

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 872**

51 Int. Cl.:
C07K 14/75 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07C 271/22 (2006.01)
C07K 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09075233 .8**
96 Fecha de presentación: **08.04.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **2204383**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.07.2010**

54 Título: **PROCESOS PARA LA PREPARACIÓN DE EPTIFIBATIDE Y LOS COMPUESTOS INTERMEDIOS PERTINENTES.**

30 Prioridad:
08.04.2004 US 560453 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2011

73 Titular/es:
**MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.
40 LANDSDOWNE STREET
CAMBRIDGE, MA 02139, US**

72 Inventor/es:
**Ho, Guojie;
Paone, Antoinette D.;
Forni, Luciano y
Detollenaere, Catherine**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 369 872 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

Procesos para la preparación de eptifibatide y los compuestos intermedios pertinentes.

5 SECTOR DE LA INVENCION

La invención se refiere a compuestos que pueden ser utilizados como intermediarios sintéticos para eptifibatide, medicamento para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Eptifibatide es un antagonista heptapéptido cíclico altamente específico de la glicoproteína IIb/IIIa plaquetaria. Es un agente antitrombótico parenteral de acción rápida utilizado durante las intervenciones coronarias percutáneas para el tratamiento de la angina inestable y como complemento de los agentes trombolíticos para el tratamiento del infarto agudo de miocardio. Ver, por ejemplo, Phillips y otros, Journal of Biological Chemistry (1993), 268(2), 1066-73; y Scarborough, American Heart Journal (1999), 138(6, Pt. 1), 1093-1104. El eptifibatide también se administra a pacientes a los que se realiza un procedimiento de angioplastia con balón (globo), para el cual son candidatos anualmente más de 1 millón de personas en EE.UU.

20 Se cree que el eptifibatide actúa inhibiendo la agregación plaquetaria, específicamente, bloqueando el receptor plaquetario GP IIb-IIIa. La agregación de las plaquetas puede obstruir el suministro de sangre al corazón, provocando una angina inestable y, posiblemente, un infarto de miocardio (ataque al corazón). Los efectos del eptifibatide son específicos para las plaquetas, evitando interferencias con otros procesos cardiovasculares normales, y los efectos pueden revertirse cuando se suspende la utilización de eptifibatide.

25 El eptifibatide se comercializa en los EE.UU. bajo la marca comercial INTEGRILIN® y se utiliza en el tratamiento de pacientes con síndrome coronario agudo (angina inestable e infarto de miocardio sin onda Q), incluyendo pacientes en los que se realiza un tratamiento médico y aquellos en los que se realiza una intervención coronaria percutánea (PCI). El eptifibatide también está indicado para su utilización en el momento de las intervenciones coronarias percutáneas, incluyendo procedimientos en los que se utilizan endoprótesis vasculares (stents) intracoronarios.

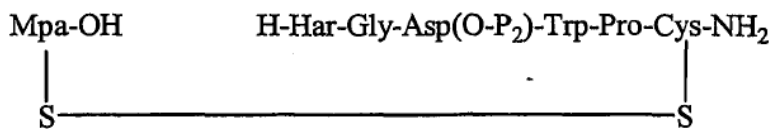
35 Varias de las estrategias sintéticas para eptifibatide dadas a conocer han utilizado técnicas conocidas de síntesis de péptidos en fase sólida, tal como se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. 5.318.899; 5.686.570 y 5.747.447. También se ha dado a conocer un proceso en fase líquida a escala comercial en la Conferencia IBC 1999 sobre tecnologías de péptidos, "Método de Peptisyntha para la producción de péptidos GMP a escala industrial" ("Peptisyntha's Method of Producing GMP Peptides on an Industrial Scale"). El proceso comercial es una síntesis convergente que supone la preparación por separado de dos fragmentos: Mpa-Har-Gly y Asp-Trp-Pro. El acoplamiento de estos dos fragmentos proporciona seis de los siete residuos necesarios para el eptifibatide. El último residuo unido es una cisteinamida protegida con S-tritilo tal como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. 5.506.362. A continuación y tras eliminar los grupos protectores de S-tritilo (en los residuos cisteinamida y mercaptopropionilo), se consigue el cierre del anillo mediante la formación de enlaces bisulfuro. Se ha informado que el eptifibatide crudo obtenido mediante el proceso comercial posee una pureza de aproximadamente el 80%. Mediante dos etapas de cromatografía en columna se mejora la pureza a más del 99%.

45 La síntesis en fase líquida se ha considerado generalmente como más viable que la síntesis en fase sólida para la fabricación a gran escala de eptifibatide. Sin embargo, los temas de solubilidad y de generación de mezclas de complejos de reacción suponen problemas en los procesos en fase líquida a gran escala. Las mezclas de complejos de reacción, por ejemplo, hacen que la purificación del producto sea más dificultosa. Existen modos de superar estos problemas, tales como la utilización de aminoácidos persililados y reactivos de transferencia de fase, tal como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. 4.954.616, y la purificación cromatográfica extensiva, pero dichos medios añaden costes al proceso global.

Por ello existe la necesidad de procesos alternativos para la fabricación de eptifibatide.

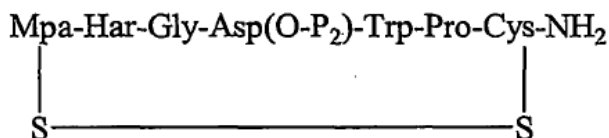
55 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención da a conocer, entre otros, procesos para la fabricación de eptifibatide. Algunos procesos de la invención comprenden proporcionar un compuesto de fórmula II:



(II)

5 en la que Har es homoarginilo; Gly es glicilo; Asp es aspartilo; Trp es triptofanilo; Pro es prolilo; Cys-NH₂ es cisteinamida; Mpa es ácido mercaptopropiónico; y P₂ es un grupo protector de carboxilo; acoplar los residuos Har y Mpa formando el compuesto de fórmula III:



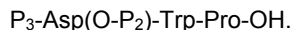
(III)

y eliminar P₂ del residuo Asp del compuesto de fórmula III para formar eptifibatide.

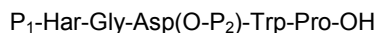
10 La invención también da a conocer procesos en los que un residuo homoarginina protegido en amino terminal se acopla con un residuo de glicina, formando de este modo el fragmento 2-3 de eptifibatide de fórmula:



15 También se dan a conocer procesos en los que un residuo ácido aspártico con una cadena lateral carboxílica protegida se acopla a un dipéptido triptofanil-prolilo a través del residuo triptofanilo del dipéptido, formando de este modo el fragmento de eptifibatide 4-6 protegido de fórmula:



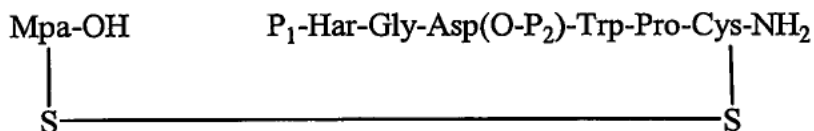
20 Tras la desprotección, el fragmento de eptifibatide 2-3 y el fragmento de eptifibatide 4-6 pueden acoplarse a su vez a través de la unión del residuo Gly del fragmento de eptifibatide 2-3 al residuo Asp del fragmento de eptifibatide 4-6, formando de este modo un fragmento de eptifibatide 2-6 de fórmula:



25 en la que Har es homoarginilo; Gly es glicilo; Asp es aspartilo; Trp es triptofanilo; Pro es prolilo; P₁ es un grupo protector de amino y P₂ es un grupo protector de carboxilo. En realizaciones preferentes, el fragmento de eptifibatide 2-6 se acopla a un residuo cisteinamida activado a través del residuo Pro del fragmento de eptifibatide 2-6, formado de este modo un fragmento de eptifibatide 2-7 de fórmula:

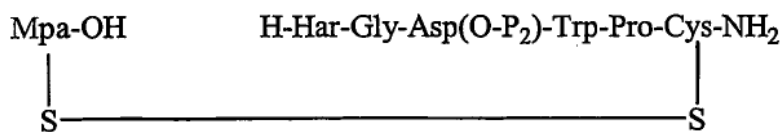


30 en la que ACys-NH₂ es un residuo cisteinamida activada. Puede unirse un residuo ácido mercaptopropiónico al fragmento de eptifibatide 2-7 mediante una unión disulfuro entre el residuo ácido mercaptopropiónico y el residuo ACys-NH₂ del fragmento de eptifibatide 2-7, formando de este modo un compuesto de fórmula I:



(I)

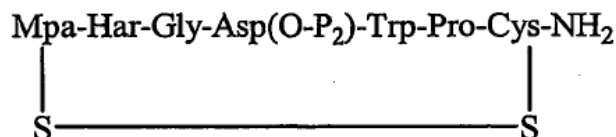
40 en la que Mpa es ácido mercaptopropiónico; Cys-NH₂ es cisteinamida. La eliminación de P₁ del residuo Har del compuesto de fórmula I da lugar al compuesto de fórmula II:



(II)

el acoplamiento de los residuos Har N-terminal y Mpa C-terminal de este compuesto da lugar a un compuesto de fórmula III:

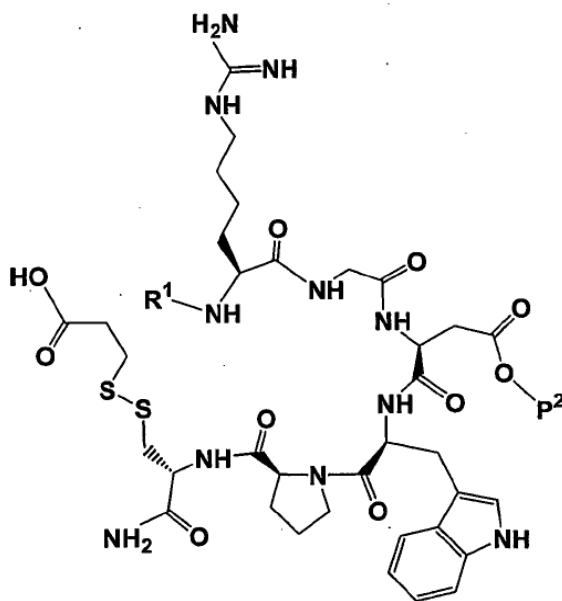
5



(III)

y la eliminación subsiguiente de P₂ del residuo Asp da lugar a eptifibatide.

10 La presente invención también de a conocer productos obtenidos mediante los procesos descritos, tales como los compuestos de fórmula IV:



(IV)

15 en la que R₁ es hidrógeno o P₁; P₁ es un grupo protector de amino y P₂ es un grupo protector de carboxilo. Como otros compuestos representativos de la invención se incluyen Fmoc-Har-Gly-OH, Fmoc-Har-Gly-O-P₄ y Fmoc-Har-Gly-Asp(O-P₅)-Trp-Pro-OH en los que P₄ y P₅ son grupos protectores de carboxilo. La invención incluye también composiciones que comprenden eptifibatide y menos de 1% de determinadas impurezas del proceso. La invención también incluye procesos de purificación de eptifibatide. El objeto de la presente invención se define en las
20 reivindicaciones adjuntas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

25 En un aspecto, la presente invención da a conocer procesos convergentes para la preparación de eptifibatide que suponen la preparación de un fragmento de eptifibatide 2-3, la preparación de un fragmento de eptifibatide 4-6 y el acoplamiento de los fragmentos de eptifibatide 2-3 y 4-6 formando un fragmento de eptifibatide 2-6. Algunos de estos procesos suponen el acoplamiento del fragmento de eptifibatide 2-6 a un residuo cisteinamida activada

formando un fragmento de eptifibatide 2-7, la formación de un enlace disulfuro entre ácido mercaptopropiónico y el fragmento de eptifibatide 2-7 formando el precursor A, la realización del acoplamiento peptídico intramolecular del precursor A y la eliminación de los grupos protectores del producto de acoplamiento dando lugar a eptifibatide.

5 La invención hace referencia a compuestos novedosos que pueden utilizarse como intermedios para la preparación de eptifibatide

10 Tal como se utiliza en la presente invención, el término "grupo protector de carboxilo" hace referencia a un grupo que puede unirse selectivamente y eliminarse de un grupo carboxilo, para evitar que éste participe en reacciones químicas no deseadas, sin efectos adversos inaceptables en las reacciones deseadas. Como ejemplos de grupos protectores de carboxilo se incluyen ésteres, tales como metilo, etilo, t-butilo, bencilo no sustituido o sustituido y ésteres de sililo, entre otros. Otros grupos protectores de carboxilo son bien conocidos en la técnica y se describen en detalle en "Grupos protectores en síntesis orgánica" ("Protecting Groups in Organic Synthesis"), Teodora W. Greene y Peter G. M. Wuts, 3ª edición, 1999, publicado por John Wiley and Sons, Inc.

15 Tal como se utiliza en la presente invención, el término "grupo protector de amino" hace referencia a un grupo que puede unirse selectivamente y eliminarse de un átomo de nitrógeno para evitar que éste participe en reacciones químicas no deseadas, sin efectos adversos inaceptables en las reacciones deseadas. Como ejemplos de grupos protectores de amino se incluyen carbamatos tales como Boc, Cbz, Fmoc, alloc, carbamatos de metilo y etilo, entre otros; derivados de imida cíclicos, tales como ftalimida,; amidas, tales como formilo, acetilo no sustituido y sustituido y benzoilo; y grupos trialquil sililo, tales como t-butildimetilsililo y triisopropilsililo. Otros grupos protectores de amino son bien conocidos en la técnica y se describen en detalle en "Grupos protectores en síntesis orgánica" ("Protecting Groups in Organic Synthesis"), Teodora W. Greene y Peter G. M. Wuts, 3ª edición, 1999, publicado por John Wiley and Sons, Inc.

20 Tal como se utiliza en la presente invención, el término "acoplamiento" y todas las variaciones del mismo, hace referencia a la formación de un enlace amida, por cualquier medio, entre los grupos que se unen.

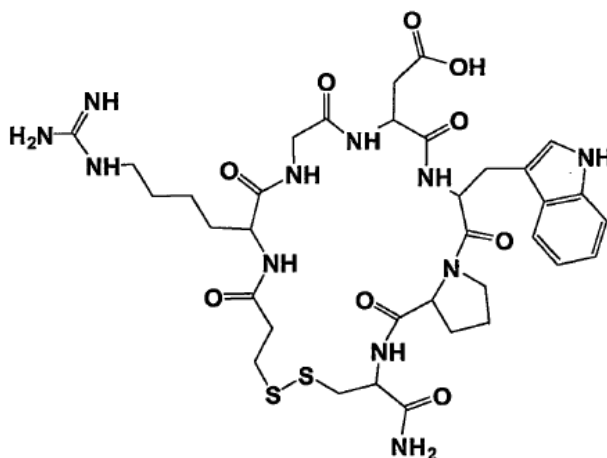
25 Tal como se utiliza en la presente invención, el término "unión" y todas las variaciones del mismo, hace referencia a la formación de un enlace amida o disulfuro, por cualquier medio que puede utilizarse para formar un enlace amida o disulfuro, entre los grupos que se unen.

30 Tal como se utiliza en la presente invención, el término "residuo cisteinamida activado" hace referencia a un residuo cisteinamida que es capaz de formar un enlace disulfuro con ácido mercaptopropiónico.

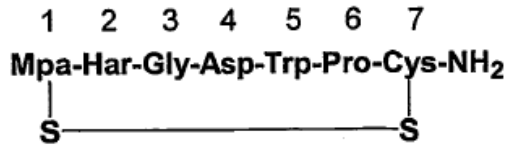
35 Tal como se utiliza en la presente invención, el término "Gly-eptifibatide" hace referencia a un compuesto que está relacionado estructuralmente a eptifibatide pero que contiene dos residuos de glicina adyacentes en lugar de un solo residuo glicina.

