



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 687**

51 Int. Cl.:

C07C 235/72 (2006.01)

C07K 1/06 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03798091 .9**

96 Fecha de presentación : **25.09.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1546090**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

54 Título: **Método de producción de péptidos acilados.**

30 Prioridad: **25.09.2002 DK 2002 01421**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.11.2009

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

72 Inventor/es: **Dünweber, Dorte, Lunøe;**
Jensen, Inge, Holm y
Hansen, Louis, Brammer

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

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

Método de producción de péptidos acilados.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para acilar péptidos y proteínas. Más específicamente, la invención se refiere a un método para introducir uno o más grupos acilo en un péptido o una proteína.

10 **Antecedentes de la invención**

Un gran número de péptidos han sido aprobados para el uso en la práctica médica, y los péptidos pueden ser producidos en células huéspedes adecuadas por tecnología del ADN recombinante o pueden ser producidos sintéticamente por tecnología de síntesis peptídica bien establecida. No obstante, los péptidos nativos al igual que sus análogos tienden a mostrar índices altos de aclaramiento que son inaceptables para muchas indicaciones clínicas donde una alta concentración de plasma del péptido es requerida sobre un periodo temporal prolongado. Ejemplos de péptidos que en su forma nativa tienen un alto aclaramiento son: ACTH, factor liberador de corticotropina, angiotensina, calcitonina, insulina, glucagón, péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1), péptido-2 de tipo glucagón (GLP-2), factor-1 de crecimiento de tipo insulina, factor-2 de crecimiento de tipo insulina, péptido gástrico inhibitorio, factor liberador de la hormona del crecimiento, péptido activador de adenilato-ciclasa pituitaria, secretina, enterogastrina, somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona paratiroidea, trombopoyetina, eritropoyetina, factores de liberación hipotálamica, prolactina, hormonas estimuladoras de la tiroides, endorfinas, encefalinas, vasopresina, oxitocina, opioides y sus análogos, superóxido-dismutasa, interferón, asparaginasa, arginasa, arginina desaminasa, adenosina-desaminasa y ribonucleasa.

Una variedad de derivaciones de péptidos y análogos peptídicos ha sido encontrada para influir en el nivel de aclaramiento de los péptidos en una dirección favorable. Una tal derivatización es la introducción de un grupo acilo lipofílico en el péptido terapéutico provocando un perfil deseable prolongado de acción con respecto al péptido no acilado. Por lo tanto, la administración menos frecuente de la proteína terapéutica mejora la adaptabilidad de pacientes a la terapia prescrita, y reduce la cantidad de péptidos que debe ser administrada. Esto ha sido descrito y demostrado en WO98/08871, que, entre otras cosas, expone la acilación de GLP-1 y análogos del mismo, en WO98/08872, que, entre otras cosas, expone la acilación de GLP-2 y análogos del mismo, y WO99/43708, que, entre otras cosas, expone la acilación de exendina y sus análogos. Se demostró que los separadores mono- o dipeptídicos tales como el ácido aspártico y ácido glutámico, entre el péptido y el grupo acilo eran deseables. Separadores incluyendo un grupo de ácido carboxílico libre deben ser protegidos antes de la acilación y posteriormente desprotegidos.

WO 98 02460 y EP 1227107 revelan la acilación de grupos ε -amino de insulina humana y WO 95 07931 y US 3 950 517 revelan acilaciones en varios aminoácidos en insulinas. WO00/55119 y US 6 451 974 revelan un método para acilar péptidos (p. ej. GLP-1) y agentes acilantes nuevos en p. ej. una mezcla de solvente aprótico polar y agua donde la proporción entre el solvente aprótico polar y el agua es de entre 1:10 y 10:1.

Kanji Meguro *et al.* revelan la síntesis de derivados de ácido 4-oxazolealcanoico tal como varios 3-acil-3-acilaminopropionatos (Chem. Pharm. Bull. Vol. 34, No.7 (1986) págs. 2840-2851) y J. F. Riordan y B. L. Vallee revelan algunos métodos de acetilación comúnmente usados (Meth. Enzym., Vol. 25, 1972, páginas 494-499).

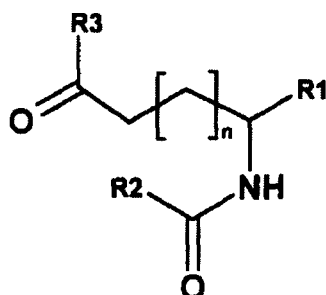
De tal manera que los péptidos terapéuticos sean económicamente viables, el coste de producción de los péptidos al igual que la dosificación terapéutica del péptido son cruciales. Un coste mayor durante la producción de péptidos terapéuticos lo representan las fases de purificación requeridas para separar la proteína meta de impurezas que están cercanamente relacionadas con la proteína meta, p. ej. isómeros, formas desamido etc. Estas fases de purificación son normalmente realizadas por cromatografía que implica matrices de cromatografía caras y solventes al igual que un rendimiento global reducido.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un método eficaz y económico para la introducción de grupos lipofílicos en péptidos mediante separadores de ácido α -amino- α,ω -dicarboxílico. El método es más específico, y por lo tanto resulta en rendimientos más altos y formación reducida de impurezas cercanamente relacionadas. Se consigue una reducción significativa del coste de producción de los péptidos acilados. Péptidos acilados menos caros son altamente deseables para maximizar el número de pacientes para quienes el tratamiento está disponible al igual que para aprovechar las ventajas de vías de entrega alternativas que tienen biodisponibilidad inferior que la inyección subcutánea, p. ej. entrega transdérmica y pulmonar.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un método para aclar uno o más grupos amino de un péptido o proteína, el método incluyendo las etapas:

- a) reaccionar el péptido que tiene al menos un grupo amino libre con un agente acilante de la fórmula general I



donde

n es 0-8;

R¹ es COOR⁴;

R² es una fracción lipofílica;

R³ junto con el grupo carboxilo al que R³ está unido designa un éster reactivo o un éster de N-hidroxi imida reactivo; y

R⁴ es seleccionado de hidrógeno, C₁₋₁₂-alquilo y bencilo, bajo condiciones básicas en una mezcla acuosa;

b) si R⁴ no es hidrógeno, saponificar el grupo éster peptídico acilado (COOR⁴) bajo condiciones básicas;

c) aislar el péptido N-acilado,

caracterizado por dicha mezcla acuosa en la fase a) conteniendo menos del 8% en peso de solvente aprótico polar.

En una forma de realización del método, dicha reacción en la fase a) se desarrolla en una mezcla acuosa que contiene menos del 5% p/p de solvente aprótico polar y preferiblemente menos del 3% p/p de solvente aprótico polar.

