



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 315 729**

⑤1 Int. Cl.:
C07K 1/30 (2006.01)
C07K 14/16 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **04804196 .6**
⑨6 Fecha de presentación : **22.12.2004**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1701972**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2006**

⑤4 Título: **Procedimiento y sistemas para la recuperación de péptidos.**

③0 Prioridad: **31.12.2003 US 533653 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

⑦3 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4002 Basel, CH

⑦2 Inventor/es: **Han, Yeun-Kwei;**
Khatri, Hiralal, N. y
Topping, Robert, J.

⑦4 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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 y sistemas para la recuperación de péptidos.

- 5 La presente invención, se refiere a la síntesis de péptidos. De una forma más particular, la invención, se refiere a la recuperación de material peptídico, vía precipitación, durante la síntesis.

Antecedentes y trasfondo de la invención

- 10 En la literatura, se encuentran descritos muchos procedimientos, para la síntesis de péptidos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense US nº 6.015.881; Mergler *et al.* (1988) Tetrahedron Letters 29: 4005 - 4008; Mergler *et al.* (1988) Tetrahedron Letters 29: 4009 - 4012; Kamber *et al.* (eds.), Peptides, Chemistry and Biology, - Péptidos, química y biología -, ESCOM, Leiden (1992) 525 - 526; Riniker *et al.* (1993) Tetrahedron Letters 49: 9307 - 9320; Lloyd - Williams *et al.* (1993) Tetrahedron Letters 49: 11065 - 11133; Anderson *et al.* (2000) Biopolymers 55: 227 - 250; y Bray, Brian L. (Julio 2003) Nature Reviews 2: 587 - 593. Los diversos procedimientos de síntesis, se distinguen por el estado físico de la fase en la cual tiene lugar la síntesis, a saber, en fase líquida o en fase sólida.

- Los procedimientos de síntesis en fase líquida (a los cuales se les hace a menudo referencia como procedimientos en fases de solución), llevan a cabo todas las reacciones, en una fase homogénea. Sucesivos aminoácidos, se acoplan, en solución, hasta que se forma el deseado material peptídico. Durante la síntesis, se precipitan sucesivos péptidos intermediarios, mediante precipitación y/o lavados.

- En la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS - del inglés, solid phase peptide synthesis -), se une un primer grupo de aminoácidos o grupo peptídico, a un soporte insoluble, tal como una resina. Se añaden sucesivos aminoácidos, al primer grupo de aminoácidos o peptídico, hasta que se forma el material peptídico de interés. El producto de síntesis en fase sólida, es así, de este modo, un péptido unido a un soporte insoluble. Los péptidos sintetizados vía técnicas de SPPS, se segmentan, a continuación, de la resina y, el péptido segmentado, se aísla.

- Adicionalmente a las técnicas en fase líquida y de SPPS, descritas anteriormente, arriba, puede utilizarse un procedimiento híbrido. Las síntesis híbrida, se utiliza, de una forma típica, para fabricar secuencias complejas. Así, por ejemplo, en un esquema híbrido representativo, las secuencias complejas, pueden fabricarse, mediante la síntesis en fase sólida, de intermediarios peptídicos protegidos, relativamente grandes, los cuales, a continuación, se ensamblan, bien ya sea mediante procedimientos de fase en solución, o bien ya sea mediante procedimientos de SPPS, para producir el producto peptídico final. Así, de este modo, como una etapa de la síntesis, se produce un compuesto intermediario, el cual incluye cada uno de los residuos de aminoácidos localizados en su secuencia deseada, en la cadena peptídica, teniendo, varios de estos residuos, grupos protectores de cadenas laterales (secundarias). Los intermediarios peptídicos, se aíslan y, los intermediarios peptídicos protegidos, se acoplan, a continuación, para formar un péptido completo. Véase, por ejemplo, el documento de patente internacional WO 99 / 48 513.

- Los péptidos, pueden también fabricarse utilizando técnicas recombinantes, a cuyo efecto, se utilizan tecnologías de DNA recombinante, en sistemas exentos de células, para producir péptidos de interés.

- Los péptidos y los aminoácidos a partir de los cuales se sintetizan los péptidos, tienden a tener grupos laterales (secundarios) reactivos, así como extremos terminales reactivos. Cuando se sintetiza un péptido, es importante el hecho de que, el grupo aminoácido de un péptido, reaccione con el grupo carboxilo de otro péptido. Las reacciones no deseadas, en los grupos laterales (secundarios), o en el extremo terminal equivocado, de un reactivo, produce subproductos no deseados, algunas veces, en cantidades significativas. Estos productos secundarios (sub-productos) y reacciones secundarias, pueden perjudicar, gravemente, el rendimiento productivo, o incluso arruinar el producto que se está sintetizando, desde una perspectiva práctica. Con objeto de minimizar las reacciones secundarias, es una práctica convencional, el hecho de enmascarar apropiadamente los grupos secundarios reactivos y extremos terminales de los reactivos, para ayudar a asegurar que acontezca la reacción deseada.

- Por ejemplo, un esquema en fase sólida, típico, involucra el unir un primer grupo de aminoácidos o grupo peptídico, a una resina de soporte, vía la porción carboxílica del péptido o aminoácido. Esto deja al grupo aminoácido del material unido a la resina, en disponible para acoplarse con aminoácidos o material peptídico adicionales. Así, de este modo, la porción carboxílica del aminoácido o péptido adicional, de una forma deseable, reacciona con el grupo aminoácido libre del material unido a la resina. Con objeto de evitar reacciones secundarias, el grupo amino del aminoácido o péptido adicionales, dicho grupo amino, se enmascara con un grupo protector, durante la reacción de acoplamiento. Los grupos protectores de aminas, que son bien conocidos, son el grupo BOC y el grupo Fmoc. En la literatura, se han descrito, también muchos otros grupos protectores. Después del acoplamiento, el grupo protector del término N de péptido unido a la resina, puede eliminarse, permitiendo así, de este modo, el que se añadan aminoácidos o material peptídico adicionales, a la cadena en crecimiento, de una forma similar. Mientras tanto, los grupos de cadenas secundarias reactivos de los aminoácidos y reactivos peptídicos, incluyendo el material peptídico unido a la resina, así como el material adicional a ser añadido a la cadena en crecimiento, típicamente, permanecen enmascarados con grupos protectores de cadenas secundarias, durante la totalidad de la síntesis, desde el principio hasta el final.

Después de la síntesis, algunos, o la totalidad de los grupos protectores, pueden eliminarse del producto peptídico (desprotección). Cuando, de una forma substancial, se ha retirado la totalidad de los grupos protectores (grupos protec-

tores terminales y grupos protectores de cadena secundaria), a ello, se le hace referencia, como desprotección global. La desprotección, puede acontecer contemporáneamente con segmentación, o puede llevarse a cabo posteriormente, si el péptido debe procesarse adicionalmente, modificarse, acoplarse a un péptido adicional u otro material, y por el estilo. Algunos reactivos de segmentación, no únicamente segmentan el péptido de la resina de soporte, sino que, también, provocan el que acontezca una desprotección al mismo tiempo (por ejemplo, los reactivos de segmentación fuertemente ácidos asociados con la química de BOC). Otros agentes de segmentación, son más suaves que aquéllos utilizados en la química de BOC, y segmentan, sin provocar una desprotección indebida. El péptido segmentado, permanece substancialmente protegido, después de la segmentación, como resultado. Los reactivos de segmentación suavemente ácidos, asociados con la química de Fmoc, tienden a producir péptidos segmentados, en un estado protegido.

Los esquemas de la síntesis de péptidos, requieren, típicamente, la recuperación de material péptido (peptídico) (por ejemplo, producto peptídico final o intermediario peptídico), en uno o más puntos, durante la síntesis. Así, por ejemplo, en los procedimientos de síntesis de SPPS, el material peptídico, se recubre, de una forma típica, después de que éste se haya segmentado del soporte sólido. De una forma similar, en los procedimientos en fase de solución, el material péptido, se recupera de la solución. Cuando se sintetizan y se acoplan intermediarios peptídicos, para producir un producto péptido final más grande, como en los procedimientos híbridos, pueden requerirse algunas etapas de adicionales de aislamiento.

Los procedimientos típicos para recuperar péptidos, involucran el uso de la química de ácidos/sales. Así, por ejemplo, el péptido, puede precipitarse en una sal acuosa (tal como el cloruro sódico), y los sólidos, pueden recolectarse, a continuación (por ejemplo, mediante filtrado al vacío), lavarse, y secarse. No obstante, tales tipos de procedimientos, presentan problemas para la producción a gran escala, incluyendo altos niveles de impurezas. La presencia de impurezas, en la solución, con un péptido, puede dar como resultado, también, problemas corriente abajo, si el péptido se hace reaccionar suficientemente con otras especies (tales como, por ejemplo, péptidos adicionales).

Otros procedimientos de recuperación, involucran la concentración del péptido, bajo la acción del vacío, seguido de la reconstitución con un disolvente, tal como el etanol, el metanol o el heptano y, a continuación, la precipitación del péptido, mediante la adición de agua. Los reactivos conocidos, utilizados para la precipitación de péptidos, incluyen el agua, metanol, etanol ó éter dietílico. Cada uno de estos reactivos, tiene limitaciones. Así, por ejemplo, algunos reactivos, pueden ser extremadamente inflamables, mientras que, otros reactivos, pueden tener un alto punto de ebullición y, por lo tanto, requerir temperaturas más altas, durante las etapas de destilación, con objeto de eliminarlos. Adicionalmente, además, el uso de algunos reactivos (tales como el heptano), durante la precipitación, pueden provocar la formación de cargas electrostáticas, lo cual limita la manipulación de este reactivo. Adicionalmente, además, cuando el reactivo se utiliza únicamente en las etapas de aislamiento, pero no en otras etapas de procesado, deben dedicarse equipos específicos y/o etapas de procesado específicas (por ejemplo, para eliminar el reactivo, o para purgar el sistema), para las etapas de aislamiento que involucran dicho reactivo.

