derivado de tipo éster, de tipo amida o de tipo hidrazida, el compuesto peptídico objetivo también puede sintetizarse sin el acompañamiento de una desprotección del grupo protector para el grupo carboxilo C-terminal usando un grupo protector apropiado para el grupo amino N-terminal en un grupo protector deseado como sustituyente en el extremo C-terminal introducido de antemano.

La combinación de los grupos protectores para el grupo amino N-terminal y el grupo carboxilo C-terminal no está particularmente limitada siempre que el grupo protector para el grupo amino N-terminal sea estable en la reacción de condensación y también el grupo protector para el grupo carboxilo C-terminal sea estable en la reacción de condensación y una condición de desprotección para la retirada del grupo protector para el grupo amino N-terminal. Los ejemplos del grupo protector para el grupo amino N-terminal que satisfacen la condición mencionada anteriormente para la combinación pueden incluir un grupo protector de tipo uretano, un grupo protector de tipo acilo y un grupo protector de tipo sulfonilo descrito en "Pepuchido Gosei no Kiso to Jikken" (Conceptos básicos y experimentos de síntesis de péptidos), Maruzen Co., Ltd. (1985), "Protective Grupos in Organic Synthesis, the third edition", John Wiley & Sons Inc. (1999) y similares.

En general, se prefieren los grupos protectores de tipo uretano, puesto que es improbable que se produzca racemización de un aminoácido, la introducción del grupo protector es relativamente fácil y la desprotección selectiva es fácil. Los ejemplos específicos del grupo protector de tipo uretano incluyen grupos alquiloiloxycarbonilo ramificados tales como un grupo t-butoxicarbonilo (Boc) y un grupo isoborniloxycarbonilo (Iboc); grupos aralquiloiloxycarbonilo tales como un grupo benciloxycarbonilo (Z), un grupo p-nitrobenciloxycarbonilo, un grupo p-bifenilisopropiloxycarbonilo (Bpoc) y un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). Entre ellos, se prefieren los siguientes grupos protectores que han dado resultados satisfactorios en un método de síntesis química de péptidos.

En primer lugar, puede ejemplificarse un grupo t-butoxicarbonilo (Boc) como grupo protector. El grupo Boc es un grupo protector de grupo amino que puede retirarse en una condición ácida relativamente leve. El grupo Boc puede retirarse incluso en una condición en la que se prohíbe agua siempre que la condición sea una condición ácida. Por tanto, también es posible eliminar selectivamente el grupo Boc mientras que, por ejemplo, el grupo protector de tipo éster para el grupo carboxilo que se somete a hidrólisis en una condición ácida permanece.

El grupo protector para el grupo carboxilo C-terminal que puede combinarse con el grupo Boc no está particularmente limitado, y puede seleccionarse un grupo protector que es estable en la condición para la retirada del grupo Boc del grupo protector de tipo éster, grupo protector de tipo amida, grupo protector de tipo hidrazida mencionados anteriormente y similares. Como grupo protector de tipo éster, por ejemplo, se usan preferiblemente un éster metílico, un éster etílico, un éster bencílico sustituido o no sustituido y similares. Entre ellos, se usa de manera particularmente preferible un éster bencílico sustituido o no sustituido, puesto que el éster es relativamente estable frente a la hidrólisis en una condición básica y puede retirarse selectivamente en una condición leve.

Posteriormente, un grupo benciloxycarbonilo (Z) puede ejemplificarse como grupo protector. El grupo Z es un grupo protector de grupo amino que puede retirarse en una condición de reducción catalítica relativamente leve.

El grupo protector para el grupo carboxilo C-terminal que puede combinarse con el grupo Z no está particularmente

limitado, y un grupo protector que es estable en la condición para la retirada del grupo Z puede seleccionarse del grupo protector de tipo éster, grupo protector de tipo amida, grupo protector de tipo hidrazida y similares. Como grupo protector de tipo éster, por ejemplo, se usan preferiblemente un éster metílico, un éster etílico, un éster t-butílico y similares. Entre ellos, se usa de manera particularmente preferible un éster t-butílico, puesto que el éster es relativamente estable frente a la hidrólisis en una condición básica.

Finalmente, un grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) puede ejemplificarse como grupo protector. El grupo Fmoc es un grupo protector de grupo amino que puede retirarse en una condición básica relativamente leve.

El grupo protector para el grupo carboxilo C-terminal que puede combinarse con el grupo Fmoc no está particularmente limitado, y un grupo protector que es estable en la condición para la retirada del grupo Fmoc puede seleccionarse del grupo protector de tipo éster, grupo protector de tipo amida, grupo protector de tipo hidrazida mencionados anteriormente y similares. Como grupo protector de tipo éster, por ejemplo, se usan preferiblemente un éster t-butílico, un éster bencílico sustituido o no sustituido y similares. Entre ellos, se usa de manera particularmente preferible un éster bencílico sustituido o no sustituido, puesto que el éster es relativamente fácil de sintetizar.

Entre el grupo protector de tipo uretano, el grupo Boc se usa de manera particularmente preferible por los motivos de que el grupo Boc es muy estable en una reacción de condensación y una reacción de descomposición de éster activo, y la reacción de desprotección del mismo es fácil.

El componente de ácido y el componente de amina que van a usarse en la presente invención tienen un grupo funcional con actividad para una reacción de formación de un enlace peptídico tal como un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo o similar en muchos casos además del grupo amino, el grupo carboxilo o similar implicado en la formación del enlace peptídico. Estos grupos funcionales se denominan grupo funcional de cadena lateral en distinción del grupo amino y el grupo carboxilo para formar un enlace peptídico en la cadena principal. No siempre es necesario proteger el grupo funcional de cadena lateral con la condición de que la característica esencial de la invención no se altere. Sin embargo, generalmente es preferible proteger el grupo funcional de cadena lateral mediante un grupo protector adecuado con el fin de impedir una reacción secundaria no deseada en el momento de la formación de un enlace peptídico a través de una reacción de condensación y también en el momento de la reacción de desprotección en el grupo amino N-terminal.

El grupo protector para el grupo funcional de cadena lateral también está restringido en un determinado grado en cuanto a una combinación con el grupo protector para el grupo amino N-terminal como grupo protector mencionado anteriormente para el grupo carboxilo C-terminal en el componente de amina. Es decir, se requiere que el grupo protector para el grupo funcional de cadena lateral se retenga hasta que se complete una secuencia de aminoácidos deseada sin retirarse incluso en la condición para la desprotección en el grupo amino N-terminal. El grupo protector no está particularmente limitado siempre que el grupo funcional de cadena lateral no provoque una reacción secundaria no deseada en el momento de la formación de un enlace peptídico a través de una reacción de condensación y también en el momento de la reacción de desprotección en el grupo amino N-terminal. Por ejemplo, cuando el compuesto peptídico objetivo es un compuesto en el que el grupo funcional de cadena lateral está protegido por un grupo protector específico, el compuesto peptídico objetivo puede sintetizarse también sin retirar el grupo protector para el grupo funcional de cadena lateral introduciendo un grupo protector deseado (sustituyente) en el grupo funcional de cadena lateral de un componente de ácido correspondiente de antemano y combinando el grupo protector mencionado anteriormente con un grupo protector apropiado para el grupo amino N-terminal.

El grupo protector para el grupo funcional de cadena lateral no está particularmente limitado siempre que el grupo protector sea estable en una condición para la retirada del grupo protector (grupo protector temporal) para el grupo amino N-terminal. Los ejemplos del grupo protector para el grupo funcional de cadena lateral pueden incluir grupos protectores descritos en "Pepuchido Gosei no Kiso to Jikken" (Conceptos básicos y experimentos de síntesis de péptidos), Maruzen Co. Ltd. (1985), "Protective Groups in Organic Synthesis, the third edition", John Wiley & Sons Inc. (1999) y similares.

Cuando el grupo funcional de cadena lateral es un grupo carboxilo, los ejemplos del grupo protector pueden incluir un grupo protector de tipo éster, un grupo protector de tipo amida y un grupo protector de tipo hidrazida, que son los mismos grupos protectores que el grupo protector mencionado anteriormente para los grupos carboxilo C-terminales en el componente de amina.

Cuando el grupo funcional de cadena lateral es un grupo amino, los ejemplos del grupo protector pueden incluir un grupo protector de tipo uretano, un grupo protector de tipo acilo y un grupo protector de tipo sulfonilo. Como grupo protector de tipo uretano, por ejemplo, se usan preferiblemente un grupo metoxicarbonilo, un grupo etoxicarbonilo, un grupo Boc, un grupo Z y similares. Cuando el grupo protector para el grupo amino N-terminal es un grupo Boc, se usan preferiblemente un grupo metoxicarbonilo, un grupo etoxicarbonilo, un grupo Z y similares como grupo protector para el grupo amino como grupo funcional de cadena lateral. Entre ellos, se usa el grupo Z de manera particularmente preferible, puesto que el grupo Z puede retirarse selectivamente en una condición de hidrólisis usando gas hidrógeno o un compuesto de ácido fórmico como donador de hidrógeno. Cuando el grupo protector para el grupo amino N-terminal es un grupo Z o un grupo Fmoc, se usan preferiblemente un grupo metoxicarbonilo,

un grupo etoxicarbonilo, un grupo Boc y similares como grupo protector para el grupo funcional de cadena lateral. Entre ellos, se usa el grupo Boc de manera particularmente preferible, puesto que el grupo Boc puede retirarse selectivamente en una condición ácida relativamente leve.

5 Como grupo protector de tipo acilo, por ejemplo, se usan preferiblemente un grupo formilo, un grupo acetilo, un grupo trifluoroacetilo y similares.

Como grupo protector de tipo sulfonilo, por ejemplo, se usan preferiblemente un grupo p-toluenosulfonilo (Ts), un grupo p-tolilmetanosulfonilo, un grupo 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo y similares.

10 Como también para el grupo funcional de cadena lateral distinto de los grupos funcionales de cadena lateral mencionados anteriormente, un grupo protector que es estable en la condición para la retirada del grupo protector (grupo protector temporal) para el grupo amino N-terminal puede seleccionarse y usarse también.

15 El grupo funcional de cadena lateral puede desprotegerse tras formarse un enlace peptídico deseado, si es necesario.

Posteriormente, se describe el método de producción de un péptido de la invención de la presente solicitud. La invención de la presente solicitud es un método de producción de un péptido mediante un método de síntesis en fase líquida, caracterizado porque comprende etapas de:

20 etapa A: una etapa de hacer reaccionar un éster activo de un componente de ácido con un componente de amina para obtener un compuesto condensado;

25 etapa B: una etapa de hidrolizar el éster activo sin reaccionar del componente de ácido poniendo en contacto la mezcla de reacción obtenida en la etapa A dos veces o más con una base y manteniendo una condición básica hasta que la cantidad del éster activo sin reaccionar restante del componente de ácido disminuye hasta el 1% o menos, y luego purificar el compuesto condensado eliminando impurezas solubles en agua incluyendo el producto descompuesto del éster activo del componente de ácido llevando a cabo extracción y lavado con una disolución acuosa;

30 etapa C: una etapa de retirar un grupo protector para un grupo amino N-terminal del compuesto condensado obtenido en la etapa B; y

35 etapa D: una etapa de purificar el compuesto condensado desprotegido en el grupo amino N-terminal eliminando una impureza en una mezcla de reacción obtenida en la etapa C, si es necesario.

40 En primer lugar, se describe la etapa A. La etapa A es una etapa de formación de un enlace peptídico haciendo reaccionar un éster activo de componente de ácido con un componente de amina. En esta etapa se incluyen no sólo una realización en la que un éster activo de componente de ácido y un componente de amina preparados por separado se hacen reaccionar entre sí, sino también una realización en la que un componente de ácido se convierte en un éster activo en un sistema que contiene tanto el componente de ácido como el componente de amina, y posteriormente el éster activo de componente de ácido resultante se hace reaccionar con el componente de amina.

45 En general, la electrofilicidad de un carbono de carbonilo aumenta convirtiendo el componente de ácido en el éster activo de componente de ácido descrito a continuación para acelerar la reacción en la síntesis de péptidos.

50 El éster activo de componente de ácido según la presente invención representa un compuesto en el que un sustituyente electroatrayente capaz de aumentar la electrofilicidad del carbono de carbonilo se introduce en lugar del grupo hidroxilo del grupo carboxilo del componente de ácido. A continuación en el presente documento, un sustituyente electroatrayente de este tipo capaz de aumentar la electrofilicidad del carbono de carbonilo se denomina sustituyente activante. Además, un reactivo que va a convertirse en el sustituyente activante mediante reacción con el grupo carboxilo del componente de ácido se denomina reactivo activante.

55 El sustituyente activante que va a introducirse en lugar del grupo hidroxilo no está particularmente limitado, y los ejemplos del sustituyente activante pueden incluir un grupo ariloxilo sustituido, un grupo ariltioxilo sustituido o no sustituido, un grupo obtenido eliminando un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo de un compuesto de hidroxilamina y un grupo obtenido eliminando un átomo de hidrógeno de un grupo carboxilo de un ácido orgánico (se forma un denominado anhídrido de ácido mixto).

60 Como grupo ariloxilo sustituido, se usa preferiblemente un grupo que tiene un grupo electroatrayente tal como un grupo p-nitrofenoxilo (ONp), un grupo 2,4-dinitrofenoxilo, un grupo 1,3,5-triclorofenoxilo, un grupo pentaclorofenoxilo y un grupo pentafluorofenoxilo. Entre ellos, se usa un grupo p-nitrofenoxilo de manera particularmente preferible, puesto que la síntesis del correspondiente éster activo es relativamente fácil, y la propiedad de cristalización y propiedad de conservación son buenas.

65

Como grupo ariltioxilo sustituido o no sustituido, se usan preferiblemente un grupo feniltioxilo, un grupo p-nitrofeniltioxilo y similares.

5 Los ejemplos del compuesto de hidroxilamina pueden incluir 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), 1-hidroxí-7-azabenzotriazol (HOAt), 3-hidroxí-4-oxo-3,4-dihidro-1,2,3-benzotriazina (HOOBt), N-hidroxisuccinimida (HONSu), N-hidroxitftalimida y N-hidroxi piperidina. Los ejemplos del grupo obtenido eliminando un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo del compuesto de hidroxilamina anterior incluyen un grupo 1H-benzotriazol-1-iloxilo (OBt), un grupo 1H-7-azabenzotriazol-1-iloxilo (OAt), un grupo 4-oxo-3,4-dihidro-1,2,3-benzotriazin-3-iloxilo (OOBt), un grupo succinimidiloxilo (ONSu), un grupo ftalimidiloxilo y un grupo piperidin-1-iloxilo, respectivamente. Entre ellos, se usan un grupo OBt, un grupo OAt, un grupo OOBt, un grupo ONSu y similares de manera particularmente preferible.

15 El ácido orgánico no está particularmente limitado, pero se usa preferiblemente un carbonato de monoalquilo, es decir un ácido monocarboxílico, o un ácido orgánico con impedimento estérico grande con el fin de impedir una reacción secundaria. Los ejemplos del carbonato de monoalquilo pueden incluir carbonato de monometilo, carbonato de monoetilo y carbonato de monoisobutilo. Los ejemplos del ácido orgánico con impedimento estérico grande pueden incluir ácido isovalérico y ácido pivalico.

20 Como sustituyente activante, se prefieren el grupo obtenido eliminando un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo de un compuesto de hidroxilamina y el grupo obtenido eliminando un átomo de hidrógeno de un grupo carboxilo de un ácido orgánico, puesto que un producto descompuesto hidrolizando un éster activo restante tras una reacción de condensación en una condición básica es soluble en agua y puede retirarse lavando con una disolución acuosa. Particularmente, se usa preferiblemente el grupo obtenido eliminando un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo de un compuesto de hidroxilamina.

25 Un método de preparación del éster activo de componente de ácido no está particularmente limitado, y el éster activo de componente de ácido puede obtenerse a partir del componente de ácido usando un método conocido. A continuación en el presente documento, se recoge un éster de OBt que se usa lo más frecuentemente en síntesis de péptidos y se describe un método de preparación del mismo como ejemplo.

