



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 329 270**

⑮ Int. Cl.:

**C07K 14/16** (2006.01)

⑫

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **05821840 .5**

⑯ Fecha de presentación : **22.12.2005**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1856142**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

④ Título: **Síntesis del péptido T-1249 utilizando fragmentos intermediarios del péptido.**

⑩ Prioridad: **30.12.2004 US 640716 P**

⑦ Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

⑤ Fecha de publicación de la mención BOP: **24.11.2009**

⑦ Inventor/es: **Han, Yeun-Kwei;**  
**Hodges, L., Mark;**  
**Johnston, David, A. y**  
**Khatri, Hiralal, N.**

⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente: **24.11.2009**

⑦ Agente: **Isern Jara, Jorge**

**ES 2 329 270 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Síntesis del péptido T-1249 utilizando fragmentos intermediarios del péptido.

5 La invención está relacionada con métodos para preparar péptidos T-1249 utilizando procesos de fase sólida y en solución, además de fragmentos intermediarios del péptido T-1249 que pueden utilizarse en estos métodos. Más particularmente, la invención está relacionada con la preparación de péptidos T-1249 utilizando dos fragmentos que se sintetizan utilizando una aproximación de fase sólida.

10 Se han descrito muchos métodos para la síntesis de péptidos en la bibliografía (por ejemplo, véase Patente Estadounidense Nº 6.015.881; Mergler *et al.* (1988) *Tetrahedron Letters* 29:4005-4008; Mergler *et al.* (1988) *Tetrahedron Letters* 29:4009-4012; Kamber *et al.* (eds), *Peptides, Chemistry and Biology*, ESCOM, Leiden (1992) 525-526; Riniker *et al.* (1993) *Tetrahedron Letters* 49:9307-9320; Lloyd-Williams *et al.* (1993) *Tetrahedron Letters* 49:11065-11133; y Andersson *et al.* (2000) *Biopolymers* 55:227-250. Los diferentes métodos de síntesis se distinguen por el 15 estado físico de la fase en el que la síntesis tiene lugar, es decir fase líquida o fase sólida.

20 En la síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS), un aminoácido o grupo de péptidos se une a una resina de soporte sólido. Entonces, sucesivos aminoácidos o grupos de péptidos se unen al péptido unido al soporte hasta que el material 25 peptídico de interés se forma. El péptido unido al soporte se escinde entonces normalmente del soporte y se somete a un posterior procesamiento y/o purificación. En algunos casos, la síntesis en fase sólida proporciona un producto peptídico maduro; en otros casos el péptido escindido del soporte (es decir, un "fragmento intermediario del péptido") se utiliza en la preparación de un producto peptídico maduro más largo.

25 Los fragmentos intermediarios de péptido generados a partir de los procesos en fase sólida pueden acoplarse entre ellos en la fase sólida o en un proceso sintético en fase líquida (denominada aquí "síntesis de fase en solución"). La síntesis de fase en solución puede ser particularmente útil en los casos en los que la síntesis de un péptido maduro mediante fase sólida es imposible o no es práctica. Por ejemplo, en la síntesis en fase sólida, los péptidos de mayor 30 longitud ocasionalmente pueden adoptar una conformación irregular mientras aún se encuentran unidos al soporte sólido, resultando así en una pérdida parcial o total de actividad en el producto final. También, a medida que la cadena de péptido se hace mayor sobre el soporte de resina, la eficiencia de los pasos del proceso como el acoplamiento y desprotección pueden verse comprometidos. Esto, a su vez, puede resultar en tiempos de procesado mayores para compensar 35 estos problemas, además de un incremento de las pérdidas en los materiales de partida, como los aminoácidos activables, coreactivos y solventes. Estos problemas pueden aumentar a medida que la longitud del péptido aumenta, y por lo tanto, es relativamente poco común encontrar péptidos maduros de más de 30 aminoácidos de longitud sintetizados utilizando sólo un procedimiento en fase sólida.

40 En el acoplamiento de fase en solución, dos fragmentos intermediarios de péptido, o un fragmento intermediario del péptido y un aminoácido reactivo, se acoplan en un solvente apropiado, normalmente en presencia de reactivos adicionales que promueven la eficiencia y calidad de la reacción de acoplamiento. Los fragmentos intermediarios de péptido se ordenan en la reacción de forma que el extremo N-terminal de un fragmento se acopla con el C-terminal de otro fragmento o viceversa. Además, los grupos protectores de la cadena lateral, que están presentes durante la síntesis en fase sólida, se mantienen comúnmente retenidos en los fragmentos durante el acoplamiento de fase en solución para asegurar la reactividad específica de los extremos terminales de los fragmentos. Estos grupos protectores de la cadena lateral normalmente no se eliminan hasta que se ha formado un péptido maduro.

45 Para la síntesis de péptidos muy largos, no es raro utilizar para los múltiples pasos de acoplamiento de fase en solución a realizar, tres, cuatro o más fragmentos intermediarios de péptido. Mientras que el concepto general de las reacciones de acoplamiento de extremos en reacciones de fase en solución es en teoría directo cuando se utilizan múltiples fragmentos intermediarios de péptido, en la práctica esto raramente es el caso. Varios factores, como las 50 impurezas y la cantidad de péptido, pueden tener un efecto significativo en la calidad y proporción de un péptido de longitud completa. Por lo tanto, la síntesis de péptido utilizando esquemas híbridos es a menudo un reto, y en muchos casos es difícil de predecir qué problemas son inherentes en un esquema de síntesis hasta que no se realiza el esquema actual.

55 En algunos casos, la síntesis de fase en solución puede verse afectada por la falta de pureza de los fragmentos intermediarios de péptido que siguen a una síntesis en fase sólida. Respecto a esto, puede ser necesario someter los fragmentos intermediarios de péptido a un paso de purificación antes de acoplar los fragmentos a un proceso de fase en solución. La purificación, a su vez, puede provocar una reducción en la cantidad de fragmentos intermediarios de péptido, y por lo tanto, de producto peptídico final.

60 También, la cantidad de péptido maduro es inversamente proporcional al número de pasos de fase en solución que son necesarios para sintetizar el péptido maduro. En algunos casos pueden ser necesarios tres, cuatro, o más de cuatro pasos de fase en solución utilizando productos intermediarios de péptido para generar un péptido maduro. Cada paso de acoplamiento de fase en solución adicional puede resultar en una disminución del producto peptídico de longitud completa. Por lo tanto, para mejorar el rendimiento general, es deseable generalmente minimizar los pasos que están 65 involucrados en el acoplamiento.

Pequeñas mejoras en uno o más pasos en el esquema sintético general pueden significar mejoras significativas en la preparación del péptido maduro. Tales mejoras pueden conducir a una gran ganancia general de tiempo y reactivos, y también pueden mejorar significativamente la pureza y rendimiento del producto final.

5 Aunque la discusión de la importancia de las mejoras en la síntesis híbrida es aplicable a cualquier tipo de péptido producido utilizando estos procedimientos, es de particular importancia en el contexto de los péptidos que son terapéuticamente útiles y que se elaboran a una escala para su uso médico comercial. Mientras que la síntesis de productos farmacéuticos de pequeñas moléculas puede ser relativamente barato, el coste de la síntesis de productos farmacéuticos de grandes biomoléculas, como los péptidos terapéuticos, puede ser en comparación enormemente superior. A causa  
10 del coste de los reactivos, el tiempo de síntesis, además de otros factores, pequeñas mejoras en el proceso sintético de estos productos farmacéuticos de grandes biomoléculas pueden tener un impacto significativo en si la producción de tal producto farmacéutico es factible económicamente. Tales mejoras son necesarias debido a estos elevados costes de producción de los productos farmacéuticos de grandes biomoléculas como demuestra el hecho de que, en muchos  
15 casos, existen pocas alternativas terapéuticas adecuadas, si las hay, para estos tipos de productos farmacéuticos de grandes biomoléculas.

Esto se observa claramente en el caso de péptidos terapéuticos que se utilizan para el tratamiento de inmunodeficiencias provocadas por una infección retroviral. Los péptidos con una actividad antirretroviral pueden actuar de diferentes maneras, incluyendo la prevención de la fusión de la partícula viral con la célula inmunitaria huésped.  
20 Existe una gran necesidad de estos nuevos y efectivos péptidos terapéuticos ya que en muchos casos, los antivirales tradicionalmente utilizados pasan a ser inefectivos para el tratamiento de estas enfermedades debido a la resistencia viral debida a la mutación.

Una clase prometedora de péptidos terapéuticos útiles para combatir las enfermedades por inmunodeficiencia son  
25 los inhibidores de la fusión. Estos tipos de péptidos terapéuticos pueden reducir la titulación viral, y mejoran significativamente la calidad de vida en los pacientes que tienen enfermedades por inmunodeficiencia. Por ejemplo, el péptido FUZEON® (también conocido como enfuvirtide o T-20), que es un péptido sintético de 36 aminoácidos, el péptido híbrido T-1249, y derivados y homólogos de estos péptidos, han demostrado ser beneficiosos como inhibidores de la fusión en el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el síndrome de la inmunodeficiencia  
30 adquirida (SIDA). El péptido FUZEON® y sus derivados son los primeros inhibidores de VIH que demuestran una actividad consistente y potente en personas infectadas con VIH. Kilby *et al.* (1998) *Nat Med* 4:1302 y Kilby *et al.* (2002) *AIDS Res Hum Retroviruses* 18:685.

35 Los inhibidores de la fusión como el T-20 y los péptidos T-1249 se unen a una región de la glicoproteína 41 de la cubierta del VIH de tipo 1 (HIV-1) que está involucrada en la fusión del virus con la membrana de la célula huésped CD4+. Wild *et al.* (1993) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9:1051. Los inhibidores de la fusión permanecen fuera de la célula y bloquean el HIV-1 antes de que entre en la célula. El péptido FUZEON® y sus derivados minimizan las interacciones con fármacos, efectos secundarios y citotoxicidad mediante la inhibición potente y selectiva de HIV-1 *in vitro*.

40 40 Además de estas preocupaciones, los temas relacionados con la recuperación de producto y la pureza del producto para la producción de péptidos a gran escala, así como la manipulación, almacenamiento y disposición de los reactivos, pueden tener un gran impacto en si el esquema de síntesis del péptido es factible. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de procesos de síntesis de péptidos capaces de producir materiales peptídicos de interés comercial de forma eficiente en grandes cantidades con rendimientos mejorados. La recuperación de péptido escindido de un soporte de resina tras la síntesis en fase sólida del péptido es un aspecto de la síntesis en que es necesaria la mejora.

50 La presente invención está relacionada con la preparación de péptidos T-1249 que se sintetizan utilizando una aproximación en fase sólida y en solución ("híbrida"). Generalmente, la aproximación incluye la síntesis de dos fragmentos intermediarios de péptido T-1249 diferentes (Id. de Sec. N°:2 e Id. de Sec. N°:3 o complementarios de los mismos) utilizando química en fase sólida. De acuerdo con algunos aspectos de la invención, se ha encontrado que siguiendo la síntesis en fase sólida, estas secuencias intermediarias de T-1249 específicas se comportan particularmente bien en los pasos de acoplamiento de fase en solución. Además, se ha encontrado también que los pasos en fase sólida que conducen a la formación de estos fragmentos intermediarios de péptido pueden modificarse inventivamente para mejorar significativamente el rendimiento y pureza de estos fragmentos intermediarios. Este rendimiento y pureza mejorados se lleva a cabo en los pasos de acoplamiento de fase en solución, mejorando así el proceso sintético completo.

60 Los métodos de la invención y los fragmentos intermediarios de péptido descritos aquí son particularmente ventajosos, especialmente porque hacen que el proceso de síntesis de T-1249 sea más eficiente de varias maneras. En particular, los pasos de síntesis en fase sólida que conducen a la formación de los productos intermediarios del péptido T-1249 Id. de Sec. N°:2 o Id. de Sec. N°:3 utilizan un soporte de resina que posee un primer aminoácido acoplado al soporte en un factor de carga que es inferior que el que se usa tradicionalmente en las técnicas estándar en fase sólida. Favorablemente, se ha encontrado que al utilizar este factor de carga inferior, los productos intermediarios del péptido T-1249 de Id. de Sec. N°:2 o Id. de Sec. N°:3, que son normalmente fragmentos largos sintetizados en fase sólida, 65 pueden producirse con un rendimiento mejorado y una pureza mejorada.

La pureza y el rendimiento mejorado, mejoran significativamente las condiciones para los pasos de acoplamiento de fase en solución, resultando así en una mejora para la síntesis total de T-1249.

Hasta ahora, las aproximaciones de síntesis de T-1249 más exitosas han utilizado el acoplamiento de fase en solución en el que tres o más de tres fragmentos intermediarios de péptido se preparan mediante síntesis en fase sólida. Estos fragmentos intermediarios se utilizan entonces en reacciones de acoplamiento de fase en solución para preparar el producto T-1249 final maduro. Aunque se pueden observar algunas ventajas de una aproximación de tres (o más) 5 fragmentos con respecto a una mayor calidad de la síntesis de intermediarios en fase sólida, esto no es necesariamente el caso con algunos fragmentos de T-1249. En particular, ha sido difícil de sintetizar los fragmentos intermediarios de péptido T-1249 que constan de los residuos 27-38, y los residuos 13-26 con una buena pureza. También, las impurezas asociadas con fragmentos intermediarios están potencialmente presentes en tres aproximaciones de fragmentos utilizando solventes particulares para el aislamiento.

10 Otra desventaja es que una aproximación de tres (o más) fragmentos implica más pasos de aislamiento y purificación en comparación con una aproximación de dos fragmentos, y estos pasos adicionales generalmente aumentan el tiempo de procesamiento y pueden posteriormente reducir el rendimiento total de la reacción de síntesis.

15 Ya que la presente invención utiliza solo dos fragmentos intermediarios de péptido preparados a través de la síntesis en fase sólida, una ventaja clara es que los tiempos de procesamiento están reducidos y la eliminación de los pasos de procesamiento pueden resultar en un uso más eficiente de los materiales y reactivos. Esto es particularmente importante en la síntesis de T-1249, ya que es un péptido relativamente largo que incluye cinco residuos de triptófano (W), que son reactivos costosos en la síntesis en fase sólida.

