

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 299**

51 Int. Cl.:

C07K 1/02 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2009 PCT/GB2009/050990**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2010 WO10015864**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2009 E 09785460 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2321339**

54 Título: **Diafiltración resistente a solventes de péptidos, PNA u oligonucleótidos**

30 Prioridad:

08.08.2008 GB 0814519

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

19.04.2017

73 Titular/es:

**IMPERIAL INNOVATIONS LIMITED (100.0%)
Electrical and Electronic Engineering Building
Level 12, Imperial College London, Exhibition
Road
London SW7 2AZ, GB**

72 Inventor/es:

**LIVINGSTON, ANDREW, GUY;
PEEVA, LUDMILA, GEORGIEVA;
SO, SHEYUNG, WANG, JERRY;
CAMPOS VASCONCELES, RENATO;
LEATHERBARROW, ROBIN, JOHN;
TATE, EDWARD, WILLIAM y
GAFFNEY, PIERS, ROBERT, JAMES**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 609 299 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diafiltración resistente a solventes de péptidos, PNA u oligonucleótidos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de compuestos, en particular compuestos seleccionados entre péptidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos.

Antecedentes de la invención

10 Los péptidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos son moléculas biológicamente importantes y comprenden polímeros constituidos por unidades de repetición distintas. En el caso de los péptidos, las unidades de repetición son aminoácidos o sus derivados, mientras que en el caso de los oligonucleótidos las unidades de repetición son nucleótidos o sus derivados. Los oligonucleótidos se pueden dividir además en oligonucleótidos de ARN y oligonucleótidos de ADN, como es bien conocido para los expertos en la técnica, véase por ejemplo P. S. Millar, Bioconjugate Chemistry, 1990, volumen 1, páginas 187-191. En el caso de los ácidos nucleicos peptídicos (PNA), el esqueleto se compone de unidades repetitivas de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos. Las diversas bases de purina y pirimidina están unidas a la cadena principal por enlaces metileno-carbonilo. La secuencia de los aminoácidos en un péptido, las secuencias de nucleótidos de ARN en el ARN o los nucleótidos de ADN en el ADN, o la secuencia de las bases de purina y pirimidina en PNA, determinan la función y los efectos de los compuestos en sistemas biológicos.

15 Los compuestos se sintetizan mediante el acoplamiento de sus unidades de repetición para dar una secuencia específica. Las unidades de repetición pueden estar protegidas en uno o más sitios reactivos utilizando grupos protectores, para dirigir las reacciones de acoplamiento a un sitio específico en la unidad de repetición protegida. Pueden ser necesarias reacciones de desprotección después de una reacción de acoplamiento para eliminar los grupos protectores y preparar el compuesto para una reacción de acoplamiento posterior. La síntesis tiene lugar en una secuencia de ciclos, comprendiendo cada ciclo una reacción de acoplamiento seguida por una reacción de desprotección. Entre las reacciones es necesaria la eliminación de trazas de reactivos en exceso y subproductos de reacción a niveles muy bajos para evitar que se formen secuencias erróneas en la secuencia de unidades de repetición. Cuando las reacciones de acoplamiento o desprotección se llevan a cabo en fase líquida, esta purificación es a menudo tediosa, y se logra mediante operaciones de precipitación, cristalización o cromatografía que consumen tiempo. Las químicas y los métodos disponibles para el acoplamiento y desprotección de péptidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos han sido bien documentados.

20 La síntesis de péptidos se revolucionó en 1963 por el advenimiento de la síntesis en fase sólida (Merrifield RB J Am Chem Soc 8.5, (1963) 2149). En este enfoque, el primer aminoácido en una secuencia se une a una cuenta de resina. Los aminoácidos posteriores se acoplan al péptido unido a la resina y, finalmente, cuando se ha cultivado el péptido deseado, se escinde de la resina. Es importante destacar que al final de cada reacción de acoplamiento o desprotección, los aminoácidos protegidos sin reaccionar, los reactivos en exceso y otros subproductos pueden eliminarse lavando, incluyendo lavado la resina sobre un filtro, o lavado de un lecho relleno de resina con solvente. La síntesis de péptidos en fase sólida es ahora una tecnología estándar para síntesis de laboratorio y comerciales. La síntesis de oligonucleótidos ha seguido un desarrollo tecnológico similar a los péptidos, como se describe por Sanghvi, YS, Org Proc Res & Dev 4 (2000) 168-169 y se basa en la síntesis en fase sólida en la que un primer oligonucleótido está unido a una fase sólida. Otros oligonucleótidos están unidos mediante ciclos de reacciones de acoplamiento y desprotección, con purificación entre las reacciones llevadas a cabo por lavado, incluyendo lavado de una resina sobre un filtro, o lavado de un lecho relleno de resina con solvente.

25 Los procesos de membrana son bien conocidos en la técnica de la ciencia de la separación y se pueden aplicar a una gama de separaciones de especies de pesos moleculares variables en fases líquida y gaseosa (véase por ejemplo "Membrane Technology" in Kirk Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4ª Edición 1993, Vol 16, páginas 135-193). La nanofiltración es un proceso de membrana que utiliza membranas cuyos poros están en el intervalo de 0.5 a 5 nm, y que tienen puntos de corte de MW de 200-3,000 Dalton. La nanofiltración ha sido ampliamente aplicada a la filtración de fluidos acuosos, pero debido a la falta de membranas estables a un solvente apropiadas no se ha aplicado ampliamente a la separación de solutos en solventes orgánicos. Las membranas de ultrafiltración por lo general tienen puntos de corte de MW en el intervalo de 1,000 a 500,000 Dalton. Recientemente se han desarrollado clases nuevas de membranas que son estables incluso en los solventes más difíciles como se ha informado en P. Vandezande, L.E. M. Gevers and I. F. J. Vankelecom Chem. Soc. Rev., (2008), Vol 37, páginas 365-405. Estas pueden ser membranas poliméricas o membranas cerámicas, o membranas inorgánicas/orgánicas de matriz mixta.

30 La diafiltración es un proceso de filtración de líquido en el cual un líquido de alimentación que contiene al menos dos solutos está en contacto con una membrana y se presuriza de manera que parte del líquido pasa a través de la

5 membrana, en donde al menos un soluto tiene un rechazo mayor en la membrana que al menos un otro soluto. Se alimenta líquido adicional al lado presurizado de la membrana para compensar el líquido que penetra a través de la membrana. Las proporciones entre la concentración del soluto más retenido y la concentración del soluto menos retenido en el permeado y el retenido varían dinámicamente, aumentando en el retenido y disminuyendo en el permeado.

10 La aplicación de la separación por membrana a la síntesis de péptidos ha sido descrita para la reconcentración de péptidos producidos por biosíntesis como se describe por Tsuru T, Nakao S, Kimura S, Shutou T, Sep. Sci. and Technol., volumen 29, (1994), páginas 971-984 o recuperación de aminoácidos a partir de soluciones acuosas como se describe en Li S, Li C, Lui Y, et al., J. Mem. Sci., volumen 222 (2003), páginas 191-201 o Wang X, Ying A, Wang W, J. Mem. Sci., volumen 196 (2002) páginas 59-67. El uso de membranas durante la síntesis de péptidos para separar péptidos en crecimiento de reactivos en exceso y subproductos de reacción se informó en US 3,772,264. Los péptidos se sintetizaron en una fase líquida, con poli(etilenglicol) (PEG) como un grupo de anclaje molecular, y la separación de la cadena peptídica en crecimiento de impurezas se logró con ultrafiltración en fase acuosa. La separación necesitó evaporación del solvente orgánico después de cada etapa de acoplamiento, neutralización seguida por evaporación después de cada desprotección, y luego para ya sea acoplamiento o desprotección, absorción de agua antes de la ultrafiltración de una solución acuosa. El agua se eliminó entonces por evaporación y/o destilación azeotrópica antes de volver a disolver el péptido anclado en PEG de nuevo en solvente orgánico para la siguiente etapa de acoplamiento o desprotección. La complejidad del proceso lo hace indeseable desde una perspectiva comercial.

Bayer et al (Nature, vol 237, Junio 30 1972) revela un proceso para la síntesis en fase líquida de péptidos.

20 Mutter et al (Liebigs Ann. Chem. 1975, 901 915) revelan la metodología y los detalles experimentales de las síntesis de péptidos en fase líquida.

Resumen de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para la preparación de un primer compuesto seleccionado entre oligonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos; comprendiendo el proceso:

25 (i) sintetizar el primer compuesto mediante síntesis en fase líquida en un solvente orgánico; y

(ii) separar el primer compuesto formado en la etapa (i) de un segundo compuesto, que es un subproducto de reacción de la síntesis del primer compuesto y/o un exceso de un reactivo utilizado para la síntesis de un primer compuesto,

en donde:

la síntesis del primer compuesto en la etapa (i) implica una o más reacciones de acoplamiento o desprotección;

30 el primer y segundo compuestos se disuelven en un solvente orgánico y se separan mediante un proceso de diafiltración utilizando una membrana que es estable en el solvente orgánico y que proporciona un rechazo para el primer compuesto que es mayor que el rechazo para el segundo compuesto;

el primer compuesto se modifica sometiéndolo a una o más reacciones de acoplamiento y/o desprotección posteriores a la separación.

35 De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para la preparación de un primer compuesto que es un péptido; comprendiendo el proceso:

(i) sintetizar el primer compuesto mediante síntesis en fase líquida en un solvente orgánico; y

(ii) separar el primer compuesto formado en la etapa (i) de un segundo compuesto, que es un subproducto de reacción de la síntesis del primer compuesto y/o un exceso de un reactivo utilizado para la síntesis de un primer compuesto,

40 en donde:

la síntesis del primer compuesto en la etapa (i) implica una reacción de acoplamiento;

el primer y segundo compuestos se disuelven en un solvente orgánico y se separan mediante un proceso de diafiltración utilizando una membrana que es estable en el solvente orgánico y que proporciona un rechazo para el primer compuesto que es mayor que el rechazo para el segundo compuesto;

45 el primer compuesto se modifica sometiéndolo a una o más reacciones de acoplamiento y/o desprotección posteriores a la separación.

5 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un uso de una membrana en un proceso para la preparación de un primer compuesto seleccionado entre oligonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos como se definen en este documento, en donde el primer y segundo compuestos se disuelven en un solvente orgánico y se separan por un proceso de diafiltración utilizando una membrana que es estable en el solvente orgánico y que proporciona un rechazo para el primer compuesto que es mayor que el rechazo para el segundo compuesto.

10 De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona un uso de una membrana en un proceso para la preparación de un péptido como se define en este documento; en donde el primer y segundo compuestos se disuelven en un solvente orgánico y se separan mediante un proceso de diafiltración utilizando una membrana que es estable en el solvente orgánico y que proporciona un rechazo para el primer compuesto que es mayor que el rechazo para el segundo compuesto.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el enfoque general de la síntesis de un péptido, oligonucleótido o ácido nucleico peptídico (denominados colectivamente en las figuras como "mareas") a partir de unidades de repetición de A₁, A₂ y A₃.

La figura 2 muestra una representación esquemática de la síntesis de péptidos mejorada con membrana.

15 La figura 3 muestra el equipo utilizado en la síntesis de péptidos mejorada con membrana descrita en los ejemplos 2 y 3, y en la síntesis de oligonucleótidos descrita en el ejemplo 4.

La figura 4 muestra los datos de cromatografía HPLC para el pentapéptido producido en el ejemplo 1.

La figura 5 muestra espectros de masas MALDI-TOF para el pentapéptido producido en el ejemplo 1.

La figura 6 muestra los datos de cromatografía HPLC para el pentapéptido producido en el ejemplo 2.

20 La figura 7 muestra espectros de masas MALDI-TOF para el pentapéptido producido en el ejemplo 2.

La figura 8 muestra datos de HPLC para el pentapéptido producido en el ejemplo 3.

La figura 9 muestra espectros de masas MALDI-TOF para el pentapéptido producido en el ejemplo 3.

La figura 10 muestra datos de RMN del oligonucleótido dimérico producido en el ejemplo 4.

La figura 11 muestra los datos de RMN del oligonucleótido dimérico producido en el ejemplo 4.

25 Descripción de diversas realizaciones

El término "péptido" utilizado en este documento abarca adicionalmente derivados de péptidos. Ejemplos de derivados peptídicos son péptidos que comprenden uno o más aminoácidos sintéticos o químicamente modificados, uno o más grupos protectores o un grupo terminal situado en uno o ambos extremos de la cadena peptídica.

30 En una realización de la invención, un péptido comprende menos de 200 residuos de aminoácidos. En una realización particular de la invención, un péptido comprende menos de 100 residuos de aminoácidos. En una realización adicional de la invención, un péptido comprende menos de 50 residuos de aminoácidos.

El término "oligonucleótido" utilizado en este documento abarca adicionalmente derivados de oligonucleótidos, por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden uno o más oligonucleótidos sintéticos o químicamente modificados, uno o más grupos protectores o uno o más grupos terminales situados en los extremos de la cadena de oligonucleótidos.

35 El término "ácido nucleico peptídico" o "PNA", tal como se usa en la presente memoria, abarca adicionalmente derivados de ácido nucleico peptídico, por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos que comprenden una o más bases de purina o pirimidina modificadas químicamente, uno o más grupos protectores o uno o más grupos terminales situados en los extremos de la cadena de ácido nucleico del péptido.