30 El éster de OBt se prepara generalmente mediante deshidratación-condensación del componente de ácido y HOBt que sirve como reactivo activante. Como agente de condensación para acelerar esta deshidratación-condensación, se usa preferiblemente un compuesto de carbodiimida. El compuesto de carbodiimida se condensa con el componente de ácido y HOBt; y al mismo tiempo, el propio compuesto de carbodiimida se convierte en un derivado de urea. Por ejemplo, cuando se usa N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como compuesto de carbodiimida, se produce como subproducto diciclohexilurea (DCUrea) que es escasamente soluble en un disolvente de reacción, y el subproducto puede retirarse del éster activo soluble mediante un procedimiento de separación sólido-líquido. Por otro lado, cuando se usa un compuesto de carbodiimida soluble en agua (WSC) tipificado por clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), se produce como subproducto derivado de urea soluble en agua tal como N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilurea (EDUrea), y el subproducto puede retirarse mediante lavado acuoso tal como lavado con ácido diluido. El éster activo de componente de ácido preparado tal como se describió anteriormente se hace reaccionar posteriormente con el componente de amina para formar un enlace peptídico mediante una reacción de sustitución.

45 El éster activo preparado usando el compuesto de carbodiimida puede aislarse una vez, o el componente de amina se añade a una mezcla de HOBt y el componente de ácido de antemano y se permite que un compuesto de carbodiimida actúe sobre la mezcla, de ese modo se prepara un éster de OBt en el sistema de reacción y puede permitirse que el éster de OBt resultante reaccione directamente con el componente de amina.

50 Además, el reactivo activante para preparar un éster de OBt sin el uso del compuesto de carbodiimida también se conoce. Por ejemplo, el componente de ácido se convierte en un éster de OBt correspondiente en el sistema de reacción, y el éster de OBt resultante y el componente de amina pueden deshidratarse y condensarse eficazmente permitiendo que un reactivo activante tal como hexafluorofosfato de 1H-benzotriazol-1-iloxi-tris-dimetilamino-fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de 1H-benzotriazol-1-iloxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU) o similares actúen directamente sobre una mezcla del componente de ácido y el componente de amina.

60 Posteriormente, se describe una condición para la reacción de condensación del éster activo de componente de ácido y el componente de amina. La cantidad de los reactivos que van a usarse en esta reacción no está particularmente limitada; sin embargo, es necesario hacer reaccionar completamente el componente de amina que es difícil de retirar si permanece el componente; por tanto, se prefiere generalmente que los reactivos distintos del componente de amina se usen en una cantidad en exceso en relación con el componente de amina.

65 Cuando la cantidad usada del éster activo de componente de ácido se basa en el componente de amina, el límite inferior es generalmente 1,0 veces molares o más, preferiblemente 1,1 veces molares o más, y más preferiblemente 1,2 veces molares o más. A medida que la cantidad del éster activo de componente de ácido es mayor, la velocidad

de reacción aumenta reacción; sin embargo, es muy difícil retirar el componente de ácido en exceso en el momento del tratamiento posterior. Por tanto, el límite superior de la cantidad usada es de 10 veces molares o menos, preferiblemente 3 veces molares o menos, y más preferiblemente 1,5 veces molares o menos.

5 Tal como se describió anteriormente, el éster activo de componente de ácido puede prepararse en el sistema de reacción, o puede usarse el éster activo de componente de ácido preparado por separado. Cuando el éster activo de componente de ácido se prepara en el sistema de reacción, el orden de adición del componente de amina, el  
10 componente de ácido, el reactivo activante y el agente de condensación no está particularmente limitado; generalmente el componente de ácido y el reactivo activante se añaden al componente de amina de antemano, y luego se añade al mismo el agente de condensación. Es particularmente preferible usar el método de preparación del éster activo en el sistema de reacción de esta manera, en el caso en el que se use HOBt, HOAt, HOObt o similar como reactivo activante. A continuación en el presente documento, se describe la cantidad usada de los respectivos componentes.

15 En el caso en el que la cantidad usada del componente de ácido se base en el componente de amina, el límite inferior es generalmente de 1,0 veces molares o más, preferiblemente 1,1 veces molares o más y más preferiblemente 1,2 veces molares o más. A medida que la cantidad usada del componente de ácido es mayor, la velocidad de reacción aumenta; sin embargo, es muy difícil retirar el componente de ácido en exceso en el momento de un tratamiento posterior. Por tanto, el límite superior de la cantidad usada es de 10 veces molares o menos,  
20 preferiblemente 3 veces molares o menos y más preferiblemente 1,5 veces molares o menos.

En el caso en el que la cantidad usada del reactivo activante se basa en el componente de ácido, el límite inferior es generalmente de 1,0 veces molares o más, preferiblemente 1,1 veces molares o más y más preferiblemente 1,2  
25 veces molares o más. A medida que la cantidad usada del reactivo activante es mayor, la velocidad de reacción aumenta; sin embargo, es muy difícil retirar el componente de ácido en exceso en el momento de un tratamiento posterior. Por tanto, el límite superior de la cantidad usada es de 10 veces molares o menos, preferiblemente 3 veces molares o menos y más preferiblemente 1,8 veces molares o menos.

30 En el caso en el que la cantidad usada del agente de condensación se basa en el componente de ácido, el límite inferior es generalmente de 1,0 veces molares o más, preferiblemente 1,1 veces molares o más y más preferiblemente 1,2 veces molares o más. Con respecto al límite superior de la cantidad usada, 20 veces molares es el límite superior de la cantidad usada del mismo, puesto que la reacción puede completarse suficientemente con 20 veces molares de la cantidad usada. El límite superior de la cantidad usada es preferiblemente de 10 veces molares o menos, más preferiblemente 5 veces molares o menos y adicionalmente más preferiblemente 2 veces molares o  
35 menos.

El disolvente de reacción que va a usarse en la reacción de condensación no está particularmente limitado siempre que el disolvente de reacción sea esencialmente inerte para el componente de ácido, el componente de amina y el éster activo o los respectivos reactivos que van a usarse en esta reacción tal como el reactivo activante y el agente  
40 de condensación. Los ejemplos del disolvente de reacción pueden incluir hidrocarburos alifáticos tales como hexano y heptano; hidrocarburos aromáticos tales como tolueno y xileno; hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano y clorobenceno; éteres tales como tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, t-butil metil éter y diisopropil éter; ésteres de ácidos grasos tales como acetato de metilo, acetato de etilo y acetato de isopropilo; disolventes polares apróticos miscibles con agua tales como acetonitrilo, N,N-dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO); y disolventes polares apróticos inmiscible con agua tales como N,N-di-n-propilformamida y N,N-dibutilformamida (DBF).

Entre ellos, se usan preferiblemente hidrocarburos halogenados, ésteres de ácidos grasos y disolventes polares apróticos, que tienen una solubilidad relativamente alta para los respectivos reactivos que van a usarse en esta  
50 reacción y un compuesto peptídico. Como hidrocarburos halogenados, se usan particularmente diclorometano y clorobenceno. Como ésteres de ácidos grasos, se prefiere particularmente acetato de etilo. Como disolventes polares apróticos, se prefieren particularmente DBF, DMF y DMSO, y sobre todo, se prefiere DBF que es un disolvente polar aprótico inmiscible con agua. Como disolvente, se prefieren particularmente diclorometano, clorobenceno y DBF. Estos disolventes pueden usarse solos o mezclando dos o más clases. Cuando los disolventes  
55 se usan mezclando dos o más clases, la razón de mezclado de los mismos no está particularmente limitada.

Además, puede permitirse que coexista agua en estos disolventes. Es particularmente preferible que coexista agua, cuando se usa una carbodiimida soluble en agua tal como EDC como agente de condensación. Puesto que un derivado de urea soluble en agua puede disolverse o dispersarse mediante la coexistencia de agua, mientras que un derivado de urea soluble en agua producido como subproducto tal como EDUrea puede agregarse o solidificarse  
60 provocando de ese modo el deterioro de la fluidez de la mezcla de reacción y también impidiendo que la reacción avance suavemente en algunos casos.

El término "inmiscible con agua" tal como se usa en el presente documento representa el caso en el que la mezcla se separa en dos fases, cuando el disolvente se mezcla con un volumen igual de agua a 20°C y la mezcla resultante se deja reposar.

65

La temperatura de reacción de esta reacción no está particularmente limitada siempre que la temperatura de reacción no sea inferior a la temperatura de solidificación de la mezcla de reacción y no superior al punto de ebullición de la mezcla de reacción. Sin embargo, en general, la temperatura de reacción es preferiblemente de 40°C o inferior y más preferiblemente 30°C o inferior, puesto que hay una tendencia a que aumente una reacción secundaria desfavorable, a medida que la temperatura de reacción es superior. En particular, cuando el éster activo de componente de ácido se prepara en el sistema de reacción, el agente de condensación se añade a una mezcla compuesta por el componente de amina, el componente de ácido y el reactivo activante. Se prefiere que la temperatura se fije tan baja como sea posible. Por ejemplo, la temperatura se fija preferiblemente a de aproximadamente 0 a 10°C, cuando está contenida agua en el sistema de reacción.

La concentración de reacción para esta reacción no está particularmente limitada siempre que los respectivos componentes tales como el componente de ácido, el componente de amina y el compuesto condensado peptídico se disuelvan o estén al menos en un estado homogéneamente dispersado. La concentración de reacción no puede especificarse uniformemente, puesto que la concentración de reacción se ve afectada por los tipos del disolvente y los respectivos componentes anteriormente mencionados como solutos, la cantidad usada de los mismos, la temperatura de reacción y similares. Sin embargo, la reacción de condensación puede llevarse a cabo generalmente en una condición de que se usa disolvente orgánico en una cantidad de 4 a 50 veces en volumen en relación con el peso del componente de amina. La condición corresponde a una condición de que la concentración de componente de amina en la mezcla de reacción es de aproximadamente el 2 al 25%.

En esta etapa, la reacción de condensación puede avanzar cualitativamente. Puede esperarse que razón de conversión de la reacción en la reacción de condensación sea de al menos el 99% o más, generalmente el 99,5% o más, preferiblemente el 99,9% o más.

Posteriormente, se describe la etapa B. La etapa B es una etapa de hidrolizar el éster activo sin reaccionar del componente de ácido poniendo en contacto la mezcla de reacción obtenida en la etapa A con una base y manteniendo una condición básica hasta que la cantidad del éster activo del componente de ácido sin reaccionar restante disminuya hasta el 1% o menos, y luego purificar el producto condensado eliminando impurezas solubles en agua incluyendo el producto descompuesto del éster activo del componente de ácido llevando a cabo extracción y lavado con una disolución acuosa. Esta etapa es una etapa importante en un método de síntesis en fase líquida de un compuesto peptídico con alta pureza. En la etapa B, existía una impureza en la mezcla de reacción tal como el éster activo de componente de ácido sin reaccionar, que provocaría una reacción secundaria en etapas posteriores, que se elimina tras la descomposición. Los ejemplos del procedimiento específico de esta etapa incluyen descomposición, extracción y lavado, y cristalización del éster activo de componente de ácido sin reaccionar. En general, estos procedimientos pueden llevarse a cabo en combinación entre sí según sea necesario, y particularmente, son importantes la descomposición y eliminación del éster activo de componente de ácido restante. La presente invención se caracteriza porque el éster activo de componente de ácido se descompone en una condición específica tal como se expone en la reivindicación 1 y a continuación en más detalle.

En el método de síntesis convencional de péptidos en fase líquida, se llevan a cabo lavado básico con una disolución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio o carbonato de sodio y lavado ácido con una disolución acuosa de ácido cítrico o hidrogenosulfato de potasio como tratamiento posterior de la reacción de condensación. Se supone que el éster activo mencionado anteriormente se descompone y se elimina mediante este procedimiento de lavado acuoso. Sin embargo, como resultado del estudio sobre el método convencional de los presentes inventores, se confirmó que la descomposición y eliminación del éster activo no eran suficientes en muchos casos.

Los presentes inventores encontraron que la facilidad de descomposición del éster activo depende en gran medida de los tipos del componente de ácido que constituyen el éster activo y un producto condensado coexistente de un compuesto peptídico (un producto intermedio), como resultado de estudios intensivos de la descomposición anterior del éster activo. Además, los presentes inventores encontraron que el pH de una fase acuosa de disolución alcalina usada para la descomposición disminuye a medida que avanza la descomposición del éster activo, y además la reacción de descomposición no avanza cuando el pH cae por debajo de un valor de pH específico.

La presente invención se completó basándose en el hallazgo anteriormente mencionado, y se caracteriza porque la cantidad del éster activo sin reaccionar restante disminuye hasta el 1% o menos manteniendo el sistema de reacción en una condición básica, cuando el éster activo sin reaccionar del componente de ácido se descompone poniendo en contacto la mezcla de reacción obtenida en la etapa A con una base. Los términos "una condición básica" tal como se usa en el presente documento significa una condición de pH que permite que la descomposición del éster activo de componente de ácido avance preferiblemente.

El pH requerido para permitir que la descomposición del éster activo de componente de ácido avance preferiblemente puede especificarse fácilmente de la siguiente manera. Cuando, por ejemplo, se añade una disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% como base a la mezcla de reacción, el éster activo no se descompone suficientemente y permanece en la misma en muchos casos. Cuando la base se añade poco a poco a la mezcla de reacción en la que permanece el éster activo mientras se mide el pH de la mezcla, en primer lugar el

pH aumenta según la cantidad de adición del anterior; sin embargo, puede observarse un fenómeno en el que el pH aumentado por la adición de la base comienza a disminuir inmediatamente al alcanzar un determinado pH. La adición de la base se detiene cuando se observa esta disminución de pH, y el pH se mide cada 10 minutos inmediatamente después de eso. Se miden el pH al que se observa el grado de disminución del pH, y el pH cada 10 minutos inmediatamente después de eso. El pH al que el grado de disminución del pH se vuelve 0,1 o menos es el pH requerido para permitir que la descomposición del éster activo avance preferiblemente en el sistema de reacción. Según dicho procedimiento, el pH de la fase acuosa requerida para permitir que la descomposición del éster activo avance dependiendo del tipo del componente de ácido que constituye el éster activo, un producto condensado coexistente de un compuesto peptídico (un producto intermedio) y el disolvente pueden especificarse como un valor de control.

En la producción real, se prefiere que mientras que se confirma el pH de la mezcla de reacción, la base se añada hasta que el pH no disminuya más, o que el pH requerido para permitir que la descomposición del éster activo avance, lo que se confirmó de antemano de la manera mencionada anteriormente, se especifique como un valor de control, y el pH se ajuste a y se mantenga al valor de control o superior añadiendo la base. Con respecto a la medición del pH, el pH de la mezcla de reacción puede medirse directamente, o puede medirse el pH de la fase acuosa de disolución alcalina añadida para la descomposición del éster activo. Generalmente es preferible mantener el pH a 10,0 o superior; mientras que es difícil especificar uniformemente el valor de control del pH, puesto que, tal como se describió anteriormente, el pH requerido para permitir que la descomposición del éster activo avance varía enormemente dependiendo de los tipos del componente de ácido que constituye el éster activo y el producto condensado coexistente de un compuesto peptídico (un producto intermedio). El pH es más preferiblemente de 10,5 o superior, y además más preferiblemente de 11,0 o superior. En general, a medida que el pH es superior, la reacción de descomposición avanza más rápidamente. Sin embargo, se prefiere que el límite superior del pH se especifique según el equilibrio con la eficacia de la reacción de descomposición, puesto que la cantidad usada de la base aumenta exponencialmente con el valor de pH y el uso de base en exceso no es eficaz. También es difícil especificar uniformemente el límite superior del pH; sin embargo, el pH se mantiene preferiblemente a 13,0 o inferior. En general, la descomposición del éster activo avanza suficientemente incluso a un pH de 12,0 o inferior.

