

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 748**

51 Int. Cl.:

C07C 227/32 (2006.01)

C07C 229/36 (2006.01)

C07B 53/00 (2006.01)

C07C 67/31 (2006.01)

C07C 69/732 (2006.01)

C07C 247/12 (2006.01)

C07C 271/34 (2006.01)

C07D 203/06 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

C07D 203/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2008 E 08852208 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **04.08.2010 EP 2213653**

54 Título: **Procedimiento de preparación estereoselectiva de derivados de aminoácidos**

30 Prioridad:

19.11.2007 ES 200703112

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

05.02.2013

73 Titular/es:

**BCN PEPTIDES, S.A. (100.0%)
POLIGONO INDUSTRIAL ELS VINYETS ELS
FOGARS 2, CARRETERA COMARCAL C-244 KM 22
08777 SANT QUINTI DE MEDIONA- BARCELONA, ES**

72 Inventor/es:

**RAFECAS JANE, LLORENÇ;
RIERA ESCALE, ANTONI;
RAMON ALBALATE, ROSARIO y
ALONSO XALMA, MONICA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 394 748 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

Procedimiento de preparación estereoselectiva de derivados de aminoácidos

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención está relacionada con un procedimiento para la preparación estereoselectiva de L- y D-mesitilalanina, útiles para la preparación de péptidos. Más particularmente, la invención está relacionada con un procedimiento para la preparación de L- o D-mesitilalanina protegidas con un grupo Fmoc, así como con dichos compuestos per se.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los fármacos peptídicos representan un mercado de aproximadamente 1000 millones de dólares estadounidenses y alrededor del 1% del total de ventas de principios activos farmacéuticos. En la actualidad, hay más de cuarenta péptidos sintéticos en el mercado y más de 500 moléculas peptídicas nuevas se encuentran en desarrollo.

La química de péptidos es un área de investigación muy importante ya que estos compuestos presentan interesantes propiedades biológicas y terapéuticas. De la misma manera, los aminoácidos no proteinogénicos tienen una importancia cada vez mayor como intermedios de dichos péptidos con actividad biológica y terapéutica.

15 Se sabe que la actividad de un fármaco depende de la conformación que es capaz de adoptar en su interacción con el receptor y ésta, por su parte, en el caso de compuestos peptídicos, depende de los aminoácidos presentes en la cadena. Así, una forma de modificar su actividad como fármacos es introducir análogos conformacionalmente restringidos de los aminoácidos que forman parte de la secuencia del péptido biológicamente activo (cfr. e.g. T. Osaka et al., Current Opinion in Chemical Biology 2002, vol. 6, pp. 809-815; D. R. Hodgson et al., Chem. Soc. Rev 2004, vol. 33, pp. 422-430).

20 El uso de aminoácidos no naturales incrementa la vida media de los correspondientes péptidos que se degradan más difícilmente por proteasas. Asimismo, se ha descrito que la sustitución de fenilo por mesitilo (2,4,6-trimetilfenilo) en diversos aminoácidos incrementa notablemente las barreras rotacionales sin cambiar significativamente la geometría del conformero más estable (cfr. E Medina et al., Helv. Chim. Acta 2000, vol. 83, pp. 972-988). Con esta sustitución de fenilalanina por mesitilalanina se han preparado análogos peptídicos con gran actividad biológica, como análogos de [D-har8]vasopresina (cf. M. Zertova et al., Collect. Czech. Chem. Comun. 1993, vol. 58, pp. 2751), agentes analgésicos y antihipertensivos (cfr. EP 0213481 A2), análogos de encefalina (cfr. EP 0136720 A2), análogos de la hormona LHRH (cfr EP 0049628 A1) y péptidos con secuencias de fibroína. La preparación de estos análogos se ha llevado a cabo incorporando el aminoácido protegido con el grupo protector Boc en forma racémica, y posteriormente los péptidos resultantes se han separado por HPLC con una fase estacionaria quiral (cfr. J.Hlavacek et al., Collect. Czech. Chem. Comun., 1991, vol. 56, p. 2991).

25 La L-fenilalanina es un aminoácido natural presente en la mayoría de proteínas y péptidos naturales. La mesitilalanina es un aminoácido no natural útil para la preparación de diversos péptidos y análogos peptídicos. La mesitilalanina se ha preparado en forma racémica y se ha separado de forma analítica, pero no preparativa. Sin embargo, hasta la fecha, el uso de mesitilalanina es poco habitual, probablemente debido a las dificultades encontradas en la preparación de aminoácidos enantioméricamente puros que contienen el grupo mesitilo en la cadena lateral.

30 E. Medina et al. han descrito una síntesis de mesitilaminoácidos basada en una epoxidación de Sharpless y una aminohidroxilación de Sharpless (cfr. Helv. Chim. Acta 2000, vol. 83, pp. 972-988). Sin embargo, esta síntesis presenta inconvenientes importantes que dificultan su utilización a nivel industrial. Entre estos inconvenientes destaca que se obtiene una baja conversión en la epoxidación de Sharpless del mesitilpropenol y los crudos de la reacción de aminohidroxilación necesitan ser cromatografiados para eliminar los reactivos en exceso. También está descrita una síntesis del hidrocloreto de la L- mesitilalanina mediante una hidrogenación catalítica asimétrica enantioselectiva de un precursor acetamidoacrilato (cf. T. Li et al., Chem. Pharm. Bull. 2006, vol. 54, pp.873-877).

35 Las enseñanzas de todos estos documentos del estado de la técnica muestran que la investigación de nuevos procedimientos para la preparación de L- o D- mesitilaminoácidos es aún un campo activo, en particular de la L- o la D- mesitilalanina, aminoácidos útiles para la preparación de diversos péptidos y análogos peptídicos que presentan una gran actividad biológica pero que han sido poco utilizados hasta la fecha debido a la complejidad de los procedimientos de preparación que se conocen para la preparación de aminoácidos enantioméricamente puros que contienen este grupo.

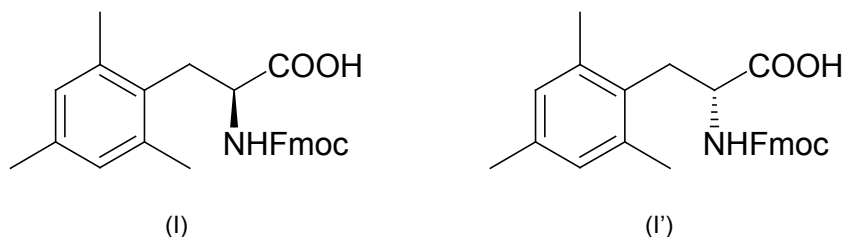
DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

40 Los inventores han encontrado un procedimiento práctico con un elevado rendimiento para la preparación de manera estereoselectiva tanto de la L-mesitilalanina como de la D-mesitilalanina. El procedimiento es particularmente

apropiado para la preparación de L- o D-mesitilalanina, protegida lo cual resulta muy conveniente para la síntesis en fase sólida de péptidos.

Así, un primer aspecto de la presente invención, es proporcionar un procedimiento de preparación estereoselectiva de un enantiómero sustancialmente puro de un compuesto de fórmula (I), alternativamente su enantiómero (I'),

5

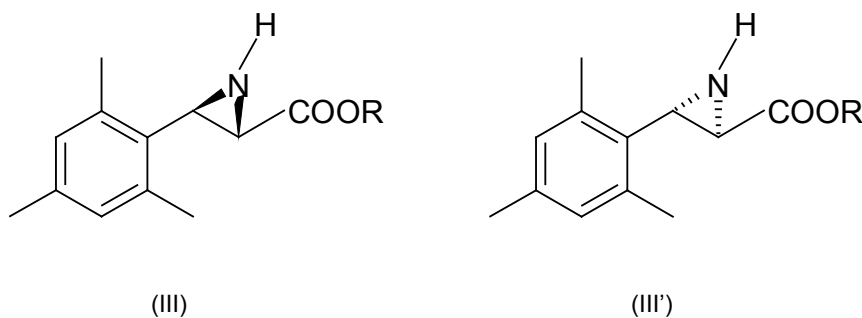


10

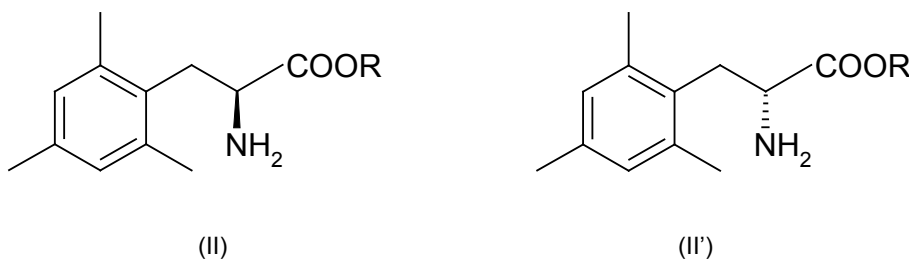
donde P es hidrógeno o un grupo protector de amina, que comprende las siguientes etapas:

a) someter un compuesto de fórmula (III), alternativamente su enantiómero (III'), a una reacción de hidrogenación para dar el compuesto de fórmula (II), alternativamente su enantiómero (II'); donde R es (C₁-C₈)-alquilo;

