



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 982**

51 Int. Cl.:

C07K 1/10 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07702683 .9**

96 Fecha de presentación : **11.01.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1987052**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2008**

54 Título: **Síntesis de péptidos similares a glucagón.**

30 Prioridad: **08.02.2006 EP 06002537**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.09.2011

73 Titular/es: **LONZA AG.**
Münchensteinerstrasse 38
4052 Basel, CH

72 Inventor/es: **Werbitzky, Oleg;**
Varray, Stéphane;
Giraud, Matthieu y
Meininghaus, Carsten

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 364 982 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 similares a glucagón

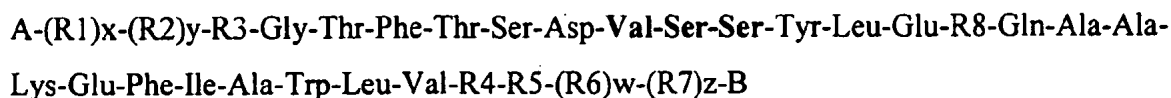
La presente invención se refiere al campo de la síntesis de fármacos peptídicos, a saber a un nuevo método para sintetizar agonistas de péptido GLP-1.

- 5 Una nueva clase de fármacos diabéticos, los agonistas de GLP-1 o péptido similar a glucagón 1, son una prometedora nueva clase de compuestos terapéuticos. Sin embargo, su preparación mediante técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida no es del todo fácil. Básicamente, el GLP-1 humano es un péptido presente en la naturaleza relacionado en secuencia con el glucagón. Se han descrito en la bibliografía diversas variantes de secuencia manipuladas ligeramente modificadas de GLP-1 natural, con el objetivo de incrementar la potencia.
- 10 La preparación de tales péptidos GLP-1 se ha descrito en WO 05/027978, EP 1 180 121 y WO 02/90388; sin embargo, no se ha empleado para la síntesis de péptidos una metodología en fase sólida de Fmoc estándar mejor que la muy básica.

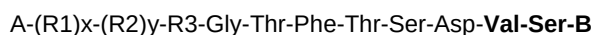
- El solicitante de la presente invención encontró que el sistema de la técnica anterior no permitía buenos rendimientos, lo que es inaceptable para la fabricación industrial. Se encontró que las etapas de acoplamiento individuales aparentemente dependientes de la secuencia eran muy ineficaces.
- 15

El objetivo de la presente invención es idear otro método o uno mejorado para sintetizar agonistas de péptido GLP-1. Este objetivo se resuelve mediante el método de la presente invención que comprende el uso de una unidad de Fmoc-dipéptido de pseudoprolina en lugar de sólo Fmoc-aminoácidos individuales en una posición de secuencia interna única durante la síntesis en fase sólida.

- 20 De acuerdo con la presente invención, se idea un método para fabricar un péptido GLP-1 o agonista de GLP-1, en el que dicho péptido es de fórmula



o es de fórmula



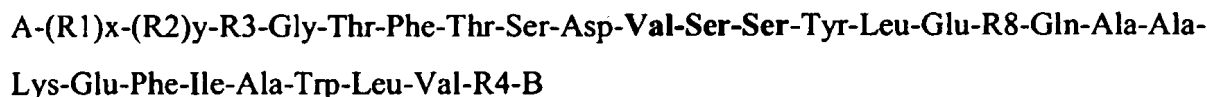
- 25 o es de fórmula



o es de fórmula

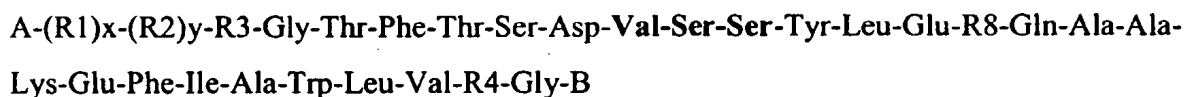


o es de fórmula



- 30

o es de fórmula



en las que

B = -OH o -NH₂

A = H-, Ac-, Boc-, Fmoc-

R1 = His, D-His, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, alfa-fluorometil-histidina o alfa-metil-histidina

5 R2 = -Ala, D-Ala, -Val, D-Val, Gly, Aib (ácido α-aminoisobutírico)

R3 = Glu, Asp, Met, Leu, preferiblemente es Glu o Asp, lo más preferiblemente es Asp

R4 = -Lys o Arg

R5 = -Gly, Aib, Ala, D-Ala

R6 = Arg, Lys o Gly

10 R7 = Arg, Lys o Gly, preferiblemente Lys o Gly

R8 = Gly o Aib

y en las que, independientemente, x, y, w, z son 0 o 1, con la condición de que y = 1 cuando x = 1 y con la condición de que w = 1 cuando z = 1,

en donde los aminoácidos individuales pueden tener opcionalmente grupos de protección,

15 que comprende las etapas de

a. sintetizar el péptido sobre una fase sólida que es escindible bajo condiciones débilmente ácidas mediante el acoplamiento por etapas de aminoácidos o dipéptidos que comprenden dipéptidos de pseudoprolina protegidos por Fmoc, adecuadamente protegidos adicionalmente en las cadenas laterales, de un modo lineal, con la condición de que en una posición de secuencia adecuada que se lee -Val-Ser- y/o Val-Ser-Ser, respectivamente, y está marcada mediante letras en negrita en las fórmulas de secuencia dadas anteriormente, un primer dipéptido de pseudoprolina se acople a la cadena peptídica creciente cuyo dipéptido de pseudoprolina se selecciona del grupo que consiste en Fmoc-Val-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-OH, Fmoc-Val-Ser(ψ^{H,H}pro)-OH, Fmoc-Ser(P)-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-OH y Fmoc-Ser(P)-Ser(ψ^{H,H}pro)-OH, y en donde P es un grupo de protección de cadenas laterales escindible con ácido que se escinde bajo una condición fuertemente ácida de al menos 80% de TFA en agua, lo más preferiblemente P es terc-butilo o es tritilo,

b. escindir el péptido de la fase sólida bajo condiciones débilmente ácidas y

c. desproteger la cadena peptídica bajo condiciones fuertemente ácidas.

