

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 164**

51 Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)

C07K 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2011 E 11749833 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2611825**

54 Título: **Síntesis de fase sólida de h[Gly2]GLP-2**

30 Prioridad:

30.08.2010 EP 10174559

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

29.12.2015

73 Titular/es:

**NPS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
550 Hills Drive, 3rd Floor
Bedminster, NJ 07921, US**

72 Inventor/es:

WELLINGS, DON

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 555 164 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

Síntesis de fase sólida de h[Gly2]GLP-2

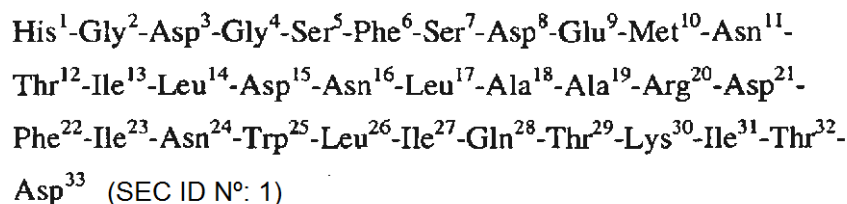
Objeto de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para preparar un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-De-Asn-Trp-Leu-Ile-
10 Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 1). En particular, el método comprende las etapas de proporcionar mediante síntesis peptídica de fase sólida un primer fragmento peptídico que tiene un primer grupo protector, estando dicho fragmento peptídico conjugado a un soporte; proporcionar mediante síntesis peptídica de fase sólida un segundo fragmento peptídico que tiene un segundo grupo protector; eliminar el primer grupo protector del primer fragmento peptídico; y acoplar el segundo fragmento peptídico con el primer fragmento peptídico conjugado al soporte desprotegido en el extremo N. La presente invención se refiere además a un método para preparar una composición farmacéutica que comprende dicho péptido.

Antecedentes de la invención

15 El péptido 2 similar a glucagón (GLP-2) es un péptido de 33 aminoácidos que tiene aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de enfermedades del tracto gastrointestinal. Se ha demostrado que esta hormona de origen natural regula el crecimiento, la proliferación y el mantenimiento de células que revisten al tracto gastrointestinal. En particular, se ha determinado que el GLP-2 y los análogos del mismo actúan como agentes tróficos para potenciar y mantener el funcionamiento del tracto gastrointestinal y para promover el crecimiento del tejido intestinal (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Europea EP 1 246 639 A2).

20 La teduglutida, en lo sucesivo citada también como "h[Gly2]GLP-2", es un péptido monocatenario y no glucosilado de 33 aminoácidos que tiene la siguiente secuencia:



25 Este análogo de GLP-2 difiere de GLP-2 nativo en un cambio en un aminoácido, es decir, se reemplaza alanina por glicina en la posición 2. Se ha determinado que este cambio da como resultado un péptido con una semivida mayor. En particular, los estudios en animales demuestran que la administración de este péptido produce un aumento significativo tanto en la masa como en el área superficial absorbente del revestimiento epitelial del intestino, y además tiene un efecto pronunciado en la reducción de la permeabilidad intestinal.

30 Al igual que muchos otros péptidos terapéuticos, este análogo de GLP-2 puede producirse de manera recombinante mediante expresión en *E. coli*. Sin embargo, para aumentar el rendimiento de la producción y para eliminar la necesidad de algunas materias primas de origen animal en la producción, había una necesidad de proporcionar métodos alternativos para preparar teduglutida.

En la técnica precedente, se habían buscado varias soluciones para sintetizar péptidos en general de químicamente.

35 La síntesis peptídica de fase sólida (SPPS) es un método introducido por Merrifield en 1963 (J. Amer. Chem. Soc. 1963, 85: 2149-2154). Desde entonces se han sintetizado numerosos péptidos con esta técnica. Se proporciona una revisión de la síntesis química de péptidos y proteínas por S.B.H. Kent (Annu. Rev. Biochem. 1988, 57: 957-989).

40 En general, una estrategia para la síntesis de cadenas peptídicas mediante síntesis en fase sólida es la síntesis en fase sólida paso a paso. En la SPPS paso a paso, el aminoácido C-terminal en forma de un derivado reactivo protegido en N-[alfa], en caso necesario protegido en la cadena lateral se acopla covalentemente bien directamente o por medio de un enlazador adecuado a un soporte sólido, por ejemplo, una resina polimérica, que se hincha en un disolvente orgánico. El grupo de protección de N-[alfa] se retira y se añaden posteriormente paso a paso los aminoácidos protegidos. Cuando se ha obtenido la longitud de la cadena peptídica deseada, se retiran los grupos protectores de la cadena lateral y se escinde el péptido del soporte. A lo largo de los años, se han desarrollado principalmente dos estrategias de acoplamiento basándose en el uso de diferentes grupos protectores de N-[alfa] y de grupos protectores de cadena lateral coincidentes. Merrifield usó t-butiloxicarbonilo (Boc) como grupo protector de N-[alfa], mientras que el 9-fluorenilmetiloxi-carbonilo (Fmoc) lo introdujeron Carpino y Han (J. Org. Chem. 1972, 37: 3404-3409).

45 Un método general de síntesis para la preparación de moléculas de GLP-2, incluyendo teduglutida se describe en, por ejemplo, las solicitudes internacionales de patente WO 2006/117565 y WO 2008/056155. Según estas solicitudes, los péptidos se sintetizaron por lotes en un vaso de polietileno equipado con un filtro de polipropileno para filtración usando

9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) como grupo protector de N-[alfa]-amino y grupos protectores adecuados comunes para las funcionalidades de cadena lateral. Los aminoácidos se acoplaron como ésteres generados *in situ* de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) o de 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol (HOAt) producidos a partir de aminoácidos protegidos en N-[alfa] adecuados y HOBt o HOAt mediante diisopropilcarbodiimida (DIC) en DMF. Estas sustancias pueden reaccionar con O-acilurea formada mediante la reacción de DIC y el grupo de ácido carboxílico del aminoácido para formar un éster activo. La desprotección del grupo Fmoc se efectuó mediante tratamiento con piperidina en DMF. Posteriormente, los péptidos se escindieron de las resinas mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) al 95 %. El producto en bruto criodesecado se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y se identificó mediante espectrometría de masas (EM). Los métodos generales de síntesis para la producción de análogos de GLP-2 también se describen en los documentos WO 98/52600 A1, WO 02/066511 A2 y WO 2008/056155 A1.

Según la técnica anterior, las moléculas de GLP-2 se consideran candidatas para síntesis química mediante la estrategia de Fmoc-fase sólida. Parecía haber un entendimiento común de que las moléculas de GLP-2 probablemente se ensamblan mejor de manera lineal mediante química de fase sólida debido a la relativa facilidad de ensamblaje y en última instancia a la escala de fabricación. Sin embargo, pueden suceder numerosas reacciones laterales durante la síntesis de fase sólida, algunas de las cuales son específicas para las químicas empleadas usando la metodología de Fmoc.

En particular, se ha descubierto que un problema particular en la síntesis de la teduglutida mediante Fmoc-química de fase sólida implica la transposición del enlace -Asp-Gly- en la posición 3-4 en la molécula, dando como resultado la formación del análogo [beta]-Asp (denominado "formación de subproducto de aspartimida"). La [beta]-isomerización de los enlaces -Asp-Gly- implica al grupo carboxilo de cadena lateral del ácido aspártico que forma un enlace peptídico con el grupo [alfa]-amino de la glicina adyacente a través de un intermedio de succinimida. La principal causa de esta reacción es el tratamiento de la teduglutida-fase sólida con piperidina, u otras bases durante la etapa de retirada de Fmoc. Esta reacción da como resultado el subproducto no deseado a aproximadamente el 10 % por ciclo de desprotección N-terminal pero puede ser significativamente mayor.

En particular, cuando se ensambla la teduglutida a escala de laboratorio, el tratamiento de piperidina para eliminar el grupo protector de Fmoc N-terminal lleva normalmente un máximo de 10 minutos. Sin embargo, a gran escala, la adición, filtración y retirada de la piperidina del polímero peptídico lleva mucho más tiempo. La adición y mezclado más lentos de los reactivos a escala de procesado da como resultado una exposición prolongada del polímero peptídico a la piperidina mucho más larga que incluso puede exagerar el problema de la formación del subproducto de aspartimida.

El problema de la formación de aspartimida y los métodos para evitar la misma se describen en el documento WO 2007/120614 A2, Hendrix y Lansbury (1992), J. Org. Chem 57:3421-3426, Cebrián et al. (2003), J. Peptide Res. 62:238-244, y Ruczynski et al. (2008), J. Pept. Sci. 14: 335-341.

Hay una necesidad de métodos de síntesis alternativos para preparar teduglutida, en donde pueda reducirse o incluso evitarse la formación de subproducto de aspartimida. En realizaciones particulares, dicha ruta para sintetizar teduglutida también tiene que ser fácil de llevar a cabo y económica. Además, dicha ruta para sintetizar teduglutida debe ser adecuada para escala industrial.

La administración de péptidos terapéuticos, tales como la teduglutida, requiere además de composiciones que permanezcan estables durante su almacenamiento. Debido a su tamaño y a la consiguiente dificultad para atravesar membranas biológicas y debido a su susceptibilidad a la digestión, los péptidos se administran frecuentemente por vía parenteral. Sin embargo, los péptidos pueden ser particularmente difíciles de formular debido a su tendencia a degradarse con el paso del tiempo y/o sufrir agregación y precipitación. La degradación, la agregación y la precipitación son todas indicativas de una composición inestable que puede no ser viable desde el punto de vista comercial. Las variables de la composición que afectan a la degradación de los péptidos durante el almacenamiento incluyen el pH, la cantidad de sales presentes y el tipo y cantidad de excipientes.

Por lo tanto, también hay una necesidad en la técnica de composiciones de teduglutida adecuadas desde un punto de vista comercial que puedan prepararse usando un proceso comercialmente aceptable.

