



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



CSA220893

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION



08-126531

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "SÍNTESIS DE UN PÉPTIDO INSULINOTRÓPICO".

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 14/605

71. SOLICITANTE F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

DOMICILIO BASILEA, SUIZA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. EOGOTÁ, D.C. 27 NOV. 2008

FORMA P 10)

PETITORIO



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-126531-00000-0000

Fecha: 2008-11-27 16:17:58 Dep. 2020 NUECREACION
Tra 11 PATENTE Y II Eje. 378 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 155

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL 23 ene 2009

①

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

Dirección: Grenzacherstrasse 124,
CH-4070 Basilea, Suiza

Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza.

Lugar de Constitución: Suiza.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: CHEN, Lin; HAN, Yeun-Kwei; ROBERTS, Christopher R.

Dirección: 3642 Blanca Peak Drive, Superior, Colorado 80027; 816 Pinehurst Court, Louisville, Colorado 80027 y 721 N. County Road, 27E, Berthoud, Colorado 80513.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2007/056052

Fecha: 19/06/07

Publicación Internacional No. WO 2007/147816 A1

Fecha: 27/12/07

⑥

Título (54) "SÍNTESIS DE UN PÉPTIDO INSULINOTRÓPICO"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 14/605

⑧

Prioridad

SI



NO



(33) País de Origen

US

(32) Fecha

23/06/06

(31) Número de Solicitud

60/815,919

⑨

Comprobante de Pago No. 08-91,876

Fecha: Noviembre 25 de 2008

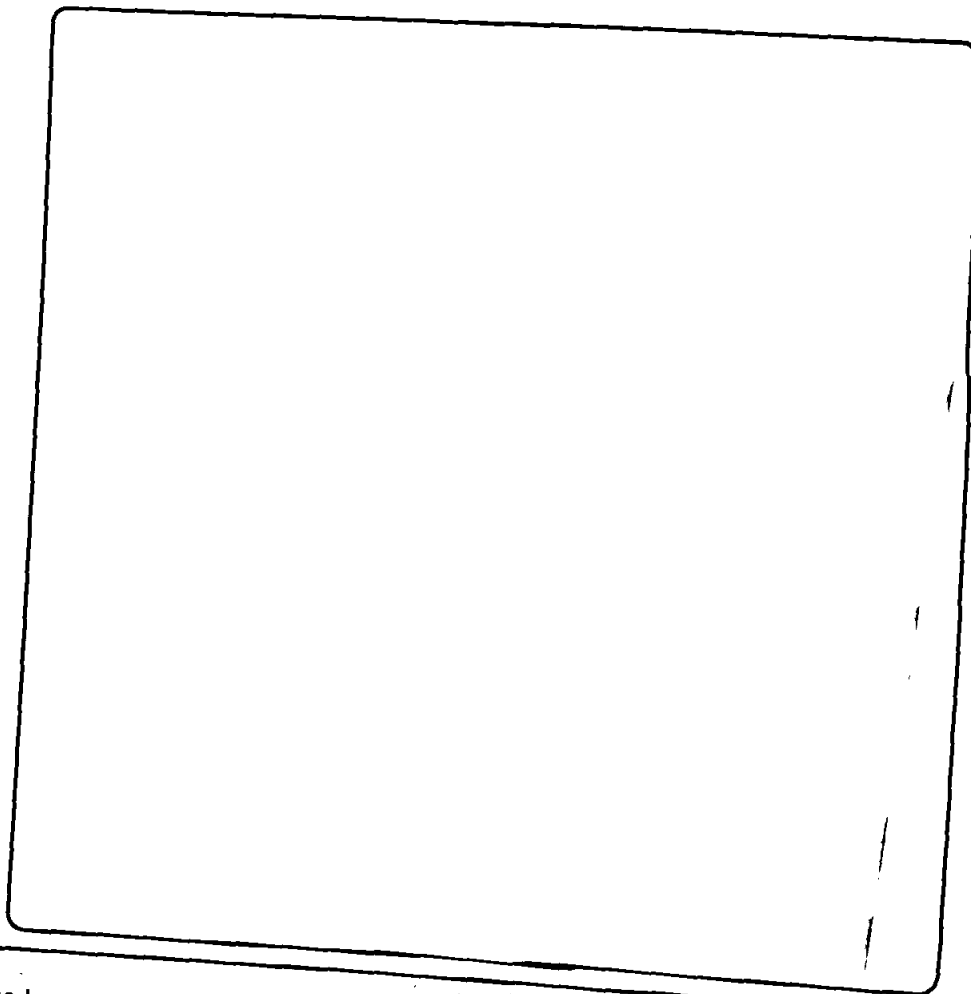
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☒ Documento de cesión de los inventores a Roche Colorado Corporation y documento de cesión de Roche Colorado Corporation a F. Hoffmann-La Roche AG.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional, Publicación y Opinión Escrita.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690 713

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 91,876
FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-126531- -00000-0000
Fecha 2008-11-27 16:17:58 Dep 2020 NULCREACION
Ira. 11 PATENTE IYII Eje: 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Folios: 155

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80211891	25/11/2008	5,703,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	501,000.00
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No.

de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. bajo el No 8835/13376

9. Sello

10. Firma

Cancillería de Estado

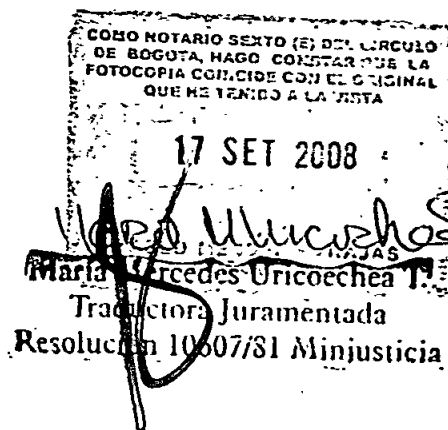
Fdo.: firma ilegible

de la ciudad de Basel (Basilea)

Ruedi Eggs

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 2 de septiembre 2004



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

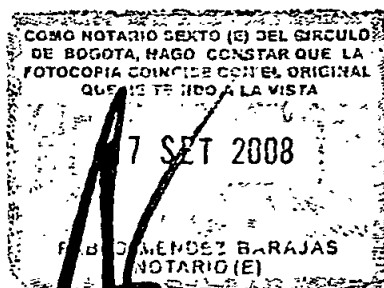
7064 SET - 3 P 12:12

JCS
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

258651

Planeta Urcochea
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS



abajo firmados, F.HOFFMANN-LA ROCHE AG,
una sociedad organizada y existente de conformidad
con las leyes de Suiza.

con domicilio en 4070 Basilea, Suiza

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o
GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA
y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá,
Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No.
5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y
verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir
notificaciones y nombrar apoderados judiciales o
extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al
parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de
1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO
TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE
ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos
designa, quedan especialmente facultados para
representarnos ante las autoridades colombianas,
administrativas, judiciales o de policía, en todos los
trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo
efecto les facultamos para dar ante dichas
autoridades todos los pasos necesarios al objeto
indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos,
recursos y presentar desistimientos; formular
descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las
solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones;
instaurar cancelaciones, renunciar total o
parcialmente a los registros, abonar todos los
impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago
determinado por la ley; recibir todos los documentos
y valores, dando el descargo respectivo; llenar
cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas
las medidas que creyeran conducentes al resguardo
de nuestros intereses; y en caso de producirse
oposición, pasando los antecedentes a los tribunales,
quedan facultados para tomar intervención como
demandantes o demandados ante los jueces que
sean competentes, pudiendo transar, someter a
árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las
demás facultades que resulten necesarias, y por el
presente declaramos desde ahora válido y bueno
cuanto dichos representantes y/o los apoderados que
cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro
beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA
LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO
SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para
solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la
protocolización de este documento y de cualquier
poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre
nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, a
corporation organized and existing under the laws of
Switzerland.

domiciled at 4070 Basel, Switzerland

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or
GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA
and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia,
with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth
Floor, our true and legal representatives in Bogotá,
with power to receive notifications and to appoint
judicial or extrajudicial agents, so as to comply with
paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO
TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or
ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of
them appointed, are especially empowered to
represent us before the administrative, judicial or
police authorities of Colombia, in all proceedings
pertaining to industrial property, for which purpose we
authorize them to take before the said authorities all
the necessary steps for the said end; to file petitions,
declarations, claims, recourses and withdrawals, to
draw up specifications; to file amendments, to limit
the scope of applications, file oppositions; file
cancellations total or partially waive registrations, to
pay all installments and effect all other payments
prescribed by law; to receive proper receipts, to
comply with all other requirements and, in short, to
take all those measures which they may deem fit for
the protection of our interests; and in case of
opposition, where the proceedings be passed over to
the courts, we authorize said agents to act on our
behalf, as complainants as well as defendants, before
the competent judges, with full powers to make
arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to
collect, to appeal and, in short, with all such further
powers as may be required, and we hereby declare
from now on as valid and good all that said
representatives and/or the agents by any one of them
appointed may do for our benefit.

COPIA DEL DOCUMENTO (E. DEL CIRCUITO)
DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CONCORDA CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

17 SET 2003

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA
and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO
SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply
for protocolization of this document and of any power
of attorney by any one of them conferred in our name,
before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 17th day of August 2003.
F. Hoffmann-La Roche AG

Fridolin Klausner
Holder of procuration

Denise Strebel
Mandatory

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Suiza
Basilea

{ss

Hoy, 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Strebel, ambos ciudadanos y residentes suizos, de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es titular del poder/mandatario de F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Suiza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Suiza, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Suiza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los estatutos de incorporación firmados en Suiza, ciudad de Basilea, con fecha 19 Junio 1997, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

Switzerland
Basel

{ss

On this 17th day of August, 2004, personally Fridolin Klausner and Denise Strebel came both Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Suiza, ciudad de Basel, under date of 19th day of June 1997, and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of two thousand and four)

D. P. Kuster
Notar

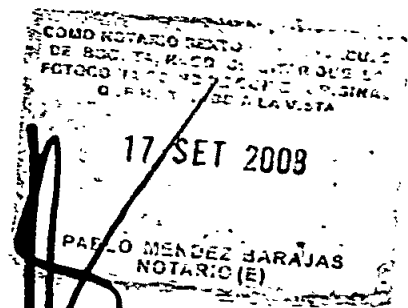
Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel

17.08.2004

2 Fr.

Dr. PETER KUSTER

Allg. Prot. No. 20



OFFICIAL AUTHENTICATION
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by *P. Kuch*

3. in his/her function as *all. Möder*

4. and certified by the seal of the *Gemeinde*

Certified **18. Aug. 2004**

5. in Basel (Bâle)

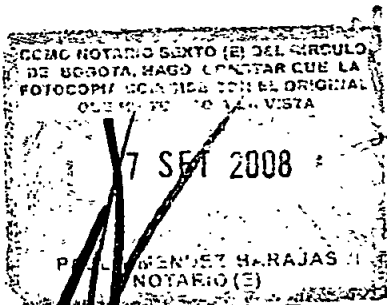
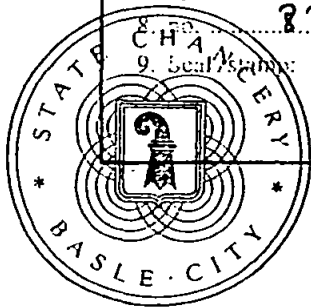
6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. No. **8835 / 11 776**