Como parte del proceso de recuperación, el péptido precipitado, se recolecta, a menudo, procediendo a hacer pasar la composición que comprende el péptido precipitado, a través de un filtro. Las características del péptido precipitado, pueden impactar la capacidad de filtración del precipitado. Así, por ejemplo, es deseable el hecho de que, las partículas de péptidos individuales, que forman el precipitado del péptido, tengan un tamaño correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que permitan el filtrado efectivo del precipitado. Si el péptido precipita fuera de estos márgenes de tamaño, éste puede generar finos (partículas finas), que atasquen el aparato de filtración (por ejemplo, cuando las partículas son demasiado pequeñas) o convertirse en demasiado "pegajosas" y evitar el filtrado (por ejemplo, cuando las partículas son demasiado grandes).

Para la producción de péptidos a gran escala, los resultados relativos a la recuperación del producto a gran escala, y a la pureza del producto, así como la manipulación, almacenaje y la eliminación de residuos, puede impactar enormemente la viabilidad del esquema de síntesis del péptido. Así, de este modo, existe una necesidad continuada, en cuanto a poder disponer de procedimientos de síntesis de péptidos, capaces de producir materiales peptídicos de interés comercial, en amplias cantidades de lotes. La recuperación de material de péptidos, después de la síntesis, por ejemplo, mediante precipitación, es uno de los aspectos de las síntesis, en el cual se necesitan mejoras. Las metodologías convencionales, pueden tener como resultado unos niveles de impurezas, que sean mayores que los deseables.

Resumen de la invención

La invención, se refiere a procedimientos para la recuperación de material peptídico (péptidos e intermediarios peptídicos) durante la síntesis, refiriéndose, de una forma particular, a procedimientos que involucran la recuperación de material peptídico, en una pureza excelente. En concordancia con la invención, se utiliza un alcohol que tenga tres o más átomos de carbono, para precipitar fragmentos de enfuvirtide, de la composición. De una forma preferible, el alcohol, incluye uno o más grupos hidroxilo secundarios o terciarios. En formas preferidas de presentación, los procedimientos, proporcionan una pureza tremendamente mejorada del péptido, si se compara con el aislamiento correspondiente a las técnicas anteriores, en los cuales se utilizan reactivos tales como el heptano. Adicionalmente, además, los procedimientos, pueden proporcionar tal tipo de pureza mejorada, de una forma eficiente, con respecto al número de etapas de aislamiento requeridas, y el volumen total de reactivos utilizado.

En formas preferidas de presentación, los procedimientos inventivos, pueden proporcionar una pureza mejorada del material peptídico resultante y, como consecuencia de ello, fases finales de purificación mejoradas, y resultados

mejorados del rendimiento productivo del péptido. Así, por ejemplo, en algunas formas de presentación, los procedimientos de la invención, proporcionan un 50% de reducción de las impurezas, en el intermediario peptídico. De una forma preferible, los procedimientos de la invención, proporcionan un tiempo de procesado mejorado, debido al hecho de que pueden eliminarse las etapas de lavado y de destilación.

En concordancia con la invención, pueden utilizarse uno o más aspectos de la recuperación de péptidos, para proporcionar un aislamiento mejorado del material peptídico. En algunos aspectos, puede conseguirse una pureza mejorada de un precipitado peptídico, mediante la selección del agente de precipitación (agente precipitante). En otros aspectos, la cantidad de agente de precipitación, puede elegirse, con objeto de proporcionar una procesabilidad mejorada de un precipitado peptídico. En todavía otros aspectos, la energía de mezclado, puede controlarse, para impactar la procesabilidad del material peptídico, durante el aislamiento. Estos aspectos, pueden utilizarse solos, o en cualquier combinación para proporcionar una o más de las ventajas descritas aquí, en este documento.

En concordancia con algunos aspectos, la invención, involucra la selección de un agente de precipitación, para proporcionar un aislamiento mejorado del material peptídico. El agente precipitante es, de una forma preferible, un alcohol que tenga tres o más átomos de carbono, y por lo menos un grupo hidroxilo. En formas preferidas de presentación, el alcohol, es un alcohol secundario o terciario. Un agente precipitante preferido, es el alcohol de isopropilo (IPA). Correspondientemente en concordancia, la invención, se refiere adicionalmente a un procedimiento para la síntesis de péptidos a gran escala, en donde, la recuperación del material peptídico, se realiza utilizando alcohol isopropílico, proporcionando, con ello, un ahorro de costos en el reactivo, así como un tiempo de procesado disminuido. La disminución del tiempo de procesado, puede lograrse mediante la reducción del número de etapas de aislamiento requeridas para la recuperación de cada intermediario peptídico, así como también, reduciendo el tiempo total de secado. Adicionalmente, además, el alcohol isopropílico, se utiliza en otras etapas, durante la síntesis de los péptidos; así, por lo tanto, el uso de este reactivo, para la precipitación, no requiere la dedicación de un equipo de reacción adicional, o de etapas de procesado adicionales.

Tal y como se discute aquí, en este documento, la procesabilidad de un péptido, puede impactarse mediante la cantidad de agente precipitante utilizado, la cantidad de energía de mezclado utilizada durante los procedimientos de aislamiento, o ambos, la cantidad de agente precipitante y de energía de mezclado, utilizadas durante los procedimientos de aislamiento. De una forma particular, un aspecto de la procesabilidad que puede impactarse en concordancia con la presente invención, es la capacidad de filtrado del precipitado peptídico. En algunas formas preferidas de presentación, el agente precipitante, se utiliza en una cantidad correspondiente a por lo menos 5 volúmenes, por volumen de solución de la reacción. En otras formas de presentación, el agente precipitante, se proporciona en una cantidad correspondiente a unos valores comprendidos dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8 volúmenes, por volumen de solución de la reacción, o en una cantidad correspondiente a unos valores comprendidos dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 6,5 hasta aproximadamente 7,5 volúmenes, por volumen de solución de la reacción. Cuando se utiliza aquí, en este documento, para describir la cantidad relativa de agente precipitante, el volumen de solución de la reacción, es el volumen total de la solución de la reacción, antes de que se haya añadido el agente precipitante.

En un aspecto de la invención, los reactivos y reactantes, pueden utilizarse en un menor volumen, para cumplir con los mismos objetivos que en procedimientos sintéticos típicos. Esto puede reducir los costes de las materias primas en su conjunto.

En concordancia con la invención, la energía de mezclado aplicada durante la recuperación de un péptido, puede controlarse, para proporcionar procedimientos y sistemas mejorados. Tal tipo de agitación, puede aplicarse, a una tasa de menos de aproximadamente 2,5 m/s, o a una tasa correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0,5 m/s hasta aproximadamente 2,5 m/s, o en una tasa correspondiente a unos valores comprendidos dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2 m/s.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la obtención de un péptido, que comprende las etapas de: (a) sintetizar un intermediario de péptido, que tenga uno o más grupos protectores de cadena secundaria; (b) proporcionar un disolvente al intermediario de péptido, para formar una composición intermediaria peptídica; (c) proporcionar un agente precipitante en una cantidad suficiente como para precipitar el intermediario de péptido de la composición intermediaria peptídica, en donde, el agente precipitante, comprende un alcohol que tiene uno o más átomos de carbono.

En otro aspecto, la invención, proporciona un procedimiento para precipitar un péptido, que comprende las etapas de: (a) proporcionar una composición que comprenda un intermediario de péptido, que tenga uno o más grupos protectores de cadena secundaria, en un disolvente; y (b), proporcionar un agente precipitante, a la composición, en donde, el agente precipitante, es un alcohol que tiene tres o más átomos de carbono.

En todavía otro aspecto, la invención, proporciona un procedimiento para concentrar un intermediario peptídico (intermediario de péptido) que comprende las etapas de: (a) proporcionar una composición que comprenda un intermediario de péptido, en un disolvente que comprende DCM; (b) precipitar el intermediario de péptido, mediante la adición de un agente precipitante, a la combinación, para proporcionar una mezcla que comprenda un precipitado, en donde, el precipitado comprenda el intermediario de péptido, en donde, el agente precipitante, comprende un alcohol que tiene uno o más átomos de carbono, y en donde, el agente precipitante, se encuentra presente en una cantidad de

por lo menos 5 volúmenes de agente precipitante con respecto al volumen de la composición peptídica, previamente a la adición del agente precipitante; y (c), recolectar el precipitado.

En todavía aspectos adicionales, la invención, proporcionar un procedimiento para filtrar un precipitado de péptido, que comprende las etapas de: (a) determinar información indicativa de la capacidad de filtrado de un precipitado de péptido, como función de una cantidad relativa de un agente precipitante utilizado para provocar precipitación; y (b) utilizar la información obtenida en la etapa (a), para filtrar un precipitado de péptido.

Descripción detallada

La formas de presentación de la presente invención, descritas más abajo, a continuación, no pretenden ser exclusivas o limitar la invención a las formas precisas dadas a conocer en la información detallada que se facilita a continuación. Más bien, la formas de presentación, se eligen y se describen de tal forma que, otras personas expertas en el arte especializado de la técnica, puedan apreciar y comprender los principios y prácticas de la presente invención.

