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

(11) PI 0813858-3 B1

(22) Data do Depósito: 30/07/2008

(45) Data de Concessão: 17/09/2019

(54) Título: MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE UM PEPTÍDEO E DE UM GLICOPEPTÍDEO

(51) Int.Cl.: C07K 1/113; C07K 5/10; C07K 7/06; C08B 37/00; C07K 9/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 31/07/2007 JP 2007-199372.

(73) Titular(es): GLYTECH, INC..

(72) Inventor(es): YASUHIRO KAJIHARA; IZUMI SAKAMOTO; YURI NAMBU; KAZUHIRO FUKAE; HIROAKI ASAI.

(86) Pedido PCT: PCT JP2008063659 de 30/07/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/017154 de 05/02/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/01/2010

(57) Resumo: MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE PEPTÍDEO A presente invenção fornece um método para a produção de um peptídeo, caracterizado por compreender a conversão de um grupo -SH de um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui o grupo -SH em um grupo -OH, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c): (a) permitir que um grupo -SH em um peptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe; (b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e (c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b) .

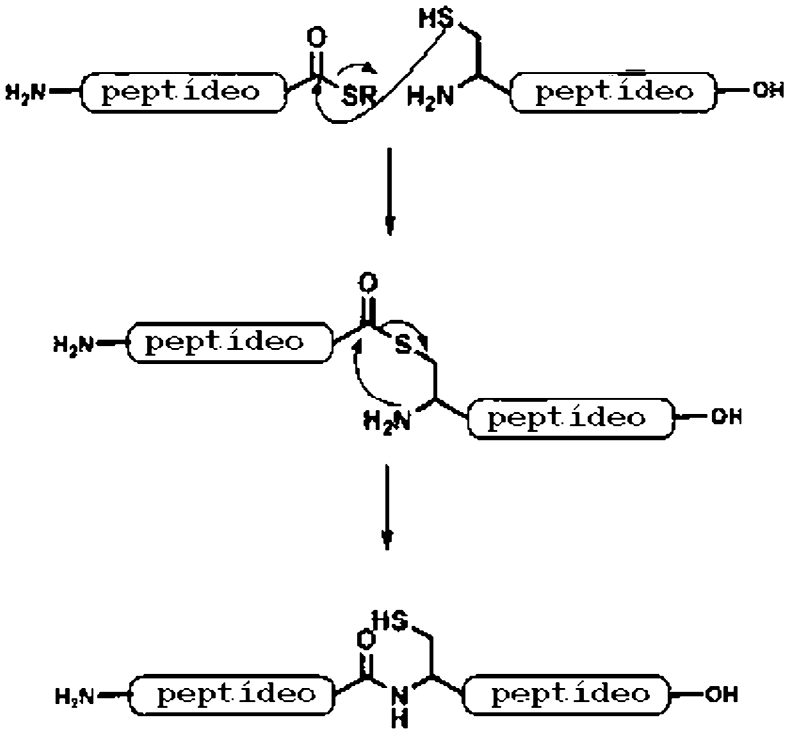
MÉTODOS PARA A PRODUÇÃO DE UM PEPTÍDEO E DE UM GLICOPEPTÍDEO

CAMPO DA TÉCNICA

A presente invenção está relacionada a um método para a produção de um peptídeo e de um glicopeptídeo.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

Como um método para a produção de um peptídeo, um método de ligação é útil. Entre esses métodos de ligação, um método de ligação química nativa (método de NCL) é um método capaz de produzir um peptídeo que possui a ligação amida natural (ligação peptídica) em um sítio de ligação. Esse método de NCL pode ser aplicado a duas cadeias peptídicas não protegidas. Esse método ficou conhecido como um método útil para a formação de uma ligação amida natural em um sítio de ligação (por exemplo, Documento de Patente 1). Como mostrado na figura abaixo, o método de NCL envolve a reação química seletiva entre um primeiro peptídeo que possui uma porção α-carboxitioéster em seu terminal C e um segundo peptídeo que possui um resíduo de cisteína em seu terminal N. Nessa reação, um grupo tiol (grupo SH, que também pode ser denominado um grupo sulfidrila) na cadeia lateral de cisteína reage seletivamente com um carbono de carbonil de um grupo tioéster e, em conseqüência de uma reação de troca de tiol, é gerado um intermediário inicial ligado ao tioéster. Esse intermediário rearranja intramolecularmente de forma voluntária para gerar uma ligação amida natural a um sítio de ligação. Ao mesmo tempo, o intermediário regenera tiol na cadeia lateral de cisteína. Com o uso dessa reação, tornou-se possível sintetizar eficientemente vários polipeptídeos.



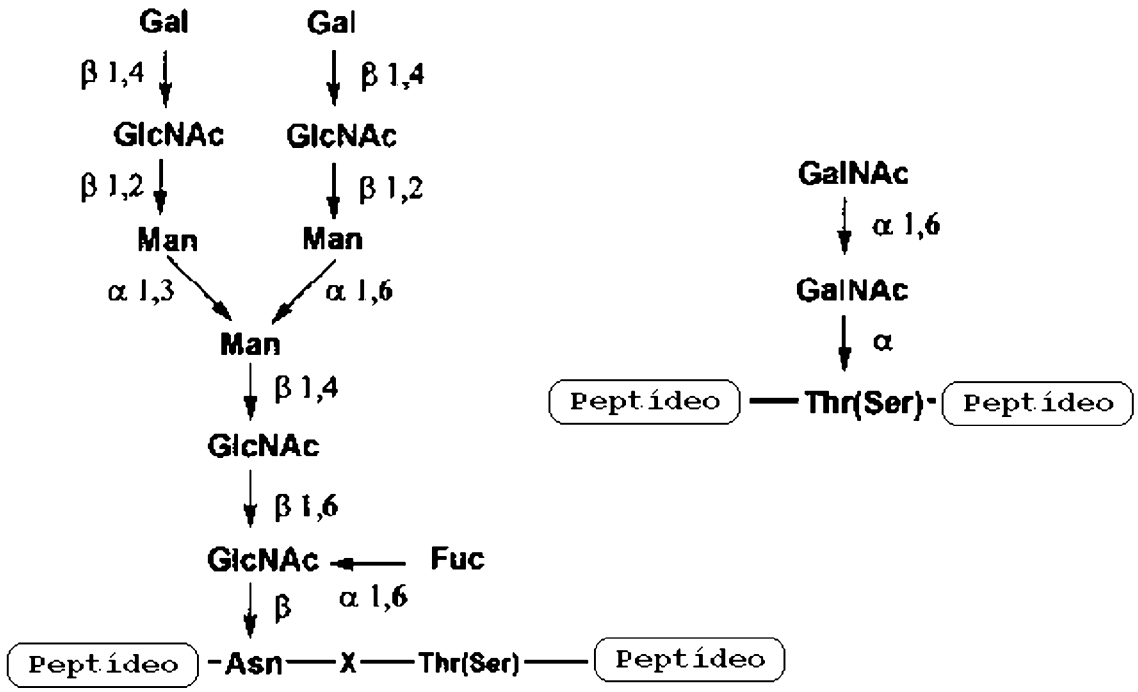
Método de ligação química nativa

A desvantagem principal de um método de NCL típico é que um dos dois fragmentos peptídicos a serem ligados deve ter um resíduo de cisteína em seu terminal N, e que um peptídeo obtido após ligação também deve ter um resíduo de cisteína no sítio de ligação nesse método. Conseqüentemente, quando um peptídeo desejado a ser sintetizado não contém um resíduo de cisteína, esse método não pode ser aplicado.

Além disso, em um método de NCL típico, dois ou mais fragmentos peptídicos a serem ligados são preparados por um método de síntese de fase sólida, por exemplo. Quando um peptídeo contém uma quantidade extremamente pequena de cisteína (ou não contém cisteína), como um peptídeo que existe em um corpo vivo, era necessário preparar um fragmento peptídico extremamente longo para ser submetido a

esse método de NCL. Dessa forma, não se pode dizer que esse é um método eficiente.

Por outro lado, sabe-se que vários glicopeptídeos e glicoproteínas estão presentes em um corpo vivo. As cadeias de açúcar desses glicopeptídeos ou glicoproteínas são classificadas de forma ampla em dois tipos; especificamente, cadeias de açúcar ligadas ao N e cadeias de açúcar ligadas ao O. A cadeia de açúcar ligada ao N é geralmente uma cadeia de açúcar que se liga ao nitrogênio de amida em uma cadeia lateral de asparagina por meio de uma ligação N-glicosídeo. Em geral, essa cadeia de açúcar ligada ao N freqüentemente se liga à Asn em uma seqüência de consenso -Asn-X-Ser/Thr- (em que X representa um aminoácido diferente de prolina) em um estado natural. A cadeia de açúcar ligada ao O é uma cadeia de açúcar que se liga a um grupo hidroxila em uma cadeia lateral de serina ou treonina por meio de uma ligação O-glicosídeo. Exemplos dessas cadeias de açúcar ligadas ao N e ligadas ao O serão fornecidos abaixo (Gal: galactose; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Man: manose; Fuc: fucose; GalNAc: N-acetilgalactosamina). Um glicopeptídeo natural que possui essa cadeia de açúcar ligada ao O sabidamente contém grandes quantidades de prolina, treonina e serina (Documentos Não Patentes 1 e 2).



Exemplos de cadeia de açúcar ligada ao N e de cadeia de açúcar ligada ao O

Documento de Patente 1: Publicação Internacional WO 96/34878

Documento Não Patente 1: *TRENDS in Biochemical Sciences*, Vol. 27, N° 3, Março de 2002

Documento Não Patente 2: *Cancer Biology & Therapy* 6: 4, 481-486, Abril de 2007

REVELAÇÃO DA INVENÇÃO

Problema técnico

É um objetivo da presente invenção fornecer um novo método para a produção de um peptídeo e de um glicopeptídeo.

Em particular, em um método convencional de NCL típico, um de dois fragmentos peptídicos a serem ligados deve ter um resíduo de cisteína em seu terminal N e, além disso, um peptídeo obtido após ligação também deve ter um

resíduo de cisteína no sítio de ligação. Dessa forma, o método de NCL deve ser projetado e aplicado com o uso de um resíduo de cisteína de um peptídeo (ou glicopeptídeo) desejado a ser finalmente obtido como um sítio de ligação. Dessa forma, a presente invenção fornece um novo método para a produção de um peptídeo e de um glicopeptídeo, que é capaz de projetar um método de ligação, em que não somente um resíduo de cisteína em um peptídeo desejado a ser obtido, mas também uma porção que corresponde a um resíduo de serina ou um resíduo de treonina, pode ser usado como um sítio de ligação.

Mais especificamente, em um aspecto da presente invenção, um resíduo de cisteína em um peptídeo (ou um glicopeptídeo) pode ser convertido em um resíduo de serina. Dessa forma, um peptídeo que possui um resíduo de cisteína em seu terminal N é ligado a outro peptídeo de acordo com o método de NCL e, portanto, esse resíduo de cisteína pode ser convertido em um resíduo de serina. Portanto, de acordo com a presente invenção, até mesmo se um resíduo de cisteína não existir em uma seqüência desejada a ser obtida, se um resíduo de serina existir no seu lugar, a posição do resíduo de serina pode ser projetada como um sítio de ligação no método de NCL.

Além disso, em um aspecto da presente invenção, um peptídeo que possui, em seu terminal N, um resíduo derivado de treonina que possui um grupo -SH em seu terminal N (ou um resíduo derivado de treonina que possui um grupo -SH que é protegido por uma ligação dissulfeto ou semelhante) é ligado a outro peptídeo de acordo com um método de ligação e, portanto, o resíduo derivado de treonina obtido pode ser

convertido em um resíduo de treonina. Portanto, de acordo com a presente invenção, até mesmo se um resíduo de cisteína não existir em uma seqüência desejada a ser obtida, se um resíduo de treonina existir no seu lugar, a posição do resíduo de treonina pode ser projetada como um sítio de ligação no método de ligação.

Dessa forma, a presente invenção fornece um novo método para a produção de um peptídeo e de um glicopeptídeo com o uso de um método de ligação, em que serina ou treonina que é abundante em glicopeptídeos pode ser projetada como um sítio de ligação no método de ligação.

Solução do problema

A fim de solucionar os problemas mencionados anteriormente, a presente invenção pode ter as seguintes características.

A presente invenção pode fornecer um método para a produção de um peptídeo, caracterizado por compreender a conversão de um grupo -SH de um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui o grupo -SH em um grupo -OH, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH em um peptídeo reaja com um agente de metilação;

(b) permitir que um grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização; e

(c) a modificação das condições de reação para que se tornem mais básicas do que as condições na etapa (b).

A presente invenção também pode fornecer um método para a produção de um peptídeo, caracterizado por compreender a conversão de um grupo -SH de um peptídeo que

compreende um resíduo de aminoácido que possui o grupo -SH em um grupo -OH, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH em um peptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b).

A presente invenção também pode fornecer um método para a produção de um peptídeo, caracterizado por compreender a conversão de um resíduo de cisteína de um peptídeo que compreende o resíduo de cisteína em um resíduo de serina, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

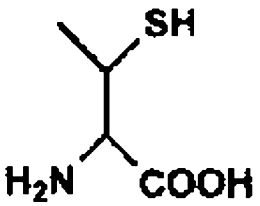
(a) permitir que um grupo -SH de um resíduo de cisteína em um peptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de serina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b).

A presente invenção também pode fornecer um método

para a produção de um peptídeo, caracterizado por compreender a conversão de um resíduo derivado de treonina A representado pela seguinte Fórmula (1) de um peptídeo que compreende o resíduo derivado de treonina A como um resíduo de aminoácido em um resíduo de treonina,



(1)

em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH de um resíduo derivado de treonina A em um peptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de treonina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b).

A presente invenção também pode fornecer um método para a produção de um peptídeo, caracterizado por compreender a conversão de um grupo -SMe de um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui o grupo -SMe em um grupo -OH, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (b) e (c):

(b) permitir que um grupo -SMe em um peptídeo reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário

da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b).

A presente invenção também pode fornecer um método para a produção de um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH, que compreende as seguintes etapas:

(o) a ligação de um primeiro peptídeo que contém, em seu terminal C, um resíduo de aminoácido em que um grupo carboxil é substituído com um grupo α-carboxitioéster representado pela fórmula -C(=O)-SR (em que R é selecionado de um grupo benzil, um grupo aril e um grupo alquil, que podem ser substituídos com substituintes), a um segundo peptídeo que contém, em seu terminal N, um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH de acordo com um método de ligação, para obter um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH;

(a) permitir que o grupo -SH no peptídeo obtido na etapa (o) reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b).

A presente invenção também pode fornecer um método

para a produção de um peptídeo que compreende um resíduo de serina, que compreende as seguintes etapas:

(o) a ligação de um primeiro peptídeo que contém, em seu terminal C, um resíduo de aminoácido em que um grupo carboxil é substituído com um grupo α-carboxitioéster representado pela fórmula -C(=O)-SR (em que R é selecionado de um grupo benzil, um grupo aril e um grupo alquil, que podem ser substituídos com substituintes), a um segundo peptídeo que contém, em seu terminal N, um resíduo de cisteína de acordo com um método de ligação, para obter um peptídeo que compreende um resíduo de cisteína;

(a) permitir que um grupo -SH do resíduo de cisteína no peptídeo obtido na etapa (o) reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de serina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b).

A presente invenção também pode fornecer um método para a produção de um peptídeo que compreende um resíduo de treonina, que compreende as seguintes etapas:

(o) a ligação de um primeiro peptídeo que contém, em seu terminal C, um resíduo de aminoácido em que um grupo carboxil é substituído com um grupo α-carboxitioéster representado pela fórmula -C(=O)-SR (em que R é selecionado de um grupo benzil, um grupo aril e um grupo alquil, que podem ser substituídos com substituintes), a um segundo

peptídeo que contém, em seu terminal N, um resíduo derivado de treonina de acordo com um método de ligação, para obter um peptídeo que compreende um derivado de treonina A representado pela Fórmula (1) mencionada anteriormente como um resíduo de aminoácido;

(a) permitir que um grupo -SH do resíduo derivado de treonina A no peptídeo obtido na etapa (o) reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de treonina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b).

A presente invenção também pode fornecer um método para a produção de um glicopeptídeo, caracterizado por compreender a conversão de um grupo -SH de um glicopeptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui o grupo -SH em um grupo -OH, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH em um glicopeptídeo reaja com um agente de metilação;

(b) permitir que um grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização; e

(c) a modificação das condições de reação para que se tornem mais básicas do que as condições na etapa (b).

A presente invenção também pode fornecer um método para a produção de um glicopeptídeo, caracterizado por

compreender a conversão de um grupo -SH de um glicopeptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui o grupo -SH em um grupo -OH, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH em um glicopeptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um glicopeptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b).

A presente invenção também pode fornecer um método para a produção de um glicopeptídeo, caracterizado por compreender a conversão de um resíduo de cisteína de um glicopeptídeo que compreende o resíduo de cisteína em um resíduo de serina, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH de um resíduo de cisteína em um glicopeptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um glicopeptídeo que compreende um resíduo de serina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b).

A presente invenção também pode fornecer um método para a produção de um glicopeptídeo, caracterizado por compreender a conversão de um resíduo derivado de treonina A representado pela Fórmula (1) mencionada anteriormente de um glicopeptídeo que compreende o resíduo derivado de treonina A como um resíduo de aminoácido em um resíduo de treonina, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH de um resíduo derivado de treonina A em um glicopeptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um glicopeptídeo que compreende um resíduo de treonina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b).

A presente invenção também pode fornecer um método para a produção de um glicopeptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH, que compreende as seguintes etapas:

(o) a ligação de um primeiro peptídeo ou glicopeptídeo que contém, em seu terminal C, um resíduo de aminoácido em que um grupo carboxil é substituído com um grupo α-carboxitioéster representado pela fórmula -C(=O)-SR (em que R é selecionado de um grupo benzil, um grupo aril e um grupo alquil, que podem ser substituídos com substituintes), a um segundo peptídeo ou glicopeptídeo que contém, em seu terminal N, um resíduo de aminoácido que

possui um grupo -SH de acordo com um método de ligação, desde que pelo menos um do primeiro peptídeo ou glicopeptídeo e de um segundo peptídeo ou glicopeptídeo seja um glicopeptídeo para obter um glicopeptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH;

(a) permitir que o grupo -SH no glicopeptídeo obtido na etapa (o) reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um glicopeptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b).

A presente invenção também pode fornecer um método para a produção de um glicopeptídeo que compreende um resíduo de serina, que compreende as seguintes etapas:

(o) a ligação de um primeiro glicopeptídeo cujo terminal C é representado pela seguinte fórmula:

-açúcar Asn-X-C(=O)-SR

(em que açúcar Asn representa uma asparagina com cadeia de açúcar adicionada, X representa uma porção diferente de um grupo carboxil de qualquer resíduo de aminoácido diferente de prolina, e R é selecionado de um grupo benzil, um grupo aril e um grupo alquil, que podem ser substituídos com substituintes), a um segundo peptídeo que contém um resíduo de cisteína em seu terminal N de acordo com um método de ligação para obter um glicopeptídeo

que contém um resíduo de cisteína;

(a) permitir que um grupo -SH do resíduo de cisteína no glicopeptídeo obtido na etapa (o) reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um glicopeptídeo que compreende um resíduo de serina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b).

A presente invenção também pode fornecer um método para a produção de um glicopeptídeo que compreende um resíduo de treonina, que compreende as seguintes etapas:

(o) a ligação de um primeiro glicopeptídeo cujo terminal C é representado pela seguinte fórmula:

-açúcar Asn-X-C(=O)-SR

(em que açúcar Asn representa uma asparagina com cadeia de açúcar adicionada, X representa uma porção diferente de um grupo carboxil de qualquer resíduo de aminoácido diferente de prolina, e R é selecionado de um grupo benzil, um grupo aril e um grupo alquil, que podem ser substituídos com substituintes), a um segundo peptídeo que contém um resíduo derivado de treonina em seu terminal N de acordo com um método de ligação para obter um glicopeptídeo que contém um derivado de treonina A representado pela Fórmula (1) mencionada anteriormente como um resíduo de aminoácido;

(a) permitir que um grupo -SH do resíduo derivado de treonina A no glicopeptídeo obtido na etapa (o) reaja com

um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um glicopeptídeo que compreende um resíduo de treonina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b).

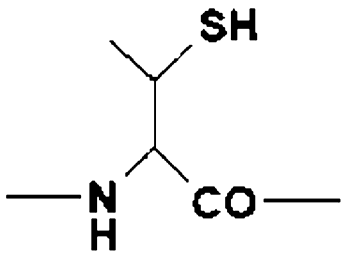
A presente invenção também pode fornecer um glicopeptídeo que possui uma estrutura representada pela seguinte fórmula:

-açúcar Asn-X-Y-

em que açúcar Asn representa uma asparagina com cadeia de açúcar adicionada,

X representa qualquer resíduo de aminoácido diferente de prolina, e

Y representa um resíduo derivado de treonina A representado pela Fórmula (2):



(2)

Em uma modalidade da presente invenção, o resíduo de metionina no peptídeo ou glicopeptídeo na etapa (a) ou na etapa (o) pode preferivelmente ser um resíduo de metionina protegido, e em que o método de produção preferivelmente ainda compreende a etapa seguinte (d), após a etapa (b) ou (c) e, particularmente, após a etapa (c), como desejado:

(d) a desproteção do resíduo de metionina protegido.

Em uma modalidade da presente invenção, o intermediário da reação obtido na etapa (b) pode preferivelmente estar em forma de éster.

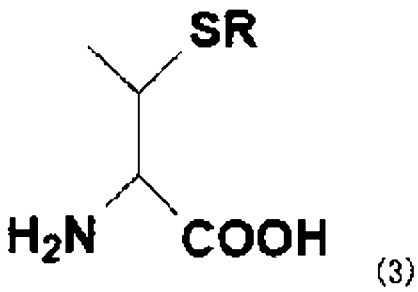
Em uma modalidade da presente invenção, a etapa (b) pode preferivelmente ser realizada sob condições acídicas e, particularmente, em pH 2 a 3.

Em uma modalidade da presente invenção, o agente de cianização usado na etapa (b) é preferivelmente brometo de cianogênio.

Em uma modalidade da presente invenção, a etapa (c) pode preferivelmente ser realizada sob condições básicas fracas, por exemplo, em pH 7 a 9 e, particularmente, em pH 7 a 8. Quando a etapa (c) é realizada sob condições básicas fracas, em uma modalidade, a etapa (c) pode preferivelmente ser realizada por aproximadamente 10 minutos ou mais e, particularmente, por aproximadamente 15 minutos ou mais (por exemplo, por aproximadamente 10 minutos a 30 horas e, particularmente, por aproximadamente 15 minutos a 30 horas).