9. Seal/Stamp

10. Signature: *[Signature]*



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 14/605	
(22) Fecha de solicitud: 27-11-08		(71) Solicitante(s) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	60/815,919	23-06-06	US
		(72) Inventor(es) CHEN, Lin; HAN, Yeun-Kwei; ROBERTS, Christopher R.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 23-01-09		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 27/12/07	
Fecha de presentación de la solicitud: 19/06/07		N° publicación: WO 2007/147816 A1	
No. de solicitud PCT/EP2007/056052			
(54) Título: "SÍNTESIS DE UN PÉPTIDO INSULINOTRÓPICO"			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

Un método para obtener un péptido insulínótropico, que comprende uno o más de los siguientes pasos:

h) proporcionar un 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, tanto H como E incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

i) 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;

j) acoplar el primer fragmento al segundo fragmento 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;

k) proporcionar un cuarto fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos QAAKEFIAWLVKX³⁵ (Id. de Sec. N° 9), en el 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;

l) acoplar el 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

m) acoplar el quinto fragmento al tercer fragmento para proporcionar un péptido insulínótropico que incluye la secuencia de aminoácidos HX⁸EX¹⁰TFTSDVX¹⁷⁻¹⁸YLEGQAAKEFIAWLVK X³⁵R (Id. de Sec. N° 13), y dichos residuos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION

PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD

DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 27/11/08

(51) Clasificación Internacional: C07K 14/605

(71) Solicitante(s) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

(72) Inventor(es) CHEN, Lin; HAN, Yeun-Kwei; ROBERTS, Christopher R.

(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad

(31) No. Prioridad

(32) Fecha

(33) Pais

60/815,919

23/06/06

US

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 23-01-08

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 19/06/07

No. De solicitud PCT/EP2007/056052

(87) Publicación internacional:

Fecha: 27/12/07

No. Publicación: WO 2007/147816 A1

FIGURA CARACTERISTICA

6 x 6 cm

(54) Título: "SÍNTESIS DE UN PÉPTIDO INSULINOTRÓPICO"

(57) Resumen:

Reivindicación número 1:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2007/056052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/605 A61K38/26

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANDERSSON L ET AL: "Large-scale synthesis of peptides." BIOPOLYMERS 2000, vol. 55, no. 3, 2000, pages 227-250, XP002457690 ISSN: 0006-3525 cited in the application the whole document ----- -/--	1-29

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 November 2007

Date of mailing of the international search report

20/11/2007

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vix, Olivier

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2007/056052

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SAMPSON W R ET AL: "The synthesis of 'difficult' peptides using 2-hydroxy-4-methoxybenzyl or pseudoproline amino acid building blocks: A comparative study" JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE, JOHN WILEY AND SONS LTD, GB, vol. 5, no. 9, 1999, pages 403-409, XP002419351 ISSN: 1075-2617 the whole document	1-29
A	US 6 514 500 B1 (BRIDON DOMINIQUE P [CA] ET AL) 4 February 2003 (2003-02-04) the whole document	1-7, 10-19, 21-29
A	WO 2004/094461 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; NATARAJAN SESA IYER [US]; MAPELLI CLAUD) 4 November 2004 (2004-11-04) GLP-1 with incorporatin of A1b residue the whole document	1-7, 10-19, 21-29
A	WO 00/34331 A (SOD CONSEILS RECH APPLIC [FR]; DONG ZHENG XIN [US]) 15 June 2000 (2000-06-15) the whole document	1-7, 10-19, 21-29
P, Y	GARCÍA-MARTÍN FAYNA ET AL: "The synergy of ChemMatrix resin and pseudoproline building blocks renders RANTES, a complex aggregated chemokine." BIOPOLYMERS 2006, vol. 84, no. 6, 2006, pages 566-575, XP002457691 ISSN: 0006-3525 the whole document	1-7, 10-19
P, Y	CREMER GAËLLE-ANNE ET AL: "Combining a polar resin and a pseudo-proline to optimize the solid-phase synthesis of a 'difficult sequence'. JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE : AN OFFICIAL PUBLICATION OF THE EUROPEAN PEPTIDE SOCIETY JUN 2006, vol. 12, no. 6, June 2006 (2006-06), pages 437-442, XP002457692 ISSN: 1075-2617 the whole document	1-7, 10-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2007/056052

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 30
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 30

Present claim 30 relate to a so-called "omnibus" claim relating to both a compound and a method categories of claims in absence of any technical features. This non-compliance with the provisions of Article 6 and Rule 6 PCT is to such an extent, that no search could be performed.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/056052

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6514500	B1	04-02-2003	US 2003108567 A1	12-06-2003
			US 2003108568 A1	12-06-2003
WO 2004094461	A	04-11-2004	EP 1615653 A2	18-01-2006
WO 0034331	A	15-06-2000	AT 282635 T	15-12-2004
			AU 762012 B2	19-06-2003
			AU 1973600 A	26-06-2000
			BR 9915961 A	21-08-2001
			CA 2353574 A1	15-06-2000
			CN 1495198 A	12-05-2004
			CN 1329620 A	02-01-2002
			CZ 20011748 A3	13-02-2002
			CZ 295044 B6	18-05-2005
			CZ 295889 B6	16-11-2005
			CZ 295768 B6	12-10-2005
			CZ 295890 B6	16-11-2005
			CZ 295891 B6	16-11-2005
			DE 69922043 D1	23-12-2004
			DE 69922043 T2	24-11-2005
			EP 1137667 A2	04-10-2001
			ES 2230912 T3	01-05-2005
			HK 1037196 A1	24-03-2005
			HU 0104574 A2	29-04-2002
			JP 3702181 B2	05-10-2005
			JP 2002531578 T	24-09-2002
			JP 3934092 B2	20-06-2007
			JP 2004131473 A	30-04-2004
			JP 2005132845 A	26-05-2005
			JP 2006151988 A	15-06-2006
			KR 20050037004 A	20-04-2005
			NO 20012786 A	20-07-2001
			NO 20032093 A	20-07-2001
			NZ 511931 A	30-01-2004
			NZ 527241 A	24-12-2004
			PL 349468 A1	29-07-2002
			PT 1137667 T	28-02-2005
			RU 2214418 C2	20-10-2003
			RU 2288232 C2	27-11-2006
			SG 125915 A1	30-10-2006
			TW 593338 B	21-06-2004
			TW 255271 B	21-05-2006
			US 6903186 B1	07-06-2005

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 December 2007 (27.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/147816 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 14/605 (2006.01) A61K 38/26 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2007/056052

(22) International Filing Date: 19 June 2007 (19.06.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/815,919 23 June 2006 (23.06.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): F. HOFF-
MANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse
124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CHEN, Lin
[CN/US]; 3642 Blanca Peak Drive, Superior, Colorado
80027 (US). HAN, Yeun-Kwei [US/US]; 816 Pinehurst
Court, Louisville, Colorado 80027 (US). ROBERTS,
Christopher R. [US/US]; 721 N. County Road, 27E,
Berthoud, Colorado 80513 (US).

(74) Agent: KLOSTERMEYER, Doerte; Grenzacherstrasse
124, CH-4070 Basel (CH).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CY, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments
- with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: INSULINOTROPIC PEPTIDE SYNTHESIS

(57) Abstract: The present invention relates to the preparation of insulinotropic peptides that are synthesized using a solid and solution phase ("hybrid") approach. Generally, the approach includes synthesizing three different peptide intermediate fragments using solid phase chemistry. Solution phase chemistry is then used to add additional amino acid material to one of the fragments. The fragments are then coupled together in the solid solution phase. The use of a pseudoproline in one of the fragments eases solid phase synthesis of that fragment and also eases subsequent solution phase coupling of this fragment to other fragments. The present invention is very useful for forming insulinotropic peptides such as GLP-1(7-36) and its natural and non-natural counterparts.

WO 2007/147816 A1

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT
23.4.08
Vex. Olivier

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220 2383A

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2007/056052

International filing date (day/month/year)
19.06.2007

Priority date (day/month/year)
23.06.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K14/605 A61K38/26

Applicant
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Vix, Olivier

Telephone No. +49 89 2399-7326



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2007/056052

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/EP2007/056052

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 30

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 30

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2007/056052

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-29</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-29</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-29</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item V.

1 Reference is made to the following document:

- D1: ANDERSSON L ET AL: "Large-scale synthesis of peptides." BIOPOLYMERS 2000, vol. 55, no. 3, 2000, pages 227-250, XP002457690 ISSN: 0006-3525 cited in the application
- D2: SAMPSON W R ET AL: "The synthesis of 'difficult' peptides using 2-hydroxy-4-methoxybenzyl or pseudoproline amino acid building blocks: A comparative study" JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE, JOHN WILEY AND SONS LTD, GB, vol. 5, no. 9, 1999, pages 403-409, XP002419351 ISSN: 1075-2617
- D3: US-B1-6 514 500 (BRIDON DOMINIQUE P [CA] ET AL) 4 February 2003 (2003-02-04)
- D4: WO 2004/094461 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; NATARAJAN SESHAIYER [US]; MAPELLI CLAUD) 4 November 2004 (2004-11-04)
- D5: WO 00/34331 A (SOD CONSEILS RECH APPLIC [FR]; DONG ZHENG XIN [US]) 15 June 2000 (2000-06-15)
- D6: GARCÍA-MARTÍN FAYNA ET AL: "The synergy of ChemMatrix resin and pseudoproline building blocks renders RANTES, a complex aggregated chemokine." BIOPOLYMERS 2006, vol. 84, no. 6, 2006, pages 566-575, XP002457691 ISSN: 0006-3525
- D7: CREMER GAËLLE-ANNE ET AL: "Combining a polar resin and a pseudoproline to optimize the solid-phase synthesis of a 'difficult sequence'." JOURNAL OF PEPTIDE SCIENCE : AN OFFICIAL PUBLICATION OF THE EUROPEAN PEPTIDE SOCIETY JUN 2006, vol. 12, no. 6, June 2006 (2006-06), pages 437-442, XP002457692 ISSN: 1075-2617

2. No Opinion

Present claim 30 relate to a so-called "omnibus" claim relating to both a compound and a method categories of claims in absence of any technical features. This non-compliance with the provisions of Article 6 and Rule 6 PCT is to such an extent, that no search could be performed.

3. Novelty

The application relates to a method of making an insulinotropic GLP-1 peptide of SEQ ID N°4, 5 or 13 involving a stepwise coupling strategy using different peptide fragments of SEQ ID N°6, 8 and 9.

The subject-matter of claims 1-29 of the present application is considered to be novel in the sense of Article 33(2) PCT in view of the available prior art.

4. Inventive step

The technical problem to be solved by the application is the provision of improved method for synthesising GLP-1 peptides according to SEQ ID N°4 with improved yields, purities and quantities.

