



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109311960 A

(43)申请公布日 2019.02.05

(21)申请号 201780017323.3

(22)申请日 2017.03.21

(30)优先权数据

16162066.1 2016.03.23 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.09.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/056668 2017.03.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/162653 EN 2017.09.28

(71)申请人 巴切姆股份公司

地址 瑞士布本多夫市

(72)发明人 A·施塔德麦尔 R·O·施勒贝

D·参孙 F·丹特纳

(74)专利代理机构 天津市北洋有限责任专利代  
理事务所 12201

代理人 曹玉平

(51)Int.Cl.

C07K 14/605(2006.01)

B01D 15/32(2006.01)

C07K 1/00(2006.01)

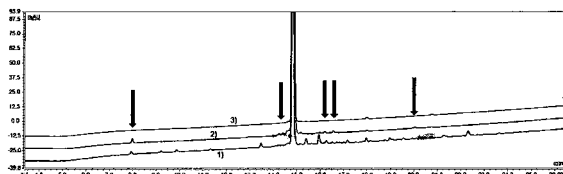
权利要求书2页 说明书20页  
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

胰高血糖素样肽1类似物的纯化方法

(57)摘要

本发明涉及一种纯化胰高血糖素样肽1类似物的方法,该方法包括二维反相高效液相色谱方案,其中第一维在7.0-7.8的pH值下进行,使用包含磷酸盐缓冲液和乙腈的流动相,第二维在低于3.0的pH值下进行,使用包含三氟乙酸和乙腈的流动相。



1. 一种利拉鲁肽的纯化方法,包括:
  - a) 提供包含利拉鲁肽和至少一种不需要的组分的液体组合物C;
  - b) 使组合物C,在pH7.0-7.8下,经受第一反相高效液相色谱(RP-HPLC)纯化,其中烷基合的二氧化硅用作固定相,流动相则包含水溶性磷酸盐缓冲液AB1和乙腈,通过逐渐增加流动相内的乙腈浓度进行洗脱,同时收集含有利拉鲁肽的级分;和
  - c) 将步骤b)中获得的含利拉鲁肽的级分合并,在pH低于3.0下,进行第二反相高效液相色谱纯化,其中烷基合的二氧化硅用作固定相,流动相则包含三氟乙酸和乙腈,通过逐渐增加流动相内的乙腈浓度进行洗脱,同时收集含有纯化利拉鲁肽的级分。
2. 根据权利要求1的方法,其中步骤b)中的水溶性磷酸盐缓冲液AB1是磷酸铵缓冲液,优选浓度为5mM-50mM。
3. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中步骤b)中乙腈的梯度为19至67%(体积比),和/或步骤c)中乙腈的梯度为31至100%(体积比)。
4. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中步骤c)中流动相内的三氟乙酸浓度选自0.05-0.5%(体积比),优选0.05-0.1%(体积比)。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,还包括以下步骤:
  - d) 将步骤c)中获得的利拉鲁肽在pH7.0至7.8下进行第三反相高效液相色谱纯化,其中烷基合的二氧化硅用作固定相,流动相则包含水溶性缓冲液AB2与乙腈的混合物,通过逐渐增加流动相内的乙腈浓度进行洗脱,同时收集含有纯化利拉鲁肽的级分。
6. 根据权利要求5的方法,其中所述水溶性缓冲液AB2选自下列组:
  - 磷酸二氢钠和磷酸氢二钠的混合物,
  - 磷酸二氢钾和磷酸氢二钾的混合物,
  - 醋酸钾,和
  - 醋酸钠。
7. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中步骤b)和/或步骤c)和/或步骤d)(如果存在的话),全部或部分在4-25°C,优选4-10°C,的温度范围内进行。
8. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中步骤b)和c)和步骤d)(如果存在的话)中使用的固定相是C8键合的二氧化硅或C18键合的二氧化硅。
9. 根据前述权利要求中任一项的方法,还包括一步尺寸排阻色谱法的步骤e)。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,还包括一步使所述肽脱盐的步骤f),其中,优选地通过离子交换色谱法,尺寸排阻色谱法或超滤法进行脱盐。
11. 根据权利要求9或10的方法,其中相应步骤的全部或部分在4-20°C,优选4-10°C,的温度范围内进行。
12. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中步骤a)包括将干燥的粗利拉鲁肽溶解在pH7.0-7.5水溶性磷酸盐缓冲液AB0中。
13. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中所述粗利拉鲁肽是通过固相肽合成,三氟乙酸介导的切割并从切割组合物中沉淀而获得。
14. 根据前述权利要求中任一项的方法,其中将纯化的利拉鲁肽冻干,优选在pH6.6-7.9下冻干,其中优选pH7.0-7.8,最优选pH7.0-7.5。
15. 一种组合物LC,包含可根据权利要求1-14中任一项的方法得到的利拉鲁肽,其特征

在于所述组合物含有纯度高于99%的利拉鲁肽,且下列每种杂质虽然可以检测到,但各自的含量不超过0.5%,优选不超过0.3%,更优选不超过0.2%,最优选不超过0.1%:i)任何第25位Trp侧链中的吲哚部分通过掺入单个氧原子而被氧化利拉鲁肽衍生物,和/或ii)任何第25位Trp侧链中的吲哚部分通过掺入两个氧原子而被氧化利拉鲁肽衍生物,和/或iii)任何25位是犬尿氨酸而不是Trp的利拉鲁肽衍生物,和/或iv)缺乏Gly<sup>31</sup>的利拉鲁肽缺失变体。

## 胰高血糖素样肽1类似物的纯化方法

[0001] 本发明有关工业或实验室规模的肽纯化领域。本发明涉及有效率地纯化胰高血糖素样肽1类似物如利拉鲁肽的方法。

[0002] 在优选的实施方案中,本发明涉及纯化胰高血糖素样肽1类似物的方法。该方法包括一种二维反相高效液相色谱方案,其中第一步在pH 7.0-7.8范围内进行,使用的流动相包含磷酸盐缓冲液和乙腈,第二步在低于pH 3.0的情况下进行,使用含有三氟乙酸和乙腈水溶性流动相。

[0003] 人类GCG基因(HGNC:4191)编码多种相关肽,包括胰高血糖素,胰高血糖素样肽1(GLP-1)和胰高血糖素样肽2(GLP-2)。它们之间具有相当大的序列同源性(参见图1),参与控制血糖稳态,肠细胞增殖和饱腹感。GLP-1功能异常与肥胖,餐后反应性低血糖和2型糖尿病有关。因此,GLP-1类似物在药物研究中具有相当大的意义。在吉拉毒蜥(*Heloderma suspectum*)中发现的肽激素exendin-4的变体和衍生物以及GLP-1肽本身的变体和衍生物正受到广泛研究。市场上已有的这类药物包括艾塞那肽(Exenatide)和利西拉来(Lixisenatide),两者均自exendin-4肽衍生,以及自GLP-1衍生的利拉鲁肽。

[0004] 利拉鲁肽(N- $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu(N- $\alpha$ -hexadecanoyl)))-Lys26Arg34-GLP-1(7-37),也称为NN2211,已被批准用于治疗2型糖尿病和治疗有相关合并症的成人肥胖症。

[0005] 该物质通过重组技术可以工业规模生产。WO 1998/008871披露了使重组表达的亲本肽与N $\alpha$ -十六烷酰基-Glu(ONSu)-OtBu反应以获得利拉鲁肽。

[0006] 人们期望有完全化学合成的方法大规模制备胰高血糖素样肽如利拉鲁肽。肽的化学合成已在文献中广泛记载。化学肽合成可以区分为两种标准方法,即液相肽合成(LPPS)和固相肽合成(SPPS)。此外,还可以利用混合方法,即首先通过上述技术之一合成片段,然后使用另一种技术将片段连接在一起。LPPS,也称为溶液肽合成,在均相反应介质中进行,连续偶联产生所需的肽。在SPPS中,经连续加入构成给定序列的受保护氨基酸而组装成C-末端锚定在不溶性聚合物树脂上的肽。因为生长的肽链与不溶性载体结合,所以可以通过简单过滤除去过量的试剂和可溶性副产物。然而,特别是对于大肽的合成,除了在脱保护期间或由于降解而形成的副产物之外,树脂结合的副产物也会累积。结果,最终产品的纯化可能非常具有挑战性。

[0007] 胰高血糖素样肽的纯化由于其聚集倾向而变得特别困难。已知胰高血糖素和胰高血糖素样肽在酸性pH下倾向于聚集(例如,European J.Biochem.11(1969)37-42)。本发明提供了生产和纯化GLP-1和GLP-1类似物的方法,特别是用于纯化利拉鲁肽的方法。

[0008] 专利申请CN-A 103275208公开了利拉鲁肽的纯化方案,包括使用C18柱的反相高效色谱(RP-HPLC),流动相由0.1%三氟乙酸(TFA)溶液和乙腈组成,或由1%乙酸水溶液和乙腈组成。总产量为20.2%。

[0009] WO2011/161007公开了一种纯化GLP-1衍生物的方法。该方法涉及二维RP-HPLC,其中流动相中的有机溶剂是乙腈,第二维使用pH8.0-11.0的碱性缓冲液进行。

[0010] 在优选的实施方案中,C18柱与pH值为2.4的磷酸铵/乙腈一起用作第一维的流动相,pH为9.5的乙酸铵/乙腈或碳酸铵/乙腈作为第二维的流动相。报告的最大纯度为

97.4%。因此,纯度不如所希望的那么高,并且肽在碱性缓冲液中获得,可能不利于肽储存的缺点,特别是因为W02011/161007中使用的碱性缓冲剂是不可蒸发的。去除其碱性缓冲剂可能需要额外的脱盐步骤。

[0011] EP-A 2813514公开了一种纯化利拉鲁肽的方法。该方法包括三维RP-HPLC纯化,其中辛基硅烷键合的二氧化硅作为固定相,水性异丙醇/TFA/乙腈体系作为第一维的流动相;氰基硅烷键合二氧化硅作为固定相,高氯酸/乙腈体系作为第二维流动相;辛基硅烷键合的二氧化硅作为固定相,氨水/乙腈体系作为第三维流动相。虽然在这个费力的程序中三个后续HPLC纯化步骤各自使用不同固相和完全不同的流动相,但报道的最大纯度却为98.7%。

[0012] W02014/199397公开了使用C8柱和TFA/甲醇/乙腈系统作为流动相,通过RP-HPLC对经混合方法合成的粗利拉鲁肽进行纯化。获得的组合物包含大量有毒甲醇。据报道,所得纯度高于97%。

