



## TÍTULO DE PATENTE NO. 314698

**Titular(es):** UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO  
**Domicilio:** Lascuráin de Retana No. 5, 36000, Guanajuato, Guanajuato, MÉXICO  
**Denominación:** EQUIPO AUTOMATIZADO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA.  
**Clasificación:** Int.Cl.8: A61K38/00  
**Inventor(es):** LUIS MANUEL DE LEÓN RODRÍGUEZ; HUMBERTO JORDÁN HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

### SOLICITUD

<b>Número:</b>	<b>Fecha de presentación:</b>	<b>Hora:</b>
MX/a/2007/002499	28 de febrero de 2007	15:37

### PRIORIDAD

<b>País:</b>	<b>Fecha:</b>	<b>Número:</b>
--------------	---------------	----------------

**Vigencia:** Veinte años

**Fecha de Vencimiento:** 28 de febrero de 2027

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2010 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

**Fecha de expedición:** 10 de octubre de 2013

**LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES**

**NAHANNY CANAL REYES**



314698  
10-X-2013

2007/2499

1

## EQUIPO AUTOMATIZADO PARA LA OPTIMIZACIÓN DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA

### DESCRIPCIÓN

#### CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se relaciona en general a un método y un aparato que permite llevar a cabo y optimizar reacciones orgánicas consecutivas de forma automatizada. En particular la invención muestra especial aplicación en la optimización de síntesis de péptidos en fase sólida.

#### 10 ANTECEDENTES

Los péptidos son cadenas pequeñas de hasta 20 aminoácidos que en la actualidad han recibido especial atención dado que prometen ser los fármacos del futuro para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades prevalentes así como futuras. Lo anterior se debe al desarrollo de metodologías que permiten generar extensas bibliotecas peptídicas y así mismo monitorear y descubrir péptidos con una actividad específica (Smith, G. P. *Science*, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface 1985, 228(4705), 1315-1317). Sin embargo, una limitante para que estos candidatos peptídicos lleguen a ser desarrollados y comercializados ha sido su producción a gran escala. En la actualidad existen diversas metodologías para la preparación de péptidos tales como la síntesis química, transgénica y recombinante (Latham, Peter W. *Nature Biotechnology*, Therapeutic peptides revisited 1999, 17(8), 755-

15

20

757). De estos la síntesis química es la más prometedora cuando se trata de péptidos cortos entre 15-20 aminoácidos y más importante cuando se trata de péptidos que contienen aminoácidos no naturales o péptidos post-modificados. En la síntesis química existen variantes tales como síntesis en fase líquida y en fase sólida y en ambas se requiere utilizar aminoácidos protegidos en los grupos amino alfa o carboxílico así como grupos funcionales de cadenas laterales (Greene, T.W.; Wuts P.G.M.; *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 3ra Edición, John Wiley & Sons, 1999). Sin embargo, desde su descubrimiento (Merrifield, R.B. *J. Am. Chem. Soc.*, Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide 1963, 85(14), 2149-2154) la síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) ha sido la metodología más ampliamente utilizada dado que simplifica los pasos de purificación y se puede automatizar fácilmente. Así la SPFS implica la adición sucesiva de aminoácidos protegidos a una cadena que está unida a un soporte sólido a través del grupo carboxílico final del péptido. SPFS comienza por la unión covalente del grupo carboxílico del primer aminoácido del péptido a un soporte sólido insoluble (Wang, S. *J. Am. Chem. Soc.*, p-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p-Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments 1973, 95(4), 1328-1333) constituido por una matriz polimérica (poli estireno, etilen glicol, etc.) en forma de perlas de tamaño lo suficientemente grande para ser separadas de la fase líquida mediante filtración. Una condición en SPFS es que los aminoácidos empleados tengan el grupo amino alfa bloqueado con un grupo protector dentro de los cuales el más común es el 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), el cual se puede remover mediante bases orgánicas nucleofílicas tales como piperidina. Adicionalmente para minimizar reacciones no deseadas

aminoácidos cuyas cadenas laterales contengan grupos funcionales reactivos como amino, alcoholes, tioles, ácidos carboxílicos, etc. deben ser bloqueados en estos mediante grupos protectores que sean estables a las condiciones de acoplamiento de aminoácidos y a las de remoción de Fmoc (Greene, T.W.; Wuts P.G.M.; Protecting Groups in Organic Synthesis, 3ra Edición, John Wiley & Sons, 1999). Lo anterior se realiza generalmente con grupos protectores lábiles a condiciones ácidas. La unión del primer aminoácido al soporte sólido se realiza activando el ácido carboxílico de este en fase líquida mediante metodologías reportadas en el estado de arte de la técnica (Chan, W.C: Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis A practical approach. Oxford University Press, 2000) seguido por la adición de la fase líquida conteniendo el aminoácido activado al soporte sólido. Completada la reacción la fase líquida se separa del soporte sólido mediante filtración seguido por lavados con fase líquida limpia. A continuación se realiza la remoción del grupo protector Fmoc del grupo amino alfa del aminoácido unido a la fase sólida agregando una solución de piperidina en dimetilformamida. La remoción de Fmoc es necesaria para tener el grupo amino alfa del aminoácido libre y disponible para la unión del siguiente aminoácido. Ya completada la reacción se procede a la limpieza del soporte sólido de la forma indicada anteriormente. A continuación se procede al acoplamiento del siguiente aminoácido seguido por la remoción del grupo protector Fmoc y así consecutivamente hasta completar el péptido deseado. Alternativamente después de cada acoplamiento y antes de la remoción del grupo Fmoc se puede llevar una etapa de capado de grupos amino que no hayan reaccionado, lo cual generalmente se realiza poniendo al soporte sólido en contacto con una solución de anhídrido acético. Después de completar la secuencia, el péptido se remueve del soporte

sólido al mismo tiempo que grupos protectores de grupos funcionales de cadenas laterales en medio ácido, seguido de su purificación y caracterización.

Sin embargo, aunque el procedimiento de SPFS en si parece simple, existen varias dificultades que complican la síntesis. Entre las más importantes a considerar se basa en el

5 hecho de que cada aminoácido a acoplar al soporte sólido presenta una cinética óptima de reacción específica, la cual además se ve afectada dependiendo del ambiente en el que se encuentre el grupo amino alfa del aminoácido terminal anclado al soporte sólido al cual se hará el acoplamiento. Este ambiente está definido no sólo por el aminoácido terminal por si mismo, sino también por los otros aminoácidos presentes en la cadena peptídica sintetizada

10 y por lo tanto es dependiente de las interacciones entre estos la fase sólida y líquida. En forma específica las diversas configuraciones de los diferentes aminoácidos en la cadena peptídica anclada a la fase sólida pueden provocar que el péptido presente diversos arreglos tridimensionales que pueden provocar que el grupo amino alfa terminal se encuentre

15 bloqueado estéricamente en diferentes grados lo cual impediría o minimizaría el acoplamiento del aminoácido subsiguiente. Adicionalmente, los diferentes aminoácidos presentes en el péptido unido al soporte sólido confieren diferentes efectos hidrofóbicos/hidrofílicos alrededor del amino alfa terminal y particularmente influyen en la solvatación del soporte sólido lo cual afectará directamente en la accesibilidad de los reactivos líquidos al grupo amino alfa terminal en la resina. En base a lo anterior se

20 concluye que las condiciones óptimas de reacción en la SPFS son difíciles de predecir y determinar dado que la secuencia de aminoácidos que constituyen a un péptido a sintetizar es diferente en cada caso.

