

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 753**

51 Int. Cl.:

C07K 5/083 (2006.01)

C07K 5/087 (2006.01)

C07K 5/09 (2006.01)

C07K 7/23 (2006.01)

C07K 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2011 PCT/EP2011/068735**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12055905**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2011 E 11776745 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2632935**

54 Título: **Procedimiento para la fabricación de Degarelix y sus intermedios**

30 Prioridad:

27.10.2010 EP 10189032

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

27.03.2017

73 Titular/es:

FERRING B.V. (100.0%)

Polaris Avenue 144

2132 JX Hoofddorp, NL

72 Inventor/es:

RASMUSSEN, JON HOLBECH;

FOMSGAARD, JENS;

HANSEN, STEFAN;

RASMUSSEN, PALLE HEDENGRAN y

WACHS, WOLFGANG OLIVER

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 606 753 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

Procedimiento para la fabricación de Degarelix y sus intermedios

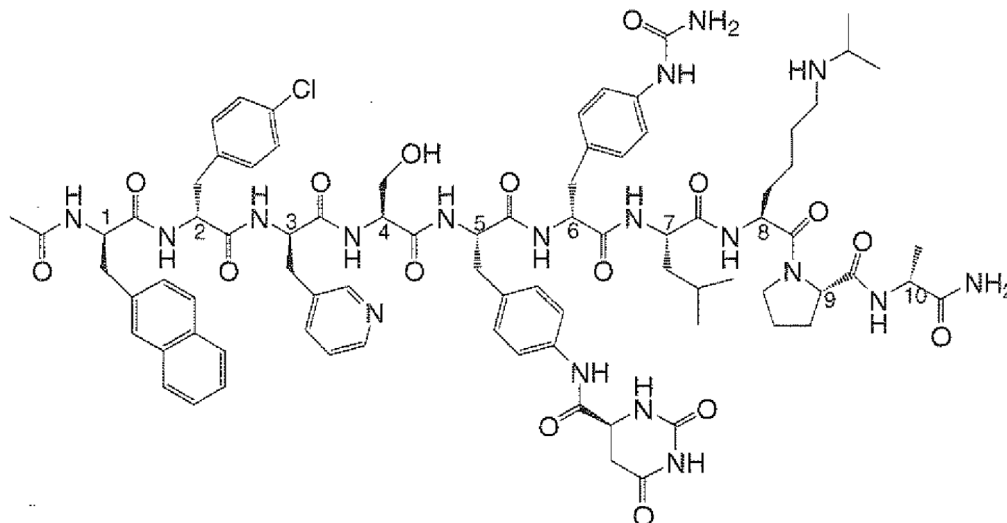
[Ámbito Técnico]

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación en fase líquida (o en fase de solución) para preparar el decapeptido Degarelix, su precursor protegido, y otros intermedios útiles. La invención se refiere además a polipeptidos útiles en el procedimiento de fabricación en fase de solución y a la purificación de Degarelix en sí mismo.

[Antecedentes de la Invención]

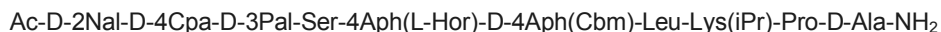
10 El cáncer de próstata es la principal causa de morbilidad y mortalidad para los hombres en el mundo industrializado. Degarelix, también conocido como FE200486, es un antagonista del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (un bloqueante GnRH) de tercera generación, el cual ha sido desarrollado y recientemente aprobado para pacientes con cáncer de próstata con necesidad de terapia de ablación de andrógenos (Doehn et al., Drugs 2006, vol 9, No. 8, pp 565-571; WO 09846634). Degarelix actúa mediante el bloqueo inmediato y competitivo de receptores de GnRH en la hipófisis y, al igual que otros antagonistas de la GnRH, no causa una estimulación inicial de la producción de la hormona luteinizante a través del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal, y por lo tanto no provoca un aumento de testosterona o un brote clínico (Van Poppel, Cancer Management and Research, 2010:2 39-52; Van Poppel et al., Urology, 2008, 71(6), 1001-1006); James, E.F. et al., Drugs, 2009, 69(14), 1967-1976).

20 Degarelix es un decapeptido lineal sintético que contiene siete aminoácidos no naturales, de los cuales cinco son D-aminoácidos. Tiene diez centros quirales en la estructura principal del decapeptido. El residuo de aminoácido en la posición 5 en la secuencia tiene un centro quiral adicional en la sustitución de la cadena lateral, dando once centros quirales en total. Su número de registro CAS es 214766-78-6 (de la base libre) y está disponible comercialmente bajo la marca comercial Firmagon™. La sustancia farmacológica se designa químicamente como D-alaninamida, N-acetil-3-(2-naftalenil)-D-alanil-4-cloro-D-fenilalanil-3-(3-piridinil)-D-alanil-L-seril-4-[[[(4S)-hexahidro-2,6-dioxo-4-pirimidinil]carbonil]amino]-L-fenilalanil-4-[(aminocarbonil)amino]-D-fenilalanil-L-leucil-N6-(1-metiletil)-L-lisil-L-prolil- y se representa mediante la estructura química siguiente (en lo sucesivo, también se refiere como Formula I):



25

La estructura de Degarelix también se puede representar como:



30 donde Ac es acetilo, 2Nal es 2-naftilalanina, 4Cpa es 4-clorofenilalanina, 3Pal es 3-piridilalanina, Ser es serina, 4Aph es 4-aminofenilalanina, Hor es hidroorotilo, Cbm es carbamoilo, Leu es leucina, Lys (iPr) es N6-isopropil-lisina, Pro es prolina y Ala es alanina.

Para la finalidad de describir esta invención, a cada aminoácido en Degarelix se le dará la notación abreviada de la siguiente manera:

AA₁ es D-2Nal, AA₂ es D-4Cpa, AA₃ es D-3Pal, AA₄ es Ser, AA₅ es 4Aph(L-Hor), AA₆ es D-Aph(Cbm), AA₇ es Leu, AA₈ es Lys(iPr), AA₉ es Pro y AA₁₀ es D-Ala.

Por lo tanto, como un ejemplo, Degarelix se puede representar como Ac-AA₁-AA₁₀-NH₂, el tetrapéptido Ac-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-Ser se puede representar como Ac-AA₁-AA₄ y el hexapéptido 4Aph(L-Hor)-D-4Aph(Cbm)-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ como AA₅-AA₁₀-NH₂.

5 Degarelix ha sido previamente preparado empleando la metodología de síntesis peptídica Boc en fase sólida (SPPS), tal y como se describe en WO 98/46634 y Jiang et al., J. Med. Chem. 2001, 44, 453-467.

10 Básicamente, D-Ala protegido con Boc, en primer lugar se acopla a resina MBHA en dimetilformamida (DMF)/CH₂Cl₂ empleando diisopropilcarbodiimida (DIC) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como agentes de activación o acoplamiento. Una vez que D-Ala está acoplada a la resina, la síntesis se desarrolla lavando, desbloqueando y después acoplado el siguiente residuo de aminoácido, hasta que el deca péptido ha sido completado. Los grupos amino primarios de la cadena lateral de 4Aph en la posición 5 y de D-4Aph en la posición 6 se protegen con Fmoc cuando se añaden y se modifican con L-Hor y Cbm, respectivamente, antes de que se añada el siguiente aminoácido en la cadena. Esto requiere las etapas adicionales de, en primer lugar, eliminar la protección de la cadena lateral con piperidina, reaccionar el grupo amino recién liberado sobre la péptido-resina con isocianato de terc-butilo o ácido L-hidrorótico, asegurarse de que la reacción sea completa con un test de ninhidrina y después lavar la péptido-resina antes de añadir el siguiente residuo de aminoácido (ver también Sorbera et al., Drugs of the Future 2006, Vol. 31, No. 9, pp 755-766).

15 Aunque la metodología SPPS-Boc ha proporcionado cantidades suficientes de Degarelix hasta ahora, la creciente demanda de este polipéptido significa que se necesitan cantidades cada vez mayores. La SPPS-Boc, la cual requiere la escisión con HF, no es adecuada para la síntesis industrial a gran escala. De hecho, WO 98/46634 menciona que SPPS solamente es adecuada para cantidades limitadas de hasta 1 kg, mientras que la síntesis clásica de péptidos en solución, o la síntesis peptídica en fase líquida (LPPS), se prefiere para grandes cantidades de producto. WO 98/46634 no especifica cómo se ha de realizar tal síntesis. Aunque la existencia de una síntesis peptídica en fase líquida de Degarelix ha sido reportada [Informe EMEA: Assessment Report for Firmagon™ (Degarelix): Doc. Ref. EMEA/CHMP/635761/2008], hasta el momento no se han dado a conocer públicamente ningunos detalles de tal procedimiento.

20 WO 97/34923 y WO 99/26964 son documentos relacionados con los procedimientos en fase líquida para la preparación de péptidos biológicamente activos. WO 99/26964 se relaciona en particular con la síntesis en fase líquida de deca péptidos que tienen actividad como antagonistas de GnRH. WO 99/26964 enumera una serie de limitaciones inherentes de la metodología de SPPS para producir antagonistas de la GnRH, incluyendo la capacidad limitada de la resina, el gran exceso de reactivos y aminoácidos necesarios, así como la necesidad de proteger todas las cadenas laterales reactivas, tales como el grupo hidroxilo en Ser, los grupos amino aromáticos en Aph y D-Aph, el grupo ε-i-propilamino en Lys (i-Pr).

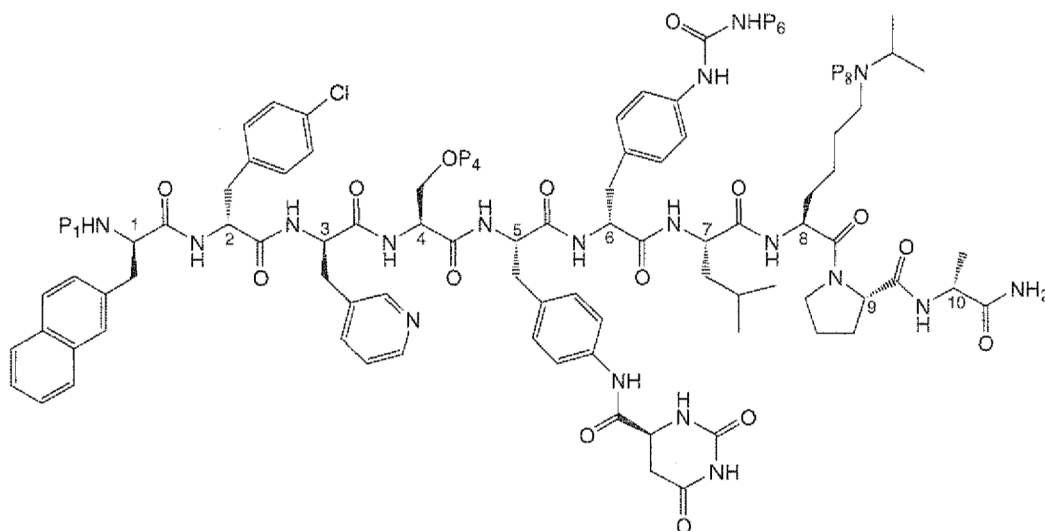
30 WO 99/26964 propone un procedimiento en fase líquida que implica en primer lugar la preparación de los fragmentos del péptido central de las posiciones 5 y 6 de un deca péptido con las cadenas laterales completamente elaboradas, y después ensamblar el péptido a través de un modelo de ensamblaje por fragmentos "4-2-4", "3-3-4" o "3-4-3". Por ejemplo, en la preparación del antagonista de la GnRH Azalina B, se acopla un tetrapéptido con un hexapéptido para formar el deca péptido deseado. Cuando el mismo modelo de ensamblaje por fragmentos se intenta para Degarelix, se produce la racemización del aminoácido Ser (AA₄), lo que resulta en aproximadamente el 20% de impureza de L-Ser. Esta impureza se transfiere al deca péptido final y es difícil de eliminar. Por otra parte, cuando se prepara el tetrapéptido AA₁-AA₄ añadiendo la unidad de Ser al tripéptido AA₁-AA₃, siguiendo el procedimiento descrito en WO 99/26964, los iones de tetrabutilamonio de la hidrólisis del grupo éster bencílico no se pudieron eliminar completamente durante las operaciones subsiguientes y se trasladaron hasta el producto final. Se encontró además que en la síntesis de Degarelix, el grupo L-hidrorotilo se reorganiza a su análogo hidantoin-acetilo, cuando el ácido L-dihidrorótico se acopla con 4Amp para preparar AA₅. Estos y otros problemas con la síntesis en fase de solución del Degarelix se han superado ahora, y se da a conocer por primera vez una nueva síntesis de polipéptidos en fase de solución de este deca péptido en el presente documento.

[Resumen de la Invención]

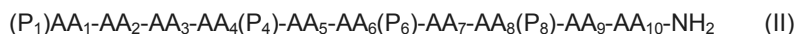
Los problemas de los métodos de SPPS para preparar Degarelix y los inconvenientes de los métodos LLPS, tal y como se describe en WO 97/34923 y WO 99/26964, han sido ahora superadas y son el objeto de esta invención.

En general, esta invención se refiere a una síntesis en fase líquida del deca péptido Degarelix.

50 En un aspecto, la invención está relacionada con un procedimiento en fase líquida para preparar Degarelix, el cual tiene la fórmula Ac-AA₁-AA₁₀-NH₂ o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende la etapa de someter al precursor de Degarelix, según la siguiente fórmula II, preparado como se define en la reivindicación 1, o una sal o solvato del mismo, a un tratamiento con un agente de escisión:



El compuesto de fórmula II por lo tanto corresponde a



donde AA₁ a AA₁₀ son los mismos que para la fórmula (I),

5 P₁ es un grupo protector de amino o acetilo;

P₄ es hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo, preferiblemente un grupo protector de hidroxilo;

P₆ es hidrógeno o un grupo protector de amino; preferiblemente un grupo protector de amino; y

P₈ es un grupo protector de amino.

