



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 733**

51 Int. Cl.:  
**C07K 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04739972 .0**

96 Fecha de presentación : **17.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1644401**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.04.2006**

54 Título: **Procedimiento mejorado para la síntesis en fase soportada.**

30 Prioridad: **04.07.2003 EP 03015188**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.07.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.07.2011**

73 Titular/es: **LONZA AG.**  
**Münchensteinerstrasse 38**  
**4052 Basel, CH**

72 Inventor/es: **Cool, Vincent;**  
**Forni, Luciano;**  
**Monnaie, Didier y**  
**Ronvaux, Alain**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 362 733 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).

## DESCRIPCION

Procedimiento mejorado para la síntesis en fase soportada

La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para la síntesis en fase soportada.

5 En la síntesis en fase sólida (SPS), también llamada síntesis en fase soportada, se ensambla un oligómero sobre un soporte uniéndose de manera secuencial monómeros adecuadamente protegidos u otros oligómeros. Esto se efectúa mediante etapas secuenciales de acoplamiento y desprotección, eventualmente separadas por ciclos de lavado.

10 El monómero es un bloque de construcción de la molécula a ensamblar sobre el soporte. Por ejemplo, pero no de forma limitativa, el monómero es un aminoácido adecuadamente protegido, un nucleótido adecuadamente protegido, un ácido nucleico peptídico adecuadamente protegido, un sacárido adecuadamente protegido o cualquier estructura estrechamente modificada de la misma familia.

El oligómero es una estructura producida ensamblando al menos dos o más de los monómeros de una misma familia o una combinación de los mismos. La definición de oligómero comprende bio-oligómeros, los cuales incluyen, pero no de forma limitativa, péptidos, oligonucleótidos (DNA, RNA), oligosacáridos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o una combinación de los mismos. El oligómero puede ser lineal o ramificado.

15 El soporte es un producto al cual se une el oligómero o primer monómero. Esto permite un lavado a fondo, a realizar cuando el oligómero unido al soporte se encuentra en el estado sólido. Ejemplos de soportes son perlas de poliestireno, zeolitas, perlas de vidrio de poros controlados, celulosa, resinas PEG o poliamida, sin que esto suponga limitación alguna. Otro ejemplo de un soporte útil es un polímero que puede existir en un estado soluble y que puede ser precipitado por adición de un disolvente adecuado con el fin de permitir que tenga lugar un lavado a fondo.

20 El soporte sobre el cual se efectúa la síntesis en fase sólida está funcionalizado por un espaciador ("linker").

Un ejemplo preferido de un soporte es una resina de poliestireno-1% divinilbenceno que con frecuencia se utiliza en la síntesis de péptidos en fase sólida.

25 El término "unión o enganche" significa generalmente la formación de un enlace covalente y se emplea para enlaces covalentes entre cualquiera de los siguientes: puede ser el enlace covalente entre el primer monómero y el soporte, en donde este enlace se forma por medio de un linker, o bien el enlace formado entre cualquiera de los monómeros en el oligómero. El enlace entre el primer monómero y el soporte, que se forma por vía de un linker, y el enlace entre monómeros en el oligómero, puede hacer uso de cualquier funcionalidad del monómero, por ejemplo grupos funcionales en su espina dorsal o cadena lateral. En la síntesis de péptidos en fase sólida, el primer aminoácido puede ser unido al soporte por vía de linkers de tipo bencílico. El linker es una estructura molecular adecuada que se une covalentemente al soporte y que liberará el oligómero diana bajo condiciones químicas adecuadas. Con frecuencia se emplean linkers de tipo bencílico tales como éster bencílico o éster monoalcoxilbencílico; sin embargo, también pueden ser considerados otros linkers. Los linkers de tipo bencílico liberan el oligómero diana bajo condiciones acidolíticas.

35 Por la expresión "lavado a fondo" se entiende cualquier método técnico que eliminará los subproductos o reactivos residuales de la etapa previa, por ejemplo, reactivos de acoplamiento o de desprotección. El lavado a fondo se puede efectuar de forma discontinua o según un procedimiento continuo. Ejemplos de un procedimiento continuo son el lavado a fondo del soporte con un disolvente en una columna o la eliminación de subproductos o reactivos a través de medios físicos tal como centrifugado.

40 En la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS), el péptido se ensambla sobre una perla de poliestireno como soporte. La construcción de una cadena péptida sobre un soporte en lugar de la síntesis en solución presenta ventajas evidentes: la separación de los péptidos intermedios de los reactivos solubles y disolventes se puede efectuar simplemente por filtración y lavado con los consecuentes ahorros de tiempo y trabajo respecto a las correspondientes operaciones en la síntesis en solución.

