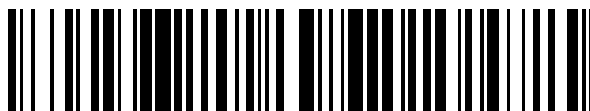


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 869**

51 Int. Cl.:

C07K 14/60 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/IB2012/003056**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13093639**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12840868 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2794634**

54 Título: **Procedimiento para la síntesis de análogos de la grelina**

30 Prioridad:

23.12.2011 US 201161580089 P

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

17.04.2018

73 Titular/es:

**IPSEN MANUFACTURING IRELAND LIMITED
(100.0%)**

**Blanchardstown Industrial Park Blanchardstown
Dublin 15, IE**

72 Inventor/es:

**HURLEY, FIONN;
WEGNER, KATARZYNA y
FOLEY, PATRICK**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 663 869 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la síntesis de análogos de la grelina

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para la síntesis a gran escala de péptidos terapéuticos que contienen aminoácidos no naturales o fabricados por el hombre. El método se puede escalar a grandes volúmenes y permite la fabricación rentable de péptidos muy puros.

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) es un método de mucho éxito presentado por primera vez por Merrifield en 1963 (Merrifield, R. B., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1963, 85: 2149-54). Desde entonces, se han sintetizado numerosos péptidos con esta técnica. En Kent, S. B. H., *Ann. Rev. Biochem.*, 1988, 57: 957-89 encontraremos una revisión de los métodos utilizados en la técnica anterior para sintetizar químicamente péptidos y proteínas. La síntesis en fase sólida permite la síntesis de péptidos naturales que son difíciles de expresar en las bacterias, la incorporación de aminoácidos no naturales o sintéticos, la modificación del esqueleto peptídico, y la síntesis de proteínas de isomería D que contienen D-aminoácidos.

Se han utilizado dos estrategias para el ensamblaje de cadenas peptídicas mediante la síntesis en fase sólida: 1) síntesis en fase sólida por etapas y 2) condensación de fragmentos en fase sólida. En la SPFS por etapas, el aminoácido del extremo carboxilo en forma de un derivado reactivo con el N α protegido y, si es necesario, con la cadena lateral protegida, se conjuga covalentemente de manera directa o bien por medio de un conector idóneo a un soporte «sólido», p. ej., una resina polimérica, hinchada típicamente en un solvente orgánico. Se retira el grupo protector del N α y se añaden de uno en uno los siguientes aminoácidos protegidos. Cuando se ha obtenido la longitud deseada de la cadena peptídica, se retiran los grupos protectores de las cadenas laterales y el péptido se escinde desde la resina. El procedimiento de escisión/desprotección se podría realizar en etapas independientes o al mismo tiempo. En la condensación de fragmentos en fase sólida, la secuencia deseada se ensambla mediante la condensación consecutiva de fragmentos en un soporte sólido mediante el uso de fragmentos protegidos preparados mediante la SPFS por etapas.

Una forma de SPFS se basa en el fluorenilmetiloxycarbonilo (o «Fmoc») para proteger de forma temporal el grupo α -amino. Con este método, el grupo Fmoc se une covalentemente al grupo amino para suprimir su nucleofilia. El aminoácido del extremo carboxilo está unido covalentemente a la resina a través de un conector. Luego, el grupo Fmoc se retira con una base, tal como piperidina. Esto libera el grupo amino que queda entonces disponible para reaccionar con un aminoácido activado. Las reacciones se llevan a la compleción con el uso del aminoácido activado en exceso (típicamente de dos a cuatro veces). Después de cada etapa de desprotección y conjugación, se realizan uno o varios lavados para retirar el exceso de reactantes. La escisión del péptido desde la resina con la retirada de los grupos protectores de las cadenas laterales se puede conseguir mediante la acidólisis con una solución ácida, tal como ácido trifluoroacético (TFA). Es una práctica habitual añadir más sustancias químicas marcadas como «depuradores», tales como triisopropilsilano (TIPS), trietilsilano (TES), fenol, anisol, tioanisol, agua, 1,2-etanoditiol (EDT), 1-dodecanotiol, ditiotreitil (DTT) e indol, para que el ácido de la mezcla de escisión reaccione con los grupos protectores liberados de las cadenas laterales, con lo que se impide que los grupos liberados se vuelvan a unir al péptido escindido.

Los aminoácidos tienen grupos reactivos en los extremos amino y carboxilo que facilitan la conjugación de los aminoácidos durante la síntesis. Además, los grupos funcionales reactivos de las cadenas laterales encontrados en la mayoría de aminoácidos pueden interactuar con los extremos libres u otros grupos de cadenas laterales durante la síntesis y la elongación de los péptidos, e influir negativamente en el rendimiento y la pureza. Para facilitar la síntesis de aminoácidos adecuada con una mínima reactividad de las cadenas laterales, se utilizan grupos químicos, denominados «grupos protectores», para que se unan a los grupos funcionales de determinados aminoácidos para «bloquear» o «proteger» dicho grupo funcional ante reacciones inespecíficas. Los grupos protectores de las cadenas laterales se conocen como grupos protectores permanentes o semipermanentes porque pueden resistir muchos ciclos de tratamiento químico durante la síntesis y solo se retiran por lo general durante el tratamiento con ácidos fuertes después de completar la síntesis del péptido.

Las estrategias actuales mencionadas más arriba no son deseables para producir los péptidos terapéuticos a escala comercial porque las resinas utilizadas en ellas requieren la retirada del péptido mediante concentraciones altas de ácido para la escisión del péptido desde la resina polimérica. Además de las preocupaciones de seguridad relacionadas con la utilización de grandes cantidades de material extremadamente corrosivo a gran escala, se podría necesitar un equipamiento especial para permitir su uso. Además, el uso de ácidos fuertes muy concentrados para escindir y desproteger los péptidos puede dar lugar a una degradación importante del péptido deseado, lo que da lugar a un bajo rendimiento y/o a la creación de nuevas impurezas como resultado de la exposición del péptido a un ácido fuerte durante el periodo de tiempo necesario para llevar a cabo una escisión y un desarrollo a escala. Tales impurezas podrían incluir especies deshidratadas u oxidadas, o impurezas relacionadas con la unión al péptido de toda o parte de la resina-conector (estas impurezas podrían ser posteriormente difíciles de retirar). Como tal, existe la necesidad de desarrollar un método eficaz a gran escala para la producción de péptidos terapéuticos.

Tal y como se mencionó anteriormente, la síntesis de péptidos en fase sólida se inicia en un soporte o anclaje «sólido». Estos «soportes» se denominan «resinas» en la industria. Las resinas podrían estar hechas de poliestireno

u otros materiales poliméricos, tales como polímeros de óxido de etileno, p. ej., resinas de PEG, o una mezcla de ambos, p. ej., resinas de PEG-poliestireno o «híbridas». Las resinas utilizadas habitualmente para la fabricación de amidas peptídicas mediante la vía de la SPFS con Fmoc incluyen resinas de poliestireno combinadas con un conector idóneo para liberar una amida peptídica completamente desprotegida tras el tratamiento con concentraciones altas de ácido. Las resinas utilizadas habitualmente incluyen resinas de amida de Rink, por ejemplo, resina de amida de Rink, resina de amida de Rink MBHA y resina de amida de Rink AM. Las resinas de amida de Rink liberan una amida peptídica totalmente desprotegida desde la resina cuando se trata con un alto porcentaje v/v de ácido en el cóctel de escisión: se utiliza típicamente, por ejemplo, el 80-95% v/v de ácido trifluoroacético (TFA).

En 1987, una nueva resina inestable en ácido para la síntesis en fase sólida de amidas del extremo carboxilo fue descubierta por Sieber (*Tetrahedron Lett.*, 1987, 28(19): 2107-10). Esta resina utiliza el grupo 9-xantenilo con un grupo -OCH₂- introducido entre dicho grupo xantenilo y el poliestireno para incrementar la inestabilidad en ácido. La escisión de las amidas peptídicas desde esta resina se lleva a cabo mediante acidólisis muy leve. El artículo describe la síntesis de dos péptidos en esta resina: el primero sin ningún grupo protector de cadena lateral (Z-Val-Gly-Ala-Pro-NH₂), en donde la escisión desde la resina en una escala de 0,5 g se efectúa mediante el bombeo de una mezcla de escisión ácida (TFA:1,2-dicloroetano 2:98 v/v) a través de la resina en una columna de vidrio; el segundo péptido (α -MSH), un péptido de 13 aminoácidos que contiene grupos protegidos de cadenas laterales (*tert*-butilo, Trt, Mtr y Boc), se escindió desde la resina mediante el bombeo de una mezcla de escisión ácida (TFA/1,2-dicloroetano-1,2-etanoditiol 2:98:0,1) a través de una columna con la resina. Se necesitaron dos etapas más con concentraciones altas de ácido y calentamiento (TFA/agua 9:1 a 30 °C, seguido de TFA al 95% con depuradores a 50 °C) para retirar todos los grupos protectores de las cadenas laterales.

Aunque no se menciona implícitamente en el artículo anterior, la principal utilidad de la resina de amida de Sieber (como acabó conociéndose a la resina de xantenilo) era la de producir péptidos con todas las cadenas laterales protegidas para ser utilizados en posteriores reacciones de condensación de fragmentos. Esto se puede conseguir con el uso de porcentajes bajos v/v de ácido en el cóctel de escisión, típicamente del 1 al 5% v/v. Según un proveedor comercial (Novabiochem®, Merck KGaA), la resina de Sieber es «[una resina con un] conector hiperinestable en ácido para la SPFS con Fmoc de amidas peptídicas protegidas a través de la escisión suave con TFA al 1%».

Se ha descubierto que la utilización de la resina de amida de Sieber combinada con la química del Fmoc y una solución de escisión mediante el uso de determinadas concentraciones de ácido trifluoroacético (TFA) (por ejemplo, por encima del 10% v/v) se puede utilizar para sintetizar amidas peptídicas completamente desprotegidas en la práctica y a gran escala (escala de kilogramos). Este es un mejor método para fabricar amidas peptídicas completamente desprotegidas cuando se compara con el uso de resinas de amida de Rink, porque:

- (i) se pueden conseguir mayores rendimientos de fabricación con el uso de este método;
- (ii) se puede conseguir mayor pureza del péptido con este método, lo que simplifica la purificación posterior;
- (iii) facilita que se consuman menos materiales brutos y solventes, y, por lo tanto, es un método de fabricación más rentable;
- (iv) es un método robusto y reproducible a pequeña y a gran escala, lo que simplifica el escalado del procedimiento.

La presente invención da a conocer un nuevo procedimiento para la síntesis a gran escala de péptidos terapéuticos que comprende la química con Fmoc en fase sólida por etapas.

