



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 335**

51 Int. Cl.:
C07K 14/605 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04739040 .6**

96 Fecha de presentación : **18.08.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1664109**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Purificación de péptidos tipo glucagón.**

30 Prioridad: **21.08.2003 DK 2003 01197**
25.08.2003 US 497887 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.12.2009

73 Titular/es: **NOVO NORDISK A/S**
Novo Allé
2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es: **Staby, Arne;**
Kornbeck, Camilla;
Dünweber, Dorte Lunoe;
Christensen, Hanne y
Schou, Ole

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 330 335 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

Purificación de péptidos tipo glucagón.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de purificación de proteínas. En particular, la invención se refiere a un método para purificar un péptido similar al glucagón de una composición que comprende el péptido similar al glucagón y al menos una impureza relacionada por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa.

10 **Antecedentes de la invención**

Para la purificación y el análisis de proteínas y de péptidos (polipéptidos), la cromatografía es un método bien conocido y muy utilizado. Se aplican varios principios cromatográficos diferentes, entre ellos, la cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC). El principio de separación por RP-HPLC se basa en la asociación hidrofóbica entre el soluto de polipéptido y ligandos hidrofóbicos en la superficie de resina cromatográfica. La purificación por RP-HPLC normalmente consiste en una o más de las siguientes secciones: equilibrado, carga, lavado, elución y regeneración.

El sistema solvente más frecuentemente aplicado en RP-HPLC se basa en agua/acetonitrilo/ácido trifluoroacético (TFA) y la elución de solutos normalmente se obtiene aumentando el contenido orgánico, es decir, acetonitrilo, del líquido aplicado a la columna cromatográfica. El acetonitrilo tiene un fuerte efecto selectivo y desnaturizante en los solutos de polipéptido en RP-HPLC (Boysen, R.I. *et al.*, J. Biol. Chem. 277, 23-31 (2002)) y combinado con TFA (consecuentemente a bajo pH - 2), este sistema es aplicado como una herramienta analítica estándar en la industria farmacéutica y otras industrias (Snyder, L.R. *et al.*, "Practical HPLC method development", 2ª ed., capítulo 11 en "Biochemical samples: Proteins, nucleic acids, carbohydrates, and related compounds", John Wiley & Sons Inc., Nueva York, 1997). También, en escala de producción, se ha utilizado ampliamente acetonitrilo a pH bajo para la purificación de polipéptido, es decir, para la purificación de la insulina humana (Kroeff, E.P. *et al.*, J. Chromatogr. 461, 45-61 (1989)). Se ha utilizado una resina de fase inversa basada en polímero insustituída para la recuperación inicial de glucagón de las glándulas del páncreas (US 4.617.376). La columna cromatográfica fue manejada a pH 2,8 con acetonitrilo como el solvente orgánico y glicina como el componente tampón. No hubo indicaciones de eliminación de impurezas relacionadas por esta fase. Varios análogos de glucagón obtenidos a partir de síntesis de péptidos fueron purificados en una columna C₁₈ con un gradiente lineal en un sistema de acetonitrilo/TFA a bajo pH (Krstenanski, J.L. *et al.*, J. Biochem. 25, 3839-3845 (1986)). El glucagón ha sido aislado de pez elasmobranquio en una columna C₁₈ usando un gradiente de acetonitrilo lineal a bajo pH utilizando TFA como sustancia tampón (Conlon J.M. y L. Thim. Gen. Comp. Endocrinol. 60, 398-405 (1985)). El glucagón recombinante en pollos fue expresado en *E. coli* y posteriormente fue purificado usando varias fases incluida la RP-HPLC con un gradiente lineal en un sistema de acetonitrilo/TFA a bajo pH (Kamisoyama H. *et al.* Anim. Sci. J. 71, 428-431 (2000)).

La insulina y el glucagón han sido separados de pez elefante en una columna C₁₈ usando un gradiente lineal de acetonitrilo a pH 7,65 utilizando 50 mM de acetato de amonio como sistema tampón (Berks B.C., *et al.*, Biochem. J. 263, 261-266 (1989)).

WO 99/52934 expone un método de RP-HPLC para la separación de varios derivados insulínicos, con el cual se logró una separación mejorada entre los componentes objetivo y las impurezas relacionadas glicosiladas por medio de la adición de iones de calcio. La purificación fue realizada a 22-25°C usando etanol como el solvente orgánico, y Tris o Bis-tris como componente tampón en la gama de pH de aprox. 7,0-7,2, es decir, por encima del punto isoeléctrico de la insulina.

También se ha descrito un proceso de purificación para la insulina que incluye fases de RP-HPLC en las columnas C₁₈ con etanol como agente de elución orgánico a bajo pH usando tampón de sulfato de amonio y a pH cercano al neutro usando tampón tris (Mollerup I. *et al.*, "Insulin purification" en "Encyclopedia of bioprocess technology", Eds. Flickinger M.C. y Drew S.W., pág. 1491-1498, John Wiley & Sons Inc. 1999). Las impurezas relacionadas de la insulina fueron eliminadas por medio de estos métodos.

En una columna C₁₈ se ha obtenido separación de productos yodados de glucagón usando distintos gradientes comenzando con metanol al 40% en agua con 10 mM de tampón fosfato y trietilamina a pH 3,0, y finalizando al 50% de (acetonitrilo/0.1 M de carbonato de amonio, pH 9,0) o finalizando al 12,5% de (acetonitrilo/0.1 M de tris-HCl, pH 9,0) (Rojas F.J. *et al.*, Endo. 113, 711-719 (1983)). Los productos de glucagón fueron separados por esta RP-HPLC de modo mixto (de solventes y pH) según el grado de yodación. Además, los métodos fueron usados para separar digeridos enzimáticos de glucagón y glucagón yodado.

Como es el caso para muchos otros polipéptidos, los péptidos similares al glucagón incluidos los análogos y derivados han sido ampliamente purificados usando la RP-HPLC que aplica un gradiente lineal de acetonitrilo con pequeñas cantidades de TFA como sustancia tampón a bajo pH, es decir, debajo del punto isoeléctrico (pI) del componente polipeptídico objetivo. Se ha aislado GLP-1 de intestinos pequeños de dos especies, cerdos y seres humanos (Ørskov C. *et al.*, J. Biol. Chem. 264, 12826-12829 (1989)). La purificación se obtuvo usando un gradiente lineal en un sistema de etanol/TFA, y se obtuvo una purificación adicional usando una elución isocrática en un sistema de acetonitrilo/TFA,

ES 2 330 335 T3

ambos a bajo pH en una columna C₁₈. Estas dos formas de GLP-1 relacionadas (GLP-1 y GLP-1 de extensión NH₂ terminal) no fueron separadas por ninguno de los métodos.

Se ha aplicado un sistema de RP-HPLC basado en acetonitrilo/TFA para la investigación de formas de GLP-1 en perros en el íleon (Namba M. *et al.*, Biomedical Res. 11(4), 247-254 (1990)). Hubo algunas indicaciones de que distintas formas fueron separadas, y que estándares de amida GLP-1 y des-Gly³⁷-GLP-1 sintéticamente obtenidos tuvieron tiempos de elución ligeramente diferentes aplicando este método. Se ha aplicado una columna C₄ en un sistema de RP-HPLC basado en acetonitrilo/TFA a bajo pH para purificación de proteínas de fusión de un derivado de GLP-1 y de exendina-4 con fragmentos de anticuerpos y albúmina de suero humano (WO 02/46227).

Varios productos de ruptura de preproglucagón han sido separados en una columna C₁₈ con elución de gradiente en un sistema de acetonitrilo/TFA a bajo pH (Noe B.D. y Andrews P.C., Péptidos 7, 331-336 (1986)).

Se ha usado una columna de cianopropilo en un sistema de RP-HPLC basado en acetonitrilo/TFA a bajo pH para la purificación de varios análogos de GLP-1 obtenidos a partir de síntesis química (WO 98/08871).

GLP-2 ha sido separado de otros péptidos relacionados con proglucagón de intestinos de dos especies, cerdos y seres humanos (Buhl T. *et al.*, J. Biol. Chem. 263, 8621-8624 (1988)). La purificación se obtuvo usando un gradiente lineal en un sistema de acetonitrilo/TFA a bajo pH y se aplicó purificación adicional usando una elución isocrática en un sistema de etanol/TFA, ambos a bajo pH en una columna C₁₈. Por el último método, se separó citocromo C oxidasa de GLP-2, no obstante, estas dos formas de GLP- 2 relacionadas (GLP-2 y GLP-2 de extensión NH₂ terminal) no fueron separadas.

WO 01/04156 expone variantes de exendina-4 y variantes de GLP-1 obtenidas tanto sintéticamente como por tecnología recombinante. Las variantes obtenidas de síntesis de péptidos fueron purificadas en una columna C₁₈ aplicando elución de gradiente de un sistema de acetonitrilo/TFA a bajo pH, mientras que los péptidos recombinantes fueron purificados en una columna C8 aplicando un gradiente lineal de un sistema de acetonitrilo/TFA a bajo pH.

WO 00/41548 expone el uso de una columna C₁₈ aplicando elución de gradiente de un sistema de acetonitrilo/TFA a bajo pH para purificar exendina-3 y exendina-4 obtenidos de síntesis de péptidos. WO 99/25727 expone el uso de una columna C₁₈ aplicando elución de gradiente de un sistema de acetonitrilo/TFA a bajo pH para purificar varios agonistas de exendina (análogos y derivados de exendina) obtenidos a partir de síntesis de péptidos.

Se ha separado glucagón, GLP-1 y GLP-2 de extractos de páncreas humano en una columna C₁₈ usando un gradiente lineal en un sistema de acetonitrilo/TFA a bajo pH (Suda K. *et al.*, Biomedical Res. 9, 39-45 (1988)).

El nivel de flujo y los efectos de la temperatura han sido descritos para una purificación por RP-HPLC de un análogo de GLP-1 obtenido a partir de tecnología recombinante en una columna C₁₈ con etanol como agente de elución orgánico sin controlar el pH de los solventes cromatográficos (Schou O., presentado en la 6ª Conferencia de Interlaken sobre avances en producción de productos biológicos, Interlaken, Suiza, 25-28 de marzo, 2003).

EP 0708179 expone el uso de síntesis de fase sólida para generar varios análogos y derivados de GLP-1. Un protocolo de purificación empleado incluyó la purificación en una columna C₁₈ a 45°C usando un gradiente lineal en un sistema de acetonitrilo/TFA a bajo pH. Otro protocolo de purificación incluyó dos fases de RP-HPLC a temperatura ambiente: purificación en una columna C₄ usando un gradiente lineal en un sistema de acetonitrilo/TFA a bajo pH seguida de purificación en una columna C₁₈ usando un gradiente lineal en un sistema de acetonitrilo/carbonato de amonio a pH 7,7. Varias impurezas relacionadas y material de inicio fueron eliminados por el método de dos fases dando como resultado una pureza HPLC de aprox. 99% del componente objetivo y un rendimiento general de sólo 14,8%.

Senderoff *et al.* (J. Pharm. Sci. 87, 183-189 (1998)) utilizaron síntesis de fase sólida y tecnología recombinante usando expresión en levadura para generar GLP-1 humano nativo para estudios de cambios conformacionales. El protocolo de purificación para el GLP-1 recombinante incluyó entre otros dos fases de RP-HPLC usando etanol como el agente de elución orgánica. La primera fase de RP-HPLC fue realizada a pH 10,7 con 0,05 M de hidróxido amónico como tampón, mientras que la segunda fase de RP-HPLC fue realizada a bajo pH (debajo de pH 3) con el 1% de ácido acético como tampón. El protocolo de purificación dio como resultado una pureza de GLP-1 de aprox. el 98,5%, no obstante, el producto sufrió cambios conformacionales drásticos dando como resultado dificultades en la redisolución del producto. Además, el alto pH implicado en las fases del proceso incluida la primera fase de RP-HPLC indujo productos de degradación catalizada por bases, que fueron menos bioactivos que el compuesto objetivo. Se empleó una tercera fase de RP-HPLC (condiciones no especificadas) como una de diferentes fases para reprocesar el GLP-1 objetivo y devolverlo a la estructura conformacional correcta.

US 2003/144471 se refiere a un método para la producción de análogos y derivados de GLP-1 recombinante usando un método de HPLC de fase inversa para la purificación en un sistema tampón de gradiente lineal que comprende tris, sulfato de sodio y etanol.

