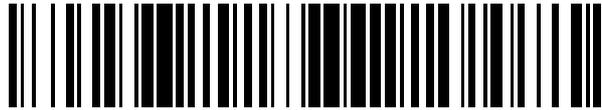


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 998**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2010 E 10715185 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2417152**

54 Título: **Procedimiento para aislar linaclotida**

30 Prioridad:

10.04.2009 US 168259 P

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

27.01.2014

73 Titular/es:

**CORDEN PHARMA COLORADO, INC. (100.0%)
2075 N 55th Street
Boulder, CO 80301, US**

72 Inventor/es:

**FLEMING, MICHAEL PAUL y
PETERSEN, RAYMOND DENNIS**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 439 998 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

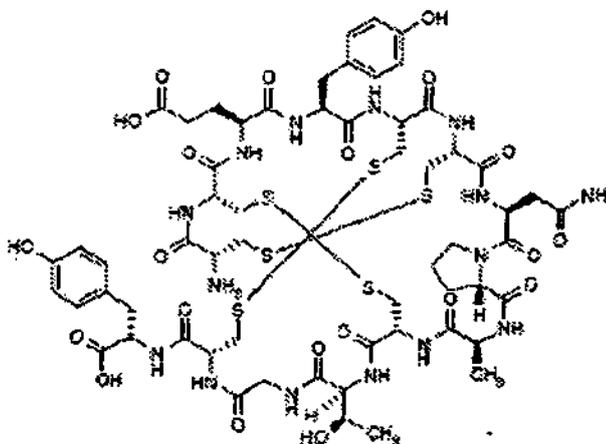
Procedimiento para aislar linaclotida

La presente invención se refiere a procedimientos de aislamiento de un péptido para tratar varios trastornos, incluyendo trastornos gastrointestinales, obesidad, insuficiencia cardíaca congestiva e hiperplasia prostática benigna.

- 5 El síndrome del colon irritable (SCI) es un trastorno crónico común del intestino que afecta a de 20 a 60 millón de individuos sólo en los EE. UU. El SCI es el trastorno más común diagnosticado por los gastroenterólogos (el 28 % de los pacientes examinados) y representa el 12 % de las visitas a los médicos de atención primaria (Camilleri 2001, Gastroenterology 120:652-668). En los EE. UU., se estima que el impacto económico del SCI es de 25 mil millones \$
- 10 anualmente, a través de los costes directos del uso de la atención sanitaria y de los costes indirectos del absentismo laboral (Talley 1995, Gastroenterology 109:1736-1741). Los pacientes con SCI presentan tres veces más absentismo laboral y se informa de una reducción en su calidad de vida. Los que lo padecen pueden ser incapaces de o estar poco dispuestos a asistir a acontecimientos sociales, mantener un empleo, o viajar incluso distancias cortas (Drossman 1993, Dig Dis Sci 38:1569-1580). Existe una enorme necesidad médica no cubierta en esta población ya que existen pocas opciones de prescripción para tratar el SCI.
- 15 La linaclotida es un péptido 14mero primero en su clase y un agonista del receptor de guanilato ciclasa de tipo C (GCC) que estimula la producción de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). Estudios *in vitro* sugieren que la linaclotida incrementó el cGMP en células intestinales humanas en concentraciones variables, y estudios *in vivo* en ratones y ratas mostraron que la linaclotida oral tuvo efectos prometedores en el incremento de la motilidad del intestino delgado, secreción de fluido y disminución del dolor visceral.
- 20 La linaclotida es un péptido cíclico de 14 aminoácidos con tres enlaces disulfuro, la secuencia que consiste en la (SEQ ID NO. 1) ciclada

Cys-Cys-Glu-Tyr-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Tyr

con puentes disulfuro entre los residuos de cisteína en las posiciones 1 y 6, 2 y 10, y 5 y 13 como se muestra a continuación:



- 25 Comparte una actividad farmacológica común en el tubo digestivo con las hormonas endógenas GN y UGN (GASTROENTEROLOGY, 2005, 128, 4, Supl. 2, A464). El fármaco actúa como un superagonista de GCC, elevando de este modo el cGMP intracelular.

- 30 Típicamente, el ciclopéptido se sintetiza de forma lineal usando un sintetizador peptídico en fase sólida automatizado antes de formar los enlaces disulfuro (documentos US7.371.727; WO-2004069165; Current Opinion in Molecular Therapeutics 2007, vol. 9, n.º 4). Sin embargo, la construcción lineal típica combinada con liofilización como procedimiento de aislamiento da como resultado un rendimiento del 10-20 % (documento US7.371.727). La liofilización no proporciona un material a granel con propiedades óptimas para la fabricación. La densidad aparente del material liofilizado es normalmente baja, el material tiene características de manejo malas (partículas finas sometidas a carga estática) y una estabilidad reducida potencial debido a un área de superficie alta. Además, la potencia de los
- 35 compuestos farmacéuticos engendra problemas de higiene industrial asociados con el manejo abierto de los materiales liofilizados. Por tanto, son necesario procedimientos mejorados de aislamiento de linaclotida, (SEQ ID NO 1) ciclada.

- 40 En un primer objetivo, la presente invención proporciona un procedimiento para precipitar un péptido que comprende la etapa de:

ES 2 439 998 T3

a) proporcionar una solución acuosa de isopropanol o etanol de péptido ciclado que incluya la secuencia de aminoácidos de (SEQ ID NO. 1)

Cys-Cys-Glu-Tyr-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Tyr

5 En un modo de realización preferente, la solución de alcohol es una solución de isopropanol y el procedimiento comprende además la etapa de:

b) separar con alimentación la solución resultante de la etapa a) con isopropanol para reducir el porcentaje de agua en la solución.

