



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 121**

51 Int. Cl.:  
**C12P 13/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08774233 .4**

96 Fecha de presentación : **23.06.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2167673**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2010**

54

Título: **Proceso para la conversión de ésteres o ácidos peptídicos C-terminales en amidas empleando subtilisina en presencia de sales de amonio.**

30

Prioridad: **25.06.2007 EP 07012410**

73

Titular/es: **N.V. ORGANON  
Kloosterstraat 6  
5349 AB Oss, NL**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.05.2011**

72

Inventor/es: **Eggen, Ivo, Franci y  
Boeriu, Carmen, G.**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.05.2011**

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 359 121 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Proceso para la conversión de ésteres o ácidos peptídicos C-terminales en amidas empleando subtilisina en presencia de sales de amonio

- 5 La invención se refiere a un proceso para la amidación enzimática selectiva de ésteres o ácidos C-terminales de sustratos peptídicos en la síntesis en fase solución de péptidos.

10 Muchos péptidos biológicamente activos contienen una función amida primaria C-terminal, por ejemplo, gonadorrelina, oxitocina y arginina vasopresina. Hay diversas estrategias para la síntesis de amidas peptídicas en solución, que pueden dividirse aproximadamente en cuatro categorías diferentes.

15 En el enfoque más sencillo, la síntesis se inicia a partir de la amino acil amida C-terminal libre, manteniendo la amida en su forma libre durante toda la síntesis. Aunque es el enfoque más obvio en un primer examen, la síntesis en solución en presencia de una función amida libre en la cadena peptídica en crecimiento a menudo está cargada de problemas de solubilidad graves, debido al enlace de hidrógeno. Además, para la síntesis peptídica a una escala de fabricación se prefiere particularmente el método DioRaSSP® (documentos EP-A-1.291.356; US 6.864.357; Eggen I. et al., *Org. Process Res. Dev.* 2005, 9, 98-101; Eggen I. et al., *J. Peptide Sci.*, 2005, 11, 633-641). En este método, la cadena peptídica en crecimiento está más o menos anclada en una fase orgánica permanente. Sin embargo, cuando se usa una función amida libre, hay un riesgo significativo de perder una parte sustancial del péptido en crecimiento durante lavados acuosos, especialmente en los ciclos tempranos de la síntesis.

25 Para evitar los problemas de solubilidad mencionados anteriormente, la función amida puede protegerse durante la síntesis, empezando de esta manera a partir de la amino acil amida protegida C-terminalmente. Este enfoque asegura también el anclaje del péptido en crecimiento en la fase orgánica. Los grupos protectores para la función amida pueden seleccionarse entre bencilo (Wegand, F. et al., *Chem. Ber.*, 1968, 101, 3623-3641), bencidriilo (Sakakibara, S. et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1967, 40, 2164-2167), trifenilmetilo (Sieber, P. et al., *Bull. Tetrahedron Lett.*, 1991, 32, 739-742), xantenilo (Shimonishi, Y. et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1962, 35, 1966-1970) y restos tipo ciclopropilmetilo (Carpino, L. A. et al., *J. Org. Chem.*, 1995, 60, 7718-7719), cuya inestabilidad en ácidos se determina mediante los sustituyentes unidos a este resto. Un problema general es la mala accesibilidad y disponibilidad comercial de los derivados de aminoácido de partida, especialmente si estos contienen cadenas secundarias protegidas. Además, la escisión del grupo protector de la función amida, en condiciones ácidas, puede dar como resultado la formación de análogos alquilados, dependiendo de la secuencia real del péptido, las condiciones para la desprotección y la naturaleza del grupo protector.

35 Una tercera opción para la síntesis hacia péptidos con una función amida C-terminal es empezar a partir de amino acil ésteres, lo que permite una escisión selectiva hacia la función carboxílica libre en presencia de grupos protectores inestables en ácido de las cadenas secundarias del péptido. La función carboxílica libre se activa posteriormente para permitir la reacción con amoniaco, es decir, amonio. Los ésteres dentro del alcance de este enfoque incluyen 9-fluorofenilo (Fm) (Cunningham, B. R. et al., *Tetrahedron Lett.*, 1994, 35, 9517-9520) y 2-(4-nitrofenilsulfonil)etilo (Nse) ésteres (Carreño, C. et al., *J. Peptide Res.*, 2000, 56, 63-69) que se escinden en condiciones básicas, ésteres de 2-(trimetilsilil)etilo (Tmse), que se escinden por fluoroyodolisis (Sieber, P., *Helv. Chem. Acta*, 1977, 60, 2711-2716) y ésteres de 2,4-dimetoxibencilo (Dmb) que se escinden por acidolisis moderada (McMurray, J. S., *Tetrahedron Lett.*, 1991, 32, 7679-7682). El problema principal con este enfoque es que comprende dos etapas de inducción de racemización potenciales del derivado de aminoácido C-terminal, es decir, la etapa de esterificación y la etapa de amidación real. Además, la etapa de escisión puede conducir a reacciones secundarias dentro de la secuencia peptídica, tales como conversión de los restos Asp (OBU<sup>t</sup>) internos de la succinimida en condiciones básicas (Mergler, M. et al., *J. Pept. Sci.*, 2003, 9, 36-46) o fluoroyodolíticas. Finalmente, la propia función éster no puede ser completamente estable durante el ensamblaje de la secuencia peptídica; por ejemplo los ésteres de tipo bencilo (Fm y Dmb) se escinden durante la hidrogenolisis, descartando de esta manera el uso del grupo benciloxicarbonilo (Z) para la protección temporal de la función amino.

50 La última opción para la síntesis hacia péptidos con una función amida C-terminal es empezar a partir de ésteres de amino acilo primarios sencillos, tales como ésteres de metilo, etilo o bencilo, que en una etapa posterior se convierten en las amidas por amonolisis directa. Éstos están en general ampliamente disponibles y son compuestos de partida fácilmente accesibles. Sin embargo, este enfoque está limitado por el hecho de que las condiciones amonolíticas inducen también reacciones secundarias dentro de la secuencia peptídica, tales como racemización y conversión de los restos Asp(OBU<sup>t</sup>) internos de la succinimida.

60 Puede concluirse que se prefiere el uso de ésteres de amino acilo primarios sencillos como los materiales de partida en la síntesis de péptidos con una función amida C-terminal, si la amonolisis química puede reemplazarse por un método selectivo moderado para la amidación.

Los métodos enzimáticos han ganado interés en la síntesis peptídica durante los dos pasados años. Las enzimas a

menudo muestran una alta quimio-, regio- y estereoselectividad. Adicionalmente, las enzimas normalmente funcionan en condiciones muy moderadas, a valores de pH neutro y a temperaturas de 20-50°C. De esta manera, en estas condiciones, pueden evitarse las reacciones secundarias.

5 En mamíferos se expresan diversas enzimas de amidación, incluyendo Monooxigenasa de  $\alpha$ -Amidación de Peptidilglicina (PAM) bifuncional y las enzimas monofuncionales Monooxigenasa de  $\alpha$ -Hidroxilación de Peptidilo (PHM) y Peptidil Amidoglicolato Liasa (PAL) (Kulathila, R. et al., Nat. Prod. Rep., 1999, 16, 145-154). Estas enzimas necesitan una glicina en el extremo C-terminal y, por lo tanto, no son aplicables genéricamente. Adicionalmente, estas enzimas aisladas son muy costosas y no han encontrado aplicación en el laboratorio (Čeřovský, V. et al., Biotechnol. Appl. Biochem., 2001, 33, 183-187).

10 Čeřovský, V. et al. informaron (Čeřovský, V. et al., Angew. Chem. Int. Ed., 1998, 37, 1885-1887) sobre la aplicación de una enzima aislada de la piel de naranja en la amidación del ácido libre de un péptido C-terminal. A pesar de la optimización los rendimientos nunca superaron el 35%. Adicionalmente, en otra publicación los rendimientos parecían depender en gran medida del sustrato usado (Čeřovský, V., Kula, M. R., Biotechnol. Appl. Biochem., 2001, 33, 183-187). Finalmente, el método de Čeřovský se basa en la conversión del péptido con un ácido C-terminal libre a la amida correspondiente. Puesto que la síntesis en fase solución normalmente produce un éster C-terminal, se requiere una etapa de síntesis adicional para desproteger la función éster. En consecuencia, será muy difícil aplicar esta enzima de piel de naranja en un proceso industrial.

20 El uso de lipasas ha demostrado una extensa aplicación en química orgánica. Varias publicaciones informan del uso de la lipasa *Candida antarctica* en la amidación de compuestos orgánicos, dando como resultado amidas sustituidas y no sustituidas (Reyes-Duarte, D. et al., Biotech Lett., 2002, 24, 2057-2061; Sánchez. V. M. et al., J. Org. Chem. 1999, 64, 1464-1470; Torre, O. et al., Adv. Synth. Catal. 2005, 347, 1007-1014; Maugard, T. et al., Tetrahedron, 1997, 53, 14, 5185-5194; Zoete de, M. C. et al., Sheldon, R. A. Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic, 1996, 1, 109-113; Litjens, M. J. J. et al., Tetrahedron, 1999, 55, 12411-12418). Sin embargo, sigue sin informarse de la aplicación de esta enzima en la química peptídica.

