

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 660**

51 Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)

C07K 1/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2017** **PCT/SE2017/000008**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2017** **WO17138855**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2017** **E 17750508 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023** **EP 3414257**

54 Título: **Método para preparación de liraglutida usando un grupo de unión de BAL**

30 Prioridad:

11.02.2016 EP 16155165

11.02.2016 US 201662293830 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2023

73 Titular/es:

POLYPEPTIDE LABORATORIES HOLDING (PPL)

AB (100.0%)

PO Box 30089

200 61 Limhamn, SE

72 Inventor/es:

CARBAJO LOPEZ, DANIEL y

ALBERICIO PALOMERA, FERNANDO

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 954 660 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).

5 Campo de la invención

10

Liraqlutida tiene el número de CAS 204656-20-2 y es un compuesto de fórmula (3).



20

25

30

35

40

45

50

Existe una necesidad de un método para la preparación de liraglutida con altos rendimientos y que no tenga la desventaja de producir subproductos mediante dicha diacilación.

Se encontró un método que usa BAL e incorpora el residuo de palmitoil-Glu-OtBu en la Lys⁽²⁰⁾ durante la SPPS y en resina mientras que el NH₂ N-terminal todavía está protegido. Si se introducía en un precursor de liraglutida completamente desprotegido que aún no tenía el residuo de palmitoil-Glu-OtBu, un método que puede derivarse a partir de la divulgación del documento WO 00/55119 A1, entonces en primer lugar se necesita proteger de manera selectiva el NH₂ N-terminal antes de poder introducir el residuo de palmitoil-Glu-OtBu en la Lys⁽²⁰⁾ con el fin de evitar la diacilación. Esta protección selectiva requerida es una dificultad adicional, una fuente adicional de impurezas e introduce etapas adicionales en la síntesis de liraglutida.

Otra ventaja del método es que el residuo de palmitoil-Glu-OtBu puede introducirse con un buen rendimiento y con pocas reacciones secundarias introduciéndolo después del acoplamiento de Ala⁽¹⁸⁾ o después del acoplamiento de Ala⁽¹⁹⁾, de ese modo no se forma nada, o sólo se forman bajas cantidades, de subproductos, que será necesario separar. El método proporciona altos rendimientos y perfiles de bajas impurezas.

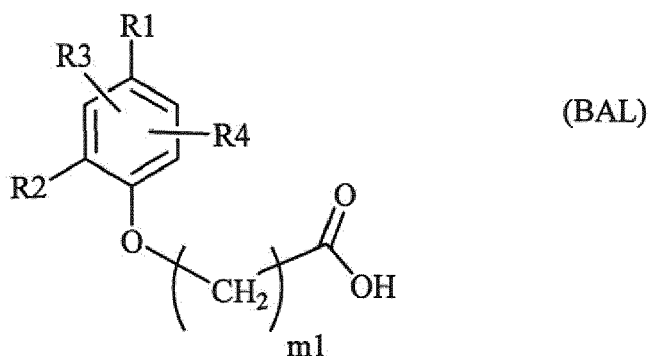
En esta memoria descriptiva se usan las siguientes abreviaturas:

AA	aminoácido;
Acm	acetamidometilo;
ACN	acetonitrilo;
Alloc	grupo protector aliloxycarbonilo;
BAL	grupo de unión de amida de estructura principal, también denominado grupo de unión de BAL;
Boc	grupo protector terc-butoxicarbonilo;
acoplamiento	también denominado reacción de acoplamiento;
DCM	diclorometano;
DIC	diisopropilcarbodiimida;
DIPCDI	diisopropilcarbodiimida;
DMF	dimetilformamida;
Dnp	dinitrofenilo;
eq	equivalentes;
Fmoc	grupo protector 9-fluorenilmetoxycarbonilo;
HFIP	hexafluoroisopropanol;
MIS	1,2-dimetilindol-3-sulfonilo;
Mtr	4-metoxi-2,3,6-trimetilfenilsulfonilo;
N ⁶	N ⁶ designa el NH ₂ de la cadena lateral de Lys;
NH ₂ N-terminal	función amino N-terminal;
OxymaPure®	(hidroxiimino)cianoacetato de etilo, CAS 3849-21-6, adquirido de Luxembourg Bio Technologies;
Pal	palmitoílo;
Palm	palmitoílo;
Pbf	grupo protector 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo;
Pmc	2,5,7,8-pentametilcroman-6-sufonilo;

TA	temperatura ambiente o ambiental;
SPPS	síntesis peptídica en fase sólida;
5 tBu	grupo protector terc-butilo o tBu;
OtBu	éster terc-butilico;
TFA	ácido trifluoroacético;
10 TFE	trifluoroetanol;
TIS	triisopropilsilano;
15 Trt	tritilo;
Z	benciloxycarbonilo.

Sumario de la invención

El objeto de la invención es un método para la preparación de liraglutida con SPPS usando un grupo de unión de amida de estructura principal, BAL, para conectar la Gly⁽³¹⁾ C-terminal con la resina durante la SPPS; BAL es un compuesto de fórmula (BAL);

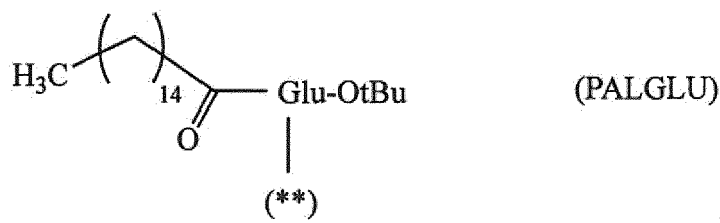


en donde

uno de los sustituyentes R1 y R2 es H y el otro es C(O)H;

m1 es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

R3 y R4 son idénticos o diferentes y son independientemente uno de otro H o metoxilo, y en donde la SPPS se realiza en una resina funcionalizada con amino AMFUNRESIN; en donde el residuo de palmitoil-Glu-OtBu en el N⁶ de la Lys⁽²⁰⁾ es el residuo de fórmula (PALGLU)



designando (**) en la fórmula (PALGLU) el enlace covalente entre el COOH de la cadena lateral del Glu y el N⁶ de la Lys⁽²⁰⁾, y el residuo de palmitoil-Glu-OtBu se une por enlace covalente a la Lys⁽²⁰⁾ en una reacción REACPALGLU, en donde se hace reaccionar el NH₂ de la cadena lateral de la Lys con un precursor del residuo de fórmula (PALGLU); y en donde REACPALGLU se realiza después del acoplamiento de Ala⁽¹⁹⁾ o después del acoplamiento de Ala⁽¹⁸⁾, y antes de la eliminación del grupo protector del NH₂ alfa de Ala⁽¹⁹⁾ o de Ala⁽¹⁸⁾ respectivamente.

Descripción detallada de la invención

Preferiblemente, m1 es 2, 3, 4, 5, 6 o 7; más preferiblemente, m1 es 3, 4, 5 o 7; incluso más preferiblemente, m1 es 3

o 4; incluso más preferiblemente, m1 es 3.

