

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 054**

51 Int. Cl.:

C07K 1/02 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2012 E 12157571 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2634193**

54 Título: **Condensación de fragmento de oligopéptido de cadena lateral protegida mediante el uso de subtilisinas en disolventes orgánicos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2015

73 Titular/es:

**ENZYPEP B.V. (100.0%)
Urmonderbaan 22, Chemelot Campus, gebouw 93
(0933220)
6167 RD Geleen, NL**

72 Inventor/es:

**NUIJENS, TIMO y
QUAEDFLIEG, PETER JAN LEONARD MARIO**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 531 054 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

Condensación de fragmento de oligopéptido de cadena lateral protegida mediante el uso de subtilisinas en disolventes orgánicos

5

La invención se relaciona con un método para sintetizar enzimáticamente un oligopéptido.

Los péptidos, particularmente los oligopéptidos tienen muchas aplicaciones, por ejemplo, como producto farmacéutico, alimento o ingrediente alimenticio, agroquímico o ingrediente cosmético.

10

Se conoce que los oligopéptidos se pueden sintetizar químicamente en solución o en fase sólida a través de procesos altamente optimizados. Sin embargo, existen aún algunas limitaciones en la síntesis química de péptidos especialmente a gran escala. Por ejemplo, los péptidos más largos que 10-15 aminoácidos son difíciles de sintetizar en fase sólida porque tienden a formar estructuras terciarias (por el llamado "colapso hidrofóbico") lo que hace que el alargamiento del péptido sea muy problemático ya que se necesita un exceso grande de reactivos y bloques de construcción de aminoácidos. Además, la purificación del producto final es frecuentemente ineficiente en cuanto a costes debido a la presencia de cantidades significativas de péptidos de longitud similar. Por lo tanto, los péptidos más largos que 10 aminoácidos se sintetizan frecuentemente mediante una combinación de síntesis en fase sólida de fragmentos de oligopéptidos protegidos que posteriormente se condensan químicamente en solución, por ejemplo, una condensación 10 + 10 para hacer un péptido de 20 aminoácidos. El inconveniente principal de la condensación química de fragmento de oligopéptido protegido es que tras la activación del residuo de aminoácido C-terminal se produce racemización, excepto cuando se usan residuos Gly o Pro C-terminales. Por lo tanto, la estrategia de condensación química de fragmentos de oligopéptidos protegidos se limita a usar residuos Gly y Pro activados en posición C-terminal, o se tiene que lidiar con una purificación muy difícil debido a la formación de diastereoisómeros no deseados. En contraste, los acoplamiento de oligopéptidos catalizados por enzimas están completamente desprovistos de racemización y tienen otras muchas ventajas sobre la síntesis química de péptidos. Para aplicación industrial, un concepto de síntesis enzimática de péptidos basado en un enfoque cinético, es decir, mediante el uso de un componente carboxi activado es más atractivo (ver por ejemplo Sewald y H.-D. Jakubke, en: "Peptides: Chemistry and Biology", 1ra reimpresión, Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 2002).

20

La síntesis quimioenzimática de péptidos puede implicar el acoplamiento enzimático de fragmentos de oligopéptidos de cadena lateral sin protección los que se han sintetizado individualmente mediante el uso de la síntesis química, fermentación, o por una combinación de etapas de acoplamiento químico y enzimático. Algunos informes se han publicado sobre la condensación enzimática de oligopéptidos de cadena lateral completamente sin protección en ambiente acuoso (Kumaran y otros Protein Science, 2000, 9, 734; Björup y otros Bioorg. Med. Chem. 1998, 6, 891; Homandberg y otros Biochemistry, 1981, 21, 3387; Komoriya y otros Int. J. Pep. Prot. Res. 1980, 16, 433). Sin embargo, un inconveniente principal de tal condensación enzimática de fragmentos de oligopéptidos en sistemas acuosos es que tiene lugar la hidrólisis simultánea de los enlaces amida de los oligopéptidos y el éster C-terminal lo que conduce a bajos rendimientos y muchos productos secundarios. Para reducir la cantidad de hidrólisis de los costosos materiales de partida de oligopéptidos y productos de péptidos, frecuentemente se usa un gran exceso de nucleófilo de oligopéptidos (5-10 equivalentes) para incrementar la velocidad de condensación y por ello disminuyen las reacciones hidrolíticas secundarias, lo que económicamente resulta una estrategia muy poco atractiva. Para reducir más aun la cantidad de hidrólisis, se han realizado condensaciones enzimáticas de fragmentos de oligopéptidos completamente sin protección en mezclas de reacción poco acuosas mediante el uso de codisolventes orgánicos que muestran rendimientos superiores de producto y menos reacciones hidrolíticas secundarias (Slomczynska y otros Biopolymers, 1992, 32, 1461; Xaus y otros Biotechnol. Tech. 1992, 6, 69; Nishino y otros Tet. Lett. 1992, 33, 3137; Clápes y otros Bioorg. Med. Chem. 1995, 3, 245; Kolobanova y otros Russian J. of Bioorg. Chemistry 2000, 26, 6, 369). Puesto que en estos informes se requiere una cantidad significativa de agua para la actividad de la enzima (entre 1-5 % vol de agua), las reacciones hidrolíticas secundarias no se eliminan aún completamente. Para eliminar prácticamente las reacciones hidrolíticas secundarias enzimáticas, se pueden usar mezclas de reacción casi anhidras (por debajo de 1 % vol de agua). Sin embargo existen solamente muy pocas enzimas activas y estables bajo estas condiciones (G. Carrea, S. Riva, Fundamentals of Biocatalysis in Neat Organic Solvents, Wiley, 2008) y los oligopéptidos que contienen funcionalidades de cadena lateral sin protección usualmente exhiben muy poca o ninguna solubilidad en estos disolventes orgánicos. Se han divulgado algunos informes sobre la síntesis enzimática de di- y tri-péptidos en disolventes orgánicos anhidros (por ejemplo, Chen y otros J. Org. Chem. 1992, 57, 6960; Nuijens y otros J.M.d. Cat.B. 2001, 71, 79) pero no se han realizado condensaciones de fragmentos de oligopéptidos. Aunque los disolventes casi anhidros prácticamente eliminan las reacciones hidrolíticas secundarias, más frecuentemente se pierde mucha actividad de la enzima y así las reacciones de acoplamiento de oligopéptidos tienden a ser muy lentas e incompletas.

30

Como se conoce a partir de la síntesis química de péptidos en fase de solución, los oligopéptidos protegidos son bien solubles en varios disolventes orgánicos puros debido a sus caracteres hidrofóbicos. Así, la condensación enzimática de fragmentos de oligopéptidos en disolventes orgánicos anhidros se podría ejecutar mediante el uso de oligopéptidos protegidos. Sin embargo, se podría esperar que los grupos protectores múltiples de cadena lateral hidrofóbica

estéricamente demandantes bloqueen el reconocimiento de la enzima. Por ejemplo, se informó por Yan y otros Tetrahedron, 2005, 61, 5933 que no se obtuvieron productos de condensación del todo con aminoácidos de cadena lateral protegida mediante el uso de la proteasa subtilisina A. De acuerdo con sus observaciones, la subtilisina A no acepta residuos de aminoácidos que portan grupos protectores voluminosos en su funcionalidad de cadena lateral; sin embargo, cuando estos grupos protectores voluminosos se eliminan, los residuos de aminoácidos se aceptan fácilmente.

Gill y otros (J. Am. Chem. Soc 1995, 117, 6175-6181) además describe un método para la síntesis enzimática de oligopéptidos. Sin embargo, la síntesis como se describe por Gill y otros requiere enzimas específicas para cada adición individual de aminoácidos para sintetizar fragmentos, y otra enzima una vez más para el acoplamiento de dos fragmentos. El hecho de que diferentes enzimas se tienen que usar para el ensamblaje de los dos fragmentos y otra enzima para la condensación de los dos fragmentos, hace la aplicación de este proceso en una escala industrial poco atractiva. Por otra parte, la etapa de condensación del fragmento como se describe por Gill y otros requiere la eliminación de dos grupos alilo protectores de cadena lateral de uno de los fragmentos, para permitir el uso de proteasa V8 para lograr el acoplamiento. Así, el proceso como se describe por Gill y otros no es un proceso versátil para la preparación de oligopéptidos que comprende 8 residuos de aminoácidos o más.

Así, aún existe una necesidad para un proceso enzimático simple versátil para la síntesis de péptidos que comprende al menos 8 residuos de aminoácidos, con ninguna o pocas reacciones hidrolíticas secundarias. Tal un proceso enzimático ahora se ha encontrado sorprendentemente.

En el marco de esta invención, un éster de oligopéptido i) se define como un éster de oligopéptido que comprende 4 o más residuos de aminoácidos,

- que comprende al menos dos residuos de aminoácidos cada uno con una funcionalidad de cadena lateral que está protegida con un grupo protector, y que comprende un éster C-terminal activado representado por la fórmula $C(=O)-O-CX_2-C(=O)N-R_1R_2$, en donde cada X independientemente representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo o un grupo arilo y R_1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo o un grupo arilo y R_2 representa un átomo de hidrógeno la funcionalidad de la cadena lateral del residuo de aminoácido o en uno o más de las funcionalidades de cadena lateral del residuo de péptido,
- y en donde el éster de oligopéptido opcionalmente comprende protección N-terminal.

Un nucleófilo de oligopéptido ii) como se usa en el proceso de la presente invención se define como un nucleófilo de oligopéptido que comprende 4 o más residuos de aminoácidos,

- que comprende un grupo amina N-terminal, y al menos dos residuos de aminoácidos cada uno con una funcionalidad de cadena lateral que está protegida con un grupo protector y
- en donde el nucleófilo de oligopéptido opcionalmente comprende protección C-terminal.

El proceso de la invención es un proceso para la síntesis enzimática de un oligopéptido, que comprende acoplamiento de un éster de oligopéptido i) de 4 o más residuos de aminoácidos como se define anteriormente, con un nucleófilo de oligopéptido ii) que comprende 4 o más residuos de aminoácidos como se define anteriormente, cuyo acoplamiento se lleva a cabo en un disolvente orgánico o una mezcla de disolvente orgánico que comprende 0.1 % vol o menos de agua con relación a la cantidad total de líquidos en la cual tiene lugar predominantemente la reacción de acoplamiento, en presencia de una subtilisina y en donde se elimina el agua que se libera por la enzima durante la reacción de acoplamiento.

Para el propósito de esta invención, el porcentaje de agua en la mezcla de disolvente es el porcentaje de agua como se determina por una titulación de Karl Fischer llevado a cabo exactamente como se describe en la sección experimental.

El éster de oligopéptido como se describió anteriormente bajo i) puede referirse también en este texto como "el donante de acilo", mientras que el nucleófilo de oligopéptido ii) se refiere frecuentemente como "el nucleófilo".

Con el método de la invención se ha encontrado posible condensar enzimáticamente fragmentos de oligopéptido protegido. Particularmente, se ha encontrado sorprendentemente que donantes de acilo de oligopéptido (es decir el éster de oligopéptido como se describe anteriormente) con múltiples grupos protectores de cadena lateral se aceptan como sustrato por la enzima. Además, la condensación de oligopéptidos protegidos ocurre sin reacciones secundarias notables. Con el proceso de conformidad con la invención, se puede lograr un rendimiento de más del 80%, por el cual el porcentaje se calcula como la cantidad de donante de acilo en mol que se ha convertido en el producto deseado, dividido por la suma de donante de acilo remanente, producto deseado y producto de hidrólisis en mol multiplicado por 100%. Preferentemente, se logra un rendimiento de más del 90%, con la máxima preferencia un rendimiento de más del 95%.

5 Sorprendentemente, un rendimiento de más del 80% se puede lograr, aun cuando se usa un muy pequeño o ningún exceso de una de las parejas de acoplamiento i) o ii). Esto es en contraste a la síntesis enzimática de péptidos en soluciones acuosas o poco acuosas donde un exceso muy grande del nucleófilo se necesita para obtener rendimientos de más del 80%, típicamente 5-10 equivalentes.

10 El método de la invención es ventajoso en que ofrece la posibilidad para el acoplamiento de varios oligopéptidos protegidos que difieren en el residuo de aminoácido terminal que es para participar en la reacción de acoplamiento, que incluyen aminoácidos no proteinogénicos. Sin importar qué aminoácido proteinogénico o no proteinogénico se use en el residuo C-terminal del éster C-terminal, no tiene lugar ninguna racemización de este residuo, mientras que en el caso de la condensación química del fragmento protegido siempre ocurre racemización excepto si se usa Gly o Pro en esta posición, así, el método de acuerdo con la invención ofrece significativamente más libertad en la estrategia de condensación del fragmento.

15 Además, el método de la invención es ventajoso ya que la magnitud de la hidrólisis de la porción éster del éster C-terminal del oligopéptido protegido es pequeña, es decir, es pequeña dentro del marco de tiempo típico para lograr el acoplamiento, al menos en varios experimentos no se observó hidrólisis detectable del éster. Para el propósito de esta invención, "pequeño" se define como menos que 5% del donante de acilo, pero típicamente mucho menos que 5% del donante de acilo se hidroliza durante el método de acuerdo con la invención. Además, la magnitud de la hidrólisis de los enlaces amida de los fragmentos de oligopéptido protegido o del producto de péptido preparado enzimáticamente es baja; al menos en varios experimentos no se ha observado hidrólisis detectable.

20 Para el propósito de esta invención, por 'oligopéptidos' se entiende un péptido basado en 2-200 aminoácidos, particularmente basado en 2-100, más particularmente basado en 2-50 aminoácidos, preferentemente cualquier cadena lineal de 2-200 aminoácidos, con mayor preferencia de 2-100 o 2-50 aminoácidos, que se usa en el método de acuerdo con la invención. Para el propósito de esta invención, por "péptidos" se entiende cualquier cadena de aminoácidos basados en 8 o más aminoácidos, cuyo péptido es el producto de un método de acuerdo con la invención.

30 Para el propósito de esta invención, por "oligopéptidos protegidos" se entiende cualquier oligopéptido que comprende una cadena de al menos 4 residuos de aminoácidos en donde al menos dos residuos de aminoácidos tienen una funcionalidad de cadena lateral y en donde al menos dos funcionalidades de cadena lateral de aminoácidos está protegida con un grupo protector. Las funcionalidades de cadena lateral son, por ejemplo, funcionalidades de hidroxilo, ácido carboxílico, amina primaria o secundaria (que incluyen indol y guanidino), tiol o carboxiamida. Preferentemente, por encima de 60%, con mayor preferencia por encima de 70%, y aún con mayor preferencia por encima de 80% de todas las funcionalidades de cadena lateral que están presentes están protegidas.

35 Para el propósito de esta invención, por "oligopéptidos sin protección" se entiende cualquier oligopéptido que tiene menos de dos residuos de aminoácidos de cuya funcionalidad de cadena lateral se protege.

40 En el contexto de la invención por 'cadena lateral de aminoácido' se entiende cualquier cadena lateral de aminoácido proteinogénico o no proteinogénico.

45 Los aminoácidos proteinogénicos son los aminoácidos que están codificados por el código genético. Los aminoácidos proteinogénicos incluyen: alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), serina (Ser), treonina (Thr), metionina (Met), cisteína (Cys), asparagina (Asn), glutamina (Gln), tirosina (Tyr), triptófano (Trp), glicina (Gly), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), histidina (His), lisina (Lys), arginina (Arg), prolina (Pro) y fenilalanina (Phe).

50 Los aminoácidos no proteinogénicos pueden particularmente seleccionarse entre D-aminoácidos, fenilglicina, DOPA (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina), beta-aminoácidos, 4-fluoro-fenilalanina, o aminoácidos C^α-alquilados.

55 Para el propósito de esta invención, por condensación se entiende la formación de nuevo enlace peptídico entre dos oligopéptidos.

En el marco de esta invención, por residuo de aminoácido o residuo peptídico se entiende un aminoácido o un péptido, sin el grupo amino N-terminal de ese aminoácido o péptido.

60 El término 'protección C-terminal' se usa en la presente para indicar que una función carboxílica C-terminal se proporciona con un grupo protector, generalmente prácticamente proteger el grupo carboxilo de ser acoplado a un grupo amina de otra molécula. El grupo protector C-terminal puede ser un éster C-terminal por medio del cual el grupo carboxilo C-terminal al menos prácticamente se protege de ser acoplado a una amina bajo las condiciones de síntesis de péptidos usadas. Un grupo t-alquilo es un grupo protector usado comúnmente. El grupo protector C-terminal puede además ser una carboxiamida C-terminal. Una carboxi amida primaria es un grupo protector usado comúnmente. El grupo protector C-terminal puede además ser una hidrazida, una carbamoil-hidrazida o un tioéster. La protección C-

terminal puede ser temporal o permanente, el último que significa que esta porción protectora es parte del producto final deseado.

5 El término 'protección N-terminal' se usa en la presente para indicar que un grupo amina N-terminal se proporciona con un grupo protector, generalmente al menos prácticamente que protege el grupo amina N-terminal de participar en el acoplamiento de un grupo carboxilo C-terminal con el grupo amina N-terminal.

10 La porción de éster $-C(=O)O-CX_2-C(=O)N-R_1R_2$ en el éster C-terminal del oligopéptido protegido i) usado en la condensación enzimática de oligopéptidos protegidos es un éster activado. Un éster activado es un éster que proporciona un grupo carboxi éster que puede tomar parte en la reacción de acoplamiento.

15 En la presente descripción, cada X independientemente representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo o un grupo arilo. Particularmente se han logrado buenos resultados en un método de la invención en donde cada X es un hidrógeno ($-O-CH_2-C(=O)N-$, referido como Cam-éster).

20 En dicha porción de éster, R_1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo o un grupo arilo y R_2 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo o un grupo arilo o un aminoácido o un residuo de péptido con una funcionalidad C-terminal de carboxiamida o ácido carboxílico, opcionalmente protegido en la funcionalidad de cadena lateral del residuo de aminoácido o en uno o más de las funcionalidades de cadena lateral del residuo de péptido.

25 En este texto, dondequiera que se use la palabra "grupo alquilo" o "grupo arilo", aplican las siguientes definiciones: cada grupo alquilo puede independientemente representar un grupo alquilo C1-C7 (sustituido o no sustituido), preferentemente un grupo alquilo lineal C1-C6 (sustituido o no sustituido), con mayor preferencia un grupo alquilo lineal C1-C3 (sustituido o no sustituido), y con la máxima preferencia un grupo metilo.

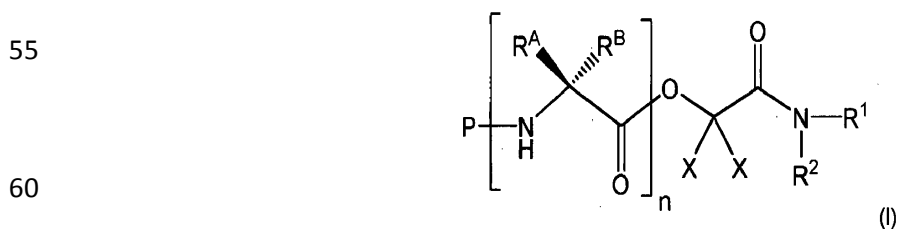
30 Cada grupo arilo puede independientemente representar un grupo arilo C4-C13 (sustituido o no sustituido), preferentemente un grupo arilo C4-C6 (sustituido o no sustituido), con mayor preferencia un grupo arilo C6 (sustituido o no sustituido), y con la máxima preferencia un grupo fenilo. El grupo arilo puede opcionalmente comprender uno o más heteroátomos en un anillo de este. Un heteroátomo se puede particularmente seleccionar del grupo de S, O y N. Los sustituyentes en el grupo arilo o alquilo puede ser cualquier átomo o grupo de átomos que no impida que tenga lugar la reacción de acoplamiento entre el éster de oligopéptido i) y el nucleófilo de oligopéptido ii). Una persona experto en la técnica puede fácilmente probar cuáles sustituyentes son útiles en el método de acuerdo con la invención y cuáles no.