15



20



25

30

b) someter el compuesto de fórmula (II), alternativamente su enantiómero (II'), a una reacción de hidrólisis para dar un compuesto de fórmula (I), alternativamente su enantiómero (I'), donde P es hidrógeno y, opcionalmente, someter dicho compuesto (I), alternativamente su enantiómero (I'), a una reacción de protección del grupo amino.

Por enantiómero sustancialmente puro se entiende que tiene un exceso enantiomérico de dicho enantiómero igual o superior al 95%, preferentemente igual o superior al 98%, más preferentemente igual o superior al 99%.

35

Preferentemente, R es un (C₁-C₄)-alquilo. En una realización particular R es metilo. En otra realización particular, R es etilo.

40

La etapa de hidrogenación transcurre con rendimiento cuantitativo y regioselectividad completa. La hidrogenación se realiza por los métodos convencionales y con los catalizadores conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo y sin sentido limitativo, metales o complejos metálicos. Preferentemente, el catalizador de la reacción de hidrogenación se selecciona del grupo formado por el catalizador de Wilkinson, catalizador de Crabtree, níquel Raney, metales en estado de oxidación cero en combinación con ácidos próticos o metales del grupo del platino en combinación con carbón activo. Más preferentemente, el catalizador de la reacción de hidrogenación es un metal del

grupo del platino en combinación con carbón activo, y en particular paladio/carbón activo (Pd/C). Entre las fuentes de hidrógeno para la reacción de hidrogenación se encuentran además del hidrógeno (H₂) todas aquellas moléculas donoras de hidrógeno conocidas por el experto en la materia, como por ejemplo y sin sentido limitativo, hidrazina, hidrazinas sustituidas, isopropanol o ácido fórmico.

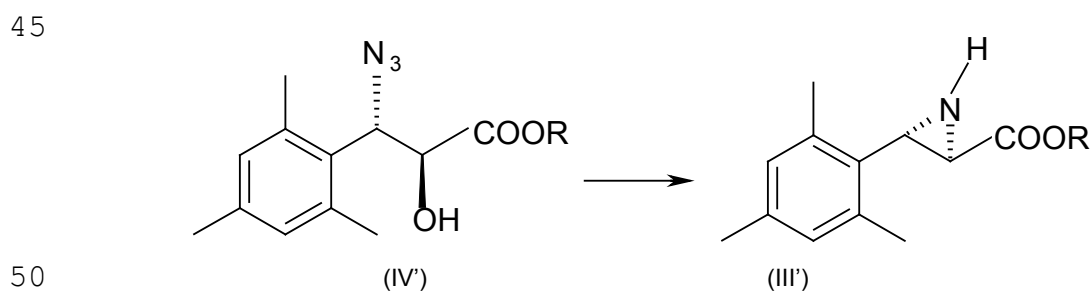
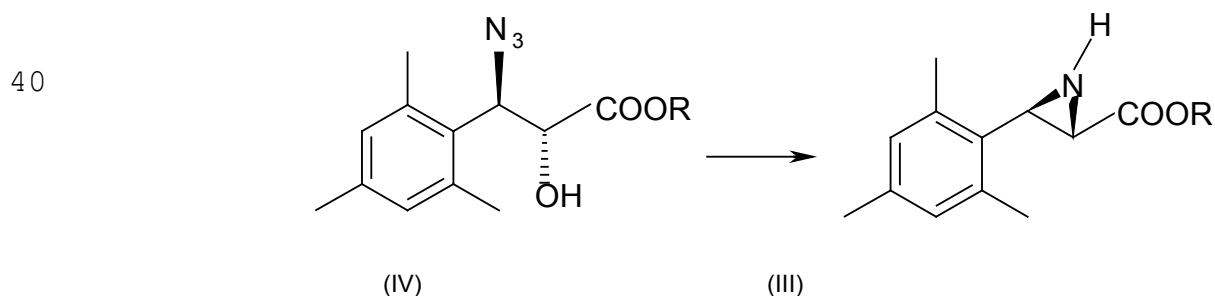
5 La hidrólisis se puede llevar a cabo en condiciones básicas o ácidas. En una realización preferida, la hidrólisis se lleva a cabo en medio básico. Entre los compuestos que aportan un medio básico a la reacción de hidrólisis se encuentra cualquier base conocida en el estado de la técnica. En una realización más preferida, la base es un hidróxido de metal alcalino. En una realización particular el hidróxido de metal alcalino es hidróxido de litio.

10 El procedimiento de la presente invención permite proteger la L- mesitilalanina y la D-mesitilalanina con diferentes grupos protectores. Existen numerosos grupos protectores adecuados de la función amino tal como carbamatos, amidas, sulfonamidas, alilo, bencilo opcionalmente sustituido, siendo el sustituyente seleccionado del grupo formado por (C₁-C₈)-alquilo, (C₁-C₈)-alcoxilo o halógeno. Entre los grupos protectores más adecuados se encuentran, pero no de forma limitativa, los seleccionados del grupo formado por t-butoxicarbonilo (BOC), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), benciloxicarbonilo (Cbz), alilo, 4-metoxibencilo, 2,4-dimetoxibencilo y bencilo.

15 En una realización preferida, el grupo protector es el Fmoc. Ninguno de los documentos del estado de la técnica describe la L-mesitilalanina o la D-mesitilalanina protegida como Fmoc, Cbz, alilo, 4-metoxibencilo, 2,4-dimetoxibencilo o bencilo. A diferencia de los procedimientos ya conocidos, el procedimiento de preparación de la presente invención es especialmente ventajoso porque permite obtener dichos compuestos de manera estereoselectiva. En un ejemplo particular, la protección con un grupo Fmoc presenta diversas ventajas en la posterior preparación de péptidos a partir de dicho aminoácido relacionadas con la facilidad y las condiciones suaves de reacción utilizadas en la desprotección de los grupos protectores y el desanclaje de los péptidos de las resinas. La estrategia de síntesis química de péptidos por fase sólida que utiliza la protección de grupos amino con Fmoc es la más usada con diferencia para la preparación de péptidos tanto a escala de laboratorio como a escala de producción.

25 La introducción y la eliminación del grupo protector puede llevarse a cabo por métodos conocidos en la técnica. (cfr. *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, (1999). Las condiciones específicas dependen del grupo protector utilizado. En una realización particular, cuando se utiliza un grupo Fmoc, este se puede introducir por reacción de Fmoc-Cl o Fmoc-osuccinimidilo en presencia de un disolvente adecuado y de una base orgánica o inorgánica. La desprotección tiene lugar en condiciones suaves por reacción con una base. Entre las bases adecuadas para la desprotección se encuentra cualquier base orgánica o inorgánica como por ejemplo, pero sin ser limitativo, piperidina, morfolina, dicitohexilamina, K₂CO₃ o KHCO₃.

