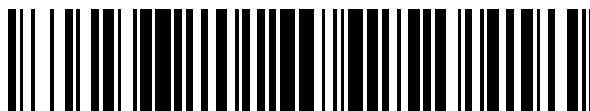


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 884**

51 Int. Cl.:

C07C 271/22 (2006.01)

C07C 229/24 (2006.01)

C07K 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014** **E 14003926 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016** **EP 2886531**

54 Título: **Derivados de ácido aspártico**

30 Prioridad:

19.12.2013 EP 13005920

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

16.11.2016

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**BEHRENDT, RAYMOND;
WILLIBALD, JULIAN y
WHITE, PETER**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 589 884 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

Derivados de ácido aspártico

Campo de la invención

5 La presente invención está dirigida a derivados de ácido aspártico con un nuevo tipo de grupo protector de cadena lateral. La presente invención está dirigida además a métodos de su preparación y su uso en síntesis de péptidos en fase sólida a base de Fmoc así como la síntesis de péptidos en solución a base de Z/tBu. El uso de derivados de ácido aspártico de acuerdo con la presente invención conduce a la minimización de formación de aspartimida catalizada por base durante la síntesis de péptidos y soporta la prevención de impurezas derivadas de aspartimida.

Fundamento de la invención

10 Los péptidos pueden ser fabricados por síntesis en fase sólida. Una aproximación ampliamente usada de fabricación de péptidos es la síntesis de péptidos en fase sólida a base de Fmoc/tBu (Fmoc SPPS), que involucra el uso de protección con 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) para los bloques de construcción de alfa aminoácido. Con ello se protegen los grupos funcionales de cadena lateral en aminoácidos trifuncionales, mediante grupos que son lábiles a los ácidos como ésteres de *tert*-butilo, dejando abierto sólo el extremo C para elongación gradual
15 específica de cadena de péptidos. Para ensamblar el péptido del extremo C al extremo N, se inmoviliza el primer aminoácido terminal en C sobre un soporte sólido, como una resina de poliestireno entrecruzado. Un ciclo que puede ser automatizado de eliminación de la protección de Fmoc y formación de enlace péptido facilita el ensamblaje del péptido. Se aseguran las conversiones completas en la formación de enlace amida, mediante un exceso del aminoácido Fmoc y reactivo de acoplamiento in-situ (véase Sheppard. R.C. J. Peptide Sci., 9:545-
20 552(2003)).

Además, los péptidos pueden ser fabricados a través de síntesis convergente. Mediante Fmoc SPPS se ensamblan fragmentos de péptidos que tienen en su mayoría seis a diez aminoácidos de longitud o alternativamente en solución donde se usa predominantemente la protección (Z) benciloxicarbonilo del extremo N.

25 Entre todas las reacciones laterales en la Fmoc SPPS así como en la síntesis en solución a base de Z, la aparición de aspartimida es uno de los problemas más severos (véase Subirós-Funosas R. et al., Tetrahedron, 67:8595-8606 (2011)). En secuencias susceptibles, ocurre en todos los pasos precedentes de eliminación de protección con Fmoc y formaciones de enlace amida que usan catálisis de amina terciaria después de la introducción de ácido aspártico. De ese modo conduce a una acumulación significativa de subproductos relacionados. La aspartimida es generada por formación de ciclo catalizada por base, de grupo carboxílico de cadena lateral con el nitrógeno de amida
30 terminal en C. La apertura de anillo del fragmento de succinimida es acompañada entonces por la epimerización y beta-isomerización que forman ocho subproductos bien sea a través de su hidrólisis o adición de piperidina (figura 1). Todos estos subproductos son modificaciones del núcleo de péptido y están presentes en el péptido deseado así como en cualquier eliminación o secuencias truncadas que contienen la cadena lateral de ácido aspártico. De ese modo se forma una mezcla compleja de impurezas de péptidos que impone dificultades para la separación del
35 compuesto deseado. En solución esta reacción lateral ocurre solamente durante la formación de enlaces amida que usa catálisis con amina terciaria (véase Martínez, J.; Bodanszky M., Int. J. Pept. Protein Res., 12:277-283 (1978)).

Las secuencias particularmente susceptibles a la formación de aspartimida son -Asp-Gly-, Asp-Asp-, -Asp-Asn-, -Asp-Arg- y Asp-Cys- (véase Mergler M., et al., J. Peptide Sci., 9: 518-526 (2003)). Mientras para cualquier otra secuencia puede ser suficiente el derivado estándar Fmoc-Asp(OtBu)-OH, el mejor derivado de Fmoc-Asp(OMpe)-OH (véase Karlström, A. et al., Tetrahedron Letters, 37:4243-4246 (1996)) disponible en el mercado actualmente, no es aun suficientemente protector contra la formación de aspartimida en las secuencias arriba mencionadas.

La aplicación de calentamiento con microondas a SPPS es particularmente ventajosa para péptidos largos o susceptibles a agregación, en la medida que la aceleración del acoplamiento y reacción de eliminación de protección conduce a menores tiempos de ciclo, rendimientos mayores repetitivos y en últimas péptidos más puros
45 (véase Pedersen L., et al., Chem. Soc. Rev., 41:1826-1844 (2012)). Sin embargo, el uso de energía de microondas conduce también a aumento en los niveles de subproductos típicos de SPPS incluyendo formación de aspartimida, la cual puede ser limitada sólo mediante uso rutinario de métodos optimizados (véase Palasek S.A., et al., J. Peptide Sci., 13,143-148 (2007)).

50 El documento WO 95/26975 divulga grupos alquilo alifáticos ramificados como constituyentes de grupos protectores para cadenas laterales de aminoácidos. Es base de ésta aproximación la generación de grupos protectores voluminosos, estéricamente demandantes para evitar reacciones laterales como la formación de aspartimida. Pero estos grupos protectores nunca ganaron mucho interés en la medida en que, debido al grupo estéricamente demandante, también se reduce la reactividad de los aminoácidos protegidos en la síntesis de péptido. También Mergler M., et al., J. Peptide Sci., 9: 518-526 (2003) discuten el uso de grupos alquilo voluminosos para protección

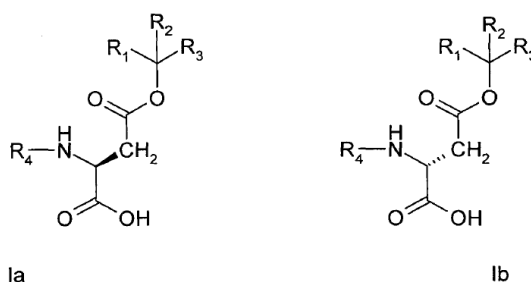
de cadena lateral de ácido aspártico, pero concluyen que no puede lograrse una supresión total de la formación de aspartimida mediante el simple incremento del volumen de la protección de la cadena lateral.

Un ejemplo de una familia de péptidos terapéuticamente importantes que sufre de niveles significativos de formación de aspartimida son los péptidos 2(GLP-2) similares a glucagón, y sus análogos relacionados (WO 2012/028602). Estos péptidos son sugeridos para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, osteoporosis y como terapia adyuvante en quimioterapia. El ejemplo más prominente es Revestive® (teduglutide) que es usado para el tratamiento de síndrome de intestino corto. Los análogos de GLP-2 como Revestive® son fabricados actualmente de manera recombinante y sería una alternativa interesante un método efectivo de producción por síntesis, para reducir los costos de producción y omitir los materiales de partida derivados de animales así como para reducir la carga de endotoxinas. Sin embargo, estos péptidos contienen una secuencia Asp-Gly así como una Asp-Asn, que reduce su accesibilidad sintética, debida a los subproductos derivados de aspartimida (véase WO 2012/028602).

Claramente, el problema de aspartimida aún impone inconvenientes a la síntesis de péptidos y persiste una necesidad en la técnica por un grupo protector versátil y eficiente de la cadena lateral de ácido aspártico que prevenga esta reacción lateral, y es una causa legítima de preocupación el que terapéuticos importantes de péptidos encuentran severas dificultades en su producción sintética. Se ha hallado que los grupos de protección de cadena lateral de ácido aspártico que tienen un átomo de carbono terciario enlazado a O con sólo sustituyentes alifáticos lineales, pueden ser usados eficientemente para síntesis de péptidos. De manera sorprendente, este tipo de grupos protectores combina el impedimento efectivo de la reacción lateral con la elevada reactividad de ácido aspártico protegido en síntesis de péptidos.

Resumen de la invención

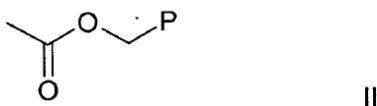
La presente invención se dirige por ello a compuestos de las fórmulas la y/o lb



en las que R_1 , R_2 , R_3 representan, independientemente uno de otro, una cadena de hidrocarburo lineal con una longitud de dos a seis átomos de carbono, por ejemplo $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

R_4 representa un grupo benciloxycarbonilo o un 9-fluorenil metiloxycarbonilo o H.

La fórmula II muestra los grupos benciloxycarbonilo o un 9-fluorenil metiloxycarbonilo.



En la fórmula II, P representa un grupo fenilo o 9-fluorenilo.

Las dos fórmulas la y lb representan los enantiómeros D y el L (R y S) de ácido aspártico. El compuesto puede ser bien sea el enantiómero D puro o el enantiómero L puro o una mezcla de los enantiómeros D y L. Se prefiere el enantiómero L.

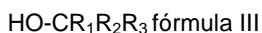
En una realización preferida R_1 , R_2 , R_3 tienen todos el mismo número de átomos de carbono.

En otra realización preferida R_1 , R_2 , R_3 son $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ o $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

La presente invención está dirigida además a un método para fabricar los compuestos de la fórmula la y/o lb mediante

a) suministro de un ácido aspártico con grupos protectores que pueden ser sometidos a hidrogenólisis en los extremos N y C

b) esterificación del ácido carboxílico de cadena lateral con el alcohol terciario de acuerdo a la fórmula III



5 en la que R₁, R₂, R₃ representan, independientemente uno de otro, una cadena de hidrocarburo lineal con una longitud de dos a seis átomos de carbono, por ejemplo -CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃

c) hidrogenólisis de los grupos protectores que pueden ser sometidos a hidrogenólisis en los extremos N y C

d) introducción de un grupo fluorenilmetoxicarbonilo o un benciloxicarbonilo en el extremo N.