35 Se han logrado buenos resultados particularmente en un método de la invención en donde ambos R_1 y R_2 representan un átomo de hidrógeno o en donde R_1 representa un átomo de hidrógeno y R_2 representa un residuo de aminoácido o péptido con una funcionalidad C-terminal de carboxiamida o ácido carboxílico, opcionalmente protegido en la funcionalidad de cadena lateral del residuo de aminoácido o en una o más de funcionalidades de cadena lateral del residuo de péptido.

40 En otra modalidad, el grupo éster C-terminal activado del éster de oligopéptido protegido se puede introducir en la fase sólida en altos rendimientos y alta pureza sin racemización. Una ventaja adicional del uso de ésteres en donde R_1 representa un átomo de hidrógeno y R_2 representa un residuo de aminoácido o péptido con una funcionalidad C-terminal de ácido carboxílico, opcionalmente protegido en la funcionalidad de cadena lateral del residuo de aminoácido o en una o más de las funcionalidades de cadena lateral del residuo de péptido, que su grupo éster C-terminal activado se puede introducir en la barata e industrialmente disponible resina 2-clorotritilo.

45 El aminoácido C-terminal del éster de oligopéptido protegido i) puede en principio ser cualquier aminoácido, proteínogénico o no proteínogénico y el éster de oligopéptido puede consistir en aminoácidos proteínogénicos o no proteínogénicos.

50 Particularmente el (éster activado N-terminal opcionalmente protegido) i) se puede representar por un compuesto de fórmula I.



En la presente descripción P significa un hidrógeno o grupo protector N-terminal. Los grupos protectores N-terminal adecuados son los grupos los grupos N-protectores que se pueden usar para la síntesis de (oligo)péptidos. Tales grupos se conoce por la persona experta en la técnica. Ejemplos de grupos N-protectores adecuados incluyen grupos protectores de tipo acilo o carbamato, por ejemplo 'Cbz' (benciloxicarbonilo), 'Boc' (ter-butiloxicarbonilo), 'For' (formilo), 'Fmoc' (9-fluorenilmetoxicarbonilo), 'PhAc' (fenacetilo) y 'Ac' (acetilo). Los grupos For, PhAc y Ac se pueden introducir y escindir enzimáticamente mediante el uso de las enzimas Péptido Deformilasa, PenG acilasa o Acilasa, respectivamente. Los métodos de escisión química se conocen generalmente en la técnica.

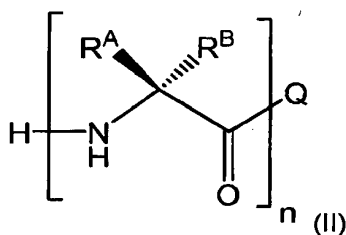
En la fórmula I, n representa un entero de al menos 4. n puede ser en particular al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 ó al menos 10. n puede ser en particular 100 ó menos, 75 ó menos, 50 ó menos, 25 ó menos, 20 ó menos 15 ó menos, por ejemplo, 10 ó menos.

En la fórmula I, cada R^A y cada R^B independientemente representan un átomo de hidrógeno o una porción orgánica, preferentemente una cadena lateral de aminoácido. Así, no se requiere que R^A sea lo mismo en todas las unidades de n aminoácidos. Similarmente, no se requiere que R^B sea lo mismo en todas las unidades de n aminoácidos. Al menos dos residuos de aminoácidos en el éster de oligopéptido de acuerdo con la fórmula I cada uno comprende una cadena lateral con un grupo protector, es decir para cada uno de esos residuos de aminoácidos R^A o R^B no es H y cada uno tiene un grupo funcional protegido, por ejemplo unas funcionalidades protegidas de hidroxilo, ácido carboxílico, amina primaria o secundaria (que incluyen por ejemplo indol y guanidino), tiol o amida primaria es decir tienen una funcionalidad de cadena lateral protegida. Preferentemente, al menos 50% por ciento de los grupos funcionales presentes en R^A y R^B tomados juntos deben estar protegidos con grupos protectores conocidos en la técnica. Muchos diferentes grupos protectores se conocen, y se pueden usar en el método de acuerdo con la invención. Si se usa la síntesis de péptidos en fase sólida basado en Fmoc, los grupos protectores de cadena lateral se pueden por ejemplo seleccionar de grupos t-Bu (ter-butilo), Boc, Trt (trilito), Mtt (4-metiltrilito), Acn (acetamidometilo), Dnp (2,4-dinitrofenilo), Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo) o Pbf (2,2,4,6,7-pentametilhidrobenzofuran-5-sulfonilo). Si se usa la síntesis de péptidos en fase sólida basado en Boc, los grupos protectores de cadena lateral se pueden por ejemplo seleccionar de grupos Bzl (bencilo), Bz (benzoilo), 2Cl-Z (2-clorobenciloxicarbonilo), cHex (ciclohexilo), Tos (tosilo), Xan (xantenilo), For o Mbzl (4-metoxibencilo) y 3-benciloximetilo.

En una modalidad preferida, todas las funcionalidades de cadena lateral del éster de oligopéptido i) están protegidas excepto para la funcionalidad de cadena lateral del residuo de aminoácido C-terminal del donante de acilo del oligopéptido, es decir el éster C-terminal activado. La ventaja de esta modalidad es que se pueden lograr rendimientos superiores y/o tiempos de reacción más cortos que en modalidades en donde se protege la funcionalidad de cadena lateral del residuo de aminoácido C-terminal del donante de acilo del oligopéptido i).

El (opcionalmente C-terminal protegido) nucleófilo de oligopéptido protegido ii) que se acopla con el éster activado i) puede ser en principio cualquier péptido basado en aminoácidos proteinogénicos o no proteinogénicos.

Particularmente, el (opcionalmente C-terminal protegido) nucleófilo de oligopéptido protegido ii) se puede representar por un compuesto de fórmula II:



En la presente, n, R^A y R^B son como se definen anteriormente. Al menos dos residuos de aminoácidos en el nucleófilo de oligopéptido de acuerdo con la fórmula II cada uno comprende una cadena lateral con un grupo protector, es decir para cada uno de los residuos de aminoácidos R^A o R^B no es H y cada uno tiene un grupo funcional protegido, por ejemplo unas funcionalidades protegidas de hidroxilo, ácido carboxílico, amina primaria o secundaria (que incluyen por ejemplo indol y guanidino), tiol o amida primaria es decir tienen una funcionalidad de cadena lateral protegida. Preferentemente, al menos 50% por ciento de los grupos funcionales presentes en R^A y R^B tomados juntos deben ser protegidos con grupo protectores conocidos en la técnica.

En la presente Q representa una porción OR, un grupo amina, un grupo hidrazina, un grupo carbamoil-hidrazina o una porción SR.

En caso de Q representa una porción OR, R puede representar un grupo protector C-terminal, un átomo de hidrógeno o un catión, por ejemplo un catión monovalente, tal como un ion de amonio tri o tetrasustituido o un catión metálico alcalino. En caso de R es un grupo protector C-terminal este puede particularmente ser un grupo alquilo (opcionalmente sustituido) o un grupo arilo (opcionalmente sustituido). En caso de R es un grupo protector C-terminal, R es preferentemente un grupo t-alquilo, aunque en principio este además puede ser cualquier otro grupo protector como se conoce por un hombre experto en la técnica. El t-alquilo puede ser en principio cualquier grupo alquilo terciario protector. Preferentemente el t-alquilo se selecciona del grupo de t-butil (2-metil-2-propilo), t-pentilo, (2-metil-2-butilo) y t-hexil (2,3-dimetil-2-butilo).

En caso Q representa un grupo amina, el grupo amina se puede representar por la fórmula NR_3R_4 , en que R_3 y R_4 puede cada uno individualmente representar un átomo de hidrógeno, cualquier alquilo (sustituido o no sustituido) o cualquier grupo arilo (sustituido o no sustituido). Particularmente, uno fuera de R_3 y R_4 puede ser un átomo de hidrógeno y el otro un grupo alquilo (sustituido o no sustituido). Se han obtenido particularmente buenos resultados con R_3 y R_4 que son ambos un átomo de hidrógeno.

En caso de Q representa un grupo hidrazina, el grupo hidrazina se puede representar por la fórmula $NR_5-NR_6R_7$, en que R_5 , R_6 y R_7 puede cada uno individualmente representar un átomo de hidrógeno, cualquier alquilo (sustituido o no sustituido) o cualquier grupo arilo (sustituido o no sustituido). Preferentemente, R_5 , R_6 y R_7 son todos un átomo de hidrógeno.

En caso de Q representa un grupo carbamoil-hidrazina, el grupo carbamoil-hidrazina se puede representar por la fórmula $NR_8-NR_9C(O)NR_{10}R_{11}$, en que R_8 , R_9 , R_{10} y R_{11} puede cada uno individualmente representar un átomo de hidrógeno, cualquier alquilo (sustituido o no sustituido) o cualquier grupo arilo (sustituido o no sustituido). Preferentemente, R_8 , R_9 , R_{10} y R_{11} son todos un átomo de hidrógeno.

En caso de Q representa una porción SR, R puede representar un grupo protector C-terminal, un átomo de hidrógeno o un catión, por ejemplo un catión monovalente, tal como un ión de amonio tri o tetrasustituido o un catión metálico alcalino. En caso de R es un grupo protector C-terminal este puede particularmente ser un grupo alquilo (opcionalmente sustituido) o un grupo arilo (opcionalmente sustituido). En caso de R es un grupo protector C-terminal, R es preferentemente un grupo t-alquilo, aunque en principio este además puede ser cualquier otro un grupo protector como se conoce por un hombre experto en la técnica. El t-alquilo puede en principio ser cualquier grupo alquilo terciario protector. Preferentemente el t-alquilo es seleccionado del grupo de t-butilo (2-metilo-2-propilo), t-pentilo, (2-metilo-2-butilo) y t-hexilo (2,3-dimetilo-2-butilo).

En el método de la invención el acoplamiento del éster de oligopéptido protegido con el nucleófilo de oligopéptido protegido, se cataliza por la subtilisina (E.C. 3.4.21.62). En principio cualquier subtilisina capaz de catalizar la reacción de acoplamiento se puede usar. Cuando se refiere a una subtilisina de una fuente particular, las subtilisinas recombinantes que se originan de un primer organismo, pero realmente se producen en un segundo organismo (genéticamente modificado), se entiende específicamente que se incluyen como enzimas de ese primer organismo.

Preferentemente, la subtilisina usada en el método de la invención es subtilisina A.

En la técnica se conocen varias subtilisinas, ver por ejemplo US 5,316,935 y las referencias citadas en la misma. Tales subtilisinas se pueden usar en el método de acuerdo con la invención.

El uso de subtilisina A en un proceso de conformidad con la invención en donde un éster de péptido i) se usa que contiene un residuo prolina en la posición C-terminal, usualmente resulta en reacciones de acoplamiento muy lentas. Por lo tanto, en una modalidad preferida, el método de acuerdo con invención se lleva a cabo con la condición de que el residuo de aminoácido C-terminal en el éster de oligopéptido i) no es un residuo de prolina si la reacción se lleva cabo en presencia de la subtilisina A silvestre. Además para otras subtilisinas, es preferido usar un éster de oligopéptido i) en donde el residuo de aminoácido C-terminal no es un residuo de prolina. Sin embargo, se espera que con mutantes de subtilisina A se pueda lograr una velocidad de acoplamiento aceptable.

Los ejemplos de organismos de los cuales se puede derivar una subtilisina usa en el método de la invención incluyen especies de Trichoderma, tal como de Trichoderma reesei; especies de Rhizopus, tal como de Rhizopus oryzae; especies de Bacillus, tales como de Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus clausii, Bacillus lentus, Bacillus alkalophilus, Bacillus halodurans; especies de Aspergillus, tales como de Aspergillus oryzae o Aspergillus niger; especies de Streptomyces, tales como de Streptomyces caespitosus o Streptomyces griseus; especies de Candida; fungi; Humicola species; especies de Rhizoctonia; Cytophagia; especies de Mucor; y tejido animal, particularmente del páncreas, tales como de páncreas porcino, páncreas bovino o páncreas de oveja.

Resultará evidente para la persona con experiencia ordinaria en la técnica que también se puede hacer uso de los

mutantes de subtilisinas de origen natural (silvestre) en un método de acuerdo con la invención. Los mutantes de enzimas silvestres se pueden por ejemplo hacer por modificación del ADN que codifica las enzimas silvestres mediante el uso de técnicas de mutagénesis conocidas para un experto en la técnica (mutagénesis aleatoria, mutagénesis sitio dirigida, evolución dirigida, barajado de genes, etc.) de manera que el ADN codifica una enzima que difiere por al menos un aminoácido de la enzima silvestre o en que este codifica una enzima que es más corta comparada con la silvestre y al efectuar la expresión del así ADN modificado en una célula (hospedera) adecuada. Los mutantes de la enzima pueden tener propiedades mejoradas, por ejemplo con respecto a uno o más de los siguientes aspectos: alcance del sustrato, actividad, estabilidad, resistencia a disolvente orgánico, perfil de temperatura, relación síntesis/hidrólisis y perfil de reacciones secundarios.

En un método preferido la subtilisina A se usa para catalizar la reacción de acoplamiento. La subtilisina A es una subtilisina disponible comercialmente de Novozymes y se ha encontrado particularmente ventajosa con respecto a condensar las parejas de acoplamiento protegidas para dar el producto de péptido deseado con un buen rendimiento en un tiempo relativamente corto.

La Alcalase® es una fuente adecuada para la subtilisina A. Este producto está disponible de Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). La Alcalase® es una mezcla de enzima proteolítica barata y disponible industrialmente producida por *Bacillus licheniformis* (que contiene subtilisina A como un componente de enzima principal).

Las enzimas comercialmente disponibles, tal como Alcalase®, se pueden proporcionar por el proveedor como un líquido, particularmente un líquido acuoso. En tal caso, la enzima es preferentemente primero aislada del líquido no deseado, por ejemplo exceso de agua o alcoholes que causan una reacción secundaria no deseada. Esto se puede lograr adecuadamente por precipitación, usualmente seguido de separación del sólido del líquido, y/o secado. La precipitación se puede lograr mediante el uso de un alcohol, tal como t-butanol. En caso que otro alcohol se use, se debe tener cuidado que tal alcohol no interfiera desfavorablemente con la reacción de acoplamiento.

En una modalidad preferida, la enzima se usa en una forma inmovilizada. Al menos en algunas modalidades esto puede resultar en un rendimiento incrementado del oligopéptido sintetizado después de un tiempo relativamente corto de reacción. Particularmente se han obtenido buenos resultados con agregados reticulados de enzima Alcalase (Alcalase-CLEAs) o con Alcalase inmovilizada en partículas sólidas tales como Alcalase-Imibond, Alcalase-Epobond, Alcalase-immozyme o Alcalase-Decalite. La inmovilización de la enzima además puede permitir fácil recuperación de la enzima después de la reacción de acoplamiento, de manera que se puede reciclar y usar repetidamente en reacciones de acoplamiento consecutivas.

Es posible llevar a cabo la reacción de acoplamiento enzimática en un disolvente orgánico inerte. Algunos ejemplos de disolventes adecuados son por ejemplo N,N-dimetilformamida (DMF), N-metilpirrolidiona (NMP), N,N-dimetilacetamida (DMA), dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo, un hidrocarburo tal como tolueno, un hidrocarburo halogenado, tal como diclorometano, 1,2-dicloroetano o cloroformo, un éter, tal como metil-t-butil éter (MTBE), tetrahidrofurano (THF), 2-metiltetrahidrofurano (Me-THF) o 1,2-dimetoxietano, o un alcohol (halogenado), tal como 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) o una mezcla de estos disolventes orgánicos. Preferentemente, la reacción de acoplamiento enzimática se puede llevar a cabo en un disolvente orgánico o mezcla de disolventes orgánicos que comprende MTBE, THF, Me-THF, 1,2-dimetoxietano, diclorometano, 1,2-dicloroetano, TFE, DMF, NMP, DMA o DMSO. Con la máxima preferencia, la reacción de acoplamiento enzimática se puede llevar a cabo en un disolvente orgánico o mezcla de disolventes orgánicos que comprende MTBE, una mezcla de MTBE con DMF o NMP o DMA o DMSO, diclorometano o una mixture de diclorometano con DMF o NMP o DMA o DMSO.

La condensación enzimática del fragmento se lleva a cabo típicamente bajo condiciones sustancialmente no acuosas. Como un experto entenderá, una pequeña cantidad de agua puede ser deseada, en dependencia de la enzima, para facilitar que la enzima ejecute correctamente su actividad catalítica.

Por sustancialmente no acuosas se entiende que el medio de reacción es libre de agua o contiene una cantidad mínima de agua, *es decir* una cantidad de 0.1 % vol o menos de agua, basado en el volumen total de líquidos en el medio de reacción. El medio de reacción se puede dispersar en una segunda fase líquida u otra fase líquida se puede dispersar en el medio de reacción. En caso de un sistema dual o multifase, el contenido de agua especificado se basa en el volumen de líquidos en la fase en donde la reacción de acoplamiento tiene lugar, o cuando existe un sistema multifase, en donde la reacción de acoplamiento al menos predominantemente tiene lugar un límite superior deseado para la concentración de agua depende de las concentraciones de éster de oligopéptido i) y nucleófilo de oligopéptido ii), en la enzima específica, el disolvente usado, la naturaleza del péptido que sea sintetizado (*por ejemplo*, el tamaño del péptido y la secuencia de los aminoácidos), la conversión deseada final y la velocidad de reacción deseada.

En el método de acuerdo con la invención, la concentración de agua es 0.1 % vol o menos, con mayor preferencia 0.05 % vol o menos, aún con mayor preferencia 0.01 % vol o menos.

5 No se presenta ningún límite inferior para la concentración de agua porque la cantidad mínima de agua necesaria para que esté presente es por debajo de los límites de detección de los métodos analíticos bien conocidos. Esto además se mantiene válido para el límite de detección de la titulación Karl-Fischer que se usa para determinar la concentración de agua por el método de acuerdo con la invención. En una modalidad ventajosa, el agua que se libera por la enzima, se puede eliminar continuamente o intermitentemente. En principio, la eliminación de agua se puede cumplir en una manera conocida en la técnica. Muy adecuado para la eliminación de agua es la evaporación, tal como la eliminación azeotrópica mediante el uso de vacío o destilación. Se han logrado buenos resultados particularmente mediante el uso de tamices moleculares. Sin embargo, es importante para retener sustancialmente la actividad deseada de la enzima.