En un aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para la síntesis de péptidos terapéuticos que comprende las sucesivas etapas de:

- (a) hacer hinchar la resina de Fmoc-Sieber (también denominada resina de amida de Sieber o resina de amida de Sieber unida a Fmoc) en un solvente aprótico dipolar;
- (b) desproteger el grupo Fmoc con una solución de piperidina en un solvente aprótico dipolar;
- (c) lavar la resina después de la desprotección del Fmoc con un solvente aprótico dipolar;
- (d) activar los aminoácidos-Fmoc para la conjugación a la resina desprotegida al disolver el aminoácido-Fmoc y el reactivo o reactivos de conjugación en un solvente aprótico dipolar, y, a continuación, añadir una base y agitar;
- (e) cargar la solución del aminoácido-Fmoc activado en la resina en el reactor;
- (f) conjugar el aminoácido-Fmoc activado con el uso del hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HCTU) o del tetrafluorocorato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU)/1-hidroxibenzotriazol (HOBt) con una base en un solvente aprótico dipolar como reactivo de conjugación;

(g) lavar la resina después de cada conjugación de aminoácido-Fmoc;

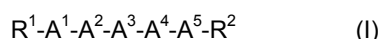
(h) repetir las etapas (b) a (g) hasta que se forme un péptido;

(i) escindir el péptido deseado desde la resina mientras que se desprotegen simultáneamente las cadenas laterales de los aminoácidos con un cóctel de escisión;

5 (j) filtrar la mezcla de escisión desde la resina; y

(k) hacer que se evaporen los filtrados, y precipitar y purificar parcialmente el producto bruto desde la solución concentrada con un solvente orgánico para producir un péptido parcialmente purificado.

en donde dicho péptido es un análogo de la grelina de fórmula (I)



10 en donde

A^1 es Aib, Apc o Inp;

A^2 es D-Bal, D-Bip, D-Bpa, D-Dip, D-1-Nal, D-2-Nal, D-Ser(Bzl), o D-Trp;

A^3 es D-Bal, D-Bip, D-Bpa, D-Dip, D-1-Nal, D-2-Nal, D-Ser(Bzl), o D-Trp;

A^4 es 2Fua, Orn, 2Pal, 3Pal, 4Pal, Pff, Phe, Pim, Taz, 2Thi, 3Thi, Thr(Bzl);

15 A^5 es Apc, Dab, Dap, Lys, Orn, o delecionado;

R^1 es hidrógeno; y

R^2 es OH o NH;

siempre y cuando

cuando A^5 es Dab, Dap, Lys u Orn, entonces:

20 A^2 es D-Bip, D-Bpa, D-Dip o D-Bal; o

A^3 es D-Bip, D-Bpa, D-Dip o D-Bal; o

A^4 es 2Thi, 3Thi, Taz, 2Fua, 2Pal, 3Pal, 4Pal, Orn, Thr(Bzl), o Pff;

cuando A^5 está delecionado, entonces:

A^3 es D-Bip, D-Bpa o D-Dip; o

25 A^4 es 2Fua, Pff, Taz, o Thr(Bzl); o

A^1 es Apc y -

A^2 es D-Bip, D-Bpa, D-Dip o D-Bal; o

A^3 es D-Bip, D-Bpa, D-Dip o D-Bal; o

A^4 es 2Thi, 3Thi, Orn, 2Pal, 3Pal, o 4Pal.

30 De acuerdo con las etapas (a), (b), (c) y (f) del procedimiento que está definido más arriba, se utiliza un solvente aprótico dipolar. Tal solvente aprótico dipolar se podría seleccionar de dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA) o *N*-metilpirrolidona (NMP), o combinaciones de las mismas. En una realización preferida, se utiliza la DMF como el solvente aprótico dipolar.

Otro procedimiento para la síntesis de péptidos terapéuticos de fórmula (I) comprende las etapas sucesivas de:

35 (a) hacer hinchar la resina de Fmoc-Sieber (también denominada resina de amida de Sieber o resina de amida de Fmoc-Sieber) en dimetilformamida (DMF);

(b) desproteger el grupo Fmoc con una solución de piperidina en DMF;

(c) lavar la resina después de la desprotección del Fmoc con DMF;

40 (d) activar los aminoácidos-Fmoc para la conjugación a la resina desprotegida mediante la disolución del aminoácido-Fmoc y el reactivo o reactivos de conjugación en DMF, y, a continuación, añadir una base y agitar;

- (e) cargar la solución del aminoácido-Fmoc activado en la resina en el reactor;
- (f) conjugar los aminoácidos-Fmoc activados con el uso del hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HCTU) o del tetrafluorocorato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU)/1-hidroxibenzotriazol (HOBt) con una base DMF como reactivo de conjugación;
- 5 (g) lavar la resina después de cada conjugación de aminoácido-Fmoc;
- (h) repetir las etapas (b) a (g) hasta que se forme un péptido;
- (i) escindir el péptido deseado desde la resina mientras que se desprotegen simultáneamente las cadenas laterales de los aminoácidos con un cóctel de escisión;
- (j) filtrar la mezcla de escisión desde la resina; y
- 10 (k) hacer que se evaporen los filtrados, y precipitar y purificar parcialmente el producto bruto desde la solución concentrada con un solvente orgánico para producir un péptido parcialmente purificado.

De acuerdo con la etapa (d) del procedimiento de la presente invención tal y como está definido más arriba, se utiliza una base. Dicha base podría ser una base de amina terciaria o una mezcla de las mismas, y seleccionarse de *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA), trietilamina (TEA), *N*-metilmorfolina (NMM), 2,4,6-trimetilpiridina (TMP, también conocida como colidina), 2,3,5,6-tetrametilpiridina (TEMP), 2,6-di-*tert*-butil-4-dimetilaminopiridina (DBDMAP), o 4-dimetilaminopiridina (DMAP). Una realización preferida del aspecto inmediatamente anterior de la presente invención se caracteriza por que la base utilizada en la etapa (d) es una amina terciaria, y que, en una realización más preferida, dicha base es la *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA).

- Otro procedimiento para la síntesis de péptidos terapéuticos de la fórmula (I) comprende las etapas de:
- 20 (a) hacer hinchar la resina de Fmoc-Sieber (también denominada resina de amida de Sieber o resina de amida de Fmoc-Sieber) en dimetilformamida (DMF);
- (b) desproteger el grupo Fmoc con una solución de piperidina en DMF;
- (c) lavar la resina después de la desprotección del Fmoc con DMF;
- 25 (d) activar los aminoácidos-Fmoc para la conjugación a la resina desprotegida mediante la disolución del aminoácido-Fmoc y el reactivo o reactivos de conjugación en DMF, y, a continuación, añadir una base y agitar;
- (e) cargar la solución del aminoácido-Fmoc activado en la resina en el reactor;
- (f) conjugar los aminoácidos-Fmoc activados con hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HCTU) o tetrafluorocorato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU)/1-hidroxibenzotriazol (HOBt) con la *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) en DMF como reactivo de conjugación;
- 30 (g) lavar la resina después de cada conjugación de aminoácido-Fmoc;
- (h) repetir las etapas (b) a (g) hasta que se forme un péptido;
- (i) escindir el péptido deseado desde la resina mientras que se desprotegen simultáneamente las cadenas laterales de los aminoácidos con un cóctel de escisión;
- (j) filtrar la mezcla de escisión desde la resina; y
- 35 (k) hacer que se evaporen los filtrados, y precipitar y purificar parcialmente el producto bruto desde la solución concentrada con un antisolvente orgánico para producir un péptido parcialmente purificado.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para la síntesis de péptidos terapéuticos que comprende las sucesivas etapas de:

- 40 (a) hacer hinchar la resina de Fmoc-Sieber (también denominada resina de amida de Sieber o resina de amida de Fmoc-Sieber) en dimetilformamida (DMF);
- (b) desproteger el grupo Fmoc con una solución de piperidina en DMF;
- (c) lavar la resina después de la desprotección del Fmoc con DMF;
- 45 (d) activar los aminoácidos-Fmoc para la conjugación a la resina desprotegida mediante la disolución del aminoácido-Fmoc y el reactivo o reactivos de conjugación en DMF, y luego añadir la *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) y agitar;

(e) cargar la solución del aminoácido-Fmoc activado en la resina en el reactor;

(f) conjugar los aminoácidos-Fmoc activados con hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HCTU) o tetrafluorocorato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU)/1-hidroxibenzotriazol (HOBt) con la *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) en DMF como reactivo de conjugación;

5 (g) lavar la resina después de cada conjugación de aminoácido-Fmoc;

(h) repetir las etapas (b) a (g) hasta que se forme un péptido;

(i) escindir el péptido deseado de la resina mientras que se desprotegen simultáneamente las cadenas laterales de los aminoácidos con un cóctel de escisión;

(j) filtrar la mezcla de escisión desde la resina; y

10 (k) hacer que se evaporen los filtrados, y precipitar y purificar parcialmente el producto bruto desde la solución concentrada con un solvente orgánico para producir un péptido parcialmente purificado.

Otra realización preferida de la presente invención se caracteriza por que dicho cóctel de escisión utilizado en la etapa (i) del procedimiento que está definido más arriba comprende TFA, uno o varios depuradores y DCM, en donde dicho depurador se selecciona del grupo que consiste en triisopropilsilano (TIPS), trietilsilano (TES), fenol, anisol, tioanisol, agua, 1,2-etanoditiol (EDT), 1-dodecanotiol, ditiotreitól (DTT) e indol, siempre y cuando el porcentaje de TFA en dicho cóctel de escisión no exceda el 25%.

15

Una realización preferida del aspecto inmediatamente anterior de la presente invención se caracteriza por que dicho depurador se selecciona del grupo que consiste en TIPS, TES, anisol y agua.

20 Otra realización preferida de la presente invención se caracteriza por que dicho cóctel de escisión utilizado en la etapa (i), tal y como está definido más arriba, comprende TFA, uno o varios depuradores y DCM, en donde dicho depurador se podría seleccionar del grupo que consiste en TIPS, TES, anisol y agua, siempre y cuando el porcentaje de TFA en dicho cóctel de escisión no exceda el 25%.

25 Para los péptidos en donde solo se necesita retirar los grupos protectores de cadenas laterales Boc y tBu, una realización preferida de la presente invención se caracteriza por que dicho cóctel de escisión consiste en TFA del 15 al 25% v/v con TIPS del 2,5 al 12% v/v y DCM del 62,5 al 82,5% v/v; y es incluso más preferido que dicho cóctel de escisión consista en TFA al 20% v/v con TIPS al 10% v/v y DCM al 70% v/v.

Para los péptidos en donde solo se necesita retirar los grupos protectores de cadenas laterales Boc y tBu, una realización preferida del procedimiento de la presente invención, tal y como está definido más arriba, se caracteriza por que:

30 dicho cóctel de escisión utilizado en la etapa (i), tal y como está definido más arriba, consiste en TFA del 15 al 25% v/v con TIPS del 2,5 al 12% v/v y lo demás del cóctel de escisión está compuesto al 100% de DCM; e incluso más preferido es que

dicho cóctel de escisión utilizado en la etapa (i), tal y como está definido más arriba, consiste en TFA a aproximadamente el 20% v/v con TIPS a aproximadamente el 10% v/v y DCM al 70% v/v.

35 Otra realización preferida del procedimiento de la presente invención, tal y como está definido más arriba, con las etapas (a) a (k) es que el péptido resultante se escinde de la resina de amida de Sieber con la deprotección de los grupos protectores de las cadenas laterales.

40 Otra realización preferida de la presente invención se caracteriza por que el grupo Fmoc se retira inicialmente de la resina con piperidina en DMF. En una realización más preferida, el grupo Fmoc se retira inicialmente de la resina con piperidina en DMF, en donde la concentración de dicha piperidina en DMF es de menos del 20% (v/v) y más preferiblemente de aproximadamente el 15% (v/v).

45 De acuerdo con la etapa (f) del procedimiento de la presente invención tal y como está definido más arriba, la conjugación de los aminoácidos-Fmoc activados se lleva a cabo con hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HCTU) o tetrafluorocorato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU)/1-hidroxibenzotriazol (HOBt) con una base, tal como la *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA), en un solvente aprótico dipolar, tal como DMF, solo o en combinación. En una realización preferida de acuerdo con cualquiera de los aspectos anteriores de la presente invención, los restos de aminoácido se conjugan con una «combinación de reactivos de conjugación» seleccionados del grupo que consiste en HCTU/DIEA y TBTU/HOBt/DIEA.

50 Una realización preferida del procedimiento de la presente invención con las sucesivas etapas (a) a (j), tal y como está definido más arriba, se caracteriza por que, en la etapa (a), la resina de amida de Fmoc-Sieber se hace hinchar inicialmente mediante 1 a 3 tratamientos con 7 a 12 volúmenes de DMF durante incluso 1 hora, incluso más preferido, 3 tratamientos de 10 volúmenes de DMF que duran de 10 a 30 min por tratamiento.

