

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 678**

51 Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)

C07K 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2016 PCT/CN2016/110373**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.07.2017 WO17114191**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2016 E 16880981 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3398960**

54 Título: **Método para preparar semaglutida**

30 Prioridad:

30.12.2015 CN 201511027176

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

05.03.2021

73 Titular/es:

**HYBIO PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
4th Flour of Office Building, Hybrio Medicine
Park, Shenzhen Hi-tech Industrial Park, Nanshan
District
Shenzhen, Guangdong 518057, CN**

72 Inventor/es:

**CHEN, XINLIANG;
MI, PENGCHENG;
TAO, ANJIN y
YUAN, JIANCHENG**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 809 678 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

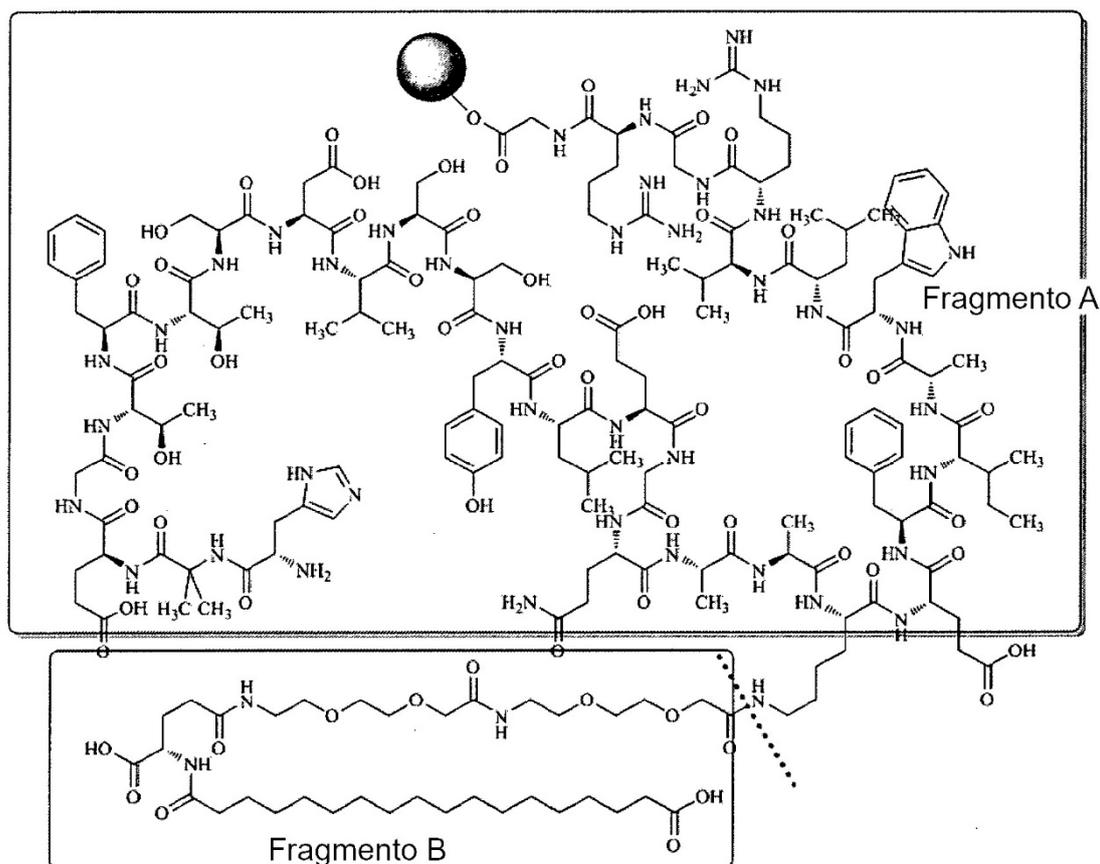
Método para preparar semaglutida

5 Campo

La presente invención se refiere al campo técnico de polipéptidos, y en particular, a un método para preparar semaglutida.

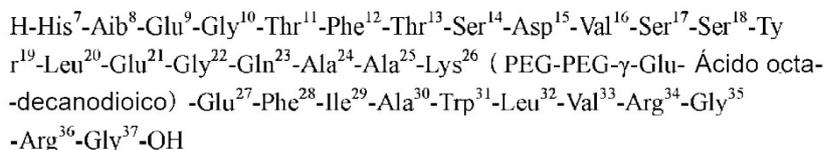
10 Antecedentes

La semaglutida tiene una estructura química de fórmula I:



Fórmula I

15 La semaglutida es un análogo de GLP-1 de acción prolongada desarrollado por Novo Nordisk, que solo requiere inyección subcutánea una vez a la semana y está todavía en fase clínica III actualmente. Tal como puede observarse a partir de la estructura de semaglutida, una cadena alifática de ácido octadecanoico, ácido glutámico y PEG va a injertarse en Lys en la posición 26 y un aminoácido no natural ácido aminoisobutírico se ubica en la posición 8 de la misma. En comparación con liraglutida, la semaglutida tiene una cadena alifática más larga e hidrofobicidad aumentada, pero una hidrofiliidad potenciada en gran medida por la modificación de PEG de cadena corta. Mediante la modificación de PEG, no solo la albúmina está estrechamente unida y el sitio de hidrólisis para la enzima DPP-4 está enmascarado, sino que también la excreción renal se reduce, la semivida biológica se prolonga y se logra un efecto prolongado en la circulación. La secuencia peptídica (SEQ ID NO:1) tiene una estructura de:



En la técnica anterior (por ejemplo, documentos CN 103848910-A, WO 2014/202727 o CN 104356224-A), se

proporciona un método para sintetizar semaglutida mediante acoplamiento secuencial usando síntesis en fase sólida de Fmoc para obtener la molécula de polipéptido diana. En esta patente, se indica que Lys en la posición 26 está protegida ortogonalmente con grupos protectores Dde, ivDde, Mmt y Mtt, y luego se realiza acoplamiento secuencial en la cadena lateral de la misma. Se menciona en la patente que puede seleccionarse un dipéptido de pseudoprolina para la sustitución de Ser y Thr.

La técnica anterior también describe un método de síntesis usando acoplamiento uno a uno secuencial en fase sólida de Fmoc, en el que se selecciona un grupo protector de Mmt, Mtt, Dde o ivDde para la protección ortogonal temporal cuando se acopla un aminoácido a la cadena lateral de la lisina, y luego se selecciona un determinado método para eliminar los grupos protectores, permitiendo el acoplamiento en la cadena lateral en secuencia. La resina se escinde con un agente de escisión y se obtienen péptidos en bruto mediante precipitación con dietil éter, y se obtienen péptidos en bruto mediante RP-HPLC.

Los métodos notificados actualmente tienen todas algunas deficiencias cuando se protege Lys con Mmt, Mtt, Dde o ivDde. Se requiere en la desprotección de Lys protegida con grupos protectores de Mmt y Mtt que se use una disolución de TFA débilmente ácida y se añada un agente de atrapamiento, lo que tiene que repetirse muchas veces. Se menciona en la patente que se requiere que el tratamiento se repita 6-12 veces durante 5-10 min cada vez en el experimento para eliminar Mmt y Mtt. Muchos procedimientos repetidos pueden afectar a otros agentes protectores que son susceptibles a ácido, tales como Trt, tBu, Boc, etc., y pueden dar como resultado reacciones secundarias. Los grupos protectores de Mmt y Mtt son más difíciles de eliminar, y por tanto es más difícil garantizar la eliminación completa de los grupos protectores durante la producción aumentada a escala. Además, 6-12 procedimientos repetidos hacen que el procedimiento experimental sea engorroso. Cuando se usa 2-CTC (resina de cloruro de 2-tritilo) como portador de reacción, se usa un ácido débil, lo que provoca muy fácilmente que el ligador se desprenda y el fragmento de polipéptido se escinda, conduciendo a un rendimiento final enormemente reducido, un aumento en el coste de producción y una disminución en la eficiencia económica. La desprotección de Lys protegida con grupos protectores de Dde o ivDde requiere el uso de una disolución de hidrazina, que tiene una fuerte capacidad de reducción, y experimenta fácilmente una reacción secundaria con un grupo oxidante. Además, la hidrazina tiene una naturaleza activa, y por tanto peligrosa en el almacenamiento y transporte, y potencialmente insegura en el procedimiento de producción aumentada a escala.

Sumario

En vista de esto, la presente invención proporciona un método para preparar semaglutida. En la presente invención, se usa un aminoácido protegido, Fmoc-Lys(Alloc)-OH como material de partida, y se selecciona Pd(PPh₃)₄ para la desprotección. Por un lado, el procedimiento de funcionamiento es simple, y solo se requieren simplemente 1-2 reacciones de eliminación durante 10-30 min cada vez, no produciéndose por tanto una reacción secundaria, haciendo que tenga un funcionamiento seguro y haciendo que sea conveniente para la producción aumentada a escala. En el procedimiento, se usan Boc-His(Boc)-OH.DCHA y Boc-His(Trt)-OH como materiales de partida, lo que puede minimizar el riesgo de racemización de His. Además, la eficiencia de síntesis aumenta usando un fragmento especial para el acoplamiento.

Con el fin de lograr los objetos anteriores de la presente invención, se proporcionan las siguientes soluciones técnicas:

La presente invención proporciona un método de preparación de semaglutida, que comprende las etapas de:

etapa 1: acoplar Gly a una resina mediante síntesis en fase sólida para obtener Gly-resina; y

etapa 2: acoplar sucesivamente la Gly-resina preparada en la etapa 1 a un aminoácido según la secuencia de la semaglutida mediante acoplamiento secuencial; escisión y purificación;

en el que se usa Fmoc-Lys(Alloc)-OH como material de partida de Lys²⁶;

se sintetiza H-His⁷ usando Boc-His(Trt)-OH o Boc-His(Boc)-OH.DCHA como material de partida; y

la cadena lateral de Lys²⁶ se prepara mediante acoplamiento secuencial o síntesis fragmentaria.

En algunas realizaciones particulares de la presente invención, se prepara el fragmento completamente protegido de Fmoc-PEG-PEG- γ -Glu-ácido octadecanodioico usado en la síntesis fragmentaria de la cadena lateral de Lys²⁶ en el método de preparación acoplando sucesivamente una resina de cloruro a Fmoc-PEG-OH, Fmoc-PEG-OH, Fmoc-Glu(OH)-OtBu y éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico, escindiendo y recristalizando para obtener PEG-PEG- γ -Glu-éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico.

En algunas realizaciones particulares de la presente invención, la resina en la etapa 1 del método de preparación se elige de resina de Wang o resina de 2-CTC.

La resina de Wang tiene un grado de sustitución de 0,1-0,5 mmol/g, preferiblemente 0,25-0,35 mmol/g.

La resina de 2-CTC tiene un grado de sustitución de 0,2-0,6 mmol/g, preferiblemente 0,25-0,45 mmol/g.