En otra forma de realización del método, el agente acilante se añade a la mezcla reactiva como un sólido.

En otra forma de realización del método, el agente acilante se añade a la mezcla reactiva como una solución en un solvente aprótico polar que es estabilizada añadiendo un ácido.

Descripción de la invención*Péptidos y proteínas*

La presente invención es útil para la introducción de grupos acilo lipofílicos en cualquier péptido (o proteína) para reducir el nivel de aclaramiento *in vivo*. Ejemplos de tales péptidos y proteínas son ACTH, factor liberador de corticotropina, angiotensina, calcitonina, exendina y sus análogos, insulina y sus análogos, glucagón y sus análogos, péptido-1 de tipo glucagón y sus análogos, péptido-2 de tipo glucagón y sus análogos, factor-1 de crecimiento de tipo insulina, factor-2 de crecimiento de tipo insulina, péptido gástrico inhibitorio, factor liberador de la hormona del crecimiento, péptido activador de adenilato-ciclase pituitaria, secretina, enterogastrina, somatostatina, somatotropina, somatomedina, hormona paratiroidea, trombopoyetina, eritropoyetina, factores de liberación hipotalámica, prolactina, hormonas estimuladoras de la tiroides, endorfinas, encefalinas, vasopresina, oxitocina, opiodes y sus análogos, superóxido-dismutasa, interferón, asparaginasa, arginasa, arginina desaminasa, adenosina-desaminasa y ribonucleasa.

Debe ser entendido que el péptido (o proteína) debería llevar al menos un grupo amino libre, tal grupo amino siendo el grupo amino N-terminal o un grupo amino de cadena lateral. Los péptidos o proteína pueden comprender aminoácidos que no son codificados por el código genético, tales como D-aminoácidos, 3-hidroxiprolina, ornitina y pentilglicina. Particularmente interesantes son grupos amino de residuos aminoácidos de lisina y ornitina. El método es particularmente relevante para la N-acilación del grupo E-amino de residuos de lisina. Debería también ser entendido que el péptido o proteína en cuestión puede comprender dos o más grupos amino pendientes que todos pueden ser N-acilados según la presente invención.

La presente invención es especialmente adecuada para la acilación de GLP-1 y sus análogos. Ejemplos de GLP-1 y análogos que pueden ser N-acilados según la presente invención son GLP-1 y análogos truncados, tales como Arg²⁶-GLP-1(7-37); Arg³⁴-GLP-1(7-37); Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys³⁹-GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg²⁶Lys³⁹-GLP-1(7-39); Arg³⁴Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Arg^{26,34}Lys^{36,39}-GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys^{36,40}-GLP-1(7-40); Gly⁸Arg²⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg³⁴-GLP-1(7-37); Gly⁸Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁹-GLP-1(7-39); Gly⁸Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Gly⁸Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37); Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-37); Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37); Val⁸Arg²²-GLP-1(7-37); Met⁸Arg²²-GLP-1(7-37); Gly⁸His²²-GLP-1(7-37); Val⁸His²²-GLP-1(7-37); Met⁸His²²-GLP-1(7-37); His³⁷-GLP-1(7-37); Gly⁸-GLP-1(7-37); Val⁸-GLP-1(7-37); Met⁸-GLP-1(7-37); Gly⁸Asp²²-GLP-1(7-37); Val⁸Asp²²-GLP-1(7-37); Met⁸Asp²²-GLP-1(7-37); Gly⁸Glu²²-GLP-1(7-37); Val⁸Glu²²-GLP-1(7-37); Met⁸Glu²²-GLP-1(7-37); Gly⁸Lys²²-GLP-1(7-37); Val⁸Lys²²-GLP-1(7-37); Met⁸Lys²²-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg²²-GLP-1(7-37); Val⁸Lys²²His³⁷-GLP-1(7-37); Gly⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-37); Val⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-37); Met⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-37); Gly⁸Lys²²His³⁷-GLP-1(7-37); Met⁸Lys²²His³⁷-GLP-1(7-37); Gly⁸His²²His³⁷-GLP-1(7-37); Val⁸His²²His³⁷-GLP-1(7-37); Met⁸His²²His³⁷-GLP-1(7-37); Gly⁸His³⁷-GLP-1(7-37); Val⁸His³⁷-GLP-1(7-37); Met⁸His³⁷-GLP-1(7-37); Gly⁸Asp²²His³⁷-GLP-1(7-37); Val⁸Asp²²His³⁷-GLP-1(7-37); Met⁸Asp²²His³⁷-GLP-1(7-37); Arg²⁶-GLP-1(7-36)-amida; Arg³⁴-GLP-1(7-36)-amida; Lys³⁶-GLP-1(7-36)-amida; Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-36)-amida; Arg^{26,34}-GLP-1(7-36)-amida; Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-36)-amida; Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-36)-amida; Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Asp²²-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Asp²²-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸His²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Arg²²-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Arg²²-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Arg²²-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸His²²-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸His²²-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸His²²-GLP-1(7-36)-amida; His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Arg²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Arg²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Asp²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Asp²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Asp²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Lys²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Lys²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Lys²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Arg²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸His²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸His²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; cada uno de estos análogos de GLP-1 y análogos truncados constituye formas de realización alternativas de la presente invención.

La presente invención es también especialmente adecuada para la acilación de GLP-2 y sus análogos. Ejemplos de GLP-2 y análogos que pueden ser N-acilados según la presente invención son análogos de GLP-2 y análogos truncados, tales como Lys²⁰GLP-2(1-33); Lys²⁰Arg³⁰GLP-2(1-33); Arg³⁰Lys³⁴GLP-2(1-34); Arg³⁰Lys³⁵GLP-2(1-35); Arg^{30,35}Lys²⁰GLP-2(1-35); y Arg³⁵GLP-2(1-35). Cada uno de estos análogos de GLP-2 y análogos truncados constituye formas de realización alternativas de la presente invención.

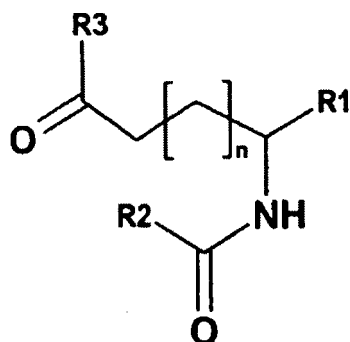
La presente invención es también especialmente adecuada para la acilación de exendina-3 y exendina-4 y sus análogos. Ejemplos de análogos de exendina que pueden ser N-acilados según la presente invención están descritos en p. ej. WO99/43708. Cada uno de estos análogos de exendina y análogos truncados constituye formas de realización alternativas de la presente invención.