La presente invención se basa en la aplicación de solventes con pH tamponado que comprenden un alcohol como el agente de elución orgánico para la purificación por RP-HPLC de péptidos similares al glucagón y análogos y derivados

ES 2 330 335 T3

del mismo a pH cercano al neutro. La presente invención facilita la eficacia de separación y aplicación aumentadas para uso industrial en comparación con la técnica actual dentro de la purificación por RP-HPLC de péptidos similares al glucagón usando sistemas de solvente basados en alcohol. Sorprendentemente, la separación de compuestos peptídicos similares al glucagón objetivo y las impurezas relacionadas es mejorada por la metodología nueva y da como resultado productos peptídicos similares al glucagón más estables.

El uso de pH cercano al neutro durante la purificación por RP-HPLC tiene la ventaja de que la agregación potencial es evitada en la columna para estos péptidos similares al glucagón, lo cual será reflejado por un ejemplo. Esto resulta sorprendente porque la insulina y el glucagón como se presentó más arriba pueden ser manejados a bajo pH sin agregación en la columna, presentando aquí la diferencia en la naturaleza entre la insulina y el glucagón por un lado y los péptidos similares al glucagón por otro lado.

El uso de alcohol durante la purificación por RP-HPLC tiene la ventaja adicional de inducir mejor conservación conformacional de péptidos en comparación con el acetonitrilo más comúnmente usado. Además, el acetonitrilo (y TFA) son productos químicos tóxicos que, debido a cuestiones medioambientales y de salud, no son adecuados y se debería evitar su uso en escala industrial. Los alcoholes generalmente son menos tóxicos y más adecuados para el uso industrial.

20 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Cromatograma de AU₂₈₀ comparado con tiempo para la separación preparatoria usando gel de sílice 120 Å sustituido en C₄ y elución a pH 3,5 de Arg³⁴-GLP-1 (7-37) de impurezas relacionadas que son impurezas glicosiladas.

Figura 2. Cromatograma de AU₂₈₀ comparado con tiempo para la separación preparatoria usando gel de sílice 120 Å sustituido en C₄ y elución a pH 7,5 de Arg³⁴-GLP-1 (7-37) de impurezas relacionadas que son impurezas glicosiladas al igual que la forma truncada, Arg³⁴-GLP-1 (9-37).

Figura 3. Cromatograma de AU₂₈₀ comparado con tiempo para la separación preparatoria usando gel de sílice 200 Å sustituido en C₁₈ y elución a pH 3,5 de Arg³⁴-GLP-1 (7-37) de impurezas relacionadas que son impurezas glicosiladas.

Figura 4. Cromatograma de AU₂₈₀ comparado con el tiempo para la separación preparatoria usando gel de sílice 200 Å sustituido en C₁₈ y elución a pH 7,5 de Arg³⁴-GLP-1 (7-37) de impurezas relacionadas que son impurezas glicosiladas al igual que la forma truncada, Arg³⁴-GLP-1 (9-37).

Figura 5. Cromatograma de AU₂₈₀ comparado con tiempo para la separación preparatoria usando gel de sílice 120 Å sustituido en C₁₈ y elución a pH 7,5 de Arg³⁴-GLP-1 (7-37) de impurezas relacionadas que son impurezas glicosiladas al igual que la forma truncada, Arg³⁴-GLP-1 (9-37).

Figura 6. Cromatograma de AU₂₈₀ comparado con el tiempo para la separación preparatoria de Arg³⁴-GLP-1(7-37) de impurezas relacionadas que son impurezas glicosiladas usando gel de sílice 120 Å sustituido en C₄ y elución a pH 7,5 en un solvente sin tampón pH.

Definiciones

Lo siguiente es una definición detallada de los términos usados en la especificación.

El término “purificar” un péptido de una composición que comprende el péptido y uno o más contaminantes significa aumentar el grado de pureza del péptido en la composición reduciendo el contenido de al menos un contaminante de la composición.

El término “impureza relacionada” según se utiliza en este caso significa una impureza que tiene similitud estructural con el péptido similar al glucagón objetivo. Una impureza relacionada tiene estructura química o física diferente al péptido similar al glucagón objetivo y es una forma truncada, una forma extendida (aminoácidos extra, varios derivados etc.), una forma desamidada, una forma incorrectamente plegada, una forma con glicosilación indeseada que incluye sialilación, formas oxidadas, formas que resultan a partir de racemización, formas carentes de aminoácidos extra en la cadena intra-peptídica, formas que tienen aminoácidos extra en la cadena intra-peptídica, formas en las cuales ha ocurrido una acilación en un residuo distinto al deseado.

El término “tampón” según se utiliza en este caso se refiere a un compuesto químico que reduce la tendencia del pH de un solvente cromatográfico a cambiar con el tiempo como ocurriría de lo contrario. Los tampones incluyen pero no se limitan a productos químicos tales como acetato sódico, carbonato sódico, citrato sódico, glicil-glicina, glicina, histidina, lisina, fosfato sódico, borato, TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano), etanolamina o mezclas derivadas.

ES 2 330 335 T3

El término “péptido similar al glucagón” según se utiliza en este caso se refiere a los péptidos homólogos péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), péptido similar al glucagón 2 (GLP-2) y oxintomodulina (OXM) derivados del gen de preproglucagón, las exendinas al igual que los análogos y derivados de los mismos. Las exendinas encontradas en el monstruo de Gila son homólogos al GLP-1 y también ejercen un efecto insulínico. Ejemplos de exendinas son exendina-4 y exendina-3.

Los péptidos similares al glucagón poseen las siguientes secuencias (SEC ID N° 1-5):

| | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|---|---|----|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------------------|
| GLP-1 | H | A | E | G | T | F | T | S | D | V | S | S | Y | L | E | G | Q | A | A | K | E | F | I | A | W | L | V | K | G | R | G | | | | | | | | | |
| GLP-2 | H | A | D | G | S | F | S | D | E | M | N | T | I | L | D | N | L | A | A | R | D | F | I | N | W | L | I | Q | T | K | I | T | D | | | | | | | |
| Exendina-4 | H | G | E | G | T | F | T | S | D | L | S | K | Q | M | E | E | E | A | V | R | L | F | I | E | W | L | K | N | G | G | P | S | S | G | A | P | P | P | S | -NH ₂ |
| Exendina-3 | H | S | D | G | T | F | T | S | D | L | S | K | Q | M | E | E | E | A | V | R | L | F | I | E | W | L | K | N | G | G | P | S | S | G | A | P | P | P | S | -NH ₂ |
| OXM | H | S | Q | G | T | F | T | S | D | Y | S | K | Y | L | D | S | R | R | A | Q | D | F | V | Q | W | L | M | D | T | K | R | N | K | N | I | A | | | | |

El término “análogo” según se utiliza en este caso en referencia a un péptido significa un péptido modificado donde uno o más residuos de aminoácidos del péptido han sido sustituidos por otros residuos de aminoácidos y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido deletados del péptido y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido añadidos al péptido. Esa adición o delección de residuos de aminoácidos puede tener lugar en el N-terminal del péptido y/o en el C-terminal del péptido. Para describir los análogos se utilizan frecuentemente dos sistemas diferentes y simples: Por ejemplo Arg³⁴-GLP-1(7-37) o K34R-GLP-1 (7-37) designa un análogo de GLP-1 donde la lisina que ocurre naturalmente en la posición 34 ha sido sustituida con arginina (abreviatura estándar de una sola letra para los aminoácidos usados según la nomenclatura IUPAC-IUB).

El término “derivado” según se utiliza en este caso en relación con un péptido parental significa una proteína parental químicamente modificada o un análogo de la misma, donde al menos un sustituyente no está presente en la proteína parental o un análogo de la misma, es decir, una proteína parental que ha sido modificada de manera covalente. Modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres, pegilaciones y similares. Un ejemplo de un derivado de GLP-1 (7-37) es Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil))) -GLP-1 (7-37).

La expresión “un fragmento del mismo” según se utiliza en este caso en relación con un péptido significa cualquier fragmento del péptido con al menos el 20% de los aminoácidos del péptido parental. Así, para la albúmina de suero humano, un fragmento comprenderá al menos 117 aminoácidos puesto que la albúmina de suero humano tiene 585 aminoácidos. En una forma de realización, el fragmento tiene al menos el 35% de los aminoácidos del péptido parental. En otra forma de realización, el fragmento tiene al menos el 50% de los aminoácidos del péptido parental. En otra forma de realización, el fragmento tiene al menos el 75% de los aminoácidos del péptido parental.

El término “variante” según se utiliza en este caso en relación con un péptido significa un péptido modificado, es decir, un análogo del péptido parental, un derivado del péptido parental o un derivado de un análogo del péptido parental.

El término “péptido de GLP-1” según se utiliza en este caso significa GLP-1 (7-37), un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1.

El término “péptido GLP-2” según se utiliza en este caso significa GLP- 2(1-33), un análogo de GLP-2, un derivado de GLP-2 o un derivado de un análogo de GLP-2.

El término “péptido de exendina-4” según se utiliza en este caso significa exendina-4(1-39), un análogo de exendina-4, un derivado de exendina-4 o un derivado de un análogo de exendina-4.

El término “péptido similar al glucagón estable en plasma” según se utiliza en este caso significa un péptido similar al glucagón químicamente modificado, es decir, un análogo o un derivado que muestra una semivida de eliminación de plasma *in vivo* de al menos 10 horas en el hombre, según se determina por el siguiente método. El método para la determinación de la semivida de eliminación de plasma de un péptido similar al glucagón en el hombre es: El compuesto es disuelto en un tampón isotónico, pH 7,4, PBS o cualquier otro tampón adecuado. La dosis es inyectada periféricamente, preferiblemente en el abdomen o muslo superior. Se toman muestras de sangre para la determinación del compuesto activo a intervalos frecuentes y para una duración suficiente para cubrir la parte de eliminación terminal (p. ej. Predosis, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24 (día 2), 36 (día 2), 48 (día 3), 60 (día 3), 72 (día 4) y 84 (día 4) horas postdosis). La determinación de la concentración de compuesto activo es realizada como se describe en Wilken *et al.*, Diabetologia 43(51): A143, 2000. Los parámetros farmacocinéticos derivados son calculados a partir de los datos de concentración-tiempo para cada sujeto individual usando métodos no compartimentales, usando el software

ES 2 330 335 T3

comercialmente disponible WinNonlin versión 2.1 (Farsight, Cary, NC, EEUU). La constante del nivel de eliminación terminal es estimada por regresión log-lineal en la parte terminal log-lineal de la curva de concentración- tiempo y es usada para calcular la semivida de eliminación.

5 El término “péptido similar al glucagón protegido contra DPP-IV” según se utiliza en este caso significa un péptido similar al glucagón que ha sido químicamente modificado para restituir dicho péptido resistente a la aminopeptidasa-4 dipeptidil peptidasa de plasma (DPP-IV) que la forma nativa de dicho péptido.

10 El término “péptido exendina-4 inmunomodulado” según se utiliza en este caso significa un péptido exendina-4 que es un análogo o un derivado de la exendina-4(1-39) que tiene una respuesta inmunitaria reducida en seres humanos en comparación con la exendina-4(1-39). El método para evaluar la respuesta inmunitaria es medir la concentración de anticuerpos reactivos al péptido exendina-4 después de 4 semanas de tratamiento del paciente.

15 El término “producto de péptido similar al glucagón” según se utiliza en este caso significa el producto de péptido purificado que se utilizará para la producción de una composición farmacéutica. Así, el producto de péptido similar al glucagón normalmente es obtenido como el producto de la fase final de purificación, de secado o de condicionamiento. El producto puede ser cristales, precipitado, solución o suspensión. El producto de péptido similar al glucagón también es conocido en la técnica como el principio activo, es decir, el ingrediente farmacéutico activo. El término “punto isoelectrico” según se utiliza en este caso significa el valor de pH donde la carga neta global de una macromolécula tal como un polipéptido es cero. En los polipéptidos puede haber muchos grupos cargados y en el punto isoelectrico la suma de todas estas cargas es cero. A un pH por encima del punto isoelectrico la carga neta global del polipéptido será negativa, mientras que a valores de pH debajo del punto isoelectrico la carga neta global del polipéptido será positiva.

25 El término “farmacéutico” según se utiliza en este caso con referencia a una composición significa que es útil para tratar una enfermedad o un trastorno.

El término “farmacéuticamente aceptable” según se utiliza en este caso significa adecuados para aplicaciones farmacéuticas normales, es decir, que no generan eventos adversos en los pacientes, etc.

30 El término “cantidad eficaz” según se utiliza en este caso significa una dosificación que es suficiente para ser eficaz para el tratamiento del paciente en comparación con la ausencia de tratamiento.