La presente invención, proporciona procedimientos para la recuperación de material de péptidos (material peptídico), sintetizados mediante cualquier tipo de metodología standard. Con objeto de facilitar la discusión de la invención, se discutirá el uso de la invención, para recuperar un intermediario peptídico particular, de 16 residuos (SEQ ID NO: 3), durante la síntesis de un producto peptídico.

La presente invención, está dirigida a procedimientos para sintetizar péptidos e intermediarios peptídicos, de una forma efectiva y, de una forma particular, para aislar material peptídico, de la solución. Tales tipos de procedimientos, en concordancia con las formas preferidas de presentación de la presente invención, pueden utilizarse, de una forma ventajosa, para proporcionar procedimientos, a escala comercial, para la síntesis y recuperación de materiales peptídicos.

Los procedimientos descritos aquí, en este documento, son particularmente apropiados para mejorar aspectos de la síntesis de péptidos a gran escala. En formas preferidas de presentación, los procedimientos de la invención, pueden proporcionar tipos de mejoras tales como las consistentes en una reducción en el tiempo de procesamiento (síntesis), mejoras en el rendimiento productivo de los productos, mejoras en la pureza del producto, y reducción en la cantidad de reactivos y materiales de partida requeridos.

Los procedimientos de la presente invención, pueden utilizarse en conexión con la síntesis de péptidos de enfuvirtide, de cualquier longitud y/o secuencia apropiadas. Se entenderá el hecho de que, los péptidos, pueden sintetizarse o prepararse, mediante técnicas bien conocidas en el arte especializado de la técnica. Véase, por ejemplo, Creighton, 1983, *Proteins: Structure and Molecular Principles*, W.H. Freeman and Co., NY, así como las referencias adicionales citadas aquí, en este documento.

En algunos aspectos, la invención, puede utilizarse para recuperar péptidos que incorporan de aproximadamente 2 a aproximadamente 500 residuos de uno o de más aminoácidos, o de aproximadamente 4 a aproximadamente 100 residuos de uno o de más aminoácidos, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 residuos de uno o de más aminoácidos. Los residuos de uno o de más constituyentes monoméricos, oligoméricos, y/o poliméricos, pueden opcionalmente incorporarse en un péptido. Los enlaces no peptídicos, pueden también encontrarse presentes. Estos enlaces no peptídicos, pueden encontrarse entre dos residuos de aminoácidos, entre un aminoácido y un residuo no aminoácido, o entre dos residuos no aminoácidos. Esta alternativa de enlaces no peptídicos, puede formarse mediante la utilización de reacciones que son bien conocidas para las personas expertas en el arte especializado de la técnica, y muchas de ellas, incluyen, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los enlaces imino, éster, hidrazida, semicarbazida, azóicos, y por el estilo.

Tal y como se utiliza aquí, en este documento, el término “monómero”, significa un material de peso molecular relativamente bajo (es decir que, de una forma general, tiene un peso molecular inferior a un valor de aproximadamente 500 Dalton) que tiene uno o más grupos polimerizables. “Oligómero”, significa una molécula de tamaño relativamente intermedio, que incorpora dos o más monómeros y que, generalmente, tiene un peso molecular comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 10.000 Dalton. “Polímero”, significa un material relativamente grande, que comprende una subestructura formada por dos o más constituyentes monoméricos, oligoméricos, y/o poliméricos y que, generalmente, tiene un peso molecular mayor de aproximadamente 10.000 Dalton.

Los aminoácidos a partir de los cuales se derivan los péptidos, pueden ser residuos de aminoácidos de origen natural, residuos de aminoácidos no naturales, o combinaciones de éstos. Los veinte residuos de aminoácidos comunes de origen natural, son los siguientes: A (Ala, alanina); R (Arg, arginina); N (Asn, asparagina); D (Asp, ácido aspártico); C (Cys, cisteína) Q (Gln, glutamina); E (Glu, ácido glutámico); G (Gly, glicina); H (His, histidina); I (Ile, isoleucina); L (Leu, Leucina); K (Lys, lisina); M (Met, metionina); F (Phe, fenilalanina); P (Pro, prolina); S (Ser, serina); T (Thr, treonina); W (Trp, triptófano); Y (Tyr, tirosina); y V (Val, valina). Los aminoácidos raros, de origen natural, se contemplan, también, e incluyen por ejemplo, a la selenocisteína y a la pirrolisina.

Los aminoácidos no naturales, incluyen a los compuestos orgánicos que tienen una estructura y reactividad similar, a los aminoácidos de origen natural, e incluyen, por ejemplo, a los D-aminoácidos, beta-aminoácidos, omega-aminoá-

ES 2 315 729 T3

cidos, (tales como el ácido 3-aminopropiónico, el ácido 2,3-diaminopropiónico, el ácido 4-aminobutírico, y por el estilo), los gama-aminoácidos, los análogos aminoácidos cíclicos, los derivados de la propargilglicina, los derivados del ácido 2-amino-4-cianobutírico, las amidas de Weinrab de aminoácidos, y los aminoalcoholes.

5 La presente invención, contempla el hecho de que, el material peptídico recuperado, pueda actuar como intermediarios en la síntesis de otros péptidos de interés, mediante la modificación del péptido resultante, a través del acoplamiento del péptido a otros materiales, tales como otros péptidos, o por el estilo. La presente invención, es de utilidad para recuperar intermediarios de fragmentos de péptidos, de utilidad en la síntesis de enfuvirtide (también conocido como péptido T-20) o, de una forma alternativa, DP-178. Tales tipos de fragmentos de péptidos de la invención, incluyen, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a aquéllos que tienen secuencias de aminoácidos, tal y como se representan en la tabla 1 que se facilita abajo, a continuación.

TABLA 1

n° de péptido	Secuencia de aminoácidos	n° sec. ID	Secuencia de aminoácidos correspondiente de T-20
1	YTSLIHSL	(SEQ ID NO 2)	1 - 8
2	YTSLIHSLIEESQNQ	(SEQ ID NO 3)	1 - 15
3	YTSLIHSLIEESQNQQ	(SEQ ID NO 4)	1 - 16
4	YTSLIHSLIEESQNQQEK	(SEQ ID NO 5)	1 - 18
5	IEESQNQ	(SEQ ID NO 6)	9 - 15
6	IEESQNQQ	(SEQ ID NO 7)	9 - 16
7	QEKNEQELLELDKWASLWNW	(SEQ ID NO 8)	16 - 35
8	QEKNEQELLELDKWASLWNWF	(SEQ ID NO 9)	16 - 36
9	EKNEQEL	(SEQ ID NO 10)	17 - 23
10	EKNEQELLEL	(SEQ ID NO 11)	17 - 26
11	EKNEQELLELDKWASLWNWF	(SEQ ID NO 12)	17 - 36
12	NEQELLELDKWASLWNW	(SEQ ID NO 13)	19 - 35
13	NEQELLELDKWASLWNWF	(SEQ ID NO 14)	19 - 36
14	LELDKWASLWNW	(SEQ ID NO 15)	24 - 35
15	LELDKWASLWNWF	(SEQ ID NO 16)	24 - 36
16	DKWASLWNW	(SEQ ID NO 17)	27 - 35
17	DKWASLWNWF	(SEQ ID NO 18)	27 - 36
18	EKNEQELLELDKWASLWNW	(SEQ ID NO 19)	17 - 35

Enfuvirtide, es un péptido que corresponde a los residuos de aminoácidos 638 a 637 de la proteína transmembrana gp41 procedente del aislamiento del HIV1-sub.LAI, y que tiene la secuencia de 36 aminoácidos (leyendo desde el término amino, NH₂, a carboxi, COOH):

5 NH₂-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-COOH (SEQ ID NO:1)

El nombre químico de enfuvirtide es N-acetil-Tyr-Thr, Ser-Leu-Ile-His-Ser-Leu-Ile-Glu-Glu-Ser-Gln-Asn-Gln-Gln-Glu-Lys-Asn-Glu-Gln-Glu-Leu-Leu-Glu-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-Leu-Trp-Asn-Trp-Phe-CONH₂. Se entenderá el hecho de que, los principios de la presente invención, pueden también aplicarse en formas preferidas de presentación, para la recuperación de péptidos que constituyen la totalidad o una porción de los fragmentos de péptidos semejantes a T-20, adicionalmente a los fragmentos del péptido T20. El término "semejante a T20", tal y como se utiliza aquí, en este documento, incluye cualquier péptido de HIV ó de no HIV, listado en las patentes estadounidenses US n° 5.464.933; US n° 5.656.480, US n° 6.015.881, y US n° 6.281.331, y/o en el documento prioritario de patente PCT de la publicación de patente internacional n° WO 96 / 19 495. La síntesis de péptidos que tienen actividad T-20 y de los intermediarios de péptidos utilizados para preparar péptidos que tengan actividad T-20, se describen en las patentes estadounidenses US n° 5.464.933, US n° 5.656.480, y en el documento prioritario de patente PCT de la publicación de patente internacional n° WO 96 / 19 495.