Alternativamente, el pH puede mantenerse también al valor de control o superior eliminando la fase acuosa cuyo pH disminuyó a medida que la descomposición del éster activo avanza mediante separación de líquido y añadiendo de manera reciente una disolución acuosa de la base al residuo. Este procedimiento es el denominado lavado repetido. El número de veces del lavado usando una disolución acuosa de la base depende de los tipos del componente de ácido que constituye el éster activo, el compuesto condensado peptídico coexistente (un producto intermedio) y la disolución acuosa de la base que va a usarse para el lavado. Por tanto, es difícil especificar uniformemente el número de veces del lavado; sin embargo, en el método de la invención, el lavado se lleva a cabo dos veces o más, más preferiblemente tres veces o más y además más preferiblemente cuatro veces o más. El número de veces del lavado puede fijarse apropiadamente considerando el equilibrio entre la razón de descomposición del éster activo y el tiempo de operación.

La base anteriormente mencionada que va a usarse para la descomposición del éster activo no está particularmente limitada, y puede usarse una base inorgánica tal como una sal de hidróxido, un carbonato o un bicarbonato de un metal alcalino o un metal alcalinotérreo. Entre ellos, se prefiere una base inorgánica de una sal de metal alcalino, y particularmente un hidróxido, un carbonato o un bicarbonato de sodio. Estas bases pueden aplicarse directamente en forma de un polvo, o puede añadirse en forma de una disolución acuosa o una suspensión acuosa. Se prefiere generalmente que las bases se manipulen como una disolución acuosa que tiene una concentración apropiada. Cuando se usa un disolvente de reacción que contiene agua en la etapa A, la base en forma de un polvo puede añadirse al sistema de reacción para formar una disolución acuosa alcalina en el sistema.

El método de confirmación de la cantidad del éster activo restante no está particularmente limitado. Por ejemplo, la mezcla de reacción, es decir la fase orgánica, se muestra apropiadamente, y la cantidad del éster activo restante en relación con el compuesto condensado peptídico se conforma mediante un análisis de HPLC o similar, y puede determinarse el punto final de la reacción de descomposición del éster activo.

La mezcla de reacción obtenida en la etapa A mencionada anteriormente puede ponerse en contacto directamente con la base; o si es necesario, la mezcla de reacción puede ponerse en contacto directamente con la base, tras condensarse la mezcla de reacción de la etapa A o someterse a reemplazo del disolvente, o tras añadirse un disolvente a la mezcla de reacción de la etapa A. Además, si es necesario, la mezcla de reacción puede ponerse en contacto con la base, tras retirarse una sustancia insoluble mediante filtración o similar. Cuando el disolvente se reemplaza o se añade un nuevo disolvente, el disolvente que va a usarse para el reemplazo o que va a añadirse no está particularmente limitado siempre que el disolvente es esencialmente inerte para el producto condensado, y puede usarse cualquiera de los disolventes de reacción ilustrados en la descripción de la etapa A anteriormente mencionada.

La temperatura de esta reacción no está particularmente limitada siempre que la temperatura no sea inferior a la temperatura de solidificación de la mezcla de reacción y no superior al punto de ebullición de la mezcla de reacción. Sin embargo, hay una tendencia general a que una reacción secundaria desfavorable a medida que la temperatura

de reacción es superior. Por tanto, la temperatura de reacción es preferiblemente de 40°C o inferior, y más preferiblemente 30°C o inferior. En general, esta reacción se lleva a cabo preferiblemente a de aproximadamente 0 a 30°C.

5 La concentración de la mezcla de reacción no está particularmente limitada siempre que los respectivos componentes se disuelvan o bien en la fase orgánica o bien en la fase acuosa, o al menos en un estado homogéneamente dispersado en la misma. La concentración de reacción no puede especificarse uniformemente, puesto que la concentración de reacción se ve afectada por los tipos del disolvente y los respectivos componentes mencionados anteriormente como solutos, la cantidad usada de los mismos, la temperatura de reacción y similares.

10 Sin embargo, esta reacción puede llevarse a cabo generalmente en una condición de que se usa el disolvente orgánico en una cantidad de 4 a 50 veces en volumen en relación con el peso del producto condensado. La condición corresponde a una condición de que la concentración de producto condensado en la fase orgánica es de aproximadamente el 2 al 25% en p/v.

15 Según la presente invención, la cantidad del éster activo restante en la mezcla de reacción obtenida mediante esta reacción, es decir la mezcla de reacción tras el tratamiento de hidrólisis, se reduce hasta el 1% o menos, preferiblemente el 0,5% o menos y más preferiblemente el 0,1% o menos, en relación con la mezcla de reacción. Es posible suprimir la producción como subproducto de un péptido impureza en la reacción posterior de desprotección y alargar una cadena peptídica con alta pureza y con buen rendimiento, reduciendo el éster activo de componente de

20 ácido en esta etapa.

La mezcla de reacción anteriormente mencionada contiene el componente de ácido que es un producto descompuesto del éster activo de componente de ácido y una impureza derivada del sustituyente activante y también el agente de condensación y una impureza derivada del agente de condensación en un gran número. Por

25 ejemplo, cuando se usa EDC como carbodiimida soluble en agua y se prepara un éster de OBt mediante deshidratación-condensación del componente de ácido y HOBt, el componente de ácido y HOBt y también EDC y EDUrea están contenidos en la mezcla de reacción como impurezas. Por consiguiente, se prefiere que estas impurezas se eliminen además del procedimiento de descomposición anteriormente mencionado para el éster activo de componente de ácido.

30 El método de extracción y lavado para eliminar impurezas solubles en agua se lleva a cabo reteniendo el producto condensado en la fase orgánica y lavando con una disolución acuosa básica y una disolución acuosa ácida, y si es necesario con agua secuencialmente.

35 Posteriormente, se describe un procedimiento de extracción y lavado.

La mezcla de reacción de la etapa A anteriormente mencionada y la mezcla de reacción obtenida descomponiendo el éster activo de componente de ácido pueden someterse directamente a extracción y lavado; o si es necesario, la mezcla de reacción puede someterse a extracción y lavado, condensarse la mezcla de reacción, o añadirse al

40 mismo disolvente nuevo, o el disolvente se reemplaza por otro disolvente. Además, si es necesario, la mezcla de reacción puede someterse a extracción y lavado tras retirarse una sustancia insoluble mediante filtración o similar. En el caso en el que el disolvente se reemplaza o se añade un disolvente nuevo, el disolvente que va a usarse para el reemplazo o que va a añadirse no está particularmente limitado siempre que el disolvente sea esencialmente inerte para el producto condensado, y puede usarse cualquiera de los disolventes de reacción ilustrados en la descripción de la etapa A mencionada anteriormente.

45

Cuando el disolvente en la mezcla de reacción obtenida mediante la etapa A anteriormente mencionada o la descomposición del éster activo de componente de ácido es un disolvente polar aprótico miscible con agua, el rendimiento del péptido disminuye en algunos casos, puesto que el disolvente está acompañado por el compuesto peptídico y una parte del compuesto peptídico se transfiere a la fase acuosa en el momento de eliminar la impureza de la fase de disolvente mediante lavado acuoso debido a la solubilidad muy alta del disolvente. En este caso, se prefiere particularmente mejorar la razón de extracción ratio usando el disolvente polar aprótico miscible con agua en combinación con un disolvente que tiene una solubilidad relativamente favorable para el compuesto peptídico tal como hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos halogenados, éteres o ésteres de ácidos grasos.

50

55 Como disolución acuosa básica que va a usarse en la extracción y el lavado, puede usarse cualquier disolución acuosa básica que contiene un compuesto básico común sin limitarse particularmente. El compuesto básico no está particularmente limitado, y los ejemplos del compuesto básico incluyen las mismas bases que van a usarse en la etapa de descomposición del éster activo de componente de ácido. Por supuesto, el lavado con la disolución acuosa básica de esta etapa puede lograrse también retirando por separación la fase acuosa (disolución acuosa) de la mezcla de reacción, cuando la hidrólisis se efectúa añadiendo la disolución acuosa de la base en la etapa de descomposición del éster activo de componente de ácido.

60

65 Como disolución acuosa ácida que va a usarse en la extracción y el lavado, puede usarse cualquier disolución acuosa ácida que contenga un compuesto ácido común sin limitarse particularmente. El compuesto ácido no está particularmente limitado, y puede usarse una sal de ácido inorgánico tal como un dihidrogenofosfato e

hidrogenosulfato de metal alcalino, un ácido mineral tal como ácido clorhídrico y ácido sulfúrico, o un ácido orgánico tal como ácido cítrico. Entre ellos, se prefiere un ácido sal tal como hidrogenosulfato de potasio y dihidrogenofosfato de potasio.

5 En la extracción y el lavado con el uso de la disolución acuosa ácida o básica anteriormente mencionada, un tratamiento que se lleva a cabo en un procedimiento de extracción común, por ejemplo, puede realizarse la adición de una sal inorgánica tal como cloruro de sodio y sulfato de sodio, con el fin de facilitar la separación en dos fases de la fase orgánica y la fase acuosa.

10 La temperatura de extracción y lavado no está particularmente limitada siempre que la temperatura no sea inferior a la temperatura de solidificación de la mezcla de reacción y no superior al punto de ebullición de la mezcla de reacción. Sin embargo, hay una tendencia general a que aumente una reacción secundaria desfavorable, a medida que la temperatura es superior. Por tanto, la temperatura es preferiblemente de 40°C o inferior, y más preferiblemente de 30°C o inferior. En general, la extracción y el lavado se llevan a cabo preferiblemente a de  
15 aproximadamente 0 a 30°C.

La concentración de la extracción y el lavado de la mezcla de reacción no está particularmente limitada siempre que los respectivos componentes se disuelvan en o bien la fase orgánica o bien la fase acuosa o al menos en un estado homogéneamente dispersado en la misma. La concentración en el momento de extracción y lavado no puede  
20 especificarse uniformemente, puesto que la concentración se ve afectada por los tipos del disolvente y los respectivos componentes como solutos, la cantidad usada de los mismos, la temperatura de reacción y similares. En general, la extracción y el lavado pueden llevarse a cabo en una condición de que se usa el disolvente orgánico en una cantidad de 4 a 50 veces en volumen en relación con el peso del producto condensado. La condición corresponde a una condición de que la concentración del producto condensado en la fase orgánica sometida a  
25 extracción y lavado es de aproximadamente el 2 al 25% en p/v.

Entre las impurezas mencionadas anteriormente, el componente de ácido que es un producto descompuesto del éster activo de componente de ácido no puede retirarse completamente en algunos casos dependiendo de los tipos de la cadena lateral del aminoácido, el grupo funcional o el grupo protector para un grupo de este tipo. En este caso,  
30 por ejemplo, la fase orgánica tras eliminar impurezas básicas tales como EDC y EDUrea mediante el procedimiento de extracción y lavado anteriormente mencionado puede someterse a la cristalización descrita a continuación.

A continuación en el presente documento, se describe un método de purificación mediante cristalización del compuesto condensado peptídico según la presente divulgación. Como buen disolvente en la cristalización del  
35 compuesto peptídico, se usan preferiblemente hidrocarburos halogenados, ésteres de ácidos grasos o disolventes polares apróticos, que tienen una solubilidad relativamente favorable para el compuesto peptídico, entre los disolventes de reacción que van a usarse en la etapa A anteriormente mencionada. Como hidrocarburos halogenados, se prefieren particularmente diclorometano y clorobenceno. Como ésteres de ácidos grasos, se prefiere particularmente acetato de etilo. Como disolventes polares apróticos, se prefieren particularmente DBF,  
40 DMF y DMSO, y sobre todo, se prefiere particularmente DBF que es un disolvente polar aprótico inmiscible con agua. Como buen disolvente, se prefieren particularmente diclorometano, DBF, DMF y DMSO. Sobre todo, se prefiere DBF que es un disolvente polar aprótico inmiscible con agua. Estos disolventes pueden usarse solos o mezclando dos o más clases.

45 Con el fin de cristalizar el compuesto peptídico, la solubilidad del compuesto peptídico se disminuye añadiendo directamente un mal disolvente apropiado a la disolución de un buen disolvente o de un disolvente mixto que contiene un buen disolvente, o añadiendo el mal disolvente mientras que o después de eliminar por destilación un disolvente innecesario mediante condensación, para depositar de ese modo el compuesto peptídico. Además, puede realizarse también favorablemente una denominada cristalización en reacción en la que se llevan a cabo la etapa A  
50 y etapa B en un disolvente mixto de un buen disolvente y un mal disolvente y el producto condensado producido se deposita secuencialmente.

El mal disolvente no está particularmente limitado siempre que el mal disolvente sea un disolvente que tiene una solubilidad inferior por el compuesto peptídico que el buen disolvente y es esencialmente inerte para el compuesto  
55 peptídico. Los ejemplos del mal disolvente pueden incluir hidrocarburos alifáticos tales como hexano y heptano; hidrocarburos aromáticos tales como tolueno y xileno; hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano y clorobenceno; éteres tales como tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, t-butil metil éter y diisopropil éter; y ésteres de ácidos grasos tales como acetato de metilo, acetato de etilo y acetato de isopropilo. Entre ellos, se usan preferiblemente hidrocarburos halogenados, hidrocarburos aromáticos, éteres y ésteres de  
60 ácidos grasos, que tienen una solubilidad relativamente alta para los respectivos reactivos que van a usarse comúnmente en un método de síntesis de péptidos en fase líquida, tal como el componente de ácido, el reactivo activante, el agente de condensación y el reactivo de desprotección.

Como hidrocarburos halogenados, se prefiere particularmente clorobenceno. Como hidrocarburos aromáticos, se prefiere particularmente tolueno. Como éteres, se prefieren particularmente t-butil metil éter y diisopropil éter. Como  
65 ésteres de ácidos grasos, se prefiere particularmente acetato de etilo. Además, también se prefiere que se use agua

como mal disolvente. Por ejemplo, no importa que la disolución acuosa ácida o básica usada para eliminar por lavado la impureza en la etapa de lavado mencionada anteriormente se use directamente como mal disolvente. Estos malos disolventes pueden usarse solos o mezclando dos o más clases.

5 La cantidad usada del buen disolvente no está particularmente limitada; sin embargo, la cantidad usada del buen disolvente es generalmente preferible tan pequeña como sea posible desde el punto de vista de la mejora del rendimiento del compuesto peptídico. La cantidad usada del buen disolvente no puede especificarse uniformemente; sin embargo, la cristalización puede llevarse a cabo generalmente en una condición de que la cantidad usada total del disolvente orgánico en relación con el número de moles del compuesto peptídico es de aproximadamente 0,1 a  
10 10 veces en volumen (l/mol). La cantidad usada puede fijarse a preferiblemente 5 veces en volumen o menos, y más preferiblemente 2 veces en volumen o menos.

La cantidad usada del mal disolvente no está particularmente limitada siempre que la cantidad se encuentre dentro del intervalo en el que la fluidez del líquido de cristalización puede mantenerse y el rendimiento de cristalización puede garantizarse. La cantidad usada del mal disolvente no puede especificarse uniformemente, puesto que la  
15 cantidad usada se ve afectada por el tipo del compuesto peptídico, la cantidad usada del buen disolvente, la temperatura de cristalización y similares. Sin embargo, la cristalización puede llevarse a cabo generalmente en una condición de que la cantidad usada total del mal disolvente en relación con el número de moles del compuesto peptídico es de aproximadamente 4 a 50 veces en volumen. La condición corresponde a una condición de que la  
20 concentración de producto condensado es de aproximadamente 0,02 a 0,25 mol/l.

La temperatura en el tiempo de cristalización no está particularmente limitada; sin embargo, se prefiere permitir que avance la cristalización lentamente con el fin de formar un líquido de cristalización (suspensión) que tiene una propiedad favorable. Por supuesto, una denominada cristalización en enfriamiento en la que se permite que la  
25 cristalización avance lentamente enfriando gradualmente el sistema de reacción también puede llevarse a cabo preferiblemente. Además, también se prefiere añadir un cristal simiente al sistema de reacción con el fin de permitir que la cristalización avance suavemente.

Con respecto al componente de ácido que no puede retirarse completamente incluso mediante el lavado o la cristalización anteriormente mencionados, también puede llevarse a cabo favorablemente un método de eliminación en la etapa D tras desprotegerse el componente de ácido en la etapa C descrita a continuación.

