

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 191**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2019 PCT/EP2019/060035**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2019 WO19202057**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2019 E 19717920 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 3781586**

54 Título: **Un método para la producción de icatibant de alta pureza**

30 Prioridad:

20.04.2018 EP 18168558

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

06.09.2024

73 Titular/es:

FRESENIUS KABI IPSUM S.R.L. (100.0%)

Via Roma, 108

20051 Cassina de' Pecchi - Milano, IT

72 Inventor/es:

CABRI, WALTER;

POZZEBON, ALICE;

VIOLA, ANGELO;

RICCI, ANTONIO;

BORGOGNO, ANDREA y

GURYANOV, IVAN

74 Agente/Representante:

LOZANO GANDIA, José

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 978 191 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

Un método para la producción de icatibant de alta pureza

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la síntesis peptidomimética. En concreto, se refiere a procesos para la fabricación de antagonistas del receptor de bradicinina B2. Más en particular, la presente invención se refiere a un proceso para la fabricación de icatibant mediante condensación de fragmentos y a la preparación de dichos fragmentos.

10

Antecedentes de la invención

El angioedema hereditario (AEH) es una enfermedad rara y potencialmente mortal causada por una deficiencia o disfunción del inhibidor de C1 (C1-INH), que da como resultado una sobreproducción de bradicinina. Los pacientes con AEH experimentan una morbilidad significativa y una calidad de vida deteriorada, debido al edema recurrente de la piel, laringe, vía gastrointestinal, que da como resultado dolor abdominal, náuseas, etc. La mortalidad puede deberse a crisis laríngeas y asfixia y se ha estimado en hasta un 30 % de los pacientes no diagnosticados previamente. Las crisis abdominales aumentan la morbilidad de la enfermedad y a menudo aumentan el costo del tratamiento debido a hospitalizaciones y cirugías innecesarias (Kalra *et al.* Expert Opin. Orphan Drugs 2014, 2, 743-750; Cole *et al.* Ann. Pharmacother. 2013, 47, 49-55).

15

20

Entre otros productos farmacéuticos para el tratamiento del AEH, tales como ecallantida o el propio C1-INH, icatibant es el único fármaco aprobado para autoadministración por vía subcutánea para tratar las crisis agudas de AEH. El icatibant fue desarrollado inicialmente por Hoechst con la abreviatura HOE-140 como antagonista del receptor de bradicinina B2 (B2R) con acción específica y selectiva. Inhibe la vasodilatación y la vasopermeabilidad mediadas por bradicinina y bloquea la formación de edema en el AEH (Kalra *et al.* citado anteriormente).

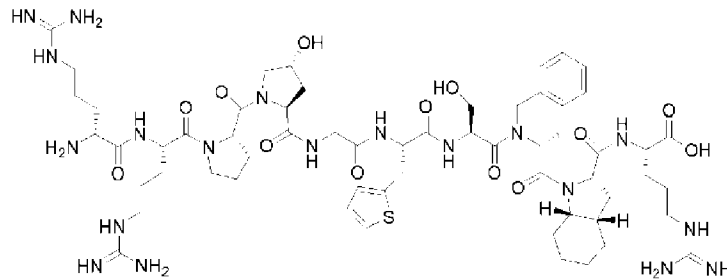
25

Icatibant es un fármaco peptidomimético sintético, que contiene diez aminoácidos, es decir, un decapeptido. Entre ellos, cinco aminoácidos no son proteinógenos o no son naturales, cuatro de los cuales son los llamados iminoácidos (es decir, aminoácidos que contienen un grupo amino secundario).

30

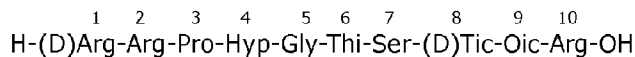
Icatibant se designa químicamente como
(N-(N-(D-arginil-L-arginil-L-prolil-(4R)-4-hidroxi-L-prolil-glicil-3-(2-tienil)-L-alanil-L-seril)-(3R)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carbonil)-(2S,3aS,7aS)-octahidroindol-2-carbonil)-L-arginina
y se muestra a continuación:

35



La estructura del icatibant también se puede representar como

40



en donde la numeración de residuos comienza con 1, que indica la (D)-arginina N-terminal y termina con 10, que indica la arginina C-terminal.

45

Los aminoácidos no naturales de icatibant son (D)-arginina [(D)Arg], (L)-hidroxiprolina (Hyp), β -2-tienilalanina (Thi), ácido (R)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico [(D)-Tic] y ácido octahidroindol-2-carboxílico (Oic).

50

La forma farmacéutica de icatibant es su sal acetato, que es el principio activo del producto inyectable comercializado denominado Firazyr®.

El desafío para mejorar los procesos de síntesis de icatibant radica en la naturaleza del péptido icatibant en sí, que presenta una serie de iminoácidos (concretamente, prolina (Pro), Hyp, (D)Tic y Oic) en su secuencia de aminoácidos, y en el consiguiente plegamiento de icatibant en una conformación pseudocíclica (estructuras de giro β).

55

En concreto, al realizar una serie de etapas de una síntesis en fase sólida, se pueden formar varios productos

secundarios con secuencias truncadas. Estos deben eliminarse y complican la purificación por HPLC, disminuyendo así el rendimiento del producto final.

- 5 La síntesis de icatibant de longitud completa se describe en la patente estadounidense US5597803 (péptido a-aminoacilado) y en la patente estadounidense US5648333. En el presente documento se divulgan los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) Fmoc o Boc, partiendo de una resina de alcohol p-benciloxibencílico y utilizando carbodiimida y aditivos supresores de la racemización, tales como HOBt. Los documentos US5597803 y US5648333 no divulgan el rendimiento ni la pureza del producto final.
- 10 De forma similar, los documentos CN 102532267 (1), CN 104072585 (2) e IN2014CH05473 (3) divulgan una SPPS Fmoc gradual en resina de cloruro de 2-clorotritilo (1) y resina Wang (2,3), mediante el uso de diversos reactivos activadores. En estas referencias se declara que el rendimiento total del péptido es del 35 %, el 55 % y el 40 %, respectivamente.
- 15 En otra solicitud de patente, el documento CN 103992383, se divulga una síntesis que sugiere el uso del dipéptido Boc-(D)Arg-Arg-OH·2HCl para la última etapa de acoplamiento de una SPPS Fmoc gradual para disminuir la cantidad de secuencias truncadas, tales como des-D-Arg¹-icatibant y des-Arg²-icatibant. El rendimiento total divulgado es del 46 %.
- 20 El documento IN 201621021157 también divulga una SPPS Fmoc gradual sobre una resina de cloruro de 2-clorotritilo (resina CTC). No se divulga información sobre el rendimiento.

