

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 917**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/02**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2010 E 10782400 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2493909**

54 Título: **Método para ligación nativa de polipéptidos**

30 Prioridad:

**29.10.2009 FR 0957639**

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

**12.09.2014**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)**

**3, rue Michel-Ange  
75794 Paris Cedex 16, FR y  
INSTITUT PASTEUR DE LILLE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MHIDIA, REDA;  
DHEUR, JULIEN;  
OLLIVIER, NATHALIE y  
MELNYK, OLEG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 493 917 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 ligación nativa de polipéptidos

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la ligación nativa de polipéptidos. La invención también se refiere a polipéptidos funcionalizados útiles para aplicar este método de ligación nativa como así como a un método para preparar estos polipéptidos funcionalizados. La invención también se refiere a un compuesto de amina así como a una resina funcionalizada, útiles para aplicar el método de preparación de polipéptidos funcionalizados.

Antecedentes en la técnica

La síntesis de polipéptidos mediante métodos de fase sólida convencionales, aminoácido a aminoácido, está limitada por bajos rendimientos cuando los polipéptidos sintetizados son de gran tamaño. Para superar esta limitación, se conoce el ensamblaje de los polipéptidos mediante ligación química, para producir un polipéptido más largo.

En general, para la unión entre los polipéptidos ensamblados por ligación es deseable que sean nativos, es decir, que correspondan a la estructura natural de los polipéptidos.

En la actualidad, el método principal para la ligación nativa es el de Kent y Dawson, que se describe, por ejemplo, en los documentos de Patente WO 96/34878 y WO 98/28434. Este método se basa en una reacción quimioselectiva entre un tioéster péptido (C-terminal) y un cisteinil péptido. La desventaja principal de este método es que la preparación de los tioéster péptidos requiere procesos químicos complejos.

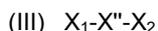
Un método alternativo se denomina ligación de Staudinger, que se describe en los documentos de Patente WO 01/68565 y WO 01/87920. Este comprende la reacción de un fosfinitioéster con una azida e hidrólisis de los reactivos combinados para formar un enlace amida. Este método es difícil de aplicar a escala industrial.

Un tercer método, que se describe en el documento de Patente WO 2007/037812, se basa en la reacción de un  $\alpha$ -cetoácido con una amina en una reacción de condensación descarboxilativa. Sin embargo, los cetoácidos son moléculas que son difíciles de preparar y de incorporar a los péptidos. Además, este tercer método es difícil de aplicar en laboratorios de síntesis peptídica que no están equipados con medios para llevar a cabo síntesis orgánicas complejas.

Por lo tanto, existe la necesidad real de desarrollar un nuevo método para ligación nativa de polipéptidos, que sea a la vez eficaz y más simple de aplicar, incluyendo a escala industrial.

## 40 Sumario de la invención

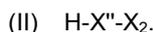
La invención se refiere en primer lugar a un método de preparación de un polipéptido de fórmula:



representando cada  $X_1$  y  $X_2$  un fragmento peptídico, y representando  $X''$  un resto de aminoácido que comprende una función tiol, comprendiendo dicho método al menos una etapa de reacción de ligación entre un polipéptido de fórmula:



y un polipéptido de fórmula:

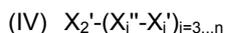


De acuerdo con una realización, la reacción de ligación se lleva a cabo poniendo en contacto un polipéptido de fórmula:

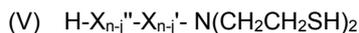


con el polipéptido de fórmula (II), en presencia de al menos un compuesto que reduce los enlaces disulfuro.

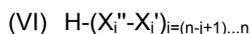
De acuerdo con una realización, X<sub>2</sub> representa un fragmento peptídico de fórmula



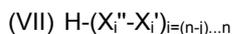
5       siendo n un número entero mayor o igual que 3, representando cada X<sub>i</sub>'', para un i entero comprendido entre 3 y n, un resto de aminoácido que comprende una función tiol, y representando cada X<sub>i</sub>', para un i entero comprendido entre 2 y n, un fragmento peptídico; comprendiendo el método, antes de la etapa de reacción de ligación entre el polipéptido de fórmula (I) y el polipéptido de fórmula (II), una sucesión de n-2 etapas de reacción de ligación, siendo la j-ésima etapa de reacción de ligación, para un j entero comprendido entre 1 y n-2, una  
10       reacción de ligación entre un polipéptido de fórmula:



15       en la que la función amida y/o la función tiol del resto X<sub>n-j</sub>'' está protegida, y un polipéptido de fórmula:

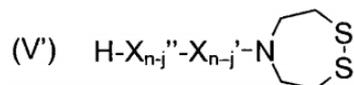


para formar un polipéptido de fórmula:

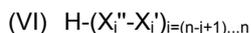


20       experimentando el polipéptido de fórmula (VII) la desprotección de la función tiol del resto X<sub>n-j</sub>'' al final de la reacción de ligación.

25       De acuerdo con una realización, una o más de las n-2 etapas de reacción de ligación entre el polipéptido de fórmula (V) y el polipéptido de fórmula (VI) se lleva a cabo poniendo en contacto un polipéptido de fórmula:

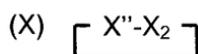


30       con el polipéptido de fórmula:

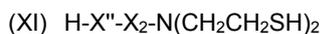


35       siendo j un número entero comprendido entre 1 y n-2, en presencia de al menos un compuesto que reduce los enlaces disulfuro.

La invención también se refiere a un método de preparación de un polipéptido cíclico de fórmula:

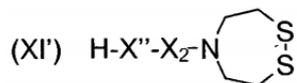


40       representando X<sub>2</sub> un fragmento peptídico, y representando X'' un resto de aminoácido que comprende una función tiol, comprendiendo dicho método al menos una etapa de reacción de ligación de un polipéptido de fórmula:



consigo mismo.

50       De acuerdo con una realización, la reacción de ligación se lleva a cabo poniendo en contacto un polipéptido de fórmula:



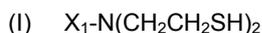
con al menos un compuesto que reduce los enlaces disulfuro.

55       De acuerdo con una realización de cualquiera de los métodos anteriores, la reacción de ligación o las reacciones de ligación se llevan a cabo en un medio acuoso, preferentemente a un pH comprendido entre 6,5 y 8,5, de forma más particularmente preferente entre 7 y 8, e idealmente a aproximadamente 7,5.

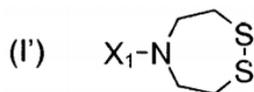
De acuerdo con una realización de cualquiera de los métodos anteriores, la reacción de ligación o las reacciones de ligación se llevan a cabo en presencia de al menos un compuesto que reduce los enlaces disulfuro, seleccionado preferentemente entre tris(2-carboxietil)fosfina, ácido 4-mercaptobenzoico, ditiotreitól, bencil mercaptano y las mezclas de los mismos.

5

La invención también se refiere a un polipéptido de fórmula:



10 o de fórmula:



en la que  $X_1$  representa un fragmento peptídico y el grupo  $-N(CH_2CH_2SH)_2$  o

15

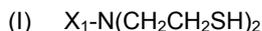


está unido a la terminación C=O del resto de aminoácido del fragmento peptídico  $X_1$  que está en posición C-terminal.

20 De acuerdo con una realización,  $X_1$  comprende entre 2 y 300 restos de aminoácido, preferentemente entre 5 y 100 restos de aminoácido, de forma más particularmente preferente entre 8 y 50 restos de aminoácido.

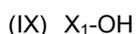
La invención también se refiere a un método de preparación de un polipéptido de fórmula:

25



representando  $X_1$  un fragmento peptídico, que comprende al menos una etapa de síntesis peptídica y una etapa de funcionalización C-terminal.

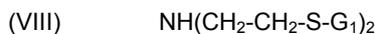
30 De acuerdo con una realización, la etapa de síntesis peptídica precede a la etapa de funcionalización; la etapa de síntesis peptídica proporciona un polipéptido de fórmula:



35 que comprende preferentemente grupos protectores en sus funciones amina y carboxílica, con la excepción de su función carboxílica C-terminal; y la etapa de funcionalización comprende:

- la reacción del polipéptido de fórmula (IX) con el compuesto de amina de fórmula:

40



en la que  $G_1$  representa un grupo protector, formando preferentemente dicho grupo protector una función tioéter, tioéster o disulfuro, y siendo de forma más particularmente preferente el grupo trifenilmetilo, en la fase líquida, para formar el polipéptido de fórmula (I);

45

- opcionalmente la desprotección del polipéptido de fórmula (I).

También es un objeto de la invención un soporte de resina polimérica para la síntesis en fase sólida de polipéptidos, que comprende un esqueleto principal y grupos funcionales  $NH-(CH_2CH_2-S-Trt-)_2$  o grupos funcionales  $NH-(CH_2CH_2-S-Trt-CO-NH-)_2$ , en los que Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, seleccionados en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano; en el que los grupos funcionales  $NH-(CH_2CH_2-S-Trt-)_2$  están unidos al esqueleto principal mediante los dos grupos trifenilmetilo, o los grupos funcionales  $NH-(CH_2CH_2-S-Trt-CO-NH-)_2$  están unidos al esqueleto principal mediante los dos grupos amina.

55

También es un objeto de la invención un soporte de resina polimérica para la síntesis en fase sólida de polipéptidos, que comprende un esqueleto principal y grupos funcionales  $G_2-AA-N-(CH_2CH_2-S-Trt-)_2$  o grupos funcionales  $G_2-AA-N-(CH_2CH_2-S-Trt-CO-NH-)_2$ , en los que Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, seleccionados en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano; AA representa un resto de aminoácido que porta opcionalmente uno o más grupos protectores;  $G_2$  representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de la función amina; en el que los grupos funcionales  $G_2-AA-N-(CH_2CH_2-S-Trt-)_2$

60

están unidos al esqueleto principal mediante los dos grupos trifenilmetilo o los grupos funcionales  $G_2-AA-N-(CH_2CH_2-S-Trt-CO-NH-)_2$  están unidos al esqueleto principal mediante los dos grupos amina.

5 De acuerdo con una realización de los soportes de resina polimérica mencionados anteriormente, el esqueleto principal se selecciona entre esqueletos de poliestireno, poli(acrilamida), polietilenglicol, celulosa, polietileno, poliéster, látex, poliamida, polidimetilacrilamida, copolímero de polietilenglicol-poliestireno, copolímero de polietilenglicol-poliacrilamida y derivados de los mismos.

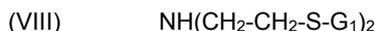
10 También es un objeto de la invención un método de preparación de un soporte de resina polimérica para síntesis de polipéptidos en fase sólida, que comprende:

- el suministro de una resina polimérica;
- la funcionalización de la resina polimérica por reacción con el compuesto de amina de fórmula:



De acuerdo con una realización del método de preparación del soporte de resina polimérica, el método comprende, antes de la etapa de funcionalización de la resina polimérica:

- 20 - el suministro de un compuesto de amina de fórmula:



25 en la que  $G_1$  representa un grupo protector, formando preferentemente dicho grupo protector una función tioéter, tioéster o disulfuro, y siendo de forma más particularmente preferente el grupo trifenilmetilo;

- la desprotección de este compuesto de amina para obtener el compuesto de amina de fórmula (VIII').

30 De acuerdo con una realización del método de preparación del polipéptido de fórmula (I):

- la etapa de funcionalización precede a la etapa de síntesis peptídica;
- la etapa de funcionalización comprende:

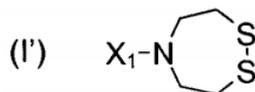
35 ■ el acoplamiento de un aminoácido a un soporte de resina polimérica que comprende un esqueleto principal y grupos funcionales  $NH-(CH_2CH_2-S-Trt-)_2$  o grupos funcionales  $NH-(CH_2CH_2-S-Trt-CO-NH-)_2$ , como se ha descrito anteriormente, para suministrar un soporte cebador; o

40 ■ el suministro de un soporte cebador, que es un soporte de resina polimérica que comprende un esqueleto principal y grupos funcionales  $G_2-AA-N-(CH_2CH_2-S-Trt-)_2$  o grupos funcionales  $G_2-AA-N-(CH_2CH_2-S-Trt-CO-NH-)_2$ , como se ha descrito anteriormente;

- la etapa de síntesis peptídica comprende una sucesión de acoplamientos de aminoácidos sobre el soporte cebador.

45 De acuerdo con una realización de este método, el acoplamiento de un aminoácido al soporte de resina polimérica comprende poner en contacto del soporte de resina polimérica con un haluro de aminoácido o con un aminoácido y un agente de activación, seleccionado preferentemente entre PyBOP, BOP, PyBROP, de forma más particularmente preferente PyBROP.

50 La invención también se refiere a un método de preparación de un polipéptido de fórmula:



55 en la que  $X_1$  representa un fragmento peptídico, que comprende una etapa de oxidación de un polipéptido de fórmula:



60 preferentemente en contacto con aire, o en presencia de  $I_2$  o de diamida, y en un tampón, estando precedida preferentemente dicha etapa de oxidación por una etapa de preparación del polipéptido de fórmula (I) de acuerdo con el método que se ha descrito anteriormente.

De acuerdo con una realización del método de preparación de un polipéptido de fórmula (III) o (X), el último comprende una etapa de preparación del polipéptido de fórmula (I) y/o (V) o (XI) que está de acuerdo con el método de preparación del polipéptido de fórmula (I) descrito anteriormente, o una etapa de preparación del polipéptido de fórmula (I') y/o (V') o (XI') de acuerdo con el método de preparación del polipéptido de fórmula (I') descrito anteriormente.

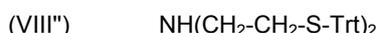
La invención también se refiere a un método de preparación de una composición farmacéutica que comprende:

- la preparación de un polipéptido de acuerdo con el método de preparación de un polipéptido de fórmula (III) o (X) descrito anteriormente, y
- la formulación de este polipéptido con uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

La invención también se refiere a un método de preparación de un dispositivo diagnóstico que comprende:

- la preparación de un polipéptido de acuerdo con el método de preparación de un polipéptido de fórmula (III) o (X) descrito anteriormente, y
- la formulación de este polipéptido en una forma adecuada para uso diagnóstico.

También es un objeto de la invención un compuesto de amina de fórmula:



en la que Trt representa el grupo trifenilmetilo.

La presente invención hace posible superar las desventajas del estado de la técnica. Más particularmente, proporciona un método para la ligación nativa de polipéptidos, que es a la vez eficaz y más sencillo de aplicar que los métodos previos, incluyendo a escala industrial.

Esto se consigue mediante el desarrollo de un esquema de reacción en el que un polipéptido modificado en el extremo C-terminal con un grupo bis(mercaptoetil)amino reacciona con un polipéptido que tiene una cisteína en el extremo N-terminal (u otro aminoácido que comprenda una función tiol) para formar un enlace amida nativo.

De acuerdo con ciertas realizaciones particulares, la invención también tiene una o preferentemente varias características ventajosas de la siguiente lista.

- El método de ligación de acuerdo con la invención usa opcionalmente reactivos de polipéptido sin proteger, en particular cuando se lleva a cabo una ligación individual. El uso de polipéptidos protegidos es difícil debido a su baja solubilidad, y debido además a que requieren una etapa de desprotección después de la ligación, conduciendo a un coste adicional y a la posibilidad de degradación. Al contrario, la invención hace posible por lo tanto evitar las desventajas asociadas con los polipéptidos protegidos, en particular cuando se lleva a cabo una ligación individual. El método de acuerdo con la invención conduce directamente a la formación de un enlace nativo en el punto de ligación, sin ser necesario llevar a cabo una desprotección después de la ligación.
- El método de ligación de acuerdo con la invención se basa en el uso de polipéptidos modificados con grupos funcionales estables químicamente, que son fáciles de introducir usando técnicas convencionales de síntesis peptídica.
- La invención permite el uso de aminoácidos proteínogénicos para la síntesis de fragmentos peptídicos. Por lo tanto, no existe la necesidad de tener que recurrir a la preparación de derivados de aminoácido (tales como, por ejemplo, cetoácidos), que complica la síntesis considerablemente.
- El ensamblaje de los reactivos de polipéptido se puede llevar a cabo de forma convencional usando, por ejemplo, química Fmoc/terc-butilo. Por lo tanto, el método de acuerdo con la invención es compatible con los procesos de síntesis industrial automatizada disponibles en la actualidad. Los aminoácidos y los soportes sólidos apropiados están disponibles en la actualidad en un gran volumen y con un bajo coste.
- La invención proporciona la ligación en un medio acuoso, que por lo tanto es compatible con la solubilidad de los péptidos y de las proteínas.
- La reacción de ligación de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo eficazmente a un pH próximo a 7,5, es decir, en condiciones compatibles con polipéptidos complejos o proteínas.
- La reacción de ligación de acuerdo con la invención ofrece la posibilidad de autoligación de un polipéptido, y por lo tanto la preparación de polipéptidos cíclicos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la monitorización, mediante RP-HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa), de la ligación nativa entre el polipéptido 1c y el polipéptido 2, para obtener el polipéptido 3c, de acuerdo con el Ejemplo 7. El gráfico inferior corresponde al punto temporal t = 10 min; el gráfico intermedio corresponde al punto temporal t = 18 h; y el gráfico superior corresponde al punto temporal t = 43 h.