[0013] W02010/066734公开了逆流色谱用于肽纯化的用途。反相和阴离子交换柱用作固定相。这里,这种基于反离子的方法是相当理论性的描述。这种方法相当复杂。

[0014] WO 2000/055203和WO 2000/055184公开了通过离子交换色谱法纯化肽。类似地,WO 2005/019261公开了通过离子交换色谱法从外消旋污染物中分离利拉鲁肽的方法

[0015] 由这些方法获得的组合物含有相当大量的盐,其通常高于所需的盐,必须在进一步的纯化步骤中除去。

[0016] W02011/107447公开了通过RP-HPLC纯化各种肽,其中流动相的pH保持在肽的等电点的1个单位内,并且洗脱优选酸性范围的pH梯度实现。

[0017] EP-B 1 664 109公开了通过RP-HPLC纯化肽,其中流动相包含醇和缓冲剂,其在选自pH 4-10的设定点处严格控制pH值。

[0018] W02016/005960公开了利拉鲁肽的两步纯化方案,其描述了使用不规则C18二氧化硅介质(10微米粒径)和流动相(包含pH8.0的10mM Tris)的第一纯化步骤。第二步使用5微米粒径的C18RP-HPLC介质和包含0.1%TFA的流动相。用乙腈的逐步梯度进行洗脱。合并级分的平均纯度为97%,因此不如所希望的高。而且,使用两种不同的固定相是不经济的。

[0019] 可见,尽管有大量现有技术,仍然需要改进方法,能够工业化生产高纯度胰高血糖素样肽1类似物和衍生物。

[0020] 令人惊讶的是,本发明发现了一种制备高纯度利拉鲁肽的简单方法。已经发现,采用两个连续的色谱步骤,首先使用含有磷酸盐缓冲液,pH为7.0-7.8 ( $7.0 \leq \text{pH} < 7.8$ )的第一流动相,随后使用含有TFA的酸性pH的第二流动相,这是有利的方法,可以很好地避免柱堵塞,并且可以在两个步骤中使用相同的固定相。在所进行的实验中,可以实现高于98.8% (甚至高于99%)的可重复的高产率和高纯度的合并级分。

[0021] 常规地,在本发明中使用几种缩写和定义:

[0022] ACN 乙腈(acetonitrile)

[0023] AcOH 醋酸(acetic acid)

[0024] Boc 叔丁氧基羰基(tert.butylloxycarbonyl)

[0025] DTE 1,4-二硫代红霉素(1,4-dithioerythriol)

[0026] DTT 1,4-二硫苏糖醇(1,4-dithiothreitol)

[0027] EDT 1,2-乙二硫醇(1,2-ethanedithiol)

- [0028] Fmoc 9-芴甲氧羰基(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)
- [0029] GLP-1 胰高血糖素样肽1(glucagon-like peptide 1)
- [0030] GLP 胰高血糖素样肽(glucagon-like peptide)
- [0031] HPLC 高效液相色谱(high performance liquid chromatography).
- [0032] 本说明书中HPLC也包括UHPLC
- [0033] LC-MS 液相色谱-质谱(Liquid chromatography-mass spectrometry)
- [0034] LPPS 液相肽合成(liquid phase peptide synthesis)
- [0035] NH<sub>4</sub>OAc 醋酸铵(ammonium acetate)
- [0036] RP-HPLC 反相高效液相色谱法(reversed phase high performance liquid chromatography)
- [0037] SEC 尺寸排阻色谱(size exclusion chromatography)
- [0038] SPPS 固相肽合成(solid-phase peptide synthesis)
- [0039] tBu 叔丁基(tert. Butyl)
- [0040] TEAP 三乙基磷酸铵(triethylammonium phosphate)
- [0041] TFA 三氟乙酸(trifluoroacetic acid)
- [0042] TIPS 三异丙基硅烷(triisopropylsilane)
- [0043] UHPLC 超高效液相色谱法(ultra high performance liquid chromatography)
- [0044] 除非另有说明,pH值是在各水溶液使用温度下的值。
- [0045] 氨基酸表示法可以是其全名(例如:丙氨酸),或根据WIPO的标准ST.25的3字母代码(如Ala)或单字母代码(如A)。在没有明确说明的情况下,对映体形式通常是L-氨基酸。然而,应该注意,本发明同样可以使用D-氨基酸和其他立体异构体进行实践。
- [0046] 在本发明中,术语“肽”和“多肽”可以互换。除非另有说明,肽序列在本文中以N-末端(左)开始并以C-末端(右)结束。
- [0047] 表1列出了肽不同的表示法,它们是等同的,并且在本说明书中可互换使用。
- [0048] 表1. 肽的表示法
- [0049]

表示法	说明
H-Gly-Leu-Ala-Phe-OH	该表示法强调N-末端氨基基团(“H”)和C-末端羧基基团(“OH”)未被修饰
Gly-Leu-Ala-Phe	末端基团只有在有修饰时才明确标明。
GLAF	单字母代码。末端基团只有在有修饰时才明确标明。
Glycyl-L-leucyl-L-alanyl-L-phenylalanine	“完整书写法”

[0050] 以下表示法将用于氨基酸衍生物: $\alpha$ 氨基(N $\alpha$ )上的取代基用氨基酸符号的左侧并用连字符分隔的符号表示, $\alpha$ 羧基上的取代基用氨基酸符号的右侧并用连字符分隔的符号表示,侧链上的取代基则在氨基酸符号右侧的括号中表示。对于未修饰的 $\alpha$ -氨基酸, $\alpha$ 氨基

(Na)上的取代基是质子(H<sup>-</sup>), $\alpha$ 羧基上的取代基是羟基(-OH)。

[0051] 对于支链二肽,该表示法遵循嵌套形式。例如,Fmoc-Lys(Boc-Glu-OtBu)-OH是指具有Fmoc保护的 $\alpha$ 氨基和游离 $\alpha$ 羧基的Lys衍生物,其侧链被谷氨酰基取代,谷氨酰基具有Boc保护的 $\alpha$ 氨基和OtBu保护的羧基。谷氨酰基通过其 $\gamma$ -羧基与Lys侧链形成酰胺键。

[0052] 类似的表示法用于取代的氨基酸,它们是肽的一部分。例如,Aaa1-Aaa2-Lys(Boc-Glu-OtBu)-Aaa4-Aaa5是指支链五肽,其中3位的Lys侧链经酰胺键被谷氨酰基取代,谷氨酰基上有Boc保护的 $\alpha$ 氨基和OtBu保护羧基。因此,所述酰胺键位于Lys的 $\epsilon$ -氨基和Glu的 $\gamma$ -羧基之间。

[0053] 本发明所用的术语“胰高血糖素样肽”或GLP是指衍生自GCG基因(HGNC:4191)的同源肽,其毒蜥外泌肽及其类似物以及任何前述物质的衍生物。图1显示原型胰高血糖素样肽之间的序列比对。

[0054] 术语“胰高血糖素样肽1类似物”和“GLP-1类似物”在发明中可互换使用,均指涉及能够结合GLP-1受体的肽。GLP-1(7-37)和exendin-4(1-39)的衍生物和类似物如艾塞那肽,利西拉肽和利拉鲁肽是优选的GLP-1类似物。示例性地,GLP-1类似物可包含与SEQ ID NO:4具有至少80%同源性的多肽链,更优选与SEQ ID NO:4具有至少90%同源性的多肽链,特别是与SEQ ID NO:4具有至少95%同源性的多肽链。任选地,还在与SEQ ID NO:4的Lys20同源的赖氨酸上有修饰。在本发明中同源性优选是在SEQ ID NO:4的整个长度上测定的序列同源性。

[0055] 在本发明中,序列同源性可以指本领域已知的序列同源性的任何定义。特别地,

[0056] 序列同源性可以理解为由国家生物技术信息中心(NCBI)提供的BLAST(基本局部比对搜索工具)在本申请提交日期时的版本可确定的序列同源性。

[0057] 本发明所用的术语“类似”或“类似物”是指从第一肽序列衍生的肽,衍生是通过取代第一肽中高达50%氨基酸残基,和/或从第一肽删除高达10%的氨基酸残基,和/或添加多达10个氨基酸残基到第一肽。优选的类似物,是通过取代多达20%的氨基酸残基,和/或通过删除多达10%的氨基酸残基,和/或通过添加多至10个氨基酸残基,自第一肽衍生。

[0058] 本文所用的术语“衍生”或“衍生物”是指可通过化学反应从第一化合物获得的化合物。衍生的结果可以通过取代基的存在或不存在而区别于第一化合物。例如,用于SPPS的氨基酸衍生物通常与衍生它们的氨基酸不同,至少是因为氨基保护基团的存在。

[0059] 本发明涉及有效率地纯化GLP-1类似物如利拉鲁肽的方法。

[0060] 本领域技术人员理解,本文使用的GLP-1类似物可任选地带有本领域已知的任何抗衡离子,例如阴离子或阳离子(如氯离子,乙酸根离子,碳酸根离子,碳酸氢根离子,钠离子,钾离子,镁离子),裂解溶液的任何离子(如,TFA离子,溴离子,高氯酸根离子,铵离子)和/或保护基残留的阳离子或阴离子。此外,肽可任选地与一种或多种痕量的清除剂共价或非共价缔合,例如三异丙基硅烷(TIS),二硫苏糖醇(DTT),苯甲醚,茴香硫醚,或1,2-乙二硫醇。

[0061] 以下描述虽然通常涉及利拉鲁肽,但应理解它们同样适用于任何其他GLP-1的类似物。

[0062] 特别地,本发明的一个方面涉及一种纯化利拉鲁肽的方法,包括以下步骤a)-c):

[0063] a) 提供液体组合物C,其包含利拉鲁肽和至少一种不需要的组分;

[0064] b) 将组合物C在pH7.0和7.8之间进行第一反相HPLC纯化,其中使用烷基合的二氧化硅作为固定相,使用包含磷酸盐缓冲液AB1和乙腈的流动相,通过逐渐增加流动相内的乙腈浓度实现洗脱,同时收集含有利拉鲁肽的级分;和

[0065] c) 将步骤b)中获得的含利拉鲁肽的合并级分进行pH低于3.0的第二反相HPLC纯化,其中使用烷基合的二氧化硅作为固定相,使用含三氟乙酸和乙腈的流动相,通过逐渐增加流动相内的乙腈浓度实现洗脱,同时收集含有纯化利拉鲁肽的级分。