GLP-1 peptides are well known in the art and have been synthesised using different routes as discussed in D1 (see table 1).

The solution provided for the preparation of GLP-1 peptides is a synthesis using a combination of a solid and solution phase ("hybrid") method, including the synthesis of three different peptide intermediates, which are then coupled together to form the GLP-1 peptide.

Although a similar approach is known for the synthesis of difficult peptides as exemplified in D2 (using building blocks and introduction of pseudo proline residues in the intermediates), there was no clear incentive in view of prior art and the different existing synthesis techniques to choose such a combination of solid and solution phase techniques using specific peptide intermediates.

Thus, the claimed method comprising a specific multi-step approach using specific peptide intermediates appears as an inventive alternative of a synthetic method for making such GLP-1 peptides in view of the available prior art

5. Industrial applicability

The subject-matter of the application relates to methods of making insulinotropic GLP-1 peptides useful in therapeutic applications whereas claim 8-9 and 20 relate to peptide products which are intermediates used in the method.

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 insulínotropico

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

Se han descrito en la bibliografía muchos métodos para la síntesis de péptidos (por ejemplo, véase la Patente Estadounidense N° 6.015.881; Mergler et al. (1988) Tetrahe-
10 dron Letters 29:4005-4008; Mergler et al. (1988) Tetrahe-
dron Letters 29:4009-4012; Kamber et al. (eds), Peptides, Chemistry and Biology, ESCOM, Leiden (1992) 525-526; Rinker et al. (1993) Tetrahedron Letters 49:9307-9320; Lloyd-
15 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 síntesis tiene lugar, es decir fase líquida o fase sólida.

20 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 peptídicos al péptido unido al soporte hasta que el material peptídico de interés se ha formado. Entonces normalmente el péptido unido al soporte se escinde del soporte
25 y se somete a un procesado y/o purificación posterior. En algunos casos, la síntesis en fase sólida proporciona un

producto peptídico maduro; en otros casos el péptido escindido del soporte (es decir, un "fragmento de péptido intermediario") se utiliza en la preparación de un producto peptídico maduro más grande.

5 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
10 en los casos 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
15 difícil la adición de aminoácidos o 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
20 en tiempos de procesado más largos para compensar estos problemas, además del incremento de las pérdidas de materiales de partida, como los aminoácidos activables, co-reactivos y disolventes. Estos problemas pueden aumentar a medida que la longitud del péptido aumenta.

25 Por lo tanto, es bastante raro encontrar péptidos maduros mayores de 30 aminoácidos de longitud sintetizados en un único fragmento utilizando solamente un procedimiento de fase sólida. En lugar de esto, pueden sintetizarse fragmen-

tos 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 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 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.

5 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
10 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 pépti-
15 dos 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
20 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 biomole-
25 culares 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 insulínótropicas. 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 insulínotrópico 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 insulíntrópicamente activo y se denomina GLP-1(7-36) de acuerdo con el Id. de Sec. N° 3:

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

5 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 insulíntrópicamente 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 insulíntrópicamente activo del mismo *in vivo*. Más comúnmente, no obstante, los tratamientos terapéuticos en investigación involucran la administración de los fragmentos insulíntrópicamente activos de GLP-1 en sí mismos.

De acuerdo con la US 6.887.849, la actividad insulíntrópica 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 farmacéuticamente aceptables, en el estudio de la patogénesis de la aparición de la diabetes mellitus en adul-

tos, 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
5 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, trastor-
10 nos 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
15 comida.

El GLP-1 nativo(1-37) y sus homólogos insulínótricamente 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
20 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:

HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWL VKAibR

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
5 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.

La EP 1137667 expone que el péptido de acuerdo con el
10 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 puede llevar a altos niveles de epimeri-
15 zación 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, son necesarias estra-
20 tegias 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 relacio-
25 nados con la recuperación del producto y la pureza del producto 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 procesos de síntesis de péptidos capaces de producir eficientemente los materiales peptídicos de interés comercial en cantidades a gran escala con rendimientos
5 mejorados.

La presente invención está relacionada con la preparación de péptidos insulínotropicos que están sintetizados utilizando una aproximación de fase sólida y en solución ("híbrida"). Generalmente, la aproximación incluye la síntesis de tres fragmentos de péptido intermediarios diferentes utilizando la química 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
10 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
15 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
25 comprende los pasos de:

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 opcional protección de la cadena lateral; y

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

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

En otro aspecto, la invención está relacionada con un
10 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} incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral. Preferiblemente, X^8 es un residuo de aminoácido que
15 ponde a Aib y X^{10} es un residuo de aminoácido que corresponde a glicina.

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 del mismo que incluye 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
20

b) la incorporación del fragmento peptídico en un péptido insulínico.
25

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 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
5 cadena lateral.

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

10 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, tanto H como E incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral, con el segundo fragmento peptídico
15 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, para proporcionar un tercer fragmento peptídico que incluye la
20 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 insulínico.
25

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 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 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 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 HX⁸EX¹⁰TFTSDVX¹⁷⁻¹⁸YLEG (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
5 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 in-
10 cluyen 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 resi-
15 duos 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:

20 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;

25 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 di-

chos 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
5 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 $\text{QAAKEFIAWLVKX}^{35}$ (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
15 arginina para proporcionar un quinto fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos $\text{QAAKEFIAWLVKX}^{35}\text{R}$ (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
20 fragmento para proporcionar un péptido insulínico que incluye la secuencia de aminoácidos $\text{HX}^8\text{EX}^{10}\text{TFTSDVX}^{17-18}\text{YLEGQAAKEFIAWLVKX}^{35}\text{R}$ (Id. de Sec. N° 13), y dichos residuos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral.

25 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 $HX^8EX^{10}TFTSDVSSYLEG-QAAKEFI\Delta WLKX^{35}R$ (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 lateral 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 ditiotreitól (DTT), anisol, p-cresol, etanoditiol 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 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} 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 HX⁸EX¹⁰TFTSDVX¹⁷⁻¹⁸YLEG (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;

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

f) el acoplamiento del quinto fragmento al tercer fragmento para proporcionar un péptido insulínico con la fórmula (Id. de Sec. N° 5) HX⁸EX¹⁰TFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX³⁵R y homólogos de la misma, en las que los símbolos X en las posiciones 8, 10 y 35 denotan independientemente un residuo de aminoácido aquiral, estéricamente obstaculi-

zado 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
5 síntesis de acuerdo con la presente invención.

El fragmento 12 es un fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos HX^8EX^{10} (Id. de Sec. N° 6). El fragmento 14 es un fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos $T^{11}FTSD^{15}VX^{17-18}YL^{20}EG$ (Id. de Sec. N°
10 8). El fragmento 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 in-
15 termediario 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 $H^7X^8EX^{10}TFTSD^{15}VX^{17-18}YL^{20}EG QAA^{25}KEFIA^{30}WLVKX^{35}R$ (Id. de Sec. N° 13) en el que las Ser-Ser de las posiciones 17 y 18 están aún en la
20 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
25 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
5 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 general-
10 ralmente 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
15 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
20 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".

25 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 re-

fiere 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 existen de forma natural con cadenas laterales alifáticas C_1 - C_4 o alifáticas C_1 - C_4 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 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 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.

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-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 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.

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 porciones 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, 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, -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, alquilamida inferior o dialquilamida del péptido. Así, los péptidos parciales 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, 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 insulino-trópica puede demostrarse de acuerdo con los ensayos descritos en las Pat. Estadounidenses N° 6.887.849 y 6.703.365.

5 En las realizaciones preferidas, la presente invención proporciona metodologías para sintetizar péptidos sintéticos (X^8 , X^{10} , X^{35}) GLP-1(7-36) que poseen la siguiente fórmula (Id. de Sec. N° 5):



10 y homólogos de la misma, en la que cada uno de los símbolos X en las posiciones 8, 10 y 35 independientemente denotan un aminoácido aquiral, obstaculizado estéricamente de forma opcional. Cualquiera de los residuos X^8 , X^{10} y/o X^{35} pueden incluir opcionalmente grupos protectores de cadenas
15 laterales. Los péptidos de acuerdo con esta fórmula difieren del GLP-1(7-36) nativo en que al menos los residuos aquirales, obstaculizados estéricamente de forma opcional X^8 y X^{35} están sustituidos por los residuos de aminoácidos nativos en las posiciones 8 y 35. El residuo X^{10} puede deri-
20 varse de la glicina aquiral nativa u otro aminoácido aquiral. El uso de los aminoácidos aquirales X^8 , X^{10} , y X^{35} no sólo ayuda a estabilizar el péptido 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
25 Fig. 1 y se describe en detalle más adelante.

Una realización particularmente preferida de un péptido (X^8 , X^{10} , X^{35}) 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):

HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKaibR

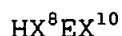
y homólogos de la misma, que preferiblemente están
5 amidados en C-terminal. Este péptido utiliza el residuo
aquiral del ácido alfa-aminoisobutírico (o metilalanina,
mostrado de forma esquemática mediante la abreviatura Aib)
como en X⁸ y X³⁵, que preferiblemente poseen una amida en C-
terminal, o utiliza un residuo de G nativa en la posición
10 10, y puede designarse mediante la fórmula (Aib^{8,35}) GLP-
1(7-36)-NH₂. Esta notación indica que un residuo de aminoá-
cido que corresponde al aminoácido "Aib" aparece en las po-
siciones 8 y 35 en lugar de la alanina nativa. El ácido al-
fa-aminoisobutírico aquiral, también se conoce como metila-
15 lanina. 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 meta-
bólica en el cuerpo, haciendo que este péptido sea mucho
más estable en el cuerpo que el péptido GLP-1(7-36) nativo.

20 La presente invención proporciona metodologías mejora-
das 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 pép-
tidos GLP-1(7-36) y sus homólogos. El esquema 10 de la Fig.
25 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.

10 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.

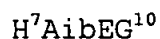
Como se muestra en la Fig. 1, el esquema 10 involucra la síntesis de los fragmentos intermediarios del péptido 12, 14 y 16 en la fase sólida. El fragmento 12 es un fragmento peptídico que incluye los residuos de aminoácido de acuerdo con el Id. de Sec. N° 6:



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 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 mediante la notación (X^8 , X^{10}) 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:



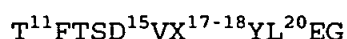
o es un homólogo del mismo que incluye el residuo Aib en la posición 10. El fragmento peptídico de acuerdo con el Id. de Sec. N° 7 puede representarse mediante la notación (Aib^8)GLP-1(7-10) para indicar la sustitución de Aib por la alanina nativa en la posición 8 del GLP-1(7-10) nativo.

La síntesis en fase sólida se lleva a cabo generalmente 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 intermediario 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 significativas 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 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 G quiral 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 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.

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 residuos de aminoácido que generalmente corresponden a

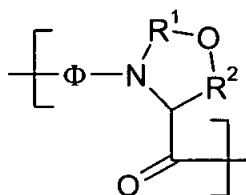
los residuos de aminoácido en las posiciones 11 a 22 del péptido GLP-1(7-36) nativo, excepto que se utiliza el residuo dipéptido de pseudoprolina X^{17-18} en lugar de los residuos SS (Ser-Ser) que ocupan las posiciones correspondientes 17 y 18 del GLP-1(7-36) nativo.

