

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7601795号

(P7601795)

(45)発行日 令和6年12月17日(2024.12.17)

(24)登録日 令和6年12月9日(2024.12.9)

(51)国際特許分類

C 0 7 K 1/20 (2006.01)

C 0 7 K 14/575 (2006.01)

F I

C 0 7 K 1/20

C 0 7 K 14/575

Z N A

請求項の数 4 (全9頁)

(21)出願番号 特願2021-569597(P2021-569597)

(86)(22)出願日 令和2年2月5日(2020.2.5)

(65)公表番号 特表2022-539492(P2022-539492
A)

(43)公表日 令和4年9月12日(2022.9.12)

(86)国際出願番号 PCT/IB2020/050915

(87)国際公開番号 WO2020/161636

(87)国際公開日 令和2年8月13日(2020.8.13)

審査請求日 令和4年11月14日(2022.11.14)

(31)優先権主張番号 201941004693

(32)優先日 平成31年2月6日(2019.2.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関
インド(IN)

前置審査

(73)特許権者 506292941

バイオコン・リミテッド

BIOCON LIMITED

インド国、バンガロア 560100、

カルナータカ、エレクトロニック・シティ

、トゥエンティース・ケイエム・ホス
ル・ロード

20th KM, Hosur Road,

Electronic City, Ka

rnataka Bangalore 5

60100, India

(74)代理人 110003971

弁理士法人葛和国際特許事務所

(72)発明者 バティル, ニティン ソパンラオ

インド共和国 560034 カルナータ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 GLP - 1 類似体の精製

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

粗リラグルチドを精製するための方法であって、以下：

- a . 水性酸性溶液およびアセトニトリルを含む混合物中に粗リラグルチドを溶解することによって粗リラグルチドの溶液を得ること；
- b . 移動相 A として水性酸性溶液およびイオンペアリング剤、移動相 B としてアルコールを含有するアセトニトリルを使用して、粗リラグルチドの溶液を第 1 の H P L C 精製に付すこと；
- c . 第 1 の H P L C 精製からのリラグルチドを第 2 の H P L C 精製に付すこと；および
- d . 精製されたリラグルチドを単離すること
- を含み、イオンペアリング剤が、アルカンスルホン酸の塩である、前記方法。

【請求項 2】

アルカンスルホン酸の塩が、1 - オクタンスルホン酸ナトリウム塩および 1 - ヘプタン
スルホン酸ナトリウム塩からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

アルカンスルホン酸の塩が、1 - ヘキサンスルホン酸ナトリウム塩である、請求項 1 に
記載の方法。

【請求項 4】

水性酸性溶液が、選択されたクエン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、またはギ酸である、
請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願：

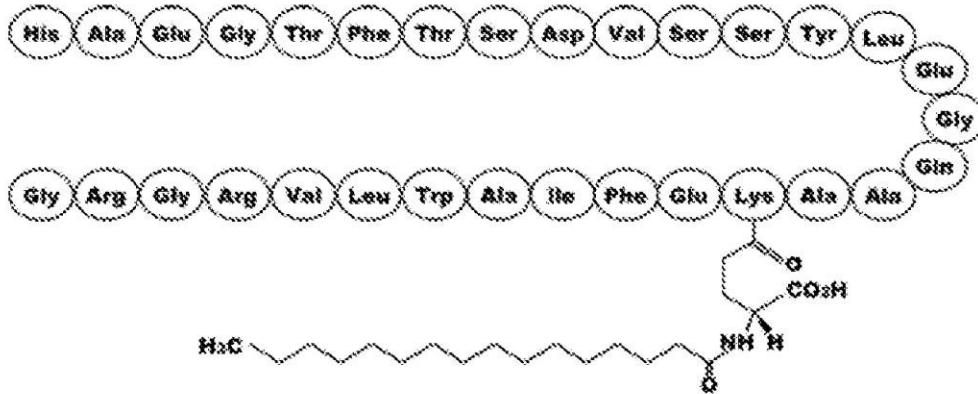
本出願は、本明細書に参照によって組み込まれる、2019年2月6日に出願された、我々のインド特許出願第201941004693号の優先権の利益を主張する。

【0002】

本発明は、とりわけ式-Iによって表される、粗GLP-1類似体、リラグルチド(Liraglutide)を精製するための方法に関する。

式-I

【化1】



式1

【背景技術】

【0003】

本開示の背景および先行技術

リラグルチド(VICTOZA(登録商標))は、2型糖尿病を伴う成人の血糖制御を改善するための食事および運動の補助剤として用いられるグルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)受容体アゴニストである。

