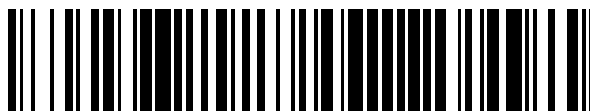


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 197**

51 Int. Cl.:

C07K 1/02 (2006.01)

C07K 1/08 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

C07K 5/08 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2008 E 08828960 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2195329**

54 Título: **Método para la síntesis química de polipéptidos y proteínas**

30 Prioridad:

28.08.2007 US 966416 P

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

03.02.2014

73 Titular/es:

**IPSEN PHARMA S.A.S. (100.0%)
65, QUAI GEORGES GORSE
92100 BOULOGNE-BILLANCOURT, FR**

72 Inventor/es:

**DONG, ZHENG XIN y
EYNON, JOHN S.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 441 197 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

Método para la síntesis química de polipéptidos y proteínas

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a métodos y compuestos intermedios para la síntesis química de polipéptidos y proteínas y, más particularmente, a métodos y compuestos intermedios para ligar químicamente un fragmento de péptido que contiene N-metil-cisteína N-terminal (SEQ ID NO: 1) con otro fragmento de péptido que tiene un tioéster C-terminal, para generar un compuesto intermedio de β -(metilamino)-tioéster que se re-dispone espontáneamente para formar un enlace amida. Además, la invención se refiere a métodos de convertir N-metil-tiazolidina en N-metil-cisteína (SEQ ID NO: 1) de polipéptidos y proteínas.

10 Se han desarrollado varias técnicas para sintetizar químicamente proteínas. Véase, *p. ej.*, Stewart, J. M. *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co., 2ª ed., 1984) y Bodanszky, M. *et al.*, *The Practice of Peptide Synthesis* (Springer-Verlag, 1984). Entre ellas, el ligamiento químico nativo ha demostrado ser uno de los métodos más útiles para generar químicamente proteínas nativas. Sin embargo, el ligamiento químico nativo es sólo adecuado para la síntesis de polipéptidos y proteínas con residuo(s) cisteína, que se pueden utilizar como el o los puntos de conexión para ligar fragmentos de péptidos para formar los polipéptidos y proteínas dianas finales.

15 Para producir análogos y derivados de polipéptidos y proteínas que tengan propiedades químicas y biológicas mejoradas se requiere a veces la incorporación de residuo(s) aminoácidos no naturales en posición o posiciones específicas dentro de los polipéptidos y proteínas. Análogos y derivados de este tipo pueden tener estabilidad química mejorada, estabilidad enzimática mejorada, prolongada duración de la acción *in vivo* y actividades biológicas mejoradas. Una clase de aminoácidos no naturales de este tipo son los N-metil-aminoácidos. Los N-metil-aminoácidos pueden imponer una limitación conformacional a la cadena principal del péptido, bloquear sitios de unión de hidrógeno y proteger potencialmente los enlaces péptido frente a la escisión enzimática (véase, *p. ej.*, Haviv, F. *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1993, 36:363-369; Failie, D.P., *et al.*, *Curr. Med. Chem.*, 1995, 2:654-686; Miller, S.M., *et al.*, *Drug Dev. Res.*, 1995, 35:20-32; y Schmidt, R., *et al.*, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1995, 46:47-55). N-metil-cisteína (SEQ ID NO: 1) es un miembro de esta clase de aminoácidos no naturales. Para generar análogos y derivados de proteínas biológicamente más activos y enzimáticamente más estables, existe la necesidad de desarrollar un nuevo método químico para incorporar un residuo N-metil-cisteína (SEQ ID NO: 1) en cualquier posición deseada dentro de las proteínas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 La FIG. 1 es una ilustración que muestra un esquema de síntesis para formar un enlace amida de acuerdo con un aspecto de la presente invención.

La FIG. 2 es una ilustración que muestra un esquema de síntesis para proteger N-metil-cisteína N-terminal (SEQ ID NO: 1) en una forma de N-metil-tiazolidina durante la síntesis química de polipéptidos y proteínas de acuerdo con un aspecto de la presente invención.

35 La FIG. 3 es una ilustración que muestra un esquema de síntesis para sintetizar un péptido-tioéster a partir de un péptido-ácido protegido.

COMPENDIO DE LA INVENCION

40 La presente invención está dirigida a un método para formar un enlace amida entre dos moléculas que pueden ser proteínas, polipéptidos, peptidomiméticos, polímeros o cualquier combinación de los mismos. Entre estas dos moléculas, una - la "primera" - molécula contiene un residuo HN-metil-cisteína (o simplemente, "N-metil-cisteína" (SEQ ID NO: 1)) terminal y la otra - la "segunda" - molécula contiene un grupo funcional tioéster. Durante la reacción, las dos moléculas se conectan primero a través de un enlace β -(metilamino)-tioéster, y luego el enlace β -(metilamino)-tioéster se convierte espontáneamente en el enlace amida final a través de una re-disposición intramolecular, tal como se muestra en la FIG. 1. El producto final resultante contiene los restos de las dos moléculas que están conectadas a través del enlace amida recién formado.

45 Otro aspecto de la presente invención está dirigido a una reacción de ligamiento que se lleva a cabo en disolución o en fase sólida. El medio de reacción puede contener catalizador o catalizadores de tiol. Catalizadores de tiol de este tipo incluyen, pero no se limitan a tiofenol, 1-tio-2-nitrofenol, ácido 2-tio-benzoico, 2-tio-piridina, ácido 4-tio-2-piridinacarboxílico, 4-tio-2-nitropiridina, ácido 4-mercaptofenilacético, ácido 2-mercaptoetanosulfónico, ácido 3-mercapto-1-propanosulfónico y ácido 2,3-dimercaptopropanosulfónico.

50 Otro aspecto de la presente invención está dirigido a la conversión de N-metil-tiazolidina en N-metil-cisteína (SEQ ID NO: 1). Para este ligamiento escalonado se necesita un fragmento de péptido que porte N-metil-cisteína N-terminal (SEQ ID NO: 1) y tioéster C-terminal. Sin embargo, los grupos tio-protectores convencionales tales como bencilo para la química Boc, y tritilo y t-butilo para la química Fmoc, no se pueden utilizar para proteger el grupo sulfhidrido de la N-metil-cisteína N-terminal (SEQ ID NO: 1). Esto es debido al hecho de que durante la etapa de escisión final

se separará un grupo protector convencional de este tipo y se generará un grupo sulfhidrilo libre, el cual reaccionará con el tioéster C-terminal para formar productos indeseados.

