

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 828**

51 Int. Cl.:

C07K 7/23

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2010 E 10720343 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2421887**

54 Título: **Método para la fabricación de degarelix**

30 Prioridad:

24.04.2009 SE 0900558

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

24.06.2015

73 Titular/es:

**POLYPEPTIDE LABORATORIES A/S (100.0%)
Herredsvejen 2
3400 Hillerød, DK**

72 Inventor/es:

**ZHANG, HAIXIANG;
FOMSGAARD, JENS y
STAERKAER, GUNNAR**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 538 828 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 la fabricación de degarelix

Campo de la invención

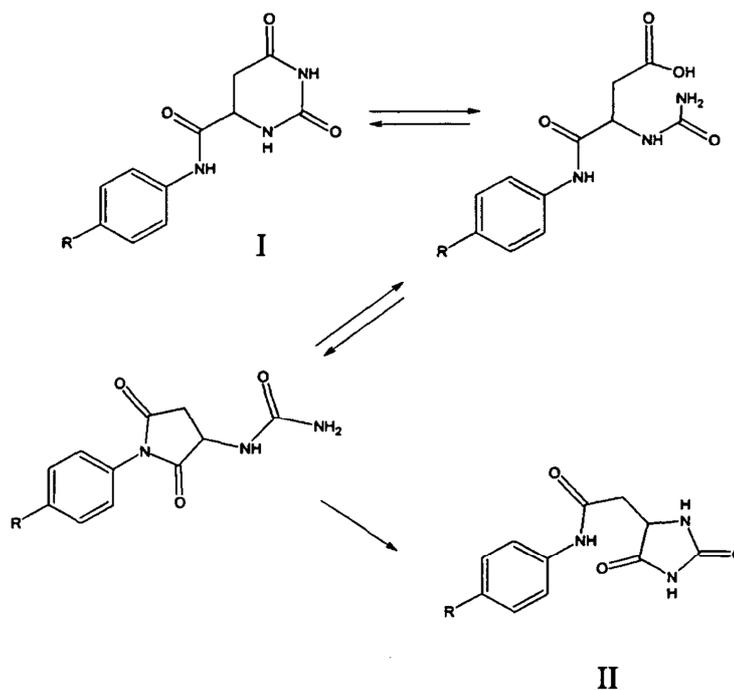
5 La presente invención se refiere a un método para la fabricación de péptidos sintéticos, en particular a la fabricación del decapeptido degarelix.

Antecedentes de la invención

10 Existe un número de métodos conocidos disponibles para la síntesis de péptidos. Un enfoque clásico es la síntesis de péptidos en fase líquida (LPPS, por sus siglas en inglés), que ha sido un método preferido para producir grandes cantidades de péptidos. Otro enfoque actual y comúnmente usado para la síntesis de péptidos es la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, por sus siglas en inglés), en la que la cadena peptídica en crecimiento se liga covalentemente a una resina sobre un soporte sólido, hasta que se escinde de él una vez que se alcanza la longitud y la secuencia deseadas. En estos métodos las cadenas laterales reactivas de los aminoácidos incorporados necesitan protegerse a fin de evitar otras reacciones aparte de la formación deseada de nuevos enlaces peptídicos en el péptido en crecimiento. Además, para evitar reacciones secundarias entre los aminoácidos añadidos, así como la incorporación de múltiples aminoácidos en cada etapa, los aminoácidos añadidos se protegen normalmente en el amino en α . La síntesis se convierte así en una de ciclos repetidos de desprotección de la amina en α de un péptido ligado en fase sólida, seguido por acoplamiento a una sola unidad de aminoácido protegida en amino en α .

20 El degarelix es un antagonista de GnRH para el uso en el tratamiento del cáncer de próstata. El degarelix tiene un comienzo de acción inmediato y suprime gonadotropinas, testosterona y antígeno específico de la próstata (PSA). El degarelix es un decapeptido sintético de la fórmula Ac-D-2Nal-D-Phe(4Cl)-D-3Pal-Ser-4Aph(Hor)-D-4Aph(Cbm)-Leu-Ilys-Pro-D-Ala-NH₂

25 El quinto resto de aminoácido del extremo amino del degarelix corresponde al aminoácido no natural Aph(L-hor). Aph(L-Hor) indica (L-hidroorotil)-4-amino-fenilalanina. Se sabe en la técnica (Koedjikov, A. H. y cols., J. Chem. Soc. Perkin, Trans. 2, 1984, páginas 1077-1081; Kaneti, J. y cols., Org. Biomol. Chem., 2004, páginas 1098-1103) que, bajo condiciones básicas, compuestos que comprenden un resto dihidouracilo sufren una transposición hasta compuestos que comprenden un resto hidantoína. La correspondiente transposición de Aph(L-Hor) se ilustra posteriormente (arriba a la izquierda: resto dihidouracilo N-4-(L-hidroorotilamino)-fenilalanina I, R = -CH₂CHNH₂COOH; abajo a la derecha: resto hidantoína II, N-4-[2-(5-hidantoil)-acetil]-fenilalanina).



