

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 27982 A1** (51) Cl. internationale : **C07K 14/655; C07K 7/64**
(43) Date de publication : **03.07.2006**

(21) N° Dépôt : **28779**
(22) Date de Dépôt : **07.02.2006**
(30) Données de Priorité : **08.08.2003 GB 0318682.2**
(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/EP2004/008850 06.08.2004**
(71) Demandeur(s) : **NOVARTIS AG., LICHTSTRASSE 35 CH-4056 BALE (CH)**
(72) Inventeur(s) : **HELLSTERN, HERIBERT ; PACHINGER, WERNER ; PRIKOSZOVICH, WALTER ; WIETFELD, BERNHARD**
(74) Mandataire : **SABA & CO**

(54) Titre : **PREPARATION DE PEPTIDES SOMATOSTATINE**
(57) Abrégé : " PREPARATION DE PEPTIDES DE SOMATOSTATINE " Invention de : HELLSTERN, Heribert PACHINGER, Werner PRIKOSZOVICH, Walter WIETFELD, Bernhard Il est fourni un procédé pour préparer des analogues de somatostatine cycliques et les intermédiaires linéaires utilisés dans le procédé.

ABREGE DESCRIPTIF

" PREPARATION DE PEPTIDES DE SOMATOSTATINE "

Invention de : HELLSTERN, Heribert
PACHINGER, Werner
PRIKOSZOVICH, Walter
WIETFELD, Bernhard

Il est fourni un procédé pour préparer des analogues de somatostatine cycliques et les intermédiaires linéaires utilisés dans le procédé.

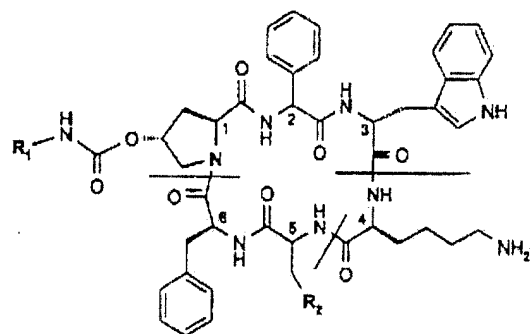
22/28779

27982

03 JUL 2006

La présente invention concerne un procédé pour préparer des analogues de somatostatine cycliques et les intermédiaires utilisés dans ce procédé.

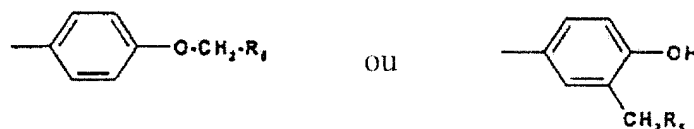
Plus particulièrement, l'invention fournit un procédé de préparation d'un analogue de somatostatine cyclique de formule I :



dans laquelle :

R_1 est un groupe -alkylène en C_2 à C_6 - NR_3R_4 , -alkylène en C_2 à C_6 -guanidine ou -alkylène en C_2 à C_6 -COOH, dans lequel chacun des radicaux R_3 et R_4 représente indépendamment H, un groupe alkyle en C_1 à C_4 , ω -hydroxy-alkylène en C_2 à C_4 ou acyle, ou bien R_3 et R_4 forment, conjointement avec l'atome d'azote auquel ils sont fixés, un groupe hétérocyclique qui peut comprendre un autre hétéroatome, et

R_2 est un groupe Z_1 - CH_2 - R_5 , - CH_2 -CO-O- CH_2 - R_5 ,



où Z_1 représente O ou S, et R_5 est un groupe phényle facultativement substitué,

ou l'un de ses sels.

Tout groupe acyle peut être, par exemple, un groupe R_a CO-, dans lequel R_a représente H, un groupe alkyle en C_1 à C_4 , alcényle en C_2 à C_4 , cycloalkyle en C_3 à C_6 ou benzyle. Lorsque NR_3R_4 forme un groupe hétérocyclique, ce groupe peut être aromatique ou saturé, et peut comprendre un atome d'azote ou un atome d'azote et un deuxième hétéroatome choisi entre l'azote et l'oxygène. De préférence, le groupe hétérocyclique est, par exemple, un groupe pyridyle ou morpholino. Alkylène en C_2 à C_6 est de préférence un groupe - CH_2 - CH_2 -. Lorsque R_5 est un groupe phényle substitué, le cycle phényle peut être substitué par un halogène, un groupe

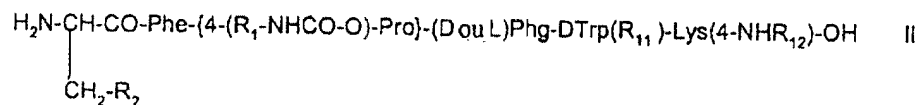
méthyle, éthyle, méthoxy ou éthoxy, par exemple en position ortho et/ou para. De préférence, R_5 est un groupe phényle non substitué.

Les amino-acides en position(s) 2 et/ou 5 peuvent avoir la configuration D ou L. De préférence, chacun d'entre eux a la configuration L.

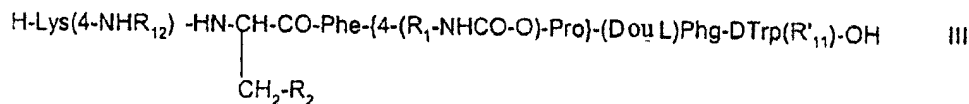
Les composés de formule I peuvent exister par exemple sous forme libre ou sous forme de sels. Les sels comprennent des sels d'addition d'acides, par exemple avec des acides organiques, des acides polymériques ou des acides inorganiques, par exemple avec l'acide chlorhydrique, l'acide acétique, l'acide lactique, l'acide aspartique, l'acide benzoïque, l'acide succinique ou l'acide pamoïque, ou par exemple des sels de métaux alcalins lorsque R_1 comprend un groupe COOH. Les sels d'addition d'acides peuvent exister sous forme de sels mono- ou divalents, par exemple en fonction du fait qu'un ou deux équivalents acides sont ajoutés au composé de formule I sous forme de base libre. Les sels préférés sont le di-sel d'aspartate ou le monosel de pamoate.

Le procédé de préparation selon l'invention comprend une étape de cyclisation d'un peptide linéaire correspondant sous forme protégée. On a maintenant découvert que, de manière surprenante, l'étape de cyclisation dépend en particulier de la sélection des 2 amino-acides terminaux du peptide linéaire correspondant. Hormis 6 possibilités de cyclisation, on a découvert que, de manière surprenante, la cyclisation entre les amino-acides 3 et 4, ou 4 et 5, ou 6 et 1, donne des résultats significativement intéressants. La cyclisation entre les amino-acides 4 et 5 est particulièrement appréciée. La cyclisation selon l'invention entre les amino-acides 3 et 4, ou 4 et 5, ou 6 et 1, conduit à des rendements améliorés avec une isomérisation réduite aux sites chiraux. En outre, ces étapes de cyclisation peuvent être effectuées dans des conditions et avec des réactifs moins contraignants : par exemple, la cyclisation par utilisation d'un azoture peut être évitée.

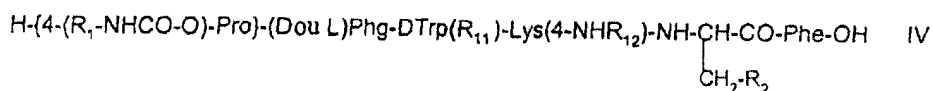
Dans une première forme de réalisation de l'invention, il est fourni un procédé de préparation d'un composé de formule I, ou de l'un de ses sels, comme indiqué ci-dessus, comprenant la cyclisation d'un analogue de somatostatine linéaire de formule II :



ou de formule III :



ou de formule IV :



5

où R_1 et R_2 sont tels que définis,

chacun des radicaux R_{11} et R_{12} représente indépendamment un groupe protecteur de groupe amino, où lorsque R_1 comprend un groupe NH_2 terminal, ce groupe NH_2 terminal est également protégé par un groupe

10

protecteur de groupe amino, et, lorsque cela est nécessaire, l'élimination du(des) groupe(s) protecteur(s), et la récupération d'un composé de formule I ainsi obtenu, sous forme libre ou sous forme de sel.

