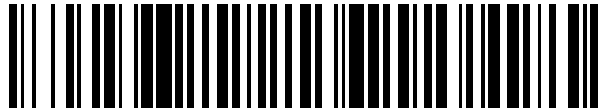


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 586**

51 Int. Cl.:

C07K 1/00	(2006.01)
C07K 1/02	(2006.01)
C07K 1/04	(2006.01)
C07K 1/06	(2006.01)
C07K 7/16	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2015 PCT/EP2015/067881**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16020349**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2015 E 15745209 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 3177635**

54 Título: **Procedimientos para la preparación de análogos de oxitocina**

30 Prioridad:

07.08.2014 EP 14180161

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

18.02.2019

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BLEICHER, KONRAD;
CUENI, ANTON;
PUENTENER, KURT y
SHIINA, JUNICHI**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

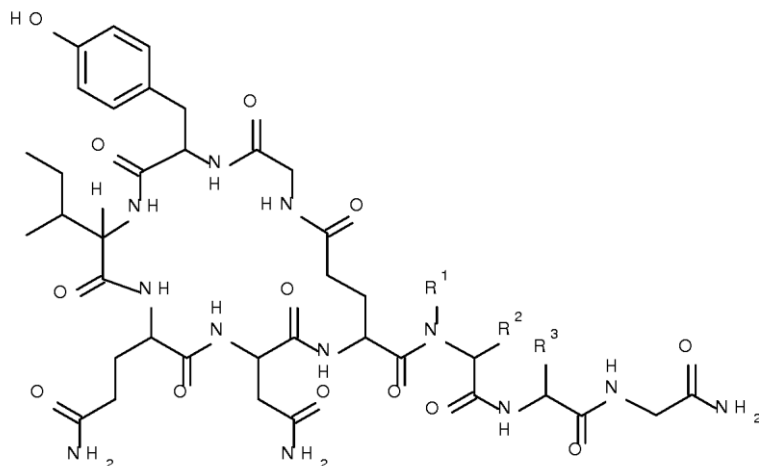
ES 2 700 586 T3

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

Procedimientos para la preparación de análogos de oxitocina

5 La invención se refiere a un nuevo procedimiento para la preparación de análogos de oxitocina de fórmula I



10 en la que

R¹ es hidrógeno o alquilo C₁₋₇ y

R² es hidrógeno o alquilo C₁₋₇; o

15 R¹ y R² conjuntamente con el átomo de nitrógeno y de carbono al que están unidos forman un heterociclo de 5 miembros que está opcionalmente sustituido con hidroxilo o halógeno;

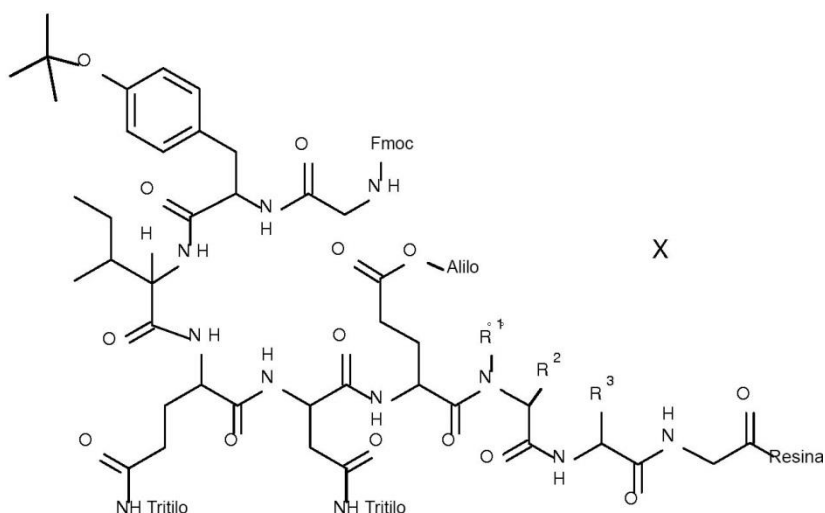
R³ es alquilo C₁₋₇

20 y sus correspondientes enantiómeros y/o isómeros ópticos de los mismos.

25 Los análogos de oxitocina de fórmula I actúan como agonistas de receptores de oxitocina y tienen el potencial de usarse para el tratamiento de trastornos neurológicos tales como autismo, estrés, incluyendo trastorno por estrés posttraumático, ansiedad, incluyendo trastornos de ansiedad y depresión, esquizofrenia, trastornos psiquiátricos y pérdida de memoria, abstinencia alcohólica, toxicomanía y para el tratamiento del síndrome de Prader-Willi (publicación PCT WO 2014/095773).

30 La preparación de los análogos de oxitocina de acuerdo con el procedimiento descrito en la publicación PCT WO 2014/095773 se caracteriza por las siguientes etapas:

x¹) escisión de Fmoc de un precursor peptídico unido a resina de fórmula X



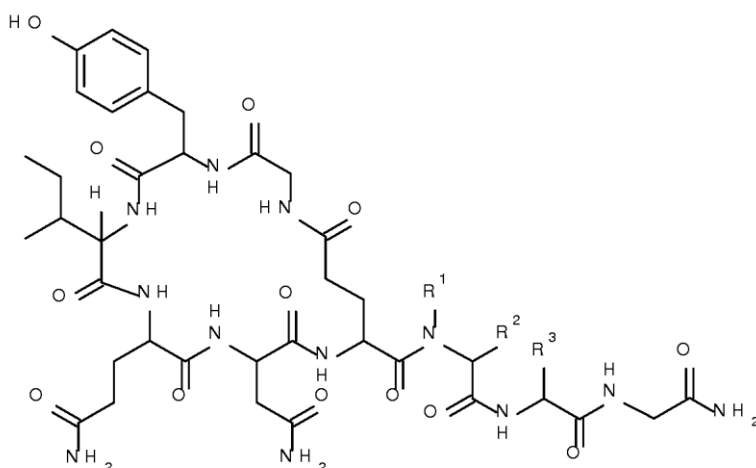
- x²) escisión del grupo alilo en una etapa posterior
- 5 x³) ciclación de anillo sobre la resina
- x⁴) desprotección global y escisión de la resina
- 10 x⁵) purificación y aislamiento.

Se descubrió que este procedimiento conocido en la técnica se ve afectado por bajos rendimientos totales y selectividad de producto.

15 El objetivo de la presente invención, por lo tanto, fue mejorar la síntesis con respecto al rendimiento y la selectividad de los análogos de oxitocina deseados.

El objetivo se pudo lograr con el procedimiento de la presente invención como se explica a continuación en el presente documento.

20 El procedimiento para la preparación de análogos de oxitocina de fórmula I



25 en la que

R¹ es hidrógeno o alquilo C₁₋₇ y

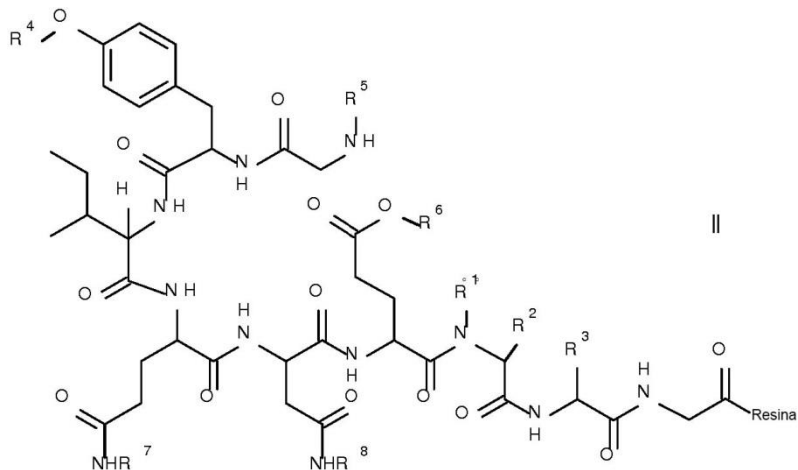
R² es hidrógeno o alquilo C₁₋₇; o

30 R¹ y R² conjuntamente con el átomo de nitrógeno y de carbono al que están unidos forman un heterociclo de 5 miembros que está opcionalmente sustituido con hidroxilo o halógeno;

R³ es alquilo C₁₋₇

y de sus correspondientes enantiómeros y/o isómeros ópticos de los mismos comprende tratar un precursor peptídico unido a resina de fórmula II

5



en la que

10 R¹, R² y R³ son como anteriormente y

R⁴ es un grupo protector de hidroxilo;

R⁵ es Fmoc;

15

R⁶ es t-butilo, 1-adamantilo o fenilisopropilo;

R⁷ es un grupo protector de amida; y

20

R⁸ es un grupo protector de amida

y sus correspondientes enantiómeros y/o isómeros ópticos de los mismos,

de acuerdo con el procedimiento:

25

b) en el que R⁶ es t-butilo, 1-adamantilo o fenilisopropilo

y las etapas b¹), b²), b³) y b⁴) se definen por las reivindicaciones adjuntas.

30

Las siguientes definiciones se exponen para ilustrar y definir el significado y alcance de los diversos términos usados para describir la invención en el presente documento.

El término "alquilo C₁₋₇" se refiere a un radical hidrocarburo alifático saturado monovalente de cadena lineal o ramificada de uno a siete átomos de carbono, preferentemente de uno a cuatro, más preferentemente de uno a dos átomos de carbono. Este término se ejemplifica además por radicales como metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, s-butilo, i-butilo, o t-butilo, pentilo y sus isómeros, hexilo y sus isómeros y heptilo y sus isómeros.

35

Asimismo, el término "alquilo C₁₋₄" se refiere a un radical hidrocarburo alifático saturado monovalente de cadena lineal o ramificada de uno a cuatro átomos de carbono, con las preferencias y los ejemplos respectivos mencionados anteriormente.

40

El término "alquilo C₁₋₄" se refiere a una cadena de alquilo C₁₋₄ unida a un átomo de oxígeno. Este término se ejemplifica además por radicales como metoxi, etoxi, n-propoxi, i-propoxi, n-butoxi, i-butoxi y t-butoxi.