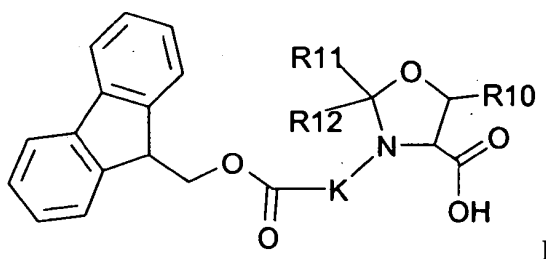
La actividad de los péptidos GLP-1 es altamente sensible a cambios en la secuencia, principalmente los elementos de secuencia periféricos que permiten alguna sustitución conservativa de residuos. Cambios aparentemente menores puede tener todavía efectos imprevistos sobre la estabilidad biológica o la unión al receptor y de ahí la actividad farmacológica. Una buena revisión de esto se da en Sarrauste de Menthère et ál., European J. Medicinal Chemistry 39, 2004:473-480. La porción de secuencia nuclear de la familia de péptidos GLP-1 literalmente no permite ningún cambio.

La síntesis lineal en fase sólida de péptidos de longitud completa o parciales que comprenden esta porción nuclear encuentra enormes problemas de etapas de acoplamiento individuales que son completamente ineficaces hasta el punto de casi la imposibilidad incluso durante el acoplamiento repetido. Prolongar los tiempos de acoplamiento, elevar la temperatura de acoplamiento, etc. implica riesgo de racemización o productos secundarios no deseados incrementados.

Diversos autores (Sarrauste, anteriormente, y Adelhörst et ál. J. Biol. Chem. 269 (1994), 6275-6278) han analizado la estructura secundaria de péptidos GLP-1 naturales en solución acuosa mediante espectroscopía de dicroísmo circular (p. ej., Chen et ál. (1974) Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. Biochemistry 13, 3350-3359, Greenfield, N. y Fasman, G. D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. Biochemistry 8, 4108-4116) y han encontrado sólo un contenido bastante bajo (10%) de estructura de lámina β que provoca la agregación de cadenas principales peptídicas, sin embargo, aparte de regiones mucho mayores de estructura desordenada y helicoidal. Los métodos espectroscópicos

aplicados no permitían asignar las correspondientes partes de la secuencia de GLP-1 a dichos elementos estructurales. – Se cree comúnmente en la técnica que la agregación y de ahí los problemas en la síntesis en fase sólida se correlacionan con la presencia de regiones extendidas de estructura de lámina β . Un bajo contenido de estructura de lámina β es común a la mayoría de los péptidos de al menos 10 aa de longitud y no se correlaciona con ningún problema inusual en la metodología sintética.

Unidades Fmoc-dipéptido de pseudoprolina están disponibles comercialmente hoy en día; su síntesis se ha descrito (Ruckle et ál., Tetrahedron 1999, 55(37): 11281-11288; Keller et ál., 1998, J. Am. Chem. Soc. 120:2714-2720, pongamos por caso). Dichos péptidos de pseudoprolina se usan al menos para introducir al menos uno de los residuos de Serina centrales en el segmento de secuencia o posición de secuencia o secuencia parcial central único -Val-Ser-Ser-, permitiendo usar dipéptidos de pseudoprolina para la secuencia parcial bien -Val-Ser- o bien -Ser-Ser- en esta posición de secuencia, siendo esto lo esencial de la presente invención, y además de eso finalmente introducir adicionalmente un segundo residuo de pseudoprolina en las secuencias parciales -Gly-Thr- o -Phe-Thr-, preferiblemente en la secuencia parcial -Gly-Thr-. Dichas pseudoprolinas de la presente invención son carboxilatos de N-Fmoc-peptidil-(4S)-1,3-oxazolidina derivados de Ser o Thr y que tienen en el contexto de la presente invención la estructura común de fórmula I



en la que K es un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Val, Phe, Gly y en la que Ser tiene además un grupo de protección de la cadena lateral P que es escindible bajo condiciones fuertemente ácidas según se definen anteriormente; R11, R12, independientemente, son H, metilo o etilo y R10 es H o metilo. – La naturaleza de los sustituyentes R11 y R12 influye en la isomerización cis/trans del enlace amida del péptido del que es parte la oxazolidina y de ahí el impacto de la pseudoprolina de afectar positivamente a la estructura de la cadena peptídica creciente durante la síntesis.

Más preferiblemente, sólo dicho primer un residuo de pseudoprolina en uno cualquiera de los dos sitios de residuos de Ser centrales dentro de la secuencia de GLP-1 que se especifica anteriormente se emplea en el presente método de síntesis. Esto significa que no se emplea una segunda unidad de dipéptido de pseudoprolina durante la síntesis. Lo más preferiblemente, dicho primer dipéptido de pseudoprolina es Fmoc-Val-Ser($\psi^{Me,Me}$)-OH para el uso en la síntesis en fase sólida de acuerdo con la presente invención. Ejemplos comparativos que buscan inútilmente sintetizar péptidos GLP-1 en ausencia del único dipéptido de pseudoprolina de la presente invención se indican en la sección experimental, que ilustra el problema técnico objetivo que motivó la presente invención.