15

Des groupes protecteurs de groupe amino appropriés sont, par exemple, tels que décrits par exemple dans "Protective Groups in Organic Synthesis", T.W. Greene et al., John Wiley & Sons Inc., deuxième édition, 1991. Des exemples de tels groupes protecteurs de groupe amino sont, par exemple, les groupes acétyle ou amino, tels qu'utilisés dans la synthèse peptidique, par exemple les groupes tert-butoxy-carbonyle, carbobenzoxy, fluorénylméthoxy-carbonyle, alloxycarbonyle, 1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)-éthyle, 1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)-3-méthylbutyle, 4-méthyltrityle. (W.C. Chan et P.D. White, Fmoc solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, 2000).

20

La cyclisation peut être effectuée de manière convenable en présence d'un dérivé à base d'aminium ou de phosphonium pour l'activation du carboxy *in situ*, par exemple l'hexafluorophosphate de O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tétraméthyluronium, l'hexafluorophosphate de benzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphonium, le N-oxyde de tétrafluoroborate de N-[(1H-benzotriazol-1-yl)(diméthylamino)méthylène]-N-méthyl-

30

méthanaminium, le N-[(diméthylamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridine-1-ylméthylène]-N-méthylméthanaminium et l'hexafluorophosphate de 7-

azabenzotriazol-1-yloxytris(pyrrolidino)phosphonium. De préférence, la réaction peut être conduite en présence d'une base, par exemple d'une amine organique, par exemple la N-éthyl-diisopropylamine, la N-méthylmorpholine, la triéthylamine ou la tribenzylamine, et en présence
5 d'un agent nucléophile auxiliaire, par exemple le 1-hydroxybenzotriazole, le N-hydroxysuccinimide, la 3-hydroxy-3,4-dihydro-1,2,3-benzotriazine-4-one ou le 1-hydroxy-7-azabenzotriazole.

La cyclisation d'un composé de formule II, III ou IV conduit à un composé de formule I sous forme protégée, c'est-à-dire à un composé de
10 formule I dans laquelle un, ou plusieurs, ou tous les groupes amino présents dans la molécule sont protégés par un groupe protecteur de groupe amino. Des exemples de tels composés sont, par exemple, les suivants :
cyclo[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phg-D-Trp(Boc)-
Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-Phe-], cyclo[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-
15 Pro-Phg-D-Trp-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-Phe] et cyclo[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-
CH₂-NH-CO-O)-Pro-DPhg-D-Trp-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-Phe-].

Les groupes protecteurs de groupe amino peuvent être éliminés conformément à des procédés connus dans la technique, par exemple par
clivage, par exemple avec de l'acide trifluoroacétique ; HCl 3 M, EtOAc ;
20 Me₃CCl, du phénol, CH₂Cl₂ ; H₂SO₄ à 10 %, le dioxane ; le bromocatécholborane.

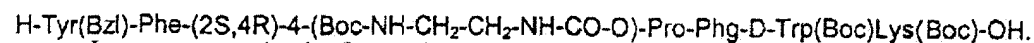
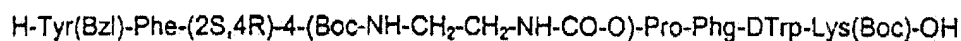
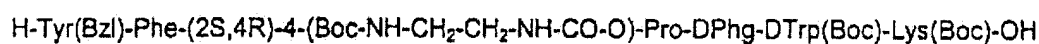
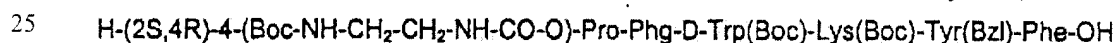
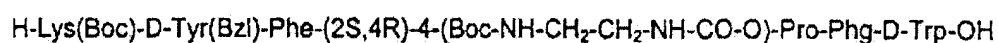
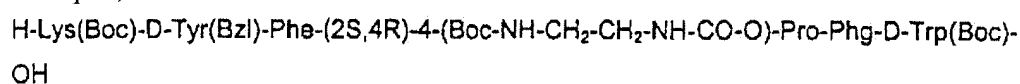
Les composés de formules II, III et IV, ou leurs sels, sont nouveaux et constituent une partie de l'invention. Ces composés peuvent être préparés
en liant conjointement par une liaison amide deux motifs peptidiques,
25 chacun d'entre eux contenant au moins un amino-acide sous forme protégée ou non protégée, où la liaison amide est telle que l'on obtienne la séquence d'amino-acides désirée telle que définie dans les formules II, III ou IV.

La synthèse peut être effectuée conformément à des procédés connus dans la technique, par exemple en solution ou par synthèse en phase solide,
30 en commençant par le premier amino-acide. Dans la synthèse en phase solide, le premier amino-acide est fixé à une résine, par exemple une résine à base de polystyrène disponible dans le commerce, facultativement par l'intermédiaire d'un linker approprié, par exemple un linker qui est clivable dans des conditions douces, pour garder intacte la protection de la chaîne
35 latérale, par exemple un linker à base de trityle facultativement substitué,

par exemple l'acide 4-(hydroxyl-diphényl-méthyl)-benzoïque, dans lequel l'un des groupes phényle peut être facultativement substitué, par exemple par Cl. Le développement de la chaîne peptidique désirée, soit en solution, soit par synthèse en phase solide, peut être effectué de manière classique, par exemple en utilisant des amino-acides dans lesquels les groupes amino terminaux sont à protection Fmoc, les groupes amino de chaîne latérale, lorsqu'ils sont présents, étant protégés par un groupe protecteur de groupe amino différent, par exemple Boc ou CBO.

Lorsque la synthèse est effectuée par synthèse en phase solide, le peptide développé est ensuite recueilli à partir de la résine conformément à des procédés connus dans la technique, par exemple avec de l'acide acétique; de l'acide trifluoroacétique; un mélange acide acétique-trifluoroéthanol-dichlorométhane; de l'hexafluoroisopropanol dans du dichlorométhane. Un procédé préféré pour recueillir le peptide développé à partir de la phase solide, par exemple lorsque l'on utilise un linker à base de trityle non chloré, est, par exemple, le traitement avec un mélange méthanol/dichlorométhane, de préférence à température ambiante, ou un traitement avec une cétone, par exemple l'éthylméthylcétone, de préférence à une température d'environ 50 °C.

Des exemples de composés de formules II, III et IV sont, par exemple, les suivants :



Les composés de formules II, III et IV peuvent exister sous forme de sels, comme décrit ci-dessus pour les composés de formule I.

Les composés de formule I sont de précieux agonistes de somatostatine, et présentent des propriétés pharmacologiques intéressantes, comme décrit, par exemple, dans les documents WO 97/01579 ou WO 02/10192, dont les contenus décrivant les propriétés pharmacologiques sont incorporés à titre de référence dans le présent mémoire. Un composé préféré est le cyclo[{(4-NH₂-C₂H₄-NH-CO-O)-Pro} -Phg-DTrp-Lys-Tyr(4-

Benzyl)-Phe], ou l'un de ses sels. Les sels préférés sont l'aspartate (mono- ou di-aspartate) ou le pamoate.

