

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 798**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**C07K 1/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2016 PCT/CN2016/110106**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17101810**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2016 E 16874867 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3392266**

54 Título: **Método de síntesis de linaclotida**

30 Prioridad:

**18.12.2015 CN 201510964573**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**18.03.2021**

73 Titular/es:

**HYBIO PHARMACEUTICAL CO., LTD (100.0%)  
4th Floor Office Building Hybio Medicine Park Hi-Tech Industrial Park Central Nanshan District Shenzhen, Guangdong 518057, CN**

72 Inventor/es:

**CHEN, XUEMING;  
WU, JINGKANG;  
MI, PENGCHENG;  
TAO, ANJIN y  
YUAN, JIANCHENG**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 812 798 T3

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

## DESCRIPCIÓN

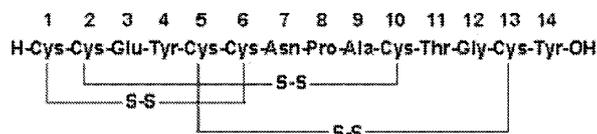
Método de síntesis de linaclotida

**Campo**

La presente invención se refiere al campo técnico de síntesis farmacéutica, y en particular a un método de síntesis de linaclotida.

**Antecedentes**

La linaclotida es un agonista del receptor GC-C (uridilato ciclasa C de enterocitos) y fue aprobada por la FDA de EE.UU. en agosto de 2012 para el tratamiento del estreñimiento idiopático crónico en adultos y el síndrome del intestino irritable en el que predomina el estreñimiento (IBS-C). La linaclotida, que se desarrolla por Ironwood Pharmaceuticals, es un polipéptido que consiste en 14 aminoácidos y que contiene tres enlaces disulfuro en la estructura química de la misma, y puede prepararse mediante expresión celular y síntesis química. La linaclotida tiene una estructura de:



Benitez *et al.* publicaron un informe relevante en Peptide Science en 2010. En el informe se adoptan tres métodos para intentar sintetizar linaclotida. En el método (1), se usa Trt para proteger la cadena lateral de Cys, y el péptido lineal se sintetiza usando un procedimiento de síntesis de péptidos en fase sólida con Fmoc para obtener un péptido en bruto, que luego se oxida mediante una sola etapa usando un procedimiento de oxidación en fase líquida para obtener el péptido objetivo. En el método (2), se usan Trt y AcM para proteger la cadena lateral de Cys, y se obtiene un péptido lineal parcialmente protegido mediante un procedimiento de síntesis de péptidos en fase sólida con Fmoc, y luego se completa la síntesis de enlaces disulfuro usando una estrategia semiselectiva. En el método (3), se usan tres estrategias completamente selectivas para sintetizar linaclotida, respectivamente: [2 Mmt +2 AcM +2 Trt], [2 AcM +2 Trt +2 pMeOBzl] y [2 StBu +2 Trt +2 pMeOBzl].

En el método (1), las etapas de síntesis son sencillas y sólo se usa un tipo de grupo protector para Cys. Sin embargo, para los péptidos en los que es necesario formar tres enlaces disulfuro específicamente en el sitio, se obtendrán muchos isómeros diferentes con enlaces disulfuro no coincidentes mediante oxidación aleatoria. Aunque es posible hacer que la conversión en las moléculas objetivo en el procedimiento de oxidación sea lo más alta posible mediante algunos sistemas de disolución tampón, no siempre puede evitarse la producción de otros isómeros. Un procedimiento de este tipo da como resultado fácilmente un péptido objetivo en bruto con una pureza y un rendimiento más bajos, lo que hace que sea muy difícil lograr una producción a gran escala. Mientras tanto, la oxidación mediante este método tiene una dependencia muy alta de condiciones externas tales como la temperatura, etc. En diferentes circunstancias, el rendimiento del producto obtenido mediante oxidación natural también varía mucho, lo que no conduce al control de la calidad del producto. El método (2) es un método para la oxidación semiselectiva específica de sitio, en el que un enlace disulfuro se oxida específicamente en el sitio, disminuyendo el número de isómeros diferentes formados, en comparación con el método (1). Sin embargo, la producción de isómeros todavía no puede evitarse. Mientras tanto, se menciona además directamente en el informe que se forman dos enlaces disulfuro usando oxidación con yodo, y el rendimiento de péptidos en bruto se reduce severamente. En el método (3), los investigadores optaron por usar tres métodos de selectividad completa diferentes para formar tres enlaces disulfuro, pero no se obtiene ningún producto objetivo.

