(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 578 798**

(51) Int. CI.:

C07K 1/02 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07D 293/02 (2006.01)
C07K 1/04 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2013 E 13713375 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2828279**

(54) Título: **Método de ligación nativa**

(30) Prioridad:

21.03.2012 FR 1252548

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2016

(73) Titular/es:

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.3%)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR;
INSTITUT PASTEUR DE LILLE (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE LILLE 2 DROIT ET SANTÉ (33.3%)

(72) Inventor/es:

MELNYK, OLEG;
RAIBAUT, LAURENT y
OLLIVIER, NATHALIE

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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).

Método de ligación nativa

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para la preparación de un polipéptido que comprende al menos una etapa de ligación nativa con la ayuda de un polipéptido funcionalizado con un grupo seleniuro. La invención también se refiere a péptidos y compuestos a base de selenio. La invención también se refiere a un kit de síntesis para la síntesis de péptidos.

Antecedentes de la técnica

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

La síntesis total de polipéptidos es cada vez más útil para la preparación de proteínas de estructuras bien definidas o que aportan modificaciones naturales, tales como las modificaciones posteriores a la traducción, o no naturales. Los métodos de ligación química dar una respuesta a esta necesidad, sin embargo demuestran que son limitados en su uso y su aplicación industrial.

De forma general, en estos métodos, se desea que la unión entre los polipéptidos ensamblados por ligación sea nativa, es decir, que corresponda a la estructura natural de los polipéptidos.

En la actualidad, el método principal para ligación nativa es el de Kent y Dawson, que se describe, por ejemplo, en los documentos de solicitud internacional WO 96/34878 y WO 98/28434. Este método se basa en una reacción quimioselectiva entre un tioéster peptídico (en C terminal) y un cisteinil-péptido. Sin embargo, el principal inconveniente de este método es que la preparación de los tioésteres peptídicos requiere procesos químicos complejos. Estos métodos de la técnica anterior no son satisfactorios ya que conducen de forma inevitable a mezclas que no se pueden separar fácilmente, por lo tanto afectan a la pureza del producto final obtenido y conducen a pérdidas inevitables de rendimiento.

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

Otro método, que se describe en el documento de solicitud internacional WO 2007/037812, se basa en la reacción de un α-cetoácido con una N-alcoxiamina en una reacción de condensación descarboxilativa. Sin embargo, los cetoácidos son moléculas que son difíciles de preparar y de incorporar a los péptidos. Además, este tercer método es difícil de aplicar en los laboratorios de síntesis peptídica que no dispongan de medios para realizar síntesis orgánicas complejas.

El documento WO 2011/051906 describió un método de ligación nativa en el que interviene un compuesto de tiol. Aunque este método es extremadamente satisfactorio, la cinética de reacción de este compuesto de tiol en ocasiones es lenta, en particular cuando los aminoácidos que flanquean el enlace entre los dos péptidos presentan impedimentos.

Por lo tanto, existía la necesidad de un método de ligación nativa provisto de una cinética de reacción rápida con el fin de hacer más fácil la ligación de péptidos mediante la formación de un enlace entre dos aminoácidos con impedimentos.

Sumario de la invención

La invención se basa en el desarrollo de un método de ligación basado en el uso de un péptido con unión amida en particular, el péptido SeEA, y un péptido con cisteinilo. Cuando estos dos péptidos se ponen en contacto en solución acuosa, se forma un enlace peptídico nativo entre los dos fragmentos. La ligación es muy eficaz y se realiza con rendimientos excelentes. Ésta funciona en un amplio intervalo de pH.

Esta ligación presenta similitudes con la ligación SEA, descrita en la solicitud FR 09 57 639, aunque las propiedades de estas dos ligaciones y segmentos SeEA y SEA sean significativamente diferentes.

En efecto, las cinéticas de ligación de SeEA son de forma significativa muy superiores a las cinéticas de ligación de SEA, obtenidas con el análogo de azufre de SEA, o a las cinéticas de la Ligación Química Nativa (NCL) basada en el uso de tioésteres peptídicos.

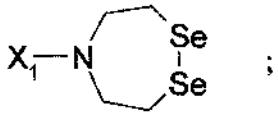
La superioridad cinética de SeEA no disminuye en absoluto el interés de la ligación de SEA. Al contrario, intenta completarla permitiendo la formación de uniones difíciles de producir con las otras técnicas de ligación de SEA o NCL (química de los tioésteres).

En la presente solicitud, el grupo SEA representa un grupo $-N(CH_2-CH_2-S-G_4)_2$, con G_4 representando H o un grupo protector del azufre o un enlace disulfuro.

Un primer objeto de la presente invención se refiere a un péptido funcionalizado elegido entre:

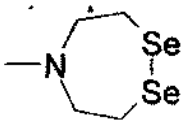
a) el péptido de fórmula (I): $X_1-N(CH_2CH_2SeH)_2$; o

b) el péptido de fórmula (I'):



;

en las que X_1 representa un fragmento peptídico y el grupo $-N(CH_2CH_2SeH)_2$ o



forma un enlace amida con la terminación C=O del resto del aminoácido del fragmento peptídico X_1 que está en posición C-terminal.

De acuerdo con un modo de realización, X_1 comprende de 2 a 300 restos de aminoácidos, preferentemente de 5 a 100 restos de aminoácidos, de manera más particularmente preferente de 8 a 50 restos de aminoácidos.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un método de obtención de un péptido funcionalizado (I) o (I') de acuerdo con la invención, que comprende las etapas a1 y b1 siguientes:

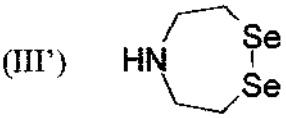
a1) síntesis peptídica para proporcionar un polipéptido de fórmula (II):

(II) X_1-OH

que comprende preferentemente grupos protectores sobre sus funciones aminas y ácidos carboxílicos, con la excepción de su función ácido carboxílico C-terminal,
b_1) funcionalización del polipéptido obtenido en la etapa a) que comprende:

- la reacción del polipéptido de fórmula (II) con un compuesto de amina elegido entre:

(IIIa) $NH(CH_2-CH_2-Se-G_1)_2$

(III') 

en la que G_1 representa un grupo protector del selenio o un átomo de hidrógeno, en fase líquida, para formar el polipéptido de fórmula (Ia) $X_1-N(CH_2CH_2-Se-G_1)_2$, o (I');
- opcionalmente la desprotección del polipéptido de fórmula (Ia) para producir el compuesto de fórmula (I),

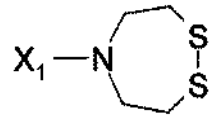
o que comprende las etapas a2 y b2 siguientes:

a2) el uso

- del compuesto de fórmula (IV) o (IV''):

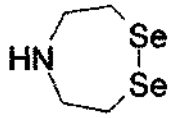
(IV) $X_1-N(CH_2CH_2-S-H)_2$;

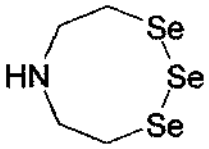
O

(IV'') 

- de un péptido funcionalizado con un grupo portador de una función tioéster (IV') = X_1 -SR y R representa un grupo alquilo o arilo opcionalmente sustituido,

b2) la reacción entre el compuesto de fórmula (IV) o (IV") o el compuesto de fórmula (IV') con el compuesto de amina de fórmula (III') o (III"):

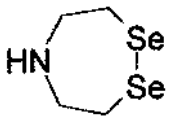
(III') 

(III'') 

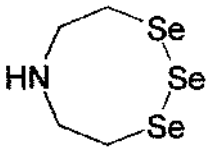
en fase líquida, para formar el péptido de fórmula (I) o (I').

Otro objeto de la presente invención se refiere a un compuesto que puede usarse el método de obtención de un péptido funcionalizado de acuerdo con la invención, siendo elegido este compuesto entre:

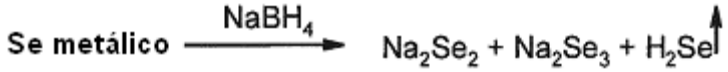
a) el compuesto de fórmula (III'):



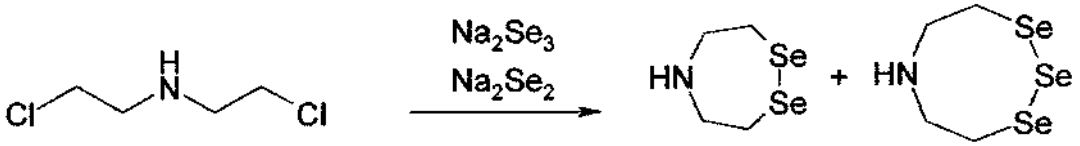
b) el compuesto de fórmula (III"):



La invención también se refiere a un método de preparación de los compuestos de fórmulas (III') y (III") de acuerdo con la invención, que comprende la siguiente reacción de tratamiento con un hidruro metálico ilustrada en el esquema en el caso de $NaBH_4$, pero también se puede usar $LiAlH_4$ o $LiBH_4$:

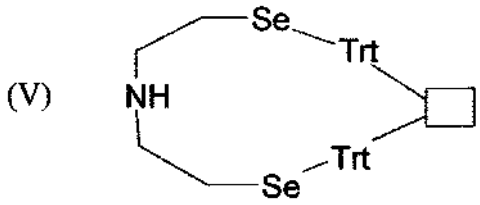


seguido de la reacción:

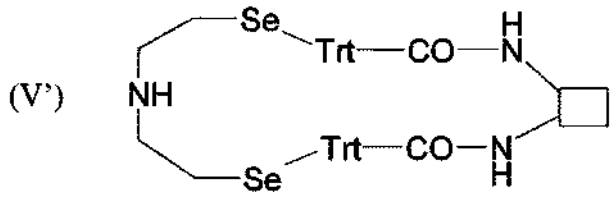


Otro objeto de la presente invención se refiere a un método de obtención de un péptido funcionalizado (I) o (I') de acuerdo con la invención, que comprende las etapas siguientes:

a) Proporcionar una resina de polímero funcionalizada que presenta la estructura (V):



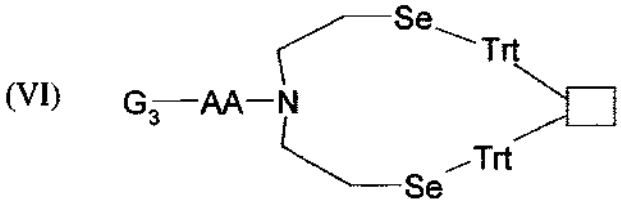
O la estructura (V'):



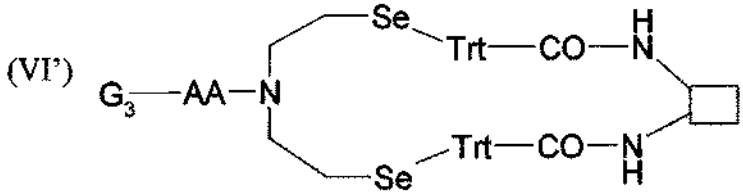
en las que,

□ representa un soporte sólido,
Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes, elegidos en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano.

b) Injertar un aminoácido sobre la resina de polímero funcionalizada obtenida en la etapa a) para producir el compuesto de estructura (VI):



O de estructura (VI'):

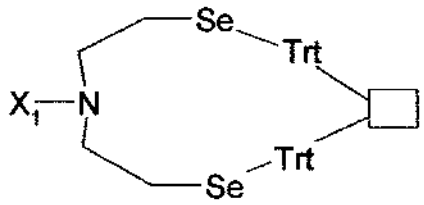


en las que,

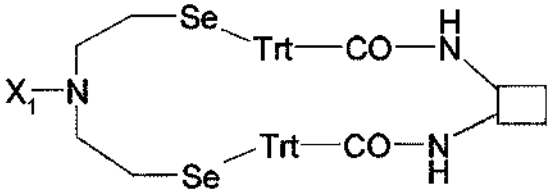
□ y Trt tienen el mismo significado que en el compuesto (V) o (V'),
AA representa un resto de aminoácido que comprende opcionalmente uno o varios grupos protectores;
G_3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de la función amina N-terminal de AA,

c) Síntesis peptídica a partir del aminoácido AA para producir el compuesto (VII) o (VII'):

(VII)



(VII')



en los que,

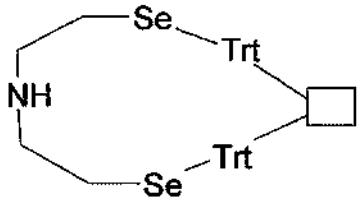
□ representa un soporte sólido,
Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes, elegidos en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano,
X_1 representa un fragmento peptídico,

d) Cortar el enlace entre Trt y Se para producir el compuesto (I) o (I').

De acuerdo con un modo de realización del método mencionado anteriormente, el injerto de un aminoácido sobre la resina de polímero comprende la puesta en presencia de la resina funcionalizada (V) o (V') con un halogenuro de aminoácido o con un aminoácido y un agente de activación, elegido preferentemente entre HATU, PyBOP, BOP, PyBROP, de manera más particularmente preferente HATU.

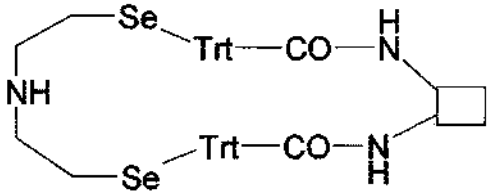
Otro objeto de la presente invención se refiere a una resina de polímero funcionalizada que puede usarse en el método de acuerdo con la invención, que presenta la estructura (V):

(V)



O la estructura (V'):

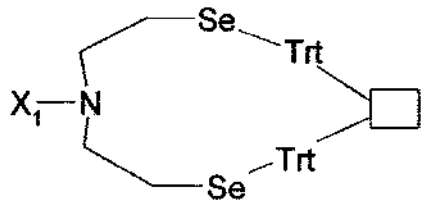
(V')

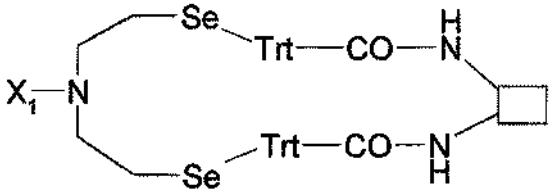


en las que,

□ representa un soporte sólido,
Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes, elegidos en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano.

Otro objeto de la presente invención se refiere a una resina de polímero que comprende un fragmento peptídico que responde a la fórmula (VII) o (VII'):

(VII) 

(VII') 

en las que,

D representa un soporte sólido,
Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes, elegidos en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano,
X_1 representa un fragmento peptídico.

De acuerdo con un modo de realización, el soporte sólido □ se elige entre un poliestireno, una poliacrilamida, un polietilenglicol, una celulosa, un polietileno, un poliéster, un látex, una poliamida, un polidimetilacrilamida, un copolímero de polietilenglicol-poliestireno, un copolímero de polietilenglicol-poliacrilamida y sus derivados.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un método de preparación de la resina de polímero de acuerdo con la invención, que comprende:

a) proporcionar un soporte sólido funcionalizado con grupos -Trt o -NH-CO-Trt;
b) reacción de la función Trt del soporte sólido con el compuesto de amina de fórmula (III): $NH(CH_2\text{-}CH_2\text{-}Se\text{-}H)_2$ teniendo Trt la misma definición que se ha mencionado anteriormente .

Otro objeto de la presente invención se refiere a un método de preparación de un polipéptido de fórmula (VIII):

(VIII) $X_1\text{-}C_1\text{-}X_2\text{-}C_2\text{-}...\text{-}C_{i-1}\text{-}X_i\text{-}...\text{-}C_{n-1}\text{-}X_n$

en la que,

X_1, X_2,..., X_i,..., X_n son fragmentos peptídicos,
C_1, C_2, ..., C_{i-1}, ..., C_{n-1} son restos de aminoácidos que portan una función tiol o selenol,
n es un número entero superior o igual a 2,
i es un número entero cualquiera que varía de 1 a n, comprendiendo este método una o varias etapas de reacción entre un compuesto de fórmula (IX_i):

(IX_i) X'_i - $N(CH_2CH_2\text{-}Se\text{-}H)_2$

en la que,

X'_1 representa X_1
X'_i representa $C_{i-1}\text{-}X_i$ para $i > 1$

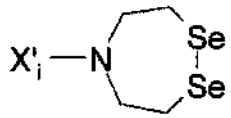
y un compuesto de fórmula (X_{i+1}):

(X_{i+1}) $X_{i+1}\text{-}...\text{-}C_{n-1}\text{-}X_n$

para formar un compuesto de fórmula (X_i):

(X_i) $X'_i\text{-}C_i\text{-}X_{i+1}\text{-}...\text{-}C_{n-1}\text{-}X_n$

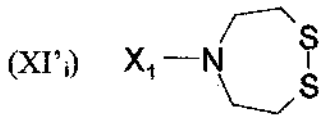
De acuerdo con un modo de realización, el compuesto (IX_i) se forma a partir del compuesto (IX'_i):

(IX'_i) = 

mediante la puesta en presencia de al menos un compuesto reductor de los enlaces diselenio.

De acuerdo con un modo de realización, el compuesto (IX'_i) se obtiene por reacción entre un compuesto de fórmula (XI_i), (XI'_i) o (XI''_i):

(XI_i) X'_i-S-R_1



(XI''_i) X'_i-N(CH_2-CH_2-S-H)$_2$

en las que X'_i es un fragmento peptídico de la forma C_{i-1}-X_i para i > 1 y X'_1 representa X_1, R_1 representa un grupo alquilo o arilo, opcionalmente sustituido,
y un compuesto de fórmula (III') o de fórmula (III") de acuerdo con la invención.

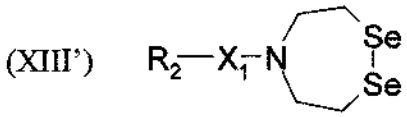
De acuerdo con un modo de realización, el método mencionado anteriormente se realiza para la preparación de un polipéptido representado con la fórmula (XII):

(XII) X_1-C_1-X_2-C_2-X_3

que comprende las etapas siguientes:

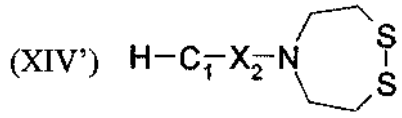
a) reacción entre un compuesto de fórmula (XIII) o (XIII'):

(XIII) R_2-X_1-N(CH_2-CH_2-Se-H)$_2$



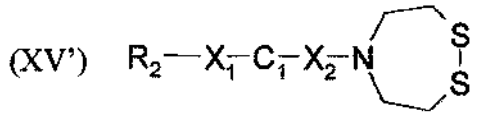
y un compuesto de fórmula (XIV) o (XIV'):

(XIV) H-C_1-X_2-N(CH_2-CH_2-S-H)$_2$



para formar el compuesto de fórmula (XV) o (XV'):

(XV) R_2-X_1-C_1-X_2-N(CH_2-CH_2-S-H)$_2$

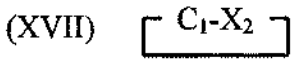


b) reacción entre un compuesto de fórmula (XV) o (XV') y un polipéptido de fórmula (XVI):

(XVI) $H\text{-}C_2\text{-}X_3$

para formar el compuesto de fórmula (XII),
en las que, R_2 representa H o un grupo protector de la función N-terminal de X_1; X_1, X_2, X_3 representan independientemente entre sí, fragmentos peptídicos; C_1 y C_2 representan, independientemente entre sí, restos de aminoácidos portadores de una función tiol o selenol.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un método de preparación de un polipéptido cíclico de fórmula (XVII):

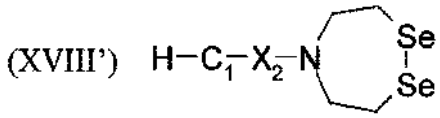


X_2 representando un fragmento peptídico, y C_1 representando un resto de aminoácido que comprende una función tiol o selenol,
comprendiendo dicho método al menos una etapa de reacción de ligación de un polipéptido de fórmula (XVIII):

(XVIII) $H\text{-}C_1\text{-}X_2\text{-}N(CH_2\text{-}CH_2\text{-}Se\text{-}H)_2$

consigo mismo.

De acuerdo con un modo de realización del método de preparación de un polipéptido cíclico de acuerdo con la invención, la reacción de ligación se realiza poniendo en contacto polipéptido de fórmula (XVIII'):



con al menos un compuesto reductor de los enlaces diselenio.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un kit de síntesis de polipéptidos que comprende uno o varios péptidos de fórmulas (IX_i) o (IX'_i) que pueden usarse en el método del ligación de acuerdo con la invención, o al menos un compuesto (III') o (III") de acuerdo con la invención.

Algunas ventajas de la presente invención son las siguientes:

- la ligación nativa de la invención permite asegurar el enlace de uniones difíciles, tales como las uniones con impedimentos,
- la cinética de ligación nativa de la invención es muy rápida,
- la ligación nativa de la invención se puede combinar con otros métodos de ligación que tienen cinéticas diferentes,
- la ligación nativa de la invención tiene una realización sencilla,
- la preparación de los péptidos SeEA se puede realizar a partir de un soporte sólido,
- la preparación de los péptidos SeEA se puede realizar a partir de segmentos de SEA o tioéster en solución
- la ligación nativa de la invención se puede realizar a partir de fragmentos peptídicos que se pueden preparar en fase sólida o en fase líquida,
- la ligación nativa de la invención se puede combinar con otros tipos de ligaciones nativas de la técnica anterior en un método de una sola etapa que comprende varias ligaciones sucesivas,
- la ligación nativa de la invención se puede realizar mediante la realización de un método de ligación de la

técnica anterior por simple adición de un compuesto de selenio en particular en la mezcla de reacción.

Breve descripción de las figuras

Otras características y ventajas de la invención aparecerán con la lectura de la descripción que sigue a un modo de realización preferente de la invención, proporcional a modo de ejemplo y por referencia a la figura adjunta.

Las figuras 1a y 1b representan respectivamente el cromatograma de HPLC y el espectro de masas de un compuesto de selenio de acuerdo con la invención.
Las figuras 2a y 2b representan respectivamente el cromatograma de HPLC y el espectro de masas de un compuesto de selenio de acuerdo con la invención.
Las figuras 3a y 3b representan cromatogramas de HPLC para el seguimiento de la síntesis de un péptido funcionalizado de acuerdo con la invención.
La figura 3c representa el espectro de masas de un péptido funcionalizado de acuerdo con la invención.
Las figuras 4a y 4b representan respectivamente el cromatograma de HPLC y el espectro de masas de un péptido funcionalizado de acuerdo con la invención.
Las figuras 5a y 5b representan respectivamente el cromatograma de HPLC y el espectro de masas de un péptido funcionalizado de acuerdo con la invención después de purificación.
Las figuras 6a y 6b representan respectivamente el cromatograma de HPLC y el espectro de masas de un polipéptido obtenido con un método de ligación de acuerdo con la invención.
La figura 7 representa un diagrama que mide la cinética de reacción de un método de ligación de acuerdo con la invención y de acuerdo con la técnica anterior.
La figura 8 representa un diagrama que mide la cinética de reacción de un método de ligación de acuerdo con la invención y de acuerdo con la técnica anterior.
Las figuras 9a y 9b representan respectivamente el cromatograma de HPLC y el espectro de masas de un péptido funcionalizado obtenido con un método de acuerdo con la invención.
Las figuras 10a y 10b representan respectivamente el cromatograma y el espectro de masas de un péptido obtenido con un método de acuerdo con la invención.
Las figuras 11a y 11b representan respectivamente el cromatograma y el espectro de masas de un péptido obtenido con un método de acuerdo con la invención después de purificación.
La figura 12 representa un diagrama que mide la cinética de reacción de un método de ligación de acuerdo con la invención y de acuerdo con la técnica anterior.
La figura 13 representa un cromatograma de HPLC de una solución obtenida por la síntesis de un péptido funcionalizado de acuerdo con la invención.
Las figuras 14a y 14b representan respectivamente el cromatograma de HPLC y el espectro de masas de un péptido funcionalizado de acuerdo con la invención.

Descripción de modos de realización de la invención

La invención se describe ahora con más detalle y de modo no limitante en la descripción que sigue a continuación.

Por « péptido o polipéptido » se entiende, en el contexto de la presente solicitud, una cadena lineal de restos de aminoácidos (con un número superior o igual a dos) unidos por enlaces peptídicos. Por lo tanto, los « péptidos o polipéptidos » en el sentido de la presente solicitud pueden ser, por ejemplo, oligopéptidos, péptidos o proteínas de acuerdo con la aceptación convencional de estos términos. Les restos de aminoácidos presentes en los polipéptidos de acuerdo con la invención se pueden elegir entre los restos de aminoácidos proteinogénicos o no. Preferentemente, se eligen entre los veinte restos de aminoácidos proteinogénicos y selenocisteína.

La notación de los polipéptidos se realiza desde el extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal. Los restos de aminoácidos presentes a lo largo de la cadena polipeptídica se indican de acuerdo con el código habitual de una letra o de tres letras. Un resto de aminoácido es un fragmento de polipéptido de fórmula -NH-(CH-R)-(C=O)-, en la que R representa una cadena lateral, diferente de un aminoácido con la otra.

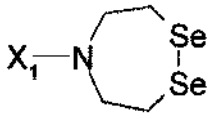
Por « fragmento peptídico » se entiende, en el contexto de la presente solicitud, una parte de polipéptido que comprende al menos un resto de aminoácido. Por ejemplo, un fragmento peptídico, en el sentido de la presente solicitud, puede ser por ejemplo: una secuencia de restos de aminoácidos (tal como -AHG- o -Ala-His-Gly-) si el fragmento peptídico no comprende ni el extremo N-terminal ni el extremo C-terminal del polipéptido; o bien una secuencia de restos de aminoácidos que presentan 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 restos de aminoácidos que presentan un grupo en su extremo C-terminal (tal como -AHG-OH o -Ala-His-Gly-OH) si el fragmento peptídico comprende el extremo C-terminal del polipéptido.

