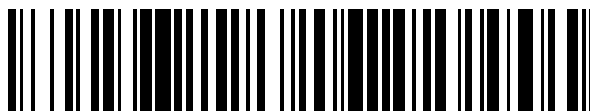


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 185**

51 Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2016** **PCT/CN2016/098844**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.03.2017** **WO17050157**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2016** **E 16848039 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020** **EP 3321279**

54 Título: **Modificador de exenatida y uso del mismo**

30 Prioridad:

25.09.2015 CN 201510619012

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

24.07.2020

73 Titular/es:

BRIGHTGENE BIO-MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)
Building C25, No. 218 Xinghu Street, BioBay
Suzhou Industrial Park, Suzhou
Jiangsu 215123, CN

72 Inventor/es:

YUAN, JIANDONG;
HUANG, YANGQING;
SONG, YUNSONG y
YUAN, FANG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 775 185 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

Modificador de exenatida y uso del mismo

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo de los péptidos terapéuticos, en particular, a modificadores de exenatida, a una composición farmacéutica que contiene la misma y al uso de los modificadores y de la composición en el tratamiento de enfermedades asociadas con el glucometabolismo.

Antecedentes de la invención

La exenatida (o Exendina-4, nombre comercial Byetta) es un polipéptido de 39 aminoácidos con un peso molecular de 4186,6, cuya fórmula molecular es $C_{184}H_{282}N_{50}O_{60}S$, y la secuencia de aminoácidos es:

- 10 His-Gly-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Leu-Ser-Lys-Gln-Met-Glu-Glu-Glu-Ala-Val-Arg-Leu-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Lys-Asn-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-NH₂; que producen y venden Amylin Pharmaceuticals y Eli Lilly company (Eli Lilly and Company). La FDA aprobó la exenatida en abril de 2005, que pertenece a una preparación de inyección subcutánea, con efectos de promoción de la secreción de insulina dependiente de glucosa, recuperación de la secreción de insulina de la primera fase, inhibición de la secreción de glucagón, ralentizamiento del vaciado de los contenidos gástricos, mejora de la función de las células β pancreáticas y similares, es muy útil en el tratamiento de la diabetes tipo II, por ejemplo, para mejorar y controlar la glucosa en sangre de pacientes con diabetes tipo II que no son ideales cuando se tratan con fármacos de metformina y sulfonilurea.

- 20 La exenatida es una forma sintética de la hormona, exendina-4, en la saliva del lagarto *Heloderma suspectum* (monstruo de Gila) que crece en varios estados en el suroeste de Estados Unidos (J. Biol. Chem. 1990, 265, 20259-20262; J. Biol. Chem. 1992, 267, 7402-7405), que es un análogo del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), cuya secuencia de aminoácidos está solapada parcialmente con la secuencia de aminoácidos de GLP-1, que es un potente agonista del receptor de GLP-1, y también se conoce como agonista de incretina, ya que imita el efecto de regulación de la glucosa del GLP-1. A diferencia de las sulfonilureas y las meglitinidas, la exenatida solo aumenta la síntesis y secreción de insulina en presencia de glucosa, lo que reduce el riesgo de hipoglucemia. Algunos médicos usarán también Byetta en el tratamiento de resistencia a la insulina.

- 30 Sin embargo, las propiedades tales como corta semivida *in vivo*, mala estabilidad física y química, susceptibilidad a la degradación por medio de varias proteasas *in vivo* son frecuentes en los fármacos de proteínas/polipeptídicos, de modo que estos fármacos requieren con frecuencia múltiples inyecciones al día, lo que supone mucho dolor y molestias a los pacientes. La PEGilación surgida en los años 1970 ha demostrado ser una tecnología adecuada para el campo de la administración actual de proteínas/polipéptidos. Sin embargo, después de modificarlos usando simplemente PEG, en términos generales, la actividad de los fármacos descenderá.

- 35 Se ha usado una serie de diferentes métodos para modificar la estructura de los análogos de GLP-1, para proporcionar una duración mayor de acción *in vivo*. El documento CN1384755 describe preparaciones innovadoras de agonistas de exendina y sus métodos de dosificación, que describe la estructura del compuesto de exenatida y su preparación. El documento CN102532303 describe el método para sintetizar conjugado de exenatida con polietilenglicol, al conjugar el residuo de metoxi polietilenglicol con el amino del residuo de lisina en la molécula de exenatida o el amino del residuo de histidina en el N-terminal; el documento CN101980725 describe la estructura de ácido graso-PEG-exenatida, con el sitio de modificación de PEG en el N-terminal de His; las publicaciones internacionales WO2005028516 y WO2012035139 describen también la estructura de ácido graso-PEG-exenatida. La patente china CN101215324 describe un péptido mimético de un péptido de exenatida corto que se obtiene de la restructuración de exenatida. La patente china CN101125207 documenta la modificación de PEG con Exendina-4. La publicación internacional WO99/43708 describe los derivados de GLP-1 (7-35) y de GLP-1 (7-36) con sustituyentes lipofílicos unidos a los residuos de aminoácidos en el C-terminal. La publicación internacional WO2013059323A1 describe una exenatida conjugada con PEG y su preparación.

- 45 El documento CN102397558 describe el uso de PEG o modificación de PEG con sustitución de metilo en el extremo, después de sustituir algunos aminoácidos en exendina-4 por cisteína. El documento CN102421796 describe que uno o más polietilenglicoles polimerizan a la cisteína de variantes de exendina, describe una exenatida en la que un aminoácido se sustituye con una cisteína y, a continuación, se modifica con polietilenglicol en la cisteína. El documento CN102827270 describe un derivado de exendina-4-Cys-PEG, que introduce específicamente una cisteína en el C-terminal del área inactiva de la molécula de exenatida, y que se acopla con maleimida polietilenglicol, en donde termina con metilo en el extremo del polietilenglicol.

- 55 A pesar de que se han realizado estos esfuerzos en muchos aspectos, la exendina-4 que existe actualmente o sus variantes o varias modificaciones aún poseen algunas desventajas, que incluyen la alta frecuencia de dosificación cuando se usan *in vivo*, lo que supone una gran carga en el cuerpo para los pacientes, tanto mental como económica, lo que restringe el cumplimiento de los pacientes e incapacita una aplicación amplia. Sigue existiendo una gran necesidad de análogos activos de GLP-1 de acción prolongada para poblaciones diabéticas, por lo que existe una

necesidad de desarrollar nuevos derivados de exenatida, que sean de larga duración de acción, buena estabilidad, buen efecto hipoglucémico, a la vez que mantienen baja toxicidad y buena actividad.

Compendio de la invención

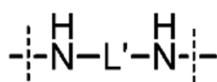
5 La presente invención se dirige a superar las desventajas de los receptores de GLP-1 modificadores de exenatida descritos en la presente invención, con baja fuerza de unión y corta duración de hipoglucemia, lo que provoca, por consiguiente, malos efectos o inyecciones frecuentes en el uso clínico.

10 Los expertos en la técnica saben que, en la molécula bioactiva con un grupo polimérico conjugado, la actividad biológica de la molécula biológica conjugada disminuirá gradualmente de manera exponencial a medida que aumenta el peso molecular del grupo conjugado. Los expertos en la técnica también saben que, a medida que aumenta el peso molecular del grupo polimérico, la semivida biológica y/o semivida en plasma y la exposición sistemática al fármaco de la molécula biológica conjugada se prolongará o aumentará gradualmente.

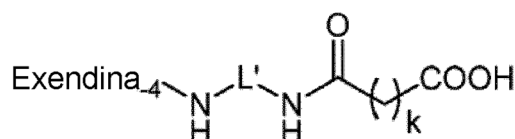
15 Inesperadamente, los expertos en la presente invención han descubierto que, a través de la modificación de exenatida por los expertos en la presente invención, las propiedades farmacocinéticas han mejorado, aumentando por consiguiente la duración de la hipoglucemia. Y, en comparación con la exenatida, las moléculas de la presente invención aún retienen la mayor parte de la actividad de los agonistas del receptor de GLP-1, lo que significa que las moléculas de la presente invención tienen una alta actividad del agonista del receptor de GLP-1, y tienen una duración larga de la hipoglucemia, con la posibilidad de ser fármacos con larga duración de acción, buena estabilidad y buen efecto hipoglucémico en aplicaciones clínicas futuras.

20 Por un lado, la presente invención proporciona un modificador de exenatida de este tipo o sales farmacéuticamente aceptables del mismo que tienen actividad del agonista del receptor de GLP-1, como se muestra en la fórmula (I):

(Ex-4)-L-Y (I)

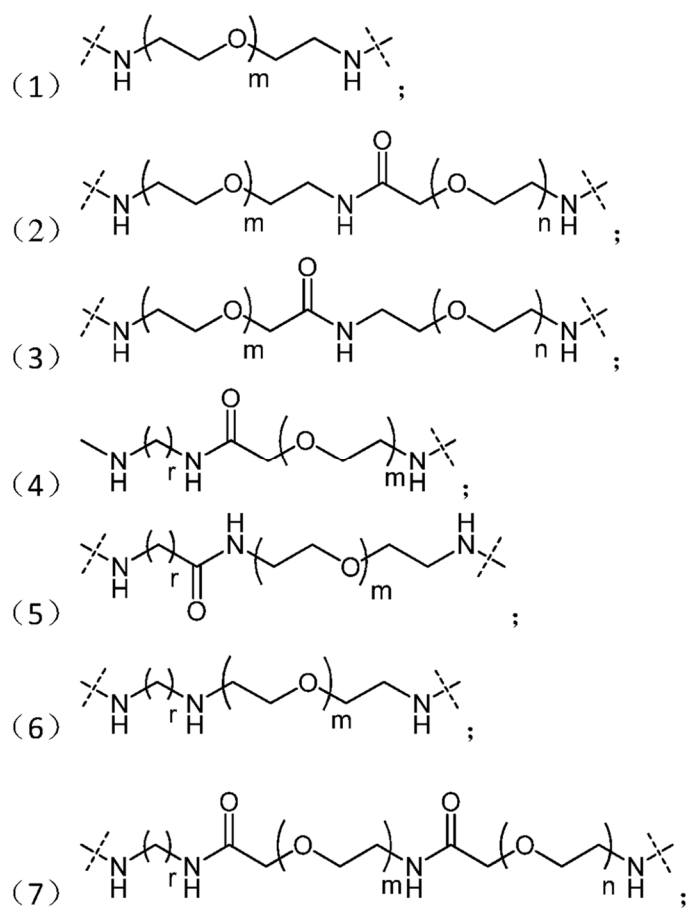


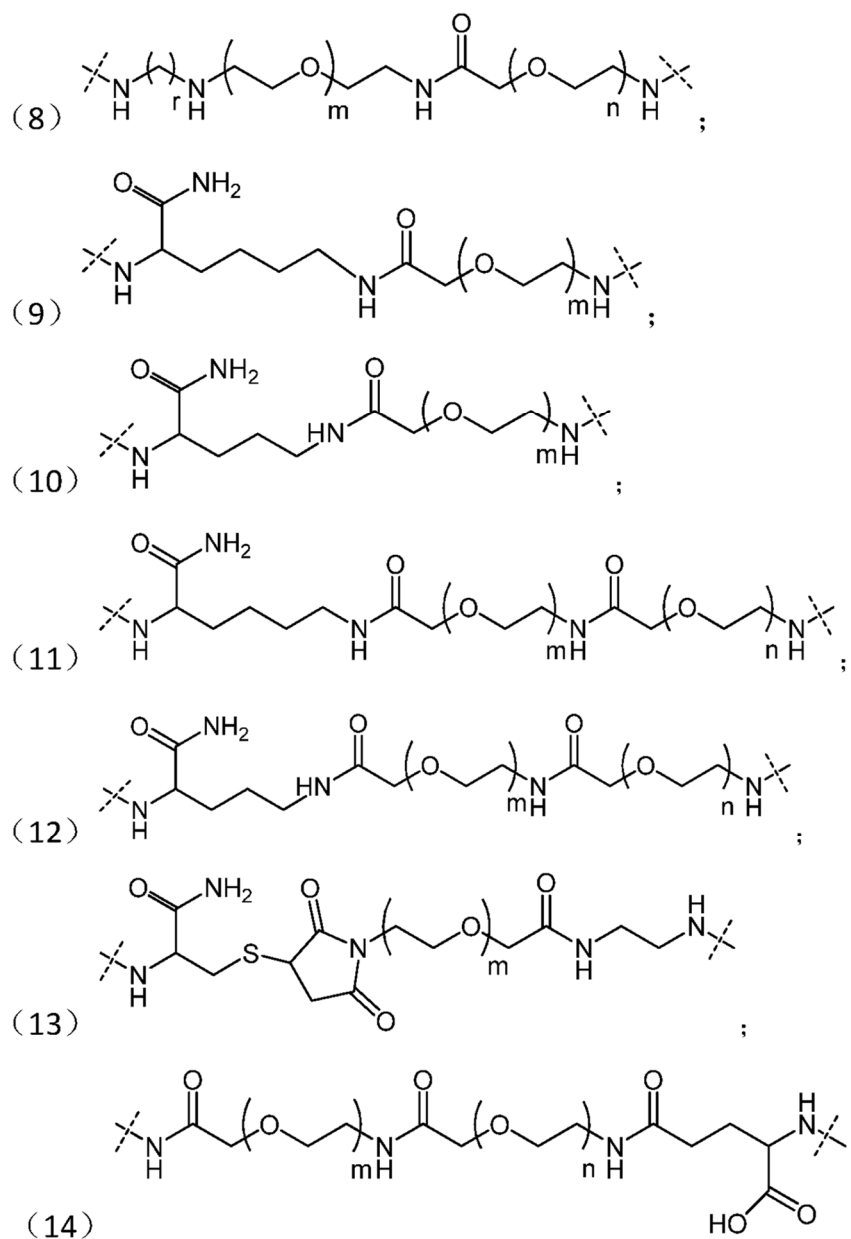
25 en donde, Ex-4 es Exendina-4; L es para conectar Ex-4 con Y; L' es una cadena hidrofílica que contiene un grupo éter; Y es una cadena alifática con un grupo carboxilo terminal, en donde el modificador de exenatida es:



k es cualquier número entero entre 6-20.

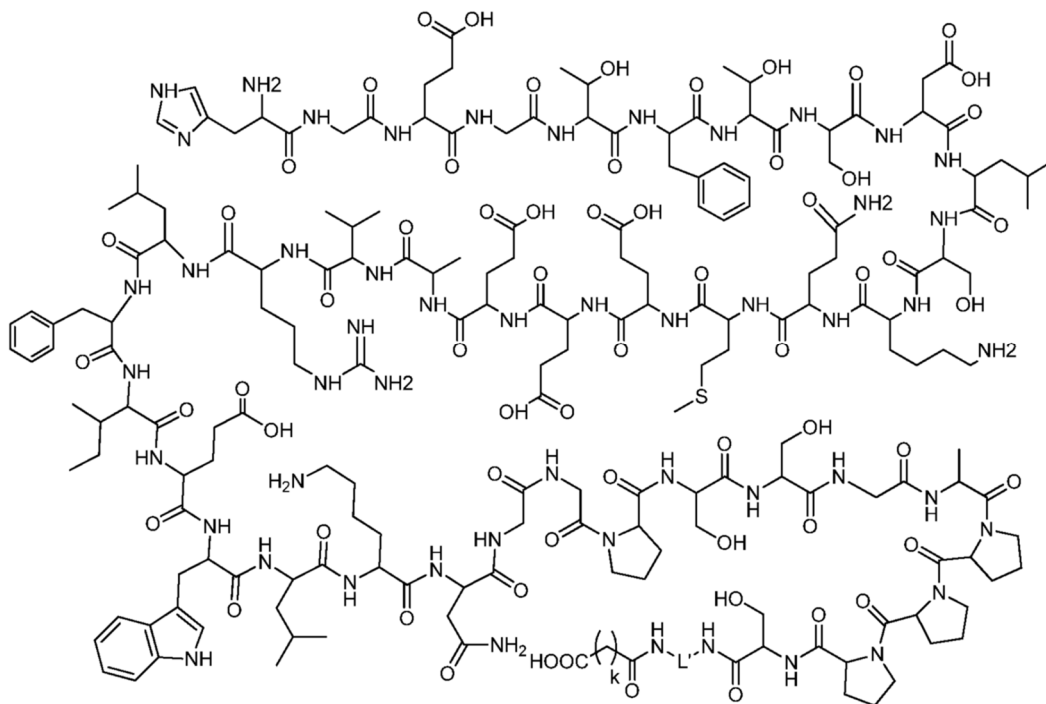
30 Asimismo, en el modificador de exenatida (Ex-4)-L-Y de la presente invención, el brazo L de unión hidrofílico se puede seleccionar de entre:



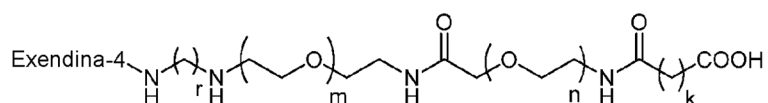
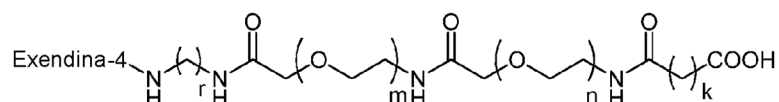
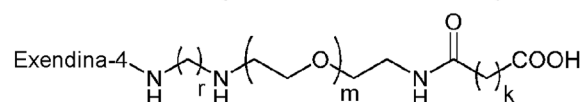
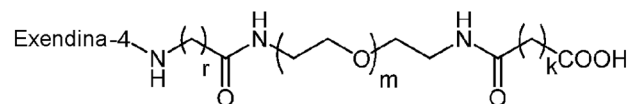
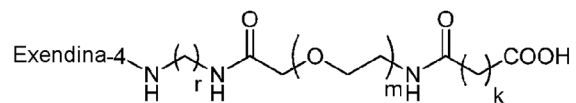
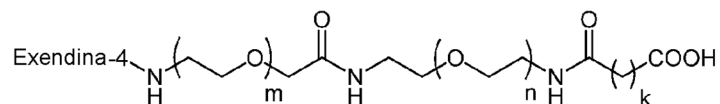
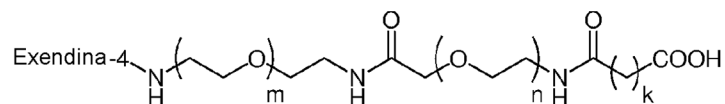
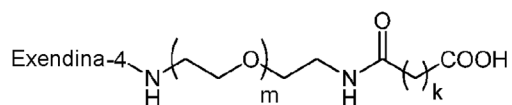


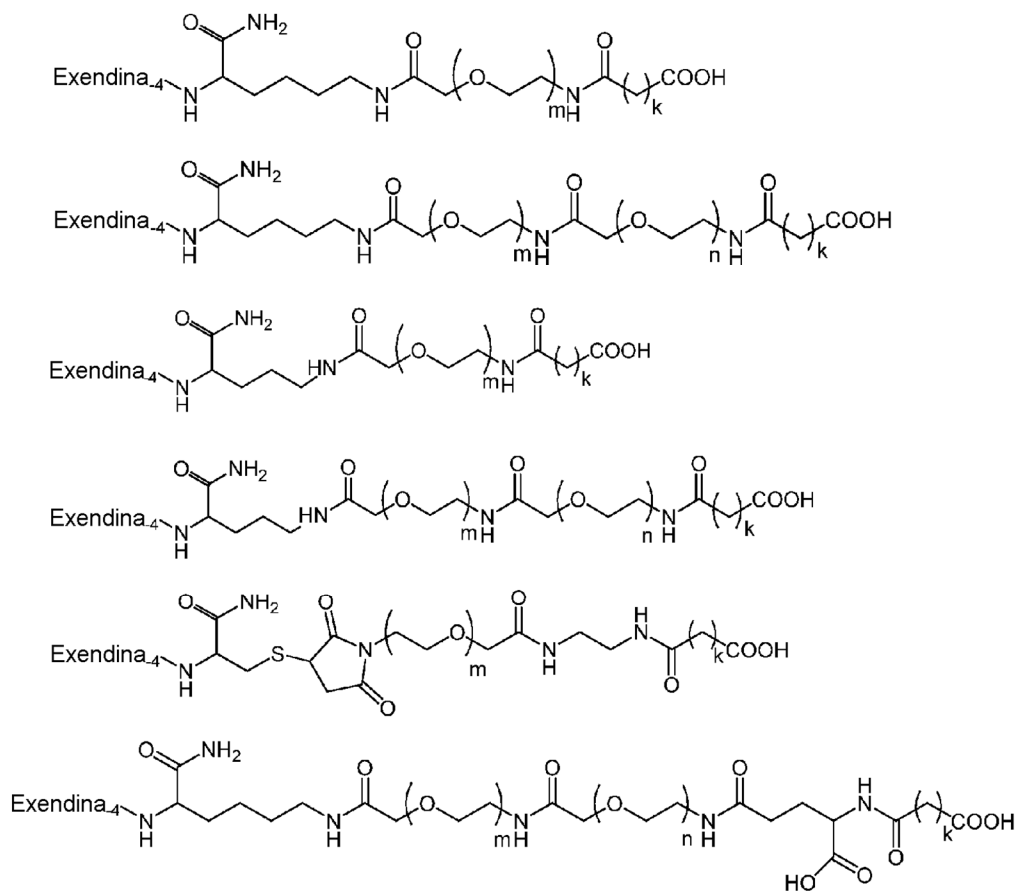
en donde m es cualquier número entero entre 2-20; n es cualquier número entero entre 2-20; r es cualquier número entero entre 1-6.

La estructura específica es la siguiente:



La presente invención proporciona preferiblemente modificadores de exenatida de este tipo:

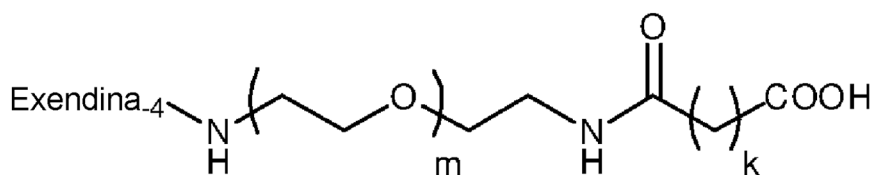




en donde m es cualquier número entero entre 2-20; n es cualquier número entero entre 2-20; r es cualquier número entero entre 1-6; k es cualquier número entero entre 6-20.

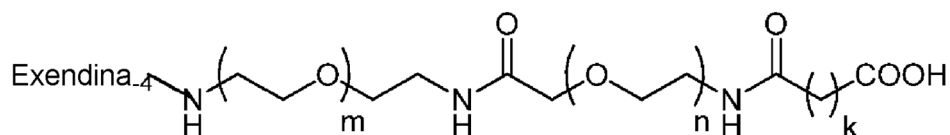
Más específicamente, la presente invención proporciona los siguientes modificadores de exenatida:

5 Serie 1: véanse los Ejemplos 1-5



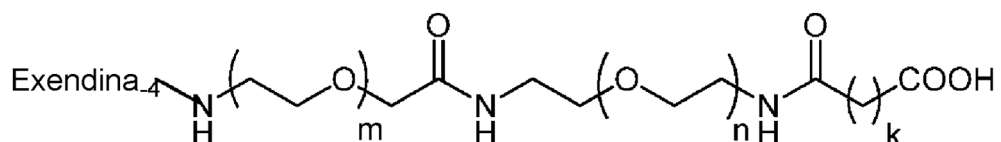
Compuesto	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	Compuesto 5
m	5	2	20	14	10
k	16	20	6	10	14

Serie 2: véanse los Ejemplos 6-10



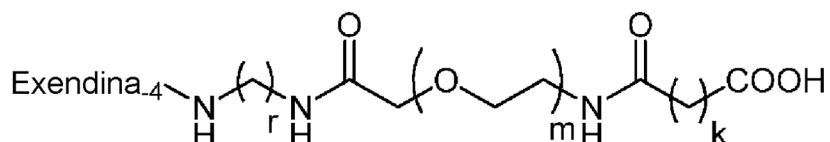
Compuesto	Compuesto 6	Compuesto 7	Compuesto 8	Compuesto 9	Compuesto 10
m	5	2	20	10	11
n	3	7	2	20	15
k	16	20	12	6	10

Serie 3: véanse los Ejemplos 11-15



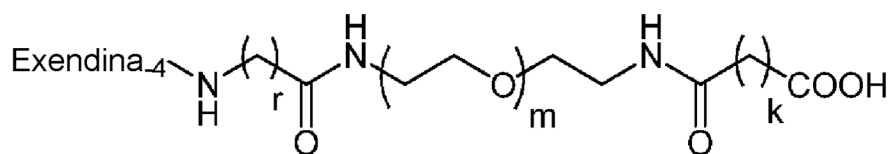
Compuesto	Compuesto 11	Compuesto 12	Compuesto 13	Compuesto 14	Compuesto 15
m	3	2	20	10	11
n	5	9	2	20	15
k	16	20	12	6	10

Serie 4: véanse los Ejemplos 16-20



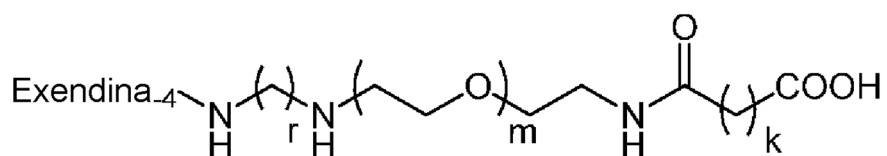
Compuesto	Compuesto 16	Compuesto 17	Compuesto 18	Compuesto 19	Compuesto 20
r	2	3	3	3	6
m	6	2	15	10	20
k	16	18	10	20	6

5 Serie 5: véanse los Ejemplos 21-25



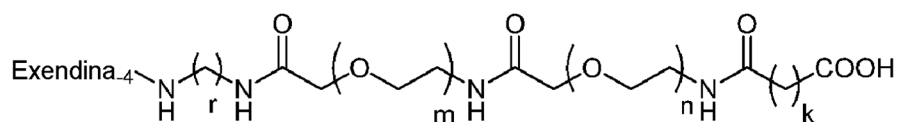
Compuesto	Compuesto 21	Compuesto 22	Compuesto 23	Compuesto 24	Compuesto 25
r	1	2	3	3	6
m	5	2	15	10	20
k	16	18	10	20	6

Serie 6: véanse los Ejemplos 26-30



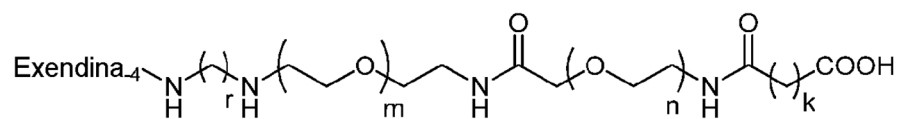
Compuesto	Compuesto 26	Compuesto 27	Compuesto 28	Compuesto 29	Compuesto 30
r	2	2	3	3	6
m	5	2	15	10	20
k	16	14	10	20	6

Serie 7: véanse los Ejemplos 31-35



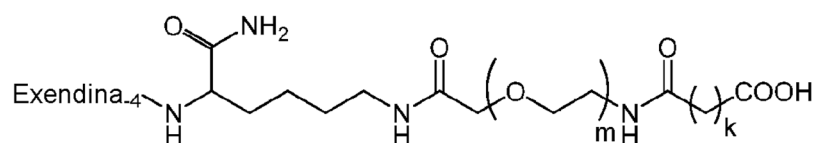
Compuesto	Compuesto 31	Compuesto 32	Compuesto 33	Compuesto 34	Compuesto 35
r	2	2	3	3	6
m	6	2	15	10	20
n	3	20	5	10	2
k	16	14	10	20	6

Serie 8: véanse los Ejemplos 36-40



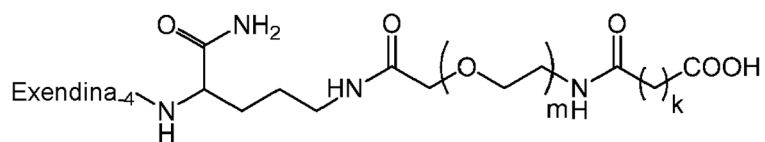
Compuesto	Compuesto 36	Compuesto 37	Compuesto 38	Compuesto 39	Compuesto 40
r	2	2	3	3	6
m	5	2	15	10	20
n	6	20	5	10	2
k	16	14	10	20	6

Serie 9: véanse los Ejemplos 41-45



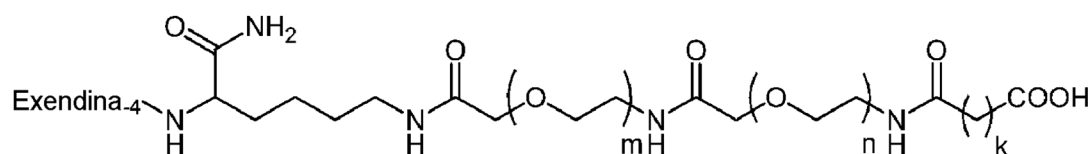
Compuesto	Compuesto 41	Compuesto 42	Compuesto 43	Compuesto 44	Compuesto 45
m	6	2	20	10	15
k	16	14	10	20	6

Serie 10: véanse los Ejemplos 46-50



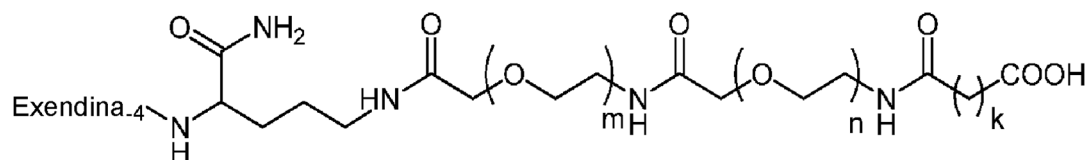
Compuesto	Compuesto 46	Compuesto 47	Compuesto 48	Compuesto 49	Compuesto 50
m	6	2	20	10	15
k	16	14	10	20	6

Serie 11: véanse los Ejemplos 51-55



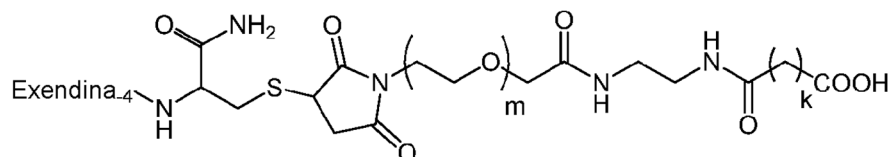
Compuesto	Compuesto 51	Compuesto 52	Compuesto 53	Compuesto 54	Compuesto 55
m	6	2	20	10	15
n	3	9	16	2	20
k	16	14	10	20	6

Serie 12: véanse los Ejemplos 56-60



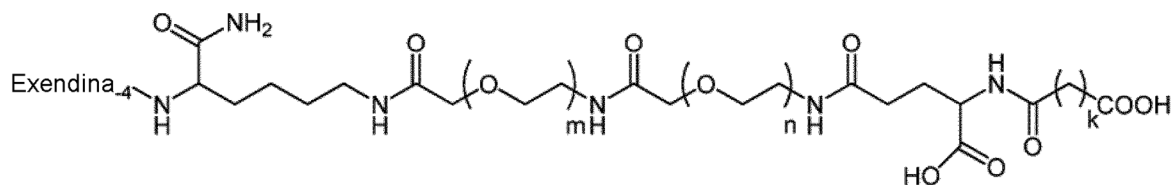
Compuesto	Compuesto 56	Compuesto 57	Compuesto 58	Compuesto 59	Compuesto 60
m	6	2	20	10	15
n	3	9	16	2	20
k	16	14	10	20	6

Serie 13: véanse los Ejemplos 61-66



Compuesto	Compuesto 61	Compuesto 62	Compuesto 63	Compuesto 64	Compuesto 65	Compuesto 66
m	2	4	5	7	9	10
k	20	10	16	8	16	6

Serie 14: véase el Ejemplo 67



m=6; n=3; k=16

En la presente memoria, también se analiza el uso del modificador de exenatida o sales farmacéuticamente aceptables del mismo en la preparación de fármacos que cumplen la función de un agonista del receptor de GLP-1 y un uso en la preparación de fármacos para prevenir y/o tratar enfermedades y/o síntomas asociados con baja actividad del receptor de GLP-1. La presente invención también proporciona los modificadores de exenatida descritos anteriormente para su uso en el tratamiento de enfermedades y/o síntomas asociados con el glucometabolismo, su uso en el tratamiento de la diabetes, su uso en el tratamiento de la esteatosis hepática y su uso en un método para perder peso.

En el tercer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un modificador de exenatida o sales farmacéuticamente aceptables del mismo y, opcionalmente, vehículos farmacéuticamente aceptables.

En la presente memoria, también se describe el uso de la composición descrita anteriormente en la preparación de fármacos que cumplen la función de un agonista del receptor de GLP-1 y un uso en la preparación de fármacos para prevenir y/o tratar enfermedades y/o síntomas asociados con una baja actividad del receptor de GLP-1. La presente invención también proporciona la composición descrita anteriormente para su uso en el tratamiento de enfermedades y/o síntomas asociados con el glucometabolismo, su uso en el tratamiento de la diabetes, su uso en el tratamiento de la esteatosis hepática y su uso en un método para perder peso.

Los modificadores de exenatida proporcionados en la presente invención no solo poseen alta actividad agonística del receptor de GLP-1, sino también larga duración de hipoglucemia. Esto se ilustra a través de las siguientes pruebas farmacológicas.

Cada muestra de prueba se disolvió respectivamente en agua bidestilada a una concentración final de $1,0 \times 10^{-2}$ mol/l y se almacenó a 4 °C. Las células PC12 se cultivaron en un matraz de cultivo de 25 cm² colocado en la incubadora de CO₂ (37 °C, 95 % de aire y 5 % de CO₂), con el medio de cultivo de DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco, pH=7,4, glucosa alta), en el que se añadieron suero bovino fetal al 5 % y suero equino al 10 %. Las células PC12 crecidas adecuadamente se digirieron con pancreatina al 0,25 %, la concentración celular se ajustó a $1,0 \times 10^5$ células/ml, esparcidas en una placa de 24 pocillos. Cuando las células crecieron a una densidad de un 60-70 %, se lavaron dos veces con PBS (disolución salina tamponada con fosfato) con la adición de PBS que contenía ASB (albúmina de suero bovino) al 1 % por cada 1 ml, y los fármacos de prueba se dividieron respectivamente en 5 gradientes de concentración (10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} mol/l) y se incubaron conjuntamente con IBMX (3-isobutil-1-metilxantina, 100 µmol/l) durante 30 min, se realizaron 3 operaciones de múltiples orificios para cada concentración de las muestras. Una vez que se acabó el tiempo de intervención de los fármacos, las células se recolectaron inmediatamente, se suspendieron con PBS frío, y la concentración celular se ajustó a $1,0 \times 10^7$ /ml. Se añadió inmediatamente un volumen de 1N de HCl a 9 volúmenes de suspensión celular, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se sometió a ultrasonidos con un aparato ultrasónico durante 15 s. Se centrifugó a 4 °C durante 10 min a 1000 rpm para retirar el detritus celular. Se añadió el sobrenadante a 1N de NaOH de volumen igual con 1N de HCl para neutralización (en donde 1N representa un equivalente), la disolución resultante era la disolución de muestra que contenía AMPc, almacenada a -20 °C preparada para detección. Se empleó un kit Non-Interference Protein Assay para detectar la concentración total de proteínas en la muestra. Se detectó el contenido de AMPc en el lisado celular usando el kit ELISA siguiendo las instrucciones del kit, y se determinó el valor de OD (densidad óptica) a 450 nm por medio del lector de microplacas BIO-RAD 680. En función del valor DO del estándar, se empleó el *software* CurveExpert 1.3 para ajustar las curvas y computar la fórmula de la curva estándar y calcular la concentración de cada muestra. Se usaron los programas informáticos Microsoft Excel y GraphPad Prism 5 para el procesamiento de datos y la representación gráfica para calcular EC₅₀ (concentración efectiva media, concentración del 50 % del efecto máximo) de cada fármaco de prueba.

Tabla 1 Efectos de los compuestos en la actividad de AMPc en las células

Compuesto	EC ₅₀	Compuesto	EC ₅₀	Compuesto	EC ₅₀
1	5,879	23	8,014	45	6,204
2	6,423	24	7,963	46	5,674
3	6,174	25	8,257	47	5,916

Compuesto	EC ₅₀	Compuesto	EC ₅₀	Compuesto	EC ₅₀
4	6,075	26	8,019	48	5,705
5	6,278	27	8,742	49	6,342
6	6,346	28	7,878	50	6,154
7	7,217	29	8,042	51	5,341
8	7,064	30	8,173	52	5,462
9	5,974	31	8,425	53	5,674
10	6,127	32	8,053	54	5,553
11	7,236	33	8,172	55	5,697
12	8,042	34	8,345	56	6,247
13	7,578	35	8,296	57	5,969
14	7,642	36	8,247	58	6,374
15	7,539	37	7,942	59	6,545
16	8,742	38	8,296	60	6,278
17	9,416	39	8,472	61	6,212
18	7,753	40	8,257	62	5,774
19	7,942	41	5,554	63	5,692
20	8,363	42	5,872	64	5,726
21	8,567	43	5,742	65	5,948
22	9,642	44	6,117	66	5,970
				67	5,742
Exendina-4	5,096 nmol/l				

Después de la unión, GLP-1 y los receptores de GLP-1 (proteínas de unión de G de la familia de receptores β) activan el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y la ruta de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Los receptores de GLP-1 de células β pancreáticas maduras acopladas con G activan la adenilato ciclasa y producen AMPc, este último, coordinado con glucosa, estimula la síntesis y secreción de insulina, estimula la transcripción de genes de la insulina y la biosíntesis de proinsulina, reduce la concentración de glucagón e inhibe la secreción de glucagón, potencia la sensibilidad de las células a la insulina, estimula la síntesis de glucógeno dependiente de insulina. reduce la concentración postprandial de azúcares en la sangre. Entre más baja es la EC₅₀, mayor es la actividad agonística del receptor de GLP-1 del fármaco.

- 5
- 10 A partir de los resultados de la Tabla 1, se mostró que los compuestos de la presente invención eran comparables con la exenatida en actividad o solo disminuyó ligeramente, lo que indica que las modificaciones en la exenatida en la presente invención no influyen en la actividad agonística del receptor de GLP-1.

Efectos hipoglucémicos en ratones db/db de diabetes tipo 2 espontánea

- 15 Se adquirieron ratones C57BL/6db/db9 (macho) con una edad de 5~6 semanas del Centro de Investigación de Modelos Animales de la universidad de Nanjing, los animales de experimentación se alimentaron en animalarios SPF. Los animalarios estaban bien ventilados, equipados con aire acondicionado, se mantuvo la temperatura a 20~25 °C y la humedad a un 40 %-70 %, con una tasa de ventilación de 10~15 veces/h, luz y oscuridad cada una durante 12 horas. Los animales de experimentación tuvieron libre acceso a comida y agua, y cada ratón se marcó con una marca auricular. Los animales se usaron en el experimento una vez a la semana, durante un periodo no superior a tres semanas. Después de una semana de aclimatación, se determinó la glucosa en sangre capilar en la punta de la cola de los ratones por medio de un glucómetro MAJOR. Se eligieron 340 ratones con un nivel de glucosa en sangre superior a 16,7 mmol/l y se agruparon de manera aleatoria en 68 grupos según el nivel de glucosa en sangre. Se
- 20

5 administraron 5 ml/kg de PBS (pH=7,4) al grupo de control modelo por medio de inyección subcutánea, se administró Exenatida (10 µg/kg, 5 ml/kg) al grupo 1 de control positivo por medio de inyección subcutánea, los compuestos 1-15 (10 µg/kg, 5 ml/kg) se inyectaron por vía subcutánea respectivamente a los grupos de dosificación. Después de la administración, se determinó la glucosa en sangre a las 0, 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 72 horas por medio de un glucómetro, y se introdujeron todos los datos en Graphpad Prism para calcular la glucosa en sangre media. Se calcularon el efecto hipoglucémico máximo (la tasa de reducción máxima en comparación con el grupo modelo), el tiempo hipoglucémico máximo (el último punto temporal en el que la glucosa en sangre disminuyó de manera importante en comparación con el grupo modelo) y el área bajo la curva.

Tabla 2 Efectos hipoglucémicos en ratones db/db de diabetes tipo 2 espontánea (h)

Compuesto	Tiempo hipoglucémico máximo	Compuesto	Tiempo hipoglucémico máximo	Compuesto	Tiempo hipoglucémico máximo
1	36	23	42	45	30
2	36	24	42	46	42
3	30	25	36	47	42
4	36	26	36	48	48
5	42	27	30	49	48
6	36	28	36	50	36
7	42	29	42	51	48
8	42	30	30	52	48
9	36	31	36	53	42
10	36	32	36	54	48
11	30	33	30	55	42
12	42	34	48	56	48
13	36	35	30	57	48
14	30	36	42	58	42
15	36	37	42	59	48
16	36	38	36	60	42
17	42	39	48	61	48
18	42	40	36	62	42
19	48	41	42	63	48
20	30	42	42	64	36
21	48	43	42	65	40
22	48	44	48	66	36
				67	42
Exendina-4			4		

10 A partir de los resultados de la Tabla 2, se mostró que, en comparación con la Exenatida, los compuestos de la presente invención tienen una gran ventaja en términos de mantener el tiempo de hipoglucemia, prolongan el tiempo hipoglucémico máximo de 4 h a 30 h-48 h.

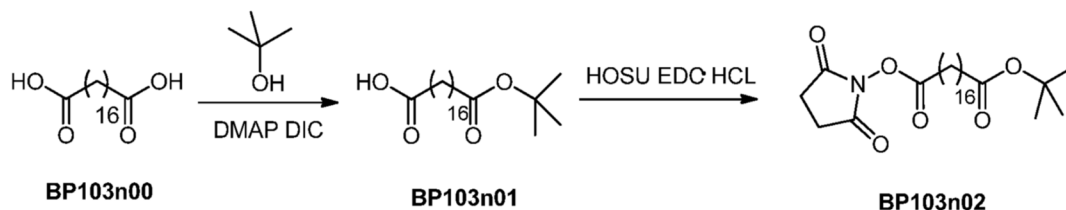
En función de los resultados de las dos pruebas anteriores, los compuestos preferidos de la presente invención son los compuestos 41, 42, 43, 46, 47, 48, 51-63, 65, 67.

En resumen, los modificadores de exenatida de la presente invención son comparables con la exenatida en actividad o solo disminuye ligeramente, retuvieron la mayor parte de la actividad agonística del receptor de GLP-1, y las modificaciones en la exenatida no influyeron en la actividad agonística del receptor de GLP-1. Por otra parte, los modificadores de exenatida de la presente invención tienen una gran ventaja en términos de mantener el tiempo de hipoglucemia, prolongan el tiempo hipoglucémico máximo de 4 h a 30 h-48 h. Las moléculas de la presente invención no solo tienen una alta actividad agonística del receptor de GLP-1, sino que también tienen larga duración de hipoglucemia, con la posibilidad de convertirse en fármacos con acción prolongada *in vivo*, buena estabilidad y buen efecto hipoglucémico en aplicaciones clínicas futuras.

Ejemplos específicos

En la siguiente tabla, se muestran los aminoácidos y sus abreviaturas y nombres cortos en español:

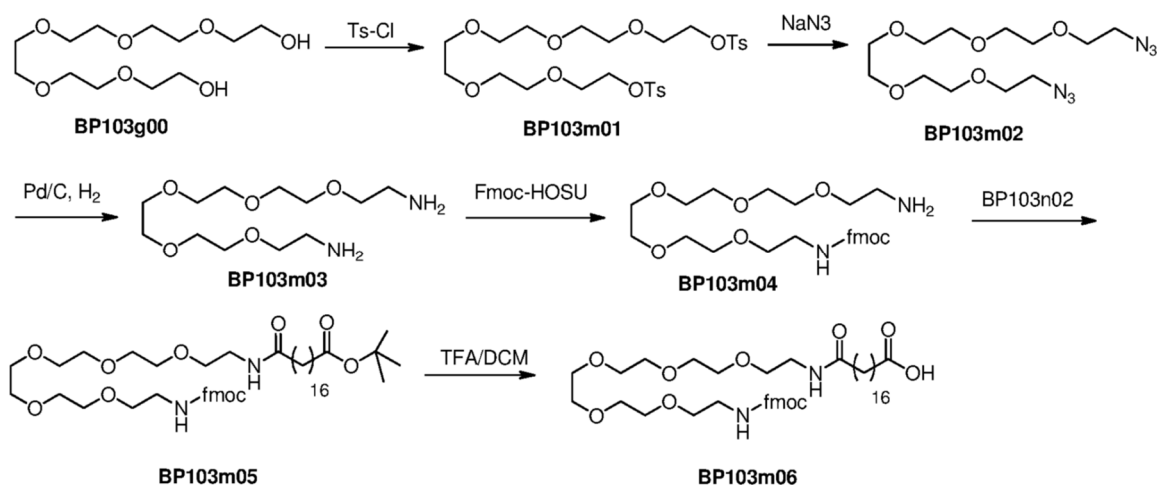
Aminoácidos protegidos requeridos en la síntesis del proceso Fmoc en fase sólida y sus abreviaturas			
Nombre	Aminoácidos protegidos	Abreviaturas de tres letras	Abreviaturas de una única letra
Alanina	Fmoc-Ala-OH	Ala	A
Ácido aspártico	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Asp	D
Ácido glutámico	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Glu	G
Fenilalanina	Fmoc-Phe-OH	Phe	F
Glicina	Fmoc-Gly-OH	Gly	G
Histidina	Fmoc-His(Trt)-OH	His	H
Isoleucina	Fmoc-Ile-OH	Ile	I
Lisina	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Lys	K
Leucina	Fmoc-Leu-OH	Leu	L
Metionina	Fmoc-Met-OH	Met	M
Asparagina	Fmoc-Asn(Trt)-OH	Asn	N
Prolina	Fmoc-Pro-OH	Pro	P
Glutamina	Fmoc-Gln(Trt)-OH	Gln	Q
Arginina	Fmoc-Arg (Pbf)-OH	Arg	R
Serina	Fmoc-Ser(tBu)-OH	Ser	S
Treonina	Fmoc-Thr(tBu)-OH	Thr	T
Valina	Fmoc-Val-OH	Val	V
Triptófano	Fmoc-Trp(Boc)-OH	Trp	W
Tirosina	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	Tyr	Y
Lisina	Fmoc-Lys(Alloc)-OH	Lys	K
Ornitina	Fmoc-Orn(Alloc)-OH	Orn	

Ejemplo 1 Preparación del compuesto 1**Preparación de BP103n01**

Se añadieron 1,0 g del compuesto BP103n00 (1,0 eq, en donde eq representa el equivalente, el mismo a continuación), 10 ml de diclorometano, 10 ml de terc-butanol, 0,40 g de DIC (1,0 eq) y 0,39 g de DMAP (1,0 eq, 4-dimetilaminopiridina) a un matraz de tres bocas de 50 ml. Durante la noche, se agitaron a temperatura ambiente, se monitorizaron por medio de TLC (cromatografía de capa fina) hasta la compleción de la reacción, se diluyeron con éter y, a continuación, se lavaron 3 veces con agua, se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 10,4 g de BP103n0 como un polvo esponjoso.

Preparación de BP103n02

Se añadieron 0,95 g de N-hidroxisuccinimida (HOSU), 2,0 g del compuesto 19 y 15 ml de diclorometano a un matraz de tres bocas de 100 ml, al que se añadieron 1,58 g de EDC•HCl y se hicieron reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se diluyeron con diclorometano y, a continuación, se lavaron 2 veces con 50 mmol/l de disolución acuosa de dihidrógeno fosfato de potasio a un pH=6,0, se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 2,6 g del compuesto BP103n02 como un sólido blanco.

**Preparación de BP103m01**

Bajo la protección de nitrógeno, se añadieron 200 ml de piridina, 50 g de BP103g00 (1,0 eq) a un matraz de tres bocas de 500 ml, se agitaron y se enfriaron hasta 0 °C. Se añadieron de forma discontinua 70,7 g de TsCl (2,1 eq), se agitaron durante 1 h y, a continuación, se calentaron lentamente hasta temperatura ambiente, y se continuó agitando durante 3-4 h. Después de la compleción de la reacción, el líquido de reacción se vertió en la disolución helada de ácido hidrocórico diluido, se extrajo con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lavó una vez con ácido hidrocórico diluido, se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera saturada y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Los disolventes se evaporaron a una presión reducida y se sometieron a cromatografía en una columna de gel de sílice para proporcionar 52 g de BP103m01 puro.

Preparación de BP103m02

Se añadieron 50 g de BP103m01 (1,0 eq) y 150 ml de DMSO (dimetilsulfóxido) a un matraz de tres bocas de 500 ml, se agitaron uniformemente y se añadieron a continuación 22,0 g de NaN₃ (4,0 eq), se calentaron hasta 50 °C y se hicieron reaccionar durante 3 horas, se enfriaron hasta temperatura ambiente. El líquido de reacción se vertió en agua,

se extrajo muchas veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 25,3 g de BP103m02 como un líquido incoloro.

Preparación de BP103m03

- 5 Se añadieron 25 g de BP103m03, 200 ml de metanol, 6,0 g de paladio sobre carbono a un reactor de hidrogenación de 1 l, se agitaron, con nitrógeno reemplazado por medio de la introducción de hidrógeno para hacerlos reaccionar durante 3-4 h. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se filtró el líquido de reacción y el filtrado se concentró para proporcionar 20,4 g de BP103m03 como un aceite.

Preparación de BP103m04

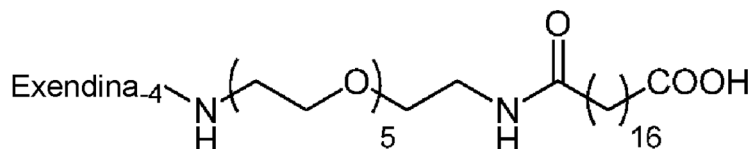
- 10 Se añadieron 20,0 g del compuesto BP103m03 (1,0 eq), 200 ml de diclorometano y 24,0 g de Fmoc-HOSU (1,0 eq) a un matraz de tres bocas de 500 ml, se agitaron y se enfriaron hasta 0 °C. Se añadieron gota a gota 9,2 g de DIEA (1,0 eq, N,N-diisopropiletilamina) y se agitaron durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se lavaron con agua y salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y, a continuación, se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 27,3 g de BP103m04 como un aceite.

Preparación de BP103m05

- 15 Se añadieron 5,0 g de BP103m04 (1 eq), 50 ml de agua, 1,7 g de NaHCO₃ (2,0 eq) a un matraz de 200 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 4,7 g del compuesto BP103n02 (1,0 eq) en 50 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 50 ml de THF (tetrahidrofurano) y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=4 con ácido acético, se extrajeron con acetato de etilo, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 6,4 g del compuesto BP103m05 como un sólido blanquecino.
- 20

Preparación de BP103m06

- 25 Se añadieron 6,0 g del compuesto BP103m05, 30 ml de diclorometano, 30 ml de TFA (ácido trifluoroacético) a un matraz de 100 ml y se agitaron a 20 °C. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se suspendieron en éter de petróleo, se filtraron por aspiración y se secaron para proporcionar 5,1g del BP103m06 como un sólido blanquecino.



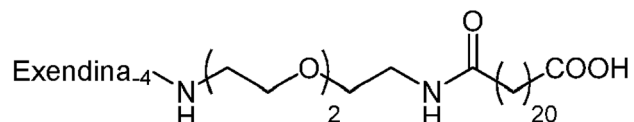
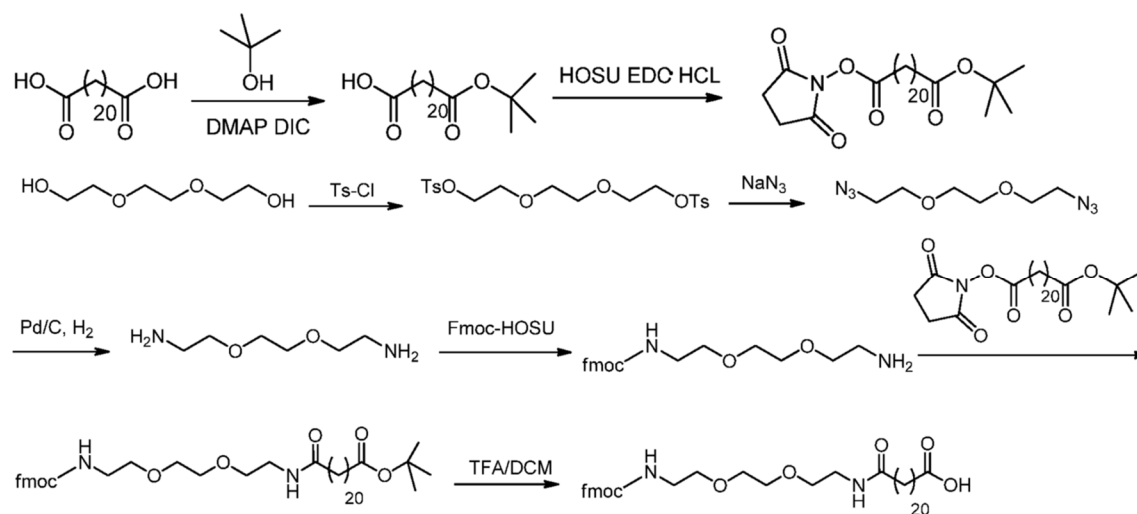
Síntesis del compuesto objetivo

- 30 Se añadieron 1,0 g de resina 2Cl-Trt, 240 mg de BP103m06, 5 ml de diclorometano y 300 ul de DIEA a una columna de reacción de 20 ml, en la que se burbujeó nitrógeno durante 40 min. Se añadieron 5 ml de diclorometano, 1 ml de metanol y 1 ml de DIEA y se hicieron reaccionar durante 20 min, después de esto se lavaron con DMF (N,N-dimetilformamida), lo que produjo resina de BP103m06. Se usó HOBt/DIC (es decir, 1-hidroxibenzotriazol/N,N-diisopropilcarbodiimida) como reactivo de acoplamiento, con DMF como el disolvente reactivo. La reacción se monitoreó empleando el método de detección de la ninhidrina, conectando sucesivamente los siguientes aminoácidos protegidos sobre la resina: Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, con la protección de Fmoc retirada finalmente. La pirólisis de la resina se logró empleando un 82,5 % de TFA/5 % de fenol/5 % de agua/2,5 % de EDT/5 % de tioanisol y, a continuación, se precipitaron con metil terc-butil éter (MTBE) helado y se lavaron, y los productos brutos se purificaron por medio de HPLC inversa para proporcionar 32 mg del péptido objetivo puro.
- 40

MS(ESI⁺, m/e):4743,53[M+H]⁺

45 Ejemplo 2 Preparación del compuesto 2

Se preparó el compuesto 2 con referencia al método del Ejemplo 1:

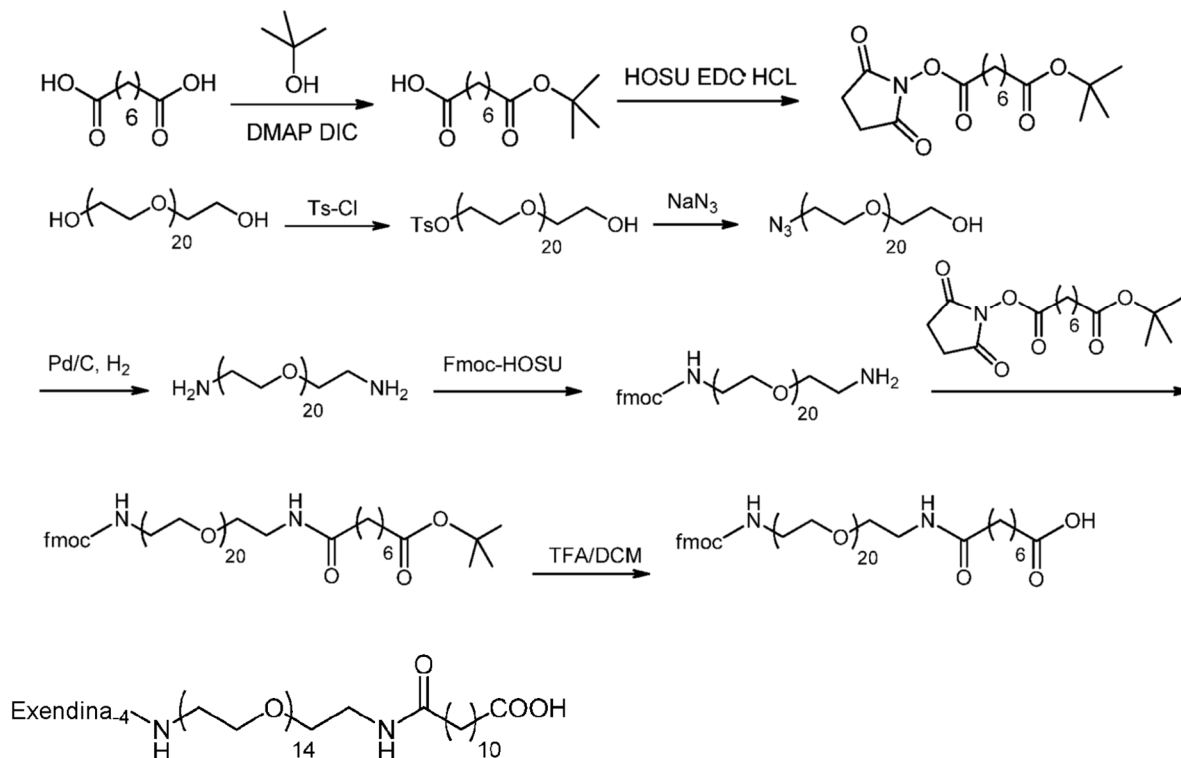


Se obtuvieron finalmente 31,2 mg del péptido objetivo puro.

5 MS(ESI⁺, m/e): 4667,52[M+H]⁺

Ejemplo 3 Preparación del compuesto 3

Se preparó el compuesto 3 con referencia al método del Ejemplo 1:

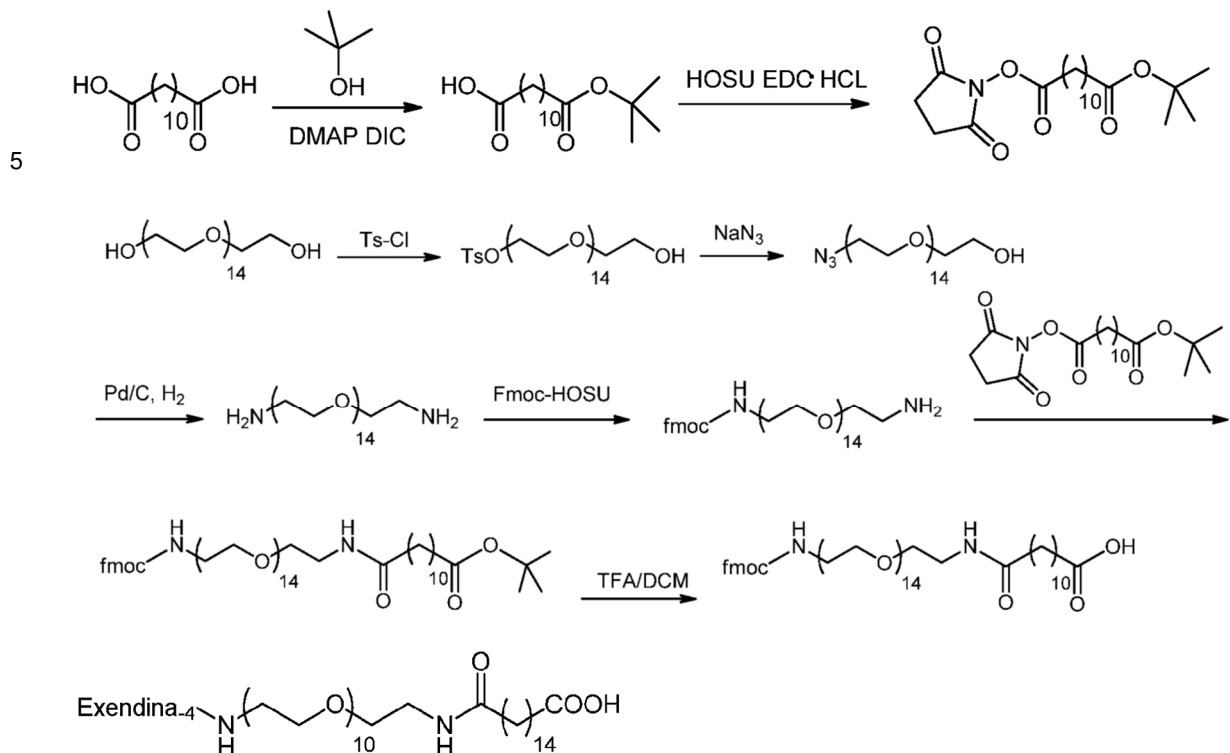


Se obtuvieron finalmente 32,3 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5263,78[M+H]⁺

Ejemplo 4 Preparación del compuesto 4

Se preparó el compuesto 4 con referencia al método del Ejemplo 1:

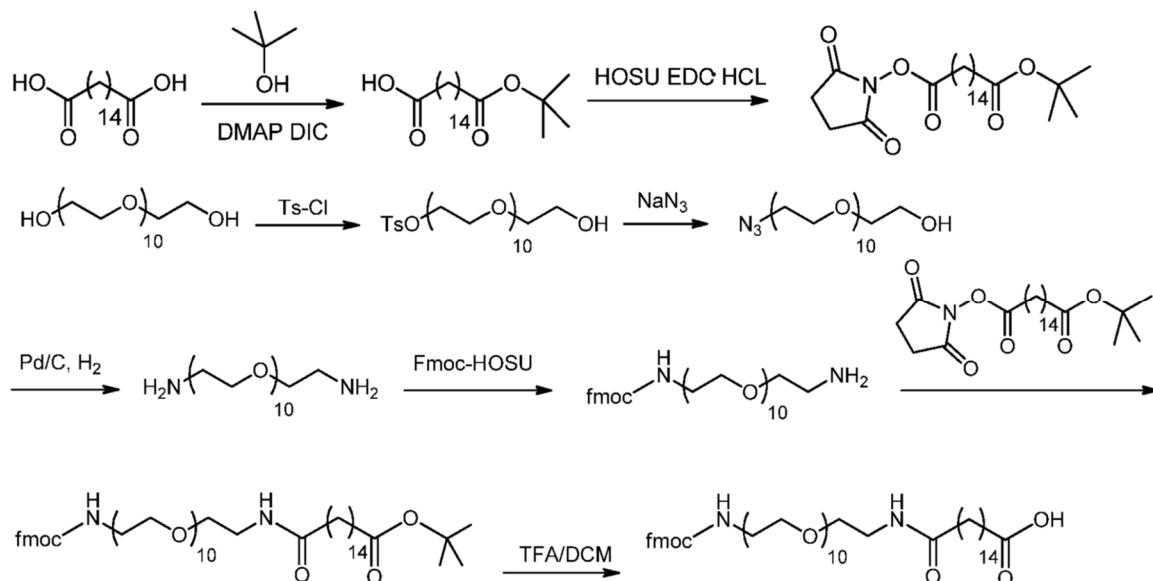


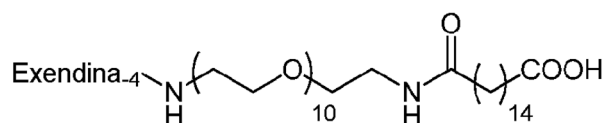
Se obtuvieron finalmente 31,8 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5055,68[M+H]⁺

10 Ejemplo 5 Preparación del compuesto 5

Se preparó el compuesto 5 con referencia al método del Ejemplo 1:

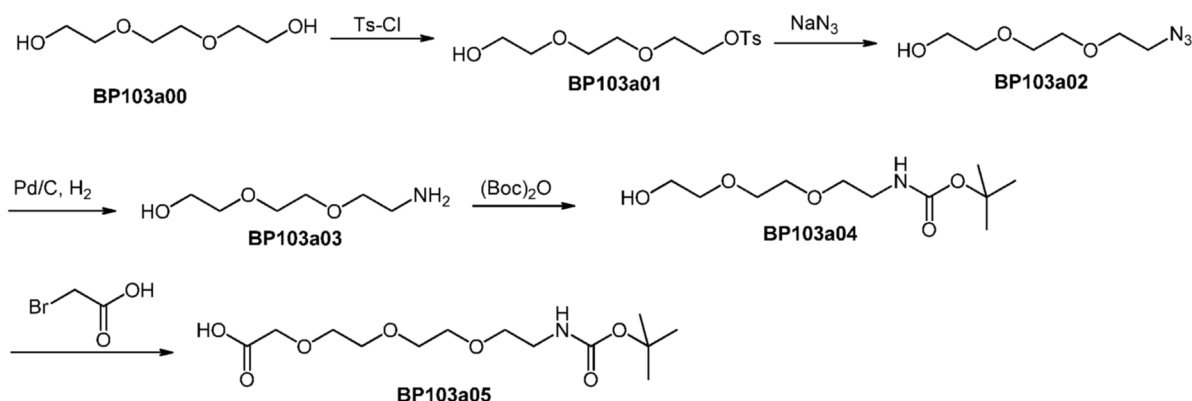




Se obtuvieron finalmente 31,0 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 4935,64[M+H]⁺

Ejemplo 6 Preparación del compuesto 6



BP103a01 的制备

Preparación de BP103a01

Bajo la protección de nitrógeno, se añadieron 200 ml de piridina, 120 g de BP103a00 (1,0 eq) a un matraz de tres bocas de 1000 ml, se agitaron y se enfriaron hasta 0 °C. Se añadieron de forma discontinua 151,8 g de TsCl (1,0 eq), se agitaron durante 1 h, a continuación, se calentaron lentamente hasta temperatura ambiente, y se continuó agitando durante 3-4 h. Después de la compleción de la reacción, el líquido de reacción se vertió en la disolución helada de ácido hidroclicórico diluido, se extrajo con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lavó una vez con ácido hidroclicórico diluido, se lavó con bicarbonato de sodio saturado, se lavó con salmuera saturada y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Los disolventes se evaporaron a una presión reducida y se sometieron a cromatografía en una columna de gel de sílice para proporcionar 55 g de BP103a01 puro.

Preparación de BP103a02

Se añadieron 55 g de BP103a01 (1,0 eq) y 160 ml de DMSO a un matraz de tres bocas de 1000 ml, se agitaron uniformemente y se añadieron a continuación 23,52 g de NaN₃ (2,0 eq), se calentaron hasta 50 °C y se hicieron reaccionar durante 3 horas, y se enfriaron hasta temperatura ambiente. El líquido de reacción se vertió en agua, se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 29,2 g de BP103a02 como un líquido incoloro.

Preparación de BP103a03

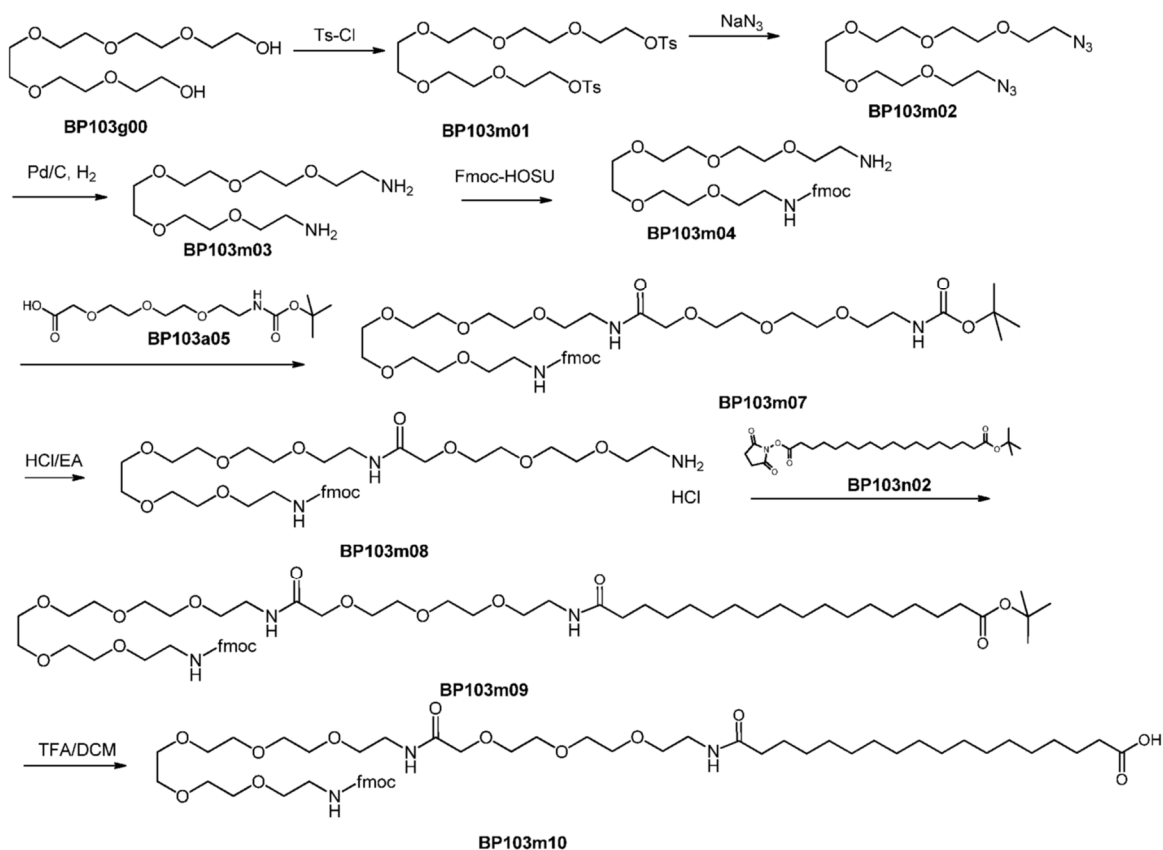
Se añadieron 29 g de BP103a02, 360 ml de etanol, 5,0 g de paladio sobre carbono a un reactor de hidrogenación de 1 l y se agitaron. Se reemplazó el nitrógeno y se introdujo hidrógeno para hacerlo reaccionar durante 3-4 h. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se filtró el líquido de reacción y el filtrado se concentró para proporcionar 23,5 g de BP103a03 como un aceite.

Preparación de BP103a04

Se añadieron 23,5 g del compuesto BP103a03 (1,0 eq), 68,6 g de (Boc)₂O (2,0 eq), 500 ml de una disolución mezclada de metanol:triethylamina (9:1) a un matraz de tres bocas de 1 l, se agitaron y se calentaron hasta reflujo y se hicieron reaccionar durante 1 h. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se evaporó el metanol triethylamina y se disolvió con agua. El diclorometano se extrajo 3 veces. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron una vez con agua, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. Los disolventes se evaporaron y se secaron para proporcionar 34,8 g de BP103a04 como un sólido.

Preparación de BP103a05

Se añadieron 34,8 g del compuesto BP103a04 (1,0 eq), 150 ml de tolueno y de THF, 58,2 g de ácido bromoacético (3 eq) a un matraz de tres bocas de 1000 ml, se agitaron, se calentaron hasta 45~50 °C, a continuación, se añadieron 33,5 g de hidróxido de sodio (6 eq) y se hicieron reaccionar durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, el líquido de reacción se evaporó, se extrajo con agua y acetato de etilo, y se ajustó la fase acuosa a pH 3. Se extrajo la fase acuosa con diclorometano, y se combinaron las capas de diclorometano, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y, a continuación, se concentraron para proporcionar 18 g del compuesto BP103a05 como un aceite.



Preparación de BP103m07

Se añadieron 5,0 g del compuesto BP103m04 (1,05 eq), 2,9 g de BP103a05 (1,0 eq), 50 ml de diclorometano, 3,8 g de DIEA (3,0 eq), 2,4 g de DEPC (1,5 eq, cianofosfonato de dietilo) a un matraz de tres bocas de 100 ml. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, la reacción se lavó con 0,1 mol/l de HCl/agua, bicarbonato de sodio, agua y salmuera saturada, y se secó sobre sulfato de sodio anhidro y, a continuación, se sometió a cromatografía en una columna para proporcionar 6,3 g de BP103m07 como un aceite.

Preparación de BP103m08

Se añadieron 6,3 g del compuesto BP103m07, 30 ml de acetato de etilo a un matraz de 100 ml, se enfriaron hasta 0 °C y se añadieron 7,0 mol de HCl/acetato de etilo. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se suspendieron con éter de petróleo, se filtraron por aspiración y se secaron para proporcionar 5,3 g de BP103m08 como un sólido blanquecino.

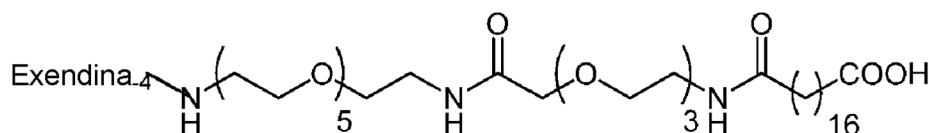
Preparación de BP103m09

Se añadieron 5,0 g de BP103m08 (1,0 eq), 50 ml de agua, 1,2 g de NaHCO₃ (2,0 eq) a un matraz de 200 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota la disolución de 3,2 g del compuesto BP103n02 (1,0 eq) en 50 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 50 ml de THF y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=4 con ácido acético, se extrajeron con acetato de etilo, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 6,1 g del compuesto BP103m09 como un sólido blanquecino.

Preparación de BP103m10

Se añadieron 6,0 g del compuesto BP103m09, 30 ml de diclorometano, 30 ml de TFA a un matraz de 100 ml y se agitaron a 20 °C. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se suspendieron con éter de petróleo, se filtraron por aspiración y se secaron para proporcionar 4,8 g de BP103m10 como un sólido blanquecino.

Preparación del péptido objetivo

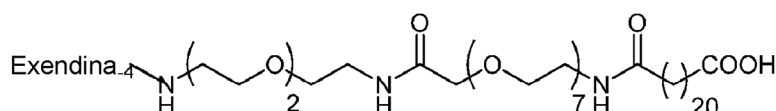


Se añadieron 1,0 g de resina 2Cl-Trt, 296 mg de BP103m10, 5 ml de diclorometano y 300 µl de DIEA a una columna de reacción de 20 ml, en la que se burbujeó nitrógeno durante 40 min. Se añadieron 5 ml de diclorometano, 1 ml de metanol y 1 ml de DIEA y se hicieron reaccionar durante 20 min, después de esto se lavaron con DMF, lo que produjo resina de BP103m06. Para retirar Fmoc, se usó piperidina/DMF al 20 %, la reacción se mantuvo durante 20 minutos, se usó HOBt/DIC como el reactivo de acoplamiento y el disolvente reactivo fue DMF. La reacción se monitoreó empleando el método de detección de la ninhidrina, conectando sucesivamente los siguientes aminoácidos protegidos sobre la resina: Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, con la protección de Fmoc retirada finalmente. La pirólisis de la resina se logró empleando un 82,5 % de TFA/5 % de fenol/5 % de agua/2,5 % de EDT/5 % de tioanisol y, a continuación, se precipitaron con metil terc-butil éter (MTBE) helado y se lavaron, y los productos brutos se purificaron por medio de HPLC inversa para proporcionar 39 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 4932,65[M+H]⁺

Ejemplo 7 Preparación del compuesto 7

Se preparó el compuesto 7 con referencia al método del Ejemplo 6:

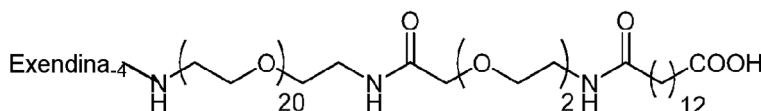


Se obtuvieron finalmente 39,6 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5032,76[M+H]⁺

Ejemplo 8 Preparación del compuesto 8

Se preparó el compuesto 8 con referencia al método del Ejemplo 6:

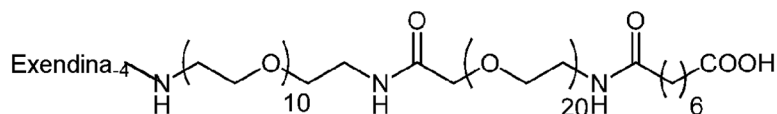


Se obtuvieron finalmente 40,2 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5492,99[M+H]⁺

Ejemplo 9 Preparación del compuesto 9

Se preparó el compuesto 9 con referencia al método del Ejemplo 6:

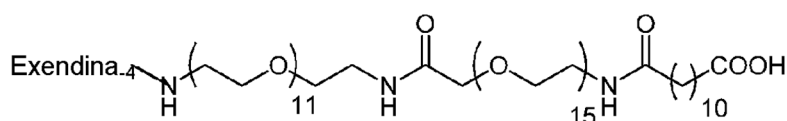


Se obtuvieron finalmente 40,7 mg del péptido objetivo puro.

5 MS(ESI⁺, m/e): 5761,11[M+H]⁺

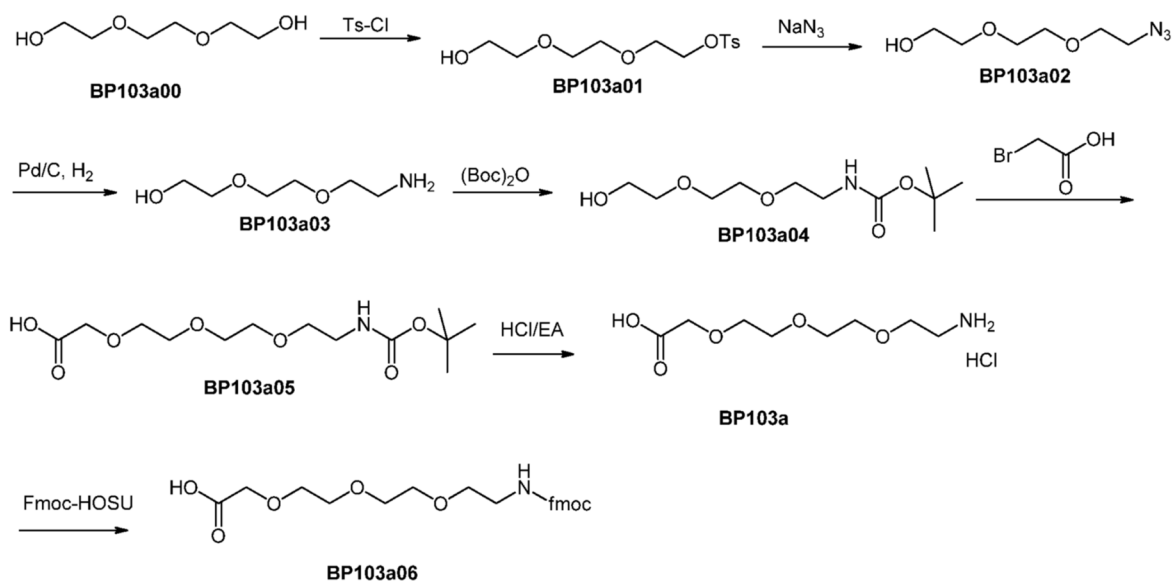
Ejemplo 10 Preparación del compuesto 10

Se preparó el compuesto 10 con referencia al método del Ejemplo 6:



Se obtuvieron finalmente 40,7 mg del péptido objetivo puro.

10 MS(ESI⁺, m/e): 5641,07[M+H]⁺

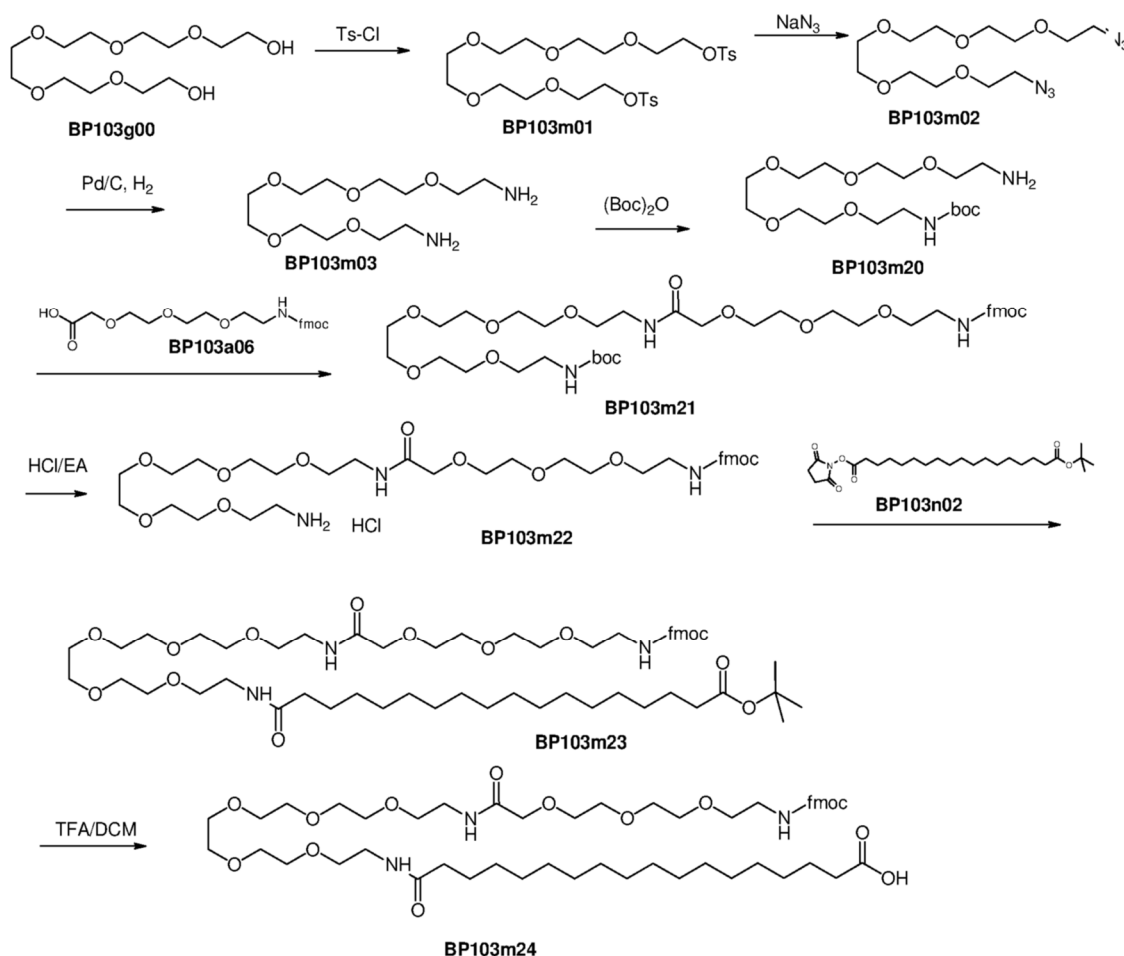
Ejemplo 11 Preparación del compuesto 11**Preparación de BP103a**

15 Se añadieron 18 g del compuesto BP103a05, 100 ml de acetato de etilo a un matraz de tres bocas de 250 ml, se agitaron para disolverlos y, a continuación, se enfriaron hasta 0 °C, con la adición de 150 ml de acetato de etilo/HCl (3,5 M), se mantuvieron a una temperatura de 0 °C. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se filtraron y la torta de filtrado se lavó con TBME para proporcionar 10,4 g de BP103a como un sólido blanco.

Preparación de BP103a06

20 Se añadieron 5,0 g de BP103a (1,0 eq), 50 ml de agua, 3,5 g de NaHCO₃ (2,0 eq) a un matraz de 200 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 7,3 g de Fmoc-HOSU (1,0 eq) en 50 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 50 ml de THF y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=2 con ácido hidrocórico diluido,

se extrajeron con acetato de etilo, se lavaron con agua y salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 7,6 g del compuesto BP103a06 como un sólido blanquecino.



Preparación de BP103m20

- 5 Se añadieron 10,0 g del compuesto BP103m03 (1,0 eq), 100 ml de diclorometano y 7,8 g de (Boc)₂O (1,0 eq) a un matraz de tres bocas de 500 ml, se agitaron y se enfriaron hasta 0 °C. Se añadieron gota a gota 4,6 g de DIEA (1,0 eq) y se agitaron durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se lavaron con agua y salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y, a continuación, se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 6,2 g de BP103m20 como un aceite.

10 Preparación de BP103m21

Se añadieron 6,2 g del compuesto BP103m20 (1,05 eq), 6,7 g de BP103a06 (1,0 eq), 50 ml de diclorometano, 6,3 g de DIEA (3,0 eq), 4,0 g de DEPC (1,5 eq) a un matraz de tres bocas de 100 ml. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se lavaron con 0,1 mol/l de HCl/agua, bicarbonato de sodio, agua y salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y, a continuación, se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 9,5 g de BP103m21 como un aceite.

- 15 para proporcionar 9,5 g de BP103m21 como un aceite.

Preparación de BP103m22

Se añadieron 9,5 g del compuesto BP103m21, 50 ml de acetato de etilo a un matraz de 100 ml, se agitaron y se enfriaron hasta 0 °C, con la adición de 50 ml de HCl/acetato de etilo 7,0 mol/l. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se suspendieron con éter de petróleo, se filtraron por aspiración y se secaron para proporcionar 8,3 g de BP103m22 como un sólido blanquecino.

- 20 Se filtraron por aspiración y se secaron para proporcionar 8,3 g de BP103m22 como un sólido blanquecino.

Preparación de BP103m23

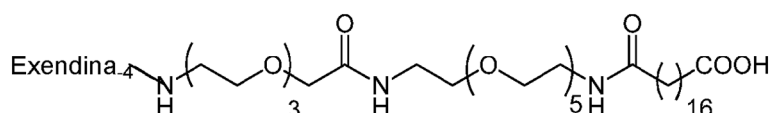
Se añadieron 5,0 g de BP103m22 (1,0 eq), 50 ml de agua, 1,2 g de NaHCO₃ (2,0 eq) a un matraz de 200 ml, se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 3,2 g del compuesto BP103n02 (1,0 eq) en 50 ml de DME

(etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 50 ml de THF y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=4 con ácido acético, se extrajeron con acetato de etilo, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 5,6 g del compuesto BP103m23 como un sólido blanquecino.

5 Preparación de BP103m24

Se añadieron 5,6 g del compuesto BP103m23, 30 ml de diclorometano, 30 ml de TFA a un matraz de 100 ml y se agitaron a 20 °C. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se suspendieron con éter de petróleo, se filtraron por aspiración y se secaron para proporcionar 4,4 g de BP103m24 como un sólido blanquecino.

10 Preparación del péptido objetivo

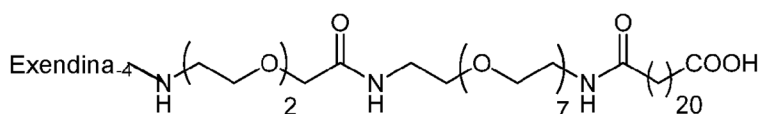


Se añadieron 1,0 g de resina 2Cl-Trt, 296 mg de BP103m24, 5 ml de diclorometano y 300 µl de DIEA a una columna de reacción de 20 ml, en la que se burbujeó nitrógeno durante 40 min. Se añadieron 5 ml de diclorometano, 1 ml de metanol, 1 ml de DIEA y se hicieron reaccionar durante 20 min. después de esto se lavaron con DMF, lo que produjo 15 resina de BP103m06. Para retirar Fmoc, se usó piperidina/DMF al 20 %, la reacción se mantuvo durante 20 minutos, se usó HOBT/DIC como el reactivo de acoplamiento y el disolvente reactivo fue DMF. La reacción se monitoreó empleando el método de detección de la ninhidrina, conectando sucesivamente los siguientes aminoácidos protegidos sobre la resina: Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, 20 Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, con la protección de Fmoc retirada finalmente. La pirólisis de la resina se logró 25 empleando un 82,5 % de TFA/5 % de fenol/5 % de agua/2,5 % de EDT/5 % de tioanisol y, a continuación, se precipitaron con metil terc-butil éter (MTBE) helado y se lavaron, y los productos brutos se purificaron por medio de HPLC inversa para proporcionar 29 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 4932,65[M+H]⁺

Ejemplo 12 Preparación del compuesto 12

30 Se preparó el compuesto 12 con referencia al método del Ejemplo 11.

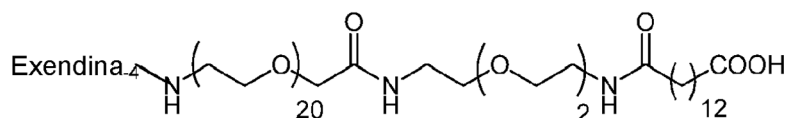


Se obtuvieron finalmente 29,1 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5032,76[M+H]⁺

Ejemplo 13 Preparación del compuesto 13

35 Se preparó el compuesto 13 con referencia al método del Ejemplo 11:

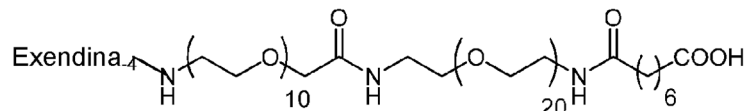


Se obtuvieron finalmente 30 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5492,99[M+H]⁺

Ejemplo 14 Preparación del compuesto 14

Se preparó el compuesto 14 con referencia al método del Ejemplo 11:

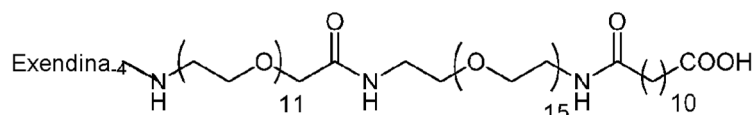


- 5 Se obtuvieron finalmente 30,2 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5761,11[M+H]⁺

Ejemplo 15 Preparación del compuesto 15

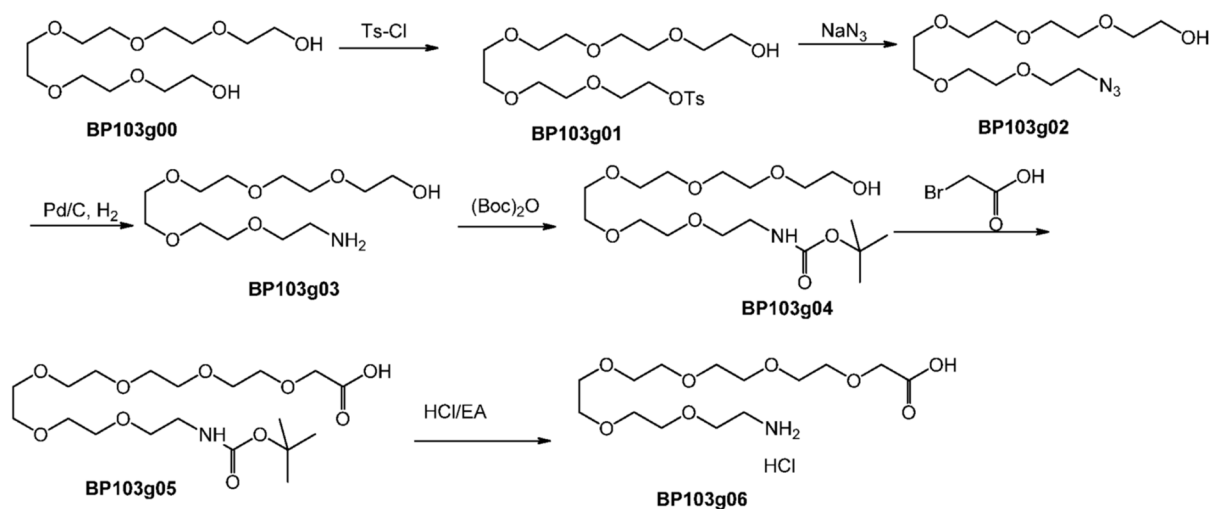
Se preparó el compuesto 15 con referencia al método del Ejemplo 11:



- 10 Se obtuvieron finalmente 30,4 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5641,07[M+H]⁺

Ejemplo 16 Preparación del compuesto 16



Preparación del compuesto BP103g01

- 15 Bajo la protección de nitrógeno, se añadieron 200 ml de piridina, 50 g de BP103g00 (1,0 eq) a un matraz de tres bocas de 500 ml, se agitaron y se enfriaron hasta 0 °C. Se añadieron de forma discontinua 35,5 g de TsCl (1,0 eq), se agitaron durante 1 h y, a continuación, se calentaron lentamente hasta temperatura ambiente, y se continuó agitando durante 3-4 h. Después de la compleción de la reacción, el líquido de reacción se vertió en la disolución helada de ácido hidroclicórico diluido, se extrajo con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lavó una vez con ácido hidroclicórico diluido, se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera saturada y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Los disolventes se evaporaron a una presión reducida y se sometieron a cromatografía en una columna de gel de sílice para proporcionar 38 g de BP103g01 puro.
- 20

Preparación del compuesto BP103g02

- 25 Se añadieron 38 g de BP103g01 (1,0 eq) y 190 ml de DMSO a un matraz de tres bocas de 500 ml, se agitaron uniformemente y se añadieron a continuación 11,5 g de NaN₃ (2,0 eq), se calentaron hasta 50 °C y se hicieron

reaccionar durante 3 horas, y se enfriaron hasta temperatura ambiente. El líquido de reacción se vertió en agua, se extrajo muchas veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 40 g de BP103g02 como un líquido incoloro.

Preparación del compuesto BP103g03

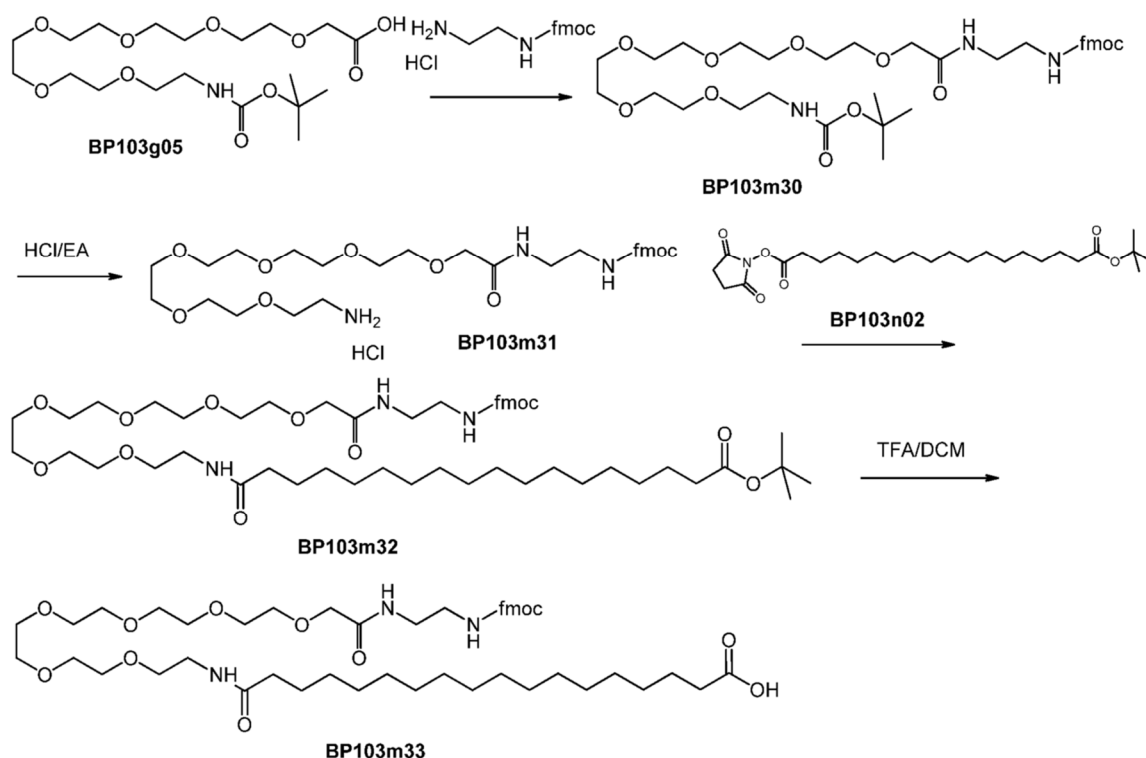
- 5 Se añadieron 70 g de BP103g02, 500 ml de metanol, 8,0 g de paladio sobre carbono a un reactor de hidrogenación de 1 l, se agitaron, con nitrógeno reemplazado por medio de la introducción de hidrógeno para hacerlos reaccionar durante 3-4 h. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se filtró el líquido de reacción y el filtrado se concentró para proporcionar 52 g de BP103g03 como un aceite.

Preparación del compuesto BP103g04

- 10 Se añadieron 10,0 g del compuesto BP103a03(1,0 eq), 15,5 g de (Boc)₂O (2,0 eq), 200ml de una disolución mezclada de metanol:triethylamina (9:1) a un matraz de tres bocas de 250 ml, se agitaron y se calentaron hasta reflujo y se hicieron reaccionar durante 1 h. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se evaporó el metanol triethylamina y se disolvió con agua. El diclorometano se extrajo 3 veces. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron una vez con agua, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 9,0 g de BP103g04 como un aceite.

Preparación del compuesto BP103g05

- 20 Se añadieron 7,0 g del compuesto BP103g04 (1,0 eq), 40 ml de tolueno y 40 ml de THF, 7,6 g de ácido bromoacético (3,0 eq) a un matraz de tres bocas de 250 ml, se agitaron, se calentaron hasta 45~50 °C, a continuación, se añadieron 4,4 g de hidróxido de sodio y se hicieron reaccionar durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se evaporó el líquido de reacción. Se extrajeron las impurezas con agua y acetato de etilo y se ajustó la fase acuosa a pH=3. Se extrajo la fase acuosa con diclorometano, y se combinaron las capas de diclorometano, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y, a continuación, se concentraron para proporcionar 4,2 g del compuesto BP103g05 como un aceite.



- 25 Preparación de BP103m30

Se añadieron 4,2 g del compuesto BP103g05 (1,05 eq), 2,9 g de Fmoc-hidrocloruro de etilendiamina (1,0 eq), 50 ml de diclorometano, 3,7 g de DIEA (3,0 eq), 2,3 g de DEPC (1,5 eq) a un matraz de tres bocas de 100 ml. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se lavaron con 0,1 mol/l de HCl/agua, bicarbonato de sodio, agua y salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y, a continuación, se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 5,6 g de BP103m21 como un aceite.

30

Preparación de BP103m31

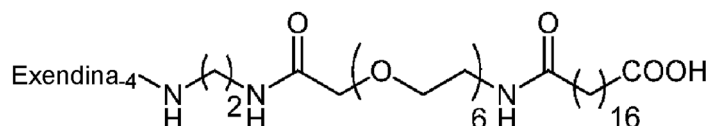
5 filtraron por aspiración y se secaron para proporcionar 4,8 g de BP103m31 como un sólido blanquecino.

Preparación de BP103m32

10 de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=4 con ácido acético, se extrajeron con acetato de etilo, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 4,9 g del compuesto BP103m32 como un sólido blanquecino.

Preparación de BP103m33

15 agitaron a 20 °C. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se suspendieron con éter de petróleo, se filtraron por aspiración y se secaron para proporcionar 3,8 g de BP103m33 como un sólido blanquecino.

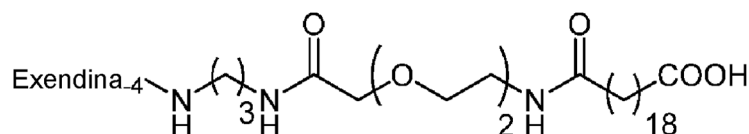


20 de reacción de 20 ml en la que se burbujeó nitrógeno durante 40 min. Se añadieron 5 ml de diclorometano, 1 ml de metanol, 1 ml de DIEA y se hicieron reaccionar durante 20 min, después de esto se lavaron con DMF, lo que produjo resina de BP103m06. Para retirar Fmoc, se usó piperidina/DMF al 20 %, la reacción se mantuvo durante 20 minutos, se usó HOBt/DIC como el reactivo de acoplamiento y el disolvente reactivo fue DMF. La reacción se monitoreó empleando el método de detección de la ninhidrina, conectando sucesivamente los siguientes aminoácidos protegidos
25 sobre la resina: Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH,
30 Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, con la protección de Fmoc retirada finalmente. La pirólisis de la resina se logró empleando un 82,5 % de TFA/5 % de fenol/5 % de agua/2,5 % de EDT/5 % de tioanisol y, a continuación, se precipitaron con metil terc-butil éter (MTBE) helado y se lavaron, y los productos brutos se purificaron por medio de HPLC inversa para proporcionar 33 mg del péptido objetivo puro.

35 MS(ESI⁺, m/e): 4844,6[M+H]⁺

Ejemplo 17 Preparación del compuesto 17

Se preparó el compuesto 17 con referencia al método del Ejemplo 16.

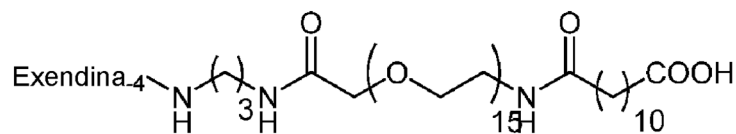


Se obtuvieron finalmente 32 mg del péptido objetivo puro.

40 MS(ESI⁺, m/e): 4710,54[M+H]⁺

Ejemplo 18 Preparación del compuesto 18

Se preparó el compuesto 18 con referencia al método del Ejemplo 16.

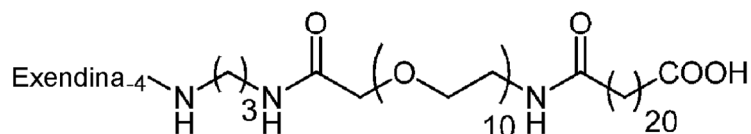


Se obtuvieron finalmente 33,5 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5170,77[M+H]⁺

Ejemplo 19 Preparación del compuesto 19

- 5 Se preparó el compuesto 19 con referencia al método del Ejemplo 16.

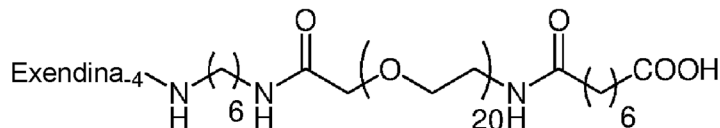


Se obtuvieron finalmente 33,1 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5090,82[M+H]⁺

Ejemplo 20 Preparación del compuesto 20

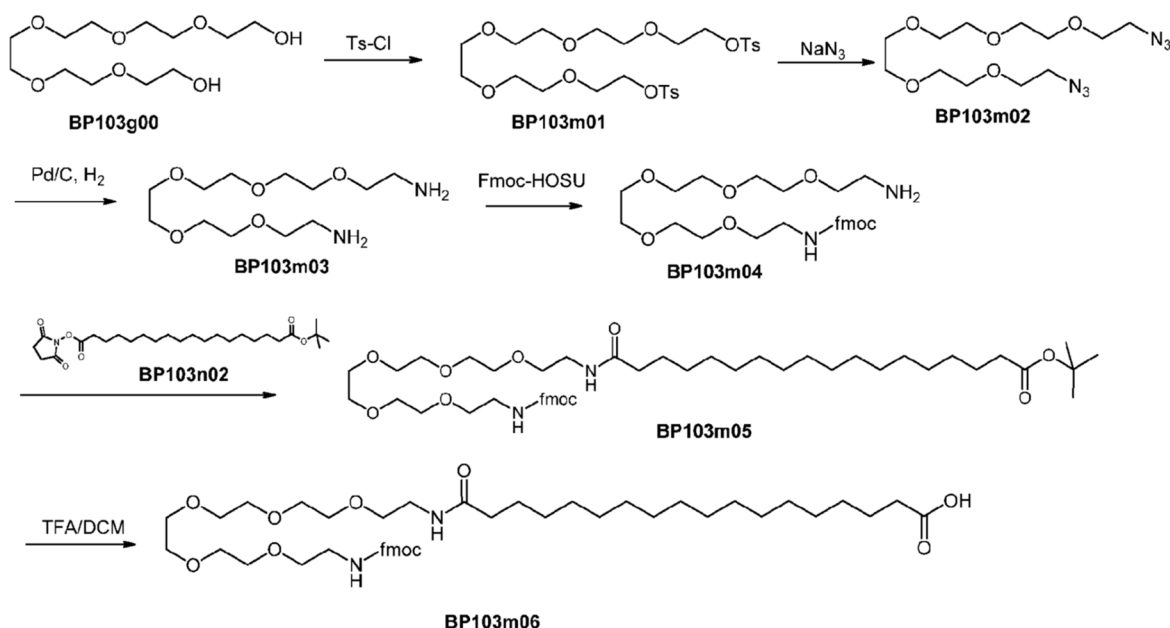
- 10 Se preparó el compuesto 20 con referencia al método del Ejemplo 16.



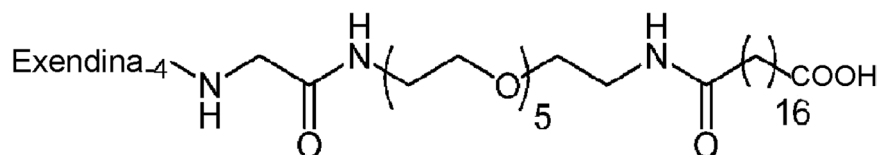
Se obtuvieron finalmente 33,1 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5090,82[M+H]⁺

Ejemplo 21 Preparación del compuesto 21



La preparación del método de BP103m06 se encontró en el Ejemplo 6.

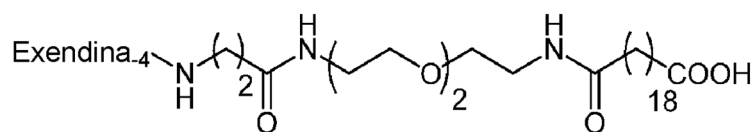


Se añadieron 1,0 g de resina 2Cl-Trt, 240 mg de BP103m06, 5 ml de diclorometano, 300 μ l de DIEA a una columna de reacción de 20 ml en la que se burbujó nitrógeno durante 40 min. Se añadieron 5 ml de diclorometano, 1 ml de metanol, 1 ml de DIEA y se hicieron reaccionar durante 20 min, después de esto se lavaron con DMF, lo que produjo resina de BP103m06. Para retirar Fmoc, se usó piperidina/DMF al 20 %, la reacción se mantuvo durante 20 minutos, se usó HOBt/DIC como el reactivo de acoplamiento y el disolvente reactivo fue DMF. La reacción se monitoreó empleando el método de detección de la ninhidrina, conectando sucesivamente los siguientes aminoácidos protegidos sobre la resina: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, con la protección de Fmoc retirada finalmente. La pirólisis de la resina se logró empleando un 82,5 % de TFA/5 % de fenol/5 % de agua/2,5 % de EDT/5 % de tioanisol y, a continuación, se precipitaron con metil terc-butil éter (MTBE) helado y se lavaron, y los productos brutos se purificaron por medio de HPLC inversa para proporcionar 42 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 4800,56[M+H]⁺

Ejemplo 22 Preparación del compuesto 22

Se preparó el compuesto 22 con referencia al método del Ejemplo 21.

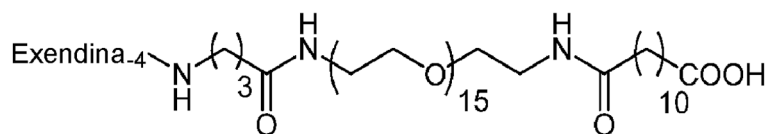


Se obtuvieron finalmente 41,7 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 4710,53[M+H]⁺

Ejemplo 23 Preparación del compuesto 23

Se preparó el compuesto 23 con referencia al método del Ejemplo 21.

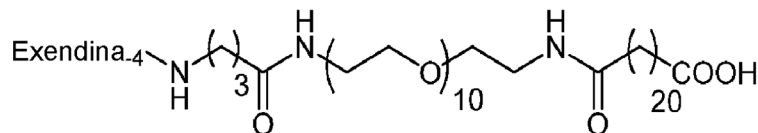


- 5 Se obtuvieron finalmente 42,5 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5184,78[M+H]⁺

Ejemplo 24 Preparación del compuesto 24

Se preparó el compuesto 24 con referencia al método del Ejemplo 21.

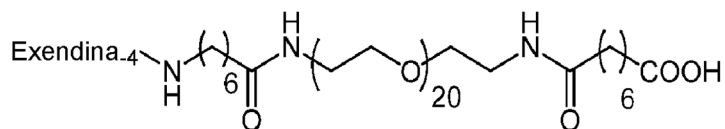


- 10 Se obtuvieron finalmente 42,1 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5104,83[M+H]⁺

Ejemplo 25 Preparación del compuesto 25

Se preparó el compuesto 25 con referencia al método del Ejemplo 21.

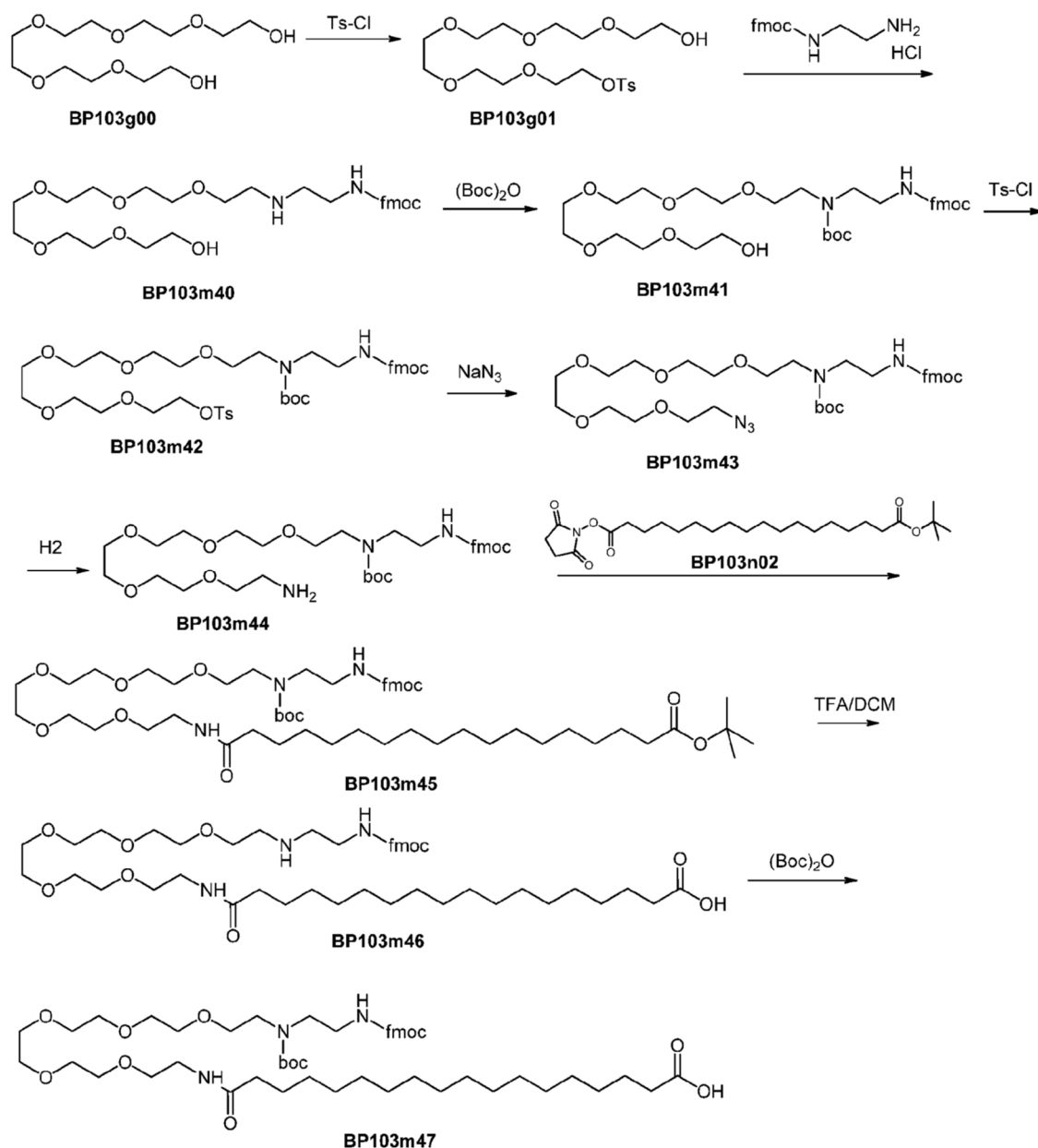


- 15

Se obtuvieron finalmente 43 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5390,91[M+H]⁺

Ejemplo 26



Preparación de BP103m40

- 5 Se añadieron 25,0 g del compuesto BP103g01 (1,0 eq), 250 ml de acetonitrilo y 18,3 g de Fmoc-hidrocloruro de etilendiamina (1,0 eq) a un matraz de tres bocas de 500 ml, se agitaron y se enfriaron hasta 0 °C, con la adición de 7,9 g de carbonato de potasio (1,0 eq). Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se lavaron con ácido hidroclórico diluido y salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y, a continuación, se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 25,3 g de BP103m40 como un aceite.

Preparación de BP103m41

- 10 Se añadieron 25,0 g del compuesto BP103m40 (1,0 eq), 250 ml de diclorometano y 19,9 g de (Boc)₂O (2,0 eq) a un matraz de tres bocas de 500 ml, en el cual se añadieron gota a gota 17,7 g de DIEA (3,0 eq). Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se lavaron con ácido hidroclórico diluido, disolución de bicarbonato de sodio acuosa y, a continuación, salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y, a continuación, se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 23,8 g de BP103m41 como un aceite.

Preparación de BP103m42

- 5 Bajo la protección de nitrógeno, se añadieron 100 ml de piridina, 23,5 g de BP103m41 (1,0 eq) a un matraz de tres bocas de 1000 ml, se agitaron y se enfriaron hasta 0 °C. Se añadieron de forma discontinua 8,3 g de TsCl (1,2 eq), se agitaron durante 1 h y, a continuación, se calentaron lentamente hasta temperatura ambiente, y se continuó agitando durante 3-4 h. Después de la compleción de la reacción, la mayor parte de la piridina se evaporó, se disolvió en acetato de etilo, se lavó una vez con ácido hidroclicórico diluido, se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera saturada, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se sometió a cromatografía en una columna de gel de sílice para proporcionar 25,3 g de BP103m42 puro.

Preparación de BP103m43

- 10 Se añadieron 25,0 g de BP103m42 (1,0 eq) y 100 ml de DMSO a un matraz de tres bocas de 1000 ml, se agitaron uniformemente y se añadieron a continuación 4,1 g de NaN₃ (2,0 eq), se calentaron hasta 50 °C y se hicieron reaccionar durante 3 horas, y se enfriaron hasta temperatura ambiente. El líquido de reacción se vertió en agua, se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 22,7 g de BP103m43 como un líquido incoloro.

15 Preparación de BP103m44

Se añadieron 22,7 g del compuesto BP103m43, 250 ml de metanol, 5,0 g de paladio sobre carbono a un reactor de hidrogenación de 1 l, se agitaron, con nitrógeno reemplazado por medio de la introducción de hidrógeno para hacerlos reaccionar durante 3-4 h. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se filtró el líquido de reacción y el filtrado se concentró para proporcionar 19,6 g de BP103m44 como un aceite.

20 Preparación de BP103m45

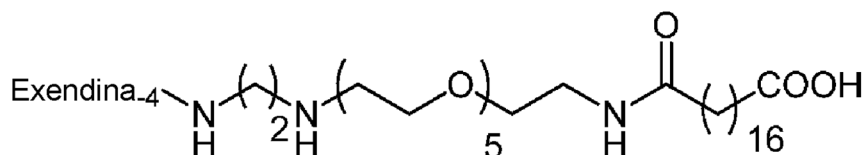
- Se añadieron 10,0 g de BP103m44 (1,0 eq), 100 ml de agua, 2,6 g de NaHCO₃ (2,0 eq) a un matraz de 500 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 7,2 g del compuesto BP103n02 (1,0 eq) en 100 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 100 ml de THF y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=4 con ácido acético, se extrajeron con acetato de etilo, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 13,2 g del compuesto BP103m45 como un sólido blanquecino.

Preparación de BP103m46

- 30 Se añadieron 13,2 g del compuesto BP103m45, 15 ml de diclorometano, 15 ml de TFA a un matraz de 100 ml y se agitaron a 20 °C. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se suspendieron con éter de petróleo, se filtraron por aspiración y se secaron para proporcionar 10,5 g de BP103m46 como un sólido blanquecino.

Preparación de BP103m47

- 35 Se añadieron 10,5 g del compuesto BP103m36 (1,0 eq), 110 ml de diclorometano y 5,4 g de (Boc)₂O (2,0 eq) a un matraz de tres bocas de 250 ml, en el cual se añadieron gota a gota 4,8 g de DIEA (3,0 eq). Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se lavaron con ácido hidroclicórico diluido, disolución de bicarbonato de sodio acuosa y, a continuación, salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 7,9 g de BP103m47 como un sólido blanquecino.



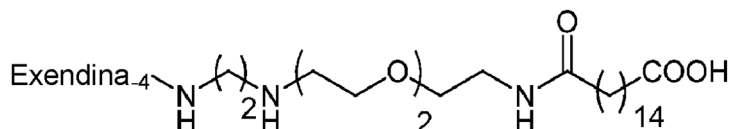
- 40 Se añadieron 1,0 g de resina 2Cl-Trt, 283 mg de BP103m47, 5 ml de diclorometano y 300 ul de DIEA a una columna de reacción de 20 ml, en la que se burbujeó nitrógeno durante 40 min. Se añadieron 5 ml de diclorometano, 1 ml de metanol y 1 ml de DIEA y se hicieron reaccionar durante 20 min, después de esto se lavaron con DMF, lo que produjo resina de BP103m06. Para retirar Fmoc, se usó piperidina/DMF al 20 %, la reacción se mantuvo durante 20 minutos, se usó HOBT/DIC como el reactivo de acoplamiento y el disolvente reactivo fue DMF. La reacción se monitoreó empleando el método de detección de la ninhidrina, conectando sucesivamente los siguientes aminoácidos protegidos sobre la resina: Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH,

5 Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, con la protección de Fmoc retirada finalmente. La pirólisis de la resina se logró empleando un 82,5 % de TFA/5 % de fenol/5 % de agua/2,5 % de EDT/5 % de tioanisol y, a continuación, se precipitaron con metil terc-butil éter (MTBE) helado y se lavaron, y los productos brutos se purificaron por medio de HPLC inversa para proporcionar 41 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 4771,57[M+H]⁺

Ejemplo 27 Preparación del compuesto 27

Se preparó el compuesto 27 con referencia al método del Ejemplo 26.

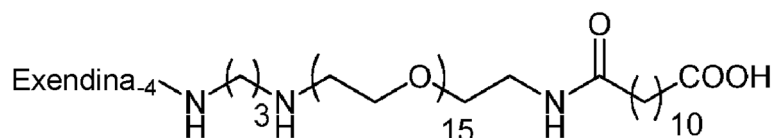


Se obtuvieron finalmente 40,5 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 4611,44[M+H]⁺

Ejemplo 28 Preparación del compuesto 28

Se preparó el compuesto 28 con referencia al método del Ejemplo 26.

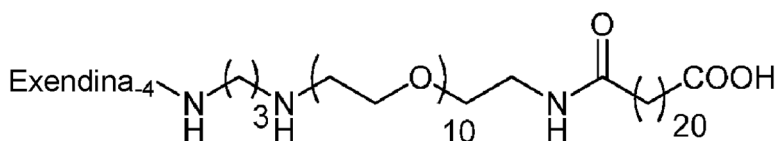


Se obtuvieron finalmente 41,6 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5141,77[M+H]⁺

Ejemplo 29 Preparación del compuesto 29

Se preparó el compuesto 29 con referencia al método del Ejemplo 26.

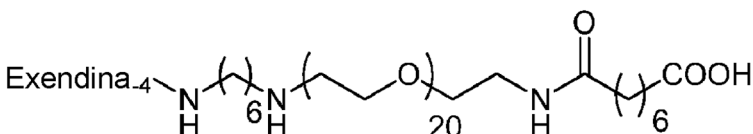


Se obtuvieron finalmente 41,2 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5061,82[M+H]⁺

Ejemplo 30 Preparación del compuesto 30

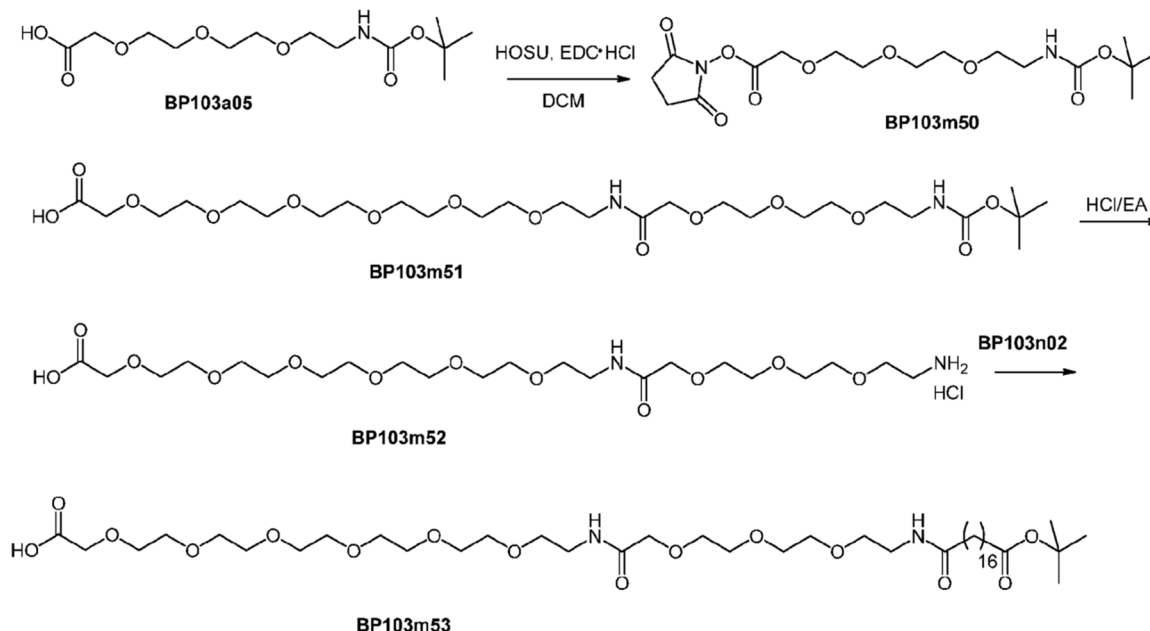
Se preparó el compuesto 30 con referencia al método del Ejemplo 26.



Se obtuvieron finalmente 42,3 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5347,9[M+H]⁺

Ejemplo 31 Preparación del compuesto 31



Preparación de BP103m50

- 5 Se añadieron 286 mg de N-hidroxisuccinimida (HOSU), 0,50 g de BP103a05 y 5 ml de diclorometano a un matraz de tres bocas de 100 ml, al que se añadieron 477 mg de EDC·HCl y se hicieron reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se diluyeron con diclorometano y, a continuación, se lavaron 2 veces con 50 mmol/l de disolución acuosa de dihidrógeno fosfato de potasio a un pH=6,0, se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 0,72 g del compuesto BP103m50 como un aceite.
- 10

Preparación de BP103m51

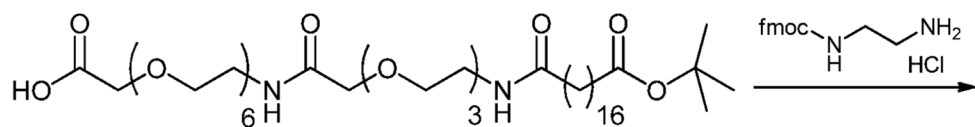
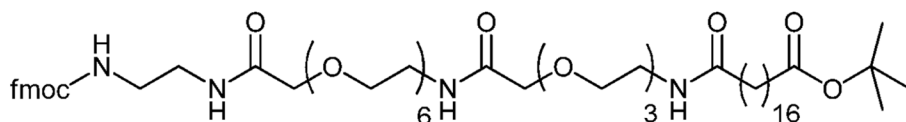
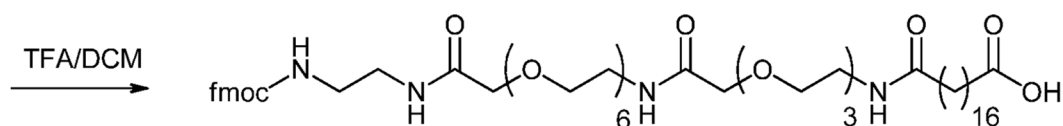
- Se añadieron 0,62 g del compuesto BP103g06 (1,0 eq), 10 ml de agua, 0,27 g de NaHCO₃ (2,0 eq) a un matraz de 100 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 0,66 g del compuesto BP103m50 en 10 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 5 ml de THF y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=4 con ácido hidrocórico diluido, se extrajeron con diclorometano, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 0,71 g del compuesto BP103m51 como un aceite.
- 15

Preparación de BP103m52

- Se añadieron 0,71 g del compuesto BP103m51 y 5 ml de acetato de etilo a un matraz de 100 ml, después de que se disolvieran, se enfriaron hasta 0 °C, se añadieron 5 ml de HCl/acetato de etilo (7 mol/l), se mantuvo la temperatura a 0 °C. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se concentraron para proporcionar 0,71 g de BP103m52 como un aceite.
- 20

Preparación de BP103m53

- Se añadieron 640 mg del compuesto BP103m52 (1,0 eq), 15 ml de agua, 190 mg de NaHCO₃ (2,0 eq) a un matraz de 100 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 528 mg del compuesto BP103n02 en 15 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 15 ml de THF y se agitaron durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=6 con ácido acético, se extrajeron con diclorometano, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 0,65 g del compuesto BP103m53 como un aceite.
- 25

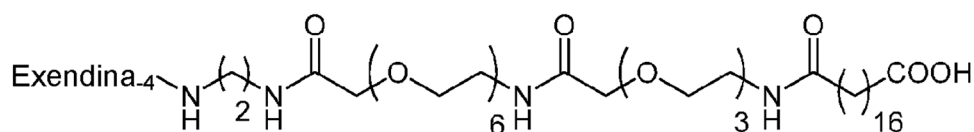
**BP103m53****BP103m54****BP103m55**

Preparación de BP103m54

Se añadieron 3,0 g del compuesto BP103m53 (1,0 eq), 1,1 g de Fmoc-hidrocloruro de etilendiamina (1,05 eq), 30 ml de diclorometano, 1,3 g de DIEA (3,0 eq) y 0,8 g de DEPC (1,5 eq) a un matraz de tres bocas de 100 ml. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se lavaron con 0,1 mol/l de HCl/agua, bicarbonato de sodio, agua y salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y, a continuación, se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 2,9 g de BP103m54 como un aceite.

Preparación de BP103m55

Se añadieron 2,9 g del compuesto BP103m54, 15 ml de diclorometano, 15 ml de TFA a un matraz de 100 ml y se agitaron a 20 °C. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se suspendieron con éter de petróleo, se filtraron por aspiración y se secaron para proporcionar 2,5 g de BP103m55 como un sólido blanquecino.

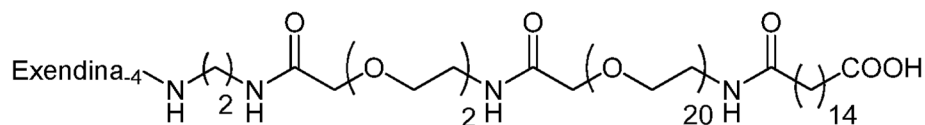


Se añadieron 1,0 g de resina 2Cl-Trt, 344 mg de BP103m55, 5 ml de diclorometano y 300 ul de DIEA a una columna de reacción de 20 ml, en la que se burbujeó nitrógeno durante 40 min. Se añadieron 5 ml de diclorometano, 1 ml de metanol y 1 ml de DIEA y se hicieron reaccionar durante 20 min, después de esto se lavaron con DMF, lo que produjo resina de BP103m06. Para retirar Fmoc, se usó piperidina/DMF al 20 %, la reacción se mantuvo durante 20 minutos, se usó HOBT/DIC como el reactivo de acoplamiento y el disolvente reactivo fue DMF. La reacción se monitoreó empleando el método de detección de la ninhidrina, conectando sucesivamente los siguientes aminoácidos protegidos sobre la resina: Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, con la protección de Fmoc retirada finalmente. La pirólisis de la resina se logró empleando un 82,5 % de TFA/5 % de fenol/5 % de agua/2,5 % de EDT/5 % de tianisól y, a continuación, se precipitaron con metil terc-butil éter (MTBE) helado y se lavaron, y los productos brutos se purificaron por medio de HPLC inversa para proporcionar 46 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5033,72[M+H]⁺

Ejemplo 32 Preparación del compuesto 32

Se preparó el compuesto 32 con referencia al método del Ejemplo 31.

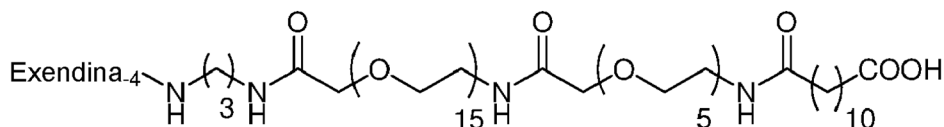


Se obtuvieron finalmente 46,8 mg del péptido objetivo puro.

5 MS(ESI⁺, m/e): 5578,07[M+H]⁺

Ejemplo 33 Preparación del compuesto 33

Se preparó el compuesto 33 con referencia al método del Ejemplo 31.

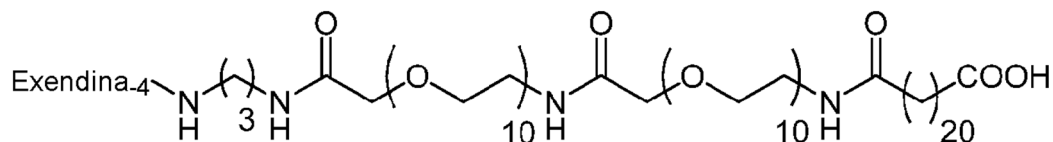


Se obtuvieron finalmente 46,4 mg del péptido objetivo puro.

10 MS(ESI⁺, m/e): 5447,95[M+H]⁺

Ejemplo 34 Preparación del compuesto 34

Se preparó el compuesto 34 con referencia al método del Ejemplo 31.

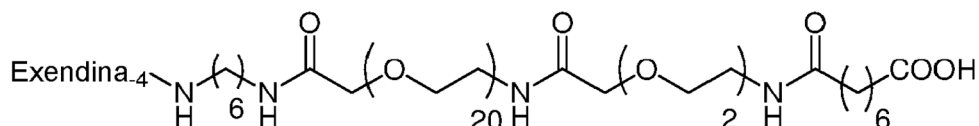


Se obtuvieron finalmente 46,5 mg del péptido objetivo puro.

15 MS(ESI⁺, m/e): 5588,15[M+H]⁺

Ejemplo 35 Preparación del compuesto 35

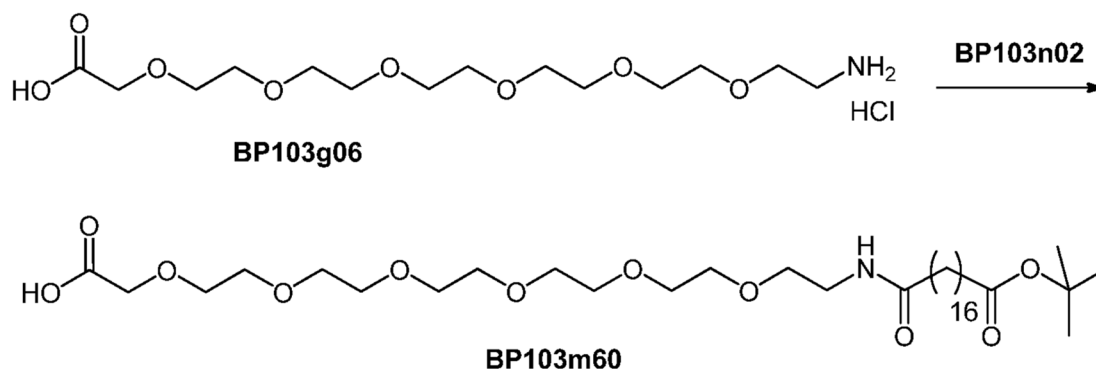
Se preparó el compuesto 35 con referencia al método del Ejemplo 31.



Se obtuvieron finalmente 46 mg del péptido objetivo puro.

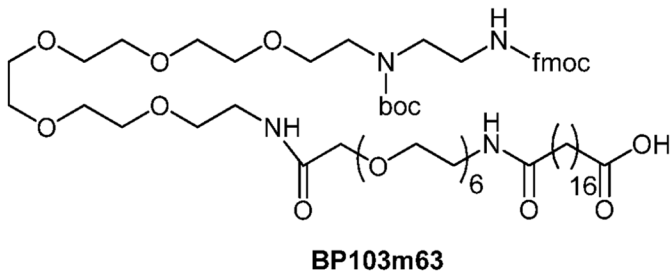
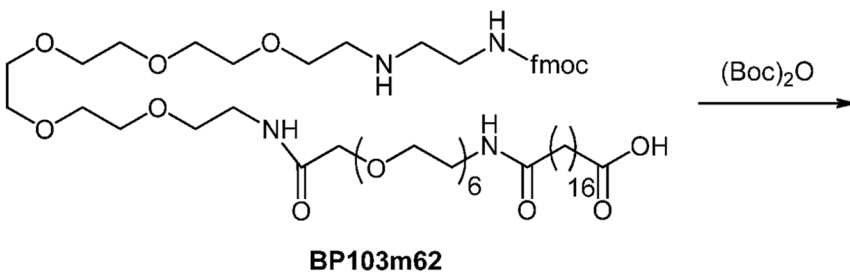
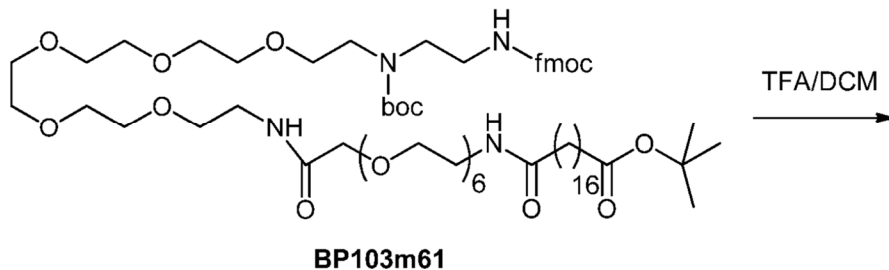
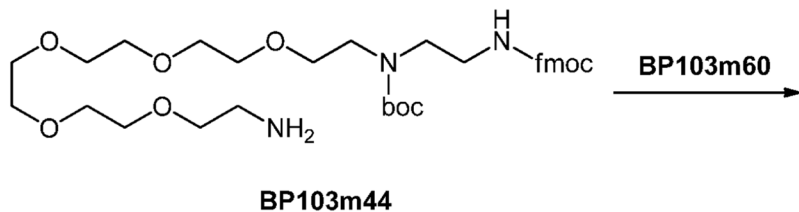
20 MS(ESI⁺, m/e): 5521,99[M+H]⁺

Ejemplo 36 Preparación del compuesto 36



Preparación de BP103m60

5 Se añadieron 10,0 g de BP103g06 (1,0 eq), 100 ml de agua, 4,5 g de NaHCO_3 (2,0 eq) a un matraz de 500 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 12,4 g del compuesto BP103n02 (1,0 eq) en 100 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 100 ml de THF y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=4 con ácido acético, se extrajeron con acetato de etilo, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 15,2 g del compuesto BP103m60 como un sólido blanquecino.



Preparación de BP103m61

5 reacción bajo la monitorización de la TLC, se lavaron con 0,1 mol/l de HCl/agua, bicarbonato de sodio, agua y salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y, a continuación, se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 4,1 g de BP103m61 como un aceite.

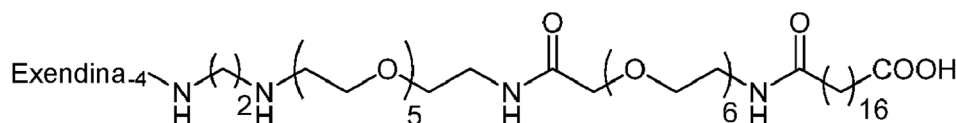
Preparación de BP103m62

10 agitaron a 20 °C. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se suspendieron con éter de petróleo, se filtraron por aspiración y se secaron para proporcionar 3,5 g de BP103m62 como un sólido blanquecino.

Preparación de BP103m63

15 Se añadieron 3,5 g del compuesto BP103m62 (1,0 eq), 50 ml de diclorometano y 1,2 g de (Boc)₂O (2,0 eq) a un matraz de tres bocas de 250 ml, en el cual se añadieron gota a gota 1,1 g de DIEA (3,0 eq). Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se lavaron con ácido hidroclórico diluido, disolución de bicarbonato de sodio

acuosa y, a continuación, salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 2,6 g de BP103m63 como un sólido blanquecino.

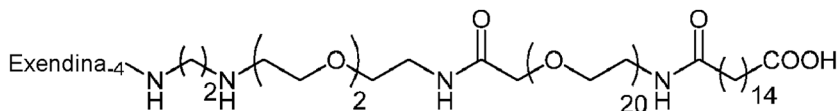


Se añadieron 1,0 g de resina 2Cl-Trt, 408 mg de BP103m63, 5 ml de diclorometano, 300 μ l de DIEA a una columna de reacción de 20 ml en la que se burbujeó nitrógeno durante 40 min. Se añadieron 5 ml de diclorometano, 1 ml de metanol y 1 ml de DIEA y se hicieron reaccionar durante 20 min, después de esto se lavaron con DMF, lo que produjo resina de BP103m06. Para retirar Fmoc, se usó piperidina/DMF al 20 %, la reacción se mantuvo durante 20 minutos, se usó HOBT/DIC como el reactivo de acoplamiento y el disolvente reactivo fue DMF. La reacción se monitoreó empleando el método de detección de la ninhidrina, conectando sucesivamente los siguientes aminoácidos protegidos sobre la resina: Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, con la protección de Fmoc retirada finalmente. La pirólisis de la resina se logró empleando un 82,5 % de TFA/5 % de agua/2,5 % de EDT/5 % de tioanisol y, a continuación, se precipitaron con metil terc-butil éter (MTBE) helado y se lavaron, y los productos brutos se purificaron por medio de HPLC inversa para proporcionar 55 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5107,81[M+H]⁺

Ejemplo 37 Preparación del compuesto 37

Se preparó el compuesto 37 con referencia al método del Ejemplo 36.

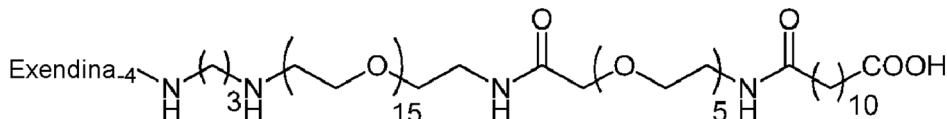


Se obtuvieron finalmente 55,7 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5564,1[M+H]⁺

Ejemplo 38 Preparación del compuesto 38

Se preparó el compuesto 38 con referencia al método del Ejemplo 36.

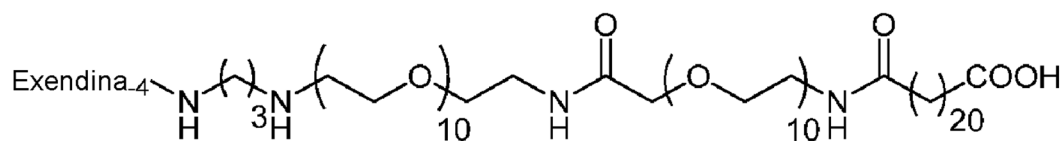


Se obtuvieron finalmente 55 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5433,98[M+H]⁺

Ejemplo 39 Preparación del compuesto 39

Se preparó el compuesto 39 con referencia al método del Ejemplo 36.

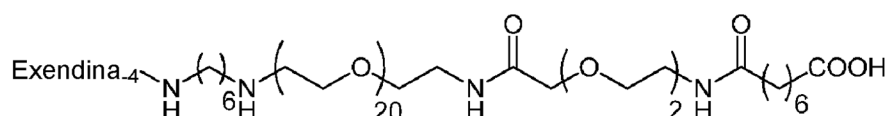


Se obtuvieron finalmente 55,2 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5574,18[M+H]⁺

Ejemplo 40 Preparación del compuesto 40

- 5 Se preparó el compuesto 40 con referencia al método del Ejemplo 36.



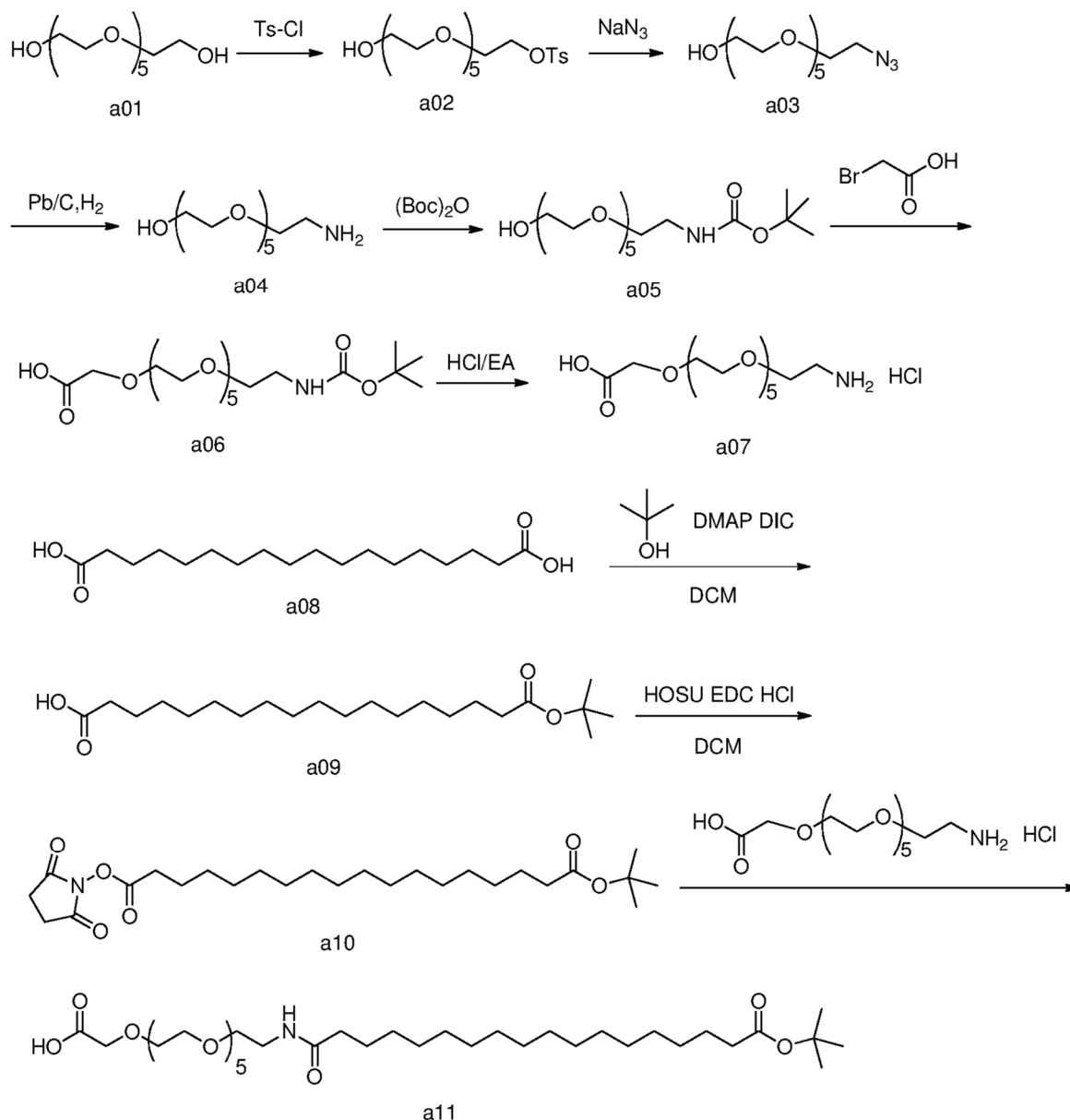
Se obtuvieron finalmente 55,3 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5508,02[M+H]⁺

Ejemplo 41 Preparación del compuesto 41

- 10 Preparación de Exendina-4(1-39)-Lys40(Alloc)-NH₂

Se sintetizaron los péptidos en fase sólida de los péptidos objetivo empleando la síntesis en fase sólida del proceso Fmoc, usando resina Fmoc-Rink MBHA Amide, en la que se usó piperidina/DMF al 20 % para retirar Fmoc, se usó HOBT/DIC como el reactivo de acoplamiento y el disolvente reactivo fue DMF. La reacción se monitoreó empleando el método de detección de la ninhidrina, conectando sucesivamente los siguientes aminoácidos protegidos sobre la resina Rink MBHA Amide: Fmoc-Lys(Alloc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, (BOC)₂O (usando DIEA, diclorometano). Se lavaron con DMF, metanol y diclorometano y, a continuación, se secaron para proporcionar 12,1 g de resina de Exendina-4(1-39)-Lys40(Alloc)-NH₂.



Preparación del compuesto a02

5 Bajo la protección de nitrógeno, se añadieron 200 ml de piridina, 50 g de a01 (1,0 eq) a un matraz de tres bocas de 500 ml, se agitaron y se enfriaron a 0 °C, se añadieron de forma discontinua 35,5 g de TsCl (1,0 eq), se agitaron durante 1 h y, a continuación, se calentaron lentamente hasta temperatura ambiente, y se continuó agitando durante 3-4 h. Después de la compleción de la reacción, el líquido de reacción se vertió en la disolución helada de ácido hidroclicó diluido, que genera un sólido, que se extrae con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lavó una vez con ácido hidroclicó diluido, se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera saturada y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Los disolventes se evaporaron a una presión reducida y se sometieron a cromatografía en una columna de gel de sílice para proporcionar 38 g de a02 puro.

Preparación del compuesto a03

15 Se añadieron 38 g de a (1,0 eq) y 190 ml de DMSO a un matraz de tres bocas de 500 ml, se agitaron uniformemente y se añadieron a continuación 11,5 g de NaN₃ (2,0 eq), se calentaron hasta 50 °C y se hicieron reaccionar durante 3 horas, y se enfriaron hasta temperatura ambiente. El líquido de reacción se vertió en agua, se extrajo muchas veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 40 g de a03 como un líquido incoloro.

Preparación del compuesto a04

Se añadieron 70 g de a03, 500 ml de metanol, 8,0 g de paladio sobre carbono a un reactor de hidrogenación de 1 l, se agitaron, con nitrógeno reemplazado por medio de la introducción de hidrógeno para hacerlos reaccionar durante 3-4 h. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se filtró el líquido de reacción y el filtrado se concentró para proporcionar 52 g de a04 como un aceite.

5 Preparación del compuesto a05

Se añadieron 10,0 g de a04 (1,0 eq), 15,5 g de (Boc)₂O (2,0 eq), 200 ml de una disolución mezclada de metanol:triethylamina (9:1) a un matraz de tres bocas de 250 ml, se agitaron y se calentaron hasta reflujo y se hicieron reaccionar durante 1 h. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se evaporó el metanol triethylamina y se disolvió en agua, y se extrajo con diclorometano 3 veces. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron una vez con agua, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 9,0 g de a05 como un aceite.

Preparación del compuesto a06

Se añadieron 7,0 g del compuesto a05 (1,0 eq), 40 ml de tolueno y 40 ml de THF, 7,6 g de ácido bromoacético (3,0 eq) a un matraz de tres bocas de 250 ml, se agitaron, se calentaron hasta 45~50 °C, a continuación, se añadieron 4,4 g de hidróxido de sodio y se hicieron reaccionar durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, el líquido de reacción se evaporó, se extrajeron las impurezas con agua y acetato de etilo, y se ajustó la fase acuosa a pH=3. Se extrajo la fase acuosa con diclorometano, y se combinaron las capas de diclorometano, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y, a continuación, se concentraron para proporcionar 4,2 g del compuesto a06 como un aceite.

20 Preparación del compuesto a07

Se añadieron 4,0 g del compuesto a06 y 20 ml de acetato de etilo a un matraz de una boca de 250 ml, después de que se disolvieran, se enfriaron hasta 0 °C, se añadieron 20 ml de HCl/acetato de etilo (7 mol/l). Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se concentraron para proporcionar 4,2 g de a07 como un aceite.

25 Preparación del compuesto a09

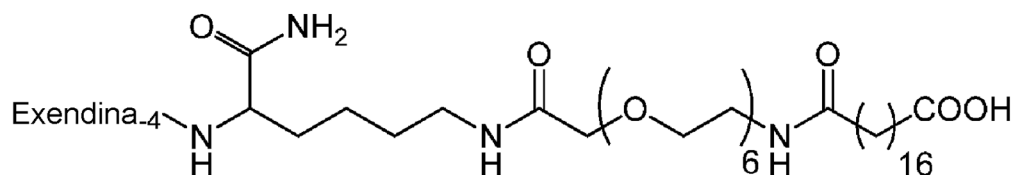
Se añadieron 1,0 g del compuesto a08 (1,0 eq), 10 ml de diclorometano, 10 ml de terc-butanol, 0,40 g de DIC (1,0 eq), 0,39 g de DMAP (1,0 eq) a un matraz de tres bocas de 50 ml y se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se diluyeron con éter, a continuación, se lavaron con agua 3 veces y se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 0,4 g de a09 como un polvo esponjoso.

Preparación del compuesto a10

Se añadieron 0,95 g de N-hidroxisuccinimida (HOSU), 2,0 g del compuesto a09 y 15 ml de diclorometano a un matraz de tres bocas de 100 ml, al que se añadieron 1,58 g de EDC·HCl y se hicieron reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se diluyeron con diclorometano, a continuación, se lavaron 2 veces con 50 mmol/l de disolución acuosa de dihidrógeno fosfato de potasio a un pH=6,0 y se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 2,6 g del compuesto a10 como un aceite.

Preparación del compuesto a11

Se añadieron 1,28 g del compuesto a07 (1,0 eq), 20 ml de agua, 1,16 g de NaHCO₃ (4,0 eq) a un matraz de 100 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 1,75 g del compuesto a10 en 20 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 20 ml de THF y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=6 con ácido acético, se extrajeron con acetato de etilo, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar un sólido blanquecino, que se sometió a cromatografía para proporcionar 0,95 g del compuesto a11.



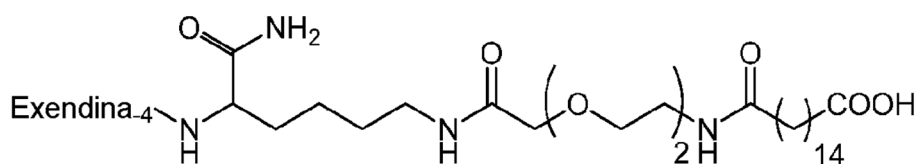
Se aumentaron 1,5 g de resina de Exendina-4(1-39)-Lys40-NH₂ en DMF, en la que se añadieron 3 eq de disolución de Pd(PPh₃)₄ en CHCl₃:AcOH:NMM (18:1:0.5). Se hicieron reaccionar durante 2 h, a continuación, se lavaron con

cloroformo (6 veces, 20 ml de cloroformo para cada vez), se lavaron con disolución al 20 % de HOAc en diclorometano (6 veces, 20 ml de disolución al 20 % de HOAc en diclorometano para cada vez), se lavaron con diclorometano (6 veces, 20 ml de diclorometano para cada vez) y se lavaron con DMF (6 veces, 20 ml de DMF para cada vez). Cuando se detectó como positivo con ninhidrina, se añadieron 5 ml de DMF, 415 mg del compuesto a11, 150 mg de HOAT y 150 μ l de DIC y se hicieron reaccionar durante 4 h; y, cuando se detectó como negativo con ninhidrina, lo que indicaba que la cadena lateral de a11 se había conectado en la resina de Exendina-4(1-39)-Lys40-NH₂. La pirólisis de la resina se llevó a cabo empleando un 82,5 % de TFA/5 % de fenol/5 % de EDT/5 % de tioanisol y, a continuación, se precipitaron con metil terc-butil éter (MTBE) helado y se lavaron. Los productos brutos se purificaron por medio de HPLC para proporcionar 43 mg del compuesto objetivo.

MS(ESI⁺, m/e): 4932,56[M+H]⁺

Ejemplo 42 Preparación del compuesto 42

Se preparó el compuesto 42 con referencia al método del Ejemplo 41.

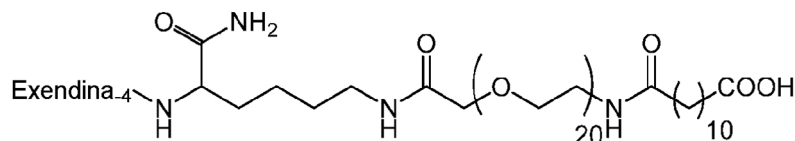


Se obtuvieron finalmente 41 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 4725,38[M+H]⁺

Ejemplo 43 Preparación del compuesto 43

Se preparó el compuesto 43 con referencia al método del Ejemplo 41.

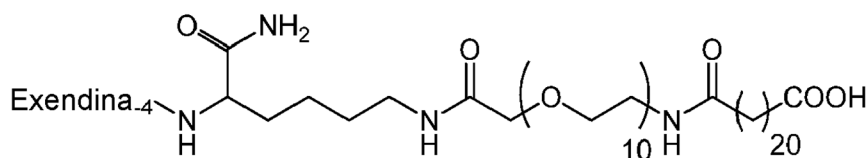


Se obtuvieron finalmente 41,5 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5461,93[M+H]⁺

Ejemplo 44 Preparación del compuesto 44

Se preparó el compuesto 44 con referencia al método del Ejemplo 41.

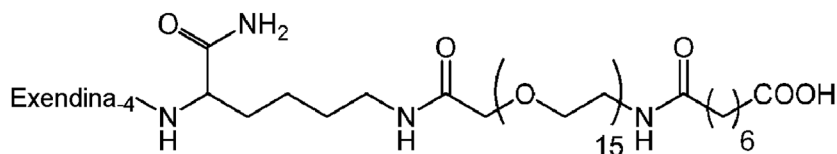


Se obtuvieron finalmente 43 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5161,83[M+H]⁺

Ejemplo 45 Preparación del compuesto 45

Se preparó el compuesto 45 con referencia al método del Ejemplo 41.



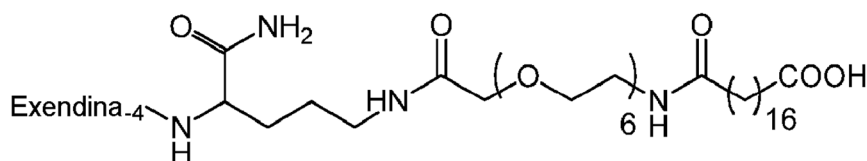
Se obtuvieron finalmente 42 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5185,7[M+H]⁺

Ejemplo 46 Preparación del compuesto 46

5 Preparación de resina de Exendina-4(1-39)-Orn40(Alloc)-NH₂

Tomando 5 g de resina Fmoc-Rink MBHA Amide, se usó piperidina/DMF al 20 % para retirar Fmoc, se usó HOBT/DIC como el reactivo de acoplamiento y el disolvente reactivo fue DMF. La reacción se monitoreó empleando el método de detección de la ninhidrina, conectando sucesivamente los siguientes aminoácidos protegidos sobre la resina Rink MBHA Amide: Fmoc-Orn(Alloc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, (Boc)₂O (usando DIEA, diclorometano). Se lavaron con DMF, se lavaron con metanol, se lavaron con diclorometano y, a continuación, se secaron para proporcionar 7,8 g de resina de Exendina-4(1-39)-Orn40(Alloc)-NH₂.

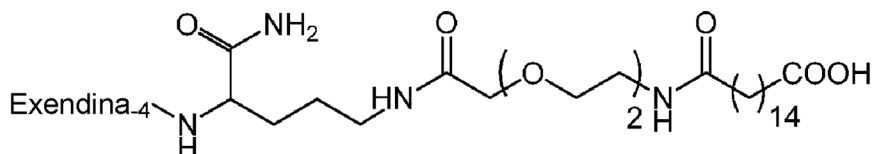


Se aumentaron 1,5 g de resina de Exendina-4(1-39)-Orn40(Alloc)-NH₂ en DMF, en la que se añadieron 3 eq de disolución de Pd(PPh₃)₄ en CHCl₃:AcOH:NMM (18:1:0.5). Se hicieron reaccionar durante 2 h, a continuación, se lavaron con cloroformo (6 veces, 20 ml de cloroformo para cada vez), se lavaron con disolución al 20 % de HOAc en diclorometano (6 veces, 20 ml de disolución al 20 % de HOAc en diclorometano para cada vez), se lavaron con diclorometano (6 veces, 20 ml de diclorometano para cada vez) y se lavaron con DMF (6 veces, 20 ml de DMF para cada vez). Cuando se detectó como positivo con ninhidrina, se añadieron 5 ml de DMF, 415 mg del compuesto BP103m60, 150 mg de HOAT y 100 ul de DIC y se hicieron reaccionar durante 4 h; y, cuando se detectó como negativo con ninhidrina, lo que indicaba que la cadena lateral de BP103m60 se había conectado en la resina de Exendina-4(1-39)-Orn40-NH₂. La pirólisis de la resina se llevó a cabo empleando un 82,5 % de TFA/5 % de fenol/5 % de agua/2,5 % de EDT/5 % de tioanisol y, a continuación, se precipitaron con metil terc-butil éter (MTBE) helado y se lavaron. Los productos brutos se purificaron por medio de HPLC para proporcionar 41 mg del compuesto objetivo.

MS(ESI⁺, m/e): 4915,61[M+H]⁺

Ejemplo 47 Preparación del compuesto 47

Se preparó el compuesto 47 con referencia al método del Ejemplo 46.

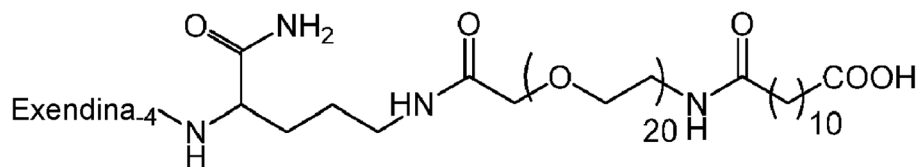


Se obtuvieron finalmente 42 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 4711,45[M+H]⁺

Ejemplo 48 Preparación del compuesto 48

Se preparó el compuesto 48 con referencia al método del Ejemplo 46.

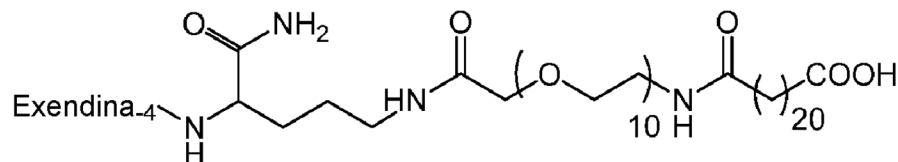


- 5 Se obtuvieron finalmente 43,4 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5447,91[M+H]⁺

Ejemplo 49 Preparación del compuesto 49

Se preparó el compuesto 49 con referencia al método del Ejemplo 46.

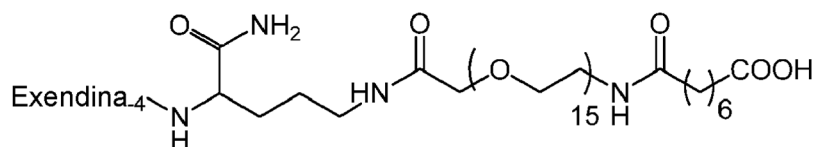


- 10 Se obtuvieron finalmente 43 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5147,81[M+H]⁺

Ejemplo 50 Preparación del compuesto 50

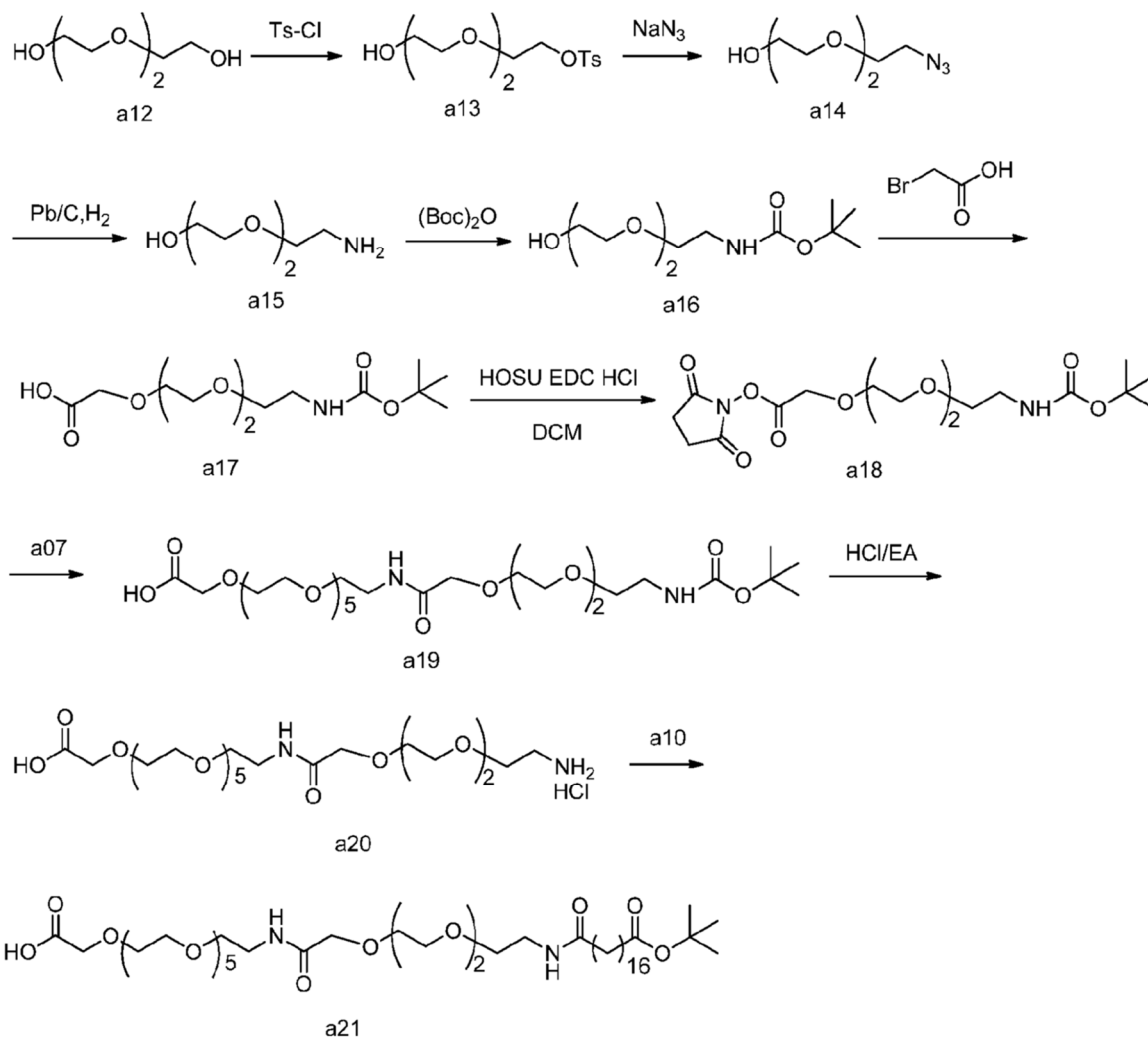
Se preparó el compuesto 50 con referencia al método del Ejemplo 46.



- 15 Se obtuvieron finalmente 42,8 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5171,68[M+H]⁺

Ejemplo 51 Preparación del compuesto 51



Preparación del compuesto a13

Bajo la protección de nitrógeno, se añadieron 200 ml de piridina, 120 g de a12 (1,0 eq) a un matraz de tres bocas de 1000 ml, se agitaron y se enfriaron hasta 0 °C. Se añadieron de forma discontinua 151,8 g de TsCl (1,0 eq), se agitaron durante 1 h y, a continuación, se calentaron lentamente hasta temperatura ambiente, y se continuó agitando durante 3-4 h. Después de la compleción de la reacción, el líquido de reacción se vertió en la disolución helada de ácido hidroclicórico diluido, que genera un sólido, que se extrae con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lavó una vez con ácido hidroclicórico diluido, se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera saturada y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Los disolventes se evaporaron a una presión reducida para proporcionar 119 g de producto bruto, que se sometió a cromatografía en una columna de gel de sílice para proporcionar 55 g de a13 puro.

Preparación del compuesto a14

Se añadieron 55 g de a13 (1,0 eq) y 160 ml de DMSO a un matraz de tres bocas de 1000 ml, se agitaron uniformemente y se añadieron a continuación 23,52 g de NaN₃ (2,0 eq), se calentaron hasta 50 °C y se hicieron reaccionar durante 3 horas, y se enfriaron hasta temperatura ambiente. El líquido de reacción se vertió en 1,2 l de agua, se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 29,2 g de a14 como un líquido incoloro.

Preparación del compuesto a15

Se añadieron 29 g del compuesto a14, 360 ml de metanol, 5,0 g de paladio sobre carbono a un reactor de hidrogenación de 1 l, se agitaron, con nitrógeno reemplazado por medio de la introducción de hidrógeno para hacerlos reaccionar durante 3-4 h. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se filtró el líquido de reacción y el filtrado se concentró para proporcionar 23,5 g de a15 como un aceite.

Preparación del compuesto a16

Se añadieron 23,5 g del compuesto a15 (1,0 eq), 68,6 g de (Boc)₂O (2,0 eq), 500 ml de una disolución mezclada de metanol:triethylamina (9:1) a un matraz de tres bocas de 1 l, se agitaron y se calentaron hasta reflujo y se hicieron reaccionar durante 1 h. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se evaporó el metanol triethylamina y se disolvió en agua. El diclorometano se extrajo 3 veces. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron una vez con agua, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se evaporaron los disolventes y se concentraron para proporcionar 34,8 g de a16 como un sólido.

Preparación del compuesto a17

Se añadieron 34,8 g del compuesto a16 (1,0 eq), 150 ml de tolueno y 150 ml de THF, 58,2 g de ácido bromoacético (3 eq) a un matraz de tres bocas de 1000 ml, se agitaron, se calentaron hasta 45~50 °C, a continuación, se añadieron 33,5 g de hidróxido de sodio (6 eq) y se hicieron reaccionar durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, el líquido de reacción se evaporó, se extrajo con agua y acetato de etilo, y se ajustó la fase acuosa a pH 3. Se extrajo la fase acuosa con diclorometano, y se combinaron las capas de diclorometano, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y, a continuación, se concentraron para proporcionar 18 g del compuesto a17 aceitoso.

Preparación del compuesto a18

Se añadieron 286 mg de N-hidroxisuccinimida (HOSU), 0,50 g de a17 y 5 ml de diclorometano a un matraz de tres bocas de 100 ml, al que se añadieron 477 mg de EDC·HCl, y se hicieron reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se diluyeron con diclorometano y, a continuación, se lavaron 2 veces con 50 mmol/l de disolución acuosa de dihidrógeno fosfato de potasio a un pH=6,0, se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 0,72 g del compuesto a18 como un aceite.

Preparación del compuesto a19

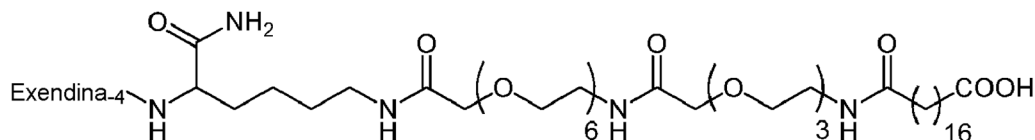
Se añadieron 0,62g del compuesto a07 (1,0 eq), 10 ml de agua, 0,27 g de NaHCO₃ (2,0 eq) a un matraz de 100 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 0,66 g del compuesto a18 en 10 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 5 ml de THF y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=4 con ácido hidrocórico diluido, se extrajeron con diclorometano, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 0,71 g del compuesto a19 como un aceite.

Preparación del compuesto a20

Se añadieron 0,71 g del compuesto a19 a un matraz de tres bocas de 100 ml, que se disolvieron con 5 ml de acetato de etilo y, a continuación, se enfriaron hasta 0 °C, con la adición de 5 ml de HCl/acetato de etilo (7 mol/l), se mantuvieron a una temperatura de 0 °C. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se concentraron para proporcionar 0,71 g de a20 como un aceite.

Preparación del compuesto a21

Se añadieron 640 mg del compuesto a20 (1,0 eq), 15 ml de agua, 190 mg de NaHCO₃ (2,0 eq) a un matraz de 100 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 528 mg del compuesto a10 en 15 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 15 ml de THF y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=6 con ácido acético, se extrajeron con diclorometano, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 0,65 g de a21 como un aceite.



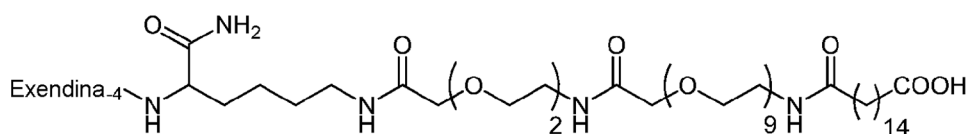
Se aumentaron 1,5 g de resina de Exendina-4(1-39)-Lys40(Alloc)-NH₂ en DMF, en la que se añadieron 3 eq de disolución de Pd(PPh₃)₄ en CHCl₃:AcOH:NMM (18:1:0.5). Se hicieron reaccionar durante 2 h, a continuación, se lavaron con cloroformo (6 veces, 20 ml de cloroformo para cada vez), se lavaron con disolución al 20 % de HOAc en diclorometano (6 veces, 20 ml de disolución al 20 % de HOAc en diclorometano para cada vez), se lavaron con diclorometano (6 veces, 20 ml de diclorometano para cada vez) y se lavaron con DMF (6 veces, 20 ml de DMF para

- 5 cada vez). Cuando se detectó como positivo con ninhidrina, se añadieron 5 ml de DMF, 528 mg del compuesto a21, 150 mg de HOAT (1-hidroxi-7-azobenzotriazol) y 150 μ l de DIC y se hicieron reaccionar durante 4 h; y, cuando se detectó como negativo con ninhidrina, lo que indicaba que la cadena lateral de a21 se había conectado en la resina de Exendina-4(1-39)-Lys40-NH₂. La pirólisis de la resina se llevó a cabo empleando un 82,5 % de TFA/5 % de fenol/5 % de agua/2,5 % de EDT/5 % de tioanisol y, a continuación, se precipitaron con metil terc-butil éter (MTBE) helado y se lavaron. Los productos brutos se purificaron por medio de HPLC para proporcionar 48 mg del compuesto objetivo.

MS(ESI⁺, m/e): 5123,50[M+H]⁺

Ejemplo 52 Preparación del compuesto 52

- 10 Se preparó el compuesto 52 con referencia al método del Ejemplo 51.

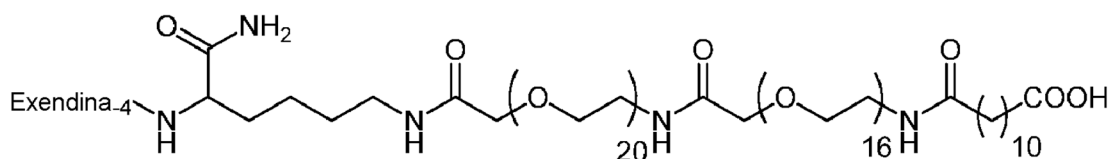


Se obtuvieron finalmente 47,5 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5178,76[M+H]⁺

Ejemplo 53 Preparación del compuesto 53

- 15 Se preparó el compuesto 53 con referencia al método del Ejemplo 51.

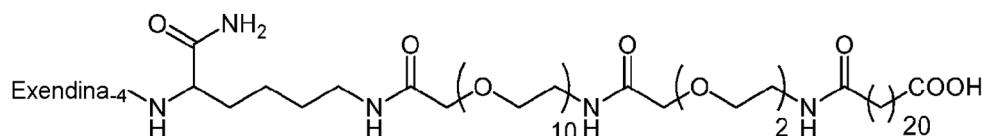


Se obtuvieron finalmente 53 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 6223,43[M+H]⁺

Ejemplo 54 Preparación del compuesto 54

- 20 Se preparó el compuesto 54 con referencia al método del Ejemplo 51.

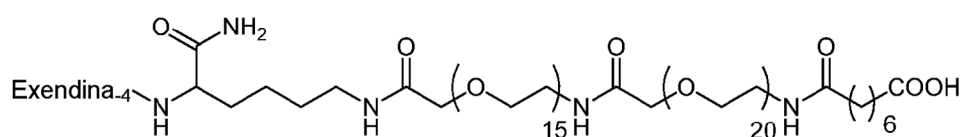


Se obtuvieron finalmente 48,3 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5306,91[M+H]⁺

Ejemplo 55 Preparación del compuesto 55

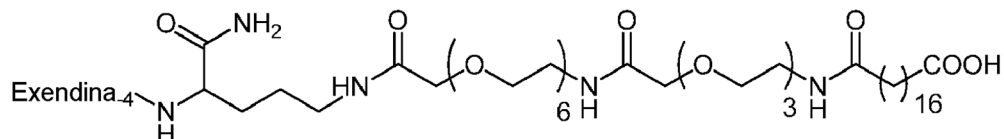
- 25 Se preparó el compuesto 55 con referencia al método del Ejemplo 51.



Se obtuvieron finalmente 52,8 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 6123,32[M+H]⁺

Ejemplo 56 Preparación del compuesto 56

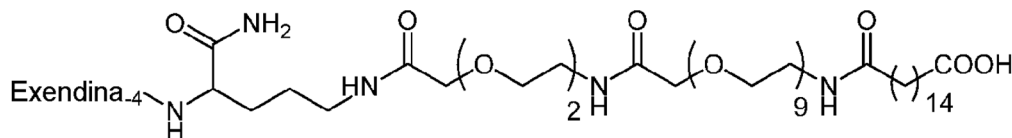


Se aumentaron 1,5 g de resina de Exendina-4(1-39)-Orn40(Alloc)-NH₂ en DMF, en la que se añadieron 3 eq de disolución de Pd(PPh₃)₄ en CHCl₃:AcOH:NMM (18:1:0.5). Se hicieron reaccionar durante 2 h, a continuación, se lavaron con cloroformo (6 veces, 20 ml de cloroformo para cada vez), disolución al 20 % de HOAc en diclorometano (6 veces, 20 ml de disolución al 20 % de HOAc en diclorometano para cada vez), se lavaron con diclorometano (6 veces, 20 ml de diclorometano para cada vez) y se lavaron con DMF (6 veces, 20 ml de DMF para cada vez). Cuando se detectó como positivo con ninhidrina, se añadieron 5 ml de DMF, 528 mg del compuesto BP 103m53, 150 mg de HOAT y 150 µl de DIC y se hicieron reaccionar durante 4 h; y, cuando se detectó como negativo con ninhidrina, lo que indicaba que la cadena lateral de BP103m53 se había conectado en la resina de Exendina-4(1-39)-Orn40-NH₂. La pirólisis de la resina se llevó a cabo empleando un 82,5 % de TFA/5 % de fenol/5 % de agua/2,5 % de EDT/5 % de tianisól y, a continuación, se precipitaron con metil terc-butil éter (MTBE) helado y se lavaron. Los productos brutos se purificaron por medio de HPLC para proporcionar 47 mg del compuesto objetivo.

MS(ESI⁺, m/e): 5104,72[M+H]⁺

Ejemplo 57 Preparación del compuesto 57

Se preparó el compuesto 57 con referencia al método del Ejemplo 56.

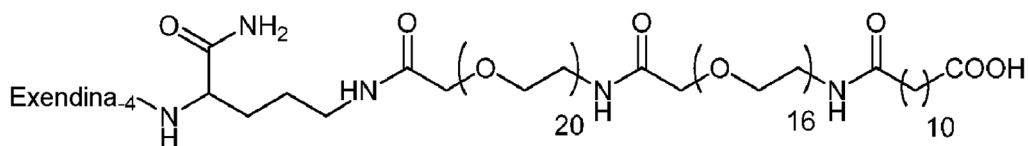


Se obtuvieron finalmente 48 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5164,74[M+H]⁺

Ejemplo 58 Preparación del compuesto 58

Se preparó el compuesto 58 con referencia al método del Ejemplo 56.

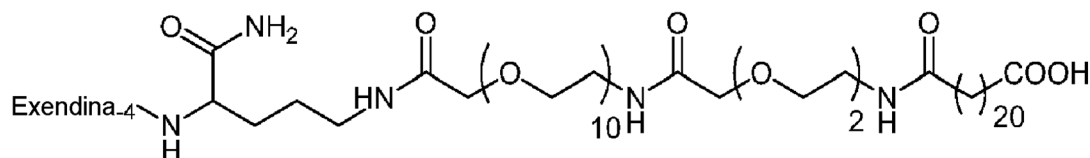


Se obtuvieron finalmente 51 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 6209,41[M+H]⁺

Ejemplo 59 Preparación del compuesto 59

Se preparó el compuesto 59 con referencia al método del Ejemplo 56.

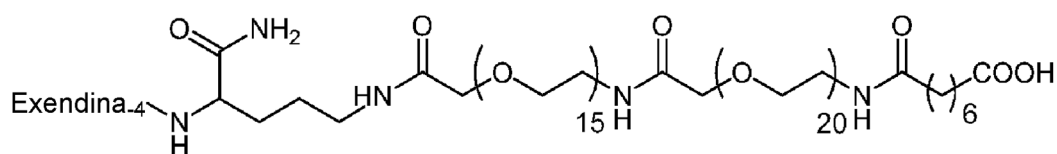


Se obtuvieron finalmente 47,6 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 5292,89[M+H]⁺

Ejemplo 60 Preparación del compuesto 60

- 5 Se preparó el compuesto 60 con referencia al método del Ejemplo 56.



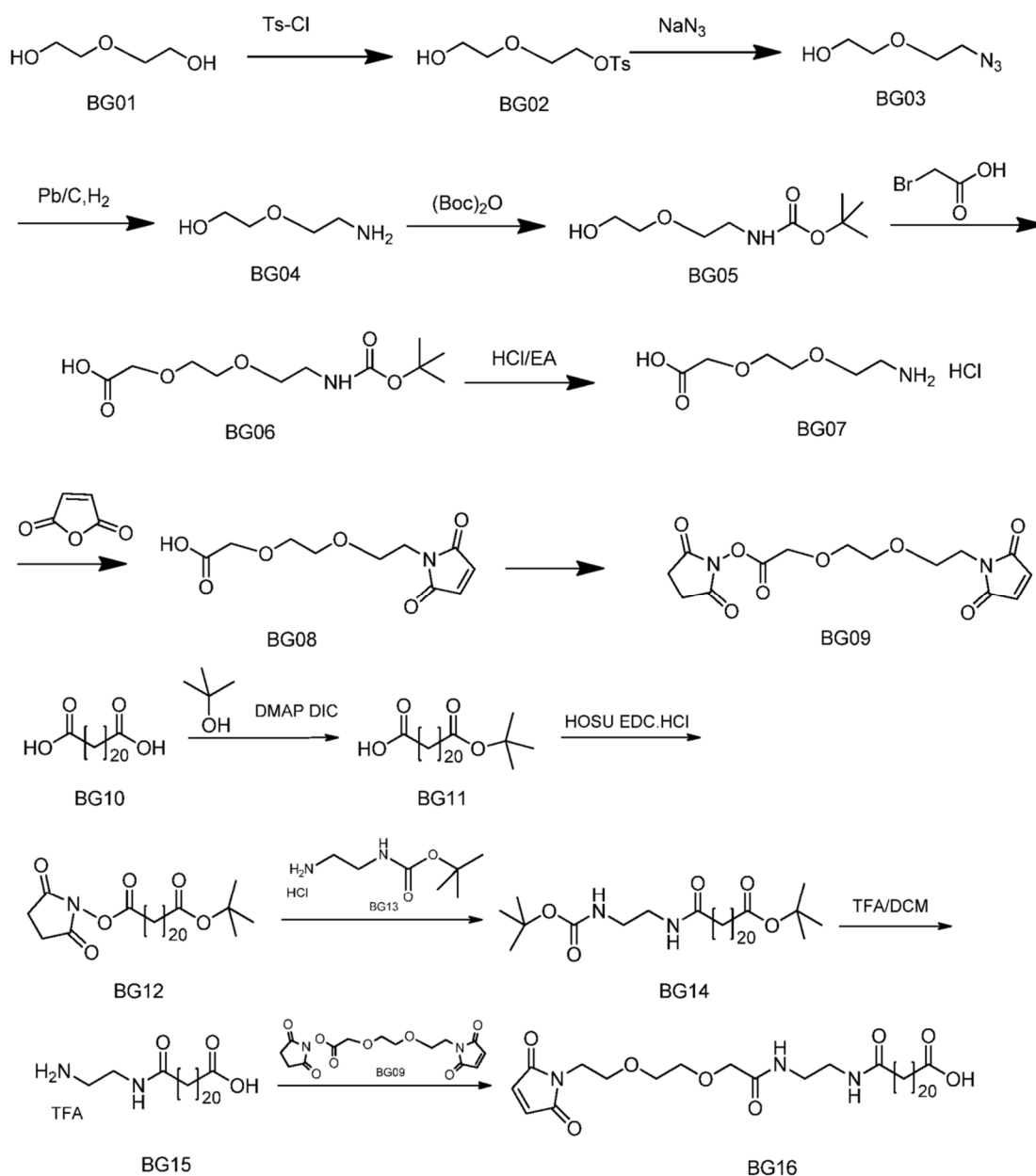
Se obtuvieron finalmente 49,7 mg del péptido objetivo puro.

MS(ESI⁺, m/e): 6109,3[M+H]⁺

Ejemplo 61 Preparación del compuesto 61

- 10 Preparación de Exendina-4(1-39)-Cys(40)-NH₂

Se sintetizaron los péptidos en fase sólida de los péptidos objetivo empleando la síntesis en fase sólida del proceso Fmoc, usando resina Fmoc-Rink MBHA Amide, en la que se usó piperidina/DMF al 20 % para retirar Fmoc, se usó HOBT/DIC como el reactivo de acoplamiento y el disolvente reactivo fue DMF. La reacción se monitoreó empleando el método de detección de la ninhidrina, conectando sucesivamente los siguientes aminoácidos protegidos sobre la resina Rink MBHA Amide: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, con la protección de Fmoc retirada finalmente. Se lavaron con DMF, diclorometano y MeOH y, a continuación, se secaron para proporcionar resina con protección completa. La pirólisis de la resina se logró empleando un 82,5 % de TFA/5 % de fenol/5 % de agua/2,5 % de EDT/5 % de tioanisol y, a continuación, se precipitaron con metil terc-butil éter (MTBE) helado y se lavaron, y los productos brutos se purificaron por medio de HPLC inversa para proporcionar Exendina-4(1-39)-Cys(40)-NH₂ pura.



Preparación de BG02

Bajo la protección de nitrógeno, se añadieron 200 ml de piridina, 18,8 g de BG01 (1,0 eq) a un matraz de tres bocas de 500 ml, se agitaron y se enfriaron hasta 0 °C. Se añadieron de forma discontinua 35,5 g de TsCl (1,0 eq), se agitaron durante 1 h y, a continuación, se calentaron lentamente hasta temperatura ambiente, y se continuó agitando durante 3-4 h. Después de la compleción de la reacción, el líquido de reacción se vertió en la disolución helada de ácido hidroclicó diluido, que genera un sólido, que se extrae con acetato de etilo. La capa de acetato de etilo se lavó una vez con ácido hidroclicó diluido, se lavó con bicarbonato de sodio saturado y salmuera saturada y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Los disolventes se evaporaron a una presión reducida y se sometieron a cromatografía en una columna de gel de sílice para proporcionar 22,7 g de BG02 puro.

Preparación de BG03

Se añadieron 22,7 g de BG02 (1,0 eq) y 190 ml de DMSO a un matraz de tres bocas de 500 ml, se agitaron uniformemente y se añadieron a continuación 11,5 g de NaN₃ (2,0 eq), se calentaron hasta 50 °C y se hicieron reaccionar durante 3 horas, y se enfriaron hasta temperatura ambiente. El líquido de reacción se vertió en agua, se

extrajo muchas veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 17,1 g de BG03 como un líquido incoloro.

Preparación de BG04

- 5 Se añadieron 30 g de BG03, 500 ml de metanol, 8,0 g de paladio sobre carbono a un reactor de hidrogenación de 1 l, se agitaron, con nitrógeno reemplazado por medio de la introducción de hidrógeno para hacerlos reaccionar durante 3-4 h. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se filtró el líquido de reacción y el filtrado se concentró para proporcionar 19,4 g de BG04 como un aceite.

Preparación de BG05

- 10 Se añadieron 3,7 g de BG04 (1,0 eq), 15,5 g de (Boc)₂O (2,0 eq), 200 ml de una disolución mezclada de metanol:triethylamina (9:1) a un matraz de tres bocas de 500 ml, se agitaron y se calentaron hasta reflujo y se hicieron reaccionar durante 1 h. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se evaporó el metanol triethylamina y se disolvió en agua. El diclorometano se extrajo 3 veces. Las capas orgánicas se combinaron y se lavaron una vez con agua, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 4,8 g de BG05 como un aceite.

15 Preparación de BG06

- 20 Se añadieron 3,7 g del compuesto BG05 (1,0 eq), 40 ml de tolueno y 40 ml de THF, 7,6 g de ácido bromoacético (3,0 eq) a un matraz de tres bocas de 250 ml, se agitaron, se calentaron hasta 45~50 °C, a continuación, se añadieron 4,4 g de hidróxido de sodio y se hicieron reaccionar durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, el líquido de reacción se evaporó, se extrajeron las impurezas con agua y acetato de etilo, y se ajustó la fase acuosa a pH=3. Se extrajo la fase acuosa con diclorometano, y se combinaron las capas de diclorometano, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y, a continuación, se concentraron para proporcionar 2,5 g del compuesto BG06 aceitoso.

Preparación de BG07

- 25 Se añadieron 2,4 g del compuesto BG06 y 20 ml de acetato de etilo a un matraz de una boca de 100 ml, después de que se disolvieran, se enfriaron hasta 0 °C, se añadieron 20 ml de HCl/acetato de etilo (7 mol/l). Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se concentraron para proporcionar 2,3 g de BG07 como un aceite.

Preparación de BG08

- 30 Se añadieron 3,5 g del compuesto BG07 (1,0 eq), 1,7 g de anhídrido maleico (1,0 eq), 70 ml de ácido acético a un matraz de tres bocas de 200 ml y se calentaron hasta reflujo durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, el ácido acético se evaporó, se añadió acetato de etilo para disolverlo y, a continuación, se lavó con agua 3 veces, se lavó con cloruro de sodio saturado 3 veces, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se sometió a cromatografía en una columna para proporcionar 1,8 g de BG08 como un sólido blanquecino.

Preparación de BG09

- 35 Se añadieron 1,30 g de N-hidroxisuccinimida (HOSU) (1,53 eq), 3,1 g de compuesto, 1,8 mg BG08 y 15 ml de diclorometano a un matraz de tres bocas de 100 ml, al que se añadieron 2,16 g de EDC·HCl (1,53 eq) y se hicieron reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se diluyeron con diclorometano y, a continuación, se lavaron 2 veces con 50 mmol/l de disolución acuosa de dihidrógeno fosfato de potasio a un pH=6,0, se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 2,2 g del compuesto BG09 blanquecino.

Preparación de BG11

- 45 Se añadieron 2,17 g del compuesto BG10 (1,0 eq), 10 ml de diclorometano, 10 ml de terc-butanol, 0,40 g de DIC (1,0 eq) y 0,39 g de DMAP (1,0 eq) a un matraz de tres bocas de 50 ml y se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se diluyeron con éter y, a continuación, se lavaron con agua 3 veces, se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 0,6 g de BG11 como un polvo esponjoso.

Preparación de BG12

- 50 Se añadieron 0,95 g de N-hidroxisuccinimida (HOSU), 3,1 g del compuesto BG11 y 15 ml de diclorometano a un matraz de tres bocas de 100 ml, al que se añadieron 1,58 g de EDC·HCl, y se hicieron reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se diluyeron con diclorometano y, a continuación, se lavaron 2 veces con 50 mmol/l de disolución acuosa de dihidrógeno fosfato de

potasio a un pH=6,0, se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 3,3 g del compuesto BG12 como un sólido blanco.

Preparación de BG14

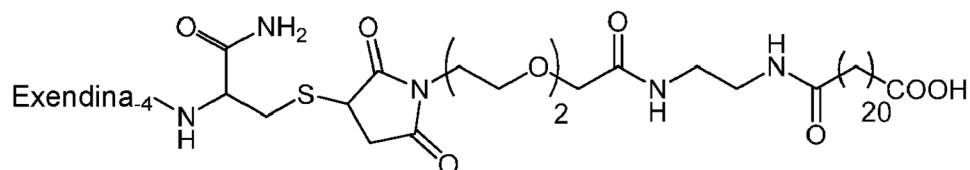
5 Se añadieron 2,8 g del compuesto BG13 (1,05 eq), 50 ml de agua, 1,8 g de NaHCO_3 (2,0 eq) a un matraz de 200 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 6,4 g del compuesto BG12 (1,0 eq) en 50 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 50 ml de THF y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=4 con ácido acético, se extrajeron con acetato de etilo, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 6,9 g del compuesto BG14 como un sólido blanquecino.

10 Preparación de BG15

Se añadieron 6,9 g del compuesto BG14, 30 ml de diclorometano, 30 ml de TFA a un matraz de 100 ml y se agitaron a 20 °C. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se suspendieron con éter de petróleo, se filtraron por aspiración y se secaron para proporcionar 5,35 g de BG15 como un sólido blanquecino.

15 Preparación de BG16

Se añadieron 1,27 g del compuesto BG15 (1,0 eq), 10 ml de agua, 0,36 g de NaHCO_3 (2,0 eq) a un matraz de 100 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 0,72 g del compuesto BG09 (1,0 eq) en 10 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 10 ml de THF y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=6 con ácido acético y se extrajeron con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con agua y salmuera saturada y, a continuación, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se concentraron y se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 0,9 g del compuesto BG16 como un sólido blanquecino.

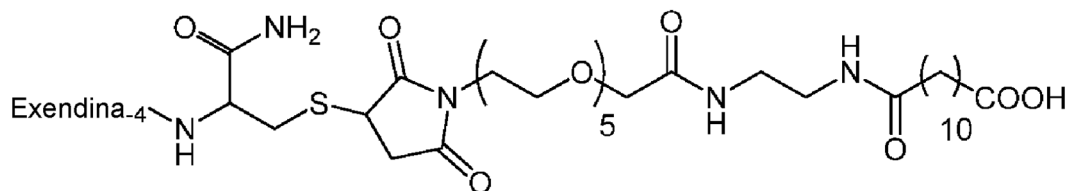


25 Se disolvieron 50,0 mg de Exendina-4(1-39)-Cys(40)-NH₂ en 10 ml de tampón de fosfato de sodio (pH 6,5) a 20 mM, se añadieron 16 mg de BG16 y se agitaron durante 1 hora a la condición de 20 °C. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la HPLC, se detuvo la reacción con disolución de exceso de cisteína (0,5 ml de disolución de cisteína 0,5 M), se preparó con HPLC y, a continuación, se liofilizó para proporcionar 30 mg de compuesto de acoplamiento.

MS(ESI⁺, m/e): 4926,49[M+H]⁺.

30 Ejemplo 62 Preparación del compuesto 62

Se preparó el compuesto 62 con referencia al método del Ejemplo 61.

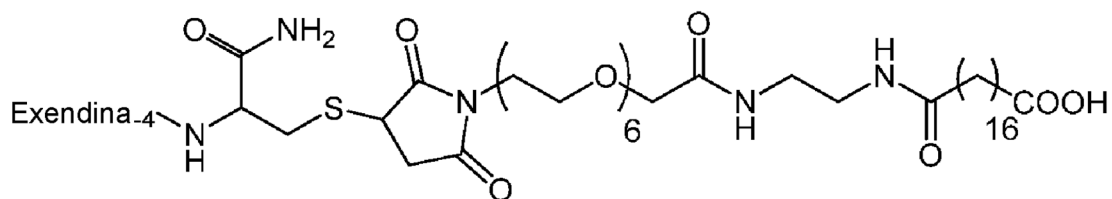


Los productos brutos se purificaron por medio de HPLC para proporcionar 31 mg del compuesto objetivo.

MS(ESI⁺, m/e): 4918,41[M+H]⁺.

35 Ejemplo 63 Preparación del compuesto 63

Se preparó el compuesto 63 con referencia al método del Ejemplo 61.

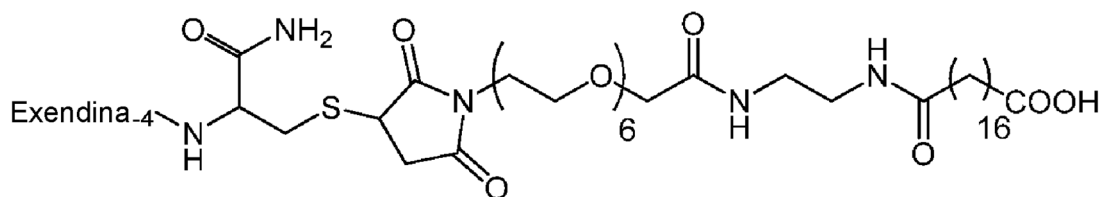


Los productos brutos se purificaron por medio de HPLC para proporcionar 31 mg del compuesto objetivo.

MS(ESI⁺, m/e): 5046,53[M+H]⁺.

Ejemplo 64 Preparación del compuesto 64

- 5 Se preparó el compuesto 64 con referencia al método del Ejemplo 61.

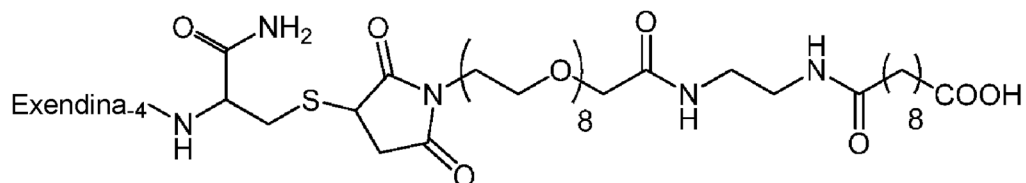


Los productos brutos se purificaron por medio de HPLC para proporcionar 29 mg del compuesto objetivo.

MS(ESI⁺, m/e): 5022,46[M+H]⁺.

Ejemplo 65 Preparación del compuesto 65

- 10 Se preparó el compuesto 65 con referencia al método del Ejemplo 61.

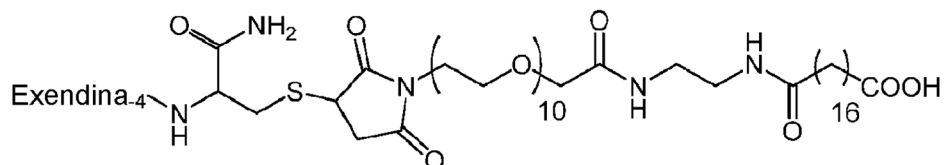


Los productos brutos se purificaron por medio de HPLC para proporcionar 34 mg del compuesto objetivo.

MS(ESI⁺, m/e): 5222,63[M+H]⁺.

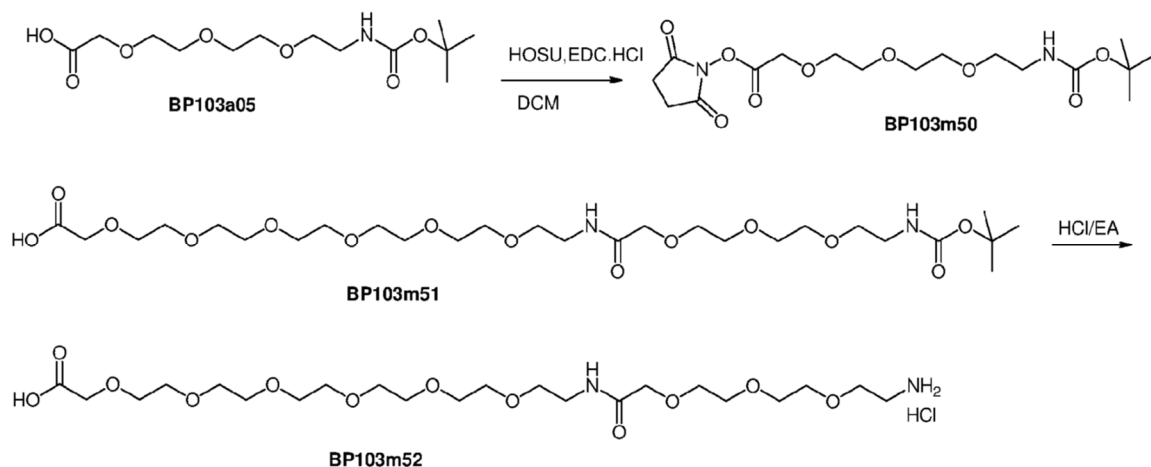
Ejemplo 66 Preparación del compuesto 66

- 15 Se preparó el compuesto 66 con referencia al método del Ejemplo 61.



Los productos brutos se purificaron por medio de HPLC para proporcionar 32 mg del compuesto objetivo.

MS(ESI⁺, m/e): 5126,5[M+H]⁺.

Ejemplo 67 Preparación del compuesto 67**Preparación del compuesto BP103m50**

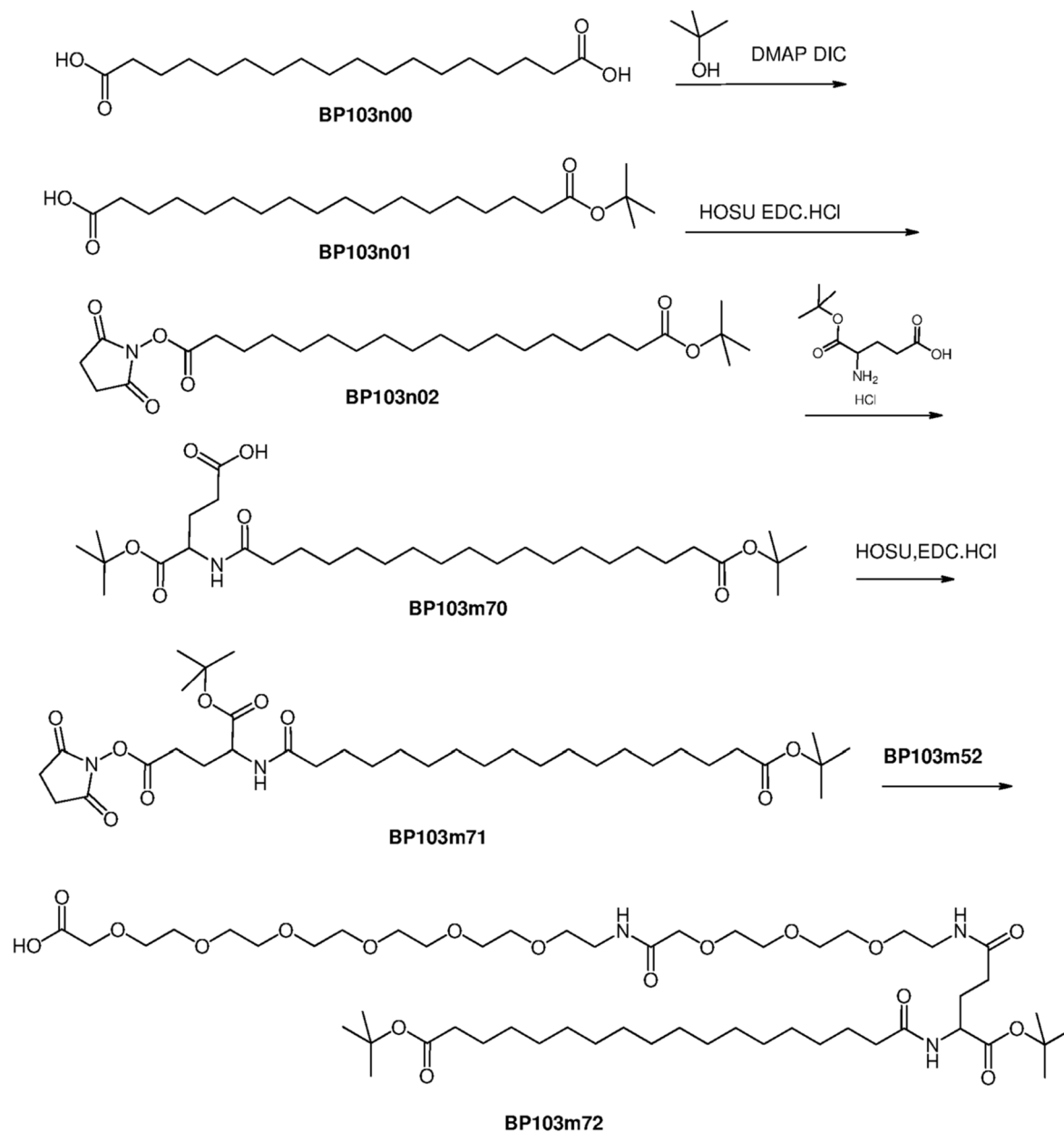
5 Se añadieron 286 mg de N-hidroxisuccinimida (HOSU), 0,50 g de BP103a05 y 5 ml de diclorometano a un matraz de tres bocas de 100 ml, al que se añadieron 477 mg de EDC.HCl, y se hicieron reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se diluyeron con diclorometano y, a continuación, se lavaron 2 veces con 50 mmol/l de disolución acuosa de dihidrógeno fosfato de potasio a un pH=6,0, se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 0,72 g del compuesto BP103m50 como un aceite.