45

El término "alquilo carbonilo C₁₋₄" se refiere a una cadena de alquilo C₁₋₄ unida a un grupo carbonilo y se ejemplifica además por los radicales alquilo particulares explicados anteriormente unidos a un grupo carbonilo.

El término "alquilo C₂₋₄" se refiere a una cadena de carbonos lineal o ramificada insaturada que contiene de 2 a 4 átomos de carbono que contiene al menos un doble enlace. Este término se ejemplifica además por radicales como vinilo, alilo y butenilo y sus isómeros.




50

El término "halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

5 El término "heterociclo de 5 miembros" que se forma conjuntamente con R¹ y R² con el átomo de nitrógeno y de carbono al que están unidos representa un anillo pirrolidina opcionalmente sustituido con hidroxilo o halógeno, en particular el anillo pirrolidina de prolina que está sustituido con hidroxilo o flúor.

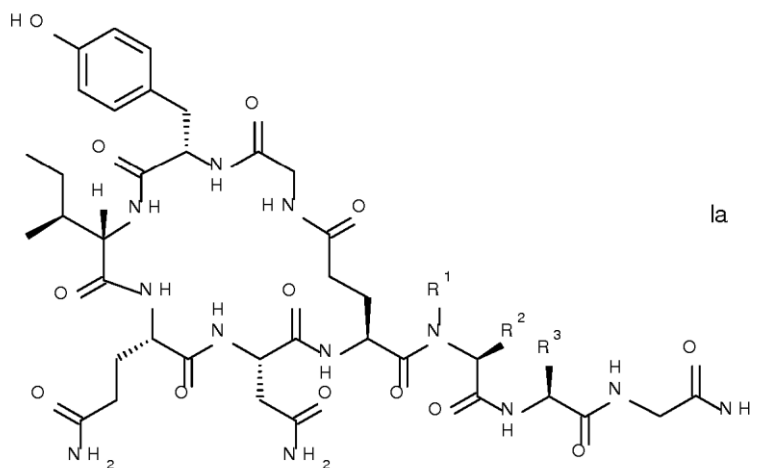
10 El término "grupo protector de amida" se refiere a un sustituyente sensible a ácidos o ácidos de Lewis usado convencionalmente para impedir la reactividad del grupo amida. Los grupos protectores de amida sensibles a ácidos o ácidos de Lewis adecuados se describen en Isidro-Llobet A., Alvarez, M. y Albericio F., "Amino Acid-Protecting Groups", Chem. Rev. 2009, 109, 2455-2504., Chan W. C. y White P. D. "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis", Oxford University Press y Green T., "Protective Groups in Organic Synthesis", 4.^a ed. por Wiley Interscience, 2007, capítulo 7, 696 y siguientes. Por lo tanto, se pueden seleccionar grupos protectores amida adecuados de tritilo, Tmob (2,4,6-trimetoxibencilo), Xan (9-xantenilo), Cpd (ciclopropildimetilcarbinilo), Mbh (4,4'-dimetoxibenzhidrido) o Mtt (4-metiltritilo).

20 El término "grupo protector de hidroxilo" usado para el sustituyente R⁴ se refiere a cualquier sustituyente usado convencionalmente para impedir la reactividad del grupo hidroxilo. Se describen grupos protectores de hidroxilo adecuados en Isidro-Llobet A., Alvarez, M. y Albericio F., "Amino Acid-Protecting Groups", Chem. Rev. 2009, 109, 2455-2504., Chan W. C. y White P. D. "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis", Oxford University Press, Green T., "Protective Groups in Organic Synthesis", capítulo 1, John Wiley y Sons, Inc., 1991, 10-142 y se pueden seleccionar de alquilo C₁₋₄ que está opcionalmente sustituido con fenilo o fenilo halogenado; alqueno C₂₋₄; sililo que está opcionalmente sustituido con alquilo C₁₋₄ o fenilo o alquilo carbonilo C₁₋₄.

25 El enlace espiral "  " representa "  " o "  ", indicando, por tanto, la quiralidad de la molécula.

Siempre que un carbono quiral esté presente en una estructura química, se entiende que todos los estereoisómeros asociados con ese carbono quiral están englobados por la estructura como estereoisómeros puros, así como mezclas de los mismos.

30 En un modo de realización particular de la presente invención, los análogos de oxitocina tienen la fórmula la



35 en la que R¹, R² y R³ son como anteriormente.

R¹ es en particular hidrógeno o alquilo C₁₋₄, más en particular hidrógeno o metilo.

40 R² es en particular hidrógeno o alquilo C₁₋₄, más en particular hidrógeno.

R¹ y R² conjuntamente con el átomo de nitrógeno y de carbono al que están unidos en particular forman el anillo pirrolidina de prolina que está opcionalmente sustituido con hidroxilo o halógeno, en particular con hidroxilo o flúor;

45 R³ en particular representa n-butilo o i-butilo;

Los análogos de oxitocina incluso más particulares se enumeran a continuación:

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Gly-Leu-Gly-NH₂ (1)

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Pro-Leu-Gly-NH₂ (2)

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Sar-Leu-Gly-NH₂ (3)

5

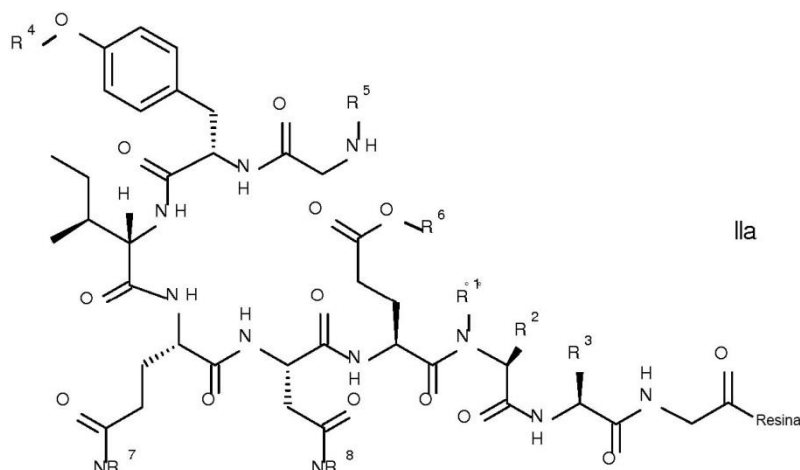
c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Sar-Nle-Gly-NH₂ (4)

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-trans-4-fluoro-Pro-Leu-Gly-NH₂ (5)

10

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-trans-4-hidroxi-Pro-Leu-Gly-NH₂ (6).

El precursor peptídico unido a resina de fórmula II tiene la fórmula



15

en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son como anteriormente.

R¹ es en particular hidrógeno o alquilo C₁₋₄, más en particular hidrógeno o metilo.

20

R² es en particular hidrógeno o alquilo C₁₋₄, más en particular hidrógeno.

R¹ y R² conjuntamente con el átomo de nitrógeno y de carbono al que están unidos en particular forman el anillo pirrolidina de prolina que está opcionalmente sustituido con hidroxilo o halógeno, en particular con hidroxilo o flúor;

25

R³ en particular representa n-butilo o i-butilo;

R⁴ en particular es t-butilo, alilo, tritilo, 2-clorotritilo, t-butiloxicarbonilo, t-butildifenilsililo o t-butildimetilsililo, pero más en particular t-butilo;

30

R⁵ es Fmoc;

R⁶ en particular es 1-adamantilo, fenilisopropilo o t-butilo,

R⁷ en particular es tritilo, 2-clorotritilo, 4-metiltritilo, pero más en particular tritilo; y

35

R⁸ en particular es tritilo, 2-clorotritilo, 4-metiltritilo, pero más en particular tritilo.

El precursor peptídico unido a resina de fórmula II se puede preparar usando procedimientos conocidos por el experto en la técnica de síntesis peptídica en fase sólida, normalmente por una escisión de Fmoc repetida y un acoplamiento repetido de los aminoácidos protegidos con Fmoc deseados.

40

Como norma se pueden usar resinas de amida comercialmente disponibles adecuadas para la síntesis peptídica en fase sólida, en particular para la síntesis peptídica en fase sólida con Fmoc. Las resinas útiles se describen, por ejemplo, en Chan W. C. y White P. D. "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis", Oxford University Press. Por ejemplo, se descubrió que la resina PL-Rink (resina 4-[(2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil]fenoxiacetamido-metilo) de Agilent Technology es particularmente adecuada para el procedimiento de la presente invención.

45

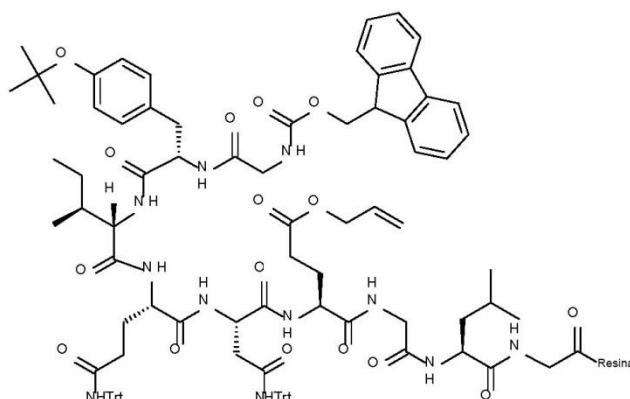
Se puede producir escisión de Fmoc con una solución de derivados de piperidina en un disolvente orgánico adecuado. De forma ventajosa, se puede aplicar una solución de piperidina o 4-metilpiperidina en N,N-dimetilformamida o N-metilpirrolidona.

50

El acoplamiento sobre la resina con los aminoácidos protegidos con Fmoc puede tener lugar con un agente de acoplamiento seleccionado de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)triperrolidinofosfonio (PyAOP), hexafluorofosfato de bromotripirrolidinofosfonio (PyBroP), hidroxibenzotriazol (HOBt) y N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU), O-(6-clorobenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HCTU), hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenamino)dimetilamino-morfolino-carbenio (COMU), hexafluorofosfato de tetrametilfluoroformamidinio (TFFH), 2-hidroxipiridina (HOPy) o cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triacin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) en presencia de una base amina orgánica y un disolvente orgánico adecuado.

Se ha descubierto que HOBt, HOPy y DIC en presencia de piridina como base amina orgánica y N,N'-dimetilformamida como disolvente orgánico son un agente de acoplamiento preferente.

