



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **329024**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
C07K 1/30 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20043046	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.12.23 PCT/IB02/05581
(22)	Inng.dag	2004.07.16	(85)	Videreføringsdag	2004.07.16
(24)	Løpedag	2002.12.23	(30)	Prioritet	2001.12.29, SE, 0104462
(41)	Alm.tilgj	2004.08.30			
(45)	Meddelt	2010.08.02			
(73)	Innehaver	Polypeptide Laboratories A/S, Herredsvejen 2, DK-3400 HILLERÖD, Danmark			
(72)	Oppfinner	Jon H Rasmussen, Buddingevej 69, DK-2800 LYNGBY, Danmark			
		Palle H Rasmussen, Aldershvilevej 121B, 1 th, DK-2880 BAGSVÆRD, Danmark			
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 6963 St Olavs Plass, 0130 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Peptidrensing			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 0018423 A1, WO 0055190 A1, EP 955308 A1			
(57)	Sammen drag				

Et nona- eller dekaeptid renses fra organisk løsningsmiddelrest ved oppløsning i et løsningsmiddel omfattende vann og i det minste en C₁-C₃-alkohol etterfulgt av presipitering i et kraftig rørt løsningsmiddel bestående av en alkylester av en karboksylsyre, hvor esteren omfatter fra 3-6 karbonatomer, og én eller flere ikkepolare forbindelser valgt fra heksan, heptan, oktan, sykloheksan, metylsykloheksan og eventuelt opptil 5 % eddik- eller propionsyre, isolere det presipiterte nona- eller dekaeptidet, etterfulgt av vasking med en blanding av C₃-C₅-estere og tørking, med det forbehold at vanninnholdet i løsningsmidlet omfattende vann og i det minste én alkohol er under 8 % (volum/volum), og at volumforholdet mellom (oppløsningsløsningsmiddelblandingen og presipiteringsløsningsmiddelblandingen er 1:10 eller høyere. Monoacetatet av Ac-D-2Nal-D-4CIPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ beskrives også.

Oppfinnelsens område

Den foreliggende oppfinnelse angår rensingen av peptider, spesielt middels store peptider, nærmere bestemt nona- og dekaeptider, slik som LHRH-antagonister.

Bakgrunn for oppfinnelsen

- 5 De fleste naturlige og syntetiske, middels store peptider er amorfe forbindelser. Mange av disse har farmakologisk interessante egenskaper, slik som mange nona- og dekaeptider som er LHRH (luteiniserende hormonfrigjørende hormon)-antagonister. En spesiell forbindelse av denne typen som kun er kjent i amorf form er det syntetiske dekaeptidet med formel (I)
- 10 $\text{Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH}_2$ (I)
- som, ved å være en kraftig LHRH-antagonist, har ønskede farmakologiske egenskaper.
- For anvendelse i farmasøytiske preparater er det nødvendig at LHRH-antagonist (I)- og nona- og dekaeptider med lignende struktur er vesentlig rene. Det ubearbeidede produktet oppnådd i det siste trinnet i en flertrinnsyntese er rensing ved hjelp av
- 15 kromatografiske metoder og andre fremgangsmåter. For å eliminere restløsningsmiddel fra kromatografien må et således rensset produkt vanligvis løses i et vandig medium og frysetørkes. Dette er en kostbar prosess som produserer et voluminøst produkt som ikke er enkelt å håndtere.
- 20 En fremgangsmåte for å rense et ellers rent peptid fra organisk restløsningsmiddel ved hjelp av andre midler enn frysetørking er derfor ønskelig.
- WO 0018423 A beskriver anvendelsen av kombinasjonen av syklodekstrin og en LHRH-peptidanalogue, inkludert dets farmasøytisk akseptable salter, for fremstillingen av et farmasøytisk preparat for oral administrering. Abarelix er en
- 25 foretrukket LHRH-analog. Acetatsalter av LHRH-peptidantagonistene i D1 er beskrevet å være generelt farmasøytisk akseptable. Forbindelsene i WO 0018423 er anvendelige i fremstillingen av medikamenter.
- WO 0055190 A beskriver dekaeptid-LHRH-antagonister for fremstillingen av medikamenter mot hormonavhengige tumorer og hormonpåvirkede sykdommer,
- 30 som kan renses ved hjelp av preparativ HPLC og frysetørkes.
- EP 0955308 A beskriver en fremgangsmåte for omdanningen av hydrokloridsalter av dekaeptid-LHRH-antagonister til deres diacetatsalter samtidig i en ett-trinns rensing ved hjelp av væskerkromatografi.
- ### Formål ved oppfinnelsen
- 35 Det er et formål ved den foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en fremgangsmåte for å rense et ellers rent peptid av foran nevnte type fra organisk løsningsmiddelrest, og hvor frysetørking unngås.

