

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 322**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61P 15/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2011 PCT/CN2011/084414**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12083861**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2011 E 11850254 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2537856**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de acetato de atosiban**

30 Prioridad:

24.12.2010 CN 201010604790

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

25.01.2018

73 Titular/es:

**HYBIO PHARMACEUTICAL CO., LTD (100.0%)
Hybio Medicine Park No. 37 Keji Middle 2nd Road
Hi-Tech Industrial Park Nanshan
Shenzhen, Guangdong 518000, CN**

72 Inventor/es:

**XIAO, QING;
LIU, JIAN;
LI, HONGLING;
MA, YAPING y
YUAN, JIANCHENG**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 651 322 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 preparación de acetato de atosiban

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un fármaco polipéptido, y en particular a un procedimiento para preparar acetato de atosiban.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0002] El atosiban es un nonapéptido que contiene tres aminoácidos no naturales: D-Tyr(Et), Mpa y Orn, y un par de enlaces disulfuro en bucle entre Mpa y Cys, la fórmula estructural es: c [Mpa-D-Tyr(Et)-Ile-Thr-Asn-Cys]-Pro-Orn-Gly-NH₂.

15 [0003] Por medio de la competición por el receptor de oxitocina con la oxitocina, el atosiban puede inhibir la combinación entre la oxitocina y el receptor de oxitocina, y evitar directamente que la oxitocina actúe en el útero y, a continuación, inhibir la contracción uterina; por otro lado, el atosiban también puede inhibir la hidrólisis de fosfatidilinositol y, a continuación, bloquear la generación de mensajero y la actividad de Ca²⁺, con la disminución de la actividad de la oxitocina, se inhibe indirectamente la contracción uterina.

20 [0004] En la actualidad, existen muchos informes sobre el procedimiento del proceso de síntesis en el extranjero y China; un informe encontrado en China muestra que: el inventor encontró un proceso simple mediante la realización de la oxidación en fase sólida, a continuación, la pureza del producto bruto es bajo, con bajo rendimiento y bajo valor de aplicación. Los informes sobre el proceso de síntesis de atosiban en el extranjero revelan que: la mayoría de ellos realizan el procedimiento utilizando síntesis en fase sólido de Boc y la escisión del péptido con amoníaco líquido, a continuación oxidar con la oxidación en fase líquida, y la purificación, relativamente aquellos procesos con una gran cantidad de "los tres residuos" son demasiado complejos para llevar a cabo la producción industrial. Véase la patente US4504469.

25 El documento CN 101357937 A describe un procedimiento de preparación síntesis del péptido atosiban en fase sólida. El documento IN 284 MUM 2004 A da a conocer un procedimiento para preparar atosiban.

30 **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

35 [0005] La presente invención proporciona una ruta adecuada para obtener atosiban mediante el uso de atosiban lineal sintetizado y mediante oxidación en fase líquida. El procedimiento resuelve el problema de la insolubilidad, reduce la extensión del tamaño reacción y reduce el tiempo de reacción al máximo, y también el rendimiento es alto y es fácil de industrializar.

40 [0006] Con el fin de lograr el objetivo anterior, la presente invención realiza los esquemas técnicos prescritos en la reivindicación independiente 1.

[0007] Un procedimiento para preparar atosiban acetato incluye las siguientes etapas de:
sintetizar para obtener atosiban lineal;

45 disolver el atosiban lineal en una solución acuosa de acetonitrilo, ajustar el valor de pH con agua amoniacal, añadir H₂O₂ para oxidar, filtrar, purificar y transferir la sal de acetato sal y obtener el acetato de atosiban.

[0008] "Obtener mediante síntesis" se refiere a la obtención de atosiban lineal por medio de un procedimiento de síntesis en fase líquida o un procedimiento de síntesis en fase sólida. Preferiblemente, el procedimiento de síntesis en fase sólida está más optimizado, se inicia mediante Fmoc-Gly-OH y resina de amino con sustitución adecuada, a continuación se sintetiza la resina de atosiban lineal por acoplamiento uno por uno; a continuación, se obtiene el atosiban lineal a través del proceso de escindir la resina de atosiban lineal con la mezcla de lisado de TFA y H₂O y precipita, en el que la resina de amino es preferiblemente una resina de amida Rink, la posibilidad de sustitución de la cual es preferiblemente de 0,4 mmol/g a 1,0 mmol/g. El agente de acoplamiento usado en el procedimiento de síntesis en fase sólida incluye DIC/HOBt, PyBOP/HOBt, HATU/HOBt o HBTU/HOBt, preferiblemente DIC/HOBt. Se ha encontrado que el agente de acoplamiento de la presente invención puede mejorar la velocidad de reacción, obviamente, al mismo tiempo, el sistema de acoplamiento DIC/HOBt reduce en gran medida el coste de producción. El término "/" significa "y". La escisión de la resina de atosiban lineal se consigue escindiendo la resina de atosiban lineal utilizando la mezcla de lisado con la relación en volumen de TFA:H₂O = 95: 5. La dosificación del agente de escisión es de 10-15 ml/g para la resina de atosiban lineal.

