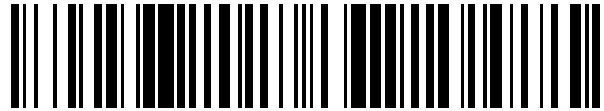


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 638**

51 Int. Cl.:

C07K 1/00 (2006.01)

C07K 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2012 E 12705265 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2675823**

54 Título: **Procedimiento de preparación de péptidos mediante el ensamblaje de múltiples fragmentos peptídicos**

30 Prioridad:

16.02.2011 FR 1151279

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.07.2015

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR y
UNIVERSITÉ DE LILLE 1 SCIENCES ET
TECHNOLOGIES (50.0%)**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 541 638 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).

Procedimiento de preparación de péptidos mediante el ensamblaje de múltiples fragmentos peptídicos**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La presente invención concierne a un procedimiento de preparación de péptidos o de polipéptidos mediante el ensamblaje de múltiples fragmentos peptídicos, utilizando la unión natural de los polipéptidos. La invención concierne igualmente a la preparación de los intermedios utilizados en este procedimiento y a dichos intermedios preparados mediante el procedimiento.

Antecedentes tecnológicos

La síntesis de polipéptidos mediante los métodos convencionales en fase sólida, de aminoácido por aminoácido, está limitada por unos bajos rendimientos cuando los polipéptidos sintetizados son de gran tamaño. Con el fin de superar esta limitación, se conoce el ensamblaje de dos polipéptidos mediante una unión química con el fin de producir un polipéptido más largo.

La síntesis total de polipéptidos es cada vez más útil para la preparación de proteínas con unas estructuras bien definidas. Los métodos de unión química aportan una respuesta a esta necesidad, no obstante parecen estar limitados en su empleo y en su aplicación industrial.

De forma general, en estos métodos se desea que la conexión entre los polipéptidos ensamblados mediante un enlace sea natural, es decir, que se corresponda con la estructura natural de polipéptidos.

El principal método de unión natural que existe hoy en día es el de Kent y Dawson, que se describe, por ejemplo, en las solicitudes internacionales WO 96/34878 y WO 98/28434. Este método se basa en una reacción quimioselectiva entre un péptido tioéster (en C terminal) y un cisteinil-péptido. No obstante, el principal inconveniente de este método es la fabricación de los péptidos tioésteres, que necesita unos procedimientos químicos complejos. Particularmente, según un modo de ensamblaje descrito por S. Kent (Kinetically Controlled Ligation (KCL)), es necesaria la síntesis de los fragmentos A-SAr, H-Cys-B-SAlk y H-Cys-C. No obstante, los fragmentos de tipo A-SAr son difíciles de producir y resultan ser muy sensibles a la hidrólisis. Además, este procedimiento no permite ir más allá del ensamblaje de 3 fragmentos.

Un método alternativo es la unión denominada de Staudinger, descrita en las solicitudes internacionales WO 01/68565 y WO 01/87920. Esta comprende la reacción de un fosfotioéster con una azida y la hidrólisis de los reactivos combinados para formar un enlace amida. No obstante, este método es difícilmente aplicable a escala industrial.

Otro método, descrito en la solicitud internacional WO 2007/037812, reposa en la reacción de un α -cetoácido con una alcoxiamina en una reacción de condensación descarboxilativa. Sin embargo, los cetoácidos son unas moléculas que son difíciles de fabricar y de incorporar en los péptidos. También, este tercer método es difícilmente aplicable en los laboratorios de síntesis peptídica que no dispongan de medios para la realización de unas síntesis orgánicas complejas.

La publicación de D. Bang, B. L. Pentelute and S. B. H. Kent, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 3985 - 3988 propone una vía de síntesis que hace intervenir péptido-(tiofenilésteres) con Cys-péptido-tioésteres, y la publicación de W. Hou y coll., *Org Lett.*, (2010), 22 de diciembre de 2010, propone la formación de péptidos tioésteres para la síntesis de proteínas. No obstante, estos métodos no pueden impedir la competición entre las reacciones de los diferentes tioésteres, que conducen inevitablemente a unas mezclas que pueden ser difícilmente separables, y que afectan por tanto a la pureza del producto final obtenido, y a unas pérdidas inevitables de rendimiento.

Finalmente, la publicación de O. Melnyk y coil., *Org. Lett.*, 12 (22), 5238 - 41 (2010) describe la unión natural de los péptidos mediante fragmentos de péptido-bis(sulfaniletíl)amino. No obstante, este método no ha sido utilizado nunca, a día de hoy, para la síntesis de péptidos de múltiples fragmentos.

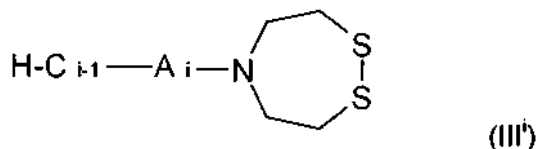
La transposición a escala industrial de los procedimientos que permitan la implementación de las síntesis peptídicas mediante una síntesis total es una necesidad que requiere encontrar unos procedimientos simples, poco costosos, que produzcan unos productos de calidad con una pureza elevada, y razonables con respecto a la higiene industrial.

Por las razones sindicadas anteriormente, se ha vuelto indispensable encontrar un procedimiento de síntesis total, convergente e industrializable, que permita la síntesis de una cadena peptídica de la longitud y la naturaleza deseadas. Particularmente, un procedimiento que implique un ensamblaje del N-terminal hacia el C-terminal, que ofrezca unas características de simplicidad de realización y de pureza de los péptidos o de los polipéptidos obtenidos.

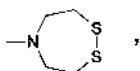
Descripción de la invención

Se ha averiguado, lo que supone el objeto de la presente invención, que el ensamblaje de múltiples fragmentos peptídicos en un método en *one-pot* que implica métodos simples tales como la formación de péptidos-tioésteres y la unión natural, podría conducir a un procedimiento de síntesis total, convergente, industrializable y que responda a los criterios de pureza requeridos.

Según la invención, el procedimiento de ensamblaje implica la síntesis de péptido-tioésteres, su reacción de condensación con un péptido (o polipéptido) portador de una función bis(2-sulfaniletíl)amino en un estado de disulfuro cíclico, que responde a la fórmula general:



en la que A_i representa un fragmento peptídico cuyo C-terminal porta un grupo bis(2-sulfaniletíl)amino cíclico

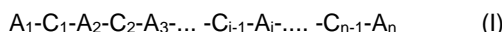


denominado en lo sucesivo SEAoff, y C_{i-1} representa un residuo de aminoácido portador de una función tiol, así como la unión química natural en un medio productor, a nivel del C-terminal, de los polipéptidos obtenidos.

Se entiende que el término SEAoff significa el disulfuro cíclico no reactivo, por oposición al disulfuro reactivo de estructura $-N[(CH_2)_2-SH]_2$ denominado en lo sucesivo SEAon.

Se entiende que el aminoácido portador de una función tiol representado por C_{i-1} puede elegirse particularmente de entre cisteína, homocisteína y que estos aminoácidos portan un residuo de disulfuro (SR') en el tiol del aminoácido, en la realización de la reacción con el péptido-tioéster.

Según la invención, el procedimiento 78 conduce a la preparación de un ensamblaje peptídico múltiple que comprende residuos de aminoácidos portadores de una función tiol, es decir, un ensamblaje peptídico de n fragmentos y de $n-1$ aminoácidos portadores de una función tiol, representado por la fórmula:



en la que $A_1, A_2, A_3, ... A_i, ... A_n$ son fragmentos peptídicos, $C_1, C_2, C_3, ... C_{i-1}, ... C_{n-1}$ son residuos de aminoácidos portadores de una función tiol, n está comprendido entre 3 y 50, preferentemente entre 3 y 20, o de una forma más preferente entre 3 y 10, e i es un número entero cualquiera comprendido entre 2 y n .

Se entiende que, cuando $n = 3$, $C_{n-1}-A_n$ representa C_2-A_3 y $C_{i-1}-A_i$ representa C_1-A_2 . En ese caso, el ensamblaje peptídico de fórmula (I) tiene la estructura: $A_1-C_1-A_2-C_2-A_3$.

