



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 826**

51 Int. Cl.:
C07K 14/575 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06759010 .9**

96 Fecha de presentación : **02.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1773870**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Procedimientos para la producción de un péptido que presenta una amida C-terminal.**

30 Prioridad: **03.05.2005 US 677582 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2010

73 Titular/es: **Novetide, Ltd.**
P.O. Box 10140
Haifa Bay 26111, IL

72 Inventor/es: **Ivchenko, Alexander;**
Alon, Hagi;
Elster, Shai;
Shushan, Shimon;
Eidelman, Chaim;
Tovi, Avi;
Gadi, Tehila;
Bar-Oz, Leah;
Alterman, Eleonora;
Zaovi, Gil y
Butilca, Gabriel-Marcus

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 336 826 T3

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

Procedimientos para la producción de un péptido que presenta una amida C-terminal.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar un péptido que es un derivado de amida C-terminal y a sus productos.

10 **Antecedentes de la invención**

La síntesis peptídica puede consistir en una síntesis en fase sólida (SPPS) o en una síntesis en fase de solución y generalmente se lleva a cabo desde el extremo C al extremo N. Existen diversos grupos de péptidos y de compuestos peptidomiméticos caracterizados por la derivación en el extremo carboxilo de la cadena peptídica.

15 La síntesis de los péptidos derivados se lleva a cabo generalmente mediante una síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) o una síntesis en fase de solución. La SPPS implica habitualmente la utilización de una resina sobre la cual se construye el péptido derivado. La síntesis en fase de solución se basa habitualmente en la condensación de fragmentos.

20 La SPPS se describe en BE 841180 y la patente US nº 4.002.738. Mediante este procedimiento, la prolina que transporta como grupo bloqueador el sustituyente t-butiloxi-carbonilo (Boc-) sobre el grupo amino, es esterificada mediante combinación con un copolímero estireno-divinilbenceno clorometilado (resina Merrifield), utilizando el procedimiento descrito por Stewart *et al*, en "SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS" (publicado por Freeman & Company en 1969). La síntesis continúa secuencialmente en un sintetizador automático, aplicando la química Boc para la síntesis del nonapéptido deseado. La desprotección del grupo Boc se realizó por el 4N ácido clorhídrico/dioxano. La conjugación se llevó a cabo utilizando dicitlohexilcarbodiimida en diclorometano con un exceso de 2,9 veces. Finalmente, la resina peptídica obtenida por este procedimiento se suspendió en 200 ml de trietilamina/metanol al 5%, añadiéndose 100 ml de etilamina destilada. Después de 24 horas, la resina fue eliminada mediante filtración, evaporándose la solución para obtener un sólido. Éste se disolvió en ácido acético glacial y se purificó en una columna de gel de sílice para obtener un nonapéptido tri-prottegido (con grupos protectores de Ser, Tyr y Arg). La desprotección final se llevó a cabo mediante fluoruro de hidrógeno anhidro. El producto en bruto se purificó finalmente mediante cromatografía en una columna Sephadex G-25 (comercializada por Pharmacia Uppsala, Suecia).

Otro ejemplo de SPPS se encuentra en la patente US nº 4.005.063.

35 En general, los péptidos pueden prepararse utilizando la SPPS que se describe por Merrifield en J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963). Más particularmente, la prolina N-bloqueada es esterificada a un copolímero estireno-divinilbenceno-clorometilado, después del desbloqueo, la arginina N γ -bloqueada que transporta un grupo protector lábil sobre N-imino se conjuga con el grupo imino, ahora libre, del éster de la prolina y, después del desbloqueo, esta secuencia de fases de conjugación y desbloqueo se repite con otros aminoácidos en la secuencia del péptido deseado. Todos los aminoácidos se utilizan en su forma L, excepto para el aminoácido identificado como D-aminoácido en la fórmula. Después de que todos estos aminoácidos se unen en la secuencia mencionada anteriormente con los grupos protectores que transportan la arginina, tirosina, serina y opcionalmente, histidina, el nonapéptido es eliminado de la resina mediante transesterificación/amonólisis, por lo que el enlace resínico es reemplazado por el extremo etilamida. El tratamiento siguiente, de forma conocida, elimina todos los grupos protectores, dando lugar al péptido en forma sustancialmente pura y con un rendimiento aceptable.