45 Los principios generales de la síntesis de péptidos en fase sólida son como sigue (véase Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach, de W.C. Chan y P.D. White, Oxford University Press, 2000, p. 41-76; Solid Phase Synthesis, A Practical Guide, de Steven A. Kates y Fernando Albericio, Marcel Dekker Inc., 2000, p. 275-330; Solid-Phase Peptide Synthesis, de Gregg B. Fields, Academic Press, 1997, páginas 3-83): generalmente, el residuo C-terminal del péptido diana se une a un soporte. También se pueden emplear las cadenas laterales de los aminoácidos para efectuar la unión al linker. La mayoría de, o preferentemente la totalidad de los grupos funcionales en las cadenas laterales de los aminoácidos, deben enmascarse con grupos protectores permanentes que no son afectados por las condiciones de reacción empleadas durante el ensamblaje de la cadena péptida. El grupo  $\alpha$ -aminoácido de cada aminoácido que ha de acoplarse, se protege temporalmente. Después de la unión inicial del primer aminoácido, se separa el grupo protector temporal que enmascara al grupo  $\alpha$ -amino. A continuación, se efectúan lavados. Se introduce entonces un exceso del segundo aminoácido, estando activado el grupo carboxi de este aminoácido para la formación de enlaces amida mediante reacción con un reactivo de acoplamiento. Después  
55 de este acoplamiento, se separan los reactivos en exceso mediante lavado. A continuación, se separa el grupo

protector del terminal N del dipéptido. Tiene lugar otro lavado a fondo antes de la adición del tercer residuo de aminoácido. Este procedimiento se repite hasta que se ensambla la secuencia péptida deseada. En una etapa final, el péptido se libera del soporte.

5 Se requieren lavados extensivos después de cada etapa de acoplamiento y después de cada escisión de un grupo protector de  $\alpha$ -amino, es decir, después de cada etapa de N-desprotección, con el fin de eliminar entidades químicas perjudiciales que de otro modo conducirían a errores en la secuencia en el péptido final. En particular, si todavía está presente un aminoácido activado durante la etapa de N-desprotección debido a que el lavado después del acoplamiento no ha sido efectuado adecuadamente, tendrá lugar un acoplamiento indeseado con este aminoácido y conducirá a impurezas correspondientes a la doble adición del mismo aminoácido en la secuencia péptida.

10 Similarmente, en ciertos casos, si el lavado después de la N-desprotección y antes de la adición de un nuevo aminoácido no se efectúa adecuadamente, los reactivos de escisión permanecerán en la solución y conducirán a una doble adición de aminoácido durante la siguiente etapa de acoplamiento.

15 Para evitar estas secuencias de doble adición en los procedimientos clásicos, se necesitan de 6 a 10 lavados aproximadamente después de cada acoplamiento y se necesitan otros 6 a 10 lavados después de cada etapa de N-desprotección. Esto significa que para cada aminoácido se necesitan de 12 a 20 lavados aproximadamente en un procedimiento clásico, empleando cada uno de ellos aproximadamente 10 ml de disolvente por gramo de soporte seco sin cargar (véase Peptide Synthesis Protocols, de Michael W. Pennington y Ben M. Dunn, vol. 35, Humana Press, Capítulo 1, Párrafo 3.2.1; y Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach, de W.C. Chan y P.D. White, Oxford University Press, 2000, Tabla 2 en página 15 en combinación con p. 43). La reducción del número de etapas de lavado y de la cantidad de disolvente necesario en cada etapa de lavado individual constituiría un importante progreso en términos de ahorro de disolvente y tiempo.

20

25 Esto es aplicable no solo a las síntesis de péptidos en fase sólida sino análogamente a cualquier procedimiento de síntesis en donde se ensambla un polímero sobre un soporte. En Chem Files, Green Chemistry de Fluka, vol. 1, no. 7, 2001, páginas 1-18 se describe el uso y ventajas de sales de amonio cuaternario, líquidos iónicos, sales de fosfonio o sales de sulfonio como reactivos en catálisis de transferencia de fases y en otras reacciones químicas. Spatola A. F. et al., "Phase transfer catalysis in solid phase peptide synthesis" Int. J. Peptide Protein Res., 40 1992, 322-332 y Chen S-T. et al. "Phase-transfer Reagents as C-Terminal Protecting Groups" J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1990, 1045-1047 describen el uso de catálisis de transferencia de fases en conjunción con síntesis de péptidos en fase sólida. Chan W.C. et al., "Fmoc solid phase peptide synthesis. A Practical Approach", 2000, Oxford University Press describen métodos de acoplamiento empleados en la síntesis de péptidos en fase sólida. Coste J. et al., "Coupling N-methylated amino acids using PyBroP and PyCloP halogenophosphonium salts: Mechanism and fields of application", J. Org. Chem. 1994, 59, 2437-2446 describen el uso de sales de halofosfonio como reactivos de acoplamiento de péptidos. Varanda L.M. et al., "Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures", J. Peptide Res. 50. 1997, 102-108 describen síntesis de péptidos en fase sólida a temperaturas elevadas.