Reactivos de acoplamiento para la síntesis de péptidos son muy conocidos en la técnica (véase Bodansky, M., Principles of Peptide Synthesis, 2ª ed. Springer Verlag Berlin/Heidelberg, 1993; véase también el análisis del papel de los aditivos o adyuvantes de acoplamiento en la misma). Los reactivos de acoplamiento pueden ser anhídridos mixtos (p. ej. T3P: anhídrido de ácido propanofosfónico) u otros agentes acilantes tales como ésteres activados o halogenuros de ácido (p. ej. ICBF, cloroformiato de isobutilo), o pueden ser carbodiimidas (p. ej. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida, diisopropilcarbodiimida), derivados de benzotriazina activados (DEPBT: 3-(dietoxifosforiloxi)-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona) o derivados de sal de uronio o fosfonio de benzotriazol.

En vista del mejor rendimiento, el tiempo de reacción corto y la protección contra la racemización durante la elongación de la cadena, se prefiere más que el reactivo de acoplamiento se seleccione del grupo que consiste en sales de uronio y sales de fosfonio del benzotriazol capaces de activar una función ácido carboxílico libre junto con que la reacción se lleve a cabo en presencia de una base. Ejemplos adecuados y asimismo preferidos de tales sales de acoplamiento de uronio o fosfonio son, p. ej., HBTU (hexafluorofosfato de O-1H-benzotriazol-1-il)-N,N',N'-tetrametiluronio), BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitris-(dimetilamino)-fosfonio), PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tripirrolidinofosfonio), PyAOP, HCTU (hexafluorofosfato de O-(1H-6-clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio), TCTU (tetrafluoroborato de O-1H-6-clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio), HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio), TATU (tetrafluoroborato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio), TOTU (tetrafluoroborato de O-[ciano(etoxicarbonil)metilnamino]-N,N,N',N''-tetrametiluronio), HAPyU (hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)oxibis-(pirrolidino)-uronio).

Preferiblemente, el reactivo básico es una base débil cuyo ácido conjugado tiene un valor del pKa de pKa 7,5 a 15, más preferiblemente de pKa 7,5 a 10, con la exclusión de una función amino en α de un péptido o aminoácido o derivado de aminoácido, y base que preferiblemente es una amina terciaria estéricamente impedida. Ejemplos de esta y otras preferidas son una base de Hüinig (N,N-diisopropiletilamina), N,N'-dialquilililina, 2,4,6-trialquilpiridina, 2,6-trialquilpiridina o N-alquilmorfolina, siendo el alquilo alquilo C1-C4 lineal o ramificado, más preferiblemente, es N-metilmorfolina (NMM) o colidina (2,4,6-trimetilpiridina), lo más preferiblemente, es colidina.

También se conoce el uso de aditivos de acoplamiento, en particular de aditivos de acoplamiento del tipo del benzotriazol (véase Bodansky, anteriormente). Su uso se prefiere particularmente cuando se usan los reactivos de acoplamiento de sal de uronio o fosfonio altamente activantes mencionados anteriormente. De ahí que se prefiera que el aditivo del reactivo de acoplamiento sea un compuesto hidroxilado nucleófilo capaz de formar ésteres activados, más preferiblemente que tienen una función N-hidroxi nucleófila ácida en la que N es imida o es triazeno sustituido con acilo en N o arilo en N, lo más preferiblemente el aditivo de acoplamiento es un derivado de N-hidroxi-benzotriazol (o derivado de 1-hidroxi-benzotriazol) o es un derivado de N-hidroxi-benzotriazina. Tales compuestos N-hidroxilados de aditivo de acoplamiento se han descrito a fondo en WO 94/07910 y EP-410 182. Ejemplos son, p. ej., N-hidroxisuccinimida, N-hidroxi-3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (HOOBt), 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) y N-hidroxibenzotriazol (HOBt). Se prefieren particularmente los derivados de N-hidroxi-benzotriazina, en la realización más preferida, el reactivo de acoplamiento es hidroxí-3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazina. Se conocen compuestos de sal amónica de aditivos de acoplamiento y su uso en la química del acoplamiento se ha descrito, pongamos por caso, en US4806641.

Es posible emplear, concomitante con su papel como un adyuvante de acoplamiento, p. ej., HOBt como un reactivo de apareamiento iónico para la protección de la cadena lateral de Arg durante la síntesis, como una opción a la protección covalente de la cadena lateral de Arg. En ese caso, debe mantenerse una concentración suficientemente alta de HOBt a lo largo de todas las etapas de procesamiento cíclicas de la síntesis en fase sólida.

En una realización particularmente preferida adicional, el reactivo de acoplamiento de sal de uronio o fosfonio es un reactivo de sal de uronio y preferiblemente es HCTU, TCTU o HBTU y aún más preferiblemente se usa en la reacción en combinación con N-hidroxi-3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazina o una sal de la misma. Esta realización se prefiere principalmente para el uso en la etapa de elongación de cadena de la síntesis de péptidos después de la retirada del grupo de protección de N α lábil frente a las bases, pero puede usarse también para la reacción de lactamización durante la ciclación de la cadena lateral.

En el contexto de la presente invención, ha de apuntarse que el HCTU y el TCTU se definen para ser abarcados por el término "reactivo de sal de uronio" según se entiende comúnmente en la técnica, a pesar de que se ha observado por medio del análisis de la estructura cristalina que estos compuestos y los posibles análogos comprenden un resto isonitroso en vez de un resto uronio (O. Marder, Y. Shvo y F. Albericio "HCTU and TCTU: New Coupling Reagents: Development and Industrial Applications", *Chimica Oggi* 2002, 20:37-41), dando lugar en cambio un sustituyente amidino en N sobre el núcleo heterocíclico a una estructura de guanidio. En el presente contexto, tal clase de compuestos se denomina "subclase de tipo guanidio" de reactivos de sal de uronio de acuerdo con la presente invención.