【0004】

リラグルチドは、位置34のリシンがアルギニンによって置き換えられ、そして、パルミトイル基がグルタモイルスパーサーを介してリシンに位置26で付着している、天然に存在するヒトグルカゴン様ペプチド-1(GLP-1(7-37))の長時間作用型類似体である。

Novo Nordiskによって開発されたリラグルチド(VICTOZA(登録商標))は、皮下注射として2010年に米国において最初の承認を得た。

リラグルチドは、パルミトイル基に起因するその長いペプチド鎖および高い疎水性に起因して、精製することが高度に困難である。

リラグルチドを含むGLP-1類似体の精製のための複数の試みが過去に報告されている。

【0005】

Journal of Medicinal Chemistry 43, 1664-1669, 2000は、シアノプロピルカラム(Zorbax 300SB-CN)および標準アセトニトリル/TFAシステムを使用する逆相-高速液体クロマトグラフィー(RP HPLC)によるリラグルチドの精製プロセスを開示する。

上に開示された方法は、35%の減少した精製収率を結果としてもたらす。WO2013117135は、イソプロピルアルコール/TFAシステムを使用するRP HPLCによるリラグルチドの精製プロセスを開示する。

開示された方法には、面倒なプロセスである R P H P L C 操作を関与させた複数の精製ステップが関与する。

【 0 0 0 6 】

G L P - 1 ペプチドは、合成によってまたは組み換えアプローチによってのいずれかで生成され、しばしば、R P - H P L C 上で分離するのが困難である密接に関連した不純物 (closely related impurities) を有する。これらの不純物は、親分子と類似の特徴を有する、異性体または欠失 / 添加ベースの不純物である。これらの密接に関連した不純物は、精製の課題を提起する。

【 0 0 0 7 】

R P - H P L C の使用は、p K a 値における大きいバリエーションを伴う構成要素を有する複合体混合物の分離および同定については限定されることが周知である。よって、不純物を厳密に溶出させる分解能は、クロマトグラフィーの精製において常に難題であった。従来の H P L C 方法を伴う有機イオンの分解能において、イオン対試薬の使用は、溶離液比率を変更するかまたは固定相を変えることなどの一般的な改善策が失敗するとき、ピーク形状および保持時間を増強することができる。この技法は、しばしば、イオン対クロマトグラフィー (I P C) と称される。

10

【 0 0 0 8 】

I P C は、帯電アナライトを伴うイオン対の形成を推進するためにイオン対試薬が移動相に加えられる R P - H P L C のタイプであり、それはイオン性分子の分離のために好適な逆相カラムを形成する。保持 / 分離は、逆相およびイオン対 - イオン交換機構の動的な組み合わせに続く。

20

【 0 0 0 9 】

イオン対試薬は、長い直鎖アルキル鎖 (C 3 から C 1 6 まで)、および、R P 相のアルキル鎖 (C 8 または C 1 8) に可逆的に吸着して動的なイオン交換体を形成することができるイオン性基を含んでなり、イオン性化合物は、そこで分離されることができる。イオン対試薬には 2 つの主なタイプ、塩基性化合物のためのアニオン性アルキルスルホナートおよび酸性化合物のためのカチオン性第四級アミンがある。I P C において一般的に用いられるアルキルスルホナートは、1 - ヘキサンスルホン酸ナトリウム塩、1 - ヘプタンスルホン酸ナトリウム塩、1 - オクタンスルホン酸ナトリウム塩などである。システムの選択性は、移動相における前者のイオン対の選択および量に強く依存する。長い鎖長を伴う試薬は、R P 相上へ大幅によりよく吸着され、保持に肯定的な影響を及ぼす。

30

【 0 0 1 0 】

これらの密接に関連した不純物からのリラグルチドの分離は、R P - H P L C 上で、イオンペアリング剤、すなわち 1 - オクタンスルホン酸、ヘキサンスルホン酸のナトリウム塩の不在下および存在下で研究された。密接に関連した不純物の分解能が、イオンペアリング剤が使用されない精製実行と比較して、全体的により良好な純度に、結果としてなるイオンペアリング剤の存在下においてより有効であったことが観察された。