10 Preferiblemente, el grupo protector P₁, si está presente, es ortogonal a P₈, eso es, ambos grupos protectores se pueden escindir de forma independiente.

En una realización preferida, P₁ es acetilo, y cada uno de P₄ y P₈ son grupos protectores que se pueden escindir en una sola etapa, y P₆ es hidrógeno o un grupo protector que se puede escindir junto con los grupos protectores P₄ y P₈. La escisión de los grupos protectores se lleva a cabo preferiblemente tratando el precursor de fórmula II con ácido trifluoroacético (TFA). Se prefiere particularmente que P₄, P₆, y P₈ sean grupos protectores seleccionados de terc-butilo (tBu) y t-butiloxicarbonilo (Boc), y más preferible es un precursor de fórmula II donde P₄ es tBu, P₆ es hidrógeno o tBu y P₈ es Boc.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para la fabricación en fase líquida del intermedio representado por la fórmula (II) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, el cual comprende la etapa de acoplar un primer polipéptido representado por la fórmula (III)



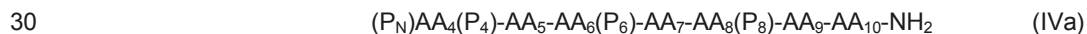
o una sal del mismo, con un segundo polipéptido representado por la fórmula (IV)



25 o sal del mismo, en un medio de reacción líquido en presencia de un reactivo de acoplamiento peptídico, opcionalmente junto con una base amínica orgánica, para formar un decapeptido representado por la fórmula (II). En este caso AA₁ a AA₁₀, P₄, P₆ y P₈ son los mismos que para la fórmula (II).

Las sales incluyen sales ácidas, tales como clorhidratos, y sales básicas, tales como sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, y sales de amonio.

De acuerdo con la invención, el segundo polipéptido representado por la fórmula (IV) se puede preparar eliminando el grupo protector P_N del siguiente compuesto (IVa):



P_N es preferiblemente un grupo protector de amino N-terminal, y más preferiblemente un grupo protector que se puede eliminar mediante hidrogenación, tal como benciloxicarbonilo.

El compuesto de fórmula (IVa) se puede obtener acoplado un polipéptido representado por la fórmula (V) con un polipéptido representado por la fórmula (VI)



o sales de estos compuestos, donde AA_4 a AA_{10} , P_N , P_4 , P_6 y P_8 son los mismos que para la fórmula (IVa).

La invención también se refiere a los polipéptidos representados por las fórmulas (IV) a (V), los cuales son útiles en el proceso de fabricación en fase líquida de la invención.

10

[Figuras]

La figura 1 muestra un diagrama de flujo para la síntesis de un derivado de AA_1 y AA_2 para la síntesis peptídica.

La figura 2 muestra un diagrama de flujo para la síntesis de un derivado de AA_2 - AA_3 para la síntesis peptídica.

La figura 3 muestra un diagrama de flujo para la síntesis de $Ac-AA_1-AA_3$.

15 La figura 4 muestra un diagrama de flujo para la síntesis de un derivado de AA_6-AA_7 .

La figura 5 muestra un diagrama de flujo para la síntesis de un derivado de AA_5-AA_7 .

La figura 6 muestra un diagrama de flujo para la síntesis de $Z-AA_4-AA_7$.

La figura 7 muestra un diagrama de flujo para la síntesis de AA_9-AA_{10} .

Las figuras 8 y 9 muestran un diagrama de flujo para la síntesis de $Z-AA_8-AA_{10}$.

20 La figura 10 muestra un diagrama de flujo para la síntesis de $Z-AA_4-AA_{10}$.

La figura 11 muestra un diagrama de flujo para la síntesis de un precursor de fórmula II.

La figura 12 muestra un diagrama de flujo para la síntesis de Degarelix a partir del precursor de fórmula II y la purificación y liofilización.

25 [Descripción Detallada de la Invención]

La presente invención se describirá ahora con mayor detalle.

Etapas de desprotección

30 En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento en fase líquida para preparar Degarelix, que tiene la fórmula $Ac-AA_1-AA_{10}-NH_2$, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. El procedimiento comprende la etapa de escindir los grupos protectores (P_4), (P_6), y (P_8), si están presentes, del precursor de Degarelix según la fórmula II ($(P_1)AA_1-AA_2-AA_3-AA_4(P_4)-AA_5-AA_6(P_6)-AA_7-AA_8(P_8)-AA_9-AA_{10}-NH_2$), o una sal o solvato del mismo, preparado como se define en la reivindicación 1, en una solución orgánica que comprende el precursor y un agente de escisión disuelto en la misma.

35 AA_1 a AA_{10} en la fórmula II tienen el mismo significado que en la fórmula (I), y P_1 es un grupo protector de amino o acetilo, preferiblemente acetilo.

P_8 es un grupo protector de amino. Preferiblemente, P_8 es cualquier grupo protector de cadena lateral conocido en la técnica, tal como los descritos en E. Gross & J. Meienhofer, *The Peptides: Analysis, Structure, Biology*, Vol. 3: Protection of Functional Groups in Peptide Synthesis (Academic Press, N.Y., 1981). Ejemplos adecuados incluyen 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), benciloxicarbonilo (Cbz o Z), y Cbz sustituido, tal como, por ejemplo, 2-bromobenciloxicarbonilo (2-Br-Z), 2-clorobenciloxicarbonilo (2-Cl-Z), p-clorobenciloxicarbonilo, p-6-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, y p-metoxibenciloxicarbonilo, o-clorobenciloxicarbonilo, 2,4-diclorobenciloxicarbonilo, 2,6-diclorobenciloxicarbonilo, y similares; grupos protectores alifáticos del tipo uretano, tales como t-butiloxicarbonilo (Boc), t-amiloxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, 2-(p-bifenilil)isopropiloxicarbonilo, y similares; grupos protectores cicloalquilo del tipo uretano, tales como ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, y ciclohexiloxicarbonilo; aliloxicarbonilo (Alloc) acetilo (Ac), benzoilo (Bz), trifluoroacetilo (Tfa), toluenosulfonilo (Tos), bencilo (Bn), trifenilmetilo (Trt), o-nitrofenil-sulfenilo (Nps), t-butil-dimetilsililoxicarbonilo, [2-(3,5-dimetoxifenil)-propil-2-oxicarbonilo] (Ddz), 2,2,2-

tricloroetiloxycarbonilo (Troc), bifenililisopropiloxycarbonilo (Bpoc), y o-nitrobeniloxycarbonilo. Grupos protectores preferidos son Fmoc, Boc y Alloc, siendo Boc el más preferido.

5 P₄ es hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo, preferiblemente un grupo protector de hidroxilo. El grupo hidroxilo de Ser (P₄) es preferiblemente un alquilo C₄-C₆ (p. ej. t-butilo, ciclohexilo), acetilo (Ac), tritilo, bencilo, un éter bencílico, tal como p-metoxibencilo, u otros bencilos sustituidos, tales como p-nitrobencilo, p-clorobencilo, o-clorobencilo, y 2,6-diclorobencilo, tetrahidropiranilo, trialquil(C₁-C₆)alquilsililo, 2-metoxietoximetilo (MEM), 4-dimetilcarbamoilbencilo y éteres o-fenoxiacetílicos.

Son particularmente preferidos los éteres t-butílico, bencílico y 9-fluorenilmetílico, siendo el t-butílico el más preferido.

10 P₆ es hidrógeno o un grupo protector de amino, preferiblemente un grupo protector de amino. Grupos protectores preferidos incluyen alquilo C₄-C₆ (p. ej. t-butilo, ciclohexilo), acetilo (Ac), tritilo, bencilo, un éter bencílico, tal como p-metoxibencilo, u otros bencilos sustituidos, tales como p-nitrobencilo, p-clorobencilo, o-clorobencilo, y 2,6-diclorobencilo, tetrahidropiranilo, trialquil(C₁-C₆)alquilsililo, 2-metoxietoximetilo (MEM), 4-dimetilcarbamoilbencilo y éteres o-fenoxiacetílicos. Son particularmente preferidos éteres t-butílico, bencílico y 9-fluorenilmetílico, siendo el t-butílico el más preferido.

15 El agente de escisión empleado para eliminar los grupos protectores depende de la naturaleza del grupo protector y son bien conocidos en la técnica.

Agentes de escisión preferidos para el grupo protector del hidroxilo de Ser P₄ son:

- ácido trifluoroacético (TFA), HCl, o ácido metanosulfónico, en particular para el éter t-butílico como grupo protector
- 20 • H₂/Pd-C, HF, o ácido trifluorometanosulfónico, en particular para el éter bencílico como grupo protector, y
- SiCl₄/anisol, en particular para 2-(metilsulfinil)bencil éter como un grupo protector;

Agentes de escisión preferidos para el grupo protector de amino P₈ son:

- ácido trifluoroacético (TFA), HCl, o ácido metanosulfónico, en particular para carbamatos de t-butilo como grupo protector
- 25 • H₂/Pd-C, HF, o ácido trifluorometanosulfónico, en particular para carbamatos de bencilo como grupo protector, y
- Piperidina, DBU y DEA, particularmente para Fmoc como grupo protector

Disolventes preferidos incluyen DCM, DMF, NMP, dioxano, EtOH, HF puro, y TFA.

Son particularmente preferidas las diferentes condiciones de escisión indicadas en la tabla 1 siguiente:

30 **Tabla 1: Condiciones de escisión**

Grupo protector		Grupo protegido	Reactivo de escisión	Disolvente
Abreviatura	Nombre			
t-Bu	éteres y ésteres t-butílicos	-OH y -CO ₂ H	TFA	DCM
			HCl	Dioxano
			Ácido metanosulfónico	DCM
Bzl	Éteres y ésteres bencílicos	-OH y -CO ₂ H	H ₂ /Pd-C	EtOH/agua
			HF	Puro
			Ácido trifluorometanosulfónico	DCM
MsOb	Éter 4-(metilsulfinil)bencílico	-OH	SiCl ₄ /anisol	TFA
Cbz o Z	Benciloxycarbonilo	-NH ₂	H ₂ /Pd-C	EtOH/agua/ácido
			HF	Puro
			Ácido trifluorometanosulfónico	DCM
Boc	tert-butoxi-carbonilo	-NH ₂	TFA	DCM
			HCl	Dioxano
			Ácido metanosulfónico	DCM

Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo carboxilo	-NH ₂	piperidina DBU (1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno) DEA (dietilamina)	DMF DMF DMF
Trt	Tritilo (Trt)	-OH -NH ₂	TFA-DCM 1%	DCM
TBDMS	Terc-butil-dimetil-sililo	-OH	TFA ACOH-THF-H ₂ O (3:1:1), 18h	THF
Ciclohexilo (CHX o CH _x)	Ciclohexilo	-OH	HF o TFSMA	HF puro o DCM

Referencia: Chem. Rev. 2009, 109, 2465-2504 (por Albert Isidro-Llobet)

5 Típicamente, el precursor de fórmula II se disuelve en un agente de escisión, preferiblemente TFA, con o sin un disolvente adicional, a temperatura ambiente (20 a 25 °C) durante 20 a 30 horas, preferiblemente 24 horas. Cuando se ha eliminado el grupo protector (preferiblemente la conversión es un rendimiento > 95%, más preferiblemente >99%), el Degarelix crudo se vierte entonces preferiblemente en una mezcla de agua-etanol tamponada para proporcionar una solución tamponada de Degarelix crudo para posterior purificación. El pH preferido está preferiblemente en el intervalo de 2 a 4, más preferiblemente en el intervalo de 2,5 a 3,5, y más preferiblemente aproximadamente 3.

Realizaciones específicas de la etapa de desprotección se muestran en la Figura 12 y el Ejemplo 4 (véase la Etapa 12).

10 Purificación y liofilización

La solución de degarelix crudo se purifica preferiblemente empleando técnicas cromatográficas tales como cromatografía preparativa de fase reversa (RPC).

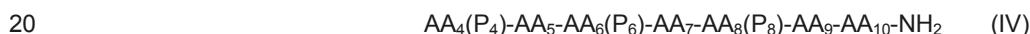
El producto resultante entonces preferiblemente se liofiliza.

Acoplamiento 3 + 7

15 En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para la fabricación en fase líquida del intermedio representado por la fórmula (II) o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, el cual comprende la etapa de acoplar un primer polipéptido representado por la fórmula (III)



o una sal del mismo, con un segundo polipéptido representado por la fórmula (IV)



25 o una sal del mismo, en un medio de reacción líquido en presencia de un reactivo de acoplamiento peptídico y opcionalmente una base amínica orgánica, para formar un decapeptido representado por la fórmula (II). En este caso AA₁ a AA₁₀, P₁, P₄, P₆ y P₈ son los mismos que para la fórmula (II). Las sales incluyen sales ácidas, tales como hidroclouros, y sales básicas, tales como sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos, y sales de amonio.

La reacción de acoplamiento se lleva a cabo en una solución orgánica donde los dos péptidos y un reactivo de acoplamiento peptídico y opcionalmente una base amínica orgánica se disuelven en la misma. También pueden estar presentes un aditivo de acoplamiento peptídico y/o una amina orgánica.

30 El disolvente orgánico, reactivo de acoplamiento peptídico, aditivo de acoplamiento peptídico y base amínica orgánica pueden ser cualquiera de los conocidos en la técnica de LPPS.

Disolventes orgánicos típicos son THF, NMP (N-metil pirrolidona), DCM, DMF, DMSO, y mezclas de los mismos. El disolvente más preferido es DMSO.

35 Reactivos de acoplamiento peptídico típicos son uno o más de o-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU), o-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU), o-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU), benzotriazol-1-il-oxi-tris(dimetilamino)fosfonio hexafluorofosfato (BOP), benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidinofosfonio hexafluorofosfato (PyBOP), dicloruro N,N-bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfónico (BOP-Cl), hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBroP), iso-butilcloroformiato (IBCF), 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1,3-diisopropil-carbodiimida (DIC), hidroclouro de 1-(dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (WSCDI), N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ), isopropilcloroformiato (IPCF),

tetrafluoroborato de 2-(5-norbornen-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TNTU), ácido propano fosfónico anhidro (PPAA) y tetrafluoroborato de 2-succinimido-1,1,3,3-tetrametiluronio (TSTU).