Objeto y compendio de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para preparar teduglutida, en donde pueda reducirse o incluso evitarse la formación de aspartimida. Por consiguiente, es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un método para preparar teduglutida, siendo este método fácil de llevar a cabo y económico. Además, dicho método para preparar teduglutida debe ser adecuado para escala industrial. Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un método comercialmente aceptable para preparar composiciones de teduglutida.

Según una realización de la presente invención, se proporciona un método para preparar teduglutida que separa el montaje en dos fragmentos.

Se ha descubierto que el método según la presente invención puede ofrecer una serie de ventajas en comparación con el método de síntesis conocido. En particular, se ha descubierto que el nivel de transposición en las posiciones 3-4 de Asp-Gly puede reducirse preparando el péptido a partir de un montaje basado en fragmentos. Esto significa que el

péptido puede ensamblarse hasta la posición 4 mediante montaje de fase sólida. El tetrapéptido correspondiente a las posiciones 1-4 de teduglutida (His-Gly-Asp-Gly) puede ensamblarse por separado, y después purificarse opcionalmente para eliminar el análogo de [beta]-Asp antes de acoplarlo al fragmento de 5-33 en la fase sólida. Por consiguiente, el péptido no se expone, por ejemplo, a piperidina después del acoplamiento de este fragmento de tetrapéptido. Sorprendentemente, el método según la presente invención no solo aumenta la pureza del péptido, sino también el rendimiento general.

Estos objetivos, así como otros que serán evidentes a partir de la descripción adjunta se logran mediante la materia objeto de las reivindicaciones independientes. Algunas de las realizaciones de la presente invención se definen mediante la materia objeto de las reivindicaciones dependientes.

10 En una realización, la presente invención se refiere a un método para preparar un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-TTir-He-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ue-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 1), comprendiendo el método las etapas de:

15 (a) proporcionar mediante síntesis peptídica de fase sólida un primer fragmento peptídico que comprenda la secuencia de aminoácidos X-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°:2), en donde X es un primer grupo protector y el resto C-terminal del primer fragmento peptídico está conjugado a un soporte;

(b) proporcionar mediante síntesis peptídica de fase sólida un segundo fragmento peptídico que comprenda la secuencia de aminoácidos Y-His-Gly-Asp-Gly (SEC ID N°: 3), en donde Y es un segundo grupo protector;

20 (c) eliminar al primer grupo protector del primer fragmento peptídico; y

(d) acoplar el segundo fragmento peptídico al primer fragmento peptídico desprotegido en N-terminal, conjugado al soporte.

25 Por lo tanto, el primer fragmento peptídico y/o el segundo fragmento peptídico se preparan mediante síntesis peptídica de fase sólida. Por ejemplo, se proporcionan el primer fragmento peptídico y/o el segundo fragmento peptídico conjugado el resto de aminoácido en C-terminal a un soporte y añadiendo secuencialmente aminoácidos protegidos de manera adecuada al extremo N-terminal de los restos conjugados al soporte en C-terminal.

En particular, los aminoácidos que van a añadirse secuencialmente al extremo N-terminal del resto (o los restos) conjugados al soporte en N-terminal del primer fragmento peptídico y/o del segundo fragmento peptídico pueden protegerse cada uno mediante un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en Boc y Fmoc.

30 En otra realización de la presente invención, el primer grupo protector es Fmoc.

En otra realización de la presente invención, el segundo grupo protector es un grupo de protección lábil a ácidos, seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en Boc y benciloxicarbonilo (Z).

Típicamente, el resto de histidina del segundo fragmento peptídico puede protegerse en su cadena lateral con un grupo protector que, por ejemplo, se selecciona entre el grupo que consiste en tritilo, Boc, Bom y Bum.

35 Asimismo, el resto de ácido aspártico del segundo fragmento peptídico puede protegerse en su cadena lateral, por ejemplo, con un grupo protector de éster de *tert*-butilo.

En otra realización, antes de acoplar el segundo fragmento peptídico al primer fragmento peptídico protegido en N-terminal conjugado al soporte, se escinde el segundo fragmento peptídico del soporte.

40 En algunas realizaciones, antes de acoplar el segundo fragmento peptídico al primer fragmento peptídico protegido en N-terminal conjugado al soporte, se purifica el segundo fragmento peptídico escindido del soporte, opcionalmente mediante cromatografía y/o cristalización.

Según una realización, el grupo protector Fmoc puede retirarse del primer fragmento peptídico añadiendo una amina secundaria seleccionada entre el grupo que consiste en piperidina, piperazina, morfolina y diciclohexilamina.

45 Según una realización adicional, el método de la invención comprende además escindir al primer fragmento peptídico acoplado al segundo fragmento peptídico del soporte.

En otra realización, el método según la presente invención comprende además purificar al primer fragmento peptídico escindido acoplado al segundo fragmento, opcionalmente mediante cromatografía.

50 En una realización específica, la presente invención se refiere a un método para preparar un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp -Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 1), comprendiendo el método las etapas de:

- (a) proporcionar mediante síntesis peptídica de fase sólida un primer fragmento peptídico que comprenda la secuencia de aminoácidos X-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 2), en donde X es un grupo protector de Fmoc y el resto C-terminal del primer fragmento peptídico está conjugado a un soporte;
- (b) proporcionar mediante síntesis peptídica de fase sólida un segundo fragmento peptídico que comprenda la secuencia de aminoácidos Y-His-Gly-Asp-Gly (SEC ID N°: 3), en donde Y es un grupo protector lábil a ácidos, seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en Boc y benciloxicarbonilo, y el resto C-terminal del segundo fragmento peptídico está conjugado a un soporte;
- (c) escindir al segundo fragmento peptídico del soporte;
- (d) purificar el segundo fragmento peptídico purificado, opcionalmente mediante cromatografía líquida de alta presión de fase inversa;
- (e) eliminar el grupo protector de Fmoc del primer fragmento peptídico, opcionalmente mediante la adición de una amina secundaria seleccionada entre el grupo que consiste en piperidina, piperazina, morfolina y dicitlohexilamina;
- (f) acoplar el segundo fragmento peptídico al primer fragmento peptídico acoplado al soporte añadiendo el segundo fragmento peptídico purificado al primer fragmento peptídico conjugado al soporte desprotegido en N-terminal;
- (g) escindir el primer fragmento peptídico conjugado al soporte que está acoplado al segundo fragmento peptídico del soporte; y
- (h) purificar el primer fragmento peptídico escindido que está acoplado al segundo fragmento peptídico, opcionalmente mediante cromatografía líquida de alta presión en fase inversa.

Según una realización, el soporte es un polímero funcionalizado, seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en poliestireno, polidimetilacrilamida y polietilenglicol.

Generalmente, el aminoácido C-terminal del primer fragmento peptídico y/o el segundo fragmento peptídico está unido al polímero funcionalizado mediante un enlazador, opcionalmente ácido 4-hidroximetilfenoxiacético (HMPA).

- En algunas realizaciones, el primer fragmento peptídico y/o el segundo fragmento peptídico se escinden del soporte mediante un ácido, seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en ácido trifluoroacético (TFA), ácido trifluorometanosulfónico (TFMSA), bromuro de hidrógeno (HBr), cloruro de hidrógeno (HCl) y fluoruro de hidrógeno (HF), o mediante una base, opcionalmente un hidróxido.

- En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar una composición farmacéutica que contenga un péptido que comprenda la secuencia de aminoácidos His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 1), comprendiendo el método las etapas de:

- (a) preparar el péptido según el método de la presente invención como se ha descrito anteriormente; y
- (b) preparar una composición farmacéutica que contenga el péptido preparado en la etapa (a).

En una realización, la composición farmacéutica comprende además un tampón, opcionalmente un tampón fosfato en una cantidad suficiente para ajustar el pH de la composición a un nivel fisiológicamente tolerable, por ejemplo, a un pH de entre aproximadamente 6 a aproximadamente 9 o de entre aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8 o de entre aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5.

- En otra realización, la composición farmacéutica comprende además L-histidina.

Además, la composición farmacéutica puede comprender un agente de carga seleccionado opcionalmente entre el grupo que comprende manitol y sacarosa.

Según una realización específica, la composición farmacéutica se proporciona en una forma de dosificación inyectable.

- En una realización adicional, la presente invención se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 1), pudiendo obtenerse el péptido mediante el método de la presente invención como se ha descrito anteriormente.

Leyenda de las figuras

La figura 1 ilustra una HPLC de una molécula de teduglutida en bruto ensamblada usando el procedimiento de fase sólida de Fmoc convencional (ensamblaje lineal). Se observan dos picos principales, a saber, el péptido de teduglutida en bruto (pico 1) y el subproducto [beta]-Asp (pico 2). Esta HPLC muestra que la pureza del péptido en bruto ensamblado fue del 52 % mediante HPLC y contenía un 24 % del análogo de [beta]-Asp.

La figura 2 ilustra una HPLC de una molécula de teduglutida en bruto ensamblada usando el procedimiento de Fmoc-fase sólida convencional con tratamiento extendido de piperidina para los 4 últimos aminoácidos. Se observan dos picos principales, a saber, el péptido de teduglutida en bruto (pico 1) y el subproducto de [beta]-Asp (pico 2). Esta HPLC muestra que la pureza del péptido en bruto ensamblado fue solo del 39 % mediante HPLC y contenía un 45 % del análogo de [beta]-Asp.

La figura 3 ilustra una HPLC de una molécula de teduglutida en bruto ensamblada usando el método según la presente invención (ensamblaje basado en fragmentos). Se observaron un pico principal y un pico más pequeño, a saber, el péptido de teduglutida en bruto (pico 1) y el subproducto de [beta]-Asp (pico 2). Esta HPLC muestra que la pureza del péptido en bruto ensamblado fue del 59 % mediante HPLC y contenía únicamente un 17 % del análogo de [beta]-Asp.