【 0 0 1 1 】

本発明は、イオンペアリング剤、すなわちプロパンスルホン酸、ブタンスルホン酸、ペンタンスルホン酸、ヘキサンスルホン酸、ヘプタンスルホン酸、オクタンスルホン酸、ノナンスルホン酸、デカンスルホン酸、ウンデカンスルホン酸、ドデカンスルホン酸、トリデカンスルホン酸のナトリウム塩の不在下および存在下で、R P - H P L C 上で研究された、これらの密接に関連した不純物からのリラグルチドの精製のための方法を、提供する。

40

【 0 0 1 2 】

密接に関連した不純物の分解能が、イオンペアリング剤が使用されない R P H P L C 精製と比較して、全体的により良好な純度に、結果としてなるイオンペアリング剤の存在下においてより有効であったことが観察された。

【 発明の概要 】

【 0 0 1 3 】

本出願の側面は、リラグルチドの精製のためのプロセスを提供する。

50

本発明の一側面は、粗リラグルチドを精製するための方法を開示し、該方法は、以下を含む：

- a . 水性酸性溶液およびアセトニトリルを含む混合物中に粗リラグルチドを溶解することによってリラグルチドの溶液を得ること；
 - b . 移動相 A として水性酸性溶液およびイオンペアリング剤、移動相 B としてアルコールを含有するアセトニトリルを使用して、粗リラグルチドの溶液を第 1 の H P L C 精製に付すこと；
 - c . 第 1 の H P L C 精製からのリラグルチドを第 2 の H P L C 精製に付すこと；
- および
- d . 精製されたリラグルチドを単離すること。

10

本発明の別の側面は、粗リラグルチドを精製するための方法を開示し、ここで、イオンペアリング剤は、アルカンスルホン酸の塩から選択される。

【 0 0 1 4 】

本発明の別の側面は、粗リラグルチドを精製するための方法を開示し、ここで、アルカンスルホン酸の塩は、1 - オクタンスルホン酸ナトリウム塩または 1 - ヘプタンスルホン酸ナトリウム塩からなる群から、選択される。

本発明の別の側面は、粗リラグルチドを精製するための方法を開示し、ここで、アルカンスルホン酸の塩は、1 - ヘキサンスルホン酸ナトリウム塩である。

本発明の別の側面は、粗リラグルチドを精製するための方法を開示し、ここで、水性酸性溶液は、選択されたクエン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、またはギ酸である。

20

本発明の別の側面は、イオンペアリング剤を使用した H P L C によって粗リラグルチドを精製するための方法を開示する。

機器のパラメーター：

H P L C 機器パラメーター：

カラム : C 8、1 5 0 × 4 . 6 m m、2 . 7 μ m

カラム温度 : 6 0

検出 : U V

波長 : 2 1 5 n m

【 0 0 1 5 】

本発明の利点：

30

粗リラグルチド粉末（アッセイ 2 0 ~ 2 5 % ；純度 3 0 ~ 5 0 % ）が、それぞれ異なる条件の下での 2 つの連続した R P - H P L C 精製ステップに付され、続いて、凍結乾燥によって純粋なリラグルチドが産生される。本発明には、密接に関連した不純物から粗リラグルチドを精製するために、R P - H P L C ステップの 1 つにおいて、選択的イオンペアリング剤を使用することが関与する。プロセスにおけるイオンペアリング剤の不在は、関連した不純物の分解能が全くないかまたは劣るという結果をもたらし、最終的な A P I 中の不純物につながる。

【 0 0 1 6 】

イオンペアリング剤としてのオクタン - 1 - スルホン酸を伴わないおよび伴うリラグルチド純度プロファイルの比較：

40

下表は、イオンペアリング剤としてのオクタン - 1 - スルホン酸の使用を伴わないおよび伴う、R R T の 0 . 9 3、0 . 9 8、および 1 . 0 6 で存在する、密接に関連する不純物に関して、リラグルチド純度プロファイルの比較を提供する。

【 0 0 1 7 】

50

【表 1】

ステージ	イオンペアリング 剤	面積 (%)			
		0.93 RRT	0.98 RRT	リラグル チド	1.06 RRT
RP-HPLC-1 精製	イオンペアリング 剤なし	0.84	0.31	92.55	0.4
	オクタン-1-ス ルホン酸ナトリウ ム塩 (OSA)	0.02	0.08	94.64	0

