

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 849 373**

21 Número de solicitud: 202030131

51 Int. Cl.:

**C07K 5/062** (2006.01)

**C07K 5/065** (2006.01)

**A61K 38/05** (2006.01)

12

## PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**17.02.2020**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**17.08.2021**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**09.02.2023**

Fecha de concesión:

**13.10.2023**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**20.10.2023**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO / EUSKAL  
HERRIKO UNIBERTSITATEA (100.0%)**

**Barrio Sarriena, s/n  
48940 Leioa (Bizkaia) ES**

72 Inventor/es:

**CORREA NAVARRO, Arkaitz y  
SAN SEGUNDO EIZAGUIRRE, Marcos**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **ACILACIÓN DE UNIDADES DE TIROSINA EN COMPUESTOS PEPTÍDICOS**

57 Resumen:

Acilación de unidades de tirosina en compuestos peptídicos.

La presente invención se dirige a un procedimiento para la modificación selectiva de unidades de tirosina presentes en una secuencia peptídica, en particular, mediante la incorporación de grupos acilo en la posición orto del resto hidroxilo de su anillo aromático. Asimismo, la invención también se refiere a una secuencia peptídica que comprende al menos una unidad de tirosina mono- o di-funcionalizada con dicho grupo acilo en el anillo aromático, así como a una composición farmacéutica que comprende dicha secuencia.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.  
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 849 373 B2

## DESCRIPCIÓN

## ACILACIÓN DE UNIDADES DE TIROSINA EN COMPUESTOS PEPTÍDICOS

## CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se encuadra dentro de los procedimientos para modificar selectivamente secuencias peptídicas, y más en concreto, secuencias que comprenden unidades de tirosina para incorporar nuevos grupos en su estructura.

## ANTECEDENTES

- 10 La modificación selectiva de un aminoácido concreto en una secuencia compleja de aminoácidos perteneciente a un péptido, o incluso una proteína, se ha convertido en una prometedora herramienta para su aplicación en numerosas áreas, y en particular en el campo de la proteómica. De hecho, existe una creciente demanda de estrategias, tanto desde el punto de vista académico como industrial, que permitan la funcionalización de péptidos, dado que los péptidos modificados pueden proporcionar
- 15 propiedades biológicas mejoradas en comparación con los péptidos de los que provienen.

- Estas modificaciones también son de especial relevancia en el desarrollo de fármacos puesto que permiten minimizar algunos problemas convencionales asociados a algunos péptidos, entre los que se incluyen la falta de estabilidad in vivo y una pobre
- 20 biodisponibilidad oral.

Mientras que la incorporación de bloques formados por unidades de aminoácidos no naturales en la síntesis de cadenas peptídicas es algo más habitual, la introducción selectiva de modificaciones sobre los aminoácidos naturales de la cadena peptídica ya formada sigue siendo objeto de extensa investigación.

- 25 La modificación de péptidos se ha basado fundamentalmente en reacciones clásicas de resolución enzimática o síntesis asimétrica [Bayer, et al., *J. Org. Chem.*, 2014, 79, 8491-8497; Maruoka, K. et al., *Org. Chem. Rev.*, 2003, 103, 3013-3028]. También se han llevado a cabo reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas con metales de transición [Johansson, S., et al, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51, 5062-5085; *Angew. Chem.*, 2012, 124, 5150-5174].
- 30

Sin embargo, estos métodos requieren de la síntesis y uso de sustratos preactivados, lo que obliga a realizar procedimientos sintéticos extensos que proporcionan además sub-productos no deseados.

- 35 Como alternativa más prometedora que evita las limitaciones anteriores, se han efectuado modificaciones directas sobre la cadena peptídica para funcionalizar los enlaces C-H de manera quimioselectiva y en posiciones concretas [(a) Wang, W.; Lorian, M. M.; Shah, J.; Kapdi, A. R.; Ackermann, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, 57, 14700. (b) Malins, L. R. *Pep. Sci.* 2018, 110, e24049. (c) Mondal, S.; Chowdhury, S. *Adv. Synth. Catal.* 2018, 360, 1884. (d) Malins, L. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2018, 46,
- 40 25. (e) deGruyter, J. N.; Malins, L. R.; Baran, P. S. *Biochemistry* 2017, 56, 3863. (f) He, G.; Wang, B.; Nack, W. A.; Chen, G. *Acc. Chem. Res.* 2016, 49, 635. (g) Metz, A. M.; Kozlowski, M. C. *J. Org. Chem.* 2015, 80, 1. (h) Noisier, A. F. M.; Brimble, M. A. *Chem. Rev.* 2014, 114, 8775.]. Sin embargo, a pesar de haberse realizado avances al respecto, la mayoría de los métodos utilizados hasta la fecha se apoya en el empleo de derivados

de haluro que presentan una alta toxicidad, tales como ioduros de arilo, haluros de alquilo o de alquinilo, lo que refuerza la idea de encontrar nuevas estrategias para incorporar funcionalizaciones más versátiles.

La funcionalización de los enlaces C(sp<sup>3</sup>)-H se ha estudiado de forma exhaustiva, llegándose a introducir de manera selectiva un amplio número de grupos funcionales en el esqueleto principal del α-aminoácido [San Segundo, M; Correa, A., *Synthesis*, 2018, 50, 2853-2866], así como en las posiciones β, γ y δ de la cadena lateral hidrocarbonada. Por el contrario, se han descrito relativamente pocos métodos para la funcionalización de enlaces C(sp<sup>2</sup>)-H en el residuo aromático que presentan algunos aminoácidos tales como la fenilalanina y la tirosina.

En concreto, el uso de aldehídos en este contexto ha sido recientemente explorado para la modificación selectiva de unidades de fenilalanina (Phe) presentes en distintas secuencias oligopeptídicas [San Segundo, M.; Correa, A. *Chem. Sci.* 2019, 10, 8872-8879]. Dicho método ha permitido la acilación selectiva de oligopéptidos en el residuo aromático de la unidad de fenilalanina gracias a la introducción del grupo picolinamida en la posición N-terminal del oligopéptido. A pesar de la novedad de este método, sufre de algunas limitaciones como la necesidad de utilizar sales de plata (Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) en cantidades estequiométricas y un disolvente orgánico como la N,N-dimetilformamida, lo cual limita su aplicación en sistemas biológicos.

Además, esta estrategia no ha permitido modificar residuos aromáticos de otros aminoácidos como la tirosina.

La tirosina es un aminoácido no esencial precursor de las hormonas del tiroides, de las catecolaminas (adrenalina, dopamina, noradrenalina) y de la melanina. Por tanto, en este contexto, el desarrollo de un método que permita introducir modificaciones estructurales de manera selectiva en una secuencia peptídica que contenga unidades de tirosina tiene un gran valor sintético con potencial aplicación en el campo de la modificación de las proteínas.

En el caso particular de la tirosina, se ha descrito la funcionalización en el anillo aromático, en concreto en la posición orto al grupo hidroxilo o sobre el propio grupo hidroxilo, haciéndose referencia a reacciones de tipo Mannich, reacciones de arilación, de O-arilación, de acetoxilación o de alquilación con complejos de n-alilo [deGruyter, J.N et al., *Biochemistry*, 2017, 56, 3863-3873]. Asimismo, se han descrito métodos de iodación, alquenilación o arilación [*Org. Lett.*, 2008, 10, 3243-3245; *Chem. Eur. J.*, 2019, 25, 6896-6901; *Org. Biomol. Chem.*, 2009, 7, 3119-3127].

De forma más particular, se ha descrito la reacción de acetoxilación catalizada por complejos de Pd en unidades de tirosina, así como de fenilalanina y homofenilalanina, dirigida por grupos N-triflamida presentes en el N-terminal, lo que ha permitido modificar de forma selectiva la posición orto del anillo aromático de dichos aminoácidos con grupos OAc [Vickers, C.J., *Org. Lett.*, 2010, 12, 2511-2513].

No obstante, no se ha descrito aún la introducción selectiva de fragmentos derivados de compuestos aldehídicos en el anillo aromático de unidades de tirosina presentes en secuencias peptídicas.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Los autores de la presente invención han desarrollado un procedimiento que permite introducir en condiciones oxidantes una gran variedad de grupos acilo, ya sea aromáticos, heteroaromáticos o alquílicos, de manera selectiva sobre el residuo aromático de unidades de tirosina presentes en cualquier posición de una secuencia peptídica.

El procedimiento desarrollado es altamente selectivo pudiéndose modificar residuos de tirosina en presencia de una gran variedad de aminoácidos sin que la estructura de éstos se vea alterada.

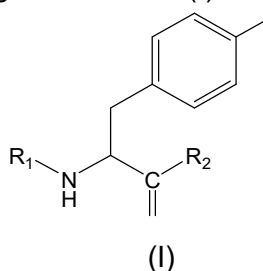
Además, a diferencia de la mayoría de los métodos de diversificación de péptidos que transcurren en disolventes orgánicos tóxicos, como son los disolventes clorados, el procedimiento de la invención puede utilizar agua como medio de reacción, lo que supone una ventaja para su aplicación en sistemas biológicos de mayor complejidad estructural, como es el caso de las proteínas. Como ventaja adicional, el procedimiento de la invención permite prescindir de las sales de plata comúnmente empleadas en procesos oxidativos.

Esto supone un avance significativo dado que la unidad de tirosina está presente en compuestos de gran relevancia biomédica como la endomorfina 2 o el neurotransmisor Neuromedina N, neuropéptido derivado del mismo polipéptido precursor de la neurotensina.

Por tanto, es posible introducir variedad estructural en compuestos de gran interés biomédico en estados "late-stage" mediante un proceso sintético que permite obtener de manera sencilla, rápida y efectiva amplias familias de compuestos derivados de un target concreto.

