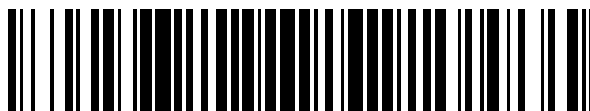


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 248**

51 Int. Cl.:

C07K 14/575 (2006.01)

C07K 17/08 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2007 E 07765833 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2012 EP 2019118**

54 Título: **Procedimiento para sintetizar timosinas**

30 Prioridad:

10.05.2006 ES 200601197

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

27.03.2013

73 Titular/es:

**BCN PEPTIDES, S.A. (100.0%)
Polígono Industrial Els Vinyets-Els Fogars, 2,
Carretera C-244 Km 22
08777 Sant Quinti de Mediona, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ CARNEADO, JIMENA;
PONSATI OBIOLS, BERTA;
CLEMENTE RODRÍGUEZ, JAVIER;
RUBIRES FERRER, RAIMON y
PAVÓN FERNÁNDEZ, SERGI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 399 248 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

Procedimiento para sintetizar timosinas

CAMPO DE LA INVENCION:

5 Esta invención está dentro del campo de la química biomédica. En particular, la invención se refiere a un nuevo procedimiento de síntesis química de timosinas mediante síntesis de péptidos en fase sólida con un rendimiento y pureza elevados. El procedimiento se basa en la incorporación de derivados de pseudoprolina en posiciones clave de las secuencias de las timosinas. El ciclo oxazolidina de la pseudoprolina impide la estructuración de la cadena peptídica creciente anclada a la resina, evitando la agregación de la peptidil resina y el colapso de la síntesis durante la elongación de la secuencia peptídica.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION:

Las timosinas son una familia de polipéptidos bioquímica y funcionalmente diferentes con importantes funciones fisiológicas. Descritas por primera vez en 1966 y originariamente aisladas en el timo, han sido identificadas posteriormente en diversos tejidos y células [Goldstein, A.L., Slater, F.D., White, A., Preparation and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1966, 56 (3), 1010-1017].

15 Existen diferentes familias de timosinas que desempeñan funciones distintas, por ejemplo las α -timosinas, que tienen localización nuclear y están implicadas en replicación y/o transcripción de DNA y las β -timosinas, que se localizan en el citoplasma y muestran una gran afinidad por G-actina en procesos implicados en motilidad celular. Las α - y β -timosinas juegan un importante papel en la regulación de la respuesta inmune, biología vascular y patogénesis del cáncer, presentando un gran potencial terapéutico además de su aplicación en diagnóstico como marcadores moleculares [Goldstein A.L.; Badamchian M., Thymosins: chemistry and biological properties in health and disease, Expert Opin. Biol. Therapy, 4 (4), 559-573].

25 La subfamilia de las α -timosinas está compuesta por α -paratimosina, α -protimosina, $\alpha 1$ -timosina y $\alpha 11$ -timosina. La más importante es la $\alpha 1$ -timosina o timalfasina, originariamente aislada de tejido tímico, es un péptido de 28 aminoácidos, acilado en posición N-terminal y con un grupo ácido en su extremo C-terminal, derivado del precursor $\alpha 1$ -protimosina con 111 aminoácidos. Debido a sus propiedades inmunoregulatoras, $\alpha 1$ -timosina ha sido utilizada para el tratamiento de enfermedades en las que el sistema inmunitario está afectado; principalmente en hepatitis B, C y carcinoma hepático. La hepatitis B crónica es una enfermedad relacionada con una disfunción del sistema inmune, conlleva un alto riesgo de padecer cirrosis y carcinoma hepatocelular. La $\alpha 1$ -timosina actúa como modulador del sistema inmunitario activando la producción de células NK en varios modelos animales y humanos e incrementado la producción de células CD3, CD4 y CD8 en enfermos con hepatitis crónica B y cáncer. Activa también la producción de citoquinas Th1, relacionadas con una fuerte respuesta inmune antiviral.

35 Numerosos modelos celulares in vitro avalan el potencial terapéutico de la $\alpha 1$ -timosina. El tratamiento con $\alpha 1$ -timosina reduce la replicación del VIH-1 y del virus parainfluenza en cultivos celulares primarios [Colledge, D., Wang, Y. Tuthill C.; Locarnini, S. Antiviral effects of thymosin alpha 1 versus leukocytic interferon in primary cultures of duck hepatocytes persistently infected with duck HBV in vitro, Second international conference on therapies for viral hepatitis, 1997; Kona, Hawaii; Palamara, A. Bue M., Savini, P., Thymosin alpha 1 inhibits Sendai virus replication: involvement of intracellular redox state, 6th International Expert Forum of Immunotherapy and Gene Therapy; May 1998, Florence, Italy]. Además reduce el estrés oxidativo aumentando los niveles de glutación intracelular cuya baja concentración en pacientes con el VIH está relacionada con un bajo índice de supervivencia [Giuliani, C., Napolitano, G., Mastino, A., Thymosin alpha-1 regulates MHC class I expression in FRTL-5 cells at transcriptional level, Eur. J. Immunol. 2000, 30, 778-786]. La $\alpha 1$ -timosina aumenta los niveles de expresión de MHC clase 1 en cultivos celulares, manteniendo la capacidad del sistema inmune para responder a agentes infecciosos [Herzenberg, L.A.; De Rosa, S.C.; Dubs, J.G., Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 1967-1972].

45 En modelos animales de infección, el potencial terapéutico de $\alpha 1$ -timosina ha sido puesto de manifiesto en ratones infectados con varios patógenos (*Listeria monocitogenes*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens*) y en ratones inmunodeprimidos con 5-fluorouracilo [Ishitsuka, H; Umeda, Y. Nakamura, J. Yagi, Y. Protective activity of thymosin against opportunistic infections in animal models. Cancer Immunol. Immunother. 1983, 14, 145-150]. Así, en estudios con modelos animales de hepatitis B crónica (woodchuck hepatitis virus) en los que los animales siguieron un tratamiento con $\alpha 1$ -timosina, la concentración del virus en suero fue reducida en un 99% [Gerin, J.L., Korba, B.E., Cote P.J., Tennant, B.C., A preliminary report of a controlled study of thymosin alpha 1 in the woodchuck model of hepanavirus infection. In: Block T., ed. Innovations in antiviral development and the detection of virus infection. Philadelphia, Pa: Jefferson Medical; 1992, 121-123; Tennant, B.V., Korba, B.E., Baldwin B.H., Goddard, L.A., Hornbuckle W.E., Cote, P.J., Treatment of chronic woodchuck hepatitis virus infection with

thymosin alpha-1 (TA1). *Antiviral Res.* 1993; 20 (suppl 1),1634], disminuyendo dicho tratamiento el riesgo de muerte por carcinoma hepatocelular. Asimismo α 1-timosina aumenta la supervivencia de animales adultos o inmunodeprimidos infectados con el virus herpes simple, el virus influenza o *Candida albicans* [Effros, R.B., Casillas, A., Wadford, R.L., The effect of thymosin alpha 1 on immunity to influenza in aged mice. *Aging: immunology and infectious disease*. Vol 1. New York, N.Y.: Mary Ann Liebert, Inc; 1988; 31-40; Bistoni, F., Marconi, P., Frati, L., Bonmassar, E., Garaci, E. Increase of mouse resistance to candida albicans infection by thymosin alpha1. *Infect. Immun.* 1982, 36, 609-614].

El efecto sinérgico de α 1-timosina con otras citoquinas en el tratamiento de la hepatitis C ha sido puesto de manifiesto en ensayos con ratones infectados con el virus influenza A tratados con una combinación de α 1-timosina, interferón IFN α / β y el antiviral amantadina. La combinación de los tres compuestos mejora sustancialmente el porcentaje de supervivencia [D'Agostini C., Palamara, A.T., Favalli, C. Efficacy of combination therapy with amantadine, thymosin alpha 1 and alpha/beta interferon in mice infected with influenza A virus. *Int. J. Immunopharmacol.* 1996, 16, 95-102].

Un estudio en el que se estudió comparativamente el efecto del tratamiento con α 1-timosina o interferón IFN α -2b en pacientes difíciles de tratar con un mutante del virus de la hepatitis B muestra casi el doble de eficacia en eliminación del virus con α 1-timosina. En contraposición al IFN α -2b, la α 1-timosina es mejor tolerada y además no presenta efectos secundarios significativos en personas inmunodeprimidas [Andreone, P., Cursaro, C., Gramenzi, A., A randomized controlled trial of thymosin alpha 1 versus interferon alpha treatment in patients with hepatitis B antigen antibody and hepatitis B virus DNA, positive chronic hepatitis B, *Hepatology*, 1996, 24, 774-777]. Mientras interferón produce una rápida respuesta durante el tratamiento, cepas resistentes del virus provocan la recaída del paciente, la α 1-timosina tiene un efecto más retardado, relacionado con una mejora del sistema inmunitario a largo plazo [Garaci, E., Milanese, G., Vella, S., A randomized controlled study for the evaluation of the activity of a triple combination of zidovudine, thymosin alpha 1 and interferon alpha in HIV-infected individuals with CD4 counts between 200 and 500 cells/mm³, *Antiviral Therapy*, 1998, 3, 103-11].