En otro modo de realización preferente, la solución de alcohol es una solución de etanol y el procedimiento comprende además la etapa de:

10 b) separar con alimentación la solución resultante de la etapa a) con etanol para reducir el porcentaje de agua en la solución.

En otro modo de realización preferente, la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 45 % a aproximadamente un 70 %.

15 En otro modo de realización preferente, la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 45 % a aproximadamente un 65 %.

En otro modo de realización preferente, la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 45 % a aproximadamente un 60 %.

En otro modo de realización preferente, la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 60 %.

20 En otro modo de realización preferente, la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 55 %.

En otro modo de realización preferente, la solución de etanol acuosa es una solución de etanol acuosa de aproximadamente un 55 % a aproximadamente un 75 %.

25 En otro modo de realización preferente, la solución de etanol acuosa es una solución de etanol acuosa de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 75 %.

En otro modo de realización preferente, la solución de etanol acuosa es una solución de etanol acuosa de aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 75 %.

30 En otro modo de realización preferente, la separación con alimentación con isopropanol o etanol en la etapa b) reduce el porcentaje de agua en la solución hasta que el porcentaje de isopropanol o etanol es mayor de un 96 %, preferentemente un 97 %, más preferentemente un 98 %.

En otro modo de realización preferente, el procedimiento de la presente invención comprende además la etapa de:

c) separar con alimentación la solución resultante de la etapa b) con heptano.

35 En otro modo de realización preferente, la separación con alimentación con heptano en la etapa c) reduce el porcentaje de isopropanol o etanol en la solución hasta que el porcentaje de heptano es mayor de un 98 %, preferentemente un 98,5 %, más preferentemente un 99 %, aún más preferentemente un 99,5 %, lo más preferentemente un 99,9 %.

En un modo de realización alternativo, el procedimiento de la presente invención comprende además la etapa de:

b) diluir con agua la solución resultante de la etapa a).

40 En otro modo de realización preferente, la solución se diluye hasta aproximadamente 3/1 v/v de agua/isopropanol o hasta aproximadamente 3/1 v/v de agua/etanol para precipitar la SEQ ID No. 1.

En un segundo objetivo, la presente invención proporciona un procedimiento para aislar un péptido que comprende las etapas de:

a) proporcionar una solución acuosa de isopropanol o etanol de péptido ciclado que incluya la secuencia de aminoácidos de (SEQ ID NO. 1)

45 Cys-Cys-Glu-Tyr-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Tyr

b) secar por pulverización la solución resultante de la etapa a).

En otro modo de realización preferente, la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 45 % a aproximadamente un 70 %.

En otro modo de realización preferente, la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 45 % a aproximadamente un 65 %.

- 5 En otro modo de realización preferente, la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 45 % a aproximadamente un 60 %.

En otro modo de realización preferente, la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 60 %.

- 10 En otro modo de realización preferente, la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 55 %.

En otro modo de realización preferente, la solución de etanol acuosa es una solución de etanol acuosa de aproximadamente un 55 % a aproximadamente un 75 %.

En otro modo de realización preferente, la solución de etanol acuosa es una solución de etanol acuosa de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 75 %.

- 15 En otro modo de realización preferente, la solución de etanol acuosa es una solución de etanol acuosa de aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 75 %.

Definiciones

- 20 La expresión "un" o "una" entidad como se usa en el presente documento se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, un compuesto se refiere a uno o más compuestos o al menos un compuesto. Como tal, los términos "un" (o "una"), "uno o más", y "al menos uno" se pueden usar de manera intercambiable en el presente documento.

- 25 Como se usa en esta memoria descriptiva, ya sea en una expresión transicional o en el cuerpo de la reivindicación, los términos "comprende(n)" y "comprender" se han de interpretar como con un significado abierto. Esto es, los términos se han de interpretar como sinónimos con las expresiones "teniendo al menos" o "incluyendo al menos". Cuando se usa en el contexto de un procedimiento, el término "comprende" quiere decir que el procedimiento incluye al menos las etapas enumeradas, pero puede incluir etapas adicionales. Cuando se usa en el contexto de un compuesto o composición, el término "comprende" quiere decir que el compuesto o composición incluye al menos las características o componentes enumerados, pero también puede incluir características o componentes adicionales. Como se usa en el presente documento, a menos que se indique específicamente de otro modo, la palabra "o" se usa en sentido "inclusivo" de "y/o" y no en sentido "exclusivo" de "o bien/o".

- 30 El término "aproximadamente" se usa en el presente documento para significar sobre, en la región de, más o menos, o alrededor de. Cuando el término "aproximadamente" se usa junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos.

- 35 Como se usa en el presente documento, los términos "péptido ciclado de SEQ ID No 1", "péptido ciclado que incluye la secuencia de aminoácidos de (SEQ ID NO. 1)", "linaclotida", y "un péptido cíclico de 14 aminoácidos con tres enlaces disulfuro, la secuencia que consiste en (SEQ ID NO. 1) ciclada" quiere decir la secuencia peptídica de (SEQ ID NO. 1)

Cys-Cys-Glu-Tyr-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Tyr

en la que el péptido de (SEQ ID NO. 1) está plegado en la forma de tri-disulfuro policíclico debido a puentes disulfuro entre los residuos de cisteína en las posiciones 1 y 6, 2 y 10, y 5 y 13.

