

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 502**

51 Int. Cl.:

C07K 5/10 (2006.01)

C07K 14/815 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009 E 09795927 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 2382232**

54 Título: **Proceso para la producción de bivalirudina**

30 Prioridad:

29.12.2008 EP 08022479

12.11.2009 US 260471 P

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

23.01.2014

73 Titular/es:

LONZA BRAINE SA (100.0%)

Chaussee de Tubize 297

1420 Braine-L'Alleud, BE

72 Inventor/es:

SOMMEN, GEOFFROY y

FORNI, LUCIANO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

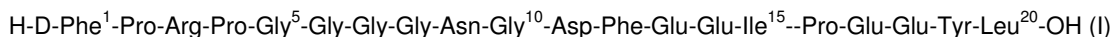
ES 2 439 502 T3

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

Proceso para la producción de bivalirudina

5 La presente invención se refiere a una nueva síntesis convergente de bivalirudina, un péptido de 20 unidades de fórmula



10 La invención se refiere adicionalmente a diversos péptidos protegidos como productos intermedios en la síntesis de bivalirudina.

El procesamiento proteolítico por trombina es crucial en el control de la coagulación sanguínea. La hirudina, un potente inhibidor peptídico de trombina clínico, consiste en 65 aminoácidos. Pero también segmentos peptídicos más cortos han resultado ser eficaces en el tratamiento de la trombosis, una afección que pone en peligro la vida.

15 El documento US 5.196.404 desvela, entre otros, la bivalirudina, uno de estos péptidos más cortos, que son fuertes inhibidores de trombina. La bivalirudina también se conoce como hirulog-8, BG-8967, Efludan, Angiomax[®] o Hirulog[®] y posee la secuencia de aminoácidos proporcionada en la fórmula I.

20 El documento WO 98/50563 describe un método para la preparación de diversos péptidos, incluyendo la bivalirudina, por tecnología recombinante. El método comprende expresar el péptido como parte de una proteína de fusión, seguido de la liberación del péptido de la proteína de fusión por un aceptor de acilo.

25 Okayama et al. Chem. Pharm. Bull. 1996, 44, 1344-1350, y Steinmetzer et al. Eur. J. Biochem. 1999, 265, 598-605, diseñan la síntesis en fase sólida de diferentes hirulogs sobre resina de Wang. La resina Wang requiere la escisión del péptido desde la resina con ácido trifluoroacético concentrado. En una estrategia de síntesis en fase sólida similar para la presentación de bivalirudina, el documento WO 91/02750 desvela una estrategia secuencial de unión de aminoácidos protegidos solo con Boc a resina Boe-L-leucina-o-divinilbenceno, seguida de desprotección y separación simultánea usando HF/*p*-cresol/etil metil sulfato y posterior liofilización y purificación. En ambos casos, la escisión del péptido desde la resina requiere condiciones ácidas agresivas, que probablemente ocasionan desprotección global concomitante y produciría reacciones secundarias no deseadas con restos de aminoácidos, afectando por tanto negativamente a la pureza del producto. Además, las reacciones secundarias con frecuencia se originan en síntesis en fase sólida por incorporación errónea, doble pérdida de aminoácidos sencillos y/o racemización y dan lugar a productos secundarios que tienen una estructura muy similar a la del péptido diana. Por lo tanto, la purificación es poco práctica y da como resultado pérdida de rendimiento. Los péptidos especialmente más largos son propensos a adoptar una conformación irregular mientras que aún están unidos al soporte sólido, lo cual dificulta incluso más la unión de aminoácidos adicionales a la cadena en crecimiento. Por lo tanto, este problema aumenta a medida que aumenta la longitud del péptido.

30 El documento WO 2007/033383 desvela un método para la producción de bivalirudina basado en una síntesis en fase sólida o en una combinación de síntesis en fase sólida y en solución (estrategia mixta). En una realización, la secuencia peptídica de la bivalirudina se prepara en una resina híper inestable a ácidos. En otra realización, la bivalirudina se prepara acoplado un fragmento peptídico *N* terminal protegido con cadena lateral con un fragmento peptídico *C* terminal protegido con cadena lateral y posterior desprotección usando condiciones fuertemente ácidas. En este caso, dichos fragmentos *N* terminal y el precursor de dicho fragmento *C* terminal (es decir, secuencia peptídica menos Leu) se preparan ambos por síntesis en fase sólida. Una de las desventajas de esta estrategia es la formación sustancial de D-Tyr¹⁹-bivalirudina. Esta impureza es difícil de eliminar, requiriendo por tanto esfuerzos, costes y pérdida de rendimiento extras para conseguir el producto purificado. Además, la cantidad de bivalirudina purificada obtenida en los ejemplos del documento WO 2007/033383 se encuentra solo en el intervalo de gramos, lo que indica que esta estrategia no es adecuada para la producción a gran escala de bivalirudina con una buena pureza.

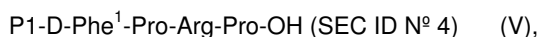
35 Es un objetivo de la presente invención proporcionar una síntesis de bivalirudina que sea más eficaz, que supere los inconvenientes conocidos de la síntesis lineal, en fase sólida, y que sea adecuada para la producción a escala industrial. Este objetivo se ha conseguido mediante el proceso de acuerdo con la reivindicación 1, los fragmentos peptídicos de la reivindicación 19 y el uso de estos fragmentos peptídicos de acuerdo con la reivindicación 29. Las realizaciones preferidas constituyen la materia objeto de las reivindicaciones dependientes 2-18 y 20-28.

40 La presente invención se refiere a un proceso que sigue una estrategia convergente, es decir, fragmentos individuales se sintetizan por separado y después se acoplan en fase en solución para construir el péptido deseado. La dificultad de la síntesis convergente es encontrar fragmentos adecuados y su orden de acoplamiento para superar los inconvenientes conocidos de la síntesis convergente. Estos inconvenientes son problemas de solubilidad durante el acoplamiento y el aislamiento, velocidades de reacción más lentas en comparación con la síntesis en fase sólida y un riesgo de racemización mucho más alto del fragmento *C* terminal durante el acoplamiento. La bivalirudina consiste en veinte restos de aminoácidos de tal manera que existe una enorme cantidad de fragmentos y órdenes de acoplamiento posibles. Además, la bivalirudina contiene siete restos de aminoácidos, en concreto -Arg³-, -Asn⁹-, -Asp¹¹-, -Glu¹³-, -Glu¹⁴-, -Glu¹⁷-y -Glu¹⁸-, todos ellos con funciones de cadena lateral reactiva que requieren protección

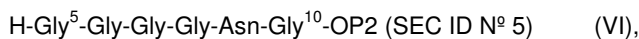
y desprotección adecuadas. Lo mismo se aplica a la protección y desprotección adecuada del extremo *N* y *C* de los fragmentos sencillos, aumentando por tanto la dificultad de encontrar una vía que consiga el objeto de la presente invención.

5 De manera sorprendente, el solicitante ha descubierto que la bivalirudina de fórmula I puede construirse ventajosamente por la estrategia [(1 + 2) + (3 + {4 + 5})] como se define más adelante. Los números 1, 2 y 5 representan los tres fragmentos peptídicos de fórmula V, VI y X, el número 3 representa el derivado de ácido aspártico de fórmula XIII, y el número 4 representa el derivado de fenilalanina de fórmula XI. La presente invención se refiere a un proceso para la producción de bivalirudina de fórmula I en fase en solución que comprende las etapas de

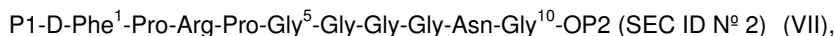
(a) hacer reaccionar un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula



en la que P1 es un grupo protector, con un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula



en la que P2 es un grupo protector, para producir un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula



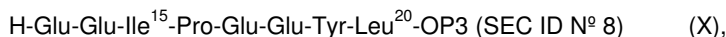
en la que P1 y P2 son como se ha definido anteriormente,

(b) eliminar P2 del péptido producido en la etapa (a) para producir el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

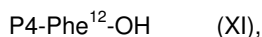


en la que P1 es como se ha definido anteriormente,

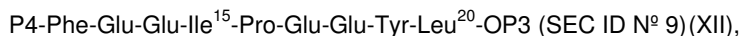
(c) hacer reaccionar un péptido protegido con cadena lateral de fórmula



en la que P3 es un grupo protector, con una fenilalanina de fórmula



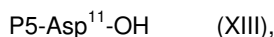
en la que P4 es un grupo protector, para producir un péptido protegido con cadena lateral de fórmula



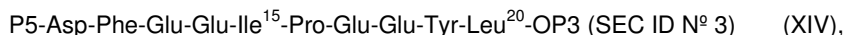
en la que P3 y P4 son como se ha definido anteriormente,

(d) eliminar P4 del péptido producido en la etapa (c) para producir el correspondiente péptido protegido con cadena lateral, no protegido en posición *N terminal* de fórmula XII,

(e) hacer reaccionar el péptido de fórmula XII producido en la etapa (d) con un ácido aspártico protegido con cadena lateral de fórmula

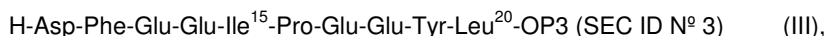


en la que P5 es un grupo protector, para producir un péptido protegido con cadena lateral de fórmula



en la que P3 y P5 son como se ha definido anteriormente,

(f) eliminar P5 del péptido producido en la etapa (e) para producir el péptido protegido con cadena lateral de fórmula



en la que P3 es como se ha definido anteriormente,

(g) hacer reaccionar el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula II producido en la etapa

(b) con el péptido protegido con cadena lateral de fórmula III producido en la etapa (f) para producir un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro--Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 1) (IV),

en la que P1 y P3 son como se ha definido anteriormente,

(h) eliminar P1, P3 y los grupos protectores de cadena lateral del péptido producido en la etapa (g) para producir la bivalirudina de fórmula I.

El proceso de la presente invención permite realizar una síntesis muy eficaz de la bivalirudina mediante una síntesis convergente de fragmentos, que puede adaptarse fácilmente a la producción a escala industrial.

Los grupos protectores P2 (para el péptido VI) y P3 (para el péptido X) en posición C-terminal pueden ser cualquier grupo protector que esté en línea con la ortogonalidad del resto de los grupos protectores. Son ejemplos adecuados grupos protectores en posición C-terminal que se eliminan por saponificación como metilo (Me) o etilo (Et) o grupos protectores en posición C-terminal que se eliminan por hidrogenación catalítica.

En una realización del proceso de la presente invención, en la etapa (a), el grupo protector P1 es un grupo protector que es estable a hidrogenación catalítica y el grupo protector P2 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica y que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral opcional; en la etapa (c), el grupo protector P3 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica y el grupo protector P4 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral del péptido de fórmula X y con respecto a P3; y en la etapa (e), el grupo protector P5 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral del péptido/aminoácido de fórmula XII y XIII y con respecto a P3, permitiendo un proceso de fase en solución que comprende las etapas de

(a) hacer reaccionar un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-OH (SEC ID N° 4) (V),

en la que P1 es un grupo protector que es estable a hidrogenación catalítica, con un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

H-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OP2 (SEC ID N° 5) (VI),

en la que P2 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica y que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector opcional de cadena lateral, para producir un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OP2 (SEC ID N° 2) (VII),

en la que P1 y P2 con como se ha definido anteriormente,

(b) eliminar P2 del péptido producido en la etapa (a) para producir el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OH (SEC ID N° 2) (II),

en la que P1 es como se ha definido anteriormente,

(c) hacer reaccionar un péptido protegido con la cadena lateral de fórmula

H-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 8) (X),

en la que P3 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica, con una fenilalanina de fórmula

P4-Phe¹²-OH (XI),

en la que P4 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral del péptido de fórmula X y con respecto a P3, para producir un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

P4-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 9)(XII),

en la que P3 y P4 son como se ha definido anteriormente,

(d) eliminar P4 del péptido producido en la etapa (c) para producir el péptido correspondiente protegido con

cadena lateral, no protegido en posición *N*-terminal, de fórmula XII,

(e) hacer reaccionar el péptido de fórmula XII producido en la etapa (d) con un ácido aspártico protegido con cadena lateral de fórmula

5 P5-Asp¹¹-OH (XIII),

en la que P5 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral del péptido/aminoácido de fórmula XII y XIII y con respecto a P3 para producir un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

10 P5-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 3) (XIV),

en la que P3 y P5 son como se ha definido anteriormente,

15 (f) eliminar P5 del péptido producido en la etapa (e) para producir el péptido protegido con cadena lateral de fórmula

H-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 3) (III),

en la que P3 es como se ha definido anteriormente,

20 (g) hacer reaccionar el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula II producido en la etapa (b) con el péptido protegido con cadena lateral de fórmula III producido en la etapa (f) para producir un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

25 P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 1) (IV),

en la que P1 y P3 son como se ha definido anteriormente,

30 (h) eliminar P1, P3 y los grupos protectores de cadena lateral del péptido producido en la etapa (g) para producir la bivalirudina de fórmula

H-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OH (SEC ID N° 1) (I).

35 Aquí y en lo sucesivo, el término "ortogonal", como atributo característico del comportamiento de dos grupos protectores diferentes, debe entenderse que significa que un grupo protector, que puede escindirse por un método determinado, no afecta al otro grupo protector. Por ejemplo, "un grupo protector que es ortogonal con respecto a los grupos protectores de cadena lateral" significa un grupo protector que puede escindirse mediante un método determinado que no afecta a los grupos protectores de cadena lateral.

40 La ventaja de esta estrategia es que puede aplicarse a escala comercial, posibilitando de este modo la producción de bivalirudina con excelente pureza y en una cantidad de kilogramos por lote sin formación de impurezas desagradables como D-Phe¹²-bivalirudina, D-Tyr¹⁹ bivalirudina o Asp⁹-bivalirudina. Por ejemplo, cuando el fragmento protegido Asp-Phe¹² se acopla con el fragmento peptídico protegido de fórmula X, se forma un 5 % de D-Phe¹²-bivalirudina, cuya formación puede suprimir inesperadamente el proceso de acuerdo con la invención. La hidrogenación catalítica, como se aplica en el proceso de acuerdo con la invención, tiene la ventaja de que es un método de reacción muy limpio que, a diferencia de otros métodos de desprotección, no induce la formación de carbocationes, de tal manera que no se forman productos secundarios indeseables resultantes de reacciones entre dichos carbocationes y el péptido diana. Por comparación, en la vía desvelada en el documento WO 2007/033383 la protección se realiza usando *tert*-butilo (tBu; como *tert*-butil éter o como *tert*-butil éster), que es un grupo protector que solo se escinde por acidólisis (por ejemplo con ácido clorhídrico o ácido trifluoroacético). Esta acidólisis induce la formación de productos secundarios, tal como tirosina *tert*-butilada, que es difícil de eliminar en el producto final debido a sus propiedades físicoquímicas similares. Otra desventaja de la acidólisis es que la manipulación de grandes cantidades de ácidos fuertes, tal como, ácido trifluoroacético, genera problemas de seguridad tanto en la producción como de tipo ambiental, especialmente a escala comercial.

55 Para una comparación adicional, si un grupo protector en posición *C* terminal que puede eliminarse por saponificación, tal como Et, se usa como P2 para los péptidos de fórmula VI y VII, su eliminación en condiciones básicas induce la degradación sustancial del resto de asparagina (-Asn⁹-) y del resto de arginina (-Arg⁹-). Incluso si la saponificación no se realiza ni con ácido ni con base, sino con la estrategia más suave de reacción enzimática, al igual que la saponificación con la enzima subtilisina, se observa formación sustancial de Asp⁹bivalirudina producida por la degradación del resto de asparagina.