En modelos animales de cáncer, la α -timosina ha demostrado su eficacia en la prevención de cáncer intestinal [Moody, T.W., Leyton, J., Zia, F., Tuthill, C., Badamchian, M. Goldstein, A.L., Thymosin alpha1 is chemopreventive for lung adenoma formation *in A/J mice*, *Cancer Lett.* 2000, 155, 121-127], cáncer de mama, reduciendo la incidencia de desarrollo del cáncer como resultado de la estimulación del sistema inmunitario en ratas [Moody, T.W., Tuthill, C., Badamchian, M., Goldstein, A.L., Thymosin alpha1 inhibits mammary carcinogenesis in Fisher rats, *Peptides*, 2002, 23 (5), 1011-1014] y glioblastoma [Patente WO03049697, Thymosin-alpha1 is used as an adjuvant in combination with carmustine (BCNU) as an effective treatment for malignant glioblastoma, Wands, J.R. De la Monte S., Rhode Island Hospital (US), 30-06-2005]. La terapia combinada de interferón IFN α -2b, α 1-timosina y ciclofosfamida ha dado buenos resultados, reduciendo el tamaño del melanoma en ratones [Pica, F., Frascchetti, M., Matteucci, C., Tuthill, C., Rasi, G., High doses of thymosin alpha 1 enhance the anti-tumor efficacy of combination chemo-immunotherapy for murine B16 melanoma, *Anticancer Res.* 1998, 18, 3571-3578].

Otros dos péptidos relacionados con α 1-timosina y tan potentes como ella en infecciones de *Candida albicans* han sido aislados de preparaciones de fracción 5 de timosina: des-(25-28)- α 1-timosina y α 11-timosina [Thymosin α 11: a peptide related to thymosin α 1 isolated from calf thymosin fraction 5, Calderella, J., Goodall, G.J., Felix, A.M., Heimer, E.P., Salvin, S.B., Horecker, B.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 7424-742].

La segunda subfamilia de timosinas son las β -timosinas que constituyen una familia de proteínas (β -4, β -8, β -9, β -10, β -11, β -12, β -15 timosinas) con una alta homología en su secuencia peptídica (ver Tabla 1).

La tabla 1 muestra las secuencias de las timosinas.

SECUENCIAS	SECUENCIAS PEPTÍDICAS	Nombre abreviado
SEQ.ID.N.1	Ac-SDAAVDTSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN-OH 28AA	α 1-Timosina
SEQ.ID.N.2	Ac-SDAAVDTSSEITTKDLKEKKEVVE-OH 24AA	Des-(25-28)- α 1-Timosina
SEQ.ID.N.3	Ac-SDAAVDTSSEITTKDLKEKKEVVEEAENGREAPAN-OH 35 AA	α 11-Timosina
SEQ.ID.N.4	Ac-SDKPDMAEIEKFDKSKLKKTTETQEKNPPLPSKETIEQEKQAGES-OH 43AA	β 4-Timosina
SEQ.ID.N.5	Ac-SDKPDMAEIEKFDKAKLKKTTETQEKNPPLPSKETIENEKNTSGES-OH 44AA	β 4 ^{Xen} -Timosina
SEQ.ID.N.6	Ac-ADKPDLDGEINSFDKAKLKKTTETQEKNTLPTKETIEQEKQ-OH 39AA	β 8-Timosina
SEQ.ID.N.7	Ac-ADKPDLDGEINSFDKAKLKKTTETQEKNTLPTKETIEQEKQAK-OH 41AA	β 9-Timosina
SEQ.ID.N.8	Ac-ADKPDMEIASFDKAKLKKTTETQEKNTLPTKETIEQEKRSSEIS-OH 43AA	β 10-Timosina
SEQ.ID.N.9	Ac-SDKPNLEEVASFDTKLKKTTETQEKNPPLPTKETIEQEKQAS-OH 41AA	β 11-Timosina
SEQ.ID.N.10	Ac-SDKPDLAEVSNFDTKLKKTTETQEKMPPLPTKETIEQEKQATA-OH 42AA	β 12-Timosina
SEQ.ID.N.11	H ₂ N-SDKPDLSEVETFDKSKLKKNTTEKNTLPSKETIQEKEYNQRS-OH 44AA	β 15-Timosina

TABLA 1

La β 4-timosina contiene 43 aminoácidos y se expresa en fases del desarrollo embrionario correspondientes con el desarrollo del corazón. Este descubrimiento, llevado a cabo en estudios preclínicos con animales, ha puesto en relieve el potencial de β 4-timosina para el tratamiento de pacientes que hayan sufrido un infarto de miocardio. En estudios preclínicos con ratones a los que se inducían ataques cardíacos, el tratamiento con la proteína β 4-timosina promovía la diferenciación de las células endoteliales y estimulaba la migración de las células cardíacas, mejorando la capacidad de supervivencia de dichas células [Bock-Marquette, I., Saxena, A., White, M.D., DiMaio, J.M., Srivastava, D., Thymosin β 4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair, *Nature*, 2004, 432, 466-472].

La β 4-timosina regula además una serie de citoquinas y quimioquinas inflamatorias, controla la función de la proteína actina, uniéndose a ella, e induce la producción de laminina-5, una proteína necesaria para la correcta adhesión de algunos tipos de células de mamíferos y un importante componente del proceso de reparación de heridas, facilitando así la reepitelización e induciendo la deposición de colágeno [Bubb, M.R., Thymosin beta 4 interactions, *Vitam. Horm.* 2003, 66, 297-316].

Otras posibles aplicaciones terapéuticas de la β 4-timosina incluyen el aumento del crecimiento del cabello activando células madre de folículos pilosos, denominadas "hair follicle stem cells" [Patente WO/063775 A2, Methods and compositions for the promotion of hair growth utilizing actin binding peptides]. También para el tratamiento diversos tipos de indicaciones dermatológicas crónicas como úlceras venosas crónicas "chronic venous stasis ulcers", úlceras por presión crónicas "chronic pressure ulcers", epidermolisis bullosa, un grupo de desórdenes hereditarios caracterizados por la formación de ampollas en respuesta a un trauma mecánico y tratamiento de heridas de córnea. El fragmento LKKTETQ de la β 4-timosina, el dominio de unión a actina, facilita la curación de heridas dérmicas en animales adultos [Philp D., Huff, D., Song Gho, Y.; Hannappel, E., Kleinman, T., The actin binding site on thymosin β 4 promotes angiogenesis, *FASEB J.*, 17, 2103-2105].

La β 15-timosina es un péptido de 44 aminoácidos sobreexpresado en cáncer de próstata, donde favorece la diseminación del tumor fuera de la glándula prostática. Este péptido está siendo desarrollado como biomarcador para el diagnóstico de dicho cáncer, para la discriminación entre los tumores benignos y malignos prostáticos y para su adecuado tratamiento [Hutchinson, L.M., Chang, E.L., Becker, C.M., Ushiyama, N., Behonick, D., Shih, M.C., DeWolf, W.C., Gaston, S.M., Zetter, B.R., Development of a sensitive and specific enzyme-linked immunoassay for thymosin beta 15, a urinary biomarker of human prostate cancer, *Clin. Biochem.* 2005, 38 (6), 558-571]. La β 15-timosina también ha sido patentada para su utilización en regeneración y cicatrización de heridas pudiendo ser aplicada para esta indicación en un futuro próximo [Patente CN1579539, Thymic hormone beta 15 to promote wound healing and generation of blood, , Gan Chunyu (CN)].

La β 10-timosina está constituida por 43 aminoácidos y se sobreexpresa en células embrionarias y tumorales como adenocarcinomas de colon [Vasile, E., Tomita, Y., Brown, L.F., Kocher, O., Dvorak, H.F., Differential expression of thymosin β -10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis, *FASEB J.*, 2001, 15, 458-466]. La β 10-timosina presenta una gran homología con la β 4-timosina ya que ambas se unen a la actina e inhiben su polimerización [Yu, F.X., Lin, S.C., Morrison-Bogorad, M., Atkinson, M.A., Yin, H.L., Thymosin beta 10 and thymosin beta 4 are both actin monomer sequestering proteins, *J. Biol. Chem.*, 1993, 268 (1), 502-509]. Recientes resultados relacionados con la unión de la β 10-timosina a la actina y activación del proceso apoptótico en células de cáncer de ovario están demostrando el potencial de la β 10-timosina y sus derivados en una nueva terapia para el tratamiento del cáncer de ovarios [Rho, S.B., Lee, K.W., Chun, T., Lee, S-H., Park, K., Lee, J-H., The identification of apoptosis-related residues in human thymosin β -10 by mutational analysis and computational modelling, *J. Biol. Chem.*, 280 (40), 34003-34007].

