

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 103**

51 Int. Cl.:

C07K 1/04 (2006.01)

C07K 14/655 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2007 PCT/IE2007/000080**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.05.2008 WO08062391**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2007 E 07805470 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2084176**

54 Título: **Síntesis de péptidos en fase sólida con BOC y Fmoc**

30 Prioridad:

21.11.2006 IE 20060841

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

18.09.2018

73 Titular/es:

**IPSEN MANUFACTURING IRELAND LIMITED
(100.0%)
Blanchardstown Industrial Park Blanchardstown
Dublin 15, IE**

72 Inventor/es:

**DALTON, CATHERINE FIONA;
EYNON, JOHN STUART;
JACKSON, STEVEN ALLEN y
SIWRUK, GARY ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 682 103 T3

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

DESCRIPCIÓN

Síntesis de péptidos en fase sólida con BOC y FMOC

Campo técnico

5 Esta invención se refiere a un método para preparar un péptido que comprende tres o más residuos de aminoácido que tienen un aminoácido N-terminal, un aminoácido siguiente al último aminoácido adyacente al aminoácido N-terminal y un aminoácido C-terminal.

Técnica anterior

10 La síntesis de péptidos en fase sólida se introdujo en 1963 con la intención de superar muchos de los problemas de purificación intermedia asociados con la síntesis de péptidos en solución. Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co., 2ª ed., 1984). Durante la síntesis en fase sólida, los aminoácidos se ensamblan (es decir, se acoplan) para formar un péptido de cualquier secuencia deseada, mientras que un extremo de la cadena (es decir, el extremo C) se ancla a un soporte insoluble. Una vez que la secuencia deseada se ha unido al soporte, el péptido se desbloquea (es decir, se escinde) del soporte. Los dos grupos protectores convencionales para las funciones α -amino de los aminoácidos acoplados son Boc, que se elimina mediante tratamiento con un ácido fuerte, 15 y Fmoc, que se elimina con un álcali. La presente invención se refiere a un método conveniente para fabricar péptidos utilizando una combinación de estos dos grupos protectores de α -amino en una única síntesis sobre una resina de poliestireno clorometilado económica.

20 Al diseñar una síntesis de un péptido mediante el método en fase sólida utilizando cualquiera de los esquemas de protección de α -amino anteriormente mencionados, es importante que cualquier "grupo lateral" reactivo de los aminoácidos constitutivos se proteja de reacciones químicas indeseadas a lo largo de todo el ensamblaje de la cadena. También es deseable que los grupos químicos elegidos para proteger los diversos grupos laterales sean resistentes a la eliminación por los reactivos utilizados para eliminar los grupos protectores de α -amino. En tercer lugar, es importante que el enlace de la cadena peptídica en crecimiento con la partícula de resina sea estable a los reactivos utilizados para eliminar cualquier tipo de grupo protector de α -amino durante el ensamblaje de la cadena. 25 En el caso del esquema de protección de α -amino con Fmoc, las funciones de protección del grupo lateral deben ser resistentes a los reactivos alcalinos utilizados para eliminar Fmoc. En la práctica, estos grupos protectores de la cadena lateral generalmente se eliminan mediante reactivos levemente ácidos una vez que se haya ensamblado la cadena peptídica. Cuando se utiliza el esquema de protección de α -amino con Boc, los grupos protectores de la cadena lateral deben ser resistentes a la eliminación mediante el reactivo ácido suave utilizado para desproteger el grupo Boc en cada ciclo. En la práctica, estos grupos protectores de la cadena lateral para el esquema de protección de α -amino con Boc se eliminan generalmente por medio de HF anhidro después de que se haya ensamblado la cadena peptídica. Por lo tanto, en la práctica, los grupos protectores de cadena lateral comúnmente utilizados con la protección de α -amino con Fmoc no son estables en las condiciones utilizadas para la desprotección de Boc de α -amino y los dos tipos de esquemas de protección de α -amino no se mezclan en el ensamblaje de una cadena peptídica mediante síntesis de péptidos en fase sólida. Además, aunque la resina polimérica menos costosa utilizada en la síntesis de péptidos, el poliestireno clorometilado o "resina Merrifield", se utiliza ampliamente con aminoácidos protegidos con Boc, la bibliografía sugiere que no es adecuada para su uso con protección Fmoc en el grupo α -amino debido a su labilidad en condiciones alcalinas (véase Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co., 2ª ed., 1984). La presente invención se dirige a un método para el uso mixto de aminoácidos Boc y Fmoc en la "resina Merrifield" durante la síntesis en fase sólida de ciertos péptidos. 30 35 40

Lanreotide® es un análogo de somatostatina y se sabe que inhibe la liberación de la hormona del crecimiento e inhibe la insulina, el glucagón y secreción exocrina pancreática.

45 La Patente de Estados Unidos Núm. 4.853.371 describe y reivindica Lanreotide®, un método para prepararlo y un método para inhibir la secreción de hormona del crecimiento, la insulina, el glucagón y la secreción exocrina pancreática.

La Patente de Estados Unidos Núm. 5.147.856 describe el uso de Lanreotide® para tratar la reestenosis.

La Patente de Estados Unidos Núm. 5.411.943 describe el uso de Lanreotide® para tratar el hepatoma.