5 Un agente de acoplamiento preferido es DCC. DCC se emplea preferiblemente sin una amina orgánica. En una realización particularmente preferida, se emplea DCC en combinación con DMSO. DCC se emplea preferiblemente en una cantidad de 1,3 a 2, más preferiblemente de 1,4 a 1,6 equivalentes con respecto al tripéptido.

Otro agente de acoplamiento preferido es DIC, el cual se emplea preferiblemente en combinación con 6-cloro-HOBt, opcionalmente junto con sales de cobre.

Típicos aditivos de acoplamiento peptídico son 1-hidroxi-1H-benzotriazol (HOBt), 6-cloro-HOBt, y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt).

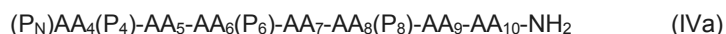
10 Típicas bases amínicas orgánicas son NMM, DIPEA, TEA, y colidina.

Es particularmente preferido llevar a cabo la reacción de acoplamiento empleando DMSO como disolvente y DCC como agente de acoplamiento.

Realizaciones específicas de la etapa de acoplamiento se muestran en la Figura 11 y el Ejemplo 4 (véase la Etapa 11).

Síntesis del heptapéptido

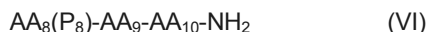
15 El compuesto de fórmula IV, i.e. AA₄(P₄)-AA₅-AA₆(P₆)-AA₇-AA₈(P₈)-AA₉-AA₁₀-NH₂, se obtiene preferiblemente eliminando el grupo protector P_N del siguiente compuesto IVa:



20 Mientras que AA₄ a AA₁₀, P₄, P₆, y P₈ tienen el mismo significado que anteriormente, P_N es un grupo protector de amino N-terminal. En una realización preferida, P_N es un grupo protector que se puede eliminar mediante hidrogenación, por ejemplo empleando hidrógeno y un catalizador de paladio (tal como Pd/C). El grupo protector P_N más preferido es benciloxicarbonilo (Z).

Realizaciones específicas de la etapa de eliminación se muestran en la Figura 11 y el Ejemplo 4 (véase la Etapa 11).

El compuesto de fórmula (IVa) se puede obtener acoplado un polipéptido representado por la fórmula (V) con un polipéptido representado por la fórmula (VI)



30 o sales de uno o ambos de estos compuestos, donde AA₄ a AA₁₀, P₄, P₆ y P₈ son los mismos que para la fórmula (IVa). La reacción de acoplamiento se lleva a cabo en una solución orgánica donde los dos péptidos y un reactivo de acoplamiento peptídico se disuelven en la misma. También pueden estar presentes un aditivo de acoplamiento peptídico y/o una amina orgánica. Se pueden emplear los mismos reactivos de acoplamiento peptídico, disolventes orgánicos, aditivos de acoplamiento peptídico y aminas orgánicas como descritas anteriormente. En una realización preferida, se emplea DCC como un reactivo de acoplamiento, opcionalmente con acetato de etilo como disolvente.

Síntesis del tetrapéptido de Fórmula V

35 En una realización preferida, el tetrapéptido de fórmula V, es decir, (P_N)AA₄(P₄)-AA₅-AA₆(P₆)-AA₇, se prepara mediante un proceso que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar (P_{N2})AA₅-AA₆(P₆)-AA₇(P_C), donde P₆ tiene el mismo significado que anteriormente en la fórmula IVa, (P_{N2}) es un grupo protector de amino N-terminal o hidrógeno, y (P_C) es un grupo protector de carboxilo C-terminal que se puede escindir mediante hidrogenación;

(b) eliminar el grupo protector de amino (P_{N2}), si está presente;

40 (c) hidrogenar H-AA₅-AA₆(P₆)-AA₇(P_C) para obtener H-AA₅-AA₆(P₆)-AA₇; y

(d) reaccionar H-AA₅-AA₆(P₆)-AA₇ con un éster activado de (P_N)AA₄(P₄) para proporcionar (P_N)AA₄(P₄)-AA₅-AA₆(P₆)-AA₇, donde (P₄) es un grupo protector de hidroxilo o hidrógeno, P₆ es hidrógeno o un grupo protector de amino, y P_N es un grupo protector que preferiblemente se puede eliminar mediante hidrogenación, por ejemplo empleando hidrógeno y un catalizador de paladio (tal como Pd/C).

45 El grupo protector P_N más preferido es benciloxicarbonilo (Z).

El éster activado preferido de (P_N)AA₄(P₄) es un éster 4-nitrofenílico (ONp).

Por lo tanto, preferiblemente, el éster bencílico se elimina en el intermedio AA₅-AA₇ para proporcionar AA₅-AA₇ tanto N- como C- desprotegido. Este tripéptido se hace reaccionar entonces con serina preactivada (por ejemplo, Z-Ser (tBu)-Np).

Fabricación de Degarelix

5 La presente invención se refiere por tanto a la fabricación de Degarelix, siendo la etapa de desprotección anteriormente tratada una etapa esencial de esta fabricación.

Esta etapa de desprotección sigue al acoplamiento 3 + 7 tratado anteriormente. En una realización preferida, el acoplamiento 3 + 7 sigue a la síntesis del heptapéptido tratada anteriormente, eso es, el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- 10 a) Síntesis de AA₄(P₄)-AA₅-AA₆(P₆)-AA₇-AA₈(P₈)-AA₉-AA₁₀-NH₂, o una sal o solvato del mismo;
- b) Acoplamiento de AA₄(P₄)-AA₅-AA₆(P₆)-AA₇-AA₈(P₈)-AA₉-AA₁₀-NH₂ y (P₁)AA₁-AA₂-AA₃ para proporcionar (P₁)AA₁-AA₂-AA₃-AA₄(P₄)-AA₅-AA₆(P₆)-AA₇-AA₈(P₈)-AA₉-AA₁₀-NH₂, o una sal o solvato del mismo;
- c) Desprotección de (P₁)AA₁-AA₂-AA₃-AA₄(P₄)-AA₅-AA₆(P₆)-AA₇-AA₈(P₈)-AA₉-AA₁₀-NH₂, o una sal o solvato del mismo, para proporcionar Degarelix, o un solvato o sal del mismo.

15 AA₁ a AA₁₀ y P₁, P₄, P₆, y P₈ tienen los mismos significados que los definidos anteriormente.

En una realización particularmente preferida,

- P₁ es acetilo;
 - P₄ es un grupo protector que se puede escindir con TFA, preferiblemente tBu;
 - P₆ es un hidrógeno o un grupo protector que se puede escindir con TFA, preferiblemente tBu;
- 20 • P₈ es un grupo protector que se puede escindir con TFA, preferiblemente Boc.

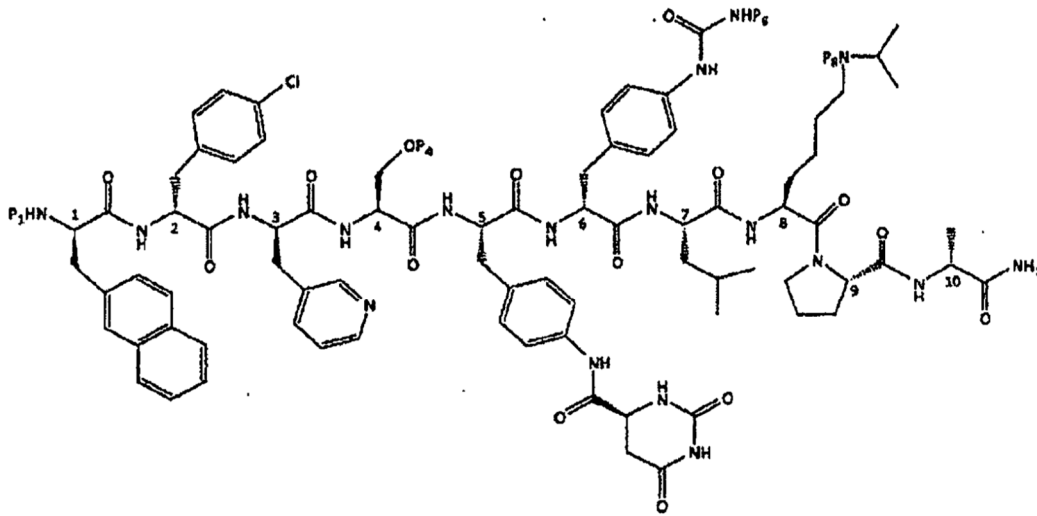
En la realización más preferida, el heptapéptido se produce empleando la síntesis de heptapéptido descrita anteriormente. Por otra parte, la etapa de desprotección es seguida preferiblemente por los métodos de purificación y liofilización descritos anteriormente.

25 En la síntesis de degarelix o sus precursores, y en particular en todas las etapas que contienen un péptido con la unidad hidroorotilo, el pH preferiblemente se mantiene por debajo de 9, preferiblemente por debajo de 8,5, siendo aún más preferido que esté por debajo de 8. Es preferible emplear una base débil tal como NaHCO₃ para el ajuste del pH. Es particularmente preferible que todas las extracciones después de las etapas de acoplamiento se lleven a cabo en un intervalo de pH de 2 a 9, preferiblemente de 2,5 a 8 (véase las etapas 6, 7, 10, y 11 en la sección experimental).
30 Adicionalmente es preferible añadir un alcohol alifático C4-5 tal como n-butanol o 2-butanol antes de la etapa de extracción o de lavado.

Intermedios

La invención también se refiere a los polipéptidos representados por las fórmulas (IV) a (V), los cuales son útiles en el proceso de fabricación en fase líquida de la invención.

Realizaciones preferidas de fórmula (II)



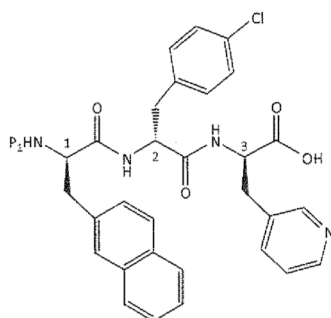
(P₁)AA₁-AA₂-AA₃-AA₄(P₄)-AA₅-AA₆(P₆)-AA₇-AA₈(P₈)-AA₉-AA₁₀-NH₂ (II)

Tabla 2

Compuesto	P ₁	P ₄	P ₆	P ₈
IIa	Ac	tBu	tBu	Fmoc
IIb	Ac	tBu	tBu	Boc
IIc	Ac	H	H	Alloc
IId	Ac	H	H	Boc
IIe	Ac	tBu	H	Boc
IIf	Boc	tBu	tBu	Fmoc
IIg	Fmoc	tBu	tBu	Boc
IIh	Boc	tBu	H	Fmoc
IIi	Fmoc	tBu	H	Boc
IIj	Ac	H	tBu	Boc
IIk	Ac	H	tBu	Fmoc
III	Ac	H	H	Fmoc

Realizaciones preferidas incluyen sales de estos compuestos.

Realizaciones preferidas de fórmula (III)



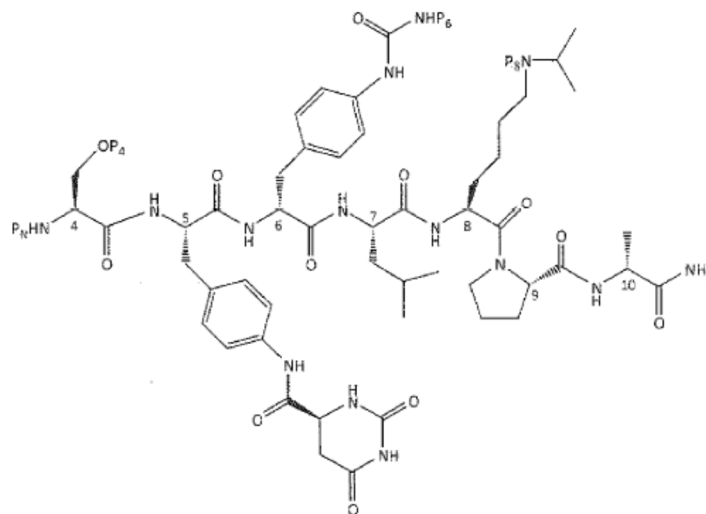
(P_N)AA₁-AA₂-AA₃

(III)

Tabla 3

Compuesto	P _N
IIIa	Ac
IIIb	Boc

Realizaciones preferidas incluyen sales de estos compuestos.



(P_N) AA₄(P₄)–AA₅–AA₆(P₆)–AA₇–AA₈(P₈)–AA₉–AA₁₀–NH₂ (IV)

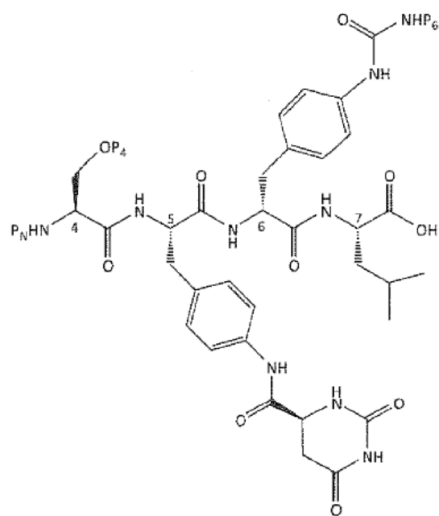
Realizaciones preferidas de fórmula (IV)/(IVA)

Tabla 4

Compuesto	P ₄	P ₆	P ₈	P _N
IVa	tBu	tBu	Fmoc	H
IVb	tBu	tBu	Boc	H
IVc	H	H	Alloc	H
IVd	H	H	Boc	H
IVe	tBu	H	Boc	H
IVf	H	H	Fmoc	H
IVg	tBu	H	Fmoc	H
IVh	tBu	tBu	Fmoc	Z
IVi	tBu	tBu	Boc	Z
IVj	H	H	Alloc	Z
IVk	H	H	Boc	Z
IVl	tBu	H	Boc	Z
IVm	H	tBu	Boc	Z
IVn	H	H	Fmoc	Z
IVo	tBu	H	Fmoc	Z
IVp	H	tBu	Fmoc	Z

Realizaciones preferidas incluyen sales de estos compuestos.

