

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 585**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/605** (2006.01)

**B01D 15/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2013 PCT/CN2013/071063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13117135**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2013 E 13746833 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2813514**

54 Título: **Método para purificar crudo de liraglutida sintética en fase sólida**

30 Prioridad:

**10.02.2012 CN 201210029818**

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

**28.04.2017**

73 Titular/es:

**HYBIO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)  
Hybio Medicine Park No.37 KEJIC Str. 2ND Hi-  
Tech Industrial Park  
Shenzhen, Guangdong 518057, CN**

72 Inventor/es:

**QIN, LIANGZHENG;  
PAN, JUNFENG;  
MA, YAPING y  
YUAN, JIANCHENG**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

ES 2 610 585 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**

Método para purificar crudo de liraglutida sintética en fase sólida

**5 Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención se refiere al campo de agentes biofarmacéuticos y, en particular, a un método para purificar crudo de liraglutida sintética en fase sólida.

**10 Antecedentes de la invención**

**[0002]** La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad común en todo el mundo con una alta tasa de incidencia. Basándose en los datos recientemente publicados por la OMS (organización mundial de la salud), ha habido hasta 180 millones de pacientes diabéticos en todo el mundo en 2007, con una incidencia creciente potenciada de año en año. De acuerdo con la estadística epidemiológica, ha habido casi 92 millones de pacientes diabéticos en China en 2010. Como todos los sistemas individuales en el organismo están implicados en la diabetes, puede incluso inducir complicaciones letales. La diabetes tiene un fuerte impacto sobre la capacidad laboral de los seres humanos y amenaza su seguridad en la vida diaria, produciendo un gran daño en la salud de los seres humanos. La diabetes se divide principalmente en diabetes de tipo I y de tipo II, en que la última es responsable de más del 90 % del total de pacientes diabéticos.

**[0003]** La liraglutida es un análogo de glicetina 1 (GLP-1) usado para tratamiento a largo plazo de diabetes de tipo II, que es un tipo de agonistas del receptor de GLP-1 y es el primer análogo de glicetina 1 (GLP-1) humana desarrollado para el tratamiento de diabetes de tipo II. La liraglutida se desarrolló por Novo Nordisk y se aprobó para su comercialización por la FDA el 25 de enero de 2010, y se aprobó por la SFDA el 4 de marzo de 2011. Como nueva generación de agente hipoglucémico basado en incretina, la liraglutida no solamente tiene duración de acción prolongada, sino que también retiene múltiples actividades biológicas de GLP-1 natural, que es seguro y eficaz en disminuir los niveles de azúcar en la sangre, y puede usarse para la protección contra una pluralidad de factores de riesgo cardiovascular, produciendo una nueva elección para el tratamiento de diabetes de tipo II. El efecto terapéutico clínico de liraglutida es alentador.

**[0004]** Actualmente, China es totalmente dependiente de la importación desde países foráneos de liraglutida, lo que la hace cara. La liraglutida se produce por Novo Nordisk mediante tecnología de recombinación genética. La síntesis química en fase sólida de polipéptidos es un medio técnico importante en el campo de investigación y producción de agentes farmacéuticos polipeptídicos y proteicos debido a ventajas tales como síntesis orientada y menos consumo de disolvente. Sin embargo, las impurezas producidas en la síntesis química son difíciles de separar y purificar a causa de sus propiedades similares, que hacen que la técnica de purificación se convierta en uno de los cuellos de botellas del procedimiento, conduciendo a dificultades en su industrialización.

**[0005]** Actualmente, se ha informado de un método de RP-HPLC para la purificación de liraglutida (Journal of Medicinal Chemistry 43, 1664-1669, 2000) usando una columna de cianopropilo (Zorbax 300SB-CN) con un sistema convencional de TFA/acetonitrilo (un gradiente de concentración de acetonitrilo de un 0 a un 100 % en 60 min) como fase móvil a una temperatura de columna de 65 °C, lo que conduce a un rendimiento del 35 % para el producto diana; el mismo método también se ha adoptado en las patentes chinas 200610110898.3 y 200510107588, con un rendimiento de purificación del 28 %.