El documento WO2018007930 divulga una síntesis basada en fragmentos convergentes de icatibant en fase líquida.

- 25 Por lo tanto, sigue siendo necesario desarrollar un proceso eficiente, simple e industrialmente viable para preparar icatibant que pueda superar los inconvenientes de la técnica anterior y proporcionar icatibant con alto rendimiento y con un perfil de impurezas favorable, facilitando la purificación final.

- 30 Los presentes inventores han desarrollado una síntesis mejorada de icatibant en fase sólida que utiliza un enfoque convergente en el que dos fragmentos peptídicos se acoplan con la formación de un enlace amida entre los aminoácidos 5 y 6, concretamente, glicina (Gly) y β-2-tienilalanina (Thi). En concreto, se concibe una estrategia (5+5), o, como alternativa, se utilizan estrategias (4+5), o (3+5), o (2+5), en donde el pentapéptido C-terminal Thi-Ser-(D)Tic-Oic-Arg (fragmento A) se acopla con un fragmento penta-, tetra-, tri- o di-péptido con glicina C-terminal (fragmento B), y en donde la posible adición de los últimos aminoácidos N-terminales se logra mediante SPPS Fmoc gradual para
35 obtener la secuencia completa de aminoácidos de icatibant.

Objeto de la invención

- 40 Un objeto de la presente invención es proporcionar un proceso mejorado en fase sólida para la preparación de icatibant, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, lo que da como resultado icatibant bruto con un alto rendimiento y un buen perfil de impurezas, facilitando la purificación final.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un proceso con mayor rendimiento y pureza que los logrados en el estado de la técnica.

- 45 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar intermedios peptídicos útiles para la síntesis de icatibant, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Sumario de la invención

- 50 La presente invención proporciona un método convergente para la preparación de icatibant en síntesis en fase sólida, que comprende la etapa de acoplar un primer fragmento peptídico unido a resina, opcionalmente protegido, caracterizado por la secuencia de aminoácidos Thi-Ser-(D)Tic-Oic-Arg (fragmento A), con un segundo fragmento peptídico -opcionalmente protegido- (fragmento B) que comprende una glicina C-terminal, seguido opcionalmente de
55 una o más etapas de elongación del péptido resultante con aminoácidos adecuados para completar la secuencia de icatibant.

- 60 El fragmento A está unido a una resina o soporte sólido, en su aminoácido C-terminal, es decir, arginina (Arg). El soporte sólido se selecciona preferentemente de resina Wang, resina de cloruro de 2-clorotritilo o resina de cloruro de tritilo. El fragmento A está preferentemente protegido en sus cadenas laterales de aminoácidos.

El fragmento B tiene una glicina C-terminal y está opcionalmente protegido en su grupo amino N-terminal.

- 65 El fragmento B se selecciona del grupo que consiste en

(D)Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-OH

(equivalente a D-Arg N-terminal de secuencia Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-OH (SEQ ID No 1), Arg-Pro-Hyp-Gly-OH (SEQ ID No 2), Pro-Hyp-Gly-OH y Hip-Gly-OH.

5 Preferentemente, el fragmento B también está protegido en sus cadenas laterales de aminoácidos.

10 El fragmento B se caracteriza por proporcionar una glicina C-terminal que reacciona con el residuo β -2-tienilalanina (Thi) N-terminal del fragmento A. De este modo se forma un enlace amida, de manera que se obtiene o la secuencia completa de icatibant o una secuencia peptídica más corta, dependiendo de la longitud del fragmento B. En el último caso, se realizan etapas de desprotección/acoplamiento posteriores (es decir, etapas de elongación) para agregar los aminoácidos que faltan para completar la secuencia de icatibant en forma de SPPS gradual.

15 El decapeptido icatibant obtenido, preferentemente protegido en la cadena lateral, se desprotege y/o se escinde del soporte sólido para obtener icatibant bruto. Dicho icatibant bruto se purifica opcionalmente para obtener icatibant puro. El método de la presente invención proporciona icatibant con un alto rendimiento y una alta pureza.

Por otra parte, la presente invención proporciona los fragmentos intermedios A y B y métodos para su preparación.

20 Descripción detallada de la invención

La presente invención divulga un nuevo método para preparar icatibant con alto rendimiento y pureza. En concreto, consiste en un enfoque convergente sobre la fase sólida. La preparación de fragmentos cortos y su posterior acoplamiento da como resultado una reducción de la cantidad de impurezas debido al aumento de los rendimientos de las etapas de acoplamiento individuales durante la síntesis de fragmentos. También reduce la cantidad de aminoácidos N-protegidos necesarios para los acoplamientos individuales.

30 La presente invención proporciona un método para la preparación de icatibant, que consiste en un enfoque convergente en donde fragmentos peptídicos opcionalmente protegidos se acoplan de manera que el ácido carboxílico de la glicina C-terminal de un fragmento B reacciona con el grupo amino N-terminal de un fragmento A, que está unido a un soporte sólido. Dicho método reduce sustancialmente la formación de impurezas de modo que el péptido bruto obtenido se puede purificar fácilmente para dar icatibant con un alto rendimiento total.

35 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona los fragmentos A y B del péptido icatibant necesarios y el método para prepararlos. Dicha síntesis se realiza mediante SPPS o mediante síntesis de péptidos en fase líquida (LPPS), ambos mediante el uso de un sistema de reactivos de acoplamiento. Preferentemente se realiza mediante SPPS.

40 La expresión "fragmento peptídico" o "fragmento", describe un péptido con una secuencia parcial de aminoácidos de icatibant, que puede consistir en dos a nueve aminoácidos. Opcionalmente puede unirse a una resina en su aminoácido C-terminal. Un fragmento peptídico puede estar protegido o no protegido.