Así, un primer aspecto de la invención se dirige a un procedimiento para la modificación de unidades de tirosina en una secuencia peptídica que comprende al menos una unidad de tirosina, donde dicho procedimiento comprende:

- a) hacer reaccionar una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una unidad de tirosina según la fórmula (I):



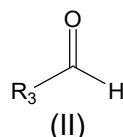
donde:

Py es un grupo piridinilo;

R<sub>1</sub> se selecciona entre un grupo protector del grupo amino, un aminoácido y una secuencia de aminoácidos, donde dicho aminoácido o secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector N-terminal;

R<sub>2</sub> se selecciona entre O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, un aminoácido y una secuencia de aminoácidos, donde dicho aminoácido o secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector C-terminal;

con un aldehído de fórmula (II):

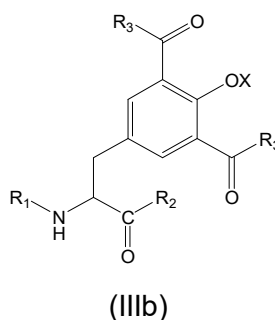
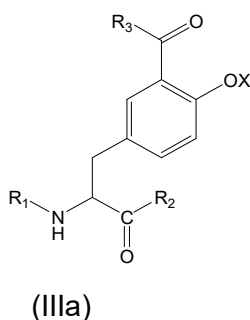


- 5 donde  $R_3$  se selecciona entre un grupo alquilo  $C_1-C_{10}$  lineal o ramificado, un grupo cicloalquilo  $C_4-C_{10}$ , un grupo arilo  $C_6-C_{10}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo  $C_1-C_6$ ,  $CF_3$ , un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , halógeno, fenilo o  $-NHC(O)-$ alquilo  $C_1-C_3$ ;

en presencia de un catalizador de paladio y un agente oxidante;

- 10 para proporcionar una secuencia peptídica que comprende al menos una unidad de tirosina mono- o di-sustituida por un grupo acilo  $R_3C(O)-$  en la posición orto con respecto al grupo O-Pyr del residuo aromático.

- Un segundo aspecto de la invención lo constituye una secuencia peptídica que comprende al menos una unidad de tirosina, donde dicha unidad de tirosina se encuentra monofuncionalizada o difuncionalizada con un grupo acilo en el residuo aromático según las fórmulas (IIIa) y (IIIb):



donde :

- 20 X se selecciona entre H y un grupo piridinilo;

$R_1$  se selecciona entre H, un grupo protector del grupo amino, un aminoácido y una secuencia de aminoácidos, donde dicho aminoácido o secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector N-terminal;

- 25  $R_2$  se selecciona entre OH, O-alquilo  $C_1-C_3$ , un aminoácido y una secuencia de aminoácidos, donde dicho aminoácido o secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector C-terminal;

$R_3$  se selecciona entre un grupo alquilo  $C_1-C_{10}$  lineal o ramificado, un grupo cicloalquilo  $C_4-C_{10}$ , un grupo arilo  $C_6-C_{10}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo  $C_1-C_6$ ,  $CF_3$ , un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , halógeno, fenilo o  $-NHC(O)-$ alquilo  $C_1-C_3$ .

- 30 Finalmente, la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende la secuencia peptídica de la invención según se define en el párrafo anterior.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

En el contexto de la presente invención, los siguientes términos encontrados en las distintas fórmulas descritas tienen el significado indicado a continuación:

El término alquilo se refiere a un grupo formado por una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, la cual no contiene ninguna insaturación y está enlazada al resto de la molécula a través de un enlace sencillo. Ejemplos concretos incluyen, sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, etc. La mención a alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> se refiere a cuando dicho grupo tiene entre 1 y 10 átomos de carbono, entre 1 y 6 átomos de carbono y entre 1 y 3 átomos de carbono, respectivamente.

El término "cicloalquilo C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>" se refiere a un grupo formado por un anillo de entre 4 a 10 miembros consistente en átomos de carbono e hidrógeno, el cual no contiene ninguna insaturación y está enlazado al resto de la molécula a través de un enlace sencillo. Ejemplos concretos incluyen ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo.

El término "arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>" se refiere a un grupo formado por un anillo aromático de entre 6 y 10 miembros consistente en átomos de carbono e hidrógeno, siendo de forma preferida un grupo fenilo. Dicho grupo arilo puede estar sustituido por al menos un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, CF<sub>3</sub>, un grupo O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, halógeno, fenilo y -NHC(O)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

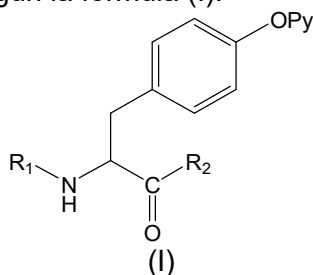
El término "heteroarilo C<sub>6</sub>-C<sub>16</sub>" se refiere a un grupo formado por un anillo aromático o varios anillos aromáticos condensados que tienen entre 6 y 16 miembros consistente en átomos de carbono e hidrógeno y uno o más heteroátomos seleccionados entre O, N y S. Dicho grupo heteroarilo puede estar sustituido por al menos un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

El término "halógeno" se refiere a F, Cl, Br o I.

Los términos secuencia peptídica o secuencia de aminoácidos se utilizan en la presente descripción indistintamente. Tal como un experto entendería, por "secuencia de aminoácidos" debe entenderse una cadena de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos o grupos amida. En el contexto de la presente invención, dicha secuencia de aminoácidos comprende al menos una unidad de tirosina que se encuentra unida a dicha secuencia a través del N-terminal y/o del C-terminal mediante un enlace amida. La al menos una unidad de tirosina puede encontrarse dentro de la secuencia peptídica o en uno de sus extremos terminales.

Tal como se ha descrito anteriormente, un primer aspecto de la invención se dirige a un procedimiento para la modificación de unidades de tirosina en una secuencia peptídica que comprende al menos una unidad de tirosina, donde dicho procedimiento comprende:

- a) hacer reaccionar una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una unidad de tirosina según la fórmula (I):



donde:

Py es un grupo piridinilo;

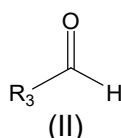
$R_1$  se selecciona entre un grupo protector del grupo amino, un aminoácido y una secuencia de aminoácidos, donde dicho aminoácido o secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector N-terminal;

5

$R_2$  se selecciona entre O-alquilo  $C_1-C_3$ , un aminoácido y una secuencia de aminoácidos, donde dicho aminoácido o secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector C-terminal;

con un aldehído de fórmula (II):

10



15

donde  $R_3$  se selecciona entre un grupo alquilo  $C_1-C_{10}$  lineal o ramificado; un grupo cicloalquilo  $C_4-C_{10}$ ; un grupo arilo  $C_6-C_{10}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo  $C_1-C_6$ ,  $CF_3$ , un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , halógeno, fenilo o  $-NHC(O)$ -alquilo  $C_1-C_3$ ; y un grupo heteroarilo  $C_5-C_{16}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo  $C_1-C_6$ ,

en presencia de un catalizador de paladio y un agente oxidante,

20

para proporcionar una secuencia peptídica que comprende al menos una unidad de tirosina mono- o di-sustituida por un grupo acilo  $R_3C(O)$ - en la posición orto con respecto al grupo O-Pyr del residuo aromático.

25

En una realización particular,  $R_1$  es un grupo protector del grupo amino terminal. Cualquier grupo protector de un grupo amino terminal empleado en la síntesis de secuencias peptídicas puede ser utilizado en el procedimiento de la invención, tal como por ejemplo tert-butiloxycarbonilo (comúnmente conocido como t-Boc) o 9-fluorenilmetoxycarbonilo (también conocido como Fmoc).

No obstante, en una realización particular se prefiere el uso de tert-butiloxycarbonilo (t-Boc).

En otra realización particular,  $R_2$  es un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , preferiblemente O- $CH_3$ .

30

En una realización preferida,  $R_1$  y/o  $R_2$  es una secuencia de aminoácidos. Dicha secuencia de aminoácidos puede comprender otras unidades de tirosina en cualquier posición. Dichas unidades de tirosina tendrán la misma estructura que la que se detalla en la fórmula (I), es decir, contendrá restos aromáticos que incluyen el grupo director O-Pyr.

35

En otra realización preferida,  $R_1$  o  $R_2$  es un aminoácido. En este contexto, se entiende entonces que dicho aminoácido se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo N-terminal o del grupo C-terminal de la misma mediante el correspondiente enlace amida. En el caso particular de que  $R_1$  sea un aminoácido, dicho aminoácido puede comprender un grupo protector N-terminal. En el caso particular de que  $R_2$  sea un aminoácido, dicho aminoácido puede comprender un grupo protector C-terminal.

40

En otra realización preferida,  $R_1$  y  $R_2$  son un aminoácido. En este contexto, se entiende entonces que uno de dichos aminoácidos se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo N-terminal y el otro de dichos aminoácidos se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo C-terminal de la misma, en ambos casos mediante

el correspondiente enlace amida. De forma preferida, ambos aminoácidos son distintos. El aminoácido de  $R_1$  puede comprender un grupo protector N-terminal, mientras que el aminoácido de  $R_2$  puede comprender un grupo protector C-terminal.

- 5 En otra realización preferida,  $R_1$  es un grupo protector del grupo amino y  $R_2$  es un aminoácido que se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo C-terminal de la misma mediante el correspondiente enlace amida para dar lugar a un dipéptido. En esta realización preferida el aminoácido puede comprender un grupo protector C-terminal.

En una realización preferida  $R_2$  es leucina.

- 10 En otra realización preferida,  $R_2$  es un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , preferiblemente un grupo  $O-CH_3$ , y  $R_1$  es un aminoácido que se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo N-terminal de la misma mediante el correspondiente enlace amida para dar lugar a un dipéptido. En esta realización preferida el aminoácido puede comprender un grupo protector N-terminal.

- 15 En una realización preferida,  $R_1$  es alanina.

- En otra realización particular,  $R_1$  es un grupo protector del grupo amino y  $R_2$  es una secuencia de aminoácidos que se encuentra unida a la unidad de tirosina a través del grupo C-terminal de la misma mediante el correspondiente enlace amida. En esta realización particular, la secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector C-terminal.
- 20

- En otra realización preferida,  $R_2$  es un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , preferiblemente un grupo  $O-CH_3$ , y  $R_1$  es un aminoácido que se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo N-terminal de la misma mediante el correspondiente enlace amida. En esta realización particular, la secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector N-terminal.
- 25

En el contexto de la presente invención, por grupo protector N-terminal debe entenderse cualquier grupo protector de un grupo amino terminal empleado en la síntesis de secuencias peptídicas, tal como por ejemplo tert-butiloxycarbonilo o 9-fluorenilmetoxycarbonilo.

- 30 No obstante, en una realización particular se prefiere el uso de tert-butiloxycarbonilo (t-Boc).

Por grupo protector C-terminal debe entenderse cualquier grupo protector de un grupo carboxilo terminal empleado en la síntesis de secuencias peptídicas, tal como por ejemplo un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , preferiblemente  $O-CH_3$ .

- 35 En una realización preferida,  $R_1$  y  $R_2$  no pueden ser a la vez un grupo protector del grupo amino y un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , respectivamente.

