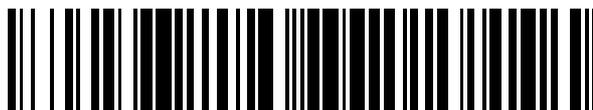


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 999**

51 Int. Cl.:

**C07K 5/062** (2006.01)

**C07K 1/02** (2006.01)

**C07K 1/107** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2010 PCT/JP2010/065334**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2011 WO11027897**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2010 E 10813843 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2476691**

54 Título: **Método para preparar un compuesto lipopeptídico**

30 Prioridad:

**07.09.2009 JP 2009205855**

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

**10.04.2018**

73 Titular/es:

**NISSAN CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (100.0%)  
7-1 Kanda-Nishiki-cho 3-chome Chiyoda-ku  
Tokyo 101-0054, JP**

72 Inventor/es:

**KAKIUCHI, NOBUYUKI;  
SHOJI, TAKEAKI;  
HIRASADA, KAZUKI;  
MATSUMOTO, KEIGO y  
YAMAGUCHI, HIROKI**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

ES 2 662 999 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**

Método para preparar un compuesto lipopeptídico

**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método nuevo de preparación de compuestos lipopeptídicos.

**Técnica anterior**

10 Los geles funcionales a los que se les han conferido diversas capacidades, tales como una capacidad de retención de sustancias, una capacidad para responder a estímulos externos y, dada la preocupación por el medio ambiente, biodegradabilidad, están atrayendo recientemente la atención.

15 Por ejemplo, se espera que derivados de péptidos compuestos por una combinación de un biocomponente tal como una cadena peptídica (resto hidrófilo) y una cadena de alquilo (resto hidrófobo) se usen como materiales de partida y productos intermedios en productos farmacéuticos y productos químicos agrícolas, y también, como materiales que tienen propiedades anfífilas, en gelificantes, espesantes y similares. Por ejemplo, se ha notificado que los compuestos de dipéptido que tienen un resto lipídico especial y se denominan "ácido 2-(naftalen-2-iloxi)acético" + "glicilglicina o glicilserina, etc." se convierten en hidrogeles (documento no de patente 1).

20 Recientemente, se han divulgado lipopéptidos nuevos compuestos por glicina o histidina unidos a ácido palmítico o similar como tales compuestos lipopeptídicos (véanse, por ejemplo, los documentos de patente 1 y 2). Se han divulgado métodos para preparación de tales lipopéptidos que implican la síntesis de péptidos en fase sólida, aunque tales métodos sólo son capaces de sintetizar una pequeña cantidad de producto y, por tanto, son poco adecuados para la producción en masa.

25 También se ha notificado, como método que implica la síntesis en fase líquida de un compuesto lipopeptídico, una reacción para obtener N-(1-cianoaceto)histidina haciendo reaccionar 1-cianoacetato de etilo con histidina en presencia de etóxido de sodio (documento no de patente 2).

Además, se ha notificado un método para amidar histidina y un compuesto de éster que implica el uso de una enzima en agua (documento no de patente 3).

35 En los ejemplos anteriores de la bibliografía, con respecto no sólo a compuestos lipopeptídicos terminados en histidina (His), sino también compuestos lipopeptídicos que terminan con arginina (Arg), asparagina (Asn), glutamina (Gln), lisina (Lys) o triptófano (Trp), no se han descrito casos en los que la reacción se lleve a cabo en un disolvente mixto compuesto por un disolvente orgánico no polar y un disolvente alcohólico.

40 Documento de patente 1: WO 2009/005151

Documento de patente 2: WO 2009/005152

Documento no de patente 1: Z. Yang, B. Xu *et al.*, J. Mater. Chem. 2007, 17, 850-854.

45 Documento no de patente 2: Huanan Shifan Daxue Xuebao, Ziran Kexueban (2007), (2), 89-92.

Documento no de patente 3: Yokozeki, Kenzo; Hara, Seiichi; Journal of Biotechnology (2005), 115 (2), 211-220.

50 N. Sewald y H. -D. Jakubke en "Peptides: Chemistry and Biology", Wiley-VCH, 1 de marzo de 2009; páginas 235-237, describen el uso de ésteres activos en la formación de enlaces peptídicos mediante aminólisis de éster.

55 En el documento EP 1.995.254 A1 se describe un método de producción de un péptido descomponiendo un éster activo. En los ejemplos, se emplean aminoácidos protegidos en N tales como BoC-Pro-NHEt y agentes de condensación tales como clorhidrato de EDC y HOBt monohidratado con el fin de preparar péptidos a una escala de gramos (ejemplo 1, por ejemplo).

60 Tanmoy Kar *et al.*, LANGMUIR, 2009 vol. 25, n.º 15, 8639-8648 describen la preparación de gelificantes basados en dipéptidos que implican la reacción de un aminoácido de N-lipoílo con un aminoácido protegido en C en presencia de un agente de activación seguido por hidrólisis del grupo protector de C.

**Sumario de la invención**

65 Problema que va a solucionarse mediante la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar un método práctico para preparar compuestos lipopeptídicos,

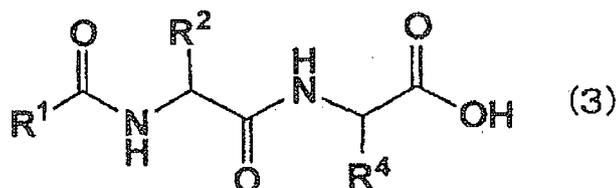
método que es capaz de una producción en masa económica sin requerir operaciones complicadas.

Medios para solucionar el problema

5 Los inventores han realizado investigaciones extensas con el fin de lograr el objeto anterior. Como resultado, han descubierto que, cuando se amidan el grupo amino sobre un aminoácido y un compuesto de éster, llevando a cabo la reacción en presencia de una base y dentro de un disolvente que contiene un disolvente orgánico no polar, puede obtenerse directamente un compuesto lipopeptídico sin el uso de grupos protectores.

10 Por consiguiente, la presente invención se refiere a:

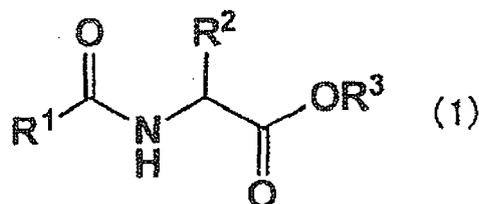
1. Un método de preparación de un compuesto lipopeptídico de fórmula (3):



15 (en la que R<sup>1</sup> es un grupo alifático C<sub>9-23</sub>; R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1-4</sub> que puede tener una ramificación C<sub>1-2</sub>; y R<sup>4</sup> es un grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Y grupo en el que n es un número de desde 1 hasta 4 e Y es un grupo amino, un grupo guanidino, un grupo -CONH<sub>2</sub>, un anillo de 5 miembros o de 6 miembros que puede contener desde 1 hasta 3 átomos de nitrógeno, o un heterociclo condensado compuesto por un anillo de 5 miembros y un anillo de 6 miembros) o una sal farmacéuticamente utilizable del mismo,

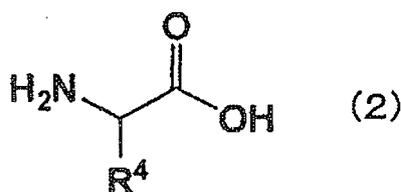
20

caracterizado el método porque comprende: hacer reaccionar un compuesto de éster de fórmula (1):



25 (en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son tal como se definieron anteriormente, y R<sup>3</sup> es un grupo alquilo C<sub>1-6</sub>, un grupo halogenoalquilo C<sub>1-6</sub>, un grupo hidroxialquilo C<sub>1-6</sub> o un grupo arilo que puede estar sustituido con un grupo alquilo C<sub>1-6</sub>) con un compuesto de α-aminoácido de fórmula (2):

25



30

(en la que R<sup>4</sup> es tal como se definió anteriormente) en presencia de una base y dentro de un disolvente que contiene un disolvente orgánico no polar.

35 2. El método según el punto 1, caracterizado porque el disolvente contiene un disolvente orgánico no polar y un alcohol.

40 3. El método según el punto 1, en el que cualquier n es un número de desde 1 hasta 4 e Y es un grupo amino, un grupo guanidino o un grupo -CONH<sub>2</sub>, o n es 1 e Y es un grupo pirrol, un grupo imidazol, un grupo pirazol o un grupo imidazol.

4. El método según el punto 1, en el que R<sup>1</sup> es un grupo alifático lineal C<sub>11-21</sub> que puede tener desde 0 hasta 2 enlaces insaturados.

45 5. El método según el punto 1, en el que R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1-3</sub> que puede tener una ramificación C<sub>1</sub>.

6. El método según el punto 1, en el que R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno, grupo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-

butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo; y R<sup>4</sup> es un grupo aminometilo, aminoetilo, 3-aminopropilo, 4-aminobutilo, carbamoilmetilo, 2-carbamoiletilo, 3-carbamoilbutilo, 2-guanidinoetilo, 3-guanidinopropilo, pirrolmetilo, imidazolmetilo, pirazolmetilo o 3-indolmetilo.

5 7. El método según el punto 1, en el que R<sup>3</sup> es un grupo metilo o etilo.

8. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en el que la base es al menos una seleccionada de entre metales alcalinos, sales de ácidos inorgánicos de metales alcalinos, hidróxidos de metales alcalinos, alcóxidos de metales alcalinos, aminas alicíclicas y disoluciones en alcohol o dispersiones en alcohol de los mismos.

10 9. El método según el punto 8, en el que la base es al menos una seleccionada de entre un sodio metálico, potasio metálico, carbonato de sodio, carbonato de potasio, fosfato de potasio, fosfato de sodio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, metóxido de sodio, etóxido de sodio, metóxido de potasio, etóxido de potasio, t-butóxido de potasio, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno, 1,5-diazabicyclo[4.3.0]-5-noneno, y disoluciones en alcohol o dispersiones en alcohol de los mismos.

15 10. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en el que el disolvente orgánico no polar es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en compuestos aromáticos, compuestos alifáticos saturados y compuestos alifáticos insaturados.

20 11. El método según el punto 2, en el que el disolvente incluye ciclohexano y metanol o etanol.

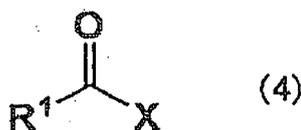
25 12. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 11, en el que la reacción del compuesto de éster de fórmula (1) con el compuesto de  $\alpha$ -aminoácido de fórmula (2) se lleva a cabo a una temperatura de reacción de 60±5 °C.

13. El método según uno cualquiera de los puntos 1 a 12, que incluye una etapa de neutralizar con un haluro de hidrógeno un producto obtenido a partir de la reacción del compuesto de éster de fórmula (1) con el compuesto de  $\alpha$ -aminoácido de fórmula (2).

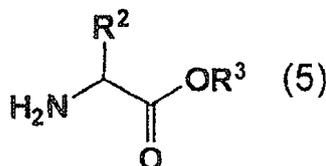
30 14. El método según el punto 13, en el que la etapa de neutralización se lleva a cabo en un disolvente que contiene agua y un alcohol.

15. El método según cualquiera de los puntos 1 a 14, en el que

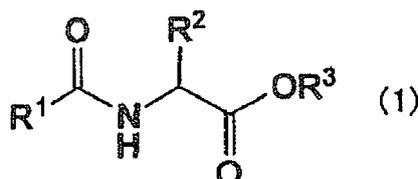
35 el método comprende además una etapa de hacer reaccionar un compuesto de fórmula (4):



40 (en la que X es un átomo de halógeno, un grupo alcóxido C<sub>1-6</sub> o un grupo -OC(O)R<sup>1</sup> en el que R<sup>1</sup> es tal como se definió anteriormente) con un compuesto de fórmula (5):



45 (en la que R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son tal como se definieron anteriormente) para obtener el compuesto de éster de fórmula (1):



(en la que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son tal como se definieron anteriormente).

50 Efectos de la invención

El método de preparación de la presente invención permite que se obtenga un compuesto lipopeptídico deseado con un alto rendimiento.

5 Además, debido a que el método de preparación de la presente invención no va acompañado por racemización del aminoácido usado, no requiere operaciones de protección y desprotección complicadas, y no usa el reactivo costoso conocido como agente de condensación, es un método de preparación práctico que puede utilizarse como procedimiento de producción industrial.

10 Además, debido a que el compuesto lipopeptídico diana tiene la capacidad de gelificar, puede emplearse incluso en casos en los que el aislamiento de la forma libre del compuesto sea difícil.

### Breve descripción de los dibujos

15 [Figura 1] La figura 1 muestra el espectro de IR de la N-palmitoil-Gly-His obtenida en el ejemplo 20.

[Figura 2] La figura 2 muestra el espectro de IR de la N-palmitoil-Gly-His obtenida en el ejemplo comparativo 2.

[Figura 3] La figura 3 muestra el espectro de IR de la N-palmitoil-Gly-His obtenida en el ejemplo comparativo 3.

20 [Figura 4] La figura 4 muestra el espectro de IR de la N-palmitoil-Gly-His obtenida en el ejemplo comparativo 4.

[Figura 5] La figura 5 muestra el espectro de IR de la N-palmitoil-Gly-His obtenida en el ejemplo comparativo 5.

25 [Figura 6] La figura 6 muestra el espectro de IR de la N-palmitoil-Gly-His obtenida en el ejemplo comparativo 6.

[Figura 7] La figura 7 muestra el espectro de IR de la N-palmitoil-Gly-His obtenida en el ejemplo comparativo 7.

[Figura 8] La figura 8 muestra el espectro de IR de la N-palmitoil-Gly-His obtenida en el ejemplo comparativo 8.

30 [Figura 9] La figura 9 muestra el espectro de HPLC de la forma libre de N-palmitoil-Gly-His (figura 9A) y el espectro de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de la forma libre de N-palmitoil-Gly-His racémica (figura 9B) obtenida en el ejemplo 21.

### Modos para llevar a cabo la invención

35 Tal como se indicó anteriormente, se han propuesto diversos métodos para preparar compuestos lipopeptídicos, aunque ha existido la necesidad de un método que fuera capaz de producción a gran volumen sin requerir operaciones complicadas tales como la protección y desprotección de grupos funcionales y agentes de condensación o reactivos de grupo protector costosos.

40 Por ejemplo, en el método descrito en el documento no de patente 2, tras la reacción, es difícil eliminar la dimetilformamida (DMF) de alto punto de ebullición, altamente polar usada como disolvente. Cuando se han hecho intentos de preparar los compuestos lipopeptídicos que son el objeto de la presente invención mediante los métodos descritos en el documento no de patente 2 y documento no de patente 3, se han producido problemas tales como gelificación de la DMF o el agua que sirve como disolvente de reacción.

45 Los inventores han descubierto que, en la preparación de un compuesto de éster de fórmula (1), utilizando  $R^3$  como grupo protector, se logran mejoras en el rendimiento del producto y facilidad de operación, además de que el resto  $-OR^3$  que se ha formado como resultado puede utilizarse como grupo saliente en la amidación posterior con el compuesto de  $\alpha$ -aminoácido de fórmula (2), dando como resultado, por tanto, un método de preparación que tiene una rentabilidad excelente, genera pocos desechos y tiene un bajo impacto medioambiental.

