



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 199**

51 Int. Cl.:
C07K 14/605 (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00910570 .1**
96 Fecha de presentación : **15.03.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1163268**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2001**

54 Título: **Separación de la GLP-1 y de péptidos asociados por cromatografía de intercambio iónico.**

30 Prioridad: **15.03.1999 DK 1999 00361**
19.01.2000 DK 2000 00082

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.10.2011

73 Titular/es: **NOVO NORDISK A/S**
Novo Allé
2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es: **Staby, Arne**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 366 199 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Separación de GLP-1 y de péptidos asociados por cromatografía de intercambio iónico

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de intercambio iónico para purificar GLP-1 o un análogo o un derivado de una mezcla conteniendo dicho GLP-1 e impurezas relacionadas, y a un método industrial que incluye tal proceso de cromatografía de intercambio iónico.

10

Antecedentes

15

[0002] Para la purificación y análisis de proteínas y péptidos, la cromatografía es un método bien conocido y muy usado. Varios principios cromatográficos diferentes son aplicados, entre esta cromatografía de intercambio iónico (IEC). El principio de IEC incluye dos métodos diferentes: intercambio aniónico e intercambio catiónico según la carga de los ligandos en la resina de intercambio iónico. Un proceso de purificación convencional IEC normalmente consiste en una o más: secciones de equilibrado, secciones de aplicación o de carga, secciones de lavado, secciones de elución, y secciones de regeneración (cf. Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, or Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición (1995)).

20

[0003] El principio principal de elución en IEC en procesos de purificación industriales es gradientes de componente de sal en una solución tamponada acuosa a pH constante, bien como gradientes de paso o lineales (cf. S. Bjørn y L. Thim, Activation of Coagulation Factor VII to VIIa, Res. Discl. N°. 269, 564-565, 1986). La elución isocrática es posible, pero raramente usada. Solventes orgánicos o modificadores han sido ocasionalmente añadidos a las soluciones para tener la proteína o péptido en la forma deseada o sólo en solución (cf. K. H. Jørgensen, Process for Purifying Insulin, US Patent No. 3,907,676, Sept. 23, 1975; y J. Brange, O. Hallund y E. Sørensen, Chemical Stability of Insulin 5. Isolation, Characterisation and Identification of Insulin Transformation Products, Acta Pharm. Nord. 4(4), 223-232, 1992).

25

30

[0004] Péptido-1 tipo glucagón (GLP-1) (cf. Schmidt et al. en Diabetologia 28 704-707, 1985) y análogos al igual que derivados de las mismas se pueden utilizar en el tratamiento de diabetes, como se describe en WO 98/08871. Un péptido GLP-1 y análogos relacionados son fácilmente disueltos en solventes acuosos y mantenidos en una forma monomizada. La purificación por IEC tradicional de GLP-1 con gradientes de sal en solventes acuosos puede, no obstante, ser problemática debido a la falta de selectividad entre una fracción de objetivo de GLP-1 e impurezas relacionadas.

35

[0005] WO 87/06941 (The General Hospital Corporation) revela fragmentos peptídicos que comprenden GLP-1 (7-37) y derivados funcionales de los mismos y su uso como un agente insulínico.

40

[0006] WO 90/11296 (The General Hospital Corporation) revela fragmentos peptídicos que comprenden GLP-1 (7-36) y derivados funcionales de los mismos y tiene una actividad insulínica que excede la actividad insulínica de GLP-1 (1-36) o GLP-1 (1-37) y su uso como agentes insulínicos.

45

[0007] WO 91/11457 (Buckley et al.) divulga análogos de los péptidos activos GLP-1 7-34, 7-35, 7-36, y 7-37.

[0008] WO 98/08871 divulga derivados de GLP-1 en los que un sustituyente lipofílico se fija al menos a un residuo de aminoácido. Los sustituyentes lipofílicos están en grupos de cadena larga particulares conteniendo por ejemplo 12-24 átomos de carbono.

50

[0009] WO 98/08872 divulga derivados de GLP-2 en los que un sustituyente lipofílico se fija al menos a un residuo de aminoácido. Los sustituyentes lipofílicos están en grupos de cadena larga particulares conteniendo por ejemplo 12-24 átomos de carbono.

[0010] WO 96/32414 divulga análogos de GLP-2.

55

[0011] EP 0699686-A2 (Eli Lilly & Co.) divulga fragmentos truncados N-terminales determinados de GLP-1 que se proporcionan por ser biológicamente activos.

[0012] EP 0708179-A2 (Eli Lilly & Co.) divulga análogos de GLP-1 y derivados que incluyen un grupo de imidazol N-terminal y opcionalmente un grupo acilo de cadena recta C6-C10 fijado al residuo de lisina en la posición 34.

[0013] EP 0207727-A2 se refiere a un proceso para recuperar glucagón de glándulas del páncreas.

[0014] J.Chromatography 237, 417-28, 1982 describe la separación de péptidos por HPLC en una fase enlazada de intercambio aniónico débil.

[0015] En US 3907676 un proceso para reducir la antigenicidad de insulina es descrito donde se usa un sistema de cromatografía de intercambio aniónico.

[0016] US 5101013 se refiere a un proceso para el aislamiento de proteínas básicas tales como insulinas de una mezcla de proteínas donde se usa un intercambiador catiónico fuertemente ácido

[0017] US 4361 51 0 concierne métodos para producir complejos de coagulación sanguínea que comprenden factores de coagulación II, VII, IX y X, donde los métodos incluyen fases de lavado de intercambio aniónico y de elución.

Descripción de la invención

[0018] A diferencia de las técnicas descritas anteriormente IEC para purificación de cualquier proteína o péptido, que consiste en una o más fases de equilibrado, fases de aplicación o de carga, fases de lavado, fases de elución, y fases de regeneración, la presente invención se refiere al uso de un modificador orgánico para la purificación de un péptido GLP-1 y todos los análogos relacionados etc. por IEC. Por adición de un modificador orgánico especialmente a la sección de elución de la fase de purificación IEC, un aumento en selectividad y eficiencia se obtiene en comparación con la misma ejecución con tampones acuosos, tanto para cromatografía de intercambio aniónico como catiónico. La solución de equilibrado y la muestra para aplicación puede o no contener el modificador orgánico. El uso de un modificador orgánico tiene la ventaja adicional que no se necesita ninguna sal o se necesitan concentraciones muy bajas de sal para elución, especialmente para cromatografía de intercambio catiónico en comparación con un sistema cromatográfico acuoso.

[0019] En un aspecto amplio la presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de intercambio catiónico para depuración de un péptido de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas relacionadas, comprendiendo la fase de:

separar dicho péptido y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que comprende un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una red de carga global o local positiva diferente de la red de carga local o global positiva de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas.

[0020] En otro aspecto amplio la presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de intercambio catiónico para la depuración de un péptido de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas relacionadas, comprendiendo la fase de:

separar dicho péptido y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que consiste esencialmente en un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH deberían estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una red de carga global o local positiva diferente de la red de carga local o global positiva de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas.

[0021] En otro aspecto amplio la presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de intercambio aniónico para depuración de un péptido de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas relacionadas, comprendiendo la fase de:

separar dicho péptido y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que comprende un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una red de carga global o local negativa diferente de la red de carga local o global negativa de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas.

[0022] En otro aspecto amplio la presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de intercambio aniónico para purificar un péptido de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas relacionadas, comprendiendo la fase de:

5 separar dicho péptido y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que consiste esencialmente en un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una red de carga global o local negativa, diferente de la red de carga local o global negativa de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas.

10 [0023] Un aspecto de la presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de intercambio catiónico para purificar un péptido GLP-1 de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas relacionadas, comprendiendo la fase de:

15 separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que comprende un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH deberían estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una red de carga global o local positiva diferente de la red de carga local o global positiva de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas.

20 [0024] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de intercambio catiónico para purificar un péptido GLP-1 de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas relacionadas, comprendiendo la fase de:

25 separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que consiste esencialmente de un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una red de carga global o local positiva diferente de la red de carga local o global positiva de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas.

30 [0025] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de intercambio aniónico para purificar un péptido GLP-1 de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas relacionadas, comprendiendo la fase de:

35 separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que comprende un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH deberían estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una red de carga global o local negativa diferente de la red de carga local o global negativa de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas.

40 [0026] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un proceso de cromatografía de intercambio aniónico para purificar un péptido GLP-1 de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas relacionadas, comprendiendo la fase de:

45 separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que consiste esencialmente en un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH deberían estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una carga neta global o local negativa diferente de la red de carga local o global negativa de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas.

50 [0027] La elución en los aspectos anteriores puede también ser posible cambiando el contenido de modificador orgánico en la sección de elución, que se considera una forma de realización de la presente invención.

55 [0028] El gradiente lineal o escalonado en el componente de sal sería de una concentración inferior a una concentración más alta en ambos modos de IEC.

60 [0029] En los aspectos anteriores del presente proceso la elución podría también ser considerada una fase de lavado de impurezas relacionadas.

- [0030] En una forma de realización de la presente invención la proporción de modificador orgánico a agua, en una base porcentual en peso, es de 1:99 a 99:1, tal como 1:99 a 80:20, 20:80 a 80:20, 30:70 para 70:30, 35:50 a 50:35, o 40:50 a 50:40. Cada una de estas proporciones constituye una forma de realización alternativa de la presente invención.
- 5 [0031] En la presente invención el modificador orgánico se selecciona de C1-6 alcohol y C2-6 glicol, más preferiblemente metanol, etanol, propanoles y butanoles y hexil glicoles, de la forma más preferible etanol y 2-propanol. Cada uno de estos modificadores orgánicos constituye una forma de realización alternativa de la presente invención.
- 10 [0032] En otra forma de realización de la presente invención el gradiente de pH escalonado o lineal para el proceso de cromatografía de intercambio aniónico va de un pH superior a un pH inferior.
- [0033] En otra forma de realización de la presente invención el gradiente de pH escalonado o lineal para el proceso de cromatografía de intercambio catiónico va de un pH inferior a un pH superior.
- 15 [0034] En otra forma de realización de la presente invención el componente de sal se selecciona de cualquier sal inorgánica u orgánica y sus mezclas derivadas, preferiblemente NaCl, KCl, NH₄Cl, CaCl₂, acetato sódico, acetato de potasio, acetato amónico, citrato sódico, citrato de potasio, citrato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de amonio, acetato de calcio o mezclas derivadas, los más preferidos acetato sódico, acetato de potasio, acetato amónico, NaCl, NH₄Cl, KCl. Cada uno de estos componentes de sal constituye una forma de realización alternativa de la presente invención.
- 20 [0035] En otra forma de realización de la presente invención el gradiente en el componente de sal es un gradiente escalonado en el componente de sal.
- [0036] En otra forma de realización de la presente invención el componente de sal está presente en una concentración escalonada seleccionada del intervalo de 0.1 mmol/kg a 3000 mmol/kg, preferiblemente 1 mmol/kg a 1000 mmol/kg, más preferiblemente 5 mmol/kg a 500, de la forma más preferible 20 mmol/kg a 300 mmol/kg. Cada una de estas gamas constituye una forma de realización alternativa de la presente invención.
- 25 [0037] En otra forma de realización de la presente invención el gradiente en el componente de sal es un gradiente lineal en el componente de sal.
- 30 [0038] En otra forma de realización de la presente invención el componente de sal está presente en una concentración lineal seleccionada de 0.1 mmol/kg a 3000 mmol/kg, preferiblemente 1 mmol/kg a 1000 mmol/kg, más preferiblemente 5 mmol/kg a 500, de la forma más preferible 20 mmol/kg a 300 mmol/kg. Cada una de estas concentraciones lineales constituye una forma de realización alternativa de la presente invención.
- 35 [0039] En otra forma de realización de la presente invención no está presente ningún componente de sal.
- [0040] En otra forma de realización de la presente invención el tampón se selecciona de tampones de citrato, tampones de fosfato, tampones tris, tampones de borato, tampones de lactato, tampones de glicil glicina, tampones de arginina, tampones carbonatos, tampones de acetato, tampones de glutamato, tampones de amonio, tampones de glicina, tampones de alquilamina, tampones de alcohol de aminoetilo, tampones de etilendiamina, amina de trietanol, tampones de imidazol, tampones de piridina y tampones de barbiturato y sus mezclas derivadas, preferiblemente ácido cítrico, citrato sódico, citrato de potasio, fosfato sódico, fosfato potásico, ácido fosforoso, ácido glutámico, glutamato sódico, glutamato de potasio, glicina, carbonato de sodio, tris-hidroximetil amino metano y ácido bórico y sus mezclas derivadas. Cada uno de estos tampones constituye una forma de realización alternativa de la presente invención.
- 40 [0041] En otra forma de realización de la presente invención el tampón está presente en una concentración seleccionada del intervalo de 0.1 mmol/kg a 500 mmol/kg, preferiblemente 1 mmol/kg a 200 mmol/kg, más preferiblemente 5 mmol/kg a 100 mmol/kg, de la forma más preferible 10 mmol/kg a 50 mmol/kg. Cada una de estas gamas constituye una forma de realización alternativa de la presente invención.
- 45 [0042] En otra forma de realización de la presente invención ningún tampón está presente.
- 50 [0043] En otra forma de realización de la presente invención el péptido GLP-1 para ser purificado se selecciona de GLP-1 (7-37), GLP-1 (7-36) amida al igual que análogos y derivados de los mismos, en particular pero no limitado a péptido-1 tipo glucagón humano,
- 55 Arg26-GLP-1(7-37);
Arg34-GLP-1 (7-37);
Lys36-GLP-1 (7-37);
- 60

Arg26,34Lys36-GLP-1 (7-37);
 Arg26,34Lys38-GLP-1 (7-38);
 Arg26,34Lys39-GLP-1 (7-39);
 Arg26,34Lys40-GLP-1 (7-40);
 5 Arg26Lys36-GLP-1 (7-37);
 Arg34Lys36-GLP-1 (7-37);
 Arg26Lys39-GLP-1 (7-39);
 Arg34Lys40-GLP-1 (7-40);
 10 Arg26,34Lys36,39-GLP-1 (7-39);
 Arg26,34Lys36,40-GLP-1 (7-40);
 Gly8Arg26-GLP-1 (7-37);
 Gly8Arg34-GLP-1 (7-37);
 Gly8Lys36-GLP-1 (7-37);
 15 Gly8Arg26,34Lys36-GLP-1 (7-37);
 Gly8Arg26,34Lys39-GLP-1 (7-39);
 Gly8Arg26,34Lys40-GLP-1 (7-40);
 Gly8Arg26Lys36-GLP-1 (7-37);
 Gly8Arg34Lys36-GLP-1 (7-37);
 20 Gly8Arg26Lys39-GLP-1 (7-39);
 Gly8Arg34Lys40-GLP-1 (7-40);
 Gly8Arg26,34Lys36,39-GLP-1 (7-39);
 Gly8Arg26,34Lys36,40-GLP-1 (7-40);
 Arg26,34Lys38GLP-1 (7-38);
 25 Arg26,34Lys39GLP-1 (7-39);
 Arg26,34Lys40GLP-1 (7-40);
 Arg26,34Lys41GLP-1 (7-41);
 Arg26,34Lys42GLP-1 (7-42);
 Arg26,34Lys43GLP-1 (7-43);
 30 Arg28,34Lys44GLP-1 (7-44);
 Arg26,34Lys45GLP-1 (7-45);
 Arg26,34Lys38GLP-1 (1-38);
 Arg26,34Lys39GLP-1 (1-39);
 Arg26,34Lys40GLP-1 (1-40);
 35 Arg26,34Lys41GLP-1 (1-41);
 Arg26,34Lys42GLP-1 (1-42);
 Arg26,34Lys43GLP-1 (1-43);
 Arg26,34Lys44GLP-1 (1-44);
 Arg26,34Lys45GLP-1 (1-45);
 40 Arg26,34Lys38GLP-1 (2-38);
 Arg26,34Lys39GLP-1 (2-39);
 Arg26,34Lys40GLP-1 (2-40);
 Arg26,34Lys41GLP-1 (2-41);
 Arg26,34Lys42GLP-1 (2-42);
 45 Arg26,34Lys43GLP-1 (2-43);
 Arg26,34Lys44GLP-1 (2-44);
 Arg26,34Lys45GLP-1 (2-45);
 Arg26,34Lys38GLP-1 (3-38);
 Arg26,34Lys39GLP-1 (3-39);
 50 Arg26,34Lys40GLP-1 (3-40);
 Arg26,34Lys41GLP-1 (3-41);
 Arg26,34Lys42GLP-1 (3-42);
 Arg26,34Lys43GLP-1 (3-43);
 Arg26,34Lys44GLP-1 (3-44);
 55 Arg26,34Lys45GLP-1 (3-45);
 Arg26,34Lys38GLP-1 (4-38);
 Arg26,34Lys39GLP-1 (4-39);
 Arg26,34Lys40GLP-1 (4-40);
 60 Arg26,34Lys41GLP-1 (4-41);
 Arg26,34Lys42GLP-1 (4-42);
 Arg26,34Lys43GLP-1 (4-43);

Arg26,34Lys44GLP-1 (4-44);
 Arg26,34Lys45GLP-1 (4-45);
 Arg26,34Lys38GLP-1 (5-38);
 Arg26,34Lys39GLP-1 (5-39);
 5 Arg26,34Lys40GLP-1 (5-40);
 Arg26,34Lys41GLP-1 (5-41);
 Arg26,34Lys42GLP-1 (5-42);
 Arg26,34Lys43GLP-1 (5-43);
 10 Arg26,34Lys44GLP-1 (5-44);
 Arg26,34Lys45GLP-1 (5-45);
 Arg26,34Lys38GLP-1 (6-38);
 Arg26,34Lys39GLP-1 (6-39);
 Arg26,34Lys40GLP-1 (6-40);
 15 Arg26,34Lys41GLP-1(6-41);
 Arg26,34Lys42GLP-1 (6-42);
 Arg26,34Lys43GLP-1 (6-43);
 Arg26,34Lys44GLP-1 (6-44);
 Arg26,34Lys45GLP-1 (6-45);
 20 Arg26Lys38GLP-1 (1-38);
 Arg34Lys38GLP-1 (1-38);
 Arg26,34Lys36,38GLP-1 (1-38);
 Arg26Lys38GLP-1 (7-38);
 Arg34Lys38GLP-1 (7-38);
 25 Arg26,34Lys36,38GLP-1 (7-38);
 Arg26,34Lys38GLP-1 (7-38);
 Arg26Lys39GLP-1 (1-39);
 Arg34Lys39GLP-1 (1-39);
 Arg26,34Lys36,39GLP-1 (1-39);
 30 Arg26Lys39GLP-1 (7-39);
 Arg34Lys39GLP-1 (7-39);
 Arg26,34Lys36,39GLP-1 (7-39);
 Arg26-GLP-1 (8-37);
 Arg34-GLP-1 (8-37);
 35 Lys36-GLP-1 (8-37);
 Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-37);
 Arg26,34Lys38GLP-1 (8-38);
 Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 Arg26,34Lys40-GLP-1 (8-40);
 40 Arg26Lys36-GLP-1 (8-37);
 Arg34Lys36-GLP-1 (8-37);
 Arg26Lys39-GLP-1 (8-39);
 Arg34Lys40-GLP-1 (8-40);
 Arg26,34Lys36,39-GLP-1 (8-39);
 45 Arg26,34Lys36,40-GLP-1 (8-40);
 Gly8Arg26-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg34-GLP-1 (8-37);
 Gly8Lys36-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 50 Gly8Arg26,34Lys40-GLP-1 (8-40);
 Gly8Arg26Lys36-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg34Lys36-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg26Lys39-GLP-1 (8-39);
 Gly8Arg34Lys40-GLP-1 (8-40);
 55 Gly8Arg26,34Lys36,39-GLP-1(8-39);
 Gly8Arg26,34Lys36,40-GLP-1 (8-40);
 Argzsv'Lys38GLP-1 (8-38);
 Arg26,34Lys39GLP-1 (8-39);
 Arg26,34Lys40GLP-1 (8-40);
 60 Arg26,34Lys41GLP-1 (8-41);
 Arg26,34Lys42GLP-1 (8-42);

