

JOSE LLOREDA CAMACHO & CO.**ABOGADOS**

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

**No. 08-126531-00007-0000**Fecha: 2012-09-14 16:34:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 91

Re: PI.-F.HOFFMANN-LA ROCHE AG.-Solicitud de Patente de Invención en
Fase Nacional PCT para "SÍNTESIS DE UN PÉPTIDO
INSULINOTRÓPICO".-Clase C07K 14/605.-Expediente número 08-
126.531.-

1. Me refiero al auto dictado por ese Despacho notificado por fijación en lista de 22 de Junio de 2012.

2. Con el fin de responder las objeciones expuestas por el Señor Examinador en su Concepto Técnico correspondiente al Oficio No. **10968**, en relación a la Claridad y la Novedad de la solicitud en estudio, me permito dirigir su atención a las siguientes modificaciones y argumentos técnicos por medio de los cuales se superan completamente dichas objeciones.

3. **CLARIDAD DE LA SOLICITUD.**

3.1. **CAPÍTULO DESCRIPTIVO.**

En conexión con la descripción de la solicitud, el Señor Examinador señala que sería recomendable introducir una breve descripción de la figura 1, para mejorar la claridad de la divulgación.

Tomando en consideración esta objeción, me permito manifestar que el solicitante ha modificado el texto de la descripción de manera que se incluye una referencia particular a dicha figura 1 y se explica de forma resumida lo que significan cada uno de los numerales e indicaciones allí contenidas.

Dicha descripción se introdujo en la página 18 actualmente presentada, luego de la frase *"La Fig. 1 es un diagrama esquemático de un esquema de síntesis de acuerdo con la presente invención."*

En este sentido me permito resaltar que en virtud de esta modificación el texto de la descripción de la solicitud es totalmente claro y conciso al revelar el método de síntesis que es objeto de la invención.

Así mismo, me permito señalar que debido a la introducción del mencionado párrafo se ha modificado la numeración de las páginas de la descripción, por lo que anexo al presente memorial me permito presentar nuevamente el texto completo de la descripción, que incluye el párrafo añadido que ahora se encuentra en la nueva página 15.

En vista de todo lo anterior, me permito señalar que dicha descripción de la solicitud, tal como ha sido modificada se enmarca completamente dentro de lo estipulado en el Artículo 28 de la Decisión Andina 486 de 2000.

3.2. **CAPÍTULO REIVINDICATORIO.**

De otra parte, con respecto al capítulo reivindicatorio actualmente en estudio el Señor Examinador señala que este carecería de claridad, toda vez que incluye términos imprecisos que no limitan adecuadamente el alcance de la invención.

Tomando en consideración estas objeciones me permito manifestar que es deseo del solicitante **modificar el capítulo reivindicatorio actualmente presentado**, de manera que este describa clara y concisamente el método de la invención, haciendo referencia a sus características técnicas esenciales.

Con respecto estas modificaciones me permito resaltar que no constituyen de ninguna manera una ampliación al alcance de la invención, tal como fue originalmente presentada, toda vez que tienen como única finalidad definir el método aquí desarrollado de acuerdo con las realizaciones preferidas reveladas dentro de la descripción de la solicitud, como se muestra a continuación:

- **Reivindicación 1.** Con el fin de clarificar los pasos que deben seguirse para la síntesis de un péptido insulínico tal como se describe en la presente solicitud, se ha eliminado de esta reivindicación la expresión "uno o mas" y se ha especificado que el método reclamado comprende todos los pasos **a) a f)** en concordancia con lo resaltado en la reivindicación 2 actualmente presentada. Así mismo, se han definido claramente los residuos **X⁸**, **X¹⁰**, **X¹⁷⁻¹⁸** y **X³⁵**, de acuerdo con las realizaciones preferidas reveladas a lo largo de la descripción de la solicitud. De esta forma, **X⁸** se ha definido como Aib, **X¹⁰** es glicina, **X¹⁷⁻¹⁸** es un dipéptido de pseudoprolina, y **X³⁵** es Aib. Sumado a lo anterior se ha eliminado la expresión "opcionalmente" de esta reivindicación.

- **Reivindicación 2.** Como consecuencia de las modificaciones realizadas sobre la reivindicación 1, esta reivindicación ha sido **eliminada** del capítulo reivindicatorio.

JOSE LLORED A CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

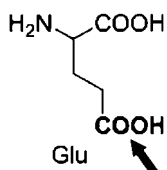
- **Reivindicación 3 (nueva reivindicación 2).** Se hecho congruente con las modificaciones realizadas en la reivindicación 1.
- **Reivindicaciones 4 a 7.** En concordancia con las modificaciones realizadas sobre la reivindicación 1, estas reivindicaciones han sido **eliminadas** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicación 8 (nueva reivindicación 3).** Se han modificado los significados de las variables X^8 y X^{10} en concordancia con la reivindicación 1.
- **Reivindicación 9.** De acuerdo con las modificaciones de la reivindicación 1, esta reivindicación ha sido **eliminada** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicación 10 (nueva reivindicación 4).** Se ha reemplazado el término "incluye" por "tiene" al referirse a la secuencia del péptido insulínico obtenido por el método de la invención, y se ha incluido la materia de la contenida en las reivindicaciones 11 y 12 actualmente presentadas.
- **Reivindicaciones 11 a 14.** En concordancia con las modificaciones realizadas en el resto del capítulo reivindicatorio, estas reivindicaciones **ya no hacen parte** del capítulo reivindicatorio modificado.
- **Reivindicación 15 (nueva reivindicación 5).** Se ha definido el residuo Φ como serina, R^2 como $-\text{CH}_2-$, R^1 como $\begin{array}{c} R^4 \\ | \\ R^3 - \text{C} - \\ | \end{array}$ y R^3 y R^4 como metilo.
- **Reivindicaciones 16 a 19.** Estas reivindicaciones han sido **eliminadas** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicación 20 (nueva reivindicación 6).** Se ha modificado de acuerdo con el resto del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicaciones 21 a 27.** Estas reivindicaciones han sido **eliminadas** del capítulo reivindicatorio.
- **Reivindicaciones 28 y 29 (nuevas reivindicaciones 7 y 8).** Se ha eliminado la expresión "homólogos de la misma" al referirse a las secuencias del péptido insulínico obtenido por el método de la invención; así mismo, se ha ajustado la dependencia a la nueva numeración.

De esta forma, el capítulo reivindicatorio modificado está constituido por **8 reivindicaciones**, la cuales describen de manera clara y concisa el método que es objeto de la presente invención, haciendo referencia a las realizaciones preferidas de acuerdo con las enseñanzas de la descripción.

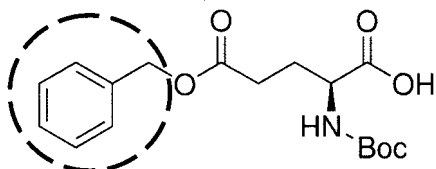
En conexión con lo anterior muy respetuosamente me permito llamar la atención a ese Despacho al hecho que para la persona versada en la materia sería totalmente clara la expresión "*tienen protección en su cadena lateral*", y esta no impediría que dicha persona estableciera sin lugar a dudas el alcance de la invención.

En este sentido es pertinente señalar que dentro del campo técnico de la invención es un hecho reconocido que en el proceso de síntesis de péptidos las cadenas laterales de los aminoácidos que cuentan con grupos funcionales reactivos podrían interferir en la síntesis con la subsecuente reducción del rendimiento y la presencia de especies indeseadas. Por lo tanto, es una práctica común en este tipo de síntesis emplear grupos protectores para bloquear los sitios reactivos de dichas cadenas laterales de manera que estas no se vean involucradas dentro de la reacción.

Así, por ejemplo, el ácido glutámico tiene un grupo carbonilo adicional en su cadena lateral:



Para la síntesis de péptidos que incluyan este aminoácido se requiere bloquear dicho grupo carboxílico adicional para evitar que este participe en las reacciones. Así, por ejemplo, la casa Sigma-Aldrich comercializa un ácido glutámico que posee en su grupo amino un grupo protector Boc (tert-Butiloxycarbonilo), el cual permite dirigir la síntesis de carboxi a amino, y en el grupo carbonilo de la cadena lateral está unido a un grupo protector bencilo¹:



De esta forma, **para la persona versada en la materia sería evidente que la protección de las cadenas laterales en la síntesis de péptidos es esencial para llevar a cabo dicha síntesis, y en la mayoría de los casos dicha protección es un paso que no es realizado por el experimentador en el proceso de síntesis porque comercialmente ya se distribuyen productos que incluyen los grupos protectores adecuados para cada aminoácido y cada estrategia de síntesis.**

Sumado a lo anterior, dentro del campo técnico de la invención es también ampliamente conocido los tipos de grupos protectores que son adecuados para cada aminoácido según sea la estrategia de síntesis que se esté empleando, tal como por

¹ <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/15418?lang=en®ion=CO>

ejemplo lo resume el documento: *Isidro-Llober, A. et al. "Amino Acid-Protecting Groups" Chem. Rev. 2009, 109, 2455-2504.*

Por lo tanto, **para la persona versada en la materia resultaría evidente que la protección de las cadenas laterales no es un paso que haga parte del método reclamado por la solicitud en estudio, y que los grupos protectores y la manera de introducir estos dentro de la molécula de aminoácido hacen parte del estado del arte. Consecuentemente, la referencia a que los residuos incluidos dentro del péptido sintetizado por el método de la invención poseen protección de sus cadenas laterales de ninguna manera resta claridad a la reclamación.**

A la luz de todos estos hechos, me permito reiterar que es evidente que el capítulo reivindicatorio modificado se refiere de forma clara al objeto de la presente invención, y permite sin lugar a dudas su identificación y comprensión por parte de la persona versada en la materia, a la cual va dirigida la presente solicitud.

Por lo tanto, me permito resaltar que dicho capítulo reivindicatorio supera completamente las objeciones presentadas a este respecto por el Señor Examinador y se ajusta totalmente a los requerimientos del Artículo 30 de la Decisión Andina 486 de 2000.

4. **NOVEDAD.**

Finalmente, el Señor Examinador indica que la materia reclamada por la solicitud en estudio sería anticipada por las enseñanzas del documento **WO0034331 (D1).**

En este sentido el Señor Examinador señala que el documento D1 contendría todas las características técnicas del paso d) del método de la invención toda vez que revela la síntesis en fase sólida del péptido (Aib^{8,35})GLP-1(7-36)-NH₂, lo que según su opinión implicaría la obtención de un fragmento que sería igual a la Sec No. 9 de la presente solicitud.

Sobre este particular me permito resaltar que existen diferencias significativas entre las enseñanzas de D1 y las de la presente invención, diferencias que son aún más evidentes a la luz de las modificaciones realizadas dentro del capítulo reivindicatorio, y que hacen que dicho documento no pueda anticipar el método reclamado por la solicitud en estudio.

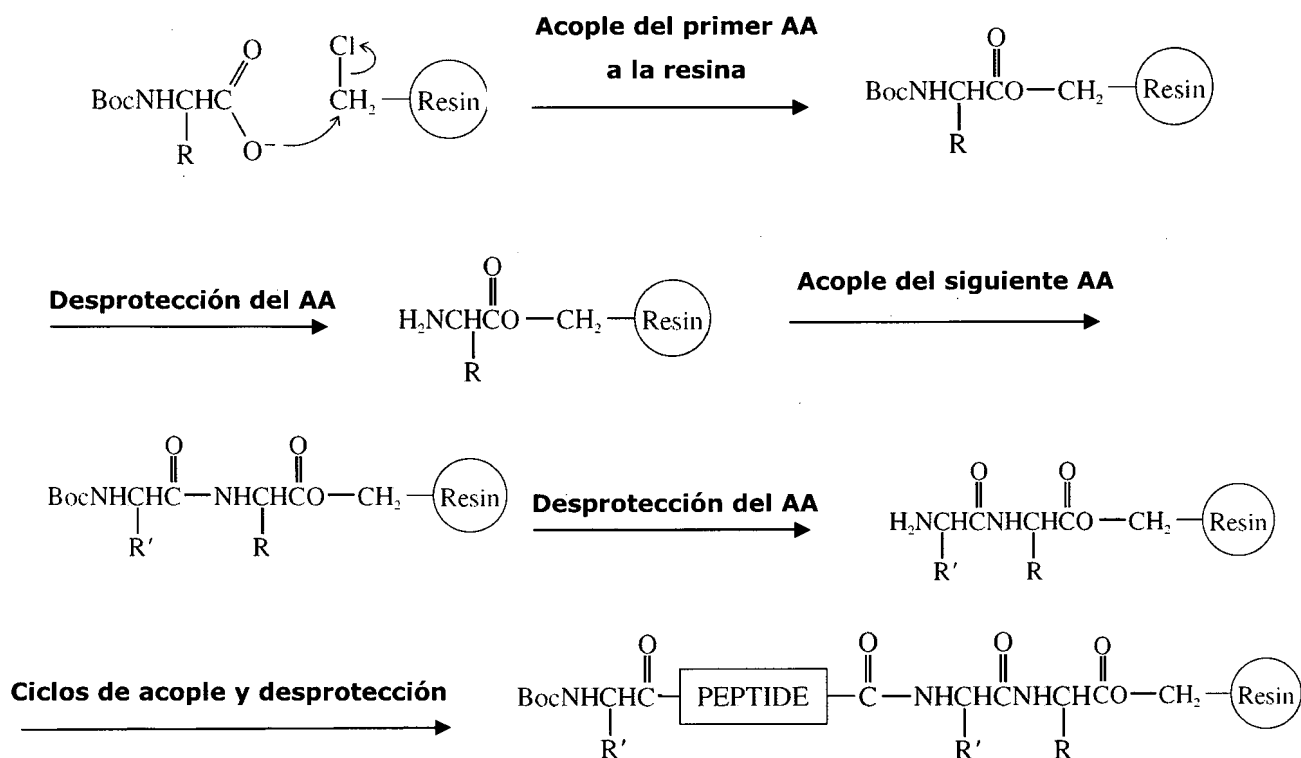
En primer lugar, me permito señalar que si bien el documento D1 se dirige a análogos peptídicos del péptido tipo glucagón 1, y métodos para su obtención, dicho documento claramente describe que los péptidos allí revelados son obtenidos **completamente por síntesis en fase sólida:**

"Los péptidos de esta invención pueden ser preparados por síntesis de péptidos en fase sólida estándar, ver Stewart, J.M. et al., *Solid Phase Synthesis* (Pierce Chemical Co., 2d ed. 1984)." (Página 13, líneas 6 y 7, D1).

Así mismo, el péptido señalado por el Señor Examinador, péptido (Aib^{8,35})GLP-1(7-36)-NH₂ se revela en el Ejemplo 1, de la página 18 de D1, donde claramente se indica que es sintetizado por síntesis en fase sólida usando estrategia Boc.

Contrario a esto, en la presente solicitud se realiza una síntesis convergente que mezcla síntesis en fase sólida de ciertos fragmentos peptídicos que luego se acoplan entre sí por medio de síntesis en solución, tal como se revela a lo largo de la descripción de la solicitud.

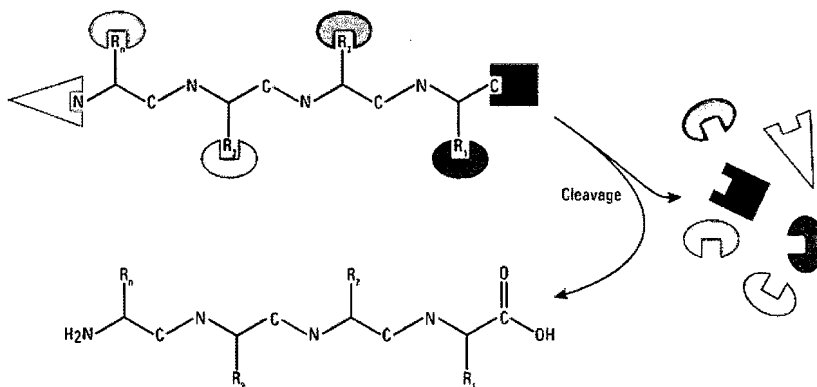
Así mismo, me permito resaltar que el mencionado Ejemplo 1 de D1 revela claramente la síntesis de un péptido de **30 residuos**, los cuales corresponden a los residuos 7 a 36 de la secuencia del GLP-1 reemplazando los residuos 8 y 35 por Aib, y la síntesis del péptido completo es llevada a cabo en fase sólida, lo que implica que el primer aminoácido del extremo carboxi está unido a una resina, y cada residuo va incorporándose sobre el anterior hasta completar los 30 residuos²:



En este sentido considero pertinente resaltar que para la persona versada en la materia sería claro que en la síntesis convencional en fase sólida no se obtienen fragmentos de péptidos que luego se ensamblan, sino que se soporta sobre la resina el primer aminoácido del extremo carboxi terminal y se van introduciendo uno a uno los demás aminoácidos hasta terminar el péptido de interés y es sólo hasta ese punto

² Carey, Francis A. Organic chemistry 4th ed. McGraw-Hill, 2000, página 1083.

cuando se desprende de la resina y se quitan los grupos protectores de las cadenas laterales³:



De esta forma, si se toma en consideración que el péptido que se está construyendo en el mencionado ejemplo 1 de D1 corresponde a los residuos 7 a 36 del GLP-1:



es evidente que el péptido correspondiente a la SEQ ID NO:9 de la presente invención es un fragmento en la región carboxi terminal del péptido, el cual de ninguna manera es sintetizado en D1 porque en dicho documento se resalta que se hace la síntesis completa de manera tradicional, lo que implica que hasta que no se haya introducido el residuo de histidina amino terminal no se habrá desprendido el péptido de la resina.

Finalmente, me permito reiterar que en virtud de las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio, este se refiere claramente a un método de síntesis que combina la síntesis en fase sólida con la síntesis en solución para proporcionar un péptido insulínico, siguiendo todos los pasos a) a f) de la reivindicación 1, lo cual de ninguna manera ocurre dentro de las enseñanzas de D1 que se refiere a síntesis convencional en fase sólida.

De esta forma, en la presente solicitud se realiza la síntesis de los intermediarios: HX8EX10, TFTSDVX17-18YLEG y QAAKEFWLWKX35, los cuales son acoplados para obtener el péptido final, mientras que en el documento D1 se sigue el proceso de síntesis del péptido completo unido a la resina hasta completar los 30 residuos.

Sumado a todo lo anterior, el documento D1 claramente señala que la estrategia empleada en la síntesis del péptido es la estrategia Boc, mientras que la

³ <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fidID=0A155590-C023-01E0-FB62-238BB9C7270F>

⁴ <http://www.abcam.com/GLP1-peptide-7-36-ab50245.html>

presente invención señala que el fragmento correspondiente a al SEQ ID NO:9 es preferiblemente sintetizado en fase sólida empleando la estrategia Fmoc (ver página 32 actualmente presentada y 28 del la descripción modificada), lo que se constituye en una diferencia adicional, sumado a la presencia dentro de la presente solicitud de protección de grupos laterales empleando pseudoprolina X¹⁷⁻¹⁸, lo cual de ninguna manera ocurre en D1.

Por lo tanto, en vista de lo discutido anteriormente, me permito resaltar que el mencionado documento D1 no revela un método que incluya todas y cada una de las características técnicas de aquel que es objeto de la presente solicitud, y de esta forma es evidente que la solicitud en estudio cumple a cabalidad con las exigencias de la Decisión Andina 486 de 2000.

5. **CONCLUSIÓN.**

En vista de las modificaciones realizadas sobre el capítulo descriptivo, me permito señalar que este es completamente claro el revelar el método de la presente invención.

Así mismo, me permito resaltar que las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio hacen que este sea totalmente claro y conciso al reclamar dicho método de la invención, refiriéndose a sus características técnicas esenciales, en concordancia con las realizaciones preferidas de la invención.

Finalmente, a la luz de este nuevo capítulo reivindicatorio, y en virtud de los argumentos discutidos con respecto al documento D1, se estableció de manera incontrovertible la Novedad de la solicitud en estudio frente al estado del arte más próximo.

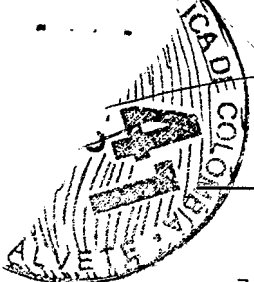
6. Anexo me permito presentar:

(i) Copia de las páginas **1 a 79** del texto de la descripción modificado como se expuso en el presente memorial;

(ii) Copia de las páginas **80 a 82** que corresponde al **capítulo reivindicatorio modificado**, discutido en el presente memorial, constituido por **8** reivindicaciones;

(iii) Copia de la portada y la página 2482 del documento *Isidro-Llober, A. et al. "Amino Acid-Protecting Groups" Chem. Rev. 2009, 109, 2455-2504*, referenciado en el texto; y

(iv) Copia del documento <http://www.abcam.com/GLP1-peptide-7-36-ab50245.html>.



JOSE LLORED CAMACHO & CO.

Calle 72 No. 5-83 Piso 5, Bogotá, D.C. Tel: 6069700 Fax 6069701

7. En vista de lo anterior, ruego a usted proceder a estudiar nuevamente la solicitud a la luz de las modificaciones y los argumentos presentados y conceder el privilegio de patente solicitado.

Señor Superintendente,


ALICIA LLORED RICAURTE

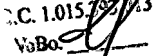
T. P. 53.215

Dirección para Notificaciones: notificacionespatentes@lloredacamacho.com

NOTARIA 41 DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.
DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA
REPÚBLICA DE COLOMBIA

El Notario 41 del círculo de Bogotá, da fe de que compareció personalmente: Alicia Lloreda Ricaurte
identificada (o) con: C.C. 39.690.713 y tarjeta
profesional de abogado No. 53215 del Consejo
Superior de la Judicatura, quien autentica la firma puesta por ella
(el) mismo en este escrito.
(Art. 84 C. P. C. Decreto. 2282/89 mod. 36)

Bogotá D.C. 14 SET. 2012
Alicia Lloreda Ricaurte
C.C. 39.690.713 de Usaquén

Jenny Nery
Morales Beltrán
C.C. 1.015.722.23
VaBo: 



Síntesis de un péptido insulínotropico

Resumen-objeto y finalidad de la invención

La presente invención está relacionada con la preparación de péptidos insulínotropicos que se sintetizan utilizando una aproximación en fase sólida y en solución ("híbrida"). En general, la aproximación incluye la síntesis de tres fragmentos de péptido intermediarios diferentes utilizando la química de fase sólida. Entonces se utiliza la química de fase en solución para añadir material de aminoácidos adicional a uno de los fragmentos. Entonces se acoplan los fragmentos en la fase en solución sólida. La utilización de una pseudoprolina en uno de los fragmentos síntesis en fase sólida de ese fragmento y también facilita el subsiguiente acoplamiento en fase en solución de este fragmento con otros fragmentos. La presente invención es muy útil para la formación de péptidos insulínotropicos como el GLP-1(7-36) y sus homólogos naturales y no naturales.