En la actualidad, todavía no existe un método para preparar linaclotida con una alta eficiencia. Las patentes chinas CN 104974229A, CN 104231051A, CN 104628826A, CN 104163853A, CN 104844693A y CN 102875655A introducen un método para formar tres enlaces disulfuro mediante oxidación en una sola etapa, en el que en primer lugar se sintetiza una resina de linaclotida, y luego se escinde para retirar todos los grupos protectores y el portador de resina en fase sólida para obtener un péptido lineal en bruto de linaclotida, que finalmente se somete a una reacción de oxidación en una sola etapa usando un sistema de oxidación. Entre ellos, se usa un sistema de oxidación GHS/GSSH en los documentos CN 104231051A, CN 104163853A y CN 102875655A; se usa yodo elemental para oxidar en una disolución tampón de fosfato de sodio de pH = 6~13 en el documento CN 104628826A; y se usa un sistema de oxidación de disolución de tampón de clorhidrato de cisteína/DMSO en el documento CN 104844693A. Aunque el método de oxidación en una sola etapa puede convertir el péptido lineal en la estructura objetivo tanto como sea posible mediante el sistema de tampón, las impurezas de isómeros con enlaces disulfuro no coincidentes todavía no pueden evitarse y el rendimiento es menor.

Por tanto, es necesario explorar un método de síntesis de linaclotida que se realice en condiciones suaves, bajo coste, alto rendimiento, alta pureza del producto, procedimientos sencillos y estables, y adecuado para la producción a gran escala.

## Sumario

Con respecto al problema existente en los métodos de síntesis anteriores de que las impurezas de isómeros se producen debido a la falta de coincidencia de enlaces disulfuro, lo que conduce a una pureza y un rendimiento más bajos de los productos, la presente invención proporciona un método para sintetizar linaclotida mediante la formación de tres enlaces disulfuro con selectividad completa, permitiendo así la síntesis eficiente específica de sitio de tres enlaces disulfuro completamente entrecruzados.

Los materiales de partida usados en el método de la presente invención son menos costosos, y especialmente se usa una cisteína protegida con metilo más económica en la formación del tercer enlace disulfuro. Además, la desmetilación y la formación del tercer enlace disulfuro se producen en una sola etapa simultáneamente, lo cual es fácil de manejar, menos costoso y de valor económico y práctico.

Para lograr los objetos anteriores, la presente invención proporciona las siguientes soluciones técnicas:

Un método para preparar linaclotida, que comprende las siguientes etapas:

- 1) preparar una resina precursora de linaclotida haciendo reaccionar Fmoc-Tyr(tBu)-OH con una resina portadora para obtener Fmoc-Tyr(tBu)-resina, y acoplado Fmoc-AA-OH uno a uno en el orden desde el extremo C-terminal hasta el extremo N-terminal con Fmoc-Tyr(tBu)-resina como portador en fase sólida para obtener la resina precursora de linaclotida, en el que las cadenas laterales de Cys correspondientes a las posiciones 5 y 13 de linaclotida están protegidas por Me, las cadenas laterales de Cys correspondientes a posiciones 1 y 6 de linaclotida están protegidas por Mmt y las cadenas laterales de Cys correspondientes a las posiciones 2 y 10 de linaclotida están protegidas por Dpm;
- 2) retirar los grupos protectores Mmt de la resina precursora de linaclotida obtenida en la etapa 1) con un agente de desprotección;
- 3) oxidar la resina precursora de linaclotida obtenida en la etapa 2) con un agente oxidante para formar un primer enlace disulfuro para obtener una resina precursora de linaclotida que contiene un anillo de mono-ditio;
- 4) escindir la resina en la resina precursora de linaclotida que contiene un anillo de mono-ditio obtenida en la etapa 3) y retirar simultáneamente los grupos protectores Dpm con una disolución de lisado para obtener un péptido cíclico de mono-ditio;
- 5) oxidar el péptido cíclico de mono-ditio obtenido en la etapa 4) con un agente oxidante para formar un segundo enlace disulfuro para obtener un péptido cíclico de bis-ditio; y
- 6) retirar los grupos protectores metilo de Cys del péptido cíclico de bis-ditio obtenido en la etapa 5) y oxidar simultáneamente para formar un tercer enlace disulfuro para obtener la linaclotida.

En el método para preparar linaclotida de la presente invención, la resina portadora en la etapa 1) es resina de Wang o resina de 2-cloro, con un grado de sustitución de 0,1-1,0 mmol/g, preferiblemente 0,2-0,8 mmol/g y más preferiblemente 0,2-0,5 mmol/g.

En el método para preparar linaclotida de la presente invención, el acoplamiento de Fmoc-AA-OH en el orden desde el extremo C-terminal hasta el extremo N-terminal en la etapa 1) es Fmoc-Cys (Me)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Dpm)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH, Fmoc-Cys(Me)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Dpm)-OH y Fmoc-Cys(Mmt)-OH. El procedimiento para obtener la resina precursora de linaclotida comprende:

- a) hacer reaccionar Fmoc-Tyr(tBu)-OH con una resina portadora para obtener Fmoc-Tyr(tBu)-resina;
- b) retirar Fmoc seguido por lavar la resina con un disolvente hasta que se detecte la retirada completa de Fmoc mediante un método de detección;
- c) disolver y activar una cantidad apropiada de aminoácido que va a acoplarse y un agente de acoplamiento en un disolvente, y luego añadirlos juntos en una columna de reacción en fase sólida hasta que se detecte la terminación de la reacción mediante un método de detección; y
- d) repetir b) y c).

