

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 336**

51 Int. Cl.:

C07K 7/23

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2011 PCT/EP2011/068733**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO2012055903**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2011 E 11776156 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2632934**

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

30 Prioridad:

27.10.2010 EP 10189011

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

16.06.2017

73 Titular/es:

**FERRING B.V. (100.0%)
Polaris Avenue 144
2132 JX Hoofddorp, NL**

72 Inventor/es:

**KALITA, DIPAK;
LAYEK, MOHOSIN;
RAO, ATMAKURI VENKATA DHANUNJAYA;
POTULA, VENKAT ARAVINDA;
GAJARE, VIKAS;
BALAKUMARAN, KESAVAN;
NILSSON, ANDERS y
JIANG, GUANGCHENG**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 617 336 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 productos intermedios

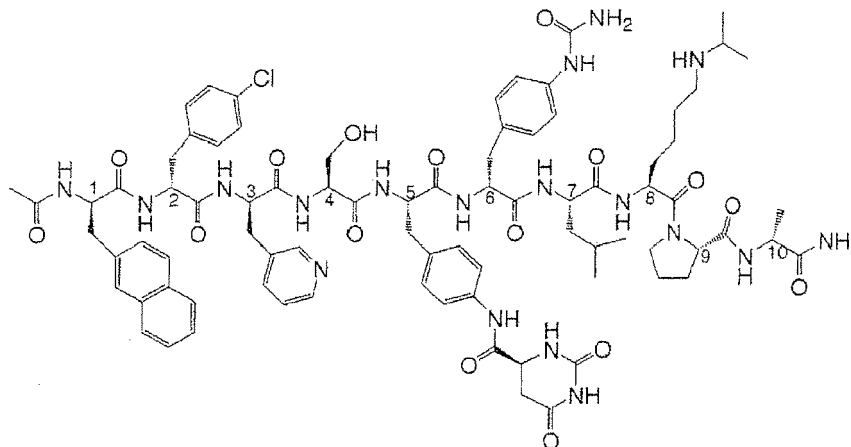
5 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a un procedimiento de fabricación en fase líquida (o de disolución) para preparar el decapeptido degarelix, su precursor protegido con amino, y otros productos intermedios útiles. La invención se refiere además a polipéptidos útiles en el procedimiento de fabricación en fase de disolución y a la purificación del propio degarelix.

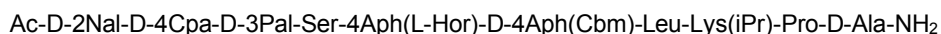
[Antecedentes de la invención]

El cáncer de próstata es una causa principal de morbilidad y mortalidad en hombres en el mundo industrializado. Degarelix, también conocido como FE200486, es un antagonista del receptor de la hormona de liberación de gonadotropina (GnRH) de tercera generación (un bloqueante de GnRH) que se ha desarrollado y aprobado recientemente para pacientes con cáncer de próstata que necesitan terapia de ablación de andrógenos (Doehn *et al.*, *Drugs* 2006, vol. 9, n.º 8, págs. 565-571; documento WO 09846634). Degarelix actúa mediante el bloqueo inmediato y competitivo de receptores de GnRH en la hipófisis y, como otros antagonistas de GnRH, no provoca una estimulación inicial de producción de hormona luteinizante a través del eje hipotálamo-pituitaria-gónada y, por tanto, no provoca aumento de testosterona ni crisis clínica (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).

Degarelix es un decapeptido lineal sintético que contiene siete aminoácidos no naturales, cinco de los cuales 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 cadena quiral que da once centros quirales en total. Su número de registro CAS es 214766-78-6 (de base libre) y está disponible comercialmente con la marca registrada Firmagon™. El principio activo se denomina químicamente 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 a continuación:



La estructura de degarelix también puede representarse como:



en la que 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-isopropilisina, Pro es prolina y Ala es alanina.

Con el fin de describir esta invención, a cada aminoácido en degarelix se le dará la notación abreviada tal como sigue:

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

El degarelix se ha preparado previamente usando la metodología de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) con Boc tal como se notificó en el documento WO 98/46634 y Jiang *et al.*, J. Med. Chem. 2001, 44, 453-467. Básicamente, D-Ala protegida con Boc se acopla en primer lugar a una resina de MBHA en dimetilformamida (DMF)/CH₂Cl₂ usando diisopropilcarbodiimida (DIC) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) como agentes de activación de acoplamiento. Una vez que se ha acoplado la D-Ala a la resina, la síntesis continúa lavando, desbloqueando y luego acoplando el siguiente residuo de aminoácido hasta que se ha completado el decapeptido. Los grupos amino primarios de 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 retirar, en primer lugar, la protección de cadena lateral con piperidina, hacer reaccionar el grupo amino recién liberado en la péptido-resina con isocianato de terc-butilo o ácido L-hidroorótico, garantizar que la reacción está completa con una prueba de ninhidrina y después lavar el péptido-resina antes de añadir el siguiente residuo de aminoácido (véase también Sorbera *et al.*, Drugs of the Future 2006, vol. 31, n.º 9, págs. 755-766).

Aunque la metodología de SPPS con Boc ha proporcionado cantidades suficientes de degarelix hasta ahora, la creciente demanda de este polipéptido significa que se requieren cantidades aún mayores. La SPPS con Boc, que requiere escisión de HF, no es adecuada para síntesis industrial a gran escala. En efecto, el documento WO 98/46634 menciona que la SPPS solamente es adecuada para cantidades limitadas de hasta 1 kg, mientras que se prefiere la síntesis de péptidos en disolución clásica, o la síntesis de péptidos en fase líquida (LPPS), para cantidades más grandes de producto. El documento WO 98/46634 no especifica cómo debe realizarse tal síntesis. También están los gastos atribuibles al gran exceso de reactivos de acoplamiento, aditivos y aminoácidos requeridos para la SPPS. Aunque se ha notificado la existencia de una síntesis de péptidos en fase líquida de degarelix [informe de la EMEA: Assessment Report for Firmagon™ (Degarelix): ref. del documento EMEA/CHMP/635761/2008], hasta ahora no se han divulgado públicamente los detalles de un procedimiento de este tipo.

Los documentos WO 97/34923 y WO 99/26964 son publicaciones de solicitud internacional que se refieren a procedimientos en fase líquida para la preparación de péptidos biológicamente activos. El documento WO 99/26964 se refiere particularmente a la síntesis en fase líquida de decapeptidos que tienen actividad como antagonistas de GnRH. El documento WO 99/26964 enumera varias limitaciones inherentes de la metodología de SPPS para producir antagonistas de GnRH incluyendo la capacidad limitada de la resina, los grandes excesos de reactivos y aminoácidos requeridos, 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).

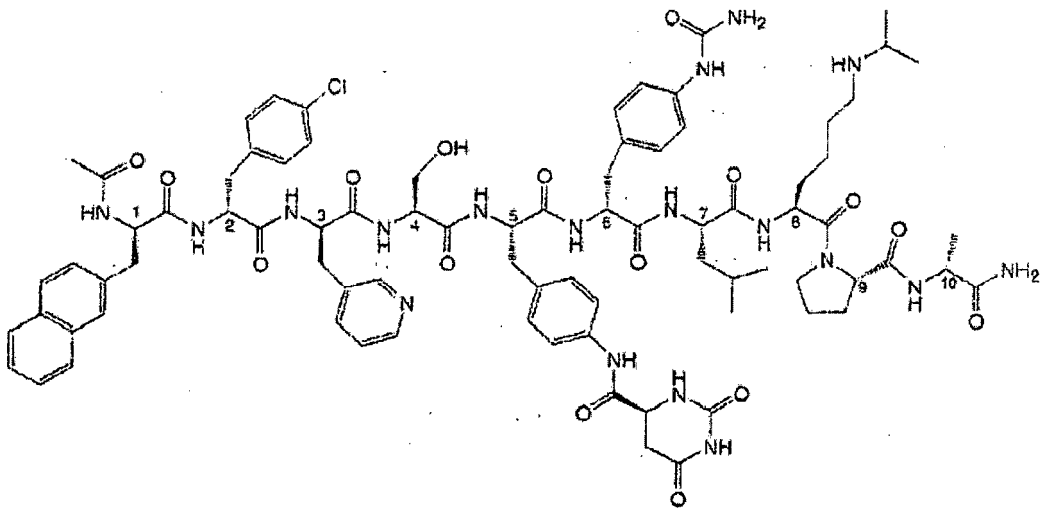
La publicación de solicitud internacional n.º WO 99/26964 describe un procedimiento en fase líquida que implica preparar en primer lugar los fragmentos de péptido centrales de las posiciones 5 y 6 de un decapeptido con las cadenas laterales totalmente elaboradas y después ensamblar el péptido mediante un patrón de ensamblaje de fragmentos "4-2-4", "3-3-4" o "3-4-3". Por ejemplo, en la preparación del antagonista de GnRH, azalina B, se acopla un tetrapéptido con un hexapéptido para formar el decapeptido deseado. Cuando se intenta el mismo patrón de ensamblaje de fragmentos para degarelix, se produce racemización del aminoácido serina (AA₄) que da como resultado aproximadamente el 20 % de impureza de L-Ser. Esta impureza se transmite en el decapeptido final y es difícil de eliminar. Además, cuando se prepara el tetrapéptido AA₁-AA₄ añadiendo la unidad de Ser al tripéptido AA₁-AA₃ siguiendo el procedimiento descrito en el documento WO 99/26964, no pudieron eliminarse completamente los iones de tetrabutilamonio de la hidrólisis del grupo éster bencílico durante las operaciones posteriores y se transmitieron hasta el producto final. Además, se encontró que en la síntesis de degarelix, el grupo L-hidroorotilo se reordena para dar su análogo hidantoína-acetilo cuando se acopla ácido L-dihidroorótico con 4Amp para preparar AA₅. Estos y otros problemas con la síntesis en fase de disolución de degarelix no se han superado y por primera vez se divulga en este documento una nueva síntesis de polipéptido en fase de disolución de este decapeptido.

[Sumario de la invención]

Actualmente se han superado los problemas de los métodos de SPPS para preparar degarelix y las desventajas de los métodos de LPPS tal como se describió en los documentos WO 97/34923 y WO 99/26964 y son el objeto de esta invención.

En general, esta invención se refiere a una síntesis en fase líquida del decapeptido degarelix.

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento en fase líquida para preparar degarelix que tiene la fórmula Ac-AA₁-AA₁₀-NH₂:

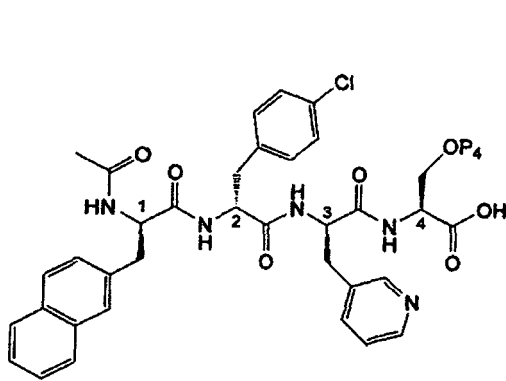


Ac-AA₁-AA₁₀-NH₂

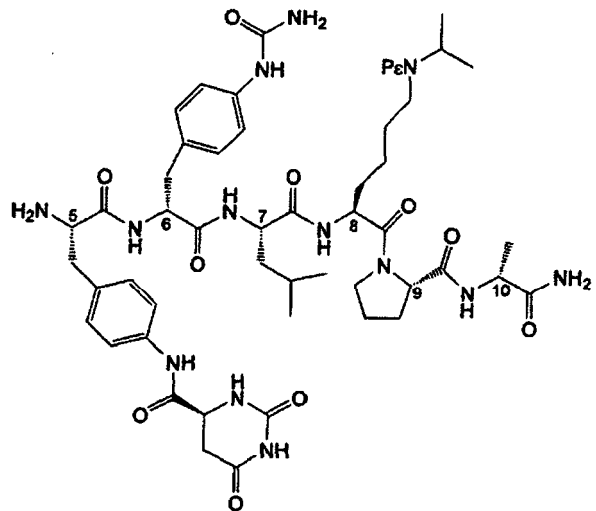
o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;

- 5 que comprende la etapa de acoplar (P₄)Ac-AA₁-AA₄ con (P_ε)AA₅-AA₁₀NH₂ o acoplar Ac-AA₁-AA₃ con (P₄)(P_ε)AA₄-AA₁₀NH₂ en un disolvente orgánico que comprende los dos péptidos, un reactivo de acoplamiento de péptidos y una base de amina orgánica disueltos en el mismo, en el que P_ε es un grupo protector de ε-amino y P₄ es un grupo protector de hidroxilo o hidrógeno, en el que el agente de acoplamiento de péptidos en el caso de acoplar (P₄)Ac-AA₁-AA₄ con (P_ε)AA₅-AA₁₀NH₂ se selecciona de uno o más de hexafluorofosfato de o-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) y hexafluorofosfato de 2-(benzotriazol-1-il)oxi-1,3-dimetilimidazolidinio (BOP),
- 10

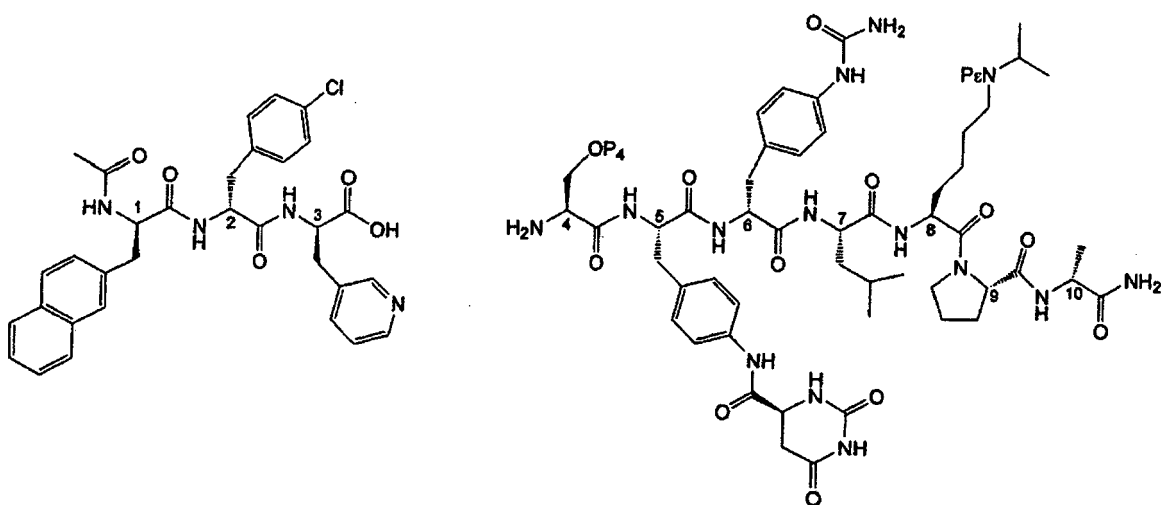
y estando los péptidos representados a continuación:



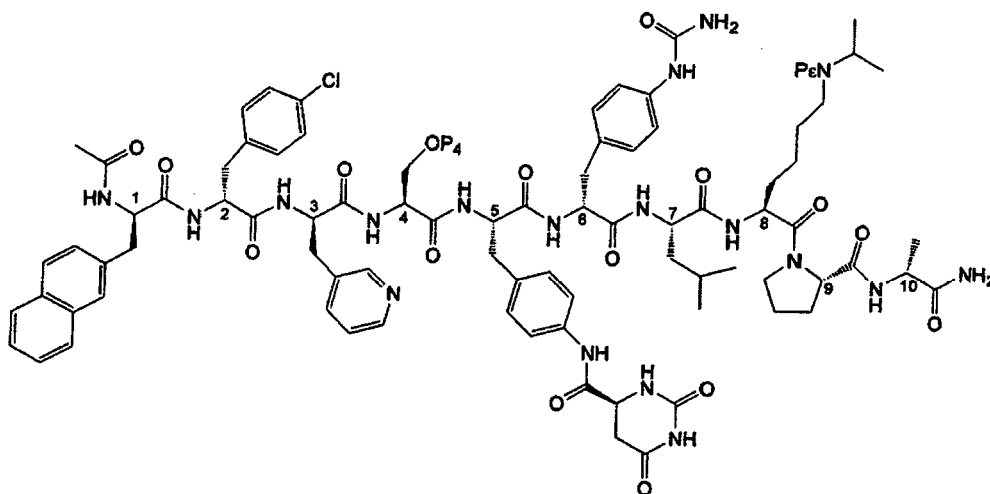
(P₄)Ac-AA₁-AA₄



(P_ε)AA₅-AA₁₀NH₂

**Ac-AA₁-AA₃****(P₄)(P_ε)AA₄-AA₁₀NH₂**

para proporcionar un precursor de degarelix protegido que tiene la fórmula (P₄)(P_ε)Ac-AA₁AA₁₀-NH₂:

**(P₄)(P_ε)Ac-AA₁-AA₁₀-NH₂**

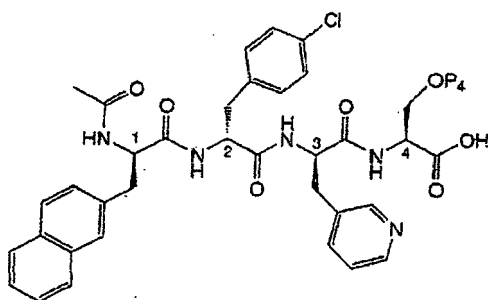
5

y

10 que comprende la etapa de escindir el grupo protector de ε-amino P_ε de un precursor de degarelix según la fórmula (P₄)(P_ε)Ac-AA₁-AA₁₀-NH₂ en un disolvente orgánico que comprende el precursor y un agente de escisión disueltos en el mismo para proporcionar degarelix.