40 De acuerdo con la invención, el primer compuesto se separa del segundo compuesto por diafiltración. La diafiltración se puede realizar en dos modos de funcionamiento. El primer modo de funcionamiento es la diafiltración en volumen constante en la que se alimenta el solvente nuevo al sistema de filtración a la misma velocidad que el permeado se descarga del sistema, manteniendo así un volumen constante en el sistema. El segundo modo de funcionamiento es una diafiltración de volumen variable en la que el volumen de filtración se reduce descargando permeado del sistema y se adiciona periódicamente un solvente nuevo al sistema para aumentar el volumen del sistema antes de que se descargue el permeado adicional.

45

De forma apropiada, el primer compuesto tiene un peso molecular superior a 200 dalton. En una realización particular de la invención, el primer compuesto tiene un peso molecular mayor que 300 dalton. En una realización preferida de la invención, el primer compuesto tiene un peso molecular superior a 500 dalton

5 El segundo compuesto es un subproducto de la reacción de síntesis que forma el primer compuesto o un reactivo utilizado en dicha reacción. Se puede utilizar cualquier método de síntesis apropiado del primer compuesto que se conoce en la técnica. La reacción de síntesis puede ser una reacción de acoplamiento o desprotección. De forma apropiada, la síntesis se lleva a cabo en una fase líquida. En particular, la síntesis se puede realizar en presencia de un solvente orgánico, que puede ser igual o diferente al solvente orgánico utilizado para la diafiltración.

10 En una realización, el proceso comprende modificar el primer compuesto después de la separación. Por ejemplo, el primer compuesto se puede modificar realizando una o más etapas adicionales de acoplamiento y/o desprotección. El compuesto modificado puede purificarse posteriormente, en particular utilizando el proceso de diafiltración de la presente invención. En una realización, un proceso de la invención comprende una pluralidad de etapas secuenciales de acoplamiento, desprotección y separación, facilitando de este modo la síntesis de una diversidad de péptidos, oligonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos.

15 Las membranas apropiadas para uso en la invención incluyen membranas poliméricas y cerámicas, y membranas mixtas poliméricas/inorgánicas. El rechazo de la membrana R_i es un término común conocido para los expertos en el arte y se define como:

$$R_i = \left(1 - \frac{C_{P,i}}{C_{R,i}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

20 donde $C_{P,i}$ = concentración de la especie i en el permeado, siendo el permeado el líquido que ha pasado a través de la membrana, y $C_{R,i}$ = concentración de la especie i en el retenido, siendo el retenido el líquido que no ha pasado a través de la membrana. Se apreciará que una membrana es apropiada para la invención si R (primer compuesto) > R (segundo compuesto).

25 La membrana de la presente invención puede estar formada a partir de cualquier material polimérico o cerámico que proporcione una capa de separación capaz de separar preferentemente la marea de al menos un subproducto o reactivo de reacción. Preferiblemente, la membrana se forma a partir de o comprende un material seleccionado de materiales poliméricos apropiados para fabricar membranas de microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración u osmosis inversa, incluyendo polietileno, polipropileno, politetrafluoroetileno (PTFE), difluoruro de polivinilideno (PVDF), polisulfona, polietersulfona, poliacrilonitrilo, poliamida, poliimida, polieterimida, acetato de celulosa, polianilina, polipirrol y mezclas de los mismos. Las membranas se pueden fabricar mediante cualquier técnica conocida en la técnica, incluyendo sinterización, estiramiento, grabado de pistas, lixiviación de plantillas, polimerización interfacial o inversión de fase. Más preferiblemente, las membranas pueden ser reticuladas o tratadas de manera que mejoren su estabilidad en los solventes de reacción. De particular mención son las membranas descritas en WO 2007/125367.

35 En una realización, la membrana es un material compuesto que comprende un soporte y una capa delgada selectivamente permeable, y la capa no porosa, selectivamente permeable de la misma, se forma a partir de o comprende un material seleccionado entre elastómeros a base de polisiloxano modificado que incluyen elastómeros basados en polidimetilsiloxano (PDMS), elastómeros basados en etileno-propileno-dieno (EPDM), elastómeros basados en polidiborneno, elastómeros basados en polioctenamer, elastómeros basados en poliuretano, elastómeros basados en caucho de butadieno y nitrilo butadieno, cauchos naturales, elastómeros basados en caucho butílico, elastómeros basados en el policloropreno (neopreno), elastómeros de epiclorhidrina, elastómeros de poliacrilato, polietileno, polipropileno, politetrafluoroetileno (PTFE), elastómeros basados en difluoruro de polivinilideno (PVDF), poliéter bloque amida (PEBAX), elastómeros de poliuretano, poliéter reticulado, poliamida, polianilina, polipirrol y mezclas de los mismos

45 En otra realización, la membrana se prepara a partir de un material inorgánico tal como a modo de ejemplo no limitativo carburo de silicio, óxido de silicio, óxido de zirconio, óxido de titanio o zeolitas, utilizando cualquier técnica conocida para los expertos en el arte tal como como sinterización, lixiviación o procesamiento sol-gel. Las membranas inorgánicas proporcionadas por Inopor GmbH (Alemania) se prefieren para uso en esta invención.

50 En una realización adicional, la membrana comprende una membrana polimérica con matrices orgánicas o inorgánicas dispersas en forma de sólidos en polvo presentes a cantidades de hasta 20% en peso de la membrana polimérica. Las matrices de tamiz molecular de carbono se pueden preparar por pirólisis de cualquier material apropiado como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6,585,802. Zeolitas como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6,755,900 también se puede usar como una matriz inorgánica. Se pueden usar óxidos metálicos, tales como

dióxido de titanio, óxido de zinc y dióxido de silicio, por ejemplo, los materiales disponibles de Degussa AG (Alemania) bajo sus marcas comerciales Aerosol y AdNano. Se pueden usar óxidos metálicos mixtos tales como mezclas de óxido de cerio, zirconio y óxido de magnesio. Las matrices preferidas serán partículas de menos de 1.0 micras de diámetro, preferiblemente menos de 0.1 micras de diámetro y preferiblemente menos de 0.01 micras de diámetro.

5 El primer compuesto se puede unir mediante una química apropiada a un soporte, por ejemplo, un polímero, dendrímero, dendrón, polímero hiperramificado o una nanopartícula inorgánica u orgánica que actúa como un anclaje molecular soluble que permite que el primer compuesto permanezca en solución durante las etapas de reacción y
10 diafiltración de la invención y proporcione un mayor volumen molecular para mejorar el rechazo de la membrana. Los polímeros apropiados para uso como anclajes moleculares incluyen matrices de policondensación o matrices de polimerización que contienen funciones de heteroátomo. Estas funciones de heteroátomos pueden contener oxígeno, nitrógeno o pueden contener más de un heteroátomo, tales como grupos amida de ácido. Ejemplos de polímeros utilizados en la presente invención incluyen polialquilenglicoles incluyendo polietilenglicol, policaprolactona, polietilenglicol esterificado con ácido cítrico, copolímeros de polietilenglicol y ácido succínico, de vinilpirrolidona y ácido acrílico o b-hidroxietilacrilato; o de acrilamida y acetato de vinilo. Los dendrímeros apropiados para uso en la presente
15 invención incluyen poli(amidoamina), también conocidos como dendrímeros PAMAM; dendrímeros de fósforo; dendrímeros de polilisina; y dendrímeros de polipropiliminina (PPI) que pueden tener grupos funcionales superficiales que incluyen grupos -OH, -NH₂, -PEG y COOH. Las nanopartículas se pueden obtener a partir de fuentes comerciales o sintetizar in situ para proporcionar dimensiones controladas, y las nanopartículas apropiadas pueden ser de SiO₂, TiO₂ u otros materiales orgánicos o inorgánicos. US 3,772,264 describe procedimientos químicos apropiados para unir aminoácidos y péptidos con anclajes moleculares. Bonora et al Bioconjugate Chem., (1997) volumen 8 (6), páginas 793-797, describe procedimientos químicos para unir nucleótidos y oligonucleótidos con anclajes moleculares. Christensen et al. J Pept. Sci. (1995) May-Jun; 1(3): páginas 175-83 describen técnicas apropiadas para unir ácidos nucleicos peptídicos con anclajes moleculares. La eliminación del primer compuesto del soporte se puede llevar a cabo fácilmente utilizando técnicas bien conocidas para los expertos en el arte, por ejemplo, las descritas en US 3,772,264.

25 Los procedimientos químicos apropiados para las reacciones de acoplamiento y desprotección de los péptidos son bien conocidas para los expertos en el arte, por ejemplo, véase Acid and Peptide Synthesis, 2^a Edn, J Jones, Oxford University Press 2002, o Schroder-Lubbke, The Peptides, New York 1967. Los procedimientos químicos apropiados para las reacciones de acoplamiento y desprotección sobre los oligonucleótidos son bien conocidas para los expertos en el arte, por ejemplo, véase P. S. Millar, Bioconjugate Chemistry, (1990), volumen 1, páginas 187-191 y C.B. Reese Org.Biomol.Chem. (2005) volumen 3 páginas 3851-3868. Los procedimientos químicos apropiados para las reacciones de acoplamiento y desprotección de ácidos nucleicos peptídicos son conocidos para los expertos en el arte, por
30 ejemplo, véase B. Hyrup and P.E. Nielsen Bioorganic & Medicinal Chemistry (1996), volumen 4, Issue 1, Páginas 5-23.

El término "solvente orgánico" será bien comprendido por el lector experto en la técnica e incluye, por ejemplo, un líquido orgánico con un peso molecular inferior a 300 Daltons. Se entiende que el término solvente también incluye una
35 mezcla de solventes.

A modo de ejemplo no limitativo, los solventes incluyen aromáticos, alcanos, cetonas, glicoles, solventes clorados, ésteres, éteres, aminas, nitrilos, aldehídos, fenoles, amidas, ácidos carboxílicos, alcoholes, furanos y solventes apróticos dipolares, y mezclas de los mismos y con agua.

A modo de ejemplo no limitativo, ejemplos específicos de solventes incluyen tolueno, xileno, benceno, estireno, anisol, clorobenceno, diclorobenceno, cloroformo, diclorometano, dicloroetano, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de butilo, metil éter cetona (MEK), metil-iso-butil-cetona (MIBK), acetona, etilenglicoles, etanol, metanol, propanol, butanol, hexano, ciclohexano, dimetoxietano, metil-terbutiléter (MTBE), dietiléter, adiponitrilo, N,N-dimetilformamida, dimetilsulfóxido, N,N-dimetilacetamida, dioxano, nitrometano, nitrobenceno, piridina, disulfuro de carbono, tetrahydrofurano, metil-tetrahydrofurano, N-metilpirrolidona, N-etilpirrolidona, acetonitrilo y mezclas de los mismos y con
45 agua.

Esquema y aparato de síntesis

Los ejemplos 1 a 3 ilustran la síntesis de pentapeptidos. El esquema empleado se muestra en la figura 2. El aparato empleado se muestra en la figura 3. El aparato se utilizó tanto para llevar a cabo ensayos de rechazo como para realizar síntesis. Ambas etapas de acoplamiento y desprotección se realizan en el recipiente de reacción (tanque de alimentación) a presión atmosférica. La bomba de circulación recircula la solución de reacción a través del cartucho de membrana y asegura una buena mezcla de líquido de principio a fin. Una vez completada cada reacción, el sistema se presuriza utilizando N₂ a ~7 bar. El flujo de solvente resultante que penetra a través de la membrana se equilibra con un flujo constante de solvente nuevo (DMF) suministrado al recipiente de reacción (tanque de alimentación) desde el depósito de solvente a través de una bomba de HPLC. Se aplica el mismo proceso en cada ciclo de reacción/lavado.
50 Los péptidos se ensamblaron sobre un anclaje molecular polimérico soluble para aumentar la retención por la membrana. Se eligió PEG como soporte polimérico.