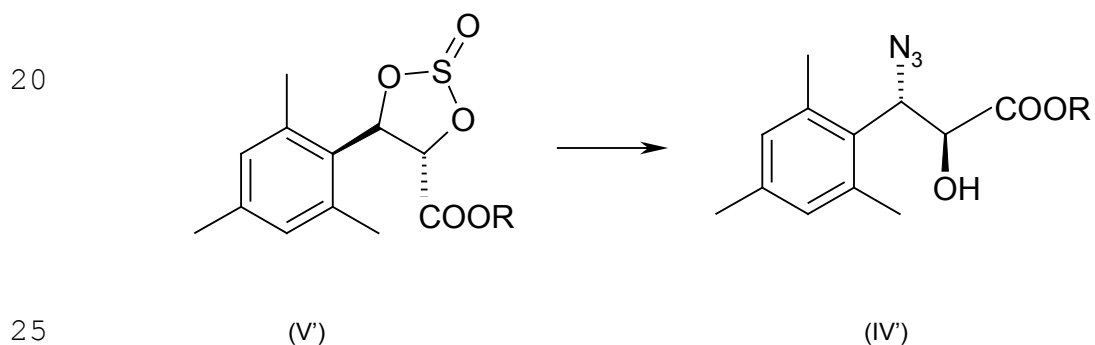
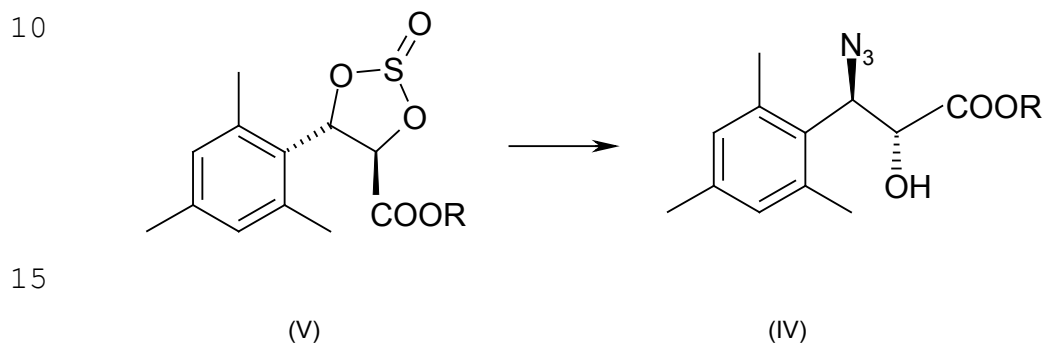
35 En una realización preferida, previamente se hace reaccionar un compuesto de fórmula (IV), alternativamente su enantiómero (IV'), con una fosfina de fórmula P(R₁)₃, donde R₁ es un radical que se selecciona independientemente entre el grupo formado por (C₁-C₈)-alquilo, (C₁-C₈)-cicloalquilo, fenilo opcionalmente sustituido, -(CH₂)_n-fenilo opcionalmente sustituido, donde n es un entero de 1 a 4, y los sustituyentes de los radicales con anillos bencénicos se seleccionan independientemente del grupo formado por (C₁-C₈)-alquilo, (C₁-C₈)-alcoxilo o halógeno, para dar el compuesto de fórmula (III), alternativamente su enantiómero (III'), donde en las fórmulas (III), (III'), (IV) y (IV') R es (C₁-C₈)-alquilo.



50

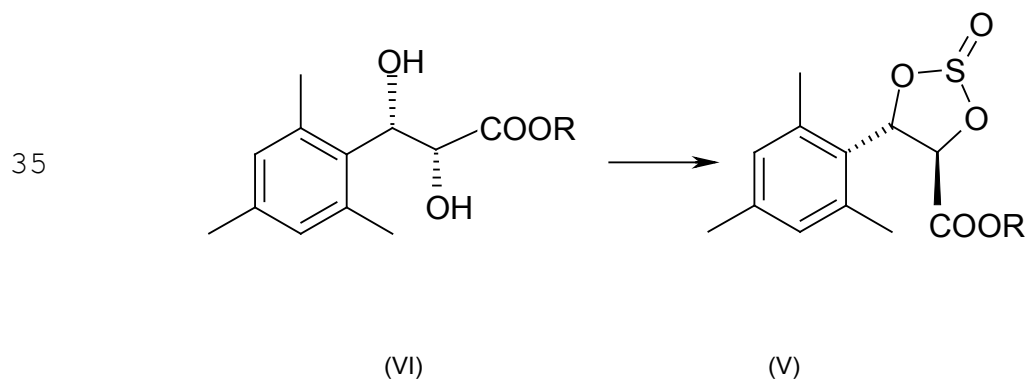
Preferentemente, R_1 son iguales y la fosfina es una fosfina aromática, y más preferentemente la fosfina es trifenilfosfina. Esta etapa transcurre con rendimiento moderado pero el compuesto que se obtiene está en forma ópticamente pura (>99% ee por HPLC quiral).

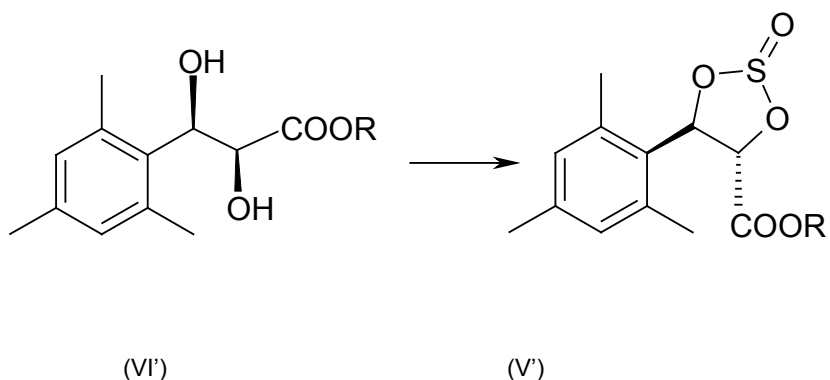
5 En otra realización preferida previamente se hace reaccionar un compuesto de fórmula (V), alternativamente su enantiómero (V'), donde R es (C_1-C_8)-alquilo, con una azida inorgánica para dar el compuesto de fórmula (IV), alternativamente (IV'). Preferentemente la azida inorgánica se selecciona del grupo formado por las azidas de metales alcalinos o alcalinotérreos, y en particular es azida sódica.



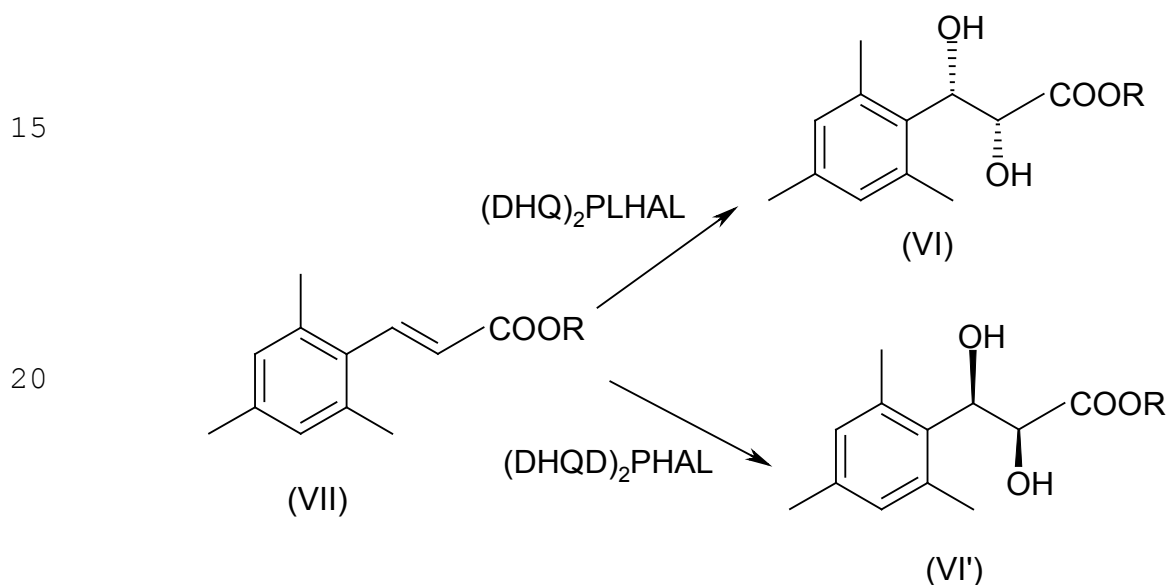
Generalmente, la reacción se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 50-150 °C, más preferentemente a una temperatura alrededor de 100 °C. La apertura del anillo de sulfito se lleva a cabo de manera completamente regioselectiva y con buen rendimiento.

30 En otra realización preferida, previamente un compuesto de fórmula (VI), alternativamente su enantiómero (VI'), donde R es (C_1-C_8)-alquilo se hace reaccionar con halogenuro de tionilo para dar el compuesto de fórmula (V), alternativamente su enantiómero (V'). Preferentemente, el halogenuro de tionilo es cloruro de tionilo.