Péptido funcionalizado

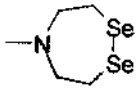
Un primer objeto de la invención se refiere a un péptido funcionalizado con un grupo de selenio elegido entre:

a) el péptido de fórmula (I): X_1-N($CH_2CH_2SeH)_2$;

b) el péptido de fórmula (I'):



en las que X_1 representa un fragmento peptídico y el grupo -N($CH_2CH_2SeH)_2$ o



forma un enlace amida con la terminación C=O del resto del aminoácido del fragmento peptídico X_1 que está en posición C-terminal.

El fragmento peptídico X_1 es de la forma Y_1-AA_1-AA_2-...-AA_n en la que Y_1 es un grupo N-terminal, preferentemente un átomo de hidrógeno, pero también opcionalmente cualquier grupo sustituyente de las aminas primarias o secundarias conocido por el experto en la materia, por ejemplo, un grupo acilo y en particular un grupo acetilo; n es un número entero superior o igual a 2; AA_1, AA_2, ..., AA_n representan, independientemente entre sí, restos de aminoácidos.

El polipéptido de fórmula (I) o (I') comprende preferentemente de 2 a 300 restos de aminoácidos, preferentemente de 5 a 100 restos de aminoácidos, de manera más particularmente preferente de 8 a 50 restos de aminoácidos.

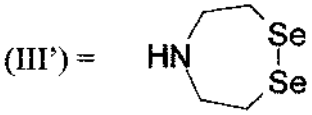
Los polipéptidos de fórmula (I) o (I') de forma preferente comprenden únicamente restos de aminoácidos elegidos entre los veinte restos de aminoácidos proteinogénicos y selenocisteína. Sin embargo, de acuerdo con un modo de realización en particular, los polipéptidos de fórmula (I) o (I') comprenden uno o varios restos de aminoácidos no proteinogénicos.

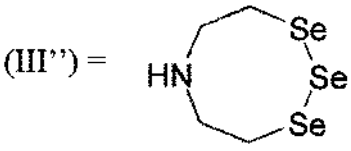
Los restos de aminoácidos de los polipéptidos de fórmula (I) o (I') se pueden proteger opcionalmente con grupos protectores de las cadenas laterales.

Compuesto de amina de fórmula (III') y (III")

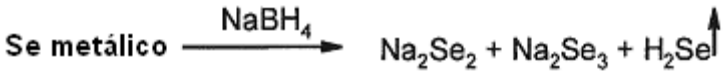
Otro objeto de la invención se refiere a los compuestos de amina de fórmula (III') y (III") que siguen a continuación y su método de preparación.

Los compuestos (III') y (III") responden a las fórmulas:

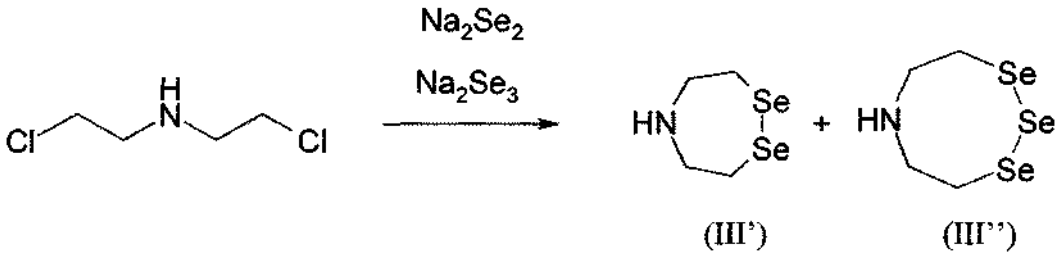




Los compuestos (III') y (III") se pueden obtener de acuerdo con el método que comprende la etapa a) que sigue a continuación:



seguida de la etapa b) siguiente:



(III') (III'')

La primera etapa mencionada anteriormente (etapa a) se realiza preferentemente en atmósfera de nitrógeno. Preferentemente, los reactivos introducen en frío, a continuación, la mezcla se lleva a reflujo.

De acuerdo con otro modo de realización, en la etapa a), $NaBH_4$ se sustituye por otro hidruro metálico, tal como $LiAlH_4$ o $LiBH_4$. En el caso de los dos hidruros metálicos mencionados, se forman los compuestos Li_2Se_2 y Li_2Se_3. Estos dos compuestos, Li_2Se_2 y Li_2Se_3 se usan después en la etapa b) que sigue a continuación.

Preferentemente, la segunda etapa (etapa b) se realiza a temperatura ambiente.

Preferentemente, la fase orgánica que comprende los productos (III') y (III") se purifica al final del método, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Método de obtención de los compuestos (I) y (I') en fase líquida

Otro objeto de la invención se refiere a un método de obtención del polipéptido funcionalizado (I) o (I') en fase líquida, este método comprende una primera etapa de síntesis peptídica y una segunda etapa de funcionalización.

La primera etapa (etapa de síntesis peptídica) permite obtener el polipéptido de fórmula:

(II) X_1-OH

Esta etapa de síntesis peptídica se puede realizar de acuerdo con cualquier método conocido por el experto en la materia. En particular, se puede realizar en fase líquida o, preferentemente, en fase sólida.

De forma esquemática, la síntesis peptídica comprende la sucesión de acoplamientos de aminoácidos a partir de un iniciador (aminoácido inicial o fragmento peptídico que resulta de las adiciones de los aminoácidos precedentes) y desprotecciones. De forma más precisa, la síntesis peptídica puede comprender de forma sucesiva:

(a) proporcionar un fragmento peptídico que presenta un extremo N-terminal no protegido, y un aminoácido protegido en su extremo N-terminal;
(b) establecer un enlace peptídico entre el aminoácido y el fragmento peptídico, en el extremo N-terminal de dicho fragmento peptídico;
(c) desproteger el extremo N-terminal del aminoácido unido, para proporcionar el fragmento peptídico de la etapa (a) siguiente.

En el transcurso de las diferentes reacciones de acoplamiento, es ventajoso usar un compuesto activado, en particular una carbodiimida (por ejemplo, diciclohexilcarbodiimida o diisopropilcarbodiimida) en presencia de un triazol (por ejemplo, 1-hidroxi-benzotriazol o 1-hidroxi-7-azabenzotriazol), o una sal de fosfonio o uronio de un anión no nucleófilo (por ejemplo, HBTU, HATU, TBTU o PyBOP); o incluso usar aminoácidos activados en forma de halogenuros de ácido, por ejemplo, fluoruros de ácido.

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

Del mismo modo, las cadenas laterales de los restos de aminoácidos se protegen preferentemente en el transcurso de las diferentes reacciones de acoplamiento con uno o varios grupos protectores apropiados, por ejemplo, un grupo terc-butilo para las cadenas que portan una función de ácido carboxílico.

En este caso, una vez que se ha realizado la última reacción de acoplamiento de aminoácidos, se puede prever una reacción de desprotección de las cadenas laterales. Sin embargo, se debe observar que puede ser preferente conservar el conjunto de las protecciones (con la excepción de una protección opcional de la función COOH en el

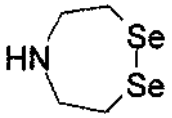
extremo C-terminal) en vista de la etapa de funcionalización.

Funcionalización

La etapa de funcionalización comprende de forma sucesiva:

- Opcionalmente, proteger el extremo N-terminal del polipéptido de fórmula (II) con un grupo protector, elegido preferentemente entre la familia de los carbamatos, amidas o grupos alquilo, y en particular un grupo terc-butoxicarbonilo (t-Boc), Fmoc (9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo), trifluoroacetilo o trifenilmetilo.
- Opcionalmente también, proteger las funciones de las cadenas laterales de los restos de aminoácidos del polipéptido de fórmula (II), y en particular de las funciones amina (preferentemente por medio de los grupos protectores mencionados anteriormente) y funciones ácido carboxílico (por medio, por ejemplo, de grupos terc-butilo).
- Como alternativa, y de acuerdo con un modo de realización más sencillo, se puede proporcionar el polipéptido de fórmula (II) directamente en una forma en la que el conjunto de las funciones amina los ácidos carboxílicos estén protegidos, en previsión de una desprotección selectiva de la función COOH del extremo C-terminal.
- La reacción de acoplamiento en fase líquida del polipéptido de fórmula (II) con un compuesto de amina elegido entre los compuestos (IIIa) y (III') en los que:

(IIIa) = $NH(CH_2\text{-}CH_2\text{-}Se\text{-}G_1)_2$

(III') = 

en los que G_1 representa un grupo protector del selenio,

- Opcionalmente desproteger el polipéptido.

De acuerdo con un modo de realización, el grupo protector G_1 del compuesto (IIIa) se elige entre los grupos de tipo trifenilmetilo y bencilo y en particular entre para-metilbencilo o para-metoxibencilo.

En el caso en el que el compuesto (IIIa) se usa como reactivo de partida para el acoplamiento con el compuesto (II), se prevé una etapa posterior de desprotección del grupo G_1 con el fin de obtener el compuesto (I) o (I'). Preferentemente, la desprotección se realiza por tratamiento con un ácido tal como ácido trifluoroacético o ácido fluorhídrico, o un oxidante tal como yodo.

Un activador está presente de forma ventajosa durante la reacción de acoplamiento, por ejemplo hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP) o hexafluorofosfato de bromo-trispirrolidinofosfonio (PyBROP) o el aminoácido C-terminal en sí mismo es activo en la forma de un derivado halogenado (en particular en forma de un fluoruro de aminoácido o cloruro de aminoácido), pudiéndose formar este previamente o formar *in situ* con la ayuda de reactivos apropiados conocidos por el experto la materia. Entre los halogenuros de aminoácidos, son preferentes los fluoruros de aminoácidos, formados previamente por reacción con 1,3,5-trifluorotriazina o formados *in situ* con la ayuda de TFFH (hexafluorofosfato de tetrametilfluoroformamidinio).

De manera general, también se puede considerar cualquier reactivo que permita la activación de la función ácido carboxílico del aminoácido conocido por el experto en la materia, tal como HBTU, TBTU, HATU, BOP... (se podrá hacer referencia, por ejemplo, a Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins de Lloyd-Williams, P., Albericio, F., Giralt, E., 1997, CRC Press). Son preferentes PyBOP, PyBROP, BOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitris-(dimetilamino)-fosfonio) o de manera más general los fosfonios.

El polipéptido funcionalizado (I) o (I') de acuerdo con la invención se puede obtener de acuerdo con una segunda variante.

Los segmentos de SeEA se pueden formar por separado mediante intercambio a partir de un segmento de SEA de tipo $X_1\text{-}N(CH_2CH_2\text{-}S\text{-}G_4)_2$ o tioéster $X_1\text{-}S\text{-}R_1$ con la ayuda de los reactivos de estructura (III') o (III"), G_4 representando un átomo de hidrógeno, un grupo protector de las funciones tiol o un enlace disulfuro y R_1 representando un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo o arilo, opcionalmente sustituido.

Los segmentos de SeEA también se pueden formar *in situ*, durante la ligación mediante intercambio a partir de un segmento de SEA de tipo X_1-SEA o tioéster $X_1\text{-}SR_1$ con la ayuda de los reactivos (III') o (III"). El segmento de tipo H-Cys-X_2 presente en solución consume el segmento X_1-SeEA formado por intercambio. En general, el segmento X_1-SeEA formado *in situ* no se observa ya que reacciona muy rápidamente con el segmento H-Cys-X_2. debido a la rapidez del intercambio y de la ligación de SeEA, como resultado se produce una aceleración de la ligación muy

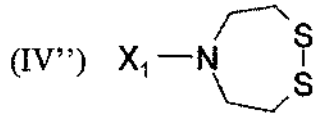
significativa, ya que el reactivo (III') o (III") se introduce en el medio de reacción de ligación.

Por lo tanto, de acuerdo con una segunda variante, la obtención de los compuestos (I) et (I') comprende las etapas sucesivas siguientes:

a2) proporcionar

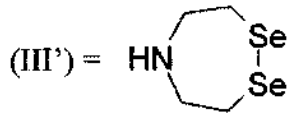
- un péptido funcionalizado sobre su extremo C-terminal mediante un grupo portador de una función tiol que responde a la fórmula (IV) o (IV"):

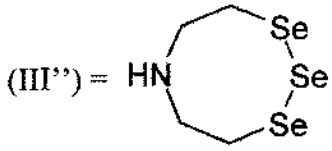
$$(IV) = X_1\text{-}N(CH_2CH_2\text{-}S\text{-}H)_2$$



- un péptido funcionalizado con un grupo portador de una función tioéster (IV') = X_1 -SR y R representa un grupo alquilo o arilo opcionalmente sustituido,

b2) la reacción en fase líquida entre el compuesto de fórmula (IV) o el compuesto de fórmula (IV") o el compuesto de fórmula (IV') y con el compuesto de amina de fórmula (III') o (III"):





en presencia opcionalmente de un compuesto reductor de los enlaces disulfuros en el caso en el que se use el compuesto (IV").

El compuesto de fórmula (IV) o de fórmula (IV") se puede obtener en particular de acuerdo con el protocolo descrito en el documento WO 2011/051906.

En la fórmula (IV'), el grupo R representa preferentemente un alquilo en C_1-C_{12} opcionalmente sustituido o un arilo en C_6-C_{12} opcionalmente sustituido. Algunos compuestos de este tipo se describen en particular en el documento WO96/34878 y en el documento WO98/28434.

De acuerdo con un modo de realización, el compuesto reductor de los enlaces disulfuros se puede elegir entre los compuestos de tiol, tales como ácido 4-mercaptofenilacético (MPAA), ditiotreitol (DTT), tiofenol y sus derivados, un alquiltiol (en particular bencilmercaptano), entre los compuestos de selenol tales como selenofenol o difenilseleniuro o entre las fosfinas tales como tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), o sus mezclas.

Al final de la reacción de acoplamiento precedente, se obtiene el compuesto (I'). El compuesto (I) se obtiene poniendo en contacto el compuesto (I') con un compuesto reductor de los enlaces diselenio o triselenio.

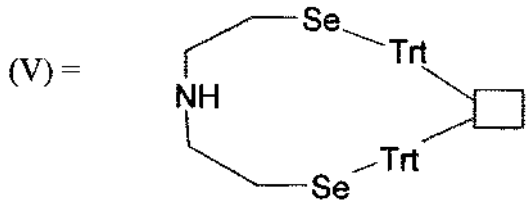
Entre los compuestos conocidos como reductores de los enlaces diselenio o triselenio, se pueden mencionar: tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), tioles reductores tales como ácido 4-mercaptofenilacético (MPAA), tiofenol, bencilmercaptano, ditiotreitol (DTT), selenofenol o difenilseleniuro más un agente reductor de los enlaces diselenio, cinc metálico, hidruros tales como $NaBH_4$, $LiBH_4$, $NaBH_3CN$, $NaBH(OAc)_3$.

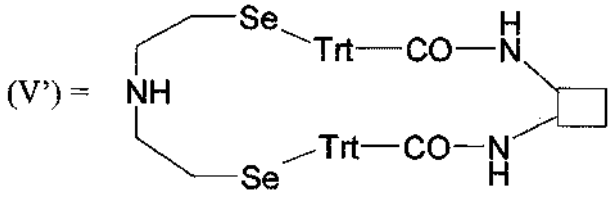
Al final de la etapa de funcionalización, se obtiene el polipéptido de fórmula (I) o (I'). En este estadio es ventajoso prever una etapa de purificación del compuesto, por ejemplo mediante cromatografía en fase líquida.

Resina de polímero funcionalizada

Otro objeto de la invención se refiere a las resinas de polímeros funcionalizada las que responden a la estructura (V)

o (V'):





en las que,

□ representa un soporte sólido,
Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes, elegidos en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano.

Estas resinas de polímeros se usa una continuación para preparar el péptido funcionalizado SeEA.

A modo de soporte sólido D, se usa un polímero soluble o insoluble, estando el polímero insoluble preferentemente en forma de partículas (perlas). Por ejemplo, se puede usar una resina a base de poliestireno (preferentemente) o incluso a base de poliacrilamida, polietilenglicol, celulosa, polietileno, poliéster, látex, poliamida, polidimetilacrilamida, copolímero de polietilenglicol-poliestireno, copolímero de polietilenglicol-poliacrilamida o incluso una resina derivada de los mismos.

Para preparar la resina de polímero funcionalizada (V) o (V'), se usa un soporte sólido □ portador de una funcionalización adaptada, □-Z, en la que Z es un grupo conector. Preferentemente, el soporte sólido presenta grupos cloro-trifenilmetilo (o clorotritilo), en el que el trifenilmetilo está opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes, elegidos en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano.

A modo de ejemplos de soporte sólido □-Z funcionalizado, se pueden mencionar las resinas de poliestireno que presentan grupos conectores de cloruro de tritilo, cloruro de 2-clorotritilo, cloruro de 4-metiltritilo o cloruro de 4-metoxi-tritilo. Los soportes de este tipo están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Glycopep.

De acuerdo con otro modo de realización, el soporte sólido funcionalizado □-Z presenta grupos conectores que son grupos de tipo alcohol de tritílico, es decir, grupos OH-Trt-CO-NH-, en los que el trifenilmetilo (Trt) está opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes, elegidos en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano. Algunos soportes sólidos que presentan grupos conectores de este tipo se describen por ejemplo en Quibell, JACS 1995, 117, 11656-11668, y están disponibles en el mercado, por ejemplo, en la gama ChemMatrix® de soportes sólidos de polietilenglicol.

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

- ya sea con un agente bromado (en particular bromuro de acetilo) para modificar los grupos conectores en la forma Br-Trt-CO-NH-;
- ya sea con un agente clorado (en particular cloruro de oxalilo) para modificar los grupos conectores en la forma de Cl-Trt-CO-NH-;
- ya sea con un ácido tal como ha sido trifluoroacético, para modificar los grupos conectores en la forma de H_2O^+-Trt-CO-NH-;
- ya sea con $BF_3.Et_2O$, para modificar los grupos conectores en la forma BF_3 :HO-Trt-CO-NH-, de acuerdo con Singh, S*. et al.,* J. Org. Chem. 2004, 69, 4551-4554.

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

La preparación de la resina de polímero funcionalizada se realiza por acoplamiento del compuesto de amina de fórmula:

(III) $NH(CH_2\text{-}CH_2\text{-}Se\text{-}H)_2$

con el soporte sólido funcionalizado, □-Z, mencionado anteriormente. El compuesto de amina (III) se puede obtener por sí mismo por desprotección del compuesto de amina de fórmula (IIIa) mencionado anteriormente, en el que G_1 es un grupo protector del selenio.

El acoplamiento se realiza en medio ácido con el fin de limitar los riesgos de desenmascaramiento de la aminas secundaria, lo que induciría reacciones secundarias.

Los grupos cloruro de tritilo en exceso se neutralizan preferentemente, por ejemplo, con metanol. Por lo tanto, es importante añadir una base para neutralizar el HCl formado.

Se puede prever que la preparación de la resina de polímero funcionalizada forme parte integrante del método de preparación en fase sólida de los polipéptidos de fórmula (I) y (I').

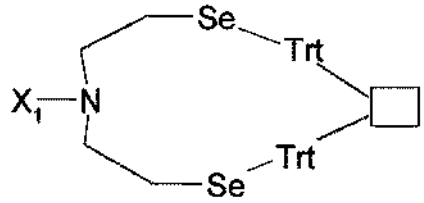
Como alternativa, la resina de polímero funcionalizada se puede preparar por adelantado y de una manera distinta, con el fin de que esté lista para su uso en el contexto del método de preparación en fase sólida de péptidos de fórmula (I) y (I').

El uso de soportes sólidos de este tipo puede permitir usar esqueletos de resina de tipo polietilenglicol o polietilenglicol-poliestireno, más adaptados a la preparación de polipéptidos largos que las resinas de tipo poliestireno.

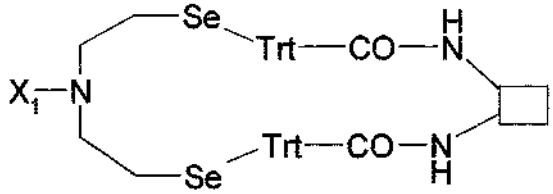
Preferentemente, las partículas de resina presentan un Dv50 comprendido entre 1 y 1000 µm. El Dv50 se define como el 50º centil de la distribución de tamaño de las partículas, es decir, que un 50 % de las partículas tienen un tamaño inferior al Dv50 y un 50 % tienen un tamaño superior al Dv50. De manera general, el Dv50 es característico del perfil de granulometría (distribución volumétrica) de las partículas, y se puede determinar mediante granulometría láser (para un tamaño inferior a 200 µm), comediante tamizado (para un tamaño superior a 200 µm).

Otro objeto de la invención se refiere a un péptido injertado sobre una resina de polímero funcionalizada que presenta la estructura (VII) o (VII'):

(VII) =



(VII') =



en las que,

□ representa un soporte sólido,
Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes, elegidos en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano, X_1 representa un fragmento peptídico funcionalizados sobre su extremo C-terminal.

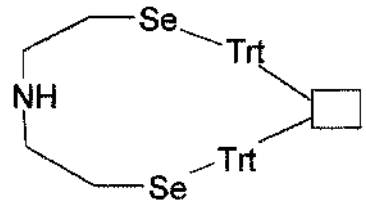
Método de obtención de péptidos de fórmulas (I) y (I') en fase sólida

Otro objeto de la invención se refiere a un método de preparación en fase sólida de los péptidos (I) y (I') descrito anteriormente.

Este método en fase sólida comprende una fase de funcionalización seguida por una fase de síntesis peptídica.

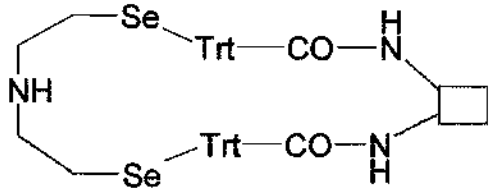
La primera etapa comprende proporcionar una resina de polímero funcionalizada que presenta la estructura:

(V) =



O

(V') =

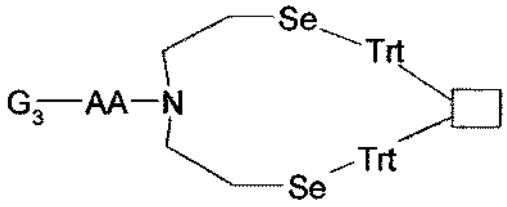


en las que,

□ representa un soporte sólido,
Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes, elegidos en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano.

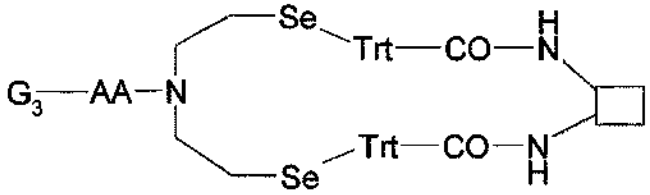
La segunda etapa del método comprende el injerto de un aminoácido G_3 - AA sobre la resina de polímero funcionalizada (V) o (V') obtenida en la primera etapa para producir el compuesto de estructura (VI):

(VI)



O de estructura (VI'):

(VI')



en las que,

□ y Trt tienen el mismo significado que en el compuesto (V) o (V'),
AA representa un resto de aminoácido que comprende opcionalmente uno o varios grupos protectores;
G_3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de la función amina N-terminal de AA.

Preferentemente, el aminoácido AA está protegido en su extremo N-terminal por un grupo protector G_3 inestable en presencia de base, elegido preferentemente entre los grupos 2-(4-nitrofenilsulfonil)etoxicarbonilo (NSC) o Fmoc.

Preferentemente, el aminoácido AA comprende grupos protectores sobre la totalidad o una parte (preferentemente la totalidad) de las funciones presentes sobre su cadena lateral, y en particular las funciones ácido carboxílico (ácidos aspártico y glutámicos), amina (para la lisina), alcohol (para la serina o la treonina), fenol (para la tirosina), tiol o selenol (para la cisteína o selenocisteína), guanidina (para la arginina) e imidazol (para la histidina). El experto en la materia conoce algunos grupos protectores de este tipo. Por ejemplo, se podrá hacer mencionar la obra de referencia Protective groups in organic synthesis, 2ª edición, T. Greene y P. Wuts, John Wiley & Sons, Inc.

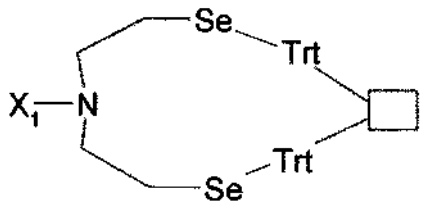
Preferentemente, el aminoácido se activa en presencia de HATU (hexafluorofosfato de 2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-il)--1,1,3,3-tetrametiluronio Metanaminio), PyBOP o BOP o de manera más particularmente preferente en presencia de PyBROP, o incluso en forma de un halogenuro, en particular fluoruro (es decir, que un átomo de flúor está unido al grupo acilo del resto de aminoácido).

El aminoácido reacciona con la función amina secundaria presente sobre un soporte sólido funcionalizado para formar un enlace amida. Después del acoplamiento del aminoácido, se puede proceder opcionalmente a la desprotección del mismo.

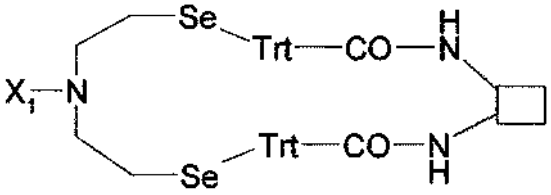
Por lo tanto, en este modo de realización, la etapa de funcionalización consiste en crear un soporte sólido iniciador a partir de un soporte sólido funcionalizado previamente.

La tercera etapa comprende la síntesis peptídica a partir del aminoácido AA injertado sobre la resina de polímero para producir el compuesto (VII) o (VII'):

(VII)



(VII')



La etapa de síntesis peptídica se realiza de manera análoga a la que ya se ha descrito anteriormente, que se refiere la síntesis peptídica en fase líquida, siendo proporcionado el iniciador inicial por el aminoácido AA injertado sobre el soporte sólido.

Por último, una vez que la síntesis peptídica termina, se prevé una reacción de separación (o escisión) del polipéptido de su soporte, por corte del enlace entre Trt y Se para producir el compuesto (I) o (I'). Preferentemente, el corte se realiza con una solución de ácido trifluoroacético que comprende las trampas de carbocationes conocidas por el experto en la materia tales como agua, triisopropilsilano, tiofenol, tioanisol, anisol, dimetilsulfuro, etc...