45 La expresión "fragmento peptídico protegido" o "fragmento protegido" describe un fragmento peptídico que puede portar independientemente grupos protectores en sus cadenas laterales de aminoácidos, o grupos laterales, y/o en su grupo α -amino.

Un fragmento, o fragmento peptídico, también puede indicarse con una secuencia de aminoácidos específica, como

$aa_1-aa_2-\dots-aa_n$

donde aa_x es el código de tres letras del aminoácido en la posición x.

50 Cuando el fragmento está indicado con

$aa_1-aa_2-\dots-aa_n-OH$

se pretende que el aminoácido C-terminal aa_n tenga un ácido carboxílico libre.

55 El término "resina" o la expresión "soporte sólido", describe un polímero insoluble funcionalizado al que se puede unir un aminoácido o un fragmento peptídico y que es adecuado para el alargamiento de aminoácidos hasta que se obtiene la secuencia completa.

60 La SPPS puede definirse como un proceso en el que un péptido anclado por su aminoácido C-terminal a una resina se ensambla mediante la adición sucesiva de los aminoácidos opcionalmente protegidos que constituyen su secuencia. Comprende cargar un primer aminoácido o péptido protegido con α -amino, sobre una resina y es seguido por la repetición de una secuencia de etapas denominada ciclo, o etapa de elongación, que consiste en la escisión del grupo protector α -amino y el acoplamiento del posterior aminoácido protegido.

65 La formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos, o entre un aminoácido y un péptido, generalmente implica dos etapas. Primero, la activación del grupo carboxilo, a continuación, el ataque nucleófilo del grupo amino al grupo carboxílico activado.

El ciclo puede repetirse secuencialmente hasta que se logre la secuencia deseada del péptido.

Finalmente, el péptido se desprotege y/o se escinde de la resina.

5 Como referencia de la SPPS, consulte, por ejemplo, Knud J. Jensen *et al.* (eds.), *Peptide Synthesis and Applications, Methods in Molecular Biology*, vol. 1047, Springer Science, 2013.

10 En un aspecto preferido de la presente invención, se utiliza una resina sensible a los ácidos. Más preferentemente, se selecciona de resina Wang, resina de cloruro de 2-clorotritilo (CTC) y resina de cloruro de tritilo. Otra resina preferida es la resina de bromuro de 4-metilbencidriló (MBH-Br).

Aún más preferentemente, se utiliza una resina Wang o CTC para la preparación del fragmento A y por tanto también para el acoplamiento del fragmento A con el fragmento B.

15 Preferentemente, se utiliza una resina CTC para la preparación del fragmento B.

20 En un aspecto preferido de la presente invención, la carga del primer aminoácido C-terminal sobre la resina Wang se lleva a cabo después de hinchar la resina en un disolvente adecuado, preferentemente DMF, filtrar la resina y añadir a la resina la solución de aminoácido protegido con agente activador, tal como una carbodiimida, en presencia de dimetilaminopiridina (DMAP). En caso de utilizar una resina de cloruro de tritilo, y en particular la resina CTC, después de hinchar la resina en un disolvente adecuado, preferentemente DCM, y filtrar la resina, se añade una solución de aminoácido protegido con una base orgánica, preferentemente diisopropiletilamina (DIEA).

25 En un aspecto preferido de la presente invención, después de que el primer aminoácido C-terminal se haya cargado en la resina, se realiza una etapa adicional para bloquear los sitios que no han reaccionado para evitar secuencias truncadas y prevenir reacciones secundarias. Esta etapa se denomina a menudo "adición de la caperuza". La adición de la caperuza se logra mediante un tratamiento corto de la resina cargada con un gran exceso de un reactivo no impedido altamente reactivo, que se elige de acuerdo con los sitios sin reaccionar a los que se va a añadir la caperuza. Cuando se utiliza una resina Wang, los sitios que no han reaccionado son grupos hidroxilo, que se protegen con caperuza preferentemente mediante tratamiento con un derivado ácido, tal como un anhídrido, en un medio básico, por ejemplo, con una mezcla DMF/DIEA/Ac₂O, preferentemente con una composición 17/2/1 v/v/v.

35 Cuando se utiliza una resina CTC, los sitios que no reaccionaron son cloros, que se protegen con una caperuza preferentemente con un tratamiento con alcohol, opcionalmente en un medio básico, por ejemplo, con una mezcla de DCM/MeOH, preferentemente con una composición 19/1 v/v, o una mezcla DCM/DIEA/MeOH, preferentemente con una composición 17/2/1 v/v/v. A continuación, después del lavado con DCM, la resina se trata adicionalmente con una mezcla DCM/Ac₂O, opcionalmente en presencia de DIEA, preferentemente con una mezcla DCM/DIEA/Ac₂O, preferentemente con una composición 17/2/1 v/v/v, para proteger con caperuza los grupos hidroxilo posiblemente resultantes de la hidrólisis del cloro.

45 Como alternativa a la carga del primer aminoácido C-terminal, se utilizan resinas precargadas, que son aminoácidos L o D protegidos con Fmoc unidos a una resina Wang/CTC. En consecuencia, la resina Fmoc-Arg(Pbf)-Wang se usa preferentemente para la síntesis del fragmento A, y la resina Fmoc-Gly-CTC se usa preferentemente para la síntesis del fragmento B. Otra resina precargada preferida para la síntesis del fragmento A es la resina Fmoc-Arg(Pbf)-CTC.

50 En un aspecto preferido de la presente invención, la carga del primer aminoácido C-terminal sobre la resina se determina espectrofotométricamente, como se describe, por ejemplo, en Knud J. Jensen *et al.* (eds.), *Peptide Synthesis and Applications, Methods in Molecular Biology*, vol. 1047, Springer Science, 2013.

En un aspecto preferido de la presente invención, cada aminoácido puede estar protegido en su grupo α -amino y/o en sus grupos funcionales de cadena lateral.

55 Preferentemente, el grupo protector de los grupos α -amino de los aminoácidos utilizados para la SPPS es de tipo carbamato. El grupo protector más preferido es el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), que se puede eliminar en condiciones básicas.