Las siguientes abreviaturas se utilizan en los ejemplos:

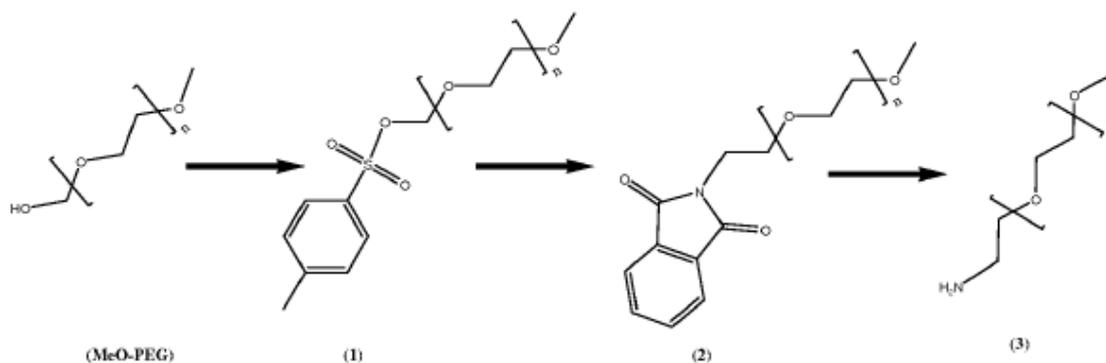
	Di-clorometano	DCM
	Diisopropilcarbodiimida	DIC
	Diisopropiletilamina	DIPEA
5	Dimetilformamida	DMF
	N- α -Fmoc-L-Alanina	Fmoc-Ala
	N- α -Fmoc-bis-t-butoxicarbonil-L-arginina	Fmoc-Arg(Boc) ₂
	Éster de β -t-butilo del ácido N- α -Fmoc-L-aspartico	Fmoc-Asp(O ^t Bu)
	N- α -Fmoc-N-t-Boc-L-lisina	Fmoc-Lys(Boc)
10	N- α -Fmoc-O-t-butil-L-tirosina	Fmoc-Tyr(^t Bu)
	N- α -Fmoc-L-valina	Fmoc-Val
	Ácido 4-hidroximetilfenoxiacético	HMPA
	N-Hidroxibenzotriazol	HOBt
	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio	PyBOP
15	Acetonitrilo	MeCN
	Trietilamina	TEA
	4-dimetilaminopiridina	DMAP
	Cloroformo	CHCl ₃
	Metanol	MeOH
20	N-metilimidazol	NMI
	Acetato de etilo	EtOAc
	Ácido dicloroacético	DCA
	Trifluoroacetato de piridinio	PyTFA
	Hidroperóxido de tert-butilo	TBHP

25 Ejemplo 1

30 Se produjo un péptido modelo con secuencia Tyr-Ala-Tyr-Ala-Tyr mediante síntesis de péptidos mejorada con membrana (MEPS) utilizando una membrana polimérica. La secuencia se eligió con el fin de incluir uno de los mayores aminoácidos protegidos comunes Fmoc-Tyr(^tBu) y uno de los aminoácidos hidrófobos protegidos más pequeños, Fmoc-Ala. Se utilizó una membrana de poliimida reticulada químicamente (DuraMem™, MET Ltd, UK que se cree que se fabricó siguiendo las técnicas descritas en PCT/GB2007/050218) para realizar las etapas de separación de membrana. El rechazo del péptido MeO-PEG-Inker fue ~100% para la etapa de acoplamiento y >99.7% para la etapa de desprotección.

Síntesis de amino poli(etilenglicol) metilado (MeO-PEG-NH₂)

El procedimiento utilizado para producir MeO-PEG-NH₂ se ilustra en el Esquema 1:



Esquema 1: Síntesis de PEG amino metilado

5 Síntesis de MeO-PEG-tosilato (1). Se deshidrataron 20 g de monometil éter de polietilenglicol (MeO-PEG, MW~5000 gmol^{-1}) a vacío a 80°C , durante 4 horas antes de disolver en 100 mL de DCM (25 mL por mmol de MeO-PEG). Se adicionaron 36 g de cloruro de p-toluenosulfonilo (46 mmol por mmol de MeO-PEG) y 6 mL de piridina (1.5 mL por mmol de PEG) a la solución de PEG, y la reacción se realizó en atmósfera de nitrógeno y agitación continua durante 12 horas. La solución resultante se concentró al vacío y el producto (MeO-PEG-Tos) se precipitó adicionando éter dietílico y se mantuvo a 4°C durante pocas horas para completar la precipitación. El precipitado se filtró y se lavó con éter, se recristalizó con etanol y se secó a vacío. El análisis UV se realizó midiendo la absorción a 270 nm, para verificar la presencia del grupo tosilato.

10 Síntesis de MeO-PEG-ftalimida (2). Se disolvieron 18 g de MeO-PEG-Tos y 8 g de ftalimida de potasio (10 mmol por mmol de MeO-PEG-Tos) en 50 mL de DMF (14 mL por mmol de MeO-PEG-Tos) y se calentó a reflujo y atmósfera de nitrógeno durante 4 horas. Los residuos sólidos se filtraron y se adicionó éter dietílico al filtrado para precipitar el producto de la solución. La solución se mantuvo a 4°C durante 5 horas para completar la precipitación. El producto se filtró y se lavó con éter, seguido de digestión con 50 mL de DCM. Las impurezas insolubles se filtraron y MeO-PEG-Phth se precipitó a partir de filtrado con éter. El producto se filtró de nuevo, se lavó con éter y se secó al vacío. La aparición del grupo de ftalimida se verificó por análisis UV a 292 nm y 264 nm.

20 Síntesis de MeO-Amino-PEG (3). Se disolvieron 16 g de MeO-PEG-Phth y 8 mL de hidrato de hidrazina (40 mmol por mmol de MeO-PEG-Phth) en 60 mL de etanol (18.5 mL por mmol de MeO-PEG-Phth) y se calentó a reflujo durante 12 horas. La mezcla del producto se enfrió a temperatura ambiente antes de la precipitación con éter dietílico. El precipitado se filtró y se volvió a disolver en 30 mL de DCM, las impurezas insolubles se filtraron y el producto MeO-PEG-NH₂ se precipitó del filtrado, se lavó con éter dietílico, se recristalizó con etanol y finalmente se secó a vacío. El producto se analizó con análisis de UV para la desaparición del grupo de ftalimida y la prueba de Kaiser aplicada para verificar la presencia del grupo amino. La conversión (~80%) se determinó por titulación con $\text{HCl}_{(\text{ac})}$.

Síntesis de péptidos

25 Síntesis de MeO-PEG-HMPA. Se disolvió 1 g de MeO-PEG-NH₂ (3) en 4 mL de DCM. Se preactivaron 0.073 g de HMPA, 0.21 g de PyBOP (ambas 2 moles por mol de MeO-PEG-NH₂) y 0.0026 g de DIPEA (0.1 mol por mol de MeO-PEG-NH₂) en 4 mL de DMF durante 15 minutos antes de que sea adicionado en la solución de PEG. El producto se precipitó con éter dietílico a 4°C , durante 2 horas y se separó por centrifugación, seguido de lavados con éter. El producto en bruto se purificó por recristalización con etanol. El producto de MeO-PEG-HMPA se secó al vacío y se analizó por análisis de ^1H -RMN. La conversión se estimó basándose en la relación entre los picos a 3.4 (s, 3H) para grupo MeO y 6.7 (d, 2H), 6.9 (d, 2H) para el sistema aromático en el enlazante HMPA.

35 Síntesis de Fmoc-Tyr-HMPA-PEG-OMe. Se disolvieron previamente 0.5 g de MeO-PEG-HMPA en 4 mL de DMF (45 L por mol de MeO-PEG-HMPA). Se adicionaron 0.096 g de Tyr protegido con Fmoc (Fmoc-Tyr(^tBu)), 0.028 g de HOBT, 0.026 g de DIC (2 moles por mol de MeO-PEG-HMPA) y 0.0013 g de DIPEA (0.1 mol por mol de MeO-PEG-HMPA) se preactivaron durante 15 minutos en 4 mL de DMF (10 L por mol de MeO-PEG-HMPA) antes de mezclar con la disolución de MeO-PEG-HMPA durante 2 horas. Tras la finalización de la reacción, se eliminaron los reactivos en exceso por diafiltración (40 x volumen de partida) con una membrana de políimida reticulada químicamente. Se recogieron muestras de permeato para monitorizar las pérdidas de péptidos anclados en PEG y para verificar la eliminación de impurezas. Se recolectaron pequeñas muestras de retenido y se precipitaron para el análisis de ^1H RMN para estimar la conversión y para las pruebas de Kaiser para confirmar la ausencia del grupo amino.

5 Ensamblaje de cadena con Fmoc-aminoácidos. Se preactivaron 0.046 g de Fmoc-Ala con 0.076 g de PyBOP, 0.020 g de HOBt (todas 2 moles por mol de MeO-PEG-HMPA) y 0.001 g de DIPEA (0.1 mol por mol de MeO-PEG-HMPA) en 4 mL de DMF (10 L por mol de MeO-PEG-HMPA) durante 15 minutos. Se preparó una solución separada de MeO-PEG-HMPA-Tyr-H en DMF y se mezcló con la solución preactivada. La solución resultante se mezcló vigorosamente durante 1 hora seguida de lavados con diafiltración (40 x volumen de partida) con una membrana de poliimida reticulada químicamente. Los procedimientos similares se aplicaron a la unión de aminoácidos adicionales.

Fmoc-desprotección. Se preparó una solución de piperidina/DMF al 20% adicionando la cantidad requerida de piperidina pura al volumen de solución conocido. La desprotección se realizó durante 30 minutos. La separación después de la desprotección se realizó por diafiltración (40 x volumen inicial) con membrana de poliimida reticulada químicamente.

10 Desprotección de cadena lateral y reacción de escisión. La solución que contenía 0.33 g de bloque de construcción PEG-péptido se retiró de la célula de filtración, el producto se precipitó con éter dietílico y se secó a vacío. El precipitado se volvió a disolver en 20 mL por mmol de solución de acidólisis durante 3 horas. Se utilizó éter dietílico para precipitar el péptido diana junto con MeO-PEG-HMPA.

Pureza del péptido

15 Las figuras 4 y 5 muestran datos para HPLC y análisis MALDI-TOF de la pureza del pentapéptido resultante. No se generaron secuencias aleatorias a partir de la síntesis mostrando que la mayoría de los reactivos no reaccionados e impurezas se eliminaron del sistema antes de que se realizara la fijación. Los únicos subproductos de las secuencias de delección se debieron a una reacción incompleta y no estaban relacionados con el proceso de separación.

Ejemplo 2

20 La secuencia de péptidos modelo Tyr-Ala-Tyr-Ala-Tyr se produjo de nuevo como un ejemplo de síntesis de péptidos mejorada con membrana con una membrana cerámica. En este ejemplo se utilizó una membrana revestida de óxido de zirconio Inopor con un tamaño de poro de 3 nm y una modificación superficial hidrófoba (Inopor GmbH, Alemania).

El rechazo de la membrana del péptido MeO-PEG aumentó a >99.7% después de la primera y segunda fijación de aminoácidos y ~100% para los anexos posteriores.

25 Síntesis de amino poli(etilenglicol) metilado (MeO-PEG-NH₂)

El MeO-PEG-NH₂ utilizado en este ejemplo se produjo por la misma ruta que la descrita en el Ejemplo 1.

Resultados del rechazo de la membrana

Los datos de rechazo para esta membrana se presentan en la Tabla 1. La membrana Inopor mostró 99% de rechazo de tanto el MeO-PEG como del MeO-PEG-HMPA.

30 Se ensayaron varios aminoácidos Fmoc que cubrían una amplia gama de propiedades -el aminoácido de PM más bajo y el aminoácido de PM más elevado, aminoácidos ácidos, básicos e hidrófobos, y algunos de los aminoácidos que ocurren más frecuentemente en las proteínas. Se llevaron a cabo pruebas de rechazo adicional sobre activadores de acoplamiento y reactivo. Los resultados mostraron que los activadores PyBOP y HBTU exhiben un rechazo relativamente alto por la membrana, presumiblemente debido al hecho de que estos activadores son sales voluminosas, de modo que el impedimento estérico y los efectos Donnan contribuirían a su retención. Sin embargo, durante la reacción de acoplamiento estos activadores se descomponen en moléculas más pequeñas, por lo tanto, se espera que el rechazo final sea menor. El reactivo de acoplamiento DIC mostró un rechazo muy bajo del 13%, de forma similar piperidina, el reactivo de desprotección para la desprotección Fmoc se rechazó sólo el 5%. Sin embargo, el DIC sólo puede usarse en combinación con HOBt para suprimir la racemización, por lo que es importante examinar el rechazo del HOBt. Existen dos tipos de HOBt disponibles en el mercado, uno es el HOBt cristalino de la escama, el otro es un polvo húmedo HOBt.H₂O, y como se muestra en la Tabla 1 el contenido de humedad parece afectar al rechazo del HOBt por la membrana. El uso de PyBOP o HBTU no requiere la adición de HOBt y se espera que el rechazo de HOBt que se rompe de estos activadores durante la reacción de acoplamiento sea bajo, ya que está libre de humedad. Finalmente, se investigó también el rechazo del enlazante de HMPA. El rechazo de HMPA es relativamente bajo (39%) con 99% de rechazo de MeO-PEG-HMPA.

Tabla 1: Datos de rechazo de PEG, aminoácidos protegidos y otros reactivos comunes utilizados en la síntesis de péptidos obtenidos con la membrana cerámica Inopor ZrO₂/Al₂O₃. Los experimentos se realizaron en un modo discontinuo, y el rechazo se determinó de acuerdo con la Ec. 1.