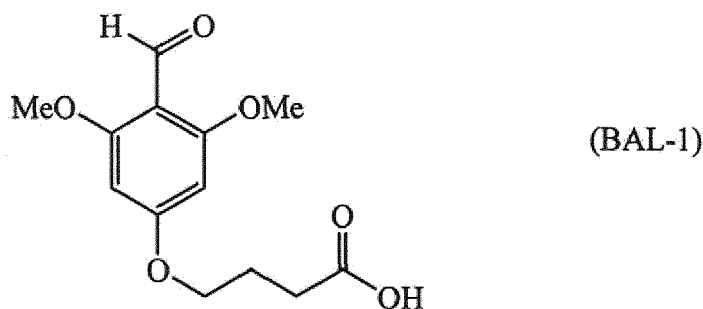
Preferiblemente, R3 y R4 están en la posición 3 y en la 5 del anillo de fenoxilo con respecto a la posición del residuo de ácido carboxílico en la posición 1 del anillo de fenoxilo.

Preferiblemente, R2 es H y R1 es C(O)H.

Más preferiblemente, R3 y R4 están en la posición 3 y en la 5 del anillo de fenoxilo con respecto a la posición del residuo de ácido carboxílico en la posición 1 del anillo de fenoxilo; y R2 es H y R1 es C(O)H.

Incluso más preferiblemente, R3 y R4 están en la posición 3 y en la 5 del anillo de fenoxilo con respecto a la posición del residuo de ácido carboxílico en la posición 1 del anillo de fenoxilo; R2 es H y R1 es C(O)H; m1 es 3.

Especialmente, BAL es un compuesto de fórmula (BAL-1) que tiene el n.º de CAS 197304-21-5.



La SPPS se realiza en una resina funcionalizada con amino AMFUNRESIN.

En principio, AMFUNRESIN puede ser cualquier resina funcionalizada con amino convencionalmente usada en SPPS, dado que, como en cualquier SPPS, la estructura de la resina y sus características (tales como sustitución, granulometría, porcentaje de reticulación y así sucesivamente) de la resina influirán únicamente en el hinchado de la resina, pero no tendrán ninguna implicación directa sobre la SPPS.

Preferiblemente, AMFUNRESIN se selecciona del grupo que consiste en resina ChemMatrix® de aminometilo, resina de aminometil-poliestireno, resina de amida Rink, resina de Sieber, resina de 4-metil-benzohidrilamina (resina de MBHA), resina de poli-Lys y resina de benzohidrilamina (resina de BHA).

Preferiblemente, AMFUNRESIN es una resina ChemMatrix® de aminometilo, resina de amida Rink o resina de Sieber.

Preferiblemente, la resina usada en la SPPS muestra una capacidad de carga de desde 0,5 hasta 2 mmol de sitios reactivos por g de resina.

Preferiblemente, BAL se conecta de manera covalente con la resina mediante un enlace de amida entre el COOH de BAL y el NH₂ de AMFUNRESIN.

Preferiblemente, Gly⁽³¹⁾ se conecta de manera covalente con BAL mediante un enlace entre el NH₂ alfa de Gly⁽³¹⁾ y el átomo de C del residuo de C(O)H de BAL.

Preferiblemente, se usa Gly⁽³¹⁾ con su COOH alfa en forma protegida, preferiblemente en forma de H-Gly-OtBu, es decir con un éster de tBu en el COOH alfa.

Preferiblemente, se prepara liraglutida mediante SPPS conectando en primer lugar de manera covalente el BAL con AMFUNRESIN. Después de eso, se conecta el NH₂ alfa de Gly⁽³¹⁾ de manera covalente con el residuo de C(O)H de BAL. Después se acoplan los otros AA mediante SPPS en la Gly⁽³¹⁾ y después en la cadena peptídica en crecimiento respectivamente.

La conexión covalente de BAL con AMFUNRESIN se realiza en una reacción REACBONBALRES; REACBONBALRES es una reacción de acoplamiento y puede realizarse con los reactivos y las condiciones tal como se describen para COUPL.

Preferiblemente, la cantidad molar de BAL usada en REACBONBALRES es desde 1 hasta 10 veces, más preferiblemente desde 1 hasta 8 veces, incluso más preferiblemente desde 2 hasta 7 veces la capacidad de carga molar de la resina.

Preferiblemente, la conexión covalente del NH₂ alfa de Gly⁽³¹⁾ con el residuo de C(O)H de BAL se realiza con una

reacción de aminación reductora, que comprende dos reacciones consecutivas, una reacción REACONBALGLY1, que es una reacción de condensación, y una reacción REACBALGLY2, que es una reducción.

Preferiblemente, REACONBALGLY1 y REACBALGLY2 se realizan en un disolvente.

Preferiblemente, REACONBALGLY1 se realiza en presencia de un ácido, el ácido es preferiblemente AcOH.

Preferiblemente, el volumen de ácido es de desde 50 hasta 250 microlitros por g de resina, más preferiblemente desde 75 hasta 150 microlitros por g de resina.

Preferiblemente, el ácido se usa en una mezcla de desde el 0,1 hasta el 10%, preferiblemente desde el 0,2 hasta el 5%, más preferiblemente desde el 0,2 hasta el 3%, de ácido con el disolvente, los % son % en volumen y se basan en el volumen total de la mezcla de ácido y disolvente.

REACBALGLY2 se realiza preferiblemente con un agente reductor, el agente reductor es preferiblemente NaBH_3CN .

Preferiblemente, la cantidad molar de agente reductor es desde 1 hasta 20 veces, más preferiblemente desde 1 hasta 15 veces la capacidad de carga molar de la resina.

Preferiblemente, el agente reductor se usa en una mezcla de desde el 0,1 hasta el 10%, preferiblemente desde el 0,2 hasta el 5%, más preferiblemente desde el 0,2 hasta el 3%, de agente reductor con un disolvente, los % son % en volumen y se basan en el volumen total de la mezcla de agente reductor y disolvente.

El disolvente para las dos reacciones y para el agente reductor puede ser cualquier disolvente que sea inerte frente al agente reductor usado en la reducción, preferiblemente, el disolvente es DMF, MeOH, THF, MetF, NMP o una mezcla de los mismos; más preferiblemente DMF, MeOH o una mezcla de los mismos.

Preferiblemente, REACONBALGLY1 y REACBALGLY2 se realizan a presión atmosférica.

Preferiblemente, la temperatura de reacción de REACONBALGLY1 y de REACBALGLY2 respectivamente es de desde -20 hasta 70°C; más preferiblemente desde -15 hasta 40°C, incluso más preferiblemente desde -15 hasta 35°C.

Preferiblemente, el tiempo de reacción de REACONBALGLY1 y de REACBALGLY2 respectivamente es de desde 10 min hasta 48 h, más preferiblemente desde 10 min hasta 24 h, incluso más preferiblemente desde 10 min hasta 12 h.

Preferiblemente, el método comprende dos etapas, una etapa ETAPA1 y una etapa ETAPA2; ETAPA1 comprende la SPPS usando un grupo de unión de amida de estructura principal, BAL; ETAPA1 proporciona liraglutida conectada a la resina de la SPPS; ETAPA2 comprende la escisión de liraglutida a partir de la resina.

Preferiblemente, los AA que pueden protegerse en la cadena lateral se usan en una forma con cadena lateral protegida en la SPPS.

Preferiblemente, ETAPA1 proporciona una liraglutida protegida conectada a la resina de la SPPS.

Preferiblemente, ETAPA2 comprende la desprotección de la liraglutida protegida.

Preferiblemente, ETAPA2 proporciona liraglutida.

Preferiblemente, la protección de cadena lateral se realiza en forma de grupos de protección de cadena lateral que no pueden escindirse en condiciones débilmente ácidas, siendo las condiciones débilmente ácidas tal como se describen en el presente documento.

