

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 979**

51 Int. Cl.:

**C07D 233/72** (2006.01)

**C07K 5/00** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2014 PCT/EP2014/055506**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14147124**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2014 E 14710915 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2976331**

54 Título: **Síntesis de productos peptídicos que contienen hidantoína**

30 Prioridad:

**21.03.2013 EP 13160384**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.07.2017**

73 Titular/es:

**SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH  
(100.0%)  
Brüningstrasse 50  
65929 Frankfurt am Main, DE**

72 Inventor/es:

**HENKEL, BERND**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 623 979 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Síntesis de productos peptídicos que contienen hidantoína.

5 La presente invención se refiere a un método para sintetizar un producto peptídico que comprende al menos un grupo hidantoína. El producto peptídico puede usarse como material de referencia para el control de calidad de péptidos farmacéuticos, en particular para el control de calidad de péptidos de exendina. Además, la invención se refiere a bloques de construcción de hidantoína, un método para fabricar dichos bloques de construcción y su uso para la síntesis de productos peptídicos.

10 Usando procedimientos de síntesis de ADN recombinante y procedimientos químicos de síntesis de fase sólida, conocidos, se han sintetizado varias proteínas y péptidos para uso farmacéutico. La producción de estas proteínas y péptidos, sin embargo, conduce con frecuencia a una multiplicidad de subproductos de síntesis no deseados. Éste es especialmente el caso cuando se producen por síntesis en fase sólida. Con un aumento en longitud del péptido/de la proteína, conduciendo a un aumento en las etapas de síntesis, estos subproductos pueden estar presentes en 50 a 70% del producto bruto.

15 La síntesis de bloques de construcción de hidantoína para la síntesis peptídica es conocida de Zhang et al., J. Org. Chem. 71 (2.006), 1.750-1.753; Opacic et al., J. Pept. Res. 66 (2.005), 85-93; Vazquez et al., Chem. Med. Chem. 3 (2.008), 979-985; Takeuchi et al., Chem. Commun. (2.000), 785-786; Nefzi et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 8 (1.998), 2.273-2.278; Lamothe et al., J. Comb. Chem. 4 (2.002), 73-78; Chong and Petillo, Tetrahedron Lett. 40 (1.999), 2.493-2.496 y Park and Kurth, Tetrahedron Lett. 41, 2.000: 7.409-7.413).

20 Los documentos anteriores describen la síntesis en fase sólida de compuestos de hidantoína. No se conoce la preparación de hidantoínas que comprenda cadenas laterales protegidas de ácido lábil, sin embargo.

Quibell et al. (1.993), J Chem Soc Perkin Trans 1, 2.843-2.849, describe la síntesis de azapéptidos por la técnica Fmoc/*terc*-butil/poliámida. Se observaron fragmentos que contenían hidantoína de azapéptidos después de fragmentación por BAR-EM (Bombardeo con Átomos Rápidos - Espectrometría de Masas).

25 Royo *et al.* (2.001), Tetrahedron Letters 42: 7.387-7.391, describen la síntesis en fase sólida de péptidos que contienen una unidad de Arg-Gly-Asp (RGD), en la que se ha introducido un grupo hidantoína procedente de RG por ciclación.

Witkowska *et al.* (2.004), J Peptide Sci, 10: 285-290 describe la síntesis de un péptido que contiene hidantoína por ciclación de los aminoácidos Tyr e Ile en un péptido lineal.

30 Mhidia *et al.* (2.010), J Peptide Sci, 16: 141-147 describe la escisión de un enlace peptídico azaGly con cobre (II), dando como resultado un producto de escisión que contiene un grupo hidantoína.

Yahalom *et al.* (2.000), J Med Chem, 43: 2.824-2.830 describe una hidantoína que contiene hexapéptido. El grupo hidantoína ha sido introducido por ciclación de aminoácidos N-terminales D-Trp y Leu.

35 Los presentes autores describen una nueva síntesis de productos peptídicos que contienen hidantoína a partir de dipéptidos con cadenas laterales protegidas por grupos protectores de ácido lábil tales como tritilo (Trt), *terc*-butilo (tBu) o *butoxi*-carbonilo (Boc). Las hidantoínas resultantes pueden comprender aminoácidos trifuncionales con grupos protectores de cadena lateral de ácido lábil o una combinación de un aminoácido bifuncional y un aminoácido trifuncional con un grupo protector de cadena lateral intacta.

40 Además, los autores han proporcionado un nuevo procedimiento para la fabricación de hidantoínas sobre un portador de ácido lábil, por ej., una resina CCT (cloruro de clorotritilo) junto con una ciclación, por ej., en presencia de un trifosgeno.

Además, la solicitud proporciona nuevos bloques de construcción de hidantoína adecuados para la síntesis de péptidos en fase sólida para preparar productos peptídicos con un grupo hidantoína N-terminal.

Este método se conoce de manera ejemplar para el péptido Lixisenatida (AVE0010), un agonista de GLP-1 con una longitud de 44 aminoácidos de largo. Se conoce la secuencia de aminoácidos de Lixisenatida en la SEC ID N° 1:

H-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-

45 G-A-P-P-S-K-K-K-K-K-NH<sub>2</sub>

Se produce lixisenatida por un procedimiento químico de síntesis en fase sólida.

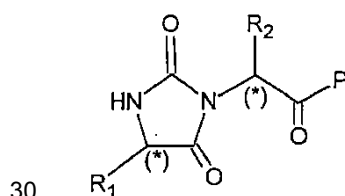
En el producto bruto de lixisenatida, se encontraron varios péptidos que contenían hidantoína N-terminal como subproductos. Se asume que se generan por una reacción del nitrógeno de la amida (N-1) con el grupo carbonilo del grupo de protección Fmoc (Fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc)) como se muestra en la Figura 1. Después de la

eliminación de fluorenilmetanol, se forma un producto peptídico que comprende un grupo hidantoína N-terminal que conduce a la terminación prematura de la síntesis peptídica. El péptido Des [1-12]-hidantoín-(13)-AVE0010 como se muestra en la Figura 1 se identificó como un producto que no podía separarse completamente de AVE0010 por procedimientos cromatográficos.