30

35 Por lo tanto, el problema a solucionar por la presente invención consistió en proporcionar un procedimiento mejorado que reduce en gran medida la cantidad total de disolvente y el tiempo del procedimiento, en comparación con el procedimiento del estado de la técnica.

40 Se ha encontrado ahora que la adición de sales durante la síntesis en fase soportada mejora de manera importante la deficiencia del lavado. Incluso es posible efectuar el procedimiento sin llevar a cabo ningún lavado entre las etapas de acoplamiento y de desprotección. La invención proporciona un procedimiento para la síntesis en fase sólida de péptidos, caracterizado porque al menos una de las etapas de lavado se efectúa en presencia de una sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$ , en donde X representa un catión, n representa la carga del catión, Y representa un anión y m representa la carga del anión, y en donde dicha sal se elige del grupo consistente en sales de amonio cuaternario, líquidos iónicos, sales de fosfonio, sales catiónicas inorgánicas, sales de sulfonio, sales inorgánicas o cualquier mezcla de las mismas.

45

En un aspecto preferido, la invención proporciona un procedimiento para unir un aminoácido o péptido protegido en el grupo  $\alpha$ -amino que tiene un terminal C sin proteger a otro aminoácido o péptido que está protegido por un grupo protector de  $\alpha$ -amino y que se une a un soporte durante la síntesis de péptidos en fase sólida, que comprende las siguientes etapas:

- 50 a) escindir el grupo protector de  $\alpha$ -amino del aminoácido o péptido unido al soporte;
- b) efectuar un lavado a fondo;
- c) añadir un aminoácido o péptido protegido en  $\alpha$ -amino que tiene un terminal C sin proteger y acoplarlo al aminoácido o péptido que está unido al soporte y que ahora tiene un terminal N sin proteger, para formar un enlace amida; y
- 55 d) efectuar otro lavado a fondo;

caracterizado porque al menos en la etapa b) se añade una sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$ , que es soluble en un disolvente empleado en esta etapa, en donde X representa un catión, n representa la carga del catión, Y representa un anión y

m representa la carga del anión, y en donde dicha sal se elige del grupo consistente en sales de amonio cuaternario, líquidos iónicos, sales de fosfonio, sales catiónicas inorgánicas, sales de sulfonio, sales inorgánicas o cualquier mezcla de las mismas.

5 La etapa a) se conoce como etapa de desprotección y la etapa c) se conoce como etapa de acoplamiento en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Es importante que el aminoácido o péptido que se añade en la etapa c) de acuerdo con la invención esté protegido en su terminal amino pero que tenga un terminal C sin proteger.

10 El término péptido tal como se emplea en esta invención abarca péptidos de cualquier longitud, incluyendo oligopéptidos cortostales como dipéptidos o tripéptidos. En  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$  X representa un catión, n representa la carga del catión, Y representa un anión y m representa la carga del anión.

15 Se puede emplear cualquier sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$  que tenga al menos 0,01% en peso de solubilidad en el disolvente.  $X^{n+}$  puede ser cualquier catión, pero preferentemente es amonio, fosfonio o sulfonio.  $Y^{m-}$  puede ser cualquier anión pero preferentemente es fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, hidróxido, carbonato o hidrogenocarbonato. Se pueden emplear sales en donde  $Y^{m-}$  se elige entre nitrato, fosfato, hidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, tetrafluorborato, hexafluorofosfato, acetato, carboxilatos, cianuros, isocianatos, tetraalquilboratos, tetraarilborato, trifluoroacetato, tosilato o mesilato. Preferentemente, la sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$  se elige del grupo consistente en sales de amonio cuaternario, líquidos iónicos, sales de fosfonio, sales catiónicas inorgánicas o sales de sulfonio. La presente invención abarca también cualquier mezcla de estas sales.

20 Se consigue una eficiencia de lavado particularmente mejorada cuando la sal de amonio cuaternario se elige entre hidróxido de benciltrimetilamonio (hidróxido BTMA), cloruro de benciltrimetilamonio (cloruro BTMA), carbonato de benciltrimetilamonio (carbonato BTMA); la sal de fosfonio es bromuro de tetrabutilfosfonio; y la sal disulfonio es tetrafluorborato de trietilsulfonio. Cualquier mezcla de estas sales queda también abarcada por esta invención.

25 La sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$  se emplea habitualmente en una concentración de 1 a 2% en peso en volumen de disolvente en el lavado a fondo. La concentración se puede disminuir a 0,1% en peso o incrementar hasta su límite de solubilidad en el disolvente usado.