Las Figuras 2a y 2b muestran la monitorización, mediante RP-HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa), de la ligación nativa entre el polipéptido 1d y el polipéptido 2, para obtener el polipéptido 3d, de acuerdo con el Ejemplo 7. El gráfico A corresponde al punto temporal  $t = 0$ ; el gráfico B corresponde al punto temporal  $t = 1$  h; el gráfico C corresponde al punto temporal  $t = 3$  h; el gráfico D corresponde al punto temporal  $t = 5$  h; y el gráfico E corresponde al punto temporal  $t = 22$  h.

La Figura 2c muestra el espectro de espectrometría de masas en deconvolución para el pico del polipéptido 3d obtenido en el punto temporal  $t = 22$ h (Figura 2b).

Las Figuras 3a a 3c muestran la monitorización, mediante RP-HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa), de la ligación nativa entre el polipéptido 1f y el polipéptido 2, para obtener el polipéptido 3f, de acuerdo con el Ejemplo 7. El gráfico A corresponde al punto temporal  $t = 0$ ; el gráfico B corresponde al punto temporal  $t = 1$  h; el gráfico C corresponde al punto temporal  $t = 3$  h; el gráfico D corresponde al punto temporal  $t = 6$  h; y el gráfico E corresponde al punto temporal  $t = 27$  h.

La Figura 3d muestra el espectro de espectrometría de masas en deconvolución para el pico del polipéptido 3f obtenido en el punto temporal  $t = 27$  h (Figura 3c).

#### Descripción de realizaciones de la invención

A continuación se representa una descripción de la invención más detallada, no limitante.

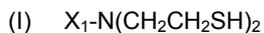
"Polipéptido" significa, en el contexto de la presente solicitud, una cadena lineal de restos de aminoácido (con un número mayor o igual que dos) unidos conjuntamente mediante enlaces peptídicos. Por lo tanto, los "polipéptidos" dentro del significado de la presente solicitud pueden ser, por ejemplo, oligopéptidos, péptidos o proteínas de acuerdo con la definición generalmente aceptada de estos términos. Los restos de aminoácido presentes en los polipéptidos de acuerdo con la invención se pueden seleccionar entre restos de aminoácido proteinogénicos o no proteinogénicos. Preferentemente, se seleccionan entre los veinte restos de aminoácido proteinogénicos.

La notación de los polipéptidos va desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal. Los restos de aminoácido presentes a lo largo de la cadena de polipéptido se designan de acuerdo con los códigos habituales de una letra o de tres letras. Un resto de aminoácido es un fragmento de polipéptido de fórmula  $-\text{NH}-(\text{CH}-\text{R})-(\text{C}=\text{O})-$ , en la que R representa una cadena lateral, diferente de un aminoácido al siguiente.

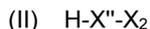
"Fragmento peptídico" significa, en el contexto de la presente solicitud, una porción de polipéptido que comprende al menos un resto de aminoácido. Por lo tanto, un fragmento peptídico, dentro del significado de la presente solicitud, puede ser, por ejemplo: una secuencia de restos de aminoácido (tal como -AHG- o -Ala-His-Gly-) si el fragmento peptídico no comprende ni el extremo N-terminal ni el extremo C-terminal del polipéptido; o una secuencia de restos de aminoácido que tiene un grupo en su extremo N-terminal (tal como H-AHG- o H-Ala-His-Gly-) si el fragmento de polipéptido comprende el extremo N-terminal del polipéptido; o una secuencia de restos de aminoácido que tiene un grupo en su extremo C-terminal (tal como -AHG-OH o -Ala-His-Gly-OH) si el fragmento peptídico comprende el extremo C-terminal del polipéptido.

#### Ligación nativa de polipéptidos

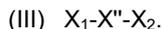
La invención proporciona un método para la ligación nativa de polipéptidos, de acuerdo con el cual un polipéptido de fórmula:



reacciona con un polipéptido de fórmula:



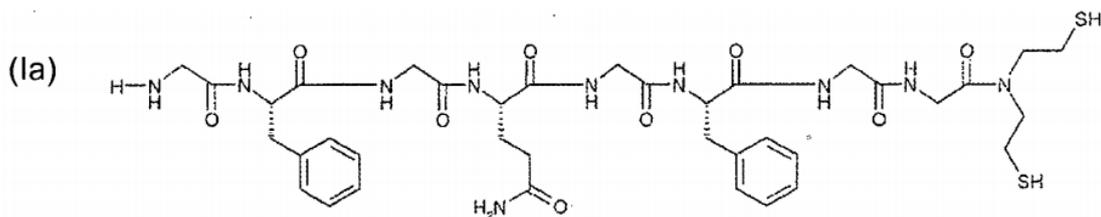
para proporcionar un polipéptido de fórmula:



El polipéptido de fórmula (I) comprende un fragmento peptídico  $X_1$  (comprendiendo dicho fragmento peptídico el extremo N-terminal del polipéptido) y un grupo funcional  $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH})_2$  en el extremo C-terminal (unido a la terminación  $(\text{C}=\text{O})$  del resto de aminoácido en la posición C-terminal).

El fragmento peptídico  $X_1$  es de la forma  $\text{Y}_1-\text{AA}_1\text{AA}_2\dots\text{AA}_n$ .  $\text{Y}_1$  es un grupo N-terminal, preferentemente un átomo de hidrógeno, pero opcionalmente también cualquier grupo sustituyente para aminas primarias o secundarias conocido por un experto en la materia, por ejemplo un grupo acilo y en particular un grupo acetilo.  $n$  es un número entero mayor o igual que 2. Cada  $\text{AA}_i$  representa un resto de aminoácido.

Un ejemplo de un polipéptido de fórmula (I) es el polipéptido 1a (véase posteriormente el Ejemplo 3) de fórmula:



En este ejemplo, el fragmento peptídico  $X_1$  es H-GFGQGFGG.

- 5 El polipéptido de fórmula (I) comprende preferentemente entre 2 y 300 restos de aminoácido, preferentemente entre 5 y 100 restos de aminoácido, de forma más particularmente preferente entre 8 y 50 restos de aminoácido.

10 El polipéptido de fórmula (II) comprende un átomo de hidrógeno y un resto  $X''$  en el extremo N-terminal. El resto  $X''$  es un resto de aminoácido que comprende una función tiol. Esta función tiol puede ser, en particular, una función beta-aminotiol (en cuyo caso el resto  $X''$  representa preferentemente el resto cisteína) o una función gamma-aminotiol (en cuyo caso el resto  $X''$  representa preferentemente el resto homocisteína).

15 En la siguiente descripción, de acuerdo con una realización particular,  $X''$  se puede leer de modo que represente un resto de cisteína (Cys).

De acuerdo con la anotación usada anteriormente,  $X_2$  representa un fragmento peptídico, que comprende el extremo C-terminal del polipéptido de fórmula (II) así como todos los restos de aminoácido de este polipéptido, excepto el resto N-terminal.

20 El fragmento peptídico  $X_2$  es de la forma  $AA_2'AA_3' \dots AA_n'-Y_2$ .  $Y_2$  es un grupo extremo, preferentemente un grupo -OH o -NH<sub>2</sub> o un grupo -OR o -NRR', representando cada R y R' un grupo alquilo o arilo. n es un número entero mayor o igual que 2. Cada  $AA_i'$  representa un resto de aminoácido.

25 El polipéptido de fórmula (II) comprende preferentemente entre 2 y 300 restos de aminoácido, preferentemente entre 5 y 100 restos de aminoácido, de forma más particularmente preferente entre 8 y 50 restos de aminoácido.

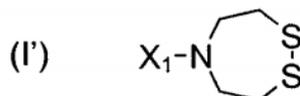
30 El polipéptido de fórmula (II) se puede obtener, por ejemplo, mediante un método habitual de síntesis peptídica, en particular un método de síntesis en fase sólida. También se puede obtener por medio de una ligación nativa precedente (véase posteriormente).

Cada uno de los polipéptidos de fórmula (I) y (II) comprende preferentemente únicamente restos de aminoácido seleccionados entre los veinte restos de aminoácido proteinogénicos. Sin embargo, de acuerdo con una realización particular, los polipéptidos de fórmula (I) y (II) comprenden uno o más restos de aminoácido no proteinogénicos.

35 Los restos de aminoácido de los polipéptidos de fórmula (I) y (II) pueden estar opcionalmente protegidos con grupos que protegen las cadenas laterales.

40 Para que la reacción de ligación tenga lugar correctamente, es esencial la presencia de los dos grupos tiol libres en el polipéptido de fórmula (I). Se dice que la ligación es nativa debido a que el fragmento peptídico  $X_1$  se une al fragmento peptídico  $X''-X_2$  mediante un enlace amida.

Es posible llevar a cabo la reacción de ligación anterior poniendo en contacto el polipéptido de fórmula (II) con un polipéptido de fórmula:



45 con la condición de que se use durante la reacción un compuesto que reduzca los enlaces disulfuro, que puede ser preferentemente un compuesto de tiol tal como ácido 4-mercaptofenilacético (MPAA), ditioneitol (DTT), tiofenol (y los derivados del mismo), un alquiltiol (en particular bencil mercaptano) o una fosfina tal como tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP). También es apropiado el uso combinado de varios de estos compuestos, por ejemplo el uso de MPAA y TCEP.

55 De hecho, el polipéptido de fórmula (I') se reduce a continuación *in situ* y proporciona el polipéptido de fórmula (I) para la reacción de ligación.

En general, la reacción de ligación partiendo del polipéptido de fórmula (I') como reactivo puede ser más práctica de aplicar que la reacción de ligación directamente con el polipéptido de fórmula (I). De hecho, el polipéptido de fórmula (I) tiene una tendencia natural a oxidarse en el polipéptido de fórmula (I'), en particular por acción del oxígeno del aire. Por ejemplo, es posible que el polipéptido de forma abierta (I) se oxide a lo largo del tiempo cuando se almacena en forma liofilizada. En otras palabras, una preparación del polipéptido de fórmula (I) contiene generalmente en parte, de forma inevitable, el polipéptido de fórmula (I'). La presencia de estas dos formas puede complicar la caracterización y la purificación. Esta es la razón por la cual puede ser más sencillo aplicar la reacción de ligación poniendo en contacto el polipéptido de fórmula (I') con el polipéptido de fórmula (II), al reducirse *in situ* el polipéptido con terminación cíclica de fórmula (I') al polipéptido abierto de fórmula (I).

Por las mismas razones, aún cuando la reacción de ligación se lleve a cabo directamente poniendo en contacto el polipéptido de fórmula (I) con el polipéptido de fórmula (II), es preferible que se usen durante la reacción uno o más de los compuestos que reducen los enlaces disulfuro mencionados anteriormente.

Preferentemente, se usa MPAA, cuando está presente, en una concentración comprendida entre 1 y 500 mM, por ejemplo a una concentración de aproximadamente 200 mM durante la reacción.

Preferentemente, se usa TCEP, cuando está presente, en una concentración comprendida entre 1 y 200 mM, por ejemplo a una concentración de aproximadamente 80 mM durante la reacción.

En el caso en el que el resto de aminoácido N-terminal del polipéptido (I) comprende una función tiol, esta última se debe proteger durante la ligación, ya que de lo contrario se producirá una reacción competitiva de ciclación del polipéptido de fórmula (I). Alternativamente, se puede proteger la función alfa-amino con el fin de evitar la reacción de ciclación. Por ejemplo, es posible usar una protección de tipo tiazolidina, que protege simultáneamente el tiol y la alfa-amino.

La reacción de ligación tiene lugar preferentemente en fase líquida, y en particular en medio acuoso, por ejemplo en tampón fosfato. Preferentemente, esta reacción se lleva a cabo a un pH comprendido entre 6,5 y 8,5, de forma más particularmente preferente a un pH comprendido entre 7 y 8 e idealmente a un pH próximo a 7,5.

La reacción de ligación se lleva a cabo preferentemente a una temperatura comprendida entre 0 y 50 °C, e idealmente a una temperatura de aproximadamente 37 °C. El tiempo de reacción se ajusta dependiendo de la selección de reactivos y de otras condiciones de reacción. El tiempo apropiado también se puede ajustar de acuerdo con los resultados del análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masas durante la reacción. El tiempo apropiado será habitualmente de unas pocas horas a unos pocos días.

Cada uno de los polipéptidos de fórmula (I) y (II) está presente preferentemente en una concentración comprendida entre 0,01 y 50 mM, durante la reacción. La relación de la concentración molar entre los polipéptidos de fórmula (I) y (II) durante la reacción está comprendida preferentemente entre 2:3 y 3:2.

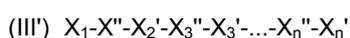
La reacción de ligación descrita anteriormente puede ir seguida de una etapa de purificación del polipéptido de fórmula (III) obtenido, por ejemplo mediante cromatografía líquida o mediante cualquier otra técnica habitual.

#### Producción de un polipéptido con varias ligaciones nativas sucesivas

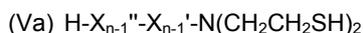
La invención también hace posible producir polipéptidos usando una sucesión de varias reacciones de ligación como se han descrito anteriormente. Esto puede ser apropiado para la obtención de polipéptidos grandes, por ejemplo, polipéptido que comprenden más de aproximadamente 100 restos de aminoácido. De hecho, en tales casos, la preparación de polipéptidos de fórmulas (I) y (II) mediante síntesis directa puede tener un bajo rendimiento, y por lo tanto es ventajoso usar dos o más de dos ligaciones sucesivas, de modo que tengan que sintetizarse directamente únicamente polipéptidos que comprenden, por ejemplo, menos de aproximadamente 50 restos de aminoácido.

A modo de ejemplo, el uso de dos ligaciones sucesivas hace posible la obtención de un polipéptido que comprende aproximadamente 150 restos de aminoácido sin requerir la síntesis directa de polipéptidos que comprendan más de aproximadamente 50 restos de aminoácido; el uso de tres ligaciones sucesivas hace posible la obtención de un polipéptido que comprende aproximadamente 200 restos de aminoácido sin requerir la síntesis directa de polipéptidos que comprendan más de aproximadamente 50 restos de aminoácido.

Por lo tanto, el método de acuerdo con la invención hace posible la obtención de un polipéptido de fórmula (III) en la que el fragmento de polipéptido  $X_2$  es de la forma  $X_2'-X_3'-X_3'-\dots-X_n''-X_n'$  (siendo  $n$  un número entero mayor o igual que 3; siendo cada  $X_i'$ , para un  $i$  entero entre 2 y  $n$ , un fragmento peptídico; y siendo cada  $X_i''$ , para un  $i$  entero entre 3 y  $n$ , un resto  $X''$ , es decir un resto de aminoácido que comprende una función tiol, y en particular un resto de cisteína de acuerdo con una realización particular) usando  $n-1$  ligaciones sucesivas. En otras palabras, en este caso el polipéptido obtenido tiene la fórmula:



La primera reacción de ligación implica, por una parte, un polipéptido de fórmula

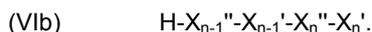


5

y, por otra parte, un polipéptido de fórmula



10 Esta reacción de ligación es exactamente igual que la que se ha descrito en la sección previa. Conduce a la obtención del polipéptido de fórmula



15 La función tiol o la función amina N-terminal (o la función tiol y la función amina) del resto de aminoácido  $X_{n-1}''$  se debe proteger en el polipéptido de fórmula (Va) durante la ligación, ya que de lo contrario se producirá una reacción competitiva de ciclación del polipéptido de fórmula (Va). Se puede usar para este fin, por ejemplo, una protección de tipo tiazolidina.