Preferiblemente, protección de cadena lateral de Cys es Trt o Acm; la de Asn y Gln es Trt; la de His es Trt o Dnp; la de Glu y Asp es OtBu; la de Thr, Ser y Tyr es tBu; la de Trp es Boc; la de Arg es Pbf, Pmc, Mtr o MIS; la de Lys es Alloc, Z o Boc.

Preferiblemente, la protección de cadena lateral se realiza en forma de grupos de protección de cadena lateral que pueden escindirse en condiciones fuertemente ácidas, siendo las condiciones fuertemente ácidas tal como se describen en el presente documento; más preferiblemente excepto por Lys, en donde la protección de cadena lateral es Alloc, Z o Boc.

Más preferiblemente, la protección de cadena lateral de Cys, Asn, His y Gln es Trt; la protección de cadena lateral de Glu y Asp es OtBu; la protección de cadena lateral de Thr, Ser y Tyr es tBu; la protección de cadena lateral de Trp es Boc; la protección de cadena lateral de Arg es Pbf; la protección de cadena lateral de Lys es Alloc.

Preferiblemente, la SPPS se realiza mediante acoplamiento por etapas de los aminoácidos individuales, más preferiblemente excepto por la Val⁽¹⁰⁾ y la Ser⁽¹¹⁾; la Val⁽¹⁰⁾ y la Ser⁽¹¹⁾ se usan preferiblemente en la SPPS en forma de pseudoprolina Fmoc-Val-Ser[Psi^(Me,Me)Pro]-OH.

- 5 Preferiblemente, la SPPS usa estrategia de Fmoc/tBu; con Fmoc como grupo protector para el NH₂ alfa de los aminoácidos usados en la SPPS; más preferiblemente excepto por la His⁽¹⁾ N-terminal, en donde el NH₂ alfa se protege con Boc.

- 10 La escisión del péptido a partir de la resina, de cualquier grupo protector de cadena lateral, de cualquier grupo protector en el NH₂ N-terminal, de cualquier grupo protector en el COOH C-terminal, también la escisión del grupo protector tBu en el COOH alfa del Glu del residuo de palmitoil-Glu-OtBu, pueden realizarse de manera independiente o simultánea. La escisión se realiza preferiblemente en ETAPA2. Cuando la escisión se realiza simultáneamente, entonces la escisión se denomina habitualmente desprotección global.

- 15 Las condiciones de tales reacciones de escisión las conoce el experto y dependen de la naturaleza del grupo protector. Muchos grupos protectores requieren condiciones ácidas para la escisión, preferiblemente condiciones fuertemente ácidas, siendo las condiciones fuertemente ácidas tal como se definen en el presente documento, otros grupos protectores tales como Z requieren la escisión mediante hidrogenación catalítica.

- 20 Tal reacción de escisión o tales reacciones de escisión pueden realizarse, y preferiblemente se realizan, en condiciones fuertemente ácidas, más preferiblemente la escisión se realiza en forma de una desprotección global.

- 25 Condiciones fuertemente ácidas significa, en el contexto de esta invención, usar para la escisión una mezcla de desde el 50 hasta el 100%, preferiblemente desde el 60 hasta el 100%, más preferiblemente desde el 70 hasta el 100%, incluso más preferiblemente desde el 80 hasta el 100%, de TFA con un componente COMPSTRONG, los % son % en volumen y se basan en el volumen total de la mezcla de TFA y COMPSTRONG. Por tanto, TFA también puede usarse puro.

- 30 Preferiblemente, COMPSTRONG se selecciona del grupo que consiste en SOLVSTRONG, fenol, agua, TIS y una mezcla de los mismos; SOLVSTRONG es un disolvente que es inerte frente a TFA.

Preferiblemente, SOLVSTRONG es DCM; más preferiblemente, COMPSTRONG es una mezcla de fenol y TIS o una mezcla de fenol, agua y TIS.

- 35 Preferiblemente, las razones en volumen de una mezcla de TFA:agua:TIS son TFA: desde 80 hasta 98; agua: desde 1 hasta 10; TIS: desde 1 hasta 10; sumando las razones en volumen individuales de los tres componentes hasta 100.

- 40 Preferiblemente, las razones en volumen de una mezcla de TFA:fenol:agua:TIS son TFA: desde 70 hasta 97; fenol: desde 1 hasta 10; agua: desde 1 hasta 10; TIS: desde 1 hasta 10; sumando las razones en volumen individuales de los cuatro componentes hasta 100.

Preferiblemente, la cantidad total de la mezcla es de desde 5 hasta 20 ml por g de péptido protegido. Preferiblemente, la escisión se realiza a presión atmosférica.

- 45 Preferiblemente, la temperatura de reacción de la escisión es de desde -20 hasta 70°C; más preferiblemente desde -15 y 40°C, incluso más preferiblemente desde -15 hasta 35°C.

- 50 Preferiblemente, el tiempo de reacción de la escisión es de desde 30 min hasta 12 h, más preferiblemente desde 30 min hasta 6 h, incluso más preferiblemente desde 30 min hasta 4 h.

- 55 Condiciones débilmente ácidas significa, en el contexto de esta invención, usar para la escisión una mezcla de desde el 0,01 hasta el 25%, preferiblemente desde el 0,01 hasta el 15%, más preferiblemente desde el 0,05 hasta el 10%, incluso más preferiblemente desde el 0,1 hasta el 7,5%, de TFA en un disolvente SOLVWEAK, los % son % en volumen y se basan en el volumen total de la mezcla de TFA y SOLVWEAK. SOLVWEAK es cualquier disolvente que es inerte frente a TFA.

Preferiblemente SOLVWEAK es DCM, metilo THF o una mezcla de los mismos.

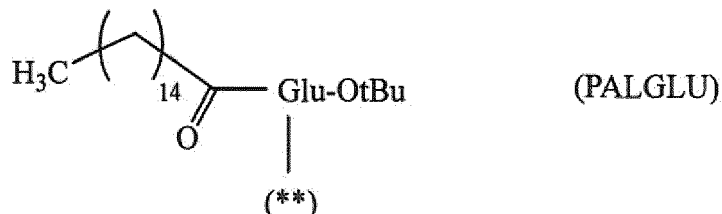
- 60 Preferiblemente, la cantidad total de la mezcla es de desde 5 hasta 20 ml por g de péptido protegido. Preferiblemente, la escisión se realiza a presión atmosférica.

Preferiblemente, la temperatura de reacción de la escisión es de desde -20 hasta 70°C; más preferiblemente desde -15 y 40°C, incluso más preferiblemente desde -15 hasta 35°C.

- 65 Preferiblemente, el tiempo de reacción de la escisión es de desde 5 min hasta 12 h, más preferiblemente desde 5 min hasta 6 h, incluso más preferiblemente desde 10 min hasta 4 h.

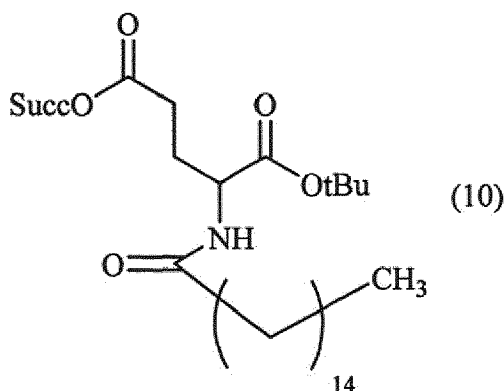
La escisión en condiciones débilmente ácidas también puede realizarse usando TFE o HFIP en vez de TFA.