50 [0009] La oxidación del péptido lineal puede realizarse mediante la oxidación en fase líquida o la oxidación en fase sólida. En cuanto a la reacción tradicional en fase líquida, el volumen de líquido es grande, y es difícil de manipular y también lleva mucho tiempo. En contraposición, la oxidación en fase sólida en general se realiza mediante la oxidación con yodo, y es cómodo de manipular, pero fácil de producir "los tres residuos".

65

[0010] La presente invención realiza la oxidación en fase líquida tomando el H₂O₂ como oxidante, lo que simplifica directamente el proceso de producción, reduce el tamaño de reacción y el tiempo de oxidación al máximo.

5 **[0011]** El acetato de atosiban se prepara mediante la disolución del atosiban lineal en la solución acuosa de acetonitrilo, ajuste del valor de pH con agua amoniacal, adición de H₂O₂ para la oxidación, filtrado, purificación, transferencia de la sal y liofilización.

10 **[0012]** La solución acuosa de acetonitrilo se utiliza para la oxidación en fase líquida, la relación en volumen de acetonitrilo es del 5% al 15%, preferiblemente 10%. El atosiban lineal es insoluble en agua, el volumen de reacción es grande cuando se utiliza el agua como disolvente, la solución acuosa de acetonitrilo utilizada por la presente invención mejora ampliamente la solubilidad del atosiban lineal, y reduce el volumen de reacción a la mitad.

15 **[0013]** La concentración de atosiban lineal en la oxidación en fase líquida es de 0,01 g/ml a 0,03 g/ml, preferiblemente de 0,02 g/ml. La concentración de atosiban lineal influye directamente en la generación de multímero durante la oxidación, cuando la concentración es de menos de 0,01 g/ml, presenta inconvenientes para el funcionamiento industrial; y cuando la concentración es de más de 0,03 g/ml, es más difícil de filtrar la polimerización producida entre las moléculas de péptidos.

20 **[0014]** La oxidación en fase líquida utiliza H₂O₂ como oxidante, el número de moles de H₂O₂ y atosiban lineal es 2-8, es decir, la cantidad de oxidante H₂O₂ es 2-8 veces al número de moles de atosiban lineal, preferiblemente 5 veces. Los experimentos muestran que cantidad adecuada de H₂O₂ puede acelerar la velocidad de oxidación y reducir la generación de polímero.

25 **[0015]** La oxidación en fase líquida utiliza H₂O₂ como oxidante, el tiempo de reacción es de 5 min a 60 min, preferiblemente 30 min. Los experimentos muestran que, cuando el tiempo de oxidación es de menos de 5 min, un gran número de péptidos lineales no se oxidan a ciclo péptido, cuando el tiempo de oxidación es de más de 60 min, múltiples péptidos lineales forman un ciclo para formar el polímero. El tiempo de oxidación de la presente invención es preferiblemente 30 min, y la pureza es superior al 85%.

30 **[0016]** La oxidación en fase líquida utiliza H₂O₂ como oxidante, la temperatura de reacción es de 10-40°C, preferiblemente 25°C. Los experimentos muestran que, cuando la temperatura de reacción es inferior a 10°C, el rendimiento de la reacción de oxidación está por debajo del 50%, cuando la temperatura de reacción es de más de 40°C, se encuentra que el aminoácido experimenta fácilmente racemización para generar impurezas que son difíciles de separar. La temperatura de oxidación de la presente invención es preferiblemente de 25°C, que no sólo reduce la racemización del aminoácido, sino que también mejora el rendimiento de la oxidación y la velocidad de reacción.

35 **[0017]** La oxidación en fase líquida utiliza agua amoniacal al 30% para ajustar el pH, en el que el valor pH es 8-9.