Adicionalmente a los péptidos de utilidad en la síntesis de péptidos de enfuvirtide y semejantes a enfuvirtide, los principios de la presente invención, pueden utilizarse, de una forma ventajosa, para recuperar el presente material peptídico, intermediarios de éste, y/o análogos tales como la Felipresina, Pitresina, Desmopresina, Perlipresina; Atosiban; hormona adenocorticotrópica (ACTH); Insulina, Glucagon; Secretina; calcitoninas; calcitonina humana, calcitonina del salmón, calcitonina de la anguila, dicarba-eel (elcatonina); hormona luteinizante - hormona de liberación (LH-RH) y análogos; leuprolida, desloreline, triptorelina, goserelina, buserelina; nafarelina, cetrorelix, garrinirelix, hormona paratiroidea (PTH); factor de liberación de corticotrofina humana, factor de liberación de corticotrofina ovina, factor de liberación de la hormona del crecimiento; somatostatina; lanreotida, hormona de liberación de la tirotrina (TRH); thimosina-1; tomopentina (TP-5); ciclosporina; integrilina; inhibidores enzimáticos de conversión de angiotensina: enalapril, lisinopril.

La invención, contempla la recuperación de un material peptídico que se ha modificado químicamente, para contener uno o más grupos químicos, distintos de los residuos de aminoácidos, a los cuales, algunas veces, se les hace referencia como péptidos modificados. Tales tipos de grupos químicos, pueden añadirse a los terminales amino de los péptidos, a los terminales carboxi, y/o a uno o más residuos de aminoácidos, a lo largo de la longitud del péptido. En todavía otras formas de presentación, el péptido, puede incluir grupos químicos adicionales, presentes en sus términos de aminoácidos y/o carboxi, de tal forma que, por ejemplo, se mejoren la estabilidad, la reactividad y/o la solubilidad de los péptidos. Así, por ejemplo, a los términos amino de los péptidos, pueden añadirse grupos hidrofóbicos, tales como los grupos dansilo, acetilo, tert.-butiloxycarbonilo, 9-fluorenilmetoxi-carbonilo. Adicionalmente, además, a los términos carboxi de los péptidos, se les puede añadir el grupo hidrofóbico, tert.-butilo, o un grupo amido. De una forma similar, en los términos carboxi de los péptidos, puede emplazarse un grupo de éster para-nitrobencílico. Las técnicas para introducir tales tipos de modificaciones, son bien conocidas en el arte especializado de la técnica.

En algunos aspectos, la invención, puede utilizarse para recuperar material de péptidos (material peptídico), el cual puede opcionalmente incluir grupos protectores. Así, por ejemplo, la invención, puede utilizarse para recuperar intermediarios de péptidos (intermediarios peptídicos). En concordancia con estas formas de presentación, los intermediarios peptídicos, incluyen, por lo menos, un grupo protector de cadena secundaria (de cadena lateral). Los intermediarios peptídicos, pueden protegerse de una forma completa, de tal forma que, todos los grupos reactivos de cadena secundaria, incluyan grupos protectores, y los aminoácidos terminales apropiados, incluyan grupos protectores. En otros aspectos, la invención, puede utilizarse para recuperar péptidos que no incluyan ningunos grupos protectores (a tales tipos de péptidos, se les puede hacer referencia como péptidos globalmente desprotegidos, cuando, todos lo grupos protectores, se han eliminado mediante un reactivo).

La naturaleza y el uso de grupos protectores, es bien conocida en el arte especializado de la técnica. De una forma general, un grupo protector apropiado, es cualquier clase de grupo que pueda ayudar a evitar que, el átomo al cual éste se encuentra unido, de una forma típica, oxígeno o nitrógeno, participe en reacciones no deseadas, durante el procesamiento y la síntesis. Los grupos protectores, incluyen a los grupos protectores de cadena secundaria y a los grupos protectores amino ó N-terminales. Los grupos protectores, pueden también evitar la reacción o unión de ácidos carboxílicos, tioles, y por el estilo.

Un grupo protector de cadena secundaria, se refiere a una porción química acoplada a la cadena secundaria (grupo R, en la fórmula general de aminoácido H₂N-C(R)(H)-COOH) de un aminoácido, que ayuda a evitar que una porción de la cadena secundaria, reaccione con productos químicos utilizados en las etapas de la síntesis de los péptidos, el procesamiento y por el estilo. La elección del grupo protector de cadena secundaria, puede depender de varios factores, por ejemplo, del tipo de síntesis realizada, el procesamiento al cual se someterá el péptido, y el producto intermediario deseado o producto final. El grupo protector de cadena secundaria, depende, también, de la naturaleza del aminoácido, en sí mismo. De una forma general, un grupo protector de cadena secundaria, se elige de tal forma que, éste, no se retira o elimina durante la desprotección de los grupo -amino, durante la síntesis. Así, por lo tanto, el grupo protector -amino, y el grupo protector de cadena secundaria, de una forma típica, no son el mismo.

En algunos casos, y dependiendo del tipo de reactivos utilizados en la síntesis de fase sólida y otros procesados de péptidos, un aminoácido, puede no requerir la presencia de un grupo protector de cadena secundaria. Tales tipos de aminoácidos, de una forma típica, no incluyen un oxígeno o nitrógeno reactivo en la cadena secundaria.

Los ejemplos de grupos protectores de cadena secundaria, incluyen a los grupos protectores acetilo (Ac), benzoílo (Bz), tert.-butilo, trifenilmetilo (Tritil), tetrahidropiraniol, éter bencílico (Bzl), 2,5-diclorobencilo (DCB), tert.-butoxicarbonilo (BOC), nitro, p-toluenosulfonilo (Tos), adamantiloxicarbonilo, xantilo (XAN), éster bencílico, metílico, etílico y tert.-butilo, benciloxicarbonilo (Z), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Z), tert.-amiloxicarbonilo (Aoc), y grupos protectores aromáticos o alifáticos del tipo uretano, grupos fotolábiles, tales como el nitroveratriloxicarbonilo (NVOC), y grupos protectores de fluoruro, tales como el trimetilsililcarbonilo (TEOC).

Así, por ejemplo, una o más de las cadenas secundarias de los residuos de aminoácidos de los péptidos listados en la tabla 1, pueden producirse con grupos protectores estándar, tales como el tert.-butilo (t-Bu), tritilo (trt), y tert.-butiloxicarbonilo (Boc). Los grupos protectores de cadena secundaria preferidos, incluyen al grupo t-Bu para los residuos de aminoácidos de tirosina, treonina, serina, y ácido aspártico; al grupo trt, para los residuos de aminoácidos histidina, glutamina, y asparagina; y al grupo Boc, para los residuos de aminoácidos lisina y triptófano.

Durante la síntesis de los fragmentos de la tabla 1, que incluyen a la histidina, la cadena secundaria del residuo de histidina, de una forma deseable, se protege, preferiblemente, con un grupo protector tritilo (trt). Si el residuo de histidina no se protege, los reactivos utilizados en la síntesis y el procesado de los péptidos (por ejemplo, el ácido utilizado para segmentar el fragmento de péptido, del residuo, en síntesis de fase sólida), podría reaccionar, de una forma perjudicial, con el residuo de histidina, provocando una elaboración no deseada de los fragmentos de péptido.

De una forma preferible, los residuos de glutamina de los fragmentos de péptidos de la invención, se protegen con grupos tritilo (trt). No obstante, es preferible no proteger el residuo de glutamina en el extremo carboxi-terminal de los fragmentos 1-16 y 9-16. Se ha encontrado el hecho de que, la ausencia de un grupo protector en el residuo de glutamina del extremo carboxi-terminal del fragmento 1-16, facilita la reacción del fragmento 1-16 con el fragmento 17-36, permitiendo el acoplamiento de los fragmentos con únicamente un 2% de racemización. Adicionalmente, además, si se desea una menor solubilidad de cualesquiera de los fragmentos de péptidos de la invención, en disolventes orgánicos, el grupo protector tritilo, puede eliminarse de cualquiera o más de los otros residuos de glutamina de los fragmentos.

De una forma preferible, se protege la totalidad de residuos de asparagina de la invención. Adicionalmente, además, se prefiere el hecho de que, los residuos de triptófano, se protejan con un grupo Boc.

Un grupo protector terminal amino (amino-terminal), incluye una porción química acoplada al grupo amino alfa de un aminoácido. De una forma típica, el grupo protector amino-terminal, se retira, en una reacción de desprotección, previamente a la adición del siguiente aminoácido a ser añadido a la cadena de péptido en crecimiento, pero puede mantenerse, cuando el péptido, se segmenta del soporte. La elección de un grupo protector terminal amino puede depender de varios factores, por ejemplo, del tipo de síntesis realizada y del producto intermedio deseado del producto final obtenido.

Los ejemplos de grupos protectores amino-terminales, incluyen: (1) grupos protectores del tipo acilo, tales como el formilo, acriloxi (Acr), benzoílo (Bz), y acetilo (Ac); (2) grupos protectores aromáticos del tipo uretano, tales como benciloxicarbonilo (Z) y Z-sustituidos, tales como p-clorobenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo; (3) grupos protectores alifáticos de uretano, tales como tert.-butiloxicarbonilo, (BOC), diisopropilmetoxicarbonilo, isopropilmetoxicarbonilo, etoxicarbonilo, aliloxicarbonilo; (4) grupos protectores del tipo cicloalquil-uretano, tales como 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), ciclopentil-oxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo y ciclohexiloxicarbonilo; y (5) grupos protectores del tipo tiouretano, tales como feniltiocarbonilo. Los grupos protectores preferidos, incluyen a los 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), 2-(4-bifenilil)-propil (2)oxicarbonilo (Bpoc), 2-fenilpropil(2)-oxicarbonilo (Poc), y tert.-butiloxicarbonilo (Boc).