[0066] 在一个实施方案中,本发明的方法还包括步骤

[0067] d) 将步骤c)中获得的利拉鲁肽进行pH7.0至7.8的第三反相HPLC纯化,其中使用烷基合的二氧化硅作为固定相,使用水性缓冲液AB2与乙腈的混合物作为流动相,通过逐渐增加流动相内的乙腈浓度实现洗脱,同时收集含有纯化利拉鲁肽的级分。

[0068] 术语“提供液体组合物C,其包含利拉鲁肽和至少一种不需要的组分”可以在最广泛的意义上理解为获得含有利拉鲁肽和至少一种不需要的组分的任何液体组合物。利拉鲁肽可以通过本领域已知的任何方法提供。示例性地,它可以从固相肽合成(SPPS)或液相肽合成(LPPS)或二者的组合获得。或者,普通多肽链也可以从生物技术的方法获得,且所获得的多肽链可以随后通过化学/合成的方法修饰。

[0069] 术语“不需要的组分”可以在最广泛的意义上理解为任何被认为是杂质的化合物,特别是指,在利拉鲁肽的合成和储存过程中形成的杂质类型,例如,氨基酸,肽及其衍生物。特别是下述原因产生的氨基酸,肽及其衍生物类的杂质:肽合成期间链过早终止,遗漏或额外添加了至少一个氨基酸,脱保护不完全,氨基酸偶联或Fmoc去保护步骤中发生的副反应,分子间或分子内缩合反应,肽从固体支持物切割过程中的副反应,外消旋化,任何其他类型的异构体形成,脱酰胺,(部分)水解,和聚集形成等。本领域众所周知,胰高血糖素和胰高血糖素样肽易于形成聚集,并且低pH值通常促进该过程,即低pH值代表不稳定条件(参见,例如,Wang等,Mol.Pharm 12:411-419)。由上述原因产生的肽杂质有时被称为“相关物质”。

[0070] 在特别优选的实施方案中,不需要的组分是肽杂质。如本文所用,术语“肽杂质”是指不需要的肽化合物,并且特别包含HMW杂质,待纯化肽的衍生物,待纯化肽的截短变体,待纯化肽的缺失变体,和截短和缺失变体的衍生物。通过合适的分析色谱方法(包括RP-UHPLC)可以常规测定肽杂质。

[0071] 在一个实施方案中,不需要的组分包含待纯化肽的共价或非共价聚集体。这些不需要的组分是生理学上无活性的或具有未知的生理作用,并且具有高于5000Da的分子量。它们在本文中称为“高分子量(HMW)杂质”。在另一个实施方案中,不需要的组分是待纯化肽的衍生物,例如,氨基酸侧链的氧化或水解的产物和/或肽合成过程中形成的副产物。在另一个实施方案中,不需要的组分是待纯化肽的截短变体或这种截短变体的衍生物。如本文所用,术语“截短的变体”是指给定肽的连续片段,即无间隙的子序列,其在肽序列的N-末端和/或C-末端缺少一个或多个氨基酸。在另一个优选的实施方案中,不需要的组分包含待纯化肽的缺失变体或这些缺失变体的衍生物。如本文所用,术语“缺失变体”用于指待纯化肽的变体,其一级序列缺少一个或多个氨基酸。“缺失的”氨基酸可以在原始肽序列内的任何位置。因此,截短变体可以被认为是特定类型的缺失变体。

[0072] 在特别优选的实施方案中,待纯化的肽是利拉鲁肽。在最优选的实施方案中,根据本发明的方法可以除去肽杂质,从而产生基本上纯的利拉鲁肽制剂。通过分析色谱法观察



到的相对峰面积评估,优选在205nm和230nm之间的波长下进行UV检测,结果显示本发明的方法可以产生基本上纯的利拉鲁肽,其含有不超过0.5%的任何单独的肽杂质。

[0073] 利拉鲁肽缺失变体可以优选地是由27-30个连续氨基酸组成的肽,其与利拉鲁肽的分子结构不同,因为它们相比利拉鲁肽肽骨架的一级序列(SEQ ID NO:4)缺少多达四个氨基酸,并且可以任选地在2-5个氨基酸侧链或在N-ε-(γ-Glu(N-α-十六酰基))--取代基处、对应于SEQ ID NO:4的Lys20位置上的Lys残基进行改变。

[0074] 换言之,利拉鲁肽缺失变体可以定义为长度为27至30个氨基酸残基的肽,按SEQ ID NO:4的整个长度计算,其与SEQ ID NO:4至少有80%的同源性,并且任选地包含有修饰,例如在N-ε-(γ-Glu(N-α-十六酰基))--取代基上对应于SEQ ID NO:4的Lys20的同源赖氨酸残基上的修饰。

[0075] 在一些实施方案中,不需要的组分包含至少一种Trp(0)<sup>25</sup>-利拉鲁肽,和/或至少一种Trp(20)<sup>25</sup>-利拉鲁肽和/或Kyn<sup>25</sup>-利拉鲁肽和/或利拉鲁肽缺失变体,其缺少Gly31。

[0076] 对于本申请,术语“Trp(0)<sup>25</sup>-利拉鲁肽”用于表示利拉鲁肽衍生物,其中第25位的Trp侧链中的吲哚残基由于掺入单个氧原子而被氧化。术语“Trp(20)<sup>25</sup>-利拉鲁肽”用于表示利拉鲁肽衍生物,其中第25位的Trp侧链中的吲哚部分通过掺入两个氧原子而被氧化。最后,表达Kyn<sup>25</sup>-Liraglutide用于利拉鲁肽衍生物,其中由犬尿氨酸取代25位的Trp。

[0077] 本文所述的本发明实施方案可有利地用于从合成后获得的粗制剂中分离利拉鲁肽。尽管本发明决不限于利拉鲁肽合成的某种具体方法,但优选的纯化实施方案涉及化学合成的利拉鲁肽。例如,利拉鲁肽可以用适当保护的氨基酸和二肽衍生物通过Fmoc固相肽合成来制备。

[0078] 优选地,组合物C包含利拉鲁肽或其盐,其通过包括以下步骤(i)-(iii)的方法制备:

[0079] (i) 提供包含式I的肽的溶液S:

[0080] 组氨酸-丙氨酸-谷氨酸-甘氨酸-苏氨酸-苯丙氨酸-苏氨酸-丝氨酸-天冬氨酸-缬氨酸-丝氨酸-丝氨酸-酪氨酸-亮氨酸-谷氨酸-甘氨酸-谷氨酰胺酰-丙氨酸-丙氨酸-B<sup>1</sup>-谷氨酸-苯丙氨酸-异亮氨酸-丙氨酸-色氨酸-亮氨酸,缬氨酸,精氨酸-甘氨酸-精氨酸-甘氨酸,

[0081] 其中B<sup>1</sup>是赖氨酸(棕榈酰-谷氨酸-OH)或赖氨酸(H-谷氨酸-OH);

[0082] (ii) 通过将溶液S与包含二异丙醚和乙腈的反溶剂混合沉淀步骤(i)的肽,其中二异丙基醚:乙腈的体积比在3:1至10:1的范围内;和

[0083] (iii) 分离步骤(ii)得到的沉淀,优选通过过滤和/或离心分离。

[0084] 更优选地,通过上述方法获得组合物C中包含的全部利拉鲁肽粗品。

[0085] 在一个特别优选的方面,组合物C包含粗利拉鲁肽或其盐,其通过包括以下步骤(i)-(iii)的方法制备:

[0086] (i) 提供包含式I肽的溶液S:

[0087] 组氨酸-丙氨酸-谷氨酸-甘氨酸-苏氨酸-苯丙氨酸-苏氨酸-丝氨酸-天冬氨酸-缬氨酸-丝氨酸-丝氨酸-酪氨酸-亮氨酸-谷氨酸-甘氨酸-谷氨酰胺酰-丙氨酸-丙氨酸-B<sup>1</sup>-谷氨酸-苯丙氨酸-异亮氨酸-丙氨酸-色氨酸-亮氨酸,缬氨酸,精氨酸-甘氨酸-精氨酸-甘氨酸,

[0088] 其中B<sup>1</sup>是赖氨酸(棕榈酰-谷氨酸-OH)或赖氨酸(H-谷氨酸-OH);

[0089] 其中所述提供溶液S的步骤包括:

[0090] (i-a) 提供与固相缀合的前体肽:

[0091] 组氨酸-丙氨酸-谷氨酸-甘氨酸-苏氨酸-苯丙氨酸-苏氨酸-丝氨酸-天冬氨酸-缬氨酸-丝氨酸-丝氨酸-酪氨酸-亮氨酸-谷氨酸-甘氨酸-谷氨酰胺-丙氨酸-丙氨酸-B<sup>1</sup>-谷氨酸-苯丙氨酸-异亮氨酸-丙氨酸-色氨酸-亮氨酸,缬氨酸,精氨酸-甘氨酸-精氨酸-甘氨酸,其中B<sup>1</sup>是赖氨酸(棕榈酰-谷氨酸-OH)或赖氨酸(H-谷氨酸-OH);并且其中至少谷氨酸,天冬氨酸和赖氨酸的侧链带有保护基团;和

[0092] (i-b) 采用包含三氟乙酸(TFA)的裂解组合物将前体肽从树脂上裂解,其中从步骤(i)得到的溶液S含有三氟乙酸(TFA),水和一种或多种选自硫醇清除剂和/或硅烷清除剂的清除剂;

[0093] (ii) 将溶液S与由二异丙基醚和乙腈组成的反溶剂混合,沉淀步骤(i)的肽,二异丙基醚:乙腈的体积比在3:1至5:1的范围内;和

[0094] (iii) 分离步骤(ii)得到的沉淀,优选通过过滤和/或离心分离。

[0095] 本领域技术人员会立即注意到,式I的肽是指普通利拉鲁肽的衍生物,其多肽链以单字母代码书写为:

[0096] HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG (SEQ ID NO:4),

[0097] 其中氨基酸序列(Lys20,K20)即第20位的赖氨酸部分被修饰。更具体地,Lys20的ε氨基通过酰胺键与谷氨酰胺部分(γ-Glu, γ-E)的γ羧基残基缀合。该谷氨酰胺部分通常具有游离的α羧基。谷氨酰胺部分可以通过其氨基与棕榈酸(即十六烷酸)缀合,或者可以带有游离的-NH<sub>2</sub>(α氨基,Na)。

[0098] 优选地,式I的肽基本上不含任何保护基团,并且除了Lys20的之外在氨基酸侧链上没有修饰。因此,式I的肽优选是完全未保护的肽,优选不进一步修饰。

[0099] 本文所用的术语“保护基团”可以在最广泛的意义上理解为通过官能团的化学改性引入分子中以阻止所述基团在随后的工艺步骤中反应的基团,例如,防止氨基酸侧链的副反应。氨基保护基团的实例是Boc和Fmoc基团,羧酸的实例保护基团是非反应性酯,例如甲酯,苄基酯或叔丁基酯。

