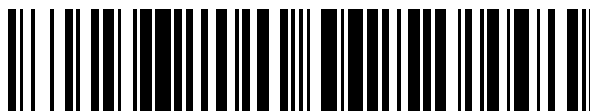


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 934**

51 Int. Cl.:

C07C 229/30 (2006.01)

C07C 227/16 (2006.01)

C07K 7/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2010** **E 10759663 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015** **EP 2493843**

54 Título: **Ácido 2-amino-3-metil-hex-5-enoico y su uso en la producción de péptidos tales como bacitracinas**

30 Prioridad:

28.10.2009 US 255521 P

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

16.02.2016

73 Titular/es:

XELLIA PHARMACEUTICALS APS (100.0%)
P.O. Box 1736
2300 København S, DK

72 Inventor/es:

MÅNSSON, MARTIN;
SENSTAD, CHRISTINE;
EFSKIND, JON y
BJØRNSTAD, VIDAR

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 559 934 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

Ácido 2-amino-3-metil-hex-5-enoico y su uso en la producción de péptidos tales como bacitracinas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos compuestos de aminoácidos.

Antecedentes de la invención

10

La mayoría de las proteínas se elaboran de 20 α -aminoácidos diferentes: Alanina, Arginina, Asparagina, Ácido aspártico, Cisteína, Glutamina, Glutamato, Fenilalanina, Glicina, Histidina, Isoleucina, Lisina, Leucina, Metionina, Prolina, Serina, Treonina, Triptófano, Tirosina, y Valina.

15

Sin embargo, hay muchos péptidos biológicamente activos que comprenden otros aminoácidos, tales como: Homocisteína, Ornitina, 4-hidroxiprolina, 5-Hidroxilisina, Selenocisteína, Formilmetionina, Fosfoserina, Acetilserina, Metilarginina, etc.

20

Los aminoácidos en configuración D son comunes en péptidos bacterianos sintetizados de manera no ribosomal y menos común en proteínas sintetizadas de manera ribosomal. Por ejemplo en las Bacitracinas sintetizadas de manera no ribosomal, los residuos de aminoácidos en posición 4, 7, 9 y 11 están usualmente en configuración D (Glu, Orn, Phe y Asp). Las bacitracinas son péptidos antibióticos producidos de manera natural por *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*. Se identificaron varias bacitracinas de las que la bacitracina A es de importancia primaria y es altamente activa (Biochemistry, vol. 39 núm. 14, 2000, página 4037-45 de Epperson y Ming). La estructura primaria de la

25

bacitracina A es $\text{NH}_2\text{-L-Ile}_1\text{-L-Tiazolina}_2\text{-L-Leu}_3\text{-D-Glu}_4\text{-L-Ile}_5\text{-L-Lys}_6\text{-D-Orn}_7\text{-L-Ile}_8\text{-D-Phe}_9\text{-L-His}_{10}\text{-D-Asp}_{11}\text{-L-Asn}_{12}\text{-COOH}$ que está ciclada entre el grupo ϵ -amino de L-Lys₆ y el grupo R-carboxilo de L-Asn₁₂.

Técnica anterior

30

Varios péptidos sintetizados de manera no ribosomal comprenden aminoácidos inusuales. Por ejemplo, la ciclosporina A comprende ácido 2(S)-amino-3(R)-hidroxi-4(R)-metilo-6(E)-octenoico que es crucial para la unión al receptor intracelular para ciclofilina, y por lo tanto para su actividad inmunosupresora (Journal of Biological Chemistry, vol. 268 núm. 35, 1993 de Offenzeller y otros).

35

Varios aminoácidos no comunes se asemejan a la estructura de la isoleucina:

El ácido 2-amino-5-metil-5-hexenoico, un nuevo análogo de la metionina, se aisló a partir de un caldo de fermentación de Streptomyces (Journal of Antibiotics vol. 32 núm. 11, páginas 1118-1124, 1979 de Takeuchi y otros).

40

- La 4 metilen-norleucina y el ácido 2-aminohept-6-enoico son compuestos con la fórmula: $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_2$.
- La 4 metil-norleucina es un derivado de isoleucina que puede incorporarse en una proteína recombinante. (J Pharm Biomed Anal, vol 31. núm. 5, 2003, página 979-987 de Muramatsu y otros).
- El ácido 2-amino-3-metil-4-pentenoico es un análogo de isoleucina insaturado que puede incorporarse en las proteínas (Chembiochem vol. 7 núm. 1, 2006, página 83-87 de Mock y otros).

