



(11) Número de Publicação: **PT 1465917 E**

(51) Classificação Internacional:
C07K 5/83 (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2002.12.23**

(30) Prioridade(s): **2001.12.29 SE 0104463**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.10.13**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.10.19
001/2007**

(73) Titular(es):

**POLYPEPTIDE LABORATORIES A/S
HERREDSVEJEN 2 3400 HILLEROD**

DK

(72) Inventor(es):

**JON, H. RASMUSSEN
PALLE, H. RASMUSSEN
WOLFGANG, O. WACHS
STEFAN HANSEN
JENS FOMSGAARD**

DK

DK

DE

DK

DK

(74) Mandatário:

**MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA**

PT

(54) Epígrafe: **INTERMEDIARIOS PARA A SINTESE DE ANTAGONISTAS DA LHRH, PROCESSO
PARA A SUA PRODUÇÃO E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO E PROCESSO PARA A
PRODUÇÃO DE ANTAGONISTAS DA LHRH**

(57) Resumo:

RESUMO

"INTERMEDIÁRIOS PARA A SÍNTESE DE ANTAGONISTAS DA LHRH, PROCESSO PARA A SUA PRODUÇÃO E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ANTAGONISTAS DA LHRH"

Os novos tripeptídeos Ac-D-2Nal-D-4ClPh-D-3Pal-OH e Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH são intermediários úteis para a síntese de análogos da LHRH por acoplamento com heptapeptídeos adequados, em particular com os heptapeptídeos $P^1\text{-Ser}(P^2)\text{-NMeTyr}(P^3)\text{-D-Lys(Nic)}\text{-Leu-Lys(iPr, P}^4\text{)}\text{-Pro-D-AlaNH}_2$ e $P^1\text{-Ser}(P^2)\text{-NMeTyr}(P^3)\text{-D-Asn-Leu-Lys(iPr, P}^4\text{)}\text{-Pro-D-AlaNH}_2$.

DESCRIÇÃO**"INTERMEDIÁRIOS PARA A SÍNTSE DE ANTAGONISTAS DA LHRH,
PROCESSO PARA A SUA PRODUÇÃO E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE
ANTAGONISTAS DA LHRH"****DOMÍNIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a um processo para a produção de intermediários para antagonistas da LHRH, a sais destes intermediários e a um processo para a produção de antagonistas da LHRH.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A hormona de libertação da hormona de luteinização, LHRH, controla a secreção da hormona de estimulação do folículo (FSH) e da hormona de luteinização (LH). Os antagonistas da LHRH são compostos capazes de bloquear a secreção de FSH e de LH. Estes compostos são geralmente nonapeptídeos e decapeptídeos (mas podem ser mais curtos ou mais longos) que compreendem parte de ou toda a estrutura da LHRH na qual um ou vários ácidos aminados foram trocados por outros ácidos aminados naturais e/ou ácidos aminados que não ocorrem na natureza.

Os antagonistas da LHRH sintéticos podem ser utilizados para a contracepção e no tratamento de hiperplasia benigna da glândula próstata, em tumores dependentes de hormonas da mama e dos ovários, na dismenorreia, na endometriose e em outras condições. Estes antagonistas sintéticos da LHRH têm a fórmula geral

Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-X-NH₂,

em que X é de 5 a 6 resíduos de ácidos aminados naturais e/ou sintéticos. Mais particularmente estes compostos têm a fórmula geral atrás mencionada em que X é AA1-AA2-Leu-AA3--Pro-D-Ala, em particular em que AA1 é um ácido aminado natural ou sintético e AA2 é um ácido aminado natural ou sintético ou zero, AA3 é um ácido aminado natural ou sintético.

Enquanto que há vários métodos de síntese para a preparação de análogos da LHRH conhecidos na técnica, existe uma necessidade de melhoramento, uma vez que o rendimento total de análogos da LHRH obtido a partir de processos conhecidos não é elevado e os produtos, para além disso, podem necessitar de purificação profunda. Para além disso, os métodos para a síntese de análogos da LHRH conhecidos na técnica são bastante caros.