La desprotección del N α lábil frente a las bases puede llevarse a cabo como se hace habitualmente en la técnica, p. ej. con piperidina al 20% en N-metilmorfolina (NMP), diclorometano (DCM) o dimetilformamida (DMF). Ambos disolventes apróticos apolares orgánicos se aplican habitualmente en la técnica para todas las etapas de la síntesis en fase sólida. La NMP es un disolvente preferido.

Los Fmoc-aminoácidos o dipéptidos se acoplan preferiblemente con 1-3 eq. normales, más preferiblemente con solo 1-2 eq. de tal reactivo de Fmoc-aminoácido por eq. de función amino reactiva unida a la fase sólida según puede determinarse, p. ej., mediante la prueba de Kaiser. La temperatura de acoplamiento está habitualmente en el intervalo de 15 a 30°C, especialmente cuando se usan reactivos de acoplamiento de tipo fosfonio o uronio. Típicamente, se aplica una temperatura de aproximadamente 20 a 25°C para el acoplamiento. Una ventaja del método de la presente invención es haber ideado un método de síntesis que permite un alto rendimiento de producto o una excelente pureza de producto de GLP-1 sin estar forzado a usar valiosos reactivos biopeligrosos en una cantidad excesiva, eliminando esencialmente ese exceso en los efluentes de reacción.

Grupos de protección y su uso, principalmente para la protección de cadenas laterales de aminoácidos o grupos amino N α -terminales, son muy conocidos en la técnica (cp. Bodanzsky, anteriormente). Grupos de protección carboxilados comúnmente empleados para Glu, Asp son, p. ej., Mpe, O-1-adamantilo, O-bencilo e incluso pueden usarse simplemente ésteres alquílicos, aunque se usan menos comúnmente. Por motivos de facilidad, se usan típicamente y preferiblemente grupos terc-butilo. La tirosina puede protegerse mediante diferentes grupos de protección, p. ej. éter terc-butílico o Z- o más preferiblemente 2-bromo-Z-ésteres. Igualmente, es posible usar grupos de protección de alcohol tritílico tales como grupos 2-cloro-tritilo o 4-metoxi- o 4,4'-metoxi-tritilo. Preferiblemente, es un tritilo o un grupo de protección terc-butilo. Más preferiblemente, es un grupo de protección butilo terciario (tBu), lo que significa que la cadena lateral de tirosilo está modificada hasta un éter terc-butílico. El grupo tBu sólo se retira

eficazmente bajo una condición fuertemente ácida. El grupo de protección de arginina puede seleccionarse preferiblemente del grupo que consiste en 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuranil-5-sulfonilo (Pbf), adamantiloxicarbonilo e isoborniloxicarbonilo, 2,2,5,7,8-pentametilencromanosulfonil-6-sulfonilo (Pmc), 4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo (Mtr) y su homólogo 4-terc-butil-2,3,5,6-tetrametilico (Tart) o Boc, que solo se escinden bajo condiciones fuertemente ácidas según se definen anteriormente. Más preferiblemente, es Pbf, Pmc, Mtr, lo más preferiblemente, es Pbf; durante la desprotección global de cadenas laterales bajo condiciones fuertemente ácidas, en medio habitualmente acuoso, la alquilación espectadora de tirosina desprotegida no se observa con Pmc, Mtr y especialmente Pbf. La velocidad de escisión de Pbf es siempre la más alta. Nótese la indicación de un modo de protección por apareamiento electrónico opcional con HOBt. - Ser, Thr pueden estar protegidas típicamente y preferiblemente por, p. ej., terc-butilo o tritilo, lo más preferiblemente terc-butilo. Otros modos de protección son igualmente factibles, p. ej. con bencilo, aunque se prefiere menos ya que requiere finalmente la retirada hidrogenolítica o la incubación prolongada a una incubación fuertemente ácida, que son ambas igualmente no deseables. Consideraciones similares se aplican a la protección de Lys o Nor- u Homo-lisina; típicamente y preferiblemente, Lys se protege con Boc. Trp no debe protegerse necesariamente durante la síntesis en fase sólida, aunque se prefiere la protección típicamente con Boc. En cuanto a los grupos de protección de las cadenas laterales, lo mencionado anteriormente es válido tanto para los L-aminoácidos naturales así como para sus homólogos D.

Ha de entenderse que la fase sólida S significa un material de soporte no soluble sólido, tal como vidrio de tamaño de poro controlado, sílice o más comúnmente una resina orgánica polimérica tal como, pongamos por caso, la clásica resina de poliestireno/divinilbenceno (resina de PS) usada por Merrifield junto con restos conectores integrales de hidroxibencilfenilo para ligar el péptido a la misma o resina de PS usada por Wang con restos de hidroxibencil-p-benciloxi directamente conectados a la resina. Tales sitios funcionales para la ligación de péptido se denominan conector en el presente contexto, y ha de entenderse que se infieren tácitamente como una característica obligatoria mediante el término "fase sólida" en el presente contexto. Si es necesario, otros restos conectores tales como, p. ej., conectores más especializados, pongamos por caso más lábiles frente a los ácidos, pueden injertarse adicionalmente en dichos primeros conectores integrales en la fase sólida preformada y a menudo se denominan un "asa" en la técnica. Ejemplos adicionales de tales materiales compuestos de conector- o asa-resina son fases sólidas de (4-metoxifenol)-aminometil- o -hidroximetil y (4-metilfenil)-aminometil o -hidroximetil-PS (Atkinson et ál., 2000, J. Org. Chem. 65, 5048) en una conexión de O o N al resto peptídico, respectivamente, permitiendo ambas la generación de un grupo ácido o carboxamida C-terminal durante la escisión final del péptido de la resina. Para los propósitos de la presente invención, una resina en fase sólida, para el uso en la síntesis, comprende obligatoriamente al menos un conector o asa integral que es parte de material central de la fase sólida; tal conector o asa puede considerarse un grupo de protección inmovilizado (Guillier et ál., Chem. Rev. 100, 2091-2157, 2000). Típicamente, una fase sólida dada que comprende un soporte sólido o resina inerte se trata en virtud de la naturaleza química de su grupo conector o de asa permitiendo la acilación con aminoácido o péptido. Resinas de poliestireno injertadas con PEG más complejas tales como Novasyn TG (Novabiochem, Merck Biosciences, Alemania) basada en tentagel que están disponibles con diferentes asas o conectores injertados son más anfífilas que la resina de PS estándar, y también impactan sobre la eficacia sintética. En el contexto de la presente invención, se prefiere el uso de una fase sólida constituida por un resto conector o de asa y una resina de PS que carece de PEG u otros segmentos de polioxialquileño. Las resinas de PEG o polioxialquileño integrales o injertados y de ahí la fase sólida se prefieren menos y preferiblemente son rechazadas por la presente invención.