Opcionalmente, también se pueden prever las desprotecciones adecuadas de las cadenas laterales de los aminoácidos para la obtención del péptido funcionalizado de fórmula (I) o (I').

Al igual que para el método en fase líquida, en este estadio es ventajoso prever una etapa de purificación del compuesto, por ejemplo, mediante cromatografía en fase líquida.

Método de ligación nativa

Otro objeto de la invención se refiere a un método de preparación de un polipéptido de fórmula (VIII):

(VIII) X_1-C_1-X_2-C_2-...-C_{i-1}-X_i-...-C_{n-1}-X_n

en la que,

X_1, X_2,..., X_i,..., X_n son fragmentos peptídicos,
C_1, C_2, ..., C_{i-1}, ..., C_{n-1} son restos de aminoácidos que portan una función tiol, o selenol

n es un número entero superior o igual a 2,
i es un número entero cualquiera que varía de 1 a n,

comprendiendo este método una o varias etapas de reacción entre un compuesto de fórmula (IX_i):

(IX_i) X'_i-$N(CH_2CH_2$-Se-H$)_2$

en la que:

X'_1 representa X_1
y X'_i representa C_{i-1}-X_i para i > 1

y un compuesto de fórmula (X_{i+1}):

(X_{i+1}) C_i-X_{i+1}-...-C_{n-1}-X_n

para formar un compuesto de fórmula (X_i):

(X_i) X'_i-C_i-X_{i+1}-...-C_{n-1}-X_n

El resto C_i es un resto de aminoácido que comprende una función tiol o selenol. Esta función tiol o selenol puede ser en particular una función beta-amino tiol o beta-amino selenol (en cuyo caso, el resto C_i representa preferentemente el resto de cisteína o el resto de selenocisteína), una función gamma-amino tiol o gamma-amino selenol (en cuyo caso, el resto C_i representa preferentemente el resto de homocisteína u homoselenocisteína).

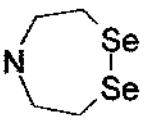
La invención permite producir polipéptidos encadenando de forma sucesiva varias reacciones de ligación. Parece que esto puede ser apropiado para obtener polipéptidos de gran tamaño, por ejemplo, polipéptidos que comprenden más de aproximadamente 100 restos de aminoácidos. En efecto, en tales casos, la preparación de polipéptidos de fórmulas (IX_i) y (X_i) mediante síntesis directa puede tener un rendimiento bajo, y por lo tanto es ventajoso usar dos o más de dos ligaciones sucesivas, para sintetizar directamente solo los polipéptidos que comprenden por ejemplo menos de aproximadamente 50 restos de aminoácidos.

A modo de ejemplo, el uso de dos ligaciones sucesivas permite obtener un polipéptido que comprende aproximadamente 150 restos de aminoácidos sin tener que sintetizar directamente el polipéptido que comprende más de aproximadamente 50 restos de aminoácidos; el uso de tres ligaciones sucesivas permite obtener un polipéptido que comprende aproximadamente 200 restos de aminoácidos sin tener que sintetizar directamente el polipéptido que comprende más de aproximadamente 50 restos de aminoácidos.

El polipéptido de fórmula (VIII) se puede obtener usando varios métodos de ligación. Otros métodos de ligación son, por ejemplo, métodos que hacen intervenir tioésteres o que hacen intervenir compuestos de azufre en particular tales como los que se describen en el documento WO 2011/051906.

el método de preparación del polipéptido de fórmula (VIII) de acuerdo con la invención comprende al menos una etapa de reacción entre un compuesto de fórmula (IX_i) y un compuesto de fórmula (X_i).
Por lo tanto, el método de acuerdo con la invención permitió tener un polipéptido de fórmula (VIII); cada X_i, para i entero entre 1 y n, siendo un fragmento peptídico; y cada C_i, para i entero entre 1 y n, siendo un resto de aminoácido que comprende una función tiol o selenol, y en particular un resto de cisteína o selenocisteína de acuerdo con un modo de realización en particular, usando n-1 ligaciones sucesivas.

De acuerdo con un modo de realización de la invención, el compuesto (IX_i) se puede obtener a partir del compuesto (IX'_i):

(IX'_i) = 

en presencia de al menos un compuesto reductor de los enlaces diselenio y/o triselenio. En efecto, el polipéptido de fórmula (IX'_i) se reduce entonces *in situ* y proporciona el polipéptido de fórmula (IX_i) para la reacción de ligación.

De acuerdo con un modo de realización, el compuesto reductor se elige entre tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), ácido 4-mercaptofenilacético (MPAA), bencilmercaptano, tiofenol, DTT, 2-mercaptoetilsulfonato de sodio (MESNa), selenofenol.

De forma análoga a la que se ha descrito preferentemente para los compuestos (I) y (I'), de acuerdo con un modo de

realización, los compuestos (IX_i) y (IX'_i) se pueden formar por intercambio, a partir de un segmento de SEA de estructura X'_i-$N(CH_2CH_2$-S-$G_5)_2$ o un tioéster de estructura X'_i-S-R_1 con la ayuda de los compuestos de selenio de estructura (III') o (III"), opcionalmente en presencia de compuestos reductores de enlaces disulfuro y/o diselenio, G_5 representando H, un grupo protector de las funciones tiol o un enlace disulfuro y R_1 representando H o un grupo protector del azufre.

En el caso en el que i es igual a 1, los compuestos (IX_i) y (IX'_i) corresponden respectivamente a los compuestos (I) y (I').

De manera general, la reacción de ligación a partir del polipéptido de fórmula (IX'_i) como reactivo se puede realizar de forma más práctica que la reacción de ligación directamente con el polipéptido de fórmula (IX_i). En efecto, el polipéptido de fórmula (IX_i) tiene una tendencia natural a oxidarse en el polipéptido de fórmula (IX'_i), en particular bajo la acción del oxígeno del aire. Por ejemplo, es posible que el polipéptido de forma abierta (IX_i) se oxide en el tiempo durante el que está almacenado en forma liofilizada. En otros términos, una preparación del polipéptido de fórmula (IX_i) contiene por lo general necesariamente en parte el polipéptido de fórmula (IX'_i). La presencia de estas dos formas puede complicar la caracterización y la purificación. Esto es por lo que puede ser más sencillo realizar la reacción de ligación mediante puesta en contacto del polipéptido de fórmula (IX'_i) con el polipéptido de fórmula (X_i), el polipéptido de terminación cíclica de fórmula (IX'_i) siendo reducido *in situ* en el polipéptido abierto de fórmula (IX_i).

Por las mismas razones, incluso cuando la reacción de ligación se realiza directamente por puesta en contacto del polipéptido de fórmula (IX_i) con el polipéptido de fórmula (X_i), es preferente usar, durante la reacción, uno o varios de los compuestos reductores de los enlaces diselenio mencionados anteriormente.

La reacción de ligación interviene preferentemente en fase líquida, y en particular en medio acuoso, por ejemplo, en un tampón fosfato. Preferentemente, esta reacción se realiza a un pH comprendido entre 4 y 8,5, de manera más particularmente preferente a un pH comprendido entre 5 y 7,5 y de forma ideal a un pH de aproximadamente 5,5.

La reacción de ligación se realiza preferentemente a una temperatura comprendida entre 0 ºC y 50 ºC, y de forma ideal a una temperatura de aproximadamente 37 ºC. La duración de la reacción se ajusta en función de la elección de los reactivos y otras condiciones de la reacción. La duración apropiada también se puede ajustar de acuerdo con los resultados de un análisis de cromatografía líquida - espectrometría de masas en el transcurso de la reacción. La reacción apropiada por lo general será de varias horas a varios días.

Cada uno de los polipéptidos de fórmula (IX_i) y (X_i) está presente preferentemente a una concentración comprendida entre 0,01 y 50 mM, durante la reacción. La proporción de concentración molar entre los polipéptidos de fórmula (IX_i) y (X_i) durante la reacción está comprendida preferentemente entre 2:3 y 3:2.

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

La cinética de ligación de acuerdo con la presente invención es significativamente superior a la cinética de ligación obtenida con compuestos de azufre descritos en el documento WO 2011/051906 o con tioésteres tales como los enseñados por Kent y Dawson.

Debido a la rapidez de la ligación de SeEA, ésta se puede realizar en presencia de otros grupos capaces de participar en una reacción de ligación nativa, como los segmentos de SEA o tioéster.

La combinación de las ligaciones de SeEA y SEA constituye una herramienta muy poderosa para la síntesis total de proteínas. Para la producción de una proteína que se debe sintetizar ligación de varios fragmentos, la ligación de SEA se puede realizar por ejemplo para las uniones fáciles, y la ligación de SeEA para las uniones difíciles. En efecto, la ligación de SeEA permite formar fácilmente uniones que presentan impedimentos, en 4 horas por ejemplo para la unión de Val-Cys, mientras que este tipo de unión necesita tiempos de ligación de 96 horas con la ligación de SEA y/o de 8 horas para la ligación de NCL.

Otra forma interesante de aprovechar las ligaciones de SeEA y SEA es la ligación secuencial en una etapa de SeEA-SEA. Se puede realizar para unir los fragmentos sin aislamiento y purificación intermedia (reacción denominada en una etapa) cuando las uniones tienen un impedimento estérico análogo. Un ejemplo de realización de esta variante se explica con detalle a continuación.

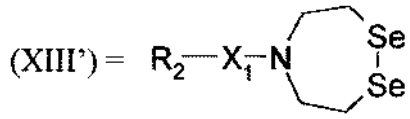
De acuerdo con un modo de realización de la invención, el método de ligación de la invención permite la preparación, a partir de tres fragmentos peptídicos, de un polipéptido representado co la fórmula (XII):

$$(XII) = X_1\text{-}C_1\text{-}X_2\text{-}C_2\text{-}X_3$$

siendo obtenido dicho polipéptido mediante un método que comprende las etapas siguientes:

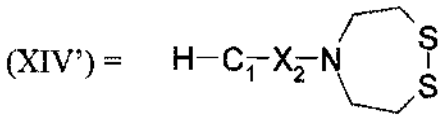
a) reacción entre un compuesto de fórmula (XIII) o (XIII'):

(XIII) = R_2-X_1-N(CH_2-CH_2-Se-H)$_2$



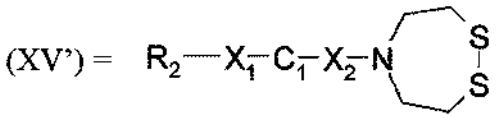
y un compuesto de fórmula (XIV) o (XIV'):

(XIV) = H-C_1-X_2-N(CH_2-CH_2-S-H)$_2$



para formar el compuesto de fórmula (XV) o (XV'):

(XV) = R_2-X_1-C_1-X_2-N(CH_2-CH_2-S-H)$_2$



b) reacción entre un compuesto de fórmula (XV) o (XV') y un polipéptido de fórmula (XVI):

(XVI) H-C_2-X_3

para formar el compuesto de fórmula (XII),
en las que,

R_2 representa un grupo protector de la función N-terminal de X_1,
X_1, X_2, X_3 representan, independientemente entre sí, fragmentos peptídicos,
C_1 y C_2 representan, independientemente el uno del otro, des restos de aminoácidos portadores de una función tiol o selenol.

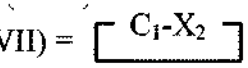
De forma análoga a la que se ha descrito anteriormente para la obtención de los compuestos (I) y (I'), los compuestos (XIII) y (XIII') mencionados anteriormente se pueden formar *in situ*, por intercambio a partir de reactivos de tipo (IIIa), (III') o (III") en presencia de compuestos de SEA de estructura R_2-X_1- SEA o tioéster de estructura R_2-X_1-S-R_1, en la que R_1 representa H o un alquilo o un arilo opcionalmente sustituido, permitiendo de este modo acelerar la segunda etapa de ligación.

Esta reacción de ligación de tres segmentos en una etapa se puede realizar para unir tres fragmentos sin aislamiento y purificación intermedia (reacción denominada « en una etapa ») cuando las uniones tienen un impedimento estético análogo. Siendo análogo el impedimento de las uniones, la ligación entre el compuesto (XIII) o (XIII') y el compuesto (XIV) o (XIV') será más rápida que la ciclación del compuesto (XIV) o (XIV') por ligación de SEA intramolecular, o que la polimerización del segmento (XIV) o (XIV') por ligación de SEA intermolecular. Las ligaciones de SEA intramolecular o intermolecular se describen en el documento WO 2011/051906.

Producción de un polipéptido cíclico por auto-ligación nativa

Los principios usados para la ligación nativa descritos anteriormente también se pueden usar para producir polipéptidos cíclicos, por auto-ligación nativa de un polipéptido (ligación de un extremo del polipéptido con otro el otro extremo del mismo polipéptido).

Objeto de la invención se refiere a un método de preparación de un polipéptido cíclico de fórmula (XVII):

(XVII) = 

X_2 representando un fragmento peptídico, y C_1 representan un resto de aminoácido que comprende una función tiol o selenol, comprendiendo dicho método al menos una etapa de reacción de ligación de un polipéptido de fórmula (XVIII):

(XVIII) $H\text{-}C_1\text{-}X_2\text{-}N(CH_2\text{-}CH_2\text{-}Se\text{-}H)_2$

consigo mismo.

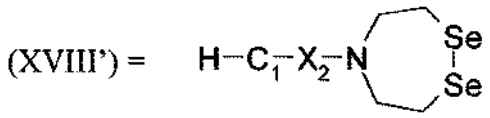
El polipéptido de fórmula (XVIII) comprende preferentemente entre 2 y 300 restos de aminoácidos, preferentemente entre 5 y 100 restos de aminoácidos, de manera más particularmente preferente entre 8 y 50 restos de aminoácidos.

El polipéptido de fórmula (XVIII) comprende un átomo de hidrógeno y un resto C_1 en el extremo N-terminal, teniendo C_1 el significado indicado anteriormente. En el presente documento, X_2 representa un fragmento peptídico de la forma $AA_1AA_2...AA_n$ en la que n es un número entero superior o igual a 1 y cada AA_i representa un resto de aminoácido.

El polipéptido de fórmula (XVIII) comprende preferentemente únicamente restos de aminoácidos elegidos entre los veinte restos de aminoácidos proteinogénicos y selenocisteína. Sin embargo, de acuerdo con un modo de realización en particular, el polipéptido de fórmula (XVIII) comprende uno o varios restos de aminoácidos no proteinogénicos, distintos de la selenocisteína.

Los restos de aminoácidos del polipéptido de fórmula (XVIII) se pueden proteger opcionalmente con grupos protectores de las cadenas laterales.

Es posible realizar la reacción de ligación mencionada anteriormente poniendo el polipéptido de fórmula (XVIII'):

(XVIII') = 

en presencia de al menos un compuesto reductor de los enlaces diselenio, que es preferentemente tal como se ha descrito anteriormente. En efecto, el polipéptido de fórmula (XVIII') se reduce a continuación *in situ* y proporciona el polipéptido de fórmula (XVIII) para la reacción de ligación.

De forma general, incluso cuando la reacción de ligación se realiza directamente a partir del polipéptido de fórmula (XVIII), es preferente usar, durante la reacción, uno o varios compuestos rectores de los enlaces diselenio mencionados anteriormente.

En general, la ciclación del polipéptido de fórmula (XVIII) no se ve obstaculizada por multimerizaciones simultáneas, si la reacción se realiza en condiciones suficientemente diluidas. Por ejemplo, se puede usar una concentración de polipéptido de fórmula (XVIII) comprendida entre 0,01 y 50 mM, por lo general de aproximadamente 1 mM (u opcionalmente entre 0,01 y 0,1 mM en caso de riesgos serios de multimerizaciones).

Además, las condiciones preferentes de realización de la reacción de ligación son las mismas que las descritas anteriormente para la reacción a partir de los polipéptidos de fórmula (IX) y (X).

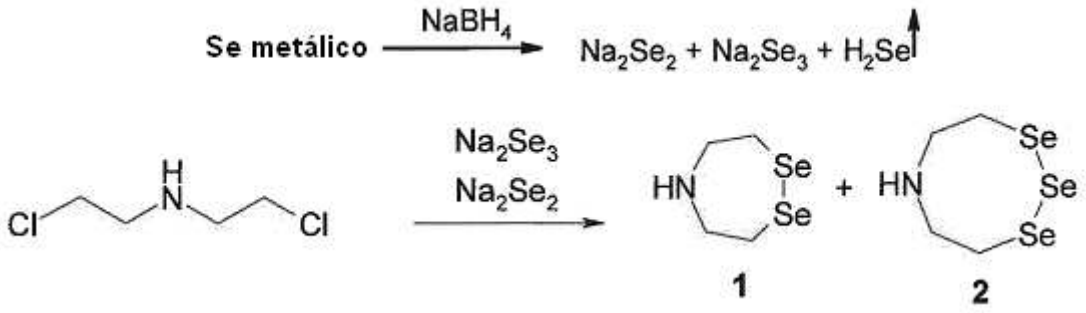
La reacción de ligación descrita anteriormente puede ir seguida de una etapa de purificación del polipéptido cíclico de fórmula (XVII) obtenido, por ejemplo, mediante cromatografía en fase líquida o mediante cualquier otra técnica habitual.

Kit de síntesis

Otro objeto de la invención se refiere a un kit de síntesis de polipéptido que comprende uno o varios péptidos de fórmulas (IX_i) o (IX'_i), o al menos un compuesto de fórmula (III') o (III"), y opcionalmente uno o varios reactivos de acoplamiento, de protección, de desprotección, o disolventes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de los compuestos **1** (Se_2EA) y **2** (Se_3EA)



Con arrastre de nitrógeno, se añade etanol absoluto a V = 19 ml gota a gota, con agitación a una mezcla de selenio Se (940 mg, 11,9 mmol, 1,5 eq) y borohidruro sódico ($NaBH_4$) (300 mg, 7,9 mmol) enfriado en un baño de hielo. Después de una reacción enérgica, el medio de reacción se lleva a reflujo durante 1 h 30. El diseleniuro de sodio, Na_2Se_2, formado en solución es de color marrón-rojo.

A temperatura ambiente, le clorhidrato de bis(2-cloroetil)amina (847 mg, 4,7 mmol, 0,5 eq) en solución en una mezcla de NaOH ac (0,5 M)/EtOH (1/1) a V = 3 ml se añade gota a gota durante 10 minutos sobre la solución de Na_2Se_2 y Na_2Se_3 precedente. El medio de reacción se agita 45 minutos a temperatura ambiente.

El medio de reacción a continuación se diluye a V = 10 ml con una solución de NaOH ac (0,5 M) a continuación se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 30 ml). A continuación, las fases orgánicas se combinan, se secan con Na_2SO_4, y a continuación se concentran hasta 1/3 del volumen total.

El concentrado orgánico obtenido se extrae a continuación con una solución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) (10 %) y a continuación se purifica directamente por RP-HPLC: Columna C_18 X-bridge (d = 1,9 cm, L = 20 cm, 130 Å, 5 µm), detección de UV (λ = 215 nm), tampón A: H_2O/TFA (1:0,05 % en v/v), tampón B: CH_3CN/H_2O/TFA (4:1:0,05 % en v/v/v), isocrático: tampón A (3 min), a continuación gradiente : tampón B (de un 0 % a un 50 % en 9 min, 25 ml/min).

Después de liofilización, los compuestos **1** (Se_2EA) 230 mg (Rendimiento R = 21 %) y los compuestos 2 (Se_3EA) 240 mg (Rendimiento R = 16 %) se obtienen en forma de un polvo de color amarillo.

Análisis de LC-MS Cromatograma de RP-HPLC de los compuestos 1 (Se_2EA) y 2 (Se_3EA) respectivamente

LC-MS: Tampón A: H_2O/TFA (1/0,1 % en v/v), Tampón B: CH_3CN/H_2O/TFA (4/1:0,1 % en v/v/v).

RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm) usando un gradiente lineal de un 0-100 % de B en 30 min, caudal 1 ml/min, detección de UV (λ = 215 nm).

MS: Modo de Ionización por Electronebulización positivo, voltaje del cono 30 V, analizador cuadrupolar.

El cromatograma y el espectro de masas del compuesto 1 se representan en las figuras 1a y 1b respectivamente.

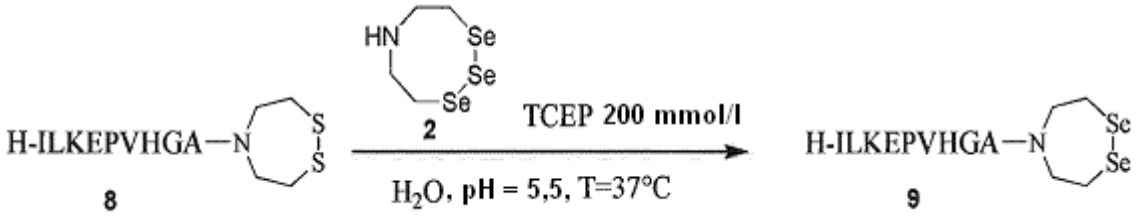
El cromatograma y el espectro de masas del compuesto 2 se representan en las figuras 2a y 2b respectivamente.

Ejemplo 2: Síntesis y aislamiento de los segmentos de SeEA de acuerdo con la invención por intercambio, a partir de segmentos de SEA.

*Síntesis del péptido **8**: H-ILKEPVHGA-SEA*

El método de síntesis de este péptido se describe en el documento Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Organic letters 2010, 12, 5238-41.

Síntesis del péptido 9: H-ILKEPVHGA-SeEA



La reacción se realiza en una caja de guantes(la concentración de dioxígeno es inferior a 50 ppm) en atmósfera de nitrógeno. Una solución de TCEP de 200 mmol/l se prepara en un tampón fosfato 0,1 M a pH = 7,2.
El pH de la solución de TCEP/MPAA obtenida se ajusta a pH = 5,5.

El péptido **8** (3,8 mg, 3 µmol) y el conector Se_3EA 2 (8,4 mg, 28 µmol, 10 eq) se disuelven en la solución precedente de TCEP a V = 297 µl. El medio de reacción se agita 24 h a 37 ºC.

Al final de la reacción, el medio de reacción se diluye a V = 2 ml con una solución de TFA (0,1 %) a continuación se purifica directamente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) (Columna C18 Nucleosil (d = 1 cm, L = 20 cm, 120 Å, 5 µm), detección de UV (λ = 215 nm), tampón A: H_2O/TFA (1:0,05 % en v/v), tampón B: CH_3CN/H_2O/TFA (4:1:0,05 % en v/v/v), gradiente : tampón B (de un 0 % a un 20 % en 5 min a continuación de un 20 % a un 42 % en 60 min, 6 ml/min)). Se obtienen 1,96 mg del péptido 9 (rendimiento de un 62 %).

*Análisis de LC-MS Cromatograma de RP-HPLC del péptido **9***

LC-MS: Tampón A: H_2O/TFA (1/0,1 % en v/v), Tampón B: CH_3CN/H_2O/TFA (4/1:0,1 % en v/v/v).

RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm) usando un gradiente lineal de un 0-100 % de B en 30 min, caudal 1 ml/min, detección de UV (λ = 215 nm).

MS: Modo de Ionización por Electronebulización positivo, voltaje del cono 30 V, analizador cuadrupolar.

La figura 3a corresponde al cromatograma de la solución después de un tiempo de reacción t de 0,8 h. Para t = 0,8 h, la reacción de intercambio no ha acabado, de hecho con el pico que corresponde al péptido **8** todavía está presente en cantidades significativas.

La figura 3b corresponde al cromatograma de la solución después de un tiempo de reacción t de 6 h y la figura 3c es el espectro de masas correspondiente. Este cromatograma muestra que la reacción de intercambio ha acabado.

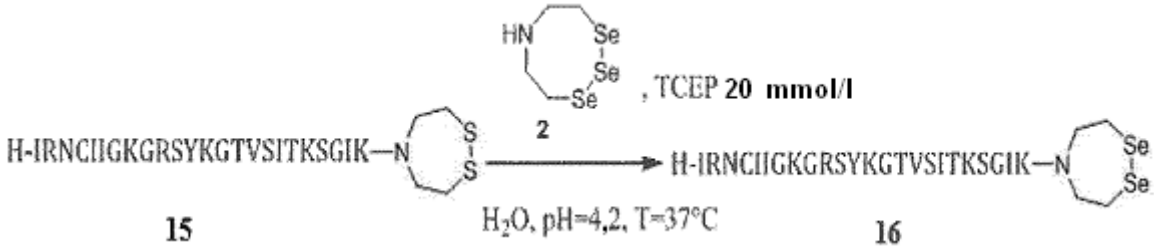
Las figuras 4a y 4b corresponden al cromatograma y el espectro de masas del péptido **9** después de purificación.

<u>Ejemplo 2 bis: Síntesis y aislamiento de segmentos de SeEA de gran tamaño de acuerdo con la invención por intercambio, a partir de segmentos de SEA.</u>

*Síntesis del péptido **15**: H-IRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIK-SEA*

El método de síntesis de este péptido se describe en el documento Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Organic letters 2010, 12, 5238-41.

*Síntesis del péptido **16**: H-IRNCIIGKGRSYKGTVSITKSGIK-SeEA*



La reacción se realiza en atmósfera de nitrógeno. Una solución de TCEP a 20 mmol/l se prepara en un tampón de acetato 0,1 M a pH = 5,5. El pH de la solución de TCEP obtenida se ajusta a pH = 4,2.

El péptido **15** (4 mg, 1,4 µmol) y el conector Se_3EA **2** (4,4 mg, 14,3 µmol, 10 eq) se disuelven en la solución precedente de TCEP a V = 719 µl. El medio de reacción se agita 24 h a 37 ºC.

Al final de la reacción, el medio de reacción se diluye a V = 3 ml con una solución de TFA (0,1 %) y a continuación se purifica directamente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) (Columna $C_1$8 Nucleosil (d = 1 cm, L = 20 cm, 120 Å, 5 µm), detección de UV (λ = 215 nm), tampón A: H_2O/TFA (1:0,05 % en v/v), tampón B: CH_3CN/H_2O/TFA (4:1:0,05 % en v/v/v), gradiente : tampón B (de un 0 % a un 20 % en 5 min a continuación de un 20 % a un 42 % en 60 min, 6 ml/min)). Se obtienen 1,8 mg de péptido 16 (Rendimiento de un 38 %).