Arg26,34Lys43GLP-1 (8-43);
 Arg26,34Lys44GLP-1 (8-44);
 Arg26,34Lys45GLP-1 (8-45);
 5 Arg26Lys38GLP-1 (8-38);
 Arg34Lys38GLP-1 (8-38);
 Arg26,34Lys36,38GLP-1 (8-38);
 Arg26,34Lys38GLP-1 (8-38);
 Arg26Lys39GLP-1 (8-39);
 Arg34Lys39GLP-1 (8-39);
 10 Arg26,34Lys36,39GLP-1(8-39);
 Arg26-GLP-1 (8-37), Arg34-GLP-1 (8-37),
 Lys36-GLP-1 (8-37), Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-37), Arg26Lys36-GLP-1 (8-37), Arg34Lys36-GLP-1 (8-37),
 Gly8Arg26-GLP-1 (8-37),
 15 Gly8Arg34-GLP-1 (8-37),
 Gly8Lys36-GLP-1 (8-37),
 Gly8Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-37),
 Gly8Arg26Lys36-GLP-1 (8-37),
 Gly8Arg34Lys36-GLP-1 (8-37);
 20 Arg26Lys38-GLP-1 (8-38),
 Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38),
 Arg26,34Lys36,38-GLP-1 (8-38),
 Gly8Arg26Lys38-GLP-1 (8-38);
 Gly8Arg26,34Lys36,38-GLP-1 (8-38);
 25 Arg34Lys40-GLP-1 (8-40),
 Arg26,34Lys36,40-GLP-1 (8-40),
 Gly8Arg34Lys40-GLP-1 (8-40);
 Gly8Arg26,34Lys36,40-GLP-1 (8-40);
 Arg26-GLP-1 (8-36);
 30 Arg34-GLP-1 (8-36);
 Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Arg26-GLP-1 (8-36)amida;
 Arg34-GLP-1 (8-36)amida;
 Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 35 Arg26-GLP-1 (8-37);
 Arg34-GLP-1 (8-37);
 Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-37);
 Arg26-GLP-1 (8-38);
 Arg34-GLP-1 (8-38);
 40 Arg26,34Lys38GLP-1 (8-38);
 Arg26-GLP-1 (8-39);
 Arg34-GLP-1 (8-39);
 Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 Gly8Arg26-GLP-1 (8-36);
 45 Gly8Arg34-GLP-1 (8-36);
 Gly8Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Gly8Arg26-GLP-1 (8-36)amida;
 Gly8Arg34-GLP-1 (8-36)amida;
 Gly8Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 50 Gly8Arg26-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg34-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg26-GLP-1 (8-38);
 Gly8Arg34-GLP-1 (8-38);
 55 Gly8Arg26,34Lys38GLP-1 (8-38);
 Gly8Arg26-GLP-1 (8-39);
 Gly8Arg34-GLP-1 (8-39);
 Gly8Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 Val8Arg26-GLP-1 (8-36);
 60 Val8Arg34-GLP-1 (8-36);
 Val8Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);

Val8Arg26-GLP-1 (8-36)amida;
 Val8Arg34-GLP-1 (8-36)amida;
 Val8Arg26,34Lys36 GLP-1 (8-36)amida;
 Val8Arg26-GLP-1 (8-37);
 5
 Val8Arg34-GLP-1 (8-37);
 Val8Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-37);
 Val8Arg26-GLP-1 (8-38);
 Val8Arg34-GLP-1 (8-38);
 10
 Val8Arg26,34Lys38GLP-1 (8-38);
 Val8Arg26-GLP-1 (8-39);
 Val8Arg34-GLP-1 (8-39);
 Val8Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 15
 Ser8Arg26-GLP-1 (8-36);
 Ser8Arg34-GLP-1 (8-36);
 Ser8Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-36);
 Ser8Arg26-GLP-1 (8-36)amida;
 Ser8Arg34-GLP-1 (8-36)amida;
 Ser8Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 20
 Ser8Arg26-GLP-1 (8-37);
 Ser8Arg34-GLP-1 (8-37);
 Ser8Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-37);
 Ser8Arg26-GLP-1 (8-38);
 Ser8Arg34-GLP-1 (8-38);
 25
 Ser8Arg26,34Lys38GLP-1 (8-38);
 Ser8Arg26-GLP-1 (8-39);
 Ser8Arg34-GLP-1 (8-39);
 Ser8Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 30
 Thr8Arg26-GLP-1 (8-36);
 Thr8Arg34-GLP-1 (8-36);
 Thr8Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Thr8Arg26-GLP-1 (8-36)amida;
 Thr8Arg34-GLP-1 (8-36)amida;
 Thr8Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 35
 Thr8Arg26-GLP-1 (8-37);
 Thr8Arg34-GLP-1 (8-37);
 Thr8Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-37);
 Thr8Arg26-GLP-1 (8-38);
 Thr8Arg34-GLP-1 (8-38);
 40
 Thr8Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Thr8Arg26-GLP-1 (8-39);
 Thr8Arg34-GLP-1 (8-39);
 Thr8Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 45
 Val8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Val8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Val8Glu36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Val8Glu37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Val8Glu38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 Val8Glu35Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-36);
 50
 Val8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Val8Glu36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Val8Glu37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Val8Glu38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 Val8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 55
 Val8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Val8Asp36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Val8Asp37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Val8Asp38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 60
 Val8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);

Val8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Val8Asp36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Val8Asp37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Val8Asp38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 5 Ser8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Ser8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Ser8Glu36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Ser8Glu37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Ser8Glu38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 10 Ser8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Ser8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Ser8Glu38Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Ser8Glu37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Ser8Glu38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 15 Ser8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Ser8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Ser8Asp36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Ser8Asp37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Ser8Asp38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 20 Ser8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Ser8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Ser8Asp36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Ser8Asp37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Ser8Asp38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 25 Thr8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Thr8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Thr8Glu36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Thr8Glu37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Thr8Glu38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 30 Thr8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Thr8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Thr8Glu36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Thr8Glu37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Thr8Glu38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 35 Thr8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Thr8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Thr8Asp36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Thr8Asp37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Thr8Asp38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 40 Thr8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Thr8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Thr8Asp36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Thr8Asp37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Thr8Asp38 Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 45 Gly8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Gly8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Gly8Glu36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Gly8Glu37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Gly8Glu38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 50 Gly8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Gly8Glu35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Gly8Glu36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Gly8Glu37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Gly8Glu38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 55 Gly8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Gly8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Gly8Asp36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 60 Gly8Asp37Arg26,34Lys38-GLP-1 (8-38);
 Gly8Asp38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);

Gly8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Gly8Asp35Arg26,34Lys36-GLP-1 (8-36)amida;
 Gly8Asp36Arg26,34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Gly8Asp37Arg26,34Lys38 -GLP-1 (8-38);
 5 Gly8Asp38Arg26,34Lys39-GLP-1 (8-39);
 Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36);
 Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36)amida;
 Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-37);
 Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-38);
 10 Gly8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36);
 Gly8Asp17Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36);
 Gly8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36)amida;
 Gly8Asp17Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36)amida;
 Gly8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-37);
 15 Gly8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-38);
 Gly8Asp17Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-38);
 Arg26,34Lys23-GLP-1 (8,36)
 Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36)amida;
 Arg26,34Lys23GLP-1 (8-37);
 20 Arg26,34Lys23GLP-1 (8-38);
 Gly8Asp24Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36);
 Gly8Asp22Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36);
 Gly8Asp24Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36)amida;
 Gly8Asp22Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36)amida;
 25 Gly8Asp24Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-37);
 Gly8Asp24Arg28,34Lys23-GLP-1 (8-38);
 Gly8Asp22Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-38);
 Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36);
 Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36)amida;
 30 Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-37);
 Arg26,34Lys27 -GLP-1 (8-38);
 Gly8Asp28Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36);
 Gly8Asp26Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36);
 Gly8Asp28Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36)amida;
 35 Gly8Asp26Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36)amida;
 Gly8Asp28Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-37);
 Gly8Asp28Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-38);
 Gly8Asp26Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-38);
 Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36);
 40 Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36)amida;
 Arg26,34Lys18GLP-1 (8-37);
 Arg26,34Lys18GLP-1 (8-38);
 Val8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36);
 Val8Asp17Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36);
 45 Val8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36)amida;
 Val8Asp17Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36)amida;
 Val8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-37);
 Val8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-38);
 Val8Asp17Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-38);
 50 Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36);
 Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36)amida;
 Arg26,34Lys23-GLP-1(8-37);
 Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-38);
 Val8Asp24Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36);
 55 Val8Asp22Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36);
 Val8Asp24Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36)amida;
 Val8Asp22Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36)amida;
 Val8Asp24Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-37);
 Val8Asp24Arg26,34Lys23-GLP-1(8-38);
 60 Val8Asp22Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-38);

Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36);
 Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36)amida;
 Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-37);
 Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-38);
 5
 Val8Asp28Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36);
 Val8Asp26Arg26,34Lys27-GLP-1(8-36);
 Val8Asp28Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36)amida;
 Val8Asp26Arg26,34Lys27-GLP-1(8-36)amida;
 10
 Val8Asp28Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-37);
 Val8Asp28Arg26,34Lys26,34-GLP-1 (8-38);
 Val8Asp26Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-38);
 Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36);
 Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36)amida;
 15
 Arg26,34Lys18GLP-1 (8-37);
 Arg26,34Lys18GLP-1 (8-38);
 Ser8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36);
 Ser8Asp17Arg26,34Lys18-GLP-1(8-36);
 Ser8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36)amida;
 20
 Se8Asp17Arg26,34Lys18-GLP-1(8-36)amida;
 Ser8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-37);
 Ser8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1(8-38);
 Ser8Asp17Arg26,34Lys18-GLP-1(8-38);
 25
 Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36);
 Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36)amida;
 Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-37);
 Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-38);
 Se8Asp24Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36);
 Ser8Asp22Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36);
 30
 Ser8Asp24Arg26,34Lys23-GLP-1(8-36)amida;
 Ser8Asp22Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36)amida;
 Ser8Asp24Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-37);
 Se8Asp24Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-38);
 Se8Asp22Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-38);
 35
 Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36);
 Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36)amida;
 Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-37);
 Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-38);
 Se8Asp28Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36);
 40
 Ser8Asp26Arg26,34Lys27-GLP-1(8-36);
 Ser8Asp28Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36)amida;
 Ser8Asp26Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36)amida;
 Ser8Asp28Arg26,34Lys27GLP-1 (8-37);
 Ser8Asp28Arg26,34Lys27GLP-1 (8-38);
 45
 Ser8Asp26Arg26,34Lys27GLP-1 (8-38);
 Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36);
 Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36)amida;
 Arg26,34Lys18GLP-1 (8-37);
 Arg26,34Lys18GLP-1 (8-38);
 50
 Thr8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36);
 Thr8Asp17Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36);
 Thr8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36)amida;
 Thr8Asp17Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-36)amida;
 Thr8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-37);
 55
 Thr8Asp19Arg26,34Lys18-GLP-1(8-38);
 Thr8Asp17Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-38);
 Arg26,30Lys23-GLP-1 (8-36);
 Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36)amida;
 Arg26,34Lys23GLP-1(8-37);
 60
 Arg26,34Lys23GLP-1 (8-38);

Thr8Asp24Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36);
 Thr8Asp22Arg26,34Lys23-GLP-1(8-36);
 Thr8Asp24Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36)amida;
 Thr8Asp22Arg26,34Lys23-GLP-1 (8-36)amida;
 5 Thr8Asp24Arg26,34Lys23GLP-1 (8-37);
 Thr8Asp24Arg26,34Lys23GLP-1(8-38);
 Thr8Asp22Arg26,34Lys23GLP-1 (8-38);
 Arg26,34Lys26-GLP-1 (8-36);
 Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36)amida;
 10 Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-37);

 Arg26,34Lys27GLP-1 (8-38);
 Thr8Asp28Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36);
 Thr8Asp26Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36);
 15 Thr8Asp28Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36)amida;
 Thr8Asp26Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-36)amida;
 Thr8Asp28Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-37);
 Thr8Asp28Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-38);
 Thr8Asp26Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-38);
 20 Arg26Lys36-GLP-1 (8-36);
 Arg34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Arg26Lys36-GLP-1 (8-37);
 Arg34Lys36-GLP-1 (8-37);
 Arg26Lys37-GLP-1 (8-37);
 25 Arg34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Arg26Lys39-GLP-1 (8-39);
 Arg34Lys39-GLP-1 (8-39);
 Arg26,34Lys36,39-GLP-1 (8-39);
 Arg26Lys18-GLP-1 (8-36);
 30 Arg34Lys18-GLP-1(8-36);
 Arg26Lys18-GLP-1 (8-37);
 Arg34Lys18-GLP-1(8-37);
 Arg26Lys18-GLP-1 (8-38);
 Arg34Lys18-GLP-1 (8-38);
 35 Arg26Lys18-GLP-1 (8-39);
 Arg34Lys18-GLP-1 (8-39);
 Arg26Lys23-GLP-1 (8-36);
 Arg34Lys23-GLP-1 (8-36);
 Arg26Lys23GLP-1 (8-37);
 40 Arg34Lys23GLP-1 (8-37);
 Arg26Lys23GLP-1(8-38);
 Arg34Lys23GLP-1(8-38);
 Arg26Lys23GLP-1(8-39);
 Arg34Lys23GLP-1 (8-39);
 45 Arg26Lys27GLP-1 (8-36);
 Arg34Lys27-GLP-1 (8-36);
 Arg26Lys27GLP-1 (8-37);
 Arg34Lys27GLP-1 (8-37);
 Arg26Lys27GLP-1 (8-38);
 50 Arg34Lys27GLP-1 (8-38);
 Arg26Lys27GLP-1 (8-39);
 Arg34Lys27GLP-1 (8-39);
 Arg26,34Lys18,36-GLP-1 (8-36);
 Arg26,34Lys18-GLP-1 (8-37);
 55 Arg26,34Lys18,37-GLP-1 (8-37);
 Arg26,34Lys18,38-GLP-1 (8-38);
 Arg26,34Lys18,39-GLP-1 (8-39);
 Arg26,34Lys23,36-GLP-1 (8-36);
 Arg26,34Lys23GLP-1 (8-37);
 60 Arg26,34Lys23,37-GLP-1 (8-37);

Arg26,34Lys23,38-GLP-1 (8-38);
 Arg28,34Lys23,39-GLP-1 (8-39);
 Arg26,34Lys27,36-GLP-1 (8-36);
 Arg26,34Lys27-GLP-1 (8-37);
 5 Arg26,34Lys27,37-GLP-1 (8-37);
 Arg26,34Lys27,38-GLP-1 (8-38);
 Arg26,34Lys27,39-GLP-1 (8-39);
 Gly8GLP-1 (8-36);
 Gly8GLP-1 (8-37);
 10 Gly8GLP-1 (8-38);
 Gly8GLP-1 (8-39);
 Gly8Arg26Lys36-GLP-1 (8-36);
 Gly8Arg34Lys36-GLP-1 (8-36);
 Gly8Arg26Lys36-GLP-1 (8-37);
 15 Gly8Arg34Lys36-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg26Lys37-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg34Lys37-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg26Lys39-GLP-1 (8-39);
 Gly8Arg34Lys39-GLP-1 (8-39);
 20 Gly8Arg26,34Lys36,39-GLP-1 (8-39);
 Gly8Arg26Lys18-GLP-1 (8-36);
 Gly8Arg34Lys18-GLP-1 (8-36);
 Gly8Arg26Lys18-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg34Lys18-GLP-1 (8-37);
 25 Gly8Arg26Lys18-GLP-1 (8-38);
 Gly8Arg34Lys18-GLP-1 (8-38);
 Gly8Arg26Lys18-GLP-1 (8-39);
 Gly8Arg34Lys18-GLP-1 (8-39);
 Gly8Arg26Lys23-GLP-1 (8-36);
 30 Gly8Arg34Lys23-GLP-1 (8-36);
 Gly8Arg26Lys23-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg34Lys23-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg26Lys23-GLP-1 (8-38);
 Gly8Arg34Lys23-GLP-1 (8-38);
 35 Gly8Arg26Lys23-GLP-1 (8-39);
 Gly8Arg34Lys23-GLP-1 (8-39);
 Gly8Arg26Lys27-GLP-1 (8-36);

 Gly8Arg34Lys27-GLP-1 (8-36);
 40 Gly8Arg26Lys27-GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg34Lys27GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg26Lys27GLP-1 (8-38);
 Gly8Arg34Lys27GLP-1 (8-38);
 Gly8Arg26Lys27GLP-1 (8-39);
 45 Gly8Arg34Lys27GLP-1 (8-39);
 Gly8Arg26,34Lys18,36-GLP-1 (8-36);
 Gly8Arg26,34Lys18GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg18,37Lys18,37GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg26,34Lys18,38GLP-1 (8-38);
 50 Gly8Arg26,34Lys18,39GLP-1 (8-39);
 Gly8Arg26,34Lys23,36-GLP-1 (8-36);
 Gly8Arg26,34Lys23GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg26,34Lys23,37GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg26,34Lys23,38GLP-1 (8-38);
 55 Gly8Arg26,34Lys23,39GLP-1 (8-39);
 Gly8Arg26,34Lys27,36-GLP-1 (8-36);
 Gly8Arg26,34Lys27GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg26,34Lys27,37GLP-1 (8-37);
 Gly8Arg26,34Lys27,38GLP-1(8-38);
 60 Gly8Arg26,34Lys27,39GLP-1(8-39);

