(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 786 225**

(51) Int. CI.:

C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2015 PCT/US2015/024347**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15154031**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2015 E 15773570 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3126373**

(54) Título: **Método para preparar AMG 416**

(30) Prioridad:

03.04.2014 US 201461974899 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2020

(73) Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320, US

(72) Inventor/es:

BEZEMER, JEROEN;
CHEN, YING;
CROCKETT, RICHARD;
CROSSLEY, KEVIN;
CUI, SHENG;
HUANG, LIANG;
JONES, SIAN;
LOWER, ASHER y
RANGANATHAN, KRISHNAKUMAR

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María 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

Método para preparar AMG 416

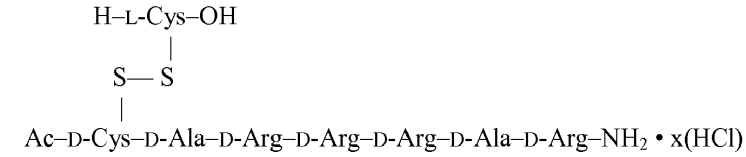
CAMPO

La presente descripción se refiere al campo de la síntesis de polipéptidos, y más particularmente a la síntesis de AMG 416, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

ANTECEDENTES

AMG 416 es un agonista de péptido selectivo sintético de ocho aminoácidos del receptor sensor de calcio. Se está desarrollando como un tratamiento intravenoso del hiperparatiroidismo secundario (SHPT) en pacientes en hemodiálisis con enfermedad renal crónica - trastorno mineral y óseo (CKD-MBD).

La sal de hidrocloruro de AMG 416 tiene la estructura química:



(SEQ ID NO:1)

La cadena principal tiene 7 aminoácidos, todos en la configuración D. El resto de cisteína de la cadena lateral está en la configuración L. La fórmula molecular de AMG 416 (base libre) es $C_{38}H_{73}N_{21}O_{10}S_2$, y tiene una masa molecular promedio calculada de 1048,3 Da.

En la Publicación de Patente Internacional nº WO 2011/014707 se describe AMG 416 y un método para su preparación. Como se describe en la Publicación de Patente Internacional nº WO 2011/014707, AMG 416 puede ensamblarse mediante síntesis en fase sólida a partir de los D-aminoácidos correspondientes protegidos con Fmoc. Después de la escisión de la resina, el material puede tratarse con Boc-L-Cys(NPyS)-OH para formar el enlace de disulfuro. El grupo Boc puede luego eliminarse con trifluoroacetato (TFA), y el producto resultante puede purificarse por cromatografía de líquidos de alta presión de fase inversa (HPLC) y aislarse como la forma de sal de TFA por liofilización. La sal de TFA se puede convertir en una sal farmacéuticamente aceptable llevando a cabo un procedimiento de intercambio de sal posterior. Tales procedimientos son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, una técnica de intercambio iónico, opcionalmente seguida de purificación del producto resultante (por ejemplo, por cromatografía de líquidos de fase inversa u ósmosis inversa).

Existe la necesidad de un método eficiente para producir AMG 416, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, AMG 416 HCl), y particularmente uno apropiado para la fabricación a escala comercial.

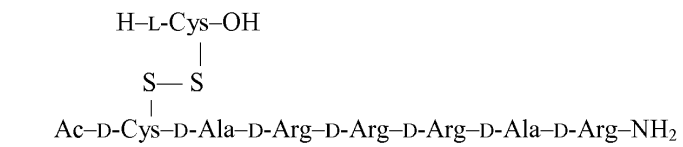
El documento WO 2011/014707 describe un conjugado compuesto por el péptido carrrar en el que el péptido se conjuga en su resto N-terminal con un resto Cys, y su uso en el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario.

Castell et al. (1979) Helvetic Chimica Acta describen la utilidad del cloruro de 2-piridinsulfenilo (PS-Cl) para desproteger y activar simultáneamente el grupo mercapto de cisteína, y de péptidos de cisteína preliminares para la formación de enlaces de disulfuro.

SUMARIO

En vista de los problemas descritos anteriormente, es un objetivo de la descripción proporcionar un método para preparar AMG 416, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, entre otras cosas.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para preparar AMG 416 como se expone en la fórmula (I):



comprendiendo dicho método:

poner en contacto un péptido que tiene la estructura de Ac-D-Cys(SPy)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2 (SEQ ID NO:4) con L-Cys para producir un producto conjugado de fórmula (I).

Según otro aspecto, se proporciona un método para preparar AMG 416 como se expone en la fórmula (I):



comprendiendo dicho método:

purificar por HPLC un péptido que tiene la estructura Ac-D-Cys(SPy)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2 (SEQ ID NO:4) en una disolución de ácido trifluoroacético (TFA);

realizar un intercambio de disolvente por destilación azeotrópica sobre el péptido purificado; y

poner en contacto el péptido purificado con L-Cys para producir un producto conjugado de fórmula (I).

También se describe aquí un método para preparar AMG 416, comprendiendo el método: proporcionar un péptido unido a resina que tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en Fmoc-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-[Resina] (SEQ ID NO:2) y Ac-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-[Resina] (SEQ ID NO:3); escindir el péptido del soporte sólido; y activar la cadena lateral del resto de D-Cys del péptido escindido.

En una o más realizaciones de esta descripción, las etapas de escisión y activación se producen en el mismo recipiente.

En una o más realizaciones adicionales, el péptido unido a resina se pone en contacto con una disolución que comprende agua, ácido trifluoroacético, triisopropilsilano y disulfuro de dipiridilo.

En un aspecto, se proporciona un método para preparar AMG 416, comprendiendo el método: proporcionar un péptido que tiene una estructura de Ac-D-Cys(SPy)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2 (SEQ ID NO:4); y poner en contacto el péptido con L-Cys para producir un producto conjugado.

En algunas realizaciones, el péptido se pone en contacto con una disolución acuosa que comprende L-Cys y ácido trifluoroacético.

En alguna realización adicional, el método comprende además liofilizar el producto conjugado.

En aún algunas otras realizaciones, el método comprende además poner en contacto el producto conjugado con una disolución acuosa que comprende alcohol isopropílico (IPA) y ácido clorhídrico (HCl), produciendo así un precipitado que comprende AMG 416 HCl.

En aún una o más realizaciones adicionales, el método comprende además purificar el precipitado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

También se describe aquí un método para preparar AMG 416, comprendiendo el método: proporcionar un péptido unido a resina que tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en Fmoc-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-[Resina] (SEQ ID NO:2) y Ac-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-[Resina] (SEQ ID NO:3); escindir el péptido del soporte sólido, es decir, para proporcionar un péptido sin soporte, y activar la cadena lateral del resto de D-Cys del péptido sin soporte para generar un intermedio AMG 416 SPy (en el que SPy es 2-piridinsulfenilo o S-Pyr), disolver el intermedio AMG 416 SPy en un TFA al 0,1% acuoso (disolución de ácido trifluoroacético), y purificar el derivado de AMG 416 SPy por HPLC.

En algunas realizaciones, el método comprende además la destilación azeotrópica del intermedio AMG 416 SPy, para de ese modo efectuar un intercambio de disolvente para producir una disolución del AMG 416 SPy en el nuevo disolvente, por ejemplo, agua y alcohol isopropílico.

En aún algunas realizaciones adicionales, el método comprende además poner en contacto la disolución de alcohol isopropílico - agua del AMG 416 SPy, en algunas realizaciones en forma de su sal de trifluoroacetato, con una disolución acuosa que comprende L-Cys.

También se describe aquí un método para preparar H-D-Arg(Pbf)-OH, es decir, un material de partida adecuado para algunos de los métodos sintéticos proporcionados aquí.

En algunas realizaciones de la descripción, el método comprende convertir Boc-D-Arg-OH en Boc-D-Arg(Pbf)-OH en presencia de NaI (yoduro de sodio). En aún algunas realizaciones adicionales, el yoduro de sodio está presente a una concentración de alrededor de 5% en moles.

En algunas realizaciones adicionales de la descripción, el método comprende además convertir Boc-D-Arg(Pbf)-OH en D-Arg(Pbf)-OH, y cristalizar el D-Arg(Pbf)-OH en un sistema de disolvente de IPA/agua.

Las realizaciones adicionales de los métodos descritos aquí serán evidentes a partir de la siguiente descripción, ejemplos y reivindicaciones. Como se puede apreciar en la descripción anterior y siguiente, todas y cada una de las características descritas aquí, y todas y cada una de las combinaciones de dos o más de tales características, se incluyen dentro del alcance de la presente descripción siempre que las características incluidas en dicha combinación sean no mutuamente inconsistentes. Además, cualquier característica o combinación de características puede excluirse específicamente de cualquier realización de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra la estructura química de AMG 416 (Ac-D-Cys(L-Cys-OH)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2) (SEQ ID NO:1).

La FIG. 2 muestra la estructura química de la resina Rink Amide AM y Ac-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-Resina (SEQ ID NO:3).

La FIG. 3 muestra un esquema de reacción en el que el producto intermedio SPy (Ac-D-Cys(SPy)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2) (SEQ ID NO:4) se forma a partir de la resina de peptidilo (Ac-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-NH-Resina) (SEQ ID NO:3).

La FIG. 4 muestra un esquema de reacción en el que se forma una sal de TFA de AMG 416 a partir del intermedio SPy ($AA^{1-7(SPy)}$).

La FIG. 5 muestra un esquema de reacción en el que la sal de HCl de AMG 416 se forma a partir de la sal de TFA de AMG 416.

La FIG. 6 muestra un esquema de reacción en el que Boc-D-Arg(Pbf)-OH se forma a partir de Boc-D-Arg-OH.

La FIG. 7 muestra un esquema de reacción en el que D-Arg(Pbf)-OH se forma a partir de Boc-D-Arg(Pbf)-OH.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente descripción se describirá ahora más completamente a continuación.

En un caso en el que el mismo término se define tanto en una publicación, patente o solicitud de patente a la que se hace referencia aquí como en la presente descripción, la definición en la presente descripción representa la definición de control.