20 Al final de la reacción de ligación, la función tiol del resto de aminoácido  $X_{n-1}''$  se debe desproteger en el polipéptido de fórmula (VIb) con el fin de permitir la siguiente reacción de ligación.

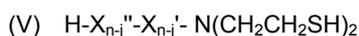
La segunda reacción de ligación implica, por una parte, un polipéptido de fórmula:



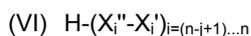
y, por otra parte, el polipéptido de fórmula (VIb) obtenido anteriormente.

30 La función tiol del resto de aminoácido  $X_{n-2}''$  se debe proteger en el polipéptido de fórmula (Vb), ya que de lo contrario se producirá una reacción competitiva de ciclación del polipéptido de fórmula (Vb). Se puede usar para este fin, por ejemplo, una protección de tipo tiazolidina. La reacción de ligación del polipéptido de fórmula (Vb) con el polipéptido de fórmula (VIb) va seguida a continuación de la desprotección de la función tiol del resto de aminoácido  $X_{n-2}''$  antes de la siguiente reacción de ligación.

35 Las siguientes reacciones de ligación son del mismo tipo. Generalmente, la reacción de ligación número j (para un j entero comprendido entre 1 y n-2) implica un polipéptido de fórmula

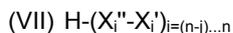


40 y un polipéptido de fórmula:



para formar un polipéptido de fórmula:

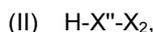
45



Finalmente, la última reacción de ligación (es decir, la (n-1)-ésima) implica el polipéptido de fórmula:

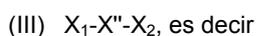


y el polipéptido de fórmula:

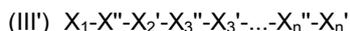


55

que aquí representa  $\text{H-X''-X}_2'\text{-X}_3''\text{-X}_3'\text{-}\dots\text{-X}_n''\text{-X}_n'$ , para formar el polipéptido de fórmula:

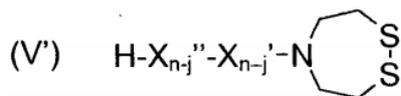


60



Cada reacción de ligación sucesiva se puede llevar a cabo como se ha descrito en la sección "ligación nativa de polipéptidos". En particular, puede ser ventajoso llevar a cabo la reacción de ligación número j (para un j entero comprendido entre 1 y n-2) poniendo en contacto el polipéptido de fórmula (VI) con el polipéptido de fórmula:

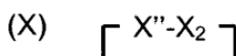
65



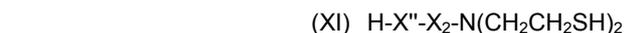
5 en presencia de uno o más de los compuestos que reducen los enlaces disulfuro mencionados anteriormente, reduciéndose a continuación *in situ* el polipéptido de fórmula (V') y proporcionando el polipéptido de fórmula (V) para la reacción de ligación.

Producción de un polipéptido cíclico mediante autoligación nativa

10 Los principios usados para la ligación nativa descrita anteriormente también se pueden usar para la producción de polipéptidos cíclicos, mediante la autoligación nativa de un polipéptido (ligación de un extremo del polipéptido con el otro extremo del mismo polipéptido). En general, la invención propone de ese modo un método para producir un polipéptido cíclico de fórmula:



15 en la que  $X_2$  representa un fragmento peptídico, y  $X''$  representa un resto de aminoácido que comprende una función tiol, mediante una reacción de ligación de un polipéptido de fórmula:



consigo mismo.

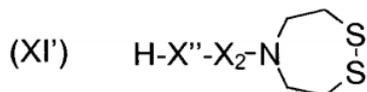
25 El polipéptido de fórmula (XI) comprende preferentemente entre 2 y 300 restos de aminoácido, preferentemente entre 5 y 100 restos de aminoácido, de forma más particularmente preferente entre 8 y 50 restos de aminoácido.

El polipéptido de fórmula (XI) comprende un átomo de hidrógeno y un resto  $X''$  en el extremo N-terminal, teniendo  $X''$  el significado dado anteriormente.  $X_2$  representa en este caso un fragmento peptídico de la forma  $AA_1AA_2...AA_n$  donde  $n$  es un número entero mayor o igual que 1 y cada  $AA_i$  representa un resto de aminoácido.

30 El polipéptido de fórmula (XI) comprende preferentemente únicamente restos de aminoácido seleccionados entre los veinte restos de aminoácido proteínogénicos. Sin embargo, de acuerdo con una realización particular, el polipéptido de fórmula (XI) comprende uno o más restos de aminoácido no proteínogénicos.

35 Los restos de aminoácido del polipéptido de fórmula (XI) pueden estar protegidos opcionalmente con grupos que protegen las cadenas laterales.

Es posible llevar a cabo la reacción de ligación anterior poniendo en contacto el polipéptido de fórmula (XI')



40 con al menos un compuesto que reduce los enlaces disulfuro, que es preferentemente como se ha descrito anteriormente. De hecho, el polipéptido de fórmula (XI') se reduce a continuación *in situ* y proporciona el polipéptido de fórmula (XI) para la reacción de ligación.

45 En general, aún cuando la reacción de ligación se lleve a cabo partiendo directamente del polipéptido de fórmula (XI), es preferible que se usen durante la reacción uno o más de los compuestos que reducen los enlaces disulfuro mencionados anteriormente

50 En general, la ciclación del polipéptido de fórmula (XI) no se ve afectada por multimerizaciones competitivas, si la reacción se lleva a cabo en condiciones suficientemente diluidas. Es posible usar, por ejemplo, una concentración de polipéptido de fórmula (XI) comprendida entre 0,01 y 50 mM, habitualmente de aproximadamente 1 mM (u opcionalmente entre 0,01 y 0,1 mM si existiera un serio riesgo de multimerizaciones).

55 Además, las condiciones preferentes de aplicación de la reacción de ligación son las mismas que las que se han descrito anteriormente para la reacción partiendo de los polipéptidos de fórmula (I) y (II).

La reacción de ligación descrita anteriormente puede ir seguida de una etapa de purificación del polipéptido cíclico de fórmula (X) obtenido, por ejemplo mediante cromatografía líquida o mediante cualquier otra técnica habitual.

Método de preparación de los polipéptidos de fórmula (I), (V) y (XI)

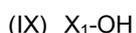
5 Los polipéptidos de fórmula (I), (V) y (XI) son compuestos que son útiles para la aplicación de la reacción de ligación que se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, un objeto de la invención también son estos polipéptidos de fórmula (I) (o de fórmula (V) o (XI)) como tal, así como un método mediante el que se pueden preparar.

El método de preparación de los polipéptidos de fórmula (I) (o de fórmula (V) o (XI)) implica dos etapas principales:

- 10 - una etapa de síntesis peptídica; y  
- una etapa de funcionalización C-terminal.

15 La invención proporciona dos variantes principales de este método. De acuerdo con la primera variante, la síntesis peptídica precede a la funcionalización. De acuerdo con la segunda variante, la síntesis peptídica sigue a la funcionalización. La segunda variante hace posible la obtención de un rendimiento más elevado y es más fácil de aplicar a escala industrial.

20 De acuerdo con la primera variante, la primera etapa (etapa de síntesis peptídica) hace posible la obtención del polipéptido de fórmula:



25 Esta etapa de síntesis peptídica se puede llevar a cabo de acuerdo con cualquier método conocido por un experto en la materia. En particular se puede llevar a cabo en la fase líquida o, preferentemente en la fase sólida.

Esquemáticamente, la síntesis peptídica comprende una sucesión de acoplamientos de aminoácidos a partir de un cebador (aminoácido inicial o fragmento peptídico que resulta de adiciones previas de aminoácidos) y desprotecciones. De forma más precisa la síntesis peptídica puede comprender sucesivamente:

- 30 (a) la provisión de un fragmento peptídico que tiene un extremo N-terminal sin proteger, y un aminoácido protegido en su extremo N-terminal;  
(b) el establecimiento un enlace peptídico entre el aminoácido y el fragmento peptídico, en el extremo N-terminal de dicho fragmento peptídico;  
35 (c) la desprotección del extremo N-terminal del aminoácido unido, para proporcionar el fragmento peptídico de la etapa (a) siguiente.

40 En el caso de la síntesis peptídica en fase sólida, el fragmento peptídico (cebador) se une a un soporte sólido en su extremo C-terminal. El soporte sólido es preferentemente un polímero en forma de partículas insolubles o solubles (perlas). Es posible usar, por ejemplo, resinas basadas en poliestireno, poliacrilamida, polietilenglicol, celulosa, polietileno, poliéster, látex, poliamida, polidimetilacrilamida y resinas derivadas de los mismos. Además es posible usar un gel de sílice o perlas de vidrio como soporte sólido.

45 El fragmento peptídico y el soporte sólido se unen en conjunto a través de un grupo funcional apropiado, denominado "conector". Por lo tanto, en primer lugar, el aminoácido que corresponde con el extremo C-terminal del polipéptido a sintetizar se fija a los grupos funcionales conectores del soporte sólido (que protegen la función amina del aminoácido durante el acoplamiento y a continuación la desprotegen para hacerla disponible para la siguiente reacción), que constituye el primer cebador, y a continuación se añaden los siguientes aminoácidos de acuerdo con la sucesión de reacciones que se ha mencionado anteriormente.

50 En el transcurso de las diversas reacciones de acoplamiento, es ventajoso usar un compuesto de activación, en particular una carbodiimida (por ejemplo dicitclohexilcarbodiimida o diisopropilcarbodiimida) en presencia de un triazol (por ejemplo 1-hidroxi-benzotriazol o 1-hidroxi-7-azabenzotriazol), o una sal de fosfonio o uronio de un anión no nucleofílico (por ejemplo HBTU, HATU, TBTU o PyBOP); o usar aminoácidos activados en forma de haluros de ácido, por ejemplo fluoruros de ácido.

55 En el caso de una síntesis en fase sólida, y una vez que se ha realizado la última reacción de acoplamiento de aminoácidos, se proporciona una reacción de separación (o escisión) del polipéptido de su soporte sólido.

60 En el transcurso de las diferentes reacciones de acoplamiento, los extremos N-terminales de los aminoácidos se protegen ventajosamente con un grupo protector, preferentemente un grupo Fmoc (9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo) o un grupo t-Boc (terc-butoxicarbonil) o un grupo NSC (2-(4-nitrofenilsulfonil)etoxicarbonilo).

65 De forma análoga, las cadenas laterales de los restos de aminoácido se protegen preferentemente durante las diversas reacciones de acoplamiento con uno o más grupos protectores adecuados, por ejemplo un grupo terc-butilo para las cadenas que comprenden una función carboxílica.

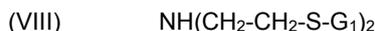
En este caso, una vez que se ha llevado a cabo la última reacción de acoplamiento de aminoácidos, se puede proporcionar una reacción de desprotección de las cadenas laterales. Sin embargo, se debería indicar que puede ser preferente mantener todas las protecciones (aparte de una protección opcional de la función COOH en el extremo C) en vista de la etapa de funcionalización.

5

Al final de la etapa de la síntesis peptídica, el polipéptido de fórmula (IX) está funcionalizado.

La etapa de funcionalización comprende sucesivamente:

- 10 - Opcionalmente la protección del extremo N-terminal del polipéptido de fórmula (IX) con un grupo protector, seleccionado preferentemente entre la familia de los grupos carbamato, amida o alquilo, y en particular un grupo terc-butoxicarbonilo (t-Boc), Fmoc (9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo), trifluoroacetilo o trifenilmetilo.
- 15 - Además opcionalmente, la protección de las funciones de las cadenas laterales de los restos aminoácido del polipéptido de fórmula (IX), y muy particularmente de las funciones amina (preferentemente por medio de los grupos protectores mencionados anteriormente) y de las funciones carboxílicas (por ejemplo por medio de grupos terc-butilo).
- 20 - Alternativamente, y de acuerdo con una realización más sencilla, el polipéptido de fórmula (IX) se puede proporcionar directamente en una forma en la que todas las funciones amina y carboxílica están protegidas, proporcionando una desprotección selectiva de la función COOH del extremo C-terminal.
- 20 - El acoplamiento del polipéptido de fórmula (IX) con un compuesto de amina de fórmula:



siendo G<sub>1</sub> un grupo protector.

25

- Opcionalmente, la desprotección del polipéptido.

Con respecto al compuesto de amina de fórmula (VIII), G<sub>1</sub> se selecciona preferentemente entre los grupos que proporcionan una función tioéter, tioéster (por ejemplo acetilo) o disulfuro (por ejemplo terc-butilsulfenilo). De forma más particularmente preferente, G<sub>1</sub> es el grupo trifenilmetilo. En este caso, el compuesto de amina es bis({2-[trifenilmetil]sulfanil]etil})amina. Con respecto a un método de preparación del compuesto de amina de fórmula (VIII), se puede hacer referencia al Ejemplo 1 que sigue a continuación.

30

De forma ventajosa, esta presente un activador durante la reacción de acoplamiento, por ejemplo hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino fosfonio (PyBOP) o hexafluorofosfato de bromo-trispirrolidino fosfonio (PyBROP) o el aminoácido amino C-terminal activado por sí mismo en forma de un derivado halogenado (en particular en forma de fluoruro de aminoácido o cloruro de aminoácido), y este último se puede formar previamente o formar *in situ* usando reactivos adecuados conocidos por un experto en la materia. Entre los haluros de aminoácido, son preferentes los fluoruros de aminoácido, formados previamente por reacción con 1,3,5-trifluorotriazina o formados *in situ* con la ayuda de TFFH (hexafluorofosfato de tetrametilfluoroformamidinio).

35

En general, se puede prever cualquier reactivo que permita la activación de la función ácido carboxílico del aminoácido conocido por un experto en la materia, tal como HBTU, TBTU, HATU, BOP, etc. (se puede hacer referencia, por ejemplo, a *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins* de Lloyd-Williams, P., Albericio, F., Giralt, E., 1997, CRC Press). Son preferentes PyBOP, PyBROP, BOP o más generalmente los fosfonios.

45

Al final de la etapa de funcionalización, se obtiene el polipéptido de fórmula (I). En esta etapa es ventajoso proporcionar una etapa de purificación del compuesto, por ejemplo mediante cromatografía líquida.

50

De acuerdo con la segunda variante del método para producir un polipéptido de fórmula (I), la etapa de funcionalización precede a la etapa de síntesis peptídica. Esta segunda variante se aplica en la fase sólida. Por lo tanto, la etapa de funcionalización consiste, en esta realización, en crear un soporte sólido cebador a partir de un soporte sólido funcionalizado previamente.

55

Como soporte sólido se usa un polímero soluble o insoluble, estando el polímero insoluble preferentemente en forma de partículas (perlas). Por ejemplo, es posible usar una resina basada en poliestireno (preferentemente) o basada en poliacrilamida, polietilenglicol, celulosa, polietileno, poliéster, látex, poliamida, polidimetilacrilamida, copolímero de polietilenglicol-poliestireno, copolímero de polietilenglicol-poliacrilamida o una resina derivada de los mismos.

60

Además, el soporte sólido tiene grupos conectores, que son preferentemente grupos cloro-trifenilmetilo (o clorotritilo), en los que el trifenilmetilo está sustituido opcionalmente con uno o más sustituyentes, en particular seleccionados entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano.

Como ejemplos de soporte sólido, se pueden mencionar resinas de poliestireno que tienen grupos conectores de cloruro de tritilo, cloruro de 2-clorotritilo, cloruro de 4-metiltritilo o cloruro de 4-metoxitritilo. Los soportes sólidos de este tipo están disponibles en el mercado, por ejemplo en Glycopep.

5 De acuerdo con otra realización, el soporte sólido tiene grupos conectores que son grupos del tipo alcohol tritílico, es decir grupos OH-Trt-CO-NH-, en los que el trifenilmetilo (Trt) está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, en particular seleccionados entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano. Los soportes sólidos que tienen dichos grupos conectores se describen por ejemplo en Quibell, JACS 1995, 117, 11656-11668, y están disponibles en el mercado, por ejemplo en la gama ChemMatrix® de soportes sólidos de polietilenglicol.