La Fmoc-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu(OAll)-Gly-Leu-Gly-resina de fórmula X



X

se puede construir, por ejemplo, sobre una resina PL-Rink por escisión de Fmoc repetida y acoplamiento repetido de los siguientes aminoácidos protegidos con Fmoc en el orden descrito: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OAll)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH y Fmoc-Gly-OH.

Como se explica anteriormente, el procedimiento puede seguir el procedimiento a) en el que R⁶ es alilo o 4-{N-[1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-3-metilbutil]amino}bencilo. En este caso, el procedimiento se caracteriza por las siguientes etapas:

- a¹) se escinde el grupo alilo o 4-{N-[1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-3-metilbutil]amino}bencilo R⁶, en una etapa posterior
- a²) se escinde el grupo Fmoc R⁵, después de esto
- a³) se efectúa la ciclación de anillo sobre la resina, en otra etapa
- a⁴) se efectúa la desprotección global y escisión de la resina, y opcionalmente
- a⁵) se purifica el análogo de oxitocina de fórmula I así obtenido y se aísla.

La escisión del grupo alilo o 4-{N-[1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-3-metilbutil]amino}bencilo en la etapa a¹) se realiza normalmente en presencia de un compuesto de paladio o de rodio o de hidracina. Se pueden seleccionar compuestos de paladio o rodio adecuados de tetraquis(trifenilfosfina)paladio, trifenilfosfina/acetato de paladio, trietilfosfito/acetato de paladio, dicloruro de bis(trifenilfosfina)paladio o cloruro de tris(trifenilfosfina)rodio. Preferentemente se usan compuestos de paladio, incluso más preferentemente tetraquis(trifenilfosfina)paladio.

Además, normalmente está presente un oxidante tal como fenilsilano, pirrolidina, morfolina o N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida, en particular fenilsilano.

La reacción como norma se puede producir a temperatura ambiente en un disolvente orgánico adecuado tal como cloruro de metileno, acetonitrilo o tetrahidrofurano.

50

Se puede realizar la escisión de Fmoc en la etapa a²) como se explica anteriormente con piperidina o 4-metilpiperidina en un disolvente orgánico adecuado.

5 Se efectúa la ciclación de anillo en la etapa a³) sobre la resina, usando convenientemente un agente de ciclación seleccionado de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio (PyAOP), hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)urano (HBTU), hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU), hexafluorofosfato de O-(6-clorobenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurano (HCTU), hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi)dimetilamino-morfolino-carbenio (COMU), 2-hidroxipiridina (HOPy) o cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triacin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) en presencia de una base amina orgánica.

10 Las bases amina orgánicas adecuadas se pueden seleccionar de piridina, imidazol, N,N-diisopropiletilamina, trietilamina, N-metilmorfolina, N,N-dimetil-4-aminopiridina, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno o 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano.

15 Se puede realizar la etapa de ciclación a³) con PyBOP o PyAOP en presencia de N,N-diisopropiletilamina, imidazol o N-metilmorfolina como bases amina orgánicas a temperaturas de entre 0 °C a 25 °C.

20 Se puede efectuar la desprotección global y escisión de la resina en la etapa a⁴) en presencia de ácido trifluoroacético/agua y un oxidante adecuado tal como tioanisol, anisol, fenol, triisopropilsilano, trietilsilano, etanoditiol o ditiotretiol normalmente a temperaturas de entre 0 °C a 25 °C. Se ha descubierto que triisopropilsilano es un oxidante preferente.

25 En la etapa a⁵) se puede aislar el análogo de oxitocina bruto separando por filtración la resina, retirando el disolvente del filtrado y llevando además el residuo a un disolvente orgánico adecuado tal como a éter metil-t-butílico, 2-metiltetrahidrofurano o a mezclas de los mismos y por filtración final y secado.

30 Se puede purificar adicionalmente el análogo de oxitocina bruto por HPLC preparativa en solución con un disolvente orgánico adecuado tal como con acetonitrilo acuoso y aditivos adecuados tales como ácido trifluoroacético, ácido acético o acetato de amonio.

A continuación se pueden liofilizar las fracciones obtenidas para obtener el análogo de oxitocina puro de fórmula I.

35 El procedimiento de la presente invención sigue el procedimiento b) en el que R⁶ es t-butilo, 1-adamantilo o fenilisopropilo. En este caso, el procedimiento se caracteriza por las etapas definidas por las reivindicaciones adjuntas.

La escisión de Fmoc en la etapa b¹) puede tener lugar como se describe para la etapa a²) anterior.

40 Se puede realizar la desprotección global y escisión de la resina en la etapa b²) como se describe anteriormente en la etapa a⁴). Los modos de realización preferentes para la etapa a⁴ se aplican asimismo para la etapa b²).

45 Se efectúa la ciclación de anillo en la etapa b³) en solución pero se puede producir con los agentes de ciclación y las bases amina orgánicas enumeradas para la etapa a³) anterior. Los modos de realización preferentes para la etapa a³ se aplican asimismo para la etapa b³).

El aislamiento y purificación en la etapa b⁴) puede tener lugar de la misma manera como se describe en la etapa a⁵). Los modos de realización preferentes para la etapa a⁵ se aplican asimismo para la etapa b⁴).

50 **Ejemplos**

Abreviaturas:

55 SPPS = síntesis peptídica en fase sólida, resina PL-Rink = resina 4-[(2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil]fenoxiacetamido-metilo de Agilent Technology (PL1467-4749: 0,32 mmol/g 75 - 150-10⁻⁶m; PL1467-4799: 0,55 mmol/g 75-150 - 10⁻⁶m; PL1467-4689: 0,96 mmol/g 150-300 - 10⁻⁶m), Fmoc = 9-fluorenilmetoxicarbonilo, Gly = glicina, Leu = leucina, Glu(OAll) = ácido glutámico protegido con alilo, Glu(tBu) = ácido glutámico protegido con *terc*-butilo, Asn(Trt) = asparagina protegida con tritilo, Gln(Trt) = glutamina protegida con tritilo, Ile = isoleucina, Tyr(tBu) = tirosina protegida con *terc*-butilo, Sar = N-metilglicina, Pro = prolina, Nle = norleucina, DMF = N,N-dimetilformamida, HOBt = 1-hidroxibenzotriazol, HOPy = 2-hidroxipiridina, DIC = N,N'-diisopropilcarbodiimida, NEP = N-etilpirrolidona, PyBOP = hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio, DIPEA = diisopropiletilamina, MeOH = metanol, CH₂Cl₂ = diclorometano, MTBE = éter metil-*terc*-butílico, MetF = 2-metiltetrahidrofurano, TFA = ácido trifluoroacético, MeCN = acetonitrilo, PyAOP = hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio, HBTU = hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)urano, HATU = hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio, HCTU = hexafluorofosfato de O-(6-clorobenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurano, COMU = hexafluorofosfato de (1-ciano-

2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi)dimetilamino-morfolino-carbenio, DMTMM = cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triacin-2-il)-4-metilmorfolinio, NMP = 1-metil-2-pirrolidinona, DMSO = dimetilsulfóxido, DMI = 1,3-dimetil-2-imidazolidinona, DMPU = 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona, NMM = N-Metilmorfolina, DMAP = N,N-dimetil-4-aminopiridina, DIPEA = N,N-diisopropiletilamina, DBU = 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno, DABCO = 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano.