En una realización preferida, la esterificación del paso b) es ejecutada con una carbodiimida, preferiblemente dicitlohexilcarbodiimida.

10 La presente invención está dirigida además a un método para la síntesis de péptidos por

a) suministro de un aminoácido o un péptido unido a una fase sólida a través de su extremo C

b) reacción del aminoácido o péptido unido a la fase sólida del paso a) con un compuesto de la fórmula la y/o Ib en la que el compuesto de la fórmula la y/o Ib está unido al extremo N.

c) escisión del grupo Fmoc mediante tratamiento alcalino.

15 En una realización preferida, el tratamiento alcalino del paso c) es ejecutado con una o más aminas secundarias, preferiblemente piperidina, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), pirrolidina y/o dietilamina.

20 En una realización muy preferida, el tratamiento alcalino del paso c) es ejecutado con una mezcla que comprende una o más aminas secundarias y un ácido orgánico o preferiblemente un alcohol ácido, por ejemplo etilcianoglixilato-2-oxima. La concentración del ácido orgánico o el alcohol ácido debería ser elegida tal que es subestequiométrica comparada con las aminas secundarias.

En otra realización preferida, la reacción en el paso b) es ejecutada en presencia de HBTU, TBTU, HATU, TATU, HCTU, TCTU y/o PyBOP.

Figuras

Figura 1. Mecanismo de la formación de subproductos derivados de aspartimida.

25 Figuras 2-7 muestran trazas por HPLC y UPLC relacionadas con los ejemplos.

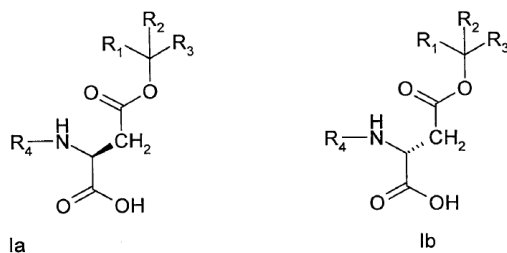
Definiciones

30 De acuerdo con la presente invención, un ácido orgánico es un compuesto orgánico con propiedades ácidas. Los ácidos orgánicos más comunes son los ácidos carboxílicos, cuya acidez está asociada con su grupo carboxilo -COOH. Los ácidos sulfónicos que contienen el grupo -SO₂OH son ácidos relativamente fuertes. Los alcoholes, con -OH, pueden actuar como ácidos pero ellos son usualmente muy débiles. La estabilidad relativa de la base conjugada del ácido determina su acidez. Otros grupos pueden conferir también acidez, usualmente débilmente: el grupo tiol -SH, el grupo enol y el grupo fenol. Los ácidos orgánicos preferidos de acuerdo con la presente invención son alcoholes ácidos.

35 Un alcohol ácido de acuerdo con la presente invención es un alcohol con un grupo OH que puede actuar de modo ácido. Son ejemplos (Z)-etil cianoglixilato-2-oxima (*Oxyma Pure*), N-hidroxibenzotriazoles y fenoles.

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención suministra derivados de ácido aspártico para la síntesis de péptidos bien sea en solución o sobre un soporte sólido. La protección de cadena lateral comprende un alcohol terciario enlazado como éster, que tiene un átomo de C terciario, con cadenas rectas de hidrocarburo con dos a seis átomos de carbono. Los derivados de ácido aspártico protegido en la cadena lateral de acuerdo con la presente invención, son mostrados en la fórmula la y Ib



en las que

5 R_1, R_2, R_3 representan, independientemente uno de otro, una cadena de hidrocarburo lineal con una longitud de dos a seis átomos de carbono, por ejemplo $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

R_4 representa un grupo benciloxicarbonilo o un 9-fluorenilmetoxicarbonilo o H.

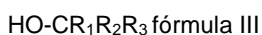
Las dos fórmulas la y lb representan los enantiómeros D y L (R y S) de ácido aspártico. Los enantiómeros pueden ser usados como compuesto D o L puro o como una mezcla.

10 Se ha hallado que es favorable si R_1, R_2 y R_3 tienen el mismo número de átomos de carbono. Eso significa que todas las tres cadenas de alquilo tienen la misma longitud.

Se ha hallado además que incluso pueden alcanzarse muy buenos resultados respecto a la supresión de la formación de aspartimida cuando se usan cadenas comparativamente cortas con longitudes de dos o tres átomos de carbono. Preferiblemente R_1, R_2 y R_3 son $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ o R_1, R_2 y R_3 son $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$.

15 La presente invención está dirigida además a un método para fabricar los compuestos de la fórmula la y/o lb. Esto es hecho preferiblemente suministrando primero un ácido aspártico con grupos protectores en los extremos N y C, que pueden ser sometidos a hidrogenólisis. Por ejemplo, son grupos protectores adecuados para los extremos N y C, benciloxicarbonilo (Z) y bencilo respectivamente. Una persona experta en la técnica conoce como introducir tales grupos protectores. En el ejemplo 1 y 2 puede encontrarse mayor información.

20 En un paso siguiente se hace reaccionar el ácido carboxílico de cadena lateral del derivado de ácido aspártico del paso a), con un alcohol terciario de acuerdo con la fórmula III



en la que R_1, R_2, R_3 representan, independientemente uno de otro, una cadena de hidrocarburo lineal con una longitud de dos a seis átomos de carbono, por ejemplo $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$.

25 En este paso se introduce el grupo protector de cadena lateral. En una realización preferida, el paso de esterificación es ejecutado con derivados de acil urea de carbodiimidas, preferiblemente dicitohexilcarbodiimida o diisopropilcarbodiimida en la presencia de N,N-dimetilaminopiridina (véase Neises, B. y Steglich, W. *Angew. Chem.-Int. Ed.*, 17:522-524 (1978)). Después de la introducción del grupo protector de cadena lateral de acuerdo con la presente invención, los grupos protectores en los extremos N y C que pueden ser sometidos a hidrogenólisis, son escindidos por hidrogenólisis. Este paso es conocido por una persona experta en la técnica. Es ejecutado típicamente con hidrógeno y un catalizador de Pd/C. Para uso del derivado de ácido aspártico en síntesis de péptidos, finalmente se introduce un grupo fluorenilmetoxicarbonilo o benciloxicarbonilo en el extremo N. También la introducción de tales grupos protectores es conocida por una persona experta en la técnica de síntesis de péptidos. Típicamente es hecha por activación con N- hidroxisuccinimida, usando Fmoc-OSu o Z-OSu.

35 Los derivados de ácido aspártico protegido en la cadena lateral de acuerdo con la presente invención, pueden ser usados entonces para síntesis de péptidos en fase líquida o sólida. Ellos son usados típicamente de la misma manera que por ejemplo derivados de ácido aspártico protegidos en la cadena lateral por tBu. La síntesis de péptidos en fase sólida es hecha preferiblemente de acuerdo con la estrategia Fmoc/tBu (Atherton E., et al., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 539 (1978)).

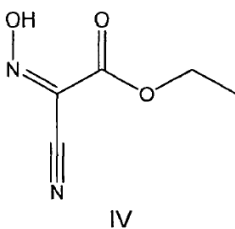
40 Para síntesis en fase sólida, los derivados de ácido aspártico protegido en la cadena lateral de acuerdo con la presente invención, pueden ser usados por ejemplo como sigue: en un primer paso, se suministra un aminoácido o péptido unido a una fase sólida a través de su extremo C. Después se hace reaccionar el aminoácido o péptido unido a una fase sólida del paso a), con compuestos de la fórmula la y/o lb, en la que los compuestos de la fórmula la y/o lb están unidos al extremo N. En una realización preferida, esta reacción es ejecutada en presencia de HBTU,

TBTU, HATU, TATU, HCTU, TCTU o PyBOP.

La escisión del grupo Fmoc es ejecutada mediante tratamiento alcalino. Los procedimientos y reactivos adecuados son conocidos por una persona experta en la técnica.

5 En una realización preferida, el tratamiento alcalino es ejecutado con una o más aminas como piperidina, dietilamina, pirrolidina o DBU, preferiblemente aminas secundarias, muy preferido con piperidina al 20 % en dimetilformamida.

10 En una realización muy preferida, el tratamiento alcalino del paso c) es ejecutado con una mezcla que comprende una o más aminas, preferiblemente aminas secundarias, por ejemplo piperidina, y un ácido orgánico como ácido fórmico, ácido acético o preferiblemente un alcohol ácido como fenol o 2,4-diclorofenol, (Z)-etil cianogloxilato-2-oxima, disponible comercialmente como Oxyma Pure (Merck KGaA, Alemania, fórmula IV) o hidroxibenzotriazol.



La concentración del ácido orgánico o el alcohol ácido debería ser elegida tal que es subestequiométrica comparada con las aminas.

15 Preferiblemente, la relación molar del ácido orgánico o el alcohol ácido comparada con las aminas (ácido : amina) está entre 0.01 : 1 y 0.4 : 1, preferiblemente entre 0.1 : 1 y 0.4 : 1, con máxima preferencia entre 0.35 : 1 y 0.37 : 1.

20 Se ha hallado que la adición del ácido orgánico o preferiblemente el alcohol ácido reduce adicionalmente la formación de aspartimida. Se ha hallado además que la etil cianogloxilato-2-oxima es especialmente adecuada en relaciones molares (ácido : amina) entre 0.1 : 1 y 0.4 : 1, preferiblemente entre 0.35 : 1 y 0.37 : 1. En consecuencia, la combinación del derivado de ácido aspártico de la invención de acuerdo con la fórmula la y/o lb y la adición de una cantidad subestequiométrica de un ácido orgánico o un alcohol ácido cuando se remueve el grupo protector Fmoc, suministra condiciones óptimas evitar la formación de aspartimida.

25 La invención está dirigida también al uso de derivados protegidos en la cadena lateral de ácido aspártico de la invención, para la síntesis de péptidos en solución aplicando el grupo Z terminal en N. El grupo Z es escindido mediante hidrogenación que no afecta el enlace éster de los alcoholes terciarios. Esta ortogonalidad es especialmente valiosa para la preparación de péptidos que contienen ácido aspártico en solución (véase Subirós-Funosas R. et al., Tetrahedron, 67:8595-8606 (2011)).