30 Finalmente, Chen S-T et al., Synthesis, 1993, 858-860, informan de la amidación enzimática de ésteres de aminoácidos y ésteres peptídicos C-terminales con alcalasa (subtilisina libre) en presencia de cloruro de amonio/trietil amina, a un pH de 10,6 y mayor. Los rendimientos de los que se informa son entre el 50 y el 70%. Chen informa en una tabla de la amidación de un dipéptido con una conversión del 68% en 12 horas. Se informa también sobre la amidación del tripéptido. Sin embargo, la conversión no se indica. Puede mencionarse también aquí que es altamente indeseable en la síntesis en fase solución del péptido el uso de un pH tan alto, puesto que esto podría dar como resultado la destrucción del péptido. Por lo tanto, se prefieren condiciones moderadas, es decir, un pH de 10 o menor.

40 Por lo tanto, a pesar de estos desarrollos positivos de la amidación enzimática del éster C-terminal de un péptido mediante una enzima disponible en el mercado con altos rendimientos permanece como un desafío abrumador hasta ahora.

45 Se ha encontrado ahora un nuevo proceso para la amidación de ésteres o ácidos C-terminales de sustratos peptídicos en la síntesis de péptidos en fase solución que comprende amidar uno o más sustratos peptídicos que comprenden ésteres o ácidos C-terminales usando la proteasa subtilisina en cualquier forma adecuada, en presencia de una sal de amonio derivada de un ácido que tiene un pKa por encima de 0.

Sorprendentemente, se ha encontrado que con el proceso de la presente invención pueden obtenerse altos rendimientos del producto amidado, aunque la actividad endopeptidasa se suprime sustancialmente.

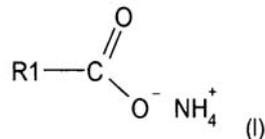
50 Por ácidos C-terminales de sustratos peptídicos se entiende el ácido C-terminal libre de un péptido.

55 Se prefieren los ésteres C-terminales de sustratos peptídicos. Puesto que la síntesis en fase solución normalmente produce un éster C-terminal, se requiere una etapa de síntesis adicional para desproteger la función éster. Adicionalmente, la amidación del ácido C-terminal libre de un péptido es mucho más lenta que la amidación del éster C-terminal.

60 Los ésteres de los ácidos C-terminales del sustrato peptídico pueden seleccionarse entre el grupo de ésteres de (ar)alquilo C<sub>1-12</sub>, por ejemplo ésteres de metilo, etilo, propilo, butilo y bencilo, en particular ésteres de (ar)alquilo C<sub>1-12</sub> primarios, preferiblemente ésteres de alquilo C<sub>1-4</sub> primarios, más preferiblemente ésteres de etilo y metilo. El éster de metilo C-terminal del sustrato peptídico es la realización más preferida.

La sal de amonio se deriva de un ácido que tiene un pKa por encima de 0, preferiblemente de un ácido que tiene un pKa por encima de 3,5, aún más preferiblemente que tiene un pKa entre 3,5 y 7. Los ejemplos incluyen hidrogenofosfato de diamonio, dihidrogenofosfato de amonio, fluoruro de amonio o sulfito de amonio hidratado.

Como alternativa, la sal de amonio puede tener la siguiente estructura química (I):



en la que

- 5 R1 se selecciona entre el grupo de hidrógeno, (ar)alquilo C<sub>1-12</sub>, arilo C<sub>6-12</sub>, -N(R2)<sub>2</sub>, -OH y R3-O<sup>-</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>,  
 R2 se selecciona entre el grupo de hidrógeno y/o alquilo C<sub>1-4</sub>, y  
 R3 es un enlace, un grupo carbonilo o un grupo alquil C<sub>1-4</sub> carbonilo, opcionalmente sustituido con uno o más  
 grupos hidroxilo y/o -COO<sup>-</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>,  
 opcionalmente en forma hidratada.
- 10 Los ejemplos de sales de amonio de acuerdo con la fórmula mencionada anteriormente incluyen carbamato de amonio, acetato de amonio, tartrato de amonio, benzoato de amonio, citrato de amonio, formiato de amonio, oxalato de amonio monohidrato, carbonato de amonio, bicarbonato de amonio y mezclas de los mismos. Preferiblemente, R1 se selecciona entre el grupo de (ar)alquilo C<sub>1-12</sub>, arilo C<sub>6-12</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OH y -O<sup>-</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.
- 15 Las realizaciones preferidas se seleccionan entre carbamato de amonio, carbonato de amonio, bicarbonato de amonio, acetato de amonio, benzoato de amonio y mezclas de los mismos.
- El carbamato de amonio es la realización más preferida.
- 20 Se entiende que el carbamato de amonio no puede derivarse en la práctica de ácido carbámico en vista del hecho de que el ácido carbámico como tal es un compuesto inestable y, de esta manera, por lo tanto no existe. Sin embargo, por conveniencia en la presente invención, se define que el carbamato de amonio es una sal de amonio derivada de ácido carbámico, que tiene un pKa entre 4,2 y 7 (Masuda K. et al., Tetrahedron, 2005, 61, 213-229).
- 25 La proteasa subtilisina (EC 3.4.21.62) puede usarse en el proceso de la invención en cualquier forma y, de esta manera, puede usarse en una forma soluble y/o cristalizada aunque también en forma inmovilizada u otra forma insoluble, por ejemplo en forma de agregados enzimáticos reticulados (CLEA) o cristales enzimáticos reticulados (CLEC).
- 30 El nuevo proceso de esta invención puede usarse convenientemente en la producción de péptidos protegidos o desprotegidos.
- Preferiblemente, el éster o ácido C-terminal de los sustratos peptídicos comprende un resto acilo C-terminal, que es un resto α-amino acilo de origen natural o sintético. El resto α-amino acilo C-terminal puede estar protegido o no
- 35 protegido en la cadena secundaria. En particular, se prefieren los restos α-amino acilo C-terminales seleccionados entre Ala, Cys protegido, Asp protegido, Glu protegido, Phe, Gly, His, Lys (protegido), Leu, Met, Asn, Gln, Arg (protegido), Ser (protegido), Thr, Val, Trp (protegido) y Tyr (protegido), en el que los paréntesis alrededor de la palabra "protegido" significan que el resto puede estar presente tanto en la forma protegida como no protegida en la cadena secundaria. El código de tres letras para los aminoácidos se usa aquí de acuerdo con la nomenclatura de la
- 40 IUPAC (IUPAC-IUB Commission (1985) J. Biol. Chem. 260, 14-42).
- En una realización preferida adicional, los sustratos peptídicos, protegidos o no protegidos, usados en el proceso de esta invención se preparan de acuerdo con DioRaSSP®. De esta manera, un sustrato peptídico que comprende un
- 45 éster o ácido C-terminal se prepara preferiblemente de acuerdo con este proceso para la síntesis en solución rápida de un péptido en un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos, comprendiendo el proceso ciclos repetitivos de las etapas (a)-(d):
- (a) una etapa de acoplamiento, usando un exceso de un componente carboxílico activado para acilar un componente amino,
- (b) una etapa de inactivación en la que se usa un aceptor para retirar las funciones carboxílicas activadas
- 50 residuales, donde el aceptor puede usarse también para la desprotección del péptido en crecimiento,
- (c) una o más extracciones acuosas y
- opcionalmente (d) una etapa de desprotección diferente, seguida de una o más extracciones acuosas, con lo que en al menos un ciclo en la etapa de proceso b se usa una amina que comprende un anión libre, o un anión latente, como aceptor de las funciones carboxílicas activadas residuales. La amina es preferiblemente β-
- 55 alaninato de bencilo o una sal del mismo.
- La proporción molar de la sal de amonio a sustrato peptídico puede variar de 2:1 a 20:1, preferiblemente 5:1 a 12:1, más preferiblemente 6:1 a 10:1.

La amidación del proceso de la presente invención puede realizarse en uno o más disolventes orgánicos. Se prefieren los disolventes orgánicos polares y, en particular, el disolvente orgánico se selecciona entre *N,N*-dimetilformamida (DMF), *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), dioxano, *N,N*-dimetilacetamida (DMA), diclorometano (DCM), tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo, *terc*-butanol, alcohol *terc*-amílico, dicloroetano (DCE), *terc*-butil metil éter (MTBE) y mezclas de los mismos. Se prefieren mezclas de *terc*-butanol y DMF, *terc*-butanol y NMP, alcohol *terc*-amílico y DMF o alcohol *terc*-amílico y NMP.