10 La adición de varias cantidades de tamices moleculares para la reacción enzimática de acoplamiento permite la variación de la concentración de agua por debajo de su límite de detección. Una concentración de agua demasiado baja, por ejemplo se obtiene por la adición de una gran cantidad de tamices moleculares, puede en algunos casos conducir a la desactivación gradual (parcial) de la enzima durante la reacción de acoplamiento. El experto en la técnica puede fácilmente determinar la concentración óptima de agua para ciertas reacciones de acoplamiento por variación de la cantidad de tamices moleculares. En caso de la desactivación (parcial) de la enzima durante la reacción enzimática de acoplamiento, la enzima desactivada (en parte) puede ser completamente o casi completamente reactivada mediante rehidratación, por ejemplo por agitación de la enzima desactivada (en parte) en una solución acuosa. Esta reactivación puede permitir el uso repetido de la enzima en reacciones de acoplamiento consecutivas. En algunos casos, particularmente con enzimas liofilizadas, la enzima necesita ser hidratada antes del acoplamiento enzimático con el fin de obtener suficiente actividad catalítica. En caso de enzimas no inmovilizadas tal una hidratación se puede ejecutar mediante agitación en solución acuosa seguido por precipitación, por ejemplo con un disolvente orgánico miscible en agua tal como t-butanol. En caso de enzimas inmovilizadas tal una hidratación se puede ejecutar mediante lavado con una solución acuosa, seguido por lavado con uno o más disolventes orgánicos, por ejemplo con un disolvente orgánico miscible en agua tal como t-butanol y un disolvente inmiscible en agua tal como MTBE.

15 Particularmente, el método de la invención permite el acoplamiento de un éster de oligopéptido i) a un nucleófilo de oligopéptido ii), sin necesitar un gran exceso de una de las parejas del acoplamiento basado en la otra pareja de acoplamiento con el fin de obtener el péptido sintetizado en un rendimiento aceptable dentro de un tiempo relativamente corto. La relación molar del éster de oligopéptido i) con el nucleófilo de oligopéptido ii) usualmente se elige en el intervalo de 2:1 a 1:4, particularmente en el intervalo de 1:1 a 1:3, preferentemente en el intervalo de 1:1 a 1:2, con mayor preferencia 1:1 a 1:1.5, aún con mayor preferencia 1:1 a 1:1.2.

20 En una modalidad preferida, la reacción de acoplamiento se lleva a cabo en ausencia de una sal. Tal una sal se forma usualmente por la adición de una base para neutralizar la sal del nucleófilo de oligopéptido protegido (opcionalmente C-terminal protegido) ii) que se forma después de la escisión ácida del oligopéptido protegido de la fase sólida mediante el uso de por ejemplo 1-2.5 % vol de ácido trifluoacético en diclorometano. La presencia de una sal en el nucleófilo de amina oligopéptido protegido (opcionalmente C-protegido) ii) se puede evitar convenientemente mediante la extracción alcalina acuosa de la capa de diclorometano después de la escisión del oligopéptido protegido de la fase sólida.

25 En principio, el pH usado (en la medida que exista un pH en el medio de reacción escogido) se puede escoger dentro de límites amplios, siempre que se escoja un pH en el cual la enzima muestra suficiente actividad. Un pH de este tipo es conocido usualmente por la enzima a usar y se puede basar en su actividad hidrolítica conocida en una solución acuosa, o se puede determinar rutinariamente, haciendo uso de un sustrato conocido para la enzima bajo condiciones de reacción conocidas. Este se puede escoger particularmente que sea aproximadamente neutral. Si se desea, se pueden usar condiciones ácidas o alcalinas, en dependencia de la enzima. Si se desea, el pH se puede ajustar mediante el uso de un ácido y/o una base o el pH se puede amortiguar con una combinación adecuada de un ácido y una base. Los ácidos y bases adecuados son particularmente aquellos solubles en el medio de reacción, por ejemplo del grupo amoniaco y ácidos solubles en disolventes orgánicos, tal como ácido acético y ácido fórmico.

30 En principio la temperatura usada no es crítica, siempre que se escoja una temperatura en la que la(s) enzima(s) usada(s) muestra(n) suficiente actividad y estabilidad. Una temperatura de este tipo es conocida usualmente para la(s) enzima(s) que se usan o se puede determinar rutinariamente, haciendo uso de un sustrato conocido para la(s) enzima(s) bajo condiciones de reacción conocidas. Generalmente, la temperatura puede ser al menos 0 °C, particularmente al menos 15 °C o al menos 25 °C. Particularmente si se usa una o más enzimas que se originan a partir de un organismo termófilo, la temperatura puede ser preferentemente al menos 35 °C. Una temperatura máxima deseada depende de las enzima(s). Generalmente tal temperatura máxima se conoce en la técnica, por ejemplo, se indica en una ficha de especificaciones técnicas en el caso de las enzimas comercialmente disponibles, o se puede determinar rutinariamente basado en el conocimiento general común. La temperatura es usualmente 70°C o menos, particularmente 60°C o menos o 50°C o menos. Sin embargo, particularmente si se usa una o más enzimas de un organismo termófilo, la temperatura se puede escoger mayor que, por ejemplo, 90°C.

Las condiciones de temperatura óptima se pueden identificar fácilmente para una enzima específica por un experto en la

técnica a través de experimentación de rutina basado en conocimiento general común. Por ejemplo, para la subtilisina, particularmente la subtilisina A (por ejemplo, en Alcalase®), la temperatura puede estar favorablemente en el intervalo de 25-60°C.

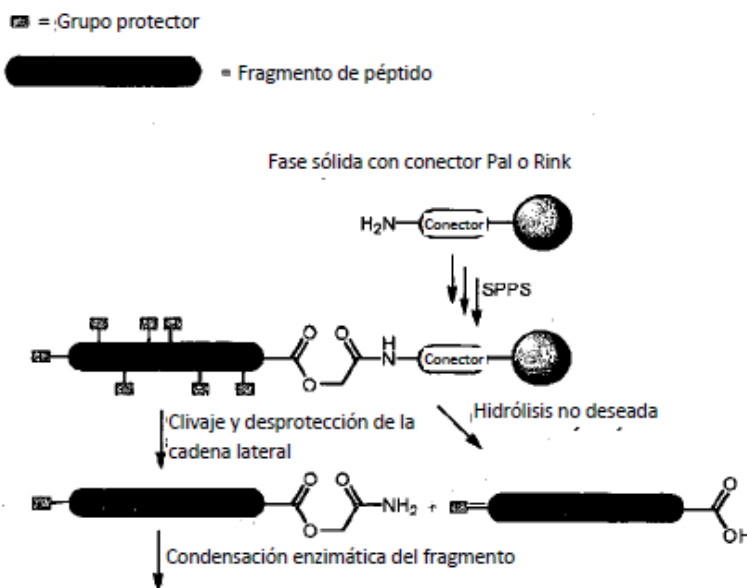
5 El éster de oligopéptido i) y el nucleófilo de oligopéptido ii) que se acoplan en el proceso de conformidad con la invención se sintetizan preferentemente a través de un enfoque de síntesis en fase sólida.

10 Los ésteres de carbamoilmetilo C-terminal (Cam) y Cam-Xxx-NH₂ de péptidos (en donde Xxx representa cualquier aminoácido proteínogénico o no proteínogénico de cadena lateral protegida o no protegida) ya se aplicaron en la síntesis de péptidos catalizada por proteasa (ver, por ejemplo, Miyazawa y otros Protein & Peptide Letters, 2008, 15, 1050) y se condensan enzimáticamente usualmente más rápido que los ésteres de alquilo pero además son mucho más propensos a la hidrólisis.

15 Las técnicas de síntesis en fase sólida se han descrito para la síntesis de ésteres Cam C-terminal de oligopéptidos de cadena lateral completamente desprotegida (ver, por ejemplo, Björup y otros Bioorg. Med. Chem., 1998, 6, 891). Estos ésteres Cam C-terminal de péptidos se sintetizan en la fase sólida que contiene un conector Rink o Pal (ver representación esquemática 1, H. Rink, Tetrahedron letters, 1987, 28, 3787; F. Albericio y otros J. Org. Chem., 1990, 55, 3730) y se escinden con desprotección simultánea de la cadena lateral mediante el uso de altas concentraciones de TFA (por ejemplo, TFA/H₂O, 95/5, v/v). Desafortunadamente esta escisión fuerte y las condiciones de desprotección de la cadena lateral además conducen a la hidrólisis parcial no deseada del éster Cam.

Representación esquemática 1

Síntesis en fase sólida de ésteres Cam C-terminal de péptidos de cadena lateral sin protección




50 Los inventores encontraron ahora, sin embargo, que es posible sintetizar ésteres Cam y Cam-Xxx-NH₂C-terminal de péptidos de cadena lateral protegida en la fase sólida. Un conector de amida de Sieber o Ramage (verrepresentación esquemática 2, Sieber, Tetrahedron letters, 1987, 28, 2107; Ramage y otros Tetrahedron letters, 1993, 34, 6599) se usa y los péptidos se escinden bajo condiciones ácidas muy suaves (por ejemplo, 2.5 % vol TFA en CH₂Cl₂) dejando los grupos protectores de cadena lateral sin afectación. Estos tipos de conectores hasta ahora nunca se han usado para la síntesis de ésteres Cam C-terminal de péptidos.

60

Representación esquemática 2

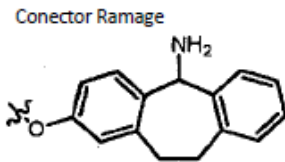
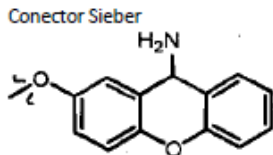
Síntesis en fase sólida de ésteres Cam C-terminal de péptidos de cadena lateral protegida

5

 = Grupo Protector

 = Fragmento de péptido

10



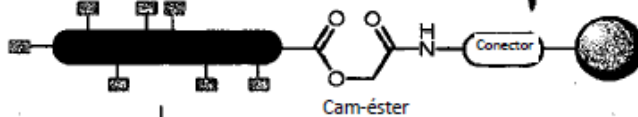
15

Fase sólida con conector Sieber o Ramage



SPPS

20



25

Clivaje suave

30



Condensación enzimática de fragmento de

35

Favorablemente, la escisión de ésteres Cam C-terminal de péptidos de cadena lateral protegida a partir de la fase sólida no se acompaña de ninguna hidrólisis no deseada del éster Cam. Además de la síntesis de éster Cam sobre una resina con un conector de Sieber o Ramage, los inventores han encontrado ahora que es posible sintetizar ésteres Cam-Xxx-OH C-terminal de péptidos de cadena lateral protegida (en donde Xxx representa cualquier aminoácido de cadena lateral protegida o no protegida proteínogénico o no proteínogénico) sobre la fase sólida que contiene un conector 2-clorotritilcloruro o SASRIN (ver representación esquemática 3, Barlos, Tetrahedron Letters, 1973, 95, 1328; Mergler y otros Tetrahedron Letters, 1988, 68, 239). Sorprendentemente, estos ésteres Cam-Xxx-OH se desempeñan igualmente bien en las reacciones de condensación enzimática de fragmentos como los ésteres Cam-Xxx-NH₂.

40

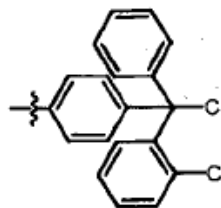
45

Representación esquemática 3

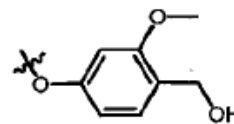
Conectores 2-clorotritilcloruro y SASRIN

50

Conector 2-clorotritilcloruro



Conector SASRIN



55

60

En la literatura se comprobó ventajoso combinar técnicas de síntesis química de péptidos en fase sólida con condensaciones enzimáticas de fragmentos. Sin embargo, esos ejemplos se basaron en la síntesis en fase sólida de péptidos de cadena lateral completamente desprotegidos y la condensación enzimática subsiguiente de esos fragmentos de péptidos en solución acuosa o parcialmente acuosa (ver por ejemplo

Čerovský y otros J Pept Res., 2000, 55, 325).

5 Por el contrario, en un método preferido de la invención los fragmentos de péptidos de cadena lateral protegida se sintetizan por medio de técnicas en fase sólida y posteriormente se condensan enzimáticamente en un disolvente orgánico anhidro, lo que nunca se ha divulgado antes.

10 Así, la invención además se relaciona con un proceso para la síntesis de un éster de oligopéptido i) que comprende una porción de éster representado por la fórmula $C(=O)-O-CX_2-C(=O)N-R_1R_2$ (es decir un éster Cam) como se describe anteriormente.

La invención además se relaciona con un proceso para la síntesis de un péptido, al

15 a) preparar un éster de oligopéptido i) como se definió antes por síntesis en fase sólida mediante el uso de un conector entre la fase sólida y el oligopéptido que es adecuado para permitir la escisión del éster de oligopéptido de la fase sólida con retención de cualquier grupo protector de cadena lateral presentes en el oligopéptido, bajo condiciones ácidas suaves, y en donde el éster de oligopéptido se escinde de la fase sólida, b) preparar un nucleófilo de oligopéptido ii) como se definió antes, por síntesis en fase sólida mediante el uso de un conector entre la fase sólida y el oligopéptido que es adecuado para permitir la escisión del nucleófilo de oligopéptido de la fase sólida con retención de cualquier grupo protector de cadena lateral presentes en el oligopéptido, bajo condiciones ácidas suaves, y en donde el nucleófilo de oligopéptido se escinde de la fase sólida, y c) posteriormente acoplar el éster de oligopéptido i) con el nucleófilo de oligopéptido ii) cuyo acoplamiento se lleva a cabo en un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos que comprende 0.1 % vol o menos de agua con relación a la cantidad total de líquidos en los cuales tiene lugar predominantemente la reacción de acoplamiento en presencia de una subtilisina y en donde se elimina el agua que se libera por la enzima durante la reacción de acoplamiento.

20

25

30 Sorprendentemente, la estrategia de condensación enzimática del fragmento es compatible con los más comúnmente aplicados grupo protectores de cadena lateral en la síntesis de péptidos en fase sólida basada en Fmoc. Incluso péptidos que contienen grupos protectores de cadena lateral grandes "voluminosos" tal como Trt, Pbf o Pmc se reconocen por la enzima y se condensan en rendimiento bueno a excelente. Esos tipos de grupos protectores nunca hasta ahora se han aplicado en la síntesis enzimática de péptidos. Los más usados comúnmente grupos de protección de cadena lateral para la síntesis de péptidos en fase sólida basada en Fmoc/Bu son:

35

^tBu por Asp, Glu, Thr, Ser y Tyr, Boc por Lys y Trp, Trt por His, Asn, Gln y Cys y Pmc o Pbf por Arg.

Los grupos de protección de cadena lateral más comúnmente usados para la síntesis de péptidos en fase sólida basada en Boc/Bzl son:

40

Tos o Mts por Arg, Bzl o Cy por Asp, Glu, Thr y Ser, Acn por Cys, Bom o Dnp por His 2-Cl-Cbz por Lys, For por Trp y 2-Br-Cbz por Tyr.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos.

45

Experimental

A menos que se indique de cualquier otra forma, las sustancias químicas se obtuvieron de fuentes comerciales y se usaron sin purificación adicional. La resina Sieber (o conector Xantenilo) y la resina 2-clorotritil se compraron de GL Biochen (China). Savinase, Esperase y Everlase se compraron a Novozymes. Proteasa de Bacillus sp. (tres variantes diferentes) y proteasa de Bacillus licheniformis se compraron a Sigma. Alcalase-immozyme se compró a ChiralVision. Los espectros ¹H y ¹³C NMR se registraron en un espectrómetro Bruker Avance 300 MHz NMR y los cambios químicos se proporcionan en ppm (δ) con relación a TMS (0.00 ppm), DMSO-d₆ (2.50 ppm para ¹H o 39.9 ppm para ¹³C) o CDCl₃ (77.0 ppm para ¹³C). La cromatografía de capa fina (TLC) se realizó sobre 60 placas F254 de gel de sílice pre-recubiertas (Merck); los puntos se visualizaron mediante el uso de luz UV o ninhidrina. Los tamices moleculares de 3Å (malla 8 a 12, Acros) se activaron bajo presión reducida a 200°C. El ter-butanol (tBuOH) se almacenó en esos tamices moleculares. tBuOH se pre-calentó hasta un líquido (45°C) antes de usar. La cromatografía en columna se llevó a cabo mediante el uso de gel de sílice, grado Merck 9385 60 Å. La HPLC analítica se realizó en un cromatógrafo líquido HP1090, mediante el uso de una columna de fase reversa (Inertsil ODS-3, C18, 5µm, 150 × 4.6 mm) a 40°C. La detección UV se realizó a 220 nm mediante el uso de un espectrómetro lineal UV-VIS 204. El programa de gradiente fue: rampa de gradiente lineal de 0-25 min desde 5% a 98% de eluyente B y desde 25.1-30 min con 5% de eluyente B (eluyente A: 0.5 µL ácido metano sulfónico (MSA) en H₂O, eluyente B 0.5 µL MSA en acetonitrilo). El flujo fue 1 mL/min desde 0-25.1 min y 2 mL/min desde 25.2-29.8 min, después de regreso a 1 mL/min hasta terminar a 30 min. Los

50

55

60

5 volúmenes de inyección fueron 20 µL. El análisis de grandes péptidos hidrofóbicos protegidos (>10 aminoácidos) se realizó mediante el uso del siguiente programa de gradiente : rampa de gradiente lineal de 0-60 min desde 0% a 100% de eluyente B y de 60-65 min con 100% de eluyente B (eluyente A: 1 mUL TFA en agua/acetonitrilo (80/20 v/v%), eluyente B 1 mUL TFA en acetonitrilo/2-propanol/agua (50/45/5, v/v/v%)). El análisis LC-MS se realizó mediante el uso de los mismos tampones y programas de gradiente como para HPLC analítica. Los cromatogramas se registraron en un LC-MS de trampa de iones Deca XP (ThermoFisher Scientific) mediante el uso de un electro spray de ión positivo (ESI) en modo de exploración completa: intervalo de 300-2000 amu. Los rendimientos de producto de las reacciones de condensación se determinaron al comparar las áreas integradas del pico del producto con los de los materiales de partida y asumir que el coeficiente de extinción del producto es igual al del donante de acilo. La HPLC preparativa se realizó en un sistema Varian PrepStar mediante el uso de una columna en fase estacionaria (Pursuit XRs, C18, 10 µm de tamaño de partícula, 500 × 41.4 mm). Alcalase-CLEA-OM se compró de CLEA-Technologies y contenía 3.5 % en peso de agua; la actividad aparente fue 650 AGE Unidades por gramo (con 1 AGE unidad que cataliza la formación de 1 µmol de N-acetil-glicina de N-acetil-glicina etil éster a 40°C y pH 7.5). Esta Alcalase-CLEA-OM se trató como sigue antes de usar: 1 g de Alcalase-CLEA-OM se suspendió en 20 mL ^tBuOH y se trituró con una espátula. Después de la filtración, este procedimiento se repitió con 20 mL de MTBE. Finalmente la enzima se tamizó (d = 0.250 mm) para eliminar las partículas de enzima grandes. La alcalasa líquida se trató como sigue antes de usar: 10 mL de Alcalase (solución líquida marrón, Novozymes tipo 2.5L DX) se diluyó con 20 mL de ^tBuOH seguido de agitación y subsecuente centrifugación de los precipitados (3.500 rpm) y decantación del sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 30 mL de ^tBuOH seguido de agitación, centrifugación y decantación (3.500 rpm). Los sedimentos resultantes se usaron en el método de acuerdo con la invención. Alcalase-imibond y Alcalase-epobond se compraron de SPRIN technologies (Trieste, Italia) y se lavaron con tampón fosfato (10 mUg, 100 mM, pH 7.5, 3 x), ^tBuOH (3 x) y MTBE. El mismo procedimiento de lavado se aplicó para Alcalase-immozyme. Los polvos liofilizados de subutilisina A y proteinasa K (Sigma) se hidrataron como sigue antes de su uso: 1 gramo de polvo liofilizado se disolvió en 10 mL tampón fosfato (100 mM, pH 7.5) seguido por la adición de 20 mL de ^tBuOH seguido por agitación y subsecuente centrifugación de los precipitados (3.500 rpm) y decantación del sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 30 mL de ^tBuOH seguido por agitación, centrifugación y decantación (3.500 rpm). Este proceso se repitió dos veces.

