(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 806 200**

(51) Int. CI.:

C07K 5/083 (2006.01)
C07K 5/11 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
A61P 5/20 (2006.01)
A61P 5/18 (2006.01)
A61P 3/14 (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2016 PCT/US2016/024308**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16154580**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2016 E 16720588 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3274360**

(54) Título: **Método en fase de disolución para preparar etelcalcetida**

(30) Prioridad:

26.03.2015 US 201562138903 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.02.2021

(73) Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320, US

(72) Inventor/es:

CUI, SHENG;
RANGANATHAN, KRISHNAKUMAR;
CROCKETT, RICHARD;
CHEN, YING;
SWIETLOW, ALEKSANDER;
CROSSLEY, KEVIN;
SHI, YUN;
DECROOS, KAREL y
MONIOTTE, ETIENNE

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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 en fase de disolución para preparar etelcalcetida

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/138.903 presentada el 26 de marzo de 2015.

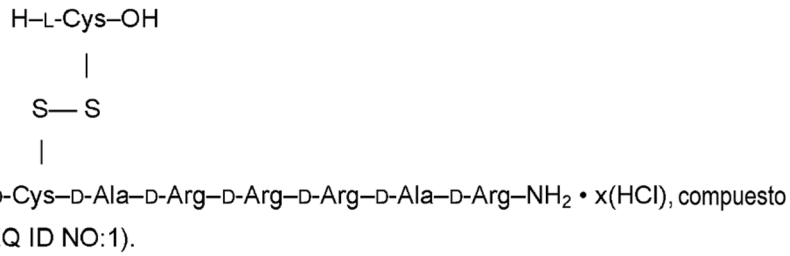
CAMPO

La presente divulgación se refiere en general al campo de la síntesis de polipéptidos y, más particularmente, a la síntesis en fase de disolución de etelcalcetida (conocida anteriormente como AMG 416 o velcalcetida) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

ANTECEDENTES

La etelcalcetida es un agonista peptídico selectivo de ocho aminoácidos, sintético, del receptor sensible al calcio. La etelcalcetida es efectiva en la disminución de los niveles de hormona paratiroidea *in vivo* y es útil, por ejemplo, en el tratamiento de la hipercalcemia o el hiperparatiroidismo. Véase, por ejemplo, Walter, S., *et al.*, J. Pharmacol Exp Ther, agosto de 2013: 346(2):229-40. La etelcalcetida está desarrollándose actualmente para el uso intravenoso en el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario (HPTS) en pacientes de hemodiálisis con trastorno mineral y óseo asociado a enfermedad renal crónica (TMO-ERC); el producto se denominará con el nombre comercial Parsabiv™.

La sal de hidrocloruro de etelcalcetida tiene la estructura química:



La cadena principal de etelcalcetida, también denominada en el presente documento estructura principal de etelcalcetida, presenta siete aminoácidos, todos en la configuración D, mientras que el residuo cisteína de cadena lateral (H-L-Cys-OH) está en la configuración L. La fórmula molecular de etelcalcetida (base libre) es: $C_{38}H_{73}N_{21}O_{10}S_2$, y tiene una masa molecular promedio calculada de 1048,3 Da.

La etelcalcetida y un método para su preparación se describen en la publicación de patente internacional n.º WO 2011/014707, y una formulación líquida estable de la misma se describe en el documento WO2014/210489. La etelcalcetida se ensambla tradicionalmente mediante síntesis en fase sólida a partir de los D-aminoácidos protegidos por Fmoc correspondientes. Tras el ensamblaje de la cadena principal mediante acoplamiento y escisión secuenciales a partir de un soporte de resina adecuado (es decir, síntesis de péptidos en fase sólida), la cadena principal se trata con una disolución de ácido trifluoroacético en presencia de disulfuro de dipiridilo para formar la estructura principal activada correspondiente, que se trata entonces con L-Cys-OH en agua para proporcionar etelcalcetida. El producto resultante se purifica entonces normalmente mediante cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (RP-HPLC) y se aísla como sal de TFA mediante liofilización. La sal de TFA se convierte entonces en una sal farmacéuticamente aceptable tal como una sal de hidrocloruro llevando a cabo un proceso de intercambio de sales, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico, seguida opcionalmente de purificación, por ejemplo, mediante cromatografía líquida en fase inversa u ósmosis inversa.

A diferencia de la síntesis en fase sólida convencional descrita en general anteriormente, la presente divulgación proporciona métodos en fase de disolución para preparar etelcalcetida. Los métodos proporcionados en el presente documento presentan varias ventajas con respecto a las síntesis en fase sólida tradicionales, incluyendo, pero sin limitarse a, bajos costes de materias primas, facilidad de purificación de productos intermedios de proceso, facilidad de ensamblaje de fragmentos, alta pureza quiral y adaptabilidad al aumento a escala comercial, entre otras, que se describirán en mayor detalle más adelante.

SUMARIO

En el presente documento se proporcionan métodos en fase de disolución para preparar productos intermedios de etelcalcetida, así como para preparar etelcalcetida y sus sales farmacéuticamente aceptables. Generalmente, los métodos comprenden acoplamiento de fragmentos en fase de disolución para formar la cadena heptapeptídica principal de etelcalcetida, seguido de la introducción de la cadena lateral de L-cisteína a través de la formación de puentes disulfuro. El alcance de la invención se define en las reivindicaciones. Cualquier materia que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos.

Más particularmente, en un primer aspecto, en el presente documento se proporciona un método para preparar etelcalcetida o un precursor de la misma, comprendiendo el método (i) acoplar en fase de disolución un fragmento tetrapeptídico N-terminal protegido de etelcalcetida que comprende D-ornitina(s) en lugar de D-arginina(s) con un fragmento tripeptídico protegido de etelcalcetida para formar un precursor heptapeptídico protegido de etelcalcetida que comprende una D-cisteína terminal.

En una realización relacionada con el primer aspecto, el fragmento tetrapeptídico N-terminal protegido de etelcalcetida tiene una secuencia de SEQ ID NO:2, H-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-OMe, (compuesto **14**). En una o más realizaciones relacionadas, el fragmento tetrapeptídico N-terminal protegido de etelcalcetida es un sólido. En aún una o más realizaciones adicionales, el fragmento tetrapeptídico N-terminal protegido de etelcalcetida es un sólido cristalizable. La preparación de un producto intermedio, opcionalmente cristalizable/cristalino, sólido, tal como un fragmento tetrapeptídico N-terminal de etelcalcetida o cualquier otro fragmento de etelcalcetida, es particularmente beneficiosa, dado que proporciona la oportunidad de purificación mediante aislamiento de sólidos, por ejemplo, mediante precipitación o mediante cristalización, en vez de utilizando metodologías cromatográficas que requieren mucho tiempo y disolventes convencionales.

En aún una o más realizaciones adicionales relacionadas con el primer aspecto, el fragmento tripeptídico tiene una secuencia de SEQ ID NO:3, Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-OH), (compuesto **13**), y el precursor heptapeptídico protegido de etelcalcetida tiene una secuencia de SEQ ID NO:4, Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-OMe (compuesto **15**).

En aún una o más realizaciones adicionales relacionadas con el primer aspecto, el fragmento tripeptídico es un sólido. En aún una o más realizaciones relacionadas, el fragmento tripeptídico es un sólido cristalizable.

En aún una o más realizaciones adicionales, el acoplamiento se lleva a cabo en un disolvente orgánico para proporcionar una mezcla de reacción, y el método comprende además añadir agua a la mezcla de reacción para hacer precipitar el precursor heptapeptídico protegido de etelcalcetida.

En aún una o más realizaciones adicionales relacionadas con las anteriores, el método comprende además (ii) eliminar los grupos protectores δ-amino de ornitina del precursor heptapeptídico protegido de etelcalcetida, y (iii) guanitinilar el precursor heptapeptídico desprotegido de etelcalcetida para reemplazar de ese modo los residuos ornitina por arginina para formar un producto intermedio que tiene una secuencia de SEQ ID NO:5 (compuesto **19**).

En una o más realizaciones adicionales, el método comprende además (iv) acoplar la D-cisteína terminal del producto intermedio formado en la etapa (iii) con L-cisteína a través de la formación de un enlace disulfuro para formar etelcalcetida (SEQ ID NO:1, compuesto **20**).

En aún una o más realizaciones adicionales del método según el primer aspecto, el método comprende, además, antes de la etapa de acoplamiento (i), (a) preparar en fase de disolución el fragmento tetrapeptídico N-terminal protegido de etelcalcetida. En una o más realizaciones relacionadas con las anteriores, el tetrapéptido N-terminal protegido de etelcalcetida se prepara a través de un proceso en fase de disolución continuo. Más particularmente, en una o más realizaciones adicionales, la etapa de preparación (a) comprende:

(a-i) acoplar un N-carboxianhídrido protegido por uretano (UNCA) de ornitina con un dipéptido que tiene la SEQ ID NO:6 (compuesto **6**) para formar un tripéptido protegido,

(a-ii) desproteger el tripéptido para formar un tripéptido desprotegido, y

(a-iii) acoplar el tripéptido desprotegido a un N-carboxianhídrido de ornitina protegido por uretano para formar el fragmento tetrapeptídico N-terminal protegido de etelcalcetida. Los fragmentos a modo de ejemplo que corresponden a lo anterior incluyen un tripéptido completamente protegido de la etapa (a-i) que tiene la SEQ ID NO:7 (compuesto **7**) y un tripéptido parcialmente desprotegido que tiene la SEQ ID NO:8 (compuesto **8**).

En una o más realizaciones relacionadas con las anteriores, la etapa de preparación da como resultado la formación de un subproducto gaseoso.

En aún una o más realizaciones adicionales, el N-carboxianhídrido de ornitina protegido por uretano es un N-carboxianhídrido protegido por benciloxicarbonilo de D-ornitina protegida.

En aún una o más realizaciones adicionales, cada una de las etapas de acoplamiento (a-i) y (a-iii) se lleva a cabo en tetrahidrofurano.

En aún otra o más realizaciones que pertenecen a la etapa (a) o subetapas de la misma, la fase de disolución comprende un disolvente orgánico seleccionado del grupo que consiste en éteres, ésteres, hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos clorados.

En aún una o más realizaciones adicionales, el método comprende además purificar el fragmento tetrapeptídico N-terminal de etelcalcetida mediante recristalización antes de la etapa de acoplamiento (i).

En el presente documento también se describe un método en fase de disolución para preparar etelcalcetida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que comprende (i) hacer reaccionar un producto intermedio de SEQ ID NO:5 (compuesto **19**) con L-cisteína en fase de disolución.

En el método descrito, la D-cisteína del compuesto **19** comprende un grupo protector acetamido, y el método comprende además (ii) escindir el grupo protector acetamido. En una realización relacionada con las anteriores, la etapa de reacción (i) y la etapa de escisión (ii) se llevan a cabo en un único recipiente de reacción para proporcionar etelcalcetida.

También se describe un método para preparar etelcalcetida o un precursor de la misma, comprendiendo el método: (i) acoplar un fragmento tripeptídico protegido N-terminal acetilado de etelcalcetida con un fragmento tetrapeptídico C-terminal completamente desprotegido de etelcalcetida que tiene un grupo amino libre en fase de disolución para formar un fragmento heptapeptídico protegido de etelcalcetida que comprende una D-cisteína terminal. Las realizaciones y/o características que siguen se refieren a este método para preparar etelcalcetida o un precursor de la misma.

En una o más realizaciones de este método descrito, el fragmento tripeptídico protegido N-terminal acetilado que presenta un extremo C-terminal libre tiene una secuencia de SEQ ID NO:9 (Ac-(D)Cys(PG)-(D)Ala-(D)Arg-OH) (compuesto **36**).

En aún una o más realizaciones adicionales, el fragmento tetrapeptídico N-terminal completamente desprotegido de etelcalcetida tiene una secuencia de SEQ ID NO:10 (H-(D)Arg-(D)Arg-(D)-Ala-(D)Arg-NH_2) (compuesto **30**).

En una o más realizaciones adicionales, el fragmento heptapeptídico protegido de etelcalcetida tiene una secuencia de SEQ ID NO:11 (Ac-(D)Cys(PG)-(D)Ala-(D)Arg-(D)Arg-(D)Arg-(D)-Ala-(D)Arg-NH_2) (compuesto **37**).

En aún una o más realizaciones adicionales, el acoplamiento se lleva a cabo en un disolvente orgánico en presencia de un reactivo de acoplamiento para proporcionar una mezcla de reacción.

En una o más realizaciones adicionales, el método descrito comprende además (ii) recuperar el fragmento heptapeptídico protegido de etelcalcetida de la mezcla de reacción.

En una o más realizaciones particulares relacionadas con las anteriores, la etapa de recuperación (ii) comprende añadir acetonitrilo a la mezcla de reacción para efectuar la precipitación del fragmento heptapeptídico protegido de etelcalcetida.

En aún una o más realizaciones adicionales, el método comprende además (iii) acoplar en disolución la D-cisteína terminal del fragmento heptapeptídico protegido de etelcalcetida con L-cisteína protegida a través de la formación de un enlace disulfuro para formar etelcalcetida.

En aún una o más realizaciones adicionales, la D-cisteína del fragmento heptapeptídico protegido de etelcalcetida comprende un grupo protector tritilo, y el método comprende además (ii-a) escindir el grupo protector tritilo antes del acoplamiento con L-cisteína.

En aún una o más realizaciones adicionales, el método comprende además (iv) purificar la etelcalcetida. En una realización particular de las anteriores, la etelcalcetida se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico. En aún una realización adicional, la etapa de cromatografía de intercambio iónico va seguida de nanofiltración, es decir, para la eliminación de sales. En una realización alternativa, la etapa de purificación (iv) comprende purificar la etelcalcetida mediante intercambio iónico/nanofiltración, pudiendo comprender el método además (v) liofilizar la etelcalcetida nanofiltrada.

En una o más realizaciones relacionadas con el método descrito, el método comprende, además, antes de la etapa de acoplamiento (i), (a) preparar en fase de disolución un fragmento tetrapeptídico C-terminal de etelcalcetida.

En una o más realizaciones relacionadas con las anteriores, la etapa de preparación (a) comprende:

(a-i) acoplar D-alanina N-protegida con hidrocloruro de H-(D)-arginamida en disolución en presencia de un agente de acoplamiento para formar hidrocloruro de D-Ala-Arg-NH_2 N-protegido,

(a-ii) tratar el D-Ala-Arg-OH N-protegido con tetrafenilborato de sodio para formar una sal de tetrafenilborato,

(a-iii) extraer la sal de tetrafenilborato de (a-ii) a un disolvente orgánico;

(a-iv) convertir la sal de tetrafenilborato en una sal de hidrocloruro,

(a-v) desproteger, por ejemplo, eliminar el grupo Cbz (Z) protector de N, la sal de hidrocloruro de (a-iv) para formar un hidrocloruro de H-D-Ala-D-Arg-NH_2, dipeptídico;

(a-vi) repetir secuencialmente las etapas de acoplamiento, tratamiento, extracción y desprotección en el hidrocloruro de H-D-Ala-D-Arg-NH_2 dipeptídico mediante el acoplamiento con hidrocloruro de D-arginina N-protegida para formar un hidrocloruro H-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2 tripeptídico, y

(a-vii) repetir secuencialmente las etapas de acoplamiento, tratamiento, extracción y desprotección en el hidrocloruro de H-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2 tripeptídico de la etapa (a-vi) mediante el acoplamiento con hidrocloruro de D-arginina N-protegida para formar un tetrapéptido que tiene la SEQ ID NO: 12 (compuesto **29**), Z-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2,2HCl.

En aún una o más realizaciones adicionales, el método comprende además (a-viii) desproteger el fragmento tetrapeptídico N-protegido de SEQ ID NO:12.

Realizaciones adicionales de los métodos descritos en el presente documento resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción, ejemplos y reivindicaciones. Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención se exponen en la siguiente descripción, particularmente cuando se consideran junto con los ejemplos y dibujos adjuntos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 proporciona la estructura química de etelcalcetida (Ac-D-Cys(H-L-Cys-OH)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2, SEQ ID NO:1).

La FIG. 2 proporciona un esquema de reacción en fase de disolución ilustrativo para preparar un fragmento tetrapeptídico N-terminal completamente protegido de etelcalcetida que tiene una secuencia de SEQ ID NO:13 (compuesto **9,** Z-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-OMe). Véanse los ejemplos 1-7.

La FIG. 3 proporciona un esquema de reacción en fase de disolución ilustrativo para preparar un fragmento tripeptídico protegido de etelcalcetida que tiene una secuencia de SEQ ID NO:3 (compuesto **13**, Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-OH). La FIG. 3 también proporciona un esquema de reacción a modo de ejemplo para el acoplamiento de un fragmento tetrapeptídico N-terminal protegido de etelcalcetida en el que el extremo N-terminal están en su forma de base libre, no protegida, **14**, con un fragmento tripeptídico protegido de etelcalcetida, **13**, en el que el extremo C-terminal no está protegido, para proporcionar en última instancia un precursor heptapeptídico completamente protegido de etelcalcetida, **16.** El precursor heptapeptídico de etelcalcetida, **16**, está completamente protegido y corresponde a la cadena principal de etelcalcetida en la que las D-argininas están reemplazadas por D-ornitinas. El fragmento heptapeptídico completamente protegido de etelcalcetida, **18**, se produce mediante la perguanidinilación de **17**, teniendo **17** todos sus grupos δ-amino de ornitina en forma no protegida (es decir, en forma amino libre). Véanse los ejemplos 8-16.

La FIG. 4 ilustra la desprotección global de argininas protegidas por Boc contenidas en un producto intermedio heptapeptídico de etelcalcetida, seguida de la desprotección de D-cisteína y el acoplamiento a L-cisteína para formar el producto deseado, etelcalcetida. Véanse los ejemplos 15 y 16.

La FIG. 5 ilustra una síntesis en fase de disolución a modo de ejemplo de un fragmento tetrapeptídico C-terminal completamente aminodesprotegido de etelcalcetida, compuesto **30** (SEQ ID NO:10), útil para la preparación en fase de disolución de un fragmento heptapeptídico protegido de etelcalcetida. Detalles de la síntesis se proporcionan en los ejemplos 17-20.

La FIG. 6 proporciona una metodología de síntesis en fase de disolución a modo de ejemplo para preparar un fragmento tripeptídico protegido N-terminal acetilado de etelcalcetida, compuesto **36** (SEQ ID NO:9), útil para la preparación en fase de disolución de un fragmento heptapeptídico protegido de etelcalcetida. Detalles de la síntesis se proporcionan en los ejemplos 21-24.

La FIG. 7 proporciona una metodología de síntesis en fase de disolución a modo de ejemplo para formar un heptapéptido de etelcalcetida. En el método, un tripéptido protegido N-terminal acetilado se acopla a un tetrapéptido C-terminal completamente aminodesprotegido para formar un producto intermedio de etelcalcetida heptapeptídico. Detalles de la síntesis se proporcionan en los ejemplos 25 y 26.

Las FIGs. 8A-8L proporcionan las estructuras de diversos compuestos descritos en el presente documento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los encabezados de sección usados en el presente documento son solo con fines organizativos y no deben interpretarse como que limitan la materia descrita de ninguna manera.

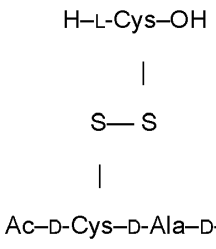
Definiciones

Debe indicarse que, tal como se usa en esta memoria descriptiva, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen los referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

A menos que se indique específicamente lo contrario, las definiciones de los términos proporcionados en el presente documento son definiciones estándar usadas en la técnica, por ejemplo, de la síntesis orgánica, la síntesis de péptidos y la ciencia farmacéutica. Véanse, por ejemplo, L. Otvos (Ed.), Peptide-Based Drug Design: Methods and Protocols, Humana Press (2010); Benoiton, L., Chemistry of Peptide Synthesis, CRC Press (2005); Ausubel F. M., (Ed.) *et al*., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (2004). Las técnicas de purificación se realizan normalmente según las especificaciones del fabricante, tal como se llevan a cabo comúnmente en la técnica, o tal como se describe en el presente documento. Los procedimientos y las técnicas de laboratorio de, por ejemplo, química analítica, química orgánica de síntesis y química médica y farmacéutica descritos en el presente documento son aquellos que son ampliamente conocidos y se usan comúnmente en la técnica.

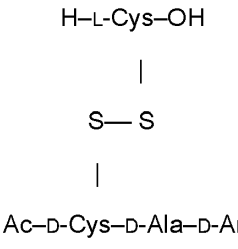
A la hora de describir y reivindicar la presente invención se usará la siguiente terminología según las definiciones descritas a continuación.

