

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035813**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.14

(51) Int. Cl. **C07K 14/605** (2006.01)

(21) Номер заявки
201591891

(22) Дата подачи заявки
2014.05.27

**(54) ПЕПТИД-КОАГОНИСТ РЕЦЕПТОРА GLP-1 И РЕЦЕПТОРА GIP И ЕГО
ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ИЛИ ЛЕЧЕНИЯ ОЖИРЕНИЯ ИЛИ ДИАБЕТА
У МЛЕКОПИТАЮЩЕГО**

(31) 2013-111893

(32) 2013.05.28

(33) JP

(43) 2016.01.29

(86) PCT/JP2014/002772

(87) WO 2014/192284 2014.12.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:
Асами Таидзи, Ниита Аюму (JP)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A2-2010/011439

WO-A2-2012/088379

STEFFEN RUNGE ET AL.: "Differential Structural Properties of GLP-1 and Exendin-4 Determine Their Relative Affinity for the GLP-1 Receptor N-Terminal Extracellular Domain +", *BIOCHEMISTRY*, vol. 46, no. 19, 1 May 2007 (2007-05-01), pages 5830-5840, XP055138608, ISSN: 0006-2960, DOI: 10.1021/bi062309m, the whole document

AL-SABAH SULEIMAN ET AL.: "A model for receptor-peptide binding at the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor through the analysis of truncated ligands and receptors", *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, BASINGSTOKE, HANTS; GB*, vol. 140, no. 2, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 339-346, XP002437826, ISSN: 0007-1188, DOI: 10.1038/SJ.BJP.0705453, the whole document

(57) Изобретение относится к пептиду, обладающему активностью коагониста рецептора GLP-1 и рецептора GIP, а также к применению заявленного пептида для профилактики или лечения ожирения или диабета у млекопитающего, к соответствующему лекарственному средству, к соответствующему способу, а также к способу активации рецептора GLP-1 и рецептора GIP.

B1

035813

035813 B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к новому пептидному соединению, обладающему активирующим действием на рецепторы GLP-1 и рецепторы GIP, и к применению пептидного соединения в качестве лекарственного средства.

Уровень техники

Как глюкагонподобный пептид-1 (GLP-1), так и зависимый от глюкозы инсулинотропный полипептид (GIP), представляют собой пептиды, называемые инкретинами. GLP-1 и GIP секретируются из L-клеток и K-клеток тонкого кишечника, соответственно.

GLP-1 действует через рецепторы GLP-1 и известно, что он обладает зависимым от глюкозы инсулинотропным действием и действием подавления пищевой активности. С другой стороны, известно, что GIP обладает зависимым от глюкозы инсулинотропным действием через рецепторы GIP, хотя его влияние на пищевую активность является неясным.

Было описано, что совместное введение агониста рецептора GLP-1 лираглутида и агониста рецептора GIP N-Ас-GIP в большей степени усиливает действие повышения толерантности к глюкозе и действие снижения массы тела, чем введение только лираглутида (непатентный документ 1). Также было описано, что пептид, являющийся совместным агонистом рецептора GLP-1/рецептора GIP, демонстрирует более выраженное гипогликемическое действие и действие снижения массы тела, чем агонист рецептора GLP-1 отдельно (патентный документ 1).

Также были предприняты попытки поиска пептидов, обладающих активностью коагониста рецептора GLP-1/рецептора GIP или активностью тройного агониста глюкагон/рецептор GLP-1/рецептор GIP, и разработки этих пептиды в качестве лекарственных средств против ожирения или терапевтических лекарственных средств от диабета, исходя из структуры природного глюкагона, GIP или GLP-1 (патентные документы с 1 по 8). Однако ни в одном из документов не описано пептидное соединение по настоящему изобретению.

Список ссылок

Патентный документ

Патентный документ 1: WO 2010/011439
 Патентный документ 2: WO 2010/148089
 Патентный документ 3: WO 2011/119657
 Патентный документ 4: WO 2012/088379
 Патентный документ 5: WO 2012/167744
 Патентный документ 6: WO 2013/164483
 Патентный документ 7: WO 2013/192129
 Патентный документ 8: WO 2013/192130

Непатентный документ

Непатентный документ 1: Clinical Science 121, 107-117 (2011)

Сущность изобретения

Техническая задача

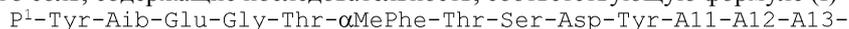
Настоящее изобретение направлено на получение нового пептидного соединения, обладающего высокой активностью коагониста рецептора GLP-1/рецептора GIP и пригодного в качестве средства для профилактики или лечения ожирения и т.п.

Решение задачи

Авторы настоящего изобретения провели тщательные исследования, касающиеся нового пептидного соединения, обладающего более высокой активностью коагониста рецептора GLP-1/рецептора GIP и являющегося пригодным в качестве средства для профилактики или лечения ожирения и т.п., и обнаружили, что пептидное соединение, содержащее частичную последовательность, соответствующую формуле (I), представленной ниже, и т.п. обладает более высокой активностью коагониста рецептора GLP-1/рецептора GIP, что привело к осуществлению настоящего изобретения.

Таким образом, настоящее изобретение относится к следующему:

[1] пептид или его соль, содержащие последовательность, соответствующую формуле (I)



где

P^1 выбран из атома водорода, метильной группы, ацетильной группы, бензоильной группы, 4-пиридилкарбонильной (4-PrCO) группы, циклопропанкарбонильной (CPrCO) группы и амидиногруппы;

A11 представляет собой Aib или Ala;

A12 представляет собой Ala, Ile, Lys, Phe или Pya(4);

A13 представляет собой Aib, Cha, Leu, α MePhe, α -MeTyr или Tyr;

A16 представляет собой Lys или Ser;

A17 представляет собой Gln или He;

- A20 представляет собой Ala, Ser или Gln и
 A29 представляет собой Gln или Gly, и
 P² представляет собой аминокислотную последовательность Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys или Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser,
 причем пептид или его соль имеет активность коагониста рецептора GLP-1/рецептора GIP;
- [2] Пептид или его соль согласно [1], где P¹ представляет собой атом водорода;
 [3] Пептид или его соль согласно [1], где A11 представляет собой Aib;
 [4] Пептид или его соль согласно [1], где A12 представляет собой Ile;
 [5] Пептид или его соль согласно [1], где A13 представляет собой Aib;
 [6] Пептид или его соль согласно [1], где A16 представляет собой Lys;
 [7] Пептид или его соль согласно [1], где A17 представляет собой Gln;
 [8] Пептид или его соль согласно [1], где A20 представляет собой Ala;
 [9] Пептид или его соль согласно [1], где A29 представляет собой Gly;
 [10] Пептид или его соль согласно [1], где P² представляет собой аминокислотную последовательность Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys;
 [11] Пептид или его соль согласно [1], где
 P¹ представляет собой атом водорода;
 A11 представляет собой Aib;
 A12 представляет собой Ile;
 A13 представляет собой Aib;
 A16 представляет собой Lys;
 A17 представляет собой Gln;
 A20 представляет собой Ala;
 A29 представляет собой Gly и
 P² представляет собой аминокислотную последовательность Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys;
- [12] Пептид, или его соль, представленный последовательностью H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr- α MePhe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Aib-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Ala-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys-NH₂;
- [13] Лекарственное средство для профилактики или лечения ожирения или диабета, содержащее пептид или его соль согласно [1];
- [14] Способ профилактики или лечения ожирения или диабета у млекопитающего, включающий введение эффективного количества пептида или его соли согласно [1];
- [15] Способ активации рецептора GLP-1 и рецептора GIP у млекопитающего, включающий введение эффективного количества пептида или его соли согласно [1];
- [16] Применение пептида или его соли согласно [1] для получения средства для профилактики или лечения ожирения или диабета;
- [22] Применение пептида или его соли согласно [1] для профилактики или лечения ожирения или диабета.