- 5 Los presentes autores han encontrado ahora que una síntesis fijada como objetivo de productos peptídicos con grupos hidantoína N-terminales tales como Des[1-12]-hidantoín-(15-44)-AVE0010 (también denominada como Des[1-12] (13)-AVE0010) modificada es posible por síntesis peptídica en fase sólida usando un bloque de construcción de hidantoína específico. Este bloque de construcción fue sintetizado por acoplamiento de un bloque de construcción de Met Fmoc-prottegido sobre una resina de cloruro de clorotritilo (CCT). Después de escisión de Fmoc, se acopló un bloque de construcción adicional, es decir, un bloque de construcción Gln tritilo (Trt)-prottegido de cadena lateral. Después de escisión adicional de Fmoc, se llevó a cabo ciclación en presencia de trifosgeno. La escisión del bloque de construcción de hidantoína de la resina se llevó a cabo en condiciones suaves, por ejemplo, en una disolución al 20% de hexafluoroisopropanol (HFIP) en diclorometano (DCM) para mantener el grupo protector de ácido lábil en la cadena lateral de Gln. El esquema de reacción se muestra en la Figura 2. El producto ácido (S)-2-((S)-2,5-dioxo-4-[2-(tritol-carbamoi)-etil]-imidazolidin-1-il)-4-metilsulfanilbutírico resultante es un nuevo compuesto. Este compuesto puede acoplarse a un producto peptídico completamente protegido, por ej., H-(15-44)-AVE0010, inmovilizado sobre un portador sólido adecuado. Después de tratamiento con un reactivo adecuado, por ej., un cóctel de King (King et al., Int. J. Peptide Protein Res. 36 (1.990), 255-266), el péptido hidantoín-modificado, por ej., Des[1-12] (13)-AVE0010 modificada puede escindirse del portador.
- 10
- 15
- 20 Este principio puede usarse para preparar cualquier bloque de construcción de hidantoína sobre un portador adecuado, por ej., resina de CCT. Se retienen los grupos protectores de ácido lábil del dipéptido original. Los bloques de construcción de hidantoína resultantes pueden acoplarse al N-terminal de péptidos para proporcionar péptidos que contienen grupo hidantoína después de escisión del portador.

25 El método de la presente invención permite una síntesis fijada como objetivo de productos peptídicos que contienen grupo hidantoína con alto rendimiento y pureza. Estos productos peptídicos pueden usarse por ej., como materiales de referencia para el control de calidad de productos peptídicos farmacéuticos tales como lixisenatida.

Un objeto de la presente invención es un método para sintetizar un producto peptídico que comprende un grupo hidantoína N-terminal de fórmula (I) o una sal o solvato del mismo:



en el que:

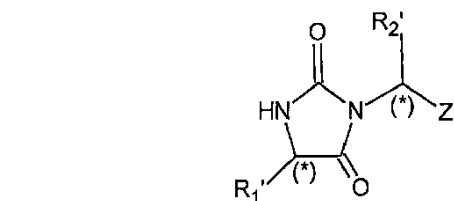
R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cadenas laterales de aminoácidos,

P es un resto peptídico y

35 (\*) en cada caso indica independientemente un átomo de C opcionalmente asimétrico,

que comprende las etapas:

(a) acoplar un bloque de construcción de hidantoína de fórmula (II)



en la que

R<sub>1</sub>' es una cadena lateral de aminoácidos opcionalmente protegida,

R<sub>2</sub>' es una cadena lateral de aminoácidos opcionalmente protegida,

Z es un grupo carboxi y

(\*) en cada caso indica independientemente un átomo de C opcionalmente asimétrico,  
a un producto peptídico de fórmula (III)

5 H<sub>2</sub>N-P'

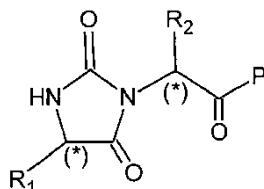
en la que

P' es un resto peptídico que comprende opcionalmente cadenas laterales de aminoácidos protegidas, preferiblemente acopladas a un portador de fase sólida,

(b) opcionalmente escindir grupos protectores de cadenas laterales de aminoácidos protegidos y

10 (c) aislar y opcionalmente purificar el producto peptídico (I).

Se describe en la presente memoria un producto peptídico que comprende un grupo hidantoína N-terminal de fórmula (I) o una sal o solvato del mismo:



15

en el que:

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cadenas laterales de aminoácidos,

P es un resto peptídico y

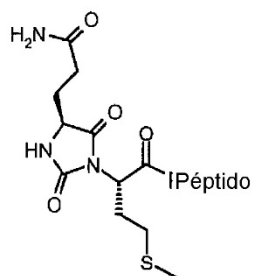
(\*) en cada caso indica independientemente un átomo de C opcionalmente asimétrico,

20 En particular, el producto peptídico es un producto peptídico agonista de GLP, por ej., un producto peptídico de exendina tal como exendina-4, liraglutida o lixisenatida (AVE0010) o un agonista receptor de GLP-1 como GLP-1(7-36), glucagón, oxintomodulina y péptidos que se unen y activan tanto el glucagón como el receptor de GLP-1 (Hjort et al., Journal of Biological Chemistry, 269, 30.121-30.124, 1.994; Day JW et al., Nature Chem. Biol. 5: 749-757, 2.009) y suprimen el aumento de peso corporal y reducen la ingesta de alimento, que se describen en las solicitudes de patente internacional WO 2008/071972, WO 2008/101017, WO 2009/155258, WO 2010/096052, WO 2010/096142, WO 2011/075393, WO 2008/152403, WO 2010/070251, WO 2010/070252, WO 2010/070253, WO 2010/070255, WO 2011/160630, WO 2011/006497, patente de EE.UU. 2011/152181, patente de EE.UU. 2011/152182, patente internacional WO 2011/117415, patente internacional WO 2011/117416, o GIP y péptidos que se unen y activan tanto el GIP como el receptor de GLP-1 y opcionalmente el receptor de glucagón y mejoran el control glucémico, suprimen el aumento de peso corporal y reducen la ingesta de alimentos, como se describe en las solicitudes de patente internacional WO 2011/119657, WO 2012/138941, WO 2010/011439, WO 2010/148089, WO 2011/094337 y WO 2012/088116.

35 En la presente memoria se describe el uso de un producto peptídico de fórmula (I) como se describió anteriormente o una sal o solvato del mismo, como material de referencia para el control de calidad de péptidos farmacéuticos, en particular de péptidos agonistas de GLP, por ej., péptidos de exendina tales como lixisenatida.