Síntesis de un péptido insulínico

La invención está relacionada con los métodos para la
5 preparación de péptidos insulínicos, particularmente del
péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y los homólogos del mis-
mo, utilizando procesos en fase sólida y en solución. La pre-
sente invención además está relacionada con los fragmentos de
péptido intermediarios que pueden utilizarse en estos métodos.

10 Se han descrito en la bibliografía muchos métodos para la
síntesis de péptidos (por ejemplo, véase la Patente Estadouni-
dense N° 6.015.881; Mergler *et al.* (1988) *Tetrahedron Letters*
29:4005-4008; Mergler *et al.* (1988) *Tetrahedron Letters*
29:4009-4012; Kamber *et al.* (eds), *Peptides, Chemistry and*
15 *Biology*, ESCOM, Leiden (1992) 525-526; Riniker *et al.* (1993)
Tetrahedron Letters 49:9307-9320; Lloyd-Williams *et al.* (1993)
Tetrahedron Letters 49:11065-11133; y Andersson *et al.* (2000)
Biopolymers 55:227-250. Estos diferentes métodos de síntesis
se distinguen por el estado físico de la fase en la que la
20 síntesis tiene lugar, es decir fase líquida o fase sólida.

En la síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS), se une
un aminoácido o grupo peptídico a un soporte sólido de resina.
Posteriormente, se unen sucesivos aminoácidos o grupos peptí-
dicos al péptido unido al soporte hasta que el material peptí-
25 dico de interés se ha formado. Entonces normalmente el péptido
unido al soporte se escinde del soporte y se somete a un pro-
cesado y/o purificación posterior. En algunos casos, la sínte-
sis en fase sólida proporciona un producto peptídico maduro;
en otros casos el péptido escindido del soporte (es decir, un
30 "fragmento de péptido intermediario") se utiliza en la prepa-
ración de un producto peptídico maduro más grande.

Los fragmentos de péptido intermediarios generados en los

procesos de fase sólida pueden acoplarse en un proceso sintético de fase sólida o de fase líquida (referido de ahora en adelante como "síntesis en fase en solución"). La síntesis en fase en solución puede ser particularmente útil en los casos

5 en los que la síntesis de un péptido maduro útil en fase sólida es imposible o no es práctica. Por ejemplo, en la síntesis en fase sólida, los péptidos largos, pueden adoptar eventualmente una conformación irregular mientras aún están unidos al soporte sólido, haciendo difícil la adición de aminoácidos o

10 material peptídico a la cadena creciente. A medida que la cadena de péptido se hace más larga en el soporte de resina, la eficiencia de los pasos del proceso, como el acoplamiento y la desprotección, pueden estar comprometidos. Esto, a su vez, puede resultar en tiempos de procesado más largos para compensar estos problemas, además del incremento de las pérdidas de

15 materiales de partida, como los aminoácidos activables, co-reactivos y disolventes. Estos problemas pueden aumentar a medida que la longitud del péptido aumenta.

Por lo tanto, es bastante raro encontrar péptidos maduros

20 mayores de 30 aminoácidos de longitud sintetizados en un único fragmento utilizando solamente un procedimiento de fase sólida. En lugar de esto, pueden sintetizarse fragmentos individuales de forma separada en fase sólida, y después acoplarse en fase sólida y/o en solución para conseguir el producto peptídico deseado. Esta aproximación requiere una cuidadosa selección de los fragmentos candidatos. Aunque algunos principios generales pueden servir de guía en la selección de fragmentos, a menudo son necesarias pruebas empíricas de los fragmentos candidatos. Estrategias de fragmentos que funcionan en

25 un contexto pueden no funcionar en otros. Aún cuando se encuentran fragmentos candidatos razonables, todavía pueden ser necesarias innovaciones del proceso para que la estrategia de

30

síntesis para que funcione bajo condiciones razonables a nivel comercial. Por lo tanto, la síntesis de péptido utilizando esquemas híbridos es a menudo un reto, y en muchos casos es difícil predecir los problemas inherentes en un esquema de síntesis hasta que se realiza la síntesis real.

En el acoplamiento en fase en solución, se acoplan dos fragmentos de péptido intermediarios, o un fragmento intermediario de péptido y un aminoácido reactivo, en un solvente apropiado, normalmente en presencia de reactivos adicionales que promueven la eficiencia y la calidad de la reacción de acoplamiento. Los fragmentos de péptido intermediarios están dispuestos de forma reactiva de forma que el extremo N-terminal de un fragmento se acopla al extremo C-terminal del otro fragmento o viceversa. Además, los grupos protectores de cadenas laterales, que están presentes durante la síntesis en fase sólida, comúnmente se retienen en los fragmentos durante la fase de acoplamiento en solución para asegurar la reactividad específica de los extremos terminales de los fragmentos. Estos grupos protectores de cadenas laterales normalmente no se eliminan hasta que se ha formado un péptido maduro.

Pequeñas mejoras en uno o más pasos en el esquema sintético general pueden proporcionar una mejora significativa en la preparación del péptido maduro. Tales mejoras pueden resultar en un gran ahorro general de tiempo y reactivos, y también puede mejorar significativamente la pureza y el rendimiento del producto final.

Mientras el discurso de la importancia de las mejoras en la síntesis híbrida es aplicable a cualquier tipo de péptido producido utilizando estos procedimientos, esto es de una particular importancia en el contexto de los péptidos que son terapéuticamente útiles y que están elaborados a una escala para uso médico comercial. La síntesis de fármacos biomoleculares

mayores, como los péptidos terapéuticos, puede ser muy cara. Debido al coste de los reactivos, el tiempo de síntesis, muchos pasos de síntesis, además de otros factores, pequeñas mejoras en el proceso sintético de estos fármacos biomoleculares grandes pueden tener un impacto significativo en sí es económicamente factible producir este medicamento. Tales mejoras son necesarias debido a estos altos costes de producción para medicamentos biomoleculares grandes como se sostiene en el hecho de que, en muchos casos, existen pocas alternativas terapéuticas adecuadas, si las hay, para estos tipos de fármacos biomoleculares grandes.

Esto está claro en el caso del péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y sus homólogos. Estos péptidos se han implicado como posibles agentes terapéuticos en el tratamiento de diabetes mellitus no insulino-dependiente de tipo 2 así como en los trastornos metabólicos relacionados, como la obesidad. Gutniak, M.K. et al., Diabetes Care 1994:17:1039-44.

López et al. han determinado que el GLP-1 nativo tiene una longitud de 37 residuos aminoacídicos. López L. C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80:5485-5489 (1983). Esta determinación se confirmó con el trabajo de Uttenthal, L. O. et al., J. Clin. Endocrinol. Metabol., 61:472-479 (1985). El GLP-1 nativo puede representarse mediante la anotación GLP-1(1-37). Esta anotación indica que el péptido posee todos los aminoácidos desde el 1 (N-terminal) hasta el 37 (C-terminal). El GLP-1 nativo posee la secuencia de aminoácidos de acuerdo con el Id. de Sec. N° 1:

HDEFERHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG

Se ha descrito que el GLP-1 nativo (1-37) es generalmente incapaz de mediar en la biosíntesis de insulina, pero fragmentos biológicamente importantes de este péptido poseen propiedades insulínótropas. Por ejemplo, el péptido GLP-1(7-37)

nativo de 31 aminoácidos de longitud de acuerdo con el Id. de Sec. N° 2:

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRG

es insulínotropico y posee los aminoácidos desde la posición 7 (N terminal) a la 37 (C terminal) del GLP-1 nativo. EL GLP-1 (7-37) posee una glicina terminal. Cuando esta glicina está ausente, el péptido resultante es aún insulínotrópicamente activo y se denomina GLP-1(7-36) de acuerdo con el Id. de Sec. N° 3:

10 HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

El GLP-1(7-36) a menudo se encuentra con la arginina C-terminal en su forma amidada, y esta forma puede representarse mediante la anotación GLP-1(7-36)-NH₂.

El GLP-1(1-37) generalmente se convierte *in vivo* en un homólogo insulínotrópicamente activo del mismo. Por ejemplo, el GLP-1(1-37) se convierte naturalmente en el GLP-1(7-37) *in vivo*. Este péptido, a su vez, puede también sufrir un procesamiento adicional mediante la eliminación proteolítica de la glicina C-terminal para producir el GLP-1(7-36), que a menudo existe en la forma amidada GLP-1(7-36)-NH₂. De acuerdo con lo anterior, los tratamientos terapéuticos pueden involucrar la administración del GLP-1(1-37) o un homólogo del mismo, esperando que se forme un derivado insulínotrópicamente activo del mismo *in vivo*. Más comúnmente, no obstante, los tratamientos terapéuticos en investigación involucran la administración de los fragmentos insulínotrópicamente activos de GLP-1 en sí mismos.

De acuerdo con la US 6.887.849, la actividad insulínotrópica de GLP-1(7-37), GLP-1(7-36) y GLP-1(7-36)-NH₂ parece ser específica para las células pancreáticas beta, en las que estos péptidos parecen inducir la biosíntesis de insulina. Esto hace útiles a estos péptidos, y a sus homólogos farmacéutica-

mente aceptables, en el estudio de la patogénesis de la aparición de la diabetes mellitus en adultos, una enfermedad caracterizada por la hiperglicemia en la que la dinámica de secreción de insulina es anormal. Además, estos péptidos similares al glucagón serán útiles en la terapia y el tratamiento de esta enfermedad, y en la terapia y tratamiento de la hiperglicemia. De acuerdo con la PE 1137667B1, estos péptidos u sus homólogos farmacéuticamente aceptables también pueden ser útiles para el tratamiento de otros tipos de diabetes, obesidad, glucagonomas, trastornos de secreción de las vías respiratorias, trastornos metabólicos, artritis, osteoporosis, enfermedad del sistema nervioso central, restenosis, enfermedad neurodegenerativa, fallo renal, fallo cardíaco congestivo, síndrome nefrótico, cirrosis, edema pulmonar, hipertensión y/o trastornos en los que se desea una reducción de la ingesta de comida.

El GLP-1 nativo(1-37) y sus homólogos insulínótrópicamente activos nativos de acuerdo con los Id. de Sec. N° 1 a 3 son metabólicamente inestables y poseen una vida media en plasma de sólo 1 a 2 minutos *in vivo*. El GLP-1 administrado de forma externa también se degrada de forma rápida. Esta inestabilidad metabólica ha limitado el potencial terapéutico del GLP-1 nativo y de los fragmentos nativos del mismo.

Se han desarrollado homólogos sintéticos de los péptidos de GLP-1 con una estabilidad mejorada. Por ejemplo, el péptido de acuerdo con el Id. de Sec. N° 4 se describe en la PE 1137667 B1:

HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKAibR

Este péptido es similar al GLP-1 nativo (7-36), con la excepción que el residuo aquiral del ácido alfa-aminoisobutírico (mostrado de forma esquemática con la abreviatura Aib) aparece en las posiciones 8 y 35 en lugar de los

aminoácidos nativos correspondientes en estas posiciones. El ácido alfa-aminoisobutírico aquiral también es conocido como metilalanina. Este péptido puede denominarse mediante la fórmula (Aib^{8,35})GLP-1(7-36)-NH₂.

5 La EP 1137667 expone que el péptido de acuerdo con el Id. de Sec. N° 4 y sus homólogos pueden obtenerse como un único fragmento utilizando técnicas de fase sólida. La aproximación de síntesis de fragmentos únicos sugerida en la EP 1137667 es problemática. Uno de los problemas es que esta aproximación
10 puede llevar a altos niveles de epimerización en el acoplamiento final de aminoácidos, por ejemplo, histidina en el caso de (Aib^{8,35})GLP-1(7-36). Además las impurezas pueden ser difíciles de eliminar durante la purificación cromatográfica y el rendimiento puede tender a ser demasiado bajo. En consecuencia,
15 son necesarias estrategias mejoradas para la síntesis de péptidos de acuerdo con el Id. de Sec. N° 4 para poder fabricar este péptido y sus homólogos con rendimientos, purezas y cantidades comercialmente aceptables.

Además de estas preocupaciones, los problemas relacionados con la recuperación del producto y la pureza del producto
20 para la producción a gran escala de péptidos, así como la manipulación de reactivos, almacenamiento y deshecho, pueden influir enormemente en que un esquema de síntesis del péptido sea factible. Por lo tanto, existe la necesidad continua de
25 procesos de síntesis de péptidos capaces de producir eficientemente los materiales peptídicos de interés comercial en cantidades a gran escala con rendimientos mejorados.

La presente invención está relacionada con la preparación de péptidos insulíntrópicos que están sintetizados utilizando
30 una aproximación de fase sólida y en solución ("híbrida"). Generalmente, la aproximación incluye la síntesis de tres fragmentos de péptido intermediarios diferentes utilizando la quí-

mica de fase sólida. La química de fase en solución se utiliza entonces para añadir material de aminoácidos adicional a uno de los fragmentos. Los fragmentos se acoplan entonces en fase sólida y en solución. El uso de una pseudoprolina en uno de los fragmentos facilita la síntesis en fase sólida de este fragmento y también facilita la posterior fase de acoplamiento en solución de este fragmento a otros fragmentos. La presente invención es muy útil para obtener péptidos insulínotropicos como el GLP-1, GLP-1(7-36) y los homólogos naturales y no naturales de estos, particularmente el GLP-1(7-36) y sus homólogos naturales y no naturales.

En un aspecto, la presente invención está relacionada con un método para realizar un péptido insulínotropico, que comprende los pasos de:

15 a) la preparación de un fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos HX^8EX^{10} (Id. de Sec. N° 6) en la que X^8 y X^{10} son ambos residuos de un aminoácido aquiral, o dicho fragmento es un homólogo del mismo que incluye los residuos X^8 y X^{10} , tanto H como E, X^8 y X^{10} incluyen de forma opcio-
20 nal protección de la cadena lateral; y

b) la incorporación del fragmento peptídico en un péptido insulínotropico.

Preferiblemente, X^8 es un residuo de aminoácido que corresponde a metilalanina (Aib). X^{10} es preferiblemente un re-
25 siduo de aminoácido que corresponde a glicina.

En otro aspecto, la invención está relacionada con un fragmento peptídico que posee la secuencia de aminoácidos HX^8EX^{10} (Id. de Sec. N° 6), en la que X^8 y X^{10} son ambos residuos de un aminoácido aquiral, y tanto H como E, X^8 y X^{10} in-
30 cluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral. Preferiblemente, X^8 es un residuo de aminoácido que corresponde a Aib y X^{10} es un residuo de aminoácido que corresponde a glici-

na.

En otro aspecto, la presente invención está relacionada con un método para elaborar un péptido insulínico, que comprende los pasos de:

- 5 a) la preparación de un fragmento peptídico o un homólogo del mismo que incluye la secuencia de aminoácidos TFTSDVX¹⁷⁻¹⁸YLEG (Id. de Sec. N° 8) en la que el residuo denotado mediante el símbolo X¹⁷⁻¹⁸ es un residuo dipeptídico de pseudoprolina; y
- 10 b) la incorporación del fragmento peptídico en un péptido insulínico.

En otro aspecto, la presente invención está relacionada con un péptido o un homólogo del mismo que incluye la secuencia de aminoácidos TFTSDVX¹⁷⁻¹⁸YLEG (Id. de Sec. N° 8) en la
15 que el residuo denotado mediante el símbolo X¹⁷⁻¹⁸ es un residuo dipeptídico de pseudoprolina; y dichos residuos de aminoácidos incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral.

En otro aspecto, la presente invención está relacionada
20 con un método para elaborar un péptido insulínico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el paso de:

- a) el acoplamiento del primer fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos HX⁸EX¹⁰ (Id. de Sec. N° 6), en la que X⁸ y X¹⁰ son ambos residuos de un aminoácido aquiral,
25 tanto H como E incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral, con el segundo fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos TFTSDVX¹⁷⁻¹⁸YLEG (Id. de Sec. N° 8), en la que el residuo denotado mediante el símbolo X¹⁷⁻¹⁸ es un residuo dipeptídico de pseudoprolina, y dichos residuos de
30 aminoácidos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral, para proporcionar un tercer fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos

HX⁸EX¹⁰TFTSDVX¹⁷⁻¹⁸YLEG (Id. de Sec. N° 11), y dichos residuos de aminoácidos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral; y

b) la incorporación del fragmento peptídico en un péptido
5 insulínico.

En otro aspecto, la presente invención está relacionada con un método para elaborar un péptido insulínico, que comprende los pasos de:

a) la preparación de un fragmento peptídico o un homólogo
10 del mismo que incluye la secuencia de aminoácidos QAAKEFIAWLVKX³⁵ (Id. de Sec. N° 9), en la que X³⁵ es un residuo de un aminoácido aquiral, y dichos residuos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral; y

b) la incorporación del fragmento peptídico en un péptido
15 insulínico.

En otro aspecto, la presente invención está relacionada con un método para elaborar un péptido insulínico, que comprende uno o más pasos de:

a) proporcionar un primer fragmento peptídico que incluye
20 la secuencia de aminoácidos HX⁸EX¹⁰ (Id. de Sec. N° 6), en los que X⁸ y X¹⁰ son ambos residuos de un aminoácido aquiral, y tanto H como E incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

b) proporcionar un segundo fragmento peptídico que incluye
25 la secuencia de aminoácidos TFTSDVX¹⁷⁻¹⁸YLEG (Id. de Sec. N° 8) en la que el residuo denotado mediante el símbolo X¹⁷⁻¹⁸ es un residuo dipeptídico de pseudoprolina, y dichos residuos de aminoácidos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

c) el acoplamiento del primer fragmento al segundo fragmento para proporcionar un tercer fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos HX⁸EX¹⁰TFTSDVX¹⁷⁻¹⁸YLEG (Id.
30

de Sec. N° 11), y dichos residuos de aminoácidos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

d) proporcionar un cuarto fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos QAAKEFIAWLVKX³⁵ (Id. de Sec. N° 9), en la que X³⁵ es un residuo de un aminoácido aquiral, y dichos residuos de aminoácidos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

e) el acoplamiento del cuarto fragmento peptídico a una arginina para proporcionar un quinto fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos QAAKEFIAWLVKX³⁵R (Id. de Sec. N° 12), y dichos residuos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral; y

f) el acoplamiento del quinto fragmento al tercer fragmento para proporcionar un péptido insulínico que incluye la secuencia de aminoácidos HX⁸EX¹⁰TFTSDVX¹⁷⁻¹⁸YLEGQAAKEFIAWLVKX³⁵R (Id. de Sec. N° 13), y dichos residuos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral.

Preferiblemente, la presente invención está relacionada con el método para elaborar un péptido insulínico, que comprende los pasos de:

a) proporcionar un primer fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos HX⁸EX¹⁰ (Id. de Sec. N° 6), en los que X⁸ y X¹⁰ son ambos residuos de un aminoácido aquiral, y tanto H como E incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

b) proporcionar un segundo fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos TFTSDVX¹⁷⁻¹⁸YLEG (Id. de Sec. N° 8) en la que el residuo denotado mediante el símbolo X¹⁷⁻¹⁸ es un residuo dipeptídico de pseudoprolina, y dichos residuos de aminoácidos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

c) el acoplamiento del primer fragmento al segundo fragmento para proporcionar un tercer fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos $HX^8EX^{10}TFTSDVX^{17-18}YLEG$ (Id. de Sec. N° 11), y dichos residuos de aminoácidos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

d) proporcionar un cuarto fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos $QAAKEFIAWLKX^{35}$ (Id. de Sec. N° 9), en la que X^{35} es un residuo de un aminoácido aquiral, y dichos residuos de aminoácidos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

e) el acoplamiento del cuarto fragmento peptídico a arginina para proporcionar un quinto fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos $QAAKEFIAWLKX^{35}R$ (Id. de Sec. N° 12), y dichos residuos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral; y

f) el acoplamiento del quinto fragmento al tercer fragmento para proporcionar un péptido insulínico que incluye la secuencia de aminoácidos $HX^8EX^{10}TFTSDVX^{17-18}YLEGQAAKEFIAWLKX^{35}R$ (Id. de Sec. N° 13), y dichos residuos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral.

En otro aspecto, la invención está relacionada con el método tal y como se ha descrito hasta aquí, que comprende otro paso de:

g) eliminación de los grupos protectores de la cadena lateral para proporcionar un péptido insulínico que incluye la secuencia de aminoácidos $HX^8EX^{10}TFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLKX^{35}R$ (Id. de Sec. N° 5) y homólogos de la misma, en que cada uno de los símbolos X en las posiciones 8, 10 y 35 independientemente denotan un residuo de aminoácido aquiral, estéricamente obstaculizado de forma opcional.

La eliminación de los grupos protectores de la cadena la-

teral se lleva a cabo preferiblemente empleando una de solución de desprotección que comprende al menos un reactivo acidolítico y al menos un neutralizador de cationes. Los reactivos acidolíticos para la desprotección global están seleccionados preferiblemente de entre el grupo que consiste en ácido trifluoroacético (TFA), HCl, ácidos de Lewis como BF_3 , Et_2O o Me_3SiBr , ácido fluorhídrico líquido (HF), bromuro de hidrógeno (HBr), ácido trifluorometano-sulfónico y combinaciones de los mismos. Los neutralizadores de cationes adecuados se seleccionan preferiblemente de entre ditioneitol (DTT), anisol, p-cresol, etanoditionol y dimetil sulfuro. La solución de desprotección puede también incluir agua.

En otro aspecto, la presente invención está relacionada con un método para elaborar un péptido insulínico, que comprende los pasos de:

a) proporcionar un primer fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos $\text{HX}^8\text{EX}^{10}$ (Id. de Sec. N° 6), en la que X^8 y X^{10} son ambos residuos de un aminoácido aquiral, y tanto H como E, X^8 y X^{10} incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

b) proporcionar un segundo fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos $\text{TFTSDVX}^{17-18}\text{YLEG}$ (Id. de Sec. N° 8) en la que el residuo denotado mediante el símbolo X^{17-18} es un residuo dipeptídico de pseudoprolina, y dichos residuos de aminoácidos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

c) el acoplamiento del primer fragmento al segundo fragmento para proporcionar un tercer fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos $\text{HX}^8\text{EX}^{10}\text{TFTSDVX}^{17-18}\text{YLEG}$ (Id. de Sec. N° 11), y dichos residuos de aminoácidos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

d) proporcionar un cuarto fragmento peptídico que incluye

la secuencia de aminoácidos QAAKEFIAWLVKX³⁵ (Id. de Sec. N° 9), en la que X³⁵ es un residuo de un aminoácido aquiral, y dichos residuos de aminoácidos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

5 e) el acoplamiento del cuarto fragmento peptídico a arginina para proporcionar un quinto fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos QAAKEFIAWLVKX³⁵R (Id. de Sec. N° 12), y dichos residuos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral; y

10 f) el acoplamiento del quinto fragmento al tercer fragmento para proporcionar un péptido insulínico con la fórmula (Id. de Sec. N° 5) HX⁸EX¹⁰TFTSDVSSYLEGQAAKE-FIAWLVKX³⁵R y homólogos de la misma, en las que los símbolos X en las posiciones 8, 10 y 35 denotan independientemente un residuo de
15 aminoácido aquiral, estéricamente obstaculizado de forma opcional; y en la que uno o más de los residuos de aminoácidos incluyen de forma opcional la protección de la cadena lateral.