Por lo tanto, la reacción en cada paso de adición de un aminoácido difícilmente llega a completarse totalmente, es decir los rendimientos son menores de 100% por paso. Así por ejemplo suponiendo un rendimiento del 95% por paso, entonces el rendimiento global de SPFS de un péptido de 15 aminoácidos sería del 46.3% y esto aun sin considerar pérdidas

5 después de la purificación del mismo. Por otro lado un incremento de tan solo 1% en el rendimiento (96% por paso) daría un rendimiento global del 54% es decir casi 10% más alto. Un rendimiento alto en la SPFS de un péptido representa la obtención de una cantidad total mayor del mismo así como la obtención de un producto más puro. La pureza del péptido es importante puesto que es difícil y costoso el purificar el péptido deseado de

10 péptidos no deseados obtenidos de reacciones incompletas y que se diferencian el péptido deseado por unos cuantos aminoácidos. Así mismo el obtener una cantidad alta total final de péptido es importante dado que si los rendimientos son bajos entonces se requiere el utilizar más cantidad de reactivos de partida los cuales son de costo elevado.

Un sistema automatizado para la síntesis de péptidos mediante SPFS debe acomodar un

15 número grande de pasos diferentes así como de condiciones de reacción. También debe ser construido de tal forma que se minimicen contaminaciones cruzadas entre los diferentes reactivos y solventes. Y aun más deseable es que el sistema contenga un método para monitorear el grado de termino de cada reacción de tal forma que este permita optimizar un proceso específico para obtener el péptido en el rendimiento global más alto posible.

20

Varios equipos automatizados han sido reportados previamente que más sin embargo no cumplen con una o varias de las características mencionadas. Así, por ejemplo, en la patente de Merrifield de EE.UU. No. 3,531,258, se presentan problemas de contaminación

cruzada entre solventes y reactivos, dificultades en medición de los volúmenes de reactivos adicionados al reactor así como el taponeo de los filtros usados en el reactor.

Adicionalmente el dispositivo presentado por Merrifield et al. no puede adecuarse a un rango amplio de volúmenes limitando su aplicación a sistemas micro escala y no cuenta con

5 un método de monitoreo para las reacciones. La adición de cantidades conocidas de reactivos al reactor es importante dado que una adición de exceso de reactivo incrementa el costo de producción y la adición de una cantidad menor a la mínima requerida repercute en el rendimiento final del producto. Parte de estas problemáticas fueron resueltas por Kubodera et al. en la patente de EE.UU. No. 3,647,390 quienes describen un sistema que

10 evita el taponamiento de los filtros del reactor y adicionalmente resuelven el problema de medición de reactivos mediante el empleo de un sistema de transferencia basado en generación de vacío en un matraz de vacío lo cual transfiere líquido en un recipiente intermedio de medición hasta que la presión entre este y el matraz de vacío se equilibra. Así el líquido es transferido del recipiente intermedio de medición al reactor. Sin embargo, el

15 sistema es problemático en la medición la cual sólo puede ser variada cambiando el recipiente intermedio de medición. Así mismo el sistema no presenta un método de monitoreo, lo cual no permite conocer los rendimientos en cada paso de reacción y finalmente existe el problema de contaminación cruzada en el recipiente intermedio de medición. En la patente de EE.UU. No. 4,816,513 se describe un sistema que tiene la

20 característica única de permitir la optimización del paso de activación del aminoácido a ser acoplado a la resina, de esta forma acorde a los inventores se garantizan acoplamientos individuales de aminoácidos de más del 99%. Sin embargo, la eficiencia en el acoplamiento de un aminoácido no depende únicamente de la completa pre-activación del mismo sino de

la secuencia de aminoácidos ya presente en la resina, factores estéricos, etc. como se mencionó anteriormente. De tal forma que existe la necesidad de contar con un sistema de monitoreo que permita determinar el grado de avance de cada reacción, sin embargo en esta patente no se utiliza un sistema de monitoreo. Adicionalmente la existencia de un sólo recipiente de activación en el sistema descrito incrementa el riesgo de contaminación cruzada. Otros sistemas reportados son los de la patente de EE.UU. No. 5,453,487 y la No. 5,240,680. En el primer caso se describe un equipo que permite la inversión total del reactor lo cual permite un mejor contacto entre la resina y la fase líquida sin pérdida de ninguno de ellos. Sin embargo, el sistema tiene la problemática de contaminación cruzada dada la existencia de un sólo recipiente de medición, además de la ausencia de un método de monitoreo. En el caso de la patente No. 5,240,680 se describe un sistema que permite realizar la desprotección, remoción y purificación parcial del péptido de forma automatizada independientemente de la pureza y el rendimiento del mismo. Respecto a los métodos de monitoreo reportados estos se pueden clasificar en tres categorías: 1) destructivos, 2) invasivos y 3) no-invasivos. En los destructivos se requiere tomar una muestra de resina para hacer pruebas cualitativas o cuantitativas que permitan determinar el grado de avance de la reacción. En los invasivos se adicionan reactivos a la resina que puedan ser detectados para seguir el avance de la reacción. Y en los no-invasivos no existe interacción con el medio de reacción. De esta forma el método de monitoreo óptimo debe ser no-invasivo. En la patente de EE.UU. No. 4,701,304 se describe un sistema que minimiza los problemas de contaminación cruzada presente en los equipos previamente reportados dado el uso de recipientes independientes para la transferencia de cada aminoácido, sin embargo el sistema muestra deficiencias dado que no existe un paso previo

de activación del aminoácido puesto que este se transfiere directamente al reactor y después son añadidos a la mezcla del reactor las soluciones requeridas para la activación del aminoácido. Lo anterior puede hacer que la cinética de acoplamiento del aminoácido a la fase sólida sea lenta dada la presencia del grupo amino libre en el aminoácido unido a la

5 resina es suficientemente básico para remover el protón del ácido carboxílico del aminoácido entrante. Adicionalmente en el sistema descrito existe una línea común por donde se realiza la adición de todos los reactivos al reactor y aunque se cuenta con un sistema para vaciar todos los contenidos de esta línea al reactor aplicando alta presión a dicha línea no existe evidencia del vaciado completo de la misma. Aunado a lo anterior se