La resina de Wang se acopla mediante DIC+A+DMAP, en donde A es HOBt o HOAt.

La resina de 2-CTC se acopla mediante un método de DIPEA.

En algunas realizaciones particulares de la presente invención, el acoplamiento en la etapa 2 del método de preparación se realiza mediante condensación con DIC+A o B+A+C hasta que se detecta que la resina es transparente con ninhidrina, en donde A se elige de HOBt o HOAt, B se elige de HBTU, HATU, TBTU, PyAOP o PyBOP, C se elige de DIPEA o TMP; y el disolvente se elige de uno o una mezcla de dos o más de DMF, CH₂Cl₂, NMP o DMSO.

En algunas realizaciones particulares de la presente invención, el acoplamiento en la síntesis fragmentaria de la cadena lateral de Lys²⁶ en el método de preparación se realiza mediante condensación con DIC+A o B+A+C hasta que se detecta que la resina es transparente con ninhidrina, en donde A se elige de HOBt o HOAt, B se elige de HBTU, HATU, TBTU, PyAOP o PyBOP, C se elige de DIPEA o TMP; y el disolvente se elige de uno o una mezcla de dos o más de DMF, CH₂Cl₂, NMP o DMSO.

En algunas realizaciones particulares de la presente invención, la escisión en la síntesis fragmentaria de la cadena lateral de Lys²⁶ en el método de preparación se realiza con TFA al 1-2%/CH₂Cl₂ (V/V) o TFE al 20%/CH₂Cl₂ (V/V).

En algunas realizaciones particulares de la presente invención, la recristalización en la síntesis fragmentaria de la cadena lateral de Lys²⁶ en el método de preparación se realiza con uno o una mezcla de dos o más de Et₂O, CH₂Cl₂, CHCl₃, MeOH, CH₃CN, THF, EtOAc, EtOH, tolueno, hexano o acetona, preferiblemente un disolvente mixto de MeOH y CH₂Cl₂.

En algunas realizaciones particulares de la presente invención, Alloc en la Fmoc-Lys(Alloc)-OH en el método de preparación se elimina dos veces con 5-10 equivalentes de morfolina (o 5-10 equivalentes de fenilsilano como alternativa del mismo) y 0,1-0,3 equivalentes de Pd(PPh₃)₄ durante 10-30 min cada vez, en donde se usa CH₂Cl₂ como disolvente en la eliminación.

En algunas realizaciones particulares de la presente invención, en el método de preparación, para Boc-His(Trt)-OH, el acoplamiento se realiza mediante un sistema de B+A+C; y para Boc-His(Boc)-OH.DCHA, el acoplamiento se realiza mediante un sistema de HOAT + HATU + TMP; en donde A se elige de HOBt o HOAt, B se elige de HBTU, HATU, TBTU, PyAOP o PyBOP, C se elige de DIPEA o TMP; y el disolvente se elige de uno o una mezcla de dos o más de DMF, CH₂Cl₂, NMP o DMSO.

En algunas realizaciones particulares de la presente invención, la escisión en la etapa 2 del método de preparación se realiza con un reactivo, que comprende uno o una mezcla de dos o más de TFA, PhSMe, PhOMe, EDT, H₂O, TIS o PhOH; en donde TFA, PhSMe, PhOMe, EDT, H₂O, TIS y PhOH están en una razón en volumen de 80-90:0-5:0-3:0-5:0-5:0-2:0-5, prefiriéndose TFA:PhSMe:PhOH:EDT:H₂O = 85:5:3:5:2.

En la presente invención, se usa un aminoácido protegido, Fmoc-Lys(Alloc)-OH como material de partida, y se selecciona Pd(PPh₃)₄ para la desprotección. Por un lado, el procedimiento de funcionamiento es simple, y solo se requieren simplemente 1-2 reacciones de eliminación durante 10-30 min cada vez, no produciéndose por tanto una reacción secundaria, haciendo que su funcionamiento sea seguro y haciendo que sea conveniente para producción aumentada a escala. En el procedimiento, se usan Boc-His(Boc)-OH.DCHA y Boc-His(Trt)-OH como materiales de partida, que pueden minimizar el riesgo de racemización de His. Además, la eficiencia de síntesis se aumenta usando un fragmento especial para el acoplamiento.

En la presente invención, se usa Fmoc-Lys(Alloc)-OH como material de partida, lo que simplifica la etapa de desprotección, y elimina las reacciones secundarias ocasionadas durante la desprotección de Mmt y Mtt, y el riesgo de seguridad de funcionamiento en la eliminación de grupos protectores de Dde o ivDde en el procedimiento de aumento a escala.

Las impurezas de racemización de His se reducen usando el sistema de acoplamiento de Boc-His(Trt)-OH y Boc-His(Boc)-OH.DCHA en la presente invención.

En la presente invención, va a usarse una disolución de TFA ácida para eliminar grupos protectores de Mmt y Mtt 6-12 veces, lo que aumenta la complejidad de la operación. Además, la disolución ácida corroerá el equipamiento y aumentará el coste de producción. La disolución ácida puede conducir a la salida de grupos protectores fácilmente eliminados en condiciones débilmente ácidas tales como tBu, Boc, aumentando la posibilidad de reacciones secundarias. Cuando se usan grupos protectores de Mmt y Mtt en la síntesis de semaglutida, solo puede usarse resina de Wang resistente a ácido, en vez de resina de cloro menos resistente a ácido, limitando la gama de resinas usadas.

En la presente invención, va a usarse una disolución de hidrazina en la eliminación del grupo protector de Dde o ivDde,

y hay un gran peligro de seguridad posible cuando se usa una gran cantidad de hidrazina en la producción aumentada a escala.

5 Usando un fragmento de cadena lateral en la presente invención, la eficiencia de síntesis se aumenta, las etapas de síntesis por acoplamiento se reducen eficazmente y el riesgo de aumento de impurezas debido al aumento del número de acoplamientos se reduce.

Los efectos beneficiosos de la presente invención incluyen los siguientes.

10 1. Se usan Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Boc-His(Trt)-OH y Boc-His(Boc)-OH.DCHA como materiales de partida para el respectivo acoplamiento de aminoácidos.

15 2. Se adopta un método de acoplamiento específico de Boc-His(Boc)-OH.DCHA o Boc-His(Trt)-OH, HOAt/HATU/TMP, HOBt/HBTU/DiPEA o HOBt/PYBOP/DiPEA para reducir el riesgo de racemización de histidina.

20 3. El uso de un fragmento de cadena lateral potencia la eficiencia de síntesis. Cuando se usa acoplamiento secuencial, el rendimiento de síntesis del péptido en bruto es del 83%, la pureza del péptido en bruto es del 65,3%, el rendimiento de purificación es del 23,6% y la pureza del péptido refinado es del 99,02%. Cuando se usa acoplamiento fragmentario, el rendimiento de síntesis del péptido en bruto es del 93%, la pureza del péptido en bruto es del 72,4%, el rendimiento de purificación es del 34,4% y la pureza del péptido refinado es del 99,60%. (véanse los ejemplos 17 y 18).

Breve descripción de los dibujos

25 Con el fin de ilustrar más claramente las soluciones técnicas en los ejemplos de la presente invención o en la técnica anterior, los dibujos que van a usarse en la descripción de ejemplos o la técnica anterior se describirán brevemente a continuación.

La figura 1 muestra la estructura y el procedimiento de preparación de semaglutida;

30 la figura 2 muestra los resultados de detección de impurezas de racemización de His producidas por acoplamiento de His durante la preparación de semaglutida en el ejemplo 9 y la técnica anterior (método 1);

35 la figura 3 muestra el espectro de detección de HPLC de impurezas de racemización de His producidas mediante acoplamiento de His durante la preparación de semaglutida en el ejemplo 10;

la figura 4 muestra el espectro de masas de MALDI-TOF de semaglutida preparada en el ejemplo 16;

la figura 5 muestra el espectro de HPLC de semaglutida preparada en el ejemplo 18;

40 la figura 6 muestra el espectro de masas de MALDI-TOF de semaglutida preparada en el ejemplo 15;

la figura 7 muestra el espectro de masas de MALDI-TOF de semaglutida preparada en el ejemplo 17; y

45 la figura 8 muestra el espectro de masas de MALDI-TOF de semaglutida preparada en el ejemplo 18.

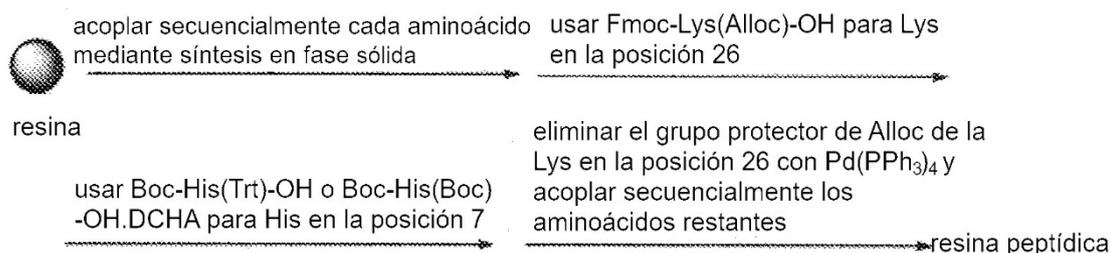
Descripción detallada de realizaciones

50 La presente invención da a conocer un método para preparar semaglutida, que los expertos en la técnica pueden lograr mejorando apropiadamente parámetros del procedimiento en vista de la divulgación. En particular, debe indicarse que todas las sustituciones y modificaciones similares resultarán evidentes para los expertos en la técnica. El método y la aplicación de la presente invención se han descrito mediante ejemplos preferidos de la misma, y resulta evidente que individuos relacionados pueden realizar modificaciones o cambios apropiados y la combinación con los métodos y aplicaciones descritos en el presente documento para lograr y aplicar la tecnología de la presente solicitud.