- 40 A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. En el presente documento se hace referencia a varias metodologías y materiales conocidos por los expertos en la técnica. Los trabajos de referencia estándar que exponen los principios generales de farmacología incluyen Goodman and Gil-man's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10^a Ed., McGraw Hill Companies Inc., New York (2001). Cualquier material y/o procedimiento adecuado conocido por los expertos se puede utilizar para llevar a cabo la presente invención. Sin embargo, se describen materiales y procedimientos preferentes. Los materiales, reactivos y similares a los que se hace referencia en la descripción y ejemplos siguientes se pueden obtener a partir de fuentes comerciales, a menos que se destaque de otro modo.

Como se usa en el presente documento, el término "que incluye la secuencia de aminoácidos" quiere decir preferentemente "que tiene la secuencia de aminoácidos".

- 50 Como se usa en el presente documento, la expresión "solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 45 % a aproximadamente un 70 %" quiere decir una solución que comprende entre aproximadamente un 45 % v/v de isopropanol y aproximadamente un 55 % v/v de agua a aproximadamente un 70 % v/v de isopropanol y

aproximadamente un 30 % v/v de agua. Como se usa en el presente documento, en este contexto, el término "aproximadamente" quiere decir más o menos un 5 % v/v.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 45 % a aproximadamente un 60 %" quiere decir una solución que comprende entre aproximadamente un 45 % v/v de isopropanol y aproximadamente un 55 % v/v de agua a aproximadamente un 60 % v/v de isopropanol y aproximadamente un 40 % v/v de agua. Como se usa en el presente documento, en este contexto, el término "aproximadamente" quiere decir más o menos un 5 % v/v.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 60 %" quiere decir una solución que comprende entre aproximadamente un 50 % v/v de isopropanol y aproximadamente un 50 % v/v de agua a aproximadamente un 60 % v/v de isopropanol y aproximadamente un 40 % v/v de agua. Como se usa en el presente documento, en este contexto, el término "aproximadamente" quiere decir más o menos un 5 % v/v.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 55 %" quiere decir una solución que comprende aproximadamente un 55 % v/v de isopropanol y aproximadamente un 45 % v/v de agua. Como se usa en el presente documento, en este contexto, el término "aproximadamente" quiere decir más o menos un 5 % v/v.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "solución de etanol acuosa de aproximadamente un 55 % a aproximadamente un 75 %" quiere decir una solución que comprende entre aproximadamente un 55 % v/v de etanol y aproximadamente un 45 % v/v de agua a aproximadamente un 75 % v/v de etanol y aproximadamente un 25 % v/v de agua. Como se usa en el presente documento, en este contexto, el término "aproximadamente" quiere decir más o menos un 5 % v/v.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "solución de etanol acuosa de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 75 %" quiere decir una solución que comprende entre aproximadamente un 60 % v/v de etanol y aproximadamente un 40 % v/v de agua a aproximadamente un 75 % v/v de etanol y aproximadamente un 25 % v/v de agua. Como se usa en el presente documento, en este contexto, el término "aproximadamente" quiere decir más o menos un 5 % v/v.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "solución de etanol acuosa de aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 75 %" quiere decir una solución que comprende entre aproximadamente un 65 % v/v de etanol y aproximadamente un 35 % v/v de agua a aproximadamente un 75 % v/v de etanol y aproximadamente un 25 % v/v de agua. Como se usa en el presente documento, en este contexto, el término "aproximadamente" quiere decir más o menos un 5 % v/v.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "solución de etanol acuosa de aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 70 %" quiere decir una solución que comprende entre aproximadamente un 65 % v/v de etanol y aproximadamente un 35 % v/v de agua a aproximadamente un 70 % v/v de etanol y aproximadamente un 30 % v/v de agua. Como se usa en el presente documento, en este contexto, el término "aproximadamente" quiere decir más o menos un 5 % v/v.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "solución de etanol acuosa de aproximadamente un 67 %" quiere decir una solución que comprende aproximadamente un 67 % v/v de etanol y aproximadamente un 33 % v/v de agua. Como se usa en el presente documento, en este contexto, el término "aproximadamente" quiere decir más o menos un 5 % v/v.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "separar con alimentación la solución" quiere decir que se añade gradualmente un segundo disolvente a vacío a una primera solución y el segundo disolvente reemplaza gradualmente la primera solución con el segundo disolvente mientras se mantiene el volumen aproximadamente constante. Por ejemplo, separar con alimentación una solución de isopropanol acuosa de un 50 % v/v con isopropanol daría como resultado gradualmente una solución de isopropanol, en la que el agua restante es menor de aproximadamente un 2 %. Por ejemplo, separar con alimentación una solución de isopropanol con heptano daría como resultado gradualmente una solución de heptano, en la que el isopropanol restante es menor de aproximadamente un 0,1 %. Por ejemplo, separar con alimentación una solución de etanol acuosa de un 50 % v/v con etanol daría como resultado gradualmente una solución de etanol, en la que el agua restante es menor de aproximadamente un 2 %. Por ejemplo, separar con alimentación una solución de etanol con heptano daría como resultado gradualmente una solución de heptano, en la que el etanol restante es menor de aproximadamente un 0,1 %.

50 Como se usa en el presente documento, el término "diluir con agua" quiere decir añadir agua a una solución para incrementar el porcentaje en volumen de agua de modo que la solución resultante sea aproximadamente 3/1 v/v de agua con relación a alcohol. Por ejemplo, diluir una solución de isopropanol acuosa de un 50 % v/v con agua proporcionaría una solución de aproximadamente 3/1 v/v de agua/isopropanol. Por ejemplo, diluir una solución de etanol acuosa de un 50 % v/v con agua proporcionaría una solución de aproximadamente 3/1 v/v de agua/etanol.