40 Todos los residuos de aminoácidos a los que se hace referencia en la presente invención son aminoácidos naturales que poseen una configuración L.

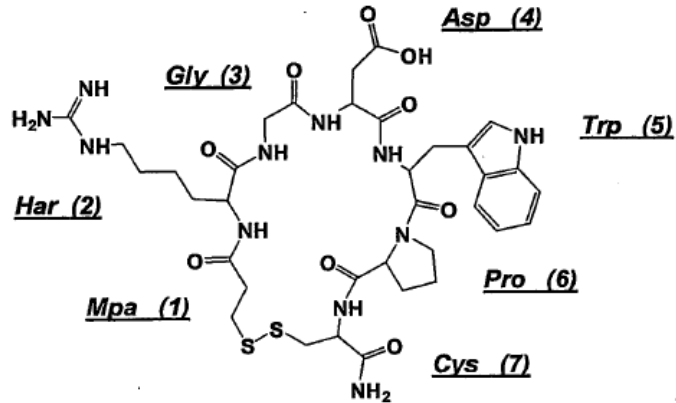
El eptifibatide posee la siguiente estructura química:



45 El eptifibatide también puede representarse con designaciones de aminoácidos del siguiente modo:



correspondiendo las designaciones de aminoácidos al gráfico químico mostrado a continuación:



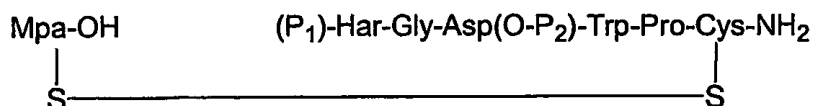
- 5 Para facilitar la descripción, también pueden numerarse los residuos de (1) a (7). El residuo (1) es el ácido mercaptopropiónico; (2) es homoarginilo (Har); (3) es glicilo (Gly); (4) es aspartilo (Asp); (5) es triptofanilo (Trp); (6) es prolilo (Pro) y (7) es cisteinamida (Cys-NH₂).

10 La presente invención hace referencia a procesos convergentes para la preparación de eptifibatide. En una primera secuencia de etapas, se prepara un fragmento de eptifibatide 2-3 que contiene los aminoácidos (2) y (3). En una segunda secuencia, se prepara un fragmento de eptifibatide 4-6 que contiene los aminoácidos (4), (5) y (6). A continuación se acoplan los dos fragmentos dando lugar a un único fragmento 2-6, que es un pentapéptido. El fragmento de eptifibatide 2-6 se protege en el extremo aminoterminal del residuo Har y en la cadena lateral carboxilo de aspartilo. El esquema 1 resume un proceso ejemplar para la preparación del fragmento de eptifibatide 2-6:

15

ejemplo, Fmoc (fluorenilmetiloxicarbonilo) o en el que R_{NP2} es un grupo protector de amino que puede escindirse mediante hidrogenólisis como, por ejemplo, un grupo RCbz (grupo protector benciloxicarbonilo sustituido en el anillo aromático). Además, el grupo -OtBu mostrado en el esquema 1 puede sustituirse por R_{CP} , siendo R_{CP} un grupo protector de carboxilo que puede escindirse mediante tratamiento ácido como, por ejemplo, un grupo ODpm (éster de difenilmetilo). Pfp (pentafluorofenilo) puede sustituirse por R_{L1} , siendo R_{L1} un grupo activador de carboxilo; Su (succinimida) puede sustituirse por R_{L2} , siendo R_{L2} un grupo activador de carboxilo. Independientemente de la naturaleza del fragmento, tanto Pfp como Su pueden sustituirse por otros ésteres activos estables como, por ejemplo, ésteres mono y dinitrofenilo, ésteres tri- y penta fenilo. Se apreciará por los expertos en la técnica que la selección de grupos protectores concretos depende de la identidad de los otros grupos protectores que estén presentes en el mismo compuesto. En algunas realizaciones de la invención, se selecciona un grupo protector concreto de manera que pueda ser eliminado de forma selectiva bajo condiciones de reacción que no afecten a otros grupos protectores.

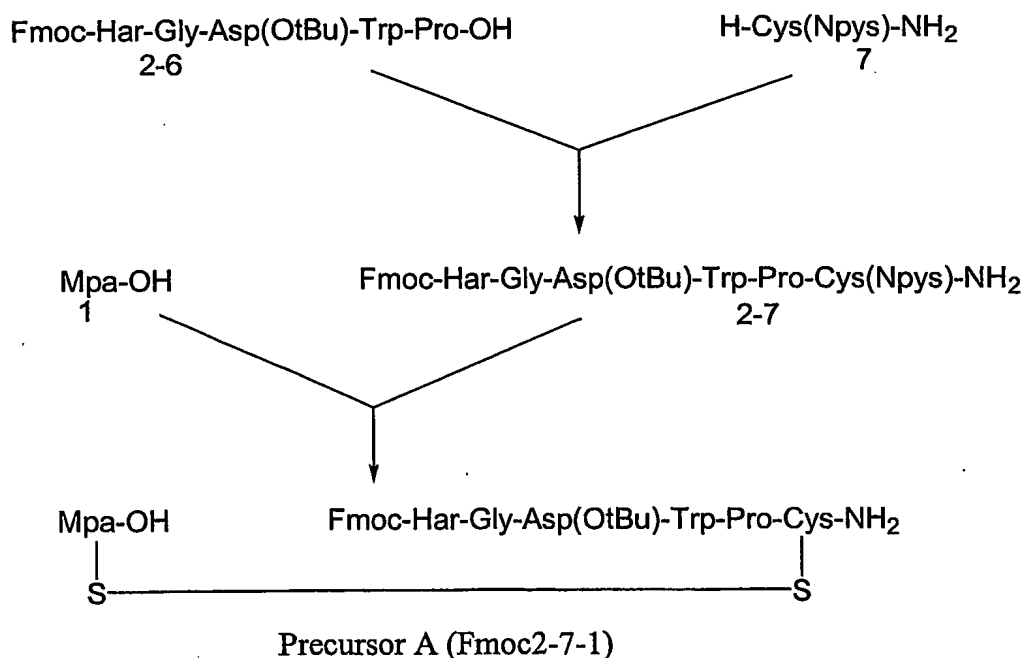
En algunas realizaciones de la invención, el fragmento de eptifibatide 2-6 se acopla a continuación a una cisteinamida "activada" (7), tal como, por ejemplo, 3-nitro-2-piridinsulfenil-cisteinamida (H-Cys(Npys)-NH₂); Nps (2-nitro-fenilsulfenilo); S-feniltiocisteinamida, en la que el anillo fenilo se halla sustituido; S- alquiltiocisteinamida; o el S-sulfonato y los S-sulfeniltiocarbonatos de cisteinamida, dando lugar al fragmento hexapéptido 2-7 de eptifibatide. El residuo restante de eptifibatide es el ácido mercaptopropiónico o Mpa-OH (1). Mpa-OH se une al fragmento hexapéptido 2-7 bajo condiciones que forman un enlace disulfuro entre 1 y el fragmento 2-7. La pieza disulfuro resultante, denominada en la presente invención como precursor A, es un precursor clave y novedoso para la síntesis de eptifibatide. A continuación se muestra la estructura del precursor A:



en el que P_1 es un grupo protector de amino y P_2 es un grupo protector de carboxilo. Preferentemente, el grupo P_2 es estable bajo condiciones adecuadas para la eliminación del grupo P_1 . La selección de grupos P_1 y P_2 compatibles que permitan la eliminación selectiva de uno solo de los grupos es bien conocida en la técnica. Un ejemplo de un par de grupos protectores compatibles es $P_1 = \text{Fmoc}$, que puede eliminarse bajo condiciones básicas, y $P_2 = \text{t-butilo}$, el cual es estable bajo las mismas condiciones.