20 No obstante, una desventaja potencial con una aproximación de dos fragmentos es que la síntesis de fragmentos intermediarios más largos mediante síntesis en fase sólida puede ser complicada y a menudo conduce a problemas serios de pureza y/o recuperación. A pesar de esto, tal como se ha dicho, la presente invención demuestra que el método para escoger fragmentos intermediarios de péptidos con una secuencia basada en el Id. de Sec. N°:2 o Id. 25 de Sec. N°:3 y después sintetizar estos fragmentos mediante síntesis en fase sólida utilizando un factor de carga de resina bajo, permitiendo la producción con éxito de los fragmentos intermediarios con buen rendimiento y pureza. Dicho logro es más bien remarcable en vista de las aproximaciones convencionales para sintetizar péptidos utilizando aproximaciones combinadas en fase sólida y de fase en solución.

30 La invención es también ventajosa en que otros aspectos de la pureza del péptido están mejorados. En particular, los fragmentos intermediarios de péptidos con una secuencia de acuerdo con Id. de Sec. N°:2 o Id. de Sec. N°:3 no incluyen un residuo N-terminal ácido glutámico (E). Con el alcance de que los fragmentos intermediarios incluyen un residuo de ácido glutámico, el residuo está posicionado dentro de la secuencia o en el extremo C-terminal del fragmento intermediario. Se ha encontrado que la pureza de los fragmentos intermediarios puede ser significativamente mayor 35 cuando se utilizan fragmentos que tienen estas disposiciones generales de la secuencia de aminoácidos (como en Id. de Sec. N°:2 e Id. de Sec. N°:3), en la medida que un fragmento con ácido glutámico en el N-terminal tiende a incluir más impurezas de ácido piroglutámico.

40 Por lo tanto, en algunos aspectos, la invención proporciona un método para preparar un fragmento intermediario de péptido para la síntesis de un péptido T-1249 que incluye los pasos de (a) proporcionar un soporte de resina de síntesis en fase sólida con un primer aminoácido acoplado al residuo que es ácido glutámico (E), en el que el ácido glutámico está acoplado en un factor de carga de 0,5 o menos; preferiblemente el ácido glutámico está acoplado en un factor de carga entre 0,2 y 0,5; (b) acoplar los siguientes aminoácidos al primer aminoácido en el soporte acoplado para proporcionar la siguiente secuencia:

45 Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE-[Soporte]; (c) eliminando el intermediario de péptido Ac-WQEWEQKITA LLEQAQIQQE (Id. de Sec. N°:2) del soporte en una reacción de escisión; y utilizando después el intermediario de péptido Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE (Id. de Sec. N°:2) para la síntesis de un péptido que posee todo o una porción de Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF (Id. de Sec. N°:1).

50 En otros aspectos, la invención proporciona la preparación de un fragmento intermediario de péptido para la síntesis de un péptido T-1249 que incluye los pasos de (a) proporcionar un soporte de resina de síntesis en fase sólida con un primer aminoácido acoplado al residuo que es triptófano (W), en el que el triptófano está acoplado en un factor de carga de 0,5 o menos; preferiblemente el triptófano está acoplado en un factor de carga entre 0,2 y 0,5; 55 (b) acoplar los siguientes aminoácidos al primer aminoácido en el soporte acoplado para proporcionar la siguiente secuencia: KNEYELQKLDKWASLWEW-[Soporte]; (c) eliminar el intermediario del péptido KNEYELQKLDK WASLWEW (Id. de Sec. N°:3) del soporte en una reacción de escisión; y utilizar después el intermediario del péptido KNEYELQKLDKWASLWEW (Id. de Sec. N°:3) para la síntesis de un péptido que posee todo o una porción de Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF (Id. de Sec. N°:1).

60 Más preferiblemente, la invención proporciona un método para preparar un péptido T-1249 que incluye los pasos de (a) proporcionar un fragmento intermediario de péptido con las secuencias Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE (Id. de Sec. N°:2) y KNEYELQKLDKWASLWEW (Id. de Sec. N°:3), en el que el fragmento intermediario de péptido ha sido sintetizado sobre soportes sólidos utilizando un factor de carga de 0,5 o menos; preferiblemente utilizando un factor de carga entre 0,2 y 0,5; (b) fase en solución, reaccionar el péptido KNEYELQKLDKWASLWEW (Id. de Sec. N°:3) con un residuo fenilalaninamida para proporcionar la secuencia KNEYELQKLDKWASLWEWF (Id. de Sec. N°:4); y (c) fase en solución, reaccionar el péptido Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE (Id. de Sec. N°:2)

con el péptido KNEYELQKLDKWASLWEWF (Id. de Sec. N°:4) para proporcionar el péptido Ac-WQEWEQKITA LLEQAQIQQEKNEYELQKL-DKWASLWEWF (Id. de Sec. N°:1).

En otros aspectos, en el paso de acoplamiento el primer aminoácido está presente en el soporte en un factor de carga inferior a 0,5. En otros aspectos, en el paso de acoplamiento el primer aminoácido está presente en el soporte en un factor de carga en el rango de 0,2 - 0,45, o un factor de carga en el rango de 0,25 - 0,40.

En aún otros aspectos, la síntesis en fase sólida se lleva a cabo acoplando los aminoácidos a la cadena de péptido naciente en una cantidad entre 1 y 1,5 equivalentes.

10 Las realizaciones de la presente invención descritas a continuación no pretenden ser exhaustivas o limitar la invención en las formas precisas descritas en la siguiente descripción detallada. En su lugar, las realizaciones se escogen y describen para que otros expertos en la materia puedan apreciar y entender los principios y prácticas de la presente invención.

15 La terminología utilizada aquí no pretende limitar el alcance de la invención. Durante todo el texto, incluyendo las reivindicaciones anexadas, las formas singulares "un/una" y "el/la" incluye el plural a menos que el contexto claramente lo dicte de otra manera. Así, por ejemplo, una referencia a "un residuo de aminoácido" es una referencia a uno o más residuos de aminoácido e incluye equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la materia. En 20 esta invención, ciertos términos se utilizan frecuentemente, cuyos significados se proporcionan aquí. A menos que se defina de otra manera, los términos utilizados aquí poseen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la materia en este campo de tecnología. Algunos términos pueden también explicarse en mayor detalle después en la especificación.

25 La presente invención está dirigida a métodos para mejorar la síntesis de T-1249 y homólogos de T-1249, y en particular para mejorar aspectos de la síntesis relacionados con la síntesis en fase sólida de fragmentos intermedios de péptidos T-1249. La metodología de la presente invención es útil para fabricar el péptido T-1249 y homólogos del mismo utilizando solo dos fragmentos de péptido sintetizados en fase sólida. Mientras que la invención está generalmente dirigida a la síntesis de T-1249, las presentes enseñanzas inventivas pueden también aplicarse a la síntesis 30 de otros péptidos, particularmente aquellos que se sintetizan utilizando una combinación de aproximaciones en fase sólida y fase en solución. La invención también es aplicable a la síntesis de fragmentos intermedios de péptido asociados con impurezas, particularmente impurezas de piroglutamato.

35 Los métodos descritos aquí son particularmente adecuados para mejorar aspectos del escalado de síntesis de péptido T-1249. Los procedimientos de escalado se realizan normalmente para proporcionar una cantidad de péptido útil para su distribución. Por ejemplo la cantidad de péptido en un proceso de escalado puede ser de 500 g, o 1 kg por lote o más, y más normalmente decenas de kg hasta cientos de kg por lote o más. En los procesos sintéticos de escalado como la síntesis en gran escala, pueden utilizarse uno o más recipientes de reacción grandes. Estos pueden acomodar cantidades de reactivos como resinas, solventes, aminoácidos, y químicos para diferentes pasos en el proceso de 40 síntesis, en un tamaño que permite la producción de péptidos en cantidades, por ejemplo, en el rango de 100-500 kilogramos o más.

45 Los métodos descritos aquí son particularmente adecuados para mejorar aspectos de la síntesis de péptidos, particularmente para procedimientos de escalado. En realizaciones preferibles, los métodos de la invención pueden proporcionar estas mejoras como reducción en el tiempo de procesamiento (síntesis), mejoras en el rendimiento de los productos, mejoras en la pureza del producto, y reducción en la cantidad de reactivos y materiales de partida necesarios.

50 El péptido T-1249 posee una secuencia de 39 aminoácidos (leyendo desde el acetilo terminal (correspondiente con el amino-terminal) hasta la amida terminal (correspondiente con el carboxi terminal) Acetil-WQEWEQKITA LLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF-NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:1).

55 Los fragmentos peptídicos representativos del péptido T-1249 incluyen, pero no se limitan a, aquellos que tienen secuencias de aminoácido como se describe en la Tabla 1 a continuación así como homólogos de estos. Por ejemplo, en la tabla, el aminoácido en la 39<sup>a</sup> posición, que es F, puede tener un ácido carboxílico terminal como en el caso del primer metabolito, o puede estar modificado como la amida en el caso del péptido T-1249 en sí.

60 T-1249 es un fármaco anti-retroviral utilizado para el tratamiento de la infección por VIH-1. T-1249 funciona para bloquear la fusión de la partícula viral de VIH-1 con células huésped mediante el bloqueo de los cambios conformacionales necesarios para la fusión con la membrana. Los péptidos con este tipo de actividad se refieren aquí como poseedores de actividad T-1249.

65 La síntesis de T-1249 normalmente utiliza ambos procedimientos de fase sólida y líquida para sintetizar y combinar grupos de fragmentos de péptido específicos para proporcionar el producto T-1249. El péptido T-1249 y los métodos de fabricación del péptido T-1249 y fragmentos del mismo se describen en la Patente Estadounidense N° 6.469.136.

La invención también se puede aplicar a la síntesis de homólogos de T-1249, incluyendo homólogos de T-1249 de longitud completa y homólogos del intermedio del péptido T-1249. Tal como se utiliza aquí, un "homólogo de

# ES 2 329 270 T3

T-1249 ” se refiere a un compuesto derivado de T-1249 o un fragmento intermedio de T-1249. Los homólogos del péptido incluyen pero no se limitan a análogos de péptido, derivados de péptido, compuestos de fusión, y similares. Por lo tanto, cuando nos referimos a un fragmento intermedio de péptido T-1249 con las secuencias de Id. de Sec. N°:2 e Id. de Sec. N°:3, sus homólogos incluyen, por ejemplo, análogos de péptido, derivados de péptido, compuestos de fusión de Id. de Sec. N°:2 e Id. de Sec. N°:3, respectivamente.

Tal como se utiliza aquí, un análogo de péptido generalmente se refiere a un péptido que tiene una secuencia de aminoácido modificada por una o más sustituciones de aminoácido, delecciones, inversiones, y/o adiciones relativas a otro péptido o péptido homólogo. Las sustituciones preferiblemente deben ser conservativas o altamente conservativas.

10 Una sustitución conservativa se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro que posee generalmente la misma carga electrónica neta y generalmente el mismo tamaño y forma. Por ejemplo, los aminoácidos con cadenas laterales alifáticas o aminoácidos alifáticos sustituidos poseen aproximadamente el mismo tamaño cuando el número total de carbonos y heteroátomos en sus cadenas laterales difieren por no más de alrededor de cuatro. Poseen aproximadamente la misma forma cuando el número de ramificaciones en sus cadenas laterales difieren en no más de alrededor de una o

15 dos. Los aminoácidos con fenilo o grupos fenilo sustituido en sus cadenas laterales se consideran que tienen alrededor del mismo tamaño y forma. Se listan a continuación cinco grupos de aminoácidos. Sustituyendo un aminoácido en un compuesto por otro aminoácido del mismo grupo, generalmente resulta en una sustitución conservativa.

20 Grupo I: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cisteína, metionina y aminoácidos que no aparecen de forma natural con alifático C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o hidroxilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> sustituidos por cadenas laterales alifáticas (cadena recta o monoramificada).

25 Grupo II: ácido glutámico, ácido aspártico y aminoácidos que no aparecen de forma natural con ácido carboxílico sustituido por cadenas laterales alifáticas C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> (no ramificado o una ramificación).

30 Grupo III: lisina, ornitina, arginina y aminoácidos que no aparecen de forma natural con amina o guanidino sustituido por cadenas laterales alifáticas C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> (no ramificado o una ramificación).

35 Grupo IV: glutamina, asparagina y aminoácidos que no aparecen de forma natural con amida sustituida por cadenas laterales alifáticas C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> (no ramificado o una ramificación).

40 Grupo V: fenilalanina, fenilglicina, tirosina y triptófano.

45 Una “sustitución altamente conservativa” es el reemplazo de un aminoácido con otro aminoácido que tienen el mismo grupo funcional en la cadena lateral y prácticamente el mismo tamaño y forma. Los aminoácidos con las cadenas laterales del aminoácido alifáticas o alifáticas sustituidas tienen prácticamente el mismo tamaño si el número total de carbonos y de heteroátomos en sus cadenas laterales no difiere en más de alrededor de dos. Tienen aproximadamente la misma forma si tienen el mismo número de ramificaciones de sus cadenas laterales. Ejemplos de sustituciones altamente conservativas incluyen valina por leucina, treonina por serina, ácido aspártico por ácido glutámico y fenilglicina por fenilalanina.

50 Un “derivado de péptido” generalmente se refiere a un péptido, un análogo de péptido, u otro homólogo de péptido con una modificación química en uno o más de sus grupos laterales, átomos en el carbón alfa, grupo amino terminal y/o grupo ácido carboxilo terminal. Como ejemplo, una modificación química incluye, pero no se limita a añadir porciones químicas, crear nuevos enlaces, y/o eliminar porciones químicas. Las modificaciones de los grupos laterales de aminoácido incluyen, sin limitación, la acilación de grupos lisina e-amino, N-alquilación de arginina, histidina o lisina, alquilación de grupos de ácido carboxílico de glutámico o aspártico, y la desamidación de la glutamina o asparagina. Las modificaciones del grupo amino terminal incluyen, sin limitación, las modificaciones de des-amino, N-alquilo inferior, N-di-alquilo inferior y N-acilo (por ejemplo, -CO-alquilo inferior). Las modificaciones del grupo terminal carboxilo incluyen, sin limitación, las modificaciones de amida, amida de alquilo inferior, dialquila-mida y éster de alquilo inferior. Así, los péptidos parcialmente o totalmente protegidos constituyen un derivado de péptido.

55 Se hace referencia al siguiente grupo de péptidos, que incluyen fragmentos intermedios de T-1249 y T-1249, como se indica en la Tabla 1.