30 La protección de cadena lateral de ácido aspártico de la invención está diseñada para suprimir cualquier subproducto formado a través de la formación de aspartimida catalizada por base. Cualquier síntesis en una fase de solución a base de Fmoc SPPS y Z, puede ser ejecutada o modificada con los derivados de la invención. Típicamente, dichos derivados son estables contra el tratamiento con aminas secundarias y terciarias como piperidina, pirrolidina, trietilamina o etildisopropilamina así como contra la hidrogenación y son escindidos con ácidos fuertes como ácido trifluoroacético. Por ello, los derivados representan un grupo de protecciones semipermanentes de cadena lateral. En la presente invención el impedimento estérico es apalancado por la longitud creciente de la cadena recta de alquilo de alcoholes terciarios. Se ha hallado que esta homologación construye una estructura voluminosa más bien flexible, capaz de aproximarse muy cerca a la columna vertebral de péptidos impidiendo de ese modo la formación de aspartimida así como añadiendo suficiente flexibilidad al sistema, para permitir el acoplamiento eficiente de cualquier aminoácido precedente.

40 En un aspecto adicional, esta invención está dirigida a la combinación de dichos derivados de ácido aspártico y el uso de alcoholes ligeramente ácidos como Oxyma Pure o hidroxibenzotriazoles en las soluciones de escisión de Fmoc. Esta combinación revela ser un método poderoso para reducir la formación de aspartimida.

45 Por lo tanto, la aspartimida catalizada con base surge especialmente durante la escisión con Fmoc; los derivados mencionados son probados con Fmoc SPPS. Para investigar la aparición de aspartimida, en los ejemplos, se escogen las secuencias del hexapéptido de toxina II de escorpión (H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH), como un péptido modelo siguiendo estudios previos y una variante de este hexapéptido (H-Val-Lys-Asp-Asn-Tyr-Ile-OH) representando un segundo motivo Asp-Asn con probada susceptibilidad a formación de aspartimida (véase Mergler M., et al., J. Peptide Sci., 9: 36-46 (2003)). Se examinan sistemáticamente el impacto de remociones múltiples de

5 Fmoc en síntesis gradual de péptidos largos y condiciones de remoción de Fmoc más severas, necesarias en la agregación de secuencias de péptidos susceptibles. Por ello las resinas de hexapéptido son expuestas por un lado a tratamientos prolongados con piperidina y por el otro lado expuestas a tratamientos con 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU). Para vigilar completamente la aparición de reacción lateral de aspartimida, se identifican todos los subproductos derivados de aspartimida, mediante análisis LCMS y se cuantifican por análisis en HPLC o UPLC. En los ejemplos, las protecciones de cadena lateral mencionadas se comparan con el compuesto estándar Fmoc-Asp(OtBu)-OH y Fmoc-Asp(OMpe)-OH, el mejor compuesto disponible comercialmente, respecto a la prevención de aspartimida.

10 Como un resultado, no pudo detectarse eliminación de Asp ni eliminaciones de cualquier aminoácido precedente, cuando se usaron los derivados de Asp de acuerdo con la presente invención. Puede asumirse que los derivados de ácido aspártico suministrados en esta invención no afectan la eficiencia de acoplamiento en la síntesis de péptidos. Además, los resultados del tratamiento con piperidina prueban que el derivado de Fmoc-Asp(OPhp)-OH de acuerdo con la invención es significativamente más efectivo en la prevención de formación de aspartimida que los otros derivados probados.

15 Adicionalmente, el derivado de Fmoc-Asp(OPhp)-OH casi inhibe la reacción lateral de aspartimida cuando se combina con una solución de remoción de Fmoc de Oxyma Pure 1 M en piperidina/DMF 1 : 4, incluso en la secuencia Asp-Gly que muestra la más alta susceptibilidad en estudios previos.

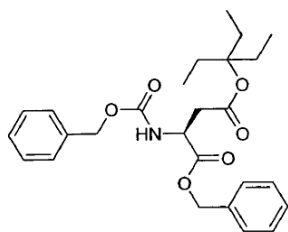
La presente invención es descrita en más detalle en los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes.

20 Ejemplos

Materiales: todos los reactivos y solventes son comprados en su mejor calidad disponible bien sea de Merck-Millipore o Sigma-Aldrich. Los carbinoles 3-etil-3-pentanol y 4-(n-propil)-4-heptanol son comprados de ABCR. El carbinol 5-(n-butil)-5-nonanol fue preparado mediante reacción estándar de Grignard.

Ejemplo 1: síntesis de 4-((3-etil)pent-3-il) éster de ácido (2S)-N-((9H-fluoren-9-ilmetiloxi)carbonil)aspártico

25 (a) síntesis de 1-bencil-4-(3-etil)pent-3-il) éster de ácido (2S)-N-benciloxicarbonilaspártico

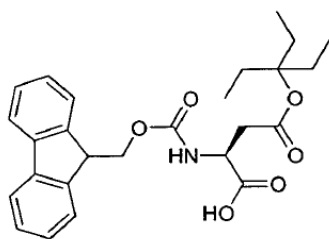


Fórmula química: $C_{26}H_{33}NO_6$, masa exacta: 455.23, peso molecular: 455.54

30 Se disuelven 6.7 g (18.7 mmol) de Z-Asp-Obzl (1-benciléster de ácido N-benciloxicarbonilaspártico) en 30 ml de diclorometano a temperatura ambiente. Después de la adición de 6.6 g (57.1 mmol) de 3-etil-pentan-3-ol, se enfría la mezcla a 2-3 °C y se añaden 0.5 g (4.1 mmol) de 4-(N,N dimetilamino)piridina. A continuación se añaden en 4 porciones iguales durante 32 horas, 4.6 g (22.3 mmol) de dicitclohexil carbodiimida. Se detiene el enfriamiento después de la adición de la primera porción de dicitclohexil carbodiimida. Se continua la reacción por dos días a temperatura ambiente, dando una suspensión espesa. Se destruye el exceso de dicitclohexil carbodiimida con ácido acético y se separa el precipitado por filtración y se evapora el solvente hasta sequedad. Se disuelve el residuo en una cantidad mínima de una mezcla de tolueno/acetato de etilo 95 : 5 y se purifica mediante cromatografía en columna usando SiO_2 como fase sólida y tolueno/acetato de etilo 95 : 5 como eluyente. Después de evaporación de las fracciones de producto se obtuvieron 8.0 g (17.6 mmol, 94 % de la teoría) del compuesto del título, como un sólido incoloro. 1H -RMN en $CDCl_3$ (TMS como estándar interno) desplazamiento químico en ppm: 7.41-7.25 (m, 10H, Fenil), 5.81 (d, 1H, NH), 5.18 (s, 2H, CH_2 , bzI), 5.10 (s, 2H, CH_2 , bzI), 4.62(m, $CH\alpha$, 1H), 3.05 + 2.78 (d, 2H, $CH_2\beta$), 1.82-1.68 (m, 6H, 3x alquil- CH_2), 0.74-0.68 (t, 9H, 3x alquil- CH_3).

40

(b) síntesis de 4-((3-etil)pent-3-il)éster de ácido (2S)-N-((9H-fluoren-9-ilmetiloxi)carbonil)aspártico

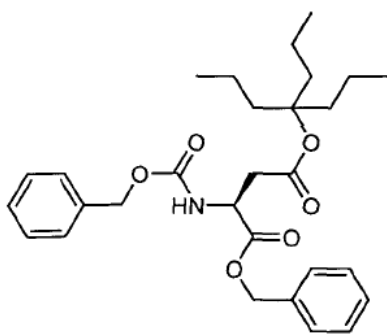


Fórmula química: $C_{26}H_{31}NO_6$, masa exacta: 453.22, peso molecular: 453.53

Se disuelven 8.0 g (17.6 mmol) de Z-Asp(OEpe)Obzl (α -bencil- γ -(3-etil)pent-3-il)éster de ácido N-benciloxycarbonilaspártico en 80 ml de dioxano a temperatura ambiente y se transfieren a un autoclave. Se añade 1 g de Pd/C suspendido al 5 % en 10 ml de agua, y se purga la solución con nitrógeno para transformarla en inerte. Después de ello se lleva a cabo la hidrogenación a una presión de 0.5 bar de hidrógeno por 7 horas. Se separa por filtración el catalizador y el filtrado resultante es aplicado directamente a la protección de Fmoc. Para esto, se añaden a temperatura ambiente 38 ml de una solución al 5 % de $NaHCO_3$ y una solución de 5.9 g (17.6 mmol) de Fmoc-OSu en 50 ml de dioxano. Después de 4 horas se remueve el solvente y se purifica el residuo mediante extracción. Se remueve el solvente residual mediante mezcla de ebullición constante con metil-tert-butiléter para dar 5.0 g (10.9 mmol, 62 % de la teoría) de una espuma blancuzca. Pureza por HPLC: 95.2 % de área, tiempo de retención 22.7 minutos (columna ACE C18-AR, 5 μ m, 150 x 4.6 mm, gradiente lineal de acetonitrilo de 0 % a 100 % B en 30 minutos, amortiguador A= 2% de acetonitrilo y 0.1 % de ácido trifluoroacético en agua, amortiguador B= 0.1% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo, flujo 1 ml/min; 1H -RMN en $CDCl_3$ (TMS como estándar interno), desplazamiento químico en ppm: 7.78 (d, 2H, Fmoc), 7.62 (m, 2H, Fmoc), 7.45-7.25 (m, 4H, Fmoc), 5.82 (d, 1H, NH), 4.68 (d, 1H, CH, Fmoc), 4.48-4.28 (m, 2H, Fmoc), 4.24-4.17 (m, 1H, $CH\alpha$), 3.05 + 2.78 (d, 2H, $CH_2\beta$), 1.91-1.78 (m, 6H, 3x alquil- CH_2), 0.94-0.75 (t, 9H, 3x alquil- CH_3); ESI-MS: monoisotópico M_W calc. = 453.2, M_W $[M+Na]^+$ = 476.1.