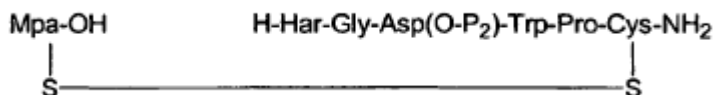
El esquema 2 resume un proceso ejemplar para la preparación del precursor A:

Esquema 2: Preparación del Precursor A a partir de 2-6



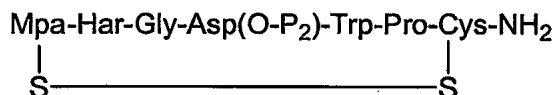
Al igual que en el esquema 1, los grupos Fmoc y t-butilo mostrados en el esquema 2 pueden sustituirse por otros grupos protectores conocidos reconocidos generalmente como útiles en la síntesis de péptidos.

En algunas realizaciones de la invención, la eliminación del grupo protector P₁ del precursor A da lugar a otro precursor, el precursor B, que es la parte 2-7-1 de eptifibatide:



5

El precursor B puede convertirse, mediante un acoplamiento peptídico intramolecular, en el precursor C:



10

El acoplamiento peptídico intramolecular puede llevarse a cabo, por ejemplo, en un solvente orgánico en presencia de un reactivo de acoplamiento adecuado como, por ejemplo, un agente de acoplamiento del tipo uronio tales como, pero sin que sirva de limitación, tetrafluorocarbonato de O-[ciano(etoxicarbonil)pietilenamino]-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (TOTU), HBTU, o TBTU (respectivamente hexafluorofosfato y tetrafluoroborato de 2-(1H-Benzotriazolelil)-1,1,3,3-tetrametiluronio); un reactivo tipo carbodiimida tal como, pero sin que sirva de limitación, DCC (diciclohexilcarbodiimida), DIC (diisopropilcarbodiimida) o EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida); ésteres activos o reactivos de acoplamiento del tipo fosfonio tales como, por ejemplo, Bop (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tri(dimetilamino)-fosfonio o PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tri(pirrolidino)-fosfonio). El acoplamiento peptídico se describe, por ejemplo en Humphrey y Chamberlin, Chem. Rev.1997, 97, 2243-2266, incorporado a la presente invención como referencia en su totalidad.

15

20

La eliminación del grupo protector P₂ del precursor C da lugar a eptifibatide. La eliminación de P₂ puede llevarse a cabo, por ejemplo, en un solvente orgánico en presencia de un ácido, una base o cualquier otro reactivo o sistema de reactivos en el cual el grupo protector es lábil. El esquema 3 resume un proceso ejemplar para la preparación de eptifibatide a partir del precursor A:

25

Gly-eptifibatide puede prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente para la preparación de eptifibatide, a excepción de que se acopla un dipéptido Gly-Gly a homoarginina para formar lo que corresponde al fragmento de eptifibatide 2-3, en lugar de acoplar glicina a homoarginina para formar el fragmento. Por ejemplo, de acuerdo con este procedimiento modificado, el grupo H-Gly-OtBu (3) mostrado en el esquema 1 es sustituido por H-Gly-Gly-OtBu.

En algunas realizaciones de la invención, también se produce Gly-eptifibatide durante la preparación de eptifibatide de acuerdo con los métodos descritos anteriormente para la preparación de eptifibatide. La invención incluye composiciones que comprenden eptifibatide y Gly-eptifibatide, incluyendo composiciones que comprenden al menos un 99% de eptifibatide y Gly-eptifibatide entre un 0,01% y un 1% y composiciones que comprenden al menos un 99% de eptifibatide y Gly-eptifibatide entre un 0,01% y un 0,1%.

La presente invención incluye también métodos para purificar eptifibatide que comprenden, por ejemplo, establecer contacto de una solución de eptifibatide con una fase estacionaria que comprende, por ejemplo, cadenas de octadecil carbono fijadas a sílice, lavar la fase estacionaria en contacto con la solución de eptifibatide con una solución de ácido trifluoroacético/acetonitrilo, lavando opcionalmente la fase estacionaria en contacto con la solución de eptifibatide con una solución de ácido acético/acetonitrilo y lavando la fase estacionaria en contacto con la solución de eptifibatide con una solución de ácido amónico/acetonitrilo. Las fases estacionarias inversas son bien conocidas por los técnicos en la materia y otras de dichas fases pueden ser sustituidas por sílice basado en octadecil carbono.

En casos específicos de la invención, la fase estacionaria en contacto con la solución de eptifibatide es lavada con un gradiente que tiene concentraciones iniciales de 95% de una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1% y 5% de una solución de acetonitrilo y unas concentraciones finales de 50% de una solución acuosa de ácido trifluoroacético al 0,1% y 50% de una solución de acetonitrilo.

La invención incluye otros casos en los que la fase estacionaria en contacto con la solución de eptifibatide es lavada con un gradiente que tiene concentraciones iniciales de 95% de una solución acuosa de ácido acético al 0,5% y 5% de una solución de acetonitrilo y concentraciones finales de 50% de una solución acuosa de ácido acético 0,5% y 50% de una solución de acetonitrilo. En algunos casos, la fase estacionaria es lavada con el gradiente de ácido acético/acetonitrilo después de uno o más lavados con un gradiente de ácido trifluoroacético/acetonitrilo.

La invención incluye también casos en los que la solución de ácido amónico/acetonitrilo es una solución que comprende 95% de una solución acuosa de ácido amónico 100 mM y 5% de una solución de acetonitrilo. En algunos casos, la fase estacionaria es lavada con una solución de ácido amónico/ácido nitrilo seguido de lavado con un gradiente de ácido trifluoroacético/acetonitrilo y/o un gradiente de ácido acético/acetonitrilo.

El acoplamiento de los residuos de aminoácidos que se produce en los procesos descritos puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos de síntesis de péptidos que son familiares para los expertos en la técnica. Puede emplearse cualquier procedimiento de acoplamiento adecuado para formar péptidos.

Los ejemplos siguientes son ilustrativos de algunas realizaciones de la invención y no debe considerarse que limiten el ámbito de la invención.

Ejemplo 1: Preparación de Z-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OH

Z-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OH se obtuvo mediante procedimientos conocidos partiendo de Z-Asp(OtBu)-OSu y H-Trp-Pro-OH disponibles comercialmente tal como se describe, por ejemplo, en Bodanszky, M. (1979), "Esteres activos en la síntesis de péptidos, Los péptidos" ("Active esters in peptide synthesis, The peptides"), Vol. 1 (ed. E. Gross y J. Meienhofer), Capítulo 3. Academic Press, Londres, que se incorpora a la presente invención como referencia en su totalidad.

Ejemplo 2: Preparación de H-Asp(O-tBu)-Trp-Pro-OH

Se añadieron a un reactor de 2 litros cargado con dimetilacetamida (DMAC, 1,2 L) a una temperatura de aproximadamente 20°C, 0,300 kg de material de partida Z-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OH, manteniendo la temperatura a aproximadamente 20°C. Se permitió que el Z-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OH se disolviera y a continuación se purgó y cubrió la mezcla de reacción con una atmósfera de nitrógeno. Se añadió a la mezcla de reacción paladio sobre carbono (5% en peso) (0,015 kg), seguido de hidrogenación a una presión de 2 bar mientras que se mantenía la mezcla de reacción a aproximadamente 20°C.

Tras dos horas, y cada hora a partir de ese momento, se analizó una muestra de la reacción mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). El análisis HPLC se realizó en una columna Purospher Star C18 de 55*4 mm con una mezcla solvente de agua/acetonitrilo con un 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) con un gradiente 98:2

agua/acetonitrilo a 2:98 agua/acetonitrilo en 10 minutos. La detección de HPLC se realizó a 215 nm, el flujo fue de 2,0 mL/min y la temperatura de 40°C.

