



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 105 975**

② Número de solicitud: 9501697

⑤ Int. Cl.⁶: C07H 17/02

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **28.08.95**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.97**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.10.97

⑦ Solicitante/s:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Torres Simón, Josep Lluís y
Clapés Saborit, Pere**

⑦ Agente: **No consta**

④ Título: **Procedimiento de purificación de aminoácidos glicosilados aptos para la síntesis en fase sólida de glicopéptidos.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de purificación de aminoácidos glicosilados aptos para la síntesis en fase sólida de glicopéptidos.

Se propone un procedimiento de purificación de aminoácidos glicosilados aptos para su utilización en la síntesis de glicopéptidos mediante la tecnología en fase sólida. Durante las reacciones de glicosilación de aminoácidos se obtienen conjugados entre aminoácidos y azúcar (sintones glicosilados) que es necesario purificar. Para ello se utiliza simple agua desionizada en la purificación por cromatografía en fase reversa a nivel preparativo.

El procedimiento de la invención permite disponer de cantidades del orden de gramos de los mencionados sintones glicosilados purificados lo que es crucial para el desarrollo de glicopéptidos con actividad biológica como posibles fármacos. Por tanto el procedimiento es de interés principalmente para el sector farmacéutico así como para el mercado de derivados para la investigación sobre compuestos bioactivos.

ES 2 105 975 A1

DESCRIPCION

Procedimiento de purificación de aminoácidos glicosilados aptos para la síntesis en fase sólida de glicopéptidos.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es un procedimiento de purificación de aminoácidos glicosilados aptos para la síntesis en fase sólida de glicopéptidos. El procedimiento de la invención es de interés principalmente para el sector farmacéutico en la obtención de sintones para la preparación de neoglicopéptidos con actividad farmacológica. Asimismo, el procedimiento tiene aplicación en Química Fina en el mercado de derivados para la investigación sobre compuestos bioactivos.

Estado de la técnica

Las técnicas de síntesis de péptidos sobre soporte polimérico (fase sólida) [G. Barany, B.R. Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. E. Gross, J. Meienhofer, eds., Academic Press, New York, 1979, Vol. 2, pp. 1-284], han sido aplicadas con éxito a la síntesis de glicopéptidos mediante el uso de Fmoc (fluoren-9-ilmetoxicarbonilo) como grupo protector temporal [H. Paulsen, G. Merz, U. Weichert, *Solid-Phase Synthesis of O-glycopeptide Sequences*, *Angewandte Chemie International Edition English*, **27**, 1365-1367 (1988)]; [E. Bardají, J.L. Torres, P. Clapés, F. Albericio, G. Barany, G. Valencia, G., *Solid-Phase Synthesis of Glycopeptide Amides under Mild Conditions: Morphiceptin Analogues*. *Angewandte Chemie International Edition English*, **29**, 291-292 (1990)]; [M. Meldal, *Glycopeptide Synthesis in Neoglucoconjugates: Preparation and Application*. Y.C. Lee, R.T. Lee, eds., Academic Press, Orlando, 1994, pp. 144-198]. La síntesis de Fmoc-aminoácidos glicosilados y su posterior incorporación a la cadena de aminoácidos que se va formando es la estrategia más utilizada frente a la glicosidación de péptidos enteros.

La preparación de sintones glicosilados es el paso limitante en el proceso de síntesis de glicopéptidos. La formación de impurezas parecidas estructuralmente durante la reacción de glicosidación hace necesario incluir al menos un paso de purificación cromatográfica. Normalmente, la glicosidación se lleva a cabo con azúcares protegidos en sus funciones hidroxilo sobre aminoácidos protegidos tanto en la función N^α como en al C^α [J.L. Torres, E. Bardají, G. Valencia, *Synthesis of Glycosyl Neuropeptides*, in *Methods in Neurosci.*, P.M. Conn Ed., Academic Press, San Diego, 1991, Vol. 6, pp. 35-494]; [B.G. de la Torres, J.L. Torres, E. Bardají, P. Clapés, N. Xaus, X. Jorba, S. Calvet, F. Albericio, G. Valencia, *Improved Method for the Synthesis of O-Glycosylated Fmoc Amino Acids to be used in the Solid-phase Glycopeptide Synthesis (Fmoc=fluoren-9-ylmethoxycarbonyl)*. *J. Chem. Soc., Chem Commun*, 965-967 (1990)]. Los conjugados protegidos completamente se purifican por cromatografía en columna sobre sílica y alternativamente por cromatografía en fase reversa [ver referencias anteriores]. En un paso posterior, el grupo carboxilo debe ser desprotegido y el sintón resul-