Det er et annet formål ved den foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe et slikt ellers rent peptid som er vesentlig fri for organisk løsningsmiddelrest og som ikke er i form av et kryopresipitat.

- 5 Ytterligere formål ved den foreliggende oppfinnelse vil tydeliggjøres av det følgende sammendraget av oppfinnelsen, beskrivelsen av de foretrukne utførelsesformene derav og de vedlagte krav.

Sammendrag av oppfinnelsen

- 10 Ifølge den foreliggende oppfinnelse tilveiebringes en fremgangsmåte for å rense et ellers rent peptid, spesielt et nona- eller dekaeptid, nærmere bestemt et nona- eller dekaeptid som er en LHRH-antagonist, fra organisk løsningsmiddelrest omfattende de følgende trinn:

- 15 - løse opp nona- eller dekaeptidet i en oppløsningsløsemiddelblanding omfattende vann og i det minste én alkohol valgt fra metanol, etanol, propanol, isopropanol;
- tilsette løsningen av nona- eller dekaeptidet i nevnte løsningsmiddelblanding til en kraftig rørt presipiteringsløsningsmiddelblanding vesentlig bestående av én eller flere polare forbindelser valgt fra metylacetat, 20 etylacetat, metylpropionat, etylpropionat, etylisopropionat, butylacetat, isobutylacetat, t-butylacetat, etylformat, propylformat, isopropylformat og én eller flere ikke-polare forbindelser valgt fra heksan, heptan, oktan, sykloheksan, metylsykloheksan og eventuelt opptil 5 % eddiksyre eller propionsyre;
- 25 - isolere det presipiterte nona- eller dekaeptidet;
- vaske det isolerte nona- eller dekaeptidet med én eller en blanding av nevnte polare forbindelser eller et løsningsmiddel eller løsningsmiddelblanding med lignende polaritet;
- tørke det vaskede peptidet,
- 30 - med det forbehold at vanninnholdet i nevnte løsningsmiddelblanding omfattende vann og i det minste én alkohol er under 8 % (volum/volum), og at volumforholdet mellom oppløsningsløsemiddelblandingen og presipiteringsløsningsmiddelblandingen er 1:10 eller mer.

- 35 "Et ellers rent peptid" er et peptid som er tilstrekkelig rent for anvendelse i en medisin bortsett fra for flyktige urenheter som må fjernes eller hvor innholdet derav i det vesentlige må reduseres. Det ellers rene peptidet vil normalt være en forbindelse som har gjennomgått rensing ved kromatografi.

Fortrinnsvis er det ellers rene peptidet

Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (I).

Nevnte nona- eller dekapeptid er i følge et aspekt ved oppfinnelsen fortrinnsvis en LHRH-antagonist.

Ifølge et første foretrukket aspekt ved oppfinnelsen er vanninnholdet i oppløsningsløsningsmiddelblandingen under 5 % (volum/volum).

- 5 Ifølge et annet foretrukket aspekt ved den foreliggende oppfinnelse er volumforholdet mellom oppløsningsløsningsmiddelblandingen og presipiteringsløsningsmiddelblandingen i det minste 15.