10

【図面の簡単な説明】

【0018】

開示が容易に理解されることができ、実質的に実行に移されることができ、参照は、添付の図に図示されるように、ここで、例示的实施形態とされる。以下の詳細な説明を伴う図は、中に組み込まれて、明細書の部分を形成し、更に実施形態を図示し、種々の原理および利点を説明するのに役立つ、ここで本開示に従って：

【図 1】図 1 は、式 I の粗リラグルチドの HPLC パターンを図示する。

【図 2】図 2 は、OSA の使用を伴わない精製の後、式 I のリラグルチドの HPLC パターンを図示する。

【図 3】図 3 は、OSA の使用を伴う精製の後、式 I のリラグルチドの HPLC パターンを図示する。

【図 4】図 4 は、HSA の使用を伴う精製の後、式 I のリラグルチドの HPLC パターンを図示する。

【発明を実施するための形態】

【0019】

発明の詳細な説明

本発明の態様は、以後具体的な例を使用して、本願明細書において更に記載される。該例は、発明の一定の実施形態のより良い理解のために提供され、そして、いかなる方法においても、それらの範囲を限定しない。本願の記載の教示および本発明の技術分野の一般的な技術を用いる当業者にとって明らかな、可能な変更および等価物も、この明細書の部分を形成し、その範囲内に含まれることが意図される。

【0020】

例：

例 1：

固相合成から得た粗リラグルチドの 275.5 mg を、10% のアセトニトリル (v/v) を含有する 250 mM のクエン酸一水和物中に溶解し、ろ過して、ツーステップ RP-HPLC 精製に付した。

【0021】

RP-HPLC-1：

粗リラグルチド溶液を、0.05% w/v オクタン-1-スルホン酸ナトリウム塩 (移動相 A)、25% アセトニトリル：イソプロパノール (7：3) (移動相 B) pH 2.0 を含有する 100 mM クエン酸の約 60 ml と平衡化した C8-置換シリカカラム (粒子サイズ 10~13 μm) の 20 ml 上へ装填した。装填後、カラムを、8：2 の緩衝液 A：緩衝液 B によって洗浄した。

【0022】

生成物を、最大 60% B までのグラディエントを適用することによって、溶出させた。検出波長を、215 nm に保った。クロマトグラフィーの温度は、25 に保った。> 9

20

30

40

50

1%の純度を伴う画分をプールし、そして、RP-1での平均プール純度は、0.50%未満の密接に関連した不純物を伴い、>95%であった。

RP-HPLC-1からのリラグルチド生成物は、さらにRP-HPLC-2に用いられた。

【0023】

例2：

固相合成から得た粗リラグルチドの275.5mgを、10%のアセトニトリル(v/v)を含有する250mMのクエン酸一水和物中に溶解し、ろ過して、ツーステップRP-HPLC精製に付した。

【0024】

RP-HPLC-1：

粗リラグルチド溶液を、0.05%1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム塩(移動相A)、25%アセトニトリル：イソプロパノール(7：3)(移動相B)pH2.0を含有する100mMクエン酸の約60mlと平衡化したC8-置換シリカカラム(粒子サイズ10~13µm)の20ml上へ装填した。

【0025】

装填後、カラムを、8：2の緩衝液A：緩衝液Bによって洗浄した。生成物を、最大60%までのグラディエントを適用することによって、溶出させた。検出波長を、215nmに保った。クロマトグラフィーの温度は、25に保った。

画分を収集し、純度に関して分析した。>91%の純度を伴う画分を、プールした。

RP-HPLC-1精製されたリラグルチドHPLCクロマトグラムは、図4に示すとおりである。

RP-HPLC-1精製されたリラグルチドのHPLC純度は、2.0%未満の密接に関連した不純物を伴い、>95%であった。

【0026】

これらのプールのpHを、7.8まで調整し、35で蒸留して、有機溶媒を取り除いた。沈殿をpH-4.9でさせ、そして、RP-HPLC-1精製されたリラグルチドを単離した。

RP-HPLC-1からのリラグルチド生成物は、さらにRP-HPLC-2に用いられた。

【0027】

例3：

固相合成から得た粗リラグルチドの275.5mgを、10%のアセトニトリル(v/v)を含有する250mMのクエン酸一水和物中に溶解し、ろ過して、ツーステップRP-HPLC精製に付した。