Los encabezados de sección utilizados aquí son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto descrita.

A menos que se defina lo contrario aquí, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente solicitud tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos normales en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán plurales, y los términos plurales incluirán el singular.

Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y las técnicas de, biología molecular y química de proteínas descritas aquí son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente solicitud se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique lo contrario. Véanse, por ejemplo, Laszlo, Peptide-Based Drug Design: Methods and Protocols, Humana Press (2008); Benoiton, Chemistry of Peptide Synthesis, CRC Press (2005); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992). Las técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante, como se logra comúnmente en la técnica o como se describe aquí. La terminología utilizada en conexión con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética, y química médica y farmacéutica descritas aquí son las bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas estándar se pueden usar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación, y suministro farmacéuticos, y tratamiento de pacientes.

Debe entenderse que esta descripción no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares, etc., descritos aquí, y como tal, puede variar. La terminología utilizada aquí tiene el propósito de describir realizaciones

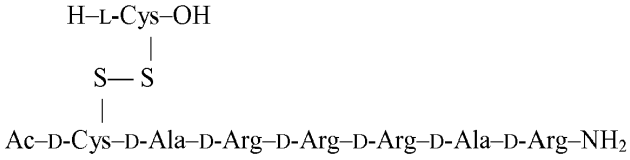
particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de lo descrito, que se define únicamente por las reivindicaciones.

La expresión “alrededor de”, particularmente en referencia a una cantidad dada, pretende abarcar desviaciones de más o menos cinco por ciento.

I. Definiciones generales

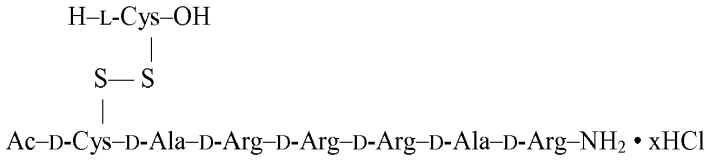
Los artículos “un” y “una” se usan aquí para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo, a menos que se indique específicamente lo contrario. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

El término “AMG 416”, también conocido como etelcalcetida, anteriormente conocido como velcalcetida o KAI-4169, se refiere a un compuesto que tiene el nombre químico: disulfuro de N-acetil-D-cisteinil-D-alanil-D-arginil-D-arginil-D-arginil-D-alanil-D-arginamida con L-cisteína, que tiene la siguiente fórmula estructural:



La referencia a AMG 416, o a cualquier compuesto o fragmento, intermedio o precursor de AMG 416, como se describe aquí, pretende abarcar formas neutras, sin carga, del mismo, así como sus sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables.

Las expresiones “hidrocloruro de AMG 416” y “AMG 416 HCl” son intercambiables, y se refieren a una forma de sal de hidrocloruro de AMG 416 que tiene la siguiente fórmula estructural:



Generalmente, x tiene un valor de 3-5 (por ejemplo, 3, 4 o 5).

“Sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a una forma de sal de un compuesto que tiene al menos un grupo adecuado para la formación de sal que no causa efectos toxicológicos adversos significativos a un paciente. La expresión “sal farmacéuticamente aceptable” puede, en un aspecto, referirse a las sales de adición de ácidos inorgánicos u orgánicos, relativamente no tóxicas, de los compuestos como se proporcionan aquí, por ejemplo AMG 416, así como fragmentos, intermedios, precursores y similares de AMG 416 que poseen uno o más grupos de amina ionizables. Las sales representativas incluyen las sales de hidrobromuro, hidrocloruro, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato, y laurilsulfonato, y similares. (Véase, por ejemplo, Berge et al. (1977) “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 66:1-19). Las formas de sales farmacéuticamente aceptables adecuadas adicionales, se pueden encontrar en, por ejemplo, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, Weinheim/Zürich:Wiley-VCH/VHCA, 2002; P. H. Stahl and C. G. Wermuth, Eds.

Como se usan aquí, los términos “aminoácido” y “resto” son intercambiables, y cuando se usan en el contexto de un péptido o polipéptido, se refieren tanto a aminoácidos naturales como sintéticos, así como a análogos de aminoácidos, miméticos de aminoácidos, y aminoácidos no naturales que son químicamente similares a los aminoácidos naturales. Un “aminoácido libre” o “grupo amino libre” se refiere a un aminoácido, fragmento de péptido, o péptido que tiene un grupo amino que está en forma de $-NH_2$, es decir, no está protegido.

La frase “grupo protector” o “PG”, como se usa aquí, se refiere a un sustituyente o sustituyentes temporales que protegen un grupo funcional potencialmente reactivo de una transformación química no deseada. Los ejemplos de tales grupos protectores incluyen ésteres de ácidos carboxílicos, éteres silílicos de alcoholes, y acetales y cetales de aldehídos y cetonas, respectivamente. Véanse, por ejemplo, Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. Protective Groups in Organic Synthesis, 4ª ed.; Wiley: New York, 2007; Isidro-Llobet, A., et al., Amino Acid-Protecting Groups, Chem. Rev 2009, 109, 2455-2504. Los aminoácidos reactivos o fragmentos peptídicos como se describen aquí a menudo contienen adecuadamente uno o más grupos protectores en funcionalidades que no son la diana de una transformación química en cuestión. Los grupos protectores ejemplares incluyen, por ejemplo, carboxibencilo, también denominado benciloxicarbonilo (“Cbz” o “Z”), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf), terc-butiloxicarbonilo (Boc), tritilo (Trt), éster metílico (OMe), 2-

piridinsulfenilo (SPy o S-Pyr), amida, y similares. En las estructuras abreviadas proporcionadas aquí, -NH_2 en el extremo C significa un grupo protector de amida (~$C(O)NH_2$), "H" en el extremo N se refiere a un grupo amino libre, y la designación de un grupo protector en los paréntesis significan que el grupo protector está en el nitrógeno δ de ornitina.

Como se usa aquí, la expresión "agente eliminador de protección" o "agente desprotector" se puede usar indistintamente, y es un reactivo químico para eliminar agentes protectores de amino conectados en aminoácidos, y el agente protector de amino puede ser bien conocido en el campo, tal como, pero no limitado a Fmoc y Boc.

Como se usan aquí, las expresiones "agente de acoplamiento", "agente de condensación", "agente de activación", "agente de activación de condensación", usados indistintamente aquí, se refieren a un reactivo químico que facilita la reacción de un grupo amino de un aminoácido con un grupo carboxilo de otro aminoácido para formar un enlace peptídico. Los agentes de acoplamiento ejemplares son bien conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, carbodiimidas tales como N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), diciclohexilcarbodiimida (DCC), hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU), tetrafluoroborato de [benzotriazol-1-iloxi(dimetilamino)metiliden]-dimetilazanio (TBTU), hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio, hexafluorofosfato de O- (benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), y N,N-diisopropiletilamina (DIPEA). Véase, por ejemplo, El-Faham, A. y Albericio, F., "Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup", Chem. Rev. 2011, 111, 6557-6602. Tales compuestos están fácilmente disponibles de vendedores comerciales.

Como se usa aquí, la expresión "agente de escisión" se refiere a un agente químico que puede separar un péptido unido a una resina de la resina. Los agentes de escisión son bien conocidos por los expertos normales en la técnica, e incluyen una disolución ácida que comprende disolución de TFA y HCl.

El término "tratando" se refiere a cualquier indicio de éxito en el tratamiento o mejora de una lesión, patología o afección, incluyendo cualquier parámetro objetivo o subjetivo, tal como la disminución; remisión; disminución de signos o síntomas, o que hace a la lesión, patología o afección más tolerable para el paciente; ralentización en la velocidad de degeneración o disminución; que hace al punto final de degeneración menos debilitante; mejora del bienestar físico o mental del paciente. El tratamiento o mejora de los signos o síntomas puede basarse en parámetros objetivos o subjetivos, incluyendo los resultados de un examen físico. Por ejemplo, ciertos métodos presentados aquí tratan con éxito SHPT en pacientes de hemodiálisis con CKD-MBD disminuyendo la hormona paratiroidea intacta (iPTH) en suero.

Una "cantidad eficaz" generalmente es una cantidad suficiente para reducir la gravedad y/o frecuencia de los síntomas, eliminar los síntomas y/o la causa subyacente, prevenir la aparición de síntomas y/o su causa subyacente, y/o mejorar o remediar el daño que resulta o está asociado con el estado de la enfermedad (por ejemplo, niveles elevados de PTH). Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para remediar un estado o síntomas de la enfermedad, particularmente un estado o síntomas asociados con el estado de la enfermedad, o de otra manera prevenir, dificultar, retrasar o revertir la progresión del estado de la enfermedad o cualquier otro síntoma indeseable asociado con la enfermedad de cualquier manera que sea. El efecto terapéutico completo no ocurre necesariamente mediante la administración de una dosis, y puede ocurrir solo después de la administración de una serie de dosis. De este modo, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz en una o más administraciones.

Las expresiones "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usan aquí, significan una cantidad que provoca una respuesta biológica o médica en un sistema de tejido, animal o ser humano buscado por un investigador, médico u otro clínico, que incluye el alivio o la mejora de los signos o síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando, es decir, una cantidad de velcalcetida que respalda un nivel observable de una o más respuestas biológicas o médicas deseadas, por ejemplo la disminución de la iPTH.

Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" son intercambiables, y se refieren a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos también se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son análogos o miméticos de un aminoácido natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos naturales. Los términos también pueden abarcar polímeros de aminoácidos que han sido modificados, por ejemplo mediante la adición de restos de hidratos de carbono para formar glicoproteínas, o fosforilados. Los péptidos, polipéptidos y proteínas pueden producirse mediante una síntesis en fase líquida o síntesis en fase sólida, o mediante una célula genéticamente modificada o recombinante, y comprenden moléculas que tienen la secuencia de aminoácidos.

Una "variante" de un péptido o polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más restos de aminoácidos se insertan, eliminan y/o sustituyen en la secuencia de aminoácidos con respecto a otra secuencia de polipéptidos. Las variantes incluyen proteínas de fusión.