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de un esquema de síntesis de acuerdo con la presente invención que comprende
20 las etapas de fase sólida y fase en solución. Esta figura resume el proceso de reacción comenzando desde los fragmentos peptídicos 12 y 14 que son preparados en fase sólida y luego acoplados en la fase sólida para obtener un fragmento peptídico 18, el cual se acopla entonces en la fase solución con un
25 fragmento peptídico 20 para obtener el producto peptídico deseado 11. El fragmento peptídico 20 se obtiene en solución a partir de un fragmento peptídico 16 el cual se ha preparado en fase sólida.

El fragmento 12 es un fragmento peptídico que incluye la
30 secuencia de aminoácidos HX⁸EX¹⁰ (Id. de Sec. N° 6). El fragmento 14 es un fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos T¹¹FTSD¹⁵VX¹⁷⁻¹⁸YL²⁰EG (Id. de Sec. N° 8). El frag-

mento 16 es un fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos $Q^{23}AA^{25}KEFIA^{30}WLVKX^{35}$ (Id. de Sec. N° 9). El fragmento intermediario 18 es un fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos $H^7X^8EX^{10}TFTSD^{15}-VX^{17-18}YL^{20}EG$ (Id. de Sec. N° 11). El fragmento peptídico intermediario 20 es un péptido que incluye la secuencia de aminoácidos $Q^{23}AA^{25}KEFIA^{30}WLVKX^{35}R$ (Id. de Sec. N° 12). El producto 11 es el péptido protegido deseado $H^7X^8EX^{10}TFTS-D^{15}VX^{17-18}YL^{20}EGQAA^{25}KEFIA^{30}WLVKX^{35}R$ (Id. de Sec. N° 13) en el que las Ser-Ser de las posiciones 17 y 18 están aún en la forma de pseudoprolina protegida. El diagrama se describe en más detalle a continuación.

Las realizaciones de la presente invención descritas más adelante no pretenden ser exhaustivas o limitar la invención a las formas precisas descritas en la siguiente descripción detallada. En lugar de ello, las realizaciones se han escogido y se describen para que otros expertos en la materia puedan apreciar y entender los principios y prácticas de la presente invención.

La presente invención está dirigida a los métodos sintéticos para elaborar péptidos como el péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y sus homólogos naturales y no naturales insulino-trópicamente activos, utilizando técnicas en fase sólida y/o en solución. Las moléculas peptídicas de la invención pueden estar protegidas, no protegidas o parcialmente protegidas. La protección puede incluir protección del extremo N-terminal, protección de la cadena lateral y/o protección de C-terminal. Mientras la invención está generalmente dirigida a la síntesis de estos péptidos similares al glucagón, sus homólogos, fragmentos y sus homólogos y productos de fusión y sus homólogos, los presentes ejemplos de la invención también pueden aplicarse a la síntesis de otros péptidos, particularmente a aquellos

que se sintetizan utilizando una combinación de aproximaciones en fase sólida y en solución. La invención se puede aplicar también a la síntesis de fragmentos de péptido intermediarios asociados con impurezas, particularmente impurezas de piroglutamato. Las moléculas útiles de GLP-1 preferidas en la práctica de la presente invención incluyen al GLP-1(7-36) natural y no natural, y los homólogos del mismo.

Tal y como se utiliza aquí, el término "que incluye la secuencia de aminoácidos" preferiblemente significa "que posee la secuencia de aminoácidos".

Tal y como se utiliza aquí, un "homólogo" se refiere a los análogos naturales y no naturales, derivados, compuestos de fusión, sales o similares de un péptido. Tal y como se utiliza aquí, un análogo de péptido generalmente se refiere a un péptido que posee una secuencia modificada de aminoácidos con una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones, inversiones y/o adiciones relacionadas con otro péptido o péptido homólogo. Las sustituciones pueden involucrar uno o más aminoácidos naturales o no naturales. Las sustituciones pueden ser preferiblemente conservativas o altamente conservativas. Una sustitución conservativa se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro que posee generalmente la misma carga electrónica neta y generalmente el mismo tamaño y forma. Por ejemplo, los aminoácidos con cadenas laterales alifáticas o alifáticas sustituidas poseen aproximadamente el mismo tamaño cuando el número total de carbonos y heteroátomos en sus cadenas laterales difieren en menos de cuatro. Poseen aproximadamente la misma forma cuando el número de ramas en sus cadenas laterales difieren en no más de una o dos. Los aminoácidos con grupos fenilo o grupos fenilo sustituidos en su cadena lateral se considera que tienen el mismo tamaño y forma. A continuación se listan cinco grupos de aminoácidos. Sustituyendo un

aminoácido en un compuesto con otro aminoácido del mismo grupo generalmente resulta en una sustitución conservativa.

Grupo I: glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina, cisteína, metionina y aminoácidos que no
5 existen de forma natural con cadenas laterales alifáticas C₁-C₄ o alifáticas C₁-C₄ sustituidas por hidroxilo (cadenas sencillas o mono-ramificadas).

Grupo II: ácido glutámico, ácido aspártico y aminoácidos que no existen de forma natural con cadenas laterales alifáticas C₁-C₄ sustituidas con ácido carboxílico (no ramificadas o
10 un punto de ramificación).

Grupo III: lisina, ornitina, arginina y aminoácidos que no existen de forma natural con cadenas laterales alifáticas C₁-C₄ sustituidas con amina o guanidina (no ramificadas o un
15 punto de ramificación).

Grupo IV: glutamina, asparagina y aminoácidos que no existen de forma natural con cadenas laterales alifáticas C₁-C₄ sustituidas con amida (no ramificadas o un punto de ramificación).

Grupo V: fenilalanina, fenilglicina, tirosina y triptófano.
20 no.

Tal y como se utiliza aquí, el término "homólogo" más preferiblemente se refiere a las sales de los péptidos o a los derivados de los mismos que están amidados en el extremo C-
25 terminal.

Una "sustitución altamente conservativa" es la sustitución de un aminoácido con otro aminoácido que posee el mismo grupo funcional en la cadena lateral y casi el mismo tamaño y forma. Los aminoácidos con cadenas laterales alifáticas o alifáticas sustituidas poseen casi el mismo tamaño cuando el número total de carbonos y heteroátomos en sus cadenas laterales difieren en menos de dos. Poseen casi la misma forma cuando
30

poseen el mismo número de ramificaciones en sus cadenas laterales. Ejemplos de sustituciones altamente conservativas incluyen valina por leucina, treonina por serina, ácido aspártico por ácido glutámico y fenilglicina por fenilalanina.

5 Un "derivado peptídico" generalmente se refiere a un péptido, a un análogo de péptido u otro homólogo de péptido que posee una modificación química de uno o más de sus grupos laterales, átomos de carbono alfa, grupo amino terminal y/o grupo ácido carboxilo terminal. A modo de ejemplo, una modificación química incluye, pero no se limita a, la adición de por-
10 ciones químicas, creación de nuevos enlaces y/o eliminación de porciones químicas. Las modificaciones en los grupos laterales de los aminoácidos incluyen, sin limitación, la acilación de los grupos e-amino de la lisina, N-alquilación de arginina,
15 histidina o lisina, alquilación de los grupos ácido carboxílico del glutámico o aspártico y desamidación de glutamina o asparagina. Las modificaciones del grupo amino terminal incluyen, sin limitación, modificaciones de des-aminación, N-alquilo inferior, N-dialquilo inferior y N-acilo (por ejemplo,
20 -CO- alquilo inferior). Las modificaciones del grupo carboxi terminal incluyen, sin limitación, las modificaciones amida, alquilamida inferior, dialquilamida y alquiléster inferior. Los derivados preferidos son aquellos derivados que están amidados en el grupo carboxi terminal, por ejemplo, la amida, al-
25 quilamida inferior o dialquilamida del péptido. Así, los péptidos parcial o totalmente protegidos constituyen derivados de los péptidos.

En la práctica de la presente invención, un compuesto posee una actividad "insulinotrópica" si es capaz de estimular,
30 provocar la estimulación o ayuda a provocar la estimulación de la síntesis o expresión de la hormona insulina. En las formas de práctica preferidas, la actividad insulinotrópica puede de-

mostrarse de acuerdo con los ensayos descritos en las Pat. Estadounidenses N° 6.887.849 y 6.703.365.

En las realizaciones preferidas, la presente invención proporciona metodologías para sintetizar péptidos sintéticos
 5 (X⁸, X¹⁰, X³⁵) GLP-1(7-36) que poseen la siguiente fórmula (Id. de Sec. N° 5):



y homólogos de la misma, en la que cada uno de los símbolos X en las posiciones 8, 10 y 35 independientemente denotan
 10 un aminoácido aquiral, obstaculizado estéricamente de forma opcional. Cualquiera de los residuos X⁸, X¹⁰ y/o X³⁵ pueden incluir opcionalmente grupos protectores de cadenas laterales. Los péptidos de acuerdo con esta fórmula difieren del GLP-1(7-36) nativo en que al menos los residuos aquirales, obstaculi-
 15 zados estéricamente de forma opcional X⁸ y X³⁵ están sustituidos por los residuos de aminoácidos nativos en las posiciones 8 y 35. El residuo X¹⁰ puede derivarse de la glicina aquiral nativa u otro aminoácido aquiral. El uso de los aminoácidos aquirales X⁸, X¹⁰, y X³⁵ no sólo ayuda a estabilizar el péptido
 20 resultante, sino que también se acaba de descubrir que el uso de estos aminoácidos como bloques de construcción facilita la ruta de síntesis sencilla de la presente invención que se muestra en la Fig. 1 y se describe en detalle más adelante.

Una realización particularmente preferida de un péptido
 25 (X⁸, X¹⁰, X³⁵) GLP-1 (7-36) que puede sintetizarse de acuerdo con los principios de la presente invención incluye un péptido de acuerdo con la fórmula (Id. de Sec. N° 4):



y homólogos de la misma, que preferiblemente están amida-
 30 dos en C-terminal. Este péptido utiliza el residuo aquiral del ácido alfa-aminoisobutírico (o metilalanina, mostrado de forma esquemática mediante la abreviatura Aib) como en X⁸ y X³⁵, que

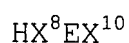
preferiblemente poseen una amida en C-terminal, o utiliza un residuo de G nativa en la posición 10, y puede designarse mediante la fórmula (Aib^{8,35}) GLP-1(7-36)-NH₂. Esta notación indica que un residuo de aminoácido que corresponde al aminoácido "Aib" aparece en las posiciones 8 y 35 en lugar de la alanina nativa. El ácido alfa-aminoisobutírico aquiral, también se conoce como metilalanina. El péptido de acuerdo con el Id. de Sec. N° 4 se describe en la PE 1137667 B1. La presencia de residuos de Aib en las posiciones 8 y 35 ralentiza la degradación metabólica en el cuerpo, haciendo que este péptido sea mucho más estable en el cuerpo que el péptido GLP-1(7-36) nativo.

La presente invención proporciona metodologías mejoradas para obtener péptidos GLP-1(7-36) como el (Aib^{8,35}) GLP-1(7-36)-NH₂. A modo de ejemplo, la Fig. 1 muestra de forma esquemática el esquema ilustrativo 10 para sintetizar péptidos GLP-1(7-36) y sus homólogos. El esquema 10 de la Fig. 1 se cree que es particularmente adecuado para el escalado de síntesis de los péptidos GLP-1(7-36). Los procedimientos de escalado normalmente se realizan para proporcionar una cantidad de péptido útil para su distribución comercial. Por ejemplo la cantidad de péptido en un procedimiento de escalado puede ser de 500 g o 1 kg por lote, y más normalmente de decenas a cientos de kg por lote o más. En las realizaciones preferidas, los métodos de la invención pueden proporcionar mejoras como la reducción en el tiempo de procesado (síntesis), mejoras en el rendimiento de los productos, mejoras en la pureza del producto y/o reducción en la cantidad de reactivos y materiales de partida necesarios.

El esquema de síntesis 10 mostrado en la Fig. 1 utiliza una combinación de técnicas en fase sólida y en solución para preparar el producto peptídico 11.

Como se muestra en la Fig. 1, el esquema 10 involucra la síntesis de los fragmentos intermediarios del péptido 12, 14 y 16 en la fase sólida. El fragmento 12 es un fragmento peptídico que incluye los residuos de aminoácido de acuerdo con el

5 Id. de Sec. N° 6:



en el que X^8 y X^{10} son como se ha definido antes, o es un homólogo de la misma, lo que incluye los residuos X^8 y X^{10} . Uno o más de los residuos de aminoácidos puede incluir grupos protectores de las cadenas laterales de acuerdo con las prácticas convencionales. En algunas realizaciones, el fragmento peptídico 12 puede estar enlazado a una resina a través del extremo C-terminal. Este fragmento puede llevar opcionalmente grupos protectores en N-terminal y/o C-terminal. Se ha encontrado que

10 el Fmoc es un grupo protector de N-terminal particularmente útil en la síntesis en fase sólida del fragmento peptídico.

El fragmento 12 incluye los 4 residuos de aminoácido que corresponden a los aminoácidos en las posiciones de 7 a 10 del péptido GLP-1(7-36) nativo, y por lo tanto puede representarse

20 mediante la notación $(\text{X}^8, \text{X}^{10}) \text{GLP-1(7-10)}$. En las realizaciones preferidas, X^8 es Aib y X^{10} es glicina, de acuerdo con el Id. de Sec. N° 7:



o es un homólogo del mismo que incluye el residuo Aib en

25 la posición 10. El fragmento peptídico de acuerdo con el Id. de Sec. N° 7 puede representarse mediante la notación $(\text{Aib}^8)\text{GLP-1(7-10)}$ para indicar la sustitución de Aib por la alanina nativa en la posición 8 del GLP-1(7-10) nativo.

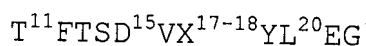
La síntesis en fase sólida se lleva a cabo generalmente

30 en dirección de C-terminal a N-terminal del fragmento 12. Así, el aminoácido X^{10} , que está presente en la porción C-terminal del fragmento, es el primer residuo de aminoácido que está

acoplado al soporte de resina en fase sólida. La síntesis en fase sólida continúa entonces mediante la adición consecutiva de los residuos de aminoácido de la forma correspondiente a la secuencia deseada. La síntesis del fragmento del péptido inter-
 5 mediario se completa después de que el residuo N-terminal (por ejemplo, el residuo histidina (H) N-terminal) se haya añadido a la cadena de péptido naciente.

La selección y uso de un fragmento peptídico de acuerdo con los Id. de Sec. N° 6 y 7 proporciona ventajas significati-
 10 vas dentro del esquema 10. Primero, la H tiende a ser un residuo de aminoácido difícil de añadir a la cadena de péptido naciente debido a, al menos en parte, problemas de epimerización. No obstante, el fragmento 12 es suficientemente pequeño para minimizar estos problemas en su mayor parte. Aún así, el
 15 fragmento 12 es suficientemente largo para tener dos centros quirales. Por lo tanto, una única cristalización permite purificar al fragmento. Si el fragmento 12 termina en Aib, el fragmento poseerá solo un centro quiral y será, en consecuencia, más difícil de purificar de forma racémica. Situando la
 20 G aquiral en posición C-terminal también evita los problemas de racemización que de otro modo serían preocupantes si el fragmento 12 acabara en C-terminal con E quiral. En resumen, la selección del fragmento 12 como un bloque de construcción del péptido hace más fácil la construcción, la purificación y
 25 el acoplamiento del fragmento a otro material peptídico. La selección de este fragmento también proporciona una baja racemización de H. Sorprendentemente, puede añadirse la H a este fragmento con un nivel muy bajo de epimerización, por ejemplo, alrededor del 3% en peso en algunas formas de la práctica.

30 El fragmento 14 es un fragmento peptídico que incluye residuos de aminoácido de acuerdo con el Id. de Sec. N° 8:



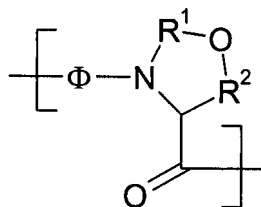
en el que el residuo denotado mediante el símbolo X^{17-18} es un residuo dipeptídico de pseudoprolina, definida en detalle más adelante, o es un homólogo del mismo que incluye el X^{17-18} en las posiciones 17 y 18. El fragmento 14 incluye los res-
5 duos de aminoácido que generalmente corresponden a los res-
duos de aminoácido en las posiciones 11 a 22 del péptido GLP-1(7-36) nativo, excepto que se utiliza el residuo dipéptido de pseudoprolina X^{17-18} en lugar de los residuos SS (Ser-Ser) que ocupan las posiciones correspondientes 17 y 18 del GLP-1(7-36)
10 nativo.

Uno o más de los residuos de aminoácido del fragmento 14 puede incluir grupos protectores de cadenas laterales de acuerdo con las prácticas convencionales. En algunas realiza-
ciones, el fragmento peptídico 14 puede estar unido a resina a
15 través del extremo C-terminal. Este fragmento puede llevar op-
cionalmente grupos protectores en N-terminal y/o C-terminal. Se ha encontrado que Fmoc es un grupo protector de N-terminal particularmente útil para la síntesis en fase sólida del frag-
mento peptídico. El fragmento peptídico de acuerdo con el Id.
20 de Sec. N° 8 puede estar referido mediante la notación (X^{17-18}) GLP-1(11-22) para indicar la sustitución por los residuos de pseudoprolina X^{17-18} de los residuos Ser-Ser en las posiciones 17 y 18.

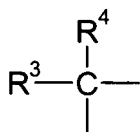
Tal y como se utiliza en la práctica de la presente in-
25 vención, el término pseudoprolina se refiere a un dipéptido que incluye un residuo de un aminoácido con función hidroxilo como la Ser o Thr en las que la cadena lateral con la función hidroxilo está protegida con un unillo oxazolidina, lábil a TFA, similar a prolina entre el amino alfa y la cadena lateral
30 hidroxilo. Como consecuencia del anillo oxazolidina, el dipép-
tido funciona como un mimético de prolina reversible.

Generalmente, un residuo típico de pseudoprolina tal como

se incorpora en un péptido puede representarse mediante la fórmula



en la que Φ representa un residuo de cualquier aminoácido y tanto R^1 como R^2 son independientemente una porción de unión
5 divalente adecuada. A menudo, R^1 es una porción divalente de fórmula

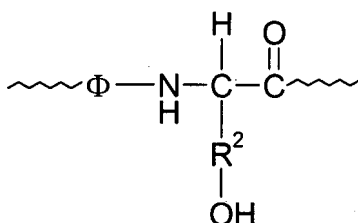


en la que tanto R^3 como R^4 son independientemente una porción monovalente como H, o un alquilo inferior como metilo. R^3 y R^4 también pueden ser co-miembros de una estructura en
10 anillo. Es deseable que tanto R^3 como R^4 sea metilo. En el caso de una Ser protegida por un anillo oxazolidinina, R^2 es la porción divalente CH_2 , mientras que en el caso de la Thr, R^2 es la porción divalente $(\text{CH}_3)\text{CH}$.

El término "alquilo inferior" se refiere a un radical al-
15 quilo monovalente de cadena sencilla o ramificada de uno a seis átomos de carbono, preferiblemente de uno a cuatro átomos de carbono. Este término se ejemplifica además mediante radicales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, s-butilo, isobutilo, t-butilo, n-pentilo, 3-metilbutilo, n-
20 hexilo, 2-etilbutilo y similares. Los residuos de alquilo inferior preferibles son metilo y etilo, siendo metilo especialmente preferido.

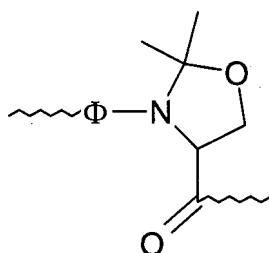
Durante la desprotección, la porción R^1 se escinde para proporcionar un residuo dipeptídico de acuerdo con la siguiente
25 fórmula:

- 25 -



en la que Φ y R^2 son como se ha definido anteriormente. Aplicado al fragmento 14, el residuo de pseudoprolina preferi-
 5 blemente corresponde a un residuo Ser-Ser en el que la Ser que es más proximal a C-terminal está protegida con el anillo oxazolidina y posee la siguiente estructura:

La cadena lateral con un hidroxilo de la Ser más cercana a N-terminal esta protegida, por ejemplo mediante el grupo de
 10 protección t-Bu. Cuando se rompe la estructura del anillo oxazolidina y t-Bu protectora, aparece el residuo Ser-Ser.



La utilización de este mimético de prolina como un bloque de construcción en la síntesis del fragmento 14 proporciona ventajas significativas en el contexto de la presente inven-
 15 ción. Primero, la síntesis en fase sólida del fragmento 14 se facilita enormemente. Cuando la pseudoprolina no se utiliza durante el curso de la síntesis en fase sólida del fragmento 14, puede haber problemas significativos con las eliminaciones de Fmoc de los residuos 13 al 11. Se cree que esta dificultad
 20 puede ser debida a la formación de láminas beta. El uso de la pseudoprolina hace que estas eliminaciones de Fmoc sean más fáciles, se cree que mediante la reducción del grado de formación de láminas beta. Segundo, el posterior acoplamiento en

fase sólida del fragmento 14 al fragmento 12 para formar el fragmento 18, descrito más abajo, se facilita enormemente. En ausencia del residuo de pseudoprolina, la solubilidad del fragmento 18 en los solventes de acoplamiento típicos en fase
 5 en solución es muy pobre. La pseudoprolina aumenta las características de solubilidad del fragmento 18, facilitando el acoplamiento de este fragmento al fragmento 20 en fase en solución (Véase discusión de la Fig. 1, a continuación).

La síntesis en fase sólida se lleva a cabo generalmente
 10 en dirección de C-terminal a N-terminal del fragmento 14. Así, el aminoácido G, que está presente en la porción C-terminal del fragmento, es el primer residuo de aminoácido que está acoplado al soporte de resina de fase sólida. La síntesis en fase sólida continúa entonces mediante la adición consecutiva
 15 de residuos de aminoácido de la forma correspondiente a la secuencia deseada. Sin embargo, se añade el dipéptido pseudoprolina X^{17-18} a la cadena creciente en una posición que corresponde a las posiciones 17 y 18 del GLP-1(7-36) en lugar de añadir de forma consecutiva un par de residuos Ser nativos en estas
 20 posiciones 17 y 18. La síntesis del fragmento de péptido intermediario se completa después de que el residuo N-terminal (por ejemplo, el residuo treonina (T) N-terminal) se haya añadido a la cadena de péptido naciente.