Compuesto	MW [g.mol ⁻¹]		Rechazo de Membrana Inopor ZrO ₂ /Al ₂ O ₃ [%]	Error * [%]	Flujo [Lm ⁻² h ⁻¹]
Fmoc-Ala-OH	311	Aminoácido	55	7.3	27
Fmoc-Arg (Boc) ₂ -OH	597	Aminoácido	68	8.7	26
Fmoc-Asp (O ^t Bu)-OH	412	Aminoácido	41	9.2	27
Fmoc-Cys (tBu)-OH	400	Aminoácido	50	3.8	28
Fmoc-Gly-OH	297	Aminoácido	51	13.5	11
Fmoc-Lys (Boc)-OH	469	Aminoácido	59	8.7	29
Fmoc-Trp (Boc)-OH	527	Aminoácido	61	3.6	27
Fmoc-Tyr (tBu)-OH	460	Aminoácido	41	6.6	25
Fmoc-Val-OH	339	Aminoácido	42	4.5	25
DIC	126	Activador	13	45.5	26
HOBt	135	Supresor de racemización	32	7.3	21
HOBt·H ₂ O	135	Supresor de racemización	61	12.4	22
HBTU	379	Activador	51	7.0	25
PyBOP	520	Activador	64	3.5	27
HMPA	182	Enlazante	39	11.4	26
Piperidina	85	Reactivo de desprotección	5	3.3	25
MeO-PEG	5000	Anclaje	99	9.7	25
MeO-PEG-HMPA	5182	Anclaje	99	39.8	20
* Error estimado a partir del balance de masas entre alimentación, permeado y retenido					

Síntesis de péptidos

Síntesis de MeO-PEG-HMPA. Se disolvieron 24 g de MeO-PEG-NH₂ (3) en 100 mL de DCM. Se preactivaron 0.9 g de HMPA, 2.5 g de PyBOP (ambas 2 moles por mol de MeO-PEG-NH₂) y 0.06 g de DIPEA (1 mol por mol de MeO-PEG-NH₂) en 80 mL de DMF durante 15 minutos antes de su adición en la solución de PEG. El producto se precipitó con éter dietílico a 4°C durante 2 horas y se separó por centrifugación, seguido de lavados con éter. El producto en bruto se purificó por recristalización con etanol. El producto de MeO-PEG-HMPA se secó al vacío y se analizó por análisis de H¹-RMN. La conversión se estimó basándose en la relación entre los picos a 3.4 (s, 3H) para el grupo MeO y 6.7 (d, 2H), 6,9 (d, 2H) para el sistema aromático en el enlazante HMPA.

5 Síntesis de Fmoc-Tyr-HMPA-PEG-OMe. Se disolvieron previamente 11 g de MeO-PEG-HMPA en 60 mL de DMF (45 L por mol de MeO-PEG-HMPA). Se disolvieron 2.0 g de Tyr protegido con Fmoc (Fmoc-Tyr), 0.5 g de HOBt, 0.55 g de DIC (todas las 2 moles por mol de MeO-PEG-HMPA) y 0.05 g de DIPEA (1 mol por mol de MeO-PEG-HMPA) preactivado durante 15 minutos en 50 mL de DMF (10 L por mol de MeO-PEG-HMPA) antes de ser mezclado con la solución de MeO-PEG-HMPA durante 2 horas. Tras la finalización de la reacción, se eliminaron los reactivos en exceso por diafiltración en volumen constante (10 x volumen inicial) con membrana cerámica Inopor. Se recogieron muestras de permeato para PEG-péptido pierde el control y para verificar la eliminación de impurezas. Se recolectaron pequeñas muestras de retenido y se precipitaron para el análisis de ^1H -RMN para estimar la conversión y para la aplicación de la prueba de Kaiser para confirmar la ausencia del grupo amino.

10 El ensamblaje en cadena con Fmoc-aminoácidos. Se preactivaron 1.3 g de Fmoc-Ala con 2.2 g de PyBOP, 0.6 g de HOBt (todas las 2 moles por mol de MeO-PEG-HMPA) y 0.026 g de DIPEA (1 mol por mol de MeO-PEG-HMPA) en 20 mL de DMF (10 L por mol de MeO-PEG-HMPA) durante 15 minutos. La solución preactivada se mezcló con la solución de MeO-PEGHMPA-Tyr-H en DMF a partir de los pasos anteriores. La solución resultante se mezcló vigorosamente durante 2 horas seguida de lavados con diafiltración (10 x volumen de partida) con la membrana cerámica Inopor. Se aplicó un proceso similar para la unión de aminoácidos adicionales.

Fmoc-desprotección. Se preparó solución de piperidina/DMF al 20% adicionando la cantidad requerida de piperidina al volumen de solución conocido. La desprotección se realizó durante 30 minutos. La purificación después de la desprotección se realizó por diafiltración (12 x volumen inicial) con la membrana cerámica Inopor.

20 Desprotección de la cadena lateral y reacción de escisión. La solución que contenía 5.5 g de bloque de construcción PEG-péptido se retiró de la célula de filtración, el producto se precipitó con éter dietílico y se secó a vacío. El precipitado se volvió a disolver en 20 mL por mmol de solución de acidólisis durante 3 horas. Se utilizó éter dietílico para precipitar el péptido diana junto con MeO-PEG-HMPA.

Pureza del péptido

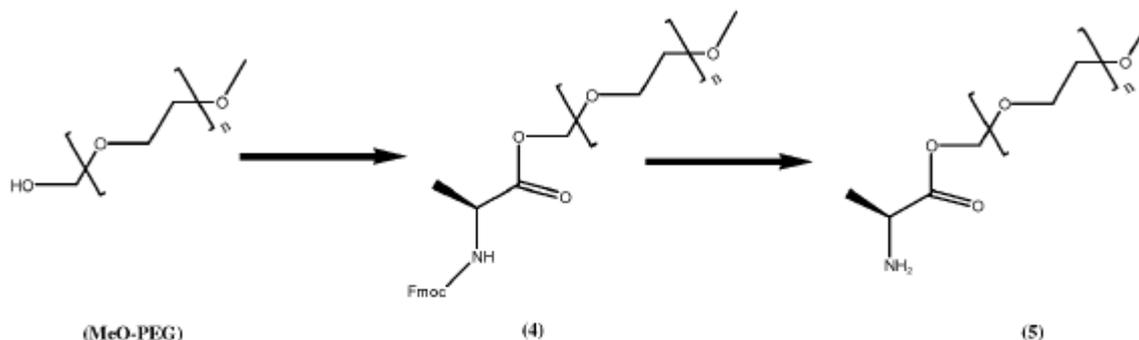
25 En este ejemplo, se produjeron 2 mmol de péptido, Tyr-Ala-Tyr-Ala-Tyr que produjo más de 1 g de producto. El resultado de HPLC mostrado en la Figura 6 indica que la pureza de Tyr-Ala-Tyr-Ala-Tyr es excelente (~100%) junto con el espectro de masas MALDI-TOF mostrado en la Figura 7 confirmando el peso molecular del producto.

Ejemplo 3

30 En este ejemplo, se preparó el pentapéptido timopentina (H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH) con ambos el proceso síntesis de péptidos mejorada con membrana (MEPS) y para la comparación utilizando el proceso de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS).

Síntesis de amino poli(etilenglicol) metilado (MeO-PEG-NH_2)

El amino poli(etilenglicol) metilado sintetizado para este ejemplo se basó en el procedimiento mostrado en el esquema 2.



Esquema 2: Síntesis de PEG amino metilado

35 Fijación de Fmoc-Ala sobre MeO-PEG (4). Se disolvieron 10 g de MeO-PEG en 20 mL de DCM (10 mL por mmol de MeO-PEG), mientras que se disolvieron 1.2 g de 0.54 g de Fmoc-Ala y HOBt (ambas 2 moles por mol de MeO-PEG) en

8 mL de DMF (4 mL por mmol de MeO-PEG) antes de mezclar las dos soluciones juntas. Después se adicionaron 0.25 g de DIC (2 moles por mol de MeO-PEG) y se mezclaron vigorosamente durante 2 horas a 4°C. Las impurezas sólidas se filtraron y el producto se precipitó con éter dietílico y se secó. La etapa de acoplamiento se repitió 3 veces para obtener una conversión >80%. El producto MeO-PEG-Ala-Fmoc se recristalizó primero en DMF adicionando éter dietílico seguido de recristalización con etanol. La conversión se determinó con H¹-RMN como una relación entre los picos a 3.4 (s, 3H) para el grupo MeO- y 1.4 (d, 1H) para grupo Me- de alanina.

Desprotección del grupo Fmoc (5). Se utilizó solución estándar de piperidina/DMF al 20% v/v para eliminar el grupo protector Fmoc de (4). Después de la desprotección, el producto se precipitó y se lavó con éter dietílico, se recristalizó con etanol y se secó a vacío. Se utilizó H¹-RMN para verificar la desaparición del grupo Fmoc a 7.2 (t, 2H), 7.3 (t, 2H), 7.5 (d, 2H) y 7.7 (d, 2H). La prueba de Kaiser se utilizó para confirmar la presencia del grupo funcional amino.

Síntesis de péptidos

Síntesis de MeO-PEG-HMPA. Se disolvieron 10 g de MeO-PEG-NH₂ (5) en 50 mL de DCM. Se preactivaron 0.72 g de HMPA, 2.1 g de PyBOP (ambas 2 moles por mol de MeO-PEG-NH₂) y 0.026 g de DIPEA (1 mol por mol de MeO-PEG-NH₂) en 50 mL de DMF durante 15 minutos antes de ser adicionados a la solución de PEG. El producto se precipitó con éter dietílico a 4°C, durante 2 horas y se separó por centrifugación, seguido de lavados con éter. El producto en bruto se purificó por recristalización con etanol. El producto de MeO-PEG-HMPA se secó al vacío y se analizó por análisis de H¹-RMN. La conversión se estimó basándose en la relación entre los picos a 3.4 (s, 3H) para grupo MeO y 6.7 (d, 2H), 6.9 (d, 2H) para el sistema aromático en el enlazante HMPA.

Síntesis de Fmoc-Tyr(^tBu)-HMPA-PEG-OMe. Se disolvieron previamente 10 g de MeO-PEG-HMPA en 60 mL de DMF (45 L por mol de MeO-PEG-HMPA). 1.8 g de Tyr protegido con Fmoc (Fmoc-Tyr(^tBu)), 0.54 g de HOBt, 0.50 g de DIC (todas las 2 moles por mol de MeO-PEG-HMPA) y 0.026 g de DIPEA (1 mol por mol de MeO-PEG-HMPA) se preactivaron durante 15 minutos en DMF (10 L por mol de MeO-PEG-HMPA) antes de mezclar con solución de MeO-PEG-HMPA durante 2 horas. Tras la finalización de la reacción, se eliminaron los reactivos en exceso por diafiltración en volumen constante (10 x volumen de partida) con la membrana cerámica Inopor. Se recogieron muestras de permeato para controlar las pérdidas de PEG-péptido y para verificar la eliminación de impurezas. Se recolectaron pequeñas muestras de retenido y se precipitaron para el análisis de H¹-RMN para estimar la conversión y para las pruebas de Kaiser para confirmar la ausencia del grupo amino.

Ensamblaje en cadena con Fmoc-aminoácidos. Se preactivaron 1.4 g de Fmoc-Val con 2.2 g de PyBOP, 0.6 g de HOBt (todas las 2 moles por mol de MeO-PEG-HMPA) y 0.026 g de DIPEA (1 mol por mol de MeO-PEG-HMPA) en DMF (10 L por mol de MeO-PEG-HMPA) durante 15 minutos. Se preparó una solución separada de MeO-PEG-HMPA-Tyr-H en DMF y se mezcló con la solución preactivada. La solución resultante se mezcló vigorosamente durante 1 hora seguida de lavados con diafiltración (10 x volumen de partida) con la membrana cerámica Inopor. Se aplicó un procedimiento similar para las uniones de aminoácidos Fmoc-Arg(Boc)₂, Fmoc-Lys(Boc) y Fmoc-Asp(O^tBu) restantes.

Fmoc-desprotección. Se preparó una solución de piperidina/DMF al 20% adicionando la cantidad requerida de piperidina pura al volumen de solución conocido. La desprotección se realizó durante 30 minutos. La purificación después de la desprotección se realizó por diafiltración (12 x volumen inicial) con la membrana cerámica Inopor.

Desprotección de la cadena lateral y reacción de escisión. La solución que contenía 8.5 g de bloque de construcción PEG-péptido se retiró de la célula de filtración, el producto se precipitó con éter dietílico y se secó al vacío. A continuación, el precipitado se volvió a disolver en 20 mL por mmol de solución de acidólisis durante 3 horas. Se utilizó éter dietílico para precipitar el péptido diana junto con MeO-PEG-HMPA.

Pureza del péptido

En este ejemplo, se produjo un lote de 1.2 mmol de TP-5 que produjo más de 1 g de producto (un rendimiento global del 94%). La pureza de TP-5 producida por ambos MEPS y SPPS se ilustra en la figura 8. La pureza del producto MEPS se estimó en ~94%, y el análisis MALDI-TOF mostrado en la figura 9 confirmó el peso molecular del producto de MH+ 650. Se identificaron las dos impurezas (a 10.0 minutos y 10.4 minutos) como péptidos resultantes de la deleción de Asp, MH+ 564 y Lys, MH+ 550. El TP-5 producido por el método SPPS en las mismas condiciones de 2 equivalentes de reactivos por 1 péptido equivalente y ciclo de reacción única, fue sólo un 77% puro. Este resultado demuestra la ventaja de una reacción homogénea en términos de un exceso menor de reactivos requerido. La principal impureza en SPPS se identificó como la deleción de Arg, MH+ 524

Ejemplo 4

Se sintetizó un dímero de oligonucleótido PEGilado como un ejemplo de síntesis de oligonucleótidos mejorada con membrana con una membrana cerámica. En este ejemplo se utilizó una membrana recubierta de óxido de zirconio

Inopor con un tamaño de poro de 3 nm y una modificación superficial hidrófoba (Inopor GmbH, Alemania), utilizando un aparato como el ilustrado en la Figura 3.