50 Además, se usan un disolvente no polar y un alcohol que es inmiscible con el mismo a temperatura ambiente como disolventes de reacción, efectuándose la reacción en condiciones calentadas en un estado en el que estos disolventes de reacción se han convertido en un disolvente mixto sustancialmente uniforme. Tras la finalización de la reacción, se enfría la mezcla de reacción, provocando que se separe en un disolvente no polar y una disolución en alcohol que contiene como producto una sal (por ejemplo, una sal de metal alcalino) del compuesto lipopeptídico, permitiendo así una fácil recuperación y descarte del disolvente no polar.

60 Además, usando un disolvente no polar, a diferencia del caso de DMF o agua que se han usado hasta la fecha en la preparación de compuestos lipopeptídicos, tras la finalización y el enfriamiento de la reacción, puede prevenirse la gelificación.

65 El uso de una disolución acuosa de un haluro de hidrógeno en una cantidad necesaria para neutralizar la (alcalinidad) humoral de la disolución en alcohol tras la reacción hizo posible completar la neutralización sin gelificación asociada, permitiendo una fácil recuperación del compuesto lipopeptídico en su forma libre.

Por tanto, se descubrió que puede sintetizarse fácilmente un compuesto lipopeptídico con un alto rendimiento sin racemización acompañante del aminoácido usado, descubrimiento que en última instancia condujo a la presente invención.

La presente invención se describe más completamente a continuación.

En esta memoria descriptiva, "n" representa normal, "i" iso, "s" o "sec" secundario, "t" o "terc" terciario, "c" ciclo, "o" orto, "m" meta y "p" para. "Me" se refiere a un grupo metilo, "Bu" a un grupo butilo y "tBu" a un grupo butilo terciario.

En la fórmula (1),  $R^1$  es un grupo alifático  $C_{9-23}$ . Es deseable que  $R^1$  sea preferiblemente un grupo alifático lineal  $C_{11-21}$  o un grupo alifático lineal  $C_{11-21}$  que tiene uno o dos enlaces insaturados.

En el presente documento, los ejemplos especialmente preferidos de grupos alifáticos representados por  $R^1$  incluyen grupos nonilo, decilo, undecilo, dodecilo (laurilo), tridecilo, tetradecilo (miristilo), pentadecilo, hexadecilo (palmitilo), heptadecilo (margarilo), octadecilo (estearilo), nonadecilo, icosilo y henicosisilo.

En la fórmula (1),  $R^2$  es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo  $C_{1-4}$  que puede tener una ramificación  $C_{1-2}$ .

En  $R^2$  anterior, un "grupo alquilo  $C_{1-4}$  que puede tener una ramificación  $C_{1-2}$ " se refiere a un grupo alquilo que tiene una cadena principal de 1 a 4 carbonos y una ramificación de 1 ó 2 átomos de carbono. Los ejemplos ilustrativos incluyen grupos metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, sec-butilo y terc-butilo.

$R^2$  es preferiblemente un átomo de hidrógeno o un alquilo  $C_{1-3}$  que puede tener una ramificación  $C_1$ , y es más preferiblemente un átomo de hidrógeno. En el presente documento, "un alquilo  $C_{1-3}$  que puede tener una ramificación  $C_1$ " se refiere a un grupo alquilo que tiene una cadena principal de 1 a 3 átomos de carbono y una ramificación de 1 átomo de carbono. Los ejemplos ilustrativos incluyen grupos metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, i-butilo y sec-butilo. Se prefieren grupos metilo, i-propilo, i-butilo y sec-butilo.

En la fórmula anterior (1),  $R^3$  es un grupo alquilo  $C_{1-6}$ , un grupo halogenoalquilo  $C_{1-6}$ , un grupo hidroxialquilo  $C_{1-6}$  o un grupo arilo que puede estar sustituido con un grupo alquilo  $C_{1-6}$ .

En el presente documento, los ejemplos preferidos de grupos alquilo representados por  $R^3$  incluyen grupos metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, sec-butilo y terc-butilo; se prefieren más grupos metilo y etilo.

En la fórmula anterior (2),  $R^4$  es un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo  $C_{1-7}$  que puede tener una ramificación  $C_{1-3}$ , un grupo fenilmetilo, grupo feniletilo o un grupo  $-(CH_2)_n-Y$ , y es preferiblemente un grupo  $-(CH_2)_n-Y$ .

En el grupo  $-(CH_2)_n-Y$ , n es un número de desde 1 hasta 4 e Y es un grupo amino, un grupo guanidino, un grupo  $-CONH_2$ , un anillo de 5 miembros o de 6 miembros que puede contener desde 1 hasta 3 átomos de nitrógeno, o un heterociclo condensado compuesto por un anillo de 5 miembros y un anillo de 6 miembros.

En el grupo  $-(CH_2)_n-Y$  anterior, Y es preferiblemente un grupo amino, un grupo guanidino, un grupo  $-CONH_2$ , un grupo pirrol, un grupo imidazol, un grupo pirazol o un grupo indol, y es más preferiblemente un grupo imidazol. En el grupo  $-(CH_2)_n-Y$  anterior, n es preferiblemente 1 ó 2, y más preferiblemente 1. Por tanto, el grupo  $-(CH_2)_n-Y$  anterior es preferiblemente un grupo aminometilo, 2-aminoetilo, 3-aminopropilo, 4-aminobutilo, carbamoilmetilo, 2-carbamoiletilo, 3-carbamoilbutilo, 2-guanidinoetilo, 3-guanidinopropilo, pirrolmetilo, imidazolmetilo, pirazolmetilo o 3-indolmetilo; más preferiblemente un grupo 4-aminobutilo, carbamoilmetilo, 2-carbamoiletilo, 3-guanidinopropilo, imidazolmetilo o 3-indolmetilo; e incluso más preferiblemente un grupo imidazolmetilo.

Por tanto, los ejemplos preferidos del compuesto lipopeptídico de la fórmula (3) anterior incluyen los siguientes compuestos formados a partir de un resto lipídico y un resto dipeptídico, en los que las abreviaturas de aminoácidos usadas son histidina (His), glicina (Gly), valina (Val), isoleucina (Ile), alanina (Ala), arginina (Arg), asparagina (Asn), glutamina (Gln), leucina (Leu), lisina (Lys) y triptófano (Trp): N-lauroil-Gly-His, N-lauroil-Gly-Trp, N-lauroil-Gly-Gln, N-lauroil-Gly-Asn, N-lauroil-Gly-Arg, N-lauroil-Gly-Lys, N-lauroil-Ala-His, N-lauroil-Ala-Trp, N-lauroil-Ala-Gln, N-lauroil-Ala-Asn, N-lauroil-Ala-Arg, N-lauroil-Ala-Lys, N-lauroil-Val-His, N-lauroil-Val-Trp, N-lauroil-Val-Gln, N-lauroil-Val-Asn, N-lauroil-Val-Arg, N-lauroil-Val-Lys, N-lauroil-Leu-His, N-lauroil-Leu-Trp, N-lauroil-Leu-Gln, N-lauroil-Leu-Asn, N-lauroil-Leu-Arg, N-lauroil-Leu-Lys, N-lauroil-Ile-His, N-lauroil-Ile-Trp, N-lauroil-Ile-Gln, N-lauroil-Ile-Asn, N-lauroil-Ile-Arg, N-lauroil-Ile-Lys, N-miristoil-Gly-His, N-miristoil-Gly-Trp, N-miristoil-Gly-Gln, N-miristoil-Gly-Asn, N-miristoil-Gly-Arg, N-miristoil-Gly-Lys, N-miristoil-Ala-His, N-miristoil-Ala-Trp, N-miristoil-Ala-Gln, N-miristoil-Ala-Asn, N-miristoil-Ala-Arg, N-miristoil-Ala-Lys, N-miristoil-Val-His, N-miristoil-Val-Trp, N-miristoil-Val-Gln, N-miristoil-Val-Asn, N-miristoil-Val-Arg, N-miristoil-Val-Lys, N-miristoil-Leu-His, N-miristoil-Leu-Trp, N-miristoil-Leu-Gln, N-miristoil-Leu-Asn, N-miristoil-Leu-Arg, N-miristoil-Leu-Lys, N-miristoil-Ile-His, N-miristoil-Ile-Trp, N-miristoil-Ile-Gln, N-miristoil-Ile-Asn, N-miristoil-Ile-Arg, N-miristoil-Ile-Lys, N-palmitoil-Gly-His, N-palmitoil-Gly-Trp, N-palmitoil-Gly-Gln, N-palmitoil-Gly-Asn, N-palmitoil-Gly-Arg, N-palmitoil-Gly-Lys, N-palmitoil-Ala-His, N-palmitoil-Ala-Trp, N-palmitoil-Ala-Gln, N-palmitoil-Ala-Asn, N-palmitoil-Ala-Arg, N-palmitoil-Ala-Lys, N-palmitoil-Val-His, N-palmitoil-Val-Trp, N-palmitoil-Val-Gln, N-palmitoil-



Lys, N-palmitoil-Ala-His, N-palmitoil-Ala-Trp, N-palmitoil-Ala-Gln, N-palmitoil-Ala-Asn, N-palmitoil-Ala-Lys, N-palmitoil-Val-His, N-palmitoil-Val-Trp, N-palmitoil-Val-Gln, N-palmitoil-Val-Asn, N-palmitoil-Val-Lys, N-margaroil-Gly-His, N-margaroil-Gly-Gln, N-margaroil-Gly-Asn, N-margaroil-Gly-Lys, N-margaroil-Gly-His, N-margaroil-Gly-Gln, N-margaroil-Gly-Asn, N-margaroil-Gly-Lys, N-estearoil-Gly-His, N-estearoil-Gly-Gln, N-estearoil-Gly-Asn, N-estearoil-Gly-Lys, N-elaidoil-Gly-His, N-elaidoil-Gly-Gln, N-elaidoil-Gly-Asn, N-elaidoil-Gly-Lys, N-araquidoil-Gly-His, N-araquidoil-Gly-Gln, N-araquidoil-Gly-Asn, N-araquidoil-Gly-Lys, N-behenoil-Gly-His, N-behenoil-Gly-Gln, N-behenoil-Gly-Asn y N-behenoil-Gly-Lys.

Los ejemplos ilustrativos de la base usada en la reacción del compuesto de éster de fórmula (1) con el compuesto de  $\alpha$ -aminoácido de fórmula (2) incluyen metales alcalinos tales como sodio metálico y potasio metálico; sales de ácidos inorgánicos de metales alcalinos, tales como carbonato de sodio, carbonato de potasio, fosfato de potasio y fosfato de sodio; hidróxidos de metales alcalinos tales como hidróxido de sodio e hidróxido de potasio; alcóxidos de metales alcalinos tales como metóxido de sodio y t-butóxido de potasio; aminas grasas tales como trietilamina y tri-n-butilamina; aminas alicíclicas tales como 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno (a continuación en el presente documento denominado DBU) y 1,5-diazabicyclo[4.3.0]-5-noneno (a continuación en el presente documento denominado DBN); aminas aromáticas tales como piridina y 2-metil-5-etilpiridina; y disoluciones en alcohol o dispersiones en alcohol de tales compuestos de base (sólidos). Uno cualquiera de estos puede usarse individualmente o dos o más pueden usarse en combinación.

De las bases anteriores, desde el punto de vista de aumentar la conversión y potenciar adicionalmente el rendimiento de la sustancia diana, se prefiere metóxido de sodio, etóxido de sodio, metóxido de potasio, etóxido de potasio, t-butóxido de potasio, DBU o DBN. Se prefiere metóxido de sodio o una disolución en alcohol o dispersión en alcohol de estos alcóxidos de metal.

El metóxido de sodio puede ser un sólido, una disolución en metanol o una dispersión en metanol, y puede prepararse de antemano usando sodio metálico y metanol o prepararse dentro del sistema de reacción y usarse. Desde el punto de vista de la facilidad de operación y rendimiento, se prefiere el uso de una disolución en metanol a aproximadamente el 28 % disponible comercialmente.

La cantidad de base usada, aunque no está sujeta a ninguna limitación particular, es normalmente de aproximadamente 1 a 10 equivalentes, preferiblemente de 1 a 5 equivalentes, y más preferiblemente de 1,3 a 2 equivalentes, con respecto al compuesto de fórmula (1).

El disolvente orgánico no polar incluido en el disolvente usado en la reacción anterior no está sujeto a ninguna limitación particular; de los diversos tipos de disolventes usados en síntesis orgánica general, puede seleccionarse y usarse adecuadamente un disolvente que no ejerza influencia sobre la reacción.

Los ejemplos ilustrativos incluyen compuestos hidrocarbonados alifáticos saturados tales como pentano, c-pentano, hexano, c-hexano, metil-c-hexano, heptano, c-heptano, octano, decano y decalina; compuestos hidrocarbonados alifáticos insaturados tales como 1-hexeno y 1-octeno; y compuestos hidrocarbonados aromáticos tales como benceno, tolueno, xileno y o-diclorobenceno. Estos disolventes pueden usarse individualmente o como combinaciones de dos o más de los mismos.

De estos disolventes orgánicos no polares, con el fin de impedir la hidrólisis del compuesto de éster de fórmula (1), el aumento de la conversión y la mejora adicional del rendimiento del producto diana, se prefiere el uso de al menos uno seleccionado del grupo que consiste en tolueno, xileno, orto-diclorobenceno, pentano, hexano, heptano, octano, c-pentano, c-hexano, metil-c-hexano, c-heptano y 1-hexeno, prefiriéndose especialmente c-hexano.

El disolvente usado en la reacción incluye preferiblemente un alcohol además del disolvente no polar anterior. El alcohol usado en el presente documento no está sujeto a ninguna limitación particular. De los diversos tipos de disolventes alcohólicos que se usan en síntesis orgánica general, puede seleccionarse y usarse adecuadamente uno que no ejerza influencia sobre la reacción.

Los ejemplos ilustrativos incluyen metanol, etanol, n-propanol, i-propanol, n-butanol, i-butanol, s-butanol, t-butanol, n-pentanol, i-pentanol, s-pentanol, t-pentanol, n-hexanol, i-hexanol, s-hexanol, t-hexanol, octanol, decanol, etilenglicol, 1,3-butanodiol y glicerol. Estos disolventes pueden usarse individualmente o dos o más de los mismos pueden usarse en combinación.

De estos disolventes, con el fin de hacer que el disolvente disuelva el compuesto lipopeptídico de fórmula (3) y la base y, en condiciones de reacción calentadas, se mezcle uniformemente con el disolvente orgánico no polar anterior, y también con el fin de tener una disolución en el mismo de la sal (por ejemplo, una sal de metal alcalino) del compuesto lipopeptídico obtenido a medida que el producto experimenta, con el enfriamiento tras la reacción, separación de fases del disolvente orgánico no polar, el disolvente es preferiblemente al menos uno seleccionado del grupo que consiste en metanol, etanol, n-propanol, i-propanol, n-butanol, i-butanol, s-butanol y t-butanol. Se prefiere especialmente metanol o etanol.

La reacción entre el compuesto de éster de fórmula (1) y el compuesto de  $\alpha$ -aminoácido de fórmula (2) puede llevarse a cabo a cualquier temperatura hasta los puntos de ebullición de los disolventes usados. Sin embargo, para obtener el producto diana en un tiempo corto y con un buen rendimiento, la temperatura es preferiblemente de desde 20 hasta 150 °C, más preferiblemente desde 40 hasta 80 °C, e incluso más preferiblemente desde 55 hasta 65 °C.

El tiempo de reacción fluctúa dependiendo de la temperatura de reacción, la base usada y el tipo de disolvente orgánico, y por tanto, no puede especificarse estrictamente, pero es generalmente de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 48 horas.