Em uma modalidade da presente invenção, a etapa (c) pode preferivelmente ser realizada sob condições básicas fortes, por exemplo, em pH 9 a 13 e, particularmente, em pH 10 a 11. Quando a etapa (c) é realizada sob condições básicas fortes, em uma modalidade, a etapa (c) pode preferivelmente ser realizada por aproximadamente 1 hora ou menos e, particularmente, por aproximadamente 10 minutos ou menos (por exemplo, por aproximadamente 5 minutos a 1 hora e, particularmente, por aproximadamente 5 minutos a 10 minutos).

Em uma modalidade da presente invenção, quando um resíduo derivado de treonina está contido no terminal N do segundo peptídeo, o resíduo derivado de treonina mencionado anteriormente pode ser um resíduo de aminoácido de terminal N de um derivado de treonina representado pela seguinte Fórmula (3):



(3)

(em que R representa H ou um grupo de proteção para um grupo tiol que é facilmente desprotegido sob condições de uma reação de ligação, e esse R preferivelmente representa H ou um grupo dissulfeto).

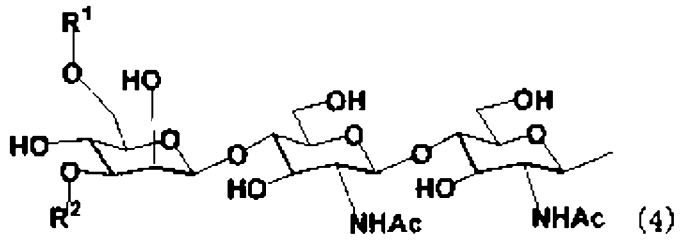
Em uma modalidade da presente invenção, um entre ou, mais especificamente, tanto o primeiro peptídeo (ou glicopeptídeo) quanto o segundo peptídeo (ou glicopeptídeo) preferivelmente podem não conter cisteína, ou contêm uma cisteína protegida.

Em uma modalidade da presente invenção, o primeiro peptídeo (ou glicopeptídeo) ou o segundo peptídeo (ou glicopeptídeo) pode preferivelmente ser um peptídeo (ou um glicopeptídeo) que possui 80 ou menos, preferivelmente 50 ou menos e, mais preferivelmente, 30 resíduos de aminoácidos ou menos.

Em uma modalidade da presente invenção, uma cadeia de açúcar em um glicopeptídeo pode preferivelmente ser uma cadeia de açúcar ligada ao N ou uma cadeia de açúcar ligada

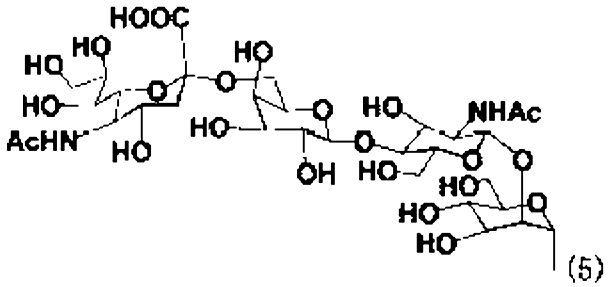
ao O.

Em uma modalidade da presente invenção, a cadeia de açúcar representada pela seguinte Fórmula (4) pode ser preferível como uma cadeia de açúcar.

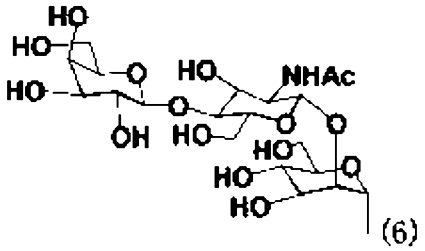


(4)

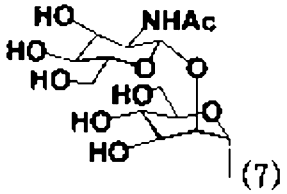
[em que cada um de R^1 e R^2 representa independentemente um átomo de hidrogênio ou um grupo representado por cada uma das Fórmulas (5) a (8)].



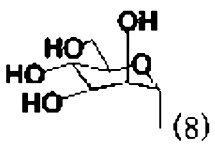
(5)



(6)



(7)



(8)

Em uma modalidade da presente invenção, o método de produção pode preferivelmente ainda compreender uma etapa de adição de uma cadeia de açúcar após a etapa (c) ou a etapa (d).

Em uma modalidade, todas as ligações amida no peptídeo ou glicopeptídeo obtido pelo método de produção da presente invenção podem preferivelmente ser ligações amida naturais. Em uma modalidade, todos os aminoácidos constitutivos do peptídeo ou glicopeptídeo obtido pelo método de produção da presente invenção podem preferivelmente ser aminoácidos que existem como aminoácidos constitutivos de um peptídeo ou glicopeptídeo em um corpo vivo.

Efeitos vantajosos da invenção

De acordo com o método para a produção de um peptídeo da presente invenção, um grupo -SH de um peptídeo que possui esse grupo -SH pode ser convertido em um grupo -OH. Além disso, um grupo -SH de um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui esse grupo -SH, que é obtido por ligação de um primeiro peptídeo que possui uma porção α-carboxitioéster representada por -C(=O)-SR em seu terminal C a um segundo peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH em seu terminal N de acordo com um método de ligação, pode ser convertido em um grupo -OH. Esses métodos também podem ser aplicados aos glicopeptídeos.

Dessa forma, de acordo com o método para a produção de um peptídeo da presente invenção, um resíduo de cisteína em um peptídeo pode ser convertido em um resíduo de serina. Como resultado, até mesmo se um resíduo de cisteína não

existir em uma seqüência desejada a ser obtida, se um resíduo de serina existir no seu lugar, o método de NCL poderá ser aplicado.

Além disso, a presente invenção também fornece um método de ligação em que um derivado de treonina que possui um grupo -SH é usado como um sítio de ligação. Na medida em que um resíduo derivado de treonina que possui um grupo -SH em um peptídeo obtido por esse método de ligação pode ser convertido em um resíduo de treonina, torna-se possível aplicar um método de ligação com o uso de um resíduo de treonina como um sítio de ligação à produção de um peptídeo que possui treonina.

A cisteína, que foi usada como um sítio de ligação no método de ligação química nativa convencional está presente em uma pequena quantidade em um peptídeo que existe em um corpo vivo. De acordo com o método da presente invenção, serina e treonina, que existem em grandes quantidades em um peptídeo e, particularmente, em um glicopeptídeo que existe em um corpo vivo, podem ser projetadas como novos sítios de ligação em um método de ligação.

Além disso, o método mencionado anteriormente é aplicado a um glicopeptídeo e, particularmente, a um glicopeptídeo que possui uma cadeia de açúcar ligada ao O que contém grandes quantidades de serina e treonina, ou um glicopeptídeo que possui uma cadeia de açúcar ligada ao N que possui, como uma seqüência de consenso, a seqüência -açúcar Asn-X-Ser- ou -açúcar Asn-X-Thr (em que o açúcar Asn representa uma asparagina com cadeia de açúcar adicionada, e X representa qualquer resíduo de aminoácido diferente de prolina) para produzir, com a utilização de um método de

ligação, um glicopeptídeo que possui uma cadeia de açúcar ligada ao N ou uma cadeia de açúcar ligada ao O, que possui a mesma estrutura que aquela de um glicopeptídeo natural.

MELHOR MODO PARA REALIZAR A INVENÇÃO

Em um primeiro aspecto, a presente invenção está relacionada à submissão de um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH às seguintes etapas de (a) a (c) para obter um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH:

(a) permitir que um grupo -SH em um peptídeo reaja com um agente de metilação;

(b) permitir que um grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização; e

(c) a modificação das condições de reação para que se tornem mais básicas do que as condições na etapa (b).

As etapas (a) a (c) descritas acima são mais especificamente as seguintes etapas:

(a) permitir que um grupo -SH em um peptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b).

Em um segundo aspecto, a presente invenção está relacionada à realização das seguintes etapas:

ligação de um primeiro peptídeo que contém, em seu

terminal C, um resíduo de aminoácido em que um grupo carboxil é substituído com um grupo α-carboxitioéster representado pela fórmula -C(=O)-SR (em que R é selecionado de um grupo benzil, um grupo aril e um grupo alquil, que podem ser substituídos com substituintes), a um segundo peptídeo que contém, em seu terminal N, um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH de acordo com um método de ligação, para obter um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH; e

etapas que incluem as etapas (a) a (c) descritas acima para obter um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH.

Em um terceiro aspecto, a presente invenção está relacionada à submissão de um glicopeptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH às etapas que incluem as etapas (a) a (c) descritas acima para obter um glicopeptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH.

Em um quarto aspecto, a presente invenção está relacionada à realização das seguintes etapas:

a ligação de um primeiro glicopeptídeo cujo terminal C é representado pela seguinte fórmula:

-açúcar Asn-X-C(=O)-SR

(em que açúcar Asn representa uma asparagina com cadeia de açúcar adicionada, X representa uma porção diferente de um grupo carboxil de qualquer resíduo de aminoácido diferente de prolina, e R é selecionado de um grupo benzil, um grupo aril e um grupo alquil, que podem ser substituídos com substituintes), a um segundo peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo

-SH em seu terminal N de acordo com um método de ligação para obter um glicopeptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH; e

etapas que incluem as etapas (a) a (c) descritas acima para obter um glicopeptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH.

No presente pedido, o "peptídeo" não é particularmente limitado, desde que dois ou mais aminoácidos se liguem uns aos outros por meio de uma ligação amida. Dessa forma, o termo "peptídeo" é aqui usado para incluir um peptídeo conhecido, um novo peptídeo e uma forma modificada do peptídeo. Na presente invenção, aqueles geralmente citados como proteínas também estão incluídos no termo "peptídeo". Em um aspecto preferido, em um peptídeo (ou um glicopeptídeo) obtido pelo método de produção da presente invenção, dois ou mais aminoácidos se ligam uns aos outros por meio da mesma ligação amida (ligação peptídica) que a de um peptídeo ou glicopeptídeo natural.

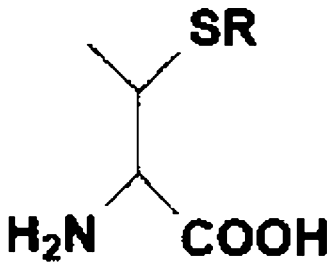
No presente pedido, o termo "forma modificada do peptídeo" é usado para significar um composto obtido modificando-se natural ou artificialmente um peptídeo. Exemplos dessa modificação incluem alquilação, acilação (por exemplo, acetilação), amidação (por exemplo, amidação do terminal C de um peptídeo), carboxilação, esterificação, a formação de uma ligação dissulfeto, glicosilação, lipidação, fosforilação, hidroxilação e a ligação de uma substância de marcação, todas sendo realizadas no mesmo resíduo ou em múltiplos resíduos de aminoácidos de um peptídeo.

No presente pedido, o termo "aminoácido" é usado em

seu sentido mais amplo. Dessa forma, no presente pedido, o termo "aminoácido" inclui não apenas aminoácidos naturais, tais como serina (Ser), asparagina (Asn), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), alanina (Ala), tirosina (Tyr), glicina (Gly), lisina (Lys), arginina (Arg), histidina (His), ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), glutamina (Gln), treonina (Thr), cisteína (Cys), metionina (Met), fenilalanina (Phe), triptofano (Trp) e prolina (Pro), mas também aminoácidos não naturais, tais como mutantes e derivados de aminoácido. Levando-se em consideração essas definições mais amplas, aqueles habilitados na técnica compreenderiam que o aminoácido no presente pedido inclui, por exemplo: L-aminoácidos; D-aminoácidos; aminoácidos modificados quimicamente, tais como mutantes e derivados de aminoácido; aminoácidos que não se tornam materiais constituintes para proteínas em um corpo vivo, por exemplo, norleucina, β-alanina e ornitina; e compostos sintetizados quimicamente que possuem propriedades de aminoácido conhecidas por aqueles habilitados na técnica. Exemplos de um aminoácido não natural incluem α-metilaminoácidos (α-metilalanina etc.), D-aminoácidos, aminoácidos histidina-*like* (2-amino-histidina, β-hidróxi-histidina, homohistidina, α-fluormetil-histidina, α-metil-histidina etc.), aminoácidos que possuem metileno excessivo em sua cadeia lateral ("homo" aminoácidos), aminoácidos cujo grupo funcional de ácido carboxílico na cadeia lateral é substituído com um grupo de ácido sulfônico (ácido cistéico etc.), bem como um derivado de treonina A, como descrito em detalhe abaixo.

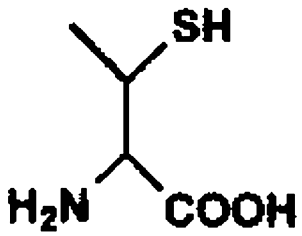
No presente pedido, o termo "derivado de treonina" é

usado para significar um composto representado pela seguinte Fórmula (3):



(3)

Na Fórmula (3), R representa H ou um grupo de proteção para um grupo tiol que é facilmente desprotegido sob condições de uma reação de ligação, e esse R preferivelmente representa H ou um grupo dissulfeto. Em particular, um composto representado pela Fórmula (1) a seguir, em que R é H na Fórmula (3) acima, é denominado um derivado de treonina A.



(1)

O derivado de treonina de Fórmula (3) é um composto no qual uma porção de grupo -OH de treonina é um grupo -SH. Esse derivado de treonina inclui aqueles que possuem todos os tipos de configurações. No método de produção da presente invenção, considera-se que ocorra a inversão de espaço quando um grupo -SH de um resíduo de aminoácido em um peptídeo é convertido em um grupo -OH. Dessa forma, particularmente quando deve ser obtida treonina existente na natureza, pode preferivelmente ser usado um derivado de treonina que possui um grupo -SR cuja configuração é

invertida com relação a um grupo -OH da treonina existente na natureza.

O derivado de treonina mencionado anteriormente pode ser obtido pelo método seguinte, em relação aos exemplos e aos exemplos de síntese descritos posteriormente, por exemplo.

Primeiro, é preparada uma treonina que compreende um grupo amino e um grupo carboxil que foram protegidos. Os tipos desses grupos de proteção não são particularmente limitados, desde que um peptídeo de interesse possa ser obtido na reação subseqüente. Por exemplo, pode ser usada uma treonina com um grupo amino protegido por um grupo Boc e um grupo carboxil protegido por um grupo TMSE (trimetilsililetil). A seguir, o grupo hidroxila na posição β é mesilado por um método conhecido. Subseqüentemente, usando DBU e ácido tioacético, por exemplo, esse grupo mesila é substituído em um grupo tioacetil (veja D. Crich *e cols.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 10064 (2007)).

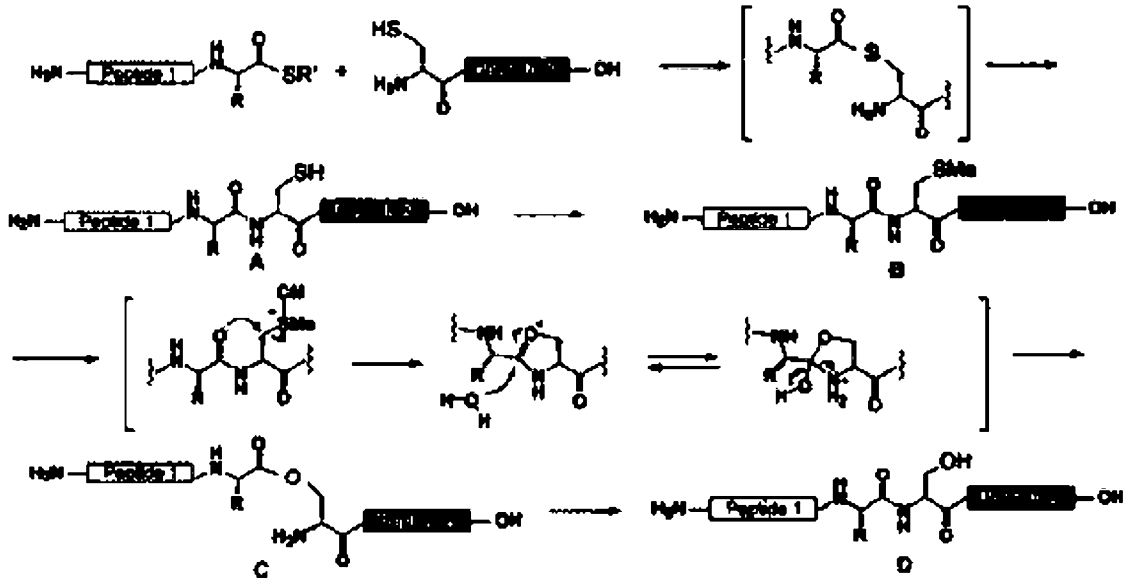
De acordo com um método conhecido, esse grupo tioacetil é convertido em um grupo tiol protegido por um grupo de proteção conhecido por aqueles habilitados na técnica, por exemplo, um grupo dissulfeto, um grupo acetamidametil, um grupo nitrobenzil ou um grupo tritil. Por exemplo, quando o grupo tioacetil é convertido em um grupo tiol protegido por um grupo dissulfeto, o Exemplo de Síntese 1, como descrito posteriormente, pode ser usado como uma referência. O grupo dissulfeto é facilmente desprotegido sob as condições de reação para o método de ligação subseqüente.

Em um aspecto preferido, o peptídeo (ou glicopeptídeo)

obtido pelo método de produção da presente invenção consiste em aminoácidos que estão presentes como aminoácidos constitutivos do peptídeo (ou glicopeptídeo) em um corpo vivo. Além disso, em um aspecto da presente invenção, o peptídeo obtido pelo método de produção da presente invenção é preferivelmente um peptídeo que não contém um resíduo de cisteína ou contém pequenas quantidades de resíduos de cisteína nos aminoácidos constitutivos. Além disso, em um aspecto da presente invenção, o peptídeo obtido pelo método de produção da presente invenção possui 80 ou menos, preferivelmente 50 ou menos e, mais preferivelmente, 30 resíduos de aminoácidos ou menos entre qualquer resíduo de serina ou resíduo de treonina e o resíduo de serina ou resíduo de treonina seguinte, ou o terminal N ou o terminal C. Por exemplo, em um aspecto da presente invenção, o peptídeo obtido pelo método de produção da presente invenção possui um ou mais resíduos de serina ou resíduos de treonina em 5 a 40 resíduos de aminoácidos e, preferivelmente, em 20 a 30 resíduos de aminoácidos.

No presente pedido, o termo "intermediário da reação" é usado para significar todos os compostos produzidos no período entre a reação de um grupo -SMe em um peptídeo com um agente de cianização e a conversão subseqüente do grupo -SMe em um grupo -OH, em um sentido amplo. O esquema de reação da presente invenção é considerado como sendo o esquema 1 seguinte. No esquema 1, a forma de éster representada por C também é um intermediário da reação na presente invenção. O presente pedido contém o "peptídeo-OH" de descrição no esquema 1 seguinte, por exemplo. Esse "-OH"

significa o -OH do Grupo carboxil do Terminal C do peptídeo, a menos que especificado de forma diferente.



Esquema 1

No presente pedido, o termo "glicopeptídeo" não é particularmente limitado, desde que seja um composto formado por adição de pelo menos uma cadeia de açúcar ao peptídeo mencionado anteriormente. O glicopeptídeo inclui glicopeptídeos conhecidos e novos glicopeptídeos. Aqueles geralmente denominados glicoproteínas também são incluídos no glicopeptídeo da presente invenção.

Em um aspecto preferido, o glicopeptídeo obtido pelo método de produção da presente invenção é um peptídeo que possui uma cadeia de açúcar ligada ao N ou uma cadeia de açúcar ligada ao O. Exemplos desse glicopeptídeo incluem uma parte ou todos os peptídeos como, por exemplo, eritropoietina, interleucina, interferon-β, um anticorpo e uma proteína-3 do fator quimiotático de monócito (MCP-3).

Em um aspecto da presente invenção, o glicopeptídeo obtido pelo método de produção da presente invenção possui

80 ou menos, preferivelmente 50 ou menos e, mais preferivelmente, 30 resíduos de aminoácidos ou menos entre qualquer resíduo de serina ou resíduo de treonina ao qual a cadeia de açúcar não é adicionada e o resíduo de serina ou resíduo de treonina seguinte, ou o terminal N ou o terminal C, ao qual a cadeia de açúcar não é adicionada. Por exemplo, em um aspecto da presente invenção, o glicopeptídeo obtido pelo método de produção da presente invenção possui um ou mais resíduos de serina ou resíduos de treonina em 5 a 40 resíduos de aminoácidos e, preferivelmente, em 20 a 30 resíduos de aminoácidos.

No caso de um glicopeptídeo desse tipo, uma cadeia de açúcar pode se ligar a um resíduo de aminoácido no peptídeo, diretamente ou por meio de um vinculador. O sítio de ligação de uma cadeia de açúcar e um aminoácido não é particularmente limitado. Um aminoácido preferivelmente se liga ao terminal redutor de uma cadeia de açúcar.

O tipo de um aminoácido ao qual uma cadeia de açúcar se liga não é particularmente limitado. Uma cadeia de açúcar pode se ligar a um aminoácido natural ou a um aminoácido não natural. Considerando que o presente glicopeptídeo deve ter uma estrutura idêntica ou similar àquela de um glicopeptídeo (glicoproteína) que existe em um corpo vivo, uma cadeia de açúcar preferivelmente se liga à Asn, como no caso de uma cadeia de açúcar ligada ao N, ou à Ser ou Thr, como no caso de uma cadeia de açúcar ligada ao O. Em particular, no caso de uma cadeia de açúcar ligada ao N, o glicopeptídeo obtido pelo método de produção da presente invenção preferivelmente possui uma estrutura (-açúcar Asn-X-Thr/Ser-) na qual uma cadeia de açúcar se liga

à Asn, um aminoácido (X) diferente de prolina se liga no lado do Terminal C da Asn por meio de uma ligação amida (ligação peptídica) e, além disso, Thr ou Ser se liga no lado do Terminal C do X por meio de uma ligação amida (ligação peptídica).

