

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 012 801**

51 Int. Cl.:

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 14/58 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.05.2018 PCT/CN2018/089034**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2019 WO19227342**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2018 E 18921212 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025 EP 3805246**

54 Título: **Procedimiento para la purificación de polipéptidos de cadena larga ularitida**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2025

73 Titular/es:

HYBIO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.00%)
4th floor, Hybio Medicine Park Office Building
High-tech Industrial Park Central District,
Nanshan
Shenzhen, Guangdong 518057, CN

72 Inventor/es:

ZHANG, BAOLE;
YIN, CHUANLONG;
TANG, YANGMING y
YU, PINXIANG

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 3 012 801 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

Procedimiento para la purificación de polipéptidos de cadena larga ularitida

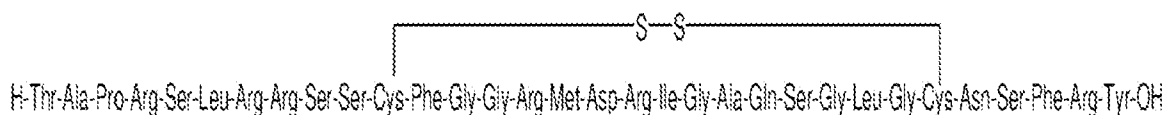
5 **SECTOR TÉCNICO**

La presente invención se refiere al sector técnico del análisis de fármacos y, en particular, a un procedimiento para la purificación del fármaco polipeptídico de cadena larga ularitida.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La ularitida es un péptido natriurético desarrollado por Cardiorentis (AG) y compuesto por 32 residuos de aminoácidos. La ularitida se aisló originalmente a partir de la orina por Schulz-Knappe et al. en 1988 como un péptido natriurético renal perteneciente a la familia de los péptidos natriuréticos auriculares (ANP, *atrial natriuretic peptide*), que se utiliza principalmente para tratar la insuficiencia cardíaca aguda.

La fórmula molecular de la ularitida es la siguiente:



20

Los datos epidemiológicos muestran que el número de pacientes con insuficiencia cardíaca en todo el mundo ha alcanzado los 22,5 millones y sigue aumentando a un ritmo de 2 millones por año. Y la tasa de supervivencia a 5 años de los pacientes con insuficiencia cardíaca es sustancialmente igual a la de los pacientes con tumores malignos. El 20 % de los pacientes con insuficiencia cardíaca serán hospitalizados nuevamente dentro de los 30 días posteriores al alta, lo que añade gastos médicos y de seguro. La prevalencia de la insuficiencia cardíaca en adultos en China es del 0,9 %, de la cual el 0,7 % es para hombres y el 1,0 % para mujeres. En la actualidad, hay todavía, aproximadamente, 4 millones de pacientes con insuficiencia cardíaca entre los adultos de 35 a 74 años, y el número aumenta año tras año.

25

Entre las causas comunes se incluyen enfermedad de las arterias coronarias, hipertensión, miocardiopatía y (o) enfermedad valvular, diabetes y otras, entre las cuales la enfermedad de las arterias coronarias es un factor importante en la insuficiencia cardíaca. Según las estadísticas, el gasto anual mundial en insuficiencia cardíaca es de 108 mil millones de dólares estadounidenses. Según una encuesta epidemiológica a gran escala realizada en 2003, la tasa de prevalencia de la insuficiencia cardíaca entre adultos en China continental ha alcanzado el 0,9 % y hay, aproximadamente, 4,5 millones de pacientes con insuficiencia cardíaca. La insuficiencia cardíaca se puede dividir en insuficiencia cardíaca aguda e insuficiencia cardíaca crónica. En los últimos 10 años, ha habido 10 millones de casos de tratamiento de emergencia por insuficiencia cardíaca aguda en los Estados Unidos y, aproximadamente, el 15-20 % se diagnostican primero de insuficiencia cardíaca, mientras que la mayoría se debe al deterioro.

35

40

Todas las enfermedades que causan insuficiencia cardíaca crónica pueden derivar en insuficiencia cardíaca aguda. Con el creciente número de pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, la descompensación cardíaca crónica y los episodios de insuficiencia cardíaca aguda también se han convertido en la principal causa de hospitalización en pacientes con insuficiencia cardíaca. La tasa de incidencia anual de insuficiencia cardíaca es del 0,23 %-0,27 %. El pronóstico de la insuficiencia cardíaca aguda es muy insatisfactorio. La tasa de mortalidad hospitalaria es del 3 %, la tasa de mortalidad a los 60 días es del 9,6 % y las tasas de mortalidad a los 3 y 5 años son de hasta el 30 % y el 60 %, respectivamente. La tasa de mortalidad por insuficiencia cardíaca aguda causada por infarto agudo de miocardio es mayor. La tasa de mortalidad hospitalaria de los pacientes con edema pulmonar agudo es del 12 % y la tasa de mortalidad al cabo de un año es del 30 %. Por lo tanto, la ularitida tiene una amplia perspectiva de mercado.

45

50

La purificación de péptidos existente se consigue principalmente mediante un sistema de fase líquida de alto rendimiento, y la fase orgánica es acetonitrilo, metanol, etc. La cantidad utilizada de la fase orgánica es generalmente sustancial, lo que da como resultado una gran cantidad de descarga de líquidos residuales. La recuperación de líquidos residuales es difícil y peligrosa. Con la extensión de la secuencia de péptidos, la cantidad de descarga de líquido residual será mayor, el ciclo de purificación será más largo y el coste empresarial será mayor. Los problemas de protección del medio ambiente, la seguridad y los costes han restringido el desarrollo de las empresas farmacéuticas. Se necesita urgentemente un procedimiento de purificación para reducir los costes empresariales y la descarga de líquidos residuales para minimizar el riesgo de almacenamiento de líquidos residuales orgánicos.

55

60

La Patente CN 105949284A da a conocer un procedimiento para purificar sinapultida mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa con el fin de resolver principalmente los problemas técnicos de

- que se generan más subproductos en la síntesis del sinapópido y de que la purificación es difícil. El procedimiento comprende las siguientes etapas: 1) los péptidos en bruto obtenidos mediante síntesis en fase sólida se calientan y se disuelven con una solución acuosa de etanol; 2) se utilizan dos columnas cromatográficas en serie, una fase estacionaria es una columna de gel de sílice de fase inversa de gel de sílice unido a octoalquilo, y la otra fase estacionaria es una columna de gel de sílice de fase inversa de gel de sílice unido a octadecilo; 3) una fase móvil que consiste en dos fases, un tampón de sulfato-fosfato amónico es una fase A y acetonitrilo cromatográficamente puro es una fase B, y una solución de péptidos con un pico de interés se recoge mediante elución y purificación en un gradiente lineal en zigzag; 3) la solución de péptidos obtenida se concentra mediante evaporación rotatoria a presión reducida y se prepara un concentrado para su utilización; 4) el concentrado se convierte en un acetato mediante un intercambio con resina de intercambio aniónico; 5) la solución de péptidos de pureza elevada final se concentra mediante evaporación rotatoria a presión reducida nuevamente y se liofiliza para obtener un producto final en forma de polvo blanco.
- 15 La Patente CN 106519009A da a conocer un procedimiento para preparar ularitida. El procedimiento incluye las siguientes etapas: (1) se sintetiza una resina de péptido lineal de protección total; (2) se realiza la escisión para obtener un péptido lineal; (3) se lleva a cabo la oxidación para obtener la ularitida; y (4) se lleva a cabo la purificación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, rotación de la sal y liofilización para obtener el producto competitivo de ularitida.
- 20 La Patente CN 104371018A da a conocer un procedimiento de purificación de ularitida y las condiciones de separación en columna apropiadas se amplían aún más sobre un sistema de cromatografía preparativa industrial de compresión axial dinámica para la separación con el fin de obtener ularitida de pureza elevada. Las ventajas del procedimiento son que se puede conseguir un buen efecto de separación y purificación mediante la utilización directa de la cromatografía preparativa industrial de compresión axial dinámica para la separación de un producto en bruto extraído, el procedimiento presenta las ventajas de una operación sencilla, un período corto y una elevada eficiencia, y la pureza puede alcanzar más del 98 %.
- 25 La Patente US 2009/240031 A1 da a conocer que se pueden preparar fragmentos de cardiodilatina de pureza elevada, tal como ularitida, si el producto en bruto se purifica utilizando una columna de HPLC de fase inversa, y el fragmento de cardiodilatina se eluye utilizando un sistema tampón que contiene fosfato de trietilamonio (TEAP) y acetonitrilo en solución acuosa. Preferentemente, el valor de pH del tampón de elución se ajusta a un valor de 2-5, más específicamente, de 2-3. La elución del péptido es particularmente ventajosa si se aplica un gradiente continuo de eluyente. Qin Ling-Li et al. ("Separation and purification of ularitide by preparative-HPLC", *Drugs & Clinic*, vol. 28, n.º 1, 30 de enero de 2013 (30-01-2013), páginas 37-40), da a conocer un procedimiento para la purificación de ularitida mediante HPLC de fase inversa utilizando columnas C18 (3 x 25 cm, 10 micras) con ácido fórmico al 0,1 % y agua como fase móvil.
- 30 La Patente WO 2017/162653 A1 se refiere a un procedimiento de purificación de Liraglutida. El procedimiento comprende un protocolo de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa bidimensional, en el que la primera etapa se lleva a cabo a un valor de pH entre 7,0 y 7,8 utilizando una fase móvil que comprende un tampón de fosfato y acetonitrilo, y la segunda etapa se lleva a cabo a un valor de pH inferior a 3,0 utilizando una fase móvil que comprende ácido trifluoroacético y acetonitrilo.
- 40 La ularitida se utiliza principalmente en la insuficiencia cardíaca aguda, por lo que su calidad es especialmente importante. La ularitida tiene una secuencia peptídica larga y debe experimentar una etapa de oxidación en el proceso intermedio, lo que da como resultado más impurezas. Para mejorar la seguridad de los fármacos, se requiere una pureza elevada de los fármacos polipeptídicos existentes. La mayoría de los fármacos deben tener una pureza superior al 99 % y también se requiere que cada impureza se controle para que sea inferior al 0,10 %. El proceso de purificación tradicional necesita, en general, dos etapas de purificación y una etapa de conversión en la sal para cumplir con este estándar. Sin embargo, el rendimiento es particularmente bajo y el coste laboral, el coste ambiental y el coste del producto son elevados.
- 45 La purificación de polipéptidos se lleva a cabo principalmente mediante cromatografía de fase inversa, y entre las fases estacionarias se incluyen, en general, C18, C8, C4, C1, etc. Además, se pueden utilizar rellenos poliméricos e incluso otros rellenos de fase inversa para la purificación, pero el proceso de purificación permanece esencialmente inalterado independientemente del tipo de relleno utilizado. Hay dos procesos básicos. Un proceso consiste en rellenar una columna con un tipo de relleno a alta presión. La longitud de la columna es, en general, de 25 cm, aproximadamente, y el tamaño de partícula es principalmente de 10 µm. Después de la purificación en diferentes condiciones cromatográficas, se recuperan las partes no cualificadas y finalmente se obtienen los productos cualificados.
- 50 El otro proceso es rellenar una columna con diferentes tipos de rellenos a alta presión. La longitud de la columna es de 25 cm, aproximadamente, y el tamaño de partícula es, en general, de 10 µm. Después de la purificación en diferentes condiciones cromatográficas, se recuperan y purifican las partes no cualificadas, y finalmente se obtienen los productos cualificados. Para los péptidos con una secuencia peptídica corta, los
- 55
- 60
- 65