Ninguna de las β -timosinas con potencial terapéutico ha llegado por el momento a fases clínicas, aunque la utilización de la β 4-timosina y la β 15-timosina para el tratamiento de pacientes que hayan sufrido un infarto de miocardio en la regeneración del tejido dañado será próximamente presentada a la FDA para su aplicación en fase clínica 1.

Entre las distintas β -timosinas (ver Tabla 1) la β 4-timosina, la β 9-timosina y la β 10-timosina se encuentran en mamíferos y en cambio la β 4^{Xen}-timosina ha sido identificada en anfibios (*Xenopus*) [Voelter, W., Kaiser, T., Hannappel, E., Echner, H., Synthesis of thymosin β 4^{Xen} and its comparison with the natural tritetraconpeptide, *J. Prakt. Chem.*, 1999, 341(1), 47-51] y la β 11- y la β 12- en trucha (*Salmo gairdneri*) [Yialouiris, P.P., Coles, B., Tsitsiloni, O., Schmid, B., Howell, S., Aitken, A., Voelter, W., Haritos, A.A., The complete sequences of trout (*Salmo gairdneri*) thymosin β 11 and its homologue thymosin β 12, *Biochem.J.*, 1992, 283, 385-389].

La β 8-timosina contiene 39 aminoácidos y un alto grado de homología (79%) con la β 4-timosina. La β 9-timosina tiene 41 aminoácidos y se diferencia de la β 9-timosina en un dipéptido adicional en la región C-terminal, presentando un 82% de homología con la β 4-timosina. La β 11-timosina con 42 aminoácidos, presenta un 78% de homología

respecto a la β 4-timosina. La β 12-timosina con 43 aminoácidos es 79% homóloga a la β 4-timosina y 84% a la β 11-timosina (ver Tabla 1).

5 El primer procedimiento sintético patentado de timosina fue para la obtención de la α 1-timosina. Este procedimiento proponía la síntesis convergente en solución de dos fragmentos de quince (15) y trece aminoácidos (13), que previamente habían sido sintetizados en fase sólida con la estrategia Boc/Bzl [Patente US4148788, Synthesis of thymosin alpha 1, Hoffmann La Roche, 1979]. Este procedimiento fue posteriormente implementado en una estrategia realizada en solución en la que se utilizaban siete (7) fragmentos [Patente US4504415, Intermediates for thymosin alpha 1 and desacetyl thymosin alpha 1, Hoffmann La Roche, 1985].

10 En estos procedimientos anteriormente descritos, la estrategia utilizada para la síntesis de fragmentos en fase sólida fue Boc/Bzl. Otra opción también utilizada fue el empleo de un grupo protector temporal de la posición N-terminal, el denominado Ddz [Nguyen, T.H., Heinzl, W., Birr, C., Ddz, a highly efficient protecting group in large scale syntheses of thymosin- α 1 related peptides, Pept., Proc. Eur. Pept. Symp., 19th, 1987].

15 Otro procedimiento que también ha sido descrito es el de la síntesis total de la α 1-timosina según una estrategia lineal Boc/Bzl en fase sólida sobre una resina MBHA, con la utilización de HBr y posteriormente bromotrimetilsilano para escindir el péptido de la resina [Wang, S., Wang, B.S.H., Hughes, J.L., Leopold, E.J., Wu, C.R., Tam, P., Cleavage and deprotection of peptides on MBHA-resin with hydrogen bromide, Int.J.Pept. Prot. Res., 1992, 40(3-4), 344-349; Hughes, J.L., Leopold, E.J., Cleavage and deprotection of peptides from MBHA-resin with bromotrimethylsilane, Tetrahedron Lett., 1993, 34(48), 7713-7716].

20 Por otro lado, también existe otro procedimiento patentado de síntesis convergente en solución de fragmentos previamente obtenidos en fase sólida que utiliza la protección temporal Moz en lugar de Boc mejorando los rendimientos y la pureza del producto final [Patente US5856440, Solid phase process for synthesizing thymosin alpha1, Alpha 1 Biomedicals Inc., 1999].

25 Sin embargo, el procedimiento que emplea la estrategia ortogonal Fmoc/tBu es actualmente la más popularmente aceptada debido a la eliminación de las etapas de trabajo con TFA para eliminar el grupo protector temporal N-terminal y HF para escindir el péptido de la resina. Con la estrategia Fmoc/tBu un método propuesto de síntesis de la α 1-timosina incluye el uso de cadenas laterales protegidas y acoplamiento en solución de dos fragmentos (1-10) y (11-28) con DCC/HOBT con un rendimiento para las 4 últimas etapas del 30%. [Felix, A.M., Heimer, E.P., Wang, C.T., Lambros, T.J., Swistok, J., Roszkowski, M., Ahmad, M., Confalone, D., Scott, J.W., Synthesis of thymosin α 1 by fragment condensation using tert-butyl side chain protection, Int. J. Pept. Prot. Res., 1985, 26 (2), 130-148]. La etapa de acoplamiento anteriormente descrita ha sido optimizada hasta obtener un rendimiento del 44% en TFE. Aunque el rendimiento de acoplamiento en CHCl_3 es del 49%, la pureza del crudo obtenido en este último es peor [Felix, A.M., Wang, C.T., Lambros, T.J., Coupling of large protected peptide fragments in trifluoroethanol: synthesis of thymosin α 1 Pept.: Struct. Funct., Proc. Am. Pept. Symp., 9th, 1985]. La estrategia lineal paso a paso en fase sólida con protectores Fmoc/tBu también ha sido descrita utilizando una resina p-benziloxicarbonilo [Echner, H., Voelter, W., A new synthesis of thymosin α 1, Liebigs Annalen der Chemie, 1988, 11, 1095-1097].

40 Para la obtención de β 4-timosina en fase sólida se han descrito dos estrategias lineales: una estrategia Boc/Bzl [Low, T.L.K., Wang, S.S., Goldstein, A.L., Solid-phase synthesis of thymosin β 4: chemical and biological characterization of the synthetic peptide, Biochemistry, 1983, 22, 733-740] y una estrategia Fmoc/tBu [Zikos, C., Livaniou, E., Leondiadis, L., Ferderigos, N., Ithakissios, D.S., Evangelatos, G.P., Comparative evaluation of four trityl-type amidomethyl polystyrene resins in Fmoc solid phase peptide synthesis, J. Pept. Sci, 2003, 9(7), 419-429]. En esta última, utilizando resinas lábiles tipo cloro-tritilo, se obtiene la β 4-timosina con un rendimiento del 30%, mejor que el obtenido con la estrategia Boc/Bzl (5-12%) pero que puede ser mejorable desde el punto de vista industrial (ver Tabla 2, en la que se muestra la comparativa de rendimientos obtenidos en la síntesis de beta-timosinas).

Producto	Estrategia de síntesis	Rendimiento	Pureza del crudo (HPLC)	Referencia	Comentarios	Resina y condiciones de síntesis
β 10-timosina	Fmoc/tBu	40%	n.i.	Leondiadis, L. et al., J.Chem.Soc., Perkin Trans.1. 1996, 971-975	-acoplamiento prolongado durante la noche que incluyen un paso de acetilación para: K3, A15, K16, L28, T30, T33,	- resina bromo-4-cianotriilo (0.56 mmol/g) - 10 eq. Fmoc-AA-OH, 10 eq. DIPCDI, 10 eq. HOBT
β 15-timosina	Fmoc/tBu	45%	n.i.	Koutrafour, V. et al., Peptides 2003, 24, 107-115	- acoplamiento largos e incompletos que incluyen un paso de acetilación para: P4, K16, I34:	- resina 4-ciano-4'-carboximetoxitriilo - Fmoc-AA, HOBT, DIPCDI
β 4 ^{xen} -timosina	Fmoc/tBu	n.i.	48-53%	Voelter, W. et al., J.Prakt.Chem., 1999, 341, 47-51	-acoplamiento dobles para todos los residuos	- resina HMP (0.5 mmol/g) - 4 eq. Fmoc-AA, HOBT, DCC
β 4-timosina	Boc/Bzi	5-12%	n.i.	Low, T.L.K., et al., Biochemistry, 1983, 22, 733-740	-acoplamiento dobles	- resina Boc-Ser(Bzi)-PAM (0.11 mmol/g) - 10 eq. Boc-AA, DCC
β 4-timosina	Fmoc/tBu	30%	60%	Zikos, C., et al., J.Pept.Sci, 2003, 9(7), 419-429	-acoplamiento dobles para: S1, D2, K3, P4, D5, I9, K14, K16, K25, I28, S30	- resina amidometiltriilo - 5 eq Fmoc-AA, HOBT, DIPCDI
β 4-timosina	Fmoc/tBu	n.i.	n.i.	Proceso BCN Peptides de síntesis convergente en fase sólida	Síntesis de dos fragmentos (1-27)+(28-43)-resin	- resina 2-clorotriilo (0.85 mmol/g) - 3 eq Fmoc-AA, HOBT y DIPCDI

(continuación)