Un objeto más de la presente invención es un producto peptídico que comprende des[1-12]-hidantoín-(15-44)-AVE0010, en el que des[1-12]-hidantoín-(15-44)-AVE0010 tiene la secuencia de aminoácidos X-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>, en el que X acoplado a la secuencia de aminoácidos es:

40

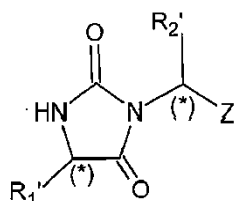


Se describe en la presente memoria un estuche de reactivos para determinar la cantidad de impurezas en una composición de producto de lixisenatida (AVE0010) que comprende:

- 5 al menos una preparación de reserva de una lixisenatida truncada de manera N-terminal con un grupo hidantoína N-terminal, en particular Des [1-12]-hidantoín(15-44)-AVE0010.

- En la presente memoria se describe un método para el control de calidad de una composición que comprende un producto peptídico farmacéutico, en particular un péptido agonista de GLP, por ej., un producto peptídico de exendina, más en particular un producto de lixisenatida (AVE0010), que comprende determinar de manera  
 10 cuantitativa la cantidad de un producto peptídico con un grupo hidantoína N-terminal de fórmula (I) o una sal o solvato del mismo en dicha composición.

Se describe en la presente memoria un compuesto de fórmula (II) o una sal o solvato del mismo:



15

en el que:

R<sub>1</sub>' es una cadena lateral de aminoácidos opcionalmente protegida,

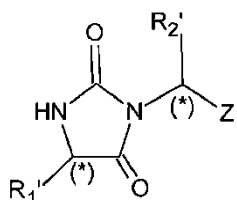
R<sub>2</sub>' es una cadena lateral de aminoácidos opcionalmente protegida,

Z es un grupo carboxi y

20

(\*) en cada caso indica independientemente un átomo de C opcionalmente asimétrico,

Se describe en la presente memoria un método para preparar un compuesto de fórmula (II) o una sal o solvato del mismo:



25

en el que:

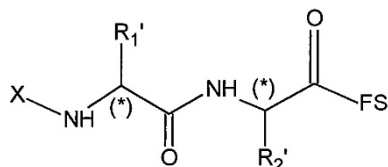
R<sub>1</sub>' es una cadena lateral de aminoácidos opcionalmente protegida,

R<sub>2</sub>' es una cadena lateral de aminoácidos opcionalmente protegida,

Z es un grupo carboxi y

(\*) en cada caso indica independientemente un átomo de C opcionalmente asimétrico,

que comprende ciclar un dipéptido ligado a portador de fórmula (IV) preferiblemente en presencia de trifosgeno:



5

en el que:

$R_1$ ,  $R_2$  y (\*) son como se describió anteriormente,

FS es un portador de fase sólida y

X es un grupo aminoprotector,

10 y escindir el producto ciclado del portador, preferiblemente en condiciones en las que se retengan los grupos protectores en las cadenas laterales  $R_1$  y/o  $R_2$ .

La presente invención se refiere a un método para sintetizar un producto peptídico que comprende un grupo hidantoína N-terminal y un resto P peptídico. El término "producto peptídico" incluye péptidos y proteínas con una longitud de al menos 5 o al menos 10 aminoácidos y hasta 50 o hasta 100 aminoácidos o incluso más largos. El producto peptídico puede consistir en bloques de construcción de aminoácidos genéticamente codificados o puede comprender bloques de construcción de aminoácidos no genéticamente codificados, por ejemplo, aminoácidos que no se encuentran en la naturaleza, D-aminoácidos o aminoácidos químicamente modificados o puede consistir en varias cadenas peptídicas ligadas, por ejemplo, mediante puentes disulfuro. El producto peptídico puede contener además modificaciones en el N- y/o C-terminal y/o en las cadenas laterales, por ej., una acilación, una amidación o la adición de grupos de cadena lateral no peptídicos tales como grupos lipófilos. El producto peptídico puede ser lineal o circular, en el que los péptidos circulares pueden obtenerse, por ej., por acoplamiento de una cadena lateral al C-terminal. Preferiblemente, el producto peptídico tiene una longitud de 5-100 aminoácidos.

El producto peptídico de la invención puede estar en forma de sal, por ej., una sal o solvato farmacéuticamente aceptable, por ej., un hidrato. Se describen ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (20ª ed.) ed. A. R. Gennaro A. R., 2.000, Lippencott Williams & Wilkins o en Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, Selection and Use, e. d. P. H. Stahl, C. G. Wermuth, 2.002, publicado de manera conjunta por Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich, Suiza y Wiley-VCH, Weinheim, Alemania. Preferiblemente, la sal es un trifluoroacetato o acetato.

La síntesis del producto peptídico se lleva a cabo por procedimientos químicos de síntesis, en particular por un procedimiento de síntesis en fase sólida que es conocido en la técnica, por ej., un procedimiento que implica un acoplamiento escalonado de bloques de construcción de síntesis a una cadena peptídica ligada a un portador, por ej., una resina sintética. En una realización preferida de la invención, el producto peptídico es un péptido agonista de GLP, en particular un péptido de exendina, por ej., exendina-4, liraglutida o lixisenatida (AVE0010), que comprende un grupo hidantoína N-terminal de fórmula (I). Más preferiblemente, el producto peptídico es un producto peptídico truncado de manera N-terminal que comprende un grupo hidantoína N-terminal de fórmula (I) y una secuencia de aminoácidos que está truncada de manera N-terminal con respecto al péptido no modificado, en particular un péptido agonista de GLP tal como un péptido de exendina, truncado de manera N-terminal, por ej., exendina-4 truncada de manera N-terminal, liraglutida, lixisenatida (AVE0010), GLP-1(7-36), glucagón, oxintomodulina y péptidos que se unen y activan tanto el glucagón como el receptor de GLP-1 (Hjort et al., Journal of Biological Chemistry, 269, 30.121-30.124, 1.994; Day JW et al., Nature Chem. Biol. 5: 749-757, 2.009) y suprimen el aumento de peso corporal y reducen la ingesta de alimento, que se describen en las solicitudes de patente internacional WO 2008/071972, WO 2008/101017, WO 2009/155258, WO 2010/096052, WO 2010/096142, WO 2011/075393, WO 2008/152403, WO 2010/070251, WO 2010/070252, WO 2010/070253, WO 2010/070255, WO 2011/160630, WO 2011/006497, patente de EE.UU. 2011/152181, patente de EE.UU. 2011/152182, patente internacional WO 2011/117415, patente internacional WO 2011/117416 o GIP y péptidos que se unen y activan tanto el GIP como el receptor de GLP-1 y opcionalmente el receptor de glucagón y mejoran el control glucémico, suprimen el aumento de peso corporal y reducen la ingesta de alimentos, como se describe en las solicitudes de patente internacional WO 2011/119657, WO 2012/138941, WO 2010/011439, WO 2010/148089, WO 2011/094337 y WO 2012/088116. Ejemplos adicionales de productos peptídicos son insulinas y análogos de insulina o inhibidores de DPP-4, en particular en forma truncada de manera N-terminal. Preferiblemente, los productos peptídicos truncados de manera N-terminal comprenden una truncación N-terminal de al menos 2, al menos 5 o al menos 10 aminoácidos y retienen al menos 5, al menos 10, al menos 15 o al menos 20 aminoácidos C-terminales.