dos procesos anteriores se pueden completar con una etapa de purificación, mientras que, para los péptidos con una secuencia peptídica mayor a 25 aminoácidos, se necesitan dos etapas de purificación, junto con la desalinización o conversión en la sal; se necesitan tres etapas para completarlo.

- 5 Las desventajas de ambos procesos son que purificar un producto a gran escala requiere un período de tiempo considerable y los intermedios no cualificados se deben reciclar muchas veces para obtener productos cualificados. Debido a la necesidad de recuperación y purificación, el ciclo se prolonga, aumenta la cantidad de disolvente orgánico utilizado y la descarga de líquido residual, lo que aumenta el coste, compromete la calidad y aumenta el coeficiente de riesgo de los disolventes orgánicos.

10

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

- 15 La presente invención da a conocer un nuevo procedimiento de purificación, tal como se define en las reivindicaciones, que puede mejorar la pureza de un producto, de modo que la pureza del producto sea más del 99 %, el contenido de la impureza individual sea menor del 0,10 % y los costes y las preocupaciones de protección medioambiental se puedan reducir en gran medida.

- 20 La presente invención da a conocer un nuevo procedimiento de purificación, tal como se define en las reivindicaciones, que es diferente del procedimiento de purificación tradicional y aborda las desventajas del procedimiento de purificación tradicional, tales como el coste elevado, el ciclo prolongado y la gran descarga de líquido residual provocada por la recuperación múltiple, mejorando de este modo en gran medida el rendimiento y siendo fácil aumentar la producción.

- 25 Un aspecto de la presente invención da a conocer un procedimiento para purificar un polipéptido de cadena larga, que incluye las siguientes etapas:

etapa 1) etapa de purificación: conectar en serie una columna cromatográfica aguas arriba y una columna cromatográfica aguas abajo para separar un producto en bruto; en la que

- 30 el relleno en la columna cromatográfica aguas arriba y en la columna cromatográfica aguas abajo en la etapa 1) es relleno de gel de sílice C18, relleno de gel de sílice C8, relleno de gel de sílice C4, un relleno polimérico, y un relleno con la misma longitud de alquilo y un tamaño de poro diferente; la longitud de la columna cromatográfica aguas arriba es de 8-20 cm; la longitud de una columna cromatográfica aguas abajo es de 8-20 cm; en la que las fases móviles en la etapa 1) son: la fase A1 es una solución salina tamponada con un valor de pH de 2-3; y la solución salina tamponada es, como mínimo, una seleccionada entre sulfato amónico o dihidrogenofosfato potásico; la fase B es una primera fase orgánica, y la primera fase orgánica es acetonitrilo; una concentración molar de la solución salina tamponada es de 20 mM-150 mM, y una longitud de onda de detección de la etapa 1) es de 230 nm;

- 40 la etapa 1) comprende una primera elución en gradiente: % de fase A1: 95 %-55 %, % de fase B: 5 %-45 %, y un tiempo de elución de 30-120 min; en la primera elución en gradiente, cuando un pico de salida de la columna cromatográfica aguas arriba es un pico de impureza, se descarta la fase móvil correspondiente; cuando el pico de salida de la columna cromatográfica aguas arriba es un pico objetivo, se abre una bomba cromatográfica conectada a un mezclador de tres vías dispuesto entre la columna cromatográfica aguas arriba y la columna cromatográfica aguas abajo, se introduce agua purificada para realizar una dilución en tiempo real y, a continuación, el producto del pico objetivo entra en la columna cromatográfica aguas abajo después de la dilución en tiempo real; el procedimiento para la purificación del péptido de cadena larga comprende, además, la etapa 2) de conversión en la sal:

- 50 etapa 2): utilizar la columna cromatográfica aguas arriba en la etapa 1) para la conversión en la sal, en la que, la fase A2 es una solución acuosa de ácido acético con una proporción en volumen del 0,05 %-0,2 %; la fase B es una segunda fase orgánica, y la segunda fase orgánica es acetonitrilo; y una longitud de onda de detección de la etapa 2) es 230 nm;

- 55 la etapa 2) comprende: cargar el producto del pico objetivo obtenido en la etapa 1) y lavar el producto del pico objetivo con el 95 % de fase A2 y 5 % de fase B durante 15-30 minutos para una desalinización;

a continuación, realizar una segunda elución en gradiente durante 10-30 minutos para la conversión de la sal para recoger un producto objetivo; % de fase A2: 95 %-55 %, % de fase B: 5 %-45 %.

- 60 en el que el polipéptido de cadena larga es ularitida.

- En la solución técnica de la presente invención, en la etapa 1), el relleno en la columna cromatográfica aguas arriba es un relleno de gel de sílice C18 que tiene un tamaño de partícula de 10 μm , y la longitud de la columna cromatográfica aguas arriba es de 10-15 cm; y el relleno en la columna cromatográfica aguas abajo es un relleno de gel de sílice C18 que tiene un tamaño de partícula de 5 μm , y la longitud de la columna cromatográfica aguas abajo es de 10-15 cm.

65

ES 3 012 801 T3

En la solución técnica de la presente invención, la etapa 1) comprende la primera elución en gradiente: % de fase A1: 85 %-65 %, % de fase B: 15 %-55 %, y el tiempo de elución es de 50-70 minutos.

- 5 En la solución técnica de la presente invención, la dilución en tiempo real es la siguiente: antes de que el producto pico objetivo entre en la columna cromatográfica aguas abajo, se introduce el 10 % de agua purificada a través de la bomba cromatográfica para reducir la proporción de la primera fase orgánica.

En la solución técnica de la presente invención, el valor de pH de la fase A1 es de 2,2-2,8.

- 10 En la solución técnica de la presente invención, la fase A2 es una solución de acetato amónico con una proporción en volumen de 0,1 %-0,4 %.

- 15 En la solución técnica de la presente invención, en la etapa 2), la desalinización se realiza con el 95 % de fase A2 y el 5 % de fase B durante 15-30 minutos.

- 20 En la solución técnica de la presente invención, en la etapa 2), la segunda elución en gradiente se realiza durante 10-30 minutos para la conversión en la sal para recoger el producto objetivo; % de fase A2: 85 %-65 %, % de fase B: 15 %-35 %.

- 25 Un nuevo procedimiento de purificación, en el que se disponen simultáneamente dos tipos diferentes de columnas cromatográficas. La primera columna es de C18 de 10 μm y la segunda columna es de C18 de 5 μm . Las longitudes de las columnas cromatográficas son ambas de 10-15 cm considerando la presión de la columna, el efecto de la columna y el coste integral de los rellenos y, a continuación, las columnas cromatográficas se conectan en serie. Para la purificación de ularitida, la primera columna con tamaño de partícula más grande se monta delante de la segunda columna con tamaño de partícula más pequeño. A continuación, se purifica un líquido de ularitida oxidada mediante las columnas. Después de la purificación y la conversión en la sal, se obtiene una ularitida purificada.

- 30 Un nuevo procedimiento para purificar ularitida, en el que dos columnas se rellenan respectivamente con dos tipos diferentes de rellenos y, a continuación, las dos columnas se conectan en serie. El procedimiento incluye una primera etapa de purificación y una segunda etapa de conversión de la sal. En la primera etapa, se utiliza una solución salina tamponada con una concentración predeterminada y un pH predeterminado como fase A1, y se utiliza acetonitrilo como fase B. En la segunda etapa se utiliza ácido acético con una concentración predeterminada como fase A2 y se utiliza acetonitrilo como fase B. La conversión en sal se realiza mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con elución en gradiente. Se recoge una solución y se liofiliza para obtener acetato de ularitida.

- 40 La cadena peptídica de la ularitida es larga y existen numerosas impurezas en la síntesis, y contiene aminoácidos, tales como Ser, que se isomerizan fácilmente durante la síntesis, lo que da como resultado impurezas isoméricas en los péptidos en bruto. Mediante el nuevo procedimiento de purificación de la presente invención, se conectan en serie dos tipos diferentes de rellenos para la purificación y los dos tipos diferentes de rellenos tienen diferentes capacidades de separación. Después de que se realice la purificación en la primera columna, el producto del pico objetivo no sale de la primera columna y, antes de entrar en la columna cromatográfica aguas abajo, la tercera bomba introduce el 10 % de agua purificada para reducir la proporción de la fase orgánica y a continuación, el producto del pico objetivo entra en la segunda columna para la segunda separación.

- 50 El proceso de purificación tradicional necesita, en general, dos etapas de purificación, que pueden completarse con una sola etapa de purificación en la presente invención. Además, el procedimiento de purificación de la presente invención reduce el riesgo de afectar la calidad del producto, tal como el procesamiento intermedio, la precipitación y la desnaturalización provocadas por el almacenamiento intermedio, lo que puede ahorrar tiempo y esfuerzo.