La forma de la reacción puede ser una en la que los reactivos se mezclan todos a temperatura ambiente, luego se calientan hasta la temperatura de reacción, o una en la que el control de la reacción se lleva a cabo mediante la adición gota a gota de los reactivos necesarios. Alternativamente, la reacción puede llevarse a cabo de cualquiera de las siguientes formas: de una manera discontinua, como una reacción continua, a vacío, a presión normal o bajo una presión aplicada. Se prefiere más una forma de reacción que implica la adición gota a gota de la base a presión normal.

Tras completarse la reacción, se efectúa la separación de fases entre el disolvente orgánico no polar (fase superior) y la fase de disolución en alcohol de la sal del compuesto lipopeptídico obtenida como producto (fase inferior) mediante enfriamiento, y el disolvente orgánico no polar se elimina mediante una operación de separación de líquido. En el presente documento, en cuanto a la facilidad de separación, se prefiere una sal de metal alcalino como sal del compuesto lipopeptídico.

A continuación, el producto obtenido se neutraliza con un haluro de hidrógeno, preferiblemente en un disolvente que contiene agua y alcohol. Por ejemplo, tras la reacción del compuesto de éster de fórmula (1) con el compuesto de  $\alpha$ -aminoácido de fórmula (2), el disolvente orgánico no polar se elimina y la disolución en alcohol de la sal del compuesto lipopeptídico que queda se neutraliza mediante la adición a una disolución de haluro de hidrógeno.

El haluro de hidrógeno empleado en la operación de neutralización puede usarse generalmente, para facilidad de operación, en forma de una disolución acuosa, y se ejemplifica por ácido clorhídrico y ácido bromhídrico. Se prefiere ácido clorhídrico.

Durante la neutralización con un haluro de hidrógeno, si se supera la cantidad requerida necesaria para la neutralización, acabará formándose un clorhidrato del lipopéptido, disminuyendo la recuperación de la forma libre de lipopéptido. Por tanto, debe tenerse cuidado con la cantidad de haluro de hidrógeno usada.

Tras la neutralización, se recoge el producto en bruto del compuesto lipopeptídico (forma libre) mediante reprecipitación y se lleva a cabo tratamiento final tal como lavado y recristalización según sea necesario para dar un producto puro.

El compuesto de éster de fórmula (3) usado en la presente invención puede obtenerse haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (4) a continuación con un compuesto de fórmula (5) a continuación.



(en las que X, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son tal como se definieron anteriormente).

Tal como se mencionó anteriormente, en el método de preparación de la presente invención, tras la finalización de la reacción, el enfriamiento de la disolución de reacción provoca la separación de fases entre el disolvente orgánico no polar (fase superior) y la fase de disolución en alcohol de la sal del compuesto lipopeptídico obtenida como producto (fase inferior). Por tanto, la recuperación y el descarte del disolvente orgánico no polar mediante una operación de separación de líquido son fáciles.

Además, en casos en los que el compuesto lipopeptídico tiene la capacidad de gelificarse, los disolventes polares tales como DMF que se han usado hasta la fecha en la preparación de lipopéptidos tienden a gelificarse debido a la acción por el lipopéptido tras el enfriamiento. Sin embargo, debido a que la gelificación puede prevenirse usando un disolvente orgánico no polar, este enfoque es altamente útil en producción.

Además, en esta reacción, la disolución se vuelve alcalina tras la reacción. Sin embargo, cuando se usa una disolución acuosa de cloruro de hidrógeno en la cantidad requerida para la neutralización, tal neutralización alcanza la finalización sin la aparición de gelificación, permitiendo que el producto se recupere en su forma libre. Los cristales en bruto de la forma libre de producto que se han depositado a partir de la disolución se purifican mediante una

técnica conocida tal como recristalización, permitiendo que se obtenga el producto diana puro.

En casos en los que no se lleva a cabo neutralización, añadiendo la disolución en alcohol de la sal del compuesto lipopeptídico (fase inferior) gota a gota a un disolvente orgánico, es posible volver a precipitar y recuperar la sal del compuesto lipopeptídico como un sólido.

### Ejemplos

La presente invención se ilustra más completamente a continuación a modo de ejemplos de síntesis, ejemplos de trabajo y ejemplos comparativos.

Tal como se indica a continuación, los reactivos usados en los siguientes ejemplos de síntesis y otros ejemplos son reactivos disponibles comercialmente. Se usó el equipo indicado a continuación para analizar los diversos compuestos sintetizados y para medir sus propiedades físicas.

Metanol: Kanto Chemical Co., Inc. (garantizado)

Etanol: Kanto Chemical Co., Inc. (extra puro)

Ciclohexano: Junsei Chemical Co., Ltd. (garantizado)

Tetrahidrofurano: Kanto Chemical Co., Inc. (extra puro)

i-Propanol: Kanto Chemical Co., Inc. (extra puro)

N,N-Dimetilformamida (DMF): Kanto Chemical Co., Inc. (extra pura)

Tolueno: Kanto Chemical Co., Inc. (extra puro)

Hexano: Kanto Chemical Co., Inc. (extra puro)

Heptano: Kanto Chemical Co., Inc. (extra puro)

Xileno: Kanto Chemical Co., Inc. (extra puro)

Cloruro de ácido palmítico: Wako Pure Chemical Industries (extra puro, cloruro de palmitoilo), Aldrich (cloruro de palmitoilo), NOF Corporation (cloruro de ácido palmítico destilado)

Clorhidrato de éster metílico de glicina: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.; Hamari Chemicals, Ltd.

Clorhidrato de éster etílico de glicina: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

Clorhidrato de éster metílico de alanina: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

Clorhidrato de éster metílico de leucina: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

Clorhidrato de éster metílico de valina: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

Cloruro de lauroilo: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Cloruro de miristoilo: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

Cloruro de estearoilo: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.

L-Histidina: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Kyowa Hakko Bio Co., Ltd.

L-Triptófano: Kanto Chemical Co., Inc. (garantizado)

Cloruro de tionilo: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (garantizado)

Glicina: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (garantizada)

Anhídrido acético: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (garantizada)

Cloruro de pivaloilo: Kanto Chemical Co., Inc.

- Metóxido de sodio: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (extra puro)
- Metóxido de sodio, disolución en metanol al 28 %: Nippon Soda Co., Ltd. (metilato de sodio líquido, 28 %); Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (metóxido de sodio al 28 %, disolución en metanol)
- 5 Metóxido de sodio: Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (extra puro)
- Hidróxido de sodio: Kanto Chemical Co., Inc. (extra puro)
- 10 Carbonato de sodio: Junsei Chemical Co., Ltd. (extra puro)
- Dietilamina: Junsei Chemical Co., Ltd. (extra pura)
- Trietilamina: Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.
- 15 Ácido clorhídrico: Kanto Chemical Co., Inc. (extra puro)
- Ácido acético: Junsei Chemical Co., Ltd. (garantizado)
- 20 Ácido succínico: Junsei Chemical Co., Ltd. (garantizado)
- Ácido fosfórico: Junsei Chemical Co., Ltd. (extra puro)
- Fosfato de sodio, monobásico: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
- 25 Ácido trifluoroacético: Kanto Chemical Co., Inc. (extra puro)
- RMN: JNM-ECP300 (fabricado por JEOL Ltd.)
- 30 Punto de fusión: Aparato de punto de fusión automatizado FP-62 (fabricado por Mettler Toledo KK)
- Peachímetro: AS-212 (fabricado por Horiba, Ltd.)
- IR: Nicolet 6700/Nicolet Cotinium (fabricado por Thermo FISHER SCIENTIFIC)
- 35 Las condiciones de análisis de HPLC se muestran a continuación.
- Condiciones de HPLC (1)
- 40 Columna: Inertsil ODS-3 (fabricada por GL Sciences)
- Disolvente de desarrollo: MeOH/tampón fosfato (pH = 2,1) = 85/15 (razón volumétrica)
- 45 Método de preparación del tampón fosfato (pH = 2,1): Se añadió agua a 7,8 g (50 mmol) de fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y 3,4 ml (50 mmol) de ácido fosfórico al 85 % para llevar el volumen total hasta 1 litro.
- Temperatura del horno: 40 °C
- Método de detección: UV, 205 nm; y RID
- 50 Caudal: 2,0 ml/min
- Cantidad de inyección: 20  $\mu\text{l}$
- 55 Tiempo de retención: N-palmitoil-Gly-His, 5,5 min; N-palmitoil-Gly, 9,3 min; N-palmitoil-Gly-metilo, 11,2 min; N-palmitoil-Gly-etilo, 11,4 min
- Condiciones de HPLC (2): Ejemplo 21 sólo
- 60 Columna: CHIRALPAK® IC (fabricada por Daicel Chemical Industries, Ltd.)
- Disolvente de desarrollo: Hexano/etanol/ácido tricloroacético/dietilamina = 90/10/0,1/0,1 (razón volumétrica)
- Temperatura del horno: 25 °C
- 65 Método de detección: UV, 205 nm

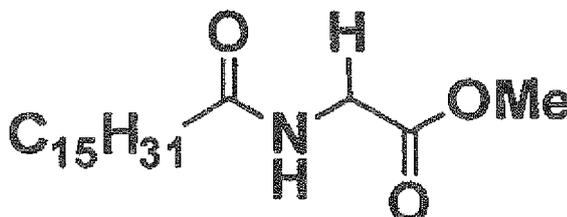
Caudal: 1,0 ml/min

Cantidad de inyección: 10 µl

5

Tiempo de retención: N-palmitoil-Gly-His, forma L: 9,5 min; forma D: 10,9 min.

Ejemplo 1: Síntesis de N-palmitoil-Gly-metilo



10

Se cargó un matraz de cuatro bocas de 2 l con 89,1 g (709 mmol) de clorhidrato de éster metílico de glicina, 75,2 g (709 mmol) de carbonato de sodio (base), 750 g de agua y 450 g de tolueno (disolvente orgánico), y se agitó. A continuación, se añadió gota a gota al mismo una disolución obtenida disolviendo 150 g (546 mmol) de cloruro de ácido palmítico en 900 g de tolueno a lo largo de un periodo de 2 horas a una temperatura de reacción de 25±5 °C, tras lo cual precipitó un sólido blanco, formando una suspensión. A dos horas de agitación a 25 °C le siguió la adición de otros 750 g de agua y 1 hora de agitación, luego filtración y lavado con 150 g de agua. Se secó el producto húmedo resultante a presión reducida, dando 150,61 g (pureza, 99,8 %; rendimiento, 87 %) de cristales blancos de N-palmitoil-Gly-metilo.

15

20

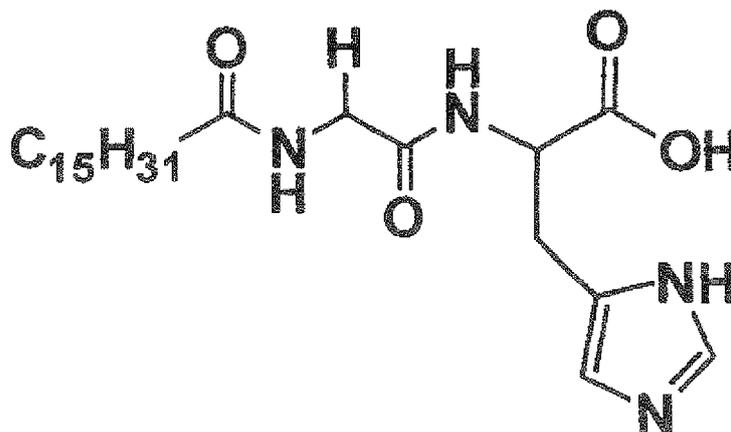
<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, MeOH-d<sub>4</sub>, δ ppm): 3,97 (2H, s), 3,71 (3H, s), 2,23 (2H, t, J = 7,4 Hz), 1,61 (2H, m), 1,28 (24H, m), 0,89 (3H, t, J = 6,8 Hz).

25

EM (ESI) m/z: 327,78 (M<sup>+</sup>).

Punto de fusión: 78,1 °C (N = 3).

Ejemplo 2: Síntesis de la forma libre de N-palmitoil-Gly-His



30

Se cargó un matraz de cuatro bocas de 2 l con 28,4 g (183 mmol) de L-histidina, 60 g (183 mmol) de N-palmitoil-Gly-metilo y 600 g de ciclohexano, tras lo cual se agitó el contenido del matraz bajo calentamiento en un baño de aceite. En el momento en que la mezcla de reacción alcanzó 60 °C, se inició la adición gota a gota de 70,7 g (366 mmol) de una disolución en metanol al 28 % de metóxido de sodio (base), completándose la adición en 20 minutos. Tras completarse la adición, se continuó agitando durante 1 hora a aproximadamente 60 °C.

35

A continuación, se retiró el baño de aceite y se permitió que el sistema de reacción se enfriara hasta 25 °C, dando como resultado la separación del sistema en una fase superior compuesta principalmente por ciclohexano y una fase inferior compuesta principalmente por metanol. Usando un embudo de decantación, se recogió la fase inferior de la mezcla de reacción que se había separado en dos fases en un matraz Erlenmeyer. Se añadió una disolución obtenida mezclando juntos 180 g de agua y 420 g de metanol a la fase superior restante, y la disolución que se separó de nuevo en dos fases se dejó en reposo durante 20 minutos, tras lo cual se recogió la fase inferior en un matraz Erlenmeyer y se mezcló con la fase inferior recogida anteriormente.

40

Se añadió esta disolución mixta a una disolución mixta compuesta por 720 g de agua, 780 g de etanol y 36,5 ml de ácido clorhídrico 6 N (366 mmol, 1 equivalente con respecto a la base anterior) mientras se agitaba a 25 °C. Tras completarse la adición de toda la cantidad, se calentó la mezcla de reacción hasta 60 °C y se agitó durante 1 hora. Entonces se permitió que la mezcla de reacción se enfriara hasta 25 °C, y se recogió el sólido que se depositó mediante filtración y se lavó con 180 g de agua.

A continuación, se añadieron 900 g de agua y 1.800 g de metanol al sólido, y se calentaron y agitaron durante 1 hora a 60 °C, tras lo cual el sólido que se depositó cuando el sistema se dejó enfriar hasta 25 °C se recogió mediante filtración. Se repitieron las mismas operaciones una vez más, tras lo cual se secó el sólido así obtenido a presión reducida. A continuación, se añadieron 650 g de tetrahidrofurano al sólido secado, y se llevó a cabo la agitación durante 1 hora a 25 °C. Se recogió el sólido posteriormente mediante filtración, luego se añadieron 1.300 g de metanol y 650 g de tetrahidrofurano al sólido así obtenido y se disolvieron bajo calentamiento a 60 °C, tras lo cual se enfrió el sistema hasta 0 °C a lo largo de un periodo de 2 horas y se agitó el líquido final durante la noche a 0 °C. Se recogió el sólido que se depositó mediante filtración y se secó a presión reducida, dando de ese modo 60,0 g (rendimiento, 72,8 %) de cristales blancos de forma libre de N-palmitoil-Gly-His.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm): 8,12 (1H, d, J = 7,8 Hz), 8,06 (1H, t, J = 5,7 Hz), 7,56 (1H, s), 6,81 (1H, s), 4,38 (1H, q, J = 7,8 Hz), 3,69 (2H, dd, J = 5,7 Hz y J = 10,2 Hz), 2,89 (2H, m), 2,20 (2H, t, J = 6,9 Hz), 1,48 (2H, m), 1,23 (24H, s), 0,85 (3H, t, J = 7,2 Hz).