Producto	Estrategia de síntesis	Rendimiento	Pureza del crudo (HPLC)	Referencia	Comentarios	Resina y condiciones de síntesis
β 4-timosina	Fmoc/tBu	30%	< 30%	Proceso BCN Peptides de síntesis lineal convencional	-acoplamientos dobles para: I34, T33, L28, N26, K16, S15, D13, E10, I9, E8, M6, D5	- resina 2-clorotritilo (0.85 mmol/g) - 3 eq. Fmoc-AA, HOBT y DIPCDI,
β 4-timosina	Fmoc/tBu	50 %	> 80%	Proceso BCN Peptides de síntesis lineal con pseudoprolinas	-acoplamientos dobles para: N26	- 2-clorotritilo (0.85 mmol/g) - 3 eq Fmoc-AA, HOBT y DIPCDI, - 2.5 eq. dipéptidos pseudoprolina

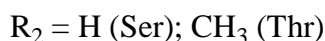
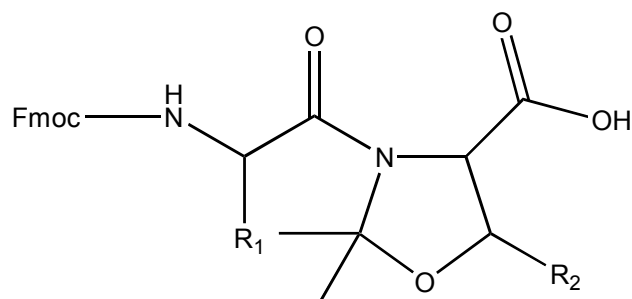
Tabla 2

Una variante de la β 4-timosina en la cual las posiciones Ser15, Ala40 y Ser41 de la β 4-timosina están reemplazadas por Ala, Thr y Ser respectivamente, es la β 4^{Xen}-timosina que ya ha sido sintetizada según una estrategia lineal Fmoc/tBu, y de la que se ha obtenido una pureza del crudo del 48-53% [Voelter, W., Kaiser, T., Hannapel, E., Echner, H, Synthesis of thymosin β 4^{Xen} and its comparison with the natural tetraconpeptide, J.Prakt.Chem., 1999, 341, 1, 47-51].

La síntesis de la β 10-timosina en fase sólida ya ha sido descrita siguiendo una estrategia de síntesis lineal, con una resina bromo-4-cianotritilo. El procedimiento de síntesis incluye acoplamiento prolongados durante la noche, reacoplamiento y acetilaciones en varias posiciones [Leondiadis, L., Vassiliadou, I., Zikos, C., Ferderigos, N., Livaniou, E., Ithakissios, D.S., Evangelatos, G.P., Solid-phase synthesis of thymosin β 10 using a p-cyanotrityl resin. Chemical characterization and immunochemical control of the synthetic peptide, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1996, 971-975]. La síntesis también descrita de la β 15-timosina se obtiene mediante una estrategia similar, es decir, una síntesis lineal basada en la estrategia Fmoc/tBu. Esta síntesis conduce al producto β 15-timosina, pero también supone acoplamiento largos e incompletos, que incluyen un paso de acetilación, disminuyendo la pureza del crudo obtenido [Koutrafouris, V., Leondiadis, L., Ferderigos, N., Avgoustakis, K., Livaniou, E., Evangelatos, G.P., Ithakissios, D.S. Synthesis and angiogenic activity in the chick chorioallantoic membrane model of thymosin beta-15, Peptides, 2003, 24, 107-115]. Los rendimientos globales obtenidos no son bajos (40% de la β 10-timosina) y (45% de la β 15-timosina) aunque el procedimiento de síntesis en previsión de una producción a gran escala necesita ser optimizado.

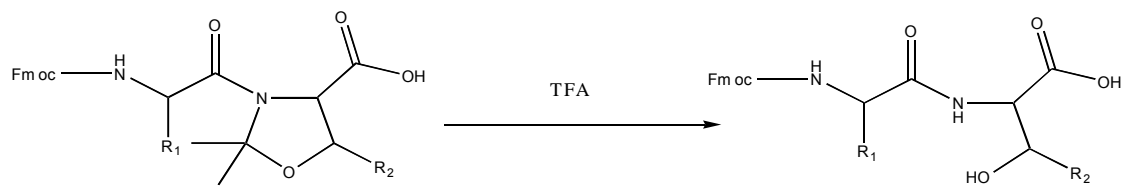
En la síntesis de péptidos en fase sólida, las interacciones hidrofóbicas de la creciente cadena peptídica protegida dan lugar a bajos rendimientos de acoplamiento, desprotecciones incompletas y a la obtención de productos secundarios. El uso de pseudoprolinas introducido recientemente en síntesis de péptidos largos es una mejora substancial para el estado de la técnica en péptidos con una gran tendencia a estructurarse durante la elongación de la cadena.

Las pseudoprolinas son derivados cíclicos de Ser, Thr o Cys que sirven como grupos protectores de estos aminoácidos (Formula I) y facilitan la síntesis de secuencias difíciles, interrumpiendo la estructuración de la cadena peptídica creciente aún anclada a la resina e impidiendo la agregación de la peptidil-resina y el colapso de la síntesis [Wöhr, T., Wahl, F., Nefzi, A., Rohwedder, B., Sato, T., Sun, X., Mutter, M., Pseudoprolines as a solubilizing, structure-disrupting protection technique in peptide synthesis, J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 9218-9227]. Las pseudoprolinas introducen codos en el esqueleto de la cadena peptídica siendo su utilización especialmente interesante en la síntesis de secuencias hidrofóbicas o péptidos largos [Abedini, A., Raleigh, D.P., Incorporation of pseudoproline derivatives allows the facile synthesis of human IAPP, a highly amyloidogenic and aggregation-prone polypeptide, Organic Lett., 2005, 7(4), 693-696; White, P., Keyte, J.W., Bailey, K., Bloomberg, G., Expediting the Fmoc solid phase synthesis of long peptides through the application of dimethylloxazolidine dipeptides, J. Peptide Sci., 2004, 10, 18-26; von Eggelkraut-Gottanka, R., Machova, Z., Grouzmann, E., Beck-Sickinger, A.G., Semisynthesis and characterization of the first analogues of pro-neuropeptide Y, ChemBioChem, 2003, 4, 425-433].



Fórmula I

Una vez acabada la síntesis, la regeneración de la secuencia y estructura nativa del péptido tiene lugar mediante el tratamiento ácido final que conlleva la escisión y desprotección de las cadenas laterales y apertura del ciclo oxazolidina (Esquema 1).



5

$R_2 = \text{H (Ser); CH}_3 \text{ (Thr)}$

Esquema 1

La tabla 3 muestra las secuencias de las timosinas; las Ser y Thr que podrían ser sustituidas por pseudoprolinas aparecen subrayadas.

10 Como se ha visto en líneas anteriores, aunque ya se han descrito en el estado de la técnica síntesis de péptidos largos con pseudoprolinas en el ámbito académico, las pseudoprolinas no han sido aplicadas ni a escala industrial ni para sintetizar timosinas, lo cual avala la novedad y la capacidad y nivel inventivos de la presente invención.

SECUENCIAS PEPTÍDICAS	Nombre abreviado
Ac- <u>S</u> DAAVD <u>I</u> SSEI <u>I</u> TKDLKEKKEVVEEAEN-OH 28AA	α 1-Timosina
Ac- <u>S</u> DAAVD <u>I</u> SSEI <u>I</u> TKDLKEKKEVVE-OH 24AA	Des-(25-28)- α 1-Timosina
Ac- <u>S</u> DAAVD <u>I</u> SSEI <u>I</u> TKDLKEKKEVVEEAENGREAPAN-OH 35 AA	α 11-Timosina
Ac- <u>S</u> DKPDMAEIEKFDKSKLKKTEIQEKNPLPSKETIEQEKQAGES-OH 43AA	β 4-Timosina
Ac- <u>S</u> DKPDMAEIEKFDKAKLKKTEIQEKNPLPSKETIENEKNTSGES-OH 43AA	β 4 ^{Xen} -Timosina
Ac-ADKPD <u>L</u> GEIN <u>S</u> FDKAKLKKTEIQEKNILPTKEIQEKQ-OH 39AA	β 8-Timosina
Ac-ADKPD <u>L</u> GEIN <u>S</u> FDKAKLKKTEIQEKNILPTKEIQEKQAK-OH 41AA	β 9-Timosina
Ac-ADKPD <u>M</u> GEIA <u>S</u> FDKAKLKKTEIQEKNILPTKEIQEKRS <u>E</u> IS-OH 43AA	β 10-Timosina
Ac- <u>S</u> DKPNLEEV <u>A</u> SFDK <u>I</u> KLKKTEIQEKNPLPTKEIQEKQAS-OH 41AA	β 11-Timosina
Ac- <u>S</u> DKPD <u>L</u> AEVSNFDK <u>T</u> KLKKTEIQEKMP <u>L</u> PTKEIQEKQATA-OH 42AA	β 12-Timosina
H ₂ N- <u>S</u> DKPD <u>L</u> SEVE <u>I</u> FDK <u>S</u> KLKKINTEEKNTLPSKETIQEKEYNQRS-OH 44AA	β 15-Timosina

