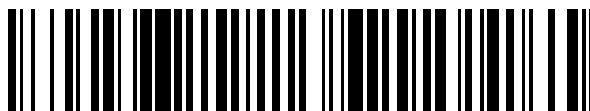


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 786**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/04** (2006.01)

**C07K 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2012 PCT/EP2012/070454**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13057084**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2012 E 12772951 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2768842**

54 Título: **Procedimiento de síntesis de proteínas**

30 Prioridad:

**17.10.2011 FR 1159348**

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

**05.03.2019**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (100.0%)  
3 rue Michel-Ange  
75794 Paris Cedex 16, FR**

72 Inventor/es:

**MELNYK, OLEG;  
RAIBAUT, LAURENT;  
AUCAGNE, VINCENT y  
DELMAS, AGNÈS**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

**ES 2 702 786 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

Procedimiento de síntesis de proteínas.

5 **ÁMBITO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de ensamblaje de proteínas a partir de fragmentos peptídicos. Permite la producción de proteínas de forma sencilla, fiable, automatizable y aplicable a escala industrial. Este procedimiento permite la producción de proteínas de interés terapéutico o diagnóstico. La invención también tiene por objeto kits y dispositivos automatizados que permiten poner en marcha este procedimiento de síntesis así como kits de ensayo y/o de diagnóstico.

**ANTECEDENTES TECNOLÓGICOS**

15 [0002] La síntesis de polipéptidos por métodos convencionales en fase sólida, aminoácido a aminoácido, está limitada a causa de rendimientos bajos cuando los polipéptidos sintetizados son de gran tamaño. Para superar esta limitación, se conoce el ensamblaje de dos polipéptidos por ligación química para producir un polipéptido más largo.

20 [0003] La síntesis total de polipéptidos es cada vez más útil para la preparación de proteínas de estructuras bien definidas o que porten modificaciones naturales, como las modificaciones postraduccionales o no naturales. Los métodos de ligación química aportan una respuesta a esta necesidad, sin embargo resultan estar limitados en su empleo y en su aplicación industrial.

25 [0004] De forma general, en estos métodos se desea que el vínculo entre los polipéptidos ensamblados por ligación sea nativo, es decir, que corresponda a la estructura natural de los polipéptidos.

[0005] El principal método de ligación nativa que existe a día de hoy es el de Kent y Dawson, descrito por ejemplo en las solicitudes internacionales WO 96/34878 y WO 98/28434. Este método se basa en una reacción quimioselectiva entre un péptido tioéster (C terminal) y un cisteinil-péptido. Sin embargo, el principal inconveniente de este método es la fabricación de los péptidos tioésteres que necesita procedimientos químicos complejos. Estos métodos no pueden impedir la competición entre las reacciones de los diferentes tioésteres, que conducen inevitablemente a mezclas que pueden ser difícilmente separables, y que por tanto afectan a la pureza del producto final obtenido, y a pérdidas inevitables de rendimiento.

35 [0006] Un método alternativo es la denominada ligación de Staudinger, descrita en las solicitudes internacionales WO 01/68565 y WO 01/87920. Esta comprende la reacción de un fosfinitioéster con una azida y la hidrólisis de los reactivos combinados para formar una unión amida. Sin embargo este método es difícilmente aplicable a escala industrial.

40 [0007] Otro método, descrito en la solicitud internacional WO 2007/037812, reposa en la reacción de un  $\alpha$ -cetoácido con una N-alkoxiamina en una reacción de condensación descarboxilativa. Sin embargo, los cetoácidos son moléculas que son difíciles de fabricar y de incorporar a los péptidos. Además, este tercer método es difícilmente aplicable en los laboratorios de síntesis peptídica que no disponen de medios para realizar síntesis orgánicas complejas.

[0008] La publicación de O. Melnyk et coll., Org. Lett., 12(22), 5238-41 (2010) y la solicitud FR-2952058, así como la publicación de Hou, W., Zhang, X., Li, F. & Liu, C.F. Peptidyl N,N-Bis(2-mercaptoethyl)-amides as Thioester Precursors for Native Chemical Ligation. Org. Lett. 13, 386-389 (2011) describen la ligación nativa de péptidos mediante fragmentos péptido-bis(sulfaniletíl)amino. Sin embargo, este método no se ha utilizado nunca, a día de hoy, para la síntesis de péptidos por ensamblaje de tres fragmentos o más. La solicitud WO2011/058188 describe un artificio de purificación que consiste en la introducción al final de la síntesis peptídica en fase sólida de un brazo N-terminal que tiene un grupo funcional azida. Una reacción de Staudinger-Bertozzi o una cicloadición (CuAAC, SPAAC) permite injertar el péptido objetivo en una resina hidrofóbica previamente funcionalizada por una fosfina o un alquino. Finalmente el péptido es expulsado por corte del brazo en condiciones suaves (base, nucleófila o fotoirradiación) después de lavar la resina para deshacerse de los péptidos truncados que no hayan podido unirse de forma covalente con la resina. Sin embargo, no se plantea en absoluto en este documento utilizar los medios que permiten el injertado para realizar la síntesis de proteínas por ligación sucesiva de péptidos.

60 [0009] El artículo M.Villain et al., Chemistry and Biology 8 (2001) 673-679 describe un procedimiento de purificación que comprende una etapa de injertado en una resina, al final de la síntesis peptídica, del péptido que comprende una cisteína o una treonina en extremo N-terminal, por reacción del residuo N-terminal con un grupo funcional aldehído, de manera que forme un ciclo tiazolidina u oxazolidina. El péptido injertado se lava entonces y después se desacopla de la resina. Sin embargo, no se plantea en absoluto en este documento utilizar los medios que permiten el injertado para realizar la síntesis de proteínas por ligación sucesiva de péptidos.

- [0010]** Los documentos US7884182 y Synthesis of Peptide-PNA-Peptide Conjugates by Semi-Solid-Phase Chemical Ligation Combined with Deactivation/Capture of Excess Reactants, Martijn C. de Koning. Eur. J. Org. Chem. 2004, 850-857, describen la ligación de péptidos con ayuda de un soporte sólido. Los autores adhieren a este soporte un péptido H-Cys-A-SR (R = Alquilo) por formación de un enlace tiazolidina, y después efectúan una ligación nativa NCL entre la función tioéster soportada y un péptido H-Cys-B. Los péptidos H-Cys-A-SR son difíciles de sintetizar. Este método comprende un riesgo elevado de tener una reacción de polimerización o de ciclización durante la formación de la tiazolidina, porque los dos extremos son reactivos. Por último, este método no permite hacer más de una ligación en el soporte.
- 10 **[0011]** El documento FR 2 952 058 describe un procedimiento de ligación de péptidos en fase líquida, en el sentido C-terminal hacia N-terminal. Este procedimiento requiere:
- la utilización de un péptido SEA;
  - opcionalmente la utilización de un péptido SEAoff convertido a continuación en SEA.
- 15 **[0012]** El documento US 2002/0132975 describe un procedimiento de ensamblaje de péptidos por ligación nativa secuencial de fragmentos peptídicos en fase sólida. La síntesis puede hacerse desde el extremo N-terminal hacia C-terminal o en el sentido inverso. Se basa en:
- 20 - la utilización de péptidos que portan una cisteína N-terminal y un grupo COS- C-terminal;
  - la conversión en C-terminal del péptido soportado en la resina de la función - COS- en tioéster -COSR;
  - la utilización de la funcionalidad tioéster C-terminal del péptido soportado en la resina para realizar cada ligación en la cisteína terminal del fragmento peptídico siguiente. Sin embargo, los péptidos tioácidos (es decir, que portan la función COS-), tales como los descritos como productos de salida en la solicitud US 2002/0132975 son difíciles de preparar por síntesis, difíciles de purificar, y son inestables. Además, la etapa de activación de la función tioácida en tioéster es delicada en concreto cuando hay cisteínas libres en la secuencia peptídica, porque el riesgo está en alquilar también las cisteínas. Por último, el grupo tioácido, contrariamente al grupo SEAoff, es un grupo reactivo, no bloqueado. Esto se ilustra concretamente en la publicación Canne, L. E. et al., J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 8720-8727, en la que los autores constataron la formación significativa de un subproducto cíclico que proviene de la reactividad residual del grupo tioácido.
- 30 **[0013]** Respecto a los procedimientos de la técnica anterior, el procedimiento de la invención goza de la mayor eficacia en la conversión de la función SEAoff en tioéster, las condiciones de reacción son más suaves y no conducen a la formación de subproductos. Además, SEAoff es un sistema bloqueado en las condiciones de la unión, contrariamente a otros grupos reactivos, y en concreto al tioácido descrito en la solicitud US 2002/0132975. Por último, los segmentos SEAoff se sintetizan fácilmente en fase sólida por la estrategia Fmoc/terc-butyl, lo que no ocurre en el caso de los péptidos tioácidos.
- 35 **[0014]** La transposición a escala industrial de procedimientos que permitan aplicar las síntesis peptídicas por síntesis total es una necesidad que requiere encontrar procedimientos simples, poco costosos, que produzcan productos de calidad, de pureza elevada y razonable en materia de higiene industrial.
- 40 **[0015]** Por las razones antes mencionadas, ha pasado a ser indispensable encontrar un procedimiento de síntesis total, convergente e industrializable que permita sintetizar un encadenamiento peptídico de la longitud y de la naturaleza deseada. Particularmente, un procedimiento que se sirva de un ensamblaje de N-terminal hacia C-terminal, que ofrezca calidades de sencillez de realización y de pureza de los péptidos o polipéptidos obtenidos. De hecho, el ensamblaje de N-terminal hacia C-terminal ofrece una ventaja considerable, comparada con la estrategia inversa, mucho más clásica, de ensamblaje de C-terminal hacia N-terminal, porque en ese caso el procedimiento permite una «autopurificación» de los fragmentos peptídicos deshaciéndose de los péptidos N-truncados acetilados, contaminantes principales de la síntesis peptídica en fase sólida (SPPS).
- 50 **[0016]** La presente invención permite superar las dificultades relacionadas con las uniones múltiples en solución. Permite sintetizar proteínas de muy gran tamaño. Puede ser fácilmente automatizada y extrapolada a escala industrial.
- 55 **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**
- [0017]** Se ha visto, lo que constituye el objeto de la presente invención, que el ensamblaje de múltiples fragmentos peptídicos en un método de síntesis en fase sólida utilizaba métodos sencillos como la formación de péptidos tioésteres y la ligación nativa, que podía conducir a un procedimiento de síntesis total, convergente, automatizable, industrializable y que responde a los criterios de pureza exigidos.
- 60 **[0018]** Con este fin, la presente invención propone un ensamblaje de fragmentos peptídicos para fabricar un polipéptido que comporte n fragmentos peptídicos y al menos n-1 aminoácidos que porten un grupo funcional tiol, representado por la fórmula:
- 65



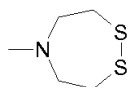
en la que  $A_1, A_2, A_3, \dots, A_i, \dots, A_n$  son fragmentos peptídicos  
 $C_1, C_2, C_3, \dots, C_{i-1}, \dots, C_{n-1}$  son restos de aminoácidos que portan un grupo funcional tiol,

- 5  $n$  está comprendido entre 3 y 50,  
 de preferencia entre 3 y 20,  
 o de manera aún preferida entre 3 y 10, e  
 $i$  es un número entero cualquiera comprendido entre 2 y  $n$ .

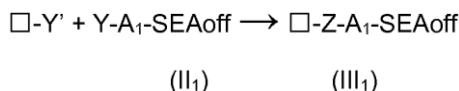
10 **[0019]** Este procedimiento implica

(a1) al menos una etapa de preparación de un fragmento  $Y-A_1-SEAoff$  (II<sub>1</sub>) en el que  $A_1$  representa un fragmento peptídico cuyo extremo C-terminal porta un grupo bis(2-sulfaniletíl)amino cíclico

- 15 denominado SEAoff; e  
 $Y$  es un fragmento capaz de reaccionar con un grupo funcional de un soporte sólido de manera que forma una unión entre  $A_1$  y un soporte sólido;

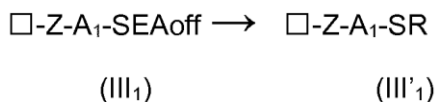


- 20 (b) al menos una etapa de reacción de  $Y-A_1-SEAoff$  (II<sub>1</sub>) con un soporte sólido indicado como  $\square-Y'$ ,  $\square$  representa el soporte sólido e  $Y'$  representa un grupo funcional reactivo capaz de reaccionar con  $Y$  para formar un grupo  $Z$  según el esquema:



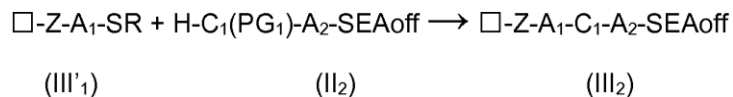
- 25 (a2) al menos una etapa de preparación de un fragmento  $H-C_1(PG_1)-A_2-SEAoff$  (II<sub>2</sub>) en la que  $C_1, A_2$  y  $SEAoff$  se definen como anteriormente y  $(PG_1)$  representa H o un grupo protector del tiol del aminoácido  $C_1$ ;

- (c1) al menos una etapa de preparación de un péptido tioéster de fórmula (III<sub>1</sub>') a partir del bis(2-sulfaniletíl)amino  
 30 péptido  $\square-Z-A_1-SEAoff$  (III<sub>1</sub>) según el esquema:



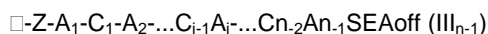
- por acción de un tiol  $R-SH$ , opcionalmente en presencia de un agente reductor de los disulfuros cíclicos, en el que  $R$   
 35 puede ser un radical alquilo o arilo opcionalmente sustituido;

(d1) al menos una etapa de condensación de (III<sub>1</sub>') en el fragmento peptídico (II<sub>2</sub>) en presencia de un tiol aromático  $ArSH$  en condiciones en las que  $PG_1$  se elimina cuando es diferente de H:

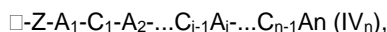


- 40 (an-1) al menos una etapa de preparación de un fragmento  $C_{n-1}(PG_{n-1})-An$  en el que  $(PG_{n-1})$  representa H o un grupo protector del tiol del aminoácido  $C_{n-1}$ ;

- 45 (dn-1) al menos una etapa de condensación de  $C_{n-1}(PG_{n-1})-An$  con

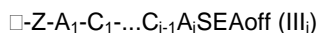


- en presencia de un tiol aromático  $ArSH$  en condiciones en las que  $PG_{n-1}$  se elimina cuando es diferente de H para  
 50 dar:



- 55 dicho procedimiento comprende, además, para cualquier  $i = 1, \dots, n-2$ ,

(ci) al menos una etapa de transformación de



en

5



por acción de un tiol R-SH, opcionalmente en presencia de un agente reductor de los disulfuros cíclicos, (di) al menos una etapa de condensación de  $C_i(\text{PG}_i)\text{A}_{i+1}\text{SEAoff}$  en el que  $(\text{PG}_i)$  representa H o un grupo protector del tiol del aminoácido  $C_i$ ;

10

con



15 para dar



**[0020]** Según una realización particular de la invención, el procedimiento comprende además: (e) una etapa de desacoplamiento del péptido  $\text{A}_1\text{-C}_1\text{-A}_2\text{-...C}_{i-1}\text{A}_i\text{-...C}_n\text{-An}$  (I) del soporte sólido.

20

**[0021]** Según una realización de la invención, el soporte sólido  $\square$  se elige entre resinas, en particular entre resinas a base de poliestireno, poliácridamida, polietilenglicol, celulosa, polietileno, poliéster, latex, poliamida, polidimetilacrilamida, polímeros hidrófilos sintéticos o naturales, perlas de vidrio, geles de sílice.

25

**[0022]** Según una realización de la invención  $C_1, \dots, C_i, \dots, C_n$  son cisteínas.

**[0023]** Según una realización de la invención  $\text{PG}_1, \dots, \text{PG}_i, \dots, \text{PG}_n$  son grupos terc-butil sulfenilo. Según una realización de la invención,

30

$Y'$  comprende un grupo funcional elegido entre una azida, e  $Y$  se elige entre los grupos que comprenden un grupo funcional alquino, o  $Y'$  comprende un grupo funcional alquino e  $Y$  se elige entre los grupos que comprenden un grupo funcional azida, o

35

$Y'$  comprende un grupo funcional aldehído,  $Y$  es H y el aminoácido N-terminal de  $A_1$  se elige entre una cisteína, una serina o una treonina, o

$Y'$  comprende un grupo funcional aldehído,  $Y$  comprende un grupo  $\text{NH}_2$  capaz de formar una base de Schiff.

Según una realización de la invención, R se elige entre un radical alquilo que comprende de 1 a 12 átomos de carbono, lineal o ramificado, opcionalmente sustituido, aralquilo o arilo C6-C12, opcionalmente sustituido.

40

**[0024]** Según una realización de la invención, para cualquier  $i = 2, \dots, n-2$ , las etapas di) del procedimiento se aplican en condiciones en las que  $\text{PG}_i$  se elimina selectivamente *in situ*, sin afectar SEAoff y el solvente de la reacción es un tampón acuoso, de pH comprendido entre 4 y 9, que contiene un tiol aromático.

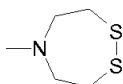
45

**[0025]** Otro objeto de la invención es un soporte sólido injertado con un péptido y que responde a la siguiente fórmula (III<sub>1</sub>):



en la que  $A_1$  representa un fragmento peptídico, cuyo extremo C-terminal porta un grupo bis(2-sulfaniletíl)amino cíclico

50



denominado SEAoff,  $\square$  representa un soporte sólido y Z representa un grupo de unión entre  $A_1$  y  $\square$ .

55

**[0026]** Un soporte sólido tal puede ser utilizado en un kit de síntesis de polipéptidos. Un tal kit de síntesis de polipéptidos comprende habitualmente al menos un soporte que tiene al menos una zona de recepción sobre la cual o en la cual se coloca al menos un soporte sólido injertado (III<sub>1</sub>).

60

**[0027]** Otro objeto de la invención es un dispositivo automatizado para la síntesis de péptidos que permiten aplicar de forma automatizada el procedimiento de síntesis de la invención. Un dispositivo tal comprende al menos un depósito en el que se coloca un soporte sólido injertado con un péptido y que responde a la siguiente fórmula (III<sub>1</sub>):

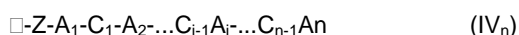
□-Z-A<sub>1</sub>-SEAoff (III<sub>1</sub>)

**[0028]** Además comprende depósitos diferentes que contienen:

- 5 - péptidos (II) C<sub>i</sub>(PG<sub>i</sub>)A<sub>i+1</sub>SEAoff que se han descrito anteriormente, así como:  
 - al menos un tiol R-SH, y opcionalmente un agente reductor de los disulfuros cíclicos  
 - los activadores de acoplamiento y  
 - los productos de lavado.

10 **[0029]** Un robot tal comprende asimismo medios mecánicos de extracción y de distribución de las muestras de productos, así como medios informáticos que permiten la puesta en marcha controlada de estos medios mecánicos.

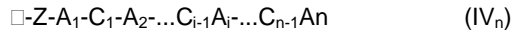
**[0030]** La solicitud tal y como se presenta describe un soporte sólido injertado con un polipéptido que  
 15 comprende n fragmentos peptídicos y al menos n-1 aminoácidos que portan un grupo funcional tiol y responden a la siguiente fórmula (IV<sub>n</sub>):



**[0031]** Un soporte sólido tal puede utilizarse para realizar pruebas de afinidad entre un polipéptido y otra  
 20 molécula.

**[0032]** Para la utilización de estos soportes sólidos injertados en pruebas de afinidad biológica, generalmente es deseable que la cadena peptídica A<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-...-C<sub>i-1</sub>A<sub>i</sub>-...-C<sub>n-1</sub>A<sub>n</sub> se pliegue, de forma que presente una conformación nativa biológicamente relevante. Para ello, la cadena se pliega después de la etapa de síntesis, en condiciones en  
 25 las que generalmente las cisteínas se emparejan para formar puentes disulfuro.

**[0033]** La solicitud tal y como se presenta describe un kit de prueba biológica que comprende al menos un soporte que tiene al menos una zona de recepción sobre una o en la que coloca al menos un soporte sólido injertado con al menos un polipéptido que comprende n fragmentos peptídicos y n-1 aminoácidos que portan un grupo  
 30 funcional tiol y responden a la siguiente fórmula (IV<sub>n</sub>):



**[0034]** Otro objeto más de la invención es un procedimiento de fabricación de un medicamento que  
 35 comprende al menos:

- La fabricación de al menos un polipéptido según el procedimiento definido anteriormente; y
- su asociación con un soporte farmacéuticamente aceptable.