45 La solicitud de patente europea EP 0 518 656 A2 describe una SPPS de la secuencia Goserelin sobre una resina mediante un ligamento que es lábil a la hidrazina. La escisión del péptido a partir de la resina da lugar al derivado de la hidrazina, que puede convertirse en el residuo aza-Gly terminal. La protección de las cadenas laterales se obtiene utilizando los siguientes grupos protectores: BrZ para Tyr, Fmoc para His, y tBu para D-Ser en la posición 6, evitando la protección del Ser en la posición 4.

50 Otra solicitud de patente europea, EP 0 518 655 A2, describe una SPPS que empieza con una resina precargada con la unidad de construcción AzaGly. No se utilizó protección para las cadenas laterales de Ser y Tyr de la posición 4. El péptido final se trató con hidrazina para hidrolizar posibles productos laterales con cadenas laterales aminoácidas aciladas que se incorporan en forma libre.

60 La solicitud de patente europea EP 1 179 537, describe una SPPS de una secuencia peptídica que se prepara secuencialmente utilizando super grupos protectores lábiles superácidos y otro tipo de super resinas ácido lábiles, de tal forma que el péptido pudo eliminarse a partir de la resina, mientras se mantuvieron los grupos protectores de la cadena lateral, que pueden eliminarse después mediante otro tratamiento ácido. El grupo C-terminal tal como azaglicina o etilamina se une a la cadena peptídica protegida mediante un procedimiento regular de formación amídica. La principal desventaja de este procedimiento es la necesidad de aplicar estrategias de protección caras y únicas.

65 Otra metodología es una síntesis en fase de solución, basada en la condensación de fragmentos, tal como se describe mediante la publicación de la patente internacional WO 99/07874. Mediante este procedimiento, el péptido requerido puede obtenerse haciendo reaccionar un fragmento peptídico representado por la fórmula general siguiente pGlu-His-

Trp-OR₁ (en la que R₁ representa un grupo alquilo inferior) con otro fragmento peptídico representado por la fórmula general: H-Ser-Tyr-X-Leu-Arg-Pro-Y, en presencia de quimiotripsina o una enzima tipo quimiotripsina.

Otra variación en el procedimiento de condensación de los fragmentos se da a conocer en la patente US nº 4.008.209. En esta patente, se produce un derivado de amida nonapeptídico mediante un procedimiento en el que un reactivo (A)- ácido L-piroglutámico o un fragmento peptídico que tiene una unidad de ácido L-piroglutámico (es decir, (Pyr)Glu) en su extremo N-terminal, y que al mismo tiempo, comprende la secuencia aminoácida deseada -se condensa con un reactivo (B)- un componente amínico que corresponde al equilibrio del derivado amídico nonapéptido-, estando los dos reactivos (A) y (B) protegidos opcionalmente mediante un grupo o grupos protectores, y entonces, el grupo o grupos protectores, si existe alguno, son eliminados.

En otro ejemplo del mismo enfoque sintético en la fase de solución (solicitud de patente rusa RU 2074191), la síntesis se lleva a cabo según un esquema de fragmentación 2+ (2+(4+1)), aplicando la química Cbz y un residuo Arg desprotegido de cadena lateral.

En otro ejemplo (publicación de patente internacional WO 97/48726), la cadena peptídica se construye mediante una estrategia 2+4+3 de acoplamiento de fragmentos. Se aplica la química Cbz de protección y uno de los productos intermedios se purifica mediante cristalización, mientras que el péptido final se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico.

La patente US nº 4.100.274 describe un procedimiento para obtener Goserelin mediante la condensación de tres fragmentos preformados que contienen -NO₂ como grupo protector para la arginina y -Bzl como grupo protector para la tirosina, los dos cuales son lábiles a la hidrogenólisis. En este procedimiento, el residuo azaglicina se introduce en el tripéptido C-terminal, que se une entonces a Z-Tyr(Bzl)-D-Ser(tBu)-Leu-N₃, para dar lugar a un fragmento que, una vez se elimina el grupo Z, se une a Pyr-His-Trp-Ser-N₃ para dar lugar a Goserelin. Esta última reacción se lleva a cabo con la totalidad de las cadenas laterales no protegidas, con la excepción de la que pertenece a D-Ser (tBu).

