



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 275 012**

⑮ Int. Cl.:

C07K 5/083 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **02781699 .0**

⑯ Fecha de presentación : **23.12.2002**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1465917**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2004**

⑭ Título: **Intermedios para la síntesis de agonista LHRH, proceso para su producción, y proceso para la producción del antagonista LHRH.**

⑩ Prioridad: **29.12.2001 SE 0104463**

⑬ Titular/es: **Polypeptide Laboratories A/S
Herredsvejen 2
3400 Hillerød, DK**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2007

⑭ Inventor/es: **Rasmussen, Jon, H.;
Rasmussen, Palle, H.;
Wachs, Wolfgang, O.;
Hansen, Stefan y
Fomsgaard, Jens**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2007

⑭ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Intermedios para la síntesis de agonista LHRH, proceso para su producción, y proceso para la producción del antagonista LHRH.

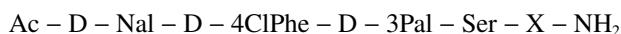
5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con un proceso para la producción de intermedios para antagonistas LHRH, a sales de tales intermedios y a un proceso para la producción de antagonistas LHPH.

10 **Antecedente de la invención**

La hormona de liberación de hormona leutinizante, LHRH, controla la secreción de la hormona de estímulo del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Los antagonistas LHRH son compuestos capaces de bloquear la secreción del FSH y LH. Ellos son generalmente nona- y decapéptidos (pero pueden ser más cortos o más largos) que comprenden parte de o la estructura completa de LHRH en el cual uno o varios aminoácidos se han cambiado por otros aminoácidos naturales y/o aminoácidos no encontrados en la naturaleza.

20 Los antagonistas LHRH sintéticos se pueden utilizar para contracción y en el tratamiento de hiperplasia benigna de la glándula de la próstata, tumores dependientes de hormonas de la mama y ovarios, dismenorrea, endometriosis y otras condiciones. Estos antagonistas LHRH sintéticos tienen la fórmula general



25 en donde X es de 5 a 6 residuos de aminoácido sintético y/o natural. Más particularmente ellos tienen la fórmula general mencionada anteriormente en donde X es AA1-AA2-Leu-AA3-Pro-D-Ala, en particular en donde AA1 es un aminoácido sintético o natural y AA2 es un aminoácido sintético o natural o 0, y AA3 es un aminoácido sintético o natural.

30 Mientras existe un número de métodos sintéticos para preparar análogos de LHRH conocidos en la técnica, subsiste la necesidad para el mejoramiento en razón al producto total de análogos LHRH obtenidos de procesos conocidos que no es alto y los productos, adicionalmente, pueden requerir purificación costosa. Más aún, los métodos para la síntesis de análogos LHRH conocidos en la técnica son bastante costosos.

35 Una estrategia de síntesis descrita en la Patente Estadounidense No. 5,710,246 para elaborar antagonistas LHRH decapéptidos o nonapéptidos comprende el acoplamiento de un tripéptido intermedio que representa uno a tres residuos amino (el conteo inicia en el terminal amino de péptido) con un heptapéptido o un hexapéptido, que representan respectivamente residuos aminoácidos 4-10 y 4-9, respectivamente. El tripéptido intermedio descrito en la US 40 5710246 A es un éster Boc-D-2Nal-D-4-ClPhe-D-3Pal-O-Me o el bencilo correspondiente o éster alilo.

Objetos de la invención

45 Es así un objeto de la invención suministrar un intermedio tripéptido para la síntesis 3+7 y 3+6 de análogos LHRH en el que el rendimiento y/o pureza del producto se mejora.

Es otro objeto de la invención suministrar un proceso para la producción de tal un intermedio tripéptido.

50 Es todavía otro objeto de la invención suministrar un proceso para la producción de análogos LHRH en el que un tripéptido se acopla a un hepta- o hexapéptido.

Objetos adicionales de la invención serán obvios a partir del siguiente resumen de la invención, la descripción de las modalidades preferidas, y las reivindicaciones de patente adjuntas.