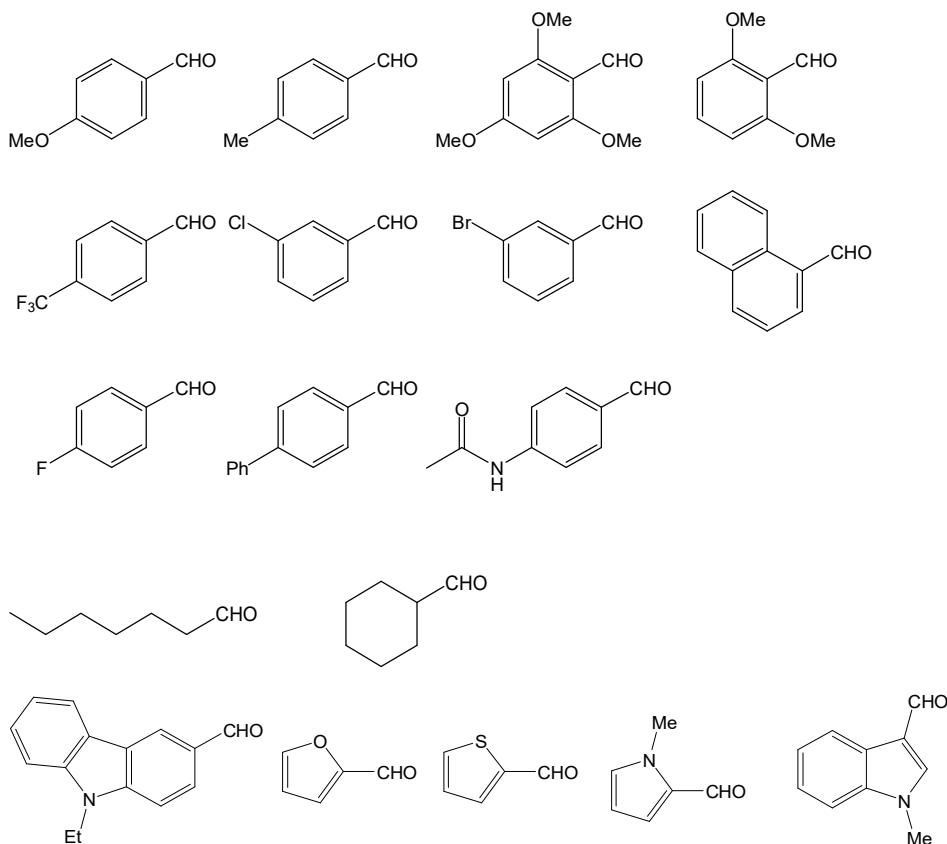
- En otra realización particular,  $R_3$  en el aldehído de fórmula (II) es un grupo alquilo  $C_1-C_6$  lineal o ramificado; un grupo cicloalquilo  $C_4-C_6$ ; un grupo arilo  $C_6-C_{10}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ,  $CF_3$ , un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , halógeno, fenilo y  $-NHC(O)$ -alquilo  $C_1-C_3$ ; y un grupo heteroarilo  $C_5-C_{16}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo  $C_1-C_3$ .
- 40

De forma preferida,  $R_3$  se selecciona entre un grupo alquilo  $C_1-C_6$  lineal; un grupo cicloalquilo  $C_4-C_6$ ; un grupo arilo  $C_6-C_{10}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo

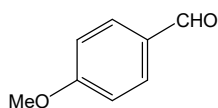


metilo,  $\text{CF}_3$ , un grupo O-metilo, halógeno, fenilo o  $-\text{NHC(O)}$ -alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_3$ ; y un grupo heteroarilo  $\text{C}_5\text{-C}_{16}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo metilo o etilo.

De forma aún más preferida el aldehído de fórmula (II) se selecciona entre los siguientes compuestos:



10 En una realización aún más preferida el aldehído de fórmula (II) es:



15 El procedimiento de la invención se lleva a cabo en presencia de un catalizador de paladio. En concreto el catalizador es una sal de paladio, preferiblemente seleccionada entre  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ ,  $\text{Pd}(\text{TFA})_2$  y  $\text{PdCl}_2$ .

En una realización más preferida, el catalizador de Pd es  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  puesto que proporciona un mayor rendimiento de reacción.

El procedimiento de la invención también requiere la presencia de un agente de oxidación en el medio de reacción.

20 Dicho agente de oxidación permite, por una parte, generar el radical acilo procedente del aldehído empleado en la reacción. Además, aunque sin estar ligados a ninguna teoría concreta, se cree que dicho agente proporciona las condiciones oxidantes que permiten evolucionar el Pd (III) del catalizador a Pd (IV) como paso previo a su regeneración tras la reacción de acilación del residuo de tirosina.

De forma preferente, el agente oxidante es tert-butil hidroperóxido (TBHP) dado que ha resultado ser el más eficiente comparativamente, además de ser el más económico. Más preferentemente, el agente oxidante es una disolución acuosa de TBHP, incluso más preferentemente dicha disolución acuosa es al 70% en agua, estando disponible comercialmente bajo el nombre Luperox® TBH70X.

En una realización preferente, el agente oxidante se emplea en una proporción de entre 2 y 5 equivalentes con respecto a cada residuo de tirosina a modificar en la secuencia peptídica. De forma más preferida se emplean entre 3 y 4 equivalentes, aún más preferiblemente 3 equivalentes de agente oxidante por cada residuo de tirosina a modificar en la secuencia peptídica.

Una ventaja significativa del procedimiento de la invención radica en la posibilidad de llevar a cabo la reacción de acilación utilizando agua como único disolvente. Esto ofrece un gran potencial dentro de un marco biológico dado que permite modificar sistemas biológicos de mayor complejidad estructural, como es el caso de proteínas que contengan unidades de tirosina, de manera selectiva en un medio acuoso.

Por tanto, en una realización preferida, el procedimiento de la invención se lleva a cabo en presencia de agua como único disolvente de reacción.

No obstante, la reacción de acilación del procedimiento de la invención también puede llevarse a cabo en presencia de otros disolventes orgánicos, en particular tolueno, o una mezcla de agua y alcohol, tal como tert-butanol, o una mezcla de agua y acetonitrilo.

En una realización particular, el procedimiento de la invención se realiza en atmósfera protectora, por ejemplo bajo atmósfera de argón, o en aire. Preferiblemente se lleva a cabo en atmósfera protectora.

De forma preferente, el procedimiento de reacción no se realiza bajo atmósfera únicamente de oxígeno.

El procedimiento de la invención permite, por tanto, modificar selectivamente las unidades de tirosina presentes en una secuencia peptídica sin afectar la estructura de otros aminoácidos también constitutivos de dicha secuencia. Dicha modificación conlleva la orto-acilación del residuo aromático de la tirosina, ya sea en una o en ambas posibles posiciones del mencionado residuo aromático.

Por orto-acilación se debe entender la incorporación del grupo  $-C(O)R_3$  en la/s posición/es orto con respecto al grupo O-Pyr del residuo aromático de la tirosina.

En una realización particular del procedimiento de la invención, se mezclan inicialmente la secuencia de aminoácidos que comprende al menos una unidad de tirosina según la fórmula (I) con el catalizador de paladio. A continuación, se adiciona el aldehído de fórmula (II) y el agente oxidante, preferiblemente estando este último en una disolución acuosa.

Según esta realización, se propone como posible mecanismo de acilación, una primera etapa de coordinación del catalizador con el residuo de tirosina que tiene el grupo  $-OPy$  con formación del correspondiente paladacilo. Una vez añadido el aldehído y el agente oxidante, este último genera inicialmente el radical acilo del correspondiente aldehído, adicionándose el citado radical acilo al paladacilo para generar un intermedio de Pd (III). Bajo las condiciones oxidantes del medio, es posible que el intermedio de Pd (III) evolucione a Pd (IV) y, posteriormente, por eliminación reductora se regenera el catalizador y se obtiene el producto acilado.

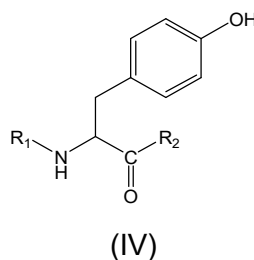
En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende, además, como un paso previo a la reacción de acilación, la incorporación del grupo piridinilo en el residuo aromático de la tirosina.

La introducción de dicho grupo permite llevar a cabo la posterior reacción de acilación selectiva del anillo aromático de la tirosina en la posición orto. En ausencia de dicho grupo director, el proceso de acilación no tiene lugar. De hecho, la incorporación del grupo piridinilo en el residuo aromático de la tirosina en lugar de en las posiciones terminales del péptido (bien en el grupo amino o en el ácido carboxílico) permite la modificación selectiva de las unidades de tirosina en cualquier posición de la secuencia peptídica.

Por tanto, el procedimiento de la invención comprende, además, como un paso previo a la reacción de acilación con el aldehído de fórmula (II), incorporar un grupo piridinilo como sustituyente del oxígeno correspondiente al grupo hidroxilo de la tirosina.

Dicha incorporación o introducción del anillo de piridina se realiza de forma preferente mediante un proceso de O-arilación.

En concreto, dicha etapa comprende hacer reaccionar una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una unidad de tirosina según la fórmula (IV):



donde:

$R_1$  se selecciona entre un grupo protector del grupo amino, un aminoácido y una secuencia de aminoácidos, donde dicho aminoácido o secuencia de aminoácidos comprende un grupo protector N-terminal;

$R_2$  se selecciona entre O-alquilo  $C_1-C_3$ , un aminoácido y una secuencia de aminoácidos, donde dicho aminoácido o secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector C-terminal;

con un yoduro de piridina,

para dar lugar al compuesto de fórmula (I) descrito previamente.

En una realización particular, el yoduro de piridina es 2-iodopiridina.

Esta etapa de introducción del anillo de piridina se basa en métodos convencionales de O-arilación adaptados a esta realización concreta. Tales métodos de arilación se encuentran descritos, por ejemplo, en *Org. Lett.*, 2017, 17, 2682-2685 o en *J. Org. Chem.*, 2014, 79, 1521-1526.

En una realización particular, esta reacción se lleva a cabo en presencia de CuCl como catalizador y de ácido picolínico.

El procedimiento de la invención puede comprender, además, tras la etapa de acilación, una etapa de desprotección del grupo amino terminal, cuando  $R_1$  es un grupo protector del N-terminal de la unidad de tirosina, o del grupo protector N-terminal del aminoácido

o secuencia de aminoácidos cuando  $R_1$  es otro aminoácido o una secuencia de aminoácidos.

Dicha desprotección del grupo amino terminal puede llevarse a cabo por procedimientos convencionales de desprotección, tales como por ejemplo mediante tratamiento con ácido trifluoroacético en diclorometano a temperatura ambiente, según se describe en *J. Med. Chem.*, 2019, 62, 8080-8089.

De la misma forma, el procedimiento de la invención puede comprender, además, tras la etapa de acilación, una etapa de desprotección del grupo carboxilo terminal, cuando  $R_2$  es un grupo O-alquilo  $C_1$ - $C_3$ , o del grupo protector C-terminal del aminoácido o secuencia de aminoácidos cuando  $R_2$  es otro aminoácido o una secuencia de aminoácidos. Igualmente, tal desprotección puede llevarse a cabo mediante procedimientos convencionales de desprotección de grupo carboxilo terminal.