Estas mezclas pueden usarse en una proporción de 40:60 a 95:5 (v/v), preferiblemente 60:40 a 90:10 (v/v), más preferiblemente en una proporción de 82,5:17,5 (v/v).

Preferiblemente, una pequeña cantidad de agua está presente en la mezcla de reacción. Se ha encontrado que en un sistema "seco", totalmente anhidro, la enzima se inactiva debido a la ausencia de agua. Sin embargo, cuando la concentración de agua es demasiado alta en la mezcla de reacción ocurre la hidrólisis indeseada del éster en un grado significativo (es decir, formación de un ácido libre C-terminal) a costa de la amidación. Por consiguiente, el porcentaje de agua en la mezcla puede variar del 0,001 al 5% (v/v), preferiblemente del 0,001 al 2% (v/v). Es especialmente útil cuando el porcentaje de agua en la mezcla es de aproximadamente 0,1 al 1% (v/v).

Puede añadirse agua a propósito o introduciendo reactivos que contienen agua. Por ejemplo, cuando se usan agregados enzimáticos reticulados (CLEA), se introduce agua automáticamente en la mezcla de reacción debido a su presencia en los CLEA. La introducción de agua en la mezcla de reacción puede realizarse en forma de un tampón acuoso. Los tampones adecuados pueden seleccionarse a partir de tampones que se usan generalmente para transformaciones usando enzimas proteolíticas. En particular, el tampón acuoso es un tampón fosfato, borato o 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol (TRIS).

El pH al que se realiza la reacción puede seleccionarse en el intervalo de 5,5-10, preferiblemente 5,5-8,5, más preferiblemente 6-8 y aún más preferiblemente el pH es 7.

Las temperaturas de reacción para la amidación pueden seleccionarse adecuadamente en el intervalo de 15-60°C, en particular 20 a 40°C. Se prefiere una temperatura de reacción de 30°C.

La cantidad de enzima puede seleccionarse adecuadamente en el intervalo del 1 al 50% en peso de la enzima relacionada con el sustrato peptídico, preferiblemente del 5 al 10% en peso.

En una realización adicional de la invención, la amidación se realiza por etapas añadiendo porciones de la proteasa subtilisina (en cualquier forma adecuada) a la mezcla de reacción, que comprende uno o más sustratos peptídicos que comprenden ésteres o ácidos C-terminales.

En una realización alternativa de la invención, la amidación se realiza por etapas añadiendo porciones de la sal de amonio a la mezcla de reacción, que comprende uno o más sustratos peptídicos que comprenden ésteres o ácidos C-terminales.

Los sustratos peptídicos, cuyos ésteres o ácidos C-terminales se amidan en el proceso de la invención, pueden llevar grupos protectores en otras partes de su secuencia peptídica.

La amidación puede realizarse con un sustrato peptídico así como una mezcla de los mismos. Dicha mezcla puede comprender sustratos peptídicos que tienen sólo ésteres C-terminales, sustratos peptídicos que tienen sólo ácidos libres C-terminales o sustratos peptídicos que tienen tanto ésteres C-terminales como ácidos C-terminales libres.

Un proceso adecuado de acuerdo con la presente invención es el siguiente.

A una solución de un éster o ácido C-terminal de un sustrato peptídico en un disolvente orgánico adecuado (o mezcla de disolventes orgánicos) se le añade una sal de amonio. La mezcla de reacción se incuba por encima de la temperatura ambiente y la reacción se inicia mediante la adición de un catalizador enzimático. La enzima puede añadirse en solución (por ejemplo, Subtilisina A en tampón fosfato), en suspensión o como un material sólido (por ejemplo, enzima nativa, enzima inmovilizada o enzima reticulada). Cuando la conversión del sustrato ha alcanzado el nivel deseado, por ejemplo mayor del 90%, el péptido puede aislarse de acuerdo con el conocimiento de la persona experta.

El término "sustrato" en este documento significa cualquier entidad que se convierte en un producto mediante la proteasa subtilisina en cualquier forma. Este producto puede ser un producto peptídico final, con lo que, si está presente, sólo las cadenas secundarias funcionales protegidas tienen aún que desprotegerse. Como alternativa, este producto puede ser también un fragmento peptídico que posteriormente se hace reaccionar con otros fragmentos peptídicos, en una síntesis convergente, para obtener un péptido más largo con el número final requerido de aminoácidos.

Una persona experta en la materia puede identificar fácilmente sustratos adecuados, por ejemplo realizando un simple ensayo de amidación de un péptido seleccionado que comprende una funcionalidad éster C-terminal o un ácido C-terminal libre, en condiciones adecuadas, como se describe en este documento, antes y después de la conversión, por ejemplo por técnicas de HPLC.

Se establece que el proceso es muy adecuado para preparar amidas de péptidos cortos que comprenden hasta cinco aminoácidos. Adicionalmente, una persona experta también será capaz de preparar péptidos más largos. Los péptidos pueden prepararse también con D-aminoácidos.

El término "protegido" significa que los grupos funcionales (dentro del péptido) están protegidos con grupos protectores adecuados. Una persona experta en la materia sabrá qué tipo de protección seleccionar para qué tipo de grupo funcional. Por ejemplo, las funciones amina presentes en los compuestos pueden protegerse durante el procedimiento sintético mediante un grupo N-protector, lo que significa un grupo usado habitualmente en la química peptídica para la protección de un grupo  $\alpha$ -amino, tal como el grupo *terc*-butiloxicarbonilo (Boc), el grupo benciloxicarbonilo (Z) o el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc).

Las visiones de conjunto de los grupos amino protectores y métodos para su retirada se da en Geiger R. and König W. (1981) en *Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol 3, Gross E. and Meienhofer, J., eds, Academic Press, Nueva York, pág. 1-99, y *Peptides: Chemistry and Biology*, Sewald N and Jakubke H.-D., eds, Wiley-VCH, Weinheim, 2002, pág. 143-154. Se prefieren las funciones de tipo *terc*-butilo o funciones de una estabilidad similar para la protección de otros grupos funcionales en las cadenas secundarias; éstas incluyen, aunque sin limitación *terc*-butilo (Bu<sup>t</sup>) para la protección de las cadenas secundarias de Asp, Glu, Ser, Thr y Tyr, *terc*-butoxicarbonilo (Boc) para la protección de las cadenas secundarias de Lys y Trp, tritilo (Trt) para la protección de las cadenas secundarias de Asn, Gln e His y 2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo (Pmc) o 2,2,4,6,7-pentametilhidrobenzofurano-5-sulfonilo (Pbf) para la protección de la cadena secundaria de Arg [Barany, G. and Merrifield, R. B. (1980) en: "The Peptides", vol. 2 (Gross, E. and Meienhofer, J., eds) Academic Press, Nueva York. pág. 1-284; para Trp (Boc): Franzén, H. et al. (1984) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1699-1700; para Asn (Trt) y Gln (Trt): Sieber, P. et al. (1991) *Tetrahedron Lett.* 32, 739-742; para His (Trt): Sieber, P. et al. (1987) *Tetrahedron Lett.* 28, 6031-6034; para Pmc: Ramage, R. et al. (1987) *Tetrahedron Lett.* 28, 2287-2290; para Pbf: Carpino, L. A. et al. (1993) *Tetrahedron Lett.* 34, 7829-7832].

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

## EJEMPLOS

Los péptidos se han producido de acuerdo con métodos en fase solución convencionales para síntesis peptídica.

La enzima libre Subtilisina A se adquirió en Novozymes a menos que se indique otra cosa. Alcalasa CLEA, Savinasa CLEA y CAL-B CLEA se obtuvieron de CLEA Technologies B.V., Delft, Países Bajos. Todas las demás enzimas se adquirieron en Sigma Aldrich.

P-NH<sub>2</sub> = Z-péptido-NH<sub>2</sub>, por ejemplo Z-Val-Phe-NH<sub>2</sub>  
 P-OH = Z- péptido-OH, por ejemplo Z-Val-Phe-OH  
 P-OMe = Z- péptido-OMe, por ejemplo Z-Val-Phe-OMe  
 Bu<sup>t</sup>OH = *terc*-butanol  
 Am<sup>t</sup>OH = alcohol *terc*-amílico  
 DMF = *N,N*-dimetilformamida  
 NMP = *N*-metil-2-pirrolidona  
 DMA = *N,N*-dimetilacetamida  
 DCM = diclorometano  
 THF = tetrahidrofurano  
 DCE = dicloroetano

### Ejemplo 1 y Ejemplos Comparativos A - G

*Procedimiento general para seleccionar el efecto de la enzima:*

Se preparó una solución madre de Z-Ala-Phe-OMe en DMF (200 mM). Se añadieron 0,5 mmol de carbamato de amonio a 0,25 ml de la solución madre del dipéptido. A continuación, se añadieron 0,625 ml de DMF y 4,125 ml de Bu<sup>t</sup>OH. Dependiendo de la enzima usada se añadieron 10  $\mu$ l de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0. La mezcla de reacción se incubó a 30°C y la reacción se inició mediante la adición de aproximadamente 20 mg de enzima. Se tomó una muestra (2 ml) después de dos horas. Se añadieron 2 ml de acetonitrilo y la mezcla se centrifugó. Los sobrenadantes se analizaron por HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Ej.	H <sub>2</sub> O/Bu <sup>t</sup> OH/ DMF	Z-Ala-Phe-NH <sub>2</sub> a/a%	Z-Ala-Phe-OH a/a%	Z-Ala-Phe-OMe a/a%	Enzima
1	0,2/82,5/17,5	86,2	13,4	0,4	Alcalasa CLEA
A	0,2/82,5/17,5	5	2,6	92,4	Savinasa CLEA
B	0,2/82,5/17,5	0	0	100	CAL-B CLEA

Como se observa a partir de los resultados de la Tabla 1 la Lipasa-B CLEA *Candida Antartica* (CAL-B CLEA) y Savinasa-CLEA no son activas.