Val8GLP-1 (8-36);
 Val8GLP-1(8-37);
 Val8GLP-1(8-38);
 Val8GLP-1(8-39)
 5 Val8Arg26Lys36-GLP-1(8-36);
 Val8Arg34Lys36-GLP-1(7-36);
 Val8Arg26Lys36-GLP-1(8-37);
 Val8Arg34Lys36-GLP-1(8-37);
 10 Val8Arg26Lys37-GLP-1(8-37);
 Val8Arg34Lys37-GLP-1(8-37);
 Val8Arg26Lys39-GLP-1(8-39);
 Val8Arg34Lys39-GLP-1(8-39);
 Val8Arg26,34Lys36,39GLP-1(8-39);
 15 Val8Arg26Lys18-GLP-1(8-36);
 Val8Arg34Lys18-GLP-1(8-36);
 Val8Arg26Lys18-GLP-1(8-37);
 Val8Arg34Lys18-GLP-1(8-37);
 Val8Arg26Lys18-GLP-1(8-38);
 Val8Arg34Lys18-GLP-1(8-38);
 20 Val8Arg26Lys18-GLP-1(8-39);
 Val8Arg34Lys18GLP-1(8-39);
 Val8Arg26Lys23-GLP-1(8-36);
 Val8Arg34Lys23-GLP-1(8-36);
 Val8Arg26Lys23GLP-1(8-37);
 25 Val8Arg34Lys23GLP-1(8-37);
 Val8Arg26Lys23GLP-1(8-38);
 Val8Arg34Lys23GLP-1(8-38);
 Val8Arg26Lys23GLP-1(8-39);
 Val8Arg34Lys23GLP-1(8-39);
 30 Val8Arg26Lys27-GLP-1(8-36);
 Val8Arg34Lys27-GLP-1(8-36);
 Val8Arg26Lys27GLP-1(8-37);
 Val8Arg34Lys27GLP-1(8-37);
 Val8Arg26Lys26GLP-1(8-38);
 35 Val8Arg34Lys27GLP-1(8-38);
 Val8Arg26Lys27GLP-1(8-39);
 Val8Arg34Lys27GLP-1(8-39);
 Val8Arg26,34Lys18,36-GLP-1(8-36);
 Val8Arg26,34Lys18GLP-1(8-37);
 40 Val8Arg26,34Lys18,37GLP-1(8-37);
 Val8Arg26,34Lys18,38GLP-1(8-38);
 Val8Arg26,34Lys18,39GLP-1(8-39);
 Val8Arg26,34Lys23,26-GLP-1(8-36);
 Val8Arg26,34Lys23GLP-1(8-37);
 45 Val8Arg26,34Lys23,37GLP-1(8-37);
 Val8Arg26,34Lys23,38GLP-1(8-38);
 Val8Arg26,34Lys23,39GLP-1(8-39);
 Val8Arg26,34Lys27,36-GLP-1(8-36);
 Val8Arg26,34Lys27GLP-1(8-37);
 50 Val8Arg26,34Lys27,37GLP-1 (8-37);
 Val8Arg26,34Lys27,38GLP-1(8-38);
 Val8Arg26,34Lys27,39GLP-1(8-39);
 Val8GLP-1(7-37);
 Thr8GLP-1(7-37);
 55 Met8GLP-1(7-37);
 Gly8GLP-1(7-37);
 Val8GLP-1(7-36) amida;
 Thr8GLP-1(7-36) amida;
 60 Met8GLP-1(7-36) amida;

Gly8GLP-1(7-36) amida;
 Lys26(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-37);
 Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-37);
 Lys26,34-bis(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-37);
 5 Gly8Lys26(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-37);
 Gly8Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-37);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-37);
 Arg26Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-37);
 Lys26(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-38);
 10 Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-38);
 Lys26,34-bis(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-38);
 Gly8Lys26(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-38);
 Gly8Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-38);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-38);
 15 Arg26Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-38);
 Lys26(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-39);
 Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-39);
 Lys26,34-bis(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-39);
 Gly8Lys26(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-39);
 20 Gly8Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-39);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-39);
 Arg26Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-39);
 Lys26(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-40);
 Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-40);
 25 Lys26,34-bis(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-40);
 Gly8Lys26(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-40);
 Gly8Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-40);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-40);
 Arg26Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-40);
 30 Lys26(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-36);
 Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-36);
 Lys26,34-bis(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-36);
 Gly8Lys26(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-36);
 Gly8Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-36);
 35 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-36);
 Arg26Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-36);
 Lys26(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-35);
 Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-35);
 Lys26,34-bis(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-35);
 40 Gly8Lys26(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-35);
 Gly8Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-35);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-35);
 Arg26Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-35);
 Lys26(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-36)amida;
 45 Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-36)amida;
 Lys26,34-bis(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-36)amida;
 Gly8Lys26(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-36)amida;
 Gly8Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-36)amida;
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-36)amida;
 50 Arg26Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-36)amida;
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-37);
 Lys26(N ϵ -tetradecanoil)Arg34-GLP-1(7-37);
 Gly8Lys26(N ϵ -tetradecanoil)Arg34-GLP-1(7-37);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-37);
 55 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-37);
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-38);
 Lys26(N ϵ -tetradecanoil)Arg34-GLP-1(7-38);

Gly8Lys26(N ϵ -tetradecanoil)Arg34-GLP-1(7-38);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-38);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-38);
 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-38);
 5 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-39);
 Lys26(N ϵ -tetradecanoil)Arg34-GLP-1(7-39);
 Gly8Lys26(N ϵ -tetradecanoil)Arg34-GLP-1(7-39);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-39);
 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-39);
 10 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-40);
 Lys26(N ϵ -tetradecanoil)Arg34-GLP-1(7-40);

Gly8Lys26(N ϵ -tetradecanoil)Arg34-GLP-1(7-40);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-40);
 15 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -tetradecanoil)-GLP-1(7-40);
 Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-37);
 Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-37);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-37);
 Gly8Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-37);
 20 Gly8Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-37);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-37);
 Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-38);
 Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-38);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-38);
 25 Gly8Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-38);
 Gly8Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-38);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-38);
 Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-39);
 Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-39);
 30 Lys26,34-bis(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-39);
 Gly8Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-39);
 Gly8Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-39);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-39);
 Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-40);
 35 Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-40);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-40);
 Gly8Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-40);
 Gly8Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-40);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-40);
 40 Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-36);
 Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-36);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-36);
 Gly8Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-36);
 Gly8Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-36);
 45 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-36);

Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-36)amida;
 Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-36)amida;
 Lys26,34-bis(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1 (7-36)amida;
 Gly8Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-36)amida;
 5 Gly8Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-36)amida;

 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1 (7-36)amida;
 Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-35);
 Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-35);
 10 Lys26,34-bis(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-35);
 Gly8Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-35);
 Gly8Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-35);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-35);
 Arg26Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-37);
 15 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-37);
 Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))Arg34-GLP-1(7-37);
 Gly8Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))Arg34-GLP-1 (7-37);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-37);
 Gly8Arg21,34Lys36(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-37);
 20 Arg26Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-38);
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-38);
 Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))Arg34-GLP-1(7-38);
 Gly8Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))Arg34-GLP-1(7-38);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-38);
 25 Arg26,34Lys38(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-38);
 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-38);
 Arg26Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-39);
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-39);
 Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))Arg34-GLP-1(7-39);
 30 Gly8Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))Arg34-GLP-1(7-39);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-39);
 Gly8Arg26,34Lys16(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-39);
 Arg34Lys26(N ϵ -(γ -glutamil(N α -hexadecanoil)))-GLP-1(7-37)-OH,
 Lys26,34-bis(N ϵ -(γ -glutamil(N α -hexadecanoil)))-GLP-1(7-37)-OH,
 35 Lys26,34-bis(N ϵ -(γ -glutamil(N α -tetradecanoil)))-GLP-1(7-37)-OH,
 Arg26,34Lys38(N ϵ -(γ -glutamil(N α -tetradecanoil)))-GLP-1(7-38)-OH,
 Arg26,34Lys38(N ϵ -(γ -glutamil(N α -hexadecanoil)))-G LP-1(7-38)-OH,
 Arg26Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-40);
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-40);
 40 Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))Arg34-GLP-1(7-40);
 Gly8Lys26(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))Arg34-GLP-1(7-40);

Arg26,34Lys31(N ϵ -(ω -carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-40);
 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -(ω - carboxinonadecanoil))-GLP-1(7-40
 Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-37);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-37);
 5 Gly8Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-37);
 Gly8Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-37);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-37);
 Arg26Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-37);
 Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-38);
 10 Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-38);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-38);
 Gly8Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-38);
 Gly8Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-38);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-38);
 15 Arg26Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-38);
 Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-39);
 Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-39);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-39);
 Gly8Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-39);
 20 Gly8Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-39);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-39);
 Arg26Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-39);
 Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-40);
 Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-40);
 25 Lys26,34-bis(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-40);
 Gly8Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-40);
 Gly8Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-40);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-40);
 Arg26Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-40);
 30 Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-36);
 Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-36);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-36);
 Gly8Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-36);
 Gly8Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-36);
 35 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-36);
 Arg26Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-36);
 Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-35);
 Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-35);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-35);
 40 Gly8Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-35);
 Gly8Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-35);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-35);
 Arg26Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-35);
 Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-36)amida;
 45 Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-36)amida;
 Lys26,34-bis(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-36)amida;
 Gly8Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-36)amida;
 Gly8Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-36)amida;
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-36)amida;
 50 Arg26Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-36)amida;
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-37);
 Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))Arg34-GLP-1(7-37);
 Gly8Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))Arg34-GLP-1(7-37);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-37);
 55 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-37);
 Lys26(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-37);
 Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-37);

Lys26,34-bis(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-37);
 Gly8Lys26(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-37);
 Gly8Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-37);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-37);
 5 Arg26Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-37);
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-38);

Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))Arg34-GLP-1(7-38);
 Gly8Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))Arg34-GLP-1(7-38);
 10 Arg26,34Lys36(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-38);
 Arg26,34Lys38(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-38);
 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-38);
 Lys26(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-38);
 Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-38);
 15 Lys26,34-bis(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-38);
 Gly8Lys26(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-38);
 Gly8Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-38);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-38);
 Arg26Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-38);
 20 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-39);
 Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))Arg34-GLP-1(7-39);
 Gly8Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))Arg34-GLP-1(7-39);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-39);
 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-39);
 25 Lys26(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-39);
 Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-39);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-39);
 Gly8Lys26(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-39);
 Gly8Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-39);
 30 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-39);
 Arg26Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-39);
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-40);
 Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))Arg34-GLP-1(7-40);
 Gly8Lys26(N ϵ -(7-deoxicoloil))Arg34-GLP-1(7-40);
 35 Arg26,34Lys36(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-40);
 Gly8Arg21,34Lys36(N ϵ -(7-deoxicoloil))-GLP-1(7-40);
 Lys26(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-40);
 Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-40);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-40);
 40 Gly8Lys26(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-40);
 Gly8Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-40);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-40);
 Arg26Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-40);
 Lys26(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-36);
 45 Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-36);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-36);
 Gly8Lys26(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-36);
 Gly8Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-36);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-36);
 50 Arg26Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-36);
 Lys26(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-35);
 Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-35);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-35);
 Gly8Lys26(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-35);
 55 Gly8Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-35);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-35);
 Arg26Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-35);

Lys26(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-36)amida;
 Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-36)amida;
 Lys26,34-bis(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-36)amida;
 Gly8Lys26(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-36)amida;
 5 Gly8Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-36)amida;
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-36)amida;
 Arg26Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-36)amida;
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-37);
 Lys26(N ϵ -(coloil))Arg34-GLP-1(7-37);
 10 Gly8Lys26(N ϵ -(coloil))Arg34-GLP-1(7-37);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-37);
 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -(coloil))-GLP-1(7-37);
 Lys26(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1(7-37);
 Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1(7-37);
 15 Lys26,34-bis(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1(7-37);
 Gly8Lys26(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1(7-37);
 Gly8Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-37);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-37);
 Arg26Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-37);
 20 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1 (7-38);
 Lys26(N ϵ -(coloil))Arg34-GLP-1 (7-38);
 Gly8Lys26(N ϵ -(coloil))Arg34-GLP-1 (7-38);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -(coloil))-GLP-1 (7-38);
 25 Arg26,34Lys38(N ϵ -(coloil))-GLP-1 (7-38);
 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -(coloil))-GLP-1 (7-38);
 Lys26(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-38);
 Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-38);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-38);
 30 Gly8Lys26(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-38);
 Gly8Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-38);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-38);
 Arg26Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-38);
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1 (7-39);
 35 Lys26(N ϵ -(coloil))Arg34-GLP-1 (7-39);
 Gly8Lys26(N ϵ -(coloil))Arg34-GLP-1 (7-39);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -(coloil))-GLP-1 (7-39);
 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -(coloil))-GLP-1 (7-39);
 Lys26(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-39);
 40 Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-39);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-39);
 Gly8Lys26(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-39);
 Gly8Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-39);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-39);
 45 Arg26Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-39);
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(coloil))-GLP-1 (7-40);
 Lys26(N ϵ -(coloil))Arg34-GLP-1 (7-40);
 Gly8Lys26(N ϵ -(coloil))Arg34-GLP-1 (7-40);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -(coloil))-GLP-1 (7-40);
 50 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -(coloil))-GLP-1 (7-40);
 Lys26(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-40);
 Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-40);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-40);
 Gly8Lys26(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-40);
 55 Gly8Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-40);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-40);
 Arg26Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-37);

Lys26(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-36);
 Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-36);
 Lys26,34-bis(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-36);
 Gly8Lys26(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-36);
 5 Gly8Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-36);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-36);
 Arg26 Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-36);
 Lys26(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-35);
 Lys34(N ϵ -(litocoloil))GLP-1 (7-35);
 10 Lys26,34-bis(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-35);
 Gly8Lys26(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-35);
 Gly8Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-35);
 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-35);
 Arg26Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-35);
 15 Lys26(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-36)amida;
 Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-36)amida;
 Lys26,34-bis(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-36)amida;
 Gly8Lys26(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-36)amida;
 Gly8Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-36)amida;
 20 Gly8Lys26,34-bis(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-36)amida;
 Arg26Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-36)amida;
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-37);
 Lys26(N ϵ -(litocoloil))Arg34-GLP-1 (7-37);
 Gly8Lys26(N ϵ -(litocoloil))Arg34-GLP-1 (7-37);
 25 Arg26,34Lys36(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-37);
 Arg26,34Lys38(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-37);
 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-37);
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-38);
 Lys26(N ϵ -(litocoloil))Arg34-GLP-1 (7-38);
 30 Gly8Lys26(N ϵ -(litocoloil))Arg34-GLP-1(7-38);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-38);
 Arg26,34Lys38(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-38);
 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-38);
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-39);
 35 Lys26(N ϵ -(litocoloil))Arg34-GLP-1 (7-39);
 Gly8Lys26(N ϵ -(litocoloil))Arg34-GLP-1 (7-39);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-39);
 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-39);
 Gly8Arg26Lys34(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-40);
 40 Lys26(N ϵ -(litocoloil))Arg34-GLP-1(7-40);
 Gly8Lys26(N ϵ -(litocoloil))Arg34-GLP-1 (7-40);
 Arg26,34Lys36(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1 (7-40) and
 Gly8Arg26,34Lys36(N ϵ -(litocoloil))-GLP-1(7-40).

45 Cada uno de estos péptidos de GLP-1 constituye una forma de realización alternativa de la presente invención.

[0044] En la presente invención las impurezas relacionadas de GLP-1 para ser eliminadas se seleccionan de formas truncadas, todos los tipos de formas extendidas (aminoácidos extra, varios derivados incluyendo ésteres etc.), formas desamidadas, formas incorrectamente plegadas, formas con glicosilación indeseada incluyendo sialilación. Como un ejemplo que ilustra la presente invención, la histidina tiene una carga neta predominante positiva por debajo de pH~6.5, así para el intercambio catiónico el gradiente de elución del pH con un solvente que comprende un solvente orgánico o modificador podría iniciarse debajo de pH 6.5 para eliminar una forma truncada faltante de histidina y terminar el gradiente encima de pH 6.5 así posteriormente eluyendo la fracción de GLP-1 meta. Como una alternativa, la elución que separa la forma truncada de la fracción de GLP-1 meta que utiliza un modificador orgánico podría ser realizada debajo de pH 6.5 simplemente por un componente de sal (gradiente o isocráticamente) a condiciones de elución. Como otra alternativa, la elución que separa la forma truncada de la fracción de GLP-1 meta utilizando modificador orgánico podría ser realizada por debajo de pH 6.5 por un gradiente en el modificador orgánico de un contenido inferior a uno superior. Como un segundo ejemplo, el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal tiene una carga neta predominante negativa por encima de pH~3.1,

así para el intercambio aniónico el gradiente de elución del pH con un solvente comprendiendo un modificador orgánico podría iniciarse por encima de pH 3.1 para eliminar una forma extendida a una amida y terminar el gradiente por debajo de pH 3.1 así posteriormente eluyendo la fracción de GLP-1 meta. Alternativamente, la elución que separa la forma de amida de la fracción de GLP-1 meta utilizando un modificador orgánico podría ser realizada por encima de pH 3.1 simplemente por un componente de sal (gradiente o isocráticamente) a condiciones de elución. Como un tercer ejemplo, el ácido aspártico tiene una carga neta predominante negativa por encima de pH~4.4, así para intercambio aniónico el gradiente de elución del pH con un solvente comprendiendo un modificador orgánico podría iniciarse por encima de pH 4.4 para eliminar una forma truncada faltante de ácido aspártico y terminar el gradiente por debajo de pH 4.4 así posteriormente eluyendo la fracción de GLP-1 meta. Alternativamente, la elución que separa la forma truncada de la fracción de GLP-1 meta utilizando modificador orgánico podría ser realizada por encima de pH 4.4 simplemente por un componente de sal (gradiente o isocráticamente) a condiciones de elución. Como un cuarto ejemplo, ácido glutámico tiene una carga neta predominante negativa por encima de pH~4.4, así para intercambio aniónico del gradiente de elución del pH con un solvente que comprende un modificador orgánico podría iniciarse por encima de pH 4.4 para eluir la fracción de GLP-1 meta y terminar el gradiente por debajo de pH 4.4 así posteriormente eliminando una forma extendida que comprende un residuo de ácido glutámico extra. Alternativamente, la elución que separa la forma extendida de la fracción de GLP-1 meta utilizando modificador orgánico podría ser realizada por encima de pH 4.4 simplemente por un componente de sal (gradiente o isocráticamente) a condiciones de elución. Como un quinto ejemplo, el grupo amino del aminoácido N-terminal tiene una carga neta predominante positiva por debajo de pH~8.0, así para intercambio catiónico el gradiente de elución del pH con un solvente que comprende un modificador orgánico podría iniciarse por debajo de pH 8.0 para eliminar una forma extendida con un grupo de acilo indeseado y terminar el gradiente por encima de pH 8.0 así posteriormente eluyendo la fracción de GLP-1 meta. Alternativamente, la elución que separa la forma acilada de la fracción de GLP-1 meta utilizando modificador orgánico podría ser realizada por debajo de pH 8.0 simplemente por un componente de sal (gradiente o isocráticamente) a condiciones de elución. Como un sexto ejemplo, el grupo amino del aminoácido N-terminal tiene una carga neta predominante positiva por debajo de pH~8.0, así para el intercambio catiónico el gradiente de elución del pH con un solvente que comprende un modificador orgánico podría iniciarse por debajo de pH 8.0 para eluir la fracción de GLP-1 meta que se extiende con un grupo de acilo deseado y terminar el gradiente por encima de pH 8.0 así posteriormente eliminando la forma indeseada no extendida. Alternativamente, la elución que separa la fracción de GLP-1 meta acilada de la forma no acilada utilizando modificador orgánico podría ser realizada por debajo de pH 8.0 simplemente por un componente de sal (gradiente o isocráticamente) a condiciones de elución. Como un séptimo ejemplo, la tirosina tiene una carga neta predominante negativa por encima de pH 10.0, así para intercambio aniónico el gradiente de elución del pH con un solvente que comprende un modificador orgánico podría iniciarse por encima de pH 10.0 para eliminar una forma truncada a la que le falta un residuo de tirosina y terminar el gradiente por debajo de pH 10.0 así posteriormente eluyendo la fracción de GLP-1 meta. Alternativamente, la elución que separa la forma truncada de la fracción de GLP-1 meta utilizando modificador orgánico podría ser realizada por encima de pH 10.0 simplemente por un componente de sal (gradiente o isocráticamente) a condiciones de elución. Como un octavo ejemplo, la lisina tiene una carga neta predominante positiva por debajo de pH~10.0, así para intercambio catiónico el gradiente de elución del pH con un solvente que comprende un modificador orgánico podría iniciarse por debajo de pH 10.0 para eluir una fracción de GLP-1 meta acilada en la cadena lateral del residuo de lisina y terminar el gradiente por encima de pH 10.0 así posteriormente eliminando una forma no acilada indeseada. Alternativamente, la elución que separa la fracción de GLP-1 meta acilada de la forma no acilada utilizando modificador orgánico podría ser realizada por debajo de pH 10.0 simplemente por un componente de sal (gradiente o isocráticamente) a condiciones de elución. Como un noveno ejemplo, la arginina tiene una carga neta predominante positiva por debajo de pH~12.0, así para intercambio aniónico el gradiente de elución del pH con un solvente que comprende un modificador orgánico podría iniciarse por debajo de pH 12.0 para eluir la fracción de GLP-1 meta y terminar el gradiente por encima de pH 12.0 así posteriormente eliminando una forma indeseada que comprende un residuo de arginina extra. Alternativamente, la elución que separa la fracción de GLP-1 meta de la forma que comprende un residuo de arginina extra utilizando modificador orgánico podría ser realizada por debajo de pH 12.0 simplemente por un componente de sal (gradiente o isocráticamente) a condiciones de elución. (los valores de pKa usados en estos ejemplos son de: L. Stryer. Biochemistry, 3rd edition, W.H. Freeman and Company, New York, Tabla 2-1 página 21).