30 Por la adición de la sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$  también en el lavado a fondo después de la escisión del grupo protector de  $\alpha$ -amino, o en la etapa de acoplamiento de un aminoácido protegido en  $\alpha$ -amino al péptido sobre el soporte o en el lavado a fondo después de este acoplamiento, se puede incluso mejorar aún más la eficiencia del lavado. Por tanto, es preferible añadir la sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$  no solo en la etapa a) sino además en cualquiera o más de las otras etapas b), c) o d).

Es preferible añadir la sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$  no solo en la etapa b), sino además en cualquiera o más de las otras etapas a), c) o d).

35 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un procedimiento para unir un aminoácido o péptido protegido en el grupo  $\alpha$ -amino que tiene un terminal C sin proteger a otro aminoácido o péptido que está protegido por un grupo protector de  $\alpha$ -amino y que se une a un soporte durante la síntesis de péptidos en fase sólida, que comprende las siguientes etapas:

a) escindir el grupo protector de  $\alpha$ -amino del aminoácido o péptido unido al soporte;

b) efectuar un lavado a fondo;

40 c) añadir un aminoácido o péptido protegido en  $\alpha$ -amino que tiene un terminal C sin proteger y acoplarlo al aminoácido o péptido que está unido al soporte y que ahora tiene un terminal N sin proteger, para formar un enlace amida; y

d) efectuar otro lavado a fondo;

45 caracterizado porque al menos en la etapa c) se añade una sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$ , que es soluble en un disolvente empleado en esta etapa, en donde X representa un catión, n representa la carga del catión, Y representa un anión y m representa la carga del anión, y en donde dicha sal se elige del grupo consistente en sales de amonio cuaternario, líquidos iónicos, sales de fosfonio, sales catiónicas inorgánicas, sales de sulfonio, sales inorgánicas o cualquier mezcla de las mismas.

Es preferible añadir la sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$  no solo en la etapa c), sino además en cualquiera o más de las otras etapas a), b) o d).

50 En otro aspecto preferido, la invención proporciona un procedimiento para unir un aminoácido o péptido protegido en el grupo  $\alpha$ -amino que tiene un terminal C sin proteger a otro aminoácido o péptido que está protegido por un grupo protector de  $\alpha$ -amino y que se une a un soporte durante la síntesis de péptidos en fase sólida, que comprende las siguientes etapas:

a) escindir el grupo protector de  $\alpha$ -amino del aminoácido o péptido unido al soporte;

b) efectuar un lavado a fondo;

c) añadir un aminoácido o péptido protegido en  $\alpha$ -amino que tiene un terminal C sin proteger y acoplarlo al aminoácido o péptido que está unido al soporte y que ahora tiene un terminal N sin proteger, para formar un enlace amida; y

d) efectuar otro lavado a fondo;

caracterizado porque al menos en la etapa d) se añade una sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$ , que es soluble en un disolvente empleado en esta etapa, en donde X representa un catión, n representa la carga del catión, Y representa un anión y m representa la carga del anión, y en donde dicha sal se elige del grupo consistente en sales de amonio cuaternario, líquidos iónicos, sales de fosfonio, sales catiónicas inorgánicas, sales de sulfonio, sales inorgánicas o cualquier mezcla de las mismas.

Es preferible añadir la sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$  no solo en la etapa d), sino además en una cualquiera o más de las otras etapas a), b) o c).

Se puede elegir una amplia variedad de disolventes para todas las etapas del procedimiento. Con preferencia, el disolvente se elige entre DMF (N,N-dimetilformamida), NMP (N-metilpirrolididona), DCM (diclorometano), ACN (acetonitrilo), ésteres de ácido acético, acetona, dioxano, éteres de glimas, carbonatos de alquilo inferior, DMSO (dimetilsulfóxido), DME (dimetoxietiléter), DMEU (1,3-dimetil-2-imidazolidinona), DMPU (1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2(1H)-pirimidinona), 1,2-dicloroetano, isopropanol, terc-butanol, metiletilcetona, formamida, sulfolano,  $CHCl_3$ ,  $CCl_4$ , THF (tetrahidrofurano), DMA (N,N-dimetilacetamida), fluidos supercríticos, líquidos iónicos, agua o cualquier mezcla de estos disolventes. Con suma preferencia, el disolvente es N,N-dimetilformamida, N-metilpirrolididona o una mezcla de las mismas.

De acuerdo con la invención, el lavado a fondo b) que tiene lugar después de la escisión del grupo protector de  $\alpha$ -amino del péptido comprende preferentemente no más de 8, con suma preferencia no más de 5 etapas de lavado. Esto constituye una mejora considerable respecto al procedimiento de síntesis de péptidos en fase sólida del estado de la técnica en donde se necesitan aproximadamente 10 lavados con el fin de separar los reactivos de escisión adecuadamente y evitar secuencias de doble adición.