#### 40 DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES DE LA INVENCIÓN

**[0035]** A continuación se describe la invención más detalladamente y de forma no limitativa en la descripción que sigue.

45 **[0036]** Por «péptidos o polipéptido» se entiende, en el marco de la presente solicitud, una cadena lineal de residuos de aminoácidos (en número superior o igual a dos) unidos por enlaces peptídicos. Los «péptidos o polipéptidos» en el sentido de la presente solicitud pueden por tanto por ejemplo ser oligopéptidos, péptido o proteínas según la acepción convencional de estos términos. Los residuos de aminoácidos presentes en los polipéptidos según la invención pueden elegirse entre los residuos de aminoácidos proteinogénicos o no.  
 50 Preferentemente, se eligen entre los veinte residuos de aminoácidos proteinogénicos.

**[0037]** La nomenclatura de los polipéptidos se realiza del extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal. Los residuos aminoácidos presentes a lo largo de la cadena polipeptídica se nombran según el código habitual de una letra o de tres letras. Un residuo de aminoácido es un fragmento de polipéptido de fórmula -NH-(CH-R)-(C=O)-, en la  
 55 que R representa una cadena lateral, diferente de un aminoácido a otro.

**[0038]** Por «fragmento peptídico» se entiende, en el marco de la presente solicitud, una porción de polipéptido que comprende al menos un residuo de aminoácido. Un fragmento peptídico, en el sentido de la presente solicitud, puede ser por tanto: una secuencia de residuos de aminoácidos (como -AHG- o -Ala-His-Gly-) si el  
 60 fragmento peptídico no comprende ni el extremo N-terminal ni el extremo C-terminal del polipéptido; o bien una secuencia de residuos 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 residuos 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.

65 **[0039]** Se entiende que cada uno de los fragmentos peptídicos comprende preferentemente únicamente

residuos de aminoácidos elegidos entre los 20 residuos de aminoácidos proteínogénicos. Sin embargo, según una realización particular, los fragmentos peptídicos  $A_i$  en posición interna de la secuencia también pueden comprender uno o varios residuos de aminoácidos no-proteínogénicos, uno o varios de los fragmentos peptídicos  $A_2 \dots A_i \dots A_{n-1}$  puede portar uno o varios aminoácidos modificados, la modificación se realiza previamente a la puesta en marcha del procedimiento. A modo de ejemplo, no limitativo, la modificación de los aminoácidos puede elegirse en concreto entre los radicales elegidos entre los residuos de ácidos carboxílicos (biotina, grupo acetilo, residuo aminoacético, un fluoróforo como la tetrametilrodamina, un agente de quelación de metales como el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), un lípido como el ácido palmítico, un polímero como por ejemplo el alfa-metoxi-omegacarboxi poli(etilenglicol) u otros. Además puede elegirse entre las modificaciones postraduccionales de aminoácidos proteínogénicos conocidas por el experto en la materia (metilación, fosforilación, acetilación, glicosilación, sulfatación, hidroxilación, carboximetilación, que portan las protecciones apropiadas para la incorporación en fase sólida, etc...), o opcionalmente un medicamento (en cuyo caso la proteína sirve de vector).

**[0040]** La presencia de aminoácidos modificados permite en concreto funcionalizar el polipéptido con vistas a la detección de interacciones del polipéptidos con otras moléculas (marcadores de fluorescencia...), pero se pueden prever otros tipos de funcionalizaciones.

**[0041]** Según una manera simple, la introducción de una modificación puede realizarse utilizando un aminoácido no proteínogénico, en concreto un derivado de aminoácido proteínogénico, para introducir la modificación durante la síntesis en fase sólida del fragmento considerado. A modo de ejemplo, es posible utilizar una Fmoc-L-Lys(Biotina)-OH, es decir, una lisina que lleve en su cadena lateral una biotina, para efectuar la síntesis de un fragmento. Este fragmento se incluye en el ensamblaje de forma idéntica a la que emplea los fragmentos de aminoácidos proteínogénicos.

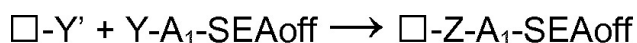
**[0042]** Los residuos de aminoácidos de los polipéptidos  $A_1, \dots, A_i, A_n$  pueden opcionalmente estar protegidos de manera provisional o permanente por grupos protectores de las funciones portadas por las cadenas laterales, cuya naturaleza varía en función de las funciones reactivas de las cadenas laterales y que son bien conocidas por el experto en la materia.

**[0043]** Según una realización de la invención, un fragmento peptídico  $A_i$  comprende entre 2 y 600 residuos de aminoácidos, de preferencia entre 5 y 100 residuos de aminoácidos, de forma más particularmente preferida entre 8 y 50 residuos de aminoácidos.

**[0044]** El polipéptido de fórmula (II) puede por ejemplo obtenerse por un método de síntesis peptídica usual, en concreto un método de síntesis en fase sólida. Asimismo puede obtenerse mediante una ligación nativa anterior.

**[0045]** La preparación del bis(2-sulfaniletíl)aminopéptido:  $Y-A_1-SEAoff$  (etapa a1) del procedimiento) puede hacerse según el método descrito por Melnyk, O. et coll., Bis(2-sulfanyléthyl)amino native peptide ligation., Org. Lett., 12(22), 5238-41(2010), así como en FR-2952058. Según la realización de este procedimiento, el aminoácido C-terminal está acoplado a un soporte de resina polímera P injertado SEA (bis(2-sulfaniletíl)amino) mediante la presencia de un soporte de resina polímero injertado SEA con un halogenuro de aminoácido o con un aminoácido y un agente de activación, elegido de preferencia entre el PyBOP® (benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinafosfonio hexafluorofosfato), el BOP, el PyBroP® (bromo-tris-pirrolidina-fosfonio hexafluorofosfato), o el HATU (2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio hexafluorofosfato metanaminio) y de manera más particularmente preferida el PyBroP y el HATU. Esta realización se describe con más detalle a continuación en los ejemplos de preparación de los fragmentos peptídicos de salida.  $A_1-SEA-P$  se funcionaliza a continuación por un grupo Y y se desacopla del polímero P.

**[0046]** El procedimiento de la invención comprende la reacción de un péptido funcionalizado  $Y-A_1-SEAoff$  (II<sub>1</sub>) con un soporte sólido indicado como □-Y', □ representa el soporte sólido e Y' representa un grupo funcional reactivo capaz de reaccionar con Y para formar un grupo Z según el esquema 1:



Esquema 1

**[0047]** El soporte sólido es de preferencia un polímero en forma de partículas (perlas) insolubles o solubles. Por ejemplo se pueden utilizar resinas a base de poliestireno, poliacrilamida, polietilenglicol, celulosa, polietileno, poliéster, látex, poliamida, polidimetilacrilamida y resinas derivadas de estas. También es posible utilizar un gel de sílice o perlas de vidrio a modo de soporte sólido.

**[0048]** Ventajosamente, se utiliza un soporte sólido elegido entre los polímeros hidrófilos sintéticos como las resinas PEGA, ChemMatrix®, SPOCC (*superpermeable organic combinatorial chemistry* o química combinatoria

orgánica superpermeable) o polímeros carbohidratos naturales como la agarosa o la sefarosa.

**[0049]** Estas resinas se injertan a través de un grupo Y' que comprende un grupo funcional elegido entre una azida, un alquino, preferentemente un alquino verdadero o un alquino terminal, un ciclooctino, Y se elige entonces entre un alquino, de preferencia un alquino verdadero o alquino terminal, y una azida.

**[0050]** Según una variante estas resinas se injertan por un grupo Y' que comprende un grupo funcional aldehído, Y es H y el aminoácido N-terminal de A<sub>1</sub> se elige entre una cisteína, una serina o una treonina, o un grupo NH<sub>2</sub> capaz de formar una base de Schiff, como el grupo hidrazinocarbonilo H<sub>2</sub>NNHCO, o más generalmente un derivado de la hidracina o H<sub>2</sub>NO, es decir un derivado de la hidroxilamina.

**[0051]** De manera más precisa, los modos de aplicación preferidos de la invención son los siguientes:

Cuando Y' comprende un alquino, Y comprende una azida,

15 Cuando Y' comprende un alquino, Y comprende una azida,

Cuando Y' es un aldehído, Y es H y el aminoácido N-terminal de A<sub>1</sub> se elige entre una cisteína, una serina o una treonina,

o

20 Cuando Y' es un aldehído, Y es un grupo NH<sub>2</sub> capaz de formar una base de Schiff, como el grupo hidrazinocarbonilo H<sub>2</sub>NNHCO, o más generalmente un derivado de la hidracina o H<sub>2</sub>NO, es decir un derivado de la hidroxilamina.

**[0052]** La unión entre el fragmento peptídico y el soporte sólido se realiza a través de un grupo funcional apropiado, denominado enlazador (o «linker»). Así, en un primer tiempo, el fragmento peptídico N-terminal se fija en los grupos funcionales enlazadores del soporte sólido (dejando el extremo C-terminal del fragmento peptídico en forma de SEAoff) mediante el aminoácido correspondiente en el extremo N-terminal del polipéptido que hay que sintetizar, lo que constituye el primer cebador, después los fragmentos peptídicos siguientes se añaden según la sucesión de reacciones descritas a continuación.

**[0053]** Según una primera variante, la preparación del soporte sólido injertado con el (bis(2-sulfaniletíl)aminopéptido: □-Z-A<sub>1</sub>-SEAoff (III<sub>1</sub>)) puede realizarse según el método descrito en WO2011/058188:

**[0054]** Se hace reaccionar el péptido A<sub>1</sub>-SEAoff con un compuesto que responde a la fórmula general X<sub>1</sub>-L-X<sub>2</sub>, en la que X<sub>1</sub> representa un grupo elegido entre:

35 -N<sub>3</sub>

y

-C≡CH

**[0055]** L representa un grupo espaciador y X<sub>2</sub> representa un grupo que comprende un grupo funcional capaz de reaccionar con el grupo NH<sub>2</sub> terminal del péptido A<sub>1</sub>, la unión entre X<sub>2</sub> y A<sub>1</sub> es resistente en las condiciones de ligación mencionadas anteriormente y susceptible de ser escindida en condiciones que no degraden la cadena peptídica. Tales grupos X<sub>2</sub> se describen de forma detallada en WO2011/058188.

**[0056]** El péptido A<sub>1</sub> está soportado por una fase sólida mediante su función ácida terminal y por un grupo precursor de SEAoff. La puesta en contacto del péptido A<sub>1</sub> soportado con el compuesto X<sub>1</sub>-L-X<sub>2</sub> resulta en la formación de una unión covalente entre el grupo NH<sub>2</sub> terminal del péptido A<sub>1</sub> y el grupo X<sub>2</sub> para formar un compuesto X<sub>1</sub>-L'-A<sub>1</sub> en el que X<sub>1</sub> tiene el mismo significado que se ha dado anteriormente y L' representa un brazo de unión producto de la condensación de -L-X<sub>2</sub> con el extremo N-terminal del péptido A<sub>1</sub>. El grupo SEAoff solo se forma después del desacoplamiento del péptido X<sub>1</sub>-L'-A<sub>1</sub> del soporte sólido.

**[0057]** De forma habitual, L' es una cadena alcano di-ilo que comprende de 1 a 50 átomos de carbono, y una o varias funciones que pueden elegirse, de forma no exhaustiva, entre: un grupo funcional hidróxilo, un grupo funcional amina, un grupo funcional éster, tioéster, un grupo funcional éter, un grupo funcional amida, un grupo funcional NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, un átomo de halógeno, un grupo arilo opcionalmente sustituido, y esta cadena alcano di-ilo está opcionalmente interrumpida por uno o varios grupos elegidos entre: un puente éter (-O-), un puente amino (-NH-), un puente éster (-COO-), un puente amida (-CONH-), un puente urea (-NH-CO-NH-), un puente uretano (-NH-CO-O-).

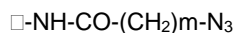
**[0058]** A continuación el grupo reactivo X<sub>1</sub> reacciona con un soporte sólido portador de una funcionalidad apropiada. Tales soportes se describen en WO2011/058188. En concreto cuando X<sub>1</sub> representa:

60 -C≡CH

se puede elegir un soporte sólido portador de una de las siguientes funcionalidades

65 □-N<sub>3</sub>



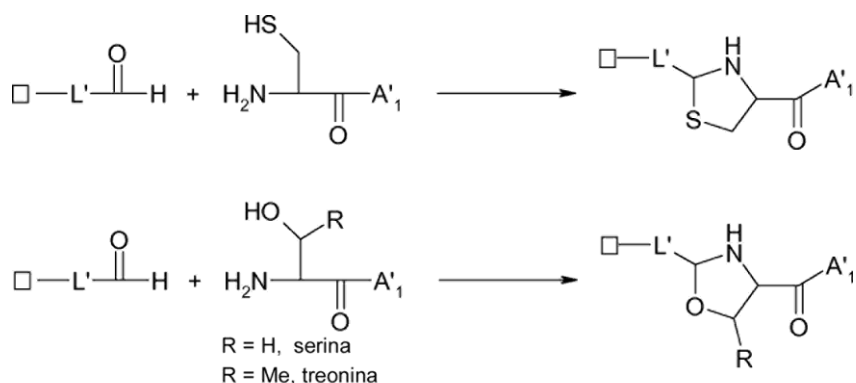


**[0059]** Cuando  $X_1$  representa  $N_3$ , se puede por ejemplo elegir un soporte sólido funcionalizado por un grupo alquino, preferentemente un alquino verdadero, presente en una molécula más o menos compleja como las 5 ilustradas en WO2011/058188, como por ejemplo:



**[0060]** un grupo ciclooctino... La reacción entre  $X_1$  y el soporte sólido se realiza en condiciones 10 quimioselectivas y no se produce una reacción concurrente entre  $X_1$  y los aminoácidos del péptido  $A_1$ .

**[0061]** Según una segunda variante, la preparación del soporte sólido injertado con el (bis(2-sulfaniletíl)aminopéptido:  $\square\text{-Z-A}_1\text{-SEAoff}$  (III<sub>i</sub>) puede realizarse según el método descrito en M.Villain et al., Chemistry and Biology 8 (2001) 673-679. Según este método, un enlace tiazolidina u oxazolidina se forma entre un grupo 15 funcional aldehído portado por el soporte sólido y una cisteína, respectivamente una serina o una treonina, N-terminal del péptido  $A_1$  según el esquema 2 siguiente:



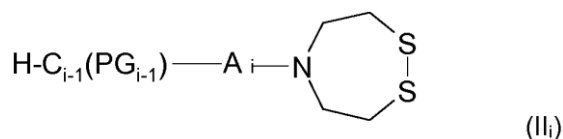
Esquema 2

**[0062]** En este esquema,  $L'$  representa un brazo espaciador entre el soporte sólido y la función aldehído,  $A'_1$  20 representa el residuo peptídico que forma el péptido  $A_1$  con la cisteína la serina o la treonina N-terminal. Ventajosamente  $L'$  es una cadena alcano di-ilo que comprende de 1 a 50 átomos de carbono, y una o varias funciones que pueden elegirse, de forma no exhaustiva, entre: un grupo funcional hidróxila, un grupo funcional amina, un grupo funcional éster, tioéster, un grupo funcional éter, un grupo funcional amida, un grupo funcional  $NO_2$ , 25  $SO_2$ , un átomo de halógeno, un grupo arilo opcionalmente sustituido, y esta cadena alcano di-ilo está opcionalmente interrumpida por uno o varios grupos elegidos entre: un puente éter (-O-), un puente amino (-NH-), un puente éster (-COO-), un puente amida (-CONH-), un puente urea (-NHCO-NH-), un puente uretano (-NH-CO-O-).

**[0063]** De hecho, según esta variante, el injerto puede hacerse por una reacción directa entre un péptido y el 30 soporte sólido funcionalizado. La única obligación consiste en la presencia en posición N-terminal del péptido  $A_1$  de un residuo de cisteína, serina o treonina. Es decir, que el péptido final buscado comprende uno de estos aminoácidos en posición N-terminal, y el método puede utilizarse en este péptido sin modificación de secuencia. Si no, hay que prever la adición de uno de estos tres residuos en posición N-terminal de la secuencia objeto.

**[0064]** En todos los casos, el brazo de unión  $Z$  que une el soporte sólido y  $A_1$  debe ser resistente en las 35 condiciones de realización de las etapas de transformación (i) y de condensación (ii). Además debe poder escindirse en condiciones que permitan liberar el polipéptido (I) sin dañarlo.

**[0065]** La invención se basa además en la preparación de fragmentos  $H\text{-C}_{i-1}(PG_{i-1})\text{-A}_i\text{-SEAoff}$  (II<sub>i</sub>) 40 representados a continuación (con  $i=2, \dots, n-1$ ) en los que  $C_{i-1}$ ,  $A_i$  y  $SEAoff$  se han definido anteriormente y  $(PG_{i-1})$  representa H o un grupo protector del tiol del aminoácido  $C_{i-1}$ .



**[0066]** El péptido de fórmula (II<sub>i</sub>) comprende un átomo de hidrógeno y un residuo  $C_{i-1}(PG_{i-1})$  en el extremo N-terminal. El residuo  $C_{i-1}$  es un residuo de aminoácido que comprende un grupo funcional tiol. Esta función tiol puede ser en particular un grupo funcional beta-amino tiol (en cuyo caso el residuo  $C_{i-1}$  representa de preferencia el residuo cisteína), un grupo funcional gamma amino tiol (en cuyo caso el residuo  $C_{i-1}$  representa de preferencia el residuo 45

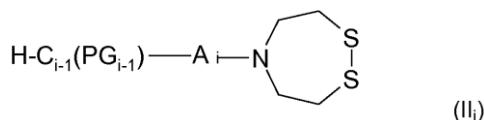
homocisteína), o una selenocisteína.

**[0067]** En toda la descripción que sigue, según una realización particular,  $C_{i-1}$  puede leerse como representando un residuo cisteína (Cis).

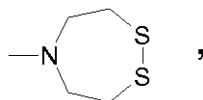
**[0068]** Según una variante preferida de la invención, la función tiol de  $C_{i-1}$  está protegida por un grupo protector  $PG_{i-1}$ . Ventajosamente,  $PG_{i-1}$  representa un grupo protector (SR') de manera que forma un resto disulfuro en el tiol del aminoácido  $C_{i-1}$ , y R' representa un grupo alquilo  $C_1-C_6$ , en particular SR' representa un grupo terc-butilo sulfenilo, o un grupo arilo sulfenilo o aralquilo sulfenilo  $C_6-C_{12}$ , tal como fenilo sulfenilo o benzilo sulfenilo.

**[0069]** Se entiende que cada fragmento peptídico  $A_i$  puede haber sido preparado previamente por una serie de operaciones como las descritas anteriormente, según el procedimiento de la invención o por cualquier otro método de síntesis de péptidos.

**[0070]** La invención reposa sobre la transformación ci) de péptidos injertados sobre un soporte sólido y portadores de un grupo funcional SEAoff de péptido-tioésteres,  $\square-Z-A_1-C_1-A_2-\dots-C_{i-2}-A_{i-1}-SR$  ( $i=2,\dots,n$ ) (III' $_{i-1}$ ) y su reacción de condensación di) sobre un péptido (o polipéptido) que porta un grupo funcional bis(2-sulfaniletíl)amino en el estado de disulfuro cíclico, que responde a la fórmula general:



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



denominado SEAoff; y

$C_{i-1}$  representa un residuo de aminoácido que porta un grupo funcional tiol.

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

Esta etapa concreta fue descrita para su aplicación en otros compuestos en Dheur, J., Ollivier, N., Vallin, A. & Melnyk, O. Synthesis of Peptide Alkylthioesters Using the Intramolecular N,S-Acyl Shift Properties of Bis(2-sulfanylethyl)amido Peptides. J. Org. Chem. 76, 3194-3202 (2011)

Esta etapa de síntesis reposa sobre al menos una etapa ci) (con  $i=2,\dots,n-1$ ) de transformación de



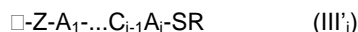
en



por acción de un tiol R-SH, opcionalmente en presencia de un agente reductor de disulfuros cíclicos.

**[0071]** Se entiende que cuando  $i=n$ , la transformación de SEAoff en SR no es necesaria y la reacción de condensación dn) de (III' $_{n-1}$ ) con el fragmento peptídico C-terminal  $-Cn_1(PGn_1)An$  puede realizarse directamente.

**[0072]** Esta transformación está seguida de una etapa de condensación di) de



con  $C_i(PG_i)-A_{i+1}-SEAoff$  (II' $_{i+1}$ ) en presencia de un tiol aromático ArSH en condiciones en las que  $PG_i$ , cuando es diferente de H, se elimina para dar:



**[0073]** En caso de que  $i=n-1$ , la etapa de condensación se hace con un péptido  $-Cn_1(PGn_1)An$  no portador del grupo SEA, la transformación de SEAoff en SR no es necesaria pero puede realizarse, en concreto en el caso en que el conjunto de la síntesis se realice con ayuda de un robot, el resto de las condiciones de operación son las mismas que para las otras condensaciones; en concreto en presencia de un tiol aromático ArSH en condiciones en las que  $PGn_1$ , cuando es diferente de H, se elimina.