*Análisis de LC-MS Cromatograma de RP-HPLC del péptido **16***

LC-MS: Tampón A: H_2O/TFA (1/0,1 % en v/v), Tampón B: CH_3CN/H_2O/TFA (4/1:0,1 % en v/v/v).

RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm) usando un gradiente lineal de un 0-100 % de B en 30 min, caudal 1 ml/min, detección de UV (λ = 215 nm).

MS: Modo de Ionización por Electronebulización positivo, voltaje del cono 30 V, analizador cuadrupolar.

La figura 13 corresponde al cromatograma de la solución después de un tiempo de reacción t de 24 h. El pico que corresponde al péptido **16** está presente e indica que la reacción de intercambio ha terminado.

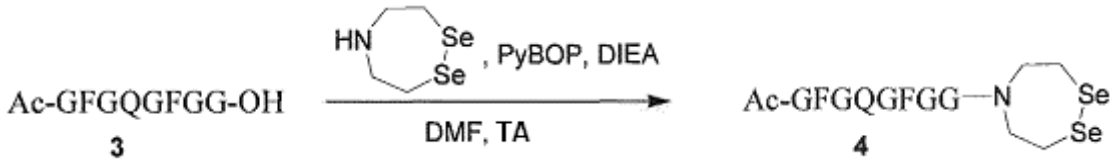
Las figuras 14a y 14b corresponden respectivamente al cromatograma y al espectro de masas del péptido **16** después de purificación.

Ejemplo 3: Ligación negativa con compuestos a base de selenio de acuerdo con la invención o a base de azufre de acuerdo con la técnica anterior

Síntesis del péptido 3, SEQ ID NO: 1 Ac-GFGQGFGG-OH

El método de síntesis de este péptido se describe en el documento Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Organic letters 2010, 12, 5238-41.

*Síntesis del péptido **4**: Ac-GFGQGFGG-SeEA*



3 4

El péptido **3** (50 mg, 0,07 mmol) y la molécula **1** (30 mg, 0,13 mmol, 2 eq) se disuelven en un V = 3,5 ml de DMF (*N,N*-dimetilformamida) seguido por la adición de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidinofosfonio (PyBOP) (68 mg, 0,14 mmol, 2 eq). A continuación, se añade *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) (45 µl, 0,28 mmol, 4 eq). El medio de reacción se agita 1,5 horas a temperatura ambiente y a continuación se precipita en una mezcla fría de éter dietílico/heptano (75 ml, 1:1 en v/v), se centrifuga, a continuación se disuelve en una cantidad mínima de agua y se liofiliza.

El péptido **4** en bruto se purifica directamente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) (Columna C18 Nucleosil (d = 1 cm, L = 20 cm, 120 Å, 5 µm), detección de UV (λ = 215 nm), tampón A: H_2O/TFA (1:0,05 % en v/v), tampón B: CH_3CN/H_2O/TFA (4:1:0,05 % en v/v/v), gradiente : tampón B (de un 0 % a un 20 % en 5 min a continuación de un 20 % a un 42 % en 60 min, 6 ml/min)). Se obtienen 15 mg de péptido **4** (Rendimiento de un 24 %).

Análisis de LC-MS Cromatograma de RP-HPLC del péptido 4

LC-MS: Tampón A: H_2O/TFA (1/0,1 % en v/v), Tampón B: CH_3CN/H_2O/TFA (4/1:0,1 % en v/v/v).

RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm) usando un gradiente lineal de un 0-100 % de B en 30 min, caudal 1 ml/min, detección de UV (λ = 215 nm).

MS: Modo de Ionización por Electronebulización positivo, voltaje del cono 30 V, analizador cuadrupolar.

Las figuras 5a y 5b representan respectivamente el cromatograma y el espectro de masas del péptido **4** después de purificación.

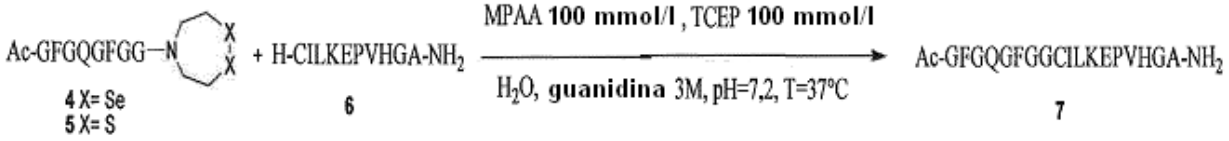
*Síntesis del péptido **5**: Ac-GFGQGFGG-SEA*

El método de síntesis de este péptido se describe en el documento Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Organic letters 2010, 12, 5238-41.

Síntesis del péptido 6, SEQ ID NO: 2 H-CILKEP VHGA -NH_2

El método de síntesis de este péptido se describe en el documento Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Organic letters 2010, 12, 5238-41.

Síntesis del péptido 7, SEQ ID NO: 3 Ac-GFGQGFGGCILKEPVHGA-NH_2 por ligación de SeEA. Comparación de la reactividad del péptido 4 Ac-GFGQGFGG-SeEA y del péptido 5 Ac-GFGQGFGG-SEA



a- Cinética y rendimiento de ligación del péptido 4 Ac-GFGQGFGG-SeEA con el péptido **6** H-CILKEPVHGA-NH_2

La ligación de SeEA del péptido **4** con el péptido **6** se realizan una caja de guantes (concentración de dioxígeno inferior a 50 ppm) en atmósfera de nitrógeno. Una solución de guanidina 3 M se prepara en un tampón fosfato 0,2 M a pH = 7,3. A continuación, se añaden tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP, 28,6 mg, 0,1 mmol) y ácido 3-mercaptofenilacético (MPAA, 16,8 mg, 0,1 mmol). El pH de la solución de TCEP/MPAA/Guanidina obtenida se ajusta a pH = 7,2.

Los péptidos **4** (4,9 mg, 5 µmol) y **6** (10,6 mg, 7,6 µmol, 1,5 eq) se disuelven en la solución precedente de TCEP/MPAA/Guanidina (1,5 ml). El medio de reacción se agita 24 h a 37 ºC.

Con la reacción de ligación terminada, el medio de reacción se diluye con agua a V = 3 ml y a continuación se acidifica con una solución de TFA (10 %) a V = 1 ml y a continuación el MPAA se extrae con éter durante 3 veces con 6,5 ml.

El producto de de ligación **7** en fase acuosa se purifica directamente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC) (Columna C18 Nucleosil (d = 1 cm, L = 20 cm, 120 Å, 5 µm), detección de UV (λ = 215 nm), tampón A: H_2O/TFA (1:0,05 % en v/v), tampón B: CH_3CN/H_2O/TFA (4:1:0,05 % en v/v/v), gradiente : tampón B (de un 0 % a un 20 % en 5 min a continuación de un 20 % a un 42 % en 60 min, 6 ml/min). Se obtienen 5,6 mg de péptido **7** (Rendimiento de un 54 %).

Análisis de LC-MS Cromatograma de RP-HPLC del péptido 7

LC-MS: Tampón A: H_2O/TFA (1/0,1 % en v/v), Tampón B: CH_3CN/H_2O/TFA (4/1:0,1 % en v/v/v).

RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm) usando un gradiente lineal de un 0-100 % de B en 30 min, caudal 1 ml/min, detección de UV (λ = 215 nm).

MS: Modo de Ionización por Electronebulización positivo, voltaje del cono 30 V, analizador cuadrupolar.

Las figuras 6a y 6b representan respectivamente el cromatograma y el espectro de masas del péptido 7 después de purificación.

b- Cinética de ligación del péptido **5** Ac-GFGQGFGG-SEA con el péptido **6** H-CILKEPVHGA-NH_2

La reacción de ligación SEA del péptido **5** con el péptido **6** se realiza estrictamente en las mismas condiciones.

Comparación de las cinéticas

La figura 7 representa una comparación de las cinéticas de reacción de ligación para la formación del péptido **7**, con un compuesto a base de selenio (péptido **4**) de acuerdo con la invención, curva representada con el símbolo • o con un compuesto a base de azufre (péptido **5**) de acuerdo con el estado de la técnica, curva representada con el símbolo A.

La figura 7 muestra una velocidad de reacción mayor para la reacción de ligación de acuerdo con la invención, curva representada con el símbolo •.

Ejemplo 4: Comparación de las cinéticas de ligaciones para los métodos de SeEA. SEA y NCL (química de los tioésteres)

*Síntesis del péptido **15a**:* H-ILKEPVHGV-SEA

El método de síntesis de este péptido se describe en el documento Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Organic letters 2010, 12, 5238-41.

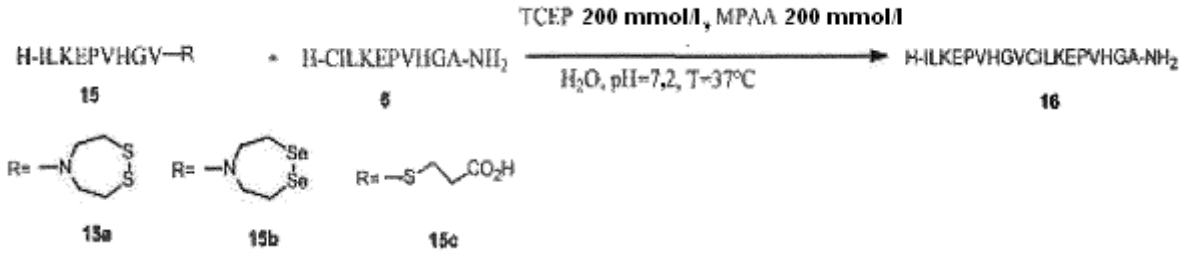
*Síntesis del péptido **15b***: H-ILKEPVHGV-SeEA

A partir del péptido **15a**, el método de síntesis del péptido **15b** es estrictamente idéntico al usado para la síntesis del péptido **9**.

*Síntesis del péptido **15c**:* H-ILKEPVHGV-MPA (MPA = ácido 3-mercapto propiónico)

El método de síntesis de este péptido se describe en el documento Dheur, J.; Ollivier, N.; Vallin, A.; Melnyk, O. Journal of Organic Chemistry 2010, 76, 3194-3202.

*Comparación de las cinéticas de ligación del péptido **15a/15b/15c** H-ILKEPVHGV-R con el péptido 6 H-CILK-EPVHGA-NH_2 para los métodos de ligaciones de SeEA, SEA y NCL*



Las diferentes ligaciones del péptido 15a o 15b o **15c** con el péptido 6 se realizan por separado en una caja de guantes ($[O_2]$ < 50 ppm) en atmósfera de nitrógeno. Una solución de TCEP de 200 mmol/l se prepara en un tampón fosfato 0,1 M a pH = 7,2. A continuación, se añade el ácido 3-mercaptofenilacético (MPAA 33 mg, 0,2 mmol). El pH de la solución de TCEP/MPAA obtenida se ajusta a pH = 7,2.
Los péptidos 15a o 15b o **15c** y 6 (1,5 eq) se disuelven por separado en la solución precedente de TCEP/MPAA a una concentración de 3 mmol/l. El medio de reacción se agita 24 h a 37 ºC. La cinética de formación del producto de ligación **16** va seguida por HPLC.

La figura 12 permite la comparación de la cinética de reacción de formación del péptido **16** de acuerdo con el método de ligación de SeEA, SEA o NCL (química de los tioésteres).

En la figura 12, la curva simbolizada por • corresponde a la formación del péptido **16** a partir del péptido **15b**, la curva simbolizada por ■ corresponde a la formación del péptido **16** a partir del péptido **15a** y la curva simbolizada por ♦ corresponde la formación del péptido **16** a partir del péptido **15c**.

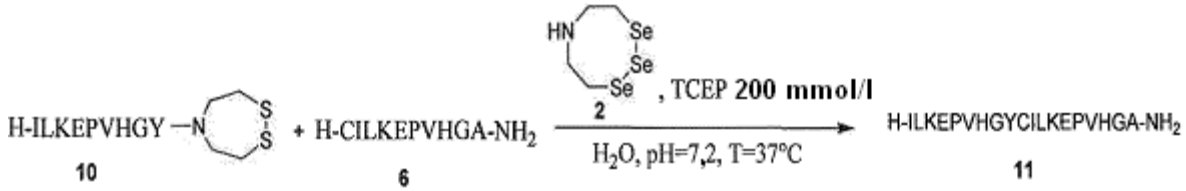
La figura 12 muestra una velocidad reacción de ligación de SeEA (curva simbolizada por •) superior a la del método de NCL (curva simbolizada por ■), esta misma bastante superior a la del método de SEA (curva simbolizada por ♦).

Ejemplo 5: Formación de segmentos de SeEA *in situ* por intercambio y ligación simultánea - Catálisis de la reacción de ligación

*11 - Síntesis del péptido **10**: H-ILKEPVHGY-SEA*

El método de síntesis de este péptido se describe en el documento Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Organic letters 2010, 12, 5238-41.

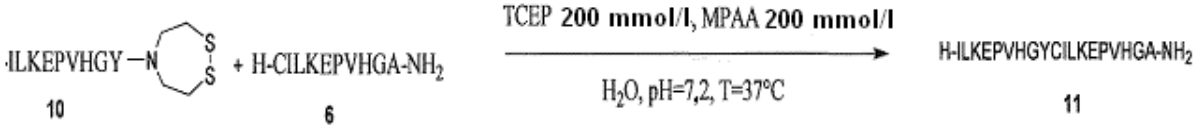
a - Cinética de ligación del péptido **10** H-ILKEPVHGY-SEA con el péptido **6** H-CILKEPVHGA-NH_2 en presencia del conector 2 Se_3EA para conducir al péptido **11**, SEQ ID NO: 4 H-ILKEPVHGYCILKEPVHGA-NH_2



La ligación de SEA del péptido **10** con el péptido **6** se realiza en una caja de guantes (concentración de dioxígeno inferior a 50 ppm) en atmósfera de nitrógeno. Una solución de TCEP de 200 mmol/l se prepara en un tampón fosfato 0,1 M a pH 7,2.

Los péptidos **10** (1 mg, 0,6 µmol) y **6** (1,4 mg, 1 µmol, 1,5 eq) así como el conector 2 Se_3EA (5,8 mg, 0,02 mmol, 28 eq) se disuelven en la solución precedente de TCEP (94 ml). El medio de reacción se agita 24 h a 37 ºC. La cinética de formación del producto de ligación **11** va seguida por HPLC.

b - Comparación de la cinética de ligación del péptido **10** H-ILKEPVHGY-SEA con el péptido **6** H-CILKEPVHGA-NH_2 en presencia de MPAA



La ligación de SEA del péptido **10** con el péptido **6** se realiza en una caja de guantes (concentración de dioxígeno inferior a 50 ppm) en atmósfera de nitrógeno. Una solución de TCEP de 200 mmol/l se prepara en un tampón fosfato 0,1 M a pH 7,2. A continuación, se añade ácido 3-mercaptofenilacético (MPAA 33 mg, 0,2 mmol). El pH de la solución de TCEP/MPAA obtenida se ajusta a pH = 7,2.

Los péptidos **10** (1 mg, 5 µmol) y **6** (10,6 mg, 7,6 µmol, 1,5 eq) se disuelven en la solución precedente de TCEP/MPAA (94 µl). El medio de reacción se agita 24 h a 37 ºC. La cinética de formación del producto de ligación **11** va seguida por HPLC.

La figura 8 permite la comparación de la cinética de reacción de formación del péptido **11** en presencia o no del compuesto **2** de acuerdo con la invención.

En la figura 8, la curva simbolizada por • corresponde a la ligación de acuerdo con la invención del péptido **10** en presencia del compuesto de selenio **2** y la curva simbolizada por ▲ corresponde a la ligación de acuerdo con la técnica anterior del péptido **10** sin compuesto de selenio pero en presencia de MPAA.

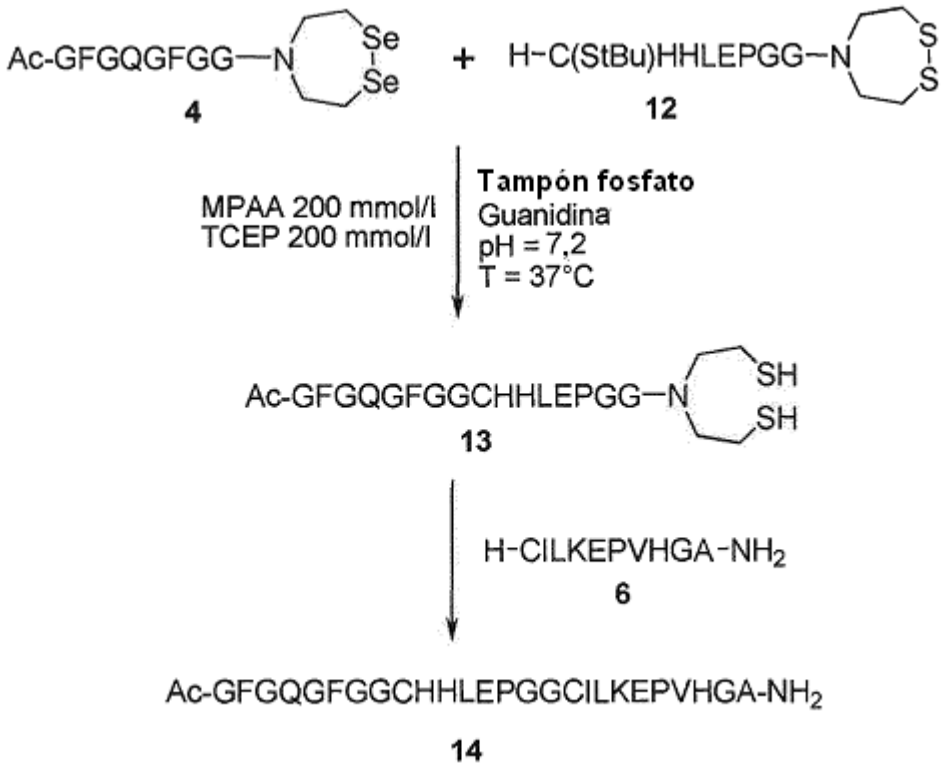
La figura 8 muestra una velocidad de reacción más elevada cuando el compuesto **2** está presente.

Ejemplo 6: Ligación secuencial en una etapa de tres segmentos con la ayuda de las ligaciones de SeEA y SEA

Síntesis del péptido 12: H-C(StBu)HHLEPGG-SEA

El método de síntesis de este péptido se describe en el documento Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Organic letters 2010, 12, 5238-41.

*Síntesis del péptido **14**, SEQ ID NO: 5 Ac-GFGQGFGG-CHHLEPGG-CILKEPIIHGA-NH_2 por ligación de los segmentos **4** Ac-GFGQGFGG-SeEA, **12** H-C(StBu)HHLEPGG-SEA y **6** H-CILKEPVHGA-NH_2*



- *Etapa 1*

El clorhidrato de guanidina (Gdn, HCl, 573,18 mg, 6 mmol) se disuelve en tampón fosfato 0,1 M pH = 7,3 (1 ml final, 6 M).

El ácido 4-mercaptofenilacético (MPAA, 33,83 mg, 0,2 mmol) y el clorhidrato de *tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP, HCl, 57,37 mg, 0,2 mmol) se disuelven en esta solución (1 ml). Se añade NaOH 6 M para ajustar el pH de la solución a 7,37.

Los péptidos **4** Ac-GFGQGFGG-SeEA (5,33 mg, 5,4 µmol) y **12** H-C(StBu)HHLEPGG-SEA (7,59 mg, 5,4 µmol) se disuelven en conjunto en la solución precedente (780 µl). El medio de reacción se coloca en un baño con termostato a 37 ºC en atmósfera inerte.

La ligación va seguida por RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 µm) (215 nm, 1 ml/min, 30 ºC, tampón A es agua que contiene TFA al 0,1 %, tampón B es CH_3CN/agua a 4/1 que contiene TFA al 0,1 %, de un 0-100 % de B en 30 min). Para esto, una alícuota (2 µl) de medio de reacción se acidifica con TFA al 10 % acuoso, se extrae con Et_2O para eliminar MPAA antes del análisis.

De este modo se obtiene el péptido **13** Ac-GFGQGFGG-CHHLEPGG-SEA en solución.

Las figuras 9a y 9b representan respectivamente el cromatograma y el espectro de masas del péptido **13**.

- *Etapa 2*

Después de 4 h 35 de reacción, el péptido **6** H-CILKEPVHGA-NH_2 (11,06 mg, 8,1 µmol) se añade sólido al medio de reacción. La reacción se coloca a 37 ºC en atmósfera inerte.

La ligación más seguida por RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (4,6 x 250 mm, 300 Å, 5 µm) (215 nm, 1 ml/min, 30 ºC, tampón A de agua que contiene TFA al 0,1 %, tampón B de CH_3CN/agua a 4/1 que contiene TFA al 0,1 %, de un 0-100 % de B en 30 min). Para esto, una alícuota (2 µl) de medio de reacción se acidifica con TFA al 10 % acuoso, se extrae con Et_2O para eliminar MPAA antes del análisis.

Cuando la reacción es completa, el medio de reacción se diluye con agua (4 ml) y se añade TFA al 10 % acuoso (1 ml). Después de 4 extracciones con Et_2O (4 x 4 ml), la fase acuosa sé desgasifica durante 2 minutos mediante

burbujeo de argón. Después de la purificación por RP-HPLC sobre una columna C18 nuclenosil 120 Å, 5 µm (215 nm, 6 ml/min, tampón A de agua que contiene TFA al 0,05 %, tampón B de CH_3CN/agua a 4/1 que contiene TFA al 0,05 %, un 0-10 % de B en 5 min, a continuación un 10-100 % de B en 150 min), se obtienen 6 mg (36 %) del péptido **14** Ac-GFGQGFGG-CHHLEPGG-CILKEPVHGA-NH_2.

Las figuras 10a et 10b representan respectivamente el cromatograma y el espectro de masas del compuesto **14** antes de la purificación.
Las figuras 11a y 11b representan respectivamente el cromatograma y el espectro de masas del compuesto **14** después de la purificación.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE
INSTITUT PASTEUR DE LILLE

<120> MÉTODO DE LIGACIÓN NATIVA

<130> 33456 cnrs

<160> 5

<170> patentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PÉPTIDO 3 ACETILO

<400> 1

Gly Phe Gly Gln Gly Phe Gly Gly
1 5

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PÉPTIDO 6

<400> 2

Cys Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Ala
1 5 10

<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PÉPTIDO 7 ACETILO

<400> 3

Gly Phe Gly Gln Gly Phe Gly Gly Cys Ile Leu Lys Glu Pro Val His
1 5 10 15

Gly Ala

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PÉPTIDO 11

<400> 4

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Tyr Cys Ile Leu Lys Glu Pro Val
1 5 10 15

His Gly Ala

<210> 5
<211> 26
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> PÉPTIDO 14 ACETILO

<400>5

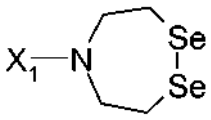
Gly Phe Gly Gln Gly Phe Gly Gly Cys His His Leu Glu Pro Gly Gly
1 5 10 15

Cys Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Ala
20 25

REIVINDICACIONES

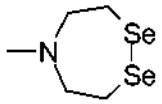
1. Péptido funcionalizado elegido entre:

a) el péptido de fórmula (I): X_1-N($CH_2CH_2SeH)_2$; o
b) el péptido de fórmula (I'):



;

en las que X_1 representa un fragmento peptídico y el grupo -N($CH_2CH_2SeH)_2$ o



forma un enlace amida con la terminación C=O del resto de aminoácido del fragmento peptídico X_1 que está en posición C-terminal.

2. Péptido funcionalizado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X_1 comprende de 2 a 300 restos de aminoácidos, preferentemente de 5 a 100 restos de aminoácidos, de manera más particularmente preferente de 8 a 50 restos de aminoácidos.

3. Método de obtención de un péptido funcionalizado de acuerdo con la reivindicación 1 o de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende las etapas a1 y b1 siguientes:

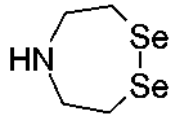
a1) síntesis peptídica para proporcionar un polipéptido de fórmula (II):

(II) X_1-OH

que comprende preferentemente grupos protectores sobre sus funciones aminas y ácidos carboxílicos, con la excepción de su función ácido carboxílico C-terminal,
b1) funcionalización del polipéptido obtenido en la etapa a) que comprende:

- la reacción del polipéptido de fórmula (II) con un compuesto de amina elegido entre:

(IIIa) NH(CH_2-CH_2-Se-$G_1)_2$

(III') 

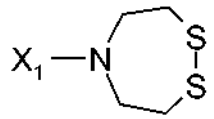
en la que G_1 representa un grupo protector del selenio o un átomo de hidrógeno, en fase líquida, para formar el polipéptido de fórmula (Ia) X_1-N(CH_2CH_2-Se-$G_1)_2$, o (I') ;
- opcionalmente la desprotección del polipéptido de fórmula (Ia) para producir el compuesto de fórmula (I), o las etapas a2 y b2 que siguen a continuación
a2) el uso

- del compuesto de fórmula (IV) o (IV"):

(IV) X_1 - N(CH_2CH_2-S-H)$_2$;

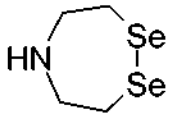
o

(IV'')

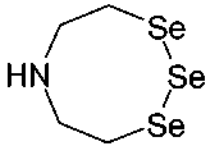


- de un péptido funcionalizado con un grupo portador de una función tioéster (IV') = X_1 -SR y R representa un grupo alquilo o arilo opcionalmente sustituido, b2) la reacción entre el compuesto de fórmula (IV) o (IV") o el compuesto de fórmula (IV') con el compuesto de amina de fórmula (III') o (III"):

(III')



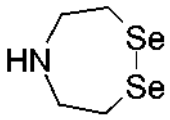
(III'')



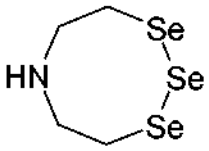
en fase líquida, para formar el péptido de fórmula (I) o (I').