65 Antes, durante y después de únicas etapas de reacción sencillas de la presente invención, todos los fragmentos peptídicos, así como los productos de acoplamiento, pueden estar presentes como tales o en una forma salina adecuada, dependiendo de las propiedades físicoquímicas de la molécula y/o de las condiciones de reacción. Son sales adecuadas, por ejemplo, las sales formadas con trietilamina (TEA), dicitclohexilamina (DCHA), ácido clorhídrico (HCl) y ácido trifluoroacético (TFA).

En la etapa (h), P1, P3 y los grupos protectores de cadena lateral pueden eliminarse después o de manera simultánea.

5 Preferentemente, en la etapa (h), primero se eliminan P3 y el grupo (o grupos) protector de cadena lateral de manera simultánea, y después se elimina P1.

10 Normalmente, el fragmento peptídico obtenido después de cada una de las etapas (a) a (g) se aísla antes de someterlo a la siguiente etapa. Sorprendentemente, el solicitante ha descubierto que en la etapa (h) el aislamiento del péptido, obtenido después de eliminar simultáneamente P3 y el grupo (o grupos) protector de cadena lateral, puede suprimirse antes de eliminar P1, obteniendo al mismo tiempo similares rendimientos y sin efecto negativo sobre la pureza. Esto es sorprendente, dado que normalmente es esencial realizar una etapa de aislamiento para eliminar productos secundarios que también pueden reaccionar en la siguiente etapa de desprotección y por tanto disminuir la pureza del péptido diana. Este hallazgo tiene un efecto positivo sobre los costes y el tiempo de los procesos globales y normalmente dan como resultado un mayor rendimiento del péptido no protegido con P1 dado que el aislamiento normalmente supone pérdida de producto. Por lo tanto, en una realización más preferida del proceso de acuerdo con la invención, en la etapa (h), el péptido obtenido después de eliminar simultáneamente P3 y el grupo protector de cadena lateral no se aísla antes de eliminar P1.

20 Cualquier grupo protector normalmente conocido que sea estable a hidrogenación catalítica puede usarse como P1. Son ejemplos adecuados *tert*-butoxicarbonilo (Boc), 2-(bifenil-4-il) prop-2-iloxicarbonilo (Bpoc), 2-(3, 5-dimetoxifenil) prop-2-iloxicarbonilo (Ddz), fluoren-9-ilmetoxicarbonilo (Fmoc), adamantil-1-oxicarbonilo (Adc), *tert*-amiloxicarbonilo (Aoc), difenilfosfinilo (Dpp), 2-(metilsulfonyl) etoxicarbonilo (Msc) y ftaloilo (Pht). Preferentemente, P1 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc, más preferentemente P1 es Boc.

25 Como grupos protectores P4 y P5, puede usarse cualquier grupo protector adecuado y normalmente conocido que sea ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral y con respecto a P3 del fragmento de fórmula II (para P4), respectivamente del aminoácido de fórmula XIII y del fragmento de fórmula XIV (para P5). Preferentemente, P4 y P5 son estables a hidrogenación catalítica y ortogonales con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral y con respecto a P3. Por ejemplo, son grupos protectores adecuados Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc, Adc, Aoc, Dpp, Msc y Pht. Preferentemente, P4 y/o P5 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc; más preferentemente P4 y/o P5 es Boc.

30 En una realización preferida del proceso de la presente invención, al menos uno de P1, P4 y P5 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc; preferentemente al menos uno de P1, P4 y P5 es Boc.

35 Como grupo protector P3, puede usarse cualquier grupo protector normalmente conocido que pueda eliminarse por hidrogenación catalítica. Son ejemplos adecuados bencilo (Bzl), benciloximetilo (Bom), fenacilo (Pac), 4-nitrobencilo (ONbz), 4-piridilmetilo (Pic) y 4-sulfobencilo. Preferentemente P3 es Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic o 4-sulfobencilo a condición de que, si P4 o P5 es Boc, Bpoc o Ddz, P3 no sea Bom. Más preferentemente P3 es Bzl. El grupo protector Bom es sensible a ácidos y los grupos protectores Boc, Bpoc y Ddz son escindibles por ácidos, es decir Bom no es ortogonal con respecto a Boc, Bpoc o Ddz. Este comportamiento excluye, aquí y en lo sucesivo, el uso simultáneo de Bom y uno de los grupos protectores Boc, Bpoc o Ddz.

40 Como grupo protector P2, puede usarse cualquier grupo protector normalmente conocido que pueda eliminarse por hidrogenación catalítica y, en caso de protección de cadena lateral, que sea al mismo tiempo ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral. Son ejemplos adecuados Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic y 4-sulfobencilo. Preferentemente, P2 es Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic o 4-sulfobencilo; más preferentemente P2 es Bzl.

En una realización preferida, al menos uno de P2 y P3 es Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic o 4-sulfobencilo, a condición de que, si P4 o P5 es Boc, Bpoc o Ddz, P3 no sea Bom. Preferentemente al menos uno de P2 y P3 es Bzl.

50 En una realización más preferida, al menos uno de P1, P4 y P5 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc; y al menos uno de P2 y P3 es Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic o 4-sulfobencilo, a condición de que, si P4 o P5 es Boc, Bpoc o Ddz, entonces P3 no sea Bom. Preferentemente, al menos uno de P1, P4 y P5 es Boc y al menos uno de P2 y P3 es Bzl.

55 Preferentemente, en el proceso de acuerdo con la invención los péptidos/aminoácidos protegidos con cadena lateral de fórmula III, IV, X y XII-XIV se protegen con al menos un grupo protector de cadena lateral seleccionado del grupo que consiste en Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic y 4-sulfobencilo; a condición de que, si P4 o P5 es Boc, Bpoc o Ddz, ningún grupo protector de cadena lateral sea Bom.

60 En particular, en el proceso de acuerdo con la invención los péptidos/aminoácidos protegidos con cadena lateral de fórmula III, IV, X y XII-XIV están protegidos con al menos un Bzl como grupo (o grupos) protector de cadena lateral.

65 Normalmente, el péptido de fórmula V está protegido con cadena lateral en el resto de arginina con un grupo protector de cadena lateral adecuado, tal como nitro, para impedir reacciones secundarias no deseadas. Normalmente, el péptido de fórmula VI está protegido con cadena lateral en el resto de asparagina con un grupo protector de cadena lateral adecuado, especialmente para la protección en posición *N*-terminal con Fmoc, para

impedir reacciones secundarias no deseadas. Un ejemplo adecuado es tritilo (Trt), especialmente en caso de protección en posición *N*-terminal con Fmoc.

Sorprendentemente, el solicitante descubrió que la protección con cadena lateral podía suprimirse para los péptidos de fórmula V y VI, lo que facilita tanto su ensamblaje como la desprotección en posición *C*-terminal del producto de acoplamiento, es decir, del péptido de fórmula VII. Este hallazgo permite pasar por alto la ortogonalidad entre la protección de la cadena lateral y de la posición *C*-terminal, simplificando por tanto la vía. Otra ventaja es que el material de partida no protegido correspondiente es más económico que el protegido, lo cual es importante especialmente para la producción a gran escala.

Preferentemente, en el proceso de acuerdo con la invención, en la etapa (a) al menos uno de los péptidos opcionalmente protegidos con cadena lateral de fórmula V y VI no está protegido con cadena lateral. En el caso de que ambos péptidos no estén protegidos con cadena lateral, los péptidos resultantes de fórmula VII y II en las etapas (a) y (b) tampoco están protegidos con cadena lateral.

Más preferentemente, en el proceso de acuerdo con la invención,

en la etapa (a), ambos péptidos de fórmula V y VI no están protegidos con cadena lateral;

en la etapa (c), el péptido de fórmula X está protegido con al menos un grupo protector de cadena lateral seleccionado del grupo que consiste en Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic y 4-sulfobencilo, preferentemente Bzl, a condición de que, si P4 o P5 es Boc, Bpoc o Ddz, ninguno de los grupos protectores de cadena lateral sea Bom; y

en la etapa (e), el derivado de ácido aspártico de fórmula XIII está protegido con un grupo protector de cadena lateral seleccionado del grupo que consiste en Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic y 4-sulfobencilo, preferentemente Bzl, a condición de que, si P4 o P5 es Boc, Bpoc o Ddz, ninguno de los grupos protectores de cadena lateral sea Bom.

Incluso más preferentemente, en el proceso de acuerdo con la invención, en la etapa (a), ambos péptidos de fórmula V y VI no están protegidos con cadena lateral, y en ambas etapas (c) y (e), el al menos un grupo protector de cadena lateral es Bzl.

En una realización más preferida del proceso de acuerdo con la invención, en la etapa (c) el péptido de fórmula X está protegido con cadena lateral con cinco grupos protectores de cadena lateral que protegen a las cadenas laterales de los cuatro ácidos glutámicos y de la tirosina, dando así lugar al péptido de fórmula

H-Glu (OP6)-Glu (OP7)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OP8)-Glu (OP9)-Tyr (P10)--Leu²⁰-OP3 (SEC ID 8) (Xb),

en la que P3 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica, preferentemente P3 es Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic o 4-sulfobencilo; más preferentemente P3 es Bzl; y

cada uno de P6 a P10 se selecciona independientemente del grupo que consiste en Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic y 4-sulfobencilo; preferentemente cada uno de P6 a P10 es Bzl; y en la etapa (e) el ácido aspártico protegido con cadena lateral de fórmula XIII es

P5-Asp (OP11)¹¹-OH,

en la que P5 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de la cadena lateral del péptido/aminoácido de fórmula XII y XIII y con respecto a P3; preferentemente P5 es estable a hidrogenación catalítica y ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral y con respecto a P3; más preferentemente P5 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc; más preferentemente P5 es Boc; y P11 se selecciona del grupo que consiste en Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic y 4-sulfobencilo; preferentemente P11 es Bzl.

En el presente documento y a continuación, en los dos extremos *C* y en las cadenas laterales, la abreviatura "OP [número]" indica un éster (después de la reacción con un ácido carboxílico tanto en la cadena lateral como el extremo *C*), mientras que la abreviatura "T [número]" indica un éter. Por ejemplo, "OBzl" indica un éster bencílico (después de la reacción con un grupo carboxi de la cadena lateral e del extremo *C*), mientras que la abreviatura "Bzl" indica un éter bencílico (después de la reacción con, por ejemplo, el grupo hidroxifenólico de la tirosina).

Preferentemente, en el proceso de acuerdo con la invención P1, P4 y P5 son Boc; P2, P3, P6, P7, P8, P9, P10 y P11 son Bzl;

Más preferentemente, P1, P4 y P5 son Boc, P2, P3, P6, P7, P8, P9, P10 y P11 son Bzl y los péptidos de fórmula V y VI no están protegidos con cadena lateral, dando lugar a un proceso de fase en solución que comprende las etapas de

(a) hacer reaccionar

Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-OH (SEC ID N° 4)

con

H-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID N° 5)

5 para producir

Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID N° 2)

(b) eliminar Bzl del péptido producto en la etapa (a) para producir

10

Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OH (SEC ID N° 2),

(c) hacer reaccionar

15

H-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Tyr (Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID 8)

con

Boc-Phe¹²-OH

20

para producir

Boc-Phe-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Tyr (Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 9),

25

(d) eliminar Boc del péptido producido en la etapa (c) para producir el correspondiente péptido no protegido en el extremo N,

(e) hacer reaccionar el péptido producido en la etapa (d) con

Boc-Asp (OBzl)¹¹-OH

30

para producir

Boc-Asp (OBzl)¹¹-Phe-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Tyr (Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 3)

35

(f) eliminar Boc del péptido producido en la etapa (e) para producir H-Asp (OBzl)¹¹-Phe-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Tyr (Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 3)

(g) hacer reaccionar el péptido producido en la etapa (b) con el péptido producido en la etapa (f) para producir

40

Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp (OBzl)-Phe-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Tyr (Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 1),

y

45

(h) eliminar Boc, el Bzl que protege el extremo C y todos los Bzl que protegen la cadena lateral del péptido producido en la etapa (g) para producir la bivalirudina de fórmula I.

Esta realización preferida es muy sencilla y no requiere ninguna estrategia de grupo protector complicada.

50 Preferentemente, en la etapa (h), primero se elimina simultáneamente el Bzl que protege el extremo C y el Bzl que protege toda la cadena lateral, dando lugar a la bivalirudina protegida con Boc en el extremo N

Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OH (SEC ID N° 1),

55

y después de esto se elimina Boc.

Preferentemente, la bivalirudina protegida con Boc en el extremo N, obtenida después de la eliminación simultánea de Bzl que protege el extremo C y de Bzl que protege toda la cadena lateral, no se aísla antes de eliminar Boc.

60

Los grupos protectores P2, P3 del extremo C, así como los grupos protectores de cadena lateral P6 a P11, en caso de que se eliminen por hidrogenación catalítica, pueden eliminarse por cualquier método de hidrogenación catalítica conocido por el experto. La hidrogenación puede realizarse por hidrógeno elemental o mediante el uso de un donante de hidrógeno adecuado como ácido fórmico, formato de amonio, 1,3-ciclohexadieno, 1,4-ciclohexadieno o aductos del borano, tales como, *tert*-BuNH₂ · BH₃. Son catalizadores de hidrogenación adecuados, por ejemplo, los catalizadores de hidrogenación basados en metales nobles, en particular los metales conocidos como metales de

65

platino, es decir, rodio, rutenio, paladio, osmio, iridio y platino. Convenientemente, el catalizador de hidrogenación es un soporte tal como carbón vegetal. Dependiendo de la actividad requerida, el catalizador de hidrogenación puede estar "envenenado" para reducir su actividad, en particular sulfurado.

5 Opcionalmente, pueden añadirse co-catalizadores adecuados para dar soporte a la hidrogenación. Dichos co-catalizadores pueden ser compuestos de vanadio o molibdeno como óxido de vanadio (V) (V_2O_5), metavanadato amónico (NH_4VO_3) o molibdato sódico (Na_2MoO_4).

10 En una realización preferida, el catalizador se recicla teniendo un efecto positivo sobre los costes de producción y sobre el medio ambiente. Para el reciclado del catalizador, puede aplicarse cualquier tratamiento adecuado para reciclar el catalizador.

15 Preferentemente, al menos una de las etapas de eliminación (b) y (h) se realiza en un disolvente con gas hidrógeno y paladio sobre carbón vegetal. Como disolvente, puede usarse cualquier disolvente líquido inerte que pueda disolver los reactivos. Como disolventes aplicables se incluyen hidrocarburos aromáticos halogenados tales como clorobenceno y trifluorotolueno; hidrocarburos halogenados tales como diclorometano y dicloroetano; alcoholes tales como metanol, etanol, 2-propanol, butanol y alcohol bencílico; alcoholes halogenados, tales como, 2, 2, 2-trifluoroetanol; ácidos carboxílicos, tales como, ácido acético; ésteres carboxílicos y lactonas, tales como, etil acetato, metil acetato y valerolactona; y disolventes orgánicos que contienen heteroátomos, tales como, *N*-metilpirrolidona (NMP) o *N,N*-dimetilformamida (DMF). Los disolventes pueden usarse en solitario, como una mezcla de disolvente o como una mezcla con agua. Dependiendo de la solubilidad del fragmento peptídico, incluso puede usarse agua pura. Por lo tanto, en la etapa (b) la eliminación puede realizarse en agua pura como disolvente.

20 Un disolvente preferido se selecciona del grupo que consiste en DMF, acetona, ácido acético, una mezcla de acetona y agua y una mezcla de ácido acético y agua.