30 En la transposición, el resto dihidouracilo I se convierte en un resto hidantoína II. Siendo el resto L-Hor de 4Aph(L-Hor) del tipo dihidouracilo, se espera que tal transposición se produzca durante un procedimiento de fabricación de degarelix en el que se emplean condiciones básicas. Esto fue confirmado por el solicitante poniendo en contacto

productos intermedios de síntesis de péptidos que comprenden un extremo 4Aph(Hor) protegido con Fmoc en el amino en α bien con NaOH o bien con la base orgánica dicitohexilamina (DCHA). Se encontró que el producto de desprotección obtenido estaba contaminado por hasta varios % en peso del correspondiente producto de transposición de hidantoína. En la síntesis de degarelix, se puede esperar así que el producto intermedio Fmoc-4Aph(Hor)-4Aph(Cbm)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH-Resina se transponga parcialmente en Fmoc-X-4Aph(Cbm)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH-Resina, siendo X 4-([2-(5-hidantoinil)]acetilamino)-fenilalanina, cuando se desprotege bajo condiciones básicas. Por consiguiente, se puede esperar así que un producto de degarelix obtenido a través de Fmoc-4Aph(Hor)-4Aph(Cbm)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH-Resina esté contaminado por una cantidad correspondiente de Ac-D-2Nal-D-Phe(4Cl)-D-3Pal-Ser-X-D-4Aph(Cbm)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂. El degarelix es el ingrediente activo de un fármaco para la administración a seres humanos. Por lo tanto, no debe estar contaminado por ninguna impureza que supere 0,3% en peso del producto. Así, en degarelix adecuado para el consumo humano, el subproducto de hidantoína no puede ser tolerado en una cantidad de más de 0,3% en peso. Puesto que el subproducto que contiene resto hidantoína es estructuralmente muy similar al degarelix, su separación es difícil. Si se intenta, se espera que la separación dé como resultado una pérdida sustancial de producto. De ahí que, en un procedimiento de fabricación de degarelix de calidad farmacéutica empleando el grupo protector Fmoc, se deban evitar las condiciones básicas.

La síntesis de degarelix se divulga en US 5925730 A. El grupo protector del amino en α preferido en esta síntesis y que se ha usado en todos los Ejemplos es el grupo terc-butiloxicarbonilo (Boc). Además, una amplia gama de otros grupos protectores muy conocidos, tales como el grupo fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) se divulga con este propósito.

Una ventaja con el grupo Boc es que los grupos amino en α protegidos por él se pueden desbloquear bajo condiciones ácidas mediante tratamiento estándar con ácido trifluoroacético (TFA).

Una desventaja con el TFA es su alta toxicidad para seres humanos, que pone en riesgo al personal de la fábrica. Otra desventaja con el TFA es su toxicidad medioambiental, que bien hace costosa la eliminación o bien, si se elimina inapropiadamente, contamina el medio ambiente.

Objetivos de la invención

Un objetivo de la invención es proporcionar un método para la fabricación de degarelix, que no ponga en riesgo la salud humana, en particular que sea menos nocivo para la salud humana que el método divulgado en US 5925730 A.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un método para la fabricación de degarelix, que no ponga en riesgo el medio ambiente, en particular que sea menos nocivo para el medio ambiente que el método divulgado en US 5925730 A.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar un método para la fabricación de degarelix, que sea menos costoso que los métodos conocidos en la técnica.

Objetivos adicionales de la invención se harán evidentes a partir del siguiente compendio de la invención, un número de realizaciones preferidas divulgadas en forma de ejemplos, y las reivindicaciones adjuntas.

Compendio de la invención

Los inventores han encontrado sorprendentemente que se puede fabricar degarelix farmacéuticamente puro mediante síntesis en fase sólida usando Fmoc como grupo protector de amino en α . "Farmacéuticamente puro" indica que el producto no contiene más de 0,3% en peso de cualquier impureza individual. Inesperadamente, el resto Aph(L-Hor) no sufre transposición durante la síntesis en fase sólida a pesar de ser sometido a varios ciclos de protección con y desprotección de Fmoc bajo condiciones básicas.

Los aminoácidos protegidos en el amino en α con Fmoc se acoplan a la resina y a continuación entre sí de un modo por etapas, cíclico y dependiente de la secuencia. Cada etapa de acoplamiento de un aminoácido es seguida por una etapa de desprotección para retirar el grupo de protección Fmoc y permitir que se acople el siguiente aminoácido. La desprotección se consigue mediante una base. Se usa para la desprotección la base piperidina o piperidina sustituida con alquilo en un medio orgánico.