Posteriormente, se describe la etapa C. La etapa C es una etapa de retirar el grupo protector para el grupo amino N-terminal del producto condensado obtenido en la etapa B. El producto condensado obtenido cuyo grupo amino N-terminal se desprotege se convierte en el componente de amina para una reacción de condensación adicional (una  
35 reacción de alargamiento) en la fase central del alargamiento de la cadena peptídica.

El método de retirada del grupo protector para el grupo amino N-terminal no está particularmente limitado siempre que los grupos protectores (grupos protectores semipermanentes) para el grupo carboxilo C-terminal y el grupo  
40 funcional de cadena lateral sean estables. Como método, pueden emplearse métodos de desprotección conocidos descritos en, por ejemplo, "Pepuchido Gosei no Kiso to Jikken" (Conceptos básicos y experimentos de síntesis de péptidos), Maruzen Co. Ltd. (1985), "Protective Groups in Organic Synthesis, the third edition", John Wiley & Sons Inc., (1999) y similares. Los ejemplos del grupo protector pueden incluir un grupo protector de tipo uretano, un grupo protector de tipo acilo y un grupo protector de tipo sulfonilo; y los ejemplos del método de desprotección pueden  
45 incluir un método de desprotección llevado a cabo en una condición ácida, un método de desprotección llevado a cabo en una condición de reducción catalítica y un método de desprotección llevado a cabo en una condición básica. El método de desprotección puede seleccionarse dependiendo del grupo protector. A continuación en el presente documento, se ilustrará un método típico de retirada del grupo protector para el grupo amino N-terminal.

50 En primer lugar, se describe un método de retirada de un grupo Boc. El grupo Boc es un grupo protector para el grupo amino, que puede retirarse en una condición ácida relativamente leve. Con el fin de obtener un sistema de reacción en la condición ácida, puede añadirse una sustancia ácida al sistema de reacción como reactivo de desprotección. La sustancia ácida que va a añadirse no está particularmente limitada; sin embargo, pueden usarse hidrógenos halogenados tales como fluoruro de hidrógeno, cloruro de hidrógeno y bromuro de hidrógeno, ácidos  
55 minerales tales como ácido sulfúrico y ácido nítrico, ácidos carboxílicos tales como ácido fórmico, ácido acético y ácido trifluoroacético (TFA), ácidos sulfónicos tales como ácido metanosulfónico y ácido p-toluenosulfónico, y una mezcla de los mismos. Los ejemplos de la mezcla pueden incluir bromuro de hidrógeno/ácido acético, cloruro de hidrógeno/dioxano y cloruro de hidrógeno/ácido acético. Entre ellos, cuando se usa un ácido que no es una disolución acuosa, por ejemplo, ácido fórmico, ácido metanosulfónico o similar en un sistema no acuoso, también es  
60 posible retirar selectivamente el grupo Boc mientras que, por ejemplo, un grupo protector de tipo éster para el grupo carboxilo que se somete a hidrólisis en una condición ácida se deja intacto. Sobre todo, se prefieren particularmente ácidos sulfónicos que son solubles en agua y en una forma líquida a temperatura ambiente, tal como ácido metanosulfónico, puesto que los ácidos sulfónicos pueden permitir que la reacción avance rápidamente con una cantidad usada relativamente pequeña a temperatura ambiente y puede retirarse fácilmente en una fase acuosa tras  
65 la finalización de la reacción en el caso de usarse en un sistema no acuoso.

Posteriormente, se describe un método de retirada de un grupo Z. El grupo Z es un grupo protector para el grupo amino, que puede retirarse en una condición de reducción catalítica relativamente leve. Con el fin de obtener un sistema de reacción en la condición de reducción catalítica, puede añadirse un catalizador y un donador de hidrógeno al sistema de reacción como reactivos de desprotección. El catalizador no está particularmente limitado; sin embargo, pueden usarse negro de paladio, del 5 al 10% de paladio-carbono, del 5 al 10% de hidróxido de paladio-carbono o similares. El donador de hidrógeno no está particularmente limitado; sin embargo, se usa generalmente gas hidrógeno, un compuesto de ácido fórmico o similar.

Finalmente, se describe un método de retirada de un grupo Fmoc. El grupo Fmoc es un grupo protector para el grupo amino, que puede retirarse en una condición básica relativamente leve. Con el fin de obtener un sistema de reacción en la condición básica, puede añadirse una sustancia básica al sistema de reacción como reactivo de desprotección. La sustancia básica que va a añadirse no está particularmente limitada; sin embargo, se usan preferiblemente aminas secundarias tales como dietilamina, piperidina y morfolina, aminas terciarias tales como diisopropilamina y p-dimetilaminopiridina, y similares.

El disolvente de reacción que va a usarse en esta etapa no está particularmente limitado siempre que el disolvente sea un disolvente que es esencialmente inerte para el producto condensado, el componente de amina y los respectivos reactivos que van a usarse en esta etapa, tal como un reactivo de desprotección. Los ejemplos del disolvente de reacción pueden incluir los mismos disolventes de reacción que se describieron en la etapa A. Por supuesto, el disolvente de reacción usado en la etapa B anteriormente mencionada puede usarse directamente, o se añade al mismo un nuevo disolvente, o el disolvente puede reemplazarse por otro disolvente.

La temperatura de reacción de esta etapa no está particularmente limitada siempre que la temperatura no sea inferior a la temperatura de solidificación de la mezcla de reacción y no sea superior al punto de ebullición de la mezcla de reacción. Hay una tendencia general a que aumente una reacción secundaria desfavorable, a medida que la temperatura de reacción es superior. Por tanto, la temperatura de reacción es preferiblemente de 40°C o inferior, y más preferiblemente de 30°C o inferior. En general, esta etapa se lleva a cabo preferiblemente a de aproximadamente 0 a 30°C.

La concentración de reacción para esta etapa no está particularmente limitada siempre que los respectivos componentes se disuelvan o al menos estén en un estado homogéneamente dispersado. La concentración de reacción no puede especificarse uniformemente, puesto que la concentración de reacción depende de los tipos del disolvente y los respectivos componentes como solutos, la cantidad usada de los mismos, la temperatura de reacción y similares. Sin embargo, esta etapa puede llevarse a cabo generalmente en una condición de que la cantidad usada total del disolvente orgánico en relación con el peso del producto condensado es de aproximadamente 4 a 50 veces en volumen. La condición corresponde a una condición de que la concentración de producto es de aproximadamente el 2 al 25% en p/v.

En esta etapa, la reacción de desprotección puede avanzar cuantitativamente. La razón de conversión de la reacción en esta etapa puede esperarse que sea de al menos el 99% o más, generalmente el 99,5% o más, preferiblemente el 99,9% o más.

Tras la reacción de desprotección, el producto condensado desprotegido en el grupo amino N-terminal puede purificarse eliminando una impureza de la mezcla de reacción si es necesario. El producto condensado purificado se somete a una reacción de condensación adicional (una reacción de alargamiento) como componente de amina en la fase central del alargamiento de la cadena peptídica. A continuación en el presente documento, esta etapa de purificación se denomina etapa D, y los detalles se describen a continuación.

En la mezcla de reacción obtenida en la etapa C, están contenidos como impurezas un subproducto derivado del grupo protector retirado del grupo amino N-terminal y el reactivo de desprotección.

Además, cuando el componente de ácido en exceso no pudo retirarse completamente en la etapa B mencionada anteriormente, el compuesto desprotegido del componente de ácido, es decir, un derivado de aminoácido o un péptido en el que ambos del grupo amino N-terminal y el grupo carboxilo C-terminal no están protegidos y que se deriva del componente de ácido, también está contenido en la mezcla de reacción como una de las impurezas. Este compuesto desprotegido del componente de ácido puede comportarse como componente de ácido o componente de amina en una reacción de alargamiento adicional, es decir etapa A (una reacción de condensación) del ciclo posterior, y puede provocar la producción como subproducto de diversos péptidos impureza; por tanto, estas impurezas se retiran preferiblemente llevando a cabo esta etapa.

El método de eliminación de estas impurezas no está particularmente limitado, y puede usarse un método de separación y purificación común tal como extracción o cristalización. Se prefiere generalmente que la extracción y el lavado para eliminar impurezas solubles en agua se lleven a cabo reteniendo el producto condensado en la fase orgánica y lavando la fase orgánica con una disolución acuosa básica y/o ácida.

La mezcla de reacción obtenida en la etapa C puede someterse directamente a extracción y lavado, o si es

necesario, la mezcla de reacción puede someterse a extracción y lavado tras condensarse la mezcla de reacción o someterse a reemplazo del disolvente, o tras añadirse un disolvente a la mezcla de reacción. Además, si es necesario, la mezcla de reacción puede someterse a extracción y lavado tras eliminarse una sustancia insoluble mediante filtración o similar. Como disolvente que va a usarse para el reemplazo del disolvente o adición de disolvente, puede usarse un disolvente similar a los usados en el caso de extracción y lavado en la etapa B mencionada anteriormente. Tal como se describió anteriormente, es particularmente preferible usar el disolvente polar aprótico miscible con agua en combinación con otro disolvente de una manera similar a en la etapa B, puesto que el disolvente polar aprótico miscible con agua tiene una solubilidad en agua muy alta.

Además, el producto condensado desprotegido en el grupo amino N-terminal o una sal del producto condensado con un ácido puede cristalizarse para la purificación a partir de la fase orgánica tras lavar con la disolución acuosa. Como buen disolvente que va a usarse en esta realización, pueden usarse los mismos buenos disolventes que los usados en el método de purificación mediante cristalización en la etapa B. Con el fin de cristalizar el compuesto peptídico, el compuesto peptídico se deposita directamente añadiendo un mal disolvente apropiado al mismo, o mientras que o después de eliminar por destilación un disolvente innecesario mediante condensación para disminuir la solubilidad del compuesto peptídico. Además, puede llevarse a cabo también favorablemente una denominada cristalización en neutralización, en la que se añade una base a la misma para neutralizar la sal del compuesto peptídico y el ácido en un disolvente mixto del buen disolvente y el mal disolvente y el compuesto peptídico producido se deposita secuencialmente.

Como condición para la cristalización, tal como el tipo del mal disolvente que va a usarse, la cantidad usada del disolvente y la temperatura, puede usarse la misma condición descrita en el método de purificación mediante cristalización en la etapa B.

Por otro lado, en esta etapa no se requiere necesariamente purificación, puesto que la impureza distinta del componente de ácido restante no afecta de manera adversa a la etapa A (una reacción de condensación) del ciclo posterior en la mayoría de los casos. Por ejemplo, cuando el producto condensado purificado cuyo grupo protector para el grupo amino N-terminal es un grupo Boc y del cual el componente de ácido en exceso se retira completamente en la etapa B mencionada anteriormente se desprotege usando ácido metanosulfónico como el reactivo de desprotección, isobutileno, gas dióxido de carbono y ácido metanosulfónico están contenidos como impurezas en la mezcla de reacción. Ambos del isobutileno y el gas dióxido de carbono pueden eliminarse fácilmente, puesto que ambos de ellos no afectan de manera adversa a la etapa A posterior (la reacción de condensación) y están en una forma gaseosa a temperatura ambiente. El ácido metanosulfónico afecta de manera adversa a la etapa A, puesto que el ácido metanosulfónico puede enmascarar la nucleofilicidad del grupo amino que es un sitio de reacción del componente de amina en la reacción de condensación. Sin embargo, el ácido metanosulfónico puede volverse inocuo, por ejemplo, neutralizando el ácido metanosulfónico con una base tal como una amina terciaria que no afecta de manera adversa a la reacción de condensación, por ejemplo trietilamina. Por tanto, también es posible omitir la eliminación de la impureza mediante esta etapa.

La condición tal como la temperatura de extracción y lavado y la concentración del producto condensado es la misma que la condición para la extracción y el lavado descrita en la etapa B.

Tal como se describió anteriormente, en la presente invención, el péptido objetivo que tiene una alta pureza puede obtenerse suprimiendo la producción como subproducto del péptido impureza derivado del éster activo de componente de ácido y la acumulación del mismo, incluso cuando las etapas A, B, C y D se realizan de manera secuencial y continua, puesto que el éster activo de componente de ácido sin reaccionar se descompone hasta que la cantidad del éster activo restante disminuye hasta el 1% o menos en la etapa B. Por consiguiente, el efecto de la presente invención se ejerce de manera máxima, cuando se sintetiza un péptido que consiste en 3 o más residuos de aminoácido, preferiblemente 4 o más residuos de aminoácido, de manera particularmente preferible 5 o más residuos de aminoácido.

No se requiere necesariamente que la presente invención comience a partir de la etapa A y finalice en la etapa C o etapa D. Además, las etapas A, B y C pueden llevarse a cabo respectivamente al menos una vez, y no se requiere necesariamente llevar a cabo todas las etapas A, B y C el mismo número de veces. La etapa D puede llevarse a cabo si es necesario y no es una etapa esencial en la presente invención. La invención puede comenzar a partir de cualquier etapa según una materia prima disponible. Por ejemplo, la invención puede comenzar a partir de la etapa C cuando el aminoácido o el péptido cuyo grupo amino N-terminal se protege puede obtenerse fácilmente. Además, la invención puede finalizar en cualquier etapa según el compuesto peptídico objetivo. Por ejemplo, un péptido cuyo grupo amino N-terminal se protege y que se obtiene mediante las etapas hasta la etapa B se somete a una reacción de desprotección del grupo funcional de cadena lateral a través de un método conocido.

Posteriormente, se describe el método de producción de un péptido que es un segundo método según la presente divulgación. El segundo método divulgado es un método de producción de un péptido mediante un método de síntesis en fase líquida, que comprende etapas de:

etapa A: una etapa de hacer reaccionar un éster activo de un componente de ácido con un componente de amina

para obtener un compuesto condensado;

etapa B: una etapa de purificar el compuesto condensado eliminando una impureza en una mezcla de reacción obtenida en la etapa A;

etapa C: una etapa de retirar un grupo protector para un grupo amino N-terminal del compuesto condensado obtenido en la etapa B; y

etapa D: una etapa de purificar el compuesto condensado desprotegido en el grupo amino N-terminal eliminando una impureza en una mezcla de reacción obtenida en la etapa C, si es necesario;

en el que se usa un disolvente de tipo amida inmiscible con agua en al menos una de las etapas.

En el caso en el que la síntesis de péptidos en fase líquida se lleva a cabo usando, por ejemplo, DMF que es un disolvente de tipo amida miscible con agua como disolvente de reacción, tal como se describió anteriormente, el disolvente va acompañado por el compuesto peptídico y una parte del compuesto peptídico se transfiere a la fase acuosa y por tanto el rendimiento del péptido disminuye en algunos casos en la extracción y el lavado de la etapa B en el momento de eliminar un reactivo innecesario de la fase de disolvente mediante lavado acuoso. En tal caso, puede pretenderse mejorar la razón de extracción mediante, por ejemplo, la eliminación de DMF que tiene un alto punto de ebullición para la condensación o usando una gran cantidad de un disolvente de extracción; sin embargo, se provoca una complicación de la operación o un aumento en la cantidad del disolvente de extracción. Además, incluso si se lleva a cabo el tratamiento tal como se describió anteriormente, no se retiene suficientemente DMF en la fase de disolvente y se reparte en la fase acuosa; como resultado, se deposita una gran cantidad del péptido a partir de la fase de disolvente y la separación del líquido no puede llevarse a cabo en algunos casos.

Por otro lado, en el caso en el que la síntesis de péptidos en fase líquida se lleva a cabo usando el disolvente de tipo amida inmiscible con agua como disolvente de reacción, la operación de separación del líquido puede realizarse al tiempo que se mantiene la solubilidad del péptido, puesto que el disolvente de tipo amida inmiscible con agua se retiene en la fase de disolvente.

Además, hay una tendencia a que la velocidad de reacción de la reacción de condensación disminuya a medida que la cadena peptídica se alarga en la síntesis de péptidos en fase líquida; sin embargo, se encontró que la velocidad de reacción de la reacción de condensación aumenta y la reacción puede completarse rápidamente usando el disolvente de tipo amida inmiscible con agua como disolvente de reacción.