## ES 2 329 270 T3

TABLA 1

5 Id. de Sec. N°:	Secuencia de aminoácido	Secuencia de aminoácidos correspondiente numerada de T- 1249
10 1	Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQ- EKNEYELQKLDKWASLWEWF	1-39
15 2	Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE	1-20
20 3	KNEYELQKLDKWASLWEW	21-38
4	KNEYELQKLDKWASLWEWF	21-39

Para proporcionar una visión general, basada en los métodos de la invención, el esquema sintético general para el péptido T-1249 es el siguiente. T-1249 (Id. de Sec. N°:1) se prepara mediante los pasos que incluye la síntesis en fase sólida de los fragmentos intermedios del péptido T-1249 Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE (Id. de Sec. N°:2) y KNEYELQKLDKWASLWEW (Id. de Sec. N°:3). Estos péptidos se sintetizan utilizando los métodos descritos aquí y después se escinden de la resina en fase sólida en la forma de cadena lateral protegida. Se acopla entonces un residuo fenilalaninamida al intermedio del péptido KNEYELQKLDKWASLWEW (Id. de Sec. N°:3) en la solución para producir KNEYEL-QKLDKWASLWEWF (Id. de Sec. N°:4). KNEYELQKLDKWASLWEWF (Id. de Sec. N°:4) se acopla entonces a Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE (Id. de Sec. N°:2) en solución para producir Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF (Id. de Sec. N°:1).

De acuerdo con la presente invención, las técnicas de síntesis en fase sólida se utilizan para preparar un primer fragmento de péptido de T-1249 (Fragmentos intermedios 1) con la secuencia de 20 aminoácidos Ac-WQEWEQKITALLEQAQI-QQE (Id. de Sec. N°:2) o un homólogo de la misma. Por referencia respecto a un método preferible de una síntesis en fase sólida, el residuo ácido glutámico aminoterminal (E) (es decir, residuo número 20 de Id. de Sec. N°:2), que está presente en la porción C-terminal del péptido, es el primer residuo de aminoácido que está acoplado a la resina en fase sólida y constituye así el aminoácido alfa del fragmento en términos de esta posición con respecto al soporte sólido de resina. En este método preferible la síntesis en fase sólida por lo tanto continúa con la adición consecutiva de residuos de aminoácido desde el amino terminal al carboxilo terminal, añadiendo secuencialmente aminoácidos en la manera correspondiente a la secuencia deseada. La síntesis del fragmento intermedio de péptido se completa tras la adición del residuo N-terminal (por ejemplo, el triptófano N-terminal (W) de Id. de Sec. N°:2) a la cadena del péptido naciente.

Las técnicas de síntesis en fase sólida también se utilizan para preparar un segundo fragmento de péptido de T-1249 (Fragmentos intermedios 2) con la secuencia de 18 aminoácidos KNEYELQKLDKWASLWEW (Id. de Sec. N°:3) o un homólogo de la misma. Por referencia respecto a un método preferible de una síntesis en fase sólida, el residuo triptófano amino-terminal (W) (es decir, el residuo número 18 de Id. de Sec. N°:3) es el primer residuo de aminoácido que está acoplado a la resina en fase sólida y constituye así el aminoácido alfa del fragmento en términos de su posición con respecto al soporte sólido de resina. En este método preferible la síntesis en fase sólida también continúa por la adición consecutiva de residuos de aminoácido desde el amino terminal al carboxilo terminal, añadiendo secuencialmente aminoácidos en la manera correspondiente a la secuencia deseada. La síntesis del fragmento intermedio de péptido se completa tras la adición del residuo N-terminal (por ejemplo, la lisina N-terminal (K) de Id. de Sec. N°:3) a la cadena del péptido naciente.

De forma ventajosa, ningún fragmento intermedio 1 ni fragmento intermedio 2 incluye un residuo ácido glutámico (E) N-terminal. En el grado en que cualquier fragmento intermedio incluye un residuo de ácido glutámico, el residuo se posiciona dentro de la secuencia o en el C-terminal del fragmento intermedio. Se ha encontrado que la pureza de fragmentos intermedios puede ser significativamente alta cuando se utilizan fragmentos con estas disposiciones de secuencia generales de aminoácidos, en la medida que un fragmento con ácido glutámico en N-terminal tiende a incluir más de una impureza de ácido piroglutámico.

Se muestra que cada uno de los fragmentos intermedios 1 y 2 incluyen los residuos de al menos 18 aminoácidos. Estos son más bien fragmentos de péptido más largos en el contexto de la síntesis en fase sólida, aunque los principios de la presente invención permiten dichos fragmentos largos y el resultante T-1249 se sintetiza con alto rendimiento y pureza.

De acuerdo con la invención, se ha descubierto mediante un control apropiado la cantidad relativa de péptido sintetizado en la resina en fase sólida, los efectos ventajosos pueden obtenerse respecto al rendimiento y pureza de los fragmentos intermediarios de péptidos. La cantidad relativa de péptido sintetizado puede controlarse mediante el factor de carga, que se refiere a la cantidad del aminoácido alfa acoplado a una cantidad de resina, expresado normalmente como milímoles de aminoácido alfa por gramo de resina en fase sólida. Por ejemplo, un factor de carga de 0,25 corresponderá a 25 mmol de aminoácido alfa que está actualmente acoplado a 100 g de resina en fase sólida. Se entiende que la reacción de acoplamiento del primer aminoácido a la resina en fase sólida puede que no sea completamente eficiente, y por lo tanto la cantidad actual que está acoplada puede ser inferior a la cantidad teórica basada en una eficiencia de acoplamiento del 100% y las cantidades de reactivos de partida. La cantidad actual de material acoplado puede determinarse después de que la reacción tuviera lugar. Para poder determinar el acoplamiento actual, el péptido puede escindirse de la resina y analizarse utilizando, por ejemplo, análisis HPLC *versus* un estándar. Los métodos para determinar la cantidad actual del primer residuo de aminoácido acoplado se describe aquí.

De acuerdo con la invención, se ha encontrado que el rendimiento y la pureza de un fragmento de péptido relativamente largo (como las secuencias del fragmento intermediario de péptido de Id. de Sec. N°:2 e Id. de Sec. N°:3) y por lo tanto el rendimiento y la pureza del péptido resultante T-1249, tiende a ser mayor en factores de carga relativamente inferiores, como 0,5 o menos. No obstante, si el factor de carga es, por ejemplo, inferior a 0,2, entonces el rendimiento del producto puede verse reducido. Equilibrando estos aspectos, el factor de carga respecto al menos a un fragmento 1 y 2, preferiblemente ambos Fragmentos 1 y 2, está entre alrededor de 0,2 y alrededor de 0,50, preferiblemente en el rango de alrededor de 0,2 a alrededor de 0,45, y más preferiblemente en el rango de alrededor de 0,2 a alrededor de 0,40. Por ejemplo, en un modo de práctica representativo, utilizando un factor de carga de alrededor de 0,34 será adecuado.

Para ilustrar este aspecto, puede realizarse el siguiente procedimiento en fase sólida. Se obtiene una resina adecuada y se prepara lavándola en un solvente apropiado. Después, se añade una solución que contiene el primer aminoácido en forma activable y protegida a la resina lavada. Para lograr un factor de carga dentro de un rango deseado, la cantidad y/o concentración de aminoácido, y/o otros factores de reacción, como la presencia y concentración de coreactivos como un HOBT, la duración de la reacción de acoplamiento, la temperatura de la reacción de acoplamiento, y así pueden escogerse.

Puede utilizarse la síntesis en fase sólida utilizando la química de Fmoc para preparar un fragmento intermediario T-1249 (como el fragmento intermediario de péptido que incluye Id. de Sec. N°:2 e Id. de Sec. N°:3) acoplado a una resina. Tras sintetizar el fragmento intermediario de péptido en la resina, se escinde utilizando un reactivo de escisión para generar un fragmento intermediario de péptido en solución que está en forma protegida. El fragmento intermediario de péptido se separa entonces de la resina. En algunos casos el fragmento intermediario de péptido se pone en contacto con un agente precipitante como medida para purificar el fragmento intermediario de péptido antes de realizar el acoplamiento de fase en solución.

Los métodos para la síntesis de péptidos utilizando una aproximación en fase sólida son bien conocidos en la materia. De acuerdo con esto, la invención contempla utilizar cualquier aproximación de síntesis en fase sólida utilizando un factor de carga bajo para preparar un fragmento intermediario de péptido que puede utilizarse en la preparación de un producto final T-1249.

Por ejemplo, el fragmento intermediario de péptido T-1249 descrito aquí puede sintetizarse mediante técnicas de SSPS utilizando protocolos Fmoc estándar. Los protocolos Fmoc se describen en, por ejemplo, Carpin *et al.* (1970), J. Am. Chem. Soc. 92(19):5748-5749; Carpin *et al.* (1972), J. Org. Chem. 37(22):3404-3409, "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis", Weng C. Chan y Peter D. White Eds. (2000) Oxford University Press Oxford Eng.

Puede utilizarse cualquier tipo de soporte adecuado en la práctica de la síntesis de péptidos en fase sólida. En realizaciones preferibles, el soporte comprende una resina que puede fabricarse de uno o más polímeros, copolímeros o combinaciones de polímeros como poliamida, polisulfamida, polietilenos sustituidos, polietilenglicol, resinas fenólicas, polisacáridos o poliestireno. El soporte de polímero también puede ser cualquier sólido que es suficientemente insoluble e inerte en los solventes utilizados en la síntesis de péptidos. El soporte sólido típicamente incluye una porción de unión a la que se acopla el péptido creciente durante la síntesis y que puede escindirse bajo las condiciones deseadas para liberar el péptido del soporte. Los sólidos de soporte adecuados pueden tener enlazantes que son foto-escindibles, escindibles con TFA, escindibles con HF, escindibles con ion flúor, escindibles reductivamente, escindibles con Pd(O), escindibles con nucleófilos o escindibles con radicales. Las porciones de unión preferibles son escindibles bajo condiciones tales que los grupos de la cadena lateral del péptido escindido siguen estando sustancialmente protegidos.

En un método de síntesis preferible, los fragmentos intermediarios de péptido se sintetizan sobre un soporte sólido sensible al ácido que incluye grupos trítilo, y más preferiblemente sobre una resina que incluye grupos trítilo con grupos de cloro sobresalientes, por ejemplo una resina con cloruro de 2-clorotritilo (2-CTC), (Barlos *et al.* (1989) Tetrahedron Letters 30(30):3943-3946). Los ejemplos también incluyen resina de cloruro de trítilo, resina de cloruro de 4-metiltrítilo, resina de cloruro de 4-metoxitritilo, resina de 4-aminobutan-1-ol 2-clorotritilo, resina de 4-aminometilbenzoilo 2-clorotritilo, resina de 3-aminopropan-1-ol 2-clorotritilo, resina de ácido bromoacético 2-clorotritilo, resina de ácido cianoacético 2-clorotritilo, resina de ácido 4-cianobenzoico 2-clorotritilo, resina de glicinol 2-clorotritilo, resina de propiónico 2-clorotritilo, resina de etilenglicol 2-clorotritilo, resina de N-Fmoc hidroxilamina 2-clorotritilo-

lo y resina de hidrazina 2-clorotritilo. Algunos soportes sólidos preferibles incluyen el poliestireno, que puede copolimerizarse con divinilbenceno para formar un material de soporte al que se anclan los grupos reactivos.

El material peptídico normalmente está unido a las cuentas de resina en la superficie y en el interior de la cuenta.

5 Fmoc y el péptido protegido por la cadena lateral se escinde fácilmente en un estado protegido de esta resina utilizando reactivos medianamente acídicos como TFA diluido en DCM o ácido acético.

Otras resinas que se utilizan en la síntesis en fase sólida incluyen las resinas "Wang", lo que comprende un copolímero de estireno y divinilbenceno con grupos de anclaje 4-hidroximetil-feniloximetilo (Wang, S.S. 1973, J. Am. 10 Chem. Soc.), y resina de ácido 4-hidroximetil-3-metoxifenoxibutírico (Richter *et al.* (1994), Tetrahedron Letters 35 (27):4705-4706). Las resinas Wang, de cloruro de 2-clorotritilo, y de ácido 4-hidroximetil-3-metoxifenoxi-butírico pueden adquirirse, por ejemplo, de Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, California.

15 Para proporcionar un soporte con un primer aminoácido acoplado, la resina puede prepararse, por ejemplo, lavándola, y después incubándola con una solución que contiene un aminoácido activado, protegido. El primer aminoácido y los posteriores aminoácidos que están acoplados a la resina normalmente incluyen un grupo protector N-terminal, un grupo protector de cadena lateral (dependiendo del aminoácido específico), y un grupo que es reactivo con un grupo que cuelga de la resina, o un grupo que es reactivo con el aminoácido que cuelga.

20 En aspectos preferibles, el primer aminoácido está unido al soporte del extremo carboxi, mientras que el N-terminal y los grupos de las cadenas laterales están protegidos, como sea apropiado, mediante grupos protectores. Como descripción de ejemplo, la síntesis en fase sólida del fragmento intermedio de péptido Ac-WQEWEQKI TALLEQAQIQQE (Id. de Sec. N°:2) se lleva a cabo a partir del carboxi terminal a la dirección NH<sub>2</sub> terminal mediante la primera carga de un residuo protegido de ácido glutámico en una resina de cloruro de 2-clorotritilo (2-CTC).

25 La naturaleza y utilización de los grupos protectores es bien conocida en la materia. Generalmente, un grupo protector adecuado es cualquier tipo de grupo que puede ayudar a evitar que el átomo o porción a la que está unido, por ejemplo, un oxígeno o nitrógeno, participen en reacciones no deseadas durante el procesado y la síntesis. Los grupos protectores incluyen grupos protectores de la cadena lateral y grupos protectores de amino o N-terminal. Los 30 grupos protectores también pueden evitar la reacción o enlace de ácidos carboxílicos, tioles y similares.