Una realización preferida del procedimiento de la presente invención con las sucesivas etapas (a) a (j), tal y como está definido más arriba, se caracteriza por que, en la etapa (b), el grupo Fmoc en la resina de Sieber se desprotege con 1 a 2 tratamientos con una solución de piperidina en DMF (10-20% v/v) que dura de 5 a 20 minutos, incluso más preferido, 2 tratamientos con piperidina al 15% v/v en DMF que dura 10 minutos.

- 5 Una realización preferida del procedimiento de la presente invención con las sucesivas etapas (a) a (j), tal y como está definido más arriba, se caracteriza por que, en la etapa (c), la resina desprotegida se lava de 3 a 5 veces con 7 a 12 volúmenes de DMF, donde cada lavado dura hasta 5 minutos, incluso más preferido, 3 lavados con 10 volúmenes de DMF, donde cada lavado dura hasta 5 minutos.

- 10 Una realización preferida del procedimiento de la presente invención con las sucesivas etapas (a) a (j), tal y como está definido más arriba, se caracteriza por que, en la etapa (d), 1,2 - 2,0 mol de equivalentes (respecto a la escala por lote de resina) del aminoácido-Fmoc se activa para la conjugación al disolver el aminoácido-Fmoc y el reactivo o reactivos de conjugación en DMF, añadir DIEA, y agitar hasta 5 minutos; y más preferiblemente, 1,5 mol de equivalentes (respecto a la escala por lote de resina) del aminoácido-Fmoc se activa para la conjugación al disolver el aminoácido-Fmoc y el reactivo o reactivos de conjugación en DMF, añadir DIEA, y agitar durante 1 a 2 minutos.

- 15 Una realización preferida del procedimiento de la presente invención con las sucesivas etapas (a) a (j), tal y como está definido más arriba, se caracteriza por que, en la etapa (f), de 0,5 a 1,5 mol de equivalentes (respecto al aminoácido-Fmoc) del reactivo o reactivos de conjugación se utilizan con 1,5 a 2,5 mol de equivalentes (respecto al aminoácido-Fmoc) de DIEA en 4 a 10 volúmenes de DMF durante 30 a 120 minutos a temperatura ambiente; y más preferiblemente, de 0,5 a 1,5 mol de equivalentes (respecto a aminoácido-Fmoc) del reactivo o reactivos de conjugación se utiliza con 1,5 a 2,5 mol de equivalentes (respecto al aminoácido-Fmoc) de DIEA en 5 a 7 volúmenes de DMF durante 60 minutos a 15 a 30 °C.

- 25 Una realización preferida del procedimiento de la presente invención con las sucesivas etapas (a) a (j), tal y como está definido más arriba, se caracteriza por que, en la etapa (g), la resina se lava después de cada conjugación, de 2 a 4 veces con de 7 a 12 volúmenes de DMF durante hasta 5 minutos; y en una realización más preferida, la resina después de cada conjugación se lava 2 veces con 10 volúmenes de DMF durante hasta 5 minutos.

Una realización preferida del procedimiento de la presente invención con las sucesivas etapas (a) a (j), tal y como está definido más arriba, se caracteriza por que, en la etapa (i):

- la resina se sumerge en el cóctel de escisión y se agita durante 2 a 3 horas a temperatura ambiente y, más preferiblemente, la resina se sumerge y agita durante 2,5 horas, y
- 30
- la solución de resina/cóctel de escisión se rocía intermitentemente con nitrógeno gaseoso.

Una realización preferida del procedimiento de la presente invención con las sucesivas etapas (a) a (j), tal y como está definido más arriba, se caracteriza por que, en la etapa (j):

- la resina consumida se lava con un volumen pequeño de cóctel de escisión recién preparado, o bien con TFA/DCM (20:80 v/v) de 1 a 2 veces;
- 35
- la resina consumida se lava optativamente con un volumen pequeño de MeOH.

Una realización preferida del procedimiento de la presente invención con las sucesivas etapas (a) a (j), tal y como está definido más arriba, se caracteriza por que, en la etapa (k), después de combinar los filtrados y hacer que se evapore la combinación:

- el péptido bruto se precipita con 5 a 15 volúmenes de MtBE;
- 40
- el péptido precipitado se seca hasta el nivel necesario de sequedad;
 - el péptido precipitado se disuelve con ácido diluido, o ácido diluido con el modificador orgánico a utilizar en la purificación cromatográfica posterior
 - el péptido se purifica y se realiza una etapa de intercambio de sales mediante cromatografía preparativa en fase inversa.

- 45 Otra realización preferida del procedimiento de la presente invención se caracteriza por que comprende las siguientes etapas sucesivas (a) a (j):

(a) hacer hinchar la resina de amida de Fmoc-Sieber con 1 a 3 tratamientos con 7 a 12 volúmenes de DMF durante hasta 1 hora, incluso más preferido, 3 tratamientos con 10 volúmenes de DMF que duran de 10 a 30 minutos por tratamiento;

- (b) desproteger el grupo Fmoc en la resina de Sieber mediante 1 a 2 tratamientos con una solución de piperidina en DMF (10-20% v/v) que dura de 5 a 20 minutos, incluso más preferiblemente 2 tratamientos de piperidina al 15% v/v en DMF que duran 10 minutos;
- 5 (c) lavar la resina desprotegida de 3 a 5 veces con 7 a 12 volúmenes de DMF, donde cada lavado dura hasta 5 minutos, incluso más preferiblemente, 3 lavados con 10 volúmenes de DMF, donde cada lavado dura hasta 5 minutos.
- (d) activar de 1,2 a 2,0 mol de equivalentes (respecto a la escala por lote de resina) del aminoácido-Fmoc para la conjugación a la resina desprotegida al disolver el aminoácido-Fmoc y el reactivo o reactivos de conjugación en DMF, añadir DIEA, y agitar durante 1 a 2 minutos; y más preferiblemente, activar 1,5 mol de equivalentes (respecto a la escala por lote de resina) del aminoácido-Fmoc para la conjugación al disolver el aminoácido-Fmoc y el reactivo o reactivos de conjugación en DMF, añadir DIEA, y agitar durante 1 a 2 minutos.
- 10 (e) cargar la solución del aminoácido-Fmoc activado en la resina en el reactor;
- (f) conjugar el aminoácido-Fmoc a la resina desprotegida al sumergir y agitar la resina desprotegida con la solución de aminoácido-Fmoc activado durante 30 a 120 min a temperatura ambiente; dicha solución de aminoácido-Fmoc activado que comprende el aminoácido-Fmoc como tal y como está descrito en (d) más arriba junto con 0,5 a 1,5 mol de equivalentes (respecto al aminoácido-Fmoc) del reactivo o reactivos de conjugación con 1,5 a 2,5 mol de equivalentes (respecto al aminoácido-Fmoc) de DIEA en 4 a 10 volúmenes de DMF a temperatura ambiente; y más preferiblemente, de 0,5 a 1,5 mol de equivalentes (respecto a aminoácido-Fmoc) del reactivo o reactivos de conjugación con 1,5 a 2,5 mol de equivalentes (respecto al aminoácido-Fmoc) de DIEA en 5 a 7 volúmenes de DMF durante 60 minutos a 15 a 30 °C.
- 15 (g) lavar la resina después de cada conjugación, de 2 a 4 veces con 7 a 12 volúmenes de DMF durante hasta 5 minutos; y más preferiblemente, 2 veces con 10 volúmenes de DMF durante hasta 5 minutos;
- 20 (h) repetir las etapas (b) a (g) hasta que se forme un péptido;
- (i) escindir el péptido deseado desde la resina mientras que simultáneamente se desprotegen las cadenas laterales de los aminoácidos con un cóctel de escisión, al:
- 25
- sumergir la resina en el cóctel de escisión y agitarla durante 2 a 3 horas a temperatura ambiente, y, más preferiblemente, al sumergir y agitar la resina durante 2,5 horas, y
 - rociar la mezcla de resina/cóctel de escisión intermitentemente con nitrógeno gaseoso.
- (j) filtrar la mezcla de escisión desde la resina, y luego
- 30
- lavar la resina consumida con un volumen pequeño de cóctel de escisión recién preparado o bien con TFA/DCM (20:80 v/v) de 1 a 2 veces; y
 - lavar optativamente la resina consumida con un volumen pequeño de MeOH.
- (k) combinar los filtrados y los lavados, y hacer que se evapore la combinación, y luego
- 35
- precipitar el péptido bruto desde los filtrados combinados evaporados y lavados con 5 a 15 volúmenes de MtBE;
 - secar el péptido precipitado hasta el nivel necesario de sequedad;
 - disolver el péptido precipitado con ácido diluido, o ácido diluido con el modificador orgánico a utilizar en la purificación cromatográfica posterior;
 - purificar el péptido y realizar una etapa de intercambio de sales mediante cromatografía preparativa en fase inversa.
- 40 Una realización preferida de cualquiera de los aspectos inmediatamente anteriores de la presente invención se caracteriza por que, en las etapas (a) a (j) (las nuevas subetapas se indican con un #-), se definen además como sigue:
- (a) hacer hinchar la resina de amida de Fmoc-Sieber inicialmente con 1 a 3 tratamientos con 7 a 12 volúmenes de DMF durante hasta 1 hora, incluso más preferiblemente, 3 tratamientos con 10 volúmenes de DMF que duran de 10 a 30 minutos por tratamiento;
- 45 (b) desproteger el grupo Fmoc en la resina de Sieber con 1 a 2 tratamientos con una solución de piperidina en DMF (10-20% v/v) que dura de 5 a 20 minutos, incluso más preferiblemente 2 tratamientos de piperidina al 15% v/v en DMF que dura 10 minutos;

- (c) lavar la resina desprotegida de 3 a 5 veces con 7 a 12 volúmenes de DMF, donde cada lavado dura hasta 5 minutos, incluso más preferiblemente, 3 lavados con 10 volúmenes de DMF, donde cada lavado dura hasta 5 minutos;
- 5 (d) activar los aminoácidos-Fmoc (de 1,2 a 2,0 mol de equivalentes o, más preferiblemente, 1,5 mol de equivalentes respecto a la escala por lote de resina) para la conjugación al disolver el aminoácido-Fmoc y el reactivo o reactivos de conjugación en DMF, añadir DIEA, agitar hasta 5 minutos, incluso más preferiblemente, agitar de 1 a 2 minutos;
- (e) cargar la solución de conjugación en la resina en el reactor;
- (f) usar de 0,5 a 1,5 mol de equivalentes del reactivo o reactivos de conjugación respecto al aminoácido-Fmoc con 1,5 a 2,5 mol de equivalentes de DIEA respecto a los aminoácidos-Fmoc en 4 a 10 volúmenes de DMF durante 30 a 10 120 minutos a temperatura ambiente, incluso más preferiblemente, usar de 5 a 7 volúmenes de DMF durante 60 minutos a 15 a 30 °C;
- (g) lavar la resina, después de cada conjugación, de 2 a 4 veces con 7 a 12 volúmenes de DMF de hasta 5 minutos, incluso más preferiblemente, 2 lavados con 10 volúmenes de DMF de hasta 5 minutos;
- (h) repetir las etapas (b) a (g) hasta que se forme un péptido;
- 15 (i) sumergir la resina en el cóctel de escisión y agitarla durante 2 a 3 horas a temperatura ambiente y, más preferiblemente, sumergir y agitar la resina durante 2,5 horas;
- (i-1) rociar la solución de resina/cóctel de escisión intermitentemente con nitrógeno gaseoso;
- (j) filtrar la mezcla de escisión desde la resina;
- (j-1) lavar la resina consumida con un volumen pequeño de cóctel de escisión recién preparado o bien con TFA/DCM 20 (20:80 v/v) de 1 a 2 veces;
- (j-2) lavar la resina consumida con un volumen pequeño de MeOH.
- (k) combinar los filtrados y hacer que se evapore la combinación
- (k-1) precipitar un péptido bruto con 5 a 15 volúmenes de MtBE;
- (k-2) secar el péptido precipitado hasta el nivel necesario de sequedad;
- 25 (k-3) disolver el péptido precipitado con ácido diluido, o ácido diluido con el modificador orgánico a utilizar en la purificación cromatográfica posterior
- (k-4) purificar el péptido y realizar una etapa de intercambio de sales mediante cromatografía preparativa en fase inversa.