Ejemplo 2: síntesis de 4-(4-(n-propil)hept-4-il) éster de ácido (2S)-N-((9H-fluoren-9-ilmetiloxi)carbonil)aspártico

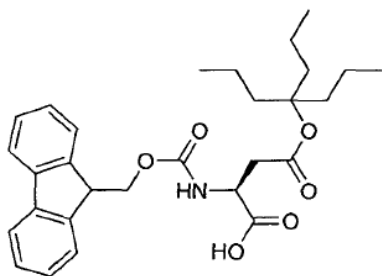
(a) síntesis de 1-bencil-4-(4-(n-propil)hept-4-il) éster de ácido (2S)-N-benciloxycarbonilaspártico



Fórmula química: $C_{29}H_{39}NO_6$, masa exacta: 497.28, peso molecular: 497.63

Se disuelven 25.0 g (70.0 mmol) de Z-Asp-Obzl (1-benciléster de ácido N-benciloxycarbonilaspártico) en 100 ml de diclorometano a temperatura ambiente. Después de la adición de 12.2 g (77.0 mmol) de 4-(n-propil)-4-heptanol, se enfría la mezcla a 2-3 $^{\circ}C$ y se añaden 1.7 g (14.0 mmol) de 4-(N,N dimetilamino)piridina. A continuación se añaden en 4 porciones iguales durante 48 horas, 10.6 g (84.0 mmol) de diisopropil carbodiimida. Se remueve el enfriamiento después de la adición de la primera porción de dicitohexil carbodiimida. Se continua la reacción por dos días a temperatura ambiente. Se destruye el exceso de diisopropil carbodiimida con ácido acético y se filtra sobre sílica gel la mezcla de reacción y se evaporan las fracciones de producto hasta sequedad. Se purifica el residuo mediante cromatografía en columna usando SiO_2 como fase sólida y tolueno/acetato de etilo 95 : 5 como eluyente. Después de evaporación de las fracciones de producto se obtuvieron 19.4 g (39.0 mmol, 56% de la teoría) del compuesto del título, como una espuma incolora. 1H -RMN en $CDCl_3$ (TMS como estándar interno) desplazamiento químico en ppm: 1H -RMN en $CDCl_3$ (TMS como estándar interno), desplazamiento químico en ppm: 7.41-7.25 (m, 10H, fenil), 5.79 (d, 1H, NH), 5.18 (m, 2H, CH_2 , bz), 5.10 (s, 2H, CH_2 , bz), 4.62(m, $CH\alpha$, 1H), 3.00 + 2.71 (d, 2H, $CH_2\beta$), 1.77-1.61 (t, 6H, 3x alquil- CH_2), 1.32-1.08 (m, 6H, 3x alquil- CH_2), 0.95-0.78 (t, 9H, 3x alquil CH_3).

(b) síntesis de 4-(4-(n-propil)hept-4-il)éster de ácido (2S)-N-((9H-fluoren-9-ilmetiloxi)carbonil)aspártico

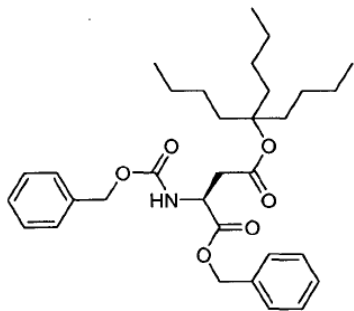


Fórmula química: $C_{29}H_{37}NO_6$, masa exacta: 495.26, peso molecular: 495.61

Se disuelven 18.0 g (36.2 mmol) de Z-Asp(OPh)-Obzl (α -bencil- γ -(4-(n-propil)hept-4-il)éster de ácido N-benciloxicarbonilaspártico) en 200 ml de dioxano a temperatura ambiente y se transfieren a un autoclave. Se añaden 2.8 g de Pd/C suspendido al 5 % en 20 ml de agua, y se purga la solución con nitrógeno para transformarla en inerte. Después de ello se lleva a cabo la hidrogenación a una presión de 0.5 bar de hidrógeno por 7 horas. Se separa por filtración el catalizador y el filtrado resultante es aplicado directamente a la protección de Fmoc. Para esto, se añaden a temperatura ambiente 20 ml de una solución al 10 % de $NaHCO_3$ y 13.5 g (40.0 mmol) de Fmoc-OSu. Después de 6 horas se remueve el solvente y se purifica el residuo mediante extracción. Se remueve el solvente residual mediante mezcla de ebullición constante con metil-tert-butiléter. El aceite resultante es purificado mediante RP-HPLC. Se liofilizan las fracciones de producto para dar 1.4 g (2.8 mmol, 8 % de la teoría) de espuma blanca. Pureza por HPLC: 97.1 % de área, tiempo de retención 25.4 minutos (columna ACE C18-AR, 5 μ m, 150 x 4.6 mm, gradiente lineal de acetonitrilo de 0 % a 100 % B en 30 minutos, amortiguador A= 2% de acetonitrilo y 0.1 % de TFA en agua, amortiguador B= 0.1% de TFA en acetonitrilo, flujo 1 ml/min; 1H -RMN en $CDCl_3$ (TMS como estándar interno), desplazamiento químico en ppm: 7.82 (d, 2H, Fmoc), 7.63 (m, 2H, Fmoc), 7.25-7.45 (m, 4H, Fmoc), 5.87 (d, 1H, NH), 4.65 (m, 1H, CH, Fmoc), 4.28-4.48 (m, 2H, Fmoc), 4.17-4.25 (m, 1H, $CH\alpha$), 2.72 + 3.05 (2xd, 2H, $CH_2\beta$), 1.68-1.85 (m, 6H, 3x alquil- CH_2), 1.18-1.37(m, 6H, 3x alquil- CH_2), 0.82-1.01 (t, 9H, 3x alquil- CH_3); ESI-MS: monoisotópico $M_{W \text{ calc.}} = 495.26$, $M_{W} [M+Na]^+ = 518.26$.

Ejemplo 3: síntesis de 4-(5(n-butil)nonan-3-il) éster de ácido (2S)-N-((9H-fluoren-9-ilmetiloxi)carbonil)aspártico

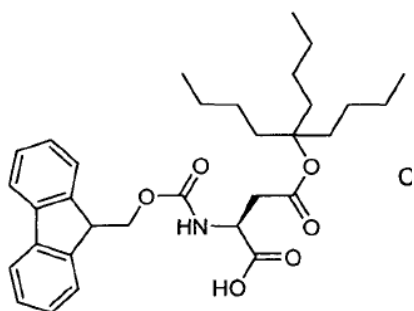
(a) síntesis de 1-bencil-4-(5(n-butil)nonan-5-il) éster de ácido (2S)-N-benciloxicarbonilaspártico



Fórmula química: $C_{32}H_{45}NO_6$, masa exacta: 539.32, peso molecular: 539. 71

Se disuelven 14.3 g (40.0 mmol) de Z-Asp-Obzl (1-benciléster de ácido N-benciloxicarbonilaspártico) en 60 ml de diclorometano a temperatura ambiente. Después de la adición de 23.2 g (116 mmol) de 5-n-butil-5-nonanol, se enfría la mezcla a 0 °C y se añade la primera porción de 4.1 g (20.0 mmol) de dicitlohexil carbodiimida. Después de 15 minutos de activación previa a 0 °C se añade 1.0 g (8.0 mmol) de 4-(N,N dimetilamino)piridina. Se continua la reacción a temperatura ambiente por cuatro días añadiendo diariamente 1.65 g (8.0 mmol) de dicitlohexil carbodiimida por los primeros tres días, dando una suspensión espesa. Se destruye el exceso de dicitlohexil carbodiimida con ácido acético. Se diluye la suspensión con 500 ml de tolueno/acetato de etilo 95 : 5 y se filtra sobre 40 g de sílica gel. Después de evaporación hasta sequedad, se disuelve el residuo en una cantidad mínima de una mezcla de ciclohexano/acetato de etilo 9 : 1 y se purifica mediante cromatografía en columna usando 900 g de SiO_2 como fase sólida y ciclohexano/acetato de etilo 9 : 1 como eluyente. Después de evaporación de las fracciones de producto se obtuvieron 15.3 g (28.4 mmol, 71 % de la teoría) del compuesto del título, como una cera líquida blancuzca. 1H -RMN en $CDCl_3$ (TMS como estándar interno), desplazamiento químico en ppm: 7.39-7.25 (m, 10H, fenil), 5.82 (d, 1H, NH), 5.07-5.25 (m, 2H, CH_2 , bzI), 5.10 (s, 2H, CH_2 , bzI), 4.54-4.65 (m, 1H, $CH\alpha$), 2.78 + 3.01 (2xd, 2H, $CH_2\beta$), 1.65-1.81 (m, 6H, 3x alquil- CH_2), 1.09-1.34 (m, 12H, 3x alquil- CH_2), 0.83-0.96 (t, 9H, 3x alquil- CH_3)).

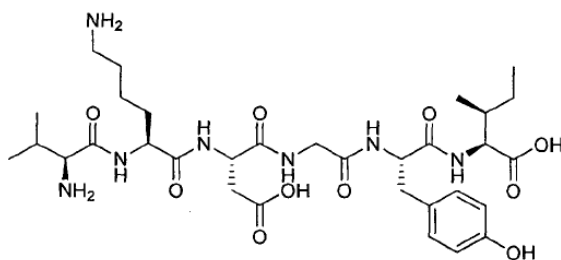
(b) síntesis de 4-(5(n-butil)nonan-5-il)éster de ácido (2S)-N-((9H-fluoren-9-ilmetiloxi)carbonil)aspártico