Quando uma cadeia de açúcar se liga a um aminoácido por meio de um vinculador, considerando-se a propriedade de se ligar facilmente ao vinculador, aminoácidos preferidos aos quais a cadeia de açúcar se liga incluem: um aminoácido que possui dois ou mais grupos carboxil em sua molécula, por exemplo, ácido aspártico ou ácido glutâmico; um aminoácido que possui dois ou mais grupos amino em sua molécula, por exemplo, lisina, arginina, histidina ou triptofano; um aminoácido que possui um grupo hidroxila em sua molécula, por exemplo, serina, treonina ou tirosina; um aminoácido que possui um grupo tiol em sua molécula, por exemplo, cisteína; e um aminoácido que possui um grupo amida em sua molécula, por exemplo, asparagina ou glutamina. Em particular, considerando-se a reatividade, ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, arginina, serina, treonina, cisteína, asparagina e glutamina são preferíveis.

Quando uma cadeia de açúcar se liga a um aminoácido por meio de um vinculador em um glicopeptídeo, vinculadores que foram amplamente usados no presente campo podem ser aqui usados vinculadores. Exemplos desses vinculadores incluem:

$-NH-(CO)-(CH_2)_a-CH_2-$

(em que a é um número inteiro, que não é particularmente limitado, a menos que interfira com a função vinculadora de interesse, e é preferivelmente um

número inteiro de 0 a 4);

C_{1-10} polimetileno; e

$-CH_2-R^3-$

(em que R^3 representa um grupo produzido por dissociação de um único átomo de hidrogênio de um grupo selecionado do grupo que consiste em alquil, alquil substituído, alquenil, alquenil substituído, alquinil, alquinil substituído, aril, aril substituído, um grupo carbocíclico, um grupo carbocíclico substituído, um grupo heterocíclico e um grupo heterocíclico substituído).

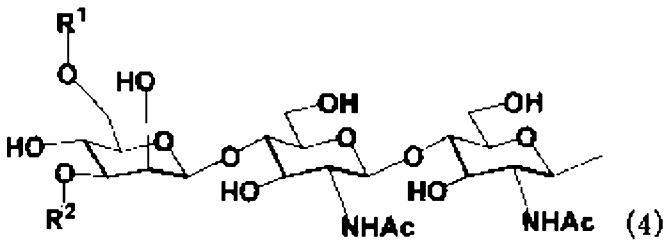
No presente pedido, o termo "cadeia de açúcar" inclui não apenas um composto formado por conexão de duas ou mais unidades de açúcares (monossacarídeos e/ou os seus derivados), mas também um composto que consiste em uma única unidade de açúcar (um monossacarídeo e/ou o seu derivado). Exemplos dessa cadeia de açúcar incluem uma ampla gama de cadeias de açúcar, incluindo: monossacarídeos e polissacarídeos presentes em um corpo vivo (glicose, galactose, manose, fucose, xilose, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido siálico, e o complexo e derivado deste); e cadeias de açúcar decompostas ou induzidas a partir de biomoléculas complexas como, por exemplo, polissacarídeo decomposto, uma glicoproteína, um proteoglicano, um glicosaminoglicano e um glicolipídeo. No entanto, os exemplos não se limitam e esses. Quando duas ou mais unidades de açúcares são conectadas entre elas, uma unidade de açúcar se liga a outra unidade de açúcar em conseqüência da condensação da desidratação em função de uma ligação glicosídica. Uma cadeia de açúcar pode ser do tipo linear ou do tipo ramificada.

Além disso, no presente pedido, também são incluídos derivados da cadeia de açúcar na "cadeia de açúcar". Exemplos desses derivados da cadeia de açúcar incluem: um açúcar que constitui uma cadeia de açúcar, que possui um grupo carboxil (por exemplo, ácido aldônico cuja posição C-1 foi oxidada em ácido carboxílico (por exemplo, ácido D-glucônico que pode ser obtido por oxidação de D-glicose), e ácido urônico, cujo átomo C no terminal foi convertido em ácido carboxílico (ácido D-glicurônico que pode ser obtido por oxidação de D-glicose)); um açúcar que possui um grupo amino ou um derivado deste (por exemplo, um grupo amino acetilado) (por exemplo, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina etc.); um açúcar que possui tanto um grupo amino quanto um grupo carboxil (por exemplo, ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico), ácido N-acetil murâmico etc.); um açúcar desóxi (por exemplo, 2-desóxi-D-ribose); um açúcar sulfatado que contém um grupo sulfato; e um açúcar fosforilado que contém um grupo fosfato. No entanto, os exemplos não se limitam e esses.

A cadeia de açúcar da presente invenção é preferivelmente uma cadeia de açúcar que existe como um carboidrato complexo em um corpo vivo (um glicopeptídeo (ou uma glicoproteína), um proteoglicano, um glicolipídeo etc.). A presente cadeia de açúcar é preferivelmente uma cadeia de açúcar ligada ao N, uma cadeia de açúcar ligada ao O, ou semelhante, que se liga como um glicopeptídeo (ou uma glicoproteína) a um peptídeo (ou uma proteína) em um corpo vivo. Em uma glicopeptídeo de ligação de cadeia de açúcar ligada ao O, N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), xilose, fucose, e semelhantes

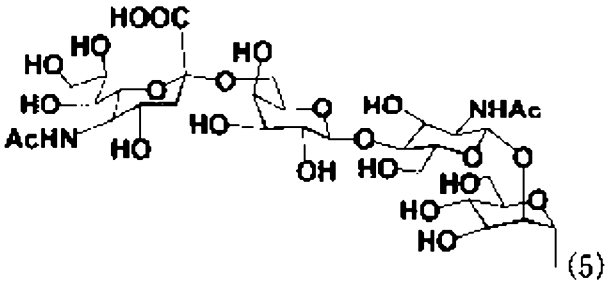
se ligam à Ser ou Thr de um peptídeo por meio de uma ligação O-glicosídica, e uma cadeia de açúcar é ainda adicionada a esse corpo ligado. Exemplos de uma cadeia de açúcar ligada ao N incluem uma manose do tipo superior, uma do tipo complexa e uma do tipo híbrida. Destas, uma do tipo complexa é preferível.

Na presente invenção, uma cadeia de açúcar preferida é a cadeia de açúcar representada pela seguinte Fórmula (4), por exemplo:

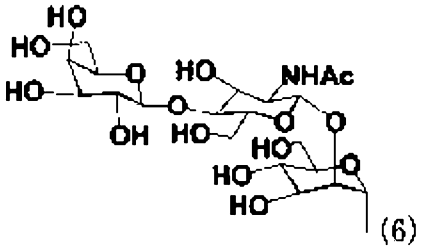


(4)

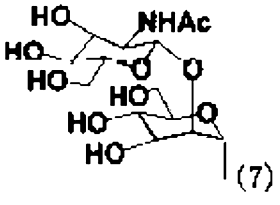
[em que cada um de R^1 e R^2 representa independentemente um átomo de hidrogênio ou um grupo representado por cada uma das Fórmulas (5) a (8)].



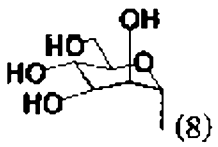
(5)



(6)



(7)



(8)

A fim de evitar problemas, por exemplo, antigenicidade, que podem ocorrer quando o método para a produção de um glicopeptídeo da presente invenção é aplicado no campo da produção de produtos farmacêuticos e semelhantes, exemplos de uma cadeia de açúcar preferida usada incluem: uma cadeia de açúcar que possui uma estrutura idêntica àquela de uma cadeia de açúcar que existe como uma glicoproteína que se liga a uma proteína em um corpo humano (que possui os mesmos tipos de açúcares constituintes e as mesmas formas de ligação) (por exemplo, a cadeia de açúcar descrita em *FEBS LETTERS* Vol. 50, N° 3, Fevereiro de 1975); e uma cadeia de açúcar formada por perda de um ou de múltiplos açúcares do terminal não redutor da cadeia de açúcar mencionada anteriormente.

O número de cadeias de açúcar adicionadas a um glicopeptídeo não é particularmente limitado, desde que seja de 1 ou mais. Do ponto de vista da produção de um glicopeptídeo que possui uma estrutura similar àquela de um glicopeptídeo que existe em um corpo vivo, o número de cadeias de açúcar adicionadas é mais preferivelmente quase o mesmo que aquele de um glicopeptídeo que existe em um corpo.

Em um aspecto preferido da presente invenção, as estruturas de cadeias de açúcar nos glicopeptídeos da

presente invenção são uniformes. No presente pedido, uma expressão como "as estruturas de cadeias de açúcar nos glicopeptídeos são uniformes" significa que, quando é feita uma comparação entre glicopeptídeos, os locais de adição de cadeias de açúcar, os tipos de açúcares que constituem as cadeias de açúcar, uma ordem de ligação e a forma de ligação de um açúcar são idênticos entre eles, e que as estruturas de cadeias de açúcar são uniformes em uma percentagem de pelo menos 90% ou mais, preferivelmente 95% ou mais e, mais preferivelmente, 99% ou mais. Glicopeptídeos que possuem cadeias de açúcar uniformes são da mesma qualidade, e esses glicopeptídeos são usados preferivelmente, em particular, no campo da produção de produtos farmacêuticos, ensaios, e semelhantes.

Um peptídeo usado como matéria-prima no método de produção da presente invenção pode ser produzido por aplicação de métodos de produção de peptídeos conhecidos por aqueles habilitados na técnica, por exemplo, síntese de fase sólida, síntese de fase líquida, síntese com o uso de células e um método de separação e extração de produtos de ocorrência natural. Além disso, quando um glicopeptídeo é usado como matéria-prima, esse glicopeptídeo pode ser produzido por incorporação de uma etapa de adição de cadeias de açúcar nos métodos de produção de peptídeos conhecidos mencionados anteriormente. Com relação a um método para a produção de cadeias de açúcar usado nessa etapa de adição de cadeia de açúcar, as Publicações Internacionais WO 03/008431, WO 2004/058984, WO 2004/058824, WO 2004/070046, WO 2007/011055 etc. podem ser citadas.

Como um exemplo específico, será descrito abaixo um método para a produção de um peptídeo ou um glicopeptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH de acordo com um método de síntese de fase sólida. Também para o método mencionado abaixo, a Publicação Internacional WO 2004/005330 também pode ser citada.

Primeiro, (1) um grupo hidroxila de uma resina que possui um grupo hidroxila e um grupo carboxil de um aminoácido cujo grupo amino é protegido por um grupo de proteção lipossolúvel são submetidos a uma reação de esterificação. Nesse caso, na medida em que o grupo amino do aminoácido é protegido pelo grupo de proteção lipossolúvel, a autocondensação de aminoácidos é evitada, e o grupo hidroxila da resina reage com o grupo carboxil do aminoácido, de tal forma que ocorra a esterificação.

A seguir,

(2) o grupo de proteção lipossolúvel do éster como obtido acima é dissociado para formar um grupo amino livre,

(3) esse grupo amino livre é aminado com um grupo carboxil de um aminoácido desejado cujo grupo amino é protegido por um grupo de proteção lipossolúvel,

(4) o grupo de proteção lipossolúvel mencionado anteriormente é dissociado para formar um grupo amino livre, e

(5) as etapas (3) e (4) mencionadas anteriormente são repetidas como necessário para obter um peptídeo no qual um número desejado de aminoácidos desejados é ligado, e que possui uma resina em um terminal deste e também possui um grupo amino livre no outro terminal deste.

Com o uso de um aminoácido que possui um grupo -SH (em

que o grupo -SH pode ser protegido) (por exemplo, cisteína ou o derivado de treonina mencionado anteriormente de Fórmula (3)) nas etapas mencionadas (1) a (5) anteriormente, pode ser obtido um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH. Quando um grupo -SH de um aminoácido que possui o grupo -SH é usado nas etapas mencionadas (1) a (5) anteriormente, o grupo -SH pode ser protegido por um grupo de proteção conhecido por aqueles habilitados na técnica, por exemplo, um grupo dissulfeto, um grupo acetamidametil, um grupo nitrobenzil ou um grupo tritil. A seguir, esse grupo de proteção é removido, como necessário. Além disso, com o uso de um aminoácido com uma cadeia de açúcar adicionada (por exemplo, uma cadeia de açúcar asparagina formada por adição de uma cadeia de açúcar à asparagina, à cadeia de açúcar serina ou cadeia de açúcar treonina formada por adição de uma cadeia de açúcar à serina ou treonina, e semelhantes) como um aminoácido nas etapas mencionadas anteriormente (1) a (5), glicopeptídeos ligados ao N e/ou ligados ao O que possuem uma ou duas ou mais cadeias de açúcar em uma posição (ou posições) desejada também pode ser obtida. Como descrito acima, esses glicopeptídeos ligados ao N e/ou ligados ao O são capazes de compreender um resíduo de aminoácido (ou aminoácidos) que possui um grupo -SH(s) em uma posição (ou posições) desejada.

(6) Portanto, a ligação éster entre a resina e o aminoácido em (1) acima é clivada por um ácido para produzir um peptídeo (ou glicopeptídeo) desejado.

Geralmente, o tipo de uma resina de fase sólida não é particularmente limitado, desde que seja uma resina usada

na síntese de fase sólida. Por exemplo, a resina Amino-PEGA (fabricada por Merck), a resina Wang (fabricada por Merck), a resina HMPA-PEGA (fabricada por Merck), a resina Trt Chloride (fabricada por Merck), e semelhantes, podem ser usadas.

Além disso, um vinculador pode ser disposto entre essa resina Amino-PEGA e um aminoácido. Exemplos de um vinculador desse tipo incluem ácido 4-hidroximetilfenoxiacético (HMPA) e ácido 4-(4-hidroximetil-3-metoxifenoxi)-butilacético (HMPB).

Exemplos de um grupo de proteção lipossolúvel incluem: grupos que contêm carbonil, por exemplo, um grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc), um grupo t-butiloxicarbonil (Boc) e um grupo aliloxicarbonil (Alloc); grupos de proteção como, por exemplo, grupos acil, tais como um grupo acetil (Ac), um grupo alil e um grupo benzil. No entanto, os exemplos não são particularmente limitados a esses.

A fim de introduzir um grupo de proteção lipossolúvel em um peptídeo (ou glicopeptídeo) desejado, quando um grupo Fmoc é introduzido, por exemplo, ele pode ser introduzido por adição de carbonato de 9-fluorenilmetil-N-succinimidil e bicarbonato de sódio ao sistema de reação e depois a reação é efetuada. A reação pode ser realizada em uma temperatura entre 0°C e 50°C e, preferivelmente, em temperatura ambiente, por aproximadamente 1 a 5 horas.

Como um aminoácido protegido por um grupo de proteção lipossolúvel, podem ser usados aminoácidos protegidos mencionados anteriormente pelo método descrito acima. Além disso, também podem ser usados produtos disponíveis comercialmente. Exemplos de aminoácidos protegidos por um

grupo de proteção incluem Fmoc-Ser, Fmoc-Asn, Fmoc-Val, Fmoc-Leu, Fmoc-Ile, Fmoc-Ala, Fmoc-Tyr, Fmoc-Gly, Fmoc-Lys, Fmoc-Arg, Fmoc-His, Fmoc-Asp, Fmoc-Glu, Fmoc-Gln, Fmoc-Thr, Fmoc-Cys, Fmoc-Met, Fmoc-Phe, Fmoc-Trp e Fmoc-Pro.

Como catalisadores da esterificação, podem ser usados agentes de condensação de desidratação conhecidos, tais como 1-mesietilenossulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT), diciclohexilcarbodiimida (DCC) e 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), por exemplo. Com relação à proporção de utilização entre um aminoácido e um agente de condensação de desidratação, 1 a 10 partes por peso e, preferivelmente, 2 a 5 partes por peso do agente de condensação de desidratação é geralmente usada com relação a 1 parte por peso do aminoácido.

Uma reação de esterificação é realizada preferivelmente por colocação de uma resina em uma coluna de fase sólida, lavagem da resina com um solvente, e depois adição de uma solução de aminoácidos a ela, por exemplo. Exemplos desse solvente de lavagem incluem dimetilformamida (DMF), 2-propanol e cloreto de metileno. Exemplos de um solvente para a dissolução de aminoácidos incluem sulfóxido de dimetila (DMSO), DMF e cloreto de metileno. Essa reação de esterificação pode ser realizada em uma temperatura entre 0°C e 50°C e, preferivelmente, em temperatura ambiente, por aproximadamente 10 minutos a 30 horas e, preferivelmente, por aproximadamente 15 minutos a 24 horas.

Durante a reação, também é preferível que grupos funcionais não reagidos na fase sólida sejam acetilados usando anidrido acético ou semelhante e que sejam cobertos.

Um grupo de proteção lipossolúvel pode ser dissociado

por seu tratamento com uma base, por exemplo. Exemplos dessa base incluem piperidina e morfolino. O tratamento é realizado preferivelmente na presença de um solvente. Exemplos de um solvente aqui usado incluem DMSO, DMF e metanol.

A reação de amidação entre um grupo amino livre e um grupo carboxil de qualquer aminoácido cujo nitrogênio do grupo amino seja protegido por um grupo de proteção lipossolúvel é realizada preferivelmente na presença de um ativador e um solvente.

Exemplos de ativadores incluem diciclohexilcarbodiimida (DCC), cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (WSC/HCl), difenilfosforil azida (DPPA), carbonildiimidazol (CDI), dietilcianofosfonato (DEPC), 1,3-diisopropilcarbodiimida (DIPCI), benzotriazol-1-ilóxi-tris(pirrolidino)fosfônio hexafluorfosfato (PyBOP), 3-dietoxifosforiloxi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-ona (DEPBT), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), hidroxissuccinimida (HOSu), dimetilaminopiridina (DMAP), 1-hidróxi-7-azabenzotriazol (HOAt), 3-hidróxi-4-oxo-3,4-diidro-5-azabenzo-1,2,3-triazina (HODhbt), hidroxiftalimida (HOPht), pentafluorfenol (Pfp-OH), hexafluorfosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU), hexafluorfosfonato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HATU) e tetrafluorborato de O-benzotriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametilurônio (TBTU).

Com relação à quantidade de ativador usada, 1 a 20 quantidades equivalentes de, preferivelmente 1 a 10 quantidades equivalentes de e, mais preferivelmente, 1 a 5

quantidades equivalentes de ativador são usadas com relação a qualquer aminoácido cujo nitrogênio do grupo amino seja protegido por um grupo de proteção lipossolúvel.

A reação procede apenas com o ativador mencionado anteriormente. No entanto, preferivelmente é adicionada amina como um agente auxiliar. Como essa amina, diisopropiletilamina (DIPEA), N-etilmorfolino (NEM), N-metilmorfolino (NMM), N-metilimidazol (NMI), e semelhantes podem ser usados. Com relação à quantidade desse agente auxiliar usado, 1 a 20 quantidades equivalentes de, preferivelmente 1 a 10 quantidades equivalentes de e, mais preferivelmente, 1 a 5 quantidades equivalentes de agente auxiliar são usadas com relação a qualquer aminoácido cujo nitrogênio do grupo amino seja protegido por um grupo de proteção lipossolúvel.

Exemplos de solventes incluem DMSO, DMF e cloreto de metileno. A reação é realizada em uma temperatura entre 0°C e 50°C e, preferivelmente, em temperatura ambiente, por aproximadamente 10 a 30 horas e, preferivelmente, por aproximadamente 15 minutos a 24 horas. Durante essa reação, também é preferível que grupos amino não reagidos na fase sólida sejam acetilados usando anidrido acético ou semelhante e sejam cobertos. O grupo de proteção lipossolúvel pode ser dissociado da mesma forma que aquele descrito acima.

A fim de clivar uma cadeia peptídica de uma resina, é preferível tratar a resina com um ácido. Exemplos de um ácido aqui usado incluem ácido trifluoracético (TFA) e fluoreto de hidrogênio (HF). Durante o tratamento, pode ser gerada uma espécie de cátion altamente reativa pelo grupo

de proteção lipossolúvel usado para o aminoácido e para o vinculador na resina. Dessa forma, para capturar essa espécie de cátion, preferivelmente é adicionado um reagente nucleofílico. Exemplos desse reagente nucleofílico incluem triisopropilsilano (TIS), fenol, tioanisol e etanoditiol (EDT).

Dessa forma, pode ser obtido um peptídeo (ou um glicopeptídeo) que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH.

Além disso, um método de utilização da reação reversa de uma enzima, incluindo transglutaminase como um exemplo típico, pode ser aplicado ao peptídeo ou glicopeptídeo assim obtido que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH para adicionar a ele uma cadeia de açúcar, obtendo, dessa forma, um glicopeptídeo que compreende um aminoácido que possui um grupo -SH.

Além disso, também é possível combinar uma reação de alongamento da cadeia de açúcar usando transferase com o método mencionado anteriormente.

Entre os peptídeos ou glicopeptídeos obtidos acima, um peptídeo (ou um glicopeptídeo) que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH em seu terminal N pode ser ligado a um peptídeo (ou um glicopeptídeo) que possui uma porção α-carboxitioéster em seu terminal C de acordo com um método de ligação.

No presente pedido, o termo "método de ligação" é usado para incluir não apenas o método de ligação química nativa (método de NCL) descrito no Documento de Patente 1, mas também inclui a aplicação desse método de ligação química nativa aos peptídeos que compreendem aminoácidos

não naturais ou derivados de aminoácidos (por exemplo, o derivado de treonina A de Fórmula (1), uma metionina protegida, um aminoácido com uma cadeia de açúcar adicionada etc.), como descrito nos exemplos apresentados posteriormente. De acordo com esse método de ligação, pode ser produzido um peptídeo que possui uma ligação amida natural (ligação peptídica) em um sítio de ligação.

De acordo com o método de ligação, a ligação pode ser realizada em todos os casos entre um peptídeo e um peptídeo, entre um peptídeo e um glicopeptídeo, e entre um glicopeptídeo e um glicopeptídeo.

Um peptídeo (ou um glicopeptídeo) que possui um grupo α-carboxitioéster em seu terminal C, que é usado no método de ligação, pode ser produzido por um método conhecido por aqueles habilitados na técnica, como descrito no Documento de Patente 1.

Por exemplo, como descrito nos exemplos apresentados posteriormente, um método de síntese de fase sólida é aplicado para obter um peptídeo (ou glicopeptídeo) protegido cujos grupos amino na cadeia lateral do aminoácido e no terminal N estão protegidos. Um grupo carboxil no seu lado do terminal C é condensado com benziltiol, usando PyBOP (hexafluorfosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfônio)/DIPEA como agente de condensação em uma fase líquida. A seguir, a cadeia do aminoácido é desprotegida usando uma solução de TFA 95% para obter um peptídeo (ou um glicopeptídeo) que possui um grupo α-carboxitioéster em seu terminal C.

