

NO 904.458

CLASSIF. INTERNAT.: C07K

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

MIS EN LECTURE LE: 16 juillet 1986

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention

Vu la Convention d' Union pour la Protection de la Propriété Industrielle

Vu le procès-verbal dressé le 21 Mars 1986 A 15h 25

à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : PHIDEA S.R.L.
Via Ariosto 32, 20145 Milan(ITALIE)

REPR. PAR Bureau Gevers S.A. à 1050 Bruxelles
un brevet d'invention pour NOUVEAU PROCEDE DE PREPARATION DE (D-TRP 6)-LHRH ET
COMPLEXE DE RESINE BENZHYDRYLAMINIQUE ET DE PEPTIDE.(INV.: Fabrizio Niccolai)

qu'il(elle)(s) déclare(nt) avoir fait l'objet d'une
(des) demande(s) de brevet déposée(s)
en/au(x) ITALIE le 06 Décembre 1985, no ITA 2312185

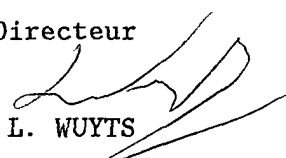
ARTICLE 2.- Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et périls, sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit de l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention (mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui de sa demande de brevet.

Bruxelles, le 15 Avril 1986

PAR DELEGATION SPECIALE

Le Directeur


L. WUYTS

90458

MEMOIRE DESCRIPTIF

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

formée par

PHIDEA s.r.l.

pour :

"Nouveau procédé de préparation de [D-Trp⁶]-LHRH et complexe de résine benzhydrylaminique et de peptide"

Priorité d'une demande de brevet en Italie déposée le 6 décembre 1985, sous le n° 23121 A/85

Inventeur: Fabrizio NICCOLAI



"Nouveau procédé de préparation de [D-Trp⁶]-LHRH et complexe de résine benzhydrylaminique et de peptide".

La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation de [D-Trp⁶]-LHRH, ainsi qu'un nouveau complexe de résine-peptide utile dans ce procédé de préparation.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé de préparation de [D-Trp⁶]-LHRH en phase solide sur une résine benzhydrylaminique, ce procédé étant caractérisé en ce que les aminoacides particuliers protégés sont chargés deux fois sur le support polymère grâce à une double condensation, en ce que le radical hydroxyle de la sérine est protégé grâce à un groupe benzyle, le radical hydroxyle de la tyrosine grâce à un groupe 2,6-dichlorobenzyle, le groupe guanidinique de l'arginine grâce à un groupe tosyle, le noyau indolique du L- et D-tryptophane grâce à un groupe formyle, et l'azote-~~tr~~ du noyau imidazolique de l'histidine grâce à un groupe benzyloxyméthyle, et en ce que la suppression finale de la protection des chaînes latérales et la séparation du peptide à partir du support polymère sont réalisés grâce à de l'acide fluorhydrique d'abord à basse concentration, puis à haute concentration.

Il est connu que le [D-Trp⁶]-LHRH, dont le nom chimique est L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-propylglycinamide est utile en médecine aussi bien pour des buts de diagnostic que pour des besoins thérapeutiques.

Suivant les procédés connus de préparation de [D-Trp⁶]-LHRH, la protection des groupes fonctionnels qui ne sont pas impliqués dans la formation du groupement peptidique, la suppression finale de la protection et la séparation du peptide à partir du support polymère présentent des désavantages bien connus qui se reflètent sur les rendements.

Le procédé de la présente invention évite en grande partie les inconvénients susdits et permet de ce fait d'obtenir des rendements globaux, aussi bien chez le premier aminoacide que chez la résine, qui sont supérieurs à ceux que l'on peut obtenir par les procédés connus (brevet belge n° 842.857).

D'une manière générale, les abréviations utilisées dans la présente description pour désigner des aminoacides et les groupes protecteurs sont ceux qui sont recommandés par la Commission IUPAC-IUB pour la Nomenclature Biochimique (voir Eur. J. Biochem 138, 9-37; 1984). A titre d'exemple, p-Glu, His, Trp, Ser, Tyr, D-Trp, Leu, Arg, Pro et Gly désignent respectivement des "restes" de 5-oxo-L-proline (acide L-pyroglutamique), de L-histidine, de L-tryptophane, de L-sérine, de L-tyrosine, de D-tryptophane, de L-leucine, de L-arginine, de L-proline et de glycine. Le terme "reste" désigne des radicaux dérivés des alpha-aminoacides correspondants par élimination du radical hydroxyle du groupe carboxylique et d'un atome d'hydrogène du groupe aminique.