10 cuenta con la complejidad del reactor que requiere de pasos de inversión total donde deben coincidir entradas de forma exacta para poder liberar la presión interna del mismo. Por otro lado en esta patente se establece un sistema de monitoreo del tipo invasivo que permite monitorear el grado de avance en los pasos de acoplamientos de los aminoácidos a la fase

15 sólida. Este monitoreo consiste en la adición de cloruro de tritilo ( o derivado similar) a la resina de forma que este reaccione con los grupos aminos libres que no han reaccionado con el aminoácido a acoplar, seguido de lavados y remoción de los grupo tritilo que han reaccionado con la resina y que por tanto indicarían el grado de avance de la reacción. Finalmente el líquido que contiene los grupos tritilos removidos de la resina se transfiere a un sistema de medición espectrofotométrico para determinar la cantidad de grupos tritilo

20 dada su absorbancia a 259 nanómetros. Este sistema de monitoreo presenta varias desventajas: primero sólo permite el monitoreo de la reacción de acoplamiento del aminoácido; segundo requiere la adición de reactivos exógenos al sistema lo cual incrementa el tiempo de síntesis y el riesgo de contaminación; tercero la remoción de los

grupos tritilos se lleva a cabo en medio relativamente ácido lo cual puede provocar la remoción parcial de grupos protectores de cadenas laterales de aminoácidos en la resina y la remoción parcial del péptido de la resina, disminuyendo el rendimiento final y limitando el uso de otros soportes sólidos lábiles a las mismas condiciones de remoción del grupo tritilo;

5 cuarto la medición de los grupos tritilo tiene que ser por espectrofotometría por su absorción en la región ultravioleta, lo cual dificulta la medición directa en el reactor además de que requiere de sistemas ópticos relativamente caros. Dado lo anterior se han utilizado alternativas no-invasivas como la detección espectrofotométrica en el rango ultravioleta del grupo Fmoc tanto en su remoción de la resina como de los aminoácidos a acoplarse que  
10 contienen este grupo ( Dryland, A. Sheppard, R.C. J. *Chem. Soc. Perk. Trans. I* 1986, 125-137). Sin embargo, dado el exceso de reactivos comúnmente utilizados en SPFS (hasta 10 equivalentes) la medición es complicada e inexacta y por tanto la optimización de rendimientos es muy complicada. Una alternativa de monitoreo útil es la presentada en la solicitud de patente WO 90/11291 que se basa en la medición de conductividad eléctrica de  
15 la fase líquida en el reactor. La utilidad de esta técnica depende de que en solución existan iones o moléculas cargadas que modifican la conductividad de la misma. Así en la patente hacen referencia a la formación de pares iónicos entre algunos de los reactivos comúnmente utilizados para el acoplamiento de aminoácidos durante SPPS por ejemplo HOBt (hidroxibenzotriazol) y DIPEA (diisopropiletilamina) dada la acidez del primero y  
20 basicidad del segundo. Así mismo los inventores sugieren que la etapa de remoción del grupo Fmoc puede ser monitoreada más exactamente si en la solución de remoción que es usualmente utilizada piperidina al 20% en dimethylformamida (DMF) se le adiciona 3-hidroxi-4-oxodihidrobenzotriazol (Dhbt). Lo anterior es necesario dado la baja

conductividad en la solución de remoción de Fmoc. De aquí que la problemática principal de este sistema de monitoreo es la sensibilidad del mismo y de esta forma estaría limitado a la detección de etapas con cambios de conductividad semejantes. Por otro lado la adición de reactivos exógenos para incrementar la sensibilidad no es deseable como indicado previamente. Así mismo el sistema de detección no podría utilizarse satisfactoriamente para la síntesis de péptidos donde la etapa de acoplamiento requiere la no utilización de DIPEA (Ej. cuando se usan resinas basadas en tritilo) lo anterior dado la esperada baja conductividad de la solución. Por último ninguno de los sistemas hasta ahora reportados ha sido utilizado de forma específica en la optimización de la síntesis de péptidos.

10

#### OBJETOS DE LA INVENCION

Dados los defectos de los estados de arte de la técnica anteriores resulta evidente la necesidad de un equipo automatizado para SPFS-Fmoc que permita la síntesis y optimización de cada una de las etapas de la misma y que sea lo suficientemente versátil para ser aplicada en todas las variantes de la SPFS-Fmoc.

Otro objeto de la presente invención es desarrollar un sistema automatizado de SPFS donde no exista contaminación cruzada.

Es un objeto más de la presente invención el desarrollar un sistema de monitoreo simple no-invasivo basado en conductimetría aplicable a diferentes sensibilidades.

Otro objeto de la presente invención es desarrollar un reactor simplificado que permita ser integrado de forma simple al sistema de adición de reactivos, agitación y detección simultánea.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Los aspectos novedosos que se consideran característicos de la presente invención, se establecerán con particularidad en las reivindicaciones anexas. Sin embargo la invención misma, tanto por su organización como por su método de operación, conjuntamente con

5 otros objetos y ventajas de la misma, se comprenderá mejor en la siguiente descripción detallada de los dibujos que se acompañan, de los cuales:

Figura 1, muestra el sistema automatizado para la optimización de la síntesis de péptidos o compuestos orgánicos en fase sólida.

Figura 2, muestra la vista superior del reactor.

10 Figura 3, muestra un corte transversal del reactor.

Figura 4, muestra la vista inferior del reactor.

Figura 5, muestra un corte frontal del sistema para síntesis de péptidos, con divisiones horizontales cuadradas hechas de material plástico A, fijadas a cuatro columnas metálicas C. Todo el sistema se encuentra cubierto por placas D y en divisiones horizontales

15 abarcadas por B se encuentran los componentes electrónicos y eléctricos.