Uma estratégia de síntese divulgada na patente US 5.710.246 para a preparação de antagonistas da LHRH decapeptídicos ou nonapeptídicos compreende o acoplamento de um tripeptídeo intermediário que representa os resíduos de ácidos aminados 1 a 3 (iniciando a contagem no terminal amina do peptídeo) com um heptapeptídeo ou um hexapeptídeo, respectivamente, que representam os resíduos de ácidos aminados 4 a 10 e 4 a 9, respectivamente. O tripeptídeo intermediário dado a conhecer no documento US 5710246 A é um éster, Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-O-Me ou o éster de benzilo ou de alilo correspondente.

OBJECTOS DA INVENÇÃO

É, por conseguinte, um objecto da invenção proporcionar um intermediário tripeptídico para a síntese 3+7 e 3+6 de análogos da LHRH nos quais o rendimento e/ou a pureza do

produto são melhorados.

É um outro objecto da invenção proporcionar um processo para a produção deste intermediário tripeptídico.

É ainda um outro objecto da invenção proporcionar um processo para a produção de análogos da LHRH nos quais um tripeptídeo é acoplado a um heptapeptídeo ou hexapeptídeo.

Outros objectos adicionais da invenção tornar-se-ão óbvios a partir do sumário seguinte da invenção, da descrição de formas de concretização preferidas e das reivindicações da patente em anexo.

DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

Para definições e abreviaturas utilizadas neste pedido de patente e que são geralmente aceites no domínio da invenção, faz-se referência em particular ao documento US 5710246 A.

RESUMO DA INVENÇÃO

De acordo com a invenção, é proporcionado um processo para a preparação de um tripeptídeo (I) que representa os ácidos aminados 1 a 3 de um antagonista da LHRH, cujo grupo amina terminal está protegido por Ac e cujo grupo carboxilo terminal (isto é, o grupo terminal do ácido aminado n.º 3) não está protegido

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

que é um intermediário útil num processo para a síntese de um antagonista da LHRH da fórmula geral (II)

Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-X-NH₂ (II)

em que X é de 5 a 7 resíduos de ácidos aminados naturais e/ou sintéticos, de modo especialmente preferido AA1-AA2-Leu-AA3-Pro-D-Ala, em particular em que AA1 é um ácido aminado natural ou sintético e AA2 é um ácido aminado natural ou sintético ou zero, AA3 é um ácido aminado natural ou sintético.

Especificamente, de acordo com a invenção é dado a conhecer um processo para a preparação de um tripeptídeo da fórmula (I)

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

que compreende os seguintes passos consecutivos para a preparação de (I) :

- (a) fazer reagir Boc-D-4ClPhe-OH com HONSu para dar origem a Boc-D-4ClPhe-OSu (VII) ;
- (b) fazer reagir Boc-D-4ClPhe-OSu (VII) com H-D-3Pal-OH para dar origem a Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (VIII) ;
- (c) fazer reagir Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (VIII) com Boc-D-2Nal-OSu preparado por reacção de Boc-D-2Nal-OH com HON-Su para dar origem a Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX) ;
- (d) fazer reagir Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX) com ácido acético para dar origem a Ac-D-2Nal-4ClPhe-D-3Pal-OH (I) .