El término “etelcalcetida”, conocida anteriormente como AMG 416, velcalcetida y KAI-4169, se refiere a un compuesto que tiene el nombre químico: disulfuro de *N*-acetil-D-cisteinil-D-alanil-D-arginil-D-arginil-D-arginil-D-alanil-D-arginamida con L-cisteína, que tiene la siguiente fórmula estructural:



La referencia a etelcalcetida, o a cualquier compuesto o fragmento, producto intermedio o precursor de etelcalcetida tal como se describe en el presente documento, pretende abarcar formas sin carga, neutras, de la misma, así como sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables de la misma.

Los términos “hidrocloruro de etelcalcetida” y “etelcalcetida HCl” son intercambiables y hacen referencia a una forma de sal de hidrocloruro de etelcalcetida que tiene la siguiente fórmula estructural:



Normalmente, x tiene un valor de aproximadamente 4 a 5. El valor preciso puede determinarse para una muestra dada mediante análisis del contenido de cloruro.

"Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una forma de sal de un compuesto que tiene al menos un grupo adecuado para la formación de sal que no provoca ningún efecto toxicológico adverso significativo a un paciente. El término "sal farmacéuticamente aceptable" puede, en un aspecto, hacer referencia a las sales de adición de ácido inorgánicas u orgánicas, relativamente no tóxicas, de compuestos proporcionados en el presente documento, por ejemplo, etelcalcetida, así como fragmentos, productos intermedios, precursores y similares de etelcalcetida, que presentan uno o más grupos amino ionizables. Las sales representativas incluyen las sales de hidrobromuro, hidrocloruro, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato y similares (véase, por ejemplo, Berge *et al.* (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19).

En algunos casos, un compuesto puede contener uno o más grupos funcionales ácidos. En tales casos, el compuesto formará una sal farmacéuticamente aceptable con una base farmacéuticamente aceptable. El término "sales farmacéuticamente aceptables" en un caso de este tipo se refiere a las sales de adición de base inorgánicas y orgánicas, relativamente no tóxicas, de tales compuestos. Las sales alcalinas o alcalinotérreas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares. Formas de sal farmacéuticamente aceptable de manera adecuada pueden encontrarse en, por ejemplo, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, Weinheim/Zürich:Wiley-VCH/VHCA, 2002; P. H. Stahl y C. G. Wermuth, Eds.

La frase "grupo protector" o "PG" tal como se usa en el presente documento se refiere a un sustituyente o sustituyentes temporales que protegen un grupo funcional potencialmente reactivo de una transformación química no deseada. Los ejemplos de tales grupos protectores incluyen ésteres de ácidos carboxílicos, silil éteres de alcoholes, y acetales y cetales de aldehídos y cetonas, respectivamente. Véanse, por ejemplo, Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. Protective Groups in Organic Synthesis, 4ª ed.; Wiley: Nueva York, 2007; Isidro-Llobet, A., *et al.*, Amino Acid-Protecting Groups, Chem. Rev 2009, 109, 2455-2504. Los fragmentos peptídicos o aminoácidos reactivos descritos en el presente documento contienen a menudo de manera adecuada uno o más grupos protectores en funcionalidades que no son la diana de una transformación química objeto. Los grupos protectores a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, carboxibencilo, también denominado benciloxicarbonilo ("Cbz" o "Z"), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), terc-butiloxicarbonilo (Boc), tritilo (Trt), éster metílico (OMe), amida y similares. En las estructuras abreviadas proporcionadas en el presente documento, $-NH_2$ en el extremo C-terminal significa un grupo protector amida ($\sim C(O)NH_2$), "H" en el extremo N-terminal se refiere a un grupo amino libre, y la designación de un grupo protector entre paréntesis significa que el grupo protector está en el nitrógeno δ de ornitina.

Un "aminoácido libre" o "grupo amino libre" se refiere a un aminoácido, fragmento peptídico o péptido que tiene un grupo amino que está en la forma de $-NH_2$, es decir, no está protegido.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "agente de acoplamiento", "agente de condensación", "agente activador de la condensación", usados de manera intercambiable en el presente documento, hacen referencia a un reactivo químico que facilita la reacción de un grupo amino de un aminoácido con un grupo carboxilo de otro aminoácido para formar un enlace peptídico. Los agentes de acoplamiento a modo de ejemplo se conocen ampliamente en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, carbodiimidas tales como N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), diciclohexilcarbodiimida (DCC), hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU), tetrafluoroborato de [benzotriazol-1-iloxi(dimetilamino)metiliden]-dimetilazanio (TBTU), hexafluorofosfato de *N,N,N',N'*-tetrametil-O-(1*H*-benzotriazol-1-il)uronio, hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N*,*N*,*N*',*N*'-tetrametiluronio (HBTU) y N,N-diisopropiletilamina (IPEA). Tales compuestos están disponibles fácilmente de vendedores comerciales.

El término "acoplamiento" tal como se usa en el presente documento se refiere a la reacción entre dos aminoácidos, o dos fragmentos peptídicos, o la reacción de un aminoácido con un fragmento peptídico, para formar de ese modo un péptido que tiene una longitud de cadena que se alarga más allá de la de los reactantes. Generalmente, una reacción de acoplamiento da como resultado la formación de un nuevo enlace peptídico o amida entre dos aminoácidos, o entre un aminoácido y un fragmento peptídico, o entre dos fragmentos peptídicos, sin embargo, el término "acoplamiento" tal como se usa en el presente documento también puede dar como resultado la formación de un enlace disulfuro, por ejemplo, cuando se hacen reaccionar grupos tiol de cisteína para formar un puente disulfuro (como en el caso de la introducción de L-cisteína en la cadena principal de etelcalcetida).

El término "tratar" se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora de una lesión, patología o estado, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo tal como atenuación; remisión; disminución de signos o síntomas o hacer que la lesión, patología o estado sea más tolerable para el paciente; ralentización en la tasa de degeneración

o decadencia; hacer que el punto final de degeneración sea menos debilitante; mejorar un bienestar físico o mental del paciente. El tratamiento o la mejora de signos o síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos, incluyendo los resultados de un examen físico. Por ejemplo, la administración de etelcalcetida puede usarse para tratar HPTS en pacientes de hemodiálisis con TMO-ERC disminuyendo la hormona paratiroidea intacta (HPTi) en suero.

Una "cantidad efectiva" es generalmente una cantidad suficiente para reducir la gravedad y/o frecuencia de síntomas, eliminar los síntomas y/o la causa subyacente, prevenir la aparición de síntomas y/o su causa subyacente, y/o mejorar o remediar el daño que resulta de o está asociado con el estado patológico (por ejemplo, niveles de HPT elevados). Una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad suficiente para remediar un estado patológico o síntomas, particularmente un estado o síntomas asociados con el estado patológico, o prevenir, impedir, retardar o invertir de otro modo la progresión del estado patológico o cualquier otro síntoma no deseable asociado con la enfermedad en cualquier manera sea la que sea. El efecto terapéutico completo no se produce necesariamente por la administración de una dosis, y puede producirse solo tras la administración de una serie de dosis. Por tanto, una cantidad terapéuticamente efectiva puede administrarse como una única dosis o puede administrarse en múltiples dosis.

Los términos "dosis terapéuticamente efectiva" y "cantidad terapéuticamente efectiva," tal como se usan en el presente documento, significan una cantidad que provoca una respuesta biológica o medicinal en un sistema tisular, animal o ser humano, que incluye el alivio o la mejora de los signos o síntomas de la enfermedad o el trastorno que esté tratándose, es decir, una cantidad de etelcalcetida que soporta un nivel observable de una o más respuestas biológicas o medicinales deseadas, por ejemplo, disminución de la HPT.

El término "péptido" se refiere a un compuesto que contiene dos o más aminoácidos en los que el grupo carboxilo de un aminoácido está enlazado al grupo amino de otro aminoácido. Por tanto, la etelcalcetida y fragmentos, productos intermedios y precursores de la misma que contienen dos o más aminoácidos (dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos, etcétera) se denominan en el presente documento generalmente péptidos. El término péptido también es aplicable a péptidos en los que uno o más residuos de aminoácido es un análogo o mimético de un aminoácido que se produce de manera natural correspondiente, así como a péptidos que comprenden solo aminoácidos que se producen de manera natural. Un péptido tal como se proporciona en el presente documento también modificarse, por ejemplo, mediante la adición de residuos carbohidrato para formar glicoproteínas, o fosforilarse.

Una "variante" de un péptido comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más residuos de aminoácido están insertados en, delecionados de y/o sustituidos en la secuencia de aminoácidos en relación con otra secuencia de polipéptido. Las variantes incluyen proteínas de fusión.

Un "derivado" de un péptido es un péptido que se ha modificado químicamente de alguna manera distinta de las variantes de inserción, deleción o sustitución, por ejemplo, a través de conjugación con otro resto químico. Tal modificación puede incluir, por ejemplo, la adición covalente de un grupo a los extremos amino- y/o carboxiterminales del péptido o polipéptido, por ejemplo, acetilación del extremo aminoterminal y/o amidación del extremo carboxiterminal de un péptido o polipéptido. En casos en los que la modificación química es la introducción de uno o más grupos protectores, tal péptido se denominará generalmente en el presente documento como en forma protegida.

El término "aminoácido" incluye su significado normal en la técnica. Los veinte aminoácidos que se producen de manera natural y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase, Immunology-A Synthesis, 2ª Edición, (E. S. Golub y D. R. Green, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, Mass. (1991). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los 19 aminoácidos convencionales (excepto glicina), aminoácidos no naturales tales como aminoácidos [alfa], [alfa]-disustituidos, N-alquilaminoácidos y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para un péptido proporcionado en el presente documento y se incluyen en el término "aminoácido". Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: homocisteína, ornitina, 4-hidroxiprolina, [gamma]-carboxiglutamato, [epsilon]-N,N,N-trimetil-lisina, [epsilon]-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, [sigma]-N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de péptidos usada en el presente documento, el sentido izquierdo es el sentido aminoterminal y el sentido derecho es el sentido carboxiloterminal, según la convención y el uso estándar.

La pureza quiral se refiere a la pureza diastereomérica de un fragmento peptídico o péptido. Por ejemplo, un fragmento peptídico que tiene una pureza quiral del 98% significa que el 98% del fragmento peptídico está en la forma de un único diastereómero. Los péptidos y fragmentos peptídicos proporcionados por el método descrito en el presente documento presentan generalmente una pureza quiral de más del 95%, y a menudo más del 98%, y preferiblemente de al menos el 99%.

La abreviatura "UNCA" se refiere a un N-carboxianhídrido de aminoácido protegido por uretano. Los compuestos UNCA ilustrativos proporcionados en el presente documento incluyen los compuestos **1** y **4.**

El término "temperatura ambiente" tal como se usa en el presente documento se refiere a una temperatura que se encuentra dentro de un intervalo de 16ºC y 26ºC.

Una reacción o un proceso que se lleva a cabo en “fase de disolución” se lleva a cabo en disolución en vez de con el uso de un soporte sólido tal como se emplea en la síntesis de péptidos en fase sólida convencionales. En la síntesis de péptidos en fase sólida (“SPFS”), una cadena peptídica en crecimiento se enlaza a un soporte sólido.

Un proceso en fase de disolución continuo es un proceso en fase de disolución tal como se describió anteriormente, en el que los productos intermedios que se forman en el proceso no se aíslan ni se purifican, sino que se llevan a etapas de transformación posteriores. Generalmente, un proceso en fase de disolución continuo es uno en el que pueden eliminarse los subproductos y reactivos en exceso mediante filtración o extracción, o están en forma gaseosa, para permitir de ese modo la eliminación del aislamiento y la purificación que requieren mucho tiempo de productos intermedios.

Un “sujeto” o “paciente” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier mamífero; en una realización típica, el sujeto o paciente es un humano.

“Opcional” u “opcionalmente” significa que la circunstancia descrita posteriormente puede producirse o no, de modo que la descripción incluye casos en los que se produce la circunstancia y casos en los que no.

El término “sustancialmente” en referencia a una cierta característica o entidad significa hasta un grado significativo o casi completamente (es decir hasta un grado del 85% o mayor) en referencia a la característica o entidad.

El término “aproximadamente”, particularmente en referencia a una cantidad dada, pretende abarcar desviaciones de más o menos el cinco por ciento.

También pueden encontrarse definiciones adicionales en las secciones que siguen.

Compendio

La presente divulgación proporciona métodos en fase de disolución para preparar etelcalcetida, o productos intermedios y precursores de la misma, usando estrategias de acoplamiento de fragmentos.

En un primer enfoque en fase de disolución, la cadena principal de etelcalcetida se ensambla mediante acoplamiento de fragmentos en fase de disolución de dos fragmentos peptídicos, preparándose los fragmentos usando materiales de partida/reactantes de N-carboxianhídrido de aminoácido protegido por uretano (UNCA). Preferiblemente, los fragmentos de etelcalcetida se preparan usando un proceso continuo, es decir, uno que no requiere etapas de aislamiento o purificación intermedias. Los fragmentos de etelcalcetida empleados en el primer enfoque contienen aminoácidos de D-ornitina en lugar de D-arginina. El uso de fragmentos que contienen D-ornitina en vez de sus homólogos de D-arginina permite eludir las reacciones secundarias no deseables asociadas con la presencia de guanidina. Ambos fragmentos usados en la estrategia de acoplamiento para ensamblar un precursor de etelcalcetida, es decir, uno que tiene residuos de D-ornitina en lugar de D-argininas, son sorprendente y ventajosamente cristalizables, lo que significa que los fragmentos pueden purificarse mediante cristalización. La capacidad para formar productos intermedios cristalinos proporciona un método fácil y rentable para proporcionar productos intermedios de proceso altamente puros sin tener que basarse en métodos cromatográficos que requieren mucho disolvente, costosos, que requieren mucho tiempo. Una característica ventajosa adicional del primer enfoque es la capacidad de llevar a cabo una guanilación global (es decir, una única reacción) en el precursor heptapeptídico de etelcalcetida para reemplazar de ese modo las D-ornitinas por D-arginina. Tras el ensamblaje de la cadena principal de etelcalcetida y la guanilación global, se introduce una L-cisteína a través de la formación de enlaces disulfuro.

En un segundo enfoque de acoplamiento de fragmentos en fase de disolución que utiliza una estrategia de síntesis convergente, un tripéptido protegido N-terminal acetilado se acopla a un tetrapéptido C-terminal completamente desprotegido para formar para formar un producto intermedio de etelcalcetida heptapeptídico. En este enfoque en fase de disolución, el alargamiento de cadena (es decir, reacciones de acoplamiento) se lleva a cabo usando aminoácidos/fragmentos peptídicos que tienen residuos amina no protegidos. Usando esta metodología se preparan fragmentos peptídicos que contienen arginina tal como un tetrapéptido C-terminal y sus di- y tripéptidos precursores relacionados de etelcalcetida y se convierten en su(s) sal(es) de tetrafenilborato, para permitir una eliminación simplificada de subproductos e impurezas, sin la necesidad de protección de las cadenas laterales de arginina durante el tratamiento final. Tras la eliminación de subproductos de reacción e impurezas, la forma de sal de tetrafenilborato de un fragmento que contiene arginina se convierte normalmente en una sal inorgánica, por ejemplo, una sal de hidrocloruro. La formación de etelcalcetida a partir de la estructura principal heptapeptídica se lleva a cabo entonces, por ejemplo, mediante la formación de un puente disulfuro con L-cisteína.

Ahora se describirán en detalle las características de los métodos anteriores en las secciones que siguen.

Método en fase de disolución 1

Tal como se ha descrito anteriormente, el primer método para preparar etelcalcetida comprende generalmente el acoplamiento en fase de disolución de (a) un fragmento tetrapeptídico protegido de etelcalcetida en el que las D-argininas se han reemplazado por D-ornitinas con (b) un fragmento tripeptídico protegido de etelcalcetida, para proporcionar un precursor heptapeptídico protegido de etelcalcetida. El precursor heptapeptídico de etelcalcetida corresponde a la cadena principal o parte de estructura principal de etelcalcetida en la que las D-argininas se han reemplazado por D-ornitinas. El precursor heptapeptídico protegido de etelcalcetida se perguanila entonces para reemplazar las D-ornitinas por D-argininas para proporcionar un fragmento heptapeptídico protegido de etelcalcetida, seguido de la introducción de la cadena lateral de cisteína a través de la formación de un enlace disulfuro.

Un esquema de reacción en fase de disolución a modo de ejemplo para preparar un fragmento tetrapeptídico completamente protegido de etelcalcetida (compuesto **9**) se proporciona en la **FIG. 2.** Un fragmento peptídico "completamente protegido" es uno en el que todos los grupos funcionales reactivos susceptibles en el fragmento están protegidos. Véase, por ejemplo, el compuesto **9.** Un fragmento peptídico o aminoácido "protegido" se refiere a un péptido o aminoácido que tiene grupos protectores adecuados en todos los sitios reactivos susceptibles dentro del fragmento peptídico o aminoácido con la excepción del grupo funcional que es la diana pretendida de la reacción de transformación/acoplamiento.

En referencia a la **FIG. 2,** se usa un N-carboxianhídrido N-protegido de D-ornitina protegida para introducir D-ornitina en la cadena peptídica en crecimiento (en lugar de D-arginina) para formar el producto intermedio tetrapeptídico. El material de partida, N-carboxianhídrido protegido por benciloxicarbonilo (Cbz) **1**, puede prepararse a partir de D-ornitina protegida por Boc tal como se describe en Biopolymers, 1996, 40, 183-205 y en la publicación de patente internacional n.º WO 2012/068187. Aunque en el presente documento se describen grupos protectores particulares para la protección/el enmascaramiento del (α) amino terminal, amino de cadena lateral, carboxilo terminal, cisteína y otros grupos funcionales de aminoácido o péptido, tales grupos protectores se proporcionan solo con fines ilustrativos, y se refieren a una o más realizaciones de las metodologías de síntesis en fase de disolución proporcionadas en el presente documento; pueden emplearse otros grupos protectores adecuados y estrategias de desprotección correspondientes y se considera que se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación. Por ejemplo, el UNCA puede contener un grupo protector Boc, Fmoc, Cbz u otro adecuado.

El anillo de anhídrido se abre entonces en condiciones de reacción suaves, por ejemplo, en un disolvente alcohólico en condiciones ambientales, por ejemplo, a temperatura ambiente, para formar el éster metílico correspondiente, **2,** seguido de la eliminación del grupo protector Cbz en condiciones de reacción adecuadas para proporcionar el compuesto de D-ornitina protegido **3** (H-D-Orn(Boc)-OMe) que tiene un grupo α-amino no protegido disponible para el acoplamiento pero que tiene grupos protectores en el extremo C-terminal y el grupo δ-amino de ornitina. El grupo protector Cbz puede eliminarse, por ejemplo, mediante hidrogenólisis catalítica. La hidrogenólisis catalítica se emplea normalmente durante el proceso de alargamiento de cadena para eliminar el grupo Cbz, mientras que pueden emplearse ácidos fuertes tales como HBr en ácido acético, ácido trifluoroacético (TFA) a altas temperaturas, TFA-tioanisol, ácido fluorhídrico líquido o tribromuro de boro para la eliminación del grupo Cbz en la desprotección final del péptido. Condiciones de reacción ilustrativas se muestran en la **FIG. 2.**

Continuando con la preparación de un fragmento tetrapeptídico de etelcalcetida, el compuesto **3**, H-D-Orn(Boc)-OMe, se hace reaccionar entonces con un UNCA de D-alanina protegido, por ejemplo, un UNCA de D-alanina protegido por Cbz, **4**, normalmente en un disolvente aprótico polar para proporcionar un dipéptido de D-ornitina-D-arginina completamente protegido, Z-D-Ala-D-Orn(Boc)-OMe, **5.** Los disolventes orgánicos apróticos polares adecuados para llevar a cabo una reacción de adición de UNCA incluyen, por ejemplo, éteres, ésteres, hidrocarburos aromáticos polares e hidrocarburos clorados. Los disolventes a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, dimetilsulfóxido, N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, N-metil-2-pirrolidina, formamida, tetrahidrofurano, acetonitrilo y similares. Una reacción de adición de UNCA se lleva a cabo normalmente a temperaturas que oscilan entre aproximadamente -15ºC y aproximadamente 60ºC, o entre aproximadamente -10ºC y aproximadamente 30ºC, o más preferiblemente entre aproximadamente -10ºC y aproximadamente 25ºC.

Si se desea, el UNCA en exceso puede eliminarse de la mezcla de reacción, por ejemplo, mediante la reacción con un eliminador tal como NH_2 Silicycle®, o cualquier otra amina soportada en sólido adecuada, que puede eliminarse entonces mediante filtración. Los di-, tri- y tetrapéptidos protegidos intermedios pueden, si se desea, purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante recristalización o usando técnicas cromatográficas. Por ejemplo, el di-, tri- y/o tetrapéptido (protegido o completamente protegido) puede purificarse mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice usando un eluente tal como un sistema de disolventes mixto de alcohol-hidrocarburo clorado, tal como, por ejemplo, metanol al 5% en diclorometano o cloroformo. Para preparar un producto intermedio tetrapeptídico completamente protegido, PG-NH-D-Orn(NH-PG)-D-Orn(NH-PG)-D-Ala-Orn(NH-PG)-CO_2-PG, donde "PG" significa un grupo protector, por ejemplo, Z-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-OMe, **9**, se repite de manera iterativa una estrategia de desprotección-acoplamiento usando, por ejemplo, un dipéptido de D-ornitina-D-alanina completamente protegida tal como el compuesto **5,** para proporcionar el producto intermedio tetrapeptídico completamente protegido.