O método de ligação pode ser realizado com o uso de um método conhecido por aqueles habilitados na técnica, como

descrito no Documento de Patente 1, ou por referência às descrições dos exemplos que serão apresentados posteriormente. Por exemplo, um primeiro peptídeo que possui um grupo α-carboxitioéster representado por -C(=O)-SR em seu terminal C e um segundo peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH em seu terminal N são preparados, por referência às descrições mencionadas anteriormente. No primeiro peptídeo, R não é particularmente limitado, desde que não interfira com uma reação de troca de tiol e atue como um grupo abandonador em uma reação de substituição nucleofílica em um carbono do carbonil. De preferência, esse R pode ser selecionado entre grupos do tipo benzil como, por exemplo, benzilmercaptano, grupos do tipo aril como, por exemplo, tiofenol ou 4-(carboximetil)-tiofenol, grupos do tipo alquil como, por exemplo, 2-mercaptoetanossulfonato ou amida de ácido 3-mercaptopropiônico, e semelhantes. O grupo -SH no terminal N do segundo peptídeo pode ser protegido por um grupo de proteção, como desejado. Esse grupo de proteção é removido em um momento desejado, antes da reação de ligação subseqüente, e o segundo peptídeo que possui um grupo -SH em seu terminal N reage com o primeiro peptídeo. Por exemplo, caso ele seja um grupo de proteção que é removido espontaneamente sob condições nas quais ocorre a ligação, o segundo peptídeo protegido por o grupo de proteção poderá ser usado diretamente na reação de ligação subseqüente.

Os dois peptídeos são misturados entre eles em uma solução como, por exemplo, 100 mM de tampão fosfato, na presença de tiol catalítico, por exemplo, ácido 4-mercaptofenilacético, benzilmercaptano ou tiofenol, como

necessário. De preferência, a reação é realizada usando 0,5 a 2 quantidades equivalentes do segundo peptídeo e aproximadamente 5 quantidades equivalentes do tiol catalítico com relação a 1 quantidade equivalente do primeiro peptídeo. A reação é realizada preferivelmente sob condições que consistem em pH 6,5 a 7,5, e uma temperatura entre 20°C e 40°C por aproximadamente 1 a 30 horas. O progresso da reação pode ser confirmado por um método conhecido, em que HPLC, MS e semelhantes são combinados.

Ao produto de reação, um agente redutor, por exemplo, ditiotreitol (DTT) ou cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), é adicionado para suprimir reações colaterais, e o produto de reação é purificado como desejado, de modo que o primeiro peptídeo possa ser ligado ao segundo peptídeo.

Quando existem peptídeos que possuem diferentes grupos R entre os peptídeos que possuem uma porção carboxitioéster (-C=O-SR) em seu terminal C, a ordem das reações de ligação pode ser alterada (veja *Protein Science* (2007), 16: 2.056-2.064 etc.). Dessa forma, quando a ligação é realizada várias vezes, a ordem das reações de ligação pode ser levada em conta. Por exemplo, quando um grupo aril, um grupo benzil e um grupo alquil existem como R, a reação de ligação geralmente progride nessa ordem.

Na presente invenção, será especificamente descrito um método para a produção de um peptídeo (ou um glicopeptídeo) caracterizado pelo fato de que um grupo -SH de um peptídeo (ou um glicopeptídeo) que compreende um resíduo de aminoácido que possui o grupo -SH é convertido em um grupo -OH. Como matérias-primas, é usado o peptídeo ou

glicopeptídeo obtido pelo método mencionado anteriormente. Em um aspecto da presente invenção, é preferivelmente usado um peptídeo ou um glicopeptídeo obtido por um método de ligação. Subseqüentemente, as seguintes etapas de (a) a (c) são realizadas:

(a) permitir que um grupo -SH em um peptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação; e

(c) conversão do intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b). A seguir, será exemplificado o uso de um peptídeo como matéria-prima.

Etapa (a)

O agente de metilação usado na metilação da etapa (a) não é particularmente limitado, desde que seja capaz de converter o grupo -SH no peptídeo no grupo -SMe. Exemplos desse agente de metilação incluem iodometano e metil-4-nitrobenzenossulfonato.

Com relação à quantidade de um agente de metilação usado, 1 a 1.000 quantidades equivalentes de, preferivelmente 10 a 100 quantidades equivalentes de e, mais preferivelmente, 15 a 30 quantidades equivalentes do agente de metilação podem ser usadas com relação a um único resíduo do grupo -SH do peptídeo matéria-prima. A reação de metilação é realizada desejavelmente em uma temperatura entre 0°C e 50°C e, preferivelmente, entre 20°C e 30°C, por

aproximadamente 10 minutos a 30 horas e, preferivelmente, por aproximadamente 15 minutos a 1 hora.

Uma solução-tampão é preferivelmente usada como um solvente na reação de metilação. Uma solução-tampão que possui pH 7 a 9 e, particularmente, pH 8 a 9, pode ser preferivelmente usada. Por exemplo, pode ser usada uma solução-tampão de 0,25 M de Tris-HCl (solução de 6 M de cloridrato de guanidina, contendo 3,3 mM de EDTA, pH 8,6), ou semelhante.

Quando um resíduo de cisteína está contido como um aminoácido em um peptídeo e em que o resíduo de cisteína não se destina a ser convertido em um resíduo de serina e se permite que exista como um resíduo de cisteína em um peptídeo obtido pelo método de produção da presente invenção, essa cisteína é protegida e é introduzida na forma de uma cisteína protegida em um peptídeo de acordo com um método conhecido. Dessa forma, pode-se evitar que o grupo -SH da cisteína seja metilado na etapa (a). Levando-se em conta uma reação de troca de tiol, um tratamento com ácido, um tratamento com base etc. realizado em cada etapa do método de produção da presente invenção, pode ser usado um grupo de proteção apropriado como um grupo de proteção para cisteína. Exemplos desse grupo de proteção incluem um grupo acetamidametil (Acm), um grupo benzil, um grupo acetamida e um grupo tritil. De preferência, pode ser usado um grupo Acm. Após as etapas (a) a (c), o resíduo de cisteína protegido é desprotegido usando um método conhecido. Por exemplo, quando uma cisteína protegida que foi protegida por um grupo de proteção como, por exemplo, um grupo Acm, um grupo nitrobenzil ou um grupo tritil, é

introduzida, essa cisteína protegida é convertida em um resíduo de cisteína por adição de uma etapa de aplicação de um método de desproteção usando uma solução aquosa de acetato de prata, um método de desproteção que utiliza luz, um método de desproteção que envolve um tratamento com ácido, ou outros métodos. Dessa forma, permite-se que exista um resíduo de cisteína no peptídeo obtido pelo método de produção da presente invenção.

Em um aspecto da presente invenção, também é possível obter um peptídeo que possui um grupo -OH por conversão de um grupo -SMe de um peptídeo que possui o grupo SMe no grupo -OH. Nesse caso, a etapa (a) mencionada anteriormente pode ser omitida.

Etapa (b)

Do ponto de vista da segurança e semelhantes, brometo de cianogênio, fenilcianato, ou semelhantes podem ser usados como um agente de cianização na etapa (b), por exemplo. De preferência, brometo de cianogênio, que pode facilmente ser procurado, pode ser usado.

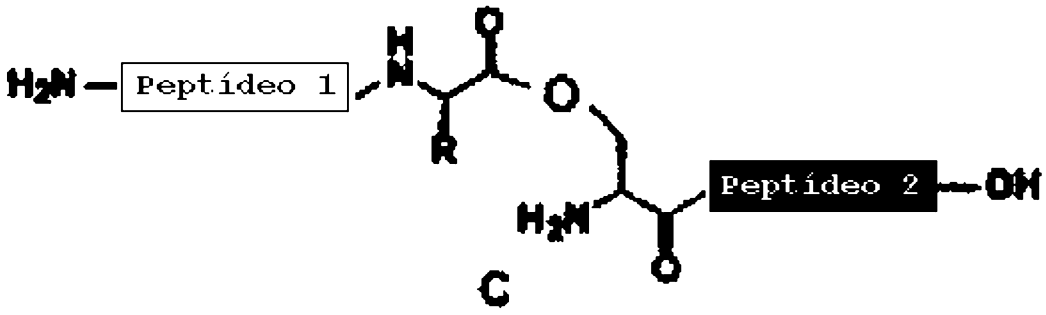
Com relação à quantidade de um agente de cianização usado, 1 a 1.000 quantidades equivalentes de, preferivelmente 10 a 100 quantidades equivalentes de e, mais preferivelmente, 15 a 30 quantidades equivalentes do agente de cianização podem ser usadas com relação a um único grupo -SMe. A reação com o agente de cianização é realizada desejavelmente em uma temperatura entre 0°C e 50°C e, preferivelmente, entre 30°C e 40°C, por aproximadamente 30 minutos a 100 horas e, preferivelmente, por aproximadamente 12 horas a 50 horas.

A reação com o agente de cianização é realizada sob

condições acídicas, e é particularmente realizada preferivelmente em pH 2 a 3. Com o uso de uma substância acídica hidrossolúvel, e especificamente com o uso de ácido fórmico, ácido trifluoracético, ácido metanossulfônico, ou semelhante, a reação pode ser realizada sob condições acídicas. Durante a reação, a fim de evitar a oxidação de átomos de enxofre, é particularmente preferível que a substância acídica hidrossolúvel usada tenha sido desaerada. Além disso, do ponto de vista da estabilidade do agente de cianização, a reação é realizada preferivelmente sob condições protegidas.

Como solvente, o solvente hidrossolúvel mencionado anteriormente que possui pH 2 a 3, por exemplo, uma solução de ácido fórmico 80%, uma solução de ácido fórmico 70%, ou uma solução aquosa contendo ácido trifluoracético 2%/acetonitrila 39%, pode preferivelmente ser usado.

Um exemplo do intermediário da reação obtido na etapa (b) é uma forma de éster que possui a seguinte estrutura:



Quando um resíduo de metionina está contido como um aminoácido no peptídeo, é preferível distinguir o grupo -SMe contido no resíduo de metionina do grupo -SMe obtido na etapa (a). No presente pedido, a metionina protegida não é particularmente limitada, desde que seja um composto que não reaja com o agente de cianização na etapa (b). Um

exemplo dessa metionina protegida é uma metionina do tipo sulfóxido (Met(O): $-CH_2-CH_2-S(=O)-CH_3$). Como descrito no Exemplo 5 apresentado posteriormente, uma metionina protegida (por exemplo, Met(O)) é introduzida no peptídeo usando um método conhecido, de forma que um resíduo de metionina possa ser distinguido do grupo -SMe obtido na etapa (a), e o resíduo de metionina se torna inativo na reação com o agente de cianização na etapa (b). A seguir, o resíduo de metionina protegido é convertido em um resíduo de metionina usando um método conhecido, como adequado (a etapa (e) mencionada posteriormente). Dessa forma, um peptídeo que possui um resíduo de metionina também pode ser obtido pelo método de produção da presente invenção.

Além disso, uma cisteína oxidada, que é um subproduto formado durante a reação com o agente de cianização na etapa (b), pode ser removida, como necessário. Nessa etapa de remoção, uma mistura que compreende o intermediário da reação obtido na etapa (b) pode ser reagida em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos na presença de iodeto de amônio e sulfeto de dimetila, por exemplo, e, a seguir, a solução da reação pode ser separada e lavada. Essa etapa de remoção pode ser realizada em qualquer ponto após a etapa (b), e pode ser realizada preferivelmente após a etapa (c).

Etapa (c)

Na etapa (c), sob condições mais básicas do que aquelas na etapa (b), um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH é obtido por um rearranjo intramolecular de acil de O- para N- do intermediário da reação obtido na etapa (b).

As condições básicas na etapa (c) podem ser acídicas ou neutras, desde que sejam condições mais básicas do que as condições na etapa (b). Mais especificamente, as condições básicas na etapa (c) não são particularmente limitadas, desde que sejam condições nas quais um grupo -NH_2 em um átomo de C adjacente à ligação éster do intermediário da reação obtido na etapa (b) não seja protonado. Do ponto de vista da conversão eficiente do intermediário da reação em um peptídeo que possui um grupo -OH, podem ser aplicadas condições básicas fracas ou condições básicas fortes.

Quando as condições básicas na etapa (c) são condições básicas fracas, o pH é pH 7 a 9 e, preferivelmente, pH 7 a 8. Por exemplo, por adição a uma solução, um composto básico que é usado um meio de ajuste do pH conhecido por aqueles habilitados na técnica, por exemplo, guanidina, fosfato dissódico, Tris ou bicarbonato de sódio, condições básicas fracas podem ser preparadas. Durante essa operação, com relação à quantidade de um composto básico usado, 1 a 1.000 quantidades equivalentes de, preferivelmente 10 a 100 quantidades equivalentes de e, mais preferivelmente, 15 a 30 quantidades equivalentes desse composto básico podem ser usadas com relação a um peptídeo matéria-prima.

Quando as condições básicas na etapa (c) são condições básicas fracas, a reação é realizada desejavelmente em uma temperatura entre 0°C e 50°C e, preferivelmente, entre 20°C e 40°C, por aproximadamente 10 minutos a 30 horas e, preferivelmente, por aproximadamente 15 minutos a 30 horas. A reação é realizada desejavelmente em uma solução-tampão que possui pH 7 a 9 e, preferivelmente, pH 7 a 8. Por

exemplo, a etapa (c) pode ser realizada em um tampão de fosfato 0,2 M (contendo uma solução de 6 M de cloridrato de guanidina, pH 7,2).

Quando as condições básicas na etapa (c) são condições básicas fracas, o pH pode ser diminuído ainda mais, e a etapa (c) pode ser terminada. Caso contrário, a rotina pode proceder até uma etapa de purificação usando HPLC ou semelhante, sem alteração do pH.

Quando as condições básicas na etapa (c) são condições básicas fortes, o pH é pH 9 a 13 e, preferivelmente, pH 10 a 11. Essas condições básicas fortes são preferivelmente condições nas quais um composto que foi excessivamente reagido com um grupo hidroxila pode ser removido por hidrólise. Por adição a uma solução de uma substância hidrossolúvel básica, por exemplo, um hidrato de hidrazina, uma solução aquosa de hidróxido de sódio 50 mM, ou semelhante, condições básicas fortes podem ser preparadas. Durante essa operação, com relação à quantidade de uma substância hidrossolúvel básica usada, 0,5 a 100 quantidades equivalentes de, preferivelmente 0,1 a 10 quantidades equivalentes de e, mais preferivelmente, 0,5 a 1 quantidade equivalente dessa substância hidrossolúvel básica podem ser usadas com relação a um peptídeo matéria-prima. Por exemplo, a etapa (c) pode ser realizada em uma solução aquosa de hidrazina 5% que possui pH 10 a 11.

Quando as condições básicas na etapa (c) são condições básicas fortes, um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH pode ser obtido por um rearranjo intramolecular de acil de O- para N- do intermediário da reação obtido na etapa (b) e, ao mesmo

tempo, descianização (uma reação de descianização para remoção de agentes de cianização excessivamente reagidos por hidrólise), desformilação (uma reação de desformilação de ácidos fórmicos excessivamente reagidos), e semelhantes, podem ocorrer em grupos -OH excessivamente reagidos nas etapas (a) e (b).

Quando as condições básicas na etapa (c) são condições básicas fortes, a etapa (c) é realizada desejavelmente em uma temperatura entre 0°C e 50°C e, preferivelmente, entre 20°C e 30°C, por aproximadamente 5 minutos a 3 horas, preferivelmente por aproximadamente 5 minutos a 1 hora e, mais preferivelmente, por aproximadamente 5 minutos a 10 minutos. Quando as condições básicas na etapa (c) são condições básicas fortes, se a etapa (c) é realizada por um período de tempo longo, podem ocorrer reações colaterais como, por exemplo, racemização e a clivagem de uma ligação peptídica.

Quando as condições básicas na etapa (c) são condições básicas fortes, a etapa (c) pode ser terminada por diminuição do pH até o pH 4 a 9 e, preferivelmente, até o pH 5 a 9, por exemplo, pH de aproximadamente 7, ou pH de 8 a 9.

Na etapa (c), presume-se que a configuração da posição β do resíduo de aminoácido obtido que possui um grupo -OH esteja invertida em relação àquela do intermediário da reação obtido na etapa (b).

Etapa (d)

Quando um peptídeo que contém um resíduo de metionina protegido é usado como matéria-prima, uma etapa seguinte (d) é ainda realizada após a etapa (b) ou (c), como

desejado:

(d) desproteção da metionina protegida.

A desproteção pode ser realizada com o uso de um método conhecido por aqueles habilitados na técnica, dependendo do tipo da metionina protegida usada. Quando uma metionina do tipo sulfóxido (Met(O)) é introduzida como uma metionina protegida, por exemplo, essa metionina protegida é convertida em metionina por adição de uma etapa de redução com o uso de uma solução mista de iodeto de amônio/sulfeto de dimetila/TFA, ou semelhante. Do ponto de vista da prevenção da ocorrência de reações colaterais, a etapa (d) é preferivelmente realizada após a etapa (c).

Dessa forma, no caso de se obter um peptídeo que também possui um resíduo de metionina, o método de produção da presente invenção pode ser aplicado.

Para a purificação do produto obtido, preferivelmente é aplicado um método para a obtenção de um produto 97% purificado ou mais sob vários tipos de condições de cromatografia líquida de alto rendimento. Exemplos específicos de um método desse tipo incluem cristalização, um método de divisão transacional, cromatografia por divisão, um método de filtração em gel, cromatografia por troca iônica e cromatografia líquida de alto rendimento. De preferência, pode ser aplicada cromatografia líquida de alto rendimento ou semelhante.

Além das etapas mencionadas anteriormente, pode anda ser realizada uma etapa de adição de uma cadeia de açúcar. Essa adição de uma cadeia de açúcar pode ser efetuada tanto em um peptídeo quanto em um glicopeptídeo. Essa adição de uma cadeia de açúcar pode ser efetuada em qualquer ponto,

desde que um glicopeptídeo de interesse possa ser obtido. Ela é realizada preferivelmente após a etapa (c).

A adição de uma cadeia de açúcar pode ser realizada por um método que utiliza a reação reversa de uma enzima, incluindo transglutaminase como um exemplo típico, ou por um método realizado por referência às descrições da Publicação Internacional WO 2005/010053, como descrito abaixo.

Primeiro, um derivado de cadeia de açúcar do tipo complexo de haloacetamida é produzido ao se deixar que ele reaja com um peptídeo como obtido acima (em particular, um peptídeo que compreende: um aminoácido que possui dois ou mais grupos carboxil em sua molécula, por exemplo, ácido aspártico ou ácido glutâmico; um aminoácido que possui dois ou mais grupos amino em sua molécula, por exemplo, lisina, arginina, histidina ou triptofano; um aminoácido que possui um grupo hidroxila em sua molécula, por exemplo, serina, treonina ou tirosina; um aminoácido que possui um grupo tiol em sua molécula, por exemplo, cisteína; ou um aminoácido que possui um grupo amida em sua molécula, por exemplo, asparagina ou glutamina e, entre eles, particularmente, um peptídeo que compreende ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, arginina, serina, treonina, cisteína, asparagina ou glutamina). A reação mencionada anteriormente pode ser realizada em uma temperatura geralmente entre 0°C e 80°C, preferivelmente entre 10°C e 60°C e, mais preferivelmente, entre 15°C e 35°C. De preferência, o tempo de reação é geralmente de aproximadamente 30 minutos a 5 horas. Após o término da reação, um produto de reação pode ser purificado por um

método conhecido (por exemplo, cromatografia líquida de alto rendimento (HPLC)), como adequado.

O derivado de cadeia de açúcar do tipo complexo de haloacetamida é um composto formado por substituição de um grupo hidroxila que se liga ao carbono na posição 1 de uma cadeia de açúcar ligada a uma asparagina do tipo complexa com $-NH-(CO)-(CH_2)_a-CH_2X$ (em que X representa um átomo de halogênio, e a representa um número inteiro que não é particularmente limitado, a menos que ele interfira com uma função vinculadora de interesse e, preferivelmente, representa um número inteiro de 0 a 4), por exemplo.

Especificamente, permite-se que o derivado de cadeia de açúcar do tipo complexo de haloacetamida reaja com o peptídeo obtido acima em um tampão fosfato em temperatura ambiente. Após o término da reação, a solução da reação é purificada por HPLC para se obter uma glicopeptídeo com cadeia de açúcar adicionada.

Também é possível combinar uma reação de alongamento da cadeia de açúcar com o uso de transferase com o método mencionado anteriormente. O glicopeptídeo assim obtido também está incluído no escopo da presente invenção.

Exemplos

A seguir, a presente invenção será especificamente descrita nos exemplos seguintes. No entanto, esses exemplos não visam limitar o escopo da presente invenção.

Exemplo 1

Produção de Ac-Ala-Ser-Gly-Leu

A resina Wang (fabricada por Merck) (100 μmol) foi colocada em uma coluna de síntese de fase sólida, e foi então completamente lavada com cloreto de metileno (DCM) e

DMF. A seguir, o resultante ficou completamente intumescido com DCM. Fmoc-Leu (0,50 mmol), MSNT (0,50 mmol) e N-metilimidazol (0,375 mmol) foram dissolvidos em DCM (2 ml), e a solução obtida foi então colocada na coluna de síntese de fase sólida, seguida por agitação a 25°C por 1 hora. Deve-se observar que o volume do DCM também pode ser ajustado para 1,5 ml. Após o término da operação de agitação, a resina foi completamente lavada com DCM e DMF, e o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 15 minutos para desproteção. Deve-se observar que o presente tratamento de desproteção também pode ser realizado por 10 minutos. Após lavagem com DMF, para o alongamento subseqüente de uma cadeia peptídica, os aminoácidos foram sucessivamente condensados de acordo com o método mencionado abaixo.