55 La presente invención describe dos métodos para la síntesis de semaglutida:

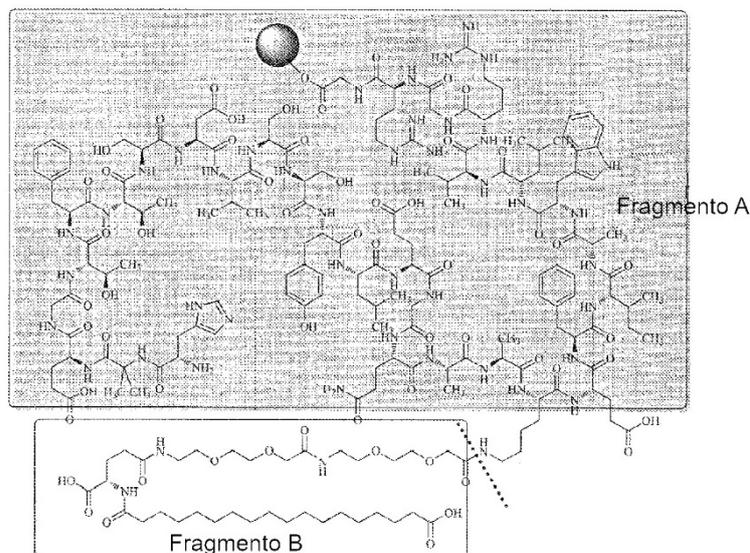
Método 1: Acoplamiento secuencial

60 La ruta para el acoplamiento secuencial es:



Método 2: Acoplamiento secuencial + síntesis fragmentaria

5 El diagrama esquemático para el análisis del acoplamiento secuencial + síntesis fragmentaria es:



La ruta de síntesis de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- 10 1) seleccionar un portador apropiado y unir Fmoc-Gly-OH a la resina mediante síntesis en fase sólida;
- 2) acoplar sucesivamente cada aminoácido mediante acoplamiento secuencial;
- 15 3) preparar un fragmento completamente protegido de Fmoc-PEG-PEG-γ-Glu-ácido octadecanodioico usando una resina de cloruro y purificando mediante recristalización;
- 4) usar Fmoc-Lys(Alloc)-OH como material de partida de Lys²⁶, con desprotección en la condición de Pd(PPh₃)₄ y morfolina;
- 20 5) sintetizar H-His⁷ con Boc-His(Trt)-OH o Boc-His(Boc)-OH.DCHA como material de partida;
- 6) acoplar ácido octadecanodioico usando éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico como material de partida;
- 25 7) escindir la resina peptídica; y
- 8) purificar el péptido en bruto.
- 30 La resina a la que se une Fmoc-Gly-OH en la etapa 1) puede elegirse de resina de Wang o resina de 2-CTC.

En la etapa 1), la Fmoc-Gly-resina de Wang tiene un grado de sustitución dentro de un intervalo de 0,1-0,5 mmol/g, preferiblemente 0,25-0,35 mmol/g cuando se usa en la síntesis; y la Fmoc-Gly-resina de 2-CTC tiene un grado de sustitución dentro de un intervalo de 0,2-0,6 mmol/g, preferiblemente 0,25-0,45 mmol/g cuando se usa en la síntesis. Se usa DIC+A+DMAP en la unión de resina de Wang, en donde A es HOBt o HOAt; y se usa DiPEA en la unión de resina de cloruro de 2-CTC.

El aminoácido o análogos de aminoácido usados en el acoplamiento secuencial de la etapa 2) son aminoácidos

protegidos con Fmoc, en donde se usa Boc-His(Trt)-OH o Boc-His(Boc)-OH.DCHA para H-His⁷, se usa Fmoc-Lys(Alloc)-OH para Lys²⁶ y se usa éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico para el acoplamiento de ácido octadecanodioico.

- 5 La condensación se realiza usando DIC+A o B+A+C en el acoplamiento de la etapa 2) hasta que se detecta que la resina es transparente con ninhidrina; en donde A es HOBt o HOAt, B es HBTU, HATU, TBTU, PyAOP o PyBOP, C es DIPEA o TMP, y el disolvente se elige de DMF, CH₂Cl₂, NMP, DMSO o un disolvente mixto de cualquiera de los mismos.
- 10 En la etapa 3), se prepara el fragmento completamente protegido de ácido PEG-PEG- γ -Glu-octadecanodioico usando resina de cloruro de 2-CTC, en donde la escisión se realiza con TFA al 1-2%/CH₂Cl₂ o TFE al 20%/CH₂Cl₂; y la condensación se realiza con DIC+A o B+A+C en el acoplamiento hasta que se detecta que la resina es transparente con ninhidrina; en donde A es HOBt o HOAt, B es HBTU, HATU, TBTU, PyAOP o PyBOP, C es DIPEA o TMP, y el disolvente se elige de DMF, CH₂Cl₂, NMP, DMSO o un disolvente mixto de cualquiera de los mismos.
- 15 El disolvente usado en la recristalización de la etapa 3) se elige de Et₂O, CH₂Cl₂, CHCl₃, MeOH, CH₃CN, THF, EtOAc, EtOH, tolueno, hexano, acetona o un disolvente mixto de cualquiera de los mismos, preferiblemente un disolvente mixto de MeOH y CH₂Cl₂.
- 20 En la etapa 4), se elimina Alloc en Fmoc-Lys(Alloc)-OH dos veces usando 0,1-0,3 equivalentes de Pd(PPh₃)₄ y 5-10 equivalentes de morfolina o fenilsilano durante 10-30 min cada vez, en donde se usa CH₂Cl₂ como disolvente en la eliminación.
- 25 En la etapa 5), se prefiere el sistema de B+A+C cuando se usa Boc-His(Trt)-OH para el acoplamiento; y se prefiere el sistema de HOAT+HATU+TMP cuando se usa Boc-His(Boc)-OH.DCHA para el acoplamiento.

La escisión en la etapa 7) se realiza con TFA:PhSMe:PhOMe:EDT:H₂O:TIS:PhOH=80~90:0~5:0~3:0~5:0~5:0~2:0~5 (V:V), prefiriéndose TFA:PhSMe:PhOH:EDT:H₂O=85:5:3:5:2.

- 30 Las abreviaturas y los significados respectivos de las mismas se muestran en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Abreviaturas y significados respectivos de las mismas

Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
Resina de 2-CTC	resina de cloruro de 2-clorotritilo
tBu	terc-butilo
OtBu	terc-butoxilo
Alloc	aliloxicarbonilo
DCM	diclorometano
DBLK	disolución de hexahidropiridina al 20%/DMF
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HOAt	1-hidroxi-7-azobenzotriazol
PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinilo
DMSO	dimetilsulfóxido
HATU	hexafluorofosfato de <i>O</i> -(7-azobenzotriazol)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio

35

HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
TFA	ácido trifluoroacético
TMP	2,4,6-trimetilpiridina
Mmt	4-metoxitritilo
Mtt	4-metiltritilo
DCHA	diciclohexilamina
Boc	t-butoxicarbonilo
Trt	tritilo

Los materiales de partida y reactivos usados en el método de preparación de semaglutida proporcionado por la presente invención están todos disponibles comercialmente.

5

A continuación, se ilustrará adicionalmente la presente invención en combinación con ejemplos:

Ejemplo 1: Preparación de Fmoc-Gly-resina de Wang

10 Se pesaron 210 g de resina de Wang seca (con un grado de sustitución de 0,845 mmol/g) y se añadieron a una columna de reacción en fase sólida. En primer lugar, se lavó la resina dos veces con DMF, se hinchó de nuevo durante 30 min con DMF en un volumen de 2-3 veces el lecho de resina, y se lavó con DMF tres veces y DCM dos veces, para alimentación futura.

15 Bajo enfriamiento en baño de hielo, se disolvieron 105,48 g de Fmoc-Gly-OH y 47,92 g de HOBt en un disolvente mixto de DMF y DCM. Tras disolverse el aminoácido, se añadieron lentamente 55 ml de DIC, y se vertió el reactante en la columna de reacción tras la activación durante 3 min. Se añadieron 2,17 g de DMAP, y se agitó con soplado de aire durante 2 h. Tras completarse la reacción, se añadió una cantidad apropiada de una disolución mixta de anhídrido acético y piridina (razón en volumen: Ac₂O/piridina=7/6) para bloquear la reacción durante 5 h o más, tras lavar tres veces con DMF. Tras detenerse la reacción, se obtuvo Fmoc-Gly-resina de Wang con un grado de sustitución de 0,496 mmol/g, tras lavar 6 veces con DMF, encoger dos veces con metanol y secar a presión reducida.

20

Ejemplo 2: Preparación de Fmoc-Gly-resina de Wang

25 Se pesaron 218 g de resina de Wang seca (con un grado de sustitución de 0,845 mmol/g) y se añadieron en una columna de reacción en fase sólida. En primer lugar, se lavó la resina dos veces con DMF, se hinchó de nuevo durante 30 min con DMF en un volumen de 2-3 veces el lecho de resina y se lavó con DMF tres veces y DCM dos veces, para alimentación futura.

30 Bajo enfriamiento en baño de hielo, se disolvieron 26,88 g de Fmoc-Gly-OH y 12,03 g de HOBt en un disolvente mixto de DMF y DCM. Tras disolverse el aminoácido, se añadieron lentamente 11 ml de DIC, y se vertió el reactante en la columna de reacción tras activación durante 3 min. Se añadieron 1,12 g de DMAP, y se agitó con soplado de aire durante 45 min. Tras completarse la reacción, se añadió una cantidad apropiada de una disolución mixta de anhídrido acético y piridina (razón en volumen: Ac₂O/piridina=7/6) para bloquear la reacción durante la noche, tras lavar tres veces con DMF. Tras detenerse la reacción, se obtuvo Fmoc-Gly-resina de Wang con un grado de sustitución de 0,108 mmol/g, tras lavar 6 veces con DMF, encoger dos veces con metanol y secar a presión reducida.

35

Ejemplo 3: Preparación de Fmoc-Gly-resina de Wang

40 Se pesaron 220 g de resina de Wang seca (con un grado de sustitución de 0,845 mmol/g) y se añadieron en una columna de reacción en fase sólida. En primer lugar, se lavó la resina dos veces con DMF, se hinchó de nuevo durante 30 min con DMF en un volumen de 2-3 veces el lecho de resina y se lavó con DMF tres veces y DCM dos veces, para alimentación futura.

45 Bajo enfriamiento en baño de hielo, se disolvieron 55,76 g de Fmoc-Gly-OH y 25,11 g de HOBt en un disolvente mixto de DMF y DCM. Tras disolverse el aminoácido, se añadieron lentamente 29 ml de DIC, y se vertió el reactante en la columna de reacción tras la activación durante 3 min. Se añadieron 2,17 g de DMAP, y se agitó con soplado de aire durante 90 min. Tras completarse la reacción, se añadió una cantidad apropiada de una disolución mixta de anhídrido

acético y piridina (razón en volumen: Ac2O/piridina=7/6) para bloquear la reacción durante la noche, tras lavar tres veces con DMF. Tras detenerse la reacción, se obtuvo Fmoc-Gly-resina de Wang con un grado de sustitución de 0,314 mmol/g, tras lavar 6 veces con DMF, encoger dos veces con metanol y secar a presión reducida.

5 Ejemplo 4: Preparación de Fmoc-Gly-resina de 2-CTC

Se pesaron 198 g de resina de 2-CTC seca (con un grado de sustitución de 0,568 mmol/g) y se añadieron en una columna de reacción en fase sólida. En primer lugar, se lavó la resina dos veces con DMF, se hinchó de nuevo durante 30 min con DMF en un volumen de 2-3 veces el lecho de resina y se lavó con DMF tres veces y DCM dos veces, para alimentación futura.