El fragmento 16 es un fragmento de péptido, u homólogo
 25 del mismo, que incluye los residuos de aminoácido de acuerdo con el Id. de Sec. N° 9:



en el que X^{35} es como se ha definido anteriormente, o es un homólogo del mismo que incluye el residuo X^{35} . Uno o más de
 30 los residuos de aminoácido pueden incluir grupos protectores de cadenas laterales de acuerdo con las prácticas convencionales. El fragmento 16 incluye los residuos de aminoácido que

corresponden a los aminoácidos en las posiciones de 23 a 35 del péptido GLP-1(7-36) nativo, excepto que en la posición 35 está el X³⁵ en lugar del aminoácido nativo en esa posición. El fragmento 16 puede estar representado mediante la notación

5 (X³⁵) GLP-1(23-35).

En algunas realizaciones, el fragmento peptídico 16 puede estar unido a la resina a través del extremo C-terminal. Este fragmento puede llevar opcionalmente grupos protectores de la cadena lateral, N-terminal y/o C-terminal. Se ha encontrado

10 que el Fmoc es un grupo protector de N-terminal particularmente útil para la síntesis en fase sólida del fragmento peptídico.

En realizaciones preferidas, X³⁵ es Aib de acuerdo con el Id. de Sec. N° 10:

15 Q²³AA²⁵KEFIA³⁰WLVKAib³⁵

o un homólogo del mismo que incluye el Aib en la posición 35. El fragmento peptídico de acuerdo con el Id. de Sec. N° 10 puede estar representado por la notación (Aib³⁵) GLP-1(23-35) para indicar la sustitución de Aib por el aminoácido nativo en

20 la posición 35 del GLP-1(7-36) nativo.

Nótese que el fragmento 16 de acuerdo con los Id. de Sec. N° 9 y 10 no incluye todavía el residuo R (Arg) en la posición 36 en C-terminal. La Arg se acopla posteriormente en C-terminal del fragmento 16 en la fase en solución, preferiblemente

25 mente utilizando Arg sin la protección de la cadena lateral. Esta estrategia proporciona ventajas significativas dentro del esquema 10 de la Fig. 1, debido a que evita reacciones adversas no deseadas que tienden a ocurrir como consecuencia de utilizar Arg protegida. Por ejemplo, tras la desprotección de

30 la Arg protegida, los productos secundarios de la desprotección tienden a reaccionar con otros constituyentes del péptido, por ejemplo, el triptófano. Esto reduce la cantidad de

péptido crudo deseado disponible para la purificación.

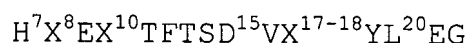
La síntesis en fase sólida se lleva a cabo generalmente en dirección desde C-terminal a N-terminal del fragmento 16. Así, el aminoácido X^{35} , que está presente en la porción C-terminal del fragmento, es el primer residuo de aminoácido que se acopla al soporte de resina en fase sólida. La síntesis en fase sólida continúa entonces mediante la adición consecutiva de residuos de aminoácido de la forma correspondiente a la secuencia deseada. La síntesis del fragmento de péptido intermedio se completa cuando el residuo N-terminal (por ejemplo, el residuo glutamina (Q) N-terminal) se ha añadido a la cadena naciente de péptido. Cualquiera de los aminoácidos utilizados en la síntesis del fragmento 16 puede incluir protección de la cadena lateral de acuerdo con las prácticas convencionales.

Debido a la obstaculización estérica proximal en el soporte de resina cargado con X^{35} , el acoplamiento de lisina (34) y valina (33) en la cadena de péptido creciente puede ser problemática. Aún con un exceso de aminoácido, es difícil de forzar estas reacciones de acoplamiento hasta su finalización. La elección del solvente y/o la protección del extremo puede ayudar a mitigar este problema. Se ha descrito que la naturaleza del solvente de acoplamiento puede impactar en el grado en el que finaliza el acoplamiento. En un grupo de experimentos, por ejemplo, las reacciones de acoplamiento se llevaron a cabo con NMP/ DCM 3:1, NMP/ DCM 1:1, DMF/ DCM 1:1 y DMF/ DCM 3:1. Las proporciones en estas combinaciones de solventes se realizaron en base a su volumen. NMP se refiere a N-metilpirrolidona, DCM se refiere a diclorometano y DMF se refiere a dimetilformamida. Se encontró que las reacciones de acoplamiento continúan más allá en su finalización cuando se utiliza DMF/DCM 1:1.

También se puede utilizar la protección del extremo des-

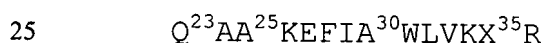
pués de cada uno de los acoplamientos de lisina y valina para prevenir posteriores reacciones de acoplamiento del material unido a la resina que no ha reaccionado. El material protegido en el extremo se elimina más fácilmente durante la purificación si se desea. Se pueden utilizar las técnicas convencionales de protección de extremos.

En referencia a la Fig. 1, los fragmentos 12, 14 y 16, junto con Arg, se ensamblan para completar el péptido 11 deseado. Para conseguir esto, el fragmento 12 se añade al fragmento 14 en esta fase sólida para producir el fragmento intermediario 18 más largo, que incorpora los residuos de aminoácido de acuerdo con el Id. de Sec. N° 11:



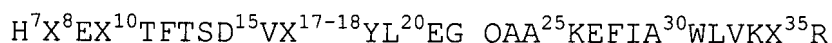
en el que X^8 , X^{10} y X^{17-18} son como se ha definido anteriormente. En una realización preferida, X^8 es Aib, X^{10} es la G nativa, y X^{17-18} es un residuo dipeptídico de pseudoprolina como se ha definido antes. Este intermediario del fragmento peptídico puede estar representado por la notación (X^8 , X^{10} , X^{17-18}) GLP-1(7-22).

La Fig. 1 muestra además que se añade la Arg en el extremo C-terminal del fragmento 16 en la fase en solución para proporcionar el fragmento peptídico intermediario 20 más largo, que incorpora los residuos de aminoácido de acuerdo con el Id. de Sec. N° 12:



en el que X^{35} es como se ha definido anteriormente y es preferiblemente Aib. Preferiblemente, la Arg añadida al fragmento peptídico de esta forma no incluye la protección de la cadena lateral. Este del fragmento peptídico intermediario 20 puede estar representado por la notación (X^{35})GLP-1(23-36). Los fragmentos peptídicos 18 y 20 se acoplan entonces en la fase en solución para proporcionar el péptido protegido 11 de-

seado de acuerdo con el Id. de Sec. N° 13 en el que la Ser-Ser en las posiciones 17 y 18 está todavía en forma de pseudoprolina protegida:



5 El péptido 11 puede estar designado por la notación (X^8 , X^{10} , X^{17-18} , X^{35})GLP-1(7-36). En el caso de que el resto de aminoácidos lleven la protección de la cadena lateral, es deseable mantener esta protección a lo largo de este paso.

Al llevar a cabo el esquema de reacción de la Fig. 1, las
10 síntesis en fase sólida y en solución pueden llevarse a cabo mediante métodos estándar conocidos en la industria. En las formas representativas de la práctica, los péptidos se sintetizan en fase sólida utilizando la química mediante la que los aminoácidos se añaden de C-terminal a N-terminal. Así, el ami-
15 noácido o grupo peptídico proximal a C-terminal de un fragmento particular es el primero en añadirse a la resina. Esto sucede al reaccionar la función en C-terminal del aminoácido o grupo peptídico con la función complementaria en el soporte de resina. La parte N-terminal del aminoácido o grupo peptídico
20 está enmascarada para prevenir reacciones adversas no deseadas. Es deseable que el aminoácido o grupo peptídico también incluya protección de la cadena lateral. A continuación, se unen sucesivos aminoácidos o grupos peptídicos al material peptídico unido al soporte hasta que el péptido de interés se
25 haya formado. La mayoría de éstos también incluyen protección de cadenas laterales de acuerdo con las prácticas convencionales. Con cada acoplamiento sucesivo, se elimina el grupo de enmascaramiento en el extremo N-terminal del material peptídico unido a la resina. Éste se hace reaccionar con el extremo
30 C-terminal del siguiente aminoácido, cuyo extremo N-terminal está enmascarado. El producto de la síntesis en fase sólida es así un péptido unido a un soporte de resina.

Puede utilizarse cualquier tipo de soporte adecuado en la práctica de la síntesis de péptidos en fase sólida. En las realizaciones preferidas, el soporte comprende una resina que puede elaborarse a partir de uno o más polímeros, copolímeros o combinaciones de polímeros como poliamida, polisulfamida, polietilenos sustituidos, polietileneglicol, resinas fenólicas, polisacáridos o poliestireno. El soporte polimérico puede ser también cualquier sólido que sea suficientemente insoluble e inerte en los solventes utilizados en las síntesis de péptidos. El soporte sólido normalmente incluye una porción de unión a la que el péptido creciente se acopla durante la síntesis y que puede ser escindido bajo las condiciones deseadas de liberación del péptido del soporte. Los soportes sólidos adecuados pueden ser enlazantes que sean fotoescindibles, escindibles con TFA, escindibles con HF, escindibles con ion fluoruro, escindibles reductivamente, escindibles con Pd(O), escindibles con nucleófilos o escindibles con radicales. Las porciones de unión preferidas son escindibles bajo condiciones en las que los grupos de las cadenas laterales del péptido escindido aún estén sustancialmente protegidos en su totalidad.

En un método de síntesis preferido, los fragmentos de péptido intermediarios se sintetizaron en un soporte sólido sensible al ácido que incluye grupos tritilo, y más preferiblemente en una resina que incluye grupos tritilo que tienen grupos cloro expuestos, por ejemplo una resina de cloruro de 2-clorotritilo (2-CTC) (Barlos et al. (1989) Tetrahedron Letters 30(30):3943-3946). Los ejemplos también incluyen la resina de cloruro de tritilo, resina de cloruro de 4-metiltritilo, resina de cloruro de 4-metoxitritilo, resina de 4-aminobutan-1-ol 2-clorotritilo, resina de 4-aminometilbenzoil 2-clorotritilo, resina de 3-aminopropan-1-ol 2-clorotritilo, resina de ácido bromoacético 2-clorotritilo, resina de ácido

cianoacético 2-clorotritilo, resina de ácido 4-cianobenzoico 2-clorotritilo, resina de glicinol 2-clorotritilo, resina de ácido propiónico 2-clorotritilo, resina de etilenglicol 2-clorotritilo, resina de N-Fmoc hidroxilamina 2-clorotritilo, 5 resina de hidrazina 2-clorotritilo. Algunos soportes sólidos preferidos incluyen el poliestireno, que puede copolimerizarse con divinilbenceno para formar el material de soporte al que se pueden anclar los grupos reactivos.

Otras resinas que se utilizan en la síntesis en fase sólida incluyen las resinas "Wang", que comprenden un copolímero 10 de estireno y divinilbenceno con grupos de anclaje 4-hidroximetilfenil-oximetilo (Wang, S.S. 1973, J. Am. Chem. Soc.) y las resinas de ácido 4-hidroximetil-3-metoxifenoxibutírico (Richter et al. (1994), Tetrahedron Let- 15 ters 35(27):4705-4706). Las resinas de Wang, cloruro de 2-clorotritilo y 4-hidroximetil-3-metoxifenoxi ácido butírico pueden obtenerse de, por ejemplo, Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, California.

Para preparar una resina para la síntesis en fase sólida, 20 la resina puede prelavarse en solvente(s) adecuado(s). Por ejemplo, una resina de fase sólida como la resina 2-CTC se añade a una cámara peptídica y se prelava con un solvente adecuado. El solvente de prelavado puede elegirse en función del tipo de solvente (o mezcla de solventes) que se utilizan en la 25 reacción de acoplamiento, o viceversa. Los solventes que son adecuados para el lavado, y también para la posterior reacción de acoplamiento incluyen el diclorometano (DCM), dicloroetano (DCE), dimetilformamida (DMF) y similares, así como las mezclas de estos reactivos. Otros solventes útiles incluyen el 30 DMSO, piridina, cloroformo, dioxano, tetrahidrofurano, acetato de etilo, N-metilpirrolidona y mezclas de los mismos. En algunos casos el acoplamiento puede realizarse en un sistema de

solvente binario, como una mezcla de DMF y DCM en una proporción en volumen en el rango de 9:1 a 1:9, más comúnmente de 4:1 a 1:4.

La síntesis de la presente invención preferiblemente se lleva a cabo en presencia de grupos protectores apropiados a menos que se especifique de otra manera. La naturaleza y utilización de los grupos protectores es bien conocida en la materia. Generalmente, un grupo protector adecuado es cualquier tipo de grupo que pueda ayudar a prevenir la participación del átomo o la porción al que está unido, por ejemplo oxígeno o nitrógeno, en reacciones no deseadas durante el procesado y la síntesis. Los grupos protectores incluyen los grupos protectores de cadenas laterales y los grupos protectores amino- o N-terminal. Los grupos protectores pueden también prevenir la reacción o unión de ácidos carboxílicos, tioles y similares.

Un grupo protector de cadena lateral se refiere a una porción química acoplada a la cadena lateral (es decir, un grupo R en la fórmula general de los aminoácidos $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{R})(\text{H})-\text{COOH}$) de un aminoácido que ayuda a prevenir que una porción de la cadena lateral reaccione con los reactivos utilizados en los pasos de síntesis del péptido, procesado, etc. La elección de un grupo protector de cadena lateral puede depender de varios factores, por ejemplo, del tipo de síntesis realizada, el procesado al que se someterá el péptido y el producto intermedio o producto final deseado. La naturaleza del grupo protector de la cadena lateral también depende de la naturaleza del aminoácido en sí. Generalmente, se elige un grupo protector de cadena lateral que no se elimine durante la desprotección de los grupos α -amino durante la síntesis en fase sólida. Por lo tanto el grupo protector α -amino y el grupo protector de la cadena lateral no son normalmente el mismo.

En algunos casos, y dependiendo del tipo de reactivos

utilizados en la síntesis en fase sólida y del resto de proce-
sado del péptido, puede no ser necesaria la presencia de un
grupo protector de la cadena lateral de un aminoácido. Tales
aminoácidos normalmente no incluyen un oxígeno reactivo, ni-
5 trógeno u otra porción reactiva en la cadena lateral.

Ejemplos de grupos protectores de cadenas laterales in-
cluyen acetilo (Ac), benzoilo (Bz), terc-butilo, trifenilmeti-
lo (tritilo), tetrahidropiraniolo, éter de bencilo (Bzl) y 2,6-
diclorobencilo (DCB), t-butoxicarbonilo (Boc), nitro, p-
10 toluenosulfonilo (Tos), adamantiloxicarbonilo, xantilo (Xan),
bencilo, 2,6-diclorobencilo, metilo, etilo y éster de t-
butilo, benciloxicarbonilo (Z), 2-clorobencil-oxicarbonilo (2-
Cl-Z), t-amiloxi-carbonilo (Aoc) y los grupos protectores de
tipo uretano aromáticos o alifáticos, los grupos fotolábiles
15 como el nitro veratrilo oxicarbonilo (NVOC) y los grupos lábi-
les al fluoruro como el trimetilsilil oxicarbonilo (TEOC).

Los grupos protectores de cadenas laterales preferidos
para los aminoácidos comúnmente utilizados para sintetizar los
péptidos GLP-1 en la práctica de la presente invención se
20 muestran en la siguiente Tabla A:

Tabla A:

<u>Aminoácido</u>	<u>Grupo(s) protector(es) de la</u> <u>cadena lateral</u>
Aib	Ninguno
Ala	Ninguno
Arg	Ninguno
Asp	éster de t-butilo (OtBu)
Gln	tritilo (trt)
Glu	OtBu
Gly	Ninguno
His	tritilo (trt)
Ile	Ninguno

<u>Aminoácido</u>	<u>Grupo(s) protector(es) de la cadena lateral</u>
Leu	Ninguno
Lys	t-butiloxicarbonilo (Boc)
Phe	Ninguno
Ser	t-butilo (tBu)
X ¹⁷⁻¹⁸ (que corresponde a Ser-Ser)	anillo oxazolidina entre el nitrógeno alfa y el OH de la Ser más cercano a C-terminal; tBu en la otra Ser
Thr	tBu
Trp	Boc
Tyr	tBu
Val	Ninguno

Un grupo protector amino-terminal incluye una porción química acoplada al grupo amino alfa de un aminoácido. Normalmente, el grupo protector amino-terminal se elimina en una reacción de desprotección antes de la adición del siguiente aminoácido a añadir a la cadena de péptido creciente, pero puede mantenerse cuando el péptido se escinde del soporte. La elección de un grupo protector amino terminal puede depender de varios factores, por ejemplo, del tipo de síntesis realizada y del producto intermediario o producto final deseado.

Ejemplos de grupos protectores amino-terminales incluyen (1) los grupos protectores de tipo acilo, como formilo, acrililo (Acr), benzoilo (Bz) y acetilo (Ac); (2) los grupos protectores de tipo uretano aromático, como benciloxicarbonilo (Z) y Z sustituido, como p-clorobenciloxi-carbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxi-carbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo; (3) los grupos protectores uretano alifáticos, como t-butiloxicarbonilo (Boc), diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo, etoxicarbonilo, aliloxicar-

bonilo; (4) los grupos protectores de tipo uretano cicloalquilo, como 9-fluorenil-metiloxicarbonilo (Fmoc), ciclopentiloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, y ciclohexiloxicarbonilo; y (5) los grupos protectores de tipo tiouretano, como feniltiocarbonilo. Los grupos protectores preferidos incluyen 9-fluorenil-metiloxicarbonilo (Fmoc), 2-(4-bifenilil)-propil(2)oxi-carbonilo (Bpoc), 2-fenilpropil(2)-oxicarbonilo (Poc) y t-butiloxicarbonilo (Boc).

La química con Fmoc o parecida a Fmoc es altamente preferible para la síntesis de péptidos en fase sólida, considerando que la escisión del péptido resultante en un estado protegido es relativamente fácil de llevar a cabo utilizando agentes de escisión medianamente ácidos. Este tipo de reacción de escisión es relativamente limpia en términos de productos secundarios resultantes, impurezas, etc., haciendo que sea técnicamente y económicamente factible la recuperación del péptido a gran escala a partir de ambos lavados de expansión y contracción, aumentando el rendimiento. Tal y como se utiliza aquí, "a gran escala" referido a la síntesis de péptido incluye generalmente la síntesis de péptidos en el rango de al menos 500 g, y más preferiblemente al menos 2 kg, por lote. La síntesis a gran escala se realiza normalmente en recipientes de reacción grandes, como un tanque de reacción de acero, que puede acomodar cantidades de los reactivos como las resinas, solventes, aminoácidos, reactivos para las reacciones de acoplamiento y de desprotección, que se ajustan para permitir la producción de péptidos en el rango de entre kilogramos y toneladas.

De forma adicional, el grupo protector Fmoc puede escindirse selectivamente de un péptido en relación a los grupos protectores de la cadena lateral, de forma que la protección de la cadena lateral permanece en su lugar cuando se escinde

el Fmoc. Este tipo de selectividad es importante durante el acoplamiento de aminoácidos para minimizar las reacciones de la cadena lateral. De forma adicional, los grupos protectores de la cadena lateral pueden escindirse de forma selectiva para
5 eliminarlos respecto al Fmoc, permaneciendo el Fmoc en su lugar. Los esquemas de purificación descritos en profundidad a continuación se basan de forma muy ventajosa en esta última selectividad.

La reacción de acoplamiento en fase sólida puede reali-
10 zarse en presencia de uno o más compuestos que aumenten o mejoren la reacción de acoplamiento. Los compuestos que pueden incrementar la tasa de reacción y reducir la tasa de reacciones secundarias incluyen las sales de fosfonio y uronio que en presencia de una base terciaria, por ejemplo diisopropiletilamina (DIEA) y trietilamina (TEA), pueden convertir los aminoácidos protegidos en especies activadas (por ejemplo, BOP, Py-BOPO, HBTU y TBTU, todas generan ésteres de HOBT). Otros reactivos ayudan a prevenir la racemización proporcionando un reactivo de protección. Estos reactivos incluyen las carbodiimidas (por ejemplo, DCC o WSCDI) con un nucleófilo auxiliar añado (por ejemplo, 1-hidroxi-benzotriazol (HOBT), 1-hidroxi-azabenzotriazol (HOAt) o HOSu). También puede utilizarse el método de anhídrido mezclado, que utiliza cloroformato de isobutilo, con o sin un nucleófilo auxiliar añadido, así como el
20 método de azida, debido a la baja racemización asociada con él. Estos tipos de compuestos pueden también aumentar la tasa de acoplamientos mediados por carbodiimida, así como prevenir la deshidratación de los residuos Asn y Gln.

Después de determinar la finalización del acoplamiento,
30 la mezcla de reacción de acoplamiento se lava con un solvente y el ciclo de acoplamiento se repite para cada uno de los residuos de aminoácido subsiguientes del material peptídico. Pa-

ra acoplar el siguiente aminoácido, normalmente se logra la eliminación del grupo protector en N-terminal (por ejemplo, un grupo Fmoc) del material unido a la resina mediante el tratamiento con un reactivo que incluye un 20-50% (en base al peso) de piperidina en un solvente como la N-metilpirrolidona (NMP) o dimetilformamida (DMF). Tras la eliminación del grupo protector de Fmoc, normalmente se realizan varios lavados para eliminar los productos secundarios residuales de la piperidina y el Fmoc (como dibenzofulveno y su aducto de piperidina).

Los siguientes aminoácidos pueden utilizarse en un exceso estequiométrico de aminoácidos en relación al factor de carga del material peptídico en el soporte de resina. Generalmente, la cantidad de aminoácidos utilizados en el paso de acoplamiento es al menos equivalente al factor de carga del primer aminoácido en la resina (1 equivalente o más). Preferiblemente la cantidad de aminoácidos utilizados en el paso de acoplamiento es de al menos 1,3 equivalentes (0,3 de exceso) o más, y más preferiblemente alrededor de 1,5 equivalentes (0,5 de exceso) o más. En algunos casos, por ejemplo, el paso de acoplamiento utiliza una cantidad de equivalentes de aminoácido en el rango de entre 1 y 3.

Tras el ciclo final de acoplamiento, la resina se lava con un solvente como NMP, y después se lava con un segundo solvente inerte como el DCM. Para eliminar el material peptídico sintetizado de la resina, se lleva a cabo un tratamiento de escisión de forma que el material peptídico escindido todavía tiene suficientes grupos protectores de la cadena lateral y terminal. La permanencia de los grupos protectores en su lugar ayuda a prevenir acoplamientos no deseados u otras reacciones no deseables de los fragmentos de péptido durante o tras la escisión de la resina. En el caso de utilizar Fmoc o un reactivo similar para sintetizar el péptido, se puede con-

seguir una escisión protegida de cualquier forma deseada, por ejemplo utilizando un reactivo ácido relativamente débil como el ácido acético o TFA diluido en un solvente como el DCM. Normalmente se utiliza TFA en DCM entre un 0,5 y 10 por ciento en peso, preferiblemente entre 1 y 3 por ciento en peso. Véase, por ejemplo, la Pat. Estadounidense N° 6.281.335.

