



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004119965/04, 23.12.2002

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.12.2002

(30) Конвенционный приоритет:
29.12.2001 SE 0104462-7

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2006

(45) Опубликовано: 20.07.2007 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2163910 C2, 10.03.2001. WO 0018423
A1, 06.04.2000. WO 0055190 A1, 21.09.2000. EP
0136728 A2, 10.04.1985. EP 0955308 A1,
10.11.1999.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
29.07.2004

(86) Заявка РСТ:
IB 02/05581 (23.12.2002)

(87) Публикация РСТ:
WO 03/055900 (10.07.2003)

Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ",
пат.пов. А.В.Поликарпову

(72) Автор(ы):

РАСМУССЕН Йон Х. (DK),
РАСМУССЕН Палле Х. (DK)

(73) Патентообладатель(и):

Полипептид Лэборэторис А/С (DK)

(54) ОЧИСТКА ПЕПТИДОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу очистки
чистого в других отношениях нона- или
декапептида, представляющего собой антагонист
рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона
(LHRH), от остаточного органического
растворителя. Способ заключается в том, что нона-
или декапептид растворяют в растворителе,
содержащем воду и по меньшей мере
один C₁-C₃ спирт, с последующим осаждением в
энергично перемешиваемом растворителе,
состоящем из алкилового эфира карбоновой
кислоты, содержащего от 3 до 6 атомов углерода, и

одного или нескольких неполярных соединений,
выбранных из гексана, гептана, октана,
циклогексана, метилциклогексана, и, возможно, до
5% уксусной или пропионовой кислоты, выделяют
выпавший в осадок нона- или декапептид, затем
промывают смесью C₃-C₅ сложных эфиров и
высушивают при условии, что содержание воды в
растворителе, содержащем воду и по меньшей
мере один спирт, составляет ниже 8% (об./об.) и
что объемное соотношение смеси растворителей
для растворения и смеси растворителей для
осаждения составляет 1:10 или выше. 7 з.п. ф-лы,
1 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004119965/04, 23.12.2002**(24) Effective date for property rights: **23.12.2002**(30) Priority:
29.12.2001 SE 0104462-7(43) Application published: **10.01.2006**(45) Date of publication: **20.07.2007 Bull. 20**(85) Commencement of national phase: **29.07.2004**(86) PCT application:
IB 02/05581 (23.12.2002)(87) PCT publication:
WO 03/055900 (10.07.2003)Mail address:
**191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT",
pat.pov. A.V.Polikarpovu**

(72) Inventor(s):

**RASMUSSEN Jon Kh. (DK),
RASMUSSEN Palle Kh. (DK)**

(73) Proprietor(s):

Polipeptid Lehborehtoris A/S (DK)(54) **PURIFICATION OF PEPTIDES**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry of peptides, chemical technology.

SUBSTANCE: invention relates to a method for purification of nona- or decapeptide representing antagonist of luteinizing hormone releasing factor (LHRH) from residual organic solvent. Method involves dissolving nona- or decapeptide in a water-containing solvent and at least one (C₁-C₃)-alcohol followed by precipitation in a solvent under condition with intensive stirring wherein this solvent represents carboxylic acid alkyl ester comprising from 3 to 6 carbon atoms and one

or some nonpolar compounds chosen from hexane, heptane, octane, cyclohexane and methylcyclohexane and, possibly, up to 5% of acetic or propionic acid. Then precipitate of nona- or decapeptide is washed out with a mixture of (C₃-C₅)-esters and dried. The water content in water-containing solvent used and at least one alcohol is less 8% (vol./vol.) and in the volume ratio of solvents mixture used for dissolving and solvents mixture used for precipitation is 1:10 or above.

EFFECT: improved purifying method.

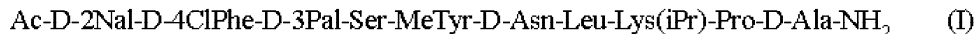
8 cl, 1 tbl, 6 ex

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение касается очистки пептидов, в частности пептидов промежуточного размера, более конкретно нона- и декапептидов, таких как антагонисты LHRH.