La protección de la cadena lateral se incluye preferiblemente para proteger cadenas laterales de aminoácidos que son particularmente reactivas o lábiles, para evitar reacciones secundarias y/o la ramificación de la molécula en crecimiento. Los grupos de protección de la cadena lateral se retiran una vez que se ha alcanzado la longitud total del péptido en crecimiento.

Así, según la presente invención, se divulga un método de fabricación de degarelix, Ac-D-2Nal-DPhe(4Cl)-D-3Pal-

5 Ser-4Aph(Hor)-D-4Aph(Cbm)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂, en donde el degarelix comprende 0,3% en peso o menos, en particular 0,1% en peso o menos, lo más particularmente 0,01% en peso o menos, de Ac-D-2Nal-D-Phe(4Cl)-D-3Pal-Ser-X-D-4Aph(Cbm)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂, en donde X es 4-([2-(5-hidantoi)]-acetilamino)-fenilalanina, comprendiendo el método la síntesis por etapas sobre un soporte sólido que comprende un grupo amino conectado al soporte, en donde las etapas comprenden proporcionar una solución de un aminoácido o péptido del que un grupo amino en α se protege mediante Fmoc; poner en contacto el soporte con la solución en presencia de un reactivo para formar un enlace peptídico entre un grupo carboxilo del aminoácido o péptido disuelto y el grupo amino conectado al soporte durante un tiempo suficiente para formar dicho enlace peptídico; retirar el Fmoc poniendo en contacto el soporte con una base orgánica en un disolvente orgánico. La base orgánica se selecciona de piperidina y piperidinas sustituidas con alquilo en C, en particular 2-alquilpiperidina, 3-alquilpiperidina, 2,4-dialquilpiperidina, 2,5-dialquilpiperidina, 2,6-dialquilpiperidina, en donde el alquilo es una cadena ramificada o lineal de 1 a 6 carbonos, en particular metilo o etilo, lo más particularmente metilo. Un disolvente preferido es la dimetilformamida. Otro disolvente preferido es la dietilformamida. Otros disolventes preferidos son NMP o DMA. Un reactivo preferido para formar un enlace peptídico comprende N,N'-diisopropilcarbodiimida. Se prefiere que el grupo amino conectado al soporte sea un grupo amino en α de un fragmento de degarelix conectado al soporte. También se prefiere que el péptido protegido por Fmoc sea un fragmento de degarelix. Un soporte preferido es uno seleccionado de amida de Rink AM-resina y amida de Rink MBHA-resina. Un método preferido para liberar degarelix del soporte es mediante tratamiento con ácido.

20 Según un aspecto preferido de la invención, se divulga degarelix preparado mediante el método de la invención que comprende 0,3% en peso o menos de Ac-D-2Nal-D-Phe(4Cl)-D-3Pal-Ser-X-D-4Aph(Cbm)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂, en donde X es 4-([2-(5-hidantoi)]-acetilamino)-fenilalanina, en particular 0,1% en peso o menos, lo más particularmente 0,01% en peso o menos.

25 Según otro aspecto preferido de la invención, se divulga el uso de Fmoc en la síntesis en fase sólida para preparar degarelix que contiene 0,3% en peso o menos, más preferiblemente 0,1% en peso o menos, lo más preferiblemente 0,01% en peso o menos, de Ac-D-2Nal-D-Phe(4Cl)-D-3Pal-Ser-X-D-4Aph(Cbm)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂, en donde X es 4-([2-(5-hidantoi)]-acetilamino)-fenilalanina.

La invención se describirá ahora con mayor detalle mediante referencia a un dibujo y un número de realizaciones preferidas descritas en los ejemplos.

Descripción de realizaciones preferidas

30 Abreviaturas

4-(2',4'-Dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamidometil-resina de poliestireno	[Fmoc-amida de Rink AM-resina]
4-(2',4'-Dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-4-metilbenzhdrilamino-resina de poliestireno	[Fmoc-amida de Rink MBHA-resina]
9-Fluorenilmetiloxicarbonil-D-4-clorofenilalanina	[Fmoc-D-Phe-(4Cl)-OH]
9-Fluorenilmetiloxicarbonil-D-2-naftilalanina	[Fmoc-D-2Nal-OH]
9-Fluorenilmetiloxicarbonil-D-3-piridilalanina	[Fmoc-D-3Pal-OH]
9-Fluorenilmetiloxicarbonil-N(4)-(t-butilcarbamoil)-D-4-aminofenilalanina	[Fmoc-D-4Aph(tBuCbm)-OH]
9-Fluorenilmetiloxicarbonil-N(4)-(L-hidroorotil)-4-aminofenilalanina	[Fmoc-Aph(L-Hor)-OH]
9-Fluorenilmetiloxicarbonil-leucina-OH	[Fmoc-L-Leu-OH]
9-Fluorenilmetiloxicarbonil-O-t-butil-serina	[Fmoc-Ser(tBu)-OH]
9-Fluorenilmetiloxicarbonil-L-prolina	[Fmoc-Pro-OH]
9-Fluorenilmetiloxicarbonil-D-alanina	[Fmoc-D-Ala-OH]
9-Fluorenilmetiloxicarbonil-N(ε)-isopropil-N(ε)-Boc-lisina	[Fmoc-L-Lys(Boc)-OH]