35 Un grupo protector de la cadena lateral se refiere a una porción química acoplada a la cadena lateral (es decir, un grupo R en la fórmula general de aminoácido H<sub>2</sub>N-C(R)(H)-COOH) de un aminoácido que ayuda a evitar que una porción de la cadena lateral reaccione con los agentes químicos utilizados en los pasos de síntesis del péptido, su procesado, etc. La elección del grupo protector de la cadena lateral puede depender de varios factores, por ejemplo, el tipo de síntesis realizada, el procesado al que se va a someter el péptido, y el producto intermedio o producto final deseado. La naturaleza del grupo protector de la cadena lateral también depende de la naturaleza del aminoácido en sí mismo. Generalmente, un grupo protector de la cadena lateral se elige de forma que no se escinda durante la 40 desprotección de los grupos  $\alpha$ -amino durante la síntesis en fase sólida. Por lo tanto, el grupo protector de  $\alpha$ -amino y el grupo protector de la cadena lateral normalmente no son el mismo.

45 En algunos casos, y dependiendo del tipo de reactivos utilizados en la síntesis en fase sólida y el procesado de otros péptidos, un aminoácido puede no requerir la presencia de un grupo protector de la cadena lateral. Tales aminoácidos normalmente no incluyen un oxígeno o nitrógeno reactivo, u otra porción reactiva en la cadena lateral.

50 Ejemplos de grupos protectores de la cadena lateral incluyen acetilo (Ac), benzoilo (Bz), terc-butilo, trifenilmetilo (tritilo), tetrahidropiranilo, éter de bencilo (Bzl) y 2,6-diclorobencilo (DCB), t-butoxicarbonilo (Boc), nitro, p-toluenosulfonilo (Tos), adamantiloxicarbonilo, xantilo (Xan), bencilo, 2,6-diclorobencilo, metilo, etilo y éster de t-butilo, benciloxicarbonilo (cBz o Z), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Z), t-amiloxicarbonilo (Aoc) y los grupos protectores tipo uretano aromáticos o alifáticos, los grupos fotolábiles como el nitro-veratriloxicarbonilo (NVOC) y los grupos lábiles al fluoruro como el 2-trimetilsililetoxicarbonilo (TEOC).

55 Los grupos protectores de la cadena lateral preferibles incluyen el grupo t-Bu para los residuos de aminoácido Tyr (Y), Thr(T), Ser(S) y Asp(D); el grupo tritilo (trt) para los residuos de aminoácido His(H), Gln(Q) y Asn(N); y el grupo Boc para los residuos de aminoácido Lys(K) y Trp (W).

60 Por ejemplo, pueden protegerse cualquiera o más de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos de los fragmentos de péptidos listados en la Tabla 1 con grupos protectores estándar como t-butilo (t-Bu), tritilo (trt) y t-butiloxicarbonilo (Boc). El grupo (t-Bu) es el grupo protector de cadena lateral preferido para los residuos de aminoácido Tyr(Y), Thr(T), Ser(S) y Asp (D); el grupo (trt) es el grupo protector de cadena lateral preferido para los residuos de aminoácido His(H), Gln(Q) y Asn(N); y el grupo Boc es el grupo protector de cadena lateral preferido para los residuos de aminoácido Lys(K) y Trp(W).

65 Preferiblemente, todos los residuos de asparagina de cada fragmento de péptido de la invención están protegidos. Además, es preferible que el residuo de triptófano esté protegido con un grupo Boc.

Un grupo protector de amino-terminal incluye una porción química acoplada al grupo alfa amino de un aminoácido. Normalmente, el grupo protector de amino-terminal se elimina en una reacción de desprotección previamente a la

adición del siguiente aminoácido a añadir a la cadena de péptido creciente, pero puede mantenerse si el péptido se escinde del soporte. La elección del grupo protector de amino terminal puede depender de varios factores, por ejemplo, el tipo de síntesis realizada y el producto intermedio o producto final deseado.

5 Ejemplos de grupos protectores de amino-terminal incluyen (1) grupos protectores tipo acilo, como formilo, acrilo (Acr), benzoilo (Bz) y acetilo (Ac); (2) grupos protectores tipo uretano aromáticos, como benciloxicarbonilo (Z) y Z sustituido, como p-clorobenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo y p-metoxibenciloxicarbonilo; (3) grupos protectores tipo uretano alifáticos, como t-butiloxicarbonilo (Boc), diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo, aliloxicarbonilo; (4) grupos protectores tipo uretano cicloalquilo, como 9-fluorenil-metiloxicarbonilo (Fmoc), ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo y ciclohexiloxicarbonilo; y (5) grupos protectores tipo tiouretano, como feniltiocarbonilo. Los grupos protectores preferibles incluyen el 9-fluorenil-metiloxicarbonilo (Fmoc), 2-(4-bifenilil)-propil(2)oxicarbonilo (Bpoc), 2-fenilpropil(2)-oxicarbonilo (Poc) y t-butiloxicarbonilo (Boc).

15 De acuerdo con la invención, los grupos protectores están normalmente retenidos en el fragmento intermedio de péptido a lo largo de la síntesis en fase sólida y también en y durante la reacción de acoplamiento de fase en solución. (Generalmente, tras completar un paso de acoplamiento de fase en solución, se realiza un paso de desprotección para eliminar uno o más grupos protectores del péptido).

20 Ejemplos específicos de los primeros aminoácidos con grupos protectores específicos que pueden ser acoplados a la resina para la síntesis de fragmento intermedio de péptido con Id. de Sec. N°:2 e Id. de Sec. N°:3, puede ser FmocGlu(OtBu)OH y FmocTrp(Boc)OH, respectivamente.

25 Para preparar una resina para la síntesis en fase sólida, la resina puede prelavarse en un solvente. Por ejemplo, una resina de fase sólida como la resina de 2-CTC se añade a un cámara de péptido y se prelava con un solvente adecuado. El lavado puede realizarse para preparar la resina para contactar con el primer aminoácido que se acopla a la resina. En esencia, puede realizarse un prelavado para promover un acoplamiento eficiente del primer aminoácido a la resina. El solvente de prelavado puede elegirse en base al tipo de solvente (o mezcla de solventes) que se utiliza en la reacción de acoplamiento, o viceversa.

30 Los solventes que son adecuados para el lavado, y también para la subsiguiente reacción de acoplamiento incluyen el diclorometano (DCM), dicloroetano (DCE), dimetilformamida (DMF), y similares, así como las mezclas de estos reactivos. Otros solventes útiles incluyen el DMSO, piridina, cloroformo, dioxano, tetrahidrofurano, acetato de etilo, N-metilpirrolidona y mezclas de los mismos. En algunos casos el acoplamiento puede realizarse en un sistema de solvente binario, como una mezcla de DMF y DCM.

35 Tal como se describe aquí, se desea controlar el factor de carga del primer aminoácido alfa en la resina para que esté en el rango entre alrededor de 0,2 a alrededor de 0,50, preferiblemente entre alrededor de 0,2 a alrededor de 0,45, y más preferiblemente entre alrededor de 0,2 a alrededor de 0,40. Por lo tanto, se prepara una solución con una cantidad 40 de aminoácido que proporcionará un factor de acoplamiento en el rango objetivo. Esto puede determinarse conociendo generalmente, cual es la eficiencia de acoplamiento para una reacción particular. Por ejemplo, cuando se desea tener un factor de carga objetivo de alrededor de 0,34, y se sabe que la eficiencia de acoplamiento es de alrededor del 80%, se utilizará entonces una solución de acoplamiento que contiene 0,425 mmol de aminoácido por cada gramo de resina (0,34/0,8).

45 La reacción de acoplamiento puede realizarse en presencia de uno o más compuestos que aumentan o mejoran la reacción de acoplamiento. Los compuestos que pueden aumentar la tasa de reacción y reducir la tasa de reacciones secundarias incluyen sales de fosfonio y uronio que pueden, en presencia de una base terciaria, por ejemplo, diisopropiletilamina (DIEA) y trietilamina (TEA), convertir aminoácidos protegidos en especies activadas (por ejemplo, BOP, PyBOP, HBTU, y TBTU generando ésteres de HOBT). Otros reactivos ayudan a prevenir la racemización proporcionando un reactivo protector. Estos reactivos incluyen carbodiimidas (por ejemplo, DCC o WSCDI) con un nucleófilo auxiliar añadido (por ejemplo, 1-hidroxi-benzotriazol (HOBT), 1-hidroxi-azabenzotriazol (HOAt), o HOSu). Otro reactivo que puede utilizarse es TBTU. El método de anhídrido mezclado, utilizando cloroformato de isobutilo, con o sin un nucleófilo auxiliar añadido, también se utiliza, como en el método azida, debido a la baja racemización asociada con ella. Estos tipos de compuestos pueden también aumentar la tasa de acoplamientos mediados por carbodiimida, así como prevenir la deshidratación de los residuos de Asn y Gln.

50 La finalización del acoplamiento puede monitorizarse con un ensayo ninhidrina cualitativo como se describe aquí. Después de determinar la finalización del acoplamiento, las mezclas de la reacción de acoplamiento se lavan con un solvente, y el ciclo de acoplamiento se repite para cada uno de los siguientes residuos de aminoácido del material 55 peptídico. Tras el ciclo de acoplamiento final, la resina se lava con un solvente como el NMP, y luego se lava con un segundo solvente inerte como el DCM.

55 Para poder acoplar el siguiente aminoácido, se logra la eliminación del grupo protector N-terminal (por ejemplo, un grupo Fmoc) normalmente mediante tratamiento con un reactivo que incluye 20-50% (en base al peso) de piperidina en un solvente, como N-metilpirrolidona (NMP) o dimetilformamida (DMF). Tras eliminar el grupo protector Fmoc, se realizan normalmente varios lavados para eliminar la piperidina residual y los productos secundarios de Fmoc (como dibenzofulveno y su aducto de piperidina).

Tras acoplar el primer aminoácido a la resina en un factor de carga deseado y haber eliminado el grupo protector N-terminal, se pueden añadir los siguientes aminoácidos para preparar los fragmentos intermedios de péptidos. Los siguientes aminoácidos pueden utilizarse en un exceso estequiométrico de aminoácidos respecto al factor de carga. No obstante, se ha encontrado que la síntesis en fase sólida de los fragmentos intermedios específicos de T-1249 5 descritos aquí no requieren el uso de un gran exceso de aminoácidos (y reactivos correspondientes) en la síntesis en fase sólida de estos fragmentos. Generalmente, la cantidad de aminoácidos utilizados en el paso de acoplamiento es al menos equivalente al factor de carga del primer aminoácido sobre la resina (un equivalente o más). Preferiblemente la cantidad de aminoácidos utilizados en el paso de acoplamiento es de al menos 1,3 equivalentes (exceso de 0,3) o más, y más preferiblemente alrededor de 1,5 equivalentes (exceso de 0,5) o más. En algunos casos, por ejemplo, el paso de 10 acoplamiento utiliza una cantidad equivalente de aminoácidos en el rango de entre 1 y 1,5 (mayor de 1 e inferior de 1,5).

Se ha encontrado que este exceso de aminoácidos (por ejemplo, alrededor de 1,5) es suficiente para la reacción 15 de acoplamiento hasta su finalización. Este exceso puede también ayudar a la reacción a tolerar al exceso de base del reactivo de desprotección.

Los pasos de acoplamiento, lavado, desprotección del grupo protector N-terminal, y lavado puede repetirse hasta que se forman los productos intermedios de T-1249 deseados.

20 Tras la síntesis en fase sólida y para eliminar los intermedios del péptido de T-1249 de la resina, se lleva a cabo un tratamiento de escisión de forma que los intermedios del péptido de T-1249 escindidos aún llevan suficientes cadenas laterales y grupos protectores terminales. Dejando a los grupos protectores en su sitio ayuda a prevenir reacciones de acoplamiento indeseables u otras reacciones indeseables de fragmentos de péptido durante o después de la escisión. En el caso de utilizar Fmoc o sustancias similares para sintetizar el péptido, puede lograrse la escisión de 25 los protectores de cualquier forma deseada como utilizando un reactivo ácido relativamente débil como ácido acético o TFA diluido en un solvente como DCM, que puede también inflar la resina, siendo útil para el proceso de escisión y separación. Es preferible el uso de 0,5 a 10 por ciento del peso, preferiblemente 1 al 3 por ciento del peso de TFA en DCM. Véase, por ejemplo, la patente Estadounidense Nº 6.281.335.

30 Los pasos para escindir el fragmento intermedio de péptido de la resina de fase sólida pueden proceder según se describe en el proceso de ejemplo que sigue. Sin embargo, puede utilizarse cualquier proceso adecuado que escinda de forma efectiva el fragmento intermedio de péptido de la resina. Por ejemplo, se añaden aproximadamente de 5 a 20, preferiblemente alrededor de 10 volúmenes de un solvente que contiene un reactivo acídico de escisión al recipiente. Las cuentas de resina, como consecuencia, están inmersas en el reactivo. La reacción de escisión ocurre a medida que 35 el contenido líquido se agita a la temperatura adecuada durante un periodo de tiempo adecuado. La agitación ayuda a evitar que las cuentas se aglutinen. Las condiciones de tiempo y temperatura adecuadas dependerán de factores como el reactivo ácido que se está utilizando, la naturaleza del péptido, la naturaleza de la resina y similares. Como líneas generales, será adecuada la agitación a entre alrededor de -15°C a alrededor de 5°C, preferiblemente entre alrededor de -10°C a alrededor de 0°C durante alrededor de entre 5 minutos a dos horas, preferiblemente alrededor de entre 40 minutos a alrededor de 45 minutos. El tiempo de escisión puede estar en el rango de entre alrededor de 10 minutos a alrededor de 2 horas. Para la producción a gran escala, un tiempo preferible está en el rango entre alrededor de 15 a 50 minutos. La escisión preferiblemente se realiza en un rango de temperatura lo suficientemente frío como para acomodar la reacción exotérmica que normalmente ocurre durante la reacción. Además, una temperatura inferior de la reacción de escisión evita que los grupos protectores de la cadena lateral sensibles al ácido, como los grupos trt, se 45 eliminan en esta etapa.

Al final del tratamiento de escisión, la reacción se bloquea. Esto puede conseguirse, por ejemplo, añadiendo una base adecuada, como piridina o similares, en el recipiente, y continuando con la agitación durante un periodo adicional, como entre 5 minutos y 2 horas adicionales, preferiblemente de alrededor de 20 minutos a alrededor de 40 minutos. 50 La adición de la base y continuando la agitación se causa un aumento de la temperatura del contenido del recipiente. Al final de la agitación, el contenido del recipiente puede estar a una temperatura en el rango de entre alrededor de 0°C y alrededor de 15°C, preferiblemente entre alrededor de 5°C y alrededor de 10°C.