4. Compuesto que puede usarse en el método de acuerdo con la reivindicación 3 elegido entre:

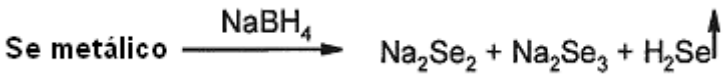
a) el compuesto de fórmula (III'):



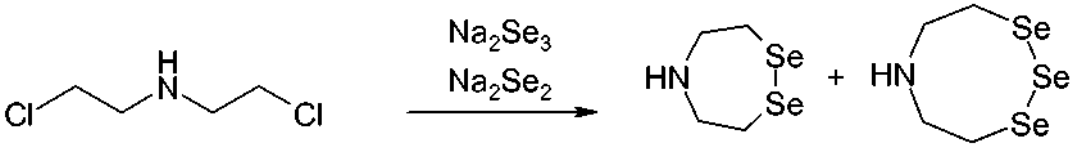
b) el compuesto de fórmula (III"):



5. Método de preparación de los compuestos de fórmulas (III') y (III") de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende la siguiente reacción de tratamiento con un hidruro metálico, $NaBH_4$, $LiBH_4$, o $LiAlH_4$:

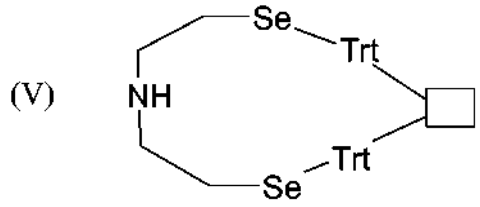


seguido de la reacción:

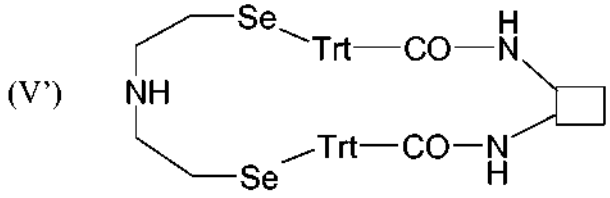


6. Método de obtención de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende las etapas siguientes:

a) Proporcionar una resina de polímero funcionalizada que presenta la estructura (V):



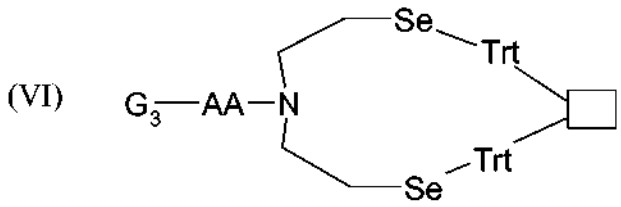
O la estructura (V'):



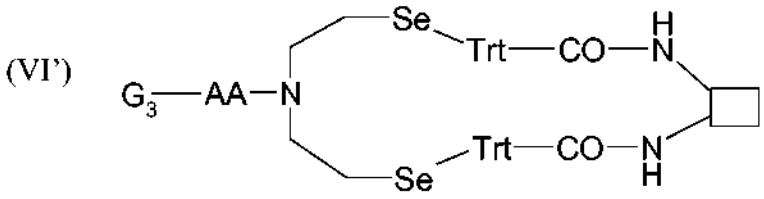
en las que,

□ representa un soporte sólido,
Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes, elegido en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano.

b) Injertar un aminoácido sobre la resina de polímero funcionalizada obtenida en la etapa a) para producir el compuesto de estructura (VI):



O de estructura (VI'):

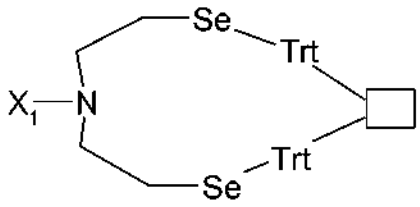


en las que,

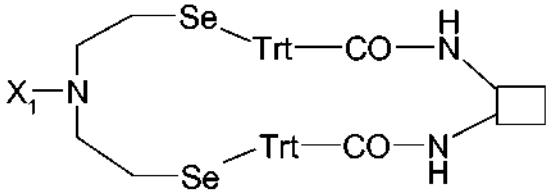
□ y Trt tienen el mismo significado que en el compuesto (V) o (V'), AA representa un resto de aminoácido que comprende opcionalmente uno o varios grupos protectores;
G_3 representa un átomo de hidrógeno o un grupo protector de la función amina N-terminal de AA,

c) Síntesis peptídica a partir del aminoácido AA para producir el compuesto (VII) o (VII'):

(VII)



(VII')



en las que,

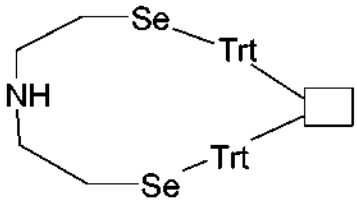
□ representa un soporte sólido,
Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes, elegido en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano,
X_1 representa un fragmento peptídico,

d) Cortar el enlace entre Trt y Se para producir el compuesto (I) o (I').

7. Método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el injerto de un aminoácido sobre la resina de polímero comprende la puesta en presencia de la resina funcionalizada (V) o (V') con un halogenuro de aminoácido o con un aminoácido y un agente de activación, elegido preferentemente entre HATU, PyBOP, BOP, PyBROP, de manera más particularmente preferente HATU.

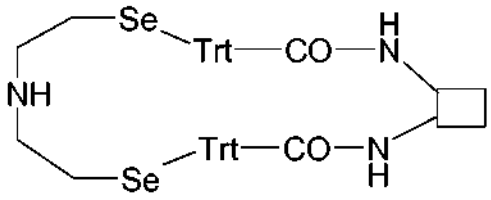
8. Resina de polímero funcionalizada que puede usarse en el método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, que presenta la estructura (V):

(V)



O la estructura (V'):

(V')

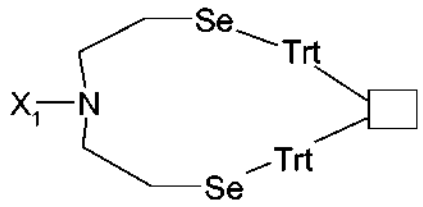


en las que,

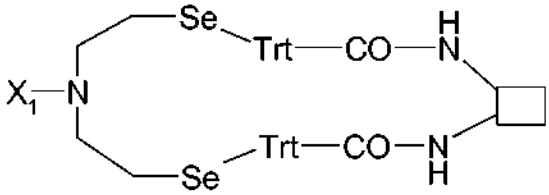
□ representa un soporte sólido,
Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes, elegido en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano.

9. Resina de polímero que comprende un fragmento peptídico que responde a la fórmula (VII) o (VII'):

(VII)



(VII')



en las que,

□ representa un soporte sólido,
Trt representa un grupo trifenilmetilo opcionalmente sustituido con uno o varios sustituyentes, elegido en particular entre los sustituyentes cloro, metoxi, metilo, flúor y ciano,
X_1 representa un fragmento peptídico.

10. Resina de polímero de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en la que el soporte sólido □ se elige entre un poliestireno, una poliacrilamida, un polietilenglicol, una celulosa, un polietileno, un poliéster, un látex, una poliamida, un polidimetilacrilamida, un copolímero de polietilenglicol-poliestireno, un copolímero de polietilenglicol-poliacrilamida y sus derivados.

11. Método de preparación de la resina de polímero de acuerdo con una de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende:

a) proporcionar un soporte sólido funcionalizado con grupos -Trt o -NH-CO-Trt;
b) reacción de la función Trt del soporte sólido con el compuesto de amina de fórmula (III): $NH(CH_2-CH_2-Se-H)_2$

teniendo Trt la misma definición que en las reivindicaciones 8 a 10.

12. Método de preparación de un polipéptido de fórmula (VIII):

(VIII) $X_1-C_1-X_2-C_2-...-C_{i-1}-X_i-...-C_{n-1}-X_n$

en la que,

X_i, X_2,..., X_i,..., X_n son fragmentos peptídicos,
C_1, C_2, ..., C_{i-1}, ..., C_{n-1} son restos de aminoácidos que portan una función tiol o selenol,
n es un número entero superior o igual a 2,
i es un número entero cualquiera que varía de 1 a n,
comprendiendo este método una o varias etapas de reacción entre un compuesto de fórmula (IX_i):

(IX_i) $X'_i - N(CH_2CH_2-Se-H)_2$

en la que,

X'_1 representa X_i
X'_i representa $C_{i-1}-X_i$ para $i > 1$

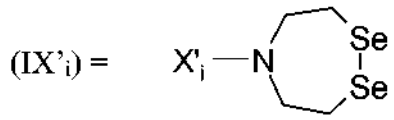
y un compuesto de fórmula (X_{i+1}):

(X_{i+1}) $C_i-X_{i+1}-...-C_{n-1}-X_n$

para formar un compuesto de fórmula (X_i):

(X_i) X'_i-C_i-X_{i+1}-...-C_{n-1}-X_n

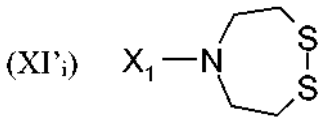
13. Método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el compuesto (IX_i) se forma a partir del compuesto (IX'_i):



mediante la puesta en presencia de al menos un compuesto reductor de los enlaces diselenio.

14. Método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el compuesto (IX'_i) se obtiene por reacción entre un compuesto de fórmula (XI_i), (XI'_i) o (XI''_i):

(XI_i) X'_i - S - R_1



(XI''_i) X'_i - $N(CH_2-CH_2-S-H)_2$

en las que X'_i es un fragmento peptídico de la forma C_{i-1}-X_i; para i > 1 y X'_i representa X_i, R_1 representa un grupo alquilo o un grupo arilo opcionalmente sustituido,
y un compuesto de fórmula (III') o de fórmula (III") de acuerdo con la reivindicación 4.

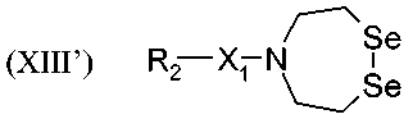
15. Método de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, para la preparación de un polipéptido representado con la fórmula (XII):

(XII) X_1- C_1- X_2- C_2- X_3

que comprende las etapas siguientes:

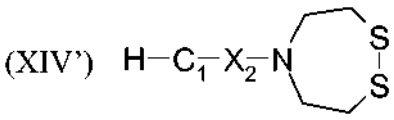
a) reacción entre un compuesto de fórmula (XIII) o (XIII'):

(XIII) R_2 - X_1 - $N(CH_2-CH_2-Se-H)_2$



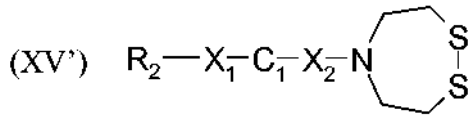
y un compuesto de fórmula (XIV) o (XIV'):

(XIV) H - C_1 - X_2 - $N(CH_2-CH_2-S-H)_2$



para formar el compuesto de fórmula (XV) o (XV'):

(XV) R_2 - X_1 - C_1 - X_2 - $N(CH_2-CH_2-S-H)_2$

(XV') 

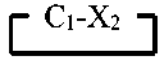
b) reacción entre un compuesto de fórmula (XV) o (XV') y un polipéptido de fórmula (XVI):

(XVI) H - C_2 - X_3

para formar el compuesto de fórmula (XII),

en las que R_2 representa H o un grupo protector de la función N-terminal de X_1; X_1, X_2, X_3 representan, independientemente entre sí, fragmentos peptídicos; C_1 y C_2 representan, independientemente el uno del otro, restos de aminoácidos portadores de una función tiol o selenol.

16. Método de preparación de un polipéptido cíclico de fórmula (XVII):

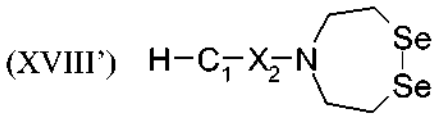
(XVII) 

X_2 representando un fragmento peptídico, y C_1 representando un resto de aminoácido que comprende una función tiol o selenol,
comprendiendo dicho método al menos una etapa de reacción de ligación de un polipéptido de fórmula (XVIII):

(XVIII) H - C_1 - X_2 - N(CH_2-CH_2-Se-H)$_2$

consigo mismo.

17. Método de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la reacción de ligación se realiza poniendo en contacto un polipéptido de fórmula (XVIII'):

(XVIII') 

con al menos un compuesto reductor de los enlaces diselenio.

18. Kit de síntesis de polipéptidos que comprende uno o varios péptidos de fórmulas (IX_i) o (IX'_i) que pueden usarse en el método de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, o al menos un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4.

Figura 1a

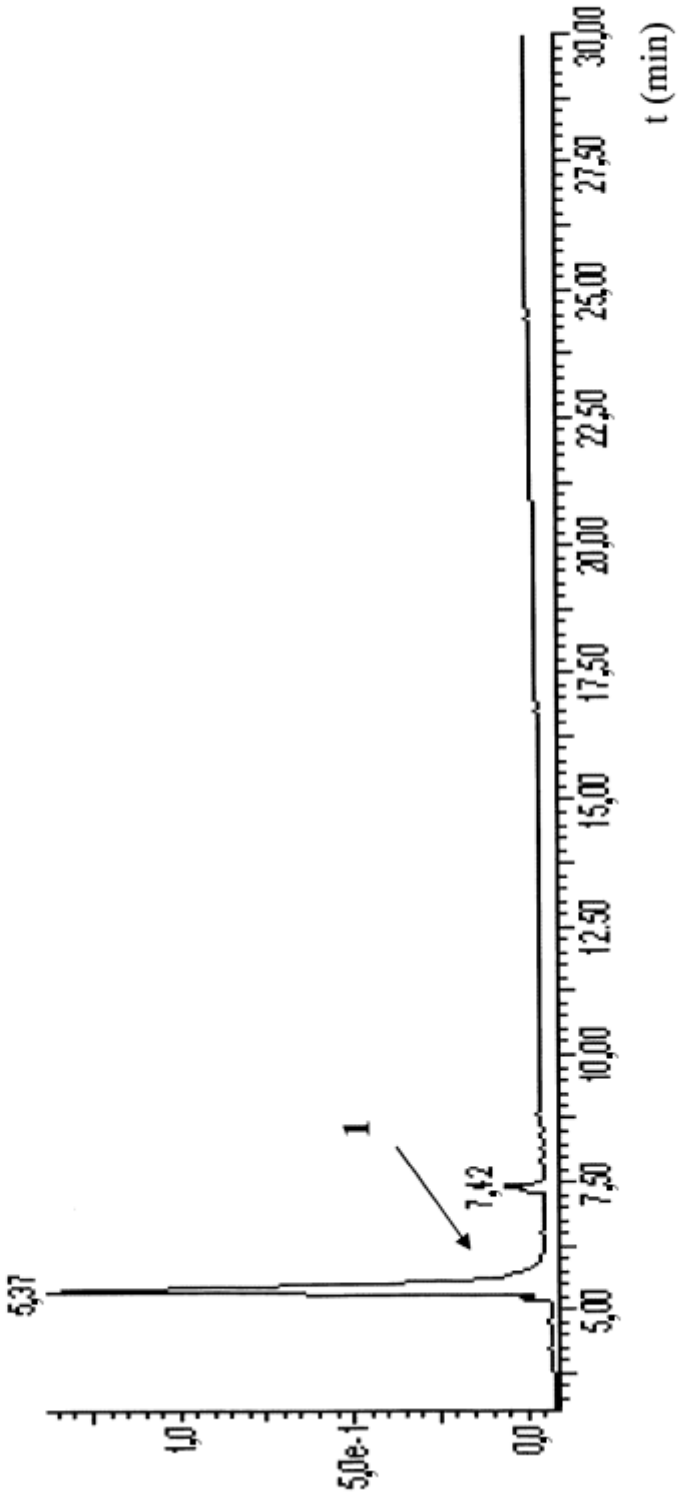

t (min)
30,00
27,50
25,00
22,50
20,00
17,50
15,00
12,50
10,00
7,50
5,00
1
7,42
5,37
1,0
5,0e-1
0,0

Figura 1b

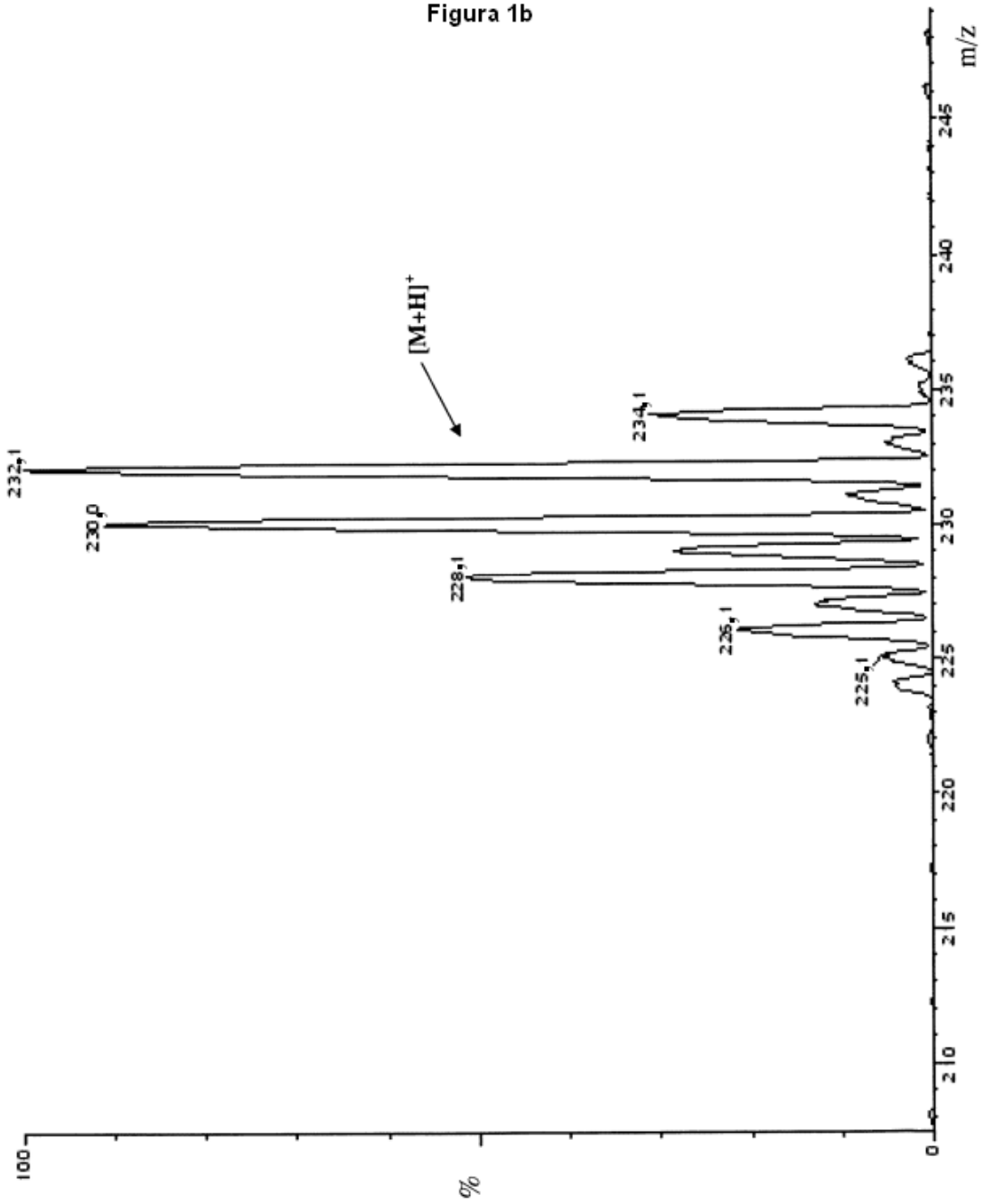

[M+H]+
232,1
230,0
234,1
228,1
226,1
225,1
100
%
0
210
215
220
225
230
235
240
245
m/z

Figura 2a

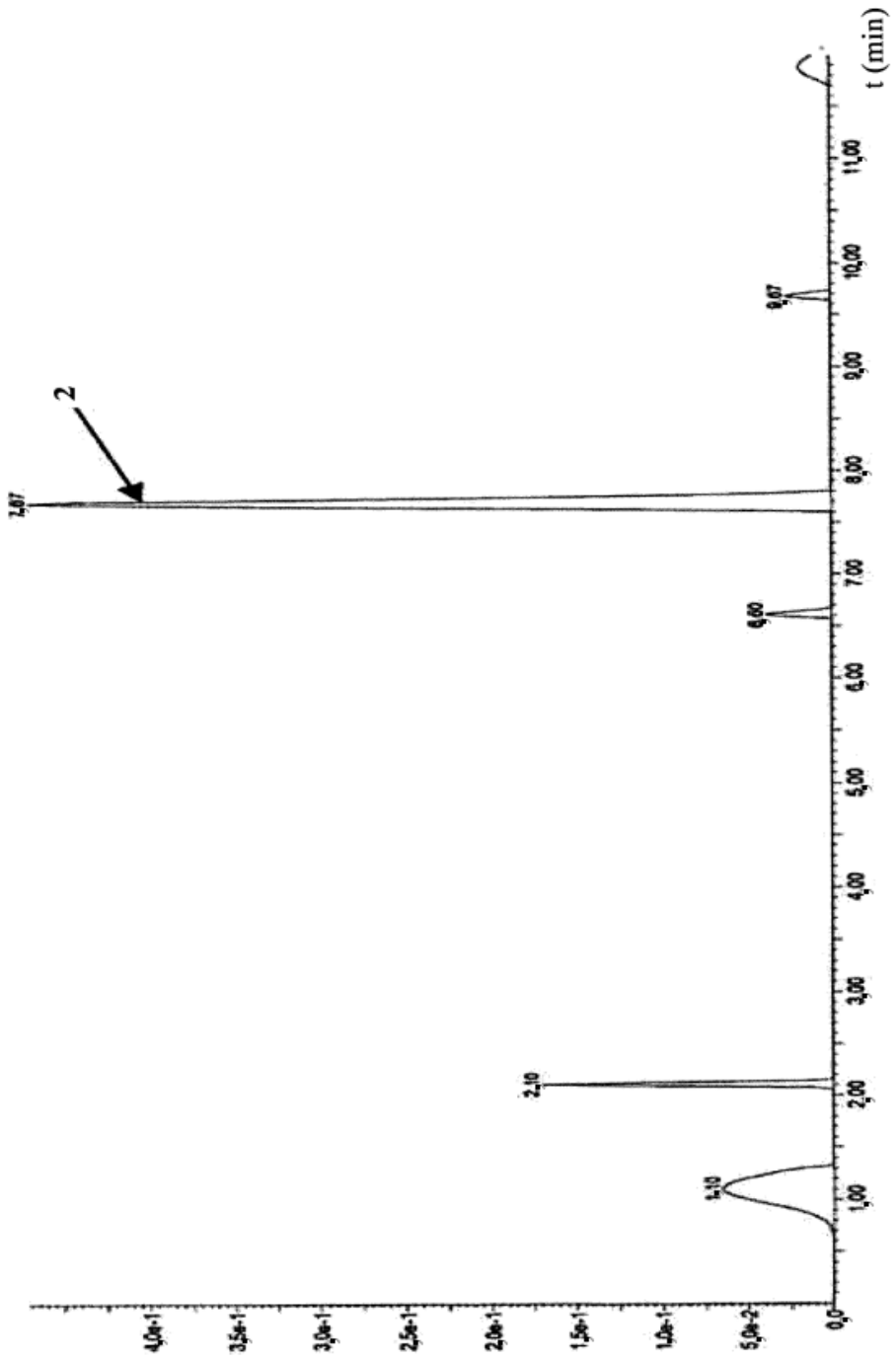

2
t (min)
1,00
2,00
3,00
4,00
5,00
6,00
7,00
8,00
9,00
10,00
11,00
0,0
5,0e-2
1,0e-1
1,5e-1
2,0e-1
2,5e-1
3,0e-1
3,5e-1
4,0e-1

Figura 2b

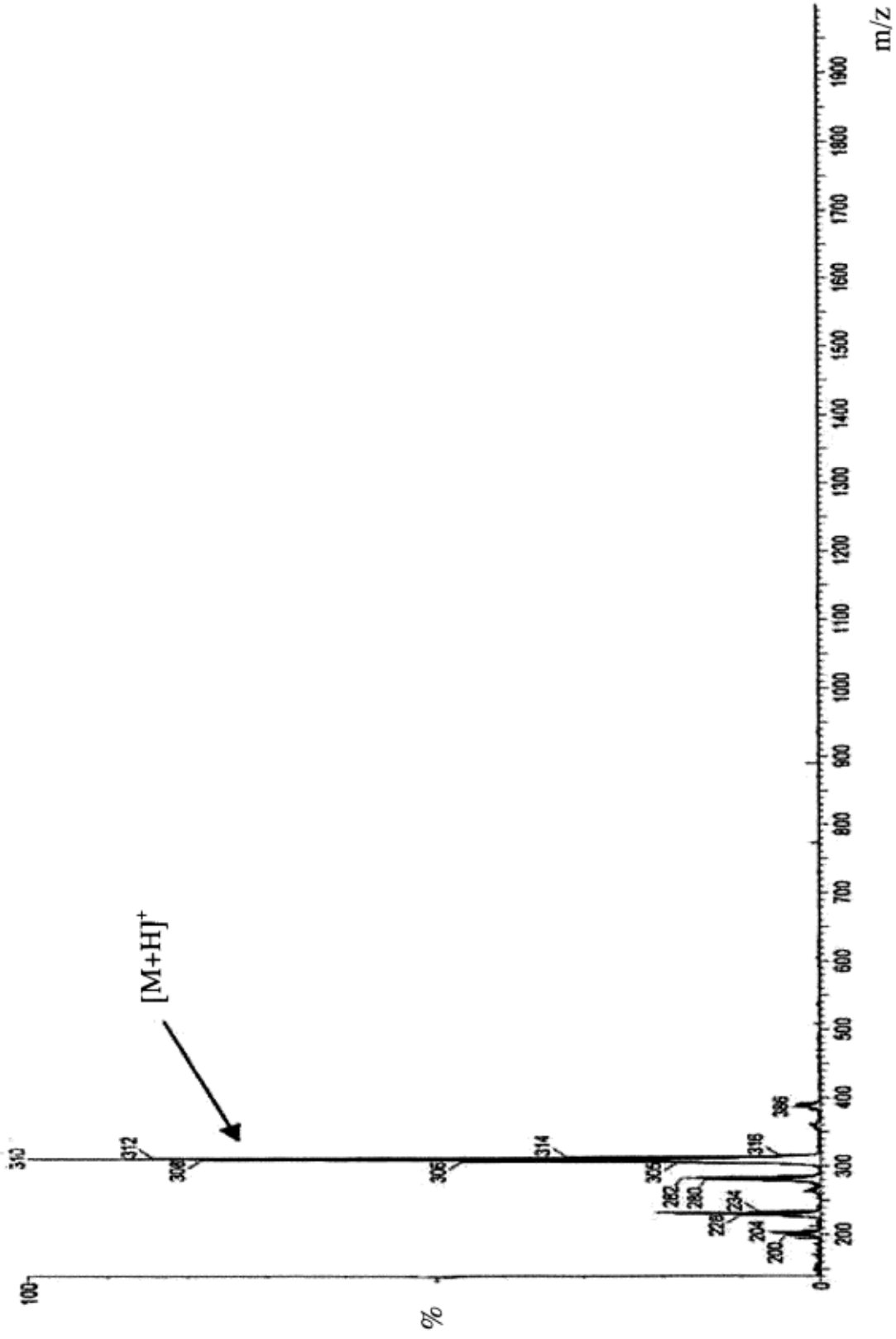

[M+H]+
m/z
%
100
0
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
1500
1600
1700
1800
1900
310
312
308
306
314
316
396
305
282
280
234
228
204
200