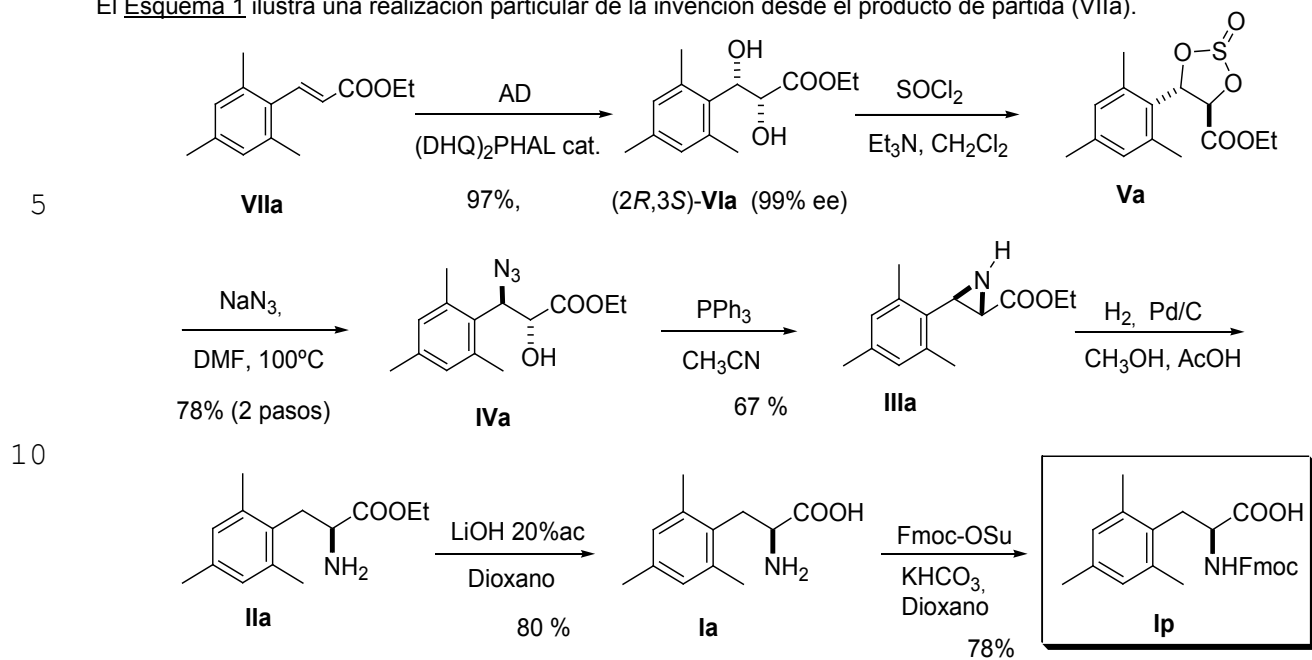
10 En otra realización preferida, previamente un compuesto de fórmula (VII), donde R es (C₁-C₈)-alquilo se somete a una reacción de dihidroxilación asimétrica de Sharpless para dar el compuesto de fórmula (VI), alternativamente su enantiómero (VI').



25 La dihidroxilación asimétrica de Sharpless (AD) tiene lugar con rendimiento casi cuantitativo y el dihidroxiéster (VI), alternativamente su enantiómero (VI'), se obtiene en forma ópticamente pura (generalmente >99%ee por HPLC quiral). Generalmente, la dihidroxilación de Sharpless se lleva a cabo en presencia de tetraóxido de osmio u osmato potásico, de un ligando quinina quiral y de un agente oxidante tal como K₃Fe(CN)₆ o N-óxido de N-metilmorfolina. El compuesto obtenido puede utilizarse en las siguientes etapas sin previa purificación. Entre los ligandos quirales apropiados se encuentran, pero sin sentido limitativo, la hidroquinina 1,4-ftalazinediil dieter ((DHQ)₂PHAL) o la hidroquinidina 1,4-ftalazinediil dieter ((DHQD)₂PHAL) como ligandos quirales. Así, en el caso de utilizar (DHQ)₂PHAL se obtiene el compuesto (VI), y en el caso de utilizar (DHQD)₂PHAL se obtiene el compuesto (VI').

30

El Esquema 1 ilustra una realización particular de la invención desde el producto de partida (VIIa).



Si se requiere la configuración opuesta del compuesto (Ia) o (Ip), el procedimiento se lleva a cabo de manera análoga a a partir de los compuestos de configuración adecuada.

El compuesto de partida (VII) se puede obtener fácilmente a partir del aldehído mesitilo mediante una reacción de Horner-Wadsworth-Emmons.

20 Un segundo aspecto de la presente invención es proporcionar los compuestos Fmoc-(L)-mesitilalanina y Fmoc-(D)-mesitilalanina, intermedios útiles para la preparación de péptidos y análogos peptídicos con actividad biológica.

25 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de preparación en fase sólida de péptidos con uno o más residuos de mesitilalanina, que comprende la utilización de un aminoácido N-protegido seleccionado entre Fmoc-(L)-mesitilalanina, Fmoc-(D)-mesitilalanina, Cbz-(L)-mesitilalanina, Cbz-(D)-mesitilalanina, alil-(L)-mesitilalanina, alil-(D)-mesitilalanina, 4-metoxibencil-(L)-mesitilalanina, 4-metoxibencil-(D)-mesitilalanina, 2,4-dimetoxibencil-(L)-mesitilalanina, 2,4-dimetoxibencil-(D)-mesitilalanina, bencil-(L)-mesitilalanina, bencil-(D)-mesitilalanina.

30 También forma parte de la invención el procedimiento de preparación en fase sólida de péptidos con uno o más residuos de mesitilalanina, que comprende llevar a cabo el procedimiento de preparación estereoselectiva de un enantiómero sustancialmente puro de un compuesto de fórmula (I), alternativamente su enantiómero (I'), tal como se ha definido anteriormente en la presente descripción.

35 El procedimiento de la presente invención resulta especialmente ventajoso por el hecho de permitir obtener derivados de L- y D-mesitilalanina enantioméricamente puros, éstos son intermedios útiles para la preparación de péptidos y análogos peptídicos con gran actividad biológica que además presentan una mayor estabilidad atribuible al hecho de incorporar aminoácidos no naturales. Los ejemplos 9 a 11 ilustran a modo de ejemplo la utilización de estos compuestos en la síntesis de péptidos en fase sólida.

40 Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran la invención para una configuración estereoisomérica. Cuando se requiere la configuración opuesta, la invención puede llevarse a cabo de manera similar partiendo de compuestos de configuración adecuada, como sería obvio para un experto en la materia.

- 5 Las rotaciones ópticas se midieron a temperatura ambiente (23 °C). El espectro de ¹H RMN se obtuvo a 400 MHz con tetrametilsilano como estándar interno. El ¹³C RMN se obtuvo a 100.6 MHz y se referenció a la señal de disolvente. Señales marcadas con un asterisco corresponden a los rotámeros.

Ejemplo 1: Preparación de (2R,3S)-dihidroxi-3-mesitilpropanoato de etilo (VIa).