Um aminoácido cujo grupo amino foi protegido por um grupo Fmoc, HOBt (67,6 mg, 0,50 mmol) e DIPCI (77,0 µl, 63,1 mg, 0,50 mmol) foi dissolvido em DMF (1 ml), e a solução obtida foi então ativada por 15 minutos. A seguir, a solução foi colocada na coluna de síntese de fase sólida. Deve-se observar que o volume da DMF também pode ser ajustado para 2 ml. Após agitação a 25°C por 1 hora, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 20 minutos para desproteção. Deve-se observar que o presente tratamento de desproteção também pode ser realizado por 10 minutos. Essas operações foram repetidas, de tal forma que os aminoácidos fossem sucessivamente condensados. Como aminoácidos protegidos pelos grupos Fmoc, Fmoc-Gly (148,7 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Cys(Trt) (292,9 mg, 0,50 mmol) e Fmoc-Ala (155,7 mg, 0,50

mmol) foram usados, e um peptídeo de 4 resíduos que possui um grupo de proteção, Fmoc-Ala-Cys(Trt)-Gly-Leu (ID. DE SEQ. N°: 1) foi obtido na resina de fase sólida. A seguir, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) na resina por 20 minutos para desproteção, e grupos amino livres foram então protegidos por acetil usando uma solução de anidrido acético 20%/DMF (2 ml). Deve-se observar que o volume da solução de anidrido acético 20%/DMF também pode ser ajustado para 1,7 ml. Após lavagem com DMF e DCM, um reagente preparado previamente (TFA/água/fenol/tioanisol/EDT (1,2-etanoditiol)/TIPS = 81,5/5/5/5/2,5/1) foi adicionado em um grau tal que a resina ficasse suficientemente imersa nele, e ele foi então agitado a 25°C por 2 horas. A resina foi removida por filtração, e a solução da reação foi então concentrada sob uma pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por HPLC (coluna C8 Vydac, 250 x 10 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 85 : 15 → 50 : 50; 60 minutos; taxa de fluxo: 3,0 ml/min) para obter um peptídeo de 4 resíduos que possui um grupo de proteção, Ac-Ala-Cys-Gly-Leu (ID. DE SEQ. N°: 2).

30 mg (73 μmol) do peptídeo de 4 resíduos obtido (ID. DE SEQ. N°: 2) foram colocados em um frasco de fundo redondo e foram dissolvidos em 73 ml de um tampão de 0,25 M de Tris-HCl (pH 8,6; contendo uma solução de 6 M de cloridrato de guanidina e 3,3 mM de EDTA) e 24 ml de acetonitrila. A seguir, metil-4-nitrobenzenossulfonato (316 mg) foi adicionado à solução a 25°C. Trinta minutos mais tarde, uma solução de TFA 10% (7,3 ml) foi a ela

adicionada, de tal forma que o pH da solução fosse ajustado para o pH 4. A seguir, éter dietílico foi a ela adicionado para realizar uma operação de extração. Após o término da concentração, o resíduo obtido foi colocado em uma coluna ODS para realização da purificação, obtendo, dessa forma, 25 mg de um peptídeo de 4 resíduos que possui um grupo de proteção, Ac-Ala-Cys(Me)-Gly-Leu (ID. DE SEQ. N°: 3), em que o átomo de enxofre do resíduo de cisteína foi metilado.

ESI-MS: Calculado para $C_{17}H_{30}N_4O_6S$: $[M+1H]^{1+}$ 419,2, encontrado, 419,1.

6,5 mg (15 µmol) do peptídeo de 4 resíduos obtido (ID. DE SEQ. N°: 3), no qual o átomo de enxofre do resíduo de cisteína foi metilado, foram colocados em um tubo de Eppendorf, e foram dissolvidos em uma solução de ácido fórmico 80% (6,5 ml). A seguir, 159,0 mg (1,5 mmol) de brometo de cianogênio foram adicionados à solução a 25°C. O reator foi protegido da luz, e foi então realizada uma reação a 37°C. Vinte e oito horas e meia mais tarde, a solução da reação foi congelada para terminar a reação. O resíduo obtido após a liofilização da solução da reação foi purificado por HPLC (coluna C4 Vydac, 250 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 100 : 0 → 60 : 40; 30 minutos; taxa de fluxo: 1,0 ml/min) para obter 3,8 mg de uma forma de éster como um intermediário da reação.

ESI-MS: Calculado para $C_{16}H_{28}N_4O_7$: $[M+1H]^{1+}$ 389,4, encontrado, 389,2.

5 mg do intermediário da reação obtido foram colocados em um tubo de Eppendorf da mesma forma descrita acima, e

foram dissolvidos em 0,6 ml de um tampão fosfato (pH 7,2; contendo 6 M de cloridrato de guanidina), seguida por uma reação a 37°C. Uma hora mais tarde, após confirmação por HPLC de que a reação havia terminado, a solução da reação foi purificada por HPLC (coluna C4 Vydac, 250 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 100 : 0 → 60 : 40; 30 minutos; taxa de fluxo: 1,0 ml/min) para obter 3,5 mg de um peptídeo de 4 resíduos de interesse que possui um grupo de proteção, Ac-Ala-Ser-Gly-Leu (ID. DE SEQ. N°: 4). Deve-se observar que o tempo de reação também pode ser ajustado para 30 minutos.

ESI-MS: Calculado para $C_{16}H_{28}N_4O_7$: $[M+1H]^{1+}$ 389,4, encontrado, 389,1.

Exemplo 2

Produção de Val-Asp-Lys-Ala-Val-Ser-Gly-Leu

A resina Wang (fabricada por Merck) (100 µmol) foi colocada em uma coluna de síntese de fase sólida, e foi então completamente lavada com cloreto de metileno (DCM) e DMF. A seguir, o resultante ficou completamente intumescido com DCM. Fmoc-Leu (0,50 mmol), MSNT (0,50 mmol) e N-metilimidazol (0,375 mmol) foram dissolvidos em DCM (2 ml), e a solução obtida foi então colocada na coluna de síntese de fase sólida, seguida por agitação a 25°C por 1 hora. Deve-se observar que o volume do DCM também pode ser ajustado para 1,5 ml. Após o término da operação de agitação, a resina foi completamente lavada com DCM e DMF, e o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 15 minutos para desproteção. Deve-se observar que o presente tratamento de desproteção também

pode ser realizado por 10 minutos. Após lavagem com DMF, para o alongamento subseqüente de uma cadeia peptídica, os aminoácidos foram sucessivamente condensados de acordo com o método mencionado abaixo.

Um aminoácido cujo grupo amino foi protegido por um grupo Fmoc, HOBt (67,6 mg, 0,50 mmol) e DIPCI (77,0 µl, 63,1 mg, 0,50 mmol) foram dissolvidos em DMF (1 ml), e a solução obtida foi então ativada por 15 minutos. A seguir, a solução foi colocada na coluna de síntese de fase sólida. Deve-se observar que o volume da DMF também pode ser ajustado para 2 ml. Após agitação a 25°C por 1 hora, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 20 minutos para desproteção. Deve-se observar que o presente tratamento de desproteção também pode ser realizado por 10 minutos. Essas operações foram repetidas, de tal forma que os aminoácidos fossem sucessivamente condensados. Como aminoácidos protegidos pelos grupos Fmoc, Fmoc-Gly (148,7 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Cys (Trt) (292,9 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Val (169,7 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Ala (155,7 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Lys (Boc) (234,3 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Asp (OtBu) (205,8 mg, 0,50 mmol) e Fmoc-Val (169,7 mg, 0,50 mmol) foram usados, e um peptídeo de 8 resíduos que possui um grupo de proteção, Fmoc-Val-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Ala-Val-Cys(Trt)-Gly-Leu (ID. DE SEQ. N°: 5) foi obtido na resina de fase sólida. A seguir, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) na resina por 20 minutos para desproteção, e a solução da reação foi então lavada com DMF e DCM. A seguir, um reagente K preparado previamente (TFA/água/fenol/tioanisol/EDT = 82,5/5/5/5/2,5) foi

adicionado em um grau tal que a resina ficasse suficientemente imersa nele, e ele foi então agitado a 25°C por 2 horas. Deve-se observar que, em vez do reagente K, TFA/água/fenol/tioanisol/EDT/TIPS = 81,5/5/5/5/2,5/1,0 também pode ser usado. A resina foi removida por filtração, e a solução da reação foi então concentrada sob uma pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por HPLC (Vydac coluna C18, 250 x 10 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 85 : 15 → 50 : 50; 15 minutos; taxa de fluxo: 2,5 ml/min) para obter an 8-resíduo peptídeo, Val-Asp-Lys-Ala-Val-Cys-Gly-Leu (ID. DE SEQ. N°: 6).

32 mg (40 µmol) do peptídeo de 8 resíduos obtido (ID. DE SEQ. N°: 6) foram colocados em um frasco de fundo redondo e foram dissolvidos em 40 ml de um tampão de 0,25 M de Tris-HCl (pH 8,6; contendo uma solução de 6 M de cloridrato de guanidina e 3,3 mM de EDTA) e 13 ml de acetonitrila. A seguir, metil-4-nitrobenzenossulfonato (261 mg) foi adicionado à solução a 25°C. Uma hora mais tarde, uma solução de TFA 10% (3,8 ml) foi a ela adicionada, de tal forma que o pH da solução fosse ajustado para o pH 4. A seguir, éter dietílico foi a ela adicionado para realizar uma operação de extração. Após o término da concentração, o resíduo obtido foi colocado em uma coluna ODS para realização da purificação, obtendo, dessa forma, 30 mg de um peptídeo de 8 resíduos, Val-Asp-Lys-Ala-Val-Cys(Me)-Gly-Leu (ID. DE SEQ. N°: 7), em que o átomo de enxofre do resíduo de cisteína foi metilado.

ESI-MS: Calculado para $C_{35}H_{64}N_9O_{11}S$: $[M+1H]^{1+}$ 819,0,

encontrado, 818,8.

29 mg (36 µmol) do peptídeo de 8 resíduos obtido (ID. DE SEQ. N°: 7), no qual o átomo de enxofre do resíduo de cisteína havia sido metilado, foram colocados em um frasco de fundo redondo e foram dissolvidos em 15 ml de uma solução de ácido fórmico 80%. A seguir, 381 mg (3,6 mmol) de brometo de cianogênio foram adicionados à solução a 25°C. O reator foi protegido da luz, e foi então realizada uma reação a 25°C. Trinta e duas horas mais tarde, a solução da reação foi congelada para terminar uma reação. O resíduo obtido após a liofilização da solução da reação foi purificado por HPLC (coluna C8 Vydac, 250 x 10 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 90 : 10 → 70 : 30; 60 minutos; taxa de fluxo: 4,0 ml/min) para obter 18 mg de uma forma de éster como um intermediário da reação.

ESI-MS: Calculado para $C_{34}H_{62}N_9O_{12}$: $[M+1H]^{1+}$ 788,9, encontrado, 788,5.

5 mg do intermediário da reação obtido foram colocados em um tubo de Eppendorf e foram dissolvidos em 0,63 ml de um tampão fosfato (pH 7,2; contendo 6 M de cloridrato de guanidina), seguido por uma reação a 37°C. Depois de 9,25 horas, após confirmação de que reação havia terminado, a solução da reação foi purificada por HPLC (coluna C4 Vydac, 250 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 100 : 0 → 40 : 60; 30 minutos; taxa de fluxo: 1,0 ml/min) para obter 4,1 mg de um peptídeo de 8 resíduos de interesse, Val-Asp-Lys-Ala-Val-Ser-Gly-Leu

(ID. DE SEQ. N°: 8). Deve-se observar que o tempo de reação também pode ser ajustado para 7,25 horas.

ESI-MS: Calculado para $C_{34}H_{62}N_9O_{12}$: $[M+1H]^{1+}$ 788,9, encontrado, 788,7.

Exemplo 3

Produção de Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly

A resina Wang (fabricada por Merck) (100 µmol) foi colocada em uma coluna de síntese de fase sólida, e foi então completamente lavada com cloreto de metileno (DCM) e DMF. A seguir, o resultante ficou completamente intumescido com DCM. Fmoc-Gly (0,50 mmol), MSNT (0,50 mmol) e N-metilimidazol (0,375 mmol) foram dissolvidos em DCM (2 ml), e a solução obtida foi então colocada na coluna de síntese de fase sólida, seguida por agitação a 25°C por 1 hora. Deve-se observar que o volume do DCM também pode ser ajustado para 1,5 ml. Após o término da operação de agitação, a resina foi completamente lavada com DCM e DMF, e o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 15 minutos para desproteção. Deve-se observar que o presente tratamento de desproteção também pode ser realizado por 10 minutos. Após lavagem com DMF, para o alongamento subseqüente de uma cadeia peptídica, os aminoácidos foram sucessivamente condensados de acordo com o método mencionado abaixo.

Um aminoácido cujo grupo amino foi protegido por um grupo Fmoc, HOBt (67,6 mg, 0,50 mmol) e DIPCI (77,0 µl, 63,1 mg, 0,50 mmol) foi dissolvido em DMF (1 ml), e a solução obtida foi então ativada por 15 minutos. A seguir, a solução foi colocada na coluna de síntese de fase sólida. Após agitação a 25°C por 1 hora, o grupo Fmoc foi tratado

com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 20 minutos para desproteção. Deve-se observar que o presente tratamento de desproteção também pode ser realizado por 10 minutos. Essas operações foram repetidas, de tal forma que os aminoácidos fossem sucessivamente condensados. Como aminoácidos protegidos pelos grupos Fmoc, Fmoc-Arg (Pbf) (324,4 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Leu (176,7 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Phe (193,7 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Asn (177,2 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Cys (Trt) (292,9 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Tyr (tBu) (229,8 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Val (169,7 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Arg (Pbf) (324,4 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Phe (193,7 mg, 0,50 mmol) e Fmoc-Leu (176,7 mg, 0,50 mmol) foram usados, e um peptídeo de 11 resíduos que possui um grupo de proteção, Fmoc-Leu-Phe-Arg(Pbf)-Val-Tyr(tBu)-Cys(Trt)-Asn-Phe-Leu-Arg(Pbf)-Gly (ID. DE SEQ. N°: 9) foi obtido na resina de fase sólida. A seguir, o grupo Fmoc foi tratado com 2 ml de uma solução de piperidina 20%/DMF na resina por 20 minutos para desproteção. Deve-se observar que o presente tratamento de desproteção também pode ser realizado por 10 minutos. A solução da reação foi lavada com DMF e DCM. A seguir, um reagente K preparado previamente (TFA/água/fenol/tioanisol/EDT = 82,5/5/5/5/2,5) foi adicionado em um grau tal que a resina ficasse suficientemente imersa nele, e ele foi então agitado a 25°C por 2 horas. Deve-se observar que, em vez do reagente K, TFA/água/fenol/tioanisol/EDT/TIPS = 81,5/5/5/5/2,5/1,0 também pode ser usado. A resina foi removida por filtração, e a solução da reação foi então concentrada sob uma pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por HPLC (Vydac coluna C18, 250 x 10 mm; solventes de desenvolvimento A:

solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 70 : 30 → 40 : 60; 15 minutos; taxa de fluxo: 2,0 ml/min) para obter um peptídeo de 11 resíduos, Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Cys-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly (ID. DE SEQ. N°: 10).

21 mg (15 µmol) do peptídeo de 11 resíduos obtido (ID. DE SEQ. N°: 10) foram colocados em um frasco de fundo redondo e foram dissolvidos em 15 ml de um tampão de 0,25 M de Tris-HCl (pH 8,6; contendo uma solução de 6 M de cloridrato de guanidina e 3,3 mM de EDTA) e acetonitrila (5 ml). A seguir, metil-4-nitrobenzenossulfonato (66 mg) foi adicionado à solução a 25°C. Trinta minutos mais tarde, uma solução de TFA 10% (1,5 ml) foi a ela adicionada, de tal forma que o pH da solução fosse ajustado para o pH 4. A seguir, éter dietílico foi a ela adicionado para realizar uma operação de extração. Após o término da concentração, o resíduo obtido foi colocado em uma coluna ODS para realização da purificação, obtendo, dessa forma, 19 mg de um peptídeo de 11 resíduos, Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Cys(Me)-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly (ID. DE SEQ. N°: 11), em que o átomo de enxofre do resíduo de cisteína foi metilado.

ESI-MS: Calculado para $C_{66}H_{100}N_{18}O_{14}S$: $[M+2H]^{2+}$ 701,4, encontrado, 701,5.

18 mg (13 µmol) do peptídeo de 11 resíduos obtido (ID. DE SEQ. N°: 11), no qual o átomo de enxofre do resíduo de cisteína havida sido metilado, foram colocados em um frasco de fundo redondo e foram dissolvidos em 5,4 ml de uma solução de 2,4 mM de ácido fórmico 80%. A seguir, 136 mg (1,3 mmol) de brometo de cianogênio foram adicionados à solução a 25°C. O reator foi protegido da luz, e foi então

realizada uma reação a 25°C. Aproximadamente 50 horas mais tarde, a solução da reação foi congelada para terminar uma reação. O resíduo obtido após a liofilização da solução da reação foi purificado por HPLC (coluna C8 Vydac, 250 x 10 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 85 : 15 → 50 : 50; 60 minutos; taxa de fluxo: 3,0 ml/min) para obter 7,5 mg de uma forma de éster como um intermediário da reação.

ESI-MS: Calculado para $C_{65}H_{100}N_{18}O_{15}$: $[M+2H]^{2+}$ 686,4, encontrado, 686,5.

7 mg do intermediário da reação obtido foram colocados em um tubo de Eppendorf e foram dissolvidos em 0,50 ml de um tampão fosfato (pH 7,2; contendo 6 M de cloridrato de guanidina), seguida por uma reação a 37°C. Uma hora mais tarde, após confirmação de que reação havia terminado, a solução da reação foi purificada por HPLC (coluna C4 Vydac, 250 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 80 : 20 → 40 : 60; 30 minutos; taxa de fluxo: 1,0 ml/min) para obter 5,4 mg de um peptídeo de 11 resíduos de interesse, Leu-Phe-Arg-Val-Tyr-Ser-Asn-Phe-Leu-Arg-Gly (ID. DE SEQ. N°: 12).

ESI-MS: Calculado para $C_{65}H_{100}N_{18}O_{15}$: $[M+2H]^{2+}$ 686,4, encontrado, 686,4.

Exemplo 4

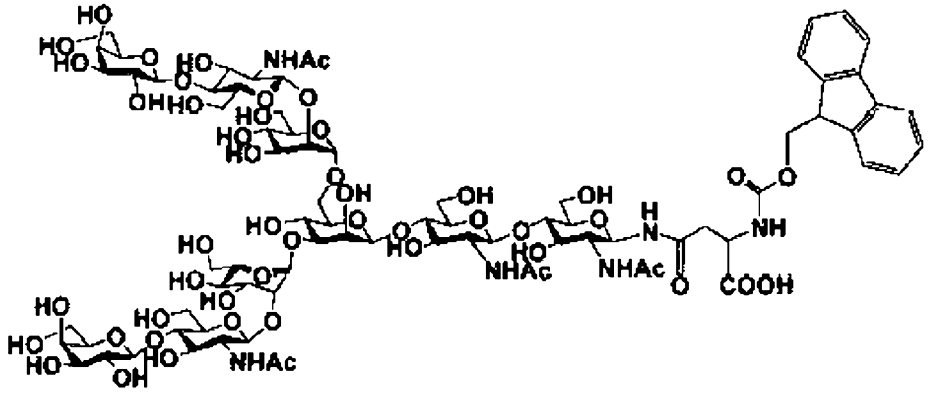
Produção de Ala-Leu-Leu-Val-Asn(cadeia de oligossacarídeos)-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala

A resina Amino-PEGA (fabricada por Merck) (100 µmol)

foi colocada em uma coluna de síntese de fase sólida, e foi então completamente lavada com cloreto de metileno (DCM) e DMF. A seguir, o resultante ficou completamente intumescido com DCM. Ácido 4-hidroximetil-3-metoxifenoxi butírico (HMPB) (0,25 mmol), TBTU (0,25 mmol) e N-etilmorfolino (0,25 mmol) foram dissolvidos em DMF (2 ml), e a solução obtida foi então colocada na coluna, seguido por agitação a 25°C por 4 horas. A seguir, a resina foi completamente lavada com DMF e DCM para obter uma resina HMPB-PEGA. A resina HMPB-PEGA obtida foi usada como um veículo de fase sólida na síntese de fase sólida.

Fmoc-Ser (tBu) (0,50 mmol), MSNT (0,50 mmol) e N-metilimidazol (0,375 mmol) foram dissolvidos em DCM (2 ml), e a solução obtida foi então colocada na coluna de síntese de fase sólida, seguida por uma reação a 25°C por 3 horas. Deve-se observar que o volume do DCM também pode ser ajustado para 2,5 ml. Após o término da operação de agitação, a resina foi lavada com DCM e DMF, e o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 15 minutos para desproteção. Deve-se observar que o presente tratamento de desproteção também pode ser realizado por 10 minutos.

Após lavagem com DMF, uma resina que corresponde a 2 µmol de um peptídeo de 1 resíduo foi transferida em um tubo de Eppendorf. A cadeia de açúcar asparagina (10 mg, 3,6 µmol) representada pela Fórmula (9) abaixo e DEPBT (2 mg, 6 µmol) foram dissolvidos em DMF (0,12 ml), e a solução obtida foi então colocada em um tubo de Eppendorf. DIPEA (0,68 µl, 4 µmol) foi a ela adicionada, e a mistura obtida foi então agitada a 25°C por 18 horas.



(9)

Após o término da operação de agitação, a resina foi lavada com DCM e DMF. O grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (1 ml) por 15 minutos para desproteção. Após lavagem com DMF, para o alongamento subseqüente de uma cadeia glicopeptídica, os aminoácidos foram sucessivamente condensados de acordo com o método mencionado abaixo.

Um aminoácido cujo grupo amino foi protegido por um grupo Fmoc, HOBt (1,35 mg, 0,01 mmol) e DIPCI (1,53 µl, 1,26 mg, 0,01 mmol) foi dissolvido em DMF (0,02 ml), e a solução obtida foi então ativada por 15 minutos. A seguir, a solução foi colocada na coluna de síntese de fase sólida. Após agitação a 25°C por 1 hora, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (1 ml) por 20 minutos para desproteção. Essas operações foram repetidas, de tal forma que os aminoácidos fossem sucessivamente condensados. Como aminoácidos cujos grupos amino foram protegidos pelos grupos Fmoc, Fmoc-Val (3,4 mg, 0,01 mmol), Fmoc-Leu (3,5 mg, 0,01 mmol), Fmoc-Leu (3,5 mg, 0,01 mmol) e Fmoc-Ala (3,1 mg, 0,01 mmol) foram usados, e um peptídeo de 6

resíduos com açúcar adicionado que possui um grupo de proteção, Fmoc-Ala-Leu-Leu-Val-Asn (cadeia de oligossacarídeos)-Ser(tBu) (ID. DE SEQ. N°: 13) foi obtido na resina de fase sólida. Ácido acético : trifluoretanol (= 1 : 1) foi adicionado a esse peptídeo com açúcar adicionado em um grau em que a resina ficasse suficientemente imersa nele. Quatro horas mais tarde, a resina foi removida por filtração, e uma porção do filtrado foi então adicionada a éter dietílico, que havia sido preparado separadamente para realizar cristalização. A seguir, a porção da solução foi removida usando um filtro de membrana, obtendo, dessa forma, um resíduo contendo um peptídeo de 6 resíduos com cadeia de açúcar adicionada que possui um grupo de proteção (ID. DE SEQ. N°: 13).