10 Preparación del compuesto BP103m51

15 Se añadieron 0,62 g del compuesto BP103g06 (1,0 eq), 10 ml de agua, 0,27 g de NaHCO₃ (2,0 eq) a un matraz de 100 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 0,66 g del compuesto BP103m50 en 10 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 5 ml de THF y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=4 con ácido hidrocórico diluido, se extrajeron con diclorometano, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 0,71 g del compuesto BP103m51 como un aceite.

Preparación del compuesto BP103m52

20 Se añadieron 0,71 g del compuesto BP103m51 y 5 ml de acetato de etilo a un matraz de 100 ml, después de que se disolvieran, se enfriaron hasta 0 °C, se añadieron 5 ml de HCl/acetato de etilo (7 mol/l), se mantuvo la temperatura a 0 °C. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se concentraron para proporcionar 0,71 g de BP103m52 como un aceite.



Preparación del compuesto BP103n01

- 5 Se añadieron 1,0 g del compuesto BP103n00 (1,0 eq), 10 ml de diclorometano, 10 ml de terc-butanol, 0,40 g de DIC (1,0 eq) y 0,39 g de DMAP (1,0 eq) a un matraz de tres bocas de 50 ml y se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se diluyeron con éter y se lavaron con agua 3 veces, se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se sometieron a cromatografía en una columna para proporcionar 0,4 g de BP103n01 como un polvo esponjoso.

Preparación del compuesto BP103n02

- 10 Se añadieron 0,95 g de N-hidroxisuccinimida (HOSU), 2,0 g del compuesto BP103n01 y 15 ml de diclorometano a un matraz de tres bocas de 100 ml, al que se añadieron 1,58 g de EDC.HCl, y se hicieron reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se diluyeron con diclorometano y, a continuación, se lavaron 2 veces con 50 mmol/l de disolución acuosa de dihidrógeno fosfato de potasio a un pH=6,0, se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 2,6 g del compuesto BP103n02 como un sólido blanco.

- 15 Preparación del compuesto BP103m70

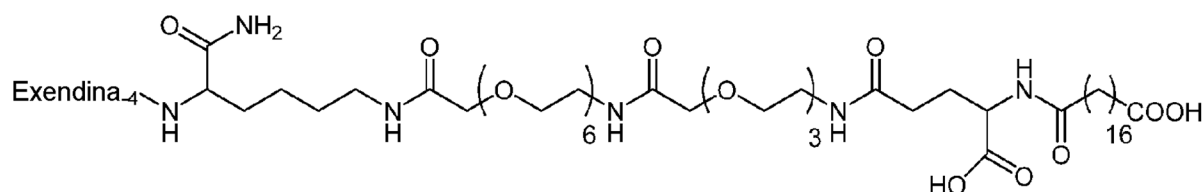
Se añadieron 0,50 g del compuesto H-Glu-OtBu.HCl (1,0 eq), 10 ml de agua, 350 mg de NaHCO₃ (2,0 eq) a un matraz de 100 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 0,96 g del compuesto BP103n02 (1,0 eq) en 10 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 10 ml de THF y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=6 con ácido acético, se extrajeron con diclorometano, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 1,09 g del compuesto BP103m70 como un aceite.

Preparación del compuesto BP103m71

Se añadieron 1,0 g del compuesto BP103m70, 317 mg de N-hidroxisuccinimida (HOSU) (1,53 eq) y 10 ml de diclorometano a un matraz de tres bocas de 100 ml, al que se añadieron 528 mg de EDC.HCl (1,53 eq) y se hicieron reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, se diluyeron con diclorometano y, a continuación, se lavaron 2 veces con 50 mmol/l de disolución acuosa de dihidrógeno fosfato de potasio a un pH=6,0, se lavaron con salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 1,07 g del compuesto BP103m71 como un sólido blanco.

Preparación del compuesto BP103m72

Se añadieron 0,87 g del compuesto BP103m52 (1,0 eq), 10 ml de agua, 300 mg de NaHCO₃ (2,0 eq) a un matraz de 100 ml y se agitaron. Se añadió gota a gota una disolución de 1,00 g del compuesto BP103m71 (1,0 eq) en 10 ml de DME (etilenglicol dimetil éter), se reaprovisionó con 10 ml de THF y se agitó durante la noche. Después de la compleción de la reacción bajo la monitorización de la TLC, los disolventes orgánicos se evaporaron, se ajustó el pH=6 con ácido acético, se extrajeron con diclorometano, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron para proporcionar 1,22 g del compuesto BP103m72 como un aceite.



Síntesis del péptido objetivo

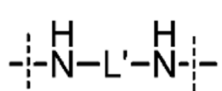
Se aumentaron 1,5 g de resina de Exendina-4(1-39)-Lys40(Alloc)-NH₂ en DMF, en la que se añadieron 3 eq de disolución de Pd(PPh₃)₄ en CHCl₃:AcOH:MM (18:1:0.5). Se hicieron reaccionar durante 2 h, a continuación, se lavaron con cloroformo (6 veces, 20 ml de cloroformo para cada vez), se lavaron con disolución al 20 % de HOAc en DCM (6 veces, 20 ml de disolución al 20 % de HOAc en DCM para cada vez), se lavaron con DCM (6 veces, 20 ml de DCM para cada vez) y se lavaron con DMF (6 veces, 20 ml de DMF para cada vez). Cuando se detectó como positivo con ninhidrina, se añadieron 5 ml de DMF, 640mg del compuesto BP103m72, 150 mg de HOAT y 150 ul de DIC y se hicieron reaccionar durante 4 h; y, cuando se detectó como negativo con ninhidrina, lo que indicaba que la cadena lateral de BP103m72 se había conectado en la resina de Exendina-4(1-39)-Lys40-NH₂. La pirólisis de la resina se llevó a cabo empleando un 82,5 % de TFA/5 % de fenol/5 % de agua/2,5 % de EDT/5 % de tioanisol y, a continuación, se precipitaron con metil terc-butil éter (MTBE) helado y se lavaron. Los productos brutos se purificaron por medio de HPLC para proporcionar 48 mg del compuesto objetivo.

MS(ESI⁺, m/e): 5252,54[M+H]⁺.

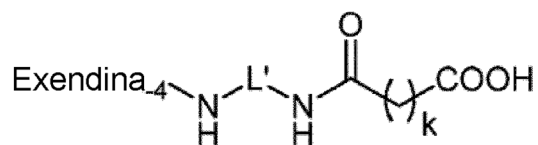
REIVINDICACIONES

1. Un modificador de exenatida o sales farmacéuticamente aceptables del mismo que tienen actividad del agonista del receptor de GLP-1, como se muestra en la fórmula (I):

(Ex-4)-L-Y (I)

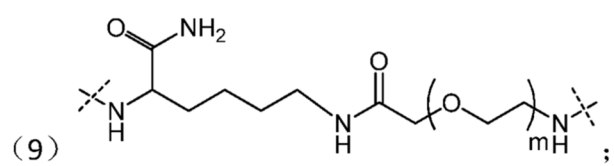
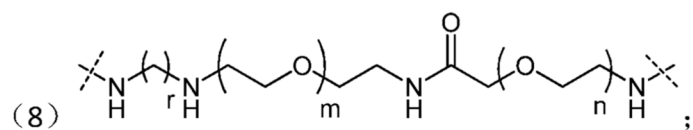
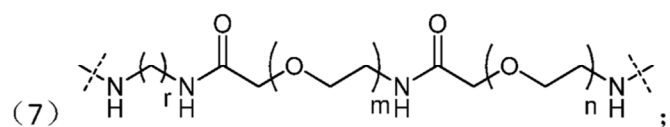
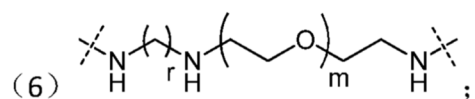
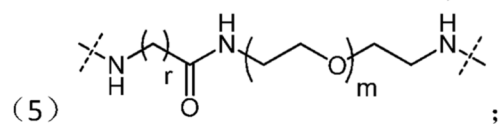
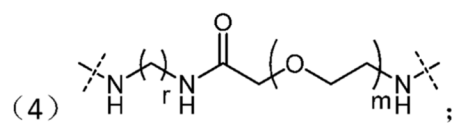
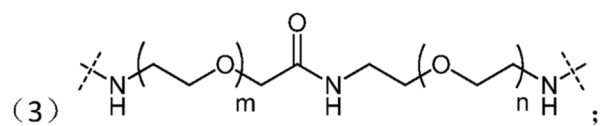
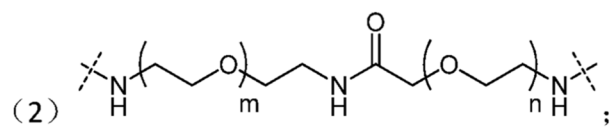
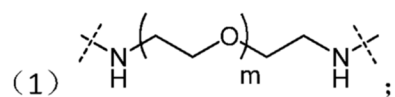


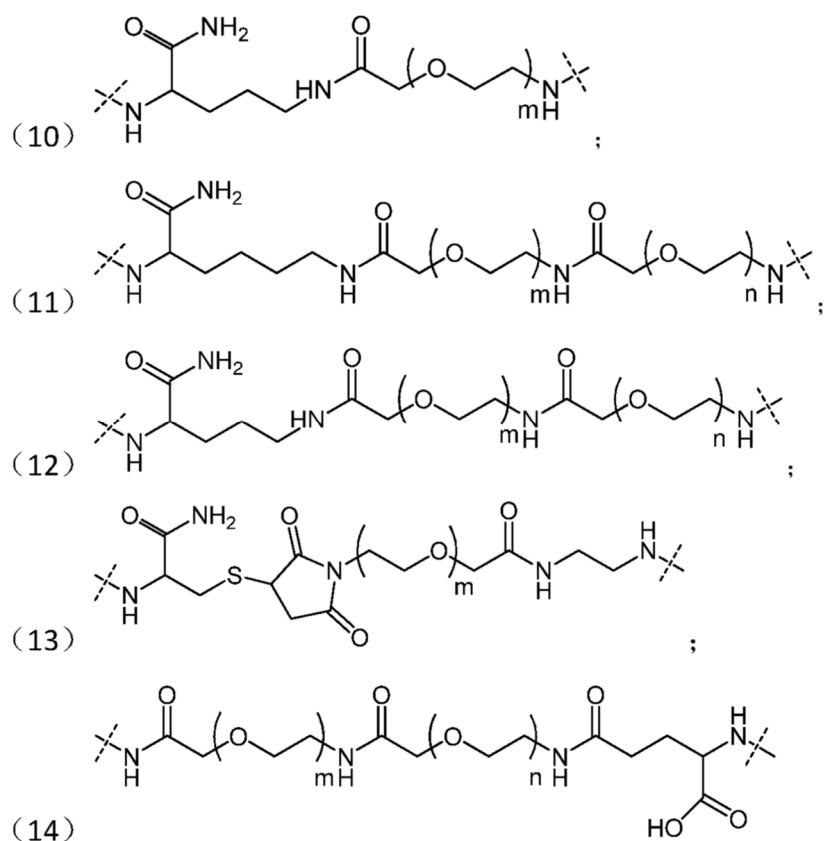
5 en donde, Ex-4 es Exendina-4; L es para conectar Ex-4 con Y; L' es una cadena hidrofílica que contiene un grupo éter; Y es una cadena alifática con un grupo carboxilo terminal, en donde el modificador de exenatida es:



k es cualquier número entero entre 6-20.

10 2. El modificador de exenatida o sales farmacéuticamente aceptables del mismo según la reivindicación 1, en donde L se selecciona de entre:

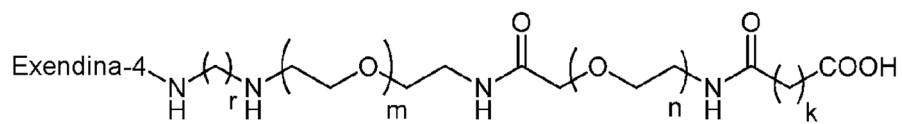
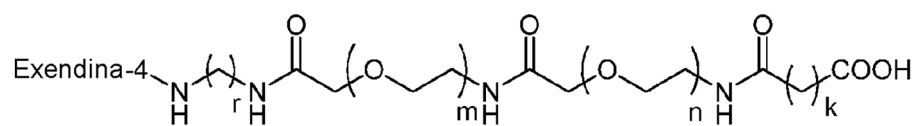
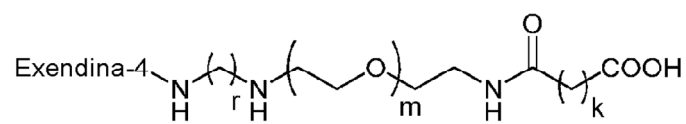
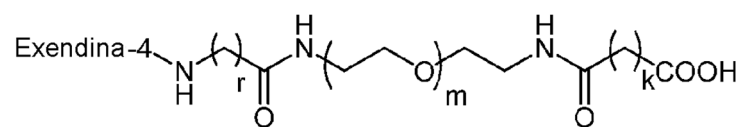
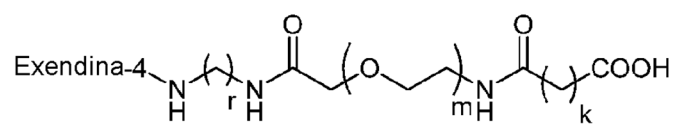
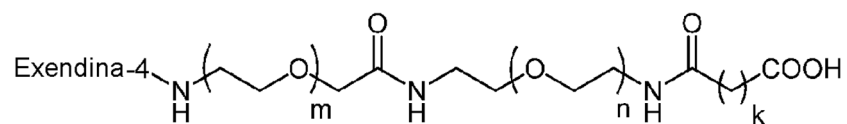
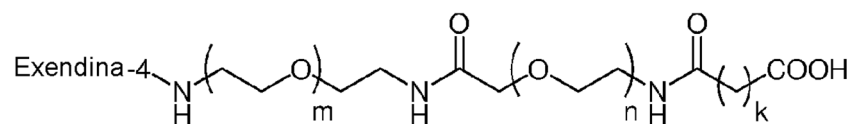
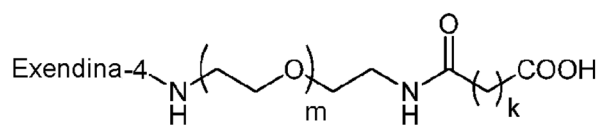


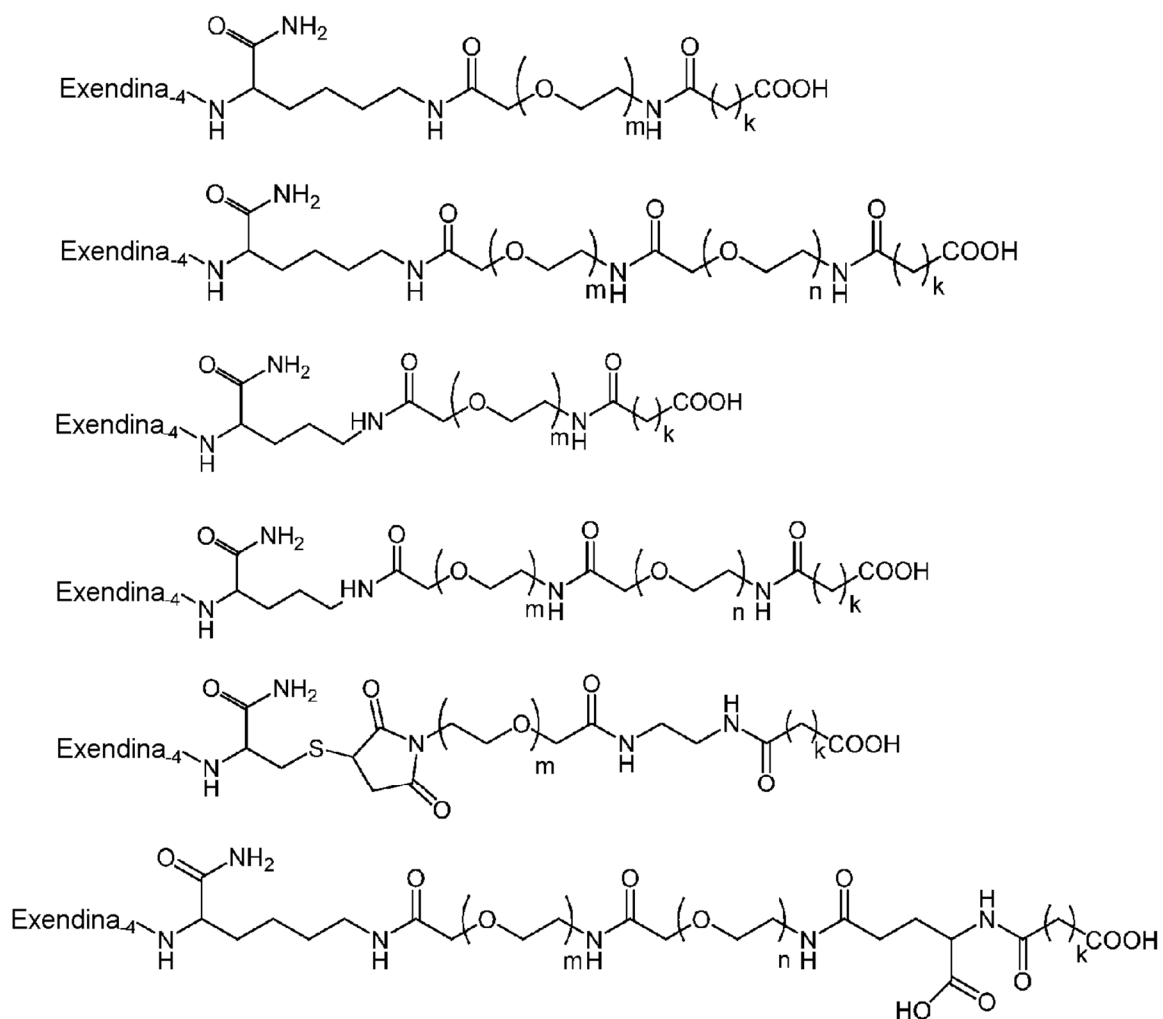


en donde, m es cualquier número entero entre 2-20; n es cualquier número entero entre 2-20; r es cualquier número entero entre 1-6.

3. El modificador de exenatida o sales farmacéuticamente aceptables del mismo según la reivindicación 1, en donde el modificador de exenatida es:

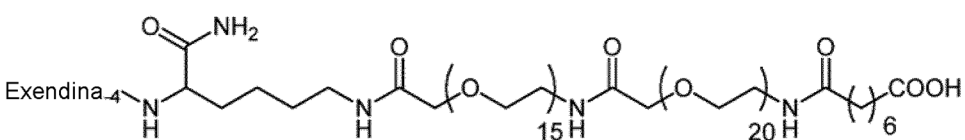
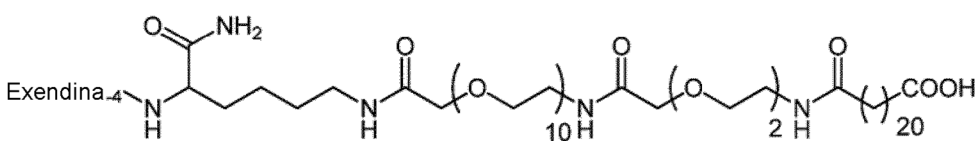
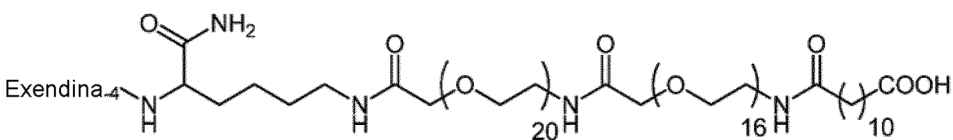
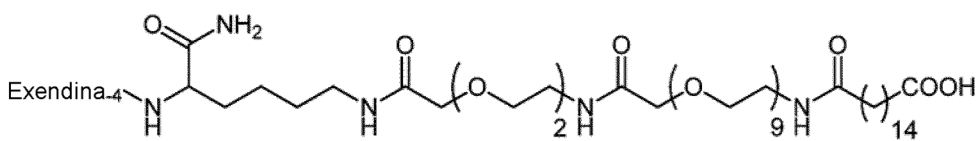
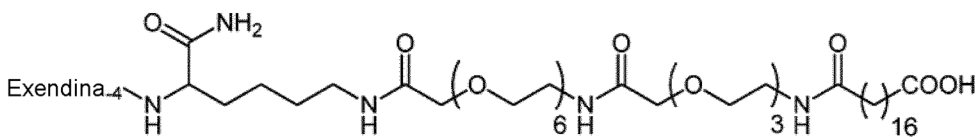
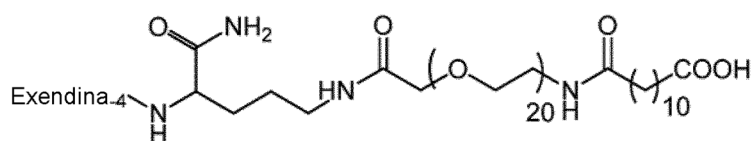
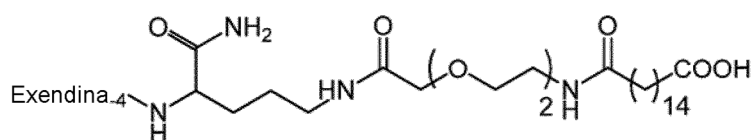
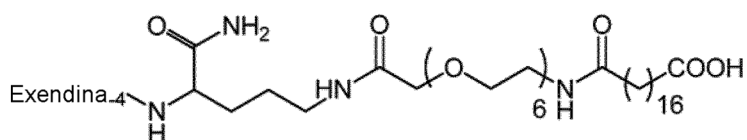
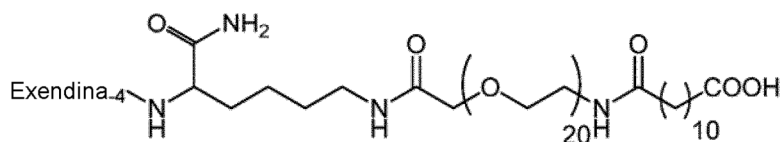
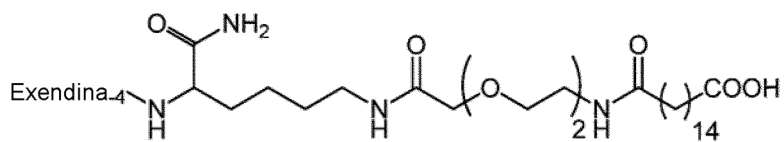
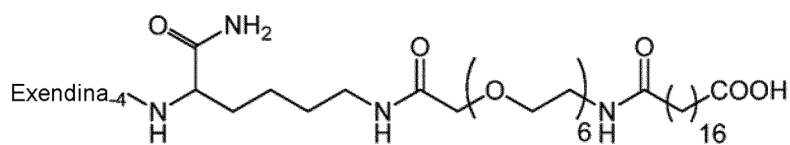
5

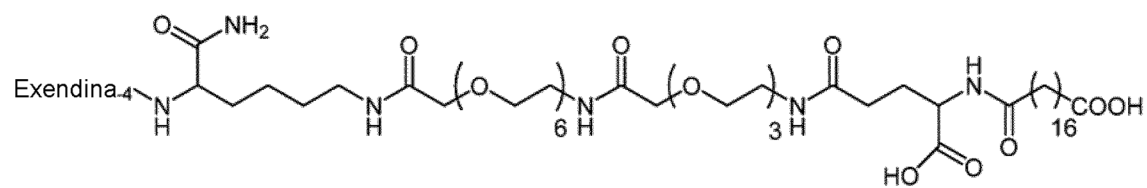
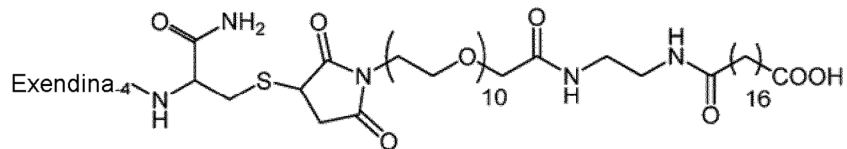
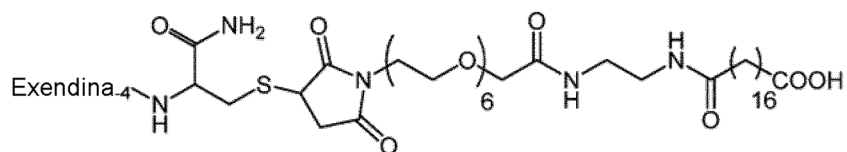
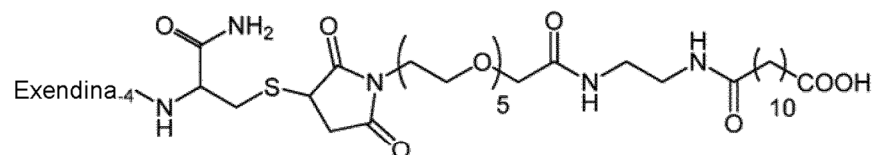
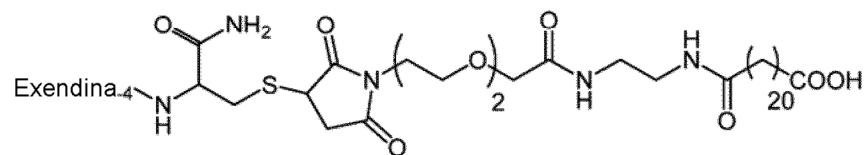
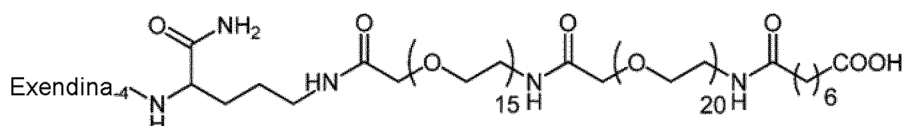
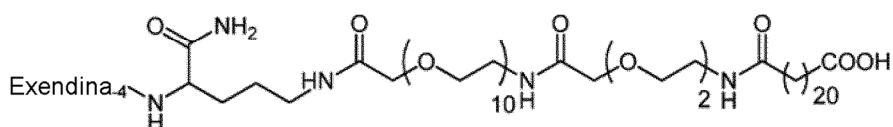
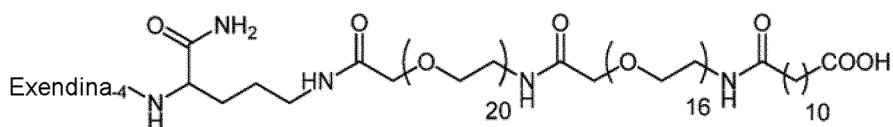
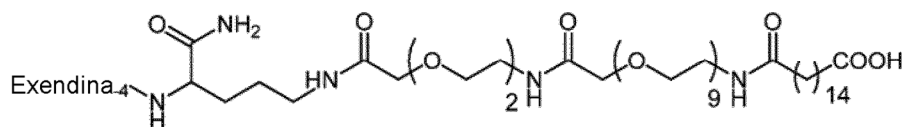
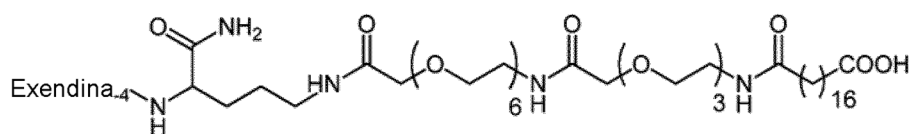




en donde m es cualquier número entero entre 2-20; n es cualquier número entero entre 2-20; r es cualquier número entero entre 1-6; k es cualquier número entero entre 6-20.

4. El modificador de exenatida o sales farmacéuticamente aceptables del mismo según la reivindicación 3, que
5 comprende los siguientes compuestos:





5. El modificador de exenatida o sales farmacéuticamente aceptables del mismo según la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento de enfermedades y/o síntomas asociados con el glucometabolismo,
- o para su uso en el tratamiento de la diabetes,
- o para su uso en el tratamiento de la esteatosis hepática,
- 5 o para su uso en el método para perder peso.
6. Una composición farmacéutica que comprende el modificador de exenatida o sales farmacéuticamente aceptables del mismo según la reivindicación 1 o 2 y, opcionalmente, vehículos farmacéuticamente aceptables.
7. La composición de la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de enfermedades y/o síntomas asociados con el glucometabolismo,
- 10 o para su uso en el tratamiento de la diabetes,
- o para su uso en el tratamiento de la esteatosis hepática,
- o para su uso en el método para perder peso.