- 10 En un reactor de 2 L se introdujeron 790 mg (1.0 mmol) de (DHQ)₂PHAL, 100 g (302 mmol) de K₃Fe(CN)₆, 41.7g (302 mmol) de K₂CO₃, 149 mg (0.403 mmol) de K₂OsO₄(OH)₄ y se disolvieron en 1L de una mezcla H₂O:^tBuOH (1:1). A continuación se añadieron 9.5 g (100 mmol) de metanosulfonamida. Se mantuvo 15 minutos en agitación y seguidamente se añadieron 22.0g (100 mmol) de 3-mesitil-2-propenoato de etilo. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 48 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, se detuvo la reacción añadiendo Na₂SO₃ (180 g). Se mantuvo la agitación durante 2 horas y finalmente, se extrajo la fase acuosa con CH₂Cl₂ (3 x 150 mL). El conjunto de las fases orgánicas se lavó con una solución acuosa de KOH 2N, se secó sobre MgSO₄ y se evaporó el disolvente a presión reducida. Se obtuvieron 24.3g (97% de rendimiento) del producto (2R,3S)-VIa en forma de aceite amarillo. [α]_D = - 24.7 (c 0.98, CHCl₃). IR (film): ν max 3441 (b), 2978, 1733, 1611, 1190 cm⁻¹. ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ : 6.80 (s, 2H), 5.18 (d, 1H, J= 6.4 Hz), 4.51 (d, 1H, J= 6.4 Hz), 4.04 (q, 2H, J= 7 Hz), 3.18 (b, 1H), 2.86 (b, 1H), 2.40 (s, 6H), 2.24 (s, 3H), 1.00 (t, 3H, J= 7 Hz) ppm. ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 173.0 (CO), 137.4 (C), 136.8 (C), 131.8 (C), 130.3 (CH), 73.8 (CH), 73.7 (CH), 61.9 (CH₂), 21.0 (CH₃), 20.9 (CH₃), 13.7 (CH₃) ppm. EM (CI-NH₃) m/z: 270.1 [(M + 18)⁺, 100%], 252.1 [(M)⁺, 60%]. HRMS (CI+): Calcd para C₁₄H₂₀O₄: 252.1361, encontrado 252.1357. HPLC: Chiralpack-AD. Hexano/*i*-PrOH 98:2, 1 mL/min, λ = 254 nm, t_R (S,R) = 44 min y t_R (R,S) = 41 min.

Ejemplo 2: Preparación de (2S,3R)-dihidroxi-3-mesitilpropanoato de etilo (VI'a)

- 25 Se utilizó el mismo procedimiento con el ligando (DHQD)₂PHAL para obtener (2S,3R)-dihidroxi-3-mesitilpropanoato de etilo con un rendimiento del 95%.

La pureza enantiomérica de (2R,3S)-dihidroxi-3-mesitilpropanoato de etilo del Ejemplo 1 y de (2S,3R)-dihidroxi-3-mesitilpropanoato de etilo del Ejemplo 2 fue en ambos casos >99% ee.

Ejemplo 3: Preparación de (4R,5S)-4-etoxicarbonil-5-mesitil-1,3,2-dioxatolano-2-óxido (Va).

- 30 En un reactor se disolvieron 23.5g (93 mmol) del diol (2R,3S)-dihidroxi-3-mesitilpropanoato de etilo en 1.4 L de CH₂Cl₂. A continuación se añadieron 38.9 mL (279 mmol) de NEt₃. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se mantuvo en agitación durante 5 minutos. Finalmente se añadieron, gota a gota, 9.5 mL (130.4 mmol) de SOCl₂ y se mantuvo la agitación durante 15 minutos a 0 °C. Pasado ese tiempo, se añadieron 370 mL de Et₂O y 370 mL de agua. La fase acuosa se extrajo con Et₂O (3 x 150 mL) y el conjunto de las fases orgánicas se lavó con una solución saturada de NaCl, se secó sobre MgSO₄ y se evaporó el disolvente a presión reducida. Se obtuvo el sulfito de forma cuantitativa (4R,5S)-Va como un aceite. [α]_D = - 18.8 (c 1.00, CHCl₃). IR (film): ν max 2979, 1742, 1216, 1030 cm⁻¹. ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ : 6.90 (s, 2H), 6.89^{*} (s, 2H), 6.61 (d, 1H, J= 8 Hz), 5.95^{*} (d, 1H, J= 10 Hz), 5.35^{*} (d, 1H, J= 10 Hz), 4.96 (d, 1H, J= 8 Hz), 4.30 (dq, 2H, J= 20 y 7 Hz), 4.22^{*} (m, 2H), 2.45^{*} (s, 6H), 2.37^{*} (s, 6H), 2.28 (s, 6H), 1.31 (t, 3H, J= 7 Hz), 1.22^{*} (t, 3H, J= 7 Hz) ppm. ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ 168.0 (CO), 166.2 (CO), 139.9 (C), 139.8 (C), 138.4 (C), 138.2 (C), 131.0 (CH), 130.9 (CH), 125.6 (C), 122.6 (C), 84.9 (CH), 80.6 (CH), 80.3 (CH), 76.0 (CH), 62.8 (CH₂), 21.07 (CH₃), 21.06 (CH₃), 20.5 (CH₃), 20.2 (CH₃), 14.2 (CH₃), 14.0 (CH₃) ppm. EM (CI-NH₃) m/z: 315.6 [(M + 17)⁺, 100%]. HRMS (CI+): Calcd para C₁₄H₁₈O₅S: 298.0875, encontrado 298.0876.

Ejemplo 4: Preparación de (2S,3S)-3-azido-2-hidroxi-3-mesitilpropanoato de etilo (IVa)

- 45 En un matraz de dos bocas y provisto de un refrigerante se disolvieron 18.6 g (62.95 mmol) del (4R,5S)-4-etoxicarbonil-5-mesitil-1,3,2-dioxatolano-2-óxido en 386 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) y se le añadieron 8.2 g (125.9 mmol) de NaN₃. La mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante 18 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo resultante se disolvió en 310 mL de Et₂O y 310 mL de una solución de H₂SO₄ al 20% y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante una noche. Se añadieron un exceso de solución saturada de NaHCO₃ y la fase acuosa se extrajo con Et₂O (3 x 150 mL). El conjunto de las fases orgánicas se secó sobre MgSO₄ y se evaporó el disolvente a presión reducida. El crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna (SiO₂/NEt₃ 2.5% v/v, hexano/AcOEt) y se obtuvieron 13.6 g (78% de rendimiento) del azidoalcohol (2S,3S)-IVa en forma de aceite amarillo. [α]_D = -126 (c 0.795, CHCl₃). IR (film): ν max 3468 (b), 2924, 2105, 1737, 1610, 1257 cm⁻¹. ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ : 6.88 (s, 2H), 5.19 (d, 1H, J= 8.8 Hz), 4.45 (dd, 1H, J= 7 y 9 Hz), 4.33 (m, 2H), 2.52 (d, 1H, J= 7 Hz), 2.43 (s, 6H), 2.26 (s, 3H), 1.36 (t, 3H, J= 7 Hz) ppm. ¹³C

RMN (100MHz, CDCl₃) δ173.0 (CO), 138.4 (C), 137.6 (C), 130.66 (CH), 130.56 (CH), 128.6 (C), 72.1 (CH), 64.1 (CH), 62.4 (CH₂), 21.0 (CH₃), 20.9 (CH₃), 14.2 (CH₃) ppm. EM (Cl-NH₃) m/z: 295.3 [(M+18)⁺, 90%]. HRMS (ESI): Calcd para C₁₄H₁₉N₃O₃Na: 300.1315, encontrado 300.1318.

Ejemplo 5: Preparación de (2R,3S)-3-mesitil-aziridin-2-carboxilato de etilo (IIIa)

5 En un matraz se introdujeron 13.0 g (46.72 mmol) del azidoalcohol (2S,3S)-3-azido-2-hidroxi-3-mesitilpropanoato de etilo y se disolvieron en 282 mL de acetonitrilo, seguidamente se añadieron 12.2 g (46.72 mmol) de PPh₃. La mezcla de reacción se agitó durante 1h a temperatura ambiente y 6h a la temperatura de reflujo. Una vez pasado este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida y el crudo se purificó por cromatografía en columna (SiO₂/NEt₃ 2.5% v/v, hexano/AcOEt). Se obtuvieron 7.32 g (67% de rendimiento) de la aziridina (2R,3S)-IIIa como un aceite amarillo. [α]_D = -131 (c 0.79, CHCl₃). IR (film): ν max 3281, 2978, 2922, 1726, 1218, 1201 cm⁻¹. ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ: 6.82 (s, 2H), 4.31 (m, 2H), 3.16 (d, 1H, J= 2 Hz), 2.57 (d, 1H, J= 2 Hz), 2.39 (s, 6H), 2.26 (s, 3H), 1.78 (b, 1H), 1.36 (t, 3H, J= 7 Hz) ppm. ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ172.8 (CO), 137.8 (C), 137.3 (C), 129.0 (CH), 61.8 (CH₂), 38.9 (CH), 37.8 (CH), 20.9 (CH₃), 20.0 (CH₃), 14.4 (CH₃) ppm. EM (Cl-NH₃) m/z: 233.0 [(M)⁺, 25%], 146.0 [(M-87)⁺, 100%]. HRMS (Cl⁺): Calcd para C₁₄H₁₉NO₂: 233.1416, encontrado 233.1418. HPLC: Chiralpack-IA. Heptano/*i*-PrOH 95:5, 1 mL/min, λ = 254 nm, t_R (S,R) = 19 min y t_R (R,S) = 14 min. La pureza enantiomérica de (2R,3S)-3-mesitil-aziridin-2-carboxilato de etilo fue >99% ee.