Les autres abréviations utilisées dans la présente description sont :

AcOH = acide acétique, Boc = t-butyloxycarbonyl; Bom = benzyloxyméthyle; n-BuOH = n-butanol; Bzl = benzyle; Cl₂-Bzl = 2,6-dichlorobenzyle; DCC = N,N'-dicyclohexylcarbodiimide; DMF = diméthylformamide; For = formyle; HOBt = 1-hydroxybenzotriazole; MeOH = méthanol; i-PrOH = isopropanol; TEA = triéthylamine; TFA = acide trifluoroacétique; Tos = tosyl.

En ce qui concerne la synthèse des peptides en phase solide, on se référera à la bibliographie en la matière, par exemple à G. Barany et R.D. Merryfield, "Solid-phase peptide synthesis", dans The Peptides-Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 2 publié par E. Gross et J. Meienhofer, Academic Press, New York, 1980; et J.M. Stewart et J.D. Young, "Solid-phase peptide synthesis", Seconde Edition, Pierce Chemical Company, Rockford, Ill, 1984.

Suivant la présente invention, le décapeptide produit est formé phase après phase, sur un copolymère de benzhydrylamine-polystyrène-1%-divinylbenzène. Durant toute la synthèse, on utilise

✓

des N- α -t-butyloxycarbonyl-aminoacides. L'acide pyroglutamique est utilisé sous une forme non dérivée. Tous les groupes fonctionnels qui ne sont pas impliqués dans la formation d'une liaison peptidique sont protégés grâce à des groupes protecteurs appropriés : le radical hydroxyle de la sérine et de la tyrosine respectivement grâce à un
5 groupe benzyle et grâce à un groupe 2,6-dichlorobenzyle [Ser (Bzl) et Tyr(Cl₂Bzl)]; le groupe guanidinique de l'arginine grâce à un groupe tosylo [Arg(Tos)]; le noyau indolique du L- et D- tryptophane grâce à un groupe formyle [Trp(For) et D-Trp-(For)]; et l'azote- π du noyau
10 imidazolique de l'histidine grâce à un groupe benzyloxyméthyle [His(π -Bom)].

Les groupes protecteurs susdits sont stables dans les conditions de l'hydrolyse acide que l'on utilise pour débloquer les groupes protecteurs du groupement alpha-aminique (Boc) dans chaque
15 phase de la synthèse, ils ne sont en outre pas séparés dans les conditions de la condensation et sont par contre écartés facilement à la fin de la synthèse. Les condensations sont effectuées grâce à du DCC dans du chlorure de méthylène ou du DMF. Le premier Boc- aminoacide est incorporé sur le support solide en utilisant un excès de trois fois
20 et en effectuant une seconde condensation avec un excès de deux fois. Les groupes aminiques de la résine benzhydrylaminique, qui n'ont pas réagi, sont désactivés grâce à une réaction avec du N-acétylimidazole en excès de dix fois. L'incorporation du reste du premier aminoacide est déterminée par l'analyse de l'acide sur un échantillon
25 de la résine après hydrolyse avec de l'acide chlorhydrique 12N/acide propionique pendant 2 heures à 130°C. Le programme suivant consiste essentiellement à alterner des suppressions de protection par Boc avec du TFA à 50% dans du chlorure de méthylène et des condensations avec un agent de condensation, tel que le DCC, seul ou en présence
30 de HOBt. L'incorporation complète de l'acide est contrôlée grâce à l'essai à la ninhydrine de Kaiser (E. Kaiser et col., Anal. Biochem. 34, 595; 1970). La suppression finale de la protection de la chaîne latérale et la séparation du peptide depuis le support polymère se réalisent grâce au procédé récent à l'acide fluorhydrique à basse et
35 à haute concentration (J.P. Tam. et col., J. Am. Chem. Soc. 105,

6422; 1983). Le peptide est ensuite extrait de la résine avec de l'acide acétique aqueux et purifié grâce à une succession de processus chromatographiques.