Realizaciones preferidas de fórmula (V)



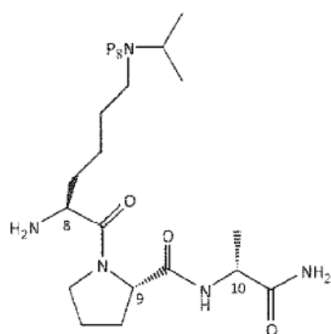
(P_N)AA₄(P₄)-AA₅-AA₆(P₆)-AA₇(V)

Tabla 5

Compuesto	P ₄	P ₆	P _N
Va	tBu	tBu	Z
Vb	tBu	H	Z
Vc	H	tBu	Z
Vd	H	H	Z

Realizaciones preferidas incluyen sales y solvatos de estos compuestos.

Realizaciones preferidas de fórmula (VI)



AA₈(P₈)-AA₉-AA₁₀-NH₂ (VI)

Tabla 6

Compuesto	P ₈
VIa	Boc
VIb	Alloc
VIc	Fmoc

Cuando no está presente ningún grupo protector, el grupo funcional es el grupo desprotegido (por ejemplo >NH).
Realizaciones preferidas incluyen sales de estos compuestos.

EJEMPLOS

5 Sección Experimental

Materiales Empleados en la Sección Experimental

Los materiales empleados en la sección experimental se enumeran a continuación.

10 **Productos químicos:**

amoniaco acuoso NH_3 (ac)

Acetonitrilo $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$

n-Butanol $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$

2-Butanol $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$

15 Isopropanol (isopropanol) $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$

Butil acetato $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_2$

Etanol, 99,9% $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$

Metanol CH_4O

Heptano C_7H_{16}

20 Agua purificada H_2O

Etil acetato $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$

Ácido acético $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$

Acetato amónico $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$

Acetil imidazol $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$

25 Trietilamina $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$

N-Metilmorfolina $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}$

N-Metilpirrolidona $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}$

N,N'-Diciclohexilcarbodiimida $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2$

Diciclohexilamina $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{N}$

30 N,N'-Diisopropilcarbodiimida $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2$

N,N-Dimetiletildiamina $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2$

N,N-Dimetilformamida $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$

Dimetil sulfóxido $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$

1-Hidroxibenzotriazol $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3\text{O}$

35 p-Nitrofenol $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_3$

N-Hidroxisuccinimida $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$

Isobutil cloroformiato $\text{C}_5\text{H}_9\text{ClO}_2$

- Cloruro sódico NaCl
 Hidróxido sódico, NaOH acuoso (ac)
 Ácido clorhídrico, HCl acuoso (ac)
 Ácido fosfórico H₃PO₄
 5 Hidrogenosulfato sódico NaHSO₄
 Hidrogenocarbonato sódico NaHCO₃
 Ácido metanosulfónico CH₃SO₃
 Ácido trifluoroacético C₂HF₃O₂
 Paladio sobre carbón vegetal, 5% Pd-C
 10 Hidrógeno H₂
 Tolueno C₇H₈

Materiales de partida:

- | | | |
|----|---|---|
| | N-t-Butiloxicarbonil-D-4-clorofenilalanina | Boc-D-4Cpa-OH C ₁₄ H ₁₈ NO ₄ |
| 15 | N-t-Butiloxicarbonil-D-2-naftilalanina | Boc-D-2Nal-OH C ₁₈ H ₂₁ NO ₄ |
| | D-3-Piridilalanina hidrocloreto | H-D-3Pal-OH x 2HCl C ₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₂ |
| | N-α-t-Butiloxicarbonil-N-4-(t-Butilcarbamoil)-
D-4-Aminofenilalanina | Boc-D-4Aph(tBuCbm)-OH C ₁₉ H ₂₉ N ₃ O ₅ |
| | N-α-t-Butiloxicarbonil-N-4-(L-Hidroorotil)
-4-Aminofenilalanina | Boc-4Aph(L-Hor)-OH C ₁₉ H ₂₄ N ₄ O ₇ |
| 20 | Leucina bencil éster p-tosilato | H-Leu-OBzl x TOS C ₂₀ H ₂₇ NO ₅ |
| | N-Benciloxicarbonil-O-t-butil-serina | Z-Ser(tBu)-OH C ₈ H ₁₅ NO ₅ |
| | N-t-Butiloxicarbonil-prolina | Boc-Pro-OH C ₁₀ H ₁₇ NO ₄ |
| | D-Alaninamide hidrocloreto | H-D-Ala-NH ₂ x HCl C ₃ H ₈ ClNO ₂ |
| 25 | N-α-Benciloxicarbonil-N-ε-t-butiloxicarbonil-N-ε-isopropil-lisina,
sal diciclohexilaminónica | Z-Lis(iPr,Boc)-OH x DCHA C ₃₄ H ₅₇ N ₃ O ₆ |

Ejemplo 1: Síntesis del Intermedio Ac(1-3)ONa: Ac-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-ONa[7]**Activación de Boc-D-4Cpa-OH y aislamiento****30 Etapa 1 (Etapa de reacción)**

Se disuelve Boc-D-4Cpa-OH (299,75 g) en iPrOH (3,53 kg), la mezcla se agita y se añade HOSu (0,184 kg) y DIC (0,164 kg), y se agita a 0 °C durante 1 hora. El precipitado se separa mediante filtración y se lava con iPrOH. El sólido se seca a presión reducida para proporcionar Boc-D-4Cpa-OSu[1].

35 Activación de Boc-D-2Nal-OH y aislamiento**Etapa 2 (Etapa de reacción)**

Se disuelve Boc-D-2Nal-OH (315,38 g) en iPrOH (5,35 kg) y se añaden IBC (157,07 g) y NMM (116,7 g). Se añade una mezcla de agua (42 mL), iPrOH (1,1 kg) y HOSu (230,14 g) después de enfriar hasta -10 °C junto con NMM adicional

(10,11g), y la mezcla se agitó 30 min. Se añade agua (0,82 L) y se separa el precipitado mediante filtración, y se lava con iPrOH y se seca bajo presión reducida para proporcionar Boc-D-2Nal-OSu[2].

Síntesis de Boc(2-3)OH: Boc-D-4Cpa-D-3Pal-OH

5 Etapa 3 (Etapa de reacción)

Se disuelven H-D-3Pal-OH x 2 HCl (0,251 kg) y Boc-D-4Cpa-OSu [1] (0,397 kg) de la etapa 1 en DMSO (3,33 L) y se añade NMM (318,8 g). La mezcla se agita a 20 °C durante 6 horas. Se añade agua (17 L) y se ajusta el pH añadiendo HCl hasta pH 4,25. El precipitado se separa mediante filtración y se dispersa en agua. Entonces se filtra la suspensión obtenida y se lava con agua. El sólido se seca bajo presión reducida para proporcionar Boc-D-4Cpa-D-3Pal-OH[3].

10

Síntesis del Intermedio Ac(1-3)ONa: Ac-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-ONa[7] (Compuesto de fórmula IIIa)

Etapa 4 (Etapa de reacción)

15 Se disuelve Boc-D-4Cpa-D-3Pal-OH [3] (447,93 g) de la etapa 3 en una mezcla de AcOEt (3,4 L) y AcOH (675 mL), se enfría la mezcla a 5°C, después de lo cual se añade MSA (672,77 g). La reacción continúa a 10°C durante 2 horas y a la solución se añade TEA (1214,28 g) para proporcionar H-D-4Cpa-D-3Pal-OH[4].

Se añade Boc-D-2Nal-OSu [2] (412,44 g) de la etapa 2 a H-D-4Cpa-D-3Pal-OH [4], se agita durante 24 horas a 20°C. Se añaden NH₃ acuoso 25% (0,154L) y n-butanol (4,5L), y la mezcla se agita a 45°C durante 1 hora.

La solución se lava con:

- Agua
- 20 • Agua a pH 9,5 (pH se ajusta mientras se agita con NaOH ac.)
- Agua

Se añade AcOH (4,5 L) a la fase orgánica y la solución se concentra hasta un aceite bajo presión reducida. El aceite se redissuelve en AcOH (4,5 L) y se reconcentra bajo presión reducida para proporcionar Boc-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-OH[5] como un aceite.

25 Se disuelve Boc-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-OH [5] en agua (0,09 L) y AcOH (1,8 L). Se añade MSA (672,77 g) y la mezcla se agita a menos de 35°C durante 2 horas. La solución se neutraliza con TEA (779,16 g). La solución se concentra bajo presión reducida hasta un aceite. El aceite se redissuelve en tolueno (2,5 L) y se reconcentra bajo presión reducida hasta un aceite. Se repite la última etapa para proporcionar H-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-OH[6].

30 Se disuelve H-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-OH [6] en tolueno (2,0 L) y se añade una solución de acetilimidazol (132,14 g) en tolueno (0,25 L). Se agita la solución a 20°C durante 2 horas, y se añade agua (0,1 L).

Se añade n-butanol (4,5 L) y la mezcla orgánica se lava a 35 °C con:

- NaCl acuoso 5%
- Metanol y agua a pH ácido 5,5 (pH se ajusta mientras se agita con NaOH ac.)
- Metanol y agua a pH 11 (pH se ajusta mientras se agita con NaOH acuoso)
- 35 • Metanol y NaCl acuoso 10%

A la fase orgánica agitada de las extracciones se añade heptano (15 L) a 20 °C durante 1 hora, y la suspensión resultante se deja con agitación a 20 °C durante 1 hora. El precipitado se aísla mediante filtración, y se suspende en heptano (3,5L). La suspensión se filtra otra vez. Se repiten la última etapa de lavado con heptano y la filtración. Entonces el sólido se seca bajo presión reducida para proporcionar Ac-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-ONa[7].

40

Especificaciones para productos intermedios clave

Etapa 4 Intermedio Ac(1-3)ONa [7]

Control de calidad

Criterios de aceptación

Descripción	"Polvo blanco a ligeramente amarillo (inspección visual)"
45 Identificación (1)	"587,2±0,4Da (MS)"
Identificación (2)	"2Nal 0,9-1,1, 4Cpa 0,9-1,1, 3Pal 0,9-1,1 (AAA)"
Pureza quiral	L-2Nal ≤1,3%, L-4Cpa ≤0,7%, L-3Pal ≤2,0% (GC-MS)

Pureza $\geq 90\%$ (HPLC, % Área)

Ejemplo 2: Síntesis del Intermedio Z(4-7)OH x DCHA: Z-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-OH x DCHA[15]

5 **Síntesis del Intermedio Boc(6-7)OBzl: Boc-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-OBzl**

Etapa 5 (Etapa de reacción)

Se disuelve Boc-D-4Aph(tBuCbm)-OH (379,45 g) en NMP (0,76 L) y se añade AcOEt (4,4 kg). Después de enfriar a -4°C, se añaden IBC (150,2 g) y NMM (101,1 g), y la solución se agita a -7°C durante 0,5 horas para proporcionar Boc-D-4Aph(tBuCbm)-OAct[8].

10 Se disuelve H-Leu-OBzl x TOS (491,88 g) en NMP (1,5 L) y AcOEt (2,7 kg), seguido de NMM (126,4 g). Esta solución se transfiere seguidamente a Boc-D-4Aph(tBuCbm)-OAct [8], y se agita a -10°C durante 1 hora. Entonces, se añade agua (0,5 L).

La mezcla de reacción se lava a 20 °C con:

- 15 • Agua a pH 8,5 (pH se ajusta mientras se agita con NaOH ac.)
- Agua a pH 2,0 (pH se ajusta mientras se agita con HCl ac.)
- Agua

La fase orgánica se concentra bajo presión reducida hasta un aceite. El aceite se redissuelve en AcOEt (0,6 kg) y se reconcentra bajo presión reducida hasta un aceite. El aceite restante se disuelve en AcOEt (0,6 kg). Se añade heptano (15,5 L) mientras se agita a 20°C. El precipitado se aísla mediante filtración, y se lava con heptano y subsiguientemente se seca bajo presión reducida para proporcionar Boc-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-OBzl[9].

Síntesis de Boc(5-7)OBzl: Boc-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-OBzl

Etapa 6 (Etapa de reacción)

25 Se disuelve Boc-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-OBzl [9] (582,7 g) de la etapa 5 en AcOEt (3,15 kg). Se añade MSA (481 g), y se agita por debajo de 15 °C durante 5 horas, y se añade TEA (406 g). Se añade DMF (0,333 kg), seguido de TEA (101 g) y NMM (51 g) para proporcionar H-D-4Aph (tBuCbm) Leu-OBzl [10].

Se disuelve Boc-4Aph(L-Hor)-OH (462,46 g) en DMF (2,09 kg) y AcOEt (1,44 kg). Se añaden IBC (150,24 g) y NMM (111,27 g), y se agita a -10°C durante 0,5 horas para proporcionar Boc-4Aph(L-Hor)-OAct[11].

30 Se añade H-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-OBzl [10] a Boc-4Aph(L-Hor)-OAct [11] y se agita a -10°C durante 1,5 horas. A continuación, se añaden AcOEt (5,4 kg) y n-butanol (6,0 L).

La fase orgánica se lava a 20 °C con:

- NaHCO₃ acuoso 5% a pH alrededor de 8 (pH se ajusta mientras se agita con NaHCO₃ ac)
- NaCl acuoso 10% a pH 2,5 (pH se ajusta mientras se agita con H₃PO₄ ac.)