Acetonitrilo	
2-Propanol (isopropanol)	(IPA)
Etanol, 99,9%	(EtOH)
Metanol	(MeOH)
Agua purificada	(agua)
Acetato de etilo	(AcOEt)
Ácido acético	(AcOH)
Hidróxido amónico acuoso	(NH ₃ ac.)
Acetato amónico	(AcONH ₄)
Acetilimidazol	---
N-metilmorfolina	(NMM)
N-metilpirrolidona	(NMP)
N,N'-diisopropilcarbodiimida	(DIC)
N,N-dimetilformamida	(DMF)
N,N-dimetilacetamida	(DMA)
Dimetilsulfóxido	(DMSO)
Diciclohexilamina	(DCHA)
1-Hidroxibenzotriazol	(HOBt)
Solución de hidróxido sódico, acuosa	(NaOH ac.)
Ácido clorhídrico, acuoso	(HCl ac.)
Ácido fosfórico	(H ₃ PO ₄)
Diisopropiletilamina	(DIEA)
Etanoditiol	(EDT)
Isopropil-etil-éter	(IPE)
Control durante la fabricación	(IPC)
Benciloxicarbonilo	(Z)
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-eno	(DBU)

EJEMPLO 1

Formación de hidantoína en la síntesis de degarelix. La transposición del grupo hidroorótico en un grupo hidantoinacetilo en la producción de degarelix se ha observado en dos fases y dos grupos de condiciones básicas.

5 La primera transposición aparecía durante extracciones básicas del segmento Z-Ser(tBu)-4Aph(Hor)-D-4Aph(tBu-Cbm)-Leu-ILys(Boc)-Pro-D-Ala-NH₂. El pH se ajustó hasta 9,1 en el sistema bifásico orgánico/acuoso usando solución conc. de NaOH, dando como resultado la formación de 4,5% en peso del análogo de hidantoína. El mecanismo parecía comprender dos etapas: (a) hidrólisis del resto hidroorótico de 6 miembros bajo condiciones básicas seguido por cierre de anillo hasta el análogo de hidantoína de 5 miembros bajo condiciones ácidas.

10 La segunda transposición se observó durante la evaporación del segmento Z-Ser(tBu)-4Aph(Hor)-D-4Aph(tBu-Cbm)-Leu-OH·DCHA. Después de las extracciones precedentes, se disolvió Z-Ser(tBu)-4Aph(Hor)-D-4Aph(tBu-Cbm)-Leu-OH en una mezcla de acetato de etilo y 2-butanol. Se añadió DCHA (2,5 eq.), debido a que el segmento se aísla como la sal de DCHA después de la evaporación del disolvente seguido por una etapa de precipitación. En la partida particular se identificaban tanto el análogo de hidantoína como la forma hidrolizada (mencionada anteriormente). La cuantificación de la hidantoína no era posible debido a la escasa separación mediante HPLC de otros productos; la forma hidrolizada se formaba en una cantidad de 1,34% en peso de los productos combinados. La evidencia experimental mostraba que la cantidad de transposición/hidrólisis estaba relacionada con la cantidad de DCHA usada en el método.

15 El siguiente experimento proporcionaba una prueba adicional de la inestabilidad del resto hidroorótico bajo condiciones básicas. Z-Ser(tBu)-4Aph(Hor)-D-4Aph(tBu-Cbm)-Leu-OH·DCHA (67 mM) se disolvió en 2-BuOH húmedo con 167 mM (2,5 eq.) de DCHA a 31°C. Después de 25 h, se habían formado 1,3% del análogo de hidantoína y 0,3% del producto intermedio hidrolizado.

EJEMPLO 2

20 Estabilidad del degarelix en DBU/DMF y piperidina/DMF. La estabilidad del degarelix se probó bajo condiciones correspondientes a las usadas para la retirada del grupo Fmoc durante la SPPS. Se sabe que el grupo hidroorótico de la cadena lateral de 4Aph(Hor), residuo de aminoácido nº 5 en la secuencia del degarelix, es sensible a una base y se transpone hasta un grupo hidantoinoacetilo. Todos los procedimientos de SPPS conocidos por los inventores se han basado en la química del Boc.