Las formas preferidas de presentación de procedimientos, en los cuales, los péptidos se realizan utilizando técnicas de SPPS, se describirán, ahora, en mayor detalle. Puede utilizarse cualquier tipo de soporte apropiado en la práctica de SPPS, en concordancia con los procedimientos de la invención. En formas preferidas de presentación, el soporte, comprende una resina, la cual puede realizarse a partir de uno o más polímeros, copolímeros, o combinaciones de polímeros, tales como la poliamida, polisulfamida, polietilenos sustituidos, polietilenglicol, resinas fenólicas, polisacáridos, o poliestireno. El soporte del polímero, puede ser cualquier sólido, el cual sea lo suficientemente insoluble e inerte a los disolventes utilizados en la síntesis de péptidos. El soporte sólido incluye, de una forma típica, una porción de unión o ligado, a la cual se acopla el péptido en crecimiento, durante la síntesis, y la cual puede segmentarse, bajo condiciones deseadas, para liberar el péptido del soporte. Los soportes sólidos apropiados, pueden incluir engarces o uniones los cuales, son foto-segmentables, segmentables mediante TFA, segmentables mediante HF, segmentables mediante iones fluoruro, segmentables mediante reducción, segmentables mediante Pd(O), nucleofílicamente segmentables, o segmentables por radicales. Las porciones de engarce preferidas, son segmentables bajo unas condiciones tales que, el péptido segmentado, se encuentre substancialmente protegido, mediante grupos protectores de cadena secundaria.

Los soportes sólidos preferidos, incluyen a los soportes sólidos sensibles a los ácidos, como por ejemplo, resina de polímeros de hidroximetil-poliestireno-divinilbenceno (resinas de "Wang", véase Wang, S.S. 1973, J. Am. Chem. Soc., 95: 1328 - 33), resina de cloruro de 2-clorotritilo (véase Barlos *et al.* (1989), Tetrahedron Letters 30 (30): 3943 - 3946), y resinas de ácido 4-hidroximetil-3-metoxifenoxibutírico (véase Richter *et al.* (1994), Tetrahedron Letters 35 (27): 4705 - 4706), así como resinas de poli-N-acrilolpirrolidona reticuladas, funcionalizadas, y resinas de polímeros de clorometilpoliestireno-divinilbenceno. Estos tipos de soportes sólidos, se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, de procedencia de, por ejemplo, la firma Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA.

Cuando se utiliza la SPPS, el péptido sintetizado, se segmenta, de una forma preferible, del soporte sólido (tal como una resina), previamente a la utilización de los procedimientos de la invención, descritos aquí, en este documento. Los péptidos sintetizados vía técnicas de SPPS, pueden segmentarse utilizando técnicas bien conocidas por parte de las personas expertas en el arte especializado de la técnica. Así, por ejemplo, para segmentar el péptido, pueden utilizarse soluciones de ácido trifluoroacético (TFA) en DCM, al 1% ó al 2%. De una forma alternativa, para segmentar el péptido, puede utilizarse ácido acético (HOAC). El reactivo de segmentación específico, disolventes, y tiempo seleccionado para la segmentación, dependen el péptido particular que se esté segmentando. Estos parámetros, se encuentran dentro de los utilizados en el arte especializado relevante de la técnica.

Los procedimientos generales para la producción y la carga de resinas que puede utilizarse en la SPPS, se describen en "Principles and Practice of Solid Phase Peptide Synthesis", - Principios y práctica de la síntesis de péptidos en fase sólida -, (editado por Gregory A. Grant, 1992, W.H. Freeman and Company), y las referencias en éste, y son bien conocidos por parte de las personas expertas en el arte especializado de la técnica. Los procedimientos específicos para la carga de las resinas de Wang, se describen, por ejemplo, en Sieber (1987) Tet. Lett. 29: 6147 - 50, y Granadas *et al.* (1987), Int. J. Pept. Protein Res. 33 - 386 - 90.

Tal y como se anota aquí, en este documento, el Fmoc, es un grupo protector utilizado en ciertas formas de presentación, para la protección de la porción amino en un aminoácido. Dependiendo de cuál es el aminoácido que se esté cargando, y en qué punto del fragmento intermediario del péptido se deba unir, la cadena secundaria del aminoácido, puede protegerse, o no.

En algunas formas de presentación, los intermediarios de fragmentos de péptidos de la invención, se sintetizan mediante técnicas de SSPS, utilizando protocolos standard de Fmoc. Véase, por ejemplo, Carpin *et al.* (1970), J. Am. Chem. Soc. 92(19): 5748 - 5749; Carpin *et al.* (1972), J. Org. Chem. 37(22): 3404 - 3409, "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis", - Síntesis de péptidos en fase sólida con Fmoc -, "Weng C. Chan y Peter D. White Eds. (2000) Oxford University Press Oxford Eng". Los aminoácidos protegidos con Fmoc, bien ya sea con grupos protectores de cadena secundaria, o bien ya sea sin ellos, según se desee, los cuales se utilizan en la carga de resina y en la síntesis de péptidos, se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, de procedencia de las firmas Genzyme Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA; Bachem Biosciences Inc., Torrance, CA; Senn Chemicals, Dieldorf, Suiza; y Orpegen Pharma, Heidelberg, Alemania, o son fácilmente sintetizables, utilizando materiales y procedimientos que son bien conocidos en el arte especializado de la técnica. Como una alternativa a los procedimientos anteriormente mencionados, arriba, la resina, puede comprarse, por ejemplo, pre-cargada con el aminoácido N-protégido con Fmoc (por ejemplo, de procedencia de la firma Bachem Biosciences Inc. o de la firma Senn Chemicals).

La resina cargada, se lava con un disolvente, tal como el NMP. La resina, se agita, a continuación, con nitrógeno burbujeante, en un disolvente hinchable, para hinchar las perlas de resina. El grupo Fmoc, se retira, de la amina terminal, utilizando piperidina en NMP. La resina desprotegida, se lava, a continuación, con NMP, para eliminar los sub-productos de Fmoc, y la piperidina residual.

El residuo o fragmento de aminoácidos a ser acoplado, se activa, para la reacción, en su término carboxi, y se acopla. El ciclo de acoplamiento, se repite, para cada uno de los residuos de aminoácidos subsiguientes del fragmento peptídico intermediario. A continuación del ciclo final de acoplamiento, la resina, se lava con un disolvente tal como NMP y, a continuación, se lava con un segundo disolvente inerte, tal como DCM. Los intermediarios de fragmentos de péptidos sintetizados vía técnicas de SPPS, pueden segmentarse, a partir de la resina, utilizando técnicas bien conocidas por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, por ejemplo, mediante la adición de una solución de un ácido, tal como TFA en DCM. El intermediario de péptido segmentado, a continuación, puede aislarse.

Los procedimientos de la invención, los cuales están dirigidos para precipitar péptidos, pueden integrarse en cualquier procedimiento de síntesis de péptidos, tales como los correspondientes a la síntesis en fase sólida, en fase líquida, síntesis híbrida, o síntesis recombinante. Los procedimientos de la invención, comprenden la adición de un agente precipitante a una composición de péptido, para precipitar el péptido, a partir de la composición. La composición del péptido, incluye el péptido y uno o más disolventes inertes, tales como el diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), dicloroetano (DCE), dimetilacetamida, y/o otros disolventes comunes utilizados en la síntesis de péptidos. En otras formas de presentación, la invención, proporciona procedimientos para controlar la cantidad relativa de agente precipitante añadida, para impactar la pureza del péptido precipitado. En todavía otras formas de presentación adicionales, la invención, proporciona procedimientos para seleccionar agentes precipitantes, basados en el impacto que el agente precipitante tendrá, sobre las impurezas, en el precipitado.

En un aspecto de esta forma de presentación, la concentración del péptido en el disolvente, previamente a la adición del agente precipitante, es de por lo menos aproximadamente 2 mg/ml, o de por lo menos aproximadamente 4, mg/ml, o de por lo menos aproximadamente 10 mg/ml, o de por lo menos aproximadamente 15 mg/ml, o de por lo menos aproximadamente 20 mg/ml.

En ciertos aspectos de la invención, la energía de mezclado aplicada durante la síntesis, puede impactar la procesabilidad del precipitado peptídico. La energía de mezclado, se proporciona, al sistema de recuperación de péptidos, mediante mecanismos tales como los consistentes en la agitación o removido, por ejemplo. Si la energía de mezclado aplicada es demasiado lenta, el precipitado del péptido, puede comprender aglomerados grandes, pegajosos del material peptídico, el cual puede ser dificultoso de procesar, si no imposible de procesar. Por otro lado, si la energía de mezclado aportada es demasiado rápida, el sistema, puede generar finos, los cuales, a su vez, bloqueen u obturen el equipo de procesado, tales como los consistentes en los dispositivos de filtración. Correspondientemente en concordancia, la energía de mezclado, se elige para proporcionar un mezclado apropiado del agente precipitante con la composición del péptido, para a su vez proporcionar un precipitado de péptido procesable. La energía de mezclado, puede ajustarse, para conseguir la procesabilidad deseada.

Tal y como se menciona aquí, en este documento, la invención, proporciona procedimientos para precipitar péptidos a partir de una composición de péptidos. Los péptidos a ser recuperados de la composición, pueden ser en forma de intermediarios peptídicos (incluyendo así, de este modo, por lo menos un grupo protector de cadena secundaria), o péptidos que no incluyan ningunos grupos protectores.

