



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 9909018-0 B1**



**(22) Data do Depósito: 22/03/1999**

**(45) Data de Concessão: 09/04/2019**

**(54) Título:** PROCESSO PARA A SÍNTESE DE UM PEPTÍDEO

**(51) Int.Cl.:** A61K 38/00; C07K 5/00; C07K 7/00; C07K 16/00; C07K 17/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 01/05/1998 US 09/071877; 23/03/1998 US 09/045920.

**(73) Titular(es):** TRIMERIS, INC..

**(72) Inventor(es):** MYUNG-CHOL KANG; BRIAN BRAY; MAYNARD LICHTY; CATHERINE MADER; GENE MERUTKA.

**(86) Pedido PCT:** PCT US1999006230 de 22/03/1999

**(87) Publicação PCT:** WO 1999/048513 de 30/09/1999

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 21/09/2000

**(57) Resumo:** "PROCESSO PARA A SÍNTESE DE UM PEPTÍDEO, CONJUNTO DE FRAGMENTOS DE PEPTÍDEO, E, PEPTÍDEO". A presente invenção refere-se, primeiro, aos processos de síntese de peptídeos, em particular de T-20 (também referido como "DP178"; SEQ ID NO: 1) e de peptídeos semelhantes a T-20. Tais processos utilizam procedimentos de síntese em fases líquida e sólida e combinam grupos de fragmentos de peptídeo específicos para dar o peptídeo de interesse. A presente invenção refere-se em adição aos fragmentos de peptídeo individuais que atuam como intermediários na síntese de peptídeos de interesse (por exemplo, T-20). A presente invenção ainda refere-se adicionalmente aos grupos de tais fragmentos de intermediário de peptídeo que podem ser empregados juntos para produzir T-20 de comprimento total e peptídeos semelhantes a T-20.

## “PROCESSO PARA A SÍNTESE DE UM PEPTÍDEO”.

### 1. Introdução:

A presente invenção refere-se, primeiro, aos processos para a síntese de peptídeos, em particular de T-20 (também referido como “DP-178”; SEQ ID NO: 1) e de peptídeos semelhantes a T-20. Tais processos utilizam procedimentos de síntese em fases líquida e sólida e combinam grupos de fragmentos de peptídeo específicos para dar o peptídeo de interesse. A presente invenção refere-se em adição aos fragmentos de peptídeo individuais que atuam como intermediários na síntese de peptídeos de interesse (por exemplo, T-20). A presente invenção refere-se ainda adicionalmente aos grupos de tais fragmentos de intermediário de peptídeo que podem ser empregados juntos para produzir T-20 de comprimento total e peptídeos semelhantes a T-20. A presente invenção refere-se ainda adicionalmente aos processos para a purificação de peptídeos, em particular de T-20 e de peptídeos semelhantes a T-20, e de fragmentos de peptídeo individuais que atuam como intermediários na síntese de peptídeos da presente invenção.

### 2. Fundamentos:

Recentemente, peptídeos em um grande número têm sido identificados os quais exibem uma capacidade para inibir eventos associados com fusão, e, de modo importante, também exibem potente atividade antiviral. Veja, por exemplo, patentes U.S. de números: 5.464.933; 5.656.480 e publicação PCT de número WO 96/19495T-20. Como estes peptídeos são para serem extensivamente utilizados, por exemplo como agentes terapêuticos, é necessária uma capacidade de síntese em quantidades de grande escala.

Embora existam técnicas para síntese de peptídeo, (veja, por exemplo, 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", ESCOM, Leiden, 1992, 525-526; e Riniker *et al.*, 1993, *Tetrahedron Letters* 49:9307-9320) não há técnicas correntes que possam ser utilizadas para produção econômica, em grande escala, de peptídeos facilmente purificados tais como T-20 e peptídeos semelhantes a T-20.

### 3. Sumário da invenção:

A presente invenção refere-se, primeiro, aos processos para a síntese de peptídeos, em particular de T-20 (também referido como "DP-178"; SEQ ID NO: 1) e de peptídeos semelhantes a T-20. Tais processos utilizam procedimentos de síntese em fases líquida e sólida para sintetizar e combinar grupos de fragmentos de peptídeo específicos para dar o peptídeo de interesse. Em geral, os processos da invenção compreendem síntese de específicos intermediários de fragmento de peptídeo de cadeia lateral protegida de T-20 ou de um peptídeo semelhante ao peptídeo T-20 sobre um suporte sólido, copulação dos fragmentos protegidos em solução para formar um peptídeo T-20 protegido ou peptídeo semelhante ao peptídeo T-20 protegido, seguida por desproteção das cadeias laterais para dar o T-20 ou peptídeo semelhante a T-20 final. Uma modalidade preferida dos processos da invenção envolve a síntese de um peptídeo T-20 possuindo uma seqüência de aminoácidos como a mostrada na SEQ ID NO: 1.

A presente invenção refere-se em adição aos fragmentos de peptídeo individuais que atuam como intermediários na síntese de peptídeos de interesse (por exemplo, T-20). Os fragmentos de peptídeo da invenção incluem, mas não se limitam, àqueles possuindo as seqüências de aminoácidos mostradas na tabela 1 abaixo.

TABELA 1

P: 9909010

| Peptídeo<br>Nº | Amino Acid Sequence                    | Seq.de aminoácidos de T-20 correspondente numerada |
|----------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 1              | YTSLIHSL (SEQ ID NO:2)                 | 1-8                                                |
| 2              | YTSLIHSLIEESQNNQ (SEQ ID NO:3)         | 1-15                                               |
| 3              | YTSLIHSLIEESQNNQQ (SEQ ID NO:4)        | 1-16                                               |
| 4              | YTSLIHSLIEESQNNQEK<br>(SEQ ID NO:5)    | 1-18                                               |
| 5              | IEESQNNQ (SEQ ID NO:6)                 | 9-15                                               |
| 6              | IEESQNNQQ (SEQ ID NO:7)                | 9-16                                               |
| 7              | QEKNEQELLELDKWASLWNW<br>(SEQ ID NO:8)  | 16-35                                              |
| 8              | QEKNEQELLELDKWASLWNWF<br>(SEQ ID NO:9) | 16-36                                              |
| 9              | EKNEQEL (SEQ ID NO:10)                 | 17-23                                              |
| 10             | EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11)              | 17-26                                              |
| 11             | EKNEQELLELDKWASLWNWF<br>(SEQ ID NO:12) | 17-36                                              |
| 12             | NEQELLELDKWASLWNW<br>(SEQ ID NO:13)    | 19-35                                              |
| 13             | NEQELLELDKWASLWNWF<br>(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<br>(SEQ ID NO:19)  | 17-35                                              |

A presente invenção refere-se ainda adicionalmente aos grupos específicos de fragmentos de peptídeo que atuam como intermediários na síntese de peptídeo de interesse. Os grupos de fragmentos de peptídeo de

acordo com a invenção incluem grupos 1-20, como mostrados na tabela 2 abaixo.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

TABELA 2

| <u>Grupo</u> | <u>Seq. de aminoácidos</u>                                                                                 | <u>Seq. de aminoácidos de T-20 correspondentes numerada</u> |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1            | YTSLIHSLIEESQNQQ (SEQ ID NO:4)<br>EKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:12)                                      | 1-16<br>17-36                                               |
| 2            | YTSLIHSLIEESQNQQ (SEQ ID NO:4)<br>EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11)<br>DKWASLWNWF (SEQ ID NO:13)                   | 1-16<br>17-26<br>27-36                                      |
| 3            | YTSLIHSLIEESQNQQ (SEQ ID NO:4)<br>EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11)<br>DKWASLWNW (SEQ ID NO:17)                    | 1-16<br>17-26<br>27-35                                      |
| 4            | YTSLIHSL (SEQ ID NO:2)<br>IEESQNQ (SEQ ID NO:6)<br>EKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:12)                     | 1-8<br>9-15<br>17-36                                        |
| 5            | YTSLIHSL (SEQ ID NO:2)<br>IEESQNQ (SEQ ID NO:6)<br>EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11)<br>DKWASLWNWF (SEQ ID NO:13)  | 1-8<br>9-15<br>17-26<br>27-36                               |
| 6            | YTSLIHSL (SEQ ID NO:2)<br>IEESQNQ (SEQ ID NO:6)<br>EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11)<br>DKWASLWNW (SEQ ID NO:17)   | 1-8<br>9-15<br>17-26<br>27-35                               |
| 7            | YTSLIHSL (SEQ ID NO:2)<br>IEESQNQQ (SEQ ID NO:7)<br>EKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:12)                    | 1-8<br>9-16<br>17-36                                        |
| 8            | YTSLIHSL (SEQ ID NO:2)<br>IEESQNQQ (SEQ ID NO:7)<br>EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11)<br>DKWASLWNWF (SEQ ID NO:13) | 1-8<br>9-16<br>17-26<br>27-36                               |
| 9            | YTSLIHSL (SEQ ID NO:2)<br>IEESQNQQ (SEQ ID NO:7)<br>EKNEQELLEL (SEQ ID NO:11)<br>DKWASLWNW (SEQ ID NO:17)  | 1-8<br>9-16<br>17-26<br>27-35                               |

| <u>Grupo</u> | <u>Seq. de aminoácidos</u>                                                                                 | <u>Seq. de aminoácidos de T-20 correspondientes numerada</u> |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 10           | YTSLIHSLIEESQNQQ (SEQ ID NO:4)<br>EKNEQEL (SEQ ID NO:10)<br>LELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:16)                   | 1-16<br>17-23<br>24-36                                       |
| 11           | YTSLIHSLIEESQNQQ (SEQ ID NO:4)<br>EKNEQEL (SEQ ID NO:10)<br>LELDKWASLWNW (SEQ ID NO:15)                    | 1-16<br>17-23<br>24-35                                       |
| 12           | YTSLIHSL (SEQ ID NO:2)<br>IEESQNQ (SEQ ID NO:6)<br>EKNEQEL (SEQ ID NO:10)<br>LELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:16)  | 1-8<br>9-15<br>17-23<br>24-36                                |
| 13           | YTSLIHSL (SEQ ID NO:2)<br>IEESQNQ (SEQ ID NO:6)<br>EKNEQEL (SEQ ID NO:10)<br>LELDKWASLWNW (SEQ ID NO:15)   | 1-8<br>9-15<br>17-23<br>24-35                                |
| 14           | YTSLIHSL (SEQ ID NO:2)<br>IEESQNQQ (SEQ ID NO:7)<br>EKNEQEL (SEQ ID NO:10)<br>LELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:16) | 1-8<br>9-16<br>17-23<br>24-36                                |
| 15           | YTSLIHSL (SEQ ID NO:2)<br>IEESQNQQ (SEQ ID NO:7)<br>EKNEQEL (SEQ ID NO:10)<br>LELDKWASLWNW (SEQ ID NO:15)  | 1-8<br>9-16<br>17-23<br>24-35                                |
| 16           | YTSLIHSLIEESQNQ (SEQ ID NO:3)<br>QEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:9)                                       | 1-15<br>16-36                                                |
| 17           | YTSLIHSLIEESQNQ (SEQ ID NO:3)<br>QEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:9)                                       | 1-15<br>16-36                                                |
| 18           | YTSLIHSLIEESQNQQEK (SEQ ID NO:5)<br>NEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO:14)                                      | 1-18<br>19-36                                                |
| 19           | YTSLIHSLIEESQNQQEK (SEQ ID NO:5)<br>NEQELLELDKWASLWNW (SEQ ID NO:13)                                       | 1-18<br>19-35                                                |
| 20           | YTSLIHSLIEESQNQQ (SEQ ID NO:4)<br>EKNEQELLELDKWASLWNW (SEQ ID NO:19)                                       | 1-16<br>17-35                                                |

Esta invenção baseia-se, em parte, na surpreendente descoberta dos inventores de que certas combinações de reações de síntese em fase líquida e em fase sólida permitem, pela primeira vez, a preparação de peptídeo T-20 e de peptídeos semelhantes a T-20 de alta pureza, em uma grande escala com alta produção e elevado rendimento. Em particular, de acordo com os processos da invenção, peptídeo T-20 e peptídeos semelhantes a T-20 podem ser sintetizados em uma escala de uma ou mais quilogramas. Tem sido verificado que pela seleção de fragmentos de peptídeo T-20 específicos da invenção para síntese em fase sólida, a copulação elevadamente eficiente das técnicas em fase sólida pode ser explorada sem o uso de excesso de 3, 4 ou até mesmo cinco vezes de aminoácidos e reagentes que são normalmente requeridos na síntese em fase sólida. Os processos da invenção empregam apenas cerca de 1,5 vezes a quantidade de aminoácidos na síntese em fase sólida de fragmentos de peptídeo da invenção. Esta redução economizadora de custo na quantidade de aminoácidos e de reagentes torna os processos da invenção adequados para síntese em grande escala de peptídeo T-20 e de peptídeos semelhantes a T-20.

Em adição, os inventores verificaram de modo surpreendente que certos fragmentos de peptídeo podem ser sintetizados em fase sólida em uma carga de cerca de 0,8 a 1 mmol por grama de resina de fase sólida. Esta carga é significativamente maior do que a faixa de carga de 0,25 a 0,4 mmol por grama de resina tipicamente alcançada na síntese de peptídeo em fase sólida. Além do mais, os inventores verificaram que síntese de fragmentos de peptídeo selecionados em fase sólida usando resina supersensível a ácido permite que os peptídeos protegidos, sintetizados, da invenção, sejam clivados da resina sem remoção concomitante de grupos protetores de cadeia lateral. Isto reduz impurezas, e permite que peptídeos compreendendo 10 aminoácidos ou mais sejam sintetizados em alta pureza. O perfil de impureza de peptídeo T-20 e de peptídeos semelhantes a T-20 que são sintetizados em

fase de solução de acordo com os processos da invenção por copulação dos fragmentos de peptídeo de alta pureza produzidos de acordo com a invenção consiste de fragmentos principais que não copulam, em vez de análogos estritamente relacionados. Conseqüentemente, peptídeo T-20 e peptídeos semelhantes a T-20 produzidos de acordo com a invenção são muito mais fáceis de purificar do que aqueles produzidos de acordo com técnicas convencionais. Os exemplos apresentados nas seções 9 e 11, abaixo, demonstram tais sínteses combinatoriais de peptídeos T-20 de comprimento total. Os exemplos presentes na seção 11 demonstram a síntese em grande escala e a purificação de peptídeo T-20 e de peptídeos intermediários de T-20. Conseqüentemente, conforme os processos da invenção o peptídeo T-20 e os intermediários de peptídeos semelhantes a T-20 podem ser produzidos em uma escala de um ou mais quilogramas.

Os presentes inventores também verificaram de modo surpreendente que peptídeos tais como peptídeo T-20 e peptídeos semelhantes a T-20, bem como certos fragmentos de peptídeo aqui descritos podem ser purificados usando materiais de alta capacidade que podem ser utilizados em faixas de pH básico. Assim, a presente invenção refere-se em adição aos processos para a purificação de peptídeos, em particular de peptídeo T-20 e de peptídeos semelhantes a T-20, e aos fragmentos de peptídeo individuais que atuam como intermediários na síntese de peptídeos da presente invenção.

### 3.1 Definições:

Os notações de aminoácido aqui empregadas são convencionais e são as seguintes:

| Aminoácido: | Símbolo de uma letra | Abreviação convencional |
|-------------|----------------------|-------------------------|
| Alanina     | A                    | Ala                     |
| Asparagina  | N                    | Asn                     |

|                 |   |     |
|-----------------|---|-----|
| Ácido aspártico | D | Asp |
| Glutamina       | Q | Gln |
| Ácido glutâmico | E | Glu |
| Histidina       | H | His |
| Isoleucina      | I | Ile |
| Leucina         | L | Leu |
| Lisina          | K | Lys |
| Fenil-alanina   | F | Phe |
| Serina          | S | Ser |
| Treonina        | T | Thr |
| Triptofano      | W | Trp |
| Tirosina        | Y | Tyr |

#### 4. Breve descrição das figuras:

Figura 1. Processo de quatro fragmentos de T-20. Esta figura mostra o esquema seguido pelo exemplo apresentado na seção 9.1, abaixo, para a síntese de T-20 de comprimento total começando com fragmento de peptídeo intermediário de grupo 6, como mostrado na tabela 2, acima.

Figura 2. Processo de quatro fragmentos de T-20, rota 2. Esta figura mostra um esquema adicional de quatro fragmentos que copula intermediário de peptídeo de grupo 6, como mostrado na tabela 2, acima, para a síntese de T-20 de comprimento total.

Figura 3. Processo de três fragmentos de T-20. Esta figura mostra o esquema seguido nos exemplos apresentados na seção 9.1, abaixo, para a síntese de T-20 de comprimento total.

Figura 4. Processo de três fragmentos de T-20, rota 2. Esta figura mostra o esquema seguido no exemplo apresentado nas seções 9.2, 9.3, 9.4 e 9.5, abaixo, para a síntese de T-20 de comprimento total.

Figura 5. Processo de dois fragmentos de T-20. Esta figura mostra um esquema que copula intermediário de peptídeo de grupo 18 como

### 5.1 Peptídeos de comprimento total:

NH<sub>2</sub>-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-COOH

Em adição ao peptídeo T-20 e aos peptídeos semelhantes a T-20 descritos acima, os processos, fragmentos e grupos de fragmentos da presente invenção podem ser empregados para sintetizar peptídeos possuindo extremidades terminais amino e/ou carboxila modificadas. Tomando T-20 como um exemplo, tais peptídeos podem ser de fórmula:

na qual X representa um grupo amino; um grupo hidrofóbico selecionado do grupo consistindo de carbobenzoxila, dansila, e T-butil-óxi-carbonila; um grupo acetila; um 9-fluoro-enil-metóxi-carbonila (Fmoc); ou um grupo veículo macromolecular selecionado do grupo consistindo de conjugados de

lipídeo-ácido graxo, poli(etileno-glicol), e carboidratos; e Z representa um grupo carboxila; um grupo para-nitro-benzil-éster; ou um grupo veículo macromolecular selecionado do grupo consistindo de conjugados de lipídeo-ácido graxo, poli(etileno-glicol), e carboidratos. Técnicas para adição de tais grupos "X" e "Z" são bem conhecidas por aqueles experientes na arte.

Em uma modalidade preferida, os processos da invenção são utilizados para sintetizar o peptídeo possuindo a fórmula acima na qual X é um grupo acetila e Z é um grupo amida. Os exemplos apresentados na seção 9, abaixo, demonstram a síntese bem sucedida de peptídeos T-20 via copulação de intermediários de peptídeo descritos, abaixo, na seção 5.2. Em um processo preferido, peptídeo T-20 e peptídeos semelhantes a T-20 e intermediários podem ser purificados usando qualquer recheio de coluna à base de não-sílica (para maximização da capacidade de carga) incluindo mas não se limitando aos recheios à base de zircônio, poliestireno, poliacrílico ou outros recheios à base de polímero que são estáveis em faixas de pH elevado (maior do que sete). Por exemplo, dentre colunas carregadas com não-sílica recheios exibindo uma ampla faixa de pH que inclui valores de pH maiores do que aqueles são vendidos por Tosohaus (Montgomeryville, PA). Colunas recheadas com tal material podem ser corridas em cromatografia de pressão baixa, média e alta. Veja por exemplo o processo de purificação apresentado na seção 10, abaixo.

## 5.2 Intermediários de peptídeo:

A presente invenção engloba, mas não se limita aos, intermediários de fragmento de peptídeo de T-20 e de peptídeos semelhantes a T-20 com seqüências de aminoácidos específicas como as listadas na tabela 1 acima, e os grupos de intermediários de fragmento de peptídeo listados na tabela 2. Tais intermediários de peptídeo especialmente nos grupos listados na tabela 2, abaixo, podem ser utilizados para produzir peptídeo T-20 e peptídeos semelhantes a T-20.

Uma ou mais cadeias laterais dos resíduos de aminoácido dos fragmentos de peptídeo listados na tabela 1 ou 2 podem ser protegidas com grupos protetores padrão tais como t-butila (t-Bu), tritila (trt) e t-butil-óxi-carbonila (Boc). O grupo t-Bu é o preferido grupo protetor de cadeia lateral para resíduos de aminoácido Try (Y), Thr (T), Ser (S) e Asp (D); os grupo trt é o preferido grupo protetor de cadeia lateral para resíduos de aminoácido His (H), Gln (Q) e Asn (N); e o grupo Boc é o preferido grupo protetor de cadeia lateral para resíduos de aminoácido Lys (K) e Trp (W).

Durante a síntese de fragmentos 1, 2, 3 e 4 listados na tabela 1, a cadeia lateral do resíduo de histidina tem que ser protegida, preferivelmente com um grupo protetor tritila (trt). Se ela não for protegida, o ácido usado para clivar o fragmento de peptídeo da resina reagirá prejudicialmente com o resíduo de histidina, causando degradação do fragmento de peptídeo.

De preferência, os resíduos de glutamina dos fragmentos de peptídeo da invenção são protegidos com grupos tritila (trt). Entretanto, é preferido não proteger o resíduo de glutamina na extremidade terminal carboxila dos fragmentos 1-16 e 9-16. Tem sido verificado que a ausência de um grupo protetor no resíduo de glutamina na extremidade terminal carboxila dos fragmento 1-16 facilita reação do fragmento 1-16 com o fragmento 17-36, permitindo copulação dos fragmentos com apenas cerca de 2% de racemização. Em adição, for desejada se solubilidade menor de qualquer um dos fragmentos de peptídeo da invenção em solventes orgânicos, os grupos protegidos com tritila podem ser eliminados de qualquer um dos ou de quaisquer outros resíduos de glutamina dos fragmentos.

De preferência, todos os resíduos asparagina de cada fragmento de peptídeo da invenção são protegidos. Em adição, é preferido que o resíduo de triptofano seja protegido com um grupo Boc.

Fragmentos de peptídeo protegidos de acordo com as fórmulas

de peptídeo 1-18 listadas na tabela 1 acima incluem, mas não se limitam aos, compostos listados na tabela 3 abaixo.

TABELA 3

| Número da fórmula do peptídeo | Fórmula                                      | Seq. de aminoácidos T-20 correspondentes numeradas |
|-------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 1a                            | Ac-YTSLIHSL-COOH (SEQ ID NO:2)               | 1-8                                                |
| 1b                            | FMOC-YTSLIHSL-COOH (SEQ ID NO:2)             | 1-8                                                |
| 3a                            | Ac-YTSLIHSLIEESQNQQ-OPNB (SEQ ID NO:4)       | 1-16                                               |
| 3b                            | FMOC-YTSLIHSLIEESQNQQ-OPNB (SEQ ID NO:4)     | 1-16                                               |
| 3c                            | Ac-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO:4)       | 1-16                                               |
| 3d                            | FMOC-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO:4)     | 1-16                                               |
| 5a                            | Ac-IEESQNQ-COOH (SEQ ID NO:6)                | 9-15                                               |
| 5b                            | FMOC-IEESQNQ-COOH (SEQ ID NO:6)              | 9-15                                               |
| 6a                            | NH <sub>2</sub> -IEESQNQQ-OPNB (SEQ ID NO:7) | 9-16                                               |
| 6b                            | FMOC-IEESQNQQ-OPNB (SEQ ID NO:7)             | 9-16                                               |
| 9a                            | Ac-EKNEQEL-COOH (SEQ ID NO:10)               | 17-23                                              |
| 9b                            | FMOC-EKNEQEL-COOH (SEQ ID NO:10)             | 17-23                                              |
| 10a                           | Ac-EKNEQELLEL-COOH (SEQ ID NO:11)            | 17-26                                              |
| 10b                           | FMOC-EKNEQELLEL-COOH (SEQ ID NO:11)          | 17-26                                              |

| Número da fórmula do peptídeo | Fórmula                                                                 | Seq. de aminoácidos T-20 correspondentes numeradas |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 11a                           | NH <sub>2</sub> -EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH <sub>2</sub><br>(SEQ ID NO:12) | 17-36                                              |
| 11b                           | FMOC-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH <sub>2</sub><br>(SEQ ID NO:12)             | 17-36                                              |
| 14a                           | Ac-LELDKWASLWNW-COOH (SEQ ID NO:15)                                     | 24-35                                              |
| 14b                           | FMOC-LELDKWASLWNW-COOH (SEQ ID NO:15)                                   | 24-35                                              |
| 15a                           | NH <sub>2</sub> -LELDKWASLWNWF-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:16)           | 24-36                                              |
| 15b                           | FMOC-LELDKWASLWNWF-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:16)                       | 24-36                                              |
| 16a                           | Ac-DKWASLWNW-COOH (SEQ ID NO:17)                                        | 27-35                                              |
| 16b                           | FMOC-DKWASLWNW-COOH (SEQ ID NO:17)                                      | 27-35                                              |
| 17a                           | NH <sub>2</sub> -DKWASLWNWF-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:18)              | 27-36                                              |
| 17b                           | FMOC-DKWASLWNWF-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:18)                          | 27-36                                              |
| 18A                           | FMOC-EKNEQELLELDKWASLWNW-COOH<br>(SEQ ID NO:19)                         | 17-35                                              |

Qualquer uma ou mais das cadeias laterais dos resíduos de aminoácido dos peptídeos listados na tabela 3 acima podem ser protegidas com grupos protetores de cadeia lateral padrão tais como tBu, trt e Boc, como descrito acima. Sínteses representativas de peptídeos da tabela 3 são apresentadas nas seções 7 e 8, abaixo, que incluem as técnicas gerais discutidas na seção 5.4, abaixo.

### 5.3 Síntese de peptídeo:

Como discutido acima, alguns dos fragmentos de peptídeo individuais da invenção são preferivelmente preparados usando técnicas de síntese em fase sólida, embora outros peptídeos da invenção sejam

preferivelmente preparados empregando uma combinação de técnicas de síntese em fase de solução e em fase sólida, citadas sínteses culminando na produção de peptídeo T-20 e de peptídeos semelhantes a T-20 como aqui descritos. Entretanto, será entendido que os fragmentos de peptídeo da invenção podem ser sintetizados ou preparados por técnicas bem conhecidas na arte. Veja, por exemplo, Creighton, 1983, "Proteins: structures and molecular principles", W.H. Freeman and Co., NY, que é aqui totalmente incorporado como referência.

Os peptídeos da invenção podem ser alternativamente sintetizados de tal modo que uma ou mais das ligações que ligam os resíduos de aminoácido dos peptídeos sejam ligações não-peptídicas. Estas ligações não-peptídicas alternativas podem ser formadas pela utilização de reações bem conhecidas por aqueles experientes na arte, e podem incluir, mas não se limitam às, ligações de imino, éster, hidrazida, semicarbazida, e azo, para citar algumas.

Em ainda outra modalidade da invenção, peptídeo T-20 e peptídeos semelhantes a T-20 compreendendo as seqüências descritas acima podem ser sintetizados com grupos químicos adicionais presentes em suas terminações amino e/ou carboxila, de tal maneira que, por exemplo, a estabilidade, reatividade e/ou solubilidade dos peptídeos sejam aumentadas. Por exemplo, grupos hidrofóbicos tais como grupos carbobenzoxila, dansila, acetila ou t-butil-óxi-carbonila, podem ser adicionados nas terminações amino de peptídeos. Igualmente, um grupo acetila ou um grupo 9-fluoro-enil-metóxi-carbonila pode ser posicionado nas terminações amino de peptídeos. (Veja, modificação com "X" de peptídeo T-20, acima descrita) Em adição, o grupo hidrofóbico, t-butil-óxi-carbonila, ou um grupo amino pode ser adicionado nas terminações carboxila de peptídeos. De modo semelhante, um grupo para-nitro-benzil-éster pode ser posicionado nas terminações carboxila de peptídeo. (Veja, modificação com "Z" de peptídeo T-20, acima descrita).

Técnicas para introdução de tais modificações são bem conhecidas por aqueles experientes na arte.

Em adição, peptídeo T-20 e peptídeos semelhantes a T-20 podem ser sintetizados de tal modo que sua configuração estérica seja alterada. Por exemplo, o isômero D de um ou mais resíduos de aminoácido do peptídeo pode ser utilizado, em vez do usual isômero L.

Ainda mais, pelo menos um dos resíduos de aminoácido dos peptídeos da invenção pode estar substituído por um dos resíduos de aminoácido bem conhecidos de ocorrência não-natural. Alterações tais como estas podem servir para aumentar a estabilidade, reatividade e/ou solubilidade dos peptídeos da invenção.

Qualquer um de o peptídeo T20 ou peptídeos semelhantes a T20 pode ser sintetizado para possuir adicionalmente um grupo veículo macromolecular covalentemente ligado em suas terminações amino e/ou carboxila. Tais grupos veículo macromoleculares podem incluir, por exemplo, conjugados de lipídeo-ácido graxo, poli(etileno-glicol), carboidratos ou peptídeos adicionais. A modificação com "X" de T-20 descrita acima pode portanto adicionalmente representar qualquer um dos grupos veículo macromoleculares acima covalentemente ligados na terminação amino de um peptídeo, com um grupo peptídeo adicional sendo preferido. Igualmente, a modificação com "Z" de T-20 acima descrita pode adicionalmente representar qualquer um dos grupos veículo macromoleculares acima descritos.