**[0006]** La purificación de liraglutida es difícil debido a su larga cadena peptídica y alta hidrofobicidad producida por la presencia del grupo palmitilo. En la presente invención, se proporciona un método de purificación para liraglutida obtenida por síntesis química en fase sólida, que produce alta pureza y rendimiento, y puede industrializarse fácilmente.

**Descripción resumida de la invención**

**[0007]** Sobre dicha base, se proporciona un método para purificar crudo de liraglutida obtenido por síntesis en fase sólida en la presente invención. En este método, se obtiene solución de crudo de liraglutida disolviendo el péptido crudo de la síntesis en fase sólida en solución acuosa de acetonitrilo, que después se somete a purificación por HPLC de cuatro etapas para obtener liraglutida purificada con alta pureza y rendimiento.

**[0008]** Para conseguir el objetivo de la presente invención, a continuación se proporciona una realización técnica:

Un método para purificar crudo de liraglutida obtenido mediante síntesis en fase sólida, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

Etapa 1: se obtiene una solución de crudo de liraglutida disolviendo crudo de liraglutida obtenido mediante síntesis en fase sólida en solución acuosa de acetonitrilo;

5 Etapa 2: la solución de crudo de liraglutida se somete a una primera purificación por HPLC usando sílice unida a octilsilano como fase estacionaria, y usando solución acuosa de isopropanol que contiene un 0,1-0,2 % de ácido trifluoroacético como fase móvil A y acetonitrilo que contiene un 0,1-0,2 % de ácido trifluoroacético como fase móvil B eluyendo a un gradiente lineal de un 20-40 % de B a un 40-60 % de B, y se recoge un pico objetivo como la primera fracción;

10 Etapa 3: la primera fracción se somete a una segunda purificación por HPLC usando sílice unida a cianosilano como fase estacionaria, y usando solución acuosa de ácido perclórico a un 0,05-0,15 % (concentración en masa) como fase móvil A y ácido perclórico a un 0,05-0,15 % (concentración en masa) en acetonitrilo como fase móvil B eluyendo a un gradiente lineal de un 40 % de B a un 70 % de B, y se recoge un pico objetivo como la segunda fracción;

15 Etapa 4: la segunda fracción se somete a una tercera purificación por HPLC usando sílice unida a octilsilano como fase estacionaria, y usando solución acuosa de amoniaco a un 0,01-0,06 % (concentración en masa) como fase móvil A y acetonitrilo de calidad cromatográfica como fase móvil B eluyendo a un gradiente lineal de un 30 % de B a un 60 % de B, y se recoge un pico objetivo como la tercera fracción;

20 Etapa 5: se obtiene péptido purificado de la tercera fracción por evaporación rotatoria a presión reducida y liofilización.

25 **[0009]** En la síntesis en fase sólida de polipéptidos, las purezas son principalmente fragmentos oligonucleosídicos cortos, sales y diversos grupos protectores, en la cual, las impurezas que se tienen que eliminar son principalmente el péptido prefijado y péptido racémico. En la presente invención, la pureza del péptido crudo de la síntesis en fase sólida está en el intervalo de un 50 a un 60 %, con un contenido máximo de impurezas de un 5 a un 8 %.

30 **[0010]** Preferentemente, la relación en volumen entre acetonitrilo y agua en la solución acuosa de acetonitrilo es de 10-30:70-90.

35 **[0011]** Preferentemente, la relación en volumen entre isopropanol y agua en la solución acuosa de isopropanol es de 15-35:65-85.

**[0012]** Preferentemente, el caudal para la primera, segunda o tercera purificación por HPLC es de 55-2000 ml/min en la etapa 2, 3 o 4, respectivamente.

40 **[0013]** Preferentemente, el caudal para la primera, segunda o tercera purificación por HPLC es de 55-500 ml/min en la etapa 2, 3 o 4, respectivamente.

**[0014]** Preferentemente, la duración de la elución en gradiente lineal en la etapa 2 o 3 es de 40 min.

45 **[0015]** Preferentemente, la duración de la elución en gradiente lineal en la etapa 4 es de 30 min.

**[0016]** Preferentemente, la concentración después de la evaporación rotatoria a presión reducida en la etapa 5 es de 50-70 mg/ml.