Ifølge et tredje foretrukket aspekt ved oppfinnelsen er alkoholen i oppløsningsløsningsmiddelblandingen etanol.

- 10 Ifølge et fjerde aspekt ved oppfinnelsen er den polare komponenten i presipiteringsløsningsmiddelblandingen etylacetat.

Ifølge et femte foretrukket aspekt ved oppfinnelsen er den ikke-polare komponenten i presipiteringsløsningsmiddelblandingen heptan.

- 15 I det følgende vil oppfinnelsen bli beskrevet i større detalj med henvisning til en foretrukket utførelsesform derav som ikke skal forstås å være begrensende for oppfinnelsen.

Beskrivelse av en foretrukket utførelsesform

- 20 Eksempel 1. Fraksjonene inneholdende ren forbindelse (1) (100 g totalt) i etanol-vann-eddiksyre 40:59:1 (volum/volum/volum) oppnådd gjennom preparativ HPLC hvorved det syntetisk oppnådde produktet var blitt rensset, ble samlet og konsentrert *in vacuo* til en olje som sammen ble fordampet to ganger fra etanol. Det resulterende faste stoffet ble løst i 440 ml etanol og den resulterende klare løsningen ble tilsatt til 8,8 l etylacetat/heptan 1:1 (volum/volum) i løpet av et
- 25 tidsrom på 20 min.

Røringen fortsatte i 1 time og blandingen ble filtrert. Det amorf produktet ble vasket med 3 l etylacetat; det ble funnet at dette fjernet nesten all heptan. Det vaskede produktet ble tørket i en vakuumovn ved 40°C ved 0,3 bar i 48 timer.

- 30 Elementanalyse av det tørkede produktet indikerte at monoacetatet av (I) var oppnådd. Kryopresipitering, i kontrast til dette, gir det korresponderende diacetatet. I den følgende tabellen er analytiske parametere for monoacetatet av (I) fremstilt i henhold til oppfinnelsen sammenlignet med de til et korresponderende lyofiliserte produkt (diacetat).

Tabell. Alle procenter er vektprocenter

	Lyofilisert produkt	Presipitert produkt
Vann	3,4 %	3,0 %
Etanol	< 0,024 %	< 0,024 %
Etylacetat	< 0,024 %	< 0,024 %
Heptan	< 0,024 %	< 0,024 %
Eddiksyre (som acetat)	7,5 %	3,9 %
HPLC-renhet	99,8 %	99,8 %
Peptidinnhold	88,8 %	94,9 %
Filtertap	-	0,3 %

- 5 Eksempel 2. Variasjon i sammensetningen av presipiteringsløsningsmidlet eller løsningsmiddelblanding; ellers som fremgangsmåten i eksempel 1. Presipitering i ren etylacetat resulterte i fra omtrent 3 til omtrent 5 vekt% peptidtap. Presipitering i ren heptan resulterte i et klebrig produkt som var vanskelig å filtrere. En 1:1 (volum/volum) blanding av etylacetat:heksan gir et produkt som lett filtreres og tørkes; i repeterte eksperimenter var peptidtapet alltid mindre enn 0,5 vekt%.
- 10 Eksempel 3. Variasjon av vanninnhold i løsningen av oljeaktig produkt i oppløsningsløsningsmidlet (absolutt etanol); ellers som fremgangsmåten i eksempel 1. Et vanninnhold på 10 % (volum/volum) resulterte i et klebrig produkt ved presipitering som var vanskelig å filtrere. Et vanninnhold på 15 % (volum/volum) resulterte i et oljeaktig produkt ved presipitering. For å oppnå tilfredsstillende
- 15 resultater må vanninnholdet ikke overskride 8 % (volum/volum), men bør fortrinnsvis holdes under 5 % (volum/volum). Et vanninnhold under 5 % ble oppnådd ved samtidig fordampning av det oljeaktige produktet fra kromatografien med etanol minst to ganger.
- 20 Eksempel 4. Variasjon i presipiteringstemperatur; ellers som fremgangsmåten i eksempel 1. Presipiteringstemperaturen viste seg ikke å være kritisk. Den kunne varieres fra 0°C til 20°C uten merkbar forskjell i produktutbytte og morfologi.
- 25 Eksempel 5. Variasjon i konsentrasjon av (I) i oppløsningsløsningsmidlet; ellers som fremgangsmåten i eksempel 1. Det ble funnet at konsentrasjonen av det oljeaktige produktet fra kromatografien som samtidig fordamper med etanol i

oppløsningsløsningsmidlet bør være så høy som mulig. Selv en konsentrasjon på 330 g gjennom vekt kunne anvendes.

- Eksempel 6. Variasjon av forhold mellom oppløsningsløsningsmiddel- og presipiteringsløsningsmiddelvolumer og andre variasjoner; ellers som fremgangsmåten som i eksempel 1. Det optimale forholdet blir funnet å være omtrent 1:20. Det kunne vises at forhold fra 1:15 til 1:30 ga tilfredsstillende resultater. Et forhold på 1:10 resulterte i et klebrig produkt. Presipiteringen var svært rask. Suspensjonen kan filtreres 30 min. etter den siste tilsetningen av oppløst forbindelse. Vasking med etylacetat resulterte ikke i tap av produkt men fjernet effektivt heptan.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for rensing av et ellers rent nona- eller decapeptid fra organisk løsningsmiddelrest,
karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter de følgende trinn:
 - 5 - oppløsning av nona- eller decapeptidet i en oppløsningsløsningsmiddelblanding omfattende vann og i det minste én alkohol valgt fra metanol, etanol, propanol, isopropanol;
 - tilsetning av nona- eller decapeptidløsningen i nevnte løsningsmiddelblanding til en kraftig rørt presipiteringsløsningsmiddelblanding
 - 10 vesentlig bestående av én eller flere polare forbindelser valgt fra metylacetat, etylacetat, metylpropionat, etylpropionat, etylisopropionat, butylacetat, isobutylacetat, t-butylacetat, etylformat, propylformat, isopropylformat, og én eller flere ikke-polare forbindelser valgt fra heksan, heptan, oktan, sykloheksan, metylsykloheksan og eventuelt opptil 5 % eddik- eller propionsyre;
 - 15 - isolering av nevnte presipiterte nona- eller decapeptid;
 - vasking av det isolerte nona- eller decapeptidet med én eller en blanding av nevnte polare forbindelser eller et løsningsmiddel eller løsningsmiddelblanding med lignende polaritet,
 - tørking av det vaskede nona- eller decapeptidet,
 - 20 med det forbehold at vanninnholdet i løsningsmiddelblandingen omfattende vann og i det minste én alkohol er under 8 % (volum/volum), og at volumforholdet mellom oppløsningsløsningsblandingen og presipiteringsløsningsmiddelblandingen er 1:10 eller mer.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvori vanninnholdet i løsningsmiddelblandingen omfattende vann og i det minste én alkohol er under 5 % (volum/volum).
- 25 3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at nevnte nona- eller decapeptid er en LHRH-antagonist.
- 30 4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, karakterisert ved at nevnte nona- eller decapeptid er Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (I).
5. Fremgangsmåte ifølge krav 4, karakterisert ved at Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Asn-
35 Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (I) er oppnådd i form av monoacetatet.
6. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at vanninnholdet i oppløsningsløsningsmiddelblandingen er under 5 % (volum/volum).

7. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at volumforholdet mellom
oppløsningsløsningsmiddelblandingen og presipiteringsløsningsmiddelblandingen
er i det minste 15.
- 5 8. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at alkoholen til oppløsningsløsningsmiddelblandingen
er etanol.
9. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at den polare komponenten i
10 presipiteringsløsningsmiddelblandingen er etylacetat.
10. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at den ikke-polare komponenten i
presipiteringsløsningsmiddelblandingen er heptan.