25 Muestras de degarelix se disolvieron en piperidina al 20%/DMF; DBU al 2% en DMF y DBU al 2% + agua al 5% en DMF; respectivamente. Las muestras se analizaron mediante HPLC después de 20 h y se determinó la cantidad de análogo de hidantoína.

30 DBU al 2%/DMF daba como resultado la formación de 1,8% de hidantoína. Si estaba presente agua al 5%, además (simulando la DMF húmeda), la cantidad se incrementaba hasta 7%. Sorprendentemente, el uso de piperidina al 20% en DMF no daba como resultado formación del análogo de hidantoína, indicando que esta mezcla podría ser útil para la SPPS basada en Fmoc de degarelix.

EJEMPLO 3

Síntesis y purificación de degarelix usando Fmoc-amida de Rink AM-resina

35 Etapa 1. Se puso Fmoc-amida de Rink AM-resina (64 g; sustitución 0,67 mmol/g) en un reactor y se lavó con 1,9 l de DMF. Se añadieron a la resina hinchada 250 ml de piperidina al 20% en DMF y se agitó durante 20 min. El reactor se descarga a través del filtro del fondo aplicando vacío al reactor y se aplica un segundo tratamiento con 250 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga una vez más aplicándole vacío seguido por un lavado de la resina peptídica usando 2 l de DMF. A continuación, el reactor se descarga aplicando vacío. La resina peptídica está ahora lista para la etapa 2.

40 Etapa 2. Una solución de 27,0 g de Fmoc-D-Ala-OH (2 eq.), 14,3 g de HOBt y 13,2 ml de DIC se disuelve en 250 ml de DMF y se deja activar durante 15 min, después de los cuales se vierte en el reactor que contiene la resina peptídica. Después de 1 h de tiempo de reacción, se añaden a la solución 2,2 ml de NMM y se deja que la reacción avance durante otra hora. A continuación, se añaden 30 ml de anhídrido de ácido acético y 2 ml de NMM a la mezcla, que se deja bajo agitación durante 15 min. A continuación, el reactor se descarga usando vacío. La resina peptídica se lava con 2 l de DMF. Después de aplicar vacío al reactor, retirando la DMF, la resina peptídica se trata con 250 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga aplicando vacío y se realiza un segundo tratamiento de 250 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga una vez más aplicando vacío y la resina peptídica se lava con 2 l de DMF. Ahora está lista para la etapa 3.

50 Etapa 3. Una solución de 29 g de Fmoc-L-Pro-OH (2 eq.), 14,3 g de HOBt y 13,2 ml de DIC se disuelve en 250 ml de DMF y se deja activar durante 25 min., después de los cuales se vierte en el reactor que contiene la resina peptídica. Después de 75 min. de reacción, se añaden a la solución 2,2 ml de NMM y se deja que la reacción avance durante otra hora. A continuación, se añaden 30 ml de anhídrido de ácido acético y 2 ml de NMM a la mezcla, que se deja que permanezca bajo agitación durante 15 min. A continuación, el reactor se descarga usando vacío. Se usa DMF

(2,6 l) para lavar la resina peptídica. Después de aplicar vacío al reactor, retirando la DMF, la resina peptídica se trata con 250 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga aplicando vacío, y se realiza un segundo tratamiento con 250 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga una vez más aplicando vacío y la resina peptídica se lava con 2 l de DMF. Ahora está lista para la etapa 4.

5 Etapa 4. Una solución de 33 g de Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (1,5 eq), 10,7 g de HOBt y 10,1 ml de DIC se disuelve en 250 ml de DMF y se deja activar durante 0,5 h, después de las cuales se vierte en el reactor que contiene la resina peptídica. Después de 2 h de reacción, se añaden a la solución 2,2 ml de NMM y se deja que la reacción avance durante otra hora. A continuación, se añaden 30 ml de anhídrido de ácido acético y 2,2 ml de NMM a la mezcla, que se deja bajo agitación durante 15 min., después de los cuales el reactor se descarga usando vacío. La resina peptídica se lava con DMF (3 l). Después de aplicar vacío al reactor, retirando la DMF, la resina peptídica se trata con 250 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga aplicando vacío y se realiza un segundo tratamiento de 250 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga una vez más aplicando vacío y la resina peptídica se lava con 3,5 l de DMF. Ahora está lista para la etapa 5.

15 Etapa 5. Una solución de 38 g de Fmoc-L-Leu-OH (2,5 eq.), 18 g de HOBt y 16,8 ml de DIC se disuelve en 250 ml de DMF y se deja activar durante 0,5 h, después de lo cual se vierte en el reactor que contiene la resina peptídica. Después de 2 h de reacción, se añaden a la solución 2,2 ml de NMM y se deja que la reacción avance durante otros 50 min. A continuación, se añaden 30 ml de anhídrido de ácido acético y 2 ml de NMM a la mezcla, que se deja bajo agitación durante 15 min. A continuación, el reactor se descarga usando vacío. Se usa DMF (2,6 l) para lavar la resina peptídica. Después de aplicar vacío al reactor, retirando la DMF, la resina peptídica se trata con 250 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga aplicando vacío y se realiza un segundo tratamiento con 250 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga una vez más aplicando vacío y la resina peptídica se lava con 2,5 l de DMF. Ahora está lista para la etapa 6.

