



REGISTRO DE LA  
PROPIEDAD INDUSTRIAL  
ESPAÑA

① N.º de publicación: ES 2 011 991

② Número de solicitud: 8900845

⑤ Int. Cl.<sup>4</sup>: C07K 7/06

C07K 1/00

//A61K 37/02

⑫

PATENTE DE INVENCION

A6

⑫ Fecha de presentación: **08.03.89**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.90**

④ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**16.02.90**

⑦ Titular/es: **Consejo Superior Investigaciones Científicas  
Serrano, 117  
28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Reig, Francisca;  
Haro, Isabel; Busquets, M. Antonia;  
Ruiz, Pilar; Valencia, Gregorio y  
García Antón, José M.**

⑦ Agente: **Renter Llenas, María**

⑤ Título: **Procedimiento de síntesis de análogos glicosilados de la sustancia P.**

⑤ Resumen:

El procedimiento de síntesis se realiza en las etapas siguientes: Primera, consiste en efectuar el acoplamiento entre la N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanina y el éster metílico de la L - fenilalanina; en la segunda se lleva a cabo la saponificación del primero y la hidrogenación catalítica del segundo; en la tercera etapa se elimina el grupo protector terbutiloxicarbonilo; en la cuarta etapa se lleva a cabo la condensación entre el tripéptido y el dipéptido; y en la quinta etapa se procede a la condensación entre el pentapéptido con el resto del ácido glutámico.

La fórmula general del hexapéptido es la siguiente:

Glu - Phe - Phe - X - Leu - Met - CO - Z

↓  
CO  
↓  
Y

Dicho procedimiento incrementa la afinidad y selectividad del péptido por sus receptores, presentando un amplio espectro de acciones biológicas, tales como la contracción de varios músculos lisos, el incremento de la secreción salivar y pancreática, etc.

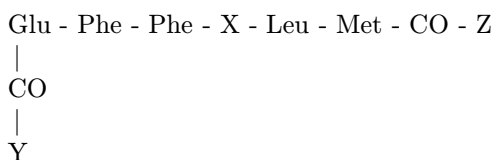
## DESCRIPCION

La presente invención se refiere a la síntesis y descriptiva de una serie de péptidos cuya fórmula se detalla a continuación. Estos, se encuentran relacionados estructuralmente con el hexapéptido C - terminal de la Sustancia P.

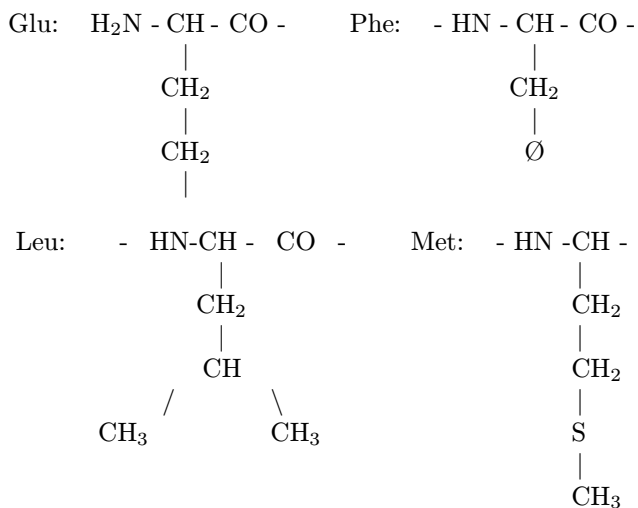
La Sustancia P es un undecapéptido que actúa como neurotransmisor o neuromodulador en el sistema nervioso central y periférico, presentando un amplio espectro de acciones biológicas, tales como la contracción de varios músculos lisos, el incremento de la secreción salivar y pancreática, etc.

El objetivo de la síntesis de esta familia de moléculas es incorporar en el carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico N - terminal residuos glicosilados que por ser constituyentes de la membrana neuronal puedan incrementar la afinidad y selectividad del péptido por sus receptores.