Figura 6, muestra la vista superior de las divisiones horizontales a, b y c.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención se refiere a la Figura 1 un sistema para sintetizar péptidos que consta de un sistema de recipientes **1a, 1b, ...1f, ...1n** (donde n indica que los recipientes o lo que se indique más adelante puede ser más y no está limitado a lo mostrado en la figura) cada uno

5 conteniendo un reactivo **Ra, Rb, ...Rf, ...Rn** empleado en la síntesis de péptidos, estos reactivos están conectados a las microbombas **3a, 3b, ...3f, ..., 3n** a través de las líneas **2a, 2b, ...2f, ...2n**. Un grupo de reactivos **Ra, Rb y Rc** (como ejemplo en la figura aunque no está limitado a estos) se dirigen a través de líneas **4a, 4b y 4c** pasando por los multiplexores **5a y 5b** a las válvulas **7a, 7b, ....7g, ....7n** a través de las líneas **8a, 8b, ....8g, ....8n**. Cada

10 una de estas líneas llega a los recipientes **10a, 10b, ...10g, ...10n** que contienen a los aminoácidos **AAa, AAb, ...AAg, ....AAn** así como los reactivos de acoplamiento **BBa, BBb, ...BBg, ... BBn**. Cada recipiente que contiene aminoácidos y reactivos de

acoplamiento tiene una barra magnética de agitación que permite agitación mecánica mediante el motor **11** de forma tal que mediante agitación se logre la activación y/o

15 disolución de los reactivos. Cada recipiente **10a, 10b, ...10g, ...10n** está conectado a las microbombas **12a, 12b...12g,...12n** a través de las líneas **9a, 9b, ...9g, ...9n**. Todas estas líneas se conectan por el multiplexor **5c** y pasan a través de la línea **14a** el cual se conecta directamente al reactor **15**. Por otro lado los reactivos **Rd, Re y Rf** (como ejemplo en la figura aunque no está limitado a estos) pasan directamente a través de las líneas **14b, 14c y**

20 **14d** al reactor **15**. El reactor se encuentra conectado a la válvula **17** a través de la línea **16** la válvula se conecta a un matraz quitazato **19** que es el receptor de los desechos a través de la línea **18**. La salida del matraz quitazato se conecta a la bomba de vacío **20**. Por otro lado al reactor entran dos electrodos **21** que están conectados al detector conductimétrico **22**.

También el reactor se fija al agitador vortex **23**. El reactor también cuenta con un orificio de entrada **24** para la entrada de aire o en su caso de un gas inerte (ejemplo nitrógeno). El sistema incluye un microcontrolador **25** controlado por una computadora personal (PC) para el control automático de todos los procesos del sistema tales como activación y apagado de microbombas y válvulas, activación y apagado de agitadores, activación, apagado y registro de conductímetro, activación y apagado de bomba de vacío. Todo el sistema está montado en la caja gabinete mostrada en la figura 5. En la figura 2 se muestra la vista superior del reactor donde se observan los orificios de entrada de las líneas **14a**, **14b**, **14c** y **14d**, el orificio de entrada de los electrodos **21** y el orificio **24** expuesto al aire o de ser necesario de entrada de un gas inerte como nitrógeno. En la figura 3 se muestra un corte transversal el reactor **15** donde este está constituido de dos piezas **26** y **27** las dos piezas se ensamblan por un sistema de rosca. Así mismo en la figura se muestra que en el fondo de la pieza **27** se coloca un filtro poroso **28** y en la misma pieza existe un orificio **29** por el cual se conecta la línea **16** que va al sistema de recolección de desechos. Por último la figura 4 muestra una vista de la parte inferior del reactor la cual ha sido diseñada para encajar perfectamente a los sistemas de agitación Vortex comerciales. Aquí cabe señalar que todos los materiales que están en contacto con los reactivos de reacción, aminoácidos y resina son hechos de Teflón (bombas, válvulas, líneas, reactor, adaptadores), mientras que los recipientes son hechos de vidrio.

La figura 5, muestra un corte frontal del sistema para síntesis de péptidos, con divisiones horizontales cuadradas hechas de material plástico **A**, fijadas a cuatro columnas metálicas **C**. Todo el sistema se encuentra cubierto por placas **D** y en divisiones horizontales abarcadas por **B** se encuentran los componentes electrónicos y eléctricos.

La figura 6, muestra la vista superior de las divisiones horizontales **a**, **b** y **c**.

Las divisiones horizontales **a**, **b** y **c** corresponden a divisiones donde se ubican las microbombas **3a**, **3b**, ...**3f**, ..., **3n** (**12a**, **12b**...**12g**,...**12n**), las válvulas **7a**, **7b**, ...**7g**, ...**7n** y los recipientes **10a**, **10b**, ...**10g**, ...**10n** respectivamente.

- 5 El proceso para la optimización de síntesis de péptidos en fase sólida comienza con la calibración de flujo de cada una de las bombas en el sistema así como pruebas de fugas y funcionamiento apropiado del sistema. La medida de flujo de las bombas se realiza activando las bombas por un tiempo determinado y midiendo el volumen transferido. Los valores de flujo determinados se toman como referencia para determinar los tiempos de
- 10 llenado y vaciado descritos en el proceso. Posteriormente se sigue con el llenado de las líneas **2a**, **2b**, ...**2f**, ... **2n** con los reactivos y disolventes **Ra**, **Rb**, ...**Rf**, ...**Rn**. En seguida se pesa de la resina y se coloca en el reactor **15**. La cantidad de resina pesada determina la cantidad final de péptido \ a preparar y esta depende de las dimensiones del reactor. Así por ejemplo para un reactor de volumen interno de 10 mL se puede emplear una cantidad de
- 15 resina no mayor a la necesaria para sintetizar 0.3 mmol de péptido. Dependiendo de la cantidad de resina pesada y de la carga de la misma se pesan por separado en cada uno de los recipientes **10a**, **10b**, ...**10g**,...**10n** los aminoácidos que conforman el péptido **AAa**, **AAb**, ...**AAg**, ....**AAn** y los reactivos de activación de los aminoácidos **BBa**, **BBb**, ...**BBg**, ... **BBn** y los reactivos químicos necesarios. Respecto a los aminoácidos estos pueden
- 20 contener el ácido carboxílico libre o estar en forma de ésteres de pentafluorofenol, benzotriazol etc., mientras el grupo amino alfa debe estar protegido con Fmoc y los grupos funcionales de cadenas laterales deben estar protegidos ortogonalmente respecto al Fmoc de preferencia con grupos protectores lábiles a condiciones ácidas.

La cantidad de cada aminoácido y de agentes de acoplamiento debe corresponder a cuando menos 2 equivalentes no más de 3 equivalentes de la carga de la resina. Una parte importante para poder optimizar la síntesis es el no utilizar gran exceso de reactivos como es el caso de los estados de arte de la técnica reportados. Ya colocados los recipientes que

5 contienen los aminoácidos en el sistema se agrega al primer recipiente **10a** un volumen predeterminado que será constante para todos los demás pasos del primer reactivo **Ra** activando la microbomba **3a** mientras se mantienen cerradas las microbombas **3b,..3c,..3n** y abriendo la válvula **7a** manteniendo las otras válvulas cerradas **7b,..7c,..7n**, para síntesis de péptidos **Ra** en general será una solución de una amina terciaria como

10 diisopropiletilamina (DIPEA) en dimetilformamida (DMF), en seguida se adiciona al mismo recipiente **10a** un volumen predeterminado que será constante para todos los demás pasos del segundo reactivo **Rb** activando la microbomba **3b** mientras se mantienen cerradas las microbombas **3a,..3c,..3n** y abriendo la válvula **7a** manteniendo las otras válvulas