El residuo de palmitoil-Glu-OtBu en el N⁶ de la Lys⁽²⁰⁾ es el residuo de fórmula (PALGLU),

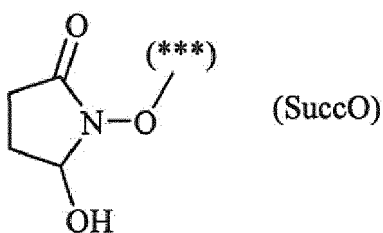


designando (**) en la fórmula (PALGLU) el enlace covalente entre el COOH de la cadena lateral del Glu y el N⁶ de la Lys⁽²⁰⁾, y el residuo de palmitoil-Glu-OtBu se une por enlace covalente a la Lys⁽²⁰⁾ en una reacción REACPALGLU, en donde se hace reaccionar el NH₂ de la cadena lateral de la Lys con un precursor del residuo de fórmula (PALGLU); preferiblemente, REACPALGLU se realiza antes de escindirse el péptido a partir de la resina. Por tanto, REACPALGLU se realiza en la resina, es decir, REACPALGLU se realiza mientras el péptido todavía está unido por enlace covalente a la resina.

Preferiblemente, el precursor del residuo de fórmula (PALGLU) es Pal-Glu(OSu)-OtBu, es decir, un compuesto de fórmula (10);



siendo SuccO un residuo de fórmula (SuccO);



en donde (***) designa el enlace covalente con el residuo de CO en el compuesto de fórmula (10).

REACPALGLU se realiza después del acoplamiento de Ala⁽¹⁹⁾ o después del acoplamiento de Ala⁽¹⁸⁾, y antes de la eliminación del grupo protector del NH₂ alfa de Ala⁽¹⁹⁾ o de Ala⁽¹⁸⁾ respectivamente, preferiblemente después del acoplamiento de Ala⁽¹⁸⁾.

Preferiblemente, cualquier grupo protector de la cadena lateral de Lys⁽²⁰⁾ se escinde antes de REACPALGLU.

Preferiblemente, Lys⁽²⁰⁾ se usa en la SPPS en forma de Fmoc-Lys(Alloc)-OH; de modo que el grupo protector de cadena lateral de Lys⁽²⁰⁾, que se escinde antes de REACPALGLU, es preferiblemente Alloc.

Preferiblemente, la escisión de Alloc a partir de la Lys⁽²⁰⁾ se realiza con una reacción CLEAVALLOC que usa Pd(PPh₃)₄ y PhSiH. CLEAVALLOC puede realizarse en presencia de un aditivo ADDALLOC, ADDALLOC se selecciona del grupo que consiste en morfolina, ácido 1,3-dimetilbarbitúrico, pirrolidina, trifenilfosfina, dimedona y mezclas de los mismos.

Preferiblemente, la cantidad molar de ADDALLOC es desde 2 hasta 7 veces la cantidad molar del residuo de Alloc.

Preferiblemente, la cantidad molar de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ es desde 0,01 hasta 10 veces, más preferiblemente desde 0,02 hasta 5 veces, incluso más preferiblemente desde 0,05 hasta 2 veces la capacidad de carga molar de la resina.

- 5 Preferiblemente, la cantidad molar de PhSiH es desde 1 hasta 30 veces, más preferiblemente desde 2 hasta 20 veces, incluso más preferiblemente desde 5 hasta 15 veces la capacidad de carga molar de la resina.

Preferiblemente, CLEAVALLOC se realiza en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en DMSO, diclorometano, Me-THF, DMF, NMP y mezclas de los mismos, más preferiblemente el disolvente es DCM.

- 10 Preferiblemente, CLEAVALLOC se realiza a presión atmosférica.

Preferiblemente, la temperatura de reacción de CLEAVALLOC es de desde -20 hasta 70°C; más preferiblemente desde -15 y 60°C, incluso más preferiblemente desde 5 hasta 35°C.

- 15 Preferiblemente, el tiempo de reacción de CLEAVALLOC es de desde 1 min hasta 2 h.

Preferiblemente, la cantidad molar de Pal-Glu(OSu)-OtBu en REACPALGLU es desde 1 hasta 15 veces, más preferiblemente desde 1 hasta 10 veces, incluso más preferiblemente desde 1 hasta 5 veces la capacidad de carga molar de la resina.

- 20 REACPALGLU puede realizarse en presencia de una base, preferiblemente una base de amina terciaria. Las bases adecuadas son, por ejemplo, tri-alkil-aminas, tales como N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) o trietilamina (TEA); N,N-dialquilanilinas, tales como N,N-dietilanilina; 2,4,6-trialquilpiridinas, tales como 2,4,6-trimetilpiridina; y N-alkilmorfolinas, tales como N-metilmorfolina.

Preferiblemente, REACPALGLU se realiza en presencia de DIPEA como base.

- 30 Preferiblemente, la cantidad molar de base es desde 1 hasta 10 veces, más preferiblemente desde 3 hasta 8 veces la capacidad de carga molar de la resina.

Preferiblemente, REACPALGLU se realiza en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en DMSO, diclorometano, Me-THF, DMF, NMP y mezclas de los mismos, más preferiblemente el disolvente es DCM.

- 35 Preferiblemente, REACPALGLU se realiza a presión atmosférica.

Preferiblemente, la temperatura de reacción de REACPALGLU es de desde -20 hasta 70°C; más preferiblemente desde -15 y 60°C, incluso más preferiblemente desde 5 hasta 35°C.

- 40 Preferiblemente, el tiempo de reacción de REACPALGLU es de desde 1 hasta 48 h, más preferiblemente desde 5 h hasta 24 h, incluso más preferiblemente desde 10 h hasta 24 h.

Preferiblemente, cualquier acoplamiento, que por facilidad de lectura también se denomina COUPL, tal como acoplamiento durante la SPPS o REACBONBALRES, puede llevarse a cabo usando condiciones de reacción conocidas en la técnica de la síntesis peptídica.

- 45 Preferiblemente, los reactivos de acoplamiento, que pueden usarse para COUPL y que se usan *in situ*, son, por ejemplo, reactivos de acoplamiento de fosfonio o uronio, tales como hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(dimetilamino)fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris(pirrolidino)fosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de O-(6-clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HCTU), tetrafluoroborato de O-(6-clorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TCTU), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), tetrafluoroborato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TATU), tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), tetrafluoroborato de O-[ciano(etoxicarbonil)metilenamino]-1,1,3,3-tetrametiluronio (TOTU) y hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenamino)dimetilamino-morfolino-carbenio (COMU); o reactivos de acoplamiento de carbodiimida, tales como diisopropilcarbodiimida (DIC), dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y carbodiimidas solubles en agua (WSCDI) tales como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), opcionalmente como sal tal como sal de clorhidrato.

- 60 Otras técnicas de acoplamiento usan ésteres activos previamente formados, tales como ésteres de N-hidroxisuccinimida (HOSu) y p-nitrofenol (HONp), anhídridos simétricos previamente formados, anhídridos no simétricos tales como N-carboxianhídridos (NCAs) y haluros de ácido, tales como fluoruros de acilo o cloruros de acilo.