EM (EI) m/z: 451,43 (M<sup>+</sup>+1, pe).

Punto de fusión: No observado.

#### Ejemplo 3: Síntesis de la forma libre de N-palmitoil-Gly-His

Se sintetizó la forma libre de N-palmitoil-Gly-His mediante un método sustancialmente similar al del ejemplo 2 usando 10,3 kg (31,45 mol) de N-palmitoil-Gly-metilo, dando 9,02 kg (rendimiento, 63,6 %) del producto.

#### Ejemplo 4: Síntesis de la sal de sodio de N-Palmitoil-Gly-His

Se cargó un matraz de cuatro bocas de 200 ml con 9,0 g (27,5 mmol) de N-palmitoil-Gly-metilo, 4,3 g (27,5 mmol) de L-histidina y 90 g del disolvente orgánico ciclohexano, y se elevó la temperatura hasta 60 °C con agitación. A continuación, se añadió gota a gota al mismo una disolución en metanol al 28 % de metóxido de sodio como base a lo largo de un periodo de 15 minutos, y se llevó a cabo la reacción durante 1 hora a 60±5 °C. Tras completarse la reacción, se enfrió el sistema hasta 35 °C o menos, y la fase en metanol de la disolución que se separó en una fase de ciclohexano y una fase de metanol volvió a precipitarse en 270 g de hexano, provocando que se depositaran cristales. Se enfrió esta disolución hasta 0 °C y se agitó durante 1 hora, tras lo cual se llevó a cabo la filtración. Se secó el producto húmedo así obtenido a presión reducida, dando de ese modo 10 g de cristales de color amarillo claro de la sal de sodio de N-palmitoil-Gly-His (pureza, 94 %; rendimiento, 77 %).

#### Ejemplos 5 a 12

Se sintetizó N-palmitoil-Gly-His usando el mismo compuesto de partida que en el ejemplo 2, pero cambiando los disolventes, la base, la temperatura de reacción y el tiempo de reacción tal como se muestra en la tabla 1. La tabla 1 también muestra las conversiones en HPLC (detector RID) y los porcentajes de área relativa de los compuestos diana.

Tabla 1

Ejemplo	Disolvente	Base	Conversión <sup>1)</sup> (%)	% de área de RID		
				Producto diana <sup>2)</sup>	Hidrolizado <sup>3)</sup>	Compuesto de partida <sup>4)</sup>
5	Tolueno	NaOEt	92	64	28	8
6	Tolueno	KOMe	100	71	29	0
7	Tolueno	NaOMe	98	80	18	2
8	Xileno	NaOMe	97	76	21	3
9	Heptano	NaOMe	100	92	8	0
10	Heptano:tolueno = 5:5 (p/p)	NaOMe	92	85	7	8
11	Heptano:tolueno = 7:3 (p/p)	NaOMe	97	89	8	3
12	Ciclohexano	NaOMe	99	93	6	1

1) Método de cálculo de la conversión (%) = (% de área de compuesto diana + % de área de hidrolizado)/(% de área de compuesto diana + % de área de hidrolizado + % de área de compuesto de partida)

2) Compuesto diana: N-palmitoil-Gly-His

3) Hidrolizado: N-palmitoil-Gly

4) Compuesto de partida: N-palmitoil-Gly-metilo

Ejemplo comparativo 1

Aparte de cambiar el disolvente a DMF y establecer la temperatura de reacción en 80 °C, se llevó a cabo la reacción en las mismas condiciones que en el ejemplo 2. Sin embargo, la reacción no se completó y, tras enfriar, el sistema de reacción se gelificó. Además, el hidrolizado aumentó, como resultado de lo cual el rendimiento disminuyó hasta el 65 %.

Ejemplos 13 a 19

Aparte de ajustar el pH en el momento de la neutralización tal como se muestra en la tabla 2, la síntesis de la forma libre de N-palmitoil-Gly-His se llevó a cabo mediante el mismo procedimiento que en el ejemplo 2. Se confirmaron los cambios en el valor de pérdida del filtrado.

Tabla 2

Ejemplo	pH del sobrenadante	Pérdida del filtrado (%)
13	7,6	12
14	7,2	4
15	7,0	4
16	6,7	1
17	6,6	2
18	6,4	0,8
19	6,2	0,2

Ejemplo 20, ejemplos comparativos 2 a 8

Aparte de los cambios, tal como se muestra en la tabla 3, en los tipos y las cantidades de ácidos usados para la neutralización tras la reacción, se llevó a cabo la síntesis del mismo modo que en el ejemplo 2. Sin embargo, en los ejemplos comparativos 2 a 8, la recuperación de N-palmitoil-Gly-His fue difícil. En las figuras 1 a 8 se muestran gráficos de IR de los productos de N-palmitoil-Gly-His resultantes.

Tabla 3

	Ácido/equivalentes (total)	Condición en el momento de la neutralización	IR
EJ. 20	Ácido clorhídrico/2,0 eq.	Forma libre depositada como un sólido	[Figura 1] (El sólido obtenido se secó y se midió)
EC. 2	Ácido clorhídrico/4,0 eq.	El sólido se convirtió en un clorhidrato y se redisolvió	[Figura 2] (Se secó la disolución que volvió a disolverse hasta que era dura y se midió)
EC. 3	Ácido acético/2,0 eq.	Se gelificó y no pudo extraerse del reactor	[Figura 3] (Se extrajo el gel por raspado, se secó y se midió)
EC. 4	Ácido acético/4,0 eq.	Se gelificó y no pudo extraerse del reactor	[Figura 4] (Se extrajo el gel por raspado, se secó y se midió)
EC. 5	Ácido succínico/1,0 eq.	Se gelificó y no pudo extraerse del reactor	[Figura 5] (Se extrajo el gel por raspado, se secó y se midió)
EC. 6	Ácido succínico/1,5 eq.	Se gelificó y no pudo extraerse del reactor	[Figura 6] (Se extrajo el gel por raspado, se secó y se midió)
EC. 7	Ácido fosfórico/1,0 eq.	Se gelificó y no pudo extraerse del reactor	[Figura 7] (Se extrajo el gel por raspado, se secó y se midió)
EC. 8	Ácido fosfórico/1,5 eq.	Se gelificó y no pudo extraerse del reactor	[Figura 8] (Se extrajo el gel por raspado, se secó y se midió)

Ejemplo comparativo 9

Aparte de cambiar la disolución mixta de ácido usada para la neutralización tras la reacción a una disolución acuosa obtenida añadiendo ácido clorhídrico a agua (2 equivalentes con respecto a la base), se llevó a cabo la síntesis del mismo modo que en el ejemplo 2. Sin embargo, cuando se llevaron a cabo la neutralización y reprecipitación, el

sistema de reacción gelificó y no pudo extraerse del reactor.

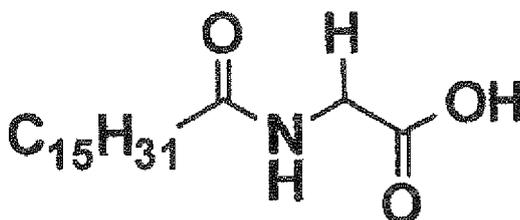
#### Ejemplo 21

- 5 Como en el ejemplo 2, se hicieron reaccionar N-palmitoil-Gly-metilo y L-histidina en ciclohexano y a 60 °C usando una disolución al 28 % en metanol de metóxido de sodio como base, tras lo cual se llevaron a cabo la neutralización y purificación, dando la forma libre de N-palmitoil-Gly-His.

10 Tras comprobar el espectro de HPLC de la forma libre resultante de N-palmitoil-Gly-His (en condiciones de HPLC (2), véase la figura 9), no se confirmó la racemización. La figura 9A muestra el espectro de HPLC de la forma libre de N-palmitoil-Gly-His obtenida en este ejemplo (usando L-histidina), y la figura 9B muestra el espectro de HPLC de la forma libre de N-palmitoil-Gly-His obtenida usando histidina racémica.

15 Síntesis de N-palmitoil-Gly-His a partir de N-palmitoil-Gly

Ejemplo de síntesis 1: Síntesis de N-palmitoil-Gly



- 20 En primer lugar, se disolvieron 27,3 g (364 mmol) de glicina y 29,1 g (727 mmol) de hidróxido de sodio en un disolvente mixto de 450 g compuesto por i-propanol y 200 g de agua con agitación a temperatura ambiente, luego se enfrió hasta 10 °C. A continuación, se añadió gota a gota al mismo 100 g (364 mmol) de cloruro de ácido palmítico a lo largo de un periodo de 1 hora. Se devolvió el producto de reacción a temperatura ambiente, luego se agitó durante aproximadamente 15 horas. A continuación, se añadieron 400 g de agua al mismo, tras lo cual se añadieron gota a gota 73,8 g (727 mmol) de ácido clorhídrico al 35 %. Se recuperó el sólido que se depositó, se lavó la suspensión y se purificó mediante recristalización en metanol, dando 36,4 g (rendimiento, 32%) de N-palmitoil-Gly como un sólido blanco.

30  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 12,43 (1H, sa), 8,07 (1H, t, J = 5,7 Hz), 3,70 (2H, d, J = 5,7 Hz), 2,09 (2H, t, J = 7,8 Hz), 1,47 (2H, m), 1,23 (24H, sa), 0,85 (3H, t, J = 6,9 Hz).

Punto de fusión: 125,0 °C (N = 3)

#### Ejemplo comparativo 10

- 35 Usando cloruro de tionilo, se convirtió N-palmitoil-Gly en el cloruro de ácido en tolueno a temperatura ambiente, luego se hizo reaccionar con L-histidina usando trietilamina como base. Sin embargo, sólo se formó una cantidad traza de N-palmitoil-Gly-His.

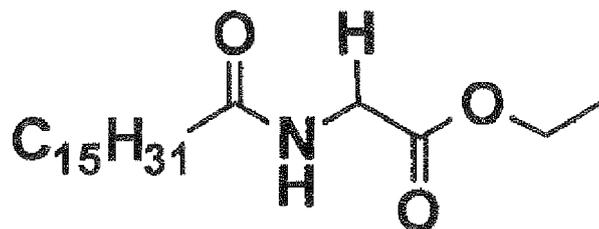
#### Ejemplo comparativo 11

- 40 Se hizo reaccionar N-palmitoil-Gly con anhídrido acético en tolueno a 80 °C y de ese modo se acetiló, y posteriormente se hizo reaccionar con L-histidina a 70 °C en la DMF, usando trietilamina como base. Sin embargo, no se formó N-palmitoil-Gly-His.

#### Ejemplo comparativo 12

- 45 En presencia de trietilamina como base, se hizo reaccionar N-palmitoil-Gly con cloruro de pivaloilo en tolueno a 0 °C, generando de ese modo un anhídrido de ácido en el sistema, tras lo cual se añadió más trietilamina y se llevó a cabo la reacción con L-histidina. Sin embargo, no se formó N-palmitoil-Gly-His.

50 Ejemplo 22: Síntesis de N-palmitoil-Gly-etilo



5 Se cargó un matraz de cuatro bocas de 300 ml con 6,6 g (47,3 mmol) de clorhidrato de éster etílico de glicina, 5,0 g (47,3 mmol) de carbonato de sodio como base, 50 g de agua y 30 g de tolueno como disolvente orgánico, y se agitó el contenido del matraz. A continuación, se añadió gota a gota al mismo una disolución de 10 g (36,4 mmol) de cloruro de ácido palmítico disuelto en 60 g de tolueno a lo largo de un periodo de 2 horas a una temperatura de reacción de  $25 \pm 5$  °C, tras lo cual se depositó un sólido blanco, formando una suspensión. Se agitó la suspensión a 25 °C durante 1 hora, tras lo cual se añadieron otros 50 g de agua y se llevó a cabo agitación durante 1 hora. Entonces se filtró el contenido del matraz y se lavó con 30 g de agua. Se secó el producto húmedo resultante a presión reducida, dando 7,0 g de cristales blancos de N-palmitoil-Gly-etilo (rendimiento, 56 %).

10  $^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 6,02-5,86 (m, 1H), 4,22 (2H, c,  $J = 7,2$  Hz), 4,03 (2H, d,  $J = 5,4$  Hz), 2,23 (2H, t,  $J = 8,1$  Hz), 1,72-1,56 (2H, m), 1,34-1,22 (27H, m), 0,89 (3H, t,  $J = 6,6$  Hz)

15 EM (ESI)  $m/z$ : 342,37 (M+H) $^+$ .

Punto de fusión: 110,0°C (N = 3).

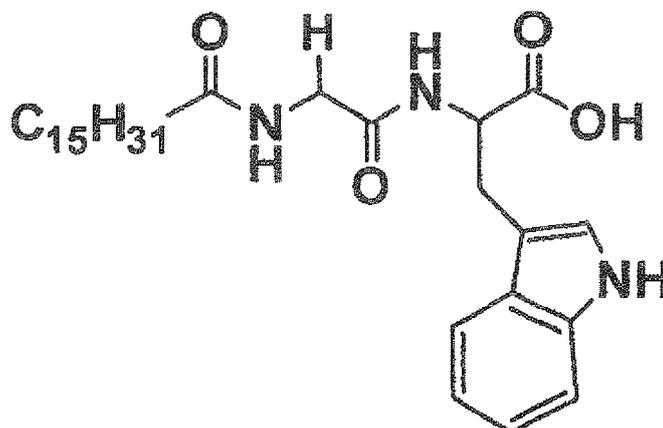
20 Ejemplo 23: Síntesis de la forma libre de N-palmitoil-Gly-His

Se cargó un matraz de cuatro bocas de 100 ml con 0,91 g (5,8 mmol) de L-histidina, 2,0 g (5,8 mmol) de N-palmitoil-Gly-etilo y 20 g de ciclohexano, luego se añadieron 2,2 g (11,6 mmol) de una disolución en metanol al 28 % de metóxido de sodio como base, y se calentó el contenido del matraz con agitación hasta 60 °C en un baño de aceite. Se continuó agitando durante 1 hora a aproximadamente 60 °C.

25 A continuación, se retiró el baño de aceite y se permitió que la disolución se enfriara hasta 25 °C. Se añadió la disolución, a 25 °C y con agitación, a una disolución mixta de 30 g de agua, 40 g de metanol y 1,9 ml (11,6 mmol) de ácido clorhídrico 6 N. Tras completarse la adición de toda la cantidad, se calentó la disolución de reacción hasta 60 °C y se agitó durante 1 hora. Entonces se permitió que la disolución de reacción se enfriara hasta 25 °C, y se recogió el sólido que se depositó mediante filtración y se lavó con 6 g de agua. Se secó el sólido así obtenido a presión reducida.

30 A continuación, se añadieron 20 g de tetrahidrofurano y 40 g de metanol al sólido secado, y se agitó la disolución a 60 °C durante 1 hora. Entonces se añadió gota a gota la disolución mixta a 60 °C a 20 g de tetrahidrofurano que se había enfriado hasta 0 °C. En este momento, se llevó a cabo la adición gradualmente de manera que el límite superior en la temperatura en el lado al que estaba añadiéndose era de 15 °C. Tras completarse la adición gota a gota, se envejeció el sistema durante 10 minutos a 0 °C, y se recogió el sólido mediante filtración y se secó a presión reducida, dando 1,1 g (rendimiento, 41 %) de cristales blancos de forma libre de N-palmitoil-Gly-His.