45

- Las norleucinas no saturadas de Amanita solitaria. Estudios químicos y farmacológicos (Lloydia vol. 36 núm. 2, 1973, página 69-73 de Chilton y otros).
- Beta-metilnorleucina, un antimetabolito producido por *Serratia marcescens* (J Antibiot, vol. 34 núm. 10, 1981 página 1278-82 de Sugiura y otros)

50

- US6168912 describe diversos derivados alilo de aminoácidos para usar en una genoteca química combinatoria multidimensional.
- La alilglicina y crotilglicina se describen en Journal of Bacteriology, vol. 148 núm. 1, 1981 de Kunz y otros.

Resumen de la invención

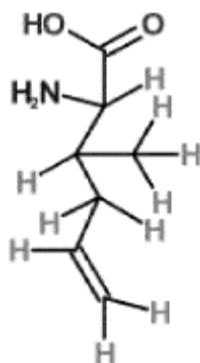
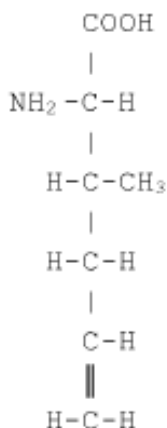
55

La invención se refiere al compuesto ácido 2-amino-3-metil-hex-5-enoico.

Aunque usamos el nombre ácido 2-amino-3-metil-hex-5-enoico, este cubre el mismo compuesto que el ácido 2-amino-3-metil-5-hexenoico.

60

La estructura de este aminoácido compuesto en su forma libre se representa por la Fórmula I:



o

Fórmula I:

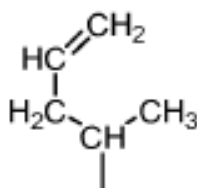
La Fórmula I no debe interpretarse como una proyección de Fischer, sino más bien como un compuesto sin especificación de estereoquímica.

El aminoácido de la Fórmula I comprende dos átomos de carbono quirales. La presente invención cubre los cuatro estereoisómeros del ácido 2-amino-3-metil-hex-5-enoico:

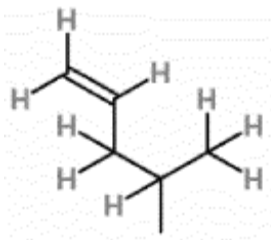
ácido (2S,3S)-2-amino-3-metil-hex-5-enoico,
 ácido (2R,3S)-2-amino-3-metil-hex-5-enoico,
 ácido (2S,3R)-2-amino-3-metil-hex-5-enoico, y
 ácido (2R,3R)-2-amino-3-metil-hex-5-enoico.

Además, la presente invención cubre la sales del ácido 2-amino-3-metil-hex-5-enoico.

Proponemos y usamos el nombre 5-metilen-isoleucina para el ácido 2-amino-3-metil-hex-5-enoico. Por lo tanto, la cadena lateral de la 5-metilen-isoleucina tiene la estructura $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ que se puede representar



o



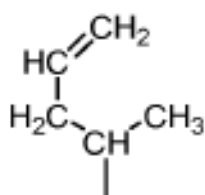
La invención involucra además el uso de la 5-metilen-isoleucina para producir Bacitracinas y un proceso para elaborar 5-metilen-isoleucina.

La 5-metilen-isoleucina se puede usar para la producción de Bacitracina J1, Bacitracina J2, Bacitracina J3, Bacitracina K1, Bacitracina K2, Bacitracina K3 y Bacitracina L.

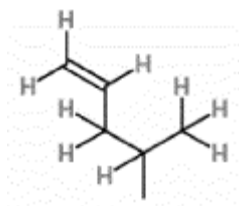
Los aspectos de la invención se pueden obtener por las características que se exponen en la siguiente descripción de la invención y/o las reivindicaciones de la patente adjuntas.

Descripción detallada de la invención

Algunas Bacitracinas altamente activas comprenden la cadena lateral de un aminoácido no común que tiene la siguiente estructura:



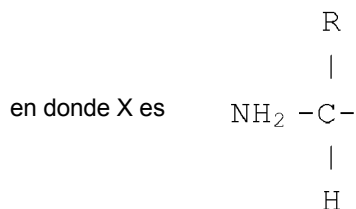
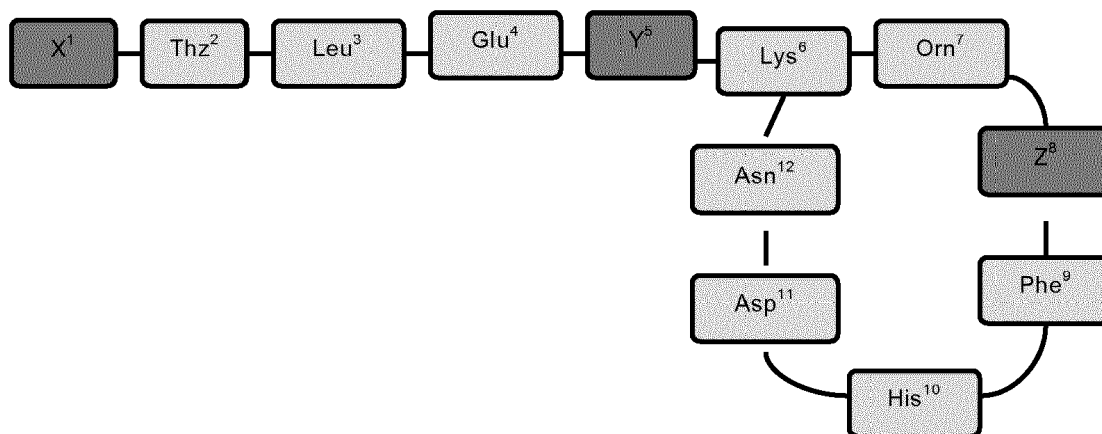
o



Hemos propuesto y usado los nombres Bacitracina J, K o L para las Bacitracinas que comprenden la estructura anterior. Las estructuras de estas Bacitracinas se representan en las Figuras 1A-G.

Definiciones

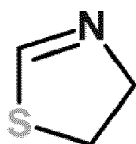
Las "Bacitracinas" son compuestos peptídicos que comprenden la siguiente estructura (con la numeración del residuo de aminoácido superíndice):



y, en donde R es la cadena lateral del residuo de aminoácido de isoleucina, valina o 5-metilen-isoleucina;

y en donde
Y y Z son independientemente
el residuo de aminoácido de
isoleucina, valina o 5-metilen-isoleucina;

y en donde
Thz es un anillo de tiazolina



2' acoplado a X y 4' acoplado al carbono α en Leu;

5 y en donde

Leu es un residuo de aminoácido de leucina

Glu es un residuo de aminoácido de glutamina

Lys es un residuo de aminoácido de lisina que forma enlaces peptídicos con Y y Orn mientras que su ϵ -amina se acopla al grupo α -carboxilo de asparagina mediante un enlace peptídico.

10 Orn es un residuo de aminoácido de ornitina

Phe es un residuo de aminoácido de fenilalanina

His es un residuo de aminoácido de histidina

Asp es un residuo de aminoácido de ácido aspártico

15 Asn es un residuo de aminoácido de asparagina que forma enlaces peptídicos con Asp mientras que su grupo α -carboxilo se acopla a la ϵ -amina de lisina mediante un enlace peptídico.

20 Cuando se usa en esta solicitud; "Bacitracinas" pretende abarcar cualquier compuesto que tenga la estructura primaria anterior sin tener en cuenta el método de producción. Así, el término "Bacitracinas" incluye los compuestos antibióticos que se producen de manera natural por *Bacillus licheniformis* pero además compuestos producidos *in vitro* (sintéticos) y compuestos semisintéticos que tienen la estructura primaria anterior. "Bacitracinas" además pretende abarcar cualquier compuesto que tenga la estructura primaria anterior sin tener en cuenta la carga que varía con el pH. "Bacitracinas" además pretende abarcar cualquier compuesto que tenga la estructura primaria anterior sin tener en cuenta la estereoquímica. "Bacitracinas" además pretende abarcar sales e hidratos de los compuestos que tengan la estructura primaria anterior.

25 "Bacitracinas que comprenden al menos un residuo de 5-metilen-isoleucina" pretende abarcar cualquier Bacitracina que comprende la estructura que se generaría si un residuo(s) de isoleucina o valina se sustituyera con residuo(s) de 5-metilen-isoleucina en las posiciones 1 y/o 5 y/u 8.

30 Cuando el grupo amino N-terminal y/o el anillo tiazolina de las Bacitracinas se oxida, se pierde una cantidad sustancial de actividad antibacteriana. Por ejemplo, el compuesto de baja actividad Bacitracina F, comprende una porción ceto-tiazol en lugar de la porción amino-tiazolina (J. Org. Chem, vol. 22, 1957, página 1345-1353 de Craig y otros).