Ejemplo 6: Preparación de (2S)-Mesitilalanina etil ester (IIa).

20 En un reactor de alta presión se disolvieron 9.9 g (42.42 mmol) de la aziridina (2R,3S)-3-mesitil-aziridin-2-carboxilato de etilo en 300 mL de metanol, seguidamente se añadieron 990 mg de Pd/C y 10 mL de ácido acético (84.84mmol). Se purgó el sistema con ciclos de vacío/nitrógeno y a continuación se presurizó el reactor con 40 bar de hidrógeno. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 48 horas. Pasado este tiempo, se eliminó el catalizador mediante filtración sobre celite y la disolución resultante se concentró a presión reducida. Se obtuvo cuantitativamente el compuesto (IIa) en forma de sólido amarillo. Pf 81-83°C. [α]_D = - 26.7 (c 1.00, CHCl₃). IR (film): ν max 2918, 1742, 1612, 1483, 1225. ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ: 6.84 (s, 2H), 5.61 (b, 1H), 4.14 (m, 2H), 3.77 (dd, 1H, J= 6.4 y 7.6 Hz), 3.08 (m, 2H), 2.94 (m, 2H), 2.31 (s, 6H), 2.25 (s, 3H), 1.18 (t, 3H, J= 7 Hz) ppm. ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ178.9 (CO), 137.1 (C), 136.3 (C), 131.1 (C), 129.5 (CH), 129.5 (CH), 129.2 (C), 61.4 (CH₂), 54.1 (CH), 34.6 (CH₂), 24.9 (CH₃), 21.0 (CH₃), 19.8 (CH₃), 14.2 (CH₃) ppm. EM (ESI⁺) m/z: 236.2 [(M+H)⁺, 100%]. HRMS (ESI⁺): Calcd para C₁₄H₂₂NO₂: 236.1645, encontrado 236.1637.

Ejemplo 7: Preparación de (2S)-Mesitilalanina (Ia)

30 En un matraz se disolvieron 2.0 g (8.50 mmol) del aminoester (2S)-mesitilalanina etil ester en 57 mL de dioxano, seguidamente se añaden 70 mL de una solución acuosa de LiOH al 20%. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24h. Finalmente, el disolvente se eliminó a presión reducida y la fase acuosa resultante se enfrió y acidificó con HCl 1M hasta pH 7. Se observó la precipitación de cristales, que se aislaron mediante filtración y posterior secado a vacío. Se obtuvieron 1.3 g (80% de rendimiento) del aminoácido Ia en forma de sólido blanco. Pf: 318-320 °C. [α]_D = - 80 (c 1.00, CH₃OH). IR (film): νmax 3300, 2973, 1730, 1608, 1409 cm⁻¹. ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ: 6.75 (s, 2H), 3.27 (t, 1H, J= 7.2 Hz), 2.88 (m, 1H), 2.65 (m, 1H), 2.12 (s, 6H), 2.05 (s, 3H) ppm. ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ181.8 (CO), 137.8 (C), 136.4 (C), 132.2 (C), 128.9 (CH), 56.2 (CH), 34.3 (CH₂), 19.9 (CH₃), 19.4 (CH₃) ppm. EM (Cl⁺) m/z: 208.3 [(M+H)⁺, 100%]. HRMS (Cl⁺): Calcd para C₁₂H₁₈NO₂: 208.1337, encontrado 208.1330. Anal. Cald para C₂₇H₂₇NO₄: C 71.46, H 8.99, N 5.95 encontrado C 71.36, H 8.69, N 6.39.

Ejemplo 8: Preparación de Fmoc-(L)-mesitilalanina (Ip)

45 En un matraz se suspendieron 1.08 g (5.22 mmol) del aminoácido L-mesitilalanina en 16 mL de una solución acuosa de Na₂CO₃ del 10 y se enfrió a 0°C. A continuación se añadió gota a gota una solución de Fmoc-OSu (2.64 g, 7.83 mmol) en 24 mL de dioxano. La mezcla de reacción se agitó 20 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, se añadió agua (20 mL) y se hizo extracciones con hexano (3 x 20 mL). La fase acuosa resultante se enfrió a 0°C, se acidificó a pH 2 con HCl 1M y se hicieron extracciones con acetato de etilo. El conjunto de las fases orgánicas resultantes se secó sobre MgSO₄ y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía en columna (SiO₂/NEt₃ 2.5% v/v, hexano/AcOEt) y se obtuvieron 1.5 g (68% de rendimiento) de Ip como un sólido blanco. Pf: 187-188°C. [α]_D = - 26.04 (c 1.00, CHCl₃). IR (film): νmax 3321, 2962, 1713, 1450, 1265 cm⁻¹. ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ: 7.74 (d, 2H, J= 7.6 Hz), 7.51 (t, 2H, J= 7.6 Hz), 7.40 (t, 2H, J= 7.6 Hz), 7.30 (t, 2H, J= 7.6 Hz), 6.83 (s, 2H), 5.25 (d, 1H, J= 8 Hz), 4.60 (dd, 1H, J= 8.0 y 8.4 Hz), 4.30 (m, 1H), 4.14 (m, 1H), 3.18 (m, 2H), 2.32 (s, 6H), 2.21 (s, 6H) ppm. ¹³C RMN (100MHz, CDCl₃) δ176.7 (CO), 156.08 (CO), 144.0 (C), 141.5 (C), 137.2 (C), 136.6 (C), 130.0 (C), 129.6 (C), 129.5 (CH), 127.9 (CH), 127.3 (CH), 125.3 (CH), 120.2 (CH), 67.4 (CH₂), 53.7 (CH₂), 47.3 (CH), 32.5 (CH₂), 21.3 (CH₃), 20.4 (CH₃) ppm. EM (Cl-NH₃) m/z: 206.09 [(M-233)⁺, 82%], 430.2 [(M+H)⁺, 5%]. HRMS (Cl⁺): Calcd para C₂₇H₂₈NO₄: 430.2029; encontrado 430.2018. Anal. Cald para C₂₇H₂₇NO₄: C 75.50, H 6.34, N 3.26 encontrado C 74.94, H 6.21, N 3.41. HPLC: Chiralcel-AD. Heptano/EtOH/TFA 95:5:0.2, 1 mL/min, λ = 254 nm, t_R (D) = 20 min y t_R (L) = 26 min. La pureza enantiomérica de L-*l*p fue >99% ee.

La preparación de manera análoga del compuesto de D-Ip a partir del compuesto de configuración adecuada dio lugar al producto con una pureza enantiomérica >99% ee.

Ejemplo 9: Preparación del Tripéptido Ac-(D-Msa)-Val-Nal-NH₂

5 Se dispuso una jeringa con 100mg (0.06 mmol) de resina Rink amida, se acondicionó con CH₂CL₂ (5 x 1min) y DMF (5 x 1min). La síntesis se llevó a cabo mediante una estrategia estándar Fmoc/tBu, utilizando diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) como agente acoplante y hidroxibenzotriazol (HOBt) como aditivo. Se utilizó Fmoc-3-(1-naphthyl)-L-Ala-OH (Fmoc-Nal) (78.75 mg, 0.18 mmol, 3 eq), Fmoc-L-Val-OH (61.2 mg, 0.18 mmol, 3 eq) y Fmoc-D-Mesitilalanina-OH (Fmoc-D-Msa) (77.4 mg, 0.18 mmol, 3 eq), la sucesiva incorporación de los aminoácidos se corroboró con ensayos de ninhidrina. Tras la incorporación del tercer aminoácido, se eliminó el grupo Fmoc con una mezcla de piperidina en DMF y se acetiló el extremo amino libre con Ac₂O - diisopropildietilamina (DIEA). Finalmente, la resina se filtró y lavó exhaustivamente con DMF (5 x 1min), CH₂CL₂ (5 x 1min) y metanol (5 x 1min). Para escindir el tripéptido se trató con una solución de ácido trifluoroacético-agua-trisopropilsilano (TFA-H₂O-TIS) (95:2.5:2.5) durante 1 hora y el filtrado resultante se evaporó. Se caracterizó por cromatografía en fase reversa (HPLC) y por EM. Tras 9 pasos se síntesis y sin ninguna purificación intermedia, el crudo obtenido presentaba una pureza del 39%. Se purificó con un HPLC semipreparativo (gradiente 20-50 en 10 min y 50-100 en 15 min) obteniendo 3.4 mg del tripéptido con una pureza del 86% (λ = 220nm). HPLC-MS: tr (H₂O 0.1% HCOOH; ACN 0.07% HCOOH)=4.830 min. ES+:545.65 (calc. C₃₂H₄₀N₄O₄, 544.30).