De preferência, os fragmentos de peptídeo da presente invenção são sintetizados pela técnica de síntese de peptídeo em fase sólida (SPPS) usando protocolos padrão com Fmoc. Veja, por exemplo, Carpino *et al.*, 1970, *J. Am. Chem. Soc.* 92(19):5748-5749; Carpino *et al.*, 1972, *J. Org. Chem.* 37(22):3404-3409. Em uma modalidade preferida, a síntese em fases sólida dos fragmentos de peptídeo da presente invenção é realizada sobre

suportes sólidos supersensíveis a ~~ácido que incham, mas~~ não se limitam a, resina de cloreto de 2-cloro-tritila (veja, por exemplo, Barlos *et al.*, 1989, *Tetrahedron Letters* 30(30):3943-3946) e resina de ácido 4-hidróxi-metil-3-metóxi-fenóxi-butírico (veja, por exemplo, Seiber, 1987, *Tetrahedron Letters* 28(49):6147-6150, e Richter *et al.*, 1994, *Tetrahedron Letters* 35(27):4705-4706). Ambas as resinas de cloreto de 2-cloro-tritila e de ácido 4-hidróxi-metil-3-metóxi-fenóxi-butírico podem ser obtidas na Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA.

Procedimentos gerais para produção e carga de resinas que podem ser utilizadas na síntese de peptídeo em fase sólida são aqui descritos. Carga de resina pode ser realizada, por exemplo, via as seguintes técnicas: a resina, preferivelmente uma resina supersensível a ácido tal como 2-cloro-tritil-resina, é carregada na câmara de reação. A resina é lavada com um solvente clorado tal como dicloro-metano (DCM). O leito é drenado e uma solução de 1,5 equivalentes de um aminoácido e de 2,7 equivalentes de diisopropil-etil-amina (DIEA) em cerca de 8-10 volumes de dicloro-etano (DCE) é adicionada. A terminação N do aminoácido deve ser protegida, preferivelmente com Fmoc, e a cadeia lateral do aminoácido deve ser protegida onde necessário ou apropriado. A mistura é agitada com borbulhamento de nitrogênio por 2 horas.

Deve ser notado que um solvente clorado é requerido para inchamento apropriado da 2-cloro-tritil-resina. Embora DCE proporcione maior eficiência de carga de acordo com as fontes da literatura, DCM pode ser substituído com pouca ou nenhuma redução na carga.

Após agitação, o leito é drenado e lavado com DCM. Os sítios ativos sobre a resina são arrematados em sua extremidade com uma solução de MeOH:DIEA 9:1 por cerca de 20-30 minutos. O leito é drenado, lavado 4 x com DCM e seco com uma purga de nitrogênio para dar a resina carregada.

Fmoc é o grupo protetor preferido para a terminação N de

aminoácido. Dependendo de qual aminoácido está sendo carregado, sua cadeia lateral pode ou não ser protegida. Por exemplo, quando Trp é carregado, sua cadeia lateral deve ser protegida com Boc. De modo semelhante, a cadeia lateral de Gln pode ser protegida com trt. Entretanto, quando Gln está sendo carregada na preparação para síntese do fragmento de peptídeos 1-16, sua cadeia lateral não deve ser protegida. Não é necessário proteger a cadeia lateral de Leu.

Os aminoácidos Fmoc-protégidos usados na carga da resina e na síntese de peptídeo estão disponíveis, com ou sem grupos protetores de cadeia lateral conforme requerido, na Sean ou na Genzyme. Como uma alternativa para o procedimento acima, a resina pode ser obtida já carregada com o aminoácido apropriado.

Os exemplos apresentados na seção 6, abaixo, descrevem preparações de resina exemplares.

Técnicas de síntese de peptídeo em fase sólida podem ser realizadas como, por exemplo, de acordo com as seguintes técnicas: a resina carregada é adicionada na câmara de reação e condicionada com um solvente, preferivelmente cloreto de metileno (DCM, preferivelmente cerca de 10 vol.) com agitação de nitrogênio por cerca de 15 minutos para inchar os glóbulos de resina. DCM é requerido para adequado inchamento da 2-cloro-tritil-resina. O volume de resina dobrará ou triplicará dentro da câmara de reação à medida que os glóbulos incham e os sítios reativos se desdobram e se tornam acessíveis para reação. Após inchamento da resina, o solvente é drenado da câmara de reação.

Remoção do grupo protetor Fmoc (9-fluoro-enil-metil-óxi-carbonila) da terminação amina ou da resina é realizada pelo tratamento da resina com 2 alíquotas de uma solução 20% de piperidina em N-metil-2-pirrolidona (NMP) por cerca de dez minutos cada. O volume da solução 20% de piperidina em NMP requerido para cada alíquota dependerá da escala da

reação sendo conduzida. A resina é depois lavada 5-7 vezes com alíquotas de NMP (cerca de 10 vol.) para remover os subprodutos de Fmoc (isto é, dibenzofulveno e seu aduto de piperidina) e piperidina residual.

Um teste de cloranil pode ser utilizado para determinar se a remoção de subprodutos de Fmoc e de piperidina residual está completa. A solução de teste de cloranil é preparada pela adição de uma gota de uma solução saturada de cloranil em tolueno para cerca de 1 ml de acetona. As lavagens de NMP podem ser testadas pela adição de uma gota da lavagem na solução de teste de cloranil. Uma cor violeta ou azul é uma indicação positiva para a presença de amina secundária, indicando que subprodutos de Fmoc e/ou piperidina residual ainda estão presentes. A lavagem de NMP é repetida até que a cor azul ou violeta não seja mais observada.

Entrementes, o subsequente resíduo de aminoácido na sequência a ser adicionado na resina é ativado para reação em sua terminação carboxila. A terminação amino de cada aminoácido deve ser protegida com Fmoc. Dependendo de qual aminoácido está sendo adicionado, sua cadeia lateral pode ou não ser protegida. De preferência, as cadeias laterais de Tyr (Y), Thr (T), Ser (S) e Asp (P) são protegidas com t-Bu, as cadeias laterais de His (H), Gln (Q) e Asn (N) são protegidas com trt, e as cadeias laterais de Lys (K) e Trp (W) são protegidas com Boc. Entretanto, como discutido acima, a cadeia lateral de His tem que ser protegida. Em adição, é preferido não proteger a cadeia lateral de resíduo de Gln na extremidade terminal carboxila dos fragmentos 1-16 e 9-16. Não é necessário que as cadeias laterais de Leu ou de Ile sejam protegidas.

O aminoácido é ativado como segue. O aminoácido Fmoc-  
protegido (1,5 eq.), hidrato de 1-hidróxi-benzotriazol (HOBT) (1,5 eq.), e diisopropil-etil-amina (DIEA) (1,5 eq.) são dissolvidos em NMP (cerca de 7,5 vol.) na temperatura ambiente. A solução é esfriada para 0-5°C, e depois hexafluoro-fosfato de O-benzotriazil-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-urônio

(HBTU) (1,5 eq.) é adicionado ~~seguido por agitação por~~ 5-15 minutos para dissolução. É importante que ativação seja realizada em baixa temperatura para minimizar racemização do aminoácido. O HBTU é o último reagente adicionado na solução fria porque ativação e racemização não podem ocorrer em sua ausência.

A solução de aminoácido ativado é carregada na resina drenada, lavando com DCM (cerca de 2,5 vol.). Notar que ativação de aminoácido é realizada em BMP devido à insolubilidade de HBTU em DCM. Entretanto, DCM é adicionado na reação neste ponto para manter adequado inchamento dos glóbulos de resina. A reação é agitada com borbulhamento de N<sub>2</sub> por cerca de 1 hora. Completitude da copulação pode ser monitorada com um teste qualitativo de ninhidrina como descrito abaixo.

Para checar a completitude da reação usando o teste qualitativo de ninhidrina, uma amostra de 2-20 mg de resina é retirada e limpa por lavagem com metanol. Na amostra são adicionadas 3 gotas de uma solução 76% de fenol em etanol, 4 ou 5 gotas de uma solução 0,2 mM de KCN em piridina, e 3 gotas de uma solução 0,28 M de ninhidrina em etanol. A amostra é diluída com etanol para um volume de cerca de 0,5 ml e deixada em um bloco quente a cerca de 75°C por 5-10 minutos. Uma cor violeta ou azul é uma indicação positiva para a presença de amins livres, indicando que a reação ainda não está completa. A amostra pode ser adicionalmente diluída para um volume de cerca de 3 ml para indicar melhor o grau de mudança de cor na amostra concentrada.

Se um teste de ninhidrina positivo for observado após uma hora, a reação de copulação é continuada por mais uma hora. Se o teste de ninhidrina positivo persistir após 2 horas, a resina é drenada, lavada três vezes em cerca de 10 volumes de NMP, e a reação de copulação é repetida usando 1 equivalente de aminoácido ativado.

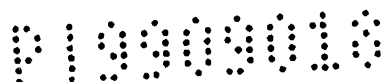
Se a resina for para ser armazenada durante a noite entre

ciclos de copulação, o leito de resina poderá ser drenado e coberto com DCM sob uma atmosfera inerte de nitrogênio. Alternativamente, o leito pode ser drenado, armazenado sob uma atmosfera inerte de nitrogênio, depois condicionado com uma lavagem de DCM antes do procedimento com o próximo ciclo de copulação. Se o fragmento completado for para ser armazenado durante a noite antes da clivagem, o leito de resina deverá ser lavado com DCM para ficar livre de NMP porque pode ocorrer significativa desproteção de Fmoc em NMP.

10 Após a copulação ter sido julgada completada, a resina é drenada e lavada com 3 alíquotas (cerca de 10 vol.) de NMP. O ciclo é repetido para os meros subseqüentes de fragmento de peptídeo. Após a reação de copulação final, a resina é lavada com 4 alíquotas (cerca de 10 vol.) de NMP, depois com 4 alíquotas (cerca de 10 vol.) de DCM. O peptídeo ligado em resina pode ser seco com uma purga de nitrogênio.

15 Peptídeos sintetizados via técnicas de síntese em fase sólida podem ser clivados e isolados de acordo com, por exemplo, as seguintes técnicas: o peptídeo pode ser clivado da resina usando técnicas bem conhecidas por aqueles experientes na arte. Por exemplo, soluções 1% ou 2% de ácido trifluoro-acético (TFA) em DCM ou uma combinação de uma  
20 solução 1% ou 2% de TFA em DCM pode ser utilizada para clivar o peptídeo. Ácido acético (HOAC) também pode ser empregado para clivar o peptídeo. Os específicos reagente de clivagem, solventes e tempo requeridos para clivagem dependerão do particular peptídeo sendo clivado. Após clivagem as frações de clivagem são submetidas aos procedimentos de  
25 processamento padrão para isolar o peptídeo. De modo típico, as frações de clivagem combinadas são concentradas sob vácuo, seguido pela reconstituição com um solvente tal como etanol, metanol ou heptano. Em geral, o peptídeo é precipitado pela adição de água, e coletado por filtração a vácuo. Alternativamente, o produto pode ser triturado antes do isolamento do

peptídeo.



Os exemplos apresentados nas seções 7.1 - 7.6, abaixo, apresentam sínteses em fase sólida de intermediários de peptídeo como mostrado nas tabelas 1, 2 e/ou 3.

5 Para síntese de peptídeos T-20 de comprimento total, os intermediários de peptídeo da tabela 1, acima, podem ser copulados juntos para dar o peptídeo T-20. Por exemplo, os grupos de intermediários de peptídeo listados na tabela 2, acima, podem ser copulados juntos para produzir o peptídeo T-20 de comprimento total. Exemplos representativos de  
10 tais sínteses de T-20 de comprimento total a partir de fragmentos de peptídeo intermediário são apresentados na seção 9, abaixo, e são mostrados esquematicamente nas figuras 1-5.

Em certas modalidades, uma síntese de T-20 por “processo de quatro fragmentos” refere-se a um esquema de síntese de T-20 que começa  
15 com quatro fragmentos de intermediário de peptídeo T-20 que são sintetizados e copulados usando técnicas de síntese em fases sólida e líquida em um peptídeo T-20 de comprimento total. Grupos de fragmento de peptídeo intermediário 5, 6, 8, 9 e 12-15 mostrados na tabela 2, acima, representam grupos preferidos. Figuras 1 e 2 mostram dois processos de  
20 quatro fragmentos que utilizam grupo 6 de intermediário de peptídeo da tabela 2 para sintetizar T-20 de comprimento total. Para este grupo, é notado que resíduo de aminoácido 36 (o resíduo de aminoácido carboxil-terminal de T-20) é introduzido individualmente durante o processo de copulação de fragmento. A culminação do esquema de síntese de T-20 mostrado na figura  
25 1 é demonstrada no exemplo apresentado na seção 9.1.

Em modalidades adicionais, um processo de três fragmentos para síntese de T-20 pode ser seguido. Uma síntese de T-20 por “processo de três fragmentos” refere-se a um esquema de síntese de T-20 que começa com três fragmentos de peptídeo intermediário de T-20 que são sintetizados e

copulados usando técnicas de síntese em fases líquida e sólida para dar um peptídeo T-20 de comprimento total. Grupos de fragmentos intermediários 2-4, 7, 10 e 11 mostrados na tabela 2, acima, representam preferidos grupos de três fragmentos. Figuras 3 e 4 mostram dois processos de três fragmentos que utilizam grupo 3 de intermediários de peptídeo da tabela 2 para sintetizar T-20 de comprimento total. Para este grupo, é notado que o resíduo de aminoácido 36 (o resíduo de aminoácido carboxil-terminal de T-20) é introduzido individualmente durante o processo de copulação de fragmento. A culminância do esquema de síntese de T-20 mostrado na figura 3 é demonstrada no exemplo apresentado na seção 9.1, abaixo. A culminação do esquema de síntese de T-20 na figura 4 é demonstrada nos exemplos apresentados nas seções 9.2 - 9.5, abaixo.

Em modalidades adicionais, um processo de dois fragmentos para síntese de T-20 pode ser seguido. Uma síntese de T-20 por “processo de dois fragmentos” refere-se a um esquema de síntese de T-20 que começa com dois fragmentos de peptídeo intermediário de T-20 que são sintetizados e copulados usando técnicas de síntese em fases sólida e líquida para dar um peptídeo T-20 de comprimento total. Grupos de fragmentos intermediários 1 e 16-20 mostrados na tabela 2, acima, representam grupos de fragmentos preferidos. Figura 5 mostra um processo de dois fragmentos que utiliza grupo 20 de intermediários de peptídeo da tabela 2 para sintetizar T-20 de comprimento total. Para este grupo, é notado que resíduo de aminoácido (o resíduo de aminoácido carboxil-terminal de T-20) é introduzido individualmente durante o processo de copulação do fragmento.

Técnicas de síntese de peptídeo em fase de solução bem conhecidas por aqueles experientes na arte podem ser utilizadas para a síntese de fragmentos intermediários de peptídeo da invenção. Os exemplos apresentados nas seções 8.1-8.11 descrevem exemplares sínteses de peptídeo em fase de solução de intermediários de peptídeo listados nas tabelas 1, 2

e/ou 3. Por exemplo, dentre colunas carregadas com não-sílica recheios exibindo uma ampla faixa de pH que inclui valores de pH maiores do que aqueles são vendidos por Tosohaus (Montgomeryville, PA).

#### 6. Exemplo: Síntese de resina:

5 São aqui descritos, em seções 6.1-6.3, exemplos nos quais resinas de cloro-tritila são sintetizadas as quais podem ser utilizadas juntamente com síntese em fase sólida de peptídeos e de intermediários de peptídeo aqui descritos.

#### 6.1 Preparação de Fmoc-Trp(Boc)-2-cloro-tritil-resina:

| <u>Materiais:</u>                    | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u> |
|--------------------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------|
| Resina de cloreto de 2-cloro-tritila | --        | 1,0       | 25            | 25            | --        |
| Fmoc-Trp(Boc)-OH                     | --        | 526,60    | 1,5           | 37,5          | 19,7      |
| Diisopropil-etil-amina (DIEA)        | 129,25    | 1,7       | 42,5          | 5,5           | 7,4       |
| Dicloro-etano (DCE)                  | --        | --        | --            | --            | 250       |
| Dicloro-metano (DCM)                 | --        | --        | --            | --            | 6 X 250   |
| Metanol:DIEA 9:1                     | --        | --        | --            | --            | 200       |

#### 10 Procedimento:

A resina de cloreto de 2-cloro-tritila (25 g, 1 eq.) foi carregada em uma câmara de peptídeo de 500 ml e lavada com 250 ml de DCM. O leito foi drenado e uma solução de Fmoc-Trp(Boc)-OH (1,5 eq.) e a DIEA (1,7 eq.) em 10 volumes de DCE foi adicionada. A mistura foi agitada com borbulhamento de nitrogênio por 2 horas.

15 O leito foi drenado e lavado com 250 ml de DCM. Os sítios ativos sobre a resina foram arrematados em sua extremidade com 200 ml de uma solução de MeOH:DIEA 9:1 por 20 minutos. O leito foi drenado, lavado com 4 x 250 ml de DCM, e seco com uma purga de nitrogênio para dar 34,3 g de resina carregada.

20 Análise quantitativa por HPLC foi realizada pela clivagem do Fmoc-aminoácido da resina e pelo ensaio versus um padrão. Ensaio por HPLC do material mostrou uma carga de resina a 0,68 mmol/g.

Coluna: Phenomenox Jupiter C18, 300Å; 5 µm.

25 Vazão de fluxo: 1 ml/min.

Detecção: UV a 260 nm.

Fase móvel: A: TFA aquoso a 0,1%; B: TFA a 0,1% em acetonitrila; isocrático 65% B.

Tempo de retenção: ~ 14 minutos.

## 5 6.2 Preparação de Fmoc-Gln-2-cloro-tritil-resina:

| <u>Materiais:</u>                    | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u> |
|--------------------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------|
| Resina de cloreto de 2-cloro-tritila | --        | 1,0       | 25            | 25            | --        |
| FmocGlnOH                            | 368,39    | 1,5       | 37,5          | 13,8          | --        |
| Diisopropil-etil-amina (DIEA)        | 129,25    | 1,7       | 42,5          | 5,5           | 7,4       |
| Dicloro-etano (DCE)                  | --        | --        | --            | --            | 75        |
| N,N-dimetil-formamida (DMF)          | --        | --        | --            | --            | 200       |
| Dicloro-metano (DCM)                 | --        | --        | --            | --            | 6 X 250   |
| Metanol:DIEA 9:1                     | --        | --        | --            | --            | 200       |

### Procedimento:

O procedimento usado no exemplo apresentado em 6.1 acima, foi repetido utilizando uma solução de FmocGlnOH (1,5 eq.) e DIEA (1,7 eq.) em uma mistura de 75 ml de DCE e 200 ml de DMF. A adição de DMF estabiliza o FmocGlnOH. A reação rendeu 33,8 g de resina carregada. Uma carga teórica de resina a 0,74 mmol/g foi assumida e o material foi posteriormente processado.

## 6.3 Preparação de Fmoc-Leu-2-cloro-tritil-resina:

| <u>Materiais:</u>                    | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u> |
|--------------------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------|
| Resina de cloreto de 2-cloro-tritila | --        | 1,0       | 250           | 250           | --        |
| FmocLeuOH                            | 353,42    | 1,5       | 375           | 132,5         | --        |
| Diisopropil-etil-amina (DIEA)        | 129,25    | 1,7       | 425           | 55            | 75        |
| Dicloro-etano (DCE)                  | --        | --        | --            | --            | 2000      |
| Dicloro-metano (DCM)                 | --        | --        | --            | --            | 6 X 1500  |
| Metanol:DIEA 9:1                     | --        | --        | --            | --            | 1500      |

### Procedimento:

A resina foi carregada em uma câmara de peptídeo de 3 l e lavada com 1,5 l de DCM. O leito foi drenado e uma solução de FmocLeuOH (1,5 eq.) e a DIEA (1,7 eq.) em 8 volumes de DCE foi adicionada. A mistura foi agitada com borbulhamento de nitrogênio por 2 horas.

O leito foi drenado e lavado com 1,5 l de DCM. Os sítios ativos sobre a resina foram arrematados em sua extremidade com 1,5 l de

uma solução de MeOH:DIEA 9:1 por 30 minutos. O leito foi drenado, lavado com 4 x 1,5 l de DCM, e seco com uma purga de nitrogênio para dar 345 g de resina carregada.

- 5 Análise quantitativa por HPLC foi realizada pela clivagem do Fmoc-aminoácido da resina e pelo ensaio versus um padrão. Ensaio por HPLC do material mostrou uma carga de resina a 0,72 mmol/g.

Coluna: Phenomenox Jupiter C18, 300Å; 5 µm.

Vazão de fluxo: 1 ml/min.

Deteção: UV a 260 nm.

- 10 Fase móvel: A: TFA aquoso a 0,1%; B: TFA a 0,1% em acetonitrila; isocrático 65% B.

Tempo de retenção: ~ 8 minutos.

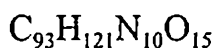
#### 7. Exemplo: Síntese de peptídeos em fase sólida:

- 15 São apresentados abaixo, nas seções 7.1-7.6, exemplos de síntese de intermediários de peptídeo em fase sólida como os listados nas tabelas 1, 2 e/ou 3.

#### 7.1 Preparação de fragmento Fmoc-AA(1-8)OH (fragmento 1b):

##### Estrutura:

20 Fmoc-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Leu-Ile-His(trt)-Ser(tBu)-Leu-OH (SEQ ID NO: 2)



PM 1619,06

| <u>Materiais:</u>                                                             | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u>         |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-------------------|
| Fmoc-Leu-2-cloro-tritil-resina                                                | --        | 1,0       | 15,6          | 20,0          | --                |
| Fmoc-aminoácido*                                                              | --        | 1,5       | 23,4          | --            | --                |
| Hidrato de 1-hidróxi-benzotriazol (HOBt)*                                     | 153,15    | 1,5       | 23,4          | 3,6           | --                |
| Hexafluoro-fosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-urônio (HBTU)* | 379,25    | 1,5       | 23,4          | 8,9           | --                |
| Diisopropil-etil-amina (DIEA)*                                                | 129,25    | 1,5       | 23,4          | 3,0           | 4,1               |
| N-metil-2-pirrolidinona (NMP)*                                                | --        | --        | --            | --            | 150               |
| Cloreto de metileno (DCM)*                                                    | --        | --        | --            | --            | 50                |
| Piperidina 20%/NMP*                                                           | --        | --        | --            | --            | 2 x 200           |
| NMP para rinçagem*                                                            | --        | --        | --            | --            | 200 (por lavagem) |
| Ácido trifluoro-acético (TFA) 1% em DCM                                       | --        | --        | --            | --            | 300               |
| TFA 0,5%/DCM                                                                  | --        | --        | --            | --            | 200               |

Piridina  
Etil-álcool  
Água

|    |    |    |    |    |    |    |    |    |           |    |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------|----|
| P  | 1  | 5  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 0  | --        | -- |
| -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- | 110       |    |
|    |    |    |    |    |    |    |    |    | 200 + 100 |    |

\* por ciclo de copulação.

Rendimento teórico: 25,3 g

Rendimento esperado: 80-90%

Rendimento real: 20,0g.

## 5 Procedimento:

Em uma câmara de reação de peptídeo de 1 l foram carregados 20,0 g de Fmoc-Leu-2-cloro-tritil-resina. A resina foi condicionada em 200 ml (~10 vol.) de DCM com agitação de nitrogênio por cerca de 15 minutos para inchar os glóbulos, depois foi drenada.

- 10 Remoção de Fmoc (9-fluoro-enil-metil-óxi-carbonila) da amina terminal foi realizada usando 2 x 200 ml de uma solução 20% de piperidina em NMP por 10 minutos cada. A resina foi depois lavada 5-7 vezes com 200 ml (~10 vol.) de NMP para remover subprodutos de Fmoc (dibenzofulveno e seu aduto de piperidina) e piperidina residual,
- 15 determinados por um teste de cloranil negativo.

- Entrementes, Fmoc-Ser (tBu), o subsequente aminoácido na seqüência foi ativado para reação na terminação carboxila. Aminoácido Fmoc-protégido (1,5 eq.), o HOBt (1,5 eq.), e a DIEA (1,5 eq.) foram dissolvidos em 150 ml (~7,5 vol.) de NMP na temperatura ambiente. A
- 20 solução foi esfriada para 0-5°C, depois o HBTU (1,5 eq.) foi adicionado e agitado 5-15 minutos para dissolver. A solução de ácido ativado foi carregada na resina drenada, lavando com 50 ml de DCM (~ 2,5 vol.). A reação foi agitada com borbulhamento de N<sub>2</sub> por 1 hora. Completitude da copulação foi monitorada com o teste qualitativo de ninhidrina. Após a
- 25 reação de copulação ter sido julgada completada, a resina foi drenada e lavada com 3 x 200 ml (1 vol.) de NMP.

O ciclo foi repetido para meros subsequentes do fragmento de peptídeo usando 1,5 equivalentes de cada um dos aminoácidos Fmoc-

protegidos His(trt), Ile, Leu, Ser(tBu), Thr(tBu) e Tyr(tBu). Após a reação de copulação final, a resina foi lavada com 4 x 200 ml (10 vol.) de NM), então com 4 x 200 ml (10 vol.) de DCM. A resina foi seca com uma purga de nitrogênio para dar 42 g de peptídeo ligado a resina.

- 5 O peptídeo foi clivado de uma quantidade de 21 g de resina usando 300 ml de TFA 1% em DCM por cerca de 2 minutos, seguido por 200 ml de TFA 0,5% em DCM. As frações de clivagem foram coletadas sobre piridina (razão em volume de 1:1 para TFA). As lavagens de clivagem foram combinadas e concentradas sob vácuo para um volume de ~50 ml, depois
- 10 reconstituídas com 110 ml de etanol enquanto que a concentração foi continuada para remover DCM residual para um volume final de ~250 ml. Produto foi precipitado com a adição de 200 ml de água. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo e lavados com ~100 ml de água. O produto foi seco com ar para dar 20,0 g (79%) de Fmoc-AA (1-8)-OH de pureza de 95%
- 15 por HPLC.

Coluna: Phenomenox Jupiter C18.

Vazão de fluxo: 1 ml/min.

Deteção: UV a 260 nm.

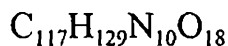
Fase móvel: A: TFA aquoso a 0,1%; B: TFA a 0,1% em acetonitrila em gradiente de 80% B para 99% B em 20 minutos.

Tempo de retenção: cerca de 23 minutos.

## 7.2 Preparação de fragmento Fmoc-AA(9-15)-OH (fragmento 5b):

### Estrutura:

- 25 Fmoc-Ile-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Ser(tBu)-Gln(trt)-Asn(trt)-Gln(trt)-OH (SEQ ID NO: 6)



PM 1963,39

P19909013

| <u>Materiais:</u>                          | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u>         |
|--------------------------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-------------------|
| Fmoc-Gln(trt)-2-cloro-tritil-resina        | --        | 1,0       | 12,0          | 20,0          | --                |
| Fmoc-aminoácido*                           | --        | 1,5       | 18,0          | --            | --                |
| Hidrato de 1-hidróxi-benzotriazol (HOBt)*  | 153,15    | 1,5       | 18,0          | 2,8           | --                |
| Hexafluoro-fosfato de O-benzotriazol-1-il- | 379,25    | 1,5       | 18,0          | 6,8           | --                |
| N,N,N',N'-tetrametil-urônio (HBTU)*        |           |           |               |               |                   |
| Diisopropil-etil-amina (DIEA)*             | 129,25    | 1,5       | 18,0          | 2,3           | 3,1               |
| N-metil-2-pirrolidinona (NMP)*             | --        | --        | --            | --            | 150               |
| Cloreto de metileno (DCM)*                 | --        | --        | --            | --            | 50                |
| Piperidina 20%/NMP*                        | --        | --        | --            | --            | 2 x 200           |
| NMP para rinçagem*                         | --        | --        | --            | --            | 200 (por lavagem) |
| DCM para clivagem                          | --        | --        | --            | --            | 160               |
| Ácido acético (HOAc)                       | --        | --        | --            | --            | 20                |
| Trifluoro-etanol                           | --        | --        | --            | --            | 20                |
| Heptano                                    | --        | --        | --            | --            | 250 + 250 + 100   |
| Metil-butil-éter                           | --        | --        | --            | --            | 100               |
| Isopropanol                                | --        | --        | --            | --            | 60                |
| Água                                       | --        | --        | --            | --            | 60 + 50           |

\* por ciclo de copulação

Rendimento teórico: 23,6 g    Rendimento esperado: 89-95%

Rendimento real: 21,1 g

#### Procedimento:

5                    O procedimento usado no exemplo apresentado na seção 7.1, acima, foi repetido usando 20,0 g de Fmoc-Gln(trt)-2-cloro-tritil-resina, e aminoácidos Fmoc-protégidos Asn(trt), Gln(trt), Ser(tBu), Glu(tBu), Glu(tBu) e Ile.

10                    Após o final da reação de copulação, a resina foi lavada com 4 x 200 ml (10 vol) de NMP, depois com 4 x 200 ml (10 vol) de DCM.

15                    O peptídeo foi clivado da resina usando 200 ml de DCM:TFE:HOAc 8:1:1 por 2 horas, seguido por lavagem de 2 x 100 ml de DCM. Os eluídos combinados foram concentrados sob vácuo para um volume de ~100 ml, depois reconstituídos com 250 ml de heptano enquanto a concentração era continuada para remover DCM residual para um volume final de ~250 ml. A camada de heptano foi separada da mistura bifásica formada. O produto foi precipitado com a adição de 250 ml de heptano e 100 ml de MTBE, depois foi triturado durante a noite na temperatura ambiente para dar material de consistência desejada. Os sólidos foram coletados por

163  
F

filtração a vácuo e lavados com cerca de 100 ml de heptano. O produto foi reprocessado para remover ácido acético residual. Os sólidos filtrados foram dissolvidos em 60 ml de isopropanol a 50°C. A solução foi esfriada em um banho de gelo para 0-5°C, depois 60 ml de água foram adicionados em uma rápida velocidade de gotejamento. A lama de produto foi triturada com agitação por ~ 1 hora no banho de gelo. Os sólidos foram isolados por filtração a vácuo e lavados com ~50 ml de água. O produto foi seco com ar para dar 21,1 g (90%) de Fmoc-AA(9-15)-OH de pureza de 95% por HPLC.