35 "Aminoácido" es cualquier compuesto que comprende tanto un grupo amina como uno carboxilo. La mayoría de las proteínas se construyen como un polímero lineal de 20 α -aminoácidos estándar diferentes en configuración L: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, glutamato, fenilalanina, glicina histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina.

40 Un "residuo de aminoácido" es la unidad en un péptido que comprende

-NH-CHR-COOH (C-terminal)

o

NH₂-CHR-CO- (N-terminal)

o

-NH-CHR-CO- (interno)

45 en donde R es

H en glicina,

CH₃ en alanina,

OH en serina,

CH₂SH en cisteína,

50 CH(CH₃)CH₂CH₃ en isoleucina,

CH₂CH(CH₃)₂ en leucina

CH(CH₃)₂ en valina

etc.

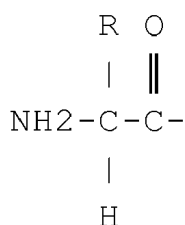
55 Una "cadena lateral de aminoácido" es el grupo R de un "residuo de aminoácido". Por ejemplo, el grupo R es CH(CH₃)CH₂CH₃ en isoleucina, CH₂CH(CH₃)₂ en leucina CH(CH₃)₂ en valina

60 "Actividad antibacteriana" es cualquier actividad que inhibe el crecimiento, metabolismo o reproducción de bacterias, o aumenta la mortalidad de bacterias, o reduce la patogenicidad de bacterias.

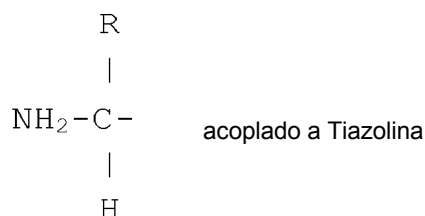
Las "posiciones" de los residuos de aminoácidos en las Bacitracinas se numeran a partir del N-terminal que puede ser

isoleucina, valina o 5-metilen-isoleucina en posición 1 (el extremo izquierdo en todas las figuras que muestran Bacitracinas en esta solicitud). De aquí que, Lys está en la posición número 6 y Asn está en la posición número 12.

En las Bacitracinas, la "posición 1" es especial, porque este residuo de aminoácido se incorpora parcialmente dentro del anillo Tiazolina. Así el residuo de aminoácido en posición 1 en las Bacitracinas no comprende la unidad N-terminal usual:



pero comprende en su lugar:



Una "composición" es cualquier mezcla que comprende más de dos compuestos diferentes, por ejemplo, una mezcla de dos ingredientes farmacéuticos activos, o una mezcla de un ingrediente farmacéutico activo y uno o más excipientes farmacéuticos.

Una "composición farmacéutica" es cualquier composición adecuada para usar *in vivo*. Tales composiciones pueden así administrarse de manera cutánea, de manera subcutánea, de manera intravenosa, de manera parenteral etc.

La 5-metilen-isoleucina comprende dos átomos de carbono quirales que pueden estar independientemente en configuración R o S.

Las Bacitracinas que comprenden al menos un residuo 5-metilen-isoleucina en las posiciones 1, 5 u 8 se pueden usar para inhibir el crecimiento bacteriano no deseado tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos compuestos pueden así tener efecto terapéutico si se administran a un animal o un humano con una infección bacteriana.

La invención involucra el compuesto 5-metilen-isoleucina que se puede usar para la producción de nuevas Bacitracinas; por ejemplo por la síntesis *in vitro* de las Bacitracinas J1-3, K1-3 o L.

Al sustituir isoleucina o valina con 5-metilen-isoleucina en los métodos descritos en J Org Chem, vol. 61 núm. 12, 1996, página 3983-3986 de Lee y otros o documento WO199747313, se pueden producir Bacitracinas con actividad antibacteriana.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A muestra la estructura de Bacitracina con un residuo 5-metilen-isoleucina en la posición 5 (= Bacitracina J1)

La Figura 1B muestra la estructura de Bacitracina con un residuo 5-metilen-isoleucina en la posición 8 (= Bacitracina J2)

La Figura 1C muestra la estructura de Bacitracina con un residuo 5-metilen-isoleucina en la posición 1 (= Bacitracina J3)

La Figura 1D muestra la estructura de Bacitracina con residuos 5-metilen-isoleucina en las posiciones 5 y 8 (= Bacitracina K1)

La Figura 1E muestra la estructura de Bacitracina con residuos 5-metilen-isoileucina en las posiciones 1 y 5 (= Bacitracina K2)

La Figura 1F muestra la estructura de Bacitracina con residuos 5-metilen-isoileucina en las posiciones 1 y 8 (= Bacitracina K3)

La Figura 1G muestra la estructura de Bacitracina con residuos 5-metilen-isoileucina en las posiciones 1 y 5 (= Bacitracina L)

La Figura 2 muestra una vía para la producción de 5-metilen-isoileucina como se describe en los ejemplos.