40 Ejemplo 24: Síntesis de la forma libre de N-palmitoil-Gly-Trp



Se cargó un matraz de cuatro bocas de 100 ml con 1,25 g (6,1 mmol) de L-triptófano, 2,0 g (6,1 mmol) de N-

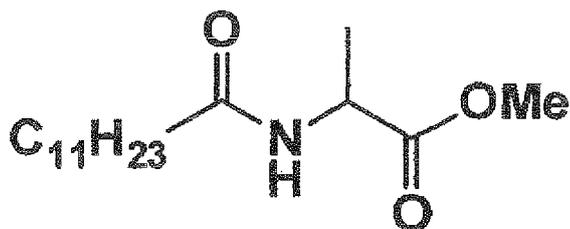
palmitoil-Gly-metilo, 20 g de ciclohexano y 0,8 g de metanol, y se agitó bajo calentamiento a 60 °C en un baño de aceite. A continuación, se añadieron 2,4 g (12,2 mmol) de una disolución en metanol al 28 % de metóxido de sodio como base, y se continuó agitando durante 2 horas a aproximadamente 60 °C. Entonces se retiró el baño de aceite, se añadieron 0,4 g de metanol y, tras permitir que se enfriara hasta 25 °C, se añadió esta disolución, a 25 °C y con agitación, a una disolución mixta compuesta por 30 g de agua, 40 g de metanol y 2,0 ml (12,2 mmol) de ácido clorhídrico 6 N. Tras haberse completado la adición de toda la cantidad, se calentó la disolución de reacción hasta 60 °C y se agitó durante 1 hora. Se permitió entonces que la disolución se enfriara hasta 25 °C y se recogió el sólido que se depositó mediante filtración y se lavó con 6 g de agua. A continuación, se añadieron 30 g de agua y 40 g de metanol al sólido resultante, y se calentó el sistema hasta 60 °C y se agitó durante 1 hora. Entonces se permitió que el sistema se enfriara hasta 25 °C y se recogió el sólido que se depositó mediante filtración y se lavó con 6 g de agua. Se secó el sólido resultante a presión reducida, dando de ese modo 2,3 g (rendimiento, 74 %; pureza, 90 %) de cristales blancos de forma libre de N-palmitoil-Gly-Trp.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm): 10,76 (1H, s), 7,98 (1H, t, J = 6,0 Hz), 7,74 (1H, d, J = 7,2 Hz), 7,51 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,29 (1H, d, J = 7,5 Hz), 7,08 (1H, s), 7,02 (1H, d, J = 7,5 Hz), 6,93 (1H, d, J = 7,5 Hz), 4,31 (1H, q, J = 7,8 Hz), 3,84-3,50 (2H, m), 3,17 (1H, dd, J = 5,4 Hz, J = 5,4 Hz), 3,01 (1H, dd, J = 6,6 Hz, J = 6,6 Hz), 2,07 (2H, t, J = 6,9 Hz), 1,55-1,35 (2H, m), 1,35-1,25 (24H, m), 0,85 (3H, t, J = 6,9 Hz).

EM (ESI) m/z: 500,2 (M+H)<sup>+</sup>.

Punto de fusión: 159,6 °C (N = 4).

Ejemplo 25: Síntesis de N-lauroil-Ala-metilo

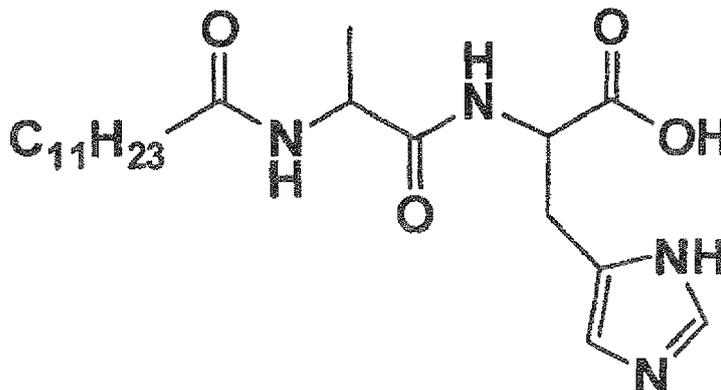


Se cargó un matraz de cuatro bocas de 500 ml con 16,6 g (118,9 mmol) de clorhidrato de éster metílico de L-alanina, 12,6 g (118,9 mmol) de carbonato de sodio como base, 100 g de agua y 60 g de tolueno como disolvente orgánico, tras lo cual se agitó el contenido del matraz. Se añadió gota a gota a lo mismo una disolución de 20 g de cloruro de lauroilo (91,4 mmol) disuelto en 120 g de tolueno a una temperatura de reacción de 25±5 °C a lo largo de un periodo de 1 hora. Tras 2 horas de agitación a 25 °C, se añadieron otros 200 g de agua, y se continuó agitando durante 1 hora. Se separó la fase orgánica, se concentró a presión reducida y se secó a vacío, dando de ese modo un sólido blanco. Se suspendió el sólido resultante y se agitó durante 2 horas en 250 g de agua, tras lo cual se llevaron a cabo la filtración y el secado, dando 24,7 g (rendimiento, 94,5 %) de cristales blancos de N-lauroil-Ala-metilo.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 6,02 (1H, s), 4,61 (1H, t, J = 7,3 Hz), 3,75 (3H, s), 2,23-2,17 (3H, m), 1,26-1,41 (20H, m), 0,88 (3H, t, J = 6,6 Hz).

EM (ESI) m/z: 286,1 (M+H)<sup>+</sup>.

Ejemplo 26: Síntesis de la forma libre de N-lauroil-Ala-His



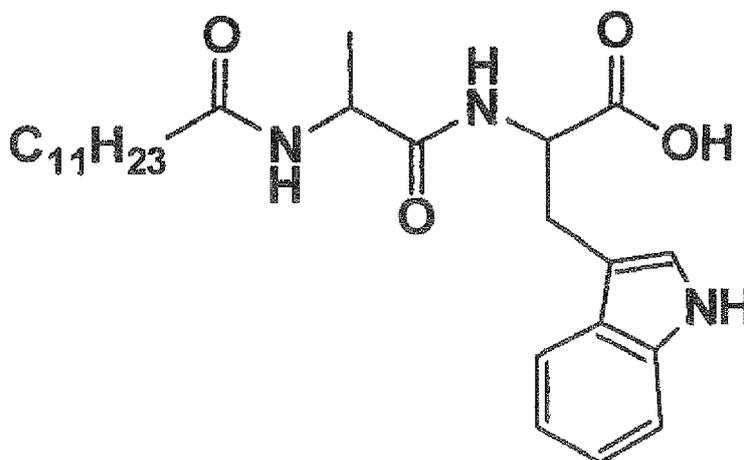
Se cargó un matraz de cuatro bocas de 200 ml con 3,81 g (24,5 mmol) de L-histidina, 7,0 g (24,5 mmol) de N-lauroil-

Ala-metilo, 70 g de ciclohexano y 2,8 g de metanol, y se agitó el contenido del matraz bajo calentamiento a 60 °C en un baño de aceite. A continuación, se añadieron 9,5 g (49,0 mmol) de una disolución en metanol al 28 % de metóxido de sodio como base, y se continuó agitando durante 2 horas a aproximadamente 60 °C. Entonces se retiró el baño de aceite y se añadieron 1,4 g de metanol al matraz, se permitió que el sistema se enfriara hasta 25 °C y se añadió esta disolución con agitación a 25 °C a una disolución mixta compuesta por 84 g de agua, 91 g de metanol y 8,0 ml (49,0 mmol) de ácido clorhídrico 6 N. Tras completarse la adición de toda la cantidad, se calentó la disolución de reacción hasta 60 °C y se agitó durante 1 hora. A continuación, se permitió que la disolución se enfriara hasta 25 °C y se concentró, dando de ese modo un sólido similar a arcilla. Se cargó el sólido resultante en un disolvente mixto compuesto por 35 g de tolueno y 35 g de metanol, se suspendió a 50 °C y se retiraron los materiales insolubles mediante filtración bajo calentamiento. Se concentró el filtrado resultante y se secó a presión reducida, dando 7,9 g (rendimiento, 79 %) de cristales de color marrón claro de forma libre de N-lauroil-Ala-His.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm): 8,02 (1H, dd, J<sub>1</sub> = 12,3 Hz, J<sub>2</sub> = 7,8 Hz), 7,9 (1H, dd, J<sub>1</sub> = 12,4 Hz, J<sub>2</sub> = 7,2 Hz), 7,50 (1H, t, J = 1,2 Hz), 6,74 (1H, d, J = 5,8 Hz), 4,24 (2H, dd, J<sub>1</sub> = 14,6 Hz, J<sub>2</sub> = 7,2 Hz), 2,80-2,96 (2H, m), 1,09-1,47 (23H, m), 0,85 (3H, t, J = 6,3 Hz).

EM (ESI) m/z: 409,0 (M-H)<sup>+</sup>.

Ejemplo 27: Síntesis de la forma libre de N-lauroil-Ala-Trp

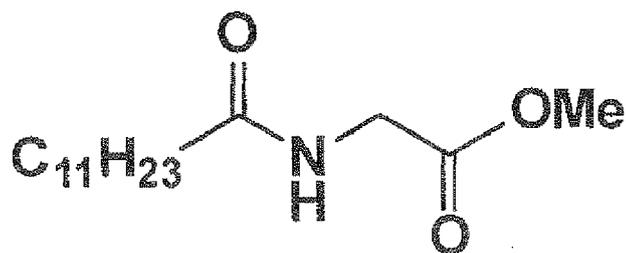


Se cargó un matraz de cuatro bocas de 100 ml con 5,0 g (24,5 mmol) de L-triptófano, 7,0 g (24,5 mmol) de N-lauroil-Ala-metilo, 70 g de ciclohexano y 2,8 g de metanol, y se agitó el contenido del matraz bajo calentamiento a 60 °C en un baño de aceite. A continuación, se añadieron 9,5 g (49,0 mmol) de una disolución en metanol al 28 % de metóxido de sodio como base, y se continuó agitando durante 2 horas a aproximadamente 60 °C. Entonces se retiró el baño de aceite, se añadieron 1,4 g de metanol y se permitió que la disolución se enfriara hasta 25 °C. Se añadió esta disolución, con agitación a 35 °C, a una disolución mixta compuesta por 84 g de agua, 91 g de metanol y 8,2 ml (49,0 mmol) de ácido clorhídrico 6 N. Se estableció el pH en 6,7 añadiendo una disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 N, tras lo cual se eliminó el disolvente mediante concentración a presión reducida. Se añadieron acetato de etilo y agua al residuo, y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo. Se concentró la fase acuosa a una presión reducida para eliminar el agua y efectuar el secado, dando de ese modo 9,2 g (rendimiento, 83 %; pureza, 99 %) de cristales blancos de forma libre de N-lauroil-Ala-Trp.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm): 10,75 (1H, s), 8,01 (1H, t, J = 7,8 Hz), 7,58-6,89 (5H, m), 4,22 (2H, m), 3,48-2,94 (2H, m), 2,06 (2H, t, J = 5,4 Hz), 1,44 (2H, sa), 1,22-1,11 (16H, m), 1,05 (2H, d, J = 7,2 Hz), 0,85 (3H, t, J = 6,9 Hz)

EM (ESI) m/z: 456,5 (M-H)<sup>+</sup>.

Ejemplo 28: Síntesis de N-lauroil-Gly-metilo



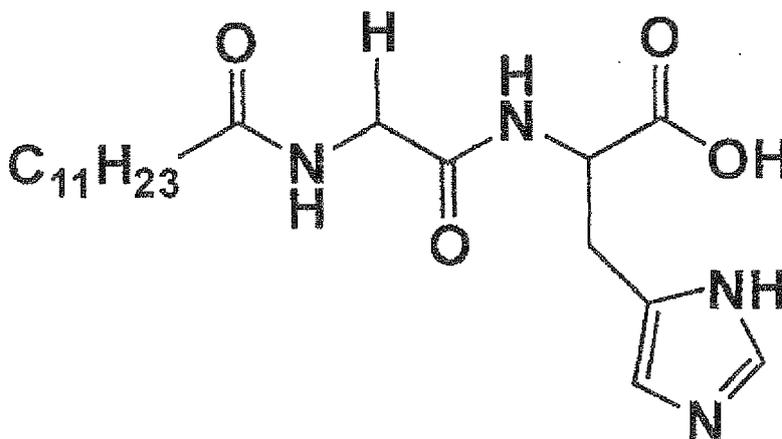
Se cargó un matraz de cuatro bocas de 500 ml con 16,4 g (130,7 mmol) de clorhidrato de éster metílico de glicina, 13,9 g (201,1 mmol) de carbonato de sodio como base, 110 g de agua y 66 g de tolueno como disolvente orgánico, y se agitó el contenido del matraz. A continuación, se añadió gota a gota al mismo una disolución de 22 g (100,6 mmol) de cloruro de lauroilo disuelto en 132 g de tolueno a lo largo de un periodo de 1 hora a una temperatura de reacción de  $25 \pm 5$  °C. Tras 2 horas de agitación a 25 °C, se añadieron otros 100 g de agua y se continuó agitando durante 1 hora. Se separó la fase orgánica, se concentró a presión reducida y se secó a vacío, dando 27,3 g (rendimiento, 100 %) de cristales blancos de N-lauroil-Gly-metilo.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 5,91 (s, 1H), 4,05 (d,  $J = 5,2$  Hz, 2H), 3,77 (s, 3H), 2,24 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 1,65-1,25 (m, 18H), 0,88 (t,  $J = 6,7$  Hz, 3H)

EM (API)  $m/z$ : 272,0 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

Punto de fusión: 62,5°C.

Ejemplo 29: Síntesis de la forma libre de N-Lauroil-Gly-His

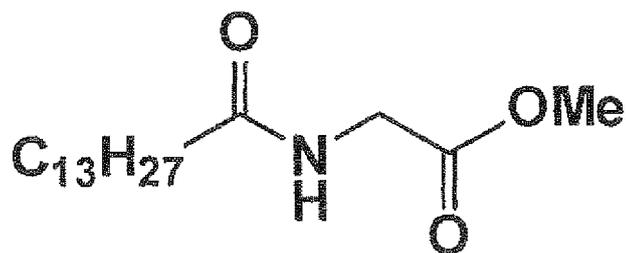


Se cargó un matraz de cuatro bocas de 500 ml con 11,4 g (73,7 mmol) de L-histidina, 20,0 g (73,7 mmol) de N-lauroil-Gly-metilo, 200 g de ciclohexano y 8,0 g de metanol, y se agitó el contenido del matraz bajo calentamiento a 60 °C en un baño de aceite. A continuación, se añadieron 28,4 g (147,4 mmol) de una disolución en metanol al 28 % de metóxido de sodio como base, y se continuó agitando durante 2 horas a aproximadamente 60 °C. Entonces se enfrió la disolución de reacción hasta aproximadamente 50 °C, y se añadió una disolución mixta compuesta por 24 g de agua, 26 g de metanol y 2,5 g (14,7 mmol) de ácido clorhídrico 6 N. A continuación, se enfrió la disolución hasta 25 °C y se añadió, a 25 °C y con agitación, a una disolución mixta compuesta por 216 g de agua, 234 g de metanol y 22,5 g (132,7 mmol) de ácido clorhídrico 6 N. Entonces se permitió que el sistema se enfriara hasta 25 °C y se concentró, dando de ese modo un sólido de color amarillo claro. Se cargó el sólido resultante en un disolvente mixto compuesto por 250 g de tolueno y 250 g de metanol, y se suspendió a 50 °C, y se retiraron los materiales insolubles mediante filtración bajo calentamiento. Se concentró el filtrado resultante y se secó a presión reducida, dando de ese modo 22,8 g (rendimiento, 79%) de cristales de color amarillo claro de forma libre de N-lauroil-Gly-His.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm): 8,12 (s, 1H), 7,78 (d,  $J = 6,6$  Hz, 1H), 7,46 (s, 1H), 6,70 (s, 1H), 4,15 (d,  $J = 5,8$  Hz, 1H), 3,66-3,60 (m, 2H), 2,90-2,85 (m, 2H), 2,11 (t,  $J = 7,2$  Hz, 2H), 1,48-1,23 (m, 18H), 0,84 (t,  $J = 3,7$  Hz, 3H).