25 En una realización preferida, la etapa de eliminación (b) se realiza en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en DMF, acetona, agua y una mezcla de acetona y agua; particularmente en DMF.

Más preferentemente, la etapa de eliminación (b) se realiza en DMF. Sorprendentemente, se descubrió que el disolvente usado en la etapa de eliminación (b) tenía una influencia sobre el perfil de impureza de la bivalirudina final. Se observó que el DMF era ventajoso en comparación, por ejemplo, con una mezcla de acetona y agua de manera que la impureza formada después de la doble incorporación de -D-Phe¹--Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-(SEC ID N° 2) puede suprimirse.

30 En otra realización preferida, la etapa de eliminación (h) se realiza en ácido acético o en una mezcla de ácido acético y agua; particularmente en una mezcla de ácido acético y agua.

35 Los procesos de hidrogenación de las etapas de eliminación (b) y (h) pueden realizarse a presión atmosférica o a presión superatmosférica. Las presiones típicas son de 0,10 a 10 MPa (1 a 100 bares). Ventajosamente, de 0,10 a 7 MPa (1 a 70 bares); en particular se usa una presión de 0,2 a 1 MPa (2 a 10 bares).

40 Las reacciones de hidrogenación de las etapas de eliminación (b) y (h) pueden realizarse a temperaturas bajas o elevadas. Un intervalo de temperatura ejemplar es de -20 °C a 70 °C. Se prefiere una temperatura entre 0 °C y 60 °C, y prefiriéndose más un intervalo de 10 °C a 40 °C.

45 Las etapas de acoplamiento (a), (c), (e) y (g) del proceso de acuerdo con la invención se realizan en fase en solución y pueden llevarse a cabo usando condiciones de reacción conocidas en la técnica de síntesis peptídica. El acoplamiento de los respectivos fragmentos peptídicos/derivados de aminoácidos con cadena lateral protegida o desprotegida puede realizarse usando reactivos de acoplamiento *in situ*, por ejemplo, reactivos de acoplamiento de fosfonio o uronio, como hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris (dimetilamino) fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tris (pirrolidino) fosfonio (Pi-BOP), hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de *O*-(6-clorobenzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametiluronio (HCTU), tetrafluoroborato de *O*-(6-clorobenzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametiluronio (TCTU), hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametiluronio (HATU), tetrafluoroborato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametiluronio (TATU), tetrafluoroborato de *O*-(benzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametiluronio (TBTU) y tetrafluoroborato de *O*-[ciano (etoxicarbonil) metilenoamino]-1, 1, 3, 3-tetrametiluronio (TOTU) o reactivos de acoplamiento de carbodiimida, como diisopropilcarbodiimida (DIC), dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y carbodiimidias solubles en agua (WSCDI) como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) opcionalmente como sal tal como sal clorhidrato. Otras técnicas de acoplamiento usan ésteres activos preformados, tales como ésteres de *N*-hidroxisuccinimida (HOSu) y de *p*-nitrofenol (HONp) éster, anhídridos simétricos preformados, anhídridos no-simétricos tales como *N*-carboxianhídridos (NCAs) y haluros de ácidos, tales como fluoruros de acilo o cloruros de acilo. Los reactivos de acoplamiento preferidos son reactivos de acoplamiento de carbodiimida, siendo los más preferidos DIC o EDC, adecuadamente como sal de EDC, tal como EDC · HCl.

60 La mezcla de reacción de las etapas de acoplamiento (a), (c), (e) y (g) puede contener ventajosamente una base, preferentemente una base de amina terciaria, que desprotona el componente carboxi y neutraliza el contraión del componente amino, y por tanto facilita la reacción *in situ*. Son bases adecuadas, por ejemplo, las trialkilaminas, como *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) o trietilamina (TEA); *N,N*-dialquilanilinas, como *N,N*-dietilnilina; 2, 4, 6-

trialquilpiridinas, como 2, 4, 6-trimetilpiridina; y *N*-alquilmorfolinas, como *N*-metilmorfolina. En particular, la mezcla de reacción contiene ventajosamente TEA o DIPEA como una base.

La mezcla de reacción de las etapas de acoplamiento (a), (c), (e) y (g) puede contener adicionalmente nucleófilos auxiliares como aditivos debido a su efecto positivo suprimiendo reacciones secundarias no deseadas. Puede aplicarse en cualquier nucleófilo auxiliar conocido. Son ejemplos de nucleófilos auxiliares conocidos el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), la *N*-hidroxisuccinimida (HOSu), la *N*-hidroxi-3, 4-dihidro-4-oxo-1, 2, 3-benzotriacina (HOObt) y el 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt). Preferentemente, las mezclas de reacción de las etapas de acoplamiento contienen adicionalmente HOBt.

En una realización preferida, la mezcla de acoplamiento de las etapas de acoplamiento (a), (c), (e) y (g) se selecciona del grupo que consiste en DIC/HOBt/TEA, EDC/HOBt/DIPEA y EDC/HOBt/TEA.

Como disolvente de las etapas de acoplamiento (a), (c), (e) y (g), puede usarse cualquier disolvente líquido inerte que pueda disolver los reactivos. Son disolventes de acoplamiento aplicables los disolventes miscibles en agua como dimetil sulfóxido (DMSO), dioxano, tetrahidrofurano (THF), 1-metil-2-pirrolidona (NMP), *N*, *N*-dimetilformamida (DMF), *N*, *N*-dimetilacetamida (DMA), o cualquier mezcla de los mismos; disolventes no miscibles en agua como diclorometano (DCM), etil acetato o cualquier mezcla de los mismos; y cualquier mezcla adecuada entre disolventes miscibles en agua y no miscibles en agua, que incluyen mezclas con agua. Un disolvente preferido es DMF o una mezcla de DMF y agua.

La desprotección en posición *N* terminal de las etapas (d), (f) y (h) puede realizarse usando condiciones de reacción conocidas en la técnica de síntesis peptídica y depende de la naturaleza de los grupos protectores P1, P4 y P5. En el caso de que el grupo protector sea Boc, la desprotección se realiza adecuadamente por ácido, preferentemente por ácido trifluoroacético, que puede aplicarse puro o como una mezcla con un disolvente inerte, como tolueno, THF o una mezcla de tolueno y THF. En el caso de que el grupo protector sea Fmoc, la desprotección en posición *N terminal* puede realizarse por reacción con una base, favorablemente con una amina secundaria, tal como piperidina o dietilamina. Normalmente, la desprotección en posición *N* terminal se realiza en un disolvente que puede ser cualquier disolvente que no interfiera con los reactivos como hidrocarburos clorados tal como diclorometano; amidas alquiladas y lactamas, tales como dimetilformamida o 1-metil-2-pirrolidona; hidrocarburos aromáticos tal como tolueno; éteres tal como THF o cualquier mezcla de los mismos. Preferentemente, la desprotección del grupo Boc en posición *N terminal* se realiza en tolueno o en una mezcla de fenol, tolueno y THF.

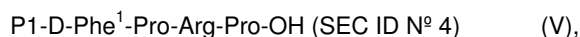
La bivalirudina en bruto obtenida después de la etapa (h) puede purificarse mediante métodos convencionales, como HPLC preparativa o distribución contracorriente. Las etapas de purificación pueden repetirse. Lo mismo se aplica a los fragmentos peptídicos obtenidos después de las etapas (a) a (g).

La bivalirudina final de fórmula I puede aislarse de acuerdo con métodos de aislamiento conocidos en la química de péptidos, tal como precipitación o secado por congelación, que también se conoce como liofilización.

Los péptidos de fórmula V y VI opcionalmente protegidos con cadena lateral y el péptido de fórmula X protegido con cadena lateral pueden prepararse usando métodos convencionales de síntesis peptídica, por ejemplo, síntesis en fase en solución (sinónimo: síntesis peptídica en fase homogénea, abreviada como HPPS), síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) o una combinación de SPPS y HPPS denominada síntesis mixta (sinónimo: síntesis peptídica en fase mixta, abreviada como MPPS).

En una realización del proceso de acuerdo con la presente invención, al menos uno de los péptidos seleccionados del grupo que consiste en el péptido de fórmula V opcionalmente protegido con cadena lateral, el péptido de fórmula VI opcionalmente protegido con cadena lateral y el péptido de fórmula X protegido con cadena lateral, se preparan por síntesis en fase en solución en un proceso anterior. Preferentemente, estos péptidos se ensamblan comenzando con los dipéptidos correspondientes, es decir, los patrones de secuencia -D-Phe¹-Pro-, -Arg³-Pro-, -Gly⁵-Gly-, -Gly⁷-Gly-, -Asn⁹-Gly-, -Glu¹³-Glu-, -Ile¹⁵-Pro-, -Glu¹⁷-Glu-o-Tyr¹⁹-Leu-. El extremo *N*, el extremo *C* y los grupos protectores de cadena lateral así como las condiciones de reacción pueden ser cualquiera de los conocidos por el experto, preferentemente pueden ser iguales o similares a los descritos anteriormente.

En particular, el proceso para la producción del péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula



preferentemente del péptido no protegido con cadena lateral Va, en el que

P1 es un grupo protector, preferentemente P1 es un grupo protector que es estable a hidrogenación catalítica, más preferentemente P1 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc, más preferentemente P1 es Boc; en fase en solución, comprende las etapas de

(a) eliminar P12 de un dipéptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

P12-Arg-Pro⁴-OP13 (XVI),

preferentemente del dipéptido no protegido con cadena lateral XVIa,
en el que

5 P12 es un grupo protector, preferentemente P12 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo(o grupos) protector de cadena lateral y con respecto a P13, más preferentemente P12 es un grupo protector que es estable a hidrogenación catalítica y ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral y con respecto a P13, incluso más preferentemente P12 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc, más preferentemente P12 es Boc; y P13 es un grupo protector como Bzl, metil (Me) o etil (Et); preferentemente P13 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica y es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral, más preferentemente P13 es Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic, o 4-sulfobencilo, más preferentemente P13 es Bzl;
10 a condición de que, si P12 es Boc, Bpoc o Ddz, entonces P13 no sea Bom;
15 (b) hacer reaccionar el dipéptido opcionalmente protegido con cadena lateral, no protegido en el extremo N, preferentemente el correspondiente dipéptido no protegido con cadena lateral, producido en la etapa (a) con un dipéptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

P1-D-Phe¹-Pro-OW (XVII),

20 preferentemente con el dipéptido no protegido con cadena lateral XVIIa,
en el que

P1 es como se ha definido anteriormente, y W es hidrógeno o un grupo de pre-activación tal como pentafluorofenilo (Pfp), para producir un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

25 P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-OP13 (SEC ID N° 4) (XV),

preferentemente el péptido no protegido con cadena lateral XVa,
en el que

30 P1 y P13 son como se han definido anteriormente, y
(c) eliminar P13 del péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula XV, preferentemente del péptido no protegido con cadena lateral XVa, producido en la etapa (b) para producir el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula V; preferentemente el péptido no protegido con cadena lateral Va.

35 Además, en particular, el proceso para la producción del péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

H-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-P2 (SEC ID N° 5) (VI),

40 preferentemente del péptido no protegido con cadena lateral VIa,
en el que

P2 es un grupo protector, preferentemente P2 es un grupo protector que se elimina por hidrogenación catalítica y que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral opcional, más preferentemente P2 es Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic, o 4-sulfobencilo, más preferentemente P2 es Bzl,
45 en fase de solución que comprende las etapas de

(a) eliminar P4 de un dipéptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

P14-Asn-Gly¹⁰-OP2 (XVIII),

50 preferentemente del dipéptido no protegido con cadena lateral XVIIIa,
en el que

P14 es un grupo protector, siendo preferentemente P14 un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral y con respecto a P2, más preferentemente P14 es un grupo protector que es estable a hidrogenación catalítica y ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral y con respecto a P2, incluso más preferentemente P14 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc, más preferentemente P14 es Boc; y

P2 es como se ha definido anteriormente;

a condición de que, si P14 es Boc, Bpoc o Ddz, entonces P2 no sea Bom;

60 (b) hacer reaccionar el dipéptido opcionalmente protegido con cadena lateral, no protegido en el extremo N, preferentemente el dipéptido no protegido con cadena lateral, producido en la etapa (a) con tetraglicina de fórmula

P15-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-OH (SEC ID N° 10) (IXX),

65 en la que

P15 es un grupo protector, siendo preferentemente P15 un grupo protector que es ortogonal con respecto al

grupo protector de cadena lateral del péptido de fórmula XX, más preferentemente P15 es un grupo protector que es estable a hidrogenación catalítica y ortogonal con respecto al grupo protector de cadena lateral del péptido de fórmula XX, incluso más preferentemente P15 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc, más preferentemente P15 es Boc;

5 para producir un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula



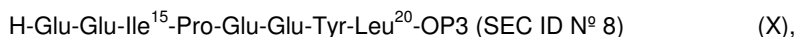
preferentemente el péptido no protegido con cadena lateral XXa en el que

10 P2 y P15 son como se ha definido anteriormente,

a condición de que, si P15 es Boc, Bpoc o Ddz, entonces P2 no sea Bom y

(c) eliminar P15 del péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula XX, preferentemente del péptido no protegido con cadena lateral XXa, producido en la etapa (b) para producir el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula VI; preferentemente el péptido no protegido con cadena lateral VIa.

Adicionalmente, en particular, el proceso para la producción del péptido protegido con cadena lateral de fórmula



20 preferentemente del péptido de fórmula

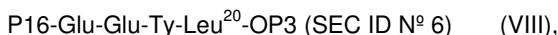


25 en la que

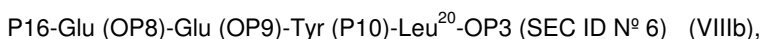
P3 es un grupo protector, preferentemente P3 es un grupo protector que se elimina por hidrogenación catalítica, más preferentemente P3 es Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic, o 4-sulfobencilo, más preferentemente P3 es Bzl, y cada uno de P6 a P10 se selecciona independientemente del grupo que consiste en Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic y 4-sulfobencilo, preferentemente cada uno de P6 a P12 es Bzl;

30 en fase en solución, que comprende las etapas de

(a) eliminar P16 de un péptido protegido con cadena lateral de fórmula



35 preferentemente del péptido de fórmula



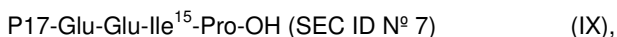
40 en la que

P3 y P8 a P10 son como se ha definido anteriormente, y

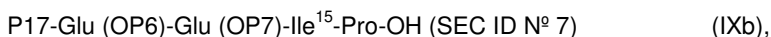
P16 es un grupo protector, preferentemente P16 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral y con respecto a P3, más preferentemente P16 es un grupo protector que es estable a hidrogenación catalítica y ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral y con respecto a P3, incluso más preferentemente P16 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc, más preferentemente P16 es Boc;

a condición de que, si P16 es Boc, Bpoc o Ddz, entonces P3 no sea Bom;

(b) hacer reaccionar el péptido protegido con cadena lateral, no protegido en el extremo N de fórmula VIII, preferentemente el péptido VIIIb correspondiente, producido en la etapa (a), con un péptido protegido con cadena lateral de fórmula



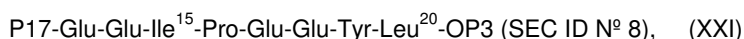
preferentemente de



en la que

60 P6 y P7 son como se ha definido anteriormente, y

P17 es un grupo protector, preferentemente P17 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral, más preferentemente P17 es un grupo protector que es estable a hidrogenación catalítica y ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral, incluso más preferentemente P17 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc, más preferentemente P17 es Boc, para producir un péptido protegido con cadena lateral de fórmula



65

preferentemente del péptido de fórmula



5 en la que

P3, P6 a P10 y P17 son como se ha definido anteriormente

a condición de que, si P17 es Boc, Bpoc o Ddz, entonces P3 o uno cualquiera de P6 a P10 no sea Bom, y

(c) eliminar P17 del péptido protegido con cadena lateral de fórmula XXI, preferentemente del péptido XXIb

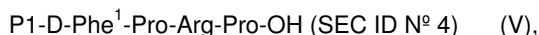
correspondiente, producido en la etapa (b) para producir el péptido protegido con cadena lateral de fórmula X;

10 preferentemente del péptido Xb.