30 Se declara conocer que algunos grupos protectores (p. ej., el 2,2,4,6,7-pentametildihidrobencofurán-5-sulfonilo (Pbf) protector de la cadena lateral de Arg) requerirá un porcentaje mayor de ácido, típicamente del 50 al 80%, para la retirada del grupo protector de cadena lateral en un plazo de tiempo práctico; sin embargo, todos los demás aspectos de la presente invención permanecen igual. Otros grupos protectores de cadena lateral contemplados incluyen, pero sin limitarse a ellos, metoxitrimetilbencenosulfonilo (Mtr), cloruro de 2,2,5,7,8-pentametilcromán-6-sulfonilo (Pmc), 4,4-dimetiloxibenzidrido (Mbh) y 2,4,6-trimetoxibencilo (Tmob).

35 La presente invención también hace posibles las situaciones en las que es deseable conservar determinados grupos protectores de cadena lateral durante y después de la escisión. Por ejemplo, es importante conservar el acetamidometilo (Acm), grupo protector de cadena lateral de la Cys, para que el péptido completado se pueda purificar en su forma lineal, y después se cicle cuando se retiren los grupos protectores y se forme un puente disulfuro entre dos restos de Cys.

40 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: gráfico en el que se representa la comparación cabeza con cabeza de los péptidos sintetizados mediante una resina de amida de Rink con los sintetizados con una resina de amida de Sieber mediante procedimientos de síntesis similares. Se fabricaron péptidos de diferentes longitudes desde 5 aminoácidos a 30 aminoácidos, según los procedimientos descritos en la presente memoria, y se midió el rendimiento de la síntesis. Para cada longitud de péptido (presentada debajo del eje y del gráfico), el porcentaje del rendimiento (que se indica mediante el eje x) con el uso de la resina de amida de Rink está representado por la barra superior, y el porcentaje del rendimiento con el uso de la resina de amida de Sieber está representado por la barra inferior. Para cada péptido sintetizado, a saber, una secuencia de 5 aminoácidos, dos secuencias de 8 aminoácidos, una secuencia de 8 aminoácidos modificada con uno o varios restos de dopamina, y una secuencia de 30 aminoácidos, el uso de la resina de amida de Sieber dio lugar a unos porcentajes de rendimiento más elevados.

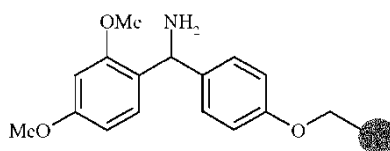
50

Figura 2: gráfico en el que se representa la reproducibilidad del rendimiento de la síntesis en una escala de 2 g a 2200 g cuando se utiliza la resina de amida de Sieber para la síntesis de un péptido de 5 aminoácidos. Tal y como está descrito, se consiguió constantemente un rendimiento de síntesis de aproximadamente el 80% para cada escala.

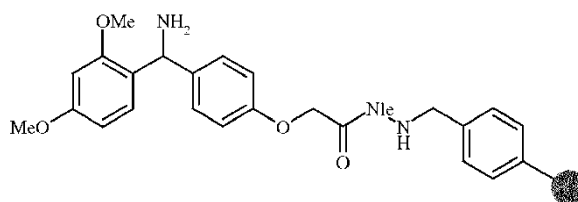
- 5 Figura 3: gráfico en el que se representa el coste relativo basado en el material empleado para la síntesis de un péptido de 8 aminoácidos y un péptido de 30 aminoácidos mediante el uso de una resina de amida de Rink frente a una resina de amida de Sieber. El coste relativo basado en los materiales utilizados para esos péptidos sintetizados mediante una resina de amida de Rink para un péptido de 8 aminoácidos y un péptido de 30 aminoácidos está representado por las barras superiores, mientras que el coste relativo para el mismo péptido con el uso de una resina de amida de Sieber está representado por las barras inferiores para cada péptido. Tal y como está descrito, el
- 10 coste relativo de utilizar una resina de amida de Sieber es menor que el de una resina de amida de Rink.

La mayoría de las etapas de síntesis en fase sólida por etapas necesitan usar una resina de poliestireno para la síntesis de las amidas peptídicas. Las resinas de amida de Rink se utilizan en una síntesis de péptidos en fase sólida para preparar las amidas peptídicas mediante la utilización de aminoácidos protegidos con Fmoc.

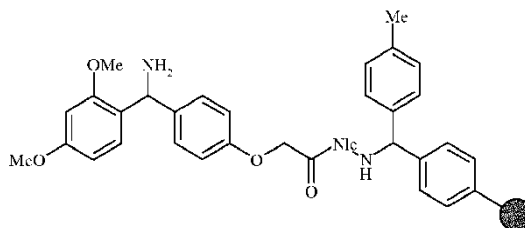
- 15 La conjugación del primer aminoácido se puede conseguir con los métodos típicos de formación de enlaces amida. La secuencia peptídica se ensambla en condiciones básicas o neutras sobre la resina de amida de Rink, y luego se escinde de la resina el péptido completado en condiciones ácidas. Típicamente, el péptido se escinde desde la resina de amida de Rink con TFA a más del 80% v/v (Stathopoulos, P.; Papas, S.; y Tsikaris, V., *J. Pept. Sci.*, 2006, 12: 227-37). Los ácidos más fuertes o las concentraciones más elevadas de TFA algunas veces escinden parte del
- 20 conector de Rink desde el soporte de poliestireno e introduce impurezas coloreadas en el producto escindido. Tal cual, para algunos péptidos, el rendimiento de la síntesis con la resina de amida de Rink es tradicionalmente bajo. Ejemplos de resinas de Rink son:



Amida de Rink



Amida de Rink AM

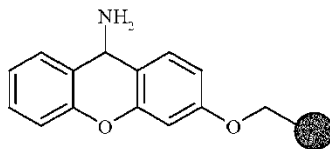


Amida de Rink MBHA

- 25 La inestabilidad del conector de la resina «supersensible a ácido» o «hipersensible a ácido» a bajas concentraciones de ácido permite que se liberen de la resina los péptidos totalmente protegidos. Típicamente, se necesita del 1 al 5% v/v de TFA para la escisión de los péptidos. Con la excepción de la disminución de la potencia del ácido necesario para la escisión, estas resinas son similares a las resinas de amida de Rink, a saber, son una matriz de poliestireno
- 30 con un tamaño de perla similar y con una capacidad de carga similar. Como tales, estas resinas son útiles para la síntesis convergente que emplea la misma química de Fmoc con respecto a la carga de primer resto y al acoplamiento de los restos posteriores.

- 35 La resina de amida de Sieber, un ejemplo de resinas «supersensibles a ácido» (Sieber, P., *Tetrahedron Lett.*, 1987, 28(19): 2107-10), se utiliza principalmente para la síntesis de amidas peptídicas que conservan los grupos protectores de la cadena lateral, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) y éter de *tert*-butilo (tBu) cuando se utilizan con concentraciones bajas de ácido trifluoroacético (TFA) (1-5% v/v) en el cóctel de escisión.

Ya que la resina de amida de Sieber se utiliza tradicionalmente para la síntesis en fase sólida con Fmoc, es necesario que los aminoácidos estén protegidos con Fmoc. De acuerdo con esto, hay que escindir los grupos protectores que permanecen después de completar la síntesis del péptido. La escisión de los demás grupos protectores necesita unas condiciones muy acidolíticas, tales como hasta el 95% de TFA que contiene hasta el 5% de etanodiol y hasta el 5% de 4-(metilmercapto)fenol (Sieber, P., *Tetrahedron Lett.*, 1987, 28(19): 2107-10).



Resina de amida de Sieber

Los inventores acometieron la síntesis de una amida de péptido de 8 restos sensible a ácido con la resina de amida de Sieber. Encontraron que la SPFS lineal se podía realizar con la resina de amida de Sieber junto con la química de Fmoc. Los inventores descubrieron que, al ajustar las condiciones, no se necesitaba una concentración alta de ácido, a saber, TFA, para la escisión del producto final desde la resina de Sieber. Además, se descubrió que los grupos protectores de las cadenas laterales se podían retirar concurrentemente con una escisión del péptido resultante desde la resina de amida de Sieber cuando se utiliza un cóctel de escisión de TFA/TIPS/DCM de concentración «media». Con algo de optimización, los inventores descubrieron que era posible sintetizar péptidos de longitud completa con aminoácidos protegidos, en particular aquellos con grupos protectores Boc, tBu y/o Trt y, a continuación, liberar una amida peptídica completamente desprotegida desde la resina, al mismo tiempo que se disminuye al mínimo la degradación del péptido.

Los inventores también intentaron utilizar la resina de amida de Sieber para sintetizar otros péptidos de 5 a 30 aminoácidos de longitud, y péptidos que contienen aminoácidos no naturales así como aminoácidos problemáticos que aparecen en la naturaleza, tales como triptófano, cisteína y arginina. Los inventores descubrieron que los péptidos que contienen aminoácidos no naturales o problemáticos se podían sintetizar con la resina de amida de Sieber con una concentración media de TFA durante la escisión. También se descubrió que los péptidos que contienen arginina se podían sintetizar mediante la resina de amida de Sieber, aunque era necesaria una concentración más elevada de TFA durante la escisión, en particular si están presentes los grupos protectores de cadenas laterales de sulfonilo.

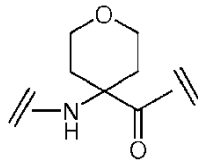
Sorprendentemente, la resina de amida de Sieber, cuando se utiliza de una manera diferente a la descrita en la bibliografía, daba lugar a rendimientos más elevados del producto bruto más puro. Por ejemplo, los inventores descubrieron que el rendimiento de la síntesis se incrementaba del 18 al 30%, cuando se utilizaba la resina de amida de Rink, hasta el 78-83%, cuando se utilizaba la resina de amida de Sieber, para preparar el análogo de grelina H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂, como se describía en la patente internacional WO 2004/014415. Para otros péptidos, tales como las quimeras de dopamina-somastostatina, los inventores describieron que el rendimiento de la síntesis con la resina de amida de Sieber era del 72,6 al 80,8% en comparación a las resinas utilizadas habitualmente, tales como la familia de resinas de amida de Rink (p. ej., resina de amida de Rink MBHA, resina de amida de Rink AM, resina de amida de Rink) con un rendimiento del 13 al 71% en las mismas condiciones. Los inventores descubrieron que con el uso de la resina de amida de Sieber se incrementaba el rendimiento como promedio hasta el 50% en comparación con el uso de la resina de amida de Rink. Además, el rendimiento era reproducible entre lotes y al escalarlo desde 2 g hasta 2,2 kg. Los rendimientos comparativos con la amida de Rink frente al uso de la resina de amida de Sieber en las mismas condiciones para sintetizar péptidos de diferentes longitudes, a saber, de 5 aminoácidos de longitud hasta 30 aminoácidos de longitud, se describen en la figura 1. En cada comparación, el uso de la resina de amida de Sieber daba lugar a rendimientos más altos de la síntesis, 70% frente al 10%. Como resultado, el porcentaje del coste relativo, basado en la longitud del péptido era menor cuando se utilizaba la resina de amida de Sieber en lugar de la tradicional resina de amida de Rink en la figura 3. Los inventores también demuestran la reproducibilidad del rendimiento de la síntesis cuando se usa la resina de amida de Sieber en la figura 2.