Bajo enfriamiento en baño de hielo, se disolvieron 64,58 g de Fmoc-Gly-OH y 75 ml de DIPEA en un disolvente mixto de DMF y DCM. Tras disolverse el aminoácido, se añadió lentamente la Fmoc-Gly-OH activada en la columna de reacción durante 2 h. Tras completarse la reacción, se añadió una disolución de bloqueo que consistía en 50 ml de metanol y 36 ml de DIPEA en la columna de reacción durante 30 min. Se obtuvo Fmoc-Gly-resina de 2-CTC con un grado de sustitución de 0,535 mmol/g, tras lavar 3 veces con DMF, encoger dos veces con metanol y secar a presión reducida.

20 Ejemplo 5: Preparación de Fmoc-Gly-resina de 2-CTC

Se pesaron 202 g de resina de 2-CTC seca (con un grado de sustitución de 0,388 mmol/g) y se añadieron en una columna de reacción en fase sólida. En primer lugar, se lavó la resina dos veces con DMF, se hinchó de nuevo durante 30 min con DMF en un volumen de 2-3 veces el lecho de resina y se lavó con DMF tres veces y DCM dos veces, para alimentación futura.

Bajo enfriamiento en baño de hielo, se disolvieron 46,75 g de Fmoc-Gly-OH y 54 ml de DIPEA en un disolvente mixto de DMF y DCM. Tras disolverse el aminoácido, se añadió lentamente Fmoc-Gly-OH activada en la columna de reacción durante 2 h. Tras completarse la reacción, se añadió una disolución de bloqueo que consistía en 48 ml de metanol y 26 ml de DIPEA en la columna de reacción durante otros 30 min. Se obtuvo Fmoc-Gly-resina de 2-CTC con un grado de sustitución de 0,368 mmol/g, tras lavar 3 veces con DMF, encoger dos veces con metanol y secar a presión reducida.

25 Ejemplo 6: Preparación de Fmoc-Gly-resina de 2-CTC

Se pesaron 216 g de resina de 2-CTC seca (con un grado de sustitución de 0,388 mmol/g) y se añadieron en una columna de reacción en fase sólida. En primer lugar, se lavó la resina dos veces con DMF, se hinchó de nuevo durante 30 min con DMF en un volumen de 2-3 veces el lecho de resina y se lavó con DMF tres veces y DCM dos veces, para alimentación futura.

Bajo enfriamiento en baño de hielo, se disolvieron 25,16 g de Fmoc-Gly-OH y 28 ml de DIPEA en un disolvente mixto de DMF y DCM. Tras disolverse el aminoácido, se añadió lentamente la Fmoc-Gly-OH activada en la columna de reacción durante 2 h. Tras completarse la reacción, se añadió una disolución de bloqueo que consistía en 45 ml de metanol y 15 ml de DIPEA en la columna de reacción durante otros 30 min. Se obtuvo Fmoc-Gly-resina de 2-CTC con un grado de sustitución de 0,211 mmol/g, tras lavar 3 veces con DMF, encoger dos veces con metanol y secar a presión reducida.

Ejemplo 7: Escisión del fragmento de resina peptídica, PEG-PEG- γ -Glu-éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico

50 Se pesaron 239 g de resina de 2-CTC seca (con un grado de sustitución de 0,568 mmol/g) y se añadieron en una columna de reacción en fase sólida. En primer lugar, se lavó la resina dos veces con DMF, se hinchó de nuevo durante 30 min con DMF en un volumen de 2-3 veces el lecho de resina y se lavó con DMF tres veces y DCM dos veces, para alimentación futura.

55 Bajo enfriamiento en baño de hielo, se disolvieron 104,6 g de Fmoc-PEG-OH y 94 ml de DIPEA en un disolvente mixto de DMF y DCM. Tras disolverse el aminoácido, se añadió lentamente el Fmoc-PEG-OH activado en la columna de reacción durante 2 h. Tras completarse la reacción, se añadió una disolución de bloqueo que consistía en 65 ml de metanol y 47 ml de DIPEA en la columna de reacción durante otros 30 min. Se realizaron 3 lavados con DMF.

60 Se acoplaron secuencialmente Fmoc-PEG-OH, Fmoc-Glu(OH)-OtBu y éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico mediante acoplamiento de aminoácidos convencional. Tras completarse el acoplamiento, se obtuvieron 345 g de resina peptídica tras encoger con metanol, seguido por escindir con 3,5 l de disolución de TFA al 1%/CH₂Cl₂ durante 2 h y concentrar a presión reducida para producir aproximadamente 108 g de péptidos completamente protegidos. Se obtuvieron 98 g de péptidos completamente protegidos mediante recristalización con un disolvente mixto de metanol y diclorometano. El peso molecular mediante espectro de masas de MALDI-TOF es de [M+H⁺]=846,8.

Ejemplo 8: Acoplamiento del fragmento de resina peptídica fragmento, PEG-PEG- γ -Glu-éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico

- 5 Se pesaron 187 g de resina de 2-CTC seca (con un grado de sustitución de 0,752 mmol/g) y se añadieron en una columna de reacción en fase sólida. En primer lugar, se lavó la resina dos veces con DMF, se hinchó de nuevo durante 30 min con DMF en un volumen de 2-3 veces el lecho de resina y se lavó con DMF tres veces y DCM dos veces, para alimentación futura.
- 10 Bajo enfriamiento en baño de hielo, se disolvieron 108,4 g de Fmoc-PEG-OH y 98 ml de DIPEA en un disolvente mixto de DMF y DCM. Tras disolverse el aminoácido, se añadió lentamente el Fmoc-PEG-OH activado en la columna de reacción durante 2 h. Tras completarse la reacción, se añadió una disolución de bloqueo que consistía en 60 ml de metanol y 50 ml de DIPEA en la columna de reacción durante otros 30 min. Se realizaron 3 lavados con DMF.
- 15 Se acoplaron secuencialmente Fmoc-PEG-OH, Fmoc-Glu(OH)-OtBu y éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico mediante acoplamiento de aminoácidos convencional. Tras completarse el acoplamiento, se obtuvieron 310 g de resina peptídica tras encoger con metanol, seguido por escindir con 3,1 l de disolución de TFE al 20%/CH₂Cl₂ durante 2 h y concentrar a presión reducida para producir aproximadamente 115 g de péptidos completamente protegidos. Se obtuvieron 108 g de péptidos completamente protegidos mediante recristalización con un disolvente mixto de acetato de etilo y triclorometano. El peso molecular mediante espectro de masas de MALDI-TOF es de $[M+H]^+=846,6$.
- 20

Ejemplo 9: Síntesis de resina peptídica de semaglutida

- 25 Se usó la Fmoc-Gly-resina de Wang sintetizada en el ejemplo 1 para la síntesis de resina peptídica de semaglutida. Se pesaron 202 g de Fmoc-Gly-resina de Wang (100 mmol) con un grado de sustitución de 0,496 mmol/g y se hincharon durante 30 min con DMF, seguido por acoplamiento de manera secuencial según la secuencia de aminoácidos de semaglutida con 2-5 equivalentes de alimentaciones de aminoácidos y condensación con DIC+A o B+A+C, hasta que se detectó que la resina era transparente con ninhidrina, en donde A era HOBt o HOAt; B era HBTU, HATU, TBTU, PyAOP o PyBOP; C era DIPEA o TMP; y se eligió el disolvente de DMF, CH₂Cl₂, NMP, DMSO o un disolvente mixto de cualquiera de los mismos; y para Boc-His(Trt)-OH, se realizó el acoplamiento mediante un sistema de HOBt/HBTU/DIPEA.
- 30

- 35 Se tomaron muestras del péptido en bruto obtenido con un sistema de acoplamiento de Boc-His (Trt)-OH/HOBt/HBTU/DIPEA y se detectó que tenía un pico significativamente más pequeño de impurezas de racemización de His que el sistema de acoplamiento de Boc-His (Boc)-OH (HOBt/HBTU/DIPEA) usado en la bibliografía, tal como se muestra en la figura 2.

- 40 Método 1: Sistema de Boc-His(Boc)-OH/HOBt/HBTU/DIPEA, con el 2%-3% de impurezas de racemización de His.

- Método 2 (la presente invención): Sistema de Boc-His(Trt)-OH/HOBt/HBTU/DIPEA, con menos del 1% de impurezas de racemización de His.

- 45 Antes del acoplamiento de la cadena lateral de Lys, se eliminaron los grupos protectores de Alloc dos veces con una disolución de 0,2 equivalentes de Pd(PPh₃)₄ y 10 equivalentes de morfolina en cloruro de metileno durante 30 min cada vez. Los aminoácidos restantes en la cadena lateral se acoplaron según un método convencional hasta que eran transparentes, y se obtuvieron 826 g de resina peptídica tras completarse el acoplamiento.

Ejemplo 10: Síntesis de resina peptídica de semaglutida

- 50 Se usó la Fmoc-Gly-resina de Wang sintetizada en el ejemplo 2 para la síntesis de resina peptídica de semaglutida. Se pesaron 200 g de Fmoc-Gly-resina de Wang (21,6 mmol) con un grado de sustitución de 0,108 mmol/g y se hincharon durante 30 min con DMF, seguido por acoplamiento de manera secuencial según la secuencia de aminoácidos de semaglutida con 2-5 equivalentes de alimentaciones de aminoácidos y condensación con DIC+A o B+A+C, hasta que se detectó que la resina era transparente con ninhidrina, en donde A era HOBt o HOAt; B era HBTU, HATU, TBTU, PyAOP o PyBOP; C era DIPEA o TMP; y se eligió el disolvente de DMF, CH₂Cl₂, NMP, DMSO o un disolvente mixto de cualquiera de los mismos; y para Boc-His(Boc)-OH.DCHA, se realizó el acoplamiento mediante un sistema de HOAt/HATU/TMP.
- 55

- 60 Antes del acoplamiento de la cadena lateral de Lys, se eliminaron los grupos protectores de Alloc dos veces con una disolución de 0,2 equivalentes de Pd(PPh₃)₄ y 10 equivalentes de fenilsilano en cloruro de metileno durante 30 min cada vez. Los aminoácidos restantes en la cadena lateral se acoplaron según un método convencional hasta que eran transparentes, y se obtuvieron 335 g de resina peptídica tras completarse el acoplamiento, tal como se muestra en la figura 3.
- 65

Hubo un 0,98% de impurezas de racemización de His cuando se usó el sistema de Boc-His(Boc)-

OH.DCHA/HOAt/HATU/TMP.