Coluna: Phenomenox Jupiter C18.

Vazão de fluxo: 1 ml/min.

Detecção: UV a 260 nm.

Fase móvel: A: TFA aquoso a 0,1%; B: TFA a 0,1% em acetonitrila em gradiente de 80% B para 99% B em 20 minutos.

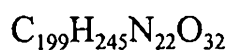
Tempo de retenção: cerca de 23 minutos.

### 7.3 Preparação de fragmento Fmoc-AA(1-16)-OH (fragmento 3d):

#### Estrutura:

Fmoc-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:

4)



PM 3457,30:

| <u>Materiais:</u>                                                             | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u>         |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-------------------|
| Fmoc-Gln-2-cloro-tritil-resina                                                | --        | 1,0       | 24,1          | 32,5          | --                |
| Fmoc-aminoácido*                                                              | --        | 1,5       | 36,2          | 5,5           | --                |
| Hidrato de 1-hidróxi-benzotriazol (HOBT)*                                     | 153,15    | 1,5       | 36,2          | 5,5           | --                |
| Hexafluoro-fosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-urônio (HBTU)* | 379,25    | 1,5       | 36,2          | 13,7          | --                |
| Diisopropil-etil-amina (DIEA)*                                                | 129,25    | 1,5       | 36,2          | 4,7           | 6,3               |
| N-metil-2-pirrolidinona (NMP)*                                                | --        | --        | --            | --            | 200               |
| Cloreto de metileno (DCM)*                                                    | --        | --        | --            | --            | 75                |
| Piperidina 20%/NMP*                                                           | --        | --        | --            | --            | 2 x 250           |
| NMP para rinçagem*                                                            | --        | --        | --            | --            | 250 (por lavagem) |
| Ácido trifluoro-acético 1% / DCM                                              | --        | --        | --            | --            | 4 x 50            |
| Piridina                                                                      | 79,10     | --        | --            | --            | 4 x 0,5           |

|         |  |    |          |
|---------|--|----|----------|
| Heptano |  | -- | 150 + 50 |
| Metanol |  | -- | 50       |
| Água    |  | -- | 50 + 25  |

\* por ciclo de copulação

Rendimento teórico: 48,9 g    Rendimento esperado: 85-90%

Procedimento:

O procedimento usado no exemplo apresentado na seção 7.1, acima, foi repetido usando 32,5 g de Fmoc-Gln-2-cloro-tritil-resina e os requeridos aminoácidos Fmoc-protetidos. A reação foi realizada como descrito no exemplo apresentado na seção 6.1, acima, exceto que volumes de solventes ligeiramente diferentes foram empregados como indicado na seção de materiais, acima.

Após a reação de copulação final, a resina foi lavada com 4 x 250 ml (8 vol.) de NMP, depois com 4 x 250 ml (8 vol.) de DCM. A resina foi seca sob uma purga de nitrogênio para dar 97,4 g de peptídeo ligado.

Numa escala de 17,7 g, o peptídeo ligado a resina foi clivado da resina usando 2 x 190 ml de TFA 1% em DCM por 1-2 minutos, seguido por 1 x 120 ml com DCM. As frações de clivagem foram coletadas sobre piridina (razão em volume de 1:1 para TFA). As frações e lavagem foram combinadas e concentradas sob vácuo para um volume de ~50 ml, depois reconstituídas com 200 ml de metanol. A concentração foi continuada para remover DCM residual para um volume final de ~50 ml. Produto foi precipitado com a adição de 250 ml de água e agitado na temperatura ambiente por ~30 minutos. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo e lavados com ~50 ml de água. O produto foi seco com ar para dar 12,8 g (84%). O produto foi reprocessado para remover sais de piridínio. Os sólidos filtrados foram dissolvidos em 150 ml de metanol na temperatura ambiente. Adição de 200 ml de água na temperatura ambiente precipitou o produto. O produto foi isolado por filtração a vácuo e lavado com cerca de 50 ml de água. O material foi seco com ar para dar 12,8 g (84%) de Fmoc-AA(1-16)OH.

Coluna: Phenomenex Jupiter C18

Vazão de fluxo: 1 ml/min.

Detecção: UV a 260 nm.

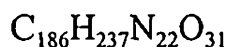
Fase móvel: A: TFA aquoso a 0,1%; B: TFA a 0,1% em acetonitrila em gradiente de 75% B para 99% B em 20 minutos.

Tempo de retenção: ~ 25 minutos.

#### 7.4 Preparação de fragmento Ac-AA(1-16)-OH (fragmento 3c):

##### Estrutura:

10 Ac-Tyr(tBu)-Thr(tBr)-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: 4):



PM 3274,76

| <u>Materiais:</u>                                                             | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u>         |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-------------------|
| Fmoc-Gln-2-cloro-tritil-resina                                                | --        | 1,0       | 24,1          | 32,5          | --                |
| Fmoc-aminoácido*                                                              | --        | 1,5       | 36,2          | --            | --                |
| Hidrato de 1-hidróxi-benzotriazol (HOBT)*                                     | 153,15    | 1,5       | 36,2          | 5,5           | --                |
| Hexafluoro-fosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-urônio (HBTU)* | 379,25    | 1,5       | 36,2          | 13,7          | --                |
| Diisopropil-etil-amina (DIEA)*                                                | 129,25    | 1,5       | 36,2          | 4,7           | 6,3               |
| N-metil-2-pirrolidinona (NMP)*                                                | --        | --        | --            | --            | 200               |
| Cloreto de metileno (DCM)*                                                    | --        | --        | --            | --            | 75                |
| Piperidina 20%/NMP*                                                           | --        | --        | --            | --            | 2 x 250           |
| NMP para rinçagem*                                                            | --        | --        | --            | --            | 250 (por lavagem) |
| Ácido trifluoro-acético 1% / DCM                                              | --        | --        | --            | --            | 4 x 50            |
| Piridina                                                                      | 79,10     | --        | --            | --            | 4 x 0,5           |
| Heptano                                                                       | --        | --        | --            | --            | 150 + 50          |
| Metanol                                                                       | --        | --        | --            | --            | 50                |
| Água                                                                          | --        | --        | --            | --            | 50 + 25           |

\* por ciclo de copulação

15 Rendimento teórico: 48,9 g

Rendimento esperado: 85-90%

Procedimento:

O procedimento usado no exemplo apresentado na seção 7.1, acima, foi repetido usando 32,5 g de Fmoc-Gln-2-cloro-tritil-resina e os requeridos aminoácidos Fmoc-protegidos, e os volumes de solvente indicados na seção de materiais acima.

20

Após a reação de copulação final, a resina foi lavada com 4 x 250 ml (8 vol.) de NMP, depois com 4 x 250 ml (8 vol.) de DCM. A resina foi seca sob uma purga de nitrogênio para dar 97,4 g de peptídeo ligado.

5        Numa escala de 10 g, o peptídeo ligado a resina foi acetilado com anidrido acético e piridina (5 eq. cada) em 100 ml de NMP:DCM 3:1 por 30 minutos, depois foi lavado com 2 x 25 ml de DCM. O peptídeo foi clivado da resina usando 3 x 50 ml de TFA 1% em DCM, seguido por lavagens com 2 x 50 ml de DCM. As frações de clivagem foram coletadas sobre piridina (razão em volume de 1:1 para TFA). As frações e lavagem foram combinadas e concentradas sob vácuo para um volume de cerca de 100 ml, depois reconstituídas com 3 x 50 ml de heptano adicionados em porções enquanto que a concentração foi continuada para remover DCM residual para um volume final de ~150 ml. Produto precipitou inicialmente com uma consistência um pouco pegajosa mas foi triturado com agitação por ~30 minutos em um banho de gelo a 0-5°C para dar um sólido filtrável. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo e lavados com ~50 ml de heptano. O produto foi reprocessado para remover sais de piridínio. Os sólidos filtrados foram dissolvidos em 50 ml de metanol na temperatura ambiente. A solução foi esfriada em um banho de gelo a 0-5°C, depois 50 ml de água foram adicionados em uma velocidade de gotejamento rápida. O material inicialmente precipitou como um sólido pegajoso que foi triturado para uma consistência filtrável com agitação por ~1 hora no banho de gelo. O produto foi isolado por filtração a vácuo e lavado com ~25 ml de água. O produto foi seco com ar para dar 7,0 g (90%) de AcAA(1-16)OH. O produto foi subsequenteiramente reprocessado como descrito acima para dar 6,2 g (recuperação de 89%) de material de pureza de 96% por HPLC.

Coluna: Zorbax LP C8, 100Å, 20 µm.

Vazão de fluxo: 1 ml/min.

Deteção: UV a 260 nm.

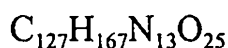
Fase móvel: A: TFA aquoso a 0,1%; B: ACN:IPA 1:1 com 0,05% TFA, gradiente de 80% B para 99% B em 20 minutos.

Tempo de retenção: ~ 15 minutos.

### 7.5 Preparação de fragmento Fmoc-AA(17-26)-OH (fragmento 10b):

#### 5 Estrutura:

Fmoc-Glu(tBu)-Lys(Boc)-Asn(trt)-Glu(tBu)-Gln(trt)-Glu(tBu)-Leu-Leu-Glu(tBu)-Leu-OH (SEQ ID NO: 11):



PM 2275,82

| Materiais:                                                                    | PM     | eq  | mmoles | gramas | ml                |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------|-----|--------|--------|-------------------|
| Fmoc-Leu-2-cloro-tritil-resina                                                | --     | 1,0 | 19,5   | 25,0   | --                |
| Fmoc-aminoácido*                                                              | --     | 1,5 | 30,0   | --     | --                |
| Hidrato de 1-hidróxi-benzotriazol (HOBt)*                                     | 153,15 | 1,5 | 30,0   | 4,6    | --                |
| Hexafluoro-fosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-urônio (HBTU)* | 379,25 | 1,5 | 30,0   | 11,4   | --                |
| Diisopropil-etil-amina (DIEA)*                                                | 129,25 | 1,5 | 30,0   | 3,9    | 5,2               |
| N-metil-2-pirrolidinona (NMP)*                                                | --     | --  | --     | --     | 200               |
| Cloreto de metileno (DCM)*                                                    | --     | --  | --     | --     | 75                |
| Piperidina 20%/NMP*                                                           | --     | --  | --     | --     | 2 x 250           |
| NMP para rinçagem*                                                            | --     | --  | --     | --     | 250 (por lavagem) |
| Ácido trifluoro-acético 1% / DCM                                              | --     | --  | --     | --     | 3 x 400           |
| Piridina                                                                      | 79,10  | --  | 150    | --     | 3 x 4             |
| Etanol, desnaturado                                                           | --     | --  | --     | --     | 300               |
| Água                                                                          | --     | --  | --     | --     | 300               |

10 \* por ciclo de copulação

Rendimento teórico: 44,4 g

Rendimento esperado: 90-95%

Rendimento real: 46,9 (105%)

#### Procedimento:

15 O procedimento usado no exemplo apresentado na seção 7.1, acima, foi repetido usando 25,0 g de Fmoc-Leu-2-cloro-tritil-resina, os requeridos aminoácidos Fmoc-protegidos e os volumes de solvente indicados na seção de materiais acima.

Após a reação de copulação final, a resina foi lavada com 4 x 250 ml (10 vol.) de NMP, depois com 4 x 250 ml (10 vol.) de DCM.

20 O peptídeo foi clivado da resina usando 3 x 400 ml (~ 15 vol.) de TFA 1% em DCM, seguido por 1 x 200 ml (7,5 vol.) de DCM. As frações

de clivagem foram coletadas sobre piridina (razão em volume de 1:1 para TFA), depois as frações e lavagem foram analisadas para conteúdo de produto. As frações contendo produto foram combinadas e concentradas sob vácuo para um volume de ~100 ml, depois reconstituídas com 300 ml de etanol. A concentração foi continuada para remover DCM residual para um volume final de ~250 ml. Na solução agitada foram adicionados 300 ml de água para precipitar o produto. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo e lavados com ~50 ml de água. O produto foi seco com ar para dar 46,4 g (105%) de Fmoc-AA(17-26)OH de pureza de 97% por HPLC.

10

Coluna: Phenomenox Jupiter C18.

Vazão de fluxo: 1 ml/min.

Deteção: UV a 260 nm.

Fase móvel: A: TFA aquoso a 0,1%; B: TFA a 0,1% em acetonitrila, gradiente de 75% B para 99% B em 20 minutos.

15

Tempo de retenção: ~ 25 minutos.

#### 7.6 Preparação de fragmento Fmoc-AA(27-35)-OH (fragmento 16b):

##### Estrutura:

Fmoc-Asp(tBu)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Ala-Ser(tBu)-Leu-Trp(Boc)-Asn(trt)-Trp(Boc)-OH (SEQ ID NO: 17)

20



PM 2182,61

| Materialis:                                                                   | PM     | eq  | mmoles | gramas | ml                |
|-------------------------------------------------------------------------------|--------|-----|--------|--------|-------------------|
| Fmoc-Trp(Boc)-2-cloro-tritil-resina                                           | --     | 1,0 | 22,4   | 33,0   | --                |
| Fmoc-aminoácido*                                                              | --     | 1,5 | 33,6   | --     | --                |
| Hidrato de 1-hidróxi-benzotriazol (HOBT)*                                     | 153,15 | 1,5 | 33,6   | 5,1    | --                |
| Hexafluoro-fosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametil-urônio (HBTU)* | 379,25 | 1,5 | 33,6   | 12,7   | --                |
| Diisopropil-etil-amina (DIEA)*                                                | 129,25 | 1,5 | 33,6   | 4,3    | 5,8               |
| N-metil-2-pirrolidinona (NMP)*                                                | --     | --  | --     | --     | 225               |
| Cloreto de metileno (DCM)*                                                    | --     | --  | --     | --     | 75                |
| Piperidina 20%/NMP*                                                           | --     | --  | --     | --     | 2 x 250           |
| NMP para rinçagem*                                                            | --     | --  | --     | --     | 250 (por lavagem) |
| Trifluoro-etanol                                                              | --     | --  | --     | --     | 30                |
| DCM para clivagem                                                             | --     | --  | --     | --     | 240               |
| Etanol, desnaturado                                                           | --     | --  | --     | --     | 300. 100          |
| Água                                                                          | --     | --  | --     | --     | 300. 150          |

|                                         |       |       |       |       |         |
|-----------------------------------------|-------|-------|-------|-------|---------|
| Acido trifluoro-acético (TFA) 1% em DCM | --    | --    | --    | --    | 2 x 250 |
| Piridina                                | 79,10 | 79,10 | 79,10 | 79,10 | 2 x 2,5 |

\* por ciclo de copulação

Rendimento teórico: 48,9 g U 85-90%

### Procedimento:

O procedimento usado no exemplo apresentado na seção 7.1, acima, foi repetido usando 33,0 g de Fmoc-Trp(Boc)-2-cloro-tritil-resina, os requeridos aminoácidos Fmoc-protégidos e materiais indicados na seção de materiais acima.

Após a reação de copulação final, a resina foi lavada com 4 x 250 ml (7,5 vol.) de NMP, depois com 4 x 250 ml (7,5 vol.) de DCM.

O peptídeo foi clivado da resina pelo tratamento com 300 ml (~ 10 vol.) de uma solução de DCM:TFE:HOAc 8:1:1 por 2 horas. A resina foi drenada e lavada com 2 x 250 ml de DCM. A solução de clivagem e as lavagens foram combinadas e concentradas para um volume de ~50 ml, depois foram reconstituídas com 250 ml de etanol. A solução foi esfriada com agitação em um banho de gele para 0-5°C. Na solução agitada foram adicionados 125 ml de água para precipitar o produto. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo e lavados com ~50 ml de água. O produto foi seco com ar para dar 32,0 g (65,4%) de Fmoc-AA(27-35)-OH de pureza de 95% por HPLC.

A resina foi tratada com 2 x 250 ml de uma solução 1% de TFA em DCM seguida por uma lavagem com 100 ml de DCM. As frações de clivagem foram coletadas sobre piridina em uma razão de volume de 1:1 com TFA. Os eluídos e a lavagem combinados foram concentrados para volume de ~50 ml. Na solução foram adicionados 100 ml de etanol, depois 150 ml de água. A lama de produto foi filtrada a vácuo dando uma segunda coleta de 10,7 g (21,9%) (pureza de 95% por HPLC) para dar um rendimento combinado de 87,3%. A clivagem com TFA 1%/DCM é preferido devido à sua maior efetividade e aos volumes menores.

Coluna: Phenomenex Jupiter C5, 300Å, 5 µm.

Vazão de fluxo: 0,75 ml/min.

Deteção: UV a 260 nm.

Fase móvel: A: TFA aquoso a 0,05%; B: TFA 0,1% em IPA:MeOH 1:1, gradiente de 70% B para 97% B em 10 minutos.

Tempo de retenção: ~ 25 minutos.

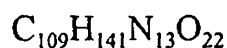
### 8. Exemplo: Síntese de fragmentos de peptídeo em fase de solução:

São apresentados abaixo, nas seções 8.1 - 8.11, exemplos de síntese de intermediários de peptídeo em fase de solução como os listados nas tabelas 1, 2 e/ou 3.

#### 8.1 Preparação de fragmento Fmoc-AA9-16OPNB por copulação de para-nitro-benzil-éster (OPNB) de glutamina em Fmoc-AA9-15OH:

##### Estrutura:

Fmoc-Ile-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Gln(trt)-Asn(trt)-Gln(trt)-Gln-OPNB (SEQ ID NO: 7)



PM 2227,65

| <u>Materiais:</u>             | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u> |
|-------------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------|
| FmocAA9-15OH                  | 1963,39   | 1         | 9,7           | 19            | --        |
| HBrGlnOPNB (BaChem 509709)    | 362,19    | 1,1       | 10,6          | 3,85          | --        |
| HOAT                          | 136       | 1,1       | 10,6          | 1,45          | --        |
| HBTU                          | 379,25    | 1,1       | 10,6          | 4,04          | --        |
| EtPr <sub>2</sub> N (d=0,755) | 129,25    | 2,1       | 20,3          | 2,62          | 3,48      |
| NMP                           | --        | --        | --            | --            | 200       |
| HCl 0,5 N                     | --        | --        | --            | --            | 250       |
| Acetato de etila              | --        | --        | --            | --            | 250       |
| Hexano                        | --        | --        | --            | --            | 250       |

Rendimento teórico: 21,5 g

Rendimento esperado: 90-105%.

##### Procedimento:

FmocAA9-15OH (sintetizado na seção 7.2, acima), HBrGlnOPNB, HOAT e EtPr<sub>2</sub>N foram combinados em um frasco de fundo redondo de 1 l contendo uma barra de agitação magnética e NMP (200 ml) foi adicionado. A solução resultante foi posicionada sob uma atmosfera de

HBTU. A solução foi agitada por 15 minutos a 0-5°C, o banho de gelo foi removido e agitação foi continuada por 2,5 horas (nota 1).

A mistura reacional foi esfriada para 0-5°C, e HCl aquoso 0,5 N (250 ml) foi adicionado para precipitar o peptídeo protegido. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo e secos no frasco do filtro para dar 24 g de FmocAA9-16OPNB bruto. O sólido foi dissolvido em acetato de etila (250 ml), seco sobre sulfato de magnésio 910 g), filtrado e concentrado para um volume de 100 ml. A solução foi esfriada para 0-5°C e hexano (250 ml) foi adicionado para precipitar o peptídeo. O sólido foi coletado por filtração a vácuo e secado proporcionando 21,5 g de FmocAA9-16OPNB com rendimento de 100% e pureza de 91,94% por HPLC (nota 2).

Notas:

1. No controle de processo (IPC) por cromatografia em camada fina (TLC).

clorofórmio/etanol 90/10

detecção por iodo, UV

$T_R$  de FmocAA9-15OH de 0,46

$T_R$  de FmocAA9-16OPNB 0,57

2. Phenomenox Jupiter C5, 5  $\mu$ m, 300Å

Vazão de fluxo: 0,75 ml/min, 260 nm

A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%

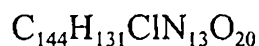
B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%, 70-97% B durante 10 min., 97% B por 8 min.

Tempo de retenção: 13,3 minutos.

## 8.2 Preparação de fragmento HCl HAA9-16OPNB:

Estrutura:

HCl H-Ile-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Gln(trt)-Asn(trt)-Gln(trt)-Gln-OPNB (SEQ ID NO: 7)



PM 2041,02

Materiais:

|                              | PM      | eq | mmoles | gramas | ml  |
|------------------------------|---------|----|--------|--------|-----|
| FmocAA9-16OPNB               | 2227,65 | 1  | 9,43   | 21     | --  |
| Piperidina                   | --      | -- | --     | --     | 10  |
| THF                          | --      | -- | --     | --     | 190 |
| Metil-terc-butil-éter (MTBE) | --      | -- | --     | --     | 250 |
| Hexano                       | --      | -- | --     | --     | 350 |
| Metanol                      | --      | -- | --     | --     | 150 |
| HCl 0,5 N                    | --      | -- | --     | --     | 100 |
| 2-Propanol                   | --      | -- | --     | --     | 50  |

Rendimento teórico: 19,2 g

Rendimento esperado: 85-105%Procedimento:

Um frasco de fundo redondo de 1 l contendo uma barra de  
 5 agitação magnética foi carregado com FmocAA9-16OPNB (sintetizado na  
 seção 8.1, acima) e tetraidro-furano/piridina 20:1. A solução resultante foi  
 agitada sob uma atmosfera de nitrogênio na temperatura ambiente por 60  
 minutos (nota 1). Hexano (350 ml) foi adicionado para precipitar o peptídeo.  
 O solvente foi decantado do sólido pegajoso. O sólido foi triturado com  
 10 MTBE (200 ml) na temperatura ambiente por 18 horas. O sólido foi coletado  
 por filtração a vácuo e seco para dar 18,9 g de HAA9-16OPNB (nota 2).

O sólido foi dissolvido em metanol (150 ml), esfriado para 0-  
 5°C com agitação. Ácido clorídrico aquoso 0,5 N (100 ml) foi adicionado  
 para precipitar o peptídeo. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo,  
 15 lavados com água (50 ml) depois com 2-propanol (50 ml) e secos para dar  
 17,7 g de HCl HAA9-16OPNB com rendimento de 92% e uma pureza de  
 92A% por HPLC (nota 3).

Notas:

1. No controle de processo, HPLC  
 20 Phenomenox Jupiter, C5, 5  $\mu$ m, 300A  
 0,75 ml/min., 260 nm  
 A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%  
 B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%  
 70-90% B durante 10 min., 97% B por 8 min.

Tempo de retenção: FmocAA9-16OPNB, 13,3 minutos;  
HAA9-16OPNB, 10,7 minutos.

2. HAA9-16OPNB isolado neste ponto contém quantidades traço de piperidina e de aduto de piperidina-benzilfulveno. Ambos são removidos antes da copulação com RAA1-8OH.

3. Phenomenox Jupiter, C5, 5  $\mu$ m, 300A

0,75 ml/min., 260 nm

A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%

B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%

80-100% B durante 10 min., 100% B por 5 min.

Tempo de retenção: HAA9-16OPNB, 7,2 minutos.

Condições de TLC:

dicloro-metano/etanol 90/10

deteção por iodo, UV

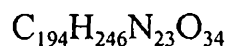
Rf: HAA9-16OPNB, 0,64.

8.3 Preparação de fragmento AcAA1-16OPNB por copulação em fase de solução de fragmentos AcAA1-8OH e HAA9-16OPNB:

Estrutura:

Ac-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Leu-Ile-His(trt)-Ser(tBu)-Leu-Ile-

Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser-(tBu)-Gln(trt)-Asn(trt)-Gln(trt)-Gln(OPNB) (SEQ ID NO: 4)



PM 3427,43

| <u>Materiais:</u>   | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u> |
|---------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------|
| AcAA1-8OH           | 1440,86   | 1,3       | 0,13          | 0,186         | --        |
| HCl HAA9-16OPNB     | 2041,02   | 1         | 0,10          | 0,204         | --        |
| HBTU                | 379,25    | 1,1       | 0,11          | 0,042         | --        |
| HOAT                | 136,1     | 1,1       | 0,11          | 0,015         | --        |
| EtPr <sub>3</sub> N | 129,25    | 2,1       | 0,21          | 0,027         | 0,036     |
| DMF                 | --        | --        | --            | --            | 4,5       |
| DMSO                | --        | --        | --            | --            | 0,5       |
| Água                | --        | --        | --            | --            | 7         |
| MTBE                | --        | --        | --            | --            | 3,5       |

Rendimento teórico: 0,38

Rendimento esperado: 85-105%

Procedimento:

Um frasco de fundo redondo de 25 ml contendo uma barra de agitação magnética foi carregado com AA1-8OH (sintetizado na seção 7.1, acima), HCl HAA9-16OPNB (sintetizado na seção 8.2, acima), e HOAT. Os sólidos foram dissolvidos em DMF:DMSO 9:1 (5 ml) contendo EtPr<sub>2</sub>N, depois esfriados para 0-5°C sob uma atmosfera de nitrogênio (nota 1). Na solução fria foi adicionado HBTU. A mistura reacional foi agitada a 0-5°C por 15 minutos, depois aquecida para a temperatura ambiente e agitada por mais 60 minutos (nota 2). O peptídeo foi precipitado da solução pela adição de água (7 ml). Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo, lavados com água (10 ml) e secos para dar 0,36 g de AcAA1-16OPNB bruto. O sólido foi triturado com MTBE (3,5 ml) por 1,5 horas na temperatura ambiente, coletado por filtração a vácuo e seco para dar 0,335 g de AcAA-16OPNB com rendimento de 88% e pureza de 82A% por HPLC (nota 3).

15    Notas:

1. É importante que todos os sólidos estejam em solução antes do esfriamento para 0-5°C e adição de HBTU.

2. No controle de processo, TLC, HPLC

20                    Phenomenox Jupiter, C5, 5 µm, 300A  
                      0,75 ml/min., 260 nm  
                      A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%  
                      B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%  
                      80-100% B durante 10 min., 100% B por 5 min.  
                      Tempo de retenção: HAA9-16OPNB, 7,2 minutos (Ac1-8OH  
25                    não apresenta absorbância a 260 nm).  
                      Tempo de retenção: AcAA1-16OPNB, 12,45  
                      Condições de TLC:  
                      clorofórmio/etanol 90/10  
                      detecção por iodo, UV

Rf: HAA9-16OPNB, 0,64

Rf: Ac1-8OH, 0,35

Rf: Ac1-16OH, 0,48

3. Phenomenox Jupiter, C5, 5  $\mu$ m, 300A

5 0,75 ml/min., 260 nm

A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%

B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%

70-97% B durante 10 min., 97% B por 8 min.

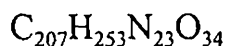
Tempo de retenção: Ac1-16OPNB, 16,4 minutos.

## 10 8.4 Preparação de fragmento FmocAA1-16OPNB por copulação em fase de solução de fragmentos FmocAA1-8OH e HCl HAA9-16OPN:

Estrutura:

Fmoc-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Leu-Ile-His(trt)-Ser(tBu)-Leu-Ile-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Gln(trt)-Asn(trt)-Gln(trt)-Gln-OPNB (SEQ

15 ID NO: 4)



PM 3607,49

| <u>Materiais:</u>               | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u> |
|---------------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------|
| FmocAA1-8OH                     | 1620,92   | 1         | 7,84          | 12,7          | --        |
| HCl HAA9-16OPNB                 | 2041,02   | 1         | 7,84          | 16,0          | --        |
| HBTU                            | 379,25    | 1,2       | 9,42          | 3,57          | --        |
| HOAT                            | 136,1     | 1,2       | 9,42          | 1,28          | --        |
| EtPr <sub>2</sub> N (d=0,755)   | 129,25    | 2,5       | 19,6          | 2,55          | 3,26      |
| DMF                             | --        | --        | --            | --            | 250       |
| Cloreto de sódio 10%/água (p/v) | --        | --        | --            | --            | 450       |
| Metanol                         | --        | --        | --            | --            | 200       |
| Água                            | --        | --        | --            | --            | 100       |

Rendimento teórico: 28,3 g

Rendimento esperado: 85-100%Procedimento:

20 Um frasco de fundo redondo de 1 l contendo uma barra de agitação magnética foi carregado com FmocAA1-8OH (sintetizado na seção 7.1, acima), HCl HAA9-16OPNB (sintetizado na seção 8.2, acima), HOAT e DMF (250 ml). Na solução foi adicionado EtPr<sub>2</sub>M. A solução foi esfriada para 0-5°C e HBTU foi adicionado. A mistura reacional foi agitada a 0-5°C

por 15 minutos, depois aquecida para a temperatura ambiente e agitada por mais 70 minutos (nota 1). A mistura reacional foi esfriada para 0-5°C e cloreto de sódio 10%/água (200 ml) foi adicionado para precipitar o peptídeo. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo, lavados com água (50 ml) e secos para dar 27 g de FmocAA1-16OPNB bruto. O sólido foi dissolvido em metanol (200 ml) e adicionado em uma solução de cloreto de sódio em água (10% p/v, 300 ml). Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo, lavados com água (50 ml) e secos para dar 26 g de FmocAA1-16OPNB com rendimento de 92% e pureza de 90A% por HPLC (nota 1).