En el que, el método de detección aplicado es uno cualquiera conocido en la técnica para lograr este propósito, tal como cromatografía o calibración química, preferiblemente usando un reactivo, cuyo punto final de reacción puede determinarse, preferiblemente ninhidrina. Cuando se usa ninhidrina, el desarrollo de la resina indica que hay una amina libre en el polipéptido, es decir, no hay ningún grupo protector en la amina.

En el que, el reactivo para retirar Fmoc es una disolución de piperidina al 20%/DMF (DBLK), es decir, una disolución mixta de piperidina y DMF con una razón en volumen de 1:4

En el que, el agente de acoplamiento es una composición de DIC y compuesto A, o una composición de DIPEA y compuesto A y compuesto B, preferiblemente una composición de DIC y compuesto A, en el que el compuesto A es HOBT o HOAt y el compuesto B es PyBOP, PyAOP, HATU, HBTU o TBTU; los componentes en el agente de acoplamiento está en una razón molar de DIC:A = 1,2:1,1 y DIPEA:A:B = 2,0:1,1:1,0.

- 5 En el que, la reacción de la etapa c) se realiza en una columna de reacción en fase sólida. La columna de reacción en fase sólida no está particularmente limitada y puede ser cualquier columna de reacción en fase sólida que pueda lograr este propósito. Además, la reacción de acoplamiento para cada aminoácido se realiza generalmente durante 1,5-4 horas, preferiblemente 2-3 horas; la presión es preferiblemente presión normal, y también puede realizarse a una presión aumentada o disminuida adecuadamente; la temperatura es preferiblemente temperatura ambiente (es decir,  $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ), y también puede llevarse a cabo a una temperatura elevada o reducida adecuadamente.

En el que, la resina se hincha antes de cada etapa de acoplamiento, en la que el reactivo usado puede ser cualquier reactivo en la técnica que pueda lograr este propósito, tal como DMF, NMP y diclorometano, preferiblemente DMF.

En el que, el disolvente usado en la etapa de lavado puede ser cualquier reactivo en la técnica que pueda lograr este propósito, tal como DMF, NMP y diclorometano, preferiblemente DMF.

- 15 En el método para preparar linaclotida de la presente invención, el agente de desprotección en la etapa 2) es una disolución mixta de TFA/DCM, y la concentración en volumen de TFA en la disolución mixta es del 1%-10%, preferiblemente el 1%-5%, y el punto final de la reacción es un cambio de color en la disolución de rojo a incoloro.

- 20 En el método para preparar linaclotida de la presente invención, el agente oxidante en la etapa 3) se selecciona de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y NCS, preferiblemente NCS, y el disolvente usado se selecciona del grupo que consiste en DMF, NMP y diclorometano, preferiblemente DMF.

En el método para preparar linaclotida de la presente invención, en el que la disolución de lisado en la etapa 4) es una mezcla de TFA,  $\text{H}_2\text{O}$ , PhOMe y tioanisol en una razón diferente, preferiblemente una mezcla de TFA,  $\text{H}_2\text{O}$ , PhOMe y tioanisol en una razón en volumen de 90:5:4:1.

- 25 En el método para preparar linaclotida de la presente invención, el agente oxidante en la etapa 5) se selecciona de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y NCS, y la razón molar entre el agente oxidante y el péptido cíclico de mono-tio obtenido en la etapa 4) es 1:10-10:1; preferiblemente, el agente oxidante es NCS y la razón molar entre NCS y el péptido cíclico de mono-tio obtenido en la etapa 4) es 1:1-10:1, preferiblemente 2:1; y el disolvente se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, acetona, tetrahidrofurano, acetonitrilo, y una disolución mixta del disolvente anterior y agua en una razón diferente, preferiblemente una disolución mixta de acetonitrilo y agua, en la que la razón en volumen entre acetonitrilo y agua es 1:1-1:5, preferiblemente 1:1.

- 30 En el método para preparar linaclotida de la presente invención, el reactivo usado en la etapa 6) para permitir la desmetilación y la oxidación sincronizadamente se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa del rábano, tirosinasa de hongo y monoaminoxidasa. La razón en masa entre el reactivo para permitir la desmetilación y la oxidación sincronizadamente y el péptido cíclico de bis-ditio obtenido en la etapa 5) es 0,5:1000-10:100. Preferiblemente, el reactivo es peroxidasa del rábano, y la razón en masa entre la peroxidasa del rábano usada y el péptido cíclico de bis-ditio obtenido en la etapa 5) es 0,5:100-10:100, más preferiblemente 1,5:100-2,5:100 y lo más preferiblemente 2,0:100.