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que puede reducirse, o incluso evitarse, la formación del posible subproducto de aspartimida durante la síntesis de la teduglutida, preparando el péptido mediante un ensamblaje basado en fragmentos. El método según la presente invención puede proporcionar teduglutida con un alto rendimiento y/o con una pureza elevada. Además, el método según la presente invención puede usarse para preparar teduglutida a escala de proceso industrial con un alto rendimiento y/o con una pureza elevada. Se ha descubierto además que, preparando la teduglutida según el método según la presente invención, puede lograrse una pureza del producto en bruto de al menos 80 %.

La pureza y el rendimiento son aspectos importantes de cualquier ruta de síntesis peptídica. La pureza se representa por el grado de presencia de impurezas farmacológicamente activas relacionadas (tales como el subproducto de aspartimida). En la síntesis peptídica, las purificaciones sucesivas en cada etapa dan lugar a un rendimiento menor del péptido final. La presente invención proporciona un método que logra una mayor pureza junto con un rendimiento potenciado del péptido de teduglutida diana mediante una metodología de fase sólida en comparación con métodos sintéticos de fase sólida conocidos.

Los métodos de la presente invención se describirán a continuación respecto a realizaciones particulares y con referencia a determinadas ilustraciones.

En los casos donde se usa el término "comprende" en la presente descripción y reivindicaciones, este no excluye a otros elementos o etapas. Para los fines de la presente invención, la expresión "que consiste en" se considera como una realización opcional de la expresión "que comprende". Si en lo sucesivo en la presente memoria se define que un grupo comprende al menos un determinado número de realizaciones, también debe entenderse esto como que se divulga un grupo que consiste opcionalmente únicamente en estas realizaciones.

En los casos donde se use un artículo indefinido o definido cuando se hace referencia a un nombre singular, por ejemplo, "un" o "una", "el" o "la", esto incluye un plural de ese nombre, a menos que se indique específicamente.

El término "aproximadamente" en el contexto de la presente invención indica un intervalo de precisión que el experto en la materia entiende que sigue asegurando el efecto técnico de la característica en cuestión. El término indica típicamente una desviación del valor numérico indicado de $\pm 10\%$, y en algunas realizaciones de $\pm 5\%$.

Además, los términos primero, segundo, tercero y similares, en la descripción y en las reivindicaciones, se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Debe entenderse que los términos usados de este modo son intercambiables en circunstancias adecuadas y que las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria pueden funcionar en otras secuencias que no son las descritas o ilustradas en la presente memoria.

Se darán descripciones adicionales de términos en lo sucesivo en el contexto en el que se usan los términos.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para preparar un péptido que comprenda la secuencia de aminoácidos His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 1), comprendiendo el método:

- (a) proporcionar mediante síntesis peptídica de fase sólida un primer fragmento peptídico que comprenda la secuencia de aminoácidos X-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 2), en donde X es un primer grupo protector y el resto C-terminal del primer fragmento

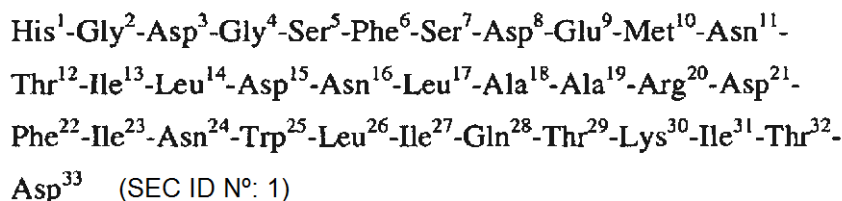
peptídico está conjugado a un soporte;

(b) proporcionar mediante síntesis peptídica de fase sólida un segundo fragmento peptídico que comprenda la secuencia de aminoácidos Y-His-Gly-Asp-Gly (SEC ID N°:3), en donde Y es un segundo grupo protector;

(c) eliminar al primer grupo protector del primer fragmento peptídico; y

- 5 (d) acoplar el segundo fragmento peptídico al primer fragmento peptídico desprotegido en N-terminal, conjugado al soporte.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para preparar teduglutida, que es un péptido monocatenario y no glucosilado de 33 aminoácidos que tiene la siguiente secuencia:



- 10 Este análogo de GLP-2 (péptido 2 similar a glucagón) difiere de GLP-2 nativo en un cambio en un aminoácido, es decir, se reemplaza alanina por glicina en la posición 2.

Los términos "polipéptido", "péptido", "oligopéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable en la presente memoria para referirse a un polímero u oligómero de restos de aminoácidos consecutivos. Los aminoácidos en dicho polímero están unidos entre sí mediante los enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de restos de aminoácidos adyacentes. Tal como se emplea en esta memoria, el término "aminoácido" se refiere no solo a moléculas de aminoácidos o a restos de aminoácidos en sí mismos, sino también a una lista de abreviaturas, letras, caracteres o palabras que representan a restos de aminoácidos, por ejemplo, restos de aminoácidos que forman parte de un péptido. Los aminoácidos pueden citarse en la presente memoria bien por sus símbolos de tres letras conocidos de manera común o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB.

A menos que se indique lo contrario, el extremo N-terminal del péptido (por ejemplo, en la posición 1) puede ser -H o un enlace peptídico (por ejemplo, está unido a un grupo bloqueante/protector N-terminal o a otro aminoácido o fragmento peptídico). A menos que se indique lo contrario, el extremo C-terminal del péptido (por ejemplo, en la posición 33) puede ser -OH o un enlace peptídico (por ejemplo, está unido a un grupo bloqueante/protector C-terminal o a otro aminoácido o fragmento peptídico).

A menos que se indique lo contrario, todos los números de posición de aminoácidos son los números de posición según la secuencia de bases de la teduglutida, como se representa por la SEC ID N°: 1.

En el contexto de la presente invención, la expresión "fragmento peptídico" se refiere a un fragmento específico de teduglutida, en particular a un primer fragmento peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos X-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 2), en donde X es un primer grupo protector, y un segundo fragmento peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos Y-His-Gly-Asp-Gly (SEC ID N°: 3), en donde Y es un segundo grupo protector.

En una realización de la presente invención, la teduglutida se sintetiza acoplando el grupo carboxilo del extremo C-terminal de un aminoácido o fragmento peptídico al grupo amino o extremo N-terminal de otro aminoácido o fragmento peptídico. La síntesis peptídica química normalmente comienza en el extremo C-terminal del péptido y termina en el extremo N-terminal. Esta es la dirección opuesta a la dirección de la biosíntesis de proteínas, que comienza en el extremo N-terminal. Debido al exceso de aminoácidos usado típicamente para asegurar el acoplamiento completo durante cada etapa sintética, es común la polimerización de aminoácidos en las reacciones donde cada aminoácido no está protegido. Para evitar esta polimerización, se usan típicamente grupos protectores usados en el método según la presente invención.

Los grupos protectores adecuados son bien conocidos para un experto en la materia (por ejemplo, véase "Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis-A practical approach", W.C. Chan, P.D. White, Oxford University Press Inc. New York, 2000).

La retirada de los grupos protectores de los fragmentos peptídicos puede lograrse, por ejemplo, añadiendo un reactivo de desprotección adecuado que depende del grupo protector que se esté usando. Los grupos protectores típicos convencionales para las funciones [alfa]-amino de los aminoácidos acoplados son Boc, que puede retirarse mediante tratamiento con un ácido fuerte, o Fmoc, que puede retirarse con una base. Las abreviaturas "Fmoc" y "Boc", tal como se emplean en la presente memoria significan 9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilo y t-butiloxycarbonilo, respectivamente.

El grupo *t*-Boc ("terc-butoxicarbonilo" o de manera más simple "Boc") se usa comúnmente para proteger al amino terminal del péptido, requiriendo típicamente el uso de más grupos ácidos estables para la protección de la cadena lateral en estrategias ortogonales. Los grupos Boc pueden añadirse a aminoácidos con anhídrido de Boc y una base adecuada.

5 Fmoc (9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilo) es un grupo protector que actualmente se usa ampliamente. Fmoc se escinde en condiciones básicas muy débiles (por ejemplo, piperidina). Esto permite grupos protectores lábiles a ácidos que son estables en condiciones básicas, tales como Boc y *t*-butilo, para su uso en las cadenas laterales de restos de aminoácidos del péptido diana.

10 Según el método de la presente invención, el primer fragmento peptídico comprende un primer grupo protector y el segundo fragmento peptídico comprende un segundo grupo protector. En algunas realizaciones, el primer grupo protector es diferente al segundo grupo protector. Como alternativa, el primero y el segundo grupo protector pueden ser idénticos.

15 Además, también la funcionalidad de cadena lateral en las pre-secuencias del péptido se protege típicamente durante las etapas de acoplamiento. Más de la mitad de los aminoácidos encontrados comúnmente en péptidos tienen cadenas laterales que contienen grupos reactivos. En la síntesis peptídica, en particular en la síntesis peptídica de fase sólida, es normal que todos estos grupos potencialmente reactivos estén enmascarados debido a las condiciones particularmente fuertes empleadas y a la necesidad de lograr el nivel mayor de eficacia en todas las reacciones químicas. Para la síntesis rutinaria, se emplean grupos protectores que se retiren con ácido trifluoroacético (TFA) a que esto permite que el péptido se desproteja de manera global a la vez a medida que se escinde o libera del soporte.

20 Además, también hay disponible una amplia variedad de grupos que pueden retirarse de manera selectiva durante la síntesis (por ejemplo, en la fase sólida), permitiendo de este modo la modificación selectiva de las cadenas laterales de restos individuales dentro de la cadena peptídica.

25 Por ejemplo, puede usarse el grupo Boc para funciones amino (por ejemplo, Lys e His), pueden usarse ésteres de *terc*-butilo para los grupos ácidos (por ejemplo, Asp y Glu) y éteres de *terc*-butilo para grupos hidroxilo (por ejemplo, Tyr, Thr y Ser). Los grupos protectores adecuados para la protección de cadenas laterales están fácilmente disponibles y se conocen bien por los expertos en la materia (por ejemplo, véase la Tabla 4 en las páginas 20-25 en "Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis-A practical approach", W.C. Chan, P.D. White, Oxford University Press Inc. New York, 2000).