- 55 El procedimiento de purificación de la presente invención puede separar y eliminar las impurezas isoméricas y otras impurezas que son difíciles de separar en los péptidos en bruto y, a continuación, utiliza el procedimiento HPLC de fase inversa para convertir en acetato, y finalmente mejora el rendimiento y la pureza del producto.

- 60 A la vez, la presente invención supera las deficiencias de que los procedimientos de purificación tradicionales consumen mucho tiempo, requieren mucha mano de obra y producen contaminantes. La presente invención da a conocer un nuevo procedimiento de purificación que es fácil de operar, lo que resulta beneficioso para conseguir una preparación a gran escala.

Como optimización, la concentración molar de la sal tamponada en la fase móvil A1 del procedimiento de HPLC de la presente invención es de 20 mM-150 mM, y la proporción en volumen del ácido acético en la fase móvil A2 es del 0,05 %-0,2 %.

5 Como optimización, un intervalo del valor de pH de la fase móvil A1 del procedimiento de HPLC de la presente invención es 2,2-2,8.

Como optimización, la sal tamponada es, como mínimo, una seleccionada entre el grupo que consiste en sulfato amónico, dihidrogenofosfato potásico, hidrogenofosfato disódico e hidrogenofosfato dipotásico.

10 Como optimización, la fase móvil B del procedimiento de HPLC es acetonitrilo.

Como optimización, las fases estacionarias del procedimiento de HPLC son octadecilo y los tamaños de partícula son 5 µm y 10 µm.

15 Ventajas

La conexión de columnas en serie para la purificación utiliza dos tipos de rellenos con diferentes capacidades de separación para purificar. Se realizan dos separaciones sin cambiar la longitud de la columna, reduciendo los tiempos de recuperación, acortando el ciclo y reduciendo la cantidad utilizada en la fase orgánica. Además, el funcionamiento es sencillo y fácilmente escalable. Una ventaja importante sobre los procedimientos anteriores es el ahorro de tiempo y de costes, especialmente para polipéptidos con una longitud de cadena peptídica mayor a 35, dado que dichos polipéptidos requieren múltiples etapas de purificación y recuperación. El efecto será más prominente. La razón principal es que cuanto más larga es la cadena peptídica, ésta es más hidrófoba, más fase orgánica se utiliza durante la elución y, junto con la recuperación múltiple, la cantidad de líquido residual es particularmente grande.

Los ejemplos son los siguientes:

30 La purificación se realiza mediante columnas cromatográficas de las siguientes especificaciones: 5 cm × 25 cm (diámetro de la columna × longitud de la columna), 10 cm × 25 cm, 15 cm × 25 cm.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

35 La figura 1 es un diagrama que muestra un espectro de masas de péptidos en bruto lineales.
La figura 2 es un diagrama que muestra un espectro de masas de péptidos purificados.
La figura 3 es un diagrama que muestra un resultado de HPLC de un producto puro en el ejemplo 1.
La figura 4 es un diagrama que muestra un resultado de HPLC de un producto puro en el ejemplo 2.
La figura 5 es un diagrama que muestra un resultado de HPLC de un producto puro en el ejemplo 3.
40 La figura 6 es un diagrama que muestra un resultado de HPLC de un producto puro en el ejemplo 4.
La figura 7 es un diagrama que muestra un resultado de HPLC de un producto puro en el ejemplo 5.
La figura 8 es un diagrama que muestra un resultado de HPLC de un producto puro en el ejemplo 6.
La figura 9 es un diagrama que muestra un resultado de HPLC de un producto puro en el ejemplo 7.
La figura 10 es un diagrama que muestra un resultado de HPLC de un producto puro en el ejemplo 8.
45 La figura 11 es un diagrama que muestra un resultado de HPLC de un producto puro en el ejemplo 9.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS EJEMPLOS

Ejemplo 1: purificación de ularitida en bruto

50 Se disuelven y se filtran 2,0 g de ularitida en bruto lineal y se recoge un filtrado para su utilización.

1. Condiciones de purificación: columnas cromatográficas: se utiliza como la columna 1 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C18 como fase estacionaria con un tamaño de partícula de 10 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 5 cm × 10 cm; se utiliza como la columna 2 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C18 como fase estacionaria con un tamaño de partícula de 5 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 5 cm × 15 cm.

60 Etapa 1: fases móviles: fase A1: el valor de pH de una solución de dihidrogenofosfato potásico (50 mmol/l) se ajusta a 2,2 con ácido fosfórico; fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico; el caudal es de 60-80 ml/min y la longitud de onda de detección es de 230 nm.

65 Se carga una solución de ularitida lineal en bruto y se eluye durante 50-70 minutos con el siguiente gradiente: % de A1: 85 %-65 %, % de B: 15 %-35 %. En el proceso de elución, el líquido residual se descarta si aparece un pico de impureza durante la separación a través de la columna cromatográfica 1. Cuando sale

ES 3 012 801 T3

un pico de producto objetivo, el producto objetivo se somete a una dilución en tiempo real mediante una tercera bomba conectada a un mezclador de tres vías y, a continuación, entra en la columna 2 para una separación secundaria.

5 La fase móvil de la dilución en tiempo real es agua purificada y el caudal es de 5 a 20 ml/min.

El producto objetivo obtenido mediante una purificación cíclica en la etapa 1, que cumple con los requisitos de calidad, pasa a la etapa 2.

10 Etapa 2: fases móviles: fase A2: una solución de acetato amónico al 0,1-0,4 %, el valor de pH es de 6,5-7,0, fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico, el caudal es de 60-80 ml/min y la longitud de onda de detección es de 230 nm.

15 Después de lavar la columna 1 con una solución de acetonitrilo superior al 50 %, el producto obtenido en la etapa 1 se carga y se lava con el 95 % de A2 y el 5 % de B durante 15-30 minutos para una desalinización. A continuación, se realiza una elución en gradiente durante 20 minutos para la conversión en la sal para recoger el producto pico objetivo, el % de A2 es el 85 %-65 % y el % de B es el 15 %-35 %. Una solución de péptido objetivo recogida se evapora rotatoriamente a presión reducida en un baño de agua con una temperatura de agua de no más de 32 °C y se concentra hasta, aproximadamente, 15-50 mg/ml y, a continuación, se transfiere a un vial de tamaño adecuado. Después de la liofilización, se puede obtener ularitida cualificada con una pureza superior al 99,0 %.

20 Después de la liofilización, se obtienen 0,92 g de péptidos purificados sólidos en forma de polvo blanco. La pureza es del 99,28 % y la impureza única es inferior al 0,15 %. El rendimiento después de la purificación es del 68 % (calculado basándose en el contenido de ularitida en el producto en bruto) y el rendimiento total es del 46 %. Durante el proceso de purificación, no es necesario reciclar ni purificar el intermedio. Según el cálculo, en comparación con los ejemplos 4-5, la descarga de líquido residual se reduce, aproximadamente, en un 30 % cuando se purifica por unidad de masa de ularitida en bruto, debido a la reducción del número de ciclos en la etapa 1.

30 Ejemplo 2: purificación de ularitida en bruto

Se disuelven y se filtran 15 g de ularitida en bruto y se recoge un filtrado para su utilización.

35 1. Condiciones de purificación: columnas cromatográficas: se utiliza como la columna 1 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C18 como fase estacionaria con un tamaño de partícula de 10 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 10 cm × 15 cm; se utiliza como la columna 2 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C18 como fase estacionaria con un tamaño de partícula de 5 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 10 cm × 10 cm.

45 Etapa 1: fases móviles: fase A1: el valor de pH de una solución de dihidrogenofosfato potásico (150 mmol/l) se ajusta a 2,5 con ácido fosfórico; fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico; el caudal es de 200-220 ml/min y la longitud de onda de detección es de 230 nm.

50 Se carga una solución de ularitida lineal en bruto y se eluye durante 50-70 minutos con el siguiente gradiente: % de A1: 85 %-65 %, % de B: 15 %-35 %. En el proceso de elución, el líquido residual se descarta si aparece un pico de impureza durante la separación a través de la columna cromatográfica 1. Cuando sale un pico de producto objetivo, el producto objetivo se somete a una dilución en tiempo real mediante una tercera bomba conectada a un mezclador de tres vías y, a continuación, entra en la columna 2 para una separación secundaria.

La fase móvil de la dilución en tiempo real es agua purificada y el caudal es de 20 a 50 ml/min.

55 El producto obtenido mediante una purificación cíclica en la etapa 1, que cumple con los requisitos de calidad, pasa a la etapa 2.

60 Etapa 2: fases móviles: fase A2: una solución de acetato amónico al 0,1-0,4 %, el valor de pH es 6,5-7,0, fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico, el caudal es 200-220 ml/min y la longitud de onda de detección es 230 nm.

65 Después de lavar la columna 1 con una solución de acetonitrilo superior al 50 %, el producto obtenido en la etapa 1 se carga y se lava con el 95 % de A2 y el 5 % de B durante 15-30 minutos para una desalinización. A continuación, se realiza una elución en gradiente durante 20 minutos para la conversión en la sal para recoger el producto del pico objetivo, el % de A2 es el 85 %-65 % y el % de B es el 15 %-35 %. Una solución de péptido objetivo recogida se evapora rotatoriamente a presión reducida en un baño de agua con una

ES 3 012 801 T3

temperatura de agua de no más de 32 °C y se concentra hasta, aproximadamente, 15-50 mg/ml y, a continuación, se transfiere a un vial de tamaño adecuado. Después de la liofilización, se puede obtener ularitida cualificada con una pureza superior al 99,0 %.

5 Después de la liofilización se obtienen 7,1 g de péptidos purificados sólidos en forma de polvo blanco. La pureza es del 99,30 % y la impureza única es inferior al 0,10 %. El rendimiento después de la purificación es del 73,9 % (calculado basándose en el contenido de ularitida en el producto en bruto) y el rendimiento total es del 47,3 %. Según el cálculo, en comparación con los ejemplos 4-5, la descarga de líquido residual se reduce, aproximadamente, el 35 % cuando se purifica por unidad de masa de ularitida en bruto, debido a la reducción del número de ciclos en la etapa 1.

Ejemplo 3: purificación de ularitida en bruto

Se disuelven y se filtran 25 g de ularitida en bruto y se recoge un filtrado para su utilización.