Síntesis de 5'-O-Dmt-dA^{Bz}-3'-succ-MeO-PEG

El rechazo de reactivos relevantes se determinó y se muestra en la Tabla 2.

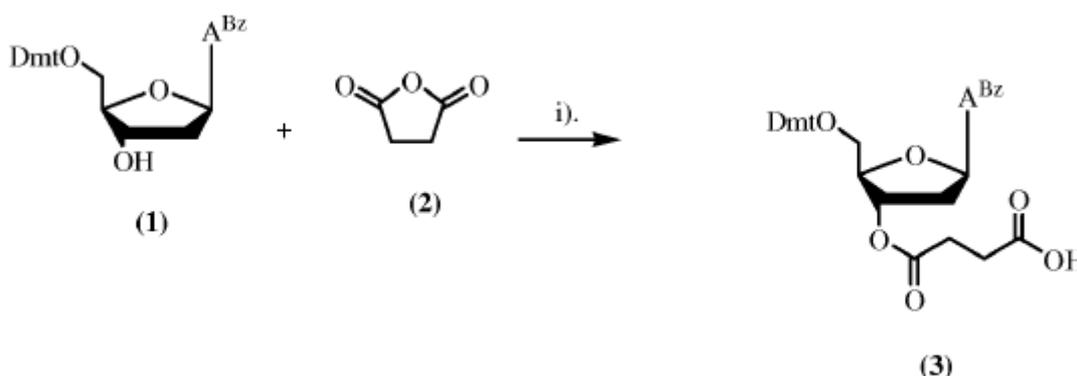
- 5 Tabla 2: Datos de rechazo para PEGs y monómeros protegidos utilizados en la síntesis de oligonucleótidos obtenidos con membrana cerámica Inopor ZrO₂/Al₂O₃. Los experimentos se realizaron en un modo discontinuo (o modo de diafiltración cuando se observó), y el rechazo se determinó de acuerdo con la Ec. 1.

Compuesto	MW [g.mol ⁻¹]		Rechazo de Membrana Inopor ZrO ₂ /Al ₂ O ₃ [%]	Error ^(a) [%]	Flujo [Lm ⁻² h ⁻¹]
5'-O-Dmt-dA ^{Bz} -3'-succinato	757	Monómero	55	7	170
MeO-PEG	5000	Anclaje	95	9	110
5'-O-Dmt-dA ^{Bz} -3'-succ-MeO-PEG ^(b)	5739	Monómero PEGilado	96	--	45

(a) Error estimado a partir del balance de masas entre pienso, permeado y retenido

(b) Modo de diafiltración

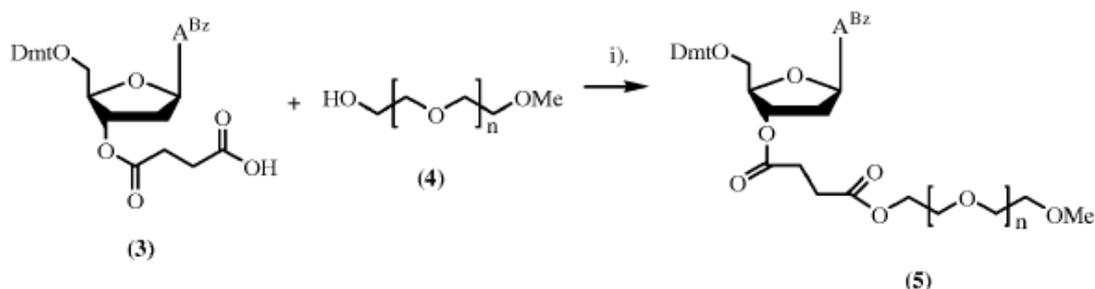
- 10 Síntesis de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-(N⁶-benzoil)deoxiadenosina-3'-succinato (5'-O-Dmt-dA^{Bz}-3'-succinato) (3). Se coevaporaron 5 g de 5'-O-Dmt-dA^{Bz}-3'-OH (1, 7.6 mmol) con MeCN (2 x 10 mL) y se disolvieron en 85 mL de DCM seco. Se adicionaron 4.2 mL de TEA (11.4 mmol) y 478 mg de DMAP (3.9 mmoles) a la solución, se agitó en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Después se adicionaron lentamente 11.4 g de anhídrido succínico (2, 11,4 mmol). La reacción se monitorizó utilizando TLC (CHCl₃:MeOH, 9:1, v/v + TEA al 0.5%) y se dejó reaccionar hasta que el nucleósido de partida se consumió por completo. A continuación, la reacción se interrumpió con un exceso de agua, se agitó durante 5 a 10 min. Después, la solución de reacción se lavó con 3 x 150 mL de agua. La fase acuosa se recogió luego y se extrajo con 450 mL de DCM (+ 0.5% v/v de TEA). La fase orgánica se recogió, se secó sobre MgSO₄ anhidro y se evaporó a sequedad para proporcionar una espuma blanca con rendimientos elevados (90%), y la integridad del producto se analizó por ¹H-RMN. El procedimiento se ilustra en el Esquema 3.
- 15



Esquema 3 - Síntesis de 5'-O-Dmt-dA^{Bz}-3'-succinato: i). TEA, DMAP, DCM.

- 20 Síntesis de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-(N⁶-benzoil)deoxiadenosina-3'-succ-MeO-PEG (5'-O-Dmt-dA^{Bz}-3'-succ-MeO-PEG) (5). (Esquema 4). Se coevaporaron 10 g de monometil-éter de polietilenglicol (4, MeO-PEG, MW~5,000 g mol⁻¹ (2 mmol) y 4.5 g de 5'-O-Dmt-dA^{Bz}-3'-succinato (3, 6 mmol) con MeCN seco (2 x 10 mL) y se disolvieron en 67 mL de DCM seco + piridina seca al 0.5% (v/v) Se adicionaron 320 µL de NMI (4 mmol) y 530 µL de DIC (3.4 mmoles) a la solución bajo agitación, y se dejó reaccionar bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación, la

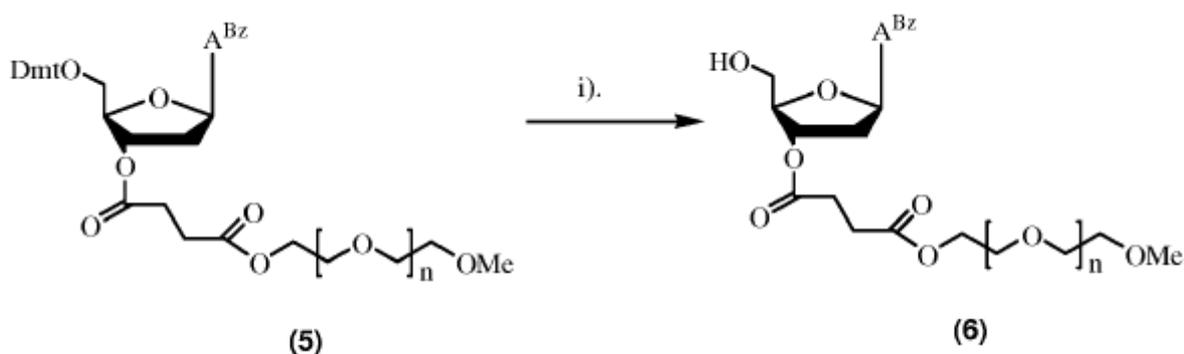
5 solución de reacción se filtró se evaporó a sequedad y se recogió en 100 mL de DCM + 1% v/v de TEA para cargar en el aparato de separación por membrana. La mezcla de reacción se purificó utilizando 20 volúmenes de diafiltración de solvente (DCM). El proceso se monitorizó con cromatografía de permeación de gel (GPC) y TLC (EtOAc:acetona:agua, 5:10:1, v/v) y se detuvo cuando no se observó ninguna especie de bajo peso molecular y especie de R_f alta, respectivamente, cuando se detectó en el retenido. La integridad del producto y la conversión de la reacción fueron analizadas por ¹H-RMN (71%, Figura 10).



Esquema 4 - Síntesis de 5'-O-Dmt-dA^{Bz}-3'-succ-MeO-PEG: i). NMI, DIC, DCM + 0.5% de piridina

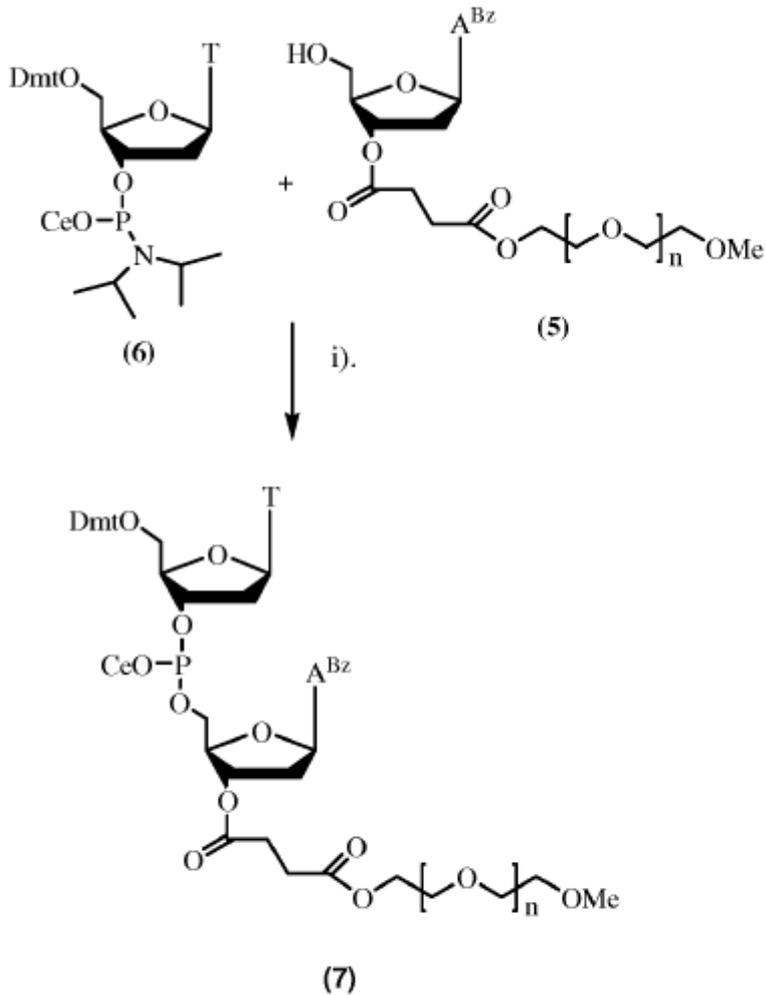
10 Acetilación de 5'-O-Dmt-dA^{Bz}-3'-succ-MeO-PEG (Caperuza). Se disolvieron 5 g de 5'-O-Dmt-dA^{Bz}-3'-succ-MeO-PEG en 25 mL de DCM seco en un matraz redondo. La solución se agitó y se enfrió con hielo, y se adicionaron 2,6-lutidina (2.5 mL), NMI (2.5 mL) y anhídrido acético (2.5 mL). La reacción se dejó reaccionar en atmósfera de nitrógeno durante 30 minutos, después de lo cual se diluyó hasta 100 mL de DCM + 1% v/v de TEA y se purificó mediante diafiltración en membrana utilizando 5 volúmenes de solvente (DCM).

15 Detritilación de 5'-O-Dmt-dA^{Bz}-3'-succ-MeO-PEG. Se coevaporaron 3.7 g de 5'-O-Dmt-dA^{Bz}-3'-succ-MeO-PEG (5) con 2 x 10 mL de MeCN seco y se disolvieron en 19 mL de DCM seco, disueltos en 25 mL de DCM seco en un matraz redondo. Se adicionaron 900 μL de pirrol (13 mmol) y 570 μL de DCA (3% v/v) a la solución agitada y se dejó reaccionar a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. La reacción se siguió por TLC y, al finalizar, se inactivó mediante la adición de un exceso de TEA, se diluyó para formar 100 mL de DCM + 1% v/v de TEA y se purificó utilizando diafiltración en membrana y 10 volúmenes de solvente (DCM), como en las etapas anteriores. La finalización de la detritilación se evaluó por ¹H-RMN.