40 **[0018]** Después de la oxidación en fase líquida, el acetato de atosiban se prepara mediante la filtración con tierra de diatomeas y el filtro de membrana de manera ordinaria, se purifica el filtrado por RP-HPLC preparativa (columna C18 o C8), se transfiere la sal y se liofiliza.

45 **[0019]** En la presente invención, el atosiban lineal se oxida mediante el procedimiento en fase líquida con H₂O₂, lo que evita una operación complicada causada por la oxidación en fase líquida tradicional, y mejora el rendimiento de oxidación en un 20%-30%. El proceso de la presente invención tiene las características de reacción simple, menos material de entrada, bajo coste, alto rendimiento o similar, y reduce en gran medida la generación de compuestos insolubles, el rendimiento de la síntesis de la reacción puede llegar al 68%, con un valor económico y práctico considerable.

50 **[0020]** Las abreviaturas implicadas en la presente invención tienen los siguientes significados:

Fmoc-: fluorenilmetoxicarbonilo

Gly: Glicina

Orn: Ornitina

55 Pro: Prolina,

Cys: Cisteína

Asn: Asparagina

Thr: Treonina

Ile: Isoleucina

60 Tyr: Tirosina

Mpa: ácido mercaptopropiónico

Boc: terc-butoxicarbonilo

Trt: trifenilmetilo

tBu: terc-butilo

65 Et: etilo

HOBt: 1-hidroxibenzotriazol

DIC: diisopropilcarbodiimida
 TFA: ácido trifluoroacético
 PyBOP: hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio
 HBTU: hexafluorofosfato de o-benzotriazol-1-il-N, N, N', N'-tetrametiluronio
 5 H₂O₂: peróxido de hidrógeno
 DMF: N, N-dimetil formamida
 DCM: diclorometano

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

10 Ejemplo 1: Preparación de la resina del péptido de atosiban lineal

[0021]

15 (i) Se ponen 6,25 g de resina de amida Rink (sustitución = 0,8 mmol/g) en un frasco de reacción, se añade DMF en el frasco y se lava dos veces, a continuación se hincha durante 30 min con DMF. Se elimina el grupo protector Fmoc de la resina de amida Rink con 30-40 ml de DBLK al 20%, se lava 4 veces con DMF, a continuación se lava dos veces con DCM después de la eliminación, el producto se detecta mediante el procedimiento de detección con ninhidrina, la resina es de color marrón rojizo.

20 (ii) Se disuelven 4,46 g de Fmoc-Gly-OH y 2,43 g de HOBt en una cantidad adecuada de DMF, que había sido pre-activado con 3,05 ml de DIC; la mezcla se añade al frasco de reacción y se hace reaccionar durante 2 h, la resina es negativo mediante el procedimiento de detección con ninhidrina, después de la reacción, el producto se lava 4 veces con DMF, a continuación se lava dos veces con DCM, si la resina es positiva, repitiendo la reacción de condensación anterior hasta negativo.

25 (iii) Fmoc-Orn(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-D-Tyr(ET)-OH y Mpa(Trt)-OH están acoplados de forma ordenada.

Ejemplo 2 Escisión de la resina del péptido atosiban lineal

30 [0022] Se preparan 5,15 g de atosiban lineal mediante el lavado de 3 veces con 30 ml de metanol de la resina de péptido atosiban lineal obtenida a partir del Ejemplo 1, la adición de la resina seca obtenida a 150 ml de solución mixta con una relación en volumen de TFA:H₂O 95:5, la reacción durante 2 horas a 25°C y filtración, lavado de la resina 3 veces con un poco de ácido trifluoroacético, combinación del filtrado y vertido en 1500 ml de éter glacial, se deja reposar durante 2 horas, se separa por centrifugación el atosiban lineal, se lava 3 veces, y se seca en un secador de vacío, MS: 995,3, HPLC: 91,5%, contenido: 65,5%, rendimiento de síntesis: 68%.

35 Ejemplo 3: Oxidación del atosiban lineal

40 [0023] Se preparan 2,85 g de acetato de atosiban mediante la disolución del atosiban lineal obtenido a partir del Ejemplo 2 en 250 ml de una solución acuosa de acetonitrilo al 5%, el ajuste del valor de pH a 8 a 9 con agua amoniacal al 30%, adición de 0,60 g de H₂O₂, reacción durante 10 min a 25°C, seguimiento con HPLC (HPLC: 75,6%), filtración después de la reacción, purificación del filtrado por RP-HPLC preparativa (columna C18 o C8), transferencia de la sal y liofilización, MS: 994,5, HPLC: 99,4%.