La presente invención es también particularmente adecuada para la acilación de insulina y sus análogos. Ejemplos de insulina y sus análogos que pueden ser N-acilados según la presente invención son insulina humana e insulina des (B30)-humana.

En otra forma de realización de la presente invención la N-acilación se desarrolla en el grupo ϵ -amino de residuos de lisina.

Agente acilante

En el método según la invención, un péptido (o proteína) que tiene al menos un grupo amino libre es reaccionado con un agente acilante de la fórmula general I



El número entero n en la fórmula I es preferiblemente 0-8, en particular 0-6 correspondiendo, p. ej., a ácido aspártico, ácido glutámico, etc. Preferiblemente, n es 0-4 tal como 0-2, p. ej. 0 (ácido aspártico) o 1 (ácido glutámico). Cada uno de estos números enteros y rangos constituye formas de realización alternativas de la presente invención.

R^1 en la fórmula I representa un grupo de ácido libre (COOH) o un grupo éster (COOR^4). En los casos donde R^1 es un grupo éster, R^4 es seleccionado de grupos que pueden ser eliminados (como los alcoholes correspondientes) por hidrólisis bajo condiciones básicas. Ejemplos de grupos de este tipo son C_{1-12} -alquilo, p. ej. metilo, etilo, prop-1-ilo, prop-2-ilo, but-1-ilo, but-2-ilo, 2 metil-prop-1-ilo, 2-metil-prop-2-ilo (terc-butilo), hex-1-ilo, etc., y bencilo. Cada uno de estos grupos constituye formas de realización alternativas de la presente invención.

R^2 en la fórmula I representa la fracción lipofílica para ser incorporada en el péptido o proteína. Tal fracción lipofílica es normalmente seleccionada de C_{3-39} -alquilo, C_{3-39} -alquenoilo, C_{3-39} -alcadienilo y residuos esteroideos. Ejemplos específicos de C_{3-39} -alquilo son heptilo, nonilo, undecanilo, tridecanilo, pentadecanilo, heptadecanilo, y nonadecanilo. Cada una de estas fracciones lipofílicas constituye formas de realización alternativas de la presente invención.

El sustituyente lipofílico o fracción se caracteriza por tener una solubilidad en agua a 20°C en el rango de aproximadamente 0,1 mg/100 ml de agua a aproximadamente 250 mg/100 ml de agua, preferible en el rango de aproximadamente 0,3 mg/100 ml de agua a aproximadamente 75 mg/100 ml de agua. Por ejemplo, ácido octanoico (C_8) tiene una solubilidad en agua a 20°C de 68 mg/100 ml, ácido decanoico (C_{10}) tiene una solubilidad en agua a 20°C de 15 mg/100 ml, y ácido octadecanoico (C_{18}) tiene una solubilidad en agua a 20°C de 0.3 mg/100 ml. Cada uno de estos rangos de sustituyente lipofílico constituye formas de realización alternativas de la presente invención.

Los términos, " C_{3-39} -alquilo", " C_{3-39} -alquenoilo" y " C_{3-39} -alcadienilo" se destinan a cubrir radicales de hidrocarburos de cadena lineal y ramificada, preferiblemente de cadena lineal, saturada, monoinsaturada y di-insaturada, respectivamente, de 3-39 átomos de carbono. Ejemplos específicos de C_{3-39} -alquilo son heptilo, nonilo, undecanilo, tridecanilo, pentadecanilo, heptadecanilo, y nonadecanilo.

Cuando se usa en la presente, el término "residuo esteroideal" se destina a significar un grupo lipofílico que con el grupo carbonilo al que R^2 está unido es derivado de un ácido carboxílico esteroide, es decir un C_{16-36} hidrocarburo tri-, tetra y pentacíclico, totalmente saturado o parcialmente insaturado. Ejemplos de grupos de este tipo $\text{R}^2\text{-C(=O)-}$ son litocoloilo, desoxicoloilo, y coloilo.

Entre los grupos lipofílicos mencionados arriba, C_{7-25} -alquilo, C_{7-25} -alquenoilo, C_{7-25} -alcadienilo y residuos esteroideos son especialmente pertinentes. Ejemplos particularmente interesantes son heptilo, nonilo, undecanilo, tridecanilo, pentadecanilo, heptadecanilo, nonadecanilo, litocoloilo, desoxicoloilo, y coloilo. Cada uno de estos grupos lipofílicos constituye formas de realización alternativas de la presente invención.

R^3 en la fórmula I junto con el grupo carboxilo al que R^3 está unido designa un éster reactivo o un éster de N-hidroxi imida reactivo. Cada uno de estos ésteres constituye formas de realización alternativas de la presente invención. Ésteres reactivos y ésteres de N-hidroxi imida reactivos son bien conocidos en la técnica de la química orgánica (especialmente en química peptídica) como grupos funcionales que son usados en acilación de grupos amino, tio e hidroxi. Dentro del contexto de la presente invención, el término "éster reactivo o un éster de N-hidroxi imida reactivo" se destina a significar una forma funcionalizada de éster de un grupo de ácido carboxílico adecuado para acilar una amina, preferiblemente una amina primaria. Debería, así, ser entendido, que se prefiere la selectividad para acilación de aminas primarias antes que la acilación de grupos hidroxi y tio. Ésteres de N-hidroxi imida reactivos son especialmente preferidos.

Ejemplos de ésteres reactivos son ésteres de 1-hidroxibenzotriazola y derivados. Varios reactivos altamente eficaces, p. ej. tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1il)-1,1,3,3-tetrametiluronio, para la formación de estos ésteres activados de ácidos carboxílicos son conocidos. Estos ésteres reactivos son normalmente formados *in situ* en presencia de una base, p. ej. una base orgánica tal como una trialkilamina.

Ejemplos de la parte de imida de ésteres de N-hidroxi imida reactivos son aquellos específicamente descritos en EP 0511600 A2, página 3 a página 7. Ejemplos especialmente interesantes de partes de imida entre estos son succinimida, ftalimida, etc. cada una de estas partes de imida constituye formas de realización alternativas de la presente invención.

Los ésteres de N-hidroxi imida reactivos de la fórmula I pueden ser preparados como se describe en WO00/55119 y WO98/02460.

En el caso de que el reactivo acilante de la fórmula I deba ser usado como el ácido α -carboxílico libre ($R^4 = \text{hidrógeno}$), un compuesto de la fórmula I donde R^4 es un grupo que puede ser eliminado selectivamente es convertido al compuesto correspondiente donde R^4 es hidrógeno. El grupo de protección de ácido carboxílico puede ser un grupo bencilo que puede ser eliminado por hidrogenación catalítica o un grupo alilo que puede ser eliminado selectivamente. Un grupo de protección de bencilo puede ser eliminado por hidrogenación catalítica en un solvente aprótico polar, p. ej. en acetona, a la temperatura ambiente usando paladio-en-carbono e hidrógeno. La reacción puede ser realizada en un vaso cerrado con una atmósfera de hidrógeno (normalmente 0,1-10 atm) bajo agitación vigorosa. La reacción es normalmente completada en 0,5-12 horas dependiendo de la calidad del catalizador de paladio. Se aplica tratamiento final convencional.