10 Notas:

1. No controle de processo, HPLC

Phenomenox Jupiter, C5, 5 µm, 300A

0,75 ml/min., 260 nm

A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%

15

B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%

80-100% B durante 10 min., 100% B por 5 min.

Tempo de retenção: HAA9-16OPNB, 7,2 minutos, FmocAA1-8OH, 7,9 minutos

Tempo de retenção: FmocAA1-16OPNB, 14,5 minutos.

20

Condições de TLC:

clorofórmio/etanol 90/10

detecção por iodo, UV

Rf: HAA9-16OPNB, 0,64

Rf: Ac1-8OH, 0,35

25

Rf: Ac1-16OH, 0,48

3. Phenomenox Jupiter, C5, 5 µm, 300A

0,75 ml/min., 260 nm

A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%

B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%

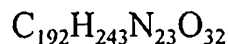
70-97% B durante 10 min.; 97% B por 8 min.

Tempo de retenção: Ac1-16OPNB, 16,4 minutos.

### 8.5 Preparação de fragmento H-AA1-16OPNB:

#### Estrutura:

- 5 H-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-OPNB (SEQ ID NO: 4):



PM 3384,41

| Materiais:     | PM      | eq | mmoles | gramas | ml   |
|----------------|---------|----|--------|--------|------|
| FmocAA1-16OPNB | 3607,49 | 1  | 0,28   | 1,0    | --   |
| Piperidina     | --      | -- | --     | --     | 0,6  |
| Dicloro-metano | --      | -- | --     | --     | 11,4 |
| Hexano         | --      | -- | --     | --     | 4,5  |

Rendimento teórico: 0,94 g

Rendimento esperado: 90-105%

#### 10 Procedimento:

- Um frasco de fundo redondo de 50 ml contendo uma barra de agitação magnética foi carregado com FmocAA1-16OPNB (sintetizado na seção 8,4, acima), dicloro-metano (11,4 ml) e piperidina (0,6 ml). A solução foi agitada na temperatura ambiente sob uma atmosfera de nitrogênio por 90 minutos (nota 1). Hexano (45 ml) foi adicionado na mistura reacional e o volume de solvente foi reduzido para 25 ml por destilação a vácuo. Os sólidos resultantes foram coletados por filtração a vácuo e secos para dar 0,96 g de HAA1-16OPNB com rendimento de 102%. Análise por HPLC do sólido indicou 72A% de HAA1-16OPNB e 18A% de fulveno e aduto de piperidina-fulveno.

#### Notas:

1. Phenomenox Jupiter, C5, 5  $\mu$ m, 300A

0,8 ml/min., 260 nm

A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%

25 B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%

80-100% B durante 10 min., 100% B por 5 min.

Tempo de retenção FmocAA1-16OPNB, 14,1 min.

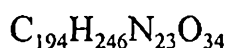
Tempo de retenção HAA1-16OPNB, 11,6 min.

Tempo de retenção de fulveno e aduto de piperidina-fulveno,  
5,5 min. e 4,8 min.

## 5 8.6 Preparação de fragmento Ac-AA1-16OPNB por acetilação de terminação N de HAA1-16OPNB:

### Estrutura:

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)-GlnOPNB (SEQ ID NO: 4)



PM 3427,43

| Materiais:                | PM     | eq | mmoles | gramas | ml    |
|---------------------------|--------|----|--------|--------|-------|
| HAA1-16OPNB               | 3384,1 | 1  | 0,28   | 0,95   | --    |
| Anidrido acético (d=1,08) | 102,09 | 3  | 0,84   | 0,086  | 0,080 |
| Piridina (d=0,978)        | 79,1   | 3  | 0,84   | 0,67   | 0,068 |
| DMF                       | --     | -- | --     | --     | 10    |
| Água                      | --     | -- | --     | --     | 30    |
| MTBE                      | --     | -- | --     | --     | 10    |
| Hexano                    | --     | -- | --     | --     | 10    |

Rendimento teórico: 0,96 g

Rendimento esperado: 80-100%

### Procedimento:

Um frasco de fundo redondo de 50 ml contendo uma barra de  
agitação magnética foi carregado com HAA1-16OPNB (sintetizado na seção  
8.5, acima), DMF (10 ml), anidrido acético e piridina. A mistura reacional foi  
agitada na temperatura ambiente sob uma atmosfera de nitrogênio por 60  
min. (nota 1). Água (20 ml) foi adicionada para precipitar o peptídeo. Os  
sólidos foram coletados por filtração a vácuo, lavados com água (10 ml) e  
secos para dar 0,87 g de AcAA1-16OPNB. Para remover fulveno e aduto de  
piperidina-fulveno residuais, o sólido foi triturado com MTBE/hexano 1:1  
(20 ml) por 4,5 horas na temperatura ambiente. Os sólidos foram coletados  
por filtração a vácuo e secos para dar 0,83 g de AcAA1-16OPNB com  
rendimento de 85% e pureza maior do que 90A% por HPLC (nota 1).

Notas:

P 19909018

## 1. No controle de processo, HPLC

Phenomenox Jupiter, C5, 5 µm, 300A

0,8 ml/min., 260 nm

A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%

5 B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%

80-100% B durante 10 min., 100% B por 15 min.

Tempo de retenção HAA1-16OPNB, 11,6 min.

Tempo de retenção AcAA1-16OPNB, 12,1 min.

TLC: 10% de etanol em clorofórmio

10 detecção por iodo, UV

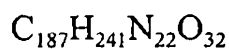
Rf: AcAA9-16OPNB, 0,69

**8.7 Preparação de fragmento AcAA1-16OH por remoção seletiva de um grupo protetor para-nitro-benzila de AcAA1-16OPNB na presença de His(trt):**

15 Estrutura:

Ac-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Leu-Ile-His(trt)-Ser(tBu)-Leu-Ile-

Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Gln(trt)-Asn(trt)-Gln(trt)-Gln-OH (SEQ ID NO: 4)



20

PM 3276,4

| <u>Materiais:</u>           | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u> |
|-----------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------|
| AcAA1-16OPNB                | 3424,86   | 1         | 0,23          | 0,80          | --        |
| Pd 10%/C, Degussa, 50% água | --        | --        | --            | 0,30          | --        |
| Formiato de amônio          | 63,06     | 15        | 3,5           | 0,22          | --        |
| DMF                         | --        | --        | --            | --            | 15        |
| Água                        | --        | --        | --            | --            | 120       |
| Acetato de etila            | --        | --        | --            | --            | 100       |
| Hexano                      | --        | --        | --            | --            | 44        |
| Metanol                     | --        | --        | --            | --            | 10        |
| NaCl aq. saturado           | --        | --        | --            | --            | 5         |
| MTBE                        | --        | --        | --            | --            | 4         |

Rendimento teórico: 0,76 g

Rendimento esperado: 70-85%Procedimento:

Um frasco de fundo redondo de 25 ml contendo uma barra de

agitação magnética foi carregado com AcAA1-16OPNB (síntetizado na seção 8.6, acima) e DMF (10 ml). Nesta solução foi adicionada uma solução de formiato de amônio em água (0,5 ml), depois paládio úmido sobre carbono (Degussa, 10%, 50% água). A lama foi agitada sob uma atmosfera de nitrogênio na temperatura ambiente por 120 minutos (nota 1). A lama foi filtrada através de um leito densamente recheado de celite para dentro de 90 ml de água. O bolo do filtro foi lavado com DMF (5 ml). A suspensão aquosa foi lavada com acetato de etila (100 ml). O acetato de etila foi então concentrado para um volume de 20 ml (nota 2). Hexano (40 ml) foi adicionado para completar a precipitação e o solvente foi decantado dos sólidos. Os sólidos foram dissolvidos em metanol (10 ml) e água/cloreto de sódio aquoso saturado 4:1 (25 ml) foi adicionado para precipitar o peptídeo. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo, lavados com água (10 ml) e secos para dar 0,62 g de AcAA1-16OH. Os sólidos foram triturados com MTBE 50%/hexano (8 ml) na temperatura ambiente por 15 horas, coletados e secos para dar 0,59 g de AcAA1-16OH com rendimento de 77% e pureza de 90%A por HPLC (nota 3).

Notas:

1. No controle de processo, TLC:

20                    dicloro-metano/etanol 80/20  
                     detecção por iodo, UV  
                     Rf: AcAA1-16OPNB, 0,90  
                     Rf: Ac1-16OH, 69

2. O AcAA1-16OH pode começar a precipitar à medida que o volume de solvente é reduzido.

3. Phenomenox Jupiter, C5, 5  $\mu$ m, 300A

0,8 ml/min., 260 nm

A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%

B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%

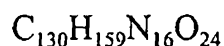
80-100% B durante 10 min.; 100% B por 15 min.

Tempo de retenção AcAA1-16OH, 10,73 min.

### 8.8 Preparação de fragmento FmocAA27-36NH<sub>2</sub> por copulação em fase de solução de FmocAA27-35OH com HPheNH<sub>2</sub>:

#### 5 Estrutura:

Fmoc-Asp(tBu)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Ala-Ser(tBu)-Leu-Trp(Boc)-Asn(trt)-  
Trp(Boc)-Phe-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 18)



PM 2329,64

| <u>Materiais:</u>             | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u> |
|-------------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------|
| FmocAA27-35OH                 | 2182,61   | 1         | 18,4          | 40,2          | --        |
| HPheNH <sub>2</sub>           | 162,21    | 1,2       | 22,1          | 3,6           |           |
| HBTU                          | 379,25    | 1,2       | 22,1          | 8,4           |           |
| HOAT                          | 136,1     | 1,2       | 22,1          | 3,0           |           |
| EtPr <sub>2</sub> N (d=0,755) | 129,25    | 2,1       | 38,7          | 5,0           | 6,6       |
| DMF                           |           |           |               |               | 500       |

10 Rendimento teórico: 42,8 g      Rendimento esperado: 90-105%

#### Procedimento:

Um frasco de fundo redondo de 2 l contendo uma barra de agitação magnética foi carregado com FmocAA27-35OH (sintetizado na seção 7.6, acima), HOAT, HPheNH<sub>2</sub>, e DMF (500 ml). EtPr<sub>2</sub>N foi adicionado e a solução foi esfriada para 0-5°C depois HBTU foi adicionado. A mistura reacional foi agitada por 15 minutos a 0-5°C depois foi aquecida para a temperatura ambiente e agitada por mais 70 minutos (nota 1). A solução foi esfriada para 0-5°C e água (500 ml) foi adicionada para precipitar o peptídeo. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo, lavados com água (100 ml) e secos para dar 43 g de FmocAA27-36NH<sub>2</sub> com rendimento de 100% e pureza de 93A% por HPLC (nota 2).

#### Notas:

1. No controle de processo, TLC:

dicloro-metano/metanol 88/12

25 detecção por iodo, UV

Rf: FmocAA27-35OH, 0,49

Rf: FmocAA27-36NH<sub>2</sub>, 0,63

2. Phenomenox Jupiter, C18, 5 µm, 300A

1,0 ml/min., 260 nm

5

A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,1%

B: ACN

75-99% B durante 20 min., 99% B por 5 min.

Tempo de retenção 29,4 min.

### 8.9 Preparação de fragmento H-AA(27-36)-NH<sub>2</sub>:

10

#### Estrutura:

H-Asp(tBu)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Ala-Ser(tBu)-Leu-Trp(Boc)-Asn(trt)-  
Trp(Boc)-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 17)



PM 2106,56

| <u>Materiais:</u>               | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u> |
|---------------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------|
| FmocAA(27-36(NH <sub>2</sub> )) | 2328,8    | 1,0       | 9,3           | 21,7          | -         |
| Piperidina                      | 85,15     | 5,0       | 46,6          | 4,0           | 4,6       |
| Cloreto de metileno (DCM)       | -         | -         | -             | -             | 100       |
| Água                            | -         | -         | -             | -             | 2 x 100   |
| Metil-t-butil-éter (MTBE)       | -         | -         | -             | -             | 100 + 300 |

15

Rendimento teórico: 19,6 g

Rendimento esperado: 85-95%

#### Procedimento:

Em um frasco de fundo redondo de 250 ml equipado com um agitador magnético e atmosfera de nitrogênio foi carregado o fragmento-Fmoc sintetizado na seção 8.8, acima, o cloreto de metileno (~5 vol.), e a piperidina. Uma solução foi obtida e agitada na temperatura ambiente por 1,5 horas (nota 1).

20

25

A solução foi lavada com 2 x 100 ml de água. As camadas foram separadas e a camada orgânica foi concentrada sob vácuo para aproximadamente a metade do volume original. MTBE foi adicionado em porções, 2 x 50 ml, enquanto que a concentração era contínua para remover DCM para um ponto de precipitação intensa e um volume de pote final de

cerca de 150 ml.

9999010

A lama de produto foi agitada e esfriada em um banho de gelo a 0-5°C por cerca de uma hora. Os sólidos foram isolados por filtração a vácuo e lavados com 2 x 15 ml de MTBE. O produto foi seco com ar para dar 17,6 g (89,6%) de H-AA(27-36)NH<sub>2</sub> de pureza de 95% por HPLC (nota 2).

Notas:

1) A completitude da reação é monitorada por HPLC:

Coluna: Phenomenox Jupiter C18; 300Å; 5 µm

Vazão de fluxo: 1 ml/min.

Detecção: UV a 260 nm

Fase móvel: A: TFA aquoso 0,1%, B: TFA 0,1% em acetonitrila; gradiente de 75% B para 99% B em 20 minutos.

Tempo de retenção: cerca de 18 minutos.

2) Ambos os subprodutos de Fmoc, o dibenzofulveno e seu aduto de piperidina, são efetivamente removidos no procedimento de separação/purificação; entretanto, um teste de uso deve ser realizado antes de posteriormente processar o material. Se o material falhar no teste de uso, o procedimento de separação/purificação é repetido pela dissolução do sólido em DCM (5 vol.), depois o processo é continuado como descrito acima.

**8.10 Preparação de fragmento FmocAA17-36NH<sub>2</sub> por copulação em fase de solução de FmocAA17-26OH com HAA27-36NH<sub>2</sub>:**

Estrutura:

Fmoc-Glu(OTbu)-Lys(Boc)-Asn(trt)-Glu(OTbu)-Gln(trt)-Glu(OTbu)-Leu-Leu-Glu(OTbu)-Leu-Asp(tBu)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Ala-Ser(tBu)-Leu-

Trp(Boc)-Asn(trt)-Trp(Boc)-Phe-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12)

C<sub>242</sub>H<sub>313</sub>N<sub>29</sub>O<sub>46</sub>

PM 4364,38

P19909019

| <u>Materiais:</u>             | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u> |
|-------------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------|
| FmocAA17-26OH                 | 2275,82   | 1         | 9,5           | 21,6          |           |
| HAA27-36NH <sub>2</sub>       | 2106,56   | 1         | 9,5           | 20            |           |
| HOAT                          | 136,1     | 1,2       | 11,4          | 1,55          |           |
| HBTU                          | 379,25    | 1,2       | 11,4          | 4,33          |           |
| EtPr <sub>2</sub> N (d=0,755) | 129,25    | 2         | 19,0          | 2,46          | 3,25      |
| DMF                           |           |           |               |               | 400       |
| Água                          |           |           |               |               | 600       |
| 2-Propanol                    |           |           |               |               | 1100      |

Rendimento teórico: 41,5 g

Rendimento esperado: 80-85%Procedimento:

Um frasco de fundo redondo de 2 l contendo uma barra de agitação magnética foi carregado com FmocAA17-26OH (sintetizado na seção 7.5, acima), HAA27-36NH<sub>2</sub> (sintetizado na seção 8.9, acima), HOAT e DMF (400 ml). EtPr<sub>2</sub>N foi adicionado, a solução agitada foi esfriada para 0-5°C sob uma atmosfera de nitrogênio e HBTU foi adicionado. A mistura reacional foi agitada a 0-5°C por 15 minutos, depois foi aquecida para a temperatura ambiente e agitada por mais 2,5 horas (nota 1). Água (500 ml) foi adicionada na mistura reacional para precipitar o peptídeo (nota 2). A lama resultante foi agitada por 45 minutos, os sólidos foram coletados por filtração a vácuo, lavados com água (100 ml) e secos. Os sólidos foram retornados para o frasco de fundo redondo de 2 l contendo uma barra de agitação magnética e foi adicionado 2-propanol (1,1 l) a 60°C. A lama foi agitada sob uma atmosfera de nitrogênio à medida que esfriava para a temperatura ambiente (durante a noite). Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo e secos para dar 37,5 g de FmocAA17-36NH<sub>2</sub> com rendimento de 90% e pureza de 95A% por HPLC (nota 1).

## Notas:

20 1. No controle de processo, HPLC

Phenomenox Jupiter, C5, 5 µm, 300A

0,75 ml/min., 260 nm

A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%

B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%

80-100% B durante 10 min., 100% B por 25 min.

Tempo de retenção FmocAA17-26OH, 8,2 minutos, HAA26-36NH<sub>2</sub>, 8,4 minutos.

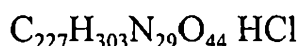
2. A mistura reacional foi aquecida para 38°C durante adição de água.

### 5 8.11 Preparação do fragmento H-AA(17-36)-NH<sub>2</sub>:

#### Estrutura:

H-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Asn(trt)-Glu(OtBu)-Gln(trt)-Glu(OtBu)-Leu-Leu-Glu(OtBu)-Leu-Asp(tBu)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Ala-Ser(tBu)-Leu-Trp(Boc)-Asn(trt)-Trp(Boc)-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 19)

10



| <u>Materiais:</u>                | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u>             |
|----------------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------------------|
| FmocAA17-(17-36)-NH <sub>2</sub> | 4364,36   | 1,0       | 5,2           | 22,5          | -                     |
| NaOH 5 N (aq)                    | -         | -         | -             | -             | 55                    |
| Tetraidrofurano (THF)            | -         | -         | -             | -             | 170                   |
| HCl 1 N                          | -         | -         | -             | -             | 13                    |
| NaCl saturado (aq)               | -         | -         | -             | -             | 2 x 55                |
| Heptano                          | -         | -         | -             | -             | 3 x 25 + 50, 200 + 50 |

Rendimento teórico: 21,6 g

Rendimento esperado: 95-100%

#### Procedimento:

Em um frasco de fundo redondo de 250 ml equipado com um agitador a ar e atmosfera de nitrogênio foram adicionados Fmoc-fragmento sintetizado na seção 8.10, acima, o THF (cerca de 7,5 vol.), e o NaOH 5 N (~2,5 vol.). Uma solução bifásica foi obtida e agitada na temperatura ambiente por 10-15 minutos (nota 1).

As camadas foram separadas e a fase orgânica foi ajustada para pH 2-3 com HCl 1 N. A solução foi então lavada com 2 x 55 ml (2,5 vol.) com uma solução se salmoura saturada (nota 2). As camadas foram separadas e a camada orgânica foi concentrada sob vácuo a 15-20°C para cerca de 1/2 do volume original. Heptano foi adicionado por gotejamento, 3 x 25 ml, enquanto que a concentração continuava a remover THF para um ponto de intensa precipitação e para um volume de pote final de cerca de 100 ml. (nota 2).

A lama de produto foi agitada na temperatura ambiente por cerca de 2 horas. Os sólidos foram isolados por filtração a vácuo e lavados com cerca de 50 ml de heptano. O produto foi seco com ar para dar 21,0 g (97,5%) de H-AA(17-36)NH<sub>2</sub>.

5 Um reprocessamento pode ser realizado para remover subproduto de dibenzofulveno residual. O produto foi empastado na temperatura ambiente com 200 ml de heptano por 2 horas. O material foi filtrado, lavado com cerca de 50 ml de heptano, e seco com ar dando 20,8 g (96,6%) de produto de pureza maior do que 95% por HPLC.

10 Notas:

1) Completitude da reação é monitorada por HPLC:

Coluna: Zorbax LP C8, 100Å, 20 µm.

Vazão de fluxo 2011: 1 ml/min.

Deteção: UV a 260 nm.

15 Fase móvel: A: TFA aquoso a 0,1%; B: TFA 0,05% em ACN:IPA 1:1, gradiente de 80% B para 99% B em 20 minutos.

Tempo de retenção: cerca de 18 minutos.

20 2) Os sólidos precipitam inicialmente como uma goma cerosa que permanece agitado e é triturado para concentração adicional para dar um sólido filtrável.

9. Exemplo: Síntese de peptídeos T-20 de comprimento total:

Os exemplos aqui apresentados, nas seções 9.1-9.5, ilustram os fragmentos intermediários de peptídeo para produzir peptídeos T-20 de comprimento total.

25 O exemplo apresentado nesta seção demonstra a combinação bem sucedida das técnicas de síntese em fase de solução e em fase sólida para produzir um peptídeo T-20 de comprimento total a partir de fragmentos intermediários de peptídeo.

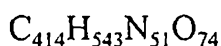
9.1 **Preparação de fragmento AcAA1-36NH<sub>2</sub> por copulação em fase de**

# solução de AcAA1-16OH com HAA17-36NH<sub>2</sub>

A rota de síntese aqui descrita representa a culminância dos processos de quatro fragmentos de T-20 esquematicamente mostrados nas figuras 1-3. Nos casos nos quais AcAA1-16OH é sintetizado via técnicas em fase sólida, o processo na figura 1 é seguido, e nos casos, nos quais AcAA1-16OH é sintetizado via técnicas em fase de solução, o processo na figura 3 é seguido. É notado que o peptídeo T-20 de comprimento total aqui sintetizado possui a seqüência de aminoácidos SEQ ID NO: 1, com uma modificação acetilada em sua terminação amino (isto é, "X") e uma modificação amidada em sua terminação carboxila (isto é "Z").

## Estrutura:

Ac-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Leu-Ile-His(trt)-Ser(tBu)-Leu-Ile-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Gln(trt)-Asn(trt)-Gln(trt)-Gln-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Asn(trt)-Glu(OtBu)-Gln(trt)-Glu(OtBu)-Leu-Leu-Glu(OtBu)-Leu-Asp(tBu)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Ala-Ser(tBu)-Leu-Trp(Boc)-Asn(trt)-Trp(Boc)-Phe-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:1)



PM 7411,95

| Materiais                     | PM      | eq  | mmoles | gramas | ml    |
|-------------------------------|---------|-----|--------|--------|-------|
| AcAA1-16OH                    | 3276,4  | 1   | 0,24   | 0,79   |       |
| HClHAA17-36NH <sub>2</sub>    | 4178,56 | 1   | 0,24   | 1,0    |       |
| HOAT                          | 136,1   | 1,1 | 0,26   | 0,036  |       |
| HBTU                          | 379,25  | 1,0 | 0,95   | 0,25   |       |
| EtPr <sub>3</sub> N (d=0,755) | 129,25  | 2,8 | 0,67   | 0,087  | 0,115 |
| DMF                           |         |     |        |        | 20    |
| Água                          |         |     |        |        | 25    |
| NaCl saturado                 |         |     |        |        | 5     |
| MTBE                          |         |     |        |        | 10    |
| Hexano                        |         |     |        |        | 10    |

Rendimento teórico: 1,77 g

Rendimento esperado: 85-100%

## Procedimento:

Um frasco de fundo redondo de 100 ml contendo uma barra de agitação magnética foi carregado com AcAA1-16OH (sintetizado quer na seção 7.4, acima, via as técnicas em fase sólida quer na seção 8.7, acima, via

técnicas em fase de solução), HOAT, DMF (20 ml), depois EtPr<sub>2</sub>N (0,074 ml). A solução foi esfriada para 0-5°C sob uma atmosfera de nitrogênio e HBTU foi adicionado. A solução foi agitada por 15 minutos a 0-5°C e HClAA17-36NH<sub>2</sub> (sintetizado na seção 8.11, acima) foi adicionado, seguido por mais 5 0,04 ml de EtPr<sub>2</sub>N. O banho de esfriamento foi removido e a mistura reacional foi agitada por 2 horas (nota 1). Para precipitar o peptídeo, água (25 ml) e cloreto de sódio aquoso saturado (5 ml) foram adicionados. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo, lavados com água (10 ml) e secos para dar 1,74 g de AcAA1-36NH<sub>2</sub> bruto (nota 2). Os sólidos foram triturados com 10 MTBE 50%/hexano na temperatura ambiente por 2,5 horas, coletados por filtração a vácuo e secos para dar 1,70 g com rendimento de 96% e pureza de 92A% por HPLC.

Notas:

1) No controle de processo, HPLC

- 15 Phenomenox Jupiter, C5, 5 µm, 300A  
 0,8 ml/min., 260 nm  
 A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%  
 B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%  
 80-100% B durante 10 min., 100% B por 15 min.
- 20 Tempo de retenção: AcAA1-16OH, 11,8 minutos.  
 Tempo de retenção: HCl HAA17-36NH<sub>2</sub>, 12,7 minutos.  
 Tempo de retenção: AcAA1-36NH<sub>2</sub>, 22,9 minutos.

2) A queda de água produz um precipitado muito fino. Uma filtração dupla pode ser requerida.

## 25 9.2 Preparação de fragmento FmocAA1-36NH<sub>2</sub> (T-20) por copulação em fase de solução de FmocAA1-16OH com HAA17-36NH<sub>2</sub>:

O exemplo apresentado nesta seção demonstra a combinação bem sucedida de técnicas de síntese em fases sólida e líquida para produzir um peptídeo T-20 a partir de fragmentos intermediários de peptídeo. Em

particular, a rota de síntese aqui descrita representa o processo de três fragmentos de T-20 esquematicamente mostrado na figura 4 para o ponto na figura no qual FmocAA1-36NH<sub>2</sub> é sintetizado.

#### Estrutura:

- 5 Fmoc-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Leu-Ile-His(trt)-Ser(tBu)-Leu-Ile-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Gln(trt)-Asn(trt)-Gln(trt)-Gln-Glu(OtBu)-Lys(Boc)-Asn(trt)-Glu(OtBu)-Gln(trt)-Glu(OtBu)-Leu-Leu-Glu(OtBu)-Leu-Asp(tBu)-Lys(BoC)-Trp(Boc)-Ala-Ser(tBu)-Leu-Trp(Boc)-Asn(trt)-Trp(Boc)-Phe-NH, (SEQ ID NO:1)



PM 7593,01

| Materiais:                    | PM      | eq   | mmoles | gramas | ml    |
|-------------------------------|---------|------|--------|--------|-------|
| FmocAA1-16OH                  | 3453,89 | 1    | 0,12   | 0,41   |       |
| HClHAA17-36NH <sub>2</sub>    | 4178,56 | 1    | 0,12   | 0,50   |       |
| HOAT                          | 136,1   | 1,25 | 0,15   | 0,020  |       |
| HBTU                          | 379,25  | 1,25 | 0,15   | 0,057  |       |
| EtPr <sub>2</sub> N (d=0,755) | 129,25  | 2,5  | 0,30   | 0,039  | 0,051 |
| DMF                           |         |      |        |        | 10    |
| Água                          |         |      |        |        | 18    |
| 2-Propanol                    |         |      |        |        | 14    |

Rendimento teórico: 0,91 g      Rendimento esperado: 85-100%

#### Procedimento:

- Um frasco de fundo redondo de 25 ml contendo uma barra de  
 15 agitação magnética foi carregado com FmocAA1-16OH (sintetizado na seção 7.3, acima), HCl HAA17-36NH<sub>2</sub> (sintetizado na seção 8.11, acima), HOAT, DMF (10 ml), e EtPr<sub>2</sub>N, foi adicionado. A solução foi esfriada para 0-5°C sob uma atmosfera de nitrogênio e HBTU foi adicionado. A mistura reacional foi agitada a 0-5°C por 15 minutos, depois foi aquecida para a temperatura  
 20 ambiente e agitada por 1,5 horas (nota 1). Água foi adicionada para precipitar o peptídeo e os sólidos foram coletados por filtração a vácuo e secos. Os sólidos foram triturados com 2-propanol (14 ml) por 15 horas na temperatura ambiente depois água (3 ml) foi adicionada para remover o produto desejado da solução. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo e secos para dar

0,80 g de FmocAA1-36NH<sub>2</sub> com rendimento de 88% e pureza de 85A% por HPLC.

Notas:

1) No controle de processo, HPLC

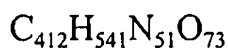
- 5 Phenomenox Jupiter, C5, 5 µm, 300A  
 0,8 ml/min., 260 nm  
 A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%  
 B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%  
 80-100% B durante 10 min., 100% B por 15 min.  
 10 Tempo de retenção: FmocAA1-16OH, 11,4 minutos.  
 Tempo de retenção: HCl HAA17-36NH<sub>2</sub>, 12 minutos.  
 Tempo de retenção: FmocAA1-36NH<sub>2</sub>, 20,4 minutos.  
 TLC, dicloro-metano/etanol 9/1  
 detecção por iodo, UV  
 15 Rf: FmocAA1-36NH<sub>2</sub>, 0,71.

### 9.3 Preparação de fragmento HAA1-36NH<sub>2</sub> (T-20):

O exemplo apresentado nesta seção demonstra a combinação bem sucedida de técnicas de síntese em fases sólida e líquida para produzir um peptídeo T-20 a partir de fragmentos intermediários de peptídeo. Em particular, a rota de síntese aqui descrita representa o processo de três fragmentos de T-20 esquematicamente mostrado na figura 4 para o ponto na figura no qual H-AA1-36-NH<sub>2</sub> é sintetizado.