55 Como se usa en el presente documento, "gran escala" con respecto a la síntesis peptídica incluye, en general, la

síntesis de péptidos en el intervalo de al menos 500 g, más preferentemente al menos 2 kg por lote. Típicamente, la síntesis a gran escala se realiza en recipientes de reacción grandes, tales como recipientes de reacción de acero, que pueden acomodar cantidades de reactivos tales como resinas, disolventes, aminoácidos, productos químicos para acoplamiento, y reacciones de desprotección, que están dimensionados para permitir la producción de péptidos en el intervalo de kilogramo a tonelada métrica.

Las abreviaturas usadas comúnmente incluyen: acetilo (Ac), azo-bis-isobutirilnitrilo (AIBN), atmósferas (Atm), 9-borabicyclo[3.3.1]nonano (9-BBN o BBN), terc-butoxicarbonilo (Boc), pirocarbonato di-terc-butilo o anhídrido boc (BOC20), bencilo (Bn), butilo (Bu), Número de registro del servicio de Chemical Abstracts (CASRN), benziloxycarbonilo (CBZ o Z), carbonildiimidazol (GDI), 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO), trifluoruro de dietilaminoazufre (DAST), dibencilidenacetona (dba), 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-eno (DBN), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1,2-dicloroetano (DCE), diclorometano (DCM), azodicarboxilato de dietilo (DEAD), di-isopropilazodicarboxilato (DIAD), hidruro de di-iso-butilaluminio (DIBAL o DIBAL-H), di-isopropiletilamina (DIPEA), N,N-dimetilacetamida (DMA), 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP), N,N-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), 1,1'-bis-(difenilfosfino)etano (dppe), 1,1'-bis-(difenilfosfino)ferroceno (dppf), clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI), etilo (Et), acetato de etilo (EtOAc), etanol (EtOH), éster etílico del ácido 2-etoxi-2H-quinoline-1-carboxílico (EEDQ), éter dietílico (Et2O), hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N'-tetrametiluronio (HATU), ácido acético (HOAc), 1-N-hidroxibenzotriazol (HOBt), cromatografía líquida de alta presión (HPLC), iso-propanol (IPA), hexametildisilazano de litio (LiHMDS), metanol (MeOH), punto de fusión (pf), MeSO₂- (mesil o Ms), metil (Me), acetonitrilo (MeCN), ácido m-cloroperbenzoico (MCPBA), espectro de masas (EM), éter metil-t-butílico (MTBE), N-bromosuccinimida (NBS), N-carboxianhidrido (NCA), N-clorosuccinimida (NCS), N-metilmorfolina (NMM), N-metilpirrolidona (NMP), clorocromato de piridinio (PCC), dicromato de piridinio (PDC), fenilo (f), propilo (Pr), iso-propilo (i-Pr), libras por pulgada cuadrada (psi), piridina (pyr), temperatura ambiente (ta o TA), terc-butildimetilsililo o t-BuMe₂Si (TBDMS), trietilamina (TEA o Et₃N), 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo (TEMPO), triflato o CF₃SO₂- (Tf), ácido trifluoroacético (TFA), 1,1-bis-2,2,6,6-tetrametilheptano-2,6-diona (TMHD), tetrafluoroborato de O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), cromatografía en capa fina (TLC), tetrahidrofurano (THF), trimetilsililo o Me₃Si (TMS), monohidrato de ácido p-toluenosulfónico (TsOH o pTsOH), 4-Me-C₆H₄SO₂- o tosilato (Ts), N-uretano-N-carboxianhidruro (UNCA). La nomenclatura convencional que incluye los prefijos normal (n), iso (i-), secundario (sec-), terciario (terc-) y neo tienen su significado habitual cuando se usan con un resto alquilo. (J. Rigaudy y D. P. Klesney, Nomenclature in Organic Chemistry, IUPAC 1979 Pergamon Press, Oxford.)

La linaclotida se puede sintetizar de forma lineal usando equipo de síntesis en fase sólida automatizado estándar (documentos US7.371.727, WO2004069165, Current Opinion in Molecular Therapeutics 2007 9(4):403-410).

Después de que se forme el péptido de SEQ ID No. 1, el producto se puede someter a, purificación, liofilización, procesamiento adicional (por ejemplo, reacción con otro péptido para formar una proteína de fusión); combinaciones de estos, y/o similares, según se desee.

Por ejemplo, en el procedimiento actual, el péptido se oxida para formar la forma de tri-disulfuro antes de la purificación.

Específicamente, el péptido lineal se forma sobre la resina y a continuación el péptido en bruto se escinde de la resina en su forma de tiol lineal. A continuación, la forma lineal se pliega (y se oxida) para formar la forma tri-disulfuro policíclica. A continuación, esta forma tri-disulfuro se purifica por HPLC y las agrupaciones purificadas se concentran (de nuevo por cromatografía) hasta una agrupación de menor volumen en agua/isopropanol. A continuación, esta solución se lleva a la precipitación para su aislamiento.

Después de la purificación, el péptido de SEQ ID NO. 1 se puede liofilizar o separar por precipitación de la solución. Debido a que la liofilización no se puede manejar para la fabricación de péptidos a gran escala como se requiere para la producción comercial, la presente solicitud divulga procedimientos útiles y novedosos para precipitar linaclotida purificada, en oposición a la liofilización del péptido purificado.

En un modo de realización preferente, la SEQ ID NO. 1 ciclada se disuelve en una solución de isopropanol acuosa. La solución puede contener cantidades residuales de ácido acético y ácido trifluoroacético de cromatografía en HPLC. En lo siguiente, a menos que se establezca de otro modo, todos los porcentajes y proporciones son en volumen.