35 El término “composición farmacéutica” según se utiliza en este caso significa un producto que comprende un compuesto activo o una sal derivada del mismo junto con excipientes farmacéuticos tales como tampón, conservante y, opcionalmente, un modificador de tonicidad y/o un estabilizador. De ese modo, una composición farmacéutica es también conocida en la técnica como una fórmula farmacéutica.

40 El término “excipientes” según se utiliza en este caso significa los compuestos químicos que normalmente son añadidos a composiciones farmacéuticas, p. ej. tampones, agentes de tonicidad, conservantes y similares.

45 El término “tratamiento de una enfermedad” según se utiliza en este caso significa dirigir y cuidar de un paciente que ha desarrollado la enfermedad, la condición o el trastorno. El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, la condición o el trastorno. El tratamiento incluye la administración de los compuestos activos para eliminar o controlar la enfermedad, la condición o el trastorno y aliviar los síntomas o complicaciones asociadas a la enfermedad, la condición o el trastorno.

Descripción de la invención

50 En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para la purificación de un péptido similar al glucagón de una composición que comprende dicho péptido similar al glucagón y al menos una impureza relacionada, cuyo método es un proceso cromatográfico de líquidos de alto rendimiento de fase inversa en el cual el solvente usado para la elución es pH tamponado en la gama de pH 4 a pH 10, dicho solvente es pH tamponado para prevenir variaciones de pH superiores a +/-1.0 unidades de pH desde el punto de referencia durante la fase de elución, y dicho solvente comprende un alcohol en una concentración del 20% p/p al 60% p/p, donde una impureza relacionada es una impureza que tiene similitud estructural con el péptido similar al glucagón objetivo y es seleccionada del grupo que consiste en una forma truncada, una forma extendida, una forma desamidada, una forma incorrectamente plegada, una forma con glicosilación no deseada, una forma oxidada, una forma que se produce a partir de la racemización, una forma carente de aminoácidos en la cadena intrapeptídica, una forma que tiene aminoácidos extra en la cadena intra-peptídica y una forma en la cual se ha producido una acilación en otro residuo que no es el deseado.

60 La fracción de GLP objetivo y las impurezas son eluidas y separadas por un gradiente de cambio de fase, lineal o asintótico o isocráticamente en solvente orgánico, o en combinaciones de los mismos. El gradiente componente de solvente orgánico sería de una concentración inferior a una más alta. La elución también puede ser posible cambiando el pH y/o la temperatura en la sección de elución.

65 La solución de equilibrado y la muestra para la aplicación pueden o no contener el solvente orgánico. El solvente orgánico podría ser pero no se limita a cualquier alcohol alifático monohídrico (metanol, etanol, propanoles y butanoles). Los componentes de sal opcionales para cualquier sección de la purificación cromatográfica puede ser cualquier

ES 2 330 335 T3

sal que incluya y no se limite a: NaCl, KCl, NH₄Cl, CaCl₂, acetato sódico, acetato de potasio, acetato amónico, etc. Cualquier componente tampón puede ser usado incluidos, a título enunciativo y no limitativo: tampones de citrato, tampones de fosfato, tris tampones, tampones de borato, tampones de carbonato, tampones de acetato, tampones de amonio, tampones de glicina etc. El método también se aplica a cualquier elección de resina de fase inversa cromatográfica opcionalmente con cualquier tipo de sustitución, incluidos, a título enunciativo y no limitativo: La resina basada en sílice, tal como Kromasil 100 C₁₈, la resina basada en polímero tal como Source de Amersham Biosciences, materiales Poros de Applied Biosystems, p. ej. resinas de fase inversa Poros R1, R2 y R3, resinas basadas en cerámico de CIPHERGEN, resinas basadas en óxido metálico y otras. Preferiblemente, se utiliza una resina basada en sílice.

En una forma de realización de la invención el solvente es pH tamponado en la gama de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9.

En otra forma de realización de la invención el solvente es pH tamponado a un pH superior al punto isoelectrico de dicho péptido similar al glucagón.

En otra forma de realización de la invención el solvente es pH tamponado para prevenir variaciones de pH superiores a +/- 1.0 unidades de pH del punto de referencia durante la fase de elución.

En otra forma de realización de la invención el solvente es pH tamponado para prevenir variaciones de pH superiores a +/- 0.5 unidades de pH del punto de referencia durante la fase de elución.

En otra forma de realización de la invención el alcohol es etanol.

En otra forma de realización de la invención el alcohol es 2-propanol.

En otra forma de realización de la invención, el alcohol es seleccionado del grupo que consiste en metanol, 1 propanol y hexilenglicol.

En otra forma de realización de la invención, el proceso cromatográfico de líquidos de alto rendimiento de fase inversa es realizado usando una resina cromatográfica basada en sílice.

En otra forma de realización de la invención la resina es un gel de sílice sustituido, tal como gel de sílice de C₄, C₆, C₈, C₁₂, C₁₆, C₁₈, C₂₀, fenilo obenceno sustituido.

En otra forma de realización de la invención el proceso cromatográfico de líquidos de alto rendimiento de fase inversa es realizado usando una resina cromatográfica que es un material de base polimérica.

Los métodos de RP-HPLC con la selectividad aumentada de péptidos similares al glucagón cerca del pH neutro preferiblemente corresponden a la eliminación de impurezas relacionadas con una estructura física o química diferente al péptido similar al glucagón objetivo, y es seleccionado del grupo que consiste en formas truncadas, todo tipo de formas extendidas (aminoácidos extra, varios derivados etc.), formas desamidadas, formas incorrectamente plegadas, formas con glicosilación indeseada incluida la sialilación, formas oxidadas, formas que resultan a partir de la racemización, formas carentes de aminoácidos en la cadena intra-peptídica, formas que tienen aminoácidos extra en la cadena intra-peptídica y otros.

En una forma de realización de la invención la impureza relacionada es una forma truncada de dicho péptido similar al glucagón.

En otra forma de realización de la invención la impureza relacionada es una forma glicosilada de dicho péptido similar al glucagón.

En otra forma de realización de la invención el solvente comprende un alcohol en una concentración de aproximadamente el 20%p/p a aproximadamente el 40%p/p.

En otra forma de realización de la presente invención el péptido similar al glucagón es GLP-1, un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1.

En otra forma de realización de la presente invención el Arg³⁴-GLP-1(7-37), Gly⁸-GLP-1(7-36)-amida, Gly⁸-GLP-1(7-37), Val⁸-GLP-1 (7-36)-amida, Val⁸ -GLP-1(7-37), Val⁸ Asp²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸ Asp²²-GLP-1(7-37), Val⁸ Glu²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸ Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸ Lys²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸ Lys²²-GLP-1 (7-37), Val⁸ Arg²²-GLP-1 (7-36)-amida, Val⁸ Arg²²-GLP-1(7-37), Val⁸ His²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸ His²²-GLP-1 (7-37), Val⁸ Trp¹⁹ Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸ Glu²² Val²⁵-GLP-1(7-37), Val⁸ Tyr¹⁶ Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸ Trp¹⁶ Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸ Leu¹⁶ Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸ Tyr¹⁸ Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸ Glu²² His³⁷-GLP-1(7-37), Val⁸ Glu²² Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸ Trp¹⁶ Glu²² Val²⁵ Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸ Trp¹⁶ Glu²² Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸ Glu²² Val²⁵ Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸ Trp¹⁶ Glu²² Val²⁵-GLP-1(7-37), sus análogos y derivados de cualquiera de éstos.

ES 2 330 335 T3

En otra forma de realización de la presente invención el derivado de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1 tiene un residuo de lisina, tal como una lisina, donde un sustituyente lipofílico opcionalmente vía un separador es fijado al grupo amino épsilon de dicha lisina.

5 En otra forma de realización de la presente invención el sustituyente lipofílico tiene de 8 a 40 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 24 átomos de carbono, p. ej. 12 a 18 átomos de carbono.

En otra forma de realización de la presente invención el separador está presente y es seleccionado de un aminoácido, p. ej. beta-Ala, L-Glu o aminobutiroilo.

10

En otra forma de realización de la presente invención el péptido similar al glucagón es un péptido similar al glucagón protegido contra DPPIV. La peptidasa DPPIV hidroliza los péptidos similares al glucagón y la tasa de depuración de péptidos similares al glucagón puede ser reducida por estos análogos de las formas naturales de péptidos similares al glucagón que son protegidos contra DPPIV, es decir, aquellos análogos que bajo condiciones fisiológicas tienen un nivel de hidrólisis inferior por la enzima DPPIV. En otra forma de realización de la presente invención el péptido similar al glucagón es un péptido similar al glucagón estable en plasma.

15

En otra forma de realización de la presente invención el péptido similar al glucagón es un derivado de un análogo de GLP-1 que es Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37).

20

En otra forma de realización de la presente invención el péptido similar al glucagón es un péptido GLP-1 que tiene de 25 a 37 residuos de aminoácidos, preferiblemente de 27 a 35 residuos de aminoácidos, incluso más preferiblemente de 29 a 33 residuos de aminoácidos.

25

En una forma de realización de la presente invención el péptido similar al glucagón es GLP-2, un análogo de GLP-2, un derivado de GLP-2 o un derivado de un análogo de GLP-2.

30

En otra forma de realización de la presente invención el derivado de GLP-2 o un derivado de un análogo de GLP-2 tiene un residuo de lisina, tal como una lisina, donde un sustituyente lipofílico opcionalmente vía un separador es fijado al grupo amino épsilon de dicha lisina.

En otra forma de realización de la presente invención el sustituyente lipofílico tiene de 8 a 40 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 24 átomos de carbono, p. ej. 12 a 18 átomos de carbono.

35

En otra forma de realización de la presente invención el separador está presente y es seleccionado de un aminoácido, p. ej. beta-Ala, L-Glu, aminobutiroilo.

En otra forma de realización de la presente invención, el péptido similar al glucagón tiene de 27 a 39 residuos de aminoácidos, preferiblemente de 29 a 37 residuos de aminoácidos, incluso más preferiblemente, de 31 a 35 residuos de aminoácidos.

40

En otra forma de realización de la presente invención el péptido similar al glucagón es Gly²-GLP-2(1-33).

En una forma de realización de la presente invención, el péptido similar al glucagón es exendina-4, un análogo de exendina-4, un derivado de exendina-4, o un derivado de un análogo de exendina-4.

45

En otra forma de realización de la presente invención el péptido similar al glucagón es exendina-4.

En otra forma de realización de la presente invención el péptido similar al glucagón es el análogo de exendina-4 ZP-10 (HGEFTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPSKKKKKK-NH₂).

50

En otra forma de realización de la presente invención el derivado de exendina-4 o derivado de un análogo de exendina-4 es acilado o pegilado.

55

En otra forma de realización de la presente invención, el péptido similar al glucagón es un péptido exendina-4 estable.

En otra forma de realización de la presente invención, el péptido similar al glucagón es un péptido exendina-4 protegido contra DPP-IV.

60

En otra forma de realización de la presente invención, el péptido similar al glucagón es un péptido exendina-4 inmunomodulado.

En otra forma de realización de la presente invención el derivado de exendina-4 o derivado de un análogo de exendina-4 tiene un residuo de lisina, tal como una lisina, donde un sustituyente lipofílico opcionalmente vía un separador es fijado al grupo amino épsilon de dicha lisina.

65

ES 2 330 335 T3

En otra forma de realización de la presente invención, el sustituyente lipofílico tiene de 8 a 40 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 24 átomos de carbono, p. ej. 12 a 18 átomos de carbono.

5 En otra forma de realización de la presente invención el separador está presente y es seleccionado de un aminoácido, p. ej. beta-Ala, L-Glu o aminobutiroilo.

10 En otra forma de realización de la presente invención, el péptido similar al glucagón es un péptido exendina-4 que tiene de 30 a 48 residuos de aminoácidos, de 33 a 45 residuos de aminoácidos, preferiblemente de 35 a 43 residuos de aminoácidos, incluso más preferiblemente de 37 a 41 residuos de aminoácidos.