#### Estrutura:

25 H-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Leu-Ile-His(trt)-Ser(tBu)-Leu-Ile-Glu(OtBu)-  
 Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Gln(trt)-Asn(trt)-Gln(trt)Gln-Glu(OtBu)-Lys(Boc) -Asn  
 (trt)-Glu(OtBu)-Gln(trt)-Glu(OtBu)-Leu-Leu-Glu(OtBu)-Leu-Asp(tBu)-  
 Lys(Boc)-Trp(Boc)-Ala-Ser(tBu)-Leu-Trp(Boc)-Asn ( trt)-Trp(Boc)-Phe-  
 NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:1)



PM: 7370,94

| Materiais:                | PM      | eq | mmoles | gramas | ml  |
|---------------------------|---------|----|--------|--------|-----|
| FmocAA1-36NH <sub>2</sub> | 7593,01 | 1  | 0,105  | 0,80   |     |
| Piperidina                |         |    |        |        | 0,5 |
| DMF                       |         |    |        |        | 9,5 |
| Água                      |         |    |        |        | 20  |
| NaCl saturado aquoso      |         |    |        |        | 5   |
| MTBE                      |         |    |        |        | 5   |
| Hexano                    |         |    |        |        | 5   |

Rendimento teórico: 0,77 g

Rendimento esperado: 85-95%

Procedimento:

- Um frasco de fundo redondo de 25 ml contendo uma barra de agitação magnética foi carregado com FmocAA1-36NH<sub>2</sub> (sintetizado na seção 9.2, acima), DMF (9,5 ml) e piperidina (0,5 ml). A solução foi agitada na temperatura ambiente sob uma atmosfera de nitrogênio por 2 horas (notas 1, 2). Água (20 ml) e cloreto de sódio aquoso saturado (5 ml) foi adicionado para precipitar o peptídeo protegido. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo e secos para dar 0,77 g de HAA1-36NH<sub>2</sub> contaminado com fulveno e aduto de piperidina-fulveno. Os sólidos foram triturados com MTBE 50%/hexano na temperatura ambiente por 15 horas para remover o fulveno e o aduto de piperidina-fulveno. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo e secos para dar 0,73 g de HAA1-36NH<sub>2</sub> com rendimento de 95% e pureza de 90A% por HPLC.

## Notas:

- 1) No controle de processo, HPLC

Phenomenox Jupiter, C5, 5 µm, 300A

0,8 ml/min., 260 nm

A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%

B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%

80-100% B durante 10 min., 100% B por 15 min.

Tempo de retenção: FmocAA1-36OH, 20,4 minutos.

Tempo de retenção: HCl HAA1-36NH<sub>2</sub>, 19,9 minutos.

Tempo de retenção: fulveno e aduto de piperidina-fulveno, 5 minutos.

TLC, dicloro-metano/etanol 9/1

detecção por iodo, UV

5 Rt: FmocAA1-36NH<sub>2</sub>, 0,71.

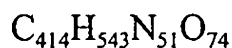
2) O produto e o material inicial não separaram bem em TLC ou em HPLC de fase reversa. Formação de produto foi seguida pela observação de fulveno e aduto de piperidina-fulveno.

#### 10 9.4 Preparação de fragmento AcAA1-36NH<sub>2</sub> (T-20) por acetilação N-terminal de HAA1-36NH<sub>2</sub>:

O exemplo apresentado nesta seção demonstra a combinação bem sucedida de técnicas de síntese em fases sólida e líquida para produzir um peptídeo T-20 a partir de fragmentos intermediários de peptídeo. Em particular, a rota de síntese aqui descrita representa o processo de três  
15 fragmentos de T-20 esquematicamente mostrado na figura 4 para o ponto na figura no qual Ac-AA1-36-NH<sub>2</sub> é sintetizado.

##### Estrutura:

Ac-Tyr(tBu)-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Leu-Ile-His(trt)-Ser(tBu)-Leu-Ile-  
Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Gln(trt)-Asn(trt)-Gln(trt)-Gln-Glu(OtBu)-  
20 Lys(Boc)-Asn(trt)-Glu(OtBu)-Gln(trt)-Glu(OtBu)-Leu-Leu-Glu(OtBu)-Leu-  
Asp(tBu)-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Ala-Ser(tBu)-Leu-Trp(Boc)-Asn(trt)-  
Trp(Boc)-Phe-NH (SEO ID NO:1)



PM 7411,95

| Materiais:                | PM      | eq | mmoles | gramas | ml    |
|---------------------------|---------|----|--------|--------|-------|
| HAA1-36NH <sub>2</sub>    | 7370,94 | 1  | 0,096  | 0,71   |       |
| Anidrido acético (d=1,08) | 102,09  | 3  | 0,29   | 0,029  | 0,027 |
| Piridina (d=0,978)        | 79,1    | 6  | 0,58   | 0,046  | 0,046 |
| DMF                       |         |    |        |        | 10    |
| Água                      |         |    |        |        | 17,5  |
| NaCl saturado aquoso      |         |    |        |        | 7,5   |

Rendimento teórico: 0,71 g

~~Rendimento esperado: 85-100%~~

Procedimento:

Um frasco de fundo redondo de 25 ml contendo uma barra de agitação magnética foi carregado com HAA1-36NH<sub>2</sub> (sintetizado na seção 9.3, acima), DMF (10 ml), piridina (0,046 ml) e anidrido acético (0,027 ml) (nota 1). A solução foi agitada na temperatura ambiente sob uma atmosfera de nitrogênio por 4 horas (nota 2). Água (7,5 ml) e cloreto de sódio aquoso saturado (7,5 ml) foram adicionados para precipitar o peptídeo protegido. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo, lavados com água (10 ml) e secos para dar 0,65 g de AcAA1-36NH<sub>2</sub> com rendimento de 91% e pureza de 90A% por HPLC (nota 3).

Notas:

1) Dicloro-metano também pode ser usado como o solvente para esta reação.

2) No controle de processo, HPLC

15 Phenomenox Jupiter, C5, 5 µm, 300A  
0,8 ml/min., 260 nm  
A: H<sub>2</sub>O/TFA 0,05%  
B: IPA 50%/MeOH/TFA 0,05%  
80-100% B durante 10 min., 100% B por 15 min.  
20 Tempo de retenção: HAA1-36OH, 23,3 minutos.  
Tempo de retenção: AcAA1-36NH<sub>2</sub>, 22,7 minutos.

3) O produto e o material inicial não separam bem em TLC ou HPLC de fase reversa.

25 **9.5 Preparação de lado de T-20 por desproteção de cadeia lateral de AcAA1-36NH<sub>2</sub>:**

O exemplo apresentado nesta seção demonstra a combinação bem sucedida de técnicas de síntese em fases sólida e líquida para produzir um peptídeo T-20 a partir de fragmentos intermediários de peptídeo. Em particular, a rota de síntese aqui descrita representa o processo de três

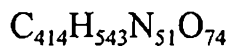
fragmentos de T-20 na figura 4.



Estrutura:

Ac-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-

5 Trp-Asn-Trp-Phe-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO:1)



PM 4492,1

| <u>Materiais:</u>       | <u>PM</u> | <u>eq</u> | <u>mmoles</u> | <u>gramas</u> | <u>ml</u> |
|-------------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------|
| AcAA1-36NH <sub>2</sub> | 7411,95   | 1         | 0,035         | 0,26          |           |
| Ácido trifluoro-acético |           |           |               |               | 2,25      |
| Água                    |           |           |               |               | 15,1      |
| Ditiotreitol            |           |           |               | 0,12          |           |
| MTBE                    |           |           |               |               | 170       |
| Acetonitrila            |           |           |               |               | 15        |

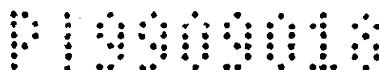
Rendimento teórico: 157 mg

Rendimento esperado: 25-50%

Procedimento:

- 10 Uma solução de ácido trifluoro-acético / água / ditiotreitol 90:5:5 (v/v/p%) foi degaseificada com nitrogênio e esfriada para 0-5°C. Na solução esfriada foi adicionado AcAA1-36NH<sub>2</sub> (sintetizado na seção 9.4, acima). A lama foi agitada a 0-5°C até dissolução dos sólidos (~5 minutos) depois foi aquecida para a temperatura ambiente e agitada por 2,5 horas.
- 15 solução foi adicionada em MTBE 0-5°C (70 ml) para precipitar o peptídeo. A lama foi centrifugada por cinco minutos a 2200 rpm e o MTBE foi decantado dos sólidos. Os sólidos foram novamente suspensos em MTBE (50 ml), centrifugados por cinco minutos a rpm e o MTBE foi decantado. Este processo foi repetido mais uma vez quando então os sólidos foram
- 20 dissolvidos em água/acetonitrila 1:1 (30 ml) contendo 1% vol. de ácido acético e armazenados na temperatura ambiente por 24 horas (nota 1). A solução foi congelada depois seca por congelamento usando um liofilizador para dar 155 mg de T-20 bruto. Purificação por HPLC preparativa proporciona 55 mg de peptídeo T-20 de comprimento total com pureza de
- 25 95A% por HPLC (nota 2).

Notas:



1) A cadeia lateral tBu de Trp(Boc) é removida rapidamente deixando TrpCOOH. Descarboxilação de TrpCOOH requer um mínimo de 24 horas na temperatura ambiente em ácido acético aquoso.

5 2) HPLC preparativa:

YMC 2", 120A, 10 µm, C18,

220 nm, 50 ml/min

A: H<sub>2</sub>O /TFA 0-1%

B: ACN/TFA 0,1%

10 39-40% B / 40 minutos.

10. Exemplo: Purificação de peptídeo T-20:

O exemplo aqui apresentado descreve processos por meio dos quais peptídeo T-20 e peptídeos semelhantes a T-20 podem ser purificados sob condições que aumentam sobremaneira a produção de purificação de peptídeo.

Materiais:

Coluna usada: 20 x 30 cm recheada com partículas de 35 µm Amberchrom CG-300S (Tosohaus; Montgomeryville, PA).

Preparação de tampões:

20 Tampão A = acetato de amônio 100 mM ajustado para pH 8,5 com NH<sub>4</sub>OH.

Tampão B = acetonitrila.

1. Coluna com cerca de 6 volumes de coluna de 20% B.

25 2. T-20 é dissolvido em 50-100 ml de 85%A/15%B por grama de peptídeo. O pH é ajustado para 8-10 com K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M. A concentração de acetonitrila na amostra de T-20 não pode ser maior do que 15-20%.

3. Solução de T-20 é carregada a 500 ml/min, com monitoração da pressão da coluna.

4. Após carregamento da solução de T-20, um volume de 3 colunas (10 l) de

uma solução de 80%A/15%B é carregado para lavar as linhas.

5. Eluído da coluna é monitorado a 303 nm, e eluído é coletado durante todo o processo de carregamento. O comprimento de onda ou atenuação é ajustado(a) durante a corrida para manter o pico em escala. Absorbância é uma função do comprimento de onda e do comprimento do percurso da célula.

6. Operação em gradiente é iniciada como abaixo (mudança de 1,6% em B/hora), com pressão sendo monitorada durante toda a corrida.

| Tempo (min.) | % B | Fluxo (ml/min.) |
|--------------|-----|-----------------|
| 0            | 15  | 330             |
| 788          | 36  | 330             |

7. Frações de 10 min. são coletadas (3,3 l) quando o pico principal começa a eluir. Todo T-20 deve ser eluído a cerca de 35% de B. Na média, 35-40 frações são coletadas. Frações são armazenadas a 0-5°C até ser realizada a determinação de qual fração é para ser reunida.

8. Frações são coletadas até que a absorbância do detector seja menor do que 0,1 AU ou até que um maior ponto de inflexão seja alcançado após a eluição do pico principal.

9. A pureza de cada fração é monitorada por HPLC analítica em fase reversa.

#### Resultados:

Peptídeo T-20 é muito mais solúvel em faixas de pH maiores do que 7. Suportes de coluna comumente empregados para purificar peptídeos são à base de sílica e, portanto, podem ser utilizados apenas em faixas de pH porque o suporte de sílica tende a se dissolver em faixas de pH mais elevadas.

O processo aqui descrito emprega um suporte de resina à base de poliestireno que é estável em uma ampla faixa de pH (pH 1-14). Este processo aumenta sobremaneira a capacidade da coluna pelo fato de que a produção de T-20 aumentou de 10 g para até 250-450 g (para uma coluna de

30 cm x 20,32 cm de diâmetro).

11. Exemplo: síntese e purificação em grande escala de carga de resina com peptídeo T-20:

FmocTrp(Boc)OH pode ser carregado em resina 2-CTC muito  
ativa em níveis de 1,2 mmoles/g de resina inicial ou mais elevados. Em  
níveis acima de 1,1 moles de FmocTrp(Boc)OH por grama de resina inicial  
(maior do que 0,72 mol/g de resina carregada), é difícil obter testes de  
ninhidrina negativos para os últimos três aminoácidos do fragmento.  
Igualmente, torna-se difícil construir FmocAA17-26O-resina quando a  
FmocLeuO-resina é carregada com mais do que 0,85 mol/g e AcAA1-16O-  
resina quando FmocGlnOH-resina é carregada com mais do que 0,75  
mmol/g.

Ao receber a resina do vendedor, um teste de uso com cerca  
de 1 g de resina 2-CTC é conduzido com cada aminoácido a ser carregado. O  
propósito do teste de uso é a determinação da quantidade de aminoácido a ser  
empregada durante o carregamento a fim de obter a faixa de carregamento  
desejada. Uso de 0,8, 1,0, e 1,5 equivalentes de FmocGlnOH, 1,0, 1,2 e 1,5  
equivalentes de FmocTrp(Boc)OH e 0,8, 1,0 e 1,5 equivalentes de  
FmocLeuOH com 0,5 equivalente em excesso de DIEA para cada (relativo à  
atividade registrada da resina). Se 1 mol de FmocLeuOH não puder ser  
carregado em 1 kg de resina 2-CTC, a resina 2-CTC do vendedor não poderá  
ser aceita. Abaixo há uma descrição do carregamento de resina almejado para  
FmocLeuOH, FmocGlnOH e FmocTrp(Boc)OH.

De 1,0 a 1,1 moles de FmocLeuOH podem ser carregados em  
cada kg de resina 2-CTC. Considerando a perda de HCl, o peso seco de  
resina após o carregamento de FmocLeuOH deve ser de 1,32 a 1,35 vezes o  
peso de resina inicial e o carregamento medido deve ser de 0,75 a 0,81  
mmol/g.

De 0,8 a 1,0 mol de FmocGlnOH podem ser carregados em

cada kg de resina 2-CTC. Considerando a perda de HCl, o peso seco de resina após o carregamento de FmocGlnOH deve ser de 1,27 a 1,33 vezes o peso de resina inicial e o carregamento medido deve ser de 0,63 a 0,75 mmol/g.

5 De 0,9 a 1,1 moles de FmocTrp(Boc)OH podem ser carregados em cada kg de resina 2-CTC. Considerando a perda de HCl, o peso seco de resina após o carregamento de FmocTrp(Boc)OH deve ser de 1,44 a 1,54 vezes o peso de resina inicial e o carregamento medido deve ser de 0,63 a 0,72 mmol/g.

10 Para acurada análise de ganho de peso, a perda na secagem (LOD) da resina inicial tem que ser determinada. Ela não pode ser maior do que 1%. Se solvente residual (ou DIEA/HCl) não for completamente removido da resina durante secagem (após o carregamento), a massa isolada será maior e o carregamento medido será menor. Entretanto, os moles totais  
15 carregados (massa vezes carga medida) deve cair dentro das faixas mencionadas acima. Se o nível de carregamento final elevado for excedido (ou os moles totais carregados por kg de resina inicial) para qualquer um dos aminoácidos mencionados, em mais do que 10%, é realizado um teste de uso empregando menos aminoácido. Isto é particularmente importante para  
20 FmocGlnOH.

### 11.1 Preparação em grande escala de Fmoc-AA(Boc)-2-cloro-tritil-resina:

O propósito da seguinte seção é a realização de um carregamento em grande escala de resinas adequadas para preparação de altas  
25 quantidades de peptídeos por síntese de peptídeo em fase sólida (SPPS). A resina é carregada com cada um dos seguintes: FmocTrp(Boc)OH, e FmocGln(Boc)OH, e FmocLeu(Boc)OH. Cada resíduo inicial foi carregado sobre cerca de 4 kg de resina 2-CTC.

200  
f

| AA carregado   | 2-CTC<br>(kg) | Massa carregada<br>(kg) | Substituição<br>(mmol/g) <sup>1</sup> | Moles totais<br>carregados |
|----------------|---------------|-------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| FmocTrp(Boc)OH | 3,7           | 4,493                   | 0,56<br>(0,56)                        | 2,52<br>(2,52)             |
| FmocLeuOH      | 2,2           | 2,436                   | 1,07<br>(0,647)                       | 2,6<br>(1,58)              |
| FmocGln(Boc)OH | 3,65          | 3,856                   | 0,55<br>(0,52)                        | 2,21<br>(2,0)              |

<sup>1</sup> O primeiro número foi calculado de um peso baseado em análise por HPLC contra um padrão de FmocAA. O valor em parêntese foi calculado do ganho de peso considerando uma LOD de 20% sobre a resina 2-CTC inicial.

5 Resina 2-CTC inicial foi obtida de Colorado BioTech com um carregamento registrado de 1,4 meq/g. O procedimento de carregamento padrão, 1,5 eq de FmocTrp(Boc)OH, 1,7 eq de DIEA em DCM (5 vol.), temperatura ambiente por 2 horas, foi empregado começando com 3,7 kg de 2-CTC. Isto proporcionou 4,493 kg de FmocTrp(Boc)OH-resina que  
10 apresentou m carregamento calculado de 0,56 mmol/g (2,52 moles totais) em peso baseado no ensaio por HPLC de FmocTrp(Boc)OH após clivagem da resina. Pelo ganho de peso da resina, o carregamento é calculado como sendo de 0,36 mmol/g para um total de 1,62 moles preparados. Entretanto, se a LOD de 12% sobre a resina 2-CTC inicial for considerada, o carregamento  
15 calculado em ganho de peso é igual a 0,56 mmol/g para um total de 2,52 moles, bem menor do que o carregamento almejado de 4 moles de FmocTrp(Boc)OH por 4 kg de resina.

Um total de 4,59 kg de FmocLeuO-resina foi preparado a partir de 3,9 kg de 2-CTC em duas corridas usando procedimentos de  
20 carregamento padrão.

Entretanto, um carregamento substancialmente menor do que o antecipado foi obtido. A primeira batelada apresentou um carregamento calculado de 1,07 mmoles/g em peso baseado na análise por HPLC de FmocLeuOH após clivagem da resina. Isto é claramente impossível visto que

o carregamento calculado em ganho de peso considerando a LOD de 12% sobre a resina 2-CTC inicial, é de (500 g) 0,647 mmol/g. O carregamento real está provavelmente próximo de 0,647 mmol/g para um total de 1,577 moles carregados.

5 Uma segunda batelada de FmocLeu-O-resina preparada (2,154 kg) de 1,7 kg de 2-CTC apresentou um carregamento calculado de 0,68 mmol/g versus um carregamento de ganho de peso de 0,66 mol/g.

10 Um total de 3,856 kg de FmocGlnO-resina foi preparado em uma única batelada começando com 3,65 kg de 2-CTC usando 0,8 eq de FmocGlnOH e 1 eq de DIEA em 7 volumes de DMF/DCM 5/2. A substituição calculada em peso baseado no ensaio por HPLC foi de 0,55 mmol/g para um total de 2,12 moles de FmocGlnO-resina. O carregamento calculado em ganho de peso considerando a LOD de 12% da resina 2-CTC inicial é de 0,52 mmol/g para um total de 2,0 moles de FmocGlnO-resina.

15 Em geral, o carregamento em ganho de peso deve ser maior do que ou igual ao carregamento calculado por um peso baseado no ensaio por HPLC contra o AA carregado ou fulveno removido. A 2-CTC inicial deve possuir uma LDO menor do que 1% e a FmocAAO-resina isolada provavelmente possuirá uma quantidade pequena de NMP, sal e/ou de  
20 FmocAAOH residual.

11.1.1 Processo preferido para preparação em grande escala de Fmoc-AA(Boc)-2-cloro-tritil-resina:

FmocTrp(Boc)OH e FmocLeuOH:

25 A resina de cloreto de 2-cloro-tritila sensível ao ar (1 eq, 3,7 kg, 5,18 moles) é adicionada em uma câmara de SPPS e lavada com 5 volumes de DCM. O solvente é drenado e uma solução quer de FmocTrp(Boc)OH quer de FmocLeu(Boc)OH (1,5 eq) e DIEA (1,7 eq) em DCM (5 vol) é adicionada (nota 1). A lama é agitada com agitação por 2 horas. O solvente é drenado e os sítios ativos restantes sobre a resina são

20  
X

arrematados em sua extremidade com MeOH:DIEA 9:1 (5 vol) por 30 minutos. O solvente é drenado e a resina é lavada com 6 x 5 volumes de DCM. A resina é seca até peso constante, depois é amostrada e analisada para carregamento (nota 2). O mesmo procedimento é usado para carregamento de

5 FmocLeuOH.

FmocGluOH:

Uma resina 2-CTC sensível ao ar (3,65 kg, 1,4 mmoles/g) é carregada em uma câmara de SPPS de 40 l sob uma atmosfera de nitrogênio e lavada com DCM (5 vol). Um reator de 20 l é carregado com FmocGlnOH (1,506 kg, 0,8 eq), DMF (5 vol) e DIEA (1,0 eq). A câmara de SPPS é drenada e a solução de DMF é adicionada. O reator é rinçado com DCM (2 vol) e a rinçagem é adicionada na câmara de SPPS. A resina é agitada na câmara de SPPS sob uma atmosfera de nitrogênio por 2 horas e drenada. Quaisquer sítios ativos restantes sobre a resina são arrematados em sua extremidade com metanol : DIEA 9:1 (5 vol) por 30 minutos. A resina é drenada, lavada com DCM (6 x 5 vol) e seca até peso constante (3,856 kg). A resina é amostrada e testada para nível de carregamento (nota 2).

Notas:

1. A resina de cloreto de 2-cloro-tritila é muito sensível à umidade. Água recobre a resina e forma HCl. Desde que o solvente esteja seco, há pouca diferença entre DCE e DCM.

2. Carregamento de resina é determinado pela clivagem do Fmoc-aminoácido da resina e pelo ensaio contra um padrão com uma análise quantitativa p/p por HPLC.

25 Phenomenox Jupiter C18, 300A, 5μm

1 ml/min, 260 nm

A: TFA aquoso 0,1%

B: TFA 0,1% em acetonitrila

65% B, isocrático

Tempo de retenção: cerca de 8 minutos

Determinação da carga por ganho de peso da resina pode ser inacurada visto que o número de lavagens usadas antes da secagem da resina pode não ser suficiente para completamente remover NMP da resina. O cálculo é:

$$\frac{(\text{Massa de Fmoc-AA-OH-resina} - \text{Massa de 2-CTC inicial})}{\text{Massa de Fmoc-AA-OH-resina (PM de AA carregado - PM de HCl)}}$$

Foi observado que armazenagem de fragmentos de peptídeo da presente invenção por períodos de tempo prolongados (dias) em DCM resulta em clivagem substancial da resina. Por exemplo, durante o curso de construção de FmoAA17-26OH, o fragmento parcialmente construído foi armazenado durante o fim de semana duas vezes em DCM. Um rendimento de 8% de FmocAA17-26OH foi obtido após completude da síntese e remoção da resina. É suspeito que HCl traço em DCM lentamente clive o fragmento parcialmente construído da resina durante a armazenagem de fim de semana.

Amostras de FmocAA17-26O-resina, AcAA1-16O-resina e de FrmoAA27-35O-resina foram permitidas repousarem em DCM e IPA na temperatura ambiente por 1 semana. O sobrenadante de cada uma foi analisado por HPLC. Embora resultados quantitativos não fossem obtidos, todos os fragmentos foram clivados da resina em uma extensão significativa em DCM enquanto que clivagem em IPA não foi observada. Se fragmentos parcialmente construídos necessitam ser armazenados por uns poucos dias (durante final de semana), é melhor rinçar os sólidos com NMP, drenar o leite e deixá-lo em repouso saturado com NMP sob uma atmosfera de nitrogênio.

DCM foi substituído por IPA para as lavagens finais de FmocLeuO-resina, FmocGlnO-resina, FmocTrp(Boc)O-resina, FmocAA17-26O-resina, AcAA1-16O-resina e FrmoAA27-35O-resina. As FmocLeuO-

resina, FmocGlnO-resina e FmocTyr(Boc)O-resina saturadas com IPA foram secas a 40°C. FmocAA17-26O-resina, AcAA1-16O-resina e FmocAA27-35O-resina foram construídas a partir de resinas carregadas que foram secas a 4°C. Na completitude da síntese, os fragmentos ligados em resina foram limpos por lavagem com DOM seguido por IPA. Os fragmentos ligados em resina saturada com IPA foram divididos e secos na temperatura ambiente e a 40°C. Os fragmentos foram clivados da resina e analisados por HPLC. Não houve diferenças observadas na pureza de fragmento. Secagem de fragmentos ligados em resina, saturada com IPA, a 40°C não prejudicou a qualidade ou a quantidade do fragmento isolado.

SPPS dos fragmentos em DMF em oposição a NMP/DCM foi examinada (1 g de resina incha para 5 ml em ambos os sistemas de solvente). Fragmento FmocAA27-35OH foi sintetizado usando DMF como um solvente e HBTU vs HBTU como um agente copulante. FmocAA27-35OH foi isolado com rendimento de 77% e pureza de 89,5A%.

O protocolo de separação/purificação para fragmentos FmocAA17-36NH<sub>2</sub> e AcAA1-36NH<sub>2</sub> remove os fragmentos não-copulados. Acetilação (arremate de extremidade) destes fragmentos nos sítios de deleção durante a síntese em fase sólida garantirá que os fragmentos de deleção não copulem em copulações em fase de solução. Os fragmentos não-copulados na síntese de ambos FmocAA17-36NH<sub>2</sub> e AcAA1-36NH<sub>2</sub> devem ser removidos nas separações/purificações com IPA e ACN.

### 11.2 Preparação em grande escala de fragmento Ac-AA(1-16)-OH (fragmento 3c):

Preparação em grande escala por SPPS de fragmento AcAA1-16OH foi conduzida em duas corridas dando um total de 7,941 kg de fragmento ligado em resina a partir de 3,53 kg de FmocGlnOH-resina. O valor de carregamento para a FmocGlnOH-resina em ambas as corridas foi o valor um pouco superestimado de 0,55 mmol/g obtido de um ensaio por

703

HPLC baseado em peso em vez do mais acurado valor de 0,52 mmol/g obtido pelo ganho de peso considerando LOD de 12% sobre 2-CTC inicial. Em adição ao carregamento da resina menor do que o desejado, um excesso de 6% de cada aminoácido foi utilizado durante a SPPS.

5 A SPPS usou 2,5 equivalentes de primeiro FmocGln(trt)OH sobre a resina, e 1,7 equivalente de cada um dos aminoácidos subsequentes no fragmento (relativo ao carregamento de 0,55 mmol/g). As reações de copulação foram conduzidas em 8 volumes de NMP:DCM 3:1 e quase todas as, com exceção de duas das, 32 reações de copulação (acetilação incluída)  
10 alcançaram a completitude em 2 horas. Todas as lavagens foram feitas com 5 volumes de NMP.

O fragmento ligado em resina foi lavado 5 a 6 vezes em 3,4 volumes (relativo ao peso de AcAA1-16O-resina seca) de TFA 1%/DCM a 0-5°C, 5 minutos por lavagem. Cada lavagem foi coletada em 1,36 volumes de  
15 NaHCO<sub>3</sub> aquoso 0,33 M para neutralizar o TFA. As lavagens trifásicas foram combinadas e água (2 vol) foi adicionada. O DCM foi removido por destilação deixando um precipitado filtrável no bicarbonato de sódio aquoso. Durante o curso da destilação, a lama de múltiplas fases se tornou viscosa e semelhante a creme antes de colapsar em uma lama filtrável quando o final  
20 do DCM foi removido. A lama foi esfriada para 0-5°C e o pH foi ajustado para 3,0 com HCl 0,1 N. A lama foi agitada a 0-5°C por 1-2 horas, coletada por filtração, lavada e seca. Nas corridas restantes os sólidos foram coletados, retornados para o reator e triturados com água por 1-2 horas, depois foram coletados e secos.

25 Clivagem de AcAA1-16OH da resina foi realizada em quatro corridas usando TFA 1% em DCM. Um total de 4,814 kg de AcAA1-16OH foi produzido a partir de 3,53 kg de FmocGlnO-resina com pureza de 93-96A%. O rendimento total baseado em carregamento de 0,53 mmol/g determinado por ganho de peso considerando a LOD de 12% de 2-CTC

inicial (5,93 kg teórico) foi de 83%.

O sal de sódio de AcAA1-16OH é insolúvel em DMF e NMP, portanto, o ajuste de pH é necessário para protonar a terminação carboxila. A lavagem de água garante remoção do trifluoro-acetato de sódio do produto.

- 5 Uma quantidade muito pequena de trifluoro-acetato de sódio em uma base em p/p interferirá com a copulação em fase de solução com HAA17-36NH<sub>2</sub>.

Este fragmento deve ser seco na temperatura ambiente. Um estudo de estabilidade procurando secar AcAA1-16OH úmido a 40°C, mostrou degradação de cerca de 4% durante 3 dias. O interessante é que o sólido seco é estável a 80°C por 24 horas.