En un modo de realización preferente, la SEQ ID NO. 1 se disuelve en una solución de isopropanol acuosa en la que el porcentaje de componente de isopropanol de la solución está entre aproximadamente un 45 % y aproximadamente un 70 % v/v, y el resto de la solución es agua.

En un modo de realización preferente, la SEQ ID NO. 1 se disuelve en una solución de isopropanol acuosa en la que el porcentaje de componente de isopropanol de la solución está entre aproximadamente un 45 % y aproximadamente un 60 % v/v, y el resto de la solución es agua.

En un modo de realización preferente, la SEQ ID NO. 1 se disuelve en una solución de isopropanol acuosa en la que el porcentaje de componente de isopropanol de la solución está entre aproximadamente un 50 % y aproximadamente un 60 % v/v, y el resto de la solución es agua.

ES 2 439 998 T3

- En un modo de realización preferente, la SEQ ID NO. 1 se disuelve en una solución de isopropanol acuosa en la que el porcentaje de componente de isopropanol de la solución está entre aproximadamente un 50 % y aproximadamente un 55 % v/v, y el resto de la solución es agua.
- 5 En un modo de realización preferente, la SEQ ID NO. 1 se disuelve en una solución de isopropanol acuosa en la que el porcentaje de componente de isopropanol de la solución está entre aproximadamente un 50 % y aproximadamente un 52,5 % v/v, y el resto de la solución es agua.
- En un modo de realización preferente, la SEQ ID NO. 1 se disuelve en una solución de isopropanol acuosa en la que el porcentaje de componente de isopropanol de la solución está entre aproximadamente un 52,5 % y aproximadamente un 55 % v/v, y el resto de la solución es agua.
- 10 En un modo de realización preferente, el porcentaje de componente de isopropanol de la solución es aproximadamente un 55 % v/v, y el resto de la solución es agua.
- En un modo de realización preferente, la solución de isopropanol que contiene la SEQ ID No. 1 se diluye a continuación hasta aproximadamente 3/1 v/v de agua/isopropanol para precipitar la SEQ ID No. 1.
- 15 En un modo de realización alternativa, la solución de isopropanol acuosa que contiene la SEQ ID NO. 1, en lugar de diluir con agua, se separa con alimentación con isopropanol para reducir el porcentaje de agua en la solución hasta que el porcentaje de isopropanol es mayor de un 95 %.
- En otro modo de realización alternativo, la solución de isopropanol acuosa que contiene la SEQ ID NO. 1, a continuación, se separa con alimentación con isopropanol para reducir el porcentaje de agua en la solución hasta que el porcentaje de isopropanol es mayor de un 96 %.
- 20 En otro modo de realización alternativo, la solución de isopropanol acuosa que contiene la SEQ ID NO. 1, a continuación, se separa con alimentación con isopropanol para reducir el porcentaje de agua en la solución hasta que el porcentaje de isopropanol es mayor de un 97 %.
- En otro modo de realización alternativo, la solución de isopropanol acuosa que contiene la SEQ ID NO. 1, a continuación, se separa con alimentación con isopropanol para reducir el porcentaje de agua en la solución hasta que el porcentaje de isopropanol es mayor de un 98 %.
- 25 En otro modo de realización alternativo, la solución de isopropanol que contiene la SEQ ID NO. 1, posteriormente, se separa con alimentación con heptano para reducir el porcentaje de isopropanol en la solución hasta que el porcentaje de heptano es mayor de un 98 %.
- En otro modo de realización alternativo, la solución de isopropanol que contiene la SEQ ID NO. 1, posteriormente, se separa con alimentación con heptano para reducir el porcentaje de isopropanol en la solución hasta que el porcentaje de heptano es mayor de un 98,5 %.
- 30 En otro modo de realización alternativo, la solución de isopropanol que contiene la SEQ ID NO. 1, posteriormente, se separa con alimentación con heptano para reducir el porcentaje de isopropanol en la solución hasta que el porcentaje de heptano es mayor de un 99 %.
- En otro modo de realización alternativo, la solución de isopropanol que contiene la SEQ ID NO. 1, posteriormente, se separa con alimentación con heptano para reducir el porcentaje de isopropanol en la solución hasta que el porcentaje de heptano es mayor de un 99,5 %.
- 35 En otro modo de realización alternativo, la solución de isopropanol que contiene la SEQ ID NO. 1, posteriormente, se separa con alimentación con heptano para reducir el porcentaje de isopropanol en la solución hasta que el porcentaje de heptano es mayor de un 99,9 %.
- 40 En otro modo de realización alternativo preferente, la solución de isopropanol acuosa que contiene la SEQ ID NO 1, en lugar de diluir con agua o separar con alimentación con isopropanol y a continuación con heptano, se seca por pulverización.
- 45 En un procedimiento preferente, la SEQ ID NO. 1 se disuelve en una solución de etanol acuosa. La solución puede contener cantidades residuales de ácido acético y ácido trifluoroacético de cromatografía en HPLC.
- En un procedimiento preferente, la SEQ ID NO. 1 se disuelve en una solución de etanol acuosa en la que el porcentaje de componente de etanol de la solución está entre aproximadamente un 55 % y aproximadamente un 75 % v/v, y el resto de la solución es agua.
- 50 En un procedimiento preferente, la SEQ ID NO. 1 se disuelve en una solución de etanol acuosa en la que el porcentaje de componente de etanol de la solución está entre aproximadamente un 60 % y aproximadamente un 75 % v/v, y el resto de la solución es agua.

En un procedimiento preferente, la SEQ ID NO. 1 se disuelve en una solución de etanol acuosa en la que el porcentaje de componente de etanol de la solución está entre aproximadamente un 65 % y aproximadamente un 75 % v/v, y el resto de la solución es agua.