5 La reacción se consideró completa cuando el análisis HPLC mostró que los materiales de partida eran inferiores o iguales a un 0,2% en relación con el porcentaje del área del producto. Cuando la reacción se mostró completa por HPLC, se añadió a la mezcla de reacción una solución acuosa de ácido p-toluensulfónico (0,094 kg p-TsOH en 0,150 L de agua). A continuación se filtró la mezcla de reacción a través de Celite® que se había pre-lavado con DMAC (Celite® lavado tres veces con 0,6 L). Tras la filtración de la mezcla de reacción, se lavó tres veces la torta de filtro con DMAC fresco (0,3 L). Se realizó un análisis mediante HPLC tras el último lavado para confirmar que no quedaba producto en la torta de filtro.

15 A continuación se transfirieron los filtrados combinados a un nuevo recipiente a aproximadamente 20 °C, temperatura a la cual se añadió N-etilmorfolina (0,066 L). La temperatura se mantuvo por debajo de aproximadamente 22 °C durante la adición. A continuación, se enfrió la mezcla a aproximadamente 8-12 °C y se añadió lentamente agua (3 L) de manera que se mantuviera la temperatura por debajo de aproximadamente 15 °C. A continuación, se agitó la mezcla a aproximadamente 8-12 °C durante aproximadamente 30 minutos y se mantuvo a dicha temperatura durante 8 horas. Durante este período de tiempo el producto cristalizó a partir de la solución. Puede analizarse el sobrenadante mediante HPLC para determinar la cantidad de producto que permanece en la solución y determinar si es necesario un enfriamiento adicional. La pasta obtenida se filtró y los sólidos recolectados se lavaron dos veces con una solución 2:1 de agua:DMAC (0,9 L cada vez). A continuación se lavaron los sólidos dos veces con acetonitrilo (0,9 L cada vez) y se secaron bajo vacío a una temperatura inferior a aproximadamente 25 °C hasta conseguir un peso constante. El contenido de agua tras el secado fue de un 3,5% (análisis de Karl-Fisher).

25 Se analizó el producto mediante HPLC de fase inversa utilizando un gradiente de ácido trifluoroacético acuoso/acetonitrilo.

Un análisis LC/MS confirmó la masa $[M^+H]$ 473,0 de H-Asp(O-tBu)-Trp-Pro-OH.

30 El rendimiento de recuperación fue del 93,2% (0,218 kg), el rendimiento neto fue del 93,1% (sobre la base del contenido en nitrógeno: 95,4%).

Ejemplo 3: Preparación de Fmoc-Har-Gly-Asp(O-tBu)-Trp-Pro-OH

35 Se añadió a una pasta de Fmoc-Har-Gly-OH (peso neto 0,163 kg; sobre la base del contenido en péptido: 90,5%) en THF:DMAC (0,717 L y 0,179 L respectivamente) ácido metansulfónico (0,027 L) y pentafluorofenol (0,083 kg). Se agitó la mezcla a aproximadamente 20 °C hasta que se disolvió el sólido. Se añadió gota a gota N-etilmorfolina (NEM) (0,030 L), y a continuación dicitohexilcarbodiimida (DCC) (0,072 kg) en THF (0,179 L) y se agitó la mezcla a aproximadamente 20 °C. La formación de Fmoc-Har-Gly-OPfp fue seguida de HPLC. Tras aproximadamente 17 horas, la relación Fmoc-Har-Gly-OH / Fmoc-Har-Gly-OPfp fue de 1,5/98,5.

45 Se añadió a la mezcla de reacción H-Asp(O-tBu)-Trp-Pro-OH (0,146 kg, aproximadamente 3,5 % peso/peso en H₂O) y NEM (0,049 L). Se agitó la mezcla a aproximadamente 20°C durante 3 horas. En ese momento, el análisis HPLC mostró que la muestra contenía aproximadamente un 87% de producto, menos de un 2% de Fmoc-Har-Gly-OPfp, un 6% de Fmoc-Har-Gly-OH, aproximadamente un 0,5% de H-Asp(O-tBu)-Trp-Pro-OH, y aproximadamente un 5,5% de una impureza identificada como Fmoc-Har-Gly-Asp(O-tBu)-Trp-Pro-Asp(O-tBu)-Trp-Pro-OH ("impureza d.a"). El análisis HPLC se realizó en una columna Purospher Star C18 55*4 mm con una mezcla de solvente agua/acetonitrilo que contenía un 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) con un gradiente de 98:2 agua/acetonitrilo a 2:98 agua:acetonitrilo en 10 minutos. La detección de HPLC se realizó a 215 nm, el flujo fue de 2,0 mL/min y la temperatura de 40°C.

50 La mezcla de reacción se filtró y el sólido se lavó dos veces con una mezcla 5/1 de THF/DMAC (2 x 0.489 L). Se concentró el filtrado a aproximadamente 0,815 L a una temperatura no superior a 35 °C bajo presión reducida (aproximadamente 20 mBar). La mezcla concentrada se añadió lentamente durante 1 hora a una mezcla 1/4 de acetonitrilo/H₂O (4,1 L) que contenía bicarbonato sódico (0,059 kg). La velocidad de adición se controló cuidadosamente para evitar la formación de un precipitado pegajoso. Se añadió aproximadamente un 3,5% de la solución durante 15 minutos, y se interrumpió la adición para agitar la pasta a aproximadamente 20°C durante una hora. El precipitado pastoso se convirtió en una pasta blanca. Se añadió un 7,5% más de la solución durante 15 a 30 minutos, y se interrumpió la adición para agitar de nuevo la pasta a aproximadamente 20 °C durante 2 horas. El 89% restante de la solución se añadió en aproximadamente 12 horas. Se agitó la mezcla a aproximadamente 20 °C durante 12 horas y a continuación se filtró. El sólido se lavó con una mezcla 1/4 de acetonitrilo/H₂O (3 x 0,7 L), una mezcla 2/3 de acetonitrilo/di-isopropileter (DIPE) (3 x 0,7 L) y DIPE (2 x 0,7 L). El producto sólido se secó a una temperatura ≤ a 30 °C hasta conseguir un peso constante. El contenido de agua tras el secado fue de un 3,3% (análisis Karl-Fisher).

El producto se analizó mediante HPLC inversa utilizando un gradiente de ácido trifluoroacético acuoso/acetonitrilo.

El análisis LC/MS confirmó la masa $[M^+H]$ 922,5 de Fmoc-Har-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OH.

- 5 El rendimiento de recuperación fue del 81,8% (0,234 kg); el rendimiento neto fue del 82,3% (sobre la base del contenido en nitrógeno: 96,0%).

Ejemplo 4: Preparación de Fmoc-Har-Gly-Asp(O-tBu)-Trp-Pro- Cys(NPys)-NH₂

- 10 Se añadió a un reactor cargado con DMF grado para la síntesis de péptidos (0,675 L) a aproximadamente 20 °C, Fmoc-Har-Gly-Asp(OtBu)-Trp-Pro-OH (0,225 kg). Se enfrió la mezcla a aproximadamente 0°C, y se añadió H-Cys(NPys)-NH₂ en forma de sal hidrocioruro sólida (0,080 kg). Se añadió a la mezcla de reacción tetrafluoroborato de O-Benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU) (0,082 kg). Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a entre 6,5 y 7,0 mediante la adición de fracciones de di-isopropiletilamina (DIPEA) (0,112 L), manteniendo la temperatura a
- 15 aproximadamente 0°C. Se agitó la mezcla a dicha temperatura, analizando muestras mediante HPLC para determinar la formación de producto cada aproximadamente 45 minutos. El pH de la mezcla de reacción se mantuvo entre pH 6,5 y 7,0 mediante la adición de DIPEA según fuera necesario. El análisis HPLC se realizó en una columna Platinum EPS 100-5 C18 5µ de 250*4,6 mm; Solvente A: TFA al 0,1% en agua; Solvente B: TFA al 0,1% en acetonitrilo; gradiente: 12 a 98% B en 15 minutos. La detección de los productos de HPLC se realizó a 215 nm, flujo
- 20 2,0 mL/min y temperatura de 40°C. La reacción se consideró completa cuando se mostró que los materiales de partida pentapéptido y Cys(NPys)-NH₂ eran ambos inferiores al 1% mediante HPLC. Por otro lado, se añadieron TBTU, DIPEA y el material de partida que se mostrará deficiente en la mezcla.