35 Se añade DMF (0,9 L) a la fase orgánica, la cual después se concentra bajo presión reducida hasta un aceite. La solución se vierte en agua (14 L) mientras se agita. Se aísla el precipitado sobre un filtro, y se lava con agua. El sólido se seca bajo presión reducida para proporcionar Boc-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-OBzl[12].

Síntesis del Intermedio Z(4-7)OH x DCHA: Z-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-OH x DCHA (Compuesto de fórmula Va)

40 **Etapa 7 (Etapa de reacción)**

Se añade Boc-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-OBzl [12] (885,02 g) de la etapa 6 a una mezcla de MSA (961,1 g) y AcOEt (7,2 kg) y se añade 2-butanol (2 L), y la mezcla resultante se agita a 0°C durante 6 horas. Entonces se neutraliza MSA con TEA (909,0 g).

45 Se añade 5% Pd/C (88,5 g) dispersado en 2-butanol (1 L) y la mezcla se hidrogena bajo presión a 20 °C durante 3 horas. A continuación, el Pd/C se separa mediante filtración, y se lava con 2-butanol para proporcionar la solución que contiene H-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-OH [13].

Se disuelve Z-Ser(tBu)-OH (413,5 g) en MeCN (2,5 L) y la solución se enfría hasta -5 °C. Se añade HONp (195 g) seguido de DCC (278,5 g), y la mezcla se agita a 20 °C durante 24 horas. Después se filtra la mezcla, y se lava con MeCN para proporcionar Z-Ser(tBu)-ONp [14]. Se añaden NMM (354,2 g), DMF (4,75 kg) y Z-Ser(tBu)-ONp [14] a la solución de H-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-OH [13] y la mezcla se deja con agitación a 20°C durante 3 días.

5 La mezcla resultante se lava con:

- NaCl acuoso 10% a pH 2,5 (pH se ajusta mientras se agita con HCl acuoso)
- Agua a pH ácido (pH se ajusta mientras se agita con HCl acuoso)
- NaHCO₃ acuoso 7,5%
- NaCl acuoso 5% a pH 2,5 (pH se ajusta mientras se agita con HCl acuoso)
- NaCl acuoso 10%

10

A la fase orgánica final se añade DCHA (181 g) y la fase orgánica se concentra bajo presión reducida hasta un aceite. El aceite se redissuelve en iPrOH (3,14 kg) y se reconcentra bajo presión reducida hasta un aceite. El aceite restante se redissuelve en iPrOH (3,14 kg) y, mientras se agita la solución, se vierte en AcOEt (31,5 kg). La agitación se continúa a 20 °C durante 1 hora hasta precipitación, y el precipitado se aísla entonces mediante filtración, y se lava con AcOEt. El sólido se seca bajo presión reducida a 30°C durante 30 horas para proporcionar Z-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-OH x DCHA[15]. La pureza del intermedio Z(4-7)OH x DCHA[15] es ≥80% (HPLC).

15

Etapa 7 Intermedio Z(4-7)OH [15]

Control de calidad

Criterios de aceptación

20	Descripción	"Polvo blanco a amarillo (inspección visual)"
	Identificación (1)	"972,5±0,4Da (MS)"
	Identificación (2)	"Ser 0,9-1,1, 4Aph 1,8-2,2, Leu 0,9-1,1 (AAA)"
	Pureza quiral	D-Ser ≤2,0%, D-4Aph 47-53%, D-Leu ≤0,7% (GC-MS)
	Pureza (1)	[4Aph ⁵ (Hidantoinacetil)] Z(4-7)OH DCHA ≤0,5% (HPLC, % Área)
25	Pureza (2)	≥80 % (HPLC, % Área)

Ejemplo 3: Síntesis del Intermedio H(8-10)NH₂: H-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂[21]

Síntesis de Boc(9-10)NH₂: Boc-Pro-D-Ala-NH₂

Etapa 8 (Etapa de reacción)

30 Se disuelve Boc-Pro-OH (226,02 g) en iPrOH (1,73 kg). La mezcla de reacción se enfría hasta -5°C. Se añaden IBC (143,4 g) y NMM (106,2 g), y la mezcla se agita a 5°C durante 0,5 horas para proporcionar Boc-Pro-OAct[16].

Se suspende H-D-Ala-NH₂ x HCl (124,57 g) en una mezcla de iPrOH (1,57 kg) y NMM (106,2 g). La suspensión se añade a Boc-Pro-OAct [16]. La mezcla de reacción se deja con agitación a 10°C durante 3 horas. A continuación se añade DMEDA (10,6 ml). Se filtra la mezcla, y el filtrado se concentra bajo presión reducida hasta un aceite. El aceite se redissuelve y se reconcentra con AcOEt (1,125 kg).

35

El aceite residual se disuelve en una mezcla de AcOEt (1,8 kg) y n-butanol (0,6 L). La fase orgánica se lava con:

- NaCl acuoso 15% a pH 2,5 (pH se ajusta mientras se agita con HCl acuoso)
- NaCl acuoso 15% a pH 9,5 (pH se ajusta mientras se agita con NaOH acuoso)

La fase orgánica se concentra bajo presión reducida, se redissuelve en AcOEt (1,08 kg) y se reconcentra hasta un aceite.

40 Se añade una mezcla de AcOEt (0,33 kg) y heptano (0,75 L) a 20 °C y se agita durante 16 horas. Se filtra el precipitado resultante y se lava con una mezcla de AcOEt y heptano sobre el filtro. Entonces el sólido se seca bajo presión reducida para proporcionar Boc-Pro-D-Ala-NH₂[17].

Síntesis del Intermedio H(8-10)NH₂: H-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂ (Compuesto de fórmula VIa)

45 **Etapa 9 (Etapa de reacción)**

Se disuelve Boc-Pro-D-Ala-NH₂[17] (313,89 g) de la Etapa 8 en una mezcla de MSA (528,61 g) e iPrOH (0,785 kg) y se agita la solución a 45°C durante 1 hora. Entonces la mezcla se neutraliza con TEA (607,14 g) para proporcionar H-Pro-D-Ala-NH₂[18].

Se suspende Z-Lys(iPr,Boc)-OH x DCHA (603,83 g) en AcOEt (1,17 kg) y se lava con:

- 5
- NaHSO₄ acuoso 12%
 - Agua
 - NaCl acuoso 15%

10 Se añade la fase orgánica de Z-Lys(iPr,Boc)-OH [19] de las extracciones a H-Pro-D-Ala-NH₂[18]. Se disuelven HOBt (183,79 g) y DCC (227,0 g) en AcOEt (0,135 kg), y la mezcla se agita a 20°C durante 0,5 horas. Entonces, se añade agua (0,2 L). La mezcla se filtra y se lava con AcOEt. Los filtrados combinados se concentran bajo presión reducida hasta un aceite. El aceite se disuelve en AcOEt (0,9 kg), se filtra y la solución se lava con:

- Agua a pH 2,5 (pH se ajusta mientras se agita con HCl acuoso)
- Agua a pH 9 (pH se ajusta mientras se agita con NaOH acuoso)
- NaCl acuoso 10% a pH 7 (pH se ajusta mientras se agita con HCl acuoso o NaOH acuoso)

15 La fase orgánica se concentra bajo presión reducida para proporcionar Z-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂[20].

20 Se disuelve Z-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂[20] en etanol (0,04 kg) y agua (0,5 L), y se añade Pd/C 5% (50 g). Se acidifica la suspensión hasta pH 2,5 mediante adición de HCl 6 M, y se hidrogena a 20 °C. Después de completar la reacción, el catalizador se elimina mediante filtración y el pH se eleva hasta pH 7,0 mediante adición de NaOH 32%. Subsiguientemente se elimina el etanol mediante evaporación bajo presión reducida. Se añade n-butanol (1 L) a la fase acuosa resultante y el pH se ajusta a pH alcalino 9 con NaOH acuoso y se inicia la extracción. Se repite esta etapa. Las fases orgánicas combinadas se concentran bajo presión reducida hasta un aceite.

25 Se disuelve el aceite en AcOBu (0,5 L), se concentra a presión reducida a 20 °C y se redissuelve en AcOBu (0,5 L). Después, se añade heptano (2 L) a 50 °C durante 1 hora. La suspensión se deja con agitación a 0°C durante 16 horas. Se aísla el precipitado mediante filtración, y se lava con heptano. Finalmente, el sólido se seca bajo presión reducida para proporcionar H-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂[21]. La pureza del intermedio H(8-10)NH₂[21] es ≥95% (HPLC).

Etapa 9 Intermedio H(8-10)NH₂ [21]

<u>Control de calidad</u>	<u>Criterios de aceptación</u>
Descripción	"Polvo blanco a ligeramente amarillo (inspección visual)"
30 Identificación (1)	"456,3±0,4Da (MS)"
Identificación (2)	"Lys(iPr) 0,9-1,1, Pro 0,9-1,1, Ala 0,9-1,1 (AAA)"
Pureza quiral	D-Lys(iPr) ≤0,3%, D-Pro ≤0,3%, L-Ala≤0,5% (GC-MS)
Pureza	≥95 % (HPLC, % Área)

35 Ejemplo 4: Condensaciones de Segmentos hasta Intermedio Final (Compuesto de Fórmula II)

Intermedio Z(4-10)NH₂: Z-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂ [22]
(Compuesto de fórmula IVg)

Etapa 10 (Etapa de reacción)

40 Se disuelve Z-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-OH x DCHA [15] (1153,41 g) de la Etapa 7 en DMF (2,1 kg). Después, se añade HOBt (153,2 g) junto con AcOEt (6,9 kg) y H-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂[21] (569,5 g) de la etapa 9. Cuando se han disuelto todos los sólidos, se añade MSA (96,1 g). La solución se enfría por debajo de 5 °C y se añade DCC (309,5 g) disuelto en AcOEt (0,810 kg). La temperatura se eleva hasta 20 °C y la reacción continúa durante 24 horas. La conversión de Z-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-OH x DCHA [15] es ≥96 % (HPLC). Se añaden AcOEt (4,95 kg) y agua (5,5 L), y la mezcla se agita, y se filtra. Mientras se agita, se añade NaHCO₃ 7,5% (ac) (35L) al filtrado. Se separan las fases y la capa orgánica se lava adicionalmente con:

- NaHCO₃ 7,5%
- Agua a pH 3 (pH se ajusta mientras se agita con HCl acuoso)
- Agua

La fase orgánica final se concentra bajo presión reducida hasta un aceite. El aceite se reconcentra con EtOH (0,405 kg) y posteriormente con AcOEt (0,45 kg). El aceite restante se disuelve en EtOH (0,405 kg), y se añaden AcOEt (0,45 kg) y AcOBu (4,6 L). La solución se añade a heptano (27,6 L) a 20°C durante 1 hora. Entonces, se filtra el precipitado, y se lava con heptano. El sólido se seca bajo presión reducida al máximo para proporcionar Z-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂[22]. La pureza de Z-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂[22] es ≥70 % (HPLC).

Intermedio Final Ac(1-10)NH₂: Ac-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂ [24]

10 **Etapa 11 (Etapa de reacción)**

Se añade Z-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂[22] (1409,67 g) de la Etapa 10 a una mezcla de EtOH (10,98 kg) y agua (3,2 L) y se agita hasta que la solución sea homogénea. Se añade Pd/C 5% (211 g). La mezcla se hidrogena a 20 °C con control de pH a pH 2,5 con HCl acuoso.

15 El catalizador se elimina mediante filtración y el pH se ajusta a pH 3,8, con NaOH acuoso. El filtrado se concentra bajo presión reducida hasta un aceite. Se añade EtOH (4,7 kg) al aceite y se reconcentra. Después, se añade AcOEt (5,4 kg) al aceite y se reconcentra y este proceso se repite otra vez para proporcionar H-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂[23].

20 Se dispersa H-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂[23] en AcOEt (1,125 kg), entonces se añade HOBt (153,16 g) y la mezcla se enfría hasta 0°C. Se disuelve Ac-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-ONa [7] (609,05 g) de la Etapa 4 en DMSO (2,5 L), esta solución se mezcla con el lodo que contiene H-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂[23] y se añade DCC (309,5 g) disuelto en AcOEt (0,45 kg). La mezcla se agita a 5°C durante 24 horas. La conversión de [23] es ≥96% (HPLC).

25 Se añade agua (150 mL) y DMSO (0,5 L) y se continúa la agitación a 20 °C durante más de 3 horas. Se filtra el precipitado y se lava con una mezcla de AcOEt y DMSO. Se combinan los filtrados, y se añade n-butanol (17 L). La solución orgánica se lava con:

- Agua a pH 2,5 (pH se ajusta mientras se agita con HCl acuoso)
- NaHCO₃ 7% (ac)
- NaCl 10% acuoso (pH en la mezcla se neutraliza hasta pH 7,0, si es necesario, mientras se agita con HCl acuoso)

30 Se añade DMF (4,75 kg) y la fase orgánica se concentra bajo presión reducida hasta un aceite. El aceite se añade lentamente a agua (50 L) a 20°C durante 1 hora con agitación vigorosa. Se aísla el precipitado sobre un filtro, y se lava dos veces con agua. Subsiguientemente el sólido se seca bajo presión reducida para proporcionar Ac-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂[24][Intermedio Final]. Pureza de [24] es ≥70 % (HPLC)

35 **Ejemplo 5: Desprotección del Intermedio Final Ac(1-10)NH₂ a Degarelix[25] Crudo**

Etapa 12 (Etapa de reacción)

40 Se disuelve Ac-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂[24] (*Compuesto de fórmula IIb*)(1844,59 g) de la etapa 11 en TFA (28,3 kg) a 20°C. La solución se agita a 20°C (eliminación de 3 grupos protectores) durante 24 horas. La conversión de [24] es ≥99 % (HPLC).