Los pasos de escisión del fragmento de péptido intermedio de la resina en fase sólida pueden darse de forma similar a las de un proceso de ejemplo como sigue. No obstante, puede utilizarse cualquier proceso adecuado que escinda de forma efectiva el fragmento de péptido intermediario de la resina. Por ejemplo, pueden añadirse aproximadamente de 5 a 20, preferiblemente alrededor de 10 volúmenes de un solvente que contenga un reactivo de escisión ácido al recipiente que contiene el material peptídico unido a la resina. La resina, normalmente en forma de cuentas, queda sumergida en el reactivo como consecuencia. La reacción de escisión sucede cuando el contenido líquido se agita a una temperatura adecuada durante un periodo de tiempo adecuado. La agitación ayuda a evitar la aglutinación de las cuentas. Las condiciones de tiempo y temperatura adecuadas dependerán de varios factores como el reactivo ácido que se vaya a utilizar, la naturaleza del péptido, la naturaleza de la resina y similares. Como una guía general, será adecuada una agitación de entre alrededor de -15°C y alrededor de 5°C, preferiblemente entre alrededor de -10°C y alrededor de 0°C durante entre alrededor de 5 minutos y dos horas, preferiblemente durante entre alrededor de 25 minutos y alrededor de 45 minutos. El tiempo de escisión puede estar en el rango de alrededor de 10 minutos a alrededor de 2 horas o incluso tanto como un día. La escisión se lleva acabo deseablemente en dicho rango de temperaturas frías para acomodar la reacción exotérmica que normalmente ocurre durante la reac-

ción. Además, la temperatura baja de la reacción de escisión evita que los grupos protectores de las cadenas laterales sensibles al ácido, como los grupos tritilo, sean eliminados en esta fase.

5 Al final del tratamiento de escisión, la reacción se detiene. Esto se puede lograr, por ejemplo, combinando el reactivo de escisión con una base adecuada, como la piridina o similares, y continuando la agitación durante un periodo adicional de entre 5 minutos y 2 horas, preferiblemente entre alrededor de 20 minutos y alrededor de 40 minutos. Añadir la base y continuar con la agitación provoca un aumento de temperatura del contenido del recipiente. Al final de la agitación, el contenido del recipiente puede estar a una temperatura en el rango de entre alrededor de 0°C y alrededor de 15°C, preferi-
10 blemente entre alrededor de 5°C y alrededor de 10°C.

Los factores como la expansión y contracción de la resina para mejorar aspectos de la recuperación del péptido puede incorporarse opcionalmente en el proceso global de síntesis. Estas técnicas se describen, por ejemplo, en la Publicación de
20 Pat. Estadounidense N° 2005/0164912 A1.

En algunos aspectos, los fragmentos de péptido escindido pueden prepararse para un acoplamiento en fase en solución a otros fragmentos de péptido y/o aminoácidos. Las reacciones de acoplamiento de péptidos en fase en solución se revisan en,
25 por ejemplo, *New Trends in Peptide Coupling Reagents*; Albericio, Fernando; Chinchilla, Rafael; Dodsworth, David J.; y Nájera, Carmen; *Organic Preparations and Procedures International* (2003), 33(3), 203-303.

El acoplamiento de los fragmentos de péptido intermedios con otros fragmentos o aminoácido(s) en la fase en solución puede llevarse a cabo utilizando reactivos de acoplamiento *in situ*, por ejemplo hexafluorofosfato de 2-(1H-

30

benzotriazol-1-il)tris(dimetilamino)fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de o-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), hexafluorofosfato de o-(7-azobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU), dicitclohexilcarbodiimida (DCC), carbodiimida soluble en agua (WSCDI) o tetrafluoroborato de o-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU). Otras técnicas de acoplamiento utilizan ésteres activos preformados como la hidroxisuccinimida (HOSu) y ésteres de p-nitrofenol (HONp), anhídridos simétricos preformados, anhídridos no simétricos como N-carboxianhídridos (NCAs) o haluros de ácido como el fluoruro de acilo, así como el cloruro de acilo.

Un solvente de acoplamiento adecuado puede utilizarse en la reacción de acoplamiento en fase en solución. Se entiende que el(los) solvente(s) de acoplamiento utilizado(s) puede afectar al grado de racemización del enlace peptídico formado; la solubilidad del péptido y/o fragmentos peptídicos; y a la tasa de la reacción de acoplamiento. En algunas realizaciones, el solvente de acoplamiento incluye uno o más reactivos miscibles en agua. Ejemplos de solventes miscibles en agua incluyen, por ejemplo, DMSO, piridina, cloroformo, dioxano, tetrahidrofurano, acetato de etilo, N-metilpirrolidona, dimetilformamida, dioxano o mezclas de los mismos.

En otras realizaciones, la reacción de acoplamiento puede incluir uno o más reactivos no miscibles en agua. Un ejemplo de solvente no miscible en agua es el cloruro de metileno. En estas realizaciones, el solvente no miscible en agua es preferiblemente compatible con la reacción de desprotección; por ejemplo, si se utiliza un solvente no miscible en agua, preferiblemente no afectará de forma adversa a la reacción de desprotección.

Tras la formación del péptido 11, el producto puede some-

terse a la desprotección, purificación, liofilización, posterior procesado (por ejemplo, reacción con otro péptido para formar una proteína de fusión), combinaciones de estos y/o similares, como se prefiera.

5 Por ejemplo, de acuerdo con la invención, los grupos protectores de cadenas laterales están normalmente retenidos en los fragmentos de péptido intermediarios a lo largo de la síntesis en fase sólida y también a través de las reacciones de acoplamiento en fase en solución. Generalmente, tras finalizar
10 el paso de acoplamiento en fase en solución, se pueden realizar uno o más pasos de desprotección para eliminar uno o más grupos protectores del péptido.

La eliminación de grupos protectores de cadenas laterales mediante la desprotección global normalmente utiliza una solución de desprotección que incluye un agente acidolítico para
15 escindir los grupos protectores de las cadenas laterales. Los reactivos acidolíticos utilizados comúnmente para la desprotección global incluyen el ácido trifluoroacético puro (TFA), HCl, ácidos de Lewis como $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ o Me_3SiBr , ácido fluorhídrico
20 líquido (HF), bromuro de hidrógeno (HBr), ácido trifluorometanosulfónico y combinaciones de los mismos. La solución de desprotección también incluye uno o más neutralizadores de cationes adecuados, por ejemplo, ditiotreitól (DTT), anisol, p-cresol, etanoditiol o sulfuro de dimetilo. La solución de des-
25 protección también puede incluir agua. Tal y como se utiliza aquí, las cantidades de reactivos presentes en la composición de desprotección se expresan normalmente en una proporción, en la que la cantidad de un componente individual se expresa como un numerador en "partes", como "partes de peso" o "partes de
30 volumen" y el denominador es el número de partes totales en la composición. Por ejemplo, una solución de desprotección que contiene TFA: H_2O : DTT en una proporción de 90:5:5 (peso/ pe-

so/ peso) posee TFA a 90/100 partes en peso, H₂O a 5/100 partes en peso, y DTT a 5/100 partes en peso.

En algunas realizaciones, la reacción de desprotección puede realizarse con una cantidad del agente acidolítico, preferiblemente TFA, en la composición de desprotección que es superior a 90/100 partes en peso. Otras composiciones de desprotección preferidas incluyen una cantidad de agente acidolítico en una proporción de 93/100 partes en peso o superior, o en una cantidad en el rango de entre 93/100 partes en peso y 10 95/100 partes en peso.

La precipitación se realiza normalmente utilizando un éter, por ejemplo, dietil éter o MTBE (Metil Terc Butil Éter). Tras la precipitación, preferiblemente se aísla el péptido y se seca antes de combinarse con otros ingredientes, liofilizarse, empaquetarse, almacenarse, procesarse y/o manipularse 15 de otro modo. Esto se puede lograr de cualquier forma adecuada. De acuerdo con una aproximación adecuada, el péptido se recoge mediante filtración, se lava mediante generosos lavados con MTBE para reducir el contenido final de sales hasta un nivel adecuado y después se seca. 20

La presente invención también proporciona técnicas útiles para purificar un amplio rango de péptidos, que incluye los péptidos GLP-1 y sus homólogos.

Un proceso de purificación particularmente preferido involucra al menos dos pasos de purificación a través de medio 25 cromatográfico, en que al menos el primer paso ocurre a un primer pH y al menos un segundo paso ocurre a un segundo pH. Más preferiblemente, el primer paso ocurre a un pH ácido, mientras que el segundo paso ocurre a un pH básico. En realizaciones preferidas, ocurre al menos un paso bajo condiciones 30 acídicas previamente a un paso bajo condiciones básicas. Una forma ilustrativa de poner en práctica esta aproximación de

purificación se describe en el contexto ilustrativo de la purificación del péptido 11 completamente protegido resultante del esquema 10 que se muestra en la Fig. 1. Inicialmente, el péptido está totalmente desprotegido. Tanto los grupos protectores de las cadenas laterales como de N-terminal se han escindido. Se llevó a cabo un primer paso cromatográfico en un gradiente de agua/ ACN (acetonitrilo), utilizando suficiente TFA para proporcionar un pH de entre alrededor de 1 y 5, preferiblemente de alrededor de 2. Entonces se lleva a cabo un segundo paso en un gradiente de agua/ ACN utilizando un poco de amoníaco y/o acetato amónico o similares, para proporcionar un pH de entre alrededor de 8 y 9, preferiblemente de entre 8,5 y 8,9.

Los valores de pH, ya sean ácidos o básicos, promueven la uniformidad, en el sentido que especies iónicas uniformes están presentes en cada caso. Así, el pH ácido deseado es suficientemente bajo para que sustancialmente todos los residuos de aminoácido en el material peptídico estén protonados. El pH básico deseado es suficientemente alto para que sustancialmente todos los residuos de aminoácido en el material peptídico estén desprotonados. La cromatografía ácida y básica puede llevarse a cabo en cualquier orden. Es conveniente realizar la cromatografía básica al final cuando el acetato de péptido es el producto deseado considerando que el acetato pueda ser el producto de la cromatografía.

Los principios de la presente invención se ilustrarán en detalle a continuación mediante los siguientes ejemplos ilustrativos. A partir de este momento, los porcentajes y proporciones están expresados en volumen a menos que se especifique de otra manera.

Ejemplo 1 - Síntesis en fase sólida del Fragmento 12 con protección de Fmoc en N-terminal y protección de la cadena lateral en la His y Glu.

A. Preparación de la resina de 2CTC cargada con Fmoc-Gly

5 Inicialmente, se preparó la resina 2CTC cargada con Fmoc-Gly. Las cantidades de reactivos utilizados se listan en la siguiente tabla:

Obtención de la resina de Fmoc-Gly-2-Clorotritilo					
Materiales	PM	Eq	mmol	gramos	mL
resina de cloruro de 2-Clorotritilo	-	-	52,24	35,06	-
Fmoc-Gly-OH	297,3	1,0	13,06	3,88	-
Diisopropiletilamina (DIEA)	129,25	2,35	30,72	3,97	
Dimetilformamida (DMF)					1270
Diclorometano (DCM)					1785
metanol: DIEA 9:1 en volumen					350
Isopropanol (IPA)					1050

La resina de 2-CTC se cargó en un reactor peptídico de 10 500 mL y se expandió con 400 mL de DCM durante 30 min. a 25°C. El lecho se drenó y se añadió una solución de Fmoc-Gly-OH y DIEA en 8 volúmenes de DMF: DCM (87,5:12,5). La mezcla se agitó bajo nitrógeno durante 2 horas a una temperatura de 25°C.

El lecho se drenó y se lavó una vez con 350 mL de DMF y 15 una vez con 175 mL de DMF. Posteriormente, los sitios activos restantes en la resina de 2-CTC se protegieron en el extremo con 350 mL de solución MeOH: DIEA (9:1) durante 1 hora. El lecho se drenó, se lavó con 250 mL de DMF dos veces y después con 350 mL de DCM cuatro veces. La resina se contrajo mediante

lavados con 3 X 350 mL de IPA. La resina se secó hasta peso constante para proporcionar 38,20 g de resina cargada. El análisis mostró un factor de carga de 0,18 mmol/ g.

B. Síntesis en fase sólida

5 La síntesis en fase sólida se llevó a cabo comenzando con 20,0 g de resina de 2-CTC cargada con Fmoc-Gly a 0,18 mmol/ g como se preparó en la Parte A de este Ejemplo 1. La resina se expandió en DCM (200 mL) durante 30 min. a 25°C. El solvente DCM se drenó y la resina se lavó tres veces con NMP (5 vol. 10 cada lavado).

La resina se trató entonces dos veces con piperidina al 20% en volumen en NMP (5 vol. cada tratamiento) para eliminar los grupos protectores de Fmoc. Tras el segundo tratamiento con piperidina al 20% /NMP, la resina se lavó cinco veces con 15 NMP (5 vol. cada lavado) hasta una prueba de cloranilo negativa.

Para preparar la solución de acoplamiento, se pesaron el aminoácido (2,85 equiv.) y 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol (6-Cl-HOBT, 2,85 equiv.), se disolvieron en 2,55 volúmenes de NMP 20 y después se combinaron con DIEA (3,25 equiv.) a entre 5°C y 10°C. El TBTU (2,85 equiv.) se disolvió en 1,3 volúmenes de NMP a entre 5°C y 10°C. Entonces se combinaron las dos soluciones. La solución resultante se añadió al recipiente de reacción. El recipiente se enjuagó con 1,3 volúmenes de DCM añadi- 25 do al reactor, que se agitó entonces durante 2-3 horas a entre 25°C y 27°C. La muestra se extrajo para un ensayo Kaiser para comprobar la finalización de la reacción. Si la reacción de acoplamiento resultaba incompleta tras 3 horas (ensayo Kaiser positivo), el recipiente de reacción se drenaba y se realizaba un re-acoplamiento con una nueva solución de aminoácido 30 activado. Tras completar la reacción de acoplamiento, la solución de acoplamiento se drenó y la resina se lavó con NMP 4

veces (5 vol. cada lavado). La eliminación del grupo protector Fmoc y el ciclo de reacción de acoplamiento se repitió para los restantes aminoácidos en el fragmento (es decir, en el orden de Glu(OtBu)→ Aib→ His(trt)).

5 Debido a la dificultad de la reacción de acoplamiento entre la Fmoc-His(trt)-OH activada y la H-Aib-Glu(OtBu)-Gly-2-CTC, y la inestabilidad de la Fmoc-His(trt)-OH activada, se forzó la finalización de la reacción de acoplamiento mediante el drenaje de la solución de reacción tras una hora y reali-
10 zando inmediatamente la reacción de re-acoplamiento con una segunda nueva solución activada de Fmoc-His(trt)-OH.

Todos los reactivos utilizados en la Parte B de este ejemplo se listan en la siguiente tabla:

Aminoáci- do	g	6-Cl- HOBT (g)	DIEA (g)	NMP (mL)	TBTU (g)	NMP (mL)	DCM (mL)	Tiempo de aco- pla- miento (min.)
Glu(OtBu)	4,34	1,76	1,55	51,0	3,28	26,0	26,0	150
Aib	3,36	1,76	1,51	51,0	3,29	26,0	26,0	155
His(trt)	6,32	1,78	1,56	51,0	3,29	26,0	26,0	60
reacopla- miento								
His(trt)	6,32	1,79	1,56	51,0	3,29	26,0	26,0	92

El fragmento peptídico unido a la resina se lavó con NMP
15 (5 vol.) 4 veces, DCM (6 vol.) 5 veces e IPA (5 vol.) 3 veces. La resina contraída se secó entonces a 35°C al vacío para proporcionar 22,58 g de resina con péptido unido a la resina.

C. Escisión del fragmento protegido de la cadena lateral y Fmoc de la resina

20 La resina obtenida en la Parte B anterior se expandió en DCM (12,5 volúmenes en relación al peso de la resina utiliza-

da; 12,5 ml de DCM por g de resina o 12,5 litros por kg) du-
rante 30 min. a 25°C y después se lavó con DCM 2 veces (6,25
vol. cada lavado) para eliminar cualquier residuo de NMP. La
resina se enfrió con el último lavado de DCM hasta -5°C. El
5 DCM se drenó y se añadió una solución fría de TFA/ DCM al 1%
(10 vol. a entre -5°C y -10°C) y se agitó durante 30 min. a
0°C. Se añadió piridina (1,3 equiv. de TFA) al reactor para
neutralizar el TFA. La solución de escisión se separó por fil-
tración y se recogió en un recipiente. Mientras el recipiente
10 se calentaba hasta 25°C, la resina se lavó con DCM 7 veces
(7,5 vol.). Los lavados se combinaron con la solución de esci-
sión. La solución de escisión de DCM se combinó con agua (7,5
vol.). La mezcla resultante se destiló bajo presión reducida
para eliminar el DCM (350 torr a 28°C). El fragmento peptídico
15 se separó del agua por precipitación cuando se eliminó el DCM.
El fragmento se lavó con agua y se secó a 30°C-35°C al vacío.
Se obtuvieron un total de 4,73 g de Fmoc-(Aib⁸)GLP-1(7-10)-OH.

Ejemplo 2

A. Preparación de la resina de 2-CTC cargada con Fmoc-Gly

20 Se preparó la resina de 2-CTC cargada con Fmoc-Gly. Las
cantidades de reactivos utilizados se listan en la siguiente
tabla:

Preparación de la resina de Fmoc-Gly-2-Clorotritilo					
Materiales	PM	Eq.	mmol	gramos	mL
resina de cloruro de 2- clorotritilo	-	-	59,66	40,04	-
Fmoc-Gly-OH	297,3	1,0	29,84	8,87	-
Diisopropiletilamina (DIEA)	129,25	1,67	49,90	6,45	
Dimetilformamida (DMF)					1580
Diclorometano (DCM)					1840
Metanol: DIEA 9:1					390

Isopropanol (IPA)					1050
-------------------	--	--	--	--	------

La resina de 2-CTC se cargó en un reactor peptídico de 500 mL y se expandió con 400 mL de DCM durante 30 min. a 25°C. La resina se drenó y se añadió una solución de Fmoc-Gly-OH y DIEA en 8 volúmenes de DMF: DCM (87,5:12,5). La mezcla se agi-
5 tó bajo nitrógeno durante 2 horas a una temperatura de 25°C.

El lecho de resina se drenó y se lavó una vez con 400 mL de DMF y una vez con 200 mL de DMF. Posteriormente, los sitios activos restantes en la resina de 2-CTC se protegieron en el extremo con 390 mL de solución de MeOH: DIEA (9:1 en volumen)
10 durante 1 hora. El lecho se drenó de nuevo, se lavó con 350 mL de DMF dos veces, y se lavó con 350 mL de DCM cuatro veces. La resina se contrajo entonces mediante lavados con 3 X 350 mL de IPA. La resina se secó a 35°C al vacío hasta un peso constante para proporcionar 48,51 g de resina cargada. El análisis mos-
15 tró un factor de carga de 0,54 mmol/ g.

B. Síntesis en fase sólida

La síntesis en fase sólida se llevó a cabo comenzando con 27,59 g de resina de 2-CTC cargada con Fmoc-Gly a 0,54 mmol/ g. La resina se expandió en DCM (300 mL) durante 30 min. a
20 25°C. El solvente de DCM se drenó y la resina se lavó tres veces con NMP (5 vol. cada lavado).

La resina se trató entonces dos veces con piperidina al 20% en volumen en NMP (5 vol. cada tratamiento) para eliminar los grupos protectores Fmoc. Tras el segundo tratamiento con
25 piperidina al 20%/ NMP, la resina se lavó seis veces con NMP (5 vol. cada lavado) hasta una prueba de cloranilo negativa.

Para preparar la solución de acoplamiento, se pesaron el aminoácido (1,7 equiv.) y el 6-cloro-1-hidroxibenzo-triazol (6-Cl-HOBT, 1,7 equiv.), se disolvieron en 4,6 volúmenes de
30 NMP y después se combinaron con DIEA (1,9 equiv.) a entre 5°C y 10°C. El TBTU (1,7 equiv.) se disolvió en 2,28 volúmenes de

NMP a entre 5°C y 10°C. Entonces se combinaron las dos soluciones. La solución resultante se añadió al recipiente de reacción. El recipiente se enjuagó con los 2,28 volúmenes de DCM añadidos al reactor, que se agitó entonces durante 2-3 horas a 25°C-27°C. Se extrajo una muestra para un ensayo Kaiser para comprobar la finalización de la reacción. Tras completar la reacción de acoplamiento, se drenó la solución de acoplamiento y la resina se lavó con NMP 4 veces (5 vol. cada lavado). La eliminación del grupo Fmoc y el ciclo de reacción de acoplamiento se repitieron para los restantes aminoácidos del fragmento (es decir, en el orden Glu(OtBu)→ Aib→ His(trt)).

Todos los reactivos utilizados en este ejemplo se listan en la siguiente tabla:

Aminoácido	g	6-Cl-HOBT (g)	DIEA (g)	NMP (mL)	TBTU (g)	NMP (mL)	DCM (mL)	T. de acoplamiento (min.)
Glu(OtBu)	10,79	4,24	2,67	127	8,13	63	63	156
Aib	8,26	4,32	3,73	125	8,14	65	65	180
His(trt)	15,68	4,31	3,69	125	8,12	65	65	180

C. Escisión del fragmento de la resina

La resina obtenida se lavó con NMP (5 vol.) 6 veces y después con DCM (6 vol.) 8 veces para eliminar el residuo de NMP. La resina se enfrió en el último lavado con DCM hasta -5°C. Después del drenaje de DCM, se añadió una solución fría (entre -5°C y -10°C) de TFA al 1% / DCM (10 vol.), y la mezcla resultante se agitó durante 30 min. a 0°C. Se cargó piridina (1,3 equiv., de TFA) en el reactor para neutralizar el TFA. La solución de escisión se recogió en el recipiente. Mientras el recipiente se calentaba hasta 25°C, la resina se lavó con DCM (7,5 vol.) 11 veces y se añadió a la solución de escisión. La solución de DCM se combinó con agua (10 vol.). La mezcla re-

sultante se destiló bajo presión reducida para eliminar el DCM (350 torr a 28°C). El fragmento se separó del agua por precipitación cuando se eliminó el DCM. El fragmento se lavó con agua y se secó a 30°C-35°C al vacío. Se obtuvieron un total de 5 11,12 g de Fmoc-(Aib⁸)GLP-1(7-10)-OH (rendimiento del 78,8%).