O processo da invenção para a preparação de um antagonista de LHRH compreende além dos passos (a) a (d) anteriores o passo de acoplar o tripeptídeo (I) a um heptapeptídeo (IV) da fórmula geral

P¹-Ser(P²)-AA1-AA2-Leu-Lys(iPr, P⁴)-Pro-D-AlaNH₂ (IV),

em que P⁴ é H ou um grupo protector de amina tal como Boc, em que AA1 e AA2 têm o significado acima mencionado, em particular com um heptapeptídeo (V) da fórmula geral P¹-Ser(P²)-NMeTyr(P³)-D-Lys(Nic)-Leu-Lys(iPr,P⁴)-Pro-DAlaNH₂ (V), em que P¹ é seleccionado de H ou um grupo protector de amina e P² e P³ são independentemente seleccionados de H e um grupo protector de -OH, e P⁴ tem o significado dado acima, para a preparação do antagonista de LHRH Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Lys(Nic)-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (III), mais em particular com um heptapeptídeo (Va) da fórmula geral P¹-Ser(P²)-NMeTyr(P³)-D-Asn-Leu-Lys(iPr,P⁴)-Pro-D-AlaNH₂ (Va), em que P¹ é seleccionado de entre H ou um grupo protector de amina e P² e P³ são independentemente seleccionados de entre H e um grupo protector de -OH, e P⁴ tem o significado dado acima, para a preparação do antagonista de LHRH Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-Ser-MeTyr-D-Asn-Leu-Lys(iPr)-Pro-D-Ala-NH₂ (III).

O heptapeptídeo (V) está descrito no documento US 5710246 A. O heptapeptídeo da fórmula geral (IV) incluindo o heptapeptídeo (Va) pode ser sintetizado por modificações de rotina da síntese de (V) ou por acoplamento dos correspondentes ácidos aminados Boc num sintetizador de peptídeos (Beckman modelo 990), conforme descrito no documento WO 94/40757 em que também se dá a conhecer o antagonista de LHRH (III).

Um vantagem particular do método da invenção é que se pode utilizar um material de partida mais barato, H-D-Pal-OH·2HCl, em vez do éster H-Pal-OR·2HCl; o grupo protector do material de partida não precisa de ser removido. Por

consequente, a síntese da invenção é mais curta em um passo e evita que se perca material num passo adicional. Outra vantagem é que se evita a formação de impurezas no passo de saponificação. A formação destas impurezas é bem conhecida. Por exemplo, as condições básicas no passo de hidrólise do éster causa uma racemização parcial de D-Pal. A outra alternativa da técnica anterior de remoção do grupo éster por hidrogenação catalítica (no caso de grupos ésteres alilo ou benzilo) tem o risco de causar uma perda de Cl do 4ClPhe, dando origem a Phe. Enquanto que os grupos alilo podem ser removidos ainda por outros reagentes, a remoção completa é de controlo difícil.

A invenção será de seguida explicada mais em pormenor por referência a uma forma de concretização preferida.

DESCRIÇÃO DE UMA FORMA DE CONCRETIZAÇÃO PREFERIDA DA INVENÇÃO

Síntese de Ac-D-2Nal-4ClPhe-D-3Pal-OH (I).

EXEMPLO 1. Boc-D-4ClPhe-OSu. Dissolvem-se Boc-D-4ClPhe-OH (299,75 g; 1,0 eq.) e HONSu (184,1 g; 1,6 eq.) em 2-propanol (4,5 L). A mistura é arrefecida a 0 °C e adiciona-se DIC (164,1 g; 1,3 eq.). A mistura é agitada durante 16 h enquanto se aquece até à temperatura ambiente. O produto é separado por filtração, lavado com 2-propanol e seco. Rendimento: 85%. pureza por HPLC: 98,8%

EXEMPLO 2. Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH. Dissolvem-se H-D-3Pal-OH, 2 HCl (251,1 g; 1,05 eq.) e Boc-D-4ClPhe-OSu (396,8 g; 1,0 eq.) em DMSO (3,33 L) e adiciona-se NMM (318,8 g; 3,15 eq.). A mistura é agitada durante 16 h à temperatura ambiente. Adiciona-se água (17 L) e ajusta-se o pH a 4-4,5,

o que provoca a precipitação do produto. A mistura é filtrada e o produto é lavado com água (3 x 5 L) a fim de remover traços de DMSO, H-D-3Pal-OH e Boc-D-4ClPhe-OH. Seca-se o produto. Rendimento: 80%. pureza por HPLC: 97,8%