Tal como se describió anteriormente, se encontró que el disolvente de tipo amida inmiscible con agua tiene una propiedad ideal para el método de síntesis en fase líquida global, particularmente el método de síntesis en fase líquida continuo. En el segundo método divulgado, el disolvente de tipo amida inmiscible con agua se usa en al menos una etapa de las etapas A a D anteriormente mencionadas basándose en este hallazgo. Específicamente, la frase anteriormente mencionada significa que se incluye al menos uno de los siguientes a) a d):

a) se usa un disolvente que contiene el disolvente de tipo amida inmiscible con agua como disolvente de reacción en la reacción de condensación de la etapa A;

b) se usa un disolvente que contiene el disolvente de tipo amida inmiscible con agua como disolvente de la fase de disolvente orgánico que contiene el producto condensado, que se somete a purificación tal como descomposición, extracción y lavado, y/o cristalización del éster activo de componente de ácido en la etapa B;

c) se usa un disolvente que contiene el disolvente de tipo amida inmiscible con agua como disolvente de reacción cuando el grupo protector para el grupo amino N-terminal del producto condensado se retira en la etapa C; y

d) se usa un disolvente que contiene el disolvente de tipo amida inmiscible con agua como disolvente de la fase de disolvente orgánico que contiene el producto condensado sometido a purificación tal como extracción y lavado y/o cristalización en la etapa D.

No hace falta decir que puede usarse un disolvente que contiene el disolvente de tipo amida inmiscible con agua en una pluralidad de etapas y procedimientos de purificación. Cuando se llevan a cabo una pluralidad de métodos de purificación en la etapa B o D, se prefiere que se use un disolvente que contiene el disolvente de tipo amida inmiscible con agua en todos los procedimientos de purificación desde el punto de vista de la simplificación de los procedimientos y la maximización del efecto del segundo método. Por el mismo motivo, se prefiere que se use un disolvente que contiene el disolvente de tipo amida inmiscible con agua en todas las etapas A a D.

Cuando el compuesto peptídico objetivo se produce repitiendo el ciclo de las etapas A a D varias veces, puede usarse un disolvente que contiene el disolvente de tipo amida inmiscible con agua a partir del primer ciclo, o puede usarse el disolvente que contiene el disolvente de tipo amida a partir de la fase central.

El disolvente de tipo amida inmisible con agua según la presente divulgación representa un compuesto de amida que tiene una estructura obtenida mediante deshidratación-condensación de un ácido carboxílico y una dialquilamina y que está en una forma líquida a temperatura ambiente y es inmisible con agua. Entre los disolventes de reacción ilustrados en la presente invención, el disolvente de tipo amida inmisible con agua se incluye en el disolvente polar aprótico inmisible con agua. El disolvente de tipo amida inmisible con agua tiene el enlace amida como compuesto peptídico; por tanto, el disolvente de tipo amida inmisible con agua tiene una afinidad muy alta por el compuesto peptídico y tiene una alta solubilidad para el péptido. Los ejemplos del disolvente de tipo amida inmisible con agua incluyen compuestos de formamidas tales como N,N-dipropilformamida y N,N-dibutilformamida (DBF), y compuestos de acetamidas tales como N,N-dipropilacetamida y N,N-dibutilacetamida. Entre estos compuestos de amida, se prefieren compuestos de amida que tienen 7 o más átomos de carbono. Sobre todo, se usa DBF de manera particularmente preferible, puesto que DBF tiene una solubilidad de péptidos y propiedad de separación de líquido excelentes, y también se obtiene fácilmente.

El disolvente de tipo amida inmisible con agua puede usarse solo o mezclando dos o más clases como disolvente de reacción o disolvente de extracción. Además, el disolvente de tipo amida inmisible con agua también puede añadirse preferiblemente a otro disolvente orgánico común, por ejemplo, hidrocarburos alifáticos tales como hexano y heptano; hidrocarburos aromáticos tales como tolueno y xileno; hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, cloroformo, 1,2-dicloroetano y clorobenceno; éteres tales como tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, t-butil metil éter y diisopropil éter; ésteres de ácidos grasos tales como acetato de metilo, acetato de etilo y acetato de isopropilo; y similares. Sobre todo, también es preferible añadir el disolvente de tipo amida a un disolvente orgánico tal como hidrocarburos halogenados o ésteres de ácidos grasos, que tienen una solubilidad relativamente favorable para los respectivos reactivos que van a usarse en la síntesis de péptidos en fase líquida y el compuesto peptídico. Como hidrocarburos halogenados, se prefieren particularmente diclorometano y clorobenceno, y como éster de ácido graso, se prefiere particularmente acetato de etilo.

La cantidad usada del disolvente de tipo amida inmisible con agua no está particularmente limitada siempre que los respectivos agentes que van a usarse en la síntesis de péptidos en fase líquida se disuelven en o bien la fase orgánica o bien la fase acuosa o al menos en un estado homogéneamente dispersado en la misma. Sin embargo, en general, la cantidad usada del disolvente inmisible con agua de tipo amida es preferiblemente tan grande como sea posible desde el punto de vista de la solubilidad del péptido. La cantidad usada del disolvente de tipo amida inmisible con agua no puede especificarse uniformemente, puesto que la cantidad usada se ve afectada por los tipos de los respectivos reactivos como solutos y que se usan en la síntesis de péptidos en fase líquida, otros disolventes orgánicos que van a usarse mediante mezclado, la cantidad usada de los mismos, la temperatura de reacción y similares. Sin embargo, en general, el volumen usado total (l/mol) del disolvente de tipo amida inmisible con agua en relación con la suma del número de moles del componente de amina anteriormente mencionado, el producto condensado y el producto condensado desprotegido en el grupo amino N-terminal es de 0,1 veces en volumen o más, más preferiblemente 1 vez en volumen o más, y de manera particularmente preferible 2 veces en volumen o más. El límite superior del mismo es 50 veces en volumen o menos, más preferiblemente 20 veces en volumen o menos y de manera particularmente preferible 10 veces en volumen o menos.

El disolvente de tipo amida inmisible con agua tiene una solubilidad extremadamente alta, y el péptido puede disolverse y la propiedad del líquido puede mejorarse añadiendo sólo una cantidad extremadamente pequeña del disolvente de tipo amida inmisible con agua; por tanto, se prefieren que la cantidad usada del disolvente de tipo amida inmisible con agua disminuya tan poco como sea posible desde el punto de vista de la productividad, y la cantidad usada mínima requerida del disolvente de tipo amida puede fijarse al tiempo que se confirma el estado disuelto. La cantidad usada puede fijarse a preferiblemente 10 veces en volumen o menos, más preferiblemente 5 veces en volumen o menos, y de manera particularmente preferible 2 veces en volumen o menos. Por supuesto, el disolvente de tipo amida inmisible con agua también puede añadirse preferiblemente con el propósito de eliminar el problema, por ejemplo, para disolver el compuesto peptídico depositado cuando se confirma un problema tal como la deposición del compuesto peptídico en la etapa de extracción y lavado de la etapa B en la presente invención.

En la síntesis de péptidos en fase líquida usando el disolvente de tipo amida inmisible con agua, las concentraciones del componente de amina, producto condensado y componente de amina nuevo anteriormente mencionados en la fase de disolvente orgánico no pueden especificarse uniformemente, puesto que tales concentraciones se ven afectadas por los tipos de los respectivos reactivos que van a usarse, la cantidad usada de los mismos, la composición del disolvente orgánico, es decir la razón de mezclado del disolvente, la temperatura de reacción y similares. Sin embargo, la reacción puede llevarse a cabo generalmente en una condición de que el volumen usado total (l/mol) del disolvente orgánico en relación con la suma del número de moles del componente de amina, producto condensado y componente de amina nuevo anteriormente mencionados es de aproximadamente 1 a 50 veces en volumen. El volumen usado total de los mismos puede fijarse a más preferiblemente 20 veces en volumen o menos, y además más preferiblemente 10 veces en volumen o menos.

En el método de síntesis en fase líquida de un compuesto peptídico caracterizado por usar el disolvente de tipo amida inmisible con agua, los métodos detallados de las etapas A, C y D anteriormente mencionadas son los mismos que los descritos en la invención excepto porque se usa el disolvente anteriormente mencionado como disolvente.

El método detallado de la etapa B anteriormente mencionada no está particularmente limitado, y pueden llevarse a cabo la etapa de descomposición, etapa de extracción y lavado y etapa de cristalización anteriormente mencionadas del éster activo, o pueden usarse sin limitación métodos conocidos tales como el método de Carpino *et al.* (Org. Proc. Res. Dev., 7, 28 (2003), documento US 5516891) o el método DioRaSSP de Diosynth (documento JP-A-2003-55396) en el que el éster activo de componente de ácido se descompone usando un eliminador.

No hace falta decir que la presente invención en la que el éster activo sin reaccionar de componente de ácido se hidroliza al tiempo que se mantiene el sistema de reacción en una condición básica hasta que la cantidad del éster activo sin reaccionar restante del componente de ácido disminuye hasta el 1% o menos en la etapa B puede llevarse a cabo también en el segundo método de la presente divulgación. En la etapa B del segundo método de la presente solicitud, la cantidad del éster activo sin reaccionar restante del componente de ácido no está particularmente limitada; sin embargo, se prefiere más que la cantidad restante del mismo disminuya hasta el 1% o menos por el mismo motivo descrito en la presente invención.

El disolvente de tipo amida funciona preferiblemente en la purificación del compuesto peptídico, puesto que el disolvente de tipo amida tiene una interacción selectiva con el compuesto peptídico en una mezcla de péptidos que contiene diversas impurezas debido a una alta afinidad por el compuesto peptídico. Como método de purificación del compuesto peptídico contenido en la disolución de disolvente orgánico que incluye el disolvente de tipo amida inmisible con agua, pueden llevarse a cabo preferiblemente métodos de purificación mediante el método de lavado y el método de cristalización en la etapa B o etapa D anteriormente mencionada. Además, cuando el disolvente de tipo amida inmisible con agua se usa como buen disolvente en el método de cristalización, la impureza puede eliminarse más eficazmente. Además, es preferible en la etapa D eliminar la impureza mediante cristalización usando el disolvente de tipo amida inmisible con agua en presencia de un ácido y purificar la sal del ácido con el compuesto peptídico en el que el grupo amino N-terminal no está protegido y el grupo carboxilo C-terminal está protegido, puesto que puede obtenerse un compuesto peptídico de mayor pureza.

Se describe el método de purificación de la sal del ácido con el compuesto peptídico en el que el grupo amino N-terminal no está protegido y el grupo carboxilo C-terminal está protegido por la deposición de la impureza contaminante llevando a cabo cristalización usando el disolvente de tipo amida inmisible con agua y eliminando la impureza depositada en la etapa D anteriormente mencionada. En este método de purificación, la impureza se retira por separación al tiempo que se retiene la sal del compuesto peptídico con el ácido en la fase de disolvente orgánico utilizando el hecho de que la sal del compuesto peptídico con el ácido tiene una alta afinidad por el disolvente de tipo amida inmisible con agua. Por ejemplo, en el caso de que la hidrofiliidad del componente de ácido que es un producto descompuesto del éster activo sea baja, el componente de ácido no puede retirarse completamente en la etapa B en algunos casos. En tal caso, el componente de ácido se convierte en un producto desprotegido del componente de ácido por la reacción de desprotección posterior, y la sal del producto desprotegido del componente de ácido obtenido añadiendo un ácido tras la desprotección tiene una baja afinidad por el disolvente de tipo amida inmisible con agua; por tanto, la sal del producto desprotegido del componente de ácido puede retirarse fácilmente, puesto que la sal se retira por separación como un sólido del disolvente orgánico. De esta manera, la sal del compuesto peptídico con el ácido puede purificarse eficazmente. Cuando la desprotección en la etapa C se lleva a cabo en una condición ácida, no es necesario añadir el ácido. En el caso en el que el compuesto peptídico no forme la sal con el ácido, el compuesto peptídico puede convertirse en la sal con un ácido añadiendo adecuadamente el ácido. Como ácido que va a añadirse en este caso, puede usarse un ácido inorgánico o ácido orgánico comúnmente usado.

La cantidad usada del disolvente de tipo amida inmisible con agua no está particularmente limitada. En general, la cantidad usada es preferiblemente tan pequeña como sea posible desde el punto de vista de la mejora de la razón de eliminación de la sal del producto desprotegido de componente de ácido con el ácido. La cantidad usada del disolvente de tipo amida inmisible con agua no puede especificarse uniformemente; sin embargo, este procedimiento puede llevarse a cabo generalmente en una condición de que el volumen usado total (l/mol) del disolvente orgánico en relación con el número de moles del compuesto peptídico es de aproximadamente 0,1 a 10 veces en volumen. El volumen usado total del mismo puede fijarse a preferiblemente 5 veces en volumen o menos, y más preferiblemente 2 veces en volumen o menos.

El disolvente de tipo amida inmisible con agua puede usarse como una mezcla de disolventes orgánicos con otro disolvente. Los ejemplos de tal otro disolvente pueden incluir los mismos disolventes ilustrados en el disolvente de reacción usado en la etapa A. Entre ellos, se usan preferiblemente hidrocarburos halogenados y ésteres de ácidos grasos, que tienen una solubilidad relativamente favorable para el compuesto peptídico. Como hidrocarburos halogenados, se prefieren particularmente diclorometano y clorobenceno. Como ésteres de ácidos grasos, se prefieren particularmente acetato de etilo. Se prefieren particularmente diclorometano y clorobenceno.

La cantidad usada de tal otro disolvente no está particularmente limitada siempre que la cantidad usada se encuentre dentro del intervalo en el que la fluidez de la mezcla de reacción que tiene la sal del producto desprotegido de componente de ácido con el ácido depositado en el mismo puede mantenerse y la cantidad disuelva de la sal del compuesto peptídico con el ácido no se satura. La cantidad usada de otro disolvente no puede

especificarse uniformemente, puesto que la cantidad usada se ve afectada por el tipo del compuesto peptídico anteriormente mencionado, la cantidad usada del disolvente de tipo amida inmiscible con agua, la temperatura de cristalización y similares. Este procedimiento puede llevarse a cabo generalmente en una condición de que la cantidad usada total del disolvente en relación con el número de moles del compuesto peptídico anteriormente mencionado es de aproximadamente 4 a 100 veces en volumen. La condición corresponde a una condición de que la concentración de componente de amina nuevo es de aproximadamente 0,01 a 0,25 mol/l.

La temperatura en el momento de la cristalización anteriormente mencionada no está particularmente limitada; sin embargo, se prefiere permitir que la cristalización avance lentamente con el fin de formar un líquido de cristalización (suspensión) que tiene una propiedad favorable. Por supuesto, puede llevarse a cabo también una denominada cristalización en enfriamiento en la que se permite que la cristalización avance lentamente enfriando gradualmente el sistema de reacción. Además, también se prefiere añadir un cristal simiente al sistema de reacción con el fin de permitir que la cristalización avance lentamente.

En el método de purificación, la sal del compuesto peptídico con el ácido se obtiene como una disolución que contiene el disolvente inmiscible con agua de tipo péptido; sin embargo, la sal se neutraliza posteriormente cuando se lleva a cabo lavado con una disolución acuosa básica en la etapa de extracción y lavado de la etapa D y puede convertirse en un compuesto peptídico libre, de una manera similar al método de la presente invención. El compuesto peptídico libre obtenido también puede cristalizarse sometiéndolo a la etapa de cristalización de la etapa D como el método de la presente invención.

Como otro efecto ejercido por el disolvente de tipo amida inmiscible con agua, puede ejemplificarse la aceleración de la reacción de condensación. El efecto de aceleración de la reacción de condensación no puede especificarse uniformemente, puesto que el efecto de aceleración se ve afectado por la combinación del componente de ácido y el componente de amina que van a condensarse, los tipos de los respectivos reactivos tales como el reactivo activante y el agente de condensación, la cantidad usada de los mismos, el tipo o la composición del disolvente orgánico (la razón de mezclado del disolvente), la temperatura de reacción y similares. Sin embargo, la reacción puede completarse generalmente en el plazo de 10 horas, preferiblemente en el plazo de 5 horas, más preferiblemente en el plazo de 3 horas, debido al efecto de aceleración. Además, incluso puede obtenerse un compuesto peptídico relativamente inestable con alta pureza y con buen rendimiento sin descomposición reduciendo el tiempo de reacción, puesto que la reacción puede completarse en un corto tiempo.