Además, las resinas de amida de Rink utilizadas habitualmente necesitan concentraciones elevadas de TFA, normalmente del 80 al 95% v/v, para la escisión del péptido final desde la resina. Los inventores descubrieron que, con la resina de amida de Sieber, sólo se necesitaba del 10 al 25% de TFA. Tal y como está mencionado más arriba, una concentración más elevada de TFA puede dar lugar a una degradación grave del péptido con el tiempo, así como la presencia de impurezas, tales como las procedentes de la adhesión de todo o parte del conector de la resina al péptido, que posteriormente podría ser difícil de retirar. Además, el desarrollo después de la escisión es más rápido cuando se usa el procedimiento reivindicado, ya que se necesitan menos ácidos durante la escisión final.

Además, se encontró que era posible reducir la cantidad de aminoácidos-Fmoc, de reactivos de conjugación y de solventes si se usa la resina de amida de Sieber, sin afectar al rendimiento ni a la pureza del péptido producido.

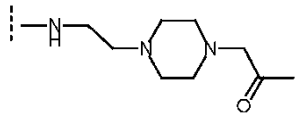
Determinados aminoácidos presentes en los compuestos de la invención se representan en la presente memoria como sigue:

- 5 A3c ácido 1-amino-1-ciclopropanocarboxílico
 A4c ácido 1-amino-1-ciclobutanocarboxílico
 A5c ácido 1-amino-1-ciclopentanocarboxílico
 A6c ácido 1-amino-1-ciclohexanocarboxílico
 Abu ácido α -aminobutírico
 Acc ácido 1-amino-1-cicloalquil(C₃-C₉)carboxílico
 Act 4-amino-4-carboxitetrahidropirano, a saber:



10

- Aepa 4-(2-aminoetil)-1-carboximetil-piperazina, representada por la estructura:

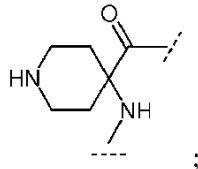


- Aib ácido α -aminoisobutírico

- Ala o A alanina

- 15 β -Ala β -alanina

- Apc ácido aminopiperidinilcarboxílico, a saber:



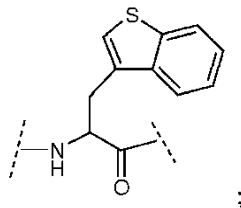
- Arg o R arginina

- hArg homoarginina

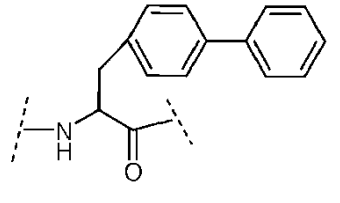
- 20 Asn o N asparagina

- Asp o D ácido aspártico

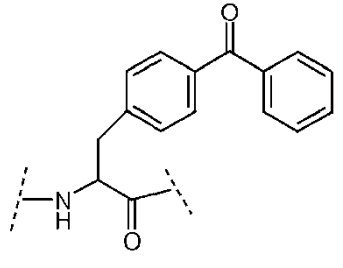
- Bal 3-benzotienilalanina, a saber:



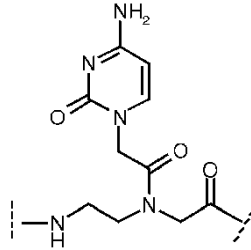
- Bip 4,4'-bifenilalanina, a saber:



Bpa 4-benzyloxyphenilalanina, a saber:



Caeg *N*-(2-aminoetil)-*N*-(2-citosinil-1-oxoetil)-glicina, representada por la estructura:



5

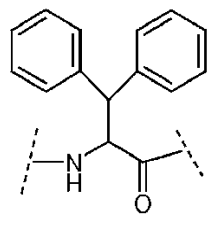
Cha β -ciclohexilalanina;

Cys o C cisteína;

Dab ácido 2,4-diaminobutírico, (ácido α,γ -diaminobutírico);

Dap ácido 2,3-diaminopropiónico, (ácido α,β -diaminopropiónico);

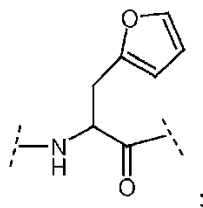
10 Dip β,β -difenilalanina, a saber:



Dhp 3,4-deshidroprolina

Dmt ácido 5,5-dimetiltiazolidina-4-carboxílico

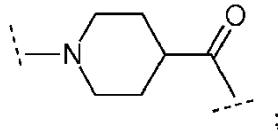
2-Fua β -(2-furil)-alanina, a saber:



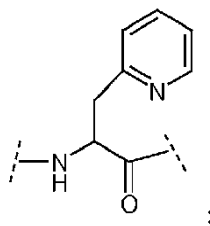
15

Gln o Q glutamina

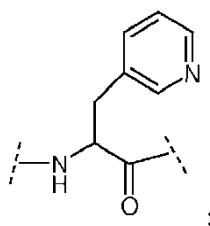
	Glu o E	ácido glutámico
	Gly o G	glicina
	His o H	histidina
	3-Hyp	<i>trans</i> -3-hidroxi-L-prolina, a saber, ácido (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-3-hidroxi-pirrolidina-2-carboxílico;
5	4-Hyp	4-hidroxi-prolina, a saber, ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-hidroxi-pirrolidina-2-carboxílico;
	Ile o I	isoleucina
	Inc	ácido indolino-2-carboxílico
	Inp	ácido isonipecótico, a saber:



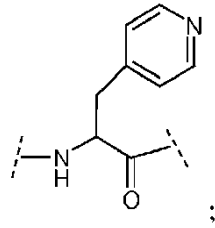
10	Ktp	4-cetoprolina
	Leu o L	leucina
	hLeu	homoleucina
	Lys o K	lisina
	Lys(Ac)	lisina(acetilo)
15	Met o M	metionina
	1-Nal	β -(1-naftil)alanina:
	2-Nal	β -(2-naftil)alanina;
	Nle	norleucina
	Nva	norvalina
20	Oic	ácido octahidroindol-2-carboxílico
	Orn	ornitina
	2-Pal	β -(2-piridil)-alanina, a saber,



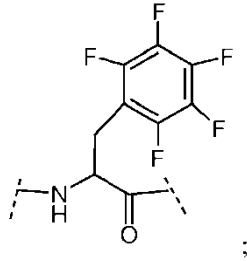
3-Pal β -(3-piridil)-alanina, a saber:



25	4-Pal	β -(4-piridil)-alanina, a saber:
----	-------	--



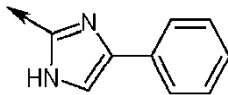
Pff pentafluorofenilalanina, a saber



Phe o F fenilalanina

5 hPhe homofenilalanina

Pim 2'-(4-fenil)imidazolilo, a saber:



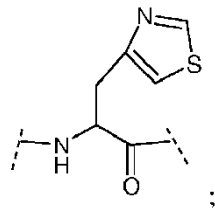
Pip ácido piperócico

Pro o P prolina

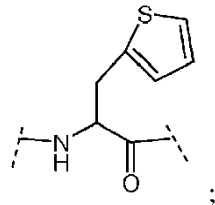
10 Ser o S serina

Ser(Bzl) serina(O-benzilo)

Taz β -(4-tiazolil)alanina, a saber,

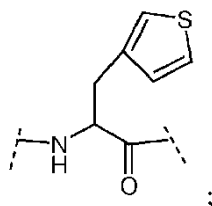


2-Thi β -(2-tienil)-alanina, a saber:



15

3-Thi β -(3-tienil)-alanina, a saber:



	Thr o T	treonina
	Thr(Bzl)	treonina(O-benzilo)
	Thz	ácido tiazolidina-4-carboxílico
5	Tic	ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolino-3-carboxílico
	Tle	<i>tert</i> -leucina
	Trp o W	triptófano
	(N-Me)D-Trp	<i>N</i> ¹ -metil-D-triptófano
	Tyr o Y	tirosina
10	3-I-Tyr	3-yodotirosina
	Val o V	valina

La letra griega psi « Ψ » se utiliza en la presente memoria para indicar que un enlace peptídico ha sido remplazado por un enlace pseudopeptídico. En un nombre de secuencia de aminoácidos, el formato del término Ψ es $A^1-\Psi-(X-X')A^2$, en donde A^1 es el radical aminoacilo cuyo grupo carbonilo ha sido modificado a X, y A^2 es el radical aminoacilo cuyo grupo α -amino ha sido modificado a X'. X y X' se muestran como cadenas de los símbolos de los elementos separados por un enlace, p. ej., Tyr- Ψ -(CH₂-NH)Gly.

La solicitud emplea las siguientes abreviaturas:

	Ac	acetilo
	ACN	acetonitrilo
20	Acm	acetamidometilo
	AM	aminometilo
	Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
	DCE	dicloroetano
	DCM	diclorometano
25	DIC	<i>N,N</i> -diisopropilcarbodiimida
	DIEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
	DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
	DTT	ditiotreitól
	EDT	etanoditiol
30	Fmoc	9-fluorenilmetiloxicarbonilo
	HATU	hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (o <i>N</i> -óxido de hexafluorofosfato de <i>N</i> -[(dimetilaminio)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i>]piridín-1-ilmetileno]- <i>N</i> -metilmetanaminio)
35	HBTU	hexafluorofosfato de 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (o <i>N</i> -óxido de hexafluorofosfato de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-(dimetilamino)metileno]- <i>N</i> -metilmetanaminio)
	HCTU	hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (o <i>N</i> -óxido de hexafluorofosfato de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -6-clorobenzotriazol-1-il)-(dimetilamino)metileno]- <i>N</i> -metilmetanaminio)

	HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
	HOBt	1-hidroxibenzotriazol
	HPLC	cromatografía líquida de alta presión
	LOD	pérdida al secar
5	Mbh	4,4-dimetiloxibenzhidrido
	MBHA	4-metilbenzhidrilamina
	MtBE	éter de metilo y <i>tert</i> -butilo
	Mtr	metoxitrimetilbencenosulfonilo
	OtBu	éster de <i>tert</i> -butilo
10	Pbf	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurán-5-sulfonilo
	PEG	polietilenglicol
	Pmc	cloruro de 2,2,5,7,8-pentametilcromán-6-sulfonilo
	TBTU	tetrafluoroborato de 2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (o <i>N</i> -óxido de tetrafluoroborato de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-(dimetilamino)metileno]- <i>N</i> -metilmetanaminio)
15	tBu	éter de <i>tert</i> -butilo
	TES	trietilsilano
	TFA	ácido trifluoroacético
	TIPS	triisopropilsilano
	Tmob	2,4,6-trimetoxibencilo
20	Trt	tritilo o trifenilmetilo

A menos que se indique otra cosa, las siguientes definiciones se presentan para ilustrar y definir el significado y el alcance de los diferentes términos utilizados para describir la invención en la presente memoria.

25 El término «cóctel de escisión», tal y como se emplea en esta memoria, hace referencia a una mezcla de reactivos utilizados para retirar o escindir el péptido ensamblado desde una resina. Además, un cóctel de escisión también sirve para retirar todos los grupos protectores de cadenas laterales y los grupos protectores de extremos aminos.

El término «unos» (o «aproximadamente»), tal y como se emplea en esta memoria en asociación con parámetros o cantidades, significa que el parámetro o la cantidad está dentro de $\pm 5\%$ del parámetro o la cantidad mencionada. Por ejemplo, «aproximadamente el 20%» significa $(20 \pm 20 \times 0,05)\%$ que es igual a $(20 \pm 0,1)\%$.