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 realizaciones, el fragmento peptídico 14 puede estar unido a 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 Fmoc es un grupo protector de N-terminal particularmente útil para la síntesis en fase sólida del fragmento peptídico. El fragmento peptídico de acuerdo con el Id. 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.

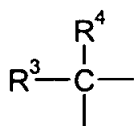
Tal y como se utiliza en la práctica de la presente invención, el término pseudoprolina se refiere a un dipéptido que incluye un residuo de un aminoácido con función hidroxilo como la Ser o Thr en las que la cadena lateral con la función hidroxilo está protegida con un unillo oxazolidina, lábil a TFA,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



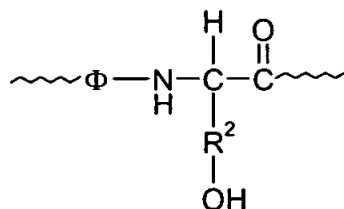
en la que Φ representa un residuo de cualquier aminoácido y tanto R^1 como R^2 son independientemente una porción de unión divalente adecuada. A menudo, R^1 es una porción divalente de fórmula



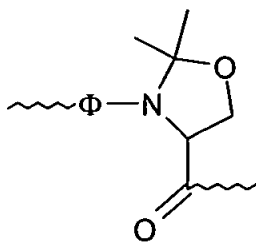
en la que tanto R^3 como R^4 son independientemente una porción monovalente como H, o un alquilo inferior como metilo. R^3 y R^4 también pueden ser co-miembros de una estructura en anillo. Es deseable que tanto R^3 como R^4 sea metilo. En el caso de una Ser protegida por un anillo oxazolidinina, R^2 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 alquilo 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-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 fórmula:



en la que Φ y R^2 son como se ha definido anteriormente. Aplicado al fragmento 14, el residuo de pseudoprolina preferiblemente 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 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 invención. 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 significati-

vos con las eliminaciones de Fmoc de los residuos 13 al 11. Se cree que esta dificultad 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 median-
5 te 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
10 en los solventes de acoplamiento típicos en fase 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).

15 La síntesis en fase sólida se lleva a cabo generalmente 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.
20 La síntesis en fase sólida continúa entonces mediante la adición consecutiva de residuos de aminoácido de la forma correspondiente a la secuencia deseada. Sin embargo, se añade el dipéptido pseudoprolina X¹⁷⁻¹⁸ a la cadena creciente en una posición que corresponde a las posiciones 17 y 18
25 del GLP-1(7-36) en lugar de añadir de forma consecutiva un par de residuos Ser nativos en estas posiciones 17 y 18. La síntesis del fragmento de péptido intermediario se completa después de que el residuo N-terminal (por ejemplo, el resi-

duo treonina (T) N-terminal) se haya añadido a la cadena de péptido naciente.

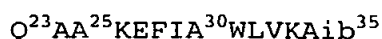
El fragmento 16 es un fragmento de péptido, u homólogo del mismo, que incluye los residuos de aminoácido de acuerdo con el Id. de Sec. N° 9:



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 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 X^{35} en lugar del aminoácido nativo en esa posición. El fragmento 16 puede estar representado mediante la notación (X^{35}) 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 que el Fmoc es un grupo protector de N-terminal particularmente útil para la síntesis en fase sólida del fragmento peptídico.

En realizaciones preferidas, X^{35} es Aib de acuerdo con el Id. de Sec. N° 10:



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

Nótese que el fragmento 16 de acuerdo con los Id. de
5 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 utilizando Arg sin la protección de la cadena lateral. Esta estrategia proporciona ventajas significati-
10 vas 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 la Arg protegida, los productos secundarios de la desprotección tienden a reaccionar con otros
15 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
20 16. Así, el aminoácido X³⁵, 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 frag-
25 mento de péptido intermediario se completa cuando el residuo N-terminal (por ejemplo, el residuo glutamina (Q) N-terminal) se ha añadido a la cadena naciente de péptido.

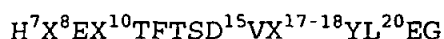
Cualquiera de los aminoácidos utilizados en la síntesis del fragmento 16 puede incluir protección de la cadena lateral de acuerdo con las prácticas convencionales.

Debido a la obstaculización estérica proximal en el
5 soporte de resina cargado con X^{35} , el acoplamiento de lisi-
na (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
10 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 acopla-
miento. En un grupo de experimentos, por ejemplo, las reac-
ciones de acoplamiento se llevaron a cabo con NMP/ DCM 3:1,
15 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 re-
fiere a diclorometano y DMF se refiere a dimetilformamida.
Se encontró que las reacciones de acoplamiento continúan
20 más allá en su finalización cuando se utiliza DMF/DCM 1:1.

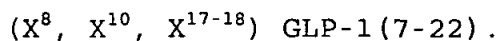
También se puede utilizar la protección del extremo
después de cada uno de los acoplamientos de lisina y valina
para prevenir posteriores reacciones de acoplamiento del
material unido a la resina que no ha reaccionado. El mate-
25 rial protegido en el extremo se elimina más fácilmente du-
rante la purificación 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

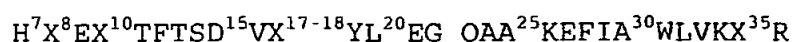


La Fig. 1 muestra además que se añade la Arg en el extremo C-terminal del fragmento 16 en la fase en solución para proporcionar el fragmento peptídico intermediario 20 más largo, que incorpora los residuos de aminoácido de acuerdo con el Id. de Sec. N° 12:



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 $(X^{35})\text{GLP-1(23-36)}$. Los fragmentos peptídicos 18 y 20 se acoplan entonces en la fase en solución para proporcionar el péptido protegido 11 deseado 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:



El péptido 11 puede estar designado por la notación
(X⁸, X¹⁰, X¹⁷⁻¹⁸, X³⁵)GLP-1(7-36). En el caso de que el resto
5 de aminoácidos lleven la protección de la cadena lateral,
es deseable mantener esta protección a lo largo de este pa-
so.

Al llevar a cabo el esquema de reacción de la Fig. 1,
las síntesis en fase sólida y en solución pueden llevarse a
10 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 aminoácido o grupo peptídico proximal a
15 C-terminal de un fragmento particular es el primero en añ-
adirse 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 está enmascarada para pre-
20 venir reacciones adversas no deseadas. Es deseable que el
aminoácido o grupo peptídico también incluya protección de
la cadena lateral. A continuación, se unen sucesivos ami-
noácidos o grupos peptídicos al material peptídico unido al
soporte hasta que el péptido de interés se haya formado. La
25 mayoría de éstos también incluyen protección de cadenas la-
terales de acuerdo con las prácticas convencionales. Con
cada acoplamiento sucesivo, se elimina el grupo de enmasca-
ramiento en el extremo N-terminal del material peptídico

unido a la resina. Éste se hace reaccionar con el extremo 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.

5 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,
10 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
15 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
20 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.
25

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 prefe-

ribilmente 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
5 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-
10 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, resina de hidrazina
15 2-clorotritilo. Algunos soportes sólidos preferidos incluyen el poliestireno, que puede co-polimerizarse 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
20 sólida incluyen las resinas "Wang", que comprenden un copolímero 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
25 Letters 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, 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
5 un solvente adecuado. El solvente de prelavado puede elegirse en función del tipo de solvente (o mezcla de solventes) que se utilizan en la reacción de acoplamiento, o viceversa. Los solventes que son adecuados para el lavado, y también para la posterior reacción de acoplamiento incluyen
10 el diclorometano (DCM), dicloroetano (DCE), dimetilformamida (DMF) y similares, así como las mezclas de estos reactivos. Otros solventes útiles incluyen el DMSO, piridina, cloroformo, dioxano, tetrahidrofurano, acetato de etilo, N-metilpirrolidona y mezclas de los mismos. En algunos casos
15 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
20 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
25 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
5 porción química acoplada a la cadena lateral (es decir, un grupo R en la fórmula general de los aminoácidos $H_2N-C(R)(H)-COOH$) 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,
10 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 intermediario o producto final deseado. La naturaleza del grupo protector de la cadena lateral tam-
15 bién 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
20 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 procesado del péptido, puede no ser necesaria la presencia de un grupo protector de la cadena lateral de un aminoácido.
25 Tales aminoácidos normalmente no incluyen un oxígeno reactivo, nitrógeno u otra porción reactiva en la cadena lateral.

Ejemplos de grupos protectores de cadenas laterales

incluyen acetilo (Ac), benzoilo (Bz), terc-butilo, trifenilmetilo (tritilo), tetrahidropiraniolo, éter de benzoilo (Bzl) y 2,6-diclorobenzoilo (DCB), t-butoxicarbonilo (Boc), nitro, p-toluenosulfonilo (Tos), adamantiloxicarbonilo, xantilo (Xan), benzoilo, 2,6-diclorobenzoilo, metilo, etilo y éster de t-butilo, benzoiloxicarbonilo (Z), 2-clorobenzoiloxicarbonilo (2-Cl-Z), t-amiloxi-carbonilo (Aoc) y los grupos protectores de tipo uretano aromáticos o alifáticos, los grupos fotolábiles como el nitro veratrilo oxycarbonilo (NVOC) y los grupos lábiles al fluoruro como el trimetilsilil oxycarbonilo (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 muestran en la siguiente Tabla A:

Tabla A:

<u>Aminoácido</u>	<u>Grupo(s) protector(es) de la 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
Leu	Ninguno

<u>Aminoácido</u>	<u>Grupo(s) protector(es) de la cadena lateral</u>
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 benciloxi- carbonilo (Z) y Z sustituido, como p-clorobenciloxi-

carbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxi-
carbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo; (3) los grupos pro-
tectores uretano alifáticos, como t-butiloxicarbonilo
(Boc), diisopropilmetoxicarbonilo, isopropiloxicarbonilo,
5 etoxicarbonilo, aliloxicarbonilo; (4) los grupos protecto-
res de tipo uretano cicloalquilo, como 9-fluorenil-
metiloxicarbonilo (Fmoc), ciclopentiloxicarbonilo, adaman-
tiloxicarbonilo, y ciclohexiloxicarbonilo; y (5) los grupos
protectores de tipo tiouretano, como feniltiocarbonilo. Los
10 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
15 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 acídicos. Este
tipo de reacción de escisión es relativamente limpia en
20 términos de productos secundarios resultantes, impurezas,
etc., haciendo que sea técnicamente y económicamente facti-
ble 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"
25 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

64

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
5 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
10 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 escin-
15 dirse de forma selectiva para 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 rea-
20 lizarse 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
25 diisopropiletilamina (DIEA) y trietilamina (TEA), pueden convertir los aminoácidos protegidos en especies activadas (por ejemplo, BOP, PyBOPO, HBTU y TBTU, todas generan ésteres de HOBT). Otros reactivos ayudan a prevenir la racemi-

zación proporcionando un reactivo de protección. Estos reactivos incluyen las carbodiimidas (por ejemplo, DCC o WSCDI) con un nucleófilo auxiliar añadido (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 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, 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. Para 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 conseguir 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 inter-

mediario 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 intermedio 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 a cabo deseablemente en dicho rango de temperaturas frías para acomodar la reacción exotérmica que normalmente ocurre durante la reacción. Además, la temperatura baja de la reacción de escisión evita que los grupos protectores de las cadenas

lateral sensibles al ácido, como los grupos tritilo, sean eliminados en esta fase.