【0028】

RP-HPLC-1：

粗リラグルチド溶液を、100mMクエン酸(移動相A)、25%アセトニトリル：イソプロパノール(7：3)(移動相B)pH2.0の約60mlと平衡化したC8-置換シリカカラム(粒子サイズ10~13µm)の20ml上へ装填した。装填後、カラムを、8：2の緩衝液A：緩衝液Bによって洗浄した。生成物を、最大60%Bまでのグラディエントを適用することによって、溶出させた。検出波長を、215nmに保った。クロマトグラフィーの温度は、25に保った。画分を収集し、純度に関して分析した。>91%の純度を伴う画分を、プールした。

RP-HPLC-1精製されたリラグルチドのHPLC純度は、2.0%未満の密接に関連した不純物を伴い、>95%であった。

RP-HPLC-1精製されたリラグルチドHPLCクロマトグラムは、図2に示すとおりである。

RP-HPLC-1からのリラグルチド生成物は、さらにRP-HPLC-2に用いられた。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

例 4 :

固相合成から得た粗リラグルチドの 32.6 g を、10%のアセトニトリル (v/v) を含有する 250 mM のクエン酸一水和物中に溶解し、ろ過して、ツーステップ RP-HPLC 精製に付した。

【 0 0 3 0 】

RP-HPLC - 1 :

粗リラグルチド溶液を、0.05% オクタン - 1 - スルホン酸ナトリウム塩 (移動相 A)、25% アセトニトリル : イソプロパノール (7 : 3) (移動相 B) pH 2.0 を含有する 100 mM クエン酸の約 7.2 L と平衡化した C8 - 置換シリカカラム (粒子サイズ 10 ~ 13 μm) の 2.4 L 上へ装填した。装填後、カラムを、8 : 2 の緩衝液 A : 緩衝液 B によって洗浄した。生成物を、最大 60% B までのグラディエントを適用することによって、溶出させた。検出波長を、215 nm に保った。クロマトグラフィーの温度は、25 に保った。画分を収集し、純度に関して分析した。> 91% の純度を伴う画分を、プールした。

10

RP-HPLC - 1 精製されたリラグルチド HPLC クロマトグラムは、図 3 に示すとおりである。

RP-HPLC - 1 精製されたリラグルチドの HPLC 純度は、0.50% 未満の密接に関連した不純物を伴い、> 94% であった。

【 0 0 3 1 】

20

これらのプールの pH を、7.8 まで調整し、35 で蒸留して、有機溶媒を取り除いた。沈殿を pH - 4.9 でさせ、そして、RP-HPLC - 1 精製されたリラグルチドを単離した。

RP-HPLC - 1 からのリラグルチド生成物は、さらに RP-HPLC - 2 に用いられた。

【 0 0 3 2 】

RP-HPLC - 2 :

3 mg/ml で 25% メタノールを含有する 50 mM のリン酸水素二ナトリウム中に溶解した RP-HPLC - 1 精製リラグルチドの 3.1 L を、5% アセトニトリルを含有する 50 mM ナトリウムホスファート緩衝液 pH 7.5 の約 7.2 L によって平衡化した C8 - 置換シリカカラム (粒子サイズ 10 ~ 13 μm) の 2.4 L 上に装填した。生成物を、最大 41% B までのグラディエントを適用することによって、溶出させた。検出波長を、215 nm に保った。

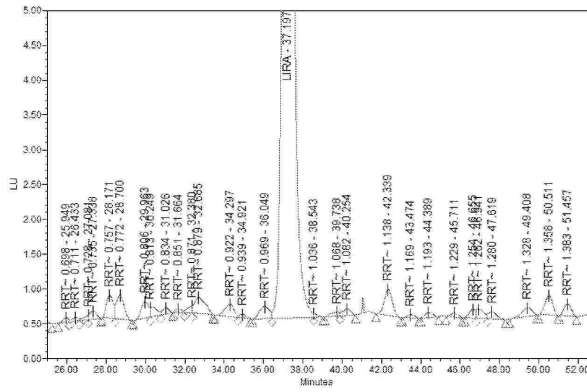
30

【 0 0 3 3 】

クロマトグラフィーの温度は、25 に保った。個々の画分を、収集して、純度に関して分析した。> 98.0% の純度を伴う画分をプールして、35 で蒸留し、有機溶媒を取り除いた。沈殿を、pH 4.9 で行った。精製したリラグルチドを、凍結乾燥に付した。凍結乾燥粉末の HPLC 純度は、0.20% を超える不純物を伴わず、> 99% であった。