La Patente de Estados Unidos Núm. 5.073.541 describe el uso de Lanreotide® para tratar el cáncer de pulmón.

50 La Solicitud de Estados Unidos Núm. 08/089.410 presentada el 9 de julio de 1993 describe el uso de Lanreotide® para tratar el melanoma.

La Patente de Estados Unidos Núm. 5.504.069 describe el uso de Lanreotide® para inhibir el crecimiento acelerado de un tumor sólido.

La Solicitud de Estados Unidos Núm. 08/854.941 presentada el 13 de mayo de 1997, describe el uso de Lanreotide® para disminuir el peso corporal.

La Solicitud de Estados Unidos Núm. 08/854.943 presentada el 13 de mayo de 1997, describe el uso de Lanreotide® para tratar la resistencia a la insulina y el Síndrome X.

La Patente de Estados Unidos Núm. 5.688.418 describe el uso de Lanreotide® para prolongar la supervivencia de las células pancreáticas.

5 La Solicitud PCT Núm. PCT/US97/14154 describe el uso de Lanreotide® para tratar la fibrosis.

La Solicitud de Estados Unidos Núm. 08/855.311 presentada el 13 de mayo de 1997, describe el uso de Lanreotide® para tratar la hiperlipidemia.

La Solicitud de Estados Unidos Núm. 08/440.061 presentada el 12 de mayo de 1995, describe el uso de Lanreotide® para tratar la hiperamilinemia.

10 La Solicitud de Estados Unidos Núm. 08/852.221 presentada el 7 de mayo de 1997, describe el uso de Lanreotide® para tratar la hiperprolactinemia y los prolactinomas.

La Patente de Estados Unidos Núm. 4.737.487 describe fragmentos de péptidos intestinales vasoactivos y análogos, así como procedimientos para su preparación. Sin embargo, no hay ninguna descripción ni sugerencia de la preparación del péptido H-D-β-Nal-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂ (Lanreotide®).

15 Descripción de la invención

Esta invención presenta un método para preparar un péptido de fórmula H-D-β-Nal-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂, en donde dicho método comprende las etapas de:

20 (a) anclar un primer aminoácido a una resina de soporte sólido a través de un enlace éster para formar un primer producto acoplado, que comprende (i) hacer reaccionar una solución acuosa de carbonato de cesio con una solución alcohólica del primer aminoácido para formar un sal de cesio del primer aminoácido, (ii) obtener una sal de cesio libre de disolvente del primer aminoácido, (iii) hacer reaccionar la resina de soporte sólido con la sal de cesio del primer aminoácido en un disolvente aprótico polar seco para formar un primer producto acoplado H-L-Thr-resina;

25 en donde el primer aminoácido Boc-L-Thr corresponde al aminoácido C-terminal del péptido, y la resina de soporte sólido es una resina de poliestireno clorometilada;

(b) desbloquear el Boc del primer producto acoplado con un ácido para formar un primer producto acoplado desbloqueado;

30 (c) acoplar un siguiente aminoácido que tiene un grupo amino que no forma parte de la cadena lateral bloqueado por Fmoc al primer producto acoplado desbloqueado del apartado (b), que comprende hacer reaccionar el siguiente aminoácido que tiene un grupo amino que no forma parte de la cadena lateral bloqueado por Fmoc con dicho primer producto acoplado desbloqueado en un disolvente orgánico que es cloruro de metileno, cloroformo, dimetilformamida o una combinación de los mismos, que comprende un reactivo de acoplamiento peptídico que es diisopropilcarbodiimida, dicitclohexilcarbodiimida o N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, para formar un siguiente producto acoplado bloqueado que tiene un grupo amino que no forma parte de la cadena lateral bloqueado por Fmoc, en donde el siguiente aminoácido que tiene un grupo amino que no forma parte de la cadena lateral bloqueado por Fmoc, con la condición de que si el siguiente aminoácido que tiene un grupo amino que no forma parte de la cadena lateral bloqueado por Fmoc tiene una o más funcionalidades de la cadena lateral, las funcionalidades de la cadena lateral no requieren protección o las funcionalidades de la cadena lateral tienen grupos protectores estables a reactivos alcalinos utilizados para desbloquear Fmoc;

35 40

(d) desbloquear el Fmoc del siguiente producto acoplado bloqueado que tiene un grupo amino que no forma parte de la cadena lateral bloqueado por Fmoc que comprende hacer reaccionar el siguiente producto acoplado bloqueado que tiene un grupo amino que no forma parte de la cadena lateral bloqueado por Fmoc con una amina primaria o secundaria para producir un siguiente producto acoplado desbloqueado;

45 (e) acoplar Boc-D-β-Nal a H-Cys(Acm)-Tyr(O-t-Bu)-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Cys(Acm)-Thr-resina, que comprende hacer reaccionar Boc -D-β-Nal con H-Cys(Acm)-Tyr(O-t-Bu)-D-Trp-Lys(Boc) -Val-Cys (Acm) -Thr-resina en un disolvente orgánico que comprende un reactivo de acoplamiento peptídico para formar una Boc-D-β-Nal-Cys(Acm)-Tyr(O-t-Bu)-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Cys(Acm)-Thr-resina acoplada bloqueada completada producto;