Para acometer este problema, la presente invención proporciona un método para proteger N-metil-cisteína N-terminal (SEQ ID NO: 1) en una forma de N-metil-tiazolidina durante la síntesis química de polipéptidos y proteínas, tal como se muestra en la FIG. 2. La N-metil-tiazolidina permanecerá intacta durante la etapa de escisión y se generará un compuesto intermedio peptídico que contiene N-metil-tiazolidina N-terminal y tioéster C-terminal. Este compuesto intermedio se utilizará en la reacción de ligamiento con otro fragmento de péptido que contiene tioéster C-terminal. Sólo después de la reacción de ligamiento, la N-metil-tiazolidina en el producto se convertirá en una N-metil-cisteína libre (SEQ ID NO: 1) utilizando un agente nucleofílico bajo condiciones de carácter ácido, en donde dicho agente nucleofílico es O-alquilhidroxilamina y, más específicamente, en donde dicha O-alquilhidroxilamina es O-metilhidroxilamina, y en donde dichas condiciones de carácter ácido se encuentran en el intervalo de pH 2,0 a pH 6,0. El fragmento de péptido mayor resultante con un residuo N-metil-cisteína N-terminal (SEQ ID NO: 1) se puede utilizar para una etapa de ligamiento adicional utilizada para generar polipéptidos o proteínas incluso mayores.

Resultará evidente para un experto en la técnica que se pueden utilizar otros reaccionantes y compuestos intermedios que incluyen, pero no se limitan a N-cisteína (C₁-C₅) (SEQ ID NO: 1), N-tiazolidina (C₁-C₅), β-(amino C₁-C₅)-tioéster, y similares.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un método para formar un enlace amida entre una primera molécula que tiene un resto tioéster y una segunda molécula que tiene un residuo N-cisteína (C₁-C₅) (SEQ ID NO: 1) con un resto sulfhidrilo no oxidado, que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar dicho resto tioéster de la primera molécula con dicho resto sulfhidrilo no oxidado del residuo N-cisteína (C₁-C₅) (SEQ ID NO: 1) de la segunda molécula para generar un compuesto intermedio que conecta las primera y segunda moléculas con un enlace β-(amino C₁-C₅)-tioéster; y

(b) permitir que el enlace β-(amino C₁-C₅)-tioéster del compuesto intermedio se re-disponga intramolecularmente para formar un enlace amida que conecta dichas primera y segunda moléculas.

La invención proporciona también un método para sintetizar un polipéptido o una proteína mediante ligamiento de dos fragmentos de péptido, que comprende las etapas de:

(a) formar un enlace amida mediante ligamiento de un tioéster C-terminal del primer fragmento de péptido que contiene N-tiazolidina (C₁-C₅) N-terminal con una N-cisteína (C₁-C₅) N-terminal (SEQ ID NO: 1) del segundo fragmento de péptido; y

(b) tratar el producto de ligamiento con un agente nucleofílico bajo condiciones de carácter ácido para convertir el residuo N-tiazolidina (C₁-C₅) N-terminal en el residuo N-cisteína (C₁-C₅) N-terminal (SEQ ID NO: 1).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Determinados aminoácidos presentes en los compuestos de la invención se pueden representar en la presente memoria como sigue:

Ala o A es alanina,

Arg o R es arginina,

Asn o N es asparagina,

Asp o D es ácido aspártico,

Cys o C es cisteína,

Gln o Q es glutamina,

Glu o E es ácido glutámico,

Gly o G es glicina,

His o H es histidina,

Ile o I es isoleucina,

Leu o L es leucina,

Lys o K es lisina,

Met o M es metionina,

Nle es norleucina,

Phe o F es fenilalanina,

Pro o P es prolina,

Ser o S es serina,

5 Thr o T es treonina,

Trp o W es triptófano,

Tyr o Y es tirosina, y

Val o V es valina.

Ciertas abreviaturas utilizadas en esta memoria se definen a continuación:

10 Boc es *tert*-butiloxicarbonilo,

Bzl es bencilo,

DCM es diclorometano,

DIC es N,N-diisopropilcarbodiimida,

DIEA es diisopropiletilamina,

15 Dmab es 4-[N-(1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-3-metilbutil)-aminobencilo,

DMAP es 4-(dimetilamino)piridina,

DMF es dimetilformamida,

DNP es 2,4-dinitrofenilo,

Fmoc es fluorenilmetiloxicarbonilo,

20 HBTU es hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio,

cHex es ciclohexilo,

HOAt es hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio,

HOBt es 1-hidroxi-benzotriazol,

Mmt es 4-metoxitritilo,

25 NM es N-metilpirrolidona,

Pbf es 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo,

Ph es fenilo,

tBu es *tert*-butilo,

TIS es triisopropilsilano,

30 TOS es tosilo,

Trt es tritilo,

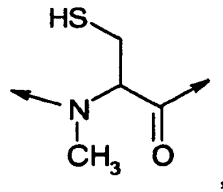
TFA es ácido trifluoroacético,

TFFH es hexafluorofosfato de tetrametilfluoroformidinio y

Z es benciloxicarbonilo.

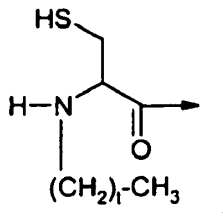
35 Todas las abreviaturas (*p. ej.*, Ala) de aminoácidos en esta descripción representan la estructura de -NH-C(R)(R')-CO-, en donde R y R' cada uno es, independientemente, hidrógeno o la cadena lateral de un aminoácido (*p. ej.*, R = CH₃ y R' = H, para Ala), o R y R' pueden estar unidos para formar un sistema de anillos.

Lo que se quiere dar a entender por "N-metil-cisteína" (SEQ ID NO: 1), "NMe-Cys", "N-MeCys" o "NMeCys", términos que son equivalentes entre sí, es:



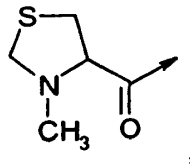
que pueden estar en la configuración L o D.

- 5 Lo que se quiere dar a entender por "N-cisteína (C₁-C₅)" o N-Cys (C₁-C₅)" (SEQ ID NO: 1), términos que son equivalentes entre sí, es:



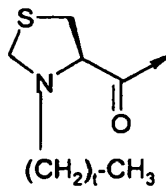
en donde t es un número entero de 0 a 4, y que puede estar en la configuración L o D.

- 10 Lo que se quiere dar a entender por "N-metil-tiozolidina" (SEQ ID NO: 1), "NMe-Thz", "N-MeThz" o "NMeThz", términos que son equivalentes entre sí, es:



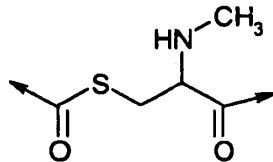
que pueden estar en la configuración L o D.