25 Etapa 6. Una solución de 32 g de Fmoc-D-4Aph(tBu-Cbm)-OH (1,5 eq), 10,7 g de HOBt y 10,1 ml de DIC se disuelve en 250 ml de DMF y se deja activar durante 1 hora, después de la cual se vierte en el reactor que contiene la resina peptídica. Después de 20 min. de reacción, se añaden a la solución 22 ml de NMM y se deja que la reacción avance durante otras 20 h. A continuación, se añaden 30 ml de anhídrido de ácido acético y 2 ml de NMM a la mezcla, que se deja bajo agitación durante 15 min. A continuación, el reactor se descarga usando vacío. La resina peptídica se lava con 4 l de DMF. Después de aplicar vacío al reactor, retirando la DMF, la resina peptídica se trata con 250 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga aplicando vacío y se realiza un segundo tratamiento de 20 min. con 250 ml de piperidina al 20% en DMF. El reactor se descarga una vez más aplicando vacío y la resina peptídica se lava con 3,4 l de DMF. Ahora está lista para la etapa 7.

35 Etapa 7. Una solución de 35 g de Fmoc-L-4Aph(L-Hor)-OH (1,5 eq), 11 g de HOBt y 10,1 ml de DIC se disuelve en 350 ml de DMF y se deja activar durante 1 h, después de la cual se vierte en el reactor que contiene la resina peptídica. Después de 50 min. de reacción, se añaden a la solución 2,2 ml de NMM y la reacción se deja avanzar durante otras 21,5 h. El reactor se descarga usando vacío. La resina peptídica se lava con 4,4 l de DMF. Después de aplicar vacío al reactor, retirando la DMF, la resina peptídica se trata con 350 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga aplicando vacío y se realiza un segundo tratamiento de 20 min. con 350 ml de piperidina al 20% en DMF. El reactor se descarga una vez más aplicando vacío y la resina peptídica se lava con 4,4 l de DMF. Ahora está lista para la etapa 8.

40 Etapa 8. Fmoc-L-Ser(tBu)-OH (2.5 eq) (41 g), 17,9 g de HOBt, 16,8 ml de DIC y 4,9 ml de NMM se disuelven en 500 ml de DMF y se vierten en el reactor que contiene la resina peptídica. La reacción se deja avanzar durante 3,5 h. A continuación, el reactor se descarga usando vacío. La resina peptídica se lava con 4,2 l de DMF. Después de aplicar vacío al reactor, retirando la DMF, la resina peptídica se trata con 375 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga aplicando vacío y se realiza un segundo tratamiento de 20 min. de 375 ml de piperidina al 20% en DMF. El reactor se descarga una vez más aplicando vacío y la resina peptídica se lava con 4,2 l de DMF. Ahora está lista para la etapa 9.

50 Etapa 9. Una solución de 25 g de Fmoc-D-3Pal-OH (1,5 eq.), 10,7 g de HOBt, 10,1 ml de DIC y 4,9 ml de NMM se disuelve en 400 ml de DMF y se vierte en el reactor que contiene la resina peptídica. La reacción se deja avanzar durante 4,5 h. A continuación, el reactor se descarga usando vacío. La resina peptídica se lava con 4,2 l de DMF. Después de aplicar vacío al reactor, retirando la DMF, la resina peptídica se trata con 375 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga aplicando vacío y se realiza un segundo tratamiento de 20 min. con 375 ml de piperidina al 20% en DMF. El reactor se descarga una vez más aplicando vacío y la resina peptídica se lava con 4,2 l de DMF. Ahora está lista para la etapa 10.

55 Etapa 10. Una solución de 27 g de Fmoc-D-Phe(4Cl)-OH (1,5 eq.), 10,7 g de HOBt, 10,1 ml de DIC y 4,9 ml de NMM se disuelve en 400 ml de DMF y se vierte en el reactor que contiene la resina peptídica. La reacción se deja avanzar durante 10 h. El reactor se descarga usando vacío. La resina se lava con 5,5 l de DMF. Después de aplicar vacío al reactor y retirar la DMF, la resina peptídica se trata con 375 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga aplicando vacío y se realiza un segundo tratamiento de 20 min. con 375 ml de piperidina al 20%

en DMF. El reactor se descarga una vez más aplicando vacío y la resina peptídica se lava con 5 l de DMF. Ahora está lista para la etapa 11.