30 En una realización, el segundo fragmento peptídico se acopla al primer fragmento peptídico conjugado al soporte desprotegido en N-terminal. La mayoría de métodos de formación de enlaces de amida implican la activación química del componente de carboxi. Aquellos empleados de manera común en la síntesis orgánica se consideran generalmente como demasiado fuertes como para usarse en la síntesis peptídica, dando lugar a la formación de intermedios sobre-activados, que no son selectivos en cuanto a sus reacciones y son por consiguiente propensos a las reacciones de cadena lateral. Los químicos que producen péptidos han buscado métodos de activación más suaves,

35 principalmente basados en la formación de ésteres activos pre-formados o generados *in situ*.

40 La velocidad de condensación de fragmentos protegidos con el fragmento N unido a resina aumenta normalmente con la concentración del fragmento. Típicamente, se aplican las soluciones de fragmento de la concentración más alta posible. Los reactivos de acoplamiento adecuados para la condensación de fragmentos están fácilmente disponibles y se conocen bien por un experto en la materia (por ejemplo, véanse las páginas 221-223 en "Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis-A practical approach", W.C. Chan, P.D. White, Oxford University Press Inc. New York, 2000). Puede usarse DMSO como disolvente. Además, como agentes de condensación pueden usarse DCC/HOBT (diciclohexilcarbodiimida/1-hidroxi-benzotriazol) o DIC/HOBT (diisopropilcarbodiimida/1-hidroxi-benzotriazol).

45 El primer fragmento peptídico y el segundo fragmento peptídico se preparan por síntesis peptídica de fase sólida. Por ejemplo, el primer fragmento peptídico y/o el segundo fragmento peptídico pueden proporcionarse conjugando el resto de aminoácido C-terminal con un soporte y añadiendo secuencialmente aminoácidos protegidos de manera apropiada al extremo N del resto o de los restos C-terminales conjugados con el soporte.

50 La síntesis peptídica de fase sólida (denominada en lo sucesivo "SPPS") se introdujo con la intención de solucionar muchos de los problemas de purificación intermedia asociados con la síntesis peptídica en solución. Durante la síntesis peptídica de fase sólida, los aminoácidos se ensamblan (es decir, se acoplan) formando un péptido de cualquier secuencia deseada mientras que un extremo de la cadena (por ejemplo, el extremo C) está anclado a un soporte insoluble. Una vez que la secuencia deseada completa está unida al soporte, el péptido se desbloquea (es decir, se escinde) del soporte. La SPPS tiene la ventaja general de que se presta a una química de ensamblaje de cadena completamente automática o semiautomática.

55 Los principios de la síntesis en fase sólida son bien conocidos por un experto en la materia (por ejemplo, véase la Figura 1 en la página 10 y las páginas 9-13 de "Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis-A practical approach", W.C. Chan, P.D. White, Oxford University Press Inc. New York, 2000). En particular, el resto de aminoácido C-terminal del péptido diana puede unirse a un soporte insoluble a través de su grupo carboxilo. Cualquier grupo funcional en las cadenas laterales de aminoácidos podría enmascararse con grupos protectores permanentes que no se vean

afectados por las condiciones de reacción empleadas durante el ensamblaje del péptido. Se retira el grupo de protección temporal que enmascara el grupo [alfa]-amino durante la carga de resina inicial. Normalmente se introduce un exceso del segundo aminoácido, estando activado el grupo carboxilo de este aminoácido para la formación de amida mediante la generación de un éster activado o mediante la reacción con un agente de acoplamiento. Los agentes de acoplamiento adecuados se pueden adquirir fácilmente y son bien conocidos para un experto en la materia (por ejemplo, véase la Tabla 5 de la página 28 y las páginas 52-60 de "Fmoc- Solid Phase Peptide Synthesis-A practical approach", W.C. Chan, P.D. White, Oxford University Press Inc. New York, 2000).

Después del acoplamiento, los reactivos en exceso pueden retirarse mediante lavado y el grupo de protección puede retirarse del extremo N del dipéptido, antes de la adición del tercer resto de aminoácido. Este proceso se repite hasta que se ensambla la secuencia peptídica deseada. En la etapa final, el péptido se libera del soporte y se retiran los grupos protectores de la cadena lateral. Generalmente, los grupos de protección de la cadena lateral y el enlace de soporte se eligen de tal manera que los grupos de protección se retiren y el péptido ensamblado se libere en las mismas condiciones.

Para diseñar la síntesis de un péptido por el método de fase sólida usando cualquiera de los esquemas de protección [alfa]-amino mencionados anteriormente o cualquier otro esquema de protección conocido en la técnica, normalmente es deseable que cualquier "grupo lateral" reactivo de los aminoácidos constituyentes esté protegido frente a reacciones químicas indeseadas a lo largo del ensamblaje de la cadena. También puede ser deseable que los grupos químicos elegidos para proteger los diversos grupos laterales sean resistentes a la eliminación mediante los reactivos usados para eliminar los grupos de protección [alfa]-amino. Además, la unión de la cadena peptídica en crecimiento al soporte debe ser estable frente a los reactivos usados para retirar cualquier tipo de grupo de protección de [alfa]-amino durante el ensamblaje de la cadena.

En una realización, cada uno de los aminoácidos que se van a añadir secuencialmente al extremo N del resto o de los restos del extremo C conjugados con el soporte del primer fragmento peptídico y/o el segundo fragmento peptídico, está protegido por un grupo de protección seleccionado del grupo que consiste en Boc y Fmoc.

En el caso del esquema de protección de [alfa]-amino con Fmoc, las funciones de protección del grupo lateral normalmente se seleccionan para que sean resistentes a los reactivos básicos usados para retirar Fmoc. En la práctica, estos grupos de protección de cadenas laterales generalmente pueden retirarse mediante reactivos ligeramente ácidos después de que se haya ensamblado la cadena peptídica. Cuando se usa el esquema de protección de [alfa]-amino con Boc, los grupos de protección de las cadenas laterales típicamente se seleccionan de manera que sean resistentes a la eliminación por el reactivo débilmente ácido usado para desproteger el grupo Boc en cada ciclo. En la práctica, estos grupos de protección de cadenas laterales para el esquema de protección de [alfa]-amino con Boc normalmente pueden retirarse con HF anhidro después de que se haya ensamblado la cadena peptídica. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los grupos de protección de las cadenas laterales usados comúnmente con la protección de [alfa]-amino con Fmoc no son estables en las condiciones usadas para la desprotección de [alfa]-amino con Boc, y en el ensamblaje de una cadena peptídica mediante síntesis peptídica de fase sólida no se mezclan los dos tipos de esquemas de protección de [alfa]-amino.

El experto en la materia conoce bien los principios de la SPPS de Merrifield (que usa Boc) y de la SPPS de Fmoc/iBu (que usa Fmoc) (por ejemplo, véanse las páginas 11-13 de "Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis-A practical approach", W.C. Chan, P.D. White, Oxford University Press Inc. New York, 2000).

En particular, según la técnica de Merrifield, como se realiza habitualmente, el aminoácido C-terminal puede anclarse al soporte mediante la formación de un éster bencilico con hidroximetilfenilacetamidometil poliestireno (resina RAM). El grupo Boc puede usarse para la protección temporal del grupo [alfa]-amino. La eliminación de este grupo puede realizarse con ácido trifluoroacético (TFA) puro o TFA en diclorometano (DCM). El trifluoroacetato resultante puede neutralizarse antes del acoplamiento con, por ejemplo, diisopropiletilamina (DIPEA) en DCM o neutralizarse *in situ* durante la reacción de acoplamiento. El acoplamiento puede realizarse mediante la activación del aminoácido entrante con dicitclohexilcarbodiimida (DCC) en DCM o mediante el uso de anhídridos simétricos de aminoácidos preformados o ésteres de benzotriazolilo en DMF o *N*-metilpirrolidona (NMP). La liberación del péptido de la resina y la eliminación de los grupos de protección de la cadena lateral puede realizarse con fluoruro de hidrógeno (HF) anhidro.

A diferencia de lo que ocurre con el enfoque de Merrifield que utiliza un régimen de acidólisis graduada para conseguir selectividad en la eliminación de la protección, el método Fmoc/*t*Bu se basa en una estrategia de grupo de protección ortogonal, que usa el grupo Fmoc lábil a bases para la protección del grupo [alfa]-amino y grupos de protección de cadenas laterales lábiles a ácidos. Como la eliminación de la protección puede realizarse por mecanismos químicos completamente diferentes, pueden emplearse grupos de protección de cadenas laterales y agentes de unión que se retiren en condiciones considerablemente más suaves que las usadas en el enfoque de Merrifield. Por ejemplo, puede usarse la protección de cadenas laterales basada en *t*-butilo y tritilo y enlazadores basados en alcóxibencilo ya que pueden retirarse con TFA. El grupo de protección temporal Fmoc puede retirarse con piperidina al 20 % en DMF. El acoplamiento puede realizarse en DMF o NMP con ésteres activos preformados o usando reactivos de activación que generen ésteres de benzotriazolilo *in situ*. La escisión del péptido de la resina y la desprotección global de la cadena lateral puede conseguirse con TFA al 95 % TFA.

En una realización de la presente invención, el primer grupo protector es Fmoc. En otra realización, el segundo grupo protector es un grupo protector lábil a ácidos, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en *t*-Butoxicarbonilo (Boc) y Benciloxicarbonilo (Z). En el contexto de la presente invención, la expresión "grupo de protección lábil a ácidos" típicamente denota grupos de protección que son estables en condiciones básicas, tales como grupos Boc y bencilo.

5 Como se ha indicado anteriormente, cualquier "grupo lateral" reactivo de los aminoácidos constituyentes normalmente está protegido frente a reacciones químicas indeseadas a lo largo del ensamblaje de la cadena. En una realización, el resto de histidina del segundo fragmento peptídico está protegido en la cadena lateral con un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en Tritilo (Trt), *t*-Butoxicarbonilo (Boc), Benciloximetilo (Bom) y *t*-Butoximetilo (Bum). Además, el resto ácido de ácido aspártico del segundo fragmento peptídico puede estar protegido en la cadena lateral con un grupo de protección de éster terc-butílico.