- 35 En el método para preparar linaclotida de la presente invención, la purificación se lleva a cabo mediante cromatografía de líquidos a alta presión de fase inversa. Tanto el péptido cíclico de bis-ditio como el producto final, linaclotida, pueden purificarse por cromatografía de líquidos a alta presión de fase inversa. Además, en la cromatografía de líquidos a alta presión de fase inversa, se usa octadecilsilano de fase inversa como fase estacionaria, se usa ácido acético acuoso al 0,1% en volumen/acetonitrilo como fase móvil, en la que una razón en volumen entre ácido acético acuoso al 0,1% en volumen y acetonitrilo en la fase móvil es preferiblemente de 98:2 a 50:50, más preferiblemente de 80:20 a 60:40 y lo más preferiblemente 70:30. Se recogen, concentran y liofilizan fracciones máximas objetivo.

- 40 En la presente invención, aunque el agente oxidante usado para formar los enlaces disulfuro primero y segundo puede ser el mismo (por ejemplo, NCS), se usa una estrategia para lograr la formación selectiva de los enlaces disulfuro primero y segundo, en la que los grupos protectores Mmt en la resina precursora de linaclotida se retira en primer lugar en una disolución mixta de TFA/DCM, y luego se forma el primer enlace disulfuro mediante oxidación en fase sólida, seguido por la retirada de los grupos protectores Dpm mientras se escinde la resina precursora de linaclotida que contiene un anillo de mono-ditio mediante una disolución de lisado, y luego mediante la formación del segundo enlace disulfuro mediante oxidación en fase líquida, ya que los grupos protectores Mmt de Cys en las posiciones 1 y 6 se retiran en disolución diluida de TFA, mientras que los grupos protectores Dpm de Cys en las posiciones 2 y 10 deben retirarse en TFA concentrado.

- 45 En la presente invención, se usa Fmoc-Cys(Me)-OH como material de partida, lo que es ventajoso para el acoplamiento oxidativo del tercer enlace disulfuro y la retirada del grupo protector metilo de cisteína al mismo tiempo para obtener linaclotida. Se usa preferiblemente peroxidasa del rábano en esta etapa, que se usa tanto como un

agente desmetilante como un agente oxidante, de modo que la desmetilación y la oxidación pueden lograrse simultáneamente.

5 En resumen, en comparación con la técnica anterior, la presente invención emplea un método para sintetizar linaclotida mediante la formación completamente selectiva de tres enlaces disulfuro, en el que se prepara en primer lugar una resina precursora de linaclotida mediante síntesis en fase sólida, y luego se forma el primer enlace disulfuro mediante oxidación en fase sólida; se lleva a cabo una reacción de escisión y luego se forma el segundo enlace disulfuro mediante oxidación en fase líquida de nuevo; finalmente, se retira el grupo metilo de la cisteína protegida con metilo, y al mismo tiempo se acopla oxidativamente el tercer enlace disulfuro para obtener linaclotida.

10 El método de la presente invención evita la producción de isómeros con enlaces disulfuro no coincidentes mediante la formación completamente selectiva de tres enlaces disulfuro para obtener una pureza y un rendimiento mayores. Mientras tanto, el primer enlace disulfuro se forma mediante oxidación en fase sólida antes de la reacción de escisión de la resina precursora de linaclotida, para reducir la dificultad en la formación del primer enlace disulfuro. Además, el material de partida usado en la preparación del tercer enlace disulfuro es cisteína protegida con metilo más económica, y la retirada del grupo protector metilo y el acoplamiento oxidativo de la cisteína se logran sincronizadamente.

15 El método de síntesis tiene las ventajas de alta pureza del producto, alto rendimiento, materiales de partida simples y fácilmente disponibles, bajo coste, procedimientos sencillos y estables, y es adecuado para la producción a gran escala, y similares, y además presenta una amplia posibilidad de aplicación en el campo técnico de la síntesis de fármacos polipeptídicos.

## 20 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático de una ruta de síntesis de la presente invención.

## Descripción detallada de las realizaciones

25 A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá adicionalmente en detalle por medio de ejemplos, que pretenden ilustrar la presente invención en lugar de limitarla. Debe observarse que, para los expertos en la técnica, pueden realizarse varias mejoras y modificaciones a la presente invención sin apartarse del principio de la presente invención, y estas mejoras y modificaciones también se encuentran dentro del alcance de protección de la presente invención.

Los significados de las abreviaturas usadas en la presente invención se enumeran en la tabla a continuación.