Lo que se quiere dar a entender por "N-tiazolidina (C₁-C₅)" es:

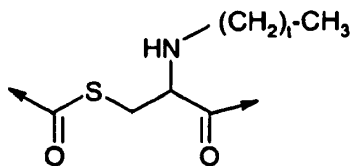


- 15 en donde t es un número entero de 0 a 4, y que puede estar en la configuración L o D.

Lo que se quiere dar a entender por "β-(metilamino)-tioéster" es:

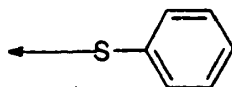


Lo que se quiere dar a entender por "β-(amino C₁-C₅)-tioéster" es:



en donde t es un número entero de 0 a 4.

Lo que se quiere dar a entender por "S-Ph" es:

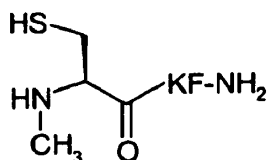


EJEMPLOS

- 5 A continuación se proporcionan Ejemplos para ilustrar en más detalle las distintas características de la presente invención. Los ejemplos también ilustran la metodología útil para practicar la invención. Estos ejemplos no limitan la invención reivindicada.

Los fragmentos de péptidos utilizados en esta invención pueden prepararse por síntesis de péptidos en fase sólida estándar (véase, *p. ej.*, Stewart, J.M., *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co., 2ª ed. 1984)).

- 10 **Ejemplo 1: Preparación de HN-MeCys-Lys-Phe-NH₂** (SEQ ID NO:5)

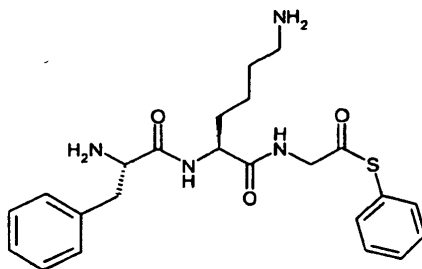


- El péptido del título se sintetizó en un sintetizador de péptidos manual. Se utilizó resina amida de Rink MBHA (211 mg, 152 micromol, 0,72 mmol/g) (Novabiochem, San Diego, CA, EE.UU.). Los aminoácidos Fmoc se utilizaron con la siguiente protección en la cadena lateral: Fmoc-N-MeCys(Trt)-OH (Trimen Chemicals, Lodz, Polonia; (SEQ ID NO: 1)), Fmoc-Lys(Boc)-OH (Novabiochem, San Diego, CA, EE.UU.; (SEQ ID NO: 2)) y Fmoc-Phe-OH (Novabiochem, San Diego, CA, EE.UU.; (SEQ ID NO: 3)). Los grupos Fmoc se separaron mediante tratamiento con piperidina al 25% en dimetilformamida (DMF) durante 10 minutos, dos veces. En cada una de las etapas de acoplamiento se utilizaron el aminoácido Fmoc (4 equivalentes), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (4 equivalentes) y diisopropilcarbodiimida (DIC) (4 equivalentes) en N-metilpirrolidona (NMP). Se utilizó el siguiente ciclo de reacción: (1) lavado con DMF; (2) separación del grupo protector Fmoc con piperidina al 25% en DMF durante 20 minutos; (3) lavado con DMF; y (4) acoplamiento con el aminoácido Fmoc preactivado durante 60 minutos. Fmoc-N-MeCys(Trt)-OH (1,1 equivalentes; (SEQ ID NO: 1)) se acopló utilizando HOBt (1,1 equivalentes) y DIC (1,1 equivalentes) en NMP durante 12 horas. Este acoplamiento se repitió luego utilizando Fmoc-N-MeCys(Trt)-OH (0,5 equivalentes; (SEQ ID NO: 1)), hexafluorofosfato de tetrametilfluorformamidinio (TFFH) (0,5 equivalentes) y diisopropiletilamina (DIEA) (1,0 equivalente) en NMP durante una hora. Durante el ciclo final en el sintetizador se desbloqueó el Fmoc. La resina resultante se lavó con DMF, diclorometano (DCM) y metanol (MeOH) y se secó en vacío.

- La resina peptídica protegida resultante se desbloqueó y escindió con triisopropilsilano (TIS) al 8% / ácido trifluoroacético (TFA) (2 ml) durante 2 horas. La resina se separó por filtración y se lavó con TFA (2 ml) y DCM (2 ml). El filtrado se concentró bajo una corriente de nitrógeno a menos de 1 ml, la cual se vertió en dietil-éter frío (5 ml). El precipitado formado se centrifugó y se recogió. El sedimento se recogió en disolución acuosa al 50% de acetonitrilo y se liofilizó.

- Este producto bruto se disolvió en acetonitrilo acuoso y se purificó en una HPLC preparativa de fase inversa utilizando una columna Luna 5 μ C₈(2) (100 x 20 mm). La columna se eluyó con un gradiente lineal de 100% A y 0% B a 80% A y 20 % B en 30 minutos, en que A era TFA al 0,1% en agua y B era TFA al 0,1% en acetonitrilo. Las fracciones se verificaron mediante HPLC analítica. Las que contenían el producto puro se combinaron y se liofilizaron hasta sequedad. La pureza del compuesto era de aproximadamente 99%. Se obtuvieron 51,2 mg del producto final. El análisis ESI-MS dio el peso molecular a 409,3 (en concordancia con el peso molecular calculado de 409,6).

- Ejemplo 2: Preparación de H-Phe-Lys-Gly-S-Ph** (SEQ ID NO: 6)



Resina de cloruro de clorotritilo (1,0 g, 1,49 mmol) (Novabiochem, San Diego, CA, EE.UU.) se trató con una disolución de Fmoc-Gly-OH (487 mg, 1,64 mmol; (SEQ ID NO: 4)) (Novabiochem, San Diego, CA, EE.UU.) y DIEA (770 mg, 5,96 mmol) en DCM (10 ml) durante 1 hora. La resina se filtró y lavó con DCM / MeOH / DIEA 17:2:1 (10 ml) dos veces, con DCM tres veces y con DMF tres veces.

- 5 El grupo protector Fmoc se separó sacudiendo la resina con piperidina al 25% / DMF (10 ml) durante 10 minutos y 30 minutos. La resina se lavó luego con DMF (10 ml) tres veces. Fmoc-Lys(Boc)-OH (2,79 g, 5,95 mmol; (SEQ ID NO: 2)) (Novabiochem, San Diego, CA, EE.UU.) se acopló a la resina peptídica resultante sacudiendo con HOBt (5,95 mmol) y DIC (5,95 mmol) en NMP (10 ml) durante 1 hora.