**[0074]** El radical alquilo representado por R es un radical alquilo de 1 a 12 átomos de carbono, lineal o

ramificado, o arilo C6-C12 opcionalmente sustituido por uno o varios grupos elegidos entre los átomos de halógeno (F por ejemplo), o los radicales CO<sub>2</sub>H, SO<sub>3</sub>H, CONH<sub>2</sub>, OH, SH, alquiloxi, alquiltio, mercaptoalquiltio, el resto de un éster o un resto polietilenglicol, o por un fenilo opcionalmente sustituido, u otros grupos orgánicos que no interfieren con las reacciones aplicadas. El tiol de fórmula general R-SH empleado en la etapa ci) puede ser por ejemplo

5 HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H, HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>H, HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH, HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH o HSCH<sub>2</sub>Ph.

**[0075]** Según una variante, si el tiol R-SH es suficientemente reductor, la presencia de un agente reductor de los disulfuros cíclicos suplementaria no es necesaria.

10 **[0076]** El tiol aromático empleado en la etapa di) se elige ventajosamente entre compuestos reductores de uniones disulfuro, de preferencia elegido entre el tiofenol y o los derivados obtenidos por sustitución del núcleo aromático, por ejemplo el 4-carboximetiltiofenol. De forma alternativa, se pueden utilizar tioles no aromáticos como el ditiotreitól, el benzilmercaptan, en lugar del tiol aromático. Por supuesto, también pueden convenir mezclas de estos tioles.

15 **[0077]** El reductor de SEAoff empleado en la etapa ci) puede elegirse entre los reductores de disulfuros cíclicos. En concreto se puede elegir entre las fosfinas (por ejemplo la tris (2-carboxietil)fosfina) o cualquier otro reductor de disulfuros cíclicos como los tioles (por ejemplo el ditiotreitól (DTT)).

20 **[0078]** De forma ventajosa, la etapa de condensación se hace en presencia de un exceso de C<sub>i</sub>(PG<sub>i</sub>)-A<sub>i+1</sub>-SEAoff o de C<sub>n-1</sub>(PG<sub>n-1</sub>)-A<sub>n</sub>.

**[0079]** La reacción de ligación se produce de preferencia en el medio acuoso, por ejemplo en un tampón de fosfato con un pH comprendido entre 4 y 9. De preferencia, esta reacción se realiza con un pH comprendido entre 5 y 9, ventajosamente entre 5,5 y 8,5, de forma más particularmente preferida con un pH comprendido entre 5,5 y 7,5 e idealmente con un pH cercano a 7,0.

30 **[0080]** La reacción de condensación se realiza de preferencia a una temperatura comprendida entre 0 y 50 °C, e idealmente a una temperatura de aproximadamente 75 °C. La duración de la reacción se ajusta en función de la elección de los reactivos y de las otras condiciones de la reacción. La duración apropiada puede asimismo ajustarse según los resultados de un análisis de cromatografía líquida-espectrometría de masa durante la reacción. La duración apropiada será típicamente de unas horas a unos días.

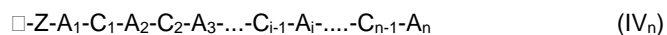
35 **[0081]** Ventajosamente, se procede a un lavado del soporte sólido entre dos etapas de condensación, de forma que se eliminen los residuos peptídicos en exceso que no hayan reaccionado y que puedan ser recuperados o reciclados opcionalmente.

**[0082]** Opcionalmente, se procede a una desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos que componen el polipéptido con ayuda de medios bien conocidos por el experto en la materia.

40 **[0083]** Según la invención, se puede representar el procedimiento de ensamblaje de múltiples fragmentos peptídicos según el esquema representado en la figura 1.

**[0084]** Según la invención, el procedimiento conduce a la preparación de un ensamblaje peptídico múltiple

45 injertado sobre un soporte sólido □ mediante un grupo de unión Z, el ensamblaje peptídico comprende restos de aminoácidos que portan un grupo funcional tiol, es decir un ensamblaje de n fragmentos peptídicos A<sub>i</sub> y de al menos n-1 aminoácidos C<sub>i</sub> que portan un grupo funcional tiol, representado por la fórmula:



50 en la que A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>,... A<sub>i</sub>,... A<sub>n</sub> son fragmentos peptídicos,  
C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> ... C<sub>i-1</sub> ... C<sub>n-1</sub> son restos de aminoácidos portadores de un grupo funcional tiol,  
n está comprendido entre 3 y 50,  
de preferencia entre 3 y 20, o de forma aún más preferida entre 3 y 10,  
55 e i es un número entero cualquiera comprendido entre 2 y n.

**[0085]** El procedimiento de la invención comprende por tanto n-1 etapas de ensamblaje peptídico. Ventajosamente las n-1 etapas de ensamblaje peptídico reposan sobre una etapa de transformación de □-Z-A<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-...C<sub>i</sub>A<sub>i</sub>SEAoff en □-ZA<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-...C<sub>i-1</sub>-A<sub>i</sub>-SR

60 por acción de un tiol R-SH, opcionalmente en presencia de un agente reductor de disulfuros cíclicos. seguida de una etapa de condensación de □-Z-A<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-...C<sub>i-1</sub>-A<sub>i</sub>-SR con C<sub>i</sub>(PG<sub>i</sub>)-A<sub>i+1</sub>-SEAoff en presencia de un tiol aromático ArSH en condiciones en las que PG<sub>i</sub> se elimina para dar: □-Z-A<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-...C<sub>i-1</sub>-A<sub>i</sub>-C<sub>i</sub>A<sub>i+1</sub>-SEAoff.

**[0086]** Sin embargo, no se excluye que una o varias etapas de ensamblaje peptídico aplicadas en la síntesis

65 del péptido (IV<sub>n</sub>) se realicen con ayuda de otro método de ligación conocido por el experto en la materia.

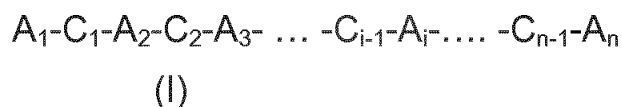
**[0087]** En particular, como se ha explicado anteriormente, la etapa n-1 puede ser una ligación SEA, por reacción directa de SEAoff con C<sub>n-1</sub>(PG<sub>n-1</sub>)-A<sub>n</sub>.

5 **[0088]** De forma ventajosa, todas las etapas del procedimiento de producción del péptido (IV<sub>n</sub>) se aplican siguiendo el encadenamiento de etapas ci), di), i=1, ...n-2, opcionalmente cn-1, después dn-1).

**[0089]** Se puede prever así la fabricación del polipéptido y de preferencia antes del desacoplamiento de la resina una o varias etapas de tratamiento químico, como una transformación de los aminoácidos, según métodos conocidos por el experto en la materia como por ejemplo la alquilación de una homocisteína en metionina o la desulfurización de una cisteína o la deselenización de una selenocisteína en alanina.

10 **[0090]** De manera preferente, el procedimiento está seguido de una etapa de corte de la unión entre el soporte sólido y el péptido (I) en condiciones que permitan liberar el péptido (I):

15



**[0091]** Según la naturaleza del brazo de unión Z, los medios de corte serán diferentes. En concreto, según se enseña en WO2011/058188, se puede, en función de la naturaleza del brazo de unión Z, liberar el péptido (I) por escisión de la unión covalente entre la parte X<sub>2</sub> del brazo espaciador Z y el péptido (I) por ataque nucleófilo, o en condiciones alcalinas, o ácidas, o por irradiación UV.

20 **[0092]** Cuando el brazo espaciador Z resulta de la condensación de una cisteína de una serina o de una treonina N-terminal del péptido A<sub>1</sub> con un grupo funcional aldehído portado por el soporte sólido para formar un ciclo tiazolidina, respectivamente oxazolidina, el péptido final se libera ventajosamente por un tratamiento con ayuda de O-metil hidroxilamina, según se enseña en M.Villain et al., Chemistry and Biology 8 (2001) 673-679.

**[0093]** Estas últimas condiciones son aplicables también en caso de que el enlace Z formado sea una base de Schiff.

30

**[0094]** Otro objeto de la invención es un soporte sólido injertado con un péptido y que responde a la siguiente fórmula:



35

**[0095]** En la que Z,  $\square$ , A<sub>1</sub> y SEAoff tienen el mismo significado que se ha indicado anteriormente. Tales soportes injertados por un primer fragmento peptídico A<sub>1</sub> permiten cebar la síntesis de polipéptidos complejos. En concreto se puede prever preparar de manera industrial o semiindustrial soportes sólidos injertados por secuencias de péptidos A<sub>1</sub> de interés general que se emplean frecuentemente como secuencia N-terminal de péptidos de interés biológico. Por ejemplo se pueden citar los tipos de secuencias siguientes: péptidos señales para el direccionamiento y la secreción de proteínas, péptidos marcadores (de fluorescencia por ejemplo), etiquetas de purificación como etiquetas de histidina, péptidos portadores de una señal de ubiquitinación, etc...

40 **[0096]** Un soporte sólido tal injertado con un primer péptido, en particular un péptido de interés puede ser utilizado ventajosamente en un kit de síntesis de polipéptido. En un kit tal, puede asociarse con un soporte que comporte zonas de recepción, tales como pocillos de una placa multipocillos en los que las reacciones de ligación sucesivas puedan realizarse. Puede asociarse con reactivos de síntesis tales como los que se han descrito anteriormente para la realización de reacciones de ligación.

50 **[0097]** La solicitud tal como se presenta describe un dispositivo automatizado para la síntesis de péptidos que permite poner en marcha de forma automatizada el procedimiento de síntesis de la invención. Un tal dispositivo comprende al menos un depósito en el que se coloca un soporte sólido injertado con un péptido y que responde a la siguiente fórmula (III<sub>1</sub>):

55



**[0098]** A<sub>1</sub> puede en concreto elegirse entre los péptidos de interés que se han mencionado anteriormente.

**[0099]** Además comprende depósitos que contienen:

60

- péptidos (II<sub>i</sub>) C<sub>i</sub>(PG<sub>i</sub>)A<sub>i+1</sub>SEAoff que se han descrito anteriormente, con diferentes depósitos previstos de forma que alojen cada péptido de secuencia diferente.

**[0100]** Se pueden prever también depósitos para:

- al menos un tiol R-SH, y opcionalmente un agente reductor de los disulfuros cíclicos;
- los activadores de acoplamiento y
- 5 - los productos de lavado.

**[0101]** Un robot tal comprende asimismo medios mecánicos de extracción de muestras de los distintos depósitos y de medios de distribución de estas muestras en el depósito que comprende el soporte sólido. Tales medios pueden consistir en un conjunto de tubos de circulación de fluidos y válvulas, dispuestos opcionalmente en circuitos microfluídicos, o en brazos articulados equipados de pipetas de extracción. El dispositivo automatizado  
10 comprende también medios informáticos (programas) que permiten la utilización controlada de estos medios mecánicos, que permiten la puesta en marcha de las reacciones secuenciadas.

**[0102]** La solicitud tal y como se presenta describe un soporte sólido injertado con un polipéptido que  
15 comprende n fragmentos peptídicos  $A_i$  y al menos n-1 aminoácidos  $C_i$  que portan un grupo funcional tiol y responden a la siguiente fórmula ( $IV_n$ ):



**[0103]** En la que Z,  $\square$ ,  $A_i$ ,  $C_i$ , i, n y SEAoff tienen el mismo significado que se ha dado anteriormente. De  
20 hecho, tras las ligaciones sucesivas y la posible desprotección de las cadenas laterales de aminoácidos, y del plegamiento de la cadena peptídica, el soporte sólido puede utilizarse para realizar pruebas biológicas, en concreto pruebas de afinidad de los polipéptidos sintetizados para moléculas de cualquier naturaleza.

**[0104]** La solicitud tal y como se presenta describe un kit de prueba y/o de diagnóstico que comprende al  
25 menos un soporte que comprende al menos una zona de recepción sobre la que se coloca al menos un soporte sólido injertado con al menos un polipéptido que comprende n fragmentos peptídicos y al menos n-1 aminoácidos portadores de un grupo funcional tiol, el soporte sólido injertado responde a la siguiente fórmula ( $IV_n$ ):



30 **[0105]** Así, el kit de prueba puede utilizarse para la detección de moléculas biológicamente activas o para pruebas de diagnóstico. Se puede prever que el kit de diagnóstico comporte varias zonas de recepción distintas, sobre las cuales se coloca un soporte sólido injertado con polipéptidos idénticos o distintos. Por ejemplo, se pueden colocar soportes sólidos injertados por polipéptidos idénticos en los pocillos de una placa de pocillos de manera que  
35 formen un soporte de prueba y/o de diagnóstico.

**[0106]** De preferencia, para la realización de pruebas, los polipéptidos injertados sobre el soporte sólido se  
ponen previamente en contacto con un medio que favorece la formación de una estructura bi- y/o tridimensional. Por ejemplo, según se enseña en E.C.B.Johnson et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 3283-3287, se puede poner en  
40 contacto el polipéptido con un tampón fosfato de pH 8 y someterlo a una liberación de aire, o se puede poner el péptido en contacto con una solución acuosa de pH igual a 9. Otra forma útil para el plegamiento es la utilización del par GSH, GSSG (GSH para glutatión, GSSG para glutatión oxidada).

**[0107]** El kit de pruebas y/o de diagnóstico también puede comprender medios de detección de una  
45 interacción entre los polipéptidos y las moléculas testadas.

**[0108]** Otro objeto más de la invención es un procedimiento de fabricación de un medicamento que comprende al menos:

- 50 - la fabricación de al menos un polipéptido según el procedimiento definido anteriormente; y
- su asociación con un soporte farmacéuticamente aceptable.

**[0109]** Efectivamente, el procedimiento de la invención puede llevarse a cabo con el objetivo de sintetizar polipéptidos que tengan una actividad terapéutica, en concreto vacunas. Su asociación con un soporte  
55 farmacéuticamente aceptable se realiza por el experto en la materia con ayuda de sus conocimientos generales y en función de las propiedades del polipéptido (en concreto solubilidad) y del modo de administración elegido.

**[0110]** Otras características y ventajas de la invención aparecerán con la lectura de la descripción que sigue,  
60 dada a título de ejemplo y en referencia al dibujo adjunto.

FIGURAS

**[0111]**

65 Figura 1: representación esquemática general del procedimiento de síntesis de péptidos según la invención

Figura 2: representación esquemática del procedimiento de síntesis del péptido **11a**, H-GILKEPVQGA-CHHLEPGGCHHLEPAG-CILKEPVHGA-NH<sub>2</sub> según el ejemplo I

Figura 3: Cromatograma RP-HPLC del péptido **4**

Figura 4: Espectro MS del péptido **4**

Figura 5: Cromatograma RP-HPLC del péptido **5.1a**

5 Figura 6: Espectro MS del péptido **5.1a**

Figura 7: Cromatograma RP-HPLC del péptido **8.2**

Figura 8: Espectro MS del péptido **8.2**

Figura 9: Cromatograma RP-HPLC del péptido **8.3**

Figura 10: Espectro MS del péptido **8.3**

10 Figura 11: Cromatograma RP-HPLC del péptido **11a**

Figura 12: Espectro MS del péptido **11a**

Figura 13: Cromatograma RP-HPLC del péptido **11a** purificado

Figura 14: Cromatograma RP-HPLC del péptido **16a**

Figura 15: Espectro MS del péptido **16a**

15 Figura 16: Cromatograma RP-HPLC del péptido **19**

Figura 17: Espectro MS del péptido **19**

Figura 18: Cromatograma RP-HPLC del péptido **21**

Figura 19: Espectro MS del péptido **21**

Figura 20: Cromatograma RP-HPLC del péptido **23.1**

20 Figura 21: Espectro MS del péptido **23.1**

Figura 22: Cromatograma RP-HPLC del péptido **26.1**

Figura 23: Espectro MS del péptido **26.1**

Figura 24: Cromatograma RP-HPLC del péptido **29**

Figura 25: Espectro MS del péptido **29**

25

## PARTE EXPERIMENTAL

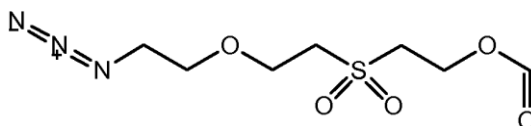
### I- SINTESIS DEL PÉPTIDO 11:

30 H-GILKEPVQGA-CHHLEPGG-CHHLEPAG-CILKEPVHGA-NH<sub>2</sub>

**[0112]** El péptido **11a** está preparado por ligaciones sucesivas de cuatro fragmentos peptídicos según el esquema representado en la figura 2.

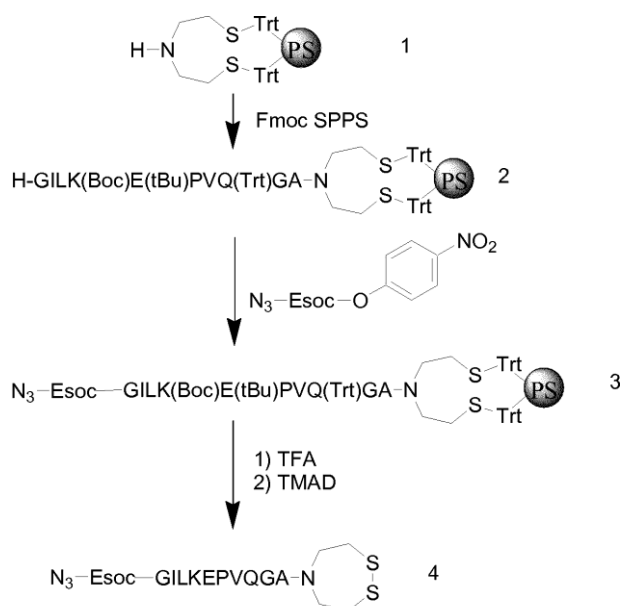
35 I-A- Preparación de N<sub>3</sub>-Esoc-GILKEPVQGA-SEAoff (péptido 4):

**[0113]** El grupo N<sub>3</sub>-Esoc se describe en el documento WO2011/058188:



40

**[0114]** La preparación de N<sub>3</sub>-Esoc-GILKEPVQGA-SEAoff se ilustra en el esquema 3 siguiente.



Esquema 3

Procedimiento:

## 5 - Síntesis de la peptidil resina 2 H-GILK(Boc)E(tBu)PVQ(Trt)GA-SEA-PS

**[0115]** El soporte sólido SEA-PS (con PS = poliestireno) está descrito en la solicitud FR-2952058. Esta peptidil resina se sintetiza a una escala de 0,25 mmole siguiendo el protocolo descrito en Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Organic Letters 2010, 12, 5238-41.

10

**[0116]** Después de la síntesis, la resina se lava sucesivamente con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 2 min) después con DMF (2 x 2 min) y se incorpora en la etapa siguiente.

- Síntesis del fragmento  $\text{N}_3$ -ESOC-GILKEPVQGA-SEAoff 4:

15

**[0117]** El brazo activado  $\text{N}_3$ -Esoc-ONp (Esquema 3) se sintetiza según el procedimiento descrito en WO2011/058188. Este carbonato mixto de 2-[2-(2-azido-etoxi)-etilsulfonilo]-etilo y de 4-nitrofenilo (145 mg, 0,4 mmol, 1,5 eq.) se disuelve en un mínimo de DMF y después se transfiere directamente a la resina. Se adiciona *N*-metilmorfolina (55  $\mu\text{L}$ , 0,5 mmol, 2 eq). El medio reaccional se agita 12 horas en atmósfera de argón a temperatura ambiente. La resina se lava sucesivamente con DMF (2 x 2 min),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 2 min) y  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 x 2 min) y después se seca al vacío.

20

**[0118]** La desprotección final de las cadenas laterales y el desacoplamiento del péptido de la resina se realizan por la acción de una mezcla TFA/TIS/DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$  (20 mL, 92,5/2,5/2,5/2,5 % en v/v) durante 1h30. El péptido se precipita en una mezcla fría de éter dietílico/heptano (200 mL, 1:1 v/v), se centrifuga, después se disuelve en un mínimo de agua y se liofiliza. El péptido 4 bruto (30 mg, 0,02 mmol) se disuelve en tampón de fosfato de sodio (20 mL, 0,2 M, pH=7,2) después se oxida en presencia de *N,N,N',N'*-tetrametilazodicarboxamida (TMAD) (6,8 mg, 0,04 mmol, 2 eq) durante 20 minutos. El medio reaccional se purifica directamente por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RPHPLC) (Columna C18 Nucleosil (d=1 cm, L=20 cm, 120 Å, 5  $\mu\text{m}$ ), detección UV ( $\lambda$  215 nm), tampón A:  $\text{H}_2\text{O}$ /TFA (1:0,05 % en v/v), tampón B:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ /TFA (4:1:0,05 % en v/v/v), gradiente: tampón B (0 a 20 % en 5 min después 20 a 42 % en 60 min, 6 mL/min)). Se obtienen 15 mg de péptido 4 (R= 14 %). El resultado de este análisis está representado en la figura 3.