En una realización adicional del proceso de acuerdo con la presente invención, al menos uno de los péptidos seleccionados del grupo que consiste en el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula V, el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula VI y el péptido protegido con cadena lateral de fórmula X se prepara por síntesis en fase sólida en un proceso anterior. Por consiguiente, puede emplearse cualquier método de SPPS normalmente conocido, incluyendo bloques de construcción de SPPS y condiciones de SPPS. Pueden aplicarse todas las resinas conocidas por el experto en la técnica y que permitan la preparación de péptidos protegidos. En este caso, el término resinas debe interpretarse de manera amplia. Por lo tanto, debe entenderse que el término "resina" se refiere, por ejemplo, a un soporte sólido en solitario o a un soporte sólido directamente unido a un conector, opcionalmente con un asa entre ellos. La resina puede ser insoluble o soluble. El polietilenglicol polimérico soluble (PEG polimérico soluble) es un ejemplo de soporte sólido de una resina soluble formando de este modo una resina peptídica soluble después del ensamblaje de los bloques de construcción sencillos. Son resinas preferidas las resinas basadas en poliestireno con tritilo o bromobencidril. Son ejemplos de resinas de tritilo la resina de 2-clorotritilo cloruro (resina CTC), la resina de tritilo cloruro, la resina de 4-metiltritilo cloruro y la resina de 4-metoxitritilo cloruro. Preferentemente, la resina CTC se aplica para la síntesis de dichos fragmentos peptídicos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar péptidos que sean útiles como productos intermedios en el proceso de la invención. En particular, uno de estos péptidos es un péptido seleccionado del grupo que consiste en

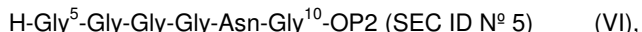
30 (i) un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula



35 en la que P1 es un grupo protector, preferentemente P1 es un grupo protector que es estable a hidrogenación catalítica, más preferentemente P1 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc, más preferentemente P1 es Boc; y dicho péptido está opcionalmente protegido con cadena lateral en el resto de arginina con un grupo protector de cadena lateral adecuado tal como nitro;

40 El compuesto Boc-DPhe-Pro-Arg-Phe se ha descrito en Biochemistry 36, no. 31, 1997, páginas 9381-9387. Sin embargo, esta referencia no menciona su uso como un producto intermedio en la preparación de la bivalirudina.

(ii) un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula



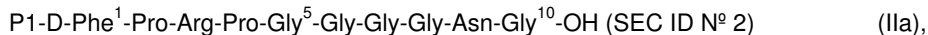
45 en la que P2 es un grupo protector, preferentemente P2 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica y que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector opcional de cadena lateral, más preferentemente P2 es Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic, o 4-sulfobencilo, más preferentemente P2 es Bzl; y dicho péptido está opcionalmente protegido con cadena lateral en el resto de asparagina con un grupo protector de cadena lateral adecuado tal como tritilo (Trt);

(iii) un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula



55 en la que P1, P2 y el grupo (o grupos) opcional protector de cadena lateral, así como los significados preferidos de P1, P2 y del grupo (o grupos) protector opcional de cadena lateral, son como se ha definido anteriormente;

(iv) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula



60 en la que P1 y el grupo (o grupos) protector de cadena lateral, así como los significados preferidos de P1 y del grupo (o grupos) opcional protector de cadena lateral, son como se ha definido anteriormente, excepto para Boc-D-Phe¹-Pro-Arg (Pbf)-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn (Trt)-Gly¹⁰-OH siendo Pbf pentametilhidrobenzofuranosulfonilo y Trt tritilo. Este péptido se desvela en el documento WO 2007/033383

como el producto de una síntesis en fase sólida sobre resina CTC. En cambio, el péptido protegido con cadena lateral de fórmula IIa de acuerdo con la presente invención se forma de un modo diferente, concretamente por síntesis de fase en solución;

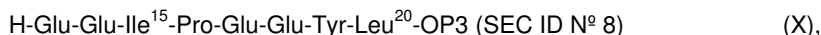
5 (v) un péptido no protegido con cadena lateral de fórmula



en la que P1, así como los significados preferidos de P1, son como se ha definido anteriormente;

10

(vi) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

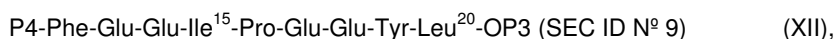


15 en la que P3 es un grupo protector, preferentemente P3 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica, más preferentemente P3 es Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic o 4-sulfobencilo, más preferentemente P3 es Bzl; y

el grupo (o grupos) protector de cadena lateral es al menos un grupo (o grupos) protector de cadena lateral adecuado, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic y 4-sulfobencilo, más preferentemente Bzl;

20

(vii) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula



25

en el que P3 y el grupo (o grupos) protegido con cadena lateral, así como los significados preferidos de P3 y del grupo (o grupos) protector de cadena lateral opcional, son como se ha definido anteriormente; y

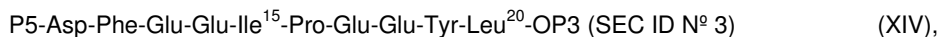
P4 es un grupo protector, preferentemente P4 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral del péptido de fórmula X y con respecto a P3, más preferentemente P4 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc, más preferentemente P4 es Boc a condición de que, si P4 es Boc, Bpoc o Ddz, entonces P3 no sea Bom;

30

o

P4 es hidrógeno;

35 (viii) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula



40

en la que P3 y el grupo (o grupos) protector de cadena lateral, así como los significados preferidos de P3 y del grupo (o grupos) protector de cadena lateral son como se define anteriormente; y

P5 es un grupo protector, preferentemente P5 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral del péptido/aminoácido de fórmula XII y XIII y con respecto a P3, más preferentemente P5 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc, más preferentemente P5 es Boc, a condición de que, si P5 es Boc, Bpoc o Ddz, entonces P3 no sea Bom,

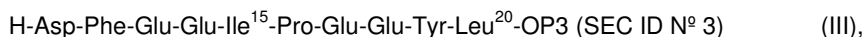
45

excepto para Fmoc-Asp (OtBu)-Phe-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Tyr (tBu)-Leu²⁰-OtBu siendo tBu *terc*-butilo. Este péptido se desvela en el documento WO 2007/033383 como el producto de la reacción entre un péptido precursor (es decir, la secuencia peptídica menos Leu) y H-Leu-OtBu. El péptido precursor como se desvela en el documento WO 2007/033383 se ha formado en una etapa anterior por síntesis en fase sólida sobre resina CTC. Después de la reacción con H-Leu-OtBu, el péptido desvelado no está aislado antes de continuar con la siguiente etapa. En cambio, el péptido protegido con cadena lateral de fórmula XIV de acuerdo con la presente invención se forma de un modo diferente, concretamente por síntesis de fase en solución y no está aislado después de su formación;

50

(ix) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

55



en la que P3 y el grupo (o grupos) protectores de cadena lateral, así como los significados preferidos de P3 y del grupo (o grupos) protector de cadena lateral, son como se ha definido anteriormente, excepto para H-Asp (OtBu)-Phe-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Tyr (tBu)-Leu²⁰-OtBu. Este péptido se desvela en el documento WO 2007/033383. Este es el péptido no protegido en el extremo N descrito anteriormente. Por consiguiente, como se ha explicado anteriormente, esta manera de formación es diferente de la del péptido protegido con cadena lateral de fórmula III de acuerdo con la presente invención; y

60

65 (x) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro--Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 1) (IV),

en la que P1, P3 y el grupo (o grupos) protector de cadena lateral, así como los significados preferidos de P1, P3 y del grupo (o grupos) protectores de cadena lateral opcional, son como se ha definido anteriormente,

excepto para Boc-D-Phe¹-Pro-Arg (Pbf)-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn (Trt)-Gly¹⁰--Asp (OtBu)-Phe-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Tyr (tBu)--Leu²⁰-OtBu. Este péptido se desvela en el documento WO 2007/033383 como producto después del acoplamiento de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg (Pbf)-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn (Trt)-Gly¹⁰-OH y H-Asp (OtBu)-Phe-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Tyr (tBu)--Leu²⁰-OtBu, ambos de los cuales se han explicado anteriormente. Por consiguiente, la manera en la que se forma su producto de acoplamiento es diferente de la manera en la que se forma el péptido protegido con cadena lateral de fórmula IV de acuerdo con la presente invención.

En una realización preferida, el péptido de fórmula V no está protegido con cadena lateral y tiene la fórmula

Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-OH (SEC ID N° 4),

que comprende la secuencia de la posición de aminoácidos 1-4 de la bivalirudina.

En otra realización preferida, el péptido de fórmula VI no está protegido con cadena lateral y tiene la fórmula

H-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID N° 5),

que comprende la secuencia de la posición de aminoácidos 5-10 de la bivalirudina.

En otra realización preferida, el péptido de fórmula VII no está protegido con cadena lateral y tiene la fórmula

Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID N° 2),

que comprende la secuencia de la posición de aminoácidos 1-10 de la bivalirudina.

En otra realización preferida, el péptido no protegido con cadena lateral de fórmula IIb es

Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OH (SEC ID N° 2),

que comprende la secuencia de la posición de aminoácidos 1-10 de la bivalirudina.

En otra realización preferida, el péptido protegido con cadena lateral de fórmula X es

H-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Tyr (Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 8),

que comprende la secuencia de la posición de aminoácidos 13-20 de la bivalirudina.

En otra realización preferida, el péptido protegido con cadena lateral de fórmula XII es

Boc-Phe-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Tyr (Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 9), o

H-Phe-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Tyr (Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 9),

comprendiendo ambos la secuencia de aminoácidos de la posición 12-20 de la bivalirudina.

En otra realización preferida, el péptido protegido con cadena lateral de fórmula XIV es

Boc-Asp (OBzl)-Phe-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Tyr (Bzl)--Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 3),

que comprende la secuencia de la posición de aminoácidos 11-20 de la bivalirudina.

En otra realización preferida, el péptido protegido con cadena lateral de fórmula III es

H-Asp (OBzl)-Phe-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Tyr (Bzl)--Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 3),

que comprende la secuencia de la posición de aminoácidos 11-20 de la bivalirudina.

En otra realización preferida, el péptido protegido con cadena lateral de fórmula IV es

Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp (OBzl)-Phe-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Tyr (Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 1),

que comprende la secuencia de la posición de aminoácidos 1-20 de la bivalirudina.

5

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un péptido seleccionado del grupo que consiste en

(i) un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

10 P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-OH (SEC ID N° 4) (V),

en la que P1 es un grupo protector, preferentemente P1 es un grupo protector que es estable a hidrogenación catalítica, más preferentemente P1 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc, más preferentemente P1 es Boc; y dicho péptido está opcionalmente protegido con cadena lateral en el resto de arginina con un grupo protector de cadena lateral adecuado tal como nitro; preferentemente, el péptido V no está protegido con cadena lateral y tiene la fórmula

15

Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-OH (SEC ID N° 4);

20 (ii) un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

H-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OP2 (SEC ID N° 5) (VI),

25

en la que P2 es un grupo protector, preferentemente P2 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica y que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral opcional, más preferentemente P2 es Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic, o 4-sulfobencilo, más preferentemente P2 es Bzl; y dicho péptido está opcionalmente protegido con cadena lateral en el resto de asparagina con un grupo protector de cadena lateral adecuado tal como tritilo (Trt); preferentemente, el péptido VI no está protegido con cadena lateral y tiene la fórmula

30

H-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID N° 5);

(iii) un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

35 P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OP2 (SEC ID N° 2) (VII),

en la que P1, P2 y el grupo (o grupos) protector de cadena lateral opcional, así como los significados preferidos de P1, P2 y del grupo (o grupos) protector de cadena lateral opcional, son como se ha definido anteriormente; preferentemente el péptido VII no está protegido con cadena lateral y tiene la fórmula

40

Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID N° 2);

(iv) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

45 P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OH (SEC ID N° 2) (IIa),

en la que P1 y el grupo (o grupos) protector de cadena lateral, así como los significados preferidos de P1 y del grupo (o grupos) protector de cadena lateral opcional, son como se ha definido anteriormente, excepto para Boc-D-Phe¹-Pro-Arg (Pbf)-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn (Trt)-Gly¹⁰-OH siendo Pbf pentametilhidrobenzofuranosulfonilo y Trt tritilo. Este péptido se desvela en el documento WO 2007/033383 como el producto de una síntesis en fase sólida sobre resina CTC. En cambio, el péptido protegido con cadena lateral de fórmula IIa de acuerdo con la presente invención se forma de un modo diferente, concretamente por síntesis de fase de solución;

50

(v) un péptido no protegido con cadena lateral de fórmula

55 P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OH (SEC ID N° 2) (IIb),

en la que P1, así como los significados preferidos de P1, son como se ha definido anteriormente; preferentemente, el péptido no protegido con cadena lateral de fórmula IIb es

60

Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OH (SEC ID N° 2);

(vi) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

65 H-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 8) (X),

en la que P3 es un grupo protector, preferentemente P3 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica, más preferentemente P3 es Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic o 4-sulfobencilo, más preferentemente P3 es Bzl; y

5 el grupo (o grupos) protector de cadena lateral se selecciona preferentemente del grupo que consiste en Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic y 4-sulfobencilo, más preferentemente Bzl; preferentemente, el péptido protegido con cadena lateral de fórmula X es



10 (vii) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula



15 en la que P3 y el grupo (o grupos) protector de cadena lateral, así como los significados preferidos de P3 y del grupo (o grupos) protector de cadena lateral opcional, son como se ha definido anteriormente; y

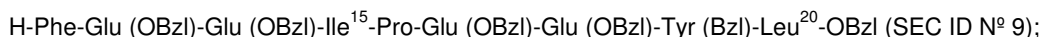
P4 es un grupo protector, preferentemente P4 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral de péptido de fórmula X y con respecto a P3, más preferentemente P4 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc, más preferentemente P4 es Boc a condición de que, si P4 es Boc, Bpoc o Ddz, entonces P3 no sea Bom;

20 o
P4 es hidrógeno;

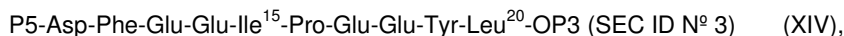
preferentemente, el péptido protegido con cadena lateral de fórmula XII es



25 o



30 (viii) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula



35 en la que P3 y el grupo (o grupos) protector de cadena lateral, así como los significados preferidos de P3 y del grupo (o grupos) protector de cadena lateral, son como se ha definido anteriormente; y

P5 es un grupo protector, preferentemente P5 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector de cadena lateral del péptido/aminoácido de fórmula XII y XIII y con respecto a P3, más preferentemente P5 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc, más preferentemente P5 es Boc, a condición de que, si P5 es Boc, Bpoc o Ddz, entonces P3 no sea Bom,