15 cerradas **7b,..7c,..7n**. Los demás reactivos empleados son seleccionados en base al estado de arte de la técnica. De ser necesaria la adición de reactivos adicionales esta se hace de forma análoga a la descrita. Cabe señalar que a este punto líneas **4b, 4c,.. 4n** y **6b, 6c,..6g,..6n** deben estar vacías dado que no se ha abierto el sistema entre ellas, sin embargo de estar llenas sería con el primer reactivo **Ra** el cual es añadido a todos los demás recipientes que contienen los aminoácidos. Después de la adición de los reactivos **Ra, Rb,**

20 **...Rn** a un volumen total predeterminado al recipiente **10a** se prende el agitador **11** y la mezcla en **10a** se deja agitando por un tiempo predeterminado por el operador de tal forma de que la activación del aminoácido sea completa según lo conocido en el estado de arte de la técnica, este tiempo en general no debe ser mayor a 5 minutos. Una vez completado el

ciclo de agitación se apaga el agitador **11** y se realiza la transferencia del líquido en **10a** al reactor **15** preñdiendo la microbomba **12a** mientras al mismo tiempo se mantienen cerradas todas las bombas y válvulas adicionales del sistema. Esta adición se realiza hasta vaciar toda la línea **9a**, **13a** y **14a**. Cabe señalar que el tiempo de vacío y transferencia de líquidos

5 está determinado por los flujos permitidos por las bombas respectivas determinado en la calibración inicial de las mismas. Inmediatamente después de la transferencia del líquido se activa el conductímetro **22** y se toman 5 mediciones en intervalos de 1 a 5 segundos para tener una medición de referencia inicial de conductividad en el reactor, la cual es registrada en la PC. Para limpiar las líneas y determinar la concentración inicial de reactivos en el

10 reactor se llena nuevamente el recipiente **10a** con reactivo **Ra** considerado de limpieza siguiendo la secuencia de apertura de bombas y válvulas ya señalado y este se transfiere inmediatamente a través de las líneas **9a**, **13a** y **14a** al reactor **15**. Es importante señalar que el volumen total adicionado al reactor **15** del recipiente **10a** incluyendo lavados debe no ser mayor a un 60% del volumen total del reactor. Inmediatamente después de la transferencia

15 del líquido se activa el conductímetro **22** y se toman 5 mediciones en intervalos de 1 a 5 segundos para tener una nueva medición de referencia inicial de conductividad **Ca** en el reactor, la cual es registrada en la PC. En seguida se prende al agitador vórtex **23** a la velocidad predeterminada por el operador. El progreso de la reacción es monitoreado tomando mediciones de conductividad en intervalos de tiempo establecidos por el operador

20 que pueden ser de 5 a 30 segundos siempre apagando el agitador vórtex. Adicionalmente el sistema de monitoreo permite manejar dos escalas de medición de la conductividad uno bajo y otro alto, para alta y baja sensibilidad. El final de la reacción se toma cuando la conductividad no varía o se mantiene constante dentro de un porcentaje predeterminado de

no variación usualmente no mayor al 2-5% una vez que haya cambiado el valor de conductividad **Ca** o cuando el cambio de la conductividad respecto al tiempo no sea mayor del 2 al 5% por un periodo de al menos 5 minutos. La respuesta de la primera reacción de acoplamiento o cambio de conductividad respecto a **Ca** del primer aminoácido **AAa** a la

5 resina es la que se toma como referencia para determinar los porcentajes de rendimientos de acoplamientos subsecuentes. Es decir el cambio de conductividad durante acoplamientos subsecuentes se toma en base a los resultados arrojados para el primer acoplamiento al cual se le asigna un porcentaje de rendimiento del 100%. Esta aproximación es práctica puesto que el acoplamiento del primer aminoácido a la resina no se ve afectado por el efecto de  
10 otros aminoácidos y por tanto lo único que prevalece en este caso son los factores energéticos y cinéticos de la reacción de acoplamiento. Al mantenerse la conductividad constante para el primer acoplamiento se da por terminada la reacción, así que se para la  
15 agitación y se activa la bomba de vacío **20** para remover la solución del reactor **15** y colectarla en el matraz de residuos **19**, esto se hace manteniendo todas las bombas y válvulas cerradas lo cual también garantiza la remoción de líquido de las líneas para evitar contaminación cruzada, por otro lado la remoción total de líquido del reactor se monitorea por el cambio en conductividad y se compara al valor de conductividad de aire o de la resina seca antes de la adición de reactivos, por lo tanto no existe un tiempo constante de vaciado. Posteriormente se lava la resina agregando líquido limpio **Rd** sin reactivos de  
20 recipiente **1d** prendiendo la microbomba **3d**, con un volumen total no mayor al 60% del volumen del reactor. Al agregar el volumen de **Rd** predeterminado se cierra **3d** y se prende el agitador vórtex **23** y posteriormente se apaga para medir la conductividad de la solución, haciendo 5 mediciones continuas en intervalos de 1 a 5 segundos que se registran en la PC.

Posteriormente se activa la bomba de vacío **20** para remover el líquido del reactor siguiendo el protocolo descrito. Los lavados se repiten siguiendo el procedimiento descrito hasta que el valor de conductividad este dentro de un 2 a 5% o menos de variación respecto al valor predeterminado de la solución limpia. En seguida se lleva a cabo la reacción de capado

5 acorde al estado de arte de la técnica agregando solución **Re** constituida generalmente de anhídrido acético y hidroxibenzotriazol o dihidrobenzotriazol en 1-metil-2-pirrolidinona (NMP) prendiendo microbomba **3e**, inmediatamente después de la adición del volumen predeterminado que debe ser no mayor al 60% del volumen del reactor se cierra la bomba y se activa el agitador vórtex **23**. Para determinar el término de la reacción se monitorea el

10 cambio de conductividad en la reacción considerándose terminada cuando la variación en conductividad es menor del 2 al 5% o cuando el cambio de la conductividad respecto al tiempo no sea mayor del 2 al 5% por un periodo de al menos 5 minutos. En este paso el

15 cambio de conductividad se hace tomando como referencia la conductividad del reactivo **Re** fuera del reactor y que ya está registrado en el sistema como predeterminado. La etapa de capado es importante para determinar el rendimiento de etapas sucesivas ya que tiene la función de bloquear grupos amino libres que no hayan reaccionado con el aminoácido a acoplar. El que estos estuvieran libres causaría una interpretación incorrecta respecto al