Condiciones de reacción

La reacción entre el agente acilante de la fórmula I y el péptido o proteína es realizada bajo condiciones básicas en una solución acuosa que contiene menos del 8% en peso de un solvente aprótico polar.

En una forma de realización de la invención la reacción en la fase a) es realizada en una solución acuosa que contiene del 1% p/p al 8% p/p de un solvente aprótico polar.

El agente acilante de la fórmula I es normalmente usado en un ligero exceso con respecto al número de grupos amino del péptido que deben ser acilados. La proporción es normalmente 1:1 a 1:20 con un exceso del agente acilante, preferiblemente 1: 1.2 a 1:5, teniendo en cuenta el número de grupos amino en el péptido. El agente acilante puede ser añadido a la mezcla reactiva como un sólido o puede ser añadido a la mezcla reactiva como una solución. Cuando el agente acilante se añade como una solución se disuelve en un solvente aprótico polar y preferiblemente se estabiliza añadiendo un ácido. Normalmente, el ácido para la estabilización es un ácido mineral, p. ej. ácido sulfúrico.

Debe ser entendido que el péptido puede ser completamente N-acilado o sólo parcialmente N-acilado dependiendo de la cantidad de agente acilante usado y de las condiciones de reacción. Se prefiere que la N-acilación sea sustancialmente estequiométrica.

Los solventes apróticos polares son solventes con constantes dieléctricas moderadamente altas que no contienen hidrógeno ácido (véase p. ej. Morrison y Boid, Organic Chemistry, 5ª ed. p 229). Normalmente, el solvente aprótico polar es seleccionado de tetrahidrofurano anhidro (THF), dimetilformamida anhidro (DMF), acetona, diclorometano, dimetilsulfóxido (DMSO), dioxano, dimetilacetamida, y N-metil-2-pirrolidona y sus mezclas derivadas, entre que dimetilformamida, dimetilsulfóxido, dimetilacetamida y N-metil-2-pirrolidona son preferidas y N-metil-2-pirrolidona es especialmente preferida.

La temperatura es normalmente mantenida en el rango de -10-50°C.

Es importante que el valor de pH de la mezcla de solvente está en el rango de 7-14, tal como 9-13, preferiblemente en el rango de 10-12, de manera que la reacción se desarrolle fácilmente. El resultado respecto al rendimiento y pureza es normalmente óptimo cuando el valor de pH de la mezcla de solvente está en la gama de 10-12. El valor de pH deseado es obtenido por adición de hidróxidos metálicos alcalinos, p. ej. hidróxido sódico e hidróxido potásico, y/o bases orgánicas tales como trialkilaminas (p. ej. trietilamina, N,N-diisopropiletilamina, etc.). Puede también ser ventajoso añadir un tampón que sea conveniente para tener el pH cerca del valor inicial antes de que comience la reacción. Ejemplos de tampón que pueden ser usados para este propósito son el tampón fosfato, tampón borato y similares.

Como un ejemplo típico, la reacción en la fase (a) es realizada usando la proteína y el agente acilante de la fórmula I en una proporción molar 1:1 a 1:5. El péptido es normalmente predisoluto en agua a -10-30°C tal como 0-25°C y el pH es ajustado al nivel deseado usando un hidróxido metálico alcalino (p. ej. hidróxido sódico o hidróxido de potasio). El valor de pH puede ser adicionalmente ajustado usando ácidos, p. ej. ácido acético, y bases, p. ej. trialkilamina, pero la temperatura está preferiblemente dentro del rango anterior. De forma alternativa el péptido es predisoluto directamente en una solución acuosa de una cantidad apropiada del ácido o base pertinente. El agente acilante es posteriormente añadido como un sólido o como una solución en un solvente aprótico polar. La reacción es normalmente dejada desarrollarse hasta la finalización (puede ser vigilada por HPLC) que es normalmente obtenida en 0,2-4 horas, tal como 0,2-1 hora, antes de la adición de agua y ácido, p. ej. ácido acético, a pH 6,5-9,0. El producto es normalmente aislado y purificado por HPLC, o es precipitado por pH isoelectrico, o es hidrolizado (fase (b)) antes de la purificación.

Cuando se usa un agente acilante de la fórmula I donde R⁴ es hidrógeno, el péptido o proteína N-acilado que lleva las fracciones lipofílicas y grupos libres carboxílicos se obtiene directamente. Así, la variante donde R⁴ es hidrógeno representa una forma de realización preferida del método de la presente invención.

De forma alternativa, es decir cuando el grupo R⁴ es C₁₋₁₂-alquilo o bencilo, el éster peptídico N-acilado (o éster de proteína) es saponificado bajo condiciones básicas para obtener el péptido N-acilado o proteína N-acilada. La saponificación es normalmente realizada en una solución 0,01-4,0 M de un hidróxido de metal alcalino, p. ej. hidróxido sódico o potásico. El pH de la solución es normalmente 10-14. La reacción es normalmente dejada que se desarrolle durante 0,1-12 horas, preferiblemente durante 0,5-4 horas, a 0-40°C tal como a aproximadamente la temperatura ambiente. Después de la reacción, el producto es purificado, p. ej. por precipitación a pH isoelectrico y/o por HPLC preparatoria. Así, la variante donde R⁴ es C₁₋₁₂-alquilo o bencilo representa otra forma de realización preferida del método de la presente invención.

En una forma de realización del método, el agente acilante se añade a la mezcla reactiva como un sólido.

En una forma de realización del método, dicha reacción en la fase a) se desarrolla en una mezcla acuosa que contiene del 0% en peso al 8% en peso de solvente aprótico polar, preferiblemente del 0% en peso al 5% en peso de solvente aprótico polar e incluso más preferible del 0% en peso al 3% en peso de solvente aprótico polar.

ES 2 328 687 T3

En otra forma de realización del método, dicha reacción en la fase a) se desarrolla en presencia de un solvente aprótico polar, y dicho solvente aprótico polar es seleccionado del grupo que consiste en N-metil-2-pirrolidona, tetrahidrofurano y dimetilsulfóxido.

5 En otra forma de realización del método, todo el solvente aprótico orgánico es añadido a la mezcla reactiva como un solvente para el agente acilante.