TABLA 3

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION:

La presente invención describe un procedimiento sintético nuevo para la preparación y obtención industrial de timosinas (α y β) usando dipéptidos pseudoprolina protegidos en posiciones estratégicas (Ver Tabla 4). Concretamente, el método de síntesis de timosinas propuesto en la presente invención describe un procedimiento que consta de las siguientes etapas:

a) Síntesis lineal de los péptidos en fase sólida sobre resina aplicando la metodología Fmoc/tBu,

b) Utilización de X-Thr o X-Ser, donde X es cualquier aminoácido, en forma de dipéptidos pseudoprolina en posiciones estratégicas de la secuencia según las siguientes pautas:

b.1) La inserción de dipéptidos pseudoprolina no es necesaria en la posición C-terminal ni en la N-terminal,

b.2) Incorporación de al menos un dipéptido pseudoprolina en la secuencia,

b.3) El efecto desestabilizador de estructura de las pseudoprolinas mantiene su influencia en los siguientes 5-6 aminoácidos,

b.4) La separación óptima entre dipéptidos pseudoprolina es de 5-6 aminoácidos.

b.5) La separación mínima entre dos dipéptidos pseudoprolina o una pseudoprolina y una prolina es preferentemente de dos residuos,

b.6) El resultado sintético es óptimo si el dipéptido pseudoprolina se encuentra en una región de residuos hidrofóbicos.

c) Rotura del enlace péptido-resina, desprotección de las cadenas laterales, apertura del ciclo de pseudoprolina y obtención de timosinas mediante el tratamiento de la peptidil-resina con ácido trifluoroacético,

d) En caso de existencia del aminoácido Met en la secuencia, tratamiento de desterbutilación del crudo con AcOH previo a la purificación por RP-HPLC.

La diferencia básica con respecto a otros procedimientos sintéticos ya existentes es la incorporación adicional en la secuencia de X-Thr y/o X-Ser en forma de dipéptidos pseudoprolina protegidos que conduce a la obtención del producto final con muy buenos rendimientos y elevada pureza (ver Tabla 2), siendo la pureza del crudo superior al 80%, pureza del producto puro superior al 99% y rendimiento global superior al 50%.

En la tabla 3 se muestran aquellas secuencias de las timosinas con todas las posibles posiciones para la incorporación de dipéptidos pseudoprolina.

El objeto de la presente invención se desarrolló porque la síntesis de péptidos largos supone un reto debido fundamentalmente a acoplamiento y desprotecciones poco eficientes, derivadas de los efectos de agregación también encontrados en secuencias no muy largas pero especialmente hidrofóbicas o repetitivas.

La presente invención pretende solucionar este problema técnico y para ello propone un procedimiento sintético para la obtención industrial de timosinas basado en la síntesis de péptidos en fase sólida, que aplican la metodología Fmoc/tBu sobre una resina tipo 2-clorotritilo, incorporando X-Ser y X-Thr en posiciones clave como dipéptidos pseudoprolina.

La síntesis en fase sólida de las timosinas con una función C-terminal ácido, se lleva cabo a partir de una resina de cloruro de 2-clorotritilo [Barlos K., Chatzi, O., Gatos, D., Stavropoulos, G, 2-Chlorotriyl chloride resin, Int. J. Peptide Protein Res., 1991 (37), 513-520]. Esta resina facilita la incorporación del primer aminoácido y minimiza la reacción secundaria de racemización. Esta resina además reduce el riesgo de formación de dicetopiperacina en el tratamiento básico con 20% piperidina en DMF posterior a la incorporación del segundo aminoácido sobre la resina.

Basándose en una estrategia de síntesis lineal Fmoc/tBu, tal y como se ha comentado en líneas anteriores, la presente invención se caracteriza porque incorpora aminoácidos Thr o Ser, según la secuencia peptídica, a través o mediante la adición de dipéptidos pseudoprolina en posiciones estratégicas de la secuencia peptídica.

SECUENCIAS PEPTÍDICAS	Nombre abreviado
Ac-SDAAVDTSSEIITKDLKEKKEVVEEAEN-OH 28AA	α 1-Timosina
Ac-SDAAVDTSSEIITKDLKEKKEVVE-OH 24AA	Des-(25-28)- α 1-Timosina
Ac-SDAAVDTSSEIITKDLKEKKEVVEAENGREAPAN-OH 35 AA	α 11-Timosina
Ac-SDKPDMAEIEKFDKSKLKKTEIQEKNPLPSKETIEQEKQAGES-OH 43AA	β 4-Timosina
Ac-SDKPDMAEIEKFDKAKLKKKTETQEKNPLPSKETIENEKNTSGES-OH 43AA	β 4 ^{Xen} -Timosina
Ac-ADKPDIGEINSFDKAKLKKTEIQEKNLPTKTEIQEKQ-OH 39AA	β 8-Timosina
Ac-ADKPDIGEINSFDKAKLKKTEIQEKNLPTKTEIQEKQAK-OH 41AA	β 9-Timosina
Ac-ADKPDMGIEIASFDKAKLKKTEIQEKNLPTKTEIQEKRSEIS-OH 43AA	β 10-Timosina
Ac-SDKPNLEEVASFDKTKLKKTEIQEKNPLPTKTEIQEKQAS-OH 41AA	β 11-Timosina
Ac-SDKPDLAEVSNFDKTKLKKTEIQEKMPPTKTEIQEKQATA-OH 42AA	β 12-Timosina
H ₂ N-SDKPDLSEVEITFDKSKLKKNTNEEKNTLPSKETIQEKEYNQRS-OH 44AA	β 15-Timosina

Tabla 4

La presente invención por tanto, se caracteriza porque incorpora aminoácidos Thr o Ser, según la secuencia peptídica, mediante la adición de dipéptidos pseudoprolina en posiciones estratégicas de la secuencia peptídica, siguiendo las siguientes pautas:

- a) La inserción de dipéptidos pseudoprolina no es necesaria en la posición C-terminal ni en la N-terminal,
- 5 b) La incorporación de al menos un dipéptido pseudoprolina en la secuencia,
- c) El efecto desestabilizador de estructura de las pseudoprolinas mantiene su influencia en los siguientes 5-6 aminoácidos,
- d) La separación óptima entre dipéptidos pseudoprolina es de 5-6 aminoácidos.
- 10 e) La separación mínima entre dos dipéptidos pseudoprolinas o una pseudoprolina y una prolina es preferentemente de dos residuos,
- f) El resultado sintético es óptimo si el dipéptido pseudoprolina se encuentra en una región de residuos hidrofóbicos.

La obtención y optimización de un proceso sintético para la producción de timosinas a nivel industrial ha supuesto un gran esfuerzo. Nuestro laboratorio ha abordado otras estrategias sintéticas para la obtención de timosinas sin éxito. Para obtener un proceso productivo rentable para la producción de β 4-timosina, se han estudiado tres estrategias diferentes:

Primera estrategia mediante síntesis convergente en fase sólida:

La síntesis de β 4-timosina ha sido abordada en una primera estrategia de síntesis convergente en fase sólida utilizando dos fragmentos (1-27) y (28-43)-resina. La etapa de activación y acoplamiento en fase sólida del fragmento 1-27 protegido sobre la peptidil-resina 28-43-resina protegida daba lugar a geles que bloqueaban la reacción. Con esta primera aproximación el producto final no pudo ser identificado.

Segunda estrategia mediante síntesis lineal en fase sólida:

Una segunda aproximación, la síntesis lineal en fase sólida paso a paso de β 4-timosina daba lugar a un crudo de síntesis de baja pureza, inviable para un proceso industrial de producción de β 4-timosina dada la dificultad de la etapa de purificación y el bajo rendimiento global obtenido.

25 Tercera estrategia mediante síntesis lineal en fase sólida con la estrategia Fmoc/tBu, y utilización de pseudoprolinas:

La tercera estrategia ha supuesto la resolución de un problema, la obtención de timosinas según un proceso competitivo a escala industrial. En la presente invención, para obtener un proceso sintético más rentable y competitivo, se ha incorporado la utilización de pseudoprolinas en la síntesis lineal en fase sólida con la estrategia Fmoc/tBu. Los resultados obtenidos en la síntesis comparativa entre la estrategia de síntesis lineal de la β 4-timosina y la misma estrategia incorporando pseudoprolinas pone de manifiesto la gran ventaja que supone la incorporación de las pseudoprolinas, ya que las pseudoprolinas son aminoácidos no naturales derivados de Cys, Ser o Thr con una estructura análoga a la prolina. El anillo cíclico de oxazolidina impide la estructuración de la cadena peptídica creciente aún anclada a la resina y bloquea la agregación de la peptidil-resina y el colapso de la síntesis. El tratamiento ácido final de la peptidil-resina regenera la Ser o Thr de la secuencia nativa.