5 Etapa 11. Una solución de 28 g de Fmoc-D-2Nal-OH (1,5 eq.), 10,7 g de HOBt, 10,1 ml de DIC y 4,9 ml de NMM se disuelve en 400 ml de DMF y se vierte en el reactor que contiene la resina peptídica. La reacción se deja avanzar durante 2,5 h. El reactor se descarga usando vacío. La resina peptídica se lava con 5,2 l de DMF. Después de aplicar vacío al reactor y retirar la DMF, la resina peptídica se trata con 375 ml de piperidina al 20% en DMF durante 20 min. El reactor se descarga aplicando vacío y se realiza un segundo tratamiento de 20 min. de 375 ml de piperidina al 20% en DMF. El reactor se descarga una vez más aplicando vacío y la resina peptídica se lava con 5 l de DMF. Ahora está lista para la etapa 12.

10 Etapa 12. Se disuelven acetilimidazol (3 eq.) (14,5 g) y 4,9 ml de NMM en 400 ml de DMF y se vierten en el reactor. Después de 1,5 h, el reactor se descarga aplicando vacío al reactor. La resina peptídica se lava con 5 l de DMF y el reactor se descarga usando vacío.

Etapa 13. La resina peptídica se lava con IPA y se seca bajo vacío. Se aisló resina peptídica (129,8 g; rendimiento 96%).

15 Etapa 14. Se suspende resina peptídica seca (60 g) en 600 ml de TFA durante 25 h a temperatura ambiente. A continuación, se vertió en una mezcla de 2,4 l de agua, 620 g de acetato amónico, 600 ml de etanol y 600 ml de ácido acético. La mezcla se ajusta hasta un pH entre 3 y 4 usando TFA y se filtra.

20 Etapa 15. El producto se purifica usando un protocolo de purificación en dos etapas. En la primera etapa, se usa una columna (2,5 cm x 34 cm) rellena con material C-18 en fase inversa con un sistema tamponador que consiste en tampón A (TFA acuoso al 0,12%) y tampón B (etanol al 99,9%). Se aplica a la columna un volumen de la solución filtrada procedente de la etapa 14 correspondiente a 1,6 g del producto. La purificación se ejecuta usando un gradiente por etapas partiendo de B al 10% para 2-3 volúmenes de columna, B al 29% para 5-7 volúmenes de columna y un gradiente de B al 29% a B al 50% a lo largo de 3 volúmenes de columna a un caudal de 70 ml/min. Este procedimiento se sigue hasta que se ha procesado toda la solución filtrada procedente de la etapa 14. Todas las fracciones recogidas se analizan mediante HPLC analítica. Las fracciones que contienen producto con una pureza superior a 94% se reúnen. La segunda etapa de purificación se realiza usando una columna (2,5 cm x 34 cm) rellena con material C-18 en fase inversa y un sistema tamponador que consiste en un tampón A (ácido acético acuoso al 1%), tampón B (etanol al 99,9%) y tampón C (acetato amónico acuoso 0,5 M). A partir de las fracciones reunidas que contienen el producto, una cantidad equivalente a 1,3 g del producto se aplica a la columna y se realiza la purificación aplicando un gradiente por etapas partiendo de B al 10% + C al 90% para 2-3 volúmenes de columna seguido por A al 90% + B al 10% para 2-3 volúmenes de columna. El producto se eluye mediante B al 24% + A al 76%. Las fracciones que contienen producto con la pureza aceptable se reúnen y se desalan usando la misma columna. El desalado se realiza usando tampón A (ácido acético acuoso al 1%) y tampón B (etanol al 99,9%). Se aplica a la columna un volumen de la fracción purificada reunida correspondiente a 1,6 g de producto, usándose 2-3 volúmenes de columna de tampón A para retirar por lavado cualquier acetato amónico del producto. A continuación, el producto se eluye usando tampón A al 50% + tampón B al 50%. La solución del producto purificado que contiene etanol al 50% se concentra en un evaporador giratorio. Cuando se ha retirado todo el etanol, la solución restante que contiene el producto se liofiliza. Se obtiene un total de 11,8 g (rendimiento global 37%) de degarelix como un sólido apelmusado. No se podía detectar 4-([2-(5-hidantolil)]acetilamino)-fenilalanina en el producto (HPLC).

40 EJEMPLO 4

Síntesis y purificación de degarelix usando Fmoc-amida de Rink MBHA

Realizadas sustancialmente como la síntesis y la purificación del Ejemplo 1. Desviaciones con respecto al método del Ejemplo 1:

- a) Se usaba Fmoc-D-Aph(Cbm)-OH en lugar de Fmoc-D-Aph(tBu-Cbm)-OH;
- 45 b) La acetilación del extremo N de la H-D-2-Nal-resina peptídica se realizó usando anhídrido de ácido acético en lugar de acetilimidazol;
- c) Se usó acetonitrilo en la purificación en lugar de etanol.