El método de síntesis en fase líquida de un compuesto peptídico caracterizado por el uso del disolvente de tipo amida inmiscible con agua tal como se describió anteriormente puede aplicarse al método de síntesis de péptidos en fase líquida global sin limitación particular, tal como el método de descomposición de un éster activo.

Además, un compuesto peptídico de alta pureza puede producirse también más eficazmente combinando el método de síntesis en fase líquida usando el disolvente de tipo amida inmiscible con agua con el método de síntesis de péptidos en fase líquida de la presente invención.

## Ejemplos

A continuación en el presente documento, la presente invención se describe con referencia a los ejemplos. Los ejemplos en los que el éster activo sin reaccionar disminuye hasta el 1% o menos tras el contacto con una base son ejemplos que se encuentran dentro del alcance de la invención.

En los presentes ejemplos, se usaron abreviaturas que se basan en el código de la Comisión conjunta de la IUPAC-IUB o se usan convencionalmente en el campo para compuestos peptídicos, grupos protectores y similares. Además, en el caso en el que existen isómeros ópticos con respecto a aminoácidos, se representa la forma L a menos que se especifique lo contrario.

Como abreviaturas para reactivos, se usaron EDC: 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida y HOBt: 1-hidroxibenzotriazol.

Como abreviaturas para grupos protectores y sustituyentes, se usaron Bn: grupo bencilo, Boc: grupo t-butoxicarbonilo, Et: grupo etilo, OBt: grupo 1H-benzotriazol-1-iloxilo y Ts: grupo p-toluenosulfonilo.

Como abreviaturas para aminoácidos, se usaron Arg(Ts): Ng-p-toluenosulfonilarginina, D-Leu: D-leucina, Gly: glicina, Leu: leucina, Phe: fenilalanina, Pro: prolina, Ser(Bn): O-bencilserina y Tyr(Bn): O-benciltirosina.

Se midió el pH en los siguientes ejemplos y similares mediante un método de electrodo de vidrio usando un peachímetro manual de tipo D21S fabricado por Horiba Instruments Company con calibración de 3 puntos usando una disolución patrón de ftalato, una disolución patrón de fosfato neutra y una disolución patrón de borato, que se especifican en el método de medición del pH de la norma JIS Z 8802.

La pureza de un compuesto peptídico objetivo, es decir un componente principal, el contenido de la impureza y la

cantidad restante del éster activo se midieron usando HPLC (columna: fabricada por YMC Co., Ltd., YMC-Pack ODS-A A303, fase móvil: tampón fosfato 10 mM (pH 2,5) / acetonitrilo = de 60 / 40 a 20 / 80, detector: UV (210 nm) equipado con un detector UV). La cantidad restante del éster activo se representó mediante la transición del contenido del éster activo en el compuesto peptídico objetivo.

5 La pureza del componente principal, el contenido de la impureza y el contenido del éster activo se calcularon mediante las siguientes fórmulas de cálculo. El valor de área de pico total se calibró restando el valor de área de pico de un disolvente tal como clorobenceno o DBF.

10 Razón de conversión de la reacción = valor de área del compuesto objetivo / (valor de área del compuesto objetivo + valor de área de la materia prima) x 100 (%)

Pureza del componente principal = valor de área del componente principal / valor de área de pico total x 100 (%)

15 Contenido de impureza = valor de área de impureza / valor de área del componente principal x 100 (%)

Contenido del éster activo = valor de área del éster activo / valor de área del componente principal x 100 (%)

#### 20 Ejemplo 1: Síntesis de Boc-Arg(Ts)-Pro-NHEt

A una disolución compuesta por Boc-Pro-NHEt (2,0 g) y diclorometano (20 ml), se le añadió ácido metanosulfónico (1,90 g) a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 4 horas, de ese modo se retiró el grupo Boc (razón de conversión de la reacción: 100,0%). Tras la reacción, se añadió a la misma trietilamina (3 ml) en una cantidad del mismo equivalente molar que el del ácido metanosulfónico añadido, y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos. Tras añadirse Boc-Arg(Ts) (4,24 g) y HOBt monohidrato (1,67 g) a la disolución en diclorometano así obtenida de Pro-NHEt, se enfrió la disolución de reacción con hielo. Entonces, se añadió a la misma clorhidrato de EDC (2,37 g), y se agitó la mezcla resultante durante 1 hora. Posteriormente, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 15 horas, realizando de ese modo una reacción de condensación.

30 Tras la reacción, se añadió a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (20 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos. Entonces, la fase acuosa se retiró por separación. El pH de la fase acuosa en este momento era de 7,6, y el contenido de Boc-Arg(Ts)-OBt como éster activo en la fase orgánica obtenida era del 0,2% y no se detectó Boc-Arg(Ts) como componente de ácido en la misma. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo este procedimiento una vez más era de 10,9, y el contenido de Boc-Arg(Ts)-OBt en la fase orgánica obtenida era del 0,04%. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo adicionalmente este procedimiento una vez más era de 11,8, y no se detectó Boc-Arg(Ts)-OBt en la fase orgánica obtenida.

40 Se lavó la fase orgánica obtenida una vez con agua (20 ml), y luego se lavó dos veces con disolución acuosa de hidrogenosulfato de potasio al 5% (20 ml). La fase orgánica obtenida se condensó a presión reducida, de ese modo se obtuvo un producto condensado (4,39 g). La pureza del Boc-Arg(Ts)-Pro-NHEt objetivo era del 96% y el rendimiento era del 94%.

#### 45 Ejemplo 2: Síntesis de Boc-D-Leu-Leu-Arg(Ts)-Pro-NHEt

Se preparó Boc-Leu-Arg(Ts)-Pro-NHEt a partir de Boc-Arg(Ts)-Pro-NHEt obtenido en el ejemplo 1 y Boc-Leu mediante el mismo procedimiento que el ejemplo 1. A una disolución compuesta por el compuesto (0,969 g) y diclorometano (10 ml), se le añadió ácido metanosulfónico (0,78 g) a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 4 horas, de ese modo se retiró el grupo Boc (razón de conversión de la reacción: 100,0%). Tras la reacción, se añadió a la misma trietilamina en una cantidad del mismo equivalente molar que el del ácido metanosulfónico añadido, y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos. Tras añadirse Boc-D-Leu (0,40 g) y HOBt monohidratado (0,33 g) a la disolución en diclorometano así obtenida de Leu-Arg(Ts)-Pro-NHEt, se enfrió la disolución de reacción con hielo. Entonces, se añadió a la misma clorhidrato de EDC (0,42 g), y se agitó la mezcla resultante durante 1 hora. Posteriormente, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 15 horas, realizando de ese modo una reacción de condensación (razón de conversión de la reacción: 100,0%).

60 Tras la reacción, se añadió a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (10 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos, y luego, la fase acuosa se retiró por separación. El pH de la fase acuosa en el momento era de 9,3, y el contenido de Boc-D-Leu-OBt como éster activo en la fase orgánica obtenida era del 11,5% y el contenido de Boc-D-Leu en la misma era del 0,8%. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo este procedimiento una vez más era de 11,0, y el contenido de Boc-D-Leu-OBt en la fase orgánica obtenida era del 0,2% y no se detectó Boc-D-Leu. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo adicionalmente este procedimiento una vez más era de 12,4, y no se detectaron Boc-D-Leu-OBt y Boc-D-Leu en la fase orgánica obtenida.

65 Se lavó la fase orgánica obtenida una vez con agua (10 ml), y luego se lavó dos veces con disolución acuosa de

hidrogenosulfato de potasio al 5% (10 ml). La fase orgánica obtenida se condensó a presión reducida, de ese modo se obtuvo un producto condensado (0,97 g). La pureza del Boc-D-Leu-Leu-Arg(Ts)-Pro-NHEt objetivo era del 95% y el rendimiento era del 85%.

#### 5 Ejemplo 3: Síntesis de Boc-Ser(Bn)-Tyr(Bn)-D-Leu-Leu-Arg(Ts)-Pro-NHEt

Se preparó Boc-Tyr(Bn)-D-Leu-Leu-Arg(Ts)-Pro-NHEt a partir de Boc-D-Leu-Leu-Arg(Ts)-Pro-NHEt obtenido en el ejemplo 2 y Boc-Tyr(Bn) mediante el mismo procedimiento que el ejemplo 2. A una disolución compuesta por este compuesto (0,46 g) y diclorometano (5 ml), se le añadió ácido metanosulfónico (0,42 g) a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1 hora, de ese modo se retiró el grupo Boc (razón de conversión de la reacción: 99,9%). Tras la reacción, se añadió a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (5 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos, y luego, la fase acuosa se retiró por separación. Tras añadirse Boc-Ser (Bn) (0,19 g) y HOBt monohidratado (0,12 g) a la disolución en diclorometano obtenida de Tyr(Bn)-D-Leu-Leu-Arg(Ts)-Pro-NHEt, se enfrió la disolución de reacción con hielo. Entonces, se añadió a la misma clorhidrato de EDC (0,15 g), y se agitó la mezcla resultante durante 1 hora. Posteriormente, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 15 horas, de ese modo se llevó a cabo una reacción de condensación (razón de conversión de la reacción: 99,9%).

Tras la reacción, se añadió a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (5 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos, y luego, la fase acuosa se retiró por separación. El pH de la fase acuosa en el momento era de 11,1, y el contenido de Boc-Ser(Bn)-OBt como éster activo en la fase orgánica obtenida era del 4,4% y el contenido de Boc-Ser (Bn) en la misma era del 0,1%. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo dicho procedimiento una vez más era de 11,3, y el contenido de Boc-Ser(Bn)-OBt en la fase orgánica obtenida era del 2,8% y el contenido de Boc-Ser(Bn) en la misma era el 1,3%. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo adicionalmente dicho procedimiento una vez más era de 11,5, y el contenido de Boc-Ser(Bn)-OBt en la fase orgánica obtenida era del 0,1% y no se detectó Boc-Ser(Bn).

Se lavó la fase orgánica obtenida una vez con agua (5 ml), y luego se lavó dos veces con disolución acuosa de hidrogenosulfato de potasio al 5% (5 ml). La fase orgánica obtenida se condensó a presión reducida, de ese modo se obtuvo un producto condensado (0,50 g). La pureza del Boc-Ser(Bn)-Tyr(Bn)-D-Leu-Leu-Arg(Ts)-Pro-NHEt objetivo era del 83% y el rendimiento era del 84%.

#### 35 Ejemplo 4: Síntesis de Boc-Phe-Leu-OBn

A una disolución compuesta por sal de Leu-OBn-TsOH (10,02 g), trietilamina (2,58 g) y diclorometano (100 ml), se le añadieron Boc-Phe (10,13 g) y HOBt monohidratado (7,01 g), y se enfrió la mezcla resultante con hielo. Entonces, se añadió a la misma clorhidrato de EDC (8,80 g), y se agitó la mezcla resultante durante 2 horas. Posteriormente, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 13 horas, de ese modo se llevó a cabo una reacción de condensación (razón de conversión de la reacción: 100,0%).

El pH de la fase acuosa obtenida llevando a cabo con disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (100 ml) tras la reacción era de 8,3, y el contenido de Boc-Phe-OBt como éster activo en la fase orgánica obtenida era del 1,6% y el contenido de Boc-Phe como componente de ácido en la misma era del 5,0%. El pH de la fase acuosa obtenida lavando adicionalmente esta fase orgánica con disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (100 ml) era de 10,4, y el contenido de Boc-Phe-OBt (un éster activo) en la fase orgánica obtenida era del 0,1% y el contenido de Boc-Phe en la misma era del 0,4%.

Se lavó la fase orgánica así obtenida una vez con agua (100 ml), y se lavó con disolución acuosa de hidrogenosulfato de potasio al 5% (100 ml), y luego se lavó con salmuera saturada (100 ml), de ese modo se obtuvo una fase orgánica (135,76 g). La pureza del Boc-Phe-Leu-OBn objetivo era del 95%.

Entonces la fase orgánica (135,57 g) se condensó a presión reducida, y el disolvente de la misma se reemplazó de diclorometano a hexano. Como resultado, se depositó un sólido. Tras permitir que la mezcla madurara agitando durante 1 hora bajo enfriamiento con hielo, se recogió el sólido depositado mediante filtración, se lavó con hexano (100 ml) y se secó a vacío, de ese modo se obtuvo un sólido blanco (10,16 g). La pureza del Boc-Phe-Leu-OBn objetivo era del 99% y el rendimiento era del 84%.

Como resultado de la determinación de HPLC usando el cristal obtenido como patrón de referencia, el rendimiento de Boc-Phe-Leu-OBn en la fase orgánica anterior era del 95%.

#### 60 Ejemplo 5: Síntesis de Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn

A la fase orgánica obtenida mediante el mismo procedimiento que el ejemplo 4, es decir la disolución compuesta por Boc-Phe-Leu-OBn (0,55 g) y diclorometano (5 ml), se le añadió ácido metanosulfónico (0,23 g) a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2 horas, de ese modo se retiró el grupo Boc (razón de conversión de la reacción: 100,0%). Tras la reacción, se añadió a la misma disolución acuosa de

carbonato de sodio al 5% (5 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos, y luego, la fase acuosa se retiró por separación. Tras añadirse Boc-Gly (0,31 g) y HOBt monohidratado (0,32 g) a la disolución en diclorometano así obtenida de Phe-Leu-OBn, se enfrió la disolución de reacción con hielo. Entonces, se añadió a la misma clorhidrato de EDC (0,41 g), y se agitó la mezcla resultante durante 1 hora. Posteriormente, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 15 horas para una reacción de condensación (razón de conversión de la reacción: 99,7%).

Tras la reacción, se añadió a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (5 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos, y luego, la fase acuosa se retiró por separación. El pH de la fase acuosa en este momento era de 8, y el contenido de Boc-Gly-OBt como éster activo en la fase orgánica obtenida era del 0,1%. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo dicho procedimiento dos veces más era de 12, y no se detectó Boc-Gly-OBt en la fase orgánica obtenida.

Se lavó la fase orgánica obtenida una vez con agua (5 ml), y luego se lavó dos veces con disolución acuosa de hidrogenosulfato de potasio al 5% (5 ml). La fase orgánica obtenida se condensó a presión reducida, de ese modo se obtuvo un producto condensado (0,54 g). La pureza del Boc-Gly-Phe-Leu-OBn objetivo era del 87%, y el rendimiento era del 88%.

A la disolución compuesta por el Boc-Gly-Phe-Leu-OBn así obtenido (0,54 g) y diclorometano (5 ml), se le añadió ácido metanosulfónico (0,26 g) a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1,5 horas, de ese modo se retiró el grupo Boc (razón de conversión de la reacción: 100,0%). Tras la reacción, se añadió a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (5 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos, y luego, la fase acuosa se retiró por separación. Tras añadirse Boc-Gly (0,27 g) y HOBt monohidratado (0,28 g) a la disolución en diclorometano así obtenida de Gly-Phe-Leu-OBn, se enfrió la disolución de reacción con hielo. Entonces, se añadió a la misma clorhidrato de EDC (0,36 g), y se agitó la mezcla resultante durante 1 hora. Posteriormente, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 15 horas para una reacción de condensación (razón de conversión de la reacción: 100,0%).

Tras la reacción, se añadió a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (5 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos, y luego, la fase acuosa se retiró por separación. El pH de la fase acuosa en el momento era de 8, y el contenido de Boc-Gly-OBt como éster activo en la fase orgánica obtenida era del 0,1%. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo dicho procedimiento dos veces más era de 12, y no se detectó Boc-Gly-OBt en la fase orgánica obtenida.

Se lavó la fase orgánica obtenida una vez con agua (5 ml), y luego se lavó dos veces con disolución acuosa de hidrogenosulfato de potasio al 5% (5 ml). La fase orgánica obtenida se condensó a presión reducida, de ese modo se obtuvo un producto condensado (0,44 g). La pureza del Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn objetivo era del 92%, y el rendimiento era del 73%.