- 10 Los procesos de desbloqueo y lavado se repitieron como antes. Boc-Phe-OH (1,58 g, 5,95 mmol; (SEQ ID NO: 3)) (Bachem, Torrance, CA, EE.UU.) se acopló a la resina peptídica resultante sacudiendo con HOBt (5,95 mmol) y DIC (5,95 mmol) en NMP (10 ml) durante 1 hora.

La resina se lavó con DMF tres veces, con DCM tres veces y luego con MeOH tres veces. La resina se secó en vacío.

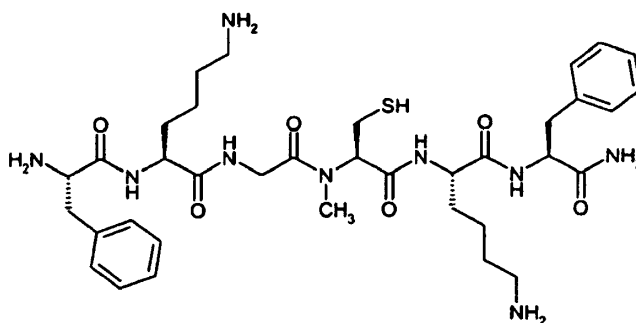
- 15 El péptido protegido se escindió de la resina sacudiendo la resina con 10 ml de TFA al 1,0% en DCM durante 2 minutos. La resina se separó por filtración y el filtrado se drenó en 2 ml de piridina al 10% en MeOH. Después de separar los disolventes bajo vacío, el residuo se recogió en DCM y se lavó con NaCl saturado dos veces y con bisulfato de sodio 1 M tres veces. La disolución de DCM se secó sobre sulfato de sodio. Los disolventes se separaron en vacío para proporcionar 120 mg de un sólido blanco.

- 20 Este péptido protegido (120 mg, 218 micromol) se trató con TFFH (218 micromol) y DIEA (436 micromol) en DCM (5 ml). El fluoruro de ácido resultante se trató con tiofenol (218 micromol) para formar el tioéster. Después de 2 horas, la cromatografía en capa fina (TLC - siglas en inglés) eluida con DCM / MeOH 9:1 indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (10 ml) y se lavó con bicarbonato de sodio saturado (5 ml) tres veces. Esta disolución se secó sobre sulfato de sodio y el disolvente se separó en vacío. El sólido blanco resultante pesaba 130 mg.

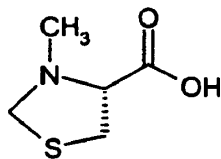
- 25 Este péptido protegido en 2 ml de DCM se desprotegió mediante la adición de 2 ml de TFA. Después de 2 horas, los disolventes se concentraron hasta 1 ml y el péptido se precipitó mediante la adición de 14 ml de dietil-éter frío. La suspensión resultante se centrifugó y decantó. El sedimento se disolvió en agua y se purificó en una HPLC preparativa de fase inversa utilizando una columna Luna 5 μ C₈(2) (100 x 20 mm). La columna se eluyó con un gradiente lineal de 100% A y 0% B a 60% A y 40 % B en 30 minutos, en que A era TFA al 0,1% en agua y B era TFA al 0,1% en acetonitrilo. Las fracciones se verificaron mediante HPLC analítica. Las que contenían el producto puro se combinaron y se liofilizaron hasta sequedad. Se obtuvieron 76,6 mg del producto final. El análisis de ESI-MS dio el peso molecular a 442,3 (en concordancia con el peso molecular calculado de 442,58).

30 Ejemplo 3: Preparación de H-Phe-Lys-Gly-N-MeCys-Lys-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 7)

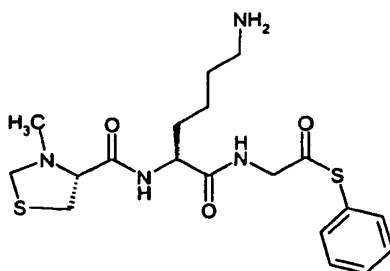
- 35 H-N-MeCys-Lys-Phe-NH₂ (Ejemplo 1, 5,0 mg, 12,2 micromol; (SEQ ID NO: 5)) se disolvió en tampón fosfato 200 mM, pH 8,5 / guanidina 6 M (0,5 ml). A esto se añadió tris(carboxietil)fosfina (TCEP) (0,042 ml de 40 mg/ml de disolución, el pH se ajustó hasta 7). H-Phe-Lys-Gly-S-Ph (Ejemplo 2, 3,4 mg, 7,6 micromol; (SEQ ID NO: 6)) se añadió a la disolución resultante. Después de 40 minutos y luego después de 75 minutos, se añadió un 1,0 mg adicional de H-Phe-Lys-Gly-S-Ph (2,2 micromol; (SEQ ID NO: 6)). Se dejó que la mezcla de reacción reposara a la temperatura ambiente durante 20 horas. Luego se añadió otro 1,0 mg de H-Phe-Lys-Gly-S-Ph (2,2 micromol; (SEQ ID NO: 6)). El análisis LC-MS mostró que la reacción de ligamiento se completó al cabo de 23 horas con el producto de H-Phe-Lys-Gly-N-MeCys-Lys-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 7), tal como se muestra mediante la siguiente estructura:



- 45 La disolución resultante se purificó en una HPLC preparativa de fase inversa utilizando una columna Luna 5 μ C₈(2) (100 x 20 mm). La columna se eluyó con un gradiente lineal de 100% de tampón A (TFA al 0,1% en agua) y 0% de tampón B (TFA al 0,1% en acetonitrilo) a 60% de tampón A y 40 % de tampón B a lo largo de 30 minutos vigilando a 235 nm. Se obtuvieron 6,8 mg del producto final. El análisis de ESI-MS dio el peso molecular a 741,3 (en concordancia con el peso molecular calculado de 741,96).

Ejemplo 4: Síntesis de ácido N-metil-tiazolidina-4-carboxílico (es decir, N-MeThz-OH)

5 Ácido L-tiazolidina-4-carboxílico (13,3 g) en una mezcla de formaldehído al 37% (22,5 ml) y ácido fórmico al 96% (39,3 ml) se calentaron hasta 80 °C. Después de una hora cesó el desprendimiento de CO₂. Se continuó el calentamiento hasta haber separado la mayoría del disolvente. El residuo se disolvió en metanol y se evaporó en el evaporador rotatorio tres veces. Se añadió un equivalente de ácido clorhídrico concentrado y la sal resultante cristalizó en metanol y etil-éter. Rendimiento 17,0 g (92%).