No se podía detectar 4-([2-(5-hidantolil)]acetilamino)-fenilalanina en el producto mediante HPLC.

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> PolyPeptide Laboratories A/S Gunnar, Staerkaer Zhang, Haixiang Fomsgaard, Jens

<120> Método para la Fabricación de Degarelix

<130> PLPP0051

<150> SE 0900558-8

<151> 2009-04-24

5 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> sintética

<220>

<221> PÉPTIDO

15 <222> (1)..(10)

<223> misc_feature Ac-D-2Nal-D-Phe(4Cl)-D-3Pal-Ser-4Aph(Hor)-D-4Aph(Cbm)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂

<300>

<302> Antagonistas de GNRH

<310> US 5925730

20 <311> 1997-04-11

<312> 1999-07-20

<313> (1)..(10)

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Leu Xaa Pro Xaa
1 5 10

25 <210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> sintética

ES 2 538 828 T3

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(10)

5 <223> misc_feature AC-D-2Nal-D-Phe(4Cl)-D-3Pal-Ser-4-((2-(5-hidantoil))acetilamino)P he-D-4Aph(Cbm)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂

<300>

<302> Antagonistas de GNRH

<310> US 5925730

<311> 1997-04-11

10 <312> 1999-07-20

<313> (1)..(10)

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Leu Xaa Pro Xaa
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de fabricación de degarelix, Ac-D-2Nal-DPhe(4Cl)-D-3Pal-Ser-4Aph(Hor)-D-4Aph(Cbm)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂, en donde el degarelix comprende 0,3% en peso o menos, en particular 0,1% en peso o menos, lo más particularmente 0,01% en peso o menos, de Ac-D-2Nal-D-Phe(4Cl)-D-3Pal-Ser-X-D-4Aph(Cbm)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂, en donde X es 4-([2-(5-hidantoi)]-acetilamino)-fenilalanina, comprendiendo el método la síntesis por etapas sobre un soporte sólido que comprende un grupo amino conectado al soporte, en donde las etapas comprenden proporcionar una solución de un aminoácido o péptido del que el grupo amino en α se protege mediante Fmoc; poner en contacto el soporte con la solución en presencia de un reactivo para formar un enlace peptídico entre un grupo carboxilo del aminoácido o péptido disuelto y el grupo amino conectado al soporte durante un tiempo suficiente para formar dicho enlace peptídico; retirar el Fmoc poniendo en contacto el soporte con una base orgánica seleccionada de piperidina y piperidina sustituida con alquilo en C, en particular 2-alquilpiperidina, 3-alquilpiperidina, 2,4-dialquilpiperidina, 2,5-dialquilpiperidina, 2,6-dialquilpiperidina, en donde el alquilo es una cadena ramificada o lineal de 1 a 6 carbonos, en particular metilo o etilo, lo más particularmente metilo, en un disolvente orgánico.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en el que la base orgánica es piperidina.
- 15 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el disolvente orgánico es dimetilformamida.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el reactivo para formar un enlace peptídico comprende N,N'-diisopropilcarbodiimida.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el grupo amino conectado al soporte es un grupo amino en α de un fragmento de degarelix conectado al soporte.
- 20 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el péptido protegido por Fmoc es un fragmento de degarelix.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el soporte se selecciona de resina de amida de Rink AM y resina de amida de Rink MBHA.
- 25 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende liberar degarelix del soporte mediante tratamiento con ácido.
- 30 9. Un método de fabricación de degarelix, en el que el degarelix comprende 0,3% en peso o menos, en particular 0,1% en peso o menos, de Ac-D-2Nal-D-Phe(4Cl)-D-3Pal-Ser-X-D-4Aph(Cbm)-Leu-ILys-Pro-D-Ala-NH₂, en donde X es 4-([2-(5-hidantoi)]-acetilamino)-fenilalanina, comprendiendo el método la síntesis por etapas sobre un soporte sólido que comprende un grupo amino conectado al soporte, en donde las etapas comprenden proporcionar una solución de un aminoácido o péptido del que el grupo amino en α se protege mediante Fmoc; poner en contacto el soporte con la solución en presencia de un reactivo para formar un enlace peptídico entre un grupo carboxilo del aminoácido o péptido disuelto y el grupo amino conectado al soporte durante un tiempo suficiente para formar dicho enlace peptídico; retirar el Fmoc poniendo en contacto el soporte con piperidina en un disolvente seleccionado de dimetilformamida, dietilformamida, N,N-dimetilacetamida, N-metilpirrolidona.
- 35 10. El método según la reivindicación 9, en el que dicho reactivo es N,N'-diisopropilcarbodiimida.