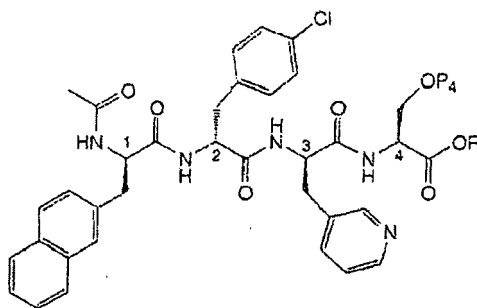
15 P₄ es un grupo protector de hidroxilo o hidrógeno, preferiblemente, tBu, (ψPro) (es decir pseudo-prolina), o hidrógeno. Si P₄ es un grupo protector de hidroxilo, el procedimiento también comprende la etapa de escindir el grupo protector de hidroxilo P₄ del precursor de degarelix. El grupo protector P₄ se selecciona preferiblemente de tal manera que esta etapa de escisión puede llevarse a cabo simultáneamente con la escisión del grupo protector de amino P_ε. Este es, por ejemplo, el caso si tanto P₄ como P_ε son BOC.

20 Un aspecto adicional se refiere al procedimiento en fase líquida para preparar un producto intermedio de degarelix que tiene la fórmula (P₄)Ac-AA₁-AA₄:



(P₄)Ac-AA₁-AA₄

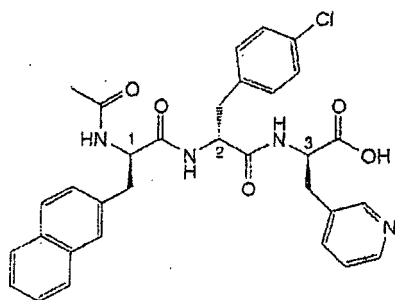
5 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende la etapa de hidrolizar un compuesto que tiene la fórmula (P₄)Ac-AA₁-AA₄-R con un hidróxido alcalino, en la que R representa un grupo protector de carboxilo, preferiblemente bencilo o alquilo C₁-C₄, P₄ representa hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo:



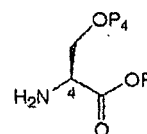
(P₄)Ac-AA₁-AA₄-R

10 y en el que el hidróxido alcalino es LiOH.

Un aspecto adicional se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto (P₄)Ac-AA₁-AA₄-R acoplado Ac-AA₁-AA₃ con (P₄)AA₄-R o acoplado Ac-AA₁-AA₂ con (P₄)AA₃-AA₄-R, estando los péptidos representados a continuación

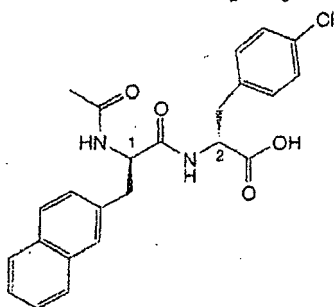


Ac-AA₁-AA₃

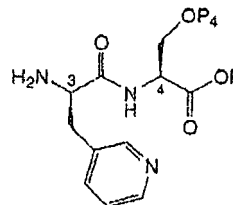


(P₄)AA₄-R

15



Ac-AA₁-AA₂



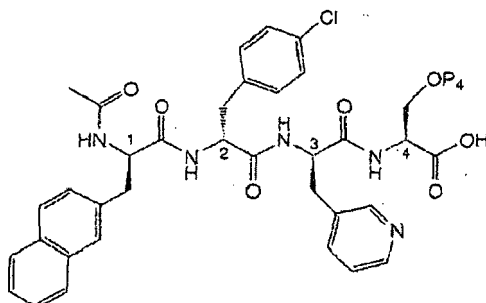
(P₄)AA₃-AA₄-R

En una cada de las fórmulas descritas anteriormente, de AA₁ a AA₁₀, P₄ y P_ε tiene los mismos significados que en la

fórmula II, y R representa un grupo protector de carboxilo, preferiblemente bencilo o alquilo C₁-C₄.

En un aspecto adicional, el tetrapéptido (P₄)Ac-AA₁-AA₄ no se prepara mediante síntesis en fase líquida, sino mediante síntesis en fase sólida. Esta invención, por tanto, también se refiere a un procedimiento en fase sólida para preparar un producto intermedio de degarelix que tiene la fórmula (P₄)Ac-AA₁-AA₄:

5



(P₄)Ac-AA₁-AA₄

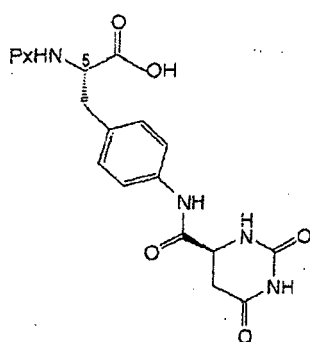
o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende las etapas:

- 10
- a) hacer reaccionar (PN)AA₂ con (P₄)AA₃-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄,PN)AA₂-AA₄-RESINA;
 - b) retirar PN de (P₄,PN)AA₂-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄)AA₂-AA₄-RESINA;
 - 15 c) hacer reaccionar (PN)AA₁ con (P₄)AA₂-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄,PN)AA₁-AA₄-RESINA;
 - d) si PN no es acetilo, retirar PN de (P₄,PN)AA₁-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄)AA₁-AA₄-RESINA y posteriormente acetilar (P₄)AA₁-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄)Ac-AA₁-AA₄-RESINA; y
 - 20 e) escindir (P₄)Ac-AA₁-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄)Ac-AA₁-AA₄.

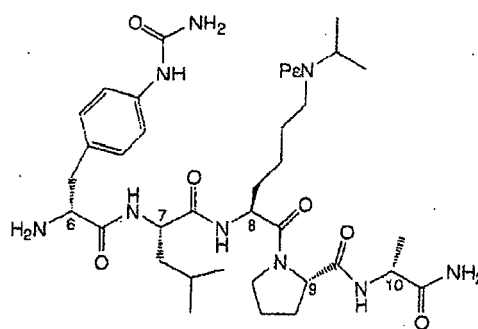
en el que P₄ es H o un grupo protector de hidroxilo en AA₄, y PN es un grupo protector de amino.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un procedimiento en fase líquida para preparar el hexapéptido (P_ε)AA₅-AA₁₀NH₂ que comprende el acoplamiento de (P_ε)AA₆-AA₁₀NH₂ y (P_χ)AA₅, en el que P_χ es un grupo protector de amino y AA₅ a AA₁₀ y P_ε tienen el mismo significado que anteriormente, para proporcionar (P_χ)(P_ε)AA₅-AA₁₀NH₂, y la escisión de P_χ con TFA para proporcionar (P_ε)AA₅-AA₁₀NH₂, estando los péptidos representados a continuación:

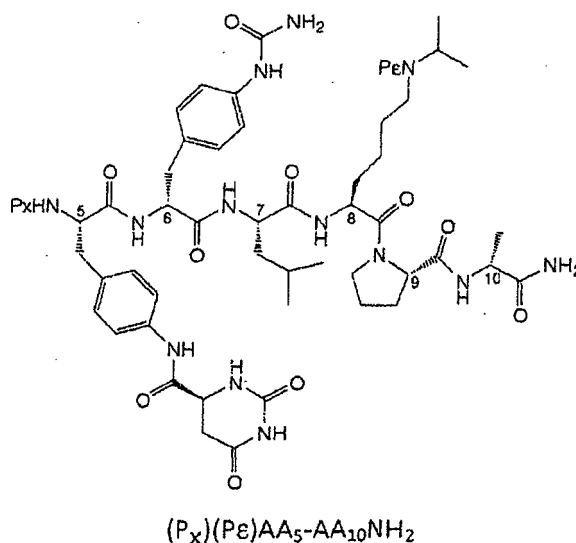
25



(P_χ)AA₅



(P_ε)AA₆-AA₁₀NH₂



5 Debe entenderse que en el procedimiento de preparación de degarelix según esta invención, pueden combinarse cualquiera de las etapas de procedimiento anteriores. Por ejemplo, esta invención también realiza un procedimiento en el que (P₄)Ac-AA₁-AA₄ se prepara en primer lugar a partir de (P₄)Ac-AA₁-AA₄-R según el tercer aspecto de la invención o según el quinto aspecto de la invención antes de acoplarse con (P_ε)AA₅-AA₁₀-NH₂ para formar el precursor protegido (P₄)(P_ε)Ac-AA₁AA₁₀-NH₂ según el segundo aspecto de la invención. El precursor (P₄)(P_ε)Ac-AA₁-AA₁₀-NH₂ formado por un procedimiento de este tipo puede entonces desprotegerse según el primer aspecto de la invención, dando finalmente un único procedimiento para preparar degarelix que incorpora el primer, segundo y tercero o quinto aspecto de la invención.

Naturalmente, cualquiera de las etapas de purificación para degarelix que se describen en el presente documento puede incorporarse en cualquier procedimiento en el que degarelix sea el producto final.

15 [Figuras]

Figura 1. Preparación en fase líquida del tetrapéptido Ac-AA₁-AA₄.

Figura 2. Preparación del hexapéptido AA₅-AA₁₀NH₂ protegido con P_ε en el que P_ε es Fmoc.

Figura 3. Condensación de segmentos y desprotección para producir degarelix.

Figura 4: Preparación en fase sólida del tetrapéptido Ac-AA₁-AA₄ con un grupo protector de pseudoprolina en AA₄.

Figura 5: Preparación en fase sólida del tetrapéptido Ac-AA₁-AA₄ con un grupo protector de tBu en AA₄.

Figura 6: Preparación en fase sólida de AA₅-AA₇ protegido con BOC.

Figura 7: Preparación en fase sólida de AA₈-AA₁₀NH₂ protegido con Fmoc.

30 [Descripción detallada de la invención]

La presente invención se describirá ahora en más detalle.

35 Desprotección del precursor de degarelix

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento en fase líquida para preparar degarelix que tiene la fórmula Ac-AA₁-AA₁₀-NH₂ o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se describe en las reivindicaciones. El procedimiento comprende la etapa de escindir un grupo protector de ε-amino P_ε de un precursor de degarelix según la fórmula (P₄)(P_ε)AA₁-AA₁₀ en una disolución orgánica que comprende el precursor y un agente de escisión disueltos en la misma.

En este caso, P_ε 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). Los ejemplos adecuados incluyen 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), CBZ, y CBZ sustituido, tal como, por ejemplo, p-clorobenciloxycarbonilo, p-6-nitrobenciloxycarbonilo, p-bromobenciloxycarbonilo y p-metoxibenciloxycarbonilo, o-clorobenciloxycarbonilo, 2,4-diclorobenciloxycarbonilo, 2,6-

diclorobenciloxycarbonilo, y similares; grupos protectores de tipo uretano alifático, tales como t-butiloxycarbonilo (Boc), t-amiloxycarbonilo, isopropiloxycarbonilo, 2-(p-bifenilil)-isopropiloxycarbonilo, y similares; grupos protectores de tipo cicloalquiluretano, tales como ciclopentiloxycarbonilo, adamantiloxycarbonilo y ciclohexiloxycarbonilo; aliloxycarbonilo (Alloc). Grupos protectores preferidos son Fmoc, Boc y Alloc, siendo Fmoc el más preferido.

5 Si se requiere, el grupo hidroxilo de Ser también podría protegerse, aunque esto no se prefiere. En este caso, P₄ no es hidrógeno, sino un grupo protector de hidroxilo tal como, por ejemplo, un alquilo C₄-C₆ (por ejemplo, t-butilo, ciclohexilo), tritilo, bencilo, un bencil éter tal como p-metoxibencilo, u otros bencilos sustituidos tales como p-nitrobencilo, p-clorobencilo, o-clorobencilo, 2,6-diclorobencilo, o (ψ Pro), (pseudoprolina). Si Ser se protege, se prefiere particularmente t-butilo, bencilo y 9-fluorenil metil éteres, siendo t-butilo el más preferido. P₄ es H, tBu, o (ψ Pro), preferiblemente tBu o (ψ Pro).

15 El agente de escisión usado para retirar el grupo protector de ϵ -amino o el grupo protector de hidroxilo de Ser depende de la naturaleza del grupo protector y se conoce bien en la técnica. En una realización preferida, se usa el mismo agente de escisión para tanto el grupo protector de ϵ -amino como el grupo protector de hidroxilo de Ser, si estuvieran presentes.

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

- 20 • ácido trifluoroacético (TFA), HCl, o ácido metanosulfónico, particularmente para t-butil éter como grupo protector
- H₂/Pd-C, HF, o ácido trifluorometano-sulfónico, particularmente para bencil éter como grupo protector, y
- 25 • SiCl₄/anisol, particularmente para 2-(metilsulfinil)bencil éter como grupo protector;

Agentes de escisión preferidos para el grupo protector de ϵ -amino son:

- 30 • ácido trifluoroacético (TFA), HCl o ácido metanosulfónico, particularmente para carbamatos de t-butilo como grupo protector
- H₂/Pd-C, HF, o ácido trifluorometano-sulfónico, particularmente para carbamatos de bencilo como grupo protector, y
- 35 • piperidina, DBU y DEA, particularmente para Fmoc como grupo protector

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

Particularmente preferidas son las diferentes condiciones de escisión indicadas en la siguiente tabla 1:

40 Tabla 1: Condiciones de escisión

Grupo protector		Grupo protegido	Reactivo de escisión	Disolvente
Abreviatura	Nombre			
t-Bu	t-Butil éteres y ésteres t-butílicos	-OH y -CO ₂ H	TFA HCl Ácido metanosulfónico	DCM Dioxano DCM
Bzl	Bencil éteres y ésteres bencilicos	-OH y -CO ₂ H	H ₂ /Pd-C HF Ácido trifluorometano-sulfónico	EtOH/agua Puro DCM
MsOb	4-(Metilsulfinil)-bencil éter	-OH	SiCl ₄ /anisol	TFA
Tce	Ésteres de 2,2,2-tricloroetilo	-CO ₂ H	Zn	AcOH/H ₂ O
Cbz o Z	Benciloxycarbonilo	-NH ₂	H ₂ /Pd-C HF Ácido trifluorometano-sulfónico	EtOH/Agua/ácido Puro DCM
Boc	Terc-butoxycarbonilo	-NH ₂	TFA HCl Ácido metanosulfónico	DCM Dioxano DCM
Fmoc	9-Fluorenilmetoxycarbonilo	-NH ₂	piperidina DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]-undec-	DMF DMF

			7-eno) DEA (dietilamina)	DMF
Trt	Tritilo (Trt)	-OH -NH ₂	TFA al 1 %-DCM	DCM
TBDMS	Terc-butil-dimetil-sililo	-OH	TFA ACOH-THF-H ₂ O (3:1:1), 18 h TBAF 0,1 M en THF	THF
Ciclohexilo (CHX _o CH _x)	Ciclohexilo	-OH	HF o TFSA	HF puro o DCM
Troc	2,2,2-Tricloroetoxicarbonilo	-NH ₂	Zn	AcOH/H ₂ O

Bibliografía: Chem. Rev. 2009, 109, 2465-2504 (por Albert Isidro-Llobet *et al.*)

5 Normalmente, un agente de escisión tal como piperidina se disuelve en un disolvente orgánico tal como DMF, NMP
bajo una atmósfera inerte tal como N₂ o argón y se enfría hasta una temperatura de entre -20 y 0 °C, preferiblemente
-10 y -2 °C, por ejemplo, aproximadamente -5 °C. Se añade el producto intermedio protegido (P_ε)AA₁-AA₁₀ y
entonces se agita la mezcla de reacción a una temperatura de entre -20 y 25 °C, preferiblemente -10 y 10 °C y más
preferiblemente 0 y 5 °C. Cuando se ha retirado el grupo protector (preferiblemente el rendimiento es un rendimiento
10 >95 %, lo más preferiblemente >99 %), el degarelix en bruto puede precipitarse, filtrarse y después lavarse con éter.
Por ejemplo, el degarelix en bruto puede precipitarse añadiéndolo a éter, tal como metil t-butil éter (MTBE) o DIPE, y
agitando durante de 10 a 30 minutos. El precipitado puede lavarse entonces con éter (preferiblemente DIPE).
Posteriormente, el sólido puede llevarse a, por ejemplo, acetato de etilo y agitarse durante algún tiempo a
temperatura ambiente. El sólido fino obtenido puede entonces filtrarse, lavarse (por ejemplo, con acetato de etilo) y
secarse a vacío.

15 Se ha encontrado que periodos de reacción prolongados no son perjudiciales para la calidad de la reacción y que no
se observa un aumento significativo (rendimiento <0,03 % tal como se determina mediante HPLC) en la impureza de
hidantoína si se permite que la reacción continúe durante hasta 24 horas. Además, particularmente en el caso de
piperidina como agente de escisión, no se observa impureza de hidantoína si se realiza la reacción en presencia del
20 5 % en volumen de agua por volumen de disolvente (por ejemplo, 0,1 ml de agua por 2 ml de disolvente tal como
DMF) durante hasta 20 horas. Esto demuestra la robustez de esta reacción de desprotección para la LPPS de
degarelix.

Acoplamiento 4+6 y acoplamiento 3+7

25 El procedimiento de la invención comprende la etapa de acoplar un producto intermedio de tetrapéptido según la
fórmula (P₄)Ac-AA₁-AA₄ con un producto intermedio de hexapéptido según la fórmula (P_ε)AA₅-AA₁₀ o la etapa de
acoplar un producto intermedio de tripéptido según la fórmula Ac-AA₁-AA₃ con un producto intermedio de
heptapéptido según la fórmula (P₄)(P_ε)AA₄-AA₁₀. En cualquier caso, el grupo protector P_ε puede ser cualquier grupo
30 protector de ε-amino tal como se comentó previamente. El grupo hidroxilo de Ser también puede protegerse si se
requiere (es decir, en este caso, P₄ no es hidrógeno, sino un grupo protector de hidroxilo). La reacción de
acoplamiento se realiza en una disolución orgánica en la que los dos péptidos, un reactivo de acoplamiento de
péptidos y una base de amina orgánica se disuelven en la misma. También puede estar presente un aditivo de
acoplamiento de péptidos.

35 El disolvente orgánico, el reactivo de acoplamiento de péptidos, el aditivo de acoplamiento de péptidos y la base de
amina orgánica pueden ser cualquiera de los conocidos en la técnica de LPPS.

40 Disolventes orgánicos típicos son THF, NMP (N-metilpirrolidona), DCM, DMF, DMSO, y mezclas de los mismos.

Reactivos de acoplamiento de péptidos típicos son uno o más de hexafluorofosfato de o-(7-azabenzotriazol-1-il)-
1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), hexafluorofosfato de o-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU),
tetrafluoroborato de o-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-
45 tris(dimetilamino)fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (Py-BOP), dicloruro
de N,N-bis-(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfónico (BOP-Cl), hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBroP),
iso-butilcloroformiato (IBCF), 1,3 dicitlohexilcarbodiimida (DCC), 1,3-diisopropil-carbodiimida (DIC), clorhidrato de 1-
(dimetilaminapropil)-3-etilcarbodiimida (WSCDI), N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidraquinolina (EEDQ),
isopropilcloroformiato (IPCF), tetrafluoroborato de 2-(5-norbornen-2,3-dicarboximido)-1,1,3,3-tetrametiluronio
(TNTU), anhídrido de ácido propanofosfónico (PPAA) y tetrafluoroborato de 2-succinimido-1,1,3,3-tetrametiluronio
50 (TSTU). Agentes de acoplamiento preferidos son DIC, HATU, HBTU y BOP.

Aditivos de acoplamiento de péptidos típicos son 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (HOOBt), 1-hidroxi-
1H-benzotriazol (HOBt), 6-cloro-HOBt y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt). Particularmente preferidos son HOBt y

HOAt.

Bases de amina orgánicas típicas son NMM, DIPEA, TE y colidina. Particularmente preferida es DIPEA.

- 5 Particularmente preferido es el uso combinado de HATU, HOAt y DIPEA. Otra realización preferida se refiere al uso combinado de DIC, 6-cloro-HOBt, opcionalmente en combinación con sales de cobre.

10 Sorprendentemente, se ha hallado que la elección del disolvente orgánico, el reactivo/aditivo de acoplamiento de péptidos y la base de amina orgánica tiene un efecto sobre los rendimientos de los productos deseados y sobre la racemización del aminoácido Ser en la estructura principal del polipéptido.

15 Por ejemplo, aunque THF, NMP, DCM, DMF y mezclas de los mismos pueden usarse como disolventes para estas reacciones de acoplamiento, el uso de DMF, o bien solo o bien en mezcla (por ejemplo, con DCM), aumenta el rendimiento del producto final deseado mientras que al mismo tiempo reduce cualquier impureza de D-Ser. El uso de DMF aumenta aparentemente el rendimiento y reduce impurezas de D-Ser. La activación es rápida en un disolvente polar tal como DMF pero lenta en un disolvente no polar tal como DCM. La combinación de HATU/HOAt conduce a un acoplamiento altamente eficaz en parte por la rápida activación por una base tal como DIEA o NMM seguido de rápido acoplamiento en presencia de la misma base en un disolvente polar como DMF. El efecto de diferentes disolventes se ilustra en la tabla 2.

20 Tabla 2. Examen de diferentes disolventes durante el acoplamiento de los segmentos AA₁-AA₄ y AA₅-AA₁₀

Entrada	Disolvente	Reactivo y aditivo de acoplamiento	Rendimiento (%)	Pureza por HPLC (%)		Comentarios
				Producto CDEG-1	Impureza (D-Ser)	
1	THF	EDC.HCl	35	62,42	16,29	NMM como base; Contenido en CLEU-15 26,5 %
2	NMP	EDC.HCl	35	62,42	16,29	NMM como base; Contenido en CLEU-15 0,17 %
3	DCM-DMF	EDC.HCl	55	47,81	10,39	Contenido en CLEU-15 25,54 %
4	DMF	EDC.HCl	65	72	92	Colidina como base
5	DMF	HATU/HOAt	74	84,4	1,91	Se usan 3,0 equiv. de DIEA
6	DMF	HATU/HOAt	74	85,3	1,44	Se usan 3,0 equiv. de DIEA
7	DMF	HATU/HOAt	87	83,65	1,44	Se usan 3,0 equiv. de DIEA

25 La elección del reactivo y aditivo de acoplamiento también tiene un gran efecto sobre el rendimiento y el grado de racemización. Se realizaron reacciones de acoplamiento usando HBTU, HCTU, TBTU, BOP y HATU y se halló que HBTU y HATU daban los mejores rendimientos globales. Sin embargo, se halló que las reacciones de acoplamiento usando BOP o HATU como reactivo de acoplamiento conducían a mucha menos racemización del aminoácido Ser.

30 La adición de un aditivo de acoplamiento mejora significativamente el rendimiento del polipéptido deseado. En muchos casos, el aditivo de acoplamiento también reduce aún más el grado de racemización del aminoácido Ser, conduciendo por tanto a un producto con menos impurezas. Las combinaciones de reactivo y aditivo de acoplamiento que aumentan el rendimiento son TBTU/HOAt, HATU/HOAt y HATU/HOBt. Sorprendentemente, la combinación de TBTU/HOAt o HATU/HOAt aumenta el rendimiento mientras que al mismo tiempo reduce la racemización, actuando HATU/HOAt mejor de entre todas las combinaciones sometidas a prueba.

35 El efecto de diferentes agentes y aditivos de acoplamiento se ilustra en las siguientes tablas 3 y 4.

Tabla 3. Examen de diferentes reactivos de acoplamiento para controlar la racemización

Entrada	Base	Reactivo y aditivo de acoplamiento	Rendimiento de CDEG-1 (%)	Pureza por HPLC (%)		Comentarios
				CDEG-1	Impureza (D-Ser)	
1	NMM	EDC.HCl/HOBt	67	65	20	La racemización es mayor
2	NMM	EDC.HCl/HOBt	67	65	18,9	La racemización es mayor
3	DIEA	TBTU	39	67,93	13,34	Permanece el 1,3 % de CLEU-15.
4	DIEA	HBTU	53	54,9	20,49	Permanece el 1,9 % de

						CLEU-15
5	DIEA	EDC.HCl	51	-	-	Permanece el 68,9 % de CLEU-15.
6	NMM	HBTU	78	61,42	15,16	Permanece el 9,8 % de CLEU-15
7	NMM	HCTU	60	51,63	15,92	Permanece el 7,32 % de CLEU-15
8	NMM	TBTU	53	62,78	14,73	Permanece el 3,75 % de CLEU-15
9	NMM	BOP	51	46,3	8,92	Permanece el 11,93 % de CLEU-15
10	NMM	HATU	74	65,97	10,62	Permanece el 4,52 % de CLEU-15
11	DIEA	TBTU/HOAt	98	76,26	6,8	Permanece el 0,14 % de CLEU-15
12	DIEA	DIC/HOAt	-	20,49	1,18	Permanece el 45,9 % de CLEU-15
13	DIEA	HATU/HOAt	74	83,16	2,9	CLEU-15 sin reaccionar
14	NMM	HATU/HOAt	81	64,0	13,32	Permanece el 7,1 % de CLEU-15
15	NMM	HATU/HOBt	89	65,0	13,14	Permanece el 4,35 % de CLEU-15
16	NMM	EDC.HCl/HOAt	74	70,38	13,66	CLEU-15 sin reaccionar
17	DIEA	HATU/HOAt	79	79,79	2,3	Esta reacción se repitió a mayor escala
18	DIEA	TBTU/HOAt	84	75,8	7,2	La reacción se repitió a mayor escala
19	DIEA	HATU/HOAt	74	84,4	1,91	"
20	DIEA	HATU/HOAt	74	85,3	1,44	"
21	DIEA	HATU/HOAt	87	84	1,44	"
22	DIEA	HATU/HOAt	79	84,5	1,37	"

Tabla 4. Examen de diferentes aditivos para controlar la racemización durante el acoplamiento de los segmentos AA₁-AA₄ y AA₅-AA₁₀

Entrada	Reactivo de acoplamiento	Aditivo	Base	Rendimiento de CDEG-1 (%)	Pureza por HPLC (%)		Comentarios
					CDEG-1	Impureza (D-Ser)	
1	TBTU	HOAt	DIEA	98	76,26	6,8	Permanece el 0,14 % de CLEU-15
2	DIC	HOAt	DIEA	-	20,49	1,18	Permanece el 45,9 % de CLEU-15
3	HATU	HOAt	DIEA	74	83,16	2,9	Finalización de la reacción
4	HATU	HOAt	NMM	80	64,0	13,32	Permanece el 7,1 % de CLEU-15
5	HATU	HOBt	NMM	89	65,0	13,14	Permanece el 4,3 % de CLEU-15
6	EDC.HCl	HOAt	NMM	74	70,38	13,66	CLEU-15 sin reaccionar
7	HATU	HOAt	DIEA	79	79,79	2,3	Repetir la reacción.
8	TBTU	HOAt	DIEA	84	75,8	7,2	Repetir la reacción
9	HATU	HOAt	DIEA	74	84,4	1,91	Se usan 3,0 equiv. de base
10	HATU	HOAt	DIEA	74	65,3	1,44	Se usan 3,0 equiv. de base
11	HATU	HOAt	DIEA	87	83,65	1,44	Se usan 3,0 equiv. de base
12	EDC.HCl	HOBt	NMM	67	65	20	La racemización es mayor
13	EDC.HCl	HOBt	NMM	64	65	17,9	La racemización es mayor
14	EDC.HCl	HOBt	NMM	67	65	18,9	La racemización es mayor
15		HOSu	NMM	-	-	-	La reacción no continuó

5 La elección de base de amina orgánica también afecta a la reacción. Para la presente invención, se prefieren NMM y DIEA ya que permiten que se obtenga el polipéptido deseado en los mejores rendimientos. DIEA se prefiere más

puesto que esta base reduce el grado de racemización de Ser. También se ha hallado que la cantidad de base afecta a la reacción. Cuando se usa una base tal como DIEA, se halló que cuanto más base estuviera presente, menor sería el rendimiento y mayor el grado de racemización. Por ejemplo, seis equivalentes de base (con respecto a A51-A10) conducen a un aumento de dos veces del producto de racemización con respecto a cuando se usan tres equivalentes de base. Por tanto, se prefiere usar 1-5 equivalentes de base, más preferiblemente 2-4 equivalentes de base y lo más preferiblemente de 2,5 a 3,5 equivalentes de base en estas reacciones de acoplamiento. El efecto de las diferentes bases y sus cantidades se muestra en las siguientes tablas 5 y 6.

Tabla 5. Examen de diferentes bases para controlar la racemización durante el acoplamiento de los segmentos AA₁-AA₄ y AA₅-AA₁₀

Entrada	Reactivo de acoplamiento	Aditivo	Base	Rendimiento de CDEG-1 (%)	Pureza por HPLC (%)		Comentarios
					CDEG-1	(D-Ser)	
1	TBTU	HOAt	DIEA	98	76,26	6,8	Permanece el 0,14 % de CLEU-15
2	DIC	HOAt	DIEA	-	20,49	1,18	Permanece el 45,9 % de CLEU-15
3	HATU	HOAt	DIEA	74	83,16	2,9	No permanece CLEU-15
4	HATU	HOAt	NMM	80	64,0	13,32	Permanece el 7,1 % de CLEU-15
5	HATU	HOBt	NMM	89	65,0	13,14	Permanece el 4,35 % de CLEU-15
6	EDC.HCl	HOAt	NMM	74	70,38	13,66	No permanece CLEU-15
7	HATU	HOAt	DIEA	79	79,79	2,3	
8	TBTU	HOAt	DIEA	84	75,8	7,2	
9	HATU	HOAt	DIEA	74	84,4	1,91	Se usan 3,0 equiv. de base
10	HATU	HOAt	DIEA	74	85,3	1,44	Se usan 3,0 equiv. de base
11	HATU	HOAt	DIEA	87	83,65	1,44	Se usan 3,0 equiv. de base
12	EDC.HCl	HOBt	Colidina	65	72	9,2	
13	EDC.HCl	HOBt	NMM	67	65	20	La racemización es mayor
14	EDC.HCl	HOBt	NMM	64	65	17,9	La racemización es mayor
15	EDC.HCl	HOBt	NMM	67	65	18,9	La racemización es mayor

Tabla 6. Selección de equivalencia de base para controlar la racemización durante el acoplamiento de los segmentos AA₁-AA₄ y AA₅-AA₁₀

Entrada	Cantidad de DIEA (equiv.)	Reactivo y aditivo de acoplamiento	Rendimiento de CDEG-1 (%)	Pureza por HPLC (%)	
				Producto CDEG-1	Impureza (D-Ser)
1	6,0	HATU/HOAt	62	74,19	1,5
2	5,0	HATU/HOAt	69	79,00	3,88
3	4,5	HATU/HOAt	68	84,12	1,18
4	4,0	HATU/HOAt	70	82,64	1,19
5	3,0	HATU/HOAt	74	84,4	1,91
6	3,0	HATU/HOAt	74	85,3	1,44
7	3,0	HATU/HOAt	87	83,65	1,44

La temperatura a la que se realiza la reacción de acoplamiento también influye en el rendimiento y el grado de racemización del producto final. Se halló que una reacción que se lleva a cabo a -15 °C produce un mayor rendimiento, pureza más alta y menor racemización del producto final que la reacción equivalente llevada a cabo a -5 °C. Por tanto, es preferible llevar a cabo estas reacciones de acoplamiento a temperaturas menores de -5 °C, preferiblemente menores de -10 °C y lo más preferiblemente a -15 °C o menos. El tiempo de reacción de estas reacciones de acoplamiento es habitualmente de 2-3 horas.

Debe indicarse que al controlar la temperatura de reacción y la cantidad de base añadida, también es posible reducir cualquier formación de impureza de hidantoína. El contenido en hidantoína es preferiblemente de menos del 0,5 % en peso, más preferiblemente menos del 0,3 % en peso. Por tanto, se prefiere usar de 2,5 a 3,5 equivalentes de base a temperaturas de -10 °C o menos en estas reacciones.

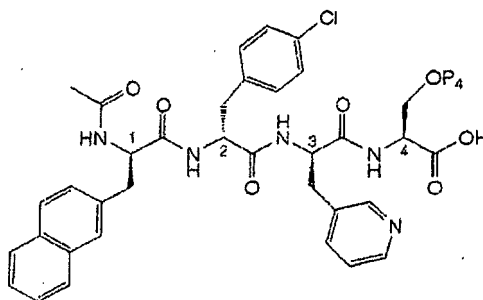
Finalmente, el orden de adición de los diversos reactivos también desempeña un papel en el rendimiento, la pureza

y la cantidad de racemización finales. Si los péptidos y el aditivo de acoplamiento se disuelven en primer lugar en el disolvente orgánico antes de que se añadan el reactivo de acoplamiento y la amina orgánica, el rendimiento global del producto deseado es significativamente más alto. Además, la cantidad de racemización se reduce drásticamente.

5 Fragmento $(P_4)Ac-AA_1-AA_4$

La presente invención proporciona diferentes métodos para preparar $(P_4)Ac-AA_1-AA_4$.

10 La invención se refiere a un procedimiento en fase líquida para preparar un producto intermedio de degarelix que tiene la fórmula $(P_4)Ac-AA_1-AA_4$:



$(P_4)Ac-AA_1-AA_4$

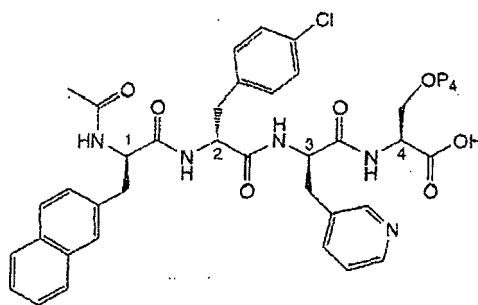
15 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que P_4 es hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo, preferiblemente hidrógeno.

20 Cuando se prepara $(P_4)Ac-AA_1-AA_4$, se prepara en primer lugar un éster que tiene la fórmula $(P_4)Ac-AA_1-AA_4-R$, en la que R es un grupo protector de carboxilo, tal como un grupo bencilo, preferiblemente, sin embargo, un grupo alquilo C_1-C_4 . Normalmente, se usa un éster bencilico de serina, retirándose entonces el grupo bencilo mediante hidrólisis con hidróxido de tetrabutilamonio (véase, por ejemplo, el documento WO 99/26964). Sin embargo, se halló que en la preparación de degarelix, los iones de tetrabutilamonio no se eliminaron completamente durante operaciones posteriores y se transmitían al producto final. Este problema se superó usando un éster alquílico C_1-C_4 de serina (por ejemplo, éster metílico de serina). Se halló que el éster alquílico podía hidrolizarse fácilmente usando un hidróxido alcalino que es LiOH. El rendimiento y la calidad del tetrapéptido no resultaron afectados por este cambio y se eliminó el problema de los iones de tetrabutilamonio.

30 Por ejemplo, un compuesto según la fórmula $(P_4)Ac-AA_1-AA_4-R$ puede suspenderse en un disolvente orgánico tal como THF y después agitarse y enfriarse hasta una temperatura de entre -20 y 5 °C, y más preferiblemente -5 y 0 °C. Se añade entonces una disolución acuosa de LiOH a la disolución enfriada en el intervalo de -5 a 0 °C o inferior. La disolución (a menudo turbia) se agita durante hasta 12 horas, preferiblemente hasta 3 horas, antes de añadirse, con buena agitación, a agua con una temperatura de 5 °C o inferior, o preferiblemente una mezcla de hielo y agua. En este punto, cualquier precipitado se elimina mediante filtración. Después se ajusta el pH a pH 4,1-4,3, de manera preferible aproximadamente 4,2 usando cualquier agente de ajuste del pH conocido. Se prefiere HCl, por ejemplo, HCl 2 M. El precipitado que se forma tras ajustar el pH se recoge mediante filtración. El precipitado puede purificarse adicionalmente lavándolo con agua, y/o agitando una suspensión del mismo en MeOH a reflujo y/o una mezcla de MeOH/MeCN antes de recogerlo mediante filtración y después secándolo para producir $(P_4)Ac-AA_1-AA_4$.

40 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto $(P_4)Ac-AA_1-AA_4-R$ acoplando $Ac-AA_1-AA_3$ con $(P_4)AA_4-R$ o acoplando $Ac-AA_1-AA_2$ con $(P_4)AA_3-AA_4-R$, en el que R es un alquilo C_1-C_4 y P_4 es hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo, preferiblemente hidrógeno. Para la reacción de acoplamiento, pueden usarse esencialmente los mismos reactivos y condiciones que los descritos anteriormente.

45 En un aspecto adicional, esta invención se refiere a un procedimiento en fase sólida para preparar un producto intermedio de degarelix que tiene la fórmula $(P_4)Ac-AA_1-AA_4$:

(P₄)Ac-AA₁-AA₄

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende las etapas:

- 5 a) hacer reaccionar (PN)AA₂ con (P₄)AA₃-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄,PN)AA₂-AA₄-RESINA;
- b) retirar PN de (P₄,PN)AA₂-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄)AA₂-AA₄-RESINA;
- 10 c) hacer reaccionar (PN)AA₁ con (P₄)AA₂-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄,PN)AA₁-AA₄-RESINA;
- d) si PN no es acetilo, retirar PN de (P₄,PN)AA₁-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄)AA₁-AA₄-RESINA y posteriormente acetilar (P₄)AA₁-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄)Ac-AA₁-AA₄-RESINA; y
- 15 e) escindir (P₄)Ac-AA₁-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄)Ac-AA₁-AA₄.

en el que P₄ es H o un grupo protector de hidroxilo en AA₄, y PN es un grupo protector de amino.

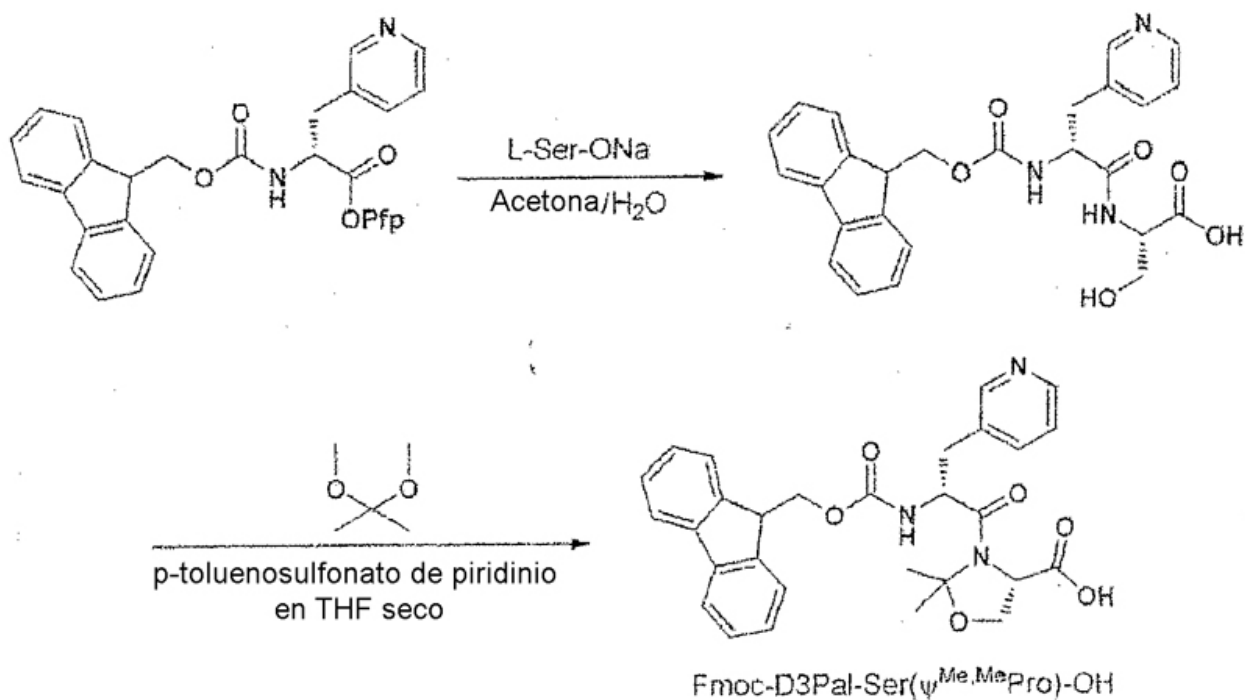
PN es preferiblemente Fmoc, que se retira preferiblemente con piperidina/NMP.

- 20 P₄ es preferiblemente tBu o (ψPro). Particularmente preferida es la combinación de (ψPro) para P₄ y Fmoc para PN.

Cada etapa de acoplamiento se lleva a cabo preferiblemente de manera conocida *per se*, preferiblemente, sin embargo, usando HATU (o HBTU) y DIPEA y aditivos de acoplamiento.

- 25 El material de partida (P₄)AA₃-AA₄-RESINA puede prepararse acoplando (PN, P₄)AA₃-AA₄ a una resina, por ejemplo a una resina de 2-CITrt, y entonces retirando PN, o acoplando (PN, P₄)AA₄ para obtener (PN, P₄)AA₄-RESINA, retirando PN, y entonces haciendo reaccionar (PN)AA₃ con (P₄)AA₄-RESINA para proporcionar (PN,P₄)AA₃-AA₄-RESINA, y entonces retirando PN. Esto se ilustra en las figuras 4 y 5.
- 30 Las resinas (RESINA) adecuadas incluyen tritilo, 2-CITrt y SASRIN.

- 35 En el caso de que P₄ sea (ψPro) y PN sea Fmoc, (PN, P₄)AA₃-AA₄ puede prepararse siguiendo J.Am.Chem.Soc. 1996, 118, 9218-9227. Es decir, se activa AA₃ protegido con Fmoc; se hace reaccionar con serina o una sal de la misma, y posteriormente se hace reaccionar con acetona o dimeticetal de acetona, tal como se ilustra a continuación. Fmoc-D3Pal-Ser((ψ^{Me,Me}Pro)-OH se prefiere particularmente como (PN, P₄)AA₃-AA₄.



Fragmento $(P_x)(P_\epsilon)AA_5-AA_{10}NH_2$

- 5 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un procedimiento en fase líquida para preparar el hexapéptido $(P_\epsilon)AA_5-AA_{10}NH_2$ que comprende el acoplamiento de $(P_\epsilon)AA_6-AA_{10}NH_2$ y $(P_x)AA_5$, en el que P_x es un grupo protector de amino y AA_5 a AA_{10} y P_ϵ tienen el mismo significado que antes, para proporcionar $(P_x)(P_\epsilon)AA_5-AA_{10}NH_2$, y la escisión de P_x con TFA para proporcionar $(P_\epsilon)AA_5-AA_{10}NH_2$.
- 10 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un procedimiento en fase líquida para preparar el hexapéptido $(P_\epsilon)AA_5-AA_{10}NH_2$ acoplado $(P_5)AA_5-AA_7$ con $(P_\epsilon)AA_8-AA_{10}NH_2$ para proporcionar $(P_5,P_\epsilon)AA_5-AA_{10}NH_2$, y posteriormente escindiendo P_5 para proporcionar $(P_\epsilon)AA_5-AA_{10}NH_2$ (en el que P_5 es un grupo protector de amino en AA_5).
- 15 El grupo protector P_5 es preferiblemente BOC. P_ϵ es preferiblemente 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). La reacción de acoplamiento se lleva a cabo preferiblemente en presencia de HATU.

20 $(P_5)AA_5-AA_7$ y $(P_\epsilon)AA_8-AA_{10}NH_2$ se sintetizan preferiblemente mediante síntesis de péptidos en fase sólida, por ejemplo, tal como se ilustra en las figuras 6 y 7, respectivamente. Se prefieren las siguientes combinaciones de P_5 y P_ϵ :

P_5	P_ϵ
Boc	Fmoc
Cbz	Boc
Troc	Boc

25 Es decir, $(P_5)AA_5-AA_7OH$ puede prepararse acoplado AA_7 protegido a una resina; retirando el grupo protector (por ejemplo, Fmoc); haciendo reaccionar AA_6 protegido con el producto obtenido; retirando el grupo protector (por ejemplo, Fmoc); haciendo reaccionar AA_5 protegido (por ejemplo, BOC protegido) con el producto obtenido; y escindiendo la resina. Esto se ilustra en la figura 6.

30 $(P_\epsilon)AA_8-AA_{10}NH_2$ puede prepararse acoplado AA_{10} protegido a una resina, por ejemplo, una resina de amida de Rink; retirando el grupo protector (por ejemplo, Fmoc); haciendo reaccionar AA_9 protegido con el producto obtenido; retirando el grupo protector (por ejemplo, Fmoc); haciendo reaccionar AA_8 protegido (preferiblemente protegido con Boc en el grupo alfa-amino y protegido con Fmoc en la cadena lateral) con el producto obtenido; retirando el grupo protector de alfa-amino; y escindiendo la resina. Esto se ilustra en la figura 7.

35 $(P_\epsilon)AA_8-AA_{10}NH_2$ también puede prepararse haciendo reaccionar $AA_{10}-NH_2$ con AA_9 protegido (por ejemplo, con BOC); retirando el grupo protector; haciendo reaccionar $AA_9-AA_{10}NH_2$ con AA_8 protegido (preferiblemente protegido con Boc en el grupo alfa-amino y protegido con Fmoc en la cadena lateral); y retirando el grupo protector en el grupo

alfa-amino.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a la purificación de degarelix. La purificación puede llevarse a cabo de manera conocida por el experto en la técnica, por ejemplo, mediante cromatografía preparativa.

Por ejemplo, se logra la primera purificación de degarelix con una fase estacionaria de PLRP-S, pH 2,25 usando TEAP como tampón y MeCN (75:25) como fase móvil. Puede obtenerse una pureza de hasta el 95 % con esta etapa. Si se requiriese, puede llevarse a cabo una segunda purificación usando una combinación de columnas C8 y C18 (por ejemplo, Zorbax) para lograr una pureza del 99 % y superior.

Ejemplos

Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren un procedimiento para la síntesis LPPS de degarelix. Se hace referencia a las figuras 1 y 2 para comprobar las estructuras de cada péptido y polipéptido descrito en el presente documento.

CLEU-2:

Se disolvió L-Cbz-prolina (50,0 g) en 2-propanol (500 ml \cong 10 V) y se enfrió la disolución hasta 15 °C. Se añadió entonces N-metilmorfolina (25 ml \cong 0,5 V) lentamente. Tras agitar la disolución durante 15 minutos, se añadieron 28,49 g (1,04 equiv.) de clorofornato de iso-butilo gota a gota a -15 °C. Se añadió una disolución de D-ala-NH₂.HCl (27,48 g, 1,1 equiv.) y NMM (25 ml \cong 0,5 V) en agua (250 ml \cong 5 V) a la mezcla de reacción a -15 °C. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a la misma temperatura y después se calentó hasta 25 °C y se agitó durante 3-5 h. Se extinguió la mezcla de reacción añadiendo acetato de etilo (1000 ml \cong 20 V) y agua (10 V) que contenía NaCl (25 g) y NaHCO₃ (25 g). Se separaron las fases orgánicas, se lavaron con agua (2 x 500 ml \cong 10 V) y entonces se secaron sobre sulfato de sodio. Se concentró la fase orgánica hasta 4 volúmenes a vacío por debajo de 40 °C. Se diluyó la disolución con acetato de etilo (250 ml \cong 5 V) y se añadió n-hexano (375 ml \cong 7,5 V) gota a gota para obtener un sólido blanco. Se separó por filtración el sólido y se secó para proporcionar el producto.

Producción: 35,2 g; Rendimiento: 54,7 %; $[\alpha]_{25}^D$: -13,0° [CHCl₃, Informe de bibliografía: -11,2° (US 5,710, 246)]. Pureza por HPLC: 99,44 %

CLEU-4:

Se llevó CLEU-2 (19,5 g) a 2-propanol (129 ml \cong 6,5 V) en un matraz de hidrogenación de Parr y se añadió una disolución de ácido p-toluenosulfónico en agua (20 ml \cong 1,0 V) al mismo. Se añadió Pd/C al 10 % (el 5 % en p/p) a la mezcla de reacción y entonces se hidrogenó la mezcla a 40 psi (275,79 kPa) durante 2 h. Cuando la CCF mostró la desaparición del material de partida, se filtró el catalizador y se lavó con 2-propanol (79 ml \cong 4 V) y agua (8,75 ml \cong 0,5 V). Se concentró el filtrado a vacío y se separó con acetonitrilo (4 x 254 ml \cong 13 V). Se llevó el residuo a un matraz y se añadió acetonitrilo (215 ml \cong 11 V) seguido de Boc-Lys(Cbz)-OH (25,5 g \cong 1,1 equiv.) y HOBt (9,9 g \cong 1,2 equiv.). Se enfrió la suspensión hasta -5 °C y se añadió NMM (14,95 g \cong 2,45 equiv.) lentamente. Finalmente, se añadió una disolución de EDC.HCl (15,3 g \cong 1,3 equiv.) en acetonitrilo (120 ml \cong 6 V). Entonces se calentó la mezcla de reacción hasta 25 °C y se agitó durante 10-12 h a la misma temperatura. Se retiró el disolvente a vacío por debajo de 40 °C y se diluyó con agua (120 ml \cong 6 V). Se extrajo el producto con acetato de etilo (878 ml \cong 45 V), agua (120 ml \cong 6 V), y carbonato de sodio al 10 % (110 ml \cong 5,7 V). Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo (2 x 430 ml \cong 2 x 22 V) y se combinaron las fases orgánicas y se lavaron con disolución de ácido cítrico al 10 % (2 x 105 ml), disolución de carbonato de sodio al 10 % (2 x 110 ml \cong 2 x 5 V), agua (120 ml \cong 6 V) y se secaron sobre sulfato de sodio. Se concentró la fase orgánica hasta 10-12 volúmenes a vacío por debajo de 40 °C, se separó con acetato de etilo (3 x 20 V) y se mantuvieron los 10-12 volúmenes finales en cada separación. Se añadió N-hexano (14 V) gota a gota a la masa concentrada para obtener un sólido blanco. Se separó por filtración el sólido y se secó para proporcionar el producto.

Producción: 29,2 g; Rendimiento: 86,6 %; Pureza 99,18 %, $[\alpha]_{26}^D$: -26,0° (c 1, CHCl₃)

CLEU-5:

Se llevó CLEU-4 (16,3 g) a una mezcla de metanol (163 ml \cong 10 V), acetona (22 ml \cong 1,4 V) en un matraz de hidrogenación de acero inoxidable de Parr. Se añadió Pd/C al 10 % (el 10 % en p/p) y se hidrogenó la mezcla (60 psi (413,69 kPa)) durante 8-12 h a 25 °C. Una vez que el material de partida había desaparecido (CCF), se filtró el catalizador a través de Celite y se lavó con metanol (163 ml \cong 10 V). Se concentró el filtrado a vacío por debajo de 40 °C y se separó el residuo con acetato de etilo (3 x 143 ml \cong 3 x 9 V). Entonces el residuo se llevó a acetato de etilo (51 ml \cong 3 V) y se añadió n-hexano (20,4 ml \cong 1,25 V). Se agitó la mezcla durante 2-3 h para obtener un sólido libre. Se separó por filtración el sólido, se lavó con n-hexano (38 ml \cong 2 V), y se secó a vacío por debajo de 40 °C.

Producción: 12,3 g; Rendimiento: 90,8 %; Pureza: 98,9 %

CLEU-6:

- 5 Se añadió CLEU-5 (12,2 g) a THF (40 ml \cong 3,3 V) y se enfrió la mezcla hasta 0 °C. Se añadió disolución de carbonato de sodio al 10 % (34 ml \cong 2,7 V) a la mezcla durante 20 minutos. Se añadió entonces Fmoc-Cl (8,63 g \cong 1,2 equiv.) en THF (12,2 ml \cong 1,0 V) lentamente durante 15-20 minutos a 0 °C. Se agitó la mezcla de reacción durante 1 h a la misma temperatura y se diluyó con agua (134,2 ml \cong 11 V). Se extrajo el producto con acetato de etilo (269 ml \cong 22 V). Se lavó la fase orgánica con agua (134,2 ml \cong 11 V), disolución de ácido cítrico al 10 % (2 x 134 ml \cong 2 x 11 V) y agua (134,2 ml \cong 11 V). Se concentró la fase orgánica a vacío por debajo de 40 °C y se purificó el producto en bruto mediante cromatografía en columna.

Producción: 13,3 g; Rendimiento: 73,2 %; Pureza: 98,2 %

15 CLEU-7:

- 20 Se cargó CLEU-6 (9,0 g) en una disolución de TFA (61 ml \cong 6,75 V) y m-cresol (0,61 ml) a -5 °C. Se agitó la mezcla de reacción durante 2 h a 0 °C y entonces se concentró a vacío por debajo de 35 °C. Se eliminaron trazas de TFA mediante destilación conjunta con tolueno (2 x 45 ml). Se cristalizó el producto en una mezcla de MTBE (9 ml \cong 1 V), y DIPE (90 ml \cong 10 V). Se separó por filtración el sólido bajo nitrógeno, se lavó con DIPE (180 ml \cong 20 V) y se secó a vacío para obtener CLEU-7 puro.

Producción: 8,8 g; Rendimiento: 90,4 %; Pureza: 98,3 %.

- 25 Comentario: el material de CLEU-7 es de naturaleza higroscópica y, por tanto, debe manejarse con cuidado.

CLEU-8:

- 30 Se llevó CLEU-7 (8,5 g) a acetonitrilo (85 ml \cong 10 V). Se añadieron Boc-Leu-OH (3,12 g \cong 1,1, equiv.), HOBt (2,31 g \cong 1,39 equiv.) y NMM (1,4 ml \cong 1,03 equiv.) a la disolución. Se enfrió la disolución hasta -2 °C y se trató con NMM (1,4 ml \cong 1,03 equiv.) y EDC.HCl (2,58 g \cong 1,1 equiv.). Se agitó la mezcla de reacción durante 2-3 h a 0 °C y se retiró el disolvente mediante destilación a vacío. Se añadieron ácido cítrico al 10 % (85 ml \cong 10 V) y acetato de etilo (213 ml \cong 25 V) al residuo. Se separó la fase orgánica y se lavó con disolución de ácido cítrico al 10 % (2 x 85 ml \cong 2 x 10,0 V), agua desmineralizada (85 ml \cong 10 V), y disolución de bicarbonato de sodio al 5 % (3 x 85 ml \cong 3 x 10,0 V) y de nuevo con agua desmineralizada (85 ml \cong 10 V). Finalmente, se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío por debajo de 35 °C para obtener el producto en bruto. Se cristalizó el producto en bruto en MTBE (68 ml x 8 V) y n-hexano (34 ml \cong 4 V). Se secó el sólido a vacío por debajo de 35 °C.

40 Producción: 7,8 g; Rendimiento: 81,2 %; Pureza: 97,5 %.

45 CLEU-9:

- 45 Se cargó CLEU-8 (7,5 g) en una disolución de TFA (54 ml \cong 7,2 V) y m-cresol (0,27 ml) a -5 °C. Se agitó la mezcla de reacción durante 2,0 h a 0 °C y entonces se concentró a vacío por debajo de 35 °C. Se eliminaron trazas de TFA mediante destilación conjunta con tolueno (2 x 38 ml), se cristalizó el producto en MTBE (75 ml \cong 10 V) y n-hexano (413 ml \cong 15 V). Se separó por filtración el sólido bajo nitrógeno, se lavó con n-hexano (37,5 ml \cong 5 V), y se secó a vacío para producir CLEU-9 puro.

50 Producción: 7,2 g; Rendimiento: 94,8 %; Pureza: 97,2 %

CLEU-12:

- 55 Se llevó CLEU-9 (10,5 g) a acetonitrilo (158 ml \cong 15 V) bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadieron CMAP-5A (4,2 g \cong 1,0 equiv.), HOBt (2,11 g \cong 1,2 equiv.) en la suspensión y se enfrió la mezcla hasta 0 °C. Se añadió EDC.HCl (2,73 g \cong 1,1 equiv.) en la suspensión seguido de adición lenta de NMM (1,38 g \cong 1,05 equiv.). Se agitó la mezcla de reacción durante 0,5 h a 0 °C, se calentó hasta condiciones ambientales y entonces se continuó la agitación durante 3 h. Se retiró el disolvente a vacío por debajo de 35 °C y se llevó el residuo a una mezcla de ácido cítrico al 10 % (105 ml \cong 10 V) y acetato de etilo (263 ml \cong 25 V). Se separó la fase orgánica y se lavó con disolución de ácido cítrico al 10 % (105 ml \cong 10 V), agua desmineralizada (105 ml \cong 10 V), disolución de bicarbonato de sodio al 5 % (3 x 105 ml \cong 3 x 10 V), y agua desmineralizada (105 ml \cong 10 V). Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío por debajo de 35 °C. Se precipitó el producto en bruto con n-hexano (84 ml \cong 8 V), se lavó con n-hexano (2 x 84 ml \cong 2 x 8 V), y se secó a vacío a 35 °C.

60 Producción: 10,5 g; Rendimiento: 80,7 %; Pureza: 92,1 %

CLEU-13:

5 Se cargó CLEU-12 (10,5 g) en una disolución de TFA (78,8 ml \cong 7,5 V) y m-cresol (0,4 ml) a -5 °C. Se agitó la mezcla de reacción durante 2 h a 0 °C y entonces se concentró a vacío por debajo de 35 °C. Se eliminaron trazas de TFA mediante destilación conjunta con tolueno (2 x 52 ml). Se llevó el residuo a acetato de etilo (105 ml \cong 10 V) y se añadió n-hexano (158 ml \cong 15 V) para precipitar el producto. Se separó por filtración el sólido bajo nitrógeno y se lavó con n-hexano (53 ml \cong 5 V). Se secó el compuesto a vacío a 35 °C.

10 Producción: 9,6 g; Rendimiento: 90,5 %; Pureza: 91,9 %.

CLEU-14:

15 Se disolvió CLEU-13 (9,5 g) en DMF (95 ml \cong 10 V) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se añadieron NMM (1,0 g \cong 1,05 equiv.), CSER-2 (3,95 g \cong 1,0 equiv.) y HOBt (1,4 g \cong 1,1 equiv.) a la disolución y se enfrió la masa de reacción hasta 0 °C. Se añadieron EDC.HCl (2,0 g \cong 1,1 equiv.) y NMM (1,0 g \cong 1,05 equiv.) posteriormente en la mezcla. Se agitó la masa de reacción durante 5 h a 0 °C y entonces se vertió en agua enfriada con hielo (950 ml \cong 100 V) y se agitó durante 30 minutos. Se separó por filtración el sólido precipitado y se lavó con agua (20 V), ácido cítrico al 10 % (10 V), de nuevo con agua (190 ml \cong 20 V), disolución de NaHCO₃ al 5 % (95 ml \cong 10 V) y agua (95 ml \cong 10 V). Se secó el producto final a vacío por debajo de 35 °C.

20 Producción: 10,3 g; Rendimiento: 84,40 %; Pureza: 90,4 %.

CLEU-15:

25 Se cargó CLEU-14 (10,0 g) en una disolución de TFA (75 ml \cong 7,5 g) y m-cresol (0,37 ml) a -5 °C. Se agitó la mezcla de reacción durante 2 h a 0 °C y entonces se concentró a vacío por debajo de 35 °C. Se eliminaron trazas de TFA mediante evaporación conjunta con tolueno (2 x 50 ml). Se llevó el residuo a acetato de etilo (100 ml \cong 10 V) y se añadió n-hexano (60 ml \cong 6 V) para precipitar el producto. Se separó por filtración el sólido bajo nitrógeno, se lavó con n-hexano (2 x 30 ml \cong 6 V) y entonces se secó a vacío a 35 °C.

30 Producción: 9,6 g; Rendimiento: 95,0 %; Pureza: 91,5 %.

CSER-2:

35 A una disolución con agitación de ácido L-hidrorótico (23,4 g, 148 mmol) y N-hidroxisuccinimida (18,14 g \cong 1,1 equiv.) en DMF seca (585 ml \cong 25 V) se le añadió DIC (20,5 g \cong 1,1 equiv.) con enfriamiento de agua helada externo. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 13-14 h. Se separó por filtración el precipitado y se evaporó el filtrado. Se lavó el residuo aceitoso con diisopropil éter (94 ml \cong 4 V) y se disolvió en DMF seca (293 ml \cong 12,5 V). Se añadió N-Boc-L-4-aminofenilalanina (41,5 g \cong 1,0 equiv.) a la disolución anterior. Se añadió DIEA (22,97 g \cong 1,2 equiv.) a 0 °C y se agitó la mezcla de reacción durante 22 h y entonces se evaporó el disolvente. Se mezcló el residuo con agua (702 ml \cong 30 V) y se ajustó el pH de la suspensión resultante a 9,0 con disolución saturada de bicarbonato de sodio. Se separó por filtración el precipitado de diisopropilurea y se lavó el filtrado con acetato de etilo (70,2 ml \cong 3 V). Se acidificó la fase acuosa hasta pH 2,5 con HCl 6 N y se recogió el precipitado resultante mediante filtración. Se obtuvo el producto como sólido amarillo.

45 Producción: 40,0 g; Rendimiento 64 %; p_f 270 °C, $[\alpha]_{25}^D = +62,5$ (c 1,0, 1 % NaHCO₃); Pureza 95 %.

CBBC-2B:

50 Se disolvió el fragmento-A (20,0 g) (adquirido de Chirotech, R.U.) en DMF (300 ml \cong 15 V) a 30-35 °C y entonces se enfrió de -10° C a 5 °C en donde se añadió HOBt (5,06 g \cong 1,1 equiv.) a la mezcla, se agitó durante 30 minutos antes de añadir éster metílico de L-serina (5,29 g \cong 1,0 equiv.) a la suspensión. Se agitó la mezcla durante 30 minutos, se trató con NMM (7,23 g \cong 2,1 equiv.) y entonces se agitó durante 30 minutos. Se añadió entonces EDC.HCl (7,18 g \cong 1,1 equiv.) a la suspensión y se agitó la mezcla de reacción durante 5 h a -5 °C hasta 0 °C. Se vertió la mezcla de reacción en agua desmineralizada helada (1,5 l o 1500 ml \cong 75 V) y se agitó durante 30 minutos. Se precipitó el producto agitando a 0-5 °C. Tras 1 h, se recogió el sólido resultante mediante filtración. Se lavó la torta de filtrado con agua (200 ml \cong 10 V), ácido cítrico al 10 % (200 ml \cong 10 V), de nuevo con agua (200 ml \cong 10 V), disolución de NaHCO₃ al 5 % (200 ml \cong 10 V), agua (200 ml \cong 10 V) y entonces se secó el sólido a vacío durante 4 h. Se suspendió el producto en metanol (300 ml \cong 15 V) y se agitó durante 1 h. Se filtró la suspensión y se lavó la torta con metanol (100 ml \cong 5 V) entonces se secó a vacío a 30-35 °C hasta un peso constante.

60 Producción: 22 g; Rendimiento: 93,8 %.

CBBC-3B:

Se suspendió CBBC-2B (20,0 g) en THF (500 ml \cong 25 V) y entonces se agitó y se enfrió hasta un intervalo de -5 °C a 0 °C. A la disolución enfriada se le añadió una disolución acuosa de hidróxido de litio (3,65 g \cong 3,0 equiv.) a una velocidad tal que se mantuvo la temperatura de reacción a de entre -5 °C y 0 °C (aproximadamente 30 min). Se añadió el sólido disuelto tras la base para proporcionar una disolución ligeramente turbia. Se continuó la agitación durante otras 2 h por debajo de -5 °C hasta 0 °C. Tras 3 h, se añadió lentamente la mezcla de reacción turbia, con buena agitación, en hielo/agua (700 ml \cong 35 V) a 5 °C por lo cual cualquier partícula no disuelta se filtró a vacío. Mientras se agita, se ajustó el pH hasta 4,2 usando HCl 2 M (\approx 40 ml \cong \approx 2 V). Se recogió el precipitado blanco espeso mediante filtración y se lavó la torta húmeda con 200 ml \cong 10 V de agua, se secó al aire a vacío brevemente, se suspendió en 400 ml \cong 20 V de metanol y entonces se agitó bajo reflujo. Se filtró la suspensión y se lavó la torta húmeda de nuevo con 200 ml, 10 V de metanol, entonces se secó a vacío. Entonces se llevó la torta húmeda a metanol (400 ml \cong 20 V) y acetonitrilo (200 ml \cong 10 V) y se agitó bajo reflujo. Se filtró la suspensión en caliente y se lavó la torta húmeda con 200 ml \cong 10 V de metanol, entonces se secó a vacío. Se secó el producto final a vacío a 35 °C hasta un peso constante para proporcionar el ácido del tetrapéptido Ac-(AA₁-AA₄).

Producción: 12,0 g; Rendimiento: 62,0 %; Pureza: 97,1 %.

CDEG-1:

Se cargaron CLEU-15 (4,3 g), CBBC-3A (2,24 g \cong 1,0 equiv.) y HOAt (0,56 g \cong 1,2 equiv.) en un matraz de fondo redondo que contenía DMF (~26 ml \cong 6 V). Se agitó la mezcla durante 15-30 minutos para producir una disolución transparente a 25 °C y entonces se trató con DIPEA (1,71 g \cong 4,0 equiv.). Entonces se enfrió la reacción hasta -15 °C y se añadió HATU (1,57 g \cong 1,25 equiv.) a la mezcla. Se agitó la mezcla de reacción durante 2 h a -10 °C, se calentó hasta 20 °C y entonces se agitó durante 1 h a la misma temperatura. Se añadió la masa de reacción a la disolución de ácido cítrico al 10 % (270 ml \cong 60 V) y se agitó durante 30 minutos a 10 °C. Se separó por filtración el sólido precipitado, se lavó con agua (270 ml \cong 30 V), disolución de NaHCO₃ al 5 % (130 ml \cong 30 V) y de nuevo con agua (270 ml \cong 60 V). Se secó el sólido a vacío a 35 °C.

Producción: 4,0 g; Rendimiento: 65,1 %; Pureza 79,25 %.

CDEG:

Se cargó piperidina al 20 % en DMF (25 ml \cong 5 V) en un matraz de fondo redondo bajo una atmósfera de nitrógeno. Se enfrió la disolución hasta -5 °C y se añadió CDEG-1 (5,0 g). Se agitó la mezcla de reacción durante 45 minutos a 0 °C. Se vertió la mezcla de reacción en DIPE (250 ml \cong 50 V) y entonces se agitó durante 15 minutos. Se separó por filtración el sólido precipitado bajo nitrógeno y se lavó con DIPE (50 ml \cong 10 V). Entonces el sólido se llevó a acetato de etilo (125 ml \cong 25 V) y se agitó durante 1 h a 25 °C. Se separó por filtración el sólido fino obtenido, se lavó con acetato de etilo (50 ml \cong 10 V), y entonces se secó a vacío.

Producción: 4,7 g; Rendimiento: cuantitativo, Pureza: 87,6 %, impureza de D-Ser 1,5 %, impureza de hidantoína 0,16 %.

Condición de HPLC para CDEG:

Columna: YMC basic (250 mm x 3,0 mm), 5 μ

Fase móvil A: TFA al 0,1 % en ACN

Fase móvil B: TFA al 0,1 % en H₂O

Longitud de onda: 226 nm, Diluyente: Fase móvil A: M.P.B =27:73

Temperatura de columna: 50 °C, vol. inyect. 50 μ l

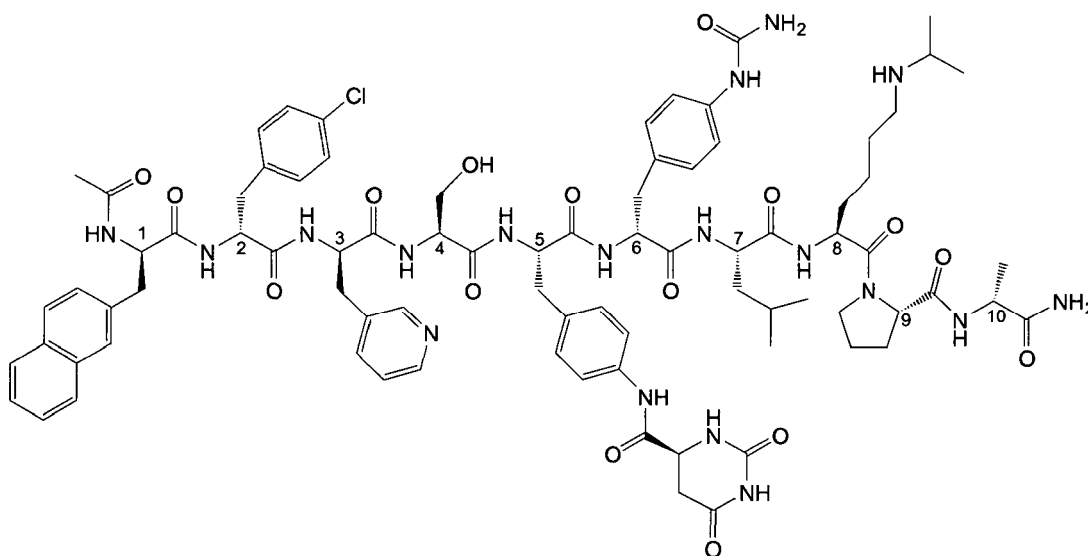
Gradiente T/%A = 0/73, 18/70, 41/30, 43/73, 50/73

Velocidad de flujo 0,5 ml/min

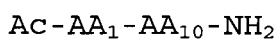
60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento en fase líquida para preparar degarelix que tiene la fórmula Ac-AA₁-AA₁₀-NH₂:



5

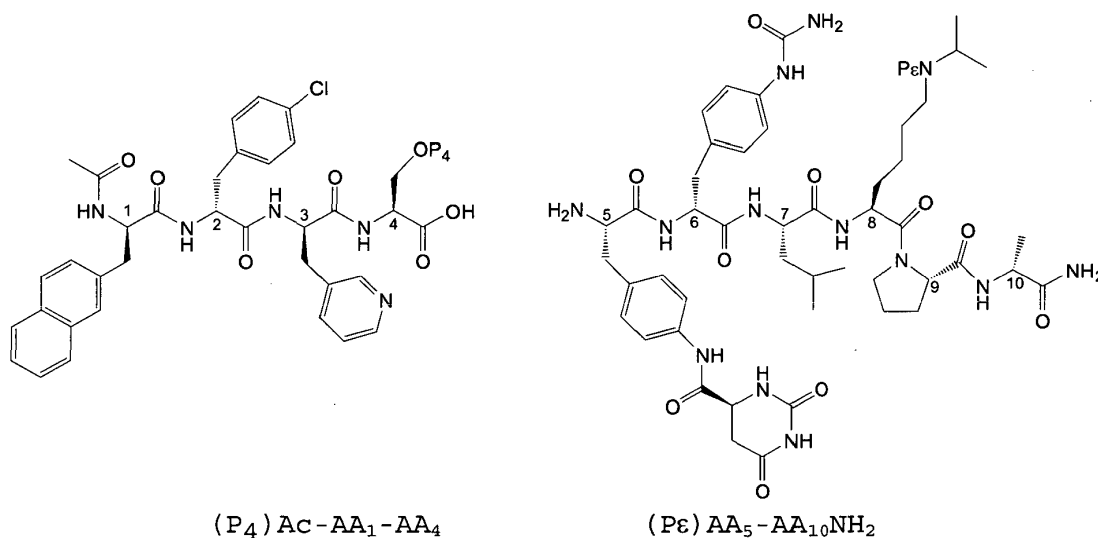


o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo;

- 10 que comprende la etapa de acoplar (P₄)Ac-AA₁-AA₄ con (P_ε)AA₅-AA₁₀NH₂ o acoplar Ac-AA₁-AA₃ con (P₄)(P_ε)AA₄-AA₁₀NH₂ en un disolvente orgánico que comprende los dos péptidos, un reactivo de acoplamiento de péptidos y una base de amina orgánica disueltos en el mismo en el que P_ε es un grupo protector de ε-amino y P₄ es un grupo protector de hidroxilo o hidrógeno, en el que el agente de acoplamiento de péptidos en el caso de acoplar (P₄)Ac-AA₁-AA₄ con (P_ε)AA₅-AA₁₀NH₂ se selecciona de uno o más de hexafluorofosfato de o-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) y hexafluorofosfato de 2-(benzotriazol-1-il)oxi-1,3-dimetilimidazolidinio (BOP),

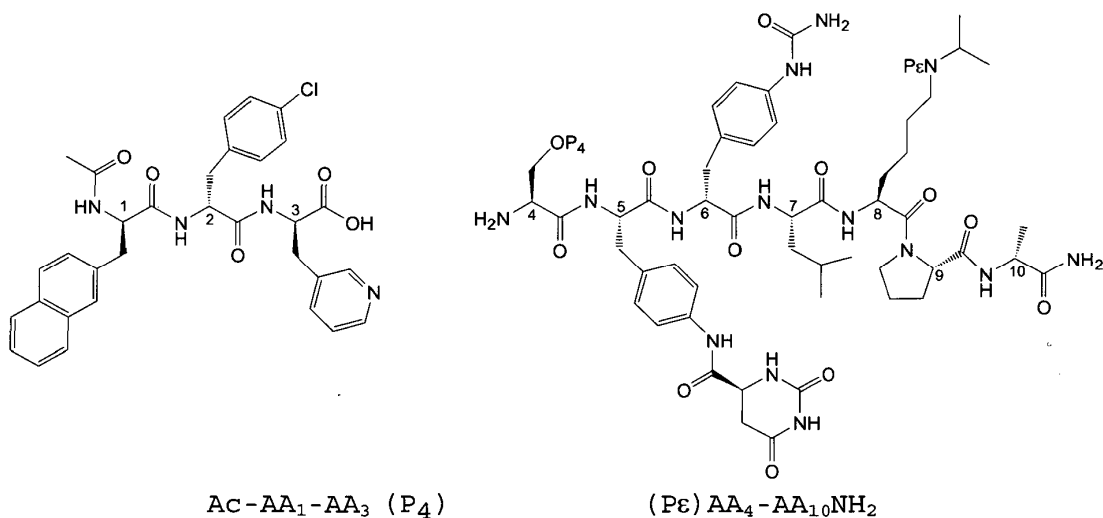
15

y estando los péptidos representados a continuación:

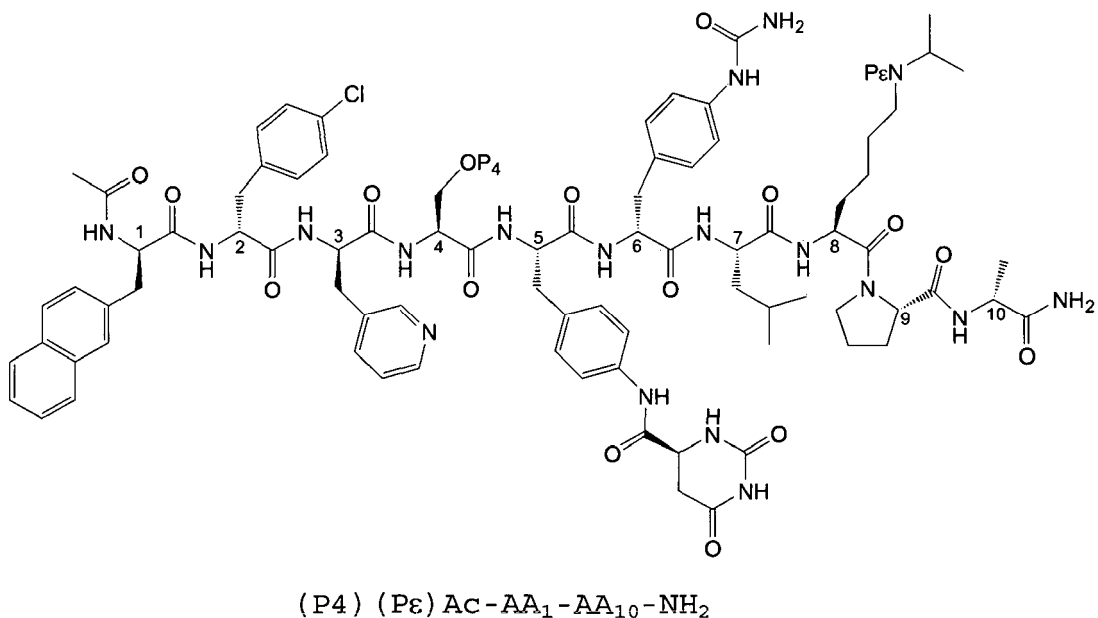


(P₄) Ac-AA₁-AA₄

(P_ε) AA₅-AA₁₀NH₂



para proporcionar un precursor de degarelix protegido que tiene la fórmula $(\text{P}_4)(\text{P}_\epsilon)\text{Ac-AA}_1\text{-AA}_{10}\text{-NH}_2$:



5

y que comprende la etapa de escindir el grupo protector de ϵ -amino P_ϵ de un precursor de degarelix según la fórmula $(\text{P}_4)(\text{P}_\epsilon)\text{Ac-AA}_1\text{-AA}_{10}\text{-NH}_2$ en un disolvente orgánico que comprende el precursor y un agente de escisión disueltos en el mismo para proporcionar degarelix.

10

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente de escisión es ácido trifluoroacético y/o piperidina.

15

3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que P_ϵ se selecciona del grupo que consiste en t-butoxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y aliloxicarbonilo (Alloc).

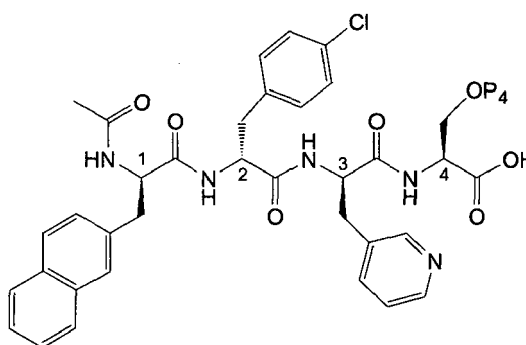
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el grupo protector P_ϵ es Fmoc y/o en el que el disolvente orgánico es DMF.

20

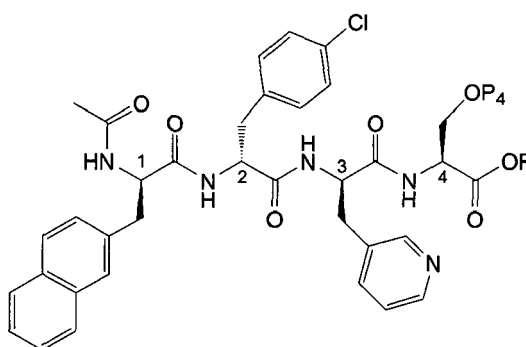
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que en el caso de acoplar $\text{Ac-AA}_1\text{-AA}_3$ con $(\text{P}_4)(\text{P}_\epsilon)\text{AA}_4\text{-AA}_{10}\text{NH}_2$, el reactivo de acoplamiento de péptidos se selecciona de uno o más de hexafluorofosfato de o-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), hexafluorofosfato de o-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) y tetrafluoroborato de o-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC.HCl), hexafluorofosfato de (2-(6-cloro-1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio) (HCTU), hexafluorofosfato de 2-(benzotriazol-1-il)oxi-1,3-dimetilimidazolidinio (BOP) y diisopropilcarbodiimida (DIC).

25

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5, en el que la base de amina orgánica se selecciona de uno o más de N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA), N-metilmorfolina (NMM), trietilamina (TEA) o 2,4,6-trimetilpiridina.
- 5 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la disolución comprende además un aditivo de acoplamiento seleccionado de 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (HOObt), 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol (HOAt) o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) disuelto en el mismo.
- 10 8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la base de amina orgánica es DIPEA y el reactivo de acoplamiento de péptidos es HATU, y/o en el que la base de amina orgánica es DIPEA y el aditivo de acoplamiento de péptidos es HOAt, y/o en el que el reactivo de acoplamiento de péptidos es HATU y el aditivo de acoplamiento de péptidos es HOAt, y/o en el que la base de amina orgánica es DIPEA, el reactivo de acoplamiento de péptidos es HATU y el aditivo de acoplamiento de péptidos es HOAt.
- 15 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la base de amina orgánica se usa en una cantidad de 2,5 a 3,5, de manera preferible aproximadamente 3, equivalentes molares del hexapéptido AA₅-AA₁₀.
- 20 10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el disolvente orgánico se enfría hasta una temperatura de -10 °C o menos, preferiblemente -15 °C o menos, y entonces se realiza la reacción a esa temperatura.
- 25 11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que los péptidos y el aditivo de acoplamiento se disuelven en primer lugar en el disolvente orgánico antes de añadir el reactivo de acoplamiento y la amina orgánica.
- 30 12. Procedimiento en fase líquida para preparar un producto intermedio de degarelix que tiene la fórmula (P₄)Ac-AA₁-AA₄:

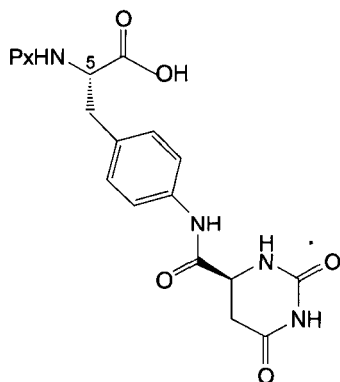
(P₄) Ac-AA₁-AA₄

- 35 o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende la etapa de hidrolizar un compuesto que tiene la fórmula (P₄)Ac-AA₁-AA₄-R con un hidróxido alcalino, en la que R representa un grupo protector de carboxilo, preferiblemente un bencilo o alquilo C₁-C₄, P₄ representa hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo:

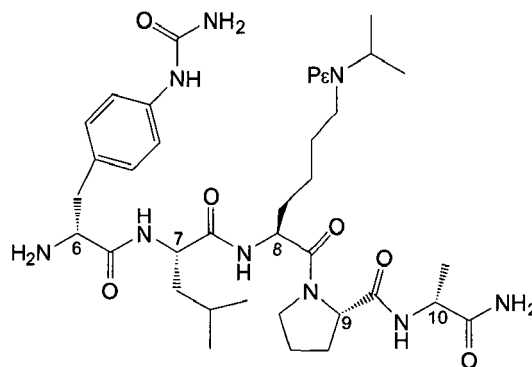
(P₄) Ac-AA₁-AA₄-R

y en el que el hidróxido alcalino es LiOH.

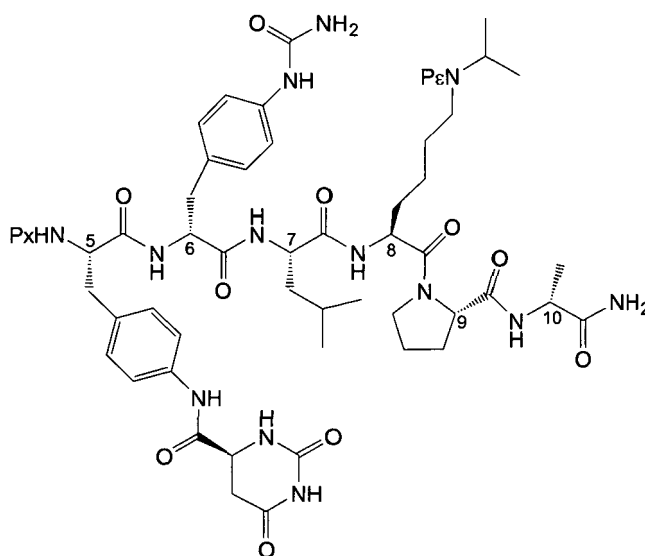
13. Procedimiento en fase líquida para preparar el hexapéptido $(P_{\epsilon})AA_5-AA_{10}NH_2$ que comprende el acoplamiento de $(P_{\epsilon})AA_6-AA_{10}NH_2$ y $(P_x)AA_5$, en el que P_x es un grupo protector de amino y AA_5 a AA_{10} y P_{ϵ} tiene el mismo significado que en la reivindicación 1, para proporcionar $(P_x)(P_{\epsilon})AA_5-AA_{10}NH_2$, y la escisión de P_x con TFA para proporcionar $(P_{\epsilon})AA_5-AA_{10}NH_2$, en el que $(P_x)(P_{\epsilon})AA_5-AA_{10}NH_2$, $(P_{\epsilon})AA_6-AA_{10}NH_2$ y $(P_x)AA_5$ tienen las siguientes estructuras:



$(P_x)AA_5$



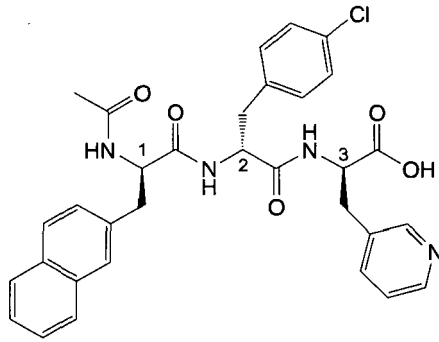
$(P_{\epsilon})AA_6-AA_{10}NH_2$



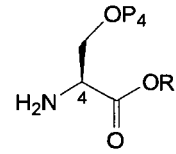
$(P_x)(P_{\epsilon})AA_5-AA_{10}NH_2$

14. Procedimiento según la reivindicación 12 y/o 13 seguido por cualquiera de los procedimientos en las reivindicaciones 1 a 13.

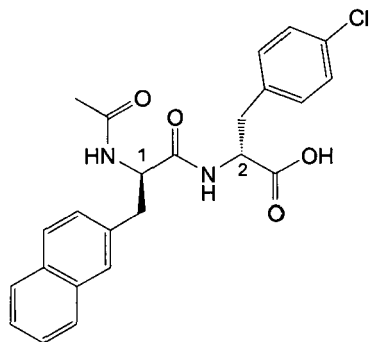
15. Procedimiento según las reivindicaciones 12 o 14, en el que el compuesto que tiene la fórmula $Ac-AA_1-AA_4-R$ se prepara en primer lugar acoplado $Ac-AA_1-AA_3$ con $(P_4)AA_4-R$ o acoplado $Ac-AA_1-AA_2$ con $(P_4)AA_3-AA_4-R$, estando los péptidos representados a continuación



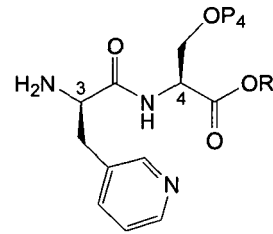
Ac-AA₁-AA₃



(P₄) AA₄-R

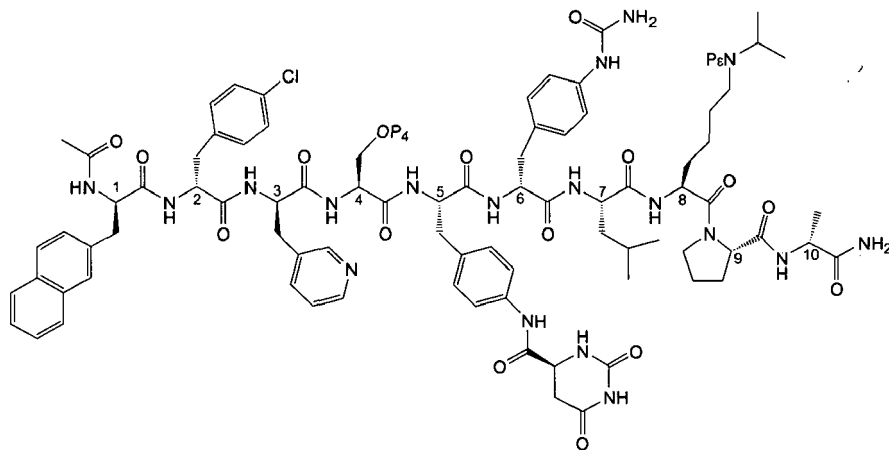


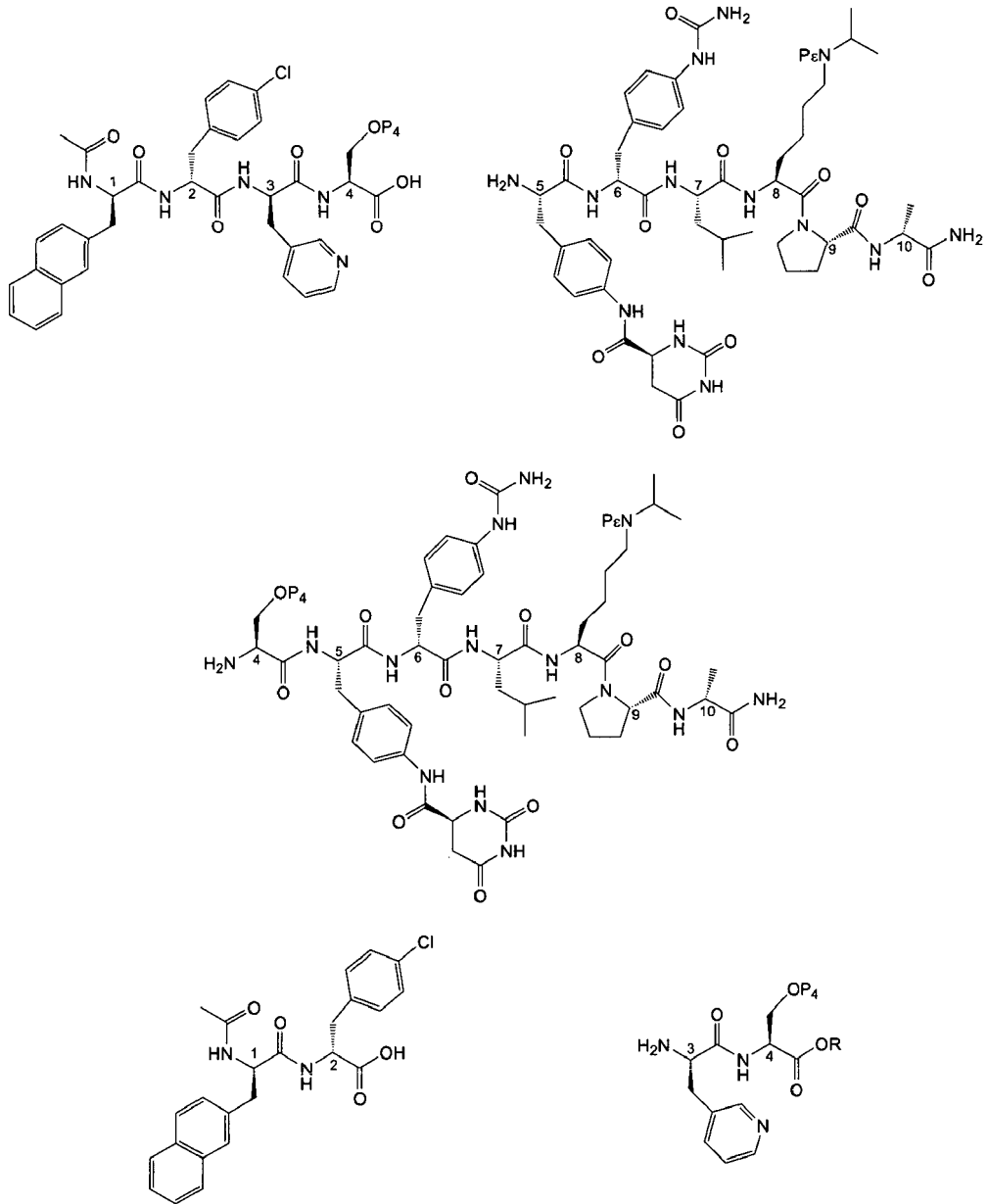
Ac-AA₁-AA₂



(P₄) AA₃-AA₄-R

- 5 16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 12 y 14 a 15, en el que R es metilo o bencilo.
 17. Polipéptidos intermedios según las fórmulas:

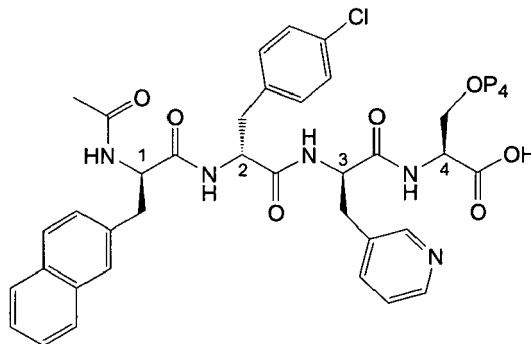




5

en las que R es un grupo protector de carboxilo, preferiblemente un bencilo o alquilo C₁-C₄, P_ε es un grupo protector de amino, y P₄ es hidrógeno o un grupo protector de hidroxilo.

- 10 18. Procedimiento en fase sólida para preparar un producto intermedio de degarelix que tiene la fórmula (P₄)Ac-AA₁-AA₄:

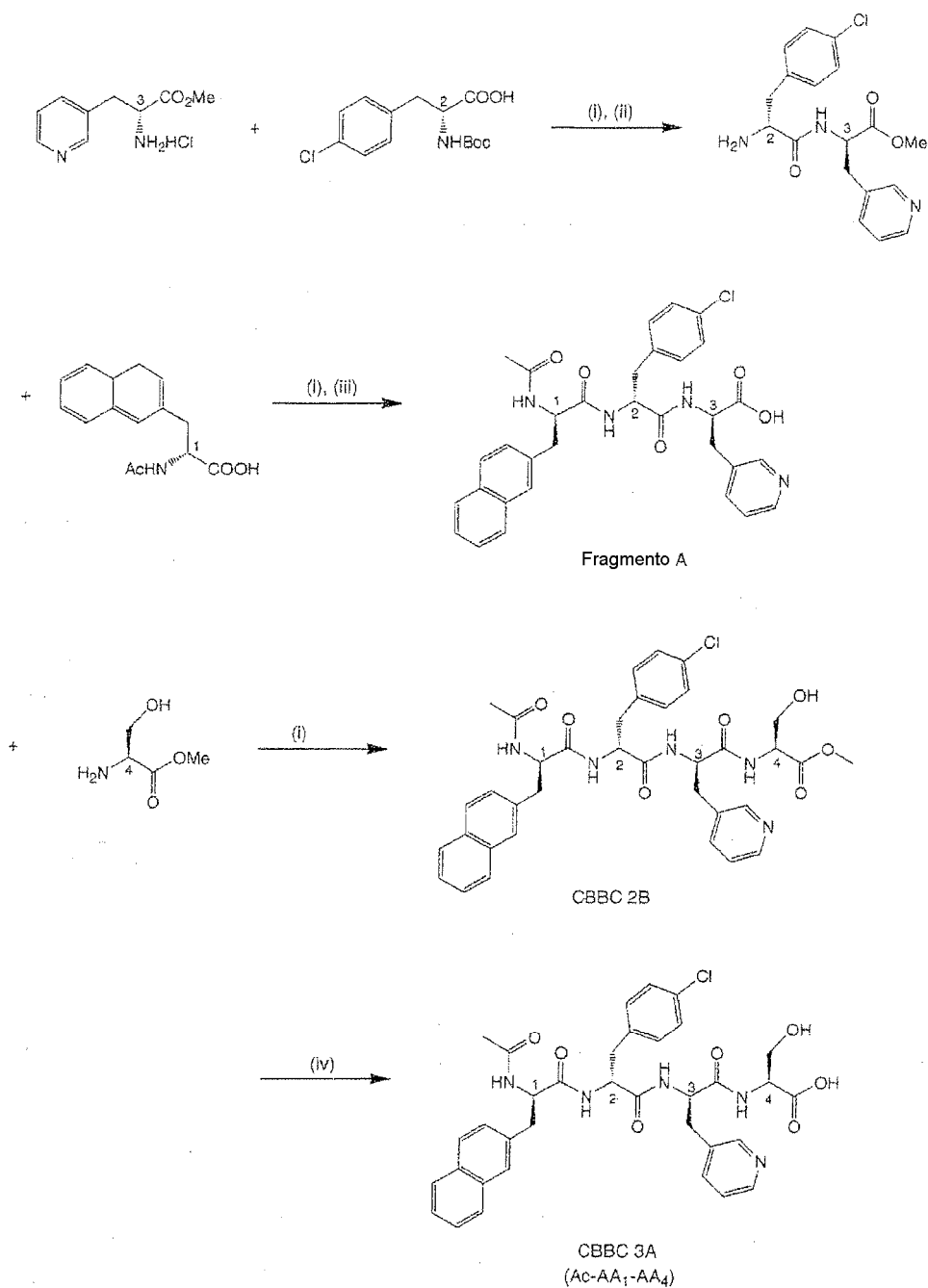


(P₄) Ac-AA₁-AA₄

o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, que comprende las etapas:

- 5 a) hacer reaccionar (PN)AA₂ con (P₄)AA₃-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄,PN)AA₂-AA₄-RESINA;
- b) retirar PN de (P₄,PN)AA₂-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄)AA₂-AA₄-RESINA;
- c) hacer reaccionar (PN)AA₁ con (P₄)AA₂-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄,PN)AA₁-AA₄-RESINA;
- 10 d) si PN no es acetilo, retirar PN de (P₄,PN)AA₁-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄)AA₁-AA₄-RESINA y posteriormente acetilar (P₄)AA₁-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄)Ac-AA₁-AA₄-RESINA; y
- e) escindir (P₄)Ac-AA₁-AA₄-RESINA para proporcionar (P₄)Ac-AA₁-AA₄.
- 15 en el que P₄ es H o un grupo protector de hidroxilo en AA₄, y PN es un grupo protector de amino.
19. Procedimiento en fase líquida para preparar el hexapéptido (P_ε)AA₅-AA₁₀NH₂ acoplando (P5)AA₅-AA₇ con (P_ε)AA₈-AA₁₀NH₂ para proporcionar (P5,P_ε)AA₅-AA₁₀NH₂, y posteriormente escindiendo P5 para proporcionar (P_ε)AA₅-AA₁₀NH₂. (en el que P5 es un grupo protector de amino en AA₅ y P_ε es un grupo protector de amino de cadena lateral en AA₆), en el que se prosigue opcionalmente el procedimiento acoplado (P₄)Ac-AA₁-AA₄ a (P_ε)AA₅-AA₁₀NH₂, en el que AA₁ a AA₁₀ tienen el mismo significado que en la reivindicación 1.
- 20

Figura 1



Condiciones : (i) EDC.HCl, HOBT; (ii) HCl/MeOH; (iii) LiOH, DMF; (iv) LiOH ac., THF

Figura 2

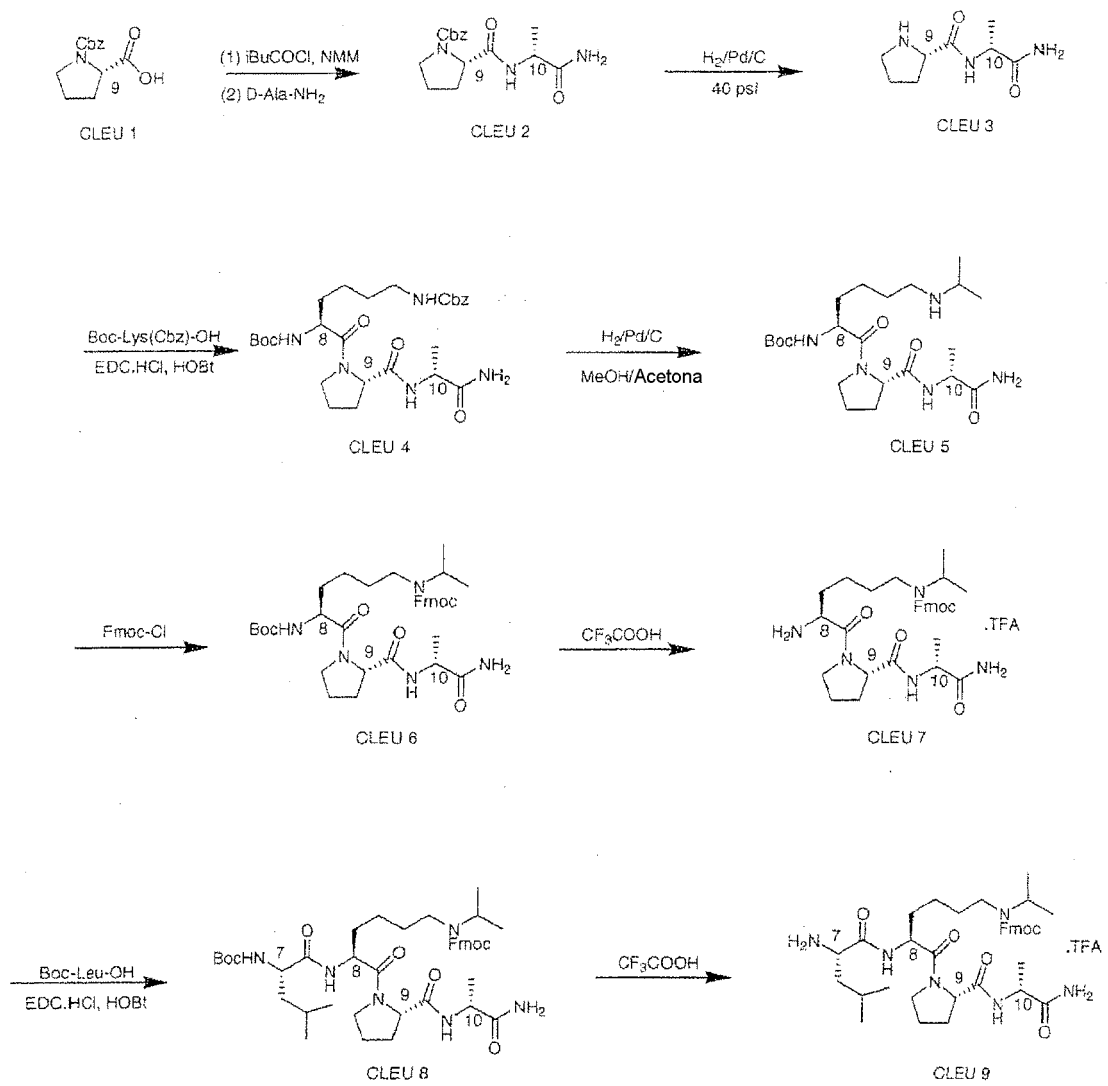


Figura 2 (continuación)

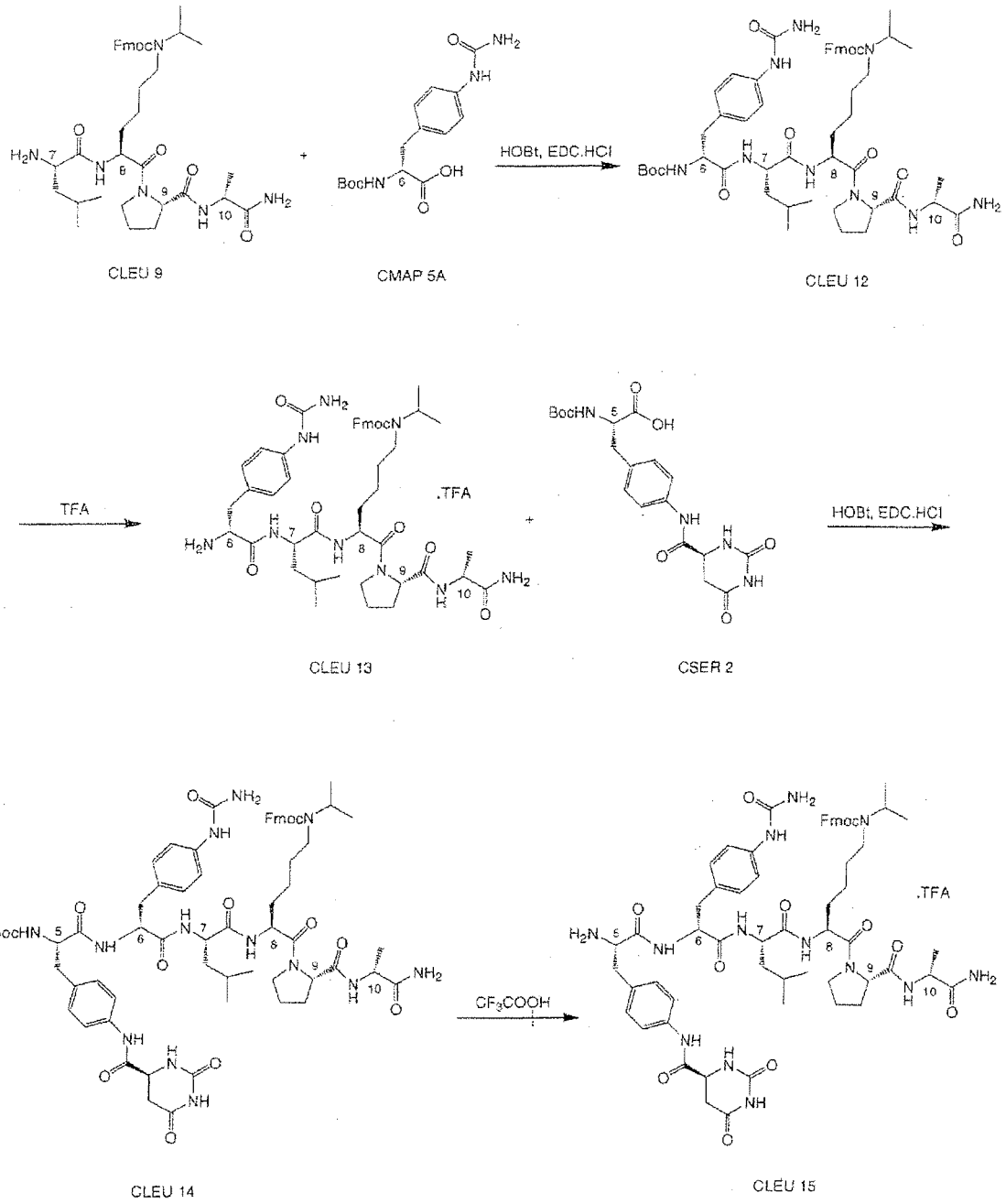


Figura 3

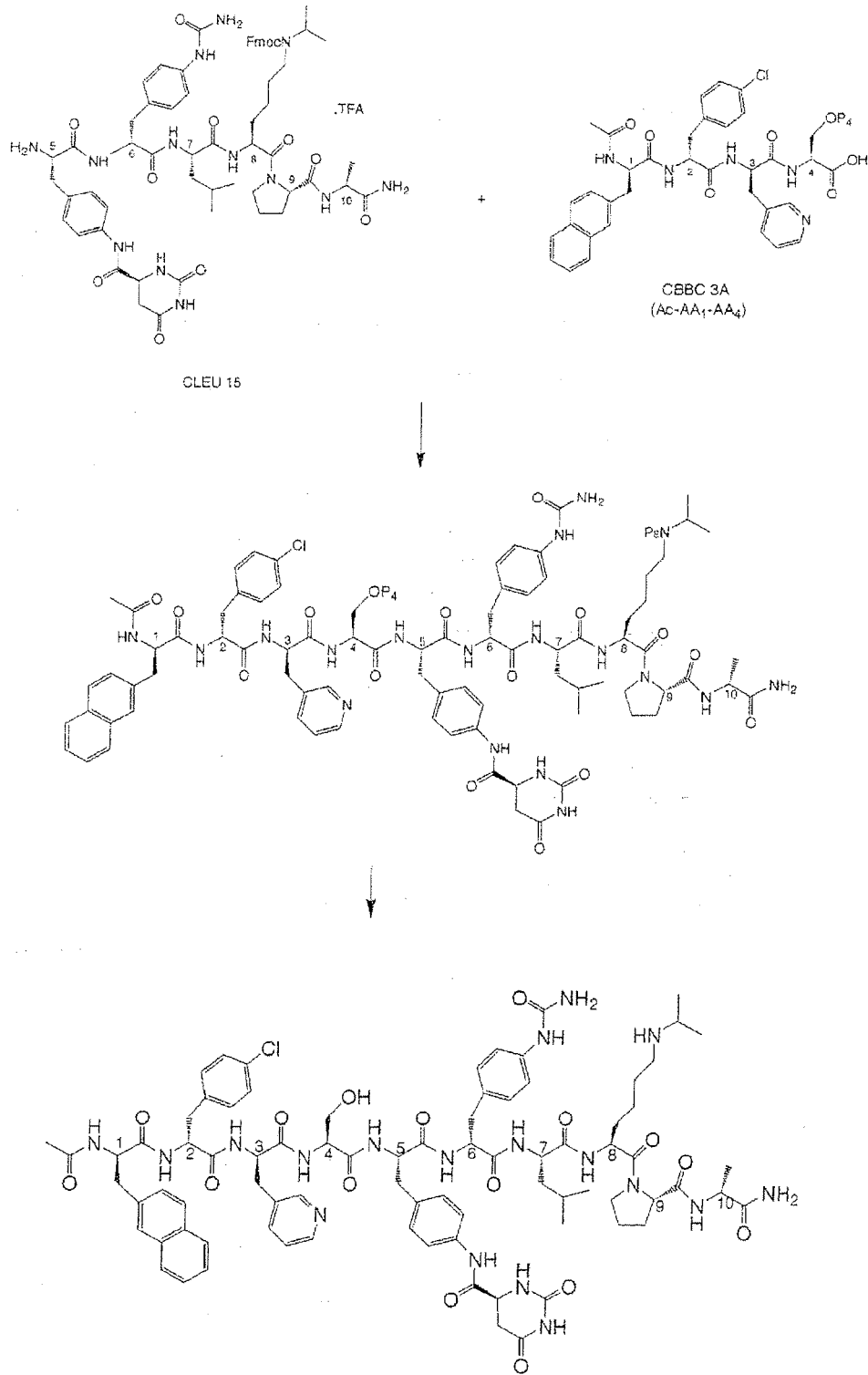


Figura 4

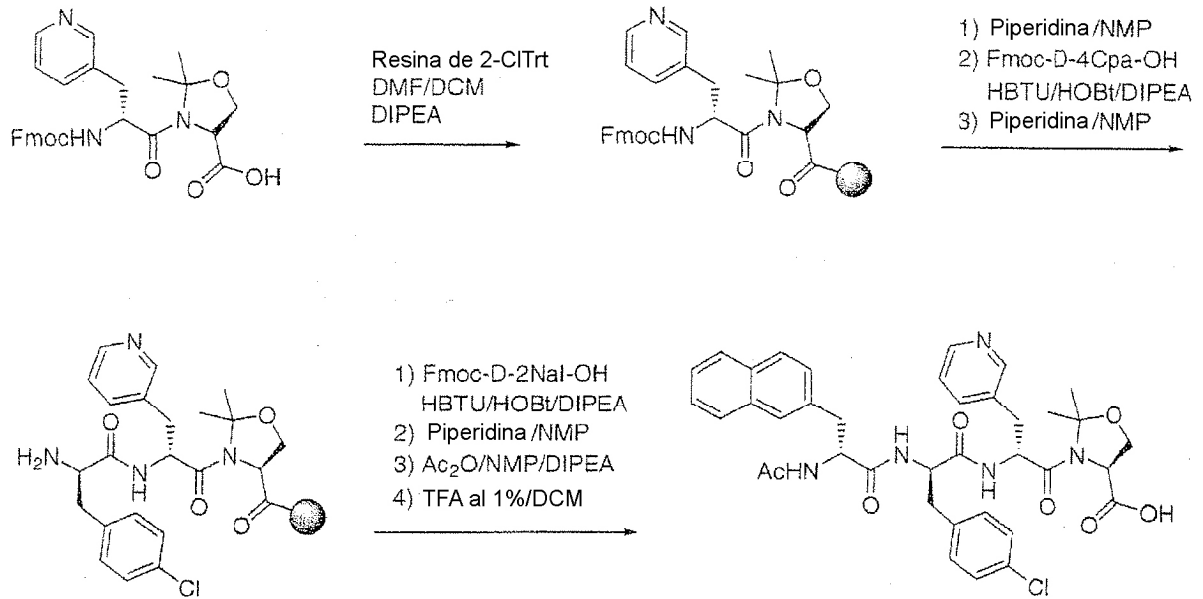


Figura 5

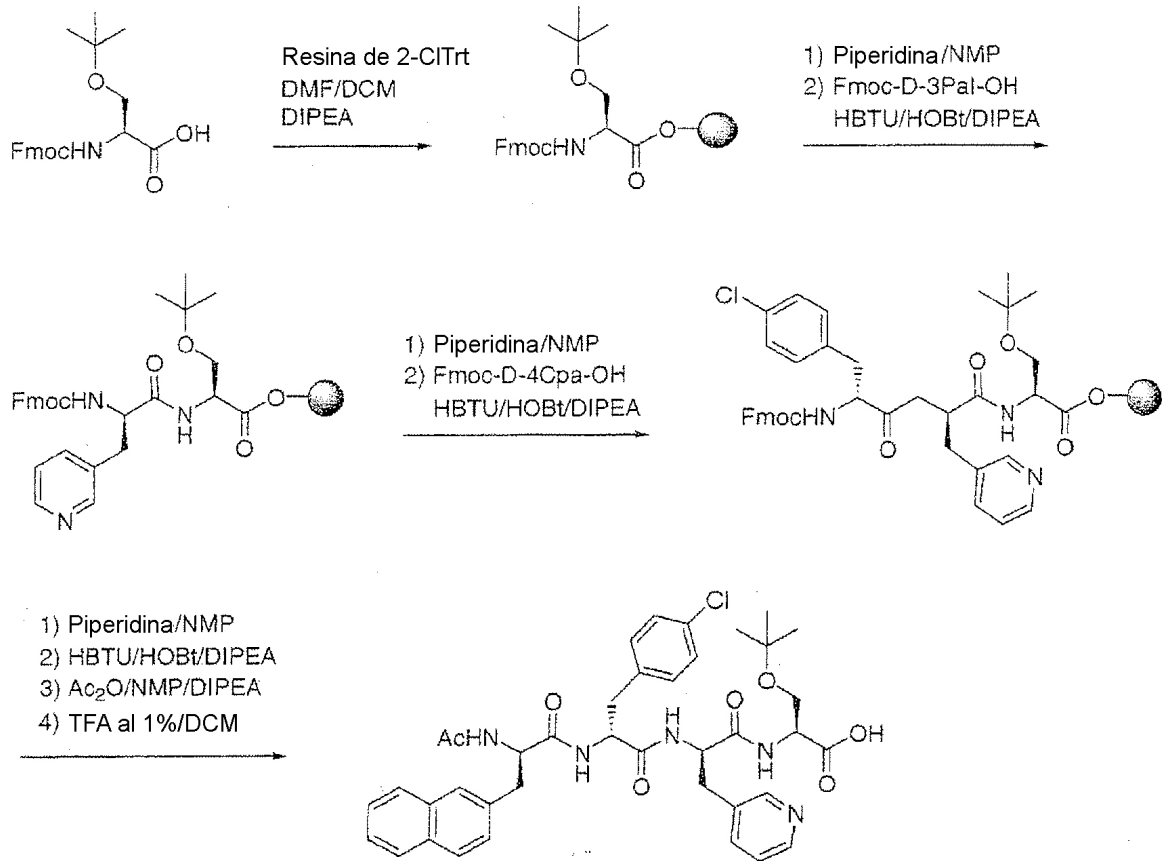


Figura 6

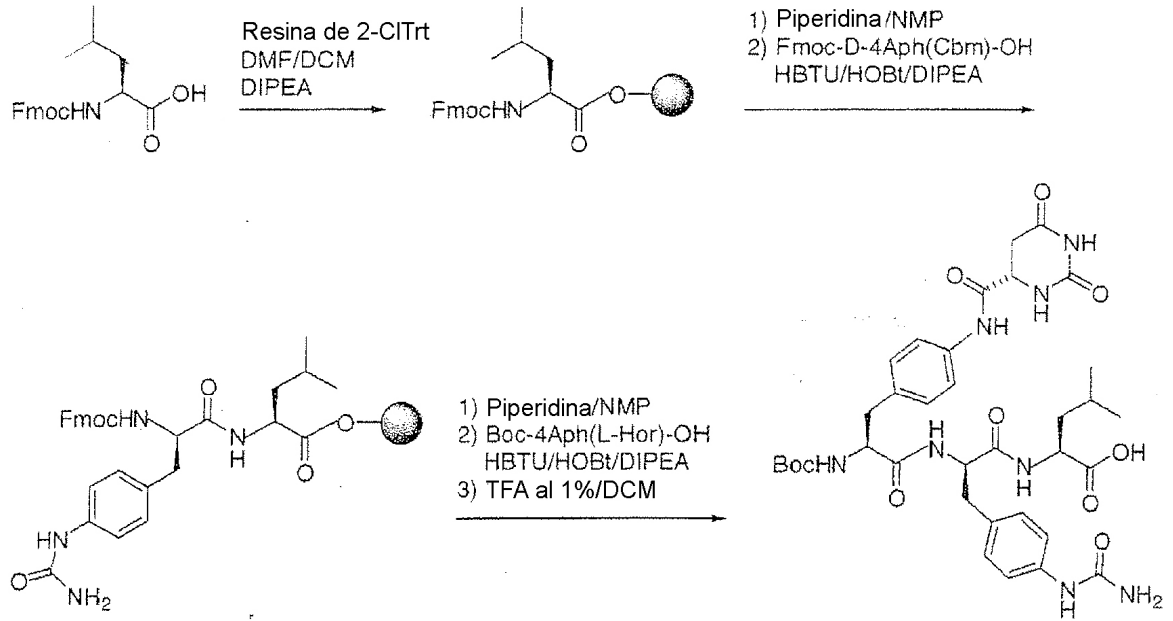


Figura 7