Ejemplo 5: Preparación de lisina-glicina-feniltioéster de ácido N-metil-tiazolidina-4-carboxílico (es decir, N-MeThz-Lys-Gly-S-Ph) (SEQ ID NO: 8)

10 Resina de cloruro de clorotritilo (714 mg, 1,0 mmol) (Novabiochem, San Diego, CA, EE.UU.) se trató con una disolución de Fmoc-Gly-OH (595 mg, 2,0 mmol; (SEQ ID NO: 4)) (Novabiochem, San Diego, CA, EE.UU.) y DIEA (517 mg, 4,0 mmol) en DCM (9 ml) durante 2 horas. La resina se filtró y lavó con DCM / MeOH / DIEA 17:2:1 (10 ml) dos veces, con DCM tres veces y con DMF tres veces.

15 El grupo protector Fmoc se separó según se describe arriba, sacudiendo la resina con piperidina al 25% / DMF (10 ml) durante 10 minutos y 30 minutos. La resina se lavó con DMF (10 ml) tres veces. Fmoc-Lys(Boc)-OH (1,87 g, 4,0 mmol; (SEQ ID NO: 2)) (Novabiochem, San Diego, CA, EE.UU.) se acopló a la resina de amina libre resultante sacudiendo con HOBt (4,0 mmol), DIEA (8,0 mmol) y HBTU (4,0 mmol) en NMP (15 ml) durante 1 hora.

20 El proceso de desbloqueo y de lavado se repitió según se describe arriba. Ácido N-metil-tiazolidina-4-carboxílico (N-MeThz-OH) (Ejemplo 4, 730 mg, 4,0 mmol) se acopló a la resina peptídica resultante sacudiendo con HOBt (4,0 mmol), DIEA (8,0 mmol) y HBTU (4,0 mmol) en NMP (15 ml) durante 1 hora.

La resina se lavó con DMF tres veces, con DCM tres veces y luego con MeOH tres veces. La resina se secó en vacío.

25 El péptido protegido se escindió de la resina sacudiendo la resina con ácido acético (HOAc) / trifluoroetanol / DCM 2:2:6 (10 ml) durante 2 horas. La resina se filtró y lavó con disolución de escisión (10 ml). Los filtrados se reunieron y concentraron. El residuo se disolvió en agua y luego se liofilizó.

El aceite viscoso resultante se purificó sobre una columna de evaporación instantánea de gel de sílice (Biotage 1,2 X 15 cm) eluida con MeOH al 5% / DCM. Las fracciones se agruparon y los disolventes se separaron en vacío para proporcionar 201 mg del péptido protegido.

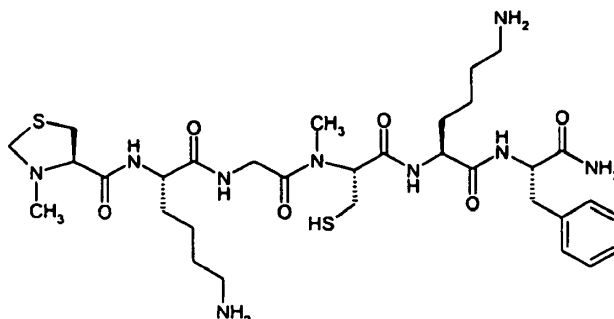
30 Este péptido protegido (100 mg, 231 micromol) se trató con TFFH (231 micromol) y DIEA (462 micromol) en DCM (5 ml). El fluoruro de ácido resultante se trató con tiofenol (231 micromol) para formar el tioéster. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (10 ml) y se lavó con bicarbonato de sodio saturado (5 ml) tres veces. Esta disolución se secó sobre sulfato de sodio y el disolvente se separó en vacío. Este tioéster de péptido protegido en 2 ml de DCM se desprotegió mediante la adición de 2 ml de TFA. Al cabo de una hora, los disolventes se concentraron y el péptido precipitó mediante la adición de éter. La suspensión resultante se centrifugó y decantó. El sedimento se disolvió en agua y se liofilizó para proporcionar un sólido blanco. Se obtuvieron 45,9 mg del producto final.

35 Se detectó un ion M+1 a 425,0 unidades másicas mediante ESI-MS. El peso molecular calculado es 424,6 unidades másicas.

Ejemplo 6: Preparación de N-MeThz-Lys-Gly-MeCys-Lys-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 9)

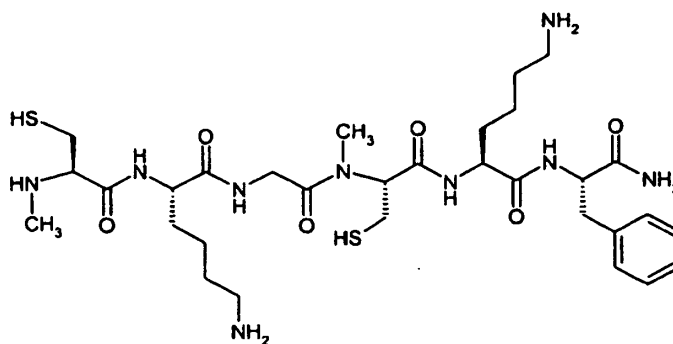
40 N-MeThz-Lys-Gly-S-Ph (Ejemplo 5, 1,2 mg, 2,83 micromol; (SEQ ID NO: 8)) y H-N-MeCys-Lys-Phe-NH₂ (Ejemplo 1, 1,2 mg, 2,83 micromol; (SEQ ID NO: 5)) se disolvieron en tampón fosfato 200 mM, pH 8,5 / guanidina 6 M (0,2 ml). A

esta disolución se añadió hidrocloreto de tris(carboxietil)fosfina (TCEP) (0,042 ml de 40 mg/mL de disolución, el pH se ajustó hasta 7). Se dejó que la mezcla de reacción reposara a la temperatura ambiente durante 4 horas. El análisis LC-MS mostró que el ligamiento se completó al cabo de 4 horas y el producto era N-MeThz-Lys-Gly-MeCys-Lys-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 9), tal como se muestra mediante la siguiente estructura:



5

Ejemplo 7: Preparación de N-MeCys-Lys-Gly-MeCys-Lys-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 10)



10 A N-MeThz-Lys-Gly-MeCys-Lys-Phe-NH₂ (Ejemplo 6, 2,0 mg, 2,83 micromol; (SEQ ID NO: 9)) en tampón fosfato 200 mM pH 8,5 / guanidina 6 M (0,2 ml) se añadió metoxiamina HCl 0,2 M para ajustar el pH a 4,0. La reacción se vigiló utilizando LC-MS. En 2 horas la reacción se había completado. La disolución de reacción se almacenó a -20 °C durante una noche.