50 (f) desbloquear simultáneamente el Boc que bloquea D-β-Nal, el grupo O-t-Bu que protege Tyr y el grupo Boc que protege Lys de la Boc-D-β-Nal-Cys(Acm)-Tyr(O-t-Bu)-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Cys(Acm)-Thr-resina en TFA, para formar un producto de resina peptídica completada de fórmula H-D-β-Nal-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys(Acm)-Thr-resina; y

(g) escindir el péptido H-D-β-Nal-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys(Acm) -Thr de la resina sólida por reacción

de H-D-β-Nal-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys(Acm)-Thr-resina con amoniaco, en un disolvente que comprende metanol y dimetilformamida hasta que la escisión se completa sustancialmente para producir H-D-β-Nal-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys(Acm)-Thr-NH₂,

5 en donde la etapa (g) comprende adicionalmente las etapas de (i) precipitar el péptido escindido del disolvente; (ii) filtrar la resina de soporte sólido y el péptido precipitado; y (iii) extraer el péptido en una solución ácida para aislar el péptido, siempre que las etapas (c) y (d) se lleven a cabo seis veces después de la formación del primer producto acoplado desbloqueado de la fórmula H-L-Thr-resina en donde los siguientes aminoácidos están acoplados en el orden Fmoc-L-Cys(Acm), Fmoc-L-Val, Fmoc-L-Lys(Boc), Fmoc-D-Trp, Fmoc-L-Tyr(O-t-Bu) y Fmoc-L-Cys(Acm) para formar H-Cys(Acm)-Tyr(O-t-Bu)-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Cys(Acm)-Thr-resina.

Un método preferido de esta invención es aquel en el que el primer aminoácido es sal de Boc-L-Thr-cesio que produce Boc-L-Thr-resina como primer producto acoplado y H-L-Thr-resina es el primer producto acoplado desbloqueado.

15 Un método preferido del método inmediatamente anterior es aquel en el que el disolvente orgánico es cloruro de metileno, cloroformo o dimetilformamida y el reactivo de acoplamiento peptídico es diisopropilcarbodiimida, dicitclohexilcarbodiimida o N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.

Un método preferido del método inmediatamente anterior comprende desproteger simultáneamente los grupos Acm que protegen Cys y ciclar los residuos de Cys desprotegidos resultantes del producto de péptido completado de fórmula H-D-β-Nal-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys(Acm)-Thr-NH₂ haciendo reaccionar H-D-β-Nal-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys(Acm)-Thr-NH₂ con una solución de yodo en un alcohol hasta que la desprotección y la ciclación estén sustancialmente completas para producir H-D-β-Nal-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂.

Las definiciones de los términos utilizados en la descripción de la presente invención son las siguientes:

25 "primer aminoácido": abarca cualquier aminoácido que tenga su grupo amino que no forma parte de la cadena lateral protegido por Boc, que esté disponible comercialmente o se pueda sintetizar de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica, p.ej., Boc-L-Thr;

"primer producto acoplado": describe el producto, que está anclado a la resina de soporte sólido, que resulta del acoplamiento de un primer aminoácido a la resina de soporte sólido, p.ej. Boc-L-Thr-resina;

30 "primer producto acoplado desbloqueado": describe el producto resultante de la eliminación o desbloqueo del grupo Boc del primer producto acoplado, p.ej., H-L-Thr-resina, donde la "H" representa el hidrógeno disponible del grupo amino que no forma parte de la cadena lateral que resulta de la etapa de desbloqueo;

35 "siguiente aminoácido": describe cualquier aminoácido que tiene su grupo amino que no forma parte de la cadena lateral protegido por Boc o Fmoc, que está disponible comercialmente o se puede sintetizar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Dado que la etapa (c) puede estar en un ciclo repetitivo en donde la etapa se lleva a cabo más de una vez, cada vez que se lleva a cabo la etapa (c) se puede seleccionar independientemente un siguiente aminoácido del grupo de aminoácidos conocidos y sintetizables que tienen su grupo amino que no forma parte de la cadena lateral protegido por Boc o Fmoc, respectivamente;

40 "resina peptídica completada producto": describe el producto peptídico, que está anclado a la resina de soporte sólido, después de que el aminoácido N-terminal se haya anclado a la cadena peptídica y después de que el grupo amino de la cadena que no forma parte de la cadena lateral del aminoácido N-terminal se haya eliminado o desbloqueado pero que todavía tiene cualquiera de los grupos protectores de la funcionalidad de la cadena lateral que no se eliminaron mediante la reacción para desbloquear el grupo de bloqueo que no formar parte de la cadena lateral aminoácido del N-terminal; y

45 "resina peptídica completada desprotegida producto": describe el producto peptídico, que está anclado a la resina de soporte sólido, en donde se ha eliminado o desprotegido cualquier grupo protector de las funcionalidades de la cadena lateral de los aminoácidos.

Los ejemplos de los ácidos que se pueden utilizar para desbloquear Boc son ácido trifluoroacético (TFA), ácido metanosulfónico y soluciones orgánicas que contienen HCl.

50 Los ejemplos de aminas primarias y secundarias que se pueden utilizar para desbloquear Fmoc son 4-(aminometil)piperidina, piperidina, dietilamina, DBU y tris(2-aminoetil)amina.