La nouveauté de la présente synthèse réside aussi bien dans le choix approprié des groupes protecteurs de la chaîne latérale que dans les conditions opératoires pour les écarter. La protection du noyau indolique du tryptophane grâce à une formylation empêche aussi bien la dégradation oxydante que l'alkylation électrophile du noyau indolique durant les traitements répétés avec des acides; l'introduction du groupe benzyloxyméthyle sur l'azote- π du noyau imidazolique de l'histidine empêche la racémisation de l'acide aminé durant l'activation au cours de la condensation, habituellement observée avec d'autres groupes protecteurs. (T. Brown et J.H. Jones, J.C.S. Chem. Comm., 1981, 468).

A la fin des diverses phases de condensation, on obtient le complexe de résine benzhydrylaminique/peptide protégé, de la formule



où R est la résine de support, et

X est l'ensemble L-pyroglutamyl-L-histidyl-(π -benzyloxyméthyl)-L-tryptophyl(formyl)-L-séryl(benzyl)-L-tyrosyl(2,6-dichlorobenzyl)-D-tryptophyl(formyl)-L-leucyl-L-arginyl(tosyl)-L-prolylglycyle.

Ce complexe est nouveau et constitue de ce fait un objectif final de la présente invention.

Tous les groupes protecteurs sont ensuite écartés de manière appropriée grâce au procédé à l'acide fluorhydrique à basse et à haute concentration et on évite ainsi l'alkylation électrophile de la tyrosine. A cause de la réduction complète des réactions secondaires et de la formation de produits collatéraux, la purification est plus simple et les rendements sont meilleurs qu'ils ne le sont avec

✓

les autres procédés connus.

Les Exemples suivants illustrent la présente invention sans pour autant la limiter.

EXEMPLE 1.

5 L-Pyroglutamyl-L-histidyl(π -benzyloxyméthyl)-L-tryptophyl (formyl)-
L-séryl(benzyl)-L-tyrosyl(2,6-dichlorobenzyl)-D-tryptophyl(formyl)-
L-leucyl-L-arginyl(tosyl)-L-propylglycyl-résine benzhydrylaminique.

On met 3 g de chlorhydrate de résine benzhydryl-
aminique (0,8 mmole/g) dans un réacteur automatique pour la synthèse
10 des peptides et on fait gonfler ce produit en l'agitant dans 30 ml
de chlorure de méthylène pendant 1 heure. La résine est ensuite
neutralisée avec du TEA à 10% dans du chlorure de méthylène grâce
à un lavage préalable pendant 0,5 minute, suivi d'un traitement
pendant 2 minutes. Le TEA est ensuite écarté avec du chlorure
15 de méthylène (3 x 1 minute), ceci étant suivi par des lavages au
méthanol (3 x 1 minute) et au chlorure de méthylène (6 x 1 minute).

On ajoute un excès de trois fois de Boc-Gly-OH (1,26 g; 7,2 mmoles)
dans 15 ml de chlorure de méthylène et le mélange est mis en équilib-
re pendant 5 minutes sous agitation; on ajoute 7,2 ml de DCC 1M
20 dans du chlorure de méthylène et le réacteur est soumis à agitation
à température ambiante pendant 2 heures. La résine est lavée trois
fois pendant 1 minute chaque fois, avec du chlorure de méthylène,
du méthanol et du chlorure de méthylène, une fois pendant 2 minutes
avec du TEA à 10% dans du chlorure de méthylène, trois fois pendant
25 1 minute respectivement avec du chlorure de méthylène, du méthanol
et du chlorure de méthylène. L'opération tout entière est répétée
encore une fois avec un excès de deux fois de Boc-Gly-OH et du
DCC. Un échantillon de 5 mg de Boc-Gly-résine soumis à analyse
de l'acide aminé, a montré une incorporation de 0,65 mmole de Gly/g
30 de résine.

Cette valeur est utilisée comme base pour tous
les calculs ultérieurs. Les groupes aminiques qui n'ont pas réagi
sont désactivés grâce à une réaction avec un excès de dix fois de
N-acétylimidazole (2,18 g; 24 mmoles) dans 30 ml de chlorure de
35 méthylène pendant 1 heure à la température ambiante. Tous les

aminoacides suivants sont ajoutés avec un programme de double condensation semblable, ce programme variant en fonction du reste particulier (à moins d'indications contraires, dans le présent programme et dans le programme suivant, le volume des solvants et des réactifs est de 10 ml par g de résine).