Ejemplo 3

A.Preparación de la resina de 2-CTC cargada con Fmoc-Gly

Se preparó la resina de 2-CTC cargada con Fmoc-Gly. Las cantidades de reactivos utilizados se listan en la siguiente 10 tabla:

Preparación de la resina de Fmoc-Gly-2-Clorotritilo					
Materiales	PM	Eq.	mmol	gramos	mL
Resina de cloruro de 2-Clorotritilo	-	-	60,88	40,86	-
Fmoc-Gly-OH	297,3	1,0	42,58	12,66	-
Diisopropiletilamina (DIEA)	129,25	1,48	63,21	8,17	
Dimetilformamida (DMF)					1380
Diclorometano (DCM)					1840
Metanol: DIEA 9:1					390
Isopropanol (IPA)					1000

La resina de 2-CTC se cargó en un reactor peptídico de 500 mL y se expandió con 400 mL de DCM durante 30 min. El lecho se drenó y se añadió una solución de Fmoc-Gly-OH y DIEA en 15 8 volúmenes de DMF: DCM (87,5: 12,5). La mezcla se agitó bajo nitrógeno durante 2 horas a una temperatura de 25°C.

El lecho se drenó y se lavó una vez con 400 mL de DMF y una vez con 200 mL de DMF. Posteriormente, los sitios activos restantes en la resina de 2-CTC se protegieron en el extremo 20 con 390 mL de solución de MeOH: DIEA (9:1) durante 1 hora. El

lecho se drenó, se lavó con 350 mL de DMF dos veces y después con 350 mL de DCM cuatro veces. La resina se contrajo entonces mediante lavados con 4 X 250 mL de IPA. La resina se secó a 35°C al vacío hasta un peso constante para proporcionar 52,02 g de resina cargada. El análisis mostró un factor de carga de 0,72 mmol/ g.

B. Síntesis en fase sólida

La síntesis en fase sólida se llevó a cabo comenzando con los 24,43 g de resina de 2-CTC cargada con Fmoc-Gly a 0,72 mmol/ g. La resina se expandió en DCM (250 mL) durante 30 min. a 25°C. El solvente de DCM se drenó y la resina se lavó tres veces con NMP (5 vol. cada lavado).

La resina se trató entonces dos veces con piperidina al 20% en NMP (5 vol. cada tratamiento) para eliminar los grupos protectores de Fmoc. Tras el segundo tratamiento con piperidina al 20% en NMP, la resina se lavó seis veces con NMP (5 vol. cada lavado) hasta una prueba de cloranilo negativa.

Para preparar la solución de acoplamiento, se pesaron el aminoácido y el 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol (6-Cl-HOBT), se disolvieron en NMP y después se combinaron con DIEA a 10°C-5°C. El TBTU (1,7 equiv.) se disolvió en 2,28 volúmenes de NMP a entre 5°C y 10°C. Entonces se combinaron las dos soluciones. La solución resultante se añadió al recipiente de reacción. El recipiente se enjuagó con el DCM añadido al reactor (véanse las cantidades en la siguiente tabla), que se agitó entonces durante 2-6 horas a 25°C-27°C. Se extrajo muestra para un ensayo Kaiser para comprobar la finalización de la reacción. Si la reacción de acoplamiento estaba incompleta tras 3 horas (ensayo Kaiser positivo), el recipiente de reacción se drenaba y se realizaba un re-acoplamiento con una nueva solución de aminoácido activado. Tras completar la reacción de acoplamiento, la solución de acoplamiento se drenó y la resina se lavó

con NMP 4 veces (5 vol. cada lavado). La eliminación del grupo protector Fmoc y el ciclo de reacción de acoplamiento se repitieron para los restantes aminoácidos del fragmento (es decir, en el orden de Glu(OtBu)→ Aib→ His(trt)).

5 Todos los reactivos utilizados en este ejemplo se listan en la siguiente tabla:

Amino-ácido	g / Eq	6-Cl-HOBT (g/Eq)	DIEA (g/Eq)	NMP (mL)	TBTU (g/Eq)	NMP (mL)	DCM (mL)	T. de acoplamiento (min.)
Glu(OtBu)	12,40 /1,65	4,95 /1,65	4,29 /1,85	145	9,37 /1,65	70	70	180
Aib	9,48 /1,65	4,96 /1,65	4,23 /1,85	140	9,33 /1,65	70	70	352
reacoplamiento Aib	4,73 /0,83	2,48 /0,83	2,15 /0,92	72	4,85 /0,83	36	36	120
His(trt)	21,18 /1,94	5,80 /1,94	4,99 /2,14	140	10,98 /1,94	70	70	180
reacoplamiento His(trt)	10,80 /0,97	2,90 /0,97	2,48 /1,07	72	5,49 /0,97	36	36	180

C. Escisión del fragmento Fmoc-AA(7-10)-OH de la resina

La resina obtenida se lavó con NMP (5 vol.) 6 veces y
 10 después con DCM (6 vol.) 7 veces para eliminar la NMP. La resina se enfrió con el último lavado de DCM hasta -5°C. El DCM se drenó y el lecho de la resina se lavó con una solución fría (entre -5°C y -10°C) de TFA al 1%/ DCM (11,26 vol.) durante 5 min. a 0°C. La solución de escisión se recogió en el recipiente,
 15 te, al que se le había añadido piridina (1,3 equiv. de TFA to-

tal) para neutralizar el TFA. Entonces, se añadió una segunda porción de TFA al 1% / DCM fría (6,14 vol.) al reactor y se agitó durante 2 min. La segunda solución de escisión se añadió de nuevo en el recipiente recolector. Mientras el recipiente se calentaba hasta 25°C, la resina se lavó con DCM 9 veces (8,2 vol.) y se añadió a la solución de escisión. La solución de DCM se combinó con agua (8,2 vol.). La mezcla resultante se destiló bajo presión reducida para eliminar el DCM (350 torr a 28°C). El fragmento se separó del agua por precipitación cuando se eliminó el DCM. El fragmento se lavó con agua y se secó a 30°C-35°C al vacío. Se obtuvieron un total de 14,02 g de Fmoc-(Aib⁸)GLP-1(7-10)-OH (rendimiento del 86,6%) de acuerdo con el Id. de Sec. N° 7. El análisis mostró una pureza del 94,3% AN.

15 **Ejemplo 4 - Síntesis en fase sólida de la cadena lateral protegida Fmoc-(Aib³⁵) GLP-1(23-35)-OH**

A.Preparación de la resina de 2-CTC cargada con Fmoc-Aib

Se preparó la resina de 2-CTC cargada con Fmoc-Aib. Las cantidades de reactivos utilizados se listan en la siguiente
20 tabla:

Preparación de la resina de Fmoc-Aib-2-Clorotritilo					
Materiales	PM	Eq.	mmol	gramos	mL
Resina de cloruro de 2-clorotritilo	-	-	59,66	40,04	-
Fmoc-Aib-OH	325,5	1,0	14,91	4,85	-
Diisopropiletilamina (DIEA)	129,25	2,39	35,20	4,61	
Dimetilformamida (DMF)					1480
Diclorometano (DCM)					1840
Metanol: DIEA 9: 1					450
Isopropanol (IPA)					1050

La resina de 2-CTC se cargó en un reactor peptídico de 500 mL y se expandió con 400 mL de DCM durante 30 min. El lecho se drenó y se añadió una solución de Fmoc-Aib-OH y DIEA en 8 volúmenes de DMF: DCM (87,5:12,5). La mezcla se agitó bajo 5 nitrógeno durante 2 horas a una temperatura de 25°C.

El lecho se drenó y se lavó una vez con 400 mL de DMF y otra con 200 mL. Posteriormente, los sitios activos restantes en la resina de 2-CTC se protegieron en el extremo con 400 mL de solución de MeOH: DIEA (9:1) durante 1 hora. El lecho se 10 drenó. La resina se lavó una vez con 450 mL de DMF/ MeOH/ DIEA (4: 0,9: 0,1), una vez con 200 mL de DMF y después cuatro veces con 350 mL de DCM. La resina se contrajo mediante lavados con 3 x 350 mL de IPA. La resina se secó hasta peso constante para proporcionar 45,15 g de resina cargada. El análisis mos- 15 tró un factor de carga de 0,24 mmol/ g.

B. Síntesis en fase sólida

Se cargaron 10,01 g de resina de CTC-2 con Fmoc-Aib con factor de carga de 0,24 mmol/ g en un recipiente de reacción y se expandieron en DCM (120 mL) durante 30 min. a 25°C. El sol- 20 vente de DCM se drenó, y la resina se lavó tres veces con NMP (6 vol. cada lavado).

La resina se trató entonces dos veces con piperidina al 5% en NMP (6 vol. cada tratamiento) para eliminar los grupos protectores Fmoc. Tras el segundo tratamiento con piperidina 25 al 5%/ NMP, la resina se lavó cuatro veces con NMP (6 vol. cada lavado).

Para preparar la solución de acoplamiento, se disolvieron el aminoácido (1,875 equiv.) y 1-hidroxibenzotriazol monohidrato (HOBt hidrato, 2,07 equiv.) en 3,5 volúmenes de NMP a 30 5°C-10°C y después se combinaron con una solución de 16,1 mL de HBTU (2,0 equiv.) en NMP (1,5 vol.). Después se añadieron 2,2 mL de DIEA (2,63 equiv.) al recipiente de activación a

10°C-5°C. La solución resultante se transfirió al recipiente de reacción. El recipiente de activación se enjuagó con 1,5 volúmenes de DCM añadido al reactor, que se agitó entonces durante 2 horas a 25°C. El recipiente de reacción se drenó. La
5 reacción de acoplamiento se repitió una vez más con nueva solución de aminoácido activado (1,875 equiv.). Tras completar la segunda reacción de acoplamiento, la solución de acoplamiento se drenó y la resina se lavó con NMP 4 veces (6 vol. cada lavado). Después, la eliminación del grupo Fmoc y el ciclo de reacción de acoplamiento se repitieron para los restantes aminoácidos en el fragmento (es decir, en el orden de
10 Lys(Boc)→ Val→ Leu→ Trp(Boc)→ Ala→ Ile→ Phe→ Glu(OtBu)→ Lys(Boc)→ Ala→ Ala→ Gln(trt)).

Todos los reactivos utilizados en este ejemplo se listan
15 en la siguiente tabla:

Reacción de acoplamiento de Fmoc-AA(23-35)-OH Ejemplo 1								
Aminoácido	g	HOBT hidrato (g)	NMP (mL)	HBTU (g)	NMP (mL)	DCM (mL)	DIEA (mL)	T de acoplamiento (min.)
Lys(Boc)	2,12	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
reacoplamiento Lys(Boc)	2,12	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
Val	1,53	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
reacoplamiento Val	1,53	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
Leu	1,58	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
reacoplamiento Leu	1,58	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120

Trp(Boc)	2,37	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
reacopla- miento Trp(Boc)	2,36	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
Ala	1,42	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
reacopla- miento Ala	1,42	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
Ile	1,59	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
reacopla- miento Ile	1,59	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
Phe	1,74	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
reacopla- miento Phe	1,74	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
Glu(OtBu)	1,93	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
reacopla- miento Glu(OtBu)	1,92	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
Lys(Boc)	2,12	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
reacopla- miento Lys(Boc)	2,11	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
Ala	1,41	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
reacopla- miento Ala	1,40	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
Ala	1,41	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
reacopla- miento Ala	1,40	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120

Gln(trt)	2,77	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
reacopla-	2,76	0,76	30,0	1,83	15,0	15,0	1,1	120
miento								
Gln(trt)								

La resina obtenida se aisló lavando 4 veces con NMP (6 vol.), 4 veces con DCM (6 vol.) y 3 veces con isopropanol (IPA, 6 vol.). La resina obtenida se secó a 35°C al vacío. Se obtuvieron 14,3 g de la resina.

5 **C. Escisión del fragmento intermediario de la resina construida**

Se expandieron 6,6 g de la resina obtenida en el paso anterior en 10 volúmenes de DCM durante 30 min., y se enfrió hasta -10°C. El DCM se drenó y se añadió una solución fría de 10 TFA al 1%/ DCM (12 vol. a entre -5°C y -10°C) y se agitó durante 30 min. a 0°C. La solución de escisión se recogió en un recipiente que contenía piridina (2-3 equiv. de TFA). Mientras se calentaba a 25°C, la resina se agitó con TFA al 1%/ DCM (10 vol.) durante 5 min. y se añadió piridina (2-3 equiv.). Tras 15 otros 5 minutos, se recogió la solución. La resina se lavó con DCM 4 veces (10 vol.). Todos los lavados de DCM se combinaron con agua (agua/ DCM = 1/4). La mezcla resultante se destiló bajo presión reducida para eliminar el DCM (350 torr a 28°C). El fragmento se separó del agua por precipitación cuando se 20 eliminó el DCM. El fragmento se lavó con agua y se secó a 30°C-35°C al vacío. EL procedimiento de escisión se repitió una vez más. Se obtuvieron un total de 2,36 g de Fmoc-(Aib³⁵) GLP-1(23-35)-OH (rendimiento del 92 %).

Ejemplo 5

25 **A. Preparación de la resina de 2-CTC cargada con Fmoc-Aib**

Se preparó la resina de 2-CTC cargada con Fmoc-Aib. Las cantidades de reactivos utilizados se listan en la siguiente tabla:

Preparación de la resina de Fmoc-Aib-2-Clorotritilo					
Materiales	PM	Equiv.	mmol	gramos	mL
Resina de cloruro de 2-clorotritilo	-	-	59,67	40,05	-
Fmoc-Aib-OH	325,5	1,0	14,92	4,85	-
Diisopropiletilamina (DIEA)	129,25	2,35	35,20	4,55	
Dimetilformamida (DMF)					1280
Diclorometano (DCM)					1840
Metanol: DIEA 9: 1					400
Isopropanol (IPA)					1050

La resina de 2-CTC se cargó en un reactor peptídico de 500 mL y se expandió con 400 mL de DCM durante 30 min. El lecho se drenó y se añadió una solución de Fmoc-Aib-OH y DIEA en 8 volúmenes de DMF: DCM (87,5: 12,5). La mezcla se agitó bajo 5 nitrógeno durante 2 horas a una temperatura de 25°C.

El lecho se drenó y se lavó con 400 mL de DMF. Posteriormente, cualquier sitio activo restante en la resina de 2-CTC se protegió en el extremo con 400 mL de solución de MeOH: DIEA (9:1) durante 1 hora. El lecho se drenó, se lavó una vez con 10 400 mL de DMF, una vez con 200 mL de DMF y cuatro veces con 350 mL de DCM. La resina se contrajo mediante lavados con 3 x 350 mL de IPA. La resina se secó hasta peso constante para proporcionar 45,32 g de resina cargada. El análisis mostró un factor de carga de 0,30 mmol/ g.

15 **B. Síntesis en fase sólida**

La síntesis en fase sólida se llevó a cabo comenzando con 15,0 g de resina de CTC-2 con Fmoc-Aib cargada a 0,24 mmol/ g. La resina se expandió en DCM (150 mL) durante 30 min. a 25°C. El solvente de DCM se drenó, y la resina se lavó dos veces con 20 NMP DCM (6 vol. cada lavado) y tres veces con NMP (6 vol. cada

lavado).

La resina se trató entonces dos veces con piperidina al 20% en NMP (6 vol. cada tratamiento) para eliminar los grupos protectores Fmoc. Tras el segundo tratamiento con piperidina al 20%/ NMP, la resina se lavó seis veces con NMP (6 vol. cada lavado) hasta un ensayo cloranilo negativo.

Para preparar la solución de acoplamiento, se pesaron el aminoácido (1,7 equiv.) y el 6-cloro-1-hidroxibenzo-triazol (6-Cl-HOBT, 1,7 equiv.), se disolvieron en 2,6 volúmenes de NMP a 10°C-5°C, y después se combinaron con DIEA (de 1,9 a 3,0 equiv.). Se disolvió TBTU o HBTU (1,7 equiv.) en 1,33 volúmenes de NMP a 10°C-5°C. Después se combinaron las dos soluciones. La solución resultante se añadió a un recipiente de reacción. El recipiente de mezclado se enjuagó con 1,33 volúmenes de DCM en el reactor, que se agitó entonces con resina durante 2-3 horas a 25°C-27°C. Se extrajo muestra para un ensayo Kaiser para comprobar la finalización de la reacción. Si la reacción de acoplamiento estaba incompleta tras 3 horas (ensayo Kaiser positivo), el recipiente de reacción se drenaba y se realizaba un re-acoplamiento con nueva solución de aminoácido activado. Tras completar la reacción de acoplamiento, la solución de acoplamiento se drenó y la resina se lavó con NMP 4 veces (6 vol. cada lavado). Entonces, la eliminación del grupo Fmoc y el ciclo de reacción de acoplamiento se repitió para los restantes aminoácidos en el fragmento (es decir, en el orden Lys(Boc)→ Val→ Leu→ Trp(Boc)→ Ala→ Ile→ Phe→ Glu(OtBu)→ Lys(Boc)→ Ala→ Ala→ Gln(trt)).

Debido a un posible efecto de refuerzo entre la 2-metilalanina (Aib) y la resina de 2-CTC, es considerablemente difícil forzar hasta la finalización las primeras dos reacciones de acoplamiento de aminoácidos (Lys(Boc)-34 y Val-33). Por lo tanto, ambas reacciones de acoplamiento de (Lys(Boc)-34,

Val-33) se realizaron tres veces (es decir, tras el acoplamiento se realizaron dos re-acoplamientos). Además, se utilizó anhídrido acético para proteger el extremo del material unido a la resina que no ha reaccionado tras las reacciones de acoplamiento de Lys(Boc)-34 y Val-33. Esto ha mejorado la eficiencia de las posteriores purificaciones separando las impurezas del producto deseado durante la purificación cromatográfica.

Todos los reactivos utilizados en este ejemplo se listan en la siguiente tabla:

Reacción de acoplamiento del Fmoc-AA(23-35)-OH									
Aminoácido	g/ Eq	6-Cl-HOBT (g/Eq)	DIEA (g/ Eq)	NMP (mL)	TBTU (g/ Eq)	HBTU (g/ Eq)	NMP (mL)	DCM (mL)	T. de acoplamiento (min.)
1° Lys(Boc)	3,61 / 1,7	1,33 / 1,7	1,15 / 1,9	39,0	2,50 / 1,7	-	20,0	20,0	175
2° Lys(Boc)	3,61 / 1,7	1,33 / 1,7	1,16 / 1,9	39,0	2,48 / 1,7	-	20,0	20,0	180
3° Lys(Boc)	3,61 / 1,7	1,33 / 1,7	1,13 / 1,9	39,0	2,47 / 1,7	-	20,0	20,0	180
Anhídrido Acético	2,33 / 5,0	-	3,22 / 5,5	60,0	-	-	30,0	-	120
1° Val	2,62 / 1,7	1,33 / 1,7	1,13 / 1,9	39,0	2,51 / 1,7	-	20,0	20,0	170
2° Val	2,62 / 1,7	1,33 / 1,7	1,17 / 1,9	39,0	2,49 / 1,7	-	20,0	20,0	180
3° Val	2,63 / 1,7	1,32/ 1,7	3,67/ 1,9	39,0	2,50/ 1,7	-	20,0	20,0	141
Anhídrido	4,69/	-	7,13/	60,0	-	-	30,0	-	153

Acético	10,0		12,0						
Leu	2,73/ 1,7	1,35/ 1,7	1,12/ 1,9	39,0	2,50/ 1,7	-	20,0	20,0	180
Trp(Boc)	4,03/ 1,7	1,33/ 1,7	1,78/ 3,0	39,0	2,50/ 1,7	-	20,0	20,0	180
Ala	2,41/ 1,7	1,31/ 1,7	1,78/ 3,0	39,0	-	2,93/ 1,7	20,0	20,0	180
Ile	2,72/ 1,7	1,31/ 1,7	1,78/ 3,0	39,0	-	2,93/ 1,7	20,0	20,0	180
Phe	3,00/ 1,7	1,31/ 1,7	1,78/ 3,0	39,0	-	2,93/ 1,7	20,0	20,0	180
Glu(OtBu)	3,28/ 1,7	1,31/ 1,7	1,78/ 3,0	39,0	-	2,93/ 1,7	20,0	20,0	180
Lys(Boc)	3,61/ 1,7	1,31/ 1,7	1,78/ 3,0	39,0	-	2,93/ 1,7	20,0	20,0	180
Ala	2,40/ 1,7	1,31/ 1,7	1,78/ 3,0	39,0	-	2,93/ 1,7	20,0	20,0	180
Ala	2,41/ 1,7	1,31/ 1,7	1,78/ 3,0	39,0	-	2,93/ 1,7	20,0	20,0	180
Gln(trt)	4,72/ 1,7	1,31/ 1,7	1,78/ 3,0	39,0	-	2,93/ 1,7	20,0	20,0	180
Gln(trt)	4,72/ 1,7	1,31/ 1,7	1,78/ 3,0	39,0	-	2,93/ 1,7	20,0	20,0	180

C. Escisión del fragmento de la resina construida

La resina obtenida anteriormente se lavó con DCM 7 veces (6 vol. cada lavado) para eliminar el residuo de NMP, y la resina se enfrió con el último lavado de DCM hasta -5°C . El DCM se drenó, y se añadió una solución fría de TFA al 1% / DCM (12 vol. a entre -5°C y -10°C) y se agitó durante 30 min. a 0°C . La solución de escisión se recogió en un recipiente que contenía piridina (1,3 equiv. de TFA). Mientras el recipiente se calentó hasta 25°C , la resina se lavó con DCM 9 veces (10

vol.) y se añadió a la solución de escisión. La solución de DCM se combinó con agua (6 vol.). La mezcla resultante se destiló bajo presión reducida para eliminar el DCM (350 torr a 28°C). El fragmento se separó del agua por precipitación cuando se eliminó el DCM. El fragmento se lavó con agua y se secó a 30°C-35°C al vacío. En este ejemplo el procedimiento de escisión se repitió una vez más. Se obtuvieron un total de 6,78 g de Fmoc-(Aib³⁵) GLP-1(23-35)-OH (rendimiento del 68,1%) con una pureza del 87,3% AN.

10 **Ejemplo 6**

A. Obtención de la resina de 2-CTC cargada con Fmoc-Aib

Se preparó la resina de 2-CTC cargada con Fmoc-Aib. Las cantidades de reactivos utilizados se listan en la siguiente tabla:

Preparación de Resina Fmoc-Aib-2-Clorotritilo					
Materiales	PM	Eq.	mmol	gramos	mL
Resina de cloruro de 2-clorotritilo	-	-	59,85	40,44	-
Fmoc-Aib-OH	325,5	1,0	20,95	6,82	-
Diisopropiletilamina (DIEA)	129,25	0,95	19,88	2,57	
Dimetilformamida (DMF)					1280
Diclorometano (DCM)					1840
Metanol: DIEA 9: 1					400
Isopropanol (IPA)					1050

15 La resina de 2-CTC se cargó en un reactor peptídico de 500 mL y se expandió con 400 mL de DCM durante 30 min. El lecho se drenó y se añadió una solución de Fmoc-Aib-OH y DIEA en 8 volúmenes de DMF: DCM (87,5:12,5). La mezcla se agitó bajo nitrógeno durante 2 horas a una temperatura de 25°C.