Ejemplo 11: Síntesis de resina peptídica de semaglutida

5 Se usó la Fmoc-Gly-resina de Wang sintetizada en el ejemplo 3 para la síntesis de resina peptídica de semaglutida. Se pesaron 102 g de Fmoc-Gly-resina de Wang (32 mmol) con un grado de sustitución de 0,314 mmol/g y se hincharon durante 30 min con DMF, seguido por acoplamiento de manera secuencial según la secuencia de aminoácidos de semaglutida con 2-5 equivalentes de alimentaciones de aminoácidos y condensación con DIC+A o B+A+C, hasta que se detectó que la resina era transparente con ninhidrina, en donde A era HOBt o HOAt; B era HBTU, HATU, TBTU, PyAOP o PyBOP; C era DIPEA o TMP; y se eligió el disolvente de DMF, CH₂Cl₂, NMP, DMSO o un disolvente mixto de cualquiera de los mismos; y para Boc-His(Trt)-OH, se realizó el acoplamiento mediante un sistema de HOBt/HBTU/DiPEA o HOBt/PYBOP/DiPEA.

15 Antes del acoplamiento de la cadena lateral de Lys, se eliminaron los grupos protectores de Alloc dos veces con una disolución de 0,2 equivalentes de Pd(PPh₃)₄ y 10 equivalentes de fenilsilano en cloruro de metileno durante 30 min cada vez. El acoplamiento de los aminoácidos restantes en la cadena lateral se completó de una vez con el fragmento de PEG-PEG-γ-Glu-éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico, y se obtuvieron 306 g de resina peptídica tras completarse el acoplamiento.

20 Ejemplo 12: Síntesis de resina peptídica de semaglutida

25 Se usó la Fmoc-Gly-resina de 2-CTC sintetizada en el ejemplo 4 para la síntesis de resina peptídica de semaglutida. Se pesaron 94 g de Fmoc-Gly-resina de 2-CTC (50 mmol) con un grado de sustitución de 0,535 mmol/g y se hincharon durante 30 min con DMF, seguido por acoplamiento de manera secuencial según la secuencia de aminoácidos de semaglutida con 2-5 equivalentes de alimentaciones de aminoácidos y condensación con DIC+A o B+A+C, hasta que se detectó que la resina era transparente con ninhidrina, en donde A era HOBt o HOAt; B era HBTU, HATU, TBTU, PyAOP o PyBOP; C era DIPEA o TMP; y se eligió el disolvente de DMF, CH₂Cl₂, NMP, DMSO o un disolvente mixto de cualquiera de los mismos; y para Boc-His(Trt)-OH, se realizó el acoplamiento mediante un sistema de HOBt/HBTU/DiPEA o HOBt/PYBOP/DiPEA.

30 Antes del acoplamiento de la cadena lateral de Lys, se eliminaron los grupos protectores de Alloc dos veces con una disolución de 0,2 equivalentes de Pd(PPh₃)₄ y 10 equivalentes de fenilsilano en cloruro de metileno durante 30 min cada vez. Los aminoácidos restantes en la cadena lateral se acoplaron según un método convencional hasta que eran transparentes, y se obtuvieron 396 g de resina peptídica tras completarse el acoplamiento.

35 Ejemplo 13: Síntesis de resina peptídica de semaglutida

40 Se usó la Fmoc-Gly-resina de 2-CTC sintetizada en el ejemplo 5 para la síntesis de resina peptídica de semaglutida. Se pesaron 114 g de Fmoc-Gly-resina de 2-CTC (42 mmol) con un grado de sustitución de 0,368 mmol/g y se hincharon durante 30 min con DMF, seguido por acoplamiento de manera secuencial según la secuencia de aminoácidos de semaglutida con 2-5 equivalentes de alimentaciones de aminoácidos y condensación con DIC+A o B+A+C, hasta que se detectó que la resina era transparente con ninhidrina, en donde A era HOBt o HOAt; B era HBTU, HATU, TBTU, PyAOP o PyBOP; C era DIPEA o TMP; y se eligió el disolvente de DMF, CH₂Cl₂, NMP, DMSO o un disolvente mixto de cualquiera de los mismos; y para Boc-His(Boc)-OH.DCHA, se realizó el acoplamiento mediante un sistema de HOAt/HATU/TMP.

45 Antes del acoplamiento de la cadena lateral de Lys, se eliminaron los grupos protectores de Alloc dos veces con una disolución de 0,2 equivalentes de Pd(PPh₃)₄ y 10 equivalentes de morfolina en cloruro de metileno durante 30 min cada vez. Los aminoácidos restantes en la cadena lateral se acoplaron según un método convencional hasta que eran transparentes, y se obtuvieron 362 g de resina peptídica tras completarse el acoplamiento.

50 Ejemplo 14: Síntesis de resina peptídica de semaglutida

55 Se usó la Fmoc-Gly-resina de 2-CTC sintetizada en el ejemplo 6 para la síntesis de resina peptídica de semaglutida. Se pesaron 95 g de Fmoc-Gly-resina de 2-CTC (20 mmol) con un grado de sustitución de 0,211 mmol/g y se hincharon durante 30 min con DMF, seguido por acoplamiento de manera secuencial según la secuencia de aminoácidos de semaglutida con 2-5 equivalentes de alimentaciones de aminoácidos y condensación con DIC+A o B+A+C, hasta que se detectó que la resina era transparente con ninhidrina, en donde A era HOBt o HOAt; B era HBTU, HATU, TBTU, PyAOP o PyBOP; C era DIPEA o TMP; y se eligió el disolvente de DMF, CH₂Cl₂, NMP, DMSO o un disolvente mixto de cualquiera de los mismos; y para Boc-His(Boc)-OH.DCHA, se realizó el acoplamiento mediante un sistema de HOAt/HATU/TMP.

60 Antes del acoplamiento de la cadena lateral de Lys, se eliminaron los grupos protectores de Alloc dos veces con una disolución de 0,2 equivalentes de Pd(PPh₃)₄ y 10 equivalentes de morfolina en cloruro de metileno durante 30 min cada vez. El acoplamiento de los aminoácidos restantes en la cadena lateral se completó de una vez con el fragmento de PEG-PEG-γ-Glu-éster mono-butílico del ácido octadecanodioico, y se obtuvieron 223 g de resina peptídica tras

completarse el acoplamiento.

Ejemplo 15: Escisión y purificación de semaglutida

5 Se tomaron 400 g de resina de Wang de semaglutida obtenida en el ejemplo 9 y se añadieron a una caldera de reacción de 5 l. Se formularon 4 l de agente de escisión en una razón en volumen de TFA:tioanisol:anisol:EDT=90:5:3:2, y se congelaron previamente durante 2 h, y luego se vertieron en la caldera de reacción de 5 l, permitiendo que reaccionaran durante 2 h a la temperatura ambiente. Tras completarse la reacción, se separó la resina por filtración y se recogió el filtrado. Se lavó la resina con una pequeña cantidad de TFA y se combinaron los filtrados. Se añadió el filtrado a 40 l de dietil éter anhidro enfriado con hielo, se precipitó, centrifugó, lavó con dietil éter anhidro y se secó a vacío para obtener 182 g de semaglutida en bruto con una pureza del 66,8%. MALDI-TOF: (M+H)⁺=4113,9, tal como se muestra en la figura 6.

15 Se pesaron 42,6 g de semaglutida en bruto, se disolvieron en 1500 ml de un disolvente mixto del 25% de acetonitrilo y el 75% de agua y se purificaron usando un sistema de RP-HPLC Waters 2545 con una longitud de onda de 218 nm, una columna cromatográfica de columna C18 de fase inversa de 50 x 250 mm, una temperatura de columna de 45°C y una fase móvil convencional de TFA al 0,1%/acetonitrilo. Se recogieron los componentes del pico objetivo para obtener péptidos refinados con una pureza de más del 98,5%. Se transformó la disolución de péptidos refinados en sales usando un sistema de RP-HPLC Waters 2545 con una columna cromatográfica de columna C18 de fase inversa de 50 x 250 mm y ácido clorhídrico al 0,1%/acetonitrilo como fase móvil. Se recogieron los componentes del pico objetivo, se concentraron a presión reducida y liofilizaron para obtener 10,86 g de clorhidrato de semaglutida refinado con una pureza de HPLC del 98,98%.

Ejemplo 16: Escisión y purificación de semaglutida

25 Se tomaron 180 g de resina de Wang de semaglutida obtenida en el ejemplo 11 y se añadieron a una caldera de reacción de 3 l. Se formularon 1,8 l de agente de escisión en una razón en volumen de TFA:tioanisol:agua:fenol:EDT=82,5:5:5:5:2,5, y se congelaron previamente durante 2 h, y luego se vertieron en la caldera de reacción de 3 l, permitiendo que reaccionaran durante 2 h a la temperatura ambiente. Tras completarse la reacción, se separó la resina por filtración y se recogió el filtrado. Se lavó la resina con una pequeña cantidad de TFA y se combinaron los filtrados. Se añadió el filtrado a 40 l de dietil éter anhidro enfriado con hielo, se precipitó, centrifugó, lavó con dietil éter anhidro y se secó a vacío para obtener 101 g de semaglutida en bruto con una pureza del 62,6%. MALDI-TOF: (M+H)⁺=4113,5, tal como se muestra en la figura 4.

35 Se pesaron 49,5 g de semaglutida en bruto, se disolvieron en 1500 ml de un disolvente mixto del 25% de acetonitrilo y el 75% agua y se purificaron usando un sistema de RP-HPLC Waters 2545 con una longitud de onda de 218 nm, una columna cromatográfica de columna C18 de fase inversa de 50 x 250 mm, una temperatura de columna de 45°C y una fase móvil convencional de TFA al 0,1%/acetonitrilo. Se recogieron los componentes de pico objetivo para obtener péptidos refinados con una pureza de más del 98,5%. Se transformó la disolución de péptidos refinados en sales usando un sistema de RP-HPLC Waters 2545 con una columna cromatográfica de columna C18 de fase inversa de 50 x 250 mm y ácido clorhídrico al 0,1%/acetonitrilo como fase móvil. Se recogieron los componentes de pico objetivo, se concentraron a presión reducida y se liofilizaron para obtener 11,12 g de clorhidrato de semaglutida refinado con una pureza de HPLC del 98,86%.

Ejemplo 17: Escisión y purificación de semaglutida

50 Se tomaron 203 g de resina de 2-CTC de semaglutida obtenida en el ejemplo 13 y se añadieron a una caldera de reacción de 3 l. Se formularon 1,8 l de agente de escisión en una razón en volumen de TFA:tioanisol:PhOMe:TIS:EDT=82,5:5:5:5:2,5, y se congelaron previamente durante 2 h, y luego se vertieron en la caldera de reacción de 3 l, permitiendo que reaccionaran durante 2 h a la temperatura ambiente. Tras completarse la reacción, se separó la resina por filtración y se recogió el filtrado. Se lavó la resina con una pequeña cantidad de TFA y se combinaron los filtrados. Se añadió el filtrado a 40 l de dietil éter anhidro enfriado con hielo, se precipitó, se centrifugó, se lavó con dietil éter anhidro y se secó a vacío para obtener 85 g de semaglutida en bruto con una pureza del 65,3%. MALDI-TOF: (M+H)⁺=4113,8, tal como se muestra en la figura 7.