60 Los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos están opcionalmente protegidos con grupos que generalmente son estables durante las etapas de acoplamiento y durante la eliminación del grupo protector α -amino, y que son ellos mismos eliminables en condiciones adecuadas. Tales condiciones adecuadas son generalmente ortogonales a las condiciones en las que los grupos α -amino están desprotegidos.

65 En un aspecto preferido de la presente invención, dichos grupos protectores de cadena lateral se especifican por aminoácido individual que se encuentra en la secuencia de icatibant, de la siguiente manera:

el grupo arginina y (D)arginina guanidinio está preferentemente protegido por un grupo protector seleccionado del

grupo que consiste en metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo (Mtr), 2,2,5,7,8-pentametilcromanil-6-sulfonilo (Pmc) y 2,2,4,6,7-pentametil-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf), todos los cuales se pueden eliminar en condiciones ácidas; más preferentemente, se utiliza el grupo Pbf,

5 el grupo hidroxilo de la hidroxiprolina (Hyp) está preferentemente protegido por un grupo protector seleccionado del grupo que consiste en tritilo (Trt), tercbutildimetilsililo (TBDMS) y tercbutilo (tBu), todos los cuales se pueden eliminar en condiciones ácidas; más preferentemente, se utiliza el grupo tBu.

10 De manera análoga, el grupo hidroxilo de la serina (Ser) está preferentemente protegido por un grupo seleccionado del grupo que consiste en tritilo (Trt), tercbutildimetilsililo (TBDMS) y tercbutilo (tBu); más preferentemente, se utiliza el grupo tBu.

En un aspecto preferido de la presente invención, las etapas de acoplamiento se realizan en presencia de un reactivo de acoplamiento.

15 Preferentemente, el reactivo de acoplamiento se selecciona del grupo que consiste en N-hidroxisuccinimida (NHS), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) y etil-dimetilaminopropilcarbodiimida (EDC). Más preferentemente, la reacción se lleva a cabo en presencia de N,N'-diisopropilcarbodiimida.

20

En un aspecto preferido de la presente invención, las etapas de acoplamiento se realizan también en presencia de un aditivo. La presencia de un aditivo, cuando se utiliza en la reacción de acoplamiento, reduce la pérdida de configuración en el residuo de ácido carboxílico, aumenta las tasas de acoplamiento y reduce el riesgo de racemización.

25 Preferentemente, el aditivo se selecciona del grupo formado por 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), N-óxido de 2-hidroxipiridina, N-hidroxisuccinimida (NHS), 1-hidroxí-7-azabenzotriazol (HOAt), endo-N-hidroxí-5-norborneno-2,3-dicarboxamida y 2-ciano-2-hidroxiiminoacetato de etilo (OxymaPure). Más preferentemente, la reacción se lleva a cabo en presencia de 2-ciano-2-hidroxiimino-acetato.

30

En un aspecto preferido de la presente invención, las etapas de acoplamiento se realizan en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en DMF, DCM, THF, NMP, DMA o mezclas de los mismos. Más preferentemente, el acoplamiento se realiza en DMF cuando se utiliza una resina Wang, y se realiza en DCM cuando se utiliza una resina CTC.

35

En un aspecto preferido de la presente invención, los grupos protectores α -amino se escinden en condiciones básicas. En concreto, el grupo protector Fmoc se escinde mediante tratamiento con una amina secundaria adecuada seleccionada del grupo que consiste en piperidina, pirrolidina, piperazina y DBU, preferentemente piperidina. Otra base preferida para escindir grupos Fmoc es *tert*-butilamina. Más preferentemente, la desprotección de Fmoc se lleva a cabo utilizando una solución de piperidina al 20 % en DMF.

40

En un aspecto preferido de la presente invención, una vez obtenido el péptido deseado según SPPS como se ha descrito anteriormente, se realiza la desprotección y/o escisión final del soporte sólido y se obtiene el fragmento B o icatibant. Preferentemente, dicha etapa se realiza utilizando una mezcla específica individualizada para la resina utilizada, en condiciones ácidas o ligeramente ácidas.

45

Cuando se usa una resina CTC para sintetizar los fragmentos protegidos de cadena lateral mencionados anteriormente, la etapa de escisión se realiza preferentemente mediante tratamiento usando una mezcla de HFIP:DCM (30:70 v/v) o una solución de TFA al 1-2 % v/v en DCM. En concreto, cuando se usa una resina CTC en la preparación del fragmento B, la escisión en estas condiciones no elimina el grupo protector α -amino ni los grupos protectores de la cadena lateral, produciendo así un fragmento protegido B.

50

En una realización preferida, el péptido protegido con cadena lateral se aísla vertiendo la mezcla de escisión en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en éteres, como el éter diisopropílico (DIPE) y el metil-*tert*-butil éter (MTBE), hidrocarburos, como éteres de petróleo, pentano y hexano, ésteres, como acetato de etilo y acetato de isopropilo, nitrilos, como acetonitrilo (ACN), o mezclas de los mismos. Preferentemente, el disolvente es DIPE o MTBE. En otra realización preferida, el péptido se aísla concentrando o secando, al vacío la mezcla de escisión y luego tratando el residuo con un disolvente de la lista anterior, preferentemente con DIPE o MTBE.

55

60 Se prefiere que cuando se use una resina Wang o CTC en el acoplamiento final para obtener la secuencia de icatibant, el tratamiento se realice con una mezcla de escisión, que comprende TFA y al menos un eliminador, proporcionando así tanto la desprotección de las cadenas laterales como la escisión de la resina. En concreto, cuando se utiliza una resina Wang en la preparación del fragmento A, la escisión final produce icatibant en bruto. Los eliminadores son sustancias, como, por ejemplo, triisopropilsilano, anisol, tioanisol, 1,2-etanoditiol, ditiotreitól, 2,2'-(etilendioxi)dietanotiol, dodecanotiol y fenol, capaz de minimizar la modificación o destrucción de las cadenas laterales sensibles desprotegidas, tales como las de los residuos de arginina en la secuencia de icatibant, en el entorno de

65

escisión.

Dicha etapa de escisión/desprotección se realiza preferentemente usando una mezcla de TFA/tioanisol/anisol/dodecanotiol, por ejemplo, con la composición v/v/v/v 90/5/2/3.