50 **[0017]** Preferentemente, la síntesis en fase sólida se realiza por las siguientes etapas: en presencia de sistema de agente activador, acoplar la resina de soporte en fase sólida con glicina protegida con Fmoc N-terminal para obtener Fmoc-Gly-resina; de acuerdo con la secuencia estructural de liraglutida, acoplar secuencialmente los aminoácidos con protección por Fmoc N-terminal y protección de cadenas laterales usando el método de síntesis en fase sólida, con protección por Alloc para la protección de la cadena lateral de lisina; eliminar el grupo protector Alloc de la cadena lateral de lisina; acoplar palmitoil-Glu-OtBu a la cadena lateral de lisina por el método de síntesis en fase sólida; obtener crudo de liraglutida después de la escisión, y eliminación del grupo protector y la resina.

55 **[0018]** Se proporciona un método para purificar crudo de liraglutida obtenido por síntesis en fase sólida en la presente invención. En este método, después de disolver el crudo de liraglutida de la síntesis en fase sólida en solución acuosa de acetonitrilo, la solución preparada se somete a 4 etapas de purificación por HPLC para obtener liraglutida purificada con un rendimiento de un 61,1-64,4 % y una pureza de un 98,2-98,7 %.

#### Descripción detallada de la invención

60 **[0019]** Se describe un método para purificar crudo de liraglutida obtenido por síntesis en fase sólida por la presente invención, que puede implementarse modificando apropiadamente los parámetros de procesamiento por los expertos en la materia, con referencia a los contenidos de la presente memoria. Particularmente, debe apreciarse que todos los remplazos y modificaciones similares son evidentes para los expertos en la materia, todos los cuales se consideran incluidos en la presente invención. El método de la presente invención y las aplicaciones del mismo  
65 se han descrito por Ejemplos preferidos.

**[0020]** Todos los reactivos usados en el método proporcionado en la presente memoria para la purificación de liraglutida obtenida por síntesis en fase sólida están disponibles en el mercado de empresas relacionadas.

**[0021]** La presente invención se ilustrará adicionalmente con referencia a los siguientes Ejemplos:

5

### Ejemplo 1

**[0022]** Se obtuvo liraglutida por síntesis en fase sólida con una pureza del 50 %.

10 Tratamiento de la muestra:

**[0023]** Se disolvieron completamente 2,2 g de crudo de liraglutida en acetonitrilo al 10 %/agua al 90 % (v/v) con asistencia de ultrasonidos, y posteriormente la solución se filtró por una membrana de filtro y se recogió para uso futuro.

15

La primera purificación por HPLC

**[0024]** Condiciones para la purificación: columna cromatográfica: una columna que usa sílice unida a octilsilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 50 mm x 250 mm. Fase móvil: fase A: TFA al 0,1 % en agua al 85 %/solución acuosa de isopropanol al 15 %; fase B: TFA al 0,1 % en acetonitrilo; caudal: 55 ml/min; gradiente: 40 % de B-60 % de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 2,2 g.

**[0025]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó con la muestra después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 2,2 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 95 % eluyendo con un gradiente lineal durante 40 min y se recogió como pico objetivo. La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente 20 mg/ml por evaporación rotatoria a presión reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y el concentrado resultante se usó como la muestra para la segunda purificación.

30 La segunda purificación por HPLC:

**[0026]** Condiciones para la purificación: columna cromatográfica: la columna que usa sílice unida a cianosilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 50 mm x 250 mm. Fase móvil: fase A: solución acuosa de ácido perclórico al 0,15 %; fase B: ácido perclórico al 0,15 % en acetonitrilo; gradiente: 40 % de B-70 % de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 1,2 g.

**[0027]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó con la fracción obtenida por la primera purificación después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 1,2 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 97 % eluyendo con un gradiente lineal durante 40 min y recogiendo el pico objetivo. La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente 20 mg/ml por evaporación rotatoria a presión reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y el concentrado resultante se usó como la muestra para la tercera purificación para desalación.

La tercera purificación por HPLC para desalación:

45

**[0028]** Columna cromatográfica: la columna que usa sílice unida a octilsilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 50 mm x 250 mm. Fase A: solución acuosa de amoníaco al 0,01 %; fase B: acetonitrilo de calidad cromatográfica; gradiente: 30 % de B-60 % de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 1,0 g.