En otra forma de realización del método, el agente acilante es añadido a la mezcla reactiva como una solución que es estabilizada añadiendo un ácido.

10

En otra forma de realización del método, dicho ácido se añade al solvente aprótico polar en una concentración del 0,01% p/p al 1% p/p, preferiblemente en una concentración del 0,05% p/p al 0,5% p/p.

15

En otra forma de realización del método, dicho ácido es seleccionado del grupo que consiste en ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico y ácido trifluoroacético.

En otra forma de realización del método, la reacción en la fase a) se desarrolla en la ausencia de un solvente aprótico polar.

20

En otra forma de realización del método, R^4 en la fórmula I es hidrógeno.

En otra forma de realización del método, R^4 es seleccionado de C_{1-8} -alquilo y bencilo.

25

En otra forma de realización del método, R^3 con el grupo carboxilo al que R^3 está unido designa un éster de N-hidroxi imida reactivo.

En otra forma de realización del método, el éster peptídico acilado es saponificado a un valor de pH en la gama de 10-14, preferiblemente en el rango de pH de 9-13.

30

En otra forma de realización del método, el éster peptídico acilado es saponificado a un valor de pH en la gama de 9-14, tal como en el rango de pH de 10-13.

En otra forma de realización del método, el pH de la mezcla reactiva en la fase a) es de pH 9 a pH 13, preferiblemente de pH 10 a pH 12, o más preferible de pH 11.0 a pH 11.5.

35

En otra forma de realización del método, la mezcla reactiva en la fase a) comprende un tampón que es conveniente para mantener un pH sustancialmente constante durante la reacción. En una forma de realización del método dicho tampón es un tampón fosfato, un tampón borato o una mezcla de estos.

40

En otra forma de realización del método, la temperatura de la mezcla reactiva en la fase a) está en el rango de 0-50°C, preferiblemente en el rango de 5-40°C y más preferible en el rango de 10-30°C.

En otra forma de realización del método, R^2 es seleccionado de C_{3-39} -alquilo, C_{3-39} -alquenilo, C_{3-39} -alcadienilo y residuos esteroidales.

45

En otra forma de realización del método, $R^2-C(=O)-$ es seleccionado del grupo que consiste en litocoloilo y hexadecanoilo.

50

En otra forma de realización del método, dicho péptido usado como materia prima para la fase a) tiene una pureza del péptido de al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 93%, al menos el 95%, o al menos el 97% según está determinado por RP-HPLC.

En otra forma de realización del método, dicho péptido es seleccionado del grupo que consiste en GLP-1, exendina-4, GLP-2, glucagón, insulina, sus análogos y derivados de cualquiera de los precedentes.

55

En otra forma de realización del método, dicho péptido es un agonista de GLP-1.

En otra forma de realización del método, dicho péptido es seleccionado del grupo que consiste en exendina-3, exendina-4; 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), insulina des(B30)humana y sus derivados.

60

En otra forma de realización del método, dicho péptido es seleccionado del grupo que consiste en que consiste en Val¹⁸Trp¹⁹Glu²²-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵-GLP-1(7-37), Val⁸Tyr¹⁶Glu²²-GLP-1(7-37), Val¹⁸Trp¹⁶Glu²²-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), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Glu²²Val²⁵Ile³³-GLP-1(7-37), Val⁸Trp¹⁶Glu²²Val²⁵-GLP-1(7-37) y sus análogos.

65

ES 2 328 687 T3

En aún otra forma de realización del método, dicho péptido es seleccionado de HEGTFTSDLSKQMEEEAVRL-FIEWLKNNGPSSGAPPSKKKKKK-NH₂ (ZP-10) y sus análogos.

En otra forma de realización del método, dicho péptido no es un péptido de insulina, es decir no es insulina o un derivado análogo. En otra forma de realización del método, dicho péptido comprende sólo una cadena polipeptídica. En otra forma de realización del método, dicho péptido comprende dos cadenas polipeptídicas que son conectadas de manera covalente al menos por un enlace de disulfuro.

Otro aspecto de la presente invención es el uso del método de acilación para la preparación de un derivado peptídico seleccionado del grupo que consiste en Arg³⁴, Lys²⁶(N^ε-(γ-Glu(N^α-hexadecanoyl)))-GLP-1(7-37) e insulina Lys^{B29}(NE-tetradecanoyl) des(B30) humana e insulina Lys^{B29}(N^ε[N^α-litocoloil-Glu-OH]) des(B30) humana.

Ejemplos

La preparación de los reactivos de acilación se hace como se describe en WO 00/55119.

En los ejemplos, la purificación final del producto se obtuvo por cromatografía en columna.

Ejemplo 1

Arg³⁴-GLP-1(7-37) fue expresado en levadura (*S. cerevisiae*) por tecnología del ADN recombinante convencional, p. ej. como se describe en WO 98/08871. Arg³⁴-GLP-1(7-37) en el caldo de fermentación fue luego purificado por cromatografía en fase inversa convencional y posteriormente precipitado en el pH isoelectrico del péptido, es decir a pH 5.4. El precipitado fue aislado por centrifugado y congelado.

Arg³⁴-GLP-1⁷⁻³⁷ (1,47 g de material de péptido de isoprecipitado congelado, aprox. 0,10 mmol) fue disuelto en 0,1 mol/kg trietilamina (23 ml) a 10-15°C. El pH de la solución fue 11.6. Éster de γ-N-hidroxisuccinimida de ácido N-hexadecanoilglutámico (63,7 mg, 0,13 mmol) fue añadido. Después de 20 minutos a la temperatura ambiente se añadió agua (42 ml), y el pH fue ajustado a 8.0 por adición de 1,0 M de ácido acético.

Rendimiento: por RP-HPLC analítico se mostró que la mezcla reactiva contenía un 84% (por área) de Arg³⁴Lys²⁶-[N-ε-(γ-Glu(N-hexadecanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁷ y 0,5% (por área) de Arg³⁴Lys²⁶-[N-ε-(α-Glu(N-hexadecanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁷.

Ejemplo 2

Arg³⁴-GLP-1(7-37) fue expresado en levadura (*S. cerevisiae*) por tecnología del ADN recombinante convencional, p. ej. como se describe en WO 98/08871. Arg³⁴-GLP-1(7-37) en el caldo de fermentación fue luego purificado por cromatografía en fase inversa convencional y posteriormente precipitado en el pH isoelectrico del péptido, es decir a pH 5.4. El precipitado fue aislado por centrifugado y congelado.