En una realización preferida, el péptido bruto se aísla vertiendo la mezcla de escisión en un disolvente seleccionado del grupo que consiste en éteres, como DIPE y MTBE, hidrocarburos, como éteres de petróleo, pentano y hexano, ésteres, como acetato de etilo y acetato de isopropilo, nitrilos, como acetonitrilo (ACN), o mezclas de los mismos. Preferentemente, el disolvente es DIPE o MTBE.

En un aspecto preferido de la presente invención, el péptido bruto obtenido por escisión de la resina, ya sea fragmento B o icatibant, se purifica para aumentar su pureza.

Para este objetivo, se carga una solución del péptido en una columna de HPLC con una fase estacionaria adecuada, preferentemente sílice modificada C18 o C8, y una fase móvil acuosa que comprende un disolvente orgánico, preferentemente acetonitrilo o metanol, y se hace pasar a través de la columna. Se aplica un gradiente de la fase móvil, si fuera necesario. El péptido con la pureza deseada se recoge y opcionalmente se liofiliza.

En consecuencia, la presente invención proporciona un método convergente para la preparación de icatibant en síntesis en fase sólida, en donde el método comprende el acoplamiento de un fragmento A opcionalmente protegido con la secuencia Thi-Ser-(D)Tic-Oic-Arg, con un fragmento B opcionalmente protegido, como se ha definido anteriormente, seguido de un acoplamiento de aminoácidos opcional para completar la secuencia de icatibant.

La presente invención proporciona los fragmentos intermedios A y B y métodos para su preparación.

En un aspecto, el fragmento A es el fragmento del péptido icatibant (6-10) Thi-Ser-(D)Tic-Oic-Arg unido a una resina en su arginina C-terminal. La resina se selecciona del grupo formado por resina Wang, resina de cloruro de 2-clorotritilo (CTC) y resina de cloruro de tritilo. Preferentemente, la resina es resina Wang. En un aspecto preferido, el fragmento A está protegido en sus grupos funcionales de cadena lateral con grupos protectores adecuados. En un aspecto más preferido, el fragmento A está protegido en el residuo Arg con Pbf y en el residuo Ser con tBu.

En un aspecto aún más preferido, el fragmento A es el fragmento **1**:
H-Thi-Ser(tBu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (**1**).

El fragmento A se prepara mediante SPPS gradual o mediante LPPS. Por ejemplo, el fragmento A se prepara en fase sólida comenzando con la carga sobre la resina del aminoácido C-terminal protegido, es decir, arginina, y posteriormente alargando la cadena peptídica acoplando la secuencia de aminoácidos uno por uno, alternando etapas de acoplamiento y desprotección del grupo α -amino.

Preferentemente, se usa Fmoc-Arg(Pbf)-OH para la carga inicial de la resina, y se usa SPPS Fmoc gradual para completar la preparación del fragmento A.

En otro aspecto preferido, el fragmento A es el fragmento **14**:
H-Thi-Ser(tBu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina CTC (**14**).

Una preparación de fragmento **1** y de fragmento **14** se describe en los Ejemplos de la presente divulgación.

En otro aspecto, el fragmento B se selecciona del grupo que consiste en (D)Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-OH opcionalmente protegido, Arg-Pro-Hyp-Gly-OH, Pro-Hyp-Gly-OH y Hyp-Gly-OH.

En un aspecto preferido, el fragmento B está protegido en su grupo α -amino, incluso más preferentemente con un grupo Fmoc.

El fragmento B se selecciona preferentemente del grupo que consiste en Fmoc-(D)Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH (fragmento **2**), Fmoc-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH (fragmento **3**), Fmoc-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH (fragmento **4**), y Fmoc-Hyp(tBu)-Gly-OH (fragmento **5**).

Lo más preferentemente, el fragmento B es Fmoc-(D)Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH (fragmento **2**).

Una preparación del fragmento **2** se describe en los Ejemplos de la presente divulgación.

En un aspecto preferido, el método convergente para la preparación de icatibant comprende el acoplamiento de Thi-Ser-(D)Tic-Oic-Arg (fragmento A) opcionalmente protegido unido a una resina con (D)Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-OH (fragmento B) opcionalmente protegido, seguido de desprotección/escisión para obtener icatibant bruto, que

opcionalmente se purifica adicionalmente.

Preferentemente, el fragmento A es H-Thi-Ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (fragmento **1**), el fragmento B es Fmoc-(D)Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OH (fragmento **2**), y el acoplamiento se realiza en presencia de DIC/OxymaPure.

En tal aspecto preferido, se forma la siguiente secuencia de icatibant protegido con α -amino, unido a una resina Wang: Fmoc-(D)Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Thi-Ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (**6**).

El péptido unido a una resina protegido con Fmoc (**6**) se trata a continuación para escindir el grupo Fmoc para obtener: H-(D)Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Thi-Ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (**7**).

Finalmente, el péptido unido a resina (**7**) se trata para la escisión simultánea de la resina y la escisión de los grupos protectores de la cadena lateral para obtener icatibant bruto.

En otro aspecto preferido, el fragmento A es H-Thi-Ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina CTC (fragmento **14**), el fragmento B es Fmoc-(D)Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OH (fragmento **2**), y el acoplamiento se realiza en presencia de DIC/OxymaPure.

En tal aspecto preferido, se forma la siguiente secuencia de icatibant protegido con α -amino, unido a una resina CTC: Fmoc-(D)Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Thi-Ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina CTC (**15**).

El péptido unido a una resina protegido con Fmoc (**15**) se trata a continuación para escindir el grupo Fmoc para obtener:

H-(D)Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Thi-Ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina CTC (**16**).

Finalmente, el péptido unido a resina (**16**) se trata para la escisión simultánea de la resina y la escisión de los grupos protectores de la cadena lateral para obtener icatibant bruto.

En otro aspecto preferido, el método convergente para la preparación de icatibant de la presente invención comprende el acoplamiento de Thi-Ser-(D)Tic-Oic-Arg (fragmento A) unido a una resina con Arg-Pro-Hyp-Gly-OH opcionalmente protegido (fragmento A). B), seguido de la adición de (D)Arg para obtener icatibant bruto, que opcionalmente se purifica adicionalmente.