10 En una forma de realización de la invención el péptido GLP-2 es seleccionado de la lista que consiste en: K30R-GLP-2(1-33); S5K-GLP-2(1-33); S7K-GLP-2(1-33); D8K-GLP-2(1-33); E9K-GLP-2(1-33); M10K-GLP-2(1-33); N11 K-GLP-2(1-33); T12K-GLP-2(1-33); I13K-GLP-2(1-33); L14K-GLP-2(1-33); D15K-GLP-2(1-33); N16K-GLP-2(1-33); L17K-GLP-2(1-33); A18K-GLP-2(1-33); D21K-GLP-2(1-33); N24K-GLP-2(1-33); Q28K-GLP-2(1-33); S5K/K30R-GLP-2(1-33); S7K/K30R-GLP-2(1-33); D8K/K30R-GLP-2(1-33); E9K/K30R-GLP-2(1-33); M10K/K30R-GLP-2(1-33); N11 K/K30R-GLP-2(1-33); T12K/K30R-GLP-2(1-33); I13K/K30R-GLP-2(1-33); L14K/K30R-GLP-2(1-33); D15K/K30R-GLP-2(1-33); N16K/K30R-GLP-2(1-33); L17K/K30R-GLP-2(1-33); A18K/K30R-GLP-2(1-33); D21 K/K30R-GLP-2(1-33); N24K/K30R-GLP-2(1-33); Q28K/K30R-GLP-2(1-33); K30R/D33K-GLP-2(1-33); D3E/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/S5K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/S7K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/D8K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/E9K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/M10K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/N11K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/T12K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/I13K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/L14K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/D15K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/N16K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/L17K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/A18K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/D21K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/N24K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); D3E/Q28K/K30R/D33E-GLP-2(1-33); y derivados de los mismos.

25 En una forma de realización de la invención, el derivado de GLP-2 es seleccionado del grupo que consiste en

- 30 S5K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- S7K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- D8K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- E9K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- 35 M10K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- N11K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- 40 T12K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- I13K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- L14K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- 45 D15K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- N16K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- 50 L17K(3-(octanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- L17K(3-(nonanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- L17K(3-(decanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- 55 L17K(3-(undecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- L17K(3-(dodecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- 60 L17K(3-(tridecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- L17K(3-(tetradecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- L17K(3-(pentadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- 65 L17K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
- L17K(3-(heptadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);

ES 2 330 335 T3

L17K(3-(octadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
L17K(3-(nonadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
5 L17K(3-(eicosanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(octanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(nonanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
10 L17K((S)-4-carboxi-4-(decanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(undecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(dodecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
15 L17K((S)-4-carboxi-4-(tridecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(tetradecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
20 L17K((S)-4-carboxi-4-(pentadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(hexadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(heptadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
25 L17K((S)-4-carboxi-4-(octadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(nonadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(9-33);
30 L17K((S)-4-carboxi-4-(eicosanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K(4-(octanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K(4-(nonanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
35 L17K(4-(decanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K(4-(undecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
40 L17K(4-(dodecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K(4-(tridecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K(4-(tetradecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
45 L17K(4-(pentadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K(4-(hexadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
50 L17K(4-(heptadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K(4-(octadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
L17K(4-(nonadecanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
55 L17K(4-(eicosanoilamino)butanoil)-GLP-2(1-33);
A18K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
60 D21K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
N24K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
Q28K(3-(hexadecanoilamino)propionil)-GLP-2(1-33);
65 S5K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);

ES 2 330 335 T3

- S7K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
D8K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
5 E9K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
M10K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
N11K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
10 T12K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
I13K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
15 L14K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
D15K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
N16K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
20 L17K(3-(octanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(3-(nonanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
25 L17K(3-(decanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(3-(undecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(3-(dodecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
30 L17K(3-(tridecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(3-(tetradecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
35 L17K(3-(pentadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(3-(heptadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
40 L17K(3-(octadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(3-(nonadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
45 L17K(3-(eicosanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(octanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(nonanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
50 L17K((S)-4-carboxi-4-(decanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(undecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
55 L17K((S)-4-carboxi-4-(dodecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(tridecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(tetradecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
60 L17K((S)-4-carboxi-4-(pentadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(hexadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
65 L17K((S)-4-carboxi-4-(heptadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(octadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);

ES 2 330 335 T3

L17K((S)-4-carboxi-4-(nonadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K((S)-4-carboxi-4-(eicosanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
5 L17K(4-(octanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(4-(nonanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(4-(decanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
10 L17K(4-(undecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(4-(dodecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
15 L17K(4-(tridecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(4-(tetradecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(4-(pentadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
20 L17K(4-(hexadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(4-(heptadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
25 L17K(4-(octadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(4-(nonadecanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
L17K(4-(eicosanoilamino)butanoil)/K30R-GLP-2(1-33);
30 A18K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
D21K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
35 N24K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
Q28K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R-GLP-2(1-33);
D3E/S5K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
40 D3E/S7K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/D8K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
45 D3E/E9K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/M10K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/N 11 K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
50 D3E/T12K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/I13K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
55 D3E/L14K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/D15K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/N16K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
60 D3E/L17K(3-(octanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K(3-(nonanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
65 D3E/L17K(3-(decanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K(3-(undecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

ES 2 330 335 T3

D3E/L17K(3-(dodecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K(3-(tridecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
5 D3E/L17K(3-(tetradecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K(3-(pentadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
10 D3E/L17K(3-(heptadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K(3-(octadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
15 D3E/L17K(3-(nonadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K(3-(eicosanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(octanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
20 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(nonanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(decanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
25 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(undecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(dodecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(tridecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
30 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(tetradecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(pentadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
35 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(hexadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(heptadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(octadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
40 D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(nonadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K((S)-4-carboxi-4-(eicosanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
45 D3E/L17K(4-(octanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K(4-(nonanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K(4-(decanoilamino)butanoil)/K30RID33E-GLP-2(1-33);
50 D3E/L17K(4-(undecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K(4-(dodecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
55 D3E/L17K(4-(tridecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K(4-(tetradecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K(4-(pentadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
60 D3E/L17K(4-(hexadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K(4-(heptadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
65 D3E/L17K(4-(octadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);
D3E/L17K(4-(nonadecanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

ES 2 330 335 T3

D3E/L17K(4-(eicosanoilamino)butanoil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/A18K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

5 D3E/D21 K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33);

D3E/N24K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33); y

10 D3E/Q28K(3-(hexadecanoilamino)propionil)/K30R/D33E-GLP-2(1-33).

Se pueden encontrar métodos para la preparación de GLP-2, análogos de los mismos al igual que derivados de GLP-2 en, p. ej., WO 99/43361 y WO 00/55119.

15 En otra forma de realización de la invención el péptido similar al glucagón es un análogo insulínico de exendina-4 (1-39), p. ej. Ser²Asp³-exendina-4(1-39) donde los residuos de aminoácidos en la posición 2 y 3 han sido sustituidos con serina y ácido aspártico, respectivamente (este análogo en particular también es conocido en la técnica como exendina-3).

20 En otra forma de realización de la invención, el péptido similar al glucagón es un derivado de exendina-4 donde el sustituyente introducido es seleccionado de amidas, carbohidratos, grupos alquilo, ésteres y sustituyentes lipofílicos. Un ejemplo de un derivado insulínico de exendina-4(1-39) y análogos del mismo es Tyr³¹-exendina-4(1-31)-amida.

25 En otra forma de realización de la invención el péptido similar al glucagón es un péptido exendina-4 estable. En otra forma de realización de la invención, el péptido similar al glucagón es un péptido exendina-4 protegido contra DPP-IV. En otra forma de realización de la invención, el péptido similar al glucagón es un péptido exendina-4 inmunomodulado.

30 Se pueden encontrar métodos para la preparación de exendina-4, análogos de la misma y derivados de exendina-4 en, p. ej., WO 99/43708, WO 00/41546 y WO 00/55119.

35 El péptido similar al glucagón parental puede ser producido por síntesis peptídica, p. ej. síntesis peptídica de fase sólida usando química Boc o Fmoc u otras técnicas bien establecidas. El péptido similar al glucagón parental también puede ser producido por un método que comprende el cultivo de una célula huésped que contiene una secuencia de ADN que codifica el polipéptido y que es capaz de expresar el polipéptido en un medio nutritivo adecuado bajo condiciones que permiten la expresión del péptido, después de lo cual el péptido resultante es recuperado del cultivo.

40 El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar las células huéspedes, tales como medios mínimos o complejos que contengan suplementos apropiados. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o pueden ser preparados según recetas publicadas (p. ej. en catálogos de la American Type Culture Collection). El péptido producido por las células luego puede ser recuperado del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluida la separación de las células huéspedes del medio por centrifugado o filtración, precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado mediante una sal, p. ej. sulfato de amonio, purificación por una variedad de procedimientos cromatográficos, p. ej. cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similares, según el tipo de péptido en cuestión.

45 La secuencia de ADN que codifica el péptido parental puede ser adecuadamente de origen genómico o de ADNc, por ejemplo, obtenido preparando una biblioteca genómica o de ADNc y explorando las secuencias de ADN que codifican todo o parte del péptido por hibridación usando sondas de oligonucleótidos sintéticos conforme a las técnicas estándar (véase, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). La secuencia de ADN que codifica el péptido también puede ser preparada sintéticamente por métodos estándar establecidos, p. ej. el método de fosfoamida descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859-1869, o el método descrito por Matthes *et al.*, EMBO Journal 3 (1984), 801-805. La secuencia de ADN también puede ser preparada por reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4.683.202 o Saiki *et al.*, Science 239 (1988), 487-491.

55 La secuencia de ADN puede ser insertada en cualquier vector que puede convenientemente ser sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección de vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la cual será introducida. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, al ser introducido en una célula huésped, es integrado en el genoma de la célula huésped y replicado con el o los cromosomas en los cuales ha sido integrado.

65 El vector es preferiblemente un vector de expresión en el cual la secuencia de ADN que codifica el péptido está operativamente enlazada a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN, tal como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede ser derivado de genes que codifican proteínas bien homólogas o heterólogas a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el péptido de la invención en una variedad de células huéspedes son bien conocidos en la técnica, cf. por ejemplo Sambrook *et al.*, *supra*.

ES 2 330 335 T3

La secuencia de ADN que codifica el péptido también puede, de ser necesario, ser conectada operativamente a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias potenciadoras transcripcionales y secuencias potenciadoras traduccionales. El vector recombinante de la invención además puede comprender una secuencia de ADN que permita que el vector se replique en la célula huésped en cuestión.

5

El vector también puede comprender un marcador seleccionable, p. ej. un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped o uno que confiera resistencia a un fármaco, p. ej. ampicilina, canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

10

Para dirigir un péptido parental de la presente invención en la vía secretora de las células huéspedes, una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia guía, secuencia prepro o secuencia pre) puede ser proporcionada en el vector recombinante. La secuencia señal secretora está unida a la secuencia de ADN que codifica el péptido en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras comúnmente están situadas 5' a la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser aquella normalmente asociada al péptido o puede provenir de un gen que codifica otra proteína segregada.

15

Los procedimientos usados para enlazar las secuencias de ADN que codifican este péptido, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contengan la información necesaria para la replicación, son conocidos por expertos en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*).

20

La célula huésped en la cual se introduce la secuencia de ADN o el vector recombinante puede ser cualquier célula que sea capaz de producir este péptido e incluye bacterias, levadura, hongos y células eucarióticas superiores. Ejemplos de células huéspedes adecuadas bien conocidas y usadas en la técnica son, sin limitación, líneas celulares de *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, o BHK o CHO de mamífero.

25

Las composiciones farmacéuticas que contienen un péptido similar al glucagón purificado según la presente invención normalmente contienen varios excipientes farmacéuticos, tales como conservantes, agentes isotónicos y agentes tensioactivos. La preparación de las composiciones farmacéuticas es bien conocida por los expertos en la materia. Para facilitar la lectura, se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, 1995.

30

Las composiciones farmacéuticas que contienen un péptido similar al glucagón purificado según la presente invención pueden ser administradas por vía parenteral a pacientes que necesiten tratamiento de este tipo. La administración parenteral puede ser realizada por inyección subcutánea, inyección intramuscular o inyección intravenosa mediante una jeringa, opcionalmente una jeringa tipo pluma. De forma alternativa, la administración puede ser realizada por infusión, p. ej. usando una bomba de infusión.

35

La presente invención es ilustrada con mayor detalle por medio de los siguientes ejemplos de los cuales, no obstante, no se debe interpretar que limiten el alcance de la protección. Las características descritas en la descripción precedente y en los siguientes ejemplos pueden ser, tanto separadamente como en cualquier combinación de los mismos, esencial para realizar la invención en diversas formas de la misma.

40

Ejemplos

45

Ejemplo 1

RP-HPLC analítica. El análisis por RP-HPLC para la identificación/verificación de valores máximos recogidos se efectuó en una columna Waters Symmetry RP-18, 3,5 μm , 100 \AA , 4,6 x 150 mm. El tampón A consistió en 0,15 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en acetonitrilo al 7,8% (p/p), pH 2,5, y el tampón B contenía acetonitrilo al 63,4% (p/p). Los gradientes lineales de B al 37-44,1% en 15 min seguidos de B al 44,1-100% en 10 min fueron ejecutados a un nivel de flujo de 1 ml/min. La temperatura cromatográfica fue mantenida a 60°C y se realizó detección UV a 214 nm.