La invención se define por las reivindicaciones y no por los siguientes ejemplos ilustrativos:

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

Metil éster del ácido(2S,3R)- 2-(1,3-Dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-3-metil-hex-5-enoico y metil éster del ácido (2S,3S)-2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-3-metil-hex-5-enoico bromuro de Vinilmagnesio en THF (1,0 M, 83,64 mL, 83,64 mmol) se añaden a una mezcla enfriada previamente (-10 °C) de (2S, 3S) y (2S, 3R)-4-yodo-N-ftaloilvalina metil éster (26,96 g, 69,68 mmol), CuCl₂ (0,47 g, 3,5 mmol), LiCl seco (0,29 g, 7,0 mmol) en THF (100 mL). La mezcla de reacción se agita durante la noche a esta temperatura. La mezcla de reacción se añade a una solución de cloruro de amonio saturada (aq) (300 mL). Las fases se separan y la fase acuosa se extrae con éter dietílico (3 x 100 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con salmuera saturada (100 mL), se secan (MgSO₄) y los solventes se eliminan a presión reducida. Se aíslan 10 g de la mezcla de productos. Los productos (2S,3S) y (2S,3R) se separan por cromatografía en columna.

Ejemplo 2:

Ácido (2S,3R)-2-amino-3-metil-hex-5-enoico

Metil éster del ácido(2S,3R)- 2-(1,3-Dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-3-metil-hex-5-enoico (2,01 g, 7,00 mmol) se disuelve en una mezcla 2:1 de ácido clorhídrico 6N y ácido acético glacial (62,5 mL), y la solución se calienta a reflujo durante 4 h. La solución se enfría a temperatura ambiente y se concentra a presión reducida. El producto se saca en agua y la solución se filtra. El filtrado se concentra a presión reducida y el residuo se disuelve en agua, después la solución se aplica a una columna de resina de intercambio catiónico de amberlita IR 120 (forma NH₄⁺). La columna se lava con agua (2,5 L), después se eluye con solución de amoníaco acuosa (2,5 L). El eluato se hierve hasta que no se detecta amoníaco, después se concentra a presión reducida lo que produce el compuesto del título (0,5 g, 3,50 mmol).

Ejemplo 3:

Ácido (2S,3S)-2-amino-3-metil-hex-5-enoico

Metil éster del ácido (2S,3S)- 2-(1,3-Dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-3-metil-hex-5-enoico (2,01 g, 7,00 mmol) se disuelve en una mezcla 2:1 de ácido clorhídrico 6N y ácido acético glacial (62,5 mL), y la solución se calienta a reflujo durante 4 h. La solución se enfría a temperatura ambiente y se concentra a presión reducida. El producto se recoge en agua y la solución se filtra. El filtrado se concentra a presión reducida y el residuo se disuelve en agua, después la solución se aplica a una columna de resina de intercambio catiónico de amberlita IR 120 (forma NH₄⁺). La columna se lava con agua (2,5 L), después se eluye con solución de amoníaco acuosa (2,5 L). El eluato se hierve hasta que no se detecta amoníaco, después se concentra a presión reducida lo que produce el compuesto del título (0,5 g, 3,50 mmol).

Ejemplo 4:

Metil éster del ácido (2R,3R)- 2-(1,3-Dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-3-metil-hex-5-enoico y metil éster del ácido (2R,3S)-2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-3-metil-hex-5-enoico.

El bromuro de vinilmagnesio en THF (1,0 M, 83,64 mL, 83,64 mmol) se añade a una mezcla enfriada previamente (-10 °C) de (2S,3S) y (2S, 3R)-4-yodo-N-ftaloilvalina metil éster (26,96 g, 69,68 mmol), CuCl₂ (0,47 g, 3,5 mmol), LiCl seco (0,29 g, 7,0 mmol) en THF (100 mL). La mezcla de reacción se agita durante la noche a esta temperatura. La mezcla de reacción se añade a una solución de cloruro de amonio saturada (aq) (300 mL). Las fases se separan y la fase acuosa se extrae con éter dietílico (3 x 100 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con salmuera saturada (100 mL), se secan (MgSO₄) y los solventes se eliminan a presión reducida. Se aíslan 10 g de la mezcla de productos. Los productos (2R,3S) y (2R,3R) se separan por cromatografía en columna