Sumario de la invención

En una forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar exenatide, que comprende: proporcionar aminoácidos, protegidos o no, unidos en su C terminal a una resina lábil superácida, protegida o no, en presencia de un reactivo de unión; repetir la etapa de unión para obtener un péptido, en la que el péptido está protegido con por lo menos un grupo protector que permanece en el péptido después de su escisión de la resina; escisión de dicho péptido protegido de la resina, mezclándolo con una solución ácida moderada; y amidando el péptido protegido obtenido con una amina apropiada.

En todavía otra forma de realización, la presente invención proporciona Acetato de exenatide con una pureza de por lo menos, alrededor del 99,0%, determinada mediante el método HPLC.

En una forma de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende Acetato de exenatide preparado mediante uno de los procedimientos de la presente invención, con por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una formulación farmacéutica que comprende la combinación de Acetato de exenatide preparado mediante uno de los procedimientos de la presente invención, con, por lo menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En todavía otra forma de realización, la presente invención proporciona la utilización de Acetato de exenatide preparado mediante uno de los procedimientos de la presente invención, para preparar una composición farmacéutica.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar Acetato de exenatide, que comprende la obtención de exenatide según el procedimiento de la presente invención, y la conversión del exenatide obtenido en Acetato de exenatide.

Descripción detallada de la invención

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ACN" se refiere a acetonitrilo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "Boc" se refiere a t-Butiloxicarbonilo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "Bzl" se refiere a bencilo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "Cbz" se refiere a benciloxicarbonilo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "DCM" se refiere a diclorometano.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "DIEA" se refiere a diisopropiletilamina.

ES 2 336 826 T3

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “DMF” se refiere a dimetilformamida.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “EDT” se refiere a etanoditiol.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “Fmoc” se refiere a 9-fluorenilmetoxicarbonilo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “HBTU” se refiere a 2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “HOBt” se refiere a N-hidroxibenzotriazol.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “Pbf” se refiere al pentametildihidrobenzofuransulfonil.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “SPPS” se refiere a síntesis peptídica en fase sólida.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “TBTU” se refiere a 2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “tBu” se refiere a terc-butilo.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “TFA” se refiere a ácido trifluoroacético.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “TIS” se refiere triisopropilsilano.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “Trt” se refiere a tritilo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “RT” o “temperatura ambiente” se refiere a una temperatura de aproximadamente 18-25°C, preferentemente de aproximadamente 20-22°C.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “solución ácida moderada” se refiere a una solución que comprende un ácido en un disolvente orgánico inerte, en una concentración tal, que durante la escisión del péptido a partir de la resina, los grupos protectores permanecen en el péptido.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “reactivo de unión ” se refiere a cualquier producto que active el grupo carboxilo del fragmento peptídico protegido.

La invención se refiere a un procedimiento para preparar exenatide que comprende una combinación de una síntesis en fase sólida (SPPS), que utiliza una resina como soporte sólido para obtener un péptido protegido con un extremo-C carboxílico, y una síntesis en fase de solución para la amidación del extremo C. La invención se refiere además a precursores peptídicos protegidos y a acetatos peptídicos que poseen una pureza, por lo menos, de aproximadamente 99,0%, determinada mediante el procedimiento de HPLC.

40 Todos los estadios en el procedimiento de la presente invención se llevan a cabo bajo condiciones moderadas, proporcionando por lo tanto un bajo contenido en productos de desecho, un alto rendimiento y una gran pureza del producto final. Además, los procedimientos de la presente invención requieren aminoácidos regulares protegidos comercializados.

45 La presente invención proporciona un procedimiento para preparar exenatide que comprende: proporcionar un aminoácido, protegido o no, unido en su C-terminal a una resina super ácida lábil; uniendo dicho aminoácido, con otro aminoácido, protegido o no, en presencia de un reactivo de unión; repitiendo la etapa de unión para obtener un péptido, en la que el péptido es protegido con, por lo menos, un grupo protector que permanece en el péptido después de su escisión a partir de la resina; llevando a cabo la escisión de dicho péptido protegido a partir de la resina mezclando con una solución ácida moderada; y realizando la amidación del péptido protegido obtenido con una amina apropiada.

50 La etapa de amidación comprende la adición de una base. Preferentemente, la base es diisopropilmetilamina.

La resina lábil superácida es seleccionada de entre el grupo constituido por: resina clorotritilo, resina ácida Rink, resina NovaSyn TGT, y resina HMPB-AM.

60 El reactivo de unión es 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3 tetrametiluronio tetrafluoroborato (TB-TU).