55 Se pesaron 40,6 g de semaglutida en bruto, se disolvieron en 1500 ml de un disolvente mixto del 25% de acetonitrilo y el 75% de agua y se purificaron usando un sistema de RP-HPLC Waters 2545 con una longitud de onda de 218 nm, una columna cromatográfica de columna C18 de fase inversa de 50 x 250 mm, una temperatura de columna de 45°C y NH₄Ac acetonitrilo como sistema de fase móvil. Se recogieron los componentes del pico objetivo para obtener péptidos refinados con una pureza de más del 98,5%. Se transformó la disolución de péptidos refinados en sales usando un sistema de RP-HPLC Waters 2545 con una columna cromatográfica de columna C18 de fase inversa de 50 x 250 mm y ácido acético al 0,1%/acetonitrilo como fase móvil. Se recogieron los componentes del pico objetivo, se concentraron a presión reducida y se liofilizaron para obtener 8,36 g de acetato de semaglutida refinado con una pureza de HPLC del 99,02%.

Ejemplo 18: Escisión y purificación de semaglutida

5 Se tomaron 220 g de resina de 2-CTC de semaglutida obtenida en el ejemplo 14 y se añadieron a una caldera de reacción de 3 l. Se formularon 2,2 l de agente de escisión en una razón en volumen de TFA:H₂O:EDT= 90:5:5, y se congelaron previamente durante 2 h, y luego se vertieron en la caldera de reacción de 3 l, permitiendo que reaccionaran durante 2 h a la temperatura ambiente. Tras completarse la reacción, se separó la resina por filtración y se recogió el filtrado. Se lavó la resina con una pequeña cantidad de TFA y se combinaron los filtrados. Se añadió el filtrado a 40 l de dietil éter anhidro enfriado con hielo, se precipitó, se centrifugó, se lavó con dietil éter anhidro y se secó a vacío para obtener 79 g de semaglutida en bruto con una pureza del 72,4%. MALDI-TOF: (M+H)⁺=4113,5, tal como se muestra en la figura 8.

10 Se pesaron 34,8 g de semaglutida en bruto, se disolvieron en 1500 ml de un disolvente mixto del 25% de acetonitrilo y el 75% de agua y se purificaron usando un sistema de RP-HPLC Waters 2545 con una longitud de onda de 218 nm, una columna cromatográfica de columna C18 de fase inversa de 50 x 250 mm, una temperatura de columna de 45°C y NaClO₄ y acetonitrilo como sistema de fase móvil. Se recogieron los componentes del pico objetivo para obtener péptidos refinados con una pureza de más del 98,5%. Se transformó la disolución de péptidos refinados en sales usando un sistema de RP-HPLC Waters 2545 con una columna cromatográfica de columna C18 de fase inversa de 15 50 x 250 mm y ácido trifluoroacético al 0,1%/acetonitrilo como fase móvil. Se recogieron los componentes del pico objetivo, se concentraron a presión reducida y se liofilizaron para obtener 11,98 g de trifluoroacetato de semaglutida refinado con una pureza de HPLC del 99,60%, tal como se muestra en la figura 5.

20

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de semaglutida, que comprende las etapas de:
 - 5 etapa 1: acoplar Gly a una resina mediante síntesis en fase sólida para obtener Gly-resina; y
 - etapa 2: acoplar sucesivamente la Gly-resina preparada en la etapa 1 a un aminoácido según la secuencia de semaglutida mediante acoplamiento secuencial; escisión y purificación;
 - 10 en el que se usa Fmoc-Lys(Alloc)-OH como material de partida de Lys²⁶;
 - se sintetiza H-His⁷ usando Boc-His(Trt)-OH o Boc-His(Boc)-OH.DCHA como material de partida; y
 - 15 la cadena lateral de Lys²⁶ se prepara mediante síntesis fragmentaria, y se prepara un fragmento completamente protegido de Fmoc-PEG-PEG- γ -Glu-ácido octadecanodioico usado en la síntesis fragmentaria de la cadena lateral de Lys²⁶ acoplando sucesivamente una resina de cloruro a Fmoc-PEG-OH, Fmoc-PEG-OH, Fmoc-Glu(OH)-OtBu y éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico, escindiendo y recristalizando para obtener PEG-PEG- γ -Glu-éster mono-terc-butílico del ácido octadecanodioico.
- 20 2. Método de preparación según la reivindicación 1, en el que la resina en la etapa 1 se selecciona de resina de Wang o resina de 2-CTC;
 - en el que la resina de Wang tiene un grado de sustitución de 0,1-0,5 mmol/g;
 - 25 la resina de 2-CTC tiene un grado de sustitución de 0,2-0,6 mmol/g;
 - la resina de Wang se acopla mediante DIC+A+DMAP, en donde A es HOBt o HOAt; y
 - 30 la resina de 2-CTC se acopla mediante un método de DIPEA.
3. Método de preparación según la reivindicación 1 o 2, en el que el acoplamiento en la etapa 2 se realiza mediante condensación mediante un método de DIC+A o B+A+C hasta que se detecta que la resina es transparente con ninhidrina, en donde A se elige de HOBt o HOAt, B se elige de HBTU, HATU, TBTU, PyAOP, o PyBOP, C se elige de DIPEA o TMP; y el disolvente se elige de uno o una mezcla de dos o más de DMF, CH₂Cl₂, NMP o DMSO.
- 35 4. Método de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el acoplamiento en la síntesis fragmentaria de la cadena lateral de Lys²⁶ se realiza mediante condensación con DIC+A o B+A+C hasta que se detecta que la resina es transparente con ninhidrina, en donde A se elige de HOBt o HOAt, B se elige de HBTU, HATU, TBTU, PyAOP o PyBOP, C se elige de DIPEA o TMP; y el disolvente se elige de uno o una mezcla de dos o más de DMF, CH₂Cl₂, NMP o DMSO.
- 40 5. Método de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que, en la síntesis fragmentaria de la cadena lateral de Lys²⁶, la escisión se realiza con TFA al 1-2%/CH₂Cl₂ (V/V) o TFE al 20%/CH₂Cl₂ (V/V).
- 45 6. Método de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que, en la síntesis fragmentaria de la cadena lateral de Lys²⁶, la recristalización se realiza con uno o una mezcla de dos o más de Et₂O, CH₂Cl₂, CHCl₃, MeOH, CH₃CN, THF, EtOAc, EtOH, tolueno, hexano o acetona.
- 50 7. Método de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que Alloc en Fmoc-Lys(Alloc)-OH se elimina dos veces con o bien 5-10 equivalentes de morfina o bien 5-10 equivalentes de fenilsilano, y 0,1-0,3 equivalentes de Pd(PPh₃)₄ durante 10-30 min cada vez, en el que se usa CH₂Cl₂ como disolvente en la eliminación.
- 55 8. Método de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que para Boc-His(Trt)-OH, el acoplamiento se realiza usando un sistema de B+A+C; y para Boc-His(Boc)-OH.DCHA, el acoplamiento se realiza usando un sistema de HOAT + HATU + TMP;
 - 60 en donde A se elige de HOBt o HOAt, B se elige de HBTU, HATU, TBTU, PyAOP o PyBOP, C se elige de DIPEA o TMP; y disolvente se elige de uno o una mezcla de dos o más de DMF, CH₂Cl₂, NMP o DMSO.
9. Método de preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la escisión en la etapa 2 se realiza con un reactivo que comprende uno o una mezcla de dos o más de TFA, PhSMe, PhOMe, EDT, H₂O, TIS o PhOH;
- 65

ES 2 809 678 T3

en el que TFA, PhSMe, PhOMe, EDT, H₂O, TIS y PhOH están en una razón en volumen de 80-90:0-5:0-3:0-5:0-5:0-2:0-5.