tante purificado mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) [ver referencias anteriores]. Se ha descrito otro método de síntesis [M. Elofsson, B. Walse, J. Kihlber, J., *Building Blocks for Glycopeptide Synthesis: Glycosylation of 3-Mercaptopropionic Acid and Fmoc Amino Acids with Unprotected Carboxyl Groups*. *Tetrahedr. Lett.*, **32**, 7613-7616 (1991)] en el que se utilizan aminoácidos con la función carboxilo libre y se purifican los sintones resultantes por RP-HPLC a nivel semipreparativo (decenas de miligramos). En todo el estado de la técnica conocido se describe la purificación de sintones glicosilados por RP-HPLC mediante un sistema de eluyentes agua/acetronitrilo en presencia de ácido trifluoroacético (TFA) [ver referencias anteriores]. Modificadores como el TFA son profusamente utilizados en RP-HPLC porque estabilizan el pH del medio y facilitan el fenómeno conocido como par iónico, que resulta en picos cromatográficos más estrechos y por consiguiente aumenta la resolución [D. Guo, C.T. Mant, R.S. Hodges, *Effects of Ion-Pairing Reagents on the Prediction of Peptide Retention in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*, *J. Chromatogr.*, **386**, 205-222 (1987)].

Breve descripción de la invención

El objeto de la presente invención es un procedimiento para la purificación de aminoácidos glicosilados aptos para su utilización en la síntesis de glicopéptidos mediante la tecnología en fase sólida. Durante las reacciones de glicosidación de aminoácidos se obtienen conjugados entre aminoácido y azúcar (sintones glicosilados) que es necesario purificar. Disponer de cantidades del orden de gramos de tales sintones es crucial para el desarrollo de glicopéptidos con actividad biológica como posibles fármacos. Entre tales glicopéptidos se encuentran los derivados glicosilados de encefalinas con actividad analgésica [J.M. García-Antón, J.L. Torres, G. Valencia, F. Reig., *Síntesis de Glicoencefalinas derivadas de Hyp⁵*. Patente Española, n^o solicitud: 8801504, (1988)]; [R.E. Rodríguez, F.E. Rodríguez, M.P. Sacristán, J.L. Torres, G. Valencia, J.M. García-Antón, *New Glycosylpeptides with High Analgesic Activity*. *Neurosci. Lett.* **101**, 89-94 (1989)]; [R. Polt, F. Porreka, L.Z. Szabò, E.J. Bilsky, P. Davis, T.J. Abbruscato, T.P. Davis, R. Horvath, H.I. Yamamura, V.J. Hruby, *Glycopeptide Enkephalin Analogues Produce Analgesia in Mice: Evidence for Penetration of the Blood-Brain Barrier*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 7114-7118 (1994)].

No se conocen métodos de obtención de sintones glicosilados escalables porque los métodos de síntesis disponibles general unas impurezas que hacen imprescindible la inclusión de una etapa de purificación de alta resolución por cromatografía. Con los procedimientos utilizados hasta el momento actual, indicados en el apartado de estado de la técnica, se obtienen cantidades del orden de miligramos y la pureza de las preparaciones es baja en muchos casos.

La gran mayoría de métodos descritos tanto a nivel analítico como preparativo para la purificación por cromatografía de alta resolución de

sustancias de naturaleza peptídica o similar incluyen un modificador de la fase móvil. En general, los modificadores de los eluyentes son universalmente utilizados para estabilizar el pH y mejorar la resolución cromatográfica. El modificador más utilizado es el ácido trifluoroacético (TFA). Sin embargo, para el caso de moléculas anfífilas como los sintones que aparecen en las reacciones de glicosidación, estos modificadores no sirven a nivel preparativo.