45 Ejemplo 4: Oxidación del atosiban lineal

50 [0024] Se preparan 3,01 g de acetato de atosiban mediante la disolución del atosiban lineal obtenido a partir del Ejemplo 2 en 250 ml de una solución acuosa de acetonitrilo al 10%, el ajuste del valor de pH a 8 a 9 con agua amoniacal al 30%, adición de 0,85 g de H₂O₂, reacción durante 30 min a 25°C, seguimiento con HPLC (HPLC: 89,5%), filtración después de la reacción, purificación del filtrado por RP-HPLC preparativa (columna C18 o C8), transferencia de la sal y liofilización, MS: 994,5, HPLC: 99,6%.

Ejemplo 5 Oxidación del atosiban lineal

55 [0025] Se preparan 2,95 g de acetato de atosiban mediante la disolución del atosiban lineal obtenido a partir del Ejemplo 2 en 250 ml de una solución acuosa de acetonitrilo al 10%, el ajuste del valor de pH a 8 a 9 con agua amoniacal al 30%, adición de 0,85 g de H₂O₂, reacción durante 60 min a 25°C, seguimiento con HPLC (HPLC: 83,5%), filtración después de la reacción, purificación del filtrado por RP-HPLC preparativa (columna C18 o C8), transferencia de la sal y liofilización, MS: 994,5, HPLC: 99,4%.

60 [0026] Lo anterior es la descripción más detallada realizada con la invención en conjunción con ejemplos específicos preferidos, pero no debe considerarse que los ejemplos específicos de la invención están limitadas sólo a estas descripciones. Para un experto en la materia a la que pertenece la invención, se pueden realizar muchas deducciones y sustituciones.

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar acetato de atosiban, que comprende las siguientes etapas:
- 5 1) sintetizar atosiban lineal;
2) disolver el atosiban lineal con una solución acuosa de acetonitrilo,
en el que, en la solución acuosa de acetonitrilo, la concentración en volumen de acetonitrilo es del 5%-15%;
3) ajustar el valor de pH con agua amoniacal;
4) llevar a cabo la oxidación en fase líquida usando H₂O₂ como oxidante,
10 en el que la cantidad de H₂O₂ es 2-8 veces el número de moles de atosiban lineal, y
en el que durante la oxidación con H₂O₂ el tiempo de oxidación es de 5-60 min;
5) filtrar, purificar y transferir la sal para obtener el acetato de atosiban.
2. Procedimiento de preparación, según la reivindicación 1, en el que el atosiban lineal se disuelve en la solución
15 acuosa de acetonitrilo, en el que la concentración de atosiban lineal es 0,01-0,03 g/ml.
3. Procedimiento de preparación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el pH se ajusta con agua
amoniacal, en el que el valor del pH es 8-9.
4. Procedimiento de preparación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que, en la solución acuosa de
20 acetonitrilo, la concentración en volumen de acetonitrilo es del 10%.
5. Procedimiento de preparación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la temperatura de
reacción de la oxidación en fase líquida es de 10-40°C.
- 25 6. Procedimiento de preparación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la temperatura de
reacción de la oxidación en fase líquida es de 25°C.
7. Procedimiento de preparación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que durante la oxidación con
30 H₂O₂ el tiempo de oxidación es de 30 min.
8. Procedimiento de preparación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el acetato de atosiban se
prepara mediante la disolución del atosiban lineal en la solución acuosa de acetonitrilo, el ajuste del valor de pH con
agua amoniacal, oxidación con H₂O₂, filtración con tierra de diatomeas y una membrana de filtro de manera
ordinaria, purificación del filtrado por RP-HPLC, transferencia de la sal y liofilización.
- 35 9. Procedimiento de preparación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el atosiban lineal se
sintetiza mediante un procedimiento en fase sólida y el agente de acoplamiento es DIC/HOBt, PyBOP/HOBt,
HATU/HOBt o HBTU/HOBt.
- 40 10. Procedimiento de preparación, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el atosiban lineal se
sintetiza mediante un procedimiento en fase sólida y el agente de acoplamiento es DIC/HOBt.