Al final del tratamiento de escisión, la reacción se detiene. Esto se puede lograr, por ejemplo, combinando el
5 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
10 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, preferiblemente entre alrededor de 5°C y alrededor de 10°C.

15 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 Pat. Estadounidense N° 2005/0164912 A1.

20 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, por ejemplo, *New Trends in Peptide Coupling*
25 *Reagents*; Albericio, Fernando; Chinchilla, Rafael; Dods-worth, David J.; y Najera, Carmen; *Organic Preparations and Procedures International* (2003), 33(3), 203-303.

El acoplamiento de los fragmentos de péptido interme-

diarios 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-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), diciclohexilcarbodiimida (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 someterse 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.

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 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 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 líquido (HF), bromuro de hidró-

geno (HBr), ácido trifluorometanosulfónico y combinaciones de los mismos. La solución de desprotección también incluye uno o más neutralizadores de cationes adecuados, por ejemplo, ditioneitol (DTT), anisol, p-cresol, etanoditioneitol o sulfuro de dimetilo. La solución de desprotección 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 volumen" y el denominador es el número de partes totales en la composición. Por ejemplo, una solución de desprotección que contiene TFA: H₂O: DTT en una proporción de 90:5:5 (peso/ peso/ 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 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 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.

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

10 Un proceso de purificación particularmente preferido involucra al menos dos pasos de purificación a través de medio 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
15 pH ácido, mientras que el segundo paso ocurre a un pH básico. En realizaciones preferidas, ocurre al menos un paso bajo condiciones ácidas 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
20 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

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 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-
5 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 una vez con 175 mL de DMF. Posteriormente, los sitios ac-
10 tivos 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
15 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

La síntesis en fase sólida se llevó a cabo comenzando
5 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. cada lavado).

10 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 NMP (5 vol. cada lavado) hasta una prueba
15 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 y después se combinaron con DIEA (3,25 equiv.) a en-
20 tre 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 añadido al reactor, que se agitó entonces
25 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 reci-

to	6,32	1,79	1,56	51,0	3,29	26,0	26,0	92
His(trt)								

El fragmento peptídico unido a la resina se lavó con NMP (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
5 resina.

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

La resina obtenida en la Parte B anterior se expandió en DCM (12,5 volúmenes en relación al peso de la resina
10 utilizada; 12,5 ml de DCM por g de resina o 12,5 litros por kg) durante 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 DCM se drenó y se añadió una solución fría
15 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 filtración y se recogió en un recipiente. Mientras el recipiente se calentaba hasta 25°C, la
20 resina se lavó con DCM 7 veces (7,5 vol.). Los lavados se combinaron con la solución de escisión. 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 se separó del
25 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

en volumen) 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 mostró 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 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 piperidina al 20%/ NMP, la resina se lavó seis veces con NMP (5 vol. cada lavado) hasta una prueba de cloraniilo 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 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

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. Se obtuvieron un total de 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-
10 Gly

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	-	-	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 15 500 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 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 5 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 po- 10 sitivo), 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 15 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)).

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

20

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	4,96	4,23	140	9,33	70	70	352

	/1,65	/1,65	/1,85		/1,65			
rea-	4,73	2,48	2,15	72	4,85	36	36	120
coplamien	/0,83	/0,83	/0,92		/0,83			
to Aib								
His(trt)	21,18	5,80	4,99	140	10,98	70	70	180
	/1,94	/1,94	/2,14		/1,94			
rea-	10,80	2,90	2,48	72	5,49	36	36	180
coplamien	/0,97	/0,97	/1,07		/0,97			
to								
His(trt)								

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

La resina obtenida se lavó con NMP (5 vol.) 6 veces y 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, al que se le había añadido piridina (1,3 equiv. de TFA total) 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.

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

10 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	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	-
Diisopropiletil-amina (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 15 500 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.

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 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 mostró un factor de carga de 0,24 mmol/ g.

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

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
10 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 (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 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 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

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
5 agitó bajo 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
10 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 45,32 g de resina cargada. El
15 análisis mostró un factor de carga de 0,30 mmol/ g.

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
20 min. a 25°C. El solvente de DCM se drenó, y la resina se lavó dos veces con 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
25 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-
5 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
10 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 es-
15 taba incompleta tras 3 horas (ensayo Kaiser positivo), el recipiente de reacción se drenaba y se realizaba un reacoplamiento 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
20 (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)).

25 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.

10 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 Acético	4,69/ 10,0	-	7,13/ 12,0	60,0	-	-	30,0	-	153
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.

20 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	-	-	59,85	40,44	-

2-clorotritilo					
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

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.

El lecho se drenó y se lavó con 400 mL de DMF. Posteriormente, 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.

10 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
15 (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
20 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.
25 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

repiteieron 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-
5 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 uti-
10 lización 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
15 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 cromato-
20 gráfica.

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 ve-

ces (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 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 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. 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

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 volúmenes 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 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
5 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 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
10 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 min. La solución resultante se añadió al recipiente de reacción y se mezcló con la resina bajo agitación
15 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, la solución de acoplamiento se drenó y la resina se lavó con NMP 5 veces (10 volúmenes, 5
20 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 síntesis general, y se acopló un fragmento de acuerdo
25 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

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).

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.

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 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).

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

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 ácido trifluoroacético 0,1%/ acetonitrilo 15%/ agua 85%

B = mezcla de ácido trifluoroacético 0,1% / tetrahidrofurano 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

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%.

- 5 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.
- 10 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

- 15 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
- 20 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.
- 25

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

5 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 amónico 20 mM en MeOH/ agua (9:1) a través de una columna de concentración a entre 20°C y 25°C. Esta adición
10 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 mL de IPA y luego se secó a entre 20°C y 25°C bajo vacío hasta un peso constante. Se obtuvie-
15 ron 746 mg de péptido (una recuperación del 74,6%).

MS

Reivindicaciones

1. Un método para obtener un péptido insulínico, que comprende uno o más de los siguientes pasos:

h) proporcionar un primer 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, tanto H como E incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

i) proporcionar un segundo fragmento peptídico que incluye 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 incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

j) acoplar el 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;

k) proporcionar un cuarto fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos $QAAKEFIAWLVKX^{35}$ (Id. de Sec. N° 9), en el 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;

l) acoplar el cuarto fragmento peptídico a arginina para proporcionar un quinto fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos $QAAKEFIAWLVKX^{35}R$ (Id. de Sec. N°

12), y dichos residuos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral; y

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

2. El método de acuerdo con reivindicación 1, que comprende los pasos de a) a f).

10 3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, que comprende otro paso de:

n) eliminación de los grupos protectores de la cadena lateral para proporcionar un péptido insulínico que incluye la secuencia de aminoácidos $HX^8EX^{10}TFTSDVSSYLEGQAA$
15 $KEFIAWLVKX^{35}R$ (Id. de Sec. N° 5) y los homólogos de la misma, en la que cada uno de los símbolos X en las posiciones, 8, 10 y 35 independientemente indican un residuo de aminoácido aquiral, opcionalmente obstaculizado estéricamente.

4. Un método para obtener un péptido insulínico
20 de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende los pasos de:

a) proporcionar un primer fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos HX^8EX^{10} (Id. de Sec. N° 6), en los que X^8 es un residuo de aminoácido que corresponde a Aib y X^{10} es un residuo de aminoácido que corresponde a glicina, y tanto H como E incluyen opcionalmente la
25 protección de la cadena lateral;

b) proporcionar un segundo fragmento peptídico que in-

cluye 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 aminoácido de la secuencia incluyen opcio-
5 nalmente la protección de la cadena lateral;

c) acoplar el primer fragmento al segundo fragmento para proporcionar un tercer fragmento peptídico que incluye la secuencia de aminoácidos HX⁸EX¹⁰ TFTSDV X¹⁷⁻¹⁸YLEG (Id. de Sec. N° 11), y dichos residuos de aminoácido de la secuen-
10 cia 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 los que X³⁵ es un residuo de aminoácido que
15 corresponde a Aib, y dichos residuos de aminoácido de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral;

e) acoplar el cuarto fragmento peptídico a arginina para proporcionar un quinto fragmento peptídico que incluye
20 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) acoplar el quinto fragmento al tercer fragmento seguido de la eliminación de los grupos protectores de la ca-
25 dena lateral para proporcionar un péptido insulínico de fórmula HX⁸EX¹⁰TFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX³⁵R (Id. de Sec. N° 5) y los homólogos de la misma, en la que X⁸ y X³⁵ son residuos de aminoácido que corresponden a Aib, y X¹⁰ es un

residuo de aminoácido que corresponde a glicina.

5. El método para obtener un péptido insulínotropico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el paso de:

- 5 a) obtener 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 de la misma que incluye los residuos X^8 y X^{10} , y tanto H como E, X^8 y X^{10} incluyen opcio-
10 nalmente la protección de la cadena lateral; y

la incorporación del fragmento peptídico en un péptido insulínotropico.

6. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 5, en el que X^8 es un residuo de aminoácido que corresponde
15 a metilalanina.

7. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 5, en el que X^{10} es un residuo de aminoácido que corresponde a glicina.

8. Un fragmento peptídico con la secuencia de aminoácidos HX^8EX^{10} (Id. de Sec. N° 6), en el que X^8 y X^{10} son ambos
20 residuos de un aminoácido aquiral, tanto H como E, X^8 y X^{10} incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral.

9. El fragmento peptídico de la reivindicación 8, en
25 el que X^8 es un residuo de aminoácido que corresponde a Aib y X^{10} es un residuo de aminoácido que corresponde a glicina.

10. El método de acuerdo con reivindicación 5, en el que el péptido insulínotropico incluye la secuencia de ami-

noácidos (Id. de Sec. N° 5)

$\text{HX}^8\text{EX}^{10}\text{TFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX}^{35}\text{R}$

y los homólogos de la misma, en la que todos los símbolos X en las posiciones 8, 10 y 35 indican de forma independiente un residuo de aminoácido aquiral, opcionalmente obstaculizado estéricamente; y en la que uno o más de los residuos de aminoácido incluye opcionalmente la protección de la cadena lateral.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que al menos uno de entre X^8 y X^{35} es un residuo de Aib.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que X^{10} es un residuo de glicina.