[0100] 对于本申请而言,术语“树脂”和“[树脂]”可以在最广泛的意义上理解为可用于SPPS的支撑结构。优选地,树脂具有珠状结构。术语“树脂”,“固相”和“载体”在本发明中可互换使用。

[0101] 在本申请文中,术语“清除剂”用于指加入反应混合物中,用于抑制SPPS后肽从树脂上裂解期间和/或脱保护基团期间的发生副反应的化合物。用于裂解组合物的典型清除剂是水,“硫醇清除剂”(例如EDT,DTE,DTT和β-巯基乙醇)和“硅烷清除剂”(例如TES和TIPS)。

[0102] 其它常用的清除剂包括乙基甲基硫醚,茴香硫醚,苯甲醚,间-或对-甲酚,2-Me-吡啶,Ac-Trp-OMe或色胺。本领域技术人员熟知可用的各种清除剂。

[0103] 在本发明的一个优选实施方案中,纯化方法的步骤a)包括获得干燥的粗利拉鲁肽沉淀物并将所述干燥的沉淀物溶解在合适缓冲液中,其pH在7.0-7.8的范围内,优选7.0-7.5的范围,从而获得包含利拉鲁肽和至少一种不需要的组分的液体组合物C。在一个优选

的实施方案中,步骤a)包括将干燥的粗利拉鲁肽溶解在水性磷酸缓冲液AB0中,其pH范围选为6.6-7.9,优选7.0-7.8,最优选7.0-7.5。特别优选的磷酸缓冲剂是磷酸氢钠或磷酸氢铵,pH范围为7.0-7.5。

[0104] 在本发明的一个优选实施方案中,粗利拉鲁肽通过固相肽合成获得,然后是三氟乙酸引导的切割,再从切割组合物中进行肽沉淀。

[0105] 就本发明而言,术语“原始”和“粗料”可互换使用以指直接制备后肽的,例如利拉鲁肽,其基本上是合成和分离过程的直接产物,尚未进行特定的纯化步骤。化学合成通常产生利拉鲁肽粗制剂,其纯度为约50-70%。然而,应该理解,液体组合物C的特征是包括低于100%的任何纯度的利拉鲁肽(例如,高于30%,40%,50%,60%,70%,80%或90%的纯度),并且本发明也可有利地应用于已经部分纯化的利拉鲁肽组合物。

[0106] 就本发明而言,术语“纯化的”用于表示已经过特定纯化步骤的肽组合物,例如,经过制备型色谱。这些组合物可以是高度或部分纯化。

[0107] 除非另有说明,肽纯度在本说明书中为“HPLC纯度”,即在分析型反相高效液相色谱(RP-HPLC)中观察到的相对峰面积,在205和230nmUV波长检测获得,即肽键最大吸收波长。换句话说,该值被确定为给定峰面积除以色谱图中所有在205和230nmUV波长观察到的峰面积之和后得到的面积%。该方法是本领域的常规,技术人员会常规地设计针对给定产品的RP-HPLC检测方案并根据美国药典中规定的既定指南进行定量。通过LC-MS测定峰纯度,可常规地评估给定RP-HPLC检测方案是否可用来检测肽纯度。假设由于它们的相似结构,所有肽组分具有相同的吸收,RP-HPLC纯度则可代表重量百分比纯度。

[0108] 技术人员熟知如何制备用于色谱纯化的样品。例如,干燥的粗利拉鲁肽制剂可以通过在水相中温和搅拌溶解,同时适当调节温度和pH。本发明人发现pH为6.6-7.9,优选7.0-7.8,特别是pH7.0-7.5的水性缓冲液,特别适用于溶解粗利拉鲁肽制剂。作为进一步的实例,样品可以保持在惰性气体下或进行超声处理,可以进行脱羧反应,可以进行特定的水解,和/或可以通过过滤或离心与非液体组分分离。有多种方法调节样品浓度,例如,视情况而定,可以通过干燥,冷冻干燥,溶剂的部分蒸发或超滤,和/或用上样缓冲液溶解或稀释肽制剂样品。

[0109] 反相高效液相色谱(RP-HPLC)是众所周知的并且广泛用于肽样品的肽纯化和分析,即用于制备和分析目的。该技术基于样品的各种组分与疏水性固定相之间的疏水缔合,该缔合被包含在流动相中的溶剂破坏。通常经逐渐增加流动相内溶剂的浓度来实现样品组分的差异洗脱。

[0110] 从实际角度来看,该梯度通常通过改变构成流动相的第一和第二洗脱缓冲液的比例来获得:第一缓冲液,按照惯例称为缓冲液A,为含有少量溶剂的合适的水性缓冲液,而按照惯例,称为缓冲液B的第二缓冲液则是在所述水性缓冲液中包含大量溶剂。因此,通过增加流动相中缓冲液B的比例,可以从固定相洗脱更多的疏水性组分。

[0111] 在本发明中,术语HPLC还包括超高效液相色谱(UHPLC,也称为UPLC)。在一个优选的实施方案中,HPLC是UHPLC。更优选地,UHPLC是反相UHPLC,因此也可以称为RP-UHPLC。因此,在特别优选的实施方案中,HPLC是RP-UHPLC。

[0112] 在本发明中,术语“键合的二氧化硅”是指由表面具有化学键合羟基的多孔二氧化硅颗粒或二氧化硅凝胶制成的固定相。应理解,化学键的类型以及键合的烃部分的化学

性质可以不同。例如,用于本发明的固定相可以由具有4-18个,优选8-18个碳原子的化学键合的烃基的多孔二氧化硅颗粒制成。这种烃基优选是直链烷基链。优选类型的烃键合二氧化硅具有烃基,其具有四个(C4),六个(C6),八个(C8),十个(C10),十二个(C12),十四个(C14),十六个(C16)或十八个(C18)碳原子。特别优选类型的烃键合二氧化硅具有四(C4),八(C8),十二(C12)或十八(C18)碳原子的无支链烷基链,即丁基,辛基,十二烷基或十八烷基。对于本发明步骤b),c)和任选的d)来说,C8键合的二氧化硅,特别是正辛基键合的二氧化硅,和/或C18键合的二氧化硅,特别是正十八烷基键合的二氧化硅,可能是更优选固定相。步骤b)和c)和任选的d)中使用的固定相可以各种相同或不同。优选地,固定相是相同的。特别优选地,在步骤b)和c)和任选的d)中使用单一固定相(即单个柱)。

[0113] 就本发明而言,术语“C8键合的二氧化硅”用于表示由多孔二氧化硅颗粒或硅胶制成的固定相,其表面具有化学键合的C8烃基,优选线性辛基,即正辛基。此外,术语“C12键合的二氧化硅”用于表示由多孔二氧化硅颗粒或硅胶制成的固定相,其表面具有化学键合的C12烃部分,优选线性十二烷基,即正十二烷基。同样,术语“C18键合的二氧化硅”或“ODS”,二者可互换使用,是指由多孔二氧化硅颗粒或硅胶制成的固定相,其表面具有化学键合的C18烃部分,优选直链十八烷基,即正十八烷基。

[0114] 各种烃键合的二氧化硅材料是可商购的。可用于本发明的固定相的实例是Daisogel™ C18 ODS,Daiso ODS-Bio,Daiso-ODS-A-HG C18,Daisogel™ C8-Bio,YMC ODS-A,YMC Triart C8-L,Luna C8,Luna C18,Kromasil™ C18,and Kromasil™ C8,分别由Daiso,YMC,Phenomenex,and AkzoNobel提供。

[0115] 二氧化硅颗粒的直径可以为2至200微米,优选2.5至20微米,优选5至15微米,最优选10微米,并且孔径可以为50至1000埃,优选80至400埃,优选100至300,最优选(约)100。

[0116] 在本发明的RP-HPLC步骤中使用的流动相通常包含含水组分和乙腈作为溶剂。流动相中可以存在其他组分,例如有机改性剂。通过逐渐增加乙腈作为溶剂的浓度来实现洗脱。不希望受任何理论束缚,理论可以认为溶剂与组合物C的组分与固定相的缔合竞争。为了保持线性速度,本领域技术人员将根据柱直径并考虑所用设备和固定相的规格来调节流动相的流速。

[0117] 本发明方法的步骤b),即RP-HPLC纯化方案的第一维,在pH 7.0-7.8之间进行,例如pH值为7.0,7.1,7.2,7.3,7.4,7.5,7.6,7.7,或7.8,优选pH值为7.5-7.8。通过在流动相的水性组分中使用磷酸盐缓冲液,按照该步骤的操作温度,对pH值进行调节。优选地,磷酸盐缓冲液以5至50mM的浓度使用。可以使用任何类型的磷酸盐缓冲液,例如,磷酸钠,磷酸钾或磷酸铵。在一个优选的实施方案中,步骤b)中的含水磷酸盐的AB1缓冲液是磷酸铵缓冲液,优选浓度为5-50mM。应当理解,任何类型的乙腈梯度可用于从固定相中洗脱利拉鲁肽,也应理解梯度曲线影响该步骤的纯化效果。在优选的实施方案中,步骤b)中的乙腈梯度为19至67%(体积比)。特别优选的是19至67%(体积比)的线性乙腈梯度。

[0118] 本发明方法的步骤c),即RP-HPLC纯化方案的第二维,在低于3的pH值下进行。流动相水性组分中的TFA的浓度为0.05-0.5%(体积比),该浓度决定流动相的pH。在优选的实施方案中,步骤c)中使用的流动相内的TFA浓度选自0.05-0.2%(体积比),优选0.05-0.1%(体积比)。应当理解,任何类型的乙腈梯度可用于从固定相中洗脱利拉鲁肽,也应理解梯度曲线影响该步骤的纯化效果。在优选的实施方案中,步骤c)中乙腈的梯度为31至100%(体

积比),特别优选的是31至100%(体积比)的线性乙腈梯度。

[0119] 任选地,可以进行步骤d),即RP-HPLC纯化方案的第三维,以进一步提高利拉鲁肽制剂的纯度。所述步骤在7.0至7.8之间的pH值下进行,例如,pH值为7.0,7.1,7.2,7.3,7.4,7.5,7.6,7.7,或7.8,优选pH值为7.5-7.8。通过水性流动相中的缓冲液AB2按该步骤的操作温度调节pH值。优选地,缓冲液浓度为5至100mM。可以采用任何类型的缓冲剂,例如,磷酸钠,磷酸钾,磷酸铵,乙酸钠,乙酸钾,碳酸钠或碳酸钾。