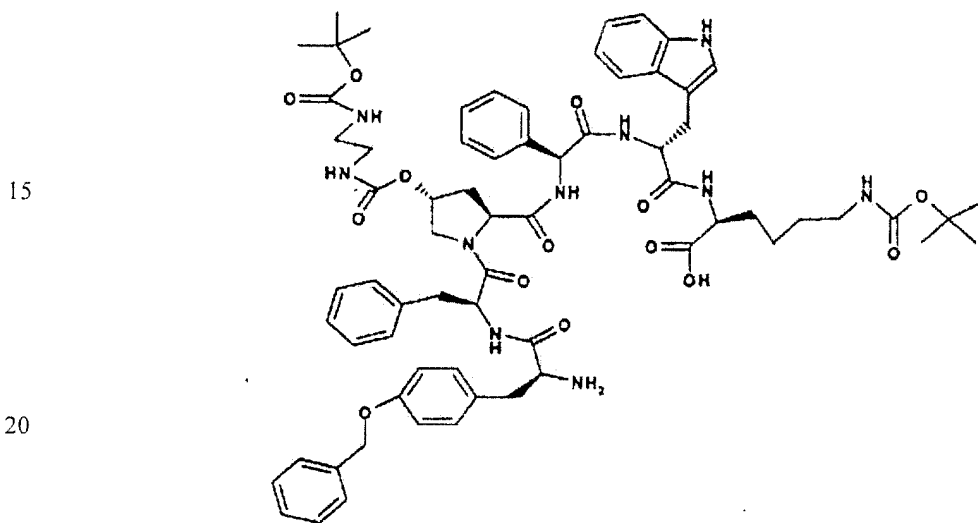
Lorsque l'on utilise le procédé de l'invention, on peut obtenir un rendement de cyclisation du peptide linéaire correspondant de formule II, III ou IV supérieur à 70 %.

Les exemples suivants sont des illustrations de l'invention. Toutes les températures sont exprimées en °C.

On utilise les abréviations suivantes :

- Bzl = benzyle
 DAEM = diéthylamine
 DICl = diisopropylcarbodiimide
 DMF = N,N-diméthylformamide
 DPPA = azoture de diphénylphosphoryle
 EDIPA = N-éthyl-diisopropylamine
 HBTU = hexafluorophosphate de O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tétraméthyluronium
 HOBT = 1-hydroxybenzotriazole
 IPA = alcool isopropylique
 Phg = phénylglycine
 TA = température ambiante
 TBME = éther tert-butylméthylique

Exemple 1 : [H-Tyr(Bzl)-Phe-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phg-D-Trp-Lys(Boc)-OH]

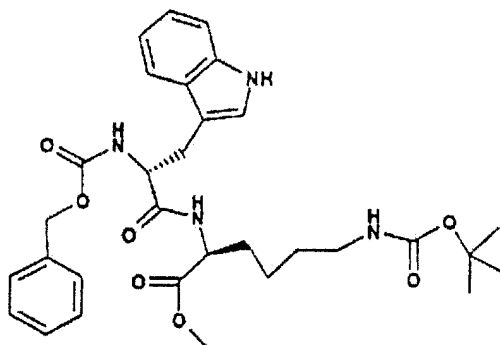


On dissout 10,4 g de (FMOC-Tyr(Bzl)-Phe-[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)]-Pro-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OH) dans 100 ml de DMF. A TA, on ajoute 2,0 ml de diéthylamine et on continue l'agitation pendant 4 heures à TA. On fait évaporer la solution jaune limpide à 40°. On
5 ajoute au résidu 150 ml d'acétate d'isopropyle. Ensemencement et agitation pendant 18 heures à TA, filtration et lavage avec 20 ml d'acétate d'isopropyle. Séchage à 40°. CLHP 87,5 % b.a. (17,6 min.). ESI-SM : 1287,5 (M+Na)⁺ ; ¹H-RMN (DMSO) (δ, DMSO) : 1,14 (2H, m), 1,33 (2H, m), 1,37 (18H, m), 1,53 (1H, m), 1,64 (1H, m), 2,06 (1H, m), 2,22 (1H, m),
10 2,78 - 3,15 (12H, m), 3,38 (1H, m), 3,79 (2H, l), 4,12 (1H, m), 4,55 - 4,75 (3H, m), 5,06 (2H, s), 5,15 (1H, d), 5,54 (1H, d), 6,75 (1H, l), 6,83 (1H, l), 6,89 (2H, d), 6,94 (1H, t), 6,99 (1H, s), 7,43 (2H, d), 7,10 - 7,50 (H aromatique), 7,59 (1H, d), 8,14 (1H, d), 8,45 - 8,55 (2H, m), 8,60 (1H, d), 10,71 (1H, l).

15 On prépare le composé utilisé comme matière de départ de la manière suivante :

a) **Z-D-Trp-Lys(BOC)-OMe**

20

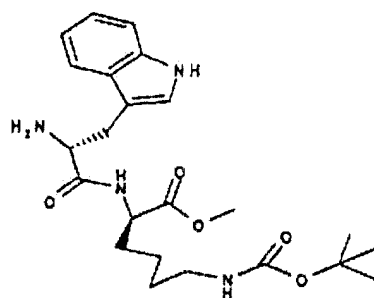


25

On ajoute 9,5 g de HOBT à TA à une solution de 23,7 g de Z-D-Trp-OH dans 230 ml de THF. Une solution incolore limpide se forme. Puis on ajoute à TA 20,8 g de H-Lys(BOC)-OMe.HCl, suivis par 7,7 ml de N-méthylmorpholine. On refroidit la suspension fine à 0° et on ajoute 11,4 ml
30 de diisopropylcarbodiimide. Agitation pendant 1 heure à 0°, puis pendant 3 heures à TA. On ajoute à la suspension une solution de 7,0 g d'acide sulfurique concentré dans 120 ml d'eau. Extraction avec 150 ml d'acétate d'éthyle, séparation des phases et lavage de la phase organique consécutivement avec une solution de 100 ml de saumure saturée, 100 ml
35 de saumure à 25 %, carbonate acide de sodium à 5 %. Puis on sèche la

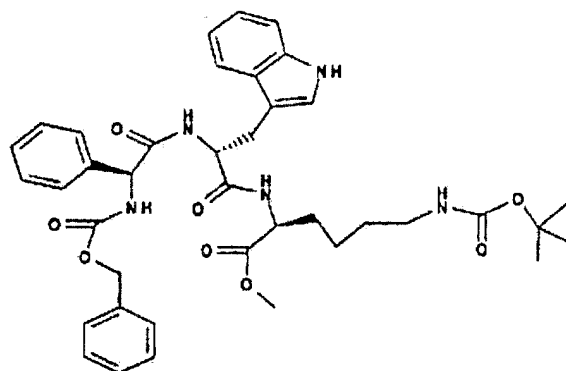
phase organique sur MgSO_4 et on la fait évaporer. On reprend le résidu dans 250 ml d'acétate d'isopropyle et on l'agite pendant 2 heures à TA. Une filtration et un séchage à 40° donnent 40,9 g de Z-D-Trp-Lys(BOC)-OMe, substance blanche. Conditions de CLHP : MN Nucleosil 100 A/C18 ; 5 micromètres ; 250×4 mm ; phase A : acide phosphorique à 0,24 %, phase B : acétonitrile ; gradient : de 20 à 80 % de B en 30 minutes ; longueur d'onde 220 nm ; débit : 1,3 ml/min ; température : 35° ; pureté : 97,8 % b.a. (24,2 min.).

b) H-D-Trp-Lys(BOC)-OMe



On dissout 19,8 g (34,1 mmoles) de Z-D-Trp-Lys(BOC)-OMe dans 220 ml de méthanol, on ajoute 2,2 g de catalyseur à 10 % de Pd/C et on hydrogène à TA. L'hydrogénation est terminée au bout d'une heure à TA ; on élimine le catalyseur par filtration et on fait évaporer le filtrat à 30° ; solide blanc. CLHP : 98,1 % b.a. (16,2 min.).

c) Z-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OMe

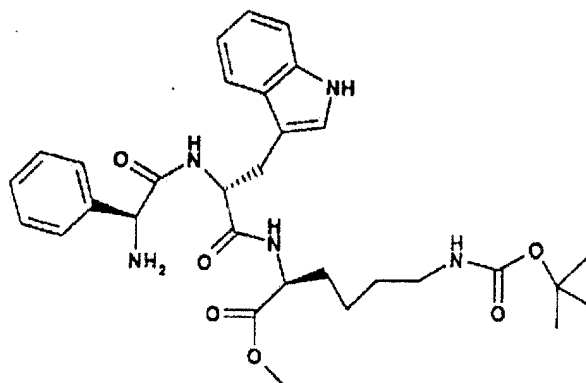


On mélange 17,0 g de H-D-Trp-Lys(BOC)-OMe avec 80 ml de THF. On ajoute 9,2 g de Z-Phg-OH à la suspension grise à TA. Addition de 4,4 g de HOBt, rinçage avec 20 ml de THF. On refroidit la solution jaune trouble à 0° et on ajoute une solution de 5,3 ml de DICl dans 15 ml de THF en un temps de 10 minutes. Agitation pendant 2 heures à 0° ; puis 2 heures à TA.