EM (ESI)  $m/z$ : 395,5 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

Ejemplo 30: Síntesis de N-miristoil-Gly-metilo



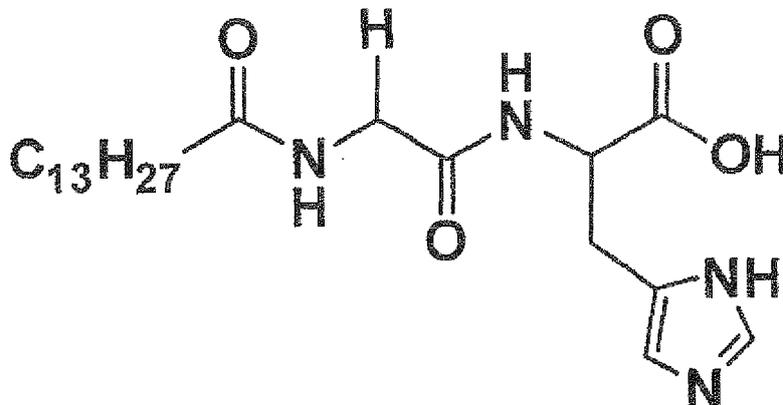
Se cargó un matraz de cuatro bocas de 500 ml con 14,6 g (115,9 mmol) de clorhidrato de éster metílico de glicina, 12,3 g (115,9 mmol) de carbonato de sodio como base, 110 g de agua y 66 g de tolueno como disolvente orgánico, y se agitó el contenido del matraz. A continuación, se añadió gota a gota a lo mismo una disolución de 22 g (89,1 mmol) de cloruro de miristoilo disuelto en 132 g de tolueno a lo largo de un periodo de 1 hora a una temperatura de reacción de  $25 \pm 5$  °C. Se agitó el sistema a 25 °C durante 2 horas, tras lo cual se añadieron otros 100 g de agua y se continuó agitando durante 1 hora. Entonces se llevó a cabo filtración, y se recogió la materia filtrada y se secó a vacío. Se sometió el filtrado a tratamiento de separación de líquido, y se concentró la fase orgánica a presión reducida y se secó a vacío. Se juntaron los sólidos obtenidos de cada una de estas operaciones, dando 26,8 g (rendimiento, 100 %) de cristales blancos de N-miristoil-Gly-metilo,

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 5,92 (s, 1H), 4,03 (t, J = 7,7 Hz, 2H), 3,77 (s, 3H), 2,24 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 1,65-1,25 (m, 22H), 0,88 (t, J = 6,7 Hz, 3H).

EM (ES) m/z: 300,0 (M+H)<sup>+</sup>.

Punto de fusión: 72,5°C.

Ejemplo 31: Síntesis de forma libre de N-Miristoil-Gly-His

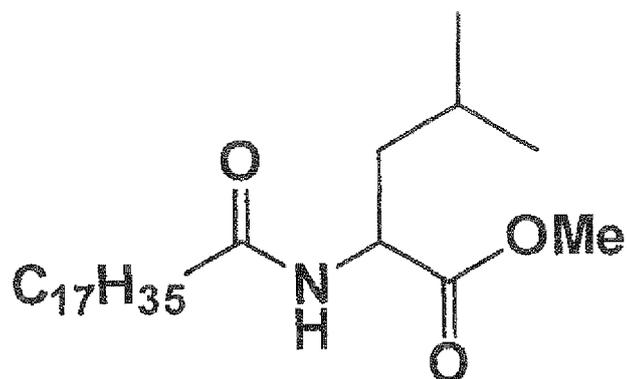


Se cargó un matraz de cuatro bocas de 500 ml con 10,4 g (66,8 mmol) de L-histidina, 20,0 g (66,8 mmol) de N-miristoil-Gly-metilo, 200 g de ciclohexano y 8,0 g de metanol, y se agitó el contenido del matraz bajo calentamiento a 60 °C en un baño de aceite. A continuación, se añadieron 25,8 g (133,6 mmol) de una disolución en metanol al 28 % de metóxido de sodio como base y se continuó agitando durante 2 horas a aproximadamente 60 °C. Entonces se concentró la disolución de reacción, y posteriormente se secó a vacío, dando de ese modo un sólido similar a arcilla. Se añadió el sólido resultante a una disolución mixta compuesta por 250 g de tolueno y 250 g de metanol, se suspendió a 50 °C y se retiraron los materiales insolubles mediante filtración bajo calentamiento. Se añadió gota a gota el filtrado resultante a 1 l de acetonitrilo enfriado hasta -10 °C, tras lo cual se depositó un sólido blanco. Se secó a presión reducida el sólido obtenido filtrando esta disolución, dando 19,5 g (rendimiento, 69 %) de cristales de color amarillo claro de forma libre de N-miristoil-Gly-His.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm): 8,06 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 7,56 (s, 1H), 6,80 (s, 1H), 4,35 (d, J = 6,9 Hz, 2H), 3,67 (d, J = 5,5 Hz, 2H), 2,92 (dd, J1 = 14,6 Hz, J2 = 9,1 Hz, 2H), 2,12 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 1,49-1,02 (m, 22H), 0,85 (t, J = 3,7 Hz, 3H).

EM (ESI) m/z: 423,0 (M+H)<sup>+</sup>.

Ejemplo 32: Síntesis de N-estearoil-Leu-metilo



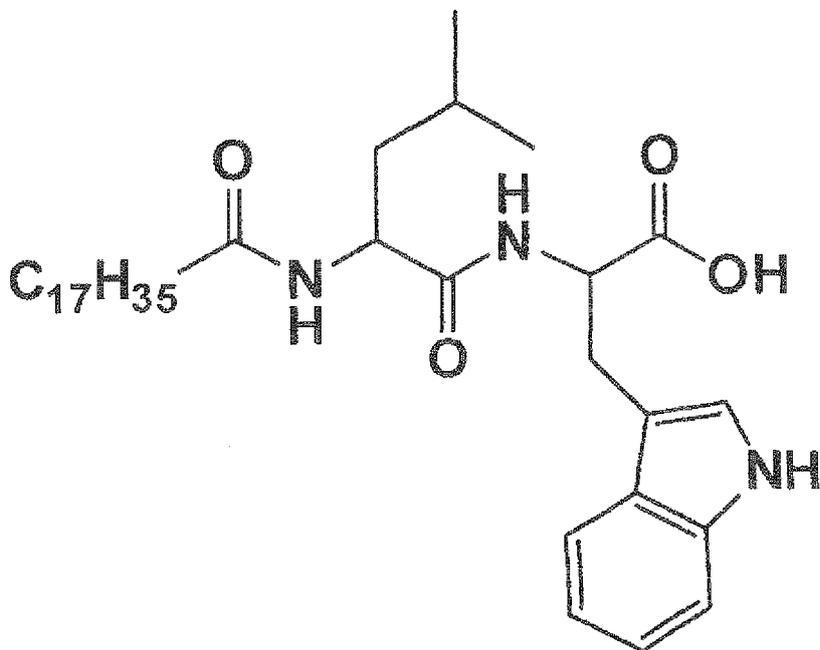
Se cargó un matraz de cuatro bocas de 500 ml con 15,5 g (85,8 mmol) de clorhidrato de éster metílico de L-leucina, 9,1 g (85,8 mmol) de carbonato de sodio como base, 100 g de agua y 60 g de tolueno como disolvente orgánico, y se agitó el contenido del matraz. A continuación, se añadió gota a gota al mismo una disolución de 20 g (66,0 mmol) de cloruro de estearoil disuelto en 120 g de tolueno a lo largo de un periodo de 1 hora a una temperatura de reacción de  $25 \pm 5$  °C. Se agitó el sistema durante 2 horas a 25 °C, tras lo cual se añadieron otros 100 g de agua y se continuó agitando durante 1 hora. Se separó la fase orgánica, se concentró a presión reducida y se secó a vacío, dando 27,3 g (rendimiento, 100 %) de cristales blancos de N-estearoil-Leu-metilo.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 5,77 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H), 4,66 (td,  $J_1 = 8,6$  Hz,  $J_2 = 5,0$  Hz, 1H), 3,73 (s, 3H), 2,21 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 1,69-0,87 (m, 42H).

EM (ESI)  $m/z$ : 412,1 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

Punto de fusión: 62,4°C.

Ejemplo 33: Síntesis de forma libre de N-estearoil-Leu-Trp



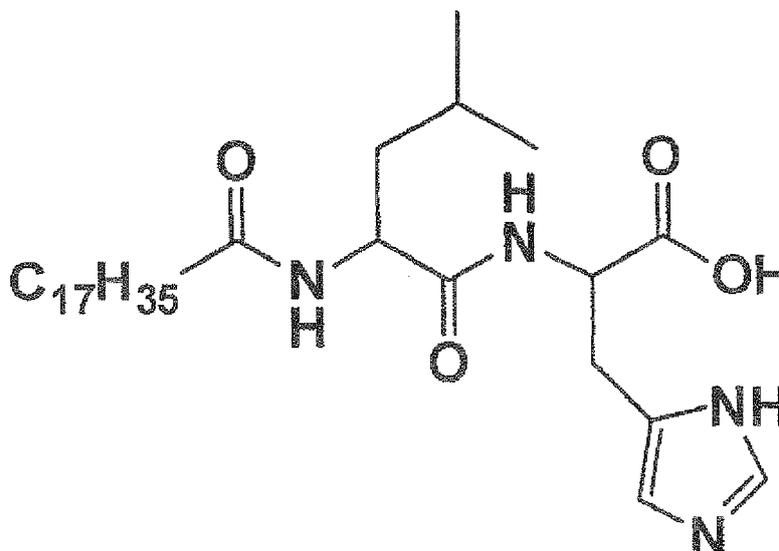
Se cargó un matraz de cuatro bocas de 100 ml con 1,49 g (7,3 mmol) de L-triptófano, 3,0 g (7,3 mmol) de N-estearoil-Leu-metilo, 30 g de ciclohexano y 1,2 g de metanol, y se agitó el contenido del matraz bajo calentamiento a 60 °C en un baño de aceite. A continuación, se añadieron 2,8 g (14,6 mmol) de una disolución en metanol al 28 % de metóxido de sodio como base, y se continuó agitando durante 20 horas a aproximadamente 60 °C. Entonces se retiró el baño de aceite, se añadieron 0,6 g de metanol, y se permitió que el sistema se enfriara hasta 25 °C. Se añadió esta disolución con agitación a 35 °C a una disolución mixta compuesta por 50 g de agua, 68 g de metanol y 2,4 g (14,6 mmol) de ácido clorhídrico 6 N. Tras la adición de toda la cantidad, se eliminó el disolvente mediante secado a presión reducida, tras lo cual se añadió acetato de etilo al residuo y se llevó a cabo filtración bajo calentamiento a 60 °C. Se secó el filtrado a presión reducida, dando de ese modo 4,0 g (rendimiento, 95 %) de forma

libre de N-estearoil-Leu-Trp.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz, MeOD- $d_4$ ,  $\delta$  ppm): 7,48 (d,  $J = 6,3$  Hz, 1H), 7,19 (dd,  $J = 2,5$  Hz,  $J = 0,3$  Hz, 1H), 6,99-6,83 (m, 3H), 4,40 (t,  $J = 5,6$  Hz, 1H), 4,28 (dd,  $J = 9,1$  Hz,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 3,19 (m, 2H), 2,14 (t,  $J = 4,2$  Hz, 1H), 1,97 (t,  $J = 7,2$  Hz, 1H), 1,60-1,17 (m, 31H), 0,87-0,69 (m, 9H).

EM (ESI)  $m/z$ , 584,1 ( $M+H$ ) $^+$ .

Ejemplo 34: Síntesis de forma libre de N-estearoil-Leu-His

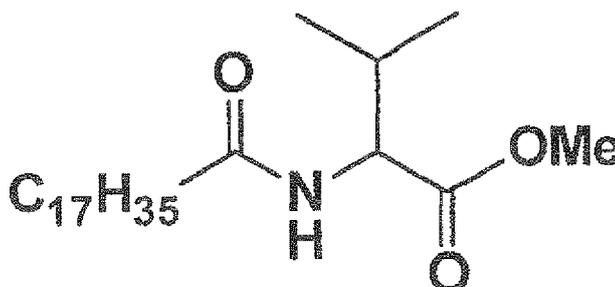


Se cargó un matraz de cuatro bocas de 100 ml con 1,13 g (7,29 mmol) de L-histidina, 3,00 g (7,29 mmol) de N-estearoil-Leu-metilo, 30 g de ciclohexano y 2,8 g de metanol, y se agitó el contenido del matraz bajo calentamiento a 60 °C en un baño de aceite. A continuación, se añadieron 2,9 g (14,6 mmol) de una disolución en metanol al 28 % de metóxido de sodio como base, y se continuó agitando durante 3 horas a aproximadamente 60 °C. Entonces se retiró el baño de aceite, se añadieron 0,6 g de metanol, y se permitió que la disolución se enfriara hasta 25 °C, tras lo cual se añadió la disolución con agitación a 25 °C a una disolución mixta compuesta por 39,1 g de agua, 35,8 g de metanol y 2,43 ml (14,6 mmol) de ácido clorhídrico 6 N. Tras completarse la adición de toda la cantidad, se calentó la disolución de reacción hasta 60 °C y se agitó durante 1 hora. Haciendo gotear esta disolución en acetonitrilo enfriado con hielo, se indujo el depósito de los sólidos y se recogieron mediante filtración. Se secaron los sólidos resultantes a presión reducida, dando 1,2 g (rendimiento, 27 %) de cristales blancos de forma libre de N-estearoil-Leu-Trp.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$  ppm): 8,22-8,17 (m, 1H), 8,01-7,90 (m, 2H), 7,05-6,96 (m, 1H), 4,42-4,27 (m, 2H), 3,10-2,92 (m, 4H), 2,11-2,08 (m, 2H), 1,60-1,43 (m, 3H), 1,35-1,05 (m, 28H), 0,86-0,76 (m, 9H).

EM (ESI)  $m/z$ : 535,1 ( $M+H$ ) $^+$ .