30 El término «resina», tal y como se utiliza de ahora en adelante, hace referencia a una resina de amida de Fmoc-Sieber o bien a una resina de amida de Sieber a la cual se han unido uno o varios aminoácidos.

El término «temperatura ambiente» (o temperatura ambiental) hace referencia a un margen de temperatura de 15 a 30 °C.

El ejemplo que se describe más adelante tiene el propósito de ilustrar un método de la presente invención y no se debe considerar que limita la presente invención de ninguna manera.

35 En una realización más preferida, la presente invención hace referencia a un procedimiento para la síntesis de un péptido terapéutico, en donde dicho péptido se selecciona de un análogo de la grelina de la fórmula (I)

en donde

A¹ es Aib, Apc o Inp;

A² es D-Bal, D-Bip, D-Bpa, D-Dip, D-1-Nal, D-2-Nal, D-Ser(Bzl), o D-Trp;

40 A³ es D-Bal, D-Bpa, D-Dip, D-1-Nal, D-2-Nal, o D-Trp;

A⁴ es Orn, 3Pal, 4Pal, Pff, Phe, Pim, Taz, 2Thi, o Thr(Bzl); y

A⁵ es Apc, Lys, o delecionado.

En una realización más preferida, la presente invención hace referencia a un procedimiento para la síntesis de un péptido terapéutico, en donde dicho péptido es un análogo de la grelina de la fórmula (I), tal y como está definido más arriba, en donde

5 A¹ es Apc o Inp;

A² es D-Bal, D-Bip, D-1-Nal, o D-2-Nal;

A³ es D-Bal, D-1-Nal, D-2-Nal, o D-Trp;

A⁴ es 3Pal, 4Pal, Pff, Phe, Pim, Taz, 2Thi, o Thr(Bzl); y

A⁵ es Apc o Lys.

10 En una realización más preferida, la presente invención hace referencia a un procedimiento para la síntesis de un péptido terapéutico, en donde dicho péptido es un análogo de la grelina seleccionado de H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂, H-Inp-D-2Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂, H-Inp-D-Bal-D-Trp-2Thi-Apc-NH₂, y H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂, y más en particular H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂.

15 El procedimiento general para la síntesis de una amida de péptido terapéutico completamente desprotegido de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se ilustra más adelante.

La resina de amida de Fmoc-Sieber (Merck Chemicals, Darmstadt, Alemania) se hace hinchar inicialmente con 1 a 3 tratamientos de 7 a 12 volúmenes, preferiblemente 10 volúmenes, de DMF (Samsung, Corea), además, durante hasta 1 hora, aunque se prefieren 3 tratamientos que duren aproximadamente 10-30 minutos.

20 La desprotección del Fmoc de la resina de amida de Sieber se realiza con 1 a 2 tratamientos de una solución de piperidina en DMF (aproximadamente 10-20% v/v, preferiblemente 15% v/v) que duran de 5 a 20 minutos, aunque se prefieren 2 tratamientos que duran 10 minutos cada uno.

La resina desprotegida se lava de 3 a 5 veces con 7 a 12 volúmenes de DMF que duran hasta 5 minutos, aunque se prefieren 3 lavados con 10 volúmenes de DMF que duran hasta 5 minutos para cada lavado.

25 Los aminoácidos-Fmoc se activan para la conjugación a la resina mediante la disolución del aminoácido-Fmoc junto con el reactivo o reactivos de conjugación en DMF, adición de una base tal como DIEA (SAFC, Gillingham, Reino Unido), agitación de hasta 5 minutos (se prefieren 1-2 minutos) y la carga en la resina en el reactor.

30 La conjugación del aminoácido-Fmoc se lleva a cabo con aproximadamente de 1,2 a 2,0 mol de equivalentes (se prefieren 1,5 mol de equivalentes) del aminoácido-Fmoc con respecto a la resina con el uso de HCTU (Merck Chemicals) o TBTU/HOBt (de 0,5 a 2,0 mol de equivalentes respecto al aminoácido-Fmoc) (tanto TBTU como HOBt se obtienen de SAFC) con una base, preferiblemente DIEA (aproximadamente de 1,5 a 3,5 mol de equivalentes con respecto al aminoácido-Fmoc, aunque se prefieren equivalentes específicos para cada uno de los aminoácidos), en DMF (de 4 a 10 volúmenes, se prefieren de 5 a 7 volúmenes) que duran de 30 a 120 minutos (aunque la duración varía según el aminoácido a conjugar; sin embargo, se prefieren 60 minutos para la mayoría de aminoácidos) a una temperatura ambiente (preferiblemente de 15 a 30 °C). Se prefiere HCTU (1,2 equivalentes respecto al aminoácido-Fmoc) o bien TBTU con HOBt (0,98 mol de equivalentes) según el aminoácido a conjugar.

35 Después de la conjugación de cada aminoácido-Fmoc, se lava la resina de 2 a 4 veces con 7 a 12 volúmenes de DMF (se prefieren 2 lavados de 10 volúmenes de DMF), en donde cada lavado dura hasta 5 minutos.

40 El péptido deseado se escinde desde la resina y todos los grupos protectores de cadena lateral se «desprotegen» con un cóctel de escisión que consiste en aproximadamente del 15 al 25% v/v de TFA (Rhodia, Lyon, Francia) (aunque se prefieren del 15 al 20 % v/v, es más preferido aproximadamente el 20% v/v) con aproximadamente del 2,5 al 12% v/v de TIPS (SAFC, Gillingham, Reino Unido) (aunque preferiblemente del 5 al 10% v/v, y es más preferido aproximadamente el 10% v/v) utilizado como un depurador con lo que queda del cóctel de escisión que comprende del 62,5 al 82,5% v/v de DCM (INEOS Chlor, Runcorn, GB) (en función del porcentaje utilizado de TFA y TIPS). La resina se introduce en el cóctel de escisión y se agita en él durante 2 a 3 horas (se prefieren 2,5 horas) a 45 aproximadamente la temperatura ambiente (aproximadamente de 15 a 30 °C). De forma intermitente, se introduce el rociado con nitrógeno gaseoso o la cobertura de la mezcla de reacción de escisión con nitrógeno gaseoso. Se filtra la mezcla de escisión que contiene el péptido deseado y la resina «agotada». La resina «agotada» se lava con un volumen pequeño del cóctel de escisión recién preparado, o bien con una mezcla de TFA/DCM (15-20:80-85 v/v) (1 a 2 veces con 1 a 2 volúmenes sobre el peso de la resina). Podría ir seguido de un lavado optativo de un volumen 50 pequeño de MeOH (de 1 a 2 veces con aproximadamente de 1 a 2 volúmenes sobre el peso de la resina) (Univar, Dublín, Irlanda).

Los filtrados ricos en péptido se combinan y se evaporan hasta <20% del peso del filtrado original (se prefiere <15%). El péptido bruto se precipita desde la solución concentrada mediante un antisolvente orgánico, tal como

MtBE (Univar, Dublín, Irlanda) (aproximadamente de 5 a 15 volúmenes, preferiblemente de 6,5 a 10 volúmenes), se filtran y se lavan con volúmenes pequeños del mismo antisolvente orgánico (hasta 3 veces con aproximadamente de 1 a 2 volúmenes). Se podría secar el péptido precipitado. La solución del precipitado peptídico seco o semihúmedo para la posterior purificación se lleva a cabo con un ácido diluido, tal como ácido acético, junto con un solvente orgánico, tal como ACN (INEOS Nitriles, Rolle, Suiza) (aproximadamente % v/v según la solubilidad del péptido y el % al cual se eluye durante la purificación cromatográfica).

La purificación del péptido a una pureza muy alta ($\geq 99\%$) combinada con el intercambio de sales (p. ej., de TFA a sal de acetato) se consigue mediante la HPLC preparativa en fase inversa (en sílice C18 o C8, u otro empaquetamiento idóneo) por los expertos en la técnica. El aislamiento del péptido purificado mediante la liofilización u otros métodos de aislamiento de un polvo peptídico desde solución (p. ej., pulverización-secado, precipitación o cristalización seguido de secado) resultan posibles para los expertos en la técnica.

En la síntesis de compuestos quiméricos, tales como las quimeras dopamina-somatostatina, el procedimiento incluye otras etapas más. El procedimiento general de estas etapas adicionales se podría ilustrar tal y como viene a continuación: antes de la etapa (i),

Etapa h-1: se activa una dopamina para la conjugación mediante la disolución en HCTU y HOBt en DMF;

Etapa h-2: se añade una base o la solución de la etapa (h-1);

Etapa h-3: se agita la solución de la etapa (h-2) durante 1 minuto y, a continuación, dicha resina se agita durante aproximadamente 1,5 horas;

Etapa h-4: la resina resultante se lava con DMF; y

Etapa h-5: la resina se lava además con 1 a 3 volúmenes de MeOH.

Se utiliza una mezcla de TFA, TIPS y DCM para escindir el péptido desde la resina y, simultáneamente, retirar los grupos protectores de cadena lateral desde los aminoácidos, y, preferiblemente, la relación TFA:TIPS:DCM es de 15:5:80. A continuación, el precipitado se lava con MtBE. Finalmente, se cicla el precipitado.

Parte experimental

Ejemplo 1: Síntesis del análogo de la grelina H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂

(tal y como está descrito en la solicitud de patente internacional WO 2004/014415). En el procedimiento según se describe más adelante, todos los equivalentes lo son con respecto a la escala de lotes de resina.

El péptido del título se sintetizó en un reactor con filtro de 50 litros (Buchi, Flawil, Suiza).

La síntesis se llevó a cabo a una escala de 1,04 mol (resina de entrada: 1,4 kg).

Aproximadamente, 1,41 kg de resina de amida de Fmoc-Sieber se hizo hinchar con DMF (3 veces, 10 volúmenes). El grupo Fmoc se desprotegió con dos tratamientos de una solución del 15% v/v de piperidina (BASF, Schwarheide, Alemania) en DMF (2 × 10 volúmenes, 10 minutos cada uno). A continuación, la resina se lavó con DMF (3 × 10 volúmenes).

Algunos de los aminoácidos-Fmoc empleados (Apc, D-Trp) requerían cadenas laterales protegidas con Boc, los otros (Phe, D-Bal, Inp) no necesitaron la protección de la cadena lateral.

Una solución de 1,5 equivalentes de Fmoc-Apc(Boc)-OH se introdujo en el reactor, y se preactivó con 1,8 equivalentes de HCTU y 3 equivalentes de DIEA en DMF (6 volúmenes). La solución y la resina se agitaron durante aproximadamente 90 minutos. Se drenó la resina y se lavó con DMF (2 × 10 volúmenes). El grupo Fmoc se desprotegió como está descrito más arriba y el segundo aminoácido, Fmoc-Phe-OH, se conjugó en las mismas condiciones que se describieron para Fmoc-Apc(Boc)-OH. El ciclo de desprotección de Fmoc, lavado y conjugación del aminoácido-Fmoc y lavado se repitió para Fmoc-D-Trp(Boc)-OH, Fmoc-D-Bal-OH y Fmoc-Inp-OH, en donde en las etapas de conjugación de aminoácido-Fmoc se utilizaron 1,45 equivalentes de TBTU, 1,45 equivalentes de HOBt y 2,25 equivalentes de DIEA en DMF (6 a 7 volúmenes). Los tiempos de conjugación fueron de 60 minutos.

Tras la compleción del ensamblaje del péptido sobre la resina de amida de Sieber, la resina se lavó con DMF, y, a continuación, se lavó dos veces más con 10 litros de metanol, y se secó.

El péptido se escindió de la resina y sus grupos protectores de cadena lateral se retiraron con 10 volúmenes de un cóctel de escisión que comprendía TFA/TIPS/DCM (20/10/70% v/v) durante 2,5 horas. El filtrado que contiene el péptido se evaporó a presión reducida, se precipitó, y se lavó con MtBE antes de disolverlo en ácido acético diluido y acetonitrilo para la posterior purificación. El rendimiento de la síntesis fue del 80,8%, y la pureza por HPLC del 90,0 %.