La solución ácida moderada es una solución que comprende aproximadamente de 0,1% a aproximadamente 5% de TFA en un disolvente orgánico inerte o en una mezcla de ácido acético con trifluoroetanol y DCM.

65 Antes de llevar a cabo la amidación, el péptido protegido se aísla. Preferentemente, el aislamiento se verifica mediante precipitación, cristalización, extracción o cromatografía. Más preferentemente, el aislamiento se lleva a cabo mediante precipitación.

ES 2 336 826 T3

El péptido obtenido después de la escisión a partir de la resina es un precursor protegido del exenatide formado por aminoácidos que poseen la secuencia de: Boc-His(Trt)-Gly-Glu(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(tBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-Leu-Phe-Ile-Glu-(tBu)-Trp-Leu-Lys-(Boc)-Asp(tBu)-Gly-Gly-Pro-Ser-(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-OH (SEC. ID. n°31). Preferentemente, llevar a cabo la amidación comprende el tratamiento del precursor protegido del exenatide con un reactivo de unión en presencia de amoníaco en DMF, para obtener exenatide protegido formado por aminoácidos que tienen la secuencia de Boc-His(Trt)-Gly-Glu(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(tBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-Leu-Phe-Ile-Glu-(tBu)-Trp-Leu-Lys-(Boc)-Asp(tBu)-Gly-Gly-Pro-Ser-(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-NH₂. (SEC. ID. n°31). Preferentemente, después de la amidación, el procedimiento comprende además: hacer reaccionar el exenatide con una composición ácida que incluye una solución TFA que contiene agua, TIS y EDT; añadir éter para obtener un precipitado de exenatide formado por aminoácidos que tienen la secuencia de H-His-Gly-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asp-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂ (SEC ID n°:31), y aislando el exenatide.

El aislamiento de los péptidos se lleva a cabo mediante precipitación.

La precipitación se realiza a partir de un disolvente seleccionado de entre el grupo constituido por metil-terc-butil-éter (MTBE), éter dietilo, diisopropiléter y sus mezclas. Preferentemente, el disolvente se mezcla con metanol, etanol o acetonitrilo.

La presente invención proporciona Acetato de exenatide con una pureza de por lo menos 99,0%, que se determina mediante el método de HPLC.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende Acetato de exenatide preparado mediante uno de los procedimientos de la presente invención y, por lo menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona un procedimiento para preparar una formulación farmacéutica que comprende la combinación de Acetato de exenatide, preparado mediante uno de los procedimientos de la presente invención, con, por lo menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona la utilización de Acetato de exenatide mediante uno de los procedimientos de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica.

La presente invención proporciona un procedimiento para preparar Acetato de exenatide que comprende la obtención de exenatide según el procedimiento de la presente invención, y la conversión del exenatide en Acetato de exenatide.

La presente invención proporciona un procedimiento para preparar una formulación farmacéutica que comprende la combinación del Acetato de exenatide obtenido según los procedimientos de la presente invención con por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los procedimientos de administración de una composición farmacéutica de la presente invención, pueden llevarse a cabo en varias preparaciones que dependen de la edad, sexo y síntomas del paciente. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse, por ejemplo, en comprimidos, grageas, polvos, líquidos, suspensiones, emulsiones, gránulos, cápsulas, supositorios, preparaciones inyectables (soluciones y suspensiones) y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden mezclarse opcionalmente con Acetato de exenatide que se obtiene en la presente invención, y otros principios activos. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener ingredientes inactivos tales como diluyentes, portadores, rellenos, agentes de hinchamiento, aglomerantes, desintegrantes, inhibidores de la desintegración, aceleradores de la absorción, agentes de humedecimiento, lubricantes, deslizantes, agentes superficiales activos, agentes saborizantes, y similares.

Los diluyentes aumentan el volumen de una composición farmacéutica sólida, y pueden propiciar que ésta contenga una forma de dosificación que sea facilitadora y más manejable para el paciente. Los diluyentes para las composiciones sólidas incluyen, por ejemplo, celulosa microcristalina (por ejemplo, Avicel[®], celulosa microfina, lactosa, almidón, almidón pregelatinizado, carbonato cálcico, sulfato cálcico, azúcar, dextratos, dextrina, dextrosa, dihidrato fosfato cálcico dibásico, fosfato cálcico tribásico, caolín, carbonato magnésico, óxido de magnesio, maltodextrina, manitol, polimetacrilatos (por ejemplo Eudragit[®], cloruro de potasio, celulosa en polvo, cloruro sódico, sorbitol y talco).