20 acoplamiento de los siguientes aminoácidos así como de la etapa de remoción de Fmoc. Lo anterior se debe a que el acoplamiento de los siguientes aminoácidos se podría dar tanto en los grupos amino de la creciente cadena del péptido como en aquellos grupos amino que son cadenas incompletas, lo cual podría representar altos rendimientos que mas sin embargo no serían los rendimientos reales del péptido de interés, si o más bien sería la suma de rendimientos de acoplamiento. Sin embargo, el tiempo de capado debe no ser

mayor a 30 minutos tiempo en el cual se para la etapa y se procede al siguiente paso dado que puede no haber cambio en conductividad suponiendo la no existencia de grupos amino libres. Terminada la reacción se para el agitador **23** y se prende la bomba de vacío **20** para remover la solución del reactor y cualquier líquido remanente en las líneas. En seguida se

5 repite el proceso de lavado de la resina como ya se describió anteriormente utilizando líquido **Rd**. A continuación se procede a la etapa de remoción del grupo Fmoc agregando un volumen predeterminado de solución **Rf** constituida generalmente de piperidina al 20% e hidroxibenzotriazol o dihidrobenzotriazol en dimetilformamida (DMF) prendiendo la microbomba **3f**. Después de que se agrega el volumen determinado no mayor al 60% del

10 volumen del reactor se cierra **3f** y se enciende el agitador vortex **23**. El término de la reacción se monitorea midiendo la conductividad con **22** a diferentes intervalos de tiempo siempre apagando el agitador vortex. La reacción se da por terminada cuando la conductividad se mantiene constante dentro de una variación no mayor al 2 a 5% o cuando el cambio de la conductividad respecto al tiempo no sea mayor del 2 al 5% por un periodo

15 de al menos 5 minutos. En este paso el cambio de conductividad se hace tomando como referencia la conductividad del reactivo **Rf** fuera del reactor y que ya está registrado en el sistema como predeterminado. El cambio de conductividad para la primera reacción de remoción de Fmoc es el que se toma como referencia para reacciones posteriores asignándosele un rendimiento del 100%. Ya terminada la reacción se procede a la etapa de

20 lavados como ya se describió. Alternativamente se pueden incluir etapas adicionales incluyendo reactivos, recipientes, bombas y líneas adicionales **1g, ...1n, 2g, ...2n, 3g, ...3n, 14e, ...14n** como ya se indicó previamente. El siguiente paso es la adición del siguiente aminoácido **AAb** siguiendo el protocolo indicado anteriormente con la diferencia es que

ahora se utilizan válvula **7b** y microbomba **12b**. En resumen los pasos son adición de reactivos al recipiente que contiene el aminoácido, mezclado de la solución resultante con agitador **11** para lograr activación del aminoácido o la disolución del mismo, transferencia de solución de aminoácido activado a reactor **15**, medición de conductividad con **22**.

5 agitación con **23**, monitoreo de reacción por conductimetría, remoción de líquido del reactor usando bomba de vacío **20**, lavados, adición de soluciones para reacción de capado, monitoreo de capado por conductimetría, lavados, adición de reactivos para la remoción de Fmoc, monitoreo de reacción por conductimetría, lavados y así consecutivamente hasta  
10 tiempo de secado de la resina activando la bomba de vacío **20** por un tiempo determinado.

En el caso de que en algún paso de reacción no se llegue a los cambios de conductimetría determinados por un máximo de tiempo predeterminado por el operador pero de preferencia

no mayor de 3 horas para acoplamiento de aminoácidos, 30 minutos para desprotección y capado, entonces el proceso se detiene y el operador tendrá que seleccionar si repite dicho  
15 paso o si toma los valores del paso detenido como nuevas referencias para seguir con la

secuencia establecida. De seleccionar repetir el paso y de tratarse del acoplamiento de un aminoácido entonces el operador tendrá que pesar nuevamente el aminoácido **AA** y los reactivos de acoplamiento **BB** en el recipiente **10** que corresponde al aminoácido cuyo acoplamiento se va a repetir. La cantidad de aminoácido y de reactivo de acoplamiento

20 debe ser no mayor de 2 a 3 equivalentes respecto a la carga inicial de la resina y no menor a dos veces la cantidad mínima no acoplada calculada en base a la medición de conductividad final del paso a repetir. Así mismo el cambio de conductividad esperado para el nuevo acoplamiento es proporcional a la cantidad de aminoácido no acoplado en el acoplamiento

previo, lo cual se considera como nuevo criterio de término de la reacción. Es decir si en el acoplamiento de un aminoácido hubo una disminución de conductividad del 50% respecto al determinado como estándar del primer aminoácido acoplado a la resina y ya ha pasado el tiempo predeterminado, si el operador selecciona repetir el paso se considera que en el

5 siguiente sólo falta por acoplarse un 50% del aminoácido y por tanto las referencias esperadas en cambio de conductividad se hacen en referencia a este. Por otro lado si el operador decide no repetir el paso entonces el proceso continúa, simplemente reajustando los parámetros iniciales establecidos para cambios de conductividad, en base al grado de término del último paso.

10 Los rendimientos de cada paso son automáticamente calculados en base a los cambios de conductividad de los pasos en referencia a los pasos respectivos iniciales. Pasos que requieren de repetición o que tienen un bajo rendimiento global son optimizados individualmente. Todos los pasos descritos se llevan a cabo a temperatura ambiente o dada una modificación del reactor se pueden llevar a cabo a cualquier otra temperatura.

15

20

39952

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito suficiente mi invención, considero como una novedad y por lo tanto reclamo como de mi exclusiva propiedad, lo contenido en las siguientes cláusulas:

Instituto  
Mexicano  
de Patentes

1. Un sistema para la síntesis de péptidos caracterizado por contar con recipientes (**1a**, **1b**, **1c**) donde cada uno contienen soluciones empleadas en la síntesis de péptidos de acuerdo a lo descrito por el estado de arte de la técnica. El sistema cuenta con microbombas (**3a**, **3b**, **3c**) que se conectan a los recipientes (**1a**, **1b**, **1c**) a través de las líneas (**2a**, **2b**, **2c**). Las microbombas (**3a**, **3b**, **3c**) cuentan con las líneas de salida (**4a**, **4b** y **4c**) que se interconectan al multiplexor (**5a**), la salida de este multiplexor se conecta al divisor de flujo (**5b**). El sistema cuenta con las válvulas (**7a**, **7b**, ....**7g**) que se conectan a (**5b**) a través de las líneas (**6a**, **6b**, ....**6g**). El sistema cuenta con los recipientes (**10a**, **10b**, ...**10g**) los que contienen los aminoácidos y reactivos de acoplamiento necesarios para la síntesis de péptidos en fase sólida de acuerdo a lo descrito por el estado de arte de la técnica. Las salidas de las válvulas (**7a**, **7b**, ....**7g**) se conectan a los recipientes (**10a**, **10b**, ...**10g**) por las líneas (**8a**, **8b**, ....**8g**). El sistema cuenta con barras magnéticas en cada uno de los recipientes (**10a**, **10b**, ...**10g**) lo que permite agitación mecánica mediante el motor (**11**). El sistema cuenta con las microbombas (**12a**, **12b**...**12g**) cuyas entradas se conectan a los recipientes (**10a**, **10b**, ...**10g**) a través de las líneas (**9a**, **9b**, ...**9g**). Las bombas (**12a**, **12b**...**12g**) cuentan con líneas de salida (**13a**, **13b**...**13g**) que se conectan por el multiplexor (**5c**) y pasan a través de la línea (**14a**). El sistema cuenta con un reactor (**15**) al cual se conecta la línea (**14a**). El sistema también cuenta con recipientes (**1d**, **1e**, **1f**) donde cada uno contienen líquidos empleadas en la síntesis