#### Ejemplo 6: Síntesis de Tyr(Bn)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn

A la disolución compuesta por Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn (0,97 g) obtenido mediante el mismo procedimiento que el ejemplo 5 y diclorometano (15 ml), se le añadió ácido metanosulfónico (0,46 g) a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2 horas, de ese modo se retiró el grupo Boc (razón de conversión de la reacción: 100,0%).

Tras la reacción, se añadió a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (15 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos. Entonces, la fase acuosa se retiró por separación. Tras añadirse Boc-Tyr(Bn) (0,93 g) y HOBt monohidratado (0,46 g) a la disolución en diclorometano obtenida de Gly-Gly-Phe-Leu-OBn, se enfrió la disolución de reacción con hielo. Entonces, se añadió a la misma clorhidrato de EDC (0,57 g), y se agitó la mezcla resultante durante 1 hora. Posteriormente, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 15 horas para una reacción de condensación (razón de conversión de la reacción: 100,0%).

Tras la reacción, se añadió a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (15 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos. Entonces, se dejó reposar la mezcla, y la fase acuosa se retiró por separación. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo dicho procedimiento dos veces más era de 12, y no se detectó Boc-Tyr(Bn)-OBt como éster activo en la fase orgánica obtenida, pero el contenido de Boc-Tyr(Bn) como componente de ácido en la misma era del 44%.

Se lavó la fase orgánica obtenida una vez con agua (15 ml), y luego se lavó dos veces con disolución acuosa de hidrogenosulfato de potasio al 5% (15 ml). La fase orgánica obtenida se condensó a presión reducida, de ese modo se obtuvo un producto condensado (1,25 g). La pureza del Boc-Tyr(Bn)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn objetivo era del 61%, y el contenido de Boc-Tyr(Bn) en la misma era del 44%.

A la disolución compuesta por el producto condensado obtenido (1,25 g) que contenía Boc-Tyr(Bn)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn y diclorometano (10 ml), se le añadió ácido metanosulfónico (1,32 g) a temperatura ambiente, y se agitó la

mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1 hora, de ese modo se retiró el grupo Boc (razón de conversión de la reacción: 100,0%).

5 Tras la reacción, se añadió trietilamina (1,82 g) a la misma y se agitó la mezcla resultante durante 5 minutos. Entonces, se añadió a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (10 ml), de ese modo se depositó un sólido blanco. Tras permitir que la mezcla madurara dejando la mezcla reposar durante 30 minutos, se recogió el sólido depositado mediante filtración y se lavó con diclorometano (20 ml). Se combinaron el filtrado así obtenido y el líquido de lavado, y se lavó la mezcla resultante 3 veces con disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (20 ml).  
10 Tras retirarse la fase acuosa por separación, la fase orgánica obtenida se condensó a presión reducida, de ese modo se obtuvo un producto condensado (0,67 g). La pureza del Tyr(Bn)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn objetivo era del 82%, y el rendimiento era del 57%. Además, el contenido de Tyr(Bn) era del 8%.

15 Por otro lado, el sólido obtenido mediante filtración y lavado contenía Tyr(Bn) como componente principal. La pureza de Tyr(Bn) era del 87%, y el contenido de Tyr(Bn)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn era del 14% (rendimiento: 4%).

#### Ejemplo 7: Extracción de Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn con adición de DBF

20 Cuando se añadió clorobenceno (0,8 ml) a Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn (0,117 g) obtenido mediante el mismo procedimiento que el ejemplo 5, el compuesto no se disolvió completamente. Sin embargo, cuando se añadió DBF (0,2 ml) al mismo, el compuesto se disolvió completamente. A la disolución así obtenida, se le añadieron disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (0,8 ml) y salmuera saturada (2,4 ml), y se mezcló la mezcla resultante mediante agitación. Después de eso, cuando la mezcla resultante se dejó reposar, la mezcla se separó rápidamente en dos fases transparentes. Se separaron la fase orgánica y la fase acuosa. La razón de extracción de Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn en la fase orgánica era del 99%, y la razón de reparto de DBF en la fase acuosa era del 1,4%.

#### Ejemplo comparativo 1: Extracción de Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn con la adición de DMF

30 Cuando se añadió clorobenceno (0,8 ml) a Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn (0,117 g) obtenido mediante el mismo procedimiento que el ejemplo 5, el compuesto no se disolvió completamente en el mismo. Sin embargo, cuando se añadió DMF (0,2 ml) al mismo, el compuesto se disolvió completamente. A la disolución así obtenida, se le añadieron disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (0,8 ml) y salmuera saturada (2,4 ml), y se mezcló la mezcla resultante mediante agitación. Después de eso, cuando la mezcla resultante se dejó reposar, se depositaron una gran cantidad de cristales de la fase orgánica y la fase orgánica perdió la fluidez. Se tomó la fase acuosa y se analizó, y como resultado, se encontró que el 100% de DMF se repartió en la fase acuosa.

35 A partir de los resultados del ejemplo 6 y ejemplo comparativo 1, se encontró que el procedimiento de extracción mejora mediante el disolvente de tipo amida inmiscible con agua, tal como DBF.

#### Ejemplo 8: Síntesis de Boc-Phe-Leu-OBn con disolvente de clorobenceno

40 A la disolución compuesta por sal de Leu-OBn-TsOH (0,984 g), trietilamina (0,257 g) y clorobenceno (10 ml), se le añadieron Boc-Phe (0,997 g) y HOBt monohidratado (0,702 g), y se enfrió la mezcla resultante con hielo. Entonces, se añadió a la misma clorhidrato de EDC (0,835 g), y se agitó la mezcla resultante durante 2 horas. Posteriormente, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 1 hora para una reacción de condensación (razón de conversión de la reacción: 99,7%).

50 El pH de la fase acuosa obtenida lavando con disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (10 ml) tras la reacción era de 8,5, y el contenido de Boc-Phe-Obt como éster activo en la fase orgánica obtenida era del 7,9% y el contenido de Boc-Phe como componente de ácido en la misma era del 3,8%. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo dicho procedimiento una vez más era de 10,5, y el contenido de Boc-Phe-Obt en la fase orgánica obtenida era del 1,8% y el contenido de Boc-Phe en la misma era del 3,6%. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo adicionalmente dicho procedimiento una vez más era de 11,0, y el contenido de Boc-Phe-Obt en la fase orgánica obtenida era del 0,1% y el contenido de Boc-Phe en la misma era del 1,6%.

55 Se lavó la fase orgánica así obtenida una vez con agua (20 ml) y luego se lavó con disolución acuosa de ácido cítrico al 10% (10 ml). Luego, se añadieron a la misma salmuera saturada (10 ml) y agua (10 ml) para lavar, de ese modo se obtuvo una fase orgánica (12,268 g). La pureza del Boc-Phe-Leu-OBt objetivo era del 93%, y la razón de extracción era del 99%.

#### Ejemplo 9: Síntesis de Boc-Phe-Leu-OBn con disolvente de clorobenceno-DBF

60 A la disolución compuesta por sal de Leu-OBn-TsOH (4,00 g), trietilamina (1,08 g), clorobenceno (40 ml) y DBF (10 ml), se le añadieron Boc-Phe (4,04 g) y HOBt monohidratado (2,81 g), y se enfrió la mezcla resultante con hielo. Entonces, se añadió a la misma clorhidrato de EDC (3,53 g), y se agitó la mezcla resultante durante 2 horas.  
65 Posteriormente, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 1 hora para una reacción de condensación (razón de conversión de la reacción: 100,0%).

El pH de la fase acuosa obtenida diluyendo la mezcla de reacción con clorobenceno (15 ml) tras la reacción y añadiendo disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (40 ml) y salmuera saturada (20 ml) a la misma para lavar era de 8,3, y el contenido de Boc-Phe-OBt como éster activo en la fase orgánica obtenida era del 9,5% y el contenido de Boc-Phe como componente de ácido en la misma era del 1,2%. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo este procedimiento de lavado con disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% y salmuera saturada tres veces más era de 11,1, y el contenido de Boc-Phe-OBt en la fase orgánica obtenida era del 0,8% y el contenido de Boc-Phe en la misma era del 0,03%.

Se lavó la fase orgánica así obtenida añadiendo agua (20 ml) y salmuera saturada (40 ml) a la misma, de ese modo se obtuvo una fase orgánica (67,34 g). La pureza del Boc-Phe-Leu-OBn objetivo era del 98%, y la razón de extracción era del 98%. Además, el contenido de agua de la fase orgánica era del 0,37%. Tras someterse esta fase orgánica (61,98 g) a deshidratación y condensación a presión reducida, se diluyó la sustancia resultante con clorobenceno, de ese modo se obtuvo una disolución deshidratada (53,23 g). El contenido de agua de la disolución era del 0,03%.

#### Ejemplo 10: Síntesis de Boc-Gly-Phe-Leu-OBn con disolvente de clorobenceno-DBF

A la disolución deshidratada (49,11 g) que contiene Boc-Phe-Leu-OBn obtenido en el ejemplo 9, se le añadió ácido metanosulfónico (8,30 g, 10 equivalentes) a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 10 horas, de ese modo se retiró el grupo Boc (razón de conversión de la reacción: 99,8%). Tras la reacción, se añadieron a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 10% (50 ml) y salmuera saturada (5 ml) y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos, y luego, la fase acuosa se retiró por separación. Tras añadirse Boc-Gly (2,26 g, 1,5 equivalentes) y HOBt monohidrato (2,37 g, 1,8 equivalentes) a la disolución en clorobenceno así obtenida de Phe-Leu-OBn, se enfrió la disolución de reacción con hielo. Entonces, se añadió a la misma clorhidrato de EDC (2,96 g, 1,8 equivalentes), y se agitó la mezcla resultante durante 2 horas. Posteriormente, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 10 horas para una reacción de condensación (razón de conversión de la reacción: 99,9%).

El pH de la fase acuosa obtenida mediante lavado añadiendo disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (34 ml) y salmuera saturada (17 ml) tras la reacción era de 7,9, y el contenido de Boc-Gly-OBt como éster activo en la fase orgánica obtenida era del 0,1% y no se detectó Boc-Gly como componente de ácido. En la fase orgánica obtenida mediante el procedimiento de lavado con disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% y salmuera saturada una vez más, no se detectaron Boc-Gly-OBt ni Boc-Gly. Tras lavarse la fase orgánica una vez con salmuera saturada (17 ml), se añadieron a la misma disolución acuosa de hidrogenosulfato de potasio al 5% (17 ml) y salmuera saturada (34 ml) para lavar. Entonces, se lavó la fase orgánica con salmuera saturada (34 ml), y se lavó adicionalmente bien con clorobenceno (15 ml), de ese modo se obtuvo una fase orgánica (63,90 g). La pureza de Boc-Gly-Phe-Leu-OBn era del 91%, y la razón de extracción era del 99,6%. Tras someterse esta fase orgánica (59,95 g) a deshidratación-condensación a presión reducida, se diluyó la sustancia resultante con clorobenceno, de ese modo se obtuvo una disolución deshidratada (46,28 g). El contenido de agua de la disolución era del 0,06%.

#### Ejemplo 11: Síntesis de Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn con disolvente de clorobenceno-DBF

Una disolución deshidratada (43,94 g) que contenía Boc-Gly-Phe-Leu-OBn obtenido mediante el mismo procedimiento que el ejemplo 10 se diluyó con diclorometano, de ese modo se obtuvo una disolución en diclorometano (137,01 g) que contenía Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn. La pureza del Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn objetivo era del 87%, y la razón de extracción era del 100%. El contenido de agua del mismo era del 0,09%.

#### Ejemplo 12: Cristalización de Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn con disolvente de clorobenceno-DBF

Cuando la disolución en diclorometano (35,41 g) que contenía Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn (pureza: 87%) obtenido en el ejemplo 11 se enfrió con hielo mientras se agitaba vigorosamente, se depositó un sólido. Tras permitir que la mezcla madurara agitando durante 1 hora bajo enfriamiento con hielo, se recogió el sólido depositado mediante filtración, se lavó con hexano (100 ml) y se secó a vacío, de ese modo se obtuvo un sólido blanco (0,68 g). La pureza del Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn objetivo era del 95%, y el rendimiento de cristalización era del 71%.

Como resultado de la determinación por HPLC usando el cristal obtenido como patrón de referencia, el rendimiento de Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn obtenido en los ejemplos 9 a 10, en relación con la sal de Leu-OBn·TsOH, era del 82%.

#### Ejemplo 13: Síntesis de Boc-Tyr(Bn)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn con disolvente de diclorometano-DBF

La disolución en diclorometano (57,74 g) que contenía Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn obtenido en el ejemplo 11 se sometió a deshidratación-condensación a presión reducida, de ese modo se obtuvo una disolución deshidratada (34,90 g). El contenido de agua era del 0,04%. A la disolución deshidratada así obtenida (30,02 g) que contenía Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn, se le añadió ácido metanosulfónico (4,70 g) a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla

resultante a temperatura ambiente durante 10 horas, de ese modo se retiró el grupo Boc (razón de conversión de la reacción: 100,0%). Tras la reacción, la mezcla resultante se condensó a presión reducida, de ese modo se obtuvo un líquido condensado (12,82 g). A este líquido condensado, se le añadieron carbonato de sodio (3,5 g) y agua (20 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos. Entonces, la fase acuosa se retiró por separación. Tras añadirse Boc-Tyr(Bn) (1,502 g) y HOBt monohidratado (0,750 g) a la disolución en diclorometano así obtenida de Gly-Gly-Phe-Leu-OBn, se enfrió la disolución de reacción con hielo. Posteriormente, se añadió a la misma clorhidrato de EDC (0,911 g), y se agitó la mezcla resultante durante 2 horas. Entonces, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 10 horas para una reacción de condensación (razón de conversión de la reacción: 100,0%).

El pH de la fase acuosa obtenida mediante lavado añadiendo disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (12 ml) y agua (6 ml) a la mezcla de reacción tras la reacción era de 9,3, y el contenido de Boc-Tyr(Bn)-OBt como éster activo en la fase orgánica obtenida era del 0,3% y el contenido de Boc-Tyr(Bn) como componente de ácido en la misma era del 16,6%. El pH de la fase acuosa obtenida lavando la fase orgánica así obtenida con disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (12 ml) y luego lavando adicionalmente con agua (12 ml) era de 10,6, y el contenido de Boc-Tyr(Bn)-OBt en la fase orgánica obtenida era del 0,2% y el contenido de Boc-Tyr(Bn) en la misma era del 2,5%.

Cuando se añadió disolución acuosa de hidrogenosulfato de potasio al 5% (12 ml) a la fase orgánica así obtenida y se agitó la mezcla resultante, se depositó un sólido. Tras permitir que la mezcla madurara agitando a temperatura ambiente durante 1 hora, se recogió el sólido depositado mediante filtración, se lavó con diclorometano (30 ml) y se secó a vacío, de ese modo se obtuvo un sólido blanco (0,622 g). La pureza de Boc-Tyr(Bn)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn objetivo era del 99%, el rendimiento de cristalización era del 37%, y el rendimiento de adquisición en relación con la sal de Leu-OBn·TsOH era del 27%. Además, el contenido de Boc-Tyr(Bn)-OBt en la fase orgánica obtenida era menor del 0,1%, y no se detectó Boc-Tyr(Bn) en la misma.

Por otro lado, se combinaron el filtrado obtenido y el líquido de lavado, y la fase acuosa se retiró por separación. Además, se lavó la fase orgánica restante con salmuera saturada (34 ml), de ese modo se obtuvo una disolución en diclorometano (41,78 g). La pureza de Boc-Tyr(Bn)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn era del 78%, la razón de extracción era del 99,5%, y el rendimiento en relación con la sal de Leu-OBn·TsOH era del 45%. Además, el contenido de Boc-Tyr(Bn)-OBt en la fase orgánica obtenida era del 0,3%, y el contenido de Boc-Tyr(Bn) en la misma era del 7,4%.