- 25 La mezcla de reacción se añadió a otro recipiente que contenía agua (4,5 L) a una temperatura de aproximadamente 5°C. Se mantuvo esta temperatura durante la adición con agitación. Tras la agitación durante 10 minutos a aproximadamente 5°C, se filtró la mezcla y se lavó el sólido cinco veces con agua (0,9 L en cada ocasión). A continuación, se lavó el sólido tres veces con tolueno (0,675 L en cada ocasión). Los lavados con tolueno pueden sustituirse por lavados con di-isopropil éter. Se secó el sólido bajo vacío a una temperatura de 35°C o inferior hasta conseguir un peso constante. El contenido en agua tras el secado fue del 1,2% (análisis de Karl-Fisher).
- 30

El producto se analizó mediante HPLC inversa utilizando un gradiente de ácido trifluoroacético acuoso/acetonitrilo.

El análisis LC/MS confirmó la masa $[M^+H]$ de 1178,4 de Fmoc-Har- Gly-Asp(O-tBu)-Trp-Pro-Cys(NPys)NH₂.

- 35 El rendimiento de recuperación fue de 102,4% (0,295 kg) y el rendimiento neto de 87,7% (sobre la base del contenido en péptido: 82,0%).

Ejemplo 5: Preparación de Fmoc-Har-Gly-Asp(O-tBu)-Trp-Pro- Cys(NH₂)-Mpa (Fmoc[2-7-1])

- 40 Se añadió lentamente y con agitación a un reactor cargado con acetonitrilo de calidad HPLC (0,570 L) y DMF grado de síntesis de péptidos (0,285 L) bajo una atmósfera de nitrógeno a aproximadamente 20°C, 0,285 kg de Fmoc-Har-Gly- Asp(O-tBu)-Trp-Pro-Cys(NPys)NH₂ (Fmoc[2-7]). Tras la disolución de Fmoc[2-7], se enfrió la mezcla a aproximadamente -3°C. Se añadió a la mezcla de reacción una solución de ácido mercaptopropiónico (Mpa, 0,023 kg) en acetonitrilo (0,057 L), preparada a aproximadamente 20°C, a una velocidad adecuada para mantener la temperatura de reacción a aproximadamente -3°C. La reacción se controló mediante HPLC y se consideró completa cuando el análisis mostró menos de un 1% de Fmoc[2-7] en comparación con el contenido de Fmoc[2-7-1]. El análisis HPLC se realizó en una columna Purospher Star C18 de 55*4 mm con una mezcla de solventes agua/acetonitrilo con un 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) con un gradiente de 98:2 agua/acetonitrilo a 2:98 agua:acetonitrilo en 10 minutos. La detección de HPLC se realizó a 215 nm, el flujo fue de 2,0 mL/min y la temperatura de 40°C.
- 50

- Se añadió la mezcla de reacción a un segundo recipiente cargado con acetonitrilo de calidad HPLC (5,7 L) y N-etilmorfolina (NEM, 0,033 L) a aproximadamente 20°C. Tras completar la adición, se agitó la reacción a dicha temperatura durante aproximadamente 30 minutos. Se enfrió lentamente la pasta a aproximadamente 0°C y se continuó la agitación a dicha temperatura durante aproximadamente 45 minutos. A continuación se realizó tres veces el siguiente procedimiento: (a) se detuvo la agitación para permitir la separación del precipitado y el sobrenadante; (b) se bombeó el sobrenadante fuera del recipiente; (c) se añadió acetonitrilo de calidad HPLC fresco (1,425 L) al reactor a aproximadamente 0°C y se reinició la agitación; y (d) se agitó la pasta durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 0°C. Se filtró la pasta restante, y se lavó el sólido dos veces con acetonitrilo de calidad HPLC
- 55 (1,140 L en cada ocasión) y una vez con tolueno (1,425 L). El lavado con tolueno puede sustituirse por un lavado con diisopropil éter. Se secó el sólido bajo alto vacío a una temperatura no superior a 20°C.
- 60

El producto se analizó mediante HPLC de fase inversa utilizando un gradiente de ácido trifluoroacético acuoso/acetonitrilo.

El análisis LC/MS confirmó la masa $[M^+H]$ de 1128,4 de Fmoc-Har-Gly-Asp(O-tBu)-Trp-Pro-Cys(NH₂)-Mpa.

El rendimiento de recuperación fue del 93,8% (0,256 kg); el rendimiento neto fue cuantitativo (sobre la base del contenido en péptido: 87,4%).

5

Ejemplo 6: Preparación de H-Har-Gly-Asp(O-tBu)-Trp-Pro-Cys(NH₂)-Mpa ([2-7-1])

A un reactor cargado con DMF grado de síntesis de péptidos (0,750 L) a aproximadamente 20°C, se añadieron lentamente y con agitación 0,250 kg de Fmoc-Har-Gly-Asp(O-tBu)-Trp-Pro-Cys(NH₂)-Mpa (Fmoc[2-7-1]). Se enfrió la mezcla a aproximadamente 10°C y a dicha temperatura se añadió dietilamina (0,034 L). Tras la adición de dietilamina, se dejó que se incrementara la temperatura de la mezcla a aproximadamente 20°C. Se controló la progresión de la reacción mediante análisis HPLC de muestras tomadas cada hora. El análisis HPLC se realizó en una columna Platinum EPS 100-5 C18 5 μ de 250*4,6 mm; Solvente A: TFA 0,1% en agua; Solvente B: TFA 0,1% en acetonitrilo; gradiente 22 a 98% en 15 minutos. La detección de los productos de HPLC se realizó a 215 nm, el flujo fue de 2,0 mL/min y la temperatura de 40°C. La reacción se consideró completa cuando el porcentaje de Fmoc [2-7-1] fue inferior a aproximadamente el 0,5% respecto al [2-7-1]. La reacción se completó habitualmente a las 3 horas.

Se añadió la mezcla de reacción a un segundo recipiente cargado con acetato de etilo (5,0 L) y se enfrió a aproximadamente 10°C. Se agitó la suspensión resultante durante 10 minutos a aproximadamente 10°C. A continuación se realizó dos veces el siguiente procedimiento: (a) se detuvo la agitación y se permitió la separación del precipitado y el sobrenadante durante 15 minutos aproximadamente; (b) se bombeó el sobrenadante fuera del recipiente; (c) se añadió acetato de etilo fresco (0,750 L) a aproximadamente 10°C; (d) se agitó la suspensión durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10°C. Se filtró la pasta, y se lavó el sólido 6 veces con acetato de etilo (0,750 L en cada ocasión). Pueden realizarse lavados adicionales con diisopropil éter para eliminar los restos de acetato de etilo. Se secó el sólido bajo alto vacío a una temperatura no superior a 25°C durante un máximo de 18 horas.

El producto se analizó mediante HPLC de fase inversa utilizando un gradiente de ácido trifluoroacético acuoso/ acetonitrilo.

30

El análisis LC/MS confirma la masa $[M^+H]$ de 906,3 de H-Har-Gly-Asp(O-tBu)-Trp-Pro-Cys(NH₂)-Mpa.

Un análisis GC demostró un 3,4% de dietilamina residual.

El rendimiento de recuperación fue del 106,1% (0,213 kg) y el rendimiento neto del 99,2% (sobre la base del contenido en péptido: 81,9%).

35

Ejemplo 7: Preparación de [MPA-Har-Gly-As(O-tBu)-Trp-Pro-Cys](NH₂) (ciclo-[1-7](OtBu)-NH₂)

Se cargó el reactor con DMF grado de síntesis de péptidos (0,768 L) y se enfrió la solución a aproximadamente 10°C. Se añadió tetrafluoroborato de O-[ciano(etoxicarbonil)metilnamino]-N,N,N',N'- tetrametiluronio (TOTU) (0,070 kg) y a continuación se diluyó con diclorometano grado de síntesis de péptidos (1,536 L) mientras se mantenía la temperatura por debajo de los 15°C. Se enfrió la solución resultante a aproximadamente -6°C y se añadió NEM (0,024 L) en pequeñas cantidades manteniendo la temperatura a aproximadamente -6°C. Se determinó el pH antes y después de la adición de NEM. Se tomó una muestra para análisis mediante HPLC.