50

**[0029]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó con la fracción obtenida por la segunda purificación después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 1,0 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 98 % eluyendo con un gradiente lineal durante 30 min y recogiendo el pico objetivo. La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente 50 mg/ml por evaporación rotatoria a presión reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y después se liofilizó, produciendo 0,85 g de ingrediente farmacéutico activo liraglutida con una pureza del 98,6 % y un rendimiento global del 64,4 %.

### Ejemplo 2

60

**[0030]** La liraglutida se preparó por síntesis en fase sólida de acuerdo con las siguientes etapas: en presencia de sistema de agente activador, acoplar la resina de soporte en fase sólida con glicina protegida con Fmoc N-terminal para obtener Fmoc-Gly-resina; de acuerdo con la secuencia estructural de liraglutida, acoplar secuencialmente los aminoácidos con protección por Fmoc N-terminal y protección de cadenas laterales usando el método de síntesis en fase sólida, con protección con Alloc para la cadena lateral de lisina; eliminar el grupo protector Alloc de la cadena

65

lateral de lisina; acoplar palmitoil-Gllu-OtBu a la cadena lateral de lisina por el método de síntesis en fase sólida; obtener crudo de liraglutida después de la escisión, y eliminación del grupo protector y la resina. La pureza del péptido crudo fue del 60 %.

#### 5 Tratamiento de la muestra:

**[0031]** Se disolvieron completamente 2,5 g de crudo de liraglutida en acetonitrilo al 20 %/agua al 80 % (v/v) con asistencia de ultrasonidos, y posteriormente la solución se filtró por una membrana de filtro y se recogió para uso futuro.

10

La primera purificación por HPLC:

**[0032]** Condiciones para la purificación: columna cromatográfica: la columna que usa sílice unida a octilsilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 50 mm x 250 mm. Fase móvil: fase A: ácido trifluoroacético al 0,2 % en agua al 75 %/solución acuosa de isopropanol al 25 %; fase B: ácido trifluoroacético al 0,2 % en acetonitrilo; caudal: 80 ml/min; gradiente: 35 % de B-55 % de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 2,5 g.

**[0033]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 2,5 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 95 % eluyendo con un gradiente lineal durante 40 min y recogiendo el pico objetivo. La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente 25 mg/ml por evaporación rotatoria a presión reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y el concentrado resultante se usó como la muestra para la segunda purificación.

#### 25 La segunda purificación por HPLC:

**[0034]** Condiciones para la purificación: columna cromatográfica: la columna que usa sílice unida a cianosilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 50 mm x 250 mm. Fase móvil: fase A: solución acuosa de ácido perclórico al 0,1 %; fase B: ácido perclórico al 0,1 % en acetonitrilo; gradiente: 40 % de B-70 % de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 1,4 g.

**[0035]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó con la fracción obtenida por la primera purificación después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 1,4 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 97 % eluyendo con un gradiente lineal durante 40 min y recogiendo el pico objetivo. La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente 20 mg/ml por evaporación rotatoria a presión reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y el concentrado resultante se usó como la muestra para la tercera purificación para desalación.

**[0036]** La tercera purificación por HPLC para desalación: columna cromatográfica: la columna que usa sílice unida a octilsilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 50 mm x 250 mm. Fase A: solución acuosa de amoniaco al 0,04 %; fase B: acetonitrilo de calidad cromatográfica; gradiente: 30 % de B-60 % de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 1,18 g.

**[0037]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó con la fracción obtenida por la segunda purificación después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 1,18 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 98 % eluyendo con un gradiente lineal durante 30 min y recogiendo el pico objetivo. La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente 60 mg/ml por evaporación rotatoria a presión reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y después se liofilizó, produciendo 0,92 g de ingrediente farmacéutico activo liraglutida con una pureza del 98,4 % y un rendimiento global del 61,3 %.

### Ejemplo 3

**[0038]** La liraglutida se obtuvo por síntesis en fase sólida con una pureza de péptido crudo del 58 %.

55

Tratamiento de la muestra:

**[0039]** Se disolvieron completamente 3,0 g de crudo de liraglutida en acetonitrilo al 30 %/agua al 70 % (v/v) con asistencia de ultrasonidos, y posteriormente la solución se filtró por una membrana de filtro y se recogió para uso futuro.

60

La primera purificación por HPLC:

**[0040]** Condiciones para la purificación: columna cromatográfica: la columna que usa sílice unida a octilsilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 50 mm x 250 mm. Fase móvil: fase A: TFA al 0,2 % en agua al

65 %/solución acuosa de isopropanol al 35 %; fase B: TFA al 0,2 % en acetonitrilo; caudal: 70 ml/min; gradiente: 30 % de B-50 % de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 3,0 g.

5 **[0041]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 3,0 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 95 % eluyendo con un gradiente lineal durante 40 min y recogiendo el pico objetivo. La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente 10 mg/ml por evaporación rotatoria a presión reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y el concentrado resultante se usó como la muestra para la segunda purificación.

10 La segunda purificación por HPLC:

**[0042]** Condiciones para la purificación: columna cromatográfica: la columna que usa sílice unida a cianosilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 50 mm x 250 mm. Fase móvil: fase A: solución acuosa de ácido perclórico al 0,05 %; fase B: ácido perclórico al 0,05 % en acetonitrilo; gradiente: 40 % de B-70 % de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 1,53 g.

20 **[0043]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó con la fracción obtenida por la primera purificación después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 1,53 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 97 % eluyendo con un gradiente lineal durante 40 min y recogiendo el pico objetivo. La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente 15 mg/ml por evaporación rotatoria a presión reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y el concentrado resultante se usó como la muestra para la tercera purificación para desalación.

25 **[0044]** La tercera purificación por HPLC para desalación: columna cromatográfica: la columna que usa sílice unida a octilsilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 50 mm x 250 mm. Fase A: solución acuosa de amoniaco al 0,06 %; fase B: acetonitrilo de calidad cromatográfica; gradiente: 30 % de B-60 % de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 1,24 g.

30 **[0045]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó con la fracción obtenida por la segunda purificación después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 1,24 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 98 % eluyendo con un gradiente lineal durante 30 min y recogiendo el pico objetivo. La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente 70 mg/ml por evaporación rotatoria a presión reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y después se liofilizó, produciendo 1,1 g de ingrediente farmacéutico activo liraglutida con una pureza del 98,7 % y un  
35 rendimiento global del 61,1 %.

#### Ejemplo 4

40 **[0046]** La liraglutida se preparó por síntesis en fase sólida de acuerdo con las siguientes etapas: en presencia de sistema de agente activador, acoplar la resina de soporte en fase sólida con glicina protegida con Fmoc N-terminal para obtener Fmoc-Gly-resina; de acuerdo con la secuencia estructural de liraglutida, acoplar secuencialmente los aminoácidos con protección por Fmoc N-terminal y protección de cadenas laterales usando el método de síntesis en fase sólida, con protección con Alloc para la cadena lateral de lisina; eliminar el grupo protector Alloc de la cadena lateral de lisina; acoplar palmitoil-Gllu-OtBu a la cadena lateral de lisina por el método de síntesis en fase sólida;  
45 obtener crudo de liraglutida después de la escisión, y eliminación del grupo protector y la resina. La pureza del péptido crudo fue del 53 %.

Tratamiento de la muestra:

50 **[0047]** Se disolvieron completamente 25 g crudo de liraglutida en acetonitrilo al 20 %/agua al 80 % (v/v) con asistencia de ultrasonidos, y posteriormente la solución se filtró por una membrana de filtro y se recogió para uso futuro.

La primera purificación por HPLC:

55 **[0048]** Condiciones para la purificación: columna cromatográfica: la columna que usa sílice unida a octilsilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 150 mm x 250 mm. Fase móvil: fase A: TFA al 0,1 % en isopropanol al 20 %/agua al 80 %; fase B: ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo; caudal: 500 ml/min; gradiente: 30 % de B-50 % de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 25 g.

60 **[0049]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó con la muestra después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 25 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 95 % eluyendo con un gradiente lineal durante 40 min y recogiendo el pico objetivo. La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente 20 mg/ml por evaporación rotatoria a presión  
65 reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y el concentrado resultante se usó como la muestra para la segunda

purificación.

La segunda purificación por HPLC:

5 **[0050]** Condiciones para la purificación: columna cromatográfica: la columna que usa sílice unida a cianosilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 150 mm x 250 mm. Fase móvil: fase A: solución acuosa de ácido perclórico al 0,15 %; fase B: ácido perclórico al 0,15 % en acetonitrilo; caudal: 500 ml/min; gradiente: 40 % de B-70 % de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 12,25 g.