35 La comparación entre la segunda y la tercera estrategia en términos de pureza del producto final se presenta en la Figura 1, en la que se observa el cromatograma de RP-HPLC del crudo de β 4-timosina obtenido siguiendo una estrategia SPPS lineal y siguiendo la misma estrategia Fmoc/tBu pero con la utilización de pseudoprolinas. Como se aprecia en la comparativa de ambos gráficos en la estrategia SPPS lineal el rendimiento es mucho menor que en la síntesis objeto de la presente invención.

40 Debemos considerar que para la síntesis lineal convencional fue necesaria la reactivación en las posiciones Ile (34), Thr (33), Lys (31), Ser (30), Pro (29), Leu (28), Pro (27), Asn (26), Lys (16) Ser (15), Lys (14), Asp (13), Phe (12), Lys (11), Glu (10), Ile (9), Glu (8), Ala (7), Met (6), Asp (5), Pro (4), Ser (1), siendo necesario en algunos casos reacoplar: Ile (34), Thr (33), Leu (28), Asn (26), Lys (16), Ser (15), Asp (13), Glu (10), Ile (9), Glu (8), Met (6), Asp (5).

Por el contrario en la síntesis lineal con pseudoprolinas sólo fue necesario reactivar en Ile (34) y Asn (26) y reacoplar

en este último, lo que indica que la adición de pseudoprolinas en el procedimiento de síntesis mejora de forma sustancial y sorprendente el rendimiento del procedimiento, haciéndolo más sencillo, más ventajoso y con un rendimiento muy superior a los procedimientos ya conocidos de síntesis de timosinas.

5 Una vez completada la síntesis objeto de la presente invención, con acetilación o no del extremo N-terminal, según el producto, la peptidil-resina se somete a un tratamiento final con ácido trifluoroacético y capturadores de carbocationes para escindir el péptido de la resina y eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales y la protección pseudoprolina. Finalmente el crudo resultante se purifica por RP-HPLC y el conjunto de fracciones puras se juntan y liofilizan, obteniéndose los productos finales con una pureza de más del 99%, con un rendimiento global superior al 50%.

10 En la Tabla 2 (expuesta en líneas anteriores) podemos observar la diferencia en rendimientos en estas estrategias y otras anteriormente publicadas para la síntesis de β -timosinas. La aproximación de síntesis lineal en fase sólida siguiendo una estrategia Fmoc/tBu sin la utilización de las pseudoprolinas da lugar a un crudo difícil de purificar (Figura 1A), obteniéndose el producto con un rendimiento muy bajo (Tabla 2). Sin embargo, la utilización de dipéptidos pseudoprolina en una estrategia lineal Fmoc/tBu mejora notablemente el rendimiento y la pureza del
 15 producto final. Para finalizar, y como conclusión de lo anteriormente expuesto, el punto clave e inventivo del procedimiento sintético reivindicado en la presente invención se fundamenta en la utilización de dipéptidos pseudoprolina en posiciones clave de la síntesis, siguiendo las pautas anteriormente mencionadas, evitando secuencias que provocan la agregación de la cadena creciente sobre la resina y eliminando así problemas de acoplamiento y desprotecciones incompletas que conducen a un crudo peptídico de baja calidad y por tanto a un
 20 bajo rendimiento de síntesis, con la consecuente dificultad en el proceso de purificación.

El éxito del proceso sintético se desarrolla para la presente invención como un proceso competitivo para la síntesis de las timosinas a gran escala, ya que resulta ser un procedimiento poco costoso, rápido y con un rendimiento y pureza superiores a los descritos en el estado de la técnica.

Las abreviaturas empleadas en la presente descripción tienen los siguientes significados:

25 Ac₂O: Anhídrido acético.

AcOH: Ácido acético.

Boc: Terc-butoxicarbonilo.

DCM: Diclorometano.

DIEA: N,N'-diisopropiletilamina.

30 DIPCDI: Diisopropilcarbodiimida.

DMF: N,N-dimetilformamida.

Fmoc: 9-Fluoroenilmetoxicarbonilo.

HF: Ácido fluorhídrico.

HOBT: N-hidroxibenzotriazol.

35 HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Presión.

μ L: microlitros.

μ mol: micromoles.

tBu: Terc-butilo.

TFA: Ácido trifluoroacético.

40 Trt: tritilo.

Aminoácidos:

Ala (A): L-Alanina

Arg (R): L-Arginina

Asn (N): L-Asparagina

Asp (D): L-Aspártico

5 Gln(Q): L-Glutamina

Glu (E): L-Glutámico

Gly (G): L-Glicina

Ile (I): L-Isoleucina

Leu (L): L-Leucina

10 Lys (K): L-Lisina

Met (M): L-Metionina

Phe (F): L-Fenilalanina

Pro (P): L-Prolina

Ser (S): L-Serina

15 Thr (T): L-Treonina

Tyr (Y): L-Tirosina

Val (V): L-Valina

20 Según un primer aspecto importante, la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables mediante síntesis en fase sólida sobre soportes poliméricos que comprende las siguientes etapas:

a. Sintetizar linealmente los péptidos derivados de timus en fase sólida sobre una resina aplicando la metodología Fmoc/tBu,

b. Incorporar al menos una X-Thr y/o X-Ser en forma de dipéptidos pseudoprolina en la secuencia,

c. Adicionar de forma intercalada los dipéptidos pseudoprolina con una distancia de al menos 5 aminoácidos,

25 d. Obtener las timosinas mediante el tratamiento de peptidil-resina con ácido trifluoroacético que provoca de forma simultánea ruptura del enlace péptido-resina, desprotección de las cadenas laterales y apertura del ciclo de pseudoprolina,

e. Purificar las timosinas por RP-HPLC.

30 La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables en el que se obtienen α -timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables en el que se obtienen β -timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables en el que la síntesis se realiza sobre soportes poliméricos.

35 La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables donde en la etapa a) se utiliza una resina de tipo cloro-tritilo.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables donde en la etapa a) se utiliza una resina de tipo pMBHA.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables donde en la etapa b) la incorporación de Ser o Thr se lleva a cabo de forma adicional como dipéptidos pseudoprolina y/o Ser o Thr modificadas en forma de pseudoprolina en la peptidil-resina.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables donde preferentemente la separación mínima entre dos dipéptidos pseudoprolina o una pseudoprolina y una prolina es de dos aminoácidos.

10 La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables donde preferentemente el dipéptido pseudoprolina se adiciona en una región de aminoácidos hidrofóbicos.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables en el que si tras la etapa d) aparece el aminoácido Met en la secuencia se realiza adicionalmente un tratamiento de destercbutilación del crudo con AcOH.

15 Según un segundo aspecto importante, la presente invención se refiere a un compuesto aislado y/o purificado obtenido por el procedimiento anterior que comprende una secuencia de aminoácidos la cual tiene al menos un 80% de identidad con las secuencias SEQ.ID.N.1 a SEQ.ID.N.11 sobre toda su longitud.

20 La presente invención se refiere a un compuesto aislado y/o purificado obtenido por el procedimiento anterior que consiste en una secuencia aminoacídica escogida del grupo formado por las secuencias SEQ.ID.N.1 a SEQ.ID.N.11, por sus secuencias complementarias y/o por sus secuencias homólogas y/o por sus secuencias equivalentes funcionales.

25 La presente invención se refiere a un compuesto aislado y/o purificado obtenido por el procedimiento anterior que incluye fragmentos de al menos una secuencia de aminoácidos escogida del grupo formado por las secuencias SEQ.ID.N.1 a SEQ.ID.N.11, por sus secuencias complementarias, por sus secuencias homólogas y por sus secuencias equivalentes funcionales.

La presente invención se refiere a un compuesto aislado y/o purificado obtenido por el procedimiento anterior en el que alguno de los aminoácidos comprendidos en las secuencias SEQ.ID.N.1 a SEQ.ID.N.11 se selecciona del grupo formado por L-aminoácidos, D-aminoácidos, N-metil aminoácidos, aminoácidos no naturales, Met-tBu o Met-oxidada.

30 La presente invención se refiere a un compuesto aislado y/o purificado obtenido por el procedimiento anterior que incluye modificaciones en el aminoácido N-terminal seleccionadas de acilaciones y/o pegilaciones.

Según un tercer aspecto importante la presente invención se refiere al uso del compuesto obtenido por el procedimiento anteriormente mencionado en la preparación de un medicamento.

35 La presente invención se refiere al uso del compuesto obtenido por el procedimiento anteriormente mencionado en la preparación de un medicamento para la regulación de la respuesta inmune, biología vascular y patogénesis del cáncer.

Ejemplos de realización:

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que se reivindica en la presente memoria.