Ejemplo 5:

Ácido (2*R*,3*R*)-2-Amino-3-metil-hex-5-enoico

- 5 Metil éster del ácido (2*R*,3*R*)-2-(1,3-Dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-3-metil-hex-5-enoico (2,01 g, 7,00 mmol) se disuelve en una mezcla 2:1 de ácido clorhídrico 6N y ácido acético glacial (62,5 mL), y la solución se calienta a reflujo durante 4 h. La solución se enfría a temperatura ambiente y se concentra a presión reducida. El producto se saca en agua y la solución se filtra. El filtrado se concentra a presión reducida y el residuo se disuelve en agua, después la solución se aplica a una columna de resina de intercambio catiónico de amberlita IR 120 (forma NH_4^+). La columna se lava con agua
- 10 (2,5 L), después se eluye con solución de amoníaco acuosa (2,5 L). El eluato se hierve hasta que no se detecta amoníaco, después se concentra a presión reducida lo que produce el compuesto del título (0,5 g, 3,50 mmol).

Ejemplo 6:

- 15 Ácido (2*R*,3*S*)-2-Amino-3-metil-hex-5-enoico

- Metil éster del ácido (2*R*,3*S*)-2-(1,3-Dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-3-metil-hex-5-enoico (2,01 g, 7,00 mmol) se disuelve en una mezcla 2:1 de ácido clorhídrico 6N y ácido acético glacial (62,5 mL), y la solución se calienta a reflujo durante 4 h. La solución se enfría a temperatura ambiente y se concentra a presión reducida. El producto se saca en agua y la
- 20 solución se filtra. El filtrado se concentra a presión reducida y el residuo se disuelve en agua, después la solución se aplica a una columna de resina de intercambio catiónico de amberlita IR 120 (forma NH_4^+). La columna se lava con agua (2,5 L), después se eluye con solución de amoníaco acuosa (2,5 L). El eluato se hierve hasta que no se detecta amoníaco, después se concentra a presión reducida lo que produce el compuesto del título (0,5 g, 3,50 mmol).

25

REIVINDICACIONES

1. El compuesto ácido 2-amino-3-metil-hex-5-enoico o sales de este.
- 5 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene configuración (2*S*,3*S*).
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene configuración (2*R*,3*S*).
- 10 4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene configuración (2*S*,3*R*).
5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene configuración (2*R*,3*R*).
6. Uso del ácido 2-amino-3-metil-hex-5-enoico para la producción de un péptido.
- 15 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el péptido es una bacitracina.
8. Una composición que comprende ácido 2-amino-3-metil-hex-5-enoico.
- 20 9. Método para producir ácido 2-amino-3-metil-hex-5-enoico, que comprende un acoplamiento cruzado de un agente de Grignard de vinilo con un halogenuro de alquilo.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, donde la reacción se cataliza por Li₂CuCl₄.
- 25 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, donde el halogenuro de alquilo es 4-yodo-*N*-ftaloilvalina metil éster.