Un "derivado" de un péptido o polipéptido es un péptido o polipéptido que se ha modificado químicamente de alguna manera distinta de las variantes de inserción, supresión o sustitución, por ejemplo mediante conjugación a otro resto químico. Dicha modificación puede incluir la adición covalente de un grupo a los terminales amino y/o carboxi del

péptido o polipéptido, por ejemplo acetilación del término amino y/o amidación del término carboxi de un péptido o polipéptido.

El término “aminoácido” incluye su significado normal en la técnica. Los veinte aminoácidos naturales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase, Immunology-A Synthesis, 2ª Edición, (E. S. Golub and D. R. Green, eds.), Sinauer Associates: Sunderland, Mass. (1991). Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los 19 aminoácidos convencionales (excepto la glicina), los aminoácidos no naturales tales como los aminoácidos [alfa]-,[alfa]-disustituidos, los N-alquilaminoácidos y otros aminoácidos no convencionales, también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos, y están incluidos en el término “aminoácido”. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: homocisteína, ornitina, 4-hidroxiprolina, [gamma]-carboxiglutamato, [épsilon]-N,N,N-trimetil-lisina, [épsilon]-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, [sigma]-N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptidos usada aquí, la dirección de la izquierda es la dirección del amino terminal, y la dirección de la derecha es la dirección del carboxilo terminal, según el uso y la convención estándar.

Un “sujeto” o “paciente”, como se usa aquí, puede ser cualquier mamífero. En una realización típica de la descripción, el sujeto o paciente es un ser humano.

El término “c.s.” significa añadir una cantidad suficiente para lograr una función deseada, por ejemplo para llevar una disolución hasta el volumen deseado (es decir, 100%).

II. Realizaciones

En una o más realizaciones, el hidrocloruro de AMG 416 se prepara mediante una serie de etapas del procedimiento de la siguiente manera: las etapas ejemplares incluyen la síntesis peptídica en fase sólida de un fragmento lineal de siete miembros (etapa I) de AMG 416, seguido de la escisión de la cadena peptídica de la resina con desprotección de cadena lateral concomitante y activación de cisteína (etapa II), seguido de conjugación in situ de la cadena peptídica con L-Cys (formación de disulfuro) para proporcionar AMG 416 bruto (etapa III), seguido, en algunas realizaciones, inmediatamente, de HPLC preparativa y liofilización para proporcionar sal de TFA de AMG 416 purificada (etapa IV). La etapa IV es seguida de un intercambio de sal posterior (TFA a HCl) por precipitación, y en algunas realizaciones, seguida de microfiltración y liofilización para proporcionar la sal de hidrocloruro de AMG 416 purificada (etapa V).

Síntesis peptídica en fase sólida

El fragmento lineal de siete miembros de AMG 416 puede sintetizarse por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo la síntesis peptídica en fase sólida (SPPS). Como se usa aquí, la expresión “síntesis en fase sólida” o “síntesis peptídica en fase sólida” se refiere a un método, bien conocido por un experto en la técnica, en el que una cadena peptídica en crecimiento está unida a un soporte sólido. La síntesis en fase sólida típicamente comprende las etapas de: (i) unir covalentemente un primer aminoácido (cuyo grupo amino está bloqueado o “protegido”) a un portador en fase sólida; (ii) eliminar el grupo protector del grupo amino usando un agente desprotector; (iii) activar el carboxilo de un segundo aminoácido (cuyo grupo amino está bloqueado) y poner en contacto el segundo aminoácido con el primer aminoácido unido al portador en fase sólida de manera que se obtenga un dipéptido (cuyo grupo amino está bloqueado); (iv) repetir las etapas de formación del enlace peptídico y, por lo tanto, la cadena peptídica se extiende desde el terminal C al terminal N; y (v) eliminar el grupo protector del grupo amino y separar la cadena peptídica del portador en fase sólida con un agente de escisión para producir un péptido.

Las técnicas adecuadas de síntesis en fase sólida son bien conocidas en la técnica, e incluyen las descritas en Merrifield, en Chem. Polypeptides, p. 335-61 (Katsoyannis and Panayotis eds. 1973); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149 (1963); Davis et al., Biochem. Intl. 10:394-414 (1985); Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis (1969); patente U.S. nº 3.941.763; Finn et al., The Proteins, 3ª ed., vol. 2, p. 105-253 (1976); y Erickson et al., The Proteins, 3ª ed., vol. 2, p. 257-527 (1976). Véanse también Houben-Weyl, Methods of Organic Chemistry. Volúmenes Suplementarios Adicionales a la 4ª Ed., Vol E22A, “Synthesis of Peptides and Peptidomimetics”, Editor Jefe M. Goodman. Georg Thieme Verlag: Stuttgard y New York. 2002, p. 685-877; Chan, W.C., White, P.D., “Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach”. Oxford University Press, (200), p. 9-109. La síntesis en fase sólida es típicamente una técnica preferida para obtener péptidos individuales tales como AMG 416, ya que a menudo es uno de los métodos más rentables para obtener péptidos pequeños.

En algunas realizaciones, el fragmento lineal de la cadena principal de AMG 416 se ensambla utilizando protocolos estándar de síntesis peptídica en fase sólida que emplean una estrategia de protección Fmoc y, por ejemplo, una resina Rink amide (RAM) tal como la disponible de Sigma Aldrich, para proporcionar la amida enlazada a la resina en el término C, junto con acetilación del término N peptídico. En algunas otras realizaciones, se pueden usar otras resinas y enlazadores (por ejemplo, resina Ramage amide AM, también denominada resina enlazadora de amida tricíclica). El ensamblaje del fragmento lineal de la cadena principal puede comprender las etapas de: (i) mezclar una resina Fmoc-Rink amide AM con un agente desprotector para obtener una resina Rink amide AM; (ii) condensar Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH con la resina Rink amide AM para obtener una resina Fmoc-D-Arg(Pbf)-Rink amide AM; (iii)

repetir la desprotección de Fmoc en la etapa (i) y la condensación entre un aminoácido y un polipéptido en la resina en la etapa (ii) para cada resto de aminoácido restante del fragmento lineal de la cadena principal de AMG 416, procediendo desde el C-terminal al N-terminal (por ejemplo, usando Fmoc-D-Cys(Trt)-OH, Fmoc-D-Ala-OH y Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH) para formar una resina polipeptídica representada por SEQ ID NO: 2; y (iv) repetir la desprotección de Fmoc en la etapa (i) y acetilar el término N para formar una resina polipeptídica representada por la SEQ ID NO: 3. Véase la FIG. 2.

Fmoc-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg(Pbf) -D-Arg(Pbf) -D-Arg(Pbf)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-

[Resina]

(SEQ ID NO:2)

Ac-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-

[Resina]

(SEQ ID NO:3)

Típicamente, la escisión del grupo protector Fmoc se logra usando un agente desprotector tal como piperidina en DMF. En una realización, el acoplamiento del aminoácido protegido con Fmoc se lleva a cabo en un disolvente tal como dimetilformamida (DMF) usando un agente de acoplamiento adecuado tal como el agente de acoplamiento de carbodiimida, N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC), opcionalmente en presencia de un aditivo tal como 2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato de etilo (Oxyma) para todos los aminoácidos excepto la cisteína. En el caso de la elongación de la cadena peptídica con cisteína, el acoplamiento se lleva a cabo típicamente usando N,N-diisopropilcarbodiimida (DIC) en presencia de un aditivo de benzotriazol tal como hidroxibenzotriazol (HOBT) en un sistema de disolvente tal como dimetilformamida-diclorometano, (es decir, DMF, DCM, HOBt, DIC).

La acetilación del término N puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica. En una realización, la acetilación del término N se lleva a cabo usando, por ejemplo, anhídrido acético (Ac_2O) en piridina y DMF.

Escisión desde la resina

El péptido puede separarse del soporte, y los grupos protectores pueden eliminarse de las cadenas laterales por cualquier medio conocido en la técnica. Véanse, por ejemplo, Synthetic Peptides: A User's Guide (G.A. Grant, ed.), W.H. Freeman and Company, New York, 1992; y Chan, W.C., White, P.D. "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach", Oxford University Press (2000), p. 64-66 y 105-109.

En una realización, la resina peptidílica se añade a una disolución de cóctel que comprende agua (por ejemplo, agua desionizada (DIW)), ácido trifluoroacético (TFA), triisopropilsilano (TIPS) y disulfuro de dipiridilo (DPDS). Esto permite que el péptido se separe de la resina con la desprotección concomitante de la cadena lateral y la activación de la cisteína, preparando así la conjugación in situ con L-Cys. Se produce el producto intermedio SPy de siete aminoácidos ($AA^{1\text{-}7(SPy)}$). Véase la FIG. 3. La secuencia del producto intermedio SPy se proporciona en SEQ ID NO: 4.

Ac-D-Cys(SPy)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2

(SEQ ID NO:4)

Conjugación in situ y HPLC preparativa

El producto intermedio SPy puede conjugarse con L-Cys por cualquier método conocido en la técnica. En una realización, la conjugación de L-Cys se realiza en TFA acuoso.

El AMG 416 (sal de TFA) producido puede purificarse por cualquier medio conocido en la técnica. En una realización, AMG 416 (sal de TFA) se purifica por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). Por ejemplo, en una realización, la purificación y concentración del AMG 416 (sal de TFA) comprende una etapa de purificación de HPLC de fase inversa y una etapa de concentración de HPLC de fase inversa. Véase la FIG. 4.

La muestra purificada y concentrada que contiene AMG 416 (sal de TFA) puede liofilizarse.

Conversión de sal

La sal de TFA puede convertirse en sal farmacéuticamente aceptable, tal como la sal de hidrocloruro, por cualquier medio conocido en la técnica.

En una realización, la sal de TFA liofilizada de AMG 416 se disuelve en una disolución acuosa de alcohol isopropílico (IPA). La disolución de sal de TFA se carga luego en una disolución de HCl para el intercambio de sal y

la precipitación de la sal de HCl. El precipitado puede reconstituirse entonces con agua, filtrarse a través de un microfiltro (por ejemplo, filtro de 0,2 μm), y liofilizarse para aislar la sal de HCl de AMG 416. Véase la FIG. 5.