[0120] 在本发明的一个优选实施方案中,所述水性缓冲液AB2选自磷酸二氢钠和磷酸氢二钠的混合物,磷酸二氢钾和磷酸氢二钾的混合物,乙酸钾和乙酸钠。

[0121] 在特别优选的实施方案中,使用乙酸钠缓冲液。应当理解,任何类型的乙腈梯度可用于从固定相中洗脱利拉鲁肽,也应理解梯度曲线影响该步骤的纯化效果。在优选的实施方案中,步骤c)中乙腈的梯度为19至67%(体积比),特别优选的是19至67%(体积比)的线性乙腈梯度。

[0122] 在本发明的一个实施方案中,纯化方法还包括步骤e),即尺寸排阻色谱。

[0123] 该步骤e)可任选地在任何步骤a)-d)之后进行。优选地,在步骤c)之后进行,或者如果存在,则在步骤d)之后进行。

[0124] 尺寸排阻液相色谱法在肽化学中用于分析以及制备目的是众所周知的。该方法依赖于一种多孔材料作为固定相,其中选择适当孔径使得样品中只有一些组分可以进入其孔中。结果,各种组分遇到的可接触体积(accessible volume)根据每种组分的表观分子大小而变化。因此,样品的组分将按其表观大小的顺序从柱中洗脱,大分子被首先洗脱。理想地,样品的组分不与固定相表面相互作用,使得洗脱时间的差异仅取决于与每种组分可进入的溶质体积的差异。因此,流动相的组成不会直接影响色谱分离度,并且可以根据样品性质或下游加工步骤的需要进行调整。

[0125] 比如,在RP-HPLC步骤之后采用尺寸排阻色谱法用于分离高分子量杂质或用于除去盐。根据此目的,技术人员将选择具有合适颗粒和孔径分布的固定相。用于本发明的优选固定相的孔径为100-300(例如100,125,145,200或300)或分子量范围为0.7-10kDa(例如<0.7,<1.5,0.1-7,1-5或<10kDa)或1.5-30kDa,粒径为2-5微米或20-300微米。合适的商业产品包括例如Sephadex®G50(GE Healthcare Life Sciences),Waters Acquity™ BEH 200,Phenomenex Yarra™ SEC-2000,Tosoh Biosciences TSKgel® SuperSW2000, Sephadex®G-25(GE Healthcare Life Sciences),Toyopearl®HW-40(Tosoh Biosciences),Superdex®peptide(GE Healthcare Life Sciences)和Superdex®30(GE Healthcare Life Sciences)。优选的流动相包括超纯水,pH7.5的10mM磷酸氢钠水溶液,或与样品相容的任何缓冲液/溶剂系统。

[0126] 在一个优选的实施方案中,该方法还包括使肽脱盐的步骤f),其中,优选通过离子交换色谱法,尺寸排阻色谱法,或超滤法进行脱盐。

[0127] 步骤f)可任选地在任何步骤a)-e)之后进行。优选地,在步骤c)之后进行,或者如果存在,则在步骤d)或e)之后进行。在本发明的一个实施方案中,步骤e)和f)可以任选地相同,即可以使用合适的固定相通过尺寸排阻色谱法进行脱盐。例如,脱盐步骤可使用GE Healthcare Life Sciences Sephadex®G-25, Sephadex®G-50或Superdex®肽作为固定相,

使用超纯水,其任选地与有机溶剂如酒精或乙腈混合,作为等度洗脱的流动相。

[0128] 在发明中,术语“脱盐”和“盐的去除”可互换,指用于降低样品盐含量的任何方法步骤。例如,盐含量可降低超过50%,超过60%,超过70%,超过80%,超过90%,超过95%或超过99%。在优选的实施方案中,缓冲阴离子的量降低至低于检测水平的量。脱盐可以通过任何合适的方法进行。除了如上所述的尺寸排阻色谱法之外,常用也是众所周知的选择是透析,离子交换色谱和超滤。超滤是一种压力驱动的分选过程,它依赖于使用半透膜,允许小的缓冲液和溶剂分子通过,而保留目标肽。

[0129] 为了本发明的目的,优选使用截留分子量不大于3kDa的膜,例如,3kDa,2kDa,1kDa或以下。通过膜的液体称为“渗透物”或“滤液”,而由膜保留的样品称为“渗余物”。为了避免堵塞膜孔,可有利地采用切向流过滤形式(也称为交叉流过滤)。为了本发明的目的,优选使用与有机溶剂如乙腈兼容的膜。在特别优选的实施方案中,使用截留分子量为1kDa的聚醚砜膜。然而,应该理解的是,只要能提供合适的截留分子量,过滤材料可以是适合过滤的已知的任何材料,例如塑料(例如,尼龙,聚苯乙烯),金属,合金,玻璃,陶瓷,玻璃纸,纤维素或复合材料。过滤材料可以是疏水的或亲水的。过滤材料的表面可以是中性的或带正电的或带负电的。

[0130] 技术人员会常规地将本发明的方法与合适的检测技术组合。例如,可以通过洗脱液在205-230nm或280nm波长下的UV吸光度和/或通过洗脱液的电导率来监测色谱步骤。此外,色谱可以在线或离线地与质谱法,尺寸排阻UHPLC,离子交换UHLPC和/或反相UHPLC,酶联免疫吸附测定(ELISA)和/或基于细胞的功能测定的分析相组合。

[0131] 为了避免肽质量的降低,技术人员会仔细且常规地优化包括样品储存的纯化步骤的条件。为此,可以将馏分合并,沉淀,喷雾灭菌,冷冻干燥,冷冻,冷藏,稀释,浓缩,和/或与稳定缓冲剂,碱,酸或其他物质混合。在稳定条件下处理敏感材料是一种好的做法。例如,在低温下工作可能是有利的,如在4°C至15°C的范围内,以补偿其他不稳定的条件。作为另一个实例,冷冻干燥利拉鲁肽制剂可能是有利的,其pH在6.6-7.9之间,优选7.0-7.8,最优选7.0-7.5。

[0132] 在本发明的一个优选实施方案中,色谱纯化步骤b)和/或c)和/或步骤d)的全部或部分(如果存在的话),选择在4-25°C的温度下进行,优选4-20°C,最优选4-10°C。同样地,任选的进一步纯化步骤,即尺寸排阻色谱步骤(步骤e))和/或脱盐步骤(步骤f))可以全部或部分地在4-25°C的温度下进行,优选4-20°C,最优选4-10°C。

[0133] 在特别优选的实施方案中,本发明的方法包括:

[0134] a) 提供含有利拉鲁肽和至少一种不需要的组分的液体组合物C,任选地溶解在pH7.0-7.5的含水磷酸盐缓冲液中;

[0135] b) 将组合物C在pH7.0和7.8之间进行第一反相HPLC纯化,其中固定相为键合的二氧化硅用作,流动相为包含乙腈和浓度为5-50mM磷酸铵水溶液混合物。将流动相内的乙腈浓度从19%至67%(体积比)逐渐增加,进行洗脱,同时收集含有利拉鲁肽的级分;和

[0136] c) 将从步骤b)中获得的含利拉鲁肽合并级分在pH低于3.0下进行第二反相HPLC纯化,其中固定相为键合的二氧化硅,流动相为含0.05-0.5%(体积比)的三氟乙酸溶液和乙腈的混合物,将流动相内的乙腈浓度从31%至100%(体积比)逐渐增加,进行洗脱,同时收集含有纯化利拉鲁肽的级分;

[0137] d) 任选地,将步骤c)中获得的利拉鲁肽在pH7.0-7.8下进行第三反相HPLC纯化,其中固定相为烃键合的二氧化硅,流动相为水性缓冲液AB2与乙腈的混合物,将流动相内的乙腈浓度从19%至67%(体积比)逐渐增加,进行洗脱,同时收集含有纯化利拉鲁肽的级分;

[0138] e) 任选地,将步骤c)或d)中任一步骤获得的利拉鲁肽进行尺寸排阻色谱;和

[0139] f) 任选地,将步骤c),d)或e)中任一步骤获得的利拉鲁肽对肽进行脱盐,其中优选通过离子交换色谱法,尺寸排阻色谱法或超滤进行脱盐;

[0140] 其中步骤b)和步骤c)和,如果存在,步骤d),e)和/或f)选择在4-25°C的温度下进行;

[0141] 其中步骤b)和c)和步骤d)(如果存在的话)中,优选使用的固定相是C8键合的二氧化硅或C18键合的二氧化硅。

[0142] 如以下实施例所示,本发明的方法能够制备非常纯的利拉鲁肽,可以常规地实现99.0%以上的纯度。然而,可以检测到几种缺失产物杂质的痕迹。特别地,它们是由27-30个连续氨基酸组成的肽,其与利拉鲁肽的分子结构不同,因为它们相比利拉鲁肽肽骨架的一级序列(SEQ ID NO:4),缺少多达四个氨基酸,并且可以任选地在2-5个氨基酸侧链或在与(SEQ ID NO:4)Lys 20相应的Lys上N-ε-(γ-Glu(N-α-hexadecanoyl))-取代基处具有另外的修饰。换句话说,利拉鲁肽缺失变体可以定义为长度为27至30个氨基酸部残基的肽,其与SEQ ID NO:4具有至少80%的同源性(按SEQ ID NO:4的整个长度计算),并且任选地在与SEQ ID NO:4的Lys<sup>20</sup>同源的赖氨酸残基上有修饰。

[0143] 本领域技术人员会立即理解,这种利拉鲁肽缺失变体可任选地但不是必需地在N-和/或C-末端氨基酸残基截短。间或,也可能是在非末端氨基酸残基截短。如上所述,序列同源性可以理解为由国家生物技术信息中心(NCBI)的BLAST(基本局部比对搜索工具)(用本申请提交日期的版本)确定的序列同源性。这意味着每个氨基酸残基(除了缺失的氨基酸残基)与待比较序列中对应的氨基酸残基对齐,并按SEQ ID NO:4的整个长度计算同源性百分比。