de péptidos de acuerdo a lo descrito por el estado de arte de la técnica. El sistema cuenta con las bombas (3d, 3e, 3f) las cuales se conectan a los recipientes (1d, 1e, 1f) por las líneas (2d, 2e, 2f). Las bombas (3d, 3e, 3f) cuentan con líneas de salida (14b, 14c y 14d) que alimentan al reactor (15). El sistema cuenta con la válvula 17 que se conecta a la salida del reactor a través de la línea (16) la válvula se conecta a un recipiente (19) que es el receptor de los desechos a través de la línea (18). El sistema cuenta con una bomba de vacío (20) que se conecta a la salida del recipiente (19). Por otro lado el sistema cuenta con un detector conductimétrico (22) que consta de dos electrodos (21) que entran al reactor. También el sistema cuenta con un agitador vortex (23) al cual se fija el reactor. El sistema incluye un microcontrolador (25) controlado por una computadora personal (PC).

2. Un sistema para la síntesis de péptidos como se reivindica en 1, que se caracteriza porque incluye un procesador controlado por un sistema de cómputo para el control automático de todos los procesos del sistema tales como activación y apagado de microbombas y válvulas, activación y apagado de agitadores, activación, apagado y registro de conductímetro, activación y apagado de bomba de vacío.
3. Un sistema para la síntesis de péptidos como se reivindica en 1 cuyo reactor está hecho de teflón y que se caracteriza porque incluye dos partes que se interconectan por medio de un sistema de rosca, y consta de:
  - a) La parte superior que contiene una serie de orificios que se conectan con tuberías para la adición de reactivos, así como de un orificio para la entrada de los electrodos del sistema de medición conductimétrica y un orificio adicional para la entrada de gas.

b) La parte inferior que por dentro contiene un disco poroso de vidrio insertado el cual está conectado a un sistema de tuberías que permite la remoción de líquidos del reactor por un sistema de vacío mientras que mantiene el soporte sólido en el reactor.

5 c) La parte inferior que por la sección externa inferior tiene una muesca que permite su perfecta colocación en sistemas de agitación tipo vórtex.

10

15

20

## RESUMEN

En la presente invención se presenta un equipo automatizado para la optimización de síntesis de péptidos en fase sólida que se llevan a cabo en un soporte sólido e implican una serie de pasos secuenciales. El sistema consta de una serie de recipientes, microbombas y válvulas interconectadas por tuberías, conectores y multiplexores, así mismo tiene un reactor, conductímetro, agitadores, bomba de vacío, sistema electrónico y software de control y computadora personal. Los componentes están integrados en un sistema de divisiones sujetos a un soporte de cuatro columnas metálicas y cubiertas. El equipo integrado permite la preactivación de los reactivos que se adicionan a la fase sólida en el reactor, minimiza las problemáticas de contaminaciones cruzadas y permite la optimización de cada uno de las reacciones involucradas en la síntesis y por lo tanto minimiza el gasto de reactivos.

