



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 252**

51 Int. Cl.:
C07K 5/08 (2006.01)
A61K 38/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05790131 .6**
96 Fecha de presentación : **04.10.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1802649**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **Síntesis de péptidos en fase sólida.**

30 Prioridad: **12.10.2004 EP 04104994**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.05.2011

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Skripko, Tanja**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

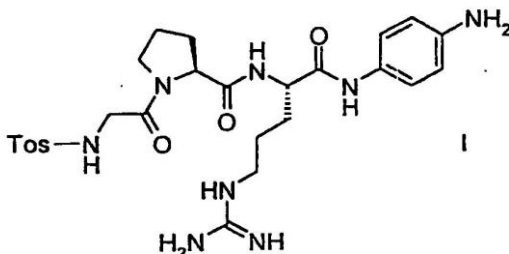
ES 2 359 252 T3

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

Síntesis de péptidos en fase sólida

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un derivado péptido de fórmula:



5

en la que Tos representa p-toluenosulfonilo.

El procedimiento de la presente invención se basa en la síntesis en fase sólida. Durante la síntesis en fase sólida, se ensamblan (es decir, se acoplan) aminoácidos formando un péptido de cualquier secuencia deseada, mientras que el material de partida se une a un soporte sólido inerte. Se añaden reactivos en solución; debido a que el producto de partida se encuentra unido al sólido, cualquier producto del material de partida también permanece unido. Tras unir la secuencia deseada sobre el soporte, se desengancha el péptido (es decir, se escinde) del soporte.

10

Los derivados péptidos producidos según la presente invención resultan adecuados para la determinación cuantitativa de determinados enzimas proteolíticos de clase EC 3.4.4 y especialmente para la trombina (EC es la abreviatura para "Enzyme Committee", de la International Union of Biochemistry).

15

Se han descrito métodos para la síntesis de dichos péptidos relacionados en, por ejemplo, las patentes US nº 4.428.874 (1984), nº 4.070.245 (1978) y nº 4.629.695 (1986). Estos métodos se basan en la síntesis en fase solución utilizando diferentes derivados de aminoácidos.

20

La publicación de patente internacional WO nº 86/01209 da a conocer péptidos p-fenilendiamina para la determinación de proteasas del sistema de coagulación sanguínea.

La publicación de patente europea EP nº 0 182 373 A2 describe un ensayo de coagulación sanguínea en tiras reactivas utilizando Tos-Gly-Pro-Arg-p-fenilendiamina como reactivo.

25

La publicación de patente europea EP nº 0 285 000 A2 da a conocer compuestos cromogeno y su utilización como sustratos enzimáticos.

30

Sin embargo, los métodos descritos en la técnica no resultan satisfactorios con respecto a la pureza óptica del isómero deseado y con respecto a los esfuerzos necesarios para la purificación de los péptidos respectivos.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento más económico para la preparación del derivado péptido de fórmula 1 con un buen rendimiento y elevada pureza óptica.

35

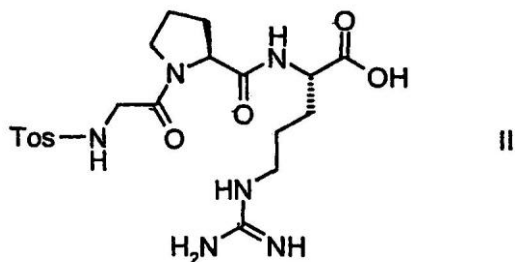
El objetivo se ha conseguido utilizando el procedimiento de la presente invención según la reivindicación 1. El procedimiento comprende:

- a) el acoplamiento consecutivo de los aminoácidos arginina, prolina y glicina en un soporte de fase sólida en presencia de un sistema de agente de acoplamiento/aditivo.
- b) la tosiliación del grupo N- α -amino de la glicina,
- c) la escisión del péptido tosiliado o de un derivado del mismo con cadena lateral amino protegida de la fase sólida de soporte,

40

d) reacción del péptido intermediario de la fórmula

o de un derivado del mismo con cadena lateral amino protegida por una anilina de fórmula:



5 R-NH₂ III

en la que R representa p-aminofenilo y en la que un grupo amino se encuentra protegido con un grupo protector de amino, en presencia de un sistema de agente de acoplamiento/aditivo.