Преимущественные эффекты изобретения

Соединение (I) обладает улучшенной активностью коагониста рецептора GLP-1/рецептора GIP и демонстрирует значительные эффекты подавления пищевой активности и эффекты снижения массы тела *in vivo*. Кроме того, соединение (I) обладает низким риском гипергликемического действия и также является пригодным для лечения ожирения, ассоциированного с диабетом и т.п., вследствие его низкой активности агониста рецептора глюкагона. Более того, соединение (I) является превосходным в отношении растворимости, а также обладает тем преимуществом, что соединение можно без труда составлять в качестве лекарственного средства.

Подробное описание изобретения

Определение каждого заместителя, используемого в настоящем описании, подробно описано ниже. Если нет иных указаний, каждый заместитель имеет следующее определение.

P¹ предпочтительно представляет собой атом водорода.

Предпочтительно A11 представляет собой Aib.

Предпочтительно A12 представляет собой Ile.

В альтернативном варианте осуществления предпочтительно A12 представляет собой Lys.

Предпочтительно A13 представляет собой Aib.

Предпочтительно A16 представляет собой Lys.

Предпочтительно A17 представляет собой Gln.

A20 представляет собой Ala или Ser.

Предпочтительно A20 представляет собой Ala.

Предпочтительно A29 представляет собой Gly. Соединение (I) имеет высокую растворимость.

Также соединение (I) обладает высоким действием активации рецептора GLP-1 и рецептора GIP *in vivo*.

Предпочтительные примеры соединения (I) включают следующие пептид или его соль.

Соединение А.

Соединение (I), где

R¹ представляет собой атом водорода;

A11 представляет собой Aib;

A12 представляет собой Ile;

A13 представляет собой Aib;

A16 представляет собой Lys;

A17 представляет собой Gln;

A20 представляет собой Ala;

A29 представляет собой Gly; и

пептид, имеющий аминокислотную последовательность, соответствующую Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-, со стороны С-конца от A29.

Соединение (I) можно получать, по существу, известным способом синтеза пептидов. Способ синтеза пептидов может представлять собой любой из, например, твердофазного способа синтеза и жидкофазного способа синтеза. Следовательно, рассматриваемый пептид можно получать путем повторяющейся конденсации частичного пептида или аминокислоты, которые могут составлять соединение (I), и остальной части (которая может состоять из двух или более аминокислот) в соответствии с желаемой последовательностью. Когда продукт, имеющий желаемую последовательность, имеет защитную группу, рассматриваемый пептид можно получать путем устранения защитной группы. Примеры способа конденсации и способа устранения защитной группы известны и включают способы, описанные в следующих (1)-(5).

(1) M. Bodanszky and M.A. Ondetti: Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966)

(2) Schroeder and Luebke: The Peptide, Academic Press, New York (1965)

(3) Nobuo Izumiya, et al.: Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken (Basics and experiments of peptide synthesis), опубликованная Maruzen Co. (1975)

(4) Haruaki Yajima and Shunpei Sakakibara: Seikagaku Jikken Koza (Biochemical Experiment) 1, Tanpakushitsu no Kagaku (Chemistry of Proteins) IV, 205 (1977)

(5) Haruaki Yajima, ed.: Zoku Iyaku hin no Kaihatsu (A sequel to Development of Pharmaceuticals), Vol. 14, Peptide Synthesis, опубликованная Hirokawa Shoten

После реакции соединение (I) можно очищать и выделять с использованием общепринятых способов очистки, таких как экстракция растворителем, дистилляция, колоночная хроматография, жидкостная хроматография, перекристаллизация и т.д., и их комбинации. Когда пептид, полученный упомянутым выше способом, находится в свободной форме, его можно конвертировать в подходящую соль известным образом; напротив, когда пептид получен в форме соли, соль можно конвертировать в свободную форму или другую соль известным способом.

Исходное соединение также может представлять собой соль. Примеры такой соли включают соли, проиллюстрированные в качестве солей соединения (I), упомянутых ниже.

Для конденсации защищенной аминокислоты или пептида можно использовать различные реагенты активации, пригодные для синтеза пептидов, которые особенно предпочтительно представляют собой соли трисфосфония, соли тетраметилурония, карбодиимиды и т.п. Примеры соли трисфосфония включают бензотриазол-1-илокситрис(пирролизин)фосфонийгексафторфосфат (PyBOP), бромтрис(пирролизин)фосфонийгексафторфосфат (PyBroP), 7-азабензотриазол-1-илокситрис(пирролизин)фосфонийгексафторфосфат (PyAOP), примеры соли тетраметилурония включают 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-гексафторфосфат (HBTU), 2-(7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-гексафторфосфат (HATU), 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуронийтетрафторборат (TBTU), 2-(5-норборнан-2,3-дикарбоксиимид)-1,1,3,3-тетраметилуронийтетрафторборат (TNTU), O-(N-сукцимидил)-1,1,3,3-тетраметилуронийтетрафторборат (TSTU), и примеры карбодиимида включают DCC, N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIPCDI), N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (EDCI·HCl) и т.п. Для конденсации с их использованием является предпочтительным добавление ингибитора рацемизации (например, HONB, HOBt, HOAt, HOObt и т.д.). Растворитель, подлежащий применению для конденсации, можно соответствующим образом выбирать из растворителей, о которых из-

вестно, что они применимы для реакции конденсации пептидов. Например, можно использовать амиды кислот, такие как безводный и содержащий воду N,N-диметилформамид, N,N-диметилацетамид, N-метилпирролидон и т.п., галогенированные углеводороды, такие как метиленхлорид, хлороформ и т.п., спирты, такие как трифторэтанол, фенол и т.п., сульфоксиды, такие как диметилсульфоксид и т.п., третичные амины, такие как пиридин и т.п., простые эфиры, такие как диоксан, тетрагидрофуран и т.п., нитрилы, такие как ацетонитрил, пропионитрил и т.п., сложные эфиры, такие как метилацетат, этилацетат и т.п., их соответствующую смесь и т.п. Температуру реакции соответствующим образом выбирают из диапазона, о котором известно, что он является пригодным для реакций связывания пептидов, и ее обычно выбирают из диапазона приблизительно от -20 до 50°C. Активированное производное обычно используют в избытке, составляющем приблизительно 1,5-6 раз. В фазовом синтезе, когда тест с использованием реакции с нингидрином выявляет, что конденсация является недостаточной, достаточную конденсацию можно проводить путем повторения реакции конденсации без устранения защитных групп. Если конденсация все еще является недостаточной даже после повторения реакции, не вступившие в реакцию аминокислоты можно ацилировать уксусным ангидридом, ацетилимидазолом и т.п. во избежание влияния на последующие реакции.

Примеры защитных групп для аминокислот исходной аминокислоты включают Z, Boc, трет-пентилоксикарбонил, изоборнилкарбонил, 4-метоксибензилоксикарбонил, Cl-Z, Br-Z, адамантилоксикарбонил, трифторацетил, фталоил, формил, 2-нитрофенилсульфенил, дифенилфосфиноил, Fmoc, тритил и т.п.

Примеры карбоксилзащитной группы для исходной аминокислоты включают аллил, 2-адамантил, 4-нитробензил, 4-метоксибензил, 4-хлорбензил, фенацил и бензилоксикарбонилгидразид, трет-бутоксикарбонилгидразид, тритилгидразид и т.п., в дополнение к упомянутой выше C₁₋₆ алкильной группе, C₃₋₁₀ циклоалкильной группе, C₇₋₁₄ аралкильной группе.

Гидроксильная группа серина или треонина может быть защищена, например, посредством эстерификации или этерификации. Примеры групп, пригодной для эстерификации, включают низшие (C₂₋₄) алканоильные группы, такие как ацетильная группа и т.п., ароильные группы, такие как бензоильная группа и т.п., и группу, происходящую из органической кислоты и т.п. Кроме того, примеры групп, пригодной для этерификации, включают бензил, тетрагидропиранил, трет-бутил (Bu^t), тритил (Trt) и т.п.

Примеры защитной группы для фенольной гидроксильной группы тирозина включают Bzl, 2, 6-дихлорбензил, 2-нитробензил, Br-Z, трет-бутил и т.п.

Примеры защитной группы для имидазола гистидина включают Tos, 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил (Mtr), DNP, Bom, Bum, Boc, Trt, Fmoc и т.п.

Примеры защитной группы для гуанидиногруппы аргинина включают Tos, Z, 4-метокси-2,3,6-триметилбензолсульфонил (Mtr), п-метоксибензолсульфонил (MBS), 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил (Pmc), мезитилен-2-сульфонил (Mts), 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил (Pbf), Boc, Z, NO₂ и т.п.

Примеры защитной группы для аминокислот боковой цепи лизина включают Z, Cl-Z, трифторацетил, Boc, Fmoc, Trt, Mtr, 4,4-диметил-2, 6-диоксоциклогексиденил (Dde) и т.п.

Примеры защитной группы для индола триптофана включают формил (For), Z, Boc, Mts, Mtr и т.п.

Примеры защитной группы для аспарагина и глутамина включают Trt, ксантил (Xan), 4,4'-диметоксибензгидрил (Mbh), 2,4,6-триметоксибензил (Tmob) и т.п.

Примеры активированных карбоксильных групп в исходном материале включают соответствующий ангидрид кислоты, азид, активные сложные эфиры [сложный эфир со спиртом (например, пентахлорфенол, 2, 4, 5-трихлорфенол, 2, 4-динитрофенол, цианометилепирт, паранитрофенол, HONB, N-гидроксисукцинимид, 1-гидроксибензотриазол (HOAt), 1-гидрокси-7-азабензотриазол (HOAt))] и т.п. Примеры активированной аминокислоты в исходном материале включают соответствующий амид фосфора.

Примеры способа удаления (элиминации) защитной группы включают каталитическое восстановление в потоке водорода в присутствии катализатора, такого как Pd-черный или Pd-уголь; обработку кислотой с использованием безводной фтористоводородной кислоты, метансульфоновой кислоты, трифторметансульфоновой кислоты, трифторацетата, триметилсилилбромид (TMSBr), триметилсилилтрифторметансульфоната, тетрафторборной кислоты, трис(трифтор)борной кислоты, трибромид бора или смеси их растворов; обработку основанием с использованием диизопропилэтиламина, триэтиламина, пиперидина, пиперазина и т.п.; и восстановление натрием в жидком аммиаке и т.п. Реакцию элиминации посредством обработки описанной выше кислотой обычно проводят при температуре от -20 до 40°C; обработку кислотой эффективно проводят путем добавления ловушки катионов, такой как анизол, фенол, тиаанизол, метакрезол и паракрезол;

диметилсульфид, 1,4-бутандитиол, 1,2-этандитиол и т.п. Также 2,4-динитрофенильную группу, используемую в качестве защитной группы имидазола гистидина, удаляют обработкой тиофенолом; формильную группу, используемую в качестве защитной группы индола триптофана, удаляют посредством

удаления защитной группы обработкой кислотой в присутствии 1,2-этандитиола, 1,4-бутандитиола и т.п., а также щелочной обработкой разбавленным гидроксидом натрия, разбавленным аммиаком и т.п.

Защита функциональной группы, которая не должна быть вовлечена в реакцию исходного материала и защитной группы, элиминацию защитной группы, активацию функциональной группы, вовлеченную в реакцию и т.п., может быть соответствующим образом выбрана из известных защитных групп и известных средств.

В способе получения амида пептида, его получают твердофазным синтезом с использованием смолы для амидного синтеза, или α -карбоксильную группу С-концевой аминокислоты амидируют и пептидную цепь удлиняют до желаемой длины цепи в направлении аминогруппы, после чего получают пептид, в котором удалена только защитная группа для N-концевой α -аминогруппы пептидной цепи, и пептид, в котором удалена только защитная группа С-концевой карбоксильной группы пептидной цепи, и оба пептида конденсируют в смешанном растворителе, описанном выше. Для подробного описания реакции конденсации применимо то же, что описано выше. После очистки защищенного пептида, полученного посредством конденсации, все защитные группы можно удалять описанным выше способом с получением желаемого неочищенного полипептида. Посредством очистки этого неочищенного пептида с использованием различных общеизвестных способов очистки и лиофилизации основной фракции можно получить желаемый амид пептида.

Когда соединение (I) присутствует в качестве конфигурационного изомера, такого как энантиомер, диастереомер и т.д., конформера и т.д., они также охватываются соединением (I) и каждый из них можно выделять способами, по существу известными или описанными выше способами разделения и очистки при необходимости. Кроме того, когда соединение (I) имеет форму рацемата, его можно разделять на S- и R-формы общепринятыми способами оптического разделения.

Когда соединение (I) включает стереоизомеры, как изомеры отдельно, так и смеси каждого изомера охватываются соединением (I).

Соединение (I) можно химически модифицировать способом, по существу известным, и с использованием полиэтиленгликоля. Например, химически модифицированное соединение (I) можно получать путем конъюгации полиэтиленгликоля с остатком Cys, остатком Asp, остатком Glu, остатком Lys и т.п. соединения (I).

Соединение (I), модифицированное полиэтиленгликолем (PEG), вызывает, например, эффекты стимуляции биологической активности, продления времени циркуляции в крови, снижения иммуногенности, повышения растворимости и повышения устойчивости к метаболизму терапевтически и диагностически важного пептида.

Молекулярная масса PEG конкретно не ограничена и обычно составляет от приблизительно 1 до приблизительно 1000 кДа, предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 100 кДа, более предпочтительно от приблизительно 20 до приблизительно 60 кДа.

Способ, хорошо известный в данной области, можно использовать в качестве способа модификации соединения (I) посредством PEG, и, например, можно использовать способы, описанные ниже.

(1) Реагент для пегилирования, имеющий активный сложный эфир (например, SUNBRIGHT MEGC-30TS (торговое название), NOF Corp.), связывают с аминогруппой соединения (I).

(2) Реагент для пегилирования, имеющий альдегид (например, SUNBRIGHT ME-300AL (торговое название), NOF Corp.), связывают с аминогруппой соединения (I).

(3) Двухвалентный сшивающий реагент (например, GMBS (Dojindo Laboratories), EMCS (Dojindo Laboratories), KMUS (Dojindo Laboratories), SMCC (Pierce)) связывают с соединением (I), с которым затем связывают реагент для пегилирования, имеющий тиольную группу (например, SUNBRIGHT ME-300-SH (торговое название), NOF Corp.).

(4) Тиольную группу вносят в соединение (I) посредством средства для внесения SH (например, остатка D-цистеина, остатка L-цистеина, реагента Трота), и эту тиольную группу подвергают реакции с реагентом для пегилирования, имеющим малеинимидную группу (например, SUNBRIGHT ME-300MA (торговое название), NOF Corp.).

(5) Тиольную группу вносят в соединение (I) с помощью агента для внесения SH (например, остаток D-цистеина, остаток L-цистеина, реагент Трота), и эту тиольную группу подвергают реакции с реагентом для пегилирования, имеющим йодацетамидную группу (например, SUNBRIGHT ME-300IA (торговое название), NOF Corp.).

(6) ω -аминокарбоновую кислоту или α -аминокислоту вносят в качестве линкера с N-концевой аминогруппой соединения (I), и аминогруппу, происходящую из этого линкера, подвергают реакции с реагентом для пегилирования, имеющим активный сложный эфир (например, SUNBRIGHT MEGC-30TS (торговое название), NOF Corp.).

(7) ω -аминокарбоновую кислоту или α -аминокислоту вносят в качестве линкера с N-концевой аминогруппой соединения (I), и аминогруппу, происходящую из этого линкера, подвергают реакции с реагентом пегилирования, имеющим альдегидную группу (например, SUNBRIGHT ME-300AL (торговое название), NOF Corp.).

Кроме того, соединение (I) может представлять собой сольват (например, гидрат) или несольват (например, негидрат).

Соединение (I) может быть мечено изотопом (например, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I) и т.п.

Более того, соединение (I) может представлять собой конвертированную дейтерием форму, где ^1H конвертирован в $^2\text{H(D)}$.

Соединение (I), меченное или замещенное изотопом, можно использовать, например, в качестве радиоактивного индикатора (индикатор PET) для применения в позитронно-эмиссионной томографии (PET), и оно является пригодным в области медицинской диагностики и т.п.

Для пептидов, упомянутых в настоящем описании, левый конец представляет собой N-конец (аминоконец) и правый конец представляет собой C-конец (карбоксиконец) в соответствии с общепринятым обозначением пептидов. C-конец пептида может представлять собой любой из амида ($-\text{CONH}_2$), карбоксильной группы ($-\text{COOH}$), карбоксилата ($-\text{COO}^-$), алкиламида ($-\text{CONHR}^a$) и сложного эфира ($-\text{COOR}^a$). В частности, амид ($-\text{CONH}_2$) является предпочтительным.

Соединение (I) может быть в форме соли. Примеры такой соли включают соли металлов, соли аммония, соли с органическим основанием, соли с неорганической кислотой, соли с органической кислотой, соли с основной или кислотной аминокислотой и т.п.

Предпочтительные примеры соли металла включают соли щелочных металлов, такие как соль натрия, соль калия и т.п.; соли щелочно-земельных металлов, такие как соль кальция, соль магния, соль бария и т.п.; соль алюминия и т.п.

Предпочтительные примеры соли с органическим основанием включают соли с триметиламином, триэтиламином, пиридином, пиколином, 2,6-лутидином, этаноламином, диэтанолламином, триэтанолламином, циклогексиламином, дициклогексиламином, N,N-дибензилэтилендиамином и т.п.

Предпочтительные примеры соли с неорганической кислотой включают соли с хлористоводородной кислотой, бромистоводородной кислотой, азотной кислотой, серной кислотой, фосфорной кислотой и т.п.

Предпочтительные примеры соли с органической кислотой включают соли с муравьиной кислотой, уксусной кислотой, трифторуксусной кислотой, фталевой кислотой, фумаровой кислотой, щавелевой кислотой, виннокаменной кислотой, малеиновой кислотой, лимонной кислотой, янтарной кислотой, яблочной кислотой, метансульфоновой кислотой, бензолсульфоновой кислотой, п-толуолсульфоновой кислотой и т.п.

Предпочтительные примеры соли с основной аминокислотой включают соли с аргинином, лизином, орнитином и т.п. Предпочтительные примеры соли с кислотной аминокислотой включают соли с аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой и т.п.

Среди упомянутых выше солей предпочтительной является фармацевтически приемлемая соль. Например, когда соединение имеет кислотную функциональную группу, предпочтительной является неорганическая соль, такая как соль щелочного металла (например, соль натрия, соль калия и т.д.), соль щелочно-земельного металла (например, соль кальция, соль магния, соль бария и т.д.) и т.п., соль аммония и т.д., и, когда соединение имеет основную функциональную группу, предпочтительной является, например, соль с неорганической кислотой, такой как хлористоводородная кислота, бромистоводородная кислота, азотная кислота, серная кислота, фосфорная кислота и т.п., или соль с органической кислотой, такой как уксусная кислота, фталевая кислота, фумаровая кислота, щавелевая кислота, виннокаменная кислота, малеиновая кислота, лимонная кислота, янтарная кислота, метансульфоновая кислота, п-толуолсульфоновая кислота и т.п.

Соединение (I) может быть в форме пролекарства.

Пролекарство означает соединение, которое конвертируется в соединение (I) вследствие реакции с ферментом, желудочной кислотой и т.д. в физиологических условиях в живом организме, т.е. соединение, которое конвертируется в соединение (I) посредством окисления, восстановления, гидролиза и т.д. в зависимости от фермента; соединение, которое конвертируется в соединение (I) посредством гидролиза и т.д. посредством желудочной кислоты и т.д.

Примеры пролекарства соединения (I) включают соединение, где аминогруппа соединения (I) ацилирована, алкилирована или фосфорилирована (например, соединение, где аминогруппа соединения (I) эйкозаноилирована, аланилирована, пентиламинокарбонилирована, (5-метил-2-оксо-1,3-диоксолен-4-ил)метоксикарбонилирована, тетрагидрофуранилирована, пирролидилметилована, пивалоилоксиметилована или трет-бутилирована и т.п.); соединение, где гидроксигруппа соединения (I) ацилирована, алкилирована, фосфорилирована или борирована (например, соединение, где гидроксигруппа соединения (I) ацетилована, пальмитоилирована, пропаноилирована, пивалоилирована, сукцинилирована, фумарилирована, аланилирована или диметиламинометилкарбонилирована); соединение, где карбоксигруппа соединения (I) эстрифицирована или амидирована (например, соединение, где карбоксигруппа соединения (I) эстрифицирована C_{1-6} алкилом, эстрифицирована фенилом, эстрифицирована карбоксиметилом, эстрифицирована диметиламинометилом, эстрифицирована пивалоилоксиметилом, эстрифицирована этоксикарбонилэтилом, эстрифицирована фталидилом, эстрифицирована (5-метил-2-оксо-1,3-диоксолен-4-ил)метилом, эстрифицирована циклогексикарбонилэтилом или метилами-

дирована) и т.п. Среди прочих, предпочтительно используют соединение, где карбоксигруппа соединения (I) эстерифицирована C_{1-6} алкилом, таким как метил, этил, трет-бутил и т.п. Эти соединения можно получать из соединения (I) способом, по существу известным.

Пролекарство соединения (I) также может представлять собой пролекарство, которое конвертируется в соединение (I) в физиологических условиях, такое как пролекарства, описанные в IYAKUHIN no KAHATSU (Development of Pharmaceuticals), vol. 7, Design of Molecules, p. 163-198, опубликованная HIROKAWA SHOTEN (1990).

В настоящем описании пролекарство может образовывать соль. Примеры такой соли включают соли, проиллюстрированные в качестве соли соединения (I).

Соединение (I) может представлять собой кристалл. Кристаллы, имеющие форму монокристалла или смеси множества кристаллических форм, также включены в соединение (I). Кристаллы можно получать кристаллизацией соединения (I) способом кристаллизации, по существу, известным.

Кроме того, соединение (I) может представлять собой фармацевтически приемлемый сокристалл или соль сокристалла. В настоящем описании сокристалл или соль сокристалла означает кристаллическое вещество, состоящее из двух или более конкретных веществ, которые являются твердыми при комнатной температуре, каждое из которых имеет отличающиеся физические свойства (например, структура, температура плавления, теплота плавления, гигроскопичность, растворимость, стабильность и т.д.). Со-кристалл или соль сокристалла можно получать способом сокристаллизации, по существу, известным.

Кристалл соединения (I) имеет улучшенные физико-химические свойства (например, температура плавления, растворимость, стабильность) и биологические свойства (например, фармакокинетика (всасывание, распределение, метаболизм, экскреция), эффективность экспрессии), и, таким образом, он является чрезвычайно полезным в качестве лекарственного средства.

Соединение (I) и его пролекарство (далее иногда сокращенно обозначаемые как соединение по настоящему изобретению) имеют активирующее действие на рецепторы GLP-1 и рецепторы GIP.

Соединение по настоящему изобретению обладает высоким активирующим действием на рецепторы GLP-1 и рецепторы GIP, в частности, *in vivo*.

GLP-1 и GIP представляют собой гормоны кишечника, называемые инкретинами, и они обладают действием стимуляции секреции инсулина из поджелудочной железы. Поскольку инкретин тесно связан с метаболизмом глюкозы, соединение, обладающее активирующим действием на рецепторы GLP-1 и рецепторы GIP, является пригодным для профилактики или лечения симптомов, ассоциированных с нарушением метаболизма глюкозы, включая ожирение.

Таким образом, соединение по настоящему изобретению обладает действием подавления пищевой активности, действием ингибирования увеличения массы тела и т.п.

Кроме того, соединение по настоящему изобретению обладает увеличенной растворимостью. Растворимость соединения по настоящему изобретению в воде предпочтительно составляет 1 мг/мл или выше, более предпочтительно 10 мг/мл или выше.

Соединение по настоящему изобретению можно использовать в качестве активатора рецептора GLP-1 и рецептора GIP (коагонист рецептора GLP-1/рецептора GIP).

В рамках настоящего изобретения активатор рецептора GLP-1 и рецептора GIP (коагонист рецептора GLP-1/рецептора GIP) означает средство, обладающее как действием активации рецептора GLP-1 (действие активации рецептора GLP-1), так и действием активации рецептора GIP (действие агониста рецептора GIP). В частности, активатор рецептора GLP-1 и рецептора GIP (коагонист рецептора GLP-1/рецептора GIP) означает средство, где EC_{50} в отношении рецептора GLP-1 и EC_{50} в отношении рецептора GIP составляет от 1:20 до 20:1, предпочтительно от 1:5 до 5:1.

Соединение по настоящему изобретению обладает низким действием активации рецептора глюкагона (агонист рецептора глюкагона) и, таким образом, обладает низким гипергликемическим действием, присущим ему. EC_{50} соединения по настоящему изобретению в отношении рецептора глюкагона составляет 1/1000 или ниже, предпочтительно 1/10000 или ниже, по сравнению с EC_{50} соединения по настоящему изобретению в отношении рецептора GLP-1 или рецептора GIP.

Соединение по настоящему изобретению имеет низкую токсичность (например, острая токсичность, хроническая токсичность, генетическая токсичность, репродуктивную токсичность, сердечную токсичность, канцерогенность), демонстрирует мало побочных эффектов и может быть безопасным образом введено млекопитающему (например, человек, животное семейства бычьих, лошадь, собака, кошка, обезьяна, мышь, крыса) в качестве средства для профилактики или лечения различных заболеваний, упомянутых ниже, и т.п.

Соединение по настоящему изобретению можно использовать в качестве средства для лечения или профилактики различных заболеваний, включая ожирение, посредством упомянутого выше активирующего действия на рецепторы GLP-1 и рецепторы GIP. Соединение по настоящему изобретению можно использовать в качестве средства для профилактики или лечения, например симптоматического ожирения, ожирения на основе простого ожирения, болезненного состояния или заболевания, обусловленного ожирением, нарушения питания, диабета (например, диабет 1 типа, диабет 2 типа, гестационный диабет, диабет при ожирении), гиперлипидемии (например, гипертриглицеридемия, гиперхолестеринемия, холе-

стеринемия с высоким содержанием LDL, холестеринемия с низким содержанием HDL, постпрандиальная гиперлипемия), гипертензии, сердечной недостаточности, осложнений диабета [например, невропатия, нефропатия, ретинопатия, диабетическая кардиомиопатия, катаракта, макроангиопатия, остеопения, гипертоническая диабетическая кома, инфекционное заболевание (например, респираторная инфекция, инфекция мочевыводящих путей, желудочно-кишечная инфекция, инфекции мягких тканей кожи, инфекция нижних конечностей), диабетическая гангрена, ксеростомия, гипоакузия, цереброваскулярное нарушение, нарушение периферического кровообращения], метаболического синдрома (болезненные состояния, имеющие 3 или более симптомов, выбранных из гипертриглицеридемии, холестеринемии с низким содержанием HDL, гипертензии, абдоминального ожирения и сниженной толерантности к глюкозе), саркопении и т.п.

Примеры симптоматического ожирения включают эндокринное ожирение (например, синдром Кушинга, гипотиреоз, инсулинома, диабет типа II при ожирении, псевдогипопаратиреоз, гипогонадизм), центральное ожирение (например, гипоталамическое ожирение, синдром лобной доли, синдром Клейн-Левина), наследственное ожирение (например, синдром Прадера-Вилли, синдром Лоренса-Муна-Бидля), индуцируемое лекарственными средствами ожирение (например, ожирение, индуцируемое стероидами, фенотиразином, инсулином, средством на основе сульфонилмочевины (SU), β -блокатором) и т.п.

Примеры болезненного состояния или заболевания, обусловленных ожирением, включают нарушения толерантности к глюкозе, диабет (в частности диабет 2 типа, диабет при ожирении), нарушение метаболизма липидов (является синонимом упомянутой выше гиперлипидемии), гипертензию, сердечную недостаточность, гиперурикемию, подагру, жировую инфильтрацию печени (включая неалкогольный стеатогепатит), коронарную болезнь сердца (инфаркт миокарда, стенокардия), церебральный инфаркт (тромбоз головного мозга, транзиторная церебральная ишемическая атака), заболевание костей/составов (остеоартрит колена, остеоартрит бедра, деформирующий спондилит, люмбаго), синдром апноэ во сне/синдром Пиквика, менструальное нарушение (нарушение менструального цикла, нарушение менструации и цикла, аменорея, аномальные менструальные симптомы), метаболический синдром и т.п.

Новые диагностические критерии были сообщены The Japan Diabetes Society в 1999 г. на тему диагностических критериев диабета.

В соответствии с этим сообщением диабет относится к состоянию, которое удовлетворяет любому из уровня глюкозы в крови натощак (концентрация глюкозы в плазме венозной крови) 126 мг/дл или более, 2-часового значения (концентрация глюкозы в плазме венозной крови) 200 мг/дл или более в пероральном тесте толерантности к глюкозе с 75 г глюкозы (75 г OGTT) и нерегулярного уровня глюкозы в крови (концентрация глюкозы в плазме венозной крови) 200 мг/дл или более. Также состояние, которое не применимо к упомянутому выше диабету и не является состоянием, проявляющим "уровень глюкозы в крови натощак (концентрация глюкозы в плазме венозной крови) менее 110 мг/дл или 2-часовое значение (концентрация глюкозы в плазме венозной крови) менее 140 мг/дл в пероральном тесте толерантности к глюкозе с 75 г глюкозы (75 г OGTT)" (нормальный тип) называют "пограничным типом".

Более того, новые диагностические критерии были сообщены American Diabetes Association (ADA) в 1997 году и ВОЗ (WHO) в 1998 г. на тему диагностических критериев диабета.

В соответствии с этими сообщениями диабет относится к состоянию, которое удовлетворяет уровню глюкозы в крови натощак (концентрация глюкозы в плазме венозной крови) 126 мг/дл или более и 2-часовому значению (концентрация глюкозы в плазме венозной крови) 200 мг/дл или более в пероральном тесте толерантности к глюкозе с 75 г глюкозы.

В соответствии с упомянутыми выше сообщениями нарушенная толерантность к глюкозе относится к состоянию, которое удовлетворяет уровню глюкозы в крови натощак (концентрация глюкозы в плазме венозной крови) менее 126 мг/дл и 2-часовому значению (концентрация глюкозы в плазме венозной крови) 140 мг/дл или более и менее 200 мг/дл в пероральном тесте толерантности к глюкозе с 75 г глюкозы. В соответствии с сообщением ADA состояние, проявляющее уровень глюкозы в крови натощак (концентрация глюкозы в плазме венозной крови) 110 мг/дл или более и менее 126 мг/дл называют IFG (нарушенный уровень глюкозы натощак). С другой стороны, в соответствии с сообщением ВОЗ, состояние IFG (нарушенный уровень глюкозы натощак), проявляющий 2-часовое значение (концентрация глюкозы в плазме венозной крови) менее 140 мг/дл в пероральном тесте толерантности к глюкозе с 75 г глюкозы называют IFG (нарушенная гликемия натощак).

Соединение по настоящему изобретению также используют в качестве средства для профилактики или лечения диабета, определенного в соответствии с упомянутыми выше новыми диагностическими критериями, диабета пограничного типа, нарушенной толерантности к глюкозе, IFG (нарушенный уровень глюкозы натощак) и IFG (нарушенная гликемия натощак). Более того, соединение по настоящему изобретению могут препятствовать прогрессированию пограничного типа, нарушенной толерантности к глюкозе, IFG (нарушенный уровень глюкозы натощак) или IFG (нарушенная гликемия натощак) в диабет.

Соединение по настоящему изобретению обладает действием ингибирования увеличения массы тела и по существу его можно использовать в качестве ингибитора увеличения массы тела для млекопитающих. Млекопитающее, которое является субъектом применения соединения по настоящему изобре-

тению, может представлять собой млекопитающее, у которого желательно избежать увеличения массы тела. Млекопитающее может представлять собой млекопитающее, имеющее генетический риск увеличения массы тела, или оно может представлять собой млекопитающее, страдающее заболеванием, связанным с образом жизни, таким как диабет, гипертензия и/или гиперлипидемия. Увеличение массы тела может быть объяснено чрезмерным употреблением пищи или несбалансированным рационом, или может представлять собой увеличение массы тела вследствие сопутствующего приема лекарственного средства (например, сенситизаторы инсулина, обладающие действием, подобным действию агониста PPAR γ , такого как троглитазон, розиглитазон, энглитазон, циглитазон, пиоглитазон и т.п.). Альтернативно увеличение массы может представлять собой увеличение массы до достижения ожирения или может представлять собой увеличение массы у пациентов с ожирением. В настоящем описании ожирение определяется как индекс массы тела (BMI: масса тела (кг) - [рост (м)]²) 25 или более (в соответствии с критериями Japan Society for the Study of Obesity) для японцев и как BMI 30 или более (в соответствии с критериями ВОЗ) для западных людей.

Соединение по настоящему изобретению также является пригодным в качестве средства для профилактики или лечения метаболического синдрома. Встречаемость сердечно-сосудистого заболевания является достаточно высокой у пациентов с метаболическим синдромом по сравнению с пациентами с одним связанным с образом жизни заболеванием. Таким образом, профилактика или лечение метаболического синдрома чрезвычайно важна для профилактики сердечно-сосудистого заболевания.

Диагностические критерии метаболического синдрома были объявлены ВОЗ в 1999 г. и NCEP в 2001 г. В соответствии с диагностическими критериями ВОЗ индивидуума, имеющего гиперинсулинемию или нарушение толерантности к глюкозе в качестве необходимого условия и два или более из висцерального ожирения, дислипидемии (высокий уровень TG или низкий уровень HDL) и гипертензии диагностируют как имеющего метаболический синдром (World Health Organization: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Part I: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, World Health Organization, Geneva, 1999). В соответствии с диагностическими критериями Adult Treatment Panel III от National Cholesterol Education Program (руководство по ишемической болезни сердца) в США, индивидуума, имеющего три или более из висцерального ожирения, гипертриглицеридемии, холестеринемии с низким уровнем HDL, гипертензии и нарушения толерантности к глюкозе диагностируют как имеющего метаболический синдром (National Cholesterol Education Program: Executive Summary of the Third Report of National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adults Treatment Panel III). The Journal of the American Medical Association, vol. 285, 2486-2497, 2001). Соединение по настоящему изобретению также можно использовать в качестве средства для профилактики или лечения, например, остеопороза, кахексии (например, кахексия при злокачественной опухоли, кахексия при туберкулезе, диабетическая кахексия, кахексия, ассоциированная с заболеванием крови, кахексия, ассоциированная с эндокринным заболеванием, кахексия, ассоциированная с инфекционным заболеванием, или кахексия, вызванная синдромом приобретенного иммунодефицита), жировой инфильтрации печени, синдрома поликистоза яичников, заболевания почек (например, хроническая почечная недостаточность, диабетическая нефропатия, гломерулонефрит, гломерулосклероз, нефротический синдром, гипертонический нефросклероз, заболевание почек конечной стадии), мышечной дистрофии, инфаркта миокарда, стенокардии, цереброваскулярного нарушения (например, церебральный инфаркт, инсульт), болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, тревожности, деменции, синдрома устойчивости к инсулину, синдрома X, гиперинсулинемии, парестезии, вызываемой гиперинсулинемией, острой или хронической диарее, воспалительного заболевания (например, хронический ревматоидный артрит, деформирующий спондилит, деформирующий артрит, люмбаго, подагра, послеоперационное или посттравматическое воспаление, вздутие живота, невралгия, ларингофарингит, цистит, гепатит (включая неалкогольный стеатогепатит), пневмония, панкреатит, энтерит, воспалительное заболевание кишечника (включая воспалительное заболевание толстой кишки), язвенный колит, повреждение слизистой оболочки желудка (включая повреждение слизистой оболочки желудка, вызываемое аспирином)), повреждения слизистой оболочки тонкого кишечника, малабсорбции, дисфункции яичек, синдрома висцерального ожирения и саркопении.

Более того, соединение по настоящему изобретению также можно использовать в качестве средства для профилактики или лечения различных злокачественных опухолей (в частности, рак молочной железы (например, инвазивный рак протоков молочной железы, неинвазивный рак протоков молочной железы, воспалительный рак молочной железы и т.д.), рак предстательной железы (например, гормонзависимый рак предстательной железы, гормоннезависимый рак предстательной железы и т.д.), рак поджелудочной железы (например, рак протоков поджелудочной железы и т.д.), рак желудка (например, папиллярная аденокарцинома, слизистая аденокарцинома, железисто-плоскоклеточная карцинома и т.д.), рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, злокачественная мезотелиома и т.д.), рак толстого кишечника (например, желудочно-кишечная стромальная опухоль и т.д.), рак прямой кишки (например, желудочно-кишечная стромальная опухоль и т.д.), рак ободочной и прямой кишки (например, семейный рак ободочной и прямой кишки, наследственный неполипозный рак ободочной и прямой кишки, желудочно-кишечная стромальная опухоль и т.д.), злокачественная опухоль

тонкого кишечника (например, неходжкинская лимфома, желудочно-кишечная стромальная опухоль и т.д.), рак пищевода, рак двенадцатиперстной кишки, рак языка, рак глотки (например, рак носоглотки, рак ротоглотки, гипофарингеальный рак и т.д.), рак слюнной железы, опухоль головного мозга (например, астроцитомы шишковидной железы, пиноцитарная астроцитомы, диффузная астроцитомы, анапластическая астроцитомы и т.д.), неврилеммома, рак печени (например, первичный рак печени, внепеченочный рак желчных протоков и т.д.), рак почки (например, почечно-клеточный рак, рак переходных клеток почечной лоханки и уретры и т.д.), рак желчных протоков, рак эндометрия, рак шейки матки, рак яичника (например, рак эпителия яичника, внегонадная герминома, герминома клеток яичника, опухоль яичника с низким злокачественным потенциалом и т.д.), рак мочевого пузыря, рак уретры, рак кожи (например, внутриглазная (глазная) меланома, карцинома из клеток Меркеля и т.д.), гемангиома, злокачественная лимфома, злокачественная меланома, рак щитовидной железы (например, медуллярный рак щитовидной железы и т.д.), рак паращитовидной железы, рак носовой полости, рак синуса, опухоль кости (например, остеосаркома, опухоль Юинга, саркома матки, саркома мягких тканей и т.д.), ангиофиброма, саркома сетчатки, рак полового члена, рак семенников, педиатрическая солидная опухоль (например, опухоль Вильямса, детская опухоль почки и т.д.), саркома Капоши, саркома Капоши, вызванная СПИД, опухоль синуса верхнечелюстного синуса, фиброзная гистиоцитомы, лейомиосаркома, рабдомиосаркома, лейкоз (например, острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз и т.д.), и т.д.).

Соединение по настоящему изобретению также можно использовать для вторичной профилактики или подавления прогрессирования различных упомянутых выше заболеваний (например, сердечно-сосудистые явления, такие как инфаркт миокарда и т.п.). Кроме того, соединение по настоящему изобретению также является пригодным в качестве средства для подавления пищевой активности и ингибитора увеличения массы тела. Соединение по настоящему изобретению также можно использовать в комбинации с диетотерапией (например, диетотерапией диабета) и лечебной физкультурой.

Лекарственное средство, содержащее соединение по настоящему изобретению, демонстрирует низкую токсичность и его получают с использованием соединения по настоящему изобретению отдельно или в смеси с фармакологически приемлемым носителем в соответствии с, по существу, известным способом (например, способ, описанный в Japanese Pharmacopoeia), обычно используемым в качестве способов получения фармацевтических препаратов, и безопасно вводят перорально или перанетерально (например, вводят местно, ректально, внутривенно) в качестве фармацевтического препарата, например, таблетки (включая покрытые сахаром таблетки, покрытые пленкой таблетки, сублингвальные таблетки, перорально дезинтегрирующие таблетки), порошки, гранулы, капсулы (включая мягкие капсулы, микрокапсулы), жидкости, лепешки, сиропы, эмульсии, суспензии, инъекционные препараты (например, подкожные инъекции, внутривенные инъекции, внутримышечные инъекции, внутривентрикулярные инъекции и т.д.), наружные препараты (например, трансназальные препараты, дермальные препараты, мази), суппозитории (например, ректальные суппозитории, вагинальные суппозитории), гранулы, назальные препараты, легочные препараты (ингалируемые препараты), трансфузионные препараты и т.п.

Эти препараты могут представлять собой препараты с контролируемым высвобождением, такие как препараты с быстрым высвобождением, препараты с замедленным высвобождением и т.п. (например, микрокапсула с замедленным высвобождением).

Содержание соединения по настоящему изобретению в фармацевтическом препарате составляет приблизительно 0,01 - приблизительно 100 мас.% от всего препарата.

Упомянутый выше фармацевтически приемлемый носитель может быть проиллюстрирован различными органическими или неорганическими материалами носителей, которые обычно используют в качестве материалов для получения, такими как эксципиент, смазывающее вещество, связующее вещество и дезинтегрирующее средство для твердых препаратов; или растворитель, солюбилизующее средство, суспендирующее вещество, обеспечивающее изотоничность средство, буферное средство, успокаивающее средство и т.п. для жидких препаратов. Кроме того, если необходимо, также можно использовать общие добавки, такие как консервант, антиоксидант, краситель, подсластитель, адсорбирующее вещество, смачивающее вещество и т.п. соответствующим образом в подходящем количестве.

Примеры эксципиента включают лактозу, сахарозу, D-маннит, крахмал, кукурузный крахмал, кристаллическую целлюлозу, легкую безводную кремниевую кислоту и т.п.

Примеры смазывающего вещества включают стеарат магния, стеарат кальция, тальк, коллоидный диоксид кремния и т.п.

Примеры связующего вещества включают кристаллическую целлюлозу, сахарозу, D-маннит, декстрин, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, поливинилпирролидон, крахмал, сахарозу, желатин, метилцеллюлозу, натрий карбоксиметилцеллюлозу и т.п.

Примеры дезинтегрирующего средства включают крахмал, карбоксиметилцеллюлозу, кальций карбоксиметилцеллюлозу, натрий карбоксиметилкрахмал, L-гидроксипропилцеллюлозу и т.п.

Примеры растворителя включают воду для инъекций, спирт, пропиленгликоль, макрогол, кунжутное масло, кукурузное масло, оливковое масло и т.п.

Примеры солюбилизующего средства включают полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, D-маннит, бензилбензоат, этанол, трисаминометан, холестерин, триэтанолламин, карбонат натрия, цитрат

натрия и т.п.

Примеры суспендирующего вещества включают поверхностно-активные вещества, такие как стеарилтриэтаноламин, лаурилсульфат натрия, лауриламинопропионовая кислота, лецитин, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, глицерин моностеарат и т.п.; гидрофильные полимеры, такие как поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, натрий карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, гидроксиметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза и т.п.

Примеры обеспечивающего изотоничность средства включают глюкозу, D-сорбит, хлорид натрия, глицерин, D-маннит и т.п.

Примеры буферного средства включают буферные растворы, такие как фосфаты, ацетаты, карбонаты, цитраты и т.п.

Примеры успокаивающего средства включают бензиловый спирт и т.п.

Примеры консерванта включают сложные эфиры парагидроксибензойной кислоты, хлорбутанол, бензиловый спирт, фенэтиловый спирт, дегидроуксусную кислоту, сорбиновую кислоту и т.п.

Примеры антиоксиданта включают сульфиты, аскорбиновую кислоту, α -токоферол и т.п.