Las composiciones farmacéuticas sólidas que están compactadas en una forma de dosificación, tal como un comprimido, pueden incluir excipientes, cuyas funciones incluyen ayudar a unir conjuntamente el principio activo y otros excipientes después de la compresión. Los aglomerantes para las composiciones farmacéuticas sólidas incluyen acacia, ácido alginico, carbómero (por ejemplo, carbopol), carboximetilcelulosa sódica, dextrina, etil celulosa, gelatina, goma guar, aceite vegetal hidrogenado, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa (por ejemplo, Kluce[®]), hidroxipropilmetilcelulosa (por ejemplo, Methocel[®]), glucosa líquida, silicato aluminico de magnesio, maltodextrin, metilcelulosa, polimetacrilatos, povidona (por ejemplo, Kollidon[®], Plasdone[®]), almidón pregelatinizado, alginato sódico y almidón.

ES 2 336 826 T3

La tasa de disolución de una composición farmacéutica sólida compactada en el estómago del paciente puede aumentar añadiendo un desintegrante a la composición. Los desintegrantes incluyen ácido algínico, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica (por ejemplo, Ac-Di-Sol[®], Primellose[®]), dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, crospovidona (por ejemplo, Kollidon[®], Polyplasdone[®]), goma de guar, silicato aluminico de magnesio, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polacrilin potásico, celulosa en polvo, almidón pregelatinizado, alginato sódico, glicolato sódico de almidón (por ejemplo, Explotab[®]) y almidón.

Los deslizantes pueden añadirse para mejorar la fluidez de una composición sólida no compactada y mejorar la exactitud de la dosis. Los excipientes que pueden funcionar como deslizantes incluyen dióxido de silicio coloidal, trisilicato magnésico, celulosa en polvo, almidón, talco y fosfato cálcico tribásico.

Cuando una forma de dosificación tal como un comprimido se prepara mediante la compactación de una composición pulverulenta, la composición se somete a presión a partir de una prensa punzonadora y un colorante. Algunos excipientes y principios activos tienden a adherirse a las superficies del punzón y del colorante, que pueden causar que el producto presente poros de corrosión y otras irregularidades superficiales. Puede añadirse un lubricante a la composición para reducir la adhesión y facilitar la liberación del producto a partir del colorante. Los lubricantes incluyen el estearato de magnesio, el estearato cálcico, el monoestearato de glicerilo, el palmitoestearato de glicerilo, el aceite hidrogenado de castor, aceites hidrogenados vegetales, aceite mineral, polietilenglicol, benzoato sódico, sulfato lauril sódico, fumarato estearil sódico, ácido esteárico, talco y estearato de zinc.

Los agentes saborizantes y los potenciadores del sabor hacen que la forma de dosificación sea más agradable para el paciente. Los agentes saborizantes y los potenciadores del sabor para los productos farmacéuticos que pueden incluirse en la composición de la presente invención incluyen maltol, vainillina, etil vainillina, mentol, ácido cítrico, ácido fumárico, etil maltol y ácido tartárico.

Las composiciones sólidas y líquidas pueden también colorearse utilizando colorantes farmacéuticamente aceptables para mejorar su apariencia y/o facilitar la identificación por parte del paciente, del producto y del nivel de la dosis unitaria.

En composiciones farmacéuticas líquidas de la presente invención, el acetato peptídico y cualesquiera otros excipientes sólidos se disuelven o suspenden en un líquido portador tal como el agua, aceite vegetal, alcohol, polietilenglicol, propilenglicol, o glicerina.

Las composiciones farmacéuticas líquidas pueden contener agentes emulsificantes para dispersar uniformemente a través de la composición, un principio activo u otro excipiente que no es soluble en el líquido portador. Los agentes emulsificantes que pueden ser útiles en composiciones líquidas de la presente invención incluyen, por ejemplo, gelatina, yema de huevo, caseína, colesterol, acacia, tragacanto, condrus, pectina, metilcelulosa, carbomer, alcohol cetosteárico y alcohol cetilo.