Por ejemplo, la desprotección del compuesto **5** se lleva a cabo para eliminar el grupo protector carboxibencilo en el extremo N-terminal de D-alanina, por ejemplo, mediante hidrogenólisis catalítica (por ejemplo, usando gas de hidrógeno en presencia de un catalizador de paladio-carbono) para proporcionar **6**, seguido de alargamiento de cadena por medio de una reacción con un UNCA de D-ornitina protegida tal como Z-D-Orn(Boc) UNCA, para proporcionar un tripéptido completamente protegido, **7.** El compuesto **7** es cristalizable, es decir, puede purificarse mediante recristalización. Los disolventes o sistemas de disolventes de recristalización adecuados incluyen, por ejemplo, acetonitrilo. La desprotección se lleva a cabo entonces de nuevo, esta vez en el compuesto tripeptídico completamente protegido, con alargamiento de cadena, **7,** Z-D-Orn(Boc)-D-Ala-D-Orn(Boc)-OMe, para eliminar el grupo protector carboxibencilo, por ejemplo, mediante hidrogenólisis catalítica, para formar el compuesto tripeptídico protegido **8**, H-D-Orn(Boc)-D-Ala-D-Orn(Boc)-OMe. El grupo amino libre del compuesto **8** se hace reaccionar entonces con un UNCA de D-ornitina protegida, por ejemplo, Z-D-Orn(Boc) UNCA, para proporcionar un tetrapéptido completamente protegido, **9.**

Como puede verse en el ejemplo **7,** el enfoque de alargamiento de cadena iterativo basado en UNCA anterior era efectivo para proporcionar el compuesto **9** en un rendimiento mayor del 90%. El grupo amino terminal del producto intermedio tetrapeptídico completamente protegido, **9**, se elimina entonces para formar el producto intermedio tetrapeptídico protegido **14**, en el que el extremo N-terminal está disponible para el acoplamiento al extremo C-terminal no protegido del compuesto de fragmento tripeptídico protegido **13.** Las síntesis ilustrativas de los compuestos **2-9** se proporcionan en los ejemplos 1-7.

Los di-, tri- y tetrapéptidos protegidos y/o completamente protegidos así preparados son adecuados para su uso en transformaciones posteriores sin requerir una purificación cromatográfica laboriosa. Los fragmentos peptídicos pueden aislarse antes del acoplamiento en fase de disolución a otros fragmentos peptídicos o aminoácidos, sin embargo, tales materiales pueden aislarse como materiales brutos sin requerir una purificación adicional antes de una reacción de acoplamiento/transformación posterior. Los materiales brutos pueden aislarse, por ejemplo, mediante la eliminación de subproductos sólidos y/o materiales de partida sin reaccionar mediante filtración, seguida de concentración del filtrado a presión reducida para eliminar el disolvente. Véase, por ejemplo, la recuperación de los compuestos **6** y **8.** Los fragmentos intermedios pueden recuperarse alternativamente mediante extracción en un disolvente adecuado, seguida de concentración a presión reducida.

Tal como se muestra en los ejemplos, tras la eliminación de los grupos protectores α-amino, los compuestos **6** y **8** se pasaron a la siguiente reacción de alargamiento de cadena de UNCA-aminoácido sin purificación adicional del producto bruto. Si se desea, sin embargo, los fragmentos pueden purificarse adicionalmente tal como se describió anteriormente, por ejemplo, mediante cromatografía en columna o mediante recristalización. Véase, por ejemplo, el ejemplo **7**, que describe la purificación del compuesto **9**, Z-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-OMe (9), un precursor tetrapeptídico completamente protegido de etelcalcetida, mediante recristalización en acetonitrilo. La pureza quiral del fragmento tetrapeptídico es normalmente bastante alta. Generalmente, la pureza quiral es mayor del 90%, o mayor del 92%, o preferiblemente mayor del 95% o incluso más preferiblemente mayor de 98%. Como puede verse a partir del ejemplo **7**, que usa el enfoque anterior, el compuesto tetrapeptídico completamente protegido, **9**, se preparó en una pureza quiral del 99%.

El uso de una estrategia basada en UNCA para formar los compuestos precursores tetrapeptídicos completamente protegidos o protegidos **9** o **14**, es particularmente ventajoso debido a la formación de un producto de reacción gaseoso, dióxido de carbono, que alivia la necesidad de numerosas etapas de procesamiento y/o eliminación de sólidos.

Para formar un precursor heptapeptídico de etelcalcetida, el fragmento tetrapeptídico **9**, tras la eliminación del grupo Cbz del extremo N-terminal para proporcionar el fragmento tetrapeptídico **14**, se acopla con un fragmento tripeptídico protegido que comprende una D-cisteína terminal. Véase, por ejemplo, la Fig. 3, que proporciona un esquema de reacción a modo de ejemplo para el acoplamiento de un fragmento tetrapeptídico N-terminal protegido de etelcalcetida que tiene un grupo amino N-terminal libre, **14**, con un fragmento tripeptídico protegido de etelcalcetida, **13**, que tiene su extremo C-terminal no protegido, para proporcionar en última instancia un precursor heptapeptídico completamente protegido de etelcalcetida, **16.** El precursor heptapeptídico de etelcalcetida, **16**, está completamente protegido y corresponde a la cadena principal de etelcalcetida, pero comprendiendo en el mismo D-ornitinas en lugar de D-argininas. El fragmento heptapeptídico completamente protegido de etelcalcetida, **18**, se produce mediante la perguanilación de **17**, teniendo el compuesto **17** todos sus grupos δ-amino de ornitina en forma no protegida (es decir, en forma amino libre).

Todavía en referencia a la FIG. 3, un fragmento tripeptídico protegido de etelcalcetida, **13,** que tiene una D-cisteína terminal, se forma acoplando el D-Cys-OH protegido, **10**, es decir, -NH-D-Cys(S-PG)OH, con un fragmento dipeptídico protegido intermedio, H-D-Ala-D-Orn(NH-PG)-CO-PG (**6**), para proporcionar un fragmento tripeptídico completamente protegido de etelcalcetida. Puede usarse cualquier grupo protector adecuado para proteger el tiol de la D-cisteína; los grupos protectores adecuados incluyen acetamidometilo (Acm), tritilo (Trt), bencilo (Bn) y metilbencilo (Meb), butilo terciario (t-Bu), p-metoxibencilo (Mob), monometoxitritilo (Mmt), 2-piridin-sulfenilo (S-Pry) y terc-butilmercapto (S-tBu),

prefiriéndose el grupo Acm. Específicamente, en una realización del método, el producto intermedio dipeptídico **6** se acopla al aminoácido comercialmente disponible **10**, Fmoc-D-Cys(Acm)OH, en condiciones de acoplamiento de péptidos estándar para proporcionar un producto intermedio tripeptídico completamente protegido **11,** Fmoc-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-OMe, o más generalmente, PG-NH-D-Cys(S-PG)-D-Ala-D-Orn(NH-PG)-COPG. Los reactivos de acoplamiento en fase de disolución convencionales que pueden emplearse en esta y otras reacciones de acoplamiento convencional incluyen, por ejemplo, 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol, N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), diciclohexilcarbodiimida (DCC), hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU), tetrafluoroborato de [benzotriazol-1-iloxi(dimetilamino)metiliden]-dimetilazanio (TBTU), hexafluorofosfato de *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)uronio, hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetrametiluronio (HBTU) y N,N-diisopropiletilamina (IPEA); también pueden usarse ésteres activados tales como ésteres de p-nitrofenol o hidroxisuccinimidilo.

El tripéptido completamente protegido, **11**, se desprotege entonces, por ejemplo, para eliminar el grupo de desprotección de Fmoc, en condiciones de desprotección adecuadas. El grupo protector Fmoc puede eliminarse de manera adecuada, por ejemplo, mediante tratamiento con base, normalmente una amina secundaria tal como piperidina. La eliminación en fase de disolución puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante tratamiento con una base tal como amoniaco líquido, morfolina, piperidina, dietilamina, dimetilacetamida o piperazina, en un disolvente orgánico. El grupo amino libre resultante se protege entonces con un grupo protector diferente, por ejemplo, un grupo acetilo, para proporcionar el compuesto completamente protegido **12**, Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-OMe, en el que el grupo acetilo recién introducido es estable a las condiciones de reacción que siguen. El compuesto de éster metílico N-protegido **12** se hidroliza entonces en condiciones básicas para proporcionar el producto intermedio tripeptídico que contiene ácido libre, protegido, **13**, Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-OH, que, tal como se describió previamente, se acopla al fragmento tetrapeptídico de amino libre derivado de **9,** compuesto **14,** H-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-OMe, para proporcionar el producto intermedio heptapeptídico completamente protegido **15,** Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-OMe. La funcionalidad éster metílico de ácido carboxílico en **15** se transforma en un grupo amida, -C(O)NH_2, mediante tratamiento con amoniaco, para proporcionar el compuesto heptapeptídico completamente protegido, **16**, Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-NH_2. El compuesto **16** se lleva entonces a una etapa de desprotección global para eliminar todos los grupos protectores, por ejemplo, Boc u otros grupos protectores adecuados, de los grupos δ-amino de ornitina, para proporcionar de este modo un compuesto tal como **17**, Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn-D-Orn-D-Orn-D-Ala-Orn-NH_2, que comprende grupos δ-amino libres en cada una de las cuatro ornitinas. Un precursor de etelcalcetida heptapeptídico resultante tal como **17** se perguanila entonces para reemplazar las cuatro ornitinas desprotegidas en el mismo por D-argininas protegidas. La reacción se lleva a cabo usando, por ejemplo, un reactivo de pirazolcarboxamidina en condiciones de reacción adecuadas para proporcionar la estructura principal de etelcalcetida completamente protegida, compuesto **18,** Ac-D-Cyst(Acm)-D-Ala-D-Arg(Boc)$_2$-D-Arg(Boc)$_2$-D-Arg(Boc)$_2$-D-Ala-D-Arg(Boc)$_2$-NH_2. Los reactivos de guanilación a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, hidrocloruro de 1H-1,2,4-triazol-1-carboxamidina, hidrocloruro de 1-H-pirazol-1-carboxamidina e hidrocloruro de 3,5-dimetil-1-H-pirazol-1-carboxamidina. También pueden usarse reactivos a base de tiourea o isotiourea.

Los grupos protectores de D-arginina se eliminan entonces globalmente de la estructura principal de etelcalcetida completamente protegida. Por ejemplo, tal como se ilustra en la Fig. 4, la desprotección de Boc global se lleva a cabo en el producto intermedio **18,** usando, por ejemplo, TFA o cualquier otra estrategia de desprotección adecuada, para proporcionar el compuesto intermedio **19.** El compuesto intermedio **19** presenta un grupo tiol de cisteína protegido que se elimina antes del acoplamiento a L-cisteína para proporcionar el producto deseado, etelcalcetida. Tal como se muestra en la FIG. 4 a modo de ejemplo, el grupo protector acetamido en **19** puede eliminarse mediante escisión oxidativa, por ejemplo, en presencia de un agente oxidante tal como yodo, para formar el tiol libre, seguido de acoplamiento a L-Cys a través de la formación de enlaces disulfuro. Los reactivos adicionales que pueden usarse para eliminar el grupo acetamido incluyen, por ejemplo, trifluoroacetato de talio Tl(TFA)$_3$ y sales de mercurio(II) tales como acetato de mercurio (II). Tanto la eliminación del grupo protector de D-cisteína como la etapa de acoplamiento final en la que la cadena lateral de L-cisteína se acopla a la estructura principal de etelcalcetida que contiene tiol libre pueden llevarse a cabo en el mismo recipiente de reacción para proporcionar el producto peptídico deseado, etelcalcetida, **20.** La Fig. 4 proporciona condiciones de reacción a modo de ejemplo para llevar a cabo la desprotección global de argininas protegidas por Boc contenidas en el producto intermedio heptapeptídico, seguida de la desprotección de tiol y del acoplamiento a L-cisteína para formar el producto deseado.

Método en fase de disolución 2

En un segundo aspecto, en el presente documento se proporciona un método de acoplamiento de fragmentos en fase de disolución en el que un tripéptido protegido N-terminal acetilado que tiene un grupo carboxilo libre se acopla a una amida tetrapeptídica que comprende una cadena lateral de arginina no protegida que tiene un grupo α-amino libre para formar un producto intermedio de etelcalcetida heptapeptídico tal como se muestra esquemáticamente en la FIG. 7. Usando este enfoque, se lleva a cabo el alargamiento de cadena usando aminoácidos/fragmentos peptídicos que tienen residuos arginina no protegidos. Los fragmentos peptídicos que contienen arginina tales como un tetrapéptido C-terminal de etelcalcetida y sus di- y tripéptidos precursores de etelcalcetida relacionados, se preparan y convierten

en su(s) sal(es) de tetrafenilborato, para permitir una eliminación simplificada de subproductos e impurezas tras una reacción de acoplamiento, sin la necesidad de protección de las cadenas laterales de arginina, por ejemplo, durante el tratamiento final de las mezclas de reacción resultantes. Tras la eliminación de los subproductos de reacción e impurezas, por ejemplo, mediante la extracción en una fase acuosa, la sal de tetrafenilborato de un fragmento que contiene arginina, por ejemplo, en un disolvente orgánico, se convierte en una sal inorgánica, por ejemplo, una sal de hidrocloruro. Entonces se lleva a cabo la formación de etelcalcetida a partir de la estructura principal heptapeptídica, por ejemplo, mediante la formación de un puente disulfuro con L-cisteína.

A la segunda metodología de síntesis en fase de disolución proporcionada en el presente documento pertenece un método para preparar uno de los reactantes que se usa en el enfoque de acoplamiento de fragmentos, es decir, un fragmento tetrapeptídico C-terminal completamente aminodesprotegido de etelcalcetida. Pasando ahora a la FIG. 5, esta figura demuestra una realización de un método para formar un fragmento tetrapeptídico completamente aminodesprotegido **30**, SEQ ID NO:10, H-(D)Arg-(D)Arg-(D)Ala-(D)Arg-NH_2,4HCl. La realización ilustrada en la FIG. 5 se describe en los ejemplos 17-20.

La síntesis de un tetrapéptido tal como **30** puede llevarse a cabo tal como sigue. Por ejemplo, la alanina aminoprotegida que tiene su grupo carboxi activado de manera adecuada, por ejemplo, en la forma de un éster activado, por ejemplo, Z-D-Ala-OSu, **22**, se acopla a la arginina que tiene su grupo carboxilo protegido de manera adecuado tal como, por ejemplo, hidrocloruro de D-arginamida, **23,** en condiciones de acoplamiento para proporcionar un fragmento dipeptídico protegido, PG-NH-(D)-Ala-(D)-Arg-CO-PG. La reacción de acoplamiento se lleva a cabo, por ejemplo, en un disolvente orgánico aprótico tal como, por ejemplo, dimetilacetamida, N,N-dimetilformamida (DMF), N-metilpirrolidona (NMP) o acetonitrilo, en presencia de un agente de acoplamiento tal como N,N-diisopropiletilamina, HATU o HBTU, o similares, que actúan como eliminadores de protones durante la reacción de acoplamiento. La reacción de acoplamiento se lleva a cabo normalmente en condiciones suaves, por ejemplo, a una temperatura que oscila entre aproximadamente 10ºC y aproximadamente 60ºC, o entre aproximadamente 15ºC y aproximadamente 45ºC, o entre aproximadamente 20ºC y 30ºC. Un dipéptido de D-Ala-D-Arg a modo de ejemplo comprende un grupo amino de alanina protegido por carboxibencilo terminal y el grupo carboxilo de D-arginina protegido como amida correspondiente, por ejemplo, Z-(D)Ala-(D)Arg-NH_2 **24.** Tras el acoplamiento puede añadirse agua a la mezcla de reacción, por ejemplo, para disolver el dipéptido, y pueden eliminarse opcionalmente los materiales de partida sin reaccionar y subproductos en una o más etapas de lavado, usando, por ejemplo, un disolvente orgánico adecuado tal como acetato de etilo. El dipéptido se trata entonces con tetrafenilborato de sodio (TPB) para formar la sal de TPB correspondiente. La formación de la sal de TPB permite que se extraiga el fragmento en un disolvente orgánico tal como diclorometano, cloroformo o cualquier otro disolvente adecuado. Véase, por ejemplo, la publicación de patente estadounidense n.º US20110098446. La fase orgánica resultante se lava entonces preferiblemente una o múltiples veces con agua para eliminar los subproductos de la reacción de acoplamiento y similares. Tras el tratamiento de la fase orgánica para eliminar las impurezas no deseadas, se lleva a cabo una reacción de intercambio iónico en un disolvente adecuado tal como metanol, por ejemplo, usando una columna de intercambio iónico para proporcionar el fragmento dipeptídico como sal de ácido inorgánico, por ejemplo, como sal de hidrocloruro. Entonces se lleva a cabo la eliminación del grupo protector amino de D-alanina terminal. Por ejemplo, el grupo carboxibencilo en Z-(D)Ala-(D)Arg-NH_2 **24** puede eliminarse mediante hidrogenólisis catalítica tal como se describió previamente. Detalles de las condiciones de reacción adecuadas para llevar a cabo la reacción de acoplamiento descrita anteriormente y el intercambio de sal se proporcionan en el ejemplo 18. Este proceso de acoplamiento, formación de sal de tetrafenilborato, intercambio de sal y desprotección se lleva entonces a cabo de manera iterativa tal como se muestra en la Fig. 5. Por ejemplo, las etapas de acoplamiento/hidrogenación se realizan de manera iterativa en **25** usando hidrocloruro de PG-NH-D-arginina, por ejemplo, Z-D-Arg-OH **26** para proporcionar el tripéptido **27** y posteriormente el tetrapéptido deseado **30** en un alto rendimiento. Véanse, por ejemplo, los ejemplos **19** y **20.** Las condiciones de acoplamiento adecuadas pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica de síntesis de péptidos, síntesis orgánica o similares. Por ejemplo, el grupo carboxi de un aminoácido tal como **26** puede activarse con cualquier grupo de activación adecuado, y la reacción de acoplamiento llevarse a cabo usando cualquiera de un número de agentes de acoplamiento conocidos por los expertos en la técnica. Las condiciones de acoplamiento particulares mostradas en la FIG. 5 y descritas en los ejemplos correspondientes está previsto que sean meramente a modo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance. La metodología anterior es útil para preparar un tetrapéptido completamente aminodesprotegido tal como el compuesto **30**, que se usa entonces en una reacción de acoplamiento en fase de disolución para formar un fragmento heptapeptídico protegido de etelcalcetida. El número de moléculas de ácido contenidas en una sal de adición de ácido, tal como una sal de HCl, puede variar dado que diferentes productos sometidos a intercambio iónico tendrán diferentes capacidades para retener un ácido, por ejemplo, HCl. En la preparación de etelcalcetida, sitios básicos adicionales disponibles para formar una sal de HCl se introducen en la cadena peptídica en crecimiento a medida que se introducen argininas adicionales.