Factores como la expansión y contracción de la resina para poder mejorar aspectos de la recuperación del péptido 55 pueden incorporarse opcionalmente en el proceso general de síntesis.

Por ejemplo, tras la escisión, el soporte puede opcionalmente lavarse una o más veces con un reactivo de expansión para extraer el péptido escindido en los resultantes lavados, y los lavados se recogen para permitir la recuperación del péptido de esos lavados. Por ejemplo, la escisión de un péptido de la resina 2-CTC utilizando TFA diluido en DCM 60 constituirá además todo o una porción de un tratamiento de expansión. Tras la escisión, y tras completar el tratamiento de expansión, el soporte puede someterse a uno o más lavados opcionales de contracción que permiten la recuperación de cantidades adicionales de péptido de dichos lavados de contracción así como potenciar la capacidad de recuperar péptido adicional de uno o más lavados opcionales de expansión posteriores. Los posteriores lavados opcionales de expansión, constituyen un tratamiento de expansión adicional, puede llevarse a cabo tras completar el tratamiento de contracción.

Ya que un solvente de expansión como el DCM puede utilizarse como constituyente en el reactivo de escisión, el tratamiento de escisión también puede constituir un primer tratamiento de expansión en que una cantidad significativa

de péptido escindido se extraerá en el líquido. Cuando se expande con TFA en DCM, el volumen de la cuenta tenderá a ser mayor al inicio del tratamiento de escisión. Las cuentas estarán aún expandidas, pero su volumen disminuye, a medida que el péptido se extrae en el líquido.

5 Tras la finalización, el contenido del recipiente se vacía y se recoge para recuperar el péptido extraído en el lavado. Puede usarse la presión para forzar la mezcla líquida que contiene el material peptídico transportado por el líquido a través del filtro y fuera del recipiente. Las cuentas restantes en el recipiente todavía contendrán DCM residual y podrán expandirse hasta cierto punto. Una cantidad significativa de péptido residual también tiende a ser retenido en las cuentas, y los posteriores tratamientos de contracción y expansión ayudan a recuperar porciones significativas del 10 péptido residual.

Como opción, puede ser deseable lavar el reactivo de escisión recogido con agua antes de su concentración a través de destilación o similar, normalmente después de lograr alguna concentración. El lavado con agua tras la escisión se cree que es útil para aumentar la calidad del péptido y, por lo tanto, de alguna manera su rendimiento. El 15 lavado con agua se cree que es útil para eliminar el TFA residual y sus productos secundarios. Tras el tratamiento de lavado/extracción con agua, la mezcla líquida puede transferirse a un aparato de destilación, en el que la mezcla se concentra más al eliminar, por ejemplo, el DCM o similar.

20 Después de vaciar la mezcla de escisión del recipiente y recuperar el péptido, el contenido del recipiente puede someterse a uno o más lavados de expansión adicionales en el que puede extraerse el péptido adicional y después recuperarse. Estos lavados de expansión adicionales también ayudan a lavar el recipiente y eliminar el reactivo de escisión residual y los productos secundarios. Dichos ingredientes se eliminan de forma deseable antes de continuar con un 25 tratamiento de contracción de forma que el líquido contraído no reacciona con ellos. Por ejemplo, es deseable eliminar TFA del recipiente antes de añadir un líquido de contracción que contiene etanol en la medida que el etanol puede reaccionar con TFA. Un tratamiento de lavado de expansión típico puede suceder con agitación durante un periodo de tiempo desde alrededor de 2 minutos a 2 horas, preferiblemente desde alrededor de 10 minutos a alrededor de 50 minutos. Tras realizar el lavado, el lavado se retira del recipiente y después puede añadirse al recipiente de destilación con otros lavados de expansión. Opcionalmente, antes de añadirse al recipiente de destilación, estos lavados de 30 expansión adicionales, si los hay, pueden someterse a un tratamiento de extracción con agua para eliminar impurezas.

35 En algunos aspectos, el fragmento intermediario de péptido puede prepararse para el acoplamiento de fase en solución realizando un paso para aumentar su pureza, por ejemplo, mediante cristalización. Uno o más de los fragmentos intermediarios de péptido T-1249 pueden tratarse con una solución que contiene IPA, como una mezcla de IPA y DCM, o IPA y agua, para cristalizar los fragmentos intermediarios de péptidos.

40 Tras la síntesis en fase sólida, la escisión desde la resina, y cualquier lavado o purificación del intermediario de péptido, el fragmento intermediario de péptido con la secuencia KNEYELQKLDKWASLWEW (Id. de Sec. N°:3) reacciona con un residuo de fenilalaninamida (F-NH<sub>2</sub>) para producir un fragmento intermediario de péptido con la secuencia KNEYELQKLDKWASLWEWF (Id. de Sec. N°:4). Esta reacción de fase en solución puede realizarse en una reacción de fase en solución adecuada, como se describe aquí. Este producto intermediario de péptido puede precipitarse en un solvente no polar, por ejemplo, agua, y lavarse para mejorar la pureza.

45 La cadena lateral protegida del fragmento intermediario de péptido T-1249 Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE (Id. de Sec. N°:2) y KNEYELQKLDKWASLWEWF (Id. de Sec. N°:4) se acoplan juntos en solución para formar un péptido T-1249 de longitud completa con la secuencia Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNYEELQKLDKWASLWEWF (Id. de Sec. N°:1). Estos fragmentos intermediarios de péptido disueltos químicamente en los que el N-terminal del fragmento intermediario de péptido KNEYELQKLDKWASLWEWF está acoplado al C-terminal del fragmento de péptido Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE.

50 Preferiblemente, los péptidos se suministran a la reacción de acoplamiento a un nivel de pureza del 80% o superior, o más preferiblemente del 82,5%, y más preferiblemente del 85% o superior en base a un perfil de HPLC. De acuerdo con los métodos de la invención, la síntesis en fase sólida utilizando un factor de carga bajo en un aspecto significativo para preparar los fragmentos intermediarios de péptidos T-1249 con un alto nivel de pureza.

55 La reacción de acoplamiento de péptidos se revisa en, por ejemplo, *New Trends in Peptide Coupling Reagents*; Albericio, Fernando; Chinchilla, Rafeal; Dodsworth, David J.; y Najera, Armen; *Organic Preparations and Procedures International* (2003), 33(3), 203-303.

60 El acoplamiento de fragmento intermediario de péptido puede realizarse utilizando reactivos de acoplamiento *in situ*, por ejemplo BOP, hexafluorofosfato de o-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), HATU, di-ciclohexilcarbodiimida (DCC), carbodiimida soluble en agua (CDISA), o tetrafluoroborato de o-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (TBTU). Otras técnicas de acoplamiento utilizan ésteres activos preformados como los ésteres de hidroxisuccinimida (HOSu) y p-nitrofenol (HONp); anhídridos simétricos preformados; anhídridos no simétricos como los N-carboxianhídridos (NCA); o haluros ácidos como el fluoruro de acilo o el cloruro de acilo.

65 Un solvente de acoplamiento adecuado puede utilizarse en la reacción de acoplamiento. Se conoce que el(s) solvente(s) de acoplamiento utilizado(s) puede afectar al grado de racemización del enlace peptídico formado, la solubilidad del péptido y/o fragmentos peptídicos y la tasa de la reacción de acoplamiento.

## ES 2 329 270 T3

En algunas realizaciones, la reacción de acoplamiento incluye un solvente miscible en agua. Ejemplos de solventes miscibles en agua incluyen, por ejemplo, el DMSO, piridina, cloroformo, dioxano, tetrahidrofurano, acetato de etilo, N-metilpirrolidona, dimetilformamida, dioxano o mezclas de los mismos.

5 En otras realizaciones, la reacción de acoplamiento incluye un solvente no miscible en agua. Un ejemplo de solvente no miscible en agua es el cloruro de metileno. En estas realizaciones, el solvente no miscible en agua es preferiblemente compatible con la reacción de desprotección; por ejemplo, si se utiliza preferiblemente un solvente no miscible en agua no afectará de forma adversa la reacción de desprotección.

10 Después de que el fragmento intermediario de péptido haya sido acoplado para producir un péptido T-1249, el producto puede someterse a un paso de desprotección para eliminar los grupos protectores de cadenas laterales.

15 La eliminación de grupos protectores de la cadena lateral mediante una desprotección global normalmente utiliza una solución de desprotección que incluye un agente acidolítico para escindir los grupos protectores de la cadena lateral. Los reactivos acidolíticos normalmente utilizados para la desprotección global incluyen el ácido trifluoroacético (TFA) puro, HCl, ácidos de Lewis como el  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$  o  $\text{Me}_3\text{SiBr}$ , ácido fluorhídrico líquido (HF), bromuro de hidrógeno (HBr), ácido trifluorometanosulfónico y combinaciones de los mismos. La solución de desprotección también incluye uno o más captadores de cationes adecuados, por ejemplo, ditioltreitol (DTT), anisol, p-cresol, etanoditiol o sulfuro de dimetilo. La solución de desprotección también puede incluir agua. Como se utiliza aquí, las cantidades de 20 reactivos presentes en la composición de desprotección normalmente se expresan en forma de proporción, en la que la cantidad de un componente individual se expresa como un numerador en "partes", como "partes en peso" o "partes en volumen" y el denominador es el total de partes en la composición. Por ejemplo, una solución de desprotección que contiene TFA:H<sub>2</sub>O:DTT en una proporción de 90:5:5 (peso/peso/peso) contiene TFA en 90/100 partes en peso, H<sub>2</sub>O en 5/100 partes en peso y DTT en 5/100 partes en peso.

25 30 En algunas realizaciones, la reacción de desprotección puede realizarse cuando la cantidad de agente acidolítico, preferiblemente TFA, en la composición de desprotección es mayor de 90/100 partes en peso. Otras composiciones de desprotección preferibles incluyen una cantidad de agente acidolítico en una cantidad de 93/100 partes en peso o superior, o en una cantidad en el rango de 93/100 en peso hasta 95/100 partes en peso.

35 40 Tras desproteger al péptido T-1249, y está en su forma final, opcionalmente el lote de péptido puede someterse a un proceso que desagrega péptido agregado que puede estar presente en este estadío en el esquema sintético general.

45 La desagregación puede realizarse disolviendo las muestras de péptido en una base acuosa y acidificando después la mezcla acuosa para precipitar el péptido en presencia de al menos una sal y un cosolvente. Preferiblemente, la sal y el cosolvente están presentes en la solución de desagregación. La desagregación puede llevarse a cabo precipitando el péptido relativamente rápido (al menos en una primera etapa de acidificación en la que el pH del medio alcalino se reduce a un pH en el rango de 6 a 7,5, tras dicha acidificación a un pH final deseado, por ejemplo, 3 a 6, puede ocurrir más lentamente) a una temperatura relativamente baja.

50 55 Para la desagregación, la solución acuosa, tamponada, alcalina generalmente deriva de ingredientes que comprenden agua, al menos una sal, y una cantidad suficiente de al menos una base para proporcionar el pH de disolución deseado. El péptido T-1249 y varios ingredientes que constituyen la solución acuosa, tamponada, alcalina pueden combinarse de cualquier forma. En un modo de la práctica, la solución se prepara a partir de los ingredientes que lo constituyen y entonces el péptido se añade a la solución ya preparada. En otra forma de práctica, el péptido puede añadirse a una solución acuosa que comprende la sal en la que la solución tiene un pH que es demasiado bajo para que suceda la disolución. Se añade una base a la mezcla para subir el pH a un valor en el que suceda la disolución. Como otra alternativa, se puede añadir la sal a la solución antes, durante, y/o después de la disolución. Generalmente, sin embargo, la sal se incorpora en la solución antes de que baje el pH de forma que provoque la precipitación del péptido como se describe más adelante en detalle.

60 La concentración del péptido en la solución puede variar en un amplio rango. Como guía general, la concentración de péptido T-1249 en la solución puede estar en el rango de alrededor de 3 g/L a alrededor de 6 g/L.

65 70 Pueden incorporarse una variedad de una o más bases en la solución para proporcionar el pH deseado. Ejemplos representativos de bases adecuadas incluyen bases de hidróxido como bases de NaOH y bicarbonato y carbonato como bicarbonato sódico o potásico o carbonato sódico o potásico. Es preferible el hidróxido sódico, especialmente NaOH 0,5 N a 1 N. La base se utiliza para ajustar el pH a un valor deseado en el que el péptido se disolverá en la solución en una cantidad de tiempo razonable. Para muchos péptidos, esto corresponde a un pH de disolución en el rango de alrededor de 8 a alrededor de 11.

75 Los constituyentes de la sal de la solución mejoran las características de disolución del péptido precipitado resultante. Específicamente, un péptido soluble que se disuelve fácilmente en una solución acuosa a pH bajo se prepara más consistentemente cuando una sal está presente a una concentración apropiada.

80 85 Serán útiles una serie de sales en la práctica de la presente invención. Ejemplos incluyen carbonato sódico, acetato sódico, carbonato amónico, acetato amónico, bicarbonato sódico, bicarbonato amónico, versiones sódicas y potásicas de estos, combinaciones de estos, y similares. Acetato amónico es el más preferible.

## ES 2 329 270 T3

La concentración de la sal en la solución puede variar en un amplio rango. Utilizando de 1 a 200 mM equivalentes de sal es un ejemplo de un rango de concentración de sal que puede ser adecuado. En una forma específica de la práctica, utilizando alrededor de 5 mM a alrededor de 50 mM, más preferiblemente alrededor de 10 mM equivalentes de la sal, especialmente acetato amónico, se ha encontrado que es adecuado.

5 La temperatura de disolución generalmente se refiere a la temperatura de la solución acuosa en la que el péptido se disuelve. La disolución puede suceder a cualquier temperatura adecuada. Generalmente, disolviendo el péptido en una solución mantenida a una o más temperaturas en un rango de alrededor de 10°C a alrededor de 30°C, preferiblemente alrededor de 10°C a alrededor de 25°C, más preferiblemente alrededor de 15°C a alrededor de 20°C será preferible.

10 Un cosolvente se incorpora preferiblemente a la solución para que ocurra la posterior precipitación del péptido en presencia del cosolvente. El cosolvente puede añadirse a la solución antes, durante, y o después de la disolución, pero preferiblemente se añade inmediatamente después de la disolución del péptido. El cosolvente se refiere a uno o más solventes adicionales en los que el péptido es soluble al pH de disolución. Preferiblemente, el péptido también 15 es soluble en el cosolvente a 25°C y pH fisiológico cuando el péptido está suficientemente desagregado para que la proporción del peso molecular medido del péptido respecto al peso molecular teórico del péptido esté en el rango de alrededor de 2:1 a alrededor de 1:1. Ejemplos de cosolventes incluye acetonitrilo, metanol, combinaciones de estos, y similares.