Las composiciones farmacéuticas líquidas de la presente invención pueden también contener un agente que potencia la viscosidad para mejorar el sabor del producto en la boca y/o tapizar el revestimiento del tracto gastrointestinal. Dichos agentes incluyen acacia, ácido algínico bentonita, carbomer, carboximetilcelulosa cálcica o sódica, alcohol cetosteárico, metilcelulosa, etilcelulosa, gelatina goma guar, hidroxietilcelulosa, hidroxopropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, maltodextrina, alcohol de polivinilo, povidona, carbonato de propileno, propilenglicol alginato, alginato sódico, glicolato sódico de almidón, almidón tragacanto y goma xantán.

Los agentes edulcorantes tales como sorbitol, sacarina, sacarina sódica, sacarosa, aspartano, fructosa, manitol y azúcar invertida pueden añadirse para mejorar el sabor.

Los agentes conservantes y quelantes tales como alcohol, benzoato sódico, hidroxil tolueno butilado, hidroxianisol butilado y ácido tetraacético etilendiamina pueden añadirse a niveles seguros para la ingestión, para mejorar la estabilidad del almacenamiento.

Según la presente invención, una composición líquida puede contener asimismo un tampón tal como ácido glucónico, ácido láctico, ácido cítrico o ácido acético, gluconato sódico, lactato sódico, citrato sódico o acetato sódico. La selección de excipientes y las cantidades utilizadas pueden determinarse fácilmente mediante la formulación científica basada en la experiencia y en la consideración de los procedimientos estándares y en los trabajos de referencia en el campo.

Cuando se preparan composiciones farmacéuticas inyectables (parenterales), las soluciones y suspensiones se esterilizan y resultan preferentemente isotónicas con la sangre. La preparación de las inyecciones puede utilizar portadores que se conocen habitualmente en la técnica. Por ejemplo, los portadores para las preparaciones inyectables incluyen, pero no se limitan a agua, alcohol etílico, propilenglicol, alcohol isoestereárico etoxilado, alcohol isoestereárico polioxilado y ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano. Un experto en la materia puede determinar fácilmente con una escasa experimentación o con ninguna, la cantidad de cloruro sódico, glucosa o glicerina necesaria para hacer que la preparación inyectable sea isotónica. Pueden añadirse Ingredientes adicionales, tales como agentes disolventes, agentes tampón y agentes analgésicos.

ES 2 336 826 T3

Las composiciones sólidas de la presente invención incluyen polvos, granulados, agregados y composiciones compactadas. Las dosis incluyen dosis apropiadas para la administración oral, bucal, rectal, parenteral (que incluye la subcutánea, intramuscular e intravenosa), inhalante y oftálmica. Aunque la administración muy apropiada en cada caso dado, dependerá de la naturaleza y gravedad (de la situación de la que) está siendo tratada, constituye la vía muy preferida de tratamiento, la vía más preferida de la presente invención, es la oral. Las dosis pueden presentarse convenientemente en formas de dosificación única y prepararse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en las técnicas farmacéuticas.

Las formas de dosificación incluyen formas sólidas de dosificación, tales como comprimidos, polvos, cápsulas, supositorios, saquitos, pastillas para chupar, pastillas, así como jarabes líquidos, suspensiones y elixires.

La forma de dosificación de la presente invención puede consistir en una cápsula que contiene la composición, preferentemente una composición pulverulenta o granulada sólida de la invención, en el interior de una cáscara (o cubierta) dura o blanda. La cáscara puede estar realizada en gelatina y contener opcionalmente contener un plastificante como glicerina y sorbitol, y un agente opacificante o colorante.

El principio activo y el excipiente pueden formularse en composiciones y formas de dosificación según los procedimientos que se conocen en la técnica.

Una composición para formar comprimidos o rellenar cápsulas puede prepararse mediante granulación húmeda. En la granulación húmeda, algunos o la totalidad de los principios activos y excipientes en forma pulverulenta, se mezclan, y se mezclan entonces posteriormente en presencia de un líquido, típicamente agua, que provoca que el polvo se amontone en gránulos. El granulado se rastrea y/o muele, se seca y rastrea entonces y/o se muele hasta el tamaño deseado de partícula. El granulado puede entonces marcarse, o pueden añadirse otros excipientes antes de formar los comprimidos, tal como un deslizante y/o un lubricante.

Una composición de comprimidos puede prepararse convencionalmente mediante mezclado seco. Por ejemplo, la composición mezclada con los principios activos y los excipientes puede compactarse en un (fragmento de) metal, o en una lámina y entonces, triturar en gránulos compactos. Los gránulos compactados pueden a continuación comprimirse (formando) un comprimido.