10 El significado de las abreviaturas utilizadas en la descripción y en las reivindicaciones es el descrito generalmente en la tabla a continuación:

Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonilo
Boc	t-Butoxicarbonilo
Tos	4-Toluenosulfonilo
DIEA	Diisopropiletilamina
NMP	N-Metilpirrolidona
DCM	Diclorometano
TFA	Ácido trifluoroacético
DMF	N,N'-Dimetilformamida
HBTU	N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluorofosfato de O-benzotriazol
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HOObt	3,4-Dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina
DEPBT	3-(Dietoxifosforiloxi)-1,2,3-benzotriazín-4(3H)-ona
PyBOP	Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio
CTC	Cloruro de 2-clortritilo
DCC	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
TBTU	Tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
Pbf	5-Sulfonil-2,2,4,6,7-pentametilbenzofurano
Pmc	6-Sulfonil-2,2,5,7,8-pentametilcromano
Et ₃ N	Trietilamina

Se entiende además que los aminoácidos arginina y prolina pueden utilizarse en su configuración L o en su configuración D, como racemato, o en diversas mezclas de sus isómeros. Preferentemente los aminoácidos se utilizan en su configuración L.

- 5 El acoplamiento consecutivo en la etapa a) de la presente invención comprende en una primera etapa la unión de una arginina preferentemente protegida a una fase sólida de soporte.

El grupo α -amino de la arginina puede protegerse con un grupo protector de amino común conocido por el experto en la materia. El grupo α -amino protector preferente de la arginina es Fmoc.

- 10 La cadena lateral, es decir, la parte guanidina de la molécula de arginina, como regla general se encuentra protegido con un grupo protector de cadena lateral de arginina conocido por el experto en la materia. Un grupo protector preferente de cadena lateral de arginina es Pmc o Pbf, más preferentemente Pbf.

- 15 En principio, puede utilizarse para la síntesis de la presente invención cualquier fase sólida de soporte que sea conocido que resulte útil para la síntesis de péptidos en fase sólida, tal como se describe en Peptides: Chemistry and Biology, N. Sewald, H.-D. Jakubke, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002, y en Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis-A practical approach, W.C. Chan, P.D. White, Oxford University Press Inc. New York, 2000.

Se ha encontrado que las resinas de 2-clorotrilcloruro-poliestireno (resinas CTC) son las más adecuadas como fase sólida de soporte para el propósito de la síntesis de péptidos de la presente invención. Las resinas CTC se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo de Merck Bioscience.

- 20 La arginina protegida preferentemente se disuelve en un solvente inerte, tal como, por ejemplo, diclorometano.

Habitualmente se encuentra presente una amina terciaria, tal como Et_3N , DIEA o sim-colidina, preferentemente DIEA o sim-colidina.

- 25 La unión a la fase sólida de soporte como regla general ocurre a temperatura ambiente.

El tratamiento de la resina cargada se realiza según técnicas conocidas por el experto en la materia, e incluye el lavado de la resina con solventes orgánicos, la filtración y finalmente el secado a temperaturas moderadas.

- 30 En una realización preferente de dicha primera etapa, se prepara resina CTC cargada con Fmoc-Arg(Pbf)-OH.

En las etapas siguientes, se lleva a cabo el acoplamiento con la prolina protegida, seguido del acoplamiento con la glicina protegida.

- 35 Antes de que pueda tener lugar el acoplamiento, el grupo α -amino de la arginina debe desprotegerse rápidamente utilizando una amina secundaria, tal como morfolina, DBU o piperidina, preferentemente con piperidina en una solución al 5-20% con un solvente adecuado, tal como DMF o NMP, preferentemente con NMP.

- 40 Los grupos α -amino de tanto prolina como glicina pueden protegerse con un grupo protector de amino común conocido por el experto en la materia. Fmoc es el grupo protector de α -amino preferente para tanto la prolina como la glicina.

La prolina puede aplicarse en forma de un derivado activado seleccionado de entre PG-Pro-OPfp, PG-Pro-OSu y PG-Pro-OBt, o en forma de un derivado no activado en forma de PG-Pro-OH, en la que PG representa un grupo protector de amino.

- 45 Preferentemente la prolina se aplica en forma de Fmoc-(L)-Pro-OH.

La glicina puede aplicarse en forma de un derivado activado en forma de PG-Gly-OPfp y PG-Gly-OSu o en forma de derivado no activado en forma de PG-Gly-OH, en la que PG representa un grupo protector de amino.

- 50 Preferentemente la glicina se aplica en forma de Fmoc-Gly-OH.