Arg³⁴-GLP-1⁷⁻³⁷ (1,57 g de material de péptido de isoprecipitado congelado, aprox. 0,14 mmol) fue disuelto en 0,1 mol/kg de trietilamina (23 ml) a 10-15°C. El pH de la solución fue ajustado a 11.5 por la adición de trietilamina. 1,7 ml de éster de γ-N-hidroxisuccinimida de ácido N-hexadecanoilglutámico (92.1 mg, 0.19 mmol) disuelto en N-metil-2-pirrolidona fue añadido conteniendo un 0,105% p/p de H₂SO₄ 1 M. Después de 20 minutos a la temperatura ambiente se añadió agua (42 ml), y el pH fue ajustado a 8.0 por adición de 1,0 M de ácido acético.

Rendimiento: por RP-HPLC analítica se mostró que la mezcla reactiva contenía un 83% (por área) de Arg³⁴Lys²⁶-[N-ε-(γ-Glu(N-hexadecanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁷ y 0.4% (por área) de Arg³⁴Lys²⁶-[N-ε-(α-Glu(N-hexadecanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁷.

Ejemplo 3

Arg³⁴-GLP-1(7-37) fue expresado en levadura (*S. cerevisiae*) por tecnología del ADN recombinante convencional, p. ej. como se describe en WO 98/08871. Arg³⁴-GLP-1(7-37) en el caldo de fermentación fue luego purificado por cromatografía en fase inversa convencional y posteriormente precipitado en el pH isoelectrico del péptido, es decir a pH 5.4. El precipitado fue aislado por centrifugado y congelado.

Arg³⁴-GLP-1⁷⁻³⁷ (1,53 g de material peptídico isoprecipitado congelado, aprox. 0,13 mmol) fue disuelto en 0,05 mol/kg de trietilamina (25 ml) a la temperatura ambiente. El pH de la solución fue 10.9. 1,8 ml de éster de γ-N-hidroxisuccinimida de ácido N-hexadecanoilglutámico (94,2 mg, 0,19 mmol) disuelto fue añadido en N-metil-2-pirrolidona sin H₂SO₄. Después de 30 minutos a la temperatura ambiente se añadió agua (48 ml), y el pH fue ajustado a 8.0 por adición de 1,0 M de ácido acético.

Rendimiento: por RP-HPLC analítica se mostró que la mezcla reactiva contenía un 75% (por área) de Arg³⁴Lys²⁶-[N-ε-(γ-Glu(N-hexadecanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁷ y 4.0% (por área) de Arg³⁴Lys²⁶-[N-ε-(α-Glu(N-hexadecanoyl))]-GLP-1⁷⁻³⁷.

Ejemplo 4

Ejemplo de referencia con solvente aprótico polar conc. > 10% p/p

- 5 Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura (*S. cerevisiae*) por tecnología del ADN recombinante convencional, p. ej. como se describe en WO 98/08871. Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ en el caldo de fermentación fue luego purificado por cromatografía en fase inversa convencional y posteriormente precipitado en el pH isoelectrico del péptido, es decir a pH 5.4. El precipitado fue aislado por centrifugado y congelado.
- 10 Arg³⁴-GLP-1⁷⁻³⁷ (1,57 g de material peptídico isoprecipitado congelado, aprox. 0,14 mmol) fue disuelto en 0,1 mol/kg de trietilamina (23 ml) a 10-15°C. N-metil-2-pirrolidona (6.8 ml) fue añadido y el pH de la solución fue ajustado a 11.5 por la adición de trietilamina. Luego éster de γ -N-hidroxisuccinimida de ácido N-hexadecanoilglutámico (92.1 mg, 0.19 mmol) disuelto fue añadido en 1,7 ml de N-metil-2-pirrolidona conteniendo 0,105% p/p de H₂SO₄ 1 M. Después de 20 minutos a la temperatura ambiente agua (54 ml) fue añadido, y el pH fue ajustado a 8.0 por adición
- 15 de 1,0 M de ácido acético.

Rendimiento: por RP-HPLC analítico se mostró que la mezcla reactiva contenía un 87% (por área) de Arg³⁴Lys²⁶-[N- ϵ -(γ -Glu(N-hexadecanoil))]-GLP-1⁷⁻³⁷ y 0.5% (por área) de Arg³⁴Lys²⁶-[N- ϵ -(α -Glu(N-hexadecanoil))]-GLP-1⁷⁻³⁷.

20
Ejemplo 5

Ejemplo de referencia con solvente aprótico polar conc. > 10% p/p

- 25 Arg³⁴GLP-1(7-37) fue expresado en levadura (*S. cerevisiae*) por tecnología del ADN recombinante convencional, p. ej. como se describe en WO 98/08871. Arg³⁴GLP-1(7-37) en el caldo de fermentación fue luego purificado por cromatografía en fase inversa convencional y posteriormente precipitado en el pH isoelectrico del péptido, es decir a pH 5.4. El precipitado fue aislado por centrifugado y congelado.
- 30 Arg³⁴-GLP-1⁷⁻³⁷ (1,51 g de material peptídico isoprecipitado congelado, aprox. 0,13 mmol) fue disuelto en 0,1 mol/kg de trietilamina (20 ml) y N-metil-2-pirrolidona (100 ml) a 10-15°C. Luego éster de N-hidroxisuccinimida de ácido γ -N-hexadecanoilglutámico (74 mg, 0.15 mmol) disuelto fue añadido en 1,4 ml de N-metil-2-pirrolidona conteniendo 0,105%p/p de H₂SO₄ 1 M. Después de 45 minutos a la temperatura ambiente se añadió agua (206 ml), y el pH fue ajustado a 8 por adición de 1.0 M de ácido acético.

35 Rendimiento: por RP-HPLC analítica se mostró que la mezcla reactiva contenía un 57% (por área) de Arg³⁴Lys²⁶-[N- ϵ -(γ -Glu(N-hexadecanoil))]-GLP-1⁷⁻³⁷ y 14% (por área) de Arg³⁴Lys²⁶-[N- ϵ -(γ -Glu(N-hexadecanoil))]-GLP-1⁷⁻³⁷.