De una forma general, la presencia de grupos protectores de cadena secundaria (particularmente, aquellos grupos protectores que incluyen grupos metilo), puede convertir al intermediario peptídico en más soluble, en disolventes monopolares, tales como el DCM. En algunos aspectos, la invención, proporciona procedimientos para la recuperación de intermediarios de péptidos, sin requerir una etapa de desprotección, en donde, los grupos protectores, se eliminarían del intermediario peptídico, antes del aislamiento del péptido. Así, de este modo, en formas preferidas de presentación de la invención, los procedimientos, pueden permitir la eliminación de las etapas de desprotección y los reactivos involucrados en estas etapas, durante la síntesis de péptidos.

En formas preferidas de presentación, el agente precipitante, comprende un alcohol, el cual incluye tres o más átomos de carbono, y por lo menos un grupo hidroxilo. De una forma preferible, el alcohol, es un alcohol secundario o terciario, de tal tipo que, el grupo hidroxilo, sea más estéricamente impedido, que un grupo hidroxilo primario. De una forma preferible, el agente precipitante, es relativamente inerte, con respecto al péptido a ser precipitado, de tal forma que, el agente precipitante, no reaccione químicamente con el péptido y/u otras porciones presentes en la composición (por ejemplo, para formar el éster etílico del péptido a ser aislado). Un agente precipitante particularmente preferido, es el alcohol isopropílico.

El agente precipitante, se proporciona a la composición del péptido, en una cantidad suficiente como para precipitar el material peptídico de la solución. De una forma preferible, la cantidad de agente precipitante, se elige para proporcionar una pureza mejorada del precipitado del péptido. En algunas formas de presentación, el agente precipitante, se proporciona, de una forma ideal, en una cantidad correspondiente a por lo menos aproximadamente 5 volúmenes, de entre unos márgenes comprendidos entre unos valores que van de 5 a 8 volúmenes, por volumen de solución del péptido. En formas alternativas de presentación, el agente precipitante, se proporciona, de una forma preferible, en una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 6,5 a 7,5 volúmenes, por volumen de solución del péptido.

Tal y como se ilustra en los ejemplos, la adición de IPA a la solución peptídica, puede provocar la precipitación del péptido, de la solución, en donde, el péptido precipitado, tiene una mayor pureza que la que se obtiene utilizando composiciones precipitantes standard, tales como heptano. Así, por ejemplo, la utilización de IPA como agente precipitante, puede proporcionar un precipitado de péptido, con un porcentaje de impurezas inferior a un 50%, si se compara con un péptido precipitado con heptano. Sin pretender ligarlo a ninguna teoría particular, se cree que, el heptano, es un disolvente no polar y, así, de este modo, precipita todo material. Como contraste de ello, el IPA, tiene un grado apropiado de polaridad, para provocar la precipitación del péptido, al mismo tiempo que retiene impurezas (tales como, por ejemplo, especies truncadas) en solución.

La invención, se dirige adicionalmente a procedimientos para la concentración de material peptídico, a partir de la solución, el cual comprende la recolección de material peptídico precipitado. En algunas formas de presentación, se generan precipitados peptídicos, mediante la adición de por lo menos un agente precipitante, a la composición que comprende el material peptídico de interés, y se recolecta el material precipitado que comprende el material peptídico de interés. En algunas formas de presentación, el procedimiento, comprende las etapas de proporcionar una composición que comprenda un material peptídico, en un disolvente que comprende DCM; precipitar el material peptídico mediante la adición de un agente precipitante a la composición, para proporcionar una mezcla que comprenda el precipitado, en donde, el precipitado, comprende el material peptídico, y en donde, el agente precipitante, es un alcohol con tres o más átomos de carbono.

En caso deseado, el péptido precipitado resultante, puede disolverse y someterse a precipitación adicional. Así, por ejemplo, el péptido precipitado, puede disolverse en un disolvente de péptidos apropiado, añadirse agente precipitante

adicional a la solución, y recolectarse el péptido precipitante, de la forma que se describe aquí, en este documento. Tales etapas sucesivas de precipitación, pueden repetirse de la forma que se desee.

El material peptídico precipitado, puede recolectarse mediante varios procedimientos bien conocidos en el arte de la técnica especializada, incluyendo, por ejemplo, la filtración y la centrifugación. En algunas formas de presentación, el péptido precipitado, se recolecta mediante filtrado al vacío, a través de una tela de filtro de polipropileno. El péptido precipitado, puede opcionalmente lavarse, si se desea, utilizando reactivos comunes.

En una de tales formas de presentación, la invención, proporciona procedimientos para impactar la capacidad de filtrado de un precipitado peptídico, procediendo a determinar la cantidad de IPA relativa al volumen total de solución, previamente a la adición de IPA, y utilizando la cantidad determinada, para impactar la capacidad de filtración del péptido, cuando se precipita de la composición. En otra forma de presentación, los procedimientos, pueden involucrar adicionalmente la obtención de la información relativa a la energía de mezclado, durante la precipitación, y utilizar la información de la energía de mezclado y la cantidad de agente precipitante relativa al volumen total de solución, previamente a la adición del agente precipitante, para impactar capacidad de filtrado del péptido, cuando se precipita de la composición. Correspondientemente en concordancia, la tasa de filtrado, puede controlarse mediante la utilización del contenido de la composición, y la tasa de agitación, durante el proceso de aislamiento, proporcionando con ello la capacidad de ajuste al proceso aislamiento, en su totalidad.

En algunas formas de presentación, la energía de mezclado, se aplica en forma de agitación a una tasa correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde menos de aproximadamente 2,5 m/s, preferiblemente, dentro de unos márgenes que van desde menos de aproximadamente 0,25 m/s, hasta aproximadamente 2,5 m/s, de una forma más preferible, dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0,4 hasta aproximadamente 2 m/s y, de una forma mayormente preferible, dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 2 m/s.

La invención, se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

30 Ejemplos

Para los ejemplos que se facilitan a continuación, se adoptan los siguientes reactivos standard y nomenclatura:

Equipo standard de filtrado: filtro Millipore de 25 mm, con un medio de filtro de Nylon, de 5 μ m, bajo un vacío de 133,3 mbar.

Test de ensayo de cloranilo: la solución de test de ensayo de cloranilo, se preparó añadiendo una gota de solución saturada de cloranilo en tolueno, a aproximadamente 1 ml de acetona. Los lavados de NMP, se sometieron a test de ensayo, procediendo a añadir una gota del lavado, a la solución de test de ensayo de cloranilo. Un color azul o violeta, es una indicación positiva para la presencia de amina secundaria, indicando el hecho de que se encuentran todavía presentes subproductos de Fmoc y/o piperidina residual.

Test de ensayo de ninhidrina: en el test de ensayo cualitativo de ninhidrina, se procedió a retirar una muestra de 2 - 20 mg de resina, y se lavó con NMP y, subsiguientemente, DCM ó metanol. Se procedió a añadir, a la muestra, tres gotas de una solución de fenol en etanol al 76%, seis gotas de una solución 0,2 mM de KCN en piridina, y tres gotas de una solución 0,28 M de ninhidrina en etanol y, la muestra, se emplazó en un bloque de calentamiento, a una temperatura de 70°C - 80°C, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 5 minutos. La muestra, se retiró e, inmediatamente, se diluyó con una solución de etanol/agua (9:1). Un color violeta o azul en la solución de sobrenadante o perlas, es una indicación positiva de la presencia de aminas libres, incluyendo el hecho de que, la reacción, no se encuentra todavía completada. Si se observaba un test de ensayo de ninhidrina positivo, después de una hora de la reacción de acoplamiento, la reacción de acoplamiento, se continuaba durante un transcurso de tiempo adicional de una hora. Si acontecía un test de ensayo de ninhidrina positivo, después de un transcurso de tiempo de 3 horas de la reacción de acoplamiento, el recipiente, se drenaba y, el acoplamiento, se repetía, utilizando aproximadamente un equivalente de aminoácido activado y reactivos.

Fragmento 1: El intermediario de péptido, designado como Fragmento 1, se sintetizó utilizando una resina de cloruro de 2-clorotritilo, sensible al aire, utilizando técnicas standard de síntesis de péptidos en fase sólida. En los ejemplos, el Fragmento 1, tenía las siguientes propiedades:

Secuencia: Ac-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Leu-Ile-His(trt)-Ser(tBu)-Leu-Ile-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Ser(tBu)-Gln(trt)-Asn(trt)-Gln(trt)-Gln-OH (SEQ ID NO: 3).

Fórmula: C186H237N22O31

MW: 3274,76.

ES 2 315 729 T3

Ejemplo 1

Aislamiento de intermediario peptídico con IPA

5 Este ejemplo, demuestra el aislamiento exitoso de un péptido de 16 residuos, presente inicialmente como una emulsión en DCM, utilizando alcohol isopropílico.

10 El material peptídico inicial, se encontraba presente, como una emulsión de Fragmento 1 en DCM. Con objeto de preparar la emulsión para la precipitación de péptidos, la emulsión, se trató mediante la adición de DCM, y agotamiento al vacío (agotador de vacío VD-800-243).

15 La clara solución de DCM resultante, se retiró del tambor, se pesó (228,2 kg), y se distribuyó en muestras. El análisis de la muestra obtenida de los 228,2 kg en el tambor, dio como resultado que ésta contenía un 4,23% (peso/peso) de Fragmento 1 (81,0% área de la norma, AN). La muestra, se sometió a test de ensayo, mediante análisis standard de HPLC. El análisis, indicó una cantidad de Fragmento 1 contenida de 9,65 kg. El contenido "efectivo" de Fragmento 1, se estimuló, a continuación, procediendo a dividir el Fragmento 1 contenido, por el área normalizada por ciento. Utilizando este cálculo, el contenido efectivo de Fragmento 1, se determinó que era de 13,5 kg.