10 En otra realización de la presente invención, antes del acoplamiento del segundo fragmento peptídico al primer fragmento peptídico conjugado al soporte desprotegido en el extremo N, el segundo fragmento peptídico se escinde del soporte. La escisión de los fragmentos protegidos del soporte es bien conocida para un experto en la materia (por ejemplo, véanse las páginas 216-220 de "Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis-A practical approach", W.C. Chan, P.D. White, Oxford University Press Inc. New York, 2000).

15 En una realización específica, antes del acoplamiento del segundo fragmento peptídico al primer fragmento peptídico conjugado con el soporte desprotegido en el extremo N, el segundo fragmento peptídico escindido se purifica, opcionalmente mediante cromatografía y/o cristalización.

20 Cuando se usa en el presente documento, el término "purificación" incluye cualquier método de separación conocido en la técnica adecuado para separar péptidos de impurezas, tal como separación cromatográfica (tal como cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba o HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Presión) de fase inversa), Ultrafiltración (UF), precipitación isoeléctrica o cualquier otro método de separación adecuado.

25 En el contexto de la presente invención, el término "cromatografía" incluye una serie de técnicas de laboratorio para la separación de mezclas. Normalmente implica pasar una mezcla disuelta en una "fase móvil" a lo largo de una "fase estacionaria", que separa los péptidos de interés de subproductos presentes en la mezcla basándose en el reparto diferencial entre las fases móvil y estacionaria. En el contexto de la presente invención, la cromatografía líquida puede ser preparativa o analítica. El objetivo de la cromatografía preparativa normalmente es separar los componentes de una mezcla para su uso futuro (y por lo tanto es una forma de purificación). La cromatografía analítica se realiza normalmente con cantidades más pequeñas de material y se utiliza para medir las proporciones relativas de analitos en una mezcla. Las dos técnicas no son mutuamente excluyentes.

30 Cuando se usa en el presente documento, el término "cristalización" incluye la separación de un producto peptídico de una fase líquida o corriente de alimentación, por ejemplo, en una forma extremadamente pura, mediante refrigeración de la fase líquida o corriente de alimentación o mediante la adición de agentes de precipitación que reducen la solubilidad del producto deseado de manera que forme cristales.

35 En una realización específica, antes del acoplamiento del segundo fragmento peptídico al primer fragmento peptídico conjugado con el soporte desprotegido en el extremo N, el segundo fragmento peptídico escindido se purifica por HPLC de fase inversa.

40 Según otra realización, el grupo de protección Fmoc se retira del primer fragmento peptídico mediante la adición de una amina secundaria seleccionada del grupo que consiste en piperidina, piperazina, morfina y dicitlohexilamina.

Según otra realización, el método de la invención comprende además escindir al primer fragmento peptídico acoplado al segundo fragmento peptídico del soporte. En particular, el método según la presente invención puede comprender además purificar el primer fragmento peptídico escindido acoplado al segundo fragmento peptídico, opcionalmente por cromatografía, por ejemplo, por HPLC de fase inversa.

45 En una realización específica, la presente invención se refiere por lo tanto a un método para preparar un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 1), comprendiendo el método las etapas de:

50 (a) proporcionar, mediante síntesis peptídica de fase sólida, un primer fragmento peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos X-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°:2), en donde X es un grupo de protección Fmoc y en donde el resto C-terminal del primer fragmento peptídico está conjugado a un soporte;

55 (b) proporcionar, mediante síntesis peptídica de fase sólida, un segundo fragmento peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos Y-His-Gly-Asp-Gly (SEC ID N°: 3), en donde Y es un grupo protector lábil a ácidos, seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en Boc y benciloxicarbonilo, y en donde el resto C-terminal

del segundo fragmento peptídico está conjugado con un soporte;

(c) escindir al segundo fragmento peptídico del soporte;

(d) opcionalmente purificar el segundo fragmento peptídico escindido, por ejemplo, mediante cromatografía, tal como cromatografía líquida de alta presión de fase inversa y/o mediante cristalización;

5 (e) eliminar el grupo protector de Fmoc del primer fragmento peptídico, opcionalmente mediante la adición de una amina secundaria seleccionada entre el grupo que consiste en piperidina, piperazina, morfina y dicitohexilamina;

(f) acoplar el segundo fragmento peptídico al primer fragmento peptídico acoplado al soporte añadiendo el segundo fragmento peptídico purificado al primer fragmento peptídico conjugado al soporte desprotegido en N-terminal;

10 (g) escindir el primer fragmento peptídico conjugado al soporte que está acoplado al segundo fragmento peptídico del soporte; y

(h) opcionalmente purificar el primer fragmento peptídico escindido acoplado al segundo fragmento peptídico, por ejemplo, mediante cromatografía, tal como cromatografía líquida de alta presión de fase inversa y/o mediante cristalización.

15 En principio, para el método según la presente invención puede usarse cualquier soporte que se considere útil para la síntesis peptídica de fase sólida, véanse, por ejemplo, los descritos en Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis-A practical approach, W.C. Chan, P.D. White, Oxford University Press Inc. New York, 2000.

20 Según una realización, el soporte es una resina o polímero funcionalizado, seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en poliestireno, polidimetilacrilamida y polietilenglicol. Normalmente se usan dos procedimientos prácticos, conocidos como discontinuo y de flujo continuo, que difieren principalmente en el método empleado para lavar la resina entre etapas de síntesis. En el proceso discontinuo, la resina de peptidilo está contenida dentro de un recipiente de reacción sinterizado, y los reactivos se añaden por partes por la parte superior del recipiente y se retiran mediante la aplicación apropiada de presión positiva de nitrógeno o vacío. En la síntesis de flujo continuo, la resina se introduce en una columna y el lavado se realiza bombeando disolvente a través del lecho de resina. De manera opcional, el método según la presente invención es un proceso discontinuo.

25 El aminoácido C-terminal del primer fragmento peptídico y/o el segundo fragmento peptídico pueden unirse al polímero funcionalizado por medio de un enlazador que puede ser, opcionalmente, ácido 4-hidroximetilfenoxiacético (HMPA). Sin embargo, en principio, para los métodos de la invención puede usarse cualquier enlazador que se considere útil para la síntesis peptídica de fase sólida. Los enlazadores adecuados se pueden adquirir fácilmente y son bien conocidos para un experto en la materia (por ejemplo, véanse las páginas 15-19 de "Fmoc-Solid Phase Peptide Synthesis-A practical approach", W.C. Chan, P.D. White, Oxford University Press Inc. New York, 2000).

30 En algunas realizaciones, el primer fragmento peptídico y/o el segundo fragmento peptídico pueden escindirse del soporte por medio de un ácido, seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en ácido trifluoroacético (TFA), ácido trifluorometanosulfónico (TFMSA), bromuro de hidrógeno (HBr), cloruro de hidrógeno (HCl) y fluoruro de hidrógeno (HF), o mediante una base, opcionalmente un hidróxido.

35 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para preparar una composición farmacéutica que contiene un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-De-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 1), comprendiendo el método las etapas de:

40 (a) preparar el péptido según el método de la presente invención como se ha descrito anteriormente; y

(b) preparar una composición farmacéutica que contenga el péptido preparado en la etapa (a).

45 Por lo tanto, la presente divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas adecuadas comercialmente de un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1, pudiendo prepararse dichas composiciones usando un proceso aceptable desde el punto de vista comercial. Tal como se emplea en esta memoria, "preparación", "formulación" y "composición" pueden usarse indistintamente en el presente documento, y se refieren a una combinación de dos o más elementos, o sustancias.

50 Tal como se emplea en esta memoria, "composición farmacéutica" puede usarse para hacer referencia a una composición que tiene actividad fisiológica seleccionada o especificada medible cuando se administra a un sujeto en una cantidad significativa o eficaz. La composición según la presente invención incorpora teduglutida en una cantidad eficaz desde el punto de vista médico, particularmente en una cantidad que es útil desde el punto de vista terapéutico o de diagnóstico. Dicha cantidad puede determinarse basándose en el uso final deseado de la composición. Las cantidades terapéuticamente útiles de teduglutida normalmente son conocidas para un experto en la materia.

Tal como se emplea en esta memoria, "cantidad eficaz", y "cantidad suficiente" pueden usarse indistintamente y se

refieren a una cantidad de teduglutida que, cuando se incluye en una composición, es suficiente para conseguir un efecto fisiológico o composicional deseado. Por lo tanto, una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente del péptido farmacéuticamente activo, para conseguir resultados terapéuticos, conservantes o de diagnóstico en el tratamiento de una afección para la que la que se considera eficaz el péptido farmacéuticamente activo.

5 Se entiende que diversos factores biológicos pueden influir en la capacidad de una sustancia para realizar una función deseada. Por lo tanto, una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" puede depender, en algunos casos, de dichos factores biológicos.

10 Además, aunque la consecución de los efectos terapéuticos puede medirla un médico u otro personal médico cualificado usando evaluaciones conocidas en la técnica, se reconoce que la variación y la respuesta individual a los tratamientos pueden hacer que la consecución de los efectos terapéuticos sea una decisión subjetiva. La determinación de una cantidad eficaz está bien dentro de la experiencia habitual en la técnica de las ciencias farmacéuticas y la medicina.

15 En una realización, la composición farmacéutica además comprende tampón fosfato en una cantidad suficiente para ajustar el pH de la composición a un nivel fisiológicamente tolerable. El término "tampón", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto químico que reduce la tendencia de cambio del pH de una solución, tal como soluciones cromatográficas, a lo largo del tiempo que se produciría en ausencia de dicho compuesto químico. Los tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, acetato, carbonato, citrato, glicilglicina, glicina, histidina, lisina, fosfato, borato, Trishidroximetil-aminometano, etanolamina y mezclas de los mismos. Generalmente, el pH de la
20 composición es mayor de aproximadamente 5,5, por ejemplo, mayor de aproximadamente 6, tal como de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,9, o de aproximadamente 7,3 a aproximadamente 7,4. En particular, el agente tamponante puede estar basado en fosfato, y en algunas realizaciones se usa un tampón fosfato 35 mM.