40
Ejemplo 6

En la tabla 1 las condiciones experimentales usadas para acilar Arg³⁴-GLP-1⁷⁻³⁷ en los experimentos de ejemplo 1-5 están resumidas y los contenidos resultantes de la impureza Arg³⁴Lys²⁶-[N- ϵ -(α -Glu(N-hexadecanoil))]-GLP-1⁷⁻³⁷ (abreviado α -glu) están catalogados. Sin la adición de H₂SO₄ como estabilizador está claro que concentraciones inferiores de solvente aprótico polar son eficaces para reducir la cantidad de la impureza α -glu. Cuando se añade el estabilizador, la formación de cantidades significantes de la impureza α -glu empieza a concentraciones significativamente más altas de solvente aprótico polar, es decir sobre la concentración 28% p/p.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

El contenido de solvente aprótico polar en la mezcla reactiva cuando acila péptidos de GLP-1 y la resultante fracción de la impureza Arg³⁴Lys²⁶-[N-ε-(α-Glu(N-hexadecanoil))]-GLP-1⁷⁻³⁷ (α-glu).
(Datos de ejemplos 1-5)

Ejemplo #	Solución de péptido acuoso (ml)	NMP añadido (ml)	Contenidos de NMP (%p/p)	H ₂ SO ₄ añadido	α-glu
1	23	0	0%	-	0,5%
2	23	1,7	7%	+	0,4%
3	25	1,8	7%	-	4%
4	23	6,8 + 1,7	28%	+	0,5%
5	20	100 + 1,4	84%	+	14%

Ejemplo 7

Insulina des(B30)-humana cristalizada de sodio (1,74 g de material de péptido congelado aislado por precipitación isoelectrica, aprox. 0,088 mmol) fue disuelta en 0,1 mol/kg de trietilamina (10,85 ml) a la temperatura ambiente. El pH de la solución fue 10.9. Luego, (2S)-5-[(2,5-dioxo-1-pirrolidinil)oxi]-2-[[[(3a,5b)-3-hidroxi-9-meil-24-oxocolan-24-il]amino]-5-oxopentanoato de metilo (55,1 mg, 0,089 mmol) disuelto fue añadido en N-metil-2-pirrolidona (1,25 ml). Después de 30 minutos a la temperatura ambiente se añadió agua (5°C, 85 ml).

Rendimiento: por RP-HPLC analítica se mostró que la mezcla reactiva contenía el 34% (por área) de insulina Nε-(litocoloil-γ-glutamyl)-Lys^{B29}-des(B30)-humana.

Ejemplo 8

Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ fue expresado en levadura (*S. cerevisiae*) por tecnología del ADN recombinante convencional, p. ej. como se describe en WO 98/08871. Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ en el caldo de fermentación fue luego purificado por cromatografía en fase inversa convencional y posteriormente precipitado en el pH isoelectrico del péptido, es decir a pH 5.4. El precipitado fue aislado por centrifugado y congelado.

El precipitado isoelectrico que contiene Arg³⁴GLP-1₍₇₋₃₇₎ (5,70 g de material peptídico precipitado congelado, aprox. 0,38 mmol) fue disuelto en 0,1 M de solución de disodio hidrogenofosfato dihidrato (170 ml, pH ajustada a 11.35 con 1 M de NaOH) a 15°C. El pH de la solución fue reajustado a 11.4 por la adición de 1 M de NaOH. 3 ml de éster de γ-N-hidroxisuccinimida de ácido N-hexadecanoilglutámico (248.1 mg, 0.51 mmol) disuelto en N-metil-pirrolidona conteniendo 0,105% p/p de H₂SO₄ 1 M fue añadido gota a gota durante 8 min.

Muestras fueron extraídas durante 21,5 horas de reacción a 15°C y se añadió 0,1 M de solución de sodio dihidrogenofosfato dihidrato conteniendo 1 mg/ml glicina, pH 7.5. La mezcla reactiva final fue diluida con agua (300 ml) y el pH fue ajustado a 8.0 por adición de ácido glacial.

Rendimiento: por RP-HPLC analítica se mostró que la mezcla reactiva contenía un 78-80% (por área) de Arg³⁴Lys²⁶-[N-ε-(γ-Glu(N-hexadecanoil))]-GLP-1⁷⁻³⁷ y 0.24-1.67% (por área) de Arg³⁴Lys²⁶-[N-ε-(γ-Glu(N-hexadecanoil))]-GLP-1⁷⁻³⁷.

TABLA 2

El contenido de Arg³⁴Lys²⁶-[N-ε-(γ-Glu(N-hexadecanoil))]-GLP-I⁷⁻³⁷ (γ-Glu) y Arg³⁴Lys²⁶-[N-ε-(α-Glu(N-hexadecanoil))]-GLP-I⁷⁻³⁷ (α-Glu) vs. tiempo de reacción. (Datos del Ejemplo 8)

Tiempo (hrs)	γ-Glu (% por área)	α-Glu (% por área)
0.17	78.01	0.24
1	79.35	0.31
2	79.45	0.36
4	80.49	0.45
21.5	80.27	1.67

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 patente citados en la descripción

- WO 9808871 A [0003] [0062] [0064] [0067] [0069] [0071] [0076]
- WO 9808872 A [0003]
- WO 9943708 A [0003] [0011]
- WO 9802460 A [0003] [0025]
- EP 1227107 A [0003]
- WO 9507931 A [0003]
- US 3950517 A [0003]
- WO 0055119 A [0003] [0025] [0060]
- US 6451974 B [0003]
- EP 0511600 A2 [0024]

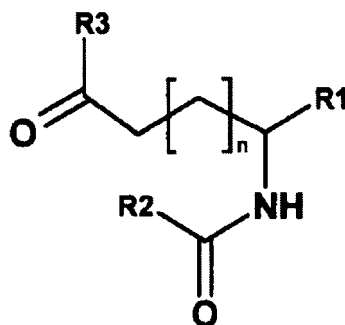
Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

- *Chem. Farm. Bull.*, 1986, vol. 34, nº. 7. 2840-2851 [0003]
- *Meth. Enzym.*, 1972, vol. 25, 494-499 [0003]

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de un péptido N-acilado, dicho método incluyendo las etapas:

a) reaccionar el péptido que tiene al menos un grupo amino libre con un agente acilante de la fórmula general I



donde

n es 0-8;

R¹ es COOR⁴;

R² es una fracción lipofílica;

R³ junto con el grupo carboxilo al que R³ está unido designan un éster reactivo o un éster de N-hidroxi imida reactivo; y

R⁴ es seleccionado de hidrógeno, C₁₋₁₂-alquilo y bencilo, bajo condiciones básicas en una mezcla acuosa;

b) si R⁴ no es hidrógeno, saponificar el grupo éster peptídico acilado (COOR⁴) bajo condiciones básicas;

c) aislar el péptido N-acilado,

caracterizado por dicha mezcla acuosa en la fase a) conteniendo menos del 8% p/p solvente aprótico polar.

2. Método según la reivindicación 1, donde dicha reacción en la fase a) se desarrolla en una mezcla acuosa que contiene menos del 5% p/p de solvente aprótico polar, preferiblemente menos del 3% p/p de solvente aprótico polar.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el agente acilante se añade a la mezcla reactiva como un sólido.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde dicha reacción en la fase a) se desarrolla en presencia de un solvente aprótico polar, y dicho solvente aprótico polar es seleccionado del grupo que consiste en N-metil-2-pirrolidona, tetrahidrofurano y dimetilsulfóxido.