- 65 Los reactivos de acoplamiento preferidos son reactivos de acoplamiento de carbodiimida y reactivos de acoplamiento de fosfonio, los reactivos de acoplamiento más preferidos se seleccionan del grupo que consiste en PyBOP, DCC, DIC y EDC; más preferiblemente, el reactivo de acoplamiento es PyBOP o DIC.

Preferiblemente se usa EDC como una sal, más preferiblemente como EDC-HCl.

5 Preferiblemente, la cantidad molar de reactivo de acoplamiento es desde 1 hasta 10 veces, más preferiblemente desde 1 hasta 5 veces la capacidad de carga molar de la resina, o de la cantidad molar del fragmento que va a acoplarse en LPPS respectivamente.

10 Más preferiblemente, la cantidad molar de reactivo de acoplamiento es desde 1 hasta 10 veces, más preferiblemente desde 1 hasta 5 veces la cantidad molar del sustrato, tal como el AA, que va a acoplarse.

COUPL puede realizarse en presencia de una base, preferiblemente una base de amina terciaria, que tanto desprotona el residuo de COOH del componente carboxílico como neutraliza cualquier contraión del residuo de NH₂ del componente de amino en COUPL, y, por tanto, facilita la reacción de acoplamiento.

15 Las bases adecuadas son, por ejemplo, trialquilaminas, tales como N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) o trietilamina (TEA); N,N-dialquilanilinas, tales como N,N-dietilanilina; 2,4,6-trialquilpiridinas, tales como 2,4,6-trimetilpiridina; N,N-dialquilaminopiridinas, tales como N,N-4-dimetilaminopiridina; y N-alquilmorfolinas, tales como N-metilmorfolina.

20 Preferiblemente, COUPL se realiza en presencia de DIPEA como base.

Preferiblemente, la cantidad molar de base es desde 0,01 hasta 20 veces, más preferiblemente desde 0,02 hasta 10 veces la capacidad de carga molar de la resina. Más preferiblemente, la cantidad molar de base es desde 0,01 hasta 20 veces, incluso más preferiblemente desde 0,02 hasta 10 veces la cantidad molar del sustrato, tal como el AA, que va a acoplarse.

25 COUPL puede realizarse en presencia de un nucleófilo auxiliar como aditivo debido a su efecto positivo en suprimir reacciones secundarias no deseadas. Puede usarse cualquier nucleófilo auxiliar conocido.

30 Ejemplos de nucleófilos auxiliares adecuados son (hidroxiimino)cianoacetato de etilo, 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), N-hidroxisuccinimida (HOSu), N-hidroxi-3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (HOObt) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt).

Preferiblemente, se usan HOBt o HOAt como nucleófilo auxiliar.

35 Preferiblemente, la cantidad molar de nucleófilo auxiliar es desde 0,5 hasta 8 veces la cantidad molar del residuo de amino que va a acoplarse.

Especialmente, COUPL se realiza usando DIC/OxymaPure, DCC/HOBt, EDC/HOBt, PyBOP/HOBt o EDC/HOAt.

40 Preferiblemente, COUPL puede realizarse en cualquier disolvente inerte que puede disolver los reactivos.

45 Disolventes preferidos para COUPL son disolventes miscibles con agua tales como dimetilsulfóxido (DMSO), dioxano, tetrahidrofurano tales como tetrahidrofurano (THF) o metiltetrahidrofurano (metil-THF), 1-metil-2-pirrolidona (NMP), N,N-dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida (DMA) o cualquier mezcla de los mismos; y disolventes no miscibles con agua tales como diclorometano (DCM), acetato de etilo o cualquier mezcla de los mismos; y cualquier mezcla adecuada entre disolventes miscibles con agua y no miscibles con agua, incluyendo mezclas con agua.

50 Más preferiblemente, COUPL se realiza en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en DMSO, diclorometano, Me-THF, DMF, NMP y mezclas de los mismos.

Preferiblemente, el sustrato en COUPL, por ejemplo cualquier AA, que se hace reaccionar con el residuo funcional respectivo conectado a la resina en SPPS, se usa preferiblemente en exceso con respecto a la capacidad de carga molar de la resina; más preferiblemente, se usa en una cantidad molar de desde 1 hasta 10 veces, más preferiblemente desde 1 hasta 8 veces, basándose en la capacidad de carga molar de la resina.

55 Preferiblemente, COUPL se realiza a presión atmosférica.

60 Preferiblemente, la temperatura de reacción de COUPL es de desde -20 hasta 70°C; más preferiblemente desde -15 hasta 40°C, incluso más preferiblemente desde -15 hasta 35°C.

Preferiblemente, el tiempo de reacción de COUPL es de desde 30 min hasta 48 h, más preferiblemente desde 30 min hasta 24 h, incluso más preferiblemente desde 30 min hasta 12 h, especialmente desde 30 min hasta 6 h.

65 Preferiblemente, el avance de COUPL se monitoriza mediante HPLC y de ese modo se determina el tiempo de reacción necesario.

La escisión de Fmoc la conoce el experto, se realiza con una base, preferiblemente la base es una amina secundaria, más preferiblemente piperidina. La base se usa en exceso con respecto a la capacidad de carga molar de la resina.

Preferiblemente, se usa DMF como disolvente en la reacción de escisión de Fmoc.

Preferiblemente, la escisión de Fmoc se realiza a presión atmosférica.

Preferiblemente, la temperatura de reacción de la escisión de Fmoc es de desde -20 hasta 70°C; más preferiblemente desde -15 y 40°C, incluso más preferiblemente desde -15 hasta 35°C.

Preferiblemente, el tiempo de reacción de la escisión de Fmoc es de desde 1 min hasta 12 h, más preferiblemente desde 1 min hasta 5 h, incluso más preferiblemente desde 1 min hasta 1 h.

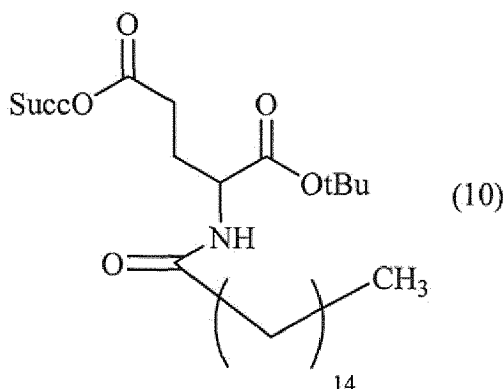
Puede aislarse liraglutida, preferiblemente después de una desprotección global, según métodos convencionales conocidos por el experto, tales como precipitación, preferiblemente con éter, centrifugación, filtración, etc.

Puede purificarse liraglutida según métodos convencionales conocidos por el experto, tales como HPLC.

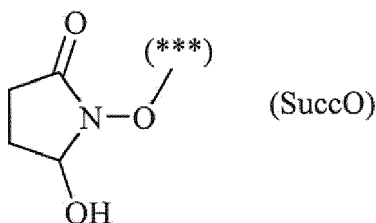
Descripción de realizaciones preferidas

Aminoácidos. La SPPS se realizó con los siguientes AA, si no se menciona lo contrario: Boc-His(Trt)-OH; Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Glu(OtBu)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-Ser[^(Me,Me)Psi]-OH opcionalmente para la posición (10) y (11); Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Lys(Alloc)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Val-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH. La SPPS se realizó manualmente sin un sintetizador automático.