Los ejemplos de bases no nucleofílicas que se pueden utilizar para neutralizar las sales de TFA del grupo amino liberado (RNH)₃⁺CF₃COO⁻, estas sales se deben convertir en la amina "libre" (NH₂) antes o durante el acoplamiento del siguiente aminoácido o el acoplamiento no funcionará) son diisopropiletilamina (DIEA) y trietilamina (TEA).

Los ejemplos de disolventes orgánicos que se pueden utilizar para las reacciones de acoplamiento de aminoácidos

son cloruro de metileno, cloroformo, dicloroetano, dimetilformamida, dimetilacetamida, tetrahidrofurano, acetato de etilo, 1-metil-2-pirrolidinona, acetonitrilo o una combinación de los disolventes anteriores.

Los ejemplos de agentes de acoplamiento peptídico incluyen carbodiimidas sustituidas tales como diisopropilcarbodiimida, dicitlohexilcarbodiimida y N-etil-N'-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida.

5 Los grupos carboxilo y amino que participan en la formación del enlace amida peptídico se denominan grupo carboxilo o grupo amino "que no forman parte de la cadena lateral", respectivamente. Por otro lado, cualquier grupo funcional de un aminoácido que no esté implicado en la formación de un enlace amida peptídico se denomina funcionalidad de "cadena lateral".

10 El término "grupo estable a los álcalis" se refiere a grupos protectores utilizados para proteger funcionalidades de los aminoácidos que (1) son estables a los álcalis, p.ej., no pueden ser eliminados por los álcalis, tales como 4-aminoetil-piperidina, piperidina o tris-(2-aminoetil)amina, que son álcalis que se utilizan típicamente para eliminar el grupo protector Fmoc, y (2) pueden ser eliminados por un ácido, tal como ácido trifluoroacético, o por otros medios, tales como hidrogenación catalítica.

15 Los símbolos "Fmoc" y "Boc" utilizados en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas significan 9-fluorenilmetoxycarbonilo y t-butiloxycarbonilo, respectivamente.

20 El método descrito anteriormente se puede utilizar para preparar el análogo de somatostatina lanreótido, que tiene la siguiente fórmula H-D-β-Nal-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂. Cuando se va a sintetizar H-D-β-Nal-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂, los grupos protectores estables a los álcalis utilizados para bloquear las funcionalidades de la cadena lateral de Cys Lys, y Tyr pueden ser acetamidometilo (Acm), Boc y t-butilo, respectivamente. Se prefiere Acm para Cys.

Lo que se entiende por un análogo de "somatostatina" es un péptido que muestra una actividad biológica similar (es decir, agonística) u opuesta (es decir, antagonista) a la de la somatostatina.

25 En la fórmula H-D-β-Nal-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂, cada uno de los símbolos de aminoácidos convencionales de tres letras (p.ej., Lys) representa un residuo estructural de un aminoácido. Por ejemplo, el símbolo Lys en la fórmula anterior representa -NH-CH((CH₂)₄NH₂)-CO-. El símbolo D-β-Nal representa el residuo de aminoácido D-2-naftilalaninilo. Los paréntesis representan un enlace disulfuro que se ancla a los tioles libres de los dos residuos de Cys del péptido, lo que indica que los aminoácidos del péptido dentro de los paréntesis son cíclicos.

Un experto en la técnica puede, basándose en la descripción de la presente memoria, utilizar la presente invención en su máxima extensión.

30 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención.

El péptido lanreótido se puede preparar de acuerdo con el método de la presente invención de acuerdo con el siguiente procedimiento.

35 Se añade lentamente una solución de 0,5 equivalentes molares de carbonato de cesio en agua a una solución de 1 equivalente molar de un Boc-AA¹ (Bachem California, Torrance, CA), en donde AA¹ corresponde al aminoácido C-terminal, disuelto en un alcohol, preferiblemente metanol. La mezcla resultante se agita durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente, y a continuación se eliminan a presión reducida todo el alcohol y el agua produciendo un polvo seco de la sal de cesio de Boc-AA¹. La resina Merrifield, 1,0 equivalentes, (poliestireno clorometilado, malla 200-400, incorporación de cloruro de 1,3 meq/gramo, Advanced ChemTech, Louisville, Kentucky o Polymer Laboratories, Church Stretton, Inglaterra) se enjuaga con un solvente clorado, preferiblemente diclorometano (DCM), un alcohol, preferiblemente metanol, y un disolvente aprótico polar, preferiblemente dimetilformamida (DMF). El polvo de sal de cesio de Boc-AA¹ se disuelve en un disolvente aprótico polar seco, preferiblemente DMF, y la solución se combina con la resina lavada anteriormente. La suspensión se mezcla suavemente a aproximadamente 45°-65°C, preferiblemente 50°-60°C, durante aproximadamente 48 a 106 horas, preferiblemente de 85 a 90 horas 45 bajo una atmósfera inerte tal como nitrógeno. La resina se filtra y se enjuaga bien con un disolvente aprótico polar, preferiblemente DMF, agua, y finalmente un alcohol, tal como MeOH. La Boc-AA¹-resina se seca a presión reducida.