55 **Definiciones y abreviaturas**

Para definiciones y abreviaturas utilizadas en esta solicitud y que generalmente se aceptan en el campo de la invención se hace referencia en particular a la US 5710246 A.

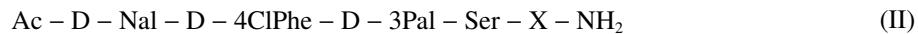
60 **Resumen de la invención**

De acuerdo con la invención se suministra un proceso para preparar un tripéptido (I) que representa 1-3 aminoácidos de un antagonista LHRH, el grupo amino terminal del cual es Ac protegido y el grupo carboxilo terminal del cual no se protege (que es, el grupo terminal del aminoácido No. 3).



(I)

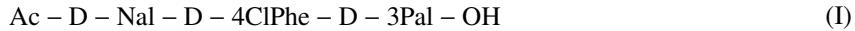
que es un intermedio útil en un proceso para la síntesis de un antagonista LHRH de la fórmula general (II)



5

en donde X es de 5 a 7 residuos de aminoácidos sintéticos y/o naturales, más preferidos AA1-AA2-Leu-AA3-Pro-D-Ala, en particular cuando AA1 es un aminoácido sintético o natural y AA2 es un aminoácido sintético o natural o 0, AA3 es un aminoácido natural o sintético.

10 Específicamente, de acuerdo con la invención se describe un proceso para la preparación de un tripéptido de fórmula (I)



15

que comprende las siguientes etapas consecutivas para la preparación de (I)

(a) Hacer reaccionar Boc-D-4ClPhe-OH con HONSu para formar Boc-D-4ClPhe-OSu (VII);

20 (b) Hacer reaccionar Boc-D-4ClPhe-OSu (VII) con H-D-3Pal-OH para formar Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (VIII)

(c) Hacer reaccionar Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (VIII) con Boc-D-2Nal-OSu preparado al hacer reaccionar Boc-D-2Nal-OH con HON-Su para formar Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX);

25 (d) Hacer reaccionar Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX) con ácido acético para formar Ac-D-2Nal-4ClPhe-D-3Pal-OH (I).

El proceso de la invención para preparar un antagonista LHRH comprende adicionalmente las etapas (a) A (d) anteriores la etapa de acoplar el tripéptido (I) con un heptapéptido de la fórmula (IV) de la fórmula general.

30



en donde P⁴ es H o un grupo amino protector tal como Boc,

35

en donde AA1 y AA2 tienen el significado mencionado anteriormente,

en particular con un heptapéptido (V) de la fórmula general P¹-Ser(P²)-NMeTyr(P³)-D-Lys(Nic)-Leu-Lys(iPr, P⁴)-Pro-D-AlaNH₂ (V) en donde P¹ se selecciona de H o un grupo amino protector y P² y P⁵ se seleccionan independientemente de H y el grupo protector -OH, y P⁴ tiene el significado dado anteriormente, para preparar el antagonista LHRH Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Lys(Nic)-Leu-Lys-(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (III), más particularmente con un heptapéptido (Va), de la fórmula general P¹-Ser (P²)-NMeTyr (P³)-D-Asn-Leu-Lys (iPr P⁴)-Pro-D-AlaNH₂ (Va) en donde P¹ se selecciona de o el grupo amino protector y P² y P³ se selecciona independientemente de H y el grupo protector -OH y P⁴ tiene el significado dado anteriormente, para preparar el antagonista LHRH Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D- Asn-Leu-Lys (iPr)-Pro-D-AlaNH₂ (III).

El heptapéptido (V) se describe en la US 5710246 A. el heptapéptido de la fórmula general (IV) que incluye el heptapéptido (Va) se puede sintetizar por modificaciones de rutina de la síntesis (V) o al acoplar los aminoácidos Boc correspondientes en un sintetizador de péptido (Beckman Model 990), como se describe en la WO 94/40757 en donde 50 también se describe en los antagonistas (III) LHRH.