Puis, addition d'une solution de 3,6 ml d'acide sulfurique dans 57 ml d'eau, extraction avec 70 ml d'acétate d'éthyle, lavage avec de l'eau, de la saumure saturée, du carbonate acide de sodium à 5 %, de la saumure à 25 %, séchage sur $MgSO_4$ et évaporation. On agite le résidu blanc dans 125 ml d'acétate d'isopropyle pendant 2 heures à 40°, et on filtre la suspension. Séchage du résidu à 40° : substance légèrement jaune. CLHP : 96,3 % b.a. (25,3 min.).

d) **H-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OMe**

10



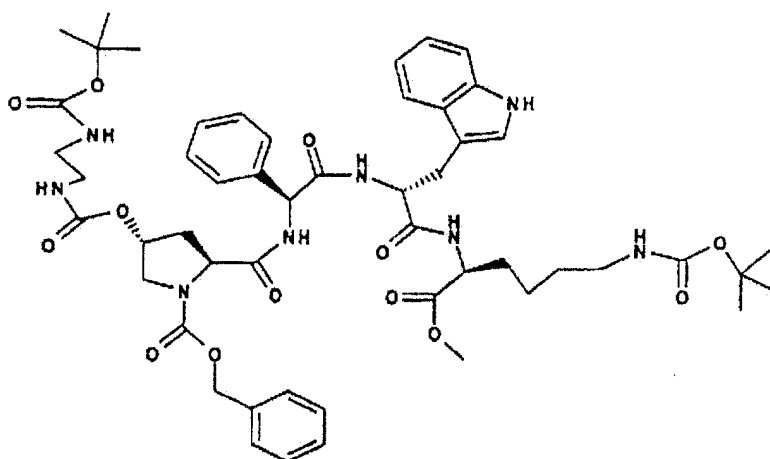
15

On dissout 23,4 g (23,8 mmoles) de (Z-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OMe) dans 260 ml de méthanol, on ajoute 2,6 g de Pd/C à 10° % et on hydrogène à TA et à pression normale. Au bout de 3 heures, on élimine le catalyseur par filtration et on fait évaporer le filtrat à 30° : solide blanc. CLHP : 95,9 % b.a. (17,6 min.).

20

e) **Z-[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)]-Pro-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OMe**

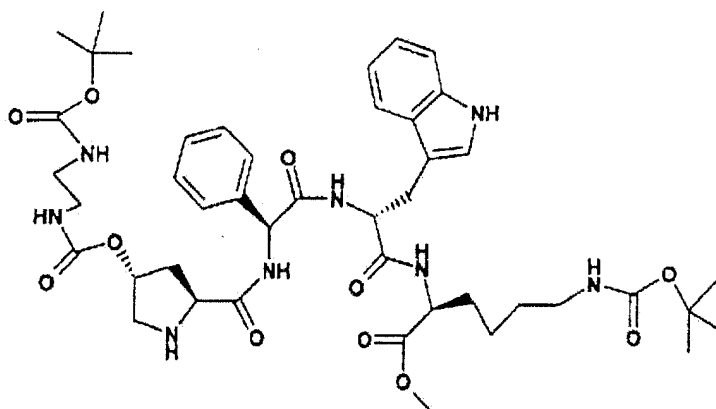
25



30

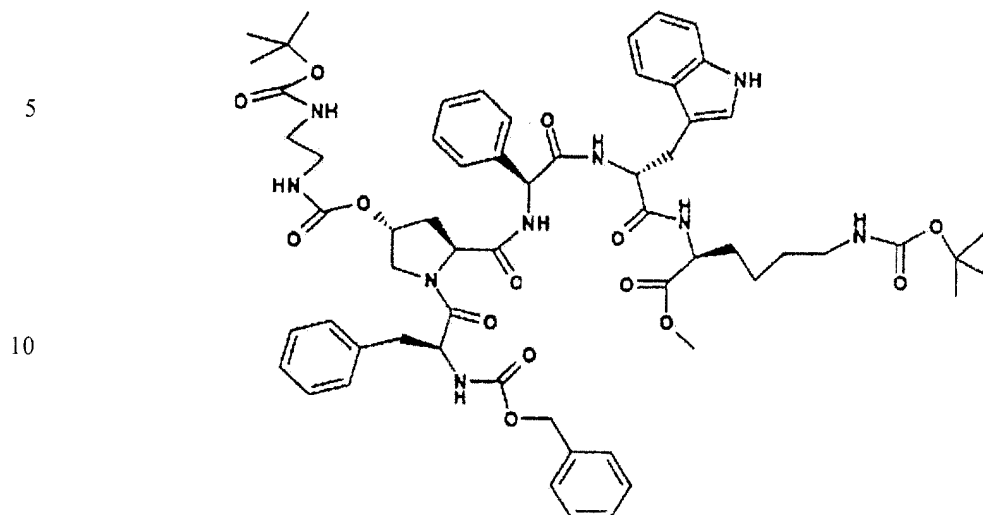
On dissout 11,1 g d'ester benzylique d'acide (2S,4R)-4-(2-tert-butoxycarbonylaminoéthylcarbamoxy)-pyrrolidine-1-carboxylique-acide 2-carboxylique et 19,0 g de H-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OMe dans 290 ml de THF à TA. On ajoute 3,32 g de HOBT et on refroidit la solution trouble à 0°. On ajoute une solution de 4,56 ml de DICL dans 90 ml de THF. Agitation pendant 24 heures à 0°. Puis on ajoute une solution de 2,2 g d'acide sulfurique dans 22 ml d'eau à TA, on agite la solution légèrement opale pendant 15 minutes, et on l'ajoute goutte à goutte à 500 ml d'eau. On fait évaporer la suspension blanche à 50° jusqu'à ce que plus aucune quantité de THF ne soit distillée. Filtration de la suspension et lavage du résidu 4 fois avec 80 ml d'eau à chaque fois, puis avec 250 ml de méthanol, puis deux fois avec au total 80 ml de méthanol. Séchage pendant la nuit à 50°. CLHP 91,0 % b.a. (19,5 minutes).

f) H-[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)]-Pro-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OMe



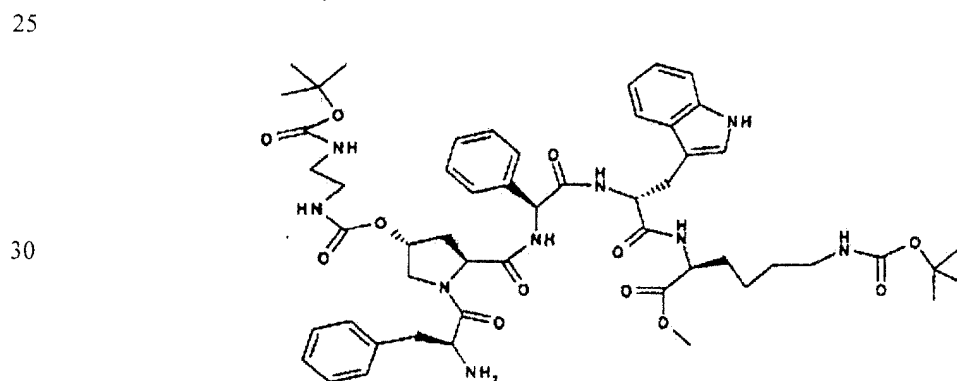
On dissout 22,0 g (12,7 mmoles) de Z-[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)]-Pro-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OMe dans 220 ml de DMF et on ajoute 4,4 g de Pd/C à 10 %. Hydrogénation 4 heures à TA. Puis on élimine le catalyseur par filtration et on ajoute le filtrat à un mélange de 600 g de glace et 400 ml d'eau. On recueille le produit précipité par filtration et on le lave avec de l'eau. Un séchage à 30° donne un solide gris. CLHP : 97,0 % b.a. (12,3 min.).