El procedimiento de la invención puede comprender también, tras la etapa de acilación, una etapa de eliminación del grupo piridinilo para proporcionar el correspondiente grupo hidroxilo propio del residuo aromático de la tirosina.

De forma particular, dicha eliminación del grupo piridinilo puede efectuarse mediante reacciones de acoplamiento cruzado asistidas por catalizadores de níquel, de forma similar a como se describe en *Chem. Commun.*, 2018, 54, 2138-2141; *Org. Lett.*, 2017, 19, 3723-3726; *Synthesis* 2018, 50, 3217-3223; *Adv. Synth. Catal.*, 2016, 358, 2417-2421. En estos casos, se activa el enlace C-OPy para poder sustituir el grupo OPy por otros grupos sustituyentes.

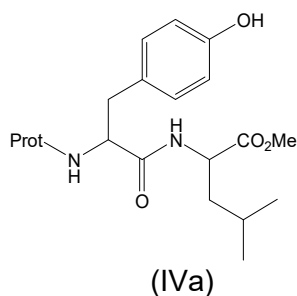
Por otra parte, la secuencia de aminoácidos según la fórmula (IV) puede obtenerse por cualquier método conocido en el estado de la técnica, ya sea mediante síntesis en solución o en fase sólida. Métodos estándar pueden encontrarse en *Synthesis*, 2019, 51, 2261-2277.

En una realización particular, la secuencia de aminoácidos de fórmula (IV) corresponde con un dipéptido, donde una de las unidades de dicha secuencia es una tirosina y la otra un aminoácido seleccionado entre alanina, aspargina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, glicina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano y valina.

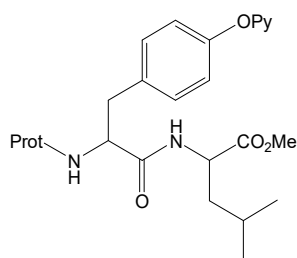
En una realización preferente, la secuencia de aminoácidos es un dipéptido, donde una de las unidades de dicha secuencia es tirosina y la otra un aminoácido seleccionado entre leucina y alanina.

En el caso particular de un dipéptido formado por la unión de tirosina y leucina, el procedimiento de la invención comprende:

a) la reacción de un dipéptido de fórmula (IVa):

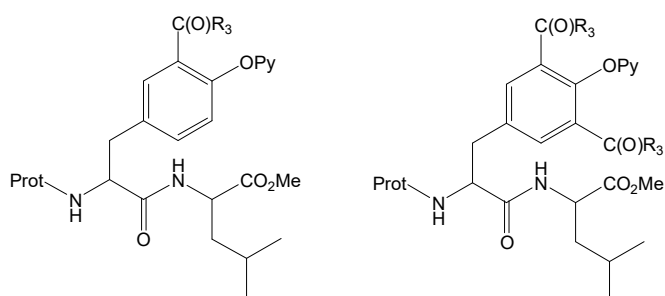


con un yoduro de piridina, preferiblemente, 2-iodopiridina;  
para dar lugar al dipéptido de fórmula (Ia):



(Ia)

- donde el grupo Prot corresponde con un grupo protector del N-terminal; y  
b) reacción de dipéptido de fórmula (Ia) con un aldehído de fórmula (II)  $R_3CHO$ ,  
donde  $R_3$  se selecciona entre un grupo alquilo  $C_1-C_{10}$  lineal o ramificado, un  
grupo cicloalquilo  $C_4-C_{10}$ , un grupo arilo  $C_6-C_{10}$  opcionalmente sustituido por  
al menos un grupo alquilo  $C_1-C_6$ ,  $CF_3$ , un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , halógeno,  
fenilo o  $-NHC(O)$ -alquilo  $C_1-C_3$ ;  
en presencia de un catalizador de paladio y un agente oxidante,  
para dar lugar a un dipéptido modificado, bien monoacilado o mezcla de  
mono- y di-acilado, según las siguientes fórmulas:

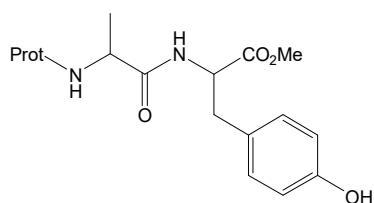


donde Prot, Py y  $R_3$  se definen como anteriormente.

El dipéptido de partida de fórmula (IVa) puede obtenerse por reacción de ambos  
aminoácidos, tirosina y leucina, por cualquier procedimiento conocido, tal como se  
describe en uno de los ejemplos aportados este documento.

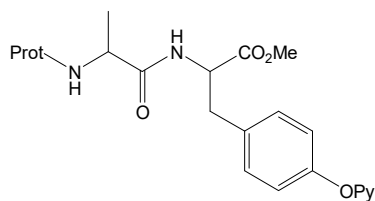
En el caso particular de un dipéptido formado por la unión de tirosina y alanina, el  
procedimiento de la invención comprende:

- a) la reacción de un dipéptido de fórmula (IVb):



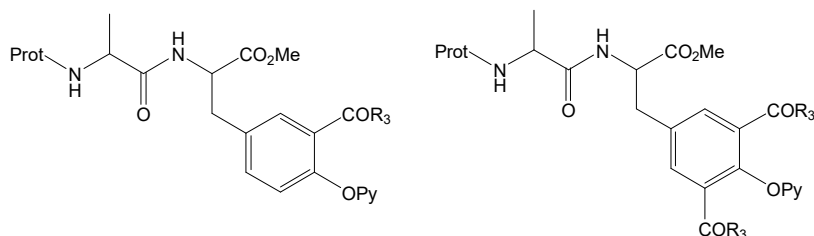
(IVb)

con un yoduro de piridina, preferiblemente, 2-iodopiridina;  
para dar lugar al dipéptido de fórmula (Ib):



(Ib)

- donde el grupo Prot corresponde con un grupo protector del N-terminal; y
- b) reacción de dipéptido de fórmula (Ia) con un aldehído de fórmula (II)  $R_3CHO$ ,  
 donde  $R_3$  se selecciona entre un grupo alquilo  $C_1-C_{10}$  lineal o ramificado, un  
 grupo cicloalquilo  $C_4-C_{10}$ , un grupo arilo  $C_6-C_{10}$  opcionalmente sustituido por  
 al menos un grupo alquilo  $C_1-C_6$ ,  $CF_3$ , un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , halógeno,  
 fenilo o  $-NHC(O)$ -alquilo  $C_1-C_3$ ;  
 en presencia de un catalizador de paladio y un agente oxidante,  
 para dar lugar a un dipéptido modificado, bien monoacilado o mezcla de  
 mono- y di-acilado según las siguientes fórmulas:



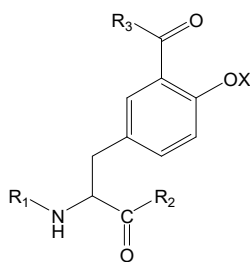
donde Prot, Py y  $R_3$  se definen como anteriormente.

- El dipéptido de partida de fórmula (IVb) puede obtenerse por reacción de ambos  
 aminoácidos, tirosina y alanina, por cualquier procedimiento conocido, tal como se  
 describe en uno de los ejemplos aportados este documento.

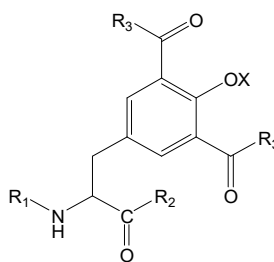
Cualquiera de estos dos procedimientos, puede incluir posteriormente la eliminación del  
 grupo piridinilo para dar lugar al grupo hidroxilo, así como la desprotección del grupo N-  
 terminal, según los procedimientos descritos anteriormente.

El procedimiento de la invención proporciona mayoritariamente el producto  
 monoacilado, junto con cantidades minoritarias en algunos casos de producto diacilado.

Así, un aspecto adicional de la presente invención lo constituye una secuencia peptídica  
 que comprende al menos una unidad de tirosina modificada, donde dicha unidad de  
 tirosina modificada se encuentra monofuncionalizada o difuncionalizada con un grupo  
 acilo en el residuo aromático según las fórmulas (IIIa) y (IIIb):



(IIIa)



(IIIb)

donde:

X se selecciona entre H y un grupo piridinilo;

R<sub>1</sub> se selecciona entre H, un grupo protector del grupo amino, un aminoácido y una secuencia de aminoácidos, donde dicho aminoácido o secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector N-terminal;

- 5 R<sub>2</sub> se selecciona entre OH, O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, un aminoácido y una secuencia de aminoácidos, donde dicho aminoácido o secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector C-terminal;

- 10 R<sub>3</sub> se selecciona entre un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> lineal o ramificado; un grupo cicloalquilo C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>; un grupo arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, CF<sub>3</sub>, un grupo O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, halógeno, fenilo o -NHC(O)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; y un grupo heteroarilo C<sub>5</sub>-C<sub>16</sub> opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

En una realización particular, R<sub>1</sub> es un grupo protector del grupo amino terminal. En una realización preferida R<sub>1</sub> es tert-butiloxycarbonilo (t-Boc).

En otra realización particular, R<sub>2</sub> es un grupo O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, preferiblemente O-CH<sub>3</sub>.

- 15 En una realización preferida, R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> es una secuencia de aminoácidos. Dicha secuencia de aminoácidos puede comprender otras unidades de tirosina en cualquier posición. Dichas unidades de tirosina tendrán la misma estructura que la que se detalla en la fórmula (I), es decir, contendrá restos aromáticos que incluyen el grupo director O-Pyr.

- 20 En otra realización preferida, R<sub>1</sub> o R<sub>2</sub> es un aminoácido. En este contexto, se entiende entonces que dicho aminoácido se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo N-terminal o del grupo C-terminal de la misma mediante el correspondiente enlace amida. En el caso particular de que R<sub>1</sub> sea un aminoácido, dicho aminoácido puede comprender un grupo protector N-terminal. En el caso particular de que R<sub>2</sub> sea un aminoácido, dicho aminoácido puede comprender un grupo protector C-terminal.

- 25 En otra realización preferida, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son un aminoácido. En este contexto, se entiende entonces que uno de dichos aminoácidos se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo N-terminal y el otro de dichos aminoácidos se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo C-terminal de la misma, en ambos casos mediante el correspondiente enlace amida. De forma preferida, ambos aminoácidos son distintos. El aminoácido de R<sub>1</sub> puede comprender un grupo protector N-terminal, mientras que el aminoácido de R<sub>2</sub> puede comprender un grupo protector C-terminal.