En protocolos similares al descrito anteriormente Carboxipeptidasa A (Ejemplo Comparativo C), Lipasa CC (*Candida Cylindracea*) (Ejemplo Comparativo D), Lipasa CR (*Candida Rugosa*) (Ejemplo Comparativo E), Esterasa HL (hígado de cerdo) (Ejemplo Comparativo F) y Lipasa CA (AR) (CAL-B inmovilizada en resina acrílica) (Ejemplo Comparativo G) no eran activas. Las mezclas de reacción se analizaron también después de 16 horas, proporcionando resultados similares.

### Ejemplos 2 y 3 y Ejemplo Comparativo H

*Procedimiento general para seleccionar el efecto de la fuente de amonio*

Se preparó una solución madre de Z-Ala-Phe-OMe en DMF (50 mM). Se añadieron 0,5 mmol de fuente de amonio a 1 ml de la solución madre del dipéptido. Se añadieron 4 ml de Bu<sup>t</sup>OH. Se añadieron 50 µl de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,6. La mezcla de reacción se incubó a 40°C y la reacción se inició mediante la adición de 5 mg de Alcalasa-CLEA. Se tomó una muestra (2 ml) después de dos horas. Se añadieron 2 ml de acetonitrilo y la mezcla se centrifugó. Los sobrenadantes se analizaron por HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Ej.	Fuente de Amonio	Composición de la mezcla de reacción		
		Z-Ala-Phe-NH <sub>2</sub> a/a%	Z-Ala-Phe-OH a/a%	Z-Ala-Phe-OMe a/a%
2	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	11,8	6,8	81,3
3	NH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>	16,1	8,7	75,2
H	NH <sub>4</sub> Cl	0,4	7,2	92,4

### Ejemplo 4

*Procedimiento para amidación enzimática de un tripéptido:*

Se preparó una solución madre de Z-Ala-Phe-OMe en DMF (200 mM). Se añadieron 0,5 mmol de NH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub> a 0,25 ml de una solución madre de tripéptido. Se añadieron 0,625 ml de DMF y 4,125 ml de Bu<sup>t</sup>OH. La mezcla de reacción se incubó a 30°C y la reacción se inició mediante la adición de 20 mg de Alcalasa-CLEA. Se tomó una muestra (2 ml) después de dos horas y después de cuatro horas. Se añadieron 2 ml de acetonitrilo y la mezcla se centrifugó. Los sobrenadantes se analizaron por HPLC. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3

Tiempo (horas)	Z-Ala-Phe-Ala-NH <sub>2</sub> a/a%	Z-Ala-Phe-Ala-OH a/a%	Z-Ala-Phe-Ala-OMe a/a%
2	69,7	10,2	18,3
4	79,0	10,6	8,9

### Ejemplo 5

*Efecto del entorno "seco" sobre la amidación de un dipéptido con subtilisina libre*

Todos los disolventes se secaron con tamices moleculares antes del experimento.

Se preparó una solución madre de Z-Ala-Phe-OMe en DMF (200 mM). Se añadieron 0,5 mmol de carbamato de amonio a 0,25 ml de la solución madre del dipéptido. Se añadieron 0,625 ml de DMF y 4,125 ml de Bu<sup>t</sup>OH. La mezcla de reacción se incubó a 30°C y la reacción se inició mediante la adición de 1 mg de la enzima Subtilisina A. Se tomó una muestra (2 ml) después de dos horas. Se añadieron 2 ml de acetonitrilo y la mezcla se centrifugó. Los

sobrenadantes se analizaron por HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Agua/Bu <sup>t</sup> OH/DMF	Z-Ala-Phe-NH <sub>2</sub> a/a%	Z-Ala-Phe-OH a/a%	Z-Ala-Phe-OMe a/a%
0/82,5/17,5	1,7	0,4	97,9

### 5 Ejemplos 6 a 14

*Efecto del carbamato de amonio adicional y/o enzimas sobre la amidación de un dipéptido cuando se usa Subtilisina A*

10 Se preparó una solución madre de Z-Ala-Phe-OMe en DMF (200 mM). Se añadieron 0,5 mmol de carbamato de amonio a 0,25 ml de la solución madre del dipéptido. Se añadieron DMF y Bu<sup>t</sup>OH correspondientes a la proporcionada dada en la Tabla 5, para un volumen de reacción total de 5 ml. La mezcla de reacción se incubó a 30°C y la reacción se inició mediante la adición de 10 µl de la solución de enzima (20 mg de Subtilisina A en 200 µl de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0) (condiciones iniciales: Z-Ala-Phe-OMe 10 mM, NH<sub>2</sub>COONH<sub>4</sub> 100 mM, pH 7 30°C).  
15 Se tomó una muestra (2 ml) después de 1,5 horas para los experimentos 6, 9 y 12, y después de 3 horas para los experimentos 7, 8, 10, 11, 13 y 14. Se añadieron 2 ml de acetonitrilo y la mezcla se centrifugó. Los sobrenadantes se analizaron por HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Ej.	H <sub>2</sub> O/Bu <sup>t</sup> OH/DMF	Z-Ala-Phe-NH <sub>2</sub> a/a%	Z-Ala-Phe-OH a/a%	Z-Ala-Phe-OMe a/a%	Comentarios
6	0,2/82,5/17,5	62,1	11,6	26,2	
7	0,2/82,5/17,5	75	10,7	14,2	carbamato extra (0,5 mmol a 1,5h)
8	0,2/82,5/17,5	77,2	12,3	10,6	carbamato extra (0,5 mmol) y enzima ( 10 µl) a 1,5 h
9	0,2/ 70/30	67,3	9,6	23,1	
10	0,2/70/30	75,8	9,3	14,9	carbamato extra (0,5 mmol a 1,5 h)
11	0,2/70/30	81,7	10,9	7,5	carbamato extra (0,5 mmol) y enzima (10 µl) a 1,5 h
12	0,2/40/60	53,6	7,2	39,1	
13	0,2/40/60	56,5	6,3	37,2	carbamato extra (0,5 mmol a 1,5 h)
14	0,2/40/60	68,6	8,4	23	carbamato extra (0,5 mmol) y enzima (10 µl) a 1,5 h

20 Los resultados muestran que la adición de carbamato de amonio y/o enzima extra da como resultado un aumento en la conversión de sustrato y la formación de mayores cantidades de amida.

### Ejemplos 15 a 18

*Efecto del carbamato de amonio adicional sobre la amidación de un dipéptido cuando se usa Alcalasa CLEA*

25 Se preparó una solución madre de Z-Ala-Phe-OMe en DMF (200 mM). Se añadieron 0,5 mmol de la fuente de amonio a 0,25 ml de la solución madre del dipéptido. Se añadieron 0,625 ml de DMF y 4,125 ml de Bu<sup>t</sup>OH. Se añadieron 10 µl de tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0, en los experimentos 17 y 18. La mezcla de reacción se incubó a 30°C y la reacción se inició mediante la adición de aproximadamente 20 mg de Alcalasa-CLEA. Se tomó una muestra (2 ml) después de dos horas. Se añadieron 2 ml de acetonitrilo y la mezcla se centrifugó. Los sobrenadantes se analizaron por HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 6 (condiciones iniciales: Z-Ala-Phe-  
30 Ome 10 mM, NH<sub>2</sub>COONH<sub>4</sub> 10 mM, pH 7, 30°C).

Tabla 6

Ej.	H <sub>2</sub> O/Bu <sup>t</sup> OH/DMF	Z-Ala-Phe-NH <sub>2</sub> a/a%	Z-Ala-Phe-OH a/a%	Z-Ala-Phe-OMe a/a%	Comentarios
15	0/82,5/17,5	90,9	8,4	0,7	
16	0/82,5/17,5	91,1	7,8	1,1	carbamato extra (0,05 mmol a 1 h)
17	0,2/82,5/17,5	84,7	14,4	0,9	
18	0,2/82,5/17,5	78,9	20,1	1	carbamato extra (0,05 mmol a 1 h)

Los resultados muestran que Alcalasa CLEA es altamente eficaz en las condiciones ensayadas. Se convirtió el 99% de Z-Ala-Phe-OMe. Cuando no se añadió tampón adicional a la mezcla de reacción, el producto contenía aproximadamente un 91% de Z-Ala-Phe-NH<sub>2</sub> y un 8% de Z-Ala-Phe-OH libre. La adición de agua aumenta la hidrólisis del éster produciendo el ácido libre.