40 excepto para Fmoc-Asp (OtBu)-Phe-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Tyr (tBu)-Leu²⁰-OtBu siendo tBu *tert*-butilo. Este péptido se desvela en el documento WO 2007/033383 como el producto de la reacción entre un péptido precursor (es decir, la secuencia peptídica menos Leu) y H-Leu-OtBu. El péptido precursor como se desvela en el documento WO 2007/033383 se ha formado en una etapa anterior por síntesis en fase sólida sobre resina CTC. Después de la reacción con H-Leu-OtBu, el péptido desvelado no está aislado antes de continuar con la siguiente etapa. En cambio, el péptido protegido con cadena lateral de fórmula XIV de acuerdo con la presente invención se forma de un modo diferente, concretamente por síntesis de fase en solución y está aislado después de su formación;

preferentemente, el péptido protegido con cadena lateral de fórmula XIV es

50 Boc-Asp (OBzl)-Phe-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Tyr (Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N^o 3);

(ix) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

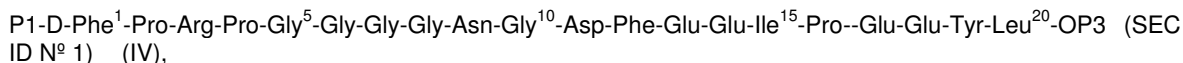
55 H-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N^o 3) (III),

60 en la que P3 y el grupo (o grupos) protector de cadena lateral, así como los significados preferidos de P3 y del grupo (o grupos) protector de cadena lateral, son como se ha definido anteriormente, excepto para H-Asp (OtBu)-Phe-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Tyr (tBu)-Leu²⁰-OtBu. Este péptido se desvela en el documento WO 2007/033383. Este es el péptido no protegido en el extremo N descrito anteriormente. Por consiguiente, como se ha explicado anteriormente, este modo de formación es diferente del modo de formación del péptido protegido con cadena lateral de fórmula III de acuerdo con la presente invención;

preferentemente, el péptido protegido con cadena lateral de fórmula III es

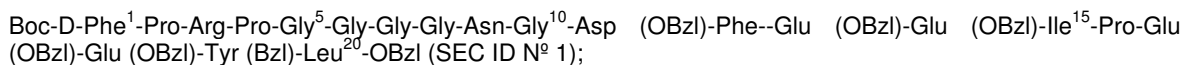
65 H-Asp (OBzl)-Phe-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OBzl)-Glu (OBzl)-Tyr (Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N^o 3);
y

(x) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

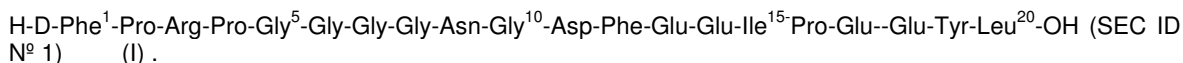


5 en la que P1, P3 y el grupo (o grupos) protector de cadena lateral, así como los significados preferidos de P1, P3 y del grupo (o grupos) protector de cadena lateral opcional, son como se ha definido anteriormente, excepto para Boc-D-Phe¹-Pro-Arg (Pbf)-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn (Trt)-Gly¹⁰--Asp (OtBu)-Phe-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Tyr (tBu)--Leu²⁰-OtBu. Este péptido se desvela en el documento WO 10 2007/033383 como producto después del acoplamiento de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg (Pbf)-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn (Trt)-Gly¹⁰-OH y H-Asp (OtBu)-Phe-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Ile¹⁵-Pro-Glu (OtBu)-Glu (OtBu)-Tyr (tBu)--Leu²⁰-OtBu, ambos de los cuales se han explicado anteriormente. Por consiguiente, el modo en el que se produce su producto de acoplamiento es diferente del modo en el que se produce el péptido protegido con cadena lateral de fórmula IV de acuerdo con la presente invención;

15 preferentemente, el péptido protegido con cadena lateral de fórmula IV es

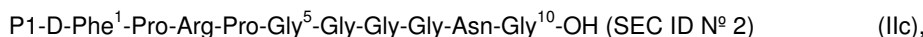


20 como un producto intermedio en una síntesis de bivalirudina de fórmula

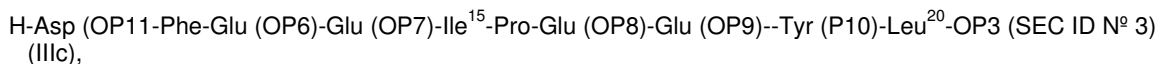


25 La presente invención también se refiere a un proceso para la producción de bivalirudina de fórmula I que comprende las etapas de

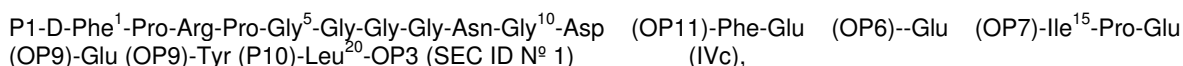
(a) hacer reaccionar un péptido de fórmula



en la que P1 es un grupo protector, con un péptido de fórmula



en la que P3 y cada uno de P6 a P11 son Bzl, para obtener un péptido de fórmula



en la que P1, P3 y P6 a P11 son como se ha definido anteriormente;

45 (b) eliminar la cadena lateral y los grupos protectores en el extremo C terminal P3 y P6 a P11 del péptido producido en la etapa (a); y

(c) eliminar el grupo protector en el extremo N terminal P1 del péptido producido en la etapa (b) para obtener la bivalirudina de fórmula I.

50 El proceso de la presente invención permite una síntesis muy eficaz de la bivalirudina mediante una síntesis de fragmento convergente, que puede adaptarse fácilmente para la producción a una escala industrial. Además, esta vía de preparación de la bivalirudina es muy sencilla y no requiere el uso de una estrategia de grupos protectores complicada. Además, para impedir o minimizar la racemización durante el ensamblaje, se seleccionan los diversos bloques de construcción (fragmentos).

55 Antes, durante y después de las reacciones de la presente invención, todos los fragmentos, así como todos los productos de acoplamiento, pueden estar presentes como tales o pueden estar presentes en una forma salina adecuada dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la molécula y/o de las condiciones de reacción. Los contra iones adecuados son, por ejemplo, las formas salinas de trietilamina (TEA), dicitclohexilamina (DCHA), ácido clorhídrico (HCl) y ácido trifluoroacético (TFA).

60 Como grupo protector P1, puede usarse cualquier grupo protector que sea estable a hidrogenación catalítica, tal como *tert*-butoxicarbonilo (Boc), fluoren-9-ilmetoxicarbonilo (Fmoc), 2-(3, 5-dimetoxifenil) prop-2-iloxicarbonilo (Ddz), adamantil-1-oxicarbonilo (Adc), *tert*-amiloxicarbonilo (Aoc), difenilfosfinilo (Dpp), 2-(metilsulfonil) etoxi-carbonilo (Msc) y ftaloilo (Pht). Preferentemente, el grupo protector P1 es Boc, Fmoc o Ddz.

Preferentemente, los grupos protectores P3 y P6 a P11 son bencilo (Bzl). En el presente documento y a continuación, la abreviatura "OBzl" indica un éster bencilico (después de la reacción con un ácido carboxílico tanto en la cadena lateral como en el extremo C), mientras que la abreviatura "Bzl" indica un éter bencilico (después de la reacción, por ejemplo, con el grupo hidroxil fenólico de la tirosina).

5 Las etapas (a) a (c) pueden realizarse usando condiciones de reacción convencionales conocidas en la técnica de síntesis peptídica.

Las etapas de acoplamiento y de desprotección (a), (b) y (c) se realizan preferentemente en solución.

10 Para la etapa de acoplamiento (a), el DMF se usa preferentemente como disolvente. La primera etapa de desprotección (b) se realiza preferentemente en ácido acético y/o en agua, mientras que la segunda etapa de desprotección (c) se realiza preferentemente en tolueno.

15 En una realización preferida, la etapa de acoplamiento (a) se consigue con una combinación de HOBt, EDC · HCl, y TEA.

En una realización preferida, la primera etapa de desprotección (b) se realiza con gas hidrógeno y paladio sobre carbón vegetal.

20 En una realización preferida, la segunda etapa de desprotección (c) se realiza con TFA.

El producto en bruto obtenido después de la etapa (c) puede purificarse por métodos convencionales, por ejemplo, con HPLC preparativa, distribución a contracorriente o equivalente. Lo mismo se aplica a los productos intermedios obtenidos después de las etapas (a) y (b), si se requiere purificación.

Los fragmentos peptídicos protegidos IIc y IIIc pueden prepararse usando métodos convencionales de síntesis peptídica, por ejemplo, síntesis de fase en solución (HPPS) o síntesis de fase sólida (SPPS). En caso de SPPS, pueden aplicarse todas las resinas conocidas por un experto en la técnica y que permitan la preparación de péptidos protegidos. En este caso, el término resinas debe interpretarse de manera amplia. Por lo tanto, el término "resina" debe entenderse que se refiere, por ejemplo, a un soporte sólido en solitario o a un soporte sólido directamente unido a un conector, opcionalmente con un asa entre ellos. La resina puede ser insoluble o soluble. El polietilenglicol polimérico soluble es un ejemplo de soporte sólido de una resina soluble. Las resinas preferidas son resinas basadas en poliestireno con tritilo o bromobencilhidrido. Son ejemplos de resinas de tritilo la resina de 2-clorotritilo cloruro (resina CTC), la resina de tritilo cloruro, la resina de 4-metiltritilo cloruro y la resina de 4-metoxitritilo cloruro. Preferentemente, se aplica la resina CTC para la síntesis de fragmentos que contienen una función carboxílica libre.

En una realización preferida, los fragmentos peptídicos protegidos IIc y IIIc se preparan usando síntesis de fase en solución.

40 Otro objeto de la presente invención es proporcionar péptidos protegidos que sean útiles como productos intermedios en el proceso de la invención. En particular, uno de estos péptidos es un péptido protegido de fórmula IVc, en la que P1 es un grupo protector; preferentemente P1 es Boc; o H; y P3 y P6 a P11 son Bzl.

45 Otro péptido, que es particularmente útil como un producto intermedio en el proceso de la invención, es un péptido protegido en el extremo N de fórmula IIc, en la que P1 es un grupo protector, preferentemente P1 es Boc.

En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un proceso para la producción de un péptido protegido en el extremo N de fórmula

50
$$P1\text{-D-Phe}^1\text{-Pro-Arg-Pro-Gly}^5\text{-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly}^{10}\text{-OH (SEC ID N}^\circ\text{ 2) (IIc),}$$

en la que P1 es Boc,
que comprende:

55 (a) eliminar el grupo protector *C-terminal* de un péptido de fórmula

$$P1\text{-D-Phe}^1\text{-Pro-Arg-Pro-OP13 (SEC ID N}^\circ\text{ 4) (Vc),}$$

60 en la que P1 es Boc y P13 es un grupo protector tal como Bzl, metilo (Me) y etilo (Et); preferentemente P13 es Bzl; para obtener un péptido protegido en el extremo N, no protegido en el extremo C de fórmula Vc, siendo P13 H;

(b) eliminar el grupo protector *N-terminal* de un péptido de fórmula

65
$$P15\text{-Gly}^5\text{-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly}^{10}\text{-OBzl (SEC ID N}^\circ\text{ 5) (VIc),}$$

en la que P15 es Boc,
 para obtener un péptido protegido en el extremo C, no protegido en el extremo N de fórmula VIc siendo P15 H;
 (c) hacer reaccionar el péptido de fórmula Vc producido en la etapa (a), en la que P13 es H, con el péptido de
 fórmula VIc producido en la etapa (b), en la que P15 es H, para obtener un péptido de fórmula

5 P1-o-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID Nº 2) (VIIc),

en la que P1 es Boc; y

10 (d) eliminar el grupo protector del extremo C del péptido producido en la etapa (c) para obtener el péptido protegido en el extremo N de fórmula IIc.

Las etapas (a) a (d) pueden realizarse usando condiciones de reacción convencionales conocidas en la técnica de
 síntesis peptídica.

15 Las etapas de acoplamiento y desprotección (a), (b), (c) y (d) se realizan preferentemente en solución.

Para la etapa de acoplamiento (c), el DMF se usa preferentemente como disolvente. La primera etapa de
 desprotección (a) se realiza preferentemente en acetona, mientras que la segunda etapa de desprotección (b) se
 realiza preferentemente en tolueno y/o en THF. La tercera etapa de desprotección (d) se realiza preferentemente en
 un disolvente seleccionado del grupo que consiste en DMF, acetona, agua y una mezcla de acetona y agua.

En una realización preferida, la primera etapa de desprotección (a) se realiza con gas hidrógeno y paladio sobre
 carbón vegetal.

25 En una realización preferida, la segunda etapa de desprotección (b) se realiza con TFA.

En una realización preferida, la etapa de acoplamiento (c) se realiza con una combinación de HOBt, DIC y TEA.

30 En una realización preferida, la tercera etapa de desprotección (d) se realiza con gas hidrógeno y paladio sobre
 carbón vegetal.

El producto bruto obtenido después de la etapa (d) puede purificarse mediante métodos convencionales, por
 ejemplo, con HPLC preparativa, distribución a contracorriente o equivalente. Lo mismo se aplica a los productos
 intermedios obtenidos después de las etapas (a), (b) y (c), si se requiere purificación.

Los fragmentos peptídicos protegidos Vc y VIc pueden prepararse usando métodos convencionales de síntesis
 peptídica, por ejemplo, síntesis de fase en solución (HPPS) o síntesis en fase sólida (SPPS). En caso de SPPS,
 pueden aplicarse todas las resinas conocidas por un experto en la técnica y que permitan la preparación de péptidos
 protegidos. En este caso, el término resinas debe interpretarse de manera amplia. Por lo tanto, el término "resina"
 debe entenderse que significa, por ejemplo, un soporte sólido en solitario o un soporte sólido directamente unido a
 un conector, opcionalmente con un asa entre ellos. La resina puede ser insoluble o soluble. El polietilenglicol
 polimérico soluble es un ejemplo de soporte sólido de una resina soluble, conduciendo por tanto a un conjugado
 péptido-resina soluble. Las resinas preferidas son resinas basadas en poliestireno con tritilo o bromobencidrillo. Son
 ejemplos de resinas de tritilo la resina de 2-clorotritilo cloruro (resina CTC), la resina de tritilo cloruro, la resina de 4-
 metiltiritilo cloruro y la resina de 4-metoxitritilo cloruro. Preferentemente, la resina CTC se aplica para la síntesis de
 fragmentos que contienen una función carboxílica libre.

En una realización preferida, los fragmentos peptídicos protegidos Vc y VIc se preparan usando síntesis de fase en
 solución.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar péptidos protegidos que sean útiles como productos
 intermedios en el proceso de la invención para la producción de un péptido protegido en el extremo N de fórmula IIc.
 En particular, uno de estos péptidos es el péptido protegido en el extremo C y en el extremo N de fórmula Vc, en la
 que P13 es un grupo protector, preferentemente Bzl. Otro de estos péptidos es un péptido protegido en el extremo N
 de fórmula Vc con el extremo C libre.

Otro péptido, que es particularmente útil como un producto intermedio en el proceso de la invención, es un péptido
 protegido en el extremo C de fórmula VIc, en la que P15 es Boc-; o P15 es H.

Otro péptido, que es particularmente útil como un producto intermedio en el proceso de la invención, es un péptido
 protegido en el extremo C y en el extremo N de fórmula VIIc, en la que P1 es un grupo protector, preferentemente
 P1 es Boc.