EXEMPLO 3. Boc-D-2Nal-OSu. Dissolve-se Boc-D-2Nal-OH (315,4 g; 1,0 eq.) em 2-propanol (6,8 L) a -10 °C e adiciona-se IBC (157 g; 1,15 eq.) e NMM (116 g; 1,15 eq.). Após agitação durante 5-10 min, adiciona-se uma mistura de HONSu (230,1 g; 2,0 eq.) em 2-propanol (1,4 L). Adiciona-se mais NMM (10,1 g; 0,1 eq.). Após meia hora , adiciona-se água (0,82 L) para dissolver o NMM·HCl precipitado. O produto é isolado por filtração, lavado com 2-propanol (1 L) e seco. Rendimento: 90%. pureza por HPLC: 99,3%.

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

(a) *Remoção da protecção.* Dissolve-se Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (447, 93 g; 1,0 eq.) numa mistura de acetato de etilo (3,4 L), ácido acético (675 mL) e MSA (454 mL; 7,0 eq.) a 0 °C e conserva-s4 a esta temperatura durante duas horas. Adiciona-se TEA (1669 ml; 12 eq.).

b) *Condensação.* Adiciona-se Boc-D-Nal-OSu (412,4 g; 1,0 eq.) à mistura de remoção da protecção neutralizada à temperatura ambiente. A mistura reaccional é conservada a esta temperatura durante 2-4 h. Adiciona-se NK_3 a 25% aq. (154 mL; 2,0 eq.) para parar a reacção do éster hidroxisuccinato remanescente. Adiciona-se 1-butanol (4,5 L) para evitar a precipitação nas extracções subsequentes.

c) *Purificação e isolamento.* A mistura reaccional é extraída duas vezes a pH 6 (2 x 4,5 L de água) para remover a TEA, a pH 9 (4,5 L de água) para remover a MSA e por fim a pH 7 (4,5 de água). As extracções são efectuadas a 40-45 °C para evitar a precipitação. Adiciona-se ácido acético

(4,5 L; 1 vol.) à fase orgânica e a mistura é concentrada sob vácuo e co-evaporada com ácido acético (4,5 L), obtendo-se um sólido.

EXEMPLO 5. Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-ONa.

a) *Remoção da protecção.* A Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH sólido adiciona-se água (90 mL), ácido acético (1,8 L) e MSA (454 mL; 7,0 eq.) e a mistura é agitada durante 1 a 2 h à temperatura ambiente. A mistura é arrefecida até 0 °C e neutralizada com TEA (1.071 ml; 7,7 eq.). A solução é concentrada sob vácuo e co-evaporada duas vezes com tolueno (2 x 2,5 L), obtendo-se um óleo.

b) *Acetilação.* O óleo do passo de remoção da protecção é dissolvido em tolueno (2,0 L) e adiciona-se acetilimidazole (132,14 g). A mistura é agitada à temperatura ambiente durante 1 h e em seguida adiciona-se água (100 ml) para fazer parar a reacção do acetilimidazole remanescente.

d) *Purificação.* A mistura da acetilação é aquecida a 30-35 °C e adiciona-se 1-butanol (4,5 L) para evitar a precipitação. A mistura é extraída duas vezes a pH 5 (2 x 2,6 L de água) e duas vezes a pH 11 (2 x 2,6 L de água) utilizando NaOH para ajustar o pH a 11. Adiciona-se metanol (2,25 L) às últimas extracções para evitar a precipitação. Adiciona-se NaCl (130 g) à primeira e à última extracção para minimizar a perda de produto nas fases aquosas.

e) *Isolamento.* À fase orgânica das extracções agitada vigorosamente adiciona-se heptano (15 L) e a suspensão resultante é deixada em repouso à temperatura ambiente enquanto se agita durante pelo menos 1 h. A mistura é filtrada e o produto é lavado com heptano (2 x 3,5 L) e seco. Rendimento: 75% (a partir de Boc-D-9ClPhe-D-3Pal-OH). pureza por HPLC: 92%. Análise de aminoácidos: 2Nal: 1,1; 4ClPhe: 1,0; 3Pal: 0,9. EM: PM 586. Na: 4,6%

EXEMPLO 6. Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH-DCHA.