Ejemplo 8: Preparación de N-MeThz-Lys-Gly-N-MeCys-Lys-Gly-MeCys-Lys-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 11)

15 El pH de la mezcla de reacción descongelada, obtenida del Ejemplo 7, se ajustó hasta 8 añadiendo NaOH 2 N. A esto se añadió N-MeThz-Lys-Gly-S-Ph (Ejemplo 5, 1,2 mg, 2,83 micromol; (SEQ ID NO: 8)). El ligamiento se vigiló mediante LC-MS. En 3 horas la reacción se había completado.

20 La disolución resultante se purificó en HPLC de fase inversa (columna Luna 5μ C₈(2) 100 X 4.6 mm) eluida en 100% de tampón A (TFA al 0,1 % en agua) y 0% de tampón B (TFA al 0,1 % en acetonitrilo) a 50% de tampón A y 50% de tampón B a lo largo de 15 minutos vigilando a 220 nm. Se detectó un ion M+1 a 1026,6 unidades másicas mediante ESI-MS. El peso molecular calculado de N-MeThz-Lys-Gly-N-MeCys-Lys-Gly-MeCys-Lys-Phe-NH₂ (SEQ ID NO: 11) es 1026,4 unidades másicas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> BIOMEASURE, INC.
- 5 <120> MÉTODOS Y COMPUESTOS INTERMEDIOS PARA LA SÍNTESIS QUÍMICA DE POLIPÉPTIDOS Y PROTEÍNAS
- <130> 184P Yankwich TBA
- 10 <140> TBA
<141> TBA
- <150> TBA
<151> TBA
- 15 <160> 11
- <170> PatentIn version 3.5
- 20 <210> 1
<211> 1
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
25 <223> Compuesto intermedio para la síntesis química de polipéptidos y proteínas
- <220>
<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
<222> (1) .. (1)
30 <223> Xaa = N-metilcisteína (N-MeCys), N-cisteína (C1-C5)-(N-Cys (C1-C5)),
o
hidróxido de fluorenilmetiloxycarbonil N-metilcisteína tritilo (Fmoc-N-MECys(Trt)-OH)
- <400> 1
35
- Xaa**
1
- <210> 2
<211> 1
40 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
45 <223> Compuesto intermedio para la síntesis química de polipéptidos y proteínas
- <220>
<221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
<222> (1)...(1)
50 <223> Xaa = hidróxido de fluorenilmetiloxycarbonil lisina terc.-butiloxycarbonilo
(Fmoc-Lys(Boc)-OH)
- <400> 2
Xaa
1
- 55 <210> 3
<211> 1
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 60 <220>
<223> Compuesto intermedio para la síntesis química de polipéptidos y proteínas

<220>
 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
 <222> (1) .. (1)
 <223> Xaa = hidróxido de fluorenilmetiloxycarbonil fenilalanina
 5 (Fmoc-Phe-OH)
 o hidróxido de terc.-butiloxycarbonil fenilalanina (Boc-Phe-OH)

<400> 3
Xaa
 10 **1**

<210> 4
 <211> 1
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Compuesto intermedio para la síntesis química de polipéptidos y proteínas

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
 <222> (1)...(1)
 <223> Xaa = hidróxido de fluorenilmetiloxycarbonil glicina (Fmoc-Gly-OH)

<400> 4
Xaa
 25 **1**

<210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto intermedio para la síntesis química de polipéptidos y proteínas

35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
 <222> (1) (1)
 <223> Xaa = N-metilcisteína (H-N-MeCys)

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3) .. (3)
 <223> AMIDACIÓN

45 <400> 5
Xaa Lys Phe
1

<210> 6
 <211> 3
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Compuesto intermedio para la síntesis química de polipéptidos y proteínas

55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
 <222> (3) (3)
 <223> Xaa = glicina feniltioéster (Gly-S-Ph)

60 <400> 6
Phe Lys Xaa
1

<210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Compuesto intermedio para la síntesis química de polipéptidos y proteínas
 <220>
 10 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
 <222> (4).... (4)
 <223> Xaa = N-metilcisteína (N-MeCys)
 <220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (6).... (6)
 <223> AMIDACIÓN
 <400> 7
 Phe Lys Gly Xaa Lys Phe
 20 1 5
 <210> 8
 <211> 2
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Compuesto intermedio para la síntesis química de polipéptidos y proteínas
 <220>
 30 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
 <222> (1) (1)
 <223> Xaa = ácido N-metil-tiazolidina-4-carboxílico-lisina (N-MeThz-Lys)
 <220>
 35 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
 <222> (2).... (2)
 <223> Xaa = glicina feniltioéster (Gly-S-Ph)
 <400> 8
 Xaa Xaa
 40 1
 <210> 9
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Compuesto intermedio para la síntesis química de polipéptidos y proteínas
 50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
 <222> (1) (1)
 <223> Xaa = ácido N-metil-tiazolidina-4-carboxílico-lisina (N-MeThz-Lys)
 55 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
 <222> (3) (3)
 <223> Xaa = metil-cisteína (MeCys)
 60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5).... (5)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 9
Xaa Gly Xaa Lys Phe
 1 5

5 <210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Compuesto intermedio para la síntesis química de polipéptidos y proteínas

15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
 <222> (1) (1)
 <223> Xaa = N-metil-cisteína (N-MeCys)

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
 <222> (4).... (4)
 <223> Xaa = metil-cisteína (MeCys)

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6).... (6)
 <223> AMIDACIÓN

<400> 10
Xaa Lys Gly Xaa Lys Phe
 1 5

30 <210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Compuesto intermedio para la síntesis química de polipéptidos y proteínas

40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
 <222> (1) (1)
 <223> Xaa = ácido N-metil-tiazolidina-4-carboxílico-lisina (N-MeThz-Lys)

45 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
 <222> (3) (3)
 <223> Xaa = N-metil-cisteína (N-MeCys)

50 <220>
 <221> CARACTERÍSTICAS MISCELÁNEAS
 <222> (6).... (6)
 <223> Xaa = metil-cisteína (MeCys)