[0045] En otra forma de realización de la presente invención las impurezas para ser eliminadas no están relacionadas con GLP-1.

[0046] Ejemplos específicos del péptido GLP-1 del método mencionado arriba son separación de Arg34GLP-1 (7-37) y Arg34GLP-1 (9-37) por cromatografía de intercambio catiónico, GLP-1 (7-37) y GLP-1 (7-36) amida por cromatografía de intercambio aniónico, GLP-1 (15-37) y GLP-1 (16-37) por cromatografía de intercambio aniónico, Arg34GLP-1 (7-37) y Arg34Lys26(N ϵ -Glu)GLP-1 (7-37) por cromatografía de intercambio aniónico, Arg34Lys26(N ϵ -(γ -Glu-(N α -tetradecanoil)))GLP-1 (7-37) y Arg34Lys26(N ϵ -(γ -Glu-(N α -tetradecanoil)))Gly37 (N α -(γ -Glu-(N α -tetradecanoil)))GLP-1 (7-37) por cromatografía de intercambio catiónico, Gly37(N α -(γ -Glu-(N α -tetradecanoil)))GLP-1 (7-37) y GLP-1 (7-37) por cromatografía de intercambio catiónico, GLP-1 (19-37) y GLP-1 (20-37) por cromatografía de intercambio aniónico, Arg34Lys26(N α -(γ -Glu-(N α -tetradecanoil)))GLP-1 (7-37) y Arg34GLP-1 (7-37) por cromatografía de intercambio catiónico, y GLP-1 (7-37) y Arg34GLP-1 (7-37) por cromatografía de intercambio catiónico utilizando sal y/o gradientes de pH.

5 [0047] Los péptidos o péptidos de GLP-1 se pueden producir por un método que comprenden cultivar o fermentar una célula huésped con una secuencia de ADN que codifica el péptido o péptido de GLP-1 y capaz de expresar dicho péptido en un medio nutritivo adecuado bajo condiciones que permiten la expresión del péptido, tras lo cual el péptido resultante o péptido GLP-1 es recuperado del caldo de cultivo o de fermentación. De ahora en adelante, el cultivo será usado para cubrir tanto el cultivo como la fermentación y similares.

10 [0048] El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huéspedes, tal como medios mínimos o complejos conteniendo suplementos apropiados. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (p. ej. en catálogos de la American Type Culture Collection). El péptido o péptido GLP-1 producido por las células puede luego ser recuperado del medio de cultivo por procedimientos convencionales incluyendo, opcionalmente lisis de células, separar las células huéspedes del medio por centrifugado o filtración, precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado mediante una sal, por ejemplo sulfato de amonio, purificación por técnicas de purificación convencionales, tal como técnicas cromatográficas, si es necesario, purificación por cromatografía de intercambio iónico según la presente invención, y posteriormente, sometiendo a pruebas analíticas, por ejemplo PAGE, IEF, si es necesario, sometiendo a una purificación adicional, si fuera necesario, y aislamiento del péptido puro o péptido GLP-1.

20 [0049] Durante la recuperación del péptido resultante o péptido GLP-1 del medio de cultivo, pero antes de la purificación por cromatografía de intercambio iónico según la presente invención, la mezcla que comprende el péptido o péptido GLP-1 e impurezas relacionadas puede opcionalmente ser químicamente modificada por técnicas convencionales, por ejemplo por alquilación, acilación, formación de éster o formación de amida o similar.

25 [0050] La secuencia de ADN que codifica el péptido progenitor o péptido GLP-1 puede adecuadamente ser de origen genómico o ADNc, por ejemplo obtenido por preparación de un genómico o genoteca de ADNc y selección para codificación de secuencias de ADN para todos o parte del péptido o péptido GLP-1 por hibridación usando sondas de oligonucleótidos sintéticas conforme a técnicas estándar (véase, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF y Maniatis, T, clonación molecular: un laboratorio, manual presión de laboratorio de puerto de muelle frío, Nueva York, 1989). La secuencia de ADN que codifica el péptido o péptido GLP-1 puede también ser preparada sintéticamente por métodos estándares establecidos, por ejemplo el método de fosfoamidita descrito por Beaucage and Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por Matthes et al., EMBO Journal 3 (1984), 801 - 805 . La secuencia de ADN puede también ser preparada por reacción en cadena de polimerasa usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4,683,202 o Saiki et al., Science 239 (1988), 487 - 491.

35 [0051] La secuencia de ADN se puede insertar en cualquier vector que puede convenientemente ser sometida a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que va a ser introducido. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el(los) cromosoma(s) en que ha sido integrado.

40 [0052] El vector es preferiblemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica el péptido o péptido GLP-1 es operativamente enlazada a segmentos adicionales requeridos para la transcripción del ADN, tal como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se puede derivar de genes que codifican proteínas heterólogas o bien homólogas a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el péptido o péptido GLP-1 de la invención en una variedad de células huéspedes se conocen bien en la técnica, cf. por ejemplo Sambrook et al., supra.

50 [0053] La secuencia de ADN que codifica el péptido o péptido GLP-1 puede también, si es necesario, ser operativamente conectado a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias potenciadoras transcripcionales, y secuencias potenciadoras traduccionales. El vector recombinante de la invención puede comprender además una secuencia de ADN permitiendo al vector replicarse en la célula huésped en cuestión.

55 [0054] El vector puede también comprender un marcador seleccionable, por ejemplo un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped o uno que confiere resistencia a un fármaco, por ejemplo ampicilina, canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

60 [0055] Para dirigir un péptido o péptido GLP-1 en la vía secretora de las células huéspedes, una secuencia señal secretora (también conocido como una secuencia líder, secuencia prepro o secuencia pre) se puede proporcionar en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el péptido GLP-1 en el marco de lectura correcto. Secuencias señal secretoras son comúnmente situadas en 5' a la secuencia de ADN que codifica el péptido

o péptido GLP-1. La secuencia señal secretora puede ser aquella normalmente asociada al péptido o péptido GLP-1 o puede ser de un gen que codifique otra proteína segregada.

5 [0056] Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN que codifican el péptido o péptido GLP-1, el promotor y opcionalmente el terminador y/o secuencia señal secretora, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados con la información necesaria para replicación, son conocidos por los expertos en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook et al., supra).

10 [0057] La célula huésped en que se introduce la secuencia de ADN o el vector recombinante puede ser cualquier célula que sea capaz de producir el presente péptido o péptido GLP-1 e incluye bacterias, virus, por ejemplo baculovirus, levadura, hongos, células de insecto y células eucarióticas superiores. Ejemplos de células huéspedes adecuadas bien conocidas y usadas en la técnica son, sin limitación, E. coli, Saccharomyces cerevisiae, o líneas celulares BHK o CHO de mamífero.

15 [0058] Algunos de los péptidos o péptidos GLP-1, se pueden producir según química sintética de péptido orgánico convencional. La mezcla sintética resultante puede luego ser químicamente modificada, por ejemplo por alquilación, acilación, formación de éster o formación de amida o similar, y purificada, o purificada como es y luego modificada químicamente como se ha mencionado anteriormente.

Preparación de factor VIIa

20 [0059] El Factor VIIa purificado humano adecuado para uso en la presente invención es preferiblemente hecho por tecnología recombinante de ADN, por ejemplo como se describe por Hagen et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83: 2412-2416, 1986 o como se describe en patente europea n°. 200.421 (ZymoGenetics). Factor VIIa producido por tecnología recombinante puede ser factor VIIa auténtico o un factor VIIa más o menos modificado a condición de que tal factor VIIa
25 tenga sustancialmente la misma actividad biológica para coagulación sanguínea que el factor VIIa auténtico. Tal factor VIIa modificado se puede producir modificando la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el factor VII bien alterando los codones de aminoácido o por eliminación de algunos de los codones de aminoácidos en el ácido nucleico que codifica el FVII natural por medios conocidos, por ejemplo por mutagénesis sitio específica.

30 [0060] El Factor VII puede también ser producido por los métodos descritos por Broze y Majerus, J.Biol.Chem. 255 (4): 1242-1247, 1980 y Hedner y Kisiel, J.Clin.Invest. 71: 1836-1841, 1983. Estos métodos producen factor VII sin cantidades detectables de otros factores de coagulación sanguínea. Una preparación de factor VII incluso más purificado se puede obtener mediante la inclusión de una filtración en gel adicional como la fase de purificación final. Factor VII es luego
35 convertido en FVIIa activado por medios conocidos, por ejemplo por diferentes proteínas plasmáticas, tales como factor XIIa, IX a o Xa. Alternativamente, como se describe por Bjoern et al. (Research Disclosure, 269 September 1986, págs. 564-565), el factor VII se puede activar pasándolo a través de una columna de cromatografía de intercambio iónico, tal como Mono Q(r) (Pharmacia fine Chemicals) o similar.

40 FVIIa modificado o inactivado (FVIIai) se puede producir por los siguientes métodos:

[0061] La solicitud internacional No. WO 92/15686 se refiere a Factor VIIa modificado, ácido polinucleico y líneas celulares mamíferas para la producción de Factor VIIa modificado, y composiciones que comprenden Factor VIIa modificado para
45 inhibir la coagulación sanguínea.

[0062] El Factor VII modificado se puede codificar por una molécula polinucleótida comprendiendo dos regiones codificantes de secuencias operativamente enlazadas que codifican, respectivamente, un péptido prepro y un dominio Gla de una proteína plasmática de vitamina K-dependiente, y una proteína de Factor VII sin dominio gla VII, donde tras la
50 expresión de dicho polinucleótido codifica una molécula de Factor VII modificada que no activa significativamente factores de plasma X o IX, y es capaz de unir el factor tisular.

[0063] La actividad catalítica del factor VIIa se puede inhibir por derivatización química del centro catalítico, o tríada. La derivatización se puede realizar al reaccionar el Factor VII con un inhibidor irreversible tal como un compuesto organofosforo, un sulfonil fluoruro, una cetona de halometilo peptídica o un azapéptido, o por acilación, por ejemplo. Las
55 cetonas de halometilo peptídicas preferidas incluyen PPACK (D-Phe-Pro-Arg clorometil-cetona; (véase patente de EEUU n°. 4,318,904, incorporada aquí por referencia), D-Phe-Phe-Arg y Phe-Phe-Arg clorometilcetona (FFR-cmk); y DEGRck (dansil-Glu-Gly-Arg clorometilcetona).

[0064] La actividad catalítica del Factor VIIa puede también ser inhibida por sustitución, inserción o delección de
60 aminoácidos. En formas de realización de aminoácidos preferidas, sustituciones han sido hechas en la secuencia de aminoácidos de la tríada catalítica del Factor VII, definida aquí como las regiones, que contienen los aminoácidos, que

contribuyen al sitio catalítico del Factor VIIa. Las sustituciones, inserciones o deleciones en la tríada catalítica son generalmente en o adyacentes a los aminoácidos que forman el sitio catalítico. En las proteínas del Factor VII humano y bovino, los aminoácidos, que forman una "tríada" catalítica, son Ser344, Asp242, y His193 (la numeración del subíndice indicando la posición en la secuencia). Los sitios catalíticos en Factor VII de otras especies mamíferas pueden ser determinados usando técnicas actualmente disponibles incluyendo, entre otros, aislamiento de proteína y análisis de la secuencia de aminoácidos. Sitios catalíticos pueden también ser determinados alineando una secuencia con la secuencia de otras serina proteasas, particularmente quimiotripsina, cuyo sitio activo ha sido previamente determinado (Sigler et al., J. Mol. Biol., 35:143-164 (1968), incorporada aquí por referencia), y a partir de ahí determinando a partir de dicho alineamiento los residuos análogos del sitio activo.

[0065] En formas de realización preferidas del Factor VII humano y bovino, el residuo de sitio activo Ser344 es modificado, sustituido con Gly, Met, Thr, o más preferiblemente, Ala. Tal sustitución podría ser hecha separadamente o en combinación con sustitución(es) a otros sitios en la tríada catalítica, lo que incluye His193 y Asp242.

[0066] Los aminoácidos, que forman el sitio catalítico en el Factor VII, tales como Ser344, Asp242, y His193 en el Factor VII humano y bovino, pueden bien ser eliminados o sustituidos. En la presente invención, se prefiere cambiar sólo un único aminoácido, minimizando así la probabilidad de aumentar la antigenicidad de la molécula o inhibiendo su capacidad para enlazar factor tisular, no obstante dos o más cambios de aminoácidos (sustituciones, adiciones o deleciones) pueden ser hechas y combinaciones de sustitución(es), adición(s) y deleción(es) pueden también ser hechas. En una forma de realización preferida para el Factor VII humano y bovino, Ser344 es preferiblemente sustituido con Ala, pero Gly, Met, Thr u otros aminoácidos pueden ser sustituidos. Se prefiere reemplazar Asp con Glu y reemplazar His con Lys o Arg. En general, sustituciones se eligen para desajustar lo menos posible la estructura terciaria de la proteína. El modelo de Dayhoff et al. (en Atlas of Protein Structure 1978, Nat'l Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), incorporado aquí por referencia, se puede utilizar como una guía en la selección de otras sustituciones de aminoácidos. Se puede introducir alteraciones de residuos como se ha descrito anteriormente en el sitio catalítico de la secuencia de Factor VII apropiada de especies humanas, bovinas u otras especies y evaluar la proteína resultante para un nivel deseado de inhibición de actividad catalítica y dando como la actividad anticoagulante como se describe en este caso. Para el Factor VII modificado la actividad catalítica será sustancialmente inhibida, generalmente menos de aproximadamente el 5% de la actividad catalítica del factor VII de tipo salvaje de las especies correspondientes, más preferiblemente menos de aproximadamente el 1%.

[0067] El Factor VII modificado se puede producir a través del uso de técnicas de ADN recombinante.

[0068] Las alteraciones de la secuencia de aminoácidos se pueden realizar por una variedad de técnicas. La modificación de la secuencia de ADN puede ser por mutagénesis sitio específica. Técnicas para mutagénesis sitio específica se conocen bien en la técnica y están descritas por, por ejemplo, Zoller y Smith (DNA 3:479-488, 1984). Así, usando las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del Factor VII, se puede introducir la alteración(s) de elección.

[0069] El FVIIa modificado puede también ser producido por métodos químicos.

FFR-FVIIa (es decir, D-Phe-Phe-Arg-FVIIa)

Ejemplo FFR clorometil cetona

[0070] Bloqueo del sitio activo de FVIIa con FFR clorometil cetona.

[0071] Bloqueo de la serina de sitio activo e histidina con clorometil cetona es un método conocido para inactivación irreversible de serina proteasas. Para optimizar el bloqueo de una proteasa dada es importante elegir un derivado de clorometil cetona, que reacciona específicamente con el sitio activo y con una constante de asociación rápida. Tales derivados se pueden desarrollar por fijación al grupo cetona de clorometilo de un oligopéptido, que interactúa, con el lugar de unión de sustratos de la serina proteasa particular de interés.

[0072] Glutamil-Glicil-Arginina clorometil cetona (EGR-ck o su derivado de dansilo, DEGR-ck) (S. Higashi, H. Nishimura, S. Fujii, K. Takada, S. Iwanaga, (1992) J. Biol. Chem. 267, 17990) o Prolil-Fenil-Arginina clorometil cetona (PFR-ck) (J. H. Lawson, S. Butenas, K. Mann, (1992) J. Biol. Chem. 267, 4834; J. Contrino, G. A. Hair, M. A. Schmeizl, F. R. Rickles, D. L. Kreutzer (1994) Am. J. Pathol. 145, 1315) han sido aplicados como inhibidores del sitio activo de FVIIa. Comparada con estas clorometil cetonas la aplicación de FFRck representa un aumento de índice de 10 - 70 veces.

[0073] La especificidad de la reacción con el derivado de FFR-clorometil cetona de FVIIa fue controlada por HPLC y mapeo peptídico que mostraba que FVIIa ha reaccionado con FFR-clorometil cetona en una proporción 1:1 de manera que > 98% podría ser recuperada como el producto previsto derivatizado a histidina 193.

Inactivación de FVIIa por varias clorometil cetonas:

[0074] 3 μ M de FVIIa fueron incubados con 12 μ M de derivado de clorometil cetona en 50 mM de TrisHCl, 100 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂, 0.01 % Tween-80, pH 7.4. Las muestras fueron retiradas a varios intervalos de tiempo como se indica y diluidas 20 veces para mediciones de actividad en 50 mM TrisHCl, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.01 % Tween-80, pH 7.4 conteniendo 1 mM Ile-pro-Arg-pNA. La actividad del FVIIa residual fue medida por el aumento en absorbencia a 405 nm.

[0075] Normalmente, la mezcla que comprende el péptido o péptido GLP-1 e impurezas relacionadas para ser purificada por cromatografía de intercambio iónico según la presente invención, también contendrá aminoácidos, péptidos pequeños, péptidos grandes, proteínas no relacionadas, reactivos, detrito celular, HCP, endotoxinas, y/o virus dependiendo de si técnicas de ADN recombinante y/o técnicas de modificación químicas han sido usadas o si técnicas de química sintética de péptidos orgánicos han sido usadas.

[0076] Así, cualquier método, tal como un método industrial, para producir un péptido puro o péptido GLP-1, que incluye un proceso IEC según la presente invención es también un aspecto de la presente solicitud.

[0077] Por consiguiente, la presente invención se refiere en otro aspecto a un método industrial para la producción de un péptido puro o péptido GLP-1, el método incluyendo un proceso de cromatografía de intercambio catiónico para purificar un péptido de una mezcla que comprende dicho péptido o péptido GLP-1 e impurezas relacionadas, que incluyen las etapas de:

separar dicho péptido o péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que comprende un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido o péptido GLP-1 tiene una carga neta global o local positiva diferente de la carga neta local o global positiva de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas.

[0078] La presente invención se refiere en otro aspecto a un método para aislar un péptido GLP-1, incluyendo el método la purificación de un péptido GLP-1 de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas relacionadas por medio de un proceso de cromatografía de intercambio catiónico, el proceso de cromatografía de intercambio catiónico comprendiendo la fase de:

separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que comprende un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una carga neta global o local positiva diferente de la carga neta local o global positiva de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas; y posteriormente, si es necesario, someter a pruebas analíticas y/o purificación adicional, y aislar dicho péptido en una manera convencional.