- a) *Remoção da protecção.* A Boc-D-ZNal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH sólido adiciona-se água (90 mL), ácido acético (1,8 L) e MSA (454 mL; 7,0 eq.) e a mistura é agitada durante 1 a 2 h à temperatura ambiente. A mistura é arrefecida até 0 °C e neutralizada com TEA (1071 ml; 7,7 eq.). A solução é concentrada sob vácuo e co-evaporada duas vezes com tolueno (2 x 2,5 L), obtendo-se um óleo.
- b) *Acetilação.* O óleo da remoção da protecção é dissolvido em tolueno (2,0 L) e adiciona-se acetilimidazole (132,14 g). A mistura é agitada à temperatura ambiente durante 1 h e de seguida adiciona-se água (100 ml) para fazer parar a reacção do acetilimidazole remanescente.
- c) *Purificação.* A mistura é aquecida a 30-35 °C e adiciona-se 1-butanol (4,5 L) para evitar a precipitação. A mistura é extraída duas vezes a pH 7 (2 x 2,6 L de água), uma vez a pH 9-9,5 (2,6 L de água) e uma vez a pH 7 (2,6 de água). Adiciona-se DCHA (diciclo-hexilamina) e a mistura é concentrada sob vácuo. O produto é suspenso em 1-butanol (4,5 L) a 50 °C e é lentamente adicionado a heptano (27 L) sob agitação vigorosa. A mistura é agitada a 0 °C de um dia para o outro e filtrada e o produto é lavado duas vezes com 1-butanol/heptano (1:3; 2 x 4,8 L) e duas vezes com heptano (2 x 4,5 L). Rendimento: 65% (a partir de Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH). pureza por HPLC: 94,2%. Análise de aminoácidos: 2Nal: 1,1; 4ClPhe: 1,0; 3Pal: 0.9. EM: PM 586 (peptídeo livre).

EXEMPLO 7. Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH.

- a) *Remoção da protecção.* A Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH sólido adiciona-se água (90 mL), ácido acético (1,8 L) e MSA (454 mL; 7,0 eq.) e a mistura é agitada durante 1 a 2 h à temperatura ambiente. A mistura é arrefecida até 0 °C e

neutralizada com TEA (1071 ml; 7,7 eq.). A solução é concentrada sob vácuo e co-evaporada duas vezes com tolueno (2 x 2,5 L), obtendo-se um óleo.

b) *Acetilação.* O óleo da remoção da proteção é dissolvido em tolueno (2,0 L) e adiciona-se acetilimidazole (132,14 g). A mistura é agitada à temperatura ambiente durante 1 h e em seguida adiciona-se água (100 mL) para fazer parar a reacção do acetilimidazole remanescente.

c) *Purificação.* A mistura da acetilação é aquecida a 30-35 °C e adiciona-se 1-butanol (4,5 L) para evitar a precipitação. A mistura é extraída duas vezes a pH 7 (2 x 2,6 L de água), uma vez a pH 9-9,5 (2,6 L de água) e uma vez a pH = 7 (2,6 L de água). A mistura é concentrada sob vácuo até se obter um óleo, o qual é dissolvido em ácido acético (750 mL), concentrado, redissolvido em ácido acético (750 mL) e adicionado lentamente a heptano/acetato de etilo (3:1; 3,6 L) agitado vigorosamente. A mistura é deixada em agitação a 0 °C de um dia para o outro. A mistura é filtrada e o produto é lavado duas vezes com acetato de etilo/heptano (1:3; 2 x 3,6 L) e duas vezes com heptano (2 x 3,6 L). Rendimento: 70% (a partir de Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH). pureza por HPLC: 93,9%. Análise de aminoácidos: Nal: 1,1; 4ClPhe: 1,0; 3Pal: 0,9 EM: PM 58 6 (peptídeo livre).