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8).... (8)
 <223> AMIDACIÓN

60 <400> 11
Xaa Gly Xaa Lys Gly Xaa Lys Phe
 1 5

REIVINDICACIONES

- 1 Un método para formar un enlace amida entre una primera molécula que tiene un resto tioéster y una segunda molécula que tiene un residuo N-cisteína (C₁-C₅) (SEQ ID NO: 1) con un residuo sulfhidrilo no oxidado, que comprende las etapas de:
- 5 (a) hacer reaccionar dicho resto tioéster de la primera molécula con dicho resto sulfhidrilo no oxidado del residuo N-cisteína (C₁-C₅) (SEQ ID NO: 1) de la segunda molécula para generar un compuesto intermedio que conecta las primera y segunda moléculas con un enlace β-(amino C₁-C₅)-tioéster; y
- (b) permitir que el enlace β-(amino C₁-C₅)-tioéster del compuesto intermedio se re-disponga intramolecularmente para formar un enlace amida que conecta dichas primera y segunda moléculas.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que:
- dicho residuo N-cisteína (C₁-C₅) (SEQ ID NO: 1) es un residuo N-metil-cisteína (SEQ ID NO: 1); y/o
- dicho enlace β-(amino C₁-C₅)-tioéster es un enlace β-(metilamino)-tioéster; y/o
- dichas primera y segunda moléculas se seleccionan independientemente de un grupo que incluye fragmentos peptídicos, polipéptidos, peptidomiméticos y proteínas; y/o
- 15 dicha reacción y etapas de re-disposición tienen lugar en una disolución o en una fase sólida; y
- dicha etapa de reacción tiene lugar en presencia de al menos un catalizador de tiol.
3. El método de la reivindicación 2, en el que dicho catalizador de tiol se selecciona del grupo que consiste en tiofenol, 1-tio-2-nitrofenol, ácido 2-tio-benzoico, 2-tio-piridina, ácido 4-tio-2-piridinacarboxílico, 4-tio-2-nitropiridina, ácido 4-mercaptofenilacético, ácido 2-mercaptoetanosulfónico, ácido 3-mercapto-1-propanosulfónico y ácido 2,3-dimercaptopropanosulfónico.
- 20 4 Un método para sintetizar un polipéptido o una proteína mediante ligamiento de dos fragmentos de péptido, que comprende las etapas de:
- (a) formar un enlace amida mediante ligamiento de un tioéster C-terminal del primer fragmento de péptido que contiene N-tiazolidina (C₁-C₅) N-terminal con una N-cisteína (C₁-C₅) N-terminal (SEQ ID NO: 1) del segundo
- 25 fragmento de péptido; y
- (b) tratar el producto de ligamiento con un agente nucleofílico bajo condiciones de carácter ácido para convertir el residuo N-tiazolidina (C₁-C₅) N-terminal en el residuo N-cisteína (C₁-C₅) N-terminal (SEQ ID NO: 1).
5. El método según la reivindicación 4, en el que:
- dicho agente nucleofílico es O-alquilhidroxilamina;
- 30 dichas condiciones ácidas están en el intervalo de pH 2,0 a pH 6,0; y
- dichas etapa (a) y etapa (b) se pueden repetir hasta formar un polipéptido o proteína deseado.
6. El método según la reivindicación 5, en el que dicha O-alquilhidroxilamina es O-metilhidroxilamina.