- 30 En otra realización preferida, R<sub>1</sub> es un grupo protector del grupo amino y R<sub>2</sub> es un aminoácido que se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo C-terminal de la misma mediante el correspondiente enlace amida para dar lugar a un dipéptido. En esta realización preferida el aminoácido puede comprender un grupo protector C-terminal.

En una realización preferida R<sub>2</sub> es leucina.

- 35 En otra realización preferida, R<sub>2</sub> es un grupo O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, preferiblemente un grupo O-CH<sub>3</sub>, y R<sub>1</sub> es un aminoácido que se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo N-terminal de la misma mediante el correspondiente enlace amida para dar lugar a un dipéptido. En esta realización preferida el aminoácido puede comprender un grupo protector N-terminal.

En una realización preferida, R<sub>1</sub> es alanina.

En otra realización particular,  $R_1$  es un grupo protector del grupo amino y  $R_2$  es una secuencia de aminoácidos que se encuentra unida a la unidad de tirosina a través del grupo C-terminal de la misma mediante el correspondiente enlace amida. En esta realización particular, la secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector C-terminal.

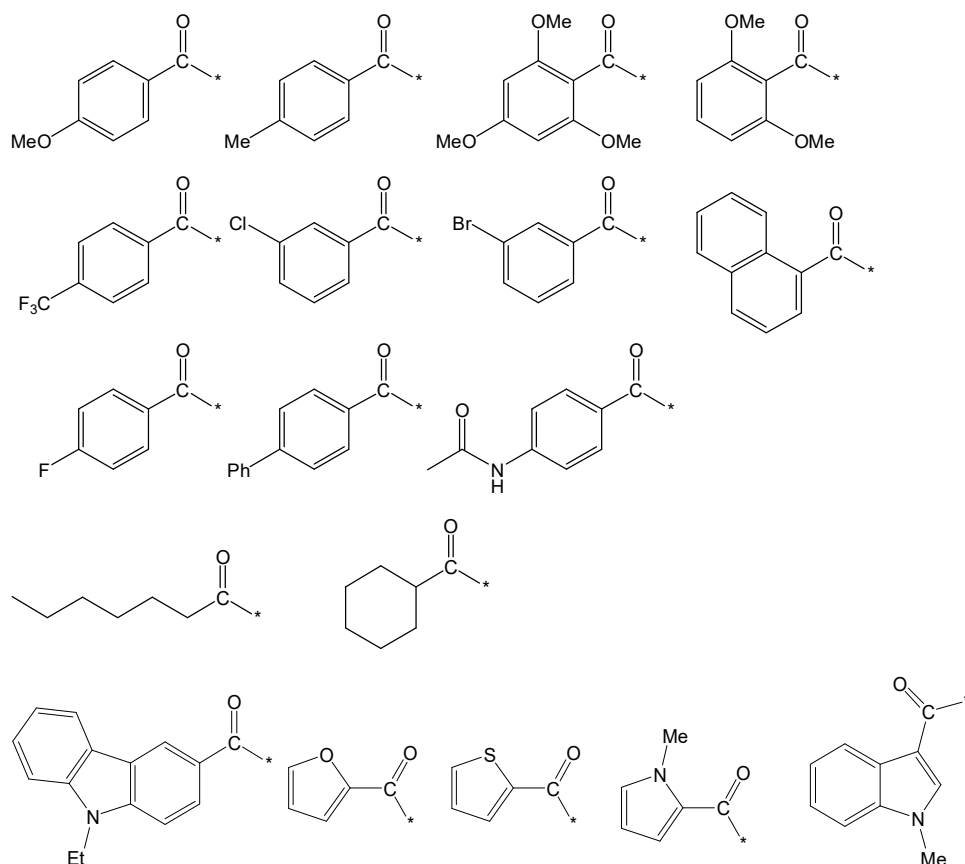
- 5 En otra realización preferida,  $R_2$  es un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , preferiblemente un grupo O- $CH_3$ , y  $R_1$  es un aminoácido que se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo N-terminal de la misma mediante el correspondiente enlace amida. En esta realización particular, la secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector N-terminal.

- 10 En una realización preferida, cuando  $R_1$  es H o un grupo protector del grupo amino,  $R_2$  no puede ser OH o un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ .

En otra realización particular,  $R_3$  es un grupo alquilo  $C_1-C_6$  lineal o ramificado; un grupo cicloalquilo  $C_4-C_6$ ; un grupo arilo  $C_6-C_{10}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ,  $CF_3$ , un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , halógeno, fenilo y  $-NHC(O)$ -alquilo  $C_1-C_3$ ; y un grupo heteroarilo  $C_5-C_{16}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo  $C_1-C_3$ .

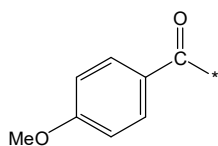
- 15 De forma preferida,  $R_3$  se selecciona entre un grupo alquilo  $C_1-C_6$  lineal; un grupo cicloalquilo  $C_4-C_6$ ; un grupo arilo  $C_6-C_{10}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo metilo,  $CF_3$ , un grupo O-metilo, halógeno, fenilo o  $-NHC(O)$ -alquilo  $C_1-C_3$ ; y un grupo heteroarilo  $C_5-C_{16}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo metilo o etilo.

De forma aún más preferida  $R_3C(O)^*$  se selecciona entre:

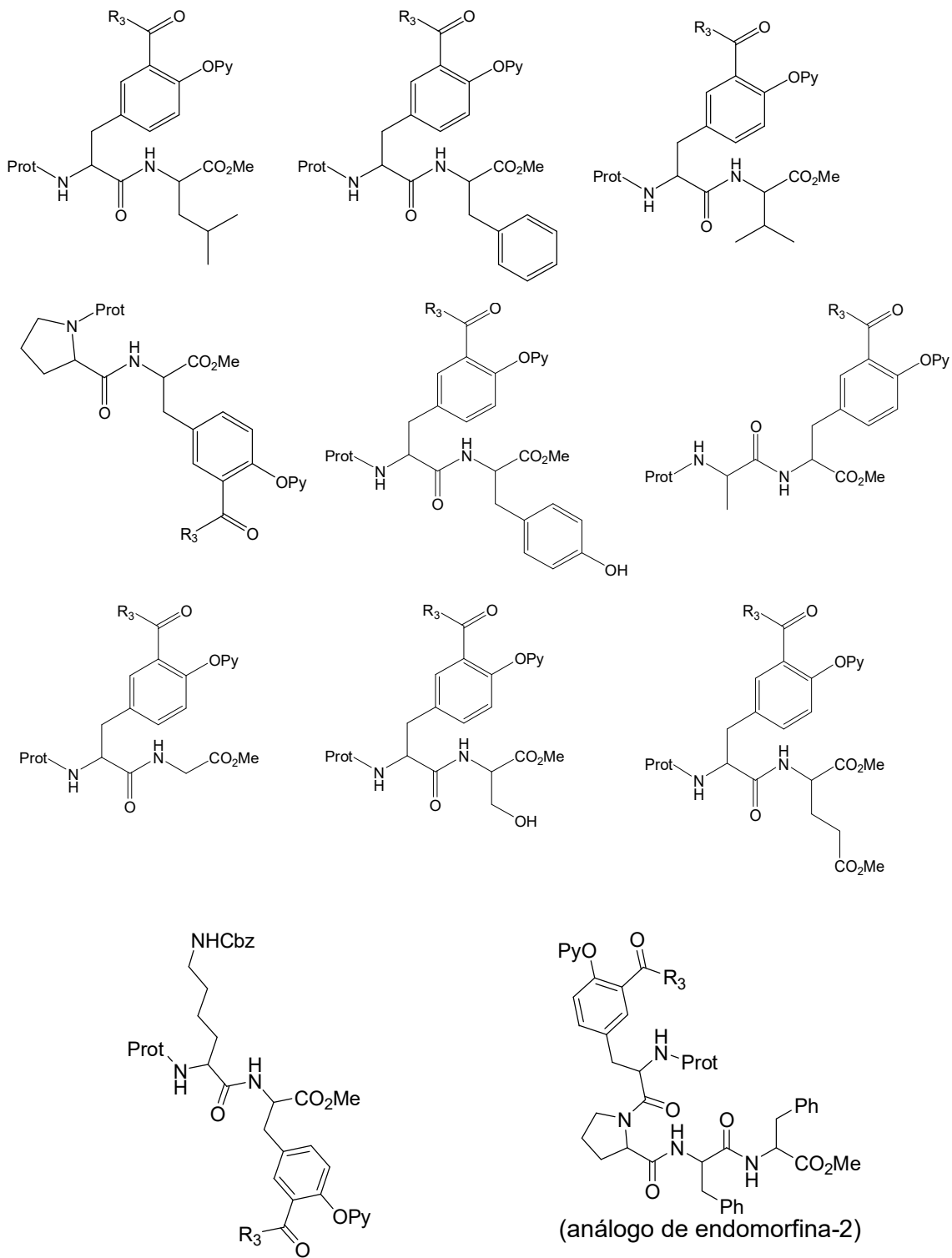


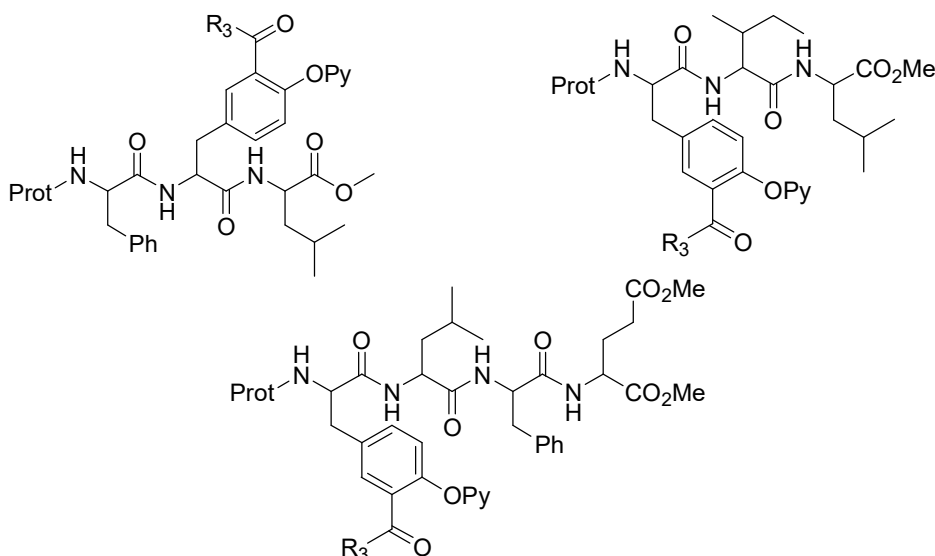
$R_3C(O)^*$  es aún más preferente:





En una realización preferente, la secuencia de aminoácidos de fórmula (IIIa) de la presente invención se selecciona entre:





así como sus correspondientes derivados di-acilados que responden a la fórmula (IIIb),  
donde:

- 5  $R_3$  se selecciona entre un grupo alquilo  $C_1$ - $C_{10}$  lineal o ramificado, un grupo cicloalquilo  $C_4$ - $C_{10}$ , un grupo arilo  $C_6$ - $C_{10}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo  $C_1$ - $C_6$ ,  $CF_3$ , un grupo O-alquilo  $C_1$ - $C_3$ , halógeno, fenilo o  $-NHC(O)$ -alquilo  $C_1$ - $C_3$ ; y

Prot es un grupo protector del amino terminal.