Ejemplo 35: Síntesis de N-estearoil-Val-metilo



Se cargó un matraz de cuatro bocas de 500 ml con 10,8 g (64,3 mmol) de éster metílico de L-valina, 6,82 g (64,3 mmol) de carbonato de sodio como base, 75 g de agua y 45 g de tolueno como disolvente orgánico, tras lo cual se agitó el contenido del matraz. A continuación, se añadió gota a gota a lo mismo una disolución de 15,0 g (49,5 mmol) de cloruro de estearoil disuelto en 90 g de tolueno a lo largo de un periodo de 15 minutos a una

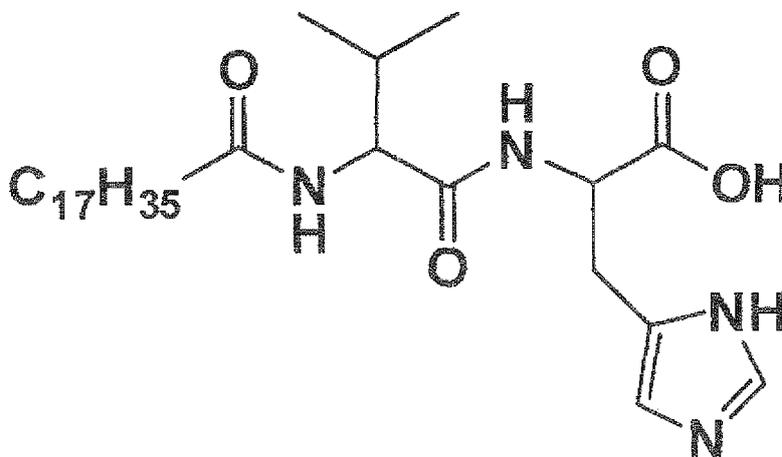
temperatura de reacción de  $25 \pm 5$  °C. Tras 17 horas de agitación a 25 °C, se añadieron otros 150 g de agua y se llevó a cabo agitación adicional, tras lo cual se separó la fase orgánica. Se lavó la fase orgánica dos veces con 150 g de agua, luego se concentró a presión reducida y se secó a vacío, dando 19,7 g (rendimiento, 100%) de cristales blancos de N-estearoil-Val-metilo.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 5,89 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H), 4,59 (dd,  $J = 8,7$  Hz, 8,7 Hz, 1H), 3,74 (s, 3H), 2,23 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 2,22-2,18 (m, 1H), 1,72-1,56 (m, 2H), 1,34-1,22 (m, 28H), 0,98-0,82 (m, 9H).

EM (ESI)  $m/z$ : 398,3 (M+H)<sup>+</sup>.

Punto de fusión: 75,7 °C (N = 2).

Ejemplo 36: Síntesis de forma libre de N-estearoil-Val-His



A un autoclave de 200 ml se le añadieron 1,17 g (7,54 mmol) de L-histidina, 3,00 g (7,54 mmol) de N-estearoil-Val-metilo, 30 g de ciclohexano, 1,2 g de metanol y 2,91 g (15,1 mmol) de una disolución en metanol al 28 % de metóxido de sodio como base, y se continuó agitando durante 4 horas a aproximadamente 110 °C. Se permitió que la disolución se enfriara hasta 25 °C con agitación, tras lo cual se añadieron 10,0 g de agua y 30,0 g de metanol a la disolución, seguido por la adición de 2,51 ml (15,1 mmol) de ácido clorhídrico 6 N. Mediante la reprecipitación de esta disolución en 200 g de acetonitrilo, se hizo que se depositara un sólido, y se recogió el sólido mediante filtración. A continuación, se añadieron 100 g de agua al sólido resultante y se agitó durante 1 hora, y volvió a precipitarse la disolución resultante en 200 g de acetonitrilo, tras lo cual se recogió el sólido que se formó mediante filtración. Se secó el sólido resultante a presión reducida, dando 0,41 g (rendimiento, 11 %) de cristales de color marrón claro de forma libre de N-estearoil-Val-His.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$  ppm): 8,15 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H), 7,85-7,65 (m, 1H), 7,60-7,50 (m, 1H), 6,85-6,70 (m, 1H), 4,45-4,20 (m, 1H), 4,25-4,10 (m, 2H), 3,00-2,75 (m, 2H), 2,25-1,80 (m, 4H), 1,60-1,35 (m, 2H), 1,35-1,10 (m, 26H), 0,90-0,60 (m, 9H).

EM (ESI)  $m/z$ : 521,1 (M+H)<sup>+</sup>.

Punto de fusión: 196,5 °C (N = 2).

Ejemplo 37: Síntesis de forma libre de N-palmitoil-Gly-His usando NaOMe sólido

Se cargó un matraz de cuatro bocas de 100 ml con 0,14 g (0,92 mmol) de L-histidina, 0,30 g (0,92 mmol) de N-palmitoil-Gly-metilo, 3,0 g de tolueno, 0,10 g (1,8 mmol) de metóxido de sodio sólido como base y 0,25 g de metanol, tras lo cual se agitó el contenido del matraz durante 1 hora a aproximadamente 60 °C.

A continuación se muestran el porcentaje de área relativa del compuesto diana obtenido mediante análisis de HPLC (detector RID), y los resultados de conversión de N-palmitoil-Gly-metilo calculados a partir del mismo.

Tabla 4

EJ.	Metanol añadido	Conversión <sup>1)</sup>	Compuesto diana <sup>2)</sup>	Hidrolizado <sup>3)</sup>	Material de partida <sup>4)</sup>
32	0,25 g	90 %	67 %	23 %	10 %

1) Conversión (%) = (% de área de compuesto diana + % de área de hidrolizado)/(% de área de compuesto diana + % de área de hidrolizado + % de área de compuesto de partida)

2) Compuesto diana: forma libre de N-palmitoil-Gly-His

3) Hidrolizado: N-palmitoil-Gly

4) Compuesto de partida: N-palmitoil-Gly-metilo

10 Ejemplo 38: Comparación de equivalentes de base

15 Se cargó un matraz de cuatro bocas de 50 ml con 2 g (6,1 mmol) de N-palmitoil-Gly-metilo, 0,95 g (6,1 mmol) de L-histidina, 20 g de ciclohexano como disolvente orgánico y una disolución en metanol al 28 % de metóxido de sodio como base, y se elevó la temperatura hasta 60 °C con agitación. Entonces se llevó a cabo la reacción a 60±5 °C. A continuación se muestran los equivalentes de la disolución en metanol al 28 % de metóxido de sodio con respecto al N-palmitoil-Gly-metilo, el tiempo de reacción y la cantidad de forma libre de N-palmitoil-Gly-His que se formó tal como se determinó mediante análisis de HPLC.

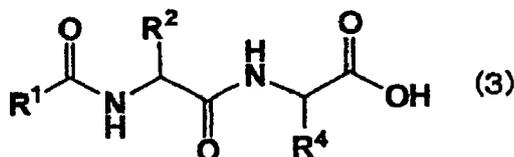
20 Tabla 5

Equivalente de base (eq.)	Tiempo de reacción (h)	Cantidad de formación (%) de forma libre de N-palmitoil-Gly-His
1,1	4	84
1,3	3	89
1,5	4	93
1,7	2	94

Por tanto, incluso en casos en los que se usan de 1 a 2 equivalentes de base, la reacción se produce bien.

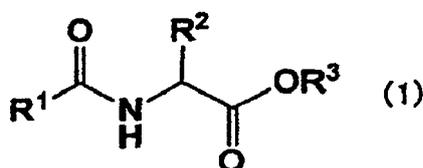
## REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de un compuesto lipopeptídico de fórmula (3):

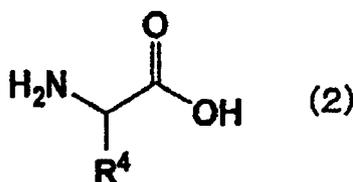


(en la que R<sup>1</sup> es un grupo alifático C<sub>9-23</sub>; R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1-4</sub> que puede tener una ramificación C<sub>1-2</sub>; y R<sup>4</sup> es un grupo -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-Y en el que n es un número de desde 1 hasta 4 e Y es un grupo amino, un grupo guanidino, un grupo -CONH<sub>2</sub>, un anillo de 5 miembros o de 6 miembros que puede contener desde 1 hasta 3 átomos de nitrógeno, o un heterociclo condensado compuesto por un anillo de 5 miembros y un anillo de 6 miembros) o una sal farmacéuticamente utilizable del mismo,

caracterizado el método porque comprende: hacer reaccionar un compuesto de éster de fórmula (1):



(en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son tal como se definieron anteriormente, y R<sup>3</sup> es un grupo alquilo C<sub>1-6</sub>, un grupo halogenoalquilo C<sub>1-6</sub>, un grupo hidroxialquilo C<sub>1-6</sub> o un grupo arilo que puede estar sustituido con un grupo alquilo C<sub>1-6</sub>) con un compuesto de α-aminoácido de fórmula (2):



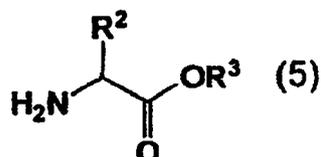
(en la que R<sup>4</sup> es tal como se definió anteriormente) en presencia de una base y dentro de un disolvente que contiene un disolvente orgánico no polar.

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el disolvente contiene un disolvente orgánico no polar y un alcohol.
3. Método según la reivindicación 1, en el que cualquier n es un número de desde 1 hasta 4 e Y es un grupo amino, un grupo guanidino o un grupo -CONH<sub>2</sub>, o n es 1 e Y es un grupo pirrol, un grupo imidazol, un grupo pirazol o un grupo imidazol.
4. Método según la reivindicación 1, en el que R<sup>1</sup> es un grupo alifático lineal C<sub>11-21</sub> que puede tener desde 0 hasta 2 enlaces insaturados.
5. Método según la reivindicación 1, en el que R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C<sub>1-3</sub> que puede tener una ramificación C<sub>1</sub>.
6. Método según la reivindicación 1, en el que R<sup>2</sup> es un átomo de hidrógeno, grupo metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo o terc-butilo; y R<sup>4</sup> es un grupo aminometilo, aminoetilo, 3-aminopropilo, 4-aminobutilo, carbamoilmetilo, 2-carbamoiletilo, 3-carbamoilbutilo, 2-guanidinoetilo, 3-guanidinopropilo, pirrolmetilo, imidazolmetilo, pirazolmetilo o 3-indolmetilo.
7. Método según la reivindicación 1, en el que R<sup>3</sup> es un grupo metilo o etilo.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la base es al menos una seleccionada de entre metales alcalinos, sales de ácidos inorgánicos de metales alcalinos, hidróxidos de metales alcalinos, alcóxidos de metales alcalinos, aminas alicíclicas, y disoluciones en alcohol o dispersiones en alcohol de los mismos.

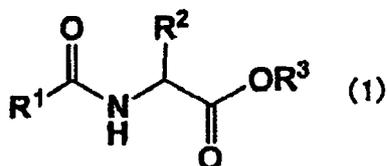
9. Método según la reivindicación 8, en el que la base es al menos una seleccionada de entre un sodio metálico, potasio metálico, carbonato de sodio, carbonato de potasio, fosfato de potasio, fosfato de sodio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, metóxido de sodio, etóxido de sodio, metóxido de potasio, etóxido de potasio, t-butóxido de potasio, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno, 1,5-diazabicyclo[4.3.0]-5-noneno, y disoluciones en alcohol o dispersiones en alcohol de los mismos.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el disolvente orgánico no polar es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en compuestos aromáticos, compuestos alifáticos saturados y compuestos alifáticos insaturados.
11. Método según la reivindicación 2, en el que el disolvente incluye ciclohexano y metanol o etanol.
12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la reacción del compuesto de éster de fórmula (1) con el compuesto de  $\alpha$ -aminoácido de fórmula (2) se lleva a cabo a una temperatura de reacción de  $60 \pm 5$  °C.
13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que incluye una etapa de neutralizar con un haluro de hidrógeno un producto obtenido a partir de la reacción del compuesto de éster de fórmula (1) con el compuesto de  $\alpha$ -aminoácido de fórmula (2).
14. Método según la reivindicación 13, en el que la etapa de neutralización se lleva a cabo en un disolvente que contiene agua y un alcohol.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el método comprende además una etapa de hacer reaccionar un compuesto de fórmula (4):



(en la que X es un átomo de halógeno, un grupo alcoxilo  $C_{1-6}$  o un grupo  $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^1$  en el que  $\text{R}^1$  es tal como se definió anteriormente) con un compuesto de fórmula (5):



(en la que  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  son tal como se definieron anteriormente) para obtener el compuesto de éster de fórmula (1):



(en la que  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  son tal como se definieron anteriormente).