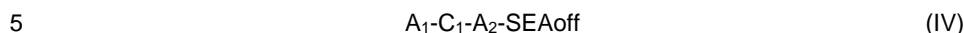
El procedimiento según la invención consiste en la preparación de un péptido-tioéster de fórmula:



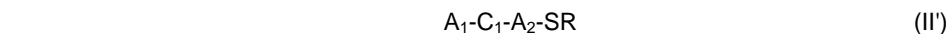
en la que A_1 es un fragmento peptídico y SR es el residuo de un tioéster alquilado, pudiendo ser R un radical alquilado eventualmente sustituido, a partir de un bis(2-sulfaniletíl)amino péptido $A_1-SEAoff$ en el que SEAoff se define como anteriormente, mediante la acción de un tiol R-SH, en presencia de un agente reductor de disulfuros cíclicos, seguido de la condensación con un fragmento peptídico de estructura:



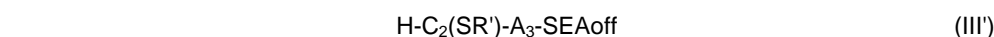
en la que C_1 , A_2 y SEAoff se definen como anteriormente, y (SR') representa un residuo de disulfuro en el tiol del aminoácido C_1 , en presencia de un tiol aromático ArSH, y después la transformación del nuevo fragmento peptídico obtenido, de estructura:



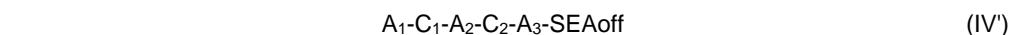
en la que A_1 , C_1 , A_2 y SEAoff se definen como anteriormente, en un péptido-tioéster de fórmula:



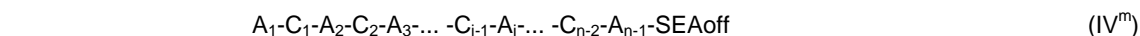
en la que A_1 , C_1 , A_2 y R se definen como anteriormente, mediante la acción de un tiol R-SH, en presencia de un agente reductor de disulfuros cíclicos, seguido de la condensación con un fragmento peptídico de estructura:



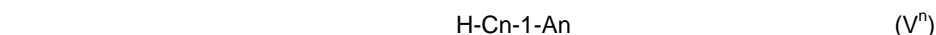
en la que SEAoff y R' y C_2 y A_3 se definen como anteriormente, en presencia de un tiol aromático ArSH, para dar un fragmento peptídico, de estructura:



en la que A_1 , C_1 , A_2 , C_2 , A_3 y SEAoff se definen como anteriormente, y después la repetición de estas 2 operaciones hasta n-2 veces, para obtener un fragmento peptídico de estructura:



en la que A_1 , A_2 , $A_3,...$ $A_i,...$, A_{n-1} , C_1 , C_2 , $C_3,...$ $C_{i-1},...$ C_{n-2} y SEAoff se definen como anteriormente, y se lleva a cabo una reacción de unión natural de este fragmento peptídico (IV^m) obtenido, con un péptido de fórmula:



en la que C_{n-1} y A_n se definen como anteriormente, mediante una reducción en presencia de un agente reductor de disulfuros cíclicos, para dar el ensamblaje peptídico múltiple de fórmula general (I).

Descripción de los modos de realización de la invención

35 La invención se describirá ahora con más detalle y de forma no limitante en la descripción que sigue.

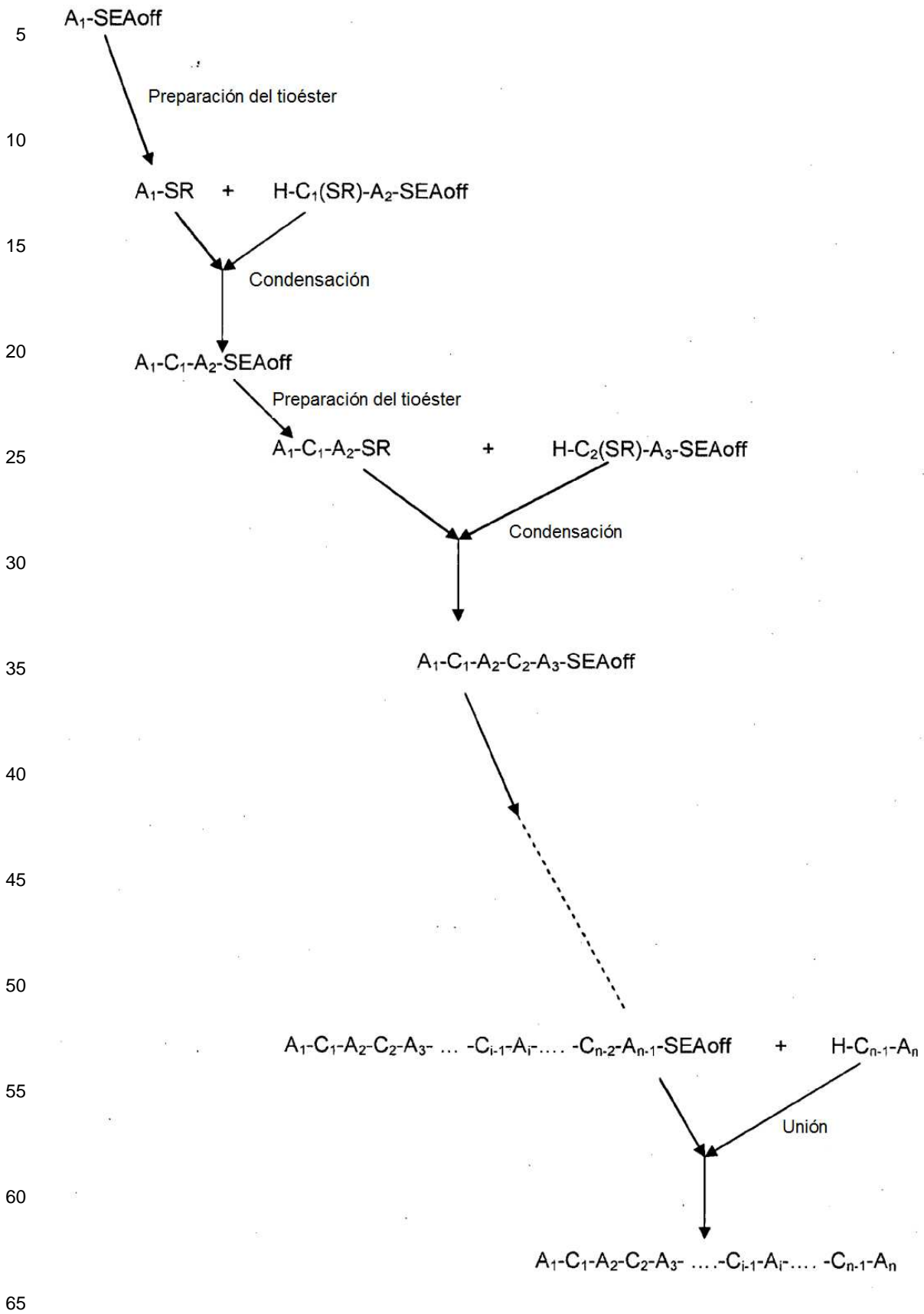
Por "péptidos o polipéptido" se entiende, en el marco de la presente solicitud, una cadena lineal de residuos de aminoácidos (en un número superior o igual a dos) unidos por enlaces peptídicos. Los "péptidos o polipéptidos" en el sentido de la presente solicitud pueden ser por lo tanto, por ejemplo, oligopéptidos, péptidos o proteínas según la acepción convencional de estos términos. Los residuos de aminoácidos presentes en los polipéptidos según la invención pueden elegirse de entre los residuos de aminoácidos proteinogénicos o no. Preferentemente, se eligen de entre los veinte residuos de aminoácidos proteinogénicos.

45 La notación de los polipéptidos se efectúa desde el extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal. Los residuos de aminoácidos presentes a lo largo de la cadena polipeptídica se indican según el código habitual de una letra o de tres letras. Un residuo de aminoácido es un fragmento de un polipéptido de fórmula -NH-(CH-R)-(C=O)-, en la que R representa una cadena lateral, diferente entre un aminoácido y otro.

50 Por "fragmento peptídico" se entiende, en el marco de la presente solicitud, una porción de un polipéptido que comprende al menos un residuo de aminoácido. Un fragmento peptídico, en el sentido de la presente solicitud, puede ser por lo tanto, por ejemplo: una secuencia de residuos de aminoácidos (tales como -AHG- o -Ala-His-Gly-) si el fragmento peptídico no comprende el extremo N-terminal ni el extremo C-terminal del polipéptido; o bien una secuencia de residuos de aminoácidos que presenta un grupo en su extremo N-terminal (tal como H-AHG- o H-Ala-His-Gly-) si el fragmento peptídico comprende el extremo N-terminal del polipéptido; o bien una secuencia de residuos de aminoácidos que presenta un grupo en su extremo C-terminal (tal como -AHG-OH o -Ala-H is-Gly-OH) si el fragmento peptídico comprende el extremo C-terminal de polipéptido.

60 Se entiende que cada uno de los fragmentos peptídicos comprende preferentemente únicamente residuos de ácidos elegidos de entre los 20 residuos de aminoácidos proteinogénicos. Sin embargo, según un modo de realización particular, los fragmentos peptídicos A_i en una posición interna de la secuencia pueden comprender también uno o varios residuos de aminoácidos no proteinogénicos, pudiendo portar uno o varios de los fragmentos peptídicos $A_2,...$ $A_i,...$ A_{n-1} uno o varios aminoácidos modificados, llevándose a cabo la modificación preferentemente previamente a la realización procedimiento. A modo de ejemplo, no limitante, la modificación de los aminoácidos puede elegirse particularmente de entre los radicales elegidos de entre residuos de ácidos carboxílicos (biotina, grupo acetilo, residuo aminooxiacético, un fluoróforo tal como la tetrametilrodamina, un agente quelante de metales tal como el

Esquema 1



El conjunto de las reacciones de preparación del ensamblaje peptídico múltiple presenta la gran ventaja de poderse llevar a cabo *in situ*, en una reacción en "one pot", particularmente cuando el número de fragmentos peptídicos n es igual a 3, sin que sea necesario aislar los intermedios formados.