45

El análisis HPLC se realizó en una columna Phenomenex Luna C18(2), 5 μ m, 150*4,6 mm; gradiente 12 a 98% B en 15 minutos. Solvente A: TFA 0,1% en agua, solvente B: TFA 0,1% en acetonitrilo. La detección se realizó a 215 nm, el flujo fue de 2,0 mL/min y la temperatura de 40°C.

50

Se cargó un reactor diferente con DMF grado de síntesis de péptidos (0,768 L) a aproximadamente 20°C y a continuación 0,192 kg de H-Har-Gly-Asp(O-tBu)-Trp-Pro-Cys(NH₂)-Mpa ([2-7-1]). Una vez disuelto el sólido se enfrió la solución resultante a aproximadamente 0°C. Se añadió HOBt (0,026 kg) en pequeñas cantidades (el peso de HOBt se corrigió respecto a la pureza). Se diluyó la solución resultante con diclorometano grado de síntesis de péptidos (0,384 L). Se tomó una muestra para análisis mediante HPLC.

55

Se añadió muy lentamente la solución de [2-7-1] a la solución de TOTU mediante una bomba de adición durante un mínimo de 3 horas manteniendo la temperatura a aproximadamente -6°C. Se tomó una muestra tras la adición del 50% de [2-7-1] para análisis mediante HPLC. También se determinó el pH en este punto. También se tomaron muestras para análisis mediante HPLC y determinación de pH tras completar la adición de [2-7-1]. Se ajustó el pH a 7-7,5 mediante la adición de NEM en caso necesario, manteniendo la temperatura a aproximadamente -6°C.

60

Se comprobó el pH cada 15 minutos y se ajustó a 7-7,5 en caso necesario con NEM manteniendo la temperatura a aproximadamente -6°C. Se tomó una muestra para análisis mediante HPLC cada 45 minutos hasta que se completó

el ciclado. La reacción se consideró completa cuando el área porcentual de [2-7-1] fue inferior al 0,5% respecto al producto ciclado.

5 En caso de que la reacción se detenga, se añaden 1,1 equivalentes de TOTU por cantidad residual de [2-7-1] y se ajustó el pH a 7-7,5 en caso necesario, manteniendo la temperatura a aproximadamente -6°C.

10 Cuando se completó la reacción, se concentró la mezcla bajo vacío a una temperatura inferior a 40°C hasta un volumen de aproximadamente 0,8 L. Se enfrió la solución viscosa resultante a aproximadamente 5°C y se añadió lentamente a acetato de etilo agitado rápidamente que se encontraba a aproximadamente 0°C (7,0 L). Se agitó la pasta resultante a aproximadamente 0°C durante 20 minutos. A continuación se realizó tres veces el siguiente procedimiento: (a) se detuvo la agitación para permitir la separación del precipitado y el sobrenadante; (b) se bombeó el sobrenadante fuera del recipiente; (c) se añadió al reactor acetato de etilo fresco (1,15 L) a aproximadamente 0°C y se reinició la agitación; (d) se agitó la pasta durante aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 0°C. La última vez que se realizó dicho procedimiento, se añadió a la reacción un volumen menor de acetato de etilo (0,768 L) y se reinició la agitación durante 10 minutos a 0°C. Se filtró la pasta resultante, y se lavó el sólido una vez con acetato de etilo (0,576 L) y tres veces con diisopropil éter (0,576 L). Se secó el sólido bajo alto vacío a aproximadamente 25°C.

20 El producto se analizó mediante HPLC de fase inversa utilizando un gradiente de ácido trifluoroacético acuoso/ acetonitrilo.

El análisis LC/MS confirmó la masa $[M^+H]$ de 888,2 del (ciclo-[1-7](OtBu)-NH₂).

25 El rendimiento de recuperación fue del 103,7% (0,194 kg), el rendimiento neto fue cuantitativo (sobre la base del contenido en péptido: 79,7%).

Ejemplo 8: Preparación de [MPA-Har-Gly-Asp-Trp-Pro- Cys](NH₂) (ciclo-[1-7]-NH₂) (ejemplo de referencia)

30 Se preparó una mezcla de diclorometano (0,573 L), anisol (0,086 L) y TFA (0,122 L) a aproximadamente 20°C. Se enfrió la solución resultante a 15°C y se añadió lentamente el sólido [1-7](OtBu)-NH₂ (0,191 kg). Durante la adición [1-7](OtBu)-NH₂ se mantuvo la temperatura por debajo de los 20°C. La mezcla de reacción se enfrió adicionalmente a 10°C y se añadió una cantidad adicional de TFA (0,365 L) en aproximadamente 10 minutos. Durante la adición se mantuvo la temperatura por debajo de los 20°C. Tras la adición de todo el TFA, se dejó la muestra en agitación a 20°C y a continuación se realizó una HPLC.

35 El análisis HPLC se realizó en una columna Platinum EPS 100-5 C18, 250*4,6 mm. El gradiente fue de 22 a 98% B en 15 minutos, siendo el solvente A TFA 0,1% en agua y el solvente B TFA 0,1% en acetonitrilo. La detección se realizó a 215 nm, el flujo fue de 1,5 mL/min, y la temperatura de 40°C. Se completó la reacción cuando quedaba menos de un 3,0 del área porcentual de [1-7](OtBu)-NH₂ respecto al producto.

40 Una vez completada la reacción, se enfrió la mezcla a 10°C y se añadió a una solución 2/1 de di-isopropil éter (DIPE) / acetonitrilo (3,78 L) a 10°C. Se agitó la pasta resultante durante 10 minutos a 10°C y a continuación se filtró bajo vacío. Se lavó el sólido tres veces con una mezcla 7/3 de DIPE y acetonitrilo (0,573 L) y tres veces con DIPE (0,573 L). El producto se secó a una temperatura no superior a los 25°C.

45 El producto se analizó mediante HPLC de fase inversa utilizando un gradiente de ácido trifluoroacético acuoso/ acetonitrilo.

50 El análisis LC/MS confirmó la masa $[M^+H]$ de 832,3 del (ciclo-[1-7]-NH₂).

El rendimiento de recuperación fue de 0,157 kg (87,9%) y el rendimiento neto fue del 87,2% (sobre la base del contenido en péptido: 79,1%).

55 El contenido en API puro fue del 45,8%. Este valor se obtuvo mediante el siguiente método de HPLC: Synergi Max-RP 4 µm 80Å 250*4,6 mm; solvente A: 52 mM H₃PO₄/CH₃CN/100 mM H₇SA (86/14/0,80); solvente B: 52 mM H₃PO₄/CH₃CN/100mM H₇SA (50/50/0,80); 220 nm; 1,3 mL/min; 50°C; gradiente: 0%B durante 45 minutos, a continuación a 45% B durante 13 minutos, a continuación a 100% B durante 1 minuto.

Ejemplo 9: Purificación de Eptifibatide (ejemplo de referencia)

Purificación primaria:

60 La purificación primaria fue una purificación basada en ácido trifluoroacético/ acetonitrilo. Las normas aplicadas para las fracciones principales individuales fueron de ≥ 92,0%. La fase estacionaria fue una columna Kromasil C18, 10

µm, 100 A con un diámetro de 5 cm. La presión de la columna fue de 50 bar, la velocidad de flujo fue de 50 mL/min, y la longitud de onda de detección fue de 215 nm. Las fases móviles fueron las siguientes:

Solvente A: TFA 0,1% en agua procesada/ CH₃CN (95/5); y

Solvente B: TFA 0,1% en agua procesada/ CH₃CN (50/50);

5 La columna se equilibró mediante la elución del solvente A al 100% durante 15 minutos. El gradiente de purificación fue el siguiente: elución de solvente A al 100% durante 10 minutos; gradiente: 15% B a 45% B durante 60 minutos; y elución de solvente B al 100% durante 15 minutos.