Примеры красителя включают растворимые в воде пищевые красители из каменноугольной смолы (например, пищевые красители, такие как Food Red No. 2 и No. 3, Food Yellow No. 4 и No. 5, Food Blue No. 1 и No. 2, и т.п.), нерастворимые в воде лакообразующие красители (например, соли алюминия упомянутых выше растворимых в воде пищевых красителей из каменноугольной смолы), природные красители (например, β -каротин, хлорофилл, оксид железа(III)) и т.п.

Примеры подсластителя включают сахаринат натрия, дикалийглицерризинат, аспартам, стевию и т.п.

Примеры адсорбирующих средств включают пористый крахмал, силикат кальция (торговое название: Florite RE), алюмометасиликат магния (торговое название: Neusilin) и легкую безводную кремниевую кислоту (торговое название: Sylsisa).

Примеры смачивающего вещества включают пропиленгликоль моностеарат, сорбитан моноолеат, диэтиленгликоль монолаурат и полиоксиэтиленлауриловый эфир.

В процессе получения перорального препарата при необходимости можно использовать покрытие для маскирования вкуса, свойства растворения в кишечнике или пролонгированного действия.

Примеры основы покрытия для применения для покрытия включают основу для покрытия из сахара, основу покрытия в форме водной пленки, основу покрытия в форме кишечнорастворимой пленки и основу покрытия в форме пленки с замедленным высвобождением.

В качестве основы покрытия из сахара используют сахарозу. Более того, один или несколько типов, выбранных из талька, преципитированного карбоната кальция, желатина, гуммиарабика, пуллулана, карнаубского воска и т.п. можно использовать в комбинации.

Примеры основания покрытия в форме водной пленки включают полимеры целлюлозы, такие как гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, метилгидроксипропилцеллюлоза и т.д.; синтетические полимеры, такие как поливинилацетат диэтиламиноацетат, аминоксилметакрилатный сополимер E [Eudragit E (торговое название)], поливинилпирролидон и т.д.; и полисахариды, такие как пуллулан и т.д.

Примеры основы покрытия в форме кишечнорастворимой пленки включают полимеры целлюлозы, такие как гидроксипропилметилцеллюлозы фталат, гидроксипропилметилцеллюлозы ацетат сукцинат, карбоксиметилэтилцеллюлоза, целлюлозы ацетат фталат и т.д.; акриловые полимеры, такие как сополимер метакриловой кислоты L [Eudragit L (торговое название)], сополимер метакриловой кислоты LD [Eudragit L-30D55 (торговое название)], сополимер метакриловой кислоты S [Eudragit S (торговое название)] и т.д.; и встречающиеся в природе вещества, такие как шеллак и т.д.

Примеры основы покрытия в форме пленки с замедленным высвобождением включают полимеры целлюлозы, такие как этилцеллюлоза и т.д.; и акриловые полимеры, такие как сополимер аминоксилметакрилата RS [Eudragit RS (торговое название)], суспензия сополимера этилакрилат-метилметакрилат [Eudragit NE (торговое название)] и т.д.

Упомянутые выше основы покрытия можно использовать после смешения двух или более их типов в соответствующих соотношениях. Для покрытия, например, можно использовать экранирующее от света средство, такое как оксид титана, оксид железа(III) и т.п.

Дозировку соединения по настоящему изобретению соответствующим образом выбирают в зависимости от субъекта введения, симптома, способа введения и т.п. Например, когда соединение по настоящему изобретению вводят перорально пациенту с ожирением или диабетом (масса тела 60 кг), суточная доза соединения по настоящему изобретению составляет приблизительно от 0,1 до 100 мг, предпочтительно приблизительно от 1,0 до 50 мг, более предпочтительно приблизительно от 1,0 до 20 мг. Когда соединение по настоящему изобретению вводят парентерально пациенту с ожирением или диабетом (масса тела 60 кг), суточная доза соединения по настоящему изобретению составляет приблизительно от 0,01 до 30 мг, предпочтительно приблизительно от 0,1 до 20 мг, более предпочтительно приблизительно от 0,5 до 10 мг. Эти количества можно вводить посредством приблизительно от 1 до нескольких частей в

сутки.

Соединение по настоящему изобретению можно вводить, например, каждые сутки (один раз в сутки, два раза в сутки, 3 раза в сутки, 4 раза в сутки, 5 раз в сутки, 6 раз в сутки), раз в 2 суток, раз в 3 суток, раз в 4 суток, раз в 5 суток, раз в 6 суток, раз в неделю, два раза в неделю, раз в две недели, раз в 3 недели, раз в месяц, раз в 2 месяца, раз в 3 месяца, раз в 4 месяца, раз в 5 месяцев или раз в 6 месяцев.

Соединение по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с другим лекарственным средством, которое не оказывает неблагоприятного влияния на соединение по настоящему изобретению, для цели, например, ускорения действия (лечение эффекта ожирения, диабета и т.п.) соединения по настоящему изобретению, снижения дозы соединения по настоящему изобретению и т.п.

Примеры лекарственного средства, которое можно использовать в комбинации с соединением по настоящему изобретению (далее иногда сокращенно обозначаемого как сопутствующее лекарственное средство) включают средства против ожирения, лекарственные средства от диабета, лекарственные средства от осложнений диабета, лекарственные средства от гиперлипидемии, антигипертензивные средства, диуретики, химиотерапевтические средства, иммунотерапевтические средства, противовоспалительные лекарственные средства, антитромботические средства, лекарственные средства от остеопороза, витамины, лекарственные средства против деменции, лекарственные средства против эректильной дисфункции, терапевтические лекарственные средства от частого мочеиспускания или недержания мочи, лекарственные средства от дизурии и т.п. Конкретные примеры сопутствующего лекарственного средства включают средства, упомянутые ниже.

Примеры средств против ожирения включают ингибиторы обратного захвата моноаминов (например, фентермин, сибутамин, мазиндол, флуоксетин, тезофензин), агонисты рецептора серотонина 2C (например, лорказерин), антагонисты рецептора серотонина 6, модулятор рецептора гистамина H3, модулятор GABA (например, топирамат), антагонисты нейропептида Y (например, велнеперит), антагонисты каннабиноидных рецепторов (например, римонабант, таранабант), антагонисты грелина, антагонисты рецептора грелина, ингибитора фермента грелинацилирования, антагонисты опиоидных рецепторов (например, GSK-1521498), антагонисты рецептора орексина, агонисты рецептора меланокортина 4, ингибиторы дегидрогеназы 11 β -гидроксиesteroидов (например, AZD-4017), ингибиторы липазы поджелудочной железы (например, орлистат, цетилистат), β 3-агонисты (например, N-5984), ингибиторы диацилглицеринацилтрансферазы 1 (DGAT1), ингибиторы ацетил-СоА-карбоксилазы (ACC), ингибиторы фермента стериоил-СоА-десатуразы, ингибиторы белка-переносчика микросомальных триглицеридов (например, R-256918), ингибиторы котранспортера Na-глюкозы (например, JNJ-28431754, ремоглифлозин), ингибиторы NF κ B (например, HE-3286), агонисты PPAR (например, GFT-505, DRF-11605), ингибиторы фосфатазы фосфотирозина (например, ванадат натрия, тродусквемин), агонисты GPR119 (например, PSN-821, MBX-2982, APD597), активаторы глюкокиназы (например, AZD-1656), лептин, производные лептина (например, метролептин), CNTF (цилиарный нейротрофический фактор), BDNF (происходящий из головного мозга нейротрофический фактор), агонисты холицистокинина, препараты амилина (например, прамлитинид, AC-2307), агонисты нейропептида Y