Una ventaja particular con el método de la invención es que un material de partida económico H-Pal-OH-2HCl, se puede utilizar en cambio del éster H-Pal-OR-2HCl; el grupo protector del material de partida no necesita ser removido. Por lo tanto la síntesis de la invención es una etapa más corta y evita que el material se pierda en la etapa adicional. 55 Otra ventaja es que se evita la formación de impurezas en la etapa de saponificación. La formación de tales impurezas es bien conocida. Por ejemplo, las condiciones básicas en la etapa de hidrólisis de éster origina racemización parcial del D-Pal. Las otras técnicas anteriores alternativas de remover el grupo éster mediante hidrogenación catalítica (en el caso de los grupos alilo o éster bencilo) corre el riesgo de ocasionar pérdida de Cl a partir de 4ClPhe que produce Phe. Cuando los grupos alilo se pueden remover mediante todavía otros reactivos, la remoción completa es difícil de controlar.

60 La invención será ahora explicada en más detalle con referencia a una modalidad preferida.

65

Descripción de una modalidad preferida de la invención*Síntesis de Ac-D-2Nal-4ClPhe-D-3Pal-OH (I)*

5 Ejemplo 1

Boc-D-4ClPhe-OSu

Se disuelve Boc-D-4ClPhe-OH (299, 75 g; 1,0 eq) y HONSu (184,1 g; 1,6 eq) se disuelve en 2-propanol (4,5 L).

10 La mezcla se enfriá a 0°C y se agrega DIC (164, 1 g; 1.3 eq). La mezcla se agita durante 16 h mientras se calienta a temperatura ambiente. El producto se filtra, se lava con 2-propanol (1,5 L) y se seca. Rendimiento: 85%. Pureza HPLC: 98,8%.

15 Ejemplo 2

Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH

Se disuelve H-D-3Pal-OH, 2 HCl (251,1g; 1,05 eq) y Boc-D-4ClPhe-OSu (396,8 g; 1,0 eq) se disuelve en DMSO (3,33 L) y se agrega NMM (318,8 g; 3,15 eq.) la mezcla se agita durante 16h a temperatura ambiente. Se agrega agua

20 (17 L) y el pH se ajusta a 4-4,5 que origina que el producto se precipite. La mezcla se filtra y el producto se lava con agua (3 x 5 L) para remover trazas de DMSO, H-D-3Pal-OH y Boc-D-4ClPhe-OH. El producto se seca. Rendimiento: 80%. Pureza HPLC: 97,8%.

25 Ejemplo 3

Boc-D-2Nal-OSu

Se disuelve Boc-D-2Nal-OH (315,4 g; 1,0 eq.) en 2-propanol (6,8 L) en-10°C e IBC (157 g; 1,15 eq.) y se agrega NMM (116 g; 1,15 eq.). Después de agitar durante 5-10 min se agrega una mezcla de HONSu (230,1 g; 2,0 eq.) en 2- propanol (1,4L). Se agrega NMM adicional (10,1 g; 0,1 eq.). Después de media hora se agrega agua (0,82 L) para disolver el precipitado NMM HCl. El producto se aísla por filtración, se lava con 2-propanol (1 L), y se seca. Rendimiento: 90%. Pureza HPLC: 99,3%.

35 Ejemplo 4

Boc-D-Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH

a) Desprotección. Se disuelve Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (447,93 g; 1,0 eq.) en una mezcla de acetato de etilo (3,4 L), ácido acético (675 ml) y MSA (454 mL; 7, 0 eq.) a 0°C y se mantiene a esta temperatura durante dos horas. Se agrega TEA (1669 ml; 12 eq.).

b) Condensación. Se agrega Boc-D-Nal-OSu (412,4 g; 1,0 eq.) a la mezcla de desprotección neutralizada a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se mantiene a esta temperatura durante 2-4 h. Se agrega 25% NK₃ Ac. (154 mL; 2, 0 eq.) para apagar el éster de hidroxisuccinimida restante. Se agrega 1-Butanol (4,5 L) para evitar la precipitación en las extracciones posteriores.