Palm-Glu(OSu)-OtBu, que es un compuesto de fórmula (10), se adquirió de IRIS Biotech;



siendo SuccO un residuo de fórmula (SuccO);



en donde (***) designa el enlace covalente con el residuo de CO en el compuesto de fórmula (10). El compuesto de fórmula (BAL-1) se adquirió de Novabiochem.

Prueba de ninhidrina, también denominada prueba de Kaiser. El experto conoce la prueba, véase Kaiser E. *et al.*, Analytical Biochemistry 1970, 34, 595-598. Disolución 1: disolver 5 g de ninhidrina en 100 ml de etanol. Disolución 2: disolver 40 g de fenol en 10 ml de etanol. Disolución 3: añadir 2 ml de una disolución ac. de KCN 0,001 M a 98 ml de piridina. Procedimiento: 1. Lavar la resina con DCM (2 veces). 2. Tomar como muestra unas pocas perlas de resina en un tubo Eppendorf. 3. Añadir de una a dos gotas de cada una de las tres disoluciones 1 a 3. 4. Mezclar bien y calentar hasta 120°C durante de 3 a 5 min. 5. La presencia de aminas unidas a resina libre se indica mediante perlas de resina azules.

Prueba de aldehído. Jesus Vazquez *et al.*, Tetrahedron Letters 2001, 42(38), 6691-6693

Lavar con un disolvente / tratar la resina con reactivo. En el siguiente ejemplo, se realizó el lavado con un disolvente tal como DMF o DCM filtrando la resina, suspendiendo y agitando la resina en el disolvente durante una determinada cantidad de tiempo y filtrando de nuevo. Todos los lavados se llevaron a cabo con 10 ml (aproximadamente 15 ml/g de resina) de DMF hasta Ala⁽¹⁸⁾, después con 15 ml. En los ejemplos se menciona el número de repeticiones de este ciclo de lavado junto con el tiempo para la agitación. Además, en el caso de tratar la resina con un reactivo que se disuelve en un disolvente, puede usarse en el ejemplo esta descripción del número de repeticiones de este tratamiento junto con el tiempo para la agitación, si no se menciona lo contrario. La introducción de los aminoácidos se realizó con 5 ml de DMF, si no se menciona lo contrario.

Disolvente para el acoplamiento. Se usó disolvente para el acoplamiento en la cantidad de 20 ml/g, si no se menciona lo contrario.

Rendimiento. Se calculó el rendimiento basándose en la escala de síntesis con respecto a la capacidad de carga de f y el peso de resina, si no se menciona lo contrario.

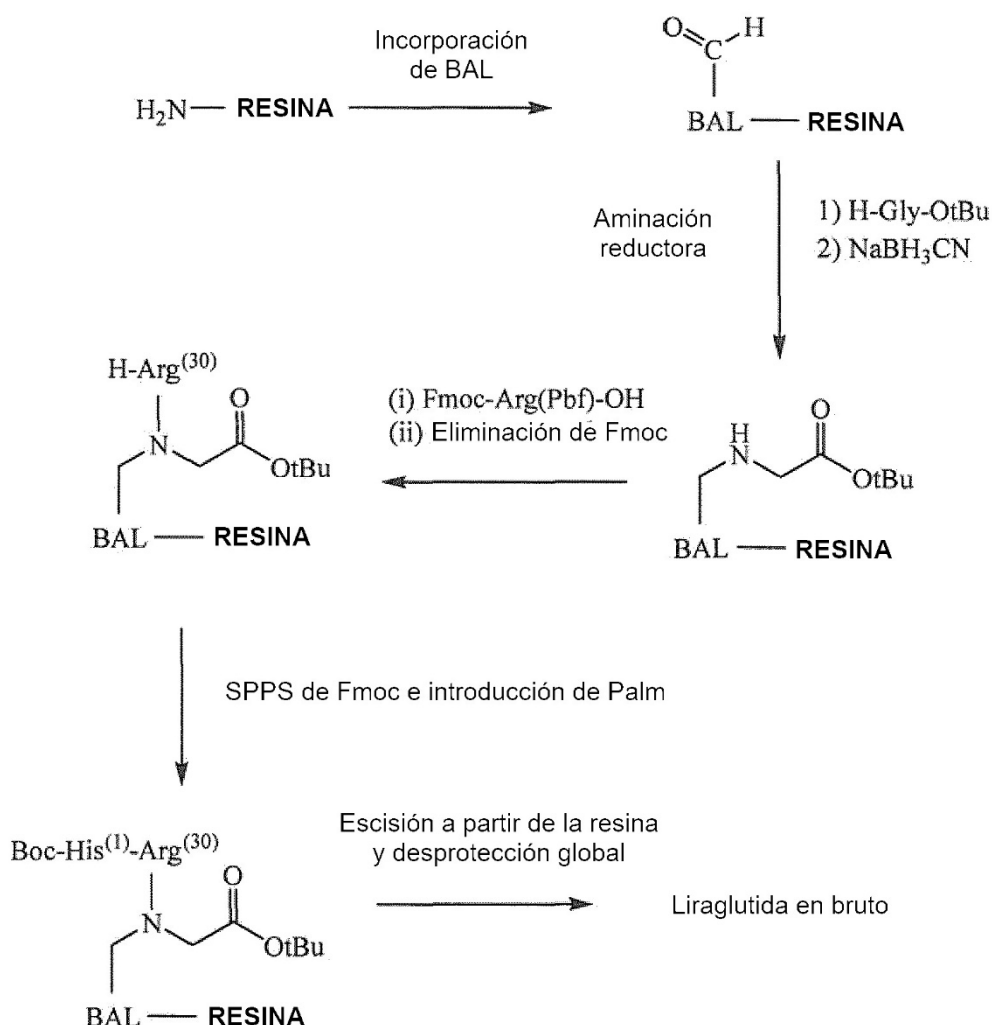
Método para la determinación de la pureza. Se trata péptido-resina (100 mg) con aproximadamente 2 ml de TFA:H₂O:TIS en una razón en volumen de 94:3:3 y se agita durante 1 h a TA. Se filtra la suspensión. Se precipita el péptido desprotegido mediante adición de diisopropil éter (20 ml) al filtrado. Se comprueba la pureza de péptido desprotegido en bruto mediante HPLC: determinación de la pureza de liraglutida en bruto: columna con fase estacionaria C18; fase móvil A: TFA al 0,1% (v/v) en agua; fase móvil B: TFA al 0,1% (v/v) en acetonitrilo; gradiente: del 5% (v/v) de B al 100% (v/v) de B en 11 min; temperatura: TA; velocidad de flujo : 1 ml/min; detección: 254 nm.

Determinación de Fmoc, también usada para la determinación de la carga de resina. Un método analítico basado en la absorción UV de dibenzofulveno tras la escisión de Fmoc en una alícuota de péptido-resina, el experto conoce el método. Puede realizarse de la siguiente manera. Se lava una alícuota de resina cargada (aproximadamente 100 mg) con DMF (3 veces con 5 ml) y DCM (3 veces con 5 ml). Después se seca a vacío. Se añaden 10 mg de resina seca a un tubo de polipropileno de 2 ml, se añaden 0,8 ml de DMF y se deja hinchar la resina durante 10 minutos. Después, se añaden 0,2 ml de piperidina, después se agita la mezcla durante 20 min. Después se transfieren con pipeta 10 microlitros del sobrenadante a una cubeta de cuarzo y se diluyen con 0,990 ml de DMF. Se determina la absorbancia a $\lambda = 301$ nm. El aducto de piperidina-dibenzofulveno que se forma tras la desprotección de Fmoc tiene un coeficiente de extinción molar de $\epsilon = 7800 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$; por tanto, el valor de carga se determina usando la ley de Beer-Lambert.