El lavado a fondo d) de acuerdo con la invención, que puede tener lugar después del acoplamiento de un aminoácido protegido en  $\alpha$ -amino, comprende preferentemente no más de 5 etapas de lavado y con suma preferencia no más de 2 etapas de lavado, o bien pueden omitirse por completo. Esto constituye de nuevo una mejora considerable respecto al procedimiento de síntesis de péptidos en fase sólida del estado de la técnica en donde se necesitan de 6 a 10 lavados con el fin de separar adecuadamente el exceso de aminoácido y evitar secuencias de doble adición.

El volumen de disolvente usado en cada etapa de lavado individual de acuerdo con la invención es de alrededor de 1 a 9 ml/g de soporte seco, en comparación con aproximadamente 10 ml de disolvente/g de soporte seco sin cargar según el enfoque del estado de la técnica.

El término soporte seco significa que el soporte se encuentra en su estado seco antes de añadir cualquier disolvente al mismo.

En general, cada etapa de lavado dura normalmente 2 minutos aproximadamente y se puede reducir a 1 minuto aproximadamente cada una de ellas. El tiempo de lavado individual se puede incrementar hasta 60 minutos y más. El lavado a fondo también puede ser efectuado según un modo de flujo continuo en lugar de etapas de lavado individuales; en ese caso, debe adaptarse la velocidad de flujo. El procedimiento como el descrito anteriormente se puede efectuar a una temperatura entre 0 y 50° C, con preferencia entre 0 y 35° C y con suma preferencia entre 18 y 22° C. El procedimiento se efectúa normalmente bajo presión atmosférica pero también es aplicable bajo una presión mayor o menor.

En la etapa de acoplamiento c) se puede añadir cualquier agente de acoplamiento bien conocido tales como DIC (1,3-diisopropilcarbodiimida), DCC (1,3-diciclohexilcarbodiimida), EDC (hidrocloruro de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio) o HBTU (tetrafluorborato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio). De acuerdo con esta invención, es preferible utilizar DIC.

Los grupos protectores de  $\alpha$ -amino adecuados para la síntesis de péptidos en fase sólida son bien conocidos en la técnica (véase Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach, de W.C. Chan y P.D. White, Oxford University Press, 2000; Solid Phase Synthesis, A Practical Guide, de Steven A. Kates y Fernando Albericio, Marcel Dekker Inc., 2000; Solid-Phase Peptide Synthesis, de Gregg B. Fields, Academic Press, 1997). Un grupo de grupos protectores de  $\alpha$ -amino conocidos se puede escindir bajo condiciones básicas. Este grupo abarca Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) y Nsc (p-nitrofenilsulfonietoxicarbonato), pero la invención no queda limitada a los mismos.

El reactivo de escisión preferido para este grupo de grupos protectores de  $\alpha$ -amino es piperidina pero también pueden emplearse otras bases tales como morfolina. Opcionalmente, es posible añadir DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno) como un reactivo de escisión adicional.

5 Cuando se emplean grupos protectores de  $\alpha$ -amino escindibles por bases como se han definido anteriormente y el lavado no se efectúa de forma adecuada, los reactivos de escisión, tal como piperidina, permanecerán en cantidades residuales en el disolvente durante la siguiente etapa de acoplamiento. Con ello, tiene lugar la escisión prematura de grupos protectores de  $\alpha$ -amino durante la etapa de acoplamiento, lo cual puede traducirse de nuevo en secuencias de doble adición. Se ha comprobado que la adición de un ácido en el lavado a fondo b) como se ha definido anteriormente, ayuda a protonar reactivos de escisión residuales tal como piperidina y mejorar la eficiencia de separación de estos reactivos de escisión. En el ciclo b) se puede añadir cualquier ácido que sea inerte al linker empleado sobre el soporte. Preferentemente se elige entre HOBt (1-hidroxibenzotriazol), HOSu (N-hidroxisuccinamida), TFA (ácido trifluoroacético), HOObt (3-hidroxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona), HOAt (7-aza-1-hidroxibenzotriazol), HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Con suma preferencia, el ácido es HOBt. Si el lavado a fondo b) consiste en 5 etapas de lavado, es preferible añadir el ácido en la segunda o tercera etapa.

15 Otro grupo de grupos protectores de  $\alpha$ -amino puede ser escindido bajo condiciones ácidas. Este grupo abarca boc (terc-butoxicarbonilo), Trt (trilito) y Bpoc (2-p-bifenilisopropiloxicarbonilo), pero la invención no queda limitada a los mismos. Los reactivos de escisión preferidos, añadidos en la etapa a), para este grupo de grupos protectores de  $\alpha$ -amino es TFA (ácido trifluoroacético) en DCM (diclorometano), seguido por un tratamiento con una base, tal como TEA (trietilamina). La base se añade en la etapa b).