Ejemplo 10: Preparación del tripéptido Ac-(D-Msa)-Val-Lys-NH₂

20 Se dispuso una jeringa con 100mg (0.06 mmol) de resina Rink amida, se acondicionó con CH₂CL₂ (5 x 1min) y DMF (5 x 1min). La síntesis se llevó a cabo mediante una estrategia estándar Fmoc/tBu, utilizando DIPCDI como agente acoplante y HOBt como aditivo. Se utilizó Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (84.33 mg, 0.18 mmol, 3 eq), Fmoc-L-Val-OH (61.2 mg, 0.18 mmol, 3 eq) y Fmoc-D-Msa-OH (77.4 mg, 0.18 mmol, 3 eq), la sucesiva incorporación de los aminoácidos se corroboró con ensayos de ninhidrina. Tras la incorporación del tercer aminoácido, se eliminó el grupo Fmoc con una mezcla de piperidina en DMF y se acetiló el extremo amino libre con Ac₂O-DIEA. Finalmente, la resina se filtró y lavó exhaustivamente con DMF (5 x 1min), CH₂CL₂ (5 x 1min) y MeOH (5 x 1min). Para escindir el tripéptido y eliminar el grupo protector Boc de la cadena lateral del aminoácido lys se trató con una solución de TFA-H₂O-TIS (95:2.5:2.5) durante 1 hora y el filtrado resultante se evaporó. Se caracterizó por cromatografía en fase reversa (HPLC) y por EM. Tras 9 pasos de síntesis y sin ninguna purificación intermedia, el crudo obtenido presentaba una pureza del 52%. Se purificó se mediante una columna de intercambio iónico obteniendo 7.3 mg del tripéptido con una pureza del 96% (λ =220nm). HPLC-MS: tr (H₂O 0.1% HCOOH; ACN 0.07% HCOOH)= 3.856 min. ES+:476.57 (calc. C₂₅H₄₁N₅O₄, 475.32)

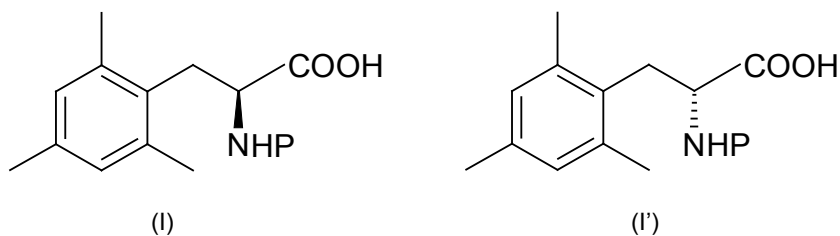
Ejemplo 11: Preparación del Tripéptido Ac-(D-Msa)-Asp-Lys-NH₂

35 Se dispuso una jeringa con 100mg (0.06 mmol) de resina Rink amida, se acondicionó con CH₂CL₂ (5 x 1min) y DMF (5 x 1min). La síntesis se llevó a cabo mediante una estrategia estándar Fmoc/tBu, utilizando DIPCDI como agente acoplante y HOBt como aditivo. Se utilizó Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (84.33 mg, 0.18 mmol, 3 eq), Fmoc-L-Asp-OtBu-OH (74.07 mg, 0.18 mmol, 3 eq) y Fmoc-D-Msa-OH (77.4 mg, 0.18 mmol, 3 eq), la sucesiva incorporación de los aminoácidos se corroboró con ensayos de ninhidrina. Tras la incorporación del tercer aminoácido, se eliminó el grupo Fmoc con una mezcla de piperidina en DMF y se acetiló el extremo amino libre con Ac₂O-DIEA. Finalmente, la resina se filtró y lavó exhaustivamente con DMF (5 x 1min), CH₂CL₂ (5 x 1min) y MeOH (5 x 1min). Para escindir el tripéptido y eliminar los grupos protectores Boc y tBu de las cadenas laterales de los aminoácidos se trató con una solución de TFA-H₂O-TIS (95:2.5:2.5) durante 1 hora y el filtrado resultante se evaporó. Se caracterizó por cromatografía en fase reversa (HPLC) y por EM. Tras 9 pasos se síntesis y sin ninguna purificación intermedia, el crudo obtenido presentaba una pureza del 71%. Se purificó se mediante una columna de intercambio iónico obteniendo 17.0 mg del tripéptido con una pureza del 94% (λ = 220nm). HPLC-MS: tr (H₂O 0.1% HCOOH; ACN 0.07% HCOOH)= 2.543 min. ES+: 492.58 (calc. C₂₄H₃₇N₅O₆, 491.27).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación estereoselectiva de un enantiómero sustancialmente puro de un compuesto de fórmula (I), alternativamente su enantiómero (I'),

5



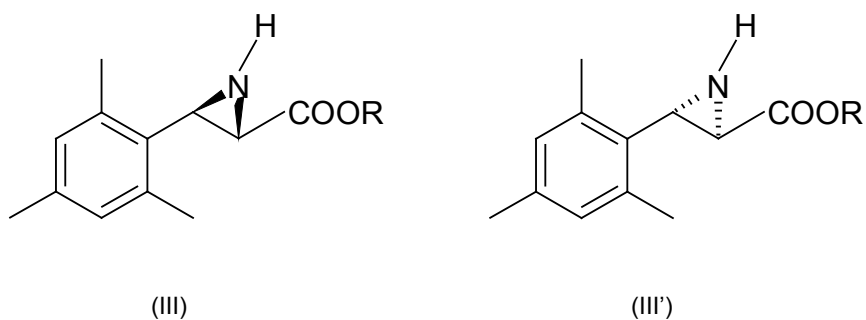
10

donde P es hidrógeno o un grupo protector de amina,

que comprende las siguientes etapas:

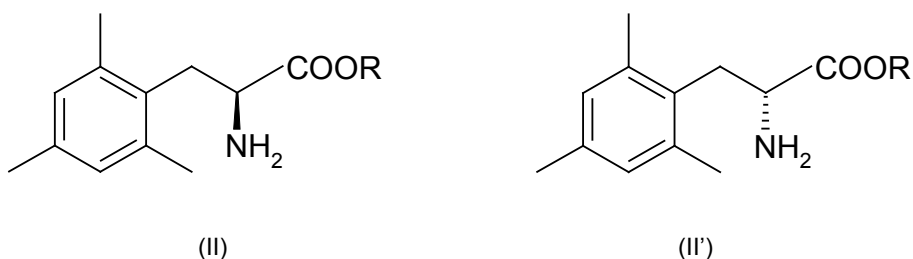
a) someter un compuesto de fórmula (III), alternativamente su enantiómero (III'), a una reacción de hidrogenación para dar el compuesto de fórmula (II), alternativamente su enantiómero (II'); donde R es (C₁-C₈)-alquilo;

15



20

25



30

b) someter el compuesto de fórmula (II), alternativamente su enantiómero (II'), a una reacción de hidrólisis para dar un compuesto de fórmula (I), alternativamente su enantiómero (I'), donde P es hidrógeno y, opcionalmente, someter dicho compuesto (I), alternativamente su enantiómero (I'), a una reacción de protección del grupo amino.

35

2. Procedimiento de preparación estereoselectiva según la reivindicación 1, donde P se selecciona del grupo formado por carbamato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc), t-butoxicarbonilo (BOC), bencilocarbonilo (Cbz), alilo, 4-metoxibencilo, 2,4-dimetoxibencilo y bencilo.

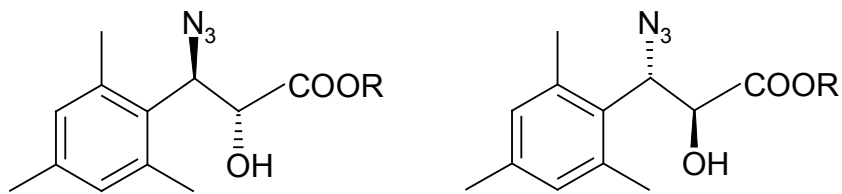
3. Procedimiento de preparación estereoselectiva según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la etapa de hidrogenación se lleva a cabo utilizando como catalizador cualquier metal o complejo metálico.