### Ejemplos 19 y 20

*Efecto de la DMF adicional sobre la amidación de un dipéptido cuando se usa Alcalasa CLEA*

Se preparó una solución madre de Z-Ala-Phe-OMe en DMF (200 mM). Se añadieron 0,5 mmol de la fuente de amonio a 0,25 ml de la solución madre del dipéptido. Se añadieron DMF y Bu<sup>t</sup>OH correspondientes a la proporción dada en la Tabla 5, para un volumen de reacción total de 5 ml. La mezcla de reacción se incubó a 30°C y la reacción se inició mediante la adición de aproximadamente 20 mg de Alcalasa-CLEA. Se tomó una muestra (2 ml) después de dos horas. Se añadieron 2 ml de acetonitrilo y la mezcla se centrifugó. Los sobrenadantes se analizaron por HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 7 (condiciones iniciales: Z-Ala-Phe-OMe 10 mM, NH<sub>2</sub>COONH<sub>4</sub> 100 mM, pH 7, 30°C).

Tabla 7

Ej.	H <sub>2</sub> O/Bu <sup>t</sup> OH/DMF	Z-Ala-Phe-NH <sub>2</sub> a/a%	Z-Ala-Phe-OH a/a%	Z-Ala-Phe-OMe a/a%
19	0/70/30	91,4	7,6	1,1
20	0/60/40	91	7,4	1,6

### Ejemplos 21 a 30

*Procedimiento general para seleccionar diferentes sustratos con Alcalasa CLEA y carbamato de amonio*

En un experimento típico, la mezcla de ensayo contenía aproximadamente sustrato 10 mM y carbamato de amonio 100 mM en una mezcla de disolvente anhidro de DMF al 17,5% (vol/vol) en Bu<sup>t</sup>OH, en un volumen de reacción total de 5 ml. La mezcla de reacción se termostató a 30°C. La reacción se inició mediante la adición de 4 mg/ml de Alcalasa-CLEA. La reacción se incubó a 30°C durante 75 horas. Se tomaron alícuotas de muestra a las 2 h, 4 h y 75 h y la reacción se detuvo mediante la adición de un volumen igual de acetonitrilo. Las muestras se analizaron por HPLC. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Tabla 8

Ej.	Sustrato peptídico	Tiempo de reacción (h)	P-NH <sub>2</sub>	P-OH	P-OMe
			a/a%	a/a%	a/a%
21	Z-Val-Phe-OMe	2	77,0	16,4	6,7
		4	82,1	17,2	6,7
		75	86,7	13,4	0,0
22	Z-Val-Tyr-OMe	2	41,2	13,1	45,8
		4	44,4	20,0	35,7
		75	59,3	40,0	0,8
23	Z-Val-Leu-OMe	2	73,4	19,5	7,2

Ej.	Sustrato peptídico	Tiempo de reacción (h)	P-NH <sub>2</sub>	P-OH	P-OMe
			a/a%	a/a%	a/a%
		4	73,5	26,5	0,0
24	Z-Val-Thr-OMe	2	87,4	7,7	5,0
		4	90,8	9,2	0,0
25	Z-Val-Ala-OMe	2	88,9	11,2	0,0
26	Z-Val-Met-OMe	2	71,1	28,1	0,9
		4	72,8	27,3	0,0
27	Z-Val-Lys(Boc)-OMe	2	22,9	7,2	70,0
		4	33,1	12,2	54,7
		75	74,8	24,0	1,3
28	Z-Ala-Phe-OMe	2	91,7	6,7	1,7
		4	92,9	6,7	0,5
29	Z-Ala-Phe-Ala-OMe	2	82,8	8,5	8,8
		4	92,2	6,9	1,0
30	Z-Ala-Phe-Ala-OMe	2	6,0	0,3	93,7
		4	10,8	0,8	88,5
		75	35,4	10,4	54,3

Con la excepción de Z-Val-Tyr-OMe, Z-Val-Lys (Boc)-OMe y Z-Ala-Phe-D-Ala-OMe, todos los sustratos peptídicos se convirtieron cuantitativamente en productos, es decir, el péptido de amida correspondiente y el péptido de ácido carboxílico libre, en un tiempo de reacción de 4 h. En tiempos de reacción mayores, también se convirtieron totalmente los péptidos de éster metílico terminados en Tyr y Lys (Boc). Sorprendentemente, el éster metílico del tripéptido con un resto D-Ala C-terminal se convirtió también. El análisis por HPLC a un tiempo de reacción de 75 h mostró la conversión del 54% a/a de sustrato, produciendo aproximadamente un 36% a/a del producto Z-Ala-Phe-D-Ala-NH<sub>2</sub>.

#### 10 Ejemplos 31 a 45 y Ejemplo Comparativo I

*Procedimiento general para seleccionar el efecto de diferentes sales de amonio*

En un experimento típico, la mezcla de ensayo contenía éster peptídico Z-Ala-Phe-OMe aproximadamente 10 mM y sal de amonio 100 mM en una mezcla de disolvente anhidro de DMF al 17,5% (vol/vol) en Bu'OH en un volumen de reacción total de 5 ml. La mezcla de reacción se termostató a 30°C. La reacción se inició mediante la adición de la enzima (Alcalasa-CLEA: 4 mg/ml de Subtilisina A (de Sigma Aldrich): 1 mg/ml). La reacción se incubó a 30°C durante 21 horas. Se tomaron alícuotas de muestra a las 2 h, 4 h y 21 h y la reacción se detuvo mediante la adición de un volumen igual de acetonitrilo. Las muestras se analizaron por HPLC. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Los resultados para Alcalasa CLEA se muestran en la Tabla 9. Los resultados para subtilisina A se muestran en el Tabla 10.

Tabla 9 (Alcalasa CLEA)

Ej.	Sal de amonio	Tiempo de reacción h	Z-Ala-Phe-NH <sub>2</sub> a/a%	Z-Ala-Phe-OH a/a%	Z-Ala-Phe-OMe a/a%
31	NH <sub>2</sub> COONH <sub>4</sub> Carbamato	2	92,3	7,7	0
		4	92,3	7,7	0
		21	91,4	8,6	0
32	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> Acetato	2	83,4	12,5	4,1
		4	87,2	12,3	0,5

Ej.	Sal de amonio	Tiempo de reacción h	Z-Ala-Phe-NH <sub>2</sub> a/a%	Z-Ala-Phe-OH a/a%	Z-Ala-Phe-OMe a/a%
		21	91,2	8,8	0
33	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Carbonato	2	88,1	11,9	0,0
		4	88,8	11,2	0,0
		21	90,8	9,2	0
34	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> Bicarbonato	2	84,7	14,9	0,4
		4	85,7	14,3	0
		21	88,3	11,7	0
35	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> COONH <sub>4</sub> Benzoato	2	61,1	30,4	8,5
		4	68,7	29,8	1,5
		21	87,7	12,3	0
36	HCOONH <sub>4</sub> 4	2	31,6	19,8	48,5
			41,9	26,6	31,5
		21	69,5	30,5	0
37	NH <sub>4</sub> F Fluoruro	2	26,9	15,1	57,9
		4	41,2	20,5	38,2
		21	71,0	27,0	1,9
38	(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Citrato	2	5,6	47,9	46,4
		4	12,6	61,0	26,4
		21	77,6	22,4	0
39	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O Oxalato monohidrato	2	3,7	48,2	48,1
		4	10,5	62,9	26,6
		21	68,1	31,9	0
40	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> Tartrato	2	6,3	37,7	55,9
		4	17,6	50,8	31,6
		21	68,2	31,8	0
41	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O Sulfito hidrato	2	2,9	6,1	91,0
		4	7,2	12,8	80,0
		21	60,7	39,3	0
I	NH <sub>4</sub> Cl Cloruro	2	6,8	38,8	54,4
		4	14,8	52,9	32,3
		21	68,5	31,5	0

El carbamato de amonio, acetato de amonio, carbonato de amonio, bicarbonato de amonio y benzoato de amonio muestran un rendimiento excelente.