#### Ejemplo 14: Síntesis de Tyr(Bn)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn con disolvente de clorobenceno-DBF, y eliminación de sal de ácido de Tyr(Bn)

Se mezclaron el sólido blanco (0,183 g) obtenido en el ejemplo 13 y diclorometano (12,28 g). Tras someterse la mezcla resultante a deshidratación-condensación a presión reducida, se diluyó la sustancia resultante con clorobenceno, de ese modo se obtuvo una disolución deshidratada (8,95 g) cuyos contenidos de Boc-Tyr(Bn)-OBt y de Boc-Tyr(Bn) eran respectivamente el 0,2% y el 4,5%. A esta disolución deshidratada, se le añadió ácido metanosulfónico (1,38 g, 18 equivalentes) a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 18 horas, de ese modo se depositó un sólido a medida que la reacción avanzaba. El contenido de Tyr(Bn) en la mezcla de reacción obtenida como suspensión era del 11,1%.

Tras permitirse que la mezcla de reacción como una suspensión madurara agitando durante 1 hora, se filtró el sólido depositado, se lavó con clorobenceno (3 ml) y luego se secó a vacío. El sólido blanco así obtenido (0,06 g) contenía Tyr(Bn) como componente principal. La pureza de Tyr(Bn) era del 82%, y el contenido de Tyr(Bn)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn era del 15%, que corresponde al rendimiento del 1%.

Por otro lado, el filtrado y el líquido de lavado se lavaron bien con clorobenceno (5 ml) y luego se combinaron entre sí, de ese modo se obtuvo una disolución transparente. Cuando se añadió disolución acuosa de carbonato de sodio al 10% (12 ml) a la disolución, se depositó un sólido. Tras permitir que la mezcla madurara agitando a temperatura ambiente durante 1 hora y luego bajo enfriamiento con hielo durante 1 hora, se filtró el sólido depositado, y se lavó secuencialmente con clorobenceno (2 ml) y agua (2 ml), y se secó a vacío, de ese modo se obtuvo un sólido blanco. La pureza del Tyr(Bn)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn objetivo era del 88%, y el contenido de Tyr(Bn) era del 4,9%. Además, el rendimiento de cristalización era del 88%, y el rendimiento de adquisición en relación con la sal de Leu-OBn·TsOH era del 58%.

#### Ejemplo 15: Síntesis de Boc-Tyr(Bn)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn con disolvente de clorobenceno-DBF

Tras someterse la disolución en diclorometano (18,22 g) que contenía Boc-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn obtenido en el ejemplo 11 a deshidratación-condensación a presión reducida, se diluyó la sustancia resultante con clorobenceno, de ese modo se obtuvo una disolución deshidratada (5,48 g). A la disolución deshidratada, se le añadió ácido metanosulfónico (1,74 g, 18 equivalentes) a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 5 horas, de ese modo se retiró el grupo Boc (razón de conversión de la reacción: 100,0%). Tras la reacción, se añadió a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 10% (15 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos. Entonces, la mezcla se condensó a presión reducida eliminando por destilación de ese modo clorobenceno hasta que la cantidad total de la disolución era de 18,35 g. Tras añadirse salmuera saturada

(2 ml) a la disolución y agitarse la mezcla durante 15 minutos, la fase acuosa se retiró por separación. Tras añadirse Boc-Tyr(Bn) (0,554 g) y HOBt monohidratado (0,273 g) a la disolución en clorobenceno obtenida de Gly-Gly-Phe-Leu-OBn, se enfrió la disolución de reacción con hielo. Entonces, se añadió a la misma clorhidrato de EDC (0,353 g), y se agitó la mezcla resultante durante 2 horas. Posteriormente, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 13 horas para una reacción de condensación (razón de conversión de la reacción: 100,0%).

El pH de la fase acuosa obtenida mediante lavado añadiendo disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (5 ml) y salmuera saturada (5 ml) a la mezcla de reacción tras la reacción era de 8,5, y el contenido de Boc-Tyr(Bn)-OBt como éster activo en la fase orgánica obtenida era del 0,8% y el contenido de Boc-Tyr(Bn) como componente de ácido era del 30,3%.

El pH de la fase acuosa obtenida mediante el procedimiento de lavado con disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% y salmuera saturada una vez más era de 9,6, y el contenido de Boc-Tyr(Bn)-OBt en la fase orgánica obtenida era del 0,2% y el contenido de Boc-Tyr(Bn) era del 0,1%. Posteriormente, se lavó la fase orgánica obtenida una vez con salmuera saturada (15 ml) y luego se lavó añadiendo disolución acuosa de hidrogenosulfato de potasio al 5% (5 ml) y salmuera saturada (15 ml) a la misma. Entonces, se añadieron salmuera saturada (15 ml), agua (15 ml) y clorobenceno (8 ml) a la fase orgánica, y la mezcla resultante se condensó a presión reducida, eliminando por destilación de ese modo clorobenceno hasta que la cantidad total de la disolución era de 7,29 g. Como resultado, se depositó un sólido. Cuando se añadieron al mismo clorobenceno (10 ml) y agua (15 ml), y se permitió que la mezcla resultante madurara a temperatura ambiente durante 1 hora, se formó una suspensión homogénea. Entonces, tras permitir que la suspensión madurara agitando durante 1 hora bajo enfriamiento con hielo, se filtró el sólido depositado, y secuencialmente se lavó con clorobenceno (2 ml) y agua (2 ml), y luego se secó a vacío, de ese modo se obtuvo un sólido blanco. La pureza del Boc-Tyr(Bn)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn objetivo era del 92%, y el contenido de Tyr(Bn) era del 2,1%. Además, el rendimiento de cristalización era del 93%, y el rendimiento de adquisición en relación con la sal de Leu-OBn·TsOH era del 64%.

Por otro lado, cuando el filtrado y el líquido de lavado se lavaron bien con agua (2 ml) y clorobenceno (2 ml), y luego se combinaron entre sí, la disolución se separó en dos fases transparentes. La fase acuosa se retiró por separación, y se obtuvo una fase orgánica (18,91 g). La pureza de Boc-Tyr(Bn)-Gly-Gly-Phe-Leu-OBn era del 71%, y la razón de extracción era del 100%, y el rendimiento en relación con la sal de Leu-OBn·TsOH era del 4%.

#### Ejemplo 16: Síntesis de Boc-Leu-Arg(Ts)-Pro-NEtBn

Se preparó Boc-Arg(Ts)-Pro-NEtBn mediante un procedimiento similar al ejemplo 1 a partir de Boc-Pro-NEtBn y Boc-Arg(Ts). A la disolución compuesta por el compuesto (1,00 g), clorobenceno (5,8 ml) y DBF (1,5 ml), se le añadió ácido metanosulfónico (1,41 g, 9,8 equivalentes) a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 24 horas, de ese modo se retiró el grupo Boc (razón de conversión de la reacción: 100,0%). Tras la reacción, se añadió a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 10% (12 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos para la neutralización. Entonces, la fase acuosa se retiró por separación, de ese modo se obtuvo una disolución que contenía Arg(Ts)-Pro-NEtBn (8,58 g).

Tras añadirse Boc-Leu monohidratado (0,54 g) y HOBt monohidratado (0,41 g) a la disolución así obtenida (8,28 g), se enfrió la disolución de reacción con hielo. Entonces, se añadieron a la misma clorhidrato de EDC (0,51 g) y agua (1,5 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 2 horas. Posteriormente, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 0,5 horas para una reacción de condensación (razón de conversión de la reacción: 99,9%).

Tras la reacción, se añadieron a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (6 ml) y salmuera saturada (6 ml). Se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos, y luego, la fase acuosa se retiró por separación. El pH de la fase acuosa en el momento era de 7,9, y el contenido de Boc-Leu-OBt como éster activo en la fase orgánica obtenida era del 6,6%, y el contenido de Boc-Leu como componente de ácido era del 0,1%. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo dicho procedimiento una vez más era de 10,1, y el contenido de Boc-Leu-OBt en la fase orgánica obtenida era del 5,5% y no se detectó Boc-Leu. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo dicho procedimiento cinco veces más era de 10,6, y el contenido de Boc-Leu-OBt en la fase orgánica obtenida era del 1,1%.

Se lavó la fase orgánica obtenida una vez con salmuera saturada (6 ml), y luego se lavó añadiendo disolución acuosa de hidrogenosulfato de potasio al 5% (6 ml) y salmuera saturada (12 ml), y se condensó a presión reducida, de ese modo se obtuvo un producto condensado (7,65 g). La pureza del Boc-Leu-Arg(Ts)-Pro-NEtBn objetivo era del 91%, y el rendimiento era del 91%.

#### Ejemplo 17: Síntesis de Boc-D-Leu-Leu-Arg(Ts)-Pro-NEtBn

Al producto condensado (7,442 g) que contiene Boc-Leu-Arg(Ts)-Pro-NEtBn obtenido en el ejemplo 16, se le añadió ácido metanosulfónico (1,329 g, 10 equivalentes) a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 6 horas para eliminar el grupo Boc (razón de conversión de la reacción: 100,0%).

Tras la reacción, se añadió a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 10% (12 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos para la neutralización. Entonces, la fase acuosa se retiró por separación, y la fase orgánica resultante se condensó a presión reducida, de ese modo se obtuvo un producto condensado (2,283 g) que contenía Leu-Arg(Ts)-Pro-NEtBn.

Tras añadirse una disolución en clorobenceno de Boc-D-Leu (4,583 g, concentración: 10,1%) y HOBt monohidratado (0,372 g) al producto condensado obtenido (2,226 g), se enfrió la disolución de reacción con hielo. Entonces, se añadieron a la misma clorhidrato de EDC (0,453 g) y agua (1,3 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 2 horas. Posteriormente, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 13 horas para una reacción de condensación (razón de conversión de la reacción: 100,0%).

Tras la reacción, se añadieron a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (5 ml), agua (5 ml) y salmuera saturada (10 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos, y luego, la fase acuosa se retiró por separación. El pH de la fase acuosa en este momento era de 7,2, y el contenido de Boc-D-Leu-OBt como éster activo en la fase orgánica obtenida era del 5,3% y el contenido de Boc-D-Leu como componente de ácido en la misma era del 0,004%. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo dicho procedimiento una vez más era de 9,8, y el contenido de Boc-D-Leu-OBt en la fase orgánica obtenida era del 4,3% y no se detectó Boc-D-Leu. El pH de la fase acuosa obtenida repitiendo dicho procedimiento siete más era de 10,7, y el contenido de Boc-D-Leu-OBt en la fase orgánica obtenida era del 0,8%.

Tras lavarse la fase orgánica obtenida una vez añadiendo disolución acuosa de hidrogenosulfato de potasio al 5% (5 ml) y salmuera saturada (15 ml) y luego lavarse con salmuera saturada (5 ml), la fase orgánica se condensó a presión reducida, de ese modo se obtuvo un producto condensado (8,024 g). La pureza del Boc-D-Leu-Leu-Arg(Ts)-Pro-NEtBn objetivo era del 93%, y el rendimiento era del 99%.

#### Ejemplo 18: Síntesis de Boc-Tyr(Bn)-D-Leu-Leu-Arg(Ts)-Pro-NEtBn

Al producto condensado (3,782 g) que contiene Boc-D-Leu-Leu-Arg(Ts)-Pro-NEtBn obtenido en el ejemplo 17, se le añadió ácido metanosulfónico (0,597 g, 9,9 equivalentes) a temperatura ambiente, y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 15 horas para eliminar el grupo Boc (razón de conversión de la reacción: 100,0%). Tras la reacción, se añadió a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 10% (5 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 15 minutos para la neutralización. Entonces, la fase acuosa se retiró por separación, y la fase orgánica resultante se condensó a presión reducida, de ese modo se obtuvo un producto condensado (3,584 g) que contenía D-Leu-Leu-Arg(Ts)-Pro-NEtBn.

Tras añadirse Boc-Tyr(Bn) (0,338 g) y HOBt monohidratado (0,167 g) al producto condensado obtenido (3,444 g), se enfrió la disolución de reacción con hielo. Entonces, se añadieron a la misma clorhidrato de EDC (0,209 g) y agua (0,6 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 2 horas. Posteriormente, se elevó la temperatura de la mezcla hasta temperatura ambiente y se agitó la mezcla durante 0,5 horas para una reacción de condensación (razón de conversión de la reacción: 99,9%).

Tras la reacción, se añadieron a la misma disolución acuosa de carbonato de sodio al 5% (2,5 ml) y salmuera saturada (2,5 ml), y se agitó la mezcla resultante durante 30 minutos. El pH de la fase acuosa en este momento era de 8,4, y el contenido de Boc-Tyr(Bn)-OBt como éster activo en la fase orgánica que se obtuvo mediante separación de fases dejando reposar la mezcla sin retirar por separación la fase acuosa era del 5,6% y el contenido de Boc-Tyr(Bn) como componente de ácido en la misma era del 26%. Cuando se añadió disolución acuosa de hidróxido de sodio al 48% (0,210 g) a esta mezcla de reacción con agitación, el pH de la mezcla de reacción se elevó hasta 11,4 una vez; sin embargo, a los 10 minutos después de eso, el pH disminuyó hasta 10,8. El pH de la mezcla se midió adicionalmente cada 10 minutos. Como resultado, el pH permaneció en 10,8. El contenido de Boc-Tyr(Bn)-OBt en la fase orgánica obtenida retirando por separación la fase acuosa era del 0,2%, y el contenido de Boc-Tyr(Bn) en la misma era del 39%.

Se lavó la fase orgánica así obtenida una vez con salmuera saturada (5 ml) y luego se lavó una vez añadiendo disolución acuosa de hidrogenosulfato de potasio al 5% (2,5 ml) y salmuera saturada (2,5 ml), y luego se lavó con salmuera saturada (2,5 ml). La fase orgánica obtenida se condensó a presión reducida, y se sometió a reemplazo del disolvente con clorobenceno (4 ml), de ese modo se obtuvo un producto condensado (7,385 g). La pureza del Boc-Tyr(Bn)-D-Leu-Leu-Arg(Ts)-Pro-NEtBn objetivo era del 66%, y el contenido de Boc-Tyr(Bn) en el mismo era del 33%. Además, el rendimiento era del 97%.

## REIVINDICACIONES

1. Método de producción de un péptido mediante un método de síntesis en fase líquida, que comprende etapas de:
  - etapa A: una etapa de hacer reaccionar un éster activo de un componente de ácido con un componente de amina para obtener un compuesto condensado;
  - etapa B: una etapa de hidrolizar el éster activo sin reaccionar del componente de ácido poniendo en contacto la mezcla de reacción obtenida en la etapa A dos veces o más con una base y manteniendo una condición básica hasta que la cantidad del éster activo sin reaccionar restante del componente de ácido disminuye hasta el 1% o menos, y luego purificar el compuesto condensado eliminando impurezas solubles en agua incluyendo el producto descompuesto del éster activo del componente de ácido llevando a cabo extracción y lavado con una disolución acuosa;
  - etapa C: una etapa de retirar un grupo protector para un grupo amino N-terminal del compuesto condensado obtenido en la etapa B; y
  - etapa D: una etapa de purificar el compuesto condensado desprotegido en el grupo amino N-terminal eliminando una impureza en una mezcla de reacción obtenida en la etapa C, si es necesario; y

en el que, en la etapa A, el componente de ácido es un aminoácido o un péptido, protegido en un grupo amino N-terminal mediante un grupo protector retirable en una condición ácida; y el componente de amina es un aminoácido o un péptido, protegido en un grupo carboxilo C-terminal mediante un grupo protector estable en una condición ácida.
2. Método de producción según la reivindicación 1, en el que se usa una disolución acuosa de un hidróxido, un carbonato o un bicarbonato de un metal alcalino en la etapa B.
3. Método de producción según la reivindicación 1 ó 2, en el que se mantiene el pH de la disolución acuosa alcalina a 10,0 o más en la etapa B.
4. Método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se usa como disolvente un disolvente de tipo hidrocarburo halogenado inmiscible con agua o una mezcla de disolventes orgánicos que contiene el disolvente de tipo hidrocarburo halogenado.
5. Método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se usa como disolvente un disolvente polar aprótico inmiscible con agua o una mezcla de disolventes orgánicos que contiene el disolvente polar aprótico.
6. Método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la desprotección en la etapa C se lleva a cabo en la condición ácida.
7. Método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el grupo protector para el grupo amino N-terminal es un grupo Boc.
8. Método de producción según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que tras formarse un enlace peptídico objetivo, se retira un grupo protector introducido en un grupo funcional de cadena lateral de un aminoácido que constituye el compuesto peptídico, si es necesario.