La FIG. 6 proporciona un esquema de reacción a modo de ejemplo y condiciones de reacción a modo de ejemplo para preparar un fragmento tripeptídico protegido N-terminal acetilado de etelcalcetida. El fragmento tripeptídico que contiene un aminoácido D-cisteína para el acoplamiento con el tetrapéptido descrito anteriormente puede ensamblarse de una manera similar tal como se describió anteriormente para el tetrapéptido, con la excepción de que el material de partida es H-D-Arg-OH, **31.** La alanina no protegida, H-D-Arg-OH, **31**, se acopla a la alanina aminoprotegida que

tiene su grupo carboxi activado de manera adecuada, por ejemplo, en la forma de un éster activado, por ejemplo, Z-D-Ala-OSu, **22**, en condiciones de acoplamiento adecuadas para proporcionar un fragmento dipeptídico protegido, PG-NH-(D)-Ala-(D)-Arg-OH. Cuando el dipéptido resultante está protegido con carboxibencilo, el dipéptido corresponde a **32**, Z-D-Ala-(D)-Arg-OH HCl. La desprotección del dipéptido se lleva a cabo entonces, usando condiciones de desprotección apropiadas para el grupo protector particular empleado. Por ejemplo, el dipéptido **32** puede someterse a hidrogenólisis para eliminar de ese modo el grupo protector Z. El dipéptido completamente desprotegido resultante es H-D-Ala-D-Arg-OH, **33.** El tripéptido se forma entonces, por ejemplo, acoplando el grupo amino libre en **33** con PG-NH-D-Cys(SH-PG)-OH, es decir, una cisteína protegida por tiol, protegida N-terminal, tal como Fmoc-D-Cys(trt)-OH, **34** para formar un tripéptido protegido, **35**, Fmoc-D-Cys(trt)-D-Ala-D-Arg-OH. La reacción de acoplamiento se lleva a cabo en condiciones de acoplamiento ampliamente conocidas en la técnica. Tal como se describe, el acoplamiento puede, por ejemplo, llevarse a cabo usando un agente de acoplamiento de carbodiimida. En particular, la reacción de acoplamiento puede efectuarse usando los activadores hidroxinorborneno/DCC en un sistema de disolventes adecuado, por ejemplo, una mezcla de disolventes de dimetilformamida-alcohol isopropílico, para proporcionar el tripéptido deseado. El tripéptido resultante se desprotege entonces, es decir, se elimina el grupo protector N-terminal usando una metodología de desprotección adecuada. Por ejemplo, el grupo Fmoc se elimina mediante tratamiento con base en un disolvente orgánico. Por ejemplo, el grupo protector Fmoc se elimina de **35** mediante tratamiento con un exceso molar de piperidina en metanol, y el grupo amino libre en el tripéptido resultante se ocupa entonces con un grupo acetilo para proporcionar un fragmento tripeptídico protegido N-terminal acetilado de etelcalcetida, por ejemplo, **36.**

Los compuestos intermedios, es decir, el fragmento tripeptídico protegido N-terminal acetilado y el fragmento tetrapeptídico C-terminal completamente aminodesprotegido de etelcalcetida, se acoplan entonces para formar un fragmento heptapeptídico protegido de etelcalcetida que comprende una D-cisteína terminal. Véase, por ejemplo, el ejemplo 25. Tal como se describe en el mismo, H-(D)Arg-(D)Arg-(D)Ala-(D)Arg-NH_2.4HCl, **30**, o un equivalente protegido de manera adecuada del mismo, se acopla con Ac-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg-OH, **36**, o un equivalente protegido de manera adecuada del mismo, en disolución para proporcionar un fragmento heptapeptídico protegido de etelcalcetida tal como **37.** El acoplamiento de los fragmentos tri- y tetrapeptídicos se lleva a cabo usando uno o más agentes de acoplamiento y condiciones de acoplamiento conocidas también en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos pueden acoplarse usando un agente de acoplamiento de carbodiimida, o una sal de fosfonio o de aminio. Por ejemplo, la reacción de acoplamiento puede llevarse a cabo usando un agente de acoplamiento de carbodiimida, opcionalmente en presencia de un derivado de hidroxilamina, tal como N-hidroxisuccinimida (HOSu), HODhbt, HOBt, HOAt, o un derivado de 1-hidroxi-1,2,3-triazol. Las condiciones de acoplamiento ilustrativas incluyen el uso de un reactivo de acoplamiento de carbodiimida tal como EDC, en presencia de N-óxido de 2-hidroxipiridina. También puede añadirse diisopropiletilamina a la mezcla de reacción, por ejemplo, para acelerar la velocidad de reacción. Pueden encontrarse reactivos y condiciones de acoplamiento adicionales adecuados para su uso en las reacciones de acoplamiento descritas en el presente documento, por ejemplo, en “Recent development in peptide coupling reagents”, Al-Warhi, T.I., *et al.*, J. of Saudi Chemical Society (2012), 16, 97-116. La reacción de acoplamiento se lleva a cabo generalmente a temperaturas que oscilan entre aproximadamente -25ºC y aproximadamente 60ºC, o entre aproximadamente 0ºC y aproximadamente 40ºC, o entre aproximadamente 0ºC y aproximadamente 25ºC, dependiendo del agente de acoplamiento empleado. La reacción de acoplamiento se lleva a cabo generalmente en un disolvente aprótico tal como dimetilacetamida. Disolventes apróticos adecuados para su uso en reacciones de acoplamiento se describen previamente en el presente documento. Tras completar la reacción de acoplamiento, el heptapéptido bruto puede recuperarse de la mezcla de reacción, por ejemplo, mediante precipitación con acetonitrilo. Si se desea, el fragmento heptapeptídico puede purificarse adicionalmente usando cualquier método de purificación de péptidos adecuado conocido en la técnica. En una realización, el heptapéptido se purifica mediante cromatografía.

La cadena lateral de cisteína se introduce entonces en un fragmento heptapeptídico protegido de etelcalcetida tal como **37,** es decir, que comprende en forma protegida la cadena principal de etelcalcetida que tiene una D-cisteína terminal, mediante la reacción de los grupos tiol de cisteína en condiciones oxidantes para formar un puente disulfuro. Por ejemplo, la formación de enlaces disulfuro puede llevarse a cabo haciendo reaccionar el fragmento heptapeptídico protegido de etelcalcetida con un exceso de L-cisteína tiolprotegida, por ejemplo, H-L-Cys(Trt)-OH, en presencia de yodo. Generalmente se usa un exceso de yodo y la reacción puede llevarse a cabo, por ejemplo, en agua o en un disolvente que contiene agua. La reacción se lleva a cabo normalmente a un pH de desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 7,5. En una realización, la reacción de acoplamiento de tiol se lleva a cabo a un pH de menos de 7, por ejemplo, desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 5. Disminuir el pH de la disolución de reacción puede, por ejemplo, ayudar en la disolución del reactante de cisteína protegida, L-H-Cys(trt)-OH. Esta reacción de acoplamiento de L-cisteína final se lleva a cabo, por ejemplo, de una manera similar a la descrita en el método en fase de disolución 1 para proporcionar el producto deseado, etelcalcetida. El uso de yodo para facilitar la formación de enlaces disulfuro permite convenientemente la escisión oxidativa tanto del grupo acetamido como del grupo tritilo para proporcionar el producto deseado. El producto obtenido en fase de disolución, etelcalcetida, se purifica normalmente de manera adicional. Los subproductos de reacción se eliminan de la mezcla de reacción, por ejemplo, mediante extracción con un disolvente adecuado, y el producto bruto se purifica usando técnicas de separación y/o purificación convencionales. Por ejemplo, en una realización, la etelcalcetida bruta se purifica mediante cromatografía de

intercambio iónico. Las sales presentes en las fracciones recogidas tras el tratamiento de intercambio iónico pueden, por ejemplo, eliminarse mediante nanofiltración.

Ejemplos

Ejemplo 1

Síntesis de 2-(benciloxicarbonilamino)-*5*-(*terc*-butoxicarbonilamino)pentanoato de (*R*)-metilo, compuesto 2

Z-D-Orn(Boc)-OMe (2). Una disolución de Z-D-Orn(Boc) UNCA **(1)**; 60 g, 157,7 mmol) en MeOH anhidro (1000 ml) a temperatura ambiental bajo atmósfera de nitrógeno se agitó durante 0,5 h, tiempo en el cual la reacción se había completado tal como se indica mediante TLC. El disolvente en exceso se eliminó a presión reducida para generar **2** (55,0 g, 95%) como una goma espesa. El material se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d_6). δ 7,71 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,32 (m, 5H), 6,77 (s a, 1H), 5,01 (s, 2H), 3,99 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 2,87 (dd, J = 12,1, 6,1 Hz, 2H), 1,63 (m, 2H), 1,54 (m, 2H), 1,39 (s, 9H); ^{13}C RMN (75 MHz, DMSo-d_6). δ 173,3, 156,6, 156,0, 137,9, 128,8, 128,3, 128,2, 127,6, 77,8, 65,9, 54,1, 52,2, 28,7, 28,5, 26,4; EM-IES (m/z) calcul. para $C_{19}H_{29}N_2O_6$ $[M+H\text{-}Boc]^+$ 281, hallado 281; pureza según HPLC. 99,5%; pureza quiral. 100%.

Ejemplo 2

Síntesis de 2-amino-5-(*terc*-butoxicarbonilamino)pentanoato de (*R*)-metilo, compuesto 3

H-D-Orn(Boc)-OMe (3). A una disolución de **2** (15,0 g, 39,4 mmol) en EtOAc anhidro (250 ml) se le añadieron Pd-C (2 g, al 10% en carbón activado) bajo una atmósfera de nitrógeno y un cantidad catalítica de ácido acético, y la disolución resultante se agitó durante 16 h a temperatura ambiental a presión de hidrógeno (3 kg). La terminación de la reacción se indicó mediante TLC (sumergida en disolución de ninhidrina, secada y calentamiento). La mezcla de reacción se hizo pasar a través de un lecho de Celite; el sólido en el filtro se lavó con EtOAc (100 ml). El filtrado así obtenido se concentró a presión reducida para obtener un residuo bruto. La masa bruta se evaporó conjuntamente dos veces con tolueno para proporcionar **3** (11,2 g; bruto) como una goma espesa, que se usó sin purificación adicional.

Ejemplo 3

Síntesis de 5,15,15-trimetil-3,6,13-trioxo-1-fenil-2,14-dioxa-4,7,12-triazahexadecano-8-carboxilato de (5*R*,8*R*)-metilo, compuesto 5

Z-D-Ala-D-Orn(Boc)-OMe (5). A una disolución bien agitada de **3** (11,0 g bruto) en THF anhidro (250 ml) bajo atmósfera de nitrógeno se le añadió 4-metil-2,5-dioxooxazolidino-3-carboxilato de (*R*)-bencilo, **4** (11,2 g, 47,3 mmol) a 0ºC y los contenidos se agitaron durante 2 h a temperatura ambiental, tras lo cual la reacción se había completado tal como se indica mediante TLC. Al matraz se le añadió amina Silicycle (5 g), y se continuó con la agitación a temperatura ambiental durante otras 16 h para eliminar mediante separación el anhídrido residual. La amina Silicycle se eliminó mediante filtración y el filtrado se evaporó a presión reducida para tener un residuo bruto. La purificación de la masa bruta mediante columna ultrarrápida de gel de sílice (230-400 de malla) con MeOH al 2%/$CHCl_3$ produjo **5** (12,0 g, 67%) como un sólido blanco. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d_6). δ 8,18 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,35 (m, 6H), 6,77 (s a, 1H), 4,99 (s, 2H), 4,12 (m, 2H), 3,59 (s, 3H), 2,87 (m, 2H), 1,61 (m, 2H), 1,36 (m, 2H), 1,35 (s, 9H), 1,18 (d, J = 7,1 Hz, 3H); ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6). δ 173,2, 172,9, 156,0, 137,5, 128,8, 128,2, 128,19, 77,9, 65,8, 52,2, 50,2, 28,7, 28,6, 26,4, 18,6; MS ESI (m/z) $C_{22}H_{34}N_3O_7$ $[M+H\text{-}Boc]^+$ 352, encontrado 352; HPLC pureza. 99,9%.

Ejemplo 4

Síntesis de 2-((*R*)-2-aminopropanamido)-5-(*terc*-butoxicarbonilamino)pentanoato de (*R*)-metilo, compuesto 6, SEQ ID NO:6

H-D-Ala-D-Orn(Boc)-OMe (6). A una disolución de **5** (56,0 g, 124,1 mmol) en THF anhidro (500 ml) se le añadió Pd-C (6 g, al 10% en carbón activado; base húmeda) bajo atmósfera de nitrógeno, y la disolución resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiental a presión de hidrógeno (40 psi). La terminación de la reacción se indicó mediante TLC (sumergida en disolución de ninhidrina, secada y calentamiento). La mezcla de reacción se hizo pasar a través de un lecho de Celite, el sólido en el filtro se lavó con THF (200 ml), el filtrado así obtenido se concentró a presión reducida para dar **6** (38,0 g; bruto) como un alquitrán negro, que se usó sin purificación adicional.

Ejemplo 5

Síntesis de 15-(benciloxicarbonilamino)-2,2,12,22,22-pentametil-4,11,14,20-tetraoxo-3,21-dioxa-5,10,13,19-tetraazatricosano-9-carboxilato de (9*R*,12*R*,15*R*)-metilo, compuesto 7, SEQ ID NO:7

Z-D-Orn(Boc)-D-Ala-D-Orn(Boc)-OMe (7). A una disolución bien agitada de **6** (38,0 g; bruto) en THF anhidro (500 ml) se le añadió **1** (51,7 g, 131,8 mmol) a 0ºC bajo atmósfera de nitrógeno y los contenidos se agitaron durante 2 h a temperatura ambiental, tras lo cual la reacción se había completado tal como se indica mediante TLC. Al matraz se le añadió amina Silicycle (15 g), y se continuó con la agitación a temperatura ambiental durante otras 16 h para eliminar mediante separación el anhídrido residual. La amina Silicycle se eliminó mediante filtración y el filtrado se evaporó a presión reducida para tener un residuo bruto. La masa bruta se recristalizó en acetonitrilo (6 volúmenes) para producir **7** (45,0 g, 55%) como un sólido blanco. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d_6). δ 8,19 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 7,92 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,36 (m, 6H), 6,76 (m, 2H), 4,99 (s, 2H), 4,29 (m, 1H), 4,18 (m, 1H), 3,94 (m, 1H), 3,58 (s, 3H), 2,87 (m, 4H), 1,58 (m, 8H), 1,35 (m, 18H), 1,18 (d, J = 7 Hz, 3H); MS ESI (*m*/*z*) calculado. para $C_{32}H_{52}N_5O_{10}$ $[M+H]^+$ 666, encontrado 666; HPLC pureza. 98,8%; pureza quiral. 100%.

Ejemplo 6

Síntesis de 15-amino-2,2,12,22,22-pentametil-4,11,14,20-tetraoxo-3,21-dioxa-5,10,13,19-tetraazatricosano-9-carboxilato de (9*R*,12*R*,15*R*)-metilo, compuesto 8, SEQ ID NO:8

H-D-Orn(Boc)-D-Ala-D-Orn(Boc)-OMe (8). A una disolución de **7** (25,0 g, 37,6 mmol) en THF anhidro (200 ml) se le añadió Pd-C (2,5 g, al 10% en carbón activado; base húmeda) bajo atmósfera de nitrógeno, y la disolución resultante se agitó durante 3 h a temperatura ambiental a presión de hidrógeno (40 psi). La terminación de la reacción se indicó mediante TLC (sumergida en disolución de ninhidrina, secada y calentamiento). La mezcla de reacción se hizo pasar a través de un lecho de Celite, el sólido en el filtro se lavó con THF (200 ml), el filtrado así obtenido se concentró a presión reducida para dar **8** (18,2 g; bruto) como una masa esponjosa negra que se usó sin purificación adicional.

Ejemplo 7

Síntesis de 18-(benciloxicarbonilamino)-15-(3-(*terc*-butoxicarbonilamino)propil)-2,2,12,25,25-pentametil-4,11,14,17,23-pentaoxo-3,24-dioxa-5,10,13,16,22-pentaazahexacosano-9-carboxilato de (9*R*,12*R*,15*R*,18*R*)-metilo, compuesto 9, SEQ ID NO:13

Z-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-OMe (9). A una disolución bien agitada de **8** (18,2 g; bruto) en THF anhidro (500 ml) a 0ºC se le añadió 1 (15,0 g, 38,3 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno, y los contenidos se agitaron durante 2 h a temperatura ambiental, tras lo cual la reacción se había completado tal como se indica mediante TLC. Al matraz se le añadió amina Silicycle (10 g), y se continuó con la agitación a temperatura ambiental durante otras 16 h para eliminar mediante separación el anhídrido residual. La amina Silicycle se eliminó mediante filtración y el filtrado se evaporó a presión reducida para tener un residuo bruto. La purificación del producto bruto se realizó mediante recristalización en acetonitrilo caliente para producir **9** (27,0 g, 81%) como un sólido blanquecino. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6).δ 8,22 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 7,92 (m, 2H), 7,33 (m, 6H), 6,78 (m, 3H), 5,02 (s, 2H), 4,25 (m, 3H), 4,01 (m, 1H), 3,60 (s, 3H), 2,88 (m, 6H), 1,56 (m, 6H), 1,52 (m, 6H), 1,37 (s, 27H), 1,1 (d, J = 7 Hz, 3H); ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6)δ 172,8, 172,7, 172,2, 171,5, 156,4, 156,0, 137,8, 128,8, 128,2, 128,1, 77,8, 65,8, 54,9, 52,4, 52,2, 48,2, 29,9, 29,8, 28,7, 26,5, 26,4, 18,6. MS ESI (*m*/*z*) calculado. para $C_{42}H_{70}N_7O_{13}$ $[M+H]^+$ 881, encontrado 881; HPLC pureza. 99%; pureza quiral. 99%.

Ejemplo 8

Síntesis de 7-(((9*H*-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-13-(3-(*terc*-butoxicarbonilamino)propil)-10-metil-2,8,11-trioxo-5-tia-3,9,12-triazatetradecan-14-oato de (*7S*,*10R*,*13R*)-metilo, compuesto 11, SEQ ID NO:14

Fmoc-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-OMe (11). A una disolución bien agitada de Fmoc-D-Cys(Acm)-OH (**10**; 12,1 g, 29,2 mmol) y **6** (12,0 g, 37,8 mmol) en THF anhidro (250 ml) a 0ºC bajo atmósfera de nitrógeno se le añadieron EDCI.HCl (6,12 g, 31,9 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (3,95 g, 29,2 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (5,4 ml, 31,9 mmol). Se permitió que los contenidos se agitasen a temperatura ambiental durante 16 h. Tras la terminación de la reacción (TLC), se vertieron los contenidos de la reacción en agua helada (250 ml) con agitación, y el sólido precipitado se filtró y la torta sólida en el filtro se lavó con agua fría y se secó a vacío para obtener un residuo bruto, que tras la purificación mediante columna ultrarrápida de gel de sílice (230-400 de malla) con MeOH al 3%/$CHCl_3$ produjo **11** (12,5 g, 66%) como un sólido blanco. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d_6). δ 8,60 (m, 1H), 8,22 (m, 1H), 7,91 (m, 3H), 7,71 (m, 2H), 7,59 (m, 1H), 7,40 (m, 2H), 7,30 (m, 2H), 6,78 (s a, 1H), 4,38-4,18 (m, 9H), 3,58 (s, 3H), 2,87 (m, 3H), 2,66 (m, 1H), 1,89 (s, 3H), 1,55 (m, 2H), 1,44 (m, 2H), 1,41 (s, 9H), 1,23 (d, J = 7 Hz, 3H); ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6). δ 172,8, 172,7, 170,6, 170,4, 156,5, 156,0, 144,2, 141,2, 128,9, 127,5, 125,7, 120,5, 77,8, 66,2, 65,4, 54,8, 52,2, 48,4, 47,0, 32,9, 28,7, 28,6, 26,3, 23,01, 18,6, 15,6; MS ESI calculado. para $C_{35}H_{48}N_5O_9S$ $[M+H]^+$ 714,8, encontrado 495; HPLC pureza. 93,6%.

Ejemplo 9

Síntesis de 7-acetamido-13-(3-(*terc*-butoxicarbonilamino)propil)-10-metil-2,8,11-trioxo-5-tia-3,9,12-triazatetradecan-14-oato de (*7S*,*10R*,*13R*)-metilo, compuesto 12, SEQ ID NO:15

Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-OMe (12). Se añadió piperidina (2,5 ml, 25,2 mmol) a una suspensión bien agitada de **11** (12,0 g, 16,8 mmol) en THF anhidro (250 ml) a 0ºC bajo atmósfera de nitrógeno y se permitió que la mezcla resultante se agitase a temperatura ambiental. La reacción se completó tras 16 h tal como se indica mediante TLC. El disolvente en exceso se eliminó a presión reducida para obtener una masa bruta. La masa bruta así obtenida se purificó mediante columna ultrarrápida de alúmina básica con MeOH al 3%/$CHCl_3$ para proporcionar 6,5 g del producto intermedio de amina libre. La amina (6,5 g) se llevó a THF anhidro (250 ml) y los contenidos de la reacción se enfriaron hasta 0ºC y al matraz se le añadieron cloruro de acetilo (1,1 ml, 15,8 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (3,7 ml, 15,8 mmol) y se continuó con la agitación durante 16 h, tiempo tras el cual se encontró que la reacción era completa tal como se indica mediante TLC. La mezcla de reacción se vertió en agua helada (250 ml) y el producto bruto se extrajo con EtOAc (2 x 300 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na_2SO_4 anhidro), se filtraron y el filtrado se evaporó a presión reducida para obtener un residuo bruto, que tras la purificación mediante columna de gel de sílice (60-120 de malla) con MeOH al 3%/CH_2Cl_2 dio **12** (6,0 g, 85%) como un sólido blanco. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-*d*$_6$). *δ* 8,51 (m, 1H), 8,13 (t, *J* = 9,6 Hz, 2H), 7,94 (d, *J* = 7,5 Hz, 1H), 6,78 (s a, 1H), 4,47 (m, 1H), 4,35-4,09 (m, 4H), 3,58 (s, 3H), 2,85 (m, 3H), 2,58 (m, 1H), 1,83 (s, 6H), 1,67-1,52 (m, 3H), 1,36 (m, 1H), 1,35 (s, 9H), 1,20 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H); ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-*d*$_6$). δ 172,8, 172,7, 170,5, 170,3, 169,9, 156,0, 77,9, 52,7, 52,2, 48,4, 33,0, 28,7, 28,6, 26,3, 23,0, 22,9, 18,6; MS ESI (m/z) calculado. para $C_{22}H_{40}N_5O_8S$ $[M+H]^+$ 533,8, encontrado 533,8; HPLC pureza. 99,9%.