65 Otro péptido, que es particularmente útil como un producto intermedio en el proceso para la producción de
 bivalirudina, es un péptido protegido de fórmula IIIc, en la que P3 y P6 a P11 son Bzl.

En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un proceso para la producción de un péptido protegido de fórmula

5 H- Asp (OP11)- Phe- Glu (OP6)- Glu (OP7)- Ile¹⁵- Pro- Glu (OP8)- Glu (OP9)- Tyr (P10)-- Leu²⁰- OP3 (SEC ID N° 3) (IIIc),

en la que P3 y P6 a P11 son Bzl, que comprende:

10 (a) eliminar el grupo protector del extremo N de un péptido de fórmula

P16- Glu (OPB)- Glu (OP9)- Tyr (P10)- Leu²⁰- OP3 (SEC ID N° 6) (VIIIc),

15 en la que P3 y P8 a P10 son Bzl y P16 es Boc, para obtener un péptido protegido en el extremo C, no protegido en el extremo N de fórmula VIIIc siendo P16 H; (b) hacer reaccionar el péptido de fórmula VIIIc producido en la etapa (a), en la que P16 es H y P3 y P8 a P10 son Bzl, con un péptido de fórmula

20 P17- Glu (OP6)- Glu (OP7)- Ile¹⁵- Pro- OH (SEC ID N° 7) (IXc),

en la que P17 es Boc; y P6 y P7 son Bzl, para obtener un péptido de fórmula

25 P17- Glu (OP6)- Glu (OP7)- Ile¹⁵- Pro- Glu (OP8)- Glu (OP9)- Tyr (P10)- Leu²⁰- OP3 (SEC ID N° 8) (Xc),

en la que P17 es Boc; y P3 y P6 a P10 son Bzl;

30 (c) eliminar el grupo protector del extremo N del péptido de fórmula Xc producido en la etapa (b), en la que P3 y P6 a P10 son Bzl; y P17 es Boc, para obtener un péptido protegido en el extremo C, no protegido en el extremo N de fórmula Xc siendo P3 y P6 a P10 Bzl y P17 H;

(d) hacer reaccionar el péptido de fórmula Xc producido en la etapa (c), en la que P17 es H; y P3 y P6 a P10 son Bzl, con un aminoácido protegido de fórmula

35 Boc- Phe¹²- OH (XI)

para obtener un péptido de fórmula

40 P4- Phe- Glu (OP6)- Glu (OP7)- Ile¹⁵- Pro- Glu (OP8)- Glu (OP9)- Tyr (P10)- Leu²⁰- OP3 (SEC ID N° 9) (XIIc),

en la que P3 y P6 a P10 son Bzl; y P4 es Boc:

45 (e) eliminar el grupo protector del extremo N del péptido de fórmula XIIc producido en la etapa (d) siendo P3 y P6 a P10 Bzl y P4 Boc, para obtener un péptido protegido de extremo C, no protegido en el extremo N de fórmula XIIc siendo P3 y P6 a P10 Bzl; y P4 H;

(f) hacer reaccionar el péptido de fórmula XIIc producido en la etapa (e), en la que P4 es H; y P3 y P6 a P10 son Bzl, con un aminoácido protegido de fórmula

50 Boc- Asp (OP11)¹¹- OH (XIIIc),

en la que P11 es Bzl, para obtener un péptido de fórmula

55 Boc- Asp (OP11)- Phe- Glu (OP6)- Glu (OP7)- Ile¹⁵- Pro- Glu (OP8)- Glu (OP9)-- Tyr (P10)- Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 3) (XIVc),

en la que P3 y P6 a P11 son Bzl; y

60 (g) eliminar el grupo protector del extremo N del péptido producido en la etapa (f) para obtener el péptido protegido en el extremo C de fórmula IIIc.

Las etapas (a) a (g) pueden realizarse usando condiciones de reacción convencionales conocidas en la técnica de síntesis peptídica.

Las etapas de acoplamiento y desprotección (a) a (g) se realizan preferentemente en solución.

65

Para las etapas de acoplamiento (b), (d) y (f), el DMF se usa preferentemente como un disolvente. Las etapas de desprotección (a), (c), (e) y (g) se realizan preferentemente en una mezcla de tolueno y THF como disolvente.

5 En una realización preferida, las etapas de acoplamiento (b), (d) y (f) se realizan con una combinación de HOBt, EDC · HCl, y la base TEA para etapa (b), respectivamente, DIPEA para las etapas (d) y (f). En otra realización preferida, las etapas de desprotección (a), (c), (e) y (g) se realizan usando TFA y fenol.

10 El producto bruto obtenido después de la etapa (g) puede purificarse mediante métodos convencionales, por ejemplo, con HPLC preparativa, distribución a contracorriente o equivalente. Lo mismo se aplica a los productos intermedios obtenidos después de las etapas (a) a (f), si se requiere purificación.

15 Los fragmentos peptídicos protegidos VIIIc, IXc, XI y XIIIc pueden prepararse usando métodos convencionales de síntesis peptídica, por ejemplo, síntesis de fase en solución (HPPS) o síntesis de fase sólida (SPPS). En el caso de SPPS, pueden aplicarse todas las resinas conocidas por un experto en la técnica y que permitan la preparación de péptidos protegidos. En este caso, el término resinas debe interpretarse de una manera amplia. Por lo tanto, el término "resina" debe entenderse que se refiere, por ejemplo, a un soporte sólido en solitario o a un soporte sólido directamente unido a un conector, opcionalmente con un asa entre ellos. La resina puede ser insoluble o soluble. El polietilenglicol polimérico soluble es un ejemplo de soporte sólido de una resina soluble. Las resinas preferidas son resinas basadas en poliestireno con tritilo o bromobencihidrilo. Son ejemplos de resinas de tritilo la resina 2-clorotritil cloruro (resina CTC), la resina de tritil cloruro, la resina de 4-metiltritil cloruro y la resina de 4-metoxitritil cloruro. Preferentemente, la resina CTC se aplica para la síntesis de fragmentos que contienen una función carboxílica libre.

25 En una realización preferida, los fragmentos peptídicos protegidos VIIIc, IXc, XI y XIIIc se preparan usando síntesis de fase en solución.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar péptidos protegidos que sean útiles como productos intermedios en el proceso de la invención para la producción de un péptido protegido en el extremo C de fórmula IIIc. En particular, uno de estos péptidos es un péptido protegido de fórmula XIVc, en la que P3 y P6 a P11 son Bzl.

30 Otro péptido, que es particularmente útil como un producto intermedio en el proceso de la invención, es un péptido protegido con cadena lateral de fórmula XIIc, en la que P3 y P6 a P10 son Bzl; y P4 es el grupo protector Boc, o P4 es H.

35 Otro péptido, que es particularmente útil como un producto intermedio en el proceso de la invención, es un péptido protegido de fórmula Xc, en la que P3 y P6 a P10 son Bzl; y P17 es el grupo protector Boc, o P17 es H.

Otro péptido, que es particularmente útil como un producto intermedio en el proceso de la invención, es un péptido protegido de fórmula IXc, en la que P6 y P7 son Bzl; y preferentemente P17 es Boc.

40 Otro péptido, que es particularmente útil como un producto intermedio en el proceso de la invención, es un péptido protegido de fórmula VIIIc, en la que P3 y P8 a P10 son Bzl; y P16 es el grupo protector Boc, o P16 es H.

En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere al uso de cualquiera de los péptidos anteriores como productos intermedios en una síntesis de la bivalirudina.

45 Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitativos ilustrarán con detalle las realizaciones representativas de la invención.

50 Abreviaturas:

| | |
|------------|------------------------------------------------------------|
| Boc | <i>tert</i> -butoxicarbonilo |
| Bzl | bencilo |
| DCC | 1,3-diciclohexilcarbodiimida |
| 55 DCHA | diciclohexilamina |
| DCU | diciclohexilurea |
| DIC | diisopropilcarbodiimida |
| DIPEA | <i>N,N</i> -diisopropiletilamina |
| DMF | <i>N,N</i> -dimetilformamida |
| 60 EDC HCl | clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida |
| equiv. | equivalentes |
| HOBt | 1-hidroxibenzotriazol |
| MTBE | metil <i>tert</i> -butil éter |
| NMM | <i>N</i> -metilmorfolina |
| 65 HOPfp | pentafluorofenol |
| OPfp | pentafluorofenilo éster |

| | |
|-------|------------------------|
| HOSu | N-hidroxisuccinimida |
| Su | N- succinimidilo |
| TEA | triethylamina |
| TFA | ácido trifluoroacético |
| 5 THF | tetrahidrofurano |

Ejemplo 1: Preparación de H-Asn-Gly¹⁰-OBzl · TFA

10 Se añadió Boc-Asn-Gly-OBzl (90,20 kg; Hexagon Labs Inc., USA) a 20 °C a una mezcla de TFA (90 l), tolueno (388 l) y THF (45 l). Se añadió lentamente TFA (198 l) a la mezcla a ≤ 22 °C. La reacción se dejó continuar hasta que se completó a 20 °C. La finalización de la escisión se controló por HPLC.

15 Después, se añadió lentamente THF y la mezcla de reacción se evaporó al vacío. Se realizaron tres destilaciones azeotrópicas con una mezcla de tolueno y THF. Se obtuvo H-Asn-Gly¹⁰-OBzl·TFA en forma de un residuo oleoso, que se diluyó con acetato de etilo. Esta solución se usó directamente en la siguiente etapa química (véase Ejemplo 3). Rendimiento: 100 %. Pureza (según HPLC): 99,3 %.

Ejemplo 2: Preparación de Boc-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-OH · TEA (SEC ID N° 10)

20 Se añadió lentamente TEA (73,1 l) a 20 °C a una suspensión de Boc-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-OEt (SEC ID N° 10) [98,11 kg; Bonora et al, Gazzetta Chimica Italiana 1980, 110, 503- 510, preparado análogamente a partir de Boc-Gly-Gly-OH (Senn Chemicals, Suiza) y H-Gly-Gly-OEt-HCl (Senn Chemicals, Suiza)] en una mezcla de acetona (78,44 l) y agua procesada (491 l). La reacción se dejó continuar hasta que se completó a 20 °C. La finalización de la saponificación se controló por HPLC. La solución se evaporó al vacío y el volumen del residuo se ajustó a 456 l con agua procesada. Esta solución de Boc-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-OH·TEA (SEC ID N° 10) se usó directamente en la siguiente etapa química (véase Ejemplo 3). Rendimiento: 100 %. Pureza (según HPLC): 99,6 %.

Ejemplo 3: Preparación de Boc-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID N° 5)

30 El pH de una solución de H-Asn-Gly¹⁰-OBzl·TFA (573 l, véase Ejemplo 1) en acetato de etilo se ajustó a 6,5 con TEA a 0 °C. La solución de Boc-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-OH (SEC ID N° 10) según se obtuvo del Ejemplo 2 se enfrió a 0 °C y se añadió, seguido de la adición de HOBt (28,52 kg) y EDC HCl (69,81 kg). El pH se ajustó a 6- 6,5 con TEA (121 l) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta que alcanzó temperatura ambiente.

35 Cuando se completó el acoplamiento (después de aproximadamente 10 h; según lo indicado por HPLC), se añadió NaCl a la mezcla de reacción. La suspensión se enfrió y se filtró para dar un residuo sólido, que se lavó varias veces con una solución acuosa de NaCl y después se enfrió. El sólido resultante se secó al vacío para dar 130,15 kg (100 %) de Boc-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID N° 5) con una pureza de 97,9 % (según HPLC)

Ejemplo 4: Preparación de H-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl · TFA (SEC ID N° 5)

45 Se añadió lentamente Boc-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID N° 5) (131,20 kg, véase Ejemplo 3) a una mezcla de TFA (131 l), tolueno (525 l) y THF (105 l) a una temperatura de ≤ 22 °C. Se añadió TFA (289 l) lentamente a la mezcla de reacción a una temperatura de ≤ 22 °C. La reacción se dejó continuar hasta que se completó a 20 °C en aproximadamente 1,5 h (supervisado por HPLC).

50 La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se vertió en éter diisopropílico. La suspensión resultante se filtró para dar un sólido, que se lavó varias veces con éter diisopropílico y después se secó al vacío para dar 130,99 kg de H-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl·TFA (SEC ID N° 5) con una pureza del 97,5 % (según HPLC).

Ejemplo 5: Preparación de H-Arg-Pro-OBzl · 2 HCl

55 Se añadió lentamente ácido clorhídrico (1 M) en ácido acético (380 l) a ≤ 22 °C a una suspensión de Boc-Arg-Pro-OBzl·HCl (95,00 kg; Hexagon Labs Inc., USA) en ácido acético (190 l) y THF (19 l). La finalización de la escisión (después de aproximadamente 1 hora) se controló por HPLC.

60 La mezcla de reacción se evaporó al vacío. Se realizaron destilaciones azeotrópicas en primer lugar con ácido acético y después con DMF. El H-Arg-Pro-OBzl · 2 HCl se obtuvo en forma de un residuo oleoso, que se diluyó con DMF para obtener un volumen de aproximadamente 380 l. La solución resultante se usó directamente en la siguiente etapa química (véase Ejemplo 7). Rendimiento: 100 %. Pureza (según HPLC): 96 %.

Ejemplo 6: Preparación de Boc-D-Phe-Pro-OPfp

65 Una solución de HOPfp (17,78 kg) en acetato de etilo (10 l) se añadió a ≤ 24 °C a una suspensión de Boc-D-Phe-Pro-OH (33,33 kg; Bachem AG, Suiza) en acetato de etilo (183 l). Una solución de DCC (21,44 kg) en acetato de etilo (83,3 l) se añadió lentamente a la mezcla de reacción a - 6 °C. Después, la mezcla se dejó calentar hasta

temperatura ambiente. La finalización del acoplamiento (aproximadamente 2 h) se controló por HPLC.

La sal de DCU se retiró por filtración y se lavó con acetato de etilo. El filtrado se evaporó al vacío hasta que se alcanzó un volumen residual de aproximadamente 80 l. Se realizaron varias destilaciones azeotrópicas con tolueno.
5 El residuo oleoso se precipitó en éter de petróleo. El sólido se filtró, se lavó con éter de petróleo y se secó al vacío para obtener 26,3 kg (54 %) Boc-D-Phe-Pro-OPfp con una pureza del 99,3 % (según HPLC).

Ejemplo 7: Preparación de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-OBzl · HCl (SEC ID N° 4)

10 Una solución de H-Arg³-Pro-OBzl · 2 HCl (103,00 kg; solución de 561 l; véase Ejemplo 5) se diluyó con DMF (360 l) a 20 °C. La DMF (82 l) se evaporó al vacío por debajo de 55 °C. Después, se añadió Boc-D-Phe¹-Pro-OPfp (121,54 kg; véase Ejemplo 6) a la solución de H-Arg³-Pro-OBzl · 2 HCl a 20 °C. El pH de la mezcla resultante se ajustó a 6,5 con TEA (58 l) a 0 °C. La reacción se dejó continuar hasta que se completó a 0 °C durante aproximadamente 20 h, según lo indicado por supervisión de HPLC.

15 Las fracciones de sólido de la suspensión resultante se retiraron por filtración y se lavaron con DMF. El filtrado se concentró al vacío hasta un volumen residual de aproximadamente 385 l. Se añadió una mezcla de agua desionizada, NaCl y acetato de etilo. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó sucesivamente con NaHCO₃ acuoso, con Na₂CO₃ acuoso, con una solución de HCl en salmuera y finalmente con salmuera. La fase orgánica se
20 concentró al vacío para dar un residuo oleoso, que se secó mediante destilación azeotrópica con tolueno y se precipitó en diisopropil éter a 20 °C. La suspensión resultante se filtró para proporcionar un sólido, que se lavó varias veces con diisopropil éter y se secó al vacío para dar 106 kg de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-OBzl · HCl (SEC ID N° 4) con una pureza del 96 % (según HPLC).