c) Purificación y aislamiento. La mezcla de reacción se extrae dos veces en pH 6 (2 x 4,5 L agua) para remover TEA, en pH 9 (4,5 L agua) para remover MSA y finalmente en pH 7 (4,5 L de agua). Las extracciones se llevan a cabo a 40-45°C para evitar precipitación. A la fase orgánica se agrega ácido acético (4,5 L; 1 vol.) y la mezcla se concentra in vacuo y se coevapora con ácido acético (4,5 L) para dar un sólido.

50 Ejemplo 5

Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-ONa

55 a) Desprotección. Al Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH sólido se agrega agua (90 ml), ácido acético (1,8 L) y MSA (454 mL; 7,0 eq.) y la mezcla se agita durante 1-2h a temperatura ambiente. La mezcla se enfriá a 0°C y se neutraliza con TEA (1071 ml; 7,7 eq.). La solución se concentra in vacuo y se coevapora dos veces con tolueno (2 x 2,5 L) para dar un aceite.

b) Acetilación. El aceite de la etapa de desprotección se disuelve en tolueno (2,0 L) y se agrega acetil imidazol (132,14 g). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1h y se agrega luego agua (100 ml) para apagar el acetil imidazol restante.

60 c) Purificación. La mezcla de acetilación se calienta 30-35°C y se agrega 1-butanol (4,5 L) para evitar precipitación. La mezcla se extrae dos veces en pH 5 (agua 2x2,6 L), y dos veces en pH 11 (2 x 2,6 L de agua) utilizando NaOH para ajustar el pH a 11. Se agrega metanol (2,25 L) a las últimas extracciones para evitar precipitación. NaCl (130 g) se agrega al primero y la última extracción para minimizar pérdida del producto en las fases acuosas.

ES 2 275 012 T3

e) Aislamiento. A la fase orgánica agitada vigorosamente de las extracciones se agrega heptano (15 L) y la suspensión resultante se deja a temperatura ambiente mientras se agita durante al menos 1h. La mezcla se filtra y el producto se lava dos veces con heptano (2 x 3,5 L) y se seca. Rendimiento: 75% (de Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH). Pureza HPLC: 92%. Análisis de aminoácido: 2Nal: 1.1; 4ClPhe: 1.0; 3Pal: 0.9. MS: PM 586. Na: 4.6%.

5

Ejemplo 6

Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH-DCHA

10 a) Desprotección. Al sólido Boc-D-ZNal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH se agrega agua (90 mL), ácido acético (1,8 L) y MSA (454 mL; 7,0 eq.) y la mezcla se agita durante 1-2 h a temperatura ambiente. La mezcla se enfriá a 0°C y se neutraliza con TEA (1071 mL; 7,7 eq.). La solución se concentra *in vacuo* y se coevapora dos veces con tolueno (2 x 2,5 L) para dar un aceite.

15 b) Acetilación. El aceite de la desprotección se disuelve en tolueno (2,0 L) y se agrega acetil imidazol (132,14 g). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1h seguido por adición de agua (100 ml) para apagar el acetil imidazol restante.

20 c) Purificación. La mezcla se calienta a 30-35°C y se agrega 1-butanol (4,5 L) para evitar precipitación. La mezcla se extrae dos veces en pH 7 (2 x 2,6 L de agua), una vez en pH 9-9,5 (2,6 L de agua) y una vez en pH 7 (2,6 L de agua). Se agrega DCHA (dicitclohexilamina) y la mezcla se concentra *in vacuo*. El producto se suspende en 1-butanol (4,5 L) a 50°C y se agrega lentamente a heptano agitado vigorosamente (27 L). La mezcla se agita a 0°C durante la noche, se filtra y el producto se lava dos veces con 1-butanol/heptano (1:3; 2x4,8 L) y dos veces con heptano (2x4,5 L). Rendimiento: 65% (de Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH). Pureza HPLC: 94,2%. Análisis de aminoácidos: 2Nal: 1.1; 4ClPhe: 1.0; 3Pal: 0.9. MS: PM 586 (péptido libre).

Ejemplo 7

Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH

30 a) Desprotección. Al sólido Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH se agrega agua (90 mL), ácido acético (1,8 L) y MSA (454 ml; 7,0 eq.) y la mezcla se agita durante 1-2 h a temperatura ambiente. La mezcla se enfriá a 0°C y se neutraliza con TEA (1071 mL; 7,7 eq.). La solución se concentra *in vacuo* y se coevapora dos veces con tolueno (2 x 2,5 L) para dar un aceite.

35 b) Acetilación. El aceite de la desprotección se disuelve en tolueno (2,0 L) y se agrega acetil imidazol (132,14 g). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 1 h y luego se agrega agua (100 mL) para apagar el acetil imidazol restante.

40 c) Purificación. La mezcla de la acetilación se calienta a 30-35°C y se agrega 1-butanol (4,5 L) para evitar precipitación. La mezcla se extrae dos veces en pH = 7 (2 x 2,6 L de agua), y una vez en pH = 9-9,5 (2,6 L de agua) y una vez en pH=7 (2,6 L de agua). La mezcla se concentra *in vacuo* para un aceite, que se disuelve en ácido acético (750 ml), se concentra, se redissuelve en ácido acético (750 ml) y se agrega lentamente a heptano/acetato de etilo agitado vigorosamente (3:1; 3,6 L). La mezcla se deja con agitación 0°C durante la noche. La mezcla se filtra, y el producto se lava dos veces con acetato de etilo/heptano (1:3; 2x3,6 L) y dos veces con heptano (2x3,6 L). Rendimiento: 70% (de Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH). Pureza HPLC: 93,9%. Análisis de aminoácido: Nal: 1.1; 4ClPhe: 1.0; 3Pal: 0.9 MS: PM 586 (péptido libre).

50

55

60

65

ES 2 275 012 T3

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar un tripéptido que incluye una sal de este, de la fórmula (I)



que comprende las siguientes etapas consecutivas para la preparación de (I):

- (a) Hacer reaccionar Boc-D-4ClPhe-OH con HONSu para formar Boc-D-4ClPhe-OSu (VII);
 - (b) Hacer reaccionar Boc-D-4ClPhe-OSu (VII) con H-D-3Pal-OH para formar Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (VIII)
 - (c) Hacer reaccionar Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (VIII) con Boc-D-2Nal-OSu preparado al hacer reaccionar Boc-2Nal-OH con HON-Su para formar Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX);
 - (d) Hacer reaccionar Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX) con ácido acético para formar Ac-D-2Nal-4ClPhe-3Pal-Oh (I).

2. Un proceso para preparar un antagonista LHRH o una sal farmacéuticamente aceptable de ésta que comprende las etapas de la reivindicación 1, en donde

el triptíptido Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (I)

se acopla adicionalmente con un heptapéptido (IV) de la fórmula general



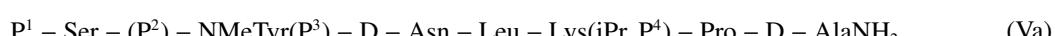
en donde P^1 se selecciona de H o grupo amino protector y P^2 es H o grupo protector OH, P^4 es H o un grupo protector amino tal como Boc, AA1 es aminoácido natural o sintético y AA2 es aminoácido natural o sintético o cero.

3. El proceso de la reivindicación 2, en donde el heptapéptido de la fórmula general (IV) es



en donde P^3 es H o el grupo protector -OH.

4. El proceso de la reivindicación 2, en donde el heptapéptido de fórmula general (IV) es



5. El proceso de la reivindicación 3, en donde el heptapéptido de la fórmula general (V) es



6. El proceso de la reinvención 4, en donde el heteróptido de la fórmula (VII) es un heteróptido de la fórmula