2 mg (0,55 µmol) do peptídeo de 6 resíduos com cadeia de açúcar adicionada obtido que possui um grupo de proteção (ID. DE SEQ. N°: 13), peneira molecular (MS) 4A (10 mg) e benzilmercaptano (2 µl, 16,4 µmol) foram agitados em um solvente de DMF (85 µl) em uma atmosfera de argônio a -20°C por 1 hora. A seguir, PyBOP (1,4 mg, 2,7 µmol) e DIPEA (0,46 µl, 2,7 µmol) foram adicionados à solução da reação, e a mistura obtida foi então agitada por 2,5 horas. A seguir, éter dietílico (5 ml) foi adicionado à solução da reação para precipitar um composto. O composto precipitado foi filtrado, e o precipitado foi então recuperado com uma solução aquosa de acetonitrila 50%. O produto recuperado foi liofilizado, e uma solução aquosa de TFA 95% foi adicionada ao produto liofilizado obtido. A mistura obtida foi agitada a 25°C por 2 horas. A resina foi removida por filtração. A solução da reação foi concentrada e depois foi

dissolvida em uma solução aquosa de acetonitrila 50%, seguida por liofilização. O produto liofilizado foi purificado por HPLC (coluna C4 Vydac, 250 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 80 : 20 → 40 : 60; 60 minutos; taxa de fluxo: 1,0 ml/min) para obter um peptídeo de 6 resíduos com cadeia de açúcar adicionada que possui benziltioéster em seu terminal C, Ala-Leu-Leu-Val-Asn(cadeia de oligossacarídeos)-Ser-SBn (ID. DE SEQ. N°: 15).

O método seguinte também pode ser aplicado como a etapa mencionada anteriormente de obtenção do peptídeo de 6 resíduos com cadeia de açúcar adicionada mostrado no ID. DE SEQ. N°: 15 pela reação com asparagina com cadeia de açúcar em um tubo de Eppendorf:

Após lavagem com DMF, uma resina que corresponde a 4,3 µmol de um peptídeo de 1 resíduo foi transferida em um tubo de Eppendorf. A asparagina com cadeia de açúcar (17 mg, 8,6 µmol) representada pela Fórmula (9) e DEPBT (6 mg, 8,6 µmol) foram dissolvidos em DMF : DMSO = 4 : 1 (0,29 ml), e a solução obtida foi então colocada em um tubo de Eppendorf. DIPEA (1,5 µl, 8,6 µmol) foi a ela adicionada, e a mistura obtida foi então agitada a 25°C por 18 horas.

Após o término da operação de agitação, a resina foi lavada com DCM e DMF. O grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (1 ml) por 10 minutos para desproteção. Após lavagem com DMF, para o alongamento subseqüente de uma cadeia glicopeptídica, os aminoácidos foram sucessivamente condensados de acordo com o método mencionado abaixo.

Um aminoácido cujo grupo amino foi protegido por um grupo Fmoc, HOBt (2,9 mg, 0,022 mmol) e DIPCI (3,3 µl, 0,022 mmol) foram dissolvidos em DMF (0,54 ml), e a solução obtida foi então ativada por 15 minutos. A seguir, a solução foi colocada na coluna de síntese de fase sólida. Após agitação a 25°C por 1 hora, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (1 ml) por 20 minutos para desproteção. Essas operações foram repetidas, de tal forma que os aminoácidos fossem sucessivamente condensados. Como aminoácidos cujos grupos amino foram protegidos pelos grupos Fmoc, Fmoc-Val (7,3 mg, 0,022 mmol), Fmoc-Leu (7,6 mg, 0,022 mmol), Fmoc-Leu (7,6 mg, 0,022 mmol), e Boc-Ala (4,0 mg, 0,022 mmol) foram usados, e um peptídeo de 6 resíduos com açúcar adicionado que possui um grupo de proteção, Boc-Ala-Leu-Leu-Val-Asn(cadeia de oligossacarídeos)-Ser(tBu) (ID. DE SEQ. N°: 14) foi obtido na resina de fase sólida. Ácido acético : trifluoretanol (= 1 : 1) foi adicionado a esse peptídeo com açúcar adicionado em um grau em que a resina ficasse suficientemente imersa nele. Vinte e quatro horas mais tarde, a resina foi removida por filtração, e uma porção do filtrado foi então adicionada a éter dietílico, que havia sido preparado separadamente para realizar cristalização. A seguir, a porção da solução foi removida usando um filtro de membrana, obtendo, dessa forma, um resíduo contendo um peptídeo de 6 resíduos com cadeia de açúcar adicionada que possui um grupo de proteção (ID. DE SEQ. N°: 14).

18 mg (7,5 µmol) do peptídeo de 6 resíduos com cadeia de açúcar adicionada obtido que possui um grupo de proteção (ID. DE SEQ. N°: 14), peneira molecular (MS) 4A (190 mg) e

benzilmercaptano (26 µl, 37,5 µmol), foram agitados em um solvente de DMF (1,9 ml) em uma atmosfera de argônio a -20°C por 1 hora. A seguir, PyBOP (20 mg, 37,5 µmol) e DIPEA (6,7 µl, 37,5 µmol) foram adicionados à solução da reação, e a mistura obtida foi então agitada por 2 horas. A seguir, éter dietílico (10 ml) foi adicionado à solução da reação para precipitar um composto. O composto precipitado foi filtrado, e o precipitado foi então dissolvido em DMF. A solução obtida foi concentrada sob uma pressão reduzida, e uma solução aquosa de TFA 95% foi adicionada ao resíduo obtido. A mistura obtida foi agitada a 25°C por 2 horas. A solução da reação foi concentrada e depois purificada por HPLC (coluna C4 Vydac, 250 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 100 : 0 → 40 : 60; 60 minutos; taxa de fluxo: 1,0 ml/min) para obter um peptídeo de 6 resíduos com cadeia de açúcar adicionada que possui benziltioéster em seu terminal C, Ala-Leu-Leu-Val-Asn(cadeia de oligossacarídeos)-Ser-SBn (ID. DE SEQ. N°: 15).

Por outro lado, resina Wang (fabricada por Merck) (100 µmol) foi colocada em uma coluna de síntese de fase sólida, e foi então completamente lavada com cloreto de metileno (DCM) e DMF. A seguir, o resultante ficou completamente intumescido com DCM. Fmoc-Ala (0,50 mmol), MSNT (0,50 mmol) e N-metilimidazol (0,375 mmol) foram dissolvidos em DCM (2 ml), e a solução obtida foi então colocada na coluna de síntese de fase sólida, seguida por agitação a 25°C por 1 hora. Deve-se observar que o volume do DCM também pode ser ajustado para 1,5 ml. Após o término da operação de

agitação, a resina foi completamente lavada com DCM e DMF, e o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 15 minutos para desproteção. Deve-se observar que o presente tratamento de desproteção também pode ser realizado por 10 minutos. Após lavagem com DMF, para o alongamento subseqüente de uma cadeia peptídica, os aminoácidos foram sucessivamente condensados de acordo com o método mencionado abaixo.

Um aminoácido cujo grupo amino foi protegido por um grupo Fmoc, HOBt (67,6 mg, 0,50 mmol) e DIPCI (77,0 µl, 63,1 mg, 0,50 mmol) foram dissolvidos em DMF (1 ml), e a solução obtida foi então ativada por 15 minutos. A seguir, a solução foi colocada na coluna de síntese de fase sólida. Deve-se observar que o volume da DMF também pode ser ajustado para 2 ml. Após agitação a 25°C por 1 hora, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 20 minutos para desproteção. Essas operações foram repetidas, de tal forma que os aminoácidos fossem sucessivamente condensados. Como aminoácidos protegidos pelos grupos Fmoc, Fmoc-Lys (Boc) (234,3 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Asp (OtBu) (205,8 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Val (169,7 mg, 0,50 mmol), Fmoc-His (Trt) (309,9 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Leu (176,7 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Gln (184,2 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Leu (176,7 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Pro (168,7 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Glu (OtBu) (212,8 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Trp (Boc) (263,3 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Pro (168,7 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Gln (184,2 mg, 0,50 mmol) e Fmoc-Cys (Trt) (292,9 mg, 0,50 mmol) foram usados, e um peptídeo de 14 resíduos que possui um grupo de proteção, Fmoc-Cys(Trt)-Gln-Pro-Trp(Boc)-Glu(OtBu)-Pro-Leu-Gln-Leu-His(Trt)-Val-

Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Ala (ID. DE SEQ. N°: 16) foi obtido na resina de fase sólida. A seguir, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 20 minutos para desproteção, o resultante foi então lavado com DMF e DCM. A seguir, um reagente K preparado previamente (TFA/água/fenol/tioanisol/EDT = 82,5/5/5/5/2,5) foi adicionado em um grau tal que a resina ficasse suficientemente imersa nele, e ele foi então agitado a 25°C por 2 horas. Deve-se observar que, em vez do reagente K, TFA/água/fenol/tioanisol/EDT/TIPS = 81,5/5/5/5/2,5/1,0 também pode ser usado. A resina foi removida por filtração, e a solução da reação foi então concentrada sob uma pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por HPLC (coluna C8 Vydac, 250 x 10 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 80 : 20 → 40 : 60; 30 minutos; taxa de fluxo: 4,0 ml/min) para obter um peptídeo de 14 resíduos, Cys-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala (ID. DE SEQ. N°: 17).

1,1 mg do peptídeo de 14 resíduos assim preparado (ID. DE SEQ. N°: 17) e 1,3 mg do peptídeo de 6 resíduos com açúcar adicionado que possui benziltioéster em seu terminal C sintetizado previamente (ID. DE SEQ. N°: 15) foram colocados em um único tubo de Eppendorf, e foram dissolvidos em 275 µl de um tampão fosfato (pH 7,2; contendo 6 M de cloridrato de guanidina). A seguir, tiofenol (1 µl) e benzilmercaptano (1 µl) foram adicionados à solução a 25°C, e foi então realizada uma reação a 37°C. Vinte e seis horas mais tarde, após confirmação por HPLC de que a reação havia terminado, a solução da reação foi

purificada por HPLC (Vydac coluna C18, 250 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 80 : 20 → 50 : 50; 60 minutos; taxa de fluxo: 1,0 ml/min) para obter 1,5 mg de um peptídeo de 20 resíduos com cadeia de açúcar adicionada, Ala-Leu-Leu-Val-Asn(cadeia de oligossacarídeos)-Ser-Cys-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala (ID. DE SEQ. N°: 18).

1.5 mg (0,39 µmol) do peptídeo de 20 resíduos com cadeia de açúcar adicionada obtido (ID. DE SEQ. N°: 18) foi colocado em um frasco de fundo redondo, e foi dissolvido em 0,39 ml de um tampão de 0,25 M de Tris-HCl (pH 8,6; contendo uma solução de 6 M de cloridrato de guanidina e 3,3 mM de EDTA) e 0,13 ml de acetonitrila. A seguir, metil-4-nitrobenzenossulfonato (1,7 mg) foi adicionado à solução a 25°C. Quarenta minutos mais tarde, uma solução de TFA 10% (1,5 ml) foi a ela adicionada, de tal forma que o pH da solução fosse ajustado para o pH 4. A seguir, éter dietílico foi a ela adicionado para realizar uma operação de extração. Após uma camada aquosa ter sido concentrada, o resíduo obtido foi purificado por HPLC (coluna C4 Vydac, 250 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 80 : 20 → 55 : 45; 60 minutos; taxa de fluxo: 1,0 ml/min) (em que uma coluna C18 também pode ser usada na purificação, no lugar da coluna C4 mencionada anteriormente) para obter 1,6 mg de um peptídeo de 20 resíduos com cadeia de açúcar adicionada, Ala-Leu-Leu-Val-Asn(cadeia de oligossacarídeos) -Ser-Cys(Me)-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala (ID. DE

SEQ. N°: 19), em que o átomo de enxofre do resíduo de cisteína foi metilado.

ESI-MS: Calculado para $C_{165}H_{265}N_{31}O_{74}S$: $[M+2H]^{2+}$ 1.300,7, encontrado, 1.300,4.

1,6 mg (0,4 µmol) do peptídeo de 20 resíduos com cadeia de açúcar adicionada obtido (ID. DE SEQ. N°: 19), no qual o átomo de enxofre do resíduo de cisteína foi metilado, foi colocado em um tubo de Eppendorf, e foi dissolvido em 0,4 ml de uma solução de ácido fórmico 80%. A seguir, 4,3 mg (0,04 mmol) de brometo de cianogênio foram adicionados à solução a 25°C. O reator foi protegido da luz, e foi então realizada uma reação a 37°C. Trinta e cinco horas mais tarde, a solução da reação foi congelada para terminar uma reação. Um hidrato de hidrazina 5% (200 µl) foi adicionado ao resíduo obtido após a liofilização da solução da reação, e o interior do sistema de reação foi ajustado para ter um pH de 10 a 11. Cinco minutos mais tarde, ácido acético (5 µl) foi adicionado ao sistema de reação, de forma que o interior deste fosse ajustado até o pH 8 a 9. O resultante foi purificado por HPLC (coluna C4 Vydac, 250 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 80 : 20 → 50 : 50; 30 minutos; taxa de fluxo: 1,0 ml/min) para obter 0,7 mg de um peptídeo de 20 resíduos com cadeia de açúcar adicionada, Ala-Leu-Leu-Val-Asn(cadeia de oligossacarídeos)-Ser-Ser-Gln-Pro-Trp-Glu-Pro-Leu-Gln-Leu-His-Val-Asp-Lys-Ala (ID. DE SEQ. N°: 20), que era um glicopeptídeo de interesse.

34 horas após uma reação com brometo de cianogênio, a solução da reação foi concentrada sob uma pressão reduzida,

e um hidrato de hidrazina 5% (200 µl) foi adicionado ao resíduo obtido, seguido por agitação por 10 minutos. A seguir, 5 µl de ácido acético foram adicionados à solução da reação, e a mistura obtida foi então purificada por HPLC. Também nesse caso, o mesmo peptídeo de 20 resíduos com cadeia de açúcar adicionada (ID. DE SEQ. N°: 20) podia ser obtido.

ESI-MS: Calculado para $C_{164}H_{263}N_{31}O_{75}$: $[M+2H]^{2+}$ 1.290,6, encontrado, 1.290,7.

Exemplo 5

Produção de Ac-Gly-Ser-Gly-Met-Ala

Resina Wang (fabricada por Merck) (100 µmol) foi colocada em uma coluna de síntese de fase sólida, e foi então completamente lavada com cloreto de metileno (DCM) e DMF. A seguir, o resultante ficou completamente intumescido com DCM. Fmoc-Ala (0,50 mmol), MSNT (0,50 mmol) e N-metilimidazol (0,375 mmol) foram dissolvidos em DCM (1,5 ml), e a solução obtida foi então colocada na coluna de síntese de fase sólida, seguida por agitação a 25°C por 2 horas. Após o término da operação de agitação, a resina foi completamente lavada com DCM e DMF, e o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 15 minutos para desproteção. Após lavagem com DMF, para o alongamento subseqüente de uma cadeia peptídica, os aminoácidos foram sucessivamente condensados de acordo com o método mencionado abaixo.

Um aminoácido cujo grupo amino foi protegido por um grupo Fmoc, HOBt (67,6 mg, 0,50 mmol) e DIPCI (77,0 µl, 63,1 mg, 0,50 mmol) foi dissolvido em DMF (2 ml), e a solução obtida foi então ativada por 15 minutos. A seguir,

a solução foi colocada na coluna de síntese de fase sólida. Após agitação a 25°C por 1 hora, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 10 minutos para desproteção. Essas operações foram repetidas, de tal forma que os aminoácidos fossem sucessivamente condensados. Como aminoácidos protegidos pelos grupos Fmoc, Fmoc-Met(O) (193,8 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Gly (148,9 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Cys(Trt) (292,9 mg, 0,50 mmol) e Fmoc-Gly (148,9 mg, 0,50 mmol) foram usados, e um peptídeo de 5 resíduos que possui um grupo de proteção, Fmoc-Gly-Cys(Trt)-Gly-Met(O)-Ala (ID. DE SEQ. N°: 21) foi obtido na resina de fase sólida. A seguir, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) na resina por 10 minutos para desproteção, e os grupos amino livres foram estão protegidos por acetil usando uma solução de anidrido acético 20%/DMF (1,25 ml). Após lavagem com DMF e DCM, um reagente preparado previamente (TFA/água/TIPS = 95/2,5/2,5) foi adicionado em um grau tal que a resina ficasse suficientemente imersa nele, e ele foi então agitado a 25°C por 2 horas. A resina foi removida por filtração, e 20 ml de éter dietílico foram então adicionados ao filtrado para precipitação. O precipitado foi filtrado, e o filtrado foi então dissolvido em uma solução aquosa de TFA 0,1%. A solução obtida foi concentrada sob uma pressão reduzida, e o resultante foi então liofilizado para obter uma mistura que compreende um peptídeo de 5 resíduos, Ac-Gly-Cys-Gly-Met(O)-Ala (ID. DE SEQ. N°: 22), em que o átomo de enxofre da metionina na posição 4 estava oxidada.

5 mg do peptídeo de 5 resíduos obtido (ID. DE SEQ. N°: 22) mistura, em que o átomo de enxofre da metionina na

posição 4 havia sido oxidado, foram colocados em um frasco de fundo redondo e foram dissolvidos em 10 ml de um tampão de 0,25 M de Tris-HCl (pH 8,6; contendo uma solução de 6 M de cloridrato de guanidina e 3,3 mM de EDTA). 2-mercaptoetanol (7 µl) foi adicionado à solução obtida, e a mistura obtida foi então agitada por 10 minutos. A seguir, 3,3 ml de uma solução de acetonitrila contendo metil-4-nitrobenzenossulfonato (66 mg) foram adicionados à solução da reação. Vinte e cinco minutos mais tarde, uma solução de TFA 10% (1,0 ml) foi a ela adicionada para neutralização. A seguir, éter dietílico foi a ela adicionado para realizar uma operação de extração 3 vezes. Após uma camada aquosa ter sido concentrada sob uma pressão reduzida, o resíduo obtido foi purificado por HPLC (Vydac coluna C18, 250 x 10 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,09%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 100 : 0 → 100 : 0 → 60 : 40; 0 minuto → 5 minutos → 35 minutos; taxa de fluxo: 4,0 ml/min) para obter 4 mg de um peptídeo de 5 resíduos, Ac-Gly-Cys(Me)-Gly-Met(O)-Ala (ID. DE SEQ. N°: 23), em que o átomo de enxofre do resíduo de cisteína na posição 2 estava metilado e o resíduo de metionina na posição 4 estava oxidado.

3,8 mg do peptídeo de 5 resíduos obtido (ID. DE SEQ. N°: 23), em que o átomo de enxofre do resíduo de cisteína na posição 2 havia sido metilado e o resíduo de metionina na posição 4 havida sido oxidado, foram colocados em um tubo de Eppendorf, e foram dissolvidos em 3,1 ml de uma solução de ácido fórmico 80%. A seguir, 79,0 mg de brometo de cianogênio foram adicionados à solução, e o reator foi então protegido da luz. A solução da reação foi agitada sob

condições substituídas por argônio a 37°C por 39 horas. Após o término da reação, o resultante foi submetido à concentração à vácuo para obter um resíduo contendo uma forma de éster como um intermediário da reação.

O resíduo obtido foi colocado em um tubo de Eppendorf, e foi dissolvido em 1,25 ml de um tampão de fosfato de sódio (contendo 6 M de cloridrato de guanidina; pH 7,2), seguido por agitação por 45 minutos. A seguir, 3,6 ml de ácido trifluoracético, 22 mg de iodeto de amônio e 11 µl de sulfeto de dimetila foram adicionados à solução da reação, e a mistura obtida foi então agitada em temperatura ambiente. Trinta minutos mais tarde, 10 ml de água foram adicionados à solução da reação, e a solução obtida foi então separada e lavada com tetracloreto de carbono. Uma camada de água foi concentrada sob uma pressão reduzida, e o resíduo obtido foi então purificado por HPLC (Vydac coluna C18, 250 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,09%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 100 : 0 → 100 : 0 → 60 : 40; 0 minuto → 5 minutos → 65 minutos; taxa de fluxo: 1,0 ml/min) para obter 2,6 mg de um peptídeo de 5 resíduos de interesse que possui um grupo de proteção, Ac-Gly-Ser-Gly-Met-Ala (ID. DE SEQ. N°: 24).

ESI-MS: Calculado para $C_{16}H_{28}N_4O_7$: $[M+1H]^{1+}$ 464,2, encontrado, 464,5.

Exemplo 6

Produção de Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr (GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly

Resina Amino-PEGA (fabricada por Merck) (100 µmol) foi colocada em uma coluna de síntese de fase sólida, e foi então completamente lavada com cloreto de metileno (DCM) e DMF. A seguir, o resultante ficou completamente intumescido com DMF. Ácido 4-hidroximetil-3-metoxifenoxi butírico (HMPB) (0,25 mmol), TBTU (0,25 mmol) e N-etilmorfolino (0,25 mmol) foram dissolvidos em DMF (2 ml), e a solução obtida foi então colocada na coluna, seguido por agitação a 25°C por 2 horas. A seguir, a resina foi completamente lavada com DMF e DCM para obter uma resina HMPB-PEGA. A resina HMPB-PEGA obtida foi usada como um veículo de fase sólida na síntese de fase sólida.

Fmoc-Gly (0,50 mmol), MSNT (0,50 mmol) e N-metilimidazol (0,375 mmol) foram dissolvidos em DCM (4,5 ml), e a solução obtida foi então colocada na coluna de síntese de fase sólida, seguida por agitação a 25°C por 3 horas. Após o término da operação de agitação, a resina foi lavada com DCM e DMF, e o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 10 minutos para desproteção. Após lavagem com DMF, para o alongamento subseqüente de uma cadeia peptídica, os aminoácidos foram sucessivamente condensados de acordo com o método mencionado abaixo.