[0144] 在进行的实验中,用RP-UHPLC在220nm处测量的相对峰面积(参见图2),没有检测到相对丰度高于0.3%(重量比)的肽污染物。这也反映了本发明的一个方面和优选实施例。相对峰面积确定为给定峰面积的%面积除以通过分析型RP-HPLC在220nm下UV检测获得的色谱图中所有观察到的峰的面积之和。这可以使用检测肽污染物的、针对给定产品制定的特异性RP-HPLC方案来完成。根据LC-MS测定的主峰纯度,可以常规地评估所用分析方法的适用性。本领域技术人员会立即理解,由于它们的相似结构,所有肽组分具有相同或至少相当的响应因子,使得通过RP-HPLC在220nm测量的相对峰面积与相对丰度相关。丰度表达为给定肽相对于所有肽组分的总质量的重量百分比,以重量%表示。

[0145] 因此,本发明的另一方面涉及组合物LC,其包含可根据本发明任一实施方案的方法获得的利拉鲁肽,其特征在于,根据在分析型RP-HPLC中观察到的相对峰面积(在220nm处进行UV检测),所述组合物含有纯度高于98.8%,优选高于99%的利拉鲁肽,并且同样根据在分析型RP-HPLC中观察到的相对峰面积(在220nm处进行UV检测)所述组合物含有不超过0.5%的任何单一利拉鲁肽衍生物,利拉鲁肽截短变体,利拉鲁肽截短变体的衍生物,利拉鲁肽缺失变体或利拉鲁肽缺失变体的衍生物。

[0146] 本发明的另一方面涉及组合物LC,其包含可根据本发明任一实施方案的方法获得

的利拉鲁肽,其特征在于,根据在分析型RP-HPLC中观察到的相对峰面积(在220nm处进行UV检测),所述组合物含有纯度高于98.8%,优选高于99%的利拉鲁肽,并且同样根据在分析型RP-HPLC中观察到的相对峰面积(在220nm处进行UV检测)所述组合物含有不超过0.3%的任何单个利拉鲁肽缺失变体,其中利拉鲁肽缺失变体是长度为27至30个氨基酸的肽,其在SEQ ID NO:4的整个长度上与SEQ ID NO:4具有至少80%的同源性,并且任选地在与SEQ ID NO:4的Lys<sup>20</sup>同源的赖氨酸上含有修饰。

[0147] 因此,本发明的另一方面涉及组合物LC,其包含可根据本发明任一实施方案的方法获得的利拉鲁肽,其特征在于,根据在分析型RP-HPLC中观察到的相对峰面积(在220nm处进行UV检测),所述组合物含有纯度高于98.8%,优选高于99%的利拉鲁肽,并且同样根据在分析型RP-HPLC中观察到的相对峰面积(在220nm处进行UV检测)所述组合物确实含有可检测水平的利拉鲁肽缺失变体,但任何单个利拉鲁肽缺失变体的水平不超过0.3%,其中利拉鲁肽缺失变体是长度为27至30个氨基酸的肽,其在SEQ ID NO:4的整个长度上与SEQ ID NO:4具有至少80%的同源性,并且任选地在与SEQ ID NO:4的Lys<sup>20</sup>同源的赖氨酸上含有修饰。

[0148] 本发明的另一方面涉及组合物LC,其包含可根据本发明任一实施方案的方法获得的利拉鲁肽,其特征在于所述组合物,基于所有肽组分的质量总和,含有纯度高于98.8% (重量比)的利拉鲁肽,并且不含任何有如下特征的利拉鲁肽缺失变体:长度为27至30个氨基酸的肽,在SEQ ID NO:4的整个长度上与SEQ ID NO:4具有至少80%的同源性,并任选地在与SEQ ID NO:4的Lys<sup>20</sup>同源的赖氨酸上含有修饰,以及浓度高于0.3% (重量比,基于所有肽组分的质量总和)。

[0149] 优选地,组合物LC可包含痕量(例如,0.001ppm(重量比)或更多,0.01ppm(重量比)或更多,或0.1ppm(重量比)或更多,或1ppm(重量比)或更多)有如下特征的肽:长度为27至30个氨基酸的肽,在SEQ ID NO:4的整个长度上与SEQ ID NO:4具有至少80%的同源性,并任选地在与SEQ ID NO:4的Lys<sup>20</sup>同源的赖氨酸上含有修饰。

[0150] 非常优选地,组合物LC包含0.001ppm至0.3% (重量比),甚至更优选0.01ppm至0.2% (重量比),甚至更优选0.1ppm至0.1% (重量比),甚至更优选1ppm至0.05% (重量比),特别是1ppm至0.01% (重量比)的有如下特征的肽:长度为27至30个氨基酸的肽,在SEQ ID NO:4的整个长度上与SEQ ID NO:4具有至少80%,特别是至少90%,的同源性,并任选地在与SEQ ID NO:4的Lys<sup>20</sup>同源的赖氨酸上含有修饰。

[0151] 优选地,组合物LC含有利拉鲁肽,其纯度基于所有肽组分质量总和高于99.1%,高于99.2%,高于99.3%,高于99.4%,高于99.5%,高于99.6%,高于99.7%,高于99.8%,或高于99.9%,以上均为重量百分比。

[0152] 在优选的实施方案中,组合物LC不含有如下特征的肽:长度为27至30个氨基酸的肽,在SEQ ID NO:4的整个长度上与SEQ ID NO:4具有至少80%,更优选至少90%,特别是至少95%的序列同源性,并任选地在与SEQ ID NO:4的Lys<sup>20</sup>同源的赖氨酸上含有修饰。

[0153] 在更优选的实施方案中,组合物LC不含有如下特征的肽:含有27至30个连续氨基酸,这些氨基酸的序列或序列片段在SEQ ID NO:4的整个长度上与SEQ ID NO:4对应,并任选地在与SEQ ID NO:4的Lys<sup>20</sup>同源的赖氨酸上含有修饰。

[0154] 根据优选的实施方案,组合物LC不含有总浓度高于0.25%,0.20%,0.15%,



0.1%，0.05%或0.01%的上述利拉鲁肽缺失变体，所述百分比均为基于所有肽组分总质量和的重量百分比。

[0155] 更优选地，组合物LC不含有任何特定的利拉鲁肽缺失变体杂质，其个体浓度高于0.1%，0.05%或0.01%，所述百分比均为基于所有肽组分总质量和的重量百分比。

[0156] 特别优选地，组合物LC含有一种或多种利拉鲁肽缺失变体，其总浓度为0.001ppm至0.3%，更优选0.01ppm至0.1%，特别是0.01ppm至0.01%，所述百分比均为基于所有肽组分总质量和的重量比。

[0157] 本发明的另一方面涉及组合物LC，包含可根据本发明任一实施方案的方法获得的利拉鲁肽，其特征在于所述组合物含有纯度高于98.8%，优选高于99%的利拉鲁肽，但下列每种杂质的含量不超过0.5%，优选不超过0.3%，更优选不超过0.2%，最优选不超过0.1%：  
i) 任何第25位Trp侧链中的吲哚部分通过掺入单个氧原子而被氧化利拉鲁肽衍生物，和/或  
ii) 任何第25位Trp侧链中的吲哚部分通过掺入两个氧原子而被氧化利拉鲁肽衍生物，和/或  
iii) 任何25位是犬尿氨酸而不是Trp的利拉鲁肽衍生物，和/或  
iv) 缺乏Gly<sup>31</sup>的利拉鲁肽缺失变体。

[0158] 本发明的另一方面涉及组合物LC，包含可从根据本发明任一实施方案的方法获得的利拉鲁肽，其特征在于所述组合物含有纯度高于98.8%，优选高于99%的利拉鲁肽，且下列每种杂质虽然可以检测到，但各自的含量不超过0.5%，优选不超过0.3%，更优选不超过0.2%，最优选不超过0.1%：  
i) 任何第25位Trp侧链中的吲哚部分通过掺入单个氧原子而被氧化利拉鲁肽衍生物，和/或  
ii) 任何第25位Trp侧链中的吲哚部分通过掺入两个氧原子而被氧化利拉鲁肽衍生物，和/或  
iii) 任何25位是犬尿氨酸而不是Trp的利拉鲁肽衍生物，和/或  
iv) 缺乏Gly<sup>31</sup>的利拉鲁肽缺失变体。

[0159] 本发明的另一方面涉及组合物LC，包含可根据本发明任一实施方案的方法获得的利拉鲁肽，其特征在于所述组合物含有纯度高于98.8%，优选高于99%的利拉鲁肽，但下列每种杂质的含量不超过0.5%，优选不超过0.3%，更优选不超过0.2%，最优选不超过0.1%：  
i) 任何第25位Trp侧链中的吲哚部分通过掺入单个氧原子而被氧化利拉鲁肽衍生物，和  
ii) 任何第25位Trp侧链中的吲哚部分通过掺入两个氧原子而被氧化利拉鲁肽衍生物，和  
iii) 任何25位是犬尿氨酸而不是Trp的利拉鲁肽衍生物，和  
iv) 缺乏Gly<sup>31</sup>的利拉鲁肽缺失变体。

[0160] 本发明的另一方面涉及组合物LC，包含可根据本发明任一实施方案的方法获得的利拉鲁肽，其特征在于所述组合物含有纯度高于98.8%，优选高于99%的利拉鲁肽，且下列每种杂质虽然可以检测到，但各自的含量不超过0.5%，优选不超过0.3%，更优选不超过0.2%，最优选不超过0.1%：  
i) 任何第25位Trp侧链中的吲哚部分通过掺入单个氧原子而被氧化利拉鲁肽衍生物，和  
ii) 任何第25位Trp侧链中的吲哚部分通过掺入两个氧原子而被氧化利拉鲁肽衍生物，和  
iii) 任何25位是犬尿氨酸而不是Trp的利拉鲁肽衍生物。

[0161] 优选地，上述百分比用分析型RP-HPLC，在220nm下UV检测，观察到的相对峰面积。或者，上述百分比基于所有肽组分总质量和。

[0162] 根据一个优选的实施方案，组合物LC包含可根据本发明任一实施方案的方法获得的利拉鲁肽，其特征在于，根据在分析型RP-HPLC中观察到的相对峰面积（在220nm处进行UV检测），所述组合物含有纯度高于98.8%，优选高于99%的利拉鲁肽，且下列每种杂质虽然根据在分析型RP-HPLC中观察到的相对峰面积（在220nm处进行UV检测）可以检测到，但各自

的含量不超过0.5%，优选不超过0.3%，更优选不超过0.2%，最优选不超过0.1%：i) 任何第25位Trp侧链中的吲哚部分通过掺入单个氧原子而被氧化利拉鲁肽衍生物，和/或ii) 任何第25位Trp侧链中的吲哚部分通过掺入两个氧原子而被氧化利拉鲁肽衍生物，和/或iii) 任何25位是犬尿氨酸而不是Trp的利拉鲁肽衍生物，和/或iv) 缺乏Gly<sup>31</sup>的利拉鲁肽缺失变体。