25

Análisis LC-MS:

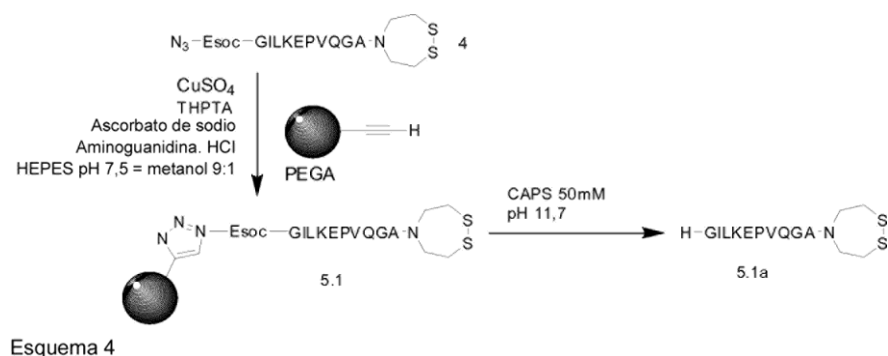
LC-MS: Tampón A:  $\text{H}_2\text{O}$ /TFA (1:0,05 % en v/v), tampón B:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ /TFA (4:1:0,05 % v/v/v). RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 mm, 4,6 x 150 mm) utilizando un gradiente lineal 0-100 % B en 30 min, caudal 1 mL/min, detección ELS.

30

MS: Modo de ionización por electrospray positivo, voltaje cono 30V, analizador cuadrupolar. Resultado ilustrado en la figura 4.

40 I-B- Preparación de la peptidil resina P-1-(1,2,3-triazolil)-Esoc - GILKEPVQGA -SEAoff, con P = PEGA 800, 5.1

**[0119]** La preparación de P-1-(1,2,3-triazolil)-Esoc-GILKEPVQGA-SEAoff está ilustrada en el esquema 4 siguiente.

Procedimiento:

5 **[0120]** La resina Aminometilo PEGA 800 (0,4 mmol/g) se acopla con el ácido pentinoico según el procedimiento descrito en WQ2011/058188. La resina alquina resultante (2 eq) se añade a una solución del azidopéptido **4** (10  $\mu$ mol) en 1,67 ml una mezcla 9:1 de tampón HEPES 100mM pH = 7,5 y metanol. La suspensión resultante se desoxigena por burbujeo continuo en argón (30 min), después el clorhidrato de aminoguanidina (1,1 mg, 1 eq), la tris(hidroxiopropil)triazolilmetil-amina (THPTA) (260 mg, 60 eq), el sulfato de cobre pentahidrato (75 mg, 30 eq) y el ascorbato de sodio (119 mg, 60 eq) se añaden a la suspensión agitada por burbujeo de argón durante 30 min a TA. La peptidil resina **5.1** se lava a continuación abundantemente sucesivamente con: agua (desionizada), una solución de EDTA 250 mM pH 4,2, agua, metanol, DMF y por último agua.

15 **[0121]** El injertado se controla tratando una pequeña cantidad de peptidil de resina por una solución 50 mM de CAPS, cuyo pH se ha ajustado a 11,7 con ayuda de sosa (2 x 30 min), después acidificación con pH = 3 con ayuda de TFA.

**[0122]** Análisis HPLC y MS de **5.1a**:

20 HPLC: Tampón A: H<sub>2</sub>O/TFA (1:0,1 % v/v), Tampón B: CH<sub>3</sub>CN/TFA (1:0,1 % v/v/v). Resultado en figura 5. RP-HPLC sobre una columna C18 Nucleosil (300 Å, 5 mm, 4,6 x 250 mm) utilizando un gradiente lineal 25-45 % B en 20 min, caudal 1 mL/min, detección DAD. Resultado en figura 6.

I-C- Transformación de la resina **5.1** en resina tioéster **6.1**

25 **[0123]** Se prepara una solución tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) a 300 mmol/L en un tampón fosfato 0,2 M a pH = 7,3. Se adiciona entonces ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) (10 % en vol, 0,1 mL, 1,14 mmol). El pH de la solución obtenida se ajusta a pH = 4.

30 **[0124]** La solución anterior (V=200 mL) se introduce en la resina **5.1** (4,5 mmol) acondicionada en una jeringa equipada de un sinterizado. El medio reaccional se agita 24 h a T = 37 °C. La resina se lava (3x 300  $\mu$ L x 1 min) con una solución de ácido 3-mercaptobenzoico (MPAA, 500 mmol/L) preparada en un tampón fosfato de sodio 0,1 M con pH=7,2.

I-D- Ligación del péptido **7.1** H-C(StBu)HHLEPGG-SEAoff. - Síntesis de la peptidil resina **5.2** Ciclo 1

35 **[0125]** El experimento se realiza en caja de guantes ([O<sub>2</sub>] <50 ppm). El péptido **7.1** (9,4 mg, 0,0068 mmol, 1,5 eq) se disuelve en la solución anterior de MPAA (270  $\mu$ L 500 mmol/L, tampón fosfato pH=7,2) después se transfiere a la peptidil resina **6.1**. El medio reaccional se agita 24 h a 37 °C. Tras la reacción, la resina se drena y después se lava con el tampón A (H<sub>2</sub>O/TFA)(1/0,05 % v/v, 3x 300  $\mu$ L x 2 min).

40 **[0126]** Análisis LC-MS: Cromatograma RP-HPLC de **8.2**. Ver figura 7: el pico **8.2** más importante representa el producto **8.2** aislado en forma de dímero (disulfuro). Este dímero de forma durante el corte del producto en medio básico, por oxidación del aire.

45 **[0127]** LC-MS: Tampón A: H<sub>2</sub>O/TFA (1/0,05 % v/v), Tampón B: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFA (4/1/0,05 % v/v/v). RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 mm, 4,6 x 150 mm) utilizando un gradiente lineal 0-100 % B en 30 min, caudal 1 mL/min, detección ELS. MS: Modo ionización por electrospray positivo, voltaje cono 30V, analizador cuadrupolar. Ver figura 8: los picos más importantes representan el producto **8.2** aislado en forma de dímero (disulfuro).

I-E- Transformación de la peptidil resina **5.2** en resina **6.2**:

50 **[0128]** La peptidil resina **5.2** se transforma en resina **6.2** tioéster de MPA utilizando el protocolo utilizado



anteriormente para la transformación de **5.1** en **6.1**.

#### I-F- Síntesis de la peptidil resina **5.3** Ciclo 2

- 5 **[0129]** El péptido **7.2** (X = Ala, 9,5 mg, 0,0068 mmol, 1,5 eq) se pone en reacción con la peptidil resina **6.2** utilizando un protocolo de síntesis estrictamente idéntico al utilizado para la peptidil resina **5.2** (ciclo 1).  
Análisis LC-MS: Cromatograma RP-HPLC de **8.3**. Ver figura 9.  
LC-MS: Tampón A: H<sub>2</sub>O/TFA (1/0,05 % v/v), Tampón B: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFA (4/1/0,05 % en v/v/v). RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 mm, 4,6 x 150 mm) utilizando un gradiente lineal 0-100 % B en 30 min, caudal 1 mL/min, detección ELS. MS: Modo ionización por electrospray positivo, voltaje cono 30V, analizador cuadrupolar. Ver figure 10.

#### I-G- Síntesis del péptido H-CILKEPVHGA-NH<sub>2</sub> (péptido **9**)

- 15 **[0130]** La síntesis de este péptido se describe en: Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Organic Letters 2010, 12, 5238-41.

#### I-H- Síntesis del péptido **11a**:

- 20 **[0131]** La reacción se realiza en una caja de guantes ([O<sub>2</sub>] <50 ppm) en atmósfera de nitrógeno. Se prepara una solución de TCEP a 300 mmol/L en un tampón fosfato 0,2 M a pH = 7,3. El ácido 3-mercaptofenilacético (MPAA 84 mg, 0,5 mmol) se adiciona entonces. El pH de la solución TCEP/MPAA obtenida se ajusta a pH = 6,5.

- [0132]** El péptido **9** (4,6 mg, 0,0068 mmol, 1,5 eq) se disuelve en la solución anterior de TCEP/MPAA (110 µL) después se transfiere a la peptidil resina **5.3**. El medio reaccional se agita 24 H a 37 °C. Tras la reacción de ligación, la peptidil resina **10** se drena y después se lava con el tampón A (H<sub>2</sub>O/TFA)(1/0,05 % v/v, 3x 300 µL x 2 min).

- [0133]** El corte de la peptidil resina **11** se realiza en caja de guantes ([O<sub>2</sub>] <50 ppm). La peptidil resina **11** se corta por la adición de una solución de NaOH (500 mL, 10-2 M), en agitación durante 15 min a 37 °C. Las perlas se filtran, se lavan y el filtrado se liofiliza.

- [0134]** El péptido **11a** se purifica directamente por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RPHPLC) (Columna C18 Nucleosil (d=1 cm, L=20 cm, 120 Å, 5 µm), detección UV (λ 215 nm), tampón A: H<sub>2</sub>O/TFA (1:0,05 % en v/v), tampón B: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFA (4:1:0,05 % en v/v/v), gradiente: tampón B (0 a 20 % en 5 min después 20 a 42 % en 60 min, 6 mL/min)). Se obtienen 4,2 mg de péptido **11** (R= 21 %).

**[0135]** Análisis LC-MS Cromatograma RP-HPLC del péptido **11a**. El cromatograma está representado en la figura 11.

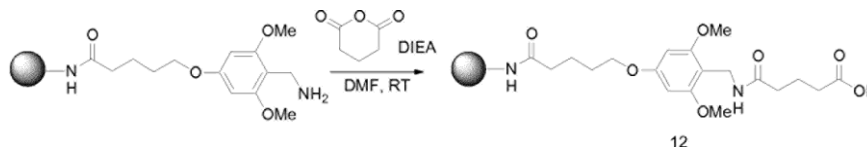
- 40 **[0136]** LC-MS: Tampón A: H<sub>2</sub>O/TFA (1/0,05 % v/v), Tampón B: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFA (4/1:0,05 % v/v/v). RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 mm, 4,6 x 150 mm) utilizando un gradiente lineal 0-100 % B en 30 min, caudal 1 mL/min, detección ELS. MS: Modo ionización por electrospray positivo, voltaje cono 30V, analizador cuadrupolar. El espectro de masas está representado en la figura 12.

- 45 **[0137]** Cromatograma RP-HPLC del péptido **11a** purificado. El cromatograma está representado en la figura 13.

## II- SÍNTESIS DEL PÉPTIDO H-CHHLEPGG-CILKEPVHGA-NH<sub>2</sub> **16a**

- 50 II-A- Síntesis de la resina **12**: Pal-ChemMatrix ácido 5-amino-5-oxopentanoico

**[0138]** Se procede según el esquema 5 siguiente:



Esquema 5

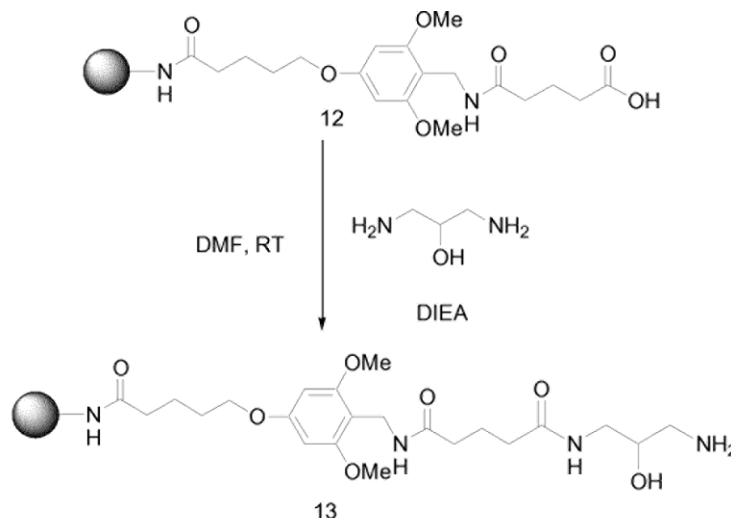
55

- [0139]** Procedimiento: El anhídrido pentanodioico (129 mg, 1 mmol, 10 eq) se disuelve en un mínimo de DMF después se transfiere directamente a la resina Pal-ChemMatrix (263 mg, 0,1 mmol, δ= 0,43 mmol/g, 1 eq). Se adiciona *N,N*-Diisopropiletilamina (DIEA) (197 mL, 1 mmol, 10 eq). El medio reaccional se agita 1,5 horas en atmósfera de argón a temperatura ambiente. La resina se lava sucesivamente con DMF (2 x 2 min), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 2

min) después se drena. Se realiza un ensayo TNBS para verificar la ausencia de amina libre.

**II-B- Síntesis de la resina 13: PAL-ChemMatrix N-(3-amino-2-hidroxiopropil)amida**

5 **[0140]** Esta síntesis se lleva a cabo según el esquema 6 siguiente:



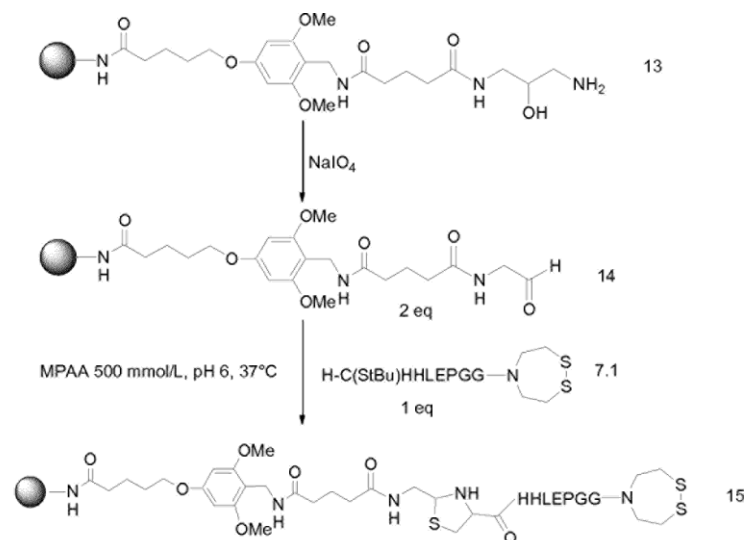
Esquema 6

10 **[0141]** **Procedimiento:** El 1,3 diamino-2-propanol (99 mg, 1 mmol, 10 eq) y el Benzotriazol-1-iloxi-tripirrolidinofosfoniohexafluorofosfato (PyBOP) (114 mg, 0,2 mmol, 2 eq) se disuelven en un mínimo de DMF después se transfieren directamente en la resina 12. Se adiciona la DIEA (191 mL, 1 mmol, 10 eq). El medio reaccional se agita 2 horas en atmósfera de argón a temperatura ambiente. La resina 13 se lava sucesivamente con DMF (2 x 2 min), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 2 min) después se drena. Se realiza un ensayo TNBS para verificar la presencia de amina libre.

15

**II-C- Síntesis de la peptidil resina tiazolidina 15**

**[0142]** Esta síntesis se lleva a cabo según el **esquema 7** siguiente:



20

Esquema 7

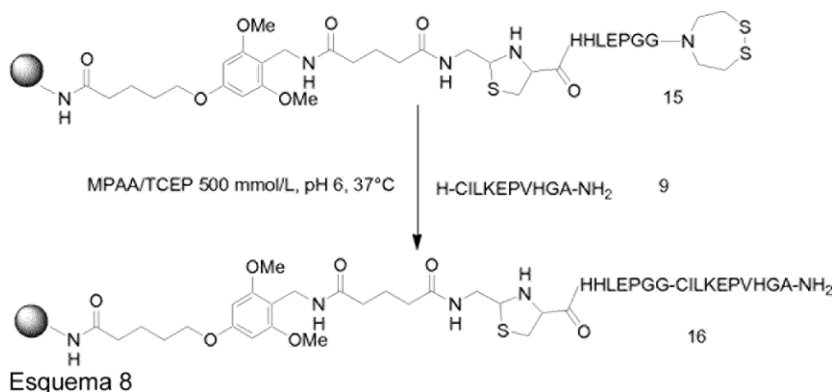
25 **[0143]** **Procedimiento:** El oxidante peryodato de sodio (NaIO<sub>4</sub>) (1,2 mg, 5,7 μmol, 4 eq) se disuelve en un mínimo de tampón fosfato 0,1 M a pH=7,2 después se transfiere en la resina 13 (7,2 mg, 2,9 μmol, 2 eq). El medio reaccional se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente. El exceso de oxidante se neutraliza entonces por la adición de etanol amina (1,4 μL, 22,9 μmol, 16 eq) en la resina. Tras agitación, la resina 14 se lava con tampón fosfato 0,1 M a pH=6.

**[0144]** La manipulación se realiza en caja de guantes ( $[O_2] < 50$  ppm). El péptido **7.1** (2 mg, 1,4  $\mu$ mol, 1 eq) se disuelve en  $V=72$   $\mu$ L de una solución de MPAA 500 mmol/L preparada en tampón fosfato 0,1 M con pH=6. La solución del péptido se transfiere a la resina **14** precedente. El medio reaccional se agita 24 horas a 37 °C. El aldehído en exceso se neutraliza por  $V = 200$   $\mu$ L de una solución de metilhidroxilamina (14 mmol/L preparada en un tampón acetato de amonio con pH=4,5). Después de la agitación, la resina **15** se drena y después se lava ( $3 \times 300$  mL x 2 min) con tampón de fosfato con pH=7,2.

II-D- Ligación del péptido **9** H-CILKEPVHGA-NH<sub>2</sub>. Síntesis de la peptidil resina **16**:

10

**[0145]** Esta síntesis se lleva a cabo según el esquema 8 siguiente:



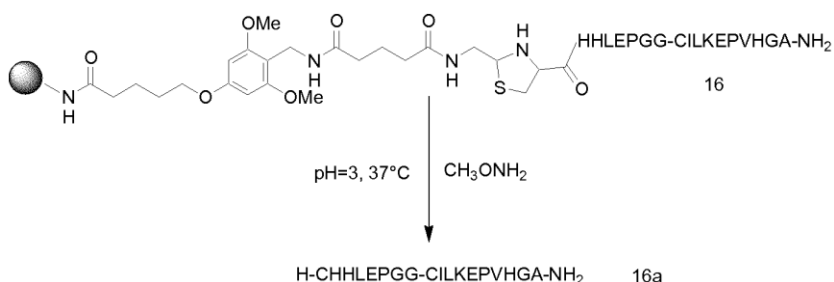
15 **[0146]** Procedimiento: La manipulación se realiza en caja de guantes ( $[O_2] < 50$  ppm). Se prepara una solución de TCEP a 300 mmol/L en un tampón fosfato 0,2 M a pH = 7,2. El ácido 3-mercaptopenilacético (MPAA) (84 mg, 0,5 mmol) se adiciona entonces. El pH de la solución TCEP/MPAA obtenida se ajusta a pH = 6,5.

**[0147]** El péptido **9** (3 mg, 2,1  $\mu$ mol, 1,5 eq) se disuelve en  $V=70$  mL de la solución anterior de TCEP/MPAA después se transfiere a la peptidil resina **15**. El medio reaccional se agita 24 H a  $T=37$  °C. Tras la reacción de ligación, la resina **16** se drena y después se lava con el tampón A: H<sub>2</sub>O/TFA (1:0,05 % en v/v) ( $3 \times 300$  mL x 2 min).

II-E- Corte de la peptidil resina **16**, síntesis del péptido H-CHHLEPGG-CILKEPVHGA-NH<sub>2</sub> **16a**

25 **[0148]**

Esta síntesis se lleva a cabo según el esquema siguiente:



**[0149]** Procedimiento: la manipulación se realiza en caja de guantes ( $[O_2] < 50$  ppm). La peptidil resina **16** se corta por la adición de una solución de  $V= 500$  mL de una solución de metilhidroxilamina (300 mmol/L con pH=3 preparada en tampón fosfato) en agitación durante 3 horas a 37 °C. Las perlas se filtran, se lavan y el filtrado se liofiliza.