20 A continuación, se procedió a cargar de nuevo la solución, en el vacío, y se concentró a 45 l, previamente al aislamiento.

25 Después de la concentración, se procedió a añadir IPA, a la solución del Fragmento 1, en una cantidad de 260 kg. A continuación, se redujo mediante destilación al vacío, mediante una suave agitación, para proporcionar un factor de relación volumétrica de la solución de IPA con respecto a DCM, correspondiente a un valor de 7,3. La velocidad extrema, durante la destilación, era de 1,6 m/s. Después de la destilación, el volumen final del recipiente, era de 180 l. El tiempo total de destilación, fue de 12 horas y, la tasa de destilación, fue de 16,2 l/h.

30 Las solución, se envejeció durante un transcurso de tiempo de 4 horas, con una velocidad extrema del agitador, durante el envejecimiento, de 1,6 m/s.

35 Después de la destilación, el recipiente, se enfrió entonces a una temperatura de 20°C y, la suspensión resultante aislada, se aisló en un filtro de Nutsche, con una tela de filtro de polipropileno (tamaño de poro de 10 µm, área de filtrado de 0,256 m²). El filtrado, se realizó durante un transcurso de tiempo de 1 hora, a una presión de 5,5 - 10⁴ Pa. La temperatura de la doble manta, durante el filtrado, se mantuvo a un nivel de 35°C - 37°C y, el vacío, se mantuvo a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 698,25 - 133,3 mbar.

El filtrado, se lavó con 79,3 kg de IPA, durante un transcurso de tiempo de 3 horas y 18 minutos. Después de lavado, el volumen del efluente, era de 230 l, con 0,95 kg de Fragmento 1 en el efluente.

40 El producto de filtrado, se secó, a continuación, durante un transcurso de tiempo de 36 horas, en un secador de doble cono (PP - DV - 111), con una temperatura en la doble manta, correspondiente a un valor de 35°C - 37°C. El valor del vacío, se mantuvo dentro de unos márgenes comprendidos entre 40 - 20 mbar. La pérdida total de disolvente/agua, en el secado (LOD), fue de 0,01. El Fragmento 1 aislado obtenido, se analizó, a continuación, mediante HPLC. Adicionalmente, además de utilizarse para determinar el porcentaje de área normalizada, el procedimiento, se utilizó, también, para determinar el ensayo de peso/peso %, mediante la técnica externa standard.

50 Los resultados, se encuentran recopilados en la tabla 2 que se facilita más abajo, a continuación. Tal y como se muestra en la tabla 2, la utilización de IPA, para aislar el intermediario del péptido, proporcionó una reducción en impurezas, de aproximadamente un 50%, en el péptido aislado, si se compara con el heptano.

Ejemplo 2

Aislamiento del intermediario del péptido con IPA

55 Este ejemplo, demuestra el aislamiento exitoso de un péptido de 16 residuos, presente inicialmente en una solución homogénea del Fragmento 1 en DCM, utilizando alcohol isopropílico.

60 En este ejemplo, la destilación, se realizó a una tasa de agitación mayor que en el ejemplo 1, en un intento para obtener una mejor transferencia de calor. No obstante, esta mayor tasa de agitación, generó finos, que blindaron la tela del filtro, y pararon el filtrado. Así, de este modo, el lote, se volvió a disolver en DCM y se precipitó. El producto de aislamiento, se restauró, a continuación, con la solución de DCM redisuelta.

65 El material peptídico inicial, era una solución homogénea de Fragmento 1 en DCM, que pesaba 65,5 kg. El análisis, indicó el hecho de que, éste, contenía un porcentaje del 20,6% (peso/peso) de Fragmento 1 (79,6% AN), para una cantidad de Fragmento 1 contenido de 13,3 kg. El rendimiento productivo "efectivo" estimado, equivalente, se determinó que era el correspondiente a un valor de 17,0 kg. La solución de DCM, se trató mediante la adición de DCM y agotamiento al vacío (VD-800-243), para proporcionar una solución que pesaba 65,6 kg. La solución, se concentró a una solución de 45 l.

ES 2 315 729 T3

Se procedió a añadir IPA a la solución, en una cantidad correspondiente a un peso de 284,2 kg, para proporcionar un factor de relación volumétrica de la solución, de IPA con respecto a DCM, correspondiente a un valor de 6,9. Se procedió, a continuación, a reducir la solución, al volumen objetivizado como diana, mediante destilación al vacío. La velocidad extrema del agitador, fue de 2,6 m/s, el valor del vacío, el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 173,3 - 51,0 mbar Hg, para la destilación. La destilación, se realizó a una tasa de 18,8 l/h, durante un transcurso de tiempo de 12 horas. El volumen final del recipiente, era de 185 l. Durante la destilación, se generaron finos, que bloquearon la tela del filtro, y pararon la filtración.

La solución, se envejeció durante un transcurso de tiempo de 4 horas y, la velocidad extrema del agitador, durante el envejecimiento, era de 2 m/s.

La suspensión en el filtro, se transfirió, a continuación, de nuevo, al recipiente de destilación, conjuntamente con los licores madre. Se procedió a añadir DCM, al lote, en una cantidad correspondiente a 99 kg, con objeto de re-disolver los sólidos, proporcionando 118 kg de solución. El fragmento 1 contenido, se determinó que era el correspondiente a 13,5 kg con el Fragmento 1 calculado, "efectivo", de 17,0 kg.

Se procedió a añadir IPA, en una cantidad de 381 kg, proporcionando una tasa del valor de relación volumétrica de la solución, de IPA con respecto a DCM, de 5,3. Se procedió, a continuación, a agotar el lote, una segunda vez, pero con la misma velocidad del agitador que en el Ejemplo 1 (1,6 m/s). Para esta (segunda) destilación, la tasa de vacío, se mantuvo a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 266 - 26,6 mbar, y la temperatura de la doble manta, era de 38°C. La destilación, se realizó a una tasa de 28 l/h, durante un transcurso de tiempo de 14 horas. El volumen final del recipiente, era de 185 l.

La solución, se envejeció durante un transcurso de tiempo de 2 horas y, la velocidad del agitador, durante el envejecimiento, era de 1,6 m/s. La suspensión del Fragmento 1 en IPA, se aisló, a continuación, en un filtro de Nutsche, con una tela de filtro de polipropileno (tamaño de poro de 10 μ m, área de filtrado de 0,256 m²). La suspensión, generó aglomerados sólidos, sin finos. El filtrado, se realizó a la presión normal, durante un transcurso de tiempo de 2 horas y quince minutos (filtrado del cuerpo principal). Durante el filtrado, el vacío se mantuvo a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 532 - 133 mbar.

El filtrado, se lavó con 86,7 g de IPA, durante un transcurso de tiempo de 7 horas. El tiempo de desmoronamiento, fue de 6 horas. El espesor del filtrado, era de 7 pulgadas. El volumen del efluente, era de 240 l, y en el efluente, se encontraban presentes 1,37 kg de producto.

El filtrado, se secó durante un transcurso de tiempo de 74 horas, en un secador de doble cono (PP-DV-111), con una temperatura de la doble manta de 38°C. El vacío, se mantuvo a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 21,3 - 9,3 mbar. El LOD final, era de 0,86. Se obtuvieron 14,0 kg de producto.

Resultados analíticos

El Fragmento 1 aislado obtenido, se analizó, a continuación, mediante HPLC. Adicionalmente, además de utilizarlo para determinar el porcentaje de área normalizada, el procedimiento, se utilizó, también, para determinar el ensayo de peso/peso %, mediante la técnica externa standard.

Los resultados, se encuentran recopilados en la tabla 2 que se facilita más abajo, a continuación. Tal y como se muestra en la tabla 2, la utilización de IPA, para aislar el intermediario del péptido, proporcionó una reducción en impurezas, de aproximadamente un 50%, en el péptido aislado, si se compara con el heptano. El AN y el % de peso/peso del Fragmento 1, en precipitado, eran comparables a los obtenidos en el ejemplo 1.

Ejemplo 3

Comparación con el procedimiento con heptano

Este ejemplo, compara el aislamiento del Fragmento 1, utilizando heptano, con los procedimientos de la invención.

Se obtuvieron 130 ml de suspensión que contenía el Fragmento 1 en heptano. La suspensión, contenía partículas sólidas grandes, según se observó vía microscopia, y sedimentó muy rápidamente. La muestra, se filtró en el laboratorio, en un transcurso de tiempo de 3 minutos y 14 segundos. Las filtraciones, se realizaron utilizando un filtro de Millipore de 35 mm, con un medio de filtro de Nylon, de 5 μ m. El filtrado, se realizó bajo un vacío correspondiente a un valor de 133 mbar.

En la tabla 3, la cual se facilita más abajo, a continuación, se muestra una comparación del material peptídico aislado, utilizando IPA *versus* heptano.

El análisis de HPLC del Fragmento 1, obtenido utilizando heptano *versus* IPA (datos no mostrados), indicaron el hecho de que, la utilización de IPA, elimina aproximadamente un porcentaje del 50% de las impurezas. Tal y como se muestra en la tabla 3, la precipitación con IPA, proporcionó un rendimiento productivo con una pureza correspondiente a un porcentaje del 94% *versus* un porcentaje del 88% de pureza, obtenida utilizando heptano. Esta reducción de un

ES 2 315 729 T3

12% de impurezas a un 6% de impurezas, en el Fragmento 1 precipitado, representaba un 50% de reducción, en impurezas, en el producto. Adicionalmente, además, tal y como se ilustra en la tabla 3, la precipitación con IPA, requirió únicamente una etapa de destilación, comparado con las cuatro etapas de destilación requeridas cuando se utilizó heptano, para la precipitación del fragmento de péptido.