g) **Z-Phe-[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)]-Pro-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OMe**



On dissout 5,1 g de Z-Phe-OH et 16,5 g de H-[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)]-Pro-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OMe dans 250 ml de THF, on ajoute 2,29 g de HOBt et on refroidit la solution de couleur sombre à 0°. On dissout 3,1 ml de DICl dans 80 ml de THF, et on les ajoute au mélange réactionnel à 0°. Agitation pendant 24 heures à 0°. On ajoute le mélange réactionnel à 200 ml d'acide sulfurique à 10 %, on recueille les solides précipités par filtration et on les rince avec de l'eau. Après filtration, on mélange le résidu avec 200 ml de méthanol et on filtre la suspension. Séchage à 40°. CLHP : 97,2 % b.a. (21,1 min.).

h) **(H-Phe-[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)]-Pro-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OMe)**



On dissout 8,5 g de Z-Phe-[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)]-Pro-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OMe dans 180 ml de DMF et on ajoute 4,25 g de Pd/C à 10 %, et on hydrogène le mélange à TA pendant 6 heures. Puis on élimine le catalyseur par filtration et on fait évaporer le filtrat à 40°.

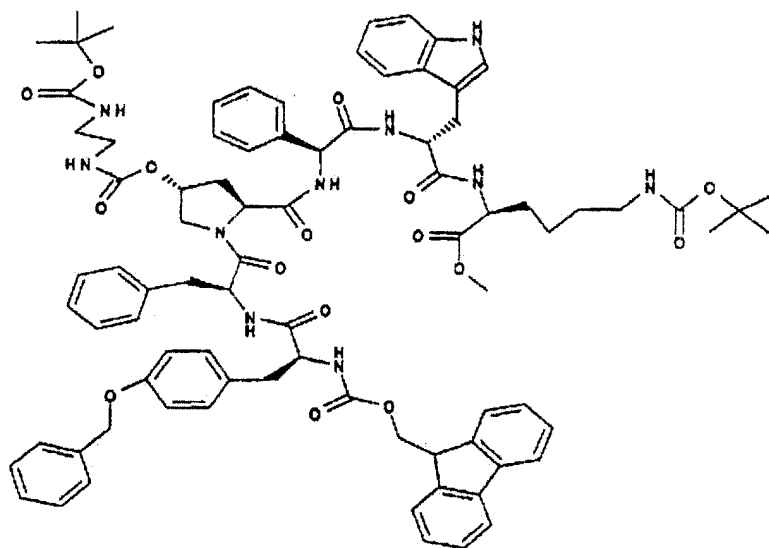
5 On ajoute goutte à goutte au résidu (30 g) 600 ml d'éther méthylique de t-butyle à TA, on filtre la suspension et on lave le résidu avec 300 ml de TBME. Séchage à 40°. CLHP : 93,1 % b.a. (16,6 min.).

i) Fmoc-Tyr(Bzl)-Phe-[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)]-Pro-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OMe

10

15

20



On met en suspension 6,5 g de H-Phe-[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)]-Pro-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OMe et 3,1 g de Fmoc-Tyr(Bzl)-OH et 0,86 g de HOBT dans 180 ml de THF, et on refroidit à 0°.

25 On ajoute 5,5 g de LiBr puis 20 ml de THF. On dissout ensuite 1,18 ml de DICL dans 50 ml de THF, et on agite la suspension de couleur sombre à 0° pendant 2 heures. On retire le bain de refroidissement et on continue l'agitation pendant 24 heures. On ajoute alors une solution de 0,65 g d'acide sulfurique et 6,5 ml d'eau, puis 160 ml d'eau. Evaporation à 40°, filtration du résidu, lavage avec de l'eau jusqu'à ce que la dernière eau de rinçage ait un pH de 4,0. On agite le gâteau de filtration dans 30 ml de méthanol, on filtre la suspension et on lave le résidu avec 10 ml de méthanol. Un séchage

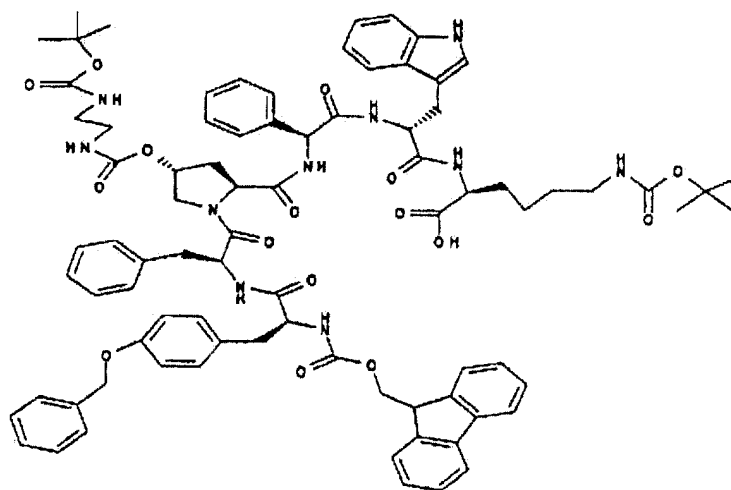
30

35 à 35° donne une substance grise. CLHP : 95,4 % b.a. (26,0 min.).

10) Fmoc-Tyr(Bzl)-Phe-[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)]-Pro-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OH

5

10



15

On met en suspension 13,0 g de Fmoc-Tyr(Bzl)-Phe-[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)]-Pro-Phg-D-Trp-Lys(BOC)-OMe dans 250 ml de THF. On ajoute 7,3 g de LiBr et 75 ml de THF. On ajoute ensuite lentement, à TA, en un temps de 20 minutes, 8,7 ml de NaOH 1 molaire.

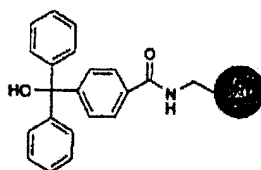
20 On continue l'agitation à TA pendant 3 heures, puis on ajoute une quantité supplémentaire de 5 ml de NaOH 1 molaire au cours des 15 heures suivantes. On ajoute la solution réactionnelle finale à une solution de 1,7 g d'acide sulfurique dans 34 ml d'eau. On ajoute le mélange biphasique résultant à 50 ml d'acétate d'éthyle. Après séparation des phases, on lave trois fois la phase organique avec de la saumure, puis on la fait évaporer.

25 On ajoute au résidu 25 ml de DIF. On ajoute la solution limpide de DIF résultante à 260 ml d'eau. On filtre la suspension résultante et on lave trois fois le gâteau de filtration avec de l'eau et on le sèche pendant la nuit à 40°. CLHP : 71,9 % b.a. (28,6 min.).