50

55

Ejemplo 2

Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura (*S. cerevisiae*) por tecnología de ADN recombinante convencional como se describe en WO 98/08871. Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ en el caldo de fermentación luego fue purificado por cromatografía en fase inversa convencional y posteriormente precipitado en el pH isoeléctrico del péptido, es decir, a pH 5,4. El precipitado fue aislado por centrifugado.

60

El precipitado isoeléctrico que contiene Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ y las impurezas relacionadas, entre otras la impureza truncada Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎ fue disuelta en agua y el pH fue ajustado a 3,5. Se cargaron 15 ml de la solución (0,91 mg/ml) a 20 ml de resina de (dimetilbutil dimetilsilil) sílice 120 \AA sustituida en C₄ (tamaño de partícula 10 μm , YMC) equilibrados con 40 ml 0,15 mol/kg de sulfato de amonio, 5 mmol/kg de ácido cítrico, etanol al 25% (p/p) pH 3,5. La columna fue lavada con 10 ml de solución de equilibrado y la elución fue realizada con un gradiente lineal de etanol al 35-45% (0,15 mol/kg de sulfato de amonio, 5 mmol/kg de ácido cítrico) durante 240 ml.

65

ES 2 330 335 T3

En la Fig. 1 se muestra un cromatograma de la purificación preparatoria. Del perfil cromatográfico se puede observar que las impurezas glicosiladas fueron separadas, no obstante, no se obtuvieron valores máximos definidos ni separación entre la forma truncada y la fracción GLP-1. Tampoco se observó ninguna separación entre Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ y Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎ por análisis de RP-HPLC.

5

Ejemplo 3

Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura, capturado por RP-LC y precipitado como se describe en el ejemplo 2.

10

El precipitado isoeléctrico conteniendo Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ e impurezas relacionadas, entre otras la impureza truncada Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎, fue disuelta en agua y el pH fue ajustado a 7,5. Se cargaron 15 ml de la solución (0,91 mg/ml) a 20 ml de gel de (dimetilbutil dimetilsilil) sílice 120 Å sustituido en C₄ (tamaño de partícula 10 μm, YMC) equilibrados con 40 ml 0,15 mol/kg de sulfato de amonio, 5 mmol/kg de ácido cítrico, etanol al 25% (p/p) pH 7,5. La columna fue lavada con 10 ml de solución de equilibrado y la elución fue realizada con un gradiente lineal de etanol al 30-40% (5 mol/kg de sodio dihidrógeno fosfato, 210 mmol/kg de acetato de potasio) durante 240 ml.

15

En la Fig. 1 se muestra un cromatograma de la purificación preparatoria. Solamente del perfil cromatográfico se puede observar que las impurezas glicosiladas fueron separadas y además, la separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 objetivo se obtuvo a un pH controlado por tampón de 7,5 de los solventes cromatográficos. Además, los resultados de los análisis por RP-HPLC de las fracciones dadas en la Tabla 1 muestran que el contenido de la forma truncada, Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎, en el valor máximo ha sido reducido a un nivel aceptable.

20

TABLA 1

Análisis por RP-HPLC del ejemplo 3. El análisis fue realizado como se describe en el ejemplo 1

25

| | Contenido de Arg ³⁴ GLP-1 ₍₇₋₃₇₎ | Contenido de Arg ³⁴ GLP-1 ₍₉₋₃₇₎ |
|---------------------------------|---|---|
| Muestra para carga | 55% | 11% |
| Valor máximo principal | 92% | 5% |
| Valor máximo de impureza | 10% | 74% |

30

35

40

Mediante la comparación de los perfiles cromatográficos de los ejemplos 1 y 2, se observa una ventaja adicional del pH neutro: un valor máximo principal mucho más alto y más estrecho y por tanto se obtiene una concentración de agrupación deseada más alta. Diferencias insignificantes en la preparación entre los ejemplos 1 y 2 son: sistema tampón diferente para controlar el pH de las pruebas cromatográficas respectivas y diferentes sistemas de sal. Además, se empleó la misma pendiente de gradiente, pero con diferente concentración de inicio de etanol para obtener retención similar.

45

50

Ejemplo 4

Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura (*S. cerevisiae*) por tecnología del ADN recombinante convencional, como se describe en WO 98/08871. Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ en caldo de fermentación libre de la célula fue purificado por cromatografía de intercambio de cationes y el pH de la agrupación resultante que contiene Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue ajustado a pH 9,0. 10 ml de la agrupación que contiene Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ (3,49 mg/ml) e impurezas relacionadas, entre otros la impureza truncada Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎, fueron cargados a 20 ml de gel de (octadecil dimetil silil) sílice 200 Å sustituido en C₁₈ (tamaño de partícula 15 μm) equilibrado con 40 ml de un solvente que contiene 0,15 mol/kg de sulfato de amonio, 5 mmol/kg de ácido cítrico, etanol al 25% (p/p), pH 3,5. La columna fue lavada con 10 ml de solución de equilibrado y la elución fue realizada con un gradiente lineal de etanol al 35-45% (0,15 mol/kg de sulfato de amonio, 5 mmol/kg de ácido cítrico) durante 240 ml. La temperatura fue mantenida a 23°C durante toda la prueba.

55

60

En la Fig. 3 se muestra un cromatograma de la purificación preparatoria. Las impurezas glicosiladas fueron separadas, no obstante, la fracción de GLP-1 objetivo no fue eluida adecuadamente porque fibriló en la columna y no fue posible recogerla. Por tanto, no se debería emplear pH bajo en relación con un ligando altamente hidrofóbico, tal como C₁₈.

65

ES 2 330 335 T3

Ejemplo 5

Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura (*S. cerevisiae*) por tecnología del ADN recombinante convencional, como se describe en WO 98/08871. Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue capturado por cromatografía de intercambio de cationes como se describe en el ejemplo 4.

10 ml de la agrupación (pH 8,9 a temperatura ambiente) conteniendo Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ (3,49 mg/ml) e impurezas relacionadas, entre otros la impureza troncada Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎, fue cargada a 20 ml de gel de (octadecil dimetil silil) sílice 200 Å sustituido en C₁₈ (tamaño de partícula 15 μm) equilibrado con 40 ml de un solvente que contiene 250 mmol/kg de cloruro de potasio, 5 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de potasio, etanol al 25%(p/p), pH 7,5. La columna fue lavada con 10 ml de solución de equilibrado y la elución fue realizada con un gradiente lineal de etanol al 30-40% (250 mmol/kg de cloruro de potasio, 5 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de potasio) durante 240 ml. La temperatura fue mantenida a 23°C durante toda la prueba.

En la Fig. 4 se muestra un cromatograma de la purificación preparatoria. Solamente del perfil cromatográfico se puede observar que las impurezas glicosiladas fueron separadas y además, la separación entre la forma troncada y la fracción de GLP-1 objetivo se obtuvo a un pH controlado por tampón de 7,5 de los solventes cromatográficos.

Al comparar los perfiles cromatográficos de ejemplos 4 y 5 se muestra que la fracción de GLP-1 objetivo sólo puede ser recogida de la prueba cromatográfica a pH neutro. Diferencias insignificantes en la preparación entre los ejemplos 4 y 5 son: sistema tampón diferente para controlar el pH de las pruebas cromatográficas respectivas y diferentes sistemas de sal. Además, se empleó la misma pendiente de gradiente, pero con diferente concentración de inicio de etanol para obtener retención similar.

Ejemplo 6

Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura y capturado por cromatografía de intercambio de cationes como se describe en el ejemplo 4.

51 ml de la agrupación (pH 7,45 a 22,5°C) conteniendo Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ (0,7 mg/ml) e impurezas relacionadas, entre otros la impureza troncada Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎, fue cargada a 20 ml de gel de (octadecil dimetil silil) sílice 200 Å sustituido en C₁₈ (tamaño de partícula 15 μm) equilibrado con 40 ml de un solvente que contiene 250 mmol/kg de cloruro de potasio, 5 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de potasio, etanol al 25%(p/p), pH 7,5. La columna fue lavada con 10 ml de solución de equilibrado y la elución fue realizada con un gradiente lineal de etanol al 30-40% (250 mmol/kg de cloruro de potasio, 5 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de potasio) durante 240 ml. La temperatura fue mantenida a 4°C durante toda la prueba.

Se obtuvieron valores máximos definidos y separación entre Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎, la forma troncada Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎ y formas glicosiladas del péptido a esta temperatura, similar a lo presentado en el ejemplo 5. La diferencia insignificante en la preparación entre este ejemplo y el ejemplo 5 es el uso de una muestra diferente para cargar.

Ejemplo 7

Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura y capturado por cromatografía de intercambio de cationes como se describe en el ejemplo 4.

51 ml de la agrupación (pH 8,88 a 24,6°C) conteniendo Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ (0,7 mg/ml) e impurezas relacionadas, entre otros la impureza troncada Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎, fue cargada a 20 ml de gel de (octadecil dimetil silil) sílice 200 Å sustituido en C_{es} (tamaño de partícula 15 μm) equilibrado con 40 ml de un solvente que contiene 250 mmol/kg de cloruro de potasio, 5 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de potasio, etanol al 25%(p/p), pH 7,5. La columna fue lavada con 10 ml de solución de equilibrado y la elución fue realizada con un gradiente lineal de etanol al 25-35% (250 mmol/kg de cloruro de potasio, 5 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de potasio) durante 240 ml. La temperatura fue mantenida a 50°C durante toda la prueba.

Se obtuvieron valores máximos distintivos y separación entre Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎, la forma troncada Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎ y formas glicosiladas del péptido a esta temperatura, similar a lo presentado en el ejemplo 5. La diferencia insignificante en la preparación entre este ejemplo y el ejemplo 5 es el uso de una muestra diferente para cargar.

Ejemplo 8

Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura y capturado por cromatografía de intercambio de cationes como se describe en el ejemplo 4.

ES 2 330 335 T3

5 11 51 ml de la agrupación (pH 8,89 a 20,9°C) conteniendo Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ (0,7 mg/ml) e impurezas relacionadas, entre otros la impureza truncada Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎ fue cargada a 20 ml de gel de (octadecil dimetil silil) sílice 120 Å sustituido en C₁₈ (tamaño de partícula 15 μm) equilibrado con 40 ml de un solvente que contiene 250 mmol/kg de cloruro de potasio, 5 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de potasio, etanol al 25%(p/p), pH 7,5. La columna fue lavada con 10 ml de solución de equilibrado y la elución fue realizada con un gradiente lineal de etanol al 30-40% (250 mmol/kg de cloruro de potasio, 5 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de potasio) durante 240 ml. La temperatura fue mantenida a 23°C durante toda la prueba.

10 En la Fig. 5 se muestra un cromatograma de la purificación preparatoria. Solamente del perfil cromatográfico se puede observar que impurezas glicosiladas fueron separadas y además, la separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 objetivo se obtuvo a un pH controlado por tampón de 7,5 de los solventes cromatográficos. De hecho, se alcanzó una resolución más alta entre el valor máximo de Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ y los valores máximos circundantes incluido Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎ con el material 120 Å que con el material 200 Å descrito en el ejemplo 5. La diferencia insignificante en la preparación entre este ejemplo y el ejemplo 5 es el uso de una muestra diferente para cargar.

Ejemplo 9

20 Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura y capturado por cromatografía de intercambio de cationes como se describe en el ejemplo 4.

25 63 ml de la agrupación (pH 8,84 a 22,1°C) conteniendo Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ (0,6 mg/ml) e impurezas relacionadas, entre otros la impureza truncada Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎, fueron cargados a 20 ml de gel de (octadecil dimetil silil) sílice 120 Å sustituido en C₁₈ (tamaño de partícula 15 μm) equilibrado con 40 ml de un solvente que contiene 250 mmol/kg de cloruro de potasio, 5 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de potasio, etanol al 25%(p/p), pH 7,0. La columna fue lavada con 10 ml de solución de equilibrado y la elución fue realizada con un gradiente lineal de etanol al 30-40% (250 mmol/kg de cloruro de potasio, 5 mmol/kg de fosfato de dihidrógeno de potasio) durante 240 ml. La temperatura fue mantenida a 23°C durante toda la prueba.

30 Se obtuvieron valores máximos distintivos y separación entre Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎, la forma truncada Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎ y formas glicosiladas del péptido a este pH, similar a lo presentado en el ejemplo 8. La diferencia insignificante en la preparación entre este ejemplo y el ejemplo 8 es el uso de una muestra diferente para cargar.