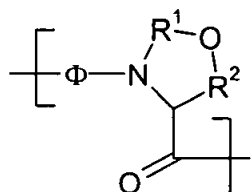
13. El método para obtener un péptido insulínico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el paso de:

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

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el péptido insulínico incluye la secuencia de aminoácidos $\text{HX}^8\text{EX}^{10}\text{TFTSDVX}^{17-18}\text{YLEGQAAKEFIAWLVKX}^{35}\text{R}$ (Id. de Sec. N° 13) y los homólogos de la misma, en la que los símbolos X^8 , X^{10} y X^{35} indican de forma independiente un residuo de aminoácido aquiral, X^{17-18} es un residuo de pseudoprolina, y dichos residuos de aminoácido incluyen opcionalmente la

protección de la cadena lateral.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 13, en el que X^{17-18} tiene la fórmula

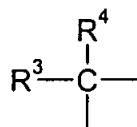


en la que Φ representa el residuo de cualquier aminoácido que opcionalmente incluye protección de la cadena lateral, y tanto R^1 como R^2 son independientemente una porción de unión divalente adecuada.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que Φ representa un residuo de Ser que incluye opcionalmente la protección de la cadena lateral.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que R^2 es $-\text{CH}_2-$.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 15, en el que R^1 es



en el que tanto R^3 como R^4 son independientemente una porción monovalente seleccionada de entre H o alquilo inferior; o R^3 y R^4 pueden ser también co-miembros de una estructura en anillo.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, en el que tanto R^3 como R^4 es metilo.

20. Un péptido 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 X^{17-18} es un residuo dipeptídico de pseudoprolina; y dichos residuos de aminoácidos incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral.

5 21. El método para la obtención de un péptido insulino-
notrónico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
el paso de:

 c) el acoplamiento del primer fragmento peptídico que
incluye la secuencia de aminoácidos HX^8EX^{10} (Id. de Sec. N°
10 6), en la que X^8 y X^{10} son ambos residuos de un aminoácido
aquiral y tanto H como E incluyen opcionalmente la protec-
ción de la cadena lateral, con el segundo fragmento peptí-
dico que incluye la secuencia de aminoácidos $TFTSDVX^{17-18}YLEG$
(Id. de Sec. N° 8), en la que el residuo denotado mediante
15 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, para pro-
porcionar un tercer fragmento peptídico que incluye la se-
cuencia de aminoácidos $HX^8EX^{10} TFTSDVX^{17-18}YLEG$ (Id. de Sec.
20 N° 11) y dichos residuos de aminoácidos de la secuencia in-
cluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral; y

 la incorporación del fragmento peptídico en un péptido
insulinotrópico.

 22. El método para la obtención de un péptido insuli-
25 notrópico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
el paso de:

 d) la obtención de un fragmento peptídico o un homólo-
go del mismo que incluye la secuencia de aminoácidos

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

5 la incorporación del fragmento peptídico en un péptido insulínico.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en el que X³⁵ es un residuo de aminoácido de metilalanina.

24. El método de acuerdo con la reivindicación 22, que
10 además comprende el paso de:

e) el acoplamiento del fragmento peptídico u homólogo del mismo que incluye la secuencia de aminoácidos QAAKEFIAWLVKX³⁵ (Id. de Sec. N° 9) a una arginina para proporcionar un fragmento peptídico que incluye la secuencia
15 de aminoácidos QAAKEFIAWLVKX³⁵R (Id. de Sec. N° 12), y dichos residuos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral.

25. El método de acuerdo con reivindicación 24, en el que R no incluye la protección de la cadena lateral.

20 26. El método de acuerdo con la reivindicación 22, en el que el péptido insulínico incluye la secuencia de aminoácidos HX⁸EX¹⁰TFTSDVX¹⁷⁻¹⁸YLEGQAAKEFIAWLVKX³⁵R (Id. de Sec. N° 13) y homólogos de la misma, en la que los símbolos X⁸, X¹⁰ y X³⁵ independientemente indican un residuo de aminoácido aquiral, y dichos residuos de aminoácidos de la secuencia incluyen opcionalmente la protección de la cadena lateral; y en la que X¹⁷⁻¹⁸ es un residuo de pseudoprolina.

27. El método de acuerdo con reivindicación 22, en el

que el péptido insulínico incluye la secuencia de aminoácidos (Id. de Sec. N° 5)

HX⁸EX¹⁰TFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKX³⁵R

5 y homólogos de la misma, en la que cada uno de los
símbolos X en las posiciones 8, 10 y 35 indican independientemente un residuo de aminoácido aquiral, opcionalmente obstaculizado estéricamente; y en la que uno o más de los
residuos de aminoácido opcionalmente incluyen la protección de la cadena lateral.

10 28. El método de acuerdo con las reivindicaciones de 1
a 7, 13 o de 21 a 25, en el que el péptido insulínico
posee la secuencia de aminoácidos (Id. de Sec. N° 4)

HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKAibR

y homólogos de la misma.

15 29. El método de acuerdo con la reivindicación 28, en
el que el péptido insulínico posee la secuencia de
aminoácidos (Id. de Sec. N° 4)

HAibEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKAibR

20 y homólogos de la misma, que está amidada en el extremo C-terminal.

30. Los nuevos métodos y péptidos como se han descrito hasta aquí.

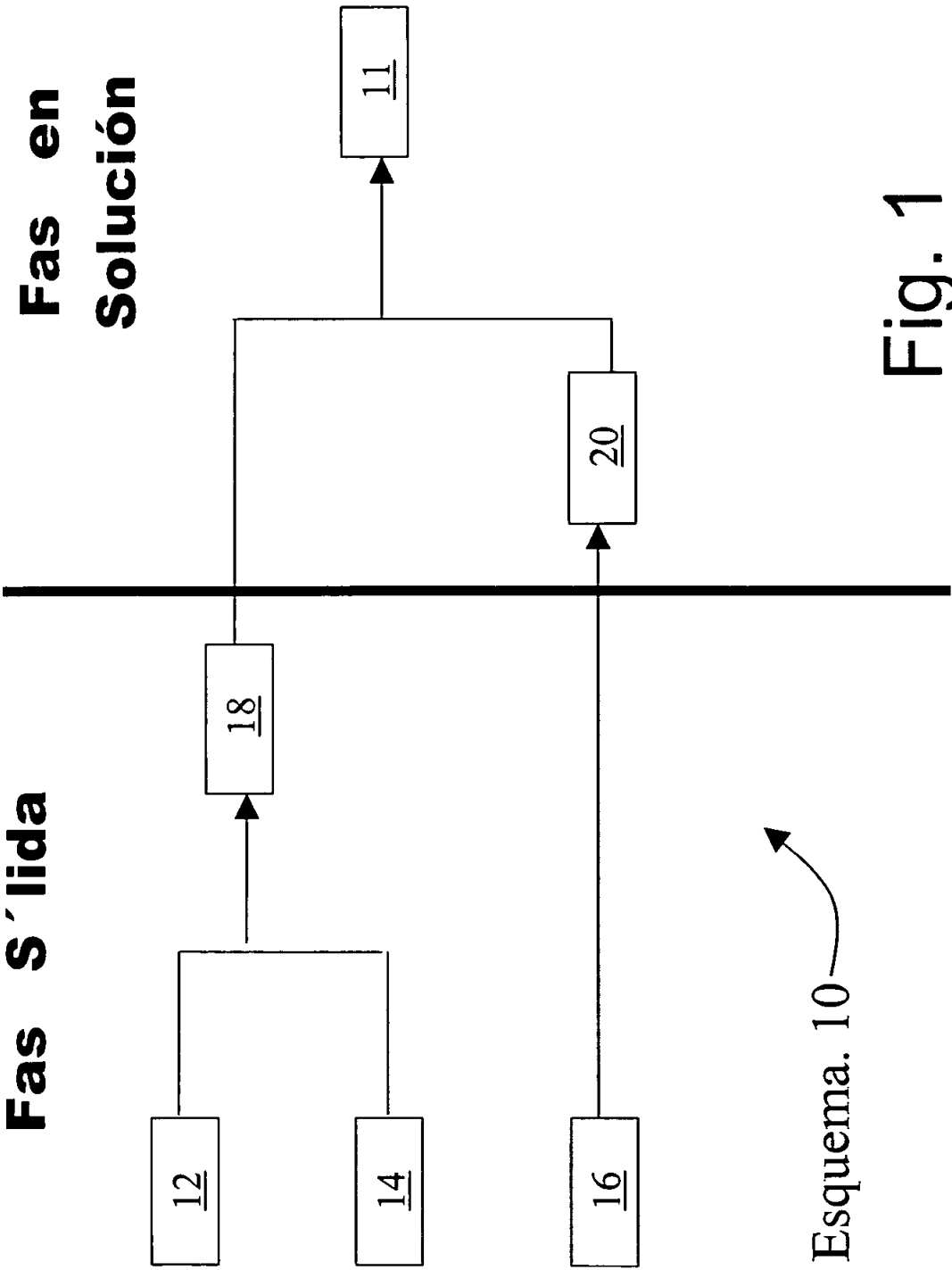


Fig. 1

TRADUCCION OFICIAL No. 2008-11-26-865
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
2008 NOV 27 A 10:35
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Pais: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por M. K. Carter
3. actuando como Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/estampilla de la Oficina de Patentes y Marcas
Certificado
el 9 de octubre de 2007
5. en Washington, D.C.
7. por el Funcionario de Autenticaciones, Departamento de Estado de los Estados Unidos
8. No. 08000751-9
9. Sello/Estampilla
Sello del Departamento de Estado
Estados Unidos de América
10. Firma: (ilegible)
Denitra T. Hawkins

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO
847340
CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961
DOCUMENTO DESTINADO A
FUNCIONES INDICADAS
RECIBO LEGALIZACION
TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
VITA ESCOBAR DETAMAYO

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
A TODOS AQUELLOS QUE VIEREN ESTOS PRESENTES:
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

19 de septiembre de 2007

POR EL PRESENTE SE CERTIFICA QUE ANEXA SE ENCUENTRA UNA COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO REGISTRADO EL 11 de septiembre de 2007.