10

#### **11.2.1 Processo preferido de preparação em grande escala de fragmento AcAA(1-16)-OH (fragmento 3c):**

- 15 Em uma câmara de peptídeo de 40 L foi adicionado o FmocGlnOH ligado em resina (1,53 kg, 0,55 mmol/g, 0,84 mol). A resina foi condicionada com DCM (5 vol) sob nitrogênio com agitação por 15 minutos, depois foi drenada. Uma solução de piperidina 20% em NMP (5 vol) foi adicionada e a suspensão foi agitada sob nitrogênio por 20 minutos. A solução foi drenada e o processo repetido. A resina foi lavada 5 vezes com 5 volumes de NMP para remover dibenzofulveno e piperidina determinados por um teste de cloranil (nota 1).

20

- 25 Enquanto piperidina estava sendo removida da resina por lavagem, o aminoácido subsequente na sequência (1,5 eq), HOBT (1,5 eq) e DIEA (1,5 eq) foram combinados em NMP (6-7 vol) e esfriados para 0°C. Na solução fria foi adicionado BTU (1,5 eq) e a solução foi agitada por 10-15 minutos para dissolver o HBTU. A solução esfriada de aminoácido ativado foi adicionada na resina seguida por uma rinçagem com DCM (2,5 vol) (nota 2). A suspensão foi agitada sob purga de nitrogênio por 2 horas, depois uma amostra de resina foi removida para um teste de ninhidrina qualitativo (nota 3). Se o teste de ninhidrina for negativo, o vaso é drenado, lavado 3 vezes

107  
X

com 5 volumes de NMP (nota 4) e o ciclo é repetido com o seguinte aminoácido na sequência. Se o teste for positivo, a suspensão é agitada por mais uma hora e é restada de novo. Se o teste de ninhidrina for negativo, passa-se para o próximo ciclo. Se o teste de ninhidrina permanecer positivo, é feita recopulação com um eq de aminoácido e reagentes. Se o teste de ninhidrina for positivo após uma hora, é realizado arremate de extremidade com Seq de anidrido acético e Seq de piridina em NMP (10 vol.) por uma hora.

Na completitude da síntese de fragmento, o Fmoc foi removido do último aminoácido como descrito e a resina foi agitada em uma solução de anidrido acético e piridina (5 eq cada) em NMP:DCM 3:1 (10 vol) por 20-30 minutos ou até ser obtido um teste de ninhidrina negativo. A resina foi drenada, lavada 2 vezes com 5 volumes de NMP, 5 vezes com 5 volumes de DCM e seca dando 3,49 kg de AcAA1-16O-resina.

A câmara de SPPS de 40 foi carregada com AcAA1-16 ligado em resina, seca (3,49 kg). O peptídeo ligado em resina foi clivado da resina usando 6 x 3,46 volumes de TFA 1%/DCM (nota 7). Cada lavagem de clivagem foi coletada em 1,36 volumes de bicarbonato de sódio aquoso 0,33 M. As frações bifásicas foram combinadas e diluídas com 2 volumes de água. A mistura bifásica foi concentrada sob pressão reduzida (2 kPa, 20°C) para remover DCM. Água adicional (2 volumes) foi adicionada durante a destilação necessária para manter agitação (nota 6). Quando o DCM foi removido (várias horas), a suspensão foi esfriada para 0°C e o pH foi ajustado para 3 com HCl aq IN. A lama foi agitada a 0°C por 1 hora e coletada. O sólido ainda úmido foi retornado para o vaso de reação e triturado com água (7 volumes) para remover TFA e trifluoro-acetato de sódio residuais. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo e secos para um peso constante (1,12 kg, 95A%). O rendimento de AcAA1-16OH baseado em carga de 0,53 mmol/g foi de 86% (nota 7).

Notas:

Pipetagem

1. Em cerca de 1 ml de acetona é adicionado 1 gota de uma solução saturada de cloranil em tolueno, seguida por uma gota de efluente. Uma cor azul ou violeta é uma indicação positiva para a presença de piperidina. À medida que aumenta a altura do leito, maiores volumes de NMP serão necessários para remover a piperidina por lavagem.
2. DCM é adicionado para garantir adequado inchamento da resina.
3. Teste de ninhidrina quantitativo é adequado para monitorar a eficiência de copulação. Uma amostra de 2-20 mg de resina é retirada e limpada por lavagem com metanol. Na amostra são adicionadas 3 gotas de fenol 76% em etanol, 4 gotas de KCN 0,2 mM em piridina e 3 gotas de ninhidrina 0,28 M em etanol. A solução é diluída para 0,5-1 ml com etanol e deixada dentro de um bloco quente a 75°C por 5-10 minutos. Uma cor violeta ou azul indica aminas livres (positivo). Azul claro ou pálido é um resultado negativo.
4. "Protocol for quantitative ninhydrin test references": Sarin, V. K., Kent, S. B., Tam, J. P., & Merrifield, R. B. (1981) *Analytical Biochem.* iii, 147-157.
5. Se a resina for para ser armazenada durante a noite, lavar 2 vezes com 5 volumes de NMP, drenar e armazenar sob nitrogênio. Não armazenar sob DCM. Isto pode resultar em clivagem do peptídeo da resina e substancial perda de massa.
6. Cada fração é testada para conteúdo de produto por visualização em TLC a 254 nm. A maior parte do produto é removida nas primeiras 5 lavagens.
7. À medida que DCM é removido, a reação toma a consistência de creme de *marshmallow*. À medida que a destilação continua, a suspensão gradualmente se quebra em uma lama sólida. É importante remover o DCM lentamente para evitar produto oleoso.
8. Vydac C8, 5 µm, 300A  
1 ml/min., 30°C, 230 nm  
A: água/TFA 1000/1

B: IPA:ACN:TFA 60:20:1:1  
60-95% B/30 min.

Tempo de retenção: 13,1 minutos.

### 11.3 Preparação em grande escala de fragmento FmocAA(17-26)-OH (fragmento 10b):

Um total de 5,3 kg de FmocAA17-26O-resina foi preparado a partir de 2,4 kg de FmocLeuO-resina em duas corridas de igual quantidade. Os 5,3 kg de FmocLeuO-resina foram clivados da resina em quatro corridas de igual quantidade dando 3,184 kg de FmocAA1-26OH de pureza média de 94,4A% e rendimento de 90%.

As reações foram conduzidas usando 1,5 equivalentes de cada aminoácido relativos ao fator de carregamento, resultando no uso de excesso de 65% de aminoácido para cada ciclo de copulação. Todas as reações de copulação foram completas (teste de ninhidrina negativo) dentro de 2 horas.

O grupo protetor Fmoc foi removido com piperidina 20% em NMP (5 volumes) por 20 minutos e repetido. A piperidina foi removida da resina por lavagem com 5 lavagens de 5 volumes de NMP. As reações de copulação foram realizadas em 8 volumes de NMP:DCM 3:1. A solução de copulação foi drenada e os sólidos foram limpos com três lavagens de 5 volumes de NMP. O ciclo foi repetido com o aminoácido seguinte na seqüência. Na completitude do fragmento, o leito de resíduo foi lavado com 2 x 5 volumes de NMP, 5 x 5 volumes de DCM e seco até peso constante.

Várias lavagens com TFA 1% em DCM foram usadas para remover o fragmento da resina. Esfriamento do TFA 1% em solução de DCM não foi necessário visto que a estabilidade deste fragmento em TFA 1%/DCM (1%/dia) é muito maior do que a de AcAA1-16OH. Com o recolhimento do produto em recipiente, lavagens de DCM ácido foram coletadas, e neutralizadas com piridina. As lavagens combinadas foram destiladas para remover DCM e etanol foi adicionado para manter uma

solução bem como para remover o DCM durante a destilação. Após remoção do DCM (determinado pelo aumento na temperatura do destilado sendo removido) água foi adicionada para precipitar o fragmento. O sólido foi coletado por filtração a vácuo (menos do que 60 minutos). O sólido ainda úmido foi transferido de volta para o reator e triturado com etanol/água 80/20 (5 vol) a 0-5°C por 60 minutos. O FmocAA17-26OH precipitado foi coletado por filtração a vácuo, lavado com mínima quantidade de etanol/água 80/20 e seco (vácuo, sem calor, 10 dias).

### 11.3.1 Processo preferido para preparação em grande escala de fragmento FmocAA(17-26)-OH (fragmento 10b):

Uma câmara de SPPS de 40 l foi carregada com FmocLeuO-resina (1,2 kg, 0,776 mol) seguido por DCM (5 vol) para inchar a resina. O DCM foi necessário para garantir completo inchamento da resina inicialmente seca. A suspensão foi agitada por 20-30 minutos e drenada. Uma solução de piperidina 20% em NMP (5 vol) foi adicionada e a solução foi agitada por 20 minutos. O solvente foi drenado e o processo foi repetido. O solvente foi drenado e o leito de resina foi lavado com 5 x 5 volumes de NMP para remover piperidina (nota 1).

Durante desproteção, um frasco de fundo redondo de 20 l com agitador mecânico foi carregado com o aminoácido seguinte na seqüência (1,95 eq), HOBT (1,95 eq), DIEA (1,95 eq) e NMP (6 volumes). A solução foi agitada até dissolução dos sólidos, depois foi esfriada para 0-5°C e HBTU (1,95 eq) foi adicionado. A solução foi agitada até HBTU se dissolver ou a resina ficar livre de piperidina (seja qual for o primeiro), depois foi adicionada na resina. O reator foi lavado com DCM (2 vol) e este foi transferido para o reator de SPPS. Nota: a estequiometria de aminoácido e reagentes deve ser de 1,5 equivalentes.

A resina foi suspensa na solução de copulação com agitação suave. Após duas horas, uma amostra de resina foi removida da câmara de

SPPS e um teste de ninhidrina qualitativo foi realizado (nota 2). Se o teste de ninhidrina for negativo, o vaso é drenado, lavado 3 vezes com 5 volumes de NMP e o ciclo é repetido com o aminoácido seguinte na sequência (o inchamento com DCM é usado apenas para o primeiro aminoácido carregado).

Se o teste for positivo, a suspensão é agitada por mais 1 hora e novamente testada. Se o teste de ninhidrina for negativo, prossegue-se para o próximo ciclo. Se o teste de ninhidrina permanecer positivo, é feita recopulação com um eq de aminoácido e reagentes. Se teste de ninhidrina for positivo após uma hora, é feito arremate de extremidade com 5 eq de anidrido acético e 5 eq de piridina em NMP (10 vol) por uma hora.

Na completitude da síntese de fragmento, a resina foi drenada, lavada com 2 x 5 volumes de NMP, 5 x 5 volumes de DCM e seca para dar 2,67 kg de FmocAA17-26O-resina.

FmocAA17-26OH foi clivado da resina (1,33 kg) usando 5-6 x 1,7 volumes de TFA 1% em DCM, cada um 5 minutos. As lavagens com TFA 1%/DCM foram coletadas em um frasco contendo piridina (razão em volume de 1:1 com TFA na lavagem). As lavagens contendo produto foram combinadas (cerca de 14 l) e o DCM foi removido por destilação para um volume mínimo de pote (de cerca de um terço do volume original). O vácuo foi ajustado para manter uma temperatura de pote de 15-25°C. Etanol (6,5 vol) foi adicionado e a destilação foi continuada até remoção de DCM (determinada pela temperatura do destilado, nota 3). De novo o vácuo foi ajustado para manter uma temperatura de pote de 15-20°C. O volume de pote final deve ser de cerca de 8-10 volumes. A solução foi esfriada para 5-10°C e água (6,5 vol) foi adicionada durante 30 minutos para precipitar o FmocAA17-26OH. O sólido foi coletado por filtração a vácuo e lavado com água (2-3 vol). Para remover piridina e/ou sais residuais, o sólido ainda úmido foi carregado de volta para o reator e etanol/água 80/20 (5 vol), pré-

esfriado para 0°C, foi adicionado. A suspensão foi agitada a 0°C por 60 minutos, os sólidos foram coletados por filtração a vácuo, lavados com uma mínima quantidade de etanol/água 80/20 e secos até peso constante para dar 0,806 kg de FmocAA17-26OH com rendimento de 90,6% e pureza de 96A% (nota 4).

Notas:

1. Em 1 ml de acetona é adicionado 1 gota de uma solução saturada de cloranil em tolueno, seguida por uma gota de efluente. Uma cor azul ou violeta é uma indicação positiva para a presença de piperidina.
- 10 2. Teste de ninhidrina quantitativo é adequado para monitorar a eficiência de copulação. Uma amostra de 2-20 mg de resina é retirada e limpada por lavagem com metanol. Na amostra são adicionadas 3 gotas de fenol 76% em etanol, 4 gotas de KCN 0,2 mM em piridina e 3 gotas de ninhidrina 0,28 M em etanol. A solução é diluída para 0,5-1 ml com etanol e deixada dentro de
  - 15 um bloco quente a 75°C por 5-10 minutos. Uma cor violeta ou azul indica aminas livres (positivo). Azul claro ou pálido é um resultado negativo.
  3. A temperatura de cabeça durante destilação a vácuo de DCM foi de 10-15°C. A temperatura de cabeça subiu para 3500 quando o DCM foi removido.
  - 20 4. Vydac C8, 5 µm, 300A
    - 1 ml/min., 262 nm, 30°C
    - A: água/TFA 0,1%
    - B: ACN/TFA 0,1%
    - 80-99% B/20 min.
    - 25 Tempo de retenção: 15,2 minutos.

#### 11.4 Preparação em grande escala de fragmento Fmoc-AA(26-35)-OH (fragmento 16b):

Um total de 4,694 kg de FmocAA27-35OH foi sintetizado a partir de 4,45 kg de FmocTrp(Boc)O-resina. A síntese em fase sólida foi

273

realizada em duas bateladas e clivagem da resina foi conduzida em quatro bateladas. FmocAA27-35OH resultante de uma batelada foi cerca de 5% menos puro do que material da outra batelada. Isto foi devido à uma impureza de 5A% não identificada que foi removida no processamento para FmocAA17-36NH<sub>2</sub>. A quantidade total de FmocTrp(Boc)OH carregada na resina foi de 2,5 moles. A síntese em fase sólida prosseguiu conforme o esperado para resina carregada com capacidade de cerca de 63%. Todas as copulações foram completas no primeiro ponto de checagem de 2 horas. Os volumes de reação e de rinçagem usados para a SPPS e a clivagem foram iguais àqueles utilizados na síntese de FmocAA17-26OH. Clivagem da resina foi como descrito acima. Filtração foi rápida (15 min). Secagem do sólido após trituração em etanol/água 90/10 durou 3 dias (vácuo, sem calor). O fragmento foi estável à secagem a 40°C.

#### 11.4.1 Processo preferido de preparação em grande escala de fragmento

##### 15 Ac-AA(27-35)-OH (fragmento 16b):

Em uma câmara de SPPS contendo FmocTrp(Boc)-resina (1 eq, 2,2 kg, 1,23 moles) foi carregada com DCM (5 vol). A suspensão foi agitada por 15 minutos e drenada. Uma solução de piperidina 20% em NMP (5 volumes) foi adicionada e a suspensão foi agitada por 10-15 volumes para remover o grupo protetor Fmoc. Este processo foi repetido e a resina foi lavada com 5-7 x NMP (5 vol) para um teste de cloranil negativo (nota 1).

O aminoácido subsequente (1,5 eq), HOBt (1,5 eq), e DIEA (1,7 eq) foram combinados em NMP (6 vol), depois esfriados para 0-5°C (nota 2). HBTU foi adicionado e a solução foi agitada por 10-15 minutos para dissolver. DCM (2 vol) foi usado para lavar o reator depois foi adicionado na resina (nota 3). A suspensão foi agitada sob uma atmosfera de nitrogênio por 1-2 horas. Completitude de copulação foi monitorada com um teste de ninhidrina qualitativo (nota 4). Se o teste de ninhidrina for negativo, o vaso é drenado, lavado 3 vezes com 5 volumes de NMP e o ciclo é repetido com o

aminoácido seguinte na sequência (o inchaço com DCM é usado apenas para o primeiro aminoácido carregado).

Se o teste for positivo, a suspensão é agitada por mais 1 hora e novamente testada. Se o teste de ninhidrina for negativo, prossegue-se para o próximo ciclo. Se o teste de ninhidrina permanecer positivo, é feita recopulação com um eq de aminoácido e reagentes. Se teste de ninhidrina for positivo após uma hora, é feito arremate de extremidade com 5 eq de anidrido acético e 5 eq de piridina em NMP (10 vol) por uma hora.

Na completitude da síntese de fragmento, a resina foi drenada, lavada com 2 x 5 volumes de NMP, 5 x 5 volumes de DCM e seca dando 4,11 kg de FmocAA27-35O-resina.

O fragmento foi clivado da resina (2,05 kg) usando 6 x 1,7 volumes de TFA 1% em DCM, 5 minutos cada. As lavagens de TFA 1%/DCM foram coletadas em um frasco contendo piridina (razão em volume de 1:1 com TFA em cada frasco). As lavagens contendo produto foram combinadas e o DCM foi removido por destilação (vácuo ajustado para manter uma temperatura de pote de cerca de 15°C) para cerca de a metade do volume original. Etanol (5 vol) foi gradualmente introduzido e destilação (vácuo ajustado para manter uma temperatura de pote de cerca de 20°C) foi continuado até remoção de DCM (determinada pela temperatura do destilado, nota 5). O volume de pote deve ser 6-7 volumes. A solução turva foi esfriada para 10-15°C e água (3,5 vol) foi adicionada durante 30 minutos com rápida agitação para precipitar FmocAA27-25OH. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo (15 minutos), e lavados com água (1 vol). Para remover piridina residual, o sólido úmido foi retornado para o reator e etanol/água 90/10 pré-esfriado para 0-5°C foi adicionado (10 vol). A lama foi agitada a 0-5°C por 60 minutos, o sólido foi coletado por filtração a vácuo, lavado com etanol/água 90-10 (0,5 vol) e seco até peso constante dando 1,19 kg de FmocAA27-35OH com rendimento de 89% e pureza de 89,2A% (nota 6).

Este protocolo pode ser reprocessado pela trituração do sólido com 15 volumes de etanol/água 9:1 com agitação por 12 horas, seguido pelas coleta e secagem.

Notas:

- 5 1. Em 1 ml de acetona é adicionado 1 gota de uma solução saturada de cloranil em tolueno, seguida por uma gota de efluente. Uma cor azul ou violeta é uma indicação positiva para a presença de piperidina.
2. Os reagentes menos HBTU são adicionados na temperatura ambiente para ajudar a dissolução. HBTU é adicionado na solução esfriada para minimizar racemização.
- 10 3. Ativação é realizada em NMP devido ao fato de HBTU não ser solúvel em DCM. DCM é usado para lavar o reator e é adicionado na resina para manter inchamento de resina adequado.
4. Teste de ninhidrina quantitativo é adequado para monitorar a eficiência de copulação. Uma amostra de 2-20 mg de resina é retirada e limpada por lavagem com metanol. Na amostra são adicionadas 3 gotas de fenol 76% em etanol, 4 gotas de KCN 0,2 mM em piridina e 3 gotas de ninhidrina 0,28 M em etanol. A solução é diluída para 0,5-1 ml com etanol e deixada dentro de um bloco quente a 75°C por 5-10 minutos. Uma cor violeta ou azul indica
- 15 aminas livres (positivo). Azul claro ou pálido é um resultado negativo.
- 20 5. A temperatura de cabeça durante destilação a vácuo de DCM foi de 10-15°C. A temperatura de cabeça subiu para 35°C quando o DCM foi removido.
6. Vydac C8, 5 µm, 300A
  - 1 ml/min., 262 nm, 30°C
  - 25 A: água/TFA 0,1%
  - B: ACN/TFA 0,1%
  - 80-99% B/20 min.
  - Tempo de retenção: 15,3 minutos.

#### 11.5 Preparação em grande escala de fragmento FmocAA(27-36)OH por

**copulação em fase de solução de FmocAA(27-35)-OH com HPheNH<sub>2</sub>:**

Um total de 5,226 kg de FmocAA27-36NH<sub>2</sub> foi preparado em quatro corridas a partir de 4,676 kg de FmocAA27-35OH. Solvente e reagentes de copulação residuais foram responsáveis pelo rendimento maior do que 100%. Estes foram removidos no próximo estágio.

Sólido aderente na parede do reator após adição de água foi citado como sendo um problema significativo neste estágio. Isolamento do sólido bruto por filtração a vácuo demorou 30 minutos. O tempo de secagem médio (vácuo, sem calor) para as corridas foi de 8 dias. O sólido necessitou se comprimido sobre o filtro para remover excesso de água antes de ir para a estufa. O fragmento foi estável na secagem a 40°C e as estufas a vácuo precisaram ser aquecidas.

Um teste de uso foi realizado em uma escala de 0,5 a 1 grama com a batelada/lote de materiais iniciais a serem empregados para ajudar a estabelecer qualidade e identidade. Cromatografia em camada fina (TLC) e HPLC foram utilizadas para monitorar conversão do material inicial ao produto. A principal impureza a ser procurada no fragmento FmocAA27-35OH é ácido trifluoro-acético (ou um seu sal). Ativação e reação do ácido trifluoro-acético presente no FmocAA27-35OH com fenil-alanina-amida é um processo rápido. Um pequeno excesso de fenil-alanina-amida pode ser utilizado para consumir qualquer ácido trifluoro-acético presente. Um ensaio de qualidade mais significativo é com a fenil-alanina-amida comprada. Os vendedores em sua maioria vendem esta como um sal de HCl. Vários lotes de sal de HCl de fenil-alanina-amida produziram uma impureza (5-15A%) que co-elui com o material inicial no HPLC. A impureza pode ser separada do fragmento inicial e do produto por TLC. A impureza é FmocAA27-35NH<sub>2</sub> resultante da presença de cloreto de amônio presente no sal de HCl de fenil-alanina-amida.

**11.5.1 Preparação em grande escala de fragmento FmocAA(27-36)-OH**

por copulação em fase de solução de FmocAA(27-35)-OH com HPheNH<sub>2</sub>:

Um reator encamisado de 40 l com um agitador mecânico foi carregado com FmocAA27-35OH (1 eq, 1,185 kg), HOAT (1,1 eq), HCl.HPheNH<sub>2</sub> (1,15 eq.) e DMF (2,1 eq). DIEA (2,1 eq) foi adicionada, a  
 5 solução foi esfriada para 0-5°C e HBTU (1,2 eq) foi adicionado. A mistura reacional foi agitada por 15 minutos a 0-5°C depois foi aquecida para a temperatura ambiente e agitada por mais 70 minutos (nota 1, HPLC usada para checar processo). Após a reação ter sido julgada completa por HPLC, água (12,5 vol) foi adicionada durante 15-30 minutos para precipitar o  
 10 peptídeo. A lama foi agitada por 15 minutos na temperatura ambiente. Os sólidos foram coletados por filtração a vácuo, lavados com água (3 vol) e secos para dar FmocAA27-36NH<sub>2</sub> (1,357 kg com rendimento de 107% e pureza de 87,1A% por HPLC (nota 2).

A reação pode ser reprocessada por trituração do sólido com  
 15 15 volumes de acetonitrila/água 9:1 com agitação por 12 horas, coleta e secagem.

Notas:

1. No controle de processo, TLC:

dicloro-metano/metanol 88/12  
 20 detecção por iodo, UV  
 Rf: FmocAA27-35OH, 0,49  
 Rf: FmocAA27-36NH<sub>2</sub>, 0,63  
 Vydac C8, 5 m, 300A  
 30°C, 1 ml/min., 262 nm,  
 25 A: água/TFA 0,1%  
 B: ACN/TFA 0,15%  
 80-99% B/20 min.  
 Tempo de retenção: FmocAA27-35OH, 15,8  
 Tempo de retenção: FmocAA27-36NH<sub>2</sub>, 17,12

2. Um rendimento maior do que o teórico é em geral obtido a não ser que o sólido isolado seja retornado para o reator e triturado com água.

#### 11.6 Preparação em grande escala de fragmento HAA(27-36)-OH a partir de FmocAA(25-36)-OH:

5 Um total de 3,897 kg de HAA27-36NH<sub>2</sub> foi preparado a partir de 5,221 kg de FmocAA27-36NH<sub>2</sub> em quatro corridas com um rendimento médio de 2 etapas de 86,4%. A faixa de rendimento observada para as corridas, 74-97%, reflete presumivelmente transporte de uma corrida para a seguinte.

10 A separação/purificação e o isolamento de produto neste estágio funcionam bem. A pureza do produto é aumentada se a quantidade correta de DCM for deixada no MTBE e as propriedades físicas do sólido acarretam rápidas filtração e secagem. Este processo de isolamento de produto está incorporado no novo estágio descrito na seção 11.6.2, abaixo.

15 DCM é o solvente empregado durante a desproteção de FmocAA27-36NH<sub>2</sub>. Na completitude da desproteção, a solução orgânica foi lavada com água duas vezes para remover a maior parte da piperidina em excesso, depois foi concentrada para cerca de um terço do volume original. MTBE foi adicionado para precipitar o fragmento. A destilação foi  
20 continuada para remover a maior parte do DCM restante e completar a precipitação do fragmento. É importante a remoção o máximo de DCM para evitar perda de massa na precipitação. Também é importante deixar um pouco de DCM no MTBE para garantir limpeza do produto. Dibenzofulveno, aduto de piperidina-fulveno e piperidina residuais também são solúveis em  
25 MTBE. O HAA27-36NH<sub>2</sub> foi coletado e seco. Se necessário, uma segunda trituração do sólido (12 horas) com MTBE removerá dibenzofulveno residual e o mais importante o aduto de piperidina-fulveno que pode estar presente no HAA27-36NH<sub>2</sub>. Uma trituração com hexano removerá dibenzofulveno, mas não o aduto de piperidina-fulveno. Tempo de secagem do sólido isolado de

MTBE é de 1 dia.

P : 990901 :

Devido à alta solubilidade de HAA27-36NH<sub>2</sub> e de impurezas relacionadas em DCM/MTBE, um processo analítico foi desejado para determinar acuradamente o ponto final da troca de solvente. Um processo de CG tem sido desenvolvido para ensaiar DCM em MTBE. A destilação é completa quanto o conteúdo de DCM em MTBE for menor do que 6%.

#### 11.6.1 Preparação em grande escala de fragmento HAA(27-36)-OH a partir de FmocAA(27-36)-OH:

Um reator de vidro encamisado de 40 l equipado com um agitador mecânico e termômetro foi carregado com FmocAA27-36NH<sub>2</sub> (1 eq., 1,356 kg), DCM (5 vol) e piperidina (0,2 vol). A solução foi agitada na temperatura ambiente por 1,5 horas (nota 1). A solução orgânica foi lavada com água (2 x 5 vol). O volume de camada orgânica foi reduzido para cerca de um terço do volume original por destilação (cerca de 3,3 kPa, temperatura da camisa menor do que 45°C para evitar fusão do sólido). MTBE (5 vol) foi gradualmente introduzido dentro do vaso de reação enquanto concentração continuou até um ponto de intensa precipitação e o volume do pote foi cerca de 5 volumes. A troca de solvente foi interrompida quando o conteúdo de DCM foi menor do que 6%. A lama foi esfriada para 0-5°C, agitada por 60 minutos depois coletada por filtração a vácuo (rápida). Os sólidos foram lavados com MTBE (2 x 0,5 vol) e secos até peso constante para dar 1,022 kg de HAA27-36NH<sub>2</sub> com rendimento de 89,2% (2 etapas) e pureza de 91,1A% (nota 1).

A reação pode ser reprocessada por trituração com MTBE (12,5 vol) a 23°C por 13 horas, coletada por filtração a vácuo e secada.

Notas:

1. IPC e pureza medidos por HPLC:

Vydac, C8, 5, 300A

1 ml/min., 626 nm, 30°C

A: Água/TFA 0,1% : 99,9%

B: ACN/TFA 0,1%

80-99%B/20 minutos

### 11.6.2 Preparação melhorada de fragmento HAA(27-36)-OH por 5 copulação em fase de solução de FmocAA(27-36)-OH com HPheNH<sub>2</sub>:

Um novo processo que combina seções 11.5 até 11.6.1, que vai diretamente de FmocAA(27-36)-OH para HAA27-36NH<sub>2</sub> tem sido desenvolvido. Este novo processo remove as questões associadas com isolamento de FmocAA27-36NH<sub>2</sub> e um longo tempo de secagem. Uma  
10 descrição detalhada é dada abaixo. O novo processo remove um longo tempo de secagem e um estágio da rota de síntese.

Adicionar FmocAA27-35OH (5,0 g, 1 eq), HOAT (0,459 , 1,2 eq) e Phe-NH<sub>2</sub> (0,389 , 1,2 eq) em um frasco de fundo redondo de 100 ml equipado com um agitador magnético e entrada de nitrogênio. Adicionar 10  
15 volumes de NMP (50 ml) e DIEA (0,45 g, 1,5 eq) no frasco e agitar sob atmosfera de nitrogênio até que os sólidos se dissolvam. Esfriar a solução para 0 a 5°C depois adicionar HBTU (1,04 g, 1,2 eq). Agitar sob um atmosfera de nitrogênio a 0-5°C por 30 minutos. Aquecer a mistura reacional para 20°C e continuar agitação. Realizar uma checagem do processo (IPC) 90  
20 minutos após adição de HBTU (nota 1).