Ejemplo 10

40 Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura y capturado por cromatografía de intercambio de cationes como se describe en el ejemplo 4.

La purificación fue realizada como se describe en el ejemplo 9, pero el pH de los solventes fue 8,0.

45 Se obtuvieron valores máximos distintivos y separación entre Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎, la forma truncada Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎ y formas glicosiladas del péptido a este pH, similar a lo presentado en el ejemplo 8. La diferencia insignificante en la preparación entre este ejemplo y el ejemplo 8 es el uso de una muestra diferente para cargar.

Ejemplo 11

50 Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura, capturado por RP-LC y precipitado como se describe en el ejemplo 2.

55 El precipitado isoelectrico que contiene Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ e impurezas relacionadas, entre otros la impureza truncada Arg³⁴GLP-1₍₉₋₃₇₎, fue disuelto en agua y el pH fue ajustado a 7,5. Se cargaron 15 ml de la solución (0,91 mg/ml) a 20 ml de gel de (dimetilbutil dimetilsilil) sílice 120 Å sustituido en C₄ (tamaño de partícula 10 μm, YMC) equilibrados con 40 ml 210 mmol/kg de acetato de potasio, etanol al 25% (p/p) pH 7,5. La columna fue lavada con 10 ml de solución de equilibrado y la elución fue realizada con un gradiente lineal de etanol al 30-40%(210 mmol/kg de acetato de potasio) durante 240 ml, es decir, en un sistema sin una sustancia tampón al pH aplicado.

60 En la Fig. 6 se muestra un cromatograma de la purificación preparatoria. Solamente, del perfil cromatográfico se puede observar que impurezas glicosiladas fueron separadas, no obstante, no se obtuvieron valores máximos distintivos ni separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 objetivo.

65 Mediante la comparación de perfiles cromatográficos de los ejemplos 3 y 11 se muestra que la fracción de GLP-1 objetivo puede ser separada de la impureza truncada a pH 7,5 si el pH es controlado por una sustancia tampón, y así, la realización de la separación. a pH neutro sin una sustancia tampón para controlar el pH reduce la eficiencia de separación del sistema. No se aplicaron otras diferencias en la preparación entre los ejemplos 3 y 11.

ES 2 330 335 T3

Ejemplo 12

Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura (*S. cerevisiae*) por tecnología recombinante convencional como se describe en otro lugar (WO 98/08871). Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ en el caldo de fermentación fue luego purificado por cromatografía en fase inversa con elución en un tampón de glicina a pH 9,0.

33 ml del eluato a pH 7,5 (1,1 mg/ml) fue cargado a una columna de 20 ml de Source 15 RPC (Amersham Pharmacia Biotech) de poliestireno/divinil benceno (tamaño de partícula 15 μ m), equilibrados con 40 ml de etanol al 25%, 250 mmol/kg de cloruro de potasio, 5 mmol/kg de citrato sódico, pH 6,75. La columna fue lavada con 10 ml de solución de equilibrado y la elución fue realizada con un gradiente lineal de etanol al 35-45% (250 mmol/kg de cloruro de potasio, 5 mmol/kg de citrato de sodio), pH 6,75 durante 240 ml. La temperatura fue mantenida a 23°C durante toda la prueba.

Se obtuvieron valores máximos distintivos y separación entre Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ y formas glicosiladas del péptido.

Ejemplo 13

Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura (*S. cerevisiae*) por tecnología recombinante convencional como se describe en otro lugar (WO 98/08871). Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ en el caldo de fermentación fue luego purificado por cromatografía en fase inversa con elución en un tampón de glicina a pH 9,0.

4,6 ml de la solución (1,2 mg/ml) fue cargada a una columna 3 ml RPC PolyBio (BioSeptra) (tamaño de partícula 15 μ m), equilibrada con 6 ml de etanol al 25%, 250 mmol/kg de cloruro de potasio, 5 mmol/kg de NaH₂PO₄, pH, 5. La columna fue lavada con 1,5 ml de solución de equilibrado y la elución fue realizada con un gradiente lineal de etanol al 35-45% (250 mmol/kg de cloruro de potasio, 5 mmol/kg de NaH₂PO₄), pH 7,5 durante 36 ml. La temperatura fue mantenida a 23°C durante toda la prueba.

Se obtuvieron valores máximos distintivos y separación entre Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ y formas glicosiladas del péptido.

Ejemplo 14

Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura (*S. cerevisiae*) por tecnología recombinante convencional como se describe en otro lugar (WO 98/08871). Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ en el caldo de fermentación luego fue purificado por cromatografía en fase inversa convencional y posteriormente precipitado en el pH isoeléctrico del péptido, es decir, a pH 5,4. El precipitado fue aislado por centrifugado.

30 g de isoprecipitado fue disuelto en 1,5 L de agua. El pH fue ajustado a 8,37. Agrupaciones de 220 ml de la solución fueron ajustadas a aproximadamente pH 3,5 y cargadas a una columna 78 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con etanol al 45% (p/p), 20 mmol/kg de ácido cítrico, 75 mol/kg de cloruro de potasio, pH 3,5. La columna fue lavada con 160 ml de etanol al 45% (p/p), 20 mol/kg de ácido cítrico, 87,5 mol/kg de cloruro de potasio, pH 3,5 y Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue eluido con 400 ml de 200 mmol/kg de glicina, pH 9,0. Los eluados fueron agrupados. 160 ml de la agrupación CIEC (1,8 mg/ml) fueron ajustados a pH 7,5 y cargados a 78 ml de gel de sílice (OdDMeSi) 120 Å sustituido en C₁₈ (tamaño de partícula 15 μ m) equilibrado con 160 ml de un solvente que contiene 250 mmol/kg de cloruro sódico, 5 mmol/kg de fosfato dihidrógeno de sodio, etanol al 25% (p/p), pH 7,0. La columna fue lavada con 40 ml de solución de equilibrado y la elución fue realizada con un gradiente lineal de etanol al 28-38% (250 mmol/kg de cloruro de sodio, 5 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de sodio) durante 936 ml. La temperatura fue mantenida a 23°C durante toda la prueba.

Se obtuvieron valores máximos distintivos y separación entre Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ y formas glicosiladas del péptido.

Diferencias insignificantes en la preparación entre los ejemplos 14 y 5 son: carga más alta, muestra diferente para carga, sistemas de tampón y sal diferentes y escala más grande.

Ejemplo 15

Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ -Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue obtenido a partir del péptido parental, Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎, por acilación como se describe en WO 00/55119.

Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ -Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue cargado a 20 ml de gel de (octadecil dimetil silil) sílice sustituido en C₁₈ (tamaño de partícula 15 μ m) equilibrado con 40 ml de etanol al 25% p/p. La columna fue lavada con 10 ml de etanol al 25% p/p, 250 mmol/kg de cloruro de potasio, 20 mmol/kg de propano bis-tris, pH 6,5 y Arg³⁴Lys²⁶N^ε(γ -Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue eluido con un gradiente lineal de etanol al 37-47,5% (250 mmol/kg de cloruro de potasio, 20 mmol/kg de propano bis-tris, pH 6,5) durante 480 ml. La temperatura fue mantenida a 50°C durante toda la prueba.

ES 2 330 335 T3

Se obtuvieron valores máximos distintivos y separación entre Arg³⁴Lys²⁶N^ε(-γ-Glu(N^α-hexadecanoil))GLP-1₍₇₋₃₇₎ y formas des- y diaciladas y además, impurezas desconocidas relacionadas fueron separadas en el flanco trasero.

5 Ejemplo 16

Lys¹⁷Arg³⁰GLP-2₍₁₋₃₃₎ fue expresado en levadura (*S. cerevisiae*) por tecnología del ADN recombinante convencional, p. ej. como se describe en WO 98/08871. Lys¹⁷Arg³⁰GLP-2₍₁₋₃₃₎ fue capturado por RP-LC y precipitado al pH isoelectrico de Lys¹⁷Arg³⁰GLP-2₍₁₋₃₃₎ (pH 4,0). El péptido fue además purificado en una columna de hidroxiapatita y eluido con 100 mmol/kg de fosfato de hidrógeno de potasio, pH 7,8 La agrupación de la captura fue purificada por cromatografía de intercambio de aniones a pH 8.

La agrupación de la fase de intercambio de aniones fue cargada a 4 L de gel de (octadecil dimetil silil) sílice 100 Å sustituido en C₁₈ (tamaño de partícula 15 μm) equilibrado con etanol al 25% p/p, 10 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de sodio, 250 mmol/kg de cloruro de potasio, pH 7,5. La columna fue lavada con 7,8 L de etanol al 25% (10 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de sodio, 250 mmol/kg de cloruro de potasio, pH 7,5) seguido de 23,6 L de etanol al 34% (10 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de sodio, 250 mmol/kg de cloruro de potasio, pH 7,5). La elución de Lys¹⁷Arg³⁰GLP-2₍₁₋₃₃₎ fue realizada con un gradiente lineal de etanol al 34-40% (10 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de sodio, 250 mmol/kg de cloruro de potasio, pH 7,5) durante 78,6 L. La temperatura fue mantenida a 23°C durante toda la prueba. Se obtuvieron valores máximos distintivos y separación entre Lys¹⁷Arg³⁰GLP-2₍₁₋₃₃₎ y una forma metoxidada del péptido. Además, Lys¹⁷Arg³⁰GLP-2₍₁₋₃₃₎ fue separado de la impureza truncada (des His-Ala Lys¹⁷Arg³⁰GLP-2₍₁₋₃₃₎).

25 Ejemplo 17

Arg³⁰Lys¹⁷N^ε(β-Ala(N^α-hexadecanoil)) GLP-2₍₁₋₃₃₎ fue obtenido a partir del péptido parental, Lys¹⁷Arg³⁰GLP-2₍₁₋₃₃₎, por acilación como se describe en WO 00/55119.

Arg³⁰Lys¹⁷N^ε(β-Ala(N^α-hexadecanoil)) GLP-2₍₁₋₃₃₎ fue cargado a 4 L de gel de (octadecil dimetil silil) sílice 100 Å sustituido en C₁₈ (tamaño de partícula 15 μm) equilibrados con 12 L de etanol al 40% p/p, 10 mmol/kg de fosfato de dihidrógeno de sodio, 250 mmol/kg de cloruro potasio, pH 7,5. La columna fue lavada con 4 L del solvente de equilibrado y 4 L de etanol al 43% p/p, 10 mmol/kg de fosfato de dihidrógeno de sodio, 227 mmol/kg de cloruro de potasio, pH 7,5. Arg³⁰Lys¹⁷N^ε(β-Ala(N^α-hexadecanoil)) GLP-2₍₁₋₃₃₎ fue eluido con un gradiente lineal de etanol al 45-60% p/p (211 - 94 mmol/kg de cloruro de potasio, 10 mmol/kg de dihidrógeno fosfato de sodio, pH 7,5.) durante 120L. La temperatura fue mantenida a 23°C durante toda la prueba.

Se obtuvieron valores máximos distintivos y separación entre Arg³⁰Lys¹⁷N^ε(β-Ala(N^α-hexadecanoil)) GLP-2₍₁₋₃₃₎ y la forma des-acilada más otras impurezas relacionadas.

Ejemplo 18

La exendina-4(1-39) (con la secuencia de aminoácidos HEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGA PPPS) y Exendina-4(2-39) (con la secuencia de aminoácidos GEGTFTSDLSKQMEEEEAVRLFIEWLKNNGPSS GAPPS) fueron sintetizadas por métodos de síntesis de fase sólida estándar usando química Fmoc.

Una solución de Exendina-4(1-39) conteniendo la impureza relacionada Exendina-4(2-39) fue disuelta en agua a una concentración total de 1 mg de péptido/ml. 6 ml de la solución fue cargada a una columna de 7,85 ml que contiene gel de (octadecil-dimetil silil) sílice 120 Å sustituido en C₁₈ (tamaño de partícula 15 μm) equilibrados con 15,7 ml de un solvente que contiene etanol al 25% p/p, monohidrato de di-hidrógeno fosfato de sodio al 0,069% p/p, acetato de potasio de 2,06% p/p, pH 4,02. La columna fue lavada con 3,9 ml de solución de equilibrado. La elución fue realizada con un gradiente isocrático de etanol al 36% durante 157 ml (20 CV) seguido de 23,6 ml de gradiente lineal (3 CV) de etanol al 36% a 39% en monohidrato de di-hidrógeno fosfato de sodio al 0,069% p/p, acetato de potasio al 2,06% p/p, pH 4,02. Posteriormente, la elución fue realizada por un gradiente de fase a etanol al 59% en monohidrato de fosfato de di-hidrógeno de sodio al 0,069% p/p, acetato de potasio al 2.06% p/p, pH 4,02 mantenido para 7,85 ml (1 CV). El experimento fue realizado a temperatura ambiente.