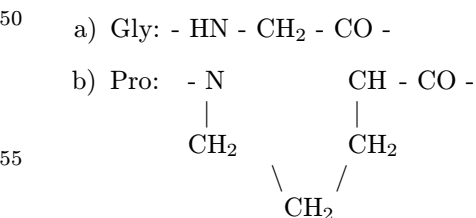
En el trabajo sujeto a la presente patente se ha sintetizado una serie de péptidos que responden a la fórmula general:



donde:



X puede ser:



Y puede ser:

- un grupo hidroxilo
- una molécula de  $\beta$  - D - glucopiranososa

Z puede ser:

a) un grupo hidroxilo

5 b) un radical metilo

La presente invención engloba la preparación de los compuestos siguientes:

1) Ester metílico de la N - terbutiloxicarbonil - Lfenilalanil - L - fenilalanina.

10 2) N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanil - L - fenilalanina

3) Ester bencílico de la N - terbutiloxicarbonil - Lfenilalanil - L - fenilalanil - L - Prolina

4) N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - L - prolina

15 5) Ester metílico de la N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - glicina

6) N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanil - L - fenilalanilglicina

20 7) Ester metílico de la N - terbutiloxicarbonil - L - leucil - L - metionina

8) N - terbutiloxicarbonil - L - leucil - L - metionina

9) Ester metílico de la N - terbutiloxicarbonil - L- fenilalanil - L - fenilalanil - glicil - L - leucil - L - metionina

25 10) Ester metílico de la N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - L - prolil - L - leucil - L - metionina

11) N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanil - L - fenilalanilglicil - L - leucil - L - metionin amida

30 12) N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - Lprolil - L - leucil - L - metionin amida

13) N - terbutiloxicarbonil - ( $\gamma$  - éster bencílico) - L - glutamil - Lfenilalanil - L - fenilalanil - glicil - L - leucil - L - metionin amida

35 14) L - glutamil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - glicil - L - leucilL - metionin amida

15) N - terbutiloxicarbonil - ( $\gamma$  - éster bencílico) - L - glutamil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - L - prolil - L - leucil - L - metionin amida

40 16) N - 9 - fluorenilmetoxicarbonil - ( $\nu$  -  $\beta$  - D - glucopiranososa) - L - glutamil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - glicil - L - leucil - L - metionin amida

17) N - 9 - fluorenilmetoxicarbonil - ( $\gamma$  -  $\beta$  - D - glucopiranososa) - L - glutamil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - L - prolil - L - leucil - L - metionin amida

45 18) ( $\nu$  -  $\beta$  - D - glucopiranososa) - L - glutamil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - glicil - L - leucil - L - metionin amida

19) ( $\gamma$  -  $\beta$  - D - glucopiranososa) - L - glutamil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - L - prolil - L - leucil - L - metionin amida

50 El procedimiento se realiza en varias etapas o fases. El número de éstas coincide con el número de enlaces peptídicos que forman el compuesto final.

La primera de las etapas consiste en efectuar el acoplamiento entre la N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanina y el éster metílico de la L - fenilalanina.

55

En la segunda etapa se hace reaccionar el dipéptido anterior previamente esterificado con el éster metílico de la glicina o el bencílico de la prolina, y una vez purificado estos tripéptidos se lleva a cabo la saponificación del primero y la hidrogenación catalítica del segundo.

60

En la tercera etapa se hace reaccionar la N - terbutiloxicarbonil - L - leucina con el éster metílico de la L - metionina, y se lleva a cabo seguidamente la eliminación del grupo protector terbutiloxicarbonilo.

En la cuarta etapa se lleva a cabo la condensación entre el tripéptido obtenido en la segunda etapa y el dipéptido obtenido en la tercera por el método del anhídrido mixto.