De forma preferida,  $R_3$  se selecciona de entre los grupos descritos anteriormente como preferidos.

- 10 En una realización particular, la secuencia peptídica de la invención comprende al menos una unidad de tirosina modificada, donde dicha unidad de tirosina modificada se encuentra monofuncionalizada.

- En una realización particular, la secuencia peptídica de la invención comprende una  
mezcla de secuencia de fórmula (IIIa) y (IIIb) en una proporción que oscila entre 70:30  
15 y 99:1, preferiblemente entre 80:20 y 99:1, más preferiblemente entre 90:10 y 99:1, aún  
más preferiblemente entre 95:5 y 99:1.

- El procedimiento de la invención ha permitido modificar unidades de tirosina presentes  
en la estructura base de péptidos de gran interés biomédico, tales como la endomorfina-  
2 que contiene una secuencia de aminoácidos Tyr-Pro-Phe-Phe. Este compuesto  
20 corresponde con un "péptido opiáceo", en concreto es un agonista de un receptor  
opiáceo que presenta una importante actividad analgésica.

- Asimismo, es posible modificar unidades de tirosina en la secuencia base del  
neurotransmisor Neuromedina n (Lys-Ile-Pro-Tyr-Ile-Leu), un neuropéptido precursor  
de la neurotensina relacionado con la modulación de señales de la dopamina que  
25 produce efectos farmacológicos similares a los medicamentos antipsicóticos.

Por tanto, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una composición  
farmacéutica que comprende la secuencia de aminoácidos según las fórmulas (IIIa) o  
(IIIb) o mezcla de las mismas.

De forma preferida, dicha secuencia de aminoácidos según las fórmulas (IIIa) o (IIIb) corresponde con la estructura base de la endomorfin-2 o de la neuromedina n.

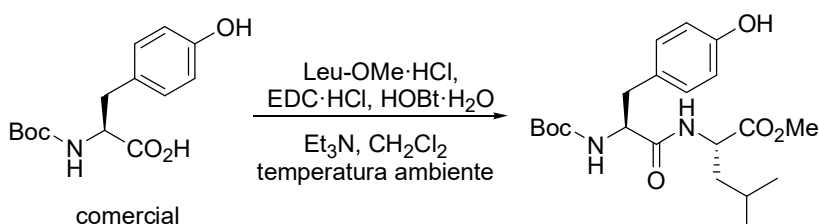
Dichas composiciones pueden incluir, además, un adyuvante, vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5

## Ejemplos

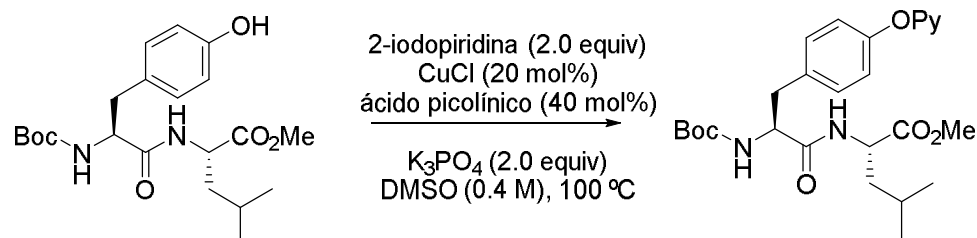
Ejemplo 1. Síntesis del dipéptido formado por unidades de leucina y tirosina modificada con grupos acilo.

### 1.1. Síntesis del dipéptido Boc-tirosina-leucina-OMe



Sobre una disolución de Boc-Tyr-OH (5.00 g, 17.77 mmol), Leu-OMe·HCl (3.55 g, 19.55 mmol), EDC·HCl (2.93 g, 15.30 mmol), HOBT·H<sub>2</sub>O (2.64 g, 19.55 mmol) en diclorometano (45 mL) se adicionó trietilamina (2.71 mL, 19.55 mmol). La disolución resultante se dejó bajo agitación magnética a temperatura ambiente 16 h. Posteriormente, se hizo un lavado acuoso con el crudo de reacción, y se extrajo la fase acuosa con diclorometano (3x30 mL). La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> y tras eliminación del disolvente a vacío, el correspondiente dipeptido se purificó por cromatografía en columna en una mezcla hexano-acetato de etilo (1:1) obteniéndose así de manera cuantitativa el dipeptido Boc-Tyr-Leu-OMe como un aceite incoloro.

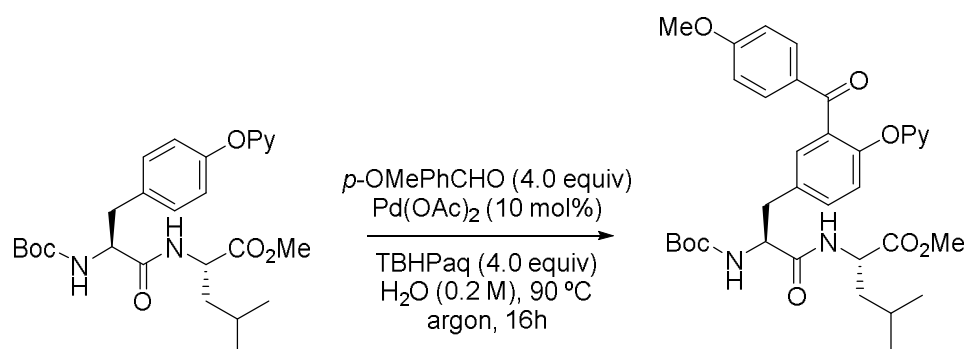
### 1.2. Incorporación del grupo piridinilo. Síntesis de Boc-Tyr(OPy)-Leu-OMe



Un matraz de reacción se cargó con el correspondiente derivado de tirosina obtenido en la etapa anterior Boc-Tyr-Leu-OMe (7.33 g, 17.96 mmol), CuCl (355 mg, 3.59 mmol), ácido picolínico (883 mg, 7.18 mmol), y K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (7.62 g, 35.93 mmol). Posteriormente, se realizaron ciclos consecutivos de vacío/argón para establecer la correspondiente atmósfera inerte. Seguidamente, sobre atmósfera de argón, se adicionó DMSO seco (45

mL) y 2-iodopiridina (3.82 mL, 35.93 mmol). La mezcla resultante permaneció a 100 °C bajo agitación magnética durante 16 h. A continuación, se hizo un lavado acuoso con brine, y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (3x50 mL). La disolución resultante se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró a vacío. El producto fue purificado por cromatografía en columna en una mezcla hexano-acetato de etilo (1:1), obteniéndose así el producto Boc-Tyr(OPy)-Leu-OMe (5.86 g, 67 %) como un sólido blanco.

### 1.3. Acilación de la unidad de tirosina



- 10 Un tubo de reacción que contenía un agitador se cargó con el correspondiente derivado de tirosina obtenido en la etapa anterior (0.25 mmol, 1.0 equiv.) y con Pd(OAc)<sub>2</sub> (10% mol). El tubo de reacción se vació y volvió a cargar con argón seco. Esta secuencia se repitió hasta tres veces. Se añadió entonces 4-metoxibenzaldehído (1.0 mmol, 4.0 equiv.), una disolución acuosa de TBHP (Luperox®, 4.0 equiv) y agua (1 mL) bajo
- 15 atmósfera de argón.

El tubo de reacción se calentó posteriormente hasta 90°C y se mantuvo bajo agitación durante 16 horas a esa temperatura. Posteriormente, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (20 mL). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo

20 (3x20 mL) y se evaporó.

El crudo resultante fue purificado mediante columna cromatográfica para proporcionar el correspondiente producto como mezcla de compuestos mono- y di-acetilados.

Se obtuvo así un rendimiento de reacción de un 78% con una relación de producto mono-acilado:di-acilado de 8:2.

25

La misma reacción fue llevada a cabo variando algunos componentes y condiciones de reacción, tales como ausencia de catalizador, ausencia de agente oxidante, diferentes tipos de atmósfera, y diferentes disolventes. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla 1:

30 Tabla 1.

| Ensayo | Variación respecto al procedimiento descrito | Conversión (RMN) | Rendimiento (RMN) (%) | Proporción mono-acilado:di-acilado |
|--------|----------------------------------------------|------------------|-----------------------|------------------------------------|
|--------|----------------------------------------------|------------------|-----------------------|------------------------------------|

|   |                                                           |    |     |      |
|---|-----------------------------------------------------------|----|-----|------|
| 1 | Ninguna                                                   | 88 | 78% | 8:2  |
| 2 | Sin catalizador de Pd                                     | 0  | 0   |      |
| 3 | Sin agente oxidante                                       | 0  | 0   |      |
| 4 | Bajo atmósfera de aire                                    | 66 | 46  | 93:7 |
| 5 | H <sub>2</sub> O/ <sup>t</sup> BuOH (1:1) como disolvente | 35 | 35  | 96:4 |
| 6 | H <sub>2</sub> O/MeCN (1:1) como disolvente               | 23 | 18  |      |
| 7 | 3 equiv. de agente oxidante TBHP                          | 81 | 75  | 8:2  |

Tal como se puede apreciar, tanto la presencia de catalizador como de agente oxidante son características esenciales en el procedimiento de la invención. Además, puede llevarse a cabo en presencia de aire, aunque disminuye en parte el rendimiento de reacción.

5

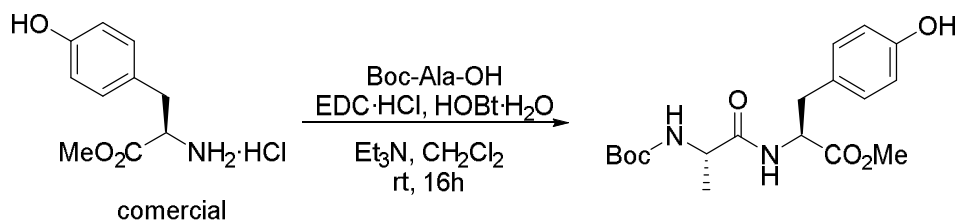
Por otra parte, el empleo de una mezcla de agua con otros disolventes también permitió llevar a cabo el procedimiento de acilación, pero se redujo significativamente su rendimiento, por lo que se prefiere el uso de agua como único disolvente con las ventajas que ello conlleva.