Se obtuvieron valores máximos distintivos y separación entre Exendina- 4(1-39) y Exendina-4(2-39), Exendina-4 (1- 39) de elución antes de Exendina- 4(2-39).

Ejemplo 19

Exendina-4(1-39) y Exendina-4(2-39) fueron sintetizados por métodos de síntesis de fase sólida estándar usando química Fmoc.

ES 2 330 335 T3

Una solución de Exendina-4(1-39) conteniendo la impureza relacionada Exendina-4(2-39) fue disuelta en agua a una concentración total de 1 mg de péptido/ml. 8 ml de la solución fueron cargados a una columna de 7,85 ml conteniendo gel de (octadecil-dimetil silil) sílice 120 Å sustituido en C₁₈ (tamaño de partícula 15 μm) equilibrada con 15,7 ml de un solvente que contiene etanol al 25% p/p, di-hidrógeno fosfato de sodio monohidrato al 0,069% p/p, acetato de potasio de 2,06% p/p, pH 3,5. La columna fue lavada con 3,9 ml de solución de equilibrado. La elución fue realizada con un gradiente isocrático de etanol al 37% durante 110 ml (14 CV) seguido de 24 ml de gradiente lineal (3 CV) de etanol al 37% al 39% en di-hidrógeno fosfato de sodio monohidrato 0,069% p/p, acetato de potasio al 2,06% p/p, pH 3,5. Posteriormente, la elución fue realizada por un gradiente lineal a etanol al 59% en di-hidrógeno fosfato de sodio monohidrato al 0,069% p/p, acetato de potasio al 2,06% p/p, pH 3,5 durante 71 ml (9 CV). El experimento fue realizado a temperatura ambiente.

Se obtuvieron valores máximos distintivos y separación entre Exendina-4(1-39) y Exendina-4(2-39), Exendina-4(1-39) de elución antes que Exendina-4(2-39).

Ejemplo 20

L-His¹ Exendina-4(1-39) y D-His¹ Exendina-4(1-39) (con la secuencia de aminoácidos HEGGTFTSDLSKQ MEEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPS) fueron sintetizadas por métodos de síntesis de fase sólida estándar usando química Fmoc.

Una solución de L-His¹ Exendina-4(1-39) conteniendo la impureza relacionada D-His¹ Exendina-4(1-39) fueron disueltas en agua a una concentración total de 1 mg de péptido/ml. 8 ml de la solución fueron cargados a una columna de 7,85 ml que contiene gel de (octadecil-dimetil silil) sílice 120 Å sustituido en C₁₈ (tamaño de partícula 15 μm) equilibrada con 15,7 ml de un solvente que contiene etanol al 25% p/p, di-hidrógeno fosfato de sodio monohidrato al 0,069% p/p, acetato de potasio al 2,06% p/p, pH 3,5. La columna fue lavada con 3,9 ml de solución de equilibrado. La elución fue realizada con un gradiente isocrático de etanol al 37% durante 63 ml (8 CV) seguido de 24 ml de gradiente lineal (3 CV) de etanol al 37% al 39% en di-hidrógeno fosfato de sodio monohidrato 0,069% p/p, acetato de potasio al 2,06% p/p, pH 3,5. Posteriormente, la elución fue realizada por un gradiente lineal a etanol al 59% en di-hidrógeno fosfato de sodio monohidrato al 0,069% p/p, acetato de potasio al 2,06% p/p, pH 3,5 durante 71 ml (9 CV). El experimento fue realizado a la temperatura ambiente.

Se obtuvo separación entre L-His¹ Exendina-4(1-39) y D-His¹ Exendina-4(1-39) y fue confirmada por análisis de tiempo de retención, D-His¹ Exendina-4(1-39) de elución antes de L-His¹ Exendina-4(1-39).

Ejemplo 21

L-His¹ Exendina-4(1-39) y D-His¹ Exendina-4(1-39) fueron sintetizados por métodos de síntesis de fase sólida estándar usando química Fmoc.

Una solución de L-His¹ Exendina-4(1-39) conteniendo la impureza relacionada D-His¹ Exendina-4(1-39) fueron disueltas en agua a una concentración total de 1 mg de péptido/ml. 8 ml de la solución fueron cargados a una columna de 7,85 ml que contiene gel de (octadecil-dimetil silil) sílice 120 Å sustituido en C₁₈ (tamaño de partícula 15 μm) equilibrados con 15,7 ml de un solvente que contiene etanol de 25% p/p, MES al 0,13% p/p, acetato de potasio al 2,06% pH 6,7. La columna fue lavada con 3,9 ml de solución de equilibrado. La elución fue realizada con un gradiente isocrático de etanol al 34% durante 157 ml (20 CV) seguido de un 24 ml de gradiente lineal (3 CV) de etanol al 34% a 39% en MES al 0,13% p/p, acetato de potasio al 2,06% p/p, pH 6,7. Posteriormente, la elución fue realizada por un gradiente de fase a etanol al 59% en MES al 0,13% p/p, acetato de potasio al 2,06% p/p, pH 6,7 mantenido por 7,85 ml (1 CV). El experimento fue realizado a temperatura ambiente.

Se obtuvo la separación entre L-His¹ Exendina-4(1-39) y D-His¹ Exendina-4(1-39) y fue confirmada por análisis de tiempo de retención, D-His¹ Exendina-4(1-39) de elución antes de L-His¹ Exendina-4(1-39).

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de Patentes citados en la descripción

- US 4617376 A [0003]
- WO 9952934 A [0005]

ES 2 330 335 T3

- WO 0246227 A [0009]
- WO 9808871 A [0011] [0110] [0117] [0119] [0142] [0145] [0148] [0155]
- 5 • WO 0104156 A [0013]
- WO 0041548 A [0014]
- WO 9925727 A [0014]
- 10 • EP 0708179 A [0017]
- US 2003144471 A [0019]
- 15 • WO 9943361 A [0091]
- WO 0055119 A [0091] [0095] [0152] [0157]
- WO 0041546 A [0095]
- 20 • WO 9943708 A [0095]
- US 4683202 A [0098]

25

Bibliografía distinta de Patentes citada en la descripción

- **Boysen**, R.I. *et al. J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, 23-31 [0003]
- 30 • Biochemical samples: Proteins, nucleic acids, carbohydrates, and related compounds **Snyder**, L.R. *et al. Practical HPLC method development John Wiley & Sons Inc. 1997.* [0003]
- **Kroeff**, E.P. *et al. J. Chromatogr.*, 1989, vol. 461, 45-61 [0003]
- 35 • **Krstenansky**, J.L. *et al. J. Biochem.*, 1986, vol. 25, 3839-3845 [0003]
- **Conlon J.M. Thim L.** *Gen. Comp. Endocrinol.*, 1985, vol. 60, 398-405 [0003]
- **Kamisoyama H.** *et al. Anim. Sci. J.*, 2000, vol. 71, 428-431 [0003]
- 40 • **Berks B.C.** *et al. Biochem. J.*, 1989, vol. 263, 261-266 [0004]
- Insulin purification **Mollerup I.** *et al. Encyclopedia of bioprocess technology John Wiley & Sons Inc. 1999.* 1491-1498 [0006]
- 45 • **Rojas F.J.** *et al. Endo.*, 1983, vol. 113, 711-719 [0007]
- **Ørskov C.** *et al. J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 12826-12829 [0008]
- 50 • **Namba M.** *et al. Biomedical Res.*, 1990, vol. 11, no. 4. 247-254 [0009]
- **Noe B.D. Andrews P.C.** *Peptides*, 1986, vol. 7, 331-336 [0010]
- **Buhl T.** *et al. J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 8621-8624 [0012]
- 55 • **Suda K.** *et al. Biomedical Res.*, 1988, vol. 9, 39-45 [0015]
- **Schou O.** *6th Interlaken Conference on Advances in Production of Biologicals*, 2003, [0016]
- 60 • **Senderoff et al.** *J. Pharm. Sci.*, 1998, vol. 87, 183-189 [0018]
- **Wilken et al.** *Diabetologia*, 2000, vol. 43, no. 51. A143- [0037]
- **Sambrook, J Fritsch, EF Maniatis, T** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.* [0098]
- 65 • **Beaucage Caruthers** *Tetrahedron Letters*, 1981, vol. 22, 1859-1869 [0098]

ES 2 330 335 T3

- **Matthes** *et al.* *EMBO Journal*, 1984, vol. 3, 801-805 [0098]

- **Saiki** *et al.* *Science*, 1988, vol. 239, 487-491 [0098]

5 • Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995. [0106]

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 330 335 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Método para purificar un péptido similar al glucagón de una composición que comprende dicho péptido similar al glucagón y al menos una impureza relacionada, que el método es un proceso cromatográfico de líquidos de alto rendimiento de fase inversa donde el solvente usado para elución es pH-tamponado en la gama de pH 4 a pH 10, dicho solvente es pH-tamponado para prevenir variaciones de pH superiores a +/-1.0 unidades de pH del punto de referencia durante la fase de elución, y dicho solvente comprende un alcohol en una concentración del 20% p/p al 60% p/p,

10 donde una impureza relacionada es una impureza que tiene similitud estructural al péptido similar al glucagón objetivo y es seleccionada del grupo que consiste en una forma truncada, una forma extendida, una forma desamidada, una forma incorrectamente plegada, una forma con glicosilación indeseada, una forma oxidada, una forma que resulta a partir de la racemización, una forma carente de aminoácidos en la cadena intra-peptídica, una forma que tiene aminoácidos extra en la cadena intra-peptídica y una forma en la cual se ha producido una acilación en otro residuo que el deseado.

2. Método según la reivindicación 1, donde dicho solvente es pH tamponado en la gama de pH 5 a pH 9.

20 3. Método según la reivindicación 1, donde dicho solvente es pH- tamponado a un pH que es superior al punto isoelectrico de dicho péptido similar al glucagón.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho solvente es pH-tamponado para prevenir variaciones de pH superiores a +1- 0,5 unidades de pH del punto de referencia durante la fase de elución.

25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho alcohol es etanol.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho alcohol es 2-propanol.

30 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho alcohol es seleccionado del grupo que consiste en metanol, 1- propanol y hexilen glicol.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el solvente además comprende una o más sales seleccionadas del grupo que consiste en: NaCl, KCl, NH₄Cl, CaCl₂, acetato sódico, acetato de potasio y acetato amónico.

35 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el tampón es seleccionado del grupo que consiste en: tampón citrato, tampón fosfato, tampón tris, tampón borato, tampón carbonato, tampón acetato, tampón amonio y tampón glicina.

40 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho proceso cromatográfico líquido de alto rendimiento de fase inversa es realizado usando una resina cromatográfica basada en sílice.

45 11. Método según la reivindicación 10, donde dicha resina es un gel de sílice sustituido, tal como gel de sílice sustituido en C₄, C₆, C₈, C₁₂, C₁₆, C₁₈, C₂₀, fenilo o benceno.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde dicho proceso cromatográfico de líquido de alto rendimiento de fase inversa es realizado usando una resina cromatográfica que es un material de base polimérica.

50 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha impureza relacionada es una forma truncada de dicho péptido similar al glucagón.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha impureza relacionada es una forma glicosilada de dicho péptido similar al glucagón.

55 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho solvente comprende un alcohol en una concentración del 20% p/p al 40% p/p.

60 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho péptido similar al glucagón es GLP-1, un análogo al GLP-1, un derivado de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1.

65 17. Método según la reivindicación 16, donde dicho análogo de GLP-1 es seleccionado del grupo que consiste en Arg³⁴-GLP-1(7-37), Gly⁸-GLP-1(7-36)-amida, Gly⁸-GLP-1(7-37), Val⁸-GLP-1 (7-36)-amida, Val⁸-GLP-1 (7-37), Val⁸Asp²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Asp²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Lys²²-GLP-1(7-37), Val⁸Arg²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸Arg²²-GLP-1(7-37), Val⁸His²²-GLP-1(7-36)-amida, Val⁸His²²-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁹Glu²² -GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵-GLP-1(7-37), Val⁸Tyr¹⁶Glu²²GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Leu¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Tyr¹⁸Glu²²-GLP-1 (7-37), Val⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²

ES 2 330 335 T3

Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵-GLP-1(7-37), análogos de los mismos y derivados de cualquiera de estos.