Ejemplo 10

Síntesis de ácido (*7S*,10*R*,13*R*)-7-acetamido-13-(3-(terc-butoxicarbonilamino)propil)-10-metil-2,8,11-trioxo-5-tia-3,9,12-triazatetradecan-14-oico, compuesto 13, SEQ ID NO:3

Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-OH (13). A una disolución bien agitada de **12** (6,0 g, 11,64 mmol) en una mezcla de THF y agua 1:1 (20 ml) se le añadió LiOH 1 N (13,5 ml, 13,5 mmol) a 0ºC, y se permitió que la disolución resultante se agitase a la misma temperatura durante 4 h. Tras la terminación de la reacción tal como se indica mediante TLC, el pH de la mezcla de reacción se redujo hasta pH~3 y la fase acuosa se extrajo con EtOAc tres veces (3 x 300 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (Na_2SO_4 anhidro), se filtraron y el filtrado así obtenido se evaporó a presión reducida para obtener un residuo bruto, que tras la purificación mediante columna de gel de sílice (60-120 de malla) con MeOH al 5%/CH_2Cl_2 proporcionó **13** (3,5 g, 60%) como un sólido blanquecino. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-*d*$_6$). *δ* 12,54 (s a, 1H), 8,53 (t, *J* = 5,7 Hz, 1H), 8,11 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H), 8,01 (dd, *J* = 21,5, 7,5 Hz, 2H), 6,80 (s a, 1H), 4,51 (m, 1H), 4,35 (m, 2H), 4,15 (m, 2H), 2,89 (m, 3H), 2,60 (m, 1H), 1,86 (s, 3H), 1,85 (s, 3H), 1,68 (m, 1H), 1,54 (m, 1H), 1,38 (m, 2H), 1,37 (s, 9H), 1,23 (d, *J* = 7 Hz, 3H); ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-*d*$_6$). *δ* 173,8, 172,5, 170,5, 170,3, 169,9, 156,0, 77,9, 60,2, 52,6, 52,2, 48,4, 33,0, 30,8, 28,8, 28,7, 26,5, 23,0, 22,9, 21,5, 21,2, 18,6; MS ESI (*m*/*z*) calculado. para $C_{21}H_{38}N_5O_8S$ $[M+H]^+$ 519,8, encontrado 519,8; HPLC pureza. 99,9%.

Ejemplo 11

Síntesis de 18-amino-15-(3-(*terc*-butoxicarbonilamino)propil)-2,2,12,25,25-pentametil-4,11,14,17,23-pentaoxo-3,24-dioxa-5,10,13,16,22-pentaazahexacosano-9-carboxilato de (9*R*,12*R*,15*R*,18*R*)-metilo, compuesto 14, SEQ ID NO:2

H-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-OMe (14). A una disolución de Z-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-OMe (9; 1,5 g) en THF anhidro (35 ml) se le añadió Pd-C (200 mg, al 10% en carbón activado; base húmeda) bajo atmósfera de nitrógeno y la disolución resultante se agitó durante 4 h a temperatura ambiental a presión de hidrógeno (40 psi). La terminación de la reacción se indicó mediante TLC (sumergida en disolución de ninhidrina, secada y calentamiento). La mezcla de reacción se hizo pasar a través de un lecho de Celite, el sólido en el filtro se lavó con THF (20 ml), el filtrado así obtenido se concentró a presión reducida para dar **14** (1,2 g; bruto) como una masa esponjosa negra, que se usó inmediatamente sin purificación adicional en la siguiente etapa.

Ejemplo 12

Síntesis de 7-acetamido-13,16,19-tris(3-(*terc*-butoxicarbonilamino)propil)-10,22,32,32-tetrametil-2,8,11,14,17,20,23,30-octaoxo-31-oxa-5-tia-3,9,12,15,18,21,24,29-octaazatritriacontano-25-carboxilato de (7*S*,10*R*,13*R*,16*R*,19*R*,22*R*,25*R*)-metilo, compuesto 15, SEQ ID NO:4

Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-OMe (15). A una disolución bien agitada de **14** (6,5 g, 7,41 mmol) en *N*-metilpirrolidona (100 ml) a 0ºC se le añadieron EDC.HCl (1,55 g, 8,08 mmol), *N*-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida, HONb (1,2 mg, 6,74 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (1,4 ml, 8,08 mmol) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiental durante 16 h, tiempo en el cual se indicó una conversión

completa de los materiales de partida mediante TLC. Se vertieron los contenidos de la reacción en agua helada (150 ml) con agitación, y el sólido precipitado se filtró y la torta sólida en el filtro se lavó con agua fría y se secó a vacío para obtener un residuo bruto, que tras la purificación mediante columna ultrarrápida de gel de sílice (230-400 de malla) con MeOH al 6%/$CHCl_3$ produjo **15** (5,2 g, 62%) como un sólido blanquecino. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6). δ 8,51 (t, J = 5,9 Hz, 1H), 8,17 (dd, J = 21,4, 7,44 Hz, 2H), 8,02 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,89 (m, 3H), 7,84 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 6,79 (m, 1H), 6,74 (m, 3H), 4,48 (m, 1H), 4,29 (m, 4H), 4,13 (m, 4H), 3,62 (s, 3H), 2,88 (m, 6H), 2,71-2,49 (m, 4H), 1,86 (s, 6H), 1,61 (m, 8H), 1,38 (m, 8H), 1,37 (s, 36H), 1,2 (m, 6H); MS ESI (*m*/*z*) calculado. para $C_{55}H_{99}N_{12}O_{18}S$ $[M+H\text{-Boc}]^+$ 1147,6, encontrado 1147,6; HPLC pureza. 99%; pureza quiral. 97%.

Ejemplo 13

Síntesis de 7*S*,10*R*,13*R*,16*R*,19*R*,22*R*,25*R*)-7-acetamido-13,16,19-tris(3-(*terc*-butoxicarbonilamino)propil)-10,22,32,32-tetrametil-2,8,11,14,17,20,23,30-octaoxo-31-oxa-5-tia-3,9,12,15,18,21,24,29-octaazatritriacontano-25-carboxamida, compuesto 16, SEQ ID NO:16

Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-NH_2 (16). A una disolución bien agitada de **15** (5,0 g, 4,05 mmol) en MeOH anhidro (200 ml) a 0ºC se le burbujeó NH_3(g) durante 1 h a través de un adaptador de aguja y se continuó con el purgado de amoniaco al intervalo de cada 12 h durante 48 h. Se continuó con la agitación hasta que la muestra en proceso indicó la desaparición completa del material de partida. El disolvente en exceso se eliminó a presión reducida para obtener una masa bruta, que se lavó con dietil éter (100 ml) para obtener un sólido. La purificación adicional del sólido bruto mediante columna de gel de sílice (60-120 de malla) con MeOH al 7%/$CHCl_3$ proporcionó **16** (3,6 g, 73%) como un sólido blanquecino. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6). δ 8,49 (t, J = 6,5 Hz, 1H), 8,13 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 8,01(m, 1H), 7,92 (m, 3H), 7,81 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,70 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,24 (s a, 1H), 7,00 (s, 1H), 6,72 (m, 4H), 4,47 (m, 1H), 4,34-4,10 (m, 8H), 2,87 (m, 6H), 2,60 (m, 4H), 1,86 (s, 6H), 1,65 (m, 8H), 1,36 (m, 8H), 1,34 (s, 36H), 1,23 (m, 6H)); MS ESI (*m*/*z*) calculado. para $C_{54}H_{98}N_{13}O_{17}S$ $[M+H]^+$ 1233,6, encontrado 1233,6; HPLC pureza. 96,3%. pureza quiral. 98%.

Ejemplo 14

Síntesis de (*R*)-2-((7*S*,10*R*,13*R*,16*R*)-7-acetamido-13,16-bis(3-aminopropil)-10-metil-2,8,11,14-tetraoxo-5-tia-3,9,12,15-tetraazaheptadecanamido)-5-amino-*N*-((*R*)-1-((*R*)-1,5-diamino-1-oxopentan-2-ilamino)-1-oxopropan-2-il)pentanamida, compuesto 17, SEQ ID NO:17

Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn-D-Orn-D-Orn-D-Ala-Orn-NH_2 (17). A una disolución agitada de **16** (1,5 g, 1,21 mmol) en HCl 5 N en EtOAc, 15 ml) se le añadió triisopropilsilano (1,2 ml, 6,0 mmol) a 0ºC a temperatura ambiental bajo atmósfera de nitrógeno. La terminación de la desprotección de Boc se produjo en 1 h tal como se indica mediante análisis de LCMS de la muestra en proceso. El disolvente en exceso se decantó el residuo sólido se lavó con dietil éter para obtener la amina bruta, que se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional. MS ESI (*m*/*z*) calculado. para $C_{34}H_{66}N_{13}O_9S$ $[M+H]^+$ 832,8, encontrado 832,8.

Ejemplo 15

Síntesis de Ac-D-Cyst(Acm)-D-Ala-[D-Arg(di-*terc*-butilcarboxiguaninil)$_3$]-D-Ala-D-Arg(di-*terc*-butilcarboxiguaninil)-NH_2, compuesto 18, SEQ ID NO:18

Ac-D-Cyst(Acm)-D-Ala-D-Arg(Boc)$_2$-D-Arg(Boc)$_2$-D-Arg(Boc)$_2$-D-Ala-D-Arg(Boc)$_2$-NH_2 (18). A una disolución bien agitada de **17** bruto (920 mg) en una mezcla de MeOH (8 ml) y agua (2 ml) se le añadieron (1*H*-pirazol-1-il)metilendicarbamato de (*Z*)-*terc*-butilo (2,06 g, 6,63 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (3,8 ml, 22,13 mmol) a temperatura ambiental y los contenidos se agitaron durante 12 h a temperatura ambiental, tiempo tras el cual se indicó la terminación de la reacción mediante análisis de LCMS de la muestra en proceso. Los disolventes en exceso se eliminaron a presión reducida para obtener un material bruto, que se disolvió en EtOAc (300 ml) y la disolución se lavó con agua fría y salmuera, se secó (Na_2SO_4 anhidro), se filtró y el filtrado así obtenido se concentró a presión reducida para obtener una masa bruta, cuya purificación mediante columna ultrarrápida de gel de sílice (230-400 de malla) con EtOAc al 70%/éter de petróleo proporcionó **18** (680 mg, 31%) como un sólido blanquecino. ^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6). δ 11,50 (s, 4H), 8,50 (t, J = 6,4 Hz, 1H), 8,27 (m, 4H), 8,13 (d, J = 8 Hz, 1H), 8,06-7,95 (m, 5H), 7,74 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,05 (s, 1H), 4,46 (m, 1H), 4,34-4,12 (m, 8H), 3,26 (m, 8H), 2,85 (m, 1H), 2,65 (m, 1H), 1,86 (s, 6H), 1,65 (m, 8H), 1,50 (m, 8H), 1,46 (s, 36), 1,39 (s, 36H), 1,21 (m, 6H); MS ESI calculado. para $C_{78}H_{138}N_{21}O_{25}S$ $[M+H]^+$ 1801,1, encontrado 1801,6; HPLC pureza. 94,9%; pureza quiral. 98%.

Ejemplo 16

Síntesis de etelcalcetida, compuesto 20

Etelcalcetida. A una suspensión de **18** (0,180 g, 0,1 mmol) en DCM (2,0 ml) en un vial a 20ºC se le añadió TFA (2,0 ml) y los contenidos se envejecieron durante la noche (los contenidos se volvieron una disolución homogénea). La LCMS indicó la terminación de la reacción (m/2 = 500,2), se observó mediante espectrometría de masas. La mezcla de reacción se sometió a destilación a presión reducida para proporcionar un residuo oleoso que se disolvió en agua y se liofilizó para proporcionar la sal de TFA del producto **19** (SEQ ID NO:5) como una espuma (0,163 g). La cantidad teórica de sal de TFA es de 0,147 g y la masa adicional se debe probablemente al agua (higroscópica) que está todavía presente en la torta liofilizada. Este material se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. A una suspensión de sal de TFA del penúltimo **19** (0,068 g, 0,068 mmol) en 1 ml de MeOH se le añadió 1ml de agua DI y los contenidos se envejecieron para formar una disolución (algunas partículas eran todavía insolubles incluso tras una sonicación prolongada). A esta mezcla se le añadieron hidrocloruro de cisteína hidratado (0,015 g, 1,25 equiv) y yodo (0,022 g, 1,25 equiv) y los contenidos se sonicaron para disolver el yodo. Los contenidos se envejecieron a temperatura ambiente y se monitorizaron mediante LC-MS (50 ul diluidos hasta 1 ml usando agua/ACN 1/1). La muestra de 10 min no mostró ninguna formación de producto, las muestras a 1 h, 3 h y 4 h mostraron la formación de producto como ion cargado doblemente junto con la presencia de material de partida. Los contenidos se envejecieron durante la noche y el análisis de datos en la muestra mostró todavía algo de material de partida presente en la mezcla. A los contenidos se le añadió resina Amberlite IRN (forma Cl) y se envejeció durante 1 h. La mayor parte del color parduzco pasó a la resina y los contenidos filtrados a través de una frita fina para proporcionar una disolución incolora que se liofilizó para proporcionar un residuo marrón. La formación de **etelcalcetida (20)** se confirmó mediante LC-MS como producto principal. El producto no se purificó adicionalmente.

Ejemplo 17

Preparación de Z-D-Ala-OSu (22)

Z-D-Ala-OSu (22). Se disolvieron 51,8 g de Z-(D)Ala-OH y 30,3 g de SucOH (1,05 eq) **21** en 560 ml de acetonitrilo y la disolución se enfrió hasta 0ºC. Se disolvieron 54,6 g de DCC (1,1 eq) en 80 ml de acetonitrilo y se añadieron lentamente. Treinta min tras la adición se llevó la disolución hasta temperatura ambiente. Tras el envejecimiento durante la noche la conversión era >99% mediante HPLC. El subproducto de DCU se eliminó mediante filtración y se lavó la torta con acetonitrilo (2x 250 ml). El filtrado y los lavados se combinaron y se concentraron a vacío para proporcionar una disolución que pesaba 573 g. A esta disolución se le añadieron 1920 ml de iPrOH y la mezcla se enfrió a 4ºC durante la noche. Los cristales obtenidos se eliminaron mediante filtración y se lavaron con IPA (2x 165 ml). Tras el secado durante la noche se aislaron 65 g de **22** (pureza según HPLC: 100% de RS (cromatograma más adelante), rendimiento: 85%).

Ejemplo 18 (no un ejemplo de la invención)

Preparación de H-D-Ala-D-Arg-NH_2.2HCl (25)

H-D-Ala-D-Arg-NH_2.2HCl (25). A una suspensión de H-(D)Arg-NH_2 (19,4 g, 75 mmol) **23** en 350 ml de dimetilacetamida se le añadieron 9,7 g de DIPEA (1 eq) seguido de Z-(D)Ala-OSu **22** (27,5 g, 1,1 eq, 82,5 mmol) a TA. Tras 1,5 h se obtuvo una conversión del 95% y se diluyó la mezcla con 1120 ml agua. Esta disolución se lavó dos veces con 625 ml de acetato de etilo con el fin de eliminar Z-(D)Ala-OSu y Z-(D)Ala-OH (formados mediante la hidrólisis del éster activado). El pH de la fase acuosa resultante se ajustó a 10,88 usando Na_2CO_3 (28,1 g, 3,54 eq) y se añadieron 29 g de tetrafenilborato de sodio (NaTPB) (1,1 eq). Esto condujo a una precipitación gomosa que se disolvió tras la adición de 1250 ml de diclorometano. Esto permite la extracción selectiva del dipéptido formado en la fase orgánica como sal de TPB. La fase acuosa resultante volvió a extraerse dos veces con 500 ml de diclorometano tras la adición de 7,2 y 2,4 g de NaTPB. En la fase acuosa final se perdió el 1,3% de producto (estimado mediante HPLC). Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron hasta un volumen de 1500 ml y entonces se lavó dos veces mediante 1100 ml de agua. La fase orgánica lavada se concentró y se realizó un intercambio de disolvente a metanol para obtener una disolución de 308 g. El sólido formado durante la concentración (sales de TPB, no contienen péptido según análisis de HPLC) se eliminó mediante filtración. En la siguiente etapa la disolución se trató con una resina de intercambio aniónico fuerte (Amberlite IRA 958 forma Cl) con el fin de intercambiar tetrafenilborato por cloruro. Esto se realizó parcialmente en una reacción discontinua y en una columna de vidrio. En total fueron necesarios 676 g (9 eq) de resina para eliminar el tetrafenilborato (monitorizado mediante HPLC). La resina se lavó con metanol para recuperar el péptido. La disolución obtenida se concentró hasta 360 g que contenían Z-(D)Ala-(D)Arg-NH_2 **24** en disolución (93,8% en área mediante HPLC).

A esta disolución se le añadieron 8 g de pasta de Pd/C (5%) y se burbujeó gas de hidrógeno a través de la disolución a TA. Tras 4 h se encontró que la desprotección se había completado. El catalizador se eliminó mediante filtración y se añadieron 19,7 g de HCl 4 N en dioxano (1eq) antes de concentrar la disolución a vacío. Una vez eliminado el metanol se elimina el agua residual (que procede del agua residual presente en la resina de intercambio aniónico) a través de destilación azeotrópica con acetonitrilo (adición en lote alimentado, un total de aprox. 2 l). Durante el secado se formó un sólido, inicialmente gomoso, cuando se secó adicionalmente se volvió cristalino. El sólido se aisló mediante filtración y se secó a vacío a 45ºC. Se obtuvieron 19,7 g de **25** (rendimiento del 71,9%).

Ejemplo 19 (no un ejemplo de la invención)

Síntesis de H-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2.2HCl (28)

H-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2.2HCl (28). A una suspensión de Z-D-Arg-OH, **26** (16,15 g, 52,7 mmol) en 170 ml de DMAc a TA se le añadieron 13,7 g de HCl 4 N en dioxano (1 eq, 52,7 mmol). Esta disolución transparente se enfrió hasta -15ºC bajo atmósfera de N_2 y durante el enfriamiento se añadieron 6,8 g de DIPEA (1 eq) y 4,2 g de piridina (1 eq). La activación se realizó mediante la adición de cloruro de pivaloílo (6,32 g, 52,7 mmol, 1 eq). Tras 5 min de activación se añadió una disolución de **25** (19,1 g, 52,7 mmol, 1 eq) en 132 ml de DMAc con 6,5 g de DIPEA (0,97 eq tal como se determinó mediante valoración) enfriada hasta 0ºC. Se permitió que la mezcla de reacción se calentase hasta RT y tras 30 minutos se consideró que la reacción se había completado. La mezcla se diluyó con 780 ml de agua desmineralizada que contenía 14,7 g de carbonato de sodio (3,54) para alcanzar un pH de 10,6. Se añadieron 40,63 g de tetrafenilborato de sodio (NaTPB) (2,2 eq). Esto condujo a una precipitación gomosa que se disolvió mediante la adición de 870 ml de diclorometano. Esto permitió la extracción selectiva del tripéptido formado en la fase orgánica como sal de TPB. La fase acuosa resultante volvió a extraerse una vez con 400 ml de diclorometano tras la adición de 12,6 g de NaTPB. En la fase acuosa final se perdió el 2,5% de producto (estimado mediante HPLC). Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron hasta un volumen de 1000 ml y entonces se lavó dos veces con 750 ml de agua. La fase orgánica lavada se concentra y se realiza un intercambio de disolvente a metanol para obtener una disolución de 198 g. El sólido formado durante concentración (sales de TPB, no contienen péptido según análisis de HPLC) se eliminó mediante filtración. En este caso, el intercambio iónico se realizó mediante la adición de 17 g de cloruro de benciltrietilamonio (1,4 eq) a 0ºC. El tetrafenilborato de benciltrietilamonio formado precipita en metanol y las sales de cloruro de los péptidos permanecen en disolución. Tras la filtración se lava el sólido con 130 ml de metanol. Los licores madre se concentran para obtener una disolución de 419 g. Con el fin de eliminar el TPB que no había precipitado como sal de amonio cuaternario (aproximadamente el 10%) se trató la disolución con 520 g (10 eq) de Amberlite IRA 958Cl. La resina se lavó con metanol para recuperar el péptido. La disolución obtenida se concentró hasta 419 g que contenían **27.** A esta disolución se le añadieron 2,8 g de pasta de Pd/C (5%) y se burbujeó gas de hidrógeno a través de la disolución a TA. Tras 1 h se eliminó mediante filtración el catalizador y se concentraron los licores madre a vacío. Una vez eliminado el metanol se eliminó el agua residual (que procede del agua residual presente en la resina de intercambio aniónico) a través de destilación azeotrópica con acetonitrilo (adición en lote de alimentación, un total de aprox. 1,1 l). Durante el secado se formó un sólido, inicialmente gomoso, cuando se secó adicionalmente cristalino. El sólido se aisló mediante filtración y se secó a vacío a 45ºC. Se obtuvieron 17,22 g de polvo (pureza según HPLC del 95,5% de RS, rendimiento del 53%).