Alternativamente a la granulación en seco, una composición mezclada puede comprimirse directamente en una forma de dosificación compactada, utilizando técnicas directas de compresión. La compresión directa produce un comprimido más uniforme sin gránulos. Los excipientes que están particularmente preparados para la formación de los gránulos mediante compresión directa, incluyen la celulosa microcristalina, pulverización de lactosa seca, dihidrato de fosfato dicálcico y sílice coloidal. La utilización apropiada de estos y otros excipientes en la obtención de comprimidos mediante compresión directa, es conocida por los expertos en la materia que poseen experiencia y habilidad en los intentos de formulación particular de la obtención de comprimidos mediante compresión directa.

Un relleno de cápsulas de la presente invención puede comprender cualquiera de las mezclas mencionadas anteriormente y los granulados que se describieron haciendo referencia a la obtención de comprimidos, no estando sometido, sin embargo, a una etapa final de obtención de comprimidos. Las composiciones sólidas de la presente invención incluyen polvos, granulados, agregados y composiciones compactas. Las dosis incluyen dosis apropiadas para la administración oral, bucal, rectal, parenteral, (que incluye subcutánea, intramuscular e intravenosa), por inhalación y oftálmica. Aunque la vía más apropiada en cualquier caso dado, dependerá de la naturaleza y gravedad de la situación que se trate, la vía más preferida de la presente invención es la oral. Las dosis pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica.

Mientras que la presente invención se describe con respecto a ejemplos particulares y formas de realización particulares, se debe entender que la presente invención no se limita a estos ejemplos y formas de realización. Pueden así introducirse en la presente invención, tal como se reivindica, variaciones de los ejemplos particulares y de las formas de realización preferidas que se describen en la presente memoria, como apreciará el experto en la materia.

Instrumentos

HPLC

Los procedimientos de HPLC siguientes son según la Farmacopea Europea.

ES 2 336 826 T3

Ejemplo 1

Preparación de Boc-His(Trt)-Gly-Gly-Glu(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(tBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys-(Doc)-Gln(Trt)-Met-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-Leu-Phe-Ile-Glu(tBu)-Trp-Leu-Lys-(Boc)-Asp(tBu)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-OH(SEC. ID nº 31) (Precursor de exenatide)

La síntesis del péptido se lleva a cabo mediante un procedimiento SPPS de paso regular Fmoc que empieza a partir de la resina cloruro de 2-Cl-Trt. El primer aminoácido (Fmoc-Ser(tBu)) se carga en la resina tal como se describe en los ejemplos anteriores para obtener una carga de aproximadamente 0,7 mmol/g de aminoácido/resina. Después del lavado de la resina y de la remoción del grupo Fmoc mediante tratamiento con piperidina/DMF, el segundo aminoácido (Fmoc-Pro) se introduce para continuar el alargamiento de la secuencia. Los aminoácidos protegidos por Fmoc se activan *in situ* utilizando TBTU/HOBt y se unen a continuación a la resina durante aproximadamente 50 minutos. La diisopropiletilamina o colidina se utiliza durante la conjugación como una base orgánica. El cumplimiento de la conjugación se indica mediante el ensayo de la ninhidrina. Después del lavado de la resina, el grupo protector Fmoc sobre la α -amina es eliminado con piperidina al 20% en DMF durante 20 minutos. Estas etapas se repiten cada vez con otro aminoácido según la secuencia peptídica. Todos los aminoácidos que se utilizan están protegidos con Fmoc-N α , excepto el último aminoácido, que se protege con Boc. Los aminoácidos trifuncionales constituyen cadenas literales protegidas de la forma siguiente: Ser(tBu), Thr(tBu), Glu(tBu), Gln(Trt), His(Trt), Arg(Pbf) y Asp(tBu). En las reacciones de unión se utilizan tres equivalentes de los aminoácidos activados. Al final de la síntesis, la resina peptídica se lava con DMF, seguido por DCM, y se seca al vacío para obtener una resina peptídica seca.

El péptido, preparado tal como se describe anteriormente, se escinde de la resina a temperatura ambiente (RT) utilizando un TFA al 1% en solución DCM mediante tres lavados repetidos (de 15 minutos cada uno). La solución peptídica ácida es neutralizada mediante DIPEA. El producto se precipita añadiendo 10 volúmenes de agua, y se filtra y se seca al vacío para obtener polvos del péptido en bruto.