Figura 1A

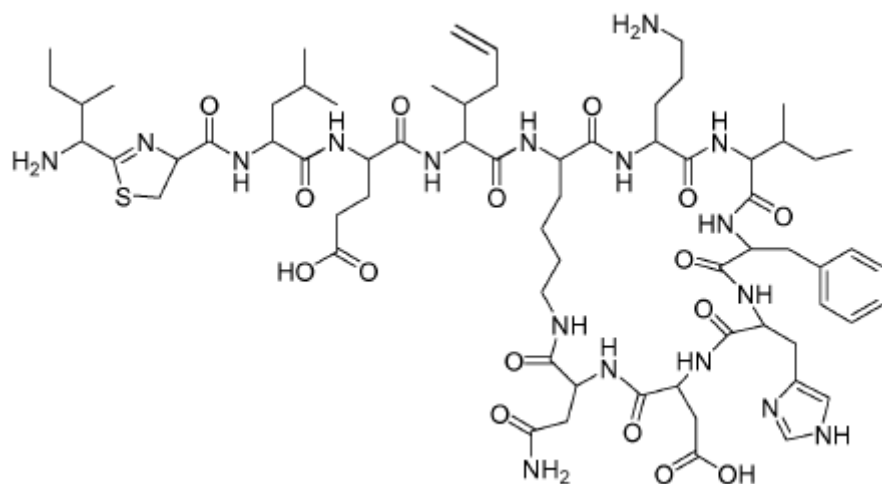


Figura 1B

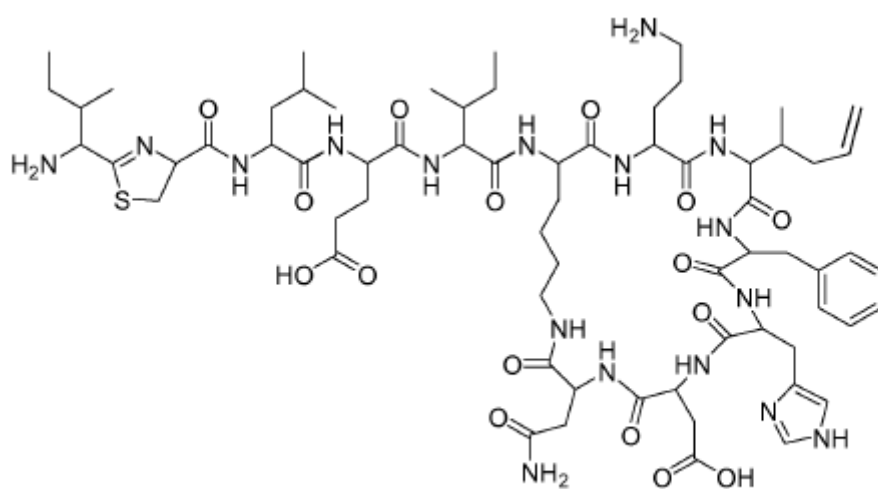


Figura 1C

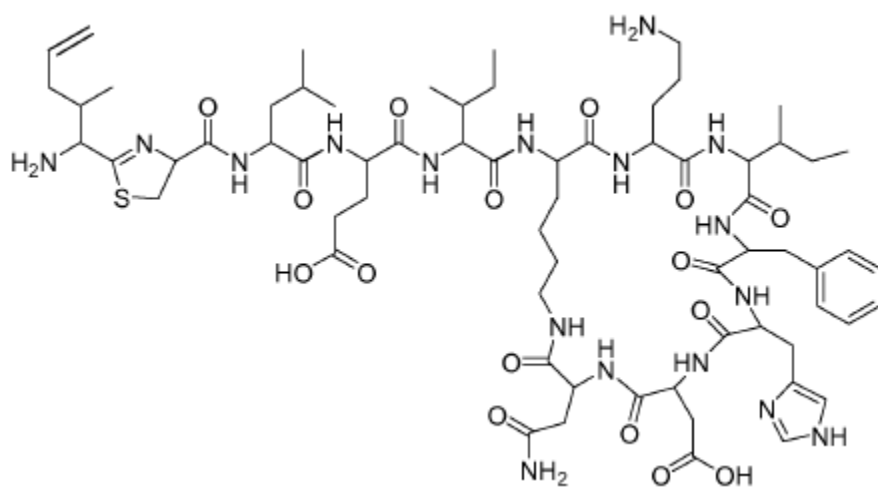


Figura 1D