Após a checagem do processo (IPC) mostrar que a reação está completa, adicionar piperidina (1,379 , 1 eq) na mistura reacional e agitar sob uma atmosfera de nitrogênio por 1,5 horas. Realizar uma IPC (nota 1). Se a remoção de Fmoc não estiver completa, agitar por mais 30 minutos e realizar  
25 a IPC.

Quando completa, adicionar a mistura reacional em ácido acético 5% aquoso em uma velocidade que não exceda uma temperatura de 35°C (35 vol). Agitar a lama resultante por 1 a 2 horas e coletar por filtração a vácuo (nota 2). Lavar o sólido com 10 volumes (50 ml) de água.

Retornar o sólido úmido para o reator, adicionar 20 volumes de água (100 ml) e agitar na temperatura ambiente por 1 a 2 horas. Coletar os sólidos por filtração a vácuo, lavar com 10 volumes de água (50 ml) e secar (nota 3).

5 O sólido seco (nota 4) é triturado com MTBE (20 vol) na temperatura ambiente por 2 a 5 horas para remover dibenzofulveno e aduto de piperidina-dibenzofulveno. Coletar o sólido por filtração a vácuo e secar até peso constante dando 4,55 gramas (94,3%) de HAA27-36NH<sub>2</sub> com pureza de 85-90A% (nota 1).

10 Fmoc-subprodutos (dibenzofulveno e seu aduto de piperidina) são em geral removidos neste protocolo, entretanto, se um reprocessamento for necessário, agitar o sólido em 10 volumes de MTBE a 20°C por 2 a 3 horas, coletar e secar.

Notas:

15 1. Checagem do processo por HPLC de fase reversa:

Coluna: Vydac C8, 300A, 5 µm, 30°C

Vazão de fluxo: 1 ml/min.

Deteção: UV a 262 nm

Fase móvel: A - água/TFA 0,1%; B - acetonitrila / TFA 0,1%

20 Processo: 80 a 99%B durante 20 minutos

Tempos de retenção: FmocAA27-36NH<sub>2</sub> (16,5 min.); HAA27-36NH<sub>2</sub> (8,4 min.)

2. O tempo de filtração total foi de 10 minutos.

3. O bolo úmido do filtro tem que ser retornado para o reator para uma  
25 imediata lavagem com água a fim de evitar os sólidos fiquem oleosos ou gomosos.

4. O produto bruto tem que ser seco completamente para garantir que a trituração em MTBE remova os subprodutos de dibenzofulveno.

**11.7 Preparação em grande escala de fragmento FmocAA(17-36)-OH por**

síntese em fase de solução com fusão de FmocAA(17-26)-OH com HAA(27-36)-OH:

Um total de 5,115 kg de FmocAA17-36NH<sub>2</sub> foi preparado a partir de 2,993 kg de HAA27-36NH<sub>2</sub> e 3,176 kg de FmocAA17-26OH em quatro corridas. O rendimento médio foi de 84,3%. Filtração do sólido bruto após a drenagem de água da mistura reacional demorou em média 40-50 minutos.

Um teste de uso foi realizado em um teste de escala de 1-2 g em ambos os fragmentos e no HBTU a ser usado antes da realização da reação de copulação. A estequiometria dos materiais iniciais e reagentes foi determinada a partir do teste de uso. A solubilidade dos materiais iniciais foi também observada no teste de uso. Uma solução turva pode indicar a presença de sais em FmocAA17-26OH e justificar uma lavagem aquosa no fragmento. É imperativo que todos os componentes da mistura reacional estejam límpidos em solução antes da adição de HBTU para garantir completa conversão dos materiais iniciais em produto com mínima formação de racemização e de subprodutos.

A pureza do FmocAA17-36NH<sub>2</sub> bruto isolado da drenagem de água é significativamente aumentada pela precipitação em IPA. FmocAA17-36NH<sub>2</sub> é parcialmente solúvel em IPA. Trituração de FmocAA17-36NH<sub>2</sub> com cerca de 15 volumes de IPA/água 95/5 pré-aquecida para 60-70°C seguida por agitação durante esfriamento para a temperatura ambiente no decorrer de várias horas aumenta a pureza do fragmento. Ambos materiais iniciais bem como piperidina-amida de FmocAA17-26OH e aduto de enamina-uréia de HAA27-36NH<sub>2</sub> são solúveis em IPA 95%. Trituração de FmocAA17-36NH<sub>2</sub> com IPA 95% na temperatura ambiente por períodos de tempo prolongados não é tão efetiva na remoção de impurezas. Um estudo de estabilidade a 60-70°C tem sido completado. Falha no aquecimento de solução de IPA para além de 52°C parece apresentar um mínimo impacto sobre a qualidade do

P 19909018

produto isolado.

**11.7.1 Processo preferido para preparação melhorada em grande escala de fragmento FmocAA(17-36)-OH por meio de síntese em fase de solução com fusão de FmocAA(17-26)-OH com HAA(27-36)-OH:**

- 5 Um reator encamisado de 40 l equipado com um agitador mecânico e entrada de nitrogênio é carregado com FmocAA17-26OH (1 eq., 0,770 kg), HAA27-36NH<sub>2</sub> (1 eq., 0,720 kg), HOAT (1,5 eq.) e DMF (12,5 volumes relativos a FmocAA17-26OH). EtPr<sub>2</sub>N (1,5 eq.) é adicionado e a suspensão é agitada na temperatura ambiente até dissolução dos sólidos
- 10 (visual). A solução é esfriada para 0-5°C sob uma atmosfera de nitrogênio e HBTU (1-1,05 eq.) é adicionado. A mistura reacional é agitada a 0-5°C até dissolução de HBTU (visual, cerca de 15 minutos). A mistura reacional é aquecida para 25°C e agitada por 2 horas (nota 1). A solução de DMF é esfriada para 0-5 e água fria de processo (12,5 vol) é adicionada em uma tal
- 15 velocidade de modo a não ultrapassar 25°C. A lama resultante é agitada por 1-24 horas, os sólidos são coletados por filtração a vácuo e lavados com água (3 x 4 vol). Os sólidos são secos no filtro por 16-24 horas para cerca de 2 vezes a massa teórica. O reator de 40 l é carregado com isopropanol/água 95/5 (25 vol) e aquecido para 45°C. O FmocAA17-36NH<sub>2</sub> semi-seco é
- 20 adicionado na solução de IPA com rápida agitação. A suspensão é aquecida para 52°C, depois é agitada por 12-16 horas enquanto esfria para a temperatura ambiente (nota 2). Os sólidos são coletados por filtração a vácuo, lavados com uma mínima quantidade de IPA e secos para dar 1,261 kg de FmocAA17-36NH<sub>2</sub> com rendimento de 85% e pureza de 90,5A% por HPLC
- 25 (nota 1). A reação pode ser reprocessada pela repetição da trituração em IPA/água 95/5.

**1. Controle do processo e pureza, HPLC**

Vydac C8, 5 µm, 300A, 30°C

1 ml/min, 262 nm, 30°C

A - água/TFA 0,1%; B - IPA/ACN 80/20 / TFA 0,1%

60 a 95%B/ 20 minutos

Tempos de retenção: HAA27-36NH<sub>2</sub> , 6,73 minutos

FmocAA17-26OH, 10,67 minutos

5 FmocAA17-36NH<sub>2</sub>, 20,2 minutos

2. O FmocAA17-36NH<sub>2</sub> não se dissolverá completamente neste volume nesta temperatura. Antes da coleta dos sólidos, parar agitação e permitir sedimentação dos sólidos. Remover uma amostra de filtrado e analisar por HPLC. Se o filtrado contiver uma quantidade significativa de FmocAA17-36NH<sub>2</sub>, esfriar para 0°C antes de coletar os sólidos.

### 11.8 Preparação em grande escala de fragmento HAA(17-36)-OH a partir de FmocAA(17-36)-OH:

Um total de 4,965 kg de HAA17-36NH<sub>2</sub> foi preparado a partir de 5,112 kg de FmocAA17-36NH<sub>2</sub> em quatro corridas. Ambos o rendimento de isolado e traços por HPLC indicaram a presença de dibenzofulveno e talvez de solvente. A presença de dibenzofulveno não interferirá com a seguinte reação de copulação visto que ele foi removido com carbonato de potássio, não piperidina, portanto, o aduto de piperidina-dibenzofulveno não é quimicamente um problema.

Há vários problemas associados com este processo. A reação é realizada em 12 volumes de DMF. A remoção do grupo Fmoc por base é 1 volume de carbonato de potássio 1,1 M, que é incapaz de formar um aduto básico com dibenzofulveno de difícil remoção. A desproteção prossegue em cerca de 90 minutos na temperatura ambiente.

Uma solução de água : cloreto de sódio aquoso saturado 1:1, pré-esfriada para 0°C é adicionada para co-precipitar o fragmento e dibenzofulveno. Isto gera um sólido leitoso, fino, que demora horas (5-8) para filtrar. Uma vez isolado, o sólido úmido tem que ser completamente seco (LOD menor do que 1%) para remover a impureza dibenzofulveno. A

225  
X

secagem dura 10 dias (vácuo, ~~sem calor~~). Uma vez seco, o sólido é retornado para o reator e triturado com heptano:MTBE 3:1 (20 vol) na temperatura ambiente por 18 horas para remover o dibenzofulveno. Tempos de trituração mais curtos não o removem completamente e se houver qualquer água sobre os sólidos, ele não é removido. Um reprocessamento em heptano:MTBE 3:1 (20 vol) pode ser usado se persistir dibenzofulveno.

Para solucionar estes problemas, o seguinte novo procedimento foi desenvolvido. Adicionar FmocAA17-36NH<sub>2</sub> (2,0 g, 1 eq.) e heptano (8 vol) em um frasco de fundo redondo de 100 ml equipado com um agitador mecânico, controlador de temperatura e condensador de refluxo. Adicionar 2 volumes de MTBE (4 ml) e aquecer a lama para 45-50°C (nota 1). Adicionar a piperidina (1 0 (sic) eq.). Agitar sob uma atmosfera de nitrogênio a 45-50°C por 24-36 horas (nota 2). Filtrar a quente a mistura reacional a 45-50°C (nota 3), depois lavar o bolo com 5 volumes (10 ml) de heptano:MTBE 60:40.

Notas:

1. Reação mais lenta resultará se MTBE for permitido escapar do reator mudando deste modo a razão de heptano:MTBE. Temperaturas de reação maiores do que 50°C podem resultar em transformação dos sólidos da reação em goma. O Fmoc é sobremaneira removido em 5 horas.

2. Completitude da reação é monitorada por HPLC:

Coluna: Vydac C8, 300A, 5 , 30°C

Vazão de fluxo: 1 ml/min

Deteção: UV a 262 nm

Fase móvel: A - água/TFA 0,1%

B - IPA:CAN 80:20 TFA 0,1%

Processo: 60 a 95%B durante 30 minutos

3. Filtração a quente ajuda na remoção de aduto de piperidina-dibenzofulveno.

11.8.1 Preparação em grande escala de fragmento Fmoc(17-36)-OH a partir de FmocAA(17-36)-OH:

Um reator encamisado de 40 l é carregado com FmocAA17-36NH<sub>2</sub> (1 eq, 1,26 kg) e DMF (12 vol) na temperatura ambiente. Uma  
5 solução aquosa de carbonato de potássio 1,11 M (1 vol, 5 eq) é adicionada de uma vez (nota 1). A mistura reacional é agitada na temperatura ambiente por 3,5 horas (nota 2). A mistura reacional é adicionada lentamente em uma solução 1:1 de cloreto de sódio aquoso saturado / água (10 volumes) pré-esfriada para 9% em peso 0°C em uma tal velocidade de modo a não  
10 ultrapassar uma temperatura de 10°C (cerca de 1-2 h). O sólido é coletado por filtração a vácuo usando uma tampa de borracha para comprimir a água do bolo do filtro (nota 3). O bolo úmido é transferido de volta para o vaso de reação e triturado (agitado) com água (10 vol) por 1-2 horas para remover sais inorgânicos residuais. O sólido é coletado por filtração a vácuo,  
15 comprimido com uma tampa de borracha e depois transferido para uma estufa a vácuo e seco até peso constante. O sólido seco (nota 4) é triturado (agitado) com heptano:MTBE (20 vol) por um mínimo de 14 horas na temperatura ambiente para remover dibenzofulveno. O sólido é coletado por filtração a vácuo, lavado com heptano (2 vol) e seco para dar 1,20 kg de HAA17-36NH<sub>2</sub>  
20 com rendimento de 99,5% e pureza de 75A%. O HAA17-36NH<sub>2</sub> contém 5A% de dibenzo-fulveno. Reação é reprocessada por repetição da trituração em heptano:MTBE.

Notas:

1. A solução torna-se turva quando carbonato de potássio aquoso é  
25 adicionado, mas fica límpida com agitação continuada. Uma exoterma de 4-5°C foi observada.

2. HPLC usada para IPC e pureza.

Vydac C8, 260 nm

1 ml/min, 262 nm, 30°C

10% B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-IPA/acetonitrile

5 4. O material tem que estar livre de água para o heptano efetivamente  
remover o dibenzil-fulveno.

O AcAA1-16OH foi dissolvido em DMF com HOAT e DIEA, esfriado para 0°C e HBTU foi adicionado. Isto foi agitado por 15 minutos, ou até dissolução do HBTU, depois HAA17-36NH<sub>2</sub> foi adicionado. Pré-ativação de AcAA1-16OH na ausência de HAA17-36NH<sub>2</sub> foi uma precaução que mais tarde foi verificada não ser necessária. Em adição, dissolução de HAA17-36NH<sub>2</sub> em solução de DMF a 0°C contendo o AcAA1-16OH ativado mostrou-se lenta em grande escala.

rendimento médio de 87% e duas corridas deram rendimento médio de 73%.

25 também observada no teste de uso. Uma solução turva pode indicar a presença de sais em AcAA1-16OH e justificar uma lavagem aquosa no fragmento. É imperativo que todos os componentes da mistura reacional estejam límpidos em solução antes da adição de HBTU para garantir completa conversão dos materiais iniciais em produto com mínima formação

de racemização e de subprodutos. 019909018

Os fragmentos, AcAA1-16OH e HAA17-36NH<sub>2</sub>, e reagentes HOAT e DIEA foram dissolvidos em DMF, esfriados para 0°C e HBTU foi adicionado. Uma das corridas requereu um equivalente adicional de DIEA para coletar HCl sobre HAA17-36NH<sub>2</sub>. O produto bruto foi isolado da mistura reacional com uma drenagem de água (tempo de filtração de 10 minutos). O sólido ainda úmido foi retornado para um reator contendo acetonitrila pré-aquecida para 55°C, depois agitado rapidamente durante esfriamento para 35°C no decorrer de 3 horas, depois para 20°C durante a noite. A lama foi esfriada para 0-5°C, agitada mais 1-2 horas e o sólido foi coletado por filtração. Durante este processo, o AcAA1-36NH<sub>2</sub> quase entra em solução a 55°C. À medida que a solução esfria, o AcAA1-36NH<sub>2</sub> precipita (óleo) da solução. À medida que solução esfria, o óleo se solidifica e eventualmente é transformado em um belo sólido branco. Durante o curso desta transformação, pode ocorrer deposição considerável de sólido sobre a parede do reator e o eixo do agitador. A maior parte desta cai à medida que a lama é agitada durante a noite a 20°C. Após coleta do sólido, o reator é cheio com água suficiente para cobrir qualquer sólido aderido nas paredes ou eixo do reator. A lama é agitada até todo o sólido restante cair das paredes e do eixo (cerca de 1 hora), depois é usada como uma lavagem sobre o bolo do filtro. A lavagem com acetonitrila remove materiais iniciais não reagidos e quaisquer fragmentos truncados menores do que 20 aminoácidos.

**11.9.1 Preparação preferida em grande escala de fragmento AcAA(1-36)-OH por síntese em fase de solução a partir de AcAA(1-16)-OH e FmocAA(17-36)-OH:**

Um reator de 40 l é carregado com AcAA1-16OH (938 g, 1 eq), HAA17-36NH<sub>2</sub> (1,19 kg, 1 eq.), HOAT (1 eq.), DMF (19 vol, relativo a AcAA1-16OH) e DIEA (1 eq). A lama é agitada até dissolução dos sólidos, depois é esfriada para 0-5°C e HBTU (1,03 eq.) é adicionado. A solução é

agitada a 0-5°C por 15 minutos ou até dissolução dos sólidos, aquecida para 20°C e agitada por 2 horas. Quando a reação é julgada completa, água (19 vol) é adicionada em uma tal velocidade de modo a não ultrapassar 35°C (nota 2).

5 A lama é agitada por 1-24 horas depois o sólido é coletado por filtração a vácuo (10 minutos) e lavado com água (2 x 3 vol). O bolo do filtro é comprimido para remover o máximo de água possível. Enquanto isso, o reator é carregado com acetonitrila 95% / água (30 volumes relativos à carga de AcAA1-16OH) e é aquecido para 55°C com agitação.

10 O sólido úmido é adicionado no reator em porções para evitar aglomeração. A lama é agitada enquanto esfria para 35°C no decorrer de 3 horas, depois para 20°C durante a noite. Esfriar para 0-5°C, agitar por 2 horas, parar agitação e amostrar a solução.

15 Coletar o sólido por filtração a vácuo. Lavar o reator e as linhas com acetonitrila 90%/água (3,6 vol).

20 Carregar o reator com uma quantidade suficiente de água para cobrir quaisquer sólidos aderentes nas paredes do reator ou eixo de agitação (cerca de 30 vol). Agitar na temperatura ambiente até que os sólidos não mais adiram nas paredes do reator e no eixo (cerca de 1 hora). Coletar o sólido com o restante e secar até peso constante (1,83 kg, rendimento de 86%).

Repetir trituração sobre o sólido seco usando acetonitrila/água 90/10.

Notas:

1. IPC e pureza, HPLC

25 YMC ODS-A, 150 x 4,6 mm, 5 µm, 120A

1 ml/min, 260 nm, 30°C

A - água/TFA 0,1%

B - THF/TFA 0,1%

60-90%B/30 min., 90-95%B/1 min., 95%B/5 min.

AcAA1-16OH 6,37 minutos

HAA17-36NH<sub>2</sub> 8,91 minutos

AcAA1-36NH<sub>2</sub> 18,07 minutos

2. Se a temperatura ultrapassar 35°C durante a adição de água, os sólidos que precipitam podem se fundir deixando aglomerados e/ou deposição sobre as paredes do reator.

#### 11.10 Desproteção de cadeias laterais de AcAA(1-36)-OH:

- O objetivo deste experimento foi mudar a velocidade de adição de MTBE na precipitação para manter a temperatura menor do que 20°C e também isolar e descarboxilar T-20 sólido bruto (isto é, remover solução de descarboxilação).

O T-20 bruto foi isolado por precipitação em ACN/água como um sólido antes do carregamento na coluna de HPLC. O conteúdo percentual de T-20 do sólido foi determinado por um ensaio por HPLC em peso.

- Após os grupos protetores de cadeia lateral terem sido removidos em TFA/água/ditiotreitol 90/5/5, a solução é esfriada para 0°C e MTBE (45 vol em relação à carga de AcAA1-36NH<sub>2</sub>) é adicionado. Esta é uma mínima quantidade de MTBE requerida para garantir completa precipitação de T-20. Há uma exoterma durante misturação e os primeiros 5 volumes têm que ser adicionados lentamente para manter a temperatura abaixo de 20°C (cerca de 60 minutos). À medida que mais MTBE é adicionado, a velocidade de adição pode ser aumentada. Manutenção da temperatura abaixo de 20°C durante a precipitação evita aglomeração do sólido à medida que ele precipita da solução.

- O corrente protocolo de clivagem/purificação envolve realização de desproteção em uma escala que acomoda purificação cromatográfica. O T-20 bruto isolado do coquetel de desproteção como um sal de TFA foi dissolvido em acetonitrila/água em pH 5, filtrado e permitido repousar por 15 horas para efetuar descarboxilação de indóis de triptofano.

207

Após a completitude da descarboxilação, a solução foi diluída e transferida para o conjunto de purificação para ser carregada na coluna. Durante diluição, a solução sempre se torna turva e a solução turva foi bombeada para a coluna. Isto resultou em deposição de sólido sobre a cabeça da coluna e gradual deterioração do desempenho da coluna durante as corridas de purificação. Permissão da descarboxilação de T-20 em acetonitrila/água em pH 5 por várias horas acarreta a formação de agregados altamente insolúveis.

Um processo para evitar descarboxilação em solução tem sido desenvolvido. O T-20 bruto, isolado como um sal de TFA da precipitação em MTBE, se descarboxilará sob vácuo na temperatura ambiente durante cerca de 5-7 dias. A descarboxilação foi verificada completa em três dias a 40°C sob vácuo. O conteúdo de TFA do sólido isolado foi de 9%. O material pode ser armazenado por até um mês a 0°C com perda de 1% p/p.

Uma troca de sal em etanol/água (1:9) COM HOAc pode ser realizada após isolamento de T-20-TFA do MTBE. O sal de acetato de T-20 bruto é significativamente mais estável e pode ser preferido. Qualquer processo de isolamento permitirá a realização da desproteção da cadeia lateral em grande escala e o T-20 não será exposto às condições de acetonitrila/água/HOAc usadas para descarboxilação que conhecidamente causam problemas de agregação.

Novo processo para desproteção de cadeias laterais de AcAA(1-36)OH:

Preparar uma solução de TFA/água/ditiotreitol 90/5/5 (13 vol) e purgar com nitrogênio por 3 minutos. AcAA1-36NH<sub>2</sub> é adicionado em porções em TFA/água/ditiotreitol 90/5/5 (13 vol) na temperatura ambiente sob uma atmosfera de nitrogênio. Uma vez em solução, agitar na temperatura ambiente por 4 horas e então esfriar para 0°C. Para precipitar o T-20, MTBE (45 vol), esfriado para 0-5°C, é adicionado por gotejamento em uma velocidade lenta inicialmente mantendo uma temperatura abaixo de 20°C (tempo de adição de cerca de 1-2 horas ). O sólido é coletado por filtração a

vácuo (nota 1). O reator, linhas e bolo do filtro são imediatamente lavados com 3 x 5 volumes de MTBE. O sólido é removido, amostrado para t=0 IPC (nota 2) e seco sob vácuo por 5 dias, ou até HPLC não mostrar mudança.

Notas:

- 5 1. Evitar puxar ar através do sólido durante esta filtração porque a solução de desproteção é higroscópica. Puxar ar através do sólido antes de a solução de TFA ter sido removida por lavagem pode resultar em um sólido pegajoso ou oleoso.
- 10 2. Usar processo de HPLC TM2-0003-01 (processo TFA). O processo de acetato de amônio (TM2-0006-01) não separa os vários intermediários carboxilados.

Desproteção de cadeias laterais de AcAA(1-36)OH:

- Um total de 7,226 kg de AcAA1-36NH<sub>2</sub> foi desprotegido em 12 corridas. Apenas 6,972 kg de AcAA1-36NH<sub>2</sub> foram preparados sugerindo
- 15 que o intermediário pode ser higroscópico. O sólido isolado da drenagem de MTBE foi dissolvido em 10 volumes de ACN/água 1:1, filtrado e ajustado para pH 3,5 com bicarbonato de sódio. Ácido acético (1,5% em volume) foi adicionado (pH 4,5 a 5) e a solução foi agitada na temperatura ambiente por 15 horas para efetuar descarboxilação. A solução foi diluída com 25 volumes
- 20 de água para dar um total de 40 volumes de uma solução de água/ACN 85/15. A solução foi turva em todos os casos e em alguns, apresentou um sólido fino (T-20 agregado). Uma amostra foi retirada para IPC e a solução foi transferida para o conjunto de purificação. Rendimentos de T-20 bruto nas corridas foram calculados usando um ensaio de HPLC p/p.

- 25 A desproteção de AcAA1-36NH<sub>2</sub> é completa em TFA/água/DTT 90/5/5 na temperatura ambiente após 4-5 horas. Em 8 horas, ocorreu degradação observável (2%). No mesmo coquetel a 5°C, a desproteção não é completa em 8 horas, mas em 23 horas. Não há diferença na pureza do T-20 bruto obtido após 5 horas na temperatura ambiente versus

23 horas a 5°C. Devido ao fato de o volume de isolamento (cerca de 55 vol) ser muito maior do que o volume de reação (desproteção) (13 vol), foi necessário dissolver o AcAA1-36NH<sub>2</sub> na solução de TFA em um garrafão de 20L, e depois transferir a solução para um reator de 40 l.

- 5 Isolamento de T-20 carboxilado bruto (como um sal de TFA) do coquetel de desproteção é acompanhado por precipitação com MTBE. A quantidade de MTBE necessária para precipitar o peptídeo é 3-4 vezes a quantidade de coquetel de desproteção. Uso de MTBE no dobro do volume (ou menos) do coquetel de clivagem deixa peptídeo para trás. Adição de
- 10 MTBE no coquetel de clivagem resulta em um sólido facilmente filtrado enquanto que adição de coquetel no MTBE produz um precipitado fino que é de difícil filtração. Há uma elevação de temperatura de 5°C para 40-45°C durante a adição de MTBE na solução de TFA. O aumento de temperatura não tem efeito sobre a pureza de T-20 bruto isolado (187/117,119). Houve
- 15 um pouco de aglomeração dos sólidos durante adição de MTBE. A lama foi agitada por 1-2 horas para quebrar os aglomerados. Mantendo uma temperatura abaixo de 20°C durante a adição de MTBE produz um sólido mais uniforme que filtra melhor (196/31). A velocidade de adição de MTBE será controlada no futuro. T-20 bruto foi coletado por filtração sob uma
- 20 atmosfera de nitrogênio. O sólido se tornará pegajoso se exposto ao ar úmido durante filtração antes de o TFA ter sido removido por lavagem. Após remoção do TFA por lavagem, o sólido é estável ao ar.

Realização do processo:

- 25 Uma solução de TFA/água/ditiotreitol 90/5/5 (13 vol) é preparada em um garrafão de 20 l depois é purgada com nitrogênio por 3 minutos. AcAA1-36NH<sub>2</sub> (650 g) é adicionado em porções para evitar aglomeração. Uma vez adicionado o sólido na solução, a solução é transferida para um reator de 70 l. O garrafão e as linhas são lavadas com uma quantidade mínima de TFA/água/ditiotreitol 90/5/5. A solução é agitada

na temperatura ambiente sob uma atmosfera de nitrogênio por 4 horas, depois é esfriada para 0-5°C. MTBE (45 vol) é adicionado em uma velocidade tal que a temperatura interna é menor do que 30°C. O sólido é coletado por filtração a vácuo sob uma corrente de nitrogênio. O reator, linhas e sólido são lavados com 2 x 2 volumes de MTBE e o sólido é seco até peso constante (594 g, 70A%).

O sólido (594 g) é dissolvido em ACN 50%/água (8 volumes relativo à carga de AcAA1-36NH<sub>2</sub>) e é filtrado. O vaso e as linhas são lavados com ACN 50%/água (2 vol). O pH da solução é ajustado para 3,5-4,0 com bicarbonato de sódio, depois ácido acético (0,18 vol) é adicionado tornando o pH 4,9. A solução é agitada na temperatura ambiente por 15 horas (IPC, nota 1), depois o pH é ajustado para 9-9,5 com carbonato de potássio 1 M. A solução é diluída em água/ACM 85/15 por adição de água (25 vol). A solução turva resultante é amostrada para análise por HPLC p/p e transferida para o conjunto de purificação.

Notas:

1. Processo TM2-0003-01.

2. Processo TM2-0006-01

#### 11.11 Purificação de HAA(1-36)-OH:

Purificação, liofilização e embalagem são classificadas em três estágios:

$\%p/p = 100 - \% \text{ impurezas} - \% \text{ acetato} - \% \text{ água} - \% \text{ TFA}$ . O conteúdo de acetato nas bateladas foi de 6-8%.

Um total de 2,08 kg de T-20 (puro) foi isolado de 6,97 kg de AcAA1-36NH<sub>2</sub>. Isto represente um rendimento de 49,3% de AcAA1-36NH<sub>2</sub>.

O rendimento médio na purificação cromatográfica foi de 55%. Os rendimentos de corridas individuais variaram de 41-55%. Os rendimentos mais baixos foram um resultado de falhas na coluna ou na bomba acarretando múltiplas passagens. Em geral, se a cromatografia funcionasse, os rendimentos ficariam dentro da faixa de 50-55%. A pureza do T-20 isolado

foi de 93-95A%.

Quatro gradientes foram examinados durante purificação para uma comparação dos processos com o objetivo de minimizar o tempo de corrida:

- 5 1. 15-22% ACN/60 minutos, 22-36% ACN/525 minutos a 330 ml/min.
2. 16-26% ACN/60 minutos, 26-40% ACN/525 minutos a 330 ml/min.
3. Gradiente Trimeris secundário. 15-36% ACN/1788 minutos a 330 ml/min.
4. Gradiente Trimeris original 20-23% ACN/112 minutos, 23-36%ACN/488 minutos a 330 ml/min.

- 10 Uma coluna de vinte centímetros (cm) foi recheada (compressão axial) com a resina Amberchrom (altura de leito de 35 cm). Bateladas de 500-700 g de AcAA1-36NH<sub>2</sub> foram desprotegidas e descarboxiladas em solução. Esta escala produz um estoque de alimentação de coluna que contém cerca de 400 gramas de peptídeo (aproximadamente
- 15 75A% de T-20). A solução estoque é tipicamente turva e pode conter sólido suspenso. A solução turva é carregada na coluna a 500 ml/min usando 15%B. Não houve desenvolvimento de pressão durante o carregamento da coluna em qualquer uma das corridas. A vazão de fluxo é reduzida para 330 ml/min e o gradiente especificado é corrido na quantidade de tempo indicada. Frações
- 20 são coletadas e aquelas contendo mais do que 78% de T-20 são reunidas (100-110 l), diluídas com água para trazer o conteúdo de acetonitrila para cerca de 15-20% (cerca de 140 litros). A coluna é lavada, depois equilibrada com 15%B. A solução contendo T-20 é carregada de novo na coluna de 20,32 cm a 900 ml/min. O %B é aumentado para 50% e T-20 é removido da coluna
- 25 em cerca de 25 l.