El procedimiento de la invención se basa en la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) y en la utilización de agua desionizada y acetonitrilo como fases móviles sin ningún tipo de modificador del eluyente. En tales condiciones, la resolución y el rendimiento aumentan significativamente. Mediante el procedimiento de la invención puede obtenerse hasta medio gramo de sintón por carga (dos litros de acetonitrilo y tres litros de agua desionizada), de una pureza mayor del 99 % por cromatografía líquida analítica de alta resolución.

La novedad del procedimiento de la invención es el uso de simple agua desionizada para la purificación por cromatografía en fase reversa a nivel preparativo.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Fórmula del sintón glicosilado de *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)- N^{α} -fluoren-9-imetoxicarbonilo hidroxiprolina.

Figura 2: Perfil de HPLC preparativo para la purificación de *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)- N^{α} -fluoren-9-imetoxicarbonil-hidroxiprolina a partir de la mezcla liofilizada después de la glicosidación en CH_2Cl_2 y procesado posterior.

Descripción detallada de la invención

El procedimiento de glicosidación habitual es el llamado método de glicosidación asistida por el grupo vecinal ("neighboring assisted procedure"), que se basa en la utilización de ácidos de Lewis para la formación del enlace β -D-glicosídico en presencia de un grupo acetilo en posición 2 del azúcar (grupo vecinal) [Paulsen H., *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* 29, 823-839, (1990)]. Cuando el enlace se efectúa entre un azúcar y el grupo hidroxilo lateral de un aminoácido, como en el procedimiento de la invención, se protegen las funciones alfa-amino y alfa-carboxilo del aminoácido.

En el procedimiento de la invención se utiliza una simplificación de este método [Elofsson, M. y col., mencionado anteriormente], que consiste en utilizar el aminoácido solamente protegido en su función amino, con lo cual se eluden dos pasos de síntesis (protección/ desprotección) y se simplifica el proceso obteniéndose un conjugado entre aminoácido y azúcar con todas sus funciones protegidas excepto el grupo carboxilo del aminoácido. Este procedimiento presenta el inconveniente de que se produce un número elevado de impurezas, por lo que se hace necesario disponer de un método de purificación eficaz, como el que es objeto de la presente invención.

Para la glicosidación se parte de una suspensión de fluoren-9-imetoxicarbonilo-aminoáci-

do (Fmoc-AA) y penta-*O*-acetil- β -D-glicósido en cloruro de metileno (CH_2Cl_2) recién destilado. Se añade gota a gota eterato de trifluoruro de boro ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) hasta alcanzar una relación molar entre los tres reactivos de 10:8:25.

La mezcla de reacción se mantiene bajo agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. La reacción se para por adición de ácido cítrico al 15 % con lo que se forma una fase acuosa y una fase orgánica. Esta se lava tres veces con ácido cítrico al 15 % y se seca sobre sulfato sódico (Na_2SO_4) anhidro. A continuación se filtra y se evapora a sequedad al vacío. El residuo se suspende en agua/acetonitrilo (1:1) y el cloruro de metileno que queda se elimina al vacío. La suspensión resultante se liofiliza, obteniéndose un sólido amorfo.

Para llevar a cabo el procedimiento de purificación, el sólido liofilizado se suspende en agua o en una mezcla de agua/acetonitrilo y se carga sobre un cartucho relleno de sílica derivatizada con cadenas alquílicas de cuatro eslabones (C_4), columna característica de separaciones mediante cromatografía líquida en fase reversa. La extracción de las sustancias absorbidas sobre el soporte se lleva a cabo mediante la técnica de la elución en gradiente, ésto es mediante la aportación de una cantidad creciente de un disolvente miscible en agua desionizada (generalmente acetonitrilo). Normalmente, la pendiente del gradiente esta comprendida entre 10 y 20 unidades de porcentaje de acetonitrilo en 30 minutos.

El análisis de las fracciones recogidas se efectúa igualmente mediante cromatografía líquida de alta eficacia analítica en fase reversa C_{18} , en este caso mediante la aportación de una cantidad fija de disolvente miscible en agua, generalmente acetonitrilo (condiciones isocráticas). En el procedimiento de la invención esa cantidad fija esta comprendida entre el 55 % y el 65 % de acetonitrilo en agua según los casos. Las fracciones que contienen el compuesto puro (99 % por HPLC analítico) se reúnen y la solución final se liofiliza. El sólido resultante se vuelve a analizar por HPLC mediante la técnica de elución en gradiente para comprobar la inexistencia de impurezas en un rango amplio de polaridad. La identidad del producto se comprueba por espectroscopía de masas y por resonancia magnética nuclear de protón y carbono-13.