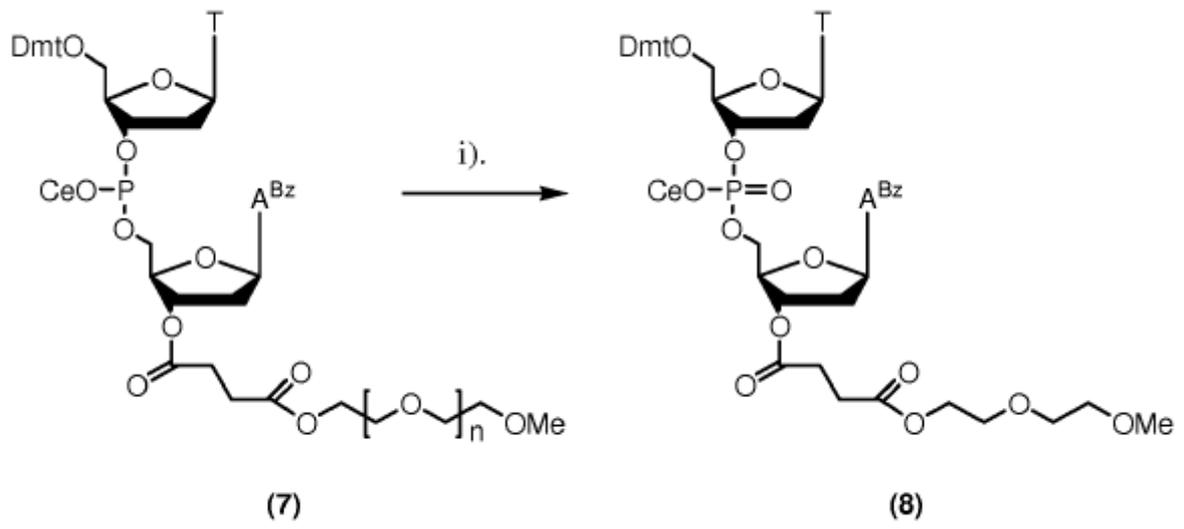
Esquema 5 - Síntesis de 5'-OH-dA^{Bz}-3'-succ-MeO-PEG: i). DCA, pirrol, DCM.

20 Síntesis de 5'-O-Dmt-dT-fosfito-dA^{Bz}-3'-succ-MeO-PEG (7) (Esquema 5). 2.5 g de 5'-OH-dA^{Bz}-3'-succ-MeOPEG (5, 0.46 mmol) y 611 mg de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-timina-3'-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilamino) fosforamidita (6, 5'-O-Dmt-dT amidita, 0.8 mmol) se coevaporaron con 2 x 10 mL de MeCN seco y se disolvieron en 30 mL de MeCN seco. Se adicionaron 65 μL de NMI (0.8 mmol) y 155 mg de PyTFA (0.8 mmol) a la solución agitada y se dejó reaccionar a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. La reacción se siguió por TLC y, al finalizar, se inactivó mediante la adición de un exceso de TEA, se evaporó y el producto en bruto se analizó mediante ¹H-RMN y ³¹P (Figura 11).



Esquema 5 - Síntesis de 5'-O - Dmt-dT-fosfina-dA^{Bz}-3'succ-MeO-PEG: i). NMI, PyTFA, MeCN.

5 Oxidación de 5'-O-Dmt-dT-fosfito-dA^{Bz}-3'succ-MeO-PEG. 5'-O-Dmt-dT-fosfito-dA^{Bz}-3'succ-MeO-PEG (7) se coevaporó con MeCN (2 x 5 mL) y se disolvió en una solución de TBH1 1.1 M en DCM, y se dejó reaccionar a temperatura ambiente y atmósfera de nitrógeno durante 15 min. La solución se evaporó, se recogió en 100 mL de DCM y se purificó en la membrana utilizando 20 volúmenes de solvente (DCM), como en los pasos anteriores, para proporcionar 1.2 g de dímero PEGilado (8).



Esquema 6 - Síntesis de 5'-O-Dmt-dT^{Bz}A-3'-succ-MeO-PEG: i). TBHP, DCM.

Reivindicaciones

1. Un proceso para la preparación de un primer compuesto seleccionado entre oligonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos; comprendiendo el proceso:
 - (i) sintetizar el primer compuesto mediante síntesis en fase líquida en un solvente orgánico; y
 - 5 (ii) separar el primer compuesto formado en la etapa (i) de un segundo compuesto, que es un subproducto de reacción de la síntesis del primer compuesto y/o un exceso de un reactivo utilizado para la síntesis de un primer compuesto, en donde:

la síntesis del primer compuesto en la etapa (i) implica una o más reacciones de acoplamiento o desprotección;

10 el primer y segundo compuestos se disuelven en un solvente orgánico y se separan mediante un proceso de diafiltración utilizando una membrana que es estable en el solvente orgánico y que proporciona un rechazo para el primer compuesto que es mayor que el rechazo para el segundo compuesto;

el primer compuesto se modifica sometándolo a una o más reacciones de acoplamiento y/o desprotección posteriores a la separación.
2. Un proceso para la preparación de un primer compuesto que es un péptido; comprendiendo el proceso:
 - 15 (i) sintetizar el primer compuesto mediante síntesis en fase líquida en un solvente orgánico; y
 - (ii) separar el primer compuesto formado en la etapa (i) de un segundo compuesto, que es un subproducto de reacción de la síntesis del primer compuesto y/o un exceso de un reactivo utilizado para la síntesis de un primer compuesto, en donde:

la síntesis del primer compuesto en la etapa (i) implica una reacción de acoplamiento;

20 el primer y segundo compuestos se disuelven en un solvente orgánico y se separan mediante un proceso de diafiltración utilizando una membrana que es estable en el solvente orgánico y que proporciona un rechazo para el primer compuesto que es mayor que el rechazo para el segundo compuesto;

el primer compuesto se modifica sometándolo a una o más reacciones de acoplamiento y/o desprotección posteriores a la separación.
- 25 3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el solvente orgánico es el mismo que el utilizado para la diafiltración.
4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, que comprende además purificar el primer compuesto modificado utilizando un proceso de diafiltración como se define en la etapa (ii) de la reivindicación 1.
- 30 5. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la membrana es una membrana polimérica.
6. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la membrana es una membrana cerámica.
7. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la membrana es una membrana de matriz mixta orgánica/inorgánica.
- 35 8. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el primer compuesto está unido a un soporte.
9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el soporte es un soporte polimérico.
10. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el soporte comprende un dendrímero o polímero hiperramificado.
- 40 11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el soporte es una nanopartícula orgánica o inorgánica.

12. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el primer compuesto tiene un peso molecular superior a 500 dalton.

5 13. Uso de una membrana estable en un solvente orgánico en un proceso para la preparación de un primer compuesto seleccionado entre oligonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos de acuerdo con la reivindicación 1; en donde el primer y segundo compuestos se disuelven en un solvente orgánico y se separan mediante un proceso de diafiltración utilizando una membrana que es estable en el solvente orgánico y que proporciona un rechazo para el primer compuesto que es mayor que el rechazo para el segundo compuesto.

10 14. Uso de una membrana estable en un solvente orgánico en un proceso para la preparación de un primer compuesto como se reivindica en la reivindicación 2; en donde el primer y segundo compuestos se disuelven en un solvente orgánico y se separan mediante un proceso de diafiltración utilizando una membrana que es estable en el solvente orgánico y que proporciona un rechazo para el primer compuesto que es mayor que el rechazo para el segundo compuesto.