30 Descripción de la titulación de Karl Fischer para ser usada para determinar el porcentaje de agua en la mezcla de reacción

El contenido de agua se midió automáticamente mediante el uso de Metrohm titrino 701 KF con el reactivo de titulación Karl Fischer Hydranal 2 (Sigma). Las mezclas de reacción se filtraron bajo una atmósfera inerte y 1.000 gramo de la muestra líquida se uso para la titulación Karl Fischer. La bureta se enjuagó con Hydranal 2 y los parámetros se fijaron como se indica más abajo:

- tiempo de extracción = 9999 segundos
- criterio de terminación = cambio
- terminación al cambio = 15 (µL/min)
- terminación = 40,0 mL
- velocidad máxima = 1,0mL/min.
- incremento de volumen mínimo= min (µL)
- I(pol.) = 10 µA
- punto final = 75 mV
- velocidad de relleno = 20,0 mL/min.

45 100 mL de disolvente Hydranal (Sigma) se introdujo dentro del recipiente de titulación en seco y se agitó con una barra magnética. El disolvente Hydranal se neutralizó con Hydranal 2 hasta que la velocidad de consumo permaneció constante a través del tiempo. 1.000 g de muestra se introdujo dentro del recipiente de titulación y la muestra se valoró con Hydranal 2. La cantidad de solución de Hydranal 2 consumida se determinó como en la Fig 4.

50 eje X : consumo de valorante
eje Y : titulación escala de tiempo

Para inferir la cantidad de solución estándar volumétrica consumida a partir de la curva consumo/tiempo:

- extender la línea de titulación b a la intersección con el eje X
- medir la distancia perpendicular desde la intersección con el eje X hasta el eje Y como una medida de la cantidad de Hydranal 2 consumida (1 cm sobre el X corresponde a 1 mL de valorante)

60 La cantidad de agua (% de masa) en la muestra se calculó mediante el uso de la siguiente fórmula.

$$(v * T_t) / (10 * a)$$

donde:

$$T_1 = \text{mg de agua equivalente a } 1,00 \text{ mL de Hydranal 2 a } t \text{ } ^\circ\text{C}$$

Síntesis de ésteres con OCam de oligopéptido (éster de oligopéptido i))

Los ésteres OCam de oligopéptido se sintetizaron mediante el uso del siguiente protocolo:

1 gramo de resina Sieber (conector Xantenil, con una carga de 0.5 mmol/gramo) se lavó con diclorometano (10 mL, 2 x 2 min), 1-metil-2-pirrolidona (NMP, 10 mL, 2 x 2 min) y Fmoc-desprotegido mediante el uso de piperidina/NMP (10mL, 1/4, v/v, 2 x 8 min). Después de lavar con NMP (10mL, 2 x 2 min), diclorometano (10mL, 2 x 2 min) y NMP (10mL, 2 x 2 min), ácido yodoacético (4 equiv.) se acopló a la resina mediante el uso de dicitohexilcarbodiimida (DCC) (4 equiv.) en diclorometano (10mL, 45 min). Después de lavar con NMP (10mL, 2 x 2 min), diclorometano (10mL, 2 x 2 min) y THF (10mL, 2 x 2 min), la resina se cargó con un aminoácido protegido con Fmoc (con grupo protector apropiado en la funcionalidad de la cadena lateral) mediante el uso de 4 equiv. de Fmoc-Xxx-OH (en donde Xxx denota un aminoácido) y 10 equiv. de DiPEA en DMF/THF (10mL, 1/4, v/v) a 50°C durante 20h. Después de lavar con DMF (10mL, 2 x 2 min), diclorometano (10mL, 2 x 2 min) y NMP (10mL, 2 x 2 min), protocolos estándar de SPPS (ver Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis por W.C. Chan y P.D. White, Oxford university press, 2004) se siguieron para alargar el péptido. La escisión de la resina se realizó mediante el uso de 2.5 % vol ácido trifluoacético (TFA) en diclorometano (10 mL por gramo de resina) durante 15 min. La resina se lavó con diclorometano y los filtrados combinados se concentraron *al vacío* hasta 1/3 de su volumen original. Posteriormente, se añadió isopropanol/agua (1/3, v/v) y la mezcla se concentró *al vacío* hasta 1/2 de su volumen original. El éster precipitado de oligopéptido-O-Cam se filtró y lavó 2 veces con agua seguido de liofilización a partir de acetonitrilo/agua (3/1, v/v). Los productos se obtuvieron generalmente en un rendimiento >90% con una pureza >95% de acuerdo con el análisis de H PLC.

Producto	Datos NMR
Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-OCam Sec. con núm. de ident.: 1	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.84 (dd, <i>J</i> = 6.3 y 10.8 Hz, 6H), 1.09-2.55 (m, 43H), 2.70-2.77 (m, 1H), 3.44-3.46 (m, 2H), 4.16-4.41 (m, 6H), 4.53-4.57 (m, 1H), 6.76 (s, 1H), 7.08-7.34 (m, 19H), 7.75 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H), 8.06 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 8.24-8.32 (m, 2H), 8.53 (m, 1H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 21.5, 22.3, 22.9, 24.0, 27.1, 27.6, 28.2, 32.2, 37.2, 49.3, 51.1, 51.6, 52.0, 53.2, 61.3, 62.2, 69.1, 82.8, 77.2, 80.0, 126.2, 127.4, 128.4, 144.8, 155.4, 168.4, 169.0, 169.2, 170.5, 170.9, 171.2, 172.6.
Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Xan)-OCam Sec. con núm. de ident.: 2	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.85 (dd, <i>J</i> = 6.6 y 12.6 Hz, 6H), 1.07-2.03 (m, 47H), 2.37-2.88 (m, 4H), 3.46 (d, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H), 4.06 (s, 2H), 4.28-4.57 (m, 5H), 4.60-4.65 (m, 1H), 6.75-7.06 (m, 2H), 7.06-7.36 (m, 10H), 7.72 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.85 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 1H), 7.97 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 8.18 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 8.36 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 2H).
Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-OCam Sec. con núm. de ident.: 3	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.77 (dd, <i>J</i> = 6.3 y 11.4 Hz, 6H), 0.97-2.66 (m, 45H), 2.76-2.82 (m, 2H), 3.38-3.40 (m, 2H), 4.13-4.41 (m, 6H), 4.49-4.56 (m, 1H), 6.65-6.71 (m, 2H), 7.16-7.28 (m, 3H), 7.63 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 7.76 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.89 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 8.09 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 8.27 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 2H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 21.5, 22.2, 22.3, 22.9, 26.5, 27.0, 27.6, 28.2, 29.1, 31.0, 37.2, 49.3, 51.2, 51.6, 52.0, 53.3, 61.3, 62.2, 72.8, 77.2, 180.0, 168.4, 169.1, 169.2, 170.5, 171.0, 171.6, 171.8, 176.2.
Ac-Phe-Ile-Glu(OtBu)-Trp(Boc)-Leu-OCam Sec. con núm. de ident.: 4	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.79-0.89 (m, 12H), 0.98-1.16 (m, 1H), 1.29-1.90 (m, 28H), 2.14-2.22 (m, 2H), 2.66-3.10 (m, 4H), 4.09-4.20 (m, 1H), 4.23-4.39 (m, 4H), 4.45-4.57 (m, 1H), 4.80-4.89 (m, 1H), 7.16-7.35 (m, 9H), 7.50 (s, 1H), 7.67 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.96-8.13 (m, 5H), 8.50 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 15.7, 21.5, 22.8, 23.2, 24.4, 24.7, 28.1, 31.4, 36.8, 37.7, 50.6, 52.0, 52.5, 54.1, 57.2, 62.7, 80.0, 83.8, 115.0, 116.4, 119.7, 122.7, 124.2, 124.6, 126.5, 128.3, 129.5, 130.6, 135.0, 138.4, 149.4, 168.7, 169.5, 171.1, 171.4, 171.7, 171.9, 172.0.

Producto	Datos NMR
Ac-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-OCam Sec. con núm. de ident.: 5	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.85 (dd, <i>J</i> = 6.6 y 13.2 Hz, 6H), 1.15-2.03 (m, 39H), 2.30-2.36 (m, 2H), 2.83-2.90 (m, 2H), 3.49 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz, 2H), 4.17-4.50 (m, 7H), 6.72-6.76 (m, 1H), 7.16-7.39 (m, 18H), 7.69 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.86-7.93 (m, 2H), 8.09 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1 H), 8.28 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 8.56 (m, 1H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 14.9, 22.0, 22.8, 23.4, 27.6, 29.6, 51.4, 51.6, 52.8, 54.0, 61.7, 62.8, 69.6, 73.2, 126.7, 127.8, 128.9, 145.3, 168.7, 169.9, 171.4, 171.6, 171.7, 172.0, 172.8.
Ac-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-OCam Sec. con núm. de ident.: 6	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.89 (dd, <i>J</i> = 7.2 Hz, 6H), 1.22 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 3H), 1.32-1.47 (m, 27H), 1.65-2.13 (m, 14H), 2.19-2.33 (m, 4H), 3.02-3.11 (m, 4H), 4.22-4.52 (m, 7H), 6.45-7.0 (m, 2H), 7.37 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz, 1H), 7.81 (d, <i>J</i> = 18.9 Hz, 1H), 8.03-8.09 (m, 2H), 8.45 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 1H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 17.6, 17.8, 18.8, 18.9, 22.3, 27.2, 27.6, 27.8, 28.1, 30.6, 31.0, 31.2, 42.3, 47.9, 51.3, 51.6, 51.8, 57.1, 62.2, 79.5, 86.1, 116.1, 124.2, 131.3, 137.1, 155.9, 157.3, 168.3, 169.3, 170.4, 171.0, 171.1, 171.2, 171.5, 171.6, 171.7.
Ac-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Leu-OCam Sec. con núm. de ident.: 7	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.84-1.77 (m, 41H), 2.40-3.10 (m, 4H), 3.44-3.65 (m, 2H), 3.95-4.00 (m, 1H), 4.23-4.42 (m, 5H), 4.58-4.72 (m, 2H), 7.19-7.34 (m, 7H), 7.66 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 7.81 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 8.03 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 8.19-8.27 (m, 2H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 18.9, 21.7, 22.7, 23.2, 24.4, 27.5, 28.0, 28.4, 37.4, 38.0, 49.6, 50.8, 53.7, 54.3, 58.0, 62.1, 62.7, 66.9, 73.3, 74.4, 80.6, 126.6, 128.4, 129.5, 138.4, 168.7, 169.3, 169.4, 169.5, 169.7, 170.7, 171.8, 171.9.
Ac-Leu-Asp(OtBu)-Gln(Trt)-Ser(tBu)-Gln-OCam Sec. con núm. de ident.: 8	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.85 (dd, <i>J</i> = 6.6 y 11.1 Hz, 6H), 1.10-2.36 (m, 30H), 2.71-2.80 (m, 1H), 3.46 (d, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H), 4.19-4.59 (m, 7H), 6.78 (s, 1H), 7.09-7.36 (m, 19H), 7.76 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz, 1H), 8.07 (d, <i>J</i> = 6.6 Hz, 1H), 8.25-8.34 (m, 2H), 8.55 (s, 1H).

Síntesis de Fmoc-Ala-O-CH₂-COOH

1 mmol de Fmoc-Ala-OH se disolvió en 100 mL de THF/DMF anhidro (8/2, v/v) seguido de la adición de 2 equivalentes de *ter*-butil 2-yodoacetato y 2.5 equivalentes de DiPEA. Esta mezcla se agitó a 50°C con 150 rpm durante 20h. Después, los volátiles se eliminaron *al vacío* y el residuo se redisolvió en una mezcla de 250 mL EtOAc y 250 mL de NaHCO₃ acuoso saturado. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado acuoso (250 mL, 1 x), HCl acuoso (250 mL, pH 1, 2 x), salmuera (250 mL, 1 x), se secaron sobre Na₂SO₄, se concentraron *al vacío* y los volátiles se coevaporaron con tolueno (50 mL, 2 x) y CHCl₃ (50 mL, 2 x). Posteriormente, 10 mL de TFA/H₂O (95/5, v/v) se añadió y la mezcla se agitó durante 1 h seguido de la adición de 100 mL IPA/H₂O (1/3, v/v). 50 mL de los volátiles se eliminaron *al vacío* y los precipitados se filtraron y lavaron con 50 mL de H₂O (2 x). El éster crudo remanente se purificó mediante HPLC preparativa y se obtuvo en 52% de rendimiento con una pureza >98% de acuerdo con el análisis de HPLC.

Síntesis de Fmoc-Gln(Trt)-O-CH₂-COOH

1 mmol de Fmoc-Gln(Trt)-OH se disolvió en 100 mL THF/DMF anhidro (8/2, v/v) seguido de la adición de 2 equivalentes de bencil-2-yodoacetato y 2.5 equivalentes de DiPEA. Esta mezcla se agitó a 50°C con 150 rpm durante 20h. Después, los volátiles se eliminaron *al vacío* y el residuo se redisolvió en una mezcla de 250 mL de EtOAc y 250 mL de NaHCO₃ saturado acuoso. Las dos fases se separaron y la capa orgánica se lavó con NaHCO₃ saturado acuoso (250 mL, 1 x), HCl acuoso (250 mL, pH 1, 2 x), salmuera (250 mL, 1 x), se secaron sobre Na₂SO₄, se concentraron *al vacío* y los volátiles se coevaporaron con tolueno (50 mL, 2 x) y CHCl₃ (50 mL, 2 x). El residuo se disolvió en 250 mL MeOH/tolueno (1/1, v/v) seguido de hidrogenólisis toda la noche a 25°C con 5 bar H₂ mediante el uso de 1 gramo de Pd/C al 10%. Después de la eliminación de los sólidos por filtración, los volátiles se eliminaron *al vacío*. El éster crudo resultante se purificó mediante HPLC preparativa y se obtuvo en 63% de rendimiento con una pureza de >98% de acuerdo con el análisis de HPLC.

Síntesis de ésteres de oligopéptido-OCam-Xxx-NH₂ (éster de oligopéptido i) con R₂ un residuo de aminoácido con una funcionalidad de carboxiamida C-terminal)

5 1 gramo de resina Sieber (conector Xantenil, con una carga de 0.5 mmol/gramo) se lavó con diclorometano (10mL, 2 x 2 min), NMP 10mL, (2 x 2 min) y Fmoc-desprotegido mediante el uso de piperidina/NMP (10mL, 1/4, v/v, 2 x 8 min). Después de lavar con NMP (10mL, 2 x 2 min), diclorometano (10mL, 2 x 2 min) y NMP (10mL, 2 x 2 min), Fmoc-Xxx-OH (4 equiv.) se acopló a la resina mediante el uso de HBTU (4 equiv.), HOBt (4 equiv.) y DiPEA (8 equiv.) en NMP (10mL, 45 min). Después de lavar con NMP (10mL, 2 x 2 min), diclorometano (10mL, 2 x 2 min) y NMP (10mL, 2 x 2 min), el aminoácido se desprotegió de Fmoc mediante el uso de piperidina/NMP (10mL, 1/4, v/v, 2 x 8 min) la resina se lavó con
 10 NMP (10mL, 2 x 2 min), diclorometano (10mL, 2 x 2 min) y NMP (10mL, 2 x 2 min), seguido por acoplamiento de Fmoc-Xxx-O-CH₂-COOH (2 equiv.) mediante el uso de HBTU (2 equiv.), HOBt (2 equiv.) y DiPEA (4 equiv.) en NMP (10mL, 90 min). Después de lavar con NMP (10mL, 2 x 2 min), diclorometano (10mL, 2 x 2 min) y NMP (10mL, 2 x 2 min), protocolos estándar de SPPS (ver Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis de W.C. Chan y P.D. White, Oxford university press, 2004) se siguieron para alargar el péptido. La escisión y purificación de los ésteres de oligopéptido-OCam-Xxx-NH₂ fue idéntica al protocolo 2. Los productos se obtuvieron generalmente en un rendimiento >90% con una pureza >95% de acuerdo con el análisis de HPLC.