Um aminoácido cujo grupo amino foi protegido por um grupo Fmoc, HOBt (67,6 mg, 0,50 mmol) e DIPCI (77,0 µl, 63,1 mg, 0,50 mmol) foram dissolvidos em DMF (4 ml), e a solução obtida foi então ativada por 15 minutos. A seguir, a solução foi colocada na coluna de síntese de fase sólida. Após agitação a 25°C por 1 hora, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 10 minutos

para desproteção. Essas operações foram repetidas, de tal forma que os aminoácidos fossem sucessivamente condensados. Como aminoácidos protegidos pelos grupos Fmoc, Fmoc-Pro, Fmoc-Ala, Fmoc-Pro, Fmoc-Arg (Pbf), Fmoc-Thr (tBu), Fmoc-Asp (OtBu), Fmoc-Pro, Fmoc-Ala, Fmoc-Ser (tBu), Fmoc-Thr (tBu), Fmoc-Val, Fmoc-Gly, Fmoc-His (Trt), Fmoc-Ala, Fmoc-Pro, Fmoc-Pro, e Fmoc-Ala foram usados. Na resina de fase sólida, um peptídeo de 18 resíduos que possui um grupo de proteção, Fmoc-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Ala-Pro-Asp(OtBu)-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Pro-Ala-Pro-Gly (ID. DE SEQ. N°: 25), foi obtido.

Esse peptídeo de 18 resíduos que possui um grupo de proteção (ID. DE SEQ. N°: 25) foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) na resina por 10 minutos para desproteção do grupo Fmoc. Após o resultante ter sido lavado com DMF e DCM, Fmoc-Thr(GalNAc) (0,20 mmol), HOBt (0,50 mmol) e DIPCI (0,50 mmol) que haviam sido dissolvidos em DMF (3,6 ml) e haviam sido ativados por 15 minutos foram adicionados ao resultante. Após a reação por 5 horas, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 20 minutos para desproteção para obter um peptídeo de 19 resíduos com açúcar adicionado que possui um grupo de proteção, Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His(Trt)-Gly-Val-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Ala-Pro-Asp(OtBu)-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Pro-Ala-Pro-Gly (ID. DE SEQ. N°: 26), na resina de fase sólida.

0,02 mmol do peptídeo de 19 resíduos com açúcar adicionado que possui um grupo de proteção obtido (ID. DE SEQ. N°: 26) na resina de fase sólida foi transferido para outra coluna de síntese de fase sólida. Boc-Ser(tBu) (0,1

mmol), DIPCI (0,1 mmol) e HOBt (0,1 mmol) que haviam sido dissolvidos em 0,5 ml de DMF e haviam sido ativados por 15 minutos foram adicionados à coluna, e foi então realizada uma reação por 1 hora. A seguir, a solução da reação foi filtrada, e ácido acético : trifluoretanol = 1 : 1 foram a ela adicionados em um grau em que a resina ficasse suficientemente imersa nele. Quatorze horas mais tarde, a resina foi removida por filtração, e o filtrado foi então concentrado sob uma pressão reduzida para obter um resíduo contendo um peptídeo de 20 resíduos com açúcar adicionado que possui um grupo de proteção, Boc-Ser(tBu)-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala- His(Trt)-Gly-Val-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Ala-Pro-Asp(OtBu)-Thr(tBu)-Arg(Pbf)-Pro-Ala-Pro-Gly (ID. DE SEQ. N°: 27).

75 mg (35 µmol) do peptídeo de 20 resíduos com açúcar adicionado que possui um grupo de proteção obtido (ID. DE SEQ. N°: 27) e 123 µl (105 µmol) de benzilmercaptano foram adicionados a 3,5 ml de DMF, e a mistura obtida foi então agitada em uma atmosfera de argônio a -20°C por 1 hora. A seguir, PyBOP (91 mg, 175 µmol) e DIPEA (30 µl, 175 µmol) foram adicionados à solução da reação, e a mistura obtida foi então agitada por 2,5 horas. A seguir, éter dietílico foi adicionado à solução da reação para precipitar os cristais, seguido por filtração. TFA/água/TIPS = 95/2,5/2,5 foi adicionado ao resíduo obtido em um grau em que a resina ficasse suficientemente imersa nele, e a mistura obtida foi então agitada a 25°C por 2 horas. A resina foi removida por filtração, e o filtrado foi então concentrado, de tal forma que o resíduo obtido fosse recuperado. O resíduo obtido foi purificado por HPLC (coluna C8 Vydac, 250 x 10 mm;

solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,09%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 90 : 10 → 60 : 40; 30 minutos; taxa de fluxo: 4,0 ml/min) para obter um peptídeo de 20 resíduos com açúcar adicionado que possui benziltioéster em seu terminal C, Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala- His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-SBn (ID. DE SEQ. N°: 28).

Por outro lado, 0,02 mmol do peptídeo de 19 resíduos com açúcar adicionado que possui um grupo de proteção obtido previamente (ID. DE SEQ. N°: 26) na resina de fase sólida foi transferido para outra coluna de síntese de fase sólida. Boc-Thia (0,04 mmol), DIPCI (0,1 mmol) e HOBt (0,1 mmol) que haviam sido dissolvidos em 1,5 ml de DMF e que haviam sido ativados por 15 minutos foram adicionados à coluna, e foi então realizada uma reação por 20 minutos. A seguir, a solução da reação foi filtrada, e um reagente (TFA/água/TIPS = 95/2,5/2,5) foi a ela adicionado em um grau em que a resina ficasse suficientemente imersa nele. A mistura obtida foi agitada a 25°C por 2 horas. A resina foi removida por filtração, e o filtrado foi então concentrado. O resíduo obtido foi dissolvido em 2,1 ml de 0,2 M de metoxiamina e 0,1 M de tampão de fosfato de sódio (pH 4; contendo 6 M de cloridrato de guanidina), de tal forma que a tiazolina no terminal N fosse submetida à abertura do anel. A seguir, a solução da reação foi purificada por HPLC (coluna C8 Vydac, 250 x 10 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 90 : 10 → 60 : 40; 30 minutos; taxa de fluxo: 4,0 ml/min) para obter um peptídeo de 20 resíduos com açúcar adicionado, Cys-Thr(GalNAc)-Ala-

Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly (ID. DE SEQ. N°: 29).

13 mg do peptídeo de 20 resíduos com açúcar adicionado assim obtido (ID. DE SEQ. N°: 29) e 12 mg do peptídeo de 20 resíduos que possui benziltioéster em seu terminal C obtido previamente (ID. DE SEQ. N°: 28) foram dissolvidos em 2,9 ml de um tampão fosfato (pH 7,2; contendo 6 M de cloridrato de guanidina). A seguir, 30 mg de ácido 4-mercaptofenilacético e 17 mg de tris(2-carboxietil)fosfina foram adicionados à solução acima, e foi então realizada uma reação por 3 horas. A solução da reação foi purificada por HPLC (coluna C8 Vydac, 250 x 10 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,09%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 90 : 10 → 60 : 40; 30 minutos; taxa de fluxo: 4,0 ml/min) para obter 18 mg de um peptídeo de 40 resíduos com açúcar adicionado, Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Cys-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly (ID. DE SEQ. N°: 30).

16 mg do peptídeo de 40 resíduos com açúcar adicionado obtido (ID. DE SEQ. N°: 30) foram colocados em um frasco de fundo redondo e foram dissolvidos em 3,8 ml de um tampão de 0,25 M de Tris-HCl (pH 8,6; contendo uma solução de 6 M de cloridrato de guanidina e 3,3 mM de EDTA). A seguir, 2-mercaptoetanol (3 µl) foi adicionado à solução obtida, e a mistura obtida foi então agitada por 10 minutos. Subseqüentemente, 1,27 ml de acetonitrila contendo 25 mg de metil-4-nitrobenzenossulfonato foi adicionado à solução da reação. Vinte e cinco minutos mais tarde, 0,45 ml de uma

solução de TFA 10% foi adicionado à solução da reação para neutralização, e 2 ml de éter dietílico foram então a ela adicionados, seguido por separação e lavagem 3 vezes. Após uma camada aquosa ter sido concentrada sob uma pressão reduzida, o resíduo obtido foi purificado por HPLC (Vydac coluna C-4, 250 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,08%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 100 : 0 → 100 : 0 → 90 : 10 → 60 : 40; 0 minuto → 10 minutos → 40 minutos; taxa de fluxo: 1.2 ml/min) para obter 13 mg de uma mistura que compreende um peptídeo de 40 resíduos com açúcar adicionado, Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Cys(Me)-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly (ID. DE SEQ. N°: 31), em que o átomo de enxofre do resíduo de cisteína na posição 21 estava metilado.

12 mg da mistura obtida que compreende o peptídeo de 40 resíduos com açúcar adicionado (ID. DE SEQ. N°: 31), em que o átomo de enxofre do resíduo de cisteína na posição 21 havia sido metilado, foram colocados em um frasco de fundo redondo e foram dissolvidos em 2,9 ml de uma solução aquosa de ácido fórmico 80%. A seguir, 152 mg de brometo de cianogênio foram adicionados à solução a 25°C. O reator foi protegido da luz, e foi então realizada uma reação a 37°C. Trinta e seis horas mais tarde, a solução da reação foi concentrada sob uma pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em 2,9 ml de ácido trifluoracético e, a seguir, 2,4 mg de iodeto de amônio e 24 µl de sulfeto de dimetila foram a ela adicionados, seguida por uma reação em

temperatura ambiente por 30 minutos. Trinta minutos mais tarde, 6 ml de água foram adicionados ao sistema de reação, e a separação e lavagem foram feitas usando tetracloreto de carbono. Uma camada de água foi concentrada sob uma pressão reduzida, e o resíduo foi então dissolvido em 1,4 ml de uma solução aquosa de hidrazina 5%, seguida por uma reação em temperatura ambiente por 10 minutos. Dez minutos mais tarde, 0,14 ml de ácido acético foi adicionado à solução da reação, e a mistura obtida foi então purificada por HPLC (Vydac coluna C-4, 250 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: 50 mM solução aquosa de $AcONH_4$; e B: acetonitrila; gradientes A : B = 90 : 10 → 70 : 30; 60 minutos; taxa de fluxo: 1,0 ml/min) para obter 2,3 mg de um peptídeo de 40 resíduos com açúcar adicionado de interesse, Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser-Thr(GalNAc)-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly (ID. DE SEQ. N°: 32).

ESI-MS: Calculado para: $[M+3H]^{3+}$ 1.388,5, encontrado, 1.388,6.

Exemplo 7

Produção de Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu

Resina de cloreto de Trt (fabricada por Merck) (100 µmol) foi colocada em uma coluna de síntese de fase sólida, e foi então completamente lavada com cloreto de metileno (DCM) e DMF. A seguir, o resultante ficou completamente intumescido com DCM. Após filtração, Fmoc-Gly (0,20 mmol) e DIPEA (0,4 mmol) foram dissolvidos em DCM (0,66 ml), e a solução obtida foi então colocada na coluna de síntese de fase sólida, seguida por agitação a 25°C por 2 horas. Após

o término da operação de agitação, a resina foi suficientemente lavada com DCM : MeOH: DIPEA = 17 : 2 : 1, DCM, e DMF, e o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (1 ml) por 20 minutos para desproteção. Após lavagem com DMF, para o alongamento subseqüente de uma cadeia peptídica, os aminoácidos foram sucessivamente condensados de acordo com o método mencionado abaixo.

Um aminoácido cujo grupo amino foi protegido, HOBt (67,6 mg, 0,50 mmol) e DIPCI (77,0 µl, 63,1 mg, 0,50 mmol) foram dissolvidos em DMF (2 ml), e a solução obtida foi então ativada por 15 minutos. A seguir, a solução foi colocada na coluna de síntese de fase sólida. Após agitação a 25°C por 1 hora, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 20 minutos para desproteção. Essas operações foram repetidas, de tal forma que os aminoácidos fossem sucessivamente condensados. Como os aminoácidos protegidos, Fmoc-Asn (177,2 mg, 0,50 mmol), Fmoc-Ser(tBu) (191,6 mg, 0,50 mmol) e Boc-Glu(OtBu) (151,6 mg, 0,50 mmol) foram usados. Na resina de fase sólida, um peptídeo de 4 resíduos que possui um grupo de proteção, Boc-Glu(OtBu)-Ser(tBu)-Asn-Gly (ID. DE SEQ. N°: 33), foi obtido.

Após o resultante ter sido lavado com DMF e DCM, 2 ml de AcOH : MeOH : DCM = 5 : 4 : 1 foram a ela adicionados, seguido por uma reação em temperatura ambiente for 2 horas. Duas horas mais tarde, a solução da reação foi recuperada por filtração, e foi então concentrada sob uma pressão reduzida para obter a resíduo. Um ml de benzeno foi adicionado a esse resíduo, uma operação azeotrópica foi então realizada 2 vezes, e o resultante foi então

dissolvido em 0,81 ml de DMF. À solução obtida, 42,1 mg de PyBOP, 14 µl de DIPEA e 57 µl de benzilmercaptano foram adicionados em uma atmosfera de argônio a 0°C, e a mistura obtida foi então agitada por 30 minutos. Após o término da reação, a solução da reação foi neutralizada com uma solução aquosa saturada de cloreto de amônio, e foi então separada e lavada com água e uma solução salina saturada. Uma camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, e foi então filtrada. A seguir, o filtrado foi concentrado sob uma pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (solventes de desenvolvimento; acetato de etila : MeOH : água = 20 : 2 : 1) para reunir as frações que contêm peptídeos de interesse, e as frações reunidas foram então concentradas sob uma pressão reduzida. O resíduo obtido foi dissolvido em uma solução aquosa de TFA 95%, e foi então realizada uma reação por 10 minutos. A solução da reação foi concentrada sob uma pressão reduzida para obter um peptídeo de 4 resíduos que possui benziltioéster em seu terminal C, Glu-Ser-Asn-Gly-SBn (ID. DE SEQ. N°: 34).

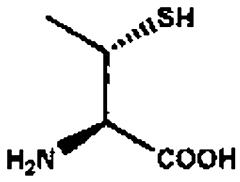
Por outro lado, resina Wang (fabricada por Merck) (0,1 mmol) foi colocada em uma coluna de síntese de fase sólida, e foi então completamente lavada com cloreto de metileno (DCM) e DMF. A seguir, o resultante ficou completamente intumescido com DCM. Fmoc-Leu (0,50 mmol), MSNT (0,50 mmol) e N-metilimidazol (0,375 mmol) foram dissolvidos em DCM (2 ml), e a solução obtida foi então colocada na coluna de síntese de fase sólida, seguida por agitação a 25°C por 2 horas. Duas horas mais tarde, a resina foi completamente lavada com DCM e DMF, e o grupo Fmoc foi tratado com uma

solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 20 minutos para desproteção. Após lavagem com DMF e DCM, para o alongamento subseqüente de uma cadeia peptídica, os aminoácidos foram sucessivamente condensados de acordo com o método mencionado abaixo.

Um aminoácido cujo grupo amino foi protegido, HOBt (67,6 mg, 0,50 mmol) e DIPCI (77,0 µl, 0,50 mmol) foram dissolvidos em 2 ml de DMF, e a solução obtida foi então ativada por 15 minutos. A seguir, a solução foi colocada na coluna de síntese de fase sólida. Após agitação a 25°C por 1 hora, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 20 minutos para desproteção. Essas operações foram repetidas, de tal forma que os aminoácidos fossem sucessivamente condensados. Como os aminoácidos protegidos, Fmoc-Thr(tBu) (198,8 mg, 0,50 mmol) e Fmoc-Leu (176,8 mg, 0,50 mmol) foram usados, e um peptídeo de 3 resíduos que possui um grupo de proteção, Fmoc-Leu-Thr(tBu)-Leu, foi obtido na resina de fase sólida. A seguir, o grupo Fmoc foi tratado com uma solução de piperidina 20%/DMF (2 ml) por 20 minutos para desproteção. Depois, um derivado de treonina que possui um grupo de proteção, Boc-Thr(S-SsecBu) sintetizado no Exemplo de Síntese 1 separadamente, HOBt (67,6 mg, 0,50 mmol) e DIPCI (77,0 µl, 0,50 mmol) que haviam sido dissolvidos em 2 ml de DMF e haviam sido ativados por 15 minutos foram adicionados à solução. A mistura obtida foi então reagida por 3 horas para obter um peptídeo de 4 resíduos que possui um grupo de proteção, Boc-Thr(S-SsecBu)-Leu-Thr(tBu)-Leu (ID. DE SEQ. N°: 35), na resina de fase sólida. Uma solução aquosa de TFA 95% foi adicionada ao peptídeo de 4 resíduos mencionado

anteriormente, e foi então realizada uma reação em temperatura ambiente for 2 horas. A seguir, a resina foi removida por filtração, e o filtrado foi então concentrado sob uma pressão reduzida para obter um peptídeo de 4 resíduos que possui um grupo de proteção, Thr(S-SsecBu)-Leu-Thr-Leu (ID. DE SEQ. N°: 36).

2,2 mg do peptídeo de 4 resíduos que possui um grupo de proteção assim obtido (ID. DE SEQ. N°: 36) e 2,2 mg do peptídeo de 4 resíduos previamente obtido que possui tioéster (ID. DE SEQ. N°: 34) foram dissolvidos em xx ml de 0,2 M de tampão de fosfato de sódio (pH 7,3; contendo 6 M de cloridrato de guanidina e 20 mg de ácido 4-mercaptofenilacético), seguido por uma reação por 3,5 horas. Após o término da reação, ditiotreitol foi adicionado à solução da reação, e a mistura obtida foi então agitada por 10 minutos. A seguir, a solução da reação foi purificada por HPLC (coluna C18 Cadenza, 75 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,1%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 90 : 10 → 35 : 65; 15 minutos; taxa de fluxo: 1,0 ml/min) para obter um peptídeo de 8 resíduos, Glu-Ser-Asn-Gly-Thr(SH)-Leu-Thr-Leu (ID. DE SEQ. N°: 37), em que o grupo hidroxila da cadeia lateral do resíduo de treonina na posição 5 foi substituído com um grupo tiol. O resíduo derivado de treonina contido no peptídeo obtido foi considerado como tendo uma configuração representada principalmente pela seguinte fórmula:



3,5 mg do peptídeo de 8 resíduos obtido (ID. DE SEQ. N°: 37), em que o grupo hidroxila da cadeia lateral do resíduo de treonina na posição 5 havia sido substituído com um grupo tiol, foram colocados em um frasco de fundo redondo e foram dissolvidos em 4,1 ml de um tampão de 0,25 M de Tris-HCl (pH 8,6; contendo uma solução de 6 M de cloridrato de guanidina e 3,3 mM de EDTA). A seguir, 2-mercaptoetanol (2,9 µl) foi adicionado à solução obtida, e a mistura obtida foi então agitada por 15 minutos. Subseqüentemente, 1,37 ml de acetonitrila, na qual metil-4-nitrobenzenossulfonato (26,2 mg) havia sido dissolvido, foi adicionado à solução da reação, e foi então realizada uma reação por 50 minutos. Após o término da reação, uma solução de TFA 10% (1,0 ml) foi adicionada à solução da reação para neutralização, e a solução da reação foi então purificada por HPLC (coluna C18 Cadenza, 75 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,1%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 90 : 10 → 35 : 65; 15 minutos; taxa de fluxo: 1,0 ml/min) para obter um peptídeo de 8 resíduos, Glu-Ser-Asn-Gly-Thr(SMe)-Leu-Thr-Leu (ID. DE SEQ. N°: 38), em que o átomo de enxofre do grupo tiol substituído do resíduo de treonina na posição 5 estava metilado.

4 mg do peptídeo de 8 resíduos obtido (ID. DE SEQ. N°: 38), em que o átomo de enxofre do grupo tiol substituído do resíduo de treonina na posição 5 havia sido metilado, foram colocados em um frasco de fundo redondo e foram dissolvidos em 4,63 ml de uma solução de ácido fórmico 70% aquosa. A seguir, 49,0 mg de brometo de cianogênio foram adicionados

à solução, e a mistura obtida foi então agitada sob condições protegidas em uma atmosfera substituída com argônio a 37°C. Quarenta e oito horas mais tarde, a solução da reação foi concentrada sob uma pressão reduzida, e 0,93 ml de uma solução aquosa de hidrazina 5% foi então a ela adicionado, seguido por uma reação por 15 minutos. Sessenta µl de ácido acético foram adicionados à solução da reação, e a solução da reação foi então purificada por HPLC (coluna C18 Cadenza, 75 x 4,6 mm; solventes de desenvolvimento A: solução aquosa de TFA 0,1%; e B: TFA 0,1%; acetonitrila : água = 90 : 10; gradientes A : B = 85 : 15 → 45 : 55; 15 minutos; taxa de fluxo: 1,0 ml/min) para obter um peptídeo de 8 resíduos de interesse, Glu-Ser-Asn-Gly-Thr-Leu-Thr-Leu (ID. DE SEQ. N°: 39). Presumiu-se a partir do mecanismo de reação que a configuração dos resíduos de treonina contidos no peptídeo obtido seria a mesma que aquela de um peptídeo natural.

ESI-MS: Calculado para $C_{34}H_{59}N_9O_{15}$: $[M+1H]^{1+}$ 834,41, encontrado, 835,1.

Exemplo de Síntese 1

Síntese de Boc-Thr(S-SsecBu)

Boc-Thr (300 mg, 1,37 mmol) foi dissolvido em DMF destilada (6,85 ml, 200 mM), e cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (786 mg, 4,1 mmol) e HOBt (370 mg, 2,74 mmol) foram então adicionados à solução. A mistura obtida foi agitada a 0°C por 15 minutos. A seguir, TMSEtOH (1,95 ml, 13,7 mmol) foi adicionado à solução da reação, e a mistura obtida foi então agitada a 0°C. Vinte horas mais tarde, após confirmação do término da reação por TLC, a solução da reação foi diluída com acetato

de etila, e foi então neutralizada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio. A solução foi então separada e lavada com água duas vezes, e com uma solução salina saturada uma vez. Uma camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, e foi então filtrada. O filtrado foi concentrado sob uma pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (solvente de desenvolvimento; acetato de etila : hexano = 1 : 3) para obter um éster de Boc-Thr-TMS (rendimento: 342 mg, constante de rendimento: 78%).