Modo de realización de la invención

Los diferentes sintones susceptibles de ser purificados por el método objeto de la presente invención tienen una estructura análoga. El azúcar puede estar protegido por otros grupos hidrofóbicos (acetilo, bencilo, benzoilo etc.) y el aminoácido puede ser también serina, treonina o hidroxilisina (enlace O-glicosídico entre el glicósido y el aminoácido) o asparagina y glutamina (enlace N-glicosídico).

La reacción de glicosidación mediante la formación de un enlace O-glicosídico se ha descrito en el apartado anterior. Cuando se forma un enlace N-glicosídico, la glicosidación se lleva a cabo mediante la formación de un enlace amida entre ácido glutámico o ácido aspártico, convenientemente protegidos, y una 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-glicosilamina. Se emplea como activador

un grupo acilo del aminoácido un agente como diciclohexilcarbodiimida (DCC) ó diisopropilcarbodiimida (DIC) en presencia de hidroxibenzotriazol (HOBt). Alternativamente pueden emplearse agentes derivados de HOBt como benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio (BOP) y similares.

En todos los casos el grupo N^α del aminoácido está protegido por una función fluoren-9-ilmetoxicarbonilo (Fmoc). Se propone como ejemplo concreto de realización de la invención la purificación de un sintón glicosilado de *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)- N^α -fluoren-9-ilmetoxicarbonilhidroxiprolina (ver Figura 1).

Reacción de glicosidación:

Eterato de trifluoruro de boro ($BF_3 \cdot Et_2O$) se añade gota a gota a temperatura ambiente sobre una suspensión de Fmoc-hidroxiprolina y penta-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil en CH_2Cl_2 recién destilado hasta alcanzar una relación molar entre los tres reactivos de 25:10:8. La mezcla de reacción se mantiene bajo agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. La reacción se detiene por adición de ácido cítrico al 15%. La fase orgánica se lava tres veces con ácido cítrico al 15%, se seca mediante adición de Na_2SO_4 , se filtra y se concentra por evaporación al vacío. El residuo es suspendido en agua/ CH_3CN (1:1) y el CH_2Cl_2 residual es evaporado al vacío. La suspensión resultante es sometida a liofilización de la que se obtiene un sólido amorfo blanco.

Purificación preparativa:

O-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)- N^α -fluoren-9-ilmetoxicarbonil-hidroxiprolina es purificada a partir del sólido que proviene de la reacción de glicosidación por cromatografía

líquida de alta eficacia en fase reversa a escala preparativa (ver Figura 2). Se utiliza como fase estacionaria un cartucho DeltaPack C_4 (marca registrada de Millipore Corporation) de 47 mm de diámetro y 300 mm de largo, con 300 Armstrong de tamaño de poro y $15 \mu m$ de tamaño de partícula. 1.5 gramos de sólido liofilizado se suspenden en 300 mL de agua/ CH_3CN (5:2) y se aplican a través de la bomba. La elución se lleva a cabo mediante un gradiente de CH_3CN (del 30% al 47% en 30 minutos) en agua desionizada a un flujo de $100 mL \cdot min^{-1}$. La detección se efectúa a 230 nm. La velocidad del papel es $0.25 cm \cdot min^{-1}$. El análisis de las fracciones se lleva a cabo también por cromatografía líquida de alta eficacia, en volumen VYDAC C_{18} (marca registrada de The Separations Group) de 4.6 mm de diámetro y 250 mm de largo, con 300 amstrong de tamaño de poro y $5 \mu m$ de tamaño de partícula. La elución se lleva a cabo con dos eluyentes: (A) 0.10% ácido trifluoroacético (TFA) en agua y (B) 0.08% TFA en agua/ CH_3CN 1:4. Una válvula selecciona las cantidades de ambos eluyentes antes de introducir la mezcla en la columna. Para la determinación analítica se trabaja en condiciones isocráticas al 66.6% B, flujo de $1.5 mL \cdot min^{-1}$ y detección a 215 nm (0.016 unidades de absorbancia fondo de escala). Las fracciones que muestran una pureza superior al 99.5% por HPLC en las condiciones descritas más arriba son reunidas y liofilizadas.