Fórmula química: $C_{32}H_{43}NO_6$, masa exacta: 537.31, peso molecular: 537.70

Se disuelven 14.6 g (26.9 mmol) de Z-Asp(OBno)-Obzl (α -bencil- γ -(5-(n-butyl)nonan-5-il)éster de ácido N-benciloxycarbonilaspártico) en 120 ml de dioxano a temperatura ambiente y se transfieren a un autoclave. Se añaden 2.4 g de Pd/C al 10 %, y se purga la solución con argón para transformarla en inerte. Después de ello se lleva a cabo la hidrogenación a una presión de 0.5 bar de hidrógeno por 27 horas. Se mantiene el pH entre 7.5 y 8 durante la hidrogenación, mediante adición de carbonato de sodio. Se separa por filtración el catalizador y el filtrado resultante es aplicado directamente a la protección de Fmoc. Para esto, se diluye el filtrado con 300 ml de dioxano/agua (8 : 2) y se ajusta el pH a 8 con 2 g de bicarbonato de sodio. Se añaden a temperatura ambiente 10.0 g (29.6 mmol) de Fmoc-OSu y se deja reaccionar la mezcla durante la noche. Se purifica la mezcla de reacción mediante extracción y se evaporan las capas orgánicas combinadas. Después de evaporación hasta sequedad se disuelve el residuo en una cantidad mínima de una mezcla de diclorometano/metanol 98 : 2 y se purifica por cromatografía en columna usando 500 g de SiO_2 como fase sólida y diclorometano/metanol 98 : 2 como eluyente. Después de la evaporación de las fracciones de producto se obtuvieron 10.0 g del compuesto del título. Para aumentar la pureza se purifica el material mediante una segunda corrida de cromatografía en columna usando 300 g de SiO_2 como fase sólida y ciclohexano/acetato de etilo/ácido acético (6 : 4 : 0.005) como eluyente. Después de la evaporación de las fracciones de producto se obtuvieron 6.5 g del compuesto del título, como una cera blancuzca (12.1 mmol, 45 % de la teoría). Pureza por HPLC: 99.0 % de área, tiempo de retención 27.6 minutos (columna ACE C18-AR, 5 μ m, 150 x 4.6 mm, gradiente lineal de acetonitrilo de 0 % a 100 % B en 30 minutos, amortiguador A= 2% de acetonitrilo y 0.1 % de ácido trifluoroacético en agua, amortiguador B= 0.1% de ácido trifluoroacético en acetonitrilo, flujo 1 ml/min 1H -RMN en $CDCl_3$ (TMS como estándar interno), desplazamiento químico en ppm: 10.33 (s, 1H, COOH), 7.75 (d, 2H, Fmoc), 7.55 (m, 2H, Fmoc), 7.19-7.43 (m, 4H, Fmoc), 5.90 (d, 1H, NH), 4.66 (d, 1H, CH, Fmoc), 4.26-4.52 (m, 2H, Fmoc), 4.14-4.26 (m, 1H, CH α), 3.05 + 2.81 (d, 2H, CH 2β), 1.62-1.83 (m, 6H, 3x alquil-CH 2), 1.07-1.38 (m, 12H, 6x alquil-CH 2), 0.79-0.95 (t, 9H, 3x alquil-CH 3); ESI-MS: monoisotópico M_W calc. = 537.3, M_W $[M+Na]^+$ = 560.3.

Ejemplo 4: síntesis de H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH (VKDGYI) usando Fmoc-Asp(OEpe)-OH, Fmoc-Asp(OPhp)-OH, Fmoc-Asp(OMpe)-OH y Fmoc-Asp(OtBu)-OH



La síntesis de péptidos en fase sólida es llevada a cabo usando la estrategia Fmoc/tBu (Atherton E., et al., *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 539 (1978)). Se usan 0.44 g de resina Fmoc-Ile-Wang (0.54 mmol/g) en un ABI 431 para síntesis automatizada de péptidos empleando activación con HBTU/etil-diisopropilamina (3.6 eq./8.0 eq.) para formación de enlace amida, y una solución de piperidina al 20% en dimetilformamida para la remoción del Fmoc. Los correspondientes aminoácidos Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Asp(OtBu/OMpe/OEpe/OPhp)-OH, Fmoc-Gly-OH y Fmoc-Tyr(tBu)-OH son usados en un exceso de cuatro veces. Se exponen muestras de 50 mg de las resinas de péptido resultantes, a 0.5 ml de TFA al 95 % en agua por 1.5 horas, se retira por filtración la resina y se precipita el filtrado de péptido en diisopropiléter para dar los péptidos crudos totalmente desprotegidos.

Se tratan otros 50 mg de muestra de resina de péptido con una solución de piperidina al 20% en dimetilformamida por 18 horas, para simular remociones múltiples de Fmoc. Después se exponen las muestras de resina de péptidos a TFA al 95 % en agua para escisión final en analogía al protocolo descrito arriba y se identifican todas las impurezas relevantes por análisis de MS (Xevo Waters Q-TOF-1, masa de referencia = 556.277 (leu-encefalina) y

se cuantifican por análisis HPLC (condiciones de HPLC: halo péptidos 2,7 μm (150 x 4.6 mm) a 40 °C; gradiente de agua acetonitrilo de 5 % a 35 % B en 30 minutos donde el amortiguador A es TFA 0.1 % y acetonitrilo 2% en agua y el amortiguador B es TFA al 0.1 % en acetonitrilo, flujo 1 ml/minuto).

5 Como se esperaba, la prolongada exposición de las resinas de péptido a piperidina exhibió diferentes niveles de descomposición respecto a la protección aplicada de cadena lateral. La figura 2 ilustra las correspondientes trazas de HPLC para el mejor derivado de Fmoc-Asp(OMpe)-OH disponible comercialmente, en comparación con Fmoc-Asp(OPhp)-OH. En la tabla 1 se resumen las cantidades de subproductos después de tratamiento prolongado con piperidina. El tratamiento con piperidina por 18 horas iguala a 108 ciclos por 10 minutos de remoción de Fmoc.

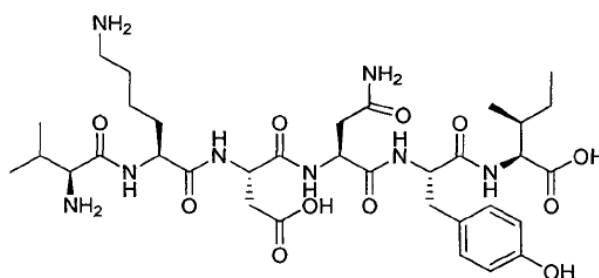
10 Por esto, este experimento tiene correlación con un ensamble Fmoc SPPS de un heptámero después de introducir el residuo de ácido aspártico.

Asp(OR)	objetivo	Asu	piperididas	Asu por ciclos de 10 minutos	Semivida en ciclos de 10 minutos
R =	[%]	[%]	[%]	[%]	
<i>tBu</i>	8.0	6.4	85.6	2.3	30
<i>Mpe</i>	42.3	6.7	51.0	0.8	90
<i>Epe</i>	64.4	4.1	31.5	0.4	175
<i>Php</i>	80.6	2.9	16.5	0.2	356

Tabla 1: resultados después de 110 ciclos de remoción de Fmoc usando piperidina, péptido objetivo = VKDGYI, los subproductos derivados de aspartimida (Asu) son la aspartimida en sí misma y la suma de piperididas

15 Como se ve en la tabla 1, la semivida del péptido objetivo que contiene la secuencia más susceptible Asp-Gly, aumenta en más de 10 veces usando protección de Php en lugar de *tBu*, y en 4 veces respecto a *Mpe*. Es de especial interés la comparación de la protección con *Epe* vs. *Mpe*, puesto que su principal diferencia es un escudo simétrico vs. uno asimétrico en el grupo γ -carboxilo del residuo aspartilo. La protección con *Epe* minimiza la formación de aspartimida por un factor de dos comparado con *Mpe*, lo cual es una primera evidencia de las propiedades ventajosas de las protecciones de cadena lateral presentadas en esta invención, para superar la formación de aspartimida.

20 **Ejemplo 5: síntesis de H-Val-Lys-Asp-Asn-Tyr-Ile-OH (VKDNYI) usando Fmoc-Asp(OEpe)-OH, Fmoc-Asp(OPhp)-OH, Fmoc-Asp(OBno)-OH, Fmoc-Asp(OMpe)-OH y Fmoc-Asp(OtBu)-OH**



25 La síntesis automatizada de péptidos, tratamientos con piperidina de las muestras de resina y escisiones finales con TFA son ejecutadas como se describió en los protocolos del ejemplo 4. Adicionalmente, se tratan muestras de 50 mg de resina de péptido con una solución de DBU/piperidina/DMF (1 : 19 : 79) durante 225 minutos para investigar la formación de aspartimida a condiciones más severas de eliminación de protección con Fmoc, usadas frecuentemente para remociones completas de Fmoc en secuencias susceptibles a la agregación.

30 Se analizan las muestras de péptidos resultantes y se identifican todas las impurezas relevantes por análisis de UPLC-MS (Xevo Waters Q-TOF-1, masa de referencia = 556.277 (leu-encefalina), condiciones de LC: CHS 18 1.7 μm (100 X 2.1 mm) a 40 °C; gradiente de agua acetonitrilo de 5 % a 35 % B en 10 minutos donde el amortiguador A es ácido fórmico 0.1 % en agua y el amortiguador B es ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo, flujo 0.6 ml/minuto).

35 La figura 3 muestra las trazas por UPLC de los péptidos crudos directamente después de la síntesis para el derivado Asp(OBno) más demandante desde el punto de vista estérico, en comparación con Asp(OMpe). En el límite de detección no se detectaron eliminación de Asp ni eliminaciones de un aminoácido precedente.

En la tabla 2 se resumen las cantidades de subproductos formados después de la exposición prolongada de las

resinas de péptidos a piperidina (110 ciclos de remoción de Fmoc), para todas las protecciones de cadena lateral usadas en esta invención. La figura 4 muestra las trazas correspondientes de UPLC para el derivado Fmoc-Asp(OMpe)-OH en comparación con Fmoc-Asp(OBno)-OH.

Asp(OR) R =	objetivo [%]	D/L-Asu [%]	piperididas [%]	Asu por ciclos de 10 minutos	Semivida en ciclos
<i>tBu</i>	16.1	4.9	79.0	1.6	40
<i>Mpe</i>	58.2	4.3	37.5	0.5	140
<i>Epe</i>	81.0	3.0	16.0	0.2	365
<i>Php</i>	90.8	1.0	8.2	0.09	800
<i>Bno</i>	95.5	0.9	3.6	0.04	1670

5 *Tabla 2: resultados después de 110 ciclos de remoción de Fmoc usando piperidina, péptido objetivo = VKDNYI, los subproductos derivados de aspartimida (Asu) son la aspartimida en sí misma y la suma de piperididas*

De manera análoga al ejemplo 4, el motivo de secuencia Asp-Gly, los resultados para el motivo Asp-Asn exhibieron diferentes niveles de descomposición respecto a la protección de cadena lateral aplicada. El grupo protector Bno que muestra el grupo más demandante estéricamente en esta corrida no impone ningún impedimento a la síntesis de péptido usado bajo condiciones estándar, pero es capaz de limitar la reacción lateral de aspartimida durante las remociones de Fmoc a una tasa de 0.05 % por ciclo con una semivida mayor a 1500 ciclos. En comparación, el mejor derivado Fmoc-Asp(OMpe)-OH disponible comercialmente dio diez veces más aspartimida por ciclo de remoción de Fmoc, con una semivida de 140 ciclos.