[0079] La presente invención se refiere en otro aspecto a un método para aislar un péptido GLP-1, incluyendo el método la purificación de un péptido GLP-1 de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas no relacionadas o relacionadas por medio de un proceso de cromatografía de intercambio catiónico, el proceso de cromatografía de intercambio catiónico comprendiendo la fase de:

separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que consiste esencialmente en un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una carga neta global o local positiva diferente de la carga neta local o global positiva de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas; y posteriormente, si es necesario, someter a pruebas analíticas y/o purificación adicional, y aislar dicho péptido de una manera convencional.

[0080] La presente invención se refiere en otro aspecto a un método industrial para la producción de un péptido puro o péptido GLP-1, incluyendo el método un proceso de cromatografía de intercambio aniónico para purificar un péptido de una mezcla que comprende dicho péptido o péptido GLP-1 e impurezas relacionadas, incluyendo las etapas de:

separar dicho péptido o péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que comprende un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un

tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido o péptido GLP-1 tiene una carga neta global o local negativa diferente de la carga neta local o global negativa de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas

5

[0081] La presente invención se refiere en otro aspecto ulterior a un método para aislar un péptido GLP-1, el método incluyendo la purificación de un péptido GLP-1 de una mezcla que comprende dicho péptido e impurezas relacionadas por medio de un proceso de cromatografía de intercambio aniónico, el proceso de cromatografía de intercambio aniónico comprendiendo la fase de:

10

separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que comprende un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una carga neta global o local negativa diferente de la carga neta local o global negativa de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas; y posteriormente, si es necesario, someter a pruebas analíticas y/o purificación adicional, y aislar dicho péptido en una manera convencional.

15

[0082] La presente invención se refiere en otro aspecto ulterior a un método para aislar un péptido GLP-1, el método incluyendo la purificación de un péptido GLP-1 de una mezcla comprendiendo dicho péptido e impurezas no relacionadas o relacionadas por medio de un proceso de cromatografía de intercambio aniónico, el proceso de cromatografía de intercambio aniónico comprendiendo la fase de:

20

separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que consiste esencialmente en un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una carga neta global o local negativa diferente de la carga neta local o global negativa de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas; y posteriormente, si es necesario, someter a pruebas analíticas y/o purificación adicional, y aislar dicho péptido en una manera convencional.

25

30

[0083] Cualquier combinación posible de dos o más de las formas de realización descritas aquí, se comprende dentro del campo de la presente invención.

35

[0084] El término "un modificador orgánico", como se utiliza en este caso, se destina a incluir un solvente orgánico o compuesto orgánico soluble en agua o mezclas derivadas, este modificador induce una selectividad favorable y cambiada entre la impureza o impurezas indeseada(s) relacionada(s) y el péptido GLP-1 y el intercambiador iónico. Si un modificador seleccionado induce o no dicha selectividad normalmente dependerá de la impureza o impurezas relacionada(s), y se pueden evaluar mediante prueba-y-error. El modificador orgánico incluye pero no se limita a C1-6 alcanol, C1-6 alqueno o C1-6 alquino, urea, guanidina-HCl, o C1-6 ácido alcanoico, tal como ácido acético, C2-6 glicol, C3-7 polialcohol incluyendo azúcares, o mezclas derivadas.

40

[0085] El término, "C1-6 -alcanol" "C1-6 -alquino" o "C1-6 -alqueno", como se utiliza en este caso solo o en combinación se destina a incluir aquellos grupos C1-6 alcanol, C1-6 alqueno o C1-6 alquino de la longitud designada en bien una configuración cíclica o lineal o ramificada a la cual se enlaza un hidróxilo (OH) (cf. Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4^a ed). Ejemplos de alcoholes lineales son metanol, etanol, n-propanol, alil alcohol, N-butanol, N-pentanol y N-hexanol. Ejemplos de alcoholes ramificados son 2-propanol y terc-butil alcohol. Ejemplos de alcoholes cíclicos son ciclo propil alcohol y 2-ciclohexen-1-ol.

50

[0086] El término "C1-6-ácido alcanoico", como se utiliza en este caso, se destina a incluir un grupo de la fórmula R'COOH donde R' es H o C1-5 alquilo, tal como, ácido acético, propiónico, butírico, metilbutírico, o valérico (cf. Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4^a ed).

55

[0087] El término "C1-5-alquilo", como se utiliza en este caso, se destina a incluir un grupo alquilo ramificado o recto teniendo de uno a cinco átomos de carbono.

Grupos de C1-5 alquilo típicos incluyen, pero de forma no limitativa, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, Isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, isopentilo, y similares (cf. Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4^a ed).

60

[0088] El término "C2-6 -glicol", como se utiliza en este caso, se destina a incluir un C2-6 alcanol conteniendo dos grupos hidróxilo en átomos de carbono diferentes que pueden ser adyacentes o no. Un C2-6 glicol típico incluye, pero no se limita a

1,2-etanodiol, 1,2-propanodiol, o 2-metil-2,4-pentanodiol (cf. Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4ª ed).

[0089] El término "C2-6-alcano", como se utiliza en este caso, se destina a incluir un grupo alcano ramificado o recto teniendo de dos a seis átomos de carbono. Grupos de C2-6-alcano típicos incluyen, pero de forma no limitativa etano, propano, isopropano, butano, isobutano, pentano, hexano y similares (cf. Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4ª ed).

[0090] El término "azúcares que incluyen C3-7-poliálcohol", como se utiliza en este caso, se destina a incluir un grupo de la fórmula HOCH₂(CHOH)_nCH₂OH donde n es un número entero de 1-5, y monosacáridos tales como manosa, glucosa (cf. Morrison & Boyd, Organic Chemistry, 4ª ed).

[0091] El término "péptido GLP-1", como se utiliza en este caso, se destina a designar GLP-1 (7-37), GLP-1 (7-36) amida al igual que análogos y derivados de las mismas, que son capaces de ser producidos por técnicas convencionales de ADN recombinante al igual que métodos sintéticos convencionales. Tales péptidos GLP-1 incluyen pero de forma no limitativa péptido 1 tipo glucagón nativo, por ejemplo tales fragmentos peptídicos que comprenden GLP-1 (7-37) y derivados funcionales de los mismos como se describe en WO 87/06941; tales fragmentos peptídicos que comprenden GLP-1 (7-36) y derivados funcionales de los mismos como se describe en WO 90/11296; tales análogos de los péptidos GLP-1 activos 7-34, 7-35, 7-36, y 7-37 como se describe en WO 91/11457; tales derivados de GLP-1 en los que un sustituyente lipofílico se une a al menos un residuo de aminoácido como se describe en WO 98/08871; tales fragmentos truncados N-terminales de GLP-1 como se describe en EP 0699686-A2; y tales análogos de GLP-1 y derivados que incluyen un grupo de imidazol N-terminal como se describe en EP 0708179-A2.

[0092] El término "péptido GLP-2", como se utiliza en este caso, se destina a designar GLP-2 (1-35), GLP-2 (1-34), GLP-2 (1-33) al igual que análogos y derivados de los mismos, que son capaces de ser producidos por técnicas convencionales de ADN recombinante al igual que métodos sintéticos convencionales. Tales péptidos de GLP-2 incluyen pero de forma no limitativa péptido 2 tipo glucagón nativo, derivados de GLP-2 en los que un sustituyente lipofílico se fija a al menos un residuo de aminoácido como se describe en WO 98/08872, péptido 2 de tipo glucagón humano (hGLP-2), GLP-2(1-30); GLP-2(1-31); GLP-2(1-32); GLP-2(1-33); GLP-2(1-34), GLP-2(1-35), Lys20GLP-2(1-33), Lys20Arg30GLP-2(1-33), Arg30Lys34GLP-2(1-34), Arg30Lys35GLP-2(1-35), Arg30,35Lys20GLP-2(1-35), Arg35GLP-2(1-35), Lys20(Nε-tetradecanoil)GLP-2(1-33); Lys20,30-bis(Nε-tetradecanoil)GLP-2(1-33); Lys20(Nε-tetradecanoil)Arg30GLP-2(1-33); Arg30Lys35(Nε-tetradecanoil)GLP-2(1-35); Arg30,35Lys20(Nε-tetradecanoil)GLP-2(1-35); Arg35Lys30(Nε-tetradecanoil)GLP-2(1-35); Arg30Lys34(Nε-tetradecanoil)GLP-2(1-34); Lys20(Nε-(ω-carboxinonadecanoil))GLP-2(1-33); Lys20,30-bis(Nε-(ω-carboxinonadecanoil))GLP-2(1-33); Lys20(Nε-(ω-carboxinonadecanoil))Arg30GLP-2(1-33); Arg30Lys35(Nε-(ω-carboxinonadecanoil))GLP-2(1-35); Lys30(Nε-(γ-glutamil(Nα-tetradecanoil))hGLP-2, Lys30(Nε-(γ-glutamil(Nα-hexadecanoil))hGLP-2, Arg30,35Lys20(Nε-(ω-carboxinonadecanoil))GLP-2(1-35); Arg35Lys30(Nε-(ω-carboxinonadecanoil))GLP-2(1-35); y Arg30Lys34(Nε-(ω-carboxinonadecanoil))GLP-2(1-34).

[0093] El término "análogos" como se utiliza en este caso, se destina a designar un péptido donde uno o más residuos de aminoácidos del péptido progenitor ha sido sustituido por otro residuo de aminoácido y/o donde uno o más residuos de aminoácidos del péptido progenitor ha sido eliminado y/o donde uno o más residuos de aminoácidos han sido añadidos al péptido progenitor. Tal adición puede tener lugar bien en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal del péptido progenitor o ambos.

[0094] El término "derivados" como se utiliza en este caso, se destina a designar un péptido en el que uno o más de los residuos de aminoácidos del péptido progenitor ha sido químicamente modificado, por ejemplo por alquilación, acilación, formación de éster o formación de amida o similar.

[0095] El término "componente de sal" como se utiliza en este caso, se destina a incluir cualquier sal inorgánica u orgánica, incluyendo pero no limitado a NaCl, KCl, NH₄Cl, CaCl₂, acetato sódico, acetato de potasio, acetato amónico, citrato sódico, citrato de potasio, citrato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de amonio, acetato de calcio o mezclas derivadas (cf. Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, o Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición (1995), o manuales de Amersham-Pharmacia Biotech).

[0096] El término "un tampón" como se utiliza en este caso, se destina a incluir cualquier tampón que incluye pero no se limita a: tampones de citrato, tampones de fosfato, tampones tris, tampones de borato, tampones de lactato, tampones de glicil glicina, tampones de arginina, tampones de carbonato, tampones de acetato, tampones de glutamato, tampones de amonio, tampones de glicina, tampones de alquilamino, tampones de aminoetil alcohol, tampones de etilenodiamina, trietanol amina, tampones de imidazol, tampones de piridina y tampones de barbitúrico y sus mezclas derivadas (cf. Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, o Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición (1995), o manuales de Amersham-Pharmacia Biotech).

[0097] La elección de pH de inicio, tampón y fuerza iónica se hace según técnicas bien conocidas tales como métodos de tubo de prueba convencionales, cf. por ejemplo manuales de Amersham-Pharmacia Biotech. La resina de intercambio iónico cromatográfica es elegida dependiendo del péptido GLP-1 específico para ser purificado y las condiciones empleadas, tales como pH, tampón, fuerza iónica etc., que se conoce por el experto en la técnica (es decir, típicamente, pH por debajo del punto isoelectrico (pI) del péptido GLP-1 para resinas de intercambio catiónico y pH por encima de pI del péptido GLP-1 para resinas de intercambio aniónico, una fuerza de tampón suficiente para mantener el pH deseado, y una fuerza iónica suficientemente baja posiblemente inducida por la concentración de sal), e incluye pero no se limita a resinas de Sepharose, resinas Sephadex, resinas de Streamline, y resinas de Source de Amersham-Pharmacia Biotech, resinas de HyperD, resinas Trisacryl, y resinas Spherosil de BioSeptra, resinas TSKgel y resinas Toyopearl de TosoHaas, resinas Fractogel EMD de Merck, resinas de Poros de Perseptive Biosystems, resinas de Macro-Prep de BioRAD, resinas de Express-ion de Whatman etc.

[0098] El término "una solución que consiste esencialmente en un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal y opcionalmente un tampón" como se utiliza en este caso, se destina a significar una solución que contiene uno o más modificadores orgánicos, agua, uno o más componentes de sal o ningún componente de sal y uno o más tampones o ningún tampón, y opcionalmente uno o varios otros componentes convencionales que el experto en la técnica considerarían adición, según procesos de cromatografía de intercambio iónico convencionales.

[0099] El término "impurezas relacionadas" como se utiliza en este caso, se destina a significar una o más impurezas con una carga neta global o local diferente del péptido GLP-1, por ejemplo formas truncadas, todos los tipos de formas extendidas (aminoácidos extra, varios derivados incluyendo ésteres etc.), formas desamidadas, formas incorrectamente plegadas, formas con glicosilación indeseada incluyendo sialilación, y otros. De ello sigue que "impurezas no relacionadas" como se utiliza en este caso, se destina a cubrir impurezas que son diferentes de impurezas relacionadas.

[0100] El término "un valor de pH constante", como se utiliza en este caso se destina a significar que el valor de pH puede ser constante, tal como en presencia de un tampón o puede variar típicamente dentro de 3 unidades de pH, si ningún tampón está presente.

[0101] El término "con un gradiente de pH lineal o escalonado", como se utiliza en este caso se destina a significar que el valor de pH cambia durante la elución de un pH más bajo a uno más alto, o de un pH más alto a uno más bajo. Tal cambio en pH es normalmente generado con un tampón y/o por adición de un ácido o base inorgánico u orgánico, por ejemplo HCl, NaOH, H₂O ácido acético, NH₃, hidróxido de potasio, H₂SO₄, ácido cítrico. Un gradiente de pH para intercambio catiónico normalmente sería de un pH más bajo a uno más alto, y para intercambio aniónico de un pH más alto a uno más bajo.

[0102] El término "con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal", como se utiliza en este caso se destina a significar que la concentración de sal cambia durante la elución de una concentración más baja a una más alta o es constante.

[0103] La presente invención también se refiere a los siguientes aspectos:

Aspecto 1. Un proceso de cromatografía de intercambio catiónico para depuración de un péptido GLP-1 de una mezcla comprendiendo dicho péptido e impurezas no relacionadas o relacionadas, comprendiendo la fase de:

separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas no relacionadas o relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que consiste esencialmente en un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una carga neta global o local positiva diferente de la carga neta local o global positiva de dichas impurezas no relacionadas o relacionadas para eliminar dichas impurezas no relacionadas o relacionadas.

Aspecto 2. Un proceso de cromatografía de intercambio catiónico para depuración de un péptido GLP-1 de una mezcla comprendiendo dicho péptido e impurezas relacionadas, comprendiendo la fase de:

separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que consiste esencialmente en un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una carga neta global o local positiva diferente de la carga neta local o global positiva de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas.

Aspecto 3. Un proceso de cromatografía de intercambio aniónico para purificación de un péptido GLP-1 de una mezcla comprendiendo dicho péptido e impurezas no relacionadas o relacionadas, comprendiendo la fase de:

5 separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas no relacionadas o relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que consiste esencialmente en un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una carga neta global o local negativa diferente de la carga neta local o global negativa de dichas impurezas no relacionadas o relacionadas para eliminar dichas impurezas no relacionadas o relacionadas.

Aspecto 4. Un proceso de cromatografía de intercambio aniónico para depurar un péptido GLP-1 de una mezcla comprendiendo dicho péptido e impurezas relacionadas, comprendiendo la fase de:

15 separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que consiste esencialmente en un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una carga neta global o local negativa diferente de la carga neta local o global negativa de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas.

Aspecto 5. El proceso según cualquiera de los aspectos 1-4 donde la proporción de modificador orgánico a agua en una base porcentual en peso es de 1:99 a 99:1.

25 Aspecto 6. El proceso según cualquiera de los aspectos 1-5 donde dicho modificador orgánico se selecciona de C1-6 alcohol, C1-6 alquenol o C1-6 alquinol, úrea, guanidina, o C1-6 ácido alcanico, C2-6 glicol, o C3-7 polialcohol incluyendo azúcares.

30 Aspecto 7. El proceso según cualquiera de los aspectos 1-6 donde dicho componente de sal se selecciona de cualquier sal inorgánica u orgánica, preferiblemente NaCl, KCl, NH₄ Cl, CaCl₂, acetato sódico, acetato de potasio, acetato amónico, citrato sódico, citrato de potasio, citrato de amonio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de amonio, acetato de calcio o mezclas derivadas.

35 Aspecto 8. El proceso según cualquiera de los aspectos 1-6 donde ningún componente de sal está presente.

Aspecto 9. El proceso según cualquiera de los aspectos 1-7 donde dicho gradiente en componente de sal es un gradiente escalonado o lineal en el componente de sal.

40 Aspecto 10. El proceso según el aspecto 9 donde dicho componente de sal está presente en una concentración seleccionada del intervalo de 0.1 mmol/kg a 3000 mmol/kg.

45 Aspecto 11. El proceso según cualquiera de los aspectos 1-10 donde dicho tampón es independientemente seleccionado de tampones de citrato, tampones de fosfato, tampones tris, tampones de borato, tampones de lactato, tampones de glicil glicina, tampones de arginina, tampones de carbonato, tampones de acetato, tampones de glutamato, tampones de amonio, tampones de glicina, tampones de alquilamino, tampones de alcohol de aminoetilo, tampones de etilenodiamina, de trietanol amina, tampones de imidazol, tampones de piridina y tampones de barbitúrico y sus mezclas derivadas.

50 Aspecto 12. El proceso según cualquiera de aspectos 1-11 donde dicho tampón está presente en una concentración seleccionada del intervalo de 0.1 mmol/kg a 500 mmol/kg.

Aspecto 13. El proceso según cualquiera de los aspectos 1-10 donde ningún tampón está presente.

55 Aspecto 14. Un método para aislar un péptido, el método incluyendo purificación de un péptido GLP-1 de una mezcla comprendiendo dicho péptido e impurezas relacionadas por medio de un proceso de cromatografía de intercambio catiónico, el proceso de cromatografía de intercambio catiónico incluyendo las etapas de:

60 separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que consiste esencialmente en un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una carga neta global o local positiva diferente de la carga neta local o global

positiva de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas;

y posteriormente, si es necesario, someter a pruebas analíticas y/o purificación adicional, y aislar dicho péptido en una manera convencional.

5

Aspecto 15. Un método para aislar un péptido, el método incluyendo purificación de un péptido GLP-1 de una mezcla comprendiendo dicho péptido e impurezas relacionadas por medio de un proceso de cromatografía de intercambio aniónico, el proceso de cromatografía de intercambio aniónico incluyendo las etapas de:

10

separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que consiste esencialmente en un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o valor de pH debería estar en el intervalo donde dicho péptido tiene una carga neta global o local negativa diferente de la carga neta local o global negativa de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas;

15

y posteriormente, si es necesario, someter a pruebas analíticas y/o purificación adicional, y aislar dicho péptido en una manera convencional.

20

Aspecto 16. El proceso o método según cualquiera de los aspectos 1-15 donde dicho péptido por ser purificado se selecciona de GLP-1 (7-37), GLP-1 (7-36) amida al igual que análogos y derivados de las mismas.

Ejemplos

25

[0104] La presente invención es posteriormente ilustrada por los siguientes ejemplos que, no obstante, no deben ser interpretados como limitativos del alcance de protección. Las características descritas en la descripción precedente y en los siguientes ejemplos pueden, ambos separadamente y en cualquier combinación de las mismas, ser material para la realización de la invención en formas diversas de las mismas.