Purificación de un intermedio SPy

En una realización alternativa, el producto intermedio SPy se purifica antes de la conjugación con la L-Cys. En general, los productos intermedios SPy, en particular los intermedios péptido-SPy, se consideran altamente inestables, es decir, se cree que no son lo suficientemente estables para soportar una purificación eficiente, tal como por HPLC. Sin embargo, al llegar a los métodos proporcionados aquí, los solicitantes descubrieron que, inesperadamente, los intermedios péptido-SPy preparados según los métodos descritos aquí son de hecho suficientemente estables para soportar una etapa de purificación separada. Además, se descubrió adicionalmente que la purificación de tales intermedios antes de la conjugación con la L-Cys en realidad puede aumentar la eficiencia y disminuir el coste de fabricación del producto farmacológico del péptido final.

En una realización ejemplar, el método alternativo se lleva a cabo como sigue. El método descrito a continuación y en el Ejemplo 5 es útil para la purificación de un intermedio SPy como se proporciona aquí, en el que el intermedio permanece estable y es adecuado para la conjugación con un resto que contiene tiol, por ejemplo mediante la formación de enlace de disulfuro. Por ejemplo, el intermedio péptido-SPy se disuelve en una disolución acuosa que contiene no más de alrededor de 0,2% de TFA, por ejemplo alrededor de 0,05% a 0,15% de TFA, o alrededor de 0,1% de TFA, y entonces se aplica directamente a una columna de HPLC para purificación cromatográfica. El intercambio de disolvente de las fracciones de HPLC que contienen el intermedio péptido-SPy se puede llevar a cabo entonces, por ejemplo, por destilación azeotrópica. Después del intercambio de disolvente del intermedio péptido-SPy en un disolvente apropiado, tal como una mezcla de agua-isopropanol, se añade directamente un resto que contiene tiol, tal como L-Cys, a la disolución del intermedio péptido-SPy para efectuar la conjugación. El producto conjugado resultante, por ejemplo en disolución, está disponible para el intercambio de sal.

Una realización particular del método de purificación anterior es la siguiente. Después de la escisión inicial del péptido del soporte de resina y el aislamiento del producto intermedio $AA^{1\text{-}7(SPy)}$, el intermedio se disuelve en TFA al 0,1% y acetonitrilo, se carga en una columna de HPLC de fase estacionaria, y se purifica como se describe anteriormente. El uso de una disolución de TFA al 0,1% tiene múltiples ventajas para la purificación por HPLC en comparación con el uso de, por ejemplo, una disolución de TFA al 0,2%. Por ejemplo, 0,1% de TFA es menos dañino para la fase estacionaria durante el procedimiento de purificación que una disolución de TFA de mayor concentración. Es decir, al usar una concentración tan optimizada de TFA, hay menos descomposición de la fase estacionaria, lo que da como resultado de ese modo una vida útil más larga para la fase estacionaria. Además, el producto intermedio péptido-SPy (por ejemplo, $AA^{1\text{-}7(SPy)}$) es menos polar, lo que da como resultado que el intermedio se retenga mejor en la fase estacionaria de fase inversa. Como resultado, se puede lograr una carga mucho mayor en la fase estacionaria en cada ciclo de purificación. En algunas realizaciones, la mayor capacidad de carga aumenta el rendimiento del procedimiento de fabricación de 1,5 a 2 veces, o alrededor de 1,5 veces.

Las fracciones de HPLC que contienen el producto intermedio SPy como una sal de TFA se someten entonces a destilación azeotrópica con suficientes cargas de IPA para cambiar el disolvente del acetonitrilo y el agua a una disolución de agua al 15% en IPA adecuada para la conjugación de L-Cys y el intercambio de sal. Este método es particularmente ventajoso ya que tanto la conjugación como el intercambio de sal se pueden llevar a cabo en un solo recipiente, mejorando aún más la eficiencia y la viabilidad del procedimiento de fabricación.

Fabricación de material de partida Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH

AMG 416 comprende una secuencia lineal de 7 aminoácidos, 4 de los cuales son D-argininas. Aquí se describe un método para sintetizar Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH, el derivado Fmoc de D-arginina utilizado en la síntesis de AMG 416. El uso de un material de partida de Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH de alta calidad puede proporcionar una pureza adicional al AMG 416 bruto desde la etapa I a la etapa III, para mejorar así el rendimiento de purificación en la etapa IV. Más importante aún, el uso de un material de partida de alta calidad y alta pureza puede proporcionar un elemento de control deseable y ventajoso para asegurar la pureza deseada de AMG 416. Se ha desarrollado un nuevo procedimiento para preparar D-Arg(Pbf)-OH y Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH de alta calidad que produce un mayor rendimiento, requiere menos operaciones de la unidad, proporciona un control de calidad más robusto, y es apto para la fabricación a gran escala. En resumen, el método de preparación de Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH descrito aquí representa un aumento significativo en la viabilidad de la fabricación de AMG 416 acompañado de una ganancia potencial en la calidad.

Una ruta sintética que es una de las síntesis más concisas de Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH encontrada en la bibliografía y que puede usarse para la síntesis a escala comercial de Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH es la siguiente. Véase, por ejemplo, la Patente China nº CN101250172B, 2 de mayo de 2012. La síntesis comienza protegiendo el grupo amino de D-Arg con dicarbonato de di-terc-butilo (Boc_2O) produciendo Boc-D-Arg-OH con un rendimiento aproximadamente cuantitativo después del aislamiento. En la etapa 2, el grupo guanidina de cadena lateral se protege con un grupo Pbf en presencia de una base tal como hidróxido de sodio acuoso. El producto se usa directamente en la siguiente etapa como una disolución de IPA (alcohol isopropílico) sin aislamiento. La etapa 3 comprende eliminar el grupo

protector Boc en condiciones ácidas, y aislar el producto correspondiente, D-Arg(Pbf)-OH, como un intermedio cristalino. La etapa 4 del procedimiento comprende la instalación de un grupo protector Fmoc en la funcionalidad amino para proporcionar Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH como producto final. Dado que los productos tanto de la etapa 2 como de la etapa 4 son materiales amorfos, es decir, que proporcionan una capacidad limitada para rechazar impurezas, el intermedio cristalino D-Arg(Pbf)-OH (producto de la etapa 3) sirve como un punto de control para influir y asegurar la pureza del producto final.

Obtener un producto de alta pureza es un desafío importante cuando se confía en los procedimientos dados a conocer en la bibliografía. Por lo general, se requieren múltiples recristalizaciones para cumplir con el requisito de pureza. Como ejemplo, el D-Arg(Pbf)-OH se recristaliza siete veces en un sistema de disolvente terciario EtOH/EtOAc/agua para mejorar la pureza hasta un nivel deseado. Además, en la etapa 2, el 20-30% de los materiales de partida permanecen sin reaccionar incluso en presencia de un gran exceso de hidróxido de sodio y PbfCl, y el rendimiento general (etapas 1 a 3) es típicamente solo inferior al 40%.

El procedimiento mejorado desarrollado y descrito aquí e ilustrado en las FIGS. 6 y 7, ofrece varias ventajas sobre los procedimientos conocidos. Se introduce NaI como catalizador para convertir Boc-D-Arg-OH en Boc-D-Arg(Pbf)-OH (véase la etapa 2 en la FIG. 6). La incorporación de yoduro de sodio es eficaz para mejorar significativamente la cinética de reacción y, como resultado, la conversión de la etapa 2 puede aumentarse a más del 95%, y el rendimiento del ensayo puede mejorarse hasta ~90%. Además, la cantidad total de impurezas también se reduce.

D-Orn(Pbf)-OH y el éster etílico de D-Arg(Pbf)-OH son impurezas clave formadas en la etapa 2 y la etapa 3 (FIG. 7), respectivamente, y son difíciles de eliminar por cristalización, lo que contribuye de ese modo a la necesidad de múltiples recristalizaciones. El procedimiento mejorado descrito aquí comprende además el uso de acetato de isopropilo (IPAc), un éster más impedido estéricamente en comparación con el EtOAc más comúnmente usado, como el disolvente para la etapa 3 en la que se convierte Boc-D-Arg(Pbf)-OH a D-Arg(Pbf)-OH. El uso de IPAc ralentiza significativamente la reacción secundaria, la transesterificación, catalizada por el ácido fuerte, HCl. Como resultado, el contenido de impurezas correspondiente, el éster de D-Arg(Pbf)-OH, se reduce a menos de alrededor de 0,5% (frente a más de 1,0% en el procedimiento que emplea EtOAc). Además, se descubrió que el alcohol isopropílico (IPA)/agua es un sistema de disolvente más potente que permite la eliminación de todas las impurezas del procedimiento y minimiza la pérdida de producto en las etapas de cristalización. En un experimento de ensayo realizado a escala de laboratorio (20 g), la pureza de D-Arg(Pbf)-OH (intermedio de la etapa 3) se mejoró a más del 99,7% con solo dos cristalizaciones, y el rendimiento general (etapa 1 a 3) fue aproximadamente del 70%. Una realización de este procedimiento mejorado se describe en el Ejemplo 6 a continuación.

El experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente descripción también se extiende a variantes y derivados de AMG 416. Por ejemplo, los métodos proporcionados aquí también se pueden usar con disulfuro de N-acetil-D-cisteinil-D-alanil-D-arginil-D-arginil-D-arginil-D-alanil-D-arginamida con D-cisteína. Las formulaciones descritas también pueden usarse con disulfuro de N-acetil-L-cisteinil-L-alanil-L-arginil-L-arginil-L-arginil-L-alanil-L-arginamida con D-cisteína y/o disulfuro de N-acetil-L-cisteinil-L-alanil-L-arginil-L-arginil-L-arginil-L-alanil-L-arginamida con L-cisteína. La formulación descrita también puede usarse con disulfuro de N-acetil-D-cisteinil-D-arginil-D-alanil-D-arginil-D-arginil-D-alanil-D-arginamida con L-cisteína, y/o disulfuro de N-acetil-D-cisteinil-D-arginil-D-alanil-D-arginil-D-arginil-D-alanil-D-arginamida con D-cisteína. Además, los presentes métodos pueden emplearse para preparar uno o más de los compuestos proporcionados en la Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4, Tabla 5, Tabla 6, Tabla 7, Tabla 8, Tabla 9 y/o Tabla 10 Publicación de Patente Internacional nº WO 2011/014707. Los métodos descritos aquí también pueden usarse para preparar compuestos descritos en la Publicación de Patente Internacional nº WO 2011/014707.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados obtenidos, se proporcionan solo con fines ilustrativos.