10 El uso de soportes sólidos de este tipo requiere una etapa preliminar de activación del soporte sólido:

- con un agente de bromación (en particular bromuro de acetilo) para modificar los grupos conectores en la forma Br-Trt-CO-NH-;
- 15 - o con un agente de cloración (en particular cloruro de oxalilo) para modificar los grupos conectores en la forma Cl-Trt-CO-NH-.

Una etapa de activación de este tipo se describe por ejemplo en Harre *et al.*, Reactive & Functional Polymers 1999, 41, 111-114.

20 Alternativamente, la resina se puede hacer reaccionar directamente con la amina  $\text{NH}(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH})_2$  en presencia de  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ , de acuerdo con Singh, S. *et al.*, J. Org. Chem. 2004, 69, 4551-4554.

25 El uso de soportes sólidos de este tipo puede hacer posible el uso de esqueletos de resina de tipo polietilenglicol o polietilenglicol-poliestireno, que son más adecuados para preparar polipéptidos largos que las resinas de tipo poliestireno.

30 Preferentemente, las partículas tienen un  $D_{v50}$  comprendido entre 1 y 1000  $\mu\text{m}$ . El  $D_{v50}$  se define como el 50º percentil de la distribución del tamaño de partícula, es decir, un 50 % de las partículas tiene un tamaño inferior al  $D_{v50}$  y un 50 % tiene un tamaño superior al  $D_{v50}$ . En general, el  $D_{v50}$  es característico del perfil granulométrico (distribución volumétrica) de las partículas, y se puede determinar por granulometría láser (para un tamaño inferior a 200  $\mu\text{m}$ ), o mediante un tamiz (para un tamaño superior a 200  $\mu\text{m}$ ).

35 El soporte sólido funcionalizado se prepara por acoplamiento del compuesto de amina de fórmula:



40 al soporte sólido mencionado anteriormente. El compuesto de amina (VIII') se puede obtener en sí mismo por desprotección del compuesto de amina de la fórmula (VIII) anterior, en la que  $G_1$  es un grupo protector.

El acoplamiento se lleva a cabo en un medio ácido para limitar los riesgos de desenmascarar la amina secundaria, que conduciría a reacciones secundarias.

45 Preferentemente, se neutralizan los grupos cloruro de tritilo en exceso, por ejemplo con metanol. A continuación es importante añadir una base para neutralizar el HCl formado.

50 Se puede prever que la preparación del soporte sólido funcionalizado forma una parte integral de la segunda variante del método de preparación de los polipéptidos de fórmula (I). Alternativamente, el soporte sólido funcionalizado se puede preparar por adelantado y separadamente, con el fin de que esté listo para su uso en el contexto la segunda variante del método de preparación de los polipéptidos de fórmula (I).

55 El soporte sólido funcionalizado es un soporte de resina de polímero que comprende un esqueleto principal (de tipo poliestireno, polietilenglicol-poliestireno, poliacrilamida, polietilenglicol, celulosa, polietileno, poliéster, látex, poliamida, polidimetilacrilamida, copolímero de polietilenglicol-poliestireno, copolímero de polietilenglicol-poliacrilamida o un derivado de los mismos, si fuera necesario) y grupos  $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-S-Trt-})_2$  unidos al esqueleto principal mediante los dos grupos Trt, o grupos  $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-S-Trt-CO-NH-})_2$ , unidos al esqueleto principal mediante las dos funciones NH, en el caso en el que el soporte sólido de partida es de tipo alcohol tritílico.

60 En lo mencionado anteriormente, Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano.

Por lo tanto, este soporte de resina polimérica está desprovisto básicamente de funciones tiol libres, y tiene funciones amina secundaria (funciones disulfaniletilamina).

65 A continuación, se acopla un aminoácido al soporte sólido funcionalizado.

Preferentemente, el aminoácido se protege en su extremo N-terminal mediante un grupo protector que es lábil en presencia de una base, seleccionado preferentemente entre el grupo de 2-(4-nitrofenilsulfonyl)etoxicarbonilo (NSC) o Fmoc.

5 Preferentemente, el aminoácido comprende grupos protectores en algunas o todas (preferentemente todas) las funciones presentes en su cadena lateral, y en particular las funciones carboxílica, amina, alcohol, fenol, guanidina (para la arginina) e imidazol (para la histidina). Un experto en la materia conoce los grupos protectores de este tipo. Se puede hacer referencia, por ejemplo, al trabajo de referencia *Protective groups in organic synthesis*, 2ª edición, T. Greene y P. Wuts, John Wiley & Sons, Inc.

10 Preferentemente, el aminoácido se activa en presencia de PyBOP o de BOP o de forma más particularmente precedente en presencia de PyBROP, o en forma de un haluro, en particular fluoruro (es decir un átomo de flúor se une al grupo acilo del resto de aminoácido).

15 El aminoácido reacciona con la función amina secundaria presente en el soporte sólido funcionalizado para formar un enlace amida. Después del acoplamiento del aminoácido, se puede llevar a cabo opcionalmente la desprotección del último.

20 Por lo tanto, al final de la etapa de funcionalización, se obtiene un soporte de resina polimérica, denominado soporte cebador, que comprende grupos  $G_2\text{-NH-CHR-CO-N(CH}_2\text{CH}_2\text{-S-Trt-)}_2$  (representando R una cadena lateral de aminoácido), que además se puede denominar  $G_2\text{-AA-N(CH}_2\text{CH}_2\text{-S-Trt-)}_2$  (representando AA un resto de aminoácido), estando unidos estos grupos al esqueleto principal mediante los dos grupos Trt; o grupos  $G_2\text{-AA-N(CH}_2\text{CH}_2\text{-S-Trt-CO-NH-)}_2$ , unidos al esqueleto principal mediante las dos funciones NH.

25 Se recordará que Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano. Además,  $G_2$  representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector con funcionalidad amina, dependiendo de si el grupo alfa-amino del aminoácido se ha desprotegido o no. Por último, se pueden proteger ventajosamente las funciones de la cadena lateral R del resto de aminoácido AA, tal como se ha mencionado anteriormente.

30 El soporte cebador obtenido de este modo (con o sin grupos protectores) también es un objeto de la invención como tal.

35 Después se lleva a cabo la etapa de síntesis peptídica, de una forma análoga a la que se ha descrito anteriormente en relación con la primera realización, proporcionándose el cebador inicial por el aminoácido acoplado al soporte activado.

40 Una vez se ha llevado a cabo la última reacción de acoplamiento de aminoácido, se proporciona una reacción de separación (o escisión) del polipéptido de su soporte sólido y, si fueran necesarias, las desprotecciones adecuadas, tras lo cual se obtienen el polipéptido de fórmula (I). Al igual que para la primera variante, es ventajoso proporcionar en esta etapa una etapa de purificación del compuesto, por ejemplo mediante cromatografía en fase líquida.

#### Método de preparación de los polipéptidos de fórmula (I'), (V') y (XI')

45 Los polipéptidos de fórmula (I'), (V') y (XI') mencionados anteriormente se pueden obtener muy fácilmente partiendo de los polipéptidos de fórmula (I), (V) y (XI) respectivamente por oxidación en aire, por ejemplo en un tampón de bicarbonato amónico a pH 8 aproximadamente. Otra posibilidad ventajosa consiste en el uso de yodo  $I_2$  o de la diamida  $H_2NCO-N=N-CONH_2$ .

#### Aplicaciones

Los polipéptidos de fórmula (I) obtenidos de acuerdo con la invención se pueden usar para producir un banco de polipéptidos, por ejemplo con fines de identificación sistemática.

55 Además, se pueden usar de preparación de composiciones farmacéuticas, en combinación con uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables (incluyendo uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables). Como ejemplos de composiciones farmacéuticas que se pueden obtener de acuerdo con la invención, se pueden mencionar productos medicinales y preparaciones de vacuna.

60 Además, también se pueden usar para producir kits de diagnóstico.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitarla.

65

El Ejemplo 1 se refiere a la preparación del compuesto bis({2-[trifenilmetil]sulfanil]etil})amina (compuesto de fórmula (VIII)).

5 Los Ejemplos 2 y 3 conducen a la preparación de un polipéptido 1a de fórmula H-GFGQGFGG-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH)<sub>2</sub> (SEC ID N°: 1, que corresponde a la fórmula general (I) mencionada anteriormente) de acuerdo con la primera variante del método de preparación de un polipéptido de fórmula (I), que se ha descrito anteriormente (síntesis en fase líquida).

10 Los Ejemplos 4 y 5 conducen a la preparación de una resina funcionalizada, que presenta funciones disulfaniletilamina.

El Ejemplo 6 se refiere a la preparación de un soporte denominado "cebador" a partir de la resina funcionalizada que se ha mencionado anteriormente, sobre la que se fija un primer aminoácido.

15 El Ejemplo 7 se refiere a la preparación de los polipéptidos 1c (H-ILKEPVHGG-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH)<sub>2</sub>) (SEC ID N°: 2), 1d (H-ILKEPVHGA-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH)<sub>2</sub>) (SEC ID N°: 3), 1e (H-ILKEPVHGV-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH)<sub>2</sub>) (SEC ID N°: 4) y 1f (H-ILKEPVHGY-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH)<sub>2</sub>) (SEC ID N°: 5), compuestos que corresponden a la fórmula general (I) mencionada anteriormente, de acuerdo con la segunda variante del método de preparación de un polipéptido de fórmula (I), que se ha descrito anteriormente (síntesis en fase sólida).

20 El Ejemplo 8 se refiere a la ligación de los respectivos polipéptidos 1c, 1d y 1f con un polipéptido 2 de fórmula H-CILKEPVHGV-NH<sub>2</sub> (SEC ID N°: 6) que corresponde a la fórmula general (II), para proporcionar los respectivos polipéptidos 3c (SEC ID N°: 9), 3d (SEC ID N°: 10) y 3f (SEC ID N°: 11).

25 El Ejemplo 9 se refiere a la síntesis del polipéptido 1g (H-CHHLEPGG-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH)<sub>2</sub>) (SEC ID N°: 7), compuesto que corresponde a la fórmula general (XI) mencionada anteriormente, de acuerdo con la segunda variante del método de preparación de un polipéptido de fórmula general (XI), que se ha descrito anteriormente (síntesis en fase sólida); así como a la ciclación de este polipéptido para proporcionar un polipéptido cíclico que corresponde a la fórmula general (X) mencionada anteriormente.

30 El Ejemplo 10 se refiere a la oxidación de los polipéptidos 1c, 1d, 1e y 1f a ditiazepanos (compuestos que corresponden a la fórmula general (I') mencionada anteriormente).

35 El Ejemplo 11 se refiere a la ligación del polipéptidos 1c con un polipéptido 4 (SEC ID N°: 17) que tiene una homocisteína N-terminal, para proporcionar un polipéptido 5 (SEC ID N°: 18).

Los Ejemplos 12, 13 y 14 se refieren respectivamente a la síntesis de un polipéptido 6 (SEC ID N°: 19), de un polipéptido 7 (SEC ID N°: 20) y de un polipéptido 8 (SEC ID N°: 21).

40 El Ejemplo 15 se refiere a la ligación del polipéptido 7 y del polipéptido 8 para formar un polipéptido 7-8 (SEC ID N°: 22), y el Ejemplo 16 se refiere a la ligación del polipéptido 6 con el polipéptido 7-8 para formar un polipéptido 6-7-8 (SEC ID N°: 23) después de la desprotección de la tiazolidina presente en la cisteína N-terminal del fragmento 7-8. Por lo tanto, esto es una construcción con dos ligaciones sucesivas. El polipéptido final 6-7-8 es un polipéptido lineal de secuencia: H-IRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGI  
 45 **KCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGKDLQENYCRNPRGEEGGPWCFSTNPEV**

RYEVCDDIPQCSEV-NH<sub>2</sub>, siendo las cisteínas indicadas en negrita las implicadas en las ligaciones.

#### Ejemplo 1: preparación de bis({2-[trifenilmetil]sulfanil]etil})amina

50 Se introducen 1,50 g de bis(2-cloroetil)amina (8,4 mmol) y 4,65 g de trifenilmetanotiol (2 equivalentes, 16,80 mmol) en un matraz y se colocan en atmósfera inerte. Se añaden, agitación magnética, 25 ml de dimetilformamida anhidra (DMF) y la mezcla de reacción se enfría en un baño de hielo. Se añaden gota a gota 4 equivalentes de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) a la mezcla. La mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas y la reacción se controla mediante cromatografía en capa fina (TLC) (eluyente: ciclohexano / acetato de etilo / trietilamina: 8 / 2 / 0,1). Después de este periodo de tiempo, el disolvente se evapora en un evaporador rotatorio. A continuación, el sólido de color blanco obtenido se disuelve en 50 ml de diclorometano (DCM) y el producto se extrae tres veces con una solución acuosa de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 5 %. El producto se purifica a continuación por cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: ciclohexano / EtOAc / trietilamina (TEA): 8 / 2 / 0,1), obteniendo 1,46 g de un sólido amorfo de color blanco (rendimiento: 28 %).

60 El análisis del producto es tal como sigue a continuación.

65 R<sub>f</sub> = 0,37 (gel de sílice, ciclohexano / EtOAc / TEA : 8 / 2 / 0,1); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,41-7,37 (m, 12H, Trt), 7,15-7,29 (m, 18H, Trt), 2,23-2,36 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 1,26 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 154,1; 129,8; 128,1; 126,9; 47,9; 32,6; MALDI-TOF: 243,1 [Trt<sup>+</sup>], 622,3 [M+H]<sup>+</sup>, 644,3 [M<sup>+</sup>+Na<sup>+</sup>].

Ejemplo 2: síntesis del polipéptido H-GFGQGFGG-OH (SEC ID N°: 8)

Se pone 1 g de resina Wang (carga: 1,1 mmol/g) en un reactor y se solvata durante 30 min en DMF. En paralelo, en un matraz en atmósfera inerte, se disuelven 3,27 g de Fmoc-Gly-OH (10 equivalentes, 11 mmol) en 100 ml de una mezcla de diclorometano anhidro / DMF (99/1, v/v). Se añade una solución de 857 µl de diisopropil carbodiimida (5 equivalentes, 5,50 mmol) en 5 ml de diclorometano anhidro, en atmósfera inerte, a la solución de aminoácido a 0 °C. La mezcla de reacción se mantiene en agitación a esta temperatura durante 30 min. Después de este periodo de tiempo, el disolvente se evapora y el sólido de color blanco obtenido se disuelve en 5 ml de DMF. La solución se añade a la resina con 0,1 equivalentes de DMAP (12,2 mg, 0,1 mmol) en 1 ml de DMF, y a continuación la mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 1 hora. A continuación, la resina se filtra, se lava con 5 ml de DMF, 5 ml de diclorometano y después se seca al vacío. La carga final de la resina (0,95 mmol/g; 86 %) se determina por cuantificación de UV del aducto de dibenzofulveno-piperidina liberado durante la desprotección de las alícuotas con una solución al 20 % de piperidina en DMF.

La síntesis en fase sólida de los polipéptidos se lleva a cabo usando la estrategia Fmoc/terc-butilo sobre resina Fmoc-Gly-Wang (escala de 0,5 mmol) preparada tal como anteriormente en un sintetizador de péptidos en microondas (CEM µ WAVES, Saclay, Francia). El acoplamiento se realiza usando un exceso molar de 5 veces cada aminoácido, se usa el activador HBTU (hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio) con un exceso molar de 4,5 veces y se usa la base DiEA (diisopropiletilamina) con un exceso molar de 10 veces. La desprotección final y la escisión del polipéptido a partir de la resina se realizan con 30 ml de una mezcla de TFA (ácido trifluoroacético) / TIS (triisopropilsilano) / H<sub>2</sub>O (95 / 2,5 / 2,5 en volumen) durante 1 hora. A continuación, el polipéptido se obtiene por precipitación en una mezcla de éter dietílico / heptano (1 / 1 en volumen), disuelto en H<sub>2</sub>O y a continuación se liofiliza. La pureza del polipéptido (79 %) se determina por HPLC (cromatografía líquida) y electroforesis capilar. El análisis de LC-MS del polipéptido principal está de acuerdo con la estructura del polipéptido esperado (C<sub>33</sub>H<sub>43</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub> calculado 726,32 Da [M+H]<sup>+</sup>, observado 726,50 Da).