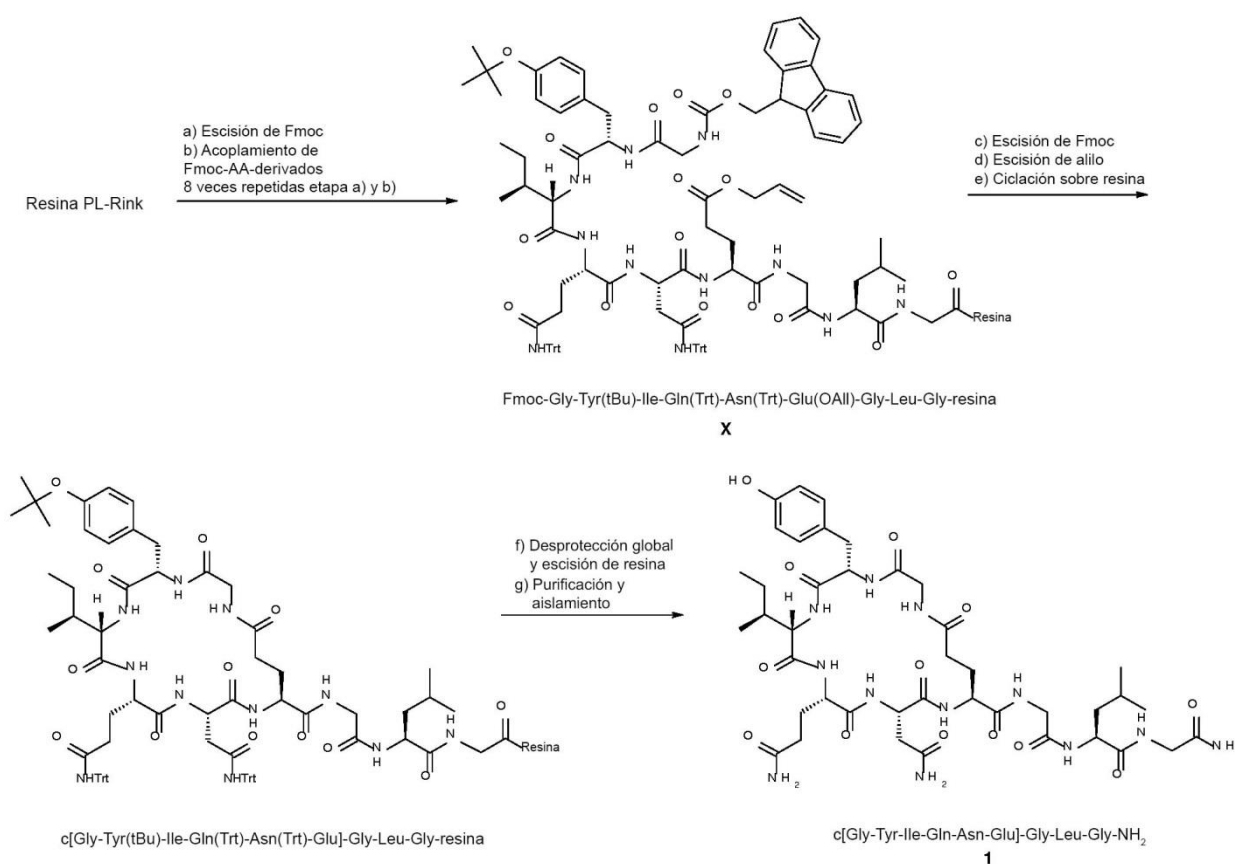
Ejemplo de comparación

Se realizó un experimento comparativo para la preparación de



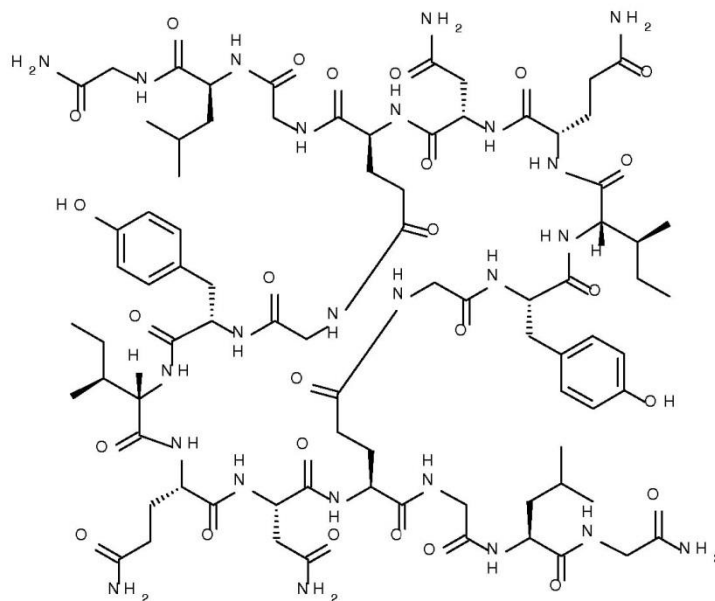
de forma análoga a la descripción de síntesis del documento WO2014/095773 (ciclación en fase sólida) y como se explica en el esquema 1 a continuación:

Esquema 1:

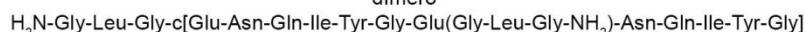


Se ha medido la eficacia de síntesis en base al rendimiento y a la proporción de producto (1) con respecto al subproducto dímero de fórmula mostrada en el esquema 2 a continuación:

Esquema 2:



dímero

5 a) **Escisión de Fmoc:**

Se cargó un reactor de SPPS (100 ml; sintetizador peptídico CS136XT ex CSBio) con resina PL-Rink (carga, 0,55 mmol/g, 5,00 g, 2,75 mmol) y piperidina al 20 % en DMF (50,0 ml). A continuación se agitó la mezcla a 25 °C durante 10 min. Después de extraer el disolvente, se añadió otra porción de piperidina al 20 % en DMF (50,0 ml) y se agitó la mezcla a 25 °C durante 30 min. Después de extraer el disolvente, se lavó la resina resultante con DMF (8 x 50,0 ml) para proporcionar la resina PL-Rink sin Fmoc.

b) **Acoplamiento con Fmoc-AA-derivados:**

A la resina PL-Rink sin Fmoc, se le añadieron una solución de Fmoc-Gly-OH en HOBt/DMF 0,35 M (32,0 ml, 11,2 mmol), DIC 0,92 M en DMF (16,0 ml, 14,7 mmol) y piridina al 10 % en DMF (16,0 ml, 19,8 mmol) y se agitó a 25 °C durante 3 h. Después de extraer el disolvente, se lavó la resina resultante con DMF (4 x 50,0 ml) para proporcionar Fmoc-Gly-resina.

Se repitieron las etapas de escisión de Fmoc y acoplamiento de Fmoc-AA-derivado 8 veces empleando en lugar de Fmoc-Gly-OH, los siguientes Fmoc-aminoácido-derivados: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OAll)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH para proporcionar Fmoc-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu(OAll)-Gly-Leu-Gly-resina. Se escindió una muestra de la resina (véase a continuación) para confirmar la masa correcta. EM (m/z): 1211,8 (M+H)⁺

c) **Escisión de Fmoc:**

Se llevó a cabo la escisión de Fmoc de la Gly terminal como se describe anteriormente para proporcionar H-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu(OAll)-Gly-Leu-Gly-resina. Se escindió una muestra de la resina (véase a continuación) para confirmar la masa correcta. EM (m/z): 989,8 (M+H)⁺

d) **Escisión de alilo:**

A H-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu(OAll)-Gly-Leu-Gly-resina, se le añadió una solución de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (159 mg, 0,138 mmol) y fenilsilano (3,40 ml, 27,6 mmol) en CH₂Cl₂ (50,0 ml) y se agitó a 25 °C durante 30 min. Después de extraer el disolvente, se repitió esta etapa una vez más y se lavó con DMF (2 x 50,0 ml). Se añadió una solución de ditiocarbamato de sodio (250 mg) y DIPEA (0,250 ml) en DMF (50,0 ml) y se agitó la mezcla a 25 °C durante 15 min. Después de extraer el disolvente, se repitió esta etapa una vez más. Después de extraer el disolvente, se lavó la resina resultante con DMF (4 x 50,0 ml) para proporcionar H-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu-Gly-Leu-Gly-resina. Se escindió una muestra de la resina (véase a continuación) para confirmar la masa correcta. EM (m/z): 949,7 (M+H)⁺

e) Ciclación sobre resina:

Se añadió una solución de PyBOP (2,36 g, 4,54 mmol) y DIPEA (2,40 ml, 13,8 mmol) en NEP (60,0 ml) a H-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu-Gly-Leu-Gly-resina y se agitó la mezcla a 25 °C durante 4 h. Después de extraer el disolvente, se lavó la resina resultante con DMF (4 x 50,0 ml), CH₂Cl₂ (3 x 50,0 ml) y MeOH (3 x 50,0 ml). Se secó la resina a 1 kPa (10 mbar) a 25 °C durante 1 día para dar c[Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu]-Gly-Leu-Gly-resina (8,60 g).

f) Desprotección global y escisión de resina:

A una solución preenfriada (10-15 °C) de triisopropilsilano (2,80 ml) en TFA (40,0 ml) y agua (10,0 ml), se le añadió c[Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu]-Gly-Leu-Gly-resina (8,60 g) y se agitó a 25 °C durante 3 h. Se separó por filtración la resina y se concentró el filtrado a vacío. Se añadió el residuo a MTBE (100 ml) y se agitó la mezcla a 25 °C durante 15 h. Se filtró la mezcla y se lavó la torta con MTBE (50,0 ml) seguido de secado para dar c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Gly-Leu-Gly-NH₂ bruto **1** (2,01 g, ensayo 11,3 % en peso, rendimiento total de un 9 %) como un sólido blanco con una pureza de un 15,9 % (% área HPLC, procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1). La proporción de **1**/dímero fue de 8,5.

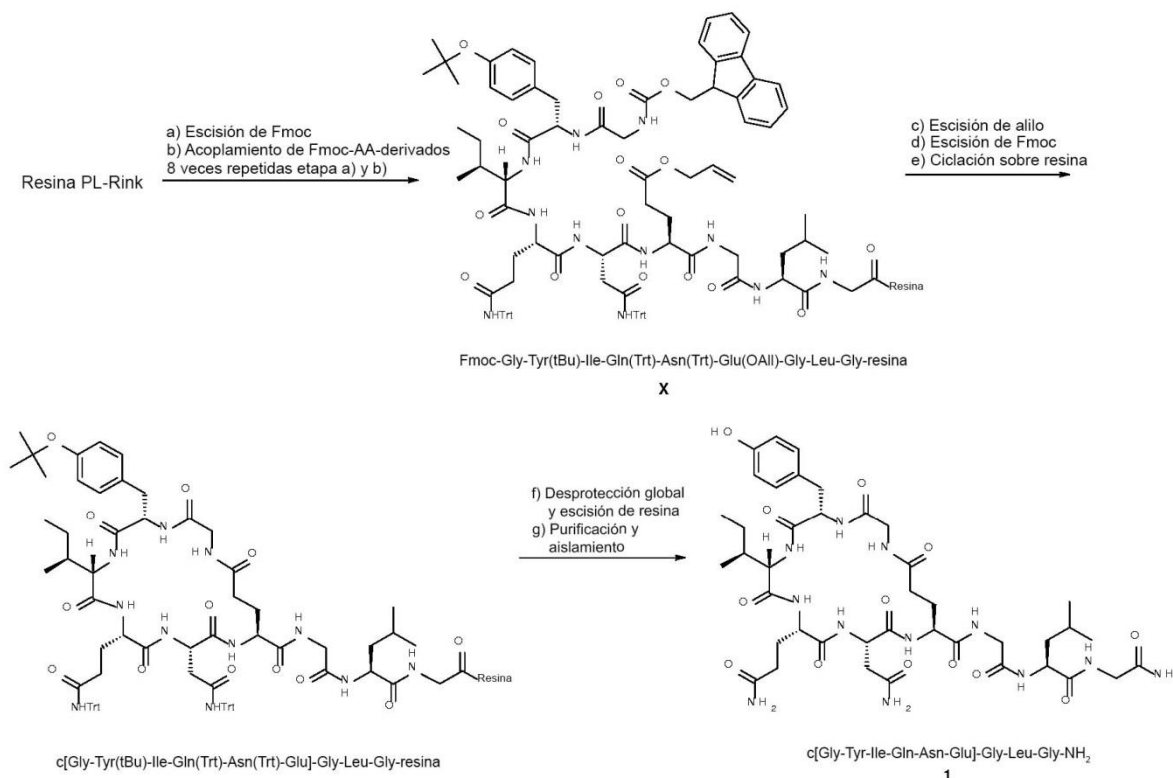
Tabla 1:

Ejemplo	Procedimiento de ciclación	Rendimiento total (%)	Pureza de péptido cíclico bruto (% área HPLC)	Proporción de 1 /dímero
Comparación	Fase sólida	9	15,9	8,5
1 (invención)	Fase sólida	38	62,7	21,9
2 (invención)	Fase líquida	31	56,6	15,1

Ejemplo 1 (ciclación en fase sólida)

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Gly-Leu-Gly-NH₂ (**1**)

Esquema 3:



30

a) Escisión de Fmoc:

Se cargó un reactor de SPPS (100 ml; sintetizador peptídico CS136XT ex CSBio) con resina PL-Rink (carga. 0,55 mmol/g, 5,00 g, 2,75 mmol) y piperidina al 20 % en DMF (50,0 ml). A continuación se agitó la mezcla a 25 °C durante 10 min. Después de extraer el disolvente, se añadió otra porción de piperidina al 20 % en DMF (50,0 ml) y se agitó la mezcla a 25 °C durante 30 min. Después de extraer el disolvente, se lavó la resina resultante con DMF (8 x 50,0 ml) para proporcionar la resina PL-Rink sin Fmoc.

b) Acoplamiento con Fmoc-AA-derivados:

A la resina PL-Rink sin Fmoc, se le añadieron una solución de Fmoc-Gly-OH en HOBt/DMF 0,35 M (32,0 ml, 11,2 mmol), DIC 0,92 M en DMF (16,0 ml, 14,7 mmol) y piridina al 10 % en DMF (16,0 ml, 19,8 mmol) y se agitó a 25 °C durante 3 h. Después de extraer el disolvente, se lavó la resina resultante con DMF (4 x 50,0 ml) para proporcionar Fmoc-Gly-resina.

Se repitieron las etapas de escisión de Fmoc y acoplamiento de Fmoc-AA-derivado 8 veces empleando en lugar de Fmoc-Gly-OH, los siguientes Fmoc-aminoácido-derivados: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OAll)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH para proporcionar **X** (Fmoc-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu(OAll)-Gly-Leu-Gly-resina). Se escindió una muestra de la resina (véase a continuación) para confirmar la masa correcta. EM (m/z): 1211,8 (M+H)⁺

c) Escisión de alilo:

A **X** (Fmoc-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu(OAll)-Gly-Leu-Gly-resina), se le añadió una solución de tetraquis(trifenilfosfina)paladio (159 mg, 0,138 mmol) y fenilsilano (3,40 ml, 27,6 mmol) en CH₂Cl₂ (50,0 ml) y se agitó a 25 °C durante 30 min. Después de extraer el disolvente, se repitió esta etapa una vez más y se lavó con DMF (2 x 50,0 ml). Se añadió una solución de ditiocarbamato de sodio (250 mg) y DIPEA (0,250 ml) en DMF (50,0 ml) y se agitó la mezcla a 25 °C durante 15 min. Después de extraer el disolvente, se repitió esta etapa una vez más. Después de extraer el disolvente, se lavó la resina resultante con DMF (4 x 50,0 ml) para proporcionar Fmoc-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu-Gly-Leu-Gly-resina. Se escindió una muestra de la resina (véase a continuación) para confirmar la masa correcta. EM (m/z): 1171,8 (M+H)⁺

d) Escisión de Fmoc:

Se llevó a cabo la escisión de Fmoc de la Gly terminal como se describe anteriormente para proporcionar H-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu-Gly-Leu-Gly-resina. Se escindió una muestra de la resina (véase a continuación) para confirmar la masa correcta. EM (m/z): 949,7 (M+H)⁺

e) Ciclación sobre resina:

Se añadió una solución de PyBOP (2,36 g, 4,54 mmol) y DIPEA (2,40 ml, 13,8 mmol) en NEP (60,0 ml) a H-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu-Gly-Leu-Gly-resina y se agitó la mezcla a 25 °C durante 4 h. Después de extraer el disolvente, se lavó la resina resultante con DMF (4 x 50,0 ml), CH₂Cl₂ (3 x 50,0 ml) y MeOH (3 x 50,0 ml). Se secó la resina a 1 kPa (10 mbar) a 25 °C durante 1 día para dar c[Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu]-Gly-Leu-Gly-resina (9,17 g).

f) Desprotección global y escisión de resina:

A una solución preenfriada (10-15 °C) de triisopropilsilano (2,50 ml) en TFA (40,0 ml) y agua (10,0 ml), se le añadió c[Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu]-Gly-Leu-Gly-resina (9,17 g) y se agitó a 25 °C durante 3 h. Se separó por filtración la resina y se concentró el filtrado a vacío. Se añadió el residuo a MTBE (100 ml) y se agitó la mezcla a 25 °C durante 15 h. Se filtró la mezcla y se lavó la torta con MTBE (50,0 ml) seguido de secado para dar c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Gly-Leu-Gly-NH₂ bruto **1** (2,39 g, ensayo 40,9 % en peso, rendimiento total de un 38%) como un sólido blanco con una pureza de un 62,7% (% área HPLC, procedimiento de HPLC: columna Aquity UPLC BEH130 C18, 150 x 2,1 mm; fase móvil, A: TFA al 0,05 % en agua, B: TFA al 0,05 % en MeCN; flujo: 0,13 ml/min durante 40 min, 0,25 ml/min durante 15 min; isocrático 90/10 (A/B) durante 3 min, gradiente de 90/10 (A/B) a 62/38 (A/B) en 37min, gradiente de 62/38 (A/B) a 10/90 (A/B) en 5 min, isocrático 10/90 (A/B) durante 10 min. Temp: 60 °C, UV: 214 nm). La proporción de 1/dímero fue de 21,9.

Tiempo de retención: 23,2 min (c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Gly-Leu-Gly-NH₂), 18,8 min (H-Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu-Gly-Leu-Gly-NH₂), 26,1 min (dímero)

g) Purificación y aislamiento:

Se disolvió c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Gly-Leu-Gly-NH₂ bruto en agua-MeCN (10-1) y se filtró. Se diluyó el filtrado con el mismo volumen de agua. Se purificó la solución por HPLC preparativa en una columna Kromasil-C18-100 (250 x 80 mm, tamaño de partícula 10 um, A: TFA al 0,1 %-agua, B: MeCN; flujo: 300 ml/min; isocrático 95/5 (A/B)

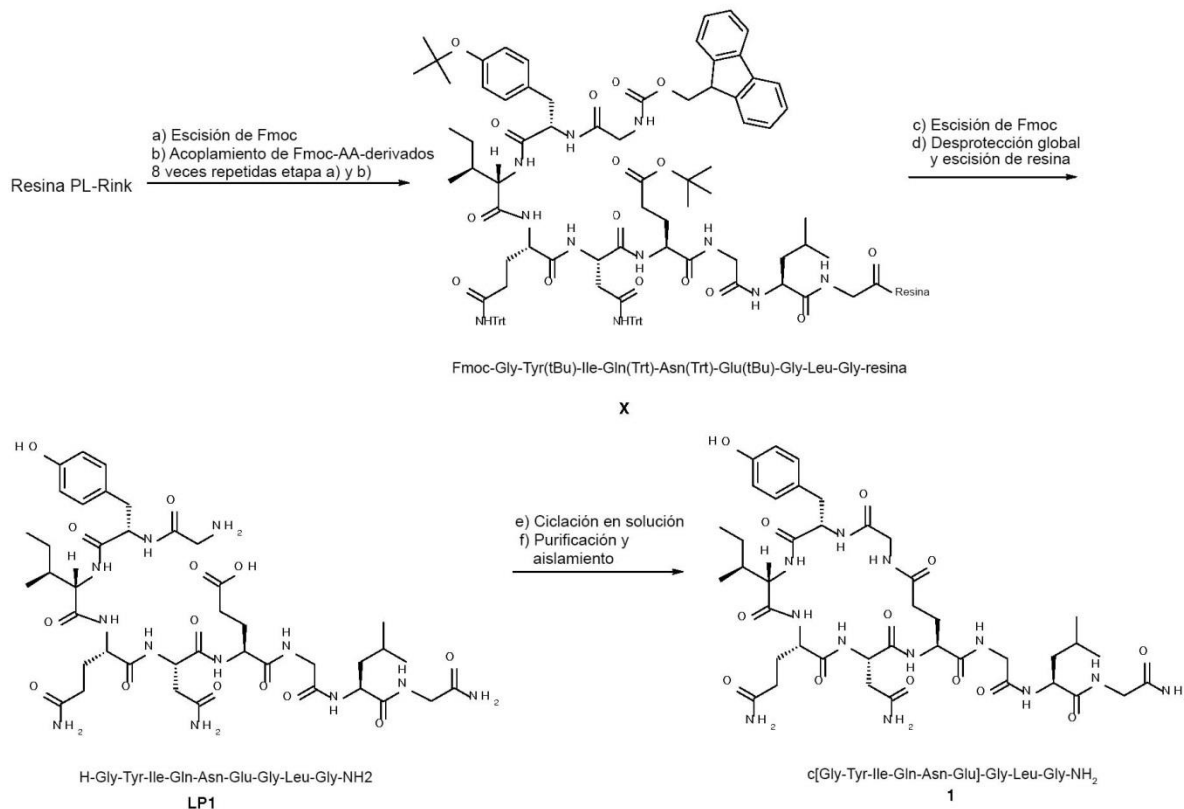
5 durante 2 min, gradiente de 95/5 (A/B) a 80/20 (A/B) en 1 min, gradiente de 80/20 (A/B) a 77/23 (A/B) en 17min, gradiente de 77/23 (A/B) a 10/90 (A/B) en 1 min, isocrático 10/90 (A/B) durante 7 min, gradiente de 10/90 (A/B) a 95/5 (A/B) en 1 min, isocrático 95/5 (A/B) durante 6 min. Se recogieron las fracciones y se liofilizó para proporcionar c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Gly-Leu-Gly-NH₂ puro **1** (0,708 g) como un polvo blanco con una pureza de un 99,2 % (% área HPLC, procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1). No se observó dímero en **1** puro. EM (m/z): 931,0 (M+H)⁺

Ejemplo 2 (ciclación en fase de solución)

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Gly-Leu-Gly-NH₂ (**1**)

10

Esquema 4:



15 **a) Escisión de Fmoc:**

Se cargó un reactor de SPPS (100 ml) con resina PL-Rink (carga. 0,55 mmol/g, 5,00 g, 2,75 mmol) y piperidina al 20 % en DMF (50 ml). A continuación se agitó la mezcla a 25 °C durante 10 min. Después de extraer el disolvente, se añadió otra porción de piperidina al 20 % en DMF (50,0 ml) y se agitó la mezcla a 25 °C durante 30 min. Después de extraer el disolvente, se lavó la resina resultante con DMF (8 x 50,0 ml) para proporcionar la resina PL-Rink sin Fmoc.