EJEMPLO 1A

Síntesis del fragmento lineal de la cadena principal

La síntesis del fragmento lineal de la cadena principal se muestra en la FIG. 2. La resina Rink Amide AM (Fmoc 2,4-dimetoxi-4'(carboximetiloxi)-benzhidrilamina unida a la resina de aminometilo) (1 kg) se añadió a DMF (5,8 l/kg), y la disolución se agitó a 22ºC. La resina se filtró, y la suspensión se lavó. Se analizó una muestra para determinar el Fmoc residual (ensayo UV) y la piperidina residual (pH). Los ensayos de color de Kaiser y/o TNBS se llevaron a cabo para garantizar que tuvo lugar la desprotección de Fmoc.

Los primeros seis acoplamientos derivados de aminoácidos siguieron el mismo procedimiento para la preactivación, el acoplamiento y el lavado. 1,6 eq del aminoácido Fmoc protegido se añadió a DMF, 8,9 l/kg a 22ºC. Después se añadió Oxyma (2,45 eq). La disolución se enfrió a 21ºC, y se añadió DIC (2,13 eq), y se dejó que la reacción continuara. La disolución preactivada se combinó con resina, y la reacción se dejó transcurrir. Se añadió DIC (1,07

eq), y la reacción se dejó transcurrir a 22ºC. Se analizó una muestra para determinar el acoplamiento incompleto utilizando los ensayos de color de Kaiser y/o TNBS. El material se lavó, seguido de desprotección de Fmoc y lavado adicional. Se analizó una muestra para determinar el Fmoc residual (ensayo UV) y la piperidina residual (pH). Los ensayos de color de Kaiser y/o TNBS se llevaron a cabo para garantizar que tuvo lugar la desprotección de Fmoc.

Se añadió Fmoc-D-Cys(Trt)-OH 1,6 eq a una disolución de DMF:DCM 1:1,7, 12 l/kg, seguido de la adición de HOBt.H_2O (2,45 eq). La disolución se enfrió hasta 20ºC y se añadió DIC (2,13 eq), y se dejó que la reacción continuara. La disolución preactivada se combinó con resina, y la reacción se dejó transcurrir a 22ºC. Se cargó DIC 1,07 eq a la reacción de SPPS, en la que la relación DMF/DCM fue alrededor de 1:1. La reacción se dejó transcurrir a 22ºC. Se analizó una muestra para determinar el acoplamiento incompleto utilizando los ensayos de color de Kaiser y/o TNBS.

El material se lavó, seguido de desprotección de Fmoc y lavado adicional. Se analizó una muestra para determinar el Fmoc residual (ensayo UV) y la piperidina residual (pH). Los ensayos de color de Kaiser y/o TNBS se llevaron a cabo para garantizar que tuvo lugar la desprotección de Fmoc.

Se añadieron DMF (0 l/kg); anhídrido acético (1,06 l/kg) y piridina (1,06 l/kg) a la disolución, y la disolución se agitó para la preactivación. La disolución de preactivación se combinó con la resina y se agitó a 22ºC. El material se filtró y se lavó. Se analizó una muestra para determinar el encaperuzamiento incompletó utilizando los ensayos de color de Kaiser y/o TNBS. El material se lavó en suspensión. La resina se secó bajo nitrógeno sin agitación. Se tomó una muestra de la resina seca, y se ensayó para determinar LOD y el disolvente residual. Véase la FIG. 2.

EJEMPLO 1B

Síntesis del fragmento lineal de la cadena principal

La síntesis del fragmento lineal de la cadena principal de AMG 416 se muestra en la FIG. 2. La cadena peptídica creció desde el término C al término N en la resina Rink AM amide, 1 aminoácido por ciclo. Cada ciclo consta de 2 etapas de reacción: 1) escisión de Fmoc del término N; 2) acoplamiento del siguiente aminoácido protegido con Fmoc, o acetilación final.

Comienzo de SPPS: la resina Rink AM amide (1,0 moles) se transfirió a un reactor de SPPS, y se lavó con N,N'-dimetilformamida (DMF).

Escisión de Fmoc: la resina de la etapa anterior se suspendió en una disolución de piperidina al 20% en DMF durante al menos 10 min. La finalización de la escisión de Fmoc se monitorizó mediante medidas de absorción ultravioleta (UV). Después de completar la escisión de Fmoc, la resina se lavó alternativamente con DMF e isopropanol (IPA) hasta que se alcanzó un pH neutro.

Acoplamiento de Fmoc-aminoácidos: después de la etapa de escisión de Fmoc, la reacción de acoplamiento se realizó mezclando la resina con la disolución de derivado de aminoácido protegido con Fmoc (> 1,2 moles) y reactivos activantes (> 1,8 moles) (N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) e (hidroxiimino)-cianoacetato de etilo (Oxyma)) en DMF. Para el acoplamiento de Fmoc-D-Cys(Trt)-OH, se usaron DIC e hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) como agentes activantes, y se empleó una mezcla de DMF y diclorometano (DCM) como disolvente de reacción. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se realizaron ensayos de Kaiser y TNBS para monitorizar la finalización del acoplamiento. Se requirieron resultados negativos de los ensayos tanto de Kaiser como de TNBS antes de que el procedimiento pasara al siguiente ciclo. Después de cada etapa de acoplamiento o encaperuzamiento, la resina se lavó alternativamente con DMF e IPA.

Acetilación final: después de la desprotección final de Fmoc, el grupo amino N-terminal del péptido se acetiló usando anhídrido acético y piridina en DMF. Se realizaron ensayos de Kaiser y TNBS para verificar la finalización de la acetilación. Si la acetilación estaba incompleta, entonces se repitió el mismo procedimiento de acetilación hasta que se obtuvieron resultados negativos de los ensayos tanto de Kaiser como de TNBS.

Finalmente, el esqueleto peptídico protegido de la sustancia farmacéutica en la resina (AMG 416-Resina) se aisló por filtración, se lavó con DMF, IPA y acetonitrilo (ACN), y se secó a presión reducida.

EJEMPLO 2A

Escisión del fragmento lineal de la cadena principal desde la resina

Se preparó combinando una disolución de cóctel DIW (0,16 l/kg); TFA (5,64 l/kg); TIPS (0,46 eq), y DPDS (6,41 eq) a temperatura ambiente, y después enfriando la disolución hasta 0 ± 2ºC. El péptido en la resina se añadió a la disolución de cóctel a 0 ± 2ºC, y la disolución se calentó a 25ºC, y la reacción se dejó transcurrir. La resina se eliminó por filtración y se lavó. La disolución se mantuvo a -10ºC, y se añadió una disolución 6,8:1 de IPE:MeCN (24,5 l/kg) a -10ºC a lo largo del tiempo para controlar la temperatura y la precipitación. La reacción se dejó

transcurrir, y el producto intermedio AMG 416 SPy se filtró a -5ºC y se lavó. El producto intermedio SPy se secó a 20ºC bajo vacío total. Véase la FIG. 3.

EJEMPLO 2B

Escisión del fragmento lineal de la cadena principal desde la resina

La disolución de escisión se preparó en un reactor mezclando TFA, H_2O y triisopropilsilano (TIPS) en una relación aproximada de 96,9:2,6:0,5 (v/v/v). A la disolución de escisión, se añadió DPDS (> 1,2 moles) como reactivo activante del grupo sulfhidrilo de D-cisteína. Se cargó AMG 416-Resina (1,0 moles) en el reactor, y la mezcla de reacción se agitó durante > 1 h a temperatura ambiente. La resina se separó por filtración. El filtrado y las disoluciones de lavado se transfirieron a otro reactor y se enfriaron. Después se cargó en la disolución una mezcla antidisolvente fría de éter diisopropílico (IPE) y ACN para precipitar AMG 416-SPy. La suspensión se filtró a través de un filtro deshidratador, y la torta de filtro de AMG 416-SPy se lavó posteriormente con ACN e IPE y se secó a aproximadamente 20ºC a presión reducida en el filtro deshidratador.

EJEMPLO 3

Conjugación in situ con L-Cys/HPLC preparativa

El intermedio AMG 416 SPy (1,0 moles) se añadió a una disolución de TFA al 0,2%. Se añadió L-cisteína (> 1,1 moles) a la disolución, y la reacción se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante al menos 15 min.

La purificación del AMG 416 bruto se realizó por cromatografía preparativa usando una fase estacionaria de gel de sílice C18 usando ACN/H_2O como fase móvil y TFA como modificador. La disolución de AMG 416 bruto de la Etapa III se cargó en la columna, y se usó un método de gradiente lineal para la etapa de purificación. La elución se monitorizó mediante absorbancia UV a 230 nm. Después de cada carga, la columna se enjuagó con ACN al 80% en agua (v/v) hasta que se logró una línea base UV estable. Las fracciones se almacenaron a 5ºC, se tomaron muestras, y entonces se agruparon las fracciones que tenían la pureza deseada (determinada por HPLC). Los grupos combinados del experimento de purificación se concentraron realizando el experimento de concentración usando la misma columna de HPLC. Las fracciones se almacenaron a 5ºC. Las fracciones con la pureza deseada (determinada por HPLC) se liofilizaron para aislar la sal de TFA de AMG 416. Véase la FIG. 4.