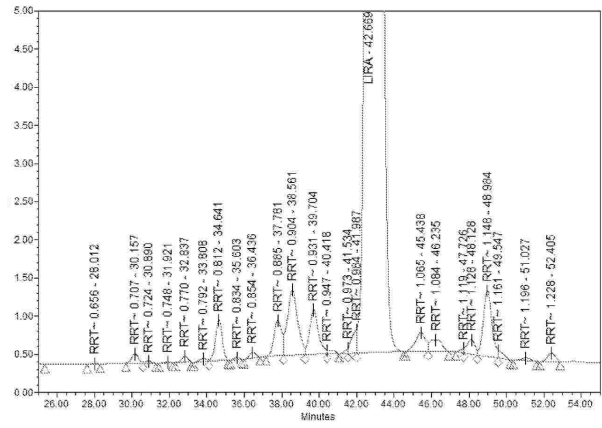
40

【 面 】
【 1 】



1

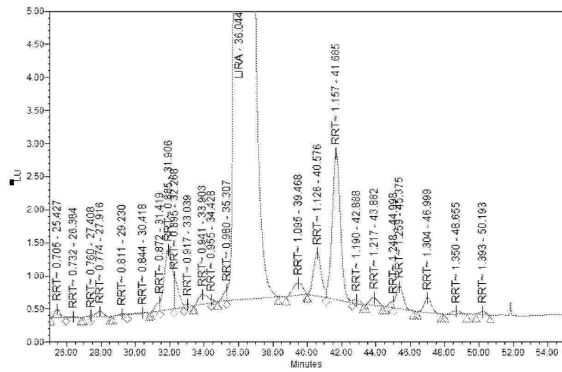
【 2 】



2

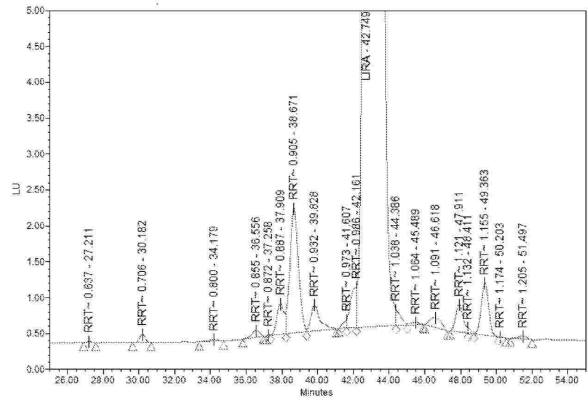
10

【 3 】



3

【 4 】



4

20

30

40

50

フロントページの続き

- カ州、バンガロア、サード ブロック、コラマンガラ、サージャプール ロード 53、フロリアナ
エステイト、211ビー
- (72)発明者 ガネシュ, ラマチャンドラン
インド共和国 560076 カルナータカ州、バンガロア、バンネルガッタ ロード、ビレカハリ
、ランカ コロニー、322 ビー
- (72)発明者 サントン, オンカー プラカシュ
インド共和国 560100 カルナータカ州、バンガロア、フェーズ - 1、エレクトロニク シテ
ィ、ファースト クロス ニーラドリ ロード、アジュメラ ストーン パーク、ジェイ 503
- (72)発明者 ランベ, アビジート アルン
インド共和国 416122 マハーラーシュトラ州、ディスト . - コールハーブル、ランベ レー
ン、エー / ビー - ナガオン タル - ハットカナンダ
- (72)発明者 バスティコッパ, クルティ サティシュ
インド共和国 577226 カルナータカ州、シモガ (ディスト)、サータハリ (タルク)、クー
ドゥーバリ、バスティコッパ、ナンバー 07
- (72)発明者 シンデュアムタン, カティラヴァン
インド共和国 626004 タミル ナドゥ州、ヴィルドゥナガル、パラヴァナタム、カマラジ
ャル ストリート、202
- 審査官 西 賢二
- (56)参考文献 国際公開第 2018 / 104922 (WO, A1)
特表 2013 - 501773 (JP, A)
高松亨 ほか, "イオン対クロマトグラフィーの基礎的検討", 東洋曹達研究報告, 1980年,
Vol. 24, pp. 23-32
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C07K 1/00 - 19/00
CAplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)