Ejemplo 3: síntesis en fase líquida del polipéptido 1a (H-GFGQGFGG-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH)<sub>2</sub>) (SEC ID N°: 1)

Se disuelven 102 mg del polipéptido H-GFGQGFGG-OH (SEC ID N°: 8) (0,14 mmol) a una cantidad mínima de dimetilformamida anhidra (DMF), y se añaden 39 µl de trietilamina (TEA) (2 equivalentes, 0,28 mmol) a la solución. Se añaden, con agitación, 42 µl de dicarbonato de di-terc-butilo (Boc<sub>2</sub>O) (1,3 equivalentes, 0,18 mmol) a la mezcla de reacción y la solución se homogeneiza mediante la adición de DMF anhidra. La reacción se controla por HPLC.

Se añaden 174,2 mg de bis({2-[trifenilmetil]sulfanil}etil)amina (2 equivalentes, 0,28 mmol) a la mezcla de reacción anterior. Se añaden 32 µl de DiEA (1,3 equivalentes, 0,18 mmol) y 94,7 mg de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP) (1,3 equivalentes, 0,18 mmol) a la mezcla de reacción. El acoplamiento se controla por HPLC. El polipéptido resultante de esta etapa de acoplamiento se precipita a continuación y se lava en un gran volumen de éter dietílico frío. A continuación, el polipéptido se disuelve en una cantidad mínima de DMF, a continuación se precipita y se lava una segunda vez en éter dietílico.

Se añaden 12,2 ml de una mezcla de TFA / TIS / agua (95 / 2,5 / 2,5) al polipéptido protegido. La solución se vuelve inmediatamente de color amarillo y desaparece rápidamente. Después de 30 min, el polipéptido se precipita en 300 ml de una mezcla fría de éter dietílico / heptano (1 / 1). La solución se centrifuga y a continuación el polipéptido se lava dos veces con la mezcla anterior. El polipéptido se solubiliza en agua, se congela y a continuación se liofiliza. El producto se purifica a continuación por HPLC preparativa (gradiente: de 0 a un 40 % de tampón B en 40 min, caudal: 6 ml/min). A continuación se obtienen 60 mg del polipéptido purificado después de liofilización (rendimiento total = 50 %).

El análisis del producto es tal como sigue a continuación.

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMF-d<sub>7</sub>).

Phe<sub>2</sub> (2,98, dd, 1H, Hβ; 3,23, dd, 1H, Hβ; 4,63, m, 1H, Hα; 7,19 - 7,33, m, 5H, H<sub>arom.</sub>); Gln<sub>4</sub> (1,98-2,15, m, 2H, Hβ; 2,31, m, 2H, Hγ; 4,37, dt, 1H, Hα; 6,97, s, 1H, NH<sub>2</sub>; 7,57, s, 1H, NH<sub>2</sub>; 8,09, d, 1H, NH); Phe<sub>6</sub> (2,98, dd, 1H, Hβ; 3,23, dd, 1H, Hβ; 4,63, m, 1H, Hα); Gly<sub>1,3,5,7,8</sub> (3,72 - 4,21, m, 10H, Hα; 8,6, s ancho, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup> term.),

Grupo bis(tritilmercaptoetil)amino: 2,22 (t, 1H, SH); 2,42 (t, 1H, SH); 2,68 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 2,81 (c, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,5 (t, 2H, CH<sub>2</sub>); 3,58 (t, 2H, CH<sub>2</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, DMF-d<sub>7</sub>): Phe<sub>2</sub> (39,7, Cβ; 57,5, Cα; C<sub>arom.</sub>; CO); Gln<sub>4</sub> (30,2, Cβ; 34,1, Cγ; 55,9, Cα; CO); Phe<sub>6</sub> (39,7, Cβ; 58,2, Cα; C<sub>arom.</sub>; CO); Gly<sub>1,3,5,7,8</sub> (Cα; CO).

Grupo bis(tritilmercaptoetil)amino: 24,0; 25,0; 52,0; 53,0.

Espectrometría de masas: LC-MS C<sub>37</sub>H<sub>52</sub>N<sub>10</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> calculado 845,34 Da; observado 845,42 Da.

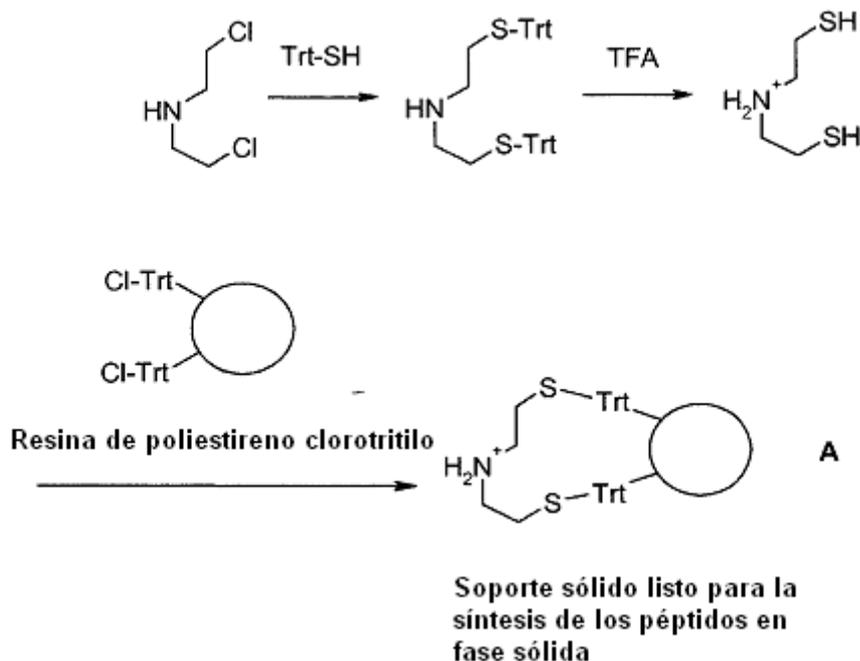
Ejemplo 4: desprotección de la amina secundaria bis(2-[trifenilmetil]sulfanil)etil}amina

Se vierten 12,5 ml de una mezcla de TFA / TIS (97,5 / 2,5) sobre 77,75 mg de bis(2-[trifenilmetil]sulfanil)etil}amina (0,125 mmol). La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 30 minutos. A continuación, la solución se evapora hasta sequedad en un evaporador rotatorio, obteniendo un sólido de color blanco. El sólido obtenido (compuesto de fórmula (VIII')) se solubiliza en ciclohexano y se evapora hasta sequedad; la operación se repite dos veces.

Ejemplo 5: acoplamiento de la amina desprotegida a la resina de clorotritilo

Se introducen 893 mg de resina (resina de cloruro de tritilo sobre esqueleto de copolímero de estireno con un 1 % de divinilbenceno, 200-400 de malla, 1,4 mmol/g, comercializada por Merck con la referencia 01-64-0074) en un reactor (1,25 mmol). En una atmósfera de argón, se solubiliza la amina del Ejemplo 4 en 5 ml de DMF anhidra y se depositan sobre la resina usando una jeringa hermética a los gases. El reactor se agita durante una noche en papel de aluminio. Se añaden 40,5 µl de metanol (1 mmol) y 116,5 µl de lutidina (1 mmol) a la resina. Después de solvólisis durante 30 minutos, la resina se lava durante 2 x 2 minutos con DMF, 2 x 2 minutos con MeOH, 2 x 2 minutos con DMF, 2 x 2 minutos con DIEA al 5 % en DMF y por último durante 2 x 2 minutos con DMF. Los ensayos de colorimetría con cloranilo y Ellman revelan la presencia de una amina secundaria y la ausencia de tiol libre en la resina.

El método para obtener la resina funcionalizada del Ejemplo 5 corresponde con el siguiente esquema general:

Ejemplo 6: acoplamiento de aminoácidos sobre la resina funcionalizada del Ejemplo 5 para proporcionar soportes cebadores (resina funcionalizada que soporta un primer aminoácido)

Se solubilizan 0,5 mmol de Fmoc-AA-F (aminoácido protegido con un grupo Fmoc y activado en forma de un fluoruro de ácido) en 2 ml de DCM anhidro y se añaden a la resina del Ejemplo 5 (0,125 mmol). A continuación, se añaden 82,4 µl de N-metilmorfolina (0,75 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se lava a continuación durante 5 x 2 minutos con DCM anhidro y 3 x 2 minutos con DMF. Los ensayos de colorimetría de cloranilo y Ellman muestran la ausencia de amina secundaria y tiol libre en la resina.

La carga final de la resina se determina mediante el ensayo de UV-VIS a 290 nm del aducto dibenzofulvenopiperidina liberado durante la desprotección con una solución al 20 % de piperidina en DMF.

Este ejemplo se aplica con 4 aminoácidos diferentes: glicina, alanina, valina y tirosina.

Se obtiene una carga de 0,15 mmol/g para la glicina; 0,124 mmol/g para la alanina; 0,115 mmol/g para la valina; y 0,107 mmol/g para la tirosina.

Se debería indicar que para el acoplamiento del primer aminoácido al soporte sólido, se pueden usar otros agentes de acoplamiento tales como PyBOP, PyBrop, HBTU etc. Se encontró que PyBrop proporciona los mejores resultados y permite el uso directo de los aminoácidos sin la necesidad de activación previa usando un fluoruro de ácido (que es menos práctico experimentalmente).

Ejemplo 7: síntesis en fase sólida de los polipéptidos 1c (H-ILKEPVHGG-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH)<sub>2</sub>), 1d (H-ILKEPVHGA-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH)<sub>2</sub>), 1e (H-ILKEPVHGV-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH)<sub>2</sub>) y 1f (H-ILKEPVHGY-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH)<sub>2</sub>).

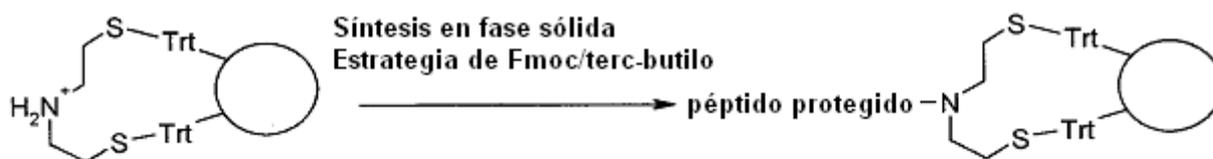
El polipéptido 1c (SEC ID N°: 2) se obtiene a partir del soporte cebador preparado en el Ejemplo 6 con glicina.

El polipéptido 1d (SEC ID N°: 3) se obtiene a partir del soporte cebador preparado en el Ejemplo 6 con alanina.

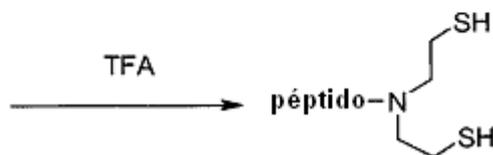
El polipéptido 1e (SEC ID N°: 4) se obtiene a partir del soporte cebador preparado en el Ejemplo 6 con valina.

El polipéptido 1f (SEC ID N°: 5) se obtiene a partir del soporte cebador preparado en el Ejemplo 6 con tirosina.

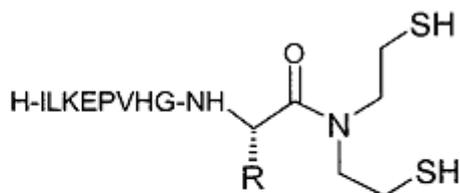
La síntesis de los polipéptidos se puede resumir tal como sigue a continuación:



**Soporte sólido listo para la síntesis de los péptidos en fase sólida**



Los polipéptidos obtenidos en el Ejemplo 7 tienen la siguiente fórmula general:



R=H 1c

R=CH<sub>3</sub> 1d

R=CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1e

R= p-OHPhCH<sub>2</sub> 1f

La síntesis en fase sólida de los diversos polipéptidos se lleva a cabo usando la estrategia Fmoc/*terc*-butilo sobre las respectivas resinas del Ejemplo 6 (escala de 0,1 mmol) en un sintetizador de péptidos en microondas (CEM  $\mu$  WAVES, Saclay, Francia). El acoplamiento se lleva a cabo usando un exceso molar de 5 veces cada aminoácido, el inactivador HBTU se usa con un exceso molar de 4,5 veces y la base DiEA se usa con un exceso molar de 10 veces.

La desprotección final y la escisión del polipéptido a partir de la resina se llevan a cabo con 10 ml de una mezcla de TFA/TIS/DMS/H<sub>2</sub>O (92,5/2,5/2,5/2,5 en volumen) durante 1 hora. A continuación, el polipéptido se obtiene por precipitación en 100 ml de una mezcla de éter dietílico/heptano (1/1 en volumen), se disuelve en H<sub>2</sub>O y a continuación se liofiliza.

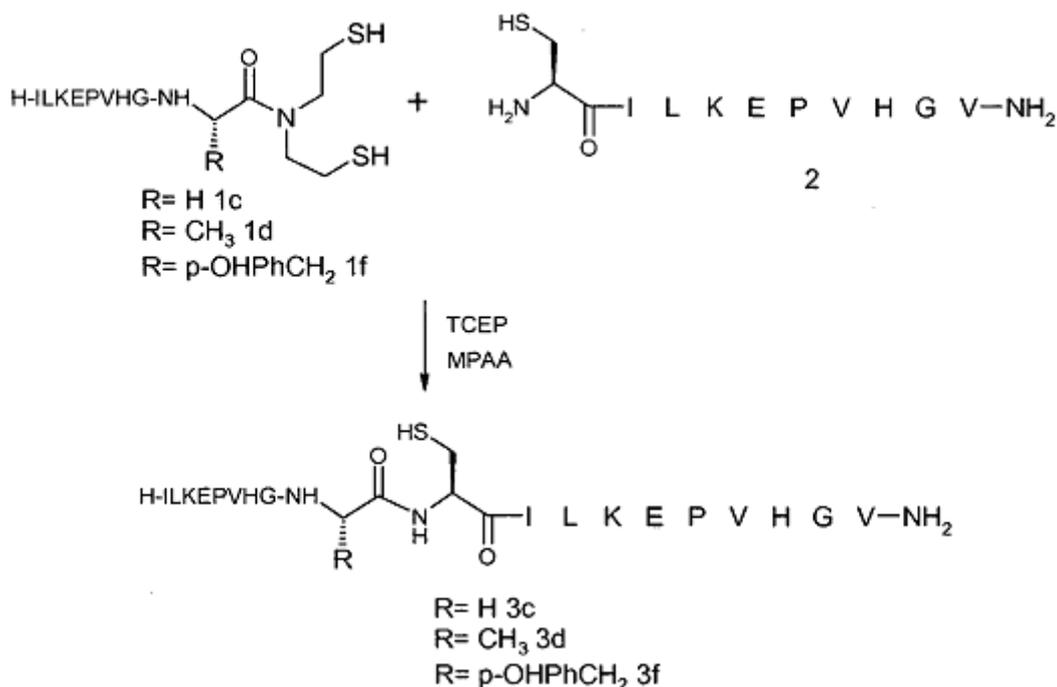
La pureza de cada polipéptido se determina por HPLC (91 % para el polipéptido 1c con una glicina, 83 % para el polipéptido 1d, 80 % para 1e, y 88 % para 1f). El análisis de MALDI-TOF de los polipéptidos está de acuerdo con la estructura del polipéptido esperado (Péptido 1c  $C_{47}H_{81}N_{13}O_{11}S_2$   $[M+H]^+$  calculado 1068,6 Da, observado 1068,5. Polipéptido 1d  $C_{48}H_{83}N_{13}O_{11}S_2$   $[M+H]^+$  calculado 1082,6 Da, observado 1082,4. Polipéptido 1e  $C_{50}H_{87}N_{13}O_{11}S_2$   $[M+H]^+$  calculado 1110,6 Da, observado 1110,5). Polipéptido 1f  $C_{54}H_{87}N_{13}O_{12}S_2$   $[M+H]^+$  calculado 1174,6 Da, observado 1174,6).

Los polipéptidos se purifican en una columna Nucleosil C18 en acetonitrilo-H<sub>2</sub>O (80-20) en TFA, con un gradiente de 0 a un 30 % en 30 min para el polipéptido 1c, y un gradiente de 0 a un 10 % en 5 min y a continuación de un 10 a un 25 % en 25 min para los polipéptidos 1d y 1e.