Tabla 10 (Subtilisina A)

Ej.	Fuente de amonio	Tiempo de reacción h	Z-Ala-Phe-NH <sub>2</sub> a/a%	Z-Ala-Phe-OH a/a%	Z-Ala-Phe-OMe a/a%
42	NH <sub>2</sub> COONH <sub>4</sub> Carbamato	2	36,9	4,8	48,4
		4	60,2	8,2	31,6
		21	86,8	12,9	0,3
43	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> Acetato	2	42,4	7,9	49,7
		4	58,6	11,6	29,8
		21	82,1	17,1	0,8
44	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> Bicarbonato	2	27,2	9,8	62,9
		4	46,6	16,1	37,3
		21	76,0	23,7	0,3
45	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Carbonato	2	42,4	7,9	49,7
		4	53,1	12,0	34,9
		21	80,9	8,7	0,4

La Tabla 10 muestra los resultados de la conversión de Z-Ala-Phe-OMe en amida con Subtilisina A, con carbamato de amonio, acetato de amonio, bicarbonato de amonio y carbonato de amonio como fuente de amoniaco. Se obtiene una alta conversión del sustrato después de 21 h de reacción para las sales seleccionadas. El mayor rendimiento (es decir, 86%) de la amida Z-Ala-Phe-NH<sub>2</sub> se obtuvo para el carbamato de amonio en un tiempo de reacción de 21 h. Se obtiene mayor cantidad de producto de la hidrólisis del éster para la Subtilisina A libre en comparación con Alcalasa-CLEA.

#### 10 Ejemplos 46 a 53

*Procedimiento general para seleccionar diferentes sustratos con Subtilisina A y carbamato de amonio*

En un experimento típico, la mezcla de ensayo contenía aproximadamente éster peptídico 10 mM y carbamato de amonio 100 mM en una mezcla de disolvente anhidro de DMF al 17,5% (vol/vol) en Bu<sup>t</sup>OH en un volumen de reacción total de 5 ml. La mezcla de reacción se termostató a 30°C. La reacción se inició mediante la adición de 1 mg/ml de Subtilisina A (de Sigma Aldrich). La reacción se incubó a 30°C durante 21 horas. Se tomaron alícuotas de muestra a las 2 h, 4 h y 21 h y la reacción se detuvo mediante la adición de un volumen igual de acetonitrilo. Las muestras se analizaron por HPLC. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Los resultados se dan en la Tabla 11.

20

Tabla 11

Ej.	Sustrato peptídico	Tiempo de reacción, h	P-NH <sub>2</sub> a/a%	P-OH a/a%	P-OMe a/a%
46	Z-Val-Phe-OMe	2	14,8	5,6	79,6
		4	26,9	10,7	62,4
		21	61,0	29,1	9,9
47	Z-Val-Tyr-OMe	2	5,8	3,0	91,2
		4	11,1	5,6	83,3
		21	29,6	18,3	52,1
48	Z-Val-Leu-OMe	2	14,3	6,9	78,8
		4	25,9	12,1	62,0
		21	58,0	33,7	8,3
49	Z-Val-Thr-OMe	2	18,2	2,3	79,4
		4	34,4	4,5	61,1
		21	76,7	13,7	9,6
50	Z-Val-Ala-OMe	2	50,1	10,0	39,9
		4	70,0	14,4	15,6
		21	82,1	17,9	0,0
51	Z-Val-Met-OMe	2	27,5	7,8	64,7
		4	42,3	15,6	42,2
		21	55,7	44,3	0,0
52	Z-Val-Lys(Boc)-OMe	2	1,6	0,0	98,4
		4	2,9	1,2	95,9
		21	10,5	6,7	82,7
53	Z-Ala-Phe-OMe	2	36,9	4,8	58,4
		4	60,2	8,2	31,6
		21	86,8	12,9	0,3

La especificidad de Alcalasa CLEA para diversos aminoácidos terminales se presenta en los Ejemplos 21 a 30. Aquí, se informa de los resultados obtenidos para el ensayo de la especificidad del sustrato de la subtilisina soluble. Todos los sustratos peptídicos se transformaron en amidas, aunque con menos rendimientos de amida que en el caso de Alcalasa-CLEA. Los mejores sustratos fueron Z-Ala-Phe-OMe (86,8% de amida después de 21 h) y Z-Val-Ala-OMe (82% amida formada después de 21 h), mientras que Z-Val-Lys (Boc)-OMe era el sustrato peor. Se observó una hidrólisis extensiva del éster. Parece que Alcalasa CLEA y Subtilisina A tienen una especificidad por el sustrato ligeramente diferente.

#### Ejemplos 54 a 68

*Procedimiento general para seleccionar diferentes disolventes orgánicos polares*

En un experimento típico, la mezcla de ensayo contenía aproximadamente Z-Ala-Phe-OMe 10 mM y carbamato de amonio 100 mM en una mezcla de disolvente anhidro que contenía el 82,5% de Bu<sup>t</sup>OH o Am<sup>t</sup>OH seco y el 17,5% (vol/vol) de un co-disolvente. El volumen de reacción total era de 5 ml. La mezcla de reacción se termostató a 30°C. La reacción se inició mediante la adición de la enzima (Alcalasa-CLEA: 4 mg/ml o Subtilisina A (Sigma Aldrich): 1 mg/ml). La reacción se incubó a 30°C durante 22 horas. Se tomaron alícuotas de muestra a las 2 h, 4 h y 22 h, y la reacción se detuvo mediante la adición de un volumen igual de acetonitrilo. Las muestras se analizaron por HPLC. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Los resultados para Alcalasa CLEA se muestran en la Tabla 12. Los resultados para subtilisina A se muestran en la Tabla 13.

Tabla 12 (Alcalasa CLEA)

Ej.	Disolvente (82,5:17,5 (% vol/vol))	Tiempo de reacción h	Z-Ala-Phe-NH <sub>2</sub> a/a%	Z-Ala-Phe-OH a/a%	Z-Ala-Phe-OMe a/a%
54	Bu <sup>t</sup> OH/DMF	2	92,0	8,0	0,0
		4	92,1	7,9	0,0
		22	91,3	8,7	0,0
55	Bu <sup>t</sup> OH/NMP	2	90,0	7,6	2,4
		4	91,9	7,8	0,3
		22	91,3	8,7	0,0
56	Bu <sup>t</sup> OH/dioxano	2	88,5	8,2	3,2
		4	91,3	8,2	0,4
		22	92,2	7,8	0,0
57	Bu <sup>t</sup> OH /DMA	2	92,0	7,6	0,5
		4	92,2	7,8	0,0
		22	90,3	9,7	0,0
58	Bu <sup>t</sup> OH /DCM	2	87,1	10,3	2,6
		4	89,1	10,6	0,3
		22	91,7	8,3	0,0
59	Bu <sup>t</sup> OH /THF	2	91,5	7,8	0,7
		4	92,3	7,7	0,0
		22	93,3	6,7	0,0
60	Bu <sup>t</sup> OH /CH <sub>3</sub> CN	2	91,5	8,5	0,0
		4	91,7	8,3	0,0
		22	91,5	8,2	0,0
61	Bu <sup>t</sup> OH /DCE	2	89,7	9,3	1,0
		4	90,4	9,6	0,0
		22	89,0	10,6	0,3
62	Am <sup>t</sup> OH/DMF*	2	78,0	4,4	17,7
		4	89,9	5,5	4,6
		22	94	6	0
63	Am <sup>t</sup> OH/NMP*	2	48,1	2,8	49,0
		4	65,8	4,5	29,7
		22	90,4	8,7	0,9

\* Concentración de Alcalasa CLEA: 1 mg de enzima/ml mezcla de reacción. En todos los demás experimentos, la enzima se usó en una concentración de 4 mg/ml.

Tabla 13 (Subtilisina A)

Ej.	Disolvente (82,5:17,5 (% vol/vol))	Tiempo de reacción h	Z-Ala-Phe-NH <sub>2</sub> a/a%	Z-Ala-Phe-OH a/a%	Z-Ala-Phe-OMe a/a%
64	Bu <sup>t</sup> OH /DMF	2	36,9	4,8	58,4
		4	60,2	8,2	31,6
		21	86,8	12,9	0,3
65	Bu <sup>t</sup> OH /NMP	2	25,1	3,4	71,5
		4	43	6	51
		21	83,3	13,5	3,2
66	Bu <sup>t</sup> OH /dioxano	2	9,9	1,4	88,6
		4	16,3	2,4	81,3
		21	44,6	7,5	47,9
67	Bu <sup>t</sup> OH /THF	2	23,4	3,3	73,3
		4	36	5,2	58,8
		21	70,3	12,1	17,6
68	Am <sup>t</sup> OH/DMF	2	22,2	3,5	74,3
		4	36,9	6,1	57
		21	73,4	21,1	5,4

- La Tabla 12 muestra los resultados obtenidos para la selección de los efectos del disolvente cuando se usa Alcalasa CLEA como catalizador. Después de 2 horas de incubación, en experimentos que contenían mezclas de disolvente de 82,5 Bu<sup>t</sup>OH/17,5 X (% vol/vol), cuando se usaba una alta cantidad de Alcalasa CLEA (es decir, 4 mg de enzima/ml de mezcla de reacción) se obtuvo la conversión de sustrato total para toda la combinación de disolvente usado. La mezcla de reacción contenía más del 87% de amida y el rendimiento de la amida aumentó por encima del 93% a un tiempo de reacción más largo.
- Am<sup>t</sup>OH resulta ser un disolvente excelente para la amidación de ésteres metílicos peptídicos. Cuando las mezclas de Am<sup>t</sup>OH/DMF (82,5/17,5 vol/vol) se usaron como mezcla de disolvente, incluso a una concentración de enzima menor (Alcalasa CLEA añadida a aproximadamente 1 mg de enzima/ml de mezcla de reacción), se obtuvieron altos rendimientos de amida (es decir, aproximadamente un 80% de la amida) después de 2 horas de incubación. A un tiempo de reacción más largo, a una conversión total del sustrato, la mezcla de producto contenía más del 90% de amida. Esto sugiere que Am<sup>t</sup>OH puede reemplazar al Bu<sup>t</sup>OH como co-disolvente principal en la mezcla de reacción, para la amidación enzimática de ésteres metílicos de péptidos.