Ejemplo 1:

30

[0105] Arg34GLP-1(1-37) fue expresado en levadura (*Sacch. Cerevisiae*) por tecnología del ADN recombinante convencional p. ej. como se describe en WO 98/08871. El caldo de fermentación de Arg34GLP-1(7-37) fue purificado por una fase de captura de la cromatografía de intercambio catiónico convencional. La agrupación conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una impureza fue ajustada a pH 3.1, y 1 ml de la solución resultante fue aplicado a una columna de 6.5 ml de Ceramic S HyperD F (BioSeptra S. A.) equilibrada con 32.5 ml 1.54 % (p/p) citrato trisódico, 0.6 % (p/p) ácido succínico, 1.09 % (p/p) disodio hidrógeno fosfato dihidrato, pH-3.2. La columna fue lavada con 6.5 ml de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con un gradiente de pH lineal de 3.2 a 8.0 (1.54 % (p/p) citrato trisódico, 0.6 % (p/p) ácido succínico, 1.09 % (p/p) disodio hidrógeno fosfato di-hidrato, pH 8.0) seguido de 13 ml de elución isocrática a pH 8.0. Un cromatograma se muestra en la figura 1. Ningún valor máximo diferente o separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 meta fue obtenido.

35

40

Ejemplo 2:

[0106] Arg34GLP-1(7-37), fue expresado y capturado por intercambio catiónico como se describe en el ejemplo 1. La agrupación conteniendo Arg34GLP-1(7-31) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una impureza fue ajustada a pH 3.1, y 1 ml de la solución resultante fue aplicado a una columna de 20 ml de Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 100 ml de 1.54 % (p/p) citrato trisódico, 0.6 % (p/p) ácido succínico, 1.09 % (p/p) disodio hidrógeno fosfato dihidrato, pH-3.2. La columna fue lavada con 20 ml de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con un gradiente de pH lineal de 3.2 a 8.0 (1.54 % (p/p) citrato trisódico, 0.6 % (p/p) ácido succínico, 1.09 % (p/p) disodio hidrógeno fosfato dihidrato, pH 8.0) seguido de 40 ml de elución isocrática a pH 8.0. Ningún valor máximo diferente o separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 meta fueron obtenidas.

45

50

Ejemplo 3:

[0107] Arg34GLP-1(7-37) fue expresado y capturado por intercambio catiónico como se describe en el ejemplo 1. La agrupación conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una impureza fue ajustada a pH 3.1, y 1 ml de la solución resultante fue aplicado a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 100 ml 0.77 % (p/p) citrato trisódico, 0.3 % (p/p) ácido succínico, 0.55 % (p/p) disodio hidrógeno fosfato dihidrato, pH-3.2. La columna fue lavada con 20 ml de solución de equilibrado. La elución fue realizada con un gradiente de pH lineal de 3.2 a 8.0 (0.77 % (p/p) de citrato trisódico, 0.3 % (p/p) de ácido succínico, 0.55 % (p/p) de disodio hidrógeno fosfato dihidrato) seguido de 40 ml de elución isocrática a pH 8.0. La elución posterior a pH 8.0 fue realizada con un

55

60

gradiente de sal lineal de 0.0 a 1.0 M de NaCl (0.77 % (p/p) de citrato trisódico, 0.3 % (p/p) de ácido succínico, 0.55 % (p/p) de disodio hidrógeno fosfato dihidrato, pH 8.0) seguido de 40 ml de elución isocrática a 1.0 M de NaCl. Ningún valor máximo o separación diferentes entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 meta fue obtenido.

5 Ejemplo 4:

[0108] Arg34GLP-1(7-37) fue expresado y capturado por intercambio catiónico como se describe en el ejemplo 1. 2 volúmenes de agua se añadieron a la agrupación conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una impureza, y la solución fue ajustada a pH 3.5. 25.5 ml de la solución resultante fueron aplicados a una columna de 10
20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 100 ml 0.21 % (p/p) de citrato trisódico, 0.08 % (p/p) de ácido succínico, 0.15 % (p/p) de disodio hidrógeno fosfato dihidrato, 45 % (p/p) de etanol, pH-3.2. La columna fue lavada con 20 ml solución de equilibrado, y la elución fue realizada con un gradiente de pH lineal de 3.2 a 8.0 (0.21 % (p/p) de citrato trisódico, 0.08 % (p/p) de ácido succínico, 0.15 % (p/p) de disodio hidrógeno fosfato dihidrato, 45 % (p/p) de etanol, pH 8.0) seguido de 40 ml de elución isocrática a pH 8.0. Un cromatograma se muestra en la figura 2. Diferentes valores
15 máximos y separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 meta fueron obtenidos por adición de etanol a las soluciones cromatográficas. Diferencias insignificantes de configuración entre éste y el ejemplo 2 son: lote diferente, pH, y dilución acuosa de la muestra para aplicación, carga más alta, y menor concentración de tampón.

20 Ejemplo 5:

[0109] Arg34GLP-1(7-37) fue expresado y capturado por intercambio catiónico como se describe en el ejemplo 1. La agrupación conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una impureza fue ajustada a pH 3.1, y 5 ml de la solución resultante fue aplicada a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 100 ml 0.85 % (p/p) citrato trisódico, 0.33 % (p/p) de ácido succínico, 0.6 % (p/p) de disodio hidrógeno
25 fosfato dihidrato, 45 % (p/p) de etanol, pH-3.2. La columna fue lavada con 20 ml solución de equilibrado, y la elución fue realizada con un gradiente de pH lineal de -3.2 a -5.0 (0.85 % (p/p) de citrato trisódico, 0.33 % (p/p) de ácido succínico, 0.6 % (p/p) de disodio hidrógeno fosfato dihidrato, 45 % (p/p) de etanol) seguido de 60 ml de elución isocrática a pH 8.0 (0.85 % (p/p) de citrato trisódico, 0.33 % (p/p) de ácido succínico, 0.6 % (p/p) de disodio hidrógeno fosfato dihidrato, 45 % (p/p) de etanol, pH 8.0). Un cromatograma se muestra en la figura 3. Diferentes valores máximos y separación entre la forma
30 truncada y la fracción de GLP-1 meta fueron obtenidos por adición de etanol a las soluciones cromatográficas.

[0110] Se efectuó un análisis RP-HPLC para identificación/verificación de valores máximos recogidos en una columna de 4.0x250 mm sustituida en C18 120 A sílice (YMC) con partículas de 5 µm. El tampón A consistió en 0.15 M (NH₄)₂SO₄ en 7.8 % (p/p) de acetonitrilo, pH 2.5, y tampón B contenía 63.4 % (p/p) de acetonitrilo. Gradientes lineales de 37-41 % B en 12
35 min seguido de 41-100%B en 15 min fue ejecutado a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La temperatura cromatográfica fue mantenida a 60°C y la detección UV fue realizada a 214 nm. Los resultados analíticos fueron:

	contenido de Arg34GLP-1(7-37)	contenido de Arg34GLP-1(9-37)
Muestra para aplicación	36%	13%
Valor máximo de impureza	2%	45%
Valor máximo principal	50%	1%

[0111] Cromatogramas de la muestra para aplicación y el eluato se muestran en las Figuras 4 y 5, respectivamente. Los resultados analíticos muestran una separación selectiva de la forma truncada y una alta reducción de la forma truncada en el valor máximo principal que contenía la fracción de GLP-1 meta por cromatografía de intercambio catiónico utilizando modificadores orgánicos.

45 Ejemplo 6:

[0112] Arg34GLP-1(7-37) fue expresado y capturado por intercambio catiónico como se describe en el Ejemplo 1. La agrupación conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una impureza fue ajustada a pH 3.1, y 10 ml de la solución resultante fueron aplicados a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 100 ml 20 mmol/kg de ácido cítrico, 45 % (p/p) de etanol, pH 3.0. La columna fue lavada con 20 ml de
50 solución de equilibrado, y la elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 250 mmol/kg KCl (20 mmol/kg ácido cítrico, 45 % (p/p) de etanol, pH 3.0) seguido de 60 ml de elución isocrática a 250 mmol/kg de KCl. Un cromatograma se muestra en la figura 6. Diferentes valores máximos y separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 meta fueron obtenidos por adición de etanol a las soluciones cromatográficas.

Ejemplo 7:

[0113] Arg34GLP-1(7-37) fue expresado y capturado por intercambio catiónico como se describe en el ejemplo 1. La agrupación conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una impureza fue ajustada a pH 3.5, y 10 ml de la solución resultante fueron aplicados a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 100 ml 20 mmol/kg de ácido cítrico, 45 % (p/p) de etanol, pH 3.5. La columna fue lavada con 20 ml de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 250 mmol/kg de KCl (20 mmol/kg de ácido cítrico, 45 % (p/p) etanol, pH 3.5) seguido de 40 ml de elución isocrática a 250 mmol/kg de KCl. Diferentes valores máximos y separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 meta similar al ejemplo 6 fueron obtenidos.

Ejemplo 8:

[0114] El caldo de fermentación de Arg34GLP-1(7-37) fue purificado por un paso de captura de cromatografía de intercambio catiónico convencional seguido de un paso de purificación de RP-HPLC convencional. 6 volúmenes de agua se añadieron a la agrupación conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una impureza, y la solución fueron ajustados a pH 3.5. 170 ml de la solución resultante fueron aplicados a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 100 ml 20 mmol/kg de ácido cítrico, 37,5 mmol/kg de KCl, 45 % (p/p) de etanol, pH 3.5. La columna fue lavada con 20 ml de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 37.5 a 162.5 mmol/kg de KCl (20 mmol/kg de ácido cítrico, 45 % (p/p) de etanol, pH 3.5) seguido de 20 ml de elución isocrática a 250 mmol/kg de KCl (20 mmol/kg de ácido cítrico, 45 % (p/p) de etanol, pH 3.5). Diferentes valores máximos y separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 meta fueron obtenidos por adición de etanol a las soluciones cromatográficas.

Ejemplo 9:

[0115] Arg34GLP-1(7-37) fue expresado y capturado por intercambio aniónico como se describe en el ejemplo 1. 10 ml de la agrupación conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y varias impurezas fueron aplicados a una columna de 20 ml DEAE HyperD 20 (BioSeptra S. A.) equilibrada con 100 ml 20 mM de disodio hidrógeno fosfato dihidrato, pH 7.5. La columna fue lavada con 20 ml solución de equilibrado, y la elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 250 mM de NaCl (20 mM de disodio hidrógeno fosfato dihidrato, pH 7.5) seguido de 40 ml de elución isocrática con 1 M de NaCl (20 mM de disodio hidrógeno fosfato dihidrato, pH 7.5). Ningún valor máximo o separación diferentes fueron obtenidos cuando la fracción de GLP-1 meta estaba eluyendo durante todo el área del valor máximo.

Ejemplo 10:

[0116] Arg34GLP-1(7-37) fue expresado y capturado por intercambio aniónico como se describe en el ejemplo 1. La agrupación conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y varias impurezas fue diluida con tres volúmenes de agua, y 40 ml de la solución resultante fueron aplicados a una columna de 20 ml Source 15Q (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 100 ml 20 mM de Tris-hidroximetil amino-metano, pH 8.5. La columna fue lavada con 20 ml de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 250 mM de NaCl (20 mM Tris-hidroximetil amino-metano, pH 8.5) seguido de 40 ml de elución isocrática con 250 mM de NaCl. Un cromatograma se muestra en la figura 7. Ningún valor máximo o separación diferentes fueron obtenidos cuando la fracción de GLP-1 meta estaba eluyendo durante todo el área del valor máximo.

Ejemplo 11:

[0117] Arg34GLP-1(7-37) fue expresado y capturado por intercambio aniónico como se describe en el ejemplo 1. La agrupación conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y varias impurezas fueron diluidas con tres volúmenes de agua, y 20 ml de la solución resultante fueron aplicados a una columna de 20 ml Source 15Q (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 100 ml 20 mmol/kg Tris-hidroximetil amino-metano, 45 % (p/p) de etanol, pH 8.5. La columna fue lavada con 20 ml de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 250 mmol/kg NaCl (20 mmol/kg Tris-hidroximetil amino-metano, 45 % (p/p) de etanol, pH 8.5) seguido de 40 ml de elución isocrática con 250 mmol/kg de NaCl. Un cromatograma se muestra en la figura 8. Diferentes valores máximos y la separación entre varias impurezas y la fracción de GLP-1 meta fueron obtenidos por adición de etanol a las soluciones cromatográficas. Diferencias insignificantes en configuración entre éste y el ejemplo 10 son: diferente carga y concentración de tampón.

Ejemplo 12:

[0118] Arg34GLP-1(7-37) fue expresado y capturado por intercambio aniónico como se describe en el ejemplo 1. La agrupación conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y varias impurezas fueron diluidas con un volumen de agua y dos volúmenes de

etanol, y 20 ml de la solución resultante fueron aplicados a una columna de 20 ml Source 15Q (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 100 ml 20 mmol/kg de Tris-hidroximetil amino-metano, 45 % (p/p) de etanol, pH 8.5. La columna fue lavada con 20 ml de solución de equilibrado, y la elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 100 mmol/kg de NaCl (20 mmol/kg Tris-hidroximetil amino-metano, 45 % (p/p) de etanol, pH 8.5) seguido de 40 ml de elución isocrática con 100 mM de NaCl. Diferentes valores máximos y separación entre varias impurezas y la fracción de GLP-1 meta fueron obtenidos por adición de etanol a las soluciones cromatográficas.

Ejemplo 13:

[0119] Arg34GLP-1(7-37) fue expresado como se describe en el ejemplo 1. Arg34GLP-1(7-37) fue aislado del caldo de fermentación por una etapa de captura de cromatografía de fase convencional inversa, y posteriormente precipitado al pl (punto isoeléctrico) de Arg34GLP-1(7-37). 10 g del precipitado conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una de varias impurezas fue suspendida en 500 ml de agua y disuelta por ajuste de pH a 8.3 a una concentración de Arg34GLP-1(7-37) de aproximadamente 1.6 mg/ml. 5 ml de la solución resultante fueron ajustados a pH 3.5 y aplicados a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 60 ml 0.42 % p/p de ácido cítrico, pH 3.5. La forma truncada no fue eluida/lavada por un gradiente lineal de 0 a 2 M NaCl (0.42 % p/p de ácido cítrico, pH 3.5). El péptido meta, Arg34GLP-1(7-37), y la impureza, Arg34GLP-1(9-37), fueron eluidos en un único valor máximo por 40 ml del solvente de regeneración 4 % p/p NaOH. Un cromatograma se muestra en la figura 9. Ninguna eliminación de la impureza truncada fue conseguida por la etapa de lavado a pH bajo con una solución salina convencional alta sin un modificador orgánico.

Ejemplo 14:

[0120] Arg34GLP-1(7-37) fue aislado del caldo de fermentación por cromatografía de fase convencional inversa y precipitado como se describe en el ejemplo 13. 10 g del precipitado conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una de varias impurezas fue suspendida en 500 ml agua y disuelta por ajuste de pH a 8.3 a una concentración de Arg34GLP-1(7-37) de aproximadamente 1.6 mg/ml. 5 ml de la solución resultante fueron ajustados a pH 3.5 y aplicados a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 60 ml 0.42 % p/p de ácido cítrico, 34 % p/p de etanol, pH 3.5. La elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 2.23 % p/p KCl (0.42 % p/p de ácido cítrico, 34 % p/p de etanol, pH 3.5). Diferentes valores máximos y separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 meta fueron obtenidos similar al ejemplo 6.

Ejemplo 15:

[0121] Arg34GLP-1(7-37) fue aislado del caldo de fermentación por cromatografía de fase convencional inversa y precipitado como se describe en el ejemplo 13. 10 g del precipitado conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una de varias impurezas fue suspendida en 500 ml agua y disuelta por ajuste de pH a 8.3 a una concentración de Arg34GLP-1(7-37) de aproximadamente 1.6 mg/ml. 5 ml de la solución resultante fueron ajustados a pH 3.5 y aplicados a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 60 ml 0.42 % p/p de ácido cítrico, 29 % p/p de etanol, pH 3.5. La elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 2.23 % p/p KCl (0.42 % p/p de ácido cítrico, 29 % p/p de etanol, pH 3.5). La separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 meta fue obtenida.

Ejemplo 16:

[0122] Arg34GLP-1(7-37) fue aislado del caldo de fermentación por cromatografía de fase convencional inversa y precipitado como se describe en el ejemplo 13. 10 g del precipitado conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una de varias impurezas fue suspendida en 500 ml de agua y disuelta por ajuste de pH a 8.3 a una concentración de Arg34GLP-1(7-37) de aproximadamente 1.6 mg/ml. 5 ml de la solución resultante fueron ajustados a pH 3.5 y aplicados a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 60 ml 0.42 % p/p de ácido cítrico, 51 % p/p de etanol, pH 3.5. La elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 2.23 % p/p KCl (0.42 % p/p de ácido cítrico, 51 % p/p de etanol, pH 3.5). Diferentes valores máximos y la separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 meta fueron obtenidos similares al ejemplo 6.

Ejemplo 17:

[0123] Arg34GLP-1(7-37) fue aislado del caldo de fermentación por cromatografía de fase convencional inversa y precipitado como se describe en el ejemplo 13. 10 g del precipitado conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una de varias impurezas fue suspendida en 500 ml agua y disuelta por ajuste de pH a 8.3 a una concentración de Arg34GLP-1(7-37) de aproximadamente 1.6 mg/ml. 5 ml de la solución resultante fueron ajustados a pH 3.5 y aplicados a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham Pharmacia Biotech) equilibrada con 60 ml 0.42 % p/p ácido

cítrico, 71 % p/p de etanol, pH 3.5. La elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 1.12 % p/p KCl (0.42 % p/p de ácido cítrico, 71 % p/p de etanol, pH 3.5). Un cromatograma se muestra en la figura 10. Diferentes valores máximos y la separación entre la forma truncada y la fracción meta de GLP-1 fueron obtenidos similares al ejemplo 6.

5 Ejemplo 18:

[0124] Arg34GLP-1(7-37) fue aislado del caldo de fermentación por cromatografía de fase convencional inversa y precipitado como se describe en el ejemplo 13. 10 g del precipitado conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una de diferentes impurezas fue suspendida en 500 ml de agua y disuelta por ajuste de pH a 8.3 a una concentración de Arg34GLP-1(7-37) de aproximadamente 1.6 mg/ml. 5 ml de la solución resultante fueron ajustados a pH 3.5 y aplicados a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham farmacia Biotech) equilibrada con 60 ml 0.42 % p/p de ácido cítrico, 40 % p/p 2-propanol, pH 3.5. La elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 2.23 % p/p KCl (0.42 % p/p de ácido cítrico, 40 % p/p 2-propanol, pH 3.5). Un cromatograma se muestra en la figura 11. Diferentes valores máximos y la separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 meta fueron obtenidos.