Ejemplo 1

Síntesis de liraglutida según la invención. Se realizó la síntesis de liraglutida en resina ChemMatrix® según el esquema 1:

Esquema 1



Incorporación de BAL. Se realizó la síntesis usando resina ChemMatrix® de aminometilo (adquirida de ChemMatrix® Innovation) ($f = 0,58 \text{ mmol/g}$). Se lavó la resina (0,6 g, 1 eq) con DCM (3 veces). Después de eso, se acopló grupo de unión de BAL (6 eq, 560 mg) a la resina con DIC/OxymaPure® (6 eq, 263 microlitros/296 mg) en DMF. Después se agitó la resina durante 4 horas. Después se filtró la resina y se lavó con DMF (5 veces durante 1 min cada vez) y DCM (5 veces durante 1 min cada vez). Se realizó la prueba de ninhidrina (negativa) y la prueba de aldehído (positiva) confirmó que se había acoplado realmente el grupo de unión de BAL.

Aminación reductora. Se suspendió la resina en DMF y se llevó a cabo la introducción de H-Gly-OtBu mediante aminación reductora en resina usando la amina libre H-Gly-OtBu (10 eq, 579 mg) en forma de una disolución en AcOH al 1% (v/v) en DMF (aproximadamente 100 microlitros de AcOH por g de resina) durante 30 min y después añadiendo una disolución de NaBH_3CN (10 eq, 218 mg) en 11 ml de MeOH durante la noche. Después de eso, se lavó la resina con DMF (5 veces durante 1 min cada vez) y DCM (5 veces durante 1 min cada vez). Se monitorizó la reacción mediante prueba de aldehído (negativa).

Acilación de Arg. Después se acopló Fmoc-Arg(Pbf)-OH (3 eq, 677mg) usando DIC/OxymaPure® (3 eq, 131 microlitros/148 mg) en 45 ml de DMF as como reactivos de acoplamiento durante 90 min. Para evitar la delección de aminoácidos, se repitió el acoplamiento de Fmoc-Arg(Pbf)-OH en las mismas condiciones. Después de eso, se eliminó el grupo Fmoc [mediante (i) lavado de la resina con DMF (5 veces durante 1 min cada vez); (ii) tratamiento de la resina en piperidina:DMF (2:8 v/v, 5 ml/g de resina) (1 vez durante 1 min y 2 veces durante 10 min cada vez); (iii) lavado con DMF (5 veces durante 1 min cada vez)]. Se realizó la prueba de ninhidrina con un resultado positivo.

Acoplamiento de los AA restantes. Se llevó a cabo el acoplamiento de los AA restantes añadiendo los reactivos AA: DIC: OxymaPure® en la razón de 3 eq:3 eq:3 eq y después agitando durante 90 min. Se acoplaron los aminoácidos Val⁽¹⁰⁾ y Ser⁽¹¹⁾ en forma de la pseudo-prolina Fmoc-Val-Ser(ψ^{Me,Me}pro)-OH.

Eliminación de Fmoc. Se realizó la eliminación de Fmoc mediante tratamiento con piperidina:DMF (2:8 v/v, 5 ml/g de resina) 1 vez durante 1 min y 1 vez durante 15 min.

Introducción de Palm. Durante la síntesis, se introdujo Lys como Fmoc-Lys(Alloc)-OH. Después del acoplamiento de Ala⁽¹⁸⁾ y antes de la eliminación de su grupo protector Fmoc, se eliminó el grupo protector Alloc de la cadena lateral de Lys⁽²⁰⁾ con Pd(PPh₃)₄/PhSiH [mediante (i) lavado de la resina con DCM (5 veces durante 1 min); (ii) tratamiento de la resina a TA con Pd(PPh₃)₄/PhSiH en la razón de 0,1 eq:10 eq (2 veces durante 10 min en DCM); (iii) lavado con DCM (5 veces durante 1 min)]. Después, se trató la resina con Palm-Glu(OSu)-OtBu (3 eq) y DIPEA (6 eq, 265 microlitros) en DCM durante 16 h. Tras la introducción de Palm, se continuó el acoplamiento.

Escisión a partir de la resina y desprotección global y aislamiento de liraglutida en bruto. Tras terminarse la estructura principal de péptido, se lavó la peptidil-resina con DCM (5 veces durante 1min) y MeOH (5 veces durante 1 min). Se realizaron las escisiones en lotes con porciones de 0,2 a 0,5 g. Se realizó la escisión con 10 ml de un cóctel [TFA:H₂O:TIS (94:3:3 en volumen)]/g de resina. Tras la filtración, se lavó la resina dos veces con TFA:H₂O:TIS (94:3:3 en volumen) (5 ml) y se concentró la disolución de TFA hasta un tercio de su volumen y después se añadió sobre terc-butil metil éter (5 veces el volumen de la disolución de escisión tras la concentración) y se centrifugó. Tras la decantación, se lavó el sólido dos veces con la misma cantidad de terc-butil metil éter y se centrifugó de nuevo y se decantó. Se liofilizó el sólido. El rendimiento del producto en bruto era de 1,06 g, la pureza del producto en bruto era del 62%.

Purificación. El siguiente método de purificación es un método de purificación convencional que no está optimizado para liraglutida y para el rendimiento. Se purificó la liraglutida en bruto sin proteger en columna de HPLC semipreparativa XSelect® CSH C18 (Waters). Fase móvil A: TFA al 0,1% (v/v) en agua. Fase móvil B: TFA al 0,1% (v/v) en acetonitrilo. Gradiente:

t	A	B
[min]	[%]	[%]
0	95	5
3	95	5
4	51	49
9	48,5	51,5
10	0	100
12	0	100
12,5	95	5

Liraglutida eluye aproximadamente en el minuto 7 del gradiente. Pureza: >99%. Rendimiento de purificación: aproximadamente el 10%.

Ejemplo 2

Se repitió el ejemplo 1 con la diferencia de que los aminoácidos Val⁽¹⁰⁾ y Ser⁽¹¹⁾ se acoplaron en forma de Fmoc-Ser(tBu)-OH y de Fmoc-Val-OH respectivamente, es decir, no se usaron en forma de una pseudo-prolina. La pureza de la liraglutida en bruto obtenida sin usar pseudo-prolina fue de aproximadamente el 40%.

Ejemplo 3 (no es según la invención)

Se repitió el ejemplo 1 con la diferencia de que la introducción del residuo de palmitoil-Glu-OtBu no se realizó después de Ala⁽¹⁸⁾, sino después del acoplamiento final de Boc-His(Trt)-OH usando el mismo procedimiento. Esto significa que, después del acoplamiento final de Boc-His(Trt)-OH, se escindió selectivamente el Alloc en la cadena lateral de Lys⁽²⁰⁾ y después se introdujo el residuo de palmitoil-Glu-OtBu en la resina. La pureza de la liraglutida en bruto era de aproximadamente el 60%.

Lista de secuencias

<110> Lonza Braine S.A.