Figura 3a

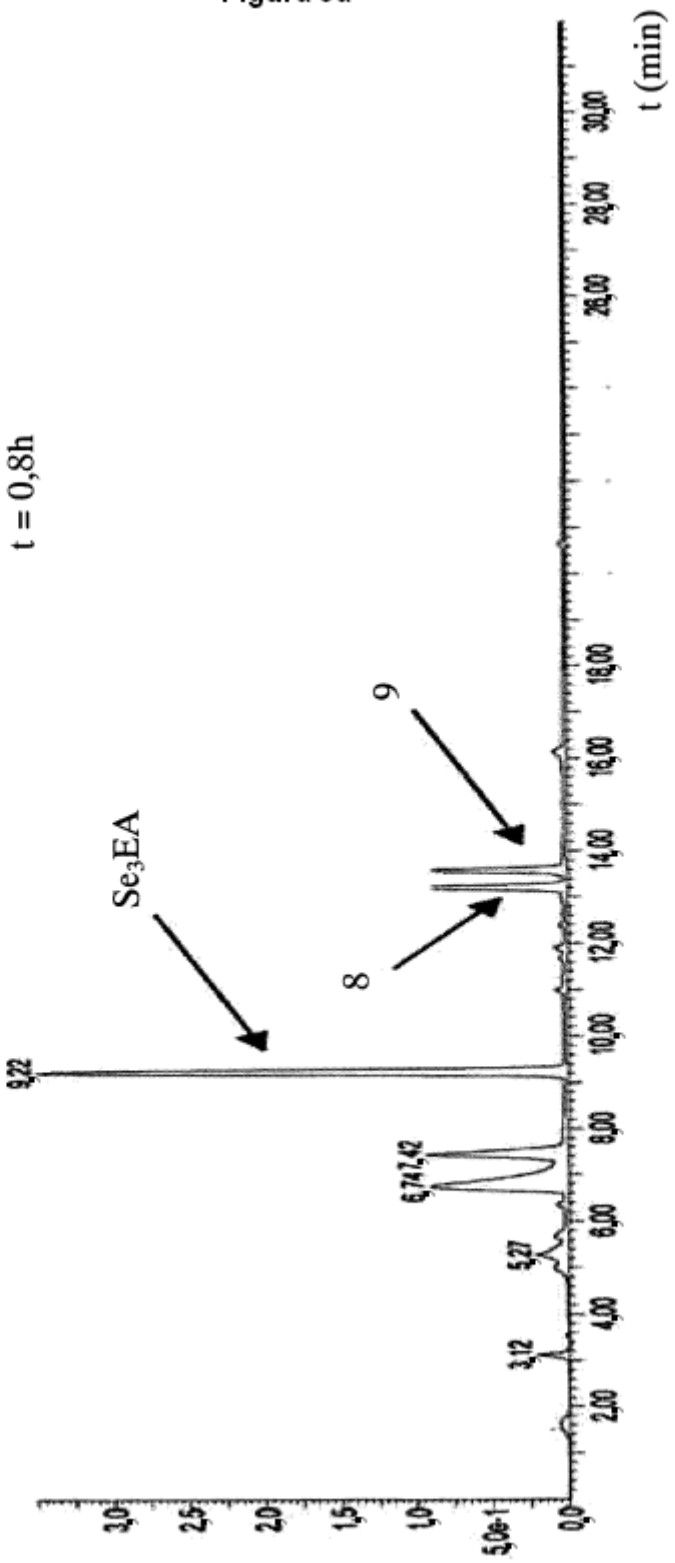


Figura 3b

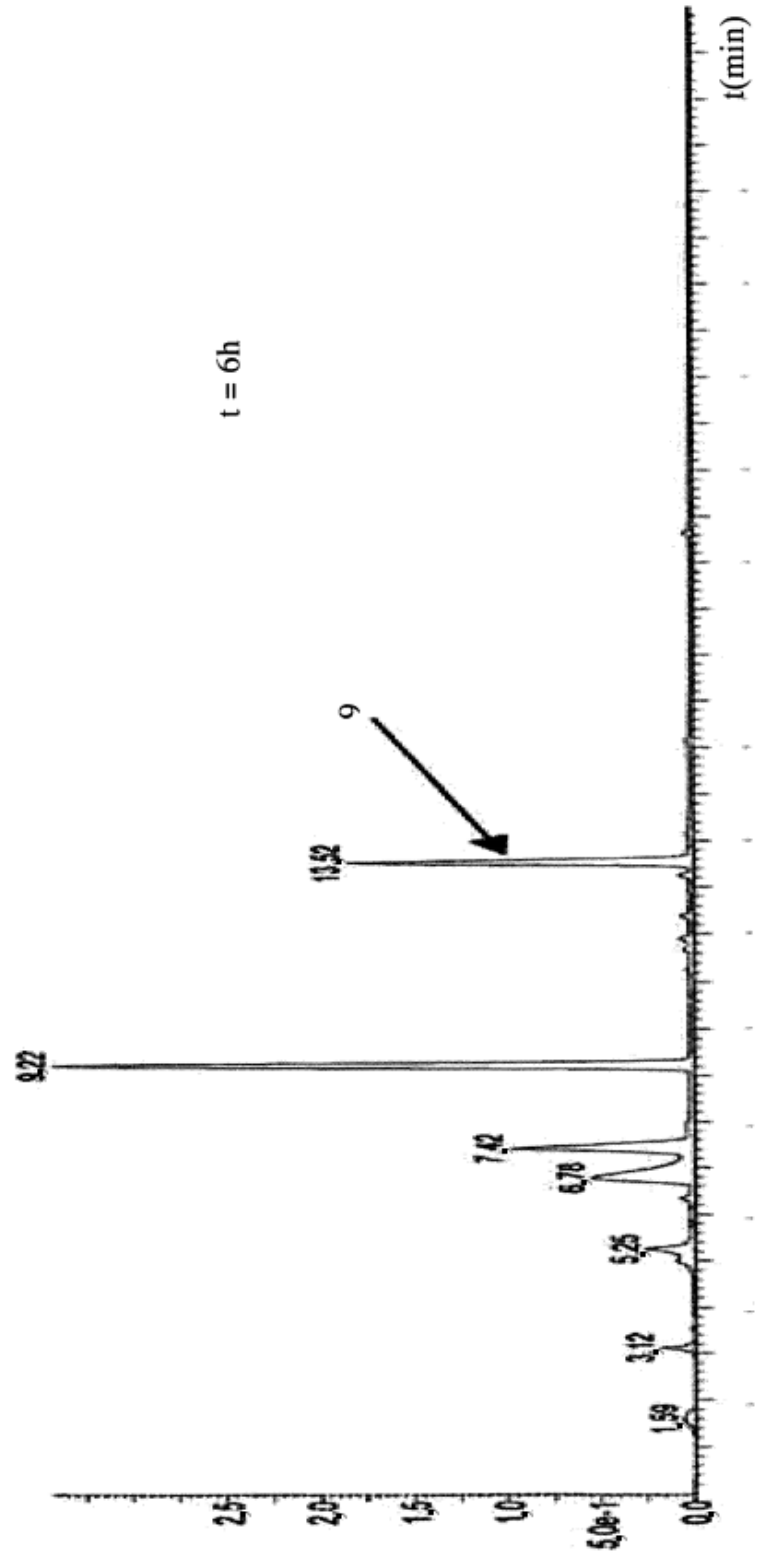


Figura 3c

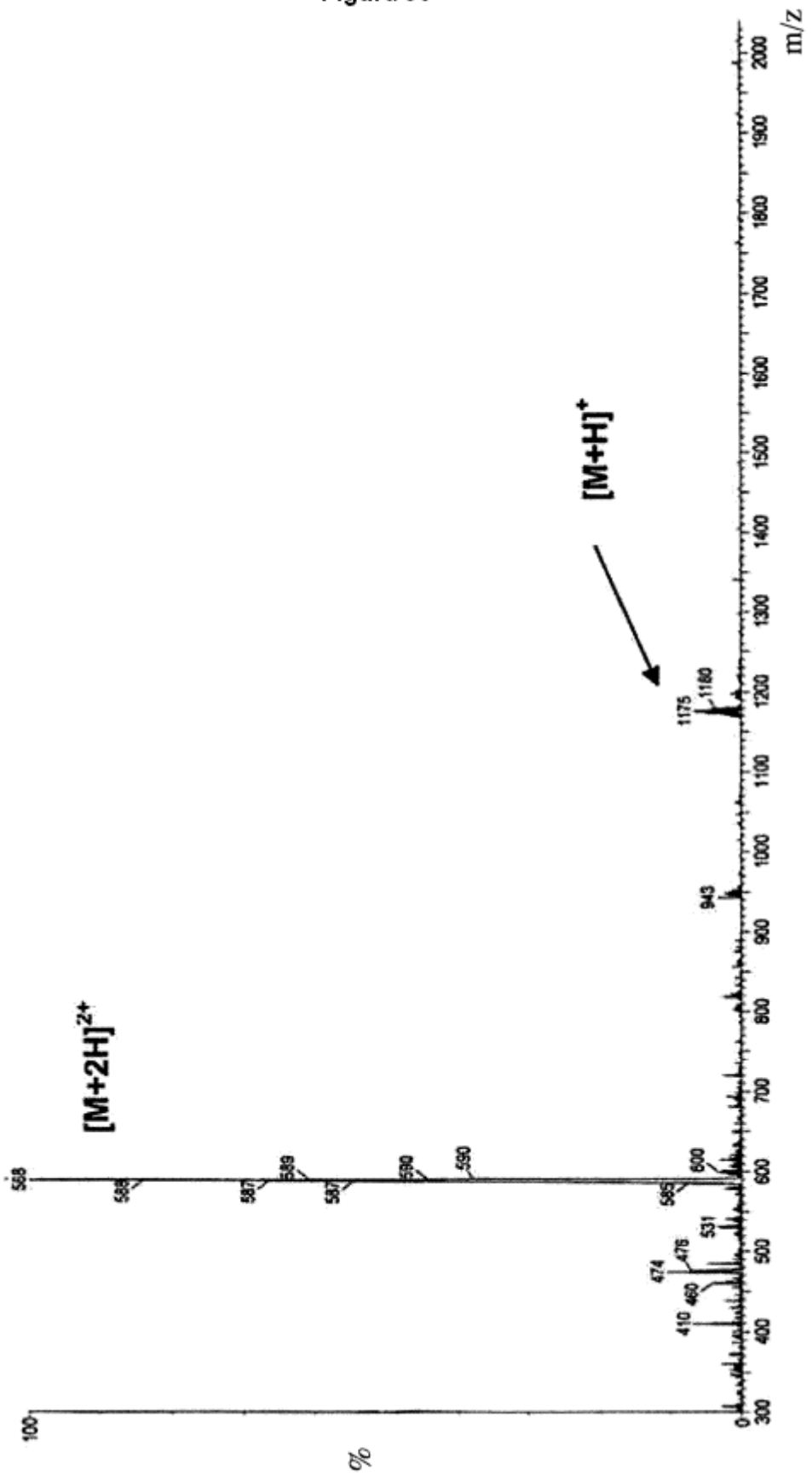

[M+H]+
[M+2H]2+
m/z
%
1180
1175
943
600
590
589
588
587
586
585
531
476
474
460
410

Figura 4a

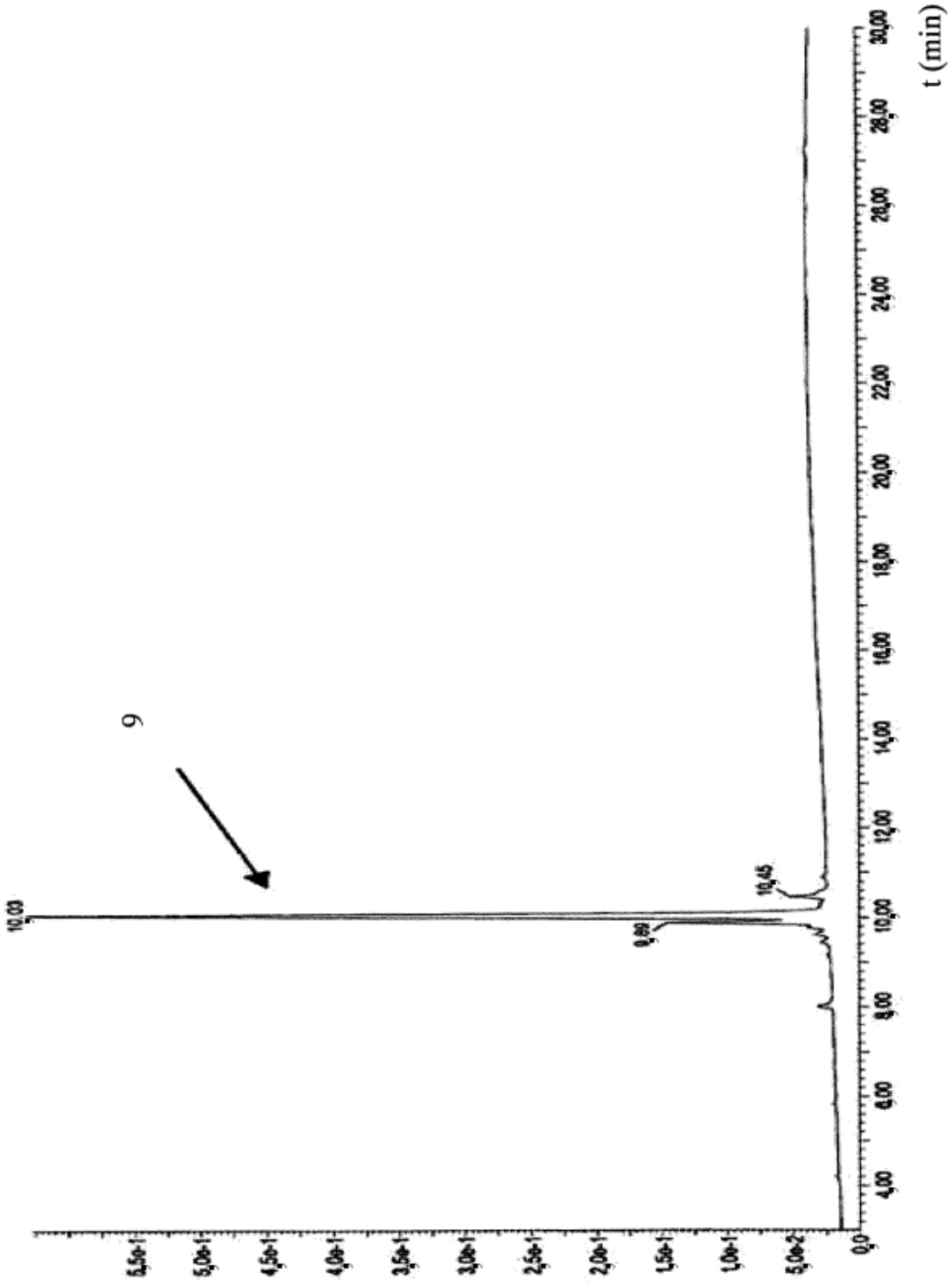


Figura 4b

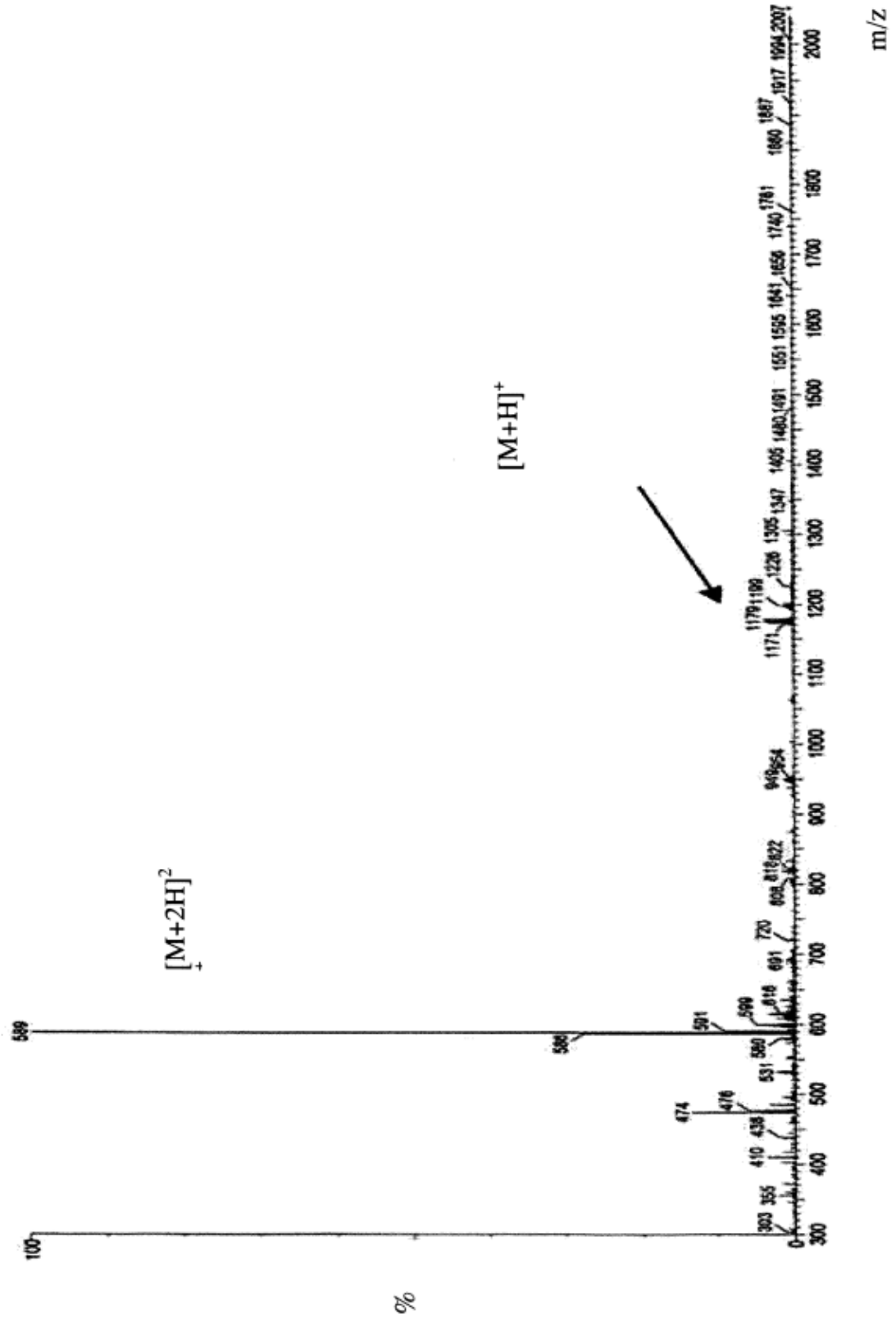


Figura 5a

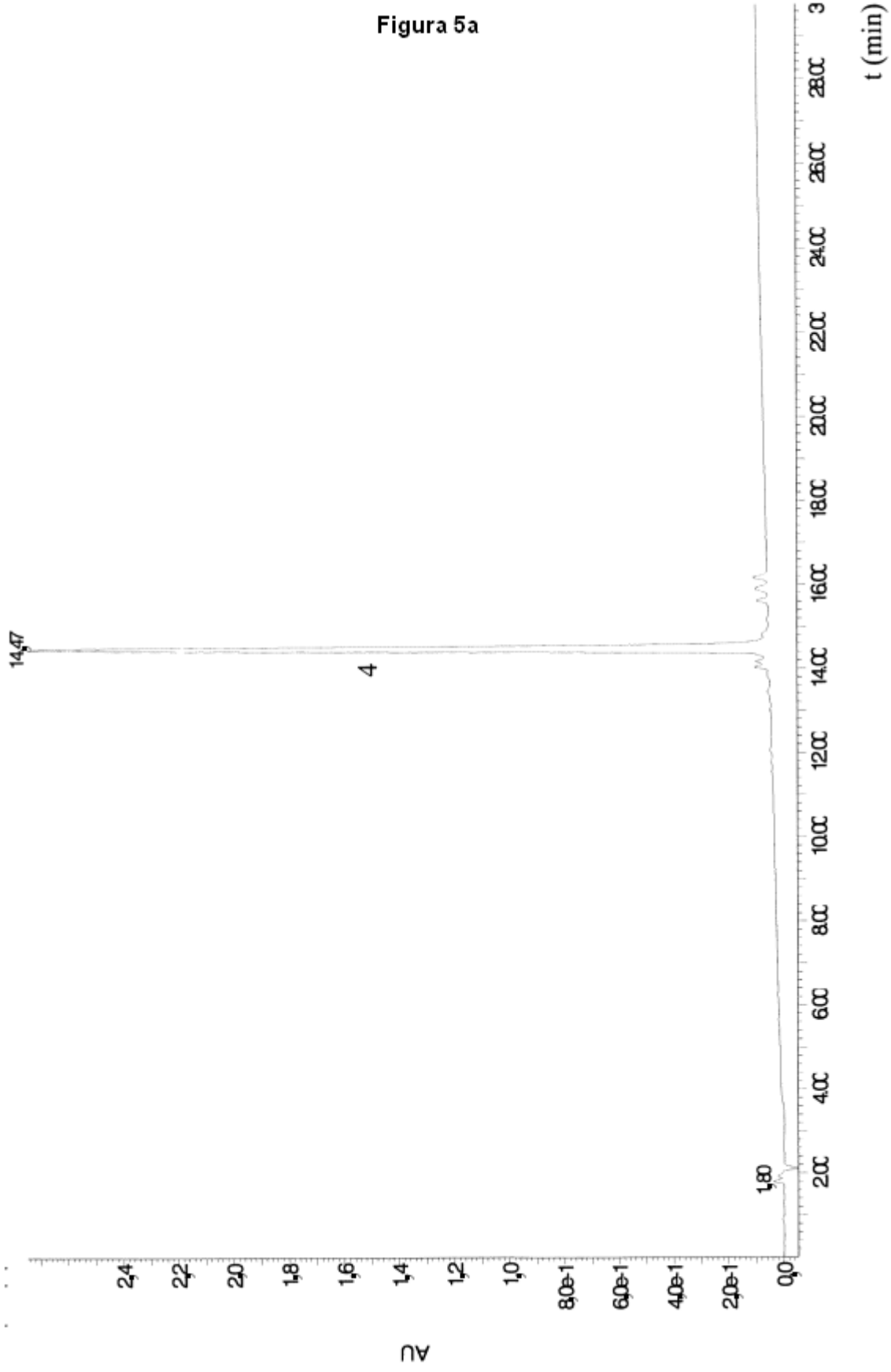

14,47
4
1,80
AU
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
8,0e-1
6,0e-1
4,0e-1
2,0e-1
0,0
2,00
4,00
6,00
8,00
10,00
12,00
14,00
16,00
18,00
20,00
22,00
24,00
26,00
28,00
t (min)