Sello del Departamento de Comercio
Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos

Por Autoridad del
Subsecretario de Comercio para
Propiedad Intelectual y Director de la
Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos

(firma: ilegible)

M. K. CARTER

Funcionario que Certifica

TRASPASO DE PATENTE	
Versión Electrónica v1.1	09/11/2007
Versión Hoja Estilo v1.1	500352069
TIPO DE PRESENTACION	NUEVO TRASPASO
NATURALEZA DEL TRASPASO	TRASPASO
DATOS DE LA PARTE QUE TRASPASA	
Nombre	Fecha de Ejecución
Lin Chen	09/10/2007
Yeun-Kwei Han	09/10/2007
Christopher R. Roberts	09/10/2007
DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE	
Nombre:	Roche Colorado Corporation
Dirección:	2075 North 55th Street
Ciudad:	Boulder
Estado/País:	COLORADO
Código Postal:	80301
Total NUMEROS PROPIEDAD: 1	
Tipo de Propiedad	Número
Número de la Solicitud:	60815919
DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Número Fax:	(650)855-5322
<i>La correspondencia será enviada vía US Mail cuando el intento por fax no sea exitoso.</i>	

Teléfono:	(650) 852-3017
Email:	barbara.nolan@roche.com
Nombre Corresponsal:	Barbara Nolan
Dirección Línea 1:	3431 Hillview Avenue
Dirección Línea 2:	M/S A2-250
Dirección Línea 4:	Palo Alto, CALIFORNIA 94304
NUMERO EXPEDIENTE APODERADO	C23831 US
NOMBRE DEL PRESENTADOR:	Barbara Nolan
Total anexos: 3	
source=C23831 US#page1.tif	
source=C23831 US#page2.tif	
source=C23831 US#page3.tif	

REEL: 019811 FRAME: 0841

TRASPASO I

POR CUANTO, Nosotros, Lin Chen, Yeun-Kwei Han y Christopher R. Roberts, (Cedentes), teniendo las direcciones respectivas indicadas a continuación, hemos inventado cierta materia objeto llamada

“SINTESIS DE UN PEPTIDO INSULINOTROPICO USANDO TECNICAS DE COMBINACION DE FASE SOLIDA Y EN SOLUCION”

(la “Invención”), descrita en la solicitud de Patente No. Serial EU 60/815.919, registrada el 23 de junio de 2006, para Patente de Invención de los Estados Unidos de América (la “Solicitud”);

Y POR CUANTO, ROCHE COLORADO CORPORATION (“Roche”), una sociedad de Delaware, que tiene dirección en 2075 North 55th Street, Boulder, Colorado 80301, desea perfeccionar su derecho a la Invención y en Patente(s) de Invención para ser obtenidas por lo tanto de los Estados Unidos de América y todos los países extranjeros a ello;

AHORA, POR LO TANTO, a cambio de una consideración buena y valiosa, el recibo y suficiencia de lo cual se reconoce por el presente, los Cedentes reconocen el interés de Roche en la Invención y por el presente traspasan a Roche para los Estados Unidos de América y todos los países extranjeros a ello todos nuestros derechos, título e interés, incluyendo todos los derechos bajo la Convención de París para la Protección de Propiedad Industrial, en la Invención,

según se describe y reivindica en la Solicitud, o en cualquier solicitud(es) de patente subsiguiente registrada bajo 35 U.S.C. §111(a), reivindicando beneficio de dicha Solicitud bajo 35 U.S.C. §119(e), o 35 U.S.C. §120, o en cualquier continuación, continuación en parte, solicitud de prosecución continuada, divisional, sustituta, reexpedición, reexamen o extensión de ello y cualquier equivalente legal de ello en un país extranjero a los Estados Unidos de América; la Invención, solicitud y Patente(s) de Invención para ser propiedad de Roche, sus sucesores, cesionarios y representantes legales, hasta el final del término del término para el cual se otorguen dichas Patente(s) de Invención.

Los Cedentes por el presente convienen que tienen pleno derecho para ceder todo el interés en el presente cedido y no han ejecutado y no ejecutarán ningún acuerdo en conflicto con el presente.

Los Cedentes además convienen ejecutar y entregar cuando se les solicite y sin demora indebida, a Roche, sus sucesores, cesionarios y representantes legales, todos los documentos legales necesarios o deseables para efectuar este traspaso y perfeccionar el título de la invención, Solicitud y Patente(s) de Invención y todas las Patentes y solicitudes y patentes extranjeras que reivindican prioridad sobre ella.

Los Cedentes además convienen cooperar y participar en cualquier procedimiento legal o administrativo y ejecutar todos los documentos legales necesarios o deseables por Roche, sus sucesores, cesionarios o representantes legales para obtener, mantener, y ejecutar la protección de patente en la Invención en todos los países, siempre y cuando que Roche rembolsa a los Cedentes cualquier gasto incurrido en relación con ellos por los Cedentes.

Esta cesión entra en vigencia desde la primera fecha de ejecución de este documento o la fecha de presentación acordada por la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos para la Solicitud, según se indica en el Recibo de Presentación para dicha Solicitud.

He leído y entiendo este documento de Traspaso la Solicitud, y estoy de acuerdo con él, como se indica por mi firma puesta a continuación.

Firma (ilegible)	Fecha	9 / 10 / 2007
Li Chen		
3642 Blanca Peak Drive, Superior, Colorado 80027		

Estado de Colorado	)
	) ss.
Condado de Boulder	)

En este día 10 de septiembre de 2007, ante mí, compareció personalmente Li Chen, quien sé que es la persona descrita en y quien ejecutó el instrumento anterior, y quien reconoció que él ejecutó el mismo como su acto y acción libre, en el día y año anteriormente mencionados.

(firma: ilegible)
Notario Público

Firma (ilegible)	Fecha	9 / 10 / 2007
Yeun-Kwei Han		
816 Pinehurst Court, Louisville, Colorado 80027		

Estado de Colorado)
) ss.
Condado de Boulder)

En este día 10 de septiembre de 2007, ante mí, compareció personalmente Yeun-Kwei Han, quien sé que es la persona descrita en y quien ejecutó el instrumento anterior, y quien reconoció que él ejecutó el mismo como su acto y acción libre, en el día y año anteriormente mencionados.

(firma: ilegible)

Notario Público

Firma (ilegible) Fecha 9 / 10 / 2007
Christopher R. Roberts
721 N. County Road, 27E, Berthoud, Colorado 80513

Estado de Colorado)
) ss.
Condado de Boulder)

En este día 10 de septiembre de 2007, ante mí, compareció personalmente Christopher R. Roberts, quien sé que es la persona descrita en y quien ejecutó el instrumento anterior, y quien reconoció que él ejecutó el mismo como su acto y acción libre, en el día y año anteriormente mencionados.

(firma: ilegible)

Notario Público

Documento No. 151651v1

Caso No. C23831 US!

No. Serial 60/815.919

REGISTRADO EL 09/11/2007

REEL: 019811 FRAME: 0845

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 26 de noviembre de 2008, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by M.K. Carter

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U.S. Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the ninth of October, 2007

7. by ~~Assistant~~ *Authentication Officer, United States Department of State*

8. No. 08000751-9

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Denitra T. Hawkins

Denitra T. Hawkins

C23831
AssignI
Colombia

A 1659138

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

September 19, 2007

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
SEPTEMBER 11, 2007.

By Authority of the

Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office




M. K. CARTER
Certifying Officer

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

09/11/2007
500352069

SUBMISSION TYPE:

NEW ASSIGNMENT

NATURE OF CONVEYANCE:

ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Lin Chen	09/10/2007
Yeun-Kwei Han	09/10/2007
Christopher R. Roberts	09/10/2007

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Roche Colorado Corporation
Street Address:	2075 North 55th Street
City:	Boulder
State/Country:	COLORADO
Postal Code:	80301

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	60815919

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)855-5322

Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.

Phone: (650) 852-3017

Email: barbara.nolan@roche.com

Correspondent Name: Barbara Nolan

Address Line 1: 3431 Hillview Avenue

Address Line 2: M/S A2-250

Address Line 4: Palo Alto, CALIFORNIA 94304

ATTORNEY DOCKET NUMBER:

C23831 US

NAME OF SUBMITTER:

Barbara Nolan

Total Attachments: 3

source=C23831 US#page1.tif

CH \$40.00 60815919

REEL 019811 FRAME 0841

137

source=C23831 US#page2.tif
source=C23831 US#page3.tif

REEL 019811 FRAME 0842

138

ASSIGNMENT I

WHEREAS, We, Lin Chen, Yeun-Kwei Han, and Christopher R. Roberts, ("Assignors"), having the respective addresses indicated below, have invented certain subject matter entitled,

"INSULINOTROPIC PEPTIDE SYNTHESIS USING SOLID AND SOLUTION PHASE COMBINATION TECHNIQUES"

(the "Invention"), described in patent application U.S. Serial No. 60/815,919, filed June 23, 2006, for Letters Patent of the United States of America (the "Application");

AND WHEREAS, ROCHE COLORADO CORPORATION ("Roche"), a corporation of Delaware, having an address at 2075 North 55th Street, Boulder, Colorado 80301, desires to perfect its right to the Invention and in the Letters Patent(s) to be obtained therefor from the United States of America and all countries foreign thereto;

NOW, THEREFORE, in exchange for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which are hereby acknowledged, Assignors acknowledge Roche's interest in the Invention and hereby assign to Roche for the United States of America and all countries foreign thereto all our rights, title and interest, including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in the Invention, as described and claimed in the Application, or in any subsequent patent application(s) filed under 35 U.S.C. §111(a), claiming benefit of said Application under 35 U.S.C. §119(e), or 35 U.S.C. §120, or in any continuation, continuation-in-part, continued prosecution application, divisional, substitute, reissue, reexamination or extension thereof and any legal equivalent thereof in a country foreign to the United States of America; the Invention, application and Letters Patent(s) to be owned by Roche, its successors, assigns and legal representatives, to the full end of the term for which such Letters Patent(s) may be granted.

Assignors hereby covenant that they have the full right to convey the entire interest assigned herein and have not executed and will not execute any agreement in conflict herewith.

Assignors further covenant to execute and deliver upon request and without undue delay, to Roche, its successors, assigns and legal representatives, all lawful documents necessary or desirable to effect this assignment and perfect the title to the Invention, Application and Letters Patent(s) and all foreign patents and applications claiming priority thereto.

Assignors further covenant to cooperate and participate in any administrative or legal proceeding and execute all lawful documents necessary or desirable for Roche, its successors, assigns and legal representatives to obtain, maintain and enforce patent protection in the Invention in all countries, provided that Roche reimburses Assignors for any expenses incurred therewith by Assignors.

This assignment is effective as of the earlier of the date of execution of this document or the filing date accorded by the United States Patent and Trademark Office to the Application, as indicated in the Filing Receipt for said Application.

ASSIGNMENT I

I have read and understand this Assignment document for the Application, and agree hereto, as indicated by my signature as set forth below.

Signature [Signature] Date 9/10/2007
Lin Chen
3642 Blanca Peak Drive, Superior, Colorado 80027

STATE OF Colorado
COUNTY OF Boulder) ss.

On this 10 day of September, 2007, before me personally appeared the above-named Lin Chen, to me known to be the person described in and who executed the foregoing instrument, and who acknowledged that he executed the same as his free act and deed, on the day and year aforesaid.

[Signature]
Notary Public

Signature [Signature] Date 9/10/2007
Yeun-Kwei Han
816 Pinehurst Court, Louisville, Colorado 80027

STATE OF Colorado
COUNTY OF Boulder) ss.

On this 10 day of September, 2007, before me personally appeared the above-named Yeun-Kwei Han, to me known to be the person described in and who executed the foregoing instrument, and who acknowledged that he executed the same as his free act and deed, on the day and year aforesaid.

[Signature]
Notary Public

ASSIGNMENT I

Signature  Date 9/10/2007
Christopher R. Roberts
721 N. County Road, 27E, Berthoud, Colorado 80513

STATE OF Colorado
COUNTY OF Boulder ss.

On this 10 day of September 2007, before me personally appeared the above-named Christopher R. Roberts, to me known to be the person described in and who executed the foregoing instrument, and who acknowledged that he executed the same as his free act and deed, on the day and year aforesaid.