20 El lecho se drenó y se lavó con 400 mL de DMF. Posterior-

mente, cualquier sitio activo restante en la resina 2-CTC se protegió en el extremo con 400 mL de solución de MeOH: DIEA (9:1) durante 1 hora. El lecho se drenó, se lavó una vez con 400 mL de DMF, una vez con 200 mL de DMF y cuatro veces con 350 mL de DCM. La resina se contrajo mediante lavados con 3 x 350 mL de IPA. La resina se secó hasta peso constante para proporcionar 47,56 g de resina cargada. El análisis mostró un factor de carga de 0,37 mmol/ g.

B. Síntesis en Fase sólida

La síntesis en fase sólida se llevó a cabo comenzando con 25,0 g de resina de CTC-2 con Fmoc-Aib cargada con 0,37 mmol/ g. La resina se expandió en DCM (250 mL) durante 30 min. a 25°C. El solvente de DCM se drenó, y la resina se lavó dos veces con DCM (6 vol. cada lavado) y tres veces con NMP (6 vol. cada lavado).

La resina se trató entonces dos veces con piperidina al 20% en NMP (6 vol. cada tratamiento) para eliminar los grupos protectores Fmoc. Tras el segundo tratamiento con piperidina al 20%/ NMP, la resina se lavó seis veces con NMP (6 vol. cada lavado) hasta un ensayo cloranilo negativo.

Para preparar la solución de acoplamiento, se pesaron el aminoácido y el 6-cloro-1-hidroxibenzotriazol (6-Cl-HOBT), se disolvieron en 3,2 volúmenes de NMP (o DMF para Lys-34, Val-33 y Gln-23) y después se combinaron con DIEA a entre 10°C y 5°C. Se disolvió TBTU en 1,6 volúmenes de NMP (o DMF para Lys-34, Val-33 y Gln-23) a 10°C-5°C. Después se combinaron las dos soluciones. La solución resultante se añadió a un recipiente de reacción, y el recipiente se enjuagó con 1,6 volúmenes de DCM en el reactor, que se agitó entonces con la resina durante 2-3 horas a entre 25°C y 27°C. Se extrajo muestra para un ensayo Kaiser para comprobar la finalización de la reacción. Si la reacción de acoplamiento estaba incompleta tras 3 horas (ensa-

yo Kaiser positivo), el recipiente de reacción se drenaba y se realizaba un re-acoplamiento con nueva solución de aminoácido activado. Tras completar la reacción de acoplamiento, la solución de acoplamiento se drenó y la resina se lavó con NMP 4 veces (6 vol. cada lavado). Entonces, la desprotección del grupo Fmoc y el ciclo de reacción de acoplamiento se repitieron para los restantes aminoácidos del fragmento (es decir, en el orden Lys(Boc)→ Val→ Leu→ Trp(Boc)→ Ala→ Ile→ Phe→ Glu(OtBu)→ Lys(Boc)→ Ala→ Ala→ Gln(trt)).

Debido a un posible efecto de refuerzo entre la 2-metilalanina (Aib) y la resina de 2-CTC, existe una dificultad considerable en forzar hasta su finalización las primeras dos reacciones de acoplamiento de aminoácidos (Lys(Boc)-34 y Val-33). Las condiciones de acoplamiento de (Lys(Boc)-34, Val-33) se modificaron para aumentar la utilización de ambos aminoácidos y el 6-Cl-HOBT de 1,7 Equiv. a 2,5 Equiv. y la DIEA de 1,9 Equiv. a 3,0 Equiv. El solvente para la reacción de acoplamiento también se cambió de NMP a DMF para forzar la finalización de la reacción de acoplamiento. Además, en este ejemplo se utilizó anhídrido acético para proteger el extremo del material unido a la resina que no ha reaccionado tras las reacciones de acoplamiento de Lys(Boc)-34 y Val-33. Esto ha mejorado la eficiencia de la posterior purificación separando las impurezas del producto deseado durante la purificación cromatográfica.

Todos los reactivos utilizados en este ejemplo se listan en la siguiente tabla:

Reacción de acoplamiento de Fmoc-AA(23-35)-OH										
Material	peso (g/ Eq.)	6-Cl- HOBT (g/Eq)	DIEA (g/ Eq)	DMF (mL)	NMP (mL)	TBTU (g/ Eq)	DMF (mL)	NMP (mL)	DCM (mL)	T. acop. (min)
Lys (Boc)	10,84 / 2,5	3,93/ 2,5	3,63/ 3,0	80,0	-	7,44/ 2,5	40,0	-	40,0	170
Anhídrido acético	4,72/ 5,0	-	6,61/ 5,5	-	100,0	-	-	50,0	-	120
Val	7,85/ 2,5	3,92/ 2,5	3,67/ 3,0	80,0	-	7,44/ 2,5	40,0	-	40,0	177
Anhídrido acético	9,48/ 10,0	-	14,46 /12,0	-	100,0	-	-	50,0	-	120
Leu	5,56/ 1,7	2,68/ 1,7	2,33/ 1,9	-	78,6	5,05/ 1,7	-	39,3	39,3	184
Trp (Boc)	8,30/ 1,7	2,70/ 1,7	2,28/ 1,9	-	78,6	5,05/ 1,7	-	39,3	39,3	180
Ala	4,92/ 1,7	2,68/ 1,7	2,30/ 1,9	-	78,6	5,05/ 1,7	-	39,3	39,3	177
Ile	5,56/ 1,7	2,70/ 1,7	2,26/ 1,9	-	78,6	5,06/ 1,7	-	39,3	39,3	168
Phe	6,10/ 1,7	2,70/ 1,7	2,31/ 1,9	-	78,6	5,06/ 1,7	-	39,3	39,3	168
Glu (OtBu)	6,72/ 1,7	2,67/ 1,7	2,29/ 1,9	-	78,6	5,05/ 1,7	-	39,3	39,3	168
Lys (Boc)	7,39/ 1,7	2,70/ 1,7	2,29/ 1,9	-	78,6	5,05/ 1,7	-	39,3	39,3	165
Ala	4,91/ 1,7	2,70/ 1,7	2,41/ 1,9	-	78,6	5,05/ 1,7	-	39,3	39,3	180
Ala	4,92/ 1,7	2,68/ 1,7	2,32/ 1,9	-	78,6	5,03/ 1,7	-	39,3	39,3	171
Gln(trt)	14,13 /2,5	3,94/ 2,5	3,71/ 3,0	80,0	-	7,42/ 2,5	40,0	-	40,0	185

C. Escisión del fragmento de la resina construida

La resina obtenida anteriormente se lavó con DCM 6 veces (6 vol. cada lavado) para eliminar la NMP, y la resina se enfrió con el último lavado de DCM a -5°C . El DCM se drenó y se
5 añadió una solución fría de TFA al 1% / DCM (10 vol. a entre -5°C y -10°C) y se agitó durante 30 min. a 0°C . La solución de escisión se recogió en un recipiente que contenía piridina (1,3 equiv. de TFA). Mientras el recipiente se calentaba a 25°C , la resina se lavó con DCM 7 veces (6 vol.) y se añadió a
10 la solución de escisión. La solución de DCM se combinó con agua (10 vol.). La mezcla resultante se destiló bajo presión reducida para eliminar el DCM (350 torr a 28°C). El fragmento se separó del agua por precipitación cuando se eliminó el DCM. El fragmento se lavó con agua y se secó a 30°C - 35°C al vacío.
15 En este ejemplo el procedimiento de escisión se repitió una vez más para conseguir una escisión completa. Se obtuvieron un total de 12,36 g de Fmoc-(Aib³⁵) GLP-1(23-35)-OH (rendimiento del 59,35%) con una pureza del 84,3% AN.

Ejemplo 7

20 1. Lavado de la resina

Empezando con la resina de Fmoc-Gly-O-2-CTC precargada (cargada de 0,18 a 0,65 mmol/ g), o de Fmoc-Aib-O-2-CTC precargada (cargada de 0,25 a 0,65 mmol/ g), se aplicó la química estándar de Fmoc. La resina se expandió primero en 10 volúme-
25 nes de DCM durante 30-60 min. Después se drenó el DCM y la resina se lavó 3-5 veces (5 min. cada vez) con 10 volúmenes de NMP.

2. Ciclo General de Síntesis:

Utilizando una resina lavada de acuerdo con la Sección A
30 de este Ejemplo 7, se logró la eliminación de Fmoc mediante dos tratamientos con una solución ~10x de piperidina al 20% en NMP (v/v). Los tratamientos duraron 15-30 min. cada uno. La

solución de piperidina/ NMP se drenó tras cada tratamiento. La resina se lavó entonces con NMP 4-5 veces (10 volúmenes, 5 min. cada uno).

Para preparar la solución de acoplamiento, se pesaron el
5 aminoácido protegido con Fmoc (AA) y el HOBt (a 1,5-2,0 equiv.), se disolvieron en 4 volúmenes de NMP a 10°C y se combinaron con DIEA (1,5-2,0 equiv.). Se disolvió HBTU (1,5-2,0 equiv) en 3 volúmenes de NMP a 10°C. Las dos soluciones se combinaron y se mezclaron con 3 volúmenes de DCM durante 1-2
10 min. La solución resultante se añadió al recipiente de reacción y se mezcló con la resina bajo agitación durante 1,5-5 horas. Se extrajo una muestra para el ensayo de Kaiser para comprobar la finalización de la reacción. El acoplamiento incompleto se re-acopló. Tras finalizar la reacción de acoplamiento,
15 la solución de acoplamiento se drenó y la resina se lavó con NMP 5 veces (10 volúmenes, 5 min. cada uno).

A. Siguiendo el procedimiento de síntesis general, el fragmento Fmoc- GLP-1(11-22)-2-CTC con la secuencia nativa se construyó paso a paso utilizando el mismo procedimiento de
20 síntesis general, y se acopló un fragmento de acuerdo con el Id. de Sec. N° 7 con el fragmento Fmoc-GLP-1(11-22)-2-CTC resultante preparado en esta Sección A utilizando el procedimiento de síntesis general.

B. Siguiendo el procedimiento de síntesis general, el
25 fragmento Fmoc-GLP-1 (11-22)-2-CTC se construyó paso a paso. No obstante, las condiciones de eliminación de Fmoc se cambiaron por una solución de piperidina al 10% y DBU al 2% en NMP (v/v) en lugar de piperidina al 20% en NMP (v/v). Además, los tiempos de tratamiento en la posición de AA14 [Fmoc-Ser(tBu)-]
30 y la posición de AA13 [Fmoc-Thr(tBu)-] se extendieron a 1,5 h para finalizar la reacción. Utilizando el mismo procedimiento de síntesis general, se acopló un fragmento de acuerdo con el

Id. de Sec. N° 7 con el Fmoc-GLP-1(11-22)-2-CTC resultante utilizando el procedimiento de síntesis general.

C. Siguiendo el procedimiento de síntesis general, con la solución de eliminación de Fmoc de piperidina al 10% y DBU al 2% en NMP (v/v), se construyó el fragmento Fmoc-(X¹⁷⁻¹⁸) GLP-1(11-22)-2-CTC paso a paso. Después se acopló el fragmento de acuerdo con el Id. de Sec. N° 7 con el Fmoc-(X¹⁷⁻¹⁸) GLP-1(11-22)-2-CTC resultante utilizando el procedimiento de síntesis general.

D. Siguiendo el procedimiento de síntesis general, se construyó el fragmento Fmoc-(X¹⁷⁻¹⁸) GLP-1(11-22)-2-CTC paso a paso. Después se acopló el fragmento de acuerdo con el Id. de Sec. N° 7 con el Fmoc-(X¹⁷⁻¹⁸) GLP-1(11-22)-2-CTC resultante utilizando el procedimiento de síntesis general.

E. Siguiendo el procedimiento de síntesis general de la sección D anterior, y con la excepción de las diferencias descritas en la siguiente tabla, se construyó un fragmento Fmoc-(X¹⁷⁻¹⁸) GLP-1(11-22)-2-CTC paso a paso. Después se acopló el fragmento de acuerdo con el Id. de Sec. N° 7 al fragmento Fmoc-(X¹⁷⁻¹⁸) GLP-1(11-22)-2-CTC resultante utilizando el procedimiento de síntesis general.

La siguiente tabla resume los detalles de los procedimientos de A a E en este Ejemplo:

Ej.	Es- cala	Carga mmol/ g	Condición de eliminación de Fmoc	Pseudo- prolina @ Posi- ción 17- 18	Equiv de AA	Pu- reza HPLC	Ren- di- mien to
A	5g	0,24	piperidina al 20%/ NMP	No	2,0	30%	42%*
B	20g	0,30	piperidina al 10%/2%DBU/ NMP	No	1,7	58%	62%

C	5g	0,30	piperidina al 10%/2%DBU/NMP	Sí	2,0	84%	74%
D	5g	0,30	piperidina al 20%/ NMP	Sí	2,0	75%	80%
E	20g	0,42	piperidina al 20%/ NMP	Sí	2,0	89%	86%

F. Escisión del Fragmento:

Para lograr la escisión de fragmento con respecto a cualquiera de los fragmentos peptídicos sintetizados en este Ejemplo, la resina de péptido obtenida se expande en 10 volúmenes de DCM durante 30 min. y se enfría hasta -10°C. El DCM se dre-
5 na y se añade una solución de TFA al 1%/ DCM (10 volúmenes) y se agita durante 30 min. La solución de escisión se recoge en un recipiente que contiene piridina (2-3 equiv. en relación a TFA). Mientras se calienta a 25°C, la resina se trata con TFA
10 al 1%/ DCM (10 volúmenes) durante 5 min., y después se añade piridina (2-3 equiv. a TFA). Tras otros 5 min. de agitación, se recoge la solución. La resina se lava entonces 4 veces con 10 volúmenes de DCM (5 min. cada uno). Las soluciones de todos los lavados y de la escisión se combinan y se mezclan con agua
15 (proporción de agua/ DCM = ~1/4 en volumen). La mezcla resultante se destila a una presión reducida para eliminar el DCM (350 torr/ 28°C). El fragmento peptídico se separó del agua por precipitación cuando se elimina el DCM, y se filtra. El fragmento peptídico se lava con agua y se seca a 30°C al va-
20 cío.

Ejemplo 8 - Síntesis en Solución: Adición de Arg

Un fragmento (Aib³⁵) GLP-1(23-35) (que lleva protección de la cadena lateral de acuerdo con la Tabla A y es portador de protección Fmoc en N-terminal (9,11 g, 3,94 mmol) se disol-
25 vió en DMSO (90 mL). A esta solución, se añadieron HOBt (2,42 g, 4 equiv.), HBTU (5,98 g, 4 equiv.), DIEA (3,44 mL, 5

equiv.) y H-Arg (2HCl)-NH₂ (3,88 g, 4 equiv.) junto con 10 mL de DMSO. La reacción se agitó y se monitorizó mediante HPLC. Tras 4 horas, la reacción no había finalizado, por lo que se añadieron 2 mL de DIEA. La reacción se dejó toda la noche.

5 Posteriormente se añadió piperidina (5 mL) a la mezcla de reacción. La eliminación de Fmoc se realizó en 2 horas. La mezcla de reacción se paró con agua helada (800 mL) y se agitó durante 40 min. El sólido blanco formado se filtró, se lavó con agua (400 mL) y se secó durante toda la noche para proporcionar el fragmento (Aib³⁵) GLP-1(23-36) (9,65 g, rendimiento

10 en peso del 109%).

Ejemplo 9

El fragmento (Aib⁸, X¹⁷⁻¹⁸) GLP-1(7-22) (7,73 g, 2,88 mmol)

15 que contiene grupos de protección de las cadenas laterales de acuerdo con la Tabla A y protección Fmoc en el extremo N-terminal se disolvió en DMSO (65 mL).

A esta solución, se le añadieron HOBt (0,73 g, 4,77 mmol), HBTU (1,46 g, 3,85 mmol), DIEA (0,71 mL, 7,40 mmol), y

20 el fragmento (Aib³⁵) GLP-1(23-36) (8,5 g, 3,45 mmol) junto con 20 mL de DMSO. La reacción se agitó y monitorizó mediante HPLC. Tras 3 horas el acoplamiento se había completado. Entonces se añadió piperidina (5 mL) a la mezcla de reacción. La eliminación de Fmoc se realizó en 2 horas. La mezcla de reac-

25 ción se detuvo con agua helada (800 mL) y se agitó durante 30 min. El sólido blanco formado se filtró, se lavó con agua (400 mL) y se secó durante toda la noche para dar lugar al péptido protegido (Aib⁸, X¹⁷⁻¹⁸, Aib³⁵) GLP-1(7-36).

Ejemplo 10 - Desprotección global

30 Un péptido preparado de acuerdo con el Ejemplo 9 (16,24 g) se trató con una solución de TFA/ DTT/ Agua (100 mL/ 5 g/ 2,0 mL) durante 2 horas y la solución resultante se vertió en

MTBE (800 mL) en un baño de hielo. Tras 30 min. en agitación, el sólido blanco formado se filtró, se lavó con MTBE (400 mL) y se secó para proporcionar el producto peptídico crudo (16,0 g, rendimiento en peso del 138%). El péptido desprotegido re-

5 sultante se denomina a partir de este momento péptido "crudo".

Ejemplo 11 - Purificación

La purificación del péptido crudo se realizó en un Kromasil® C4, columna de 10 micras, 2,0 x 25 cm y resultó en péptido purificado con una pureza del 98+% y un rendimiento del

10 ~60% contenido/ contenido. La purificación involucra un primer paso de purificación cromatográfica a pH 2, seguida de un segundo paso a pH 9. Tras esta purificación, el péptido purificado puede manipularse o procesarse posteriormente de varias formas. Por ejemplo, la colección purificada resultante del

15 segundo paso puede liofilizarse o pasarse a través de una columna de concentración y aislarse por precipitación. Ambos aislamientos darán lugar al péptido deseado (acetato).

Como resumen del proceso de dos pasos, se disolvió péptido crudo a 5 mg/ ml (en base a contenido) en una mezcla de

20 acetonitrilo 10%/ agua (ácido acético 0,2 M). Se realizaron inyecciones replicadas de 1000 mg (en base a contenido) utilizando un gradiente de acetonitrilo/ THF/ agua/ TFA, y se agruparon las fracciones de una pureza de ~95%. También se agrupó una "fracción reciclada" a una pureza de ~70% que representa

25 una recuperación del ~34%. La fracción reciclada se re-inyectó utilizando el mismo gradiente de acetonitrilo/ THF/ agua/ TFA, y una colección de una pureza del ~85% se combinó con la colección principal. El rendimiento de contenido a contenido para el primer paso de purificación cromatográfica es del 70%.

30 La colección combinada del primer paso (pH 2) se purificó entonces posteriormente en un segundo paso en la misma columna Kromasil® C4 pero utilizando un gradiente de acetonitrilo/

THF/ agua/ acetato amónico (pH 8,8). Las fracciones se combinaron para dar lugar a una pureza del 98+% con una recuperación del ~85% en el segundo paso. El rendimiento global de ambos pasos de purificación será del 60% (contenido/ contenido).

5 La colección del segundo paso combinada (pH 8,8) se concentró entonces utilizando la misma columna Kromasil® C4 pero utilizando un paso de gradiente de metanol/ agua/ acetato amónico. Las fracciones se combinaron y estaban listas para su aislamiento.

10 **A. Obtención de la solución de péptido crudo:**

8 g de péptido crudo se disolvieron en 500 ml de una solución de ácido acético 0,2N 90%/ acetonitrilo 10%. La solución se filtró, una vez a través de un filtro de 0,45 micras Durapore (diámetro 47 mm) (Millipore) y luego a través de un
15 filtro apilador de micra en disco Supor EKV (0,65/ diámetro 0,2 mm) (Pall Filters). La solución de inyección cruda se analizó mediante HPLC y se encontró que contenía 5,02 mg (% peso) de péptido contenido por ml. (500 ml x 5,02 mg/ ml = 2512 mg péptido contenido).

20 **B. Cromatografía - primer paso a pH~2:**

Se realizaron cuatro inyecciones replicadas con la solución cruda bajo las siguientes condiciones:

Columna: Fabricada por Kromasil con un empaquetamiento de C4, 10 micras y las dimensiones 2,0 x 25 cm

25 Detector: Detector de ultravioleta fijado a 280 nm (ancho de banda 8 nm, 350/20 nm ref.)

Temperatura de la columna: ambiente

Tasa de flujo: 13,0 ml/ min. (contrapresión ~50 bar)

Fase móvil:

30 A = mezcla de ácido trifluoroacético 0,1%/ acetonitrilo 15%/ agua 85%

B = mezcla de ácido trifluoroacético 0,1% / tetrahidrofu-

rano 15%/ acetonitrilo 70%/ agua 15%

Gradiente: El gradiente empieza con la fase móvil A 100% y se mantiene durante 0,1 minutos. Entonces la muestra se carga manualmente en la columna mediante la bomba C (véase a continuación la descripción de la bomba C). Tras la carga de la muestra, se realiza un gradiente lineal de A 100% a A 83% durante 1 minuto. Entonces la fase móvil se mantiene con A 83% durante los próximos 11 minutos. Luego se realiza un segundo gradiente lineal con A 73% durante 10 minutos. Entonces la fase móvil se mantiene con A 73% durante los siguientes 15 minutos. Entonces se ha completado el proceso y se continúa con un aclarado de 10 minutos con B 100% seguido de un re-equilibrado de la columna de 20 minutos con A 100%.

La muestra se cargó utilizando una bomba isocrática HP 1100 separada a 9,0 ml/ min. (bomba C). Las impurezas eluidas inicialmente se separan del pico principal mediante un mantenimiento isocrático inicial de 11 minutos con A 83% seguido de un gradiente lineal con A 73% durante los siguientes 10 minutos. El pico de péptido principal se eluye entonces durante el mantenimiento de 15 minutos con A 73%. Las fracciones se agrupan durante este mantenimiento de 15 minutos con A 73%.

C. Reciclado en el primer paso a pH~2:

La colección reciclada se obtiene de las fracciones en las que se ha determinado que tiene una pureza inferior a la que permite añadirlas a la colección combinada. Estas fracciones se combinaron de forma separada y se diluyeron con un volumen igual de agua. Se realizó una inyección de reciclado de nuevo en la columna a partir de esta colección combinada de forma separada. Se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas y las fracciones con una pureza aceptable se combinaron, se diluyeron con un volumen igual de agua, y se añadieron a la colección combinada del primer paso.

La carga con inyecciones de reciclado es significativamente inferior que con inyecciones crudas debido al aumento de impurezas que se eluyen cerca del pico del péptido. De promedio se realiza una inyección de reciclado por cada dos inyecciones crudas.