Abreviaturas	Significados
HOAt	1-hidroxi-7-azobenzotriazol
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HATU	hexafluorofosfato de 2-(7-azobenzotriazol)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
HBTU	Hexafluorofosfato de benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinilo
PyAOP	hexafluorofosfato de (3H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-3-iloxi)tri-1-pirrolidinilfosfonio
TBTU	Tetrafluoroborato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio
DMF	N,N-dimetilformamida
DCM	Diclorometano
NCS	N-clorosuccinimida

TFA	Ácido trifluoroacético
PhOMe	Anisol
EDT	Etanoditiol
DBLK	disolución de piperidina al 20%/DMF (V/V)
tBu	Terc-butilo
Trt	Trifenilmetilo
Acm	Metilo de acetamida
Mmt	4-metoxitritilo
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
Dpm	Difenilmetilo
DIC	Diisopropilcarbodiimida
NMP	N-metilpirrolidona
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DIPCDI	Diisopropilcarbodiimida
EDC.HCl	clorhidrato de 1-etil-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
THF	Tetrahidrofurano
TA	Tioanisol
pMeOBzl	p-metoxibencilo
EDT	Etanoditiol
Acm	Metilo de acetamida

Los materiales de partida y reactivos usados en el método para preparar linaclotida están todos disponibles comercialmente y se adquieren de GL Biochem (Shanghai) Ltd., Chengdu Zhengyuan Biochemical Technology Co., Ltd. y Suzhou Tianma Specialty Chemicals Co., Ltd., respectivamente.

5 *Ejemplo 1: preparación de Fmoc-Tyr(tBu)-resina de Wang con un grado de sustitución de 0,50 mmol*

Se pesaron 100 g de resina de Wang con un grado de sustitución de 1,0 mmol/g y se colocaron en una columna de reacción en fase sólida, se añadieron 150 ml de DMF, y se roció e hinchó la mezcla con nitrógeno durante 60 min. Se pesaron Fmoc-Tyr(tBu)-OH (45,9 g, 100 mmol), HOBt (16,2 g, 120 mmol) y DMAP (1,2 g, 10 mmol) y se disolvieron en 100 ml de DMF, se añadió DIC (20,3 ml, 117,1 mmol) a 0°C, y se activó la mezcla durante 5 minutos y se añadió a la columna de reacción. Después de dos horas de reacción, se añadieron anhídrido acético (70 ml) y piridina (60 ml), se mezclaron y bloquearon durante 24 horas y se lavaron 3 veces con DCM (100 ml/vez). Se contrajo la resina con metanol y se succionó en seco para dar 150 g de Fmoc-Tyr(tBu)-resina de Wang. Se detectó que el grado de sustitución era de 0,50 mmol/g.

15 *Ejemplo 2: preparación de resina precursora de linaclotida*

Se pesaron 50 g de Fmoc-Tyr(tBu)-resina de Wang (25 mmol) con un grado de sustitución de 0,50 mmol/g preparada en el ejemplo 1 y se colocaron en una columna de reacción en fase sólida, se añadieron 50 ml de DMF, y se roció e hinchó la mezcla con nitrógeno durante 60 min, y luego se desprotegió dos veces con DBLK2 (50 ml/vez) durante 6 min y 8 min, respectivamente, y se lavó con DMF 6 veces (100 ml/vez). Se pesaron Fmoc-Cys(Me)-OH

(48,7 g, 75 mmol) y HOBt (11,7 g, 75 mmol) y se disolvieron en 100 ml de DMF, y se añadió DIC (13 ml, 75 mmol) en un baño de agua helada para activarse durante 3 min. Luego, se añadió la mezcla a una columna de reacción y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h, y se detectó el punto final de la reacción con ninhidrina (la reacción se terminó si la resina era incolora y transparente; la reacción se prolongó durante 1 h si la resina se desarrolló). Después de que se completara la reacción, se lavó la resina tres veces con DMF (100 ml/vez), se añadió DBLK para desprotección dos veces (100 ml/vez) durante 6 min y 8 min, respectivamente. Se lavó la resina con DMF seis veces (100 ml/vez) y mostró color con detección con ninhidrina.

Se repitió el procedimiento de acoplamiento anterior, y se acoplaron Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Dpm)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH, Fmoc-Cys(Me)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Dpm)-OH y Fmoc-Cys(Mmt)-OH en secuencia al péptido en el orden desde el extremo C-terminal hasta el extremo N-terminal. En cada etapa de acoplamiento, se añadieron 50 g de resina con un grado de sustitución de 0,50 mmol/g obtenida en la etapa anterior, 75 mmol de cada uno de los aminoácidos mencionados anteriormente, HOBt y DIC. Después de que se completaran todos los procedimientos de acoplamiento anteriores, se contrajo la resina con metanol y se succionó en seco para obtener 107,6 g de resina precursora de linaclotida.