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de um tripeptídeo, incluindo um seu sal, da fórmula (I)

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

que comprehende os seguintes passos consecutivos para a preparação de (I) :

- (a) fazer reagir Boc-D-4ClPhe-OH com HONSu para dar origem a Boc-D-4ClPhe-OSu (VII);
- (b) fazer reagir Boc-D-4ClPhe-OSu (VII) com H-D-3Pal-OH para dar origem a Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (VIII);
- (c) fazer reagir Boc-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (VIII) com Boc-D-2Nal-OSu preparado por reacção de Boc-D-2Nal-OH com HON-Su para dar origem a Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX);
- (d) fazer reagir Boc-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (IX) com ácido acético para dar origem a Ac-D-2Nal-4ClPhe-D-3Pal-OH (I).

2. Processo para a preparação de um antagonista da LHRH ou de um seu sal farmaceuticamente aceitável que comprehende os passos da reivindicação 1, em que
o tripeptídeo

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

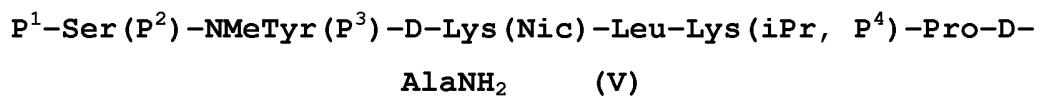
é adicionalmente acoplado a um heptapeptídeo (IV) da fórmula geral



em que P^1 é seleccionado de entre H ou um grupo protector

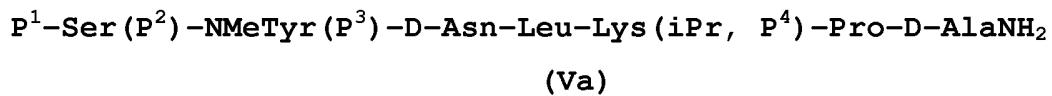
de amina, P² é H ou um grupo protector de -OH, P⁴ é H ou um grupo protector de amina tal como Boc, AA1 é um ácido aminado natural ou sintético e AA2 é um ácido aminado natural ou sintético ou zero.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2, em que o heptapeptídeo da fórmula geral (IV) é



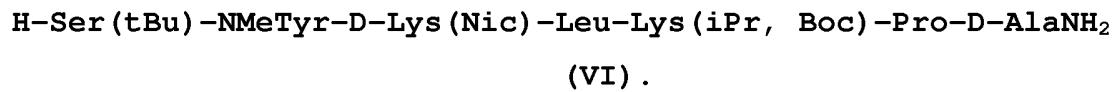
em que P³ é H ou um grupo protector de -OH

4. Processo de acordo com a reivindicação 2, em que o heptapeptídeo da fórmula geral (IV) é

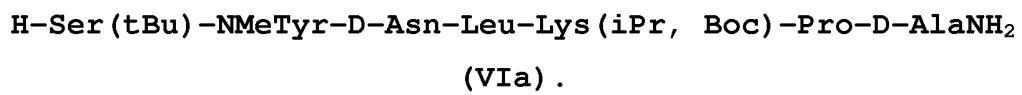


em que P³ é H ou um grupo protector de -OH

5. Processo de acordo com a reivindicação 3, em que o heptapeptídeo da fórmula geral (V) é



6. Processo de acordo com a reivindicação 4, em que o heptapeptídeo da fórmula (VI) é um heptapeptídeo da fórmula



7. Sal do tripeptídeo Ac-D-2Nal-D-4ClPhe-D-3Pal-OH (I).

Lisboa,