Preferentemente, el fragmento A es H-Thi-Ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (fragmento **1**), el fragmento B es Fmoc-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OH (fragmento **3**), y el acoplamiento se realiza en presencia de DIC/OxymaPure.

En tal aspecto preferido, se forma la siguiente secuencia:

Fmoc-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Thi-Ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (fragmento **8**).

El fragmento **8** se trata a continuación para escindir el grupo Fmoc para obtener:

H-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Thi-ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (fragmento **9**)

(D)Arg finalmente se une al fragmento **9** para obtener la secuencia de icatibant protegido con α -amino **6** (unido a una resina Wang), y el proceso se completa como se ha descrito anteriormente para obtener icatibant bruto.

En un aspecto preferido adicional, el método convergente para la preparación de icatibant de la presente invención comprende el acoplamiento de Thi-Ser-(D)Tic-Oic-Arg (fragmento A) unido a una resina con Pro-Hyp-Gly-OH opcionalmente protegido (fragmento B), seguido de la unión secuencial de Arg y (D)Arg para obtener icatibant bruto, que opcionalmente se purifica adicionalmente.

Preferentemente, el fragmento A es H-Thi-Ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (fragmento **1**), el fragmento B es Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-OH (fragmento **4**), y el acoplamiento se realiza en presencia de DIC/OxymaPure.

En tal aspecto preferido, se forma la siguiente secuencia:

Fmoc-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Thi-Ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (fragmento **10**).

El fragmento **10** se trata a continuación para escindir el grupo Fmoc para obtener:

H-Pro-Hyp(*t*Bu)-Gly-Thi-Ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (fragmento **11**)

El alargamiento continúa con Arg para obtener el primer fragmento **8**, a continuación el fragmento **9** después de la escisión de Fmoc, a continuación se completa el proceso como se ha descrito anteriormente para obtener icatibant bruto.

En un aspecto preferido adicional, el método convergente para la preparación de icatibant de la presente invención comprende el acoplamiento de Thi-Ser-(D)Tic-Oic-Arg (fragmento A) unido a una resina con Hyp-Gly-OH

opcionalmente protegido (fragmento B), seguido de la unión secuencial de Pro, Arg, y (D)Arg para obtener icatibant bruto, que opcionalmente se purifica adicionalmente.

- 5 Preferentemente, el fragmento A es H-Thi-Ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (fragmento **1**), el fragmento B es Fmoc-Hyp(*t*Bu)-Gly-OH (fragmento **5**), y el acoplamiento se realiza en presencia de DIC/OxymaPure.

En tal aspecto preferido, se forma la siguiente secuencia:
Fmoc-Hyp(*t*Bu)-Gly-Thi-Ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (fragmento **12**).

- 10 El fragmento **12** se trata a continuación para escindir el grupo Fmoc para obtener:
H-Hyp(*t*Bu)-Gly-Thi-Ser(*t*Bu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (fragmento **13**)

El alargamiento continúa de forma análoga a la descrita anteriormente, a continuación se completa el proceso también como se describió anteriormente para obtener icatibant en bruto.

- 15 En otro aspecto preferido, el método convergente para la preparación de icatibant de la presente invención comprende acoplamientos análogos a los de los métodos descritos anteriormente cuando el fragmento **14** se utiliza en lugar de fragmento **1**.

20 Abreviaturas

SPFS	Síntesis de péptidos en fase sólida
LPPS	Síntesis de péptidos en fase líquida
CCT	Cloruro de 2-cloro-tritilo
Fmoc	9-Fluorenilmetoxicarbonilo
Boc	<i>Terc</i> -butiloxicarbonilo
Trt	Tritilo (trifenilmetilo)
<i>t</i> Bu	<i>Terc</i> -butilo
Pbf	2,2,4,6,7-Pentametil-dihidrobenzofuran-5-sulfonilo
eq.	Equivalente
h	hora/s
min	minuto/s
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento
DIEA	N,N-diisopropiletilamina
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
TFA	Ácido trifluoroacético
AczO	Anhídrido acético
DMF	N,N-dimetilformamida
DMA	N,N-Dimetilacetamida
DCM	Diclorometano
THF	Tetrahidrofurano
NMP	N-Metil-2-pirrolidinona
MTBE	Metil- <i>terc</i> -butiléter
DIPE	Diisopropiléter
MeOH	Metanol
HFIP	Hexafluoro-2-propanol
TBDMS	<i>Terc</i> -butil-dimetil-sililo
CID	N,N'-Diisopropilcarbodiimida
DCC	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HOAt	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
NHS	N-Hidroxisuccinimida
TBTU	Tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
HBTU	Hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio
HATU	Hexafluorofosfato de 2-(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
PyBOP	Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio
OxymaPure	2-ciano-2-hidroxiiminoacetato de etilo

Ejemplos

- 25 Los siguientes ejemplos proporcionan parámetros experimentales detallados adecuados para la preparación de icatibant de acuerdo con la presente invención, que pretenden ser ilustrativos y no limitantes de todas las posibles realizaciones de la invención.

A menos que se indique lo contrario, todos los materiales, disolventes y reactivos se obtuvieron de proveedores

comerciales, de la mejor calidad y utilizados sin purificación adicional.

Ejemplo 1

5 Preparación de icatibant mediante la estrategia (5+5)

Etapa 1. Preparación del fragmento A sobre resina Wang:

H-Thi-Ser(tBu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (1)

10 La síntesis del fragmento peptídico **1** se llevó a cabo a temperatura ambiente mediante SPPS gradual usando resina Wang (250 mg, 0,75 mmol/g). Después de hinchar la resina en 2 ml de DMF, se añadieron Fmoc-Arg(Pbf)-OH, DIC y DMAP (30, 15 y 0,6 eq. respectivamente, referidos a la carga de la resina) en DMF. Los grupos hidroxilo de la resina que no reaccionaron se protegieron con caperuza mediante tratamiento con una mezcla de DMF/DIEA/Ac₂O (v/v/v 17/2/1) durante 30 minutos. La desprotección de Fmoc se realizó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (2 × 2 ml, 5 min y 15 min). A continuación, la resina se lavó con DMF (4 × 2 ml). La carga de la resina se comprobó espectrofotométricamente mediante medición de adsorción UV y se encontró que era de 0,3 mmol/g. Se activaron previamente Fmoc-Thi-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-(D)Tic-OH, Fmoc-Oic-OH (3 eq. cada uno, referido a la carga de la resina) con DIC (30 mg, 0,23 mmol) y 2-ciano-2-hidroxiimino-acetato de etilo (OxymaPure, 32 mg, 0,23 mmol) durante 3 minutos y se acoplaron consecutivamente a la resina durante 60 minutos cada vez para obtener finalmente el péptido de 5 unidades protegido con Fmoc. Las desprotecciones intermedia y final de Fmoc se llevaron a cabo con una solución de piperidina al 20 % en DMF (2 × 2 ml, 5 min y 15 min). Después de completar la síntesis, la resina se lavó con DMF (4 × 2 ml) para obtener el compuesto del título.