#### *Ejemplo 3: retirada del grupo protector Mmt*

Se hincharon 107,6 g de la resina precursora de linaclotida obtenida en el ejemplo 2 en 1 litro de disolución de DMF durante 1 h, luego se eliminó por succión la disolución a presión reducida y se lavó la resina dos veces con DCM (500 ml/vez). Se lavó la resina con 250 ml de disolución de TFA al 2%/DCM (v/v) durante 2 minutos cada vez hasta que el color de la resina cambió de rojo a incoloro, luego se lavó dos veces con DCM (500 ml/vez) y se lavó dos veces con DMF (500 ml/vez). Luego, se eliminó por succión la disolución a presión reducida.

#### *Ejemplo 4: preparación de resina precursora de linaclotida que contiene un anillo de mono-ditio*

Se añadió 1 litro de DMF a la resina sin el grupo protector Mmt obtenida en el ejemplo 3, y luego se añadió NCS (5,34 g, 40 mmol). Después de media hora de reacción, se eliminó por succión la disolución a presión reducida y se lavó la resina tres veces con DMF (500 ml/vez). Se añadieron 500 ml de metanol para contraer la resina durante 30 minutos, luego se eliminó por succión el metanol y se realizó secado a vacío para obtener 92,2 g de resina.

#### *Ejemplo 5: preparación de péptido cíclico de mono-ditio*

Se añadieron 92,2 g de la resina obtenida en el ejemplo 4 a un frasco de tres bocas de 1 l, se añadieron 900 ml de una disolución preformulada de TFA:H<sub>2</sub>O:PhOMe:tioanisol = 90:5:4:1 (V:V) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h. Se filtró la resina a presión reducida y se recogió el filtrado. Se lavó la resina con una pequeña cantidad de TFA y se combinaron los filtrados. Se añadió lentamente el filtrado a 10 l de dietil éter frío, se precipitó, se centrifugó, se lavó con dietil éter frío 5 veces (5 l/vez) y se secó a presión reducida para obtener 25,3 g de péptidos en bruto con una pureza mediante HPLC del 70,6%.

#### *Ejemplo 6: preparación de péptidos cíclicos de bis-ditio*

Se disolvieron 16,1 g de péptidos cíclicos de mono-ditio obtenidos en el ejemplo 5 en 500 ml de disolución de acetonitrilo al 50%/agua (v/v), se añadió NCS (2,67 mg, 0,02 mmol) y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h. Después de completarse la oxidación, se cargó la mezcla directamente en una columna preparativa de 10 cm x 25 cm para purificación y preparación. Las condiciones de purificación fueron las siguientes: se usó octadecilsilano de fase inversa como fase estacionaria; la fase móvil A era una disolución de ácido acético al 0,1%/agua (v/v) y la fase B era acetonitrilo con A:B = 70:30 (en volumen) para elución isocrática; la velocidad de flujo fue de 70-80 ml/min; y la longitud de onda de detección fue de 230 nm. Se recogieron, concentraron y liofilizaron las fracciones máximas objetivo para dar 14,5 g de productos puros con una pureza del 96% y un rendimiento del 90%.

#### *Ejemplo 7: preparación de linaclotida*

Se disolvieron 14,5 g de péptidos cíclicos de bis-ditio obtenidos en el ejemplo 6 en 300 ml de acetonitrilo, se añadieron 280 ml de disolución tampón de dihidrogenofosfato de sodio (pH=6) y luego se añadieron 300 mg de peroxidasa del rábano. Después de 1 hora de reacción, se cargó la mezcla directamente en una columna preparativa de 10 cm x 25 cm para purificación y preparación. Se usó octadecilsilano de fase inversa como fase estacionaria; la fase móvil A era una disolución de ácido acético al 0,1%/agua (v/v) y la fase B era acetonitrilo con A:B = 70:30 (en volumen) para elución isocrática; la velocidad de flujo fue de 70-80 ml/min; y la longitud de onda de detección fue de 280 nm. Se recogieron, concentraron y liofilizaron las fracciones máximas objetivo para dar 10,0 g de producto puro con una pureza del 99,5% y un rendimiento del 70%.