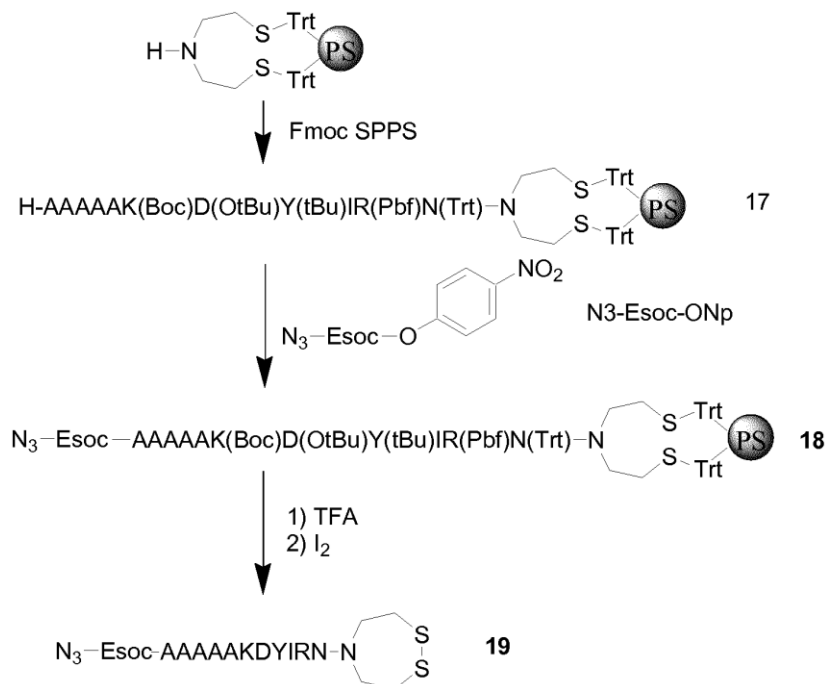
Análisis LC-MS Cromatograma RP-HPLC del péptido **16a** H-CHHLEPGG-CILKEPVHGA-NH<sub>2</sub>

LC-MS: Tampón A: H<sub>2</sub>O/TFA (1:0,05 % en v/v), tampón B: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFA (4:1:0,05 % en v/v/v). RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 mm, 4,6 x 150 mm) utilizando un gradiente lineal A/B: 0-100 % B en 30 min, caudal =1 mL/min, detección ELS. MS: Modo ionización por electrospray positivo, voltaje cono 30V, analizador cuadrupolar. La figura 14 ilustra los espectros RP-HPLC obtenidos: El pico marcado RsMPAA representa los residuos de MPAA. En la figura 15 se observa el espectro de masa.

40 III-Síntesis del péptido H-AAAAAKDYIRN- CIIGKGRSYKGTVSITKSGIK-CQPWSSMIPHEHSFLPSSYRGKDLQENYCRNPRGEEGPPWCFTSNPEVRYEVCDIPQCSEVK(biotina)-NH<sub>2</sub> **29**

III-A- Síntesis del fragmento N<sub>3</sub>-ESOC-AAAAAKDYIRN-SEAoff **19**:

**[0150]** Esta síntesis se lleva a cabo según el esquema siguiente:



5 - Síntesis de la peptidil resina **17** H-AAAAAK(Boc)D(OtBu)Y(tBu)IR(Pbf)N(Trt)-SEA-PS (PS = poliestireno)

**[0151]** Esta peptidil resina se sintetiza a una escala de 0,25 mmole siguiendo el protocolo descrito en Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. *Organic Letters* 2010, 12, 5238-41.

10 **[0152]** Después de la síntesis, la resina se lava sucesivamente con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 2 min) después con DMF (2 x 2 min) y se incorpora en la etapa siguiente.

- Síntesis del fragmento  $\text{N}_3$ -ESOC-AAAAAKDYIRN-SEAoff **19**

15 **[0153]** El brazo activado  $\text{N}_3$ -Esoc-ONp se sintetiza según el procedimiento descrito en WO2011/058188. Este carbonato mixto de 2-[2-(2-azido-etoxi)-etilsulfonilo]-etilo y de 4-nitrofenilo (145 mg, 0,4 mmol, 1,5 eq.) se disuelve en un mínimo de DMF y después se transfiere directamente a la resina **17**. Se adiciona la *N*-metilmorfolina (55  $\mu\text{L}$ , 0,5 mmol, 2 eq). El medio reaccional se agita 12 horas en atmósfera de argón a temperatura ambiente. La resina **18** se lava sucesivamente con DMF (2 x 2 min),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 2 min) y  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 x 2 min) y después se seca al vacío.

20

**[0154]** La desprotección final de las cadenas laterales y el desacoplamiento del péptido de la resina se realizan por la acción de una mezcla TFA/TIS/DMSO/ $\text{H}_2\text{O}$  (20 mL, 92,5/2,5/2,5/2,5 % en v/v) durante 1h30. El péptido se precipita en una mezcla fría de éter dietílico/heptano (200 mL, 1:1 v/v), se centrifuga, después se disuelve en un mínimo de agua y se liofiliza.

25

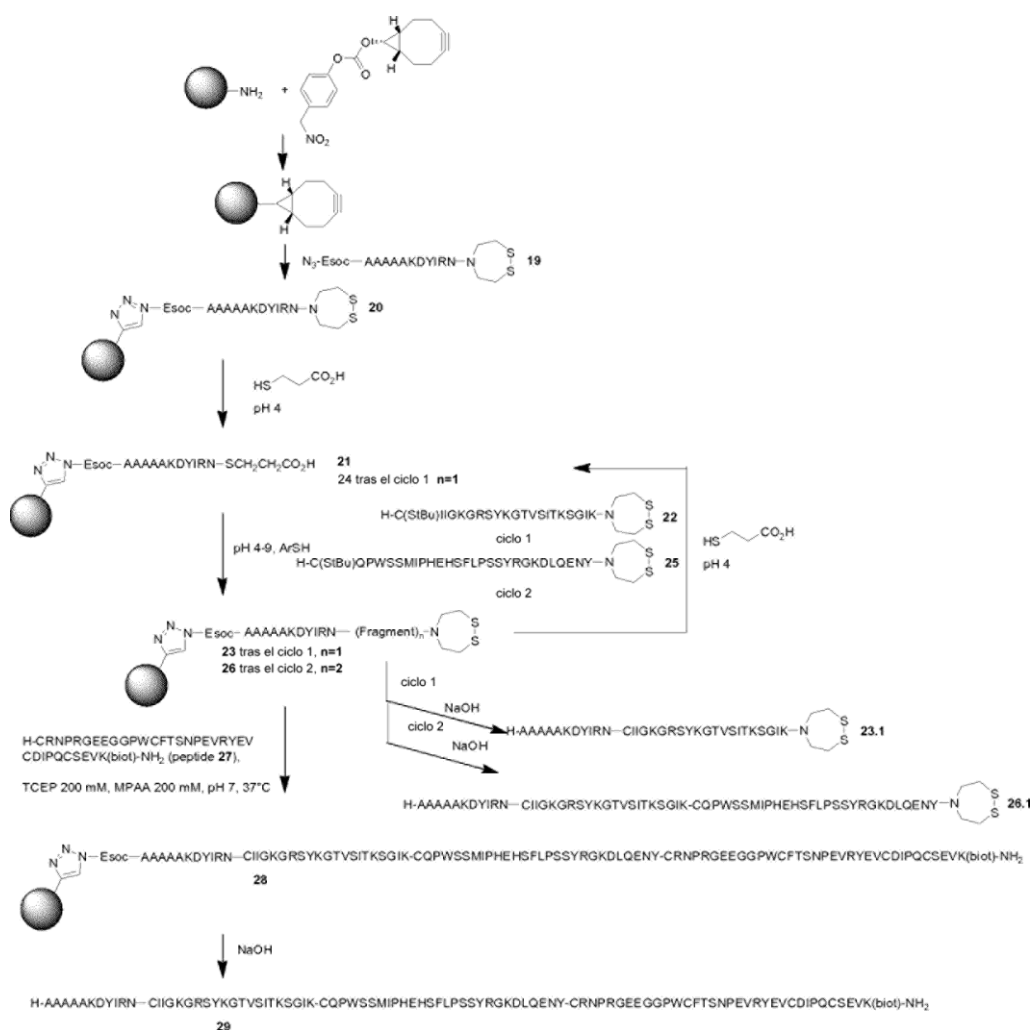
**[0155]** El péptido **19** bruto (100 mg, 0,05 mmol) se disuelve en tampón de fosfato de sodio (26 mL, 0,2 M, pH=7,2) después se oxida en presencia de *N,N,N',N'*-tetrametilazodicarboxamida (TMAD) (18,4 mg, 0,1 mmol, 2 eq) durante 20 minutos. El medio reaccional se purifica directamente por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RPHPLC) (Columna C18 Nucleosil (d=1 cm, L=20 cm, 120 Å, 5  $\mu\text{m}$ ), detección UV ( $\lambda$  215 nm), tampón A:  $\text{H}_2\text{O}$ /TFA (1:0,05 % en v/v), tampón B:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ /TFA (4:1:0,05 % en v/v/v), gradiente: tampón B (0 a 20 % en 5 min después 20 a 42 % en 60 min, 6 mL/min)). Se obtienen 23 mg de péptido **19** (R= 23 %). Análisis LC-MS: Cromatograma RP-HPLC de **19** LC-MS: Tampón A:  $\text{H}_2\text{O}$ /TFA (1/0,05 % v/v), Tampón B:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ /TFA (4/1/0,05 % en v/v/v). RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 mm, 4,6 x 150 mm) utilizando un gradiente lineal 0-100 % B en 30 min, caudal 1 mL/min, detección ELS. MS: Modo ionización por electrospray positivo, voltaje cono 30V, analizador cuadrupolar. La figura 16 ilustra los espectros RP-HPLC obtenidos. En la figura 17 se observa el espectro de masa.

30

35

### III-B- Síntesis del péptido **29**

40 **[0156]** Esta síntesis se lleva a cabo según el esquema siguiente:



- Injertado del péptido 19 en un soporte sólido ciclooctino. Preparación del soporte 20:

5 **[0157]** El carbonato mixto de biciclo[6,10]non-4-in-9-ilmtilo y de 4-nitrofenil (176 mg, 0,56 mmol, 3 eq), preparado según el procedimiento descrito en Dommerholt, J. et al., *Angewandte Chem., Int. Ed.* 2010, 49, 9422-9425, se disuelve en el mínimo de DMF y después se transfiere directamente sobre la resina aminometilo PEGA1900 (0,4 mmol/g). Se adiciona *N,N*-diisopropiletilamina (370  $\mu\text{L}$ , 3,36 mmol, 6 eq). El medio reaccional se agita 16 horas en atmósfera de argón a temperatura ambiente. La resina se lava sucesivamente con DMF (2 x 2 min),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 2 min), 20 % de piperidina en DMF después la mezcla MeOH/DMF/AcOH (9:9:2) (5 x 2 min), y MeOH (2 x 2 min).

15 **[0158]** La resina alquina resultante (2 eq) se añade a una solución del azidopéptido 19 (8.2  $\mu\text{mol}$ ) en 2,4 ml una mezcla 8:2 de agua (desionizada) y de acetonitrilo con 0,1 % de TFA. La suspensión se agita a temperatura ambiente durante 80 horas. La peptidil resina 20 se lava a continuación abundantemente sucesivamente con: acetonitrilo con 0,1 % de TFA, agua con 0,1 % de TFA, agua, MeOH, DMF, MeOH y por último agua.

- Caracterización de la peptidil resina 20. Desacoplamiento del péptido y formación del péptido 21 en solución (HAAAAAKDYIRN-SEAoff 21)

20 **[0159]** 20 % de piperidina en DMF, MeOH/DMF/AcOH (9:9:2), DMF, MeOH, y por último agua. Análisis HPLC: Cromatograma RP-HPLC de 21. Tampón A:  $\text{H}_2\text{O/TFA}$  (1:0,1 % v/v), Tampón B:  $\text{CH}_3\text{CN/TFA}$  (1:0,1 % v/v). RP-HPLC sobre una columna C18 Nucleosil (300 Å, 5 mm, 4,6 x 250 mm) utilizando un gradiente lineal 25-45 % B en 20 min, caudal 1 mL/min, detección DAD.

**[0160]** La figura 18 ilustra los espectros RP-HPLC obtenidos. En la figura 19 se observa el espectro de masa del producto 21.

30 - Síntesis del péptido 22 H-C(StBu)IIGKGRSYKGTVSITKSGIK-SEAoff

**[0161]** Este péptido se sintetiza a una escala de 0,25 mmole siguiendo el protocolo descrito en Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Organic Letters 2010, 12, 5238-41.

5 - Síntesis del péptido **25** H-C(StBu)QPWSSMIPHEHSFLPSSYRGKDLQENY-SEAoff

**[0162]** Este péptido se sintetiza a una escala de 0,25 mmole siguiendo el protocolo descrito en Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Organic Letters 2010, 12, 5238-41.

10 - Síntesis del péptido **27**

**[0163]** H-CRNPRGEEGGPWCFSTNPEVRYEVCDDIPQCSEVK(biotina)-NH<sub>2</sub>

Este péptido se sintetiza a una escala de 0,25 mmole siguiendo el protocolo descrito en Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. Organic Letters 2010, 12, 5238-41.

15

Transformación de la resina **20** en resina tioéster **21**

**[0164]** Se prepara una solución tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) a 200 mmol/L en un tampón fosfato 0,2 M en presencia de guanidina (6M) a pH = 7,2. Se adiciona entonces el ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) (5 % en vol, 20 0,05 mL, 0,58 mmol). El pH de la solución obtenida se ajusta a pH = 4.

**[0165]** La solución anterior (V=150 mL) se introduce en la resina **20** (0,5 µmol) acondicionada en una jeringa equipada de un sinterizado. El medio reaccional se agita 24 h a T = 37 °C. La resina se lava (3x 150 µL x 1 min) con una solución de ácido 3-mercaptofenilacético (MPAA, 300 mmol/L) preparada en un tampón fosfato de sodio 0,1 M en presencia de guanidina (6M) a pH=7,2.

25

- Ligación del péptido **22** H-C(StBu)IIGKGRSYKGTVSITKSGIK-SEAoff Síntesis de la peptidil resina **23**

**[0166]** El experimento se realiza en caja de guantes ([O<sub>2</sub>] <50 ppm). El péptido **22** (2,3 mg, 0,75 mmol, 1,5 eq) se disuelve en la solución anterior de MPAA (150 µL, 300 mmol/L, tampón fosfato 0,1 M en presencia de guanidina (6M) con pH=7,2) después se transfiere a la peptidil resina **21**. El medio reaccional se agita 24 h a 37 °C. Tras la reacción, la resina se drena y después se lava con el tampón fosfato de sodio 0,2 M en presencia de guanidina (6M) con pH=7,2 (3x 150 mL x 2 min).

30

**[0167]** Análisis LC-MS: Cromatograma RP-HPLC de **23.1** obtenido después del desacoplamiento del péptido en medio básico a partir de la peptidil resina **23** (figura 20).

**[0168]** LC-MS: Tampón A: H<sub>2</sub>O/TFA (1/0,05 % v/v), Tampón B: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFA (4/1/0,05 % v/v/v). RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 mm, 4,6 x 150 mm) utilizando un gradiente lineal 0-100 % B en 30 min, caudal 1 mL/min, detección ELS. MS: Modo ionización por electrospray positivo, voltaje cono 30V, analizador cuadrupolar (figura 21).

40

**[0169]** La peptidil resina **23** se transforma en resina **24** tioéster de MPA utilizando el protocolo utilizado anteriormente para la transformación de **20** en **21**.

45

- Ligación del péptido **25** H-C(StBu)IIGKGRSYKGTVSITKSGIK-SEAoff. Síntesis de la peptidil resina **26**

**[0170]** El péptido **25** (3 mg, 0,75 µmol, 1,5 eq) se pone en reacción la peptidil resina **24** utilizando un protocolo de síntesis estrictamente idéntico al utilizado para la síntesis de la resina peptidil **23** (ciclo 1). Análisis LC-MS: Cromatograma RP-HPLC del péptido **26,1** obtenido después del desacoplamiento del péptido en medio básico a partir de la peptidil resina **26** (figura 22).

50

**[0171]** LC-MS: Tampón A: H<sub>2</sub>O/TFA (1/0,05 % v/v), Tampón B: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFA (4/1/0,05 % en v/v/v). RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 mm, 4,6 x 150 mm) utilizando un gradiente lineal 0-100 % B en 30 min, caudal 1 mL/min, detección ELS. MS: Modo ionización por electrospray positivo, voltaje cono 30V, analizador cuadrupolar (figura 23).

55

- Síntesis del péptido **29**

**[0172]** La reacción se realiza en una caja de guantes ([O<sub>2</sub>] <50 ppm) en atmósfera de nitrógeno. Se prepara una solución de TCEP a 200 mmol/L en un tampón fosfato 0,2 M en presencia de guanidina (6M) a pH = 7,2. El ácido 3-mercaptofenilacético (MPAA 33 mg, 0,2 mmol) se adiciona entonces. El pH de la solución TCEP/MPAA obtenida se ajusta a pH = 6,5.

60

**[0173]** El péptido **27** (3,4 mg, 0,75 µmol, 1,5 eq) se disuelve en la solución anterior de TCEP/MPAA (150 µL) después se transfiere a la peptidil resina **26**. El medio reaccional se agita 24 h a 37 °C. Tras la reacción de ligación,

65

la peptidil resina **28** se drena y después se lava con el tampón fosfato de sodio 0,2 M en presencia de guanidina (6M) a pH=7,2.

- Corte de la peptidil resina **28**, síntesis del péptido **29**

5

**[0174]** La manipulación se realiza en caja de guantes ([O<sub>2</sub>] <50 ppm). La peptidil resina **28** se corta por la adición de una solución de NaOH (500 mL, 10-2 M), en agitación durante 5 min a 37 °C. Las perlas se filtran, se lavan y el filtrado se liofiliza.

10 Análisis LC-MS

**[0175]** Cromatograma RP-HPLC del péptido **29** (figura 24) LC-MS: Tampón A: H<sub>2</sub>O/TFA (1/0,05 % v/v), Tampón B: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/TFA (4/1:0,05 % v/v/v). RP-HPLC sobre una columna C18 Xbridge BEH (300 Å, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm) utilizando un gradiente lineal 0-100 % B en 30 min, caudal 1 mL/min, detección ELS. MS: Modo ionización por electro spray positivo, voltaje cono 30V, analizador cuadrupolar (figura 25).