15 1. Condiciones de purificación: columnas cromatográficas: se utiliza como la columna 1 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C18 como fase estacionaria con un tamaño de partícula de 10 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 15 cm × 15 cm; se utiliza como la columna 2 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C18 de fase estacionaria con un tamaño de partícula de 5 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 15 cm × 10 cm.

20 Etapa 1: fases móviles: fase A1: el valor de pH de una solución de sulfato amónico (100 mmol/l) se ajusta a 2,8 con ácido fosfórico; fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico; el caudal es de 450-550 ml/min y la longitud de onda de detección es de 230 nm.

25 Se carga una solución de ularitida lineal en bruto y se eluye durante 50-70 minutos con el siguiente gradiente: % de A1: 85 %-65 %, % de B: 15 %-35 %. En el proceso de elución, el líquido residual se descarta si aparece un pico de impureza durante la separación a través de la columna cromatográfica 1. Cuando sale un pico de producto objetivo, el producto objetivo se somete a una dilución en tiempo real mediante una tercera bomba conectada a un mezclador de tres vías y, a continuación, entra en la columna 2 para una separación secundaria.

La fase móvil de la dilución en tiempo real es agua purificada y el caudal es de 45-100 ml/min.

35 El producto obtenido mediante una purificación cíclica en la etapa 1, que cumple con los requisitos de calidad, pasa a la etapa 2.

40 Etapa 2: fases móviles: fase A2: una solución de acetato amónico al 0,1-0,4 %, el valor de pH es 6,5-7,0, fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico, el caudal es 450-550 ml/min y la longitud de onda de detección es 230 nm.

45 Después de lavar la columna 1 con una solución de acetonitrilo superior al 50 %, el producto obtenido en la etapa 1 se carga y se lava con el 95 % de A2 y el 5 % de B durante 15-30 minutos para una desalinización. A continuación, se realiza una elución en gradiente durante 20 minutos para la conversión en la sal para recoger el producto pico objetivo, el % de A2 es el 85 %-65 % y el % de B es el 15 %-35 %. Una solución de péptido objetivo recogida se evapora rotatoriamente a presión reducida en un baño de agua con una temperatura de agua de no más de 32 °C y se concentra hasta, aproximadamente, 15-50 mg/ml y, a continuación, se transfiere a un vial de tamaño adecuado. Después de la liofilización, se puede obtener ularitida cualificada con una pureza superior al 99,0 %.

50 Después de la liofilización, se obtienen 12,1 g de péptidos purificados sólidos en forma de polvo blanco. La pureza es del 99,26 % y la impureza única es inferior al 0,10 %. El rendimiento después de la purificación es del 67 % (calculado basándose en el contenido de ularitida en el producto en bruto) y el rendimiento total es del 48,4 %. Según el cálculo, en comparación con los ejemplos 4-5, la descarga de líquido residual se reduce, aproximadamente, el 40 % cuando se purifica por unidad de masa de ularitida en bruto, debido a la reducción del número de ciclos en la etapa 1.

Ejemplo 4: ejemplo comparativo de purificación de ularitida en bruto

60 Se disuelven y se filtran 25 g de ularitida en bruto y se recoge un filtrado para su utilización.

65 1. Condiciones de purificación: columna cromatográfica: se utiliza como la columna 1 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C18 como fase estacionaria con un tamaño de partícula de 10 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 15 cm × 25 cm.

ES 3 012 801 T3

Etapa 1: fases móviles: fase A1: el valor de pH de una solución de sulfato amónico (100 mmol/l) se ajusta a 2,8 con ácido fosfórico; fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico; el caudal es de 450-550 ml/min y la longitud de onda de detección es de 230 nm.

- 5 Se carga una solución de ularitida lineal en bruto y se eluye durante 50-70 minutos con el siguiente gradiente: % de A1: 85 %-65 %, % de B: 15 %-35 %.

El producto obtenido mediante una purificación cíclica en la etapa 1, que cumple con los requisitos de calidad, pasa a la etapa 2.

10

Etapa 2: fases móviles: fase A2: una solución de acetato amónico al 0,1-0,4 %, el valor de pH es 6,5-7,0, fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico, el caudal es 450-550 ml/min y la longitud de onda de detección es 230 nm.

15

Después de lavar la columna 1 con una solución de acetonitrilo superior al 50 %, el producto obtenido en la etapa 1 se carga y se lava con el 95 % de A2 y el 5 % de B durante 15-30 minutos para una desalinización. A continuación, se realiza una elución en gradiente durante 20 minutos para la conversión en la sal para recoger el producto del pico objetivo, el % de A2 es el 85 %-65 % y el % de B es el 15 %-35 %. Una solución de péptido objetivo recogida se evapora rotatoriamente a presión reducida en un baño de agua con una temperatura de agua de no más de 32 °C y se concentra hasta, aproximadamente, 15-50 mg/ml y, a continuación, se transfiere a un vial de tamaño adecuado. Después de la liofilización, se puede obtener ularitida cualificada con una pureza superior al 99,0 %.

20

25

Después de la liofilización se obtienen 8,1 g de péptidos purificados sólidos en forma de polvo blanco. La pureza es del 99,30 % y la impureza única es inferior al 0,10 %. El rendimiento después de la purificación es del 64 % (calculado basándose en el contenido de ularitida en el producto en bruto) y el rendimiento total es del 32,4 %. Según el cálculo, cuando se purifican 25 g de péptidos en bruto, las fracciones no cualificadas deben recuperarse y purificarse, como mínimo, tres veces para alcanzar el mismo resultado que el obtenido en el ejemplo 1. Después de ampliarse la producción, los tiempos de recuperación de las fracciones no cualificadas aumentan, como mínimo, el 30 %-40 %, la cantidad de acetonitrilo utilizado aumenta el 20 %-30 %, la cantidad de descarga de líquido residual aumenta, aproximadamente, el 40 % y el ciclo aumenta el 30 %.

30

35

Ejemplo 5: ejemplo comparativo de purificación de ularitida en bruto

Se disuelven y se filtran 25 g de ularitida en bruto y se recoge un filtrado para su utilización.

40

1. Condiciones de purificación: columna cromatográfica 1: se utiliza como columna una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C18 como fase estacionaria con un tamaño de partícula de 5 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 15 cm × 25 cm.

45

Etapa 1: fases móviles: fase A1: el valor de pH de una solución de sulfato amónico (100 mmol/l) se ajusta a 2,8 con ácido fosfórico; fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico; el caudal es de 450-550 ml/min y la longitud de onda de detección es de 230 nm.

Se carga una solución de ularitida lineal en bruto y se eluye durante 50-70 minutos con el siguiente gradiente: % de A1: 85 %-65 %, % de B: 15 %-35 %.

50

El producto obtenido mediante una purificación cíclica en la etapa 1, que cumple con los requisitos de calidad, pasa a la etapa 2.

55

Etapa 2: fases móviles: fase A2: una solución de acetato amónico al 0,1-0,4 %, el valor de pH es 6,5-7,0, fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico, el caudal es 450-550 ml/min y la longitud de onda de detección es 230 nm.

60

Después de lavar la columna 1 con una solución de acetonitrilo superior al 50 %, el producto obtenido en la etapa 1 se carga y se lava con el 95 % de A2 y el 5 % de B durante 15-30 minutos para una desalinización. A continuación, se realiza una elución en gradiente durante 20 minutos para la conversión en la sal para recoger el producto del pico objetivo, el % de A2 es el 85 %-65 % y el % de B es el 15 %-35 %. Una solución de péptido objetivo recogida se evapora rotatoriamente a presión reducida en un baño de agua con una temperatura de agua de no más de 32 °C y se concentra hasta, aproximadamente, 15-50 mg/ml y, a continuación, se transfiere a un vial de tamaño adecuado. Después de la liofilización, se puede obtener ularitida cualificada con una pureza superior al 99,0 %.

65

Después de la liofilización, se obtienen 8,3 g de péptidos purificados sólidos en forma de polvo blanco. La pureza es del 99,30 % y la impureza única es inferior al 0,10 %. El rendimiento después de la purificación es

ES 3 012 801 T3

del 64 % (calculado basándose en el contenido de ularitida en el producto en bruto) y el rendimiento total es del 33,2 %. Según el cálculo, la cantidad de acetonitrilo utilizada aumenta el 15 %, la cantidad de descarga de líquido residual aumenta, aproximadamente, el 35 % y el ciclo aumenta el 20 %. Sin embargo, en el proceso de preparación, el destilado precipita en el proceso de almacenamiento y la disolución es difícil. Además, durante la preparación, la presión de la columna es elevada y está cerca del límite superior del sistema de preparación. No se recomienda la utilización de relleno de fase inversa de 5 µm y su coste también es elevado.

Ejemplo 6: ejemplo comparativo de purificación de ularitida en bruto

Se disuelven y se filtran 25 g de ularitida en bruto y se recoge un filtrado para su utilización.

1. Condiciones de purificación: columnas cromatográficas: se utiliza como la columna 1 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C18 como fase estacionaria con un tamaño de partícula de 10 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 15 cm × 15 cm; se utiliza como la columna 2 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C18 como fase estacionaria con un tamaño de partícula de 10 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 15 cm × 10 cm.

Etapas 1: fases móviles: fase A1: el valor de pH de una solución de sulfato amónico (100 mmol/l) se ajusta a 2,8 con ácido fosfórico; fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico; el caudal es de 450-550 ml/min y la longitud de onda de detección es de 230 nm.

Se carga una solución de ularitida lineal en bruto y se eluye durante 50-70 minutos con el siguiente gradiente: % de A1: 85 %-65 %, % de B: 15 %-35 %. En el proceso de elución, el líquido residual se descarta si aparece un pico de impureza durante la separación a través de la columna cromatográfica 1. Cuando sale un pico de producto objetivo, el producto objetivo se somete a una dilución en tiempo real mediante una tercera bomba conectada a un mezclador de tres vías y, a continuación, entra en la columna 2 para una separación secundaria.

La fase móvil de la dilución en tiempo real es agua purificada y el caudal es de 45-100 ml/min.

El producto obtenido mediante una purificación cíclica en la etapa 1, que cumple con los requisitos de calidad, pasa a la etapa 2.

Etapas 2: fases móviles: fase A2: una solución de acetato amónico al 0,1-0,4 %, el valor de pH es 6,5-7,0, fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico, el caudal es 450-550 ml/min y la longitud de onda de detección es 230 nm.