25 Ejemplo 8: Preparación de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-OH (SEC ID N° 4)

El pH de una solución de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-OBzl · HCl (SEC ID N° 4) (33,58 kg, véase Ejemplo 7) en acetona (67 l) se ajustó a 4 con una mezcla de TFA/THF (50/50, v/v, 0,03 l) a 20 °C. La mezcla resultante se añadió a una suspensión de paladio sobre carbono (3,36 kg) en acetona (17 l). Se realizó hidrogenación a 20 °C durante al menos
30 2 h a aproximadamente 0,30 MPa (3 bar) de presión de hidrógeno. La finalización de la hidrogenación se controló por HPLC.

La mezcla de reacción se filtró sobre un cartucho de celulosa. La torta de filtro se lavó varias veces con acetona. Los filtrados combinados se concentraron al vacío. El aceite oleoso resultante se secó por destilación azeotrópica, usando una mezcla de acetona y tolueno. El residuo oleoso se diluyó con acetato de etilo y se vertió en éter diisopropílico. La suspensión resultante se filtró y el precipitado se lavó varias veces con éter diisopropílico y se secó al vacío para dar 31,4 kg de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-OH (SEC ID N° 4) con una pureza del 99,4 % (según HPLC).
35

40 Ejemplo 9: Preparación de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID N° 2)

El pH de una solución de H-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl · TFA (SEC ID N° 5) (25,20 kg, véase Ejemplo 4) en DMF (504 l) y agua desionizada (25 l) se ajustó a 6,5- 7 usando TEA (9 l) a ≤22 °C. Se añadieron lentamente Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-OH (SEC ID N° 4) (25,46 kg, véase Ejemplo 8) y HOBt (1,02 kg) a ≤22 °C. Se añadió lentamente DIC (9,5 l) a la mezcla de reacción a ≤12 °C. El pH de la mezcla resultante se ajustó a 7-7,5 usando TEA (0,3 l) a
45 512 °C. Se dejó que la reacción se completara durante 10 días a 10 °C, según se supervisó por HPLC y TLC.

La mezcla de reacción se concentró al vacío para dar un residuo oleoso, que se precipitó en una mezcla de acetato de etilo y éter diisopropílico. El líquido sobrenadante se retiró varias veces y se reemplazó por el mismo volumen de éter diisopropílico. La mezcla se filtró para dar un sólido, que se lavó tres veces con éter diisopropílico y se secó al vacío para dar 30,50 kg (76 %) de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID N° 2) con una pureza del 83,4 % (según HPLC).
50

Ejemplo 10: Preparación de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OH (SEC ID N° 2)

55 Una solución de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID N° 2) (peso de péptido puro de 23,43 kg, véase Ejemplo 9) en una mezcla de acetona (43 l) y agua desionizada (9 l) se añadió a una suspensión de paladio sobre carbono (0,75 kg) en acetona (3 l). Se realizó hidrogenación a 20 °C durante 11 h a una presión de hidrógeno de aproximadamente 0,30 MPa (3 bar). La finalización de la hidrogenación se controló por HPLC.

60 Se añadió agua desionizada (36 l) a la mezcla de reacción y la mezcla resultante se filtró sobre un cartucho de celulosa. La torta de filtro se lavó varias veces con una mezcla 2:8 de agua desionizada y acetona. Los filtrados combinados se concentraron al vacío. El residuo resultante se secó por destilación azeotrópica, usando una mezcla de DMF y tolueno para dar 21,5 kg de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OH (SEC ID N° 2) con una pureza del 80 % (según HPLC).
65

Ejemplo 11: Preparación de Boc-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl

Se suspendió H-Leu-OBzl · p-tosilato (22,2 kg; Bachem AG, Suiza) en acetato de etilo (108 l) , después se añadió TEA (aproximadamente 7,1 l) a temperatura ambiente. Se añadieron Boc-Tyr(Bzl)-OH (20 kg; Senn Chemicals, Suiza) y HOBt (7,3 kg) en forma de sólidos. Una solución de DCC (12,2 kg) en DMF (40 l) se añadió a la mezcla a -6 °C. La finalización de la reacción se controló por TLC y HPLC.

EL DCU anterior se retiró por filtración. El filtrado se lavó sucesivamente con una mezcla de una solución acuosa de KHSO₄ y salmuera; una solución acuosa de KHSO₄; una solución acuosa de NaHCO₃ acuoso y con salmuera. La fase orgánica se evaporó al vacío. El residuo se disolvió en acetato de etilo y después se precipitó en éter de petróleo. El sólido se filtró, se lavó con éter de petróleo y se secó al vacío. Se obtuvo un segundo cultivo después de la concentración de la solución de licores madre al vacío y precipitación en éter de petróleo. El sólido se filtró, se lavó con éter de petróleo y se secó al vacío. Después, los dos cultivos se mezclaron, produciendo 25,9 kg (84 %) de Boc-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl con una pureza del 97 % (según HPLC).

Ejemplo 12: Preparación de H-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl · TFA

Se añadió lentamente TFA (83 l) a 20 °C a una mezcla de Boc-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (25,9 kg, véase Ejemplo 11), fenol (1,3 kg), tolueno (104 l) y THF (21 l). La reacción se dejó continuar hasta que se completó a 20 °C. La finalización de la escisión se controló por HPLC.

La mezcla de reacción se evaporó al vacío. Se realizó una destilación azeotrópica con una mezcla de tolueno y THF. Después, se añadieron acetato de etilo y éter de petróleo se añadieron al residuo. El sólido se filtró, se lavó con una mezcla de acetato de etilo y éter de petróleo, después con éter de petróleo y finalmente se secó al vacío, produciendo 23,7 kg (89 %) de H-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl · TFA con una pureza del 98 % (según HPLC).

Ejemplo 13: Preparación de Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)- Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 6)

Se añadió Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-OSu (42,90 kg, Senn Chemicals, Suiza) a una solución de H-Tyr(Bzl)-Leu-OBzl TUFA (23,7 kg, véase Ejemplo 12) en DMF (80 l). El pH de la mezcla de reacción se ajustó lentamente a 7- 7,5 con DIPEA a 0 °C. Después, se dejó que la mezcla de reacción se completara a 20 °C. La finalización del acoplamiento se controló por HPLC.

La mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo oleoso se vertió en agua procesada. El sólido se filtró, se lavó con agua procesada, se suspendió de nuevo en una mezcla de acetonitrilo y agua procesada, y finalmente se secó al vacío, produciendo 40,3 kg de Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 6) con pureza del 92 % (según HPLC).

Ejemplo 14: Preparación de H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl · TFA (SEC ID N° 6)

Se añadió Bac-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 6) (117,45 kg, véase Ejemplo 13) lentamente a 15 °C a una mezcla de TFA (117 l) , fenol (5,87 kg) , tolueno (470 l) y THF (94 l). Se añadió lentamente más cantidad de TFA (282 l) a la mezcla a ≤ 17 °C. La reacción se dejó continuar hasta que se completó a 15 °C. La finalización de la escisión (3 h) se controló por HPLC.

La mezcla de reacción se evaporó al vacío por debajo de 35 °C. Se retiró el TFA residual por destilaciones azeotrópicas con una mezcla de tolueno/THF y después con tolueno. Se añadió MTBE (825 l) al residuo oleoso. Después, se añadió éter de petróleo a la suspensión obtenida. Después de un periodo de refrigeración, el sólido se filtró y se lavó varias veces con éter de petróleo. Después de suspender de nuevo en éter de petróleo y de filtración, el sólido se lavó con éter de petróleo. Este procedimiento se repitió una vez. Después, el sólido se secó al vacío, produciendo 114,86 kg (96 %) de H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl · TFA (SEC ID N° 6) con una pureza del 96 % (según HPLC).

Ejemplo 15: Preparación de Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)- Ile¹⁵-Pro-OH DCHA (SEC ID N° 7)

Se añadió lentamente Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-OSu (62 kg, Senn Chemicals, Suiza) a una solución de H-11e-Pro-OH · TFA (36 kg, Bachem AG, Suiza) en DMF (433 l). El pH se ajustó a 7- 7,5 con DIPEA a 0 °C. La finalización de la reacción se controló por HPLC.

La mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo oleoso se diluyó con acetato de etilo. La mezcla se lavó con una solución acuosa de KHSO₄ y con salmuera. La capa orgánica se evaporó al vacío y el residuo oleoso se secó por destilaciones azeotrópicas con tolueno. El residuo oleoso se diluyó con tolueno y el pH se ajustó a 7- 7,5 con DCHA. Después se añadió éter de petróleo a la mezcla. El sólido así obtenido se filtró, se lavó con éter de petróleo y se secó al vacío, produciendo 102 kg de Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-OH · DCHA (SEC ID N° 7) con una pureza del 89 % (según HPLC).

Ejemplo 16: Preparación de Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 8)

5 Se añadieron lentamente Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-OH · DCHA (SEC ID N° 7) (98,88 kg, véase Ejemplo 15) y HOBt (13,82 kg) a ≤24 °C a una solución de H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl · TFA (SEC ID N° 6) (110,39 kg, peso neto de péptido, véase Ejemplo 14) en DMF (451 l). Se añadió en pequeñas porciones EDC·HCl (22,99 kg) a la mezcla a -6 °C. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a 6,5-7 con TEA (12 l) a -6 °C. Se dejó que el acoplamiento se completara a 10 °C durante 16 h según se supervisó por HPLC.

10 Las sales se retiraron por filtración. Los filtrados se evaporaron al vacío. El residuo oleoso (470 l) se precipitó en una solución de NaHCO₃. El sólido se filtró y se lavó varias veces con agua procesada. Después de volver a suspender en agua procesada, se añadió acetonitrilo. Después, la suspensión se enfrió. El sólido se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío, produciendo 160,34 kg (88 %) de Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 8) con una pureza del 90 % (según HPLC).

Ejemplo 17: Preparación de H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl · TFA (SEC ID N° 8)

20 Se añadió Boc-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 8) (72,24 kg, véase Ejemplo 16) a ≤15 °C a una mezcla de TFA (72 l), tolueno (289 l) y THF (6 l). Se añadió lentamente más cantidad de TFA (159 l) a la mezcla a ≤22 °C. La reacción se dejó continuar hasta que se completó a 20 °C durante 2,5 h (supervisado por HPLC). La mezcla de reacción se evaporó al vacío. Se retiró TFA residual por varias destilaciones azeotrópicas con una mezcla de tolueno y THF. El residuo oleoso se diluyó con tolueno y se vertió en éter diisopropílico. El sólido se filtró y se lavó varias veces con éter diisopropílico. Después de volver a suspender en una mezcla de acetonitrilo y éter diisopropílico, el sólido se filtró, se lavó varias veces con éter diisopropílico y finalmente se secó al vacío, produciendo 61,7 kg (87 %) de H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl · TFA (SEC ID N° 8) con una pureza del 88,9 % (según HPLC).

Ejemplo 18: Preparación de Boc-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 9)

30 Se añadieron lentamente Boc-Phe-OH (10,03 kg; Senn Chemicals AG, Suiza) y HOBt (4,95 kg) a ≤24 °C a una solución de H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl·TFA (SEC ID N° 8) (61,63 kg, véase Ejemplo 17) en DMF (264 l). Se añadió lentamente EDC · HCl (8,53 kg) a -5 °C. El pH de la mezcla de reacción se ajustó progresivamente a 6,5- 7 con DIPEA (47,5 l) a -5 °C. Se dejó que el acoplamiento se completara a 10 °C durante 23 h (supervisado por HPLC). La mezcla de reacción se evaporó al vacío. El residuo oleoso se suspendió en una solución de NaHCO₃. El sólido se filtró, se lavó varias veces con agua procesada y se secó al vacío, produciendo 67,64 kg (95 %) de Boc-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 9) con una pureza del 87,9 % (según HPLC).

Ejemplo 19: Preparación de H-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl · TFA (SEC ID N° 9)

45 Se añadió en pequeñas porciones Boc-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 9) (67,66 kg, véase Ejemplo 18) a 15 °C a una mezcla de TFA (68 l), fenol (3,38 kg), tolueno (271 l) y THF (54 l). Se añadió lentamente más cantidad de TFA (149 l) a la mezcla a 15 °C. La finalización de la escisión (4,3 h) se controló por HPLC.

50 La mezcla de reacción se evaporó al vacío. El TFA residual se retiró mediante varias destilaciones azeotrópicas con una mezcla de tolueno y THF. El residuo oleoso se diluyó con tolueno y se vertió en éter diisopropílico. El sólido se filtró, se lavó varias veces con éter diisopropílico y se secó al vacío, produciendo 67,25 kg (99 %) de H-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl · TFA (SEC ID N° 9) con una pureza del 86,6 % (según HPLC).

Ejemplo 20: Preparación de Boc-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr (Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 3)

60 Se añadieron Boc-Asp(OBzl)¹¹-OH (20,22 kg) (Senn Chemicals AG, Suiza) y HOBt (8,42 kg) en pequeñas porciones a una solución de H-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl·TFA (SEC ID N° 9) (60,46 kg, peso neto de péptido, véase Ejemplo 19) en DMF (370 l) a ≤20 °C. Se añadió lentamente EDC · HCl (13,38 kg) a la mezcla de reacción a -5 °C. El pH de la mezcla resultante se ajustó progresivamente a 6,5-7 con DIPEA (27 l) a -5 °C. Después se dejó que la reacción de acoplamiento se completara durante 35 h a 10 °C (supervisado por HPLC).

65 Después, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El aceite oleoso resultante se añadió lentamente a una solución acuosa de NaHCO₃. La suspensión resultante se filtró y se suspendió de nuevo en agua desionizada.

Después de la filtración y de varios lavados con agua desionizada y una vez con una mezcla de acetonitrilo y agua desionizada, el sólido resultante se secó al vacío, produciendo 64 kg (96 %) de Boc-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 3) con una pureza del 81,4 % (según HPLC).

5 Ejemplo 21: Preparación de H-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl · TFA (SEC ID N° 3)

10 Se añadió en pequeñas porciones Boc-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 3) (64,00 kg, véase Ejemplo 20) a una mezcla de TFA (64 l), fenol (3,2 kg), tolueno (265 l) y THF (51 l) a una temperatura por debajo de 15 °C. Se añadió lentamente más cantidad de TFA (141 l) a la mezcla de reacción a ≤15 °C. La escisión se realizó a 15 °C durante 4,8 h (supervisado por HPLC).

15 La mezcla de reacción se concentró al vacío. El aceite oleoso resultante se añadió a éter diisopropílico para precipitación a 20 °C. La suspensión resultante se filtró, se suspendió de nuevo en éter diisopropílico y se filtró de nuevo. El sólido se lavó con éter diisopropílico y se secó al vacío, produciendo 61,4 kg (preso neto de péptido) (95 %) de H-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl · TFA (SEC ID N° 3) con una pureza del 77,6 % (según HPLC).

20 Ejemplo 22: Preparación de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 1)

25 Se añadieron en pequeñas porciones H-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl · TFA (SEC ID N° 3) (104,40 kg, véase Ejemplo 21) y HOBt (8,42 kg) en pequeñas porciones a una solución de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OH (SEC ID N° 2) (65,47 kg, véase Ejemplo 10) en DMF (345 l) a ≤24 °C. Se añadió lentamente EDC · HCl (12,46 kg) a -5 °C. El pH de la mezcla de reacción se ajustó progresivamente a 6,5-7 con TEA (16,5 l) a -5 °C. Se dejó que el acoplamiento se completara durante 22 h a -5 °C (supervisado por HPLC).