Se obtuvieron tendencias similares cuando se usó Subtilisina A (Tabla 13). Sin embargo, la Subtilisina A da menor rendimiento que Alcalasa CLEA en la síntesis de amida. Se obtiene aproximadamente un 85% de amida después de 21 horas en 82,5 Bu<sup>t</sup>OH/17,5 DMF (% vol/vol). Generalmente, la cantidad de péptido libre resultante de la hidrólisis del éster es mayor, aproximadamente 12-15%. Las mezclas de disolvente binarias que contenían 82,5% de Bu<sup>t</sup>OH o Am<sup>t</sup>OH en combinación con 17,5% de cualquiera de DMF y NMP parecían ser las mejores mezclas de disolvente para Subtilisina A en la síntesis de amida.

### 25 Ejemplos 69 a 82

Puesto que Am<sup>t</sup>OH parecía ser un co-disolvente muy bueno, en combinación con DMF y NMP, para la reacción de amidación enzimática, como se muestra en los Ejemplos 55 a 69, estas mezclas de disolventes se ensayaron con el mismo procedimiento para algunas reacciones modelo con Alcalasa CLEA y Subtilisina A, para diferentes sustratos peptídicos y sales de amonio, respectivamente. Los resultados se dan en la Tabla 14 para Alcalasa CLEA (1 mg/ml) y en la Tabla 15 para Subtilisina A (0,2 mg/ml). La conclusión de estos experimentos es que Am<sup>t</sup>OH puede usarse para reemplazar al Bu<sup>t</sup>OH como codisolvente.

Tabla 14 (Alcalasa CLEA)

Ej.	Tiempo de reacción, h	Sal de Amonio	Sustrato Peptídico	Composición de la mezcla de reacción			
				Disolvente (82,5: 17,5)	% P-NH <sub>2</sub>	% P-OH	% P-OMe
69	2	NH <sub>2</sub> COONH <sub>4</sub>	Z-Ala-Phe-OMe	Am <sup>1</sup> OH/DMF	78,0	4,4	17,7
	4				89,9	5,5	4,6
	21				94,0	6,0	0,0
70	2	NH <sub>2</sub> COONH <sub>4</sub>	Z-Val-Thr-OMe	Am <sup>1</sup> OH/DMF	47,9	2,8	49,3
	4				64,8	4,6	30,6
	21				80,3	14,6	5,1
71	2	NH <sub>2</sub> COONH <sub>4</sub>	Z-Val-Ala-OMe	Am <sup>1</sup> OH/DMF	78,5	8,6	12,9
	4				86,2	9,9	4,0
	21				87,6	10,6	1,8
72	2	NH <sub>2</sub> COONH <sub>4</sub>	Z-Ala-Phe-OMe	Am <sup>1</sup> OH/NMP	48,1	2,8	49,0
	4				65,8	4,5	29,7
	21				90,4	8,7	0,9
73	2	NH <sub>2</sub> COONH <sub>4</sub>	Z-Val-Thr-OMe	Am <sup>1</sup> OH/NMP	39,4	2,0	58,5
	4				57,1	3,7	39,3
	21				85,7	10,4	3,9
74	2	NH <sub>2</sub> COONH <sub>4</sub>	Z-Val-Ala-OMe	Am <sup>1</sup> OH/NMP	60,1	7,7	32,2
	4				74,7	10,3	14,9
	21				85,3	13,1	1,6
75	2	NH <sub>2</sub> COONH <sub>4</sub>	Z-Ala-Phe-OMe	Am <sup>1</sup> OH/DMF	78	4,4	17,7
	4				89,9	5,5	4,6
	21				94	6	0
76	2	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Z-Ala-Phe-OMe	Am <sup>1</sup> OH/DMF	68,7	6,1	25,2
	4				83,5	8,1	8,3
	21				90,9	9,1	0
77	2	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	Z-Ala-Phe-OMe	Am <sup>1</sup> OH/DMF	39	2,6	58,4
	4				52,8	3,9	43,3

Ej.	Tiempo de reacción, h	Sal de Amonio	Sustrato Peptídico	Composición de la mezcla de reacción			
				Disolvente (82,5: 17,5)	% P-NH <sub>2</sub>	% P-OH	% P-OMe
	21				86	9,9	4,1

Tabla 15 (Subtilisina A)

Ej.	Tiempo de reacción h	Sal de Amonio	Sustrato Peptídico	Composición de la mezcla de reacción			
				Disolvente (82,5: 17,5)	%P-NH <sub>2</sub>	% P-OH	% P-OMe
78	2	NH <sub>2</sub> COONH <sub>4</sub>	Z-Val-Thr-OMe	Am <sup>t</sup> OH/DMF	10,9	1,9	87,3
	4				21,2	3,4	75,4
	21				57,0	16,5	26,5
79	2	NH <sub>2</sub> COONH <sub>4</sub>	Z-Val-Ala-OMe	Am <sup>t</sup> OH/DMF	31,0	8,7	60,3
	4				49,7	14,1	36,2
	21				73,6	24,2	2,2
80	2	NH <sub>2</sub> COONH <sub>4</sub>	Z-Ala Phe-OMe	Am <sup>t</sup> OH/DMF	22,2	3,5	74,3
	4				36,9	6,1	57,0
	21				73,4	21,1	5,4
81	2	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Z-Ala Phe-OMe	Am <sup>t</sup> OH/DMF	24,9	6,5	68,6
	4				32,0	9,2	58,8
	21				69,1	26,5	4,4
82	2	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	Z-Ala Phe-OMe	Am <sup>t</sup> OH/DMF	30,3	5,8	63,9
	4				45,2	9,7	45,1
	21				73,7	21,0	5,3

**Ejemplos 83 a 91**5 **Optimización de la cantidad de Alcalasa CLEA en la mezcla de reacción**

Experimentos previos habían mostrado que Alcalasa CLEA era muy eficaz en la síntesis de amida. Los experimentos se realizaron para determinar la menor concentración de enzima que puede usarse en la reacción, para obtener un alto rendimiento de producto en un tiempo de reacción razonable.

10 En un experimento típico, la mezcla de ensayo contenía aproximadamente sustrato peptídico 10 mM y carbamato de amonio 100 mM en una mezcla de disolvente anhidro de 82,5% de Bu<sup>t</sup>OH y 17,5% (vol/vol) de DMF, en un volumen de reacción total de 5 ml. La mezcla de reacción se termostató a 30°C. La reacción se inició mediante la adición de la enzima (Alcalasa-CLEA: 0,2 mg/ml, 1 mg/ml y 2 mg/ml, respectivamente). La reacción se incubó a 30°C durante 15 horas. Se tomaron alícuotas de muestra a las 2 h, 4 h y 21 h y la reacción se detuvo mediante la adición de un volumen igual de acetonitrilo. Las muestras se analizaron por HPLC. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16.

Ej.	Tiempo de reacción, h	Concentración de enzima, mg/ml	% P-NH <sub>2</sub>	% P-OH	% P-OMe
<u>Z-Ala-Phe-OMe</u>					
83	2	0,2	33,5	1,2	65,3
	4	0,2	51,7	2,4	45,9
	21	0,2	85	6,4	8,6
84	2	1	80,4	3,4	16,2
	4	1	92,3	4,2	3,5
	21	1	95,1	4,9	0
85	2	2	91,1	5,4	3,6
	4	2	94,5	5,5	0
	21	2	94	6	0
<u>Z-Val-Phe-OMe</u>					
86	2	0,2	14,5	1,3	84,1
	4	0,2	24,2	2,5	73,3
	21	0,2	55,7	11,4	32,9
87	2	1	49,8	5,2	44,9
	4	1	67,8	7,6	24,6
	21	1	87,8	11,8	0,4
88	2	2	69,5	9,7	20,8
	4	2	81,7	11,7	6,6
	21	2	88,4	11,6	0,0
<u>Z-Val-Thr-OMe</u>					
89	2	0,2	56,7	2,6	40,7
	4	0,2	76,4	3,9	19,7
	21	0,2	93,5	6,5	0,0
90	2	1,2	76,4	3,9	19,7
	4	1,2	76,4	3,9	19,7
	21	1,2	93,5	6,5	0,0
91	2	2	68,8	4,2	27,0
	4	2	84,1	5,8	10,0
	21	2	90,3	9,7	0,0

5 Puede verse que a una concentración de Alcalasa CLEA de 1 mg/ml de mezcla de reacción, se obtiene una conversión del 95% del sustrato Z-Ala-Phe-OMe después de 4 horas de incubación. La mezcla de producto contenía un 92% de amida y sólo un 3,5% del producto secundario de la hidrólisis del éster. Se obtuvieron altos rendimientos

de amida para otros sustratos peptídicos, para esta concentración de enzima baja, aunque a mayores tiempos de reacción. Sin embargo, estos resultados muestran que la concentración de enzima, es decir, Alcalasa CLEA, puede reducirse significativamente, haciendo de esta manera que el proceso sea más económico.