50 La Boc-AA¹-resina se añade a un reactor de vidrio con un fondo de filtro de vidrio grueso sinterizado. La resina se enjuaga con un disolvente clorado, tal como DCM, se desbloquea con un ácido orgánico, preferiblemente TFA/DCM al 25%, se enjuaga brevemente con un disolvente clorado, tal como DCM, y un alcohol, tal como MeOH, se neutraliza con una base orgánica, preferiblemente trietilamina en DCM, y se enjuaga de nuevo con DCM y un disolvente aprótico polar, tal como DMF, para producir la AA¹-resina desbloqueada.

55 La AA¹-resin desbloqueada se acopla después opcionalmente a cualquier cantidad deseada de aminoácidos. Si un aminoácido posterior está protegido con Fmoc en el grupo α-amino (Fmoc-AA^x), el grupo de cadena lateral no debe requerir protección (tal como Fmoc-Gly, Fmoc-Ala, Fmoc-Phe o Fmoc-Treonina) o la cadena lateral debe estar

protegida con un grupo que sea resistente al álcali de eliminación. Un exceso molar de Fmoc-AA^x (donde x es el número de secuencia del aminoácido en el péptido, contado desde el C-terminal) se acopla a la AA¹-resina desbloqueada utilizando un reactivo de acoplamiento peptídico tal como diisopropilcarbodiimida (DIC) en una mezcla de DCM/DMF durante aproximadamente 60 minutos. La resina acoplada se enjuaga con DMF, alcohol y DCM para producir Fmoc-AA^x-AA¹-resina. El acoplamiento se puede verificar mediante el método de ninhidrina de Kaiser. La Fmoc-AA^x-AA¹-resina se enjuaga a continuación una vez con DMF y después se desbloquea con una solución de un álcali en un solvente orgánico tal como piperidina en DMF para producir AA^x-AA¹-resina. La AA^x-AA¹-resina se enjuaga a continuación con DMF y después varias veces con un alcohol, tal como MeOH, y DCM. La AA^x-AA¹-resina se enjuaga una vez durante aproximadamente 3 minutos con DMF, tres veces, preferiblemente durante aproximadamente 2 minutos cada una con isopropanol (IPA), y tres veces, preferiblemente durante aproximadamente 2 minutos cada una con DCM. La resina está lista para un acoplamiento adicional a un aminoácido protegido con Fmoc como se describió anteriormente, o un aminoácido protegido con Boc como se describe a continuación.

Del mismo modo, si cualquier aminoácido posterior que se vaya a acoplar a la AA¹-resina desprotegida se elige con protección Boc en el grupo α-amino (Boc-AA^x), el grupo de cadena lateral tampoco debe requerir protección (tal como Boc-Gly, Boc-Ala, Boc-Phe o Boc-Treonina) o la cadena lateral debe estar protegida con un grupo que sea resistente a la eliminación tanto por ácido como por álcali tal como Boc-Cys(S-Acm). Si se selecciona un Boc-AA^x, se acopla a los mismos reactivos y disolventes que los aminoácidos Fmoc descritos anteriormente en la presente memoria y se puede verificar la finalización del acoplamiento mediante el método de la ninhidrina de Kaiser. La Boc-AA^x-AA¹-resina se desbloquea a continuación con una solución de un ácido en un disolvente orgánico tal como TFA en DCM para producir CF₃CO⁻ H⁺AA^x-AA¹-resina. Esta resina se enjuaga a continuación con disolventes clorados, tales como DCM, y alcohol, tal como MeOH, varias veces y se neutraliza con un álcali no nucleofílico, tal como trietilamina, en DCM y después se enjuaga varias veces más con un disolvente clorado, tal como DCM, para producir AA^x-AA¹-resina. La resina está lista después para un acoplamiento adicional a un aminoácido protegido con Boc o Fmoc como se describió anteriormente.

Dependiendo de la secuencia peptídica deseada y del tipo de aminoácido bloqueado en α-amino utilizado, tanto si está protegido con Fmoc como si está protegido con Boc, la combinación apropiada de los procedimientos de acoplamiento anteriores se ejecuta hasta que se requiere un aminoácido en la secuencia con una cadena lateral que tiene grupo protector que puede ser eliminado mediante el álcali utilizado para desbloquear el Fmoc en el grupo α-amino o mediante el ácido utilizado para desbloquear el Boc en el grupo α-amino. Tal aminoácido protegido puede ser N-α-Boc-N'-ε-Fmoc-Lisina o N-α-Fmoc-N'-ε-Boc-Lisina. Una vez que esto ocurre, todos los grupos de bloqueo de α-amino subsiguientes elegidos deben ser compatibles con la protección del grupo lateral elegido para esa posición hasta el aminoácido N-terminal. Es decir, los grupos protectores de la cadena lateral deben ser estables frente al agente de desbloqueo utilizado para desbloquear el grupo de bloqueo de α-amino subsiguiente. Para el aminoácido N-terminal, se puede utilizar un Boc o un Fmoc como grupo de bloqueo de α-amino ya que el desbloqueo del aminoácido N-terminal puede simultáneamente desproteger ciertas cadenas laterales protegidas sin un efecto adverso en la estrategia de síntesis del péptido porque no se añadirán más aminoácidos.