Después de lavar la columna 1 con una solución de acetonitrilo superior al 50 %, el producto obtenido en la etapa 1 se carga y se lava con el 95 % de A2 y el 5 % de B durante 15-30 minutos para una desalinización. A continuación, se realiza una elución en gradiente durante 20 minutos para la conversión en la sal para recoger el producto del pico objetivo, el % de A2 es el 85 %-65 % y el % de B es el 15 %-35 %. Una solución de péptido objetivo recogida se evapora rotatoriamente a presión reducida en un baño de agua con una temperatura de agua de no más de 32 °C y se concentra hasta, aproximadamente, 15-50 mg/ml y, a continuación, se transfiere a un vial de tamaño adecuado. Después de la liofilización, se puede obtener ularitida cualificada con una pureza superior al 99,0 %.

Después de la liofilización, se obtienen 8,52 g de péptidos purificados sólidos en forma de polvo blanco. La pureza es del 99,24 % y la impureza única es inferior al 0,10 %. El rendimiento después de la purificación es del 64 % (calculado basándose en el contenido de ularitida en el producto en bruto) y el rendimiento total es del 34,1 %. Según el cálculo, en comparación con el ejemplo 4, la descarga de líquido residual se reduce, aproximadamente, el 5 % cuando se purifica por unidad de masa de ularitida en bruto, debido a la reducción del ciclo en la etapa 1, aproximadamente, el 10 %. Cuando el tamaño de partícula es grande, las ventajas de conectar en serie columnas con el mismo relleno no son significativas.

Ejemplo 7: ejemplo comparativo de purificación de ularitida en bruto

Se disuelven y se filtran 25 g de ularitida en bruto y se recoge un filtrado para su utilización.

1. Condiciones de purificación: columnas cromatográficas: se utiliza como columna 1 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C18 como fase estacionaria con un tamaño de partícula de 5 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 15 cm × 15 cm; se utiliza como columna 2 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C18 como fase

ES 3 012 801 T3

estacionaria con un tamaño de partícula de 5 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 15 cm x 10 cm.

5 Etapa 1: fases móviles: fase A1: el valor de pH de una solución de sulfato amónico (100 mmol/l) se ajusta a 2,8 con ácido fosfórico; fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico; el caudal es de 450-550 ml/min y la longitud de onda de detección es de 230 nm.

10 Se carga una solución de ularitida lineal en bruto y se eluye durante 50-70 minutos con el siguiente gradiente: % de A1: 85 %-65 %, % de B: 15 %-35 %. En el proceso de elución, el líquido residual se descarta si aparece un pico de impureza durante la separación a través de la columna cromatográfica 1. Cuando sale un pico de producto objetivo, el producto objetivo se somete a una dilución en tiempo real mediante una tercera bomba conectada a un mezclador de tres vías y, a continuación, entra en la columna 2 para una separación secundaria.

15 La fase móvil de la dilución en tiempo real es agua purificada y el caudal es de 45-100 ml/min.

El producto obtenido mediante una purificación cíclica en la etapa 1, que cumple con los requisitos de calidad, pasa a la etapa 2.

20 Etapa 2: fases móviles: fase A2: una solución de acetato amónico al 0,1-0,4 %, el valor de pH es 6,5-7,0, fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico, el caudal es 450-550 ml/min y la longitud de onda de detección es 230 nm.

25 Después de lavar la columna 1 con una solución de acetonitrilo superior al 50 %, el producto obtenido en la etapa 1 se carga y se lava con el 95 % de A2 y el 5 % de B durante 15-30 minutos para la desalinización. A continuación, se realiza una elución en gradiente durante 20 minutos para la conversión en la sal para recoger el producto del pico objetivo, el % de A2 es el 85 %-65 % y el % de B es el 15 %-35 %. Una solución de péptido objetivo recogida se evapora rotatoriamente a presión reducida en un baño de agua con una temperatura de agua de no más de 32 °C y se concentra hasta, aproximadamente, 15-50 mg/ml y, a continuación, se transfiere a un vial de tamaño adecuado. Después de la liofilización, se puede obtener ularitida cualificada con una pureza superior al 99,0 %.

35 Después de la liofilización, se obtienen 8,9 g de péptidos purificados sólidos en forma de polvo blanco. La pureza es del 99,24 % y la impureza única es inferior al 0,10 %. El rendimiento después de la purificación es del 66 % (calculado basándose en el contenido de ularitida en el producto en bruto) y el rendimiento total es del 35,6 %. Según el cálculo, en comparación con el ejemplo 5, utilizando el mismo relleno con un tamaño de partícula pequeño, el efecto de eliminación de algunas impurezas es mejor, mientras que el efecto de eliminación de algunas otras impurezas es más débil. De manera global, la descarga de líquidos residuales se reduce, aproximadamente, el 15 % cuando se purifica por unidad de masa de ularitida en bruto, debido a la reducción del número de ciclos en la etapa 1, aproximadamente, el 20 %. Sin embargo, el coste de los rellenos aumenta el 30 % y, de manera global, las ventajas no son significativas.

Ejemplo 8: purificación de semaglutida en bruto

45 Se disuelven y se filtran 15 g de semaglutida en bruto y se recoge un filtrado para su utilización.

50 1. Condiciones de purificación: columnas cromatográficas: se utiliza como la columna 1 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C8 como fase estacionaria con un tamaño de partícula de 10 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 15 cm x 10 cm; se utiliza como la columna 2 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C4 como fase estacionaria con un tamaño de partícula de 5 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 15 cm x 10 cm.

55 Etapa 1: fases móviles: fase A1: el valor de pH de una solución de bicarbonato amónico (100 mmol/l) se ajusta a 8,0 con hidróxido de tetrametilamonio; fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico: isopropanol = 9:1; el caudal es de 450-550 ml/min y la longitud de onda de detección es de 230 nm.

60 Se carga una solución de semaglutida en bruto y se eluye durante 50-70 minutos con el siguiente gradiente: % de A1: 85 %-65 %, % de B: 15 %-35 %. En el proceso de elución, el líquido residual se descarta si aparece un pico de impureza durante la separación a través de la columna cromatográfica 1. Cuando sale un pico de producto objetivo, el producto objetivo se somete a una dilución en tiempo real mediante una tercera bomba conectada a un mezclador de tres vías y, a continuación, entra en la columna 2 para una separación secundaria.

65 La fase móvil de la dilución en tiempo real es agua purificada y el caudal es de 50-70 ml/min.

ES 3 012 801 T3

El producto obtenido mediante una purificación cíclica en la etapa 1, que cumple con los requisitos de calidad, pasa a la etapa 2.

5 Etapa 2: fases móviles: fase A2: una solución de acetato amónico al 0,1-0,4 %, el valor de pH es 6,5-7,0, fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico, el caudal es 450-550 ml/min y la longitud de onda de detección es 230 nm.

10 Después de lavar la columna 1 con una solución de acetonitrilo superior al 50 %, el producto se carga y se lava con una solución de acetato amónico al 0,1-0,4 % (pH 6,5-7,0) que contenía el 5 % de acetonitrilo durante 15-30 minutos. A continuación, se realiza una elución en gradiente durante 40 minutos para recoger el producto del pico objetivo, el gradiente de acetonitrilo: el % de B es el 40 %-60 %. Una solución de péptido objetivo recogida se evapora rotatoriamente a presión reducida en un baño de agua con una temperatura de agua de no más de 32 °C y se concentra hasta, aproximadamente, 15-50 mg/ml y, a continuación, se transfiere a un vial de tamaño adecuado. Después de la liofilización, se puede obtener semaglutida cualificada con una pureza superior al 99,0 %.

20 Después de la liofilización, se obtienen 4,1 g de péptidos purificados sólidos en forma de polvo blanco. La pureza es del 99,32 % y la impureza única es inferior al 0,15 %. El rendimiento después de la purificación es del 57 % (calculado basándose en el contenido de semaglutida en el producto en bruto) y el rendimiento total es del 27,3 %. Después de conectarse en serie, la descarga de líquido residual se reduce el 35 % y el ciclo se reduce el 25 %.

Ejemplo 9: purificación de liraglutida en bruto

25 Se disuelven y se filtran 15 g de liraglutida en bruto y se recoge un filtrado para su utilización.

30 1. Condiciones de purificación: columnas cromatográficas: se utiliza como la columna 1 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C18 como fase estacionaria con un tamaño de partícula de 10 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 15 cm × 15 cm; se utiliza como la columna 2 una columna cromatográfica rellena con un relleno de gel de sílice C4 como fase estacionaria con un tamaño de partícula de 5 µm, y el diámetro y la longitud de la columna son de 15 cm × 15 cm.

35 Etapa 1: fases móviles: fase A1: el valor de pH de una solución de bicarbonato amónico (100 mmol/l) se ajusta a 8,0 con hidróxido amónico; fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico: isopropanol = 9:2, el caudal es de 450-550 ml/min y la longitud de onda de detección es de 230 nm.

40 Se carga una solución de liraglutida en bruto y se eluye durante 50-70 minutos con el siguiente gradiente: % de fase A1: 70 %-55 %, % de fase B: 30 %-45 %. En el proceso de elución, el líquido residual se descarta si aparece un pico de impureza durante la separación a través de la columna cromatográfica 1. Cuando sale un pico de producto objetivo, el producto objetivo se somete a una dilución en tiempo real mediante una tercera bomba conectada a un mezclador de tres vías y, a continuación, entra en la columna 2 para una separación secundaria.

45 La fase móvil de la dilución en tiempo real es agua purificada y el caudal es de 50-100 ml/min.

El producto obtenido mediante una purificación cíclica en la etapa 1, que cumple con los requisitos de calidad, pasa a la etapa 2.

50 Etapa 2: fases móviles: fase A2: una solución de acetato amónico al 0,1-0,4 %, el valor de pH es 6,5-6,8, fase B: acetonitrilo de grado cromatográfico, el caudal es 450-550 ml/min y la longitud de onda de detección es 230 nm.