Según la presente invención, el acoplamiento de aminoácidos se lleva a cabo con el sistema de agente de

acoplamiento/aditivo seleccionado de entre DCC/HOBt; HBTU/HOBt, TBTU/HOBt, HATU/HOAt, DEPBT/HOObt y PyBoP/Ci-HOBt.

5 El sistema de agente de acoplamiento/aditivo preferente es DEPBT/HOObt o HBTU/HOBt, en donde HBTU/HOBt es el más preferente.

Cada acoplamiento comúnmente se lleva a cabo en presencia de una amina terciaria, tal como Et₃N, DIEA o sim-colidina, preferentemente en DIEA o sim-colidina en un solvente adecuado, tal como NMP.

10 La reacción de acoplamiento idealmente tiene lugar a una temperatura de entre 0°C y 40°C bajo agitación.

La desprotección de la prolina antes del acoplamiento con la glicina y finalmente la desprotección de la glicina puede llevarse a cabo rápidamente utilizando una amina secundaria, tal como morfolina, DBU o piperidina, preferentemente con piperidina, en una solución al 5-20% con un solvente adecuado, tal como DMF o NMP, preferentemente con NMP.

15 En una realización preferente de esta reacción de acoplamiento, se prepara resina CTC cargada con H₂N-Gly-(L)-Pro-(D/L)Arg-(Pbf)-OH.

20 La tosiliación del grupo N-α-amino de la glicina tras la etapa b) del procedimiento de la presente invención habitualmente se lleva a cabo con cloruro de 4-toluenosulfonilo en presencia de una amina terciaria, tal como Et₃N, DIEA o sim-colidina, preferentemente en DIEA.

La tosiliación como regla general se lleva a cabo en presencia de un solvente inerte, tal como diclorometano, a una temperatura de entre 0°C y 40°C.

25 La escisión de la fase sólida de soporte puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos por el experto en la materia.

Preferentemente, el péptido deseado Tos-Gly-(L)-Pro-(L)-Arg(Pbf)-OH se escinde de la resina CTC mediante tratamiento con una solución ácida diluida, preferentemente con una solución al 0,115% de ácido trifluoroacético en diclorometano.

30 El péptido obtenido de esta manera puede purificarse adicionalmente mediante métodos conocidos de la técnica, preferentemente mediante técnicas de purificación de cromatografía en fase líquida.

Según la etapa d), el derivado péptido tosiliado se acopla con una anilina de fórmula:

35
$$R-NH_2 \text{ III}$$

en la que R representa p-aminofenilo, en el que un grupo amino se encuentra protegido por un grupo protector de α-amino, en presencia de un sistema de agente de acoplamiento/aditivo.

40 El acoplamiento se lleva a cabo en presencia de un sistema de agente de acoplamiento/aditivo seleccionado de entre DCC/HOBt, HBTU/HOBt, TBTU/HOBt, HATU/HOAt, PyBOP/Ci-HOBt, DEPBT/HOObt, preferentemente con DEPBT/HOObt en presencia de una amina terciaria, tal como Et₃N, DIEA o sim-colidina, preferentemente en DIEA.

45 La reacción preferentemente se lleva a cabo en un solvente adecuado, tal como DMF, a una temperatura comprendida en el intervalo de entre 0°C y 40°C, bajo agitación.

El tratamiento de la mezcla de reacción se realiza según conocimientos comunes del experto en la materia y puede implicar la extracción con un ácido diluido, tal como HCl diluido.

50 El péptido obtenido de esta manera puede purificarse adicionalmente mediante métodos conocidos de la técnica, preferentemente mediante técnicas de purificación de cromatografía en fase líquida.

Con el procedimiento de la presente invención, el isómero del péptido deseado podría obtenerse con un rendimiento excelente, de hasta 85%, y con una pureza óptica de hasta 96%.

55 **Ejemplo 1**

Unión de Fmoc-(L)-Arg(Pbf)-OH a la resina CTC

Se disolvieron 500 gramos (0,77 moles) de Fmoc-(L)-Arg(Pbf) (Merck Biosciences Novobiochem) en una solución bajo agitación de 5,51 ml de diclorometano y 812 ml (4,77 moles) de DIEA. Se añadió 1 kg de resina CTC (Merck Biosciences GmbH, malla 100-200, DVB al %, carga: 0, 8-1, 6 mmoles/g de resina) y la solución se agitó durante aproximadamente 2 minutos. Se dejó la mezcla en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas, agitando 1 y 2 horas después, respectivamente, durante 2 minutos. Tras 3 horas, la mezcla se enfrió a 5-10°C y se añadieron 300 ml de metanol. Se dejó reposar la suspensión durante 1 hora a esta temperatura. A continuación, se filtró la mezcla en un filtro de succión.