La etapa (a) del método de la invención comprende acoplar un bloque de construcción de hidantoína de fórmula (II) a un producto peptídico de fórmula (III). El bloque de construcción es un compuesto dipeptídico obtenible por ciclación de un dipéptido acoplado en fase sólida.

El bloque (II) de construcción comprende un grupo Z, en el que Z es un grupo carboxi capaz de acoplarse a un grupo amino en condiciones de acoplamiento, es decir, en presencia de reactivos de acoplamiento en un disolvente orgánico. Además, el bloque (II) de construcción comprende dos cadenas laterales R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, de aminoácidos opcionalmente protegidas, que pueden seleccionarse, por ej., de His, Asp, Arg, Phe, Ala, Cys, Gln, Glu, Lys, Met, Asn, Ser, Tyr, Thr, Ile, Trp en su configuración D o L y aminoácidos no naturales (por ej., no codificados de manera genética), por ej., como se enumera en los catálogos del proveedor y preferiblemente aminoácidos no naturales con un heteroátomo en la cadena lateral tal como α-amino-glicina, ornitina, ácido 2,6-diamino-4-hexinoico, 4,5-deshidrolisina, ω-hidroxi-norarginina, ω-amino-arginina, β-(2-quinolil)-alanina, α-metil-histidina, espinacina, 3-amino-tirosina, ácido α,γ-diaminobutírico, ácido α,β-diaminopropiónico, β-(1-piperazinil)-alanina, δ-hidroxi-lisina, homoarginina, ω-metil-arginina, ácido 4-amino-piperidin-4-carboxílico, 2,5-diyodo-histidina, 3-metil-histidina, 4-amino-fenilalanina, β-(2-piridil)-alanina, penicilamina, ácido cis-octahidroindol-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, β-(3-piridil)-alanina, β-fluoro-alanina, β-(2-tienil)-alanina, β-(3-benzotienil)-alanina, 4-clorofenil-alanina, β,β-difenil-alanina, β-cloro-alanina, ácido azetidín-2-carboxílico, tiaprolina, α-metil-prolina, 4-fluoroprolina, 4-nitro-fenilalanina, 4-yodo-fenilalanina, 3,4-dicloro-fenilalanina, β-yodo-alanina, 3,4-deshidroprolina, 4-bromo-fenilalanina, 3-fluoro-fenilalanina, 2,6-difluoro-fenilalanina, ácido pipecólico, 4-fluoro-fenilalanina, N-In-metil-triptófano, 2,3,4,5,6-pentafluoro-fenilalanina, β-ciano-alanina, alo-treonina, citrulina, hidroxil-prolina, 2-mercapto-histidina, 4-azido-fenilalanina, 3-yodo-tirosina, α-metiltriptófano, 4-metiltriptófano, ácido 1,2,3,4-tetrahidronorharman-3-carboxílico, 4-benzoil-fenilalanina, β-ureido-alanina, ácido piroglutámico, tiocitrulina, β-(2-tiazolil)-alanina, β-(3,4-dihidroxifenil)-serina, 4-ciano-fenilalanina, 3-nitro-tirosina, 3,5-dibromo-tirosina, ácido 7-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, tironina, homocisteína, ácido 2-oxotiazolidín-4-carboxílico, homocitrulina, β-(1,2,4-triazol-1-il)-alanina, β-(2-tienil)-serina, 3-hidroximetil-tirosina, 3,5-dinitro-tirosina, 3,5-diyodo-tirosina, 5-hidroxi-triptófano, β-(7-metoxi-cumarin-4-il)-alanina, ácido γ-hidroxi-glutámico, ácido γ-metilen-glutámico, ácido γ-carboxi-glutámico, ácido α-aminoadípico, ácido 2-aminoheptanodioico, ácido α-aminosubérico, 4-carboxi-fenilalanina, ácido cisteico, 4-fosfono-fenilalanina, 4-sulfometil-fenilalanina, ácido 4-(7-hidroxi-4-cumarinil)-aminobutírico.

Preferiblemente, R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> son cadenas laterales de aminoácidos protegidas con un grupo protector de ácido lábil tal como tritilo (Trt), t-butilo (tBu), butoxicarbonilo (Boc), un grupo protector de ácido lábil tal como fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) u otro grupo protector tal como carboxibencilo (Cbz) o aliloxicarbonilo (Alloc) u otros grupos protectores para los grupos hidroxil-, carboxil-, amino mencionados en Green's Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 4ª ed. 2.006, capítulo 7, Protection for the Amino Group, mencionado en Protecting Groups, P. J. Kocierski, Thieme, 3ª ed. 2.005 o mencionado en Houben-Weyl, Methods in Organic Chemistry, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, 4ª ed. 2.001. Más preferiblemente, R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> son cadenas laterales de Glu, Gln, Asp, Asn o Ser protegidas. En una realización preferida en particular, R<sub>1</sub> es una cadena lateral de Glu y/o Gln protegida y R<sub>2</sub> es una cadena lateral de Met.

El bloque (II) de construcción tiene además opcionalmente átomos de carbono asimétricos indicados por (\*) cuando R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son diferentes de H. Preferiblemente, los átomos de carbono asimétricos están en la configuración L.