TABLA 2

Pureza del Fragmento 1 recuperado

		<u>Heptano</u>	<u>IPA (Ejemplo 1)</u>	<u>IPA (Ejemplo 2)</u>
15	T1327 N	88,1%	94,1%	94,3%
	T1327 peso/peso	77,0%	87,0%	86,4%
20	Cont/Cont	N/C	82,5%	89,6%
	Act/Act	N/C	73,0%	80,9%

*N/C: no calculado

TABLA 3

Comparación de IPA con respecto a heptano, como agente precipitante

	<u>Heptano</u>	<u>IPA</u>	
35	Punto de ebullición		
	del disolvente	98°C	82,5°C
40	Destilación	4 veces	una vez
	Tiempo de filtrado en		
45	Lab (minutos:segundos)	3:14	4:19
	Pureza	88%	94%

Ejemplo 4

Aislamiento del intermediario del péptido con IPA

Este ejemplo, demuestra el aislamiento de un intermediario de péptido, de una solución de DCM, utilizando IPA.

El material peptídico inicial, se encontraba presente como una solución de Fragmento 1 en DCM, que pesaba 58,4 kg. La solución, contenía un porcentaje del 17,3% (peso/peso) de Fragmento 1, y la densidad de la solución, era de 1,29. La muestra, se ensayó mediante análisis externo, standard, de HPLC. El análisis, indicó una cantidad de Fragmento 1 contenido de 10,1 kg. El contenido "efectivo" del Fragmento 1, se determinó como siendo el correspondiente a un valor de 17,0 kg.

A continuación, se procedió a añadir IPA a la solución, en una cantidad correspondiente a un volumen de 360 ml, para proporcionar un factor de relación volumétrica de la solución, de IPA con respecto a DCM, correspondiente a un valor de 8,0. La solución, no se agitó durante la destilación y, el valor del vacío, era el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 133 - 66,5 mbar. La temperatura de la doble manta, era de 25°C. El volumen final del recipiente, era de 325 l.

ES 2 315 729 T3

La solución, se envejeció durante un transcurso de tiempo de 12 horas. La suspensión del Fragmento 1 en IPA, se aisló, a continuación, en un filtro de Nutsche, con una tela de filtro de polipropileno (tamaño de poro de 10 μm , área de filtrado de 0,256 m^2). La suspensión, se realizó a una temperatura de 0°C.

- 5 El filtrado, se secó en un secador de doble cono (PP-DV-111), con una temperatura de la doble manta de 38°C. El vacío, era el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 21,3 - 9,3 mbar. El LOD final, era de 0,86. El tiempo de secado, fue de 74 horas y, se obtuvieron 14,0 kg de producto.

10 *Resultados analíticos*

- El Fragmento 1 aislado obtenido, se analizó, a continuación, mediante HPLC. Adicionalmente, además de utilizarlo para determinar el porcentaje de área normalizada, el procedimiento, se utilizó, también, para determinar el ensayo de peso/peso %, mediante la técnica externa standard. Los resultados, se encuentran recopilados en la tabla 4 que se
15 facilita más abajo, a continuación. En la tabla 4, se encuentran también recopilados los resultados obtenidos para los lotes que eran la fuente de la concentración de DCM de partida, utilizada en este ejemplo. Los resultados, indicaban el hecho de que, utilizando IPA, en lugar de heptano, para aislar el intermediario de péptido correspondiente al Fragmento 1, se eliminan aproximadamente un 50% de la impurezas (94% versus 87% AN).

20 *Ejemplo 5*

Aislamiento del Fragmento 1, utilizando IPA

- 25 Este ejemplo, demuestra el aislamiento de un péptido, de una solución de DCM, utilizando IPA.

- El material peptídico inicial, se encontraba presente como una solución de Fragmento 1 en DCM, de un volumen de 70 ml. La solución, contenía un porcentaje del 13,3% (peso/peso) de Fragmento 1, y la densidad de la solución, era de 1,29. La muestra, se ensayó mediante análisis externo, standard, de HPLC. El análisis, indicó una cantidad de Frag-
30 mento 1 contenido de 10,1 kg. El contenido “efectivo” del Fragmento 1, se determinó como siendo el correspondiente a un valor de 15,3 g.

- A continuación, se procedió a añadir IPA a la solución, en una cantidad correspondiente a un volumen de 460 ml, para proporcionar un factor de relación volumétrica de la solución, de IPA con respecto a DCM, correspondiente
35 a un valor de 6,6. La destilación, se realizó durante un transcurso de tiempo de 6 horas y 27 minutos, a una tasa de 44,6 l/hora. La velocidad extrema del agitador, durante la destilación, fue de 0,4 m/s y, el valor de vacío, era el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 133 - 66,5 mbar. La temperatura de la doble manta, era de 25°C-30°C. El volumen final del recipiente, era 240 l.

- 40 La suspensión del Fragmento 1 en IPA, se aisló, a continuación, en un filtro de Nutsche, cargado con una tela de filtro de polipropileno (tamaño de poro de 10 μm , área de filtrado de 0,256 m^2). La suspensión, se realizó a una temperatura de 20°C y, el tiempo de filtrado, fue de 4 minutos y 15 segundos (filtración del cuerpo principal).

- El filtrado, se secó en un secador de doble cono (PP-DV-111), con una temperatura de la doble manta de 38°C. El
45 vacío, era el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 21,3 - 9,3 mbar. El LOD final, era de 0,86. El tiempo de secado, fue de 74 horas, y se obtuvieron 14,0 kg de producto.

Resultados analíticos

- 50 El Fragmento 1 aislado obtenido, se analizó, a continuación, mediante HPLC. Adicionalmente, además de utilizarlo para determinar el porcentaje de área normalizada, el procedimiento, se utilizó, también, para determinar el ensayo de peso/peso %, mediante la técnica externa standard.

- 55 Los resultados, se encuentran recopilados en la tabla 4 que se facilita más abajo, a continuación. En la tabla 4, se encuentran también recopilados los resultados obtenidos para los lotes que eran la fuente de la concentración de DCM de partida, utilizada en este ejemplo. Los resultados, indicaban el hecho de que, utilizando IPA, en lugar de heptano, para aislar el intermediario de péptido correspondiente al Fragmento 1, se eliminan aproximadamente un 50% de la impurezas (94% versus 88% AN).

60

65

ES 2 315 729 T3

TABLA 4

Recuperación del intermediario peptídico Fragmento 1, utilizando IPA

	<u>Lote #1</u>		<u>Lote #2</u>	
	Suspensión	IPA	DCM /	IPA
	<u>de DCM/heptano*</u>	<u>(Ejemplo 4)</u>	<u>IPA*</u>	<u>(Ejemplo 5)</u>
T1327V AN	88,8% 93,7%	86,2%	94,1%	
peso/peso	76,4%	88,8% 71,7%	88,8%	
Cont/cont	N/a	85,0%	N/a	82,2%
Act/act	100% asumido	73,3%	100% asumido	<u>73,1%</u>

*Material de Fragmento 1 para las soluciones que fueron la fuente del concentrado de DCM de partida, utilizado en estos ejemplos.

REIVINDICACIONES

1. Un material para la obtención de un péptido, que comprende las etapas de:

a. sintetizar un intermediario peptídico, que tenga uno o más grupos protectores de cadena secundaria;

b. proporcionar un disolvente al intermediario peptídico, para formar una composición intermediaria peptídica;

c. proporcionar un alcohol que tenga tres o más átomos de carbono, como agente precipitante, en una cantidad suficiente como para precipitar el intermediario peptídico, de la composición intermediaria peptídica, y

d. recolectar el precipitante,

caracterizado por el hecho de que, el intermediario peptídico, es un fragmento peptídico de enfuvirtide.

2. El procedimiento, según la reivindicación 1, en donde, el agente precipitante, es un alcohol secundario o terciario, que tiene tres o más átomos de carbono.

3. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 ó 2, en donde, el alcohol, es alcohol isopropílico.

4. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 3, en donde, el valor de relación volumétrica del alcohol, con respecto a la composición peptídica, es selecciona para que tenga un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 5 - 8 a 1.

5. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 4, en donde, el disolvente, para el intermediario peptídico, es un disolvente clorado.

6. El procedimiento, según la reivindicación 5, en donde, el disolvente, es diclorometano.

7. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 6, en donde, la precipitación del péptido, se lleva a cabo mediante agitación de menos de 2,5 m/s.

8. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 7, en donde, la recolección del precipitado, se realiza mediante filtración.

9. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 8, en donde, la síntesis del intermediario peptídico, se realiza vía síntesis de péptidos en fase en solución, fase sólida, o vía fase sólida híbrida/fase en solución.

10. El procedimiento, según la reivindicación 9, en donde, la síntesis del intermediario peptídico, se realiza vía síntesis de péptidos en fase sólida.

11. El procedimiento, según la reivindicación 10, que comprende adicionalmente la etapa de segmentar el intermediario peptídico, de un soporte sólido, previamente a la etapa de proporcionar un agente precipitante, para precipitar el intermediario peptídico.

12. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 11, en donde, el fragmento peptídico, se identifica en la SEQ ID NO: 3.