40 Ejemplo 1: Síntesis de la α 1-timosina

45 La incorporación del residuo C-terminal Fmoc-Asn-OH sobre la resina 2 clorotritilo se realiza con un defecto de aminoácido, con la finalidad de obtener una funcionalización de 0,85 mmol/g después de la incorporación del primer aminoácido. Sobre 2,5 g de resina ($f = 1,6$ mmol/g de resina, 4 mmol) se incorporan 0,8 g de aminoácido (2,13 mmol, 0,5 eq.). Se pesan en recipientes separados la resina y el aminoácido y se dejan secar a vacío un mínimo de 4 horas. Se disuelve el aminoácido en 25 mL de DCM seco (sobre tamiz de 4 Å). Se añade DIEA (0,7 mL, 1,6 mmol, 1 eq.) y se agita durante 5 min. Se prepara un disolución 1:1 (2,8 ml) de DIEA:DCM (1,4 mL, 3,2 mmol, 2 eq.) y se añade a la mezcla de reacción. Se deja bajo agitación durante 40 min más y seguidamente se añaden 4 mL de

MeOH seco y se deja reaccionar 10 min, después de los cuales se filtra la resina en un reactor de síntesis equipado con una placa filtrante y una llave y se procede a los siguientes lavados:

Paso	Reactivo	Repeticiones	Tiempo	
1	DCM	3	1 min	
5	2	DMF	5	1 min
3	5% piperidina en DMF	1	10 min	
4	20% piperidina en DMF	1	15 min	
5	DMF	5	1 min	

10 La incorporación de los siguientes aminoácidos se realiza en todos los casos con un exceso de 2,5 eq de aminoácido, HOBT y DIPCDI respecto a la funcionalización de la resina después de la incorporación del primer aminoácido (0,85 mmol/g). Se deja reaccionar durante 40-60 min y posteriormente se realiza la desprotección del grupo Fmoc con 20% de piperidina en DMF durante 5 min 2 veces y durante 10 min otras 2 veces.

El dipéptido Fmoc-Ile-Thr($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH (correspondiente a los aminoácidos 11-12 de la secuencia de la α 1-timosina) fue incorporado utilizando 2,5 eq. de dipéptido, HOBT y DIPCDI, dejándolo reaccionar durante 1 h.

15 La eficacia del acoplamiento se controla mediante el test de ninhidrina. Si es positivo, se reactiva utilizando 1/3 eq. HOBT y DIPCDI y si después de la reactivación aún es positivo, se reacopla utilizando 1/2 eq. de Fmoc-AA-OH, HOBT y DIPCDI respecto a los equivalentes utilizados en el primer acoplamiento. Si después de reactivar, reacoplar y reactivar de nuevo el test de la ninhidrina sigue siendo positivo, se procede a la acetilación utilizando 2,5 eq. Ac_2O , y DIEA durante 15 min.

20 Las posiciones en que fue necesario reactivar y/o reacoplar se detallan a continuación: Ser (1), Ser(2), Thr(7), dipéptido pseudoprolina (11-12), Lys(14), Leu(16), Lys(17), Glu(18), Lys(19).

El rendimiento al final de la síntesis es cuantitativo en la obtención de Ac-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Ala-Ala-Val-Asp(OtBu)-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Ile-Thr($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-Thr(tBu)-Lys(Boc)-Asp(OtBu)-Leu-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Val-Val-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-Glu(OtBu)-Asn-resina.

25 7 g de peptidil-resina se tratan durante 1h 30 min con 80 mL de la mezcla TFA: H_2O 95:5 bajo agitación. Una vez acabada la reacción, la resina se separa del producto por filtración y se lava con TFA. Se añade éter dietílico (560 mL) sobre la solución de TFA y el precipitado blanco se filtra en una placa P3 y se lava con MeOH y éter dietílico. Rendimiento de síntesis: 40%.

Caracterización del producto:

30 ESI-MS: M teórica = 3108 g/mol, M experimental: (m/z): $[\text{M}+2\text{H}]^+/2=1555$; $[\text{M}+3\text{H}]^+/3=1037$, $[\text{M}+4\text{H}]^+/4=778$, $[\text{M}+5\text{H}]^+/5=623$.

RP-HPLC analítico: Gradiente: 5-85% B en 20 min, $t_r=11.7$ min; Isocrático: 19% B en 30 min, $t_r=16,5$ min (B= 0.07% TFA en acetonitrilo).

Ejemplo 2: Síntesis de la β 4-timosina

35 La β 4-timosina se sintetizó siguiendo una estrategia de síntesis peptídica en fase sólida utilizando los protectores Fmoc/tBu. Para la incorporación del primer aminoácido sobre la resina 2-clorotritilo (1 g, 1,6 mmol/g) se utilizaron el aminoácido $\text{N}\alpha$ -Fmoc-prottegido (0,5 eq) y DIEA (3 eq.) en DCM, para conseguir una funcionalización de 0,85 mmol/g después de la incorporación del primer aminoácido. Se deja bajo agitación magnética durante 40 min y seguidamente se añaden 4 mL de MeOH seco y se deja reaccionar 10 min. Se filtra la resina en un reactor de síntesis equipado con una placa filtrante y una llave y se procede a los siguientes lavados con DCM y DMF. La resina se trata con 5% piperidina en DMF 1 x 10 min y 20% piperidina en DMF 1 x 15 min y se aclara con DMF. El resto de aminoácidos fueron incorporados utilizando $\text{N}\alpha$ -Fmoc-prottegidos (3 eq.), HOBT (3 eq.) y DIPCDI (3 eq.) en DMF, equivalentes calculados respecto a la funcionalización de la resina una vez incorporado el primer aminoácido.

40 Como grupos protectores para las cadenas laterales se eligieron los siguientes: para Arg, 2,2,4,6,7-pentametilhidrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf), el tert-butiloxycarbonilo (Boc) para las cadenas laterales de Lys, Glu y

45

Asp y el tert-butilo para las cadenas laterales de Thr y Ser. La escisión del grupo protector temporal Fmoc se llevó a cabo por tratamiento con una solución de 20% piperidina en DMF (2 veces durante 5 min y 2 veces más durante 10 min). Los dipéptidos pseudoprolina se incorporaron en la síntesis como Fmoc-Lys(Boc)-Ser($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH en lugar de los aminoácidos 14-15 y Fmoc-Glu(OtBu)-Thr($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH en las posiciones de los aminoácidos 21-22 y 32-33. Dichas posiciones se eligieron entre las posibles por su disposición en la secuencia peptídica, proximidad óptima a la posición C-terminal, proximidad óptima a residuos Pro y distancia óptima entre pseudoprolinas.

La eficacia del acoplamiento se controla con el test de ninhidrina. Si es positivo, se reactiva utilizando 1/3 eq. HOBT y DIPCDI y si después de la reactivación aún es positivo, se reacopla utilizando 1/2 eq. De Fmoc-AA-OH, HOBTy DIPCDI respecto al primer acoplamiento. Si después de reactivar, reacoplar y reactivar de nuevo, el test de ninhidrina sigue siendo positivo, se procede a la acetilación utilizando 2,5 eq. Ac₂O, y DIEA durante 15 min.

Las posiciones en que fue necesario reactivar fueron Ile(34) y Asn(26) y en este último también se reacopló.

El rendimiento al final de la síntesis de Ac-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OtBu)-Met-Ala-Glu(OtBu)-Ile-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Phe-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Ser($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Glu(OtBu)-Thr($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-Gln-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Asn-Pro-Leu-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Thr($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-Ile-Glu(OtBu)-Gln-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Gln-Ala-Gly-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-resina es cuantitativo.

4,8 g de peptidil-resina se tratan con 24 mL de la mezcla TFA: H₂O 95:5 durante 2 h bajo agitación. Se filtra la suspensión y el filtrado se precipita con éter (168 mL). El crudo se filtra en una placa P3, se lava con MeOH y éter dietílico y se seca a vacío. El péptido se trató con una disolución de 4% AcOH en H₂O durante 1h 30 min a 37°C y posteriormente se purificó por RP-HPLC preparativo. El producto final se caracterizó por espectrometría de masas en un equipo ESI-MS y se analizó según especificaciones. Pureza: 99%, Rendimiento: 50%.

Caracterización del producto:

ESI-MS: M teórica = 4962 g/mol, M experimental: (m/z): [M+4H]⁺/4 = 1242; [M+ 5H]⁺/5 = 994; [M+ 6H]⁺/6 = 828; [M+ 7H]⁺/7 = 710.

RP-HPLC analítico: Gradiente: 5-85% B en 20 min, tr =11,6 min; Isocrático: 20% B en 30 min, tr =19 min (B= 0.07% TFA en acetonitrilo).

Ejemplo 3: Síntesis de la β 15-timosina

El procedimiento sintético fue similar al utilizado para la β 4-timosina. El dipéptido Fmoc-Lys(Boc)-Ser($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH se utilizó en sustitución de los aminoácidos 14-15, Fmoc-Asn(Trt)-Thr($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH en las posiciones de los aminoácidos 21-22 y Fmoc-Glu(OtBu)-Thr($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-OH en las posiciones 32-33. Sólo fue necesario un reacoplamiento en la Lys(3).