- 5 La realización del procedimiento según la invención puede realizarse como se describe a continuación, y como se ilustra en los ejemplos que siguen.

10 La preparación de los péptidos tioésteres de fórmula (II) se lleva a cabo ventajosamente mediante la acción de un alquiltiol cuya parte de alquilo está eventualmente sustituida con un bis(2-sulfaniletíl)amino péptido : A_1 -SEAoff, en presencia de un reductor de disulfuros cíclicos, tal como, particularmente una fosfina, por ejemplo, la tris(2-carboxietil)fosfina. La reacción se lleva a cabo ventajosamente bajo una atmósfera inerte (bajo argón, por ejemplo), a un pH comprendido entre 1 y 8 preferentemente a pH 4, y a una temperatura comprendida entre 20 y 50 °C. Ventajosamente se utiliza el ácido 3-mercaptopropiónico.

15 La condensación del tioéster de fórmula (II) con el fragmento peptídico de fórmula general (III): $H-C_1(SR^i)-A_2$ -SEAoff, se lleva a cabo ventajosamente en presencia de un tiol aromático (particularmente, el ácido 4-mercaptofenilacético), operando bajo una atmósfera inerte (bajo argón, por ejemplo), a una temperatura comprendida entre 20 y 60 °C. No es necesario aislar el fragmento peptídico obtenido para su utilización en la siguiente en la reacción.

20 La reacción de unión natural del fragmento peptídico (IV^m) ($A_1-C_1-A_2-C_2-A_3\text{--}\dots-C_{i-1}-A_{i-1}\text{--}\dots-C_{n-2}-A_{n-1}$ -SEAoff) con el péptido (V^n) ($H-C_{n-1}-A_n$) se lleva a cabo mediante la acción de un agente reductor de disulfuros cíclicos, que puede ser preferentemente una fosfina (por ejemplo, la tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP)), un compuesto tiol tal como el ácido 4-mercaptofenilacético (MPAA), el ditioneitol (DTT), el tienofenol (y sus derivados), un alquiltiol (particularmente el bencilmercaptano) o incluso mezclas de varios de estos compuestos, por ejemplo, de MPAA y TCEP, operando
25 bajo una atmósfera inerte (bajo argón, por ejemplo), a una temperatura comprendida entre 20 y 60 °C, preferentemente a una temperatura de 37 °C. La reacción se lleva a cabo particularmente en medio acuoso, por ejemplo, en un tampón de fosfato. Se realiza, preferentemente, a un pH comprendido entre 5,5 y 8,5, de la forma más particularmente preferente a un pH comprendido entre 6 y 8, e idealmente a un pH cercano a 7. La duración de la reacción es función de los reactivos empleados, se le realiza un seguimiento y se ajusta según los resultados de
30 un análisis mediante una cromatografía líquida. No es necesario aislar el fragmento peptídico obtenido (IV^m), para utilizarlo en la reacción de unión natural. Se entiende que la reacción del reductor de disulfuros cíclicos puede llevarse a cabo con el fragmento peptídico de fórmula (IV^m) antes de, o simultáneamente con, la reacción con el péptido de fórmula (V^n).

35 Según un modo de realización particular, los fragmentos peptídicos de fórmula (IV^m) y (V^n) comprenden uno o varios residuos de aminoácidos no proteinogénicos.

40 Los residuos de aminoácidos de los polipéptidos de fórmula (IV^m) y (V^n) pueden eventualmente estar protegidos por grupos protectores de las cadenas laterales. La protección y la eliminación de los radicales protectores pueden llevarse a cabo según los métodos conocidos que no alteran el resto de la molécula. Más particularmente, según los métodos descritos por T. Greene y P. Wuts, Protective groups in organic synthesis, 2ª edición, John Wiley & Sons, Inc.

45 La preparación de bis(2-sulfaniletíl)amino péptido : A_1 -SEAoff puede llevarse a cabo según el método descrito por Melnyk, O. y coll., Bis(2-sulfanylethyl)amino native peptide ligation, Org. Lett., 12 (22), 5238 - 41(2010). Según la realización de este procedimiento, el acoplamiento de un aminoácido en un soporte de resina polimérica comprende la intervención de un soporte de resina polimérica con un halogenuro de un aminoácido, o con un aminoácido y un agente de activación, elegido preferentemente de entre el PyBOP® (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio), el BOP, el PiBroP® (hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidin-fosfonio), o incluso el HATU (hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio metanaminio) y de una forma más particularmente preferente, el PyBroP. Esta realización se describe con más detalle a continuación en los ejemplos de preparación de los fragmentos peptídicos de partida.

50 Particularmente, los péptidos- $N(CH_2CH_2SH)_2$ (péptidos SEAon) correspondientes son oxidados al aire, con agitación, en una solución de bicarbonato de amonio 0,1 M, a la temperatura ambiente. Ventajosamente, también pueden obtenerse mediante una oxidación en presencia de yodo o de diamida $(CH_3)_2NCON=NCON(CH_3)_2$.

60 El polipéptido de fórmula (V^n) puede obtenerse, por ejemplo, mediante un método de síntesis peptídica habitual, particularmente un método de síntesis en fase sólida. Igualmente puede obtenerse por medio de una unión natural, tal como la que se describe Org. Lett., 12 (22), 5238 - 41 (2010).

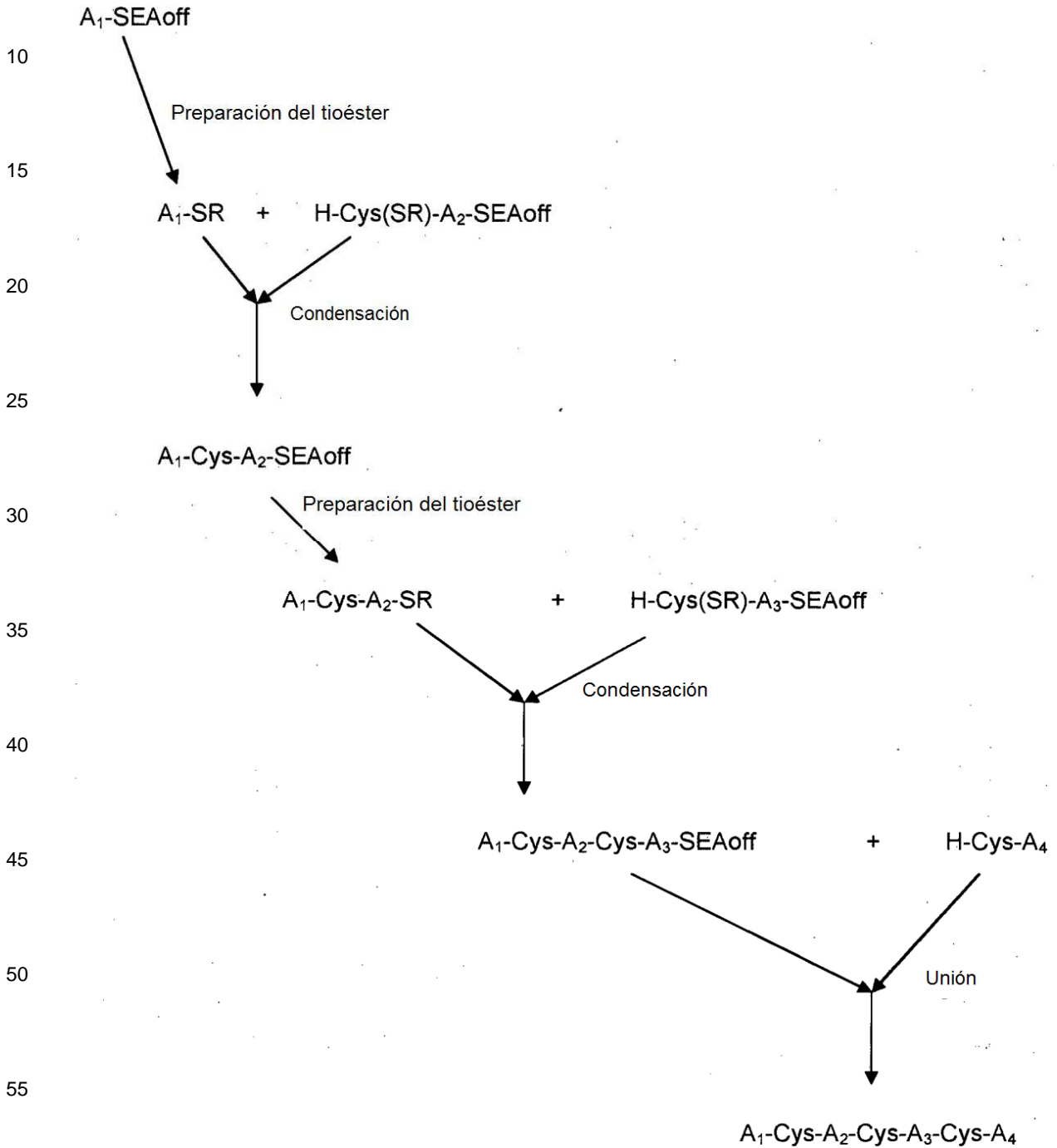
Según los modos preferentes de la presente invención, se prepara un ensamblaje peptídico de 3 o de 4 fragmentos, con las estructuras $A_1-C_1-A_2-C_2-A_3$ o $A_1-C_1-A_2-C_2-A_3-C_3-A_4$.