5 ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Большинство природных и синтетических пептидов промежуточного размера являются аморфными веществами. Многие из них обладают интересными, с точки зрения фармакологии, свойствами, такие как большинство нона- и декапептидов, которые являются антагонистами рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (luteinizing hormone releasing hormone, LHRH). Одно конкретное вещество этого вида, известное только в аморфной форме, представляет собой синтетический декапептид формулы (I)



который, являясь сильным антагонистом LHRH, имеет желательные фармакологические свойства.

15 Для применения в фармацевтических препаратах необходимо, чтобы антагонист LHRH (I) и нона- и декапептиды подобной структуры были по существу чистыми. Неочищенный продукт, полученный на последней стадии многостадийного синтеза, очищают путем хроматографии и другими способами. Для того чтобы удалить остаточный растворитель из хроматографии, очищенный таким образом продукт обычно следует растворить в водной среде и подвергнуть сублимационной сушке. Это - дорогостоящий способ производства

объемистого продукта, который нелегко обрабатывать. Таким образом, требуется способ очистки чистого в других отношениях пептида от остаточного органического растворителя другими средствами, нежели сублимационная сушка.

25 В WO 0018423 раскрыто применение комбинации циклодекстрина и пептидного аналога LHRH, включая его фармацевтически приемлемые соли, для приготовления фармацевтической композиции для перорального введения. Абареликс (Abarelix) является предпочтительным аналогом LHRH. Раскрыты ацетатные соли пептидных антагонистов LHRH по D1, которые являются в основном фармацевтически приемлемыми. Соединения, описанные в WO 0018423, полезны в производстве лекарственных средств.

В WO 0055190 А раскрыты декапептидные антагонисты LHRH для производства лекарственных средств против гормон-зависимых опухолей и гормонально опосредованных заболеваний, которые могут быть очищены путем препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и сублимационной сушки.

35 В EP 0955308 А раскрыт способ превращения солей гидрохлоридов декапептидных антагонистов LHRH в их диацетатные соли в конкурентном одностадийном способе очистки путем жидкостной хроматографии.

ЗАДАЧИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

40 Задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить способ очистки чистого в других отношениях пептида упомянутого выше вида от остаточного органического растворителя, в котором избегают сублимационной сушки.

Другая задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить такой чистый в других отношениях пептид, который по существу свободен от остаточного органического растворителя и не находится в форме криопреципитата.

45 Другие задачи данного изобретения станут очевидными из последующего краткого описания сущности изобретения, описания его предпочтительного воплощения и прилагаемой формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

50 Согласно настоящему изобретению предложен способ очистки чистого в других отношениях пептида, в частности нона- или декапептида, более конкретно нона- или декапептида, который является антагонистом LHRH, от остаточного органического растворителя, включающий следующие стадии, на которых:

- растворяют указанный чистый в других отношениях пептид в смеси растворителей для

растворения, содержащей воду и по меньшей мере один спирт, выбранный из метанола, этанола, пропанола, изопропанола;

- добавляют раствор чистого в других отношениях пептида в указанной смеси растворителей к энергично перемешиваемой смеси растворителей для осаждения,

5 состоящей по существу из одного или нескольких полярных соединений, выбранных из метилацетата, этилацетата, метилпропионата, этилпропионата, бутилацетата, изобутилацетата, трет-бутилацетата, этилформиата, пропилформиата, изопропилформиата, и одного или нескольких неполярных соединений, выбранных из гексана, гептана, октана, циклогексана, метилциклогексана, и, возможно, до 5%

10 уксусной или пропионовой кислоты;

- выделяют выпавший в осадок пептид;

- промывают выделенный пептид одним или смесью указанных полярных соединений либо растворителем или смесью растворителей сходной полярности;

- сушат промытый пептид,

15 при условии, что содержание воды в указанной смеси растворителей, содержащей воду и по меньшей мере один спирт, составляет ниже 8% (об./об.) и что объемное соотношение смеси растворителей для растворения и смеси растворителей для осаждения составляет 1:10 или более.