15 Ejemplo 19:

[0125] Arg34GLP-1(7-37) fue aislado del caldo de fermentación por cromatografía de fase convencional inversa y precipitado como se describe en el ejemplo 13. 10 g del precipitado conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34 GLP-1(9-37), como una de varias impurezas fueron suspendidos en 500 ml de agua y disueltos por ajuste a pH a 8.3 a una concentración de Arg34GLP-1(7-37) de aproximadamente 1.6 mg/ml. 5 ml de la solución resultante fueron ajustados a pH 3.5 y aplicados a una columna de 8 ml Poros 50 HS (PE biosistemas) equilibrada con 24 ml 0.42 % p/p de ácido cítrico, 51 % p/p de etanol, pH 3.5. La elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 2.23 % p/p KCl (0.42 % p/p de ácido cítrico, 51 % p/p de etanol, pH 3.5). Un cromatograma se muestra en la figura 12. Diferentes valores máximos y la separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 meta fueron obtenidos.

Ejemplo 20:

[0126] Arg34GLP-1(7-37) fue aislado del caldo de fermentación por cromatografía de fase convencional inversa y precipitado como se describe en el ejemplo 13. 10 g del precipitado conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una de varias impurezas fueron suspendidos en 500 ml de agua y disueltos por ajuste a pH a 8.3 a una concentración de Arg34GLP-1(7-37) de aproximadamente 1.6 mg/ml. 5 ml de la solución resultante fue ajustado a pH 3.5 y aplicado a una columna de 8 ml Poros 50 HS (PE biosistemas) equilibrada con 24 ml 0.42 % p/p de ácido cítrico, 40 % p/p 2-propanol, pH 3.5. La elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 2.23 % p/p KCl (0.42 % p/p de ácido cítrico, 40 % p/p 2-propanol, pH 3.5). Diferentes valores máximos y la separación entre la forma truncada y la fracción GLP-1 meta fueron obtenidos.

Ejemplo 21:

[0127] Arg34GLP-1(7-37) fue aislado del caldo de fermentación por cromatografía de fase convencional inversa y precipitado como se describe en el ejemplo 13. 10 g del precipitado conteniendo Arg34GLP-1(7-37) y la forma truncada, Arg34GLP-1(9-37), como una de varias impurezas fue suspendida en 500 ml de agua y disuelta por ajuste a pH a 8,3 a una concentración de Arg34GLP-1(7-37) de aproximadamente 1,6 mg/ml. 5 ml de la solución resultante fue ajustada a pH 3,5 y aplicada a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham farmacia Biotech) equilibrada con 60 ml 0,42 % p/p de ácido cítrico, 40 % p/p de 2-methyl-2,4-pentanediol, pH 3,5. Elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 2,23 % p/p KCl (0,42 % p/p ácido cítrico, 40 % p/p 2-methyl-2,4-pentanediol, pH 3,5). Un cromatograma se muestra en la figura 13. Diferentes valores máximos y la separación entre la forma truncada y la fracción de GLP-1 meta fueron obtenidos.

Ejemplo 22:

[0128] Arg34GLP-1(7-37) fue aislado del caldo de fermentación por cromatografía de fase convencional inversa y precipitado como se describe en el ejemplo 13. El precipitado fue disuelto en agua y purificado por cromatografía de intercambio de cationes que usa un modificador orgánico seguido por una etapa de cromatografía de fase convencional inversa en etanol. El Arg34GLP-1(7-37) purificado del eluato de fase inversa fue precipitado al pl de Arg34GLP-1(7-37). Arg34GLP-1(7-37) fue acilado como se describe en WO 9808871.

[0129] La solución resultante conteniendo Arg34GLP-1(7-37) mono-acilado en una concentración de 2 mg/ml, y Arg34GLP-1(7-37) y Arg34GLP-1(7-37) di-acilado como impurezas, fue diluido con 3 volúmenes de agua. 5 ml de la solución diluida con pH 6.9 fueron aplicados a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham farmacia Biotech) equilibrada con 60 ml 0.42 % p/p de ácido cítrico, 64,5 % p/p de etanol, pH 3.5. La elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 1.30 % p/p KCl (0.42 % p/p de ácido cítrico, 64,5 % p/p de etanol, pH 3.5). Un cromatograma se muestra en la figura 14. Los

componentes de GLP-1 eluidos como diferentes valores máximos y la separación entre las tres fracciones GLP-1 se obtuvo.

5 [0130] El análisis RP-HPLC para la identificación/verificación de valores máximos recogidos se efectuó en una columna (Fuji-Davison) de 4.0x250 mm en sílice 100 A sustituida por dimetil-silil dimetil-butil, con partículas de 5 µm. El tampón A
consistente en 0.15 M (NH₄)₂SO₄ en 7.8 % (p/p) de acetonitrilo, pH 2.5, y el tampón B conteniendo 63.4 % (p/p) de
acetónitrilo. El programa de gradiente a una velocidad de flujo de 1 ml/min fue de la siguiente manera: gradiente lineal de
35-57.5 % B en 10 min, gradiente lineal de 57.5-67.5 % B en 22 min, gradiente lineal de 67.5-90 % B en 3 min, isocrático al
10 90 % B en 5 min, gradiente lineal de 90-35 % B en 2 min, e isocrático al 35 % B en 5 min. La temperatura cromatográfica fue
mantenida a 60°C y una detección de rayos UV fue realizada a 214 nm. Los cromatogramas analíticos verificaron la
separación de las tres fracciones de GLP-1.

Ejemplo 23:

15 [0131] Arg34GLP-1(7-37) fue aislado del caldo de fermentación por cromatografía de fase convencional inversa y
precipitado como se describe en el ejemplo 13. El precipitado fue disuelto en agua y purificado por cromatografía de
intercambio de cationes que usa un modificador orgánico seguido por una etapa de cromatografía de fase convencional
inversa en etanol. El Arg34GLP-1(7-37) purificado del eluato de fase inversa fue precipitado al pl de Arg34GLP-1(7-37).
Arg34GLP-1(7-37) fue acilado como se describe en WO 9808871.

20 [0132] La solución resultante conteniendo Arg34GLP-1(7-37) mono-acilado en una concentración de 2 mg/ml, y Arg34GLP-
1(7-37) y Arg34GLP-1(7-37) di-acilado como impurezas, fue diluida con 3 volúmenes de agua. 5 ml de la solución diluida
con pH 6.9 fue aplicada a una columna de 20 ml Source 30S (Amersham pharma Biotech) equilibrada con 60 ml 0.42 %
p/p de ácido cítrico, 40 % p/p de 2-propanol, pH 3.5. La elución fue realizada con un gradiente de sal lineal de 0 a 2.23 % p/p
25 KCl (0.42 % p/p de ácido cítrico, 40 % p/p de 2-propanol, pH 3.5). La separación entre las tres fracciones de GLP-1 se
obtuvo.

[0133] El método de análisis RP-HPLC del ejemplo 22 fue usado para la identificación/verificación de valores máximos
recogidos.

REIVINDICACIONES

1. Proceso de cromatografía de intercambio de cationes para la depuración de un péptido GLP-1 de una mezcla comprendiendo dicho péptido GLP-1 y las impurezas relacionadas, que comprende la etapa de:
 - 5 separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que consiste esencialmente en un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en un componente de sal y/o con un gradiente del pH lineal o de escalonado o a un valor del pH constante, donde el gradiente del pH o del valor del pH debería estar en el rango donde dicho péptido GLP-1 tiene una carga neta global o positiva local diferente de la red local o global positiva de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas;
 - 10 donde el modificador orgánico se selecciona de alcohol C1-6 y de glicol C2-6; y
 - 15 donde las impurezas relacionadas son impurezas que tienen una carga neta global o diferente local y son seleccionadas del grupo que consiste en formas truncadas, formas extendidas, formas con aminoácidos extra, derivados, ésteres, formas desamidadas, formas incorrectamente plegadas, formas con glicosilación indeseada y formas con sialilación.

2. Proceso de cromatografía de intercambio aniónico para la depuración de un péptido GLP-1 de una mezcla comprendiendo dicho péptido GLP-1 y las impurezas relacionadas, que comprende la etapa de:
 - 20 separar dicho péptido GLP-1 y dichas impurezas relacionadas de dicha mezcla por elución en una solución que consiste esencialmente en un modificador orgánico, agua, opcionalmente un componente de sal, y opcionalmente un tampón, con un gradiente lineal o escalonado o isocráticamente en un componente de sal y/o con un gradiente de pH lineal o escalonado o a un valor de pH constante, donde el gradiente de pH o el valor de pH debería estar en el rango donde dicho péptido GLP-1 tiene una carga neta global o negativa local diferente de la carga neta local o global negativa de dichas impurezas relacionadas para eliminar dichas impurezas relacionadas;
 - 25 donde el modificador orgánico se selecciona de alcohol C1-6 y glicol C2-6; y
 - 30 donde las impurezas relacionadas son impurezas que tienen una carga neta global o diferente local y son seleccionadas del grupo que consiste en formas truncadas, formas extendidas, formas con aminoácidos extra, derivados, ésteres, formas desamidadas, formas incorrectamente plegadas, formas con glicosilación indeseada y formas con sialilación.

3. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 2, donde dicho péptido GLP-1 a purificar se selecciona de GLP-1 (7-37), GLP-1 (7-36) amida, Arg34GLP-1 (7-37); Arg26GLP-1 (7-37); Arg34Lys26(Nε-(γ-Glu-(Nα-tetradecanoil)))GLP-1 (7-37); Arg34Lys26(Nε-(γ-Glu-(Nα-hexadecanoil)))GLP-1 (7-37); Arg26Lys34(Nε-(γ-Glu-(Nα-tetradecanoil)))GLP-1 (7-37); Arg26Lys34(Nε-(γ-Glu-(Nα-hexadecanoil)))GLP-1 (7-37); Val8GLP-1(7-37); Thr8GLP-1(7-37); Met8GLP-1 (7-37); Gly8GLP-1 (7-37); Val8GLP-1 (7-36) amida; Thr8GLP-1 (7-36) amida; Met8GLP-1(7-36) amida; y Gly8GLP-1(7-36) amida

4. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 3, donde la proporción del modificador orgánico con agua en una base de porcentaje en peso es de 1:99 a 99:1.

5. Proceso según la reivindicación 4, donde la proporción del modificador orgánico con agua en una base de porcentaje en peso es de 30:70 a 70:30.

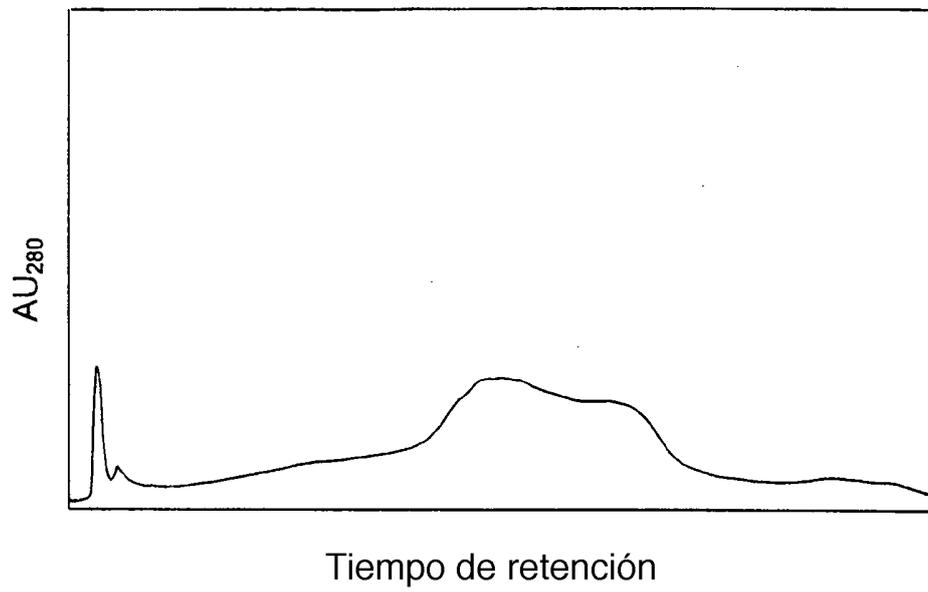
6. Proceso según la reivindicación 4, donde la proporción del modificador orgánico con agua en una base de porcentaje en peso es de 35:50 a 50:35.

7. Proceso según la reivindicación 4, donde la proporción del modificador orgánico con agua en una base de porcentaje en peso es de 40:50 a 50:40.

8. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 7, donde el modificador orgánico se selecciona de alcohol C1 -6 y glicol de hexileno.

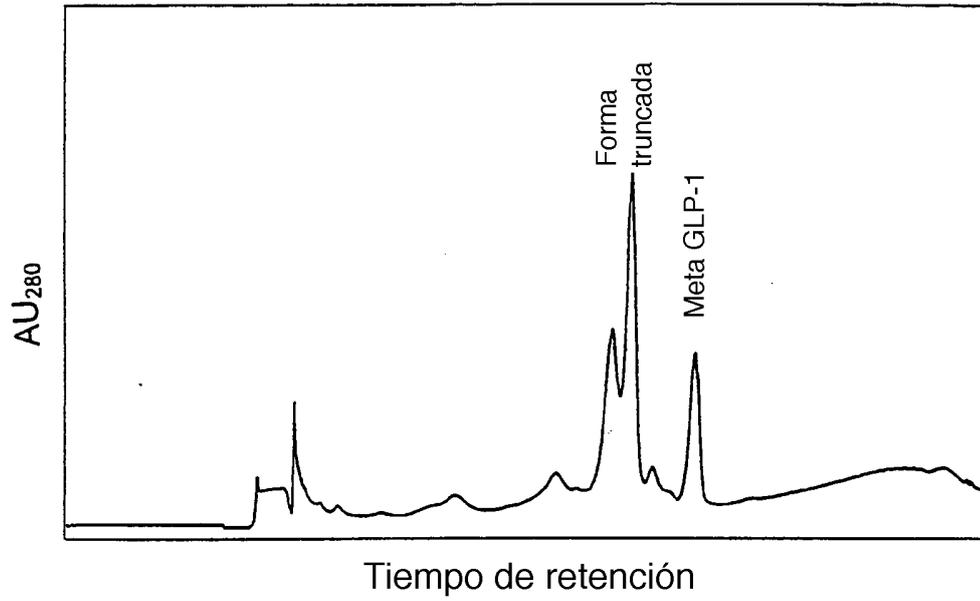
9. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 8, donde el modificador orgánico es alcohol C1-6.

10. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 8, donde el modificador orgánico es glicol de hexileno.