5. Método según la reivindicación 4, donde todo el solvente aprótico orgánico es añadido a la mezcla reactiva como un solvente para el agente acilante.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4-5, donde el agente acilante es añadido a la mezcla reactiva como una solución que es estabilizada añadiendo un ácido.

7. Método según la reivindicación 6, donde dicho ácido se añade al solvente aprótico polar en una concentración del 0,01% p/p al 1% p/p, preferiblemente en una concentración del 0,05% p/p al 0,5% p/p.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6-7, donde dicho ácido es seleccionado del grupo que consiste en ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico y ácido trifluoroacético.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la reacción en la fase a) se desarrolla en la ausencia de un solvente aprótico polar.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde R⁴ es hidrógeno.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde R⁴ es seleccionado de C₁₋₈ alquilo y bencilo.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde R³ junto con el grupo carboxilo al que R³ está unido designan un éster de N-hidroxi imida reactivo.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el éster peptídico acilado es saponificado a un valor de pH en la gama de 10-14, preferiblemente en el rango de pH de 9-13.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el pH de la mezcla reactiva en la fase a) es de pH 9 a pH 13, preferiblemente de pH 10 a pH 12, o más preferible de pH 11.0 a pH 11.5.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde la temperatura de la mezcla reactiva en la fase a) está comprendida en el rango de 0-50°C, preferiblemente en el rango de 5-40°C y más preferible en el rango de 10-30°C.

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde R² es seleccionado de C₃₋₃₉-alquilo, C₃₋₃₉-alqueno, C₃₋₃₉-alcadieno y residuos esteroidales.

17. Método según la reivindicación 16, donde R²-C(=O)- es seleccionado del grupo que consiste en litocoloilo y hexadecanoilo.

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho péptido usado como materia prima para la fase a) tiene una pureza del péptido de al menos 80%, al menos 90%, al menos 93%, al menos 95%, o al menos 97% según está determinado por RP-HPLC.

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho péptido es seleccionado del grupo que consiste en GLP-1, exendina-4, GLP-2, glucagón e insulina.

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde dicho péptido es un análogo de GLP-1 que es seleccionado del grupo que consiste en: Arg²⁶-GLP-1(7-37); Arg³⁴-GLP-1(7-37); Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}Lys³⁸-GLP-1(7-38); Arg^{26,34}Lys³⁹-GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg²⁶Lys³⁹-GLP-1(7-39); Arg³⁴Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Arg^{26,34}Lys^{36,39}-GLP-1(7-39); Arg^{26,34}Lys^{36,40}-GLP-1(7-40); Gly⁸Arg²⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg³⁴-GLP-1(7-37); Gly⁸Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg^{26,34}Lys³⁹-GLP-1(7-39); Gly⁸Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-40); Gly⁸Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37); Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}-GLP-1(7-37); Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-37); Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-37); Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-37); Val⁸Arg²²-GLP-1(7-37); Met⁸Arg²²-GLP-1(7-37); Gly⁸His²²-GLP-1(7-37); Val⁸His²²-GLP-1(7-37); Met⁸His²²-GLP-1(7-37); His³⁷-GLP-1(7-37); Gly⁸-GLP-1(7-37); Val⁸-GLP-1(7-37); Met⁸-GLP-1(7-37); Gly⁸Asp²²-GLP-1(7-37); Val⁸Asp²²-GLP-1(7-37); Met⁸Asp²²-GLP-1(7-37); Gly⁸Glu²²-GLP-1(7-37); Val⁸Glu²²-GLP-1(7-37); Met⁸Glu²²-GLP-1(7-37); Gly⁸Lys²²-GLP-1(7-37); Val⁸Lys²²-GLP-1(7-37); Met⁸Lys²²-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg²²His³⁷-GLP-1(7-37); Val⁸Arg²²His³⁷-GLP-1(7-37); Gly⁸Lys²²His³⁷-GLP-1(7-37); Met⁸Lys²²His³⁷-GLP-1(7-37); Gly⁸Arg²²His³⁷-GLP-1(7-37); Val⁸Arg²²His³⁷-GLP-1(7-37); Met⁸Arg²²His³⁷-GLP-1(7-37); Gly⁸His²²His³⁷-GLP-1(7-37); Val⁸His²²His³⁷-GLP-1(7-37); Met⁸His²²His³⁷-GLP-1(7-37); Gly⁸His³⁷-GLP-1(7-37); Val⁸His³⁷-GLP-1(7-37); Met⁸His³⁷-GLP-1(7-37); Gly⁸Asp²²His³⁷-GLP-1(7-37); Val⁸Asp²²His³⁷-GLP-1(7-37); Met⁸Asp²²His³⁷-GLP-1(7-37); Arg²⁶-GLP-1(7-36)-amida; Arg³⁴-GLP-1(7-36)-amida; Lys³⁶-GLP-1(7-36)-amida; Arg^{26,34}Lys³⁶-GLP-1(7-36)-amida; Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-36)-amida; Arg^{26,34}Lys⁴⁰-GLP-1(7-36)-amida; Arg²⁶Lys³⁶-GLP-1(7-36)-amida; Arg³⁴Lys³⁶-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Asp²²-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Asp²²-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Asp²²-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Glu²²-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Lys²²-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸His²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Arg²²-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Arg²²-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Arg²²-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸His²²-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸His²²-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸His²²-GLP-1(7-36)-amida; His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Arg²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Arg²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Asp²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Asp²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Asp²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Glu²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Gly²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸Lys²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Met⁸Lys²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Gly⁸Arg²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; Val⁸His²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida; y Met⁸His²²His³⁷-GLP-1(7-36)-amida.

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde dicho péptido es un análogo de GLP-2 que es seleccionado del grupo que consiste en: Lys²⁰GLP-2(1-33); Lys²⁰Arg³⁰GLP-2(1-33); Arg³⁰Lys³⁴GLP-2(1-34); Arg³⁰Lys³⁵GLP-2(1-35); Arg^{30,35}Lys²⁰GLP-2(1-35); y Arg³⁵GLP-2(1-35).

22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, donde dicho péptido es un análogo de insulina que es insulina des(B30)-humana.

23. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho péptido es un agonista de GLP-1.

ES 2 328 687 T3

24. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho péptido es seleccionado del grupo que consiste en exendina-3, exendina-4; 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), e insulina des(B30)humana.

25. Método según la reivindicación 19, donde dicho péptido es HGEFTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPS SGAPPSKKKKKK-NH₂ (ZP-10).

26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde la mezcla reactiva en la fase a) comprende un tampón que es conveniente para mantener un pH sustancialmente constante durante la reacción.

27. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho péptido no es un péptido de insulina.