Ejemplo 20 (no un ejemplo de la invención)

Síntesis de H-(D)Arg-(D)Arg-(D)Ala-(D)Arg-NH_2.4HCl (30) (SEQ ID NO:10)

H-(D)Arg-(D)Arg-(D)Ala-(D)Arg-NH_2.4HCl (30). Se suspendieron H-(D)Arg-(D)Ala-(D)Arg-NH2.2HCl, **28** (16,6 g, 27 mmol) y Z-Arg-OH, **26** (9,6 g, 30,5 mmol, 1,13 eq) en 285 ml de DMA y se añadió HCl 4 N en dioxano (5,4 g, 0,77 eq tal como se determina mediante la valoración del tripéptido) junto con 4,2 g de HOBt. La suspensión se calentó hasta 40ºC para obtener una disolución que se enfrió posteriormente hasta 0ºC. Se añadió hidrocloruro de etildiisopropilcarbodiimida (EDC) (5,96 g, 1,14 eq) en dos porciones a lo largo de 30 min. Una vez que la EDC se había solubilizado se permitió que la disolución se calentase hasta TA y envejeciese durante la noche. Se alcanzó una conversión de >90% y la disolución se diluyó con 400 ml de agua desmineralizada que contenía 10,1 g de carbonato de sodio (3,54 eq) para alcanzar un pH de 10,88. Se añadió tetrafenilborato de sodio (NaTPB) (29,6 g, 3,1 eq). Esto condujo a una precipitación gomosa que se disolvió añadiendo 450 ml de diclorometano. Esto permitió la extracción selectiva del tetrapéptido formado en la fase orgánica como sal de TPB. La fase acuosa resultante volvió a extraerse una vez con 200 ml de diclorometano tras la adición de 2,1 g de NaTPB. En la fase acuosa final se perdió el 3% de producto (estimado mediante HPLC). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron dos veces con 400 ml de agua. La fase orgánica lavada se concentró y se realizó un intercambio de disolvente a metanol para obtener una disolución de 193 g. La disolución se trató con 715 g (26 eq) de resina Amberlite IRA 958 forma Cl. La resina se lavó con metanol para recuperar el péptido. La disolución obtenida se concentró hasta 248 g de una disolución que contenía **29 (**Z-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-OH.2HCl, SEQ ID NO:12). A esta disolución se le añadieron 2,9 g de pasta de Pd/C (5%) y se burbujeó gas de hidrógeno a través de la disolución a TA. Tras 1 h la desprotección se había completado y el catalizador se eliminó mediante filtración y el filtrado se concentró a vacío seguido de la adición de 7 g de HCl 4 N en dioxano (1 eq). Una vez eliminado el metanol se eliminó el agua residual (que procede del agua residual presente en la resina de intercambio aniónico) a través de destilación azeotrópica con acetonitrilo (adición en lote alimentado, un total de aprox. 1,1 l). Durante el secado se formó un sólido, inicialmente gomoso, cuando se secó adicionalmente cristalino. El sólido se aísla mediante filtración y se seca a vacío a 45ºC. Se obtuvieron 18,1 g de **30** (pureza según HPLC del 94,1% de RS (cromatograma más adelante) en un rendimiento del 74,5%, la muestra se envía a CAT para la pureza enantiomérica).

Ejemplo 21 (no un ejemplo de la invención)

Síntesis de Z-D-Ala-D-Arg-OH.HCl (32)

Z-D-Ala-D-Arg-OH.HCl (32). Se disolvió H-(D)Arg-OH, **31** (9,6 g, 55 mmol) en 160 ml de agua desmineralizada y se disolvió Z-(D)Ala-OSu, **22** (19,9 g, 1,1 eq) en 292 ml de acetonitrilo por separado. La última disolución se añadió a la primera a TA. Una vez que se había consumido el éster activo (acoplamiento o hidrólisis), la mezcla de reacción se diluyó con 100 ml de agua desmineralizada y se eliminó el acetonitrilo mediante destilación a vacío para obtener una disolución de 320 g. La disolución se acidificó con HCl 1,2 N hasta pH 2,5 y se lavó dos veces con 275 ml de EtOAc (para eliminar Z-D-Ala-OH). Posteriormente el péptido se extrajo de la fase acuosa con respectivamente 285, 275 y 220 ml de 2-BuOH. Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron a vacío y se secaron a través de destilación azeotrópica. En total se añadieron 2,5 l de 2-BuOH en lote de alimentación. A la disolución concentrada (121 g) se le añadieron 437 ml de acetato de isopropilo para provocar la precipitación. El sólido se filtró y se trituró dos veces con 220 ml de iPrOAc con el fin de eliminar tanto como sea posible el SucOH liberado. Finalmente, el sólido volvió a disolverse en 100 ml de iPrOH y precipitó en 500 ml de diisopropil éter para obtener un sólido. Tras la filtración y el lavado con 100 ml de diisopropil éter se secó el sólido a vacío para proporcionar 18 g de **32** (pureza según HPLC: 98,3% (cromatograma más adelante), rendimiento del 73%).

Ejemplo 22 (no un ejemplo de la invención)

Síntesis de H-D-Ala-D-Arg-OH.HCl (33)

H-D-Ala-D-Arg-OH.HCl (33). Se disolvió Z-D-Ala-D-Arg-OH **32** (18 g, 38 mmol) en 230 ml de MeOH + 75 ml de agua. Se añadieron 2,5 g de pasta de Pd/C (5%) y se burbujeó gas de hidrógeno a través de la disolución a TA. Tras 1,5 h se había completado la reacción de desprotección y se eliminó el catalizador mediante filtración en un filtro de 0,45 µ y se lavó con 46 ml de MeOH. La disolución peptídica se concentró a vacío y se eliminó el agua mediante destilación azeotrópica mediante la adición de acetonitrilo en lote de alimentación (4x 250 ml). Durante la destilación el dipéptido desprotegido se pierde. Finalmente la suspensión obtenida se concentra hasta 189 g y se elimina mediante filtración y se lava con acetonitrilo. Tras el secado durante la noche a 45ºC se obtienen 11,2 g de polvo blanco (pureza según HPLC del 97,4% de RS (cromatograma más adelante), rendimiento: 91,3%).

Ejemplo 23 (no un ejemplo de la invención)

Síntesis de Fmoc-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg-OH.HCl (35), SEQ ID NO:19

Fmoc-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg-OH.HCl (35), SEQ ID NO:19. Se disolvieron Fmoc-D-Cys(Trt)-OH **34** (9,6 g, 1,0 eq) y HONb (N-hidroxinorborneno) (3,2 g, 1,05 eq) en 14 ml de DMF a TA. Esta mezcla se diluyó con 50 ml de iPrOAc y se enfrió hasta 0ºC. Se disolvió diciclohexilcarbodiimida (DCC, 3,7 g) en 4 ml de iPrOAc y se añadió a la disolución que contenía Fmoc-D-Cys(Trt)-OH. Una vez añadida la DCC, se permitió que la mezcla de reacción se calentase hasta TA y se agitó durante 2 h. Tras 2 h (tasa de conversión >96%) el DCU se eliminó mediante filtración y se lavó con 20 ml de iPrOAc. A esta disolución se le añadió una disolución de H-(D)Ala-(D)Arg-OH **33** (6,0 g, 1,1 eq) y DIPEA (2,4 ml, 1,09 eq) en 40 ml de DMF y 24 ml de agua desmineralizada a TA. Tras la reacción durante la noche el Fmoc-(D)Cys(trt)-ONb se había consumido completamente y la mezcla se diluyó con 200 ml de iPrOAc, 200 ml de agua y 200 ml de diclorometano. Tras la separación de fases se desechó la fase acuosa y se lavó la fase orgánica con 350 ml de agua desmineralizada seguido de una disolución de NaCl al 2% (p/v). La fase orgánica se concentró a vacío y apareció un sólido tras la eliminación de diclorometano. Este sólido se filtró y la HPLC mostró Fmoc-(D)Cys(trt)-OH como impureza principal. Cuando se repitió el procedimiento de precipitación 3x fue posible reducir el contenido hasta aprox. el 2%. Tras el secado se obtuvieron 13,9 g de sólido (pureza según HPLC del 95% de RS (cromatograma más adelante), rendimiento del 96%).

Ejemplo 24 (no un ejemplo de la invención)

Síntesis de Ac-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg-OH (36), SEQ ID NO:9

Ac-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg-OH (36), SEQ ID NO:9. Se suspendió Fmoc-D-Cys(trt)-D-Ala-D-Arg-OH.HCl (**35**) (8,65 g, 9,8 mmol, 1,0 eq) en 80 ml de MeOH y se añadió gradualmente piperidina (6,8 g, 8 eq) a TA. Una vez que la tasa de conversión era >97% se añadió la disolución a 600 ml de metiltercbutil éter (MTBE). El precipitado se eliminó mediante filtración, se lavó con 80 ml de MTBE y se secó durante la noche a vacío a 45ºC. Se obtuvieron 6,2 g de H-D-Cys(trt)-D-Ala-D-Arg-OH (compuesto 38) como un polvo blanco. (94,5% de RS (HPLC método 1, cromatograma más adelante), rendimiento: 95,4%).

Se disolvió H-D-Cys(trt)-D-Ala-D-Arg-OH **38** (6,0 g, 9,1 mmol, 1,0 eq) en 75 ml de diclorometano. Se añadieron 792 µl de HCl 4 N en dioxano (0,348 eq tal como se determinó mediante valoración) seguido de 3,4 g de acetil-N-hidroxisuccinimida (AcOSu) (2,4 eq) añadida en 3 porciones a TA. Con el fin de acelerar la reacción se aumentó el pH

desde 3,5 hasta 6 mediante la adición de DIPEA. Esto provocó la gelificación del péptido (lo más probablemente la forma zwitteriónica no es soluble en diclorometano). Se obtuvo una disolución tras la adición de 15 ml de dimetilacetamida (DMAc) y la eliminación de diclorometano. Se continuó con la reacción hasta que se obtuvo una tasa de conversión del 98% (48 h) y entonces precipitó con 350 ml de iPrOAc. El sólido se filtró y se lavó con 85 ml de iPrOAc. El sólido se llevó a 90 ml de MeOH y precipitó de nuevo en 200 ml de iPrOAc. Tras la filtración se secó el sólido durante la noche a vacío a 45ºC para proporcionar **36** (5 g) como polvo blanco (98,2% de RS (HPLC método 1, rendimiento del 87,3%). Condiciones de HPLC correspondientes a la HPLC método 1: Columna: Merck Chromolith RP C18-e (100 mm x 4,6 mm) Fase móvil A: TFA al 0,1% en agua Fase móvil B: TFA al 0,1% en acetonitrilo Temperatura de la columna: 40ºC Flujo: 4 ml/min UV a 220 nm Gradiente: inicio al 2% de B, desde el 2 hasta el 73,3% de B en 8 min.

Ejemplo 25 (no un ejemplo de la invención)

Síntesis de Ac-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2.4HCl (37), SEQ ID NO:11

Ac-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2.4HCl (37), SEQ ID NO:11. Se suspendieron Ac-(D)-Cys(trt)-D-Ala-D-Arg-OH, **36** (7,9 g, 12,0 mmol), H-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2.4HCl, **30** (11,0 g, 1,005 eq) y HOPO (N-óxido de 2-hidroxipiridina, 1,40 g, 1,05 eq) en 130 ml de DMA y se agitó hasta la disolución (durante la noche). Una vez que era una disolución, la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadieron 2,4 g de EDC.HCl (1,03 eq). Tras 8 h de reacción se añadieron 78 µl de DIPEA (0,1 eq) para acelerar la reacción. 24 h tras el inicio de la reacción se aumentó la temperatura hasta 20ºC. Se añadieron 382 µl de DIPEA (0,2 eq) en dos porciones así como 117 mg de EDC.HCl (0,05 eq) para terminar la reacción. Una vez obtenida una tasa de conversión del 96% (48 h) se hizo precipitar el péptido en 1100 ml de acetonitrilo, se eliminó mediante filtración y se lavó con 1250 ml de acetonitrilo. Tras el secado durante la noche a vacío a 45ºC se obtuvieron 17,3 g de **37** bruto como polvo blanco. (86,7% de RS (HPLC método 2). Condiciones de HPLC método 2: Columna: Zorbax SB-C18 (150 mm x 4,6 mm, 3,5 µ) Fase móvil A: ácido pentafluoropropiónico (PFPA) 20 mM en agua Fase móvil B: ácido pentafluoropropiónico (PFPA) 20 mM en acetonitrilo Temperatura de la columna: 40ºC Flujo: 1,5 ml/min UV a 220 nm Gradiente: inicio al 2% de B, desde el 2 hasta el 91,1% de B en 20 min. El péptido bruto se purificó mediante HPLC en fase inversa a escala preparativa para proporcionar el 64% del péptido deseado en más del 99% en área mediante HPLC. Condiciones de HPLC: Columna: Daisopak SP-120-25-ODS-RPS 20x250 mm, Fase móvil A: HOAc al 1% en agua, Fase móvil B: HOAc al 1% en acetonitrilo, Tasa de flujo: 19 ml/min, Gradiente: 5% de B durante 1 min, 5-25% de B en 20 min, 25-90% de B en 1 min, lavado al 90% de B durante 5 min, Muestra: 42 g/l de Ac-(D)Cys(trt)-(D)Ala-(D)Arg-(D)Arg-(D)Arg-(D)Ala-(D)Arg-NH2.4HCl a una pureza según HPLC del 88% de RS, Volumen de inyección: 3 ml Fracciones de 0,75 min.

Ejemplo 26 (no un ejemplo de la invención)

Síntesis de etelcalcetida (compuesto 20)

Etelcalcetida. Se disolvió Ac-(D)Cys(trt)-(D)Ala-(D)Arg-(D)Arg-(D)Arg-(D)Ala-(D)Arg-NH2.4HCl, **37,** SEQ ID NO:11 (1,0 g, 0,64 mmol) en 95 ml de agua y se añadió H-Cys(trt)-OH (2,4 g, 10 eq). El pH de la disolución se ajustó a 2,85 por medio de HCl acuoso y esto ayudó en la disolución de H-Cys(trt)-OH. Se añadió una disolución al 2% de yodo en MeOH en porciones (aproximadamente cada hora) hasta añadir un total de aproximadamente 10 eq. Tras la reacción durante la noche se había consumido completamente el material de partida y se eliminaron metanol y acetonitrilo mediante evaporación. Los derivados de tritilo precipitados (productos de escisión) se eliminaron mediante extracción con MTBE. La disolución acuosa obtenida (aproximadamente 60 ml) que contenía etelcalcetida bruta (a 5,9 g/l) se purificó adicionalmente (60% de RS (HPLC método 2), rendimiento del 53% (estimado mediante ensayo de HPLC). Tras una cromatografía preparativa se aislaron fracciones y tenían una pureza >95% de RS (UPLC) con un rendimiento >90%. Condiciones de UPLC: Columna: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 Column (100 Á, 1,8 µ, 2,1 x 150 mm) Fase móvil A: TFA al 0,1% en acetonitrilo al 3% Fase móvil B: TFA al 0,1% en acetonitrilo al 30% Temperatura de la columna: 45ºC Flujo: 0,25 ml/min UV a 220 nm Gradiente: 0% de B durante 1min, desde el 0 hasta el 34% de B en 23 min, desde el 34 hasta el 70% de B en 9 min.

REIVINDICACIONES

1.- Un método para preparar etelcalcetida o un precursor de la misma, comprendiendo el método:

(i) acoplar el extremo N-terminal de un fragmento tetrapeptídico protegido de etelcalcetida que comprende D-ornitina en lugar de D-arginina con un fragmento tripeptídico protegido de etelcalcetida en fase de disolución para formar un precursor heptapeptídico protegido de etelcalcetida que comprende una D-cisteína terminal.

2.- El método según la reivindicación 1, en el que el fragmento tetrapeptídico protegido de etelcalcetida tiene una estructura H-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-OMe (compuesto **14**).

3.- El método según la reivindicación 2, en el que el fragmento tetrapeptídico protegido de etelcalcetida es un sólido a temperatura ambiente.

4.- El método según la reivindicación 2, en el que el fragmento tripeptídico tiene una estructura Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-OH (compuesto 13) y el precursor heptapeptídico protegido de etelcalcetida tiene una estructura Ac-D-Cys(Acm)-D-Ala-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Orn(Boc)-D-Ala-Orn(Boc)-OMe (compuesto **15**).

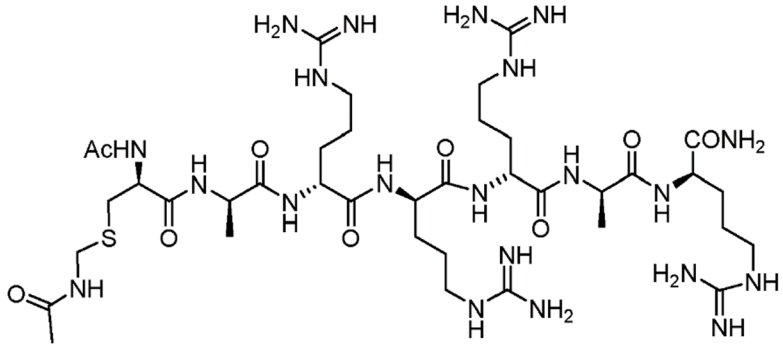
5.- El método según la reivindicación 4, en el que el fragmento tripeptídico es un sólido a temperatura ambiente.

6.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el acoplamiento se lleva a cabo en un disolvente orgánico para proporcionar una mezcla de reacción, comprendiendo el método además añadir agua a la mezcla de reacción para hacer precipitar el precursor heptapeptídico protegido de etelcalcetida.

7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además:

(ii) eliminar los grupos protectores δ-amino de ornitina del precursor heptapeptídico protegido de etelcalcetida, y

(iii) guanilar el precursor heptapeptídico desprotegido de etelcalcetida para reemplazar de ese modo los residuos ornitina por arginina para formar un producto intermedio que tiene una estructura,



(compuesto **19**).

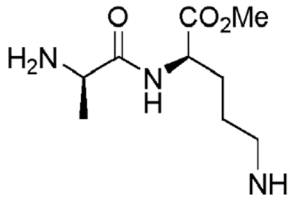
8.- El método según la reivindicación 7, que comprende además (iv) acoplar la D-cisteína terminal del producto intermedio formado en la etapa (iii) con L-cisteína a través de la formación de un enlace disulfuro para formar etelcalcetida.

9.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además, antes de la etapa de acoplamiento (i), (a) preparar en fase de disolución el fragmento tetrapeptídico protegido de etelcalcetida.

10.- El método según la reivindicación 9, en el que el tetrapéptido protegido de etelcalcetida se prepara a través de un proceso en fase de disolución continuo.

11.- El método según la reivindicación 9 o 10, en el que la etapa de preparación (a) comprende:

(a-i) acoplar un N-carboxianhídrido de ornitina protegido por uretano con un dipéptido que tiene una estructura,



(compuesto **6**)

para formar un tripéptido protegido,

(a-ii) desproteger el tripéptido para formar un tripéptido desprotegido, y

(a-iii) acoplar el tripéptido desprotegido a un N-carboxianhídrido de ornitina protegido por uretano para formar el fragmento tetrapeptídico N-terminal protegido de etelcalcetida.