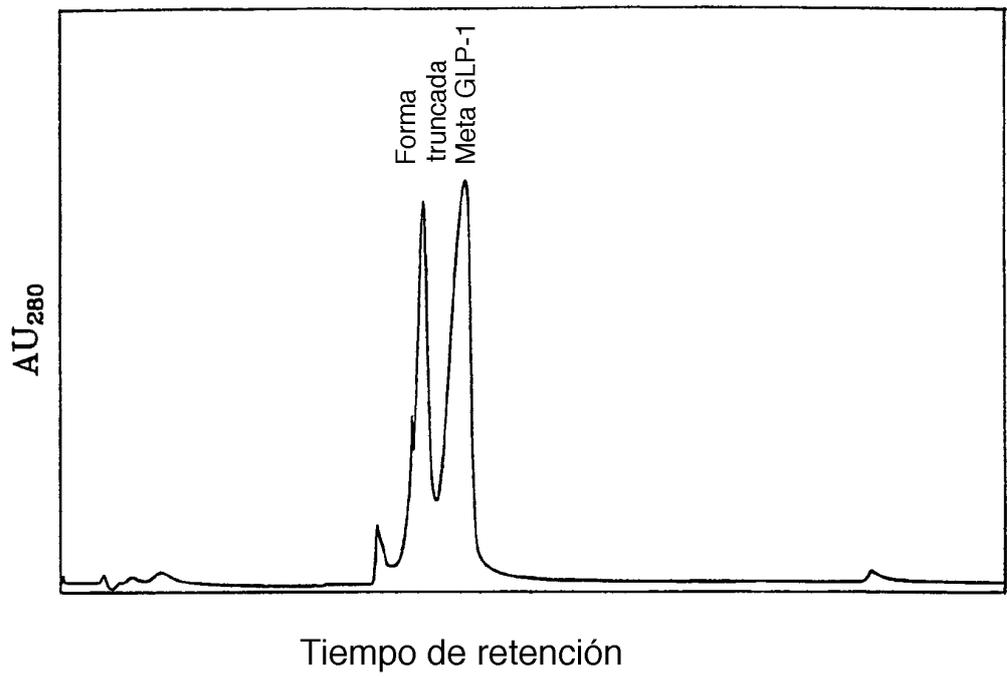
Cromatograma del ejemplo 1

Fig 1



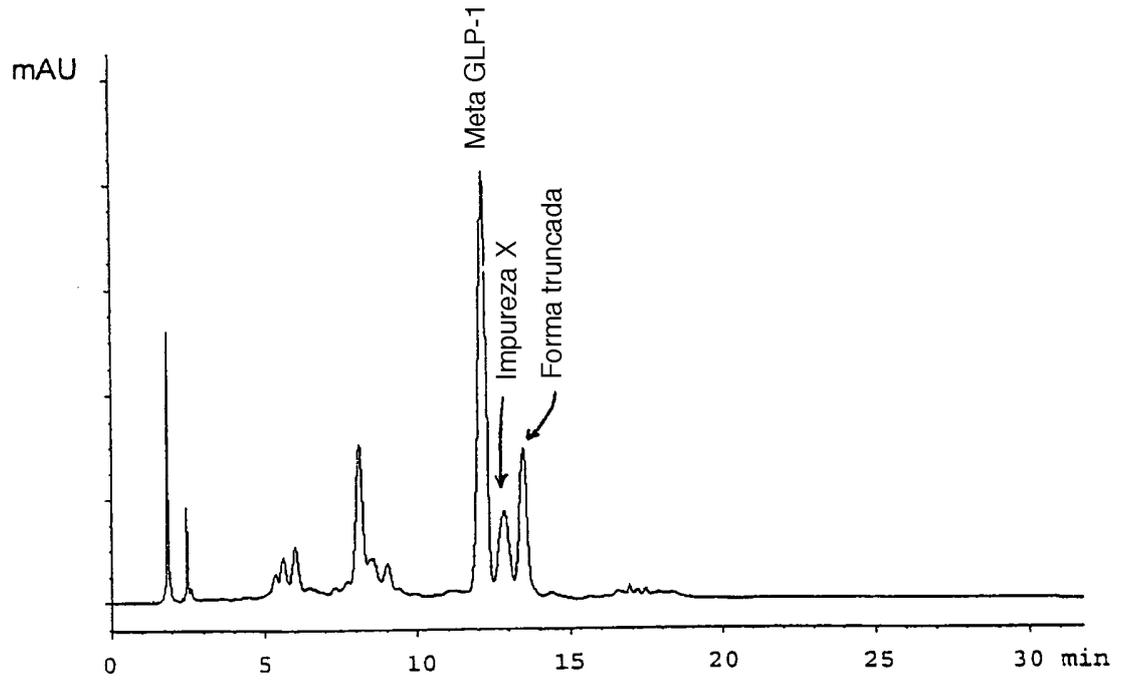
Cromatograma del ejemplo 4

Fig. 2



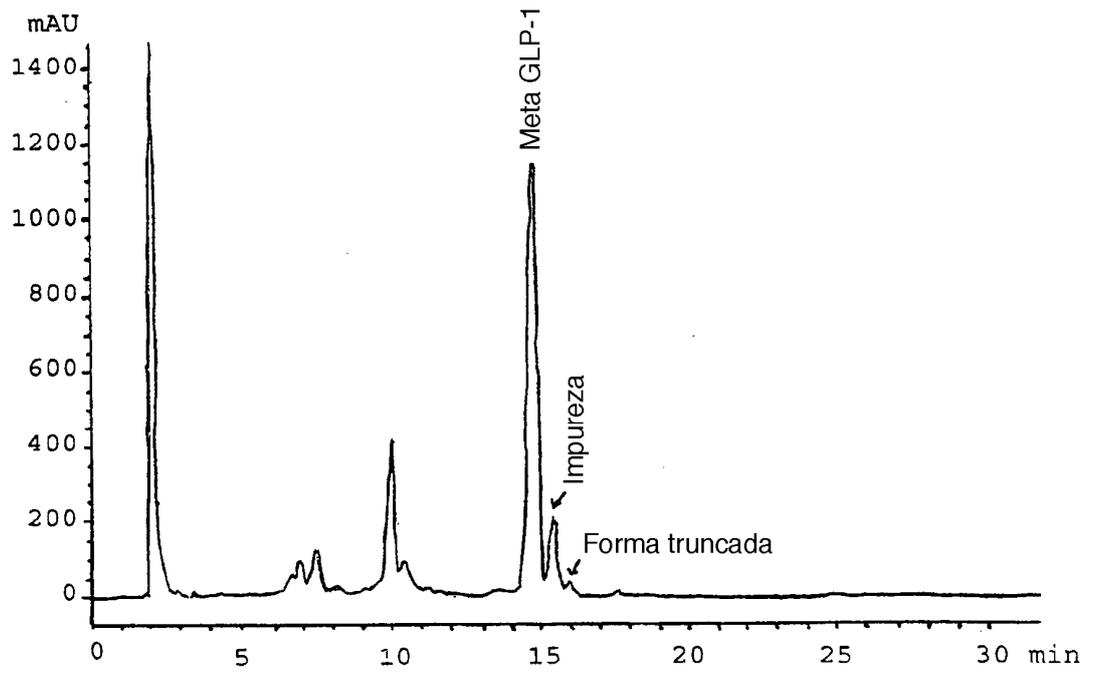
Cromatograma del ejemplo 5

Fig. 3



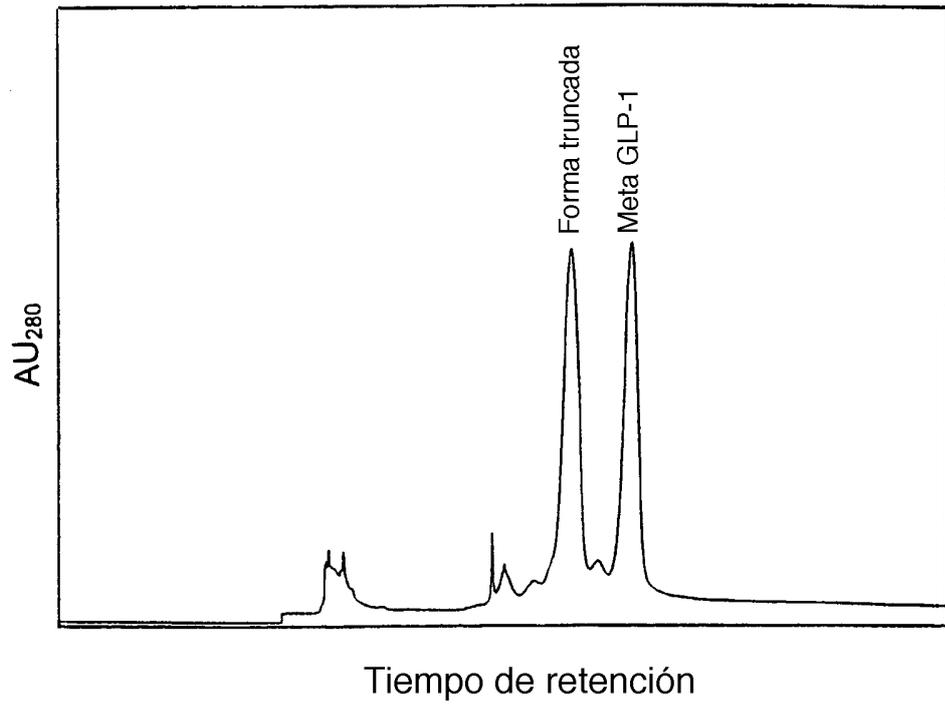
Cromatograma analítico del ejemplo 5. Muestra para aplicación

Fig. 4



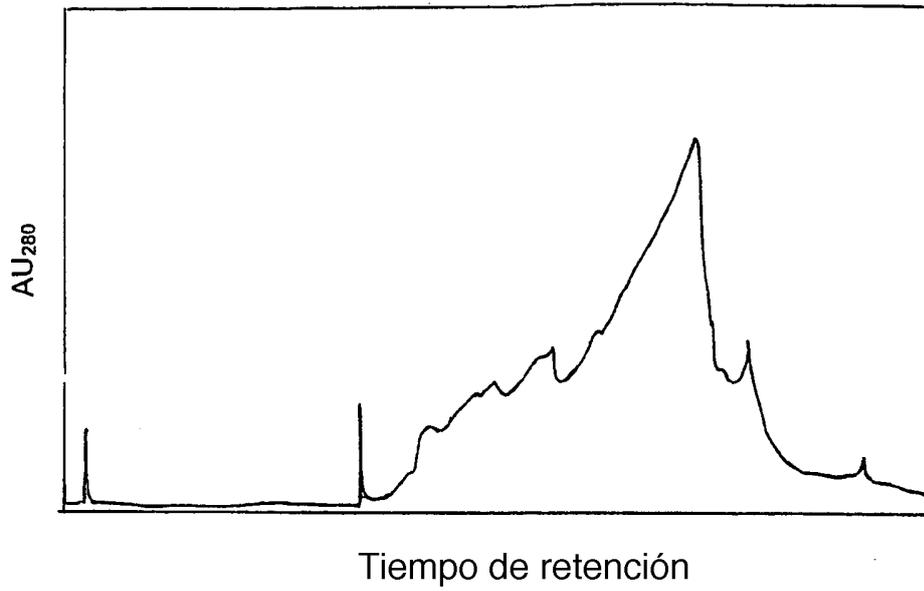
Cromatograma del ejemplo 5. Eluato

Fig. 5



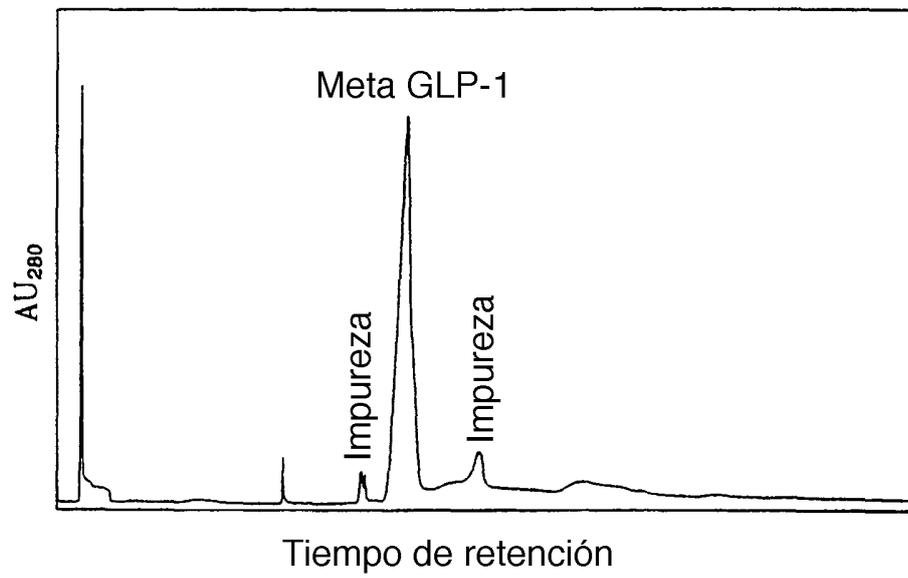
Cromatograma del ejemplo 6.

Fig. 6



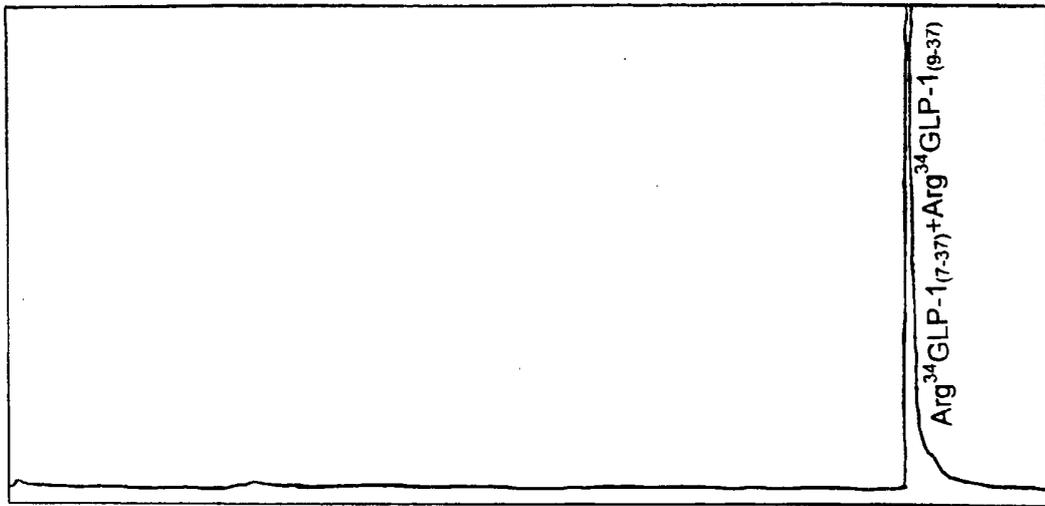
Cromatograma del ejemplo 10.

Fig. 7



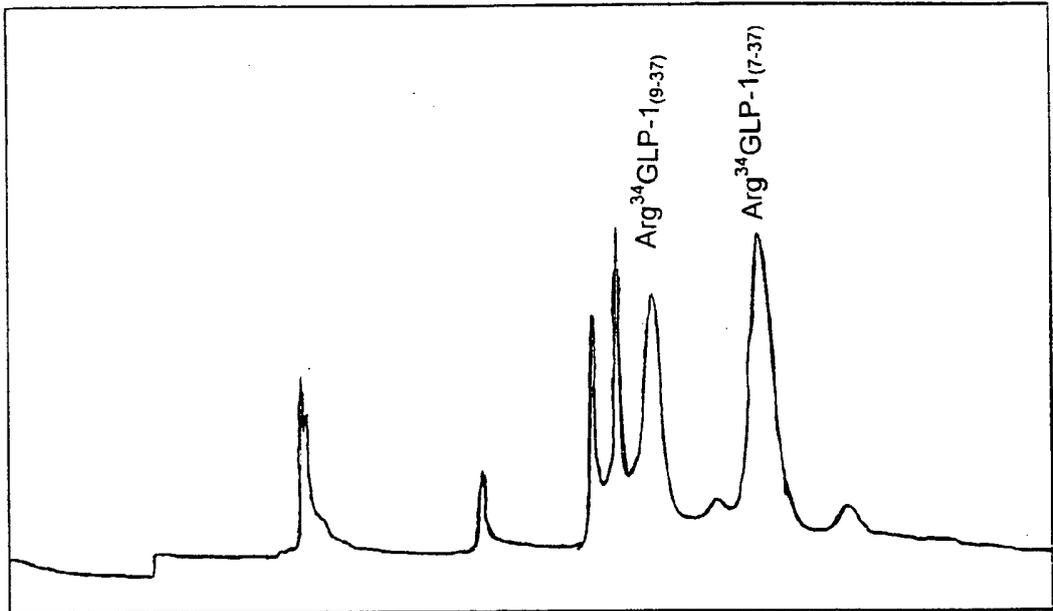
Cromatograma del ejemplo 11.

Fig. 8



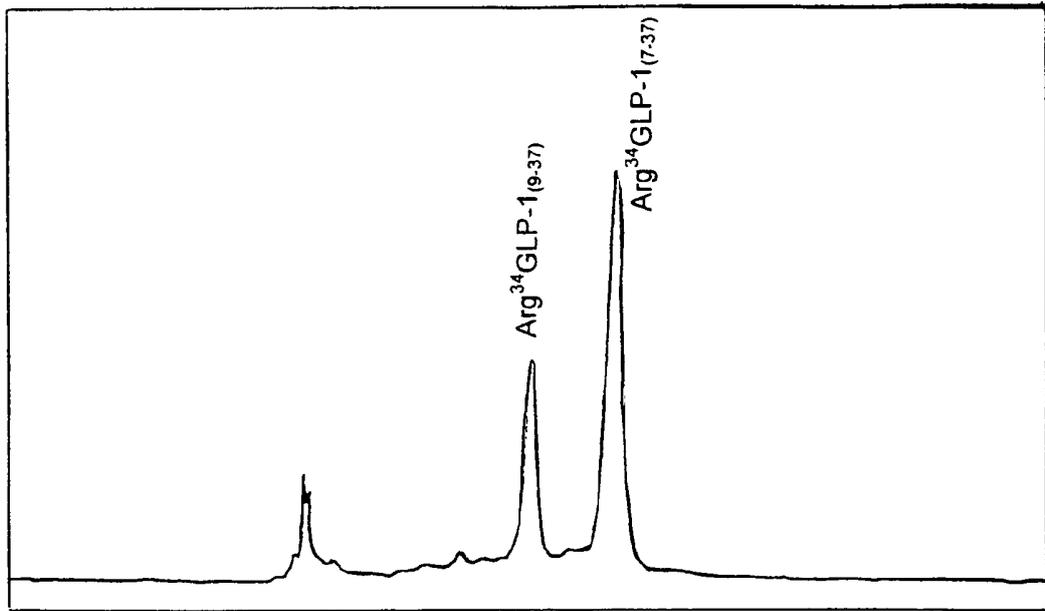
Cromatograma del ejemplo 13.

Fig. 9



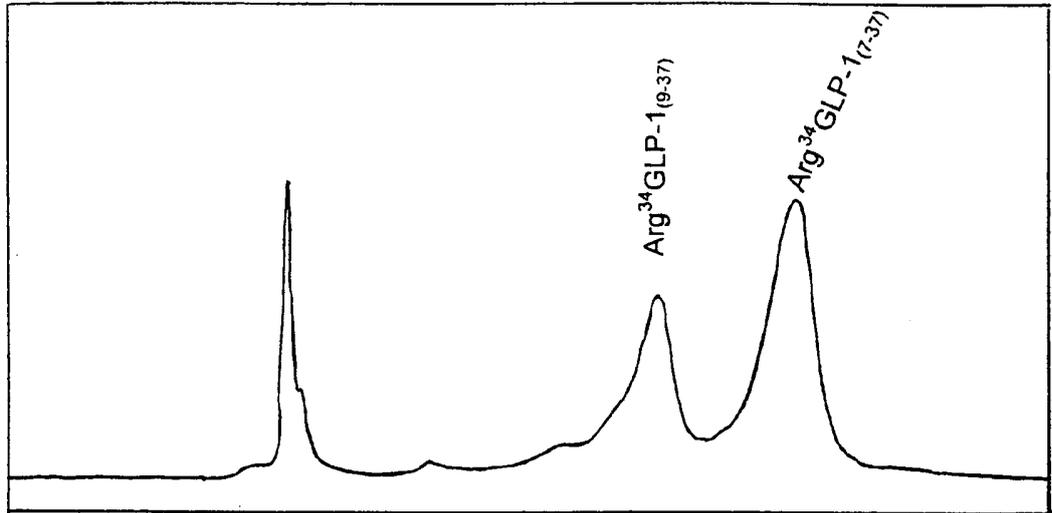
Cromatograma del ejemplo 17.

Fig. 10



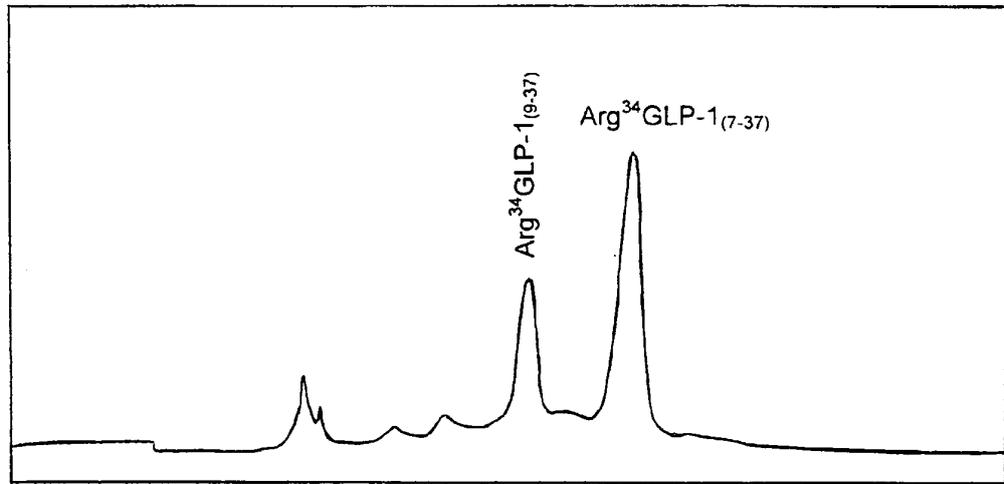
Cromatograma del ejemplo 18.

Fig. 11



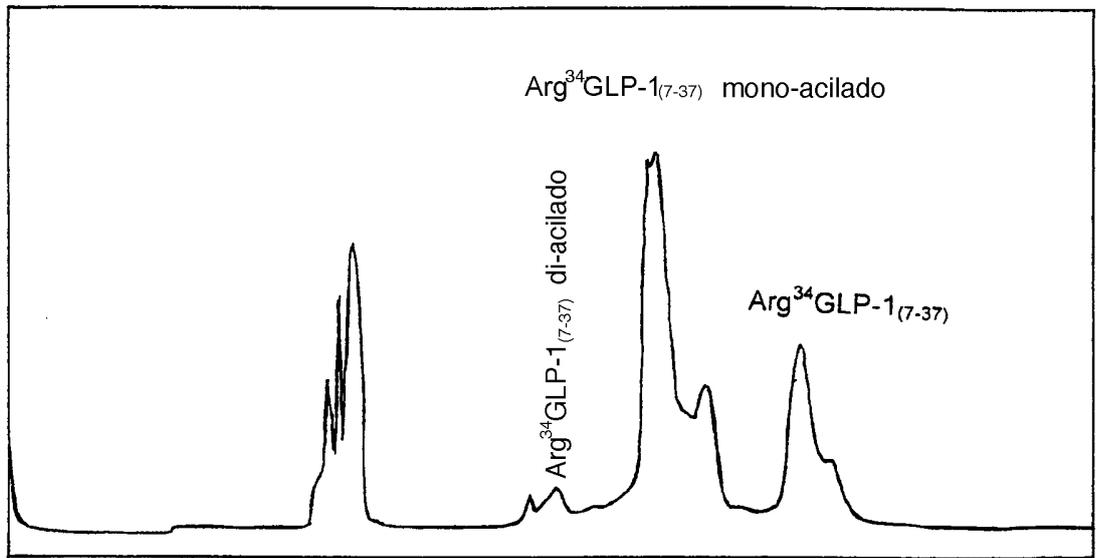
Cromatograma del ejemplo 19.

Fig. 12



Cromatograma del ejemplo 21.

Fig. 13



Cromatograma del ejemplo 22.

Fig. 14