5 En un procedimiento preferente, la SEQ ID NO. 1 se disuelve en una solución de etanol acuosa en la que el porcentaje de componente de etanol de la solución está entre aproximadamente un 65 % y aproximadamente un 70 % v/v, y el resto de la solución es agua.

En un procedimiento preferente, la SEQ ID NO. 1 se disuelve en una solución de etanol acuosa en la que el porcentaje de componente de etanol de la solución está entre aproximadamente un 65 % y aproximadamente un 67 % v/v, y el resto de la solución es agua.

10 En un procedimiento preferente, la SEQ ID NO. 1 se disuelve en una solución de etanol acuosa en la que el porcentaje de componente de etanol de la solución está entre aproximadamente un 67 % y aproximadamente un 70 % v/v, y el resto de la solución es agua.

En un modo de realización preferente, el porcentaje de componente de etanol de la solución es aproximadamente un 67 % v/v, y el resto de la solución es agua.

15 En un modo de realización preferente, la solución de etanol que contiene la SEQ ID No. 1 se diluye a continuación hasta aproximadamente 3/1 v/v de agua/etanol para precipitar la SEQ ID No. 1.

En un modo de realización alternativa, la solución de etanol acuosa que contiene la SEQ ID NO. 1, en lugar de diluir con agua, se separa con alimentación con etanol para reducir el porcentaje de agua en la solución hasta que el porcentaje de etanol es mayor de un 95 %.

20 En otro modo de realización alternativo, la solución de etanol acuosa que contiene la SEQ ID NO. 1, se separa con alimentación con etanol para reducir el porcentaje de agua en la solución hasta que el porcentaje de etanol es mayor de un 96 %.

25 En otro modo de realización alternativo, la solución de etanol acuosa que contiene la SEQ ID NO. 1, se separa con alimentación con etanol para reducir el porcentaje de agua en la solución hasta que el porcentaje de etanol es mayor de un 97 %.

En otro modo de realización alternativo, la solución de etanol acuosa que contiene la SEQ ID NO. 1, se separa con alimentación con etanol para reducir el porcentaje de agua en la solución hasta que el porcentaje de etanol es mayor de un 98 %.

30 En otro modo de realización alternativo, la solución de etanol que contiene la SEQ ID NO. 1, se separa con alimentación con heptano para reducir el porcentaje de etanol en la solución hasta que el porcentaje de heptano es mayor de un 98 %.

En otro modo de realización alternativo, la solución de etanol que contiene la SEQ ID NO. 1, se separa con alimentación con heptano para reducir el porcentaje de etanol en la solución hasta que el porcentaje de heptano es mayor de un 98,5 %.

35 En otro modo de realización alternativo, la solución de etanol que contiene la SEQ ID NO. 1, se separa con alimentación con heptano para reducir el porcentaje de etanol en la solución hasta que el porcentaje de heptano es mayor de un 99 %.

40 En otro modo de realización alternativo, la solución de etanol que contiene la SEQ ID NO. 1, se separa con alimentación con heptano para reducir el porcentaje de etanol en la solución hasta que el porcentaje de heptano es mayor de un 99,5 %.

En otro modo de realización alternativo, la solución de etanol que contiene la SEQ ID NO. 1, se separa con alimentación con heptano para reducir el porcentaje de etanol en la solución hasta que el porcentaje de heptano es mayor de un 99,9 %.

45 En otro modo de realización alternativo, la solución de etanol acuosa que contiene la SEQ ID NO. 1, en lugar de diluir con agua o separar con alimentación con etanol y a continuación con heptano, se seca por pulverización.

Los principios de la presente invención se ilustrarán ahora adicionalmente con respecto a los siguientes ejemplos. En lo siguiente, a menos que se establezca de otro modo, todos los porcentajes y proporciones son en volumen.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 En un matraz de fondo redondo de 1 boca, de 3 l, se colocaron 1500 ml de una solución de isopropanol acuosa al 50 % de aproximadamente 50,2 g de SEQ ID NO. 1, que contenía cantidades residuales de ácido acético y ácido trifluoroacético de cromatografía en HPLC. El análisis (HPLC, normalización de área) del producto inicial indicó una pureza de un 97,4 %.

10 Se colocó el matraz a presión reducida (34 Torr) sobre un evaporador rotatorio y se sumergió parcialmente en un baño a 30 °C. Se formó una suspensión blanca, granular, separando con alimentación aproximadamente 6500 ml de isopropanol durante 396 minutos a una velocidad tal que se mantienen aproximadamente 1500 ml de líquido en el matraz de 3 l. El análisis de la suspensión (CG, normalización de área) indicó agua (1,8 %) e isopropanol (98,2 %).

Se colocó el matraz a presión reducida (46 Torr) sobre un evaporador rotatorio y se sumergió parcialmente en un baño a 30 °C. Se formó una suspensión blanca, más granular, separando con alimentación aproximadamente 6000 ml de heptano durante 210 minutos a una velocidad tal que se mantienen aproximadamente 1500 ml de líquido en el matraz de 3 l. El análisis (glc, normalización de área) indicó agua (0,0 %), isopropanol (0,0 %), y heptano (100,0 %).

15 En dos minutos, la suspensión granular se filtró a vacío a través de una frita de vidrio medio de 600 ml, (10-20 micrómetros, 95 mm de dia.) y la torta se lavó con 100 ml de heptano para dar un filtrado transparente. Sólo 0,44 g de sólidos permanecieron pegados al matraz de 3 l.

El secado a presión reducida (51 mTorr) a aproximadamente 22 °C produjo un sólido granular que contenía isopropanol (0,8 % en peso) y heptano (2,5 % en peso).