Programme A.

<u>Phases</u>	<u>Réactifs et opérations</u>
1	Lavage avec CH_2Cl_2 (3 x 1 min)
2	TFA à 50% dans CH_2Cl_2 (1 x 5 min)
10 3	TFA à 50% dans CH_2Cl_2 (1 x 25 min)
4	Lavage avec i-PrOH (3 x 1 min)
5	Lavage avec CH_2Cl_2 (3 x 1 min)
6	TEA à 10% dans CH_2Cl_2 (1 x 5 min)
7	TEA à 10% dans CH_2Cl_2 (1 x 2 min)
15 8	Lavage avec CH_2Cl_2 (6 x 1 min)
9	Lavage avec MeOH (3 x 1 min)
10 10	Lavage avec CH_2Cl_2 (6 x 1 min)
11	DCC (3 équiv.) dans CH_2Cl_2 (3,5 ml/g de résine), équilibre (1 x 5 min)
20 12	Boc-aminoacide (3 équiv.) dans CH_2Cl_2 ou DMF à 2-10% dans CH_2Cl_2 , suivant la solubilité de l'aminoacide particulier (1 x 120 min)
25 13	Lavage avec DMF (3 x 1 min)
14	Lavage avec CH_2Cl_2 (3 x 1 min)
15	TEA à 10% dans CH_2Cl_2 (1 x 0,5 ml)
16	TEA à 10% dans CH_2Cl_2 (1 x 2 min)
17	Lavage avec CH_2Cl_2 (3 x 1 min)
30 18	Lavage avec MeOH (3 x 1 min)
19	Lavage avec CH_2Cl_2 (3 x 1 min)
20	Lavage avec DMF (3 x 1 min)
21	DCC (2 équiv.) dans CH_2Cl_2 (3,5 ml/g de résine), équilibre (1 x 5 min)
35	



- 22 Boc-aminoacide (2 équiv.) dans DMF
(7 ml/g de résine) (1 x 120 min)
- 23 Lavage avec DMF (3 x 1 min)
- 5 24 Lavage avec CH_2Cl_2 (3 x 1 min)
- 25 Lavage avec MeOH (3 x 1 min)

A la seule exception de l'histidine, le programme susdit est utilisé sans modifications pour les liaisons répétées des autres dérivés d'acides aminés, dans l'ordre suivant : Boc-Pro-OH, Boc-Arg(Tos)-OH, Boc-Leu-OH, Boc-D-Trp(For)-OH, Boc-Tyr(Cl_2 -Bzl)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Trp(For)-OH, Boc-His(α -Bom)-OH, pGlu.

Le dérivé protégé de l'histidine est introduit par le programme modifié suivant :

Programme B.

- | 15 | <u>Phases</u> | <u>Réactifs et opérations.</u> |
|----|---------------|---|
| | 1-10 | Comme dans A |
| | 11 | HOBt (3,3 équiv.) dans DMF
(3,5 ml/g de résine), équilibre
(1 x 5 min) |
| 20 | 12 | Boc-His(α -Bom)-OH (3 équiv.) dans DMF (7 ml/g de résine), équilibre
(1 x 5 min) |
| | 13 | DCC (3,3 équiv.) dans DMF
(3,5 ml/g de résine)
(1 x 120 min) |
| 25 | 14-21 | comme de 13 à 20 dans A |
| | 22 | HOBt (2,2 équiv.) dans DMF
(2,5 ml/g de résine), équilibre
(1 x 5 min) |
| 30 | 23 | Boc-His(α -Bom)-OH (2 équiv.) dans DMF (5 ml/g de résine), équilibre
(1 x 5 min) |
| | 24 | DCC (2,2 équiv.) dans DMF
(2,5 ml/g de résine), (1 x 120 min) |
| 35 | 25-27 | comme de 23 à 25 dans A |

Après séchage sous pression réduite, l'ensemble résine-décapeptide montre une augmentation de poids qui est voisine de la valeur théorique.

EXEMPLE 2.

5 L-pyroglutamyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-séryl-L-tyrosyl-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-L-prolylglycinamide :
[D-Trp⁶]-LHRH.