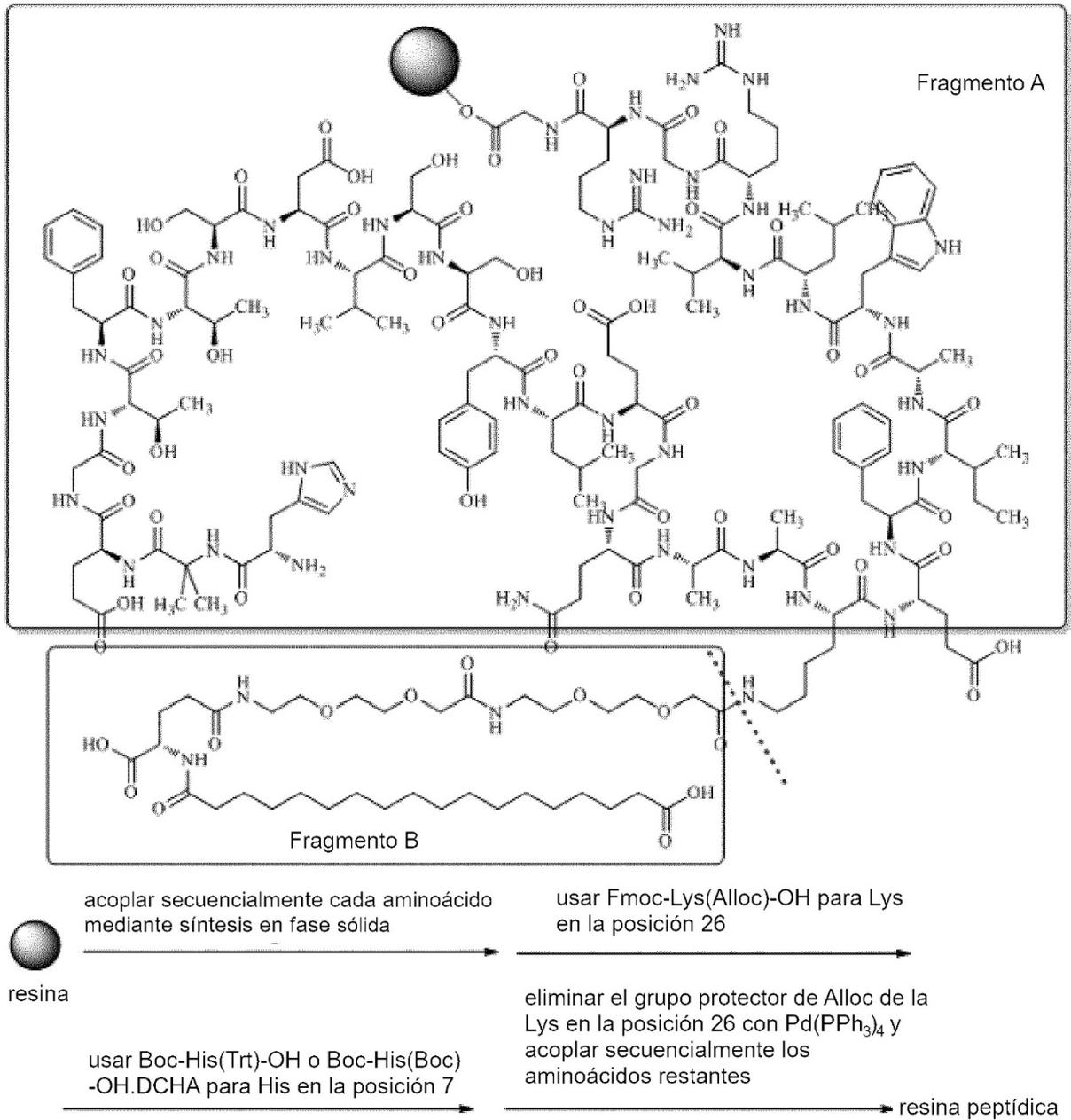


Figura 1

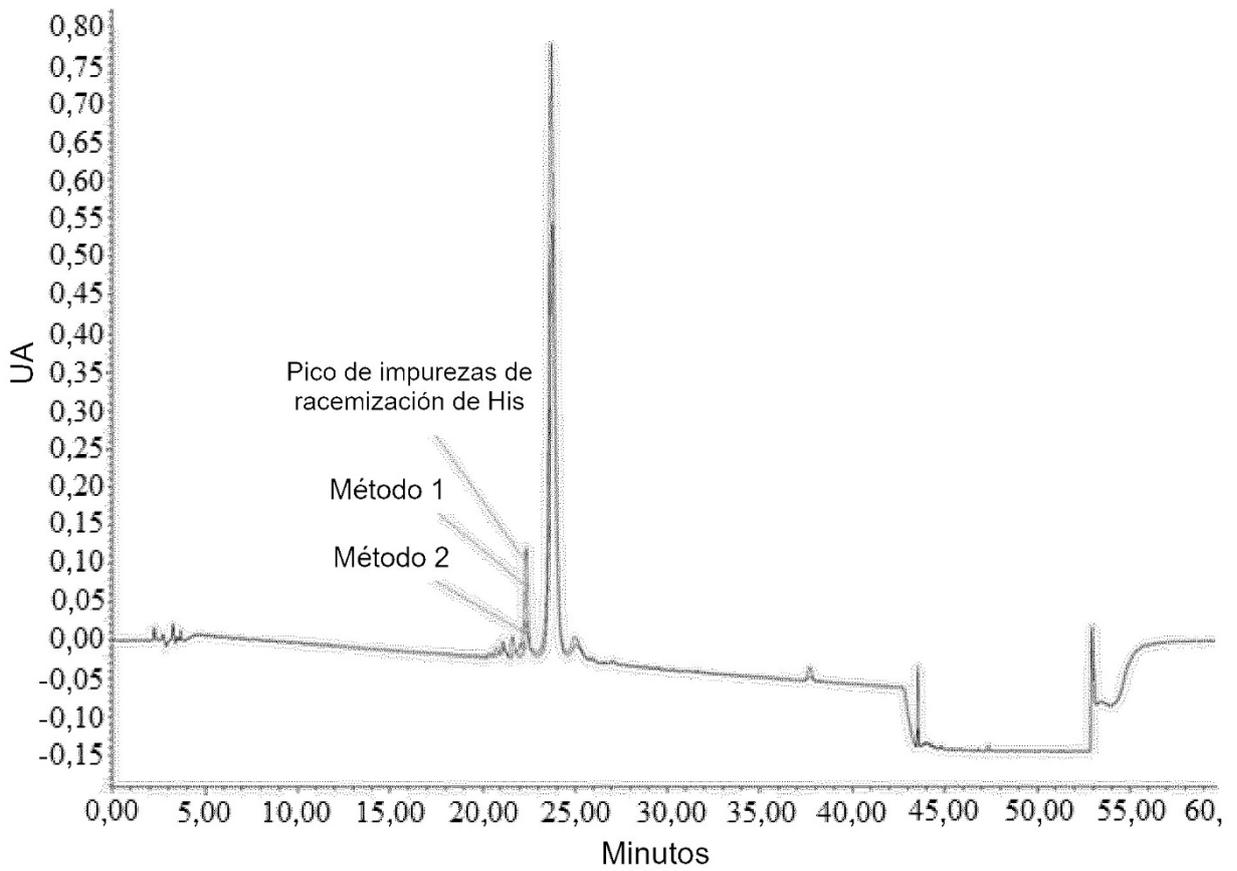


Figura 2

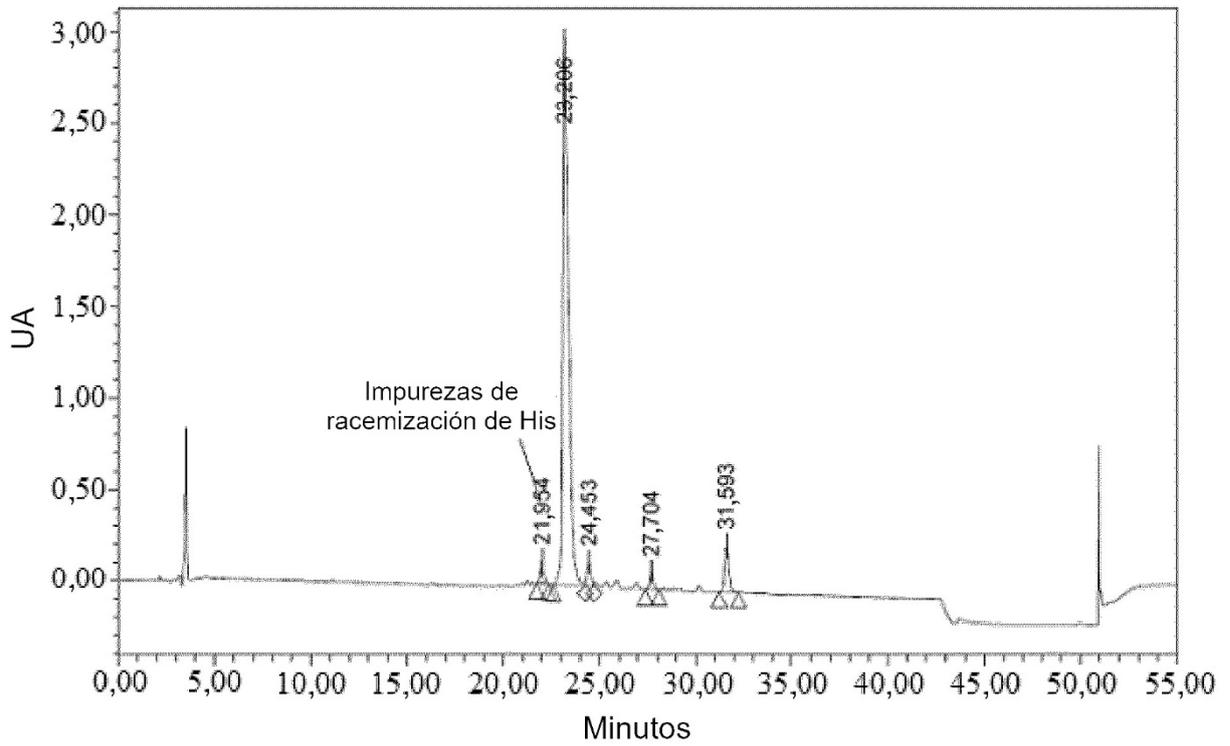


Figura 3

D:\Methods\flexControlMethods\RP_700-3500_Da.par

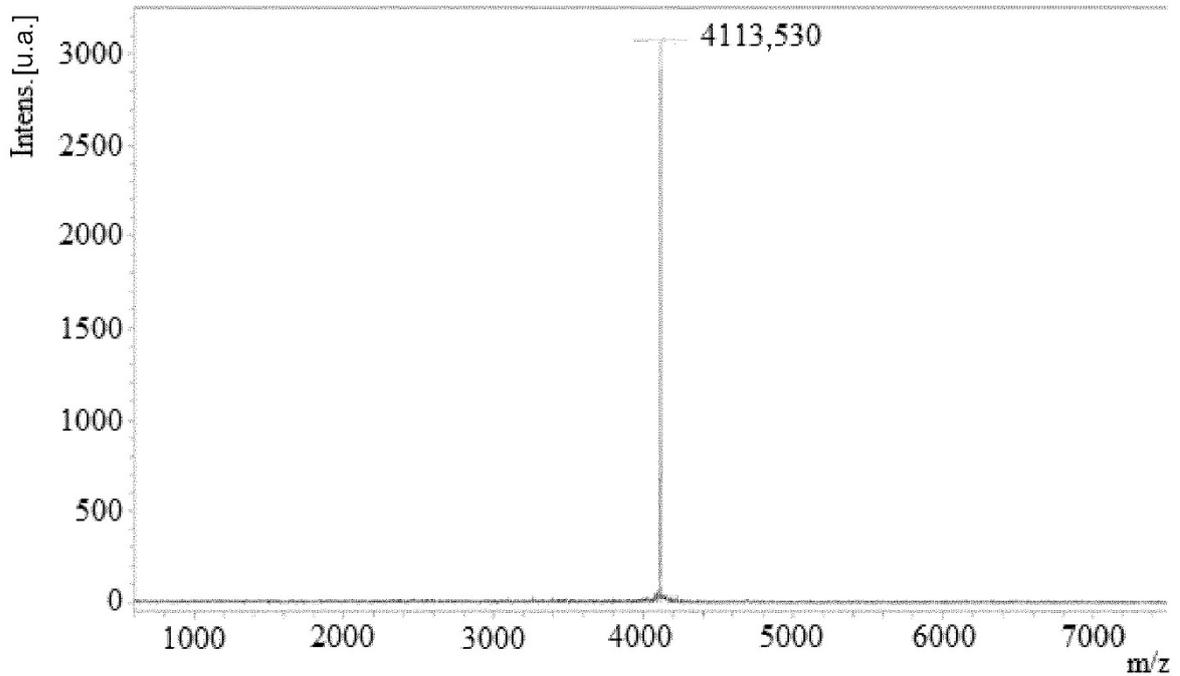
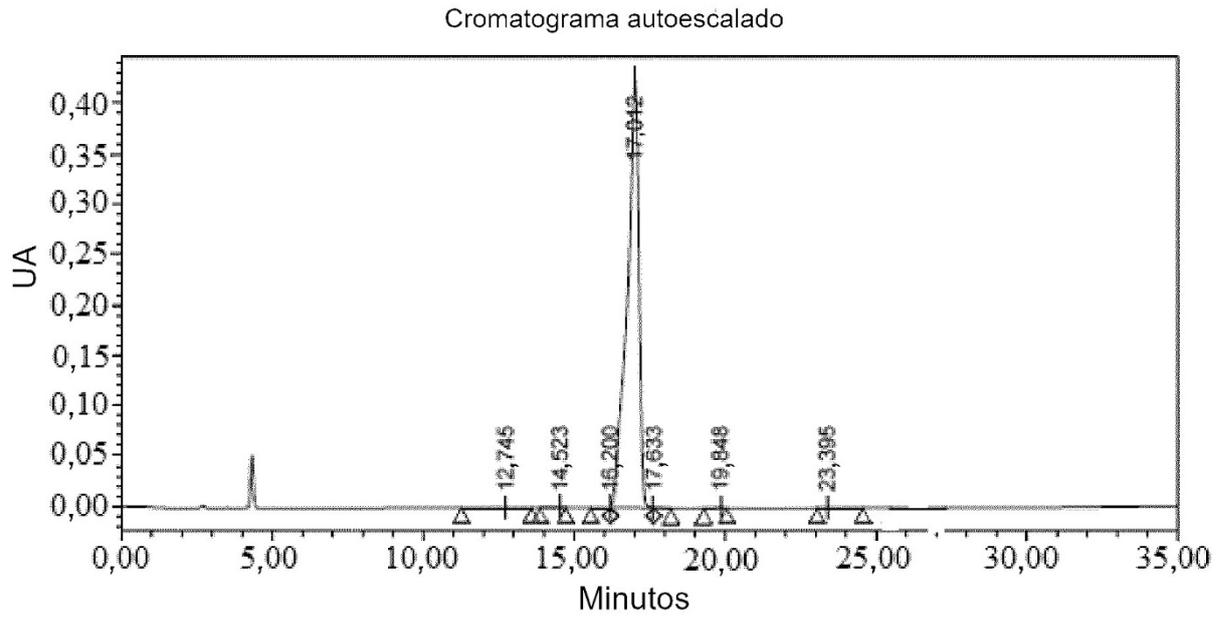