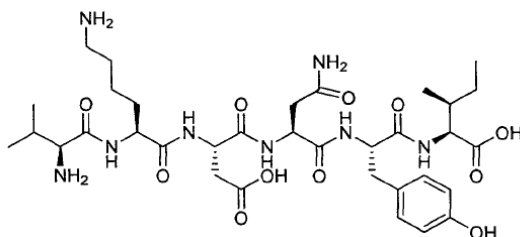
15 En la tabla 3 se resumen las cantidades de subproductos formados después de tratamientos prolongados con DBU, para todas las protecciones de cadena lateral usadas en esta invención. La figura 5 muestra las trazas correspondientes de UPLC para el derivado Fmoc-Asp(OMpe)-OH en comparación con Fmoc-Asp(OBno)-OH. Dado que las remociones de Fmoc mediadas por DBU son mucho más rápidas que las mediadas por piperidina, este experimento representa de nuevo un ensamble de Fmoc SPPS de un heptámero después de introducir el residuo de ácido aspártico usando exclusivamente DBU para la escisión de Fmoc.

Asp(OR) R =	objetivo [%]	D/L-Asu [%]	piperididas [%]	Asu por ciclos de 2 minutos	Semivida en ciclos
<i>tBu</i>	0.3	2.6	97.1	5.2	13
<i>Mpe</i>	18.8	7.5	73.7	1.5	46
<i>Epe</i>	57.1	5.6	37.3	0.5	138
<i>Php</i>	71.0	3.3	25.7	0.4	192
<i>Bno</i>	74.5	3.5	22.0	0.3	263

20 *Tabla 3: resultados después de 110 ciclos de remoción de Fmoc usando DBU, péptido objetivo = VKDNYI, los subproductos derivados de aspartimida (Asu) son la aspartimida en sí misma y la suma de piperididas*

En el caso de secuencias susceptibles a la agregación, la eficiencia incompleta de acoplamiento es acompañada frecuentemente por remociones incompletas de Fmoc durante el SPPS estándar. Se requiere emplear condiciones más severas de remoción de Fmoc para resolver este último problema. Sin embargo, los tratamientos con DBU dan lugar a impurezas derivadas de aspartimida en todos los motivos de secuencia Asp-Xaa (véase Mergler M., et al., J. Peptide Sci., 9: 36-46 (2003)). Este hecho limita fuertemente el uso de condiciones más severas de remoción de Fmoc en Fmoc SPPS. En estos experimentos la protección con Bno representa la mejor solución para esta situación, reduciendo la formación de aspartimida a menos de 0.3 % por ciclo de remoción de Fmoc de dos minutos, con una semivida de 260 ciclos. De este modo, Bno permite por primera vez ponderar las ventajas de las remociones completas de Fmoc versus el riesgo asociado de formación de aspartimida mediada por DBU.

25 **Ejemplo 6: síntesis de H-Val-Lys-Asp-Arg-Tyr-Ile-OH (VKDRYI) usando Fmoc-Asp(OEpe)-OH, Fmoc-Asp(OPhp)-OH, Fmoc-Asp(OBno)-OH, Fmoc-Asp(OMpe)-OH y Fmoc-Asp(OtBu)-OH**



La síntesis automatizada de péptidos, tratamientos con piperidina de las muestras de resina y escisiones finales con TFA son ejecutadas como se describió en los protocolos del ejemplo 4. Adicionalmente, para evaluar la ventaja de los grupos protectores usados en esta invención en SPPS acelerado con calor, se trataron muestras de 50 mg de resina de péptido con una solución de piperidina al 20% en DMF a 60 °C durante 200 minutos. Frecuentemente se usan condiciones de síntesis de péptidos asistidas por microondas, para reducir los tiempos de síntesis de péptidos e incrementar la reacción de acoplamiento y desprotección de Fmoc.

Se cuantifican todas las impurezas relevantes por análisis de HPLC (condiciones de HPLC: columna Kinetex XB-C18 2,6 µm (150 x 4.6 mm) a 50 °C gradiente de agua acetonitrilo de 5 % a 30 % B en 18 minutos donde el amortiguador A es formiato de amonio 20 mM y acetonitrilo 2 % en agua y el amortiguador B es formiato de amonio 20 mM en acetonitrilo, flujo 1 ml/minuto) y se identifican por análisis de MS (Xevo Waters Q-TOF-1, masa de referencia = 556.277 (leu-encefalina).

La figura 6 muestra las trazas por HPLC de los péptidos crudos directamente después de la síntesis para el derivado Asp(OBno) más demandante estéricamente en comparación con Asp(OMpe). En el límite de detección no se detectaron eliminación de Asp ni eliminaciones de un aminoácido **precedente**.

En la tabla 4 se resumen las cantidades de subproductos formados después de exposición prolongada de las resinas de péptidos a piperidina (110 ciclos de remoción de Fmoc), para todas las protecciones de cadena lateral usadas en esta invención.

Asp(OR)	objetivo	D/L-Asu	piperididas	Asu por ciclos de 10 minutos	Semivida en ciclos
R =	[%]	[%]	[%]		
<i>tBu</i>	24.7	16.9	58.4	1.3	55
<i>Mpe</i>	64.2	6.9	28.9	0.4	173
<i>Epe</i>	86.7	3.90	9.4	0.1	539
<i>Php</i>	91.3	3.2	5.5	0.08	845
<i>Bno</i>	93.8	2.6	3.6	0.06	1202

Tabla 4: resultados después de 110 ciclos de remoción de Fmoc usando piperidina, secuencia de péptido objetivo = VKDRYI, los subproductos derivados de aspartimida (Asu) son la aspartimida en sí misma y la suma de piperididas

El motivo de secuencia Asp-Arg mostró en completa concordancia con los resultados previos, niveles reducidos de descomposición especialmente cuando se aplica un escudo simétrico a la protección de cadena lateral. Aunque el grupo protector Bno despliega el grupo más demandante estéricamente, no impone ningún impedimento para la síntesis de péptidos usados bajo condiciones estándar. Por otro lado, el escudo estérico optimizado es muy bien capaz de suprimir la reacción lateral de aspartimida durante remociones de Fmoc, a menos de 0.06 % por ciclo con una semivida por ciclo mayor a 1000. En comparación, el mejor derivado Fmoc-Asp(OMpe)-OH comercialmente disponible dio aproximadamente siete veces más aspartimida por ciclo de remoción de Fmoc con una semivida de aproximadamente 170 ciclos.

La aplicación de calentamiento con microondas a SPPS está acelerando el acoplamiento y reacciones de eliminación de protección, conduciendo a tiempos más cortos de ciclo, rendimientos mayores repetitivos y en últimos péptidos más puros. Por otro lado, la energía de microondas puede conducir también a aumento en los niveles de subproductos de aspartimida. Para superar esta limitación se evaluó la ventaja de protecciones de cadena lateral usadas en esta invención, por exposición de las resinas de péptido a ciclos de remoción de Fmoc a 60 grados Celsius.

En la tabla 5 se resumen las cantidades de subproductos formados después de exposición prolongada de las resinas de péptido a piperidina a 60 grados Celsius (100 ciclos de remoción de Fmoc), para todas las protecciones de cadena lateral usadas en esta invención. La figura 7 muestra las trazas correspondientes de HPLC para el

derivado Fmoc-Asp(OMpe)-OH en comparación con Fmoc-Asp(OBno)-OH.

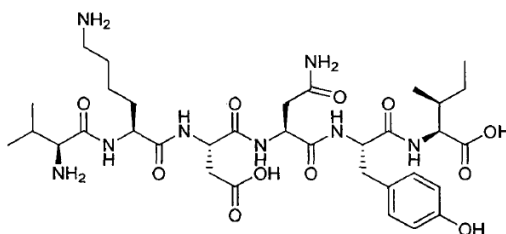
Asp(OR) R =	objetivo [%]	D/L-Asu [%]	piperididas [%]	Asu por ciclos de 10 minutos	Semivida en ciclos
<i>tBu</i>	30.3	28.7	41.0	1.2	58
<i>Mpe</i>	63.5	16.9	19.6	0.5	153
<i>Epe</i>	85.4	7.8	6.8	0.2	439
<i>Php</i>	87.8	7.1	5.1	0.1	532
<i>Bno</i>	90.8	4.9	4.3	0.1	718

Tabla 5: resultados después de 100 ciclos de remoción de Fmoc usando piperidina a 60 °C, secuencia de péptido objetivo = VKDRIYI, los subproductos derivados de aspartimida (Asu) son la aspartimida en sí misma y la suma de piperididas

Primero que todo, los resultados muestran que la secuencia Asp-Arg es altamente susceptible a la formación de aspartimida bajo calentamiento con microondas. Usando el grupo protector asimétrico Mpe se forma 0.5 % de subproductos de aspartimida por ciclo, lo cual está representado por una semivida de 153 ciclos mientras el grupo simétrico Epe conduce sólo a la formación de 0.2 % de aspartimida con una semivida de 439 ciclos. Esto puede ser atribuido al punto débil de la protección de Mpe, que está compuesto sólo de dos ramificaciones etilo y un metilo. Sin embargo, debido al movimiento browniano, las diferencias entre los homólogos se vuelven marginales a 60 grados Celsius.

Este ejemplo demuestra que el escudo estérico optimizado en las protecciones de cadena lateral usadas en esta invención, puede ser aplicado para suprimir de manera eficiente reacciones laterales de aspartimida, incluso a elevadas temperaturas, para el motivo de secuencia susceptible Asp-Arg.

Ejemplo 7: síntesis de H-Val-Lys-Asp-Gly-Tyr-Ile-OH (VKDGYI) usando Fmoc-Asp(OEpe)-OH, Fmoc-Asp(OPhp)-OH, Fmoc-Asp(OMpe)-OH y Fmoc-Asp(OtBu)-OH así como Oxyma Pure 1 M en la solución de escisión de Fmoc.