El péptido se purificó con una columna de HPLC preparativa en fase inversa (Novasep, Pompey, Francia) empaquetada con C₁₈ en fase estacionaria (EKA Chemicals AB, Bohus, Suecia). La purificación y el intercambio de sales se llevó a cabo en gradiente de elución con tampones de acetato de amonio y ácido acético, con acetonitrilo como modificador orgánico.

- 5 Los ejemplos de péptidos terapéuticos que se pueden sintetizar con el nuevo procedimiento descrito en la presente memoria incluyen, pero sin limitarse a ellos, los siguientes:

H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-3-Pal-Lys-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-4-Pal-Lys-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Orn-Lys-NH₂

- 10 H-Inp-D-Bip-D-Trp-Phe-Lys-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Thr(Bzl)-Lys-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂

- 15 H-Inp-D-Dip-D-Trp-Phe-Lys-NH₂

H-Inp-D-Bpa-D-Trp-Phe-Lys-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Bpa-Phe-Lys-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-3-Pal-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-4-Pal-NH₂

- 20 H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-3-Pal-NH₂

H-Inp-D-Bip-D-Trp-Phe-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Thr(Bzl)-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Pff-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-NH₂

- 25 H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Taz-NH₂

H-Inp-D-Dip-D-Trp-Phe-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Dip-Phe-NH₂

H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Bal-Phe-NH₂

- 30 H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-3-Pal-Lys-NH₂

H-Inp-D-Bal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂

H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Lys-NH₂

H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂

H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂

- 35 H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂

H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂

H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Phe-Lys-NH₂

H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂

- H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Thi-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Phe-NH₂
- H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
- 5 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-Lys-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂
- 10 H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-1-Nal-Phe-Apc-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-2-Nal-Phe-Apc-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-1-Nal-Phe-Lys-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-1-Nal-Phe-Apc-NH₂
- 15 H-Apc-D-Bal-D-2-Nal-Phe-Apc-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-1-Nal-Phe-Lys-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-2-Nal-Phe-Lys-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Thi-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-NH₂
- 20 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Taz-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Thi-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-NH₂
- H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-NH₂
- H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Taz-NH₂
- 25 H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
- 30 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Pal-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-3-Pal-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
- 35 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-4-Pal-NH₂

- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Pff-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
5 H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Pal-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-Apc-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
10 H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-3-Pal-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-4-Pal-NH₂
15 H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Pff-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
20 H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Fua-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Fua-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Fua-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Pal-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Thi-Apc-NH₂
25 H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Thi-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Thi-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-3-Pal-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-3-Thi-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-3-Thi-Lys-NH₂
30 H-Apc-D-Bal-D-Bal-3-Thi-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-4-Pal-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Pff-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Pff-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Pff-NH₂
35 H-Apc-D-Bal-D-Bal-Phe-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Phe-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Phe-NH₂

- H-Apc-D-Bal-D-Bal-Taz-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Taz-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Taz-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
5 H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Fua-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Pal-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-3-Pal-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
10 H-Apc-D-Bal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-3-Thi-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-4-Pal-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
15 H-Apc-D-Bal-D-Trp-Pff-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-2-Fua-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-2-Fua-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-3-Thi-Lys-NH₂
20 H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Pff-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Phe-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Taz-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Taz-NH₂
25 H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
30 H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Pff-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Taz-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
35 H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-Apc-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂

- H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
- H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-NH₂
- H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
- H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Pff-NH₂
- 5 H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
- H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Taz-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Bal-2-Fua-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Bal-2-Fua-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Bal-2-Thi-Lys-NH₂
- 10 H-Inp-D-Bal-D-Bal-3-Thi-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Bal-Pff-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Bal-Pff-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Bal-Phe-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Bal-Taz-Lys-NH₂
- 15 H-Inp-D-Bal-D-Bal-Taz-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Trp-2-Fua-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
- 20 H-Inp-D-Bal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Trp-Pff-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-NH₂
- 25 H-Inp-D-Bip-D-Bal-2-Fua-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Bal-2-Fua-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Bal-2-Thi-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Bal-3-Thi-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Bal-Pff-Lys-NH₂
- 30 H-Inp-D-Bip-D-Bal-Pff-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Bal-Taz-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Bal-Taz-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Trp-2-Fua-NH₂
- 35 H-Inp-D-Bip-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Trp-Pff-Lys-NH₂

- H-Inp-D-Bip-D-Trp-Pff-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-Taz-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-3-Pal-Lys-NH₂
5 H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-4-Pal-Lys-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Orn-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-Phe-Lys-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Thr(Bzl)-Lys-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
10 H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
H-Inp-D-Dip-D-Trp-Phe-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bpa-D-Trp-Phe-Lys-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Bpa-Phe-Lys-NH₂
15 H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Thr(Bzl)-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Pff-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Taz-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Dip-Phe-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-3-Pal-Lys-NH₂
20 H-Inp-D-Bal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂
25 H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Phe-Lys-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
30 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-Lys-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂
35 H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-1-Nal-Phe-Apc-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-2-Nal-Phe-Apc-NH₂

- H-Apc-D-1-Nal-D-1-Nal-Phe-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-1-Nal-Phe-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-2-Nal-Phe-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-1-Nal-Phe-Lys-NH₂
5 H-Apc-D-Bal-D-2-Nal-Phe-Lys-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Thi-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Taz-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Thi-NH₂
10 H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Taz-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
15 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
20 H-Inp-D-Bal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
25 H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Bal-Phe-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Bal-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Bal-3-Thi-Lys-NH₂
30 H-Inp-D-Bal-D-Bal-Taz-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Bal-2-Fua-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Bal-Pff-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Phe-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Thi-Lys-NH₂
35 H-Apc-D-Bal-D-Bal-3-Thi-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Taz-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Fua-Lys-NH₂

- H-Apc-D-Bal-D-Bal-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
5 H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Phe-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-3-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Taz-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-2-Fua-Lys-NH₂
10 H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-Apc-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
15 H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
20 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
25 H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
30 H-Inp-D-Bip-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Bal-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Bal-3-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Bal-Taz-Lys-NH₂
35 H-Inp-D-Bip-D-Bal-2-Fua-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Bal-Pff-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂

- H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Phe-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Thi-Apc-NH₂
5 H-Apc-D-Bal-D-Bal-3-Thi-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Taz-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Fua-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Pff-Apc-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
10 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-Apc-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
15 H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-2-Fua-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-Pff-NH₂
20 H-Apc-D-Bal-D-Trp-3-Thi-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Fua-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Pff-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-4-Pal-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-3-Pal-NH₂
25 H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Pal-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Bal-Taz-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Bal-2-Fua-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Bal-Pff-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Phe-NH₂
30 H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Thi-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-3-Thi-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Taz-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Fua-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Pff-NH₂
35 H-Apc-D-Bal-D-Bal-4-Pal-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-3-Pal-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Pal-NH₂

- H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Taz-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Pff-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Taz-NH₂
5 H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-2-Fua-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Pff-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Taz-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Pff-NH₂
10 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Pff-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-4-Pal-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-3-Pal-NH₂
15 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Pal-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Pff-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-4-Pal-NH₂
20 H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-3-Pal-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Pal-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-Taz-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-2-Fua-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-Pff-NH₂;
25 H-Inp-D-Bip-D-Bal-Taz-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Bal-2-Fua-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Bal-Pff-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Thi-Apc-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-2-Thi-Apc-NH₂
30 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Thi-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Thi-Apc-NH₂ y
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Phe-Lys-NH₂.
H-Inp-D-Bip-D-Trp-Pff-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
35 H-Inp-D-Bip-D-Trp-Taz-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-3-Pal-Lys-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-4-Pal-Lys-NH₂

- H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Orn-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-Phe-Lys-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Thr(Bzl)-Lys-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
5 H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
H-Inp-D-Dip-D-Trp-Phe-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bpa-D-Trp-Phe-Lys-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Bpa-Phe-Lys-NH₂
10 H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Thr(Bzl)-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Pff-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Taz-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Dip-Phe-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-3-Pal-Lys-NH₂
15 H-Inp-D-Bal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂
20 H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Phe-Lys-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
25 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-Lys-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂
30 H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-1-Nal-Phe-Apc-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-2-Nal-Phe-Apc-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-1-Nal-Phe-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-1-Nal-Phe-Apc-NH₂
35 H-Apc-D-Bal-D-2-Nal-Phe-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-1-Nal-Phe-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-2-Nal-Phe-Lys-NH₂

- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Thi-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Phe-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Taz-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Thi-NH₂
5 H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Taz-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
10 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
15 H-Inp-D-Bal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
20 H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Bal-Phe-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Bal-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Bal-3-Thi-Lys-NH₂
25 H-Inp-D-Bal-D-Bal-Taz-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Bal-2-Fua-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bal-D-Bal-Pff-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Phe-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Thi-Lys-NH₂
30 H-Apc-D-Bal-D-Bal-3-Thi-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Taz-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Fua-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
35 H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Phe-Lys-NH₂

- H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-3-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Taz-Lys-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-2-Fua-Lys-NH₂
5 H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-Apc-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
10 H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
15 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
20 H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-3-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-Taz-Lys-NH₂
25 H-Inp-D-Bip-D-Trp-2-Fua-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Trp-Pff-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Bal-2-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Bal-3-Thi-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Bal-Taz-Lys-NH₂
30 H-Inp-D-Bip-D-Bal-2-Fua-Lys-NH₂
H-Inp-D-Bip-D-Bal-Pff-Lys-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
35 H-Apc-D-Bal-D-Bal-Phe-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Thi-Apc-NH₂
H-Apc-D-Bal-D-Bal-3-Thi-Apc-NH₂

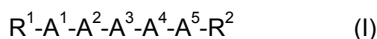
- H-Apc-D-Bal-D-Bal-Taz-Apc-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Fua-Apc-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Bal-Pff-Apc-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
- 5 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
- H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Thi-Apc-NH₂
- H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-Apc-NH₂
- H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂
- 10 H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-Apc-NH₂
- H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Pff-Apc-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Trp-2-Fua-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Trp-Pff-NH₂
- 15 H-Apc-D-Bal-D-Trp-3-Thi-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Fua-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Trp-Pff-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Trp-4-Pal-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Trp-3-Pal-NH₂
- 20 H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Pal-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Bal-Taz-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Bal-2-Fua-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Bal-Pff-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Bal-Phe-NH₂
- 25 H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Thi-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Bal-3-Thi-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Bal-Taz-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Fua-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Bal-Pff-NH₂
- 30 H-Apc-D-Bal-D-Bal-4-Pal-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Bal-3-Pal-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Bal-2-Pal-NH₂
- H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Taz-NH₂
- H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-NH₂
- 35 H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-Pff-NH₂
- H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Taz-NH₂
- H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-2-Fua-NH₂