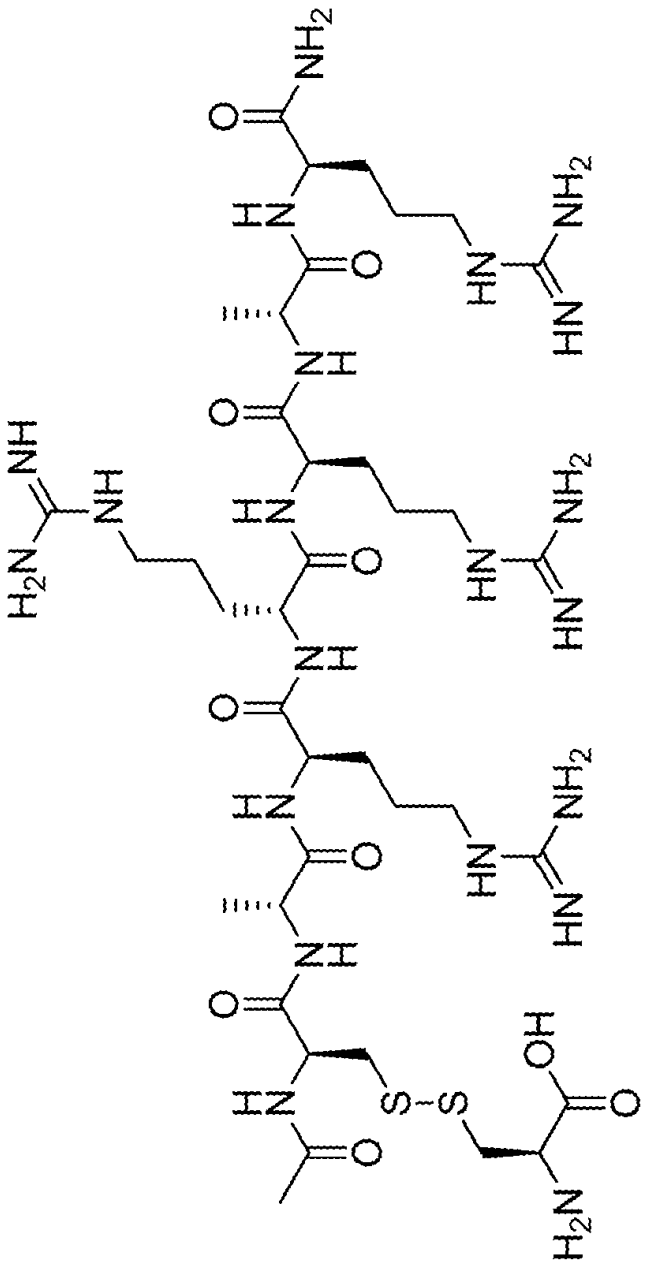
12.- El método según la reivindicación 11, en el que la etapa de preparación da como resultado la formación de un subproducto gaseoso.

13.- El método según la reivindicación 11, en el que el N-carboxianhídrido de ornitina protegido por uretano es un N-carboxianhídrido protegido por benciloxicarbonilo de D-ornitina protegida.

14.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en el que cada una de las etapas de acoplamiento (a-i) y (a-iii) se lleva a cabo en tetrahidrofurano.

15.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que la fase de disolución comprende un disolvente orgánico seleccionado del grupo que consiste en éteres, ésteres, hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos clorados.

16.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además purificar el fragmento tetrapeptídico N-terminal de etelcalcetida mediante precipitación o recristalización antes de la etapa de acoplamiento (i).



etelcalcetida DS

Ac-D-Cys(H-L-Cys-OH)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH2

FIG. 1

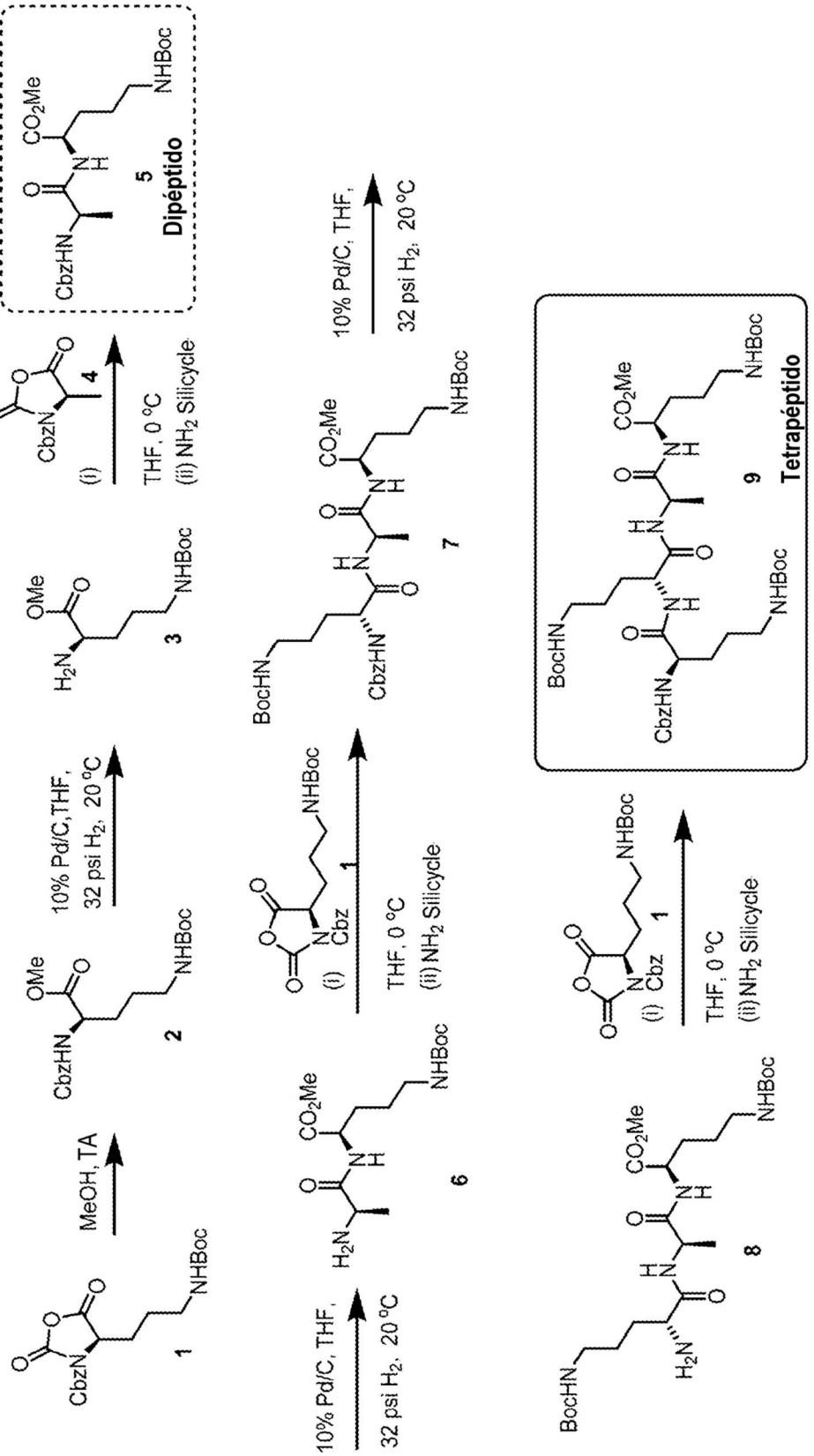

CbzN
1
NHBoc
MeOH, TA
CbzHN
OMe
2
NHBoc
10% Pd/C,THF,
32 psi H2, 20 °C
H2N
OMe
3
NHBoc
CbzN
4
(i)
THF, 0 °C
(ii) NH2 Silicycle
CbzHN
CO2Me
5
NHBoc
Dipéptido
10% Pd/C, THF,
32 psi H2, 20 °C
H2N
CO2Me
6
NHBoc
(i) Cbz 1
THF, 0 °C
(ii) NH2 Silicycle
BocHN
CbzHN
CO2Me
7
NHBoc
10% Pd/C, THF,
32 psi H2, 20 °C
BocHN
H2N
CO2Me
8
NHBoc
(i) Cbz 1
THF, 0 °C
(ii) NH2 Silicycle
BocHN
CbzHN
CO2Me
9
NHBoc
Tetrapéptido

FIG. 2

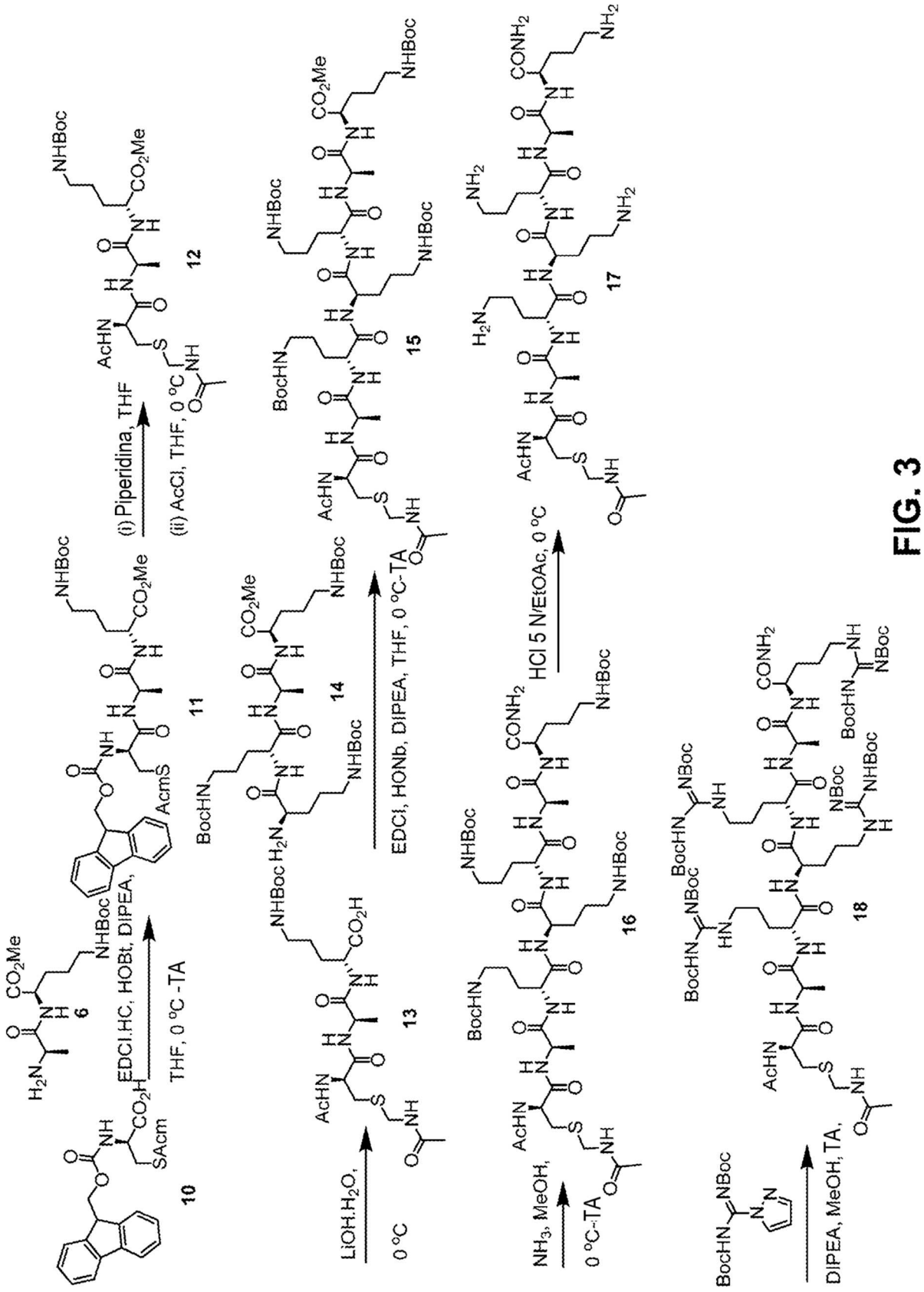

EDCI.HC, HOBt, DIPEA,
THF, 0 °C -TA
(i) Piperidina, THF
(ii) AcCl, THF, 0 °C
LiOH.H2O,
0 °C
EDCI, HONb, DIPEA, THF, 0 °C-TA
NH3, MeOH,
0 °C-TA
HCl 5 N/EtOAc, 0 °C
DIPEA, MeOH, TA.

FIG. 3

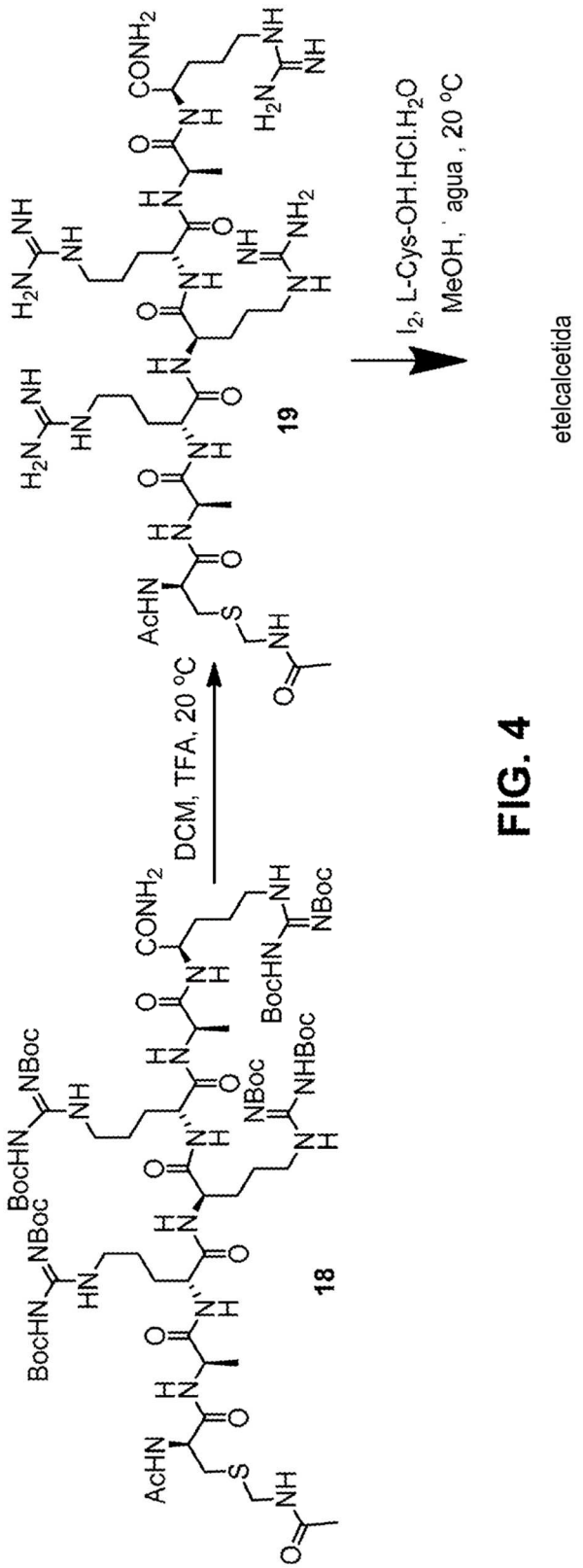

DCM, TFA, 20 °C
I2, L-Cys-OH.HCl.H2O
MeOH, agua , 20 °C
etelcalcetida
18
19

FIG. 4

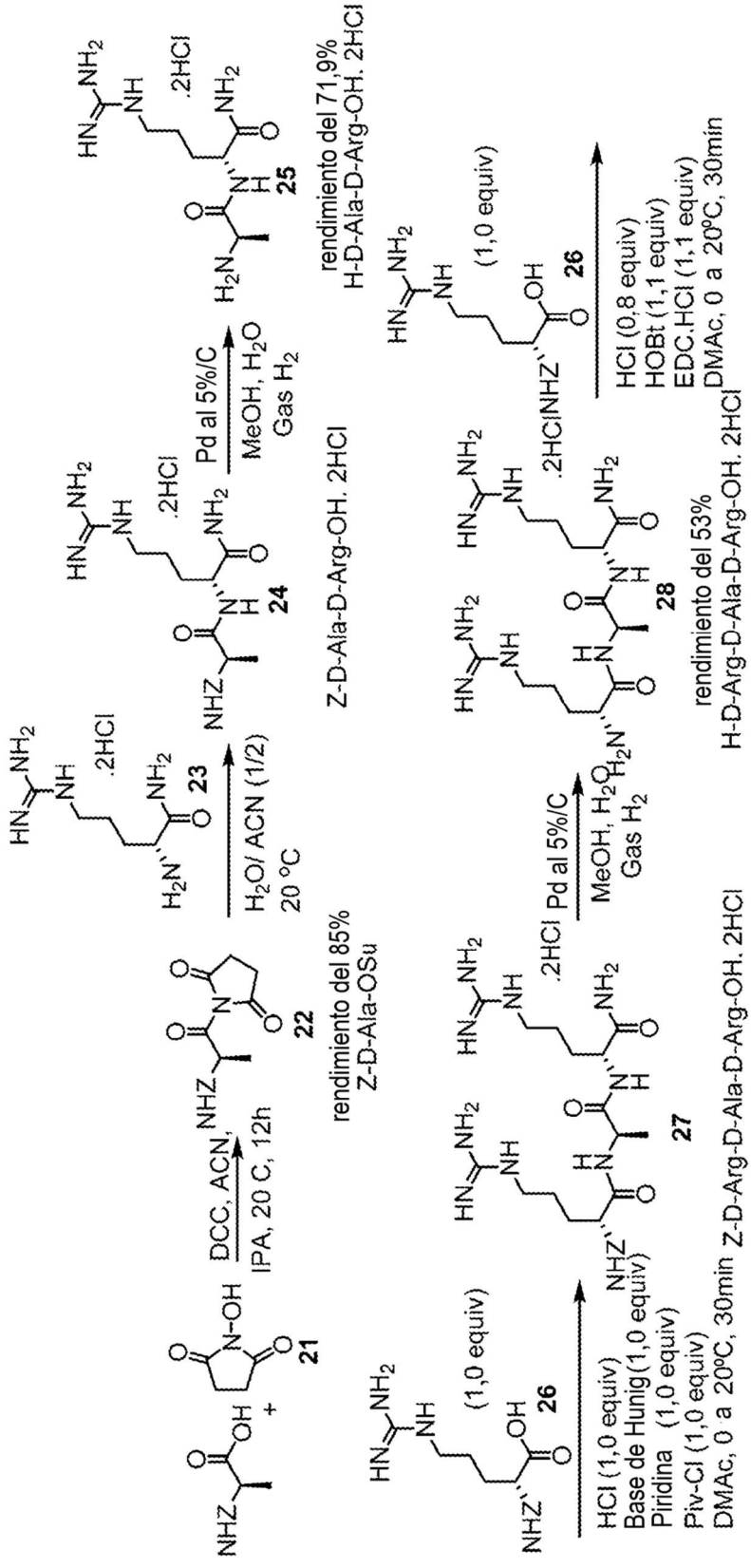

DCC, ACN,
IPA, 20 C, 12h
rendimiento del 85%
Z-D-Ala-OSu
H2O/ ACN (1/2)
20 °C
Z-D-Ala-D-Arg-OH. 2HCl
Pd al 5%/C
MeOH, H2O
Gas H2
rendimiento del 71,9%
H-D-Ala-D-Arg-OH. 2HCl
HCl (1,0 equiv)
Base de Hunig(1,0 equiv)
Piridina (1,0 equiv)
Piv-Cl (1,0 equiv)
DMAc, 0 a 20ºC, 30min
Z-D-Arg-D-Ala-D-Arg-OH. 2HCl
HCl (0,8 equiv)
HOBt (1,1 equiv)
EDC.HCl (1,1 equiv)
DMAc, 0 a 20ºC, 30min
rendimiento del 53%
H-D-Arg-D-Ala-D-Arg-OH. 2HCl
30 rendimiento del 73%
Tetrapéptido
H-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-OH. 2HCl
Z-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-OH. 2HCl