30 **Exemple 2 :**

Préparation d'une résine de 4-(chloro-(diphényl)méthyl)benzoyl-aminométhyl-polystyrène

35



On effectue la synthèse dans un réacteur de type discontinu de 1 litre, sous agitation, fonctionnant manuellement, équipé d'une fritte de verre fritté, sous azote. Une résine d'aminométhylpolystyrène disponible dans le commerce (30,4 g, 41,07 mmoles), prétraitée avec du DMF, est mise à réagir à TA pendant la nuit avec une solution d'acide 4-(hydroxyl-diphénylméthyl)benzoïque (15,0 g, 49,28 mmoles, 1,2 équivalents), d'hydroxybenzotriazole (HOBT) (7,54 g, 49,28 mmoles, 1,2 équivalents), et de DIC1 (12,43 g, 98,57 mmoles, 2,4 équivalents) dans du DMF (140 ml). On élimine le solvant par filtration à travers la fritte sous pression réduite, et on lave la résine cinq fois successivement avec du DMF et cinq fois avec du méthanol. Un séchage sous vide à 40° donne 44,69 g de résine. On utilise cette résine comme matière de départ pour la synthèse suivante des hexapeptides.

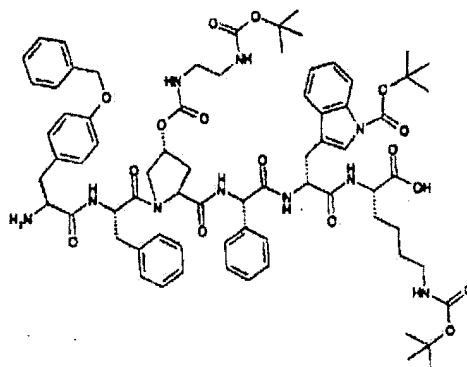
Mode opératoire de synthèse du peptide linéaire protégé

Les hexapeptides linéaires liés à la résine sont assemblés manuellement dans la direction C à N par des réactions de couplage itératives dans un réacteur de type discontinu, sous agitation, équipé d'une fritte de verre fritté sous azote. On utilise une résine de 4-(chloro(diphényl)méthyl)-benzoyl-aminométhyl-polystyrène comme matière de départ et on conduit un protocole de référence constitué de cycles répétitifs de déprotection N α (20 % v/v de diéthylamine (DAEM) dans du DMF), de lavages répétés avec du DMF et de l'IPK, successivement, et de couplages (DIPCI/HOBT, DIEPA et DMF) à TA. Lors d'une légère modification de ce mode opératoire de couplage, on apporte une attention particulière pour minimiser la racémisation de la phénylglycine en effectuant le couplage de cet amino-acide à 0°. Avant le clivage du peptide linéaire protégé, complètement assemblé à partir de son support de résine, on élimine la protection N α -Fmoc.

On synthétise le Fmoc-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-OH de la manière décrite dans le document WO 02/101192. Tous les autres amino-acides sont disponibles dans le commerce.

Synthèse de H-Tyr(Bzl)-Phe-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phg-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-OH

5



10

a) Synthèse de la Fmoc-Lys(Boc)-O-résine

On traite de la résine de 4-(chloro(diphényl)méthyl)benzoylamino-méthylpolystyrène (20 g, 19,4 mmoles), prétraitée avec du toluène, pendant 4 heures avec du chlorure d'acétyle (7,6 g, 97 mmoles) dans du toluène, à TA. Après filtration, on répète le mode opératoire pendant la nuit, puis on filtre la résine et on la lave avec du toluène et du dichlorométhane. On effectue le couplage avec un mélange de Fmoc-Lys(Boc)-OH (18,2 g, 38,8 mmoles, 2 équivalents) et de N-méthylmorpholine (3,94 g, 38,8 mmoles, 2 équivalents) pendant 4 heures à TA. Après filtration, on lave la résine avec du DMF et de l'IPA 3 fois, successivement, et on la sèche sous vide pour obtenir 26,5 g de Fmoc-Lys(Boc)-O-résine jaunâtre, avec une capacité de 0,566 mmole/g (déterminée par le procédé Fmoc). (Procédé Fmoc selon la littérature : Meienhofer, J.; Waki, M.; Heimer, E.P.; Lambros, T.J.; Makofske, R.C.; Chang, C. D., Int. J. Pep. Prot. Res., 1979, 13, 35).

25

b) Résine-O-Lys(Boc)-D-Trp(Boc)-Phg-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phe-Tyr(Bzl)-H

On met en suspension la Fmoc-Lys(Boc)-O-résine (28,0 g, 19,96 mmoles) dans du DMF, et on la traite avec une solution de DAEM dans du DMF (20 % v/v) pendant 10 minutes à TA. Après avoir effectué une filtration, on répète le mode opératoire, puis on effectue un lavage avec du DMF et de l'IPA 3 fois successivement, suivi de lavages trois fois avec du DMF. On répète ce mode opératoire de déprotection N α -Fmoc et les lavages après chaque étape de couplage.

30

On conduit le couplage avec un mélange d'un amino-acide, de HOBT et de DICl, qui est agité pendant 30 minutes à TA, puis ajouté à la résine immédiatement. On continue le couplage jusqu'à l'achèvement, c'est-à-dire jusqu'à la disparition complète des groupes amino résiduels contrôlée
5 par un test à la ninhydrine de "Kaiser" négatif. Après avoir été couplée, la résine est lavée 5 fois avec du DMF, et est prête pour la protection Fmoc.

On couple séquentiellement les dérivés d'amino-acides suivants :

Fmoc-D-Trp(Boc)-OH (16,81 g, 31,92 mmoles, 2 équivalents), DIF (100 ml), HOBT (4,93 g, 32,24 mmoles, 2,02 équivalents), DICl (5,35 g,
10 42,45 mmoles, 2,66 équivalents).

Fmoc-Phg-OH (11,92 g, 31,92 mmoles, 2 équivalents), THF (70 ml), HOBT (4,93 g, 32,24 mmoles, 2,02 équivalents), DICl (5,35 g, 42,45 mmoles, 2,66 équivalents). On apporte une attention particulière pour minimiser la racémisation de la phénylglycine en effectuant le couplage de
15 cet amino-acide à 0°C.

Fmoc-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-OH (17,26 g, 31,92 mmoles, 2 équivalents), DIF (100 ml), HOBT (4,93 g, 32,24 mmoles, 2,02 équivalents), DICl (5,35 g, 42,45 mmoles, 2,66 équivalents).

Fmoc-Phe-OH (12,36 g, 31,92 mmoles, 2 équivalents), DIF (100 ml),
20 HOBT (4,93 g, 32,24 mmoles, 2,02 équivalents), DICl (5,35 g, 42,45 mmoles, 2,66 équivalents).

Fmoc-Tyr(Bzl)-OH (15,75 g, 31,92 mmoles, 2 équivalents), DIF (100 ml), HOBT (4,93 g, 32,24 mmoles, 2,02 équivalents), DICl (5,35 g, 42,45 mmoles, 2,66 équivalents).

25 Avant le clivage du peptide linéaire protégé complètement assemblé à partir de son support de résine, la protection N α -Fmoc est éliminée par traitement de la résine avec une solution de DAEM dans du DMF (20 % v/v) pendant 10 minutes à TA. Après filtration, on répète le mode opératoire et on effectue un lavage avec du DMF et de l'IPA 3 fois
30 successivement, suivi par trois lavages successifs avec du DMF. (Un séchage de la résine sous vide à 40°C donne une résine jaunâtre).

c) Clivage du peptide linéaire à partir de son support de résine :

H-Tyr(Bzl)-Phe-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phg-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-OH

Ca) Procédé avec AcOH/CH₂Cl₂/H₂O 45/45/5 v/v/v

On met en suspension le peptide linéaire protégé complètement assemblé résine-O-Lys(Boc)-D-Trp(Boc)-Phg-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phe-Tyr(Bzl)-H (24,5 g) dans un mélange
5 d'AcOH/CH₂Cl₂/H₂O 45/45/5 v/v/v (150 ml) et on l'agite pendant une heure à TA, on le filtre et on le lave avec CH₂Cl₂. On fait évaporer le filtrat à siccité, on agite le résidu pendant une heure avec un mélange de TBME et d'heptane 7/3 v/v, on le filtre et on le sèche sous vide. On obtient un solide jaunâtre ; teneur: 93,5% CLHP g/g ; pureté 91,6 % (F)-CLHP et 2,5 % (F)-
10 CLHP D-Phg-Epimère.