55 Después de lavar la columna 1 con una solución de acetonitrilo superior al 50 %, el producto se carga y se lava con una solución de acetato amónico al 0,1-0,4 % que contiene el 5 % de acetonitrilo durante 15-30 minutos. A continuación, se realiza una elución en gradiente durante 30 minutos para recoger el producto del pico objetivo, el gradiente de acetonitrilo: el % de B es el 40 %-60 %. Una solución de péptido objetivo recogida se evapora rotatoriamente a presión reducida en un baño de agua que tiene una temperatura del agua de no más de 32 °C y se concentra hasta, aproximadamente 50 mg/ml y, a continuación, se transfiere a un vial de tamaño adecuado. Después de la liofilización, se puede obtener liraglutida cualificada con una pureza superior al 99,0 %.

65 Después de la liofilización, se obtienen 3,8 g de péptidos purificados sólidos en forma de polvo blanco. La pureza es del 99,32 % y la impureza única es inferior al 0,15 %. El rendimiento después de la purificación es del 52 % (calculado basándose en el contenido de liraglutida en el producto en bruto) y el rendimiento total es del 25,3 %. Después de conectarse en serie, la descarga de líquido residual se reduce el 30 % y el ciclo se reduce el 25 %.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación de un polipéptido de cadena larga, que comprende las siguientes etapas:

5 etapa 1) etapa de purificación: conectar una columna cromatográfica aguas arriba y una columna cromatográfica aguas abajo en serie para separar un producto en bruto; en la que el relleno en la columna cromatográfica aguas arriba y en la columna cromatográfica aguas abajo en la etapa 1) se selecciona entre gel de sílice C18; la longitud de la columna aguas arriba es de 8-20 cm; la longitud de la columna aguas abajo es de 8-20 cm; fases móviles en la etapa 1): la fase A1 es una solución salina tamponada con un valor de pH de 2-3; y la solución salina tamponada es, como mínimo, una seleccionada entre sulfato amónico o dihidrogenofosfato potásico; la fase B es una primera fase orgánica, y la primera fase orgánica es acetonitrilo; una concentración molar de la solución salina tamponada es de 20 mM-150 mM, y una longitud de onda de detección de la etapa 1) es 230 nm; la etapa 1) comprende una primera elución en gradiente: % de fase A1: 95 %-55 %, % de fase B: 5 %-45 %, y un tiempo de elución de 30-120 min; en la primera elución en gradiente, cuando un pico de salida de la columna cromatográfica aguas arriba es un pico de impureza, se descarta la fase móvil correspondiente; cuando el pico de salida de la columna cromatográfica aguas arriba es un pico objetivo, se abre una bomba cromatográfica conectada a un mezclador de tres vías dispuesto entre la columna cromatográfica aguas arriba y la columna cromatográfica aguas abajo, se introduce agua purificada para realizar una dilución en tiempo real y, a continuación, el producto del pico objetivo entra en la columna cromatográfica aguas abajo después de la dilución en tiempo real; el procedimiento para la purificación del péptido de cadena larga comprende, además, la etapa 2) de conversión en la sal:

etapa 2): utilizar la columna cromatográfica aguas arriba en la etapa 1) para la conversión en la sal, en la que, la fase A2 es una solución acuosa de ácido acético con una proporción en volumen del 0,05 %-0,2 %; la fase B es una segunda fase orgánica y la segunda fase orgánica es acetonitrilo; y la longitud de onda de detección de la etapa 2) es 230 nm; la etapa 2) comprende: cargar el producto del pico objetivo obtenido en la etapa 1) y lavar el producto del pico objetivo con el 95 % de fase A2 y el 5 % de fase B durante 15-30 minutos para una desalinización; a continuación, realizar una segunda elución en gradiente durante 10-30 minutos para la conversión en la sal para recoger un producto objetivo; % de fase A2: 95 %-55 %, % de fase B: 5 %-45 %.

en el que el polipéptido de cadena larga es ularitida.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que en la etapa 1), el relleno en la columna cromatográfica aguas arriba es el relleno de gel de sílice C18 que tiene un tamaño de partícula de 10 μ m, y la longitud de la columna cromatográfica aguas arriba es de 10-15 cm; y el relleno en la columna cromatográfica aguas abajo es el relleno de gel de sílice C18 que tiene un tamaño de partícula de 5 μ m, y la longitud de la columna cromatográfica aguas abajo es de 10-15 cm.

3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa 1) comprende la primera elución en gradiente: % de fase A1: 85 %-65 %, % de fase B: 15 %-55 %, y el tiempo de elución es de 50-70 min.

4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la dilución en tiempo real es la siguiente: antes de que el producto del pico objetivo entre en la columna cromatográfica aguas abajo, se introduce el 10 % de agua purificada a través de la bomba cromatográfica para reducir la proporción de la primera fase orgánica.

5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el valor de pH de la fase A1 es de 2,2-2,8.

6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la fase A2 es una solución de acetato amónico con una proporción en volumen del 0,1 %-0,4 %.

7. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que en la etapa 2), la desalinización se realiza con el 95 % de fase A2 y el 5 % de fase B durante 15-30 minutos.

8. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que en la etapa 2), la segunda elución en gradiente se realiza durante 10-30 minutos para la conversión en la sal para recoger el producto objetivo; el % de fase A2: 85 %-65 %, el % de fase B: 15 %-35 %.