[0163] 本发明的另一方面涉及组合物LC，包含根据本发明任一实施方案可获得的利拉鲁肽，其特征在于所述组合物，根据下列两种检测，含有纯度高于99%，优选高于99.5%的利拉鲁肽：a) 根据在分析型RP-HPLC中观察到的相对峰面积（在220nm处进行UV检测）和b) 根据在分析型尺寸排阻色谱中观察到的相对峰面积（在220nm处进行UV检测）。

[0164] 优选地，在组合物LC中，利拉鲁肽是从根据本发明的方法获得的。

[0165] 以下附图和实施例，包括进行的实验和实现的结果，仅用于说明本发明，不应解释为限制权利要求的范围。

[0166] 附图简述

[0167] 图1：所选胰高血糖素样肽的序列比对，其中与GLP-1序列同源的残基以粗体书写。

[0168] 图2：实施例2的二维利拉鲁肽纯化，显示分析性RP-UHPLC结果比对：1) 用作原料的利拉鲁肽粗制品（粗品）；2) 第一维度纯化后获得的合并的级分（1D，(NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>，pH 7.5，级分合并）；3) 第二维度纯化后获得的合并的级分（2D，TFA级分合并）。箭头标示不需要的组分，可见这些组分未在第一维度纯化中除去，但在第二维度纯化中被除去。

[0169] 图3：超滤过程中保留物的电导率与时间的关系图。

## 实施例

[0170] 实施例1：纯化条件的确定

[0171] 进行小规模实验以确定合适的纯化条件。7种流动相缓冲液（表2第2列）分别在4种不同的固定相（表2第3-6列第1行）上进行测试。每种流动相缓冲液用于制备各自的缓冲液A，即含3%（体积比）乙腈的该缓冲液的水溶液，和缓冲液B，即含67或80%（体积比）乙腈的该缓冲液的水溶液。取决于流动相缓冲液的性质，缓冲液在水溶液中浓度的为20-400mM。

[0172] 表2的每一行代表四种不同的一维RP-HPLC运行，即对于所测试的四种固定相中的每一种进行一次运行。对于每个所述运行，使用相应的第2列给定的流动相缓冲液所制备的缓冲液A和B。采用以下一般性方案：将Fmoc SPPS生产的粗制利拉鲁肽（纯度≥60%）溶解于缓冲液A中，18mg样品各自加到平行实验中的由C8或C18键合硅胶组成的四种不同的固定相（柱尺寸：250x 4.6毫米）。该方案通常涉及将柱在缓冲液A中平衡15分钟，加样，并用缓冲液A洗脱1分钟，然后用20-100%缓冲液B的梯度洗脱。流速为0.63ml/min。收集0.37ml的级分并通过反相UHPLC分析。表2显示每个实验的最纯部分中测得的纯度（根据相对峰面积）。利拉鲁肽峰的相对峰面积是通过将利拉鲁肽峰面积除以在分析型UHPLC中观察到的所有峰面积的总和得到，即利拉鲁肽峰的面积是基于总峰面积的百分比。

[0173] 表2：

[0174]

	缓冲液	YMC Triart C8-L	LunaPREPC8	Kromasil C18	Daiso ODS-Bio
1	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	95.40%	96.56%	96.86%	97.18%

2	(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	97.84%	98.02%	98.10%	97.76%
3	NH <sub>4</sub> OAc	95.84%	96.71%	94.79%	93.97%
4	TEAP	94.76%	95.58%	95.66%	95.52%
5	AcOH	94.18%	91.79%	94.90%	95.74%
6	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	95.55%	95.01%	95.37%	95.33%
7	TFA	96.97%	96.24%	97.00%	96.93%

[0175] 结论:

[0176] 1. 各种C8和C18固定相给出类似的结果。对于每个固定相,均出现下列现象:

[0177] 2. 在中性至弱碱性 ( $7.0 \leq \text{pH} < 8.0$ ) 的条件下,磷酸铵缓冲液出乎意料地优于其他测试的缓冲液(参见第1-4行的第3-6列)。

[0178] 3. 在酸性条件下 ( $\text{pH} < 3.0$ ),TFA缓冲液出乎意料地优于其他测试的缓冲液(参见第5-7行的第3-6列)。

[0179] 实施例2:二维RP-HPLC纯化

[0180] 纯化包括在pH 7.5下进行的第一维色谱纯化和其后在酸性条件下进行的第二维色谱纯化。

[0181] 填充有C8键合的二氧化硅(床深度约32cm)的5cm MODcol柱(Grace生产)用于制备型HPLC系统(Knauer HPLC泵1800),在220nm处检测(Knauer smartline UV检测器2500)和自动化馏分收集器(BüchiC-660)。在纯化方案的两个维度中使用相同的固定相。由Fmoc SPPS(纯度>60%)制备的粗制利拉鲁肽为原料。将样品以90ml/min的流速加载到柱上。每个步骤的详细洗脱方案在下表3和4中给出。在第一维中使用的流动相的水溶液中,缓冲液浓度为20mM。

[0182] 表3:第一维纯化参数

加样缓冲液	磷酸铵水溶液, pH 7.5			
缓冲液A	3% (体积比) 乙腈, 磷酸铵水溶液, pH 7.5			
缓冲液B	67% (体积比) 乙腈, 磷酸铵水溶液, pH 7.5			
洗脱方案				
时间 [min]	流速 [ml/min]	缓冲液A [%]	缓冲液B [%]	备注
0	90	100	0	冲洗 上样后
20	90	100	0	
21	90	76	24	洗脱 线性梯度
103	90	0	100	

[0184] 从第一维RP-HPLC步骤获得的合并级分,再按表4进一步纯化。

[0185] 表4:第二维纯化参数

[0186]	加样缓冲液	3% (体积比) 乙腈, 磷酸铵水溶液, pH 7.5			
	缓冲液A	3% (体积比) 乙腈, 0.1% (体积比) TFA 水溶液			
	缓冲液B	0.1% (体积比) TFA, 在乙腈中			
洗脱方案					
	时间 [min]	流速 [ml/min]	缓冲液A [%]	缓冲液B [%]	备注
[0187]	0	90	100	0	冲洗 上样后
	30	90	100	0	
	31	90	70	30	洗脱: 线性梯度
	146	90	0	100	

[0188] 通过分析型RP-UHPLC评估,在第二维纯化之后,合并级分的纯度为98.8%,两步纯化后的总产率为35%。起始原料和两步纯化后合并级分的分析性RP-UHPLC的比较测试,证明了两种纯化维度的互补性令人惊讶:每个纯化维度去除了不同的杂质组分,使得两个步骤的组合产生优异的产品纯度(参见图2)。

[0189] 实施例3:二维RP-HPLC纯化

[0190] 纯化包括在pH 7.7下进行的第一维色谱纯化和其后在酸性条件下进行的第二维色谱纯化。

[0191] 填充有C8键合的二氧化硅(床深度约32cm)的5cm MODcol柱(Grace生产)用于制备型HPLC系统(Knauer HPLC泵1800),在220nm处检测(Knauer smartline UV检测器2500)和自动化馏分收集器(BüchiC-660)。在纯化方案的两个维度中使用相同的固定相。由Fmoc SPPS制备的粗制利拉鲁肽用为起始材料。将样品以43ml/min(第一维)或64ml/min(第二维)的流速加载到柱上。每个步骤的详细洗脱方案在下表5和6中给出。

[0192] 表5:第一维纯化参数

[0193]	加样缓冲液	磷酸铵水溶液, pH 7.7			
	缓冲液A	3% (质量比) 乙腈, 磷酸铵水溶液, pH 7.7			
	缓冲液B	61% (质量比) 乙腈, 磷酸铵水溶液, pH 7.7			
洗脱方案					
	时间 [min]	流速 [ml/min]	缓冲液A [%]	缓冲液B [%]	备注
	0	90	100	0	冲洗 上样后
	20	90	100	0	

[0194]	20.1	36.5	76	24	洗脱 线性梯度
	102	36.5	0	100	

[0195] 从第一维RP-HPLC步骤获得的合并级分,再按表6进一步纯化。

[0196] 表6:第二维纯化参数

[0197]

加样缓冲液	2% (质量比) 乙腈, 磷酸铵水溶液, pH 7.7			
缓冲液A	2% (质量比) 乙腈, 0.1% (体积比) TFA水溶液			
缓冲液B	0.1% (体积比) TFA, 在100% 乙腈中			
洗脱方案				
时间 [min]	流速 [ml/min]	缓冲液A [%]	缓冲液B [%]	备注
0	90	100	0	冲洗 上样后
30	90	100	0	
30.1	36	70	30	洗脱 线性梯度
145	36	0	100	

[0198] 通过分析型RP-UHPLC评估,合并的主要级分的纯度为99.38%,最大的非产物峰为0.18%。换句话说,通过分析型RP-UHPLC评估,制剂不含任何浓度高于0.3%的不需要的组分。

[0199] 令人意想不到的是,尝试交换纯化步骤的顺序,即首先用含TFA的流动相进行运行,由于柱堵塞而失败。

[0200] 实施例4:RP-HPLC纯化,含任选的第三维

[0201] 填充有C8键合的二氧化硅(床深度约32cm)的5cm MODcol柱(Grace生产)用于制备型HPLC系统(Knauer HPLC泵1800),在220nm处检测(Knauer smartline UV检测器2500)和自动化馏分收集器(BüchiC-660)。采用上述经过二维方法纯化的利拉鲁肽作为起始材料(纯度:99.2%)。将柱在缓冲液A中平衡,并将样品以43ml/min的流速加载到柱上。详细的洗脱方案在下表7中给出。

[0202] 通过分析型RP-UHPLC在220nm处进行UV检测评估,主要级分合并的纯度为99.35%。该制剂不含任何浓度高于0.3%肽杂质。

[0203] 表7:第三维纯化参数

加样缓冲液	3% (质量比) 乙腈, 磷酸氢钠水溶液, pH7.7				
缓冲液A	3% (质量比) 乙腈, 磷酸氢钠水溶液, pH7.7				
缓冲液B	61% (质量比) 乙腈, 磷酸氢钠水溶液, pH7.7				
洗脱方案					
[0204]	时间 [min]	流速 [ml/min]	缓冲液A [%]	缓冲液B [%]	备注
	0	89	100	0	冲洗 上样后
	20	89	100	0	
	20.1	36.5	76	24	洗脱 线性梯度
	102	36.5	0	100	