La cadena peptídica completada, que todavía está anclada a la resina, se debe desproteger y desbloquear. Para eliminar cualquier grupo protector estable a los álcalis y el grupo de bloqueo de α-amino del aminoácido N-terminal, si corresponde, el péptido-resina se trata con un ácido en un disolvente orgánico, tal como TFA en DCM. Para eliminar cualquier grupo protector estable a los ácidos y el grupo de bloqueo de α-amino del aminoácido N-terminal, si corresponde, el péptido-resina se trata con un álcali orgánico, tal como piperidina en DMF. O se pueden dejar los grupos estables a los ácidos para su eliminación en la posterior escisión del péptido por medio de amoníaco o una base amínica. El péptido-resina desprotegido se enjuaga después con un disolvente clorado, tal como DCM, y un alcohol, tal como MeOH, y se seca hasta alcanzar un peso constante a presión reducida.

El péptido se escinde de la resina y el C-terminal se convierte en una amida suspendiendo el péptido-resina en MeOH/DMF 3:1. La suspensión se enfría a aproximadamente <10°C en nitrógeno y se añade gas amoníaco anhidro por debajo de la superficie del disolvente hasta que la solución se satura, mientras la temperatura se mantiene por debajo de aproximadamente 10°C. La suspensión se mezcla suavemente durante aproximadamente 24 horas mientras se permite que la temperatura aumente a aproximadamente 20°C. Se verifica la terminación de la reacción controlando la desaparición del intermedio de éster metílico por medio de HPLC en condiciones apropiadas dependiendo del péptido. La reacción se enfría y se añade más amoníaco anhidro, según sea necesario, hasta que el área del éster metílico es menor que el 10% del área del pico de producto deseado en la HPLC. La suspensión se enfría a aproximadamente menos de 10°C, y el mezclado continúa durante la noche para permitir que el péptido precipite. El producto precipitado y la resina se filtran y enjuagan con MeOH frío. El producto precipitado y la resina se secan a presión reducida, y el producto se extrae de la resina con ácido acético acuoso.

Si un péptido contiene residuos de Cys protegidos dentro de su secuencia, los grupos tiol de la Cys se pueden desproteger y ciclar de acuerdo con el siguiente procedimiento. El péptido que tiene grupos Cys protegidos con Acm se disuelve en ácido acético acuoso en atmósfera de nitrógeno. La solución se agita rápidamente y se añade una solución de yodo en alcohol en una porción. La mezcla se agita y se somete a ensayo mediante HPLC para completar la desprotección y a continuación se inactiva mediante titulación con una solución de tiosulfato de sodio al 2% hasta un punto final incoloro. La mezcla bruta se purifica mediante cromatografía preparativa en relleno C8 con

un tampón de gradiente de acetato de amonio/acetronitrilo 0,1, se somete a eliminación de la sal en relleno C8 con un gradiente de ácido acético/acetronitrilo 0,25 N, y se liofiliza para proporcionar el péptido deseado.

Modo de llevar a cabo la invención

5 El siguiente ejemplo se proporciona para ilustrar un método de la presente invención y no debe interpretarse como limitante del alcance de la misma.

Ejemplo 1

H₂-D-β-Nal-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂

A) Boc-L-Thr-Resina

10 Se añadió lentamente una solución de 2,58 gramos de carbonato de cesio en 2,5 ml de agua a una solución de 3,48 gramos de Boc-L-Treonina (Bachem California, Torrance, CA) disuelta en 7 ml de metanol. La mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente, y después se eliminaron todo el metanol y el agua a presión reducida produciendo un polvo seco de sal de cesio de Boc-L-Treonina. Se enjuagaron 10 gramos de resina Merrifield (poliestireno clorometilado, malla 200-400, incorporación de cloruro de 1,3 meq/gramo, Advanced ChemTech, Louisville, Kentucky) con diclorometano (DCM), metanol (MeOH) y dimetilformamida (DMF) (2 x 70 ml cada uno). El polvo de sal de cesio de Boc-L-Treonina se disolvió en 60 ml de DMF seca, y la solución se combinó con la resina lavada anteriormente. La suspensión se mezcló suavemente a aproximadamente 50°-60°C durante aproximadamente 85 a 90 horas bajo atmósfera de nitrógeno. La resina se filtró y se enjuagó bien con DMF, agua desionizada y finalmente MeOH. La resina de Boc-Treonina se secó a presión reducida a aproximadamente 40°C (incorporación de Treonina = 0,85 ± 0,15 meq/gramo de resina seca).

20 B) H-D-β-Nal-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys(Acm)-Thr-Resina

Se añadieron 2,0 gramos de resina de Boc-Treonina de la etapa A a un reactor de vidrio de 50 ml con un fondo de filtro de vidrio sinterizado grueso (escala de lote = 1,74 mmoles). La resina se enjuagó dos veces durante aproximadamente 5 minutos cada una con DCM (20 ml), se desbloqueó con TFA/DCM al 25% (30 ml) una vez durante aproximadamente 2 minutos y una durante aproximadamente 25 minutos, se enjuagó tres veces durante aproximadamente 2 minutos con DCM (20 ml), isopropanol (IPA) (20 ml) y DCM (20 ml), se neutralizó dos veces durante aproximadamente 5 minutos con trietilamina/DCM al 10% (20 ml), se enjuagó tres veces durante aproximadamente 2 minutos con DCM, y se enjuagó una vez durante aproximadamente 5 minutos con DMF (20 ml).