<120> Método para preparación de liraglutida usando un grupo de unión de BAL

<130> LP2434EP00

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 31
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Constructo sintético

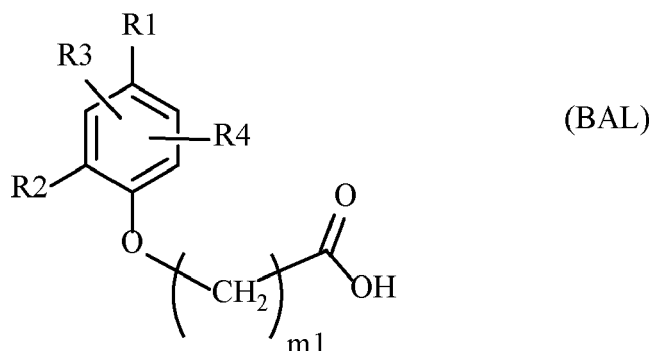
<400> 1
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

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

10

REIVINDICACIONES

1. Método para la preparación de liraglutida con SPPS usando un grupo de unión de amida de estructura principal, BAL, para conectar la Gly⁽³¹⁾ C-terminal con la resina durante la SPPS; en donde BAL es un compuesto de fórmula (BAL);

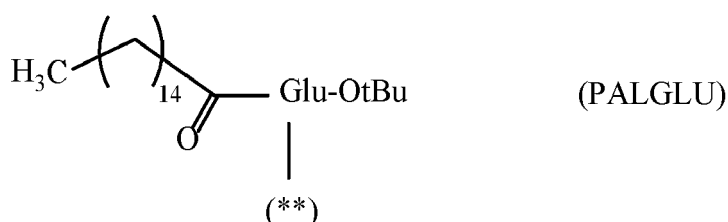


en donde

uno de los sustituyentes R1 y R2 es H y el otro es C(O)H;

m1 es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

R3 y R4 son idénticos o diferentes y son independientemente uno de otro H o metoxilo; y en donde la SPPS se realiza en una resina funcionalizada con amino AMFUNRESIN; en donde el residuo de palmitoil-Glu-OtBu en el N⁶ de la Lys⁽²⁰⁾ es el residuo de fórmula (PALGLU)

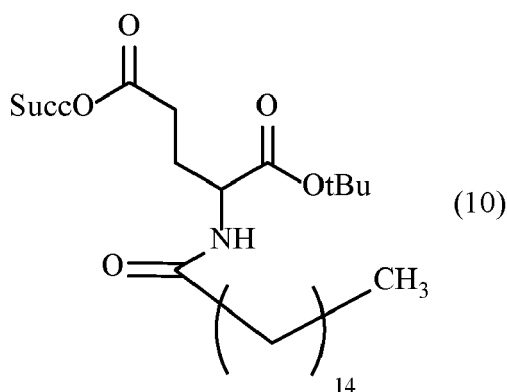


designando (**) en la fórmula (PALGLU) el enlace covalente entre el COOH de la cadena lateral del Glu y el N⁶ de la Lys⁽²⁰⁾, y el residuo de palmitoil-Glu-OtBu se une por enlace covalente a la Lys⁽²⁰⁾ en una reacción REACPALGLU, en donde se hace reaccionar el NH₂ de la cadena lateral de la Lys con un precursor del residuo de fórmula (PALGLU); y en donde REACPALGLU se realiza después del acoplamiento de Ala⁽¹⁹⁾ o después del acoplamiento de Ala⁽¹⁸⁾, y antes de la eliminación del grupo protector del NH₂ alfa de Ala⁽¹⁹⁾ o de Ala⁽¹⁸⁾ respectivamente.

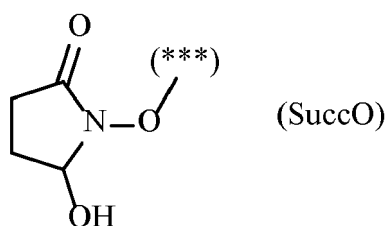
2. El método según la reivindicación 1, en donde m1 es 2, 3, 4, 5, 6 o 7.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde R3 y R4 están en la posición 3 y en la 5 del anillo de fenoxilo con respecto a la posición del residuo de ácido carboxílico en la posición 1 del anillo de fenoxilo.
4. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R2 es H y R1 es C(O)H.
5. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 4, en donde AMFUNRESIN se selecciona del grupo que consiste en resina ChemMatrix de aminometilo, resina de aminometil-poliestireno, resina de amida Rink, resina de Sieber, resina de 4-metil-benzohidrilamina (resina de MBHA), resina de poli-Lys y resina de benzohidrilamina (resina de BHA).
6. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 5, en donde BAL se conecta de manera covalente con la resina mediante un enlace de amida entre el COOH de BAL y el NH₂ de AMFUNRESIN.
7. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 6, en donde Gly⁽³¹⁾ se conecta de manera covalente con BAL mediante un enlace entre el NH₂ alfa de Gly⁽³¹⁾ y el átomo de C del residuo de C(O)H de BAL.
8. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 7, en donde se prepara liraglutida mediante SPPS conectando en primer lugar de manera covalente el BAL con AMFUNRESIN, después de eso se conecta el

NH₂ alfa de Gly⁽³¹⁾ de manera covalente con el residuo de C(O)H de BAL, después se acoplan los otros AA mediante SPPS en la Gly⁽³¹⁾ y después en la cadena peptídica en crecimiento respectivamente.

9. El método según la reivindicación 7 u 8, en donde la conexión covalente del NH₂ alfa de Gly⁽³¹⁾ con el residuo de C(O)H de BAL se realiza con una reacción de aminación reductora.
10. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el método comprende dos etapas, una etapa ETAPA1 y una etapa ETAPA2; ETAPA1 comprende la SPPS usando un grupo de unión de amida de estructura principal, BAL; ETAPA1 proporciona liraglutida conectada a la resina de la SPPS; ETAPA2 comprende la escisión de liraglutida a partir de la resina.
11. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 10, en donde los AA que pueden protegerse en la cadena lateral se usan en una forma con cadena lateral protegida en la SPPS.
12. El método según la reivindicación 11, en donde la protección de cadena lateral se realiza en forma de grupos de protección de cadena lateral que no pueden escindirse en condiciones débilmente ácidas.
13. El método según la reivindicación 11 o 12, en donde la protección de cadena lateral de Cys es Trt o Acm; la protección de cadena lateral de Asn y Gln es Trt; la protección de cadena lateral de His es Trt o Dnp; la protección de cadena lateral de Glu y Asp es OtBu; la protección de cadena lateral de Thr, Ser y Tyr es tBu; la protección de cadena lateral de Trp es Boc; la protección de cadena lateral de Arg es Pbf, Pmc, Mtr o MIS; la protección de cadena lateral de Lys es Alloc, Z o Boc.
14. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 13, en donde Val⁽¹⁰⁾ y Ser⁽¹¹⁾ se usan en la SPPS en forma de pseudoprolina Fmoc-Val-Ser[Psi^(Me,Me)Pro]-OH.
15. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la SPPS usa una estrategia de Fmoc/tBu.
16. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 15, en donde REACPALGLU se realiza antes de escindirse el péptido a partir de la resina.
17. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el precursor del residuo de fórmula (PALGLU) es un compuesto de fórmula (10);



siendo SuccO un residuo de fórmula (SuccO);



en donde (***) designa el enlace covalente con el residuo de CO en el compuesto de fórmula (10).