Las resinas que se usan en la presente invención son de tamaño de malla estándar (US bureau of standards), que es aproximadamente malla 50-500, más preferiblemente malla de 100 a 400.

Las fases sólidas de la presente invención permiten la escisión de péptido de una fase sólida bajo condiciones fuertemente ácidas. Por definición, de acuerdo con la presente invención, una condición fuertemente ácida en oposición a una condición débilmente ácida significa aplicar al menos 50% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) en el disolvente. Además, a la inversa, un grupo de protección que requiere una condición fuertemente ácida para la retirada es un grupo de protección que puede retirarse, como mínimo, mediante TFA al 80%. De acuerdo con esto, grupos de protección que requieren ácido aún más fuertes tales como HF no entran bajo la definición mencionada anteriormente en el contexto de la presente invención. Una condición débilmente ácida se define por tener de 0,01% (v/v) a < 50% de TFA, preferiblemente tener de 0,1% a 30% de TFA. El término "lábil frente a los ácidos" se refiere a una escisión esencialmente cuantitativa en TFA al 2-10% en diclorometano a temperatura ambiente durante al menos una hora.

En el contexto específico de la presente invención, los péptidos GLP-1 especificados anteriormente escindidos de la fase sólida y que se han desprotegido en su mayor parte o completamente están dando soluciones geloidas espumosas con los disolventes o las mezclas de disolventes más comúnmente empleados. El manejo de tal solución geloida da como resultado fácilmente pérdidas de material considerables, en particular junto con operaciones de filtración para la separación de la fase sólida. En la presente invención, la fase sólida es una fase sólida que es escindible del péptido todavía protegido bajo condiciones débilmente ácidas según se define anteriormente, usando una fase sólida lábil frente a los ácidos. De tal modo, en primer lugar, el péptido se escinde de la fase sólida y a continuación, en una segunda etapa, se desprotege en las cadenas laterales bajo condiciones fuertemente ácidas

según se definen anteriormente.

En una realización preferida adicional, el péptido de GLP-1 se libera de la resina como una carboxamida C-terminal. Ejemplos de tales resinas generadoras de carboxamida son, p. ej., resina de PAL (éster valérico de ácido 5-(4-amino-metil-3,5-dihidroxifenoxi)valérico), resina de Sieber (Sieber, P. 1987, Tetrahedron Lett. 28, 2107) o resinas de tipo xantenilamida relacionadas (p. ej. US5306562), resina de amida de Rink (Rink, H. 1987, Tetrahedron Lett. 28:3787), resina de BAL (éster de ácido 4-(4-formil-3,5-dimetoxifenoxi)-butírico, Tetrahedron Lett. 43:3543), preferiblemente, se usa una resina generadora de carboxamida lábil frente a los ácidos tal como, p. ej., resina de Sieber u otra resina de tipo xantenilamida o resina de BAL que están entre las realizaciones más preferidas. En otra realización preferida, la fase sólida es una fase sólida lábil frente a los ácidos que está liberando un ácido carboxílico C-terminal durante la escisión del péptido protegido de la fase sólida. Ambos ejemplos y realizaciones preferidas adicionales de estos son resinas de 2'-cloro-tritilo, 4-metoxi- o 4,4'-dimetoxi-tritilo, 4-metiltritilo o relacionadas, pero puede usarse una resina de 2-(4-hidroxifenil)-2,2-difenil-acetilo diferente derivable de una resina funcionalizada con amino o hidroxil mediante acilación con conector de 4-carboxitritilo de Bayer, y vendida, pongamos por caso, bajo la marca de resina Novasyn TG. Ejemplos adicionales son, p. ej., resina de ácido de Rink lábil frente a los ácidos (4-(2',4'-dimetoxifenil-hidroximetil)fenoxi, Rink et ál., 1987, Tetrahedron Lett. 28,3787) y resina de HMPB (Sieber et ál., 1987, Tetrahedron Lett. 28, 6147; HMPB: 4-hidroximetil-3-metoxifenoxibutirilo), habitualmente acoplada como un asa secundaria a una resina de amida de Rink o un derivado de la misma.

Lo más preferiblemente, el péptido de acuerdo con la presente invención está acoplado carboxiterminalmente a la resina o el asa de resina (S = fase sólida o resina, opcionalmente resina con asa).