EJEMPLO 4

Conversión de sal

La sal de TFA de AMG 416 se añadió a una disolución de agua al 15% en IPA (v/v) 10 l/kg a 10ºC hasta que se observó la disolución completa. La disolución se añadió a una disolución de HCl acuoso 12 M, 0,27 l/kg e IPA 49,4 l/kg durante 3 horas mediante adición subsuperficial, dando como resultado la precipitación directa de la sal de AMG 416 4,5 HCl. El lote se envejeció durante 3 horas y se muestreó para su análisis.

El material se filtró, y la suspensión se lavó con IPA al 96% en peso, 10 l/kg. La torta se volvió a suspender entonces durante 4 horas en 10 l/kg de IPA al 96% en peso. El material se filtró, y la suspensión adicional se lavó con IPA al 96%, 10 l/kg, y después IPA 10 l/kg. El material se secó a vacío completo a 25ºC. La torta seca se disolvió en agua 8 l/kg, y el lote se concentró por destilación para eliminar el IPA residual y lograr la concentración deseada. La temperatura de la disolución se mantuvo por debajo de 25ºC durante toda la destilación. Véase la FIG. 5.

EJEMPLO 5

Purificación del intermedio SPy y producción de AMG 416 HCl

Aquí se describe un método alternativo para la preparación de la sal de HCl de AMG 416. Como se describe en el Ejemplo 2 anterior, el producto intermedio SPy se secó a 20ºC a vacío completo después de la escisión de la resina, precipitación y filtración. El precipitado se disolvió entonces en una disolución acuosa de TFA al 0,1% y se cargó en una columna C-18 para purificación por HPLC. La columna se recorrió a <60 bares, y la temperatura de la disolución fue 15-25ºC en todo momento. Los eluyentes fueron TFA al 0,1% en acetonitrilo y TFA al 0,1% en agua. Las fracciones se almacenaron a 5ºC, se tomaron muestras, y después se agruparon las fracciones. Los grupos combinados de dos experimentos se diluyeron, y se realizó un experimento de concentración/purificación usando la misma columna de HPLC para disminuir el volumen total y eliminar impurezas adicionales. Las fracciones se almacenaron a 5ºC.

Las fracciones que contenían el intermedio AMG 416 SPy se sometieron a destilación azeotrópica para cambiar el disolvente del TFA al 0,1% a una disolución de agua en IPA al 15%, cargando con IPA según sea necesario. Al producto intermedio resultante AMG 416 SPy en disolución de IPA se añadió entonces L-cisteína 1,15 eq, y la reacción se dejó transcurrir a temperatura ambiente para que se produzca la conjugación y para formar la sal de TFA de AMG 416 como se describe anteriormente en el Ejemplo 4. La disolución AMG 416 TFA se añadió a una

disolución de HCl acuoso 12 M, 0,27 l/kg e IPA 49,4 l/kg durante 3 horas mediante adición subsuperficial, lo que dio como resultado la precipitación directa de la sal de AMG 416 4,5 HCl. El lote se envejeció durante 3 horas y se muestreó para su análisis.

El material se filtró, y la suspensión se lavó con IPA al 96% en peso, 10 l/kg. La torta se volvió a suspender entonces durante 4 horas en 10 l/kg de IPA al 96% en peso. El material se filtró, y la suspensión adicional se lavó con IPA al 96%, 10 l/kg y entonces IPA 10 l/kg. El material se secó a vacío completo a 25ºC. La torta seca se disolvió en agua 8 l/kg, y el lote se concentró por destilación para eliminar el IPA residual y lograr la concentración deseada. La temperatura de la disolución se mantuvo por debajo de 25ºC durante toda la destilación.

EJEMPLO 6

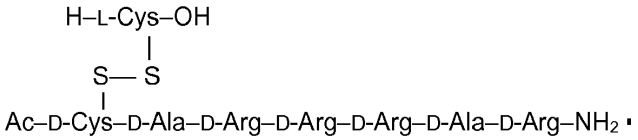
Síntesis de H-D-Arg(Pbf)-OH

La síntesis del fragmento lineal de la cadena principal como se describe en el Ejemplo 1 requiere el uso de Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH para la adición de las subunidades de D-arginina, que constituyen 4 de los 7 restos en el fragmento lineal. A continuación se describe un método mejorado y más eficiente para sintetizar Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH.

La síntesis comienza con la protección del grupo amino de D-Arg mediante dicarbonato de di-terc-butilo (Boc_2O), produciendo Boc-D-Arg-OH con un rendimiento aproximadamente cuantitativo después del aislamiento por cristalización según el procedimiento estándar descrito en la bibliografía. El grupo de guanidina de la cadena lateral de arginina se protegió con un grupo Pbf mediante una adición de una hora (0-5ºC) de una disolución de acetona/THF 10/1 de Pbf-Cl (1,3 eq) en presencia de NaOH acuoso (4,3 eq)/NaI (5% moles) como la base, produciendo Boc-D-Arg(Pbf)-OH (rendimiento del ensayo 85-90%). Véase la FIG. 6. La disolución de Boc-D-Arg(Pbf)-OH en IPAc se trató con 4,8 eq de HCl concentrado a 20ºC durante aproximadamente 6 h. Después de la reacción, la capa orgánica se desechó, y el producto bruto se aisló de la capa acuosa ajustando el pH a 5 usando NaOH, después de lo cual se observó una suspensión blanca. Véase la FIG. 7. Cuando el sobrenadante tuvo una concentración de aproximadamente 3 mg/ml a 20ºC, el sobrenadante se filtró a temperatura ambiente, y la torta resultante se lavó con agua y se secó a vacío. El rendimiento global del ensayo después de esta etapa fue alrededor de 80-85%. La pureza de H-D-Arg(Pbf)-OH se incrementó hasta >98,5% por una primera recristalización en 3/1 de agua/IPA (v/v). Cuando el sobrenadante tuvo una concentración de alrededor de 7 mg/ml, se filtró y se secó a vacío. Después de esta etapa, el rendimiento global del ensayo fue alrededor de 75%. (Normalmente, se observa alrededor del 10% de la pérdida del producto en esta etapa). Se realizó una segunda etapa de recristalización en 4/1 de agua/IPA (v/v). El filtrado se realizó cuando la concentración de sobrenadante fue alrededor de 3,7 mg/ml. La segunda recristalización aumentó la pureza de H-D-Arg(Pbf)-OH hasta alrededor de 99,84 de porcentaje de pureza de área (LCAP) por HPLC sin impurezas superiores a 0,2 LCAP. El rendimiento típico de esta etapa es alrededor de 93% con alrededor de 5% de pérdida de producto. El H-D-Arg(Pbf)-OH se hizo reaccionar entonces con FmocOSu según los protocolos estándar, y el producto Fmoc-D-Arg(Pbf)-OH se aisló utilizando el procedimiento estándar en la bibliografía.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar AMG 416 como se expone en la fórmula (I):



comprendiendo dicho método:

poner en contacto un péptido que tiene la estructura de Ac-D-Cys(SPy)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2 (SEQ ID NO:4) con L-Cys para producir un producto conjugado de fórmula (I).

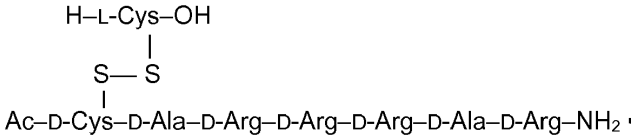
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha puesta en contacto comprende disolver el péptido en una disolución acuosa que comprende L-Cys y ácido trifluoroacético (TFA).

3. El método de la reivindicación 1, que comprende además liofilizar el producto conjugado.

4. El método de la reivindicación 1, que comprende además poner en contacto el producto conjugado con una disolución acuosa que comprende alcohol isopropílico (IPA) y HCl, produciendo así un precipitado que comprende AMG 416 HCl de SEQ ID NO: 1.

5. El método de la reivindicación 4, que comprende además purificar el precipitado por HPLC.

6. Un método para preparar AMG 416 como se expone en la fórmula (I):



comprendiendo dicho método:

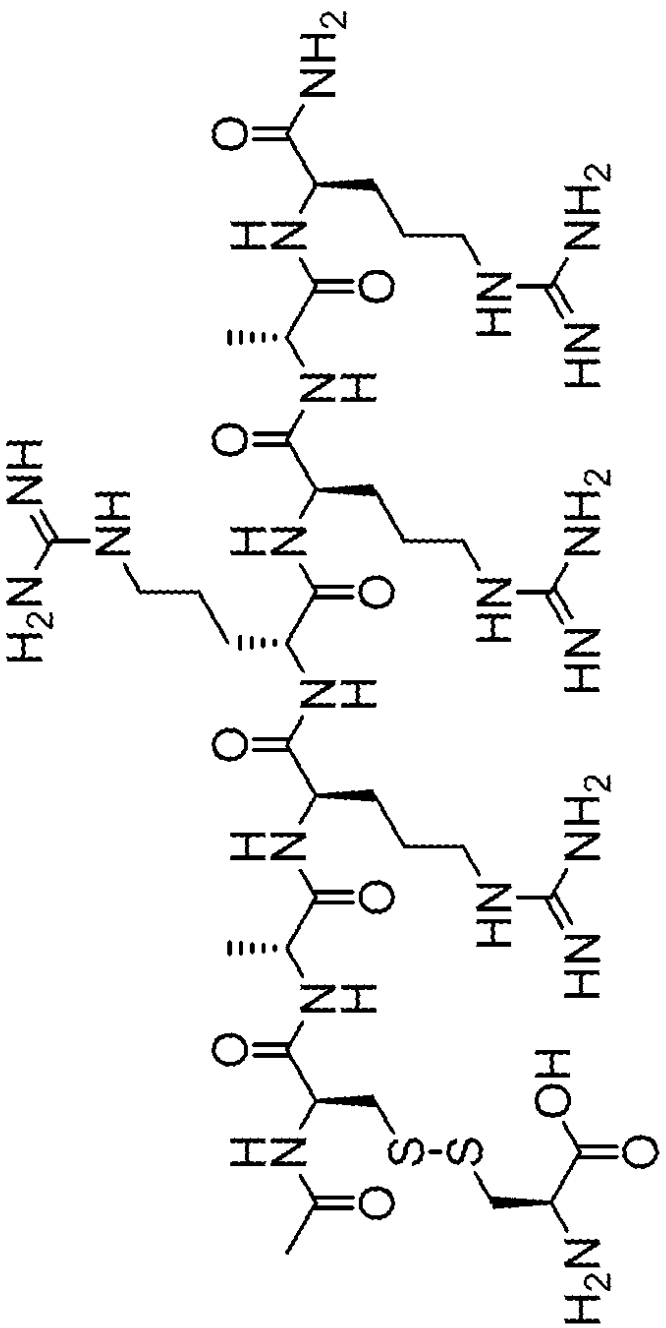
purificar por HPLC un péptido que tiene la estructura Ac-D-Cys(SPy)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2 (SEQ ID NO:4) en una disolución de ácido trifluoroacético (TFA);

realizar un intercambio de disolvente por destilación azeotrópica sobre el péptido purificado; y

poner en contacto el péptido purificado con L-Cys para producir un producto conjugado de fórmula (I).