30 La resina desbloqueada se acopló a 1,8 gramos (4,35 mmoles, 2,5 eq.) de Fmoc-L-Cisteína(Acm) (Bachem, CA) y 683 μl (4,35 mmoles, 2,5 eq) de diisopropilcarbodiimida (DIC) en 14 ml de DCM/DMF 2:1 durante aproximadamente 1 hora. La resina acoplada se enjuagó una vez durante aproximadamente 3 minutos con DMF (20 ml), tres veces durante aproximadamente 2 minutos con isopropanol (IPA) y tres veces durante aproximadamente 2 minutos con DCM (20 ml). El acoplamiento fue verificado por el método de la ninhidrina de Kaiser.

35 La resina acoplada se enjuagó después una vez con DMF y a continuación se desbloqueó con una solución de piperidina en DMF. La resina acoplada desbloqueada se enjuagó a continuación con DMF y varias veces con MeOH y DCM. La resina acoplada se enjuagó una vez durante aproximadamente 3 minutos con DMF (20 ml), tres veces durante aproximadamente 2 minutos con isopropanol (IPA) (20 ml) y tres veces durante aproximadamente 2 minutos cada vez con DCM (20 ml). El acoplamiento fue verificado por el método de la ninhidrina de Kaiser.

40 Cada uno de los siguientes aminoácidos protegidos se acopló a la resina enjuagada utilizando DIC en DMF/DCM y se desbloqueó en el siguiente orden como se describió anteriormente: Fmoc-L-Valina, Fmoc-L-Lisina(Boc), Fmoc-D-Triptófano, Fmoc-L-Tirosina(O-t-Bu) y Fmoc-L-Cisteína(Acm) (todos de Bachem California), Boc-D-2-Naftilalanina (Synthetech, Albany, OR).

45 La cadena peptídica completa se desbloqueó y se desprotegió dos veces con DCM/TFA/anisol 75:20:5 (30 ml) durante aproximadamente 2 minutos y aproximadamente 25 minutos, se enjuagó tres veces durante aproximadamente 2 minutos cada vez con DCM (20 ml), IPA (10 ml) y DCM (20 ml), se neutralizó dos veces durante aproximadamente 5 minutos con trietilamina/DCM al 10% (20 ml) y se enjuagó tres veces durante aproximadamente 2 minutos con DCM (20 ml) y MeOH (20 ml). La resina se secó a presión reducida. Peso seco = 3,91 gramos (103% del teórico).

C) H-D-β-Nal-Cys-(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys(Acm)-Thr-NH₂

50 Se suspendieron 2,93 gramos de la resina cargada con péptido de la etapa B (1,3 eq. en mmoles) en 50 ml de MeOH/DMF 3:1. La suspensión se enfrió a aproximadamente <10°C en nitrógeno y se burbujeó gas amoníaco anhidro hasta la saturación mientras la temperatura se mantenía por debajo de aproximadamente 10°C. La suspensión se mezcló suavemente durante aproximadamente 24 horas mientras se permitía que la temperatura aumentara hasta aproximadamente 20°C. Se verificó la terminación de la reacción controlando la desaparición del intermedio éster metílico por medio de HPLC (Rt. ~ 14 minutos para el éster metílico vs. Rt. ~ 9,3 minutos para el

5 producto de amida en VYDAC®, 5 μ 100 Å, C18 con CH₃CN al 26%/TFA al 0,1% Isocrático, 1 ml/min, 220 nm). La reacción se enfrió y se añadió más amoníaco anhidro hasta que el área del éster metílico fue inferior a 10% del área del pico del producto en la HPLC. La suspensión se enfrió a aproximadamente menos de 10°C y se continuó mezclando durante la noche para permitir que el péptido precipitara. El producto precipitado y la resina se filtraron y enjuagaron con 15 ml de MeOH frío. El producto precipitado y la resina se secaron a presión reducida, y el producto se extrajo de la resina con ácido acético acuoso al 50% (porciones de 3 x 30 ml). El análisis por medio de HPLC mostró 870 mg (0,70 mmoles) del producto del título presente en la mezcla (96% de pureza en el sistema de HPLC Isocrático).

D) H-D- β -Nal-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂

10 Se disolvieron 500 mg (0,40 mmoles) del péptido de la etapa C en 300 ml de ácido acético al 4% y se calentaron a aproximadamente 55°C en atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó rápidamente, y se añadió una solución al 2% p/v de yodo en 7,7 ml de MeOH (0,60 mmoles) en una porción. La mezcla se agitó durante aproximadamente 15 minutos y a continuación se sofocó mediante titulación con una solución de tiosulfato de sodio al 2% hasta un punto final incoloro (~ 2 ml). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se filtró. La mezcla bruta se purificó por medio

15 de cromatografía preparativa en relleno C8 (YMC, Inc., Wilmington, NC) con un tampón de gradiente de acetato de amonio/acetonitrilo 0,1, se sometió a eliminación de la sal en relleno YMC C8 con un gradiente de ácido acético/acetonitrilo 0,25 N, y se liofilizó para proporcionar 350 mg del péptido deseado a 99% de pureza.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un péptido de fórmula H-D- β -Nal-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂, en donde dicho método comprende las etapas de:

5 (a) anclar un primer aminoácido a una resina de soporte sólido a través de un enlace éster para formar un primer producto acoplado, que comprende (i) hacer reaccionar una solución acuosa de carbonato de cesio con una solución de alcohol del primer aminoácido para formar una sal de cesio del primer aminoácido, (ii) obtener una sal de cesio libre de disolvente del primer aminoácido, (iii) hacer reaccionar la resina de soporte sólido con la sal de cesio del primer aminoácido en un disolvente aprótico polar seco para formar la primera HL-Thr-resina acoplada producto, en donde el primer aminoácido es Boc-L-Thr correspondiente al aminoácido C-terminal del péptido, y la resina de soporte sólido es una resina de poliestireno clorometilado;

10 (b) desbloquear el Boc del primer producto acoplado con un ácido para formar un primer producto acoplado desbloqueado;

15 (c) acoplar un siguiente aminoácido que tiene un grupo amino que no forma parte de la cadena lateral bloqueado por Fmoc al primer producto acoplado desbloqueado de (b), que comprende hacer reaccionar el siguiente aminoácido que tiene un grupo amino que no forma parte de la cadena lateral bloqueado por Fmoc con dicho primer producto acoplado desbloqueado en un disolvente orgánico que es cloruro de metileno, cloroformo, dimetilformamida o una combinación de los mismos, que comprende un reactivo de acoplamiento peptídico que es diisopropilcarbodiimida, dicitlohexilcarbodiimida o N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida, para formar un siguiente producto acoplado bloqueado que tiene un grupo amino que no forma parte de la cadena lateral bloqueado por Fmoc, con la condición de que si el siguiente aminoácido que tiene un grupo amino que no forma parte de la cadena lateral bloqueado por Fmoc tiene una o más funcionalidades de la cadena lateral, las funcionalidades de la cadena lateral no requieren protección o las funcionalidades de la cadena lateral tienen grupos protectores que son estables a los reactivos alcalinos utilizados para desbloquear Fmoc;

25 (d) desbloquear el Fmoc del siguiente producto acoplado bloqueado que tiene un grupo amino que no forma parte de la cadena lateral bloqueado por Fmoc, que comprende hacer reaccionar el siguiente producto acoplado bloqueado que tiene un grupo amino que no forma parte de la cadena lateral bloqueado por Fmoc con un amina primaria o secundaria para producir un siguiente producto acoplado desbloqueado;

30 (e) acoplar Boc-D- β -Nal a H-Cys(Acm)-Tyr(O-t-Bu)-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Cys(Acm)-Thr-resina, que comprende hacer reaccionar Boc-D- β -Nal con H-Cys(Acm)-Tyr(O-t-Bu)-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Cys(Acm)-Thr-resina en un disolvente orgánico que comprende un reactivo de acoplamiento peptídico para formar la Boc-D- β -Nal-Cys(Acm)-Tyr(O-t-Bu)-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Cys(Acm)-Thr-resina acoplada bloqueada completada producto;

35 (f) desbloquear simultáneamente el grupo Boc que bloquea D- β -Nal, el grupo O-t-Bu que protege Tyr y el grupo Boc que protege Lys de Boc-D- β -Nal-Cys(Acm)-Tyr(O-t-Bu)-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Cys(Acm)-Thr-resina en TFA para producir el producto resina peptídica completado de la fórmula H-D- β -Nal-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys(Acm)-Thr-resina; y

40 (g) escindir el péptido, H-D- β -Nal-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys(Acm)-Thr, de la resina sólida mediante la reacción de H-D- β -Nal-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys(Acm)-Thr-resina con amoniaco en un disolvente que comprende metanol y dimetilformamida hasta que la escisión se completa sustancialmente para producir H-D- β -Nal-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys(Acm)-Thr-NH₂,

en donde la etapa (g) comprende adicionalmente las etapas de (i) precipitar el péptido escindido del disolvente; (ii) filtrar la resina de soporte sólido y el péptido precipitado; y (iii) extraer el péptido en una solución ácida para aislar el péptido,

45 con la condición de que las etapas (c) y (d) se llevan a cabo seis veces después de la formación del primer producto acoplado desbloqueado de la fórmula H-L-Thr-resina en donde los siguientes aminoácidos están acoplados en el orden Fmoc-L-Cys(Acm), Fmoc-L-Val, Fmoc-L-Lys(Boc), Fmoc-D-Trp, Fmoc-L-Tyr(O-t-Bu) y Fmoc-L-Cys(Acm) para formar H-Cys(Acm)-Tyr(O-t-Bu)-D-Trp-Lys(Boc)-Val-Cys(Acm)-Thr-resina.

50 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende desproteger simultáneamente los grupos Acm que protegen Cys y ciclar los residuos de Cys desprotegidos resultantes del producto de péptido-resina completado de la fórmula H-D- β -Nal-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys(Acm)-Thr-NH₂ haciendo reaccionar H-D- β -Nal-Cys(Acm)-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys(Acm)-Thr-NH₂ con una solución de yodo en un alcohol hasta que la desprotección y la ciclación estén sustancialmente completas para producir H-D- β -Nal-[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂.