

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 961**

51 Int. Cl.:

**C07D 207/00** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2014 PCT/EP2014/055511**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14147129**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2014 E 14710918 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2976325**

54 Título: **Síntesis de productos de péptido que contienen imida cíclica**

30 Prioridad:

**21.03.2013 EP 13160380**

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

**18.07.2017**

73 Titular/es:

**SANOFI-AVENTIS DEUTSCHLAND GMBH  
(100.0%)  
Brüningstrasse 50  
65929 Frankfurt am Main, DE**

72 Inventor/es:

**HENKEL, BERND**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 624 961 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 productos de péptido que contienen imida cíclica

La presente invención se refiere a un método de síntesis de un producto de péptido que comprende al menos un grupo de imida cíclica. Además, la invención se refiere a un producto de péptido que comprende al menos un grupo de imida cíclica, que está sustancialmente libre de productos de degradación. El producto de péptido puede usarse como material de referencia para el control de calidad de péptidos farmacéuticos, particularmente para el control de calidad de agonistas de GLP-1 como péptidos de exendina.

Usando procesos de ADN recombinante y q-uímicos de síntesis en fase sólida muy conocidos, se han sintetizado varias proteínas y péptidos para uso farmacéutico. La producción de estas proteínas y péptidos, sin embargo, conduce frecuentemente a una multiplicidad de subproductos de síntesis no deseados. Esto es especialmente el caso cuando se producen por síntesis en fase sólida. Con un aumento en la longitud del péptido/proteína, que conduce a un aumento en las etapas de síntesis, estos subproductos pueden estar presentes en del 50 al 70 % del producto en bruto.

Los subproductos pueden incluir productos de péptido que contienen grupos de imida cíclica, por ejemplo aspartimidias o glutarimidias. Tales grupos de imida cíclica se generan durante o después de la síntesis en fase sólida, por ejemplo cuando se elimina un péptido del soporte de fase sólida o cuando se formula o almacena una composición de péptido (Alvarez-Gutierrez et al., *Tetrahed. Lett.* 41(5) (2000), 609-612; Geiger & Clarke, *J. Biol. Chem.* 262 (1987), 785-794; Hekman et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999), 763-772; Lindner & Helliger, *Exp. Gerontol.* 36 (2001), 1551-1563; Aswad et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (2000), 1129-1136; Ritz-Timme & Collins, *Ageing Res. Rev.* 1 (2002), 43-59; Mergler et al., *J. Pept. Sci.* 9 (2003), 36-46; Mergler et al., *J. Pept. Sci.* 9 (2003), 518-526; Mergler et al., *J. Pept. Sci.* 11 (2005), 650-657; Cebrian et al., *J. Pept. Res.* 62 (2003), 238-244; De Boni et al., *J. Chrom. A.* 1022 (2004), 95-102; y Houchin et al., *J. Contr. Release* 112 (2006), 111-119).

No se conoce una síntesis dirigida de productos de péptido que contienen grupos de imida cíclica. En el pasado, se han generado aspartimidias o glutarimidias por procedimientos de "degradación forzada", en los que un péptido que comprende los aminoácidos Asp o Asn se somete a condiciones de degradación, por ejemplo agitación a pH 4 o pH 8 durante uno a dos días, opcionalmente a una temperatura elevada de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 °C. Estos métodos, sin embargo, tienen la desventaja de que además de los productos deseados, se obtienen numerosos otros productos de degradación. Particularmente, el grupo de imida cíclica puede someterse a reacciones adicionales, por ejemplo racemización, formación de un péptido de isoaspartato, conversión de Asn a Asp, apertura de la aspartimida por reactivos nucleófilos, escisión del enlace peptídico, etc. Así, después de realizar una degradación forzada, frecuentemente es difícil purificar el producto de imida cíclica deseado de una mezcla compleja de compuestos peptídicos.

Con el fin de vencer estas dificultades que se producen en la fabricación y purificación de los productos de péptido de imida cíclica, los presentes inventores han desarrollado una síntesis dirigida para péptidos que contienen imida cíclica.

Este método se muestra a modo de ejemplo para el péptido lixisenatida (AVE0010), un agonista de GLP-1 que tiene una longitud de 44 aminoácidos de longitud. La secuencia de aminoácidos de la lixisenatida se muestra en SEQ ID NO: 1:

H-G-E-G-T-F-T-S-D-L-S-K-Q-M-E-E-E-A-V-R-L-F-I-E-W-L-K-N-G-G-P-S-S-  
G-A-P-P-S-K-K-K-K-K-NH<sub>2</sub>

La lixisenatida se produce por un proceso químico de síntesis en fase sólida.

Las aspartimidias pueden formarse a partir de secuencias de péptidos -Asn-X- o -Asp-X-, en las que X indica un resto de aminoácido adyacente al extremo C. En el primer caso, la ciclación implica la eliminación de amoníaco (NH<sub>3</sub>) y en el último caso la eliminación de agua (H<sub>2</sub>O). En la Figura 1 se ilustra la formación de aspartimidias en AVE0010, concretamente en la posición -Asn(28)-Gly(29)- y Asp(9)-Leu(10). Los productos resultantes se designan [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-AVE0010 y [Asn(28)-NH<sub>3</sub>]-AVE0010, respectivamente. En principio, la misma reacción produce la formación de glutarimidias a partir de los aminoácidos Gln o Glu.

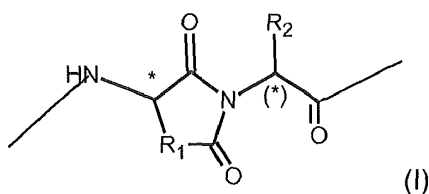
Los presentes inventores han encontrado ahora que es posible una síntesis dirigida de grupos de imida cíclica si se usa un elemento estructural de aminoácido con una cadena lateral de COOH o CONH<sub>2</sub> no protegida, por ejemplo Asp, Asn o Glu, Gln en la etapa de acoplamiento durante la síntesis de péptidos en posiciones predeterminadas donde se desea la formación de grupos de imida cíclica. En otras posiciones donde no se desee la formación de grupos de imida cíclica, pueden usarse los elementos estructurales de aminoácido con una cadena de COOH o CONH<sub>2</sub> protegida en la síntesis. Aumentando el tiempo de acoplamiento y la adición repetida de reactivos de acoplamiento, los grupos de imida cíclica pueden obtenerse en rendimiento casi cuantitativo. Así, la presente invención permite la formación selectiva de grupos de imida cíclica en posiciones predeterminadas de una secuencia

de péptidos sin afectar otras posiciones de la secuencia de péptidos potencialmente susceptibles a la formación de grupos de imida cíclica.

5 En la Figura 2 se muestra la formación de un grupo de aspartimida. Un elemento estructural de Asp protegido por amino (por ejemplo, por Fmoc) con una cadena lateral de carboxi no protegida se añade a un derivado de péptido unido a resina portadora con un grupo amino libre en presencia de reactivos de acoplamiento. La formación del grupo aspartimida se favorece aumentando el tiempo de acoplamiento a  $\geq 1$  día y adición repetida de reactivos de acoplamiento. Las otras etapas de síntesis de péptidos, es decir, etapas previas y/o posteriores, pueden llevarse a cabo bajo condiciones normales. Debe evitarse, sin embargo, usar piperidina para la escisión del grupo de protección Fmoc, debido a que esto puede conducir a una apertura del anillo de aspartimida.

10 El método de la presente invención permite una síntesis dirigida de productos de péptido de imida cíclica con alto rendimiento y pureza. Estos productos de péptido pueden usarse, por ejemplo, como materiales de referencia para el control de calidad de productos de péptido farmacéuticos tales como lixisenatida.

Una materia de la presente invención es un método de síntesis de un producto de péptido que comprende al menos un grupo de imida cíclica de fórmula (I) o una sal o solvato del mismo:



en la que

R<sub>1</sub> es un puente (o birradical) de uno o dos átomos de longitud,

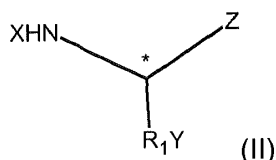
R<sub>2</sub> es una cadena lateral de aminoácido,

\* indica un átomo de C asimétrico, preferentemente en la configuración L, y

20 (\*) indica un átomo de C opcionalmente asimétrico, preferentemente en la configuración L,

que comprende las etapas:

(a) acoplar un elemento estructural de síntesis de fórmula (II):



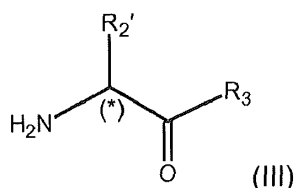
en la que

25 X es un grupo protector de amino lábil a bases,

Y es un grupo carboxi o carboxamido no protegido,

Z es un grupo carboxi, y

\* indica un átomo de C asimétrico, preferentemente en la configuración L, dando un producto de péptido de fórmula (III)



en la que

R<sub>2</sub>' es una cadena lateral de aminoácido opcionalmente protegida,

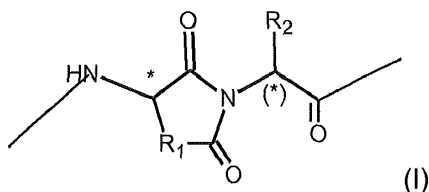
R<sub>3</sub> es un resto peptídico, preferentemente unido a un soporte en fase sólida, y

(\*) indica un átomo de C opcionalmente asimétrico, preferentemente en la configuración L,

en condiciones en las que el grupo de imida cíclica de fórmula (I) se forma y en las que las condiciones de acoplamiento comprenden un tiempo de reacción de al menos 12 h, una temperatura de entre 15 y 40 °C, adición repetida de reactivos de acoplamiento tal como TBTU o HBTU con DIPEA o HOBt/DIC y dimetilformamida (DMF) como disolvente orgánico

- 5 (b) escindir el grupo protector de amino X, en el que dicha etapa (b) no se lleva a cabo con piperidina como agente desprotector,
- (c) opcionalmente continuar la síntesis de péptidos, y
- (d) opcionalmente purificar el producto de péptido (I).

10 En el presente documento se describe un producto de péptido que comprende al menos un grupo de imida cíclica de fórmula (I) o una sal o solvato del mismo:



en la que

R<sub>1</sub> es un puente (o birradical) de uno o dos átomos de longitud,

15 R<sub>2</sub> es una cadena lateral de aminoácido,

\* indica un átomo de C asimétrico, y

(\*) indica un átomo de C opcionalmente asimétrico.

Particularmente, el producto de péptido es un agonista de GLP-1 tal como un péptido de exendina, más particularmente lixisenatida (AVE0010).

20 También se describe en el presente documento el uso de un producto de péptido de fórmula (I) o una sal o solvato del mismo como se ha descrito anteriormente como material de referencia para el control de calidad de péptidos farmacéuticos, particularmente de péptidos agonistas de GLP-1, tales como péptidos de exendina, por ejemplo lixisenatida.

25 También se describe en el presente documento un kit de reactivos para determinar la cantidad de impurezas en una composición de producto de lixisenatida (AVE0010) que comprende:

(i) al menos una preparación de reserva de [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-AVE0010 y/o

(ii) al menos una preparación de reserva de [Asn(28)-NH<sub>3</sub>]-AVE0010.

30 También se describe en el presente documento un método para el control de calidad de una composición que comprende un producto de péptido farmacéutico, particularmente un producto de péptido agonista de GLP-1, por ejemplo un producto de péptido de exendina, más particularmente un producto de lixisenatida (AVE0010), que comprende determinar cuantitativamente la cantidad de un producto de péptido con un grupo de imida cíclica de fórmula (I) o una sal o solvato del mismo en dicha composición.

35 La presente invención se refiere a un método de síntesis de un producto de péptido. El término "producto de péptido" engloba péptidos y proteínas que tienen una longitud de al menos 5 o al menos 10 aminoácidos y hasta 50 o hasta 100 aminoácidos o incluso más largo. El producto de péptido puede consistir en elementos estructurales de aminoácido genéticamente codificados o puede comprender elementos estructurales de aminoácido no genéticamente codificados, por ejemplo aminoácidos que no existen de forma natural, D-aminoácidos o aminoácidos químicamente modificados, o puede consistir en varias cadenas de péptido unidas, por ejemplo, por puentes disulfuro. El producto de péptido puede contener además modificaciones en el extremo N y/o C y/o en cadenas laterales, por ejemplo una acilación, una amidación o la adición de grupos de cadena lateral no de péptido tales como grupos lipófilos. El producto de péptido puede ser lineal o circular. Preferentemente, el producto de péptido tiene una longitud de 5-100 aminoácidos.

45 El producto de péptido puede estar en forma de una sal, por ejemplo una sal farmacéuticamente aceptable o solvato, por ejemplo un hidrato. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, (20th ed.) ed. A.R. Gennaro A.R., 2000, Lippencott Williams & Wilkins o en Handbook of

Pharmaceutical Salts, Properties, Selection and Use, e.d. P.H. Stahl, C.G. Wermuth, 2002, publicado conjuntamente por Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich, Suiza, y Wiley-VCH, Weinheim, Alemania. Preferentemente, la sal es una sal de trifluoroacetato o de acetato.

5 El producto de péptido comprende al menos un resto de aminoácido capaz de formar un grupo de imida cíclica de fórmula (I), particularmente un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral con un grupo carboxi o carboxiamida tal como Asp, Asn, Glu o Gln, localizado en el extremo N con respecto a un resto de aminoácido con un átomo de N en la cadena de péptido accesible para el ciclado. El resto de aminoácido localizado en el extremo C puede seleccionarse, por ejemplo, de Gly, Leu, His, Asp, Arg, Phe, Ala, Cys, Gln, Glu, Lys, Met, Asn, Ser, Tyr, Thr, Ile, Trp en su configuración D o L y aminoácidos no naturales (por ejemplo, no genéticamente codificados), que se  
10 enumeran, por ejemplo, en catálogos de proveedores.

Preferentemente, el producto de péptido que se ha sintetizado según la presente invención comprende al menos un grupo de imida cíclica de fórmula (I) y al menos un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral con un grupo carboxi o carboxiamida tal como Asp, Asn, Glu o Gln, que no está presente como grupo de imida cíclica.

15 La síntesis del producto de péptido se lleva a cabo por procedimientos de síntesis química, particularmente por un procedimiento de síntesis en fase sólida que es muy conocido en la técnica, por ejemplo un procedimiento que implica un acoplamiento escalonado de elementos estructurales de síntesis a una cadena de péptido unida a un soporte, por ejemplo una resina sintética. En una realización preferida de la invención, el producto de péptido es un péptido agonista de GLP-1, tal como un péptido de exendina, por ejemplo exendina-4, liraglutida o lixisenatida (AVE0010) o agonista de receptor de GLP-1 como GLP-1 o -2, oxintomodulina, glucagón o péptidos que se unen y  
20 activan tanto el receptor de glucagón como de GLP-1 (Hjort et al., Journal of Biological Chemistry, 269, 30121-30124, 1994; Day JW et al., Nature Chem. Biol. 5:749-757, 2009) y suprimen el aumento de peso corporal y reducen el consumo de alimentos que se describe en las solicitudes de patente WO 2008/071972, WO 2008/101017, WO 2009/155258, WO 2010/096052, WO 2010/096142, WO 2011/075393, WO 2008/152403, WO 2010/070251, WO 2010/070252, WO 2010/070253, WO 2010/070255, WO 2011/160630, WO 2011/006497, US 2011 /152181, US  
25 2011/152182, WO 2011/117415, WO 2011/117416, o GIP y péptidos que se unen y activan tanto el receptor de GIP como de GLP-1 y opcionalmente el receptor de glucagón, y mejoran el control glucémico, suprimen el aumento de peso corporal y reducen el consumo de alimentos como se describe en las solicitudes de patente WO 2011/119657, WO 2012/138941, WO 2010/011439, WO 2010/148089, WO 2011/094337 y WO 2012/088116. Ejemplos adicionales de productos de péptido son insulinas y análogos de insulina o inhibidores de DPP-4. Más preferentemente, el  
30 producto de péptido es un péptido de exendina, lo más preferentemente lixisenatida (AVE0010).

La etapa (a) del método de la invención comprende acoplar un elemento estructural de ácido de síntesis de fórmula (II) a un producto de péptido de fórmula (III). El elemento estructural (II) comprende un grupo Z, en el que Z es un grupo carboxi capaz de acoplarse a un grupo amino bajo condiciones de acoplamiento, es decir, en presencia de reactivos de acoplamiento en un disolvente orgánico. Además, el elemento estructural de aminoácido (II) comprende  
35 una cadena lateral R<sub>1</sub>Y, en la que R<sub>1</sub> es un birradical o puente que tiene una longitud de uno a dos átomos, preferentemente un grupo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>, más preferentemente un grupo -CH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-. Y es un grupo carboxi o carboxamido no protegido. El elemento estructural (II) también tiene un grupo amino NHX protegido, en el que X es un grupo fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) u otro grupo protector lábil a bases.

40 El elemento estructural (II) tiene además un átomo de carbono asimétrico indicado por \*. Preferentemente, el átomo de carbono asimétrico está en la configuración L.

El producto de péptido (III), que puede ser un producto intermedio de la síntesis de péptidos, tiene un grupo amino libre capaz de reaccionar con el grupo Z del elemento estructural de síntesis (II) bajo condiciones de acoplamiento, es decir, en presencia de reactivos de acoplamiento en un disolvente orgánico. El producto de péptido intermedio comprende un elemento estructural de aminoácido del extremo N con una cadena lateral de aminoácido  
45 opcionalmente protegida R<sub>2</sub> y un resto R<sub>3</sub> peptídico constituido por uno o más aminoácidos. El resto peptídico está preferentemente unido a un soporte de fase sólida, por ejemplo una resina adecuada para la síntesis de péptidos. El producto de péptido (III) también puede contener un átomo de carbono asimétrico indicado como (\*) cuando R<sub>2</sub> es diferente de H. Preferentemente, el átomo de carbono asimétrico está en la configuración L.

50 Las condiciones de acoplamiento en la etapa (a) comprenden un tiempo de reacción de al menos 12 h, 16 h o 24 h y hasta 48 h, 72 h o 96 h. Además, las condiciones de acoplamiento comprenden una temperatura de reacción entre 15 y 40 °C. La reacción de acoplamiento se lleva a cabo en presencia de un reactivo de acoplamiento tal como TBTU (tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio, HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il),1,1,3,3-tetrametiluronio) o HOBt (1-hidroxibenzotriazol)/DIC (diisopropilcarbodiimida) y una base orgánica tal como DIPEA (diisopropiletilamina) en DMF (dimetilformamida), u otros reactivos de acoplamiento. Por  
55 ejemplo, pueden emplearse los reactivos de acoplamiento nombrados en A. El-Faham, F. Albericio, Chem. Rev. 2011, 111, 6557-6602.

Preferentemente, la etapa de acoplamiento se lleva a cabo en condiciones en las que el rendimiento del producto de imida cíclica es  $\geq 50\%$ ,  $\geq 60\%$ ,  $\geq 70\%$ ,  $\geq 80\%$  o  $\geq 90\%$  basado en la cantidad de rendimiento total en la etapa de

acoplamiento (a), es decir, la cantidad de elemento estructural de aminoácido (II) acoplada al producto de péptido intermedio (III).

5 La etapa (b) del método inventivo comprende escindir el grupo protector de amino X después de la etapa de acoplamiento en presencia de un agente desprotector tal como DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno). Agentes desprotectores adecuados adicionales se mencionan en Green's Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 4ª ed. 2006, Capítulo 7, Protección del grupo amino, mencionado en Protecting Groups, P.J. Kocierski, Thieme, 3ª ed. 2005, Capítulo 8, Grupos protectores de amino o mencionado en Houben-Weyl, Methods in Organic Chemistry, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, 4ª ed. 2001, Capítulo 2, Protección de grupos funcionales. La piperidina no se usa como agente desprotector ya que produce una apertura de anillo del grupo de imida cíclica.

10 La etapa (c) opcional comprende continuar la síntesis del producto de péptido después de la formación del grupo de imida cíclica. La síntesis puede continuarse bajo condiciones normales, excepto que la piperidina no se usa como agente desprotector.

15 La etapa (c) también puede comprender desproteger los grupos de aminoácido protegidos de cadena lateral y escindir el péptido del soporte de fase sólida. Estos procedimientos pueden llevarse a cabo bajo condiciones normales, como se conoce en la técnica.

20 La etapa (d) opcional comprende purificar el producto de péptido (I) de otros péptidos obtenidos en el procedimiento de síntesis de péptidos. Preferentemente, la purificación implica un procedimiento cromatográfico. El término "*procedimiento cromatográfico*" implica un procedimiento cromatográfico adecuadamente para la purificación de productos de péptido, que incluye, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, y particularmente cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y más particularmente HPLC de fase inversa, o combinaciones de varios procedimientos. Más preferentemente, el procedimiento cromatográfico implica al menos una etapa de cromatografía de HPLC de fase inversa.

25 Como resultado del método de síntesis inventivo, puede obtenerse un producto de péptido aislado y purificado que comprende un grupo de imida cíclica de fórmula (I). Preferentemente, este producto de péptido está sustancialmente libre de productos de degradación, por ejemplo productos de desamidación, productos racemizados y/o productos que contienen isoasparagina. Preferentemente, la cantidad de productos de degradación es inferior al 1 %, 0,5 % o 0,1 % basado en la cantidad del producto total como se mide por medio de cromatografía, por ejemplo HPLC.

30 El producto de péptido comprende al menos un grupo de imida cíclica, por ejemplo 1, 2 o 3 grupos de imida cíclica. Preferentemente, el producto de péptido comprende uno o dos grupos de imida cíclica. Más preferentemente, el producto de péptido comprende uno o más grupos de imida cíclica sin ciclar.

35 El producto de péptido es preferentemente un péptido terapéutico, por ejemplo un péptido de exendina, particularmente lixisenatida (AVE0010) que tiene al menos un grupo de imida cíclica. Ejemplos específicos de productos de péptido preferidos son [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-AVE0010, [Asn(28)-NH<sub>3</sub>]-AVE0010, [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-exendina-4, [Asn(28)-NH<sub>3</sub>]-exendina-4, [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-liraglutida, [Asp(16)-H<sub>2</sub>O]-GLP-1(7-36), [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-glucagón, [Asp(15)-H<sub>2</sub>O]-glucagón, [Asp(21)-H<sub>2</sub>O]-glucagón, [Asn(28)-NH<sub>3</sub>]-glucagón, [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-oxintomodulina, [Asp(15)-H<sub>2</sub>O]-oxintomodulina, [Asp(21)-H<sub>2</sub>O]-oxintomodulina, [Asn(28)-NH<sub>3</sub>]-oxintomodulina, [Asn(32)-NH<sub>3</sub>]-oxintomodulina, [Asn(34)-NH<sub>3</sub>]-oxintomodulina, [Asn(35)-NH<sub>3</sub>]-oxintomodulina y todos los péptidos con el motivo -Asn-X- y -Asp-X- que se unen y activan tanto el receptor de glucagón como de GLP-1 (Hjort et al., Journal of Biological Chemistry, 269, 30121-30124, 1994; Day JW et al., Nature Chem Biol, 5:749-757, 2009) y suprimen el aumento de peso corporal y reducen el consumo de alimentos que se describe en las solicitudes de patente WO 2008/071972, WO 2008/101017, WO 2009/155258, WO 2010/096052, WO 2010/096142, WO 2011/075393, WO 2008/152403, WO 2010/070251, WO 2010/070252, WO 2010/070253, WO 2010/070255, WO 2011/160630, WO 2011/006497, US 2011/152181, US 2011/152182, WO 2011/117415, WO 2011/117416, o GIP y péptidos que se unen y activan tanto el receptor de GIP como de GLP-1 y opcionalmente el receptor de glucagón, y mejoran el control glucémico, suprimen el aumento de peso corporal y reducen el consumo de alimentos como se describe en las solicitudes de patente WO 2011/119657, WO 2012/138941, WO 2010/011439, WO 2010/148089, WO 2011/094337 y WO 2012/088116.

40 El producto de péptido puede usarse como material de referencia, por ejemplo para el control de calidad de péptidos farmacéuticos, particularmente para su uso en un método de control de calidad en el que la cantidad de subproductos que contienen grupo de imida cíclica no deseado en una preparación de producto de péptido se determina cuantitativamente.

45 La determinación cuantitativa de los subproductos en una muestra de producto de péptido implica preferentemente espectrometría de masas. Además de espectrometría de masas, la determinación puede implicar un procedimiento cromatográfico previo, por ejemplo con el fin de separar otras impurezas del producto de péptido o de otros componentes de la composición. Preferentemente, la espectrometría de masas se combina con HPLC.

55 La espectrometría de masas se basa en una medición de la relación de masa con respecto a carga de partículas cargadas. En un procedimiento de espectrometría de masas típico, la muestra se carga en el instrumento de

espectrometría de masas y se volatiliza. Los componentes de muestra se ionizan y los iones resultantes se separan en el analizador de masas por campos electromagnéticos. Los iones resultantes se detectan y la señal se procesa en un espectro de masas. Para la ionización de productos de péptido, puede usarse ionización por electropulverización (ESI) y desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI). Los iones resultantes pueden detectarse por métodos altamente sensibles tales como Orbitrap o sistemas de detección de resonancia ciclotrónica de iones (ICR) por transformada de Fourier (FT).

Por medio de espectrometría de masas, puede identificarse un pico derivado de un subproducto que contiene grupo de imida cíclica, que se diferencia de la masa del producto no ciclado 18 (masa de H<sub>2</sub>O) o 17 (masa de NH<sub>3</sub>).

Además, la presente invención debe explicarse en más detalle por los siguientes ejemplos que describen la síntesis, purificación cromatográfica y caracterización analítica del péptido que contiene grupo de imida cíclica [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-AVE0010.

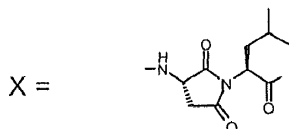
## Ejemplos

### 1. Síntesis de [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-AVE0010

[Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-AVE0010 es un subproducto en la síntesis del producto de péptido farmacéutico AVE0010. Se genera cuando la cadena lateral de aminoácido Asp(9) forma una aspartimida con el átomo de N del aminoácido adyacente Leu(10) con eliminación de agua.

La secuencia de aminoácidos de [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-AVE0010 es la siguiente:

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-X-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-NH<sub>2</sub>



La síntesis de péptidos se llevó a cabo con el sintetizador de péptidos Bio536 (CS Bio). Como material de partida, se usó resina (20-44)-AVE0010 protegida con Fmoc en el extremo N. El material de partida se preparó por síntesis de péptidos en condiciones normales.

Se mezclaron 25,56 g de resina Fmoc-(20-44)-AVE0010 con 250 ml de DMF, se agitó durante 5 minutos y entonces se hinchó durante 2 horas. Entonces se aspiró DMF a través de una frita. Después del hinchamiento, se llevó a cabo escisión de Fmoc con 25 % de piperidina en DMF.

Entonces, se acoplaron los aminoácidos Val(19) a Leu(10) al material de partida en condiciones normales usando derivados de aminoácido con un grupo amino protegido con Fmoc y una cadena lateral protegida, por ejemplo una cadena lateral de Glu protegida con O-t-butilo (OtBu), una cadena lateral de Gln protegida con tritilo (Trt), una cadena lateral de Lys protegida con butiloxicarbonilo (Boc) y una cadena lateral de Ser protegida con t-butilo (tBu).

Entonces, se acopló un elemento estructural de Fmoc-Asp-OH (sin grupo de protección de la cadena lateral) en condiciones que favorecen la formación de un grupo aspartimida.

Se mezclaron 4,26 g de Fmoc-Asp-OH, 1,9 g de hidrato de HOBT y 2 ml de DIC en 250 ml de DMF con la resina. La mezcla de reacción se agitó durante la noche. Entonces se bombeó la disolución de acoplamiento y la resina se lavó dos veces con DMF. Entonces, se mezclaron 3 eq de HOBT y 3 eq de DIC en DMF con la resina. La resina se agitó durante el fin de semana.

Para determinar el grado de formación de aspartimida, se trató una muestra de resina con una mezcla de escisión llamada mezcla de King (D.S. King, C.G. Fields, G.B. Fields, Int. J. Peptide Protein Res. 36, 1990, 255-266) para liberar el péptido que contenía la aspartimida de la resina. Por medio de mediciones de espectrometría de masas, se encontró que el producto de acoplamiento estaba principalmente presente en forma de una aspartimida cíclica.

Posteriormente, se usó una disolución de 2 % de DBU en DMF para la escisión de Fmoc.

Finalmente, los aminoácidos Ser(8) a Gly(1) se acoplaron bajo condiciones normales, excepto que el grupo de protección de Fmoc no se escindió con piperidina, sino con DBU, con el fin de prevenir una apertura del grupo de aspartimida cíclico. Como resultado, se obtuvieron 30,5 g de [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-AVE0010 sobre la resina.

La escisión de péptido de la resina y el grupo de protección de cadena lateral se llevaron a cabo con mezcla de King. Resultaron 9,25 g de producto bruto (pureza del 23,4 % como se mide por UV a 215 nm) a partir de 30,5 g de resina protegida con Fmoc después de la síntesis en fase sólida.

5 La escisión del péptido de la resina se llevó a cabo bajo condiciones normales (King et al., 1990, arriba). En total, se obtuvieron 9,25 g de [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-AVE0010 en bruto después de secar a vacío.

## 2. Purificación cromatográfica de [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-AVE0010

10 La purificación se llevó a cabo por dos etapas de RP-HPLC y posterior liofilización. Las etapas de RP-HPLC se realizaron con un dispositivo Varian PrepStar. Se usaron columnas de acero inoxidable cargadas con material de fase inversa C18 (por ejemplo, Daisogel C18 para la primera etapa o Hydrospher C18 para la segunda etapa) como fase estacionaria. Se usaron H<sub>2</sub>O + 0,1 % de ácido trifluoroacético como fase móvil A y acetonitrilo como fase móvil B. El gradiente se llevó a cabo al 0-80 % de fase móvil B (Daisogel) y 0-35 % de fase móvil B (Hydrospher), respectivamente.

Como resultado, se obtuvieron 540 mg de [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-AVE0010 con una pureza del 91,50 % (% de área como se mide por HPLC). Se muestra un cromatograma analítico del producto purificado en la Figura 3.

## 15 3. Caracterización analítica

El producto purificado se caracterizó por espectrometría de masas. Se usó AVE0010 purificado como patrón de referencia.

20 Esta caracterización analítica mostró el producto correcto [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-AVE0010 con un peso molecular (M+H)<sup>+</sup> = 4838,460, y el patrón de AVE0010 de 4856,544. La diferencia de masa de [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-AVE0010 con respecto a AVE0010 es 18,084 que es igual a una molécula de H<sub>2</sub>O. El peso molecular monoisotópico teórico de [Asp(9)-H<sub>2</sub>O]-AVE0010 es 4837,534.

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Sanofi-Aventis Deutschland GmbH

25 <120> Síntesis de productos de péptido que contienen imida cíclica

<130> 55130P EP

<160> 1

30

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 44

35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Agonista de GLP-1 de lixisenatida

40

<400> 1



ES 2 624 961 T3

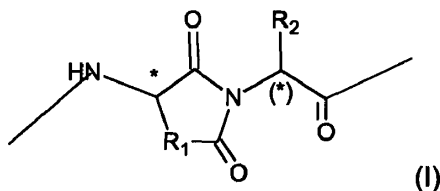
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys  
35 40

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de síntesis de un producto de péptido que comprende al menos un grupo de imida cíclica de fórmula (I) o una sal o solvato del mismo:



5 en la que

R<sub>1</sub> es un puente de uno o dos átomos de longitud,

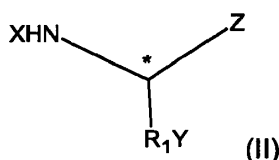
R<sub>2</sub> es un aminoácido cadena lateral,

\* indica un átomo de C asimétrico, y

(\* ) indica un átomo de C opcionalmente asimétrico,

10 que comprende las etapas:

(a) acoplar un elemento estructural de síntesis de fórmula (II):



en la que

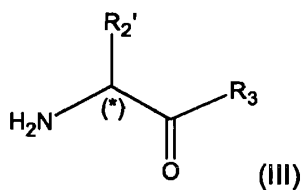
X es un grupo protector de amino lábil a bases,

15 Y es un grupo carboxi o carboxamido sin proteger,

\* indica un átomo de C asimétrico, y

Z es un grupo carboxi,

a un producto de péptido de fórmula (III)



20 en la que

R<sub>2</sub>' es una cadena lateral de aminoácido opcionalmente protegida,

R<sub>3</sub> es un resto peptídico, y

(\* ) indica un átomo de C opcionalmente asimétrico

25 en condiciones en las que el grupo de imida cíclica de fórmula (I) se forma y en las que las condiciones de acoplamiento comprenden un tiempo de reacción de al menos 12 h, una temperatura de entre 15 y 40 °C, adición repetida de reactivos de acoplamiento tales como TBTU o HBTU con DIPEA o HOBt/DIC y dimetilformamida (DMF) como disolvente orgánico

(b) escindir el grupo protector de amino X, en el que dicha etapa (b) no se lleva a cabo con piperidina como agente desprotector,

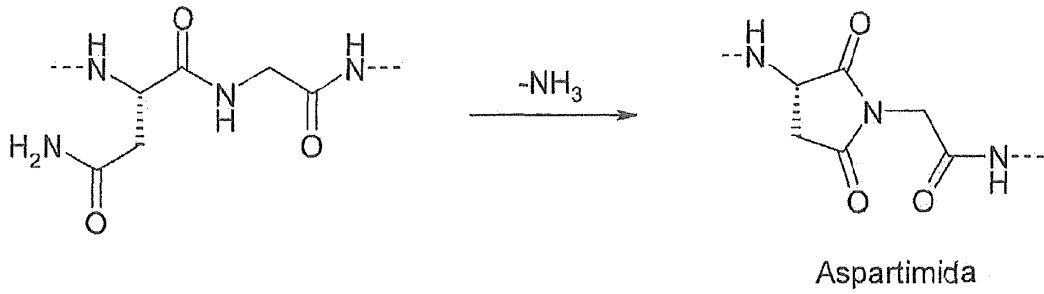
30 (c) opcionalmente continuar la síntesis de péptidos, y

(d) opcionalmente purificar el producto de péptido (I).

2. El método de la reivindicación 1, en el que  $R_1$  es  $-CH_2-$ .
3. El método de la reivindicación 1, en el que  $R_1$  es  $-CH_2-CH_2-$ .
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que Y es un grupo carboxi.
- 5 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que Y es un grupo carboxamido.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que X es un grupo protector de amino Fmoc.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la etapa de acoplamiento (a) se lleva a cabo en resina.
- 10 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el rendimiento de un producto de imida cíclica en la etapa de acoplamiento (a) es  $\geq 50\%$ ,  $\geq 60\%$ ,  $\geq 70\%$ ,  $\geq 80\%$  o  $\geq 90\%$  basado en la cantidad de rendimiento total de un producto de acoplamiento en la etapa (a).
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la etapa de escisión (b) se lleva a cabo con el agente desprotector 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU).
- 15 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el grupo de imida cíclica de fórmula (I) se introduce selectivamente en al menos una posición predeterminada del producto de péptido.

Figura 1

-Asn(28)-Gly(29)- en AVE0010



-Asp(9)-Leu(10)- en AVE0010

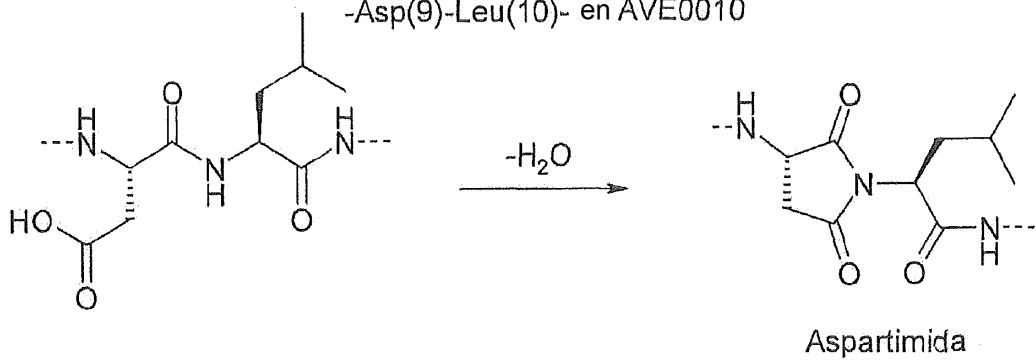


Figura 2

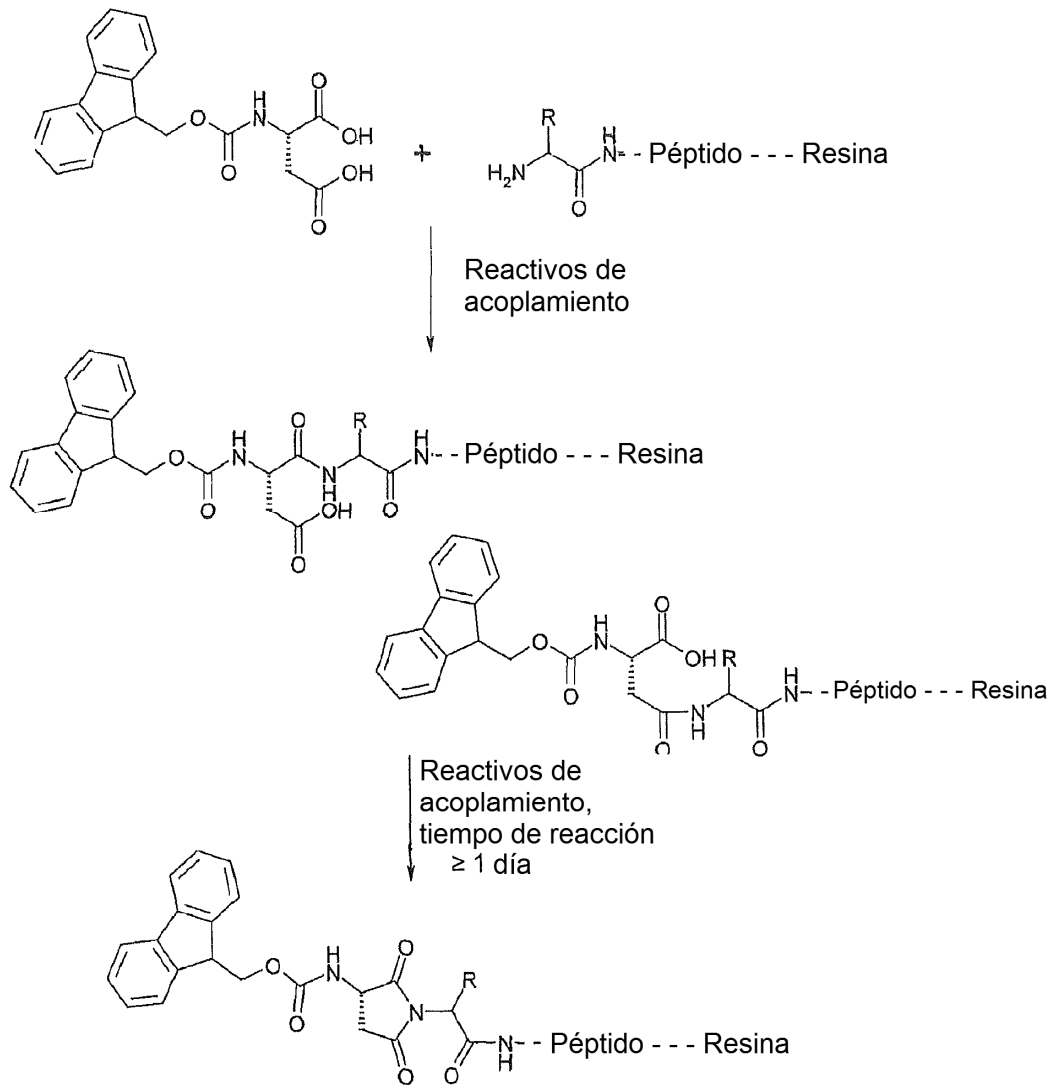


Figura 3