FIG 1

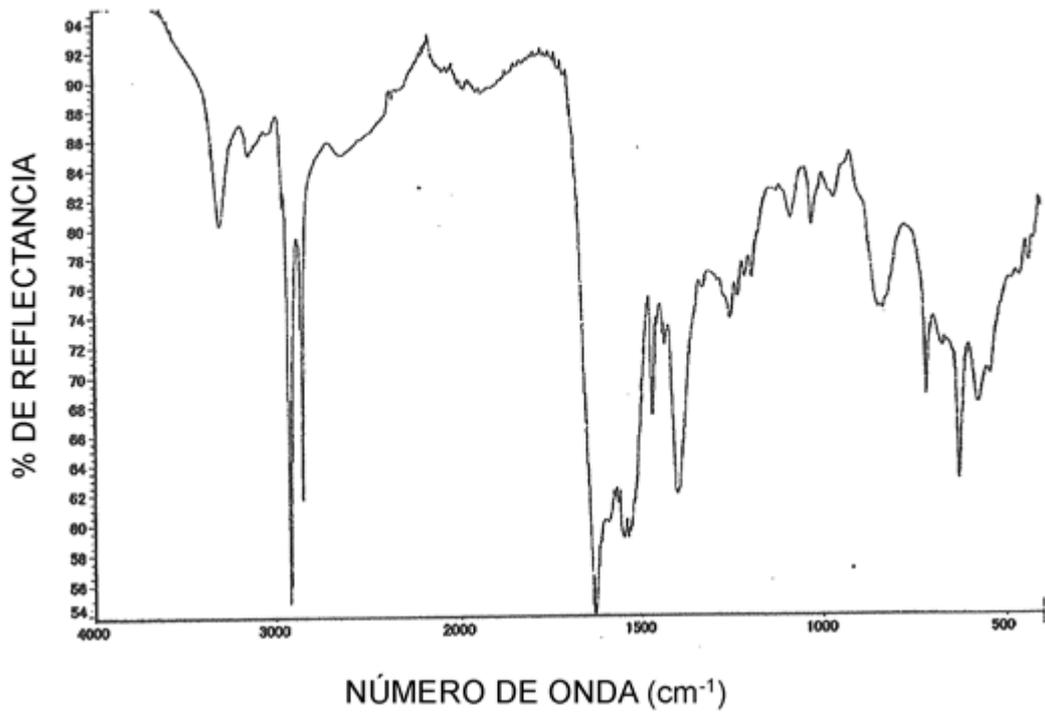


FIG. 2

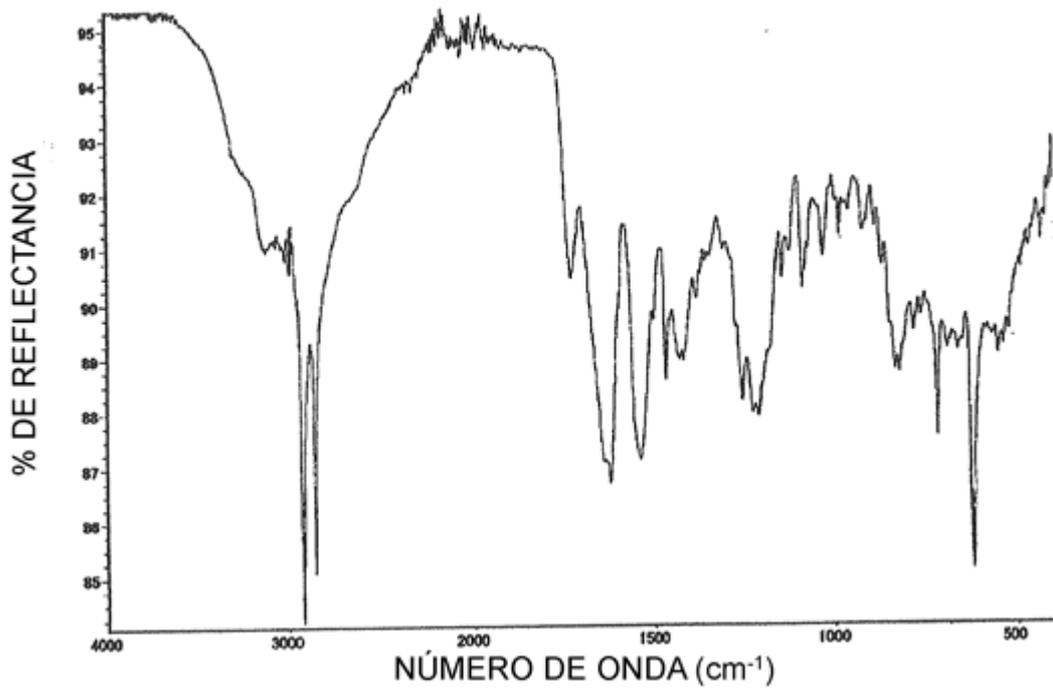


FIG 3

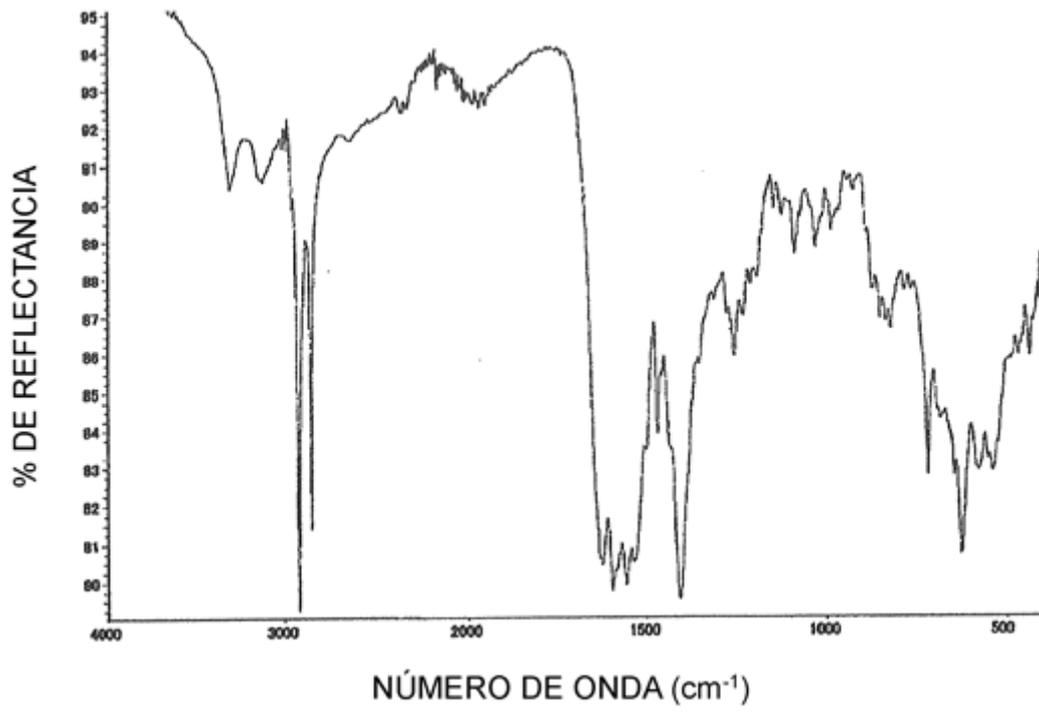


FIG 4

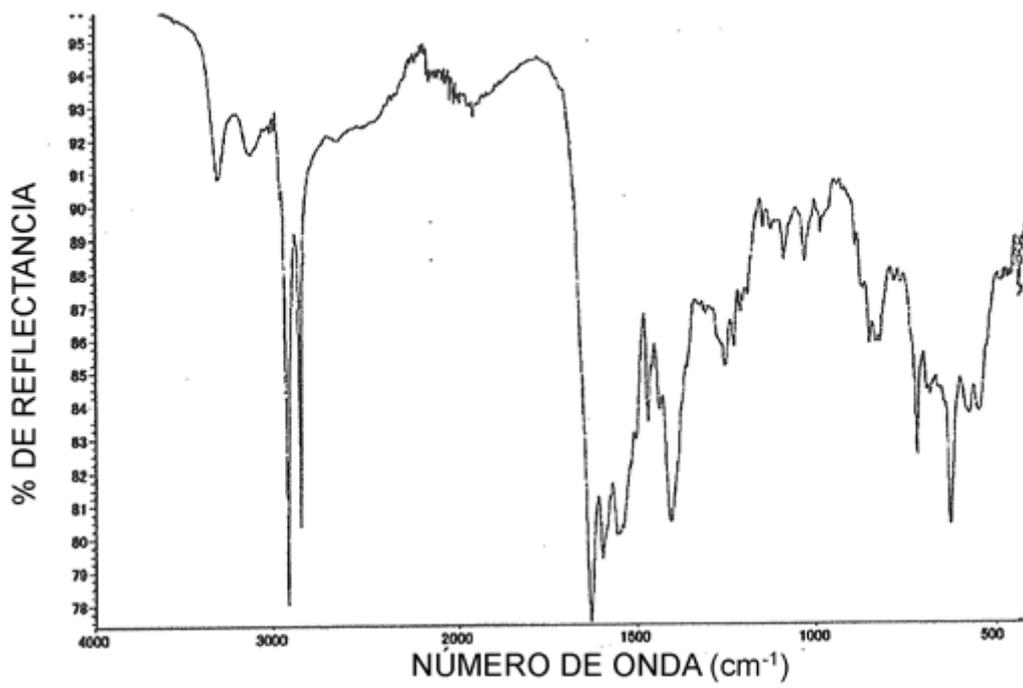


FIG. 5

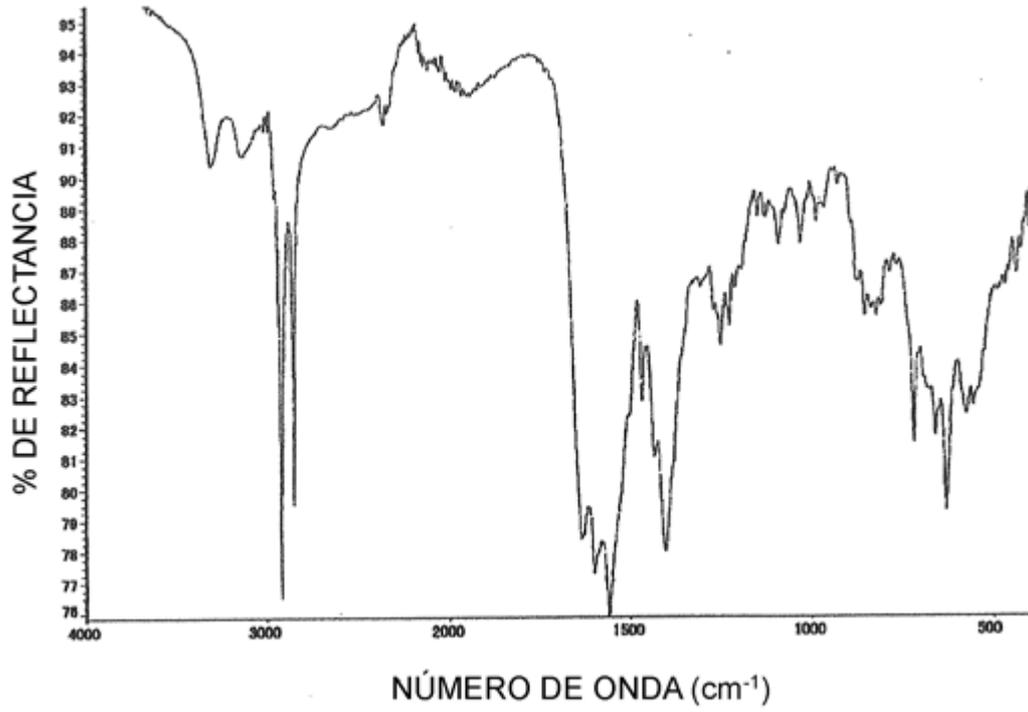


FIG. 6

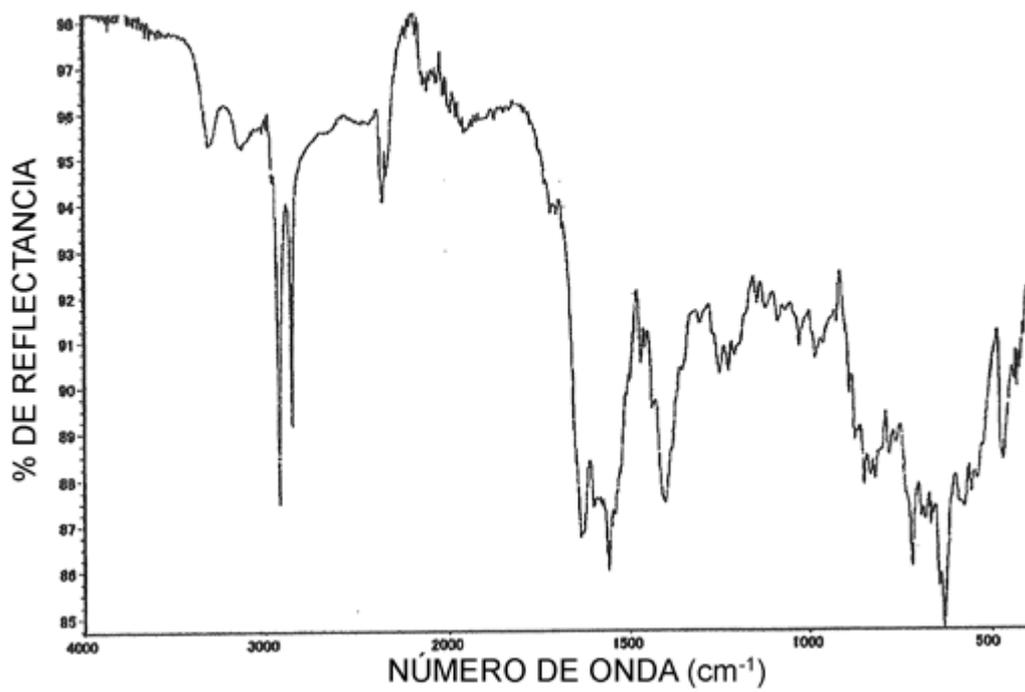


FIG. 7

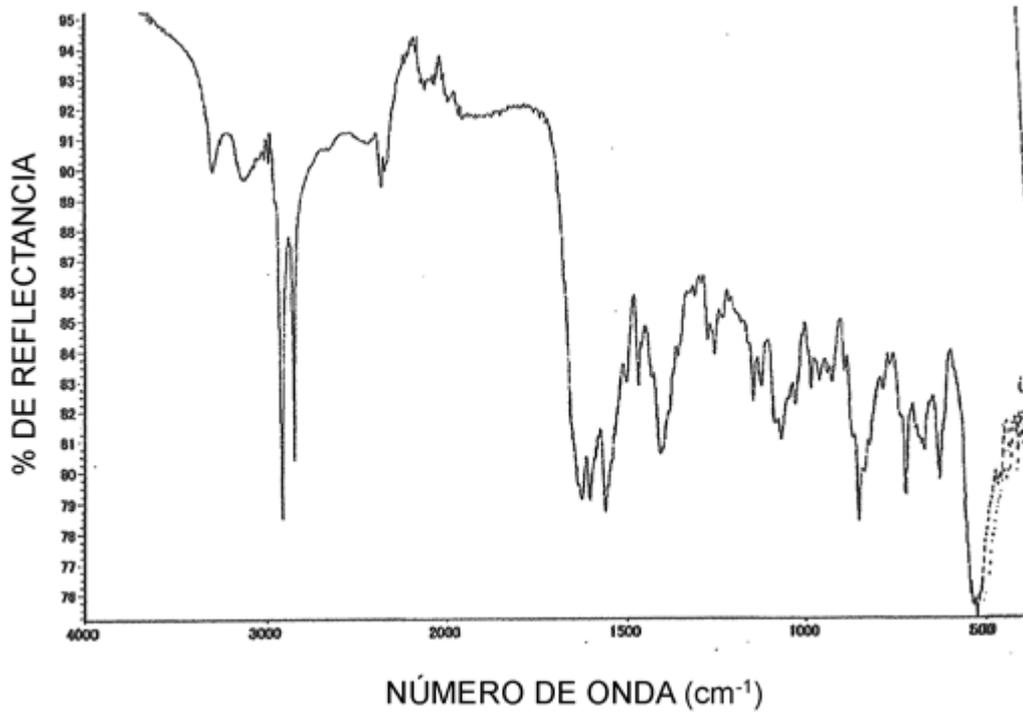


FIG. 8

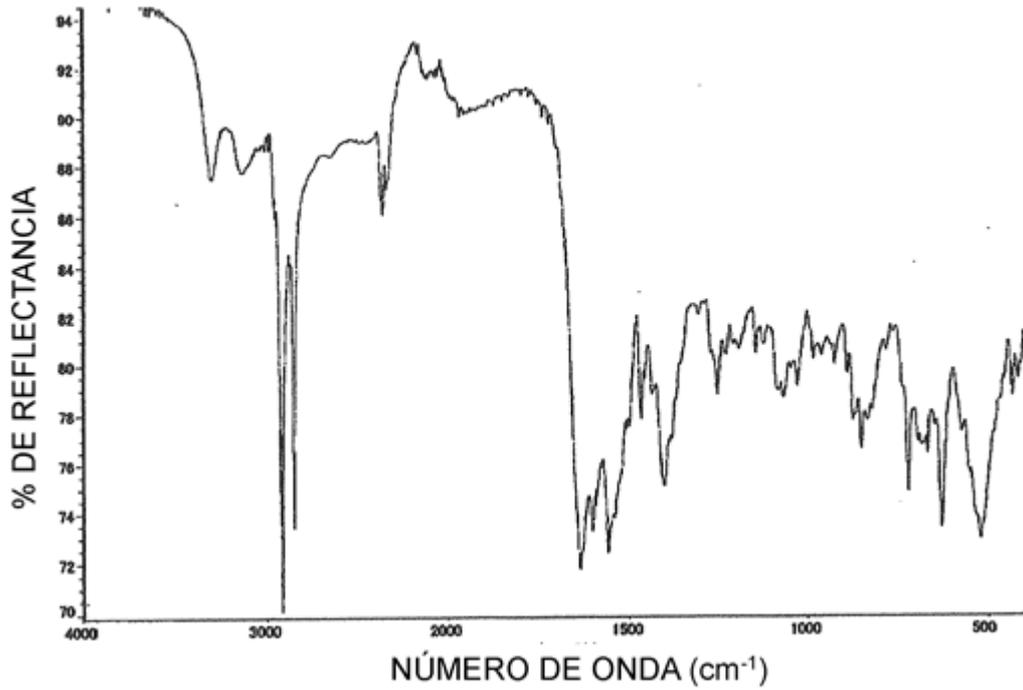


FIG. 9