- 10 Asimismo, se llevó a cabo la reacción de acilación en presencia de otros catalizadores, bien de Pd o de otros metales, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 2:

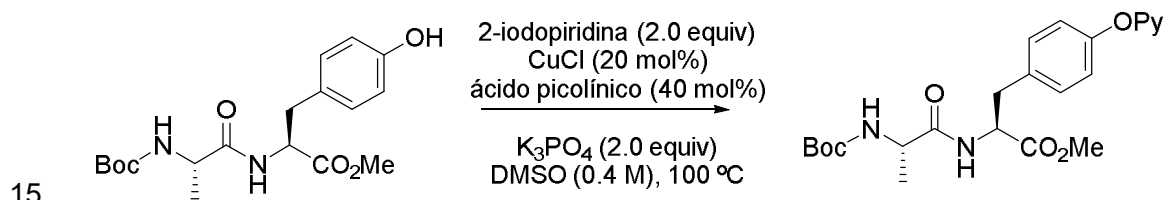
Tabla 2

| Ensayo | Variación respecto al procedimiento descrito       | Conversión (RMN) | Rendimiento (RMN) (%) | Proporción mono-acilado:di-acilado |
|--------|----------------------------------------------------|------------------|-----------------------|------------------------------------|
| 1      | PdCl <sub>2</sub> (MeCN) <sub>2</sub>              | 16               | 15                    | 100:0                              |
| 2      | Pd(TFA) <sub>2</sub>                               | 30               | 29                    | 93:7                               |
| 3      | PdCl <sub>2</sub>                                  | 23               | 23                    | 95:5                               |
| 4      | NiCl <sub>2</sub> ·DME                             | 0                | 0                     |                                    |
| 5      | NiCl <sub>2</sub> (PCy <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 0                | 0                     |                                    |
| 6      | [RuCl(p-cymene)] <sub>2</sub>                      | 0                | 0                     |                                    |

- 15 Según se desprende de estos datos, es también esencial el empleo de catalizadores de Pd, dado que con otros catalizadores de otros metales, como Ni o Ru, la reacción de acilación no tuvo lugar.

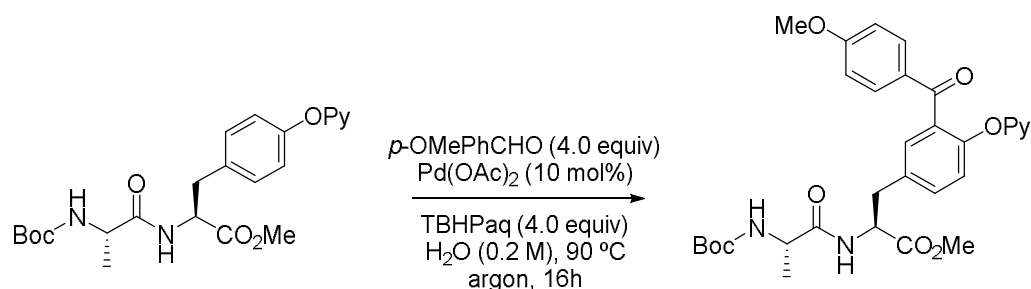
Ejemplo 2. Síntesis del dipéptido formado por unidades de alanina y tirosina modificada**2.1. Síntesis del dipéptido Boc-alanina-leucina-OMe**

Sobre una disolución de Boc-Ala-OH (3.36 g, 17.77 mmol), L-Tyr-OMe·HCl (3.54 g, 15.30 mmol), EDC·HCl (2.93 g, 15.30 mmol), HOBT·H<sub>2</sub>O (2.06 g, 15.30 mmol) en diclorometano (45 mL) se adicionó trietilamina (2.12 mL, 15.30 mmol). La disolución resultante se dejó bajo agitación magnética a temperatura ambiente 16 h. Posteriormente, se hizo un lavado acuoso con el crudo de reacción, y se extrajo la fase acuosa con diclorometano (3x30 mL). La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> y tras eliminación del disolvente a vacío, el correspondiente dipeptido se purificó por cromatografía en columna en una mezcla hexano-acetato de etilo (1:1) obteniéndose así de manera cuantitativa el dipeptido Boc-Ala-Tyr-OMe como un aceite incoloro.

**2.2. Incorporación del grupo piridinilo. Síntesis de Boc-Ala-Tyr(OPy)-OMe**

Un matraz de reacción se cargó con el correspondiente derivado de tirosina obtenido en la etapa anterior Boc-Ala-Tyr-OMe (6.57 g, 17.96 mmol), CuCl (355 mg, 3.59 mmol), ácido picolínico (883 mg, 7.18 mmol), y K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (7.62 g, 35.93 mmol). Posteriormente, se realizaron ciclos consecutivos de vacío/argón para establecer la correspondiente atmósfera inerte. Seguidamente, sobre atmósfera de argón se adicionó DMSO seco (45 mL) y 2-iodopiridina (3.82 mL, 35.93 mmol). La mezcla resultante permaneció a 100 °C bajo agitación magnética durante 16 h. A continuación, se hizo un lavado acuoso con brine, y se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (3x50 mL). La disolución resultante se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró a vacío. El producto fue purificado por cromatografía en columna en una mezcla hexano-acetato de etilo (1:1), obteniéndose así el producto Boc-Ala-Tyr(OPy)-OMe (5.90 g, 74 %) como un sólido amarillo.

## 2.3. Acilación de la unidad de tirosina



Un tubo de reacción que contenía un agitador se cargó con el correspondiente derivado de tirosina obtenido en la etapa anterior (0.25 mmol, 1.0 equiv.) y con  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (10% mol). El tubo de reacción se vació y volvió a cargar con argón seco. Esta secuencia se repitió hasta tres veces. Se añadió entonces 4-metoxibenzaldehído (1.25 mmol, 4.0 equiv.), una disolución acuosa de TBHP (Luperox®, 4.0 equiv) y agua (1 mL) bajo atmósfera de argón. El tubo de reacción se calentó posteriormente hasta 90 °C y se mantuvo bajo agitación durante 16 horas a esa temperatura. Posteriormente, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una solución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (20 mL). La fase acuosa se extrajo con acetato de etilo (3x20 mL) y se evaporó. El crudo resultante fue purificado mediante columna cromatográfica para proporcionar el correspondiente producto como mezcla de compuestos mono- y di-acetilados. Se obtuvo así un rendimiento de reacción de un 69% con una relación de producto mono-acilado:di-acilado de 7:3.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la modificación de unidades de tirosina en una secuencia peptídica que comprende al menos una unidad de tirosina, donde dicho procedimiento comprende:

- 5 a) hacer reaccionar una secuencia peptídica que comprende al menos una unidad de tirosina según la fórmula (I):



15 donde:

Py es un grupo piridinilo;

20  $R_1$  se selecciona entre un grupo protector del grupo amino, un aminoácido y una secuencia de aminoácidos, donde dicho aminoácido o secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector del grupo N-terminal;

$R_2$  se selecciona entre O-alquilo  $C_1-C_3$ , un aminoácido y una secuencia de aminoácidos, donde dicho aminoácido o secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector del grupo C-terminal;

25 con un aldehído de fórmula (II):



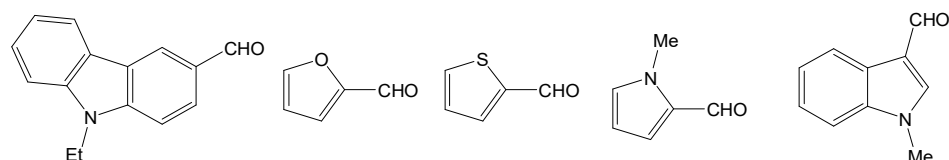
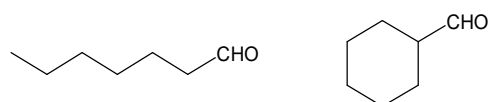
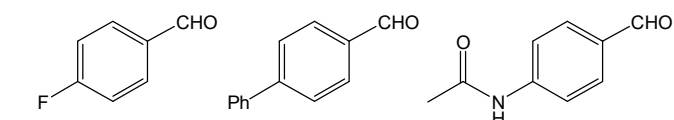
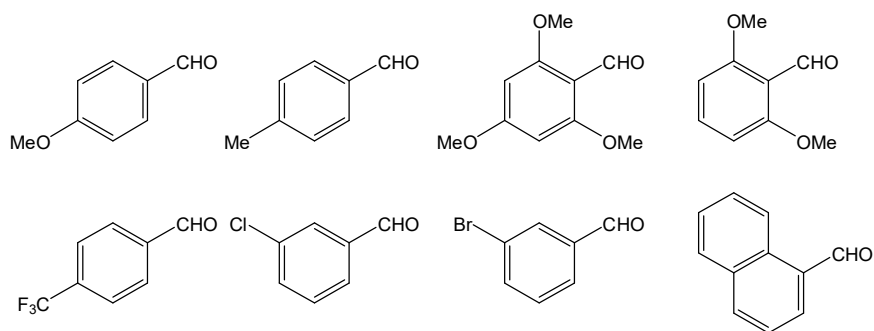
35 donde  $R_3$  se selecciona entre un grupo alquilo  $C_1-C_{10}$  lineal o ramificado; un grupo cicloalquilo  $C_4-C_{10}$ ; un grupo arilo  $C_6-C_{10}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo  $C_1-C_6$ ,  $CF_3$ , un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , halógeno, fenilo o  $-NHC(O)-$ alquilo  $C_1-C_3$ ; y un grupo heteroarilo  $C_5-C_{16}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo  $C_1-C_3$ ;

40 en presencia de un catalizador de paladio y un agente oxidante;

para proporcionar una secuencia peptídica que comprende al menos una unidad de tirosina mono- o di-sustituida por un grupo acilo  $R_3C(O)-$  en la posición orto con respecto al grupo O-Pyr del residuo aromático de la secuencia de fórmula (I).