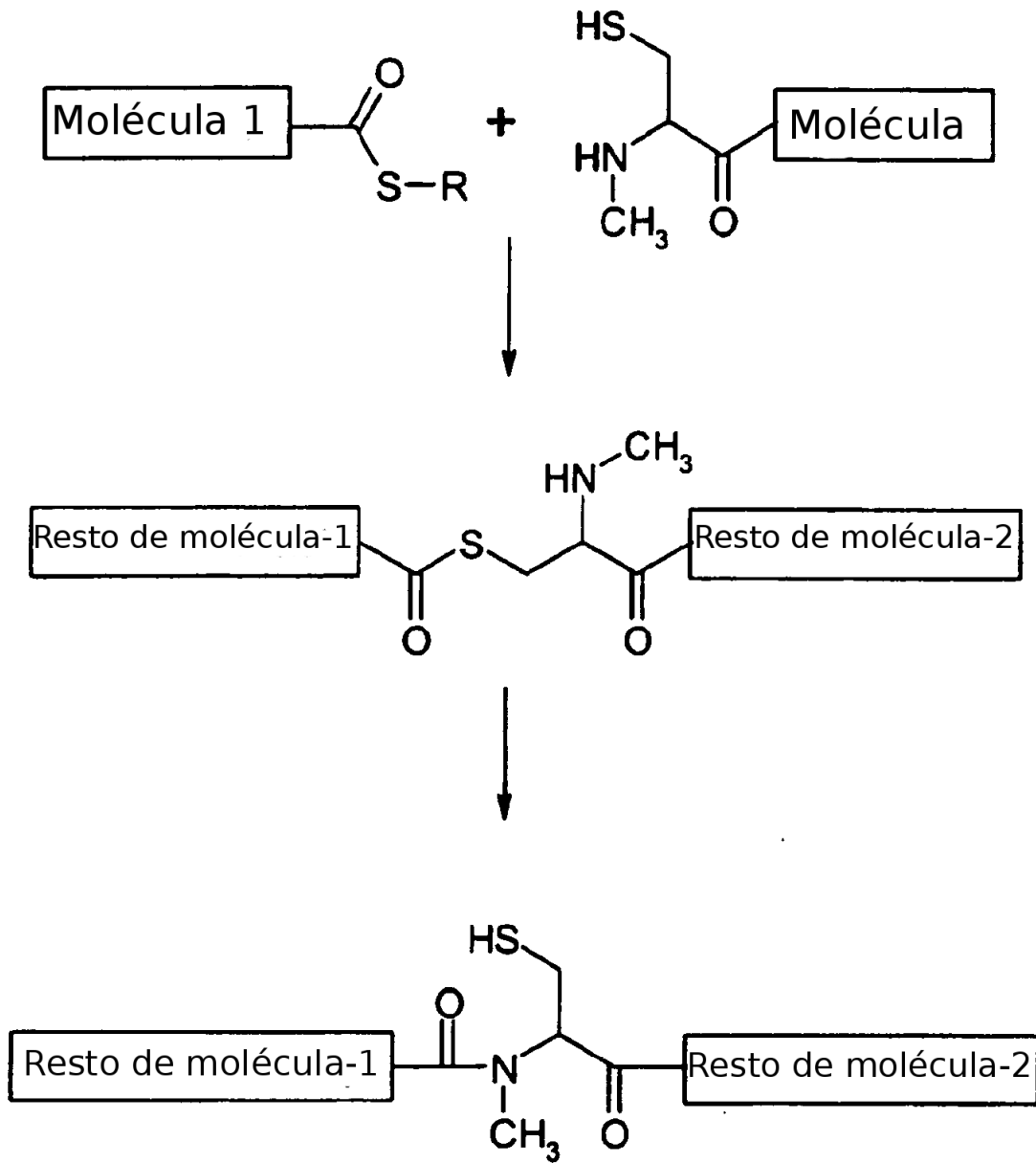


FIG. 1

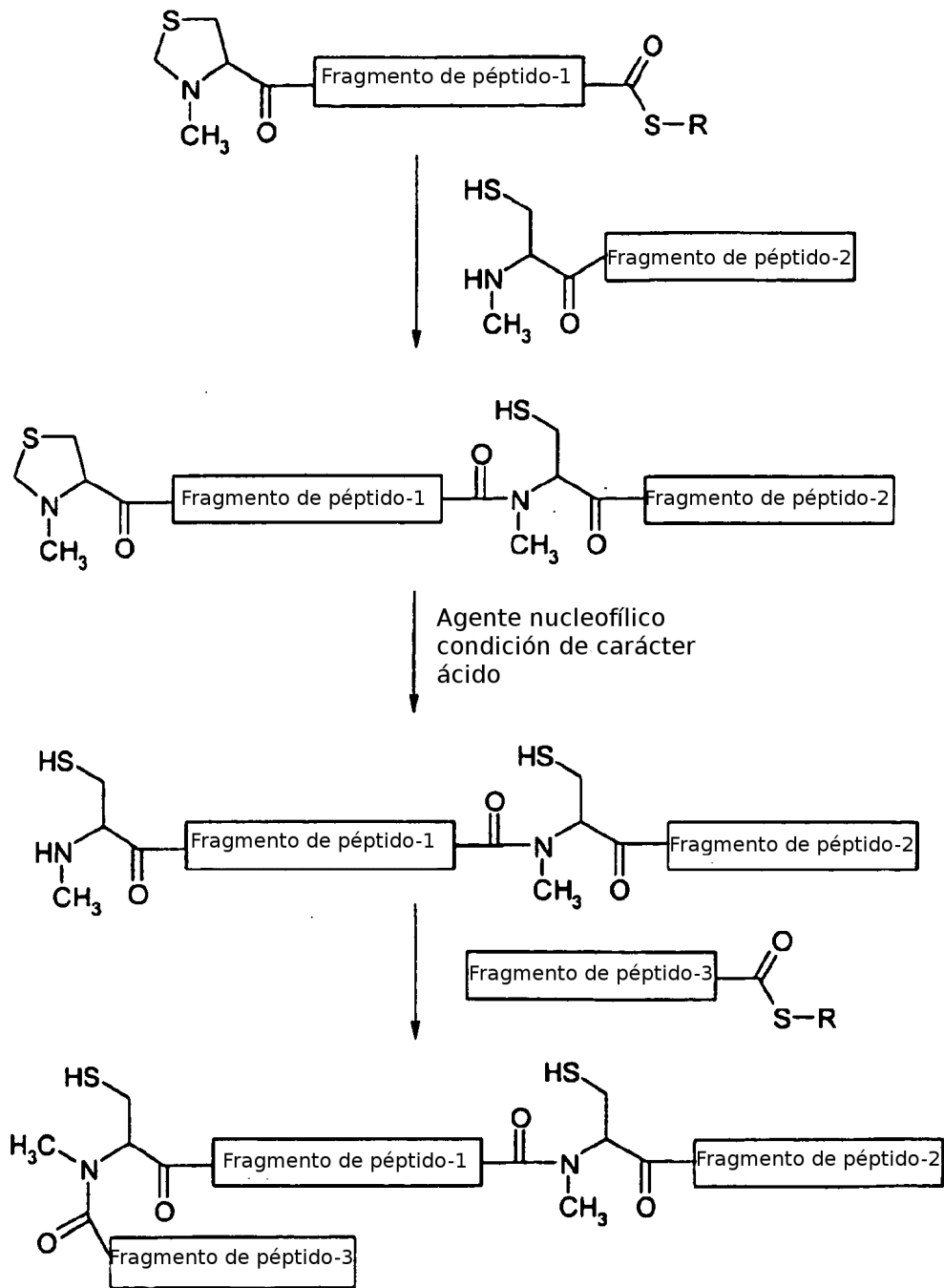
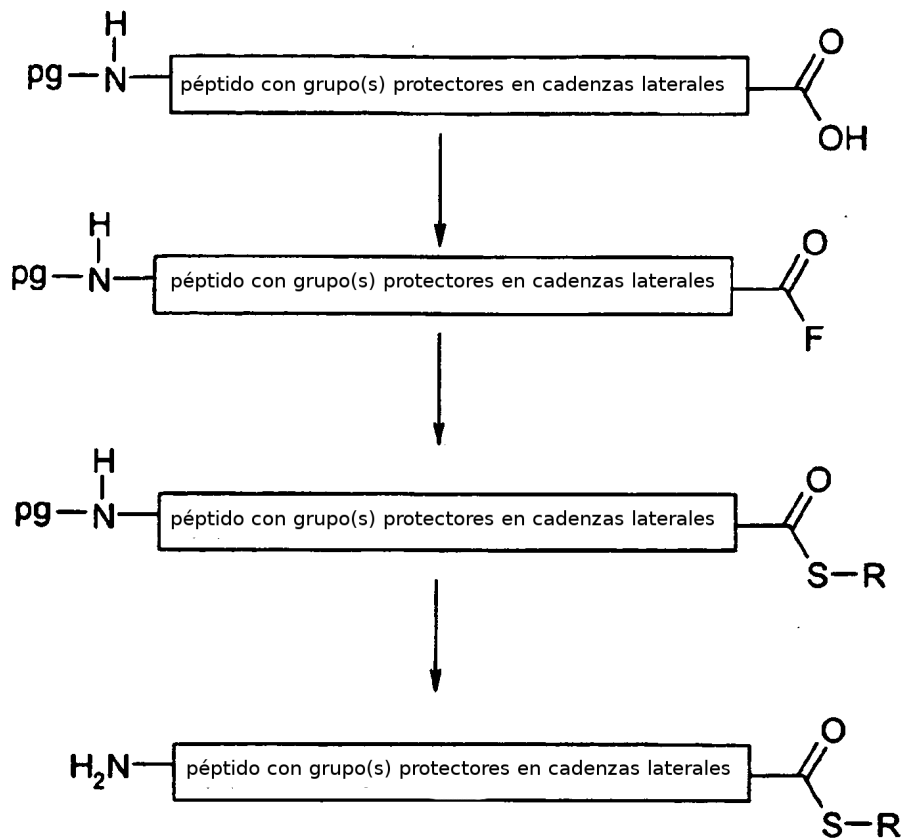


FIG. 2



"pg" representa grupo protector

FIG. 3