El producto (III) peptídico tiene un grupo amino libre capaz de reaccionar con grupo Z de bloque (II) de construcción de hidantoína en condiciones de acoplamiento, es decir, en presencia de reactivos de acoplamiento en un disolvente orgánico. El producto peptídico también comprende un resto P' peptídico con preferiblemente al menos 5, 10 ó 20 aminoácidos, que está ligado preferiblemente a un portador de fase sólida, por ejemplo, una resina adecuada para síntesis peptídica.

La reacción de acoplamiento en la etapa (a) se lleva a cabo en presencia de un reactivo de acoplamiento tal como TBTU (tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio), HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il),1,1,3,3-tetrametiluronio) o/y HOBT (1-hidroxibenzotriazol)/DIC (diisopropilcarbodiimida) y una base orgánica tal como DIPEA (diisopropiletilamina) en un disolvente orgánico adecuado tal como DMF (dimetilformamida).

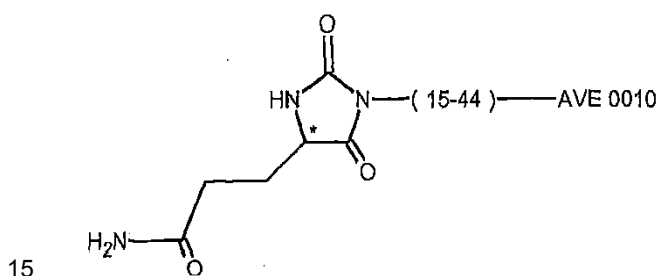
La etapa (b) opcional del método inventivo comprende escindir grupos protectores de cadenas laterales aminoprotegidas presentes en el producto peptídico. La desprotección se lleva a cabo al final de la síntesis peptídica en presencia de agentes de desprotección habituales tales como DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno), piperidina, etc.

La etapa (c) comprende aislar y opcionalmente purificar el producto (I) peptídico. La etapa (c) puede comprender escindir el péptido del portador en fase sólida usando regiones de escisión adecuadas tales como cóctel de King. Estos procedimientos pueden llevarse a cabo en condiciones clásicas como se conoce en la técnica.

La etapa (c) puede comprender además purificar el producto (I) peptídico de otros péptidos obtenidos en el procedimiento de síntesis peptídica. Preferiblemente, la purificación implica un procedimiento cromatográfico. El término "procedimiento cromatográfico" implica un procedimiento cromatográfico convenientemente para la purificación de productos peptídicos, incluyendo por ej., cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de

interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño y, en particular, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y más en particular HPLC de fase inversa o combinaciones de varios procedimientos. Más preferiblemente, el procedimiento cromatográfico implica al menos una etapa de cromatografía HPLC de fase inversa.

- 5 Como resultado del método de síntesis inventivo, se puede obtener un producto peptídico aislado y purificado que comprende un grupo hidantoína de fórmula (I). Preferiblemente, este producto peptídico está sustancialmente exento de productos de degradación, por ejemplo, productos de desamidación y/o productos racemizados. Preferiblemente, la cantidad de productos de degradación es menor que 1%, 0,5% o 0,1% basado en la cantidad del producto total cuando se mide mediante cromatografía, por ej., HPLC.
- 10 El producto peptídico es preferiblemente un péptido terapéutico, por ej., un péptido de exendina, en particular lixisenatida (AVE0010) con al menos un grupo hidantoína. Preferiblemente, el producto peptídico es un péptido de exendina truncado de manera N-terminal, en particular una lixisenatida (AVE0010) truncada de manera N-terminal con un grupo hidantoína N-terminal. El producto peptídico de la presente invención es



que se designa como [Des 1-12]-hidantoín(15-44)-AVE0010 o (13)-AVE0010 [Des-1-12]- modificada.

- 20 El producto peptídico de la invención puede usarse como material de referencia, por ej., para el control de calidad de péptidos farmacéuticos, en particular para uso en un método de control de calidad, en el que la cantidad de subproductos que contienen grupo hidantoína no deseado en una preparación de productos peptídicos se determina de manera cuantitativa.

- 25 La determinación cuantitativa de subproductos en una muestra de producto peptídico implica preferiblemente espectrometría de masas. Además de espectrometría de masas, la determinación puede implicar un procedimiento previo cromatográfico, por ejemplo, para separar otras impurezas del producto peptídico o de otros ingredientes de la composición. Preferiblemente, la espectrometría de masas se combina con HPLC.

- 30 La espectrometría de masas se basa en una medición de la relación masa a carga de partículas cargadas. En un procedimiento de espectrometría de masas típico, la muestra se carga en el instrumento de espectrometría de masas y se volatiliza. Se ionizan los componentes de la muestra y se separan los iones resultantes en el analizador de masas mediante campos electromagnéticos. Los iones resultantes son detectados y se trata la señal en un espectro de masas. Para la ionización de productos peptídicos, se puede usar ionización por electro spray (ESI) y desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) (ambas por sus siglas en inglés). Los iones resultantes pueden detectarse por métodos muy sensibles tales como sistemas de detección de Orbitrap o Resonancia Ciclotrónica de Iones (ICR) con Transformada de Fourier (FT) (ambas por sus siglas en inglés).

- 35 Mediante espectrometría de masas, se puede identificar un pico procedente de un subproducto que contiene grupo hidantoína.

Además, la presente descripción se refiere a un bloque de construcción de hidantoína peptídico según la fórmula (II) como se describió anteriormente. La presente invención se refiere al uso de este bloque de construcción para la síntesis de péptidos, en particular en la fabricación de un material de referencia para el control de calidad de productos peptídicos y a un método para preparar un compuesto de fórmula (II).

- 40 Este método implica ciclar un dipéptido ligado a portador de fórmula (IV) como se describió anteriormente en presencia de un reactivo de ciclación tal como trifosgeno y opcionalmente una base, por ej., trifosgeno/piridina, trifosgeno/trietilamina, trifosgeno/imidazol o carbonildiimidazol opcionalmente junto con trietilamina u otra base. Alternativamente, se puede usar carbonato de N,N-disuccinimidilo en presencia de 4-dimetilaminopiridina o cloruro de trimetilsililo en presencia de una base tal como trietilamina. El producto ciclado puede escindirse del portador en condiciones suaves en las que se retienen los grupos protectores, en particular un grupo protector lábil lateral en las cadenas R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub>, laterales, si hay. Preferiblemente, el portador de fase sólida es una resina de ácido lábil tal como una resina de cloruro de clorotritilo, una resina de Wang, una resina de Rink u otras resinas de ácido lábil conocidas por el experto en la materia. Las condiciones de escisión pueden implicar el uso de cóctel de King u otros reactivos de escisión que consisten en cantidades variables de TFA u otros reactivos ácidos, tiorreactivos, agua o tris-silanos



alquilados y mezclas de los mismos.