7. El método de la reivindicación 6, en el que la L-Cys está en una disolución de agua e IPA.

8. El método de la reivindicación 7, que comprende además poner en contacto el producto conjugado con una disolución acuosa que comprende IPA y HCl, produciendo así un precipitado que comprende AMG 416 HCl de SEQ ID NO: 1.



Ac-D-Cys(L-Cys-OH)-D-Ala-D-Arg-D-Arg-D-Arg-D-Ala-D-Arg-NH_2

FIG. 1

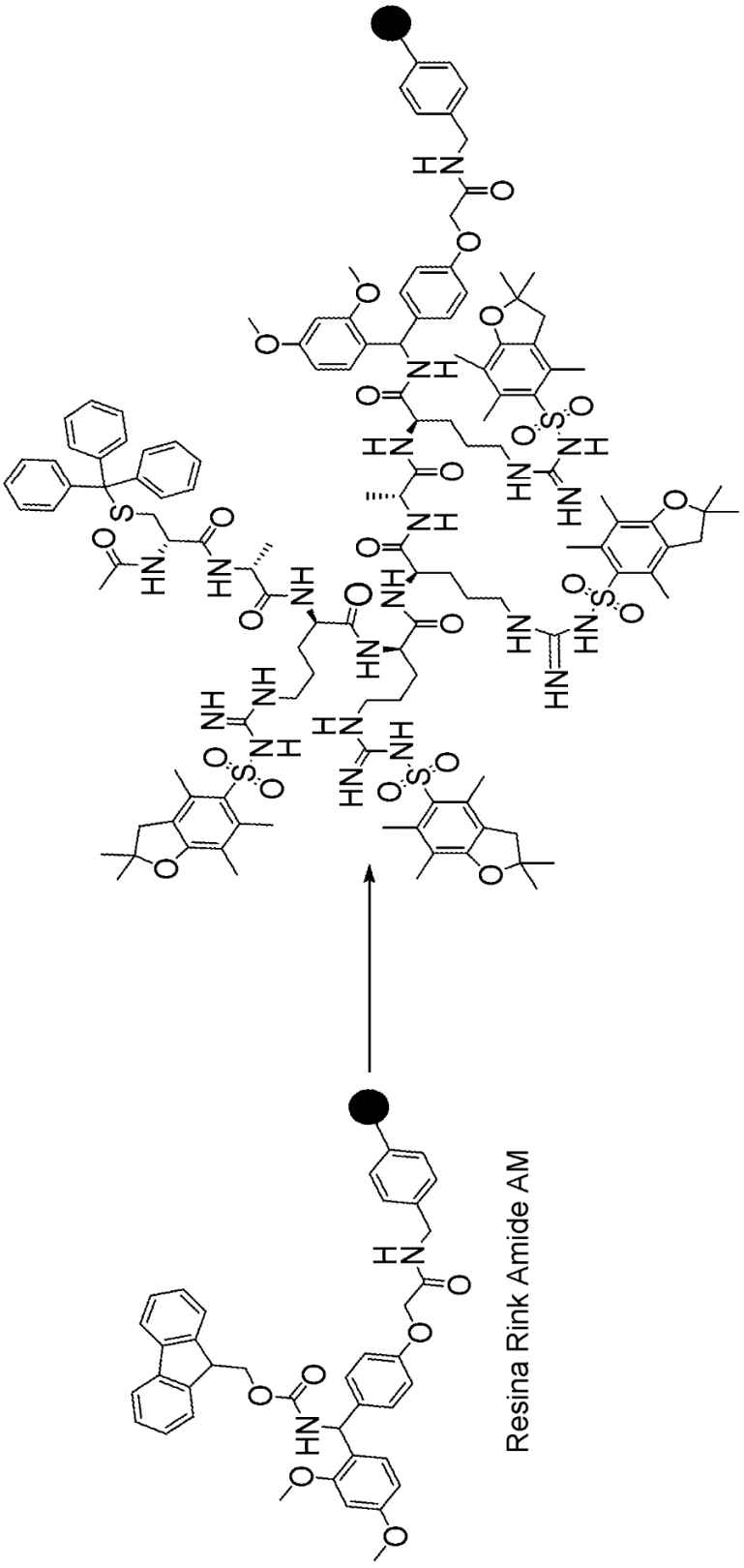

Resina Rink Amide AM
Ac-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-NH-Resina

FIG. 2

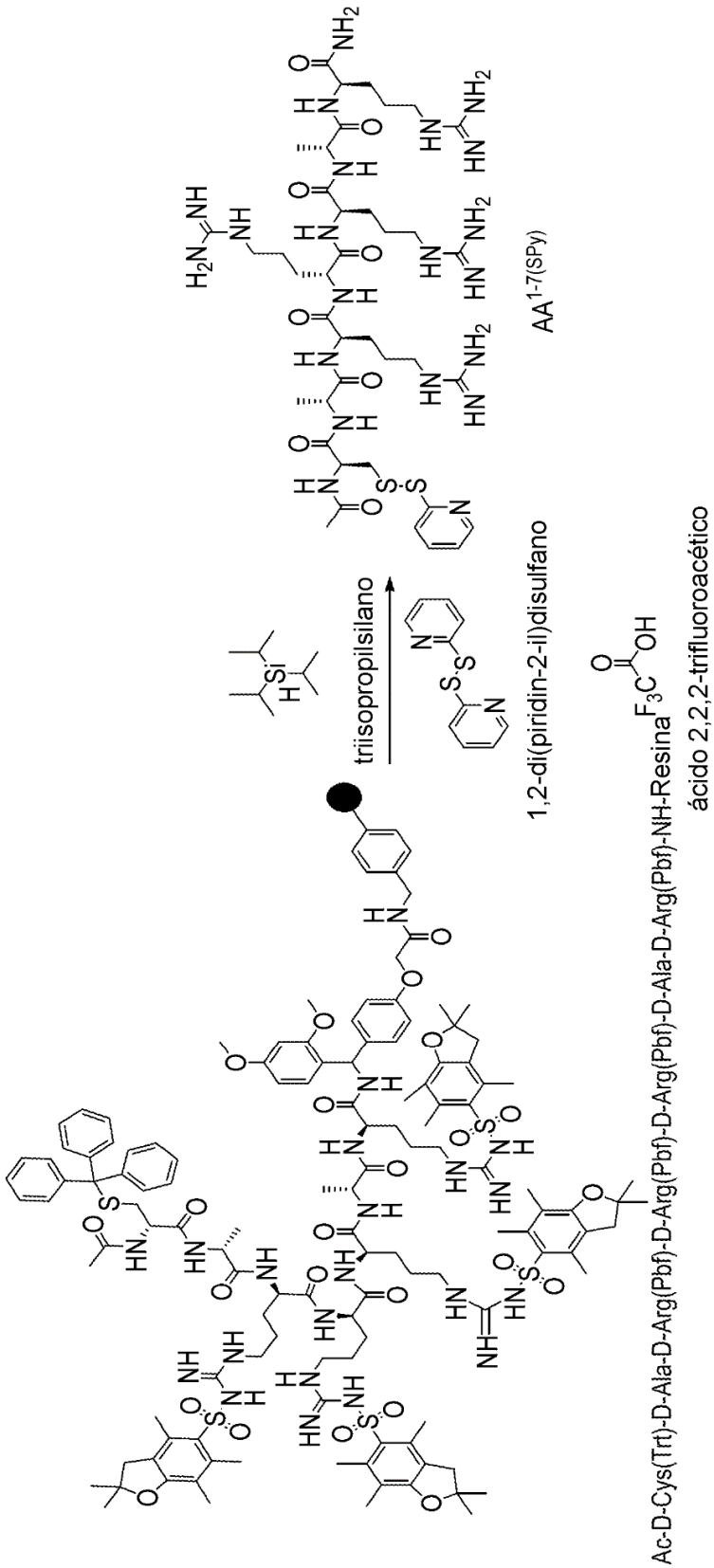

triisopropilsilano
1,2-di(piridin-2-il)disulfano
AA1-7(SPy)
Ac-D-Cys(Trt)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Arg(Pbf)-D-Ala-D-Arg(Pbf)-NH-Resina
ácido 2,2,2-trifluoroacético