65 Según otro modo preferente de la invención, los aminoácidos C_i portadores de una función tiol son residuos de cisteína Cys.

En ese caso, según un modo de realización preferente de la invención, se prepara un ensamblaje peptídico con la estructura $A_1\text{-Cys-A}_2\text{-Cys-A}_3$ o $A_1\text{-Cys-A}_2\text{-Cys-A}_3\text{-Cys-A}_4$.

Según estos modos preferentes, el esquema de preparación del ensamblaje peptídico puede estar representado por el siguiente esquema 2:

Esquema 2



65

La presente invención concierne igualmente a la preparación de los péptido-tioésteres de fórmula (II) a partir de un bis(2-sulfaniletíl)amino péptido : A₁-SEAoff según el procedimiento descrito más arriba, mediante la acción de un tiol R-SH, en presencia de un agente reductor de disulfuros cíclicos. La invención concierne igualmente a los péptidos tioésteres así obtenidos.

5 Los polipéptidos de fórmula (I) obtenidos según la invención pueden ser utilizados para la producción de un banco de polipéptidos, por ejemplo, con fines de cribado.

10 Igualmente pueden utilizarse para la fabricación de composiciones farmacéuticas, en combinación con uno o con varios coadyuvantes o vehículos compatibles y farmacéuticamente aceptables. Como ejemplo de composiciones farmacéuticas que pueden ser obtenidas según la invención, se pueden citar los medicamentos utilizables en un ser humano o en un animal, y las preparaciones de vacuna.

15 Igualmente pueden utilizarse para la realización de kits de diagnóstico.

Según otro objeto de la presente invención, la invención concierne igualmente a un procedimiento de fabricación de una composición farmacéutica que comprende:

- 20 - la fabricación de un polipéptido o de un péptido según el procedimiento de fabricación de un polipéptido de fórmula (I) descrito anteriormente, y
- las composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido o un péptido así preparado, en estado puro o en asociación con uno o con varios coadyuvantes compatibles y farmacéuticamente aceptables.

25 La invención concierne igualmente a un procedimiento de fabricación de un dispositivo de diagnóstico que comprende:

- la fabricación de un polipéptido o de un péptido según el procedimiento de fabricación de un polipéptido de fórmula (I) descrito anteriormente, y
- 30 - la formulación o la preparación de este polipéptido en una forma adaptada para una utilización en un dispositivo de diagnóstico.

35 El procedimiento según la presente invención es particularmente interesante por el hecho de que permite sintetizar, en una síntesis total, una cadena peptídica con la longitud y la naturaleza deseadas, y que comprende motivos de aminoácidos con una sustitución tiol de tipo cisteína (Cys) o de homocisteína, repartidos en la cadena.

40 Presenta la ventaja de ser industrializable, por el hecho de la síntesis convergente de la que se trata, y este tipo de síntesis es particularmente buscado en materia de la industrialización de procedimientos, ya que procura unos rendimientos ventajosos, y particularmente hay pocas pérdidas de rendimiento en los productos de elaborados cuyo coste de síntesis ya es elevado.

Según la presente invención, los fragmentos SEA permiten la síntesis de proteínas partiendo del N-terminal hacia el C-terminal mediante la unión sucesiva de fragmentos peptídicos.

45 El ensamblaje del N-terminal hacia el C-terminal ofrece una ventaja considerable en comparación con la estrategia inversa de ensamblaje del C-terminal hacia el N-terminal, en efecto, en este caso, el procedimiento induce una autopurificación de los fragmentos peptídicos, lo que es considerablemente importante en la síntesis industrial.

50 Según otra ventaja, el procedimiento de la invención permite la utilización de los aminoácidos proteínogénicos para la síntesis de los fragmentos peptídicos. Por ello, es inútil recurrir a la fabricación de derivados de aminoácidos (tales como los cetoácidos, por ejemplo), lo que recargaría considerablemente la síntesis.

Los ejemplos que siguen ilustran la presente invención.

55 Ejemplo 1

Ensamblaje en *one-pot* de 3 fragmentos

60 **1-Síntesis del péptido 1 (H-ILKEPVHGA-S(CH₂)₂COOH)**, equivalente de **A₁-SR** con R = alquilo, mediante la transformación del **A₁-SEAoff** en presencia de un alquiltiol R-SH, R = -(CH₂)₂COOH y de un reductor de disulfuros cíclicos.

El péptido precursor H-ILKEPVHGA-SEAoff ha sido preparado como se describe en Ollivier N., Dheur J., Mhidia R., Blanpain A., and Melnyk O., Bis(2-sulfanylethyl)amino native peptide ligation., Org. Lett. 12 (22), 5238 - 41 (2010).

65 Se disuelve el clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina TCEP · HCl (921,2 mg) en tampón de fosfato 0,2 M a pH = 7,3 (40 ml). Se añade el ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) (2 ml) a esta solución. El pH de la solución se reajusta a 4

con sosa 5 N (aproximadamente 3 ml).

El péptido H-ILKEPVHGA-SEAoff (40,31 mg) se disuelve en la solución anterior (40 ml). El medio de reacción se coloca bajo una atmósfera inerte con 3 ciclos de vacío / argón, y se coloca en un baño a 37 °C.

5 Después de 22 horas, el medio de reacción es transferido a un embudo de decantación. Se añade una solución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) al 7 % (20 gotas). Se realizan 4 extracciones con éter dietílico. Se añade una solución acuosa de TFA al 7 % (10 ml) y se realizan 3 nuevas extracciones con éter dietílico.

10 La fase acuosa se desgasifica durante 13 minutos burbujando argón, antes de ser purificada mediante una RP-HPLC (columna C18 nucleosil de 120 Å, 5 µm, tampón A 100 % de agua que contiene un 0,05 % de TFA, tampón B CH₃CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA, gradiente: del 0 al 10 % de tampón B en 5 min, después del 10 al 100 % de tampón B en 150 min, caudal de 6 ml/min, 215 nm). Se obtienen 18,7 mg del péptido 1 (H-ILKEPVHGA-S(CH₂)₂COOH) puro (R = 47,4 %) C₄₇H₇₈N₁₂O₁₃S₁ MALDI- TOF [M + H]⁺ calculada (masa monoisotópica) 1.051,56; observada 1.051,70.

2-Síntesis del péptido 2 H-C(StBu)HHLEPGG-SEAoff, equivalente de H-C₁(SR)-A₂-SEAoff, con R = tBu

Síntesis clásica de un péptido-SEAoff a una escala de 0,25 mmol, según:

20 Ollivier N., Dheur J., Mhidia R., Blanpain A., and Melnyk O., Bis(2-sulfanylethyl)amino native peptide ligation., Org. Lett. 12 (22), 5238 - 41 (2010).

25 El residuo de disulfuro -S-t.Bu es acoplado por medio de Fmoc-Cys(St.Bu)-OH, de una forma análoga al método descrito en el ejemplo 2, a continuación.

30 La desprotección final y la ruptura de péptido de la resina se realizan con TFA / TIS / DMS / H₂O (90 / 2,5 / 2,5 / 5 / 2,5 en volumen, 25 ml) durante 1 h 30. El péptido se precipita en una mezcla fría de éter dietílico / heptano (1 / 1 en volumen), se disuelve en un mínimo de agua y se liofiliza. Se obtienen 132,6 mg del péptido en bruto (R = 38 %). C₄₃H₆₉N₁₃O₁₀S₄ MALDI-TOF [M + H]⁺ calculada (masa monoisotópica) 1.056,42; observada 1.056,10.

35 Una parte del péptido 2 se oxida a continuación antes de la purificación. Para ello se disuelven el fragmento 2 (122,6 mg) y I₂ (222,52 mg, 10 eq) en AcOH / agua 4 / 1 (12,5 ml). Después de 10 minutos de agitación, el medio de reacción diluido (volumen total = 37 ml) es transferido a un embudo de decantación que contiene éter dietílico (75 ml). Se realizan 3 extracciones con éter dietílico (3 x 75 ml). La fase acuosa se congela y se liofiliza para proporcionar 94,3 mg del péptido en bruto.