20 En realizaciones preferibles de la invención, una cantidad suficiente de cosolvente se añade a la solución de forma que la solución contenga alrededor de 2 hasta 50 por ciento de volumen, preferiblemente desde alrededor de 5 a alrededor de 30 por ciento de volumen, y más preferiblemente desde alrededor de 10 a alrededor de 20 por ciento de volumen del cosolvente.

25 Tras la disolución, y deseablemente tras la adición del cosolvente, el pH de la solución se aumenta además opcionalmente añadiendo base adicional para facilitar además la desagregación del péptido, si se desea. La solución se filtran entonces inmediatamente de forma deseable. Será adecuado filtrar por presión a través de un filtro de 0,2 micras. El filtrado se desgasifica opcionalmente al vacío, tras lo cual la solución se envejece durante un periodo de tiempo adecuado antes de un posterior procesado para poder completar el proceso de desagregación. Generalmente, 30 se envejece para que el tiempo total en que el péptido está a pH elevado (incluyendo no solo el tiempo de envejecimiento, sino también el tiempo de filtrado, tiempo de desgasificación, etc.) esté en el rango de entre alrededor de 5 minutos a alrededor de 6 horas, más preferiblemente entre alrededor de 30 minutos a alrededor de 2 horas. Tras el envejecimiento, la solución se puede filtrar de nuevo opcionalmente.

35 Tras el envejecimiento, el pH de la solución se reduce, por ejemplo, acidificando, bajo condiciones efectivas para provocar la precipitación del péptido. Como guía general, será adecuado un pH final en el rango de alrededor de 3 a alrededor de 6, preferiblemente entre 4 a alrededor de 6. Como ejemplo específico, un pH final de 5,3 a 5,5 es deseable respecto al péptido T-1249.

40 El pH de la solución preferiblemente se disminuye al añadir uno o más ácidos a la solución. Ejemplos de ácidos incluye HCl, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido oxálico, combinaciones de estos, y similares. Es preferible el ácido acético. Por ejemplo, se ha encontrado adecuada una solución de ácido acético acuoso al 5% o 10%.

45 En algunos modos de la práctica, el producto peptídico con excelentes propiedades de disolución puede aún obtenerse si el ácido se añade relativamente rápido para disminuir el pH sólo a un pH intermedio. Tras esta adición de ácido inicial, relativamente rápida, se añade ácido una segunda vez, a una tasa relativamente lenta para disminuir el pH de la solución hasta el pH final deseado. Los valores intermedios de pH adecuados estarán en el rango de alrededor de 6 a alrededor de 8, más preferiblemente entre alrededor de 6,0 a alrededor de 7,5. De forma deseable, la rápida disminución de pH inicial ocurre en un periodo de tiempo inferior a alrededor de una hora, preferiblemente 30 minutos o 50 menos, más preferiblemente 15 minutos o menos.

55 Por ejemplo, un modo adecuado de la práctica implica disminuir el pH de una solución de T-1249 inicialmente a un pH de 11. Se añade un cantidad suficiente de ácido relativamente rápido en un periodo de 10 minutos para disminuir el pH a un valor intermedio de alrededor de 6,0. Entonces, se añade el ácido más lentamente durante 10 a 20 minutos APRA disminuir el pH entre 5,3 y 5,5.

60 La mezcla deseablemente se mezcla bien durante la adición del ácido para causar la precipitación del péptido. Como guía general, es preferible agitar las mezclas mientras se añade el ácido tan fuerte como sea práctico mientras se deja un margen de seguridad suficiente para evitar la formación de espuma en la mezcla.

La adición de ácido para provocar la precipitación del péptido puede llevarse a cabo con la solución a cualquier temperatura adecuada. Como guía, llevar a cabo la precipitación a una temperatura en el rango de 10°C a 30°C, preferiblemente 15°C a 25°C, más preferiblemente 16°C a 18°C será adecuado.

65 Tras la precipitación, el péptido se aísla deseablemente y se seca antes de combinarse con otros ingredientes, liofilizarse, empaquetarse, almacenarse, posterior procesado, y/o cualquier manipulación. Esto debe lograrse de cualquier forma adecuada. De acuerdo con una aproximación adecuada, el péptido se recoge a través de la filtración, se lava con amplios lavados con agua para reducir el contenido final de sal a un nivel adecuado, y después se seca.

Si el péptido precipita en una forma no adecuada para la filtración (por ejemplo si el precipitado es “como un gel”), el precipitado puede someterse a un proceso de envejecimiento con agitación deseable en la que las partículas de péptido se aglomeran para “endurecer” las partículas.

5 En un modo preferible de la práctica, este tratamiento de endurecimiento por envejecimiento implica envejecer el péptido con agitación durante el curso del tratamiento de enfriamiento/calentamiento/enfriamiento. Esto mejora las características de filtración del péptido sin dañar indebidamente la estructura terciaria del péptido. En un modo específico de la práctica, el tratamiento que implica el envejecimiento de las partículas en una mezcla acuosa durante 5 minutos a 48 horas, preferiblemente 30 minutos a 8 horas, más preferiblemente 30 minutos a 2 horas a una primera 10 temperatura inferior a la temperatura ambiente preferiblemente en el rango de entre más de 0°C a alrededor de 20°C, preferiblemente entre 10°C y 20°C, más preferiblemente alrededor de 16°C. La agitación deseablemente se utiliza para asegurar que las partículas se dispersen bien durante el envejecimiento.

15 Después, la temperatura de la mezcla se aumenta en alrededor de 2°C a alrededor de 30°C, preferiblemente entre alrededor de 5°C y alrededor de 15°C a una temperatura moderadamente caliente, en la que la transición a la temperatura más caliente ocurre con agitación durante un periodo de entre alrededor de 1 minuto a alrededor de 48 horas, preferiblemente entre 5 minutos y 8 horas, más preferiblemente entre 20 minutos y 2 horas. Preferiblemente, la nueva temperatura moderadamente caliente está todavía a temperatura ambiente o inferior. En un modo específico de la práctica, se encuentra adecuado aumentar la temperatura de 16°C a 21°C en alrededor de una hora. La agitación deseablemente continua durante esta transición. La mezcla se envejece entonces a la temperatura caliente durante un periodo de 5 minutos a 8 horas, preferiblemente de 20 minutos a 4 horas, más preferiblemente alrededor de 3 horas, 20 con agitación.

25 Tras este paso de envejecimiento, la temperatura de la mezcla se disminuye en alrededor de 2°C a alrededor de 30°C, preferiblemente entre alrededor de 5°C a alrededor de 15°C a una temperatura moderadamente fría, en la que la transición a la temperatura más fría ocurre con agitación durante un periodo de alrededor de 1 minuto a alrededor de 48 horas, preferiblemente entre 5 minutos a 8 horas, más preferiblemente entre 20 minutos a 4 horas. Preferiblemente, la nueva temperatura moderadamente fría está en el rango de entre alrededor de 3°C a alrededor de 8°C, más preferiblemente alrededor de 10°C. En un modo específico de la práctica, se encuentra adecuado disminuir la temperatura desde 30 21°C a 10°C en alrededor de dos horas. La mezcla se envejece entonces a la temperatura más fría preferiblemente durante un periodo de entre alrededor de 5 minutos a 48 horas, más preferiblemente alrededor de 6 horas.

35 Este tratamiento de envejecimiento mejora las características de filtración de las partículas precipitadas en las que el filtrado y separación de las partículas de péptido del filtrado ocurre más fácilmente sin cambiar excesivamente la estructura secundaria del péptido.

40 Así, tras este envejecimiento, el precipitado se filtra, preferiblemente se filtra por presión con un N<sub>2</sub> 1 psig. La pasta de filtrado se puede lavar una o más veces con agua deseablemente preenfriada para que la temperatura esté en el rango de entre alrededor de 3°C a alrededor de 20°C, preferiblemente entre 5°C y alrededor de 15°C, más preferiblemente alrededor de 10°C. Esto ayuda a disminuir el contenido de sal en la pasta. La pasta de filtrado puede entonces secarse parcial o totalmente, mediante el paso de nitrógeno a través de la pasta con nitrógeno a una temperatura adecuada durante un periodo de tiempo adecuado, como 1 minuto a 48 horas, preferiblemente 5 minutos a 8 horas, más preferiblemente alrededor de 6 horas. Utilizando nitrógeno que está alrededor de temperatura ambiente es conveniente y adecuado. La pasta puede mezclarse periódicamente para facilitar el secado. Se puede completar el 45 secado opcionalmente en un aparato de secado separado. Este secado opcional preferiblemente ocurre al vacío, por ejemplo, a menos de 40 mbar, a una temperatura moderada para no degradar el péptido, por ejemplo, a una temperatura inferior a alrededor de 30°C, preferiblemente inferior a 28°C.

50 Los principios de la presente invención se ilustrarán ahora en profundidad respecto a los siguientes ejemplos ilustrativos.

## Ejemplos

55 Para los siguientes ejemplos, se adoptan los siguientes reactivos estándar y nomenclatura:

*Ensayo cloranilo:* la solución del ensayo cloranilo se preparó añadiendo una gota de una solución saturada de cloranilo en tolueno a alrededor de 1 ml de acetona. Los lavados de NMP se analizaron añadiendo una gota del lavado a la solución del ensayo cloranilo. Un color azul o violeta es un indicativo positivo para la presencia de amina secundaria, que indica que aún están presentes productos secundarios de Fmoc desprotegido y/o piperidina residual.

*Ensayo ninhidrina (Keiser):* En el ensayo cualitativo de ninhidrina, se retira una muestra de 2-20 mg de la resina y se lava con NMP y posteriormente con DCM o metanol. Se añaden a la muestra tres gotas de una solución al 76% de fenol en etanol, seis gotas de una solución de KCN 0,2 mM en piridina, y tres gotas de una solución 0,28 M de ninhidrina en etanol, y la muestra se coloca en un bloque de calentamiento a alrededor de 100°C durante alrededor de 5 minutos. La muestra se retira e inmediatamente se diluye con una solución de etanol/agua (9:1). Un color azul o violeta es un indicativo positivo para la presencia de aminas libres, lo que incluye que la reacción de acoplamiento no se ha completado todavía. Si se observa un ensayo de ninhidrina positivo tras una hora de reacción de acoplamiento,

# ES 2 329 270 T3

la reacción de acoplamiento se deja durante una hora adicional. Si se observa un ensayo de ninhidrina positivo tras 3 horas de reacción de acoplamiento, el recipiente se drena, y el acoplamiento se repite utilizando alrededor de un equivalente de aminoácido activado y reactivos.

5

## Ejemplo 1

### *Preparación de resina 2-CTC cargada con Fmoc-Glu(OtBu)*

10 El reactor de 1L con péptido purgado con nitrógeno, se cargó con 40 g de resina 2-CTC y 400 mL de DCM. Se agitó a 25±2°C durante 30 minutos. Mientras tanto, se cargó en un frasco de 1 L, 9,7 g de Fmoc-Glu(OtBu)OH, 280 mL de DMF, 40 mL de DCM y 5,5 g de DIEA. Se agitó el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos.

15 Se drena el DCM del reactor y se cargan la solución anterior preparada de Fmoc-Glu(OtBu)OH. Se agitan las mezclas durante 2 horas a 25±2°C y se drena el reactor.

Se carga en el reactor, una mezcla de DIEA:MeOH (40:360 mL). Se agita el contenido a 25±2°C durante una hora y se drena el reactor.

20 Se lava el lecho de resina con 1x400 mL de DMF, 1x200 mL de DMF, y 4x400 mL de DCM. Se comprueba el último lavado para el ensayo UV negativo.

Se lava el lecho de resina con 3x400 mL de Isopropanol. Se seca al vacío la resina a un peso constante a 40±2°C.

25 Rendimiento: 48,9 g

Análisis del factor de carga: 0,44 mmol/g

30 Ejemplo 2

### *Síntesis en fase sólida del fragmento intermedio Ac-AA(1-20)OH (Id. de Sec. N°:2) de T-1249*

35 En una cámara de SPFS, se cargan 25,0 g de resina Fmoc-Glu(OtBu)-O-2-CTC (Ejemplo 1) y 250 mL de DCM. Se agita la mezcla durante 30 minutos a 30±3°C. Se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 3x150 mL de NMP. Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla durante 30 minutos a 30±3°C y se drena el reactor.