Figura 5b

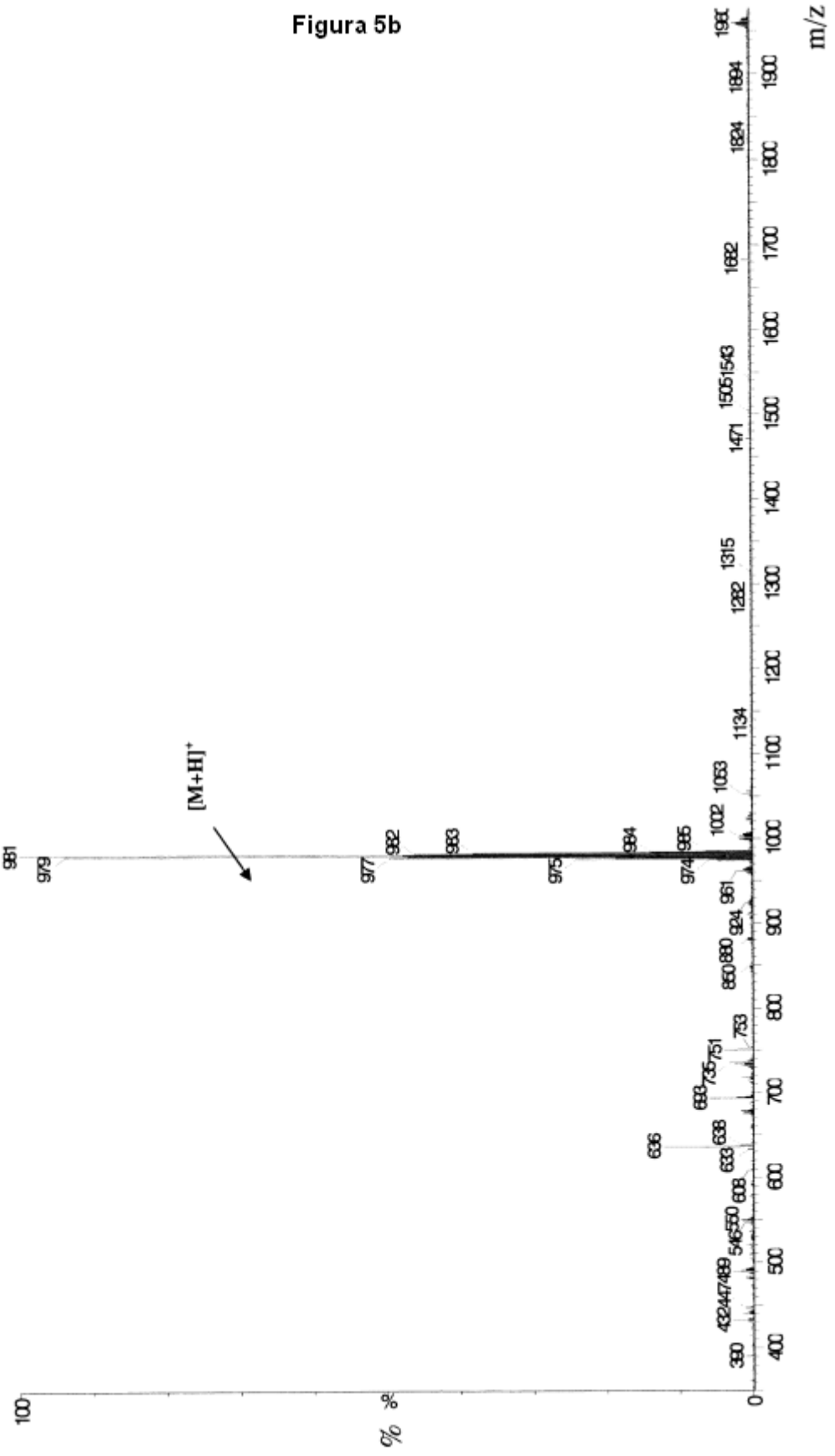

[M+H]+
m/z
%
100
0
981
979
977
982
983
975
984
974
985
1002
1063
1134
961
924
880
860
753
751
735
693
636
638
633
608
550
546
489
447
432
400
1961
1894
1824
1682
1543
1505
1471
1315
1282

Figura 6a

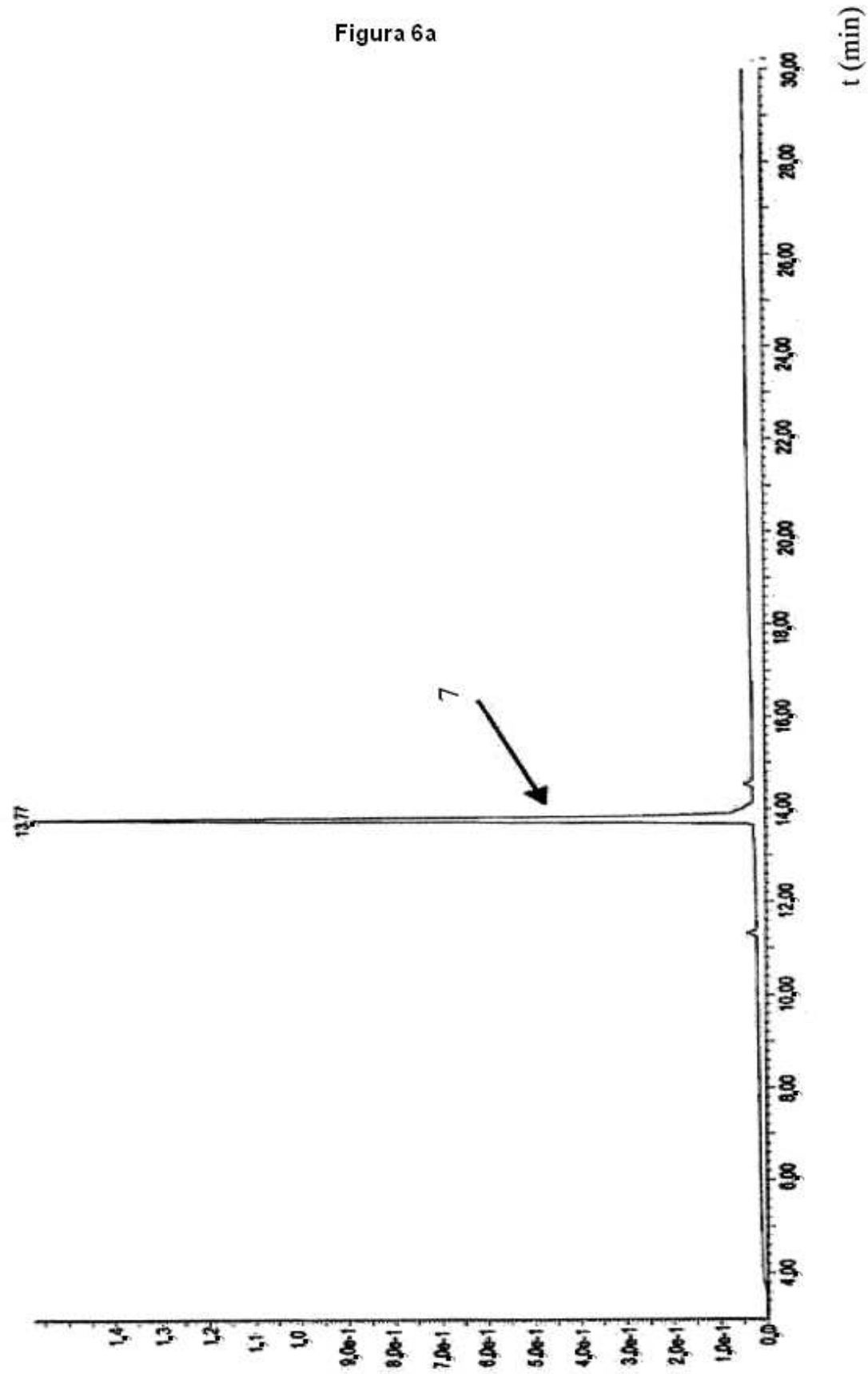

t (min)
30,00
28,00
26,00
24,00
22,00
20,00
18,00
16,00
14,00
12,00
10,00
8,00
6,00
4,00
13,77
7
1,4
1,3
1,2
1,1
1,0
9,0e-1
8,0e-1
7,0e-1
6,0e-1
5,0e-1
4,0e-1
3,0e-1
2,0e-1
1,0e-1
0,0

Figura 6b

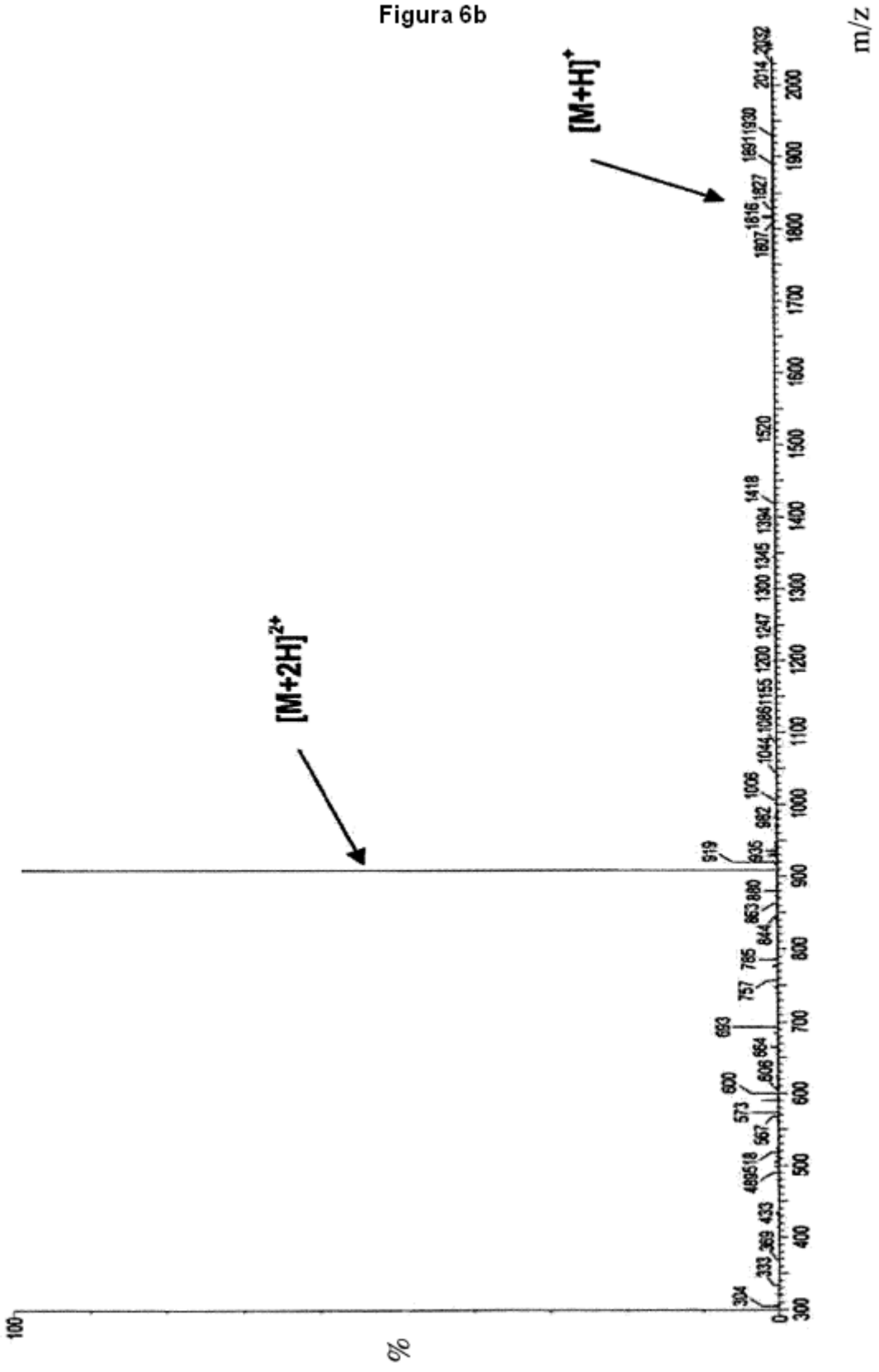


Figura 7

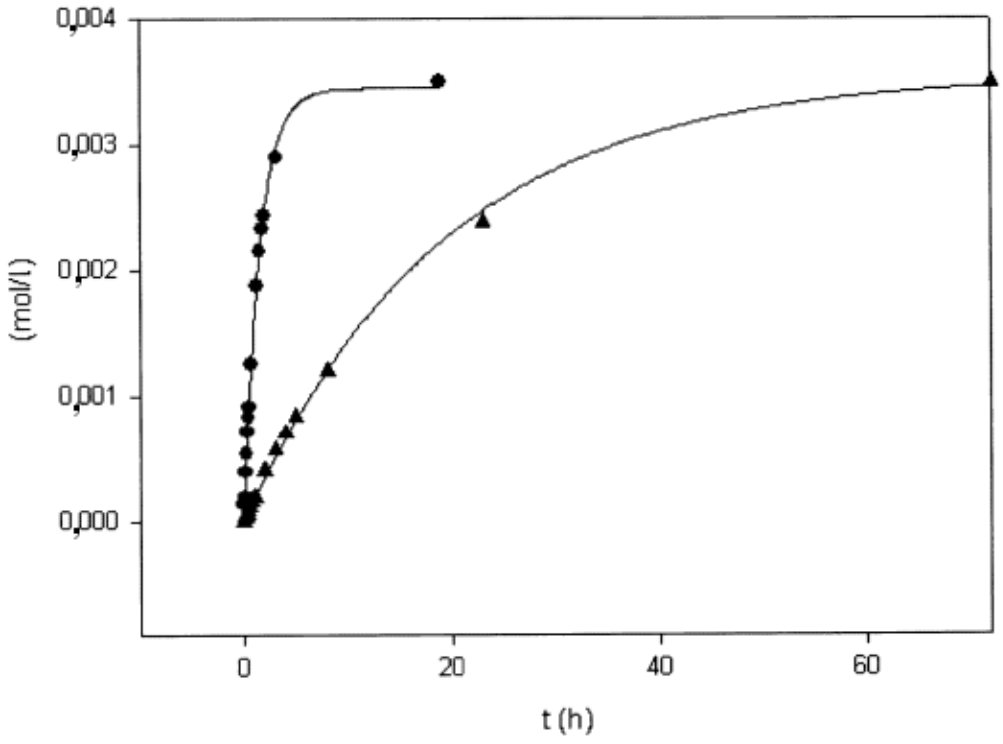


Figura 8

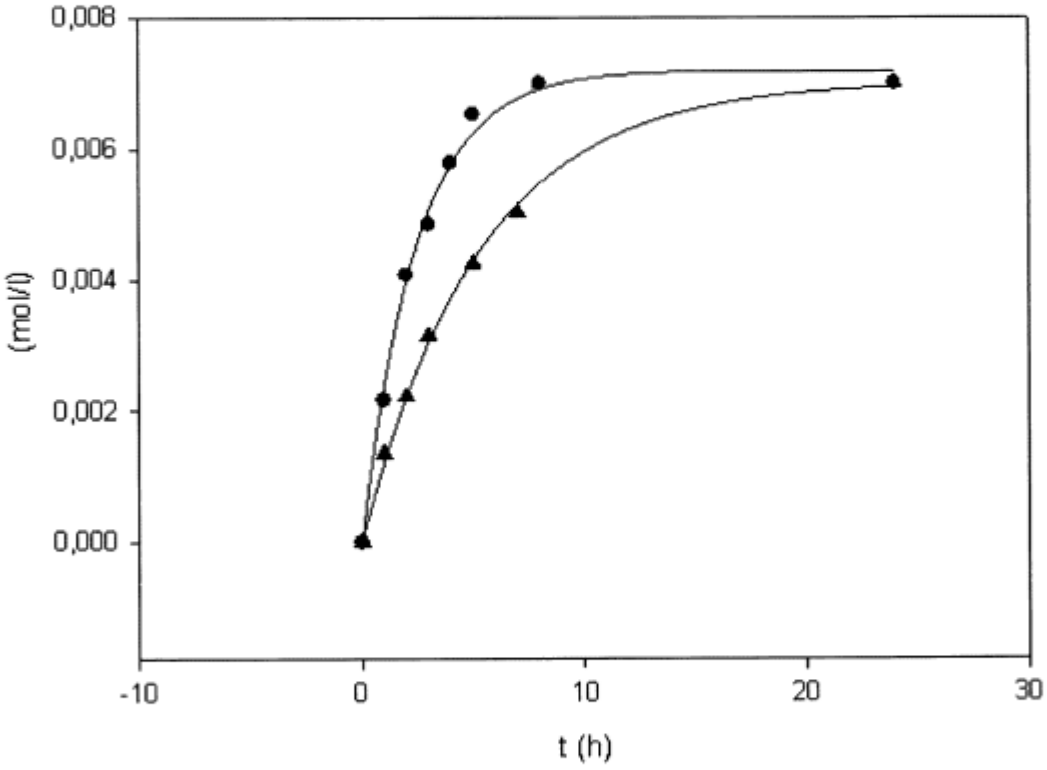


Figura 9a

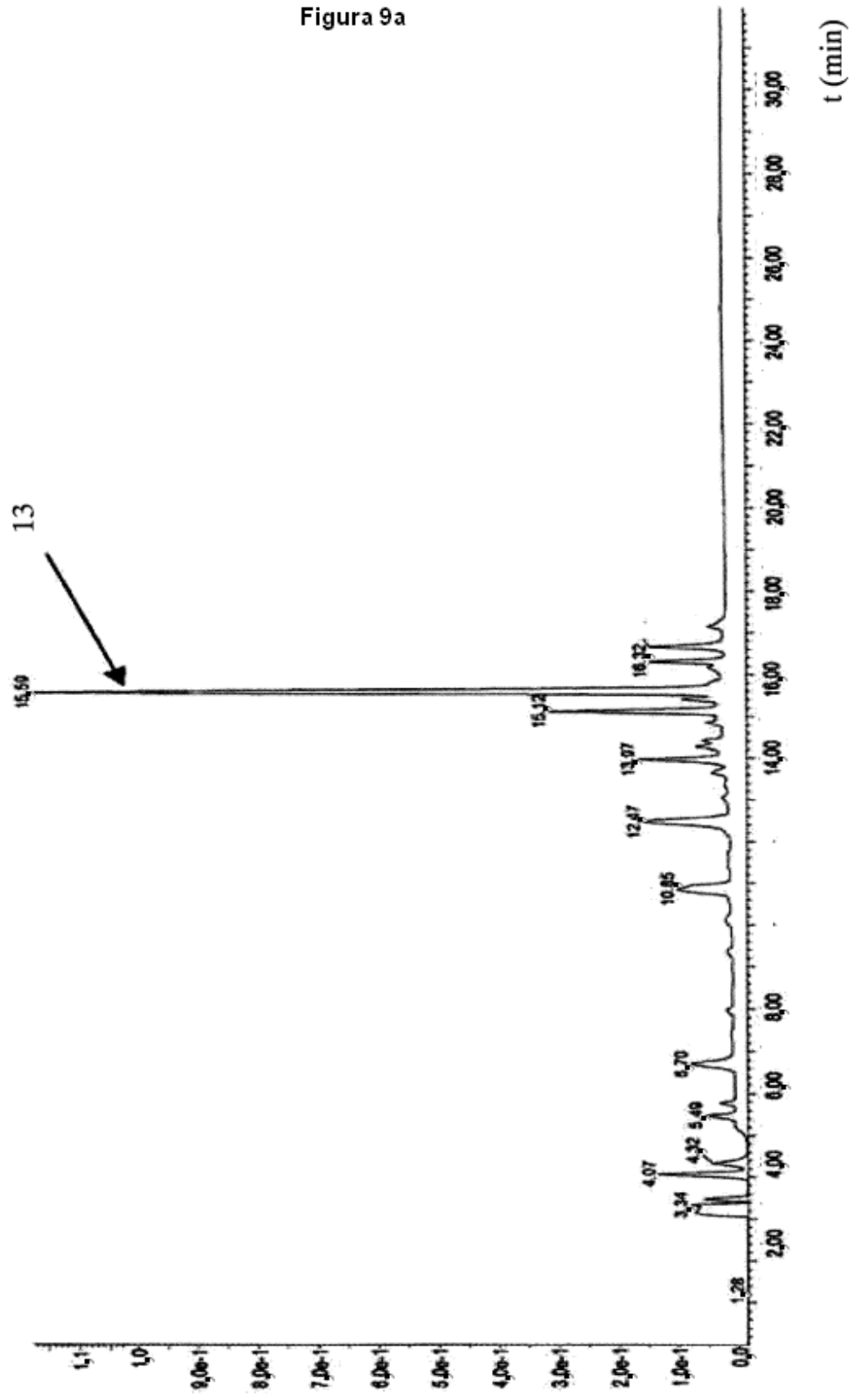


Figura 9b

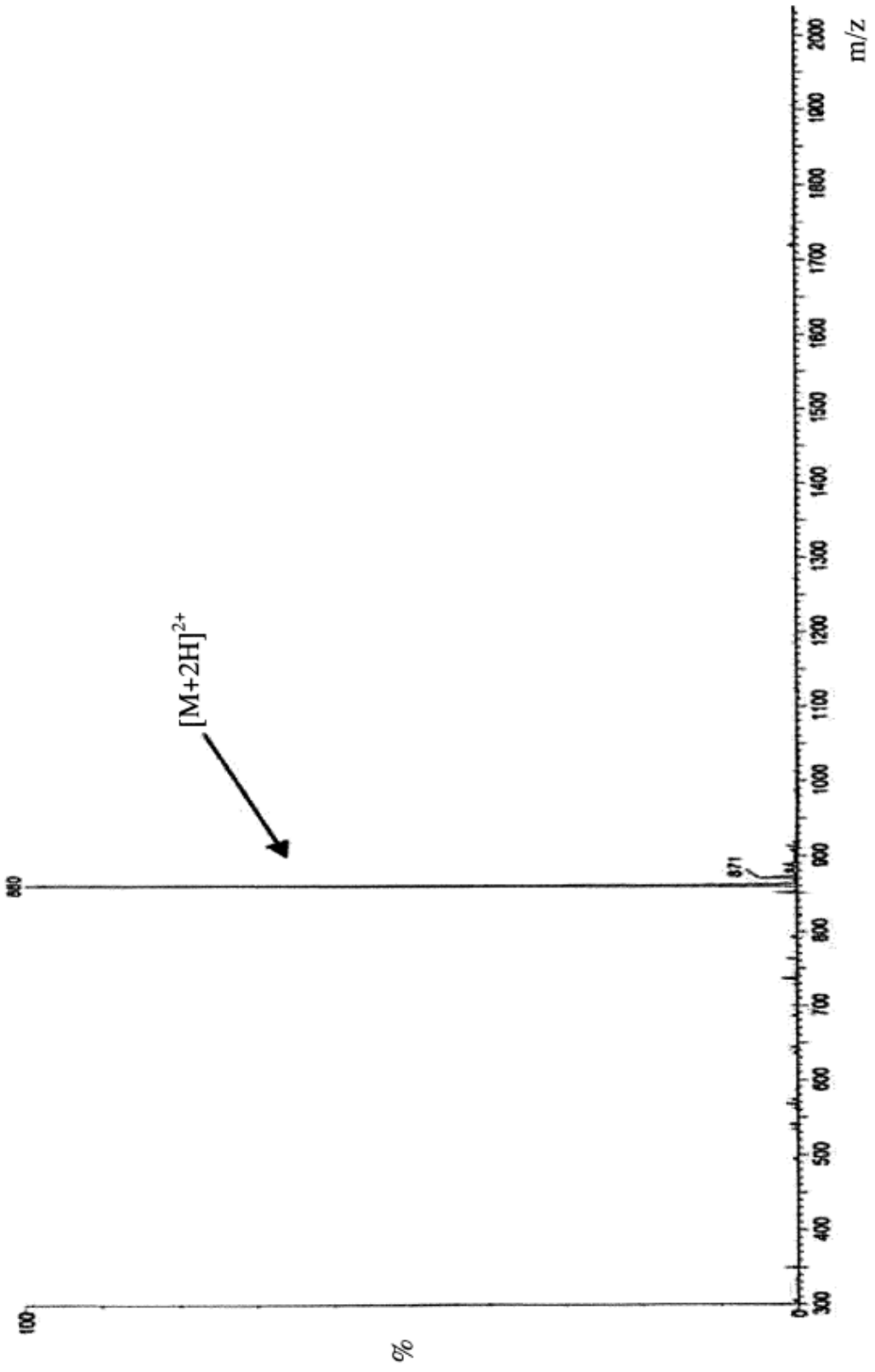

m/z
%
100
0
300
400
500
600
700
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
1500
1600
1700
1800
1900
2000
880
871
[M+2H]2+