40 Después de la purificación mediante una RP-HPLC (columna C18 nucleosil de 120 Å, 5 µm, 215 nm, tampón A 100 % de agua que contiene un 0,05 % de TFA, tampón B CH₃CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA, gradiente: del 0 al 10 % de tampón B en 5 min, después del 10 al 100 % de tampón B en 150 min, caudal de 6 ml/min) se obtienen 40,52 mg del péptido puro (R = 33 %) C₄₃H₆₇N₁₃O₁₀S₄ MALDI-TOF [M + H]⁺ calculada 1.054,4 (masa monoisotópica); observada 1.054,4.

45 **3) A₁-SR (péptido 1) (R = CH₂CH₂CO₂H) + H-C₁(StBu)-A₂-SEAoff (péptido 2) → A₁-C₁-A₂-SEAoff**

50 Se disuelve el ácido 4-mercaptofenilacético (MPAA, 33,64 mg, 0,2 mmol, tiol aromático) en tampón de fosfato a pH = 7,3, 0,1 M (1 ml). Se añade una solución de sosa 5 N (80 µl) para ajustar el pH de la solución a 7,64. El péptido 1 (10,40 mg, 7,5 µmol) y el péptido 2 (10,42 mg, 7,5 µmol) se disuelven conjuntamente en la solución anterior (533 µl). El medio de reacción se coloca en un baño termostático a 37 °C bajo una atmósfera inerte.

55 La unión se sigue mediante una RP-HPLC con una columna C18 Xbridge BEH (4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 µm) (215 nm, 1 mUmn, 30 °C, tampón A agua que contiene un 0,05 % de TFA, tampón B CH₃CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA, 0 - 100 % de B en 30 min). Para ello se acidifica una alícuota (5 µl) del medio de reacción con una solución de TFA al 10 % en agua, se extrae con éter dietílico para eliminar el MPAA y el MPA antes del análisis.

4-Síntesis del **péptido 3** H-CILKEPVHGV-NH₂, equivalente de **H-C₂-A₃**

60 La preparación de péptido H-C₂-A₃ se describe en la publicación de: Ollivier N., Dheur J., Mhidia R., Blanpain A., and Melnyk O., Bis(2-sulfanylethyl)amino native peptide ligation., Org. Lett. 12 (22), 5238 - 41 (2010).

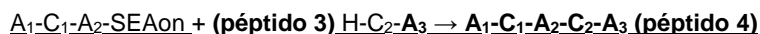
5-Protocolo de **unión** en *one-pot* de tres fragmentos.

Síntesis del péptido 4 H-ILKEPVHGACHHLEPGGCILKEPVHGV-NH₂, equivalente de A₁-C₁-A₂-C₂-A₃

65 **Preparación del péptido 4 a partir de A₁-C₁-A₂-SEAoff y del péptido 3 (H-C₂-A₃)**

A₁-C₁-A₂-SEAoff transformado en A₁-C₁-A₂-SEAon mediante una reducción en presencia de TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina)

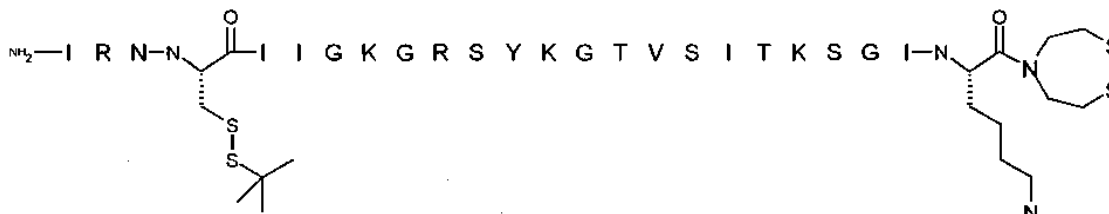
- Después de 5 h 30 de reacción, se disuelve TCEP · HCl (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina) (57,34 mg, 0,2 mmol) en un tampón de fosfato a pH = 7,3, 0,1 M (1 ml). Se añade una solución de sosa 5 N (140 µl) para ajustar el pH de la solución a 7,33.



- El **péptido 3** (16,17 mg, 11,2 µmol) se disuelve en la solución anterior (533 µl) y después se añade al medio de reacción anterior, que se coloca de nuevo a 37 °C bajo una atmósfera inerte.

- La unión se sigue mediante una RP-HPLC con una columna C18 Xbridge BEH (4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 µm) (215 nm, 1 ml/min, 30 °C, tampón A agua que contiene un 0,05 % de TFA, tampón B CH₃CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA, 0 - 100 % de B en 30 min). Para ello se acidifica una alícuota (5 µl) del medio de reacción con una solución de TFA al 10 % en agua, se extrae con éter dietílico para eliminar el MPAA (ácido 4-mercaptofenilacético) antes del análisis.

- Cuando se ha completado la reacción, el medio de reacción se diluye con agua que contiene un 0,05 % de TFA (3 ml) y se añade una solución de TFA al 10 % en agua (15 gotas). Después de 5 extracciones con éter dietílico (5 x 8 ml), la fase acuosa se desgasifica durante 10 minutos burbujando argón. Después de una purificación mediante una RP-HPLC con una columna C18 Nucleosil de 120 Å, 5 µm (215 nm, caudal de 6 ml/min, tampón A: agua que contiene un 0,05 % de TFA, tampón B: CH₃CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA, gradiente: 0 - 10 % de tampón B en 5 min, después un 10 - 100 % de tampón B en 150 min) se obtienen 16,2 mg del péptido 4 puro (59,2 %).

Ejemplo 2**1-Síntesis de K1 (fragmento 1)-MPA****a-Síntesis de K1 (fragmento 1)-SEAoff**

- La resina SEA (0,5 mmol, 0,175 mmol/g) es acondicionada en diclorometano (DCM). Se disuelve Fmoc-Lys(Boc)-O (2,342 g, 5 mmol) en DCM y después se añaden unas gotas de dimetilformamida (DMF) para ayudar en la solubilización. Se disuelve PyBrop (2,331 g, 5 mmol) en el mínimo de DCM y después se añade sobre la resina. A continuación se acondiciona diisopropiletilamina (DIEA) (2,613 ml, 15 mmol) en la resina y el acoplamiento dura 2 horas (volumen total < 5 ml). La resina se lava continuación 3 x 2 minutos con DCM. La resina se trata a continuación con un 10 % de Ac₂O / 5 % de DIEA / DCM (10 ml, 2 min), después (10 ml, 20 min). La resina se lava continuación 5 x 2 minutos con DCM

- El fragmento 1 es ensamblado sobre una parte de la resina anterior (0,25 mmol, 0,175 mmol/g) con un sintetizador de péptidos (CEM µWaves, Saclay, Francia) sin la utilización de microondas, utilizando la estrategia de Fmoc / terc-butilo. El acoplamiento se efectúa con los aminoácidos (0,2 M, 4 eq), el activador HBTU (0,5 M, 3,6 eq) y la base DIE (2 M, 8 eq). La desprotección final y la escisión del péptido de la resina se llevan a cabo con TFA / TIS / DMS / tioanisol / H₂ (90 / 2,5 / 2,5 / 2,5 / 2,5 en volumen, 25 ml) durante 2 horas 30. El péptido se precipita en una mezcla fría de éter dietílico / heptano (1 / 1 en volumen), se disuelve en un mínimo de agua y se liofiliza. Se obtienen 288 mg del péptido en bruto (R = 32 %). C₁₂₀H₂₁₆N₃₆O₃₁S₄ LC-MS [M + H]⁺ calculada (masa media) 2.788,5; observada 2.788,1.

- Una parte del fragmento 1 se oxida a continuación antes de la purificación. Para ello se disuelve el fragmento 1 (95,7 mg) en AcOH / agua 1 / 4 (47,9 ml). Se añade I₂ 197 mM en DMSO (270 µl, 50 µmol, 2 eq) a la solución anterior. Después de 30 segundos de agitación, se añade ditioneitol 64,8 mM (DTT, 823 µl, 50 µmol, 2 eq) para consumir el resto y se inyecta directamente en la RP-HPLC.

- Después de la purificación mediante la RP-HPLC (columna C18 nucleosil de 120 Å, 5 µm, tampón A 100 % de agua que contiene un 0,05 % de TFA, tampón B CH₃CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA, gradiente: del 0 al 20

% de tampón B en 5 min, después del 20 al 40 % en 40 min, caudal de 6 ml/min, 215 nm) se obtienen 25,8 mg del péptido puro (R = 27 %) $C_{120}H_{214}N_{36}O_{31}S_4$ MALDI-TOF $[M + H]^+$ calculada (masa monoisotópica) 2.784,52; observada 2.784,6.