La pureza determinada por HPLC es de un 96 % para el polipéptido 1c con un rendimiento global de un 35 %, un 97 % para el polipéptido 1d con un rendimiento de un 31 %, y un 99 % para el polipéptido 1e con un rendimiento de un 27 %.

Ejemplo 8: ligación de los polipéptidos 1c, 1d y 1f con el polipéptido 2 (H-CILKEPVG-NH<sub>2</sub>)

Las respectivas ligaciones de los polipéptidos 1c, 1d y 1f obtenidos en el Ejemplo 7 con el polipéptido 2 (SEC ID N°: 6) se llevan a cabo de acuerdo con el siguiente diagrama:



Estas ligaciones hacen posible obtener los respectivos polipéptidos 3c (de fórmula H-ILKEPVGGCILKEPVG-NH<sub>2</sub>, SEC ID N°: 9), 3d (de fórmula H-ILKEPVGACILKEPVG-NH<sub>2</sub>, SEC ID N°: 10) y 3f (de fórmula H-ILKEPVGYCILKEPVG-NH<sub>2</sub>, SEC ID N°: 11).

Ligación del polipéptido 1c.

Se disuelven 336 mg de MPAA (2 mmol, 200 mM) y 234 mg de TCEP (800 μmol, 80 mM) en 10 ml de tampón fosfato 0,1 M (el pH se ajusta a 7,5). Se disuelven 10,2 mg del polipéptido 1c en la mezcla (7,2 μmol, 0,72 mM), y se añade esta solución a 15,3 mg del polipéptido 2 H-CILKEPVG-NH<sub>2</sub> (10,6 mmol, 1,06 mM). La mezcla se coloca en atmósfera de argón y a continuación se agita a 37 °C. El producto se purifica a continuación por RP-HPLC para dar 5,9 mg del polipéptido 3c (32 %).

Ligación del polipéptido 1d.

En primer lugar, se prepara una solución de MPAA/TCEP·HCl. Se pesan 33,52 mg de MPAA y 57,54 mg de TCEP·HCl en un tubo de polipropileno de 1,5 ml. Se añade 1 ml de tampón fosfato 0,1 M a pH = 7,3 y a continuación 140 μl de NaOH 6 M, lo que conduce a la solubilización completa de los polvos. Se añaden 20 μl adicionales de NaOH 6 M para ajustar el pH de la solución a 7,05.

Para la reacción de ligación propiamente dicha, se pesan 5,99 mg del polipéptido 1d y 9,05 mg del polipéptido 2 en el mismo matraz de vidrio de 5 ml. Se añaden 600 µl de la solución anterior. La mezcla de reacción se pone en atmósfera de hidrógeno en 3 ciclos de vacío/argón, a continuación se coloca en un baño de aceite controlado de forma termostática a 37 °C y se agita usando un agitador magnético.

Después de 26,5 h, la mezcla de reacción se transfiere a un tubo de polipropileno de 15 ml. El matraz de reacción se aclara con 3,4 ml de tampón A (agua que contiene un 0,05 % en volumen de TFA), que se transfiere al tubo de 15 ml. Se llevan a cabo 4 extracciones (4 x 4 ml) con éter. La fase acuosa se acidifica adicionalmente mediante la adición de 150 µl de TFA al 10 % en agua. Se repiten 4 nuevas extracciones (4 x 4 ml) con éter.

La fase acuosa se inyecta a continuación en HPLC preparativa (temperatura ambiente, 230 nm, columna C18 Nucleosil 120 A-5 µm, tampón A (agua que contiene un 0,05 % en volumen de TFA), tampón B acetonitrilo/agua a 4/1 en volumen que contiene un 0,05 % en volumen de TFA, caudal 3 ml/min, gradiente de 0 a un 15 % de B en 15 min, a continuación de un 15 a un 100 % de B en 283 min, volumen inyectado de 4 ml).

Después de liofilización, se recogen 8,5 mg de producto de ligación (rendimiento = 77 %).

$C_{93}H_{156}N_{26}O_{23}S$  [M+H]<sup>+</sup> calculado 2038,16, encontrado 2038,07.

Determinación de la pureza enantiomérica para la alanina: D-enantiómero al 1,76 %.

Ligación del polipéptido 1f.

En primer lugar, se prepara una solución de MPAA/TCEP·HCl. Se pesan 33,63 mg de MPAA y 57,37 mg de TCEP·HCl en un tubo de polipropileno de 1,5 ml. Se añade 1 ml de tampón fosfato 0,1 M a pH = 7,3 y a continuación se añaden 140 µl de NaOH 6 M, lo que conduce a la disolución completa de los polvos. El pH de la solución se ajusta a 7,05 con NaOH 6 M.

Para la reacción de ligación propiamente dicha, se pesan 3,97 mg del polipéptido 1e y 5,75 mg del polipéptido 2 en el mismo matraz de vidrio de 5 ml. Se añaden 374 µl de la solución anterior. La mezcla de reacción se pone en atmósfera de argón en 3 ciclos de vacío/argón, a continuación se coloca en un baño de aceite controlado de forma termostática a 37 °C y se agita usando un agitador magnético.

Después de 44,5 h, se añaden 78,6 µl (30 equiv.) de una solución 1 M de TCEP·HCl en tampón fosfato ajustado a pH = 7,0 con sosa 6 N.

Después de 4,5 días, la mezcla de reacción se transfiere a un tubo de polipropileno de 15 ml. El matraz de reacción se aclara con 3,5 ml de tampón A y se acidifica con 150 µl de TFA al 10 % en agua, que también se transfiere al tubo. Se realizan 3 extracciones (3 x 5,5 ml) con éter.

A continuación, la fase acuosa se inyecta en HPLC preparativa (temperatura ambiente, 230 nm, columna C18 Nucleosil 120 A-5 µm, tampón A de agua al 100 % que contiene TFA al 0,05 %, tampón B de acetonitrilo/agua a 4/1 que contiene al TFA 0,05 %, caudal de 3 ml/min, gradiente de un 0 a un 15 % de B en 15 min, a continuación de un 15 a un 100 % de B en 283 min, volumen inyectado de 4 ml).

Después de liofilización, se recogen 3,80 mg de producto de ligación (rendimiento = 54 %).

$C_{99}H_{160}N_{26}O_{24}S$  [M+H]<sup>+</sup> calculado 2130,18, encontrado 2130,2.

Determinación de la pureza enantiomérica de Tyr: D-enantiómero al 1,25 %.

Las Figuras 1 a 3d ilustran la monitorización de la reacción de ligación para la ligación de los polipéptidos 1c, 1d y 1f.

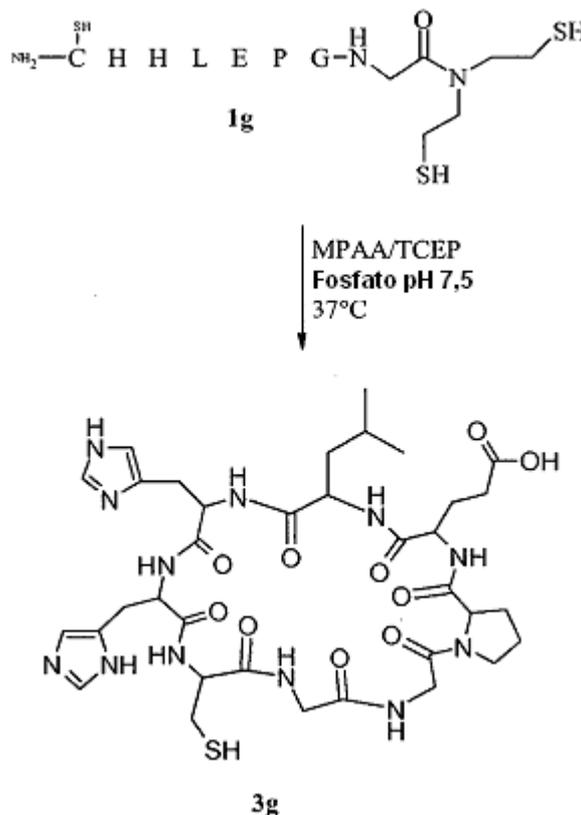
Ejemplo 9: síntesis en fase sólida del polipéptido 1g (H-CHHLEPGG-N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH)<sub>2</sub>) y ciclación de este polipéptido

El polipéptido 1g (SEC ID N°: 7) se sintetizó del mismo modo que el polipéptido 1c.

La síntesis en fase sólida del polipéptido 1g se lleva a cabo usando la estrategia Fmoc/terc-butilo (escala de 50 µmol) en un sintetizador de péptidos en microondas. El acoplamiento se lleva a cabo en presencia de HTBU como agente de activación (4,5 equiv.) y DIEA como base (10 equiv.). Al final de la síntesis, la resina se lava con diclorometano (2 x 5 ml), con etil éter (2 x 5 ml), y a continuación se seca. La desprotección final y la escisión del polipéptido se llevan a cabo con 5 ml de mezcla de TFA/TIS/H<sub>2</sub>O/DMS, 9,25/0,25/0,25/0,25 en volumen durante una hora. El polipéptido se precipita en 50 ml de una mezcla de éter/heptano (1/1), se disuelve en agua y a continuación se liofiliza.

Polipéptido 1g: C<sub>39</sub>H<sub>61</sub>N<sub>13</sub>O<sub>10</sub>S<sub>3</sub>, análisis de MALDI-TOF [M+H]<sup>+</sup> calculado 968,19, observado 968,2.

A continuación, el polipéptido 1g se cicla para proporcionar el polipéptido 3g, de acuerdo con el siguiente esquema:



5

Las condiciones usadas para la ciclación son idénticas las condiciones usadas para la ligación del polipéptido 1c al polipéptido 2.

10 Se disuelven 33,64 mg de MPA (200 mM) y 22,9 mg de TCEP (80 mM) en 1 ml de tampón fosfato 0,1 M a pH 7,5 ajustado con solución de NaOH 6 N.

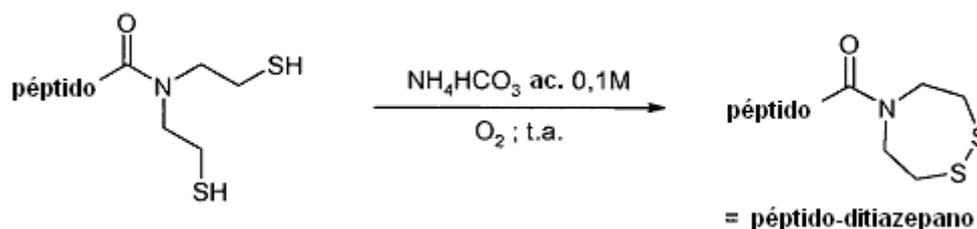
15 Se disuelven 1,0 mg (0,76 μmol) del polipéptido 1g en la mezcla (764 μl, 1 mM), se coloca en atmósfera de argón y a continuación se agita a 37 °C. La reacción conduce exclusivamente a la formación del polipéptido cíclico 3g (SEC ID N°: 12).

Polipéptido 3g: ciclo(CHHLEPGG); C<sub>35</sub>H<sub>49</sub>N<sub>12</sub>O<sub>10</sub>S análisis de MALDI-TOF [M+H]<sup>+</sup> calculado 831,1 observado 831,1.

Ejemplo 10: oxidación de los polipéptidos 1c, 1d, 1e y 1f a ditiazepanos (SEC ID N°: 13, 14, 15 y 16)

20

Los polipéptidos 1c, 1d, 1e y 1f son tal como se obtienen en el Ejemplo 7. Estos polipéptidos se oxidan de acuerdo con el siguiente esquema general:



25 Cada polipéptido se escinde del soporte sólido mediante la acción de la solución de TFA/DMS/TiS/H<sub>2</sub>O (92,5/2,5/2,5/2,5; v/v). A continuación, polipéptido se precipita en un gran volumen de una mezcla de éter dietílico/heptano (1/1; v/v) y se lava dos veces usando esta solución. El polipéptido liofilizado en bruto después de la

etapa de escisión se disuelve a continuación en una solución 0,1 M de bicarbonato de amonio desgasificada previamente durante 10 min mediante burbujeo con nitrógeno (1 mg/ml).

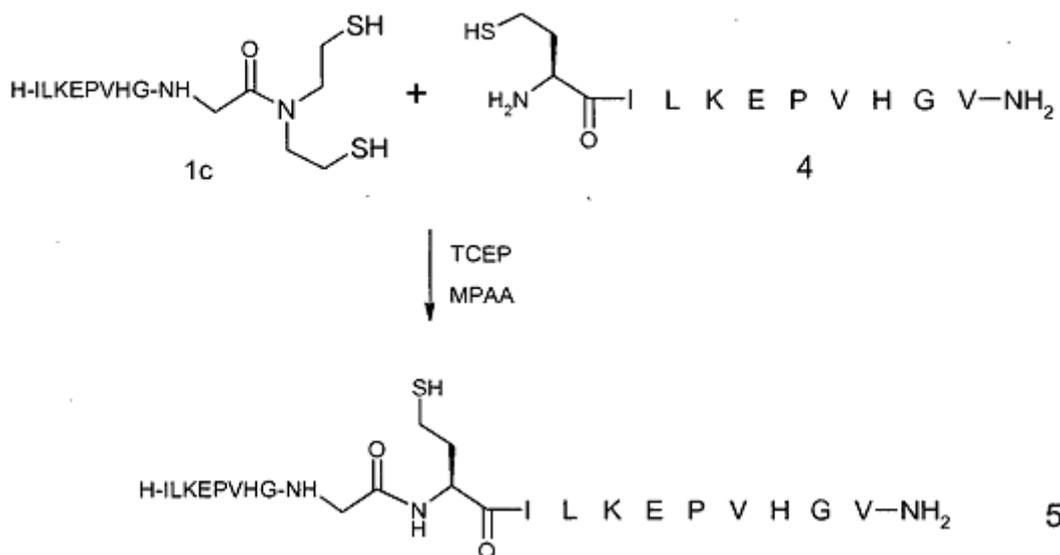
5 A continuación, la mezcla se agita vigorosamente a temperatura ambiente. El desarrollo de la reacción se monitoriza con espectrometría de masas MALDI-TOF hasta que la forma reducida del polipéptido en cuestión ha desaparecido completamente. Por último, el polipéptido se purifica por RP-HPLC (gradiente del eluyente A (H<sub>2</sub>O/TFA al 0,05 %)/eluyente B (acetonitrilo al 80 %/H<sub>2</sub>O al 20 %/TFA al 0,05 %): de 0 a un 10 % en 10 min a continuación de un 10 % a un 25 % en 25 min), y a continuación se congela y se liofiliza.

10 La siguiente tabla resume los resultados obtenidos (análisis de MALDI-TOF).

Polipéptido	m/z [M+H] <sup>+</sup> <sub>calc.</sub>	m/z [M+H] <sup>+</sup> <sub>obs.</sub>	Rendimiento final (%)
1c	1066,6	1066,6	17
1d	1080,6	1080,6	13
1e	1108,6	1108,6	23
1f	1172,6	1172,6	20

Ejemplo 11: ligación entre polipéptido 1c y el polipéptido 4

15 El polipéptido 1c (SEC ID N°: 2) se liga con el polipéptido 4 (SEC ID N°: 17), que es idéntico al polipéptido 2 excepto en que la cisteína N-terminal se reemplaza con una homocisteína. Esta reacción hace posible la obtención del polipéptido 5 (SEC ID N°: 18). El esquema de reacción es tal como sigue a continuación:



20 Se disuelven 33,6 mg de MPAA (0,2 mmol, 200 mM) y 57,4 mg de TCEP (0,2 mmol, 200 mM) en 1 ml de tampón fosfato 0,1 M (el pH se ajusta a 7,35). Se disuelven 6,15 mg del polipéptido 1c (4,4 μmol, 7 mM) y 9,35 mg del polipéptido 4 (H-homoCysILKEPVHGV-NH<sub>2</sub>) (6,55 μmol, 10,5 mM) en la mezcla (624 μl). La mezcla se coloca en atmósfera de argón y a continuación se agita a 37 °C. El producto se purifica a continuación por RP-HPLC para dar  
 25 3,3 mg del polipéptido 5 (29 %). C<sub>91</sub>H<sub>152</sub>N<sub>26</sub>O<sub>23</sub>S. Análisis de MS MALDI-TOF (monoisotópico) [M+H]<sup>+</sup> calculado 2010,12, encontrado 2009,5.