D. Segundo paso de la cromatografía preparativa a pH 8,8:

La colección combinada final del primer paso se purificó posteriormente mediante la re-cromatografía a pH 8,8. Utilizando el pH 8,8 en el segundo paso cambia significativamente el orden de elución de las impurezas, lo que permite una mayor limpieza en recuperaciones superiores. Las condiciones utilizadas para este segundo paso de cromatografía fueron las siguientes:

Columna: Fabricada por Kromasil con un empaquetamiento de C4, 10 micras y las dimensiones 2,0 x 25 cm

Detector: Detector de ultravioleta fijado a 280 nm (ancho de banda 8 nm, 350/20 nm ref.)

Temperatura de la columna: ambiente

Tasa de flujo: 13,0 ml/ min. (contrapresión ~50 bar)

Fase móvil:

A = mezcla de acetonitrilo 15%/ agua 85% que contiene 2 gramos por litro de acetato amónico y 1 mL por litro de hidróxido amónico concentrado

B = mezcla de tetrahidrofurano 15%/ acetonitrilo 60%/ agua 25% que contiene 2 gramos por litro de acetato amónico y 1 mL por litro de hidróxido amónico concentrado.

Gradiente: El gradiente empieza con la fase móvil A 100% y se mantiene durante 0,1 minutos. Entonces la muestra se carga manualmente en la columna mediante la bomba C. Tras la carga de la muestra, se realiza un gradiente lineal de A 100% a A 67% durante 2 minutos. Entonces la fase móvil se mantiene con A 67% durante los próximos 33 minutos. Entonces se ha comple-

tado el proceso y se continúa con un aclarado de 5 minutos con B 100% seguido de un re-equilibrado de la columna de 15 minutos con A 100%.

La muestra se cargó utilizando una bomba isocrática HP 1100 separada a 9,0 ml/ min. (bomba C). Tras los 30 minutos del paso de carga, se realizó un gradiente corto con A 100% a A 67% de los 30,2 a 32 min. El pico de péptido principal se eluyó durante el mantenimiento de 33 minutos con A 67%. Las fracciones se recogieron a partir de los 20 minutos tras la carga de la columna y finalizó después de la completa elución del pico principal. Las fracciones se recogieron durante aproximadamente 15 minutos. Las fracciones aceptables se agruparon y diluyeron con un volumen igual de agua. En esta etapa de la purificación es posible un reciclado pero las fracciones descartadas generalmente no contienen suficiente péptido para garantizar una inyección de reciclado. Esto puede ser factible si se realizan un gran número de inyecciones y se agrupan las fracciones descartadas para el reciclado.

E. Paso de concentración:

La colección combinada final del segundo paso se cargó en la misma columna y se eluyeron rápidamente utilizando una fase móvil diferente para concentrar el péptido para su aislamiento. Las condiciones utilizadas para este paso fueron las siguientes:

Columna: Fabricada por Kromasil con un empaquetamiento de C4, 10 micras y las dimensiones 2,0 x 25 cm

Detector: Detector de ultravioleta fijado a 280 nm (ancho de banda 8 nm, 350/20 nm ref.)

Temperatura de la columna: ambiente

Tasa de flujo: 13,0 ml/ min. (contrapresión ~50 bar)

Fase móvil:

A = mezcla de metanol 10%/ acetato amónico 20 mM 90%

B = mezcla de metanol 90%/ acetato amónico 20 mM 10%

Gradiente: El gradiente empieza con la fase móvil A 100% y se mantiene durante 0,1 minutos. Entonces la muestra se carga manualmente en la columna mediante la bomba C. Tras la carga de la muestra, la fase móvil se mantiene con A 100% durante 5 minutos. Entonces la fase móvil se cambia inmediatamente a B 100% durante los próximos 20 minutos. Entonces se ha completado el proceso y se continúa con un re-equilibrado de la columna de 15 minutos con A 100%.

La muestra se cargó utilizando una bomba isocrática HP 1100 separada a 9,0 ml/ min. (bomba C). Tras los 45 minutos del paso de carga, se realizó un mantenimiento corto con A 100% durante 5 minutos, luego se realizó un paso de gradiente con B 100% durante 20 minutos para eluir el péptido. El pico de péptido principal empezó a eluirse 2 minutos tras el gradiente con B 100%. Los siguientes 12 minutos de fracciones contenían péptido y se agruparon para su aislamiento.

Ejemplo 12 - Liofilización

Se taró una botella de 1 litro de boca ancha de FLPE. A esta botella se le añadió la colección purificada (210 ml) de acetato de (Aib⁸, ^{X17-18}, Aib³⁵) GLP-1(7-36) en acetonitrilo acuoso/ acetato amónico. El contenedor se enjuagó con agua desionizada 3 x 5 mL y los enjuagues se añadieron a la colección. Esta solución se agitó para homogeneizarla y luego se tapó y se congeló en nitrógeno líquido. La botella congelada se destapó y la boca se cubrió con un Kimwipe doblado sujeto con una banda de goma. La botella se situó en un vacutainer en el liofilizador y se liofilizó. Temperatura del condensador - 89°C, presión 19 micras.

Tras 24 h el vacutainer se aireó para comprobar el progreso; aún había una bola de hielo audible presente. Se reinició la liofilización.

Tras 18 h más la botella se extrajo del liofilizador y se comprobó el peso. El peso era inestable, con un rápido aumento debido a la naturaleza higroscópica del producto. El producto estático se transfirió rápidamente a un vial de centelleo tarado y se pesó, se obtuvieron 0,822 g de péptido.

Ejemplo 13: Precipitación de péptido purificado

En un recipiente, una solución de 100,5 mg de acetato de (Aib⁸, ^{x17-18}, Aib³⁵) GLP-1(7-36) puro en 2 mL de acetato amónico 20 mM en MeOH/ agua (9:1 en volumen) se diluyó con 1 mL de acetato amónico 20mM en MeOH/ agua (9:1 en volumen) Con agitación, se añadieron lentamente 20 mL de isopropanol (IPA) al recipiente a entre 20°C y 25°C. Esta mezcla se puso turbia tras la adición de 15 mL de IPA. La agitación continuó durante toda la noche a entre 20°C y 25°C. El producto precipitado se filtró y se lavó mediante 5 mL de IPA y luego se secó a 25°C bajo vacío hasta un peso constante. Se obtuvieron 90,9 mg de péptido (una recuperación del 90,42%).

Ejemplo 14: Aislamiento de péptido purificado

En un recipiente, una solución de 497,7 mg de acetato de (Aib⁸, ^{x17-18}, Aib³⁵) GLP-1(7-36) puro en 10 mL de acetato amónico 20 mM en MeOH/ agua (9:1) se diluyó con 6 mL de acetato amónico 20 mM en MeOH/ agua (9:1). Con agitación, 40 mL isopropanol (IPA) se añadieron lentamente en el recipiente a entre 20°C y 25°C durante 35 min. Esta mezcla se puso turbia tras la adición de 2 mL de IPA. La agitación continuó durante una hora a entre 20°C y 25°C. El producto precipitado se filtró y se lavó mediante 5 mL de IPA y luego se secó a 25°C bajo vacío hasta un peso constante. Se obtuvieron 458,4 mg de péptido (una recuperación del 92%).

Ejemplo 15: Aislamiento de péptido purificado

En un recipiente, se añadieron lentamente 900 mL de IPA en una solución en agitación de ~1000 mg de acetato de (Aib⁸,
x¹⁷⁻¹⁸, Aib³⁵) GLP-1(7-36) purificado en 150 mL de acetato amó-
5 nico 20 mM en MeOH/ agua (9:1) a través de una columna de con-
centración a entre 20°C y 25°C. Esta adición se completó a los
45 min. Esta mezcla se puso turbia tras la adición de 260 mL
de IPA. La agitación continuó durante 40 min a entre 20°C y
25°C. El producto precipitado se filtró y se lavó mediante 5
10 mL de IPA y luego se secó a entre 20°C y 25°C bajo vacío hasta
un peso constante. Se obtuvieron 746 mg de péptido (una recu-
peración del 74,6%).

Reivindicaciones

1. Un método para obtener un péptido insulínico, que comprende los pasos a) a f):

5 a) proporcionar un primer fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos HX^8EX^{10} (Id. de Sec. N° 6), en la que X^8 es un residuo de aminoácido correspondiente a Aib y X^{10} es un residuo de aminoácido correspondiente a glicina, y tanto H como E tienen protección en su cadena lateral;

10 b) proporcionar un segundo fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos $TFTSDVX^{17-18}YLEG$ (Id. de Sec. N° 8) en la que el residuo denotado mediante el símbolo X^{17-18} es un residuo dipeptídico de pseudoprolina, y dichos residuos de aminoácidos de la secuencia tienen protección en su
15 cadena lateral;

c) acoplar el primer fragmento al segundo fragmento para proporcionar un tercer fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos $HX^8EX^{10}TFTSDVX^{17-18}YLEG$ (Id. de Sec. N° 11), dichos residuos de aminoácidos de la secuencia tienen
20 protección en su cadena lateral;

d) proporcionar un cuarto fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos $QAAKEFIWLKX^{35}$ (Id. de Sec. N° 9), en el que X^{35} es un residuo de aminoácido que corresponde a Aib y dichos residuos de aminoácidos de la secuencia tienen
25 protección en su cadena lateral;

e) acoplar el cuarto fragmento peptídico a arginina para proporcionar un quinto fragmento peptídico que tiene la secuencia de aminoácidos $QAAKEFIWLKX^{35}R$ (Id. de Sec. N° 12), y dichos residuos de la secuencia tienen protección en su
30 cadena lateral; y

f) acoplar el quinto fragmento al tercer fragmento para proporcionar un péptido insulínico que tiene la

secuencia de aminoácidos

HX⁸EX¹⁰TFTSDVX¹⁷⁻¹⁸YLEGQAAKEFIAWLVK X³⁵R (Id. de Sec. N° 13), donde X⁸ y X³⁵ son residuos de aminoácido correspondientes a Aib y X¹⁰ es un residuo de aminoácido correspondiente a glicina y dichos residuos de la secuencia
5 tienen protección en su cadena lateral.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un paso adicional de:

10 g) eliminación de los grupos protectores de la cadena lateral para proporcionar un péptido insulínico que tiene la secuencia de aminoácidos HX⁸EX¹⁰TFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX³⁵R (Id. de Sec. N° 5) donde cada uno de los símbolos X en las posiciones, 8, 10 y 35 son como se
15 definió en la reivindicación 1.

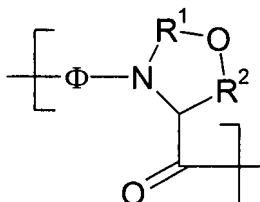
3. Un fragmento peptídico que consiste de la secuencia de aminoácidos HX⁸EX¹⁰ (Id. de Sec. N° 6), X⁸ es un residuo de aminoácido que corresponde a Aib y X¹⁰ es un residuo de aminoácido que corresponde a glicina, cada uno de H, E, X⁸ y
20 X¹⁰ tienen protección en su cadena lateral.

4. El método de acuerdo con reivindicación 1, en el que el péptido insulínico tiene la secuencia de aminoácidos
25 (Id. de Sec. N° 5)

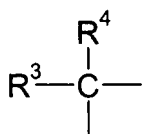
HX⁸EX¹⁰TFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX³⁵R

en la que X⁸ y X³⁵ son un residuo de aminoácido correspondiente a Aib y X¹⁰ es un residuo de aminoácido que corresponde a glicina; y en donde los residuos de aminoácido
30 tienen protección en su cadena lateral.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X^{17-18} tiene la fórmula



en la que Φ representa un residuo de Ser que tiene
5 protección de la cadena lateral, R^2 es $-\text{CH}_2-$, y R^1 es



donde cada R^3 y R^4 es metilo.

6. Un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos TFTSDVX¹⁷⁻¹⁸YLEG (Id. de Sec. N° 8) en la que el residuo
denotado mediante el símbolo X¹⁷⁻¹⁸ es un residuo dipeptídico
de pseudoprolina como se define en la reivindicación 5.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido insulínico tiene la secuencia de aminoácidos (Id. de Sec. N° 4)

HAibEGTFTSDVSSYLEGOAAKEFIAWLVKAibR.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido insulínico posee la secuencia de aminoácidos (Id. de Sec. N° 4)

HA**i**bEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKA**i**bR

la cual está amidada en el extremo C-terminal.

Amino Acid-Protecting Groups

Albert Isidro-Llobet,[†] Mercedes Álvarez,^{*,†,‡,§} and Fernando Albericio^{*,†,‡,||}

Institute for Research in Biomedicine, Barcelona Science Park, Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain; CIBER-BBN, Networking Centre on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine, Barcelona Science Park, Baldiri Reixac 10, 08028 Barcelona, Spain; Laboratory of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; and Department of Organic Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franqués 1, 08028 Barcelona, Spain

Received April 28, 2008

Contents

1. Introduction	2456	6.3.1. Protecting Groups Removed by Acid (Table 14)	2476
2. α -Amino	2457	6.3.2. Other Protecting Groups (Table 15)	2477
2.1. General	2457	7. Asparagine (Asn) and Glutamine (Gln)	2478
2.2. Introduction of the Protecting Groups	2457	7.1. General	2478
2.3. Removal	2457	7.2. Introduction of the Protecting Groups	2479
2.3.1. Protecting Groups Removed by Acid (Table 1)	2457	7.3. Removal	2479
2.3.2. Protecting Groups Removed by Base (Table 2)	2459	7.3.1. Protecting Groups Removed by Acid (Table 16)	2479
2.3.3. Other Protecting Groups (Table 3)	2460	8. Arginine (Arg)	2480
3. Lysine (Lys), Ornithine (Orn), Diaminopropionic Acid (Dap), and Diaminobutyric Acid (Dab)	2463	8.1. General	2480
3.1. General	2463	8.2. Introduction of the Protecting Groups	2480
3.2. Introduction of the Protecting Groups	2466	8.3. Removal	2480
3.3. Removal	2467	8.3.1. Protecting Groups Removed by Acid (Table 17)	2480
3.3.1. Protecting Groups Removed by Acid (Table 5)	2467	8.3.2. Protecting Groups Removed by Base (Table 18)	2481
3.3.2. Protecting Groups Removed by Base (Table 6)	2467	8.3.3. Other Protecting Groups (Table 19)	2481
3.3.3. Other Protecting Groups (Table 7)	2467	9. Cysteine (Cys)	2481
4. α -Carboxylic Acid	2467	9.1. General	2481
4.1. General	2467	9.2. Introduction of the Protecting Groups	2481
4.2. Introduction of the Protecting Groups	2468	9.3. Removal	2483
4.3. Removal	2468	9.3.1. Protecting Groups Removed by Acid (Table 20)	2484
4.3.1. Protecting Groups Removed by Acid (Table 8)	2468	9.3.2. Protecting Groups Removed by Base (Table 21)	2484
4.3.2. Protecting Groups Removed by Base (Table 9)	2469	9.3.3. Other Protecting Groups (Table 22)	2484
4.3.3. Other Protecting Groups (Table 10)	2470	10. Methionine (Met)	2488
5. Aspartic (Asp) and Glutamic (Glu) Acids	2473	10.1. General	2488
5.1. General	2473	10.2. Introduction of the Protecting Groups	2488
5.2. Introduction of the Protecting Groups	2473	10.3. Removal: Sulfoxide Reduction	2488
5.3. Removal	2473	11. Histidine (His)	2489
5.3.1. Protecting Groups Removed by Acid (Table 11)	2473	11.1. General	2489
5.3.2. Protecting Groups Removed by Base (Table 12)	2474	11.2. Introduction of the Protecting Groups	2489
5.3.3. Other Protecting Groups (Table 13)	2474	11.3. Removal	2489
6. Amide Backbone	2476	11.3.1. Protecting Groups Removed by Acid (Table 23)	2489
6.1. General	2476	11.3.2. Protecting Group Removed by Base (Table 24)	2491
6.2. Introduction of the Protecting Groups	2476	11.3.3. Other Protecting Groups (Table 25)	2491
6.3. Removal	2476	12. Serine (Ser), Threonine (Thr), and Hydroxyproline (Hyp)	2492
		12.1. General	2492
		12.2. Introduction of the Protecting Groups	2493
		12.3. Removal	2493
		12.3.1. Protecting Groups Removed by Acid (Table 26)	2493
		12.3.2. Other Protecting Groups (Table 27)	2493
		13. Tyrosine (Tyr)	2493
		13.1. General	2493

* To whom correspondence should be addressed. Fax: 34 93 403 71 26. E-mail: mercedes.alvarez@irbbarcelona.org; albericio@irbbarcelona.org;

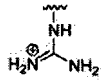
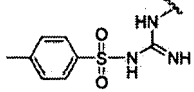
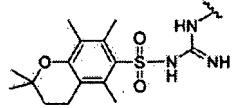
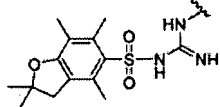
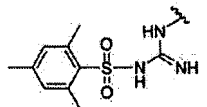
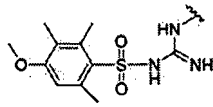
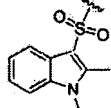
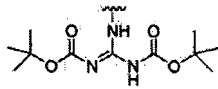
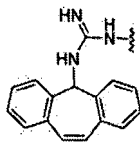
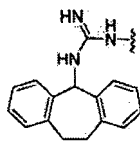
[†] Institute for Research in Biomedicine.

[‡] CIBER-BBN.

[§] Laboratory of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona.

^{||} Department of Organic Chemistry, University of Barcelona.

Table 17. Arg-Protecting Groups Removed by Acid

Name and Structure	Removal conditions	Stability to the removal of	Ref.
Protonation 	-	-	293
p-Toluenesulfonyl (Tos) 	1) HF 2) TFMSA-TFA-thioanisole 3) Na/NH ₃	Boc, Fmoc, Trt, Alloc	295, 296
2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc) 	90% TFA-scavengers (H ₂ O and TIS) several hours.	Fmoc, Trt, Alloc	294
2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf) 	90 TFA-scavengers (H ₂ O and TIS) 1 h (longer times in multiple arginine containing peptides)	Fmoc, Trt, Alloc	297
Mesityl-2-sulfonyl (Mts) 	TFMSA-TFA-thioanisole	Boc, Fmoc, Trt, Alloc	298, 299
4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenylsulfonyl (Mtr) 	95% TFA-thioanisole	Fmoc, Trt, Alloc	300
1,2-Dimethylindole-3-sulfonyl (MIS) 	50% TFA and scavengers, 30 min	Fmoc, Alloc	301
ω,ω'-bis-tert-Butyloxycarbonyl (bis-Boc) 	90- 95% TFA and scavengers	Fmoc, Alloc	302, 303, 304
5-Dibenzosuberonyl (Suben) 	25-50% TFA	Fmoc, Alloc	305
5-Dibenzosuberonyl (Sub) 	25-50% TFA	Fmoc, Alloc	305

GLP1 peptide (7-36) (ab50245)

 **1 Reference** URL for this product <http://www.abcam.com/GLP1-peptide-7-36-ab50245.html>

Product overview

Protein description	Recombinant fragment: HAEGTFTSDV SSYLEGQAA K EFIAWLVK GR G, corresponding to amino acids 7-36 of Human GLP1; 3.3 kDa, 31 amino acids.
Expression host	E. coli

Protein info

Function	Glucagon plays a key role in glucose metabolism and homeostasis. Regulates blood glucose by increasing gluconeogenesis and decreasing glycolysis. A counterregulatory hormone of insulin, raises plasma glucose levels in response to insulin-induced hypoglycemia. Plays an important role in initiating and maintaining hyperglycemic conditions in diabetes. GLP-1 is a potent stimulator of glucose-dependent insulin release. Play important roles on gastric motility and the suppression of plasma glucagon levels. May be involved in the suppression of satiety and stimulation of glucose disposal in peripheral tissues, independent of the actions of insulin. Have growth-promoting activities on intestinal epithelium. May also regulate the hypothalamic pituitary axis (HPA) via effects on LH, TSH, CRH, oxytocin, and vasopressin secretion. Increases islet mass through stimulation of islet neogenesis and pancreatic beta cell proliferation. Inhibits beta cell apoptosis. GLP-2 stimulates intestinal growth and up-regulates villus height in the small intestine, concomitant with increased crypt cell proliferation and decreased enterocyte apoptosis. The gastrointestinal tract, from the stomach to the colon is the principal target for GLP-2 action. Plays a key role in nutrient homeostasis, enhancing nutrient assimilation through enhanced gastrointestinal function, as well as increasing nutrient disposal. Stimulates intestinal glucose transport and decreases mucosal permeability. Oxyntomodulin significantly reduces food intake. Inhibits gastric emptying in humans. Suppression of gastric emptying may lead to increased gastric distension, which may contribute to satiety by causing a sensation of fullness. Glicentin may modulate gastric acid secretion and the gastro-pyloro-duodenal activity. May play an important role in intestinal mucosal growth in the early period of life.
Tissue specificity	Glucagon is secreted in the A cells of the islets of Langerhans. GLP-1, GLP-2, oxyntomodulin and glicentin are secreted from enteroendocrine cells throughout the gastrointestinal tract. GLP1 and GLP2 are also secreted in selected neurons in the brain.
Sequence similarities	Belongs to the glucagon family.
Post-translational modifications	Proglucagon is post-translationally processed in a tissue-specific manner in pancreatic A cells and intestinal L cells. In pancreatic A cells, the major bioactive hormone is glucagon cleaved by PCSK2/PC2. In the intestinal L cells PCSK1/PC1 liberates GLP-1, GLP-2, glicentin and oxyntomodulin. GLP-1 is further N-terminally truncated by post-translational processing in the intestinal L cells resulting in GLP-1(7-37) GLP-1-(7-36)amide. The C-terminal amidation is neither important for the metabolism of GLP-1 nor for its effects on the endocrine pancreas.
Cellular localization	Secreted.

Target information above from: UniProt accession [P01275](#) *The UniProt Consortium*
The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010
Nucleic Acids Res. **38**:D142-D148 (2010).

Properties

Purity	> 95% by SDS-PAGE
Purification notes	ab50245 purity is greater than 98% by SDS-PAGE and HPLC analyses.
Form	Lyophilised: Centrifuge the vial prior to opening. Reconstitute in water to a concentration of 0.1-1.0 mg/ml. This solution can then be diluted into other aqueous buffers and stored at 4oC for 1 week or -20oC for future use.
Storage instructions	Shipped at 4°C. Upon delivery aliquot and store at -20°C. Avoid freeze / thaw cycles.
Storage buffer	Preservative: None

UK office: Abcam plc 330 Cambridge Science Park Cambridge CB4 0FL UK Tel: +44 (0)1223 696000 Fax: +44 (0)1223 215 215 Email: orders@abcam.com	US office: Abcam Inc. 1 Kendall Square, Suite 82304 Cambridge, MA 02139-1517 USA Tel: (888) 77-ABCAM (22226) Fax: (877) 774-8286 These numbers are toll free in the US/Canada Email: us.orders@abcam.com
--	---

Last updated on
September 6, 2012