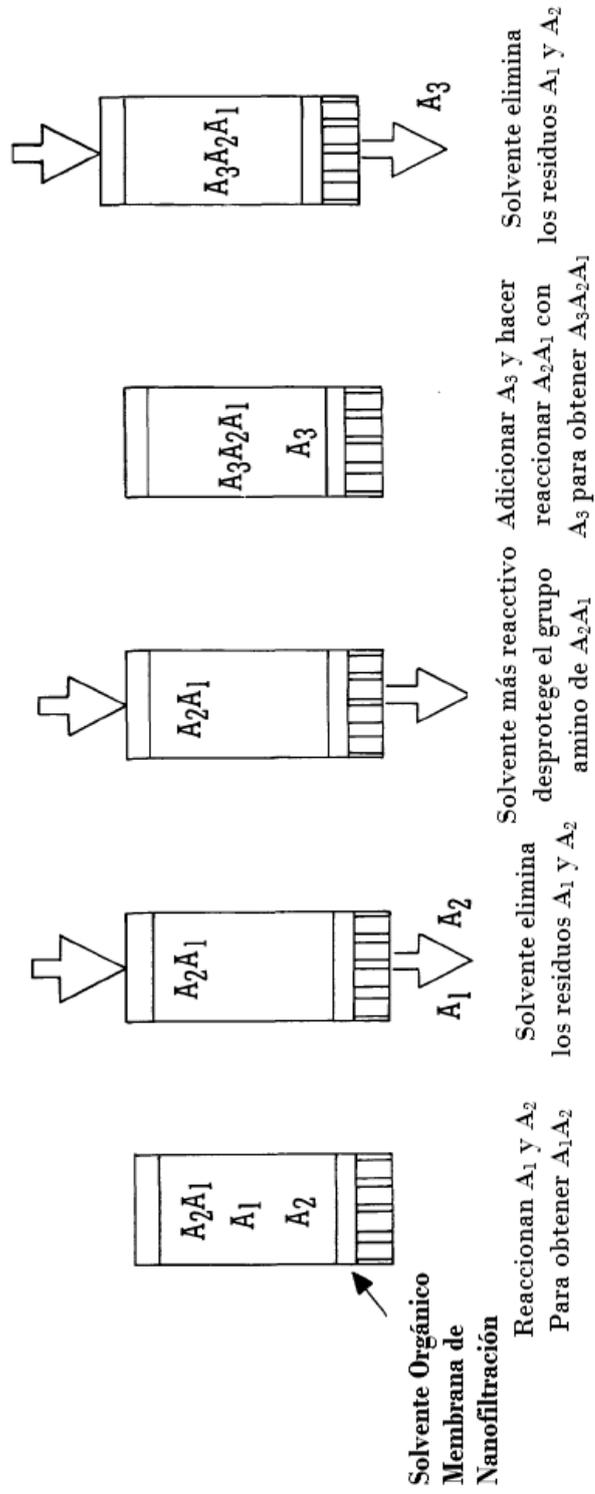


FIG. 1

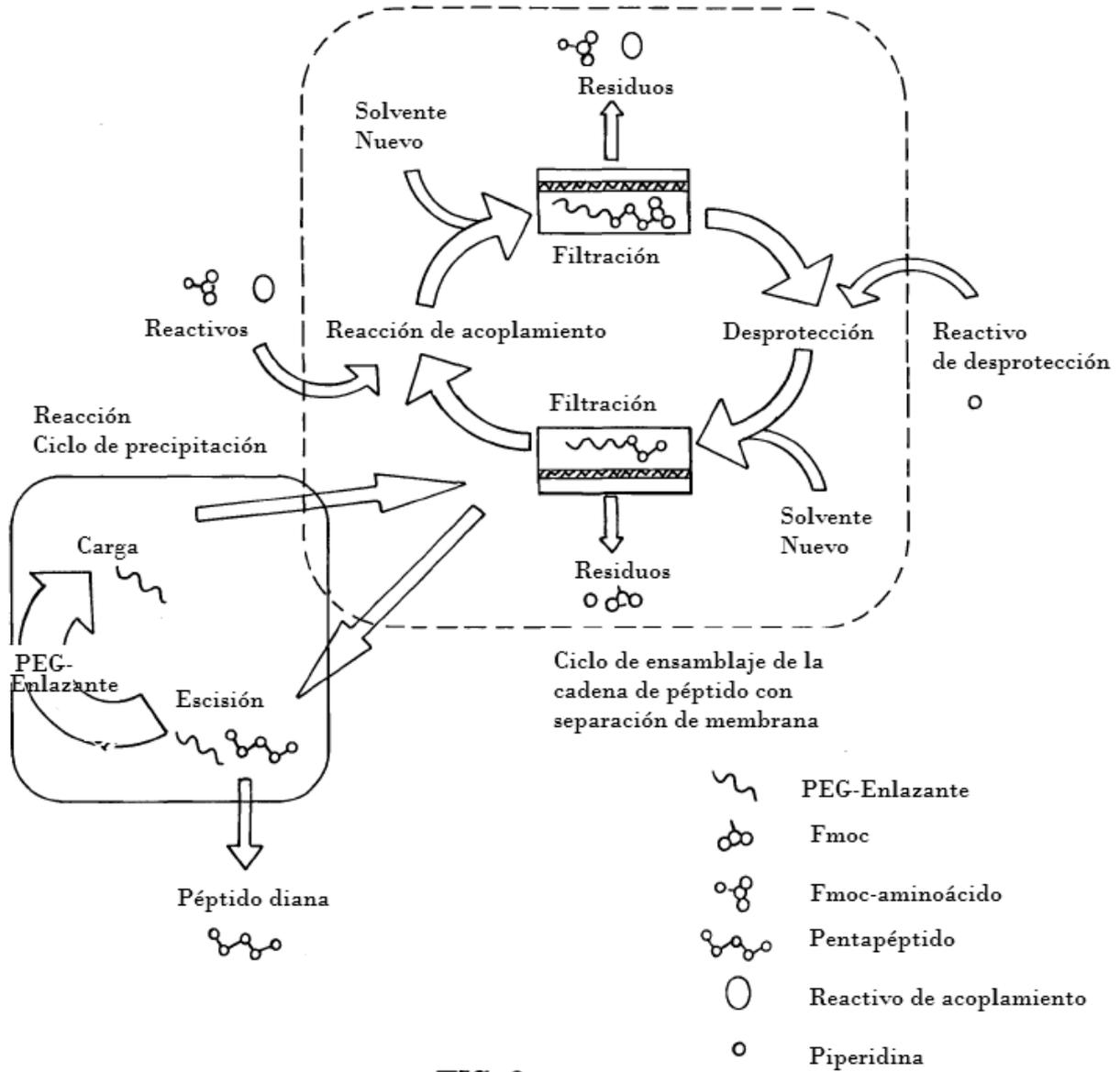


FIG. 2

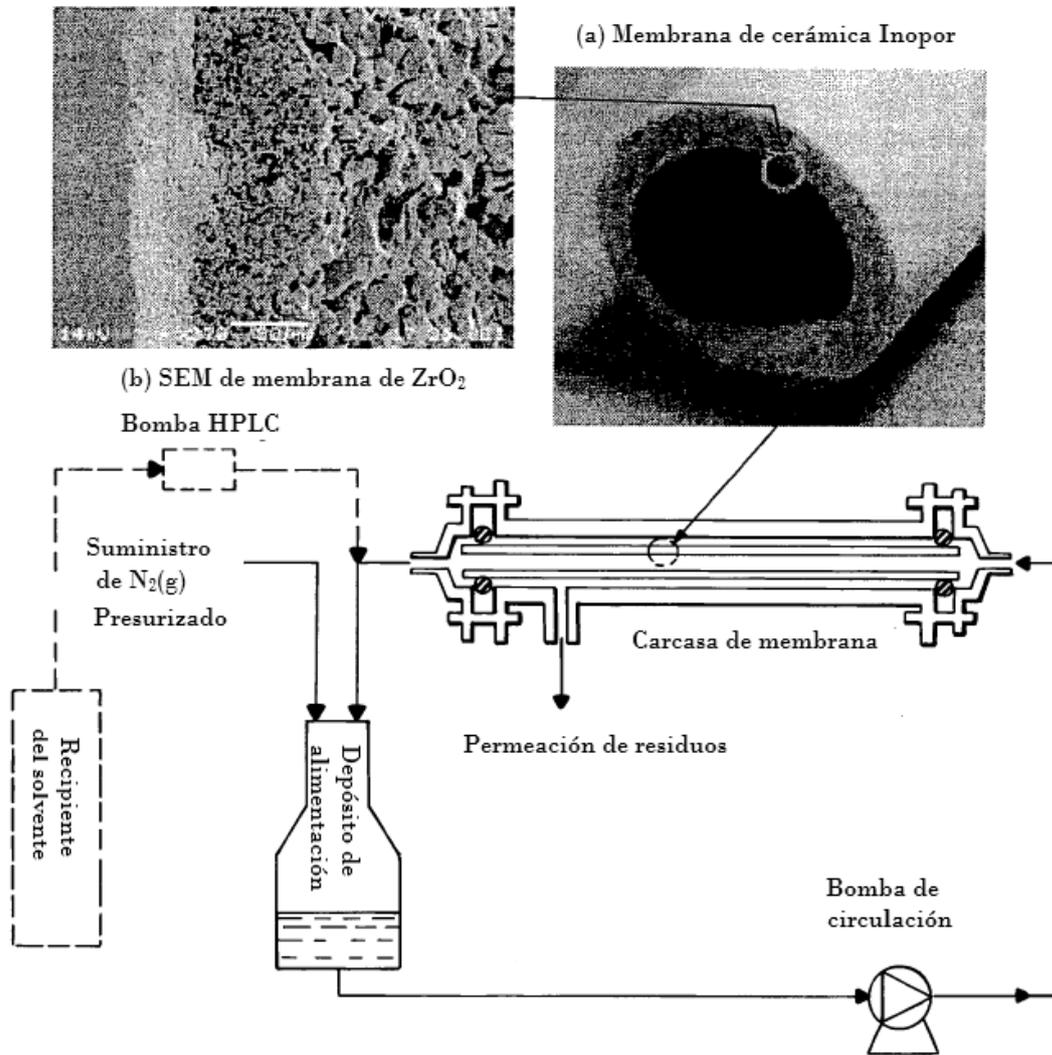
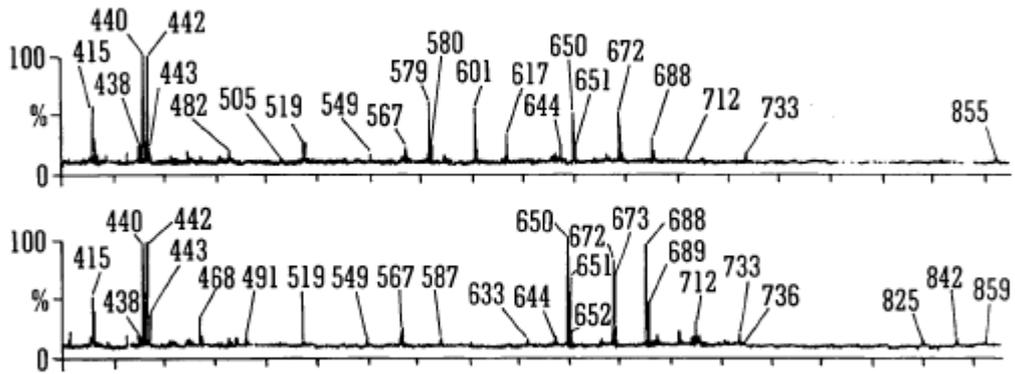
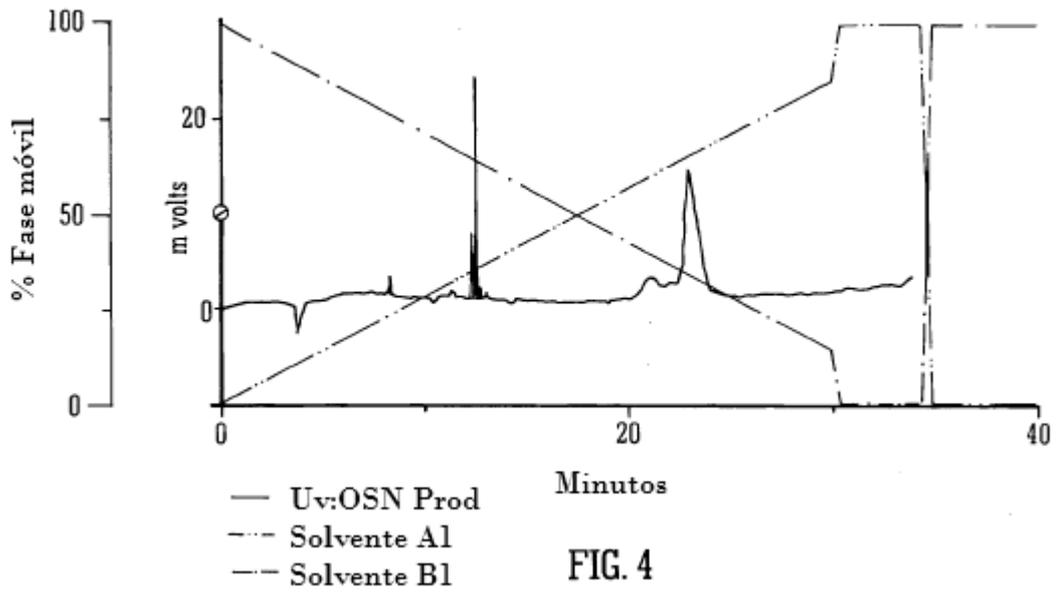


FIG. 3



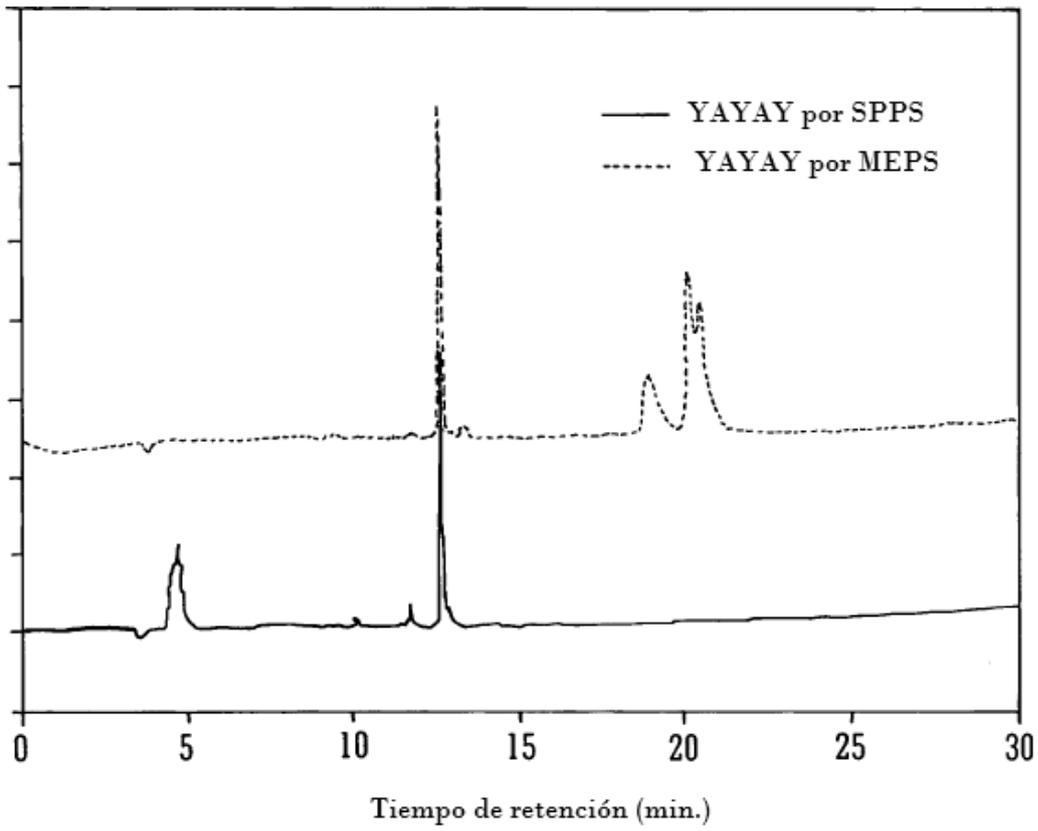


FIG. 6

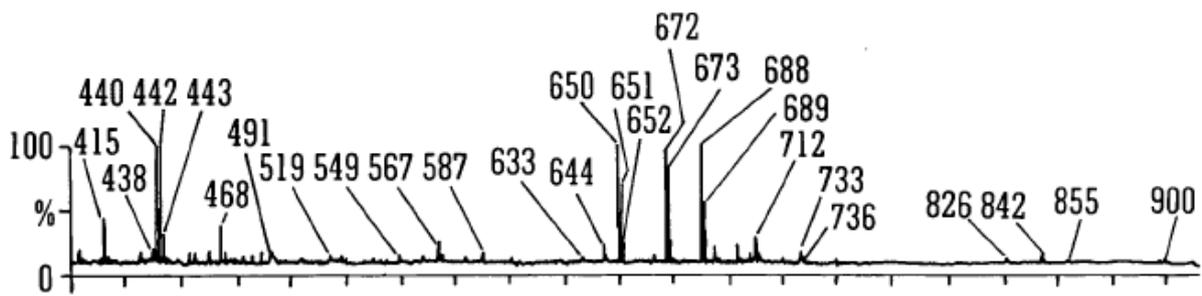
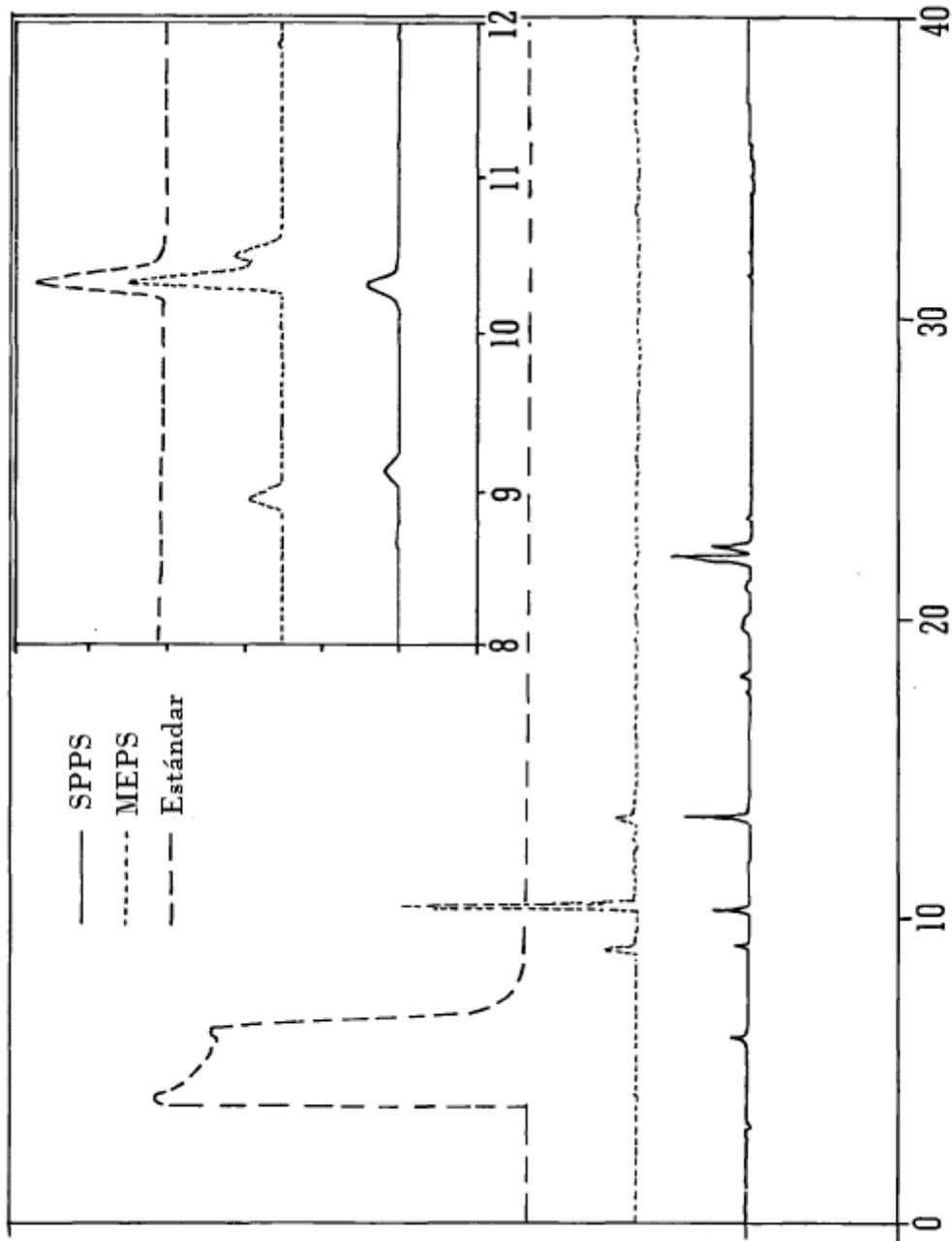


FIG. 7



Tiempo de retención (min.)