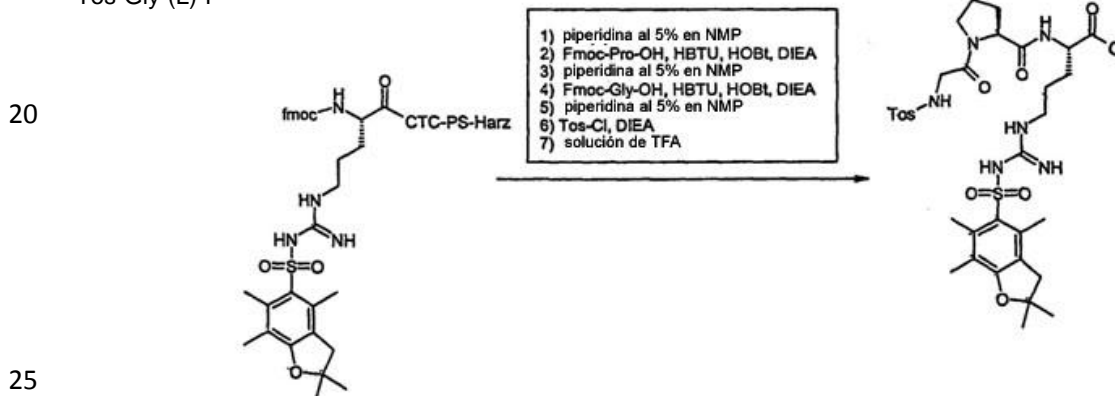
Seguidamente, se suspendió la resina en una solución de diclorometano/metanol/DIEA (80:15:5), se agitó durante 5 minutos y se dejó reposar durante 30 minutos. Tras la filtración, se lavó la resina cuatro veces con 5 l de DMF, 4 veces con 2,5 l de isopropanol y tres veces con 2,5 l de isohexano. La resina debe filtrarse, de manera que la resina permanezca húmeda. A continuación, se secó la resina en un secador de bandejas al vacío durante 40 horas a 30°C.

Análisis de carga mediante HPLC: 0,405 mmoles/g de Fmoc-Arg(Pbf)-CTC

Método HPLC, columna: C18 Keyston Beta Basic; fase móvil A: H₂O + TFA al 0,1%, fase móvil B: acetonitrilo + TFA al 0,075%, T=30°C, t=22 minutos, Rt=12,2 minutos.

Ejemplo 2

Tos-Gly-(L)-P



Se cargó un reactor para péptidos con 5 gramos de resina CTC-Fmoc-(L)-Arg(Pbf) (carga: 0,405 mmoles/g; 2,075 mmoles). Se añadieron 87,5 ml de diclorometano. Tras hinchar la resina en diclorometano durante por lo menos 30 minutos, se cambió el solvente por NMP. De esta manera, se llevó a cabo el lavado de la resina con 87,5 ml de NMP (3 veces). El desbloqueo se llevó a cabo en una solución de piperidina al 5% en NMP en 30 minutos. A continuación, se lavó la resina 6 veces con 62,5 ml de NMP.

El procedimiento de acoplamiento se llevó a cabo mediante la preparación de una solución de 1,05 gramos (3,11 mmoles) de Fmoc-(L)-Pro-OH, 0,477 gramos (3,11 mmoles) de HOBt y 1,09 ml (6,2 mmoles) de DIEA en 8,75 ml de NMP, y añadiendo 1,18 gramos (3,11 mmoles) de HBTU en 7,5 ml de NMP tras 5 minutos. Tras 10 minutos de preactivación, se añadió la solución indicada a la resina y se agitó suavemente la suspensión durante 2 horas a 30°C. Tras el acoplamiento, se realizó un lavado extensivo con NMP.