LISTA DE SECUENCIAS

**[0176]**

20

<110> Centro Nacional de Investigaciones Científicas CNRS

<120> Procedimiento de síntesis de proteínas

<130> 33259 FR

<160> 9

25 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido X1

<400> 1

	<b>Gly</b>	<b>Ile</b>	<b>Leu</b>	<b>Lys</b>	<b>Glu</b>	<b>Pro</b>	<b>Val</b>	<b>Gln</b>	<b>Gly</b>	<b>Ala</b>
35	1				5					10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 9

45 <400> 2

	<b>Cys</b>	<b>Ile</b>	<b>Leu</b>	<b>Lys</b>	<b>Glu</b>	<b>Pro</b>	<b>Val</b>	<b>His</b>	<b>Gly</b>	<b>Ala</b>
	1				5					10

<210> 3

50 <211> 36

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Péptido 11a

<400> 3

ES 2 702 786 T3

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

Gly Gly Cys His His Leu Glu Pro Ala Gly Cys Ile Leu Lys Glu Pro  
 20 25 30

Val His Gly Ala  
 35

<210> 4  
 <211> 18  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido 16a  
 10 <400> 4

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

Gly Ala

<210> 5  
 15 <211> 94  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <223> Péptido 29

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (94)..(94)  
 25 <223> Xaa es Lys biotinilada  
 <400> 5

Ala Ala Ala Ala Ala Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile Gly Lys  
 1 5 10 15

Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys  
 20 25 30

Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Phe Leu Pro  
 35 40 45

Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro  
 50 55 60

Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val  
 65 70 75 80

Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Xaa  
 85 90



<210> 6  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Péptido 21

<220>  
 10 <221> VARIANTE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa es Asn-SEAoff en el que SEAoff significa bis(2-sulfaniletíl)amino cíclico  
 <400> 6

15 Ala Ala Ala Ala Ala Lys Asp Tyr Ile Arg Xaa  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido 22  
 <220>

25 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa en posición 1 es Cys(StBu) en el que StBu significa terc-butíl sulfenilo

<220>  
 30 <221> VARIANTE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa en posición 21 es Lys-SEAoff, en el que SEAoff significa bis(2-sulfaniletíl)amino cíclico  
 <400> 7

Xaa Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr  
 1 5 10 15

35 Lys Ser Gly Ile Xaa  
 20

<210> 8  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido 25

45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa en posición 1 es Cys(StBu) en el que StBu significa terc-butíl sulfenilo  
 <220>

50 <221> VARIANTE  
 <222> (28)..(28)  
 <223> Xaa en posición 28 es Tyr-SEAoff en el que SEAoff significa bis(2-sulfaniletíl)amino cíclico  
 <400> 8

ES 2 702 786 T3

Xaa Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Phe Leu Pro  
1 5 10 15

Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Xaa  
20 25

<210> 9

<211> 34

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido 27

10 <220>

<221> VARIANTE

<222> (34)..(34)

<223> Xaa es Lys biotilada

<400> 9

15

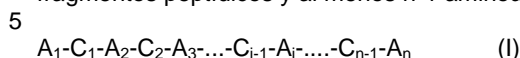
Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser  
1 5 10 15

Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu  
20 25 30

Val Xaa

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de ensamblaje de fragmentos peptídicos para fabricar un polipéptido que comprende n fragmentos peptídicos y al menos n-1 aminoácidos que portan un grupo funcional tiol, representado por la fórmula:



en la que

-  $A_1, A_2, A_3, \dots, A_i, \dots, A_n$  son fragmentos peptídicos,

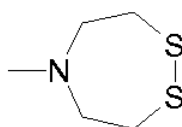
10 -  $C_1, C_2, C_3 \dots C_{i-1} \dots C_{n-1}$  son restos de aminoácidos portadores de un grupo funcional tiol,

- n está comprendido entre 3 y 50,

e

- i es un número entero cualquiera comprendido entre 2 y n, en el que este procedimiento implica:

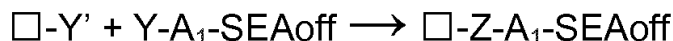
15 (a1) al menos una etapa de preparación de un fragmento  $Y-A_1-SEAoff$  (II<sub>1</sub>) en el que  $A_1$  representa un fragmento peptídico cuyo extremo C-terminal porta un grupo bis(2-sulfaniletíl)amino cíclico denominado SEAoff, y



20 en el que Y es un fragmento capaz de reaccionar con un grupo funcional de un soporte sólido de manera que forma una unión entre  $A_1$  y un soporte sólido;

(b) al menos una etapa de reacción de  $Y-A_1-SEAoff$  (II<sub>1</sub>) con un soporte sólido indicado como  $\square-Y'$ , en el que  $\square$  representa el soporte sólido en sí e  $Y'$  representa grupo funcional reactivo capaz de reaccionar con Y para formar un grupo Z según el esquema:

25

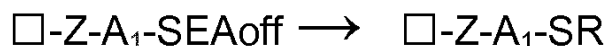


(II<sub>1</sub>)

(III<sub>1</sub>)

(a2) al menos una etapa de preparación de un fragmento  $H-C_1(PG_1)-A_2-SEAoff$  (II<sub>2</sub>) en el que  $C_1, A_2$  y SEAoff son como se han definido anteriormente y  $(PG_1)$  representa H o un grupo protector del tiol del aminoácido  $C_1$ ;

30 (c1) al menos una etapa de preparación de un péptido tioéster de fórmula (III'<sub>1</sub>) a partir del bis(2-sulfaniletíl)amino péptido  $\square-Z-A_1-SEAoff$  (III<sub>1</sub>) según el esquema:



(III<sub>1</sub>)

(III'<sub>1</sub>)

35 por acción de un tiol R-SH, opcionalmente en presencia de un agente reductor de los disulfuros cíclicos, en el que R puede ser un radical alquilo o arilo opcionalmente sustituido;

(d1) al menos una etapa de condensación de (III'<sub>1</sub>) en el fragmento peptídico (II<sub>2</sub>) en presencia de un tiol aromático ArSH en condiciones en las que  $PG_1$  se elimina cuando es diferente de H:



40

(III'<sub>1</sub>)

(II<sub>2</sub>)

(III<sub>2</sub>)

(an-1) al menos una etapa de preparación de un fragmento  $C_{n-1}(PG_{n-1})-A_n$ , en el que  $(PG_{n-1})$  representa H o un grupo protector del tiol del aminoácido  $C_{n-1}$ ;

(dn-1) Al menos una etapa de condensación de  $C_{n-1}(PG_{n-1})-A_n$  con

45



en presencia de un tiol aromático ArSH en condiciones en las que  $PG_{n-1}$  se elimina cuando es diferente de H para dar:

50

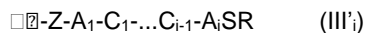


en el que dicho procedimiento comprende además, para cualquier  $i = 2, \dots, n-2$ ,

(ci) al menos una etapa de transformación de



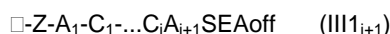
en



10 por acción de un tiol R-SH, opcionalmente en presencia de un agente reductor de disulfuros cíclicos,  
(di) al menos una etapa de condensación de  $\text{C}_i(\text{PG}_i)\text{A}_{i+1}\text{SEAoff}$  en el que (PG<sub>i</sub>) representa H o un grupo protector del tiol del aminoácido C<sub>i</sub>, en presencia de un tiol aromático ArSH en condiciones en las que PG<sub>i</sub>, cuando es diferente de H, se elimina, con



para dar



20

2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además:

(e) una etapa de desacoplamiento del péptido  $\text{A}_1\text{-C}_1\text{-A}_2\text{-}\dots\text{-C}_{i-1}\text{A}_i\text{-}\dots\text{-C}_{n-1}\text{A}_n$  (I) del soporte sólido.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el soporte sólido  $\square$  se elige  
25 entre resinas, en particular entre resinas a base de poliestireno, poli(acrilamida), polietilenglicol, celulosa, polietileno, poliéster, látex, poliamida, polidimetilacrilamida, polímeros hidrófilos sintéticos o naturales, perlas de vidrio, geles de sílice.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que C<sub>1</sub>,...C<sub>i</sub>,...C<sub>n</sub> son cisteínas.

30

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que PG<sub>1</sub>,... PG<sub>i</sub>,... PG<sub>n</sub> son grupos terc-butil sulfenilo.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que:

35

- Y' comprende un grupo funcional elegido entre una azida, e Y se elige entre los grupos que comprenden un grupo funcional alquino, o

- Y' comprende un grupo funcional alquino e Y se elige entre los grupos que comprenden un grupo funcional azida o

- Y' comprende un grupo funcional aldehído, en el que Y es H y el aminoácido N-terminal de A<sub>1</sub> se elige entre una

40

cisteína, una serina o una treonina, o

- Y' comprende un grupo funcional aldehído, en el que Y comprende un grupo NH<sub>2</sub> capaz de formar una base de Schiff.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que R se elige entre un radical alquilo que comprende de 1 a 12 átomos de carbono, lineal o ramificado, opcionalmente sustituido, o arilo C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>, opcionalmente sustituido.

45

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que, para cualquier  $i = 2, \dots, n-2$ , las etapas di) del procedimiento se llevan a cabo en condiciones en las que PG<sub>i</sub> se elimina selectivamente in situ, sin afectar a SEAoff y el disolvente de la reacción es un tampón acuoso, de pH comprendido entre 4 y 9, que contiene un tiol aromático.

50

9. Procedimiento de fabricación de un medicamento que comprende al menos:

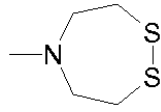
55 - la fabricación de al menos un polipéptido según el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y  
- su asociación con un soporte farmacéuticamente aceptable.

10. Soporte sólido injertado con un péptido y que responde a la siguiente fórmula (III<sub>1</sub>):

60



en la que A<sub>1</sub> representa un fragmento peptídico, cuyo extremo C-terminal porta un grupo bis(2-sulfaniletíl)amino cíclico



denominado SEAoff, en el que □ representa un soporte sólido y Z representa un grupo de unión entre A<sub>1</sub> y □.

- 5 11. Kit de síntesis de polipéptidos que comprende al menos un soporte que tiene al menos una zona de recepción sobre la cual o en la cual se coloca al menos un soporte sólido injertado según la reivindicación 10.