Figura 4



Nombre de picos:

	Inyección	TR	Área	% de área	Altura
1	9	12,745	12656	0,11	189
2	9	14,523	6006	0,05	290
3	9	16,200	5154	0,04	776
4	9	17,012	11503005	99,60	427218
5	9	17,633	5568	0,05	404
6	9	19,848	6121	0,05	304
7	9	23,395	10481	0,09	265

Figura 5

D:\Methods\flexControlMethods\RP_700-3500_Da.par

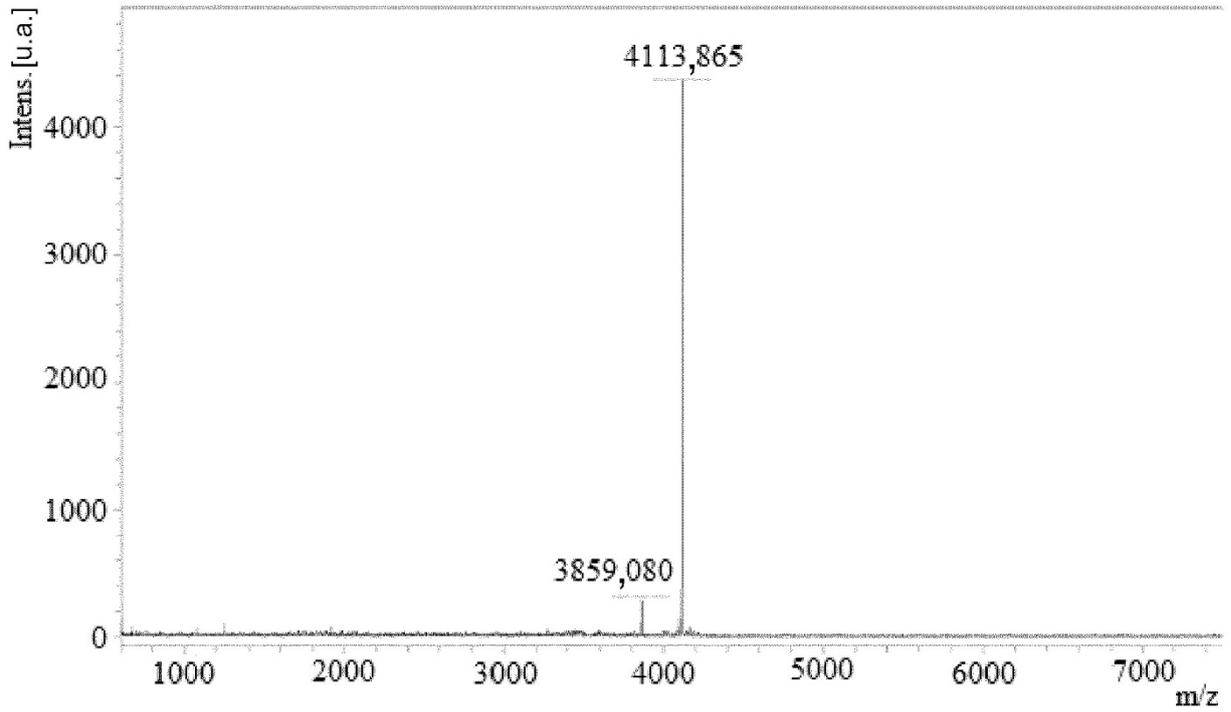


Figura 6

D:\Methods\flexControlMethods\RP_700-3500_Da.par

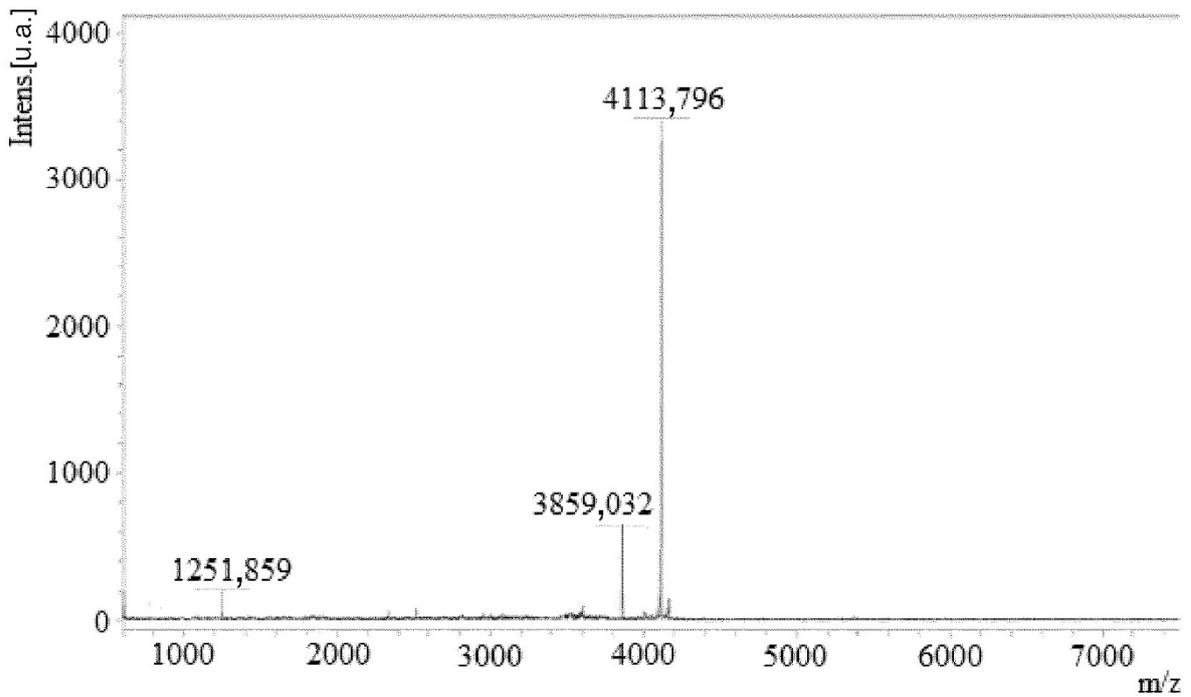


Figura 7

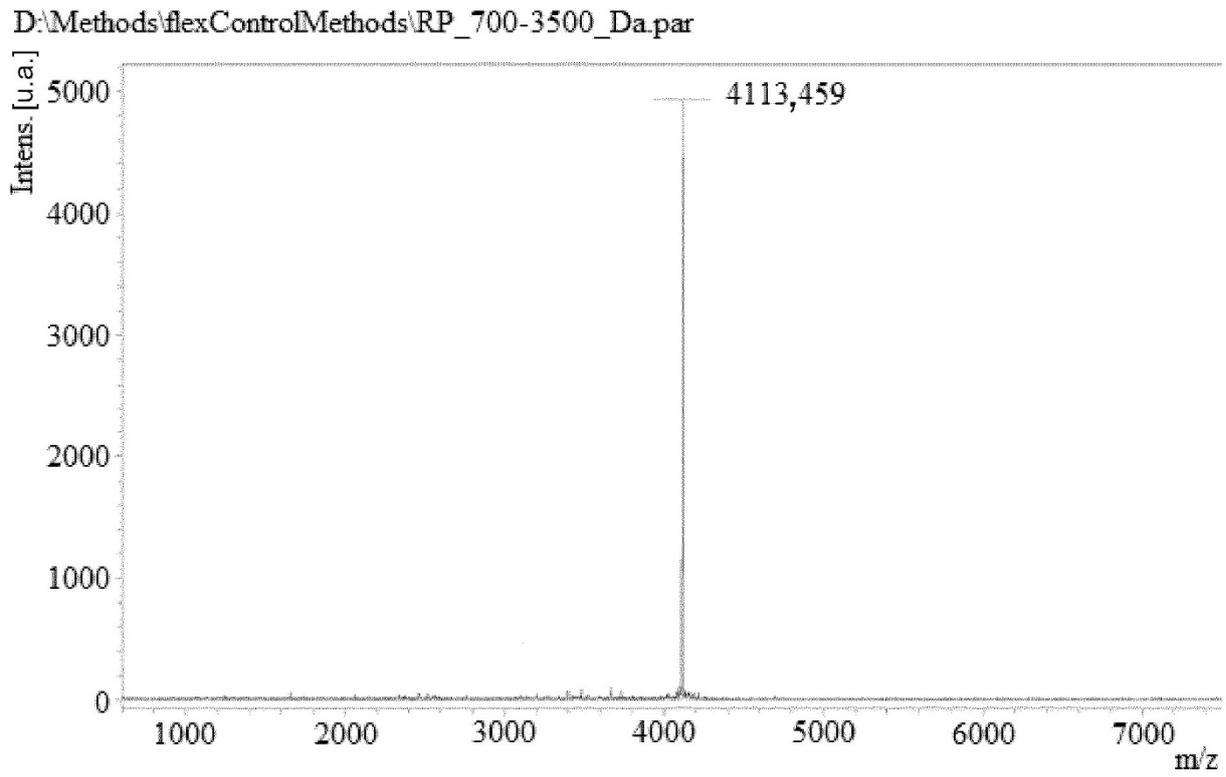


Figura 8