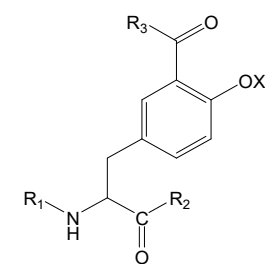
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde  $R_1$  es un grupo protector del grupo amino terminal.
3. Procedimiento según cualquier de las reivindicaciones 1 a 2, donde  $R_2$  es un grupo O-  
alquilo  $C_1-C_3$ , preferiblemente O-CH<sub>3</sub>.
4. Procedimiento según reivindicación 1, donde  $R_1$  y/o  $R_2$  es una secuencia de aminoácidos, donde dicha secuencia de aminoácidos puede comprender otras unidades de tirosina en cualquier posición.
5. Procedimiento según reivindicación 1, donde  $R_1$  o  $R_2$  es un aminoácido, donde dicho aminoácido se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo N-terminal o del grupo C-terminal de la misma mediante el correspondiente enlace amida.
6. Procedimiento según reivindicación 1, donde  $R_1$  es un grupo protector del grupo N-terminal y  $R_2$  es un aminoácido o una secuencia de aminoácidos que se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo C-terminal de la misma mediante el correspondiente enlace amida.
7. Procedimiento según reivindicación 1, donde  $R_2$  es un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$  y  $R_1$  es un aminoácido o una secuencia de aminoácidos que se encuentra unido a la unidad de tirosina a través del grupo N-terminal de la misma mediante el correspondiente enlace amida.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde  $R_3$  se selecciona entre un grupo alquilo  $C_1-C_6$  lineal; un grupo cicloalquilo  $C_4-C_6$ ; un grupo arilo  $C_6-C_{10}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo  $C_1-C_3$ , CF<sub>3</sub>, un grupo O-alquilo  $C_1-C_3$ , halógeno, fenilo o -NHC(O)-alquilo  $C_1-C_3$ ; y un grupo heteroarilo  $C_5-C_{16}$  opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo  $C_1-C_3$ .
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el compuesto de fórmula (II) se selecciona entre:



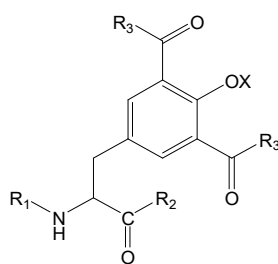
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el catalizador de paladio se selecciona entre  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ,  $\text{PdCl}_2(\text{MeCN})_2$ ,  $\text{Pd}(\text{TFA})_2$  y  $\text{PdCl}_2$ .

11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 el cual se lleva a cabo utilizando agua como único disolvente.

12. Una secuencia peptídica que comprende al menos una unidad de tirosina, donde dicha unidad de tirosina se encuentra monofuncionalizada o difuncionalizada con un grupo acilo en el residuo aromático según las fórmulas (IIIa) y (IIIb):



(IIIa)



(IIIb)

donde :

X es un grupo piridinilo;

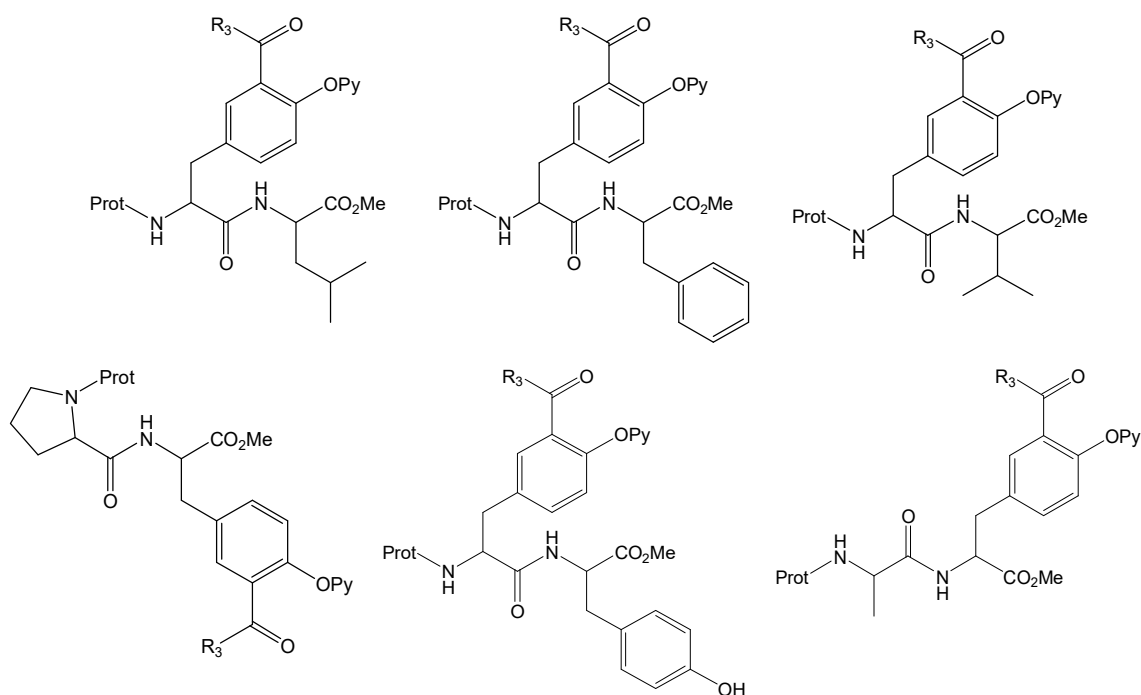
R<sub>1</sub> se selecciona entre H, un grupo protector del grupo amino, un aminoácido y una secuencia de aminoácidos, donde dicho aminoácido o secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector N-terminal;

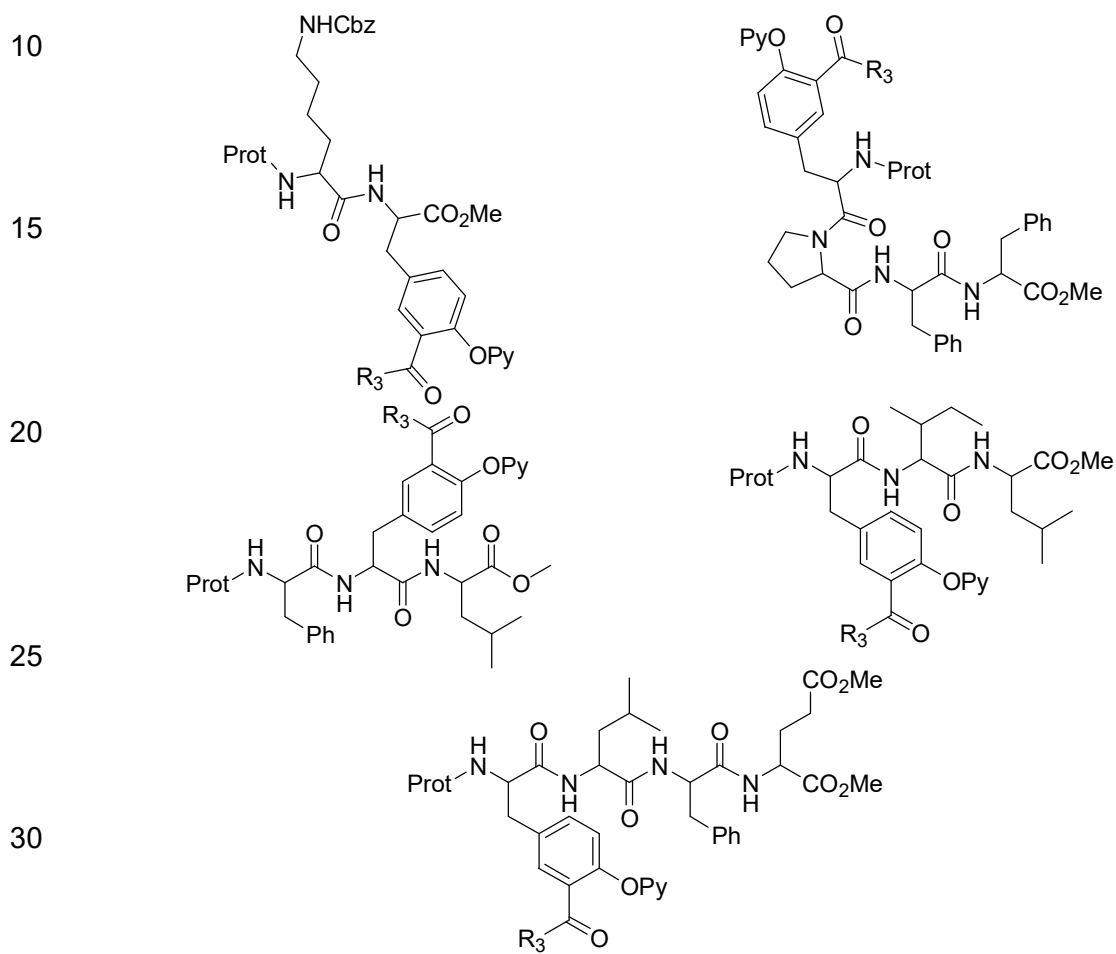
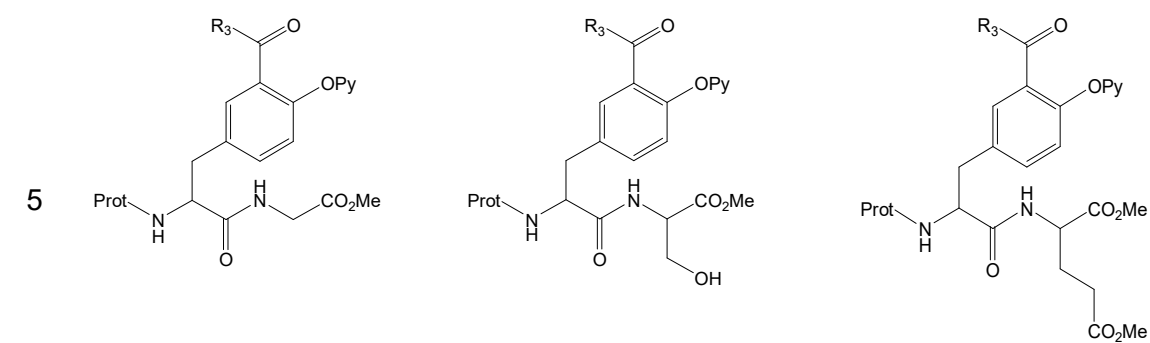
R<sub>2</sub> se selecciona entre OH, O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, un aminoácido y una secuencia de aminoácidos, donde dicho aminoácido o secuencia de aminoácidos puede comprender un grupo protector C-terminal;

R<sub>3</sub> se selecciona entre un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> lineal o ramificado; un grupo cicloalquilo C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>; un grupo arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, CF<sub>3</sub>, un grupo O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>, halógeno, fenilo o -NHC(O)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>; y un grupo heteroarilo C<sub>5</sub>-C<sub>16</sub> opcionalmente sustituido por al menos un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>.

13. Secuencia peptídica según reivindicación 12, que comprende una mezcla de secuencia de fórmula (IIIa) y (IIIb) en una proporción que oscila entre 70:30 y 99:1.

14. Secuencia peptídica según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 seleccionada entre:





35 y sus correspondientes formas diaciladas en la posición orto con respecto al grupo O-Py.

40