Además, la presente invención se explicará con más detalle por los siguientes ejemplos que describen la síntesis, purificación cromatográfica y caracterización analítica del péptido que contiene grupo hidantoína Des[1-12]-hidantoín-(15-44)-AVE 0010.

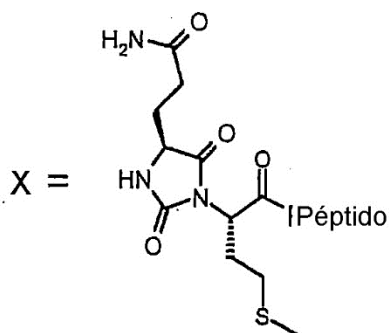
## 5 Ejemplos

### 1. Síntesis de Des[1-12]-hidantoín-(15-44)-AVE 0010

Des[1-12]-hidantoín-(15-44) AVE 0010 es un subproducto en la síntesis del producto peptídico farmacéutico AVE0010. Se genera cuando se forma un grupo hidantoína por ciclación de aminoácidos Gln (13) y Met (14) y posterior terminación de la síntesis peptídica (c. f. Figura 1).

10 La secuencia de aminoácidos de Des [1-12]-hidantoín-(15-44)-AVE 0010 es como sigue:

X-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>



15 1.1 Síntesis de la construcción de bloque ácido 2-{2,5-dioxo-4-[2-(tritol-carbamoyl)-etil]-imidazolidin-1-il}-4-metilsulfanilbutírico.

La síntesis partió de Fmoc-Met-CCT-resina que se protegió usando piperidina al 25% en DMF seguido por el acoplamiento de Fmoc-Gln(Trt)-OH usando HBTU/DIPEA como reactivos de acoplamiento. Se escindió de nuevo el grupo Fmoc. Para cierre del anillo, se lavaron 23,2 g de resina H-Gln(Trt)-Met-CCT con diclorometano y se trataron después con 1,5 g de trifosgeno en piridina neta. Se agitó la suspensión durante la noche. Con posterioridad, se lavó la resina cinco veces con diclorometano y diisopropil éter cada una y se secó a vacío.

Se puso en contacto la resina seca con 100 ml de hexafluoroisopropanol al 20% en diclorometano. Después de agitación durante 20 min a temperatura ambiente, se retiró la fase líquida en nitrógeno. Se recogió la disolución y se evaporó a sequedad después de adición de heptano.

25 Se purificó el producto bruto obtenido de ese modo por EM-CL (espectrometría de masas con cromatografía líquida) por cromatografía por desorción súbita usando un cartucho que contenía material C18. Para purificación, se usó un gradiente lineal partiendo de acetonitrilo al 35% en agua más TFA al 0,1% y alcanzando acetonitrilo al 80% en agua más TFA al 0,1%. Se recogieron fracciones y se analizaron por EM-CL. Se combinaron las fracciones que contenían el producto y se evaporaron a sequedad después de adición de tolueno. En total, se obtuvieron 1,8 g de ácido (S)-2-  
30 {(S)-2,5-dioxo-4-[2-(tritol-carbamoyl)-etil]-imidazolidin-1-il}-4-metilsulfanilbutírico.

Se confirmó la identidad del producto purificado por EM-CL: Peso molecular 545,2 g/moles (encontrado), 545,0 g/moles (calculado).

### 1.2 Síntesis de Des[1-12]-hidantoín-(15-44)-AVE 0010

35 Como material de partida, se usó resina (15-44)-AVE0010 Fmoc-protegida de manera N-terminal. Se preparó el material de partida por síntesis de péptidos en fase sólida en condiciones clásicas.

Se mezclaron 5 g de resina Fmoc-(15-44)-AVE0010 seca con 25 ml de DMF, se agitaron y se hincharon durante 30 min. Después se aspiró DMF. Después de hinchamiento, se llevó a cabo escisión de Fmoc en piperidina (25% en

DMF).

Después, se acoplaron 709,4 mg de ácido (S)-2-((S)-2,5-dioxo-4-[2-(trifil-carbamoil)-etil]-imidazolidin-1-il)-4-metil-sulfanil-butírico (cf. 1.1) sobre el material de partida en presencia de 503 mg de HBTU, 62,8 mg de HOBT y 603 µl de DIPEA.

- 5 Se succionó la resina seca y lavada con 3 x 30 ml de DMF, 3 x 30 ml de diclorometano, 3 x 30 ml de metanol y 3 x 30 ml de diisopropil éter. Después de secado durante la noche, se obtuvieron 9,225 g de resina Des(1-12)-hidantoín-(13)-AVE-0010.

10 La escisión del péptido de la resina se llevó a cabo en condiciones clásicas con 2,5 g de fenol/2,5 ml de H<sub>2</sub>O/2,5 ml de tioanisol/1,25 ml de etanoditiol/41 ml de ácido trifluoroacético. El rendimiento fue 1,49 g de producto bruto Des[1-12]-hidantoín-(15-44)-AVE0010.

### 2. Purificación cromatográfica de Des[1-12]-hidantoín-(15-44)-AVE 0010

15 Se llevó a cabo purificación mediante dos etapas de RP-HPLC (cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa, por sus siglas en inglés) y posterior liofilización. Las etapas de RP-HPLC se realizaron con un dispositivo Varian PrepStar. Se usaron como fase estacionaria columnas de acero inoxidable empaquetadas con material de fase inversa C18 (por ej., Daisogel C18). Se usaron H<sub>2</sub>O + ácido trifluoroacético al 0,1% como fase A móvil y acetonitrilo + ácido trifluoroacético al 0,1% como fase B móvil. El gradiente se realizó a 21-90% de fase B móvil.

Se obtuvieron 0,36 g de Des [1-12] hidantoín-(15-44)-AVE0010 con una pureza de 92,15% (% área cuando se mide mediante HPLC). Se muestra un cromatograma analítico del producto purificado en la Figura 3.