El desbloqueo del grupo amino se llevó a cabo en una solución de piperidina al 5% en NMP en 30 minutos. A continuación, se lavó extensivamente la resina con NMP. Se llevó a cabo el procedimiento de acoplamiento mediante la preparación de una solución de 0,925 gramos (3,11 mmoles) de Fmoc-Gly-OH,

0,477 gramos (3,11 mmoles) de HOBt y 1,09 ml (6,22 mmoles) 7,5 ml de NMP tras 5 minutos. Tras 10 minutos de preactivación, se añadió la solución indicada a la resina y se agitó suavemente la suspensión durante 2 horas a 30°C. Tras el acoplamiento se realizó un lavado extensivo con NMP.

Se llevó a cabo nuevamente un último desbloqueo del grupo amino en una solución de piperidina al 5% en NMP en 30 minutos, seguido de un lavado extensivo con NMP y con diclorometano (3 veces). A continuación, se suspendió la resina en 75 ml de diclorometano y se añadieron 0,475 gramos (2,49 mmoles) de cloruro de 4-toluenosulfonilo (Tos-Cl) y 0,43 ml (2,49 mmoles) de DIEA. La escisión final del péptido se llevó a cabo con solución de TFA al 1% en DCM. El filtrado se

diluyó con tolueno y se evaporó al vacío.

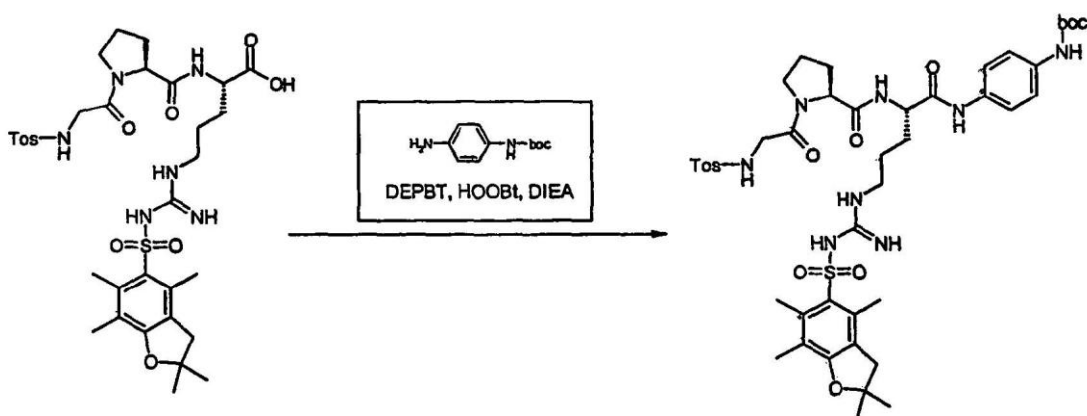
Se obtuvieron 1,7 gramos de péptido crudo (Tos-Gly-(L)-Pro-(L)-Arg(Pbf)-OH).

HPLC, columna: C18 Keystone Beta Basic; fase móvil A: H₂O + TFA al 0,1%, fase móvil B: acetonitrilo + TFA al 0,1%), T=30°C, t=34 minutos, Rt=13,9 minutos, % de A: 89,6%, RMN: ¹H, ¹³C corresponde a

5 ESI-MS: MH⁺ 735,3, MNa⁺ 757,3; [M-H]⁻ 733,3

Ejemplo 3

Tos-Gly-(L)-Pro-(L)-Arg(Pbf)-p-Boc-amino-anilida



10 Se cargó un reactor con 0,61 gramos (0,83 mmoles) de Tos-Gly-(L)-Pro-(L)-Arg(Pbf)-OH en 9 ml de DMF y se añadieron 0,135 gramos (0,83 mmoles) de HOObt y 0,29 ml (1,66 mmoles) de DIEA. La mezcla de preactivación se agitó durante cinco minutos y después se añadieron 0,248 gramos (0,83 mmoles) de DEPBT y 0,156 gramos (0,75 mmoles) de N-Boc-p-fenilendiamina. Tras 5 horas de agitación a temperatura ambiente, se destiló el solvente bajo vacío. Se extrajo el residuo con solución acuosa de HCl. Tras la purificación cromatográfica con sílice, se obtuvieron 0,39 gramos (85%) de producto. HPLC, método 1: Columna: C18 Keystone Beta Basic, 150 x 4,6 mm; método de gradiente, fase móvil A: H₂O + TFA al 0,1%, fase móvil B: acetonitrilo + TFA al 0,1%, T=30°C, t=34 minutos, Rt=16,11 minutos, % de A: 91,13%.