O éster de Boc-Thr-TMS obtido foi submetido à azeotropia com benzeno 2 vezes, e o resíduo foi então dissolvido em 20,8 ml de DCM. Trezentos e vinte e dois ml (4,16 mmol) de cloreto de metanossulfonila e 1,16 ml (8,32 mmol) de trietilamina foram adicionados à solução, e a mistura obtida foi então agitada a 0°C. Dez minutos mais tarde, após confirmação do término da reação por TLC, a solução da reação foi diluída com DCM, e foi então neutralizada com uma solução aquosa saturada de cloreto de amônio. A seguir, a solução foi separada e lavada com água duas vezes, e com uma solução salina saturada uma vez. Uma camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, e foi então filtrada. O filtrado foi concentrado sob uma pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (solvente de desenvolvimento; acetato de etila : hexano = 1 : 4) para obter um éster de Boc-Thr(OMs)-TMS (quantidade do rendimento: 724,6 mg, percentagem do rendimento: 88%).

1,06 g do éster de Boc-Thr(OMs)-TMS obtido foi submetido à azeotropia com benzeno 2 vezes, e foi então

seco com um dessecador de um dia para o outro. O resultante foi dissolvido em 8,9 ml de DMF. A seguir, uma solução obtida por dissolução de 0,57 ml (7,95 mmol) de ácido tioacético e 0,79 ml (5,3 mmol) de DBU em 4,4 ml de DMF, seguida por uma reação por 20 minutos, foi adicionada à solução acima. A mistura obtida foi agitada a 45°C. Dezoito horas mais tarde, após confirmação do término da reação por TLC, a solução da reação foi neutralizada com uma solução aquosa saturada de cloreto de amônio, e foi então separada e lavada com água duas vezes, e com uma solução salina saturada uma vez. Uma camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, e foi então filtrada. O filtrado foi concentrado sob uma pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (solvente de desenvolvimento; acetato de etila : hexano = 1 : 20) para obter um éster de Boc-Thr(SAc)-TMS (quantidade do rendimento: 536,8 mg, percentagem do rendimento: 53,7%).

1,1 g do éster de Boc-Thr(SAc)-TMS obtido foi dissolvido em 100 ml de metanol e, a seguir, uma solução obtida por dissolução de dipiridil dissulfeto (3,21 g, 14,6 mmol) e 1,75 ml (16,1 mmol) de Sec-BuSH em 5,5 ml de metanol foi adicionada à solução acima. A seguir, 11,7 ml de uma solução em metanol de hidróxido de sódio (500 mM) foram a ela adicionados. Dezoito horas mais tarde, após confirmação do término da reação por TLC, a solução da reação foi neutralizada com uma solução aquosa de ácido acético 1%, foi então concentrada sob uma pressão reduzida, e foi então diluída com acetato de etila. O resultante foi separado e lavado com água duas vezes, e depois com uma solução salina saturada uma vez. Uma camada orgânica foi

seca sobre sulfato de magnésio, e foi então filtrada. O filtrado foi concentrado sob uma pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (solvente de desenvolvimento; acetato de etila : hexano = 1 : 40). A mistura obtida foi submetida à azeotropia com benzeno 2 vezes, e foi então dissolvida em 29 ml (100 mM) de DMF. 2,28 mg (7,3 mmol) de tetrabutilamônio fluoreto trihidrato foram adicionados à solução acima, e a mistura obtida foi agitada a 0°C. Após agitação por 15 minutos, após confirmação do término da reação por TLC, a solução da reação foi neutralizada com uma solução aquosa saturada de cloreto de amônio. Essa solução da reação foi lavada com água duas vezes, e depois com uma solução salina saturada uma vez. Uma camada orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio, e foi então filtrada. O filtrado foi concentrado sob uma pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de gel de sílica (solvente de desenvolvimento; acetato de etila : hexano = 1 : 4 → acetato de etila : metanol : água = 20 : 2 : 1) para obter Boc-Thr(S-SsecBu) de interesse (quantidade do rendimento: 650 mg, percentagem do rendimento: 69%).

Texto livre da listagem de seqüências

O ID. DE SEQ. N°: 1 é uma seqüência de aminoácidos que possui um grupo de proteção do Exemplo 1.

O ID. DE SEQ. N°: 2 é uma seqüência de aminoácidos acetilados do Exemplo 1.

O ID. DE SEQ. N°: 3 é uma seqüência de aminoácidos que possui cisteína metilada do Exemplo 1.

O ID. DE SEQ. N°: 4 é uma seqüência de aminoácidos

acetilados do Exemplo 1.

O ID. DE SEQ. N°: 5 é uma seqüência de aminoácidos que possui um grupo de proteção do Exemplo 2.

O ID. DE SEQ. N°: 6 é uma seqüência de aminoácidos do Exemplo 2.

O ID. DE SEQ. N°: 7 é uma seqüência de aminoácidos que possui cisteína metilada do Exemplo 2.

O ID. DE SEQ. N°: 8 é uma seqüência de aminoácidos do Exemplo 2.

O ID. DE SEQ. N°: 9 é uma seqüência de aminoácidos que possui um grupo de proteção do Exemplo 3.

O ID. DE SEQ. N°: 10 é uma seqüência de aminoácidos do Exemplo 3.

O ID. DE SEQ. N°: 11 é uma seqüência de aminoácidos que possui cisteína metilada do Exemplo 3.

O ID. DE SEQ. N°: 12 é uma seqüência de aminoácidos do Exemplo 3.

O ID. DE SEQ. N°: 13 é uma seqüência de aminoácidos com uma cadeia de açúcar adicionada que possui um grupo de proteção do Exemplo 4.

O ID. DE SEQ. N°: 14 é uma seqüência de aminoácidos com uma cadeia de açúcar adicionada que possui um grupo de proteção do Exemplo 4.

O ID. DE SEQ. N°: 15 é uma seqüência de aminoácidos com uma cadeia de açúcar adicionada que possui um grupo benziltioéster do Exemplo 4.

O ID. DE SEQ. N°: 16 é uma seqüência de aminoácidos que possui um grupo de proteção do Exemplo 4.

O ID. DE SEQ. N°: 17 é uma seqüência de aminoácidos do Exemplo 4.

O ID. DE SEQ. N°: 18 é uma seqüência de aminoácidos com uma cadeia de açúcar adicionada do Exemplo 4.

O ID. DE SEQ. N°: 19 é uma seqüência de aminoácidos com uma cadeia de açúcar adicionada que possui cisteína metilada do Exemplo 4.

O ID. DE SEQ. N°: 20 é uma seqüência de aminoácidos com uma cadeia de açúcar adicionada do Exemplo 4.

O ID. DE SEQ. N°: 21 é uma seqüência de aminoácidos que possui um grupo de proteção e sulfóxido de metionina do Exemplo 5.

O ID. DE SEQ. N°: 22 é uma seqüência de aminoácidos acetilados que possui sulfóxido de metionina do Exemplo 5.

O ID. DE SEQ. N°: 23 é uma seqüência de aminoácidos acetilados que possui cisteína metilada e sulfóxido de metionina do Exemplo 5.

O ID. DE SEQ. N°: 24 é uma seqüência de aminoácidos acetilados do Exemplo 5.

O ID. DE SEQ. N°: 25 é uma seqüência de aminoácidos que possui um grupo de proteção do Exemplo 6.

O ID. DE SEQ. N°: 26 é uma seqüência de aminoácidos com uma cadeia de açúcar adicionada que possui um grupo de proteção do Exemplo 6.

O ID. DE SEQ. N°: 27 é uma seqüência de aminoácidos com uma cadeia de açúcar adicionada que possui um grupo de proteção do Exemplo 6.

O ID. DE SEQ. N°: 28 é uma seqüência de aminoácidos com uma cadeia de açúcar adicionada que possui um grupo benziltioéster do Exemplo 6.

O ID. DE SEQ. N°: 29 é uma seqüência de aminoácidos com uma cadeia de açúcar adicionada do Exemplo 6.

O ID. DE SEQ. N°: 30 é uma seqüência de aminoácidos com uma cadeia de açúcar adicionada do Exemplo 6.

O ID. DE SEQ. N°: 31 é uma seqüência de aminoácidos com uma cadeia de açúcar adicionada que possui cisteína metilada do Exemplo 6.

O ID. DE SEQ. N°: 32 é uma seqüência de aminoácidos com uma cadeia de açúcar adicionada do Exemplo 6.

O ID. DE SEQ. N°: 33 é uma seqüência de aminoácidos que possui um grupo de proteção do Exemplo 7.

O ID. DE SEQ. N°: 34 é uma seqüência de aminoácidos que possui um grupo benziltioéster do Exemplo 7.

O ID. DE SEQ. N°: 35 é uma seqüência de aminoácidos que possui um grupo de proteção e um derivado de treonina do Exemplo 7.

O ID. DE SEQ. N°: 36 é uma seqüência de aminoácidos que possui um derivado de treonina do Exemplo 7.

ID. DE SEQ. N°: 37 é uma seqüência de aminoácidos que possui um derivado de treonina do Exemplo 7.

O ID. DE SEQ. N°: 38 é uma seqüência de aminoácidos que possui um derivado de treonina do Exemplo 7.

O ID. DE SEQ. N°: 39 é uma seqüência de aminoácidos do Exemplo 7.

Aplicabilidade industrial

A presente invenção fornece um método para a produção de um peptídeo e de um glicopeptídeo. De acordo com a presente invenção, até mesmo quando for necessária a obtenção de um peptídeo que não contém cisteína, um método de ligação poderá ser aplicado. Além disso, a presente invenção também é útil para a produção de um glicopeptídeo ligado ao N e de um glicopeptídeo ligado ao O.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de um peptídeo, **caracterizado** por compreender a conversão de um grupo -SH de um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui o grupo -SH em um grupo -OH, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH em um peptídeo reaja com um agente de metilação, em que o agente de metilação é iodometano ou metil-4-nitrobenzenossulfonato;

(b) permitir que um grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização, em que o agente de cianização é brometo de cianogênio; e

(c) modificar as condições de reação para que se tornem mais básicas do que as condições na etapa (b) para alcançar um pH entre pH 9 e pH 13.

2. Método para a produção de um peptídeo, **caracterizado** por compreender a conversão de um grupo -SH de um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui o grupo -SH em um grupo -OH, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH em um peptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe, em que o agente de metilação é iodometano ou metil-4-nitrobenzenossulfonato;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação, em que o agente de cianização é brometo de cianogênio; e

(c) converter o intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de

aminoácido que possui um grupo -OH sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b) para alcançar um pH entre pH 9 e pH 13.

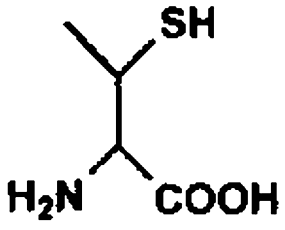
3. Método para a produção de um peptídeo, **caracterizado** por compreender a conversão de um resíduo de cisteína de um peptídeo que compreende o resíduo de cisteína em um resíduo de serina, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH de um resíduo de cisteína em um peptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe, em que o agente de metilação é iodometano ou metil-4-nitrobenzenossulfonato;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação, em que o agente de cianização é brometo de cianogênio; e

(c) converter o intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de serina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b) para alcançar um pH entre pH 7 e pH 13.

4. Método para a produção de um peptídeo, **caracterizado** por compreender a conversão de um resíduo derivado de treonina A representado pela seguinte Fórmula (1) de um peptídeo que compreende o resíduo derivado de treonina A como um resíduo de aminoácido em um resíduo de treonina,



(1)

em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH de um resíduo derivado de treonina A em um peptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe, em que o agente de metilação é iodometano ou metil-4-nitrobenzenossulfonato;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação, em que o agente de cianização é brometo de cianogênio; e

(c) converter o intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de treonina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b) para alcançar um pH entre pH 9 e pH 13.

5. Método para a produção de um peptídeo, **caracterizado** por compreender a conversão de um grupo -SMe de um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui o grupo -SMe em um grupo -OH, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (b) e (c):

(b) permitir que um grupo -SMe em um peptídeo reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação, em que o agente de cianização é brometo de cianogênio; e

(c) converter o intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b) para alcançar um pH entre pH 9 e pH 13.

6. Método para a produção de um peptídeo, de acordo

com qualquer uma das reivindicações 2 a 5, **caracterizado** pelo fato de que o intermediário da reação é uma forma de éster.

7. Método para a produção de um peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que um resíduo de metionina no peptídeo na etapa (a) é um resíduo de metionina protegido, e o método de produção ainda compreende uma etapa seguinte (d) após a etapa (b) ou (c), como desejado:

(d) a desproteção do resíduo de metionina protegido.

8. Método para a produção de um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH, **caracterizado** por compreender as seguintes etapas:

(o) ligar um primeiro peptídeo que contém, em seu terminal C, um resíduo de aminoácido em que um grupo carboxil é substituído com um grupo α-carboxitioéster representado pela fórmula -C(=O)-SR (em que R é selecionado de um grupo benzil, um grupo aril e um grupo alquil, que podem ser substituídos com substituintes), a um segundo peptídeo que contém, em seu terminal N, um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH de acordo com um método de ligação, para obter um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -SH;

(a) permitir que o grupo -SH no peptídeo obtido na etapa (o) reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe, em que o agente de metilação é iodometano ou metil-4-nitrobenzenossulfonato;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação, em que o agente de cianização é

brometo de cianogênio; e

(c) converter o intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b) para alcançar um pH entre pH 9 e pH 13.

9. Método para a produção de um peptídeo que compreende um resíduo de serina, **caracterizado** por compreender as seguintes etapas:

(o) ligar um primeiro peptídeo que contém, em seu terminal C, um resíduo de aminoácido em que um grupo carboxil é substituído com um grupo α-carboxitioéster representado pela fórmula -C(=O)-SR (em que R é selecionado de um grupo benzil, um grupo aril e um grupo alquil, que podem ser substituídos com substituintes), a um segundo peptídeo que contém, em seu terminal N, um resíduo de cisteína de acordo com um método de ligação, para obter um peptídeo que compreende um resíduo de cisteína;

(a) permitir que um grupo -SH do resíduo de cisteína no peptídeo obtido na etapa (o) reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe, em que o agente de metilação é iodometano ou metil-4-nitrobenzenossulfonato;

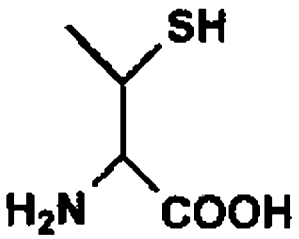
(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação, em que o agente de cianização é brometo de cianogênio; e

(c) converter o intermediário da reação obtido na etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de serina sob condições mais básicas do que as condições na

etapa (b) para alcançar um pH entre pH 7 e pH 13.

10. Método para a produção de um peptídeo que compreende um resíduo de treonina, **caracterizado** por compreender as seguintes etapas:

(o) ligar um primeiro peptídeo que contém, em seu terminal C, um resíduo de aminoácido em que um grupo carboxil é substituído com um grupo α-carboxitioéster representado pela fórmula -C(=O)-SR (em que R é selecionado de um grupo benzil, um grupo aril e um grupo alquil, que podem ser substituídos com substituintes), a um segundo peptídeo que contém, em seu terminal N, um resíduo derivado de treonina de acordo com um método de ligação, para obter um peptídeo que compreende um derivado de treonina A representado pela seguinte Fórmula (1):



(1)

como um resíduo de aminoácido;

(a) permitir que um grupo -SH do resíduo derivado de treonina A no peptídeo obtido na etapa (o) reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe, em que o agente de metilação é iodometano ou metil-4-nitrobenzenossulfonato;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação, em que o agente de cianização é brometo de cianogênio; e

(c) converter o intermediário da reação obtido na

etapa (b) em um peptídeo que compreende um resíduo de treonina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b) para alcançar um pH entre pH 9 e pH 13.

11. Método para a produção de um peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, **caracterizado** pelo fato de que o intermediário da reação é uma forma de éster.

12. Método para a produção de um peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 11, **caracterizado** pelo fato de que um resíduo de metionina no peptídeo na etapa (a) é um resíduo de metionina protegido, e o método de produção ainda compreende uma etapa seguinte (d) após a etapa (b) ou (c), como desejado:

(d) desproteger o resíduo de metionina protegido.

13. Método para a produção de um peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 12, **caracterizado** pelo fato de que o referido primeiro peptídeo é um peptídeo que não contém um resíduo de cisteína, ou um peptídeo que contém um resíduo de cisteína protegido, e o referido segundo peptídeo é um peptídeo que não contém um resíduo de cisteína em quaisquer regiões diferentes do terminal N deste, ou um peptídeo cujos resíduos de cisteína em todas as regiões diferentes do terminal N deste são resíduos de cisteína protegidos.

14. Método para a produção de um glicopeptídeo, **caracterizado** por compreender a conversão de um grupo -SH de um glicopeptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui o grupo -SH em um grupo -OH, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH em um glicopeptídeo

reaja com um agente de metilação, em que o agente de metilação é iodometano ou metil-4-nitrobenzenossulfonato;

(b) permitir que um grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização, em que o agente de cianização é brometo de cianogênio; e

(c) modificar as condições de reação para que se tornem mais básicas do que as condições na etapa (b) para alcançar um pH entre pH 9 e pH 13.

15. Método para a produção de um glicopeptídeo, **caracterizado** por compreender a conversão de um grupo -SH de um glicopeptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui o grupo -SH em um grupo -OH, em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH em um glicopeptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe, em que o agente de metilação é iodometano ou metil-4-nitrobenzenossulfonato;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação, em que o agente de cianização é brometo de cianogênio; e

(c) converter o intermediário da reação obtido na etapa (b) em um glicopeptídeo que compreende um resíduo de aminoácido que possui um grupo -OH sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b) para alcançar um pH entre pH 9 e pH 13.

16. Método para a produção de um glicopeptídeo, **caracterizado** por compreender a conversão de um resíduo de cisteína de um glicopeptídeo que compreende o resíduo de cisteína em um resíduo de serina, em que o referido método

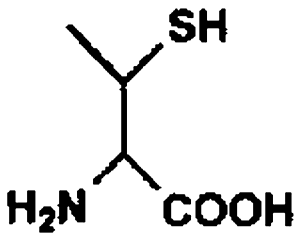
compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH de um resíduo de cisteína em um glicopeptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe, em que o agente de metilação é iodometano ou metil-4-nitrobenzenossulfonato;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação, em que o agente de cianização é brometo de cianogênio; e

(c) converter o intermediário da reação obtido na etapa (b) em um glicopeptídeo que compreende um resíduo de serina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b) para alcançar um pH entre pH 7 e pH 13.

17. Método para a produção de um glicopeptídeo, **caracterizado** por compreender a conversão de um resíduo derivado de treonina A representado pela seguinte Fórmula (1) de um glicopeptídeo que compreende o resíduo derivado de treonina A como um resíduo de aminoácido em um resíduo de treonina,



(1)

em que o referido método compreende as seguintes etapas de (a) a (c):

(a) permitir que um grupo -SH de um resíduo derivado de treonina A em um glicopeptídeo reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe, em

que o agente de metilação é iodometano ou metil-4-nitrobenzenossulfonato;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação, em que o agente de cianização é brometo de cianogênio; e

(c) converter o intermediário da reação obtido na etapa (b) em um glicopeptídeo que compreende um resíduo de treonina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b) para alcançar um pH entre pH 9 e pH 13.

18. Método para a produção de um glicopeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 17, **caracterizado** pelo fato de que o intermediário da reação é uma forma de éster.

19. Método para a produção de um glicopeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18, **caracterizado** pelo fato de que o glicopeptídeo possui uma cadeia de açúcar ligada ao N.

20. Método para a produção de um glicopeptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 18, **caracterizado** pelo fato de que o glicopeptídeo possui uma cadeia de açúcar ligada ao O.

21. Método para a produção de um glicopeptídeo que compreende um resíduo de serina, **caracterizado** por compreender as seguintes etapas:

(o) ligar um primeiro glicopeptídeo cujo terminal C é representado pela seguinte fórmula:

-açúcar Asn-X-C(=O)-SR

(em que açúcar Asn representa uma asparagina com cadeia de açúcar adicionada, X representa uma porção diferente de um

grupo carboxil de qualquer resíduo de aminoácido diferente de prolina, e R é selecionado de um grupo benzil, um grupo aril e um grupo alquil, que podem ser substituídos com substituintes), a um segundo peptídeo que contém um resíduo de cisteína em seu terminal N de acordo com um método de ligação para obter um glicopeptídeo que contém um resíduo de cisteína;

(a) permitir que um grupo -SH do resíduo de cisteína no glicopeptídeo obtido na etapa (o) reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe, em que o agente de metilação é iodometano ou metil-4-nitrobenzenossulfonato;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação, em que o agente de cianização é brometo de cianogênio; e

(c) converter o intermediário da reação obtido na etapa (b) em um glicopeptídeo que compreende um resíduo de serina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b) para alcançar um pH entre pH 9 e pH 13.

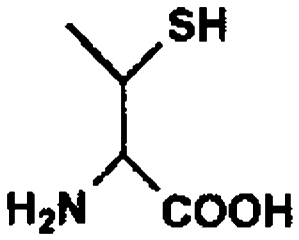
22. Método para a produção de um glicopeptídeo que compreende um resíduo de treonina, **caracterizado** por compreender as seguintes etapas:

(o) ligar um primeiro glicopeptídeo cujo terminal C é representado pela seguinte fórmula:

-açúcar Asn-X-C(=O)-SR

(em que açúcar Asn representa uma asparagina com cadeia de açúcar adicionada, X representa uma porção diferente de um grupo carboxil de qualquer resíduo de aminoácido diferente de prolina, e R é selecionado de um grupo benzil, um grupo

aril e um grupo alquil, que podem ser substituídos com substituintes), a um segundo peptídeo que contém um resíduo derivado de treonina em seu terminal N de acordo com um método de ligação para obter um glicopeptídeo que contém um derivado de treonina A representado pela seguinte Fórmula (1):



(1)

como um resíduo de aminoácido;

(a) permitir que um grupo -SH do resíduo derivado de treonina A no glicopeptídeo obtido na etapa (o) reaja com um agente de metilação para converter o grupo -SH em um grupo -SMe, em que o agente de metilação é iodometano ou metil-4-nitrobenzenossulfonato;

(b) permitir que o grupo -SMe obtido na etapa (a) reaja com um agente de cianização para produzir um intermediário da reação, em que o agente de cianização é brometo de cianogênio; e

(c) converter o intermediário da reação obtido na etapa (b) em um glicopeptídeo que compreende um resíduo de treonina sob condições mais básicas do que as condições na etapa (b) para alcançar um pH entre pH 9 e pH 13.

23. Método para a produção de um glicopeptídeo, de acordo com a reivindicação 21 ou 22, **caracterizado** pelo fato de que o intermediário da reação é uma forma de éster.