Notary Public

TRADUCCION OFICIAL No. 2008-11-26-866
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2008 NOV 27 A 10:34

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

RECIBO DE LEGALIZACION

42644

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

847337

CUYA FIRMADA EN EL
DOCUMENTO DESEMPAÑA
AS FUCIONES SINDICADAS

1. País: Estados Unidos de América
- Este documento público
2. ha sido firmado por M. K. Carter
3. actuando como Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/estampilla de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos
- Certificado**
5. en Washington, D.C.
6. por el Funcionario de Autenticaciones, Departamento de Estado de los Estados Unidos
7. No. 08000751-10
8. Sello/Estampilla
9. Sello del Departamento de Estado Estados Unidos de América
10. Firma: (ilegible)
Denitra T. Hawkins

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 217.13. INJUSTICIA
ANTITA E. COLLAR DETAMAYO

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
A TODOS AQUELLOS QUE VIEREN ESTOS PRESENTES:
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

19 de septiembre de 2007

POR EL PRESENTE SE CERTIFICA QUE ANEXA SE ENCUENTRA UNA COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA DE UN DOCUMENTO REGISTRADO EL 14 de septiembre de 2007.

Sello del Departamento de Comercio
Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos

Por Autoridad del
Subsecretario de Comercio para
Propiedad Intelectual y Director de la
Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos

(firma: ilegible)

M. K. CARTER

Funcionario que Certifica

TRASPASO DE PATENTE	
Versión Electrónica v1.1	09/14/2007
Versión Hoja Estilo v1.1	500354469
TIPO DE PRESENTACION	NUEVO TRASPASO
NATURALEZA DEL TRASPASO	TRASPASO
DATOS DE LA PARTE QUE TRASPASA	
Nombre	Fecha de Ejecución
Roche Colorado Corporation	09/12/2007
DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE	
Nombre:	F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Dirección:	124 Grenzacherstrasse
Ciudad:	Basilea
Estado/País:	SUIZA
Código Postal:	CH-4070
Total NUMEROS PROPIEDAD: 1	
Tipo de Propiedad	Número
Número de la Solicitud:	60815919
DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Número Fax:	(650)855-5322
<i>La correspondencia será enviada vía US Mail cuando el intento por fax no sea exitoso.</i>	
Teléfono:	(650)852.3017
Email:	barbara.nolan@roche.com
Nombre Corresponsal: Barbara Nolan	
Dirección Línea 1:	3431 Hillview Avenue
Dirección Línea 2:	M/S A2-250
Dirección Línea 4:	Palo Alto, CALIFORNIA 94304
NUMERO EXPEDIENTE APODERADO	C23831 US

NOMBRE DEL PRESENTADOR:	Barbara Nolan
Total anexos: 2 source=C23831 US#page1.tif source=C23831 US#page2.tif	

REEL: 019828 FRAME: 0455

TRASPASO II

ROCHE COLORADO CORPORATION (Cedente), una sociedad del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, que tiene su lugar principal de negocios en Palo Alto, California, Estados Unidos de América, por el presente traspasa a

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (Cesionario)
124 Grenzacherstrasse, CH-4070, Basle, Switzerland

todo su derecho, título e interés para todos los países del mundo excepto los Estados Unidos de América y sus territorios y posesiones, en y de la invención descrita y reivindicada en una solicitud para Patente de los Estados Unidos, No. Serial EU 60/815.919, presentada el 23 de junio de 2006, llamada

SINTESIS DE UN PEPTIDO INSULINOTROPICO USANDO TECNICAS DE COMBINACION DE FASE SOLIDA Y EN SOLUCION"

Por Lin Chen, Yeun-Kwei y Christopher R. Roberts (inventores)

así como en cualquier solicitud(es) subsiguiente en todos los países del mundo, excepto los Estados Unidos de América y sus territorios y posesiones, solicitud subsiguiente que reivindica esta solicitud No. Serial 60/815.919 como prioridad. Respecto a la invención y a todas las solicitudes de patente, nacionales y extranjeras, sobre dicha invención, un traspaso de todo derecho, título e interés en ello, para todo el mundo, a favor del Cedente fue ejecutado el 10 de septiembre de 2007 por Lin Chen, Yeun-Kwei y Christopher R. Roberts.

La presente cesión es por, pero no se limita a, los siguientes países y es por una contraprestación buena y valiosa, el recibo y suficiencia de los cual se reconoce por el presente.

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kazajstán, República de Corea, Luxemburgo, México, Mónaco, Holanda, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, República Popular China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, Sur Africa, España, Suecia, Suiza, Taiwán, Turquía, Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Ucrania, Uruguay, Venezuela.

El Cedente expresamente traspasa al Cesionario el derecho a presentar las correspondientes solicitudes de patente en todos los países del mundo excepto los Estados Unidos de América y a reivindicar la fecha de prioridad bajo cualquier tratado o convención internacional de cualquiera de solicitud(es) de patente de los Estados Unidos traspasada por el Cedente en este Traspaso. El Cedente acuerda ejecutar cualquier traspaso adicional y escrito así como llevar a cabo cualquier acto adicional necesario para permitirle al Cesionario disfrutar de todos los derechos de este Traspaso.

Palo Alto, California, EE.UU.

Fecha: 9 / 12 / 07

ROCHE COLORADO CORPORATION

Por: (firma: ilegible)

Kevin A. Marks

Secretario

RECONOCIMIENTO

Estados Unidos de América)
Estado de California) ss.
Condado de Santa Clara)

El 9 / 12 / 07, ante mí, Barbara Nolan, Notario Público compareció personalmente Grant D. Green, a quien conozco personalmente que es la persona cuyo nombre está suscrito en el documento adjunto, y reconoció ante mí que él firmó el mismo como persona autorizada, y que por medio de su firma en el documento la persona o entidad a nombre de quien la persona actúo, firmó el documento.

Barbara Nolan
Comisión # 1728323
Notario Público – California
Condado de Santa Clara
Mi Comisión Expira el 28 de marzo de 2011

TESTIFICA mi firma y sello oficial.
(firma: ilegible)

Caso No C23831 US O

USSN 60/815.919

REGISTRADO EL 09/14/2007

REEL: 019828 FRAME: 0457

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 26 de noviembre de 2008, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by M.K. Carter

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U.S. Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the ninth of October, 2007

7. by ~~Assistant~~ *Authentication Officer, United States Department of State*

8. No. 08000751-10

9. Seal/Stamp:

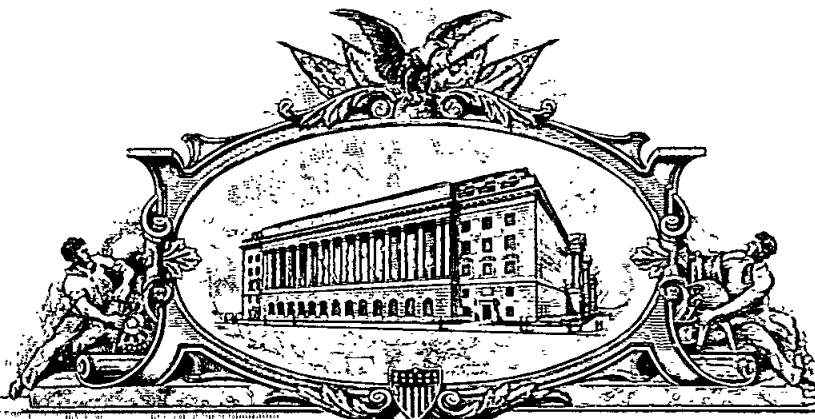
10. Signature:

Denitra T. Hawkins

Denitra T. Hawkins

C23831
Assign II
Colombia

A 1659141



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

September 19, 2007

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
SEPTEMBER 14, 2007.**

By Authority of the

**Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office**

M. K. Carter
M. K. CARTER

Certifying Officer



151

PATENT ASSIGNMENT

Electronic Version v1.1
Stylesheet Version v1.1

09/14/2007
500354469

SUBMISSION TYPE:

NEW ASSIGNMENT

NATURE OF CONVEYANCE:

ASSIGNMENT

CONVEYING PARTY DATA

Name	Execution Date
Roche Colorado Corporation	09/12/2007

RECEIVING PARTY DATA

Name:	F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Street Address:	124 Grenzacherstrasse
City:	Basel
State/Country:	SWITZERLAND
Postal Code:	CH-4070

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	60815919

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)855-5322
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
Phone: (650)852-3017
Email: barbara.nolan@roche.com
Correspondent Name: Barbara Nolan
Address Line 1: 3401 Hillview Avenue
Address Line 2: M/S A2-250
Address Line 4: Palo Alto, CALIFORNIA 94304

ATTORNEY DOCKET NUMBER:

C23831 US

NAME OF SUBMITTER:

Barbara Nolan

Total Attachments: 2

source=C23831 US#page1.tif

source=C23831 US#page2.tif

CH \$40.00 60815919

REEL 019828 FRAME 0455

152

ASSIGNMENT II

ROCHE COLORADO CORPORATION (Assignor), a corporation of the State of Delaware, United States of America, having its principal place of business at Palo Alto, California, United States of America, hereby assigns to

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (Assignee)
124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basle, Switzerland

all of its right, title and interest for all countries of the world except the United States of America and its territories and possessions, in and to the invention described and claimed in an application for United States Patent, U.S. Serial No. 60/815,919, filed June 23, 2006, entitled

INSULINOTROPIC PEPTIDE SYNTHESIS USING SOLID AND SOLUTION PHASE COMBINATION TECHNIQUES

by **Lin Chen, Yeun-Kwei Han, and Christopher R. Roberts** (inventors)

as well as in any subsequent application(s) in all countries of the world, except the United States of America and its territories and possessions, which subsequent application(s) claim this application Serial No. 60/815,919 as priority. In respect of the invention and all such patent applications, domestic and foreign, on said invention, an assignment of all right, title and interest therein, for the whole world, in favor of Assignor was executed on September 10, 2007 by Lin Chen, Yeun-Kwei Han, and Christopher R. Roberts.

The present assignment is for, but is not limited to, the following countries and is for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged:

Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Republic of Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russian Federation, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Turkey, United Kingdom and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, Venezuela.

Assignor expressly assigns to Assignee the right to file corresponding patent applications in all countries of the world except the United States of America and to claim the priority date under any international treaty or convention of any of the above U.S. patent application(s) assigned by

Assignment II cont'd

Assignor in this present Assignment. Assignor agrees to execute any additional assignments and writings as well as to perform any additional acts necessary to enable Assignee to enjoy the full rights of the present Assignment.

Palo Alto, California, U.S.A.

ROCHE COLORADO CORPORATION

Date: 9/12/07

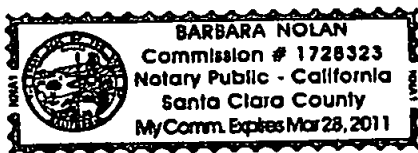
By: 

Kevin A. Marks
Secretary

ACKNOWLEDGMENT

United States of America)
State of California) ss.
County of Santa Clara)

On 9/12/07 before me, BARBARA NOLAN, Notary Public, personally appeared Kevin A. Marks, personally known to me to be the person whose name is subscribed to the within instrument, and acknowledged to me that he executed the same in his authorized capacity, and that by his signature on the instrument the person or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.



WITNESS my hand and official seal

Barbara Nolan