25 En otra realización, la composición farmacéutica además comprende un agente que proporciona volumen seleccionado entre el grupo que consiste en manitol y sacarosa. El agente que proporciona volumen, que está incorporado en la composición, puede producir una torta amorfa no cristalina.

30 Según otra realización más, la composición farmacéutica comprende además excipientes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, la composición puede comprender además un agente isotónico (es decir, un modificador de la isotonicidad), por ejemplo, una sal inorgánica tolerada fisiológicamente, tal como cloruro sódico o cloruro potásico, o un azúcar o alcohol de azúcar tolerado fisiológicamente, por ejemplo, sorbitol, o un aminoácido tolerado fisiológicamente. En particular, la composición farmacéutica puede comprender además L-histidina.

Según otra realización, la composición farmacéutica se proporciona en una forma de dosificación inyectable. Según otra realización, la composición farmacéutica se proporciona como una forma de dosificación parenteral. En una aplicación, la composición según la presente invención puede utilizarse para el tratamiento de una enfermedad gastrointestinal, particularmente enfermedades, trastornos o afecciones del intestino.

35 Tal como se emplea en esta memoria, "administración" se refiere a la manera en la que la teduglutida, o la composición que la contiene, se presenta a un sujeto. Tal como se emplea en la presente memoria, "sujeto" se refiere a un mamífero que puede beneficiarse de la administración de una composición o método como se menciona en el presente documento. La mayoría de las veces el sujeto será un ser humano, pero puede ser otro animal.

Según una realización específica, la composición comprende:

40 (a) una cantidad médicamente útil de teduglutida preparada según el método de la presente invención como se ha descrito anteriormente;

(b) un tampón fosfato suficiente para ajustar el pH de la formulación a un nivel farmacéuticamente aceptable, y en particular entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 9,0, tal como entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,0 o entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5;

45 (c) una cantidad estabilizadora del aminoácido L-histidina; y

(d) un agente para proporcionar volumen seleccionado entre sacarosa y manitol.

En particular, la composición puede comprender:

50 (a) una cantidad médicamente útil de teduglutida preparada según el método de la presente invención como se ha descrito anteriormente, que comprende de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/ml del péptido, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg/ml, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 30 mg/ml, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mg/ml, o aproximadamente 20 mg/ml;

(b) un tampón fosfato para mantener el pH a un nivel fisiológicamente tolerable, por ejemplo, por encima de 5,5 o 6 y, en particular, entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 9,0, tal como entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,0 o entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5;

- (c) un aminoácido estabilizador, particularmente L-histidina; y
- (d) un agente para proporcionar volumen, particularmente manitol.

En particular, la composición puede ser una formulación liofilizada que comprende en el producto reconstituido:

- 5 (a) tampón fosfato en una cantidad necesaria para mantener el pH del producto reconstituido entre aproximadamente 6,9 y 7,9, o, por ejemplo, en una cantidad para mantener un pH de aproximadamente 7,3 a aproximadamente 7,4;
- (b) de aproximadamente un 0,5 a aproximadamente un 1 % de L-histidina;
- (c) de aproximadamente un 2 a aproximadamente un 5 % de manitol, por ejemplo, de aproximadamente un 2,5 a aproximadamente un 3,5 % de manitol, o aproximadamente un 3 % de manitol; y
- 10 (d) de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/ml de teduglutida preparada según el método de la presente invención como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 mg/ml, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 30 mg/ml, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mg/ml, o aproximadamente 20 mg/ml.

15 En una realización específica de la invención, la composición puede ser una composición liofilizada que comprende en el producto reconstituido:

- (a) de aproximadamente 7 a aproximadamente 30 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mg/ml, o aproximadamente 20 mg/ml de teduglutida preparada según el método de la presente invención como se ha descrito anteriormente;
- (b) un tampón fosfato suficiente para mantener el pH a un valor de aproximadamente 7,3 a aproximadamente 7,4;
- 20 (c) de aproximadamente un 0,5 a aproximadamente un 1 % de L-histidina; y
- (d) aproximadamente un 3 % de manitol.

En el contexto de la presente invención, secado por congelación (que también se conoce como liofilización o criodesecación) incluye un proceso de deshidratación usado típicamente para conservar un péptido o hacer que un péptido sea más conveniente para el transporte. El secado por congelación normalmente se consigue congelando la composición líquida que comprende el péptido y después reduciendo la presión circundante y añadiendo suficiente calor para permitir la sublimación directa del agua congelada desde la fase sólida a la fase gaseosa.

Por consiguiente, las presentes composiciones también pueden proporcionarse en forma liofilizada, por ejemplo, como polvos secados por congelación adecuados para la reconstitución y la posterior administración como composiciones líquidas inyectables. Para la reconstitución, el agua estéril puede extraerse en una jeringa y después transferirse al vial que contiene la composición liofilizada. Las composiciones liofilizadas de la presente invención normalmente se proporcionan en una forma de polvo que comprende no más de aproximadamente un 5 % en peso de agua, por ejemplo, no más de un 2 % en peso de agua, o incluso no más de aproximadamente un 1% en peso de agua.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para fabricar la composición liofilizada de un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1. Dicho proceso comprende las siguientes etapas:

- (a) preparar el péptido según el método de la invención;
- (b) preparar la composición según el método de la invención
- (c) congelar la composición a aproximadamente -40 °C;
- (d) realizar una primera etapa de secado a aproximadamente -20 °C; y
- 40 (e) realizar una segunda etapa de secado a +20 °C.

En otra realización, la composición sometida al proceso de liofilización comprende:

- (a) teduglutida preparada según el método de la presente invención como se ha descrito anteriormente;
- (b) tampón fosfato 35 mM para mantener el producto reconstituido a un pH de aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,9, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 7,3 a aproximadamente 7,4;
- 45 (c) de aproximadamente un 0,5 a aproximadamente un 1 % de L-histidina; y
- (d) aproximadamente un 3 % de manitol.

En un aspecto adicional, la presente divulgación se refiere a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 1), pudiendo obtenerse el péptido mediante el método de la presente invención como se ha descrito anteriormente.

- 5 En algunas realizaciones, los métodos de la invención se realizan en un formato de alto rendimiento. En una realización adicional, la invención se refiere al uso de un método, tal como se describe en el presente documento, para la preparación de un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Ensamblaje de péptido-soporte de polímero

10 H-His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lvs-Ile-Thr-Asp-OH (SEC ID N°: 1)

- 15 1. Se añadieron Fmoc-Asp(OBu^t)-OH (1,235 g, 3 mmol) (Fmoc = 9-fluorenilmetiloxicarbonilo) y Diisopropilcarbodiimida (0,623 g, 4 mmol) (DIC) a un soporte de polímero de ácido 4-hidroximetilfenoxiacético-dimetilacrilamida (1 g, 1 mmol) en N,N-dimetilformamida (15 cm³) (DMF) seguido de 4-dimetilamino piridina (0,012 g, 0,1 mmol) (DMAP). Se dejó que esta esterificación continuara durante 1 h. El soporte de polímero se lavó con DMF (10 x 10 cm³) y se repitió la reacción. El soporte de polímero se lavó de nuevo con DMF (10 x 10 cm³).
- 20 2. Se añadió piperidina/DMF (20 cm³, 20 % v/v) al soporte sólido. La reacción se dejó en reposo durante 3 minutos. Se realizó un segundo tratamiento con Piperidina/DMF (20 cm³, 20 % v/v) durante 7 minutos y el soporte de polímero se lavó con DMF (10 x 10cm³).
- 25 3. Se disolvieron Fmoc-Thr(Bu^t)-OH (0,994 g, 2,5 mmol) y tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) (0,755 g, 2,35 mmol) en DMF (10 cm³). Se añadió 4-metilmorfolina (NMM) (0,33 cm³, 3 mmol) y la mezcla se preactivó durante 2-3 minutos antes de la adición al soporte polimérico. Se supervisó la finalización de la reacción de acoplamiento mediante ensayo de Ninhidrina. Después, el soporte de polímero se lavó con DMF (10 x 10 cm³).
- 30 4. Se añadió piperidina/DMF (20 cm³, 20 % v/v) al soporte sólido. La reacción se dejó en reposo durante 3 minutos. Se realizó un segundo tratamiento con Piperidina/DMF (20 cm³, 20 %v/v) durante 7 minutos y el soporte de polímero se lavó con DMF (10 x 10 cm³)

Después se acopló Fmoc-Ile-OH (0,884 g, 2,5 mmol) y se trató con piperidina/DMF usando el procedimiento indicado en las etapas 3-4 anteriores con la excepción de que se usó Fmoc-Ile-OH en lugar de Fmoc-Thr(Bu^t)-OH.

35 El ensamblaje de la secuencia peptídica completa se consiguió de una manera por etapas como se ha descrito en las etapas 3-4 anteriores. Se realizaron los acoplamientos repetidos necesarios para conseguir un resultado negativo en el ensayo de Ninhidrina. Se sintetizaron péptidos de manera discontinua en un recipiente adecuado y los grupos de protección comunes adecuados para las funcionalidades de las cadenas laterales. Todos los reactivos utilizados están disponibles en el mercado.

Después de retirar Fmoc en la posición 5, se retiró la mitad del soporte de polímero para el tratamiento prolongado con piperidina y se retiró la cuarta parte para el acoplamiento de los fragmentos.

40 Se continuó el ensamblaje sobre la mitad del péptido-soporte de polímero como se ha descrito anteriormente pero el péptido-soporte de polímero se trató durante 20 minutos más con piperidina en DMF durante la retirada de Fmoc para simular el tiempo de reacción prolongado que se observaría al realizar la síntesis a escala industrial.

Se continuó el ensamblaje sobre la cuarta parte del péptido-soporte de polímero usando los protocolos estándar descritos anteriormente.