25 Etapa 1bis. Preparación del fragmento A sobre resina CTC:

H-Thi-Ser(tBu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina CTC (14)

30 La síntesis del fragmento peptídico **14** se llevó a cabo a temperatura ambiente mediante SPPS gradual usando resina CTC (5 g, 1,6 mmol/g). Después de hinchar la resina en 40 ml de DCM, se añadieron Fmoc-Arg(Pbf)-OH y DIEA (3 y 3 eq. respectivamente, referidos a la carga de la resina) en DCM (8 vol). Los grupos cloruro de la resina que no reaccionaron se protegieron con caperuza mediante tratamiento con una mezcla de DCM/MeOH (29 y 1 ml respectivamente) durante 15 minutos. Los grupos hidroxilo de la resina que no reaccionaron se protegieron con caperuza mediante tratamiento con una mezcla de DCM/Ac₂O (28 y 2,5 ml respectivamente) durante 15 min. La desprotección de Fmoc se realizó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (2 × 30 ml, 2 × 10 min). A continuación, la resina se lavó con DMF (4 × 30 ml). La carga de la resina se comprobó espectrofotométricamente mediante medición de adsorción UV y se encontró que era de 1,1 mmol/g. Se activaron previamente Fmoc-Thi-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-(D)Tic-OH, Fmoc-Oic-OH (3 eq. cada uno, referido a la carga de la resina) con DIC (2,55 ml, 3 eq.) y 2-ciano-2-hidroxiimino-acetato de etilo (OxymaPure, 2,34 g, 3 eq) durante 5 minutos y se acoplaron consecutivamente a la resina durante 90 minutos cada vez para obtener finalmente el péptido de 5 unidades protegido con Fmoc. Las desprotecciones intermedia y final de Fmoc se llevaron a cabo con una solución de piperidina al 20 % en DMF (2 × 30 ml, 2 × 10 min). Después de completar la síntesis, la resina se lavó con DCM (3 × 30 ml) para obtener el compuesto del título.

45 Etapa 2. Preparación del fragmento B

Fmoc-(D)Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH (2)

50 La síntesis de fragmento peptídico **2** se llevó a cabo a temperatura ambiente mediante SPPS gradual usando resina de cloruro de 2-clorotritilo (250 mg, 1,6 mmol/g). Después de hinchar la resina con 5 ml de DCM, se añadieron Fmoc-Gly-OH y DIEA (0,75 y 1,25 eq. respectivamente, referidos a la carga de la resina) en DCM. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora y los sitios de la resina que no reaccionaron se protegieron con caperuza usando una mezcla de DCM/DIEA/MeOH (v/v/v 17/2/1) durante 30 minutos. A continuación, después de lavar con DCM (3 × 5 ml), la resina se trató con una mezcla de DCM/DIEA/Ac₂O (v/v 17/2/1) durante 30 minutos. La desprotección de Fmoc se realizó con una solución de piperidina al 20 % en DMF (2 × 2 ml, 5 min y 15 min). A continuación, la resina se lavó con DMF (4 × 2 ml). La carga de la resina se comprobó mediante medición de adsorción UV y se encontró que era 0,67 mmol/g. A continuación, se activaron previamente Fmoc-Hyp(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH y Fmoc-(D)Arg(Pbf)-OH (3 eq. cada uno, referido a la carga de la resina) mediante DIC (63 mg, 0,5 mmol) y OxymaPure (71 mg, 0,5 mmol) durante 3 minutos y se acoplaron a la resina durante 60 minutos cada vez para obtener finalmente el péptido de 5 unidades protegido con Fmoc. La resina peptídica seca se suspendió en 4 ml de una mezcla HFIP:DCM (v/v 30:70) y se agitó durante 1 h. La solución se filtró y el procedimiento se repitió 3 veces. Las soluciones orgánicas que contenían el péptido protegido escindido se recogieron y se secaron al vacío. El fragmento peptídico bruto **2** se suspendió a continuación en 10 ml de MTBE, se filtró, se lavó dos veces con 5 ml de MTBE y se secó.

65 De acuerdo con esta misma metodología, se preparan los fragmentos **3**, **4** y **5**, como se define en la *parte Descripción detallada de la invención* de la presente divulgación, interrumpiendo el alargamiento del péptido en la secuencia de

aminoácidos deseada.

Etapa 3. Acoplamiento de fragmentos peptídicos 1 y 2

5 Preparación de H-(D)Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(tBu)-Gly-Thi-Ser(tBu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang (7)

Se añadió una solución del fragmento peptídico **2** (80 mg, 0,058 mmol, 1,3 eq), como se preparó en la etapa 2, en 2 ml de DMF, que contiene 1,3 eq. tanto de OxymaPure como de DIC, a 0,045 mmol (1 eq) de fragmento peptídico unido a la resina **1**, como se obtuvo en la etapa 1. La mezcla de reacción se agitó durante 36 horas a temperatura ambiente, a continuación se filtró y la resina se lavó con DMF (3×2 ml) para finalmente obtener el intermedio **6**. El grupo protector Fmoc se eliminó mediante una solución al 20 % de piperidina en DMF (2 × 2 ml, 5 min y 15 min) y la resina se lavó nuevamente con DMF (2 × 2 ml), DCM (2 × 2 ml) y secó, para obtener el compuesto del título.