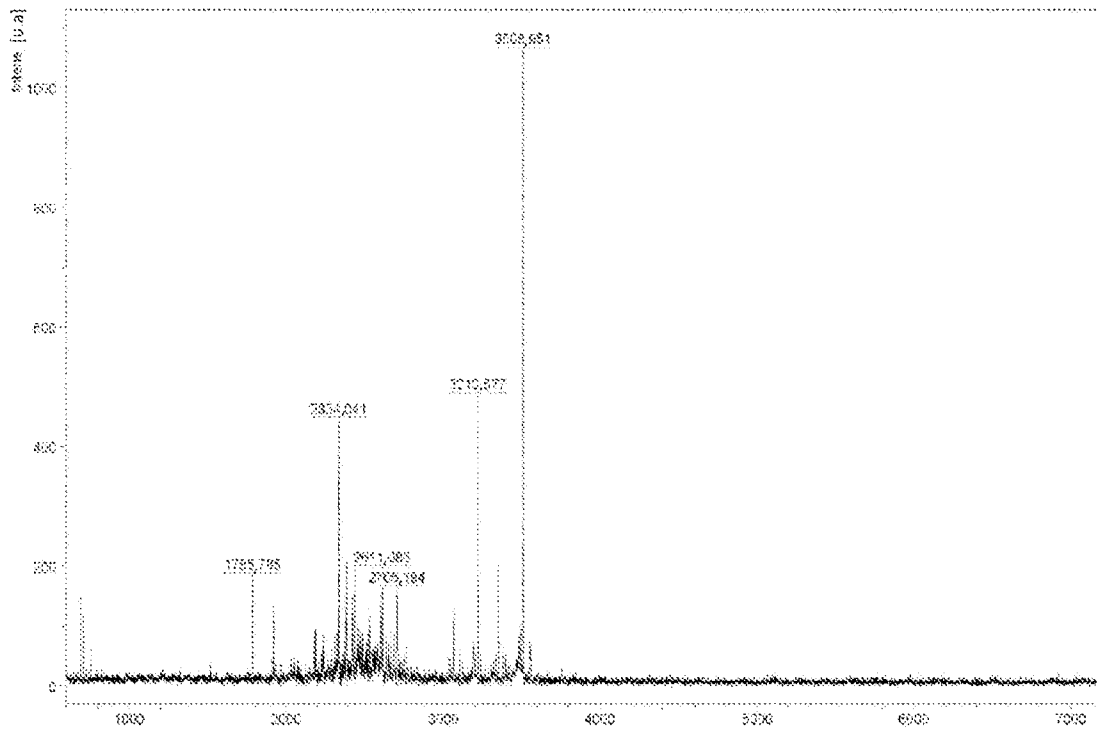


FIG. 1

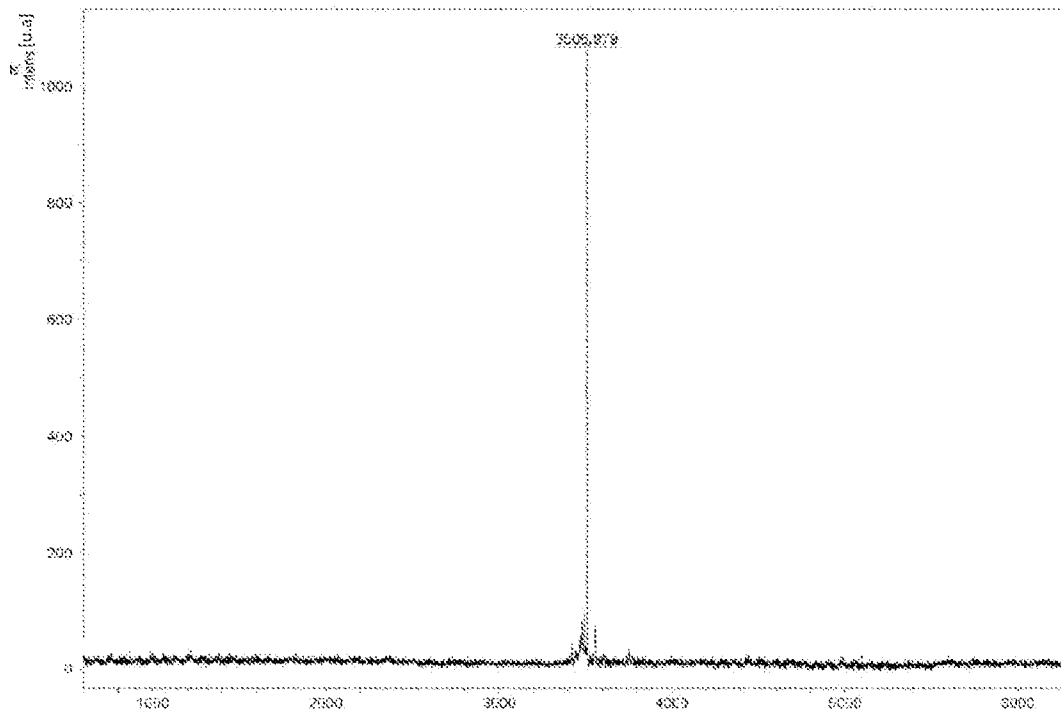


FIG. 2

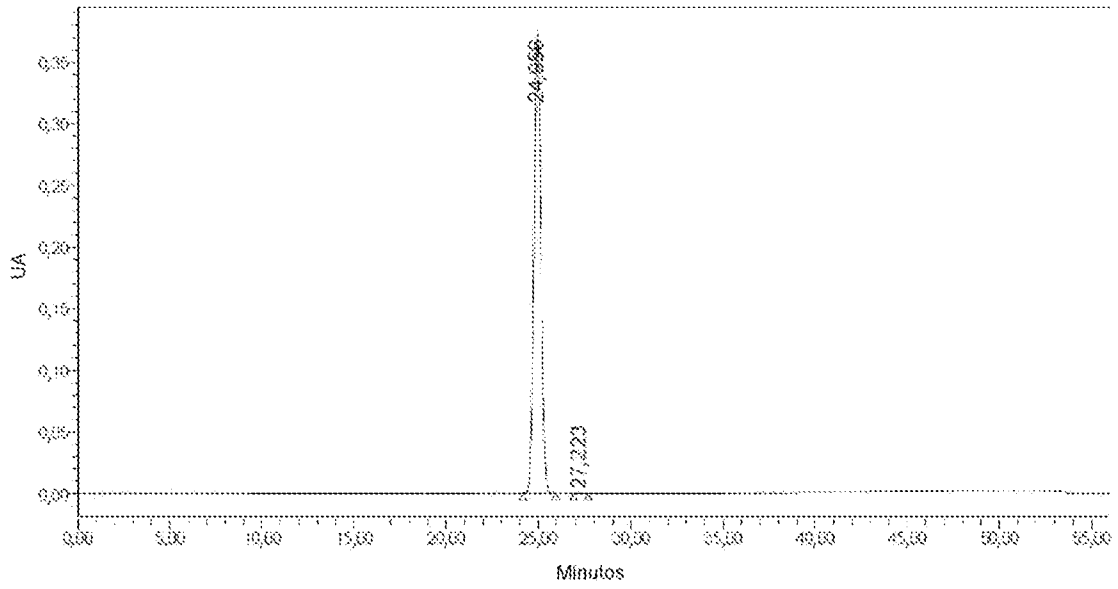


FIG. 3

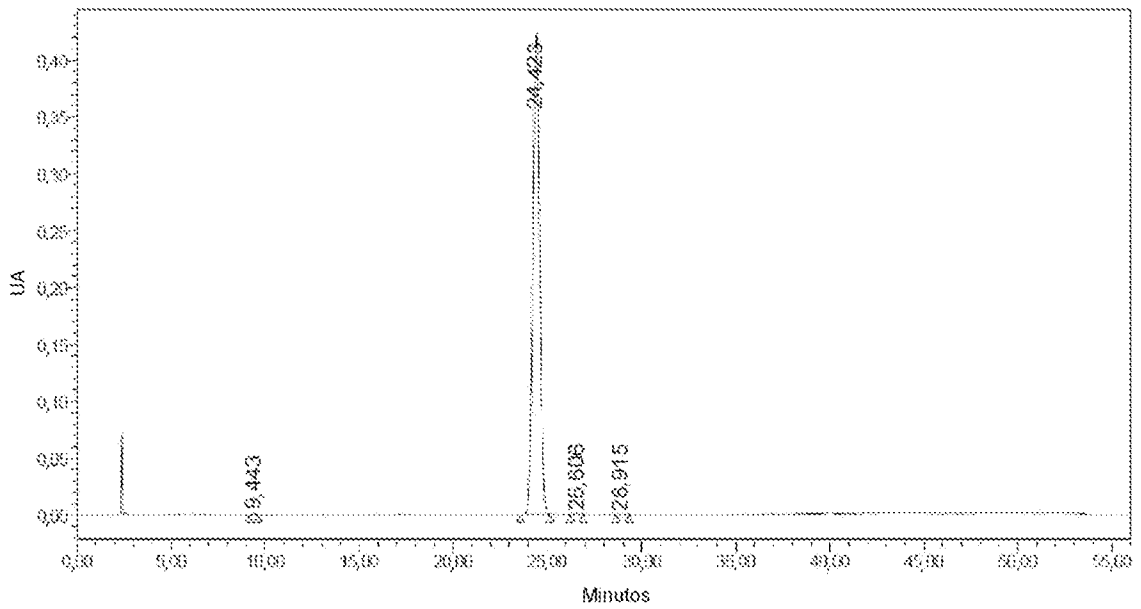


FIG. 4

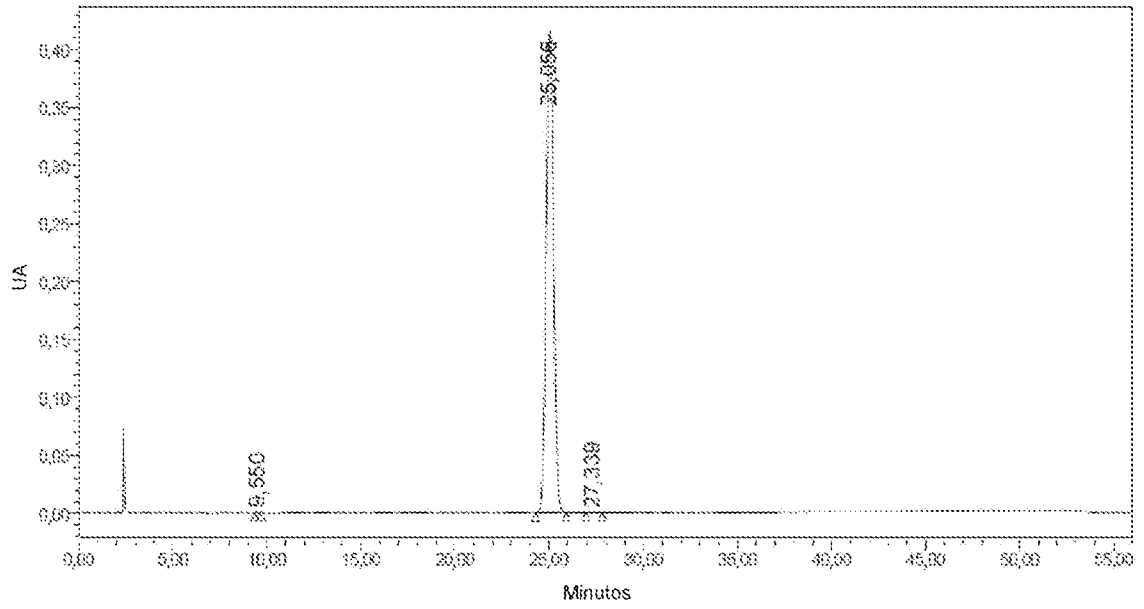


FIG. 5

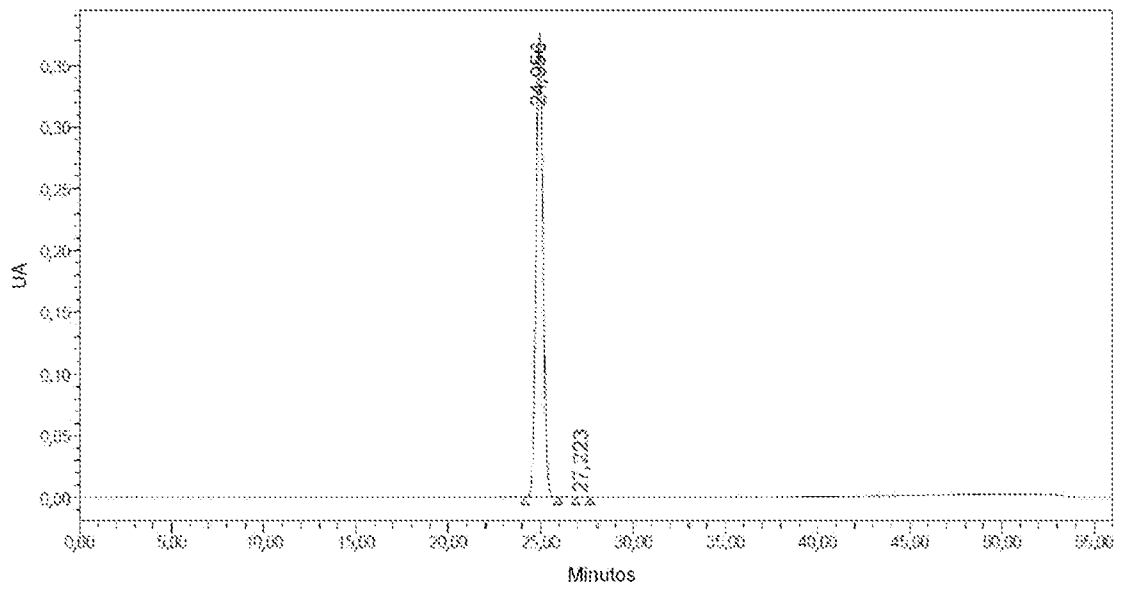