La mezcla de reacción se mezcla entonces con una solución fría (por debajo de 10 °C) de agua (74 L), AcONH₄ (19,1 kg), AcOH (18,4 L) y EtOH (14,52 kg). Mientras se mezclan las dos soluciones, la temperatura se mantiene por debajo de 25 °C. El pH de la solución final se ajusta a pH 3 con TFA o AcONH₄, si es necesario, para producir la solución de Ac-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-Ser-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(Cbm)-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂[25][Degarelix Crudo].

45 **Etapa 13 (Purificación y liofilización)**

50 La solución de degarelix crudo se bombea a través de una columna de fase reversa. Se eluye el Degarelix de la columna con un gradiente de EtOH/TFA 0,12% en agua. Las fracciones con una pureza ≥95% se repurifican en una columna de fase reversa empleando un gradiente de EtOH /AcOH 1% en agua. Se liofilizan las fracciones de alta pureza.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la fabricación en fase líquida de un decapeptido representado por la fórmula (II)



5 donde AA₁ es D-2Nal, AA₂ es D-4Cpa, AA₃ es D-3Pal, AA₄ es Ser, AA₅ es 4Aph(L-Hor), AA₆ es D-Aph(Cbm), AA₇ es Leu, AA₈ es Lys(iPr), AA₉ es Pro, AA₁₀ es D-Ala;

P₁ es un grupo protector de amino o acetilo;

P₄ es hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo, preferiblemente un grupo protector de hidroxilo;

P₆ es hidrógeno o un grupo protector de amino; preferiblemente un grupo protector de amino; y P₈ es un grupo protector de amino,

10 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende la etapa de acoplar un primer polipéptido representado por la fórmula (III)



o una sal del mismo, con un segundo polipéptido representado por la fórmula (IV)



15 o una sal del mismo, en un medio reactivo líquido en presencia de un reactivo de acoplamiento peptídico.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde P₁ es acetilo; P₄ es un grupo protector de hidroxilo, P₆ es hidrógeno o un grupo protector de amino; y P₈ es un grupo protector de amino.

20 3. Un procedimiento líquido para preparar Degarelix que comprende el procedimiento según la reivindicación 1 o 2 seguido por un procedimiento que comprende la etapa de someter el decapeptido representado por la fórmula II o una sal o solvato del mismo a un tratamiento con un agente de escisión para eliminar los grupos protectores P₄, P₆ y P₈.

25 4. El procedimiento según las reivindicaciones 1, 2 o 3, donde P₁ es acetilo; P₄ es un tBu, P₆ es hidrógeno o tBut, y P₈ es Boc.

5. Un procedimiento para preparar un polipéptido representado por la fórmula (IV)



donde

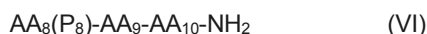
30 P₄ es hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo, preferiblemente un grupo protector de hidroxilo;

P₆ es hidrógeno o un grupo protector de amino; preferiblemente un grupo protector de amino; y

P₈ es un grupo protector de amino,

acoplado un polipéptido representado por la fórmula (V), o una sal o solvato del mismo, con un polipéptido representado por la fórmula (VI), o una sal o solvato del mismo,

35 $(P_N) AA_4(P_4)-AA_5-AA_6(P_6)-AA_7 \quad (V),$



y después eliminando el grupo de desprotección P_N, donde AA₄ a AA₁₀, P₄, P₆, y P₈ son los mismos que en la reivindicación 1, y P_N es un grupo protector que se puede eliminar mediante hidrogenación.

40 6. El procedimiento según la reivindicación 5, donde P_N es benciloxicarbonilo, el cual se elimina hidrogenando el compuesto (P_N)AA₄(P₄)-AA₅-AA₆(P₆)-AA₇-AA₈(P₈)-AA₉-AA₁₀-NH₂ en presencia de un catalizador Pd/C.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, seguido por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

5 8. Un procedimiento para producir un compuesto de $(P_N)AA_4(P_4)-AA_5-AA_6(P_6)-AA_7$, donde AA_4 a AA_7 , P_4 , y P_6 , son los mismos que en la reivindicación 1, y P_N es un grupo protector que puede ser eliminado mediante hidrogenación, que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar $(P_{N2})AA_5-AA_6(P_6)-AA_7(P_C)$, donde P_6 tiene el mismo significado que anteriormente, (P_{N2}) es un grupo protector de amino N-terminal o hidrógeno, y (P_C) es un grupo protector de carboxilo C-terminal que se puede escindir mediante hidrogenación;

10 (b) eliminar el grupo protector de amino (P_{N2}) , si está presente;

(c) hidrogenar $H-AA_5-AA_6(P_6)-AA_7(P_C)$ para obtener $H-AA_5-AA_6(P_6)-AA_7$; y

(d) reaccionar $H-AA_5-AA_6(P_6)-AA_7$ con un éster activado de $(P_N)AA_4(P_4)$ para proporcionar $(P_N)AA_4(P_4)-AA_5-AA_6(P_6)-AA_7$, donde AA_4 tiene el mismo significado que anteriormente, (P_4) es un grupo protector de hidroxilo o hidrógeno, y P_N es un grupo protector que preferiblemente se puede eliminar mediante hidrogenación.

15

9. Un procedimiento para preparar una solución de degarelix, que comprende el procedimiento de la reivindicación 8 seguido del procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4.

20 10. El procedimiento de una o más de las reivindicaciones anteriores, donde el pH se mantiene por debajo de 9, preferiblemente por debajo de 8.

11. Compuestos polipeptídicos representados por las siguientes fórmulas:

$AA_4(P_4)-AA_5-AA_6(P_6)-AA_7-AA_8(P_8)-AA_9-AA_{10}-NH_2$,

25 $(P_N)AA_4(P_4)-AA_5-AA_6(P_6)-AA_7-AA_8(P_8)-AA_9-AA_{10}-NH_2$

$(P_N)AA_4(P_4)-AA_5-AA_6(P_6)-AA_7$,

o sales o solvatos,

30 donde AA_1 es D-2Nal, AA_2 es D-4Cpa, AA_3 es D-3Pal, AA_4 es Ser, AA_5 es 4Aph(L-Hor), AA_6 es D-Aph(Cbm), AA_7 es Leu, AA_8 es Lys(iPr), AA_9 es Pro, AA_{10} es D-Ala;

P_1 es un grupo protector de amino o acetilo;

P_4 es hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo, preferiblemente un grupo protector de hidroxilo;

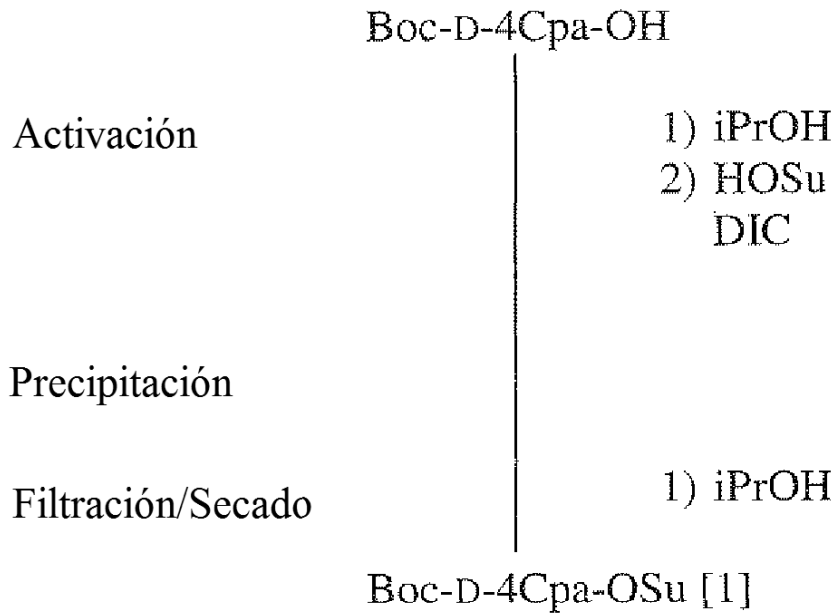
P_6 es hidrógeno o un grupo protector de amino; preferiblemente un grupo protector de amino; y

P_8 es un grupo protector de amino, y P_N es un grupo protector.

35

Figura 1

Etapa 1 (Etapa de reacción)



Etapa 2 (Etapa de Reacción)

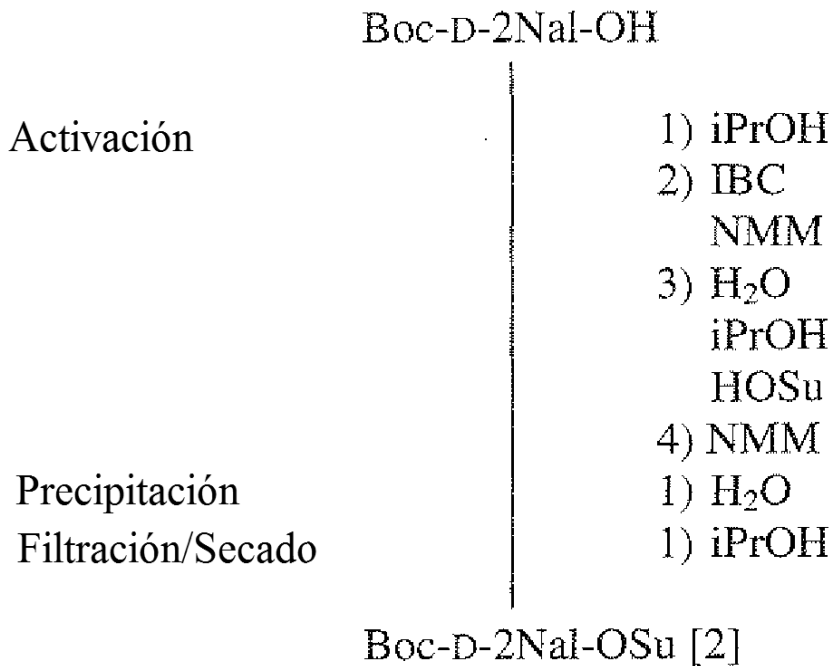


Figura 2
Etapa 3 (Etapa de reacción)

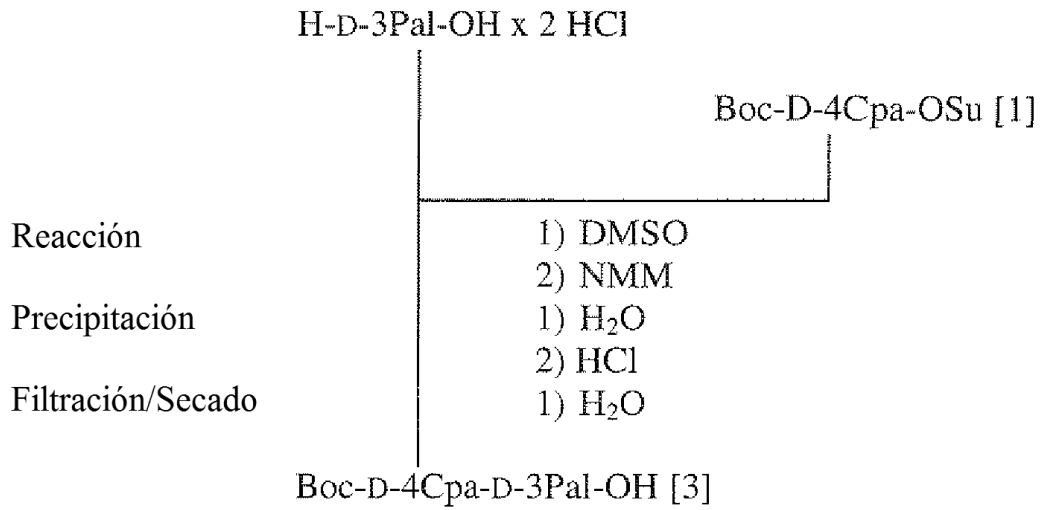


Figura 3

Etapa 4 (Etapa de reacción)

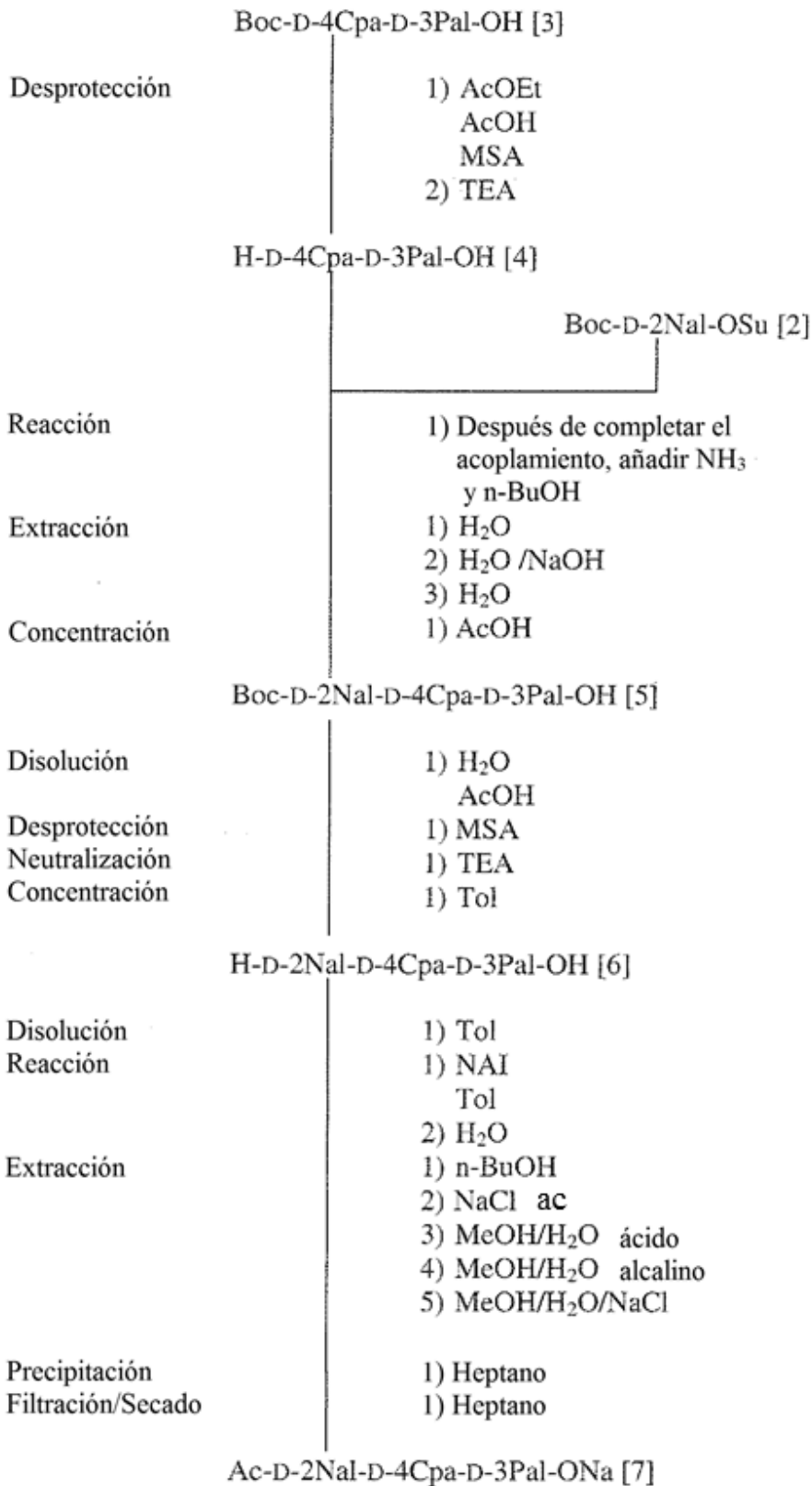


Figura 4

Etapas 5 (Etapas de reacción)