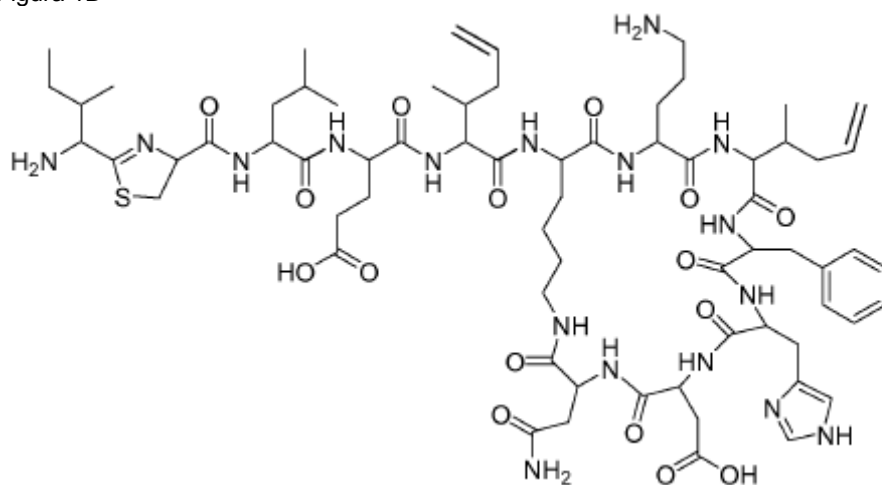


Figura 1E

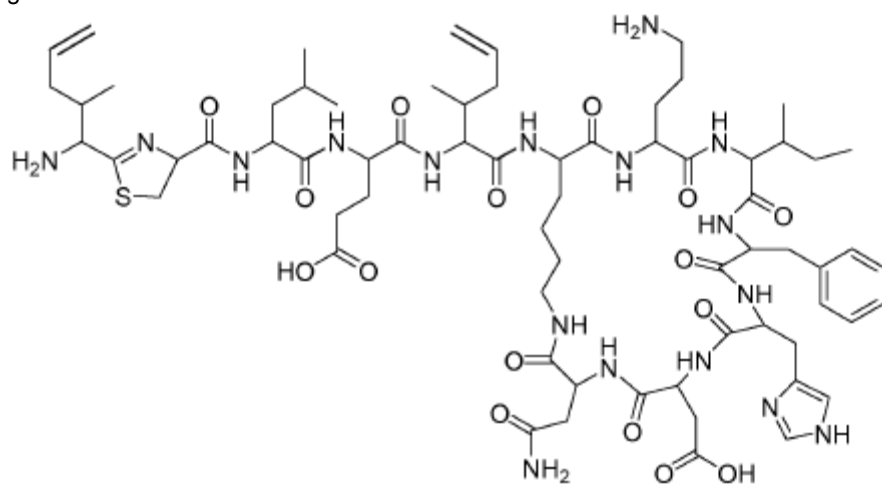


Figura 1F

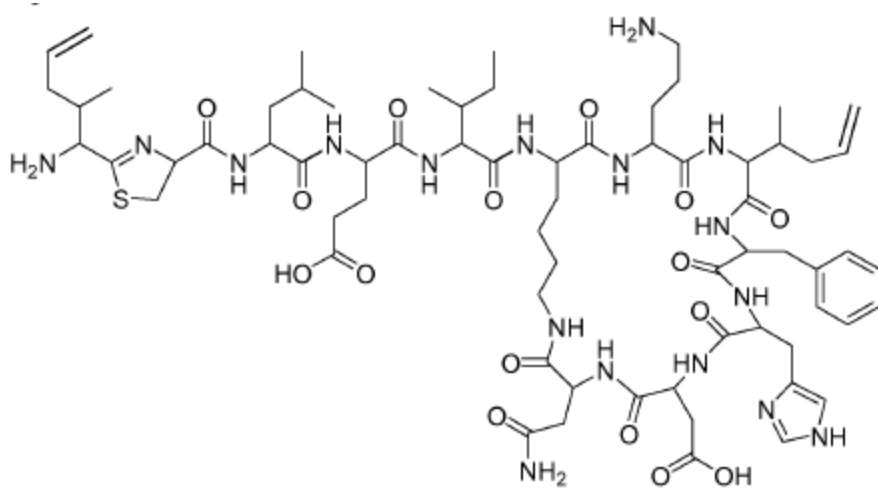


Figura 1G

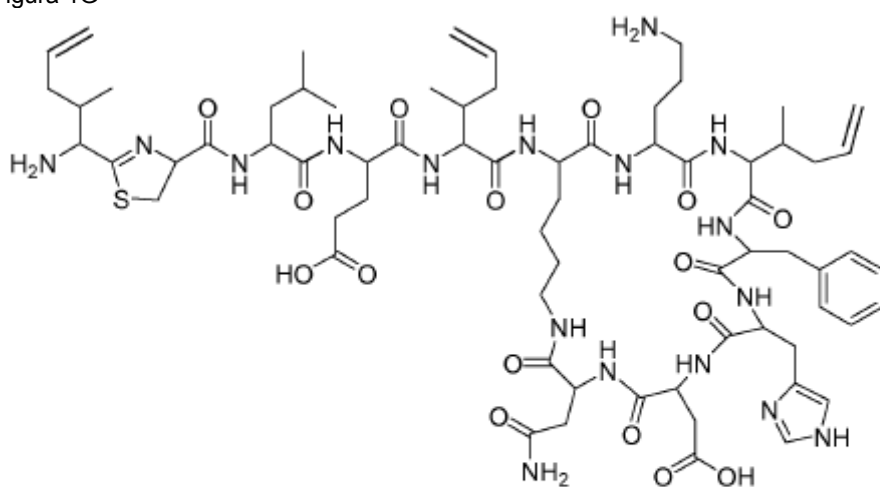


Figura 2