Producto	Datos NMR
Fmoc-Val-Ala-OCam-Ala-NH ₂	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 300 MHz): δ = 0.87 (t, 6H, J = 7.2 Hz), 1.32 (d, 3H, J = 7.2 Hz), 1.87-2.15 (m, 5H), 2.77-2.85 (m, 1H), 2.99-3.05 (m, 1H), 3.89 (t, 1H, J = 8.1 Hz), 4.20-4.61 (m, 6H), 7.12-7.46 (m, 11 H), 7.72-7.76 (m, 2H), 7.90 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 8.09 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 8.44 (d, 1H, J = 6.3 Hz). ¹³ C NMR (DMSO-d ₆ , 75 MHz): δ = 16.6, 18.2, 19.0, 30.3, 46.6, 47.5, 47.7, 59.6, 62.3, 65.6, 120.0, 125.3, 126.9, 127.5, 140.6, 143.7, 143.8, 155.9, 165.8, 171.3, 171.9, 173.7.
Fmoc-Val-Ala-OCam-Arg(Pbf)-NH ₂	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 300 MHz): δ = 0.86 (t, 6H, J = 6.9 Hz), 1.10 (s, 4H), 1.32-1.40 (m, 9H), 2.00 (s, 3H), 3.81-3.93 (m, 1H), 4.17-4.35 (m, 5H), 4.53 (q, 2H, J = 14.7 Hz y 6 Hz), 7.07 (s, 1H), 7.28-7.43 (m, 5H), 7.75 (q, 2H, J = 4.8 Hz y 2.4 Hz), 7.88 (d, 2H, 7.5 Hz), 7.99 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 8.45 (d, 1H, J = 6.3 Hz). ¹³ C NMR (DMSO-d ₆ , 75 MHz): δ = 12.1, 16.7, 17.5, 18.1, 18.8, 19.0, 28.2, 30.3, 31.2, 42.4, 46.6, 47.4, 51.6, 59.6, 62.2, 65.6, 86.2, 116.1, 120.0, 124.2, 125.3, 126.9, 127.5, 131.3, 137.2, 140.6, 143.7, 143.8, 156.0, 157.3, 166.1, 171.3, 171.9, 173.0.
Fmoc-Val-Ala-OCam-Asn(Trt)-NH ₂	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 300 MHz): δ = 0.88 (q, 5H, J = 6.6 Hz y 5.4 Hz), 1.11 (s, 1H), 1.32 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 1.97 (t, 1H, J = 6.6 Hz), 3.79-3.94 (m, 1H), 4.17-4.33 (m, 3H), 4.44-4.61 (m, 2H), 7.11-7.43 (m, 17H), 7.74 (q, 1H, J = 4.5 Hz y 2.1 Hz), 7.89 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 8.23 (d, 1 H, J = 8.1 Hz), 8.46 (d, 1H, J = 6.3 Hz), 8.59 (s, 1H). ¹³ C NMR (DMSO-d ₆ , 75 MHz): δ = 16.7, 18.1, 19.0, 30.4, 46.6, 47.5, 49.6, 62.1, 65.6, 69.3, 120.0, 125.3, 126.2, 126.9, 127.3, 127.5, 128.4, 140.6, 144.6, 166.0, 168.9, 171.3, 171.9, 172.0.
Fmoc-Val-Ala-Ocam-Asp(OtBu)-NH ₂	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 300 MHz): δ = 0.87 (t, 6H, J = 7.5 Hz), 1.11 (s, 2H), 1.37 (s, 12H), 1.97 (q, 1H, J = 6.6 Hz y 6.3 Hz), 2.63-2.70 (m, 1H), 3.90 (t, 1H, J = 8.1 Hz), 4.17-4.58 (m, 7H), 7.15 (s, 1H), 7.31-7.44 (m, 6H), 7.73 (s, 2H), 7.89 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 8.18 (d, 1H, J = 8.1), 8.45 (d, 1H, J = 6.3). ¹³ C NMP (DMSO-d ₆ , 75 MHz): δ = 16.7, 18.1, 19.0, 27.5, 30.3, 31.2, 37.4, 46.6, 47.5, 49.0, 59.6, 62.2, 65.6, 80.0, 120.0, 125.3, 126.9, 127.5, 140.6, 143.7, 143.8, 156.0, 166.1, 169.3, 171.3, 171.8.
Fmoc-Val-Ala-OCam-Cys(Trt)-NH ₂	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 300 MHz): δ = 0.87 (q, 6H, J = 6.9 Hz y 2.4 Hz), 1.34 (d, 2H, J = 7.2 Hz), 1.98 (q, 1H, J = 6.9 Hz), 3.90 (t, 1H, J = 8.1 Hz), 4.13-4.38 (m, 4H), 4.48-4.64 (m, 2H), 6.43-7.10 (m, 20H), 7.46-7.76 (m, 2H), 7.89 (d, 2H, J = 6.0 Hz), 8.20 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 8.44 (d, 1H, J = 6.9 Hz). ¹³ C NMR (DMSO-d ₆ , 75 MHz): δ = 14.0, 14.3, 16.7, 18.1, 18.2, 19.0, 22.1, 30.3, 33.8, 46.6, 47.4, 55.7, 120.0, 125.3, 126.1, 126.6, 126.9, 127.4, 127.5, 127.7, 127.9, 128.2, 128.9, 129.0, 140.6, 143.7, 143.8, 144.1, 166.0, 171.1, 171.8
Fmoc-Val-Ala-OCam-Glu(OtBu)-NH ₂	¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 300 MHz): δ = 0.88 (t, 6H, J = 7.2 Hz), 1.11 (s, 1H), 1.33-1.39 (m, 12H), 1.66-1.79 (m, 1H), 1.87-2.02 (m, 2H), 2.17-2.27 (m, 2H), 3.90 (q, 1H, J = 7.2 Hz), 4.17-4.37 (m, 5H), 4.54 (q, 2H, J = 14.7 Hz y 7.5 Hz), 7.11 (s, 1H), 7.29-7.44 (m, 6H), 7.74 (q, 2H, J = 4.5 Hz y 2.7 Hz), 7.89 (d, 2H, J = 7.5 Hz), 8.00 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 8.46 (d, 1H, J = 6.3 Hz). ¹³ C NMR (DMSO-d ₆ , 75 MHz): δ = 16.7, 18.1, 19.0, 28.0, 30.3, 31.2, 32.5, 46.6, 47.5, 51.9, 59.6, 62.2, 65.6, 69.1, 120.0, 125.3, 126.2, 126.9, 127.3, 127.4, 127.5, 128.4, 140.6, 143.7, 143.8, 144.8, 166.1, 171.2, 171.3, 171.9, 172.0.

ES 2 531 054 T3

5	Fmoc-Val-Ala-OCam-Gln(Trt)-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.80 (q, 6H, <i>J</i> = 6.6 Hz y 3.9 Hz), 1.04 (s, 1H), 1.26 (d, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz), 1.55-1.68 (m, 1H), 1.74-1.93 (m, 2H), 2.20-2.25 (m, 2H), 3.83 (q, 1H, <i>J</i> = 16.2 Hz y 7.5 Hz), 4.06-4.28 (m, 5H), 4.47 (q, 2H, <i>J</i> = 14.7 Hz y 10.2 Hz), 7.00-7.37 (m, 13H), 7.67 (q, 2H, <i>J</i> = 3.6 Hz), 7.82 (d, 2H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 7.96 (d, 1H, <i>J</i> = 8.1 Hz), 8.37 (d, 1H, <i>J</i> = 6.6 Hz), 8.54 (s, 1H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.6, 18.1, 19.0, 27.2, 27.6, 30.3, 31.1, 46.6, 47.5, 51.3, 59.6, 62.2, 65.6, 79.6, 120.0, 125.3, 126.9, 127.5, 140.6, 143.7, 143.8, 155.9, 166.2, 171.3, 171.5, 171.9, 172.6.
10	Fmoc-Val-Ala-OCam-Gly-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.88 (t, 6H, <i>J</i> = 7.2 Hz), 1.34 (d, 3H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 1.93-2.00 (m, 1H), 3.66 (d, 2H, <i>J</i> = 5.4 Hz), 3.90 (t, 1H, <i>J</i> = 7.8 Hz), 4.22-4.59 (m, 6H), 7.08 (s, 1H), 7.30-7.44 (m, 6H), 7.74-7.90 (m, 4H), 8.14 (s, 1H), 8.47 (d, 1H, <i>J</i> = 6.3 Hz). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.7, 18.1, 19.0, 30.3, 41.5, 46.6, 47.5, 59.6, 62.4, 65.6, 120.0, 125.3, 126.9, 127.5, 140.6, 143.7, 143.8, 156.0, 166.6, 170.4, 171.3, 171.9.
15	Fmoc-Val-Ala-OCam-His(Trt)-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.85 (t, 6H, <i>J</i> = 6.0 Hz), 1.30 (d, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz), 1.94 (q, 1H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 2.73-2.84 (m, 1H), 2.92-3.10 (m, 2H), 3.89 (q, 1H, <i>J</i> = 7.5 Hz y 1.2 Hz), 4.17-4.32 (m, 3H), 4.57-4.58 (m, 3H), 6.97 (s, 1H), 7.09-7.44 (m, 24H), 7.73 (q, 2H, <i>J</i> = 4.5 y 2.4 Hz), 7.89 (d, 2H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 8.14 (d, 2H, <i>J</i> = 8.1), 8.46 (d, 1H, <i>J</i> = 6.3). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.6, 18.1, 18.9, 30.3, 46.6, 47.5, 51.5, 55.7, 59.6, 62.1, 65.6, 120.0, 120.2, 125.3, 126.1, 126.5, 126.9, 127.4, 127.5, 127.6, 128.2, 128.4, 128.4, 128.9, 129.1, 136.7, 140.6, 140.8, 143.7, 143.8, 166.1, 171.3, 171.8, 171.8.
20	Fmoc-Val-Ala-OCam-Ile-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.79-0.93 (m, 12H), 1.01-1.44 (m, 7H), 1.68-1.75 (m, 2H), 1.93-2.00 (m, 1H), 3.89 (t, 1H, <i>J</i> = 8.1 Hz), 4.13-4.35 (m, 5H), 4.48-4.71 (m, 2H), 7.05 (s, 1H), 7.29-7.44 (m, 6H), 7.72-7.90 (m, 5H), 8.45 (d, 1H, <i>J</i> = 6.6). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 11.0, 15.3, 16.7, 18.1, 190.0, 24.0, 30.3, 36.5, 46.6, 47.4, 56.3, 59.6, 62.2, 65.6, 120.0, 125.3, 126.9, 127.5, 140.6, 143.7, 143.8, 155.9, 166.0, 171.2, 171.9, 172.5.
25	Fmoc-Val-Ala-OCam-Leu-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.82-0.90 (m, 12H), 1.33-1.61 (m, 5H), 1.97 (q, 1H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 3.89 (q, 1H, <i>J</i> = 7.5 Hz y 1.5 Hz), 4.18-4.38 (m, 5H), 4.53 (q, 2H, <i>J</i> = 14.7 Hz y 5.4 Hz), 7.01 (s, 1H), 7.29-7.44 (m, 1H), 7.74 (q, 2H, <i>J</i> = 4.5 Hz y 2.4 Hz), 7.88-7.98 (m, 3H), 8.46 (d, 1H, <i>J</i> = 6.0 Hz). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.7, 18.1, 19.0, 21.4, 22.9, 24.1, 30.3, 40.8, 46.6, 47.8, 50.5, 59.6, 62.2, 65.6, 120.0, 125.3, 126.9, 127.5, 140.6, 143.7, 143.8, 155.9, 166.0, 171.3, 171.9, 173.6.
30	Fmoc-Val-Ala-OCam-Lys(Boc)-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.862 (t, 6H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 1.32-1.35 (m, 12H), 1.95 (q, 1H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 2.86 (q, 2H, <i>J</i> = 6.3 Hz), 3.80-3.91 (m, 1H), 4.12-4.34 (m, 4H), 4.52 (q, 2H, <i>J</i> = 14.7 Hz y 6.3 Hz), 6.27 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 7.28-7.43 (m, 5H), 7.71-7.95 (m, 5H), 8.45 (d, 1H, <i>J</i> = 6.6 Hz). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 12.1, 16.7, 17.5, 18.1, 18.8, 190.0, 22.5, 28.2, 29.1, 30.3, 31.1, 46.6, 47.5, 51.6, 59.6, 62.2, 65.6, 86.2, 120.0, 124.2, 125.3, 126.9, 127.5, 128.8, 131.3, 140.6, 143.7, 143.8, 156.0, 166.1, 171.3, 171.9, 173.0.
35	Fmoc-Val-Ala-OCam-Met-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.87 (t, 5H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 1.10-1.35 (m, 3H), 1.93-2.02 (m, 4H), 3.82-3.92 (m, 1H), 4.20-4.35 (m, 4H), 4.54 (q, 2H, <i>J</i> = 14.7 Hz y 5.1 Hz), 7.10 (s, 1H), 7.29-7.43 (m, 5H), 7.74 (q, 2H, <i>J</i> = 3.6 Hz), 7.88 (d, 2H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 8.04 (d, 2H, <i>J</i> = 8.1 Hz), 8.47 (d, 1H, <i>J</i> = 6.3 Hz). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 14.6, 16.6, 18.1, 19.0, 29.5, 30.3, 31.7, 46.5, 47.5, 51.3, 59.6, 62.3, 65.6, 120.0, 125.3, 126.9, 127.5, 140.6, 143.7, 143.8, 155.9, 166.3, 171.3, 172.0, 172.7.
40	Fmoc-Val-Ala-OCam-Phe-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.87 (t, 6H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 1.32 (d, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz), 1.87-2.15 (m, 5H), 2.81 (q, 1H, <i>J</i> = 9.0 Hz y 4.5 Hz), 2.99-3.05 (m, 1H), 3.89 (t, 1H, <i>J</i> = 8.1 Hz), 4.20-4.46 (m, 7H), 7.11-7.46 (m, 11H), 7.72-7.76 (m, 2H), 7.89 (d, 2H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 8.09 (d, 1H, <i>J</i> = 8.4 Hz), 8.44 (d, 1H, <i>J</i> = 6.3 Hz). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.7, 18.1, 19.0, 30.3, 37.5, 46.6, 47.5, 53.5, 59.6, 62.1, 65.6, 120.0, 125.3, 126.1, 126.9, 127.5, 129.0, 137.7, 140.6, 143.7, 143.8, 166.0, 171.1, 171.7, 172.4.
45		
50		
55		
60		

ES 2 531 054 T3

5	Fmoc-Val-Ala-OCam-Pro-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.85-0.91 (m, 6H), 1.36 (d, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz), 1.78-20.3 (m, 5H), 3.90 (t, 1H, <i>J</i> = 8.1 Hz), 4.15-4.45 (m, 5H), 4.61-4.89 (m, 1H), 6.94 (s, 1H), 7.22-7.44 (m, 6H), 7.73-7.77 (m, 2H), 7.89 (d, 2H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 8.39 (d, 1H, <i>J</i> = 6.3). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.8, 18.2, 19.0, 24.0, 29.0, 30.3, 45.1, 46.6, 47.3, 59.6, 61.6, 65.6, 120.0, 125.3, 126.9, 127.5, 140.6, 143.7, 143.8, 155.9, 164.6, 171.1, 171.9, 173.3.
10	Fmoc-Val-Ala-OCam-Ser(tBu)-NH ₂ :	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.87 (t, 6H, <i>J</i> = 7.8 Hz), 1.10 (s, 10H), 1.35 (d, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz), 1.94-2.00 (m, 1H), 3.90 (t, 1H, <i>J</i> = 8.1 Hz), 4.20-4.36 (m, 5H), 4.50-4.63 (m, 2H), 7.11 (s, 1H), 7.29-7.44 (m, 6H), 7.73-7.75 (m, 2H), 7.89 (d, 3H, <i>J</i> = 7.5 Hz). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.7, 18.1, 19.0, 27.1, 30.3, 31.2, 46.6, 47.4, 52.9, 59.6, 61.7, 62.2, 65.6, 72.6, 120.0, 125.3, 126.9, 127.5, 140.6, 143.7, 156.0, 166.1, 171.2, 171.2.
15	Fmoc-Val-Ala-OCam-Thr(tBu)-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.88 (q, 6H, <i>J</i> = 6.9 Hz y 2.4 Hz), 1.00 (d, 3H, <i>J</i> = 6.3 Hz), 1.13 (s, 9H), 1.23 (d, 1H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 1.35 (d, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz), 1.97 (q, 1H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 3.84-3.98 (m, 2H), 4.13-4.36 (m, 5H), 4.52-4.69 (m, 2H), 7.16-7.44 (m, 7H), 7.62-7.76 (m, 3H), 7.89 (d, 2H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 8.43 (d, 1H, <i>J</i> = 6.6 Hz). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.8, 171.1, 19.0, 19.4, 27.9, 30.3, 46.6, 47.4, 57.3, 59.6, 62.3, 65.6, 66.7, 73.4, 120.0, 120.0, 121.3, 125.3, 126.9, 127.2, 127.5, 128.8, 140.6, 143.7, 143.8, 155.9, 166.2, 171.1, 171.2, 171.4, 171.7.
20	Fmoc-Val-Ala-OCam-Trp(Boc)-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.84 (t, 6H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 1.31, (d, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz), 1.61 (s, 8H), 1.93 (q, 1H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 2.94 (q, 1H, <i>J</i> = 8.4 Hz y 6.6 Hz), 3.12 (q, 1H, <i>J</i> = 9.9 Hz y 4.8 Hz), 3.88 (t, 1H, <i>J</i> = 8.4 Hz), 4.20-4.58 (m, 6H), 7.18-7.81 (m, 13H), 7.88 (d, 2H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 8.02 (d, 1H, <i>J</i> = 8.1), 8.18 (d, 1H, <i>J</i> = 8.1 Hz), 8.44 (d, 1H, <i>J</i> = 6.3). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.6, 18.1, 18.9, 27.2, 27.6, 30.3, 46.6, 47.5, 52.0, 59.6, 62.1, 65.6, 83.3, 114.5, 116.4, 119.2, 120.0, 122.3, 123.7, 124.1, 125.6, 126.9, 127.5, 130.2, 134.5, 140.6, 143.7, 143.8, 148.9, 155.9, 166.1, 171.2, 171.7, 172.4.
25	Fmoc-Val-Ala-OCam-Trp(Boc)-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.84 (t, 6H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 1.31, (d, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz), 1.61 (s, 8H), 1.93 (q, 1H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 2.94 (q, 1H, <i>J</i> = 8.4 Hz y 6.6 Hz), 3.12 (q, 1H, <i>J</i> = 9.9 Hz y 4.8 Hz), 3.88 (t, 1H, <i>J</i> = 8.4 Hz), 4.20-4.58 (m, 6H), 7.18-7.81 (m, 13H), 7.88 (d, 2H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 8.02 (d, 1H, <i>J</i> = 8.1), 8.18 (d, 1H, <i>J</i> = 8.1 Hz), 8.44 (d, 1H, <i>J</i> = 6.3). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.6, 18.1, 18.9, 27.2, 27.6, 30.3, 46.6, 47.5, 52.0, 59.6, 62.1, 65.6, 83.3, 114.5, 116.4, 119.2, 120.0, 122.3, 123.7, 124.1, 125.6, 126.9, 127.5, 130.2, 134.5, 140.6, 143.7, 143.8, 148.9, 155.9, 166.1, 171.2, 171.7, 172.4.
30	Fmoc-Val-Ala-OCam-Tyr(tBu)-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.85-0.89 (m, 6H), 1.25 (s, 7H), 1.32 (d, 3H, <i>J</i> = 7.5), 1.97 (q, 1H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 2.72-3.01 (m, 2H), 3.89 (q, 1H, <i>J</i> = 7.5 Hz y 1.5 Hz), 4.17-4.45 (m, 7H), 6.61-6.84 (m, 2H), 6.98-7.12 (m, 3H), 7.29-7.44 (m, 6H), 7.72-7.76 (m, 2H), 7.89 (d, 2H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 7.99-8.07 (m, 2H), 8.45 (d, 1H, <i>J</i> = 6.3). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.1, 17.6, 18.4, 27.9, 29.7, 46.0, 46.9, 52.9, 59.1, 61.5, 65.0, 76.9, 114.2, 119.3, 122.6, 124.7, 126.4, 127.0, 129.0, 129.4, 131.7, 140.0, 143.1, 143.2, 152.7, 155.4, 165.4, 170.7, 171.1, 171.9.
35	Fmoc-Val-Ala-OCam-Tyr(tBu)-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.85-0.89 (m, 6H), 1.25 (s, 7H), 1.32 (d, 3H, <i>J</i> = 7.5), 1.97 (q, 1H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 2.72-3.01 (m, 2H), 3.89 (q, 1H, <i>J</i> = 7.5 Hz y 1.5 Hz), 4.17-4.45 (m, 7H), 6.61-6.84 (m, 2H), 6.98-7.12 (m, 3H), 7.29-7.44 (m, 6H), 7.72-7.76 (m, 2H), 7.89 (d, 2H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 7.99-8.07 (m, 2H), 8.45 (d, 1H, <i>J</i> = 6.3). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.1, 17.6, 18.4, 27.9, 29.7, 46.0, 46.9, 52.9, 59.1, 61.5, 65.0, 76.9, 114.2, 119.3, 122.6, 124.7, 126.4, 127.0, 129.0, 129.4, 131.7, 140.0, 143.1, 143.2, 152.7, 155.4, 165.4, 170.7, 171.1, 171.9.
40	Fmoc-Val-Ala-OCam-Tyr(tBu)-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.85-0.89 (m, 6H), 1.25 (s, 7H), 1.32 (d, 3H, <i>J</i> = 7.5), 1.97 (q, 1H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 2.72-3.01 (m, 2H), 3.89 (q, 1H, <i>J</i> = 7.5 Hz y 1.5 Hz), 4.17-4.45 (m, 7H), 6.61-6.84 (m, 2H), 6.98-7.12 (m, 3H), 7.29-7.44 (m, 6H), 7.72-7.76 (m, 2H), 7.89 (d, 2H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 7.99-8.07 (m, 2H), 8.45 (d, 1H, <i>J</i> = 6.3). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.1, 17.6, 18.4, 27.9, 29.7, 46.0, 46.9, 52.9, 59.1, 61.5, 65.0, 76.9, 114.2, 119.3, 122.6, 124.7, 126.4, 127.0, 129.0, 129.4, 131.7, 140.0, 143.1, 143.2, 152.7, 155.4, 165.4, 170.7, 171.1, 171.9.
45	Fmoc-Val-Ala-OCam-Val-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.81-0.90 (m, 12H), 1.34 (d, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz), 1.91-2.04 (m, 2H), 3.89 (q, 1H, <i>J</i> = 7.5 Hz y 1.2 Hz), 4.11-4.38 (m, 5H), 4.56 (q, 2H, <i>J</i> = 14.4 Hz), 7.06 (s, 1H), 7.29-7.44 (m, 6H), 7.72-7.90 (m, 5H), 8.45 (d, 1H, <i>J</i> = 6.6 Hz). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.7, 17.7, 18.1, 19.0, 19.1, 30.3, 46.6, 47.4, 57.1, 59.6, 62.2, 65.6, 120.0, 125.3, 126.9, 127.5, 140.6, 143.7, 143.8, 155.9, 166.1, 171.2, 171.8, 172.5.
50	Fmoc-Val-Ala-OCam-Val-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.81-0.90 (m, 12H), 1.34 (d, 3H, <i>J</i> = 7.2 Hz), 1.91-2.04 (m, 2H), 3.89 (q, 1H, <i>J</i> = 7.5 Hz y 1.2 Hz), 4.11-4.38 (m, 5H), 4.56 (q, 2H, <i>J</i> = 14.4 Hz), 7.06 (s, 1H), 7.29-7.44 (m, 6H), 7.72-7.90 (m, 5H), 8.45 (d, 1H, <i>J</i> = 6.6 Hz). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 16.7, 17.7, 18.1, 19.0, 19.1, 30.3, 46.6, 47.4, 57.1, 59.6, 62.2, 65.6, 120.0, 125.3, 126.9, 127.5, 140.6, 143.7, 143.8, 155.9, 166.1, 171.2, 171.8, 172.5.
55	Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-OCam-Leu-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.74-0.80 (m, 12H), 1.02-1.96 (m, 45H), 1.05-2.85 (m, 4H), 4.15-4.56 (m, 8H), 6.63-6.66 (m, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.98-7.29 (m, 16H), 7.60 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.76 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.87 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 7.95 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 8.09 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 8.22 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 21.4m 21.5, 22.3, 22.9, 24.0, 24.1, 27.1, 27.5, 28.2, 69.1, 72.7, 80.0, 126.2, 127.3, 128.4, 144.7, 166.1, 169.0, 169.11 169.2, 170.5, 170.9, 171.2, 171.5, 171.8, 176.2.
60	Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-OCam-Leu-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.74-0.80 (m, 12H), 1.02-1.96 (m, 45H), 1.05-2.85 (m, 4H), 4.15-4.56 (m, 8H), 6.63-6.66 (m, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.98-7.29 (m, 16H), 7.60 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.76 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 7.87 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 7.95 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 8.09 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 8.22 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 21.4m 21.5, 22.3, 22.9, 24.0, 24.1, 27.1, 27.5, 28.2, 69.1, 72.7, 80.0, 126.2, 127.3, 128.4, 144.7, 166.1, 169.0, 169.11 169.2, 170.5, 170.9, 171.2, 171.5, 171.8, 176.2.