15 HPLC, método 2: Columna: Chirobiotic T; 10 m, 250 x 4,6 mm; método isocrático, fase móvil: acetonitrilo: MeOH; 1: 4) + Et₃N al 0,2% + AcOH al 0,2%), T=30°C,

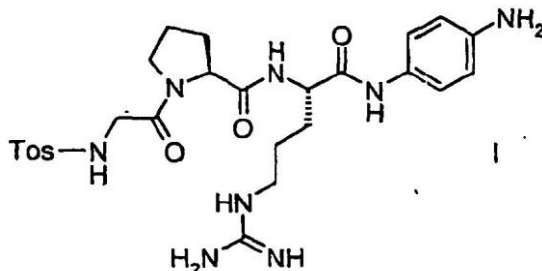
t=30min, Rt=4,53 min, % de A: 95,4%,

20 RMN: ¹H y ¹³C: corresponde a

ESI-MS: MH⁺ 925,2, MNa⁺ 947,2; [M-H]⁻ 923,2

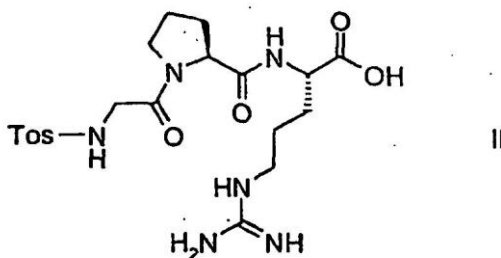
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de un derivado péptido o sal del mismo, de fórmula:



en la que Tos representa p-toluenosulfonilo, que comprende:

- 5 a) el acoplamiento consecutivo de los aminoácidos arginina, prolina y glicina en una fase sólida de soporte en presencia del sistema de agente de acoplamiento/aditivo,
- b) la tosilación del grupo N- α -amino de la glicina,
- c) la escisión del péptido tosilado o de un derivado del mismo con cadena lateral amino protegida, de la fase sólida de soporte,
- 10 d) la reacción del intermediario péptido de fórmula:



o de un derivado del mismo con cadena lateral amino protegida por una anilina de fórmula:

- 15 $R-NH_2$ III

en la que R representa p-aminofenilo y en la que un grupo amino se encuentra protegido por un grupo protector de amino, en presencia de un sistema de agente de acoplamiento/aditivo.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la fase sólida de soporte es una resina de 2-clorotritilcloruro-poliestireno.
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la arginina presenta una cadena lateral protegida por un grupo protector Pbf o Pmc.
4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la prolina se aplica en forma de un derivado activado seleccionado de entre PG-Pro-OPfp, PG-Pro-OSu y PG-Pro-OBt, o no activado en forma de PG-Pro-OH, en el que PG representa un grupo protector de amino.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque se aplica la prolina en forma de Fmoc-(L)-Pro-OH.
6. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la glicina se aplica en forma de un derivado activado seleccionado de entre PG-Gly-OPfp, PG-Gly-OSu y PG-Gly-OBt, o no activado en forma de PG-Gly-OH, en el que PG representa un grupo protector de amino.
- 5 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque se aplica la glicina en forma de Fmoc-Gly-OH.
8. Procedimiento según las reivindicaciones 5 y 7, caracterizado porque el grupo protector Fmoc se elimina mediante tratamiento con piperidina.
9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el sistema de agente de acoplamiento/aditivo para el acoplamiento consecutivo de los aminoácidos en la etapa a) se selecciona de entre DCC/HOBt, HBTU/HOBt, TBTU/HOBt, HATU/HOAt DEPBT/ HOOBt y PyBoP/Ci-HOBt.
- 10 10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque el sistema de agente de acoplamiento aditivo es HBTU/HOBt.
11. Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el sistema de agente de acoplamiento/aditivo para la reacción del intermediario péptido de fórmula II con la anilina de fórmula III se selecciona de entre DCC/HOBt, HATU/HOAt, HBTU/ HOBt, TBTU/HOBt, PyBOP/Ci-HOBt y DEPBT/HOOBt.
- 15 12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque el sistema de agente de acoplamiento/aditivo es DEPBT/HOOBt.
13. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la tosilación tiene lugar con cloruro de 4-toluenosulfonilo.
- 20 14. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la escisión de la fase sólida de soporte se lleva a cabo con ácido trifluoroacético.
15. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la reacción con la anilina de fórmula III en la etapa d) se lleva a cabo con Tos-Gly-Pro-Arg(Pbf)-OH como derivado con cadena lateral amino protegida del intermediario péptido de fórmula II.