On lave trois fois la résine (résine de 4-(chloro(diphényl)méthyl)-benzoyl-aminométhyl-polystyrène) avec du méthanol et on la sèche, puis on peut la réutiliser.

Cb) Procédé avec CH₂Cl₂ et MeOH

On met en suspension le peptide linéaire protégé complètement assemblé résine-O-Lys(Boc)-D-Trp(Boc)-Phg-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phe-Tyr(Bzl)-H (6,2 g) dans un mélange de
15 CH₂Cl₂/MeOH 1/1 v/v (115 ml) et on l'agite pendant trois jours à TA, on le filtre et on le lave avec CH₂Cl₂. On fait évaporer le filtrat à siccité, on agite le résidu pendant une heure avec un mélange de TBME et d'heptane 7/3 v/v
20 (60 ml), on le filtre et on le sèche sous vide. Teneur: 93,5 % CLHP g/g ; pureté 92,6 % (F)-CLHP et 1,1 % (F)-CLHP D-Phg-Epimère.

On lave trois fois la résine (résine de 4-(chloro(diphényl)méthyl)-benzoyl-aminométhyl-polystyrène) avec du méthanol et on la sèche, puis on
25 peut la réutiliser.

Cc) Procédé avec un mélange méthyléthylcétone/MeOH

On met en suspension le peptide linéaire protégé complètement assemblé résine-O-Lys(Boc)-D-Trp(Boc)-Phg-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phe-Tyr(Bzl)-H (4,0 g) dans un mélange de
30 diéthylméthylcétone/MeOH 1/1 v/v (24 ml) et on l'agite pendant 15 heures à 50°C, on le filtre et on le lave avec MeOH. On fait évaporer le filtrat à siccité, on agite le résidu pendant une heure avec un mélange de TBME et d'heptane 7/3 v/v (60 ml), on le filtre et on le sèche sous vide. Teneur: 88,1
% CLHP g/g ; pureté 95,2 % (F)-CLHP et 1,8 % (F)-CLHP D-Phg-
35 Epimère.

On lave trois fois la résine (résine de 4-(chloro(diphényl)méthyl)-benzoyl-aminométhyl-polystyrène) avec du méthanol et on la sèche, puis on peut la réutiliser.

Purification

5 A des fins analytiques, on a purifié les peptides linéaires par chromatographie à phases inversées.

Caractérisation

La structure d'un échantillon analytique purifié par chromatographie à phases inversées est confirmée par FAB-SM, LC-SM et résultats de RMN
10 (DMSO, en ppm, 1,16, 1,34, 1,55, 1,61 (3H), 1,66, 2,05, 2,20, 2,51, 2,83 (2H), 2,91, 2,96, 2,98, 3,02, 3,41, 3,78, 4,13, 4,61, 5,13, 5,51, 6,74, 6,83, 6,88 (2H), 7,01 (2H), 7,11 (2H), 7,38, 7,42 (2H), 7,49, 7,72, 8,01, 8,29, 8,48, 8,62, 8,75).

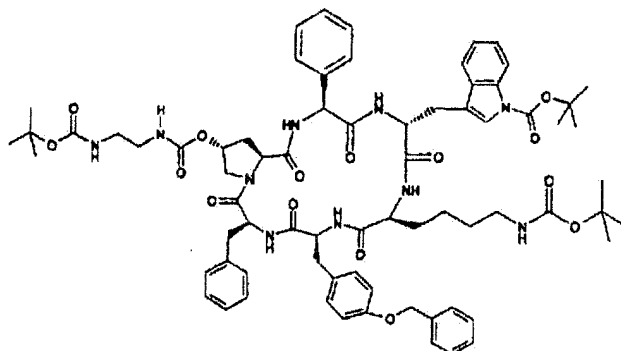
La configuration des amino-acides est déterminée par analyse des
15 amino-acides : le composé est hydrolysé dans des conditions acides, transformé en des dérivés, et la configuration de chaque amino-acide individuel est attribuée par chromatographie énantiosélective en phase gazeuse/spectrométrie de masse à ionisation chimique.

Une preuve supplémentaire de la structure est la transformation des
20 différents peptides linéaires en un peptide cyclique bien caractérisé.

On a synthétisé les composés suivants conformément au mode opératoire décrit :

H-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-Phe-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phg-D-Trp(Boc)-OH;
H-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-Phe-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phg-D-Trp-OH;
25 H-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phg-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-Phe-OH;
H-Phe-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Phg-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-OH;
H-Tyr(Bzl)-Phe-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-DPhg-DTrp(Boc)-Lys(Boc)-OH

Exemple 3 : Cyclisation des peptides linéaires protégés pour synthétiser
30 **Cyclo[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phg-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-Phe-]**



Cyclisation de H-Phe-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phg-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-OH

Procédé à base d'azoture

Pour la cyclisation, on dissout le fragment linéaire (2,5 g, 1,83 mmoles) dans du DMF (391 ml), on le refroidit à -5°, on le traite avec EDIPA (0,47 g, 3,66 mmoles, 2 équivalents) et DPPA (0,75 g, 2,75 mmoles, 1,5 équivalents), et on l'agite à cette température jusqu'à l'achèvement (approximativement 20 heures). On ajoute goutte à goutte de l'eau (391 ml) au mélange réactionnel, on filtre le précipité et on le lave avec de l'eau jusqu'à ce que l'on ne puisse plus détecter d'azoture. On obtient 4,9 g d'un solide blanc mouillé d'eau (Rf de CLHP identique à la référence), que l'on utilise dans la réaction de déprotection sans autre purification. On caractérise le composé par comparaison directe avec un composé de référence par CLHP.

15 *Cyclisation de H-Tyr(Bzl)-Phe-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phg-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-OH*

a) Procédé a à base de HBTU

Pour la cyclisation, on dissout le fragment linéaire (6,0 g, 3,5 mmoles) dans du DMF (780 ml), on le refroidit à -5°, on le traite avec EDIPA (1,13 g, 8,75 mmoles, 2,5 équivalents), HOBT (1,18 g, 8,75 mmoles, 2,5 équivalents), HBTU (3,3 g, 8,78 mmoles, 2,5 équivalents), et on l'agite à cette température jusqu'à l'achèvement (approximativement 2 heures). On ajoute goutte à goutte de l'eau (391 ml) au mélange réactionnel à TA, on filtre le précipité et on le lave avec de l'eau et de l'heptane et on le sèche sous vide pendant la nuit. On obtient 5,4 g d'un solide jaune blanchâtre. On caractérise le composé par comparaison directe avec un composé de référence par CLHP. Teneur : 55 % p/p CLHP, pureté 78 (A %) - CLHP.

b) Procédé b à base de HBTU

30 Pour la cyclisation, on dissout le fragment linéaire (6,0 g, 4,16 mmoles) dans du DMF (60 ml) et on l'ajoute goutte à goutte à un mélange de HOBT (4,15 g, 10,4 mmoles, 2,5 équivalents), de HBTU (4,15 g, 10,4 mmoles, 2,5 équivalents) et d'EDIPA (1,41 g, 10,4 mmoles, 2,5 équivalents) dans du DMF (135 ml) à -5°, et on l'agite à cette température jusqu'à l'achèvement (approximativement 2 heures). On ajoute

goutte à goutte de l'eau (559 ml) au mélange réactionnel à TA, on filtre le précipité et on le lave avec de l'eau et de l'heptane et on le sèche sous vide pendant la nuit. On obtient un solide jaune blanchâtre. On caractérise le composé par comparaison directe avec un composé de référence par CLHP.