Se prefieren además secuencias peptídicas particulares y conjugados de péptido-fase sólida respectivos como los listados posteriormente, solos o en combinación con las realizaciones preferidas adicionales anteriores:

1. **A-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-S or A-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-NH₂**
2. **A-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-S or A-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH or -NH₂**
3. **A-His-D-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Gly-S or A-His-D-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Gly-OH or -NH₂**

4. A-D-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys-S or A-D-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Lcu-Val-Lys-Gly-Arg-Lys-NH₂
5. A-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-NorVal-Arg-S or A-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-NorVal-Arg-NH₂

siendo NorVal Nor-L-valina que es ácido α -aminoisobutírico o α -metilalanina, comúnmente mencionado por el acrónimo - Aib por brevedad.

5 Experimentos

Ejemplo 1: Síntesis de H-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH empleando Fmoc-Val-Ser($\psi^{Me,Me}$ pro)-OH

El péptido anterior se obtuvo mediante síntesis de Fmoc lineal. Todos los aminoácidos acoplados eran Fmoc-monoaminoácidos disponibles comercialmente, excepto para una etapa de acoplamiento en la que el dipéptido de pseudoprolina Fmoc-Val-Ser($\psi^{Me,Me}$ pro)-OH (obtenido de Merck Biosciences GmbH, Schwalbach/Alemania, productos de la marca Novabiochem) se acopló a la secuencia N-terminal Ser-Tyr-Leu-Glu- en el transcurso de la síntesis. Excepción adicional, el último residuo de His se acopló como un residuo de Boc-His; no se confería protección a la cadena lateral de His. Grupos de protección de cadena lateral empleados; por facilidad del listado, no se menciona además la protección con Fmoc N-terminal: Arg(Pbf), Asp(tbu), Gln(Trt), Glu(tbu), Lys(Boc), Ser(tbu), Thr(tbu), Trp(Boc), Tyr(tbu).

La síntesis a escala 3 mmol comenzaba sobre una Fmoc-Gly-2-clorotritil-resina de poliestireno (es decir, resina de 2-CTC precargada con Fmoc-glicina, número de orden RAA-1039, Carga: > 0,5 mmol/ml, malla 100-200, obtenida de CBL-Patras, Grecia). Inicialmente, la resina se hinchó con diclorometano. Síntesis con Fmoc estándar usando de 2 a 2,5 eq. de Fmoc-aminoácidos para acoplamiento, empleando activación con HBTU de aminoácidos a 25°C durante 30 min. en presencia de diisopropilamina/HOBt en sistema disolvente de diclorometano-N-metilmorfolina (DCM:NMP = 1:3). No se llevó a cabo preactivación, sino que todos los reactivos simplemente se mezclaron en una sola etapa. La desprotección de Fmoc se consiguió mediante piperidina al 20% (p/p) en NMP seguido por lavados con NMP para retirar completamente el reactivo básico. La eficacia del lavado se determinó mediante la prueba del clorano; el lavado se repitió hasta que ya no podía observarse coloración azul antes del acoplamiento. Todos los acoplamientos avanzaban bien y no requerían reacoplamiento, excepto para la Boc-His terminal, probablemente debido a un problema de solubilidad en DCM que podría disminuirse al añadir una pequeña cantidad de DMSO como un codisolvente. La eficacia del acoplamiento podía mejorarse adicionalmente de forma moderada al usar Fmoc-Gln no protegida en la cadena lateral en lugar de Fmoc-Gln(Trt) para la posición Gln-17.

En una primera etapa, el péptido todavía protegido con Boc se escindió de la resina en TFA al 2% en DCM a 0°C durante al menos 10-30 min; se observó que tres ciclos de TFA repetidos de 15 min. funcionaban mejor, cada uno seguido por tratamiento con piridina y enjuague. Se usó trietilsilano (TES) al 1% (p/p) como eliminador. La reacción se agitó mediante burbujeo de nitrógeno. Después de la escisión, el TFA se neutralizó usando piridina al verter el caldo de reacción en piridina diluida (piridina/etanol 1:9 (v/v)). La resina se enjuaga con DCM y el disolvente se separa por arrastre mediante filtración. Se realizó un intercambio de disolvente del filtrado de DCM a etanol al separar por destilación el DCM bajo vacío, y finalmente el péptido protegido se precipitó mediante la adición de agua y se filtró. La torta se lavó tres veces con agua y el péptido se secó bajo vacío a TA. En esta fase, se obtuvo material con una pureza de aproximadamente 77,3% de área (según se determinaba mediante HPLC) que significaba un rendimiento de 77%. La masa molecular observada con HPLC-MS correspondía a la masa teóricamente esperada. La solubilidad de este producto en un disolvente estándar tal como DCM era perfecta.

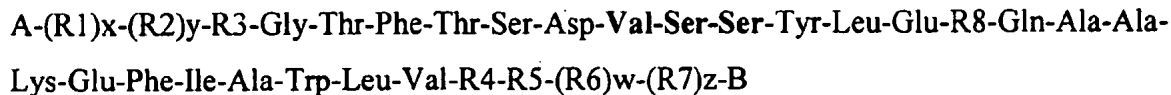
En una segunda etapa, se llevó a cabo desprotección global en DCM diluido con cóctel de escisión ("CC"), DCM:"CC" = 1:10 (v/v). Para el péptido GLP-1, en vez de DCM puro, la adición de 0,1 hasta 1 parte de trifluoroetanol por parte de DCM puro se encontró óptima para optimizar la solubilidad del péptido durante la desprotección. El "CC" estaba constituido por TFA/tioanisol/fenol/agua/TES en la relación de mezclado (% p/p): 89:2,5:2,5:5,0:1,0. – El producto seco procedente de la etapa de escisión precedente se disolvió en 10 ml de DCM diluido como se menciona anteriormente con "CC" y se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. El producto se recuperó a continuación mediante la adición de 50 ml de metil-terc-butil-éter (MTBE, Fluka Chemie, Buchs/Suiza), enfriamiento de la reacción hasta 0°C en un baño de agua durante 30 min. bajo agitación y separación por filtración del precipitado salino que se había formado mientras tanto. La torta filtrante se enjuaga con MTBE varias veces, y a continuación se seca a temperatura ambiente, dando 0,8 g de un producto en bruto de aproximadamente 95% de pureza según se determinaba mediante HPLC. El rendimiento total conjuntamente durante las etapas 2 y 3 era aproximadamente 75%.