20 Otro grupo de grupos protectores de  $\alpha$ -amino considerados por esta invención es estable bajo condiciones ácidas y básicas. Ejemplos de dichos grupos protectores son benciloxicarbonilo y aliloxicarbonilo, los cuales pueden ser escindidos respectivamente por hidrogenación catalítica o por medio de química basada en paladio.

25 Todas las modalidades antes mencionadas se refieren al procedimiento de acoplamiento de un solo aminoácido o péptido a otro aminoácido o péptido enlazado a un soporte. Este procedimiento se puede repetir con el fin de añadir varios aminoácidos o péptidos y para ensamblar un péptido más largo.

Por tanto, esta invención también se refiere a un procedimiento para sintetizar un péptido, que comprende:

a') unir un primer aminoácido o péptido, que tiene un grupo protector de  $\alpha$ -amino, por vía de su terminal C sobre un soporte funcionalizado;

30 b') efectuar el procedimiento como el descrito anteriormente con el siguiente aminoácido o péptido previsto en la secuencia;

c') repetir la etapa b') con los aminoácidos o péptidos adecuados hasta que se consigue la secuencia deseada; y

d') escindir el péptido ensamblado del soporte por medio de un método adecuado.

Esta invención también se refiere al uso de una sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$  en la síntesis de péptidos en fase sólida para mejorar el lavado de la resina peptídica.

35 Más concretamente, la invención se refiere al uso de una sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$  en la síntesis de péptidos en fase sólida para mejorar la eliminación del exceso de aminoácidos o reactivos de escisión.

La aplicabilidad del procedimiento no depende de la escala; por ejemplo, puede ser efectuado para unos pocos miligramos o a escala de varias toneladas.

Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos.

#### 40 Ejemplo 1

En este ejemplo comparativo, no se utilizó sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$  en ninguna de las etapas.

45 Un heptapéptido con la secuencia Fmoc-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-Val-Leu-Gly-OH, en donde Bu (terc-butiléter), Pbf (2,2,4,6,7-pentametilhidrobenzofuran-5-sulfonilo) son grupos protectores de la cadena lateral, fue sintetizado sobre una resina de 2-clorotritil poliestireno, de acuerdo con el siguiente protocolo. El volumen de disolvente en litros en cada etapa de lavado fue de 3,5 veces el peso en kg de la resina seca cargada con Fmoc-Gly de partida.

1) hinchar y lavar, 4,15 g de la resina de partida cargada con Fmoc-Gly-OH;

2) escindir el grupo Fmoc protector de  $\alpha$ -amino por adición 3 veces durante 10 minutos de una solución de NMP que comprende 1% en volumen de DBU y 5% en volumen de piperidina;

50 3) lavar una vez con NMP durante 2 minutos;

- 4) lavar una vez con 5% en peso de HOBt en NMP durante 2 minutos;
- 5) lavar 8 veces con NMP durante 2 minutos.
- 6) añadir 1,98 g de Fmoc-Leu-OH y acoplarlo al Gly enlazado a la resina en NMP, empleando 1,05 ml de DIC, 0,331 g de HOBt. Se efectúa un control Kaiser;
- 5 7) lavar 9 veces con NMP durante 2 minutos cada vez;
- 8) tratar 3 veces durante 10 minutos con 5% en volumen de piperidina/1% en volumen de DBU en NMP, con el fin de escindir el grupo protector Fmoc;
- 9) lavar una vez con NMP durante 2 minutos;
- 10) lavar una vez con 5% en peso de HOBt en NMP durante 2 minutos;
- 10 11) lavar 4 veces con NMP durante 2 minutos;
- 12) repetir las etapas 6-11 con los siguientes aminoácidos Fmoc-Val-OH (1,91 g), Fmoc-Lys(Boc)-OH (2,43 g), Fmoc-Arg (Pbf)-OH (332 g), Fmoc-Tyr(tBu)-OH (2,28 g), Fmoc-Ser(tBu)-OH (1,84 g);
- 13) escindir el péptido de la resina.