Ejemplo 12: síntesis del polipéptido 6 (SEC ID N°: 19)

4

30 El polipéptido 6 tiene la siguiente secuencia:



La resina que se describe en el Ejemplo 5 (0,5 mmol, 0,175 mmol/g) se acondiciona en diclorometano. Se disuelven Fmoc-Lys(Boc)-OH (2,342 g, 5 mmol) en diclorometano y unas gotas de DMF para ayudar a la solubilización, y a continuación se añade a la resina. Se disuelve PyBrop (2,331 g, 5 mmol) en una cantidad mínima de diclorometano y a continuación se añade a la resina. A continuación se añade DIEA (2,613 ml, 15 mmol) a la resina y el acoplamiento necesita 2 h. La resina se lava a continuación durante 3 x 2 minutos con diclorometano. La resina se trata a continuación con Ac<sub>2</sub>O al 10 %/DIEA al 5 %/diclorometano (10 ml, 2 min) y a continuación (10 ml, 20 min). La resina se lava a continuación durante 5 x 2 minutos con diclorometano.

Se ensambla en polipéptido 6 en una porción de la resina precedente (0,25 mmol, 0,175 mmol/g) con un sintetizador de péptidos (CEM  $\mu$ Waves, Saclay, Francia), usando la estrategia Fmoc/*tert*-butilo. El acoplamiento se lleva a cabo con los aminoácidos (0,2 M, 4 equiv.), el activador HBTU (0,5 M, 3,6 equiv.) y la base DIEA (2 M, 8 equiv.). La desprotección final y la escisión del péptido de la resina se llevan a cabo con TFA/TIS/DMS/tioanisol/H<sub>2</sub>O (90/2,5/2,5/2,5/2,5 en volumen, 25 ml) durante 2,5 h. El péptido se precipita en una mezcla fría de éter dietílico/heptano (1/1 en volumen), se disuelve en una cantidad mínima de agua y se liofiliza. Se obtienen 288 mg del péptido en bruto (rendimiento = 32 %). C<sub>120</sub>H<sub>216</sub>N<sub>36</sub>O<sub>31</sub>S<sub>4</sub> LC-MS [M+H]<sup>+</sup> calculado (masa promedio) 2788,5; observado 2788,1.

Una porción del polipéptido 6 se oxida a continuación antes de la purificación. Para esto, el polipéptido 6 (49,8 mg) se disuelve en AcOH/agua a 4/1 (2 ml). Este se añade gota a gota a una solución de yodo en AcOH/agua a 4/1 (25 ml, "10 eq"). Después de agitar durante 10 minutos, la mezcla de reacción se transfiere a un embudo de separación que contiene agua (60 ml). Se llevan a cabo 3 extracciones con éter (3 x 60 ml). La fase acuosa se congela y se liofiliza para dar 44,1 mg del péptido en bruto.

Después de la purificación por RP-HPLC (columna: Atlantis dC18 OBD 5  $\mu$ m, 19 x 100 mm, 210-300 nm, tampón A de agua al 100 % que contiene TFA al 0,05 %, tampón B de CH<sub>3</sub>CN/agua a 4/1 que contiene TFA al 0,05 %, gradiente: de un 20 a un 40 % del tampón B en 40 min, caudal 25 ml/min), se obtienen 7,2 mg del péptido puro (rendimiento = 14,5 %) C<sub>120</sub>H<sub>214</sub>N<sub>36</sub>O<sub>31</sub>S<sub>4</sub> LC-MS [M+H]<sup>+</sup> calculado (masa promedio) 2786,52; observado 2786,33.

#### Ejemplo 13: síntesis del polipéptido 7 (SEC ID N°: 20)

El polipéptido 7 tiene la siguiente secuencia:



La resina que se describe en el Ejemplo 5 (0,5 mmol, 0,175 mmol/g) se acondiciona en diclorometano. Se disuelve Fmoc-Tyr-OH (2,298 g, 5 mmol) en diclorometano (< 5 ml) y unas gotas de DMF para ayudar a la solubilización, y a continuación se añade a la resina. Se disuelve PyBrop (2,331 g, 5 mmol) en una cantidad mínima de DCM y a continuación se añade a la resina. A continuación se añade DIEA (2,614 ml, 15 mmol) a la resina y el acoplamiento necesita 2 h. La resina se lava a continuación durante 4 x 2 minutos con diclorometano. La resina se trata a continuación con Ac<sub>2</sub>O al 10 %/DIEA al 5 %/DCM (10 ml, 2 min) y a continuación (10 ml, 20 min). La resina se lava a continuación durante 5 x 2 minutos con diclorometano.

El polipéptido 7 se ensambla sobre la resina precedente (0,5 mmol, 0,175 mmol/g) con un sintetizador de péptidos (CEM  $\mu$ Waves, Saclay, Francia), usando la estrategia Fmoc/*tert*-butilo. El acoplamiento se lleva a cabo con los aminoácidos (0,2 M, 4 equiv.), el activador HBTU (0,5 M, 3,6 equiv.) y la base DIEA (2 M, 8 equiv.). El disolvente de lavado (DMF) y el disolvente de Fmoc-Met-OH contienen un 1 % de tioanisol para evitar al máximo la oxidación de la metionina de la secuencia.

La resina se separa en 2 después de la glutamina en la posición 2 (0,25 mmol) para acoplar el Boc-L-Thz-OH de forma manual. Para llevar a cabo esto, la resina se lava durante 4 x 2 minutos con DMF, se pesa en DMF y se divide

en 2. Se disuelve HBTU (379,3 mg, 1 mmol) en DMF (1100  $\mu$ l). Se disuelve HOBt (135 mg, 1 mmol) en DMF (500  $\mu$ l) y se añade al HBTU. Se disuelve Boc-L-Thz-OH (233,29 mg, 1 mmol) en DMF (500  $\mu$ l) y se añade a la mezcla de HBTU/HOBt. A continuación se añade DIEA (522,7  $\mu$ l, 3 mmol) a la mezcla. Se agita durante 1 minuto, a continuación la mezcla se añade a la resina y el acoplamiento necesita 45 minutos. La resina se lava a continuación durante 4 x 2 minutos con DMF, 4 x 2 minutos con diclorometano y a continuación 3 x 2 minutos con Et<sub>2</sub>O y se seca.

La desprotección final y la escisión del péptido a partir de la resina se llevan a cabo con TFA/TIS/DMS/tioanisol/H<sub>2</sub>O (90/2,5/2,5/2,5/2,5 en volumen, 25 ml) durante 2,5 h. El péptido se precipita en una mezcla fría de éter dietílico/heptano (1/1 en volumen), se disuelve en una cantidad mínima de agua y se liofiliza. Se obtienen 369 mg del péptido en bruto (rendimiento = 37,6 %). C<sub>153</sub>H<sub>223</sub>N<sub>41</sub>O<sub>44</sub>S<sub>4</sub> MALDI-TOF [M+H]<sup>+</sup> calculado (resolución monoisotópica) 3467,54; observado 3466,0.

Una porción del polipéptido 7 se oxida a continuación antes de la purificación. Para esto, el fragmento 2 (51,8 mg) se disuelve en CH<sub>3</sub>CN (2,38 ml) y a continuación se añade tampón fosfato 0,2 M a pH = 7,3 (9,50 ml). Esto se añade gota a gota a una solución de diamida 10 mM en agua (1,32 ml, 1 equiv.). Después de agitar durante 15 minutos, la mezcla de reacción se diluye con tampón A (1,8 ml) y se inyecta en RP-HPLC (columna: Atlantis dC18 OBD 5  $\mu$ m, 19 x 100 mm, 210-300 nm, tampón A de agua al 100 % que contiene TFA al 0,05 %, tampón B de CH<sub>3</sub>CN/agua a 4/1 que contiene TFA al 0,05 %, gradiente: de un 25 a un 45 % de tampón B en 40 min, caudal 25 ml/min); se obtienen 11,2 mg del péptido puro (rendimiento = 21,6 %) C<sub>153</sub>H<sub>221</sub>N<sub>41</sub>O<sub>44</sub>S<sub>4</sub> LC-MS [M+H]<sup>+</sup> calculado (masa promedio) 3467,97; 3467,38.

#### Ejemplo 14: síntesis del polipéptido 8 (SEC ID N°: 21)

El polipéptido 8 tiene la siguiente secuencia:



El polipéptido 8 se ensambla sobre resina Novasyn TGR (0,5 mmol, 0,25 mmol/g) con un sintetizador de péptidos (CEM  $\mu$ Waves, Saclay, Francia), usando la estrategia Fmoc/*terc*-butilo. El acoplamiento se lleva a cabo con los aminoácidos (0,2 M, 4 equiv.), el activador HBTU (0,5 M, 3,6 equiv.) y la base DIEA (2 M, 8 equiv.). La desprotección final y la escisión del péptido a partir de la resina se llevan a cabo con TFA/EDT/H<sub>2</sub>O/TIS (94/2,5/2,5/1 en volumen, 30 ml) durante 2,5 h. El péptido se precipita en una mezcla fría de éter dietílico/heptano (1/1 en volumen), se disuelve en una cantidad mínima de agua y se liofiliza. Después de purificación por RP-HPLC (columna Vydac C18 de 50 cm x 2 cm, 280 nm, tampón A de agua al 100 % que contiene TFA al 0,05 %, tampón B de CH<sub>3</sub>CN/agua a 4/1 que contiene TFA al 0,05 %, gradiente: de 0 a un 20 % de tampón B en 10 min la continuación de un 20 a un 50 % de tampón B en 60 min, caudal 30 ml/min). Se obtienen 272 mg del péptido puro (rendimiento = 13 %) C<sub>158</sub>H<sub>239</sub>N<sub>47</sub>O<sub>52</sub>S<sub>4</sub> MALDI-TOF [M+H]<sup>+</sup> calculado (resolución monoisotópica) 3755,6; observado 3755,7.

#### Ejemplo 15: ligación del polipéptido 7 y del polipéptido 8 (en caja de guantes) para obtener el polipéptido 7-8 (SEC ID N°: 22)

Se disuelven MPAA (33,70 mg) y TCEP.HCl (57,30 mg) en tampón fosfato 0,1 M a pH = 7,3 que contiene guanidina HCl 4 M (1 ml). El pH de la solución se ajusta a 7,2 con sosa 5 N (200  $\mu$ l). Los polipéptidos 7 (8,5 mg) y 8 (18,25 mg, 2 equiv.) se pesan en el mismo tubo y se disuelven con la solución previa (309  $\mu$ l). La mezcla de reacción se coloca en un baño a 37 °C. Después de 24 h, la mezcla de reacción se diluye con la misma solución (300  $\mu$ l).

Se añade, 25 h más tarde, O-metilhidroxilamina 56 mM en tampón acetato 0,1 M a pH = 3,93 (1,52 ml). El pH de la mezcla de reacción se ajusta a pH = 4,15 con ácido acético (35  $\mu$ l). Después de 20 h a 37 °C, la mezcla de reacción se saca de la caja de guantes. Se extrae MPAA con Et<sub>2</sub>O (3 x 6 ml). La mezcla de reacción se trata durante 20 minutos con TCEP.HCl (28 mg) antes de la purificación por RP-HPLC (columna Uptisphere 5C4 de 27,5 cm x 1 cm, 215 nm, tampón A de agua al 100 % que contienen TFA al 0,05 %, tampón B de CH<sub>3</sub>CN/agua a 4/1 que contienen TFA al 0,05 %, gradiente: de 0 a un 20 % de tampón B en 3 min y a continuación de un 20 a un 50 % de tampón B en 57 min, caudal 6 ml/min). Se obtienen 4,4 mg del polipéptido puro 7-8 (rendimiento = 25,4 %) C<sub>306</sub>H<sub>451</sub>N<sub>87</sub>O<sub>96</sub>S<sub>6</sub> MALDI-TOF [M+H]<sup>+</sup> calculado (masa promedio) 7077,8; observado 7078,5.

#### Ejemplo 16: ligación del polipéptido 6 y del polipéptido 7-8 (en caja de guantes) para obtener el polipéptido 6-7-8 (SEC ID N°: 23)

Se disuelven MPAA (33,74 mg) y TCEP.HCl (57,54 mg) en tampón fosfato 0,1 M a pH = 7,3 que contiene guanidina HCl 4 M (1 ml). El pH de la solución se ajusta a 7,2 con sosa 5 N (220  $\mu$ l). Los polipéptidos 7-8 (3,85 mg) y 6 (2,89

## ES 2 493 917 T3

mg, 1,7 equiv.) se pesan en el mismo tubo y se disuelven con la solución mencionada anteriormente (115 µl). La mezcla de reacción se coloca en un baño a 37 °C.

5 Después de 24 h, se observa la formación del producto de ligación, en particular el polipéptido 6-7-8 de secuencia:  
H-IRNCIIGKGRSYKGTVSITKSG IKCQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGKDLQENYCRNPRGEEGGPWCFTSNPEV  
RYEVC D I P Q C S E V - N H <sub>2</sub>

C<sub>418</sub>H<sub>648</sub>N<sub>122</sub>O<sub>127</sub>S<sub>7</sub> MALDI-TOF [M+H]<sup>+</sup> calculado (masa promedio) 9640,01; observado 9640,1.

10

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de un polipéptido de fórmula:



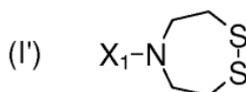
representando cada  $X_1$  y  $X_2$  un fragmento peptídico, y representando  $X''$  un resto de aminoácido que comprende una función tiol, comprendiendo dicho método al menos una etapa de reacción de ligación entre un polipéptido de fórmula:



y un polipéptido de fórmula:



2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la reacción de ligación se lleva a cabo poniendo en contacto un polipéptido de fórmula:

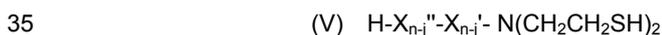


con el polipéptido de fórmula (II), en presencia de al menos un compuesto que reduce los enlaces disulfuro, reduciéndose *in situ* el polipéptido de fórmula (I') al polipéptido de fórmula (I) para la reacción de ligación.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que  $X_2$  representa un fragmento peptídico de fórmula



siendo  $n$  un número entero mayor o igual que 3, representando cada  $X_i''$ , para un  $i$  entero comprendido entre 3 y  $n$ , un resto de aminoácido que porta una función tiol, y representando cada  $X_i'$ , para un  $i$  entero comprendido entre 2 y  $n$ , un fragmento peptídico; comprendiendo dicho método, antes de la etapa de reacción de ligación entre el polipéptido de fórmula (I) y el polipéptido de fórmula (II), una sucesión de  $n-2$  etapas de reacción de ligación, siendo la  $j$ -ésima etapa de reacción de ligación, para un  $j$  entero comprendido entre 1 y  $n-2$ , una reacción de ligación entre un polipéptido de fórmula:



en la que la función amina y/o la función tiol del resto  $X_{n-j}''$  está protegida y un polipéptido de fórmula:

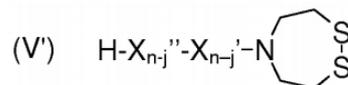


para formar un polipéptido de fórmula:



experimentando el polipéptido de fórmula (VII) la desprotección de la función tiol del resto  $X_{n-j}''$  al final de la reacción de ligación.

4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que una o más de las  $n-2$  etapas de reacción de ligación entre el polipéptido de fórmula (V) y el polipéptido de fórmula (VI) se lleva a cabo poniendo en contacto un polipéptido de fórmula:



con el polipéptido de fórmula:



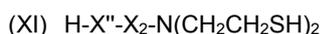
siendo  $j$  un número entero comprendido entre 1 y  $n-2$ , en presencia de al menos un compuesto que reduce los enlaces disulfuro.

60

5. Método de fabricación de un polipéptido cíclico de fórmula:

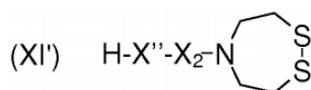


5 representando  $X_2$  un fragmento peptídico, y representando  $X''$  un resto de aminoácido que comprende una función tiol, comprendiendo dicho método al menos una etapa de reacción de ligación de un polipéptido de fórmula:



10 consigo mismo.

6. Método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la reacción de ligación se lleva a cabo poniendo en contacto un polipéptido de fórmula:



15 con al menos un compuesto que reduce los enlaces disulfuro, reduciéndose *in situ* el polipéptido de fórmula (XI') al polipéptido de fórmula (XI) para la reacción de ligación.