45 Se preparó el fragmento tetrapeptídico protegido Boc-His(Trt)-Gly-Asp(OBu^t)-Gly-OH en el soporte de polímero de H-Gly-2-clorotritil-poliestireno a una escala de 1 mmol usando protocolos estándar análogos a los descritos anteriormente.

Ejemplo 2 - Escisión de teduglutida

Cada una de las dos muestras de teduglutida-soporte de polímero completamente ensambladas se lavó minuciosamente con diclorometano y se añadió ácido trifluoroacético (TFA) que contenía triisopropilsilano (5 % v/v) (TIPS) para efectuar la escisión.

50 El TFA y el TIPS se retiraron por evaporación y el péptido se trituró con éter dietílico para retirar todo el TIPS restante.

Ejemplo 3 - Escisión de Boc-His(Trt)VGLv-Asp(OBu^t)VGLv-OH

El tetrapéptido protegido se escindió del soporte de polímero de clorotritil-poliestireno usando TFA en diclorometano (1 %v/v, 6x10 cm³). Cada parte de TFA/diclorometano se introdujo en piridina en metanol (2 %v/v, 40 cm³) para neutralizar el ácido.

- 5 El disolvente se retiró por evaporación rotatoria antes de la purificación.

Ejemplo 4 - Purificación de Boc-His(Trt)-Glv-Asp(OBu^t)VGLv-OH

El Boc-His(Trt)-Gly-Asp(OBu^t)-Gly-OH se purificó en una columna de fase inversa Luna C18 (15 µm, 5 cm de diámetro x 25 cm) usando las siguientes condiciones.

Tampón A = Tampón de agua

- 10 B = MeCN

Gradiente: 20-40 % de B durante 60 minutos seguido de 40-90 % de B durante 60 minutos

Longitud de onda: 230 nm

Ejemplo 5 - Acoplamiento de fragmentos

- 15 El Boc-His(Tit)-Gly-Asp(OBu^t)-Gly-OH purificado se acopló al péptido-soporte de polímero truncado en la posición 5 a una escala de 55 µmol aplicando el procedimiento de acoplamiento estándar que usa TBTU descrito anteriormente para acoplamientos de Fmoc-aminoácidos.

El péptido se escindió del soporte de polímero como se describe en el Ejemplo 2 en una escala reducida.

Ejemplo 6 - Análisis de péptidos en bruto

- 20 Los tres lotes de péptido en bruto se analizaron por HPLC de fase inversa en una columna Vydac C18 (5 µm, 4,6 mm x 250 mm) usando las siguientes condiciones.

Tampón A = TFA/agua al 0,1 %v/v

Tampón B = TFA/MeCN al 0,1 %v/v

Gradiente: 1-99 % de B durante 20 minutos

Longitud de onda: 230 nm

- 25 Ejemplo 7 - resultados de HPLC

La molécula de teduglutida completa se ensambló usando los protocolos de fase sólida con Fmoc descritos anteriormente. La pureza del péptido en bruto ensamblado fue del 52 % por HPLC y contenía un 24 % del análogo [beta]-Asp (véase la Figura 1).

- 30 La molécula de teduglutida completa también se ensambló usando un tratamiento prolongado con piperidina para los últimos 4 aminoácidos para demostrar el efecto de aumentar el tiempo de contacto con la base que se observaría a gran escala. Este péptido en bruto tenía una pureza del 39 % y contenía un 45 % de análogo de [beta]-Asp (véase la Figura 2).

- 35 Además, el fragmento 5-33 se ensambló sobre la fase sólida usando los protocolos de fase sólida con Fmoc descritos anteriormente. El tetrapéptido protegido Boc-His(Trt)-Gly- Asp(OBu^t)-Gly-OH se ensambló y se purificó antes del acoplamiento al fragmento 5-33 sobre la fase sólida. El tetrapéptido se escindió del soporte, se purificó, y se acopló al fragmento 5-33 que aún estaba acoplado a su soporte sólido. El péptido bruto de este conjunto tenía una pureza del 59 % y contenía un 17 % del análogo de [beta]-Asp (véase la Figura 3).

- 40 En resumen, la relación entre molécula lineal y ramificada en el conjunto estándar fue de 2,18. La relación en el conjunto con el tratamiento prolongado con piperidina fue de 0,88. La relación entre el péptido lineal y el análogo de [beta]-Asp ramificado en el conjunto de dos fragmentos fue de 3,52. Por lo tanto, estos datos demuestran claramente una reducción significativa del nivel del análogo de [beta]-Asp en el conjunto de dos fragmentos según la presente invención como se ha descrito anteriormente.

- 45 Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que se puede conseguir una pureza en bruto del 80 % o mayor, ya que solo se realizó una simple etapa de purificación del tetrapéptido en los ejemplos presentados anteriormente y el experto en la materia conoce bien la optimización adicional de las etapas descritas anteriormente. Esto podría reducir de una forma significativa el coste y la escala de fabricación con una reducción asociada de la carga sobre la etapa de purificación.

Listado de secuencias

<110> Nycomed
 <120> Síntesis en fase sólida de h[Gly2]GLP-2
 <130> N 8130
 5 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 33
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Teduglutida
 <400> 1

His Gly Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr
20 25 30

Asp

15 <210> 2
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

20 <223> fragmento peptídico
 <220>
 <221> UNIÓN
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo de protección N-terminal

25 <400> 2

Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn Leu Ala Ala Arg
1 5 10 15

Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr Asp
20 25

<210> 3
 <211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> fragmento peptídico

5

<220>

<221> UNIÓN

<222> (1)..(1)

<223> Grupo de protección N-terminal

<400> 3

His Gly Asp Gly
1

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 1), comprendiendo el método las etapas de:
- 5 (a) proporcionar mediante síntesis peptídica de fase sólida un primer fragmento peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos X-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°:2), en donde X es un primer grupo de protección y en donde el resto C-terminal del primer fragmento peptídico está conjugado con un soporte;
- 10 (b) proporcionar mediante síntesis peptídica de fase sólida un segundo fragmento peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos Y-His-Gly-Asp-Gly (SEQ ID NO: 3), en donde Y es un segundo grupo protector;
- (c) eliminar al primer grupo protector del primer fragmento peptídico; y
- (d) acoplar el segundo fragmento peptídico al primer fragmento peptídico desprotegido en N-terminal, conjugado al soporte.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde el segundo fragmento peptídico se escinde del soporte antes del acoplamiento del segundo fragmento peptídico al primer fragmento peptídico desprotegido en el extremo N, y/o en donde el primer fragmento peptídico acoplado al segundo fragmento peptídico se escinde del soporte.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el primer fragmento peptídico y/o el segundo fragmento peptídico se proporcionan conjugando el resto de aminoácido C-terminal con un soporte y añadiendo secuencialmente aminoácidos protegidos de manera apropiada al extremo N del resto o de los restos C-terminales conjugados con el soporte.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en donde cada uno de los aminoácidos que se van a añadir secuencialmente al extremo N del resto o de los restos del extremo C conjugados con el soporte del primer fragmento peptídico y/o el segundo fragmento peptídico, está protegido por un grupo de protección seleccionado del grupo que consiste en Boc y Fmoc.
- 25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el primer grupo de protección es Fmoc.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el segundo grupo de protección es un grupo de protección lábil a ácidos, opcionalmente seleccionado entre el grupo que consiste en Boc y benciloxicarbonilo.
- 30 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el resto de histidina del segundo fragmento peptídico está protegido en la cadena lateral con un grupo de protección seleccionado del grupo que consiste en tritilo (Trt), Boc, Bom y Bum.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el resto de ácido aspártico del segundo fragmento peptídico está protegido en la cadena lateral con un grupo de protección de éster terc-butílico.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende:
- 35 (a) proporcionar mediante síntesis en fase sólida un primer fragmento peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos X-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr-Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 2) por síntesis peptídica, en donde X es un grupo de protección Fmoc y en donde el resto C-terminal del primer fragmento peptídico está conjugado a un soporte;
- 40 (b) proporcionar mediante síntesis en fase sólida un segundo fragmento peptídico que comprende la secuencia de aminoácidos Y-His-Gly-Asp-Gly (SEC ID N°:3) por síntesis peptídica, en donde Y es un grupo de protección lábil a ácidos, seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en Boc y benciloxicarbonilo, y en donde el resto C-terminal del segundo fragmento peptídico está conjugado con un soporte;
- (c) escindir al segundo fragmento peptídico del soporte;
- 45 (d) opcionalmente purificar el segundo fragmento peptídico escindido, por ejemplo, mediante cromatografía, tal como cromatografía líquida de alta presión de fase inversa y/o mediante cristalización;
- (e) eliminar el grupo protector de Fmoc del primer fragmento peptídico, opcionalmente mediante la adición de una amina secundaria seleccionada entre el grupo que consiste en piperidina, piperazina, morfolina y dicitohexilamina;
- 50 (f) acoplar el segundo fragmento peptídico al primer fragmento peptídico acoplado al soporte añadiendo el segundo fragmento peptídico purificado al primer fragmento peptídico conjugado al soporte desprotegido en N-terminal;

- (g) escindir el primer fragmento peptídico conjugado al soporte que está acoplado al segundo fragmento peptídico del soporte; y
- (h) opcionalmente purificar el primer fragmento peptídico escindido acoplado al segundo fragmento peptídico, por ejemplo, mediante cromatografía, tal como cromatografía líquida de alta presión de fase inversa,
- 5 en donde opcionalmente el soporte es un polímero funcionalizado, por ejemplo, un polímero seleccionado del grupo que consiste en poliestireno, polidimetilacrilamida y polietilenglicol.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el aminoácido C-terminal del primer fragmento peptídico y/o el segundo fragmento peptídico está unido al polímero funcionalizado por medio de un enlazador, opcionalmente ácido 4-hidroximetilfenoxiacético (HMPA).
- 10 11. Un método para preparar una composición farmacéutica que contiene un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos
His-Gly-Asp-Gly-Ser-Phe-Ser-Asp-Glu-Met-Asn-Thr-Ile-Leu-Asp-Asn-Leu-Ala-Ala-Arg-Asp-Phe-Ile-Asn-Trp-Leu-Ile-Gln-Thr- Lys-Ile-Thr-Asp (SEC ID N°: 1), comprendiendo el método las etapas de:
- (a) preparar el péptido según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10; y
- 15 (b) preparar una composición farmacéutica que contenga el péptido preparado en la etapa (a).
12. El método de la reivindicación 11, en donde la composición farmacéutica además comprende tampón fosfato en una cantidad suficiente para ajustar el pH de la composición a un nivel fisiológicamente tolerable.
13. El método de la reivindicación 11 o 12, en donde la composición farmacéutica comprende además L-histidina.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde la composición farmacéutica además comprende un agente que proporciona volumen seleccionado entre el grupo que consiste en manitol y sacarosa.
- 20 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde la composición farmacéutica se proporciona como una forma de dosificación inyectable.