FIG. 5

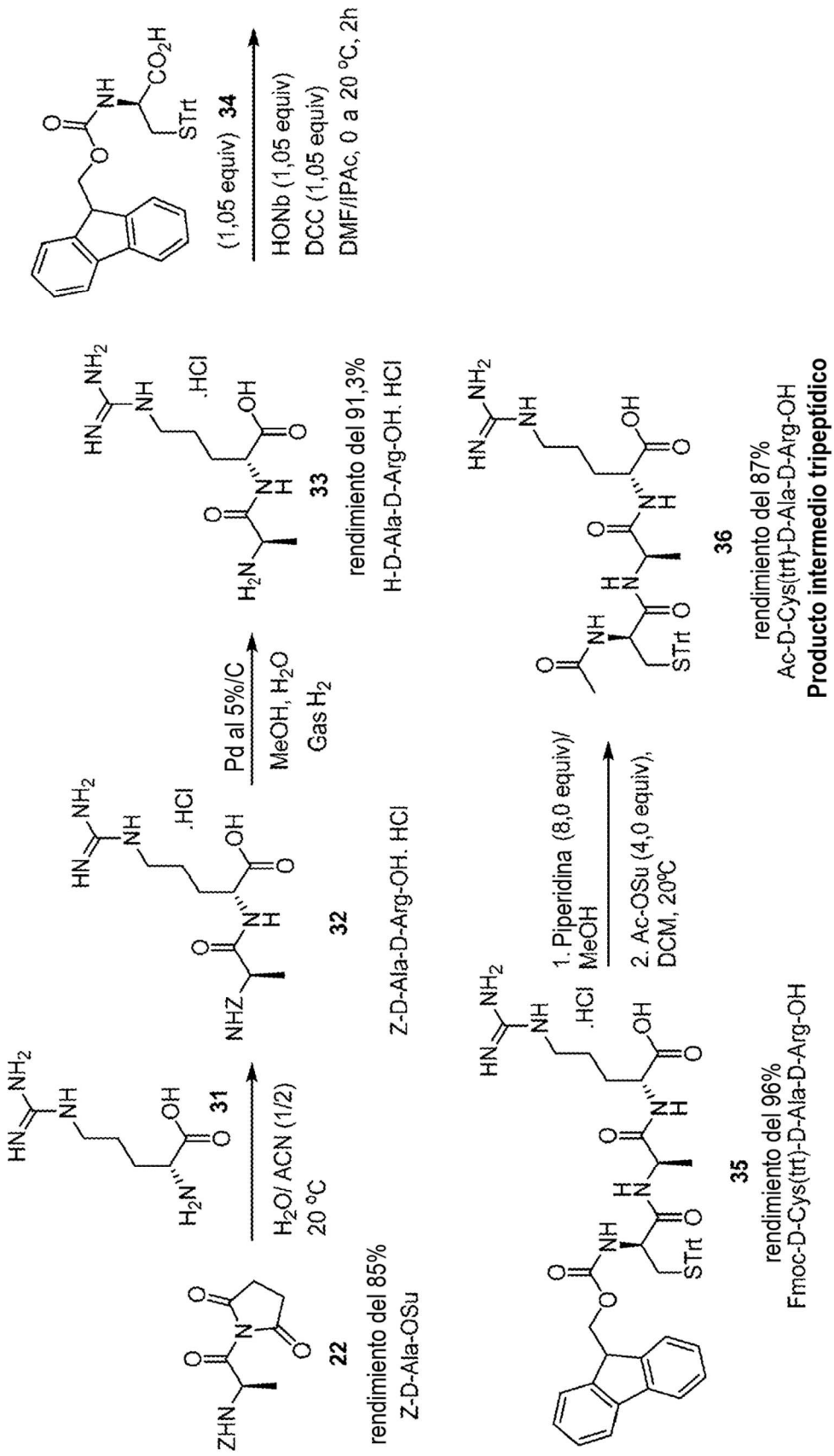

H2O/ ACN (1/2)
20 °C
31
22
rendimiento del 85%
Z-D-Ala-OSu
Z-D-Ala-D-Arg-OH. HCl
Pd al 5%/C
MeOH, H2O
Gas H2
32
33
rendimiento del 91,3%
H-D-Ala-D-Arg-OH. HCl
(1,05 equiv) 34
HONb (1,05 equiv)
DCC (1,05 equiv)
DMF/IPAc, 0 a 20 °C, 2h
1. Piperidina (8,0 equiv)/
MeOH
2. Ac-OSu (4,0 equiv),
DCM, 20ºC
35
rendimiento del 96%
Fmoc-D-Cys(trt)-D-Ala-D-Arg-OH
36
rendimiento del 87%
Ac-D-Cys(trt)-D-Ala-D-Arg-OH
Producto intermedio tripeptídico

FIG. 6

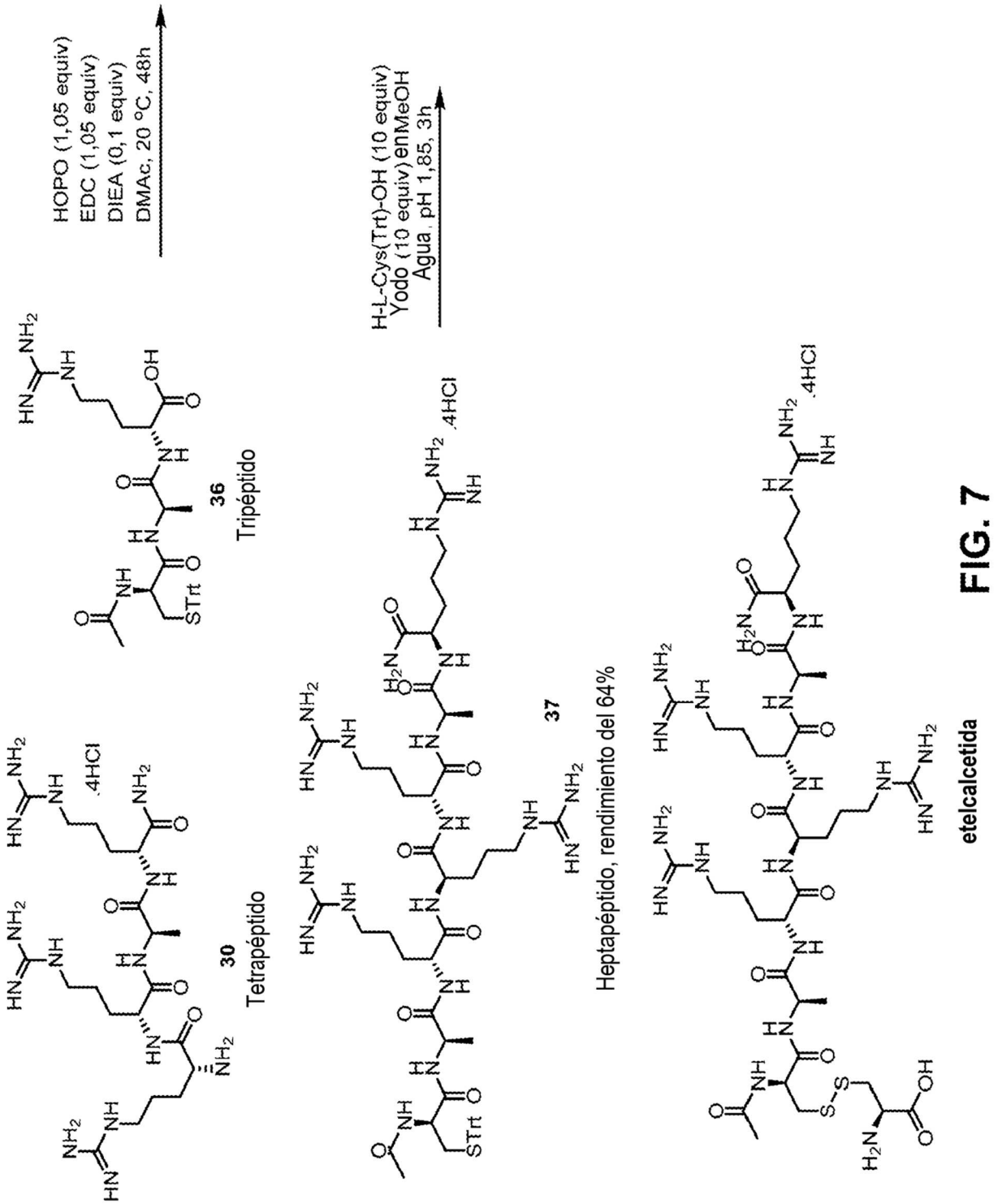
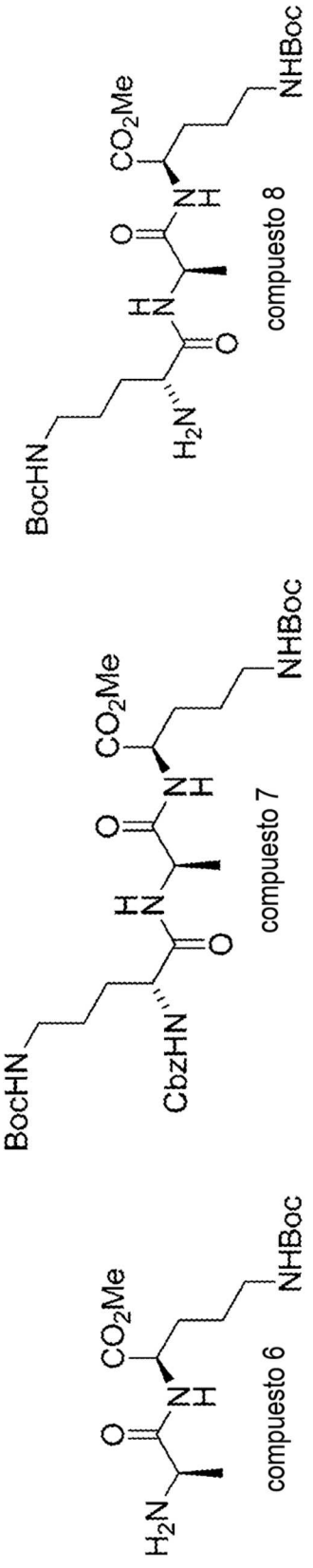

HOPO (1,05 equiv)
EDC (1,05 equiv)
DIEA (0,1 equiv)
DMAc, 20 °C, 48h
H-L-Cys(Trt)-OH (10 equiv)
Yodo (10 equiv) en MeOH
Agua. pH 1,85, 3h
30
Tetrapéptido
36
Tripéptido
37
Heptapéptido, rendimiento del 64%
etelcalcetida

FIG. 7



compuesto 6

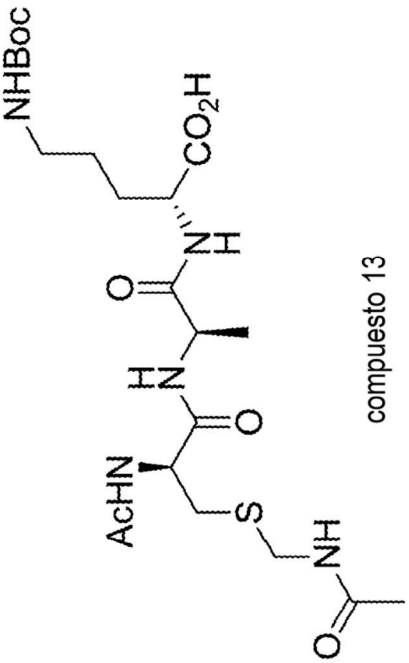
FIG. 8A

compuesto 7

FIG. 8B

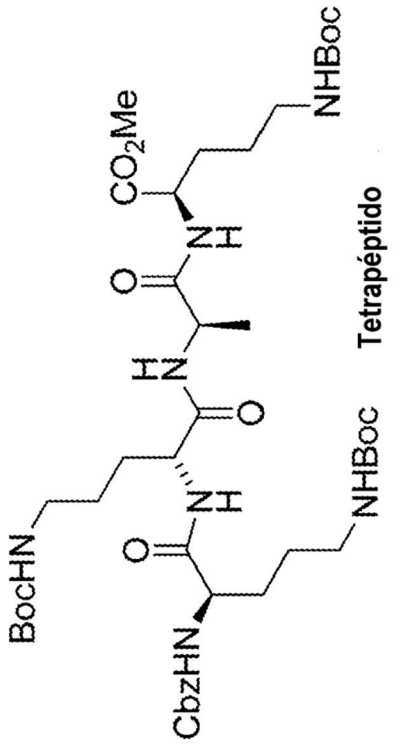
compuesto 8

FIG. 8C



compuesto 13

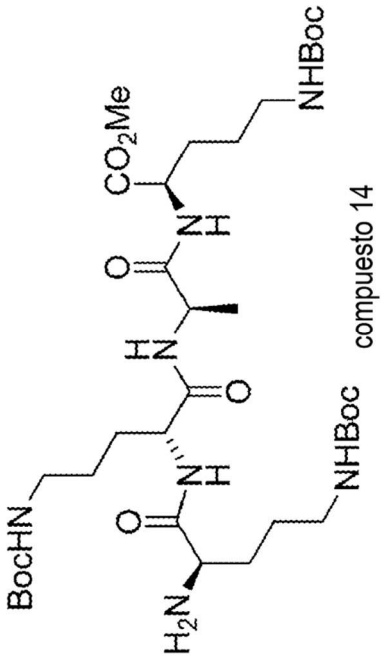
FIG. 8E



Tetrapéptido

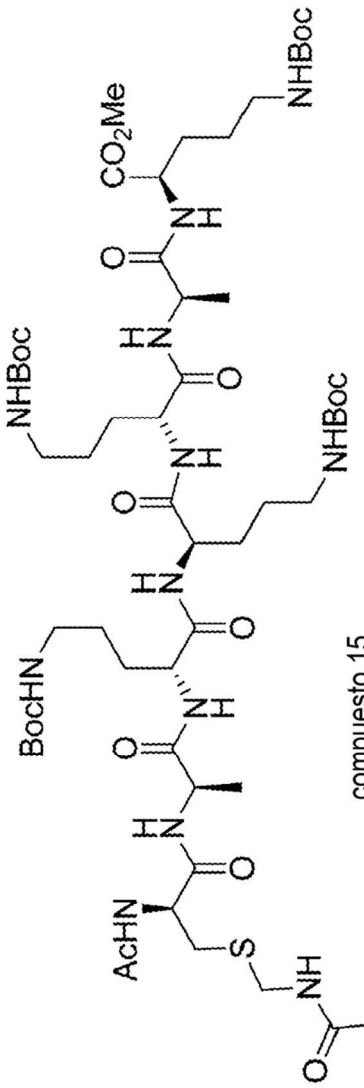
compuesto 9

FIG. 8D



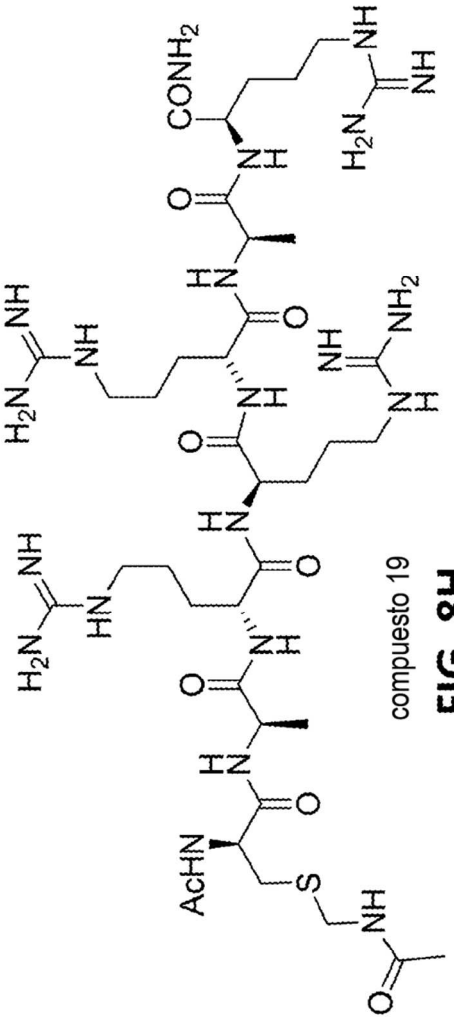
compuesto 14

FIG. 8F



compuesto 15

FIG. 8G



compuesto 19

FIG. 8H

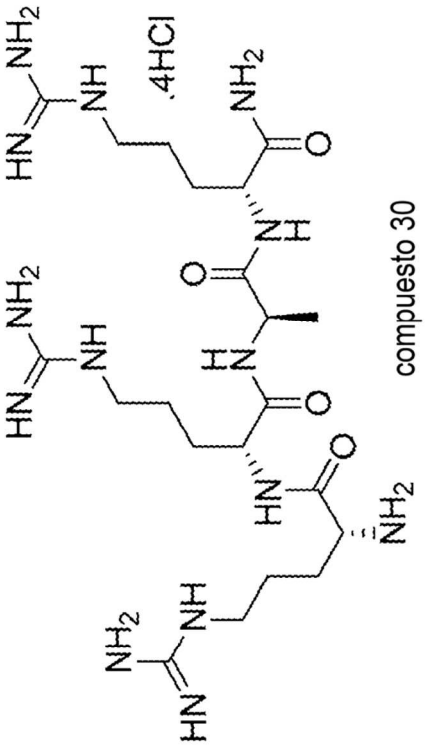


FIG. 8J

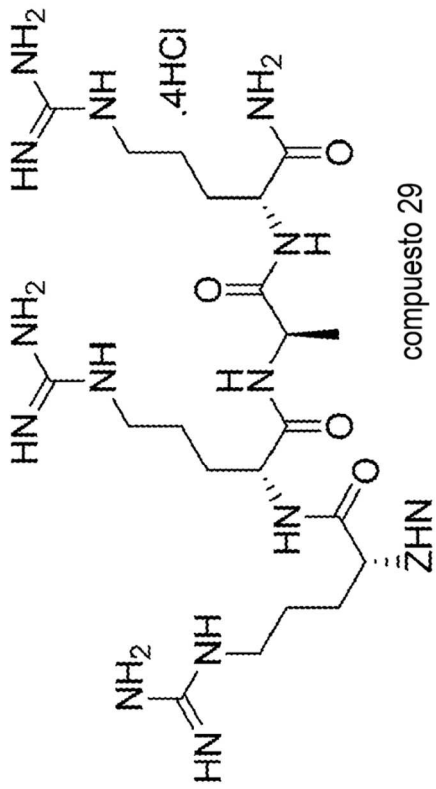


FIG. 8I

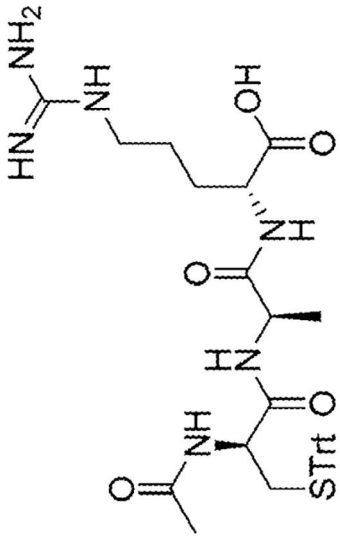


FIG. 8K

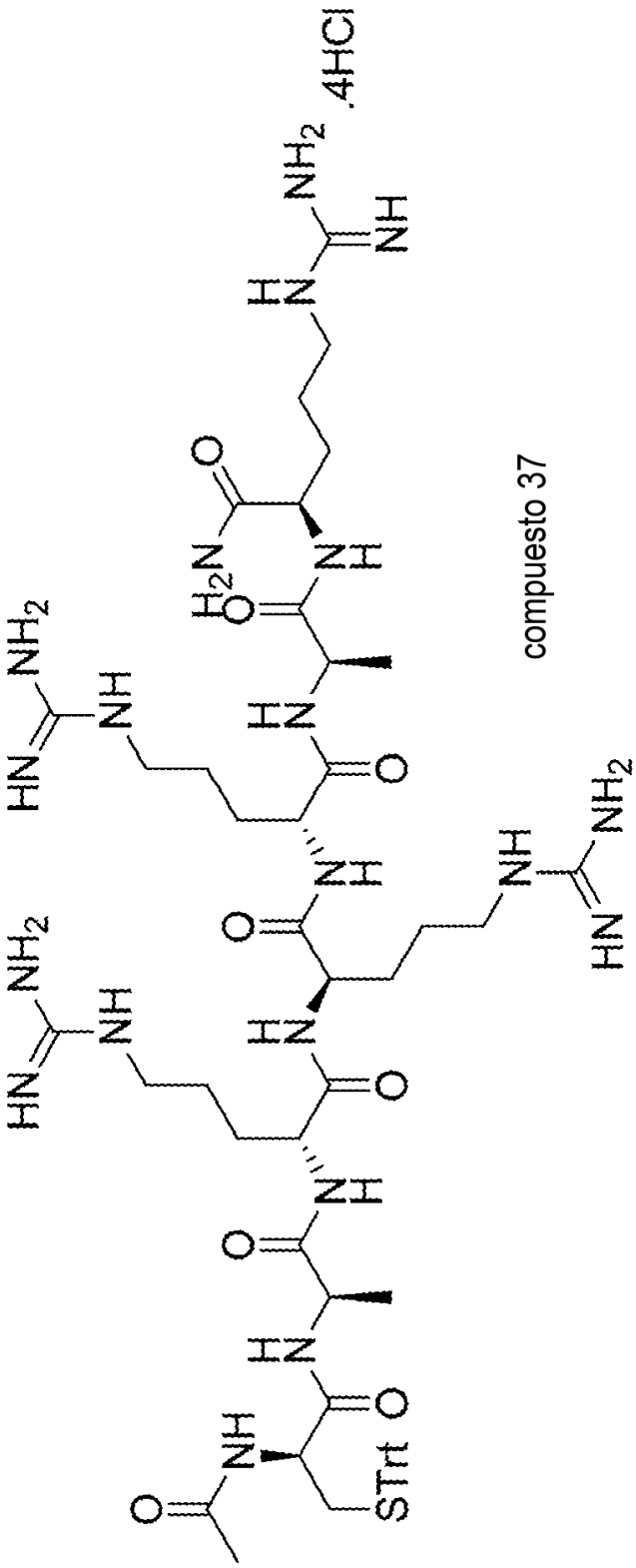


FIG. 8L