20

b) Acoplamiento de Fmoc-AA-derivados:

25 A la resina PL-Rink sin Fmoc, se le añadieron una solución de Fmoc-Gly-OH en HOBT/DMF 0,35 M (32,0 ml, 11,2 mmol), DIC 0,92 M en DMF (16,0 ml, 14,7 mmol) y piperidina al 10 % en DMF (16,0 ml, 19,8 mmol) y se agitó a 25 °C durante 3 h. Después de extraer el disolvente, se lavó la resina resultante con DMF (4 x 50,0 ml) para proporcionar Fmoc-Gly-resina.

30 Se repitieron las etapas de escisión de Fmoc y acoplamiento de Fmoc-AA-derivado 8 veces empleando en lugar de Fmoc-Gly-OH, los siguientes Fmoc-aminoácido-derivados: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH para proporcionar **X** (Fmoc-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu(tBu)-Pro-Leu-Gly-resina). Se escindió una muestra de la resina (véase a continuación) para confirmar la masa correcta. EM (m/z): 1171,8 (M+H)⁺

35

c) Escisión de Fmoc:

Se llevó a cabo la escisión de Fmoc de la Gly terminal como se describe anteriormente. Después de extraer el disolvente, se lavó la resina resultante con DMF (8 x 50,0 ml), CH₂Cl₂ (3 x 50,0 ml) y MeOH (3 x 50,0 ml). Se secó la resina a 1 kPa (10 mbar) a 25 °C durante 1 día para dar H-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu(tBu)-Gly-Leu-Gly-resina (10,8 g).

d) Desprotección global y escisión de resina:

A una solución preenfriada (10-15 °C) de triisopropilsilano (2,50 ml) en TFA (40,0 ml) y agua (10,0 ml), se le añadió H-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu(tBu)-Gly-Leu-Gly-resina (10,8 g) y se agitó a 25 °C durante 3 h. Se separó por filtración la resina y se concentró el filtrado a vacío. Se añadió el residuo a MetF (100 ml) y se agitó la mezcla a 25 °C durante 15 h. Se filtró la mezcla y se lavó la torta con MetF (50,0 ml) seguido de secado para dar **LP1** (H-Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu-Gly-Leu-Gly-NH₂) (3,60 g) como un sólido blanco con una pureza de un 67,4 % (% área HPLC, procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1). EM (m/z): 949,7 (M+H)⁺

e) Ciclación en solución:

A una mezcla de **LP1** (H-Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu-Gly-Leu-Gly-NH₂) (3,50 g) en NEP (60,0 ml) y DIPEA (3,13 ml, 18,4 mmol) se le añadió PyBOP (1,92 g, 3,69 mmol) y se agitó a 25 °C durante 1 h. Para completar la conversión, se añadió otra porción de PyBOP (0,960 g, 1,84 mmol) y se agitó a la misma temperatura durante 1 h. Se añadió la mezcla resultante a una solución de MTBE/MetF (400 ml/100 ml) y se agitó a 25 °C durante 15 h. Se filtró la mezcla y se lavó la torta con MTBE (50,0 ml) seguido de secado para dar c[Gly-Tyr-Leu-Gln-Asn-Glu]-Gly-Leu-Gly-NH₂ bruto **1** (4,30 g, ensayo 18,0 % en peso, rendimiento total de un 31 %) como un sólido blanco con una pureza de un 56,6 % (% área HPLC, procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1). La proporción de 1/dímero fue de 15,1.

f) Purificación y aislamiento:

Se disolvió c[Gly-Tyr-Leu-Gln-Asn-Glu]-Gly-Leu-Gly-NH₂ bruto en agua-MeCN (10-1) y se separó por filtración el material no disuelto. Se diluyó el filtrado con el mismo volumen de agua. Se purificó la solución por HPLC preparativa en una columna Kromasil-C18-100 (250 x 80 mm, tamaño de partícula 10 µm, A: TFA al 0,1 %-agua, B: MeCN; flujo: 300 ml/min; isocrático 95/5 (A/B) durante 2 min, gradiente de 95/5 (A/B) a 80/20 (A/B) en 1 min, gradiente de 80/20 (A/B) a 77/23 (A/B) en 17min, gradiente de 77/23 (A/B) a 10/90 (A/B) en 1 min, isocrático 10/90 (A/B) durante 7 min, gradiente de 10/90 (A/B) a 95/5 (A/B) en 1 min, isocrático 95/5 (A/B) durante 6 min. Se recogieron las fracciones y se liofilizó para proporcionar c[Gly-Tyr-Leu-Gln-Asn-Glu]-Gly-Leu-Gly-NH₂ puro **1** (444 mg) como un polvo blanco con una pureza de un 99,7% (% área HPLC, procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1). No estaba presente nada de dímero en **1** puro. EM (m/z): 931,0

Ejemplo 3 a-g (Optimización de reactivos de acoplamiento):

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Gly-Leu-Gly-NH₂ (**1**)

De manera análoga al ejemplo 2, se realizaron las ciclaciones empleando los reactivos de acoplamiento como se enumeran en la tabla 2.

Tabla 2:

Ejemplo	Reactivo de acoplamiento	Rendimiento en mezcla de reacción (%)	Pureza en mezcla de reacción (% área HPLC)	Proporción de 1/dímero
3a	PyBOP	63	54,9	13,4
3b	PyAOP	63	52,7	23,2
3c	HBTU	45	51,0	12,4
3d	HATU	51	47,1	10,6
3e	HCTU	55	10,6	13,8
3f	COMU	26	11,5	28,0
3g	DMTMM	17	18,5	34,9

Ejemplo 4 a-g (Optimización de disolventes):

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Gly-Leu-Gly-NH₂ (**1**)

De manera análoga al ejemplo 2, se realizaron las ciclaciones empleando los disolventes como se enumeran en la tabla 3.

De manera análoga al ejemplo 2, se sintetizó el péptido cíclico puro **2** empleando los Fmoc-AA-ácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH

5 Escala de síntesis: 9,60 mmol (carga: véase el ejemplo 6a-d; resina 30,0 g)

Rendimiento: 40 % (después de purificación)

Pureza: 98,2 % (% área HPLC, procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1)

10

Tiempo de retención: 29,8 min (procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1)

EM (m/z): 971,5 (M+H)⁺

15 Se determinaron la pureza y el rendimiento del péptido lineal intermedio **LP2** (H-Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu-Pro-Leu-Gly-NH₂) empleando las cargas de resina/equivalentes de aminoácido como se enumeran en la tabla 5.

Tabla 5:

Ejemplo	Carga de resina (mmol/g)	Aminoácido (eq.)	Pureza de LP2 bruto (% área HPLC)	Rendimiento de LP2 bruto (%)
6a	0,32	4	79,0	90
6b	0,55	4	83,3	116
6c	0,55	2	78,5	108
6d	0,96	4	82,7	96

20

Ejemplo 7

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Pro-Leu-Gly-NH₂ (**2**)

25 Se realizó el ejemplo 7 de manera análoga al ejemplo 2, con la excepción de que se realizaron las ciclaciones empleando N-metilmorfolina como base.

a) Escisión de Fmoc:

30 Se cargó un reactor de SPPS (250 ml; sintetizador peptídico CS536XT ex CSBio) con resina PL-Rink (carga. 0,55 mmol/g, 10,0 g, 5,50 mmol) y piperidina al 20 % en DMF (100 ml). A continuación se agitó la mezcla a 25 °C durante 10 min. Después de extraer el disolvente, se añadió otra porción de piperidina al 20 % en DMF (100 ml) y se agitó la mezcla a 25 °C durante 30 min. Después de extraer el disolvente, se lavó la resina resultante con DMF (8 x 100 ml) para proporcionar resina PL-Rink sin Fmoc.

35

b) Acoplamiento de Fmoc-AA-derivados:

A la resina PL-Rink sin Fmoc, se le añadieron una solución de Fmoc-Gly-OH en HOBt/DMF 0,35 M (64,0 ml, 22,4 mmol), DIC 0,92 M en DMF (32,0 ml, 29,4 mmol) y piridina al 10 % en DMF (32,0 ml, 39,6 mmol) y se agitó a 25 °C durante 3 h. Después de extraer el disolvente, se lavó la resina resultante con DMF (4 x 100,0 ml) para proporcionar Fmoc-Gly-resina.