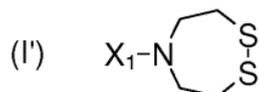
20 7. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la reacción de ligación o las reacciones de ligación se llevan a cabo en un medio acuoso, preferentemente a un pH comprendido entre 6,5 y 8,5, de forma más particularmente preferente entre 7 y 8, e idealmente a aproximadamente 7,5.

25 8. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la reacción de ligación o las reacciones de ligación se llevan a cabo en presencia de al menos un compuesto que reduce los enlaces disulfuro, seleccionado preferentemente entre tris(2-carboxietil)fosfina, ácido 4-mercaptobenzoico, ditiotreitól, bencil mercaptano y las mezclas de los mismos.

30 9. Polipéptido de fórmula:



o de fórmula:



35 en la que  $X_1$  representa un fragmento peptídico y el grupo  $-N(CH_2CH_2SH)_2$  o



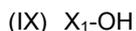
40 está unido a la terminación C=O del resto de aminoácido del fragmento peptídico  $X_1$  que está en posición C-terminal.

10. Método de preparación de un polipéptido de fórmula:



representando  $X_1$  un fragmento peptídico y estando unido el grupo  $-N(CH_2CH_2SH)_2$  a la terminación C=O del resto de aminoácido del fragmento peptídico  $X_1$  que está en posición C-terminal, que comprende al menos una etapa de síntesis peptídica y una etapa de funcionalización C-terminal.

50 11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la etapa de síntesis peptídica precede a la etapa de funcionalización; la etapa de síntesis peptídica proporciona un polipéptido de fórmula:



55

que comprende preferentemente grupos protectores en sus funciones amina y carboxílica, con la excepción de su función carboxílica C-terminal; y la etapa de funcionalización comprende:

- la reacción del polipéptido de fórmula (IX) con el compuesto de amina de fórmula:



en la que  $G_1$  representa un grupo protector, formando preferentemente dicho grupo protector una función tioéter, tioéster o disulfuro, y siendo de forma más particularmente preferente el grupo trifenilmetilo, en la fase líquida, para formar el polipéptido de fórmula (I);

- opcionalmente la desprotección del polipéptido de fórmula (I).

12. Soporte de resina polimérica para síntesis de polipéptidos en fase sólida, que comprende un esqueleto principal y grupos funcionales  $NH-(CH_2CH_2-S-Trt-)_2$  o grupos funcionales  $NH-(CH_2CH_2-S-Trt-CO-NH-)_2$  o grupos funcionales  $G_2-AA-N-(CH_2CH_2-S-Trt-)_2$  o grupos funcionales  $G_2-AA-N-(CH_2CH_2-S-Trt-CO-NH-)_2$ , en los que Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes, seleccionados en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano; AA representa un resto de aminoácido que porta opcionalmente uno o más grupos protectores;  $G_2$  representa un átomo de hidrógeno o un grupo que protege la función amina; en el que los grupos funcionales  $NH-(CH_2CH_2-S-Trt-)_2$  o los grupos funcionales  $G_2-AA-N-(CH_2CH_2-S-Trt-)_2$  están unidos al esqueleto principal mediante los dos grupos trifenilmetilo, o los grupos funcionales  $NH-(CH_2CH_2-S-Trt-CO-NH-)_2$  o los grupos funcionales  $G_2-AA-N-(CH_2CH_2-S-Trt-CO-NH-)_2$  están unidos al esqueleto principal mediante los dos grupos amina.

13. Soporte de resina polimérica de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el esqueleto principal se selecciona entre los esqueletos de poliestireno, poliacrilamida, polietilenglicol, celulosa, polietileno, poliéster, látex, poliamida, polidimetilacrilamida, copolímero de polietilenglicol-poliestireno, copolímero de polietilenglicol-poliacrilamida y los derivados de los mismos.

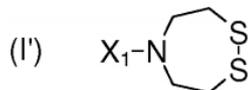
14. Método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que:

- la etapa de funcionalización precede a la etapa de síntesis peptídica;  
- la etapa de funcionalización comprende:

- el acoplamiento de un aminoácido a un soporte de resina polimérica de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende un esqueleto principal y grupos funcionales  $NH-(CH_2CH_2-S-Trt-)_2$  o grupos funcionales  $NH-(CH_2CH_2-S-Trt-CO-NH-)_2$ , para suministrar un soporte cebador; o
- el suministro de un soporte cebador que es un soporte de resina polimérica de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende un esqueleto principal y grupos funcionales  $G_2-AA-N-(CH_2CH_2-S-Trt-)_2$  o grupos funcionales  $G_2-AA-N-(CH_2CH_2-S-Trt-CO-NH-)_2$ ;

- la etapa de síntesis peptídica comprende una sucesión de acoplamientos de aminoácidos sobre el soporte cebador.

15. Método de preparación de un polipéptido de fórmula:



en el que  $X_1$  representa un fragmento peptídico y el grupo



está unido a la terminación  $C=O$  del resto de aminoácido del fragmento peptídico  $X_1$  que está en la posición C-terminal, que comprende una etapa de oxidación de un polipéptido de fórmula:



preferentemente en contacto con aire, o en presencia de  $I_2$  o de diamida, y en un tampón, estando precedida preferentemente dicha etapa de oxidación por una etapa de preparación del polipéptido de fórmula (I) de acuerdo con el método de las reivindicaciones 10, 11, o 14.

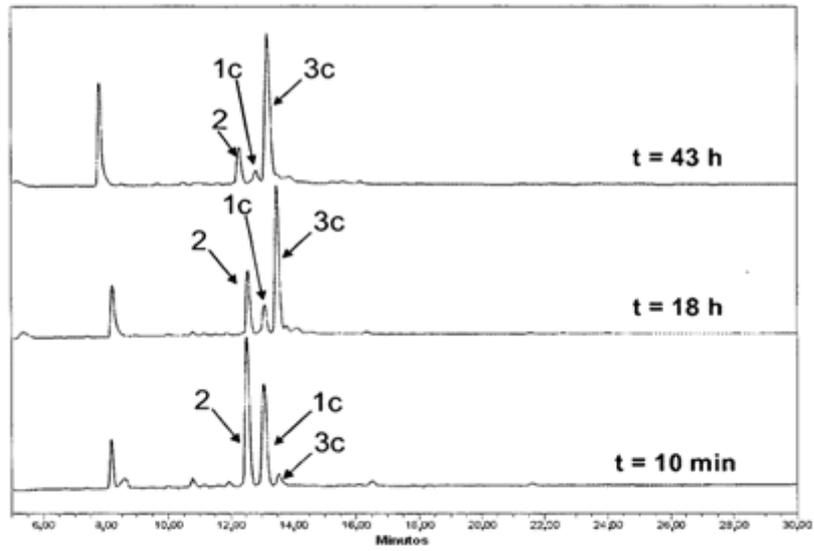


Fig. 1

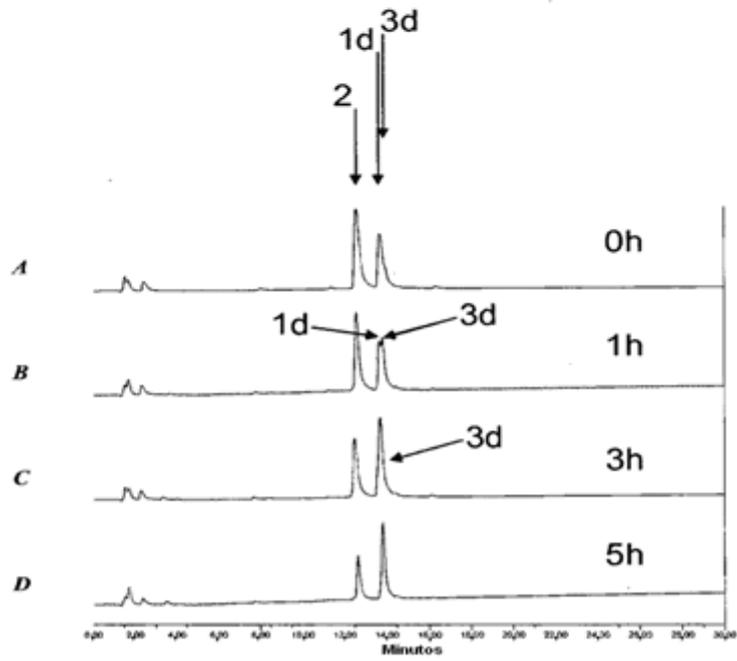


Fig. 2a

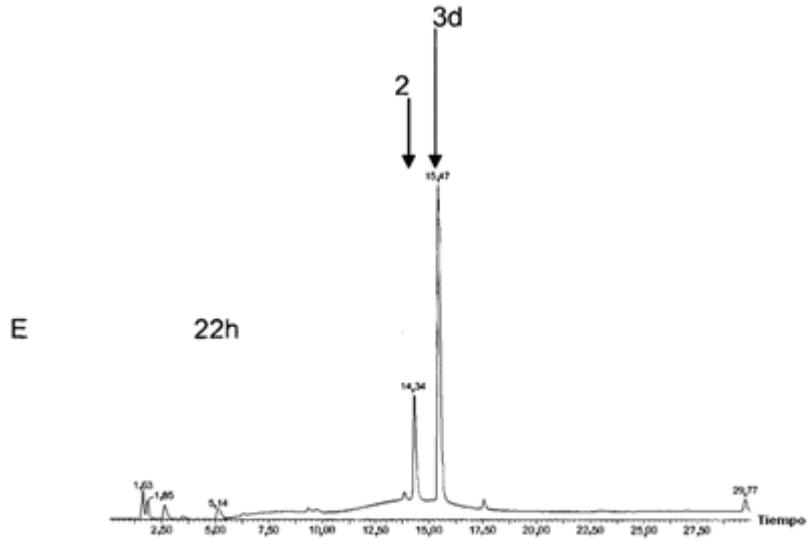


Fig. 2b

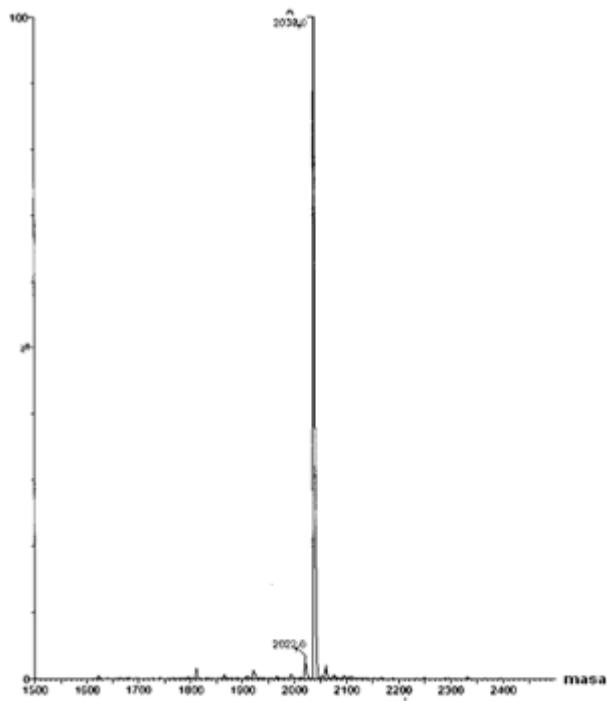


Fig. 2c

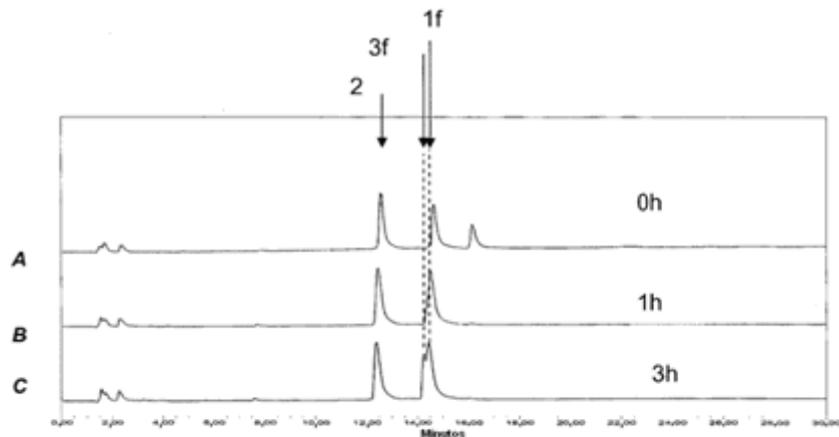


Fig. 3a

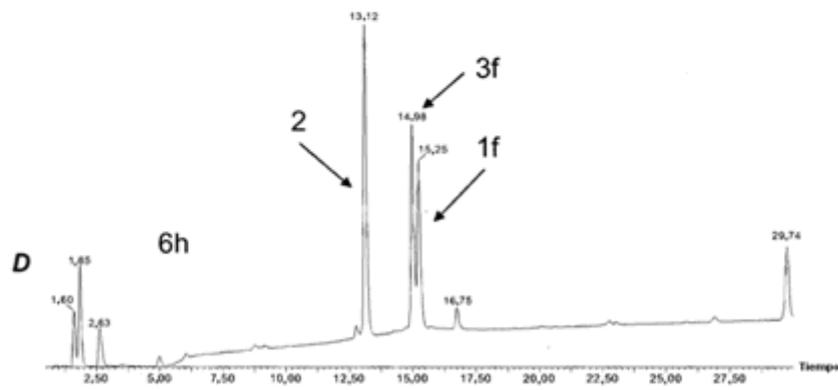


Fig. 3b

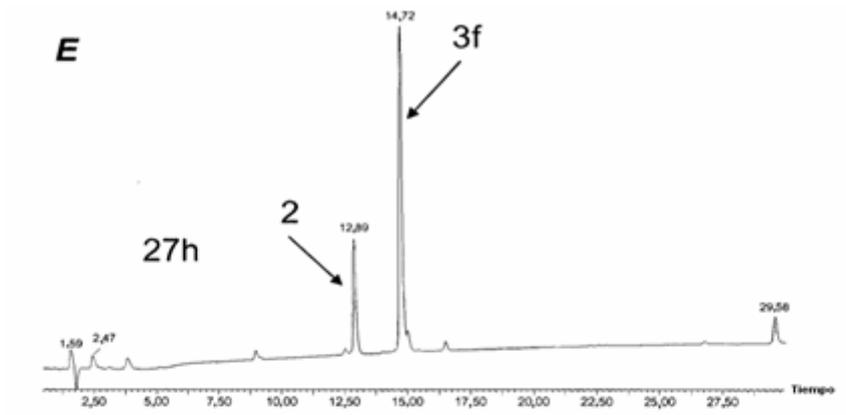


Fig. 3c

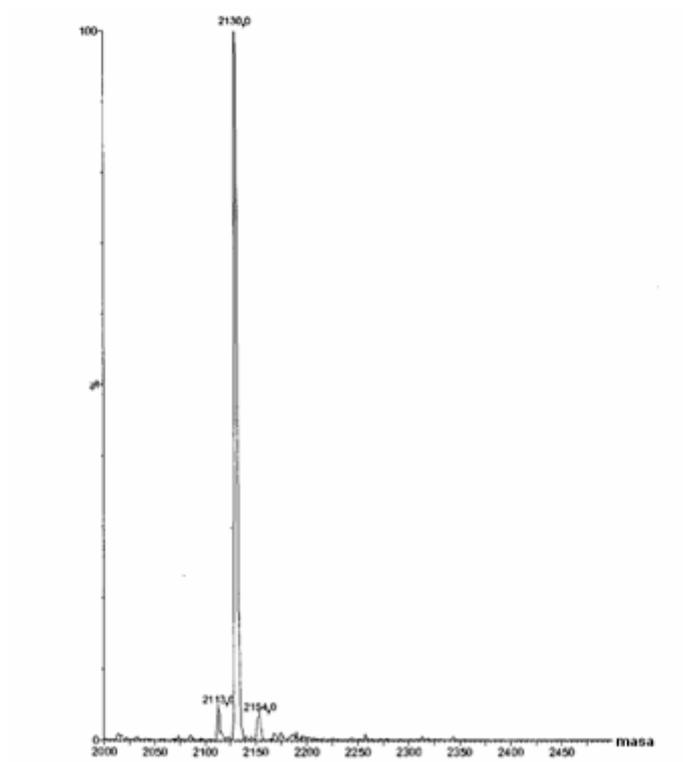


Fig. 3d