Se tratan muestras de 50 mg de los correspondientes derivados de ácido aspártico del ejemplo 4, durante 18 horas con una solución de Oxyma Pure 1 M y piperidina al 20% en dimetilformamida. Los péptidos son escindidos de la resina con TFA 95 % y analizados por HPLC así como MS para identificar todos los productos relacionados con aspartimida (véase las condiciones en el ejemplo 4). Los resultados se resumen en la tabla 6

Asp(OR) R =	Oxyma Pure	objetivo [%]	Asu [%]	piperididas [%]	Asu por ciclos de 10 minutos
<i>tBu</i>	+	61.1	8.8	30.1	0.45
	-	8.0	6.4	85.6	2.3
<i>Mpe</i>	+	84.2	3.8	12.0	0.16
	-	42.3	6.7	51.0	0.8
<i>Epe</i>	+	85.7	2.6	11.7	0.14
	-	64.4	4.1	31.5	0.4
Php	+	95.4	1.3	3.3	0.04
	-	80.6	2.9	16.5	0.2

Tabla 6: resultados después de 110 ciclos de remoción de Fmoc usando un modificador ácido en los cócteles de

remoción de Fmoc mediada por piperidina, péptido objetivo VKDGYI, los subproductos derivados de aspartimida son la aspartimida en sí misma y la suma de piperididas

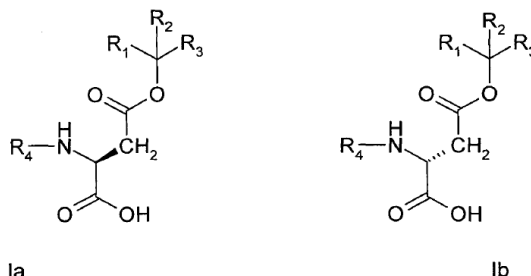
Aparte del hecho de que la adición de Oxyma Pure al cóctel de remoción de Fmoc de piperidina estándar en general reduce la ocurrencia de reacción lateral de aspartimida (véase R. Subiros-Funosas, et al., Chem. Eur. J., 2009, 9394), de modo sorprendente se observa un efecto sinérgico combinando este método con protecciones de cadena lateral de la presente invención, especialmente en el caso de la protección Php. Puesto que los tratamientos de resina de péptidos nuevamente se parecen a 110 ciclos de eliminación de protección de Fmoc, la combinación de Asp(OPhp) con Oxyma Pure 1 M en piperidina al 20% conducen a un nivel despreciable de 0,05 % de subproductos derivados de aspartimida por cada remoción de Fmoc, con una semivida mayor a 1500 ciclos. Puesto que esto es válido para el motivo de secuencia más susceptible Asp-Gly, la protección Asp(OPhp) en combinación con un método suave de eliminación de protección de Fmoc, representa una solución altamente eficiente para el problema de la aspartimida en Fmoc SPPS en general. Sin embargo, es importante notar que cócteles de remoción de Fmoc que contienen un modificador ácido son algunas veces demasiado débiles para conducir la escisión de Fmoc hasta el final, dentro de 10 minutos. Frecuentemente se requiere exposición prolongada.

Abreviaturas

Fmoc-OSu	N-(9-fluorenilmetoxicarboniloxi)-succinimida
Asp(OPhp)	4-(4-(n-propil)hept-4-il-) éster de ácido aspártico
Asp(OMpe)	4-(3-metilpent-3il-) éster de ácido aspártico
Asp(OEpe)	4-(3-etilpent-3il-) éster de ácido aspártico
Php	4-(n-propil)hept-4-il-
Mpe	3-metilpent-3il-
Epe	3-etilpent-3-il-
tBu	<i>tert</i> -butilo
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato
HATU	2-(7-aza-1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio hexafluorofosfato
HCTU	2-(6-cloro-1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio hexafluorofosfato
PyBOP	Benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato
TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato
TATU	2-(7-aza-1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio tetrafluoroborato
TCTU	2-(6-cloro-1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio tetrafluoroborato

REIVINDICACIONES

1. Compuestos de las fórmulas la y/o lb



en las que

- 5 R_1 , R_2 , R_3 representan, independientemente uno de otro, una cadena de hidrocarburo lineal con una longitud de dos a seis átomos de carbono,
- R_4 representa un grupo benciloxicarbonilo, 9-fluorenil metiloxicarbonilo o H.
2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque R_1 , R_2 , R_3 tienen todos el mismo número de átomos de carbono.
- 10 3. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 caracterizado porque R_1 , R_2 , R_3 son $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$.
4. Un método para producir el compuesto de las fórmulas la y/o lb por
- a) suministro de un ácido aspártico con grupos protectores que pueden ser sometidos a hidrogenólisis en los extremos N y C
- b) esterificación del ácido carboxílico de cadena lateral con el alcohol terciario de acuerdo a la fórmula III
- 15 $\text{HO}-\text{CR}_1\text{R}_2\text{R}_3$ fórmula III
- en la que R_1 , R_2 , R_3 representan, independientemente uno de otro, una cadena de hidrocarburo lineal con una longitud de dos a seis átomos de carbono
- c) hidrogenólisis de los grupos protectores que pueden ser sometidos a hidrogenólisis en los extremos N y C
- d) introducción de un grupo fluorenilmetoxicarbonilo o un grupo benciloxicarbonilo en el extremo N.
- 20 5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque la esterificación del paso b) es ejecutada con una carbodiimida.
6. Un método para la síntesis de péptidos por
- a) suministro de un aminoácido o un péptido unido a una fase sólida a través de su extremo C
- b) reacción del aminoácido o péptido unido a la fase sólida del paso a) con un compuesto de la fórmula la y/o lb como se definió en la reivindicación 1, en la que R_4 es fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), en la que el compuesto de la fórmula la y/o lb está unido al extremo N.
- 25 c) escisión del grupo Fmoc mediante tratamiento alcalino.
7. Método de acuerdo con la reivindicación 6 caracterizado porque el tratamiento alcalino del paso c) es ejecutado con una o más aminas secundarias.
- 30 8. Método de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, caracterizado porque el tratamiento alcalino del paso c) es ejecutado con una mezcla que comprende una o más aminas secundarias y un ácido orgánico y/o un alcohol ácido.
9. Método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 6 a 8 caracterizado porque la reacción del paso b) es ejecutada en presencia de HBTU, TBTU, HATU, TATU, HCTU, TCTU y/o PyBOP.

Fig. 1

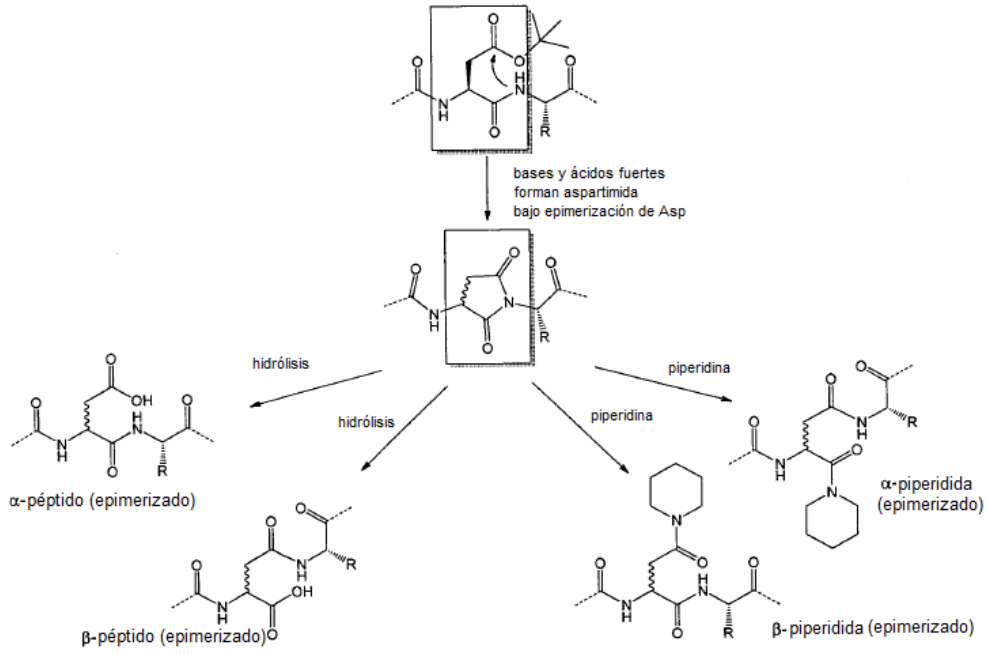
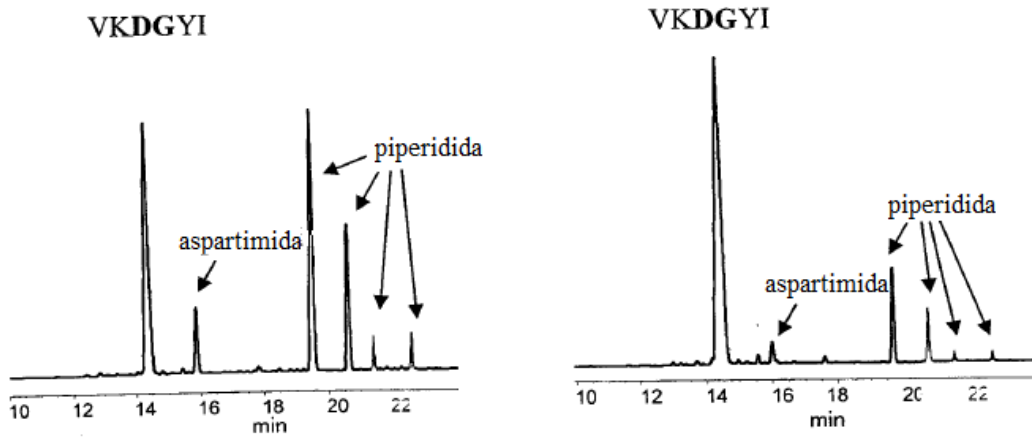