## REIVINDICACIONES

1. Método de síntesis de linaclotida, que comprende las siguientes etapas:
  - 1) preparar una resina precursora de linaclotida haciendo reaccionar Fmoc-Tyr(tBu)-OH con una resina portadora para obtener Fmoc-Tyr(tBu)-resina, y acoplando Fmoc-AA-OH uno a uno en el orden desde el extremo C-terminal hasta el extremo N-terminal con Fmoc-Tyr(tBu)-resina como portador en fase sólida para obtener la resina precursora de linaclotida, en la que las cadenas laterales de Cys correspondientes a las posiciones 5 y 13 de linaclotida están protegidas por Me, las cadenas laterales de Cys correspondientes a las posiciones 1 y 6 de linaclotida están protegidas por Mmt, y las cadenas laterales de Cys correspondientes a las posiciones 2 y 10 de linaclotida están protegidas por Dpm;
  - 2) retirar los grupos protectores Mmt de la resina precursora de linaclotida obtenida en la etapa 1) con un agente de desprotección;
  - 3) oxidar la resina precursora de linaclotida obtenida en la etapa 2) con un agente oxidante para formar un primer enlace disulfuro para obtener una resina precursora de linaclotida que contiene un anillo de mono-ditio;
  - 4) escindir la resina en la resina precursora de linaclotida que contiene un anillo de mono-ditio obtenida en la etapa 3) y simultáneamente retirar los grupos protectores Dpm con una disolución de lisado para obtener un péptido cíclico de mono-ditio;
  - 5) oxidar el péptido cíclico de mono-ditio obtenido en la etapa 4) con un agente oxidante para formar un segundo enlace disulfuro para obtener un péptido cíclico de bis-ditio; y
  - 6) retirar los grupos protectores metilo de Cys del péptido cíclico de bis-ditio obtenido en la etapa 5) y simultáneamente oxidar para formar un tercer enlace disulfuro con un agente desmetilante y oxidante para obtener la linaclotida.
2. Método de síntesis de linaclotida según la reivindicación 1, en el que el acoplamiento de Fmoc-AA-OH en el orden desde el extremo C-terminal hasta el extremo N-terminal en la etapa 1) es Fmoc-Cys(Me)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Dpm)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Mmt)-OH, Fmoc-Cys(Me)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Cys(Dpm)-OH y Fmoc-Cys(Mmt)-OH.
3. Método de síntesis según la reivindicación 1, en el que la preparación de la resina precursora de linaclotida en la etapa 1) comprende: a) hacer reaccionar Fmoc-Tyr(tBu)-OH con una resina portadora para obtener Fmoc-Tyr(tBu)-resina; b) retirar Fmoc seguido por lavado de la resina con un disolvente hasta que se detecta la retirada completa de Fmoc mediante un método de detección; c) disolver y activar una cantidad apropiada de aminoácido que va a acoplarse y un agente de acoplamiento en un disolvente, y luego añadirlos juntos en una columna de reacción en fase sólida hasta que se detecta la terminación de la reacción mediante un método de detección; y d) repetir b) y c);
 

en el que el reactivo para retirar Fmoc es disolución de piperidina al 20%/DMF (DBLK), es decir, una disolución mixta de piperidina y DMF con una razón en volumen de 1:4;

en el que el agente de acoplamiento es una composición de DIC y compuesto A, o una composición de DIPEA y compuesto A y compuesto B, preferiblemente una composición de DIC y compuesto A, en el que el compuesto A es HOBt o HOAt y el compuesto B es PyBOP, PyAOP, HATU, HBTU o TBTU; los componentes en el agente de acoplamiento está en una razón molar de DIC:A=1,2:1,1 y DIPEA:A:B=2,0:1,1:1,0; y

en el que la resina se hincha antes del acoplamiento, y el reactivo se selecciona del grupo que consiste en DMF, NMP y diclorometano.
4. Método de síntesis según la reivindicación 1, en el que la resina portadora en la etapa 1) es resina de Wang o resina de 2-cloro, con un grado de sustitución de 0,1-1,0 mmol/g, preferiblemente 0,2-0,8 mmol/g, y más preferiblemente 0,2-0,5 mmol/g.
5. Método de síntesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente de desprotección en la etapa 2) es una disolución mixta de TFA/DCM, y la concentración en volumen de TFA en la disolución mixta es del 1%-10%, preferiblemente el 1%-5%.
6. Método de síntesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente oxidante en la etapa 3) se selecciona de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NCS, y el disolvente se selecciona del grupo que consiste en DMF, NMP y diclorometano.
7. Método de síntesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la disolución de lisado en

la etapa 4) es una mezcla de TFA, H<sub>2</sub>O, PhOMe y tioanisol en una razón en volumen de TFA:H<sub>2</sub>O:PhOMe:tioanisol = 90:5:4:1.