En estas condiciones se obtienen 500 mg de *O*-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil)- N^α -fluoren-9-ilmetoxicarbonil-hidroxiprolina de una pureza superior al 99.5% por HPLC.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de purificación de aminoácidos glicosilados aptos para la síntesis en fase sólida de glicopéptidos **caracterizado** porque los conjugados entre aminoácido y azúcar (sintones glicosilados) obtenidos en la reacción de glicosilación a partir de fluoren-9 -ilmetoxicarbonilaminoácido (Fmoc-AA) y penta-*O*-acetil- β -D -glicósido (enlace O-glicosídico) ó 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-glicosilamina (enlace N-glicosídico) se someten a:

- a) Suspensión del sintón glicosilado en forma de sólido liofilizado en agua o en una mezcla de agua/acetónitrilo.
- b) Carga de la suspensión obtenida en a) sobre un cartucho relleno de sílica derivatizada con cadenas alquílicas de cuatro carbonos (C₄) para proceder a la separación de componentes mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa.
- c) Extracción de las sustancias absorbidas sobre el cartucho mediante la aportación de una cantidad creciente de un disolvente miscible en agua desionizada en ausencia de compuestos modificadores.

2. Procedimiento de purificación de aminoácidos glicosilados aptos para la síntesis en fase sólida de glicopéptidos según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la reacción de glicosilación por enlace O-glicosídico se lleva a cabo mediante:

- a) Adición gota a gota de eterato de trifluoruro de boro (BF₃.Et₂O) sobre una suspensión de fluoren-9 -ilmetoxicarbonilaminoácido-penta-*O*-acetil- β -D-glicósido en cloru-

ro de metileno hasta alcanzar una relación molar entre los reactivos de 25 (BF₃.Et₂O) : 10 (Fmoc-AA) : 8 (penta - *O* - acetil - β - D - glicósido).

- b) Agitación de la mezcla de reacción obtenida en a) durante 24 horas a temperatura ambiente.
- c) Adición de ácido cítrico al 15 % para detener la reacción formándose una fase acuosa y una fase orgánica.
- d) Lavado de la fase orgánica obtenida en c) con ácido cítrico al 15 % en tres etapas.
- e) Secado de la fase orgánica lavada obtenida en c) sobre sulfato sódico anhidro.
- f) Filtrado de la fase orgánica lavada y seca y evaporación a sequedad al vacío.
- g) Suspensión del residuo obtenido en f) en agua/acetónitrilo (1:1) y eliminación al vacío del cloruro de metileno restante.
- h) liofilización de la suspensión obtenida en g) obteniéndose un sólido amorfo.

3. Procedimiento de purificación de aminoácidos glicosilados aptos para la síntesis en fase sólida de glicopéptidos según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque la extracción de las sustancias absorbidas sobre el cartucho se lleva a cabo mediante la aportación de acetónitrilo en agua desionizada a concentraciones crecientes, estando comprendida la pendiente del gradiente de concentración de acetónitrilo en agua entre 10 y 20 unidades de porcentaje de acetónitrilo en 30 minutos.