Figura 10a

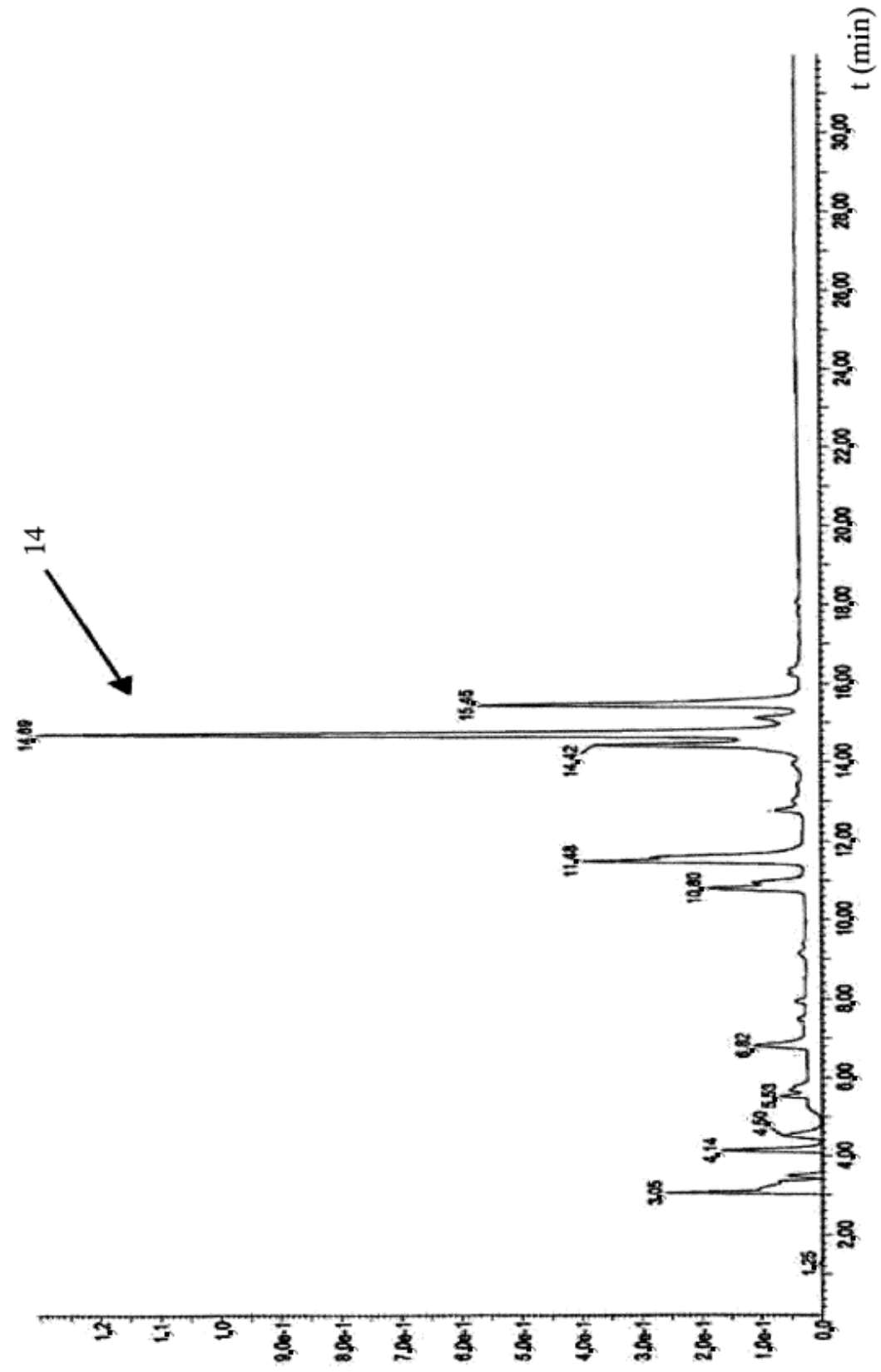


Figura 10b

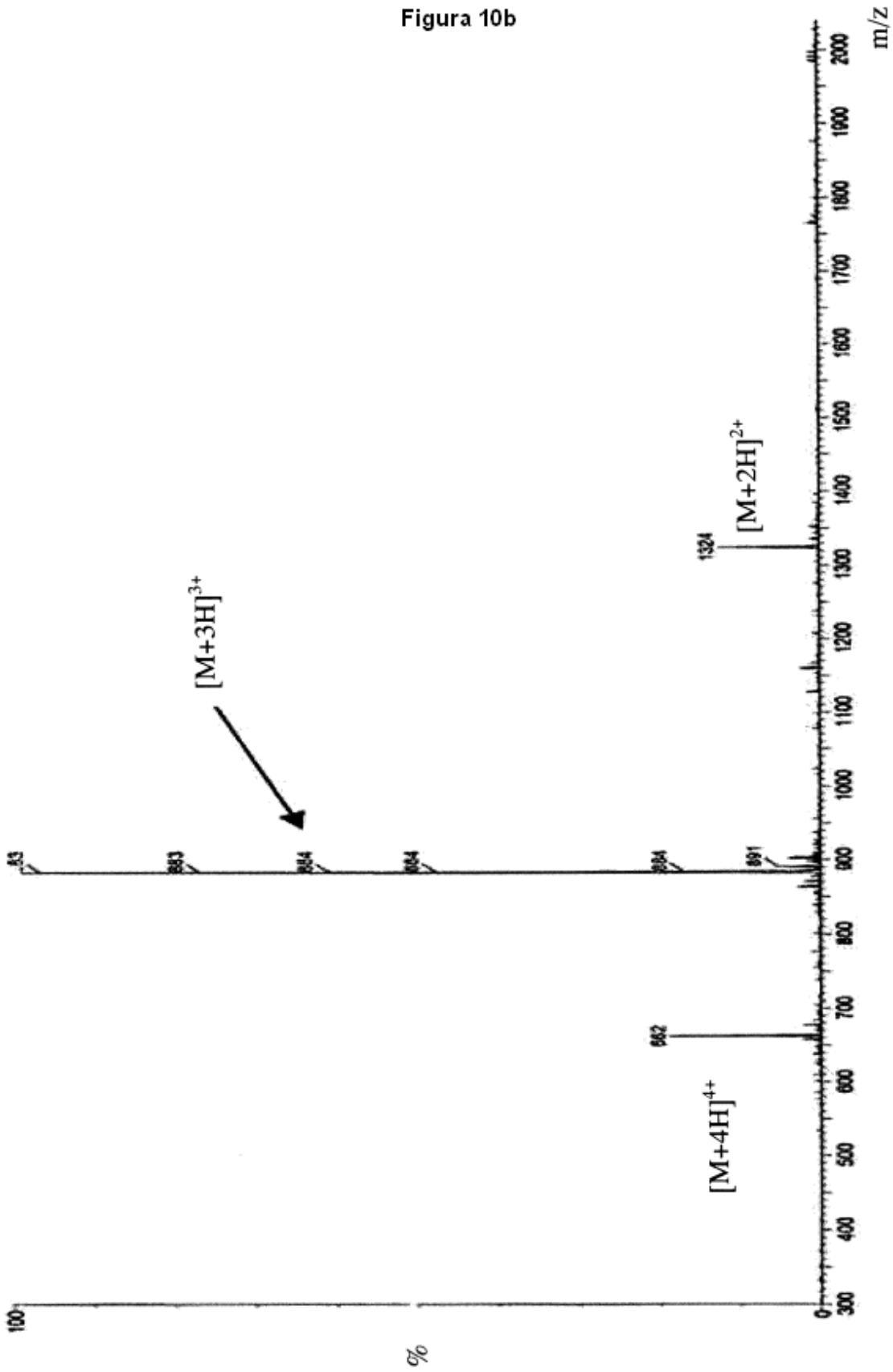


Figura 11a

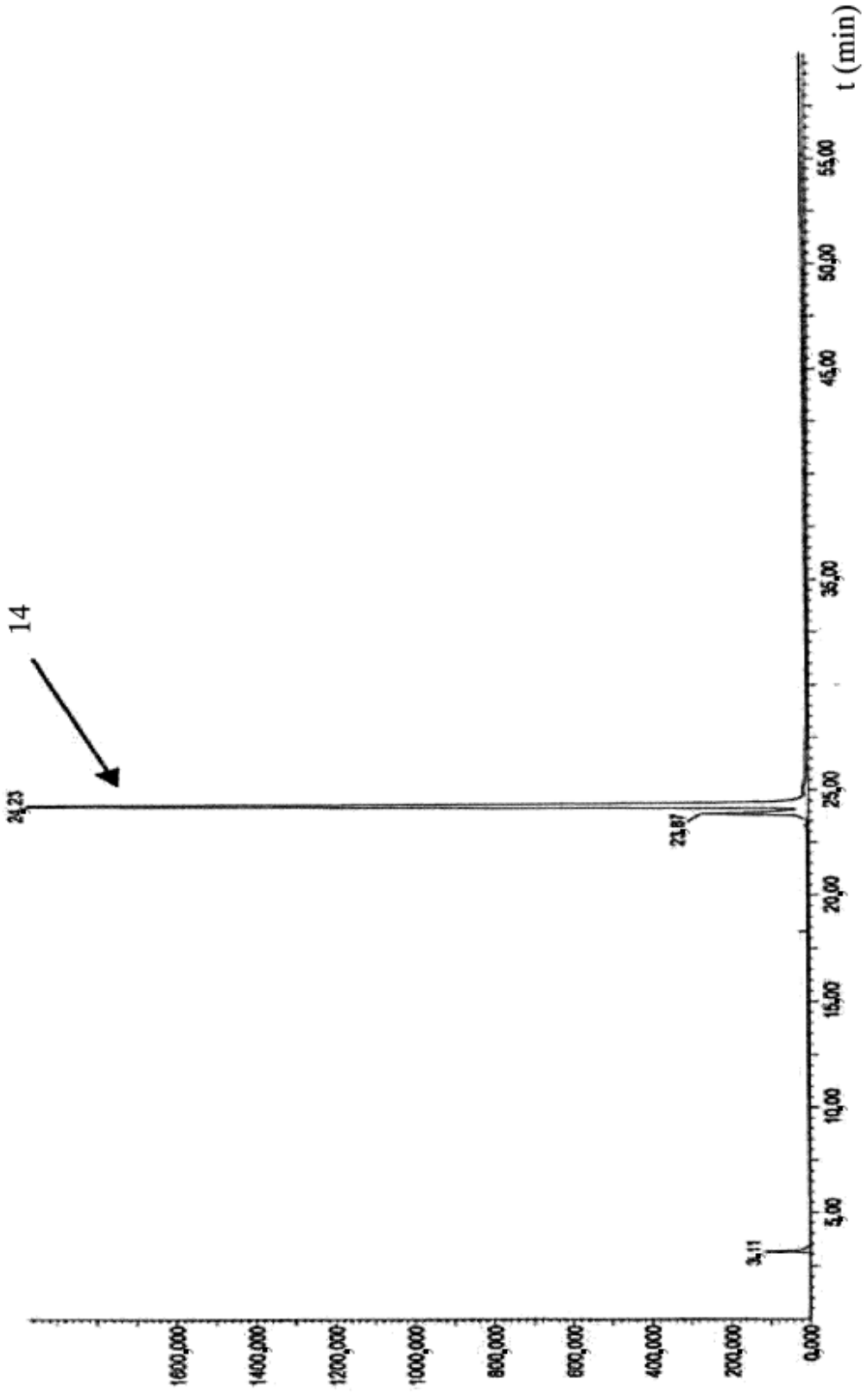

14
24,23
23,87
3,11
t (min)
0,00
5,00
10,00
15,00
20,00
25,00
35,00
45,00
50,00
55,00
200,000
400,000
600,000
800,000
1000,000
1200,000
1400,000
1600,000

Figura 11b

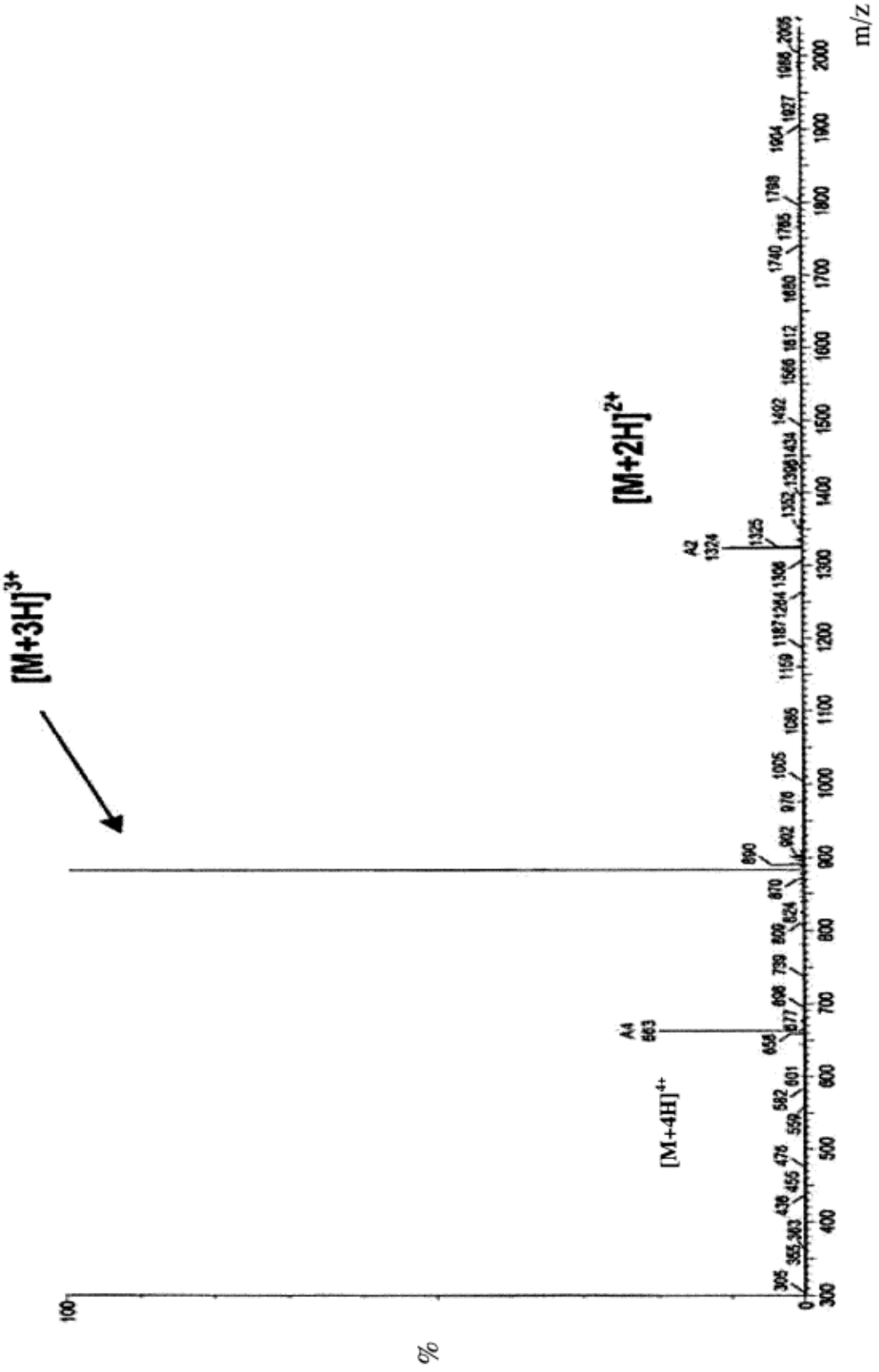


Figura 12

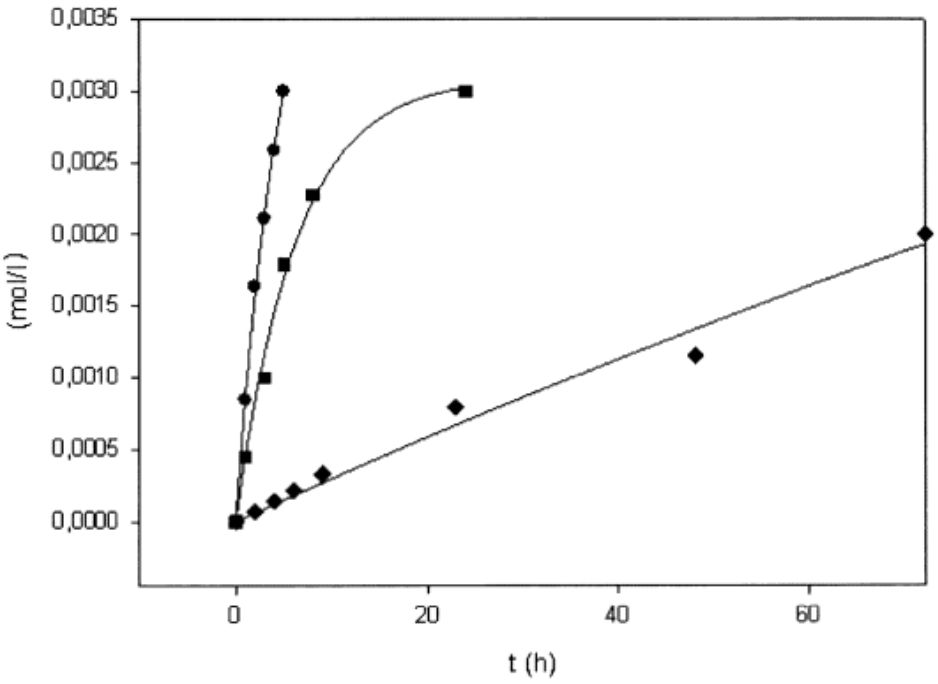

0,0035
0,0030
0,0025
0,0020
0,0015
0,0010
0,0005
0,0000
(mol/l)
0
20
40
60
t (h)

Figura 13

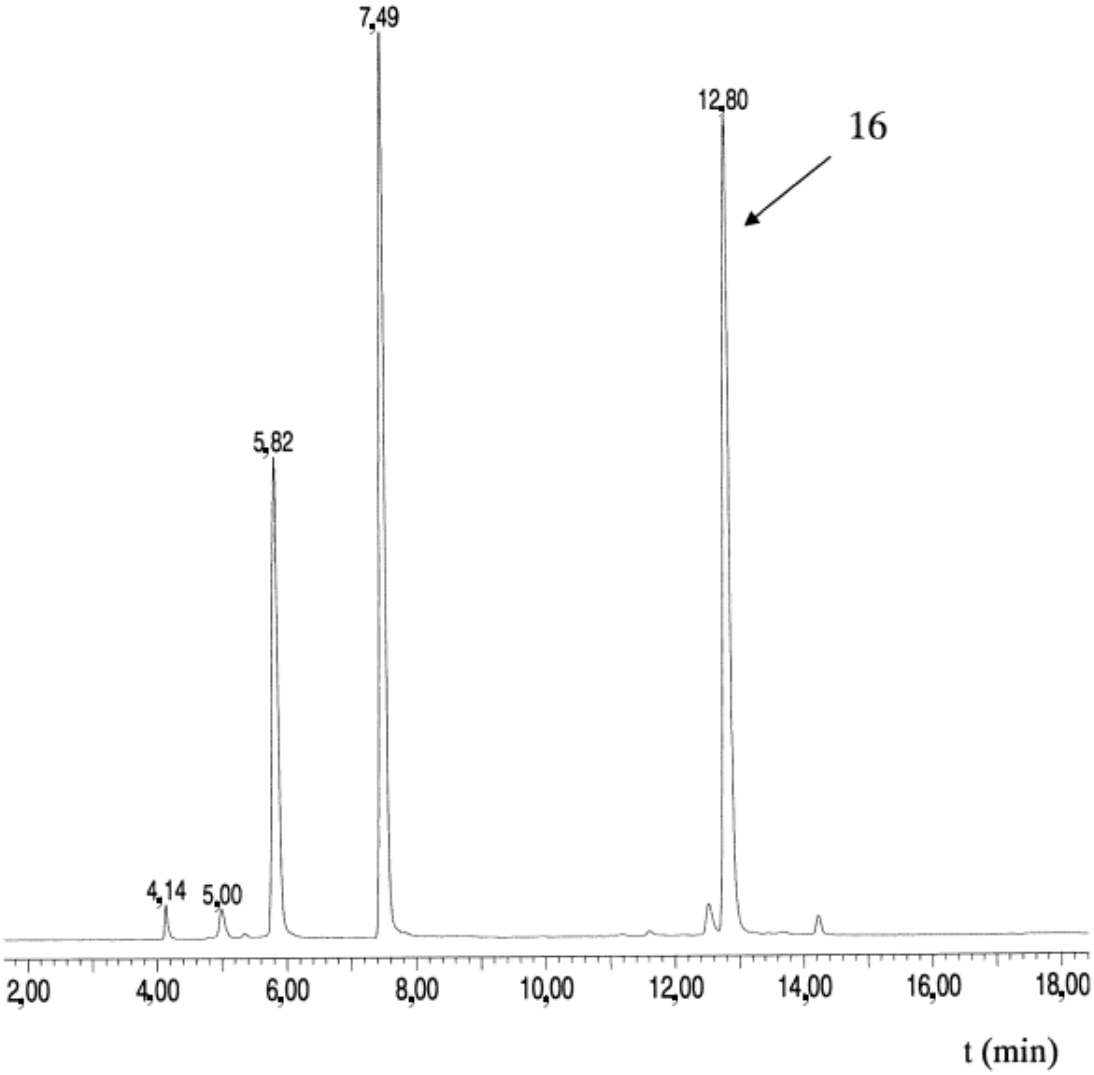

7,49
12,80
16
5,82
4,14
5,00
2,00
4,00
6,00
8,00
10,00
12,00
14,00
16,00
18,00
t (min)

Figura 14a

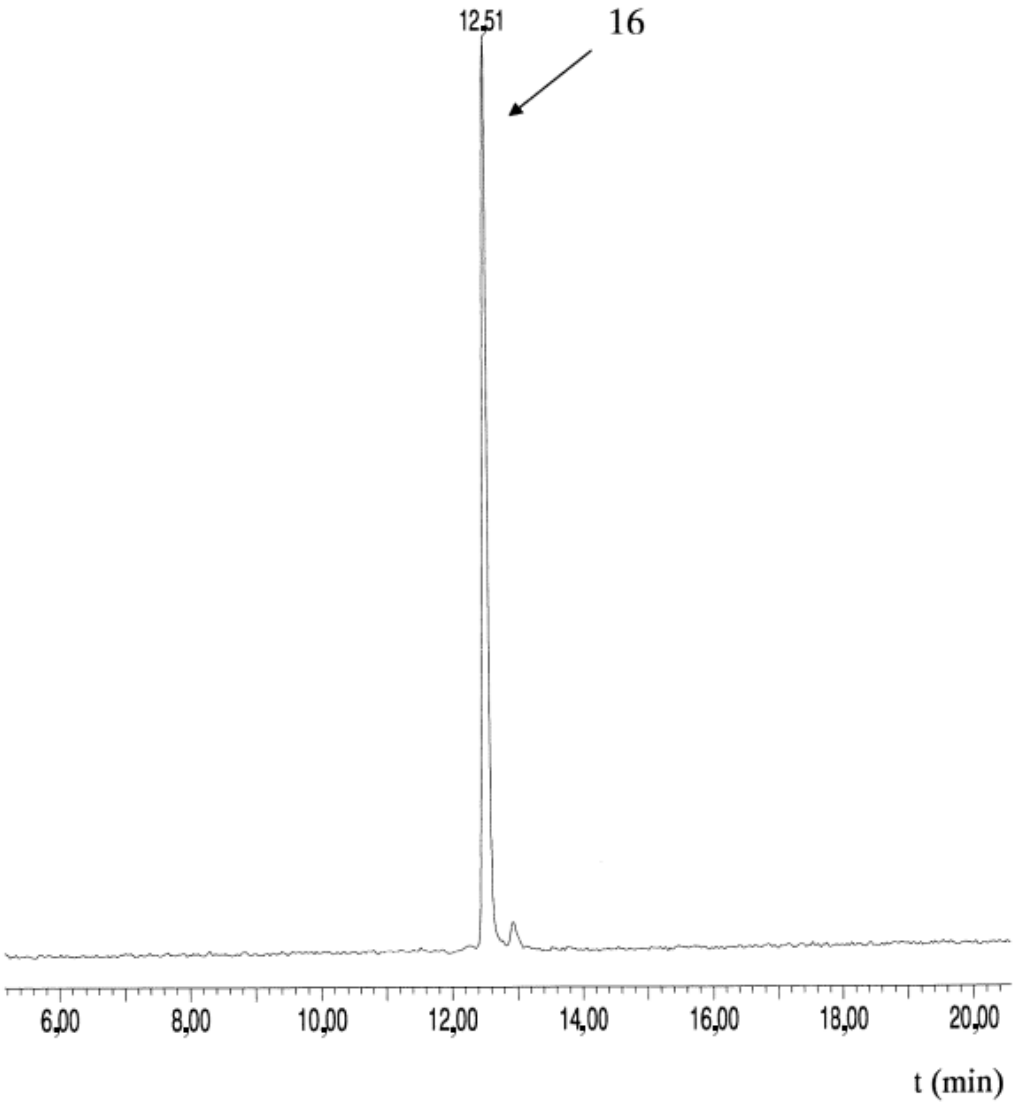
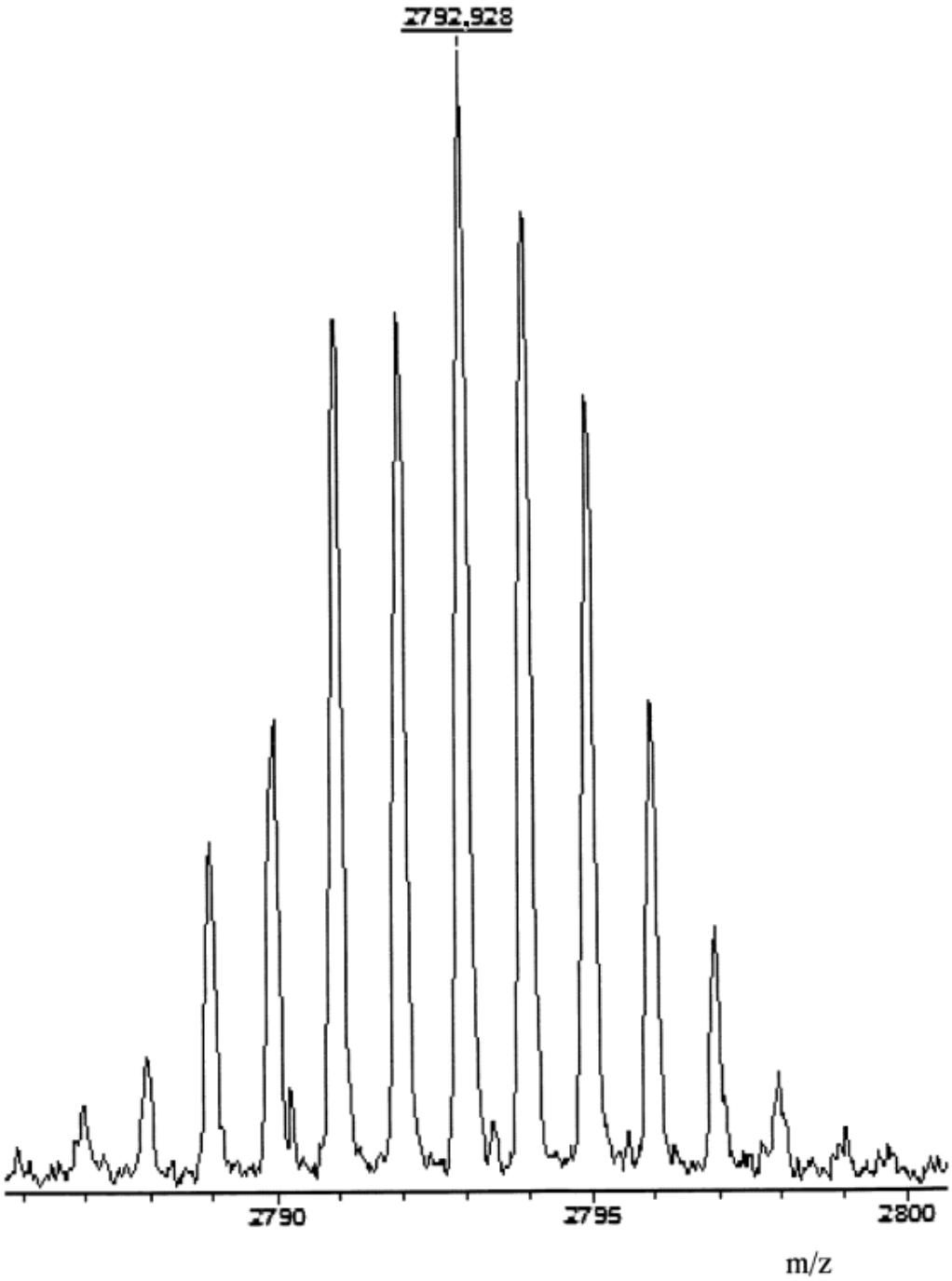



Figura 14b