Fmoc-Val-Gln(Trt)-OCam-Gly-NH ₂	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.06 (s, 2H), 0.88-0.97 (m, 8H), 1.11-1.15 (m, 3H), 1.24 (s, 2H), 1.62-1.98 (m, 5H), 2.28-2.42 (m, 3H), 3.51-3.66 (m, 5H), 3.91 (t, 1H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 4.14-4.33 (m, 5H), 4.53-4.60 (m, 2H), 7.06-7.40 (m, 25H), 7.66-7.75 (m, 2H), 7.88 (d, 1.91, <i>J</i> = 7.5 Hz), 8.21 (s, 1H), 8.44-8.54 (m, 1H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 17.0, 18.2, 19.0, 46.5, 51.5, 62.1, 65.6, 69.1, 109.6, 120.0, 121.3, 125.3, 126.2, 126.9, 127.2, 127.3, 127.5, 128.4, 128.8, 140.6, 143.6, 143.8, 144.7, 144.8, 156.0, 166.7, 166.9, 170.7, 171.0, 171.1, 171.7.
--	---

Síntesis de ésteres -OCam-Xxx-OH de oligopéptido (éster de oligopéptido) con R₂ un residuo de aminoácido con funcionalidad de ácido carboxílico C-terminal)

1 gramo de resina Tritel (conector 2-cloro-clorotritel, con una carga de 1.0 mmol/gramo) se lavó con diclorometano (10mL, 2 x 2 min) y Fmoc-Xxx-OH (2 equiv.) se acopló a la resina mediante el uso de DiPEA (5 equiv.) en diclorometano (10m, 30 min). Después de lavar con DMF (10mL, 2 x 2 min), los grupos clorotritel sin reaccionar se sellaron mediante el uso de diclorometano/MeOH/DiPEA (10mL, 80/15/5, v/v/v, 2 x 10 min). Después de lavar con NMP (10mL, 2 x 2 min), diclorometano (10mL, 2 x 2 min) y NMP (10mL, 2 x 2 min), el aminoácido se desprotegió de Fmoc mediante el uso de piperidina/NMP (10mL, 1/4, v/v, 2 x 8 min) seguido por acoplamiento del ácido yodoacético (4 equiv.) mediante el uso de DCC (4 equiv.) en diclorometano (10mL, 45 min). Después de lavar con NMP (10mL, 2 x 2 min), diclorometano (10mL, 2 x 2 min) y THF (10mL, 2 x 2 min), la resina se trató con Fmoc-Xxx-OH (4 equiv.) y 10 equiv. DiPEA en DMF/THF (10mL, 1/4, v/v) a 50°C durante 20h. Después de lavar con DMF (10mL, 2 x 2 min), diclorometano (10mL, 2 x 2 min) y NMP (10mL, 2 x 2 min), protocolos estándar SPPS (ver Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis de W.C. Chan y P.D. White, Oxford universidad press, 2004) se siguieron para alargar el péptido. La escisión y purificación del éster-OCam-Xxx-OH del oligopéptido se identificó con el protocolo 2. Los productos se obtuvieron generalmente con un rendimiento >90% con una pureza >95% de acuerdo con el análisis de HPLC.

Producto	Datos NMR
Fmoc-Val-Ala-Cam-Leu-OH	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.85-0.87 (m, 12 H), 1.34 (d, 3H, <i>J</i> = 3.5 Hz), 1.54-1.60 (m, 3H), 1.98 (t, 1H, <i>J</i> = 6 Hz), 3.87-3.92 (m, 1H), 4.22-4.36 (m, 5H), 4.46-4.60 (m, 2H), 7.32-7.44 (m, 5H), 7.74 (s, 2H), 7.89 (d, 2H, <i>J</i> = 3.6 Hz), 8.15 (d, 1H, <i>J</i> = 3.6 Hz), 8.46 (d, 1H, <i>J</i> = 2.7 Hz). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 18.2, 19.0, 21.4, 22.9, 24.1, 30.3, 46.5, 50.5, 51.5, 59.7, 62.3, 65.6, 69.1, 120.0, 125.2, 126.2, 126.9, 127.3, 127.5, 128.2, 128.4, 140.6, 143.6, 143.8, 144.7, 156.0, 166.1, 170.9, 171.3, 171.6, 173.6.
Fmoc-Val-Gln(Trt)-Cam-Gly-OH	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.06 (s, 1H), 0.88 (s, 6H), 1.41 (d, 1H, <i>J</i> = 300 Hz), 1.82-1.84 (m, 2H), 1.97 (d, 2H, <i>J</i> = 6.9 Hz), 3.77-3.79 (m, 2H), 3.92 (t, 1H, <i>J</i> = 7.5 Hz), 4.33-4.48 (m, 4H), 4.54 (q, 2H, <i>J</i> = 15.3 Hz y 6.9 Hz), 7.17-7.41 (m, 19H), 7.66-7.75 (m, 2H), 7.89 (d, 2H, <i>J</i> = 7.2 Hz), 8.31 (s, 1H), 8.44 (d, 1H, <i>J</i> = 2.7 Hz), 8.62 (s, 1H)

Síntesis de nucleófilos amida C- terminal de oligopéptido (nucleófilo de oligopéptido ii)

Los nucleófilos amida C- terminal de oligopéptido se sintetizaron sobre una resina Sieber (conector Xantenil, con una carga de 0.5 mmol/gram) mediante el uso de un protocolo SPPS estándar (ver Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis por W.C. Chan y P.D. White, Oxford university press, 2004). La escisión de la resina se realizó mediante el uso de 2.5 % vol de ácido trifluoacético (TFA) en diclorometano (10 mL por gramo de resina) durante 15 min. La resina se lavó dos veces con 10 mL de diclorometano y los filtrados combinados se lavaron dos veces con 10 mL de NaHCO₃ acuoso saturado seguido por concentración de 1/3 de su volumen original *al vacío*. La precipitación, lavado y secado son idénticos al protocolo 2. Los productos se obtuvieron generalmente con un rendimiento >90% con una pureza >95% de acuerdo con el análisis de HPLC.

Producto	Datos NMR
5 10 H-Phe-Val-Gly-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 9	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.87 (t, <i>J</i> = 6.6 Hz, 6H), 1.14 (s, 9H), 1.40-2.07 (m, 16H), 2.48-2.71 (m, 8H), 3.02-3.08 (m, 5H), 3.39-3.60 (m, 3H), 3.81 (d, <i>J</i> = 5.7 Hz, 2H), 4.14-4.25 (m, 2H), 4.35-4.44 (m, 1H), 6.44-6.75 (m, 2H), 7.08-7.36 (m, 8H), 7.97-8.09 (m, 3H), 8.34-8.38 (m, 1H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 12.6, 18.0, 18.3, 19.3, 19.5, 27.4, 28.7, 31.2, 42.8, 52.6, 53.7, 56.4, 57.5, 62.2, 73.5, 86.7, 116.6, 124.7, 126.5, 128.5, 129.7, 131.8, 137.6, 139.0, 156.4, 157.8, 169.3, 170.0, 171.7, 173.6, 174.5.
15 H-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 10	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 1.13 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 3H), 1.32 (s, 27H), 1.45-1.96 (m, 13H), 2.12-2.19 (m, 6H), 3.15-3.25 (m, 1H), 4.05-4.23 (m, 4H), 6.91 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.79 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 7.91 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 8.02 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 15.0, 18.6, 27.5, 28.0, 28.1, 30.2, 31.6, 35.0, 48.4, 51.8, 52.1, 54.2, 80.0, 170.7, 171.3, 171.5, 172.0, 172.1, 174.3, 175.2.
20 25 H-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-Glu(OtBu)-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 11	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 1.18 (s, 9H), 1.30-2.50 (m, 39H), 2.90-2.98 (m, 2H), 3.51-3.71 (m, 2H), 3.97-4.00 (m, 1H), 4.22-4.27 (m, 2H), 4.38-4.42 (m, 2H), 6.79-6.85 (m, 1H), 7.06 (s, 1H), 7.21-7.39 (m, 17H), 7.95-8.26 (m, 6H), 8.54-8.60 (m, 2H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 15.0, 22.9, 27.4, 27.7, 28.1, 28.7, 29.7, 31.7, 32.4, 32.6, 33.0, 52.0, 52.3, 52.8, 52.9, 53.2, 61.0, 74.0, 77.8, 80.1, 126.7, 127.8, 128.9, 145.2, 155.9, 166.6, 171.1, 171.3, 171.4, 171.7, 172.0, 173.2.
30 H-Leu-Phe-Ile-Glu(OtBu)-Trp(Boc)-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 12	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.75-0.85 (m, 12H), 0.99-1.93 (m, 25H), 2.16-2.22 (m, 2H), 2.73-3.12 (m, 4H), 4.14-4.19 (m, 1H), 4.24-4.32 (m, 1H), 4.49-4.63 (m, 2H), 7.15-7.36 (m, 8H), 7.50 (s, 1H), 7.69 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 8.00-8.32 (m, 4H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 11.3, 15.6, 22.2, 23.4, 24.1, 24.7, 27.8, 28.1, 31.5, 36.7, 37.8, 43.1, 52.3, 52.7, 53.7, 57.3, 80.0, 83.8, 115.0, 116.9, 119.8, 122.8, 124.1, 124.6, 126.5, 128.3, 129.6, 130.7, 135.0, 137.9, 149.4, 171.1, 171.2, 172.0, 173.0, 173.4.
35 40 H-Trp(Boc)-Met-Asp(^t Bu)-Phe-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 13	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 1.36 (s, 9H), 1.69 (s, 9H), 1.70-3.03 (m, 5H), 2.64-3.22 (m, 5H), 4.08-4.15 (m, 1H), 4.36-4.47 (m, 2H), 4.55-4.63 (m, 1H), 7.14-7.36 (9H), 7.64 (s, 1H), 7.78 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 7.93 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H), 8.04-8.11 (m, 5H), 8.40 (d, <i>J</i> = 7.8 Hz, 1H), 8.90 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz, 1H). ¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 75 MHz): δ = 15.0, 22.9, 27.4, 28.0, 28.1, 29.8, 32.1, 37.5, 37.8, 50.0, 52.4, 52.9, 54.3, 80.7, 83.9, 115.0, 117.1, 119.8, 122.7, 124.3, 124.6, 126.6, 128.4, 129.4, 130.7, 135.0, 138.1, 149.4, 169.8, 169.9, 170.2, 171.2, 171.9, 172.8.
45 H-Glu(^t Bu)-Glu(^t Bu)-Glu(^t Bu)-Ala-Val-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 14	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 300 MHz): δ = 0.85 (t, <i>J</i> = 6.9 Hz, 6H), 1.20 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 3H), 1.39-1.41 (m, 27H), 1.62-1.99 (m, 7H), 2.20-2.36 (m, 6H), 3.77-3.81 (m, 1H), 4.09-4.14 (m, 1H), 4.24-4.40 (m, 3H), 7.02 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.65 (d, <i>J</i> = 9.0 Hz, 1H), 7.87 (s, 2H), 8.10 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H), 8.20 (d, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H), 8.52 (d, <i>J</i> = 7.2 Hz, 1H).

50

Ejemplo 1

55 Acoplamiento del fragmento de ésteres activados de oligopéptido protegido i) con nucleófilos amida C-terminal de oligopéptido protegido ii).

60 3 μmol de éster activado de oligopéptido protegido y 4.5 μmol de nucleófilo amida C-terminal de oligopéptido protegido se disolvieron en 0.5 mL de diclorometano y se añadieron 10 mg de tamices moleculares triturados. Posteriormente, se añadió 0.5 mL de una solución estándar (guardada en tamices moleculares) que contiene Alcalase-CLEA-OM (20 mg/mL en diclorometano). Esta mezcla se agitó a 37°C con 200 rpm durante 24 h y se analizó por LC-MS.

Tabla 1

	éster activado de oligopéptido protegido	nucleófilo de oligopéptido protegido	producto oligopéptido protegido	Rendimiento (%)	m/z calcd y encontrado:
5					
10	Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-OCam Sec. con núm. de ident.: 15	H-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 21	Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 24	86	C ₉₃ H ₁₄₄ N ₁₃ O ₂₃ S ⁺ : 1843.0, 1842.8
15					
20	Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-OCam Sec. con núm. de ident.: 16	H-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 21	Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 25	100	C ₇₄ H ₁₃₀ N ₁₃ O ₂₃ S ⁺ 1600.9, 1601.1
25					
30	Ac-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-OCam Sec. con núm. de ident.: 17	H-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 21	Ac-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 26	98	C ₈₉ H ₁₅₈ N ₁₅ O ₂₇ S ⁺ : 1901.1, 1901.4
35					
40					
45	Ac-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-OCam Sec. con núm. de ident.: 18	H-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 21	Ac-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 27	78	C ₁₀₆ H ₁₈₃ N ₁₇ O ₃₀ S ²⁺ : 1103.2, 1103.5
50					
55					
60	Ac-Leu-Asp(OtBu)-Gln(Trt)-Ser(tBu)-Gln-OCam	H-Phe-Val-Gly-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-NH ₂	Ac-Leu-Asp(OtBu)-Gln(Trt)-Ser(tBu)-Gln-Phe-Val-Gly-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-NH ₂	86	C ₉₄ H ₁₃₄ N ₁₆ NaO ₂₀ S ⁺ 1862.0, 1862.3

	Sec. con núm. de ident.: 19	Sec. con núm. de ident.: 22	Sec. con núm. de ident.: 28		
5	Ac-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-OCam	H-Ala-Met-Val-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Pro-Arg(Pbf)-Glu(tBu)-Asn(trt)-His(trt)-NH ₂	Ac-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-Ala-Met-Val-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Pro-Arg(Pbf)-Glu(tBu)-Asn(trt)-His(trt)-NH ₂	95 ^a	C ₁₈₅ H ₂₆₈ N ₂₈ O ₃₇ S ₂ ²⁺ 1769.0, 1769.5
10	Sec. con núm. de ident.: 20	Sec. con núm. de ident.: 23	Sec. con núm. de ident.: 29		
15	unDespués de 7 días de reacción				

La Tabla 1 demuestra que una variedad de ésteres C-terminal de oligopéptido protegido se puede acoplar con una variedad de nucleófilos amida C-terminal oligopéptido protegido lo que proporciona altos rendimientos de productos de péptido por encima de al menos 19 aminoácidos de longitud. Además, se obtuvieron buenos rendimientos sin usar un gran exceso estequiométrico de ninguno de los fragmentos usados en la reacción de condensación.

Ejemplo 2

Acoplamiento del fragmento de Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-OCam (oligopéptido i) con R₁ y R₂ hidrógeno) con H-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-NH₂ (oligopéptido ii) en varios disolventes

2.2 mmol Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-OCam (Sec. con núm. de ident.: 16) y 3.3 mmol H-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-NH₂(Sec. con núm. de ident.: 21) se disolvieron en 100 µL DMF. posteriormente, se añadieron 10 mg de tamices moleculares triturados, 10 mg Alcalase-CLEA-OM y 900 µL de disolvente. Estas mezclas se agitaron a 37°C con 200 rpm durante 24 h y se analizaron por HPLC.

Disolvente	Rendimiento del Producto(%)
MTBE (que contiene 10 %vol DMF)	100
Me-THF (que contiene 10 %vol DMF)	96
Dimetoxietano (que contiene 10 %vol DMF)	95
1,2-dicloroetano (que contiene 10 %vol DMF)	96
HFIP ^a /MTBE 1/1 (que contiene 10 % volDMF)	37
TFE ^b /MTBE 1/1 (que contiene 10 %vol DMF)	93
DMF	65 ^c

^a1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol;^b2,2,2-trifluoroetanol; ^cmediante el uso de 50 mg de Alcalase-CLEA-OM.

Esta tabla demuestra que varios disolventes que pueden usarse para la reacción de acoplamiento de los fragmentos de oligopéptido protegido.

Ejemplo 3

Comparación de ésteres de OCam-Xxx-NH₂ (ésteres de oligopéptido i) con R₂un residuo de aminoácido con una funcionalidad de carboxiamida C-terminal)

Varios ésteres Cbz-Val-Ala-OCam-Xxx-NH₂ se compararon con Cbz-Val-Ala-OCam en una reacción de acoplamiento con H-Phe-NH₂. 0.028 mmol Cbz-Val-Ala-OCam-Xxx-NH₂ o Cbz-Val-Ala-OCam se añadieron a H-Phe-NH₂ (1.5 equiv) en 1.5 mL de THF (que contiene 10 % volDMF) con 5 esferas de tamices moleculares. Las mezclas de reacción se agitaron a 50°C durante 30 min seguido de la adición de 50 mg de Alcalase inmovilizada en decalite. Después de 1 h de agitación a 50°C, a 100 µL de alícuotas de las mezclas de reacción se añadieron a 900 µL de DMF y se analizaron las

muestras por HPLC. Se determinaron los rendimientos a partir del gráfico de calibración del producto Cbz-Val-Ala-Phe-NH₂. Se debe notar que después de 1 h las diferencias entre los varios ésteres activados de oligopéptidos comenzaron a ser visibles. Mediante el uso de tiempos prolongados de reacción y/o más enzima, todas las reacciones podrían causar la conversión completa.