5 Teneur : 77 % p/p CLHP, pureté 84 (A %) - CLHP.

On cyclise les peptides linéaires suivants conformément au mode opératoire ci-dessus :

H-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-Phe-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phg-D-Trp(Boc)-OH

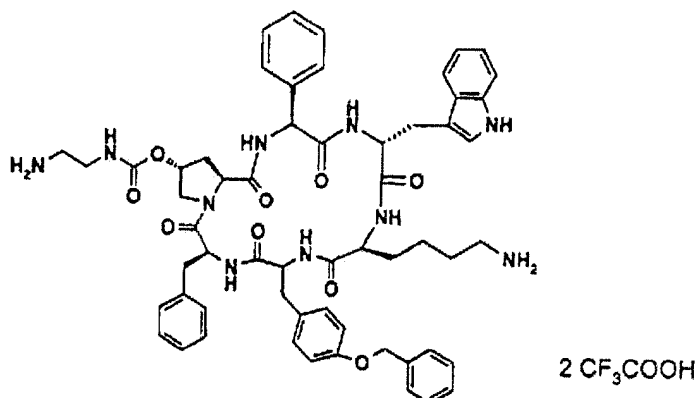
H-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-Phe-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phg-D-Trp-OH

10 H-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phg-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-Phe-OH

H-Phe-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Phg-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Tyr(Bzl)-OH

H-Tyr(Bzl)-Phe-(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-DPhg-DTrp(Boc)-Lys(Boc)-OH

Exemple 4 : Synthèse du sel d'acide cyclo[(2S,4R)-4-(Boc-NH-CH₂-CH₂-NH-CO-O)-Pro-Phg-D-Trp-Lys-Tyr(Bzl)-Phe-]-trifluoroacétique



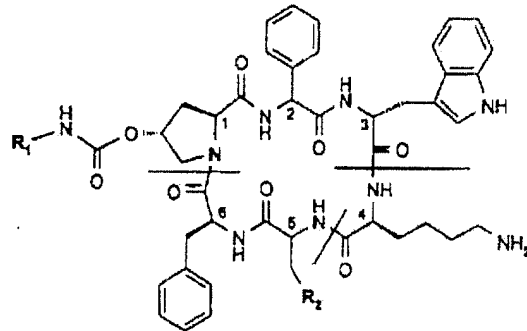
25 Pour une déprotection complète, on dissout le résidu (1,5 g, 0,79 mmole) à 0° dans un mélange TFA/H₂O 95:5 (8,3 ml), et on agite le mélange au froid pendant 30 minutes. On ajoute goutte à goutte le mélange réactionnel froid à un mélange de TBME (29 ml) et d'heptane (13 ml) à TA, et on l'agite pendant 2 heures. On filtre le précipité, on le lave avec un mélange TBME/heptane 1:1 (v/v), et on le sèche sous vide. On obtient un

30 solide beige, teneur 53 % p/p CLHP, pureté : 79 (A %)-CLHP.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'un composé de formule I :

5



10

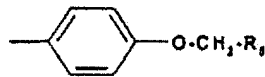
dans laquelle :

R_1 est un groupe -alkylène en C_2 à C_6 - NR_3R_4 , -alkylène en C_2 à C_6 -guanidine ou -alkylène en C_2 à C_6 -COOH, dans lequel chacun des radicaux R_3 et R_4 représente indépendamment H, un groupe alkyle en C_1 à C_4 , ω -hydroxy-alkylène en C_2 à C_4 ou acyle, ou bien R_3 et R_4 forment, conjointement avec l'atome d'azote auquel ils sont fixés, un groupe hétérocyclique qui peut comprendre un autre hétéroatome, et

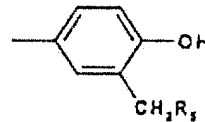
15

R_2 est un groupe Z_1 - CH_2 - R_5 , - CH_2 -CO-O- CH_2 - R_5 ,

20



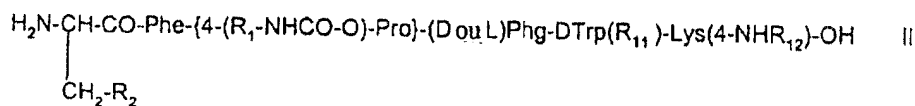
ou



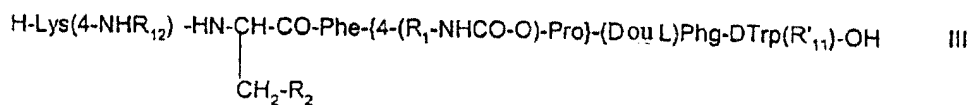
où Z_1 représente O ou S, et R_5 est un groupe phényle facultativement substitué,

ou l'un de ses sels,

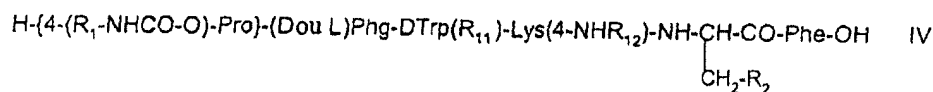
25 comprenant la cyclisation d'un analogue de somatostatine linéaire de formule II :



30 ou de formule III :

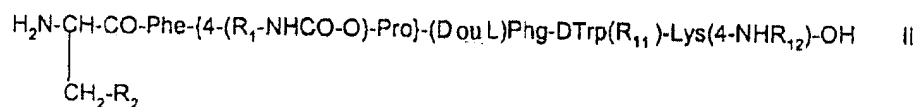


ou de formule IV :



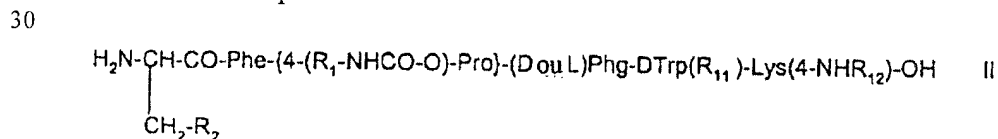
- 5 où R₁ et R₂ sont tels que définis ci-dessus,
 chacun des radicaux R₁₁ et R₁₂ représente indépendamment un groupe protecteur de groupe amino,
 où lorsque R₁ comprend un groupe NH₂ terminal, ce groupe NH₂ terminal est également protégé par un groupe protecteur de groupe amino,
 10 et, lorsque cela est nécessaire, l'élimination du(des) groupe(s) protecteur(s), et la récupération d'un composé de formule I ainsi obtenu, sous forme libre ou sous forme de sel.

2. Procédé selon la revendication 1, comprenant la cyclisation d'un
 15 analogue de somatostatine linéaire de formule II :



- 20 dans laquelle R₁ est un groupe -CH₂-CH₂-NR₃R₄, R₂ est un groupe 4-benzyloxy-phényle, et R₃, R₄, R₁₁ et R₁₂ sont tels que définis dans la revendication 1,
 où lorsque R₁ comprend un groupe NH₂ terminal, ce groupe NH₂ terminal est également protégé par un groupe protecteur de groupe amino,
 et, lorsque cela est nécessaire, l'élimination du(des) groupe(s) protecteur(s),
 25 et la récupération d'un composé de formule I ainsi obtenu, sous forme libre ou sous forme de sel, dans lequel R₁ est un groupe -CH₂-CH₂-NR₃R₄ et R₂ est un groupe 4-benzyloxy-phényle.

3. Composé de formule II :



ou de formule III :

liaison amide de deux motifs peptidiques, chacun d'entre eux contenant au moins un amino-acide sous forme protégée ou non protégée, où la liaison amide est telle que l'on obtienne la séquence d'amino-acides désirée telle que définie dans les formules II, III ou IV,

5 et, lorsque cela est nécessaire, l'élimination d'au moins un groupe protecteur,

et la récupération d'un composé de formule II, III ou IV ainsi obtenu sous forme libre ou sous forme de sel.

cut

(HUIT SOIXANTE SEIZE LIGNES)
(VINGT QUATRE PAGES)

NOVARTIS AG.
P.P. SABA & CO., Casablanca