[0205] 实施例5:RP-HPLC纯化,含任选的第三维

[0206] 填充有C8键合的二氧化硅(床深度约32cm)的5cm MODcol柱(Grace生产)用于制备型HPLC系统(Knauer HPLC泵1800),在220nm处检测(Knauer smartline UV检测器2500)和自动化馏分收集器(BüchiC-660)。采用上述经过二维方法纯化的利拉鲁肽作为起始材料。将柱在缓冲液A中平衡,并将样品以43ml/min的流速加载到柱上。详细的洗脱方案在下表8中给出。

[0207] 表8:第三维纯化参数

[0208]

加样缓冲液	3% (质量比) 乙腈, 磷酸氢二钠水溶液, pH7.5			
缓冲液A	3% (质量比) 乙腈, 磷酸氢二钠水溶液, pH7.5			
缓冲液B	61% (质量比) 乙腈, 磷酸氢二钠水溶液, pH7.5			
洗脱方案				

[0209]

时间 [min]	流速 [ml/min]	缓冲液A [%]	缓冲液B [%]	备注
0	89	100	0	冲洗 上样后
20	89	100	0	
20.1	36.5	76	24	洗脱 线性梯度
102	36.5	0	100	

[0210] 通过分析型RP-UHPLC评估,合并的主要级分的纯度为99.36%。该制剂不含任何浓度高于0.3%肽杂质。

[0211] 实施例6:超滤脱盐

[0212] 使用截留分子量为1kDa的聚醚砜(PES)膜的标准设备,对UHPLC纯化的利拉鲁肽(1.71,浓度约35g/l)进行切向流过滤。施加2.2巴的跨膜压和1升/分钟的流速,观察到33毫升/分钟的渗透流量。通过不断添加超纯水来补偿渗余物中的体积损失。

[0213] 如图3所示,反映的盐含量的滞留物电导率随时间降低。当滤液的体积达到渗余物体积的10倍时,渗余物仅含有痕量的残留盐。通过UHPLC分析检测的肽纯度为99.3,总净肽产率为91%。

[0214] 实施例7:在纯化过程中除去不需要的组分

[0215] 将用Fmoc-SPPS制备的利拉鲁肽进行本发明的三维纯化方法。使用C8键合的二氧化硅作为固定相,第一维流动相的水性组分包含磷酸盐缓冲液,第二维包含TFA,第三维包含乙酸盐缓冲液。对每个步骤后获得的合并级分进行LC-MS分析,以评估纯化方案的效率。特定显性杂质组分有关结果总结在下表9中。其中,浓度是基于拉鲁肽主峰面积的百分比。

[0216] 可以看出,第一纯化维度可有效降低缺乏Gly<sup>31</sup>的利拉鲁肽截短变体和具有单氧化Trp<sup>25</sup>的利拉鲁肽,第二纯化维度去除了具有二氧化Trp<sup>25</sup>的利拉鲁肽,且第三纯化维度实现了对Kyn<sup>25</sup>利拉鲁肽的控制。在第三维度纯化后,通过分析色谱法检测,合并的级分中没有检测到高于0.5%的其他肽杂质。

[0217] 表9:

[0218]

样品	Des-Gly <sup>31</sup> 利拉鲁肽	Trp(O) <sup>25</sup> -利拉鲁肽	Trp(2O) <sup>25</sup> -利拉鲁肽	Kyn <sup>25</sup> -利拉鲁肽
粗制剂	0.47	2.17	0.20	0.85
一维后合并级分	< 0.01	0.33	0.05	0.33
二维后合并级分	未检测到	0.04	0.02	0.34
三维后合并级分	未检测到	0.02	0.01	0.01

## SEQUENCE LISTING

<110> 巴切姆股份公司 (Bachem Holding AG)

<120> 胰高血糖素样肽 1 类似物的纯化方法

<130> BYEP1838

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1                    5                    10                    15

[0001]

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn  
                  20                    25

<210> 2

<211> 33

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn  
1                    5                    10                    15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr  
                  20                    25                    30

Asp

<210> 3

<211> 31

<212> PRT



<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
1                    5                    10                    15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly  
                  20                    25                    30

<210> 4

<211> 31

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> glucagon-like peptide liraglutide polypeptide

<400> 4

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
1                    5                    10                    15

[0002]

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly  
                  20                    25                    30

<210> 5

<211> 39

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1                    5                    10                    15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
                  20                    25                    30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
                  35

<210> 6

<211> 39  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> glucagon-like peptide exenatide

<400> 6

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1                    5                    10                    15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
                   20                    25                    30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
                   35

[0003]

<210> 7  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>  
 <223> glucagon-like peptide lixisenatide

<400> 7

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1                    5                    10                    15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
                   20                    25                    30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys  
                   35                    40

Glucagon	<b>HSQGTFTSDYSKYLSRRAQDFVQWLMN</b>	(SEQ ID NO:1)
GLP-2	<b>HADGSFSDEMNTILDNLAARDFINWLIQTKITD</b>	(SEQ ID NO:2)
GLP-1(7-37)	<b>HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKGRG</b>	(SEQ ID NO:3)
Liraglutide	<b>HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG</b>	(SEQ ID NO:4)
Exendin 4 (1-39)	<b>HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub></b>	(SEQ ID NO:5)
Exenatide	<b>HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH<sub>2</sub></b>	(SEQ ID NO:6)
Lixisenatide	<b>HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK-NH<sub>2</sub></b>	(SEQ ID NO:7)

图1

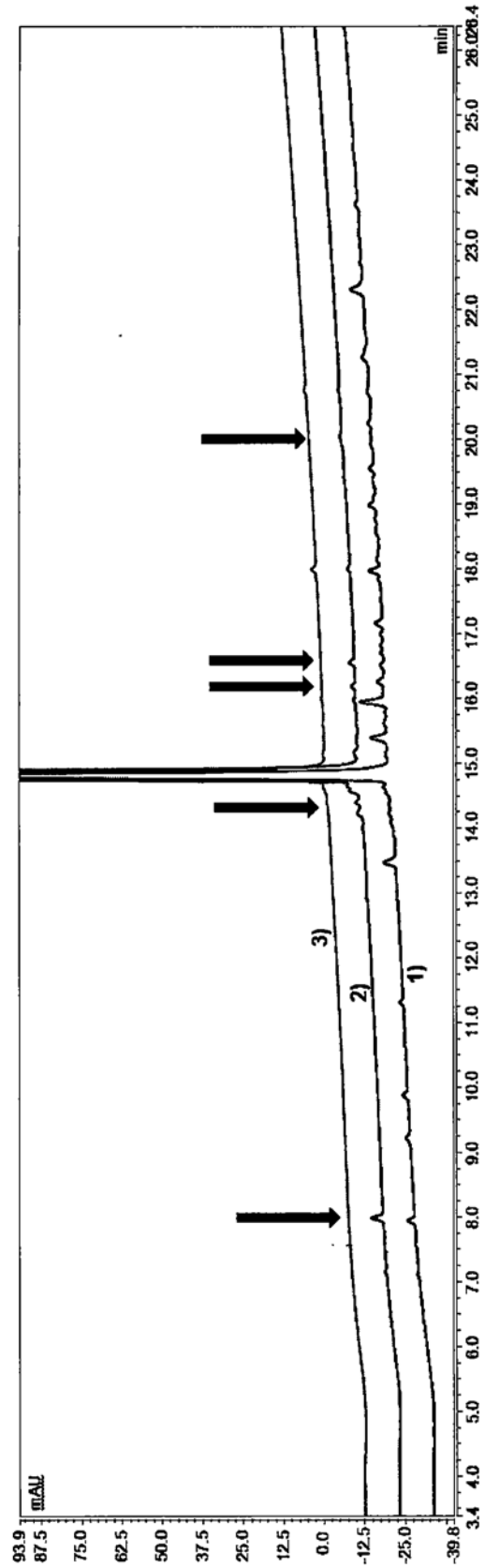


图2

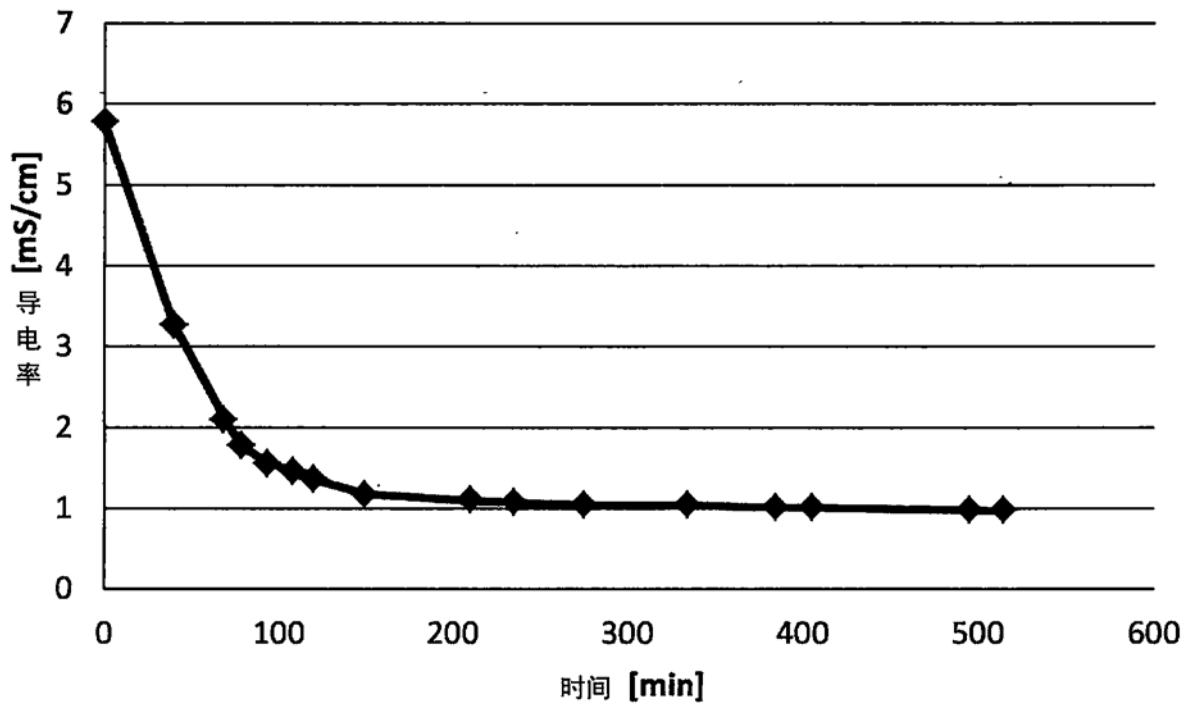


图3