

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 939 036**

51 Int. Cl.:

C07K 1/30 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2020** **PCT/EP2020/051573**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2020** **WO20152246**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2020** **E 20700941 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2022** **EP 3914605**

54 Título: **Método de precipitación de péptidos**

30 Prioridad:

24.01.2019 EP 19153416

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

18.04.2023

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

HEIDL, MARC y

SCHAERER, THOMAS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 939 036 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de precipitación de péptidos

- 5 Se proporcionan métodos para la síntesis de péptidos. Los métodos incluyen una etapa de precipitación específica que facilita la filtración del péptido.

10 Los péptidos, tanto en solución como en fase sólida, en general se sinterizan del extremo C al N por condensación del grupo carboxilo de un aminoácido al grupo amino de otro. Sin embargo, los péptidos y aminoácidos a partir de los que se sintetizan los péptidos tienen a tener grupos funcionales de cadena lateral reactivos. Por tanto, cuando se sinteriza un péptido, es importante garantizar que el grupo amino respectivo reacciona selectivamente con el grupo carboxilo sin ninguna reacción secundaria en dichos grupos funcionales de cadena lateral, ya que esto podría alterar gravemente el rendimiento o incluso estropear el producto que se está sintetizando desde una perspectiva práctica. Para minimizar dichas reacciones secundarias, por lo tanto, la práctica convencional es enmascarar apropiadamente los grupos laterales reactivos y los extremos terminales de los reactantes para ayudar a garantizar que se produce la reacción deseada.

20 Como los respectivos grupos protectores (grupos protectores temporales) de amino se retiran varias veces durante la síntesis, su retirada debe hacerse, en consecuencia, en condiciones suaves. Mientras tanto, los grupos de cadena lateral reactivos de los reactantes aminoácido y péptido, incluyendo el material peptídico unido a resina, así como el material adicional a añadir a la cadena creciente, típicamente permanecen enmascarados con los grupos protectores de cadena lateral toda la síntesis (grupos protectores permanentes) y no solamente se retiran en la última etapa del proceso sintético.

25 Grupos protectores temporales bien conocidos son los grupos *terc*-butiloxycarbonilo (Boc) y 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc), que se escinden por ácidos débiles o bases débiles.

30 La escisión de los grupos protectores permanentes, así como la escisión de la resina, sin embargo, en general se ve influida por ácidos o bases fuertes, opcionalmente en presencia de un depurador y un disolvente. Después de la escisión, el péptido tiene que recuperarse de la solución de escisión.

35 Métodos típicos para recuperar péptidos implican el uso de química de ácido/sal. Por ejemplo, el péptido puede precipitarse en sal acuosa (tal como cloruro de sodio), y los sólidos entonces pueden recogerse (por ejemplo, por filtración al vacío), lavarse y secarse. Sin embargo, dichos métodos presentan problemas para la producción a escala comercial, incluyendo altos niveles de impurezas. Otros métodos de recuperación implican precipitación del péptido mediante la adición de un disolvente tal como, en particular, un disolvente de éter seguido de recogida del péptido precipitado por filtración. La precipitación con un disolvente de éter, sin embargo, a menudo da lugar a precipitados de péptido que obstruyen el aparato de filtración (por ejemplo, cuando el precipitado es demasiado fino) y/o son adherentes/pegajosos y, por tanto, complican o incluso evitan la filtración (por ejemplo, cuando el precipitado es gelatinoso). La solicitud de patente internacional WO 2005/063793 divulga que la precipitación de péptidos mediante alcohol mejora la capacidad de filtración.

45 Para producción a gran escala de péptidos, dichas cuestiones, por tanto, pueden influir enormemente en la viabilidad del esquema de síntesis de péptidos. Por consiguiente, hay una necesidad constante de procesos de síntesis de péptidos que puedan producir materiales peptídicos de interés comercial en cantidades de lotes grandes. La recuperación de material peptídico después de la síntesis, por ejemplo, por precipitación y posterior filtración, es un aspecto de la síntesis, en que se necesita una mejora adicional ya que las metodologías convencionales a menudo requieren aún amplios tiempos de filtración que, a su vez, influyen significativamente en los costes de producción.

50 Sorprendentemente, ahora se ha descubierto que los precipitados de péptidos preparados de acuerdo con los métodos de acuerdo con la presente invención pueden filtrarse mucho más rápido que los precipitados de acuerdo con métodos convencionales en la técnica. Por consiguiente, los métodos de acuerdo con la presente invención pueden usarse ventajosamente para proporcionar procesos a escala comercial mejorados para la síntesis y recuperación de péptidos.

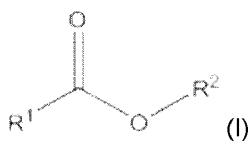
55 Por tanto, en una primera realización, la presente invención se refiere a un método de obtención de un péptido completamente desprotegido, comprendiendo dicho método las etapas consecutivas de

a.) sintetizar un intermedio peptídico que tenga al menos un grupo protector inestable en ácido

60 b.) retirar dicho grupo o grupos protectores usando un reactivo de escisión compuesto de un ácido y opcionalmente un depurador y/o un disolvente aprótico para formar una solución de péptido escindido (I), seguido de

c.) proporcionar un disolvente seleccionado del grupo de cloroformo, diclorometano o un disolvente de éster de fórmula (I)

65



en donde R¹ y R² independientemente entre sí son un grupo alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado o grupo cicloalquilo C₃-C₆ a la solución de péptido escindido (I) para formar una solución de péptido escindido (II), seguido de

d.) proporcionar una gente de precipitación seleccionado del grupo que consiste en al menos un disolvente de éter y al menos un disolvente hidrocarbonado, así como mezclas de los mismos en una cantidad suficiente para precipitar el péptido de la solución de péptido escindido (II) y

e.) recoger el péptido.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para precipitar un péptido que comprende las etapas consecutivas de: (a) proporcionar una composición que consiste esencialmente en un intermedio peptídico que tiene al menos un grupo protector inestable en ácido y un reactivo de escisión compuesto de un ácido y opcionalmente un depurador y/o un disolvente seguido de (b) proporcionar un disolvente seleccionado del grupo de cloroformo, diclorometano o un disolvente de éster de fórmula (I) como se define anteriormente a la composición para obtener una solución de péptido escindido (II), seguido de (c) proporcionar un agente de precipitación seleccionado del grupo que consiste en un disolvente de éter y un disolvente hidrocarbonado, así como mezclas de los mismos a la solución de péptido escindido (II) seguido de d.) recoger el péptido.

La expresión "que consiste esencialmente en", como se usa de acuerdo con la presente invención significa que la cantidad total de los ingredientes enumerados suma de forma ideal hasta un 100 % en peso. Sin embargo, no se excluye que puedan estar presentes pequeñas cantidades de impurezas o aditivos, con la condición de que la cantidad total de dichas impurezas o aditivos sea preferiblemente menor de un 3 % en peso, más preferiblemente menor de un 2 % en peso, muy preferiblemente menor de un 1 % en peso.

En la etapa b.) la adición del disolvente orgánico seleccionado del grupo de cloroformo, diclorometano o un disolvente de éster de fórmula (I) puede provocar la precipitación inicial del péptido. La cantidad del disolvente, sin embargo, se ajusta de modo que, en caso de dicha precipitación, el péptido vuelva a solubilizarse de nuevo para formar una solución de péptido escindido. La cantidad del disolvente orgánico puede ajustarla fácilmente un experto en la materia y puede variar ligeramente dependiendo de la secuencia peptídica y la temperatura aplicada en la etapa de dilución/resolubilización b.).

Preferiblemente, la etapa b.) se realiza a temperatura ambiente, es decir a una temperatura que varía de 18 a 25 °C.

La incorporación de la etapa b.) en la etapa de aislamiento del péptido escindido proporciona tiempos de filtración drásticamente reducidos en comparación con las técnicas de aislamiento previas que omiten la etapa de dilución/resolubilización como se ilustra en los ejemplos.

La expresión "intermedio peptídico que tiene al menos un grupo protector inestable en ácido", como se usa en este documento, se refiere a un péptido que comprende al menos un grupo protector inestable en ácido. Los intermedios peptídicos de acuerdo con la invención, por consiguiente, pueden protegerse completamente, es decir, todos los grupos reactivos de cadena lateral, así como los aminoácidos terminales apropiados incluyen grupos protectores inestables en ácido (incluyendo grupos protectores de extremo N, así como C). En otros aspectos, la invención, sin embargo, puede utilizarse también para recuperar péptidos en donde solamente todos los grupos reactivos de cadena lateral o solamente los aminoácidos terminales incluyen grupos protectores inestables en ácido. En caso de síntesis en fase sólida, la propia resina podría ser también inestable en ácido y, por tanto, se consideraría un grupo protector inestable en ácido. Preferiblemente, los intermedios peptídicos de acuerdo con la presente invención, sin embargo, comprenden al menos un grupo protector de cadena lateral inestable en ácido.

Un grupo protector (de cadena lateral) inestable en ácido se refiere a un resto químico acoplado al péptido, tal como preferiblemente a la cadena lateral (es decir el grupo R en la fórmula general de aminoácido H₂N-C(R)(H)-COOH) de un aminoácido, que ayuda a evitar reacciones secundarias indeseadas, tal como, por ejemplo, evita que una parte de la cadena reacciones con productos químicos usados en las etapas de síntesis de péptidos, procesamiento y similares, y que pueden retirarse con un ácido, opcionalmente en presencia de un depurador. La elección de un grupo protector (de cadena lateral) inestable en ácido adecuado puede depender de diversos factores, por ejemplo, el tipo de síntesis realizada, el procesamiento al que se someterá el péptido, y el producto intermedio o producto final deseado. El grupo protector (de cadena lateral) inestable en ácido también depende de la naturaleza del propio aminoácido. En general, un grupo protector (de cadena lateral) inestable en ácido se elige de modo que no se retire durante la desprotección de los grupos α-amino durante la síntesis. Por lo tanto, el grupo protector de α-amino y el grupo protector de cadena lateral típicamente no son iguales.

Ejemplos de grupos protectores (de cadena lateral) inestables en ácido adecuados de acuerdo con la presente invención incluyen *terc*-butilo (tBu), trifenilmetilo (trítico, trt), dimetoxitritilo (DMT), 2-clorotritilo (2-ClTrt), 1-ciclopropil-1-metiletilo (Dmcp), tetrahidropiranilo, t-butoxicarbonilo (BOC), metoxitrimetilbenceno sulfonilo- (Mtr-), 2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo- (Pmc-), 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobencofuran-5-sulfonilo- (Pbf-), adamantiloxicarbonilo, xantilo (Xan), bencilo, 3-etil 3-pentilo, 5-butil 5-nonilo y éster t-butílico, benciloxicarbonilo (Z), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Z) y t-amiloxicarbonilo (Aoc) sin limitarse a ellos.

Grupos protectores de cadena lateral inestables en ácido preferidos en todas las realizaciones de acuerdo con la presente invención incluyen el grupo t-Bu para los residuos aminoácidos tirosina, treonina, serina y ácido aspártico; el grupo trt para los residuos aminoácidos histidina, glutamina y asparagina; y el grupo Boc para los residuos aminoácidos lisina, DAB y triptófano y el grupo Mtr-, Pmc-, Bis-Boc o Pbf- para los residuos aminoácidos arginina.

Ácidos adecuados en los reactivos de escisión son todos ácidos que pueden desproteger completamente los grupos protectores de cadena lateral inestables en ácido. La selección de un ácido apropiado depende de los grupos protectores inestables en ácido respectivos usados y puede seleccionarlo fácilmente un experto en la materia. Ácidos ejemplares incluyen ácidos carboxílicos tales como ácido fórmico, ácido acético y ácido trifluoroacético, ácidos sulfónicos tales como ácido metanosulfónico (MSA), ácido trifluorometanosulfónico (ácido trifílico), ácido bencenosulfónico y ácido p-toluenosulfónico, bromuro de hidrógeno, trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (TMSOTf), bromuro de trimetilsililo (TMSBr), así como mezclas de los mismos. En todas las realizaciones de la presente invención, sin embargo, se prefiere el uso de ácido acético, ácido trifluoroacético y ácido metanosulfónico, así como mezclas de los mismos como ácido en la etapa b.). Lo más preferido es el uso de ácido trifluoroacético y/o ácido metanosulfónico.

La cantidad total de uno o más ácidos en el reactivo de escisión se selecciona preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 1000 mol-equivalentes con respecto al número de grupos protectores inestables en ácido presente en el intermedio peptídico, más preferiblemente de 10 a 500 mol-equivalentes, incluso más preferiblemente de 20 a 400 mol-equivalentes, y muy preferiblemente de 25 a 250 mol-equivalentes.

Depuradores adecuados a usar en el reactivo de escisión de acuerdo con la presente invención son todos depuradores habitualmente usados en la síntesis de péptidos tales como fenoles, por ejemplo, anisol, fenol; trialquilsilanos (más preferiblemente trialquil-C1-4-silanos), por ejemplo, trimetilsilano, trietilsilano o triisopropilsilano; tioles, por ejemplo, tioles alifáticos (alquiltioles), por ejemplo, etanoditiol, dodecanotiol o tioles aromáticos, por ejemplo, tioanisol y tiofenol y agua, así como mezclas de los mismos. En todas las realizaciones de la presente invención, sin embargo, se prefiere el uso de triisopropilsilano, dodecanotiol y agua, así como mezclas de los mismos.

La cantidad total de uno o más depuradores en el reactivo de escisión se selecciona preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 500 mol-equivalentes con respecto al número de grupos protectores inestables en ácido presente en el intermedio peptídico, más preferiblemente de 1 a 100 mol-equivalentes, incluso más preferiblemente de 2 a 50 mol-equivalentes, y muy preferiblemente de 3 a 40 mol-equivalentes.

En una realización preferida, el reactivo de escisión de acuerdo con la presente invención comprende obligatoriamente un depurador, incluso más preferiblemente el reactivo de escisión comprende un depurador seleccionado del grupo que consiste en agua, trietilsilano, triisopropilsilano o dodecanotiol, muy preferiblemente de agua o dodecanotiol.

Disolventes apróticos adecuados usados en el reactivo de escisión en todas las realizaciones de acuerdo con la presente invención incluyen hidrocarburos aromáticos líquidos (es decir, hidrocarburos aromáticos, que son líquidos a temperatura ambiente (es decir, 20 °C)) o halogenoalcanos-C₁₋₆, tales como, en particular, fluoro- y/o cloroalcanos-C₁₋₆, por ejemplo, cloroformo, diclorometano, dicloroetano, 1,1-difluoroetano, así como mezclas de los mismos. En todas las realizaciones de la presente invención, sin embargo, se prefiere el uso de tolueno o diclorometano. Preferiblemente, un disolvente aprótico está comprendido únicamente en el reactivo de escisión, cuando el depurador no forma una sola fase con el ácido en solitario, tal como en el caso de triisopropilsilano o dodecanotiol. Más preferiblemente, un disolvente aprótico está presente obligatoriamente cuando el depurador es triisopropilsilano.

Si está presente, la cantidad del disolvente aprótico en el reactivo de escisión se selecciona de modo que el péptido a desproteger se solubilice en el mismo a una temperatura seleccionada en el intervalo de 10 °C a 40 °C, preferiblemente de 0 °C a 30 °C, incluso más preferiblemente de 10 a 25 °C. Preferiblemente, si está presente, la cantidad del disolvente aprótico en el reactivo de escisión se selecciona en el intervalo de 0,25 a 10 ml/g de intermedio peptídico, más preferiblemente en el intervalo de 0,5 a 5 ml/g de intermedio peptídico, muy preferiblemente en el intervalo de 0,75 a 1,5 ml/g de intermedio peptídico. Si no se indica de otro modo, el término intermedio peptídico siempre se refiere al péptido completamente protegido.

La cantidad total del reactivo de escisión se selecciona adecuadamente en el intervalo de 0,5 a 50 ml/g de intermedio peptídico, más preferiblemente en el intervalo de 1 a 50 ml/g de intermedio peptídico, muy preferiblemente en el intervalo de 2,5 a 20 ml/g de intermedio peptídico (en donde la expresión intermedio peptídico se refiere al péptido completamente protegido).

Disolventes de éster adecuados de fórmula (I) en todas las realizaciones de acuerdo con la presente invención incluyen acetatos de alquilo C₁-C₁₀ lineales o ramificados, propionatos, iso-propionatos, butiratos y similares. Disolventes de éster preferidos de acuerdo con la presente invención son acetatos de alquilo C₁-C₄ lineales o ramificados tales como, por ejemplo, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de isopropilo, acetato de n-butilo y acetato de *terc*-butilo, propionatos de alquilo C₁-C₄ lineales o ramificados tales como, por ejemplo, propionato de metilo, propionato de etilo, propionato de propilo, propionato de n-butilo, propionato de *terc*-butilo, así como butiratos de alquilo C₁-C₄ tales como, por ejemplo, butirato de metilo, butirato de etilo, butirato de propilo, butirato de isopropilo y butirato de *terc*-butilo. En todas las realizaciones de la presente invención, sin embargo, se prefiere el uso de acetato de etilo, propionato de etilo, acetato de propilo y acetato de diisopropilo, así como mezclas de los mismos.

La cantidad total del disolvente orgánico seleccionado del grupo de diclorometano, cloroformo o un disolvente de éster de fórmula (I) puede variar dependiendo del intermedio peptídico respectivo y puede ajustarse fácilmente por un experto en la materia. Si el intermedio peptídico en primer lugar precipita tras la adición del disolvente orgánico, la cantidad del disolvente orgánico se selecciona de modo que el péptido vuelva a solubilizarse. Preferiblemente, en todas las realizaciones de la presente invención, la cantidad del disolvente orgánico se selecciona en el intervalo de 0,5 a 100 ml/g de intermedio peptídico, más preferiblemente en el intervalo de 1 a 50 ml/g de intermedio peptídico, muy preferiblemente en el intervalo de 5 a 35 ml/g de intermedio peptídico (en donde la expresión intermedio peptídico se refiere al péptido completamente protegido). Intervalos adecuados adicionales incluyen de 10 a 30 ml/g de intermedio peptídico o de 15 a 30 ml/g de intermedio peptídico.

Disolventes de éter adecuados como agente de precipitación en todas las realizaciones de acuerdo con la presente invención incluyen éter ciclopentil metílico, éter dibutílico, éter dietílico, éter diisopropílico, éter etil *terc*-butílico, éter metil *terc*-butílico, así como mezclas de los mismos. En todas las realizaciones de la presente invención, se prefiere el uso de éter dietílico y éter metil *terc*-butílico, así como mezclas de los mismos.

Disolventes hidrocarbonados adecuados como precipitación de acuerdo con la presente invención incluyen pentano, hexano, heptano y éter de petróleo, así como mezclas de los mismos. En todas las realizaciones de la presente invención, se prefiere el uso de éter de petróleo y hexano, así como mezclas de los mismos.

Si se usa una mezcla de disolventes de éter e hidrocarbonados como agente de precipitación, la cantidad total del disolvente hidrocarbonado en el agente de precipitación no debe exceder de un 35 % en volumen basado en el disolvente de éter usado. En una realización ventajosa particular de acuerdo con la presente invención, sin embargo, solamente se usa un disolvente de éter como agente de precipitación, ya que esto da lugar a resultados ventajosos particulares.

El agente de precipitación se proporciona a la solución de péptido escindido (II) en una cantidad suficiente para precipitar el péptido de la solución a una temperatura seleccionada en el intervalo de -10 °C a 40 °C, preferiblemente de 0 °C a 30 °C, incluso más preferiblemente de 10 a 25 °C y puede ajustarla fácilmente un experto en la materia. Preferiblemente, la cantidad de agente de precipitación se elige para proporcionar pureza mejorada del precipitado peptídico. En algunas realizaciones, el agente de precipitación se proporciona en una cantidad de al menos aproximadamente 0,25 volúmenes o en el intervalo de 0,25 a 8 volúmenes por volumen de la solución de péptido escindido (II). En realizaciones alternativas, el agente de precipitación se proporciona en una cantidad en el intervalo de 0,5 a 5 volúmenes por volumen de la solución de péptido escindido (II).

En una realización ventajosa de la presente invención, el reactivo de escisión consiste esencialmente en un ácido, muy preferiblemente en ácido trifluoroacético, muy preferiblemente en ácido trifluoroacético al 95 % con todas las definiciones y preferidas como se dan en este documento.

En otra realización ventajosa de la presente invención, el reactivo de escisión consiste esencialmente en al menos un ácido, muy preferiblemente en ácido trifluoroacético y/o MSA, dodecanotiol y tolueno, con todas las definiciones y preferencias como se dan en este documento.

Lo precipitado puede recogerse por métodos conocidos por los expertos en la materia, tal como por filtración o centrifugación. Preferiblemente, el precipitado se recoge por filtración, incluso más preferiblemente por filtración con una frita (vidrio frito).

Los métodos descritos en este documento son particularmente adecuados para mejorar aspectos de síntesis aumentada en escala de péptidos. En realizaciones preferidas, los métodos innovadores pueden proporcionar mejoras tales como reducción en el tiempo de procesamiento (síntesis), mejoras en el rendimiento de productos, así como mejoras en la pureza del producto.

Los métodos de la presente invención pueden usarse en relación con la síntesis de péptidos de cualquier longitud y/o secuencia adecuadas. Se entenderá que los péptidos de la invención pueden sintetizarse o prepararse por técnicas bien conocidas en la técnica tales como síntesis en fase sólida o en solución. Véase, por ejemplo, Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman and Co., NY, o M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, 1984, Springer Science & Business Media, así como referencias citadas en este documento.

En un aspecto ventajoso de acuerdo con la presente invención, los métodos de acuerdo con la presente invención se usan para recuperar péptidos que incorporan de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 3 a 12 residuos de uno o más aminoácidos o de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 residuos de uno o más aminoácidos. Opcionalmente pueden incorporarse en un péptido residuos de uno o más constituyentes monoméricos, oligoméricos y/o poliméricos. También pueden estar presentes enlaces no peptídicos. Estos enlaces no peptídicos pueden estar entre residuos aminoacídicos, entre un residuo aminoacídico y uno no aminoacídico, o entre dos residuos no aminoacídicos. Estos enlaces no peptídicos alternativos pueden formarse utilizando reacciones bien conocidas por los expertos en la materia, y pueden incluir, aunque sin limitación, enlaces imino, éster, hidrazida, semicarbazida, azo y similares.

Los aminoácidos a partir de los que derivan los péptidos pueden ser residuos aminoacídicos de origen natural, residuos aminoacídicos no naturales o combinaciones de los mismos. Los veinte residuos aminoacídicos de origen natural comunes son como sigue: A (Ala, alanina), R (Arg, arginina); N (Asn, asparagina); D (Asp, ácido aspártico); C (Cys, cisteína) Q (Gln, glutamina), E (Glu, ácido glutámico); G (Gly, glicina); H (His, histidina); I (Ile, isoleucina); L (Leu, leucina); K (Lys, lisina); M (Met, metionina); F (Phe, fenilalanina); P (Pro, prolina); S (Ser, serina); T (Thr, treonina); W (Trp, triptófano); Y (Tyr, tirosina); y V (Val, valina). También se contemplan aminoácidos infrecuentes de origen natural e incluyen, por ejemplo, selenocisteína y pirrolisina.

Los aminoácidos no naturales incluyen compuestos orgánicos que tienen una estructura y reactividad similares a las de aminoácidos de origen natural e incluyen, por ejemplo, D-aminoácidos, beta-aminoácidos, omega-aminoácidos (tal como ácido 3-aminopropiónico, ácido 2,3-diaminopropiónico, ácido 2,4-diaminobutírico (DAB), ácido 4-aminobutírico, y similares), gamma aminoácidos, análogos aminoacídicos cíclicos, derivados de propargilglicina, derivados de ácido 2-amino-4-cianobutírico sin limitarse a ellos.

Los péptidos de acuerdo con la presente invención pueden sustituirse en el grupo α -amino terminal con un resto lipófilo conectado al péptido mediante un enlace éster, amida, N-alquilo, N-alquenilo, sulfonilo, uretano, urea. En particular, el péptido sustituido con un resto lipófilo se refiere a derivados de N-acilo del mismo tales como, muy en particular, a derivados de N-palmitoilo, N-miristilo, N-estearoilo, N-benzoilo, N-acetilo o N-tetradecilaminocarbonilo del mismo. Derivados peptídicos particularmente preferidos en todas las realizaciones de la presente invención son derivados de N-benzoilo o N-tetradecilaminocarbonilo de los mismos.

Los métodos de la invención, que se refieren a precipitar péptidos, pueden integrarse en cualquier procedimiento de síntesis de péptidos, tal como síntesis en fase sólida, en fase líquida, síntesis híbrida o síntesis recombinante.

Cuando se utiliza síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), el péptido sintetizado puede escindirse del soporte sólido (tal como una resina) ante de la utilización de los métodos innovadores descritos en este documento. Como alternativa, el péptido sintetizado puede escindirse del soporte sólido simultáneamente con la retirada de los grupos protectores usando el reactivo de escisión de acuerdo con la presente invención.

Los reactivos de escisión que permiten la escisión del péptido de la resina, así como la retirada de los grupos protectores, son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden usarse soluciones de un 0,5 % a un 1 % de ácido trifluoroacético (TFA) en diclorometano o tolueno o una combinación de una solución de un 0,5 % a un 1 % de TFA en diclorometano y tolueno para escindir el péptido de la resina sin retirar los grupos protectores. Como alternativa, puede usarse HBr en ácido acético (HOAc), TFA al 50 % en diclorometano o TFA al 95 % con agua al 5 % u otros depuradores presentes para escindir el péptido y retirar simultáneamente los grupos protectores. El reactivo de escisión específico, los disolventes y el tiempo seleccionado para la escisión dependerán del péptido particular que se esté escindiendo y de los grupos protectores a retirar. Estos parámetros pertenecen a las habilidades de la técnica pertinente.

En una realización preferida particular de la presente invención, el intermedio peptídico es un intermedio peptídico que comprende al menos una arginina protegida en la cadena lateral con Mtr-, Pmc- o Pbf- y/o al menos una lisina protegida en la cadena lateral con Boc y/o ácido 2,3-diaminopropiónico y/o ácido 2,4-diaminobutírico (Dab) con todas las definiciones y preferidas como se dan en este documento.

En una realización preferida particular de la presente invención, el intermedio peptídico es un intermedio peptídico (I) que comprende al menos una arginina protegida en la cadena lateral con Mtr-, Pmc- o Pbf- y al menos un aminoácido que porta una cadena lateral aromática rica en electrones.

Las cadenas laterales ricas en electrones preferidas en dichos intermedios peptídicos (I) son "grupos arilalquilo-C₁-C₆" y/o "grupos heteroarilalquilo-C₁-C₆".

La expresión "grupo arilalquilo-C₁-C₆", como se usa en este documento, se refiere a un grupo -alquil-C₁-C₆-arilo (es decir, a un grupo alquilo-C₁-C₆ que está sustituido con un grupo arilo, es decir, el punto de fijación es el grupo alquilo), en donde el término "arilo" se refiere a un sustituyente aromático que contiene de 5 a 15 átomos de carbono y que contiene un solo anillo aromático o múltiples anillo aromáticos que se fusionan juntos, se unen directamente o se une

indirectamente (de modo que los diferentes anillos aromáticos se unen a un grupo común tal como un grupo metileno o etileno). Grupos arilo particularmente ventajosos de acuerdo con la presente invención contienen de 6 a 12 átomos de carbono que contienen un solo anillo aromático o múltiples anillos aromáticos que se fusionan juntos o se unen directamente. Los residuos arilo más preferidos en todas las realizaciones de la presente invención son fenilo, naftilo y bifenilo. Grupos arilalquilo-C₁-C₆ particularmente ventajosos en todas las realizaciones de la presente invención son grupos arilalquilo-C₁-C₂ tales como, en particular, fenil(m)etilo o naftil(m)etilo.

La expresión "grupo heteroarilalquilo-C₁-C₆" se refiere a un -alquil-C₁-C₆-heteroarilo (es decir, a un grupo alquilo-C₁-C₆ que está sustituido con un grupo heteroarilo, es decir, el punto de fijación es el grupo alquilo), en donde el término "heteroarilo" se refiere a un anillo aromático de 5, 6 o 7 miembros que contiene uno o más heteroátomos, concretamente, N, O o S; estos anillos heteroaromáticos pueden fusionarse a otros sistemas aromáticos. Anillos heteroaromáticos particularmente preferidos abarcan imidazol, indol, piridina y quinolina.

Los residuos arilo, respectivamente heteroarilo, pueden estar, independientemente entre sí, sin sustituir o sustituidos con uno o más sustituyentes. En todas las realizaciones de la presente invención, dichos sustituyentes se seleccionan preferiblemente de halógeno, hidroxilo, nitro, ciano, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆ y alcaniloxi C₁-C₆. Más preferiblemente en todas las realizaciones de la presente invención, los residuos arilo, respectivamente heteroarilo, están, independientemente entre sí, sin sustituir o sustituidos con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en F, Cl, hidroxilo, ciano, alquilo C₁-C₃, alcoxi C₁-C₃ y alcaniloxi C₁-C₃ tales como, en particular, sin sustituir o sustituidos con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en F o hidroxilo. Más preferiblemente, en todas las realizaciones de la presente invención, los residuos arilo y heteroarilo están sin sustituir o sustituidos con F, hidroxilo o nitro.

En todos los intermedios peptídicos (I) el grupo arilalquilo-C₁-C₆ ventajoso particular es grupos arilalquilo-C₁-C₂, que están preferiblemente sin sustituir o sustituidos con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo de fluoro (F), hidroxilo (OH) o nitro (NO₂). El grupo arilalquilo-C₁-C₆ más preferido en todas las realizaciones de la presente invención es fenil(m)etilo, 4-hidroxifenil(m)etilo, 3-nitro-4-hidroxifenil(m)etilo o naftil(m)etilo tal como, en particular, fenilmetilo, 4-hidroxifenil(m)etilo, 3-nitro-4-hidroxifenilmetilo o 1- o 2-naftilmetilo.

En todos los intermedios peptídicos (I), el grupo heteroarilalquilo-C₁-C₆ más preferido es grupos heteroarilalquilo-C₁-C₂ tales como grupos (1H-indol-3-il)(m)etilo, (1H-imidazol-4-il)(m)etilo, (piridin-2-il)(m)etilo, (piridin-3-il)(m)etilo, (quinolin-2-il)(m)etilo y (quinolin-3-il)(m)etilo que están preferiblemente sin sustituir o sustituidos con uno o dos sustituyentes seleccionados del grupo de F (fluoro), hidroxilo (OH) o nitro (NO₂). Los más preferidos en todas las realizaciones de la presente invención son (1H-indol-3-il)(m)etileno o (1H-imidazol-4-il)(m)etileno.

En todos los intermedios peptídicos (I), los aminoácidos más preferidos que portan una cadena lateral aromática rica en electrones se seleccionan del grupo de D/L-histidina, D/L-triptófano, 6-fluoro-triptófano, 5-hidroxil-triptófano, D/L-fenilalanina, D/L-tirosina, D/L-m-nitrotirosina, D/L-O-etil-tirosina, D/L-3-(2-naftil)-alanina. Aminoácidos particularmente ventajosos que portan una cadena lateral aromática rica en electrones se seleccionan del grupo de D/L-histidina, D/L-fenilalanina, D/L-tirosina y D/L-triptófano, así como D/L-tirosina O-alkilada-C₁-C₆; m/p-Cl/Br/ID/L-fenilalanina; y 4-/5-/6-/7-OH/F/Cl/Br/metil-D/L-triptófano. Las cadenas laterales ricas en electrones más preferidas en todas las realizaciones de la presente invención son las de D/L-histidina, D/L-triptófano, D/L-tirosina, D/L-triptófano, 5-hidroxil D/L-triptófano y 6-fluoro D/L-triptófano. Está bien comprendido que el término D/L abarca los respectivos D-aminoácidos, L-aminoácidos, así como mezclas de los mismos.

En todas las realizaciones de la presente invención, muy preferiblemente el intermedio peptídico (I) que comprende una arginina protegida en la cadena lateral con Mtr-, Pmc- o Pbf- también contiene al menos un aminoácido que porta una cadena lateral aromática rica en electrones seleccionada del grupo de D/L-histidina, D/L-triptófano, tirosina, D/L-6-fluoro-triptófano y D/L-5-hidroxil-triptófano.

Incluso más preferiblemente, el intermedio peptídico (I) es un di- a un hexapéptido, es decir, un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido, un pentapéptido o un hexapéptido.

En una realización preferida adicional, la arginina protegida en la cadena lateral con Mtr-, Pmc- o Pbf- y el al menos un aminoácido que porta una cadena lateral aromática rica en electrones en el intermedio peptídico (I) están separados por como mucho 3 aminoácidos, preferiblemente por como mucho dos aminoácidos y más preferiblemente por como mucho un aminoácido. En todas las realizaciones de la presente invención, sin embargo, el aminoácido rico en electrones está muy preferiblemente adyacente directamente a la arginina protegida en la cadena lateral con Mtr-, Pmc- o Pbf-.

Incluso más preferiblemente, en todas las realizaciones de la presente invención, el intermedio peptídico (I) es un intermedio peptídico (II) que comprende al menos un resto de arginina protegido con Pbf y al menos un resto aminoácido seleccionado del grupo de tirosina, histidina (preferiblemente protegida con Trt) y/o triptófano, cuyo resto de histidina, tirosina, respectivamente triptófano está preferiblemente como mucho a dos, más preferiblemente como mucho a uno, tal como en particular directamente adyacente al resto de arginina protegido. Los aminoácidos tirosina, histidina y/o triptófano particularmente preferidos son histidina, tirosina, triptófano, 5-hidroxitriptófano y 6-fluoro

triptófano, así como mezclas de los mismos. Está bien comprendido que, como se menciona anteriormente, el resto de arginina protegido con Pbf, así como los restos aminoácidos, puede estar en configuración L o D, o ser mezclas de ambas configuraciones (dentro del péptido).

Intermedios peptídicos (I) particularmente preferidos, respectivamente (II) de acuerdo con la presente invención son Boc-Trp-Arg(Pbf)-OH, Ac-Arg(Pbf)-His(Trt)-Phe-OH, TFA*H-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Pro-OH, Boc-rac-6FTrp-Gly-Arg(Pbf)-Glu(OtBu)-OH, Boc-Tyr(Et)-Arg(Pbf)-Ala-Phe-OH, Ac-5-(OH)Trp-Ala-Arg(Pbf)-Ser(tBu)-Leu-Phe-OH, Boc-Arg(Mtr)-Tyr(tBu)-Phe-OH, Boc-2Nal-Leu-Arg(Pbf)-Phe-OH, Ac-Arg(Pbf)-Met-m(NO₂)Tyr-Pro-OH y Bz-Gly-His(Trt)-D-Phe-Arg(Pbf)-D-Trp-N(Pr)₂, Bz-Gly-His-D-Phe-Arg(Pbf)-D-Trp-NPr₂, Bz-Gly-His(Trt)-D-Phe-Arg(Pbf)-D-Trp(Boc)-NPr₂. El intermedio peptídico (I) más preferido, respectivamente (II) es Bz-Gly-His(Trt)-D-Phe-Arg(Pbf)-Trp-NPr₂.

En otra realización preferida particular de la presente invención, el intermedio peptídico es un intermedio peptídico (III) que comprende al lado de la al menos una lisina protegida en la cadena lateral con Boc y/o ácido 2,3-diaminopropiónico y/o ácido 2,4-diaminobutírico (Dab) y/o al menos una valina o leucina o isoleucina. Incluso más preferiblemente, dichos intermedios peptídicos (III) son intermedios peptídicos (IV) que consiste únicamente en lisina protegida en la cadena lateral con Boc o ácido 2,4-diaminobutírico y valina.

Incluso más preferiblemente, el intermedio peptídico (III) y (IV) es un di- a un hexapéptido, es decir, un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido, un pentapéptido o un hexapéptido.

Los intermedios peptídicos (III) y (IV) más preferidos de acuerdo con la presente invención son TDAC-Dab(Boc)-Val-Dab(Boc)-OH, TDAC-Dab(Boc)-Val-Dab(Boc)-O-resina y Ac-Lys(Boc)-Val-Lys(Boc)-Val-Lys(Boc)-Val-OH.

La invención se ilustra adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, en que todos los porcentajes son en peso basado en el peso total salvo que se indique otra cosa.

Ejemplo

Abreviaturas

Ac	acetilo
Arg	arginina
Boc	<i>tert</i> -butiloxycarbonilo
Bz	benzoílo
DCM	diclorometano
D-Phe	D-fenilalanina
EtOAc	acetato de etilo
EtOPr	propionato de etilo
Et ₂ O	éter dietílico
Gly	glicina
iPropOAc	acetato de isopropilo
min	minuto
MSA	ácido metanosulfónico
MTBE	éter metil <i>tert</i> -butílico
Pbf	2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofurano-5-sulfonilo
PrOAc	acetato de propilo
TFA	ácido trifluoroacético
Trp	triptófano
Trt	tritilo
Val	valina

Método convencional (de referencia):

El péptido protegido respectivo (800 mg) como se resume en la tabla 1 y 2 se puso en un matraz. Después de ello, el reactivo de escisión (ref 1: 0,8 ml de tolueno, 387 µl de dodecanotiol, 245 µl de MSA y 4,15 ml de TFA al 100 %; ref 2 y 3: 5,0 ml de TFA al 95 %) se añadió al péptido y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 1 h para formar la solución de péptido escindido (I).

Después, la solución de péptido escindido (I) se transfirió a 43 ml de MTBE, provocando la precipitación del péptido escindido. La suspensión de péptido resultante se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 min. Después de ello, la suspensión de péptido se transfirió a una fritta sinterizada de tamaño de poro G4. El nivel de líquido se marcó y se aplicó presión reducida de 30 kPa (300 mbar) a la fritta. Después de que el nivel de líquido descendiera hasta 2 cm (medido desde la parte superior de la fritta), se registró el tiempo de filtración hasta que todo el líquido se retiró de la fritta.

Método de acuerdo con la invención:

- 5 El péptido protegido respectivo (800 mg) se puso en un matraz. Después de ello, el reactivo de escisión (I-1 a I-10: 0,8 ml de tolueno, 387 µl de dodecanotiol, 245 µl de ácido metanosulfónico y 4,15 ml de TFA al 100 %; I-11 y I-1: 5,0 ml de TFA al 95 %) se añadió al péptido y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 1 h para formar la solución de péptido escindido (I). Después, la solución de péptido escindido (I) se transfirió a un disolvente orgánico como se resume en la tabla 1 y 2 (que, en el caso de I-5, I-6, I-7, I-11, I-12, I-13 provocó una precipitación inicial del péptido, que después se solubilizó de nuevo). La agitación se continuó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) produciendo una solución de péptido escindido (II) (aproximadamente 15 min). Después, el agente de precipitación se añadió a la solución de péptido escindido (II) y la suspensión de péptido resultante se agitó durante otros 15 min.
- 10 Después de ello, la suspensión de péptido se transfirió a una frita sinterizada de tamaño de poro G4. El nivel de líquido se marcó y se aplicó presión reducida de 30 kPa (300 mbar) a la frita. Después de que el nivel de líquido descendiera hasta 2 cm (medido desde la parte superior de la frita), se registró el tiempo de filtración hasta que todo el líquido se retiró de la frita.

Tabla 1: Desprotección de Bz-Gly-His(Trt)-D-Phe-Arg(Pbf)-Trp-NPr₂

n. ^o	R-1	I-1	I-2	I-3	I-4	I-5	I-6	I-7	I-8	I-9	I-10
EtOAc ¹		21,5	21,5	21,5	21,5						21,5
EtOPr ¹						21,5					
PrOAc ¹							21,5				
iPropOAc ¹								21,5			
DCM ¹									10,8		
CHCl ₃ ¹										21,5	
MTBE ²	43	21,5				21,5	21,5	21,5	32,3	21,5	
Et ₂ O ²			21,5								13,3
éter diisopropílico ²				21,5							
éter de petróleo ²					21,5						
tolueno ²											8,3
Tiempo de filtración [min]	80	7	2	2	34	4	5	22	63	1	1
¹ disolvente orgánico [ml]											
² agente de precipitación [ml]											

Tabla 2: Desprotección de TDAC-Dab(Boc)-Val-Dab(Boc)-OH (R-2 e I-11 e I-12) respectivamente Ac-Lys(Boc)-Val-Lys(Boc)-Val-Lys(Boc)-Val-OH (R-3 e I-13)

n. ^o	R-2	I-11	I-12	R-3	I-13
EtOAc ¹		21,5	21,5		21,5
MTBE ²	43	21,5			
éter i-propílico ²			21,5	43	21,5
Tiempo de filtración [min]	67	0,6	0,5	72	58
¹ disolvente orgánico [ml]					
² agente de precipitación [ml]					

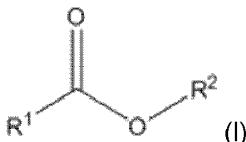
REIVINDICACIONES

1. Un método de obtención de un péptido completamente desprotegido, comprendiendo dicho método las etapas de

a.) sintetizar un intermedio peptídico que tenga al menos un grupo protector inestable en ácido

b.) retirar dicho grupo o grupos protectores usando un reactivo de escisión compuesto de un ácido y opcionalmente un depurador y/o un disolvente aprótico para formar una solución de péptido escindido (I), seguido de

c.) proporcionar un disolvente orgánico seleccionado del grupo de cloroformo, diclorometano o un disolvente de éster de fórmula (I)



en donde R¹ y R² son independientemente entre sí un grupo alquilo C₁-C₁₀ lineal o ramificado o grupo cicloalquilo C₃-C₆ a la solución de péptido escindido (I) para formar una solución de péptido escindido (II), seguido de

d.) proporcionar un agente de precipitación seleccionado del grupo que consiste en al menos un disolvente de éter y al menos un disolvente hidrocarbonado, así como mezclas de los mismos en una cantidad para precipitar el péptido de la solución de péptido escindido (II) y

e.) recoger el precipitado.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el ácido en la etapa b.) se selecciona del grupo de ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, un ácido sulfónico, bromuro de hidrógeno, trifluorometanosulfonato de trimetilsililo, bromuro de trimetilsililo, así como mezclas de los mismos, preferiblemente de ácido acético, ácido trifluoroacético y ácido metanosulfónico, así como mezclas de los mismos.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** la cantidad del ácido se selecciona en el intervalo de 0,1 a 1000 mol-equivalentes con respecto al número de grupos protectores inestables en ácido presentes en el intermedio peptídico, más preferiblemente de 10 a 500 mol-equivalentes, incluso más preferiblemente de 20 a 400 mol-equivalentes.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** el depurador se selecciona del grupo de fenoles, trialkilsilanos, tioles y agua, así como mezclas de los mismos, preferiblemente de triisopropilsilano, dodecanotiol y agua, así como mezclas de los mismos.

5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** la cantidad del depurador se selecciona en el intervalo de 0,1 a 500 mol-equivalentes con respecto al número de grupos protectores inestables en ácido presentes en el intermedio peptídico, más preferiblemente de 1 a 100 mol-equivalentes, incluso más preferiblemente de 2 a 50 mol-equivalentes.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** el disolvente aprótico en el reactivo de escisión se selecciona del grupo de hidrocarburos aromáticos líquidos o halogenoalcanos-C₁₋₆, así como mezclas de los mismos.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** la cantidad del disolvente aprótico se selecciona en el intervalo de 0,25 a 10 ml/g de intermedio peptídico, más preferiblemente en el intervalo de 0,5 a 5 ml/g de intermedio peptídico, muy preferiblemente en el intervalo de 0,75 a 1,5 ml/g de intermedio peptídico.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** la cantidad del reactivo de escisión se selecciona en el intervalo de 0,5 a 50 ml/g de intermedio peptídico, más preferiblemente en el intervalo de 1 a 50 ml/g de intermedio peptídico, muy preferiblemente en el intervalo de 2,5 a 20 ml/g de intermedio peptídico.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** la cantidad del disolvente orgánico en la etapa c.) se selecciona en el intervalo de 0,5 a 100 ml/g de intermedio peptídico, más preferiblemente en el intervalo de 1 a 50 ml/g de intermedio peptídico, muy preferiblemente en el intervalo de 5 a 35 ml/g de intermedio peptídico.

10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** el disolvente de éster de fórmula (I) se selecciona del grupo de acetato de etilo, propionato de etilo, acetato de propilo y acetato de diisopropilo, así como mezclas de los mismos.
- 5 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** el disolvente de éster en la etapa d.) se selecciona del grupo de éster ciclopentil metílico, éster dibutílico, éster dietílico, éster diisopropílico, éster etil *terc*-butílico, éster metil *terc*-butílico, así como mezclas de los mismos, preferiblemente de éster dietílico y éster metil *terc*-butílico, así como mezclas de los mismos.
- 10 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** el péptido incorpora de 2 a 20, preferiblemente de 2 a 15, más preferiblemente de 3 a 12, muy preferiblemente de 3 a 6 residuos de uno o más aminoácidos.
- 15 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** el péptido se sustituye en el grupo α -amino terminal con un resto lipófilo seleccionado del grupo de restos acetilo, benzoilo o tetradecilaminocarbonilo.
- 20 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** el intermedio peptídico comprende al menos una arginina protegida en la cadena lateral con Mtr-, Pmc- o Pbf- y/o al menos una lisina protegida en la cadena lateral con Boc, ácido 2,3-diaminopropiónico o ácido 2,4-diaminobutírico.
- 25 15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado por que** el intermedio peptídico se selecciona del grupo de Bz-Gly-His(Trt)-D-Phe-Arg(Pbf)-D-Trp-N(Pr)₂, Bz-Gly-His-D-Phe-Arg(Pbf)-D-Trp-N(Pr)₂, Bz-Gly-His-D-Phe-Arg(Boc)₂-D-Trp-N(Pr)₂, Bz-Gly-His(Trt)-D-Phe-Arg(Boc)₂-D-Trp-N(Pr)₂, TDAC-Dab(Boc)-Val-Dab(Boc)-OH, TDAC-Dab(Boc)-Val-Dab(Boc)-O^tBu, TDAC-Dab(Boc)-Val-Dab(Boc)-O-resina, Ac-Lys(Boc)-Val-Lys(Boc)-Val-Lys(Boc)-Val-OH.