Ejemplo 2: Ejemplo comparativo – síntesis del fragmento N-terminal H-His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser- Ser-Tyr-Leu-Glu-Glv-OH (fragmento 1 a 16) en ausencia de pseudoprolina

Inicialmente, la síntesis en fase sólida de dicho fragmento pequeño se llevó a cabo esencialmente como se describe en el ejemplo 1, excepto que sólo se dispuso sintetizar un fragmento más corto. Usando de 2,5 a 3 eq. de aminoácido para cada reacción de acoplamiento, los aminoácidos 15 a 9 se acoplaron todos con facilidad. Sin embargo, los siguientes Fmoc-aminoácidos 8 a 1 planteaban graves problemas: Sólo en dos posiciones, el acoplamiento avanzaba con una facilidad similar. Todas las otras posiciones requerían al menos dos ciclos repetidos de acoplamiento pero todavía no permitían rendimientos satisfactorios de más de 30% de pureza. – Para evaluar la gravedad del problema, y sin atender al aspecto comúnmente conocido de la racemización excesiva, un sistema de acoplamiento por fuerzas de cizalladura por el contrario usaba 4 eq. de aminoácido, incrementaba la temperatura al menos para el acoplamiento de los aminoácidos comúnmente menos tendentes a la racemización hasta de 30 a 40°C y usaba 6-Cl-HOBt más activo. Sin embargo, todavía entonces se requerían reacoplamientos estables y no podía observarse una mejora significativa de la eficacia de acoplamiento de por sí. – La escisión desde la resina avanzaba en una primera etapa como se describe en el ejemplo 1 en TFA al 2%, excepto que el fragmento resultó tener un comportamiento de solubilidad único. El fragmento no escindido protegido formaba un gel después de la adición de piridina. Por consiguiente, necesitaba añadirse piridina después de la etapa de filtración solamente al filtrado; se encontró que la destilación de DCM era muy difícil ya que el gel se estaba espumando, dejando sólido en todas partes y reduciendo el rendimiento drásticamente. Durante la adición de agua, se formaba un sólido que podía aislarse. Sin embargo, solubilizar dicho producto sólido posteriormente de nuevo resultaba difícil: El fragmento protegido es principalmente insoluble en DCM, THF, acetonitrilo y mezclas de los mismos. La adición de LiCl en THF no mejoraba la solubilidad. – El péptido resultaba ser ligeramente soluble en NMP, DMF o DMSO, dando una apariencia similar a gel a concentraciones más razonables, y de ahí obligando a trabajar en solución altamente diluida, lo que se encontraba subóptimo para el rendimiento.

REIVINDICACIONES

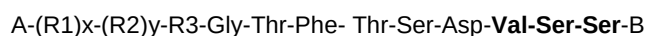
1. Un método para fabricar un péptido GLP-1 o agonista de GLP-1 de fórmula



5 o de fórmula



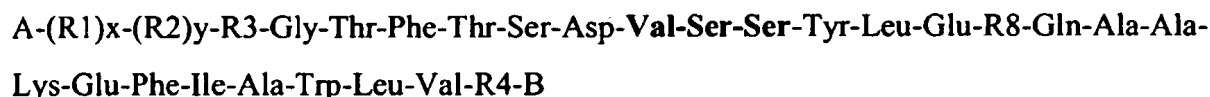
o de fórmula



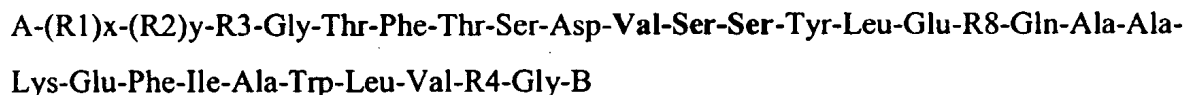
o de fórmula

10 A-(R1)_x-(R2)_y-R3-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-B

o de fórmula



o de fórmula



15 en las que

B = -OH o -NH₂

A = H-, Ac-, Boc-, Fmoc

R1 = His, D-His, desaminohistidina, 2-aminohistidina, β-hidroxihistidina, homohistidina, α-fluorometilhistidina o α-metilhistidina

20 R2 = Ala, D-Ala, Val, D-Val, Gly o Aib (ácido α-aminoisobutírico)

R3 = Glu, Asp, Met o Leu, preferiblemente es Glu o Asp, lo más preferiblemente es Asp

R4 = Lys o Arg

R5 = Gly, Aib, Ala o D-Ala

R6 = Arg, Lys o Gly

25 R7 = Arg, Lys o Gly, preferiblemente Lys o Gly

R8 = Gly o Aib

y en las que, independientemente, x, y, w, z son 0 o 1, con la condición de que y sea 1 si x es 1 y con la condición

de que w sea 1 sea z = 1, y en donde los aminoácidos individuales pueden tener opcionalmente grupos protectores, que comprende las etapas de