5

10

15

20

25

30

35

40

Cbz-Val-Ala-OCam-Xxx-NH ₂ , Xxx =	Cbz-Val-Ala-Phe-NH ₂ , rendimiento del producto (%)
leu	64
Asp(OtBu)	62
Ser(tBu)	62
Gln(Trt)	57
Gli	51
ala	51
--- (normal OCam-éster) (R ₁ y R ₂ es H)	50
Glu(OtBu)	47
Arg(Pbf)	46
phe	43
Cys(Trt)	40
pro	40
Trp(Boc)	39
Tyr(tBu)	38
Thr(tBu)	36
ile	34
MET	21
Lys(Boc)	19
Asn(Trt)	18
His(Trt)	6
val	3

Esta tabla muestra que varios ésteres OCam-Xxx-NH₂ C-terminal pueden ser usados para las reacciones de acoplamiento enzimático.

45

Ejemplo 4

Comparación de OCam-éster y OCam-Leu-NH₂ éster

50

3 μmol de éster C-terminal de oligopéptido protegido y 4.5 μmol de H-Met-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Ala-NH₂ (Sec. con núm. de ident.: 21) se disolvieron en 0.5 mL diclorometano y se añadieron 10 mg de tamices moleculares triturados. Posteriormente, se añadió 0.5 mL de una solución estándar (guardado en tamices moleculares) que contiene Alcalase-CLEA-OM (40 mg/mL en diclorometano). Esta mezcla se agitó a 37°C con 200 rpm durante 48 h y se analizó por LC-MS.

55

60

Éster C-terminal de oligopéptido protegido	Rendimiento del producto (%)	<i>m/z</i> calculado y encontrado:
Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-OCam (R ₁ y R ₂ hidrógeno) Sec. con núm. de ident.: 30	86	C ₉₃ H ₁₄₄ N ₁₃ O ₂₃ S ⁺ : 1843.0, 1843.1
Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-OCam-Leu-NH ₂ (R ₁ hidrógeno y R ₂ un residuo de aminoácido con una funcionalidad de carboxiamida C-terminal) Sec. con núm. de ident.: 31	95	C ₉₃ H ₁₄₄ N ₁₃ O ₂₃ S ⁺ : 1843.0, 1842.9

Este resultado demuestra que los resultados que se muestran en el Ejemplo 3 para los acoplamientos [2+1] pueden ser traducido a los acoplamientos de fragmento de péptido y en al menos algunos casos el uso de ésteres OCam-Xxx-NH₂C-terminal de oligopéptidos protegidos es ventajoso para la velocidad de acoplamiento y rendimiento comparado con los ésteres-OCam no sustituidos.

Ejemplo 5

Comparación de ésteres OCam-Xxx-NH₂ (funcionalidad carboxiamida C-terminal) de oligopéptido y OCam-Xxx-OH (funcionalidad ácido carboxílico C-terminal) de oligopéptido-Cbz-Val-Ala-OCam-Leu-NH₂ y Cbz-Val-Ala-OCam-Leu-OH, se condensaron enzimáticamente con H-Phe-NH₂ como se describe en el ejemplo 3. Cbz-Val-Gln(Trt)-OCam-Gly-NH₂ y Cbz-Val-Gln(Trt)-OCam-Gly-OH se condensaron enzimáticamente con H-Phe-NH₂ como se describe en el ejemplo 3 pero se usó cinco veces la cantidad de enzima. La piperidina (1 equiv.) se usó para neutralizar las porciones del ácido carboxílico antes del acoplamiento enzimático.

Éster C-terminal de oligopéptido	Rendimiento del producto (%)
Cbz-Val-Ala-OCam-Leu-NH ₂	56
Cbz-Val-Ala-OCam-Leu-OH	51
Cbz-Val-Gln(Trt)-OCam-Gly-NH ₂	90
Cbz-Val-Gln(Trt)-OCam-Gly-OH	86

Este resultado demuestra que ésteres OCam-Xxx-NH₂C-terminal así como ésteres OCam-Xxx-OH se pueden usar para la reacción de acoplamiento enzimático y exhiben una velocidad de reacción comparable en al menos algunos casos.

Ejemplo 6

El uso de varias enzimas y formas de inmovilización

2.2 mmol de Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-OCam y 3.3 mmol de H-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Val-NH₂ se disolvieron en 100 µL DMF. posteriormente, se añadieron 10 mg de tamices moleculares triturados, 10 mg de enzima y 900 µL de MTBE. Estas mezclas se agitaron a 37°C con 200 rpm durante 24 h y se analizaron por HPLC. Las siguientes enzimas dieron excelente rendimiento de producto(>80%): Alcalase-CLEA-OM, Alcalase-imibond, Alcalase-epobond, Alcalase-immozyme, Alcalase Líquida, Subtilisina A, Proteinasa K.

2.2 mmol de Cbz-Phe-OCam y 3.3 mmol de H-Phe-NH₂ se disolvieron en 100 µL de DMF. Posteriormente, se añadieron 10 mg de tamices moleculares triturados, 10 mg de enzima y 900 µL de MTBE. Estas mezclas se agitaron a 37°C con 200 rpm durante 24 h y se analizaron por HPLC. Las siguientes enzimas dieron excelente rendimiento de producto (>80%): Savinasa, Esperasa, Everlase, Proteasa de *Bacillus sp.* (tres variantes disponibles), Proteasa de *Bacillus licheniformis*.

Ejemplo 7

Acoplamiento del fragmento de Cam-ésteres activados de oligopéptido protegido i) con H-Leu-Phe-NH₂

3 μmol de donante de acilo de oligopéptido protegido se disolvió en 0.5 mL diclorometano y se añadieron 10 mg de tamices moleculares triturados. Posteriormente, 0.5 mL de una solución estándar (guardados en tamices moleculares) que contiene 12 μmol/mL H-Leu-Phe-NH₂ y se añadió 20 mg/mL Alcalase-CLEA-OM en diclorometano. Esta mezcla se agitó a 37°C con 200 rpm durante 24 h y se analizó por LC-MS. Se debe notar que después de 24h las diferencias entre los varios Cam-ésteres comenzaron a ser visibles. Mediante el uso de tiempos prolongados de reacción y/o más enzima, todas las reacciones podrían causar la conversión completa.

Entrada	Éster activado de oligopéptido protegido	Rendimiento del producto (%)	m/z calculado y encontrado:
1	Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Xan)-OCam Sec. con núm. de ident.: 32	13	C ₆₇ H ₉₈ N ₁₀ NaO ₁₅ ⁺ : 1305.7; 1305.5
2	Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-OCam Sec. con núm. de ident.: 33	18	C ₇₃ H ₁₀₄ N ₁₀ NaO ₁₄ ⁺ : 1367.8; 1367.6
3	Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Tmob)-OCam Sec. con núm. de ident.: 34	37	C ₆₄ H ₁₀₂ N ₁₀ NaO ₁₇ ⁺ : 1305.7; 1305.4
4	Ac-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-OCam Sec. con núm. de ident.: 35	92	C ₅₄ H ₉₀ N ₁₀ NaO ₁₄ ⁺ : 1125.7; 1125.5
5	Ac-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-OCam Sec. con núm. de ident.: 36	91	C ₆₉ H ₁₁₈ N ₁₂ NaO ₁₈ ⁺ : 1425.9, 1425.6
6	Ac-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-OCam Sec. con núm. de ident.: 37	97	C ₈₆ H ₁₄₂ N ₁₄ NaO ₂₁ ⁺ : 1730.0, 1730.8
7	Ac-Glu(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln-OCam Sec. con núm. de ident.: 38	53	C ₉₇ H ₁₆₁ N ₁₆ O ₂₅ ⁺ : 1950.2, 1950.7
8	Ac-Phe-Ile-Glu(OtBu)-Trp(Boc)-Leu-OCam Sec. con núm. de ident.: 39	93	C ₆₃ H ₈₉ N ₉ NaO ₁₂ ⁺ : 1186.7, 1186.5
9	Ac-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-OCam Sec. con núm. de ident.: 40	15	C ₇₀ H ₁₀₀ N ₁₀ NaO ₁₂ S ⁺ : 1327.7, 1327.5
10	Ac-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-OCam	96	C ₆₂ H ₉₈ N ₁₁ O ₁₅ S ⁺ : 1268.7, 1268.5

	Sec. con núm. de ident.: 41		
5	11 Ac-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)- Leu-OCam Sec. con núm. de ident.: 42	24	C ₅₅ H ₈₆ N ₈ NaO ₁₂ ⁺ : 1073.6, 1073.5
10	12 Ac-Leu-Asp(OtBu)-Gln(Trt)-Ser(tBu)-Gln- OCam Sec. con núm. de ident.: 43	68	C ₆₇ H ₉₂ N ₁₀ NaO ₁₃ ⁺ : 1267.7, 1267.5
15	13 Ac-His(Trt)-Lys(Boc)-Thr(tBu)- Asp(OtBu)-Ser-OCam Sec. con núm. de ident.: 44	73	C ₅₃ H ₈₅ N ₁₁ NaO ₁₄ ⁺ : 1122.6, 1122.6 (fragmento sin Trt)

20

Como se pudo observar en las entradas 1-4, varios grupos protectores de cadenas laterales se pueden usar para el residuo Gln C-terminal del éster C-terminal del oligopéptido, pero es ventajoso si éste residuo Gln C-terminal tiene una funcionalidad de cadena lateral sin protección. Las entradas 5-13 confirman que ésteres C-terminal de oligopéptidos protegidos con una variedad de secuencias de aminoácidos y grupos protectores de cadena lateral se pueden usar en la reacción de acoplamiento enzimático.

25

Ejemplo 8

30

Acoplamiento de nucleófilos amida C-terminal de oligopéptido protegido ii) con Cbz-Phe-OCam

35

3 μmol de nucleófilo amida C-terminal oligopéptido protegido se disolvió en 0.5 mL diclorometano y se añadieron 10 mg de tamices moleculares triturados. Posteriormente, 0.5 mL de una solución estándar (guardados en tamices moleculares) que contiene 12 μmol/mL de Cbz-Phe-OCam y 20 mg/mL de Alcalase-CLEA-OM se añadieron en diclorometano. Esta mezcla se agitó a 37°C con 200 rpm durante 24 h y se analizó por LC-MS. Se debe notar que luego de 24h las diferencias entre los varios nucleófilos amida C-terminal de oligopéptido protegido comenzaron a ser visibles. Mediante el uso de tiempos prolongados de reacción y/o más enzima, todas las reacciones podrían causar la conversión completa.

40

45

50

55

60

Entrada	Nucleófilo oligopéptido protegido	Rendimiento del Producto(%)	<i>m/z</i> calculado y encontrado:
1	H-Phe-Val-Gly-Ser(tBu)-Arg(Pbf)-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 45	45	C ₅₈ H ₈₁ N ₁₀ O ₁₂ S ⁺ : 1153.6, 1153.3
2	H-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ala-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 21	58	C ₅₂ H ₇₇ N ₇ NaO ₁₄ S ⁺ : 1078.5, 1078.3
3	H-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-Glu(OtBu)-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 46	23	C ₇₃ H ₉₇ N ₉ NaO ₁₄ S ⁺ : 1378.7, 1378.5
4	H-Leu-Phe-Ile-Glu(OtBu)-Trp(Boc)-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 47	23	C ₆₃ H ₈₂ N ₈ NaO ₁₂ ⁺ : 1165.6, 1165.4
5	H-Lys(Boc)-Asn(Trt)-Gly-Gly-Pro-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 48	29	C ₆₀ H ₇₁ N ₉ NaO ₁₁ ⁺ : 1116.5, 1116.5
6	H-Trp(Boc)-Met-Asp(^t Bu)-Phe-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 49	100	C ₅₅ H ₆₇ N ₇ NaO ₁₁ S ⁺ : 1056.5, 1156.3
7	H-Glu(^t Bu)-Glu(^t Bu)-Glu(^t Bu)-Ala-Val-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 50	19	C ₅₂ H ₇₇ N ₇ NaO ₁₄ ⁺ : 1046.5, 1146.4
8	H-Ser(tBu)-Leu-Leu-NH ₂	59	C ₃₆ H ₅₃ N ₅ NaO ₇ ⁺ : 690.4, 690.4
9	H-Ala-Met-Val-Ser(^t Bu)-Tyr(^t Bu)-Pro-Arg(Pbf)-Glu(^t Bu)-Asn(trt)-His(trt)-NH ₂ Sec. con núm. de ident.: 51	53	C ₁₃₀ H ₁₆₀ N ₁₈ O ₂₁ S ₂ ²⁺ : 1186.6, 1186.2

Las entradas 1-9 confirman que los nucleófilos amida C-terminal de oligopéptido protegido con una variedad de secuencias de aminoácido y grupos protectores de cadena lateral se pueden usar en la reacción de acoplamiento enzimático.

Ejemplo 9

Influencia del contenido de agua en la relación síntesis/hidrólisis

2.2 μmol Cbz-Phe-OCam y 4.4 μmol H-Phe-NH₂ se disolvieron en 1 mL diclorometano y se añadió 5 mg de Alcalase-CLEA-OM (se prepararon 6 mezclas iguales a ésta). Se añadieron a estas mezclas 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 μL de H₂O

(correspondiente a \approx 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3 % vol agua en la mezcla de reacción). Todas las seis mezclas fueron agitadas a 37°C con 200 rpm durante 2 h y se analizaron por HPLC.

5 La relación S/H se define como la cantidad (mmol) de producto dipéptido formado Cbz-Phe-Phe-NH₂ dividido por la cantidad (mmol) de producto de hidrólisis formado Cbz-Phe (mmol). Como se puede observar a partir de la figure 1 adjunta, una baja concentración de agua es esencial para evitar la hidrólisis del Cam-éster.

10 Ejemplo 10

Reactivación de enzima por rehidratación

Desactivación

15 5 mg de Alcalase-CLEA-OM y 25 mg de tamices moleculares 3A se agitaron a 37°C en 1 mL DMF y separadamente en 1 mL de diclorometano y separadamente en 1 mL de DMF/MTBE (1/9, v/v). Para todos los tres disolventes se prepararon tres de éstas mezclas iguales. Para todos los tres disolventes, las tres mezclas se filtraron después de 1, 24 y 48h, respectivamente, y en cada caso 1 mL de DMF/THF (1/9, v/v) que contiene 5 mg de Cbz-Phe-OCam y 1.5 equiv. de H-Phe-NH₂ se añadió y las mezclas de reacción se agitaron a 37°C. Para la comparación, 1 mL de DMF/THF (1/9, v/v) que contiene 5 mg Cbz-Phe-OCam y 1.5 equiv. de H-Phe-NH₂ se agitó a 37°C con 5 mg de Alcalase-CLEA-OM y 25 mg de tamices moleculares 3A que no se habían agitado previamente en disolvente orgánico. Se tomaron muestras después de 1 h y la conversión de Cbz-Phe-Phe-NH₂ se determinó por HPLC. Las actividades relativas se calcularon al dividir la cantidad de Cbz-Phe-Phe-NH₂ (mmol) obtenida con Alcalase-CLEA-OM que se había tratado con disolvente orgánico por la cantidad de Cbz-Phe-Phe-NH₂ (mmol) obtenida con Alcalase-CLEA-OM x 100% no tratado.

25 Como se pudo observar en la figure 2 adjunta, Alcalase-CLEA-OM se desactiva lentamente en disolventes orgánicos secos que contienen tamices moleculares 3A.

Reactivación

30 5 mg de Alcalase-CLEA-OM y 25 mg de tamices moleculares 3A se agitaron a 37°C en 1 mL DMF y separadamente en 1 mL diclorometano y separadamente en 1 mL DMF/MTBE (1/9, v/v). Para todos los tres disolventes se prepararon tres mezclas de reacción. Para los tres disolventes, las tres mezclas se filtraron después de 1, 24 y 48h, respectivamente, y en cada caso 1 mL de tampón (1/1, v/v) DMF/fosfato (100 mM, pH = 7.5) que contienen 5 mg de Cbz-Val-Phe-OMe se adició y la mezcla de reacción se agitó a 37°C. Para la comparación, 1 mL de tampón (1/1, v/v) DMF/fosfato (100 mM, pH = 7.5) que contiene 5 mg de Cbz-Val-Phe-OMe se agitó a 37°C con 5 mg de Alcalase-CLEA-OM y 25 mg tamices moleculares 3A que no se habían agitado previamente en disolvente orgánico. Se tomaron muestras después de 1h y la conversión a Cbz-Val-Phe-OH se determinó mediante HPLC. Las actividades relativas se calcularon al dividir la cantidad de Cbz-Val-Phe-OH (mmol) obtenida por la hidrólisis con Alcalase-CLEA-OM que se había tratado con disolvente orgánico por la cantidad de Cbz-Val-Phe-OH (mmol) obtenida mediante hidrólisis con Alcalase-CLEA-OM x 100% no tratado.

45 Como se pudo observar en la figure 3 adjunta, Alcalase-CLEA-OM se había desactivado lentamente en disolventes orgánicos secos que contienen tamices moleculares 3A, se puede reactivar en solución tampón acuosa.

50 Ejemplo 11

Desactivación de enzima con varias cantidades de tamices moleculares y reactivación en solución tampón acuosa.

Desactivación

55 A cuatro mezclas idénticas de 10 mg Alcalase-CLEA-OM en 0.5 mL diclorometano se añadió, respectivamente, 10, 20, 30 y 50 mg tamices moleculares (3A). Las mezclas fueron agitadas por 20 h a 37 °C con 200 rpm. Posteriormente, se añadió 0.5 mL diclorometano conteniendo 0.2 mM Cbz-Phe-OCam y 0.3 mM H-Phe-NH₂ y la mezcla de reacción se agitó a 37 °C con 200 rpm. Se tomaron muestras después de 1h y las conversiones de Cbz-Phe-Phe-NH₂ fueron determinadas por HPLC. Las actividades relativas se calcularon al dividir la cantidad de Cbz-Phe-Phe-NH₂ (mmol) obtenida por la reacción de acoplamiento enzimático por la cantidad de Cbz-Phe-Phe-NH₂ (mmol) obtenida por la reacción de acoplamiento enzimático con la mayor conversión (es decir, en el caso de 10 mg de tamices moleculares) x 100%.

60 Síntesis de Cbz-Phe-Phe-NH₂ mediante el uso de Alcalase-CLEA-OM la cual se ha desactivado con varias cantidades de tamices moleculares.

Alcalase-CLEA-OM tratado con	Actividad Relativa (%)
10 mg tamices moleculares	100
20 mg tamices moleculares	82
30 mg tamices moleculares	69
50 mg tamices moleculares	58

Como se pudo ver en la tabla anterior, condiciones demasiado secas debido al uso de grandes cantidades de tamices moleculares puede conducir a un alta desactivación de la enzima.