- 5 8. Método de síntesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente oxidante en la etapa 5) se selecciona de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NCS, y la razón molar entre el agente oxidante y el péptido cíclico de mono-ditio obtenido en la etapa 4) es 1:10-10:1; preferiblemente, el agente oxidante es NCS y la razón molar entre NCS y el péptido cíclico de mono-ditio obtenido en la etapa 4) es 1:1-10:1, preferiblemente 2:1; y el disolvente se selecciona del grupo que consiste en metanol, etanol, acetona, tetrahidrofurano, acetonitrilo, y una disolución mixta del disolvente anterior y agua en una razón diferente, preferiblemente una disolución mixta de acetonitrilo y agua, en el que la razón en volumen entre acetonitrilo y agua es 1:1-1:5, preferiblemente 1:1.
- 10
- 15 9. Método de síntesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que en la etapa 6), el agente desmetilante y oxidante se selecciona del grupo que consiste en peroxidasa del rábano, tirosinasa de hongo y monoaminoxidasa, y la razón en masa entre el agente desmetilante y oxidante y el péptido cíclico de bis-ditio obtenido en la etapa 5) es 0,5:1000-10:100; preferiblemente, el agente desmetilante y oxidante es peroxidasa del rábano, y la razón en masa entre peroxidasa del rábano y el péptido cíclico de bis-ditio obtenido en la etapa 5) es 0,5:100-10:100, más preferiblemente 1,5:100-2,5:100, y lo más preferiblemente 2,0:100.
- 20 10. Método de síntesis según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una etapa de: 7) purificar linaclotida mediante cromatografía de líquidos a alta presión de fase inversa.

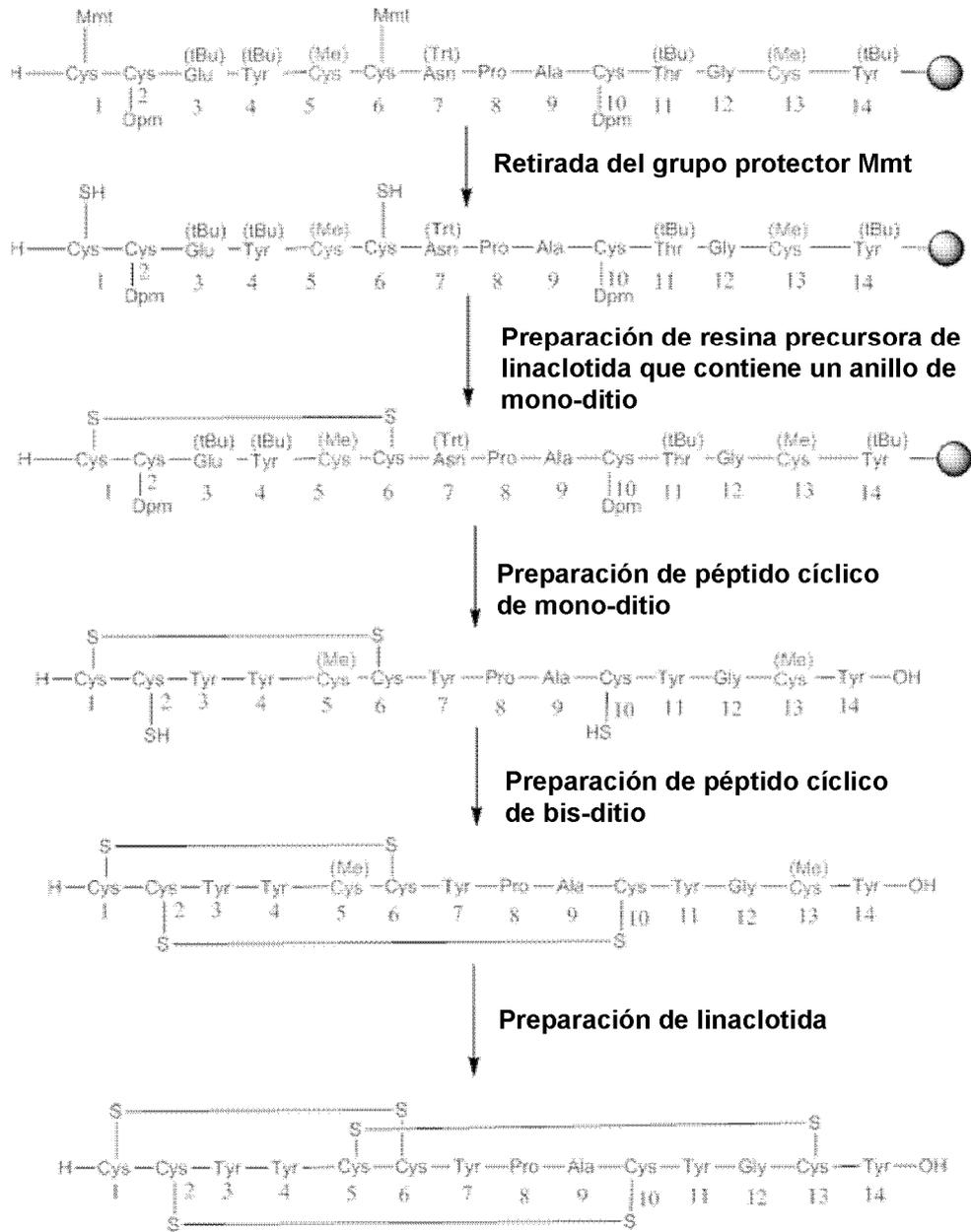


FIG. 1