### 5 Ejemplo 92

#### *Amidación de Boc-Pro-Pro-Ala-Phe-Ala-OMe*

10 En un experimento típico, la mezcla de ensayo contenía aproximadamente sustrato peptídico 10 mM y carbamato de amonio 100 mM en una mezcla de disolvente anhidro de 82,5% de Bu<sup>t</sup>OH y 17,5% (vol/vol) de DMF, en un volumen de reacción total de 5 ml. La mezcla de reacción se termostató a 30°C. La reacción se inició mediante la adición de 4 mg/ml de Alcalasa CLEA. La reacción se incubó a 30°C durante 21 horas. Se tomaron alícuotas de muestra a las 2 h, 4 h y 21 h y la reacción se detuvo mediante la adición de un volumen igual de acetonitrilo. Las muestras se analizaron por HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

15

Tabla 17

Ej.	Tiempo de reacción, h	% P-NH <sub>2</sub>	% P-OH	% P-OMe
92	2	42,15	0,3	57,55
	4	60,73	0,55	38,72
	21	99,21	-	0,79

### Ejemplo 93

#### *Amidación enzimática de Z-Ala-Phe-OH*

20 En un experimento típico, la mezcla de ensayo que contenía aproximadamente sustrato peptídico 10 mM con un ácido libre C-terminal y carbamato de amonio 100 mM en una mezcla de disolvente anhidro de 82,5% de Bu<sup>t</sup>OH y 17,5% (vol/vol) de DMF, en un volumen de reacción total de 5 ml. La mezcla de reacción se termostató a 30°C. La reacción se inició mediante la adición de 4 mg/ml de Alcalasa CLEA. La reacción se incubó a 30°C durante 21 horas. Se tomaron alícuotas de muestra a las 2 h, 4 h y 21 h y la reacción se detuvo mediante la adición de un volumen igual de acetonitrilo. Las muestras se analizaron por HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 18.

25

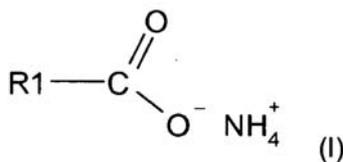
Tabla 18

Ej.	Tiempo de Reacción, h	Z-Ala-Phe-NH <sub>2</sub> a/a%	Z-Ala-Phe-OH a/a%
93	2	29,14	70,86
	4	34,43	65,57
	21	69,86	30,14

30 Puede concluirse, a partir de estos experimentos, que el ácido libre C-terminal de un sustrato peptídico puede amidarse también mediante carbamato de amonio en presencia de Alcalasa CLEA.

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la amidación de ésteres o ácidos C-terminales de sustratos peptídicos, en la síntesis en fase solución de péptidos, que comprende amidar uno o más sustratos peptídicos, que comprenden ésteres o ácidos C-terminales, usando la proteasa subtilisina en cualquier forma adecuada en presencia de una o más sales de amonio derivadas de un ácido que tiene un pKa por encima de 0.
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los ésteres C-terminales de sustratos peptídicos están amidados.
3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los ésteres de los ésteres C-terminales del sustrato peptídico se seleccionan entre el grupo de ésteres de (ar)alquilo C<sub>1-12</sub>.
4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que los ésteres de los ésteres C-terminales del sustrato peptídico se seleccionan entre el grupo de ésteres de (ar)alquilo C<sub>1-12</sub> primarios.
5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que los ésteres de los ésteres C-terminales del sustrato peptídico se seleccionan entre el grupo de ésteres de alquilo C<sub>1-4</sub> primarios.
6. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el éster del éster C-terminal del sustrato peptídico es el éster metílico C-terminal.
7. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sal de amonio se deriva de un ácido que tiene un pKa por encima de 3,5.
8. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la sal de amonio tiene la siguiente estructura química (I):



en la que

- R1 se selecciona entre el grupo de hidrógeno, (ar)alquilo C<sub>1-12</sub>, arilo C<sub>6-12</sub>, -N(R2)<sub>2</sub>, -OH y R3-O<sup>-</sup> NH<sub>4</sub><sup>+</sup>,  
 R2 se selecciona entre el grupo de hidrógeno y/o alquilo C<sub>1-4</sub> y,  
 R3 es un enlace, un grupo carbonilo, o un grupo alquil C<sub>1-4</sub> carbonilo, sustituido opcionalmente con uno o más grupos hidroxilo y/o -COO<sup>-</sup> NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.
- opcionalmente en forma hidratada.
9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que R1 se selecciona entre el grupo de (ar)alquilo C<sub>1-12</sub>, arilo C<sub>6-12</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OH y -O<sup>-</sup> NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.
10. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la sal de amonio se selecciona entre carbamato de amonio, carbonato de amonio, bicarbonato de amonio, acetato de amonio, benzoato de amonio y mezclas de los mismos.
11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la sal de amonio es carbamato de amonio.
12. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proporción molar de sal de amonio a sustrato peptídico varía de 2:1 a 20:1.
13. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sustrato peptídico que comprende el éster o ácido C-terminal comprende un resto acilo C-terminal, que es un resto α-amino acilo de origen natural o sintético.
14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el resto α-amino acilo se selecciona entre Ala, Cys protegido, Asp protegido, Glu protegido, Phe, Gly, His, Lys (protegido), Leu, Met, Asn, Gln, Arg (protegido), Ser (protegido), Thr, Val, Trp (protegido) y Tyr (protegido).
15. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sustrato peptídico se prepara de acuerdo con un proceso para la síntesis en solución rápida de un péptido en un disolvente orgánico, o

una mezcla de disolventes orgánicos, comprendiendo el proceso ciclos repetitivos de las etapas (a)-(d):

- a) una etapa de acoplamiento, usando un exceso de un componente carboxílico activado para acilar un componente amino,  
 b) una etapa de inactivación en la que se usa un aceptor para retirar las funciones carboxílicos activadas residuales, en el que el aceptor puede usarse también para la desprotección del péptido en crecimiento,  
 c) una o más extracciones acuosas y

opcionalmente, (d) una etapa de desprotección diferente, seguida de una o más extracciones acuosas, con lo que en al menos un ciclo en la etapa de proceso b se usa una amina que comprende un anión libre, o un anión latente, como aceptor de las funciones carboxílicas activadas residuales.

16. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteasa subtilisina es de la familia EC 3.4.21.62.

17. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteasa subtilisina es subtilisina libre.

18. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteasa subtilisina es un agregado de enzimas reticuladas (CLEA) de subtilisina.

19. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se usa un disolvente orgánico.

20. El proceso de la reivindicación 19, en el que el disolvente orgánico se selecciona entre *N,N*-dimetilformamida (DMF), *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), dioxano, *N,N*-dimetilacetamida (DMA), diclorometano (DCM), tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo, *terc*-butanol, alcohol *terc*-amílico, dicloroetano (DCE), *terc*-butil metil éter (MTBE) y mezclas de los mismos.

21. El proceso de la reivindicación 20, en el que el disolvente orgánico es una mezcla de *terc*-butanol y DMF, *terc*-butanol y NMP, alcohol *terc*-amílico y DMF o alcohol *terc*-amílico y NMP.

22. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 19 a 21, en el que el agua está presente en el disolvente orgánico que varía del 0,0001 al 5% (v/v).

23. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pH al que se realiza la reacción se selecciona en el intervalo de 5,5-10.

24. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la temperatura de reacción para la amidación es 15-60°C.

25. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de enzima varía del 1 al 50% en peso, relacionado con el sustrato peptídico.

26. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la amidación se realiza mediante la adición por etapas de porciones de la proteasa subtilisina (en cualquier forma adecuada) a la mezcla de reacción que comprende uno o más sustratos peptídicos que comprenden ésteres o ácidos C-terminales.

27. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la amidación se realiza mediante la adición por etapas de porciones de la sal de amonio a la mezcla de reacción que comprende uno o más sustratos peptídicos que comprenden ésteres o ácidos C-terminales.