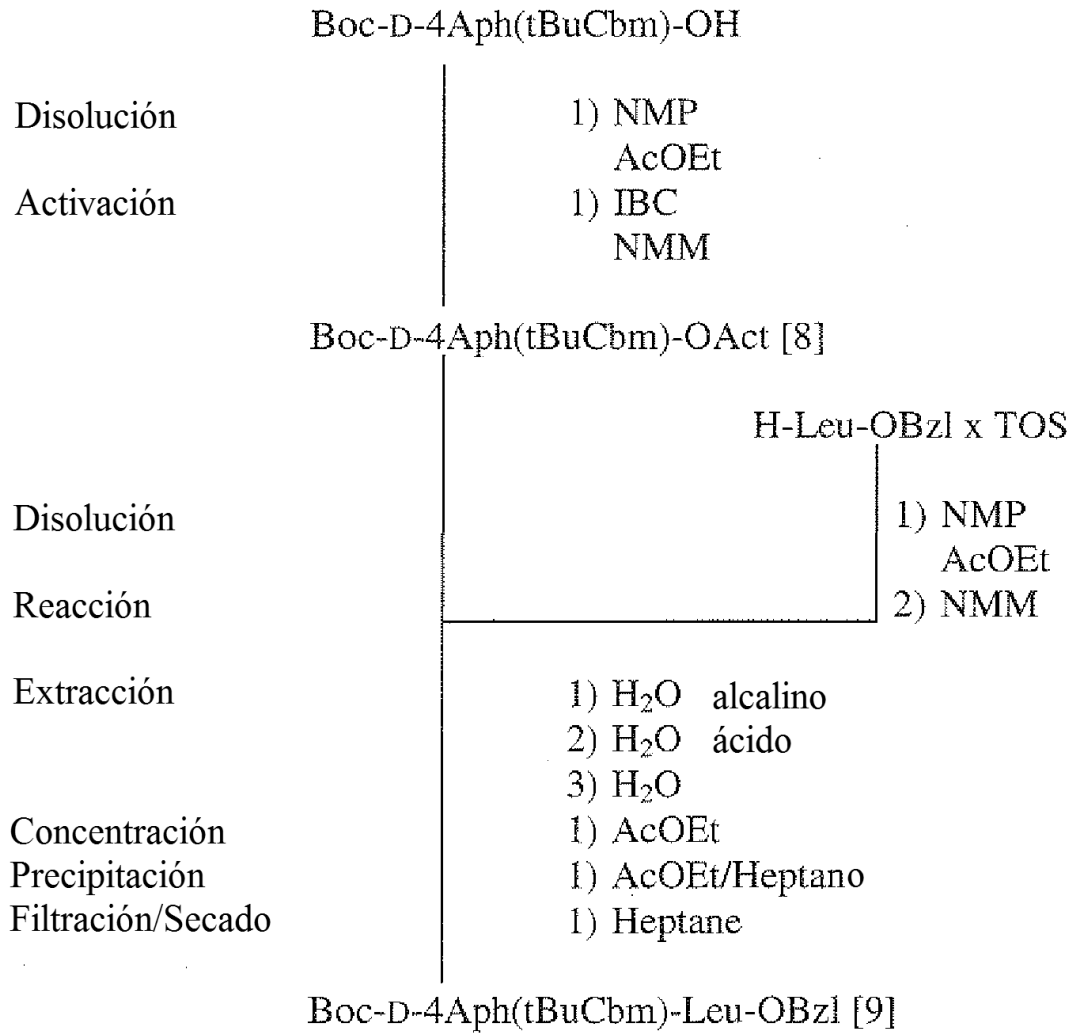


Figura 5

Etapa 6 (Etapa de reacción)

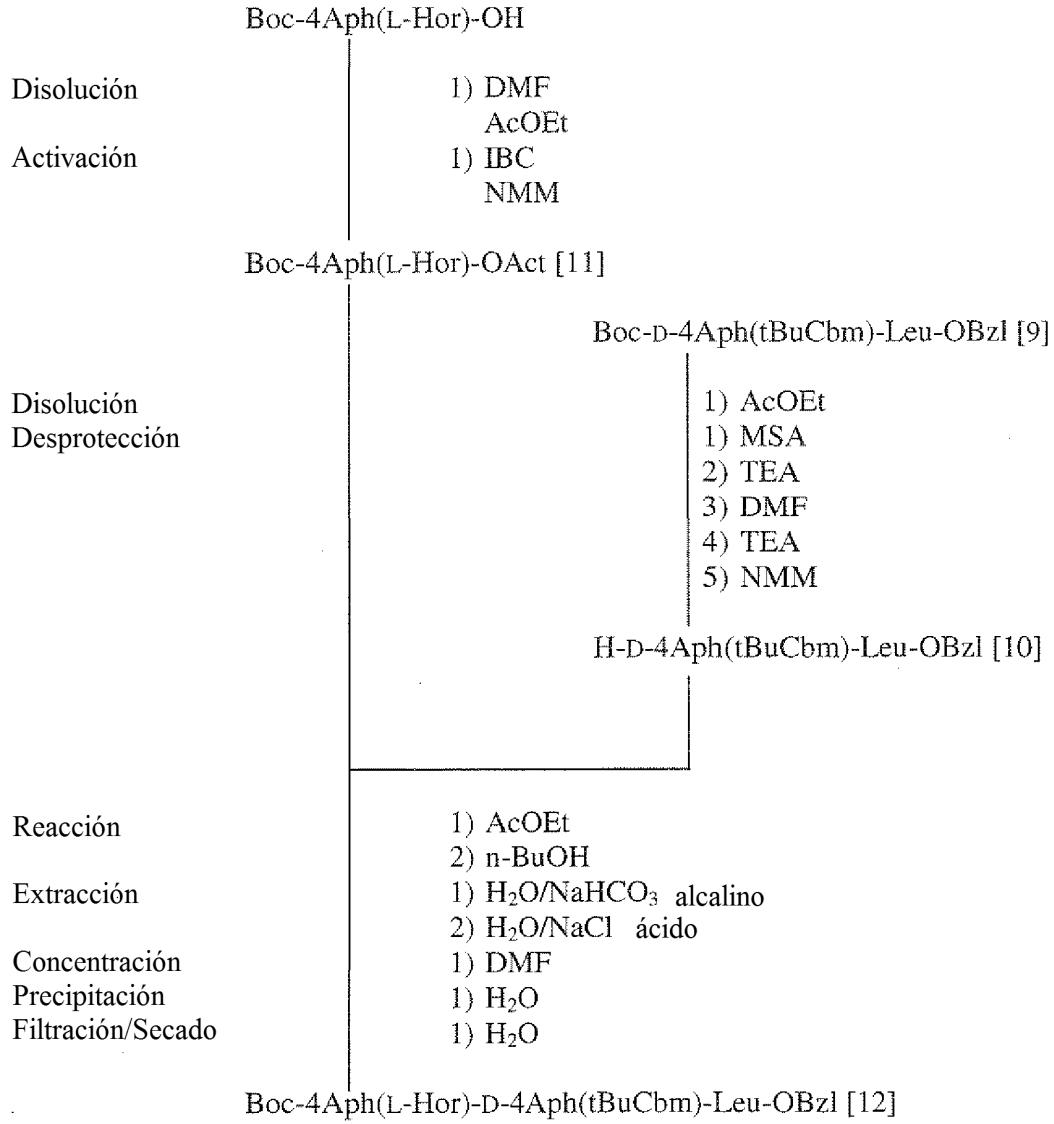


Figura 6

Etapa 7 (Etapa de reacción)

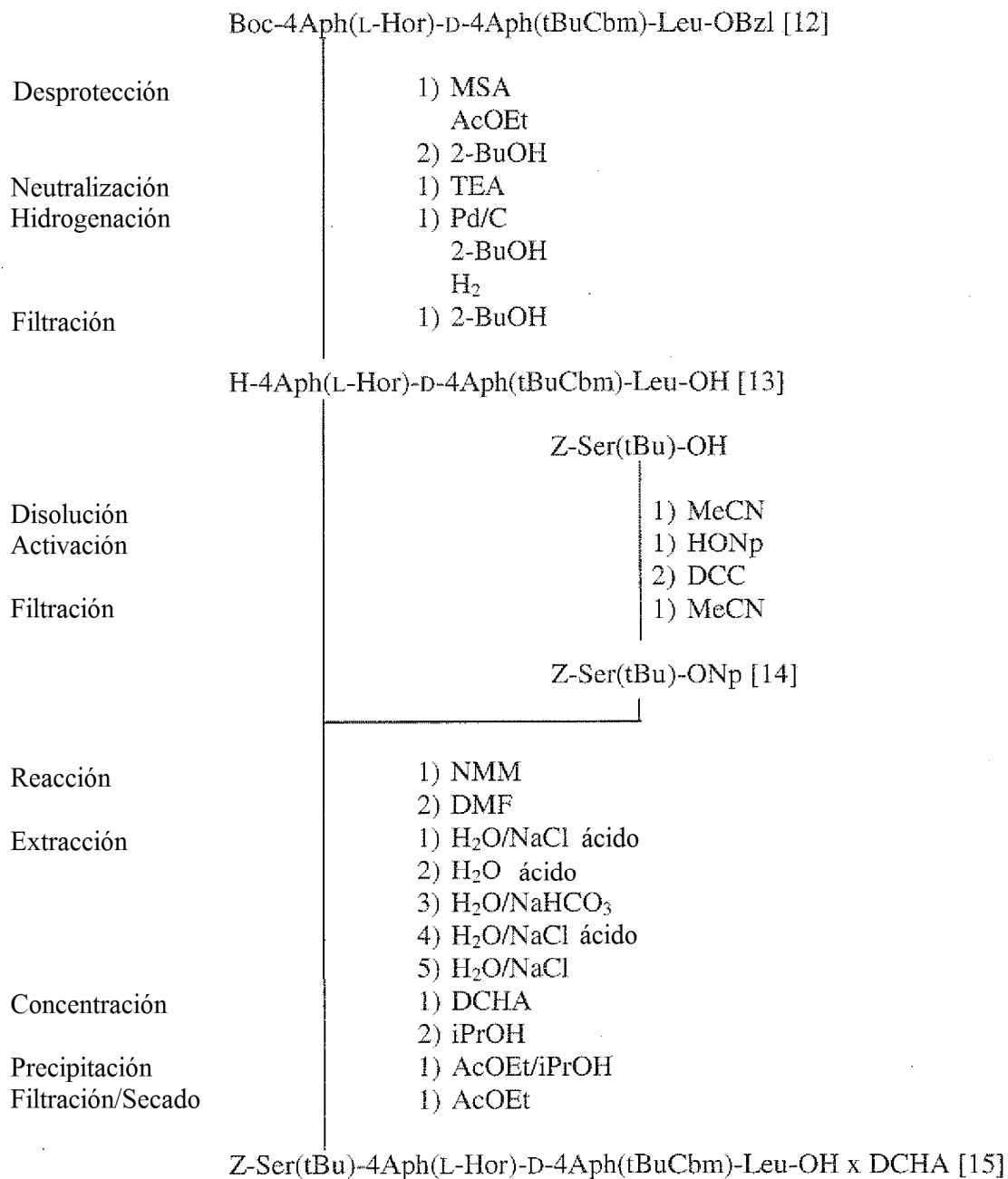


Figura 7

Etapa 8 (Etapa de reacción)