5 a. sintetizar el péptido sobre una fase sólida, que es escindible bajo condiciones débilmente ácidas, mediante el acoplamiento por etapas de aminoácidos o dipéptidos, que comprenden dipéptidos de pseudoprolina, protegidos por Fmoc, adecuadamente protegidos adicionalmente en las cadenas laterales, de un modo lineal, en donde en una posición de secuencia adecuada un primer dipéptido de pseudoprolina seleccionado del grupo que consiste en Fmoc-Val-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH, Fmoc-Val-Ser($\psi^{\text{H,H}}$ pro)-OH, Fmoc-Ser(P)-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH y Fmoc-Ser(P)-Ser($\psi^{\text{H,H}}$ pro)-OH, en donde P es un grupo protector escindible con ácido que se escinde bajo una condición fuertemente ácida de al menos 80% de TFA, preferiblemente P es terc-butilo o es tritilo,

se acopla a la cadena peptídica creciente,

y en donde el grupo o los grupos protectores de cadenas laterales son escindibles bajo condiciones fuertemente ácidas,

b. escindir el péptido de la fase sólida bajo condiciones débilmente ácidas y

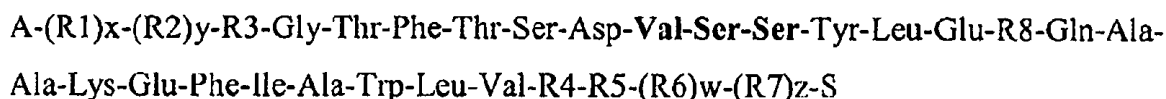
15 c. desproteger la cadena peptídica bajo condiciones fuertemente ácidas.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque al menos un residuo de glicidilo que puede acoplarse como residuo de Fmoc-glicidilo o como un residuo de Fmoc-aminoacilglicidilo está adicionalmente protegido en N en su Na de la cadena principal con N-(o,p-dialcoxi-bencilo) o con N-(o-hidroxi-p-alcoxi-bencilo) o con N-(o-aciloxi-p-alcoxi-bencilo), siendo el aciloxi y el alcoxi, independientemente, alcoxi C1-C4 y aciloxi C1-C4, respectivamente, con la condición de que dicho residuo de glicidilo no esté comprendido en una secuencia -Gly-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)- o -Gly-Thr($\psi^{\text{H,H}}$ pro)- y esté separado al menos por dos residuos de aminoácido intermedios de otro residuo de pseudoprolina o glicidilo protegido en Na.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se usan dos dipéptidos de pseudoprolina, en donde el segundo está separado por al menos cuatro residuos de aminoácido intermedios del mencionado primero y preferiblemente es Fmoc-Gly-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH.

4. Método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque sólo se usa en la síntesis un dipéptido de pseudoprolina, preferiblemente Fmoc-Val-Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)-OH.

5. Un péptido GLP-1 o agonista de GLP-1 conjugado a una fase sólida, de fórmula



30 o de fórmula



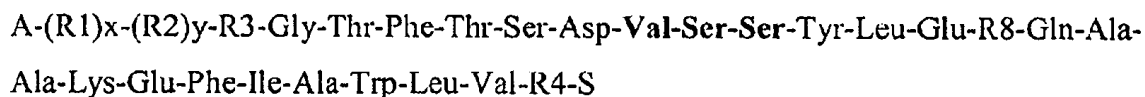
o de fórmula



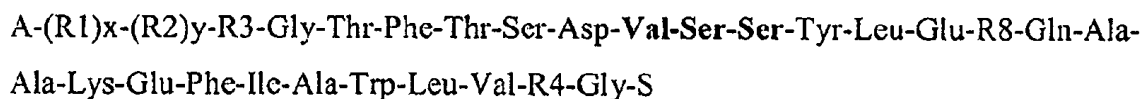
o de fórmula

35 A-(R1)x-(R2)y-R3-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-S

o de fórmula



o de fórmula



en las que

- 5 S = fase sólida, que es escindible bajo condiciones débilmente ácidas y que está unida covalentemente con el extremo C del resto peptídico a través de un grupo tioéster, éster o amido o, si el aminoácido C-terminal es una lisina, de forma opcional covalentemente a través de la función amino en ϵ de dicha lisina,

A = H, Ac, Boc o Fmoc

R1 = His, D-His, desaminohistidina, 2-aminohistidina, β -hidroxihistidina, homohistidina, α -fluorometilhistidina o α -metilhistidina

- 10 R2 = Ala, D-Ala, Val, D-Val, Gly o Aib (ácido α -aminoisobutírico)

R3 = Glu, Asp, Met o Leu, preferiblemente es Glu o Asp, lo más preferiblemente es Asp

R4 = Lys o Arg

R5 = Gly, Aib, Ala o D-Ala

R6 = Arg, Lys o Gly

- 15 R7 = Arg, Lys o Gly, preferiblemente Lys o Gly

R8 = Gly o Aib

- 20 y en donde, independientemente, x, y, w, z son 0 o 1, con la condición de que y sea 1 si x es 1 y con la condición de que w sea 1 si z es 1, en donde cadenas laterales individuales de al menos Lys, Thr, Ser, Glu, Asp tienen grupos protectores, que son escindibles bajo condiciones fuertemente ácidas y grupos protectores que pueden ser grupos protectores pseudoprolina en el caso de Thr o Ser, y en donde una Ser en el segmento de secuencia único -Val-Ser-Ser- es un derivado pseudoprolínico de serina, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en -Ser($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)- y -Ser($\psi^{\text{H,H}}$ pro)-.

6. Un péptido conjugado a una fase sólida de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque dicha Ser-pseudoprolina es el único residuo protegido por pseudoprolina en el péptido.

- 25 7. Un péptido conjugado a una fase sólida de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el péptido comprende al menos un residuo protegido por pseudoprolina adicional que es -Thr($\psi^{\text{Me,Me}}$ pro)- o -Thr($\psi^{\text{H,H}}$ pro)- y está situado en el segmento de secuencia único -Gly-Thr-, preferiblemente el péptido comprende sólo dos residuos protegidos por pseudoprolina que son dichos residuos de pseudoprolina primero y uno adicional.