20 Se colocó el sólido en un reactor de resina con frita de vidrio y se humidificó haciendo pasar agua-nitrógeno húmedo a través del sólido. El análisis (CG) del sólido granular resultante indicó isopropanol (0,0 % en peso) y heptano (0,01 % en peso). El análisis de Karl Fisher indicó agua (17,2 % en peso).

El secado del sólido en el reactor de resina a presión reducida (29 Torr) con una purga de nitrógeno a aproximadamente 22 °C produjo 39,2 g de SEQ ID NO. 1 granular, blanco, que contenía agua (2,7 % en peso).

25 El análisis (HPLC, normalización de área) del producto seco, final, indicó una pureza de un 97,0 %.

30 La tabla 1 a continuación muestra la cantidad de SEQ ID NO. 1 que se puede disolver en solución de isopropanol acuosa, dependiendo del % v/v de isopropanol:agua. El incremento muy brusco en la solubilidad entre un 40-60 % de isopropanol fue muy inesperado y el descubrimiento de este resultado inesperado permitió el aislamiento exitoso de SEQ ID NO. 1 por precipitación, lo que era necesario para una ampliación de fabricación grande viable requerida para una producción comercial.

Tabla 1

IPA (% v/v)	SEQ ID No. 1 (mg/ml)
0	1,3
5	1,8
10	2,3
15	3,3
20	4,3
25	4,8
30	6,0
35	7,0
40	13,8
45	47,8
50	120,3
55	162,5
60	138,5
65	106,5
70	65,7
75	26,5
80	19,0
85	12,5
90	9,0
95	4,5
100	0,3

Ejemplo 2

Los procedimientos generales anteriores se siguieron reemplazando el alcohol isopropílico (IPA) con etanol.

5 La tabla 1 a continuación muestra la cantidad de SEQ ID NO. 1 que se puede disolver en la solución de etanol acuosa, dependiendo del % v/v de etanol: agua. El incremento muy brusco en la solubilidad entre un 50-70 % de etanol fue muy inesperado y el descubrimiento de este resultado inesperado permitió el aislamiento exitoso de SEQ ID NO. 1 por precipitación, lo que era necesario para una ampliación de fabricación grande viable requerida para una producción comercial.

Tabla 2.

EtOH (% v/v)	SEQ ID No. 1 (mg/ml)
0	0,50
5	0,25
10	0,75
15	1,00
20	0,75
25	3,00
30	3,00
35	2,75
40	2,25
45	3,50
50	9,25
55	179,25
60	347,50
65	430,00
70	441,50
75	304,00
80	45,25
85	10,25
90	10,00
95	3,75
100	0,50

Ejemplo 310 **Precipitación y aislamiento de SEQ ID No. 1**

Los procedimientos descritos anteriormente para el aislamiento de SEQ ID No. 1 implicaban la retirada de agua por separación con alimentación a vacío con isopropanol o etanol y a continuación con heptano en un evaporador rotatorio. Se utilizó la retirada de disolvente por evaporación rotatoria para minimizar la degradación de producto potencial y pérdida de rendimiento debida a la adherencia del producto a la superficie superior del matraz. Este procedimiento proporcionó un producto que era muy fácil de manipular y de filtrar. Sin embargo, la retirada de disolventes residuales, en particular heptano, requirió la "humidificación" con una corriente de agua-nitrógeno húmedo y el posterior tratamiento con nitrógeno seco. La pureza durante todo este procedimiento de aislamiento disminuyó de un 97,4 % a un 97,0 %.

20 La corriente del procedimiento actual consiste en SEQ ID No. 1 en aproximadamente isopropanol acuoso al 50 %. Se usó esta proporción de agua e isopropanol para garantizar una solubilidad de producto máxima. Para minimizar la degradación del producto, normalmente se almacenó esta corriente del procedimiento a aproximadamente 2 °C, lo que provoca que algo del producto precipite. A esta corriente del procedimiento, se le añade agua, lo que provoca que precipite producto adicional, y el producto se aísla por filtración y secado. Para lograr un nivel de recuperación máximo, se añade agua suficiente para lograr una proporción de agua/isopropanol final de 3/1. El intervalo de temperatura preferente para la dilución con agua en una hora fue de 3 °C a 5 °C. La agitación dentro de este intervalo de temperatura durante aproximadamente 30 minutos se siguió de enfriamiento hasta aproximadamente -5 °C durante aproximadamente 30 minutos y agitación a esta temperatura menor durante de 5 h a 6 h antes de la filtración a través de un filtro enfriado. Después de un pequeño aclarado del recipiente de precipitación en el filtro con isopropanol acuoso (3/1, v/v), sólo se pierde aproximadamente un 1 % del producto como una película en el recipiente de precipitación. La agregación fue suficiente por lo que una filtración simple produjo un filtrado transparente. Aproximadamente un 4 % del producto se disuelve en el filtrado. Los datos analíticos indican que se produce muy poca degradación durante el procedimiento de precipitación.

Ejemplo 4

Secado por pulverización de linaclotida:

5 La solución de péptido purificada obtenida a partir de la etapa de HPLC preparativa o a partir de la etapa de concentración se alimenta a la unidad separadora con alimentación y se atomiza en una cámara de secado. La vaporización fina creada por el atomizador se mezcla con la corriente de nitrógeno caliente (gas de secado) y se inicia la evaporación de los disolventes a partir de gotas. La tasa de alimentación de la solución se ajusta para lograr la temperatura de salida de gas deseada. El gas de secado lleva el polvo fino a través de la cámara de secado hacia el ciclón. Debido a que el tiempo de residencia en la cámara de secado es muy breve, se minimiza la degradación térmica. El ciclón separa el polvo del gas de secado y el polvo se recoge por gravedad en tambores.