40

Se repitieron las etapas de escisión de Fmoc y acoplamiento de Fmoc-AA-derivado 8 veces empleando en lugar de Fmoc-Gly-OH, los siguientes Fmoc-aminoácido-derivados: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH para proporcionar Fmoc-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu(tBu)-Pro-Leu-Gly-resina. Se escindió una muestra de la resina (véase a continuación) para confirmar la masa correcta. EM (m/z): 1211,1 (M+H)⁺

45

c) Escisión de Fmoc:

50 Se llevó a cabo la escisión de Fmoc de la Gly terminal como se describe anteriormente. Después de extraer el disolvente, se lavó la resina resultante con DMF (8 x 100 ml), CH₂Cl₂ (3 x 100 ml) y MeOH (3 x 100 ml). Se secó la resina a 1 kPa (10 mbar) a 25 °C durante 1 día para dar H-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu(tBu)-Pro-Leu-Gly-resina (18,6 g). Se escindió una muestra de la resina (véase a continuación) para confirmar la masa correcta. EM (m/z): 989,7 (M+H)⁺

55

d) Desprotección global y escisión de resina:

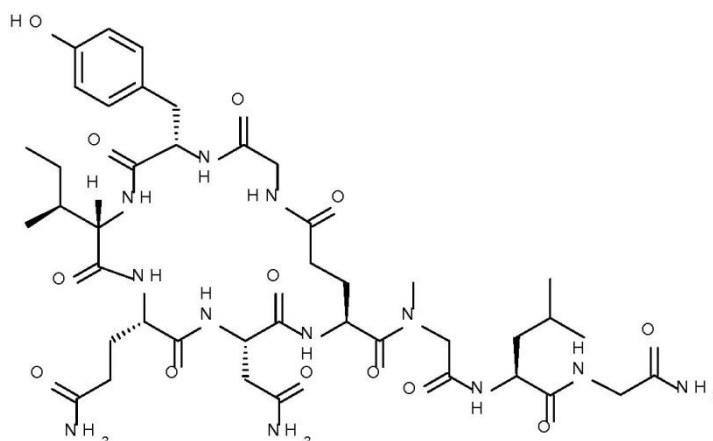
A una solución preenfriada (10-15 °C) de triisopropilsilano (3,00 ml) en TFA (48,0 ml) y agua (12,0 ml), se le añadió H-Gly-Tyr(tBu)-Ile-Gln(Trt)-Asn(Trt)-Glu(tBu)-Pro-Leu-Gly-resina (6,00 g) y se agitó a 25 °C durante 3 h. Se separó por filtración la resina y se concentró el filtrado a vacío. Se añadió el residuo a MetF (120 ml) y se agitó la mezcla a 25 °C durante 15 h. Se filtró la mezcla y se lavó la torta con MetF (60,0 ml) seguido de secado para dar H-Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu-Pro-Leu-Gly-NH₂ **LP2** (1,84 g) como un sólido blanco con una pureza de un 87,3 % (% área HPLC, procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1). Tiempo de retención: 23,9 min (procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1); EM (m/z): 989,7 (M+H)⁺

e) Ciclación en solución:

A una mezcla de H-Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu-Pro-Leu-Gly-NH₂ **LP2** (300 mg) en N-etilpirrolidona (3,60 ml) y NMM (0,167 ml, 1,52 mmol) se le añadió PyBOP (237 mg, 0,455 mmol) y se agitó a 25 °C durante 1 h. Para completar la conversión, se añadió otra porción de PyBOP (47,4 mg, 0,0910 mmol) y se agitó a la misma temperatura durante 1 h. Se añadió la mezcla resultante a una solución de MTBE (24,0 ml) y MetF (6,00 ml), y a continuación se agitó a 25 °C durante 15 h. Se filtró la mezcla y se lavó la torta con MTBE (15,0 ml). Se disolvió la torta en agua/MeCN (10/1, 3,3 ml) y se separaron por filtración los materiales no disueltos. Se liofilizó el filtrado para dar c[Gly-Tyr-Leu-Gln-Asn-Glu]-Pro-Leu-Gly-NH₂ bruto **2** (313 mg, ensayo 54,0 % en peso, rendimiento total de un 60 %) como un sólido blanco con una pureza de un 71,4 % (% área HPLC, procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1). EM (m/z): 971,5 (M+H)⁺

Ejemplo 8

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Sar-Leu-Gly-NH₂ (**3**)



c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Sar-Leu-Gly-NH₂

3

De manera análoga al ejemplo 2, se sintetizó el péptido cíclico puro **3** empleando los Fmoc-AA-ácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH

Escala de síntesis: 9,60 mmol (carga. 0,32 mmol/g, resina 30,0 g)

Rendimiento: 41 % (después de purificación)

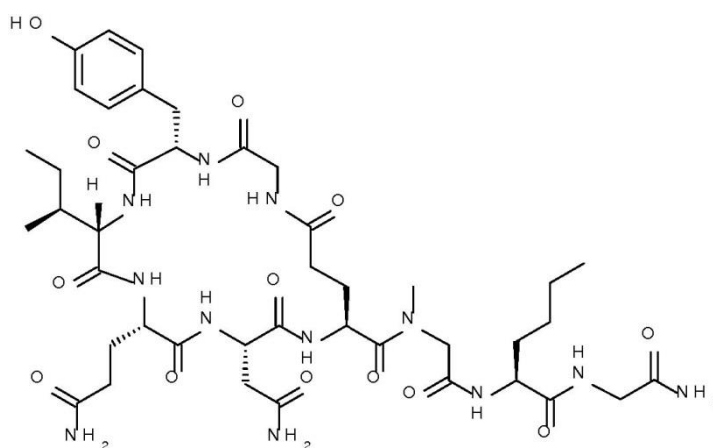
Pureza: 98,9 % (% área HPLC, procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1)

Tiempo de retención: 27,6 min (procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1)

EM (m/z): 945,5 (M+H)⁺

Ejemplo 9

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Sar-Nle-Gly-NH₂ (**4**)

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Sar-Nle-Gly-NH₂**4**

De manera análoga al ejemplo 2, se sintetizó el péptido cíclico puro **4** empleando los Fmoc-AA-ácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Nle-OH, Fmoc-Sar-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH

Escala de síntesis: 9,60 mmol (carga. 0,32 mmol/g, resina 30,0 g)

Rendimiento de un 41 % (después de purificación)

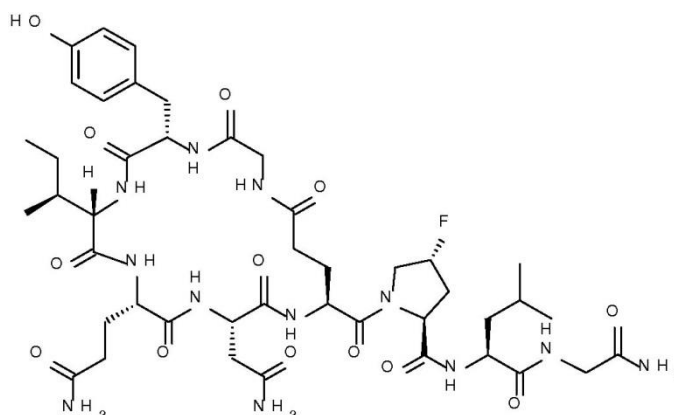
Pureza: 99,2 % (% área HPLC, procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1)

Tiempo de retención: 25,9 min (procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1)

EM (m/z): 945,5 (M+H)⁺

Ejemplo 10

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-trans-4-fluoro-Pro-Leu-Gly-NH₂ (**5**)

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-trans-4-fluoro-Pro-Leu-Gly-NH₂**5**

De manera análoga al ejemplo 2, se sintetizó el péptido cíclico puro **5** empleando los Fmoc-AA-ácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-trans-4-fluoro-Pro-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH

Escala de síntesis: 9,60 mmol (carga. 0,32 mmol/g, resina 30,0 g)

Rendimiento: 39 % (después de purificación)

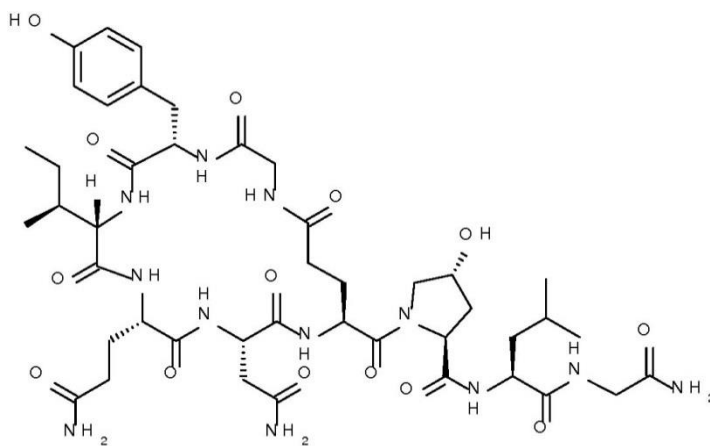
Pureza: pureza de un 98,8 % (% área HPLC, procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1)

Tiempo de retención: 25,7 min (procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1)

5 EM (m/z): 988,5 (M+H)⁺

Ejemplo 11

10 c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-trans-4-hidroxi-Pro-Leu-Gly-NH₂ (**6**)



c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-Pro-Leu-Gly-NH₂

6

De manera análoga al ejemplo 2, se sintetizó el péptido cíclico puro **6** empleando los Fmoc-AA-ácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-trans-4-*tert*-butoxi-Pro-OH, Fmoc-Glu(*t*Bu)-OH, Fmoc-Asn(*Trt*)-OH, Fmoc-Gln(*Trt*)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(*t*Bu)-OH, Fmoc-Gly-OH

15 Escala de síntesis: 9,60 mmol (carga. 0,32 mmol/g, resina 30,0 g)

Rendimiento: 22 % (después de purificación)

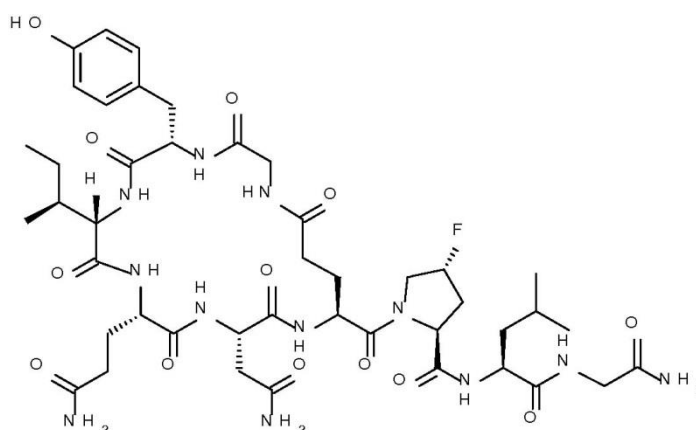
20 Pureza: pureza de un 98,7 % (% área HPLC, procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1)

Tiempo de retención: 23,3 min (procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1)

25 EM (m/z): 987,5 (M+H)⁺.

Ejemplo 12 (ciclación en fase sólida)

30 c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-trans-4-fluoro-Pro-Leu-Gly-NH₂ (**5**)

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-trans-4-fluoro-Pro-Leu-Gly-NH₂**5**