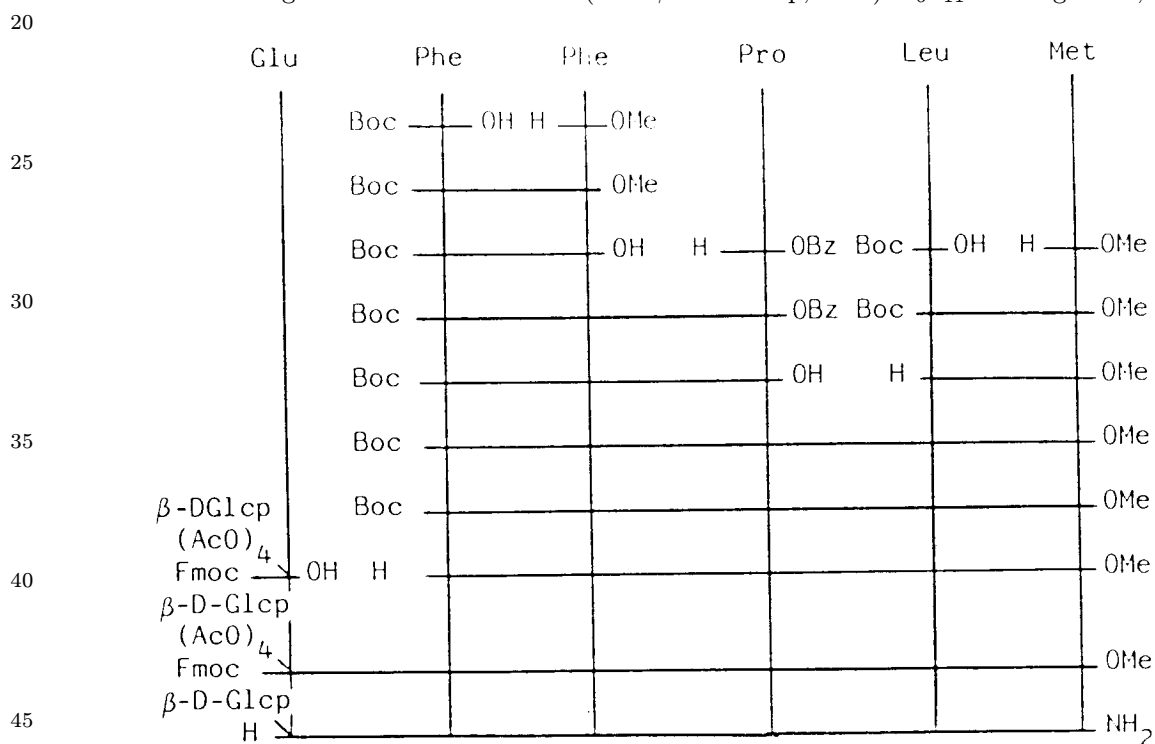
En la quinta etapa se procede a la condensación entre el pentapéptido obtenido en la anterior etapa con el resto del ácido glutámico en el cual previamente se ha incorporado la - D - Glucopiranososa. Tras varias etapas de eliminación de los grupos protectores y otras de purificación, se obtienen los hexapéptidos glicosilados finales.

A continuación y como ejemplo explicativo, pero limitativo de este procedimiento, se describe la síntesis de un glicopéptido objeto de esta patente.

### Ejemplo

Síntesis del péptido ( $N^{1,\beta}$ , - D - glucopiranosil) - L - Glutamil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - L - rotilil - L - leucil - L - metionina amida

La nueva estrategia de síntesis objeto de esta patente y que hemos seguido y describimos para la obtención del análogo de la Sustancia P:  $N^{1,6}(\text{Glu}^6 \beta\text{-D-Glcp, Pro}^9)\text{SP}_{6-11}$  es la siguiente,



De acuerdo con las siguientes etapas:

Etapa 1

Síntesis del éster metílico del N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanil - L - fenilalanina

A una solución enfriada a - 15° de 7 g (26,4 mmoles) de N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanina (BocPhe) y 5,7 g (26,4 mmoles) del clorhidrato del éster metílico de la L - fenilalanina en 40 ml de tetrahidrofurano (THF), se le adicionan 4,1 g (26,4 mmoles) de hidroxibenzotriazol (HOBt), 2,9 ml (26,4 mmoles) de N - metilmorfolina (NMM). Finalmente, se adicionan bajo fuerte agitación 6,5 g (31,7 mmoles) de dicitohexilcarbodiimida (DCC) disuelta en la mínima cantidad de THF y previamente enfriada.