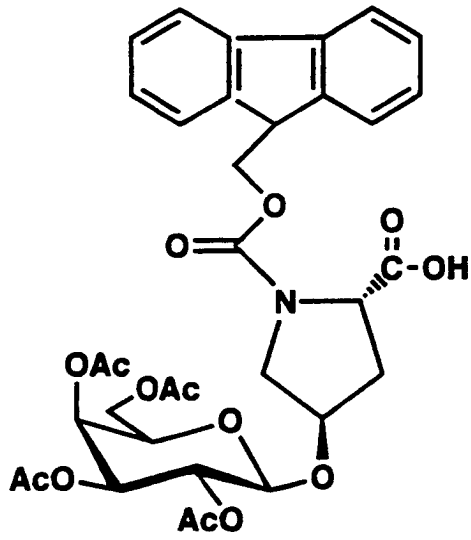


FIGURA 1

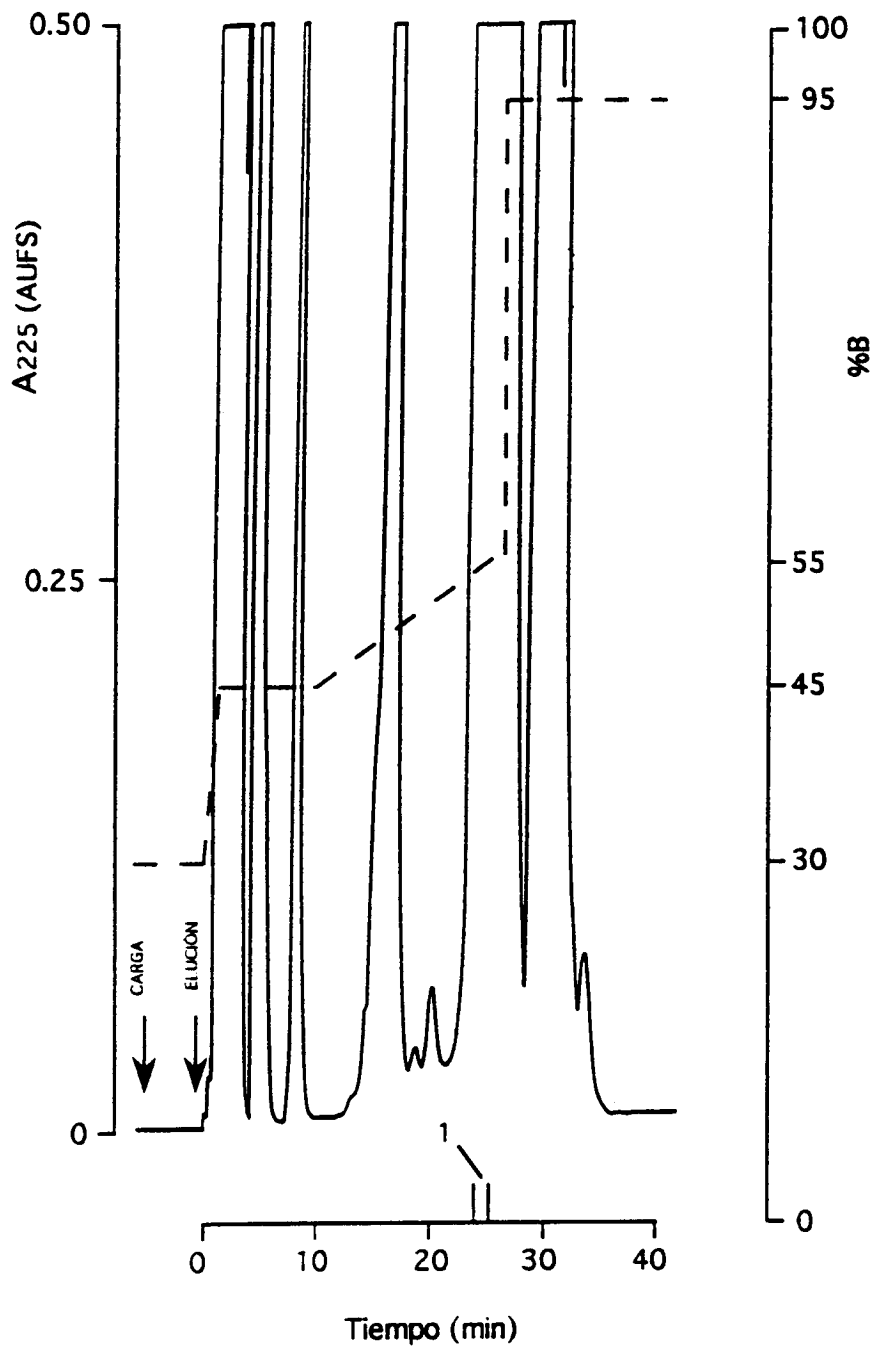


FIGURA 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ① ES 2 105 975
② N.º solicitud: 9501697
③ Fecha de presentación de la solicitud: 28.08.95
④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C07H 17/02

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES-2009274-A (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 16.09.89	
A	SMITH, K.D. et al. "Enzyme Degradation, High-Performance Liquid Chromatography and Liquid Secondary-Ion Mass Spectrometry in the Analysis of Glycoproteins". BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY. 1990. Vol. 4, n° 6, páginas 261-266	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe
13.06.97

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/1