- H-Inp-D-1-Nal-D-Bal-Pff-NH₂
- H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Taz-NH₂
- H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-NH₂
- H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Pff-NH₂
- 5 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-3-Thi-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Fua-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Pff-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-4-Pal-NH₂
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-3-Pal-NH₂
- 10 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Pal-NH₂
- H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-3-Thi-NH₂
- H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Fua-NH₂
- H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-Pff-NH₂
- H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-4-Pal-NH₂
- 15 H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-3-Pal-NH₂
- H-Apc-D-2-Nal-D-Trp-2-Pal-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Trp-Taz-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Trp-2-Fua-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Trp-Pff-NH₂;
- 20 H-Inp-D-Bip-D-Bal-Taz-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Bal-2-Fua-NH₂
- H-Inp-D-Bip-D-Bal-Pff-NH₂
- H-Inp-D-1-Nal-D-Trp-2-Thi-Apc-NH₂
- H-Inp-D-Bal-D-Trp-2-Thi-Apc-NH₂
- 25 H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-2-Thi-Apc-NH₂
- H-Apc-D-Bal-D-Trp-2-Thi-Apc-NH₂ y
- H-Apc-D-1-Nal-D-Trp-Phe-Lys-NH₂.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la síntesis de un péptido terapéutico mediante el uso de la química de Fmoc en fase sólida por etapas, que comprende las etapas de:
- 5 (a) hacer hinchar la resina de Fmoc-Sieber (también denominada resina de amida de Sieber o resina de amida de Fmoc-Sieber) en un solvente aprótico dipolar;
- (b) desproteger el grupo Fmoc con una solución de piperidina en un solvente aprótico dipolar;
- (c) lavar la resina después de la desprotección del Fmoc con un solvente aprótico dipolar;
- (d) activar los aminoácidos-Fmoc para la conjugación a la resina desprotegida al disolver el aminoácido-Fmoc y el reactivo o reactivos de conjugación en un solvente aprótico dipolar, y, a continuación, añadir una base y agitar;
- 10 (e) cargar la solución de aminoácido-Fmoc activado en la resina en el reactor;
- (f) conjugar el aminoácido-Fmoc activado con el uso de hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HCTU) o de tetrafluoroborato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU)/1-hidroxibenzotriazol (HOBt) con una base en un solvente aprótico dipolar como reactivo de conjugación;
- (g) lavar la resina después de cada conjugación de aminoácido-Fmoc;
- 15 (h) repetir las etapas (b) a (g) hasta que se forme un péptido;
- (i) escindir el péptido deseado de la resina mientras que se desprotegen simultáneamente las cadenas laterales de los aminoácidos con un cóctel de escisión;
- (j) filtrar la mezcla de escisión desde la resina; y
- 20 (k) hacer que se evaporen los filtrados, y precipitar y purificar parcialmente el producto bruto desde la solución concentrada con un solvente orgánico para producir un péptido parcialmente purificado.

en donde dicho péptido es un análogo de la grelina de fórmula (I)



en donde

- A^1 es Aib, Apc o Inp;
- 25 A^2 es D-Bal, D-Bip, D-Bpa, D-Dip, D-1-Nal, D-2-Nal, D-Ser(Bzl), o D-Trp;
- A^3 es D-Bal, D-Bip, D-Bpa, D-Dip, D-1-Nal, D-2-Nal, D-Ser(Bzl), o D-Trp;
- A^4 es 2Fua, Orn, 2Pal, 3Pal, 4Pal, Pff, Phe, Pim, Taz, 2Thi, 3Thi, Thr(Bzl);
- A^5 es Apc, Dab, Dap, Lys, Orn, o delecionado;
- R^1 es hidrógeno; y
- 30 R^2 es OH o NH;
- con tal de que
- cuando A^5 es Dab, Dap, Lys u Orn, entonces:
- A^2 es D-Bip, D-Bpa, D-Dip o D-Bal; o
- A^3 es D-Bip, D-Bpa, D-Dip o D-Bal; o
- 35 A^4 es 2Thi, 3Thi, Taz, 2Fua, 2Pal, 3Pal, 4Pal, Orn, Thr(Bzl), o Pff;
- cuando A^5 está delecionado, entonces:
- A^3 es D-Bip, D-Bpa o D-Dip; o
- A^4 es 2Fua, Pff, Taz, o Thr(Bzl); o
- A^1 es Apc y -
- 40 A^2 es D-Bip, D-Bpa, D-Dip o D-Bal; o

A³ es D-Bip, D-Bpa, D-Dip o D-Bal; o

A⁴ es 2Thi, 3Thi, Orn, 2Pal, 3Pal, o 4Pal.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el solvente aprótico dipolar es dimetilformamida (DMF).
- 5 3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha base es una base de amina terciaria y, preferiblemente, la *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA).
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho cóctel de escisión comprende una solución de TFA, uno o varios depuradores y diclorometano (DCM), en donde dicho depurador se selecciona del grupo que consiste en triisopropilsilano (TIPS), trietilsilano (TES), fenol, anisol, tioanisol, agua, etanoditiol (EDT), 1-dodecanotiol, ditiotreitól (DTT) e indol, con tal de que el porcentaje de TFA en dicho cóctel de escisión no exceda el 25%.
- 10 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho depurador se selecciona del grupo que consiste en TIPS, TES, anisol y agua.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en donde, cuando los grupos protectores de cadena lateral Boc y tBu se han de retirar, dicho cóctel de escisión comprende del 15 al 25% v/v de TFA con del 2,5 al 12% v/v de TIPS y lo demás del cóctel de escisión está compuesto al 100% de DCM.
7. Un procedimiento para la síntesis de péptido terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el grupo Fmoc se retira inicialmente de la resina con piperidina en DMF, en donde la concentración de dicha piperidina en DMF es de menos del 20% (v/v).
- 20 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde, en la etapa f, los restos aminoácidos se conjugan mediante una combinación de reactivos de conjugación, en donde los componentes de dicha combinación de reactivos de conjugación se seleccionan del grupo que consiste en HCTU/DIEA y TBTU/HOBt/DIEA.
9. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende las etapas sucesivas de:
- 25 (a) hacer hinchar la resina de Fmoc-Sieber (también denominada resina de amida de Sieber o resina de amida de Fmoc-Sieber) en dimetilformamida (DMF);
- (b) desproteger el grupo Fmoc con una solución de piperidina en DMF;
- (c) lavar la resina después de la desprotección del Fmoc con DMF;
- 30 (d) activar los aminoácidos-Fmoc para la conjugación a la resina desprotegida mediante la disolución del aminoácido-Fmoc y el reactivo o reactivos de conjugación en DMF, y luego añadir la *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) y agitar;
- (e) cargar la solución del aminoácido-Fmoc activado en la resina en el reactor;
- 35 (f) conjugar los aminoácidos-Fmoc activados con hexafluorofosfato de 2-(6-cloro-1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (HCTU) o tetrafluoroborato de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU)/1-hidroxibenzotriazol (HOBt) con la *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) en DMF como reactivo de conjugación;
- (g) lavar la resina después de cada conjugación de aminoácido-Fmoc;
- (h) repetir las etapas (b) a (g) hasta que se forme un péptido;
- (i) escindir el péptido deseado de la resina mientras que se desprotegen simultáneamente las cadenas laterales de los aminoácidos con un cóctel de escisión;
- 40 (j) filtrar la mezcla de escisión desde la resina; y
- (k) hacer que se evaporen los filtrados, y precipitar y purificar parcialmente el producto bruto desde la solución concentrada con un solvente orgánico para producir un péptido parcialmente purificado.
10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho péptido es un análogo de la grelina de fórmula (I), en donde
- 45 A¹ es Aib, Apc o Inp;
- A² es D-Bal, D-Bip, D-Bpa, D-Dip, D-1-Nal, D-2-Nal, D-Ser(Bzl), o D-Trp;

A³ es D-Bal, D-Bpa, D-Dip, D-1-Nal, D-2-Nal, o D-Trp;

A⁴ es Orn, 3Pal, 4Pal, Pff, Phe, Pim, Taz, 2Thi, o Thr(Bzl); y

A⁵ es Apc, Lys, o delecionado.

5 **11.** El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho péptido es un análogo de la grelina de fórmula (I), en donde

A¹ es Apc o Inp;

A² es D-Bal, D-Bip, D-1-Nal, o D-2-Nal;

A³ es D-Bal, D-1-Nal, D-2-Nal, o D-Trp;

A⁴ es 3Pal, 4Pal, Pff, Phe, Pim, Taz, 2Thi, o Thr(Bzl); y

10 A⁵ es Apc o Lys.

12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho péptido es un análogo de la grelina seleccionado de H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂, H-Inp-D-2Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂, H-Inp-D-Bal-D-Trp-2Thi-Apc-NH₂ y H-Inp-D-Bal-D-Trp-Taz-Apc-NH₂.

15 **13.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho análogo de la grelina es H-Inp-D-Bal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂.

14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho análogo de la grelina es H-Inp-D-2-Nal-D-Trp-Phe-Apc-NH₂.

Figura 1

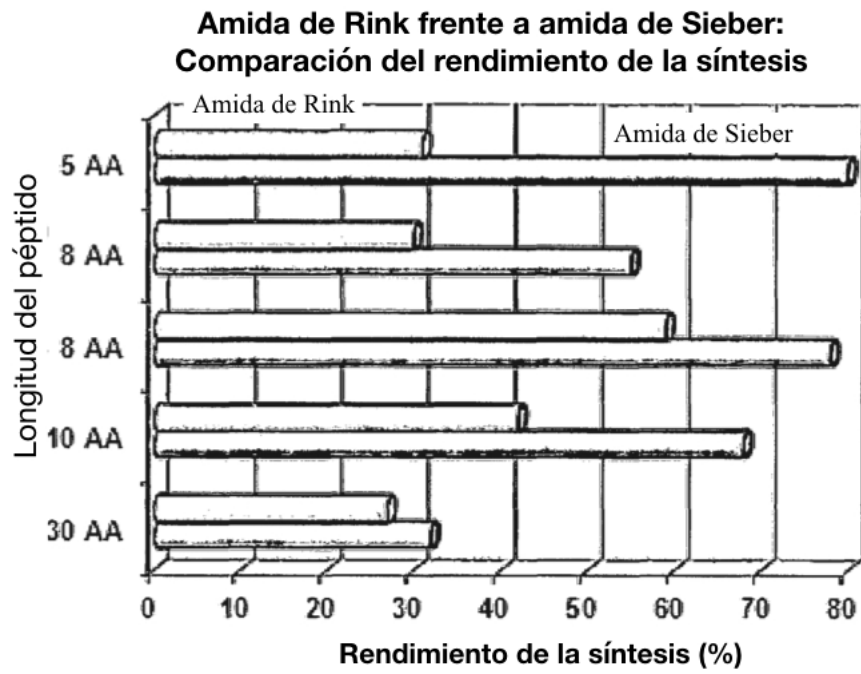


Figura 2

Amida de Sieber: Reproducibilidad del rendimiento de la síntesis

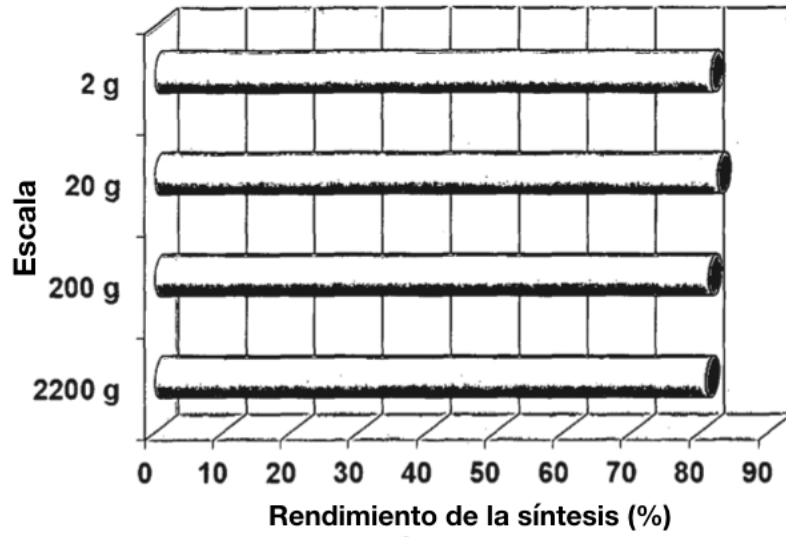


Figura 3

Coste relativo (basado en los materiales): Amida de Rink frente a amida de Sieber