5 b-Síntesis de K1 (fragmento 1)-MPA



Se solubiliza el clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP · HCl, 229,63 mg, 0,8 mmol) en tampón de fosfato de sodio 0,2 M a pH = 7,3 (10 ml). Se añade ácido mercaptopropiónico (MPA, 0,5 ml). Se añade NaOH 5 M (340 μ l) para ajustar el pH a 3,98.

20 El fragmento 1 K1-SEAoff (24,67 mg, 6,9 μ mol) se disuelve en la solución anterior (10,3 ml). El medio de reacción se calienta a 37 °C bajo una atmósfera de argón. El progreso de la reacción se sigue mediante una RP-HPLC con una columna C18 Xbridge BEH (215 nm, 1 ml/min, 30 °C, eluyente A agua que contiene un 0,05 % de ácido trifluoroacético (TFA), eluyente B CH_3CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA, 0 - 100 % de B en 30 min). Para ello se acidifican alícuotas con un 10 % de TFA acuoso, se extraen con Et_2O con el fin de eliminar el exceso de MPA antes del análisis.

30 Una vez finalizada la reacción, el medio de reacción se diluye con agua (10 ml) y se añade un 10 % de TFA acuoso (5 ml). Después de 3 extracciones con Et_2O (3 x 15 ml) y del burbujeo de argón durante 15 min, la purificación mediante una RP-HPLC con una columna C18 Nucleosil de 120 Å, 5 μ m (215 nm, 6 ml/min, temperatura ambiente, eluyente A agua que contiene un 0,05 % de TFA, eluyente B CH_3CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA, 0 - 10 % de B en 5 min, después un 10 - 100 % de B en 150 min) proporciona 9,7 mg de K1 (fragmento 1)-MPA puro (41 %).

2-Síntesis de StBu-K1(fragmento 2)-SEAoff



45 La resina SEA (0,5 mmol, 0,175 mmol/g) es acondicionada en DCM. Se disuelve Fmoc-Tyr-OH (2,298 g, 5 mmol) en DCM (< 5 ml) y después se añaden unas gotas de DMF en la resina para ayudar en la solubilización. Se disuelve PyBrop (2,331 g, 5 mmol) en el mínimo de DCM y después se añade a la resina. A continuación se añade DIEA (2,614 ml, 15 mmol) a la resina y el acoplamiento dura 2 horas. La resina se lava a continuación 4 x 2 minutos con DCM. La resina se trata a continuación con un 10 % de Ac_2O / 5 % de DiEA / DCM (10 ml, 2 min), después (10 ml, 20 min). La resina se lava a continuación 5 x 2 minutos con DCM.

50 El fragmento 2 es ensamblado en la resina anterior (0,5 mmol, 0,175 mmol/g) con un sintetizador de péptidos (CEM μ Waves, Saclay, Francia) sin la utilización de microondas, utilizando la estrategia de Fmoc / terc-butilo. Se lleva a cabo el acoplamiento con los aminoácidos (0,2 M, 4 eq), el activador HBTU (0,5 M, 3,6 eq) y la base DIEA (2 M, 8 eq). El disolvente de lavado (DMF), así como el disolvente de Fmoc-Met-OH, contienen un 1 % de tioanisol con el fin de evitar al máximo la oxidación de la metionina de la secuencia.

55 La resina se separa en 2 después de la glutamina en la posición 2 (0,25 mmol) con el fin de acoplar manualmente la Fmoc-Cys(StBu)-OH. Para hacer esto, la resina se lava 4 x 2 minutos con DMF, se pesa en DMF y se divide en 2. Se disuelve el HBTU (379,3 mg, 1 mmol) en DMF (1100 μ l). Se disuelve el HOBt (135 mg, 1 mmol) en DMF (500 μ l) y se añade al HBTU. Se disuelve el Fmoc-Cys(StBu)-OH (431,6 mg, 1 mmol) en DMF (500 μ l) y se añade a la mezcla de HBTU / HOBt. A continuación se añade DIEA (522,7 μ l, 3 mmol) a la mezcla. Se agita durante 1 minuto y después la mezcla se añade sobre la resina, y el acoplamiento dura 45 minutos. La resina se lava a continuación 4 x 2 minutos con DMF. Se lleva a cabo la desprotección del Fmoc N-terminal mediante un tratamiento con piperidina al 20 % en DMF (15 min, después 5 min). La resina se lava a continuación 4 x 2 minutos con DCM, después 3 x 2 minutos con Et_2O y se seca.

65 La desprotección final y la escisión del péptido de la resina se llevan a cabo con TFA / TIS / DMS / tioanisol / H_2O

(90 / 2,5 / 2,5 / 2,5 / 2,5 en volumen, 25 ml) durante 2 horas 30. El péptido se precipita en una mezcla fría de éter dietílico / heptano (1 / 1 en volumen), se disuelve en un mínimo de agua y se liofiliza. Se obtienen 366,14 mg del péptido en bruto (R = 35,6 %). $C_{156}H_{231}N_{41}O_{44}S_5$ MALDI-TOF $[M + H]^+$ calculada (resolución monoisotópica) 3.543,6; observada 3.542,2.

5 Una parte del fragmento 2 se oxida continuación antes de la purificación. Para ello se disuelve el fragmento 2 (67 mg) en AcOH / agua 1 / 4 (35 ml), después se añade I_2 144 mM en DMSO (223 μ l). Después de 30 segundos de agitación, se añade DTT 64,8 mM en AcOH / agua 1 / 4 (503 μ l) para consumir el exceso de I_2 . Después de la decoloración de la solución, el medio se inyecta en una RP-HPLC (columna C18 nucleosil, 120 A, 5 μ m, 2 x 28 cm, 215 nm, tampón A 100 % de agua que contiene un 0,05 % de TFA, tampón B CH_3CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA, gradiente: del 0 al 10 % de tampón B en 5 min, después del 10 al 100 % de B en 150 min, caudal de 6 ml/min) se obtienen 11,5 mg del péptido puro (R = 17,2 %) $C_{156}H_{229}N_{41}O_{44}S_5$ LC-MS $[M + H]^+$ calculada (resolución monoisotópica) 3.541,6; observada 3.541,9.

15 **3-Síntesis de K1 (fragmento 3)**



25 El fragmento 3 es ensamblado en la resina Novasyn TGR (0,5 mmol, 0,25 mmol/g) con un sintetizador de péptidos (CEM μ Waves, Saclay, Francia) sin la utilización de microondas, utilizando la estrategia de Fmoc / terc-butilo. Se lleva a cabo el acoplamiento con los aminoácidos (0,2 M, 4 eq), el activador HBTU (0,5 M, 3,6 eq) y la base DIEA (2 M, 8 eq).

30 La desprotección final y la escisión del péptido de la resina se llevan a cabo con TFA / EDT / H_2O / TIS (94 / 2,5 / 2,5 / 1 en volumen, 30 ml) durante 2 horas 30. El péptido se precipita en una mezcla fría de éter dietílico / heptano (1 / 1 en volumen), se disuelve en un mínimo de agua y se liofiliza. Después de la purificación en una RP-HPLC (columna C18 vydac 50 cm x 2 cm, 280 nm, tampón A 100 % de agua que contiene un 0,05 % de TFA, tampón B CH_3CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA, gradiente: del 0 al 20 % de tampón B en 10 min, después del 20 al 50 % de tampón B en 60 min, caudal de 30 ml/min) se obtienen 272 mg del péptido puro (R = 13 %) $C_{158}H_{239}N_{47}O_{52}S_4$ MALDI-TOF $[M + H]^+$ calculada (resolución monoisotópica) 3.755,6; observada 3.755,7.

35 **4-Protocolo de unión en one-pot:**

Síntesis de un péptido 4 K1 (125-209)

40 Se disuelve la guanidina HCl (573,24 mg, 6 mmol) en tampón de fosfato 0,1 M a pH = 7,3 (1 ml). Se disuelve el ácido 4-mercaptofenilacético (MPAA, 33,68 mg, 0,2 mmol) en esta última solución (1 ml). Se añade NaOH 5 M (150 ml) para ajustar el pH de la solución a 7,53.

45 El K1 (fragmento 1)-MPA (9,71 mg, 2,8 μ mol) y el StBu-K1 (fragmento 2)-SEA (10,65 mg, 2,6 μ mol) se disuelven conjuntamente en la solución anterior (185 μ l). El medio de reacción se coloca en un baño termostatzado a 37 °C en la caja de guantes.

50 La unión se sigue mediante una RP-HPLC con una columna C18 Xbridge BEH (4,6 x 250 mm, 300 A, 5 μ m) (215 nm, 1 ml/min, 30 °C, tampón A agua que contiene un 0,05 % de TFA, tampón B CH_3CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA, 0 - 100 % de B en 30 min). Para ello se acidifica una alícuota (1 μ l) del medio de reacción con un 10 % de TFA acuoso, se extrae con Et_2O para eliminar el MPAA y el MPA antes del análisis.