### 3. Caracterización analítica

- 20 El producto purificado se caracterizó mediante espectrometría de masas. Se usó AVE0010 purificada como patrón de referencia.

25 Esta caracterización analítica mostró el producto correcto Des [1-12] hidantoín-(15-44)-AVE0010 con un peso molecular (M+H)<sup>+</sup> = 3.623,014. El patrón de AVE0010 mostró un peso molecular de 4.856,544. La diferencia de masa de Des[1-12]-hidantoín(13)-AVE0010 a AVE0010 de 1.233,53 corresponde a los aminoácidos (His-Gly-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-12 H<sub>2</sub>O + CO). El peso molecular monoisotópico teórico de Des (1-12) hidantoín-(15-44)-AVE0010 es 3.621,95.

### Listado de secuencias

- <110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
- <120> Síntesis de productos peptídicos que contienen hidantoína.
- 30 <130> 55131P EP
- <160> 1
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- < 211> 44
- 35 < 212> PRT
- < 213> Secuencia artificial
- <220>
- < 223> Lixisenatida agonista de GLP-1
- <400> 1

40

ES 2 623 979 T3

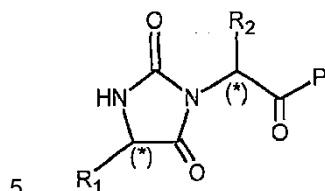
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys  
35 40

## REIVINDICACIONES

1. Un método para sintetizar un producto peptídico que comprende un grupo hidantoína N-terminal de fórmula (I) o una sal o solvato del mismo:



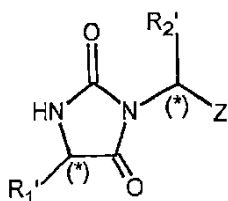
en el que:

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son cadenas laterales de aminoácidos,

P es un resto peptídico y

10 (\*) en cada caso indica independientemente un átomo de C opcionalmente asimétrico, que comprende las etapas:

(a) acoplar un bloque de construcción de hidantoína de fórmula (II)



en la que

R<sub>1</sub>' es una cadena lateral de aminoácidos opcionalmente protegida,

R<sub>2</sub>' es una cadena lateral de aminoácidos opcionalmente protegida,

Z es un grupo carboxi y

20 (\*) en cada caso indica independientemente un átomo de C opcionalmente asimétrico a un producto peptídico de fórmula (III)



25 en la que

P' es un resto peptídico que comprende opcionalmente cadenas laterales de aminoácidos protegidas, preferiblemente acopladas a un portador de fase sólida,

(b) opcionalmente escindir grupos protectores de cadenas laterales de aminoácidos protegidas y

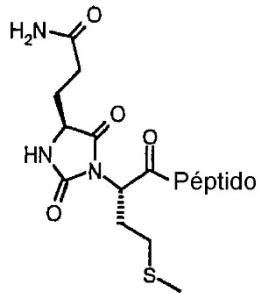
(c) aislar y opcionalmente purificar el producto peptídico (I).

30 2. El método según la reivindicación 1, en el que R<sub>1</sub>' y/o R<sub>2</sub>' son cadenas laterales de aminoácidos protegidos con un grupo protector de ácido lábil, un grupo protector de base lábil u otro grupo protector.

3. El método según la reivindicación 1, en el que R<sub>1</sub>' y/o R<sub>2</sub>' son cadenas laterales de Glu, Gln, Asp, Asn o Ser protegidas.

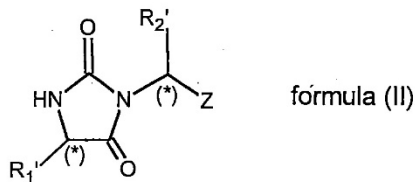
35 4. Un producto peptídico que comprende des[1-12]-hidantoín-(15-44)-AVE0010, en el que des[1-12]-hidantoín-(15-44)-AVE0010 tiene la secuencia de aminoácidos X-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-

Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>, en la que X acoplado a la secuencia de aminoácidos es:



5

5. Uso de un compuesto de fórmula (II) o una sal o solvato del mismo, como un bloque de construcción para la síntesis de péptidos, en particular en la fabricación de un material de referencia para el control de calidad de productos peptídicos,



10 en la que

R<sub>1</sub> es una cadena lateral de aminoácidos opcionalmente protegida seleccionada del grupo His, Arg, Cys, Asp, Gln, Lys, Met, Asn, Ser, Tyr, Trp y aminoácidos no naturales, preferiblemente aminoácidos no naturales con un heteroátomo en la cadena lateral,

15

R<sub>2</sub> es una cadena lateral de aminoácidos opcionalmente protegida seleccionada del grupo His, Arg, Cys, Asp, Gln, Lys, Met, Asn, Ser, Tyr, Trp y aminoácidos no naturales, preferiblemente aminoácidos no naturales con un heteroátomo en la cadena lateral,

Z es un grupo carboxi y

(\*) en cada caso indica independientemente un átomo de C opcionalmente asimétrico.