4. Procedimiento de preparación estereoselectiva según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la reacción de hidrólisis se lleva a cabo en medio básico.

5. Procedimiento de preparación estereoselectiva según la reivindicación 4, donde la base de la reacción de hidrólisis es un hidróxido de un metal alcalino.

6. Procedimiento de preparación estereoselectiva según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde se hace reaccionar el compuesto de fórmula (IV), alternativamente su enantiómero (IV'), donde R es (C₁-C₈)-alquilo,

5



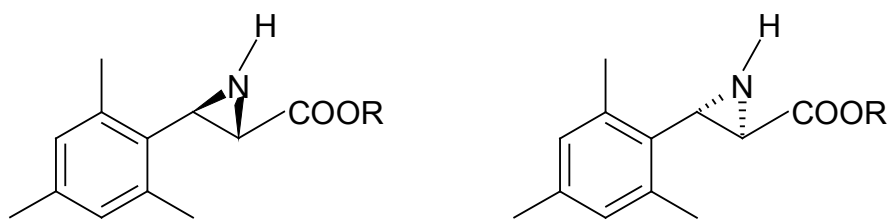
10

(IV)

(IV')

con una fosfina de fórmula P(R₁)₃, donde R₁ se selecciona independientemente entre el grupo formado por (C₁-C₈)-alquilo, (C₁-C₈)-cicloalquilo, fenilo opcionalmente sustituido, (CH₂)_n-fenilo opcionalmente sustituido, donde n es un entero de 1 a 4, y los sustituyentes de los radicales con anillos bencénicos se seleccionan independientemente del grupo formado por (C₁-C₈)-alquilo, (C₁-C₈)-alcoxilo o halógeno, para dar el compuesto de fórmula (III), alternativamente su enantiómero (III'),

15



20

(III)

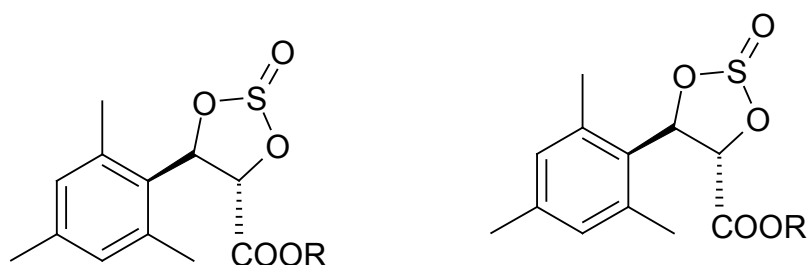
(III')

donde en las fórmulas (III), (III'), (IV) y (IV') R es (C₁-C₈)-alquilo.

25

7. Procedimiento de preparación estereoselectiva según la reivindicación 6, donde se hace reaccionar el compuesto de fórmula (V), alternativamente su enantiómero (V'),

30



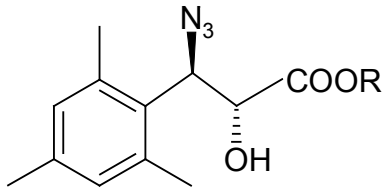
(V)

(V')

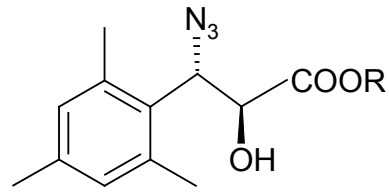
35

con una azida de metal alcalino o alcalinotérreo para dar el compuesto de fórmula (IV), alternativamente su enantiómero (IV'),

5



(IV)



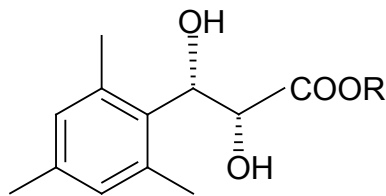
(IV')

donde en las fórmulas (IV), (IV'), (V) y (V') R es (C₁-C₈)-alquilo.

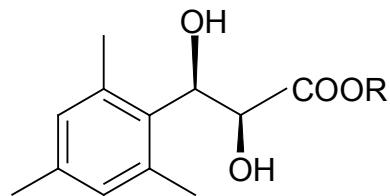
10

8. Procedimiento de preparación estereoselectiva según la reivindicación 7, donde el compuesto de fórmula (VI), alternativamente su enantiómero de fórmula (VI'),

15



(VI)

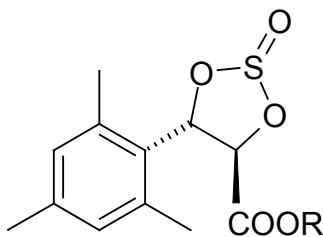


(VI')

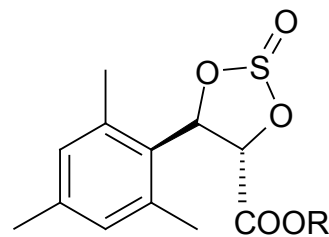
20

se hace reaccionar con un halogenuro de tionilo para dar el compuesto de fórmula (V), alternativamente su enantiómero (V'),

25



(V)



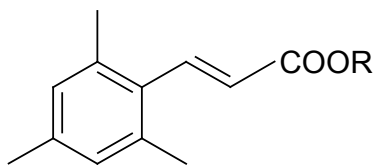
(V')

30

donde en las fórmulas (V), (V'), (VI) y (VI') R es (C₁-C₈)-alquilo.

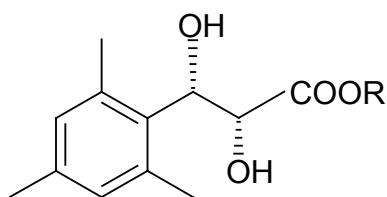
9. Procedimiento de preparación estereoselectiva según la reivindicación 8, donde el compuesto de fórmula (VII)

35

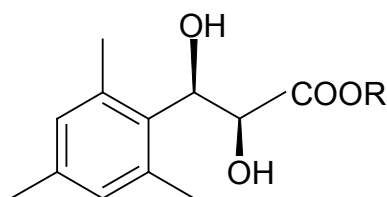


(VII)

5 se somete a una reacción de dihidroxilación asimétrica de Sharpless utilizando un ligando quiral apropiado para dar el compuesto de fórmula (VI), o alternativamente el compuesto de fórmula (VI'),



(VI)



(VI')

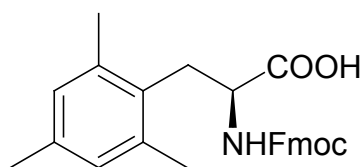
10

15 donde en las fórmulas (VI), (VI') y (VII) R es alquilo.

10. Procedimiento de preparación estereoselectiva según la reivindicación 9, donde el ligando quiral apropiado se selecciona del grupo formado por hidroquinina 1,4-ftalazinediil dieter ((DHQ)₂PHAL) para dar el compuesto de fórmula (VI) o hidroquinidina 1,4-ftalazinediil dieter ((DHQD)₂PHAL) para dar el compuesto de fórmula (VI').

11. Compuesto Fmoc-(L)-mesitilalanina de fórmula (Ip)

20



Ip

25

12. Compuesto Fmoc-(D)-mesitilalanina de configuración opuesta al compuesto de fórmula (Ip).

13. Procedimiento de preparación en fase sólida de péptidos con uno o más residuos de mesitilalanina, que comprende llevar a cabo el procedimiento de preparación estereoselectiva de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

30

14. Procedimiento de preparación en fase sólida de péptidos según la reivindicación 13, que comprende la utilización de un aminoácido N-protégido seleccionado del grupo formado por: Fmoc-(L)-mesitilalanina, Fmoc-(D)-mesitilalanina, Cbz-(L)-mesitilalanina, Cbz-(D)-mesitilalanina, alil-(L)-mesitilalanina, alil-(D)-mesitilalanina, 4-metoxibencil-(L)-mesitilalanina, 4-metoxibencil-(D)-mesitilalanina, 2,4-dimetoxibencil-(L)-mesitilalanina, 2,4-dimetoxibencil-(D)-mesitilalanina, bencil-(L)-mesitilalanina, y bencil-(D)-mesitilalanina.

35