55 Después de 20 horas de reacción, se disuelve guanidina HCl (573,15 mg, 6 mmol) en tampón de fosfato 0,1 M, pH = 7,3 (1 ml). Se disuelve clorhidrato de tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP · HCl, 57,59 mg, 0,2 mmol) en esta última solución (1 ml). Se añade NaOH 5 M para ajustar el pH de la solución a 7,27.

El K1 (fragmento 3) (16,46 mg, 3,9 μ mol) se disuelve en la solución anterior (185 μ l) y después se añade al medio de reacción anterior, que se coloca de nuevo a 37 °C bajo una atmósfera inerte.

60 La unión se sigue mediante una RP-HPLC con una columna C18 Xbridge BEH (4,6 x 250 mm, 300 A, 5 μ m) (215 nm, 1 ml/min, 30 °C, tampón A agua que contiene un 0,05 % de TFA, tampón B CH_3CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA, 0 - 100 % de B en 60 min). Para ello se acidifica una alícuota (1 μ l) del medio de reacción con un 10 % de TFA acuoso, se extrae con Et_2O para eliminar el MPAA y el MPA antes del análisis. $C_{418}H_{648}N_{122}O_{127}S_7$ MALDI-TOF $[M + H]^+$ (masa media) calculada 9640,01, encontrada 9639.

65 Cuando se ha completado la reacción, el medio de reacción se diluye con agua (4 ml) y se añade TFA acuoso al 10

2-Protocolo de unión en one-pot:**Síntesis de un péptido 4 K1 (125-209) K-biotina**

5 Se disuelve la guanidina HCl (573,28 mg, 6 mmol) en tampón de fosfato 0,1 M, pH = 7,3 (1 ml). Se disuelve el ácido 4-mercaptofenilacético (MPAA, 33,59 mg, 0,2 mmol) en esta última solución (1 ml). Se añade NaOH 5 M (80 µl) para ajustar el pH de la solución a 7,40.

10 El K1 (fragmento 1)-MPA (2,76 mg, 0,8 µmol) y el StBu-K1 (fragmento 2)-SEA (3,30 mg, 0,8 µmol) se disuelven conjuntamente en la solución (57 µl). El medio de reacción se coloca en un baño termostatzado a 37 °C en la caja de guantes.

15 La unión se sigue mediante una RP-HPLC con una columna C18 Xbridge BEH (4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 µm) (215 nm, 1 ml/min, 30 °C, tampón A agua que contiene un 0,05 % de TFA, tampón B CH₃CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA, 0 - 100 % de B en 30 min). Para ello se acidifica una alícuota (1 µl) del medio de reacción con un 10 % de TFA acuoso, se extrae con Et₂O para eliminar el MPAA y el MPA antes del análisis.

20 Después de 24 h 40 de reacción, se disuelve guanidina · HCl (573,18 mg, 6 mmol) en tampón de fosfato 0,1 M, a pH = 7,3 (1 ml). Se disuelve clorhidrato de tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP · HCl, 57,80 mg, 0,2 mmol) en esta última solución (1 ml). Se añade NaOH 5 M para ajustar el pH de la solución a 7,40.

25 El K1 (fragmento 3) (5,50 mg, 1,2 µmol) se disuelve en la solución anterior (57 µl) y después se añade al medio de reacción anterior, que se coloca de nuevo a 37 °C bajo una atmósfera inerte.

La unión se sigue mediante una RP-HPLC con una columna C18 Xbridge BEH (4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 µm) (215 nm, 1 ml/min, 30 °C, tampón A agua que contiene un 0,05 % de TFA, tampón B CH₃CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA, 0 - 100 % de B en 60 min). Para ello se acidifica una alícuota (1 µl) del medio de reacción con un 10 % de TFA acuoso, se extrae con Et₂O para eliminar el MPAA y el MPA antes del análisis.

30 C₄₃₄ H₆₇₄ N₁₂₆ O₁₃₀ S₈ [M + H]⁺ esperada (masa media) 9.994,49, observada 9.994,41.

35 Al finalizar la reacción, el medio de reacción se ha diluido con agua y con TFA acuoso al 10 %. Después de varias extracciones con Et₂O, la fase acuosa se ha desgasificado burbujeando argón, se ha diluido con agua, se ha filtrado y se ha purificado mediante una RP-HPLC con una columna C18 vydac de 300 Å, 5 µm (215 nm, 20 ml/min, tampón A agua que contiene un 0,05 % de TFA, tampón B CH₃CN / agua 4 / 1 que contiene un 0,05 % de TFA).

El fragmento 1 y el fragmento 2 : K1 (fragmento 1)-MPA y el StBu-K1 (fragmento 2)-SEA se preparan como se ha descrito previamente en el ejemplo 2.

Ejemplos de preparación de los fragmentos peptídicos de partida

A) La síntesis de los fragmentos peptídicos SEAon se lleva a cabo según Ollivier N., Dheur J., Mhidia R., Blanpain A., and Melnyk O., Bis(2-sulfanylethyl)amino native peptide ligation., Org. Lett. 12 (22), 5238 - 41 (2010).

45 A título ilustrativo, la preparación de los fragmentos peptídicos

- (la): H-ILKEPVHGG-N(CH₂CH₂SH)₂,
 (lb): H-ILKEPVHGA-N(CH₂CH₂SH)₂,
 (lc): H-ILKEPVHGV-N(CH₂CH₂SH)₂ y
 (ld): H-ILKEPVHGY-N(CH₂CH₂SH)₂

se lleva a cabo en fase sólida.

55 El fragmento peptídico (1a) se ha obtenido a partir del soporte cebado preparado con glicina.

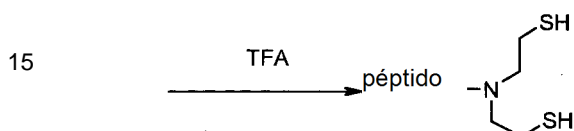
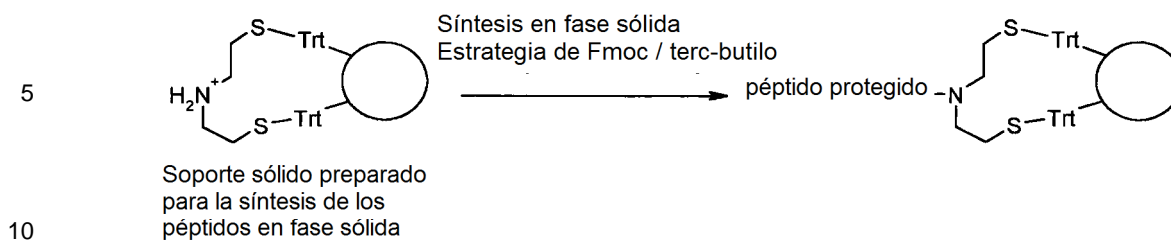
El fragmento peptídico (1b) se ha obtenido a partir del soporte cebado preparado con alanina.

El fragmento peptídico (1c) se ha obtenido a partir del soporte cebado preparado con valina.

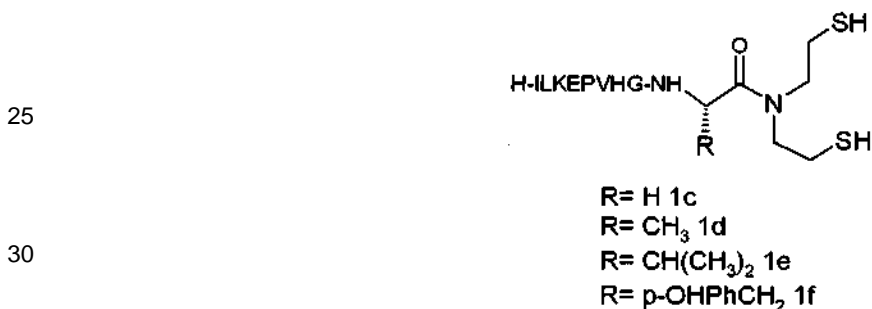
60 El fragmento peptídico (1d) se ha obtenido a partir del soporte cebado preparado con la tirosina.

La síntesis de los polipéptidos puede resumirse como sigue:

65



20 Los fragmentos peptídicos así obtenidos tienen la siguiente fórmula general:



35 La síntesis de los diferentes polipéptidos se lleva a cabo en fase sólida mediante la utilización de la estrategia de Fmoc / terc-butilo en resinas (escala de 0,1 mmol) con un sintetizador de péptido de microondas (CEM μ WAVES, Saclay, Francia). El acoplamiento se lleva a cabo mediante la utilización de un exceso molar de 5 veces de cada aminoácido, el activador HBTU se utiliza con un exceso molar de 4,5 veces y la base DiEA se utiliza con un exceso molar de 10 veces.

40 La desprotección final y la escisión del polipéptido de la resina se llevan a cabo con 10 ml de una mezcla de TFA / TIS / DMS / H₂O (92,5 / 2,5 / 2,5 / 2,5 en volumen) durante 1 hora. El polipéptido se obtiene a continuación mediante una precipitación en 100 ml de una mezcla de éter dietílico / heptano (1 / 1 en volumen), se disuelve en H₂O y después se liofiliza.