Fig. 2



Secuencia motivo *Asp(OMpe)-Gly*

Secuencia motivo *Asp(OPhp)-Gly*

incubación durante 18h con piperidina/DMF 1:4

Fig. 3

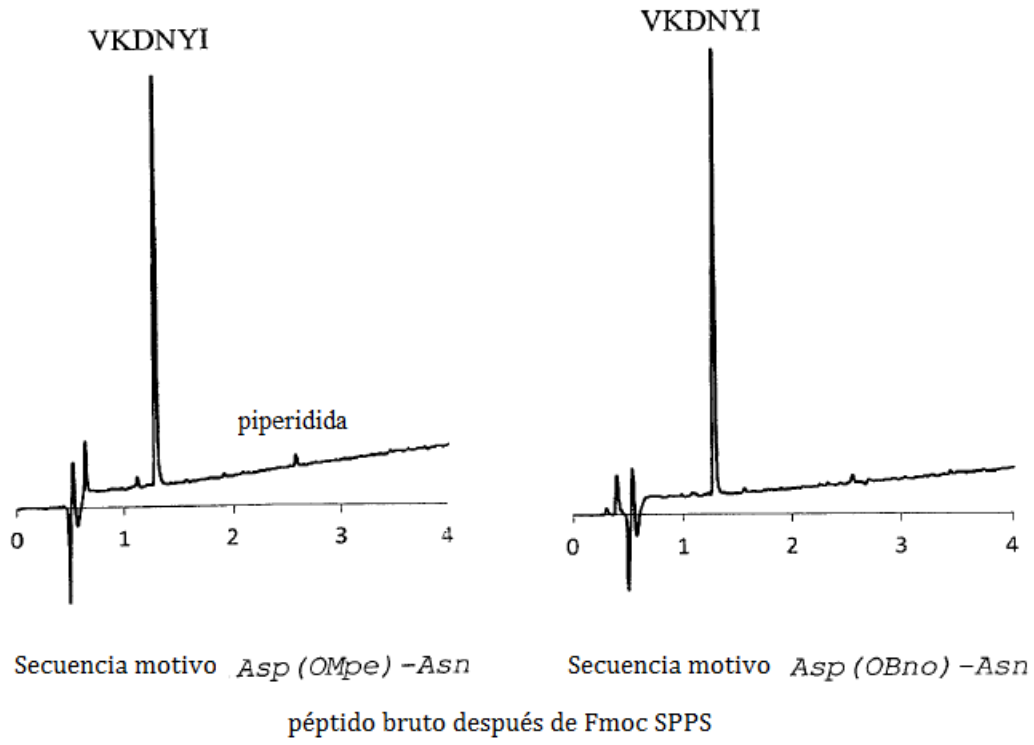


Fig. 4

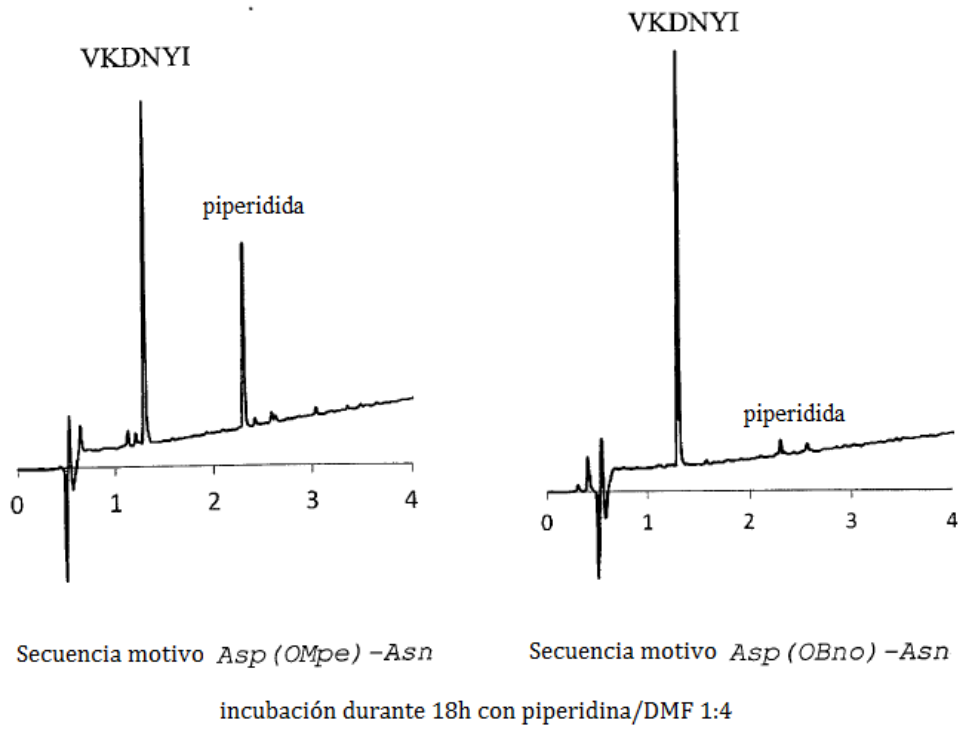


Fig. 5

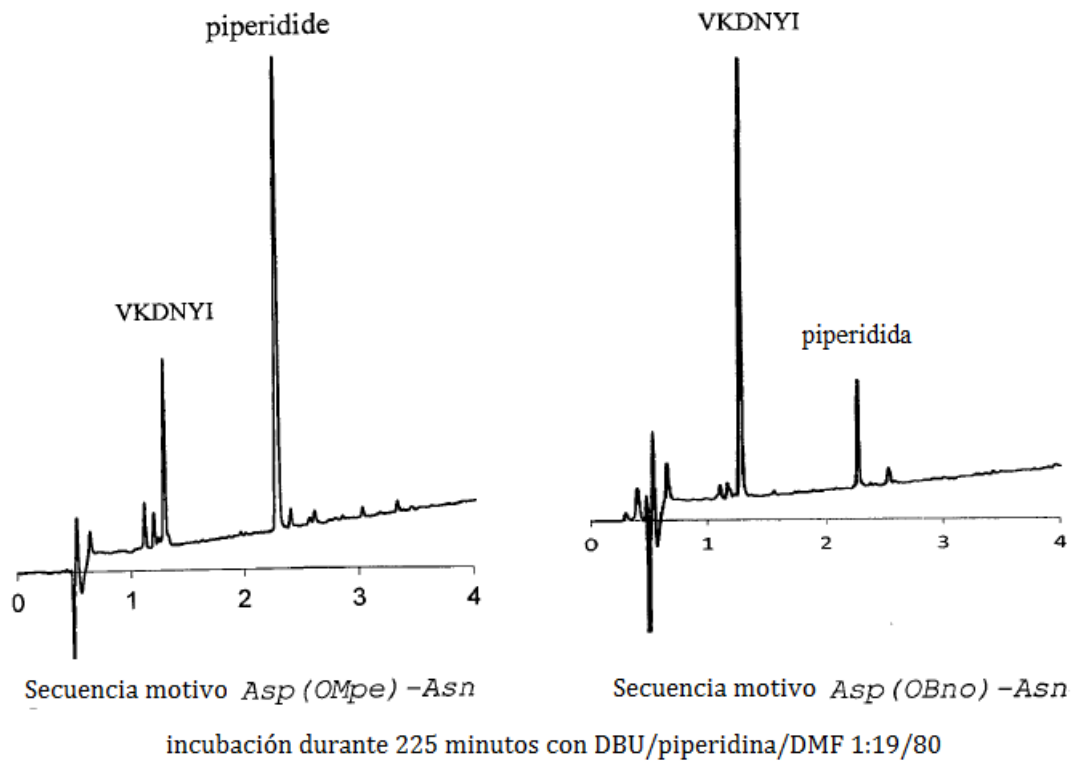


Fig. 6

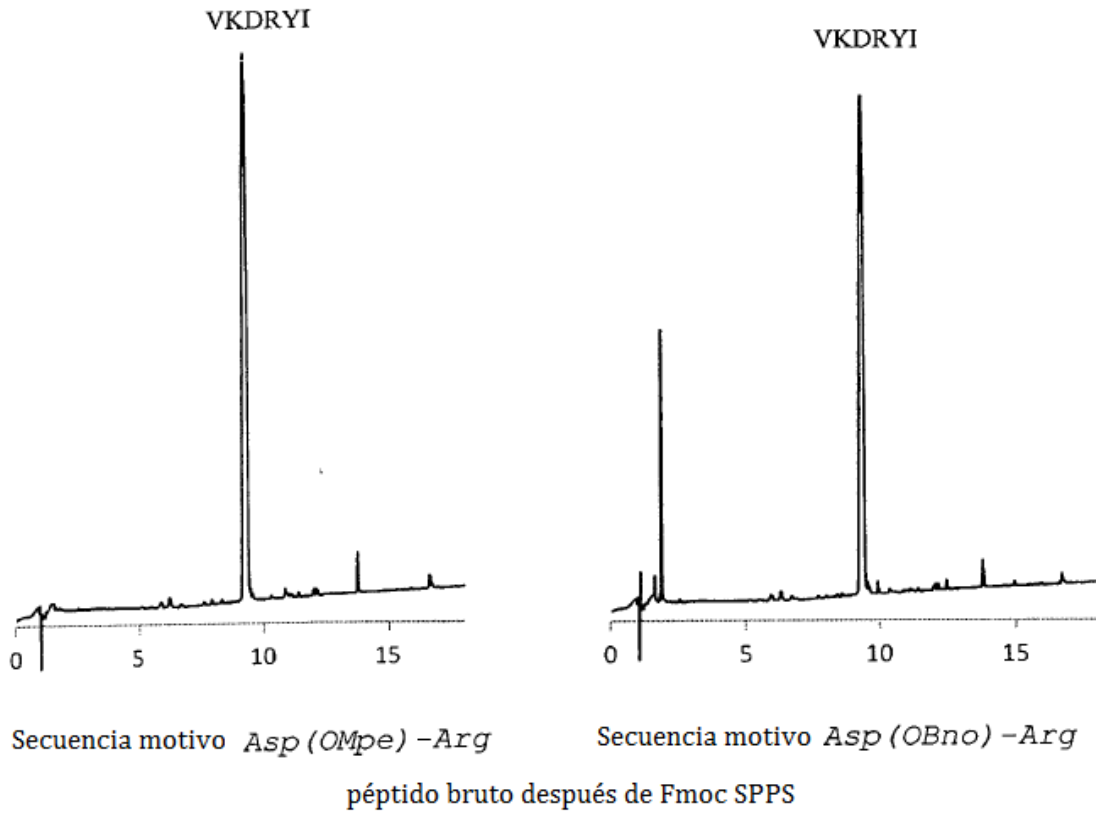


Fig. 7