FIG. 8

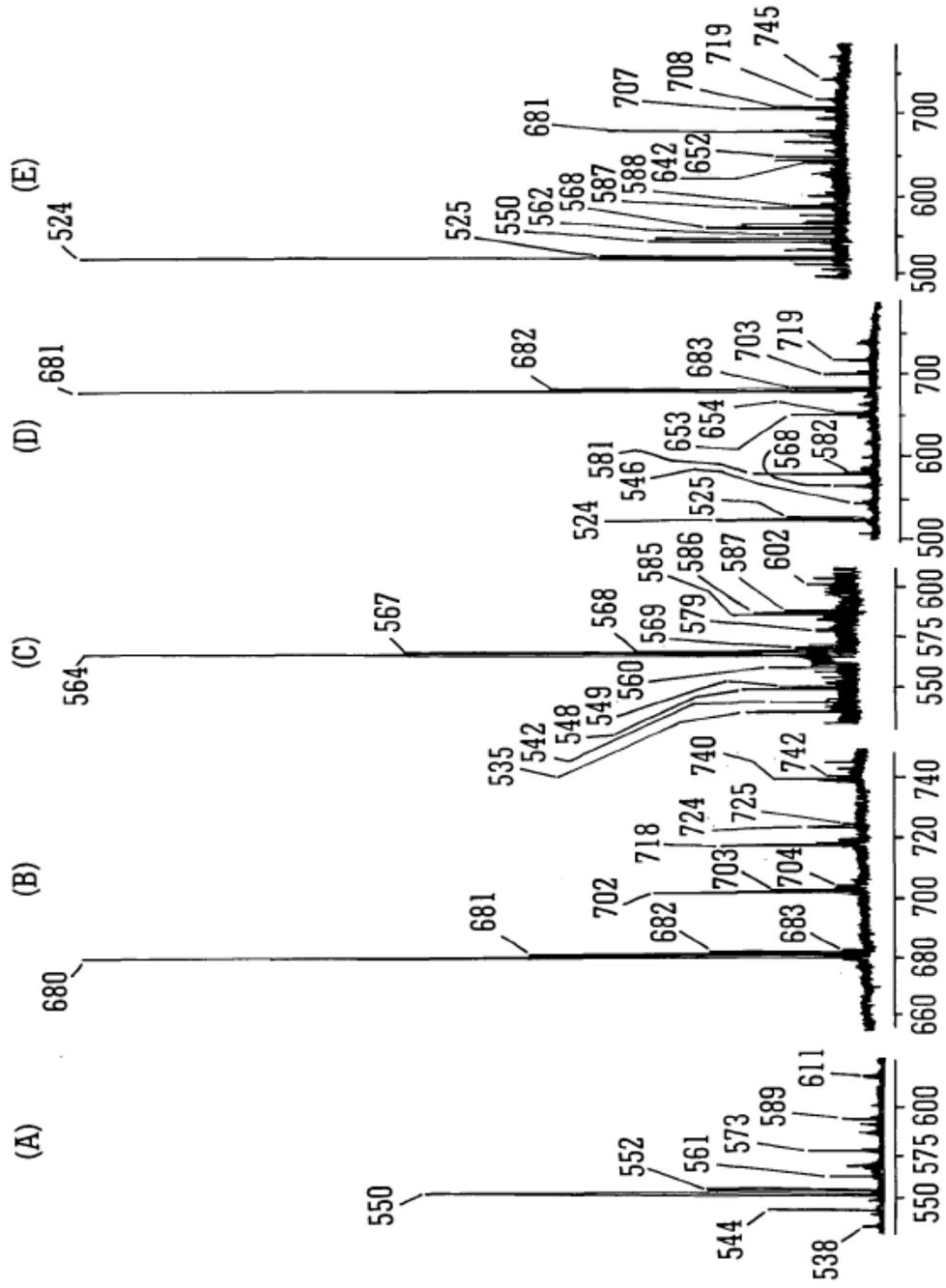


FIG. 9

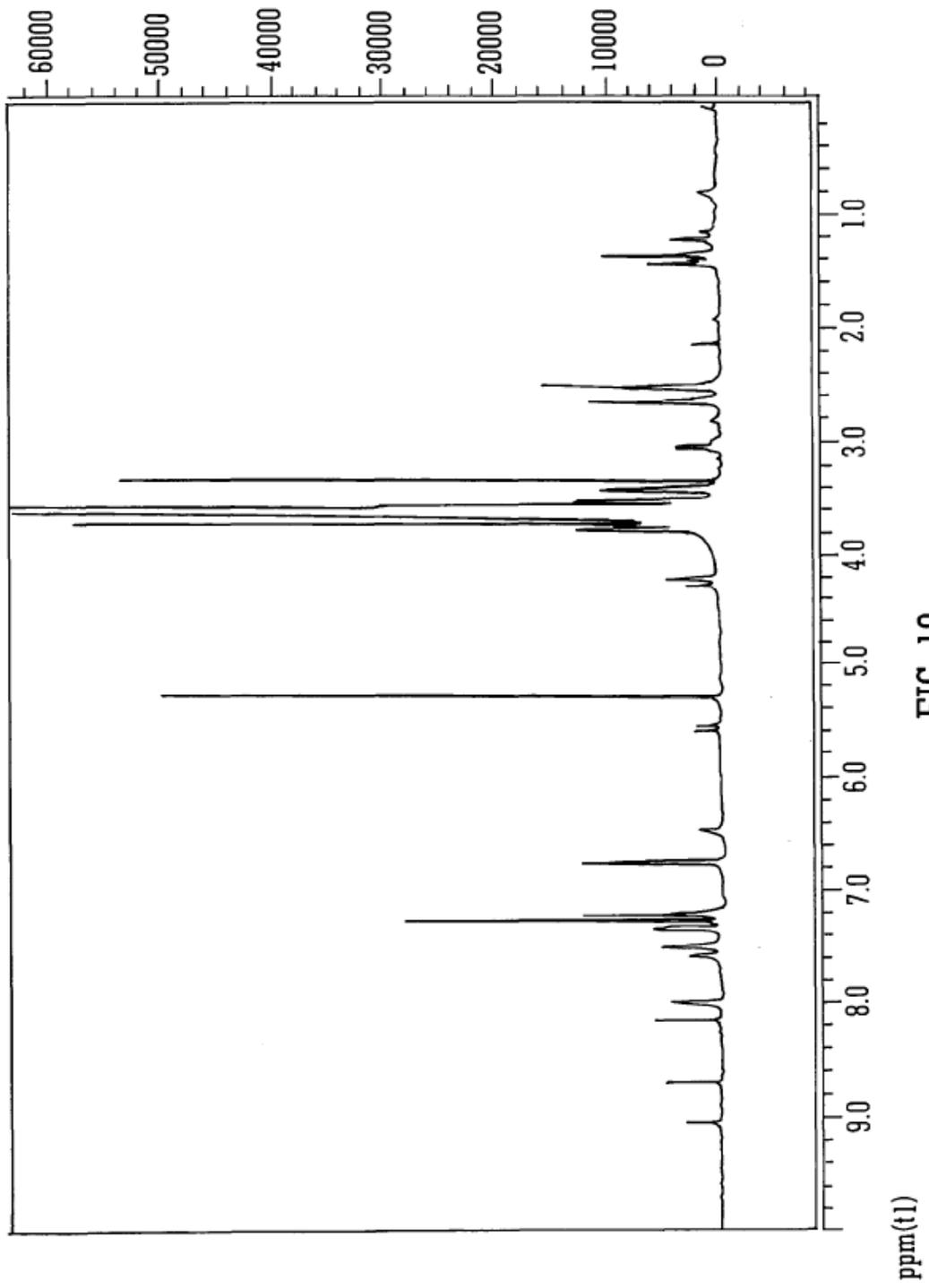


FIG. 10

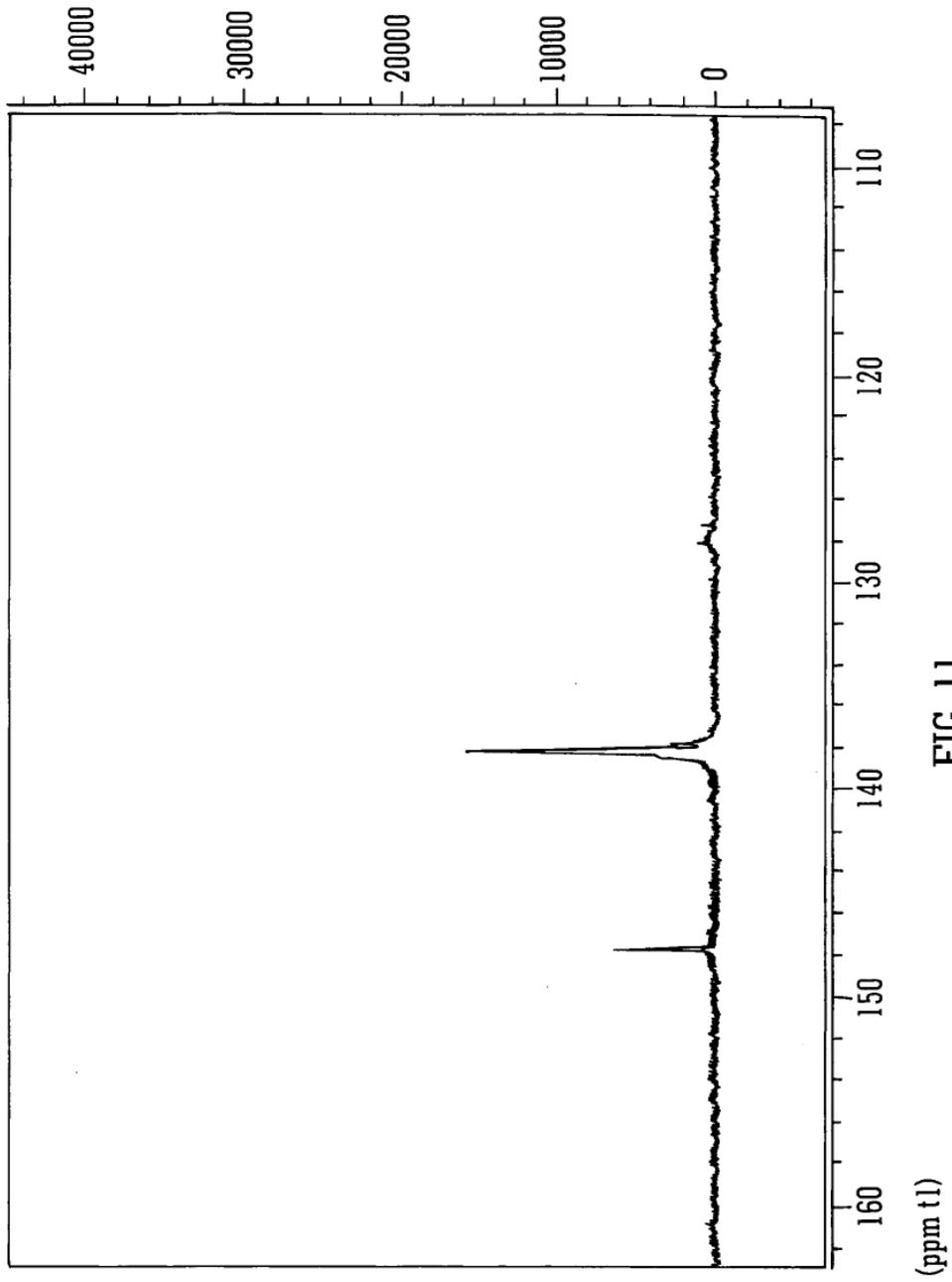


FIG. 11
(ppm t1)