Etapa 3bis. Acoplamiento de fragmentos peptídicos 14 y 2

15 Preparación de H-(D)Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(tBu)-Gly-Thi-Ser(tBu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina CTC (16)

Una solución del fragmento peptídico **2**, (900 mg 0,65 mmol, 1,3 eq) como se preparó en la etapa 2, en 4,5 ml de DCM, que contiene 1,3 eq. tanto de OxymaPure como de DIC, se añadió a 0,5 mmol (1 eq.) del fragmento peptídico unido a resina **14**, como se obtuvo en la etapa 1bis. La mezcla de reacción se agitó durante 18 horas a temperatura ambiente, a continuación se filtró y la resina se lavó con DCM (3×30 ml) para finalmente obtener el intermedio **15**. El grupo protector Fmoc se eliminó mediante una solución de piperidina al 20 % en DMF (2 × 30 ml, 2 × 10 min) y la resina se lavó nuevamente con DMF (4 × 30 ml), DCM (3 × 30 ml) y secó, para obtener el compuesto del título.

25 Etapa 4. Escisión de icatibant de la resina

Preparación de icatibant bruto

El fragmento peptídico unido a la resina seca **7** (0,045 mmol), como se obtuvo en la etapa 3, se suspendió en 2 ml de TFA/tioanisol/anisol/dodecanotiol (v/v/v/v 90/5/2/3) y se agitó durante 4 h. A continuación, la resina se filtró y se lavó con 1 ml de TFA. Las soluciones orgánicas se recogieron y se secaron al vacío. El residuo sólido se lavó con MTBE y se secó para obtener icatibant en bruto con un rendimiento global del 80 % y una pureza por HPLC del 83 %.

Etapa 4bis. Escisión de icatibant de la resina

35 Preparación de icatibant bruto

El fragmento peptídico unido a la resina seca **16**, como se obtuvo en la etapa 3bis, se suspendió en 4 ml de TFA/tioanisol/anisol/dodecanotiol (v/v/v/v 90/5/2/3) y se agitó durante 4 h. A continuación, la resina se filtró y se lavó con 2 ml de TFA. Las soluciones orgánicas se recogieron y se vertieron en 20 ml de DIPE. La suspensión obtenida se agitó durante 30 min a 5 °C, se filtró, la torta se lavó dos veces con DIPE (1 ml en cada lavado) y se secó para obtener icatibant bruto con un rendimiento general del 79 % y una pureza por HPLC del 85,4 %.

Etapa 5. Purificación de icatibant.

El icatibant bruto obtenido en la etapa 4, se disolvió en 1 ml de agua y se purificó usando una columna C18 de 250 × 21,2 mm usando una fase móvil de TFA al 0,1 %/acetonitrilo. Se recogieron las fracciones con pureza superior al 99 %. El intercambio de contraiones se llevó a cabo utilizando una columna C18 de 250 × 21,2 mm con una fase móvil que contenía acetato de amonio. Las fracciones con una pureza superior al 99 % se recogieron y liofilizaron para dar 43 mg de acetato de icatibant.

Pureza por HPLC: 99,7 %, rendimiento total 70 %.

Etapa 5bis. Purificación de icatibant.

El icatibant bruto obtenido en la etapa 4bis, se disolvió en 10 ml de agua y se purificó usando una columna C18 de 250 × 21,2 mm usando una fase móvil de TFA al 0,1 %/acetonitrilo. Se recogieron las fracciones con pureza superior al 99 %. El intercambio de contraiones se llevó a cabo utilizando una columna C18 de 250 × 21,2 mm con una fase móvil que contenía acetato de amonio. Las fracciones con una pureza superior al 99 % se recogieron y liofilizaron para dar 500 mg de acetato de icatibant.

Pureza por HPLC: 99,7 %, rendimiento total 67,2 %.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de icatibant, en donde el método comprende la etapa de acoplar un primer fragmento peptídico A unido a resina **caracterizado por** la secuencia Thi-Ser-(D)Tic-Oic-Arg, con un segundo fragmento peptídico B que comprende una glicina C-terminal, seguido opcionalmente de una o más etapas de elongación del péptido resultante para completar la secuencia de icatibant.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fragmento peptídico A unido a resina está protegido en el residuo Arg con Pbf y en el residuo Ser con tBu.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la resina es una resina Wang o una resina cloruro de 2-clorotritilo.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el fragmento A es H-Thi-Ser(tBu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang **(1)** o H-Thi-Ser(tBu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina cloruro de 2-cloro-tritilo **(14)**.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el fragmento B se selecciona del grupo que consiste en (D)Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-OH opcionalmente protegido, Arg-Pro-Hyp-Gly-OH, Pro-Hyp-Gly-OH y Hyp-Gly-OH.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el fragmento B se selecciona del grupo que consiste en
- Fmoc-(D)Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH **(2)**,
 Fmoc-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH **(3)**,
 Fmoc-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH **(4)**, y
 Fmoc-Hyp(tBu)-Gly-OH **(5)**.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde el fragmento B se prepara mediante síntesis de péptidos en fase sólida en una resina cloruro de 2-cloro-tritilo.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el acoplamiento se lleva a cabo en presencia de N,N'-diisopropilcarbodiimida y 2-ciano-2-hidroxiimino-acetato de etilo.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde
- el fragmento A es
- H-Thi-Ser(tBu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina Wang **(1)**, o
 H-Thi-Ser(tBu)-(D)Tic-Oic-Arg(Pbf)-resina CTC **(14)**,
- el fragmento B es Fmoc-(D)Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH **(2)**, y el acoplamiento se lleva a cabo en presencia de N,N'-diisopropilcarbodiimida y 2-ciano-2-hidroxiiminoacetato de etilo.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el método comprende además desprotección, preferentemente desprotección del Fmoc N-terminal y de los grupos laterales potencialmente protegidos, y escisión del icatibant de la resina.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el método comprende además la purificación de icatibant mediante cromatografía.
12. Un fragmento seleccionado del grupo que consiste en
- Fmoc-(D)Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH **(2)**, y
 Fmoc-Arg(Pbf)-Pro-Hyp(tBu)-Gly-OH **(3)**.
13. Uso del fragmento de acuerdo con la reivindicación 12 en la preparación de icatibant.