5

10

15

20

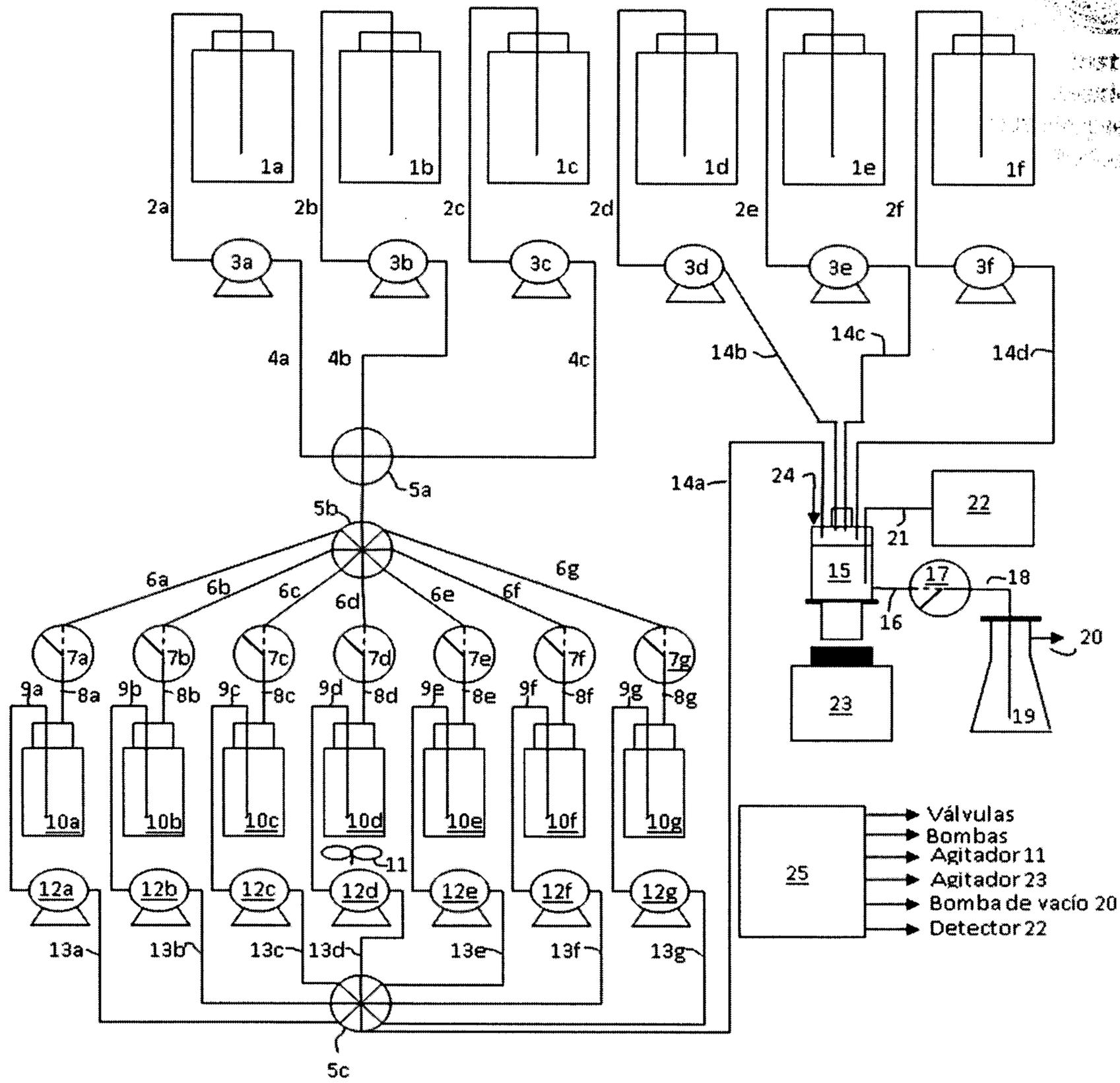


Figura 1



Figura 2

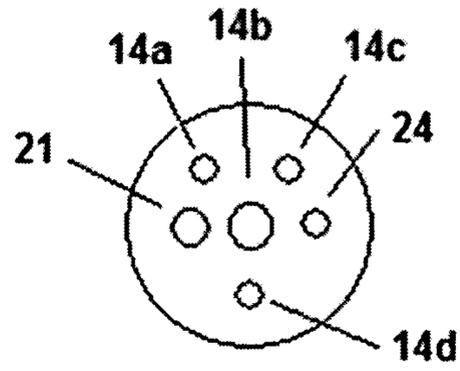


Figura 3

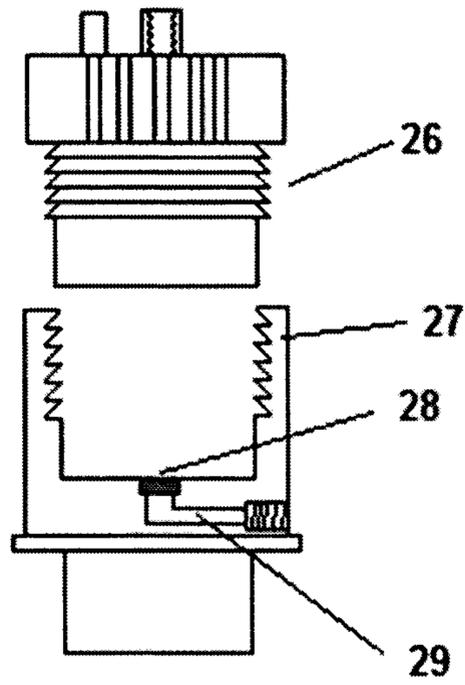
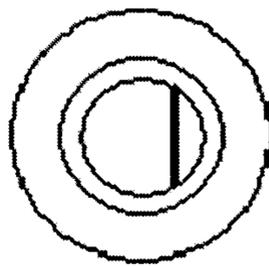


Figura 4



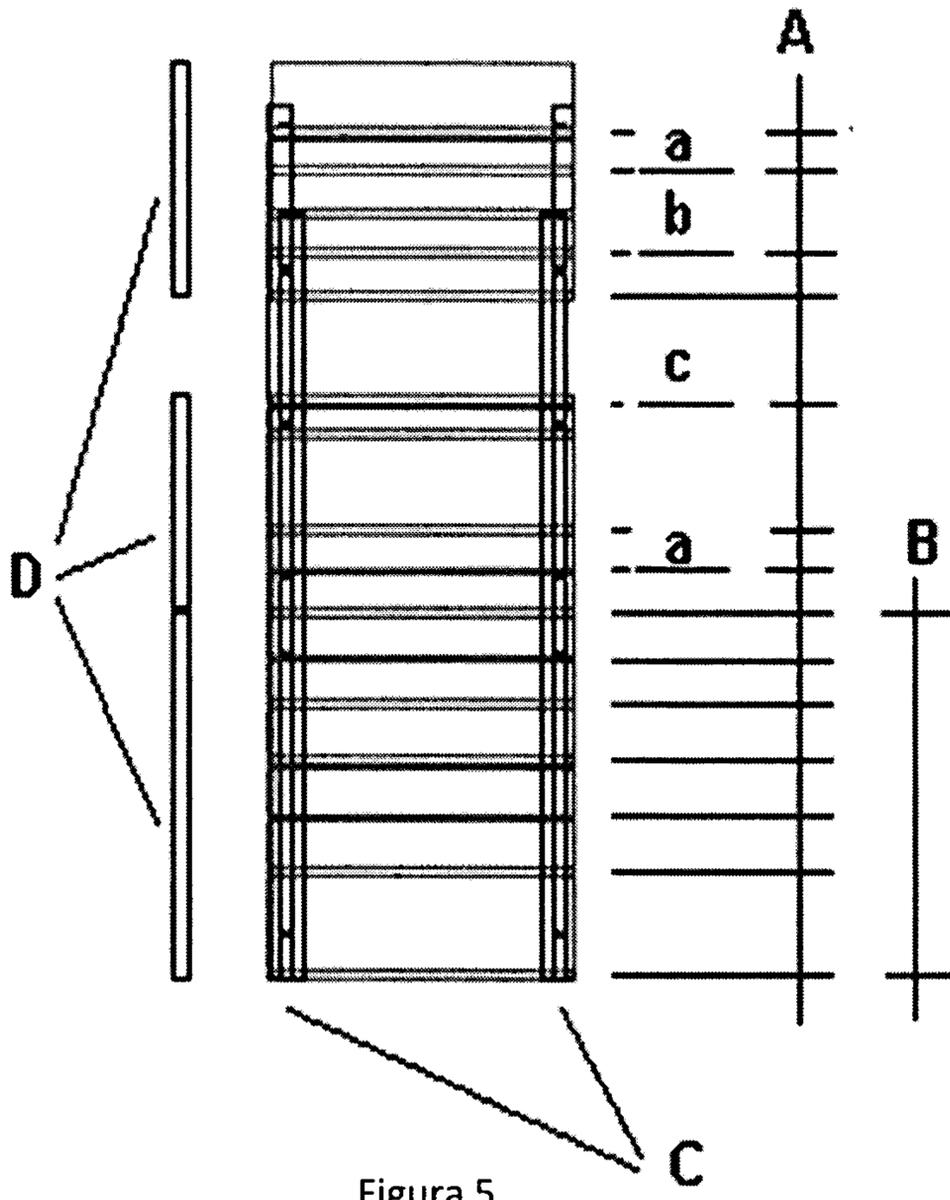


Figura 5

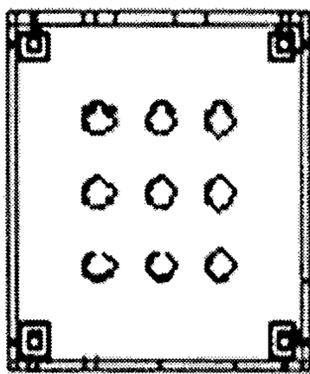


Figura 6