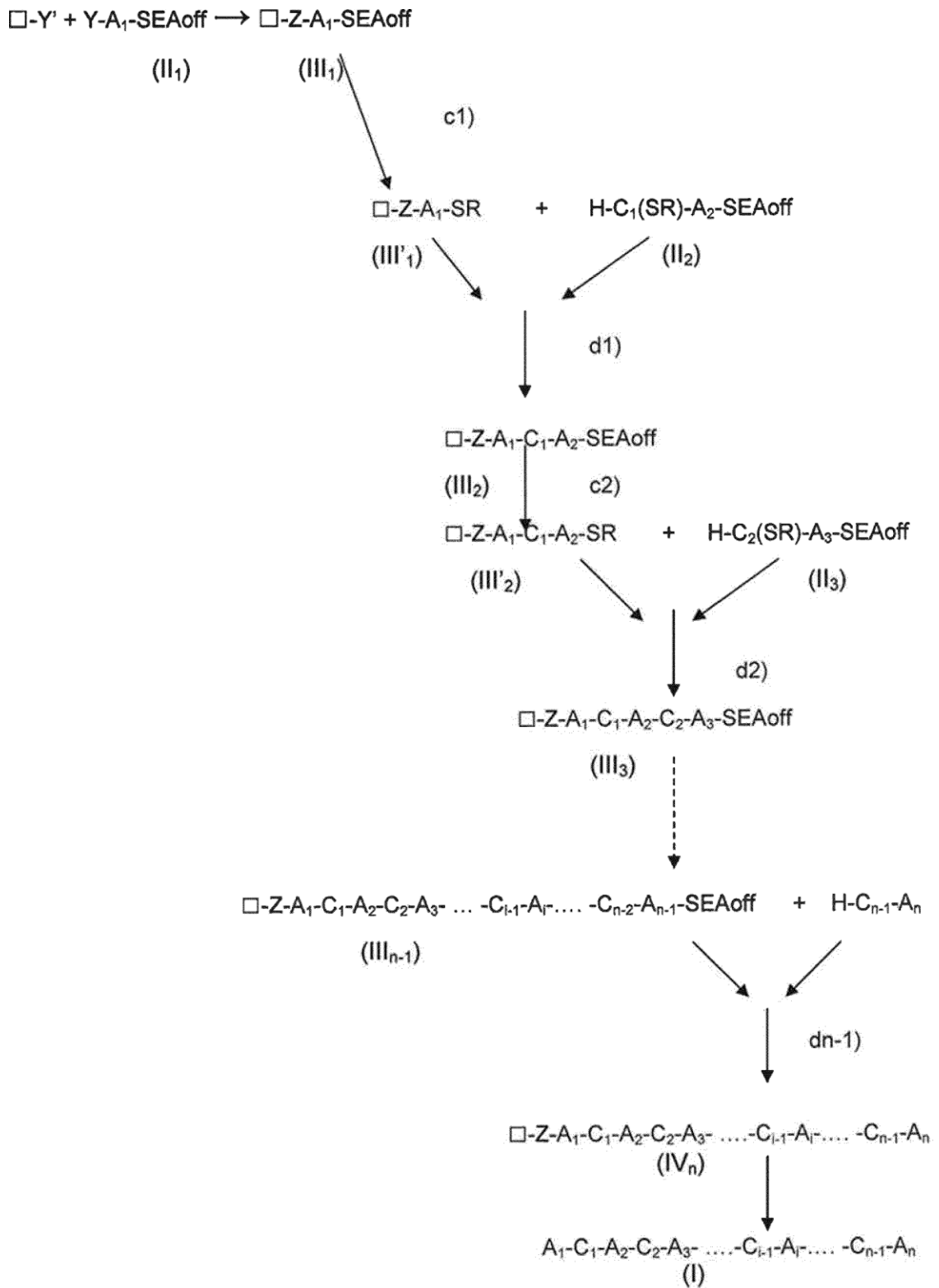


FIGURA 1

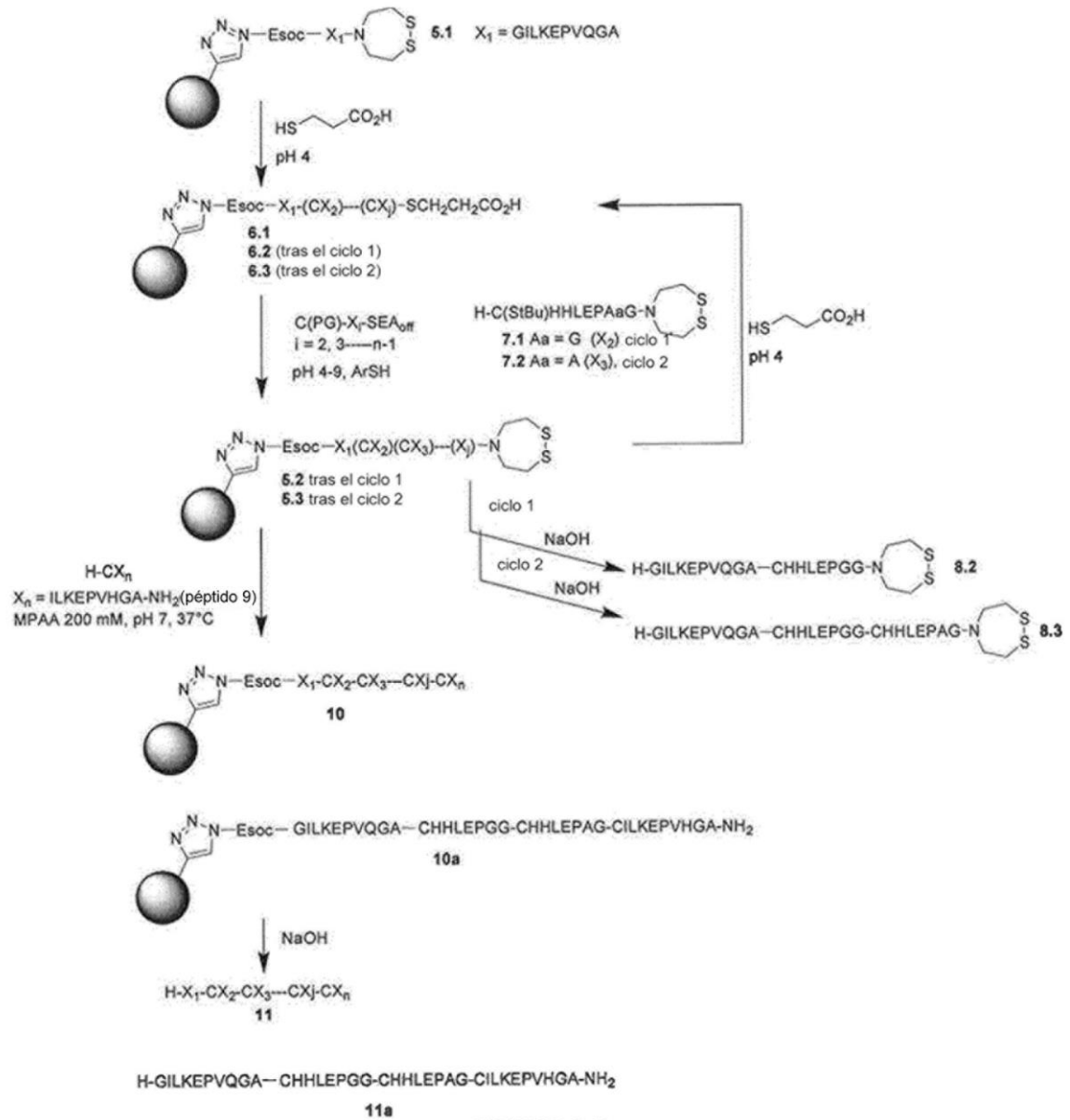


FIGURA 2

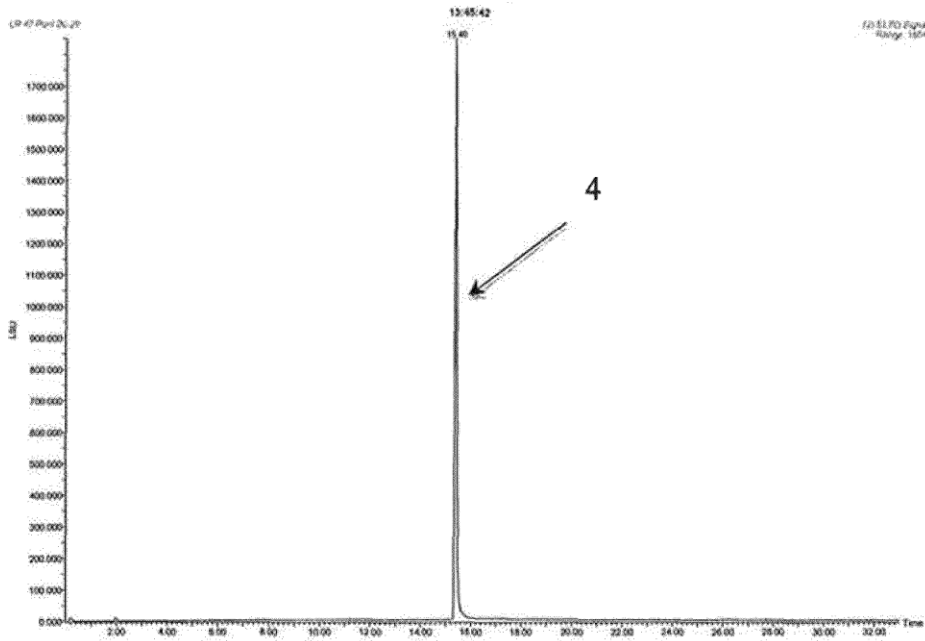


FIGURA 3

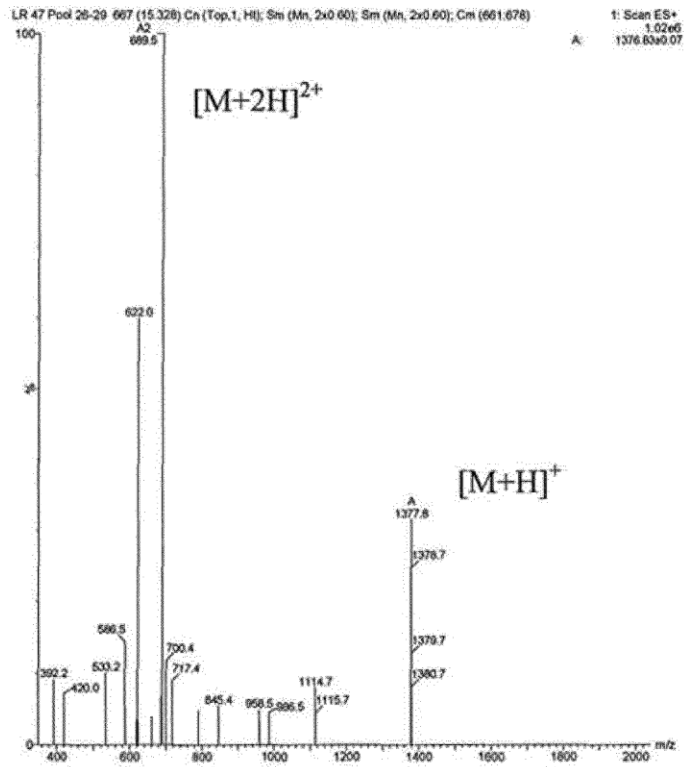


FIGURA 4



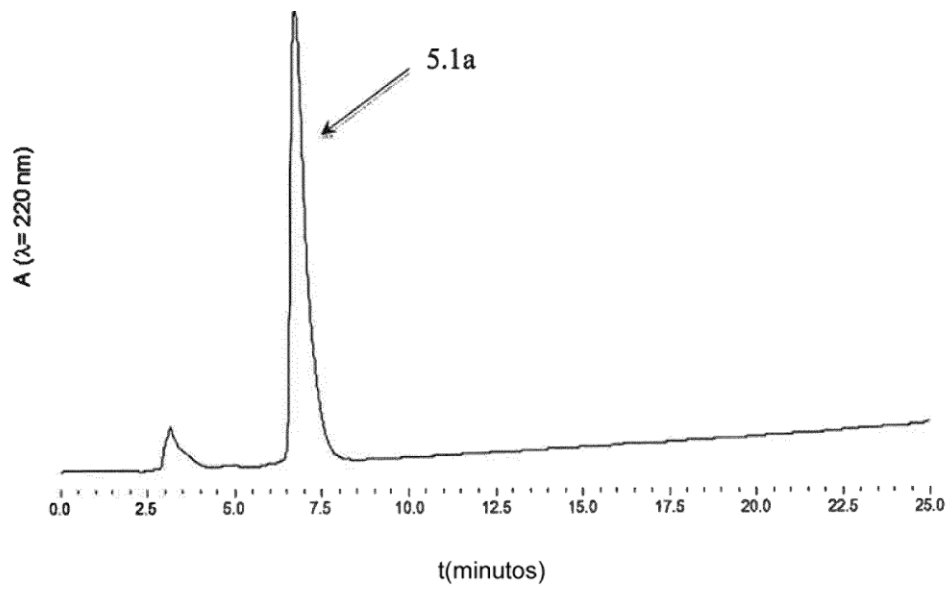


FIGURA 5

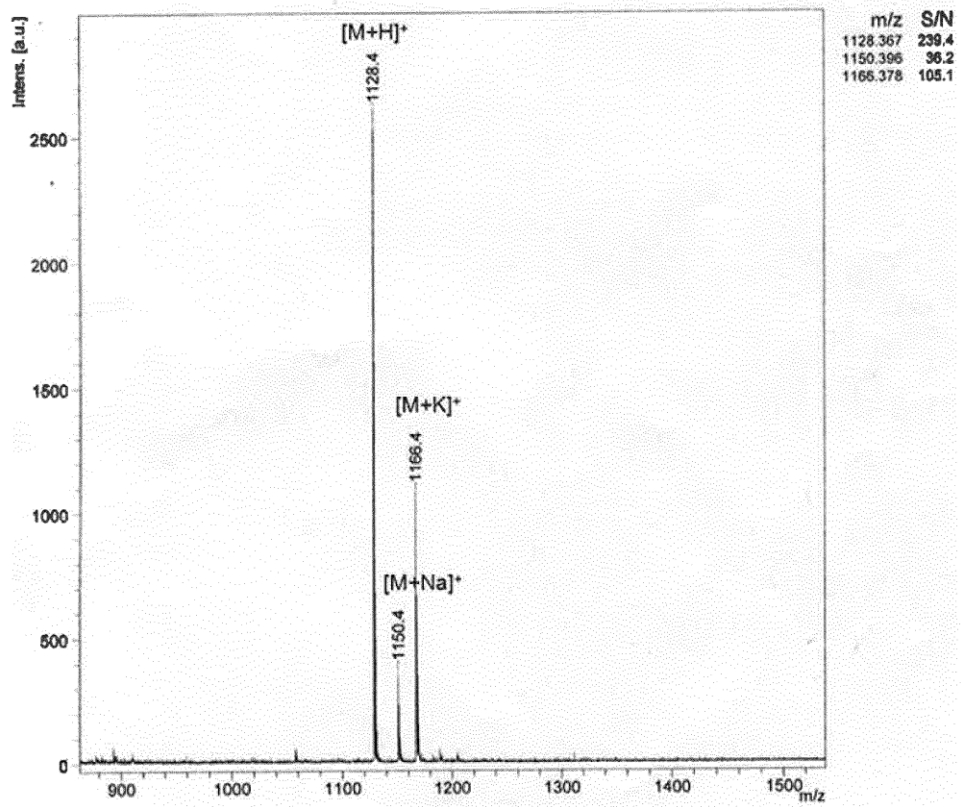


FIGURA 6

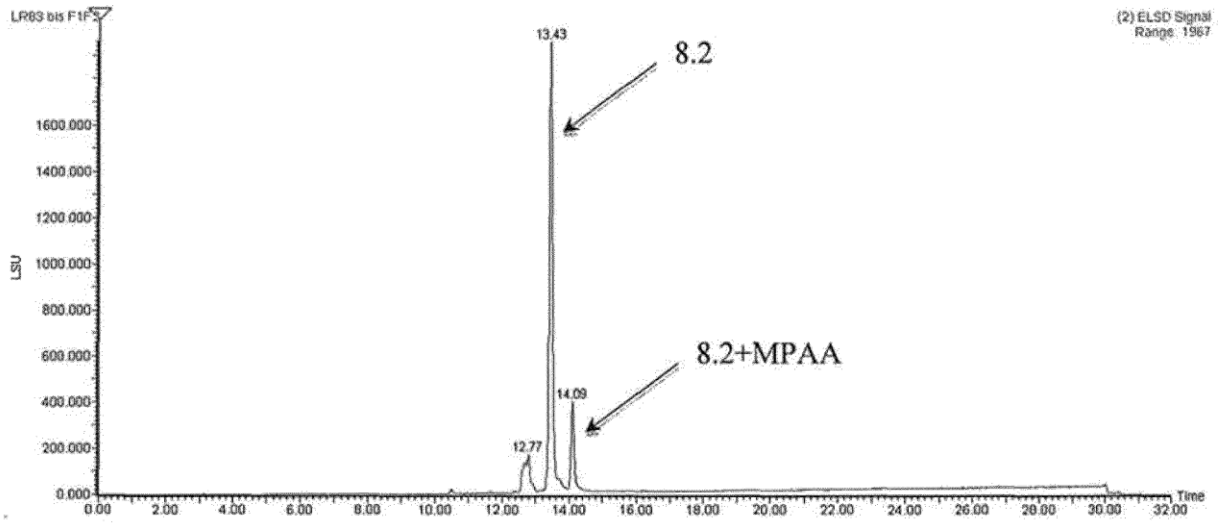


FIGURA 7

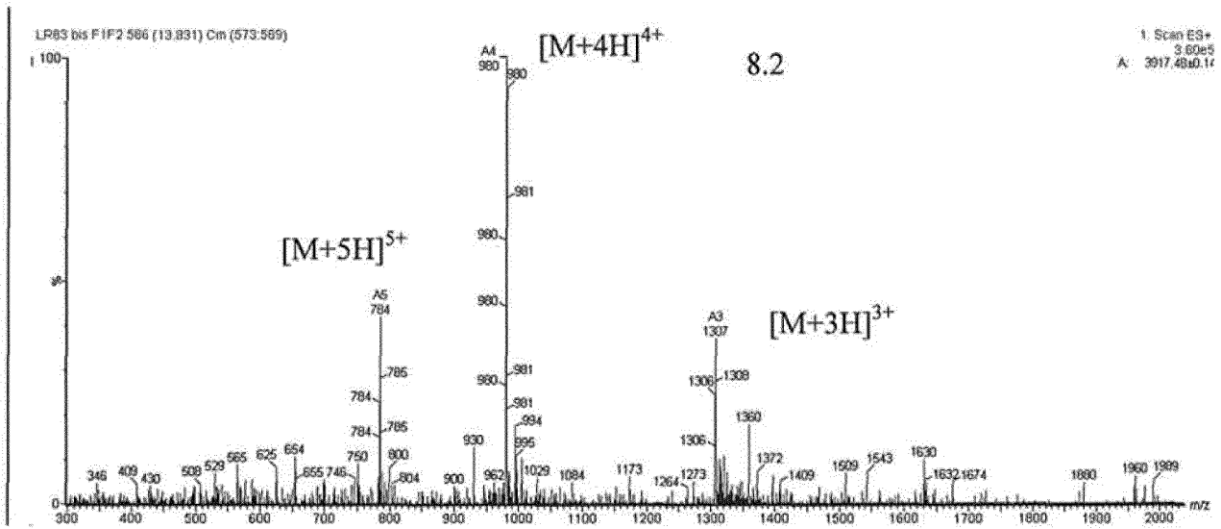


FIGURA 8

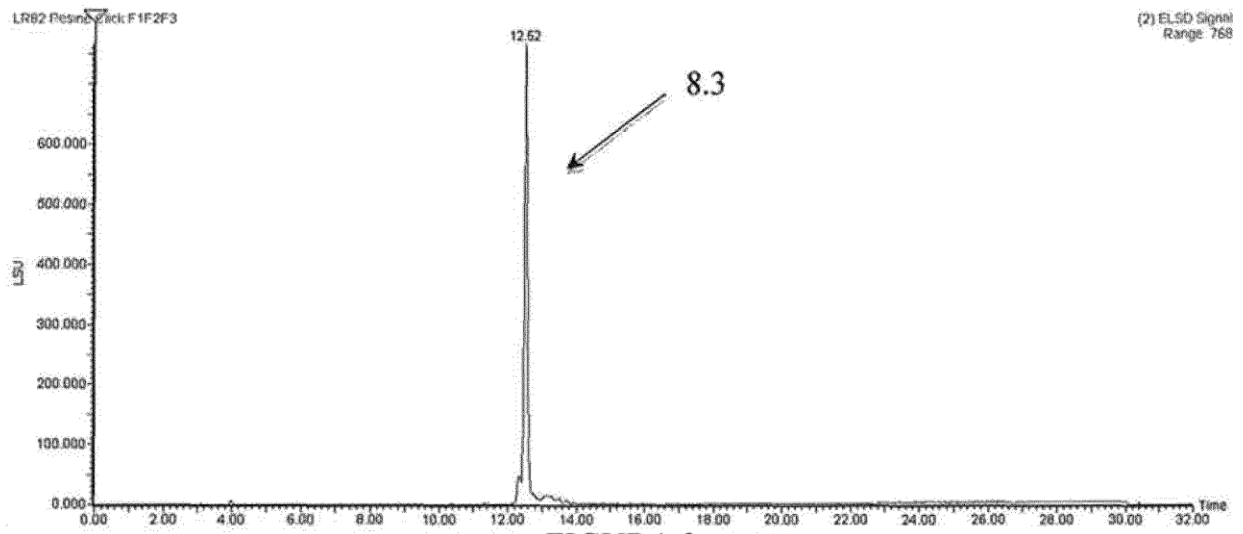


FIGURA 9

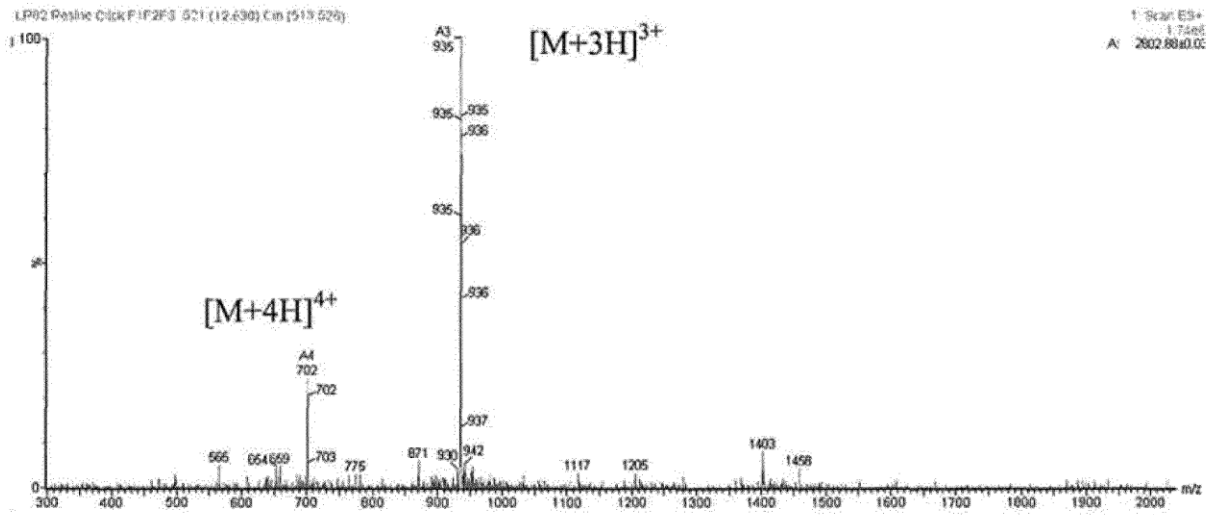


FIGURA 10

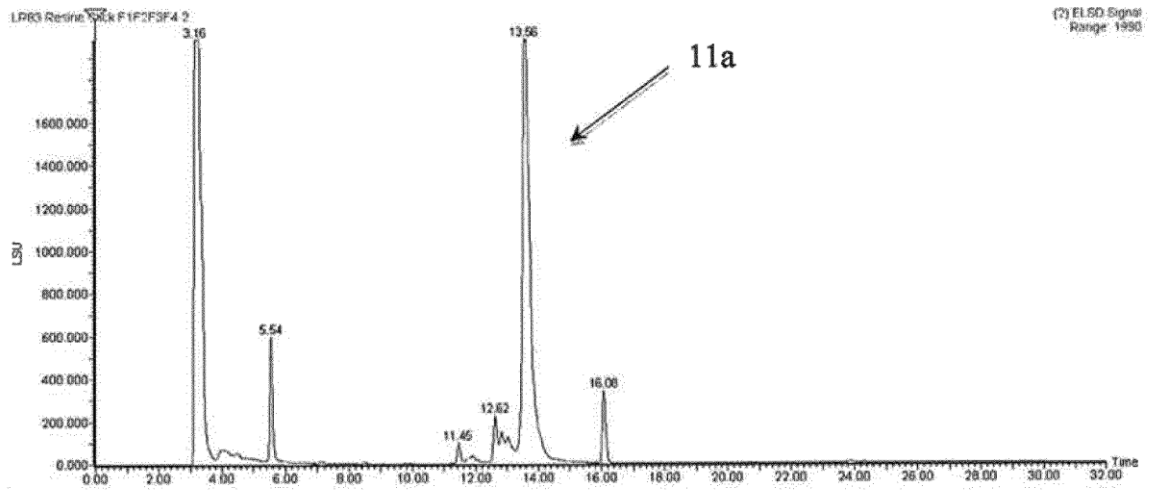


FIGURA 11

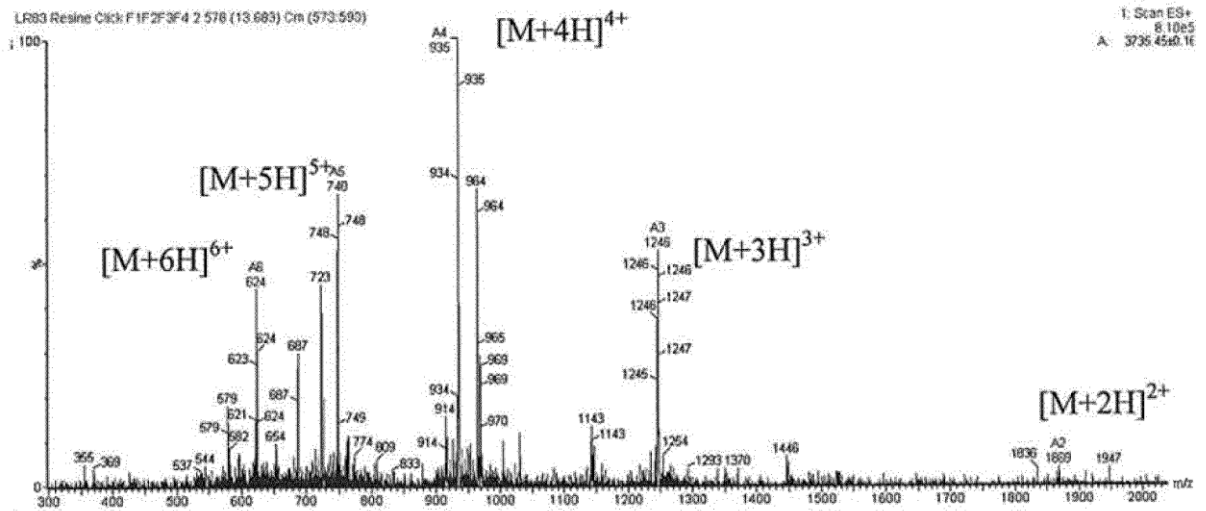


FIGURA 12

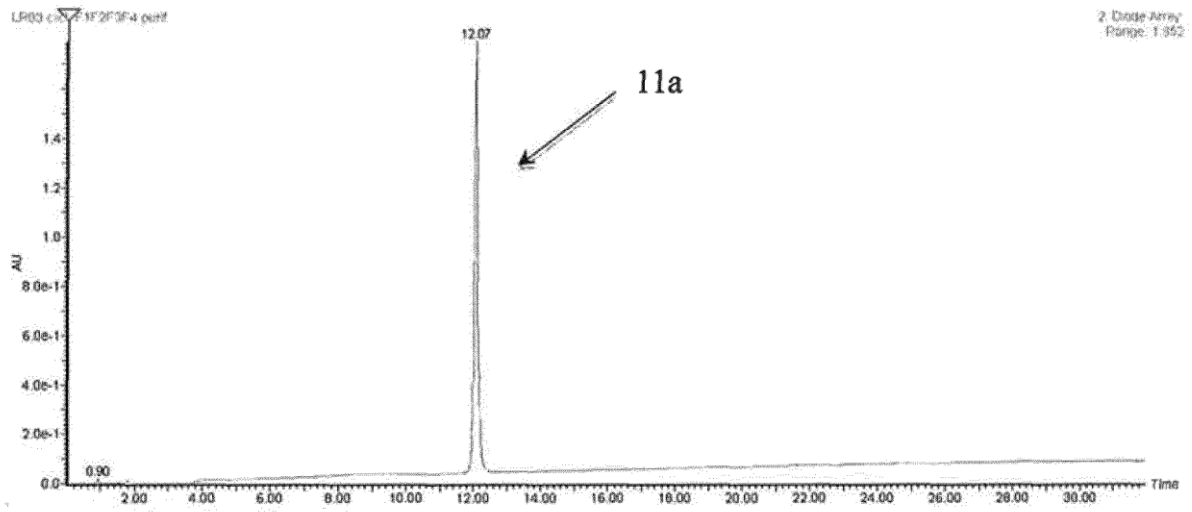