40 Se cargan en un recipiente, 10,1 g de Fmoc-Gln(Trt)OH, 2,82 g de 6-Cloro HOBT, 2,45 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

45 En un recipiente aparte, se cargan 5,3 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Gln(Trt)OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

50 Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

55 Se cargan en un recipiente, 10,1 g de Fmoc-Gln(Trt)OH, 2,84 g de 6-Cloro HOBT, 2,45 g de DIEA y 80 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

60 En un recipiente aparte, se cargan 5,3 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Gln(Trt)OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

65 Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

## ES 2 329 270 T3

Se cargan en un recipiente, 5,83 g de Fmoc-Ile-OH, 2,84 g de 6-Cloro HOBT, 2,42 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

En un recipiente aparte, se cargan 5,3 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Ile-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

Se cargan en un recipiente, 11,75 g de Fmoc-Gln(Trt)OH, 3,3 g de 6-Cloro HOBT, 2,84 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

En un recipiente aparte, se cargan 5,3 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Gln(Trt)OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

Se cargan en un recipiente, 5,45 g de Fmoc-Ala-OH, 3,3 g de 6-Cloro HOBT, 2,85 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

En un recipiente aparte, se cargan 6,18 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Ala-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

Se cargan en un recipiente, 11,75 g de Fmoc-Gln(Trt)OH, 3,2 g de 6-Cloro HOBT, 3,1 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

En un recipiente aparte, se cargan 7,9 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Gln(Trt)OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

Se cargan en un recipiente, 8,2 g de Fmoc-Glu(OtBu)OH, 3,2 g de 6-Cloro HOBT, 2,84 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

En un recipiente aparte, se cargan 6,18 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Glu(OtBu)OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

## ES 2 329 270 T3

Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

5 Se cargan en un recipiente, 5,83 g de Fmoc-Leu-OH, 2,8 g de 6-Cloro HOBT, 2,42 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

10 En un recipiente aparte, se cargan 5,3 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Leu-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

15 Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

20 Se cargan en un recipiente, 5,83 g de Fmoc-Leu-OH, 2,8 g de 6-Cloro HOBT, 2,42 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

25 En un recipiente aparte, se cargan 5,3 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Leu-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

30 Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

35 Se cargan en un recipiente, 5,14 g de Fmoc-Ala-OH, 2,8 g de 6-Cloro HOBT, 2,42 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

40 En un recipiente aparte, se cargan 5,3 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Ala-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

45 Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

50 Se cargan en un recipiente, 6,6 g de Fmoc-Thr(tBu)-OH, 2,8 g de 6-Cloro HOBT, 2,42 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

55 En un recipiente aparte, se cargan 5,3 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Tre(tBu)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

60 Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

65 Se cargan en un recipiente, 5,83 g de Fmoc-Ile-OH, 2,8 g de 6-Cloro HOBT, 2,42 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

## ES 2 329 270 T3

En un recipiente aparte, se cargan 5,3 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Ile-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

Se cargan en un recipiente, 7,73 g de Fmoc-Lys(Boc)-OH, 2,8 g de 6-Cloro HOBT, 2,42 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

En un recipiente aparte, se cargan 5,3 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Lys(Boc)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

Se cargan en un recipiente, 13,44 g de Fmoc-Gln(Trt)-OH, 3,73 g de 6-Cloro HOBT, 3,13 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

En un recipiente aparte, se cargan 7,06 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Gln(Trt)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina. Se cargan en un recipiente, 9,36 g de Fmoc-Glu(OtBu)-OH, 3,73 g de 6-Cloro HOBT, 3,13 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

En un recipiente aparte, se cargan 7,06 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Glu(OtBu)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

Se cargan en un recipiente, 11,6 g de Fmoc-Trp(Boc)-OH, 3,73 g de 6-Cloro HOBT, 3,13 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

En un recipiente aparte, se cargan 7,06 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Trp(Boc)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena

## ES 2 329 270 T3

el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

5 Se cargan en un recipiente, 9,36 g de Fmoc-Glu(OtBu)-OH, 3,73 g de 6-Cloro HOBT, 3,13 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

10 En un recipiente aparte, se cargan 7,06 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Glu(OtBu)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

15 Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

20 Se cargan en un recipiente, 13,44 g de Fmoc-Gln(Trt)-OH, 3,73 g de 6-Cloro HOBT, 3,13 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

25 En un recipiente aparte, se cargan 7,06 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Gln(Trt)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

30 Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

35 Se cargan en un recipiente, 11,6 g de Fmoc-Trp(Boc)-OH, 3,73 g de 6-Cloro HOBT, 3,13 g de DIEA y 113 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

40 En un recipiente aparte, se cargan 7,06 g de TBTU y 68 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Trp(Boc)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 50 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x150 mL de NMP.

45 Se cargan en el reactor 125 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 125 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x150 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

50 Se cargan en un recipiente, 5,62 g de anhídrido acético, 7,11 g de DIEA y 100 mL de NMP. Se mezcla la solución y se enfriá a 10°C. Se añade una solución de anhídrido acético enfriada al reactor de SPFS, se enjuaga el recipiente con 50 mL de NMP y se añade el lavado al reactor. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 1 hora. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 5x180 mL de NMP. Se lava el lecho de resina con 5x180 mL de DCM, 5x180 mL Isopropanol. Se seca al vacío la resina a 40±2°C.

55 Rendimiento: 57,83 g

### Ejemplo 3

60 *Escisión y purificación de Ac-AA(1-20)OH (Id. de Sec. N°:2) a partir de una resina en fase sólida*

65 Se carga al reactor de SPFS 30 g de la anterior resina construida y 300 mL de DCM. Se agita a temperatura ambiente durante alrededor de 5 minutos. Se drena el reactor y se repite el lavado de DCM una vez más. Se enfriá el reactor a -10±5°C.

Se prepara una solución de 6 mL de ácido trifluoroacético y 294 mL de DCM. Se enfriá la solución a 0±5°C.

## ES 2 329 270 T3

5 Se carga la solución enfriada de TFA en el reactor y se agita la solución durante 45 minutos a  $0\pm 5^\circ\text{C}$ . Se añaden 7,6 mL de piridina y se agita durante 5 minutos más a  $0\pm 5^\circ\text{C}$ . Se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 1x300 mL de DCM, y 6x200 mL de DCM a temperatura ambiente. Se lava la solución de DCM con 200 mL agua. Se concentra la solución de DCM a alrededor de 40 mL de volumen y se añaden 300 mL de Isopropanol. El DCM se elimina por destilación a 50 mm de vacío durante 4 horas. Se filtra el producto, se lava con 2x100 mL de Isopropanol (23 mL) y se seca al vacío a  $40\pm 2^\circ\text{C}$ .

Rendimiento: 14,1 g (54,1%). Se obtuvo una segunda cosecha de 7,85 g (30,1%) desde la solución madre.

10 10 Ejemplo 4

*Preparación de resina 2-CTC cargada con FmocTrp(Boc)*

15 15 Se realizó un proceso para preparar una resina 2-CTC cargada con FmocTrp(Boc).

El reactor de 1L con péptido purgado con nitrógeno, se carga con 40 g de resina 2-CTC y 400 mL de DCM. Se agita a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Mientras tanto, se carga en un recipiente de 1 L, 12,66 g de Fmoc-Trp(Boc)OH, 280 mL de DMF, 40 mL de DCM y 5,7 g DIEA. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos.

20 20 Se drena el DCM del reactor y se carga la solución preparada anteriormente de Fmoc-Trp(Boc)OH. Se agita la mezcla durante 2 horas a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  y se drena el reactor.

25 25 Se carga en el reactor, una mezcla de DIEA:MeOH (40:360 mL). Se agita el contenido a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  durante una hora y se drena el reactor.

Se lava el lecho de resina con 400 mL de DMF, 200 mL de DMF y 3x400 mL de DCM. Se comprueba el último lavado para el ensayo UV negativo.

30 30 Se lava el lecho de resina con 3x400 mL de NMP y Se cargan en el reactor 275 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a  $28\pm 2^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Se drena el reactor y se repite el paso durante otros 30 minutos. Se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 5x300 mL de NMP, 5x300 mL de DCM y 3x300 mL de Isopropanol. Se seca al vacío la resina a un peso constante a  $40\pm 2^\circ\text{C}$ .

35 35 Rendimiento: 47,4 g Análisis del factor de carga: 0,4 mmol/g

Ejemplo 5

40 40 *Síntesis en fase sólida del fragmento intermediario de Fmoc-AA(21-38)OH (Id. de Sec. N°:3) de T-1249*

En una cámara de SPFS, se cargan 20,0 g de resina 2-CTC H-Trp(Boc)-O- (Ejemplo 4) y 200 mL de DCM. Se agita la mezcla durante 30 minutos a  $30\pm 3^\circ\text{C}$ . Se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 3x120 mL de NMP.

45 45 Se cargan en un recipiente, 5,14 g de Fmoc-Glu(OtBu)OH, 2,1 g de 6-Cloro HOBT, 1,81 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

50 50 En un recipiente aparte, se cargan 3,88 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Glu(OtBu)OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a  $30\pm 3^\circ\text{C}$  durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x120 mL de NMP.

55 55 Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a  $30\pm 3^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a  $30\pm 3^\circ\text{C}$  durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

60 60 Se cargan en un recipiente, 6,33 g de Fmoc-Trp(Boc)OH, 2,04 g de 6-Cloro HOBT, 1,77 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

65 65 En un recipiente aparte, se cargan 3,86 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Trp(Boc)OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agitan las mezclas a  $30\pm 3^\circ\text{C}$  durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x120 mL de NMP.

## ES 2 329 270 T3

5 Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

10 5 Se cargan en un recipiente, 4,26 g de Fmoc-Leu-OH, 2,04 g de 6-Cloro HOBT, 1,81 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfria a 10°C.

15 10 En un recipiente aparte, se cargan 3,87 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfria a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Leu-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 3x120 mL de NMP.

20 15 Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

25 20 Se cargan en un recipiente, 4,62 g de Fmoc-Ser(tBu)-OH, 2,06 g de 6-Cloro HOBT, 1,8 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfria a 10°C.

30 25 En un recipiente aparte, se cargan 3,88 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfria a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Ser(tBu)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 3x120 mL de NMP.

35 30 Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

40 35 Se cargan en un recipiente, 3,75 g de Fmoc-Ala-OH, 2,05 g de 6-Cloro HOBT, 1,76 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfria a 10°C.

45 40 En un recipiente aparte, se cargan 3,89 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfria a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Ala-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 3x120 mL de NMP.

50 45 Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

55 50 Se cargan en un recipiente, 6,32 g de Fmoc-Trp(Boc)-OH, 2,06 g de 6-Cloro HOBT, 1,82 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfria a 10°C.

60 55 En un recipiente aparte, se cargan 3,87 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfria a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Trp(Boc)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x120 mL de NMP.

65 60 Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

65 65 Se cargan en un recipiente, 5,64 g de Fmoc-Lys(Boc)-OH, 2,06 g de 6-Cloro HOBT, 1,79 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfria a 10°C.

## ES 2 329 270 T3

En un recipiente aparte, se cargan 3,87 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Lys(Boc)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x120 mL de NMP.

Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 4x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

Se cargan en un recipiente, 4,95 g de Fmoc-Asp(OtBu)-OH, 2,09 g de 6-Cloro HOBT, 1,76 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

En un recipiente aparte, se cargan 3,88 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Asp(OtBu)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x120 mL de NMP.

Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agitan las mezclas a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

Se cargan en un recipiente, 4,25 g de Fmoc-Leu-OH, 2,09 g de 6-Cloro HOBT, 1,78 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

En un recipiente aparte, se cargan 3,86 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Leu-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x120 mL de NMP.

Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

Se cargan en un recipiente, 6,40 g de Fmoc-Lys(Boc)-OH, 2,33 g de 6-Cloro HOBT, 2,13 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

En un recipiente aparte, se cargan 4,41 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Lys(Boc)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x120 mL de NMP.

Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

Se cargan en un recipiente, 8,35 g de Fmoc-Gln(Trt)-OH, 2,33 g de 6-Cloro HOBT, 2,09 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

En un recipiente aparte, se cargan 4,38 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Gln(Trt)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x120 mL de NMP.

## ES 2 329 270 T3

Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

5 Se cargan en un recipiente, 4,83 g de Fmoc-Leu-OH, 2,33 g de 6-Cloro HOBT, 2,06 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfria a 10°C.

10 En un recipiente aparte, se cargan 4,37 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfria a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Leu-OH y se cargan estas soluciones al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 3x120 mL de NMP.

15 15 Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

20 20 Se cargan en un recipiente, 5,81 g de Fmoc-Glu(OtBu)-OH, 2,35 g de 6-Cloro HOBT, 2,08 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfria a 10°C.

25 25 En un recipiente aparte, se cargan 4,39 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfria a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Glu(OtBu)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x120 mL de NMP.

30 30 Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

35 35 Se cargan en un recipiente, 6,29 g de Fmoc-Tyr(OtBu)-OH, 2,33 g de 6-Cloro HOBT, 2,11 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfria a 10°C.

40 40 En un recipiente aparte, se cargan 4,39 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfria a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Tyr(OtBu)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 3x120 mL de NMP.

45 45 Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

50 50 Se cargan en un recipiente, 5,81 g de Fmoc-Glu(OtBu)-OH, 2,34 g de 6-Cloro HOBT, 2,06 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfria a 10°C.

55 55 En un recipiente aparte, se cargan 4,37 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfria a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Glu(OtBu)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x120 mL de NMP.

60 60 Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena el reactor. Se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

65 65 Se cargan en un recipiente, 8,13 g de Fmoc-Asn(Trt)-OH, 2,32 g de 6-Cloro HOBT, 2,17 g de DIEA y 54 mL de NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfria a 10°C.

## ES 2 329 270 T3

En un recipiente aparte, se cargan 4,37 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Asn(Trt)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización 5 de la reacción (Ensayo de Keiser). Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 4x120 mL de NMP.

Se cargan en el reactor 100 mL de piperidina al 20% en NMP y se agita a 30±3°C durante 30 minutos. Se drena el reactor y se cargan 100 mL de piperidina al 20% en NMP. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 30 minutos y se drena 10 el reactor. Se lava el lecho de resina con 4x120 mL de NMP. Se cogen muestras del último lavado para comprobar el nivel de piperidina mediante ensayo cualitativo de Ninhidrina.

Se cargan en un recipiente, 6,38 g de Fmoc-Lys(Boc)-OH, 2,33 g de 6-Cloro HOBT, 2,16 g de DIEA y 54 mL de 15 NMP. Se agita el contenido a temperatura ambiente para disolver los sólidos y después se enfriá a 10°C.

En un recipiente aparte, se cargan 4,39 g de TBTU y 32 mL de NMP. Se agita a temperatura ambiente para disolver los sólidos y se enfriá a 10°C. Se añade una solución enfriada de TBTU a la solución de Fmoc-Lys(Boc)-OH y se carga esta solución al reactor de SPFS. Se lava el recipiente con 24 mL de DCM y se carga el lavado en el reactor de SPFS. Se agita la mezcla a 30±3°C durante 3 horas. Se cogen muestras de las cuentas de resina para comprobar la finalización 20 de la reacción (Ensayo de Keiser). El ensayo de Keiser Kaiser mostró una reacción incompleta. El lecho de resina se trató con 2,83 g de Fmoc-Lys(Boc)OH, 1,04 g de 6-Cloro HOBT, 1,01 g de DIEA en 30 mL de NMP. Se añadió una solución de 1,94 g de TBTU en 22 mL de NMP y la mezcla se agitó durante otras 3 horas y se cogieron muestras. Una vez completada la reacción, se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 5x120 mL de NMP. Se lava el lecho de resina con 6x120 mL de DCM, 4x120 mL Isopropanol. Se seca al vacío la resina a 40±2°C.