La mezcla resultante se agita a - 15° durante una hora y tres horas más a temperatura ambiente. Tras filtrar el precipitado de dicitohexilurea (DCU) se evapora la solución a sequedad. El residuo formado

se redisuelve en acetato de etilo y se lava sucesivamente con solución al 5% de ácido cítrico, solución al 5% de bicarbonato sódico y agua hasta neutralidad. Tras secarse la solución sobre sulfato sódico anhidro, se cristaliza el dipéptido esperado en acetato de etilo / éter de petróleo con un rendimiento del 98%.

5 El punto de fusión del sólido obtenido es de 112 - 113° y la rotación óptica  $(\alpha)_D^{20} = -14$  (c=1, metanol).

Los resultados tanto del análisis elemental como las bandas obtenidas en el espectro de RMN corresponden perfectamente a la estructura esperada.

10 Etapa 2

*Síntesis del éster bencílico del tripéptido N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - L - prolina*

15 Para la obtención de este tripéptido se procede en primer lugar a la eliminación del éster metílico terminal del dipéptido obtenido en la etapa anterior mediante saponificación durante 1 h con NaOH / acetona (1 / 3, v / v) a temperatura ambiente.

20 Seguidamente, 2,5 g (6 mmoles) del dipéptido N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanil - L - fenilalanina se hacen reaccionar con 1,5 g (6 mmoles) del éster bencílico de la prolina en 15 THF en presencia de 0,7 ml (6 mmoles) de NMM, 1,5 g (7,2 mmoles) de DCC y 0,95 g (6 mmoles) de HOBt. La mezcla se agita a - 15° durante 1 h y a temperatura ambiente durante 3 h. Tras eliminar la DCU por filtración, se evapora la solución a sequedad. El residuo formado se disuelve en acetato de etilo y se lava sucesivamente con solución de ácido cítrico al 5%, bicarbonato sódico al 5% y agua hasta neutralidad. El tripéptido se  
25 obtiene como un aceite con 95% de rendimiento, la pureza del cual se comprueba por cromatografía en capa fina empleando como eluyente cloroformo / metanol / acético 95 / 5 / 3.

La rotación óptica del péptido obtenido es  $(\alpha)_D^{20} = -57$  (c=1, metanol). Los resultados obtenidos del análisis elemental y de la RMN son coincidentes con la estructura buscada.

30

Etapa 3

*Síntesis del éster metílico del N - terbutiloxicarbonil - L - leucil - L - metionina*

35 Siguiendo el mismo procedimiento descrito en las etapas 1 y 2 se obtiene el dipéptido indicado empleando las siguientes sustancias:

40 N - terbutiloxicarbonil - L - leucina (5 g; 20 mmoles), éster metílico de la L - metionina (4 g; 20 mmoles), DCC (4,95 g; 24 mmoles), HOBt (3,1 g; 20 mmoles) y NMM (2,2 ml, 20 mmoles) en 20 ml de THF. El dipéptido es finalmente purificado por cristalización en acetato de etilo / éter de petróleo. El rendimiento obtenido en esta etapa sintética es del 95%. La pureza del dipéptido indicado se comprueba por capa fina (eluyente cloroformo / metanol / acético, 95 / 5 / 3 y por cromatografía líquida de alta eficacia (eluyente acetonitrilo / agua 0,05% ácido trifluoroacético).

45 El punto de fusión hallado es de 95 - 96° y la rotación óptica  $(\alpha)_D^{20} = -36,1$  (c=1; etanol). Los resultados obtenidos de los análisis elementales y de la RMN son coincidentes con los esperados para la estructura prevista.

