



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 266 104**

51 Int. Cl.:
C07K 7/23 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01272223 .7**

86 Fecha de presentación : **19.12.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1343808**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.09.2003**

54 Título: **Procedimiento para la síntesis de un péptido LRRH.**

30 Prioridad: **22.12.2000 IE 20001079**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **Ipsen Manufacturing Ireland Limited
Blanchardstown Industrial Park
Blanchardstown, Dublin 15, IE**

72 Inventor/es: **Jackson, Steven, Allen**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 266 104 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la síntesis de un péptido LHRH.

5 **Campo técnico**

Esta invención se refiere a un procedimiento para la síntesis de un péptido que tiene un resto Trp usando una fase sólida.

10 **Antecedentes de la técnica**

La hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) es un neurotransmisor producido por el hipotálamo que estabiliza la secreción de la lutropina (LHRH) y la hormona estimulante del folículo (FSH) de la glándula pituitaria, que a su vez estimula la síntesis de hormonas esteroides, tal como la testosterona, de las gónadas. Muchos análogos del péptido LHRH (por ejemplo, agonistas y antagonistas) actualmente son comercializados para el tratamiento de la endometriosis, el cáncer de próstata, la pubertad precoz, y otros trastornos mediados hormonalmente. La síntesis de tales análogos de LHRH es difícil y cara.

La síntesis de péptidos en fase sólida fue introducida en 1963 con la intención de superar muchos de los problemas de la purificación de los intermedios asociados con la síntesis de péptidos en fase de disolución. Stewart, *et al.*, Solid Phase Peptide Synthesis (Compañía Pierce Chemical, 2ª ed.) 1984. Durante la síntesis en fase sólida, los aminoácidos son montados (es decir, acoplados) en un péptido de cualquier secuencia deseada a la vez que un extremo de la cadena (es decir, el extremo C) se ancla a un soporte insoluble. Una vez que la secuencia deseada ha sido unida sobre el soporte, el péptido entonces se separa (es decir, se escinde) del soporte.

La patente de EE.UU. N° 4.010.125 (1977) describe la síntesis de [D-Trp⁶]-LHRH en el cual las cadenas laterales de cuatro de los diez restos del agonista de LHRH son protegidas (por ejemplo, L-histidil(tosilo), seril(bencilo), tirosil (2,6-di-Cl-Bzl), y L-arginil(tosilo)). Sin embargo, Coy, *et al.*, *Int. J. Peptide Protein Res.* **14**:359 (1979) más tarde publicaron la síntesis de un número de otros análogos de LHRH en los que la protección de la cadena lateral mínima, por ejemplo, sólo la protección salina de arginina (es decir, Arg.HCl), produjo un rendimiento superior a la síntesis protegida correspondiente. La presente invención se refiere al descubrimiento de que, a pesar de la tendencia en la técnica de no proteger las cadenas laterales de los aminoácidos en la síntesis de los análogos de LHRH, la protección del resto de triptófano durante la síntesis en fase sólida realmente mejora de hecho el rendimiento de los análogos de LHRH que tienen un resto de triptófano (por ejemplo, [D-Trp⁶]-LHRH).

La patente de EE.UU. N° 4.569.927 describe péptidos, incluyendo decapeptidos. En tales péptidos se requiere que D-Phe sea el segundo aminoácido en la secuencia. No hay descripción de derivados de LHRH bioactivos que tengan histidina en la segunda posición del resto.

El documento DE 393 1731 describe la síntesis en fase sólida de [D-Trp⁶]-LHRH en resina poliacrílica. La síntesis tiene la ventaja de las propiedades hidrófilas inherentes a las resinas poliacrílicas, al contrario de las resinas de poliestireno.

El documento BE 904 458 describe la síntesis en fase sólida de [D-Trp⁶]-LHRH en el que el grupo indol de triptófano se protege con formilo y en el que el péptido se une al polímero de bencilhidrilamino de un copolímero de bencilhidrilamino-poliestireno-1%-divinilbenceno. El polímero de bencilhidrilamino tiene propiedades hidrófilas.

Descripción de la invención

50 En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar un péptido de la fórmula (I),



55 en el que el resto His se protege con un grupo tosilo y el indol-NH de cualquier resto de Trp es protegido, lo que comprende las etapas de:

(a) unir una sal de cesio de Boc-Gly en una resina de poliestireno clorometilada para proporcionar Boc-Gly-resina;

60 (b) desbloquear la Boc-Gly-resina mezclando la Boc-Gly-resina con una mezcla de un ácido orgánico Boc-desbloqueante para proporcionar una sal de ácido orgánico de H₂N-Gly-resina;

(c) neutralizar la sal de ácido orgánico de H₂N-Gly-resina con una base para proporcionar H₂N-Gly-resina;

65 (d) acoplar H₂N-Gly-resina con un aminoácido Boc- α -amino protegido, correspondiendo dicho aminoácido protegido al aminoácido definido por la fórmula (I) en el orden mostrado del extremo C al extremo N, lo que comprende,

ES 2 266 104 T3

- (i) hacer reaccionar H₂N-Gly-resina con un aminoácido Boc- α -amino protegido en presencia de un agente de acoplamiento de péptidos para proporcionar un producto acoplado Boc-bloqueado;
- 5 (ii) desbloquear el grupo Boc del producto acoplado Boc-bloqueado mezclando el producto acoplado Boc-bloqueado con un ácido orgánico Boc-desbloqueante para proporcionar un producto acoplado;
- (iii) hacer reaccionar el producto acoplado con un aminoácido Boc- α -amino protegido siguiente en presencia de un agente de acoplamiento de péptidos para proporcionar un producto acoplado Boc-bloqueado;
- 10 (iv) desbloquear el grupo Boc del producto acoplado Boc-bloqueado mezclando el producto acoplado Boc-bloqueado con un ácido orgánico Boc-desbloqueante para proporcionar un producto acoplado siguiente;
- 15 (v) repetir las etapas (d)(iii) y (d)(iv) hasta que el aminoácido del extremo N del péptido de fórmula (I) hayan sido acoplado, el grupo Boc del aminoácido del extremo N haya sido desbloqueado y el grupo protector de la cadena lateral de tosilo del resto His haya sido eliminado para proporcionar una péptido-resina completado protegido;
- (e) escindir y desproteger el péptido-resina completado protegido para proporcionar un péptido de fórmula (I), que comprende:
- 20 (i) preparar una solución del péptido-resina completado protegido en una mezcla de metanol/disolvente aprótico polar inerte;
- 25 (ii) enfriar la solución de aproximadamente 0°C a 10°C;
- (iii) hacer burbujear gas de amoníaco o gas etilamina despacio en la solución y mantener el enfriamiento hasta que la solución esté bien saturada con el amoníaco para proporcionar una solución saturada;
- 30 (iv) mezclar la solución saturada sin enfriar durante aproximadamente 15-36 horas hasta que >95% del éster de metilo libre sea convertido en la amida correspondiente, cuando se use gas de amoníaco, o la correspondiente etilamida, cuando se use gas etilamina; y
- (f) aislar dicho péptido de dicha solución.

35 Un procedimiento preferido del procedimiento inmediatamente precedente consiste en que los aminoácidos Boc- α -amina siguientes son acoplados sucesivamente del extremo C al extremo N, N- α -Boc-L-prolina, N- α -Boc-L-arginina, HCl, N- α -Boc-L-leucina, N- α -Boc-D-triptófano(N'-indol-formilo), N- α -Boc-L-tirosina, hidrato de N- α -Boc-L-serina, N- α -Boc-triptófano(N'-indol-formilo), sal de N- α -Boc-L-histidina(tosilo)-ciclohexilamina y ácido piroglutámico.

40 Un procedimiento preferido del procedimiento inmediatamente precedente consiste en que el grupo protector formilo de la cadena lateral de Trp es eliminado por tratamiento con una solución que comprende amoníaco, una amina primaria, o una amina secundaria y un alcohol.

45 Un procedimiento preferido del procedimiento inmediatamente precedente consiste en que dicha solución comprende amoníaco y metanol.

50 Un procedimiento preferido del procedimiento inmediatamente precedente consiste en que la etapa de aislar dicho péptido de dicha solución comprende:

- (i) filtrar dicha solución para producir un filtrado; y
- 55 (ii) concentrar dicho filtrado.

Un procedimiento preferido del procedimiento inmediatamente precedente consiste en que el 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) también se usa para acoplar N- α -Boc-D-triptófano(N'-indol-formilo), N- α -Boc-L-tirosina, hidrato de N- α -Boc-L-serina y N- α -Boc-triptófano(N'-indol-formilo).

60 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para la síntesis en fase sólida de un péptido de fórmula (I), arriba nombrado y definido en este documento, que comprende proteger temporalmente cualquier resto de triptófano con un grupo protector de cadena lateral que es lábil en una base en el que dicho grupo protector es eliminado durante la división del péptido de fórmula (II) de un soporte sólido por reacción con una base.

65 Un procedimiento preferido del procedimiento inmediatamente precedente consiste en que dicho Trp o grupo protector de cadena lateral de D-Trp es un grupo acilo.

ES 2 266 104 T3

Un procedimiento preferido del procedimiento inmediatamente precedente consiste en que dicho Trp o grupo protector de cadena lateral de D-Trp se elimina por tratamiento con una solución que comprende amoníaco, una amina primaria, o una amina secundaria y un alcohol.

- 5 Otro procedimiento preferido del procedimiento inmediatamente precedente consiste en que dicho grupo protector de cadena lateral es formilo y dicha base es una solución de metanol que comprende amoníaco.

Abreviaturas

- 10 BOC=t-butoxicarbonilo
Cit=citrulina
cPzACAla=cis-3-(4-pirazinilcarbonilaminociclohexil)alanina
15 hArg(Bu)=N-guanidino-(butil)-homoarginina
hArg(Et)₂=N,N'-guanidino-(dimetil)-homoarginina
20 hArg(CH₂CF₃)₂=N,N-guanidino-bis-(2,2,2-trifluoroetil)-homoarginina
HOBT=1-Hidroxibenzotriazol
Lys(iPr)=N^ε-isopropilisina
25 β-Nal=βb-1-naftilalanina o β-2-naftilalanina, a menos que se indique otra cosa
NicLys=N^ε-nicotinoilisina
30 Pal=piridilalanina
p-Cl-Phe=3-(4-clorofenil)alanina
p-F-Phe=3-(4-fluorofenil)alanina
35 PicLys=N^ε-picolinoilisina
Qal=quinolilalanina

- 40 A no ser que se definidan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente se entiende por ellos por cualquier experto ordinario en la técnica.

- Un péptido de la fórmula (I) puede prepararse por síntesis peptídica en fase sólida usando la química de Boc en resina Merrifield seguido de la división del péptido de la resina con amoníaco, una amina primaria o una amina secundaria en un alcohol para proporcionar el péptido del título.

- La primera etapa en tal procedimiento de acuerdo con la invención es unir la sal de cesio del aminoácido del extremo C, Boc-Gly, en la resina Merrifield por un enlace de éster. La sal de cesio de Boc-Gly se forma añadiendo Boc-Gly a carbonato de cesio en una mezcla de metanol y agua. La sal de cesio de Boc-Gly se seca bajo el vacío y luego se deja reaccionar con los grupos de clorometil-bencilo en poliestireno en un disolvente aprótico polar anhidro tal como dimetilformamida (DMF). Esta reacción se lleva a cabo durante aproximadamente de 24 a 48 horas, preferiblemente en 36 horas de aproximadamente 45°C a 60°C, preferiblemente a 50°C. La resina reaccionada entonces se filtra, se aclara con agua, un disolvente polar aprótico tal como DMF, y un alcohol tal como metanol, y luego se seca hasta un peso constante preferiblemente bajo presión reducida. La resina seca puede ser analizada para determinar el contenido de Boc-Gly que se expresa en mmoles de Gly por gramo seco de resina. El valor calculado se usa para determinar la escala de la reacción de ensamblaje para su uso material subsecuente y los cálculos de rendimiento teóricos.

- La síntesis de un péptido de fórmula (I) puede ser realizada en la Boc-Gly-resina contenida en un reactor de vidrio con filtros de disco de vidrio sinterizados en el fondo del reactor. El reactor se agita con un agitador mecánico y se agota aplicando la presión de un gas inerte tal como la presión de nitrógeno para forzar a los líquidos a pasar a través del disco sinterizado en el inferior manteniendo la resina en el reactor. Primero, el grupo Boc de Boc-Gly se elimina (por ejemplo, desbloqueado) a partir de la Gly-resina mezclando la Gly-resina dos veces con una mezcla de un ácido orgánico en un disolvente clorado, preferiblemente ácido trifluoroacético del 25% (TFA) en diclorometano (DCM), primero durante aproximadamente 2 minutos y luego durante aproximadamente 25 minutos seguido por agotamiento ayudado por la presión de nitrógeno. La Gly-resina se aclara tres veces con DCM y dos veces con un alcohol, tal como alcohol isopropílico (IPA), y la sal de amino-TFA resultante se neutraliza dos veces con una base en un disolvente inerte, preferiblemente base de trietilamina del 10% en DCM, durante aproximadamente 5 minutos cada uno y se aclara de nuevo tres veces con DCM. La resina es, luego, acoplada con mezclas de 2,5 de equivalente molar de aminoácidos

protegidos Boc α -amino, correspondiente a los aminoácidos definidos para la fórmula (I) yendo del extremo de C al extremo N, usando un agente de acoplamiento de péptidos, preferiblemente diisopropilcarbodiimida (DIC), en disolventes apróticos polares, preferiblemente mezclas DMF/DCM como medio de reacción. Cada acoplamiento se sigue de aclarados con DMF y DCM. La resina puede ser analizada por Kaiser Ninhydrin para cada terminación de acoplamiento excepto para Arginina que puede ser analizada usando isatina para detectar la amina secundaria de la Prolina residual no acoplada. El grupo Boc se elimina de cada aminoácido acoplado después de los ensayos como se describe antes. Los aminoácidos protegidos siguientes correspondientes a los aminoácidos de fórmula (I) preferiblemente se usan en la síntesis de la presente invención: N- α -Boc-L-Prolina, N- α -Boc-L-Arginina-HCl, N- α -Boc-L-Leucina, N- α -Boc-D-Triptófano(N'-indol-formilo), N- α -Boc-L-Tirosina, hidrato de N- α -Boc-L-Serina, sal de N- α -Boc-L-Histidina(tosilo)-ciclohexilamina y ácido Piroglutámico.

También puede ser usado 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) (3-5 eq.) acoplando los derivados protegidos de D-Trp, Tyr, Ser y Trp. El grupo protector de cadena lateral de tosilo de Histidina se elimina con dos tratamientos de HOBT en DMF durante una hora (cada uno) después del acoplamiento del aminoácido final. Boc-D-Triptófano y Boc-L-Triptófano están protegidos en la cadena lateral con formilo sobre el nitrógeno del anillo de indol. El formilo más tarde se elimina durante la división del péptido de la resina usando una base.

El péptido-resina completo se aclara en un embudo de vidrio sinterizado tarado con un disolvente clorado inerte tal como DCM, se aclara dos veces con un alcohol tal como metanol y se seca bajo el vacío. El péptido-resina seco se transfiere a un matraz de tres bocas de un litro de fondo redondo. Una mezcla de metanol/DMF 9:1 en aproximadamente 15 mililitros por gramo del péptido-resina se añade al matraz de fondo redondo. La solución se enfría a aproximadamente $<10^{\circ}\text{C}$, y, si se desea la forma de amida del extremo C del péptido, el gas de amoníaco se hace burbujear despacio con fuerte enfriamiento hasta que esté bien saturado (tiempo de adición de aproximadamente 1 hora), en el que el péptido se libera de la resina en forma de un intermedio de éster de metilo libre. Se permite a la solución mezclarse además sin enfriar durante aproximadamente 15-36 horas durante cuyo tiempo aproximadamente $>$ del 95% del éster de metilo libre se convierte al producto de amida correspondiente. El progreso de la reacción puede ser controlado, por ejemplo, usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y puede ser terminada cuando el grado deseado de terminación sea logrado. El producto se filtra en la solución con un embudo sinterizado de vidrio, y la resina se aclara con metanol y DMF varias veces. Todos los aclarados y filtrados se condensan en un aceite muy espeso. Se añade acetato de etilo y la solución se tritura para solidificar el producto, se decanta, y la trituración se repite de nuevo con acetato de etilo. El producto a granel se disuelve en metanol y se añade un volumen igual de ácido acético 4 N. La solución se concentra para eliminar todo el metanol. El producto se diluye con ácido acético 4 N.

La forma etilamida del extremo C del péptido puede ser obtenida sustituyendo etilamina por amoníaco en el procedimiento del párrafo inmediatamente precedente, en el que la temperatura de la solución se mantiene por debajo de aproximadamente $<16^{\circ}\text{C}$ durante la saturación de la solución con etilamina, y preferiblemente entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 15°C .

El material a granel puede purificarse por ciclos cromatográficos preparatorios de fase inversa repetidos y liofilizarse para dar el producto final.

Será evidente para cualquier experto en la técnica que pueden ser usados otros sistemas de disolventes, incluyendo, pero no limitado con, alcoholes de peso molecular bajo tales como etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, terc-butanol, y similares, otros disolventes apróticos polares y sus mezclas.

Modos para llevar a cabo la invención

Ejemplo

Síntesis de pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ ([D-Trp⁶]LHRH-NH₂)

[D-Trp⁶]LHRH-NH₂ fue preparado por la síntesis de péptidos en fase sólida usando la química de Boc en resina Merrifield seguido de la división del péptido de la resina con amoníaco metanólico para proporcionar el péptido del título.

La primera etapa del procedimiento es unir la sal de cesio del aminoácido del extremo C, Boc-glicina, a la resina Merrifield por un enlace éster. La sal de cesio de Boc-glicina se forma haciendo reaccionar Boc-glicina (40,9 g) con carbonato de cesio (37,9 g) en una mezcla de metanol y agua (80 ml/40 ml). La sal de cesio de Boc-glicina fue secada bajo el vacío y luego se permitió reaccionar con los grupos de clorometil-bencilo en perlas de poliestireno (resina Merrifield; Advanced Chemtech, 88,2 g) en dimetilformamida anhidra (DMF; 200 ml). Esta reacción fue llevada a cabo durante aproximadamente 36 horas a aproximadamente 50°C en un evaporador rotatorio Buchi® Modelo 110. La resina reaccionada entonces fue filtrada, aclarada con agua, DMF y metanol, y entonces fue secada hasta un peso constante a $T < 35^{\circ}\text{C}$. *in vacuo*. La resina seca fue analizada después para determinar el contenido de Boc-glicina que se expresa en mmoles de glicina por gramo seco de resina. Fue encontrado un valor calculado de 0,872 mmoles/gramo y se usó para determinar la escala exacta de la reacción de ensamblaje para un uso subsecuente del material y los cálculos de rendimiento teóricos.

ES 2 266 104 T3

La síntesis del péptido fue realizada sobre la resina de Boc-glicina (12,5 g) contenida en un reactor de vidrio de 500 ml con filtros de disco de vidrio sinterizados en ambas parte inferior y superior del reactor. El reactor fue relleno desde la parte inferior y fue agitado por inversión (girando 180 grados en 3 segundos). Primero, el grupo Boc fue eliminado (por ejemplo, desbloqueado) de la resina de glicina mezclando la resina dos veces con 175 ml de ácido trifluoroacético del 25% (TFA) en diclorometano (DCM) (2 minutos y 25 minutos) seguido de agotamiento ayudado por la presión de nitrógeno. La resina fue aclarada tres veces con 125 ml de DCM y dos veces con 125 ml de alcohol isopropílico (IPA) y luego tres veces con 125 ml de DCM. La sal de amino-TFA resultante fue neutralizada dos veces con 125 ml de base de trietilamina del 10% en DCM durante cinco minutos cada una y fue aclarada de nuevo tres veces con DCM.

La resina entonces fue acoplada y desbloqueada con una mezcla de 2,5 de equivalente molar del siguiente aminoácido Boc protegido con 4,2 ml de diisopropilcarbodiimida (DIC) en 16 ml de DMF y 47 ml de DCM; 5,84 g de Boc-L-Prolina, 8,93 g de Boc-L-arginina.HCl, 6,77 g de Boc-L-Leucina, 9,0 g de Boc-D-Triptófano(formilo), 7,64 g de Boc-L-Tirosina, 9,0 g de Boc-L-Triptófano(formilo), 6,06 g de hidrato de Boc-L-Serina, 16 g de sal de Boc-L-Histidina(tosilo)-ciclohexilamina, y 13,5 g de ácido piroglutámico. También fue usado 1-Hidroxibenzotriazol (HOBT) (3-5 eq.) en D-Trp, Tyr, Ser, y acoplamiento de Trp. Fueron usados 75 ml de dimetilacetamida (DMA) en lugar de DMF y DCM en el acoplamiento de Arg. La resina fue aclarada con DMF y DCM y fue analizada por Kaiser-Ninhydrin para la terminación del acoplamiento. El grupo Boc fue eliminado de cada aminoácido acoplado como se describe anteriormente. La histidina fue protegida en la cadena lateral con tosilo que fue eliminado con dos tratamientos de 4,16 g de HOBT en 105 ml de DMF durante una hora (cada uno) después del acoplamiento del aminoácido final. Boc-D-Triptófano y Boc-L-Triptófano fueron protegidos en la cadena lateral con formilo que fue eliminado durante la división del péptido de la resina.

La péptido-resina completada fue aclarada en un embudo sinterizado de vidrio tarado con DCM, fue aclarada dos veces con metanol, y secada bajo el vacío. La péptido-resina secada fue transferida a un matraz de tres bocas de un litro de fondo redondo. 15 ml/gramo del péptido-resina en methanol/DMF 9:1 (380 ml para la escala de 10,9 mm) fueron añadidos al matraz. La solución fue enfriada a aproximadamente $<10^{\circ}\text{C}$, y fue burbujeado gas de amoníaco despacio por refrigeración fuerte hasta saturación (tiempo de adición de aproximadamente 1 hora). Se permitió a la solución mezclarse además sin enfriar durante aproximadamente 15-36 horas hasta que $>95\%$ de éster de metilo libre fue convertido en un producto de amida como se determina controlando con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El producto fue filtrado en la solución con un embudo de vidrio sinterizado, y la resina fue aclarada con metanol y DMF varias veces. Todos los aclarados y filtrados fueron condensados hasta un aceite muy espeso en un evaporador rotatorio a $T <40^{\circ}\text{C}$. Fue añadido acetato de etilo (0,08 litros) y la solución fue triturada para solidificar el producto, fue decantada, y se repitió con 0,08 litros de acetato de etilo. El producto duro y gomoso fue empapado en acetato de etilo de la noche a la mañana y fue decantado. El producto a granel fue disuelto en metanol (0,07 litros) y fue añadido un volumen igual de ácido acético 4 N. La solución fue concentrada para eliminar todo el metanol en un evaporador rotatorio a $T <40^{\circ}\text{C}$. El producto fue diluido hasta aproximadamente 35 gramos del producto/litro con ácido acético 4 N.

El material a granel fue purificado entonces por ciclos cromatográficos de fase inversa repetidos y fue liofilizado para dar el producto final (8,4 g, rendimiento del 59%) como un sólido blanco a una pureza $>99\%$.

ES 2 266 104 T3

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un péptido de la fórmula (I),



en el que el resto His se protege con un grupo tosilo y es protegido el indol-NH de cualquier resto Trp,

10 que comprende las etapas de:

(a) unir una sal de cesio de Boc-Gly en una resina de poliestireno clorometilada para proporcionar Boc-Gly-resina;

15 (b) desbloquear la Boc-Gly-resina mezclando la Boc-Gly-resina con una mezcla de un ácido orgánico Boc-desbloqueante para proporcionar una sal de ácido orgánico de H₂N-Gly-resina;

(c) neutralizar la sal de ácido orgánico de H₂N-Gly-resina con una base para proporcionar H₂N-Gly-resina;

20 (d) acoplar H₂N-Gly-resina con un aminoácido protegido Boc- α -amino, correspondiendo dicho aminoácido protegido al aminoácido definido por la fórmula (I) en el orden mostrado del extremo C al extremo N, que comprende,

(i) hacer reaccionar H₂N-Gly-resina con el aminoácido Boc- α -amino protegido en presencia de un agente de acoplamiento de péptidos para proporcionar un producto acoplado Boc-bloqueado;

(ii) desbloquear el grupo Boc del producto acoplado Boc-bloqueado mezclando el producto acoplado Boc-bloqueado con un ácido orgánico Boc-desbloqueante para proporcionar un producto acoplado;

30 (iii) hacer reaccionar el producto acoplado con un aminoácido Boc- α -amino protegido siguiente en presencia de un agente de acoplamiento de péptidos para proporcionar un producto acoplado Boc-bloqueado;

(iv) desbloquear el grupo Boc del producto acoplado Boc-bloqueado mezclando el producto acoplado Boc-bloqueado con un ácido orgánico Boc-desbloqueante para proporcionar el siguiente producto acoplado;

35 (v) repetir las etapas (d)(iii) y (d)(iv) hasta que el aminoácido del extremo N del péptido de fórmula (I) haya sido acoplado, el grupo Boc del aminoácido del extremo N haya sido desbloqueado y el grupo protector de cadena lateral de tosilo del resto His haya sido eliminado para proporcionar una péptido-resina completado protegido;

40 (e) escindir y desproteger la péptido-resina completada protegida para proporcionar el péptido de fórmula (I), en el que dicha escisión y desprotección comprenden:

(i) preparar una solución del péptido-resina completado protegido en una mezcla metanol/disolvente aprótico polar inerte;

(ii) enfriar la solución con aproximadamente 0°C a 10°C;

50 (iii) hacer burbujear gas de amoníaco o gas etilamina despacio y mantener el enfriamiento hasta que la solución esté bien saturada con el amoníaco para proporcionar una solución saturada;

(iv) mezclar la solución saturada sin enfriar durante aproximadamente 15-36 horas hasta que > 95% del éster de metilo libre sea convertido en la amida correspondiente, cuando se usa gas de amoníaco, o la correspondiente etilamida, cuando se use gas etilamina; y

55 (f) aislar dicho péptido de dicha solución.

2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los siguientes aminoácidos de Boc- α -amina se acoplan sucesivamente del extremo C al extremo N, N- α -Boc-L-prolina, N- α -Boc-L-arginina·HCl, N- α -Boc-L-leucina, N- α -Boc-D-triptófano(N'-indol-formilo), N- α -Boc-L-tirosina, hidrato de N- α -Boc-L-serina, N- α -Boc-triptófano (N'-indol-formilo), sal de N- α -Boc-L-histidina(tosilo)-ciclohexilamina y ácido piroglutámico.

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el grupo protector de formilo de la cadena lateral de Trp es eliminado por tratamiento con una solución que comprende amoníaco, una amina primaria, o una amina secundaria y un alcohol.

4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha solución comprende amoníaco y metanol.

ES 2 266 104 T3

5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que también es usado 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) acoplado N- α -Boc-D-triptófano(N'-indol-formilo), N- α -Boc-L-tirosina, hidrato de N- α -Boc-L-serina y N- α -Boc-triptófano(N'-indol-formilo).

5 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para la síntesis en fase sólida de un péptido de fórmula (I), dado y definido en la reivindicación 1,

10 que comprende proteger temporalmente cualquier resto de triptófano con un grupo protector de cadena lateral que es lábil a una base en el que dicho grupo protector es eliminado durante la división del péptido de fórmula (I) de un soporte sólido por reacción con una base.

7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho Trp o grupo protector de cadena lateral de D-Trp es un grupo acilo.

15 8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho Trp o grupo protector de cadena lateral de D-Trp se elimina por tratamiento con una solución que comprende amoníaco, una amina primaria, o una amina secundaria y un alcohol.

20 9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho grupo protector de cadena lateral es formilo y dicha base es una solución de metanol que comprende amoníaco.

25

30

35

40

45

50

55

60

65