### Ejemplo 2

- 15 En este ejemplo de acuerdo con la invención, se utilizó hidróxido BTMA en el lavado d) después del acoplamiento.  
El mismo heptapéptido que en el ejemplo 3 con la secuencia Fmoc-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-Val-Leu-Gly-OH, en donde Bu (terc-butiléter), Pbf (2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo) son grupos protectores de la cadena lateral, fue sintetizado sobre una resina de 2-clorotritil poliestireno idéntica (el mismo número de lote) que la utilizada en el ejemplo 3, de acuerdo con el siguiente protocolo.
- 20 El volumen de disolvente en litros en cada etapa de lavado fue de 4 veces el peso en kg de la resina seca cargada con Fmoc-Gly de partida.
  - 1) hinchar y lavar, 4,67 g de la resina de partida cargada con Fmoc-Gly-OH;
  - 2) escindir el grupo Fmoc protector de  $\alpha$ -amino por adición 3 veces durante 10 minutos de una solución de NMP que comprende 1% en volumen de DBU y 5% en volumen de piperidina;
- 25 3) lavar una vez con NMP durante 2 minutos;
- 4) lavar una vez con 5% en peso de HOBt en NMP durante 2 minutos;
- 5) lavar 3 veces con NMP durante 2 minutos.
- 6) añadir 2,23 g de Fmoc-Leu-OH y acoplarlo al Gly enlazado a la resina en NMP, empleando 1,18 ml de DIC, 0,386 g de HOBt. Se efectúa un control Kaiser;
- 30 7) lavar una vez con NMP durante 2 minutos y una vez durante 10 minutos con NMP conteniendo 2% en peso de hidróxido BTMA;
- 8) tratar 3 veces durante 10 minutos con 5% en volumen de piperidina/1% en volumen de DBU en NMP, con el fin de escindir el grupo protector Fmoc;
- 9) lavar una vez con NMP durante 2 minutos;
- 35 10) lavar una vez con 5% en peso de HOBt en NMP durante 2 minutos;
- 11) lavar 3 veces con NMP durante 2 minutos;
- 12) repetir las etapas 6-11 con los siguientes aminoácidos Fmoc-Val-OH (2,14 g), Fmoc-Lys(Boc)-OH (2,96 g), Fmoc-Arg (Pbf)-OH (4,09 g), Fmoc-Tyr(tBu)-OH (2,90 g), Fmoc-Ser(tBu)-OH (2,42 g);
- 13) escindir el péptido de la resina.
- 40 Resultados  
Se analizó la pureza HPLC para la mayoría de los fragmentos durante la síntesis del péptido como se produjo de acuerdo con los ejemplos 3 y 4.

	Ejemplo 3 (sin hidróxido BTMA)	Ejemplo 4 (con hidróxido BTMA)
Lavados después del acoplamiento	9	2
Lavados después de la escisión de Fmoc	6	5
Cantidad total de disolvente de lavado por gr de resina seca de partida para la adición de un aminoácido	52,5 ml	28 ml
Pureza HPLC de los fragmentos		
Fmoc-Leu-Gly-OH	94,9 %	95,0 %
Fmoc-Val-Leu-Gly-OH	90,4 %	94,0 %
Fmoc-Arg(Pbf)-Lys(Boc)Val-Leu-Gly-OH	90,0 %	91,0 %
Fmoc-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Lys(Boc)Val-Leu-Gly-OH	88,2%	91,7%

Los resultados HPLC demuestran claramente que la adición de una sal como se ha definido de acuerdo con esta invención en el lavado después de la reacción de acoplamiento proporciona una pureza comparable o mayor. Este resultado se consigue mediante solo 7 etapas de lavado y 28 ml de disolvente en total en comparación con 15 etapas de lavado y 52,5 ml de disolvente en el ejemplo comparativo.