10 **[0051]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó con la fracción obtenida por la primera purificación después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 12,25 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 97 % eluyendo con un gradiente lineal durante 40 min y recogiendo el pico objetivo. La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente 20 mg/ml por evaporación rotatoria a presión reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y el  
15 concentrado resultante se usó como la muestra para la tercera purificación para desalación.

**[0052]** La tercera purificación por HPLC para desalación: columna cromatográfica: la columna que usa sílice unida a octilsilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 150 mm x 250 mm. Fase A: solución acuosa de amoniaco al 0,05 %; fase B: acetonitrilo de calidad cromatográfica; caudal: 500 ml/min; gradiente: 30 % de B-60 %  
20 de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 10,7 g.

**[0053]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó con la fracción obtenida por la segunda purificación después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 10,7 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 98 % eluyendo con un gradiente  
25 lineal durante 30 min y recogiendo el pico objetivo. La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente 50 mg/ml por evaporación rotatoria a presión reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y después se liofilizó, produciendo 9,2 g de ingrediente farmacéutico activo liraglutida con una pureza del 98,4 % y un rendimiento global del 61,3 %.

### 30 Ejemplo 5

**[0054]** La liraglutida se obtuvo por síntesis en fase sólida con una pureza de péptido crudo del 56 %.

Tratamiento de la muestra:

35 **[0055]** Se disolvieron completamente 90 g de péptido crudo en acetonitrilo al 30 %/agua al 70 % (v/v) con asistencia de ultrasonidos, y posteriormente la solución se filtró por una membrana de filtro y se recogió para uso futuro.

40 La primera purificación por HPLC:

**[0056]** Condiciones para la purificación: columna cromatográfica: la columna que usa sílice unida a octilsilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 300 mm x 250 mm. Fase móvil: fase A: ácido trifluoroacético al 0,15 % en isopropanol al 20 %/agua al 80 %; fase B: ácido trifluoroacético al 0,15 % en acetonitrilo; caudal: 2000  
45 ml/min; gradiente: 30 % de B-50 % de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 90 g.

**[0057]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó con la muestra después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 90 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 95 % eluyendo con un gradiente lineal durante 40 min y recogiendo el pico objetivo.  
50 La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente 25 mg/ml por evaporación rotatoria a presión reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y el concentrado resultante se usó como la muestra para la segunda purificación.

La segunda purificación por HPLC:

55 **[0058]** Condiciones para la purificación: columna cromatográfica: la columna que usa sílice unida a cianosilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 300 mm x 250 mm. Fase móvil: fase A: solución acuosa de ácido perclórico al 0,15 %; fase B: ácido perclórico al 0,15 % en acetonitrilo; caudal: 2000 ml/min; gradiente: 40 % de B-70 % de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 46 g.

60 **[0059]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó con la fracción obtenida por la primera purificación después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 46 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 97 % eluyendo con un gradiente lineal durante 40 min y recogiendo el pico objetivo. La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente  
65 20 mg/ml por evaporación rotatoria a presión reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y el concentrado

resultante se usó como la muestra para la tercera purificación para desalación.

5 **[0060]** La tercera purificación por HPLC para desalación: columna cromatográfica: la columna que usa sílice unida a octilsilano como fase estacionaria, con su diámetro y longitud de 300 mm x 250 mm. Fase A: solución acuosa de amoniaco al 0,05 %; fase B: acetonitrilo de calidad cromatográfica; caudal: 2000 ml/min; gradiente: 30 % de B-60 % de B; longitud de onda de detección: 275 nm. La cantidad de carga fue de 40,1 g.

10 **[0061]** Procedimiento de purificación: la columna se cargó con la fracción obtenida por la segunda purificación después de lavar por solución acuosa de acetonitrilo con una concentración del 50 % o más y equilibrado, y la cantidad de carga fue de 40,1 g. Se obtuvo una fracción con pureza mayor del 98 % eluyendo con un gradiente lineal durante 30 min y recogiendo el pico objetivo. La fracción del pico objetivo recogida se concentró a aproximadamente 50 mg/ml por evaporación rotatoria a presión reducida a una temperatura no mayor de 35 °C, y después se liofilizó, produciendo 34,0 g de ingrediente farmacéutico activo liraglutida con una pureza del 98,2 % y un rendimiento global del 62,9 %.