30 La mezcla de reacción se diluyó lentamente con agua desionizada. La suspensión resultante se filtró, se lavó con agua desionizada y se secó al vacío, produciendo 72 kg (50 %) de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 1) con una pureza del 81,4 % (según HPLC).

35 Ejemplo 23: Preparación de H-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OH · 2 TFA (bivalirudina) (SEC ID N° 1)

40 Una suspensión de Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 1) (15,00 kg, véase Ejemplo 22) en ácido acético (53 l) se añadió a una mezcla de paladio sobre carbono (1,13 kg), agua desionizada (6 l) y ácido acético (5 l). Se realizó hidrogenación a ≤37 °C a una presión de hidrógeno de aproximadamente 0,30 MPa (3 bar) (supervisado por HPLC).

45 Después de completarse (5 h), la mezcla de reacción se enfrió y se diluyó con agua desionizada y ácido acético. La mezcla resultante se filtró sobre un cartucho de celulosa, que se eluyó varias veces con una mezcla de ácido acético y agua procesada. El filtrado se concentró al vacío. Se comprobó el contenido de agua del residuo resultante por valoración de Karl Fischer (contenido de agua <5,0 %).

50 Después, se añadió tolueno al residuo oleoso seguido de la adición de TFA. La finalización de la escisión (después de 1 h) se controló por HPLC.

55 La mezcla de reacción se concentró al vacío. El aceite oleoso resultante se añadió a éter diisopropílico para precipitación. La suspensión resultante se filtró para dar un sólido, que se lavó varias veces con éter diisopropílico y se secó al vacío, produciendo 8,41 kg (preso neto de péptido) (78 %) de H-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-H · 2 TFA (bivalirudina) en bruto (SEC ID N° 1) con una pureza de bivalirudina en bruto del 65 % (según HPLC). No se detectó ninguna impureza de D-Phe¹²-bivalirudina por HPLC, es decir no sucedió racemización en la posición 12.

60 El péptido en bruto se purificó por HPLC preparativa en una fase estacionaria de fase inversa C18. En una primera etapa, la bivalirudina en bruto se purificó por elución en gradiente con acetato amónico/agua/acetonitrilo y en una segunda etapa con una elución en gradiente con ácido trifluoroacético/agua/acetonitrilo. Las fracciones de elución que contenían producto puro se concentraron y se liofilizaron, produciendo 5,89 kg (70 %, basado de contenido de bivalirudina en el péptido en bruto) de H-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-H · 2 TFA (bivalirudina) (SEC ID N° 1) en forma de un polvo de color blanco con una pureza del 99 % (según HPLC). No se detectaron ni D-Phe¹²-bivalirudina ni D-Tyr¹⁹-bivalirudina, y cada una de las otras impurezas detectadas no fue superior al 0,2 % (según HPLC).

65

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Lonza Braine SA

5 <120> Proceso para la producción de bivalirudina

<130> LP2156PC00

<160> 10

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

15 <211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Construcción sintética

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

25 <223> Enantiómero D de Phe (D- Phe)

<400> 1

Phe Pro Arg Pro Gly Gly Gly Gly Asn Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro
1 5 10 15

Glu Glu Tyr Leu
20

30 <210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

35 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

40 <221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> Enantiómero D de Phe (D- Phe)

<400> 2

Phe Pro Arg Pro Gly Gly Gly Gly Asn Gly
1 5 10

45 <210> 3

<211> 10

50 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

55 <400> 3

Asp Phe Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu
1 5 10

5
<210> 4
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

10
<220>
<223> Construcción sintética

15
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> Enantiómero D de Phe (D-Phe)

<400> 4

Phe Pro Arg Pro
1

20
<210> 5
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

25
<220>
<223> Construcción sintética

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Asn Gly
1 5

30
<210> 6
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

35
<220>
<223> Construcción sintética

40
<400> 6

Glu Glu Tyr Leu
1

45
<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

50
<220>
<223> Construcción sintética

<400> 7

Glu Glu Ile Pro
1

55
<210> 8

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

5
<220>
<223> Construcción sintética

<400> 8

10
Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu
1 5

15
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

20
<400> 9

Phe Glu Glu Ile Pro Glu Glu Tyr Leu
1 5

25
<210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30
<220>
<223> Construcción sintética

<400> 10

35
Gly Gly Gly Gly
1

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de bivalirudina de fórmula

5 H-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OH (SEC ID N° 1)(I)

en fase de solución que comprende las etapas de:

10 (a) hacer reaccionar un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-OH (SEC ID N° 4) (V),

15 en la que P1 es un grupo protector que es estable a hidrogenación catalítica, con un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

H-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OP2 (SEC ID N° 5) (VI),

20 en la que P2 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica y que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector(s) de cadena lateral opcional, para producir un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OP2 (SEC ID N° 2) (VII),

25 en la que P1 y P2 son como se ha definido anteriormente,

(b) eliminar P2 del péptido producido en la etapa (a) para producir el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula

P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OH (SEC ID N° 2) (II),

30

en la que P1 es como se ha definido anteriormente,

(c) hacer reaccionar un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

H-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 8) (X),

35

en la que P3 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica, con una fenilalanina de fórmula

P4-Phe¹²-OH (XI),

40

en la que P4 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector(es) de cadena lateral del péptido de fórmula X y con respecto a P3, para producir un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

P4-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 9)(XII),

45

en la que P3 y P4 son como se han definido anteriormente,

(d) eliminar P4 del péptido producido en la etapa (c) para producir el correspondiente péptido protegido con cadena lateral, no protegido en el extremo N, de fórmula XII,

50

(e) hacer reaccionar el péptido de fórmula XII producido en la etapa (d) con un ácido aspártico protegido con cadena lateral de fórmula

P5-Asp¹¹-OH (XIII),

55

en la que P5 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector(es) de cadena lateral del péptido/aminoácido de fórmula XII y XIII y con respecto a P3, para producir un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

P5-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 3) (XIV),

60

en la que P3 y P5 son como se han definido anteriormente,

(f) eliminar P5 del péptido producido en la etapa (e) para producir el péptido protegido con cadena lateral de fórmula

H-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 3) (III),

65

en la que P3 es como se ha definido anteriormente,

(g) hacer reaccionar el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula II producido en la etapa (b) con el péptido protegido con cadena lateral de fórmula III producido en la etapa (f) para producir un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro--Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 1) (IV),

en la que P1 y P3 son como se han definido anteriormente,

(h) eliminar P1, P3 y los grupos protectores de cadena lateral del péptido producido en la etapa (g) para producir la bivalirudina de fórmula I.

2. El proceso de la reivindicación 1, en el que al menos uno de P1, P4 y P5 es *tert*-butoxicarbonilo (Boc), 2-(bifenil-4-il)prop-2-iloicarbonilo (Bpoc), 2-(3,5-dimetoxifenil) prop-2-iloicarbonil (Ddz), fluoren-9-ilmetoxicarbonil (Fmoc) o 2-(metilsulfonil)etoxicarbonil (Msc).

3. El proceso de la reivindicación 2, en el que al menos uno de P1, P4 y P5 es Boc.

4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos uno de P2 y P3 es bencilo (Bzl), benciloximetilo (Bom), fenacilo (Pac), 4-nitrobencilo (ONbz), 4-piridilmetilo (Pic) o 4-sulfobencilo, a condición de que, si P4 o P5 es Boc, Bpoc o Ddz, P3 no sea Bom.

5. El proceso de la reivindicación 4, en el que al menos uno de P2 y P3 es Bzl.

6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los péptidos/aminoácidos protegidos con cadena lateral de fórmula III, IV, X y XII-XIV se protegen con al menos un grupo protector de cadena lateral seleccionado del grupo que consiste en bencilo (Bzl), benciloximetilo (Bom), fenacilo (Pac), 4-nitrobencilo (ONbz), 4-piridilmetilo (Pic) y 4-sulfobencilo; a condición de que, si P4 o P5 es Boc, pBoc o Ddz, ninguno de los grupos protectores de cadena lateral sea Bom.

7. El proceso de la reivindicación 6, en el que los péptidos/aminoácidos protegidos con cadena lateral de fórmula III, IV, X y XII-XIV están protegidos con al menos un Bzl.

8. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que en la etapa (a) al menos uno de los péptidos opcionalmente protegidos con cadena lateral de fórmula V y VI no están protegidos con cadena lateral.

9. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que en la etapa (c) el péptido de fórmula X tiene la fórmula

H-Glu(OP6)-Glu(OP7)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OP8)-Glu(OP9)-Tyr(P10)--Leu²⁰-OP3 (SEC ID 8) (Xb),

en la que

P3 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica; y

cada uno de P6 a P10 se selecciona independientemente del grupo que consiste en Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic y 4-sulfobencilo; y

en la etapa (e) el ácido aspártico protegido con cadena lateral de fórmula XIII es

P5-Asp (OP11)¹¹-OH,

en la que

P5 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector(es) de cadena lateral del péptido/aminoácido de fórmula XII y XIII y a P3; y

P11 se selecciona del grupo que consiste en Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic y 4-sulfobencilo.

10. El proceso de la reivindicación 9, en el que P3 es Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic o 4-sulfobencilo; cada uno de P6 a P10 es independientemente Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic o 4-sulfobencilo; P5 es Boc, Bpoc, Ddz, Fmoc o Msc; y P11 es Bzl, Bom, Pac, ONbz, Pic o 4-sulfobencilo.

11. El proceso de la reivindicación 10, en el que P3 es Bzl, cada uno de P6 a P10 es Bzl, P5 es Boc y P11 es Bzl.

12. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que P1, P4 y P5 son Boc; y P2, P3, P6, P7, P8, P9, P10 y P11 son Bzl.

13. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que en la etapa (h), primero P3 y el grupo (o grupos) protector(es) de cadena lateral se eliminan simultáneamente, y después de esto se elimina P1.

14. El proceso de la reivindicación 13, en el que el péptido, obtenido después de eliminar simultáneamente P3 y el grupo (o grupos) protector(es) de cadena lateral, no está aislado antes de eliminar P1.
- 5 15. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que al menos una de las etapas de eliminación (b) y (h) se realiza en un disolvente con gas hidrógeno y paladio sobre carbón vegetal,
16. El proceso de la reivindicación 15, en el que el disolvente se selecciona del grupo que consiste en *N,N*-dimetilformamida, acetona, una mezcla de acetona y agua, ácido acético y una mezcla de ácido acético y agua.
- 10 17. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que al menos uno de los péptidos seleccionados del grupo que consiste en el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula V, el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula VI y el péptido protegido con cadena lateral de fórmula X, se prepara por síntesis de fase en solución en un proceso anterior.
- 15 18. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que al menos uno de los péptidos seleccionados del grupo que consiste en el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula V, el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula VI y el péptido protegido con cadena lateral de fórmula X, se prepara por síntesis de fase en solución en un proceso anterior.
- 20 19. Un péptido seleccionado del grupo que consiste en
- (i) un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula
- 25 P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-OH (SEC ID N° 4) (V),
- en la que P1 es Bpoc, Ddz, Fmoc, Adc, Aoc, Dpp, Msc o Pht;
- (ii) un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula
- 30 H-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OP2 (SEC ID N° 5) (VI),
- en la que P2 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica y que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector(es) de cadena lateral opcional;
- (iii) un péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula
- 35 P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OP2 (SEC ID N° 2) (VII),
- en la que P1 y P2 son como se han definido anteriormente;
- (iv) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula
- 40 P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OH (SEC ID N° 2) (IIa),
- en la que P1 es como se ha definido anteriormente excepto para Boc-D-Phe¹-Pro-Arg(Pbf)-Pro-Gly⁵--Gly-Gly-Gly-Asn(Trt)-Gly¹⁰-OH;
- (v) un péptido no protegido con cadena lateral de fórmula
- 45 P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OH (SEC ID N° 2) (IIb),
- en la que P1 es como se ha definido anteriormente;
- (vi) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula
- 50 H-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 8) (X),
- en la que P3 es un grupo protector que puede eliminarse por hidrogenación catalítica;
- (vii) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula
- 55 P4-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 9)(XII),
- en la que P3 es como se ha definido anteriormente; y P4 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector(es) de cadena lateral del péptido de fórmula X y con respecto a P3; o P4 es hidrógeno;
- 60 (viii) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula
- P5-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 3) (XIV),
- 65 en la que P5 es un grupo protector que es ortogonal con respecto al grupo (o grupos) protector(es) de cadena lateral del péptido/aminoácido de fórmula XII y XIII y con respecto a P3; y P3 es como se ha definido

anteriormente; excepto para Fmoc-Asp(OtBu)-Phe--Glu (OtBu)-Glu(OtBu)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Leu²⁰-OtBu;
 (ix) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

5 H-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 3) (III),

en la que P3 es como se ha definido anteriormente; excepto para H-Asp(OtBu)-Phe-Glu(OtBu)--Glu(OtBu)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OtBu)-Glu (OtBu)-Tyr(tBu)-Leu²⁰-OtBu; y
 (x) un péptido protegido con cadena lateral de fórmula

10 P1-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp-Phe-Glu-Glu--Ile¹⁵-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu²⁰-OP3 (SEC ID N° 1) (IV),

15 en la que P1 y P3 son como se ha definido anteriormente; excepto para Boc-D-Phe¹-Pro--Arg(Pbf)-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn(Trt)-Gly¹⁰-Asp(OtBu)-Phe-Glu(OtBu)--Glu(OtBu)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Tyr(tBu)-Leu²⁰-OtBu.

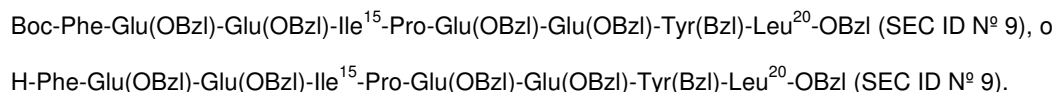
20. El péptido de la reivindicación 19, en el que el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula VI es H-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID N° 5).

20 21. El péptido de la reivindicación 19, en el que el péptido opcionalmente protegido con cadena lateral de fórmula VII es Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OBzl (SEC ID N° 2).

22. El péptido de la reivindicación 19, en el que el péptido no protegido con cadena lateral de fórmula IIb es Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-OH (SEC ID N° 2).

25 23. El péptido de la reivindicación 19, en el que el péptido protegido con cadena lateral de fórmula X es H-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 8).

30 24. El péptido de la reivindicación 19, en el que el péptido protegido con cadena lateral de fórmula XII es



35 25. El péptido de la reivindicación 19, en el que el péptido protegido con cadena lateral de fórmula XIV es Boc-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)--Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 3).

26. El péptido de la reivindicación 19, en el que el péptido protegido con cadena lateral de fórmula III es H-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)-Glu (OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)--Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 3).

40 27. El péptido de la reivindicación 19, en el que el péptido protegido con cadena lateral de fórmula IV es Boc-D-Phe¹-Pro-Arg-Pro-Gly⁵-Gly-Gly-Gly-Asn-Gly¹⁰-Asp(OBzl)-Phe-Glu(OBzl)--Glu(OBzl)-Ile¹⁵-Pro-Glu(OBzl)-Glu(OBzl)-Tyr(Bzl)-Leu²⁰-OBzl (SEC ID N° 1).

45 28. El uso de cualquiera de los péptidos de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 27 como un producto intermedio en una síntesis de bivalirudina.