Reactivación

De las cuatro mezclas de reacción anteriores el diclorometano se evaporó mediante el uso de flujo de nitrógeno. posteriormente, se añadió 1 mL de tampón de fosfato 100 mM(pH 8) que contiene 5 mg de Cbz-Asn-OMe y las mezclas de reacción se agitaron a 37°C con 200 rpm. Se toman muestras después de 1 h y la conversión de Cbz-Asn-OH se determinó mediante el uso de HPLC. Las actividades relativas se calcularon al dividir la cantidad de Cbz-Asn-OH (mmol) obtenida por la hidrólisis enzimática por la cantidad de Cbz-Asn-OH (mmol) obtenida por hidrólisis enzimática con la mayor conversión (es decir, en el caso de 50 mg de tamices moleculares) x 100%.

Hidrólisis de Cbz-Asn-OMe mediante el uso de Alcalase-CLEA-OM que se ha desactivado con varias cantidades de tamices moleculares.

Mezcla de reacción que contiene	Actividad Relativa (%)
10 mg tamices moleculares	87
20 mg tamices moleculares	93
30 mg tamices moleculares	97
50 mg tamices moleculares	100

Como se pudo observar en la tabla anterior, las actividades Alcalase-CLEA-OM son comparables e independientes de su grado de desactivación previo, lo que muestra que la actividad enzimática puede recuperarse en solución acuosa.

Funciones que se usan en lista de secuencias:

Ac = acetilo

Boc = ter.-butiloxicarbonilo

NH₂ = amina

Ocam = carboxamidometil éster

OtBu = terc.butil éster

Pbf = 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzo-furan-5-sulfonilo

TBu = tert.butilol

Tmob = 2,4,6-trimetoxibencilo

Trt = tritilo

Xan = xantenilo

Figuras:

Figura 1: Efecto del contenido de agua en la relación síntesis/hidrólisis (S/H) de Alcalase-CLEA-OM.

Figura 2: Desactivación de Alcalase-CLEA-OM en tres disolventes orgánicos diferentes (mezclas) que contienen tamices moleculares 3A .

Figura 3: Reactivación de Alcalase-CLEA-OM en solución acuosa de tampón.

Figura 4: La cantidad de solución Hydranal 2 según su consumo en el tiempo.

Listado de secuencias

- <110> DSM IP Assets BV
- 5 <120> Condensación de fragmento oligopéptido de cadena lateral protegida mediante el uso de Subtilisinas en disolventes orgánicos
- <130> 28490-EP-EPA
- 10 <140>
- <141>
- <160> 51
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Completamente Sintetizada
- 25 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> Ac
- 30 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> OtBu
- 35 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (3)..(3)
- <223> tBu
- 40 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (4)..(4)
- <223> Boc
- 45 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (5)..(5)
- <223> Trt
- 50 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (5)..(5)
- <223> OCam
- 55 <400> 1
- Asp Leu Ser Lys Gln**
- 1 5**
- <210> 2
- <211> 5
- <212> PRT
- 60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Completamente Sintetizada

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> OtBu

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

20 <220>
 <221> MOD_RES

 <222> (4)..(4)
 <223> Boc

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xan

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam

35 <400> 2

Asp Leu Ser Lys Gln
 1 5

40 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> OtBu

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

 <220>
 <221> MOD_RES

<222> (4)..(4)
 <223> Boc

5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam

10
 <400> 3
Asp Leu Ser Lys Gln
1 5
 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada
 <220>
 20
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> OtBu

30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Boc

35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam

40
 <400> 4
Phe Ile Glu Trp Leu
1 5
 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

55
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> tBu

60
 <220>
 <221> MOD_RES

<400> 8

Leu Asp Gln Ser Gln
1 5

5 <210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> tBu

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Pbf

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> NH2

<400> 9

Phe Val Gly Ser Arg
1 5

30 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> OtBu

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> OtBu

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> OtBu

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> NH2

60 <400> 10

	Met Glu Glu Glu Ala
	1 5
5	<210> 11 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Completamente Sintetizada
15	<220> <221> MOD_RES <222> (1)..(1) <223> tBu
20	<220> <221> MOD_RES <222> (2)..(2) <223> Boc
25	<220> <221> MOD_RES <222> (3)..(3) <223> Trt
30	<220> <221> MOD_RES <222> (5)..(5) <223> OtBu
35	<220> <221> MOD_RES <222> (5)..(5) <223> NH2
	<400> 11
	Ser Lys Gln Met Glu
	1 5
40	<210> 12 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial
45	<220> <223> Completamente Sintetizada
50	<220> <221> MOD_RES <222> (4)..(4) <223> OtBu
55	<220> <221> MOD_RES <222> (5)..(5) <223> Boc
60	<220> <221> MOD_RES

<222> (5)..(5)
 <223> NH2

 <400> 12
 5
Leu Phe Ile Glu Trp
1 5

 <210> 13
 <211> 4
 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Completamente Sintetizada
 15

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Boc
 20

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu
 25

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> NH2
 30

 <400> 13

Trp Met Asp Phe
1
 35
 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40

 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> tBu
 45

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> tBu
 50

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu
 55

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> NH2
 60

<400> 14
Glu Glu Glu Ala Val
1 5
 5
 <210> 15
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> OtBu
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Boc
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Trt
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam
 45
 <400> 15
Asp Leu Ser Lys Gln
1 5
 50
 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada
 60
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> OtBu

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Boc

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam

25 <400> 16
Asp Leu Ser Lys Gln
1 5
 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> tBu

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> tBu

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> OtBu

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> tBu

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Boc

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (7)..(7)
 <223> OCam

 <400> 17
 5
Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln
1 5

 <210> 18
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 15 <223> Completamente Sintetizada

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 20 <223> Ac

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 25 <223> tBu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 30 <223> tBu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 35 <223> tBu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 40 <223> OtBu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 45 <223> tBu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 50 <223> Boc

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 55 <223> OCam

 <400> 18

Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln
1 5
 60
 <210> 19
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Completamente Sintetizada

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

15

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> OtBu

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Trt

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> tBu

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam

<400> 19

35

Leu Asp Gln Ser Gln
1 5

40

<210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Completamente Sintetizada

50

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

55

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> tBu

60

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> tBu

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OtBu

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> tBu

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Boc

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> OCam

<400> 20

25 **Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln**
1 5
 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> OtBu

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

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> OtBu

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> NH2

<400> 21

55 **Met Glu Glu Glu Ala**
1 5
 <210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

<222> (10)..(10)
 <223> NH2

 <400> 23
 5
Ala Met Val Ser Tyr Pro Arg Glu Asn His
1 5 10

 <210> 24
 <211> 10
 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Completamente Sintetizada
 15

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac
 20

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> OtBu
 25

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu
 30

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Boc
 35

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Trt
 40

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> OtBu
 45

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> OtBu
 50

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> OtBu
 55

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> NH2
 60

 <400>24
Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala
1 5 10

<210> 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> OtBu
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Boc
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> OtBu
 35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> OtBu
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> OtBu
 45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> NH2
 50
 <400> 25
 Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala
 1 5 10
 55
 <210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Ac

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> tBu

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> tBu

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> OtBu

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> tBu

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Boc

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> OtBu

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> OtBu

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> OtBu

50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> NH2

<400> 26

Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala
1 5 10

55 <210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Completamente Sintetizada

ES 2 531 054 T3

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Ac

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> tBu

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> tBu

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> tBu

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> OtBu

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> tBu

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Boc

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> OtBu

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> OtBu

50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> OtBu

55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> NH2

<400> 27

Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu Glu Ala
1 5 10

60 <210> 28
<211> 10

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Completamente Sintetizada

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

15

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> OtBu

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Trt

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> tBu

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> tBu

35

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Pbf

40

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> NH2

<400> 28

45

Leu	Asp	Gln	Ser	Gln	Phe	Val	Gly	Ser	Arg
1				5					10

<210> 29
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Completamente Sintetizada

55

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

60

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> tBu

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> tBu

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> tBu

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> OtBu

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> tBu

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Boc

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> tBu

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (14)..(14)
<223> tBu

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Pbf

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> tBu

50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> trt

55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> trt

60 <220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> NH2

<400> 29

ES 2 531 054 T3

Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Ala Met Val Ser Tyr Pro Arg
 1 5 10 15

Glu Asn His

5 <210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> OtBu

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Boc

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Trt

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam

<400> 30

Asp Leu Ser Lys Gln
 1 5

45 <210> 31
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> OtBu

10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Boc

20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Trt

25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam-Leu-NH2

30
 <400> 31
Asp Leu Ser Lys Gln
1 5

35
 <210> 32
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> OtBu

55
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

60
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Boc

65
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Xan

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam
 5
 <400> 32

Asp Leu Ser Lys Gln
1 5
 10
 <210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac
 20

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> OtBu
 25

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu
 30

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Boc
 35

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Trt
 40

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam
 45
 <400> 33

Asp Leu Ser Lys Gln
1 5
 50
 <210> 34
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada
 60
 <220>
 <221> MOD_RES

<222> (1)..(1)
 <223> Ac

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> OtBu

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

15

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Boc

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Tmob

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam

30

<400> 34
Asp Leu Ser Lys Gln
1 5

35

<210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Completamente Sintetizada

45

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

50

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> OtBu

55

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

60

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Boc

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (5)..(5)
 <223> OCam
 <400> 35

5 **Asp Leu Ser Lys Gln**
 1 5

<210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> tBu

25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> tBu

30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> OtBu

35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> tBu

40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Boc

45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> OCam

50 <400> 36

Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln
 1 5

55
 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> tBu

15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> tBu

25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OtBu

30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> tBu

35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Boc

40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> OCam

<400> 37

Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln
1 5

45
 <210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

55
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

60
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> tBu

5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> tBu

15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> tBu

20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> OtBu

25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> tBu

30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Boc

35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> OCam

<400> 38

Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Leu	Ser	Lys	Gln
1				5					10	

40
 <210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

55
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> OtBu

60
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Boc

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam
 5
 <400> 39

Phe Ile Glu Trp Leu
1 5
 10
 <210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac
 20

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> tBu
 25

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Boc
 30

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Trt
 35

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam
 40
 <400> 40

Leu Ser Lys Gln Met
1 5
 45
 <210> 41
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac
 55

 <220>
 <221> MOD_RES
 60

<222> (1)..(1)
 <223> OtBu

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> OtBu

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Pbf

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam

20 <400> 41
Glu Glu Ala Val Arg
1 5

25 <210> 42
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> tBu

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> OtBu

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam

<400> 42
Phe Thr Ser Asp Leu
1 5

60 <210> 43
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Completamente Sintetizada

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

15

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> OtBu

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Trt

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> tBu

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam

<400> 43

35

Leu Asp Gln Ser Gln
1 5

40

<210> 44
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Completamente Sintetizada

50

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ac

55

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Trt

60

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Boc

60

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> OtBu

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OCam

<400> 44

15 **His Lys Thr Asp Ser**
1 5

<210> 45
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> tBu

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Pbf

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> NH2

40 <400> 45

Phe Val Gly Ser Arg
1 5

45 <210> 46
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> tBu

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Boc

5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Trt

10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> OtBu

15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> NH2

20
 <400> 46

Ser Lys Gln Met Glu
1 5

25
 <210> 47
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> OtBu

40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Boc

45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> NH2

50
 <400> 47

Leu Phe Ile Glu Trp
1 5

55
 <210> 48
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

65
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Boc

70
 <220>
 <221> MOD_RES

<222> (2)..(2)
 <223> Trt

5
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> NH2

10
 <400> 48
Lys Asn Gly Gly Pro
1 5

15
 <210> 49
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Boc

30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

35
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> NH2

40
 <400> 49
Trp Met Asp Phe
1

45
 <210> 50
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

55
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> tBu

60
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> tBu

60
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> tBu

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> NH2

<400> 50

Glu Glu Glu Ala Val
1 5

10 <210> 51
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Completamente Sintetizada

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> tBu

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> tBu

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Pbf

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> tBu

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> trt

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> trt

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> NH2

<400> 51

Ala Met Val Ser Tyr Pro Arg Glu Asn His
1 5 10

55

Reivindicaciones

- 5 1. Método para la síntesis enzimática de un oligopéptido, que comprende acoplar
- 10 i.) un éster de oligopéptido que comprende 4 o más residuos de aminoácidos,
- 15 – que comprende al menos dos residuos de aminoácidos cada uno con una funcionalidad de cadena lateral que está protegida con un grupo protector, y que comprende un éster C-terminal activado representado por la fórmula $C(=O)-O-CX_2-C(=O)N-R_1R_2$, en donde cada X representa independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo o un grupo arilo y R_1 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo o un grupo arilo y R_2 representa un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo o un grupo arilo o un aminoácido o un residuo de péptido con una funcionalidad de carboxiamida C-terminal o de ácido carboxílico, opcionalmente protegida en la funcionalidad de cadena lateral del residuo de aminoácido o uno o más de las funcionalidades de cadenas laterales del residuo de péptido,
- 20 – y en donde el éster de oligopéptido opcionalmente comprende una protección N-terminal,
- 25 con
- 30 ii.) un nucleófilo de oligopéptido que comprende 4 o más residuos de aminoácidos,
- que comprende un grupo amina N-terminal, y al menos dos residuos de aminoácidos cada uno con una funcionalidad de cadena lateral, que está protegida con un grupo protector y
- en donde el nucleófilo de oligopéptido opcionalmente comprende protección C-terminal,
- cuyo acoplamiento se lleva a cabo en un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos que comprende 0.1 % vol o menos de agua con relación a la cantidad total de líquidos en la cual tiene lugar predominantemente la reacción de acoplamiento, en presencia de una subtilisina y en donde se elimina el agua que se libera por la enzima durante la reacción de acoplamiento.
- 35 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el éster de oligopéptido se obtuvo mediante la síntesis en fase sólida mediante el uso de un conector.
- 40 3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el conector es un conector Sieber o Ramage.
- 45 4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde al menos 50% de todas las funcionalidades de cadena lateral están protegidas.
- 50 5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde cada X representa un átomo de hidrógeno.
- 55 6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde ambos R_1 y R_2 representan un átomo de hidrógeno.
- 60 7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde R_1 representa un átomo de hidrógeno y R_2 representa un residuo de aminoácido o residuo de péptido con una funcionalidad de carboxiamida o ácido carboxílico C-terminal, opcionalmente protegida en la funcionalidad de cadena lateral del residuo de aminoácido o en una o más funcionalidades de cadena lateral del residuo de péptido.
8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde todas las funcionalidades de cadena lateral del éster de oligopéptido y el nucleófilo de oligopéptido están protegidos excepto la funcionalidad de cadena lateral del residuo de aminoácido C-terminal del éster de oligopéptido.
9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la subtilisina es un mutante de una subtilisina silvestre.
10. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la subtilisina se usa en una forma inmovilizada.
11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la subtilisina se inmoviliza en forma de un agregado enzimático reticulado (CLEA).

12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el disolvente orgánico o la mezcla de disolventes orgánicos comprende MTBE, THF, Me-THF, 1,2-dimetoxietano, diclorometano, 1,2-dicloroetano, TFE, DMF, NMP, DMA o DMSO.
- 5 13. Método de acuerdo a reivindicación 12, en donde el disolvente orgánico o la mezcla de disolventes orgánicos comprende MTBE, una mezcla de MTBE con DMF o NMP o DMA o DMSO, diclorometano o una mezcla de diclorometano con DMF o NMP o DMA o DMSO.
- 10 14. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el disolvente orgánico o la mezcla de disolventes orgánicos tiene un contenido de agua de 0.05 %vol o menor.
- 15 15. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el agua que se libera por la enzima se elimina continuamente.
- 20 16. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el agua que se libera por la enzima se elimina mediante el uso de tamices moleculares.
17. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la reacción de acoplamiento se realiza en la ausencia de una sal.

FIG 1/4

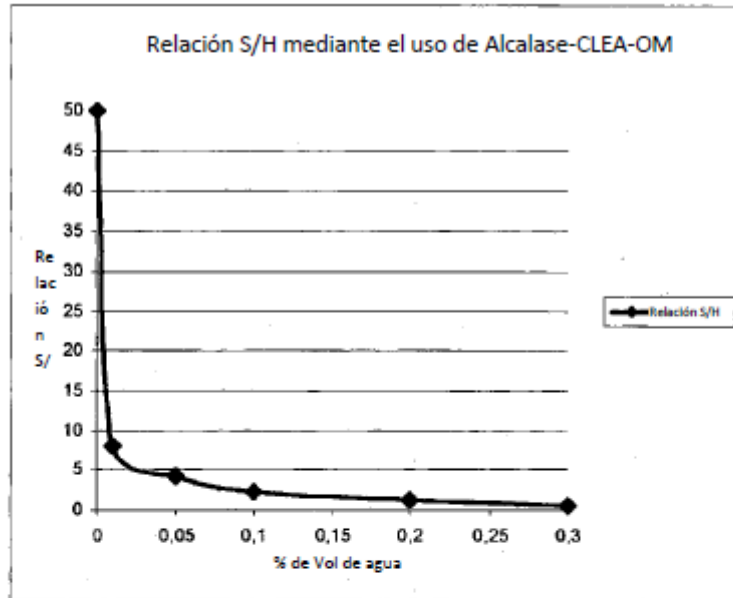


FIG 2/4

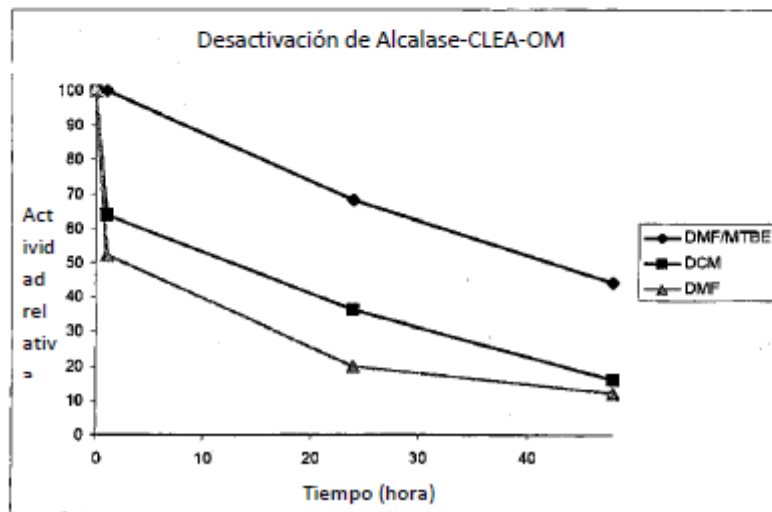


FIG 3/4

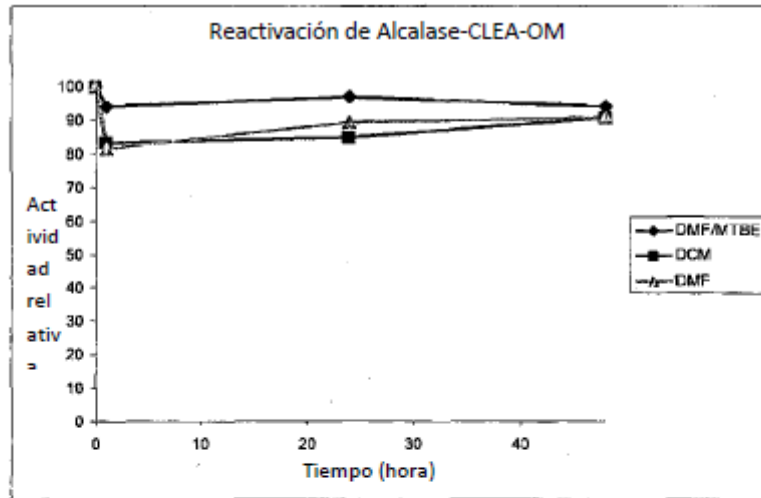


FIG 4/4