A solução é congelada em redomas de um litro e liofilizada para dar um pó. T-20 isolado apresenta pureza típica de 92-94A% por HPLC, e contém 6-8% de acetato e 3-4% de água.

Processo preferido:

20/10

Uma solução de T-20 em água/acetonitrila 85/15 (27 l) de pH 9,2 foi bombeada para uma coluna de 20,32 cm de altura a 500 ml/min. A vazão de fluxo foi reduzida para 330 ml/min no decorrer de 30 minutos (em incrementos de 30-40 ml/min a cada 5 minutos). Um gradiente linear indo de 20%B a 36%B durante 600 minutos é iniciado. Frações são coletadas até absorvância cair para menor do que 0,2 AUFS. As frações são analisadas por HPLC (nota 1) para conteúdo. A coluna é lavada com 80%B a 900 ml/min por 10 minutos, depois trazida de volta para 15%B e equilibrada a 900 ml/min. As frações contendo mais de 78A% de T-20 são reunidas (113 l) e diluídas com tampão (28,2 l) para trazer a concentração de acetonitrila para 15-20%. A solução é bombeada para a coluna a 900 ml/min. O %B é aumentado para 50% e T-20 é eluído da coluna a 900 ml/min em cerca de 25 l. A concentração de T-20 é de cerca de 9-10 mg/ml. A solução é transferida para jarros de liofilização de um litro, seca por congelamento para dar 216,29 de T-20 com rendimento de 54,9% e pureza de 94,1A%.

Notas:

1. Frações são analisadas por HPLC para conteúdo e pureza.

YMC ODS-A, 150 x 4,6 mm, 5 mm, 120A

1 ml/min, 220 nm, 30°C

A - NH<sub>4</sub>OAc 50 mM @ pH 7 (ajustado com NH<sub>4</sub>OH) : ACN

70/30

B - NH<sub>4</sub>OAc 50 mM @ pH 7 (ajustado com NH<sub>4</sub>OH) : ACN

5/95

0-15%B/50 min, 15-100%B/2 min, 100%B/3 min.

Tempo de retenção de T-20, 29,0 minutos.

#### 11.12 Estabilidade térmica dos peptídeos:

Uma série de experimentos foi conduzida para caracterizar a estabilidade térmica dos fragmentos intermediários de T-20. Fragmentos de T-20 foram saturados com água, filtrados e depois posicionados dentro de

recipientes fechados e expostos a temperaturas elevadas. Em vários instantes de tempo amostras foram coletadas e analisadas por processos de HPLC para avaliar as mudanças de pureza. Estabilidade de fragmentos de T-20 secos também foi caracterizada por análise termogravimétrica (TGA).

- 5                    Todos os fragmentos podem ser secos a 40°C por 3 dias menos AcAA1-16OH. Degradação apenas modesta é observada após 24 horas a 80°C em dois fragmentos, FmocAA27-35OH (3%) e FmocAA27-36NH<sub>2</sub> (1,4%). Fragmento AcAA1-16OH apresentou inicialmente pureza de 97A%. Após 3 dias a 40°C, ficou seco e com pureza de 93,9A%. O AcAA1-16OH úmido deve ser seco na temperatura ambiente.

O objetivo do estudo de estabilidade foi para determinar se os fragmentos podem ser secos a 40°C em vez de na temperatura ambiente. O estudo indica que os fragmentos são estáveis à secagem a 40°C. Isto reduz sobremaneira os tempos de secagem.

- 15                    Tem sido completado um estudo planejado para examinar a estabilidade dos fragmentos Ac(1-16)OH, Fmoc(27-35)OH, Fmoc(17-26)-OH, Fmoc(27-36)-NH<sub>2</sub>, Fmoc(17-36)-NH<sub>2</sub>, H(17-36)-NH<sub>2</sub>, e Ac(1-36)-NH<sub>2</sub> sob várias condições de solvente e de temperatura que imitam seu isolamento e sua purificação. Todos os fragmentos são estáveis, estabilidade está marcada com um X, no sistema de solventes do qual são isolados e/ou purificados:

276  
y

103  
P 1 5 9 0 0 0 1 0

| Intermediário            | Solução de<br>armazenagem            | Tempo   |        |         |       |        |
|--------------------------|--------------------------------------|---------|--------|---------|-------|--------|
|                          |                                      | Inicial | 1 hora | 6 horas | 1 dia | 3 dias |
| F(27-35)-OH              | 9:1 EtOH:H <sub>2</sub> O,<br>40°C   | X       | X      | X       | X     | X      |
| F(17-26)-OH              | 80:20 EtOH/H <sub>2</sub> O,<br>40°C | X       | X      | X       | X     | X      |
| F(27-36)-NH <sub>2</sub> | 1:1 NMP/H <sub>2</sub> O,<br>40°C    | X       | X      | X       | X     | X      |
| Ac(1-16)-OH              | 0.01 M HCl. 5-<br>10°C               | X       | X      | X       | X     | X      |
| F(17-36)-NH <sub>2</sub> | 95% IPA/H <sub>2</sub> O,<br>60-65°C | X       | X      | X       | X     | X      |
|                          | 50% H <sub>2</sub> O/NMP,<br>50°C    | X       | X      | X       | X     | X      |
|                          | 90:10 EtOH/H <sub>2</sub> O,<br>40°C | X       | X      | X       | X     | X      |
| H(17-36)-NH <sub>2</sub> | 1.5:1 H <sub>2</sub> O/DMF,<br>40°C  | X       | X      | X       | X     | X      |
| Ac(1-36)-NH <sub>2</sub> | 9:1 ACN/H <sub>2</sub> O,<br>50°C    | X       | X      | X       | X     | X      |
|                          | 50% H <sub>2</sub> O/NMP,<br>50°C    | X       | X      | X       | X     | X      |
|                          | 85:15 EtOH:H <sub>2</sub> O,<br>70°C | X       | X      | X       | X     | X      |

X = impurezas e conteúdo por HPLC, checagem de aparência visual.

A presente invenção não é para ser limitada no escopo pelas modalidades específicas aqui descritas, que são intencionadas como simples ilustrações dos aspectos individuais da invenção, e componentes e processos funcionalmente equivalentes estão dentro do escopo da invenção. Na verdade, várias modificações da invenção, em adição àquelas aqui mostradas e descritas se tornarão evidentes para aqueles experientes na arte a partir da descrição e dos desenhos acompanhantes citados. Tais modificações são intencionadas para caírem dentro do escopo das reivindicações apenas.

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a síntese de um peptídeo possuindo a fórmula Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 1), caracterizado pelo fato de compreender:

5 (a) desproteger a terminação amino de um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12);

(b) reagir o peptídeo produzido em (a) com um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH  
10 (SEQ ID NO: 4) para produzir um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 1);

(c) desproteger a terminação amino do peptídeo produzido em (b);

15 (d) modificar a terminação amino do peptídeo produzido em (c) para uma modificação acetilada; e

(e) desproteger as cadeias laterais do peptídeo de cadeia lateral protegida de (c) para produzir um peptídeo de fórmula: Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID  
20 NO: 1).

2. Processo para a síntese de um peptídeo possuindo a fórmula Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 1), caracterizado pelo fato de compreender:

(a) desproteger a terminação amino de um peptídeo de cadeia  
25 lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12);

(b) reagir o peptídeo produzido em (a) com um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Ac-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO: 4), para produzir um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula:

Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 1);

(c) desproteger as cadeias laterais do peptídeo de cadeia lateral protegida de (b) para produzir um peptídeo de fórmula: Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 1).

5                    3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12) é sintetizado por um processo, compreendendo:

10                    (a) reagir um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-DKWASLWNW-COOH (SEQ ID NO: 17) com HPhNH<sub>2</sub> para produzir um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-DKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 18);

(b) desproteger a terminação amino do peptídeo produzido em (a); e

15                    (c) reagir o peptídeo produzido em (b) com um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLEL-COOH (SEQ ID NO: 11) para produzir o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12).

20                    4. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12) é sintetizado por um processo compreendendo:

25                    (a) reagir um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-LELDKWASLWNW-COOH (SEQ ID NO: 15) com HPhNH<sub>2</sub> para produzir um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-LELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 16);

(b) desproteger a terminação amino do peptídeo produzido em

(a); e

(c) reagir o peptídeo produzido em (b) com um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQEL-COOH (SEQ ID NO: 10) para produzir o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12).

5. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12) é sintetizado por um processo compreendendo:

10 (a) desproteger a terminação amino do peptídeo: Fmoc-DKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 18); e

(b) reagir o peptídeo produzido em (a) com um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLEL-COOH (SEQ ID NO: 11) para produzir o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12).

6. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12) é sintetizado por um processo compreendendo:

20 (a) reagir um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNW-COOH (SEQ ID NO: 19) com HPhNH<sub>2</sub> para produzir o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12).

7. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO: 4) é sintetizado por um processo compreendendo:

(a) desproteger a terminação amino do peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-IEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO: 7);

(b) reagir o peptídeo de cadeia lateral protegida produzido em (a) com um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-YTSLIHSL-COOH (SEQ ID NO: 2) para produzir o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO: 4).

8. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Ac-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO: 4) é sintetizado por um processo compreendendo:

(a) reagir um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-IEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO: 6) com HGlnOPNB para produzir um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-IEESQNQQ-OPNB (SEQ ID NO: 7);

(b) desproteger a terminação amino do peptídeo de cadeia lateral protegida produzido em (a);

(c) reagir o peptídeo de cadeia lateral protegida produzido em (b) com um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Ac-YTSLIHSL-COOH (SEQ ID NO: 2) para produzir o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Ac-YTSLIHSLIEESQNQQ-OPNB (SEQ ID NO: 4);

(d) desproteger a terminação carboxila do peptídeo de cadeia lateral protegida produzido em (c) para produzir o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Ac-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO: 4).

9. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO: 4) é sintetizado por um processo compreendendo:

(a) reagir um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO: 3) com HGlnOPNB para produzir um peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-

YTSLIHSLIEESQNQQ-OPNB (SEQ ID NO: 4); e

(b) desproteger a terminação carboxila do peptídeo produzido em (a) para produzir o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO: 4).

5                   10. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Ac-YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 1) é produzido em uma quantidade de um ou mais quilogramas.

10                   11. Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12) é produzido em uma quantidade de um ou mais quilogramas.

15                   12. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12) é produzido em uma quantidade de um ou mais quilogramas.

20                   13. Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12) é produzido em uma quantidade de um ou mais quilogramas.

                    14. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-EKNEQELLELDKWASLWNWF-NH<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 12) é produzido em uma quantidade de um ou mais quilogramas.

25                   15. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO: 4) é produzido em uma quantidade de um ou mais quilogramas.

                    16. Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado

pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Ac-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO: 4) é produzido em uma quantidade de um ou mais quilogramas.

5 17. Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado  
pelo fato de que o peptídeo de cadeia lateral protegida de fórmula: Fmoc-YTSLIHSLIEESQNQQ-COOH (SEQ ID NO: 4) é produzido em uma quantidade de cerca de um ou mais quilogramas.

P19909018

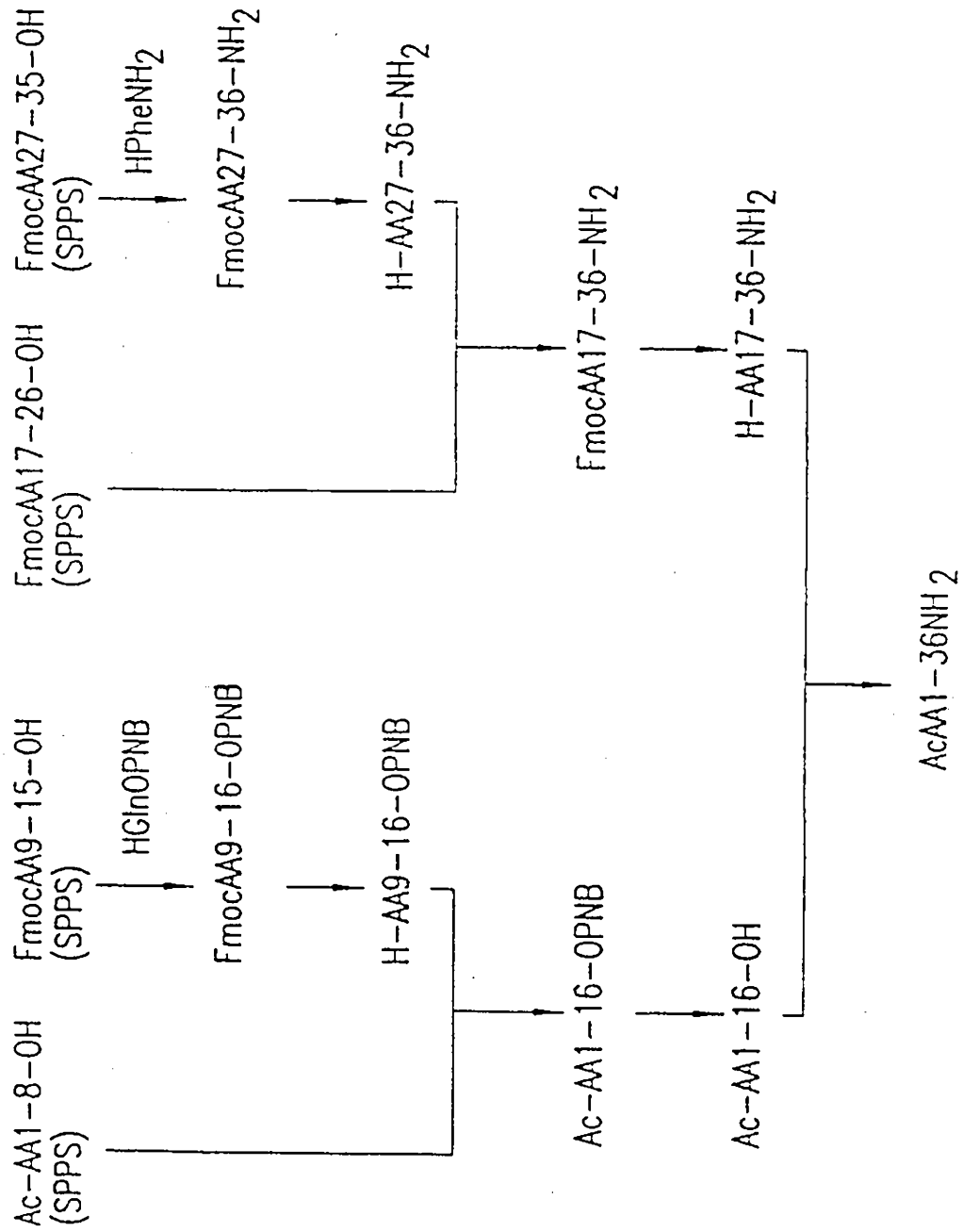


FIG.1

252  
X

P19909018

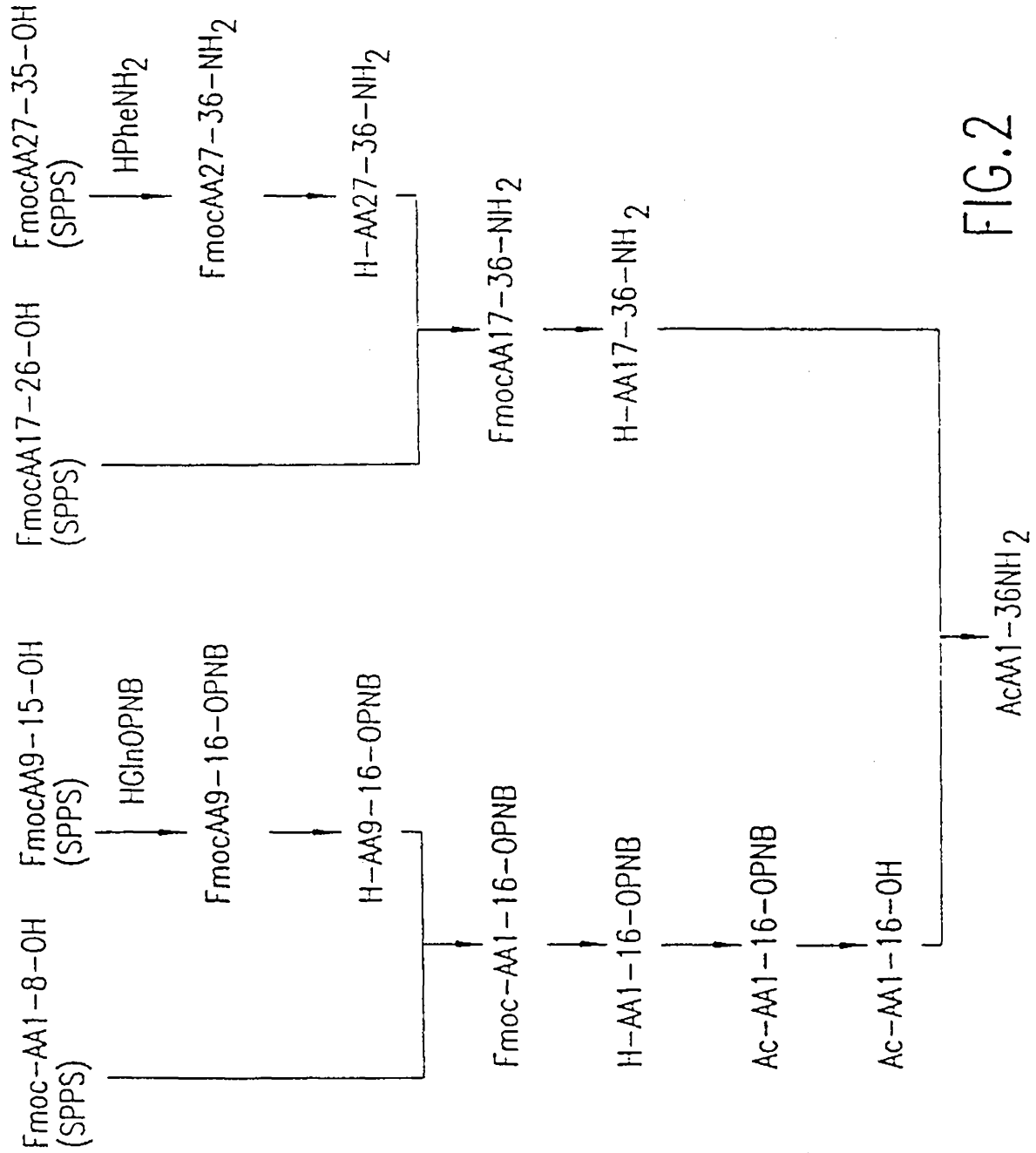


FIG.2

753  
X

P19909018

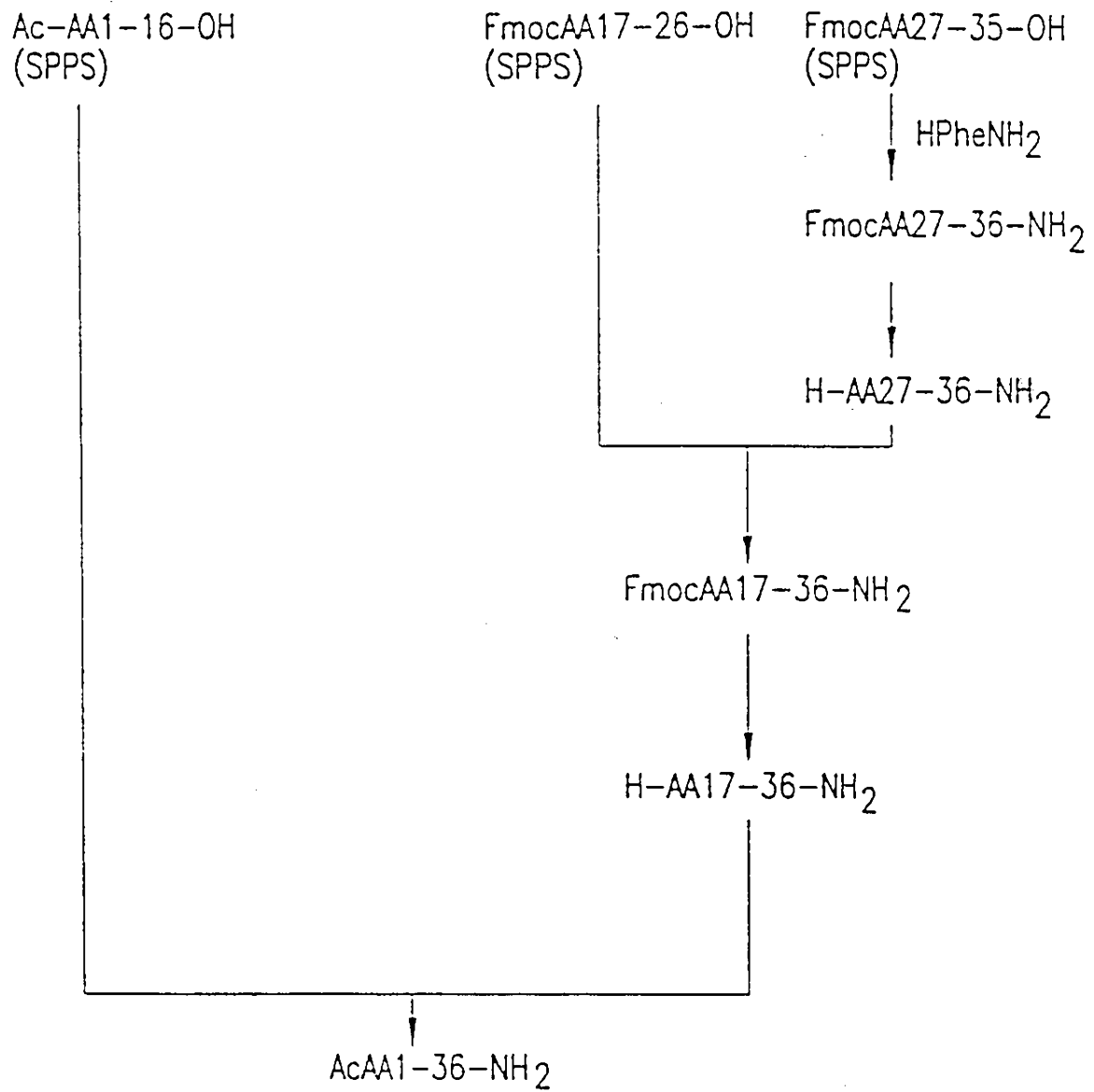


FIG.3

P199090118

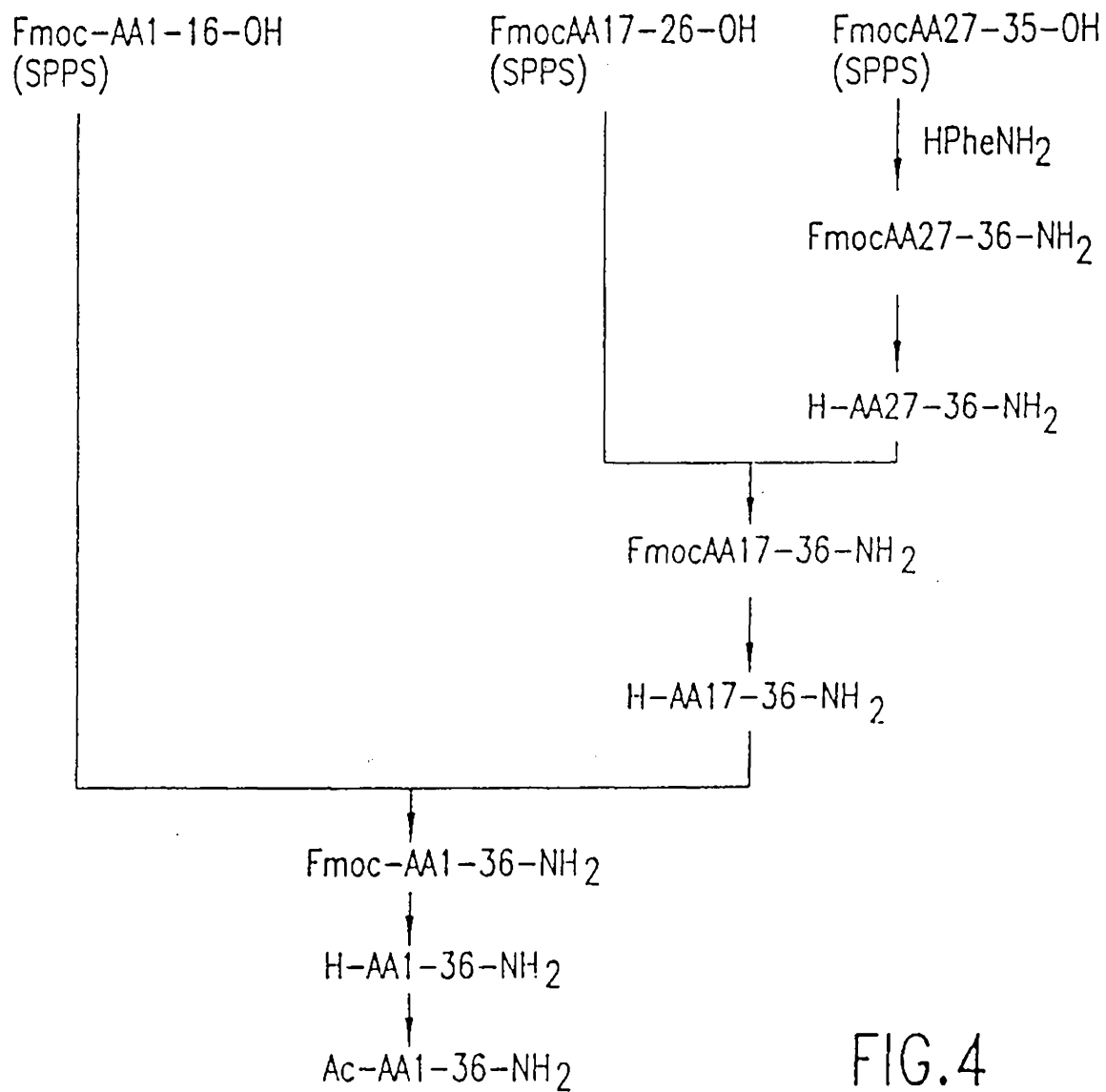


FIG.4

## FIG. 5

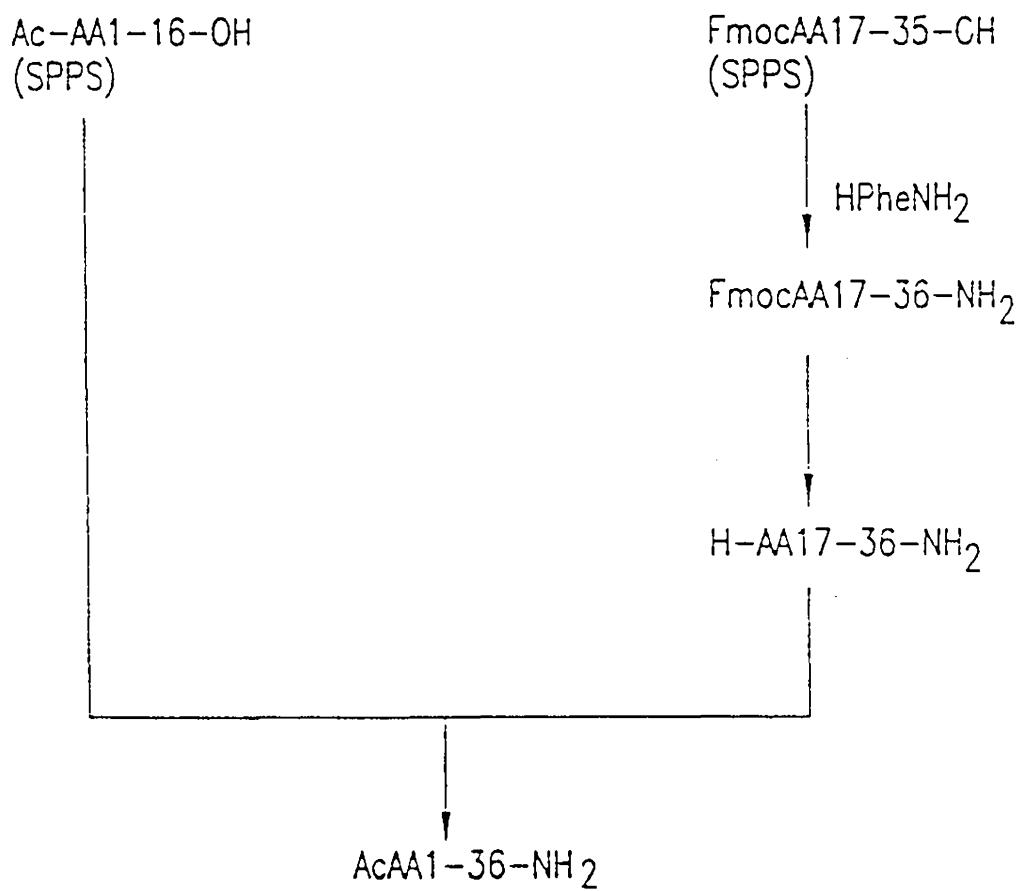


FIG. 5