10 El gas sustancialmente libre de polvo fluye en un alojamiento con filtros de manga en el que cualquier partícula muy fina queda retenida en los filtros de mangas. El gas libre de polvo se puede enfriar en un condensador en el que a continuación se produce la condensación de disolvente. El gas de secado se puede volver a recircular a la cámara de secado después de recalentar o bien se puede usar en un modo de un solo paso.

15 La composición de la solución de alimentación (agua frente a disolventes orgánicos) determina la cantidad de energía que se debe suministrar a cada gota para evaporar esencialmente todos los disolventes. El tamaño de gota en el secador por pulverización con la concentración del péptido en la solución de alimento controla el tamaño de las partículas resultantes e influencia la recuperación del procedimiento de secado por pulverización.

Parámetros del procedimiento de secado por pulverización ejemplar:

20	Composición de la solución de alimentación:	1 -12 % (p/p) SEQ ID NO. 1 10-80 %(p/p) agua 90 - 20 % (p/p) etanol o isopropanol 0 - 5 % (p/p) ácido acético
	Modo de atomización:	Atomizador de rueda rotatorio
	Velocidad del atomizador:	5.000-50.000 RPM
25	Temperatura de entrada de gas de secado:	100-160 °C
	Temperatura de salida de gas de secado:	50-90 °C
	Gas de secado (nitrógeno):	300-500 kg/h, modos de ciclo abierto o cerrado.

30 Las características divulgadas en la descripción anterior, o las siguientes reivindicaciones, expresadas en sus formas específicas o en términos de un medio para realizar la función divulgada, o un procedimiento para obtener el resultado divulgado, según sea apropiado, por separado, o en cualquier combinación de dichas características, se pueden utilizar para realizar la invención en diversas formas de la misma.

35 La invención anterior se ha descrito en detalle a modo de ilustración y ejemplo, con fines de claridad y comprensión. Será obvio para un experto en la técnica que se pueden practicar cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por lo tanto, se debe entender que la descripción anterior está destinada a ser ilustrativa y no restrictiva. Por lo tanto, el alcance de la invención se debe determinar no con referencia a la descripción anterior, sino que en su lugar se debe determinar con referencia a las siguientes reivindicaciones adjuntas, junto con todo el alcance de equivalentes a los que dichas reivindicaciones dan derecho.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hofmann-La Roche AG

<120> Procedimiento para aislar un péptido terapéutico

5

<130> 26071 WO

<150> US 61/168259

<151> 10/04/2009

10

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Linaclotida

<400> 1

Cys Cys Glu Tyr Cys Cys Asn Pro Ala Cys Thr Gly Cys Tyr
1 5 10

25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la precipitación de un péptido que comprende la etapa de:
 - a) proporcionar una solución acuosa de isopropanol o etanol de un péptido ciclado que incluya la secuencia de aminoácidos de (SEQ ID NO. 1)
- 5 Cys-Cys-Glu-Tyr-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Tyr
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución de alcohol es una solución de isopropanol y el procedimiento comprende además la etapa de:
 - b) separar con alimentación la solución acuosa resultante de la etapa a) con isopropanol para reducir el porcentaje de agua en la solución.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución de alcohol es una solución de etanol y el procedimiento comprende además la etapa de:
 - b) separar con alimentación la solución resultante de la etapa a) con etanol para reducir el porcentaje de agua en la solución.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 2 o 3, en el que la separación con alimentación con isopropanol o etanol en la etapa b) reduce el porcentaje de agua en la solución hasta que el porcentaje de isopropanol o etanol es mayor de un 95 %, preferentemente un 96 %, más preferentemente un 97 %, lo más preferentemente un 98 %.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además la etapa de:
 - c) separar con alimentación la solución resultante de la etapa b) con heptano para reducir el porcentaje de isopropanol o etanol en la solución.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la separación con alimentación con heptano en la etapa c) reduce el porcentaje de isopropanol o etanol hasta que el porcentaje de heptano es mayor de un 98 %, preferentemente un 98,5 %, más preferentemente un 99 %, aún más preferentemente un 99,5 %, lo más preferentemente un 99,9 %.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de:
 - b) diluir con agua la solución resultante de la etapa a).
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la solución se diluye hasta aproximadamente 3/1 v/v de agua/isopropanol o hasta aproximadamente 3/1 v/v de agua/etanol para precipitar la SEQ ID No. 1.
9. Un procedimiento para el aislamiento de un péptido que comprende las etapas de:
 - a) proporcionar una solución acuosa de isopropanol o etanol de un péptido ciclado que incluya la secuencia de aminoácidos de (SEQ ID NO. 1)
- 30 Cys-Cys-Glu-Tyr-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Thr-Gly-Cys-Tyr
- b) secar por pulverización la solución resultante de la etapa a).
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 - 6 y 9, en el que la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 45 % a aproximadamente un 70 %.
- 35 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 45 % a aproximadamente un 65 %.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 45 % a aproximadamente un 60 %.
- 40 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 60 %.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que la solución de isopropanol acuosa es una solución de isopropanol acuosa de aproximadamente un 55 %.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 - 6 y 9, en el que la solución de etanol acuosa es una solución de etanol acuosa de aproximadamente un 55 % a aproximadamente un 75 %.
- 45 16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que la solución de etanol acuosa es una solución de etanol acuosa

de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 75 %.

17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que la solución de etanol acuosa es una solución de etanol acuosa de aproximadamente un 65 % a aproximadamente un 75 %.