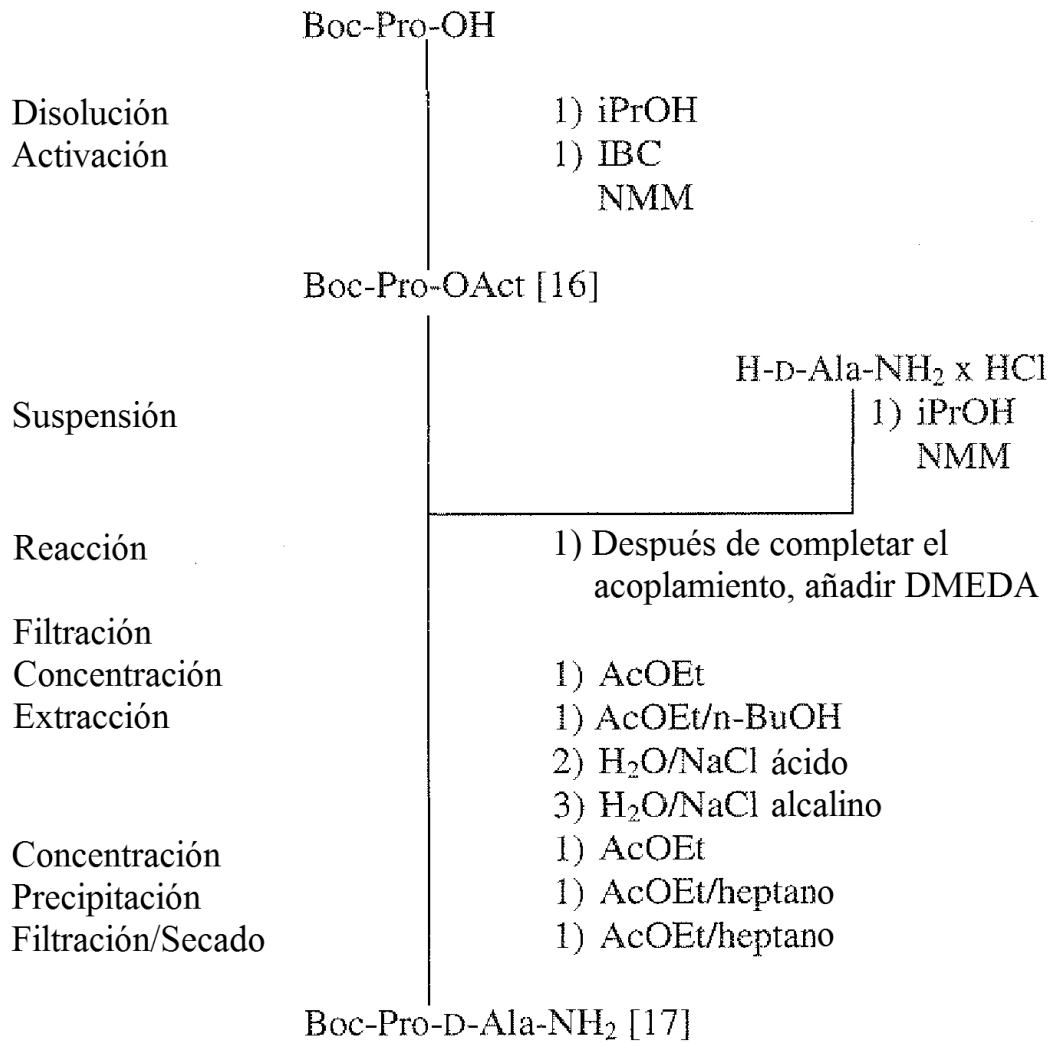


Figura 8

Etapa 9 (Etapa de reacción)

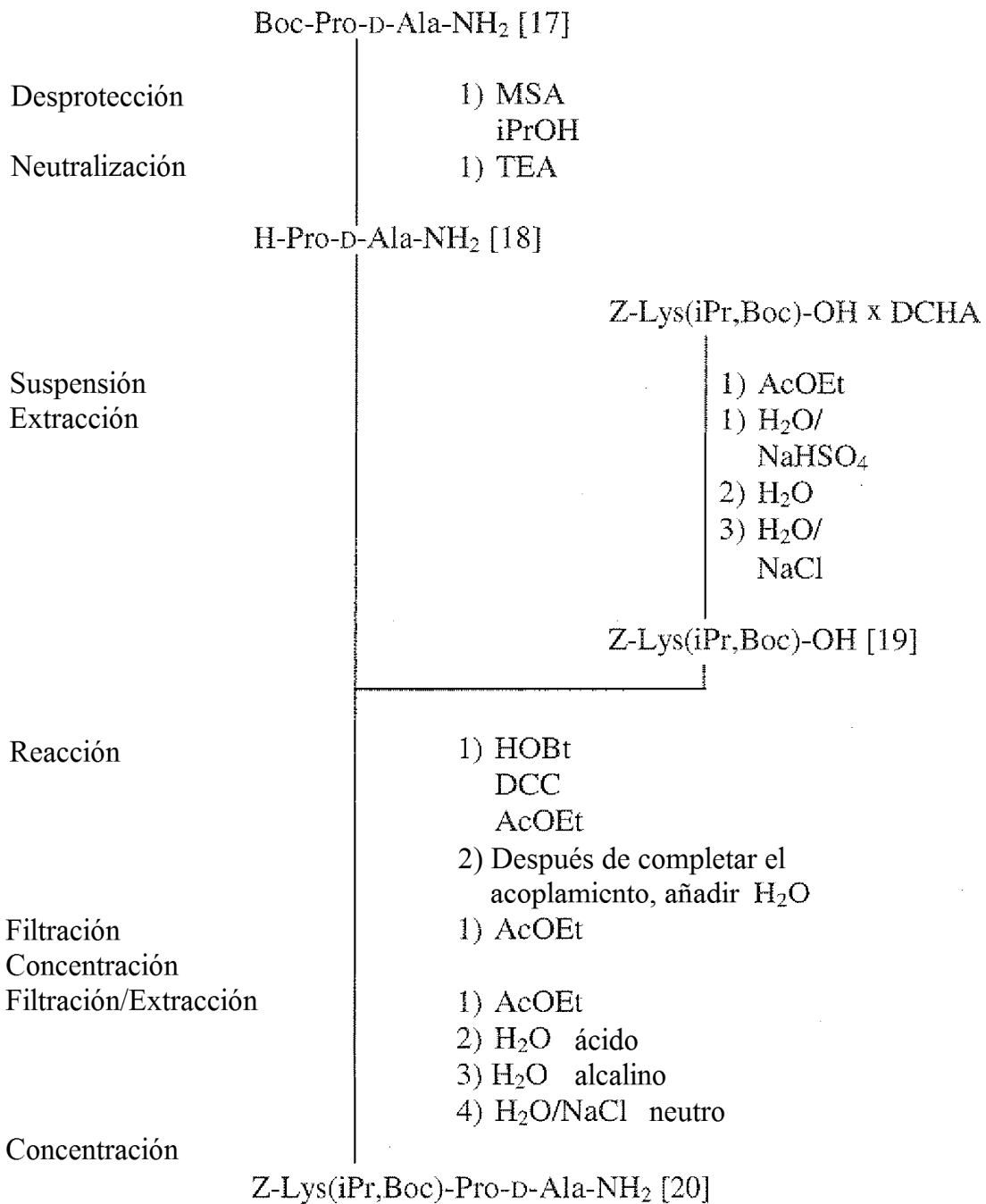


Figura 9Z-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂ [20]

Disolución

1) EtOH

H₂O

2) Pd/C

Ajuste pH

1) dil. HCl

Hidrogenación

1) H₂

Filtración/neutralización

1) NaOH dil.

Concentración

Extracción

1) n-BuOH

Ajuste pH

1) NaOH

Concentración

1) AcOBu

Precipitación

1) Heptano

Filtración/Secado

1) Heptano

H-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-Ala-NH₂ [21]

Figura 10

Etapas 10 (Etapas de reacción)

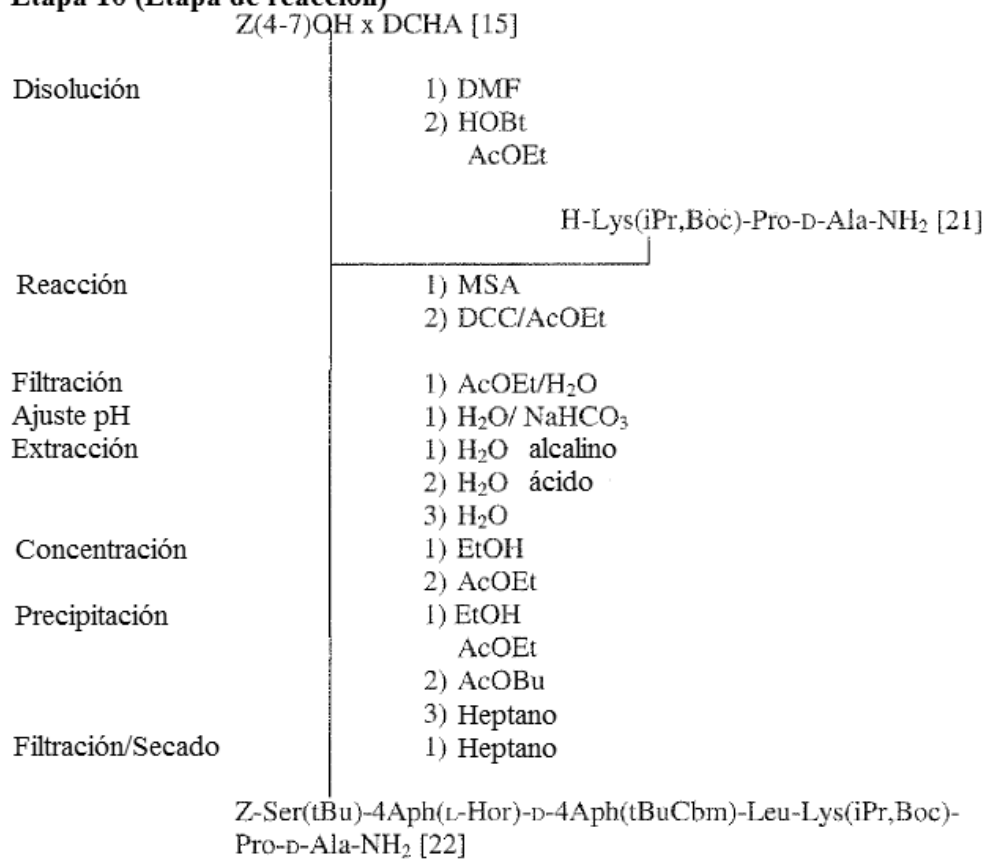


Figura 11

Etapa 11 (Etapa de reacción)

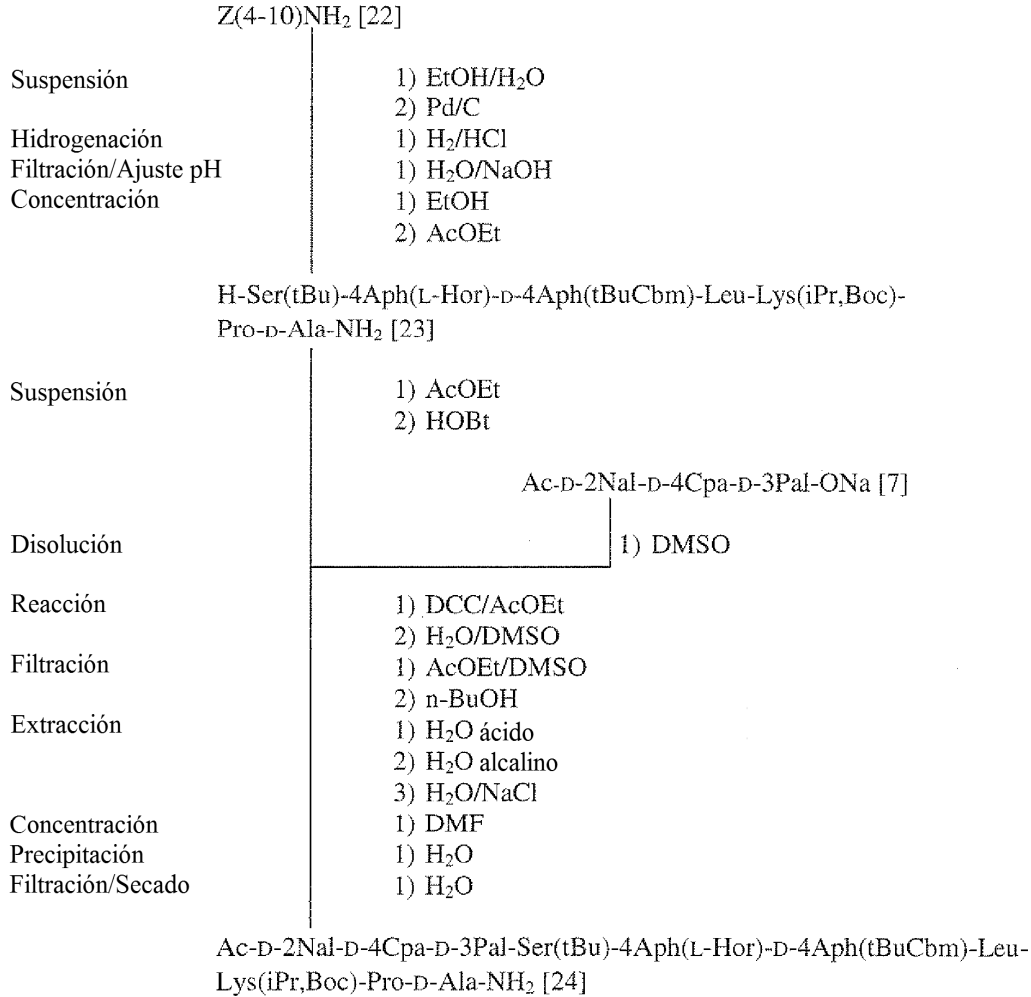


Figura 12

Etapa 12 (Etapa de reacción)

Ac-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-Ser(tBu)-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(tBuCbm)-Leu-Lys(iPr,Boc)-
Pro-D-Ala-NH₂ [24]

Desprotección	1) TFA
Neutralización	2) H ₂ O AcONH ₄ AcOH EtOH
Ajuste pH	1) TFA or AcONH ₄

Etapa 13 (Purificación y Liofilización)

Ac-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-Ser-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(Cbm)-Leu-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-
Ala-NH₂ [24]

- | | |
|---|--|
| 1) Concentración en
columna de fase
reversa y
purificación | |
| 2) Repurificación | |
| 3) Liofilización | |

Ac-D-2Nal-D-4Cpa-D-3Pal-Ser-4Aph(L-Hor)-D-4Aph(Cbm)-Leu-Lys(iPr,Boc)-Pro-D-
Ala-NH₂ [25]