45 La pureza de cada fragmento peptídico se determina mediante una HPLC (del 91 % para el fragmento peptídico (1a) con una glicina, del 83 % para el fragmento peptídico (1b), del 80 % para (1c), y del 88 % para (1d)). El análisis por MALDI-Tof de los fragmentos peptídicos concuerda con la estructura esperada del fragmento peptídico (Fragmento peptídico (1a) C₄₇H₈₁N₁₃O₁₁S₂ [M + H]⁺ calculada 1.068,6 Da, observada 1.068,5. Fragmento peptídico (1b) C₄₈H₈₃N₁₃O₁₁S₂ [M + H]⁺ calculada 1.082,6 Da, observada 1.082,4. Fragmento peptídico (1c) C₅₀H₈₇N₁₃O₁₁S₂ [M + H]⁺ calculada 1.110,6 Da, observada 1.110,5). Fragmento peptídico 1(d) C₅₄H₈₇N₁₃O₁₂S₂ [M + H]⁺ calculada 1.174,6 Da, observada 1.174,6).

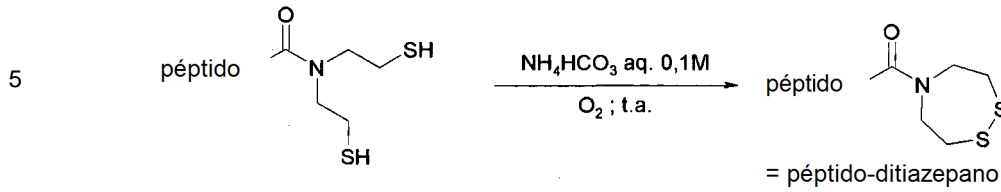
55 La purificación de los polipéptidos se lleva a cabo en una columna C18 nucleosil en acetonitrilo-H₂O (80 - 20) en TFA, con un gradiente del 0 al 30 % en 30 min para el fragmento peptídico (1a), y un gradiente del 0 al 10 % en 5 min, después del 10 al 25 % en 25 min para los fragmentos peptídicos (1b) y (1c).

60 La pureza determinada mediante una HPLC es del 96 % para el fragmento peptídico (1a) con un rendimiento global del 35 %, del 7 % para el fragmento peptídico (1b) con un rendimiento del 31 %, y del 99 % para el fragmento peptídico (1c) con un rendimiento del 27 %.

B) oxidación de los fragmentos peptídicos (1a), (1b), (1c) y (1d) en ditiázepanos

Los fragmentos peptídicos (1a), (1b), (1c) y (1d) son tales como los obtenidos anteriormente son oxidados según el siguiente esquema general:

65



10 Cada fragmento peptídico es escindido del soporte sólido mediante la acción de una solución TFA / DMS / TiS / H₂O (92,5 / 2,5 / 2,5 / 2,5; v/v). El fragmento peptídico se precipita a continuación en un gran volumen de una mezcla de éter dietílico / heptano (1 / 1; v/v) y se lava dos veces con la ayuda de esta solución. El fragmento peptídico en bruto liofilizado después de la etapa de ruptura se disuelve a continuación en una solución de bicarbonato de amonio 0,1 M previamente desgasificada durante 10 min mediante el burbujeo de nitrógeno (1 mg/ml).

20 La mezcla se deja entonces a la temperatura ambiente con una agitación fuerte. La evolución de la reacción es seguida mediante una espectrometría de masas MALDI-TOF hasta la desaparición total de la forma reducida del polipéptido considerado. El polipéptido se purifica finalmente mediante una RP-HPLC (gradiente de eluyente A (H₂O / 0,05 % de TFA) / eluyente B (80 % de acetonitrilo / 20 % de H₂O / 0,05 % de TFA): del 0 al 10 % en 10 min, después del 10 % al 25 % en 25 min) después se congela y se liofiliza.

La siguiente tabla resumen los resultados obtenidos (análisis MALDI-TOF).

25

fragmento peptídico	m/z [M + H] ⁺ calc.	M/z [M + H] ⁺ obs.	Rendimiento final (%)
(1a)	1.066,6	1.066,6	17
(1b)	1.080,6	1.080,6	13
(1c)	1.108,6	1.108,6	23
(1d)	1.172,6	1.172,6	20

30

35

40

45

50

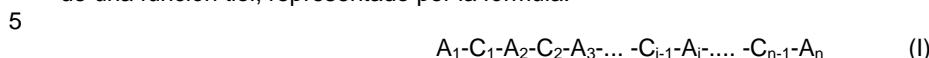
55

60

65

Reivindicaciones

1. Un procedimiento de preparación de un ensamblaje peptídico de n fragmentos y de n-1 aminoácidos portadores de una función tiol, representado por la fórmula:

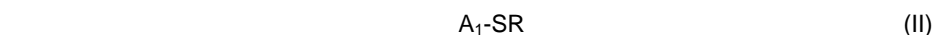


en la que A₁, A₂, A₃, ... A_i... , A_n son fragmentos peptídicos, C₁, C₂, C₃... C_{i-1}... C_{n-1} son residuos de aminoácidos portadores de una función tiol,

10 n está comprendido entre 3 y 50, preferentemente entre 3 y 20, o entre 3 y 10, e

i es un número entero cualquiera comprendido entre 2 y n,

caracterizado por que se implementa en la preparación de un péptido-tioéster de fórmula:



en la que A₁ es un fragmento peptídico y SR es el residuo de un tioéster alquilado, pudiendo ser R un radical alquilado eventualmente sustituido,

a partir de un bis(2-sulfaniletíl)amino péptido : A₁-SEAoff en la que SEAoff es un grupo bis(2-sulfaniletíl)amino cíclico



25 mediante la acción de un tiol R-SH, en presencia de un agente reductor de disulfuros cíclicos, seguido de la condensación con un fragmento peptídico de estructura:



30 en la que C₁, A₂ y SEAoff se definen como anteriormente y (SR') representa un residuo de disulfuro en el tiol del aminoácido C₁, en presencia de un tiol aromático ArSH, y después transforma el nuevo fragmento peptídico obtenido, de estructura:



en la que A₁, C₁, A₂ y SEAoff se definen como anteriormente, en un péptido-tioéster de fórmula:



40 en la que A₁, C₁, A₂ y R se definen como anteriormente, mediante la acción de un tiol R-SH, en presencia de un agente reductor de disulfuros cíclicos, y se condensa con un fragmento peptídico de estructura:



en la que SEAoff y R' y C₂ y A₃ se definen como anteriormente, en presencia de un tiol aromático ArSH, para proporcionar un fragmento peptídico, de estructura:



en la que A₁, C₁, A₂, C₂, A₃ y SEAoff se definen como anteriormente, y se reiteran estas 2 operaciones hasta n-2 veces, para obtener un fragmento peptídico de estructura:



en la que A₁, A₂, A₃,... A_i... , A_{n-1}, C₁, C₂, C₃... C_{i-1}... C_{n-2} y SEAoff se definen como anteriormente, y después se realiza una reacción de unión natural de este fragmento peptídico (IV^m) obtenido, con un péptido de fórmula:



en la que C_{n-1} y A_n se definen como anteriormente, mediante una reducción en presencia de un agente reductor de disulfuros cíclicos, para proporcionar el ensamblaje peptídico múltiple de fórmula general (I).

2. Un procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado por que** se prepara un ensamblaje peptídico de 3 o de 4 fragmentos, con las estructuras A₁-C₁-A₂-C₂A₃ o A₁-C₁-A₂-C₂-A₃-C₃-A₄.

3. Un procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado por que** se prepara un ensamblaje peptídico de 3 fragmentos en una reacción en "one pot".

5 4. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** $C_1, C_2, C_3 \dots C_{i-1} \dots C_{n-1}$ representan residuos de Cys.

5. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** uno o varios de los fragmentos peptídicos $A_2 \dots A_i \dots A_{n-1}$ pueden portar uno o varios aminoácidos modificados.

10 6. Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** la condensación del péptido-tioéster con un fragmento peptídico de estructura (III) se efectúa en presencia del ácido 4-mercaptofenilacético.

7. Procedimiento de fabricación de una composición farmacéutica **caracterizado por que** comprende:

15 - la fabricación de un polipéptido o de un péptido según el procedimiento de fabricación de un polipéptido de fórmula (I) según una de las reivindicaciones 1 a 5, y
- la preparación de composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido o un péptido así preparado, en estado puro o en asociación con uno o con varios coadyuvantes compatibles y farmacéuticamente aceptables.

20 8. Un procedimiento de fabricación de un dispositivo de diagnóstico **caracterizado por que** comprende:

25 - la fabricación de un polipéptido o de un péptido según el procedimiento de fabricación de un polipéptido de fórmula (I) según una de las reivindicaciones 1 a 5, y
- la formulación o la preparación de este polipéptido en una forma adaptada para una utilización para un dispositivo de diagnóstico.

30

35

40

45

50

55

60

65