5



## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la síntesis en fase sólida de péptidos, caracterizado porque al menos una de las etapas de lavado se efectúa en presencia de una sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$ , en donde X representa un catión, n representa la carga del catión, Y representa un anión y m representa la carga del anión, y en donde dicha sal se elige del grupo consistente en sales de amonio cuaternario, líquidos iónicos, sales de fosfonio, sales de sulfonio, sales inorgánicas o cualquier mezcla de las mismas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, para unir un aminoácido o péptido protegido en el grupo  $\alpha$ -amino que tiene un terminal C sin proteger a otro aminoácido o péptido que está protegido por un grupo protector de  $\alpha$ -amino y que se une a un soporte durante la síntesis de péptidos en fase sólida, que comprende las siguientes etapas:
- escindir el grupo protector de  $\alpha$ -amino del aminoácido o péptido unido al soporte;
  - efectuar un lavado a fondo;
  - añadir un aminoácido o péptido protegido en  $\alpha$ -amino que tiene un terminal C sin proteger y acoplarlo al aminoácido o péptido que está unido al soporte y que ahora tiene un terminal N sin proteger, para formar un enlace amida; y
  - efectuar otro lavado a fondo;
- caracterizado porque al menos en la etapa b) se añade una sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$ , que es soluble en un disolvente empleado en esta etapa, en donde X representa un catión, n representa la carga del catión, Y representa un anión y m representa la carga del anión, y en donde dicha sal se elige del grupo consistente en sales de amonio cuaternario, líquidos iónicos, sales de fosfonio, sales de sulfonio, sales inorgánicas o cualquier mezcla de las mismas.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, para unir un aminoácido o péptido protegido en el grupo  $\alpha$ -amino que tiene un terminal C sin proteger a otro aminoácido o péptido que está protegido por un grupo protector de  $\alpha$ -amino y que se une a un soporte durante la síntesis de péptidos en fase sólida, que comprende las siguientes etapas:
- escindir el grupo protector de  $\alpha$ -amino del aminoácido o péptido unido al soporte;
  - efectuar un lavado a fondo;
  - añadir un aminoácido o péptido protegido en  $\alpha$ -amino que tiene un terminal C sin proteger y acoplarlo al aminoácido o péptido que está unido al soporte y que ahora tiene un terminal N sin proteger, para formar un enlace amida; y
  - efectuar otro lavado a fondo;
- caracterizado porque al menos en la etapa c) se añade una sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$ , que es soluble en un disolvente empleado en esta etapa, en donde X representa un catión, n representa la carga del catión, Y representa un anión y m representa la carga del anión, y en donde dicha sal se elige del grupo consistente en sales de amonio cuaternario, líquidos iónicos, sales de fosfonio, sales de sulfonio, sales inorgánicas o cualquier mezcla de las mismas.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, para unir un aminoácido o péptido protegido en el grupo  $\alpha$ -amino que tiene un terminal C sin proteger a otro aminoácido o péptido que está protegido por un grupo protector de  $\alpha$ -amino y que se une a un soporte durante la síntesis de péptidos en fase sólida, que comprende las siguientes etapas:
- escindir el grupo protector de  $\alpha$ -amino del aminoácido o péptido unido al soporte;
  - efectuar un lavado a fondo;
  - añadir un aminoácido o péptido protegido en  $\alpha$ -amino que tiene un terminal C sin proteger y acoplarlo al aminoácido o péptido que está unido al soporte y que ahora tiene un terminal N sin proteger, para formar un enlace amida; y
  - efectuar otro lavado a fondo;
- caracterizado porque al menos en la etapa d) se añade una sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$ , que es soluble en un disolvente empleado en esta etapa, en donde X representa un catión, n representa la carga del catión, Y representa un anión y m representa la carga del anión, y en donde dicha sal se elige del grupo consistente en sales de amonio cuaternario, líquidos iónicos, sales de fosfonio, sales de sulfonio, sales inorgánicas o cualquier mezcla de las mismas.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde  $(Y^{m-})_n$  se elige del grupo consistente en fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, hidróxido, carbonato, hidrogenocarbonato, nitrato, fosfato, hidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, tetrafluorborato, hexafluorofosfato, acetato, carboxilatos, cianuros, isocianatos, tetraalquilboratos, tetraarilboratos, trifluoracetato, tosilato, mesilato o cualquier mezcla de los mismos, en donde Y representa un anión, m representa la carga del anión y n representa la carga del catión.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la sal de amonio cuaternario se elige entre hidróxido de benciltrimetilamonio, cloruro de benciltrimetilamonio o carbonato de benciltrimetilamonio, la sal de fosfonio es bromuro de tetrabutilfosfonio y la sal de sulfonio es tetrafluorborato de trietilsulfonio.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde la sal añadida en la etapa b), c) o d)

también se añade en una o más de las otras etapas.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde el grupo protector de  $\alpha$ -amino es Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) o Nsc (p-nitrofenilsulfoniletoxi-carbonato) o cualquiera de otros grupos protectores escindibles por bases.
- 5 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde el grupo protector de  $\alpha$ -amino es Boc (terc-butoxicarbonilo), Trt (tritol), Bpoc (2-p-bifenilisopropiloxicarbonilo) o cualquier otro grupo protector escindible por ácido.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde el grupo protector de  $\alpha$ -amino se elige de manera que no se requiera ningún tratamiento con ácido o con base para su escisión.
- 10 11. Procedimiento para sintetizar un péptido, que comprende:
- a') unir un primer aminoácido o péptido, que tiene un grupo protector de  $\alpha$ -amino, por vía de su terminal C sobre un soporte funcionalizado;
- b') efectuar el procedimiento como el descrito anteriormente con el siguiente aminoácido o péptido previsto en la secuencia;
- 15 c') repetir la etapa b') con los aminoácidos o péptidos adecuados hasta que se consigue la secuencia deseada; y
- d') escindir el péptido ensamblado del soporte por medio de un método adecuado.
12. Uso de una sal  $(X^{n+})_m(Y^{m-})_n$  en los procedimientos de la reivindicación 1 o 3 para mejorar el lavado de la resina peptídica, en donde X representa un catión, n representa la carga del catión, Y representa un anión y m representa la carga del anión.
- 20 13. Uso según la reivindicación 12 para mejorar la eliminación del exceso de aminoácidos o reactivos de escisión.