18. Método según la reivindicación 16, donde dicho derivado de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1 tiene un residuo de lisina, tal como una lisina, donde un sustituyente lipofílico opcionalmente vía un separador es fijado al grupo amino épsilon de dicha lisina.

19. Método según la reivindicación 18, donde dicho sustituyente lipofílico tiene de 8 a 40 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 24 átomos de carbono, por ejemplo 12 a 18 átomos de carbono.

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 18-19, donde dicho separador está presente y es seleccionado de un aminoácido, por ejemplo, beta-Ala, L-Glu o aminobutiroilo.

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho péptido similar al glucagón es un péptido similar al glucagón protegido contra DPPIV.

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho péptido similar al glucagón es un péptido similar al glucagón estable en plasma.

23. Método según la reivindicación 16, donde dicho derivado de un análogo de GLP-1 es Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^ε-hexadecanoil)))-GLP-1(7-37).

24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16-23, donde dicho péptido similar al glucagón tiene de 25 a 37 residuos de aminoácidos, preferiblemente de 27 a 35 residuos de aminoácidos, incluso más preferiblemente de 29 a 33 residuos de aminoácidos.

25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde dicho péptido similar al glucagón es GLP-2, un análogo de GLP-2, un derivado de GLP-2 o un derivado de un análogo de GLP-2.

26. Método según la reivindicación 25, donde dicho derivado de GLP-2 o un derivado de un análogo de GLP-2 tiene un residuo de lisina, tal como una lisina, donde un sustituyente lipofílico opcionalmente vía un separador es fijado al grupo amino épsilon de dicha lisina.

27. Método según la reivindicación 26, donde dicho sustituyente lipofílico tiene de 8 a 40 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 24 átomos de carbono, p. ej. 12 a 18 átomos de carbono.

28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 26-27, donde dicho separador está presente y es seleccionado de un aminoácido, p. ej. beta-Ala, L-Glu, aminobutiroilo.

29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25-28, donde dicho péptido similar al glucagón tiene de 27 a 39 residuos de aminoácidos, preferiblemente de 29 a 37 residuos de aminoácidos, incluso más preferiblemente de 31 a 35 residuos de aminoácidos.

30. Método según la reivindicación 25, donde dicho péptido similar al glucagón es Gly²-GLP-2(1-33).

31. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde dicho péptido similar al glucagón es exendina-4, un análogo de exendina-4, un derivado de exendina-4, o un derivado de un análogo de exendina-4.

32. Método según la reivindicación 31, donde dicho péptido similar al glucagón es exendina-4.

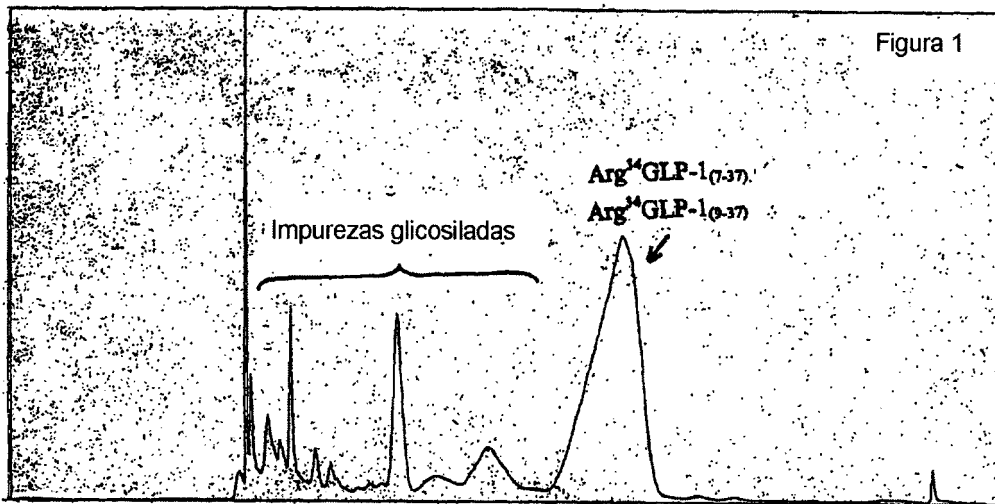
33. Método según la reivindicación 31, donde dicho péptido similar al glucagón es ZP-10, es decir HGEFTFTSDL SKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKSKKKKK-NH₂.

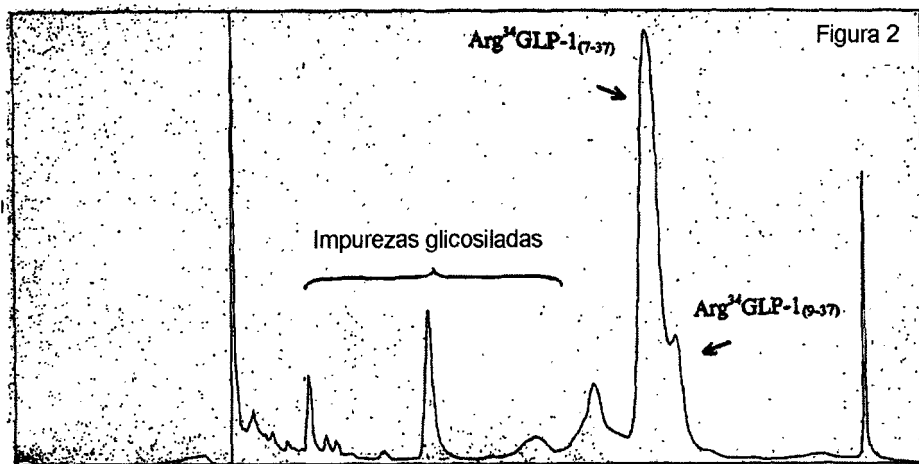
34. Método según la reivindicación 31, donde dicho derivado de exendina-4 o derivado de un análogo de exendina-4 es acilado o pegilado.

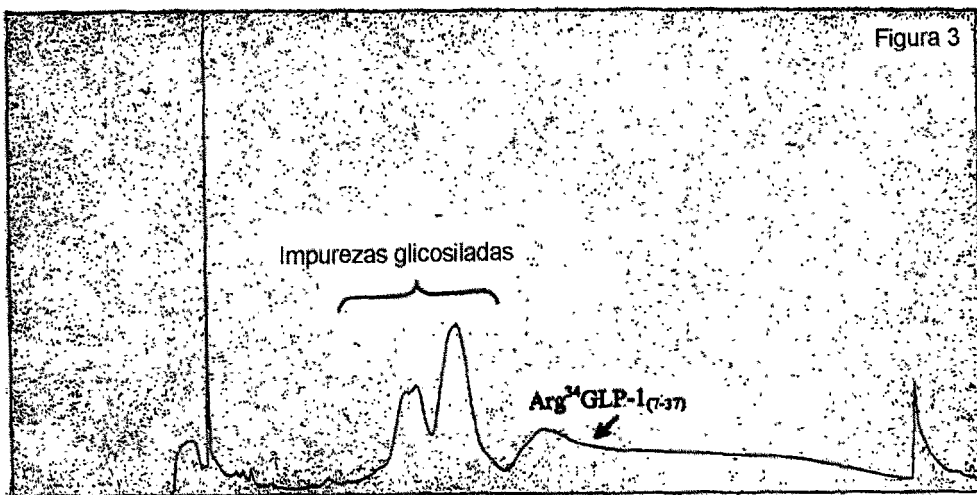
35. Método según la reivindicación 31, donde dicho derivado de exendina-4 o derivado de un análogo de exendina-4 tiene un residuo de lisina, tal como una lisina, donde un sustituyente lipofílico opcionalmente vía un separador es fijado al grupo amino épsilon de dicha lisina.

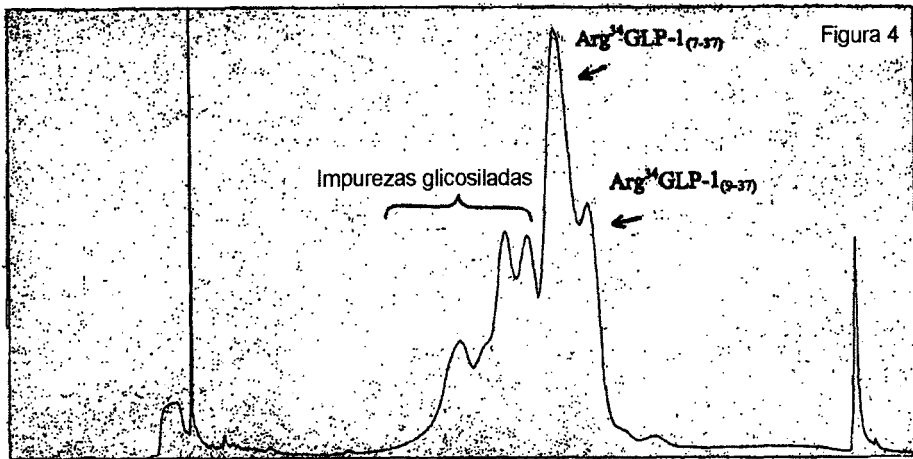
36. Método según la reivindicación 35, donde dicho sustituyente lipofílico tiene de 8 a 40 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 24 átomos de carbono, p. ej. 12 a 18 átomos de carbono.

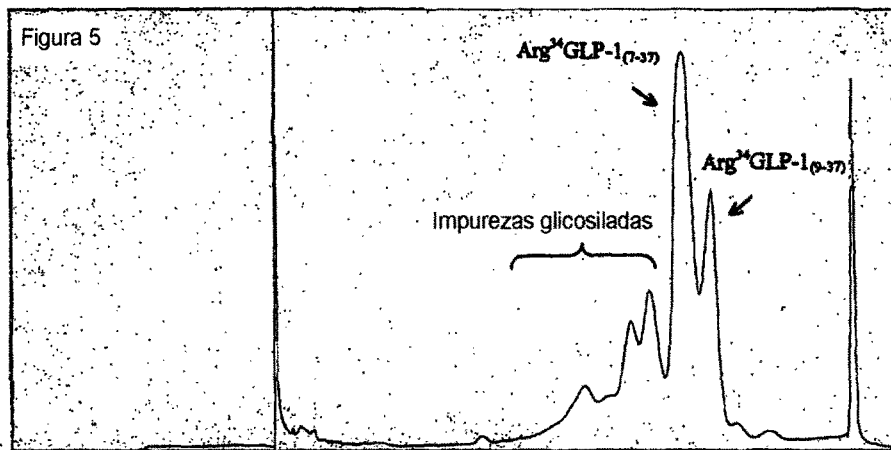
37. Método según cualquiera de las reivindicaciones 35-36, donde dicho separador está presente y es seleccionado de un aminoácido, p. ej. beta-Ala, L-Glu o aminobutiroilo.

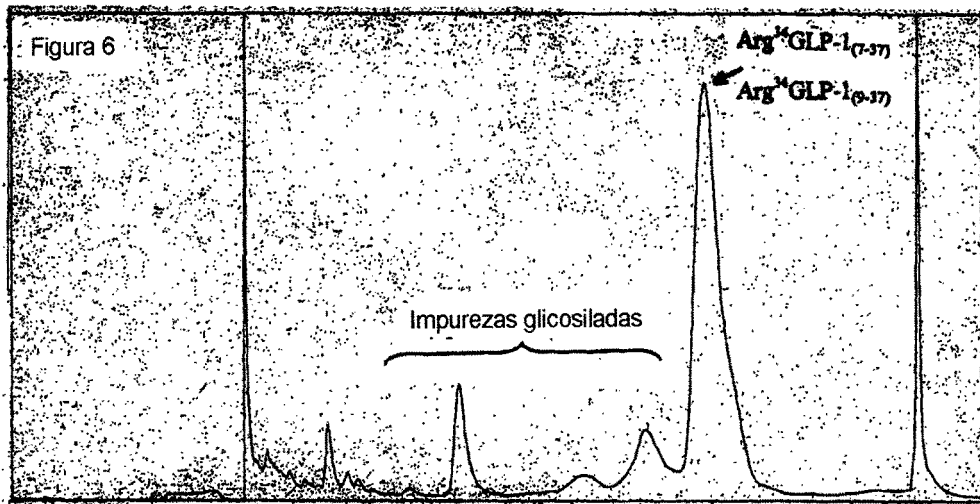












ES 2 330 335 T3

<400> 3

5 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 10 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 15 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 4

<211> 39

20 <212> PRT

<213> *Gila monster*

<220>

25 <221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Serina en posición 39 es amidada

30 <400> 4

35 His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15
 40 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 45 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 5

<211> 37

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

55 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 60 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr Lys Arg Asn
 20 25 30
 65 Lys Asn Asn Ile Ala
 35