Figura 1

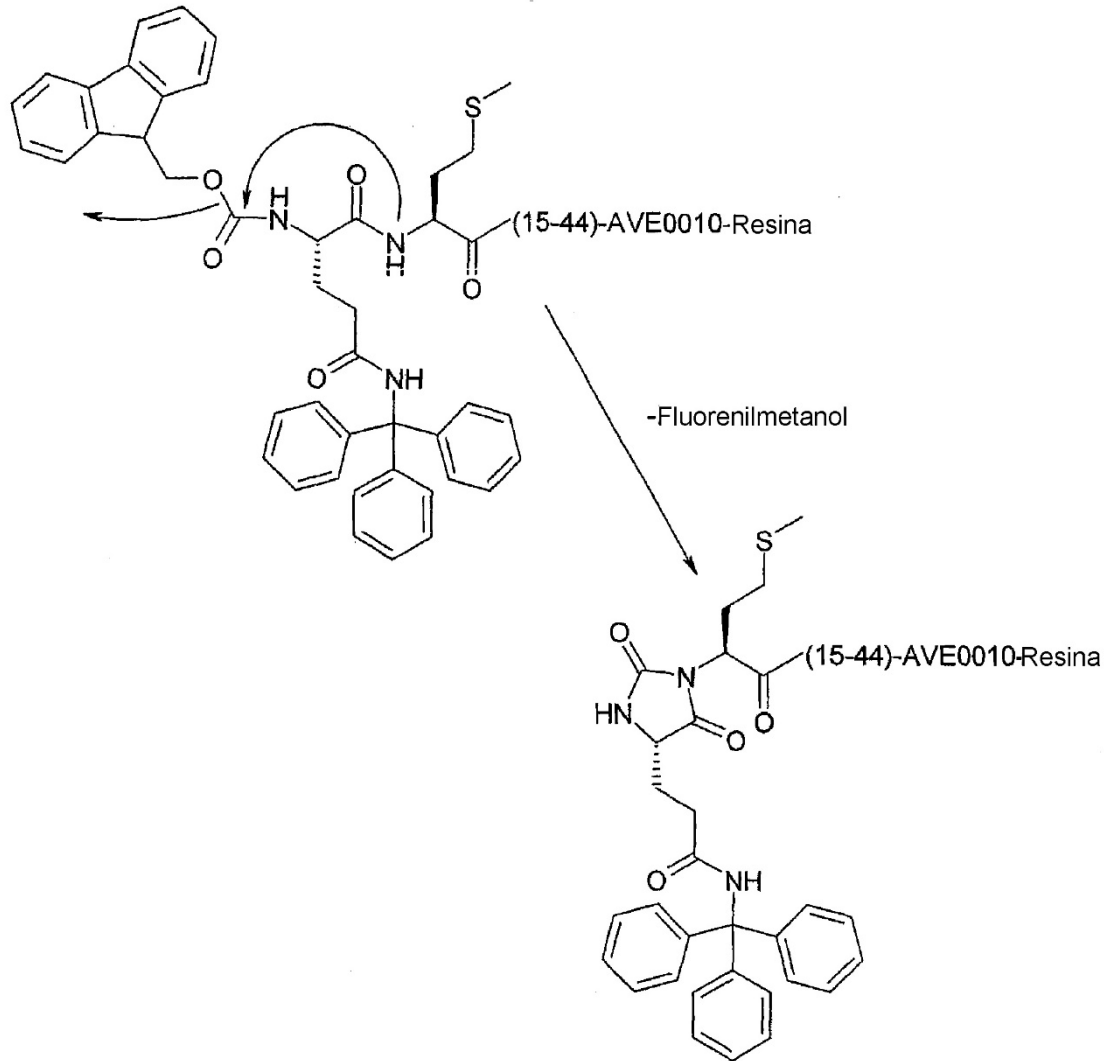


Figura 2

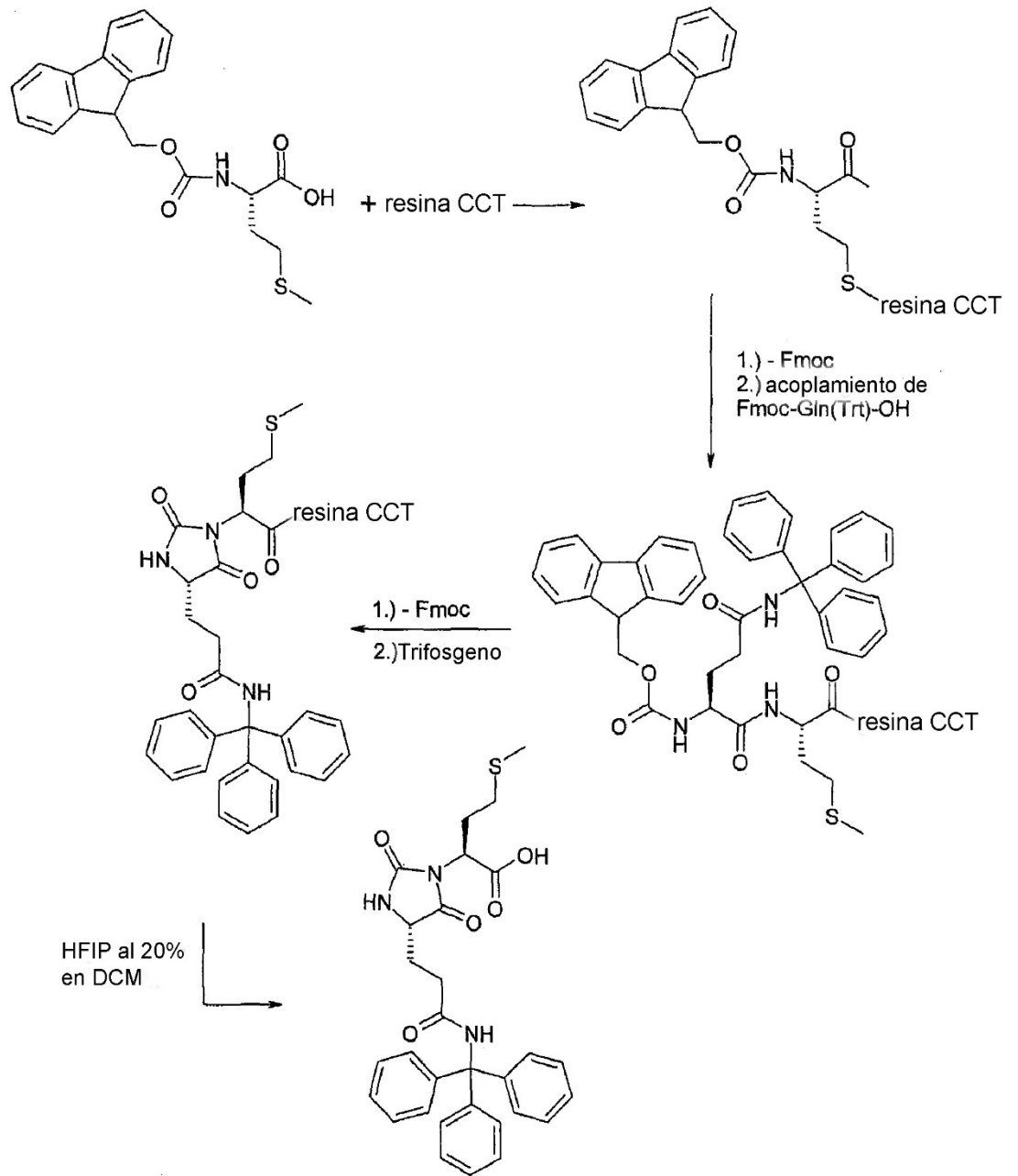


Figura 3