La peptidil-resina Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Pro-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Val-Glu(OtBu)-Thr(tBu)-Phe-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Ser($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-Lys(Boc)-Leu-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Asn(Trt)-Thr($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Asn-Thr(tBu)-Leu-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Thr($\Psi^{\text{Me, Me}}$ pro)-Ile-Gln-Gln-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Asn-Gln-Arg(Pbf)-Ser(tBu)-resina se obtuvo con un rendimiento cuantitativo.

El péptido se escindió de la resina haciéndola reaccionar con una mezcla de TFA:H₂O 95:5 durante 1h 30 min, se precipitó con éter dietílico y se liofilizó. El crudo se purificó en un RP-HPLC semipreparativo y el producto final se caracterizó por espectrometría de masas en un equipo ESI-MS. Pureza:98%. Rendimiento:50%

Caracterización del producto:

ESI-MS: M teórica = 5173 g/mol, M experimental: (m/z): [M+6H]⁺/6 = 863, [M+7H]⁺/7 = 740, [M+8H]⁺/ 8 = 648, [M+9H]⁺/9 = 576.

RP-HPLC analítico: Gradiente: 5-85% B en 20 min, tr =11,5 min; Isocrático: 20% B en 30 min, tr =11.5 min (B= 0.07% TFA en acetonitrilo).

Aunque la presente invención ha sido descrita en relación con estos casos particulares, muchas otras variaciones y modificaciones y otros usos están relacionados con aquellos especificados en la técnica. La presente invención de este modo no está limitada por la revelación específica en ella misma, sino solamente por las reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BCN-PEPTIDES

<120> PROCEDIMIENTO PARA SINTETIZAR TIMOSINAS

<130> TIMOSINAS-BCN

5 <140> ES-2006-02-27

<141> 2006-04-24

<160> 11

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

10 <211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Alfa-1-Timosina

15 <400> 1

Ser Asp Ala Ala Val Asp Thr Ser Ser Glu Ile Thr Thr Lys Asp Leu

1 5 10 15

Lys Glu Lys Lys Glu Val Val Glu Glu Ala Glu Asn

 20 25

20 <210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Des-(25-28)-Alfa1-Timosina

<400> 2

Ser Asp Ala Ala Val Asp Thr Ser Ser Glu Ile Thr Thr Lys Asp Leu

1 5 10 15

Lys Glu Lys Lys Glu Val Val Glu

30 20

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Alfa-11-Timosina

<400> 3

Ser Asp Ala Ala Val Asp Thr Ser Ser Glu Ile Thr Thr Lys Asp Leu

1 5 10 15

Lys Glu Lys Lys Glu Val Val Glu Glu Ala Glu Asn Gly Arg Glu Ala

10 20 25 30

Pro Ala Asn

35

<210> 4

<211> 43

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Beta-4-timosina

<400> 4

20 Ser Asp Lys Pro Asp Met Ala Glu Ile Glu Lys Phe Asp Lys Ser Lys

1 5 10 15

Leu Lys Lys Thr Glu Thr Gln Glu Lys Asn Pro Leu Pro Ser Lys Glu

20 25 30

Thr Ile Glu Gln Glu Lys Gln Ala Gly Glu Ser

35 40

<210> 5

<211> 44

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Beta-4Xen-Timosina

<400> 5

10 Ser Asp Lys Pro Asp Met Ala Glu Ile Glu Lys Phe Asp Lys Ala Lys

1 5 10 15

Leu Lys Lys Thr Glu Thr Gln Glu Lys Asn Pro Leu Pro Ser Lys Glu

20 25 30

Thr Ile Glu Asn Glu Lys Asn Thr Ser Gly Glu Ser

15 35 40

<210> 6

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Beta-8-Timosina

<400> 6

Ala Asp Lys Pro Asp Leu Gly Glu Ile Asn Ser Phe Asp Lys Ala Lys

1 5 10 15

25 Leu Lys Lys Thr Glu Thr Gln Glu Lys Asn Thr Leu Pro Thr Lys Glu

20 25 30

Thr Ile Glu Gln Glu Lys Gln

35

<210> 7

30 <211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Beta-9-timosina

<400> 7

5 Ala Asp Lys Pro Asp Leu Gly Glu Ile Asn Ser Phe Asp Lys Ala Lys

1 5 10 15

Leu Lys Lys Thr Glu Thr Gln Glu Lys Asn Thr Leu Pro Thr Lys Glu

20 25 30

Thr Ile Glu Gln Glu Lys Gln Ala Lys

10 35 40

<210> 8

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Beta-10-timosina

<400> 8

Ala Asp Lys Pro Asp Met Gly Glu Ile Ala Ser Phe Asp Lys Ala Lys

1 5 10 15

20 Leu Lys Lys Thr Glu Thr Gln Glu Lys Asn Thr Leu Pro Thr Lys Glu

20 25 30

Thr Ile Glu Gln Glu Lys Arg Ser Glu Ile Ser

35 40

<210> 9

25 <211> 41

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Beta-11-timosina

30 <400> 9

Ser Asp Lys Pro Asn Leu Glu Glu Val Ala Ser Phe Asp Lys Thr Lys

ES 2 399 248 T3

1 5 10 15

Leu Lys Lys Thr Glu Thr Gln Glu Lys Asn Pro Leu Pro Thr Lys Glu

20 25 30

Thr Ile Glu Gln Glu Lys Gln Ala Ser

5 35 40

<210> 10

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Beta-12-timosina

<400> 10

Ser Asp Lys Pro Asp Leu Ala Glu Val Ser Asn Phe Asp Lys Thr Lys

1 5 10 15

15 Leu Lys Lys Thr Glu Thr Gln Glu Lys Met Pro Leu Pro Thr Lys Glu

20 25 30

Thr Ile Glu Gln Glu Lys Gln Ala Thr Ala

35 40

<210> 11

20 <211> 44

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Beta-15-timosina

25 <400> 11

Ser Asp Lys Pro Asp Leu Ser Glu Val Glu Thr Phe Asp Lys Ser Lys

1 5 10 15

ES 2 399 248 T3

Leu Lys Lys Thr Asn Thr Glu Glu Lys Asn Thr Leu Pro Ser Lys Glu

20

25

30

Thr Ile Gln Gln Glu Lys Glu Tyr Asn Gln Arg Ser

35

40

5

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables mediante síntesis en fase sólida sobre soportes poliméricos caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
 - 5 a. sintetizar linealmente los péptidos derivados de timus en fase sólida sobre una resina aplicando la metodología Fmoc/tBu,
 - b. incorporar al menos una Thr o Ser en forma de dipéptido pseudoprolina en la secuencia,
 - c. obtener las timosinas mediante el tratamiento de peptidil-resina con ácido trifluoroacético que provoca de forma simultánea ruptura del enlace péptido-resina, desprotección de las cadenas laterales y apertura del ciclo de pseudoprolina,
 - 10 d. purificar las timosinas por RP-HPLC.
2. Un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1, caracterizado por que se obtienen α -timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 15 3. Un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1, caracterizado por que se obtienen β -timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables.
4. Un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1, caracterizado por que la síntesis se realiza sobre soportes poliméricos.
- 20 5. Un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1, caracterizado por que en la etapa a) se utiliza una resina de tipo cloro-tritilo de funcionalización 0.1-2 mmol/g.
6. Un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1, caracterizado por que en la etapa a) se utiliza una resina de tipo pMBHA de funcionalización 0.1-2 mmol/g.
- 25 7. Un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables según la reivindicación 1, caracterizado por que en la etapa b) la incorporación de Ser o Thr se lleva a cabo en forma de dipéptidos pseudoprolina y/o Ser o Thr modificadas en forma de pseudoprolina en la peptidil-resina.
8. Un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que el dipéptido pseudoprolina se adiciona en una región de aminoácidos hidrofóbicos.
- 30 9. Un procedimiento para la obtención de timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que si tras la etapa c) aparece el aminoácido Met en la secuencia, se realiza adicionalmente un tratamiento de destercbutilación del crudo con AcOH.
- 35 10. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que las timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con las secuencias SEQ.ID.N.1 a SEQ.ID.N.11 sobre toda su longitud.
11. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que las timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables consisten en una secuencia de aminoácidos elegida del grupo formado por las secuencias SEQ.ID.N.1 a SEQ.ID.N.11 y sus secuencias complementarias.
- 40 12. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que las timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables incluyen fragmentos de al menos una secuencia de aminoácidos elegida del grupo formado por las secuencias SEQ.ID.N.1 a SEQ.ID.N.11 y sus secuencias complementarias.
- 45 13. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que todos o alguno de los aminoácidos comprendidos en las secuencias SEQ.ID.N.1 a SEQ.ID.N.11 se seleccionan del grupo formado por L-aminoácidos, D-aminoácidos, N-metil aminoácidos, aminoácidos no naturales, Met-tBu o Met-oxidada.

14. Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que las timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables incluyen modificaciones en el aminoácido N-terminal seleccionadas de acilaciones y/o pegilaciones.
- 5 15. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende la etapa adicional de preparación de un medicamento que comprende dichas timosinas y/o sus sales farmacéuticamente aceptables.