"Чистый в других отношениях пептид" означает пептид, который является достаточно чистым для применения в медицине, за исключением летучих примесей, которые должны быть удалены или содержание которых должно быть существенно уменьшено. Чистый в других отношениях пептид обычно будет представлять собой вещество, подвергавшееся очистке путем хроматографии.

Предпочтительно чистый в других отношениях пептид представляет собой

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

Согласно первому предпочтительному аспекту данного изобретения содержание воды в смеси растворителей для растворения составляет ниже 5% (об./об.).

Согласно второму предпочтительному аспекту данного изобретения объемное соотношение смеси растворителей для растворения и смеси растворителей для осаждения составляет по меньшей мере 15, в частности по меньшей мере 20.

Согласно третьему предпочтительному аспекту данного изобретения спирт в смеси растворителей для растворения представляет собой этанол.

Согласно четвертому предпочтительному аспекту данного изобретения полярный компонент смеси растворителей для осаждения представляет собой этилацетат.

35 Согласно пятому предпочтительному аспекту данного изобретения неполярный компонент смеси растворителей для осаждения представляет собой гептан.

Далее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на его предпочтительное воплощение, которое не следует понимать как ограничивающее рамки настоящего изобретения.

40 ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНОГО ВОПЛОЩЕНИЯ

Пример 1. Фракции, содержащие очищенное соединение (I) (суммарно 100 г) в смеси этанол-вода-уксусная кислота 40:59:1 (об./об./об.), полученные в результате

препаративной ВЭЖХ, посредством которой был очищен синтетически полученный

45 продукт, собирали и концентрировали в вакууме с получением масла, которое дважды совместно упаривали из этанола. Полученный остаток растворяли в 440 мл этанола и полученный прозрачный раствор в течение 20 мин добавляли к 8,8 л смеси

этилацетат/гептан 1:1 (об./об.). Перемешивание продолжали в течение 1 часа и фильтровали. Аморфный продукт промывали 3 л этилацетата; было обнаружено, что при

50 этом удаляется почти весь гептан. Промытый продукт сушили в вакуумной печи при 40°C при давлении 30 кПа (0,3 бар) в течение 48 часов. Элементный анализ высушенного

продукта показал, что был получен моноацетат (I). В противоположность этому криопреципитация дает соответствующий диацетат. В следующей таблице сравниваются аналитические параметры моноацетата (I), полученного согласно настоящему

изобретению, с параметрами соответствующего лиофилизированного продукта (диацетата).

Таблица.
Все проценты даны по массе
лиофилизированный продукт осажденный продукт

5	Вода	3,4%	3,0%
	Этанол	<0,024%	<0,024%
	Этилацетат	<0,024%	<0,024%
	Гептан	<0,024%	<0,024%
	Уксусная кислота (в виде ацетата)	7,5%	3,9%
10	Чистота по ВЭЖХ	99,8%	99,8%
	Содержание пептида	88,8%	94,9%
	Потеря в фильтрате	-	0,3%

Пример 2. Изменение состава растворителя или смеси растворителей для осаждения; в остальном методика такая, как описано в Примере 1. Осаждение в чистом этилацетате приводит к потере пептида от приблизительно 3% до приблизительно 5% по массе. Осаждение в чистом гептане дает липкий продукт, который трудно фильтровать. Смесь этилацетат-гексан 1:1 (об./об.) дает продукт, который легко фильтруется и сушится; в повторных экспериментах потеря пептида всегда составляла менее 0,5% по массе.