Ejemplo 2

H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asp-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂ (SEC ID nº 31) (exenatide)

Se hizo reaccionar el péptido en bruto (preparado tal como se describe en el ejemplo 1) con amoníaco disuelto en DMF. La activación del grupo carboxilo del péptido se lleva a cabo *in situ* añadiendo TBTU/HOBt a la mezcla reactiva. Se utiliza la diisopropiletil amina como una base orgánica. El cumplimiento de la reacción se controla mediante análisis HPLC. Al final de la reacción, se añade la solución DMF lentamente al agua, y se precipita el péptido en bruto protegido como un sólido de color hueso. El péptido se separa mediante filtración, y entonces se seca.

El péptido anterior protegido se trata con un "cóctel" que contiene TFA al 95%, TIS al 2,5%, EDT al 2,5% durante 2 horas a temperatura ambiente. El producto se precipita añadiendo 10 volúmenes de éter, se filtra, se seca al vacío para obtener el péptido en bruto. El péptido en bruto se purifica en una columna preparativa C18 RP-HPLC, para obtener fracciones que contienen solución peptídica con una pureza mayor del 98,5%. Después del intercambio del contraión con acetato (en RP-HPLC), las fracciones se recuperaron y liofilizaron para obtener el péptido seco final con una pureza superior al 99,0%.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para preparar exenatide que comprende:

- a) proporcionar aminoácidos, protegidos o no protegidos, unidos en su C terminal a una resina lábil superácida;
- b) acoplar dicho aminoácido con otro aminoácido, protegido o no protegido, en presencia de un reactivo de acoplamiento;
- c) repetir la etapa b) para obtener un péptido, en el que el péptido está protegido con por lo menos un grupo protector que permanece en el péptido cuando se escinde la resina;
- d) escindir dicho péptido protegido de la resina mezclando con una solución ácida moderada; y
- e) realizar la amidación del péptido protegido obtenido en la etapa d), con una amina apropiada.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la amidación en la etapa e) se lleva a cabo en presencia de una base, preferentemente la diisopropiletilamina.

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la resina lábil superácida se selecciona de entre el grupo constituido por: resina clorotritilo, resina ácida Rink, resina NovaSyn TGT, y resina HMPB-AM.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el reactivo de acoplamiento es el tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3,-tetrametiluronio (TB-TU).

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución ligeramente ácida en la etapa d) es una solución que comprende aproximadamente 0,1% y aproximadamente 5% de TFA en un disolvente orgánico inerte o una mezcla de ácido acético con trifluoroetanol y DCM.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido protegido con la resina obtenida en la etapa d) se aísla antes de la etapa e).

7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el aislamiento es mediante precipitación, cristalización, extracción, o cromatografía, siendo preferentemente el aislamiento mediante precipitación.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el péptido protegido obtenido después de la escisión de la resina, es un precursor de exenatide protegido, constituido por aminoácidos que presenta la secuencia de Boc-His(Trt)-Gly-Glu(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(tBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-Leu-Phe-Ile-Glu(tBu)-Trp-Leu-Lys(Boc)-Asp(tBu)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-OH (SEC. ID. n°31).

9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la amidación comprende el tratamiento de un precursor de exenatide protegido con un reactivo de acoplamiento en presencia de amoníaco en DMF, para obtener un precursor de exenatide protegido constituido por aminoácidos que presenta la secuencia Boc-His(Trt)-Gly-Glu(tBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(tBu)-Leu-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Met-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Glu(tBu)-Ala-Val-Arg(Pbf)-Leu-Phe-Ile-Glu(tBu)-Trp-Leu-Lys(Boc)-Asp(tBu)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-NH₂ (SEC. ID. n°:31).

10. Procedimiento según la reivindicación 9, que comprende además después de la amidación, la reacción del exenatide protegido con una composición ácida que comprende una solución de TFA que contiene agua, TIS y EDT: añadir éter para obtener un precipitado de exenatide constituido por aminoácidos que presentan la secuencia de: H-His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asp-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂ (SEC ID n°:31) y aislar el exenatide.

11. Procedimiento para preparar acetato de exenatide que comprende obtener exenatide según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, y convertir el exenatide obtenido en acetato de exenatide.

12. Composición farmacéutica que comprende acetato de exenatide preparado según la reivindicación 11 y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

13. Acetato de exenatide que presenta una pureza de por lo menos aproximadamente 99,0%, como se ha determinado mediante el procedimiento HPLC.