15 **[0062]** Los métodos proporcionados por la presente invención para purificar crudo de liraglutida obtenida por síntesis en fase sólida se han descrito en detalle anteriormente. El fundamento y práctica de la presente invención se ilustraron por Ejemplos específicos anteriormente. La descripción de los Ejemplos se usa solamente para facilitar la comprensión de los métodos y conceptos clave de la presente invención.

20



## REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar crudo de liraglutida obtenido mediante síntesis en fase sólida, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
- 5 Etapa 1: se obtiene una solución de crudo de liraglutida disolviendo crudo de liraglutida obtenido mediante síntesis en fase sólida en solución acuosa de acetonitrilo;  
 Etapa 2: la solución de crudo de liraglutida se somete a una primera purificación por HPLC usando sílice unida a octilsilano como fase estacionaria y usando solución acuosa de isopropanol que contiene un 0,1-0,2 % de ácido trifluoroacético como fase móvil A y acetonitrilo que contiene un 0,1-0,2 % de ácido trifluoroacético como fase móvil B eluyendo a un gradiente lineal de un 20-40 % de B a un 40-60 % de B, y se recoge el pico objetivo como la primera fracción;
- 10 Etapa 3: la primera fracción se somete a una segunda purificación por HPLC usando sílice unida a cianosilano como fase estacionaria, y usando solución acuosa de ácido perclórico a un 0,05-0,15 % (concentración en masa) como fase móvil A y ácido perclórico a un 0,05-0,15 % (concentración en masa) en acetonitrilo como fase móvil B eluyendo a un gradiente lineal de un 40 % de B a un 70 % de B, y se recoge el pico objetivo como la segunda fracción;
- 15 Etapa 4: la segunda fracción se somete a una tercera purificación por HPLC usando sílice unida a octilsilano como fase estacionaria, y usando solución acuosa de amoníaco a un 0,01-0,06 % (concentración en masa) como fase móvil A y acetonitrilo de calidad cromatográfica como fase móvil B eluyendo a un gradiente lineal de un 30 % de B a un 60 % de B, y se recoge el pico objetivo como la tercera fracción;
- 20 Etapa 5: se obtiene péptido purificado de la tercera fracción por evaporación rotatoria a presión reducida y liofilización.
- 25 2. El método de purificación de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado **por que** la relación en volumen entre acetonitrilo y agua en la solución acuosa de acetonitrilo es de 10-30:70-90.
3. El método de purificación de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado **por que** la relación en volumen entre isopropanol y agua en la solución acuosa de isopropanol es de 15-35:65-85.
- 30 4. El método de purificación de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado **por que** el caudal para la primera, la segunda o la tercera purificación por HPLC en la etapa 2, 3 ó 4 es de 55-2000 ml/min.
5. El método de purificación de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado **por que** el caudal para la primera, la segunda o la tercera purificación por HPLC en la etapa 2, 3 ó 4 es de 55-500 ml/min.
- 35 6. El método de purificación de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado **por que** la duración de la elución en gradiente lineal en la etapa 2 ó 3 es de 40 min.
- 40 7. El método de purificación de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado **por que** la duración de la elución en gradiente lineal en la etapa 4 es de 30 min.
8. El método de purificación de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado **por que** la concentración después de la evaporación rotatoria a presión reducida en la etapa 5 es de 50-70 mg/ml.
- 45 9. El método de purificación de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado **por que** la síntesis en fase sólida se realiza de acuerdo con las siguientes etapas: en presencia de sistema de agente activador, acoplar la resina de soporte en fase sólida con glicina protegida con Fmoc N-terminal para obtener Fmoc-Gly-resina; de acuerdo con la secuencia estructural de liraglutida, acoplar secuencialmente los aminoácidos con protección por Fmoc N-terminal y protección de cadenas laterales usando el método de síntesis en fase sólida, con protección con Alloc para la cadena lateral de lisina; eliminar el grupo protector Alloc de la cadena lateral de lisina; acoplar palmitoil-Glu-OtBu a la cadena lateral de lisina por el método de síntesis en fase sólida; obtener crudo de liraglutida después de la escisión, y eliminación del grupo protector y la resina.
- 50