25 Rendimiento: 46,77 g.

### Ejemplo 6

30 *Escisión y purificación de Fmoc-AA(21-38)OH (Id. de Sec. N°:3) a partir de una resina en fase sólida*

Escisión de Fmoc-Lys-Asn-Glu-Tyr-Glu-Leu-Gln-Lys-Leu-Asp-Lys-Trp-Ala-Ser-Leu-Trp-Glu-Trp-O-resina 2-CTC [Fragmento Fmoc-AA(21-38)O-resina 2-CTC]

35 Se carga al reactor de SPFS 200 mL de solución ácido trifluoroacético/DCM 2% v/v. Se enfriá la solución a 0±5°C y se añade 20,02 g de Fmoc-AA(21-38)-O-resina 2-CTC. Se agita la mezcla durante 45 minutos. Se añade 5,1 mL de piridina y se calienta la mezcla a temperatura ambiente. Se drena el reactor y se lava el lecho de resina con 7x100 mL de DCM. Se lavan los lavados combinados de DCM con 2x250 mL de agua. Se concentra la solución de DCM al vacío 40 a alrededor de volúmenes de 250 mL. Se añaden 250 mL de heptano y continúa la destilación hasta que se recogen otros 200 mL de destilado. Se añaden 250 mL de heptano y continúa la destilación hasta que el producto precipita. Se filtra el producto y se lava con 3x50 heptano. Se suspende la pasta húmeda en 250 mL de heptano, y se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se filtra el producto y se lava con 2x75 mL de heptano. El producto se seca al vacío.

45 Rendimiento: 12,34 g (89,8%)

### Ejemplo 7

50 *Síntesis de fase en solución de H-AA(21-39)NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:4)*

Los fragmentos intermediarios de T-1249 H-AA(21-39)NH<sub>2</sub> se prepararon mediante acoplamiento de fase en solución de PheNH<sub>2</sub> en Fmoc- AA(21-38)OH

55 La preparación de H-AA(21-39)NH<sub>2</sub> se llevó a cabo empezando con 3,00 g de Fmoc-AA(21-38)OH. Fmoc-AA (21-38) OH, como se describe en el Ejemplo 6, (3,00 g), PheNH<sub>2</sub>-HCl (0,74 g, 3,68 mmol, 1,3 eq.), y 6-cloro HOBT (0,96 g, 5,66 mmol, 2,0 eq.) se disolvieron en DMF (100 mL, 8,3 vol.). La solución se enfrió a -10°C y se añadió DIEA (1,4 mL, 7,92 mmol, 2,8 eq.) en DMF (5 mL, 3,6 vol.). Se añadió TBTU (1,2 g, 3,68 mmol, 1,3 eq.) en una porción seguida de enjuague con DMF (15 mL). la mezcla de reacción se agitó a -10°C durante la noche y se calentó a temperatura ambiente. La agitación continuó durante otras 4 horas. La terminación de la reacción se monitorizó mediante análisis por HPLC que mostró un resto de 0,4% de Fmoc-AA(21-38)OH de partida. Se añadió piperidina (1,23 mL, 14,43 mmol, 5,1 eq.) y la solución se agitó a 30°C durante 3 horas. La terminación de la eliminación de Fmoc se monitorizó mediante análisis de HPLC que mostró <1% Fmoc-AA(21-38)NH<sub>2</sub>. Se añadió agua (100 mL, 8,3 vol.) para precipitar el producto. El sólido se recogió mediante filtración por succión, se lavó con agua. Se secó durante la noche a temperatura ambiente proporcionando 11,85 g (101%, % AN HPLC).

## ES 2 329 270 T3

Los intermediarios Fmoc-AA(21-39)NH<sub>2</sub> se trataron con piperidina para eliminar el grupo protector Fmoc y el producto H-AA(21-39)NH<sub>2</sub> se aisló mediante filtración por succión. La pasta húmeda se suspendió en 1:1 EtOH:Agua durante 30 minutos. La filtración seguida por otra solución en 1:2 MTBE:Heptano y el secado proporcionó 2,67 g (90,7%) de H-AA(21-39)NH<sub>2</sub> con una pureza de 84,1% (AN HPLC).

5

Condiciones de HPLC:

Columna: Betabasic C-18, 150 x 4,6 mm, 3 µm, 150 Å

10

tasa de flujo: 1,5 mL/min

Detección: UV a 262 nM

15

Fase móvil: A: 0,15% TFA/agua

B: 0,05% TFA/ACN

C: 0,05% TFA/THF

20

Tiempo de retención: Aproximadamente 12 minutos

### Ejemplo 8

#### 25 *Síntesis de fase en solución de Ac-AA(1-39)NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:1)*

El producto final de T-1249 se preparó mediante acoplamiento de fase en solución de Ac-AA(1-20)OH con H-AA(21-39)NH<sub>2</sub>.

30

H-AA(21-39)NH<sub>2</sub> (2,07 g, 0,53 mmol, 1,2 eq.), Ac-AA(1-20)OH (2,0 g, 0,44 mmol, 1 eq.), y 6-cloro HOBT (0,15 g, 0,89 mmol, 2,0 eq.) se disolvieron en DMF (33 mL, 16 vol., 15 minutos). La solución se enfrió a 0±5°C y se añadieron DIEA (0,16 g, 1,3 mmol, 3,0 eq.) seguido por TBTU (0,018 g, 0,57 mmol, 1,3 eq.). Tras agitar a 0°C durante 1,5 horas, la solución se calentó a temperatura ambiente y se agitó hasta completar la reacción. Se añadió agua (40 mL) por goteo. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 0,8 horas y el producto se agitó mediante filtración por succión. El secado durante la noche a temperatura ambiente proporcionó 4,07 g (95,1%) de Ac-AA(1-39)NH<sub>2</sub> con una pureza de 72,1% (AN HPLC).

35

Condiciones de HPLC:

40 Columna: Betabasic C-18, 150 x 4,6 mm, 3 µm, 150 Å

45

Tasa de flujo: 1,5 mL/min

Detección: UV a 262 nM

50

Fase móvil: A: 0,15% TFA/agua

B: 0,05% TFA/ACN

C: 0,05% TFA/THF

Tiempo de retención: Aproximadamente 25 minutos

55

### Ejemplo 9

#### *Preparación de T-1249 mediante la desprotección de cadena lateral de Ac-AA(1-39)NH<sub>2</sub>*

60

Ac-AA(1-39)NH<sub>2</sub> (5,00 g) se disolvió en DCM (50 mL, 10 vol.) y se trató con 35 mL de una solución recién preparada de TFA:DTT:agua (35 mL TFA:2,52 g DTT:0,85 mL agua). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 6,5 horas y se enfrió a 0±5°C. Se añadió MTBE (150 mL) y se recogió el precipitado mediante filtración por succión. El polvo fino se suspendió en una solución de acetonitrilo (130 mL), DIEA (2,6 mL), ácido acético (1,91 mL) y agua (5,6 mL). La solución se agitó a 40°C durante la noche para permitir la descarboxilación de la cadena lateral indol de los triptófanos, se enfrió a temperatura ambiente y el producto se recogió mediante filtración por succión. El secado durante la noche en un horno de vacío a temperatura ambiente proporcionó 2,98 g (100,4%) de T-1249. La pureza de T-1249 fue del 61% (AN) y 42% (p./p.).

## ES 2 329 270 T3

Condiciones de HPLC:

Columna: Betabasic C-18, 150 x 4,6 mm, 3  $\mu$ m, 150  $\text{\AA}$

5 Tasa de flujo: 1,6 mL/min

Detección: UV a 220 nM

10 Fase móvil: A: 0,10% TFA en agua/0,075% TFA en ACN/MeOH, 55/41/0,4

B: 0,10% TFA en agua/0,075% TFA en ACN/MeOH, 42/54/0,4

C: 0,075% TFA en CAN

15 Tiempo de retención: Aproximadamente 9 minutos

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un péptido con la secuencia Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDK  
 5 WASLWEWF-NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:1) que comprende los pasos de:

(a) proporcionar un soporte de resina para la síntesis en fase sólida con la fórmula: Z-E-[SOP], en el que [SOP] es el soporte de resina, E es un residuo de ácido glutámico, y Z es el grupo protector NH<sub>2</sub>-terminal, y en el que Z-E está presente en [SOP] en un factor de carga de 0,5 o menos;

10 (b) acoplar los aminoácidos a Z-E-[SOP] para proporcionar Z-WQEWEQKITALLEQAQIQQE-[SOP];

(c) tratar Z-WQEWEQKITALLEQAQIQQE-[SOP] para proporcionar un producto de escisión Ac-WQEWEQKI  
 15 TALLEQAQIQQE-OH (Id. de Sec. N°:2); y

(d) utilizando Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE-OH (Id. de Sec. N°:2) para la síntesis de Ac-WQEWEQKITA  
 LLEQAQIQQEKNEYELQ-KLDKWASLWEWF-NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:1).

20 2. El método de la reivindicación 1 en el que el paso (a) [SOP] comprende grupos tritilo.

3. El método de la reivindicación 1 o 2 en el que el paso (a), [SOP] comprende grupos cloro-tritilo.

4. El método de las reivindicaciones 1 a 3 en el que Z es un grupo Fmoc.

25 5. El método de las reivindicaciones 1 a 4 en el que, en el paso (a), Z-E está presente en [SOP] en un factor de carga inferior a 0,5.

30 6. El método de las reivindicaciones 1 a 5 en el que, en el paso (a), Z-E está presente en [SOP] en un factor de carga entre 0,2 y 0,5.

7. El método de la reivindicación 1 en el que el paso (b), los aminoácidos están acoplados a Z-E-[SOP] en una cantidad entre 1 y 1,5 equivalentes.

35 8. El método de la reivindicación 1 en el que, en el paso (d), Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE-OH (Id. de Sec. N°:2) reacciona con un péptido con la secuencia HKNYEYLQKLDKWASLWEWF-NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:4); para proporcionar el péptido con la secuencia Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF-NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:1).

40 9. El método de la reivindicación 8 en el que H-KNEYELQKLDKWASLWEWF-NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:4) se forma haciendo reaccionar Z-KNEYELQKLDKWASLWEW-OH (Id. de Sec. N°:3) con fenilalaninamida.

10. Un método para preparar un péptido con la secuencia Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDK  
 WASLWEWF-NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:1) que comprende los pasos de

45 (a) proporcionar un soporte de resina para la síntesis en fase sólida con la fórmula: Z-W-[SOP], en el que [SOP] es el soporte de resina, W es un residuo de triptófano, y Z es un grupo protector NH<sub>2</sub>-terminal, y en el que Z-W está presente en [SOP] en un factor de carga de 0,5 o menos;

50 (b) acoplar los aminoácidos a Z-W-[SOP] para proporcionar Z-KNEYELQKLDK WASLWEW-[SOP];

(c) tratar Z-KNEYELQKLDK WASLWEW-[SOP] para proporcionar un producto de escisión Z-KNEYELQKLDK  
 WASLWEW-OH; y

55 (d) utilizar Z-KNEYELQKLDK WASLWEW-OH para la síntesis de WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQ  
 KLDKWASLWEWF (Id. de Sec. N°:1).

11. El método de la reivindicación 10 en el que, en el paso (d), Z-KNEYELQKLDK WASLWEW-OH (Id. de Sec. N°:3) reacciona con fenilalaninamida para formar H-KNEYELQKLDK WASLWEWF-NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:4).

60 12. El método de la reivindicación 11 en el que H-KNEYELQKLDK WASLWEWF-NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:4) reacciona con Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE-OH (Id. de Sec. N°:2) para proporcionar Ac-WQEWEQKITALLEQAQI  
 QQEKNEYELQKLDK WASLWEWF-NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:1).

# ES 2 329 270 T3

13. Un método para preparar un péptido con la secuencia Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDK WASLWEWF-NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:1) que comprende los pasos de:

5 (a) proporcionar un fragmento intermedio de péptido de las secuencias Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE-OH (Id. de Sec. N°:2) y Z-KNEYELQKLDKWASLWEW-OH (Id. de Sec. N°:3), en el que el fragmento intermedio de péptido ha sido sintetizado en un soporte sólido utilizando un factor de carga de 0,5 o menos;

10 (b) fase en solución, reaccionar el Z-KNEYELQKLDKWASLWEW-OH (Id. de Sec. N°:3) con un residuo de fenilalaninamida para proporcionar la secuencia H-KNEYELQKLDKWASLWEWF-NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:4); y

15 (c) fase en solución, reaccionar el Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQE-OH (Id. de Sec. N°:2) con el H-KNEYELQKLDKWASLWEWF-NE2 (Id. de Sec. N°:4) para proporcionar Ac-WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF-NH<sub>2</sub> (Id. de Sec. N°:1).

20 14. El método de la reivindicación 13 en el que, en el paso (a), en el que el fragmento intermedio de péptido se ha sintetizado en un soporte sólido utilizando un factor de carga inferior a 0,5.

25 15. El método de las reivindicaciones 13 o 14 en el que, en el paso (a), en el que el fragmento intermedio de péptido se ha sintetizado en un soporte sólido utilizando un factor de carga entre 0,2 y 0,5.

20 16. El método de la reivindicación 13 en el que en el paso (b), en el que el fragmento intermedio de péptido se ha sintetizado en un soporte sólido utilizando aminoácidos acoplados al soporte en una cantidad entre 1 y 1,5 equivalentes.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 329 270 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG  
5 <120> Síntesis mejorada utilizando Fragmentos intermediarios de péptido I  
<130> Caso 22971  
<150> US 60/640716  
<151> 2004-12-30  
10 <160> 4  
<170> PatentIn version 3,3  
<210> 1  
<211> 39  
15 <212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
20 <223> sintética  
  
<400> 1  
  
25       Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln Ala Gln  
      1               5                   10                   15  
  
30        Ile Gln Gln Glu Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp  
      20                   25                           30  
  
35        Ala Ser Leu Trp Glu Trp Phe  
      35  
  
40 <210> 2  
<211> 20  
45 <212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> sintética  
  
<400> 2  
  
50       Trp Gln Glu Trp Glu Gln Lys Ile Thr Ala Leu Leu Glu Gln Ala Gln  
      1               5                   10                   15  
  
55        Ile Gln Gln Glu  
      20  
  
60 <210> 3  
<211> 18  
65 <212> PRT  
<213> Artificial  
<220>  
<223> sintética

ES 2 329 270 T3

<400> 3

Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp  
1 5 10 15

5

Glu Trp

10 <210> 4

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> sintética

20 <400> 4

Ala Lys Asn Glu Tyr Glu Leu Gln Lys Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu  
1 5 10 15

25

Trp Glu Trp Phe  
20

30

35

40

45

50

55

60

65