FIGURA 13

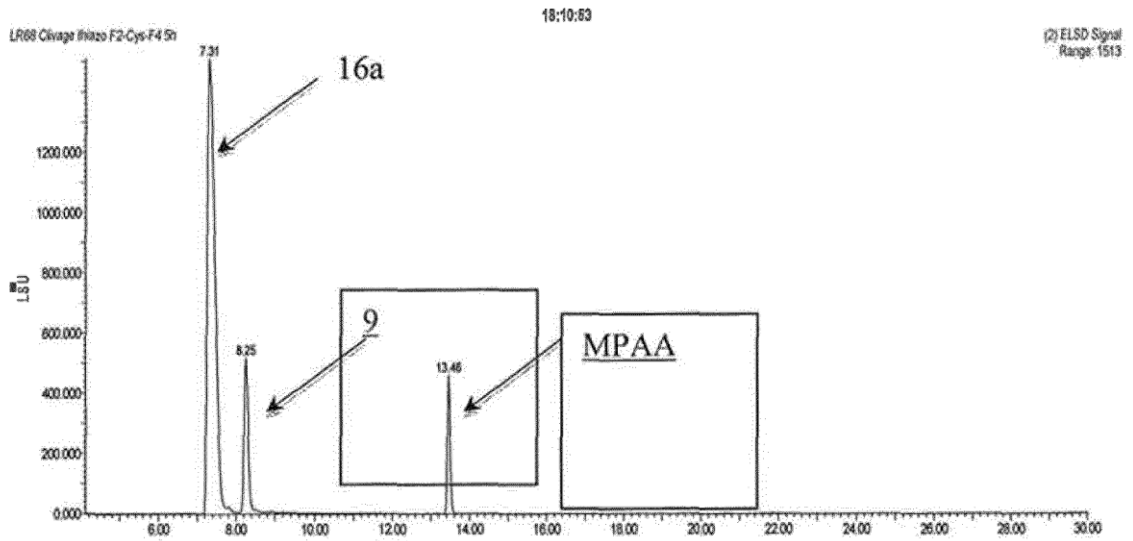


FIGURA 14

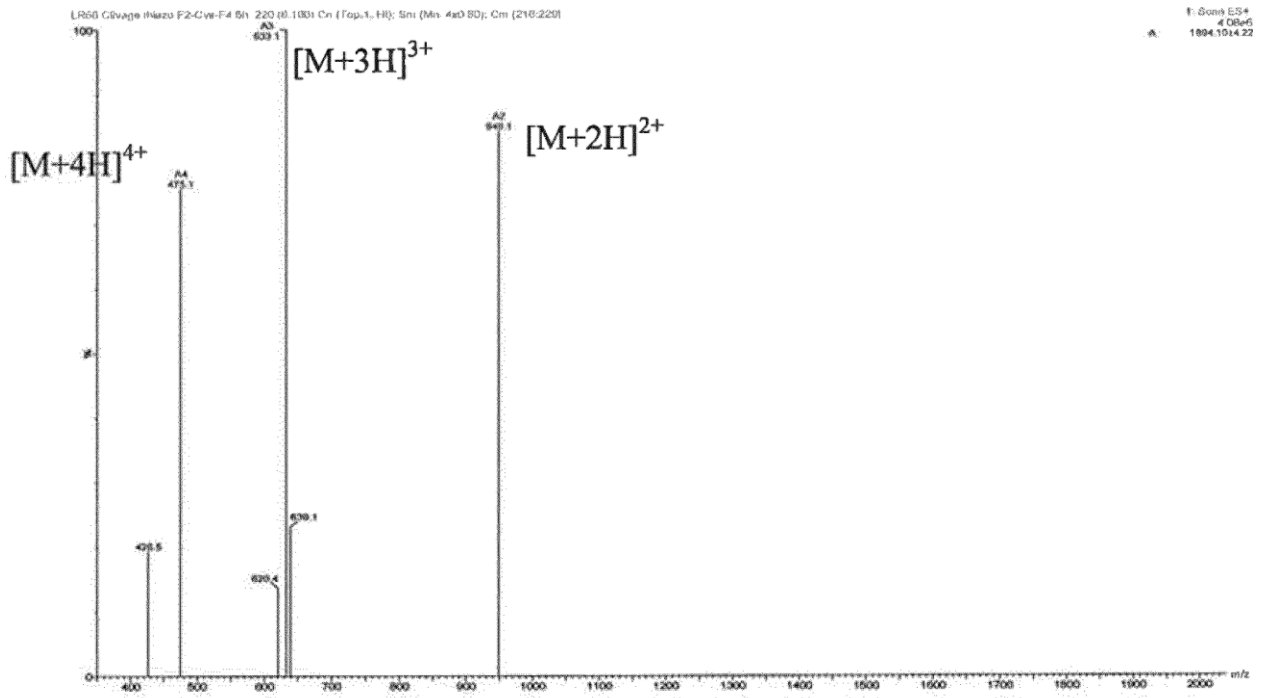


FIGURA 15

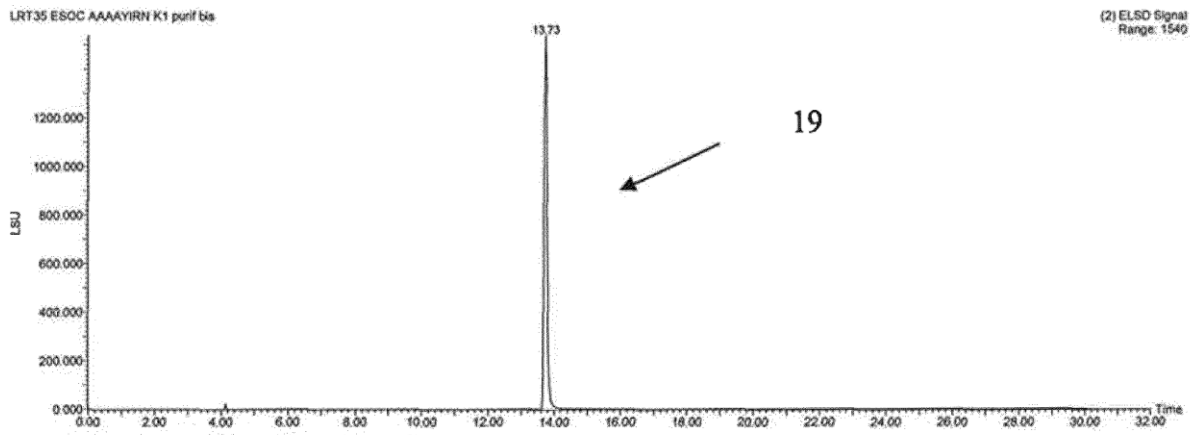


FIGURA 16

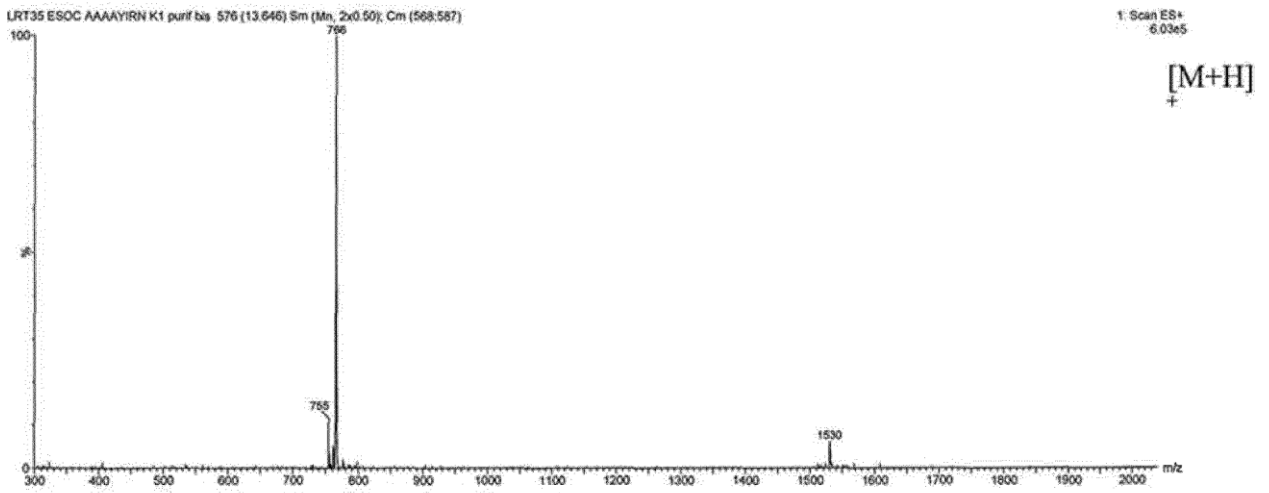


FIGURA 17

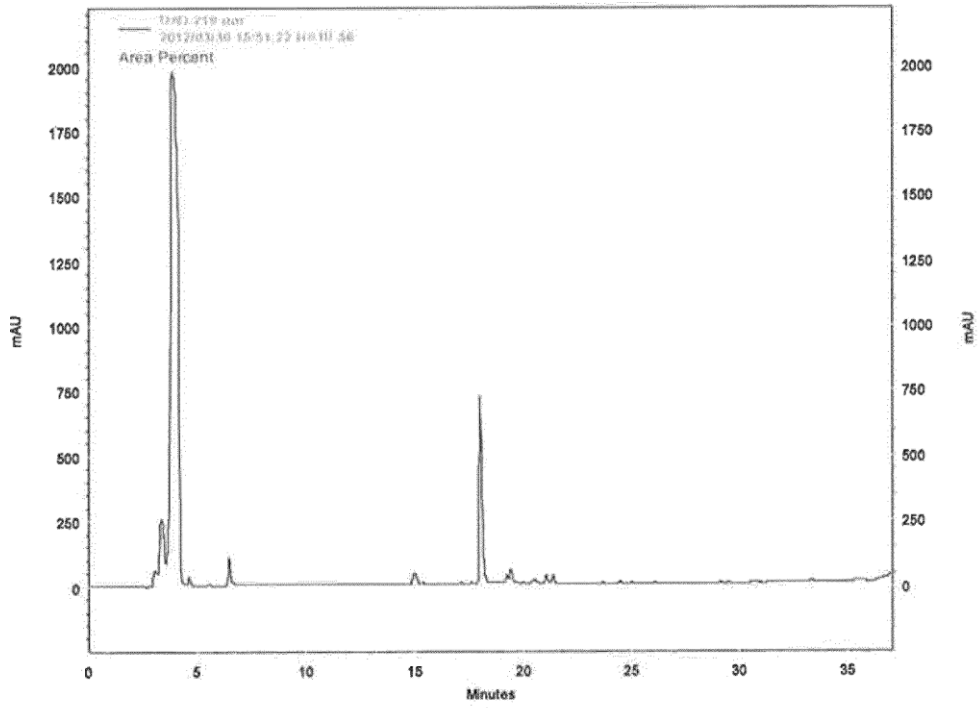


FIGURA 18

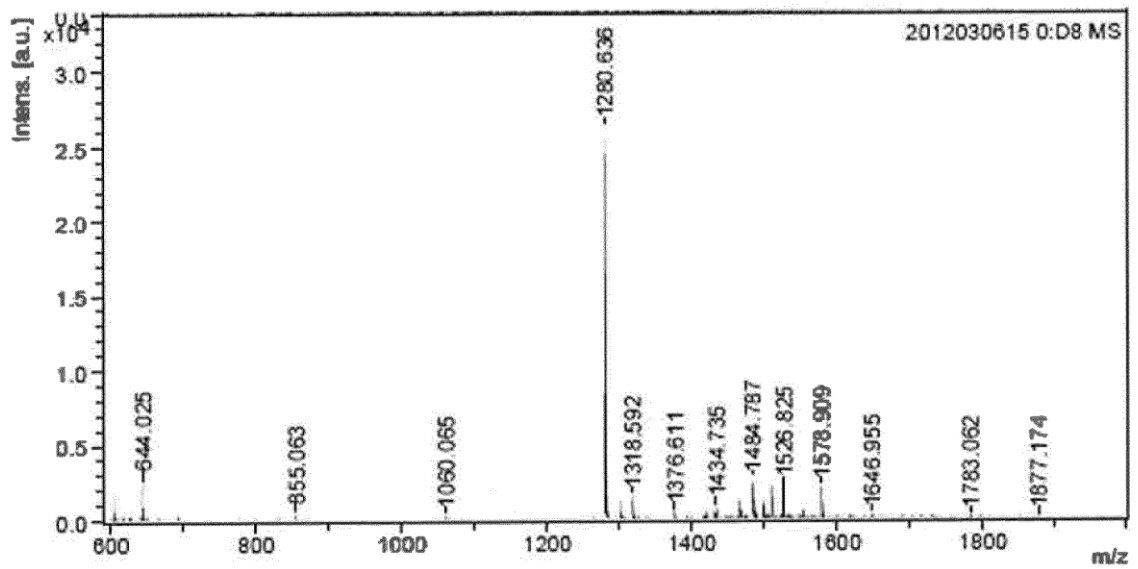


FIGURA 19



ES 2 702 786 T3

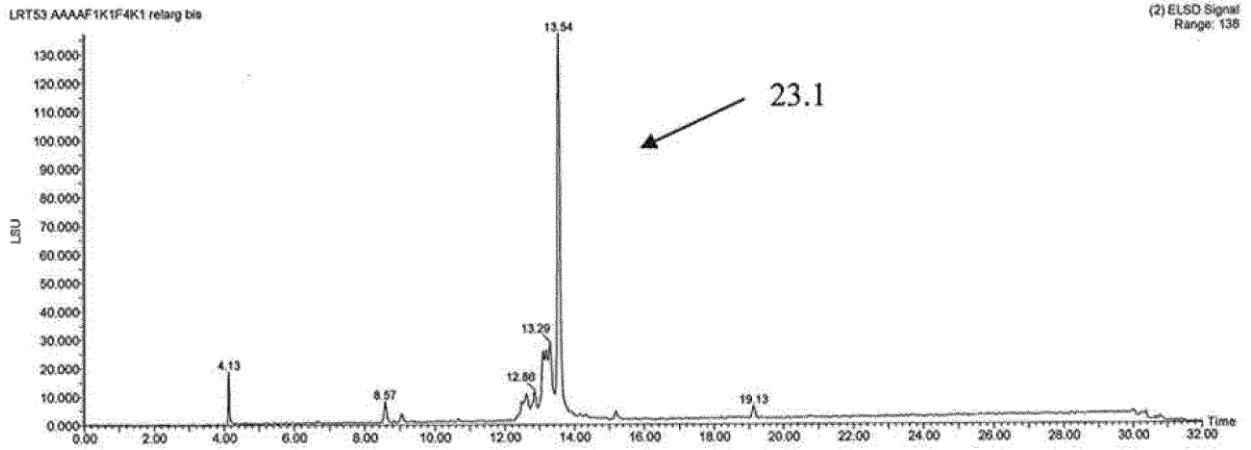


FIGURA 20

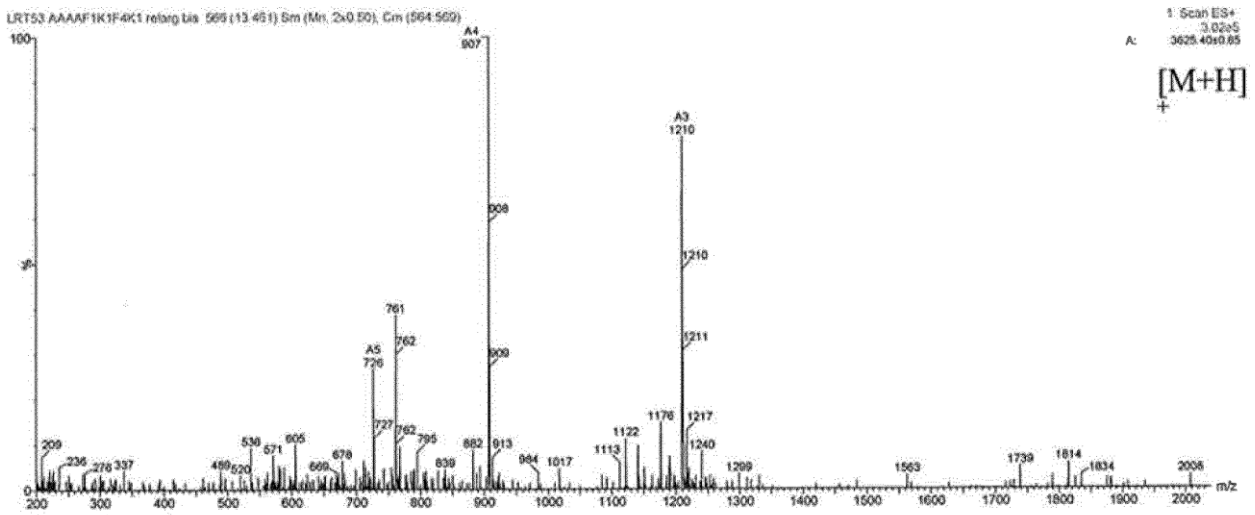


FIGURA 21

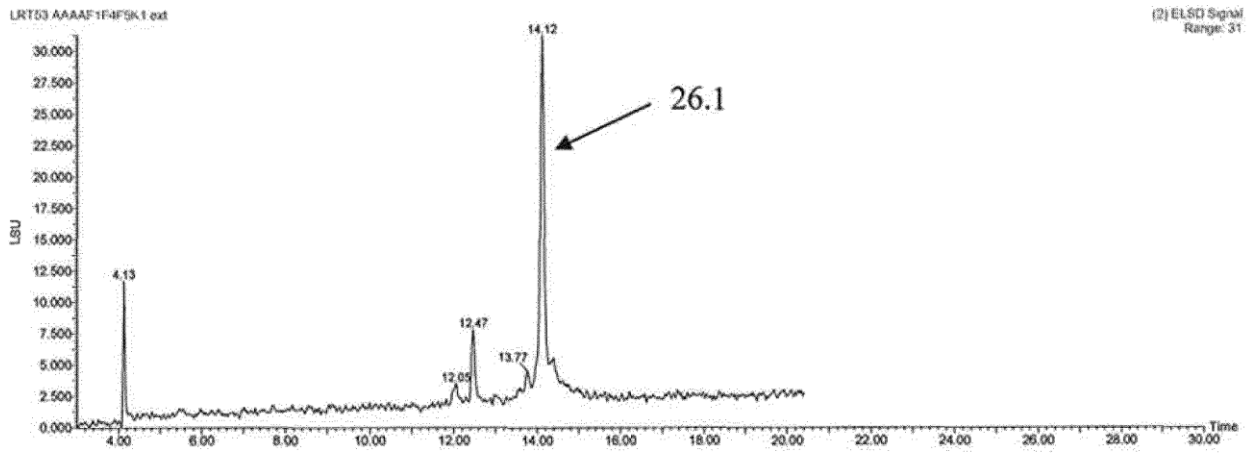


FIGURA 22

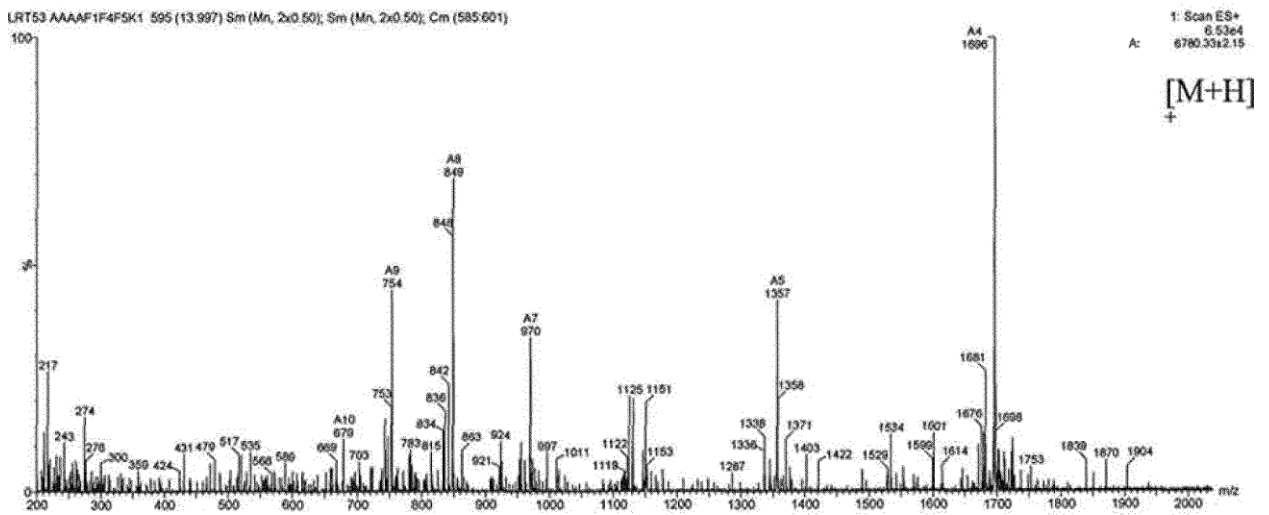


FIGURA 23

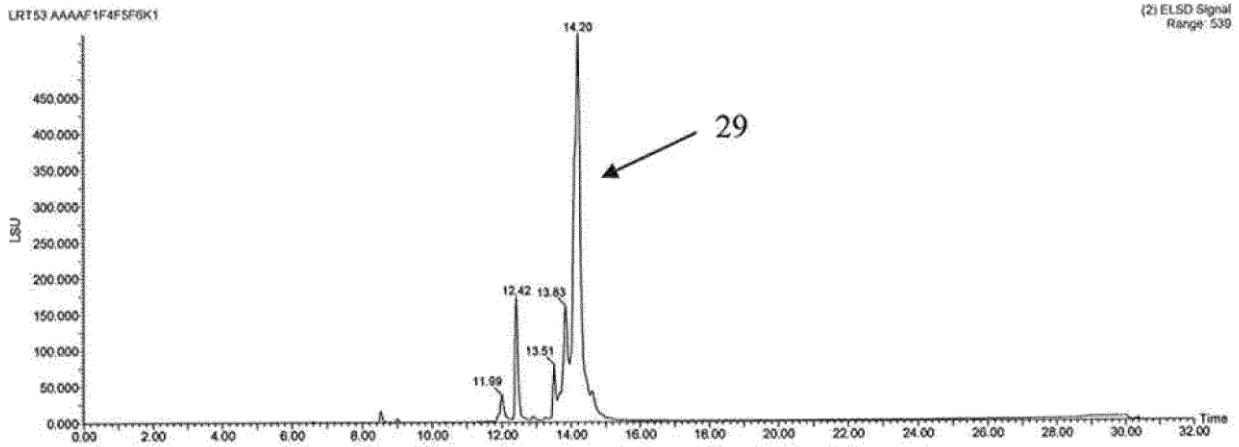


FIGURA 24

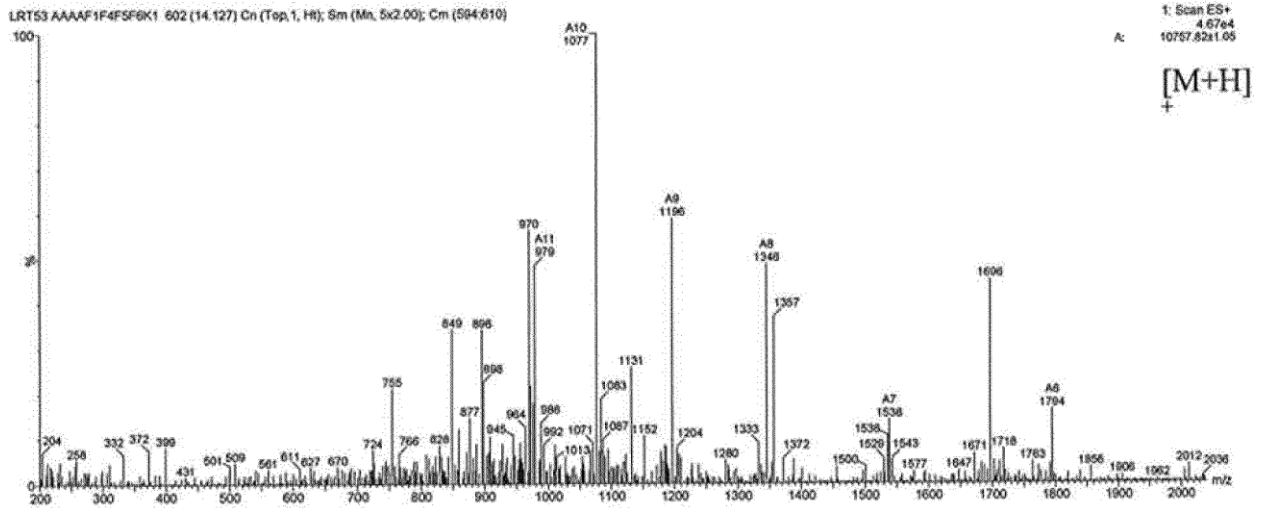


FIGURA 25