FIG. 6

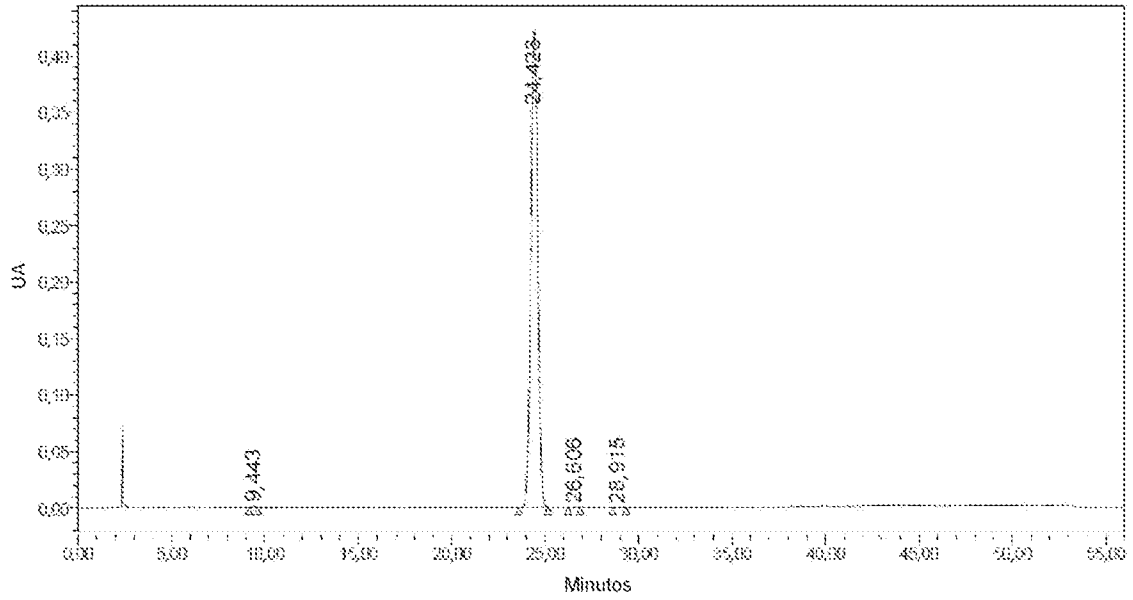


FIG. 7

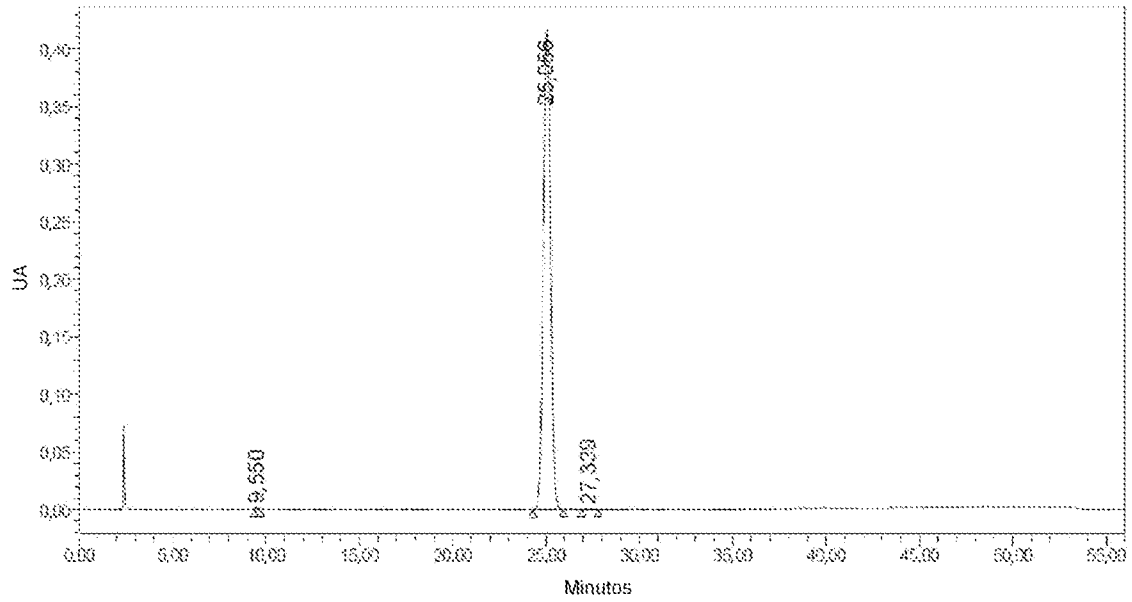


FIG. 8

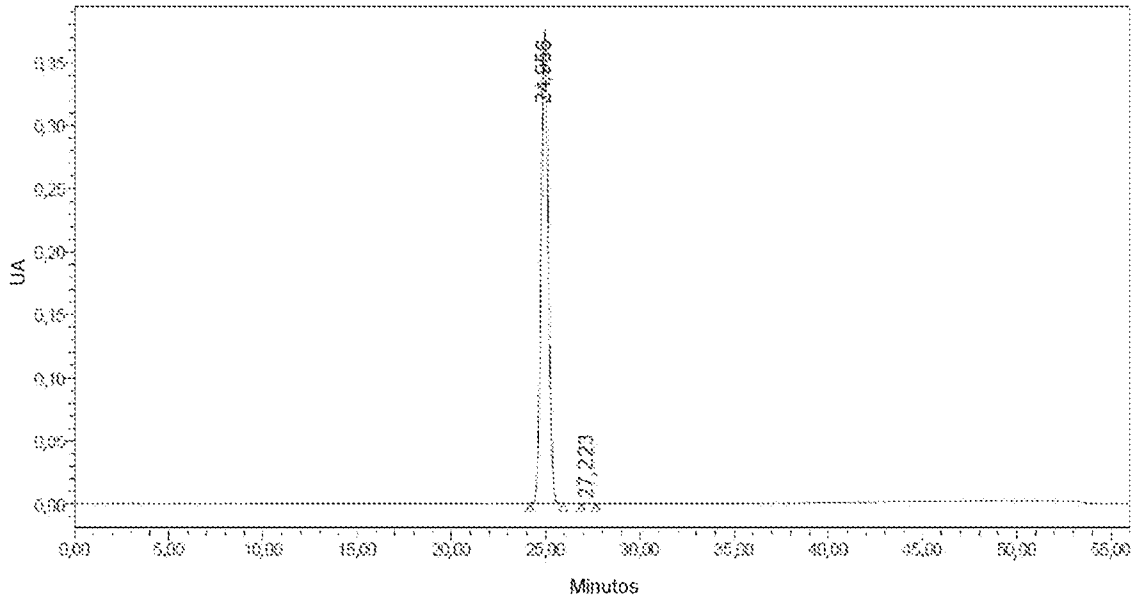


FIG. 9

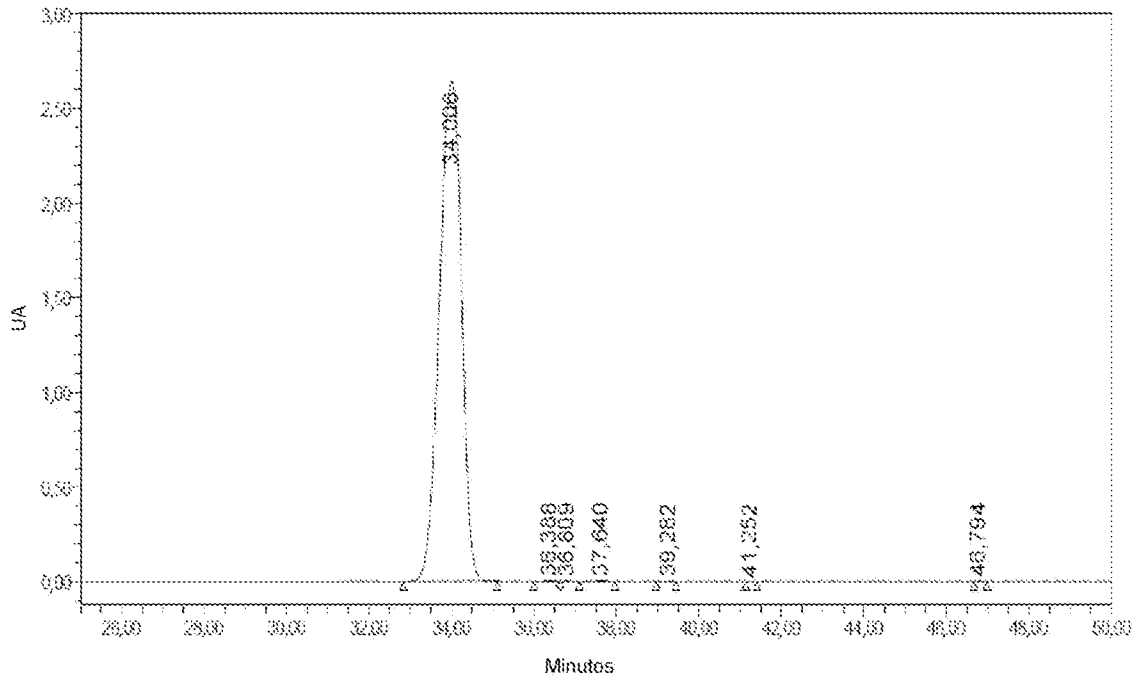


FIG. 10

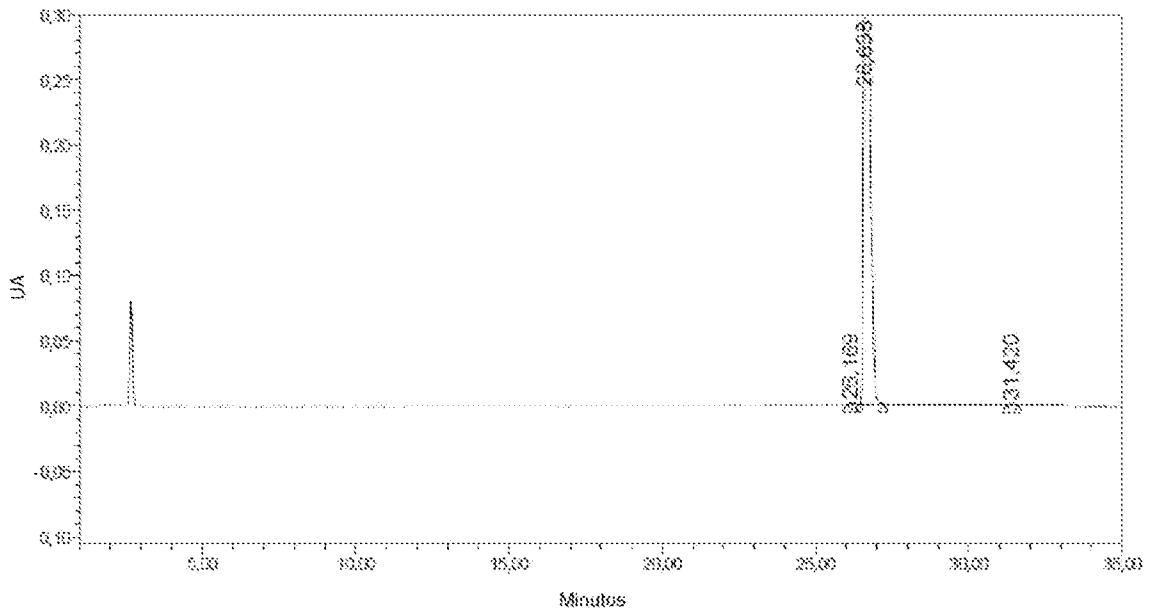


FIG. 11