Un échantillon de 1 g de résine-décapeptide protégée, décrite dans l'Exemple 1, est agité avec un mélange de HF (10 ml), de sulfure de diméthyle (26 ml), de p-thiocrésol (2 ml) et de p-crésol (2 ml) pendant 2 heures à 0°C. Ensuite, l'acide fluorhydrique et le sulfure de diméthyle sont évaporés sous pression réduite et remplacés par de l'acide fluorhydrique (40 ml). Après 1 heure à 0°C, l'acide fluorhydrique est évaporé sous pression réduite et on écarte, avec de l'acétate d'éthyle (3 x 50 ml), le thiocrésol, le crésol et leurs produits de substitution. Le peptide ainsi séparé et débarrassé de ses protections est extrait avec de l'acide acétique à 30% (4 x 50 ml) et les extraits rassemblés sont traités avec une résine échangeuse d'ions AG3 x 4A (forme acétate) et lyophilisés pour donner 0,26 g (rendement de 65%) de produit brut. La purification est réalisée grâce à une chromatographie de partage sur du Sephadex G-25M en utilisant la phase supérieure d'un système éluant constitué de p-butanol/acide acétique/eau, 4/1/5. La colonne est équilibrée d'abord avec la phase inférieure et ensuite avec la phase supérieure. Les fractions de la colonne sont contrôlées grâce à une analyse HPLC; les fractions dont la pureté est supérieure à 90% sont rassemblées et lyophilisées dans l'eau. Le produit semi-pur est ensuite purifié grâce à une chromatographie HPLC préparatoire. On utilise un gradient d'acétate d'ammonium (0,1M, pH de 6) à 20-28% dans de l'acétonitrile sur une période d'environ 1,5 heure sur un support de silice à phase inversée C-18.

L'éluat est contrôlé à 210 nm et on récolte les fractions dont la pureté est supérieure à 99%. L'acétonitrile est écarté sous pression réduite et la portion aqueuse est lyophilisée deux fois dans l'eau. Le produit est finalement soumis à une filtration sur gel sur une colonne de Sephadex G-25 (2,5 x 200 cm) dans

de l'acide acétique à 10%. Les fractions dont la pureté est supérieure à 90% sont récoltées et lyophilisées. Le produit est lyophilisé à nouveau dans l'eau et desséché sous vide en présence de P_2O_5 pendant la nuit; on obtient 143 mg (rendement de 35%) de $[Trp^6]$ LHRH sous forme du diacétate. L'analyse des aminoacides (après hydrolyse avec de l'acide méthanesulfonique) a donné les résultats suivants:

5 Ser:0,94 (1); Glu: 1,02 (1); Pro: 1,02 (1); Gly: 1,00 (1); Leu: 0,99 (1); Tyr: 0,99 (1); His:1,00 (1); Arg: 0,99 (1); Trp : 2,02 (2).

10

15

20

25

30

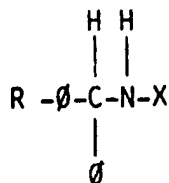
35

✓

REVENDICATIONS.

1. Procédé de préparation de [D-Trp⁶]-LHRH en phase solide sur une résine benzhydrylaminique, caractérisé en ce que les aminoacides protégés sont introduits sur le support polymère avec une double condensation, en ce que le radical hydroxyle de la sérine est protégé grâce à un groupe benzyle, le radical hydroxyle de la tyrosine grâce à un groupe 2,6-dichlorobenzyle, le groupe guanidinique de l'arginine grâce à un groupe tosyle, le noyau indolique du L- et D-tryptophane grâce à un groupe formyle et l'azote- π du noyau imidazolique de l'histidine grâce à un groupe benzyloxyméthyle, et en ce que la suppression finale de la protection des chaînes latérales et la séparation du peptide par rapport au support polymère s'effectuent grâce à un traitement ultérieur à l'acide fluorhydrique à basse et à haute concentration.

2. Complexe de résine benzhydrylaminique/peptide protégé, de formule :



dans laquelle R désigne la résine de support et

X représente l'ensemble L-pyroglutamyl-L-histidyl(π -benzyloxyméthyl)-L-tryptophyl(formyl)-L-séryl(benzyl)-L-tyrosyl(2,6-dichlorobenzyl)-D-tryptophyl(formyl)-L-leucyl-L-arginyl(tosyl)-L-prolylglycyle.

Bruxelles, le 21 mars 1986

P. Pon. de PHIDEA s.r.l.

P. Pon. de Bureau GEVERS & A,