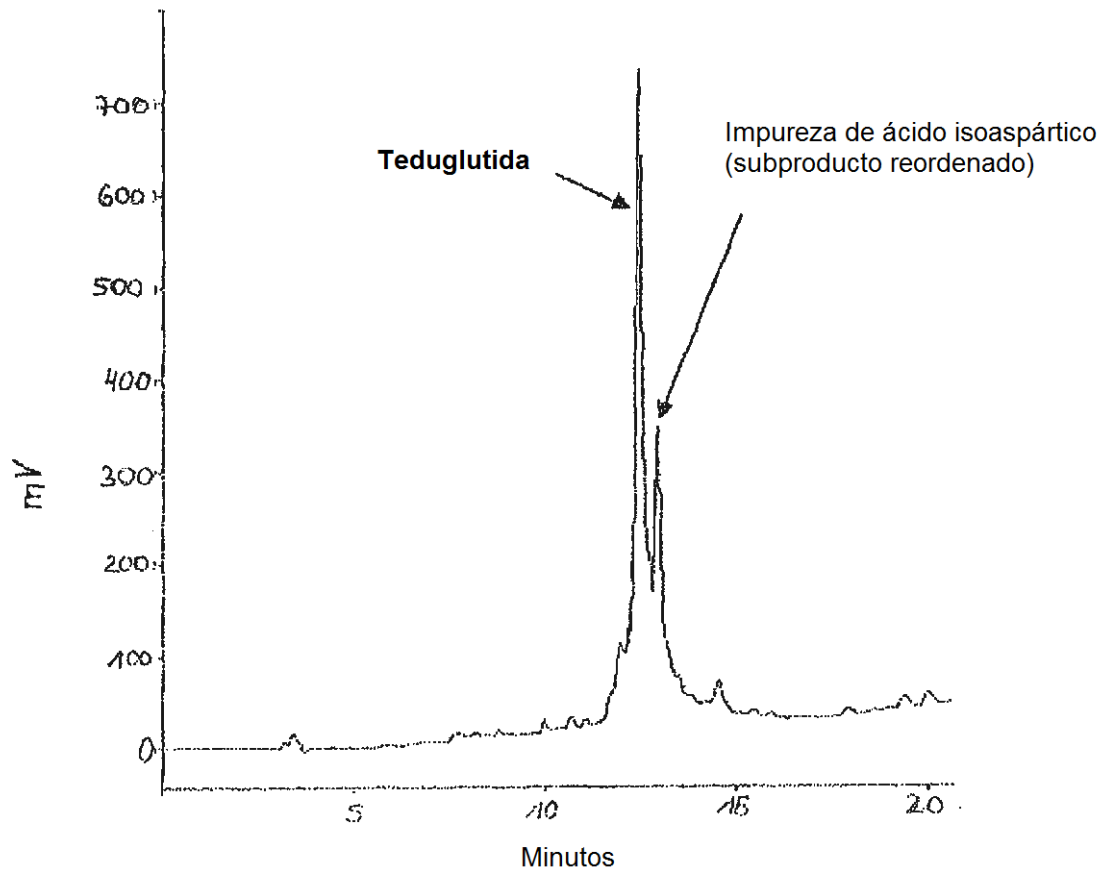


Figura 1

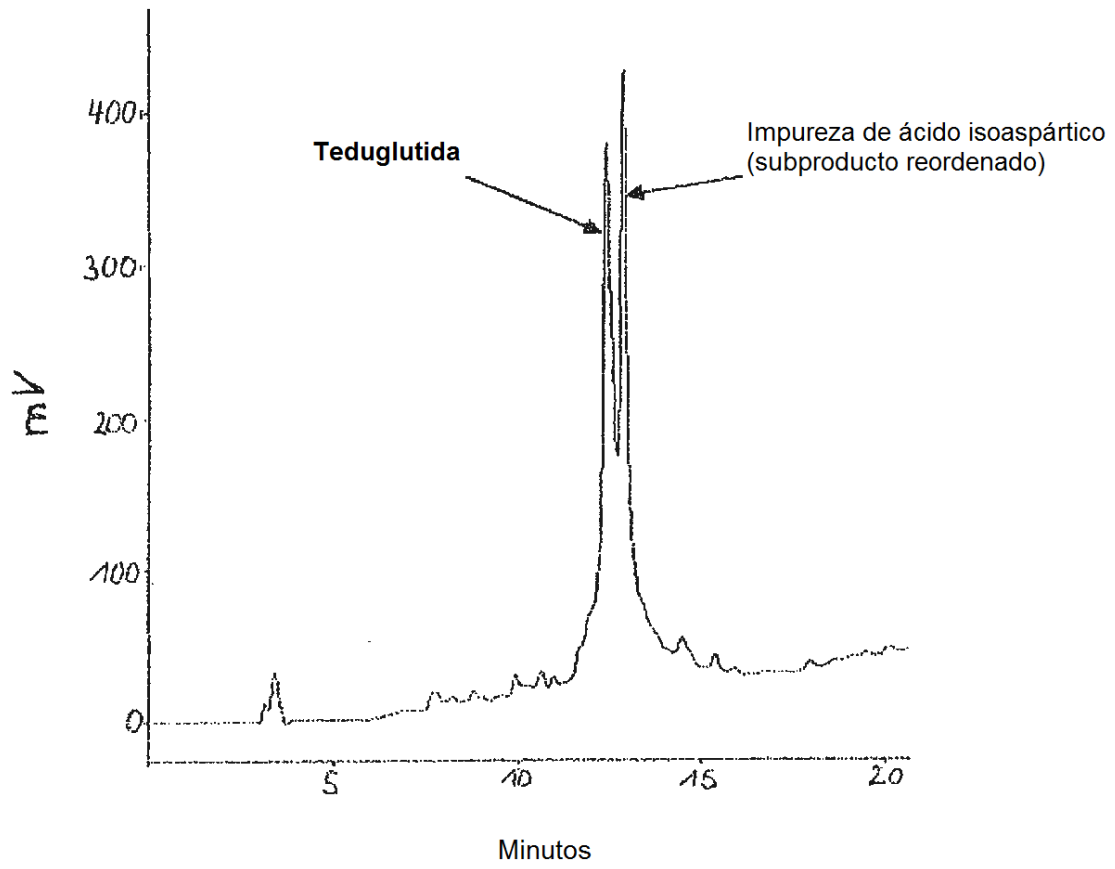


Figura 2

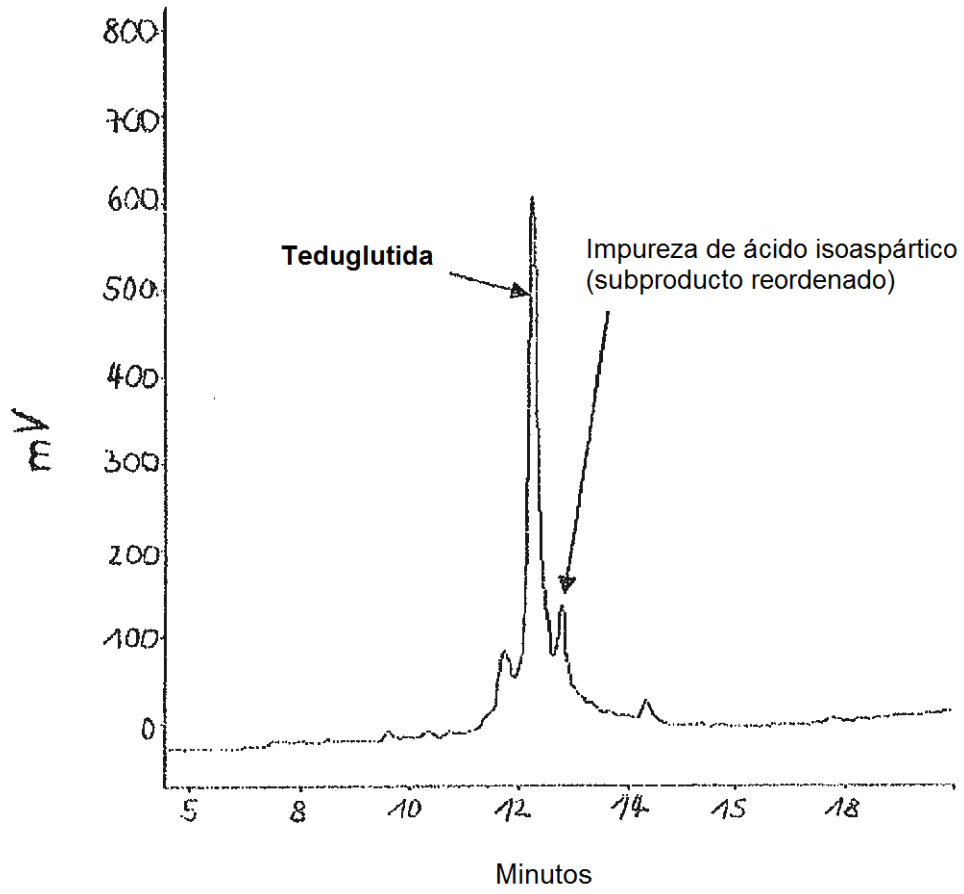


Figura 3