De manera análoga al ejemplo 1 empleando un sintetizador peptídico CS536XT de CSBio, se sintetizó el péptido cíclico puro **5** empleando los Fmoc-AA-ácidos: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-trans-4-fluoro-Pro-OH, Fmoc-Glu(OAll)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH. A lo largo de toda la síntesis, para la escisión de Fmoc se usó 4-metilpiperidina al 10 % en DMF en lugar de piperidina al 20 % en DMF, y se llevaron a cabo todos los acoplamiento aminoácidos en la secuencia lineal empleando HOPy en lugar de HOBt. En la etapa de ciclación sobre resina promovida por PyBOP final, se usó 4-metilmorfolina en lugar de DIPEA como base y se realizó la ciclación en DMF en lugar de NEP como disolvente. Se llevó a cabo la purificación por HPLC preparativa de c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-trans-4-fluoro-Pro-Leu-Gly-NH₂ bruto en una columna Kromasil-C18-100 (250 x 4,6 mm, tamaño de partícula 10 um, A: NH₄OAc 20 mM pH5, B: MeCN; flujo: 1 ml/min; isocrático 90/10 (A/B) durante 1 min, gradiente de 90/10 (A/B) a 80/20 (A/B) en 1 min, gradiente de 80/20 (A/B) a 75/25 (A/B) en 10 min, gradiente de 75/25 (A/B) a 10/90 (A/B) en 1 min, gradiente de 10/90 (A/B) durante 5 min, gradiente de 10/90 (A/B) a 90/10 (A/B) en 0,1 min, isocrático 90/10 (A/B) durante 6,9 min. Se diluyeron las fracciones recogidas con agua (1:1) y se concentró/desaló cargando en una columna Kromasil C18-100-10 acondicionada (agua/ACN 90/10) (250 x 4,6 mm) y se eluyó después de esto con agua/ACN (1:1). Se evaporaron las fracciones recogidas (UV 280 nm, valor umbral 1000 mAu) en evaporador giratorio para retirar el ACN y se liofilizó después de esto para proporcionar el péptido puro como un producto liofilizado blanco.

20 Escala de síntesis: 5,50 mmol (carga 0,55 mmol/g, resina 10,0 g)

Rendimiento: 34 % (después de purificación)

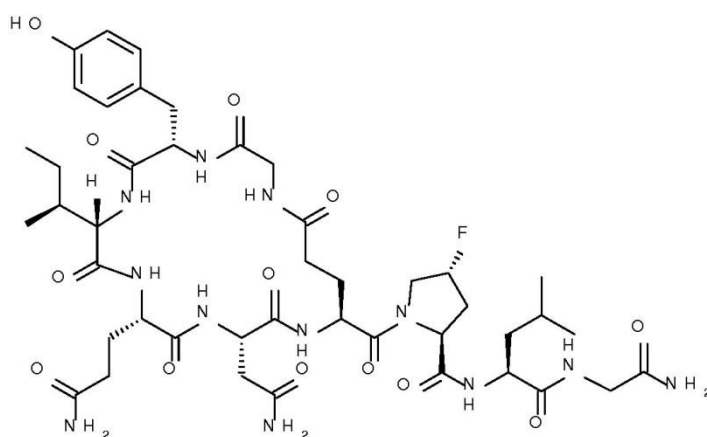
Pureza: pureza de un 98,8 % (% área HPLC, procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1)

25 Tiempo de retención: 25,3 min (procedimiento de HPLC véase el ejemplo 1)

EM (m/z): 989,5 (M+H)⁺

30 **Ejemplo 13 (ciclación en fase sólida)**

c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-trans-4-fluoro-Pro-Leu-Gly-NH₂ (**5**)



c[Gly-Tyr-Ile-Gln-Asn-Glu]-trans-4-fluoro-Pro-Leu-Gly-NH₂

5

De manera análoga al ejemplo 13, se sintetizó el péptido cíclico puro **5** empleando HOBt en lugar de HOPy a lo largo de toda la síntesis del péptido lineal sobre resina.

5

Escala de síntesis: 5,50 mmol (carga 0,55 mmol/g, resina 10,0 g)

Rendimiento: 25 % (después de purificación)

y sus correspondientes enantiómeros y/o isómeros ópticos de los mismos,

de acuerdo con el procedimiento:

5

b¹) se escinde el grupo Fmoc R⁵ con una solución de piperidina o 4-metilpiperidina en un disolvente orgánico adecuado;

10

b²) se efectúa la desprotección global y escisión de la resina en presencia de ácido trifluoroacético y un oxidante adecuado tal como tioanisol, anisol, fenol, triisopropilsilano, trietilsilano, etanoditiol o ditiotreitol;

15

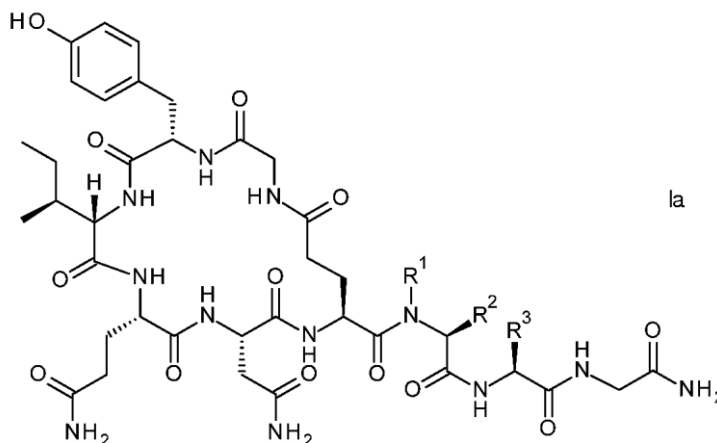
b³) se efectúa la ciclación de anillo en solución usando un agente de ciclación seleccionado de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio (PyAOP), hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uranio (HBTU), hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU), hexafluorofosfato de O-(6-clorobenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HCTU), hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxi)dimetilamino-morfolino-carbenio (COMU), 2-hidroxipiridina (HOPy) o cloruro de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triacin-2-il)-4-metilmorfolinio (DMTMM) en presencia de una base amina orgánica seleccionada de piridina, imidazol, N,N-diisopropiletilamina, trietilamina, N-metilmorfolina, N,N-dimetil-4-aminopiridina, 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno o 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano;

20

b⁴) opcionalmente se aísla el análogo de oxitocina de fórmula I así obtenido y se purifica.

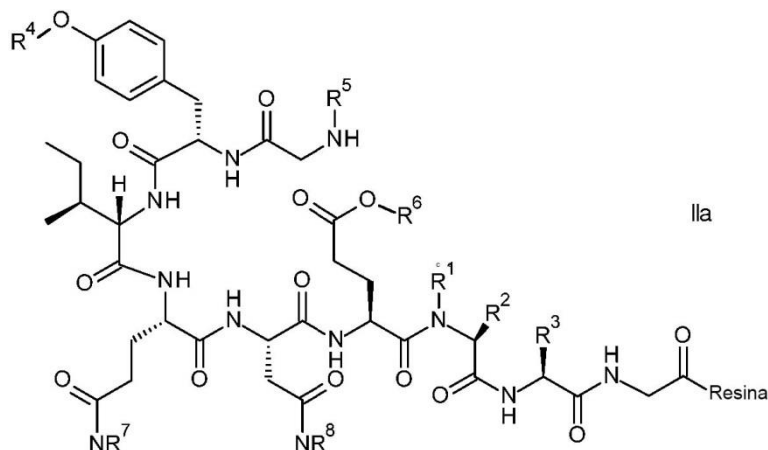
25

2. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el análogo de oxitocina tiene la fórmula la



en la que R¹, R² y R³ son como anteriormente y en el que el precursor peptídico unido a resina de fórmula II tiene la fórmula

30



en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸ son como anteriormente.

35

3. Procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2, en el que

R¹ es hidrógeno o alquilo C₁₋₄ y

R² es hidrógeno o alquilo C₁₋₄; o

R¹ y R² conjuntamente con el átomo de nitrógeno y de carbono al que están unidos forman un anillo pirrolidina de prolina que está opcionalmente sustituido con hidroxilo o halógeno;

R³ representa n-butilo o i-butilo;

R⁴ es t-butilo, alilo, tritilo, 2-clorotritilo, t-butiloxicarbonilo, t-butildifenilsililo o t-butildimetilsililo;

R⁵ es Fmoc;

R⁶ es ilo, 1-adamantilo, fenilisopropilo o t-butilo;

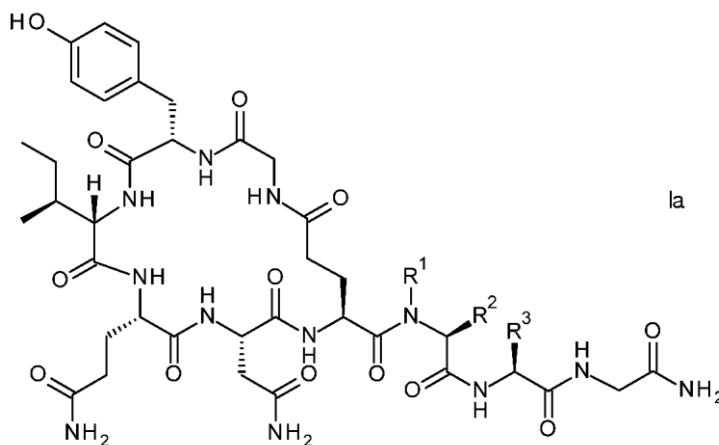
R⁷ es tritilo, 2-clorotritilo, 4-metiltritilo; y

R⁸ es tritilo, 2-clorotritilo, 4-metiltritilo.

4. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el precursor peptídico unido a resina de fórmula II se prepara sobre la resina por escisión de Fmoc repetida y acoplamiento de los respectivos aminoácidos protegidos con Fmoc.

5. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la resina es una resina 4-[(2,4-dimetoxifenil)Fmoc-aminometil]fenoxiacetamido-metilo.

6. Procedimiento de la reivindicación 1 para la preparación de análogos de oxitocina de fórmula Ia



en la que

R¹ es hidrógeno o alquilo C₁₋₄ y

R² es hidrógeno o alquilo C₁₋₄; o

R¹ y R² conjuntamente con el átomo de nitrógeno y de carbono al que están unidos forman un anillo pirrolidina de prolina que está opcionalmente sustituido con hidroxilo o halógeno;

R³ es n-butilo o i-butilo

y de sus correspondientes enantiómeros y/o isómeros ópticos de los mismos.