Etapa 4

50

*Síntesis del éster metílico de la N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - L - prolil - L - leucil - L - metionina*

55 Tras la eliminación del éster bencílico del tripéptido obtenido en la etapa 2 mediante hidrogenación catalítica empleando Paladio sobre carbón, se hace reaccionar a la N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - L - prolina (2 g, 3,9 mmoles) con el dipéptido obtenido en la etapa 3 desprotegido en su grupo amino terminal por tratamiento ácido con trifluoroacético / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 50 / 50, el éster metílico de la L - leucil - L - metionina (1,6 g, 3,9 mmoles) en 15 de THF. Posteriormente se adicionan NMM (0,4 ml, 3,9 mmoles), HOBt (0,6 g, 3,9 mmoles) y DCC (1 g, 4,7 mmoles) enfriados a - 15°. Tras la realización de  
60 los lavados ácido (ácido cítrico 5%) y básico (bicarbonato sódico 5%), el pentapéptido se aísla y purifica mediante cromatografía en sílica 40 - 63  $\mu$ m.

## Etapa 5

*Síntesis del éster metílico del hexapéptido N - 9 - fluorenilmetoxicarbonil (N<sup>1</sup> 2,3,4,6 Tetra - O - acetil - β - D - glucopiranosil) - L - glutamil - L - fenilalanil - L - fenilalanil - L - prolil - L - leucil - L - metionina*

5

Tras la desprotección del grupo amino terminal del pentapéptido anterior por tratamiento con MeOH / HCl 4 N durante 1 h a temperatura ambiente, se lleva a cabo la condensación del mismo (0,38 g; 0,57 mmoles) con el derivado del ácido glutámico que lleva incorporado en su grupo carboxilo de la cadena lateral una molécula de β - D - Glucopiranosil (0,4 g; 0,57 mmoles) en 6 ml de THF. Se añaden 0,1 g (0,57 mmoles) de DCC. Tras la eliminación de la DCU mediante filtración, el residuo se redisuelve en acetato de etilo y se llevan a cabo los lavados ácido (cítrico 5%) y básico (bicarbonato 5%). El hexapéptido se purifica finalmente por cromatografía en sílica 40 - 63 μm y se caracteriza por RMN.

10

La desprotección del glicopéptido y la formación de la amida terminal se lleva a cabo por tratamiento durante 10 h con metanol saturado de amoníaco a temperatura ambiente. El hexapéptido glicosilado final se purifica por cromatografía de alta resolución en fase reversa en condiciones semipreparativas y se caracteriza mediante RMN, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

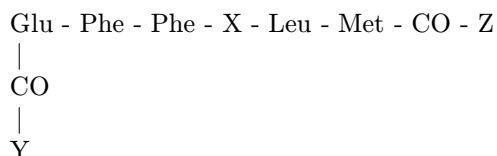
60

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de síntesis de análogos glicosilados de la sustancia P, que tienen como fórmula general:

5

10



15

(I)

donde X puede ser:

- a) glicina
- b) prolina

20

Y puede ser:

- a) un grupo hidroxilo
- b) una molécula de  $\beta$  - D - Glucopiranososa

25

Z puede ser:

- a) un grupo hidroxilo
- b) un radical metilo

30

**caracterizado** porque en una primera etapa se lleva a cabo la condensación de la N - terbutiloxicarbonil - L - fenilalanina con el éster metílico de la L - fenilalanina, el cual tras ser saponificado se acopla en una segunda etapa al éster metílico de la glicina o al bencílico de la prolina; en una tercera etapa se lleva a cabo la reacción entre la N - terbutiloxicarbonil - L - leucina con el éster metílico de la L - metionina, que tras ser purificado mediante lavados ácido y básico, se condensa en una cuarta etapa a los tripéptidos obtenidos en la segunda etapa; tras llevarse a cabo la purificación mediante cromatografía en sílica de los pentapéptidos así obtenidos, se procede a incorporar en una quinta etapa el resto de ácido glutámico que contiene la molécula de  $\beta$  - D - Glucopiranososa, desprotegiéndose finalmente los hexapéptidos glicosilados mediante tratamiento con MeOH / NH<sub>3</sub> durante 10 horas en agitación a temperatura ambiente, que se purifican finalmente mediante cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa, obteniéndose los hexapéptidos de fórmula general (I).

45

50

55

60