10 La purificación se controló utilizando el método MAD-009- SF323TG1 y los objetivos de los criterios de aceptación fueron los siguientes:

Fracción principal (F1): ≥ 92%; y

Fracción lateral (Fp): ≥ 60% y < 92%.

Las fracciones recolectadas se almacenaron a una temperatura entre 2°C y 8°C.

15 *Purificación secundaria:*

La purificación secundaria fue una purificación basada en ácido acético/acetonitrilo. Las normas para las fracciones principales individuales fueron de ≥ 99,0% con impurezas individuales <0,3 / 0,5%. La fase estacionaria fue una columna Kromasil C18, 10 µm, 100 A con un diámetro de 5 cm. La presión de la columna fue de 40 ± 5 bar, la velocidad de flujo fue de 50 mL/min, y la detección se realizó a una longitud de onda de 215 nm. Las fases móviles fueron las siguientes:

Solvente A: AcOH 0,5% en agua procesada / CH₃CN (95/5); y

Solvente B: AcOH 0,5% en agua procesada / CH₃CN (50/50).

20 La columna se equilibró mediante la elución del solvente A al 100% durante 15 minutos. El gradiente de purificación fue el siguiente: elución de solvente A al 100% durante 10 minutos; gradiente: 0% B a 15% B durante 50 minutos; 15% B a 35% B durante 60 minutos y elución de solvente B al 100% durante 15 minutos.

30 La purificación se controló utilizando el método MAD-009- SF323TG1 y los objetivos de los criterios de aceptación fueron los siguientes:

Fracción principal (F1): ≥ 99%; con impurezas < 0,3 / 0,5% y

Fracción lateral (Fp): 80% y 99%.

Las fracciones recolectadas se almacenaron a una temperatura entre 2°C y 8°C.

35 *Desalinización/concentración:*

Se realizó una etapa de desalinización doble en solución de acetato de amonio antes de la etapa de concentración para eliminar el contra-ión trifluoroacetato residual y obtener la forma acetato del péptido. La etapa de concentración redujo el volumen de la solución procesada.

La fase estacionaria para la desalinización en NH₄OAc/ concentración en AcOH fue una columna Kromasil C18, 10 µm, 100 A con un diámetro de 5 cm. La presión de la columna fue de 40 ± 5 bar, la velocidad de flujo fue de 50 mL/min, y la longitud de onda de detección fue de 215 nm. Las fases móviles fueron las siguientes:

Solvente A: AcOH 0,5% en agua procesada/ CH₃CN (95/5);

Solvente B: AcOH 0,5% en agua procesada/ CH₃CN (50/50); y

Solvente C: NH₄OAc 100 mM pH: 6,5 en agua procesada/ CH₃CN (95/5).

50 La columna se equilibró mediante la elución del solvente A al 100% durante 15 minutos. Para la carga de la columna, se diluyó la fracción principal de la purificación en AcOH con 2 volúmenes de agua procesada.

La desalinización se realizó del modo siguiente: 10 minutos de solvente A; 10 minutos de solvente C; 10 minutos de solvente A; y 10 minutos de solvente C.

55 La concentración se realizó del siguiente modo: 10 minutos de solvente A y solvente B al 50% durante 15 minutos.

La desalinización y concentración se controlaron utilizando el método MAD-009- SF323TG1 y los objetivos de los criterios de aceptación fueron los siguientes:

Fracción principal (F1): ≥ 99%; con impurezas < 0,3 / 0,5% y

Fracción lateral (Fp): 80% y < 99%.

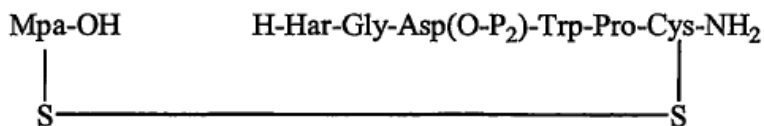
Las fracciones recolectadas se almacenaron a una temperatura entre 2°C y 8°C.

60

REIVINDICACIONES

1. Producto producido por un proceso que comprende:

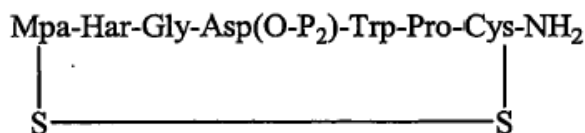
- 5 • proporcionar un compuesto de fórmula II:



(II)

en la que
 Har es homoarginilo;
 Gly es glicilo;
 10 Asp es aspartilo;
 Trp es triptofanilo;
 Pro es prolilo;
 Cys-NH₂ es cisteinamida;
 Mpa es ácido mercaptopropiónico; y
 15 P₂ es un grupo protector de carboxilo; y

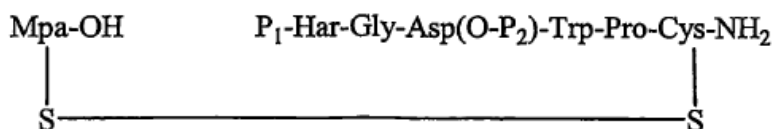
- acoplar los residuos Har y Mpa para formar un compuesto de fórmula III:



(III)

2. Producto, según la reivindicación 1, en el que P₂ es t-butilo.

3. Producto, según la reivindicación 1, que comprende además la eliminación de P₁ del residuo Har de un compuesto de fórmula I:



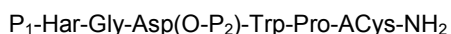
en la que P₁ es un grupo protector de amino, formando de este modo el compuesto de fórmula II.

4. Producto, según la reivindicación 3, en el que P₂ es estable en condiciones adecuadas para la eliminación de P₁.

5. Producto, según la reivindicación 3, en el que P₂ es t-butilo.

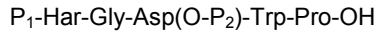
6. Producto, según la reivindicación 3, en el que P₁ es 9- fluorenilmetoxicarbonilo o benciloxicarbonilo.

7. Producto, según la reivindicación 3, en el que dicho proceso comprende además unir un residuo Mpa a un fragmento 2-7 de eptifibatide de fórmula:



en el que ACys-NH₂ es un residuo cisteinamida inactivado, mediante una unión disulfuro entre el residuo Mpa y el residuo ACys-NH₂ del fragmento 2-7 de eptifibatide, formando de este modo el compuesto de fórmula I.

8. Producto, según la reivindicación 7, en el que dicho proceso comprende además el acoplamiento del fragmento 2-6 de eptifibatide de fórmula:



a un residuo cisteinamida activado a través del residuo Pro del fragmento 2-6 de eptifibatide, formando de este modo el fragmento 2-7 de eptifibatide.

- 5
9. Producto, según la reivindicación 8, en el que el residuo cisteinamida inactivado es H-Cys(Npys)NH₂.
10. Producto, según la reivindicación 8, en el que dicho proceso comprende además el acoplamiento de un fragmento 2-3 de eptifibatide de fórmula:



y un fragmento 4-6 de eptifibatide de fórmula:



mediante la unión del residuo Gly del fragmento 2-3 de eptifibatide al residuo Asp del fragmento 4-6 de eptifibatide, formando de este modo el fragmento 2-6 de eptifibatide.

- 20 11. Producto, según la reivindicación 10, que comprende además el acoplamiento de un residuo Asp protegido en el extremo amino terminal que posee una cadena carboxílica lateral protegida a un dipéptido Trp-Pro a través del residuo Trp del dipéptido y la eliminación del grupo protector del extremo amino terminal del residuo Asp para formar un fragmento 4-6 de eptifibatide.
- 25 12. Producto, según la reivindicación 11, que comprende además el acoplamiento de un residuo Har protegido en el extremo amino terminal y un residuo Gly protegido o no protegido para formar un fragmento 2-3 de eptifibatide.