FIG. 3

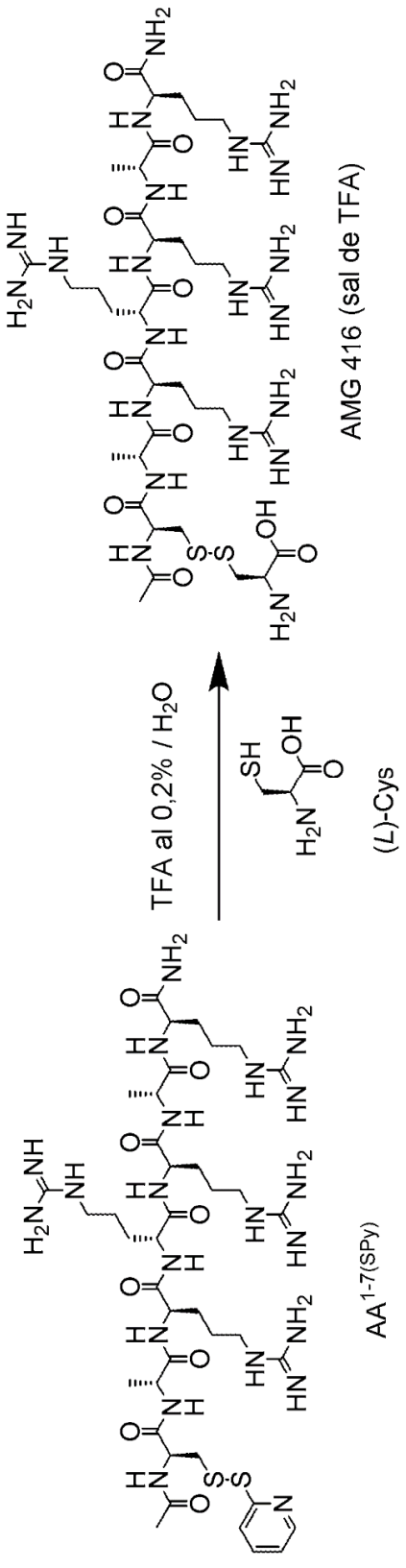


FIG. 4

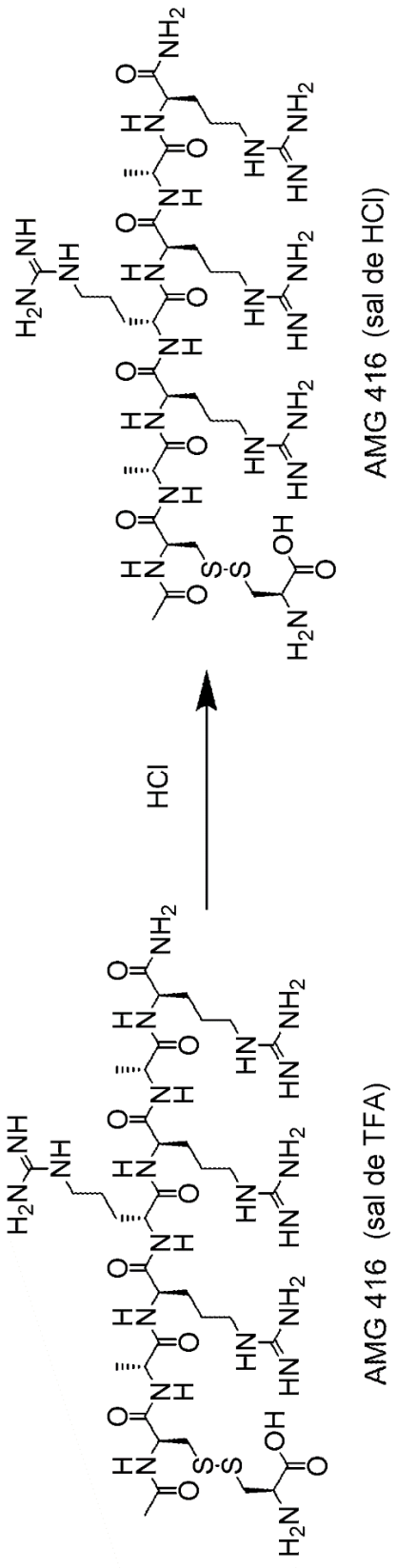


FIG. 5

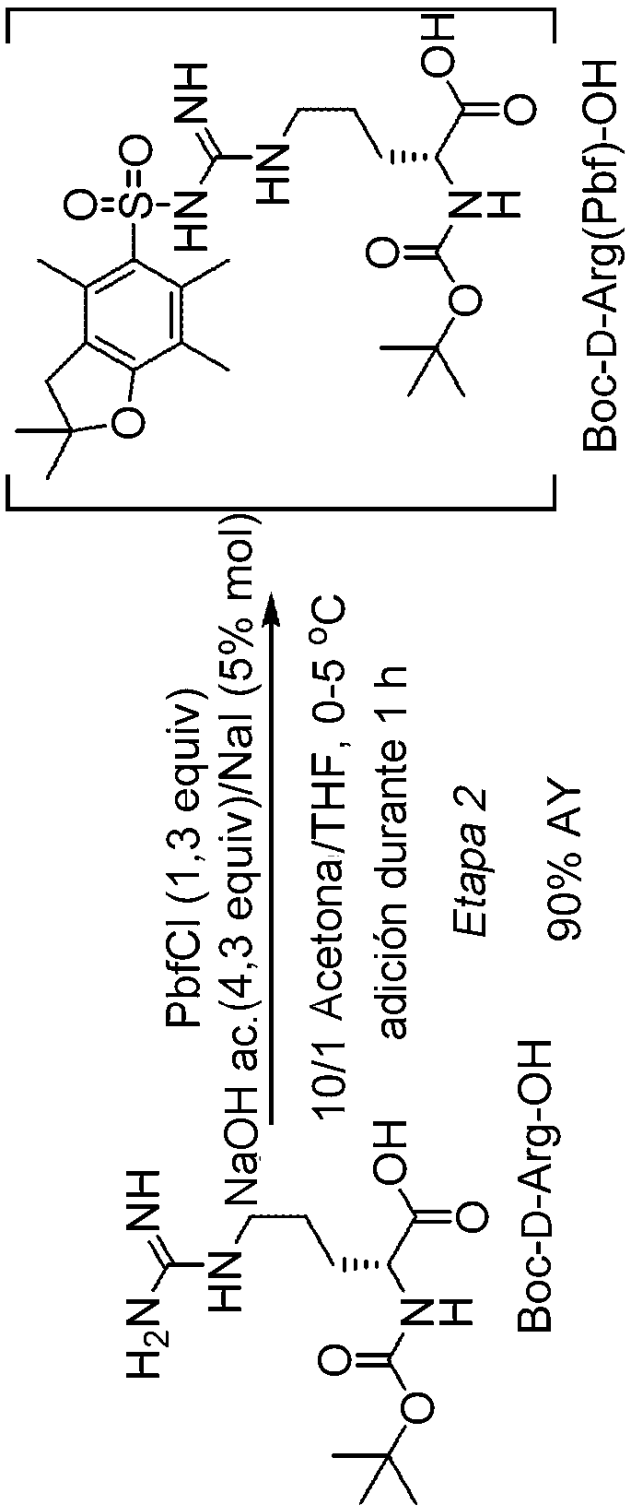

PbfCl (1,3 equiv)
NaOH ac.(4,3 equiv)/NaI (5% mol)
10/1 Acetona/THF, 0-5 °C
adición durante 1 h
Etapa 2
Boc-D-Arg-OH
90% AY
Boc-D-Arg(Pbf)-OH

FIG. 6

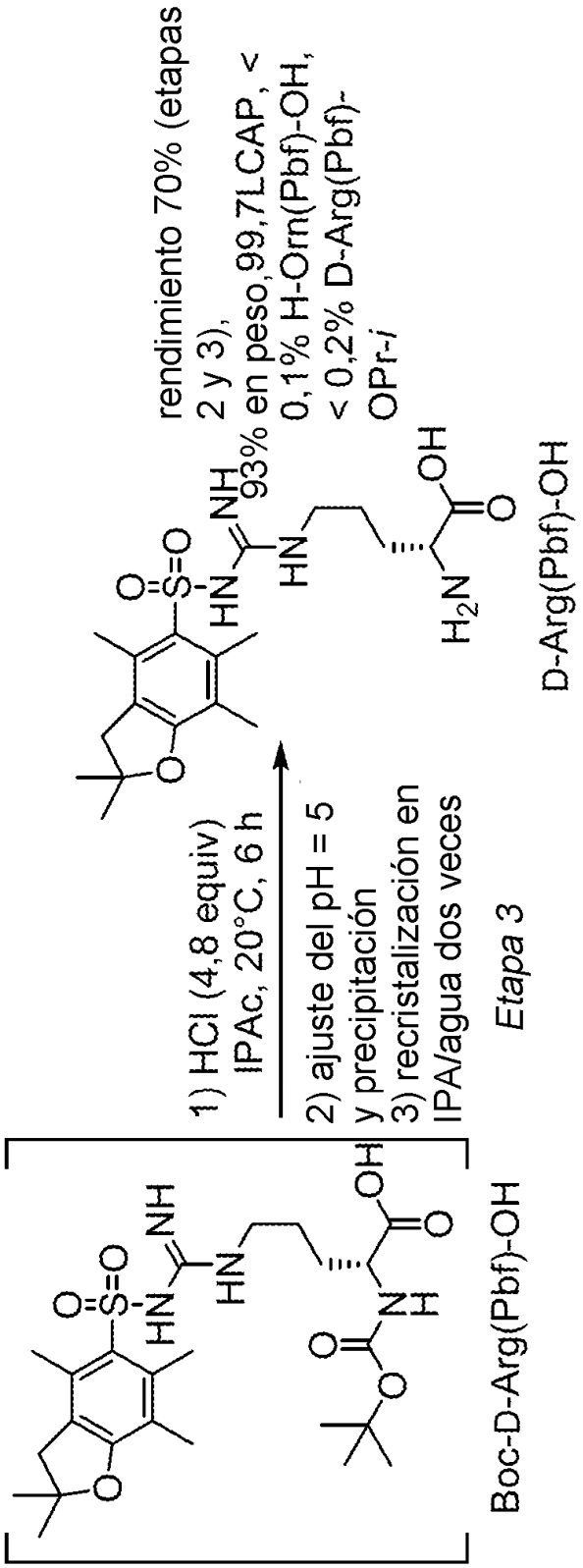

Boc-D-Arg(Pbf)-OH
1) HCl (4,8 equiv)
IPAc, 20°C, 6 h
2) ajuste del pH = 5
y precipitación
3) recristalización en
IPA/agua dos veces
Etapa 3
rendimiento 70% (etapas 2 y 3),
93% en peso,99,7LCAP, <
0,1% H-Orn(Pbf)-OH,
< 0,2% D-Arg(Pbf)-OPr-i
D-Arg(Pbf)-OH

FIG. 7