Пример 3. Изменение содержания воды в растворе маслянистого продукта в растворителе для растворения (абсолютном этаноле); в остальном методика такая, как описано в Примере 1. Содержание воды 10% (об./об.) приводит к образованию липкого продукта после осаждения, который трудно фильтровать. Содержание воды 15% (об./об.) приводит к образованию маслянистого продукта после осаждения. Для получения удовлетворительных результатов содержание воды не должно превышать 8% (об./об.), но предпочтительно должно сохраняться ниже 5% (об./об.). Содержание воды ниже 5% достигается путем совместного упаривания маслянистого продукта, полученного в результате хроматографии, по меньшей мере дважды с этанолом.

Пример 4. Изменение температуры при осаждении; в остальном методика такая, как описано в Примере 1. Температура осаждения, как было показано, не является критической. Ее можно было изменять от 0 до 20°C без заметных различий в выходе продукта и его морфологии.

Пример 5. Изменение концентрации соединения (I) в растворителе для растворения; в остальном методика такая, как описано в Примере 1. Было обнаружено, что концентрация маслянистого продукта, полученного в результате хроматографии, который упаривали совместно с этанолом в растворителе для растворения, должна быть по возможности выше. Можно было использовать даже концентрацию 330 г по массе.

Пример 6. Изменение соотношения между объемами растворителя для растворения и растворителя для осаждения и другие изменения; в остальном методика такая, как описано в Примере 1. Было обнаружено оптимальное соотношение, составляющее приблизительно 1:20. Было показано, что соотношения от 1:15 до 1:30 дают удовлетворительные результаты. Соотношение 1:10 приводило к образованию маслянистого продукта. Осаждение очень быстрое. Суспензию можно фильтровать через 30 мин после последнего добавления растворенного вещества. Промывка этилацетатом не приводила к потере продукта, но эффективно удаляла гептан.

Формула изобретения

1. Способ очистки чистого в других отношениях нона- или декапептида, представляющего собой антагонист рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (LHRH), от остаточного органического растворителя, включающий следующие стадии, на которых: растворяют нона- или декапептид в смеси растворителей для растворения, содержащей воду и по меньшей мере один спирт, выбранный из метанола, этанола, пропанола, изопропанола;

добавляют раствор нона- или декапептида в указанной смеси растворителей к энергично

перемешиваемой смеси растворителей для осаждения, по существу состоящей из одного или нескольких полярных соединений, выбранных из метилацетата, этилацетата, метилпропионата, этилпропионата, бутилацетата, изобутилацетата, трет-бутилацетата, этилформиата, пропилформиата, изопропилформиата, и одного или нескольких

5 неполярных соединений, выбранных из гексана, гептана, октана, циклогексана, метилциклогексана, и, возможно, до 5%-ной уксусной или пропионовой кислоты;

выделяют выпавший в осадок нона- или декапептид;

промывают выделенный нона- или декапептид одним или смесью указанных полярных соединений либо растворителем или смесью растворителей сходной полярности,

10 сушат промытый нона- или декапептид,

при условии, что содержание воды в указанной смеси растворителей, содержащей воду и по меньшей мере один спирт, составляет ниже 8% (об./об.), и что объемное соотношение смеси растворителей для растворения и смеси растворителей для осаждения составляет 1:10 или более.

15 2. Способ по п.1, где содержание воды в указанной смеси растворителей, содержащей воду и по меньшей мере один спирт, составляет ниже 5% (об./об.).

3. Способ по п.1, где указанный декапептид представляет собой

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

4. Способ по п.3, при котором

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

получают в форме моноацетата.

5. Способ по п.1, где объемное соотношение смеси растворителей для растворения и смеси растворителей для осаждения составляет по меньшей мере 15.

6. Способ по п.1, где спирт в смеси растворителей для растворения представляет собой этанол.

25 7. Способ по п.1, где полярный компонент смеси растворителей для осаждения представляет собой этилацетат.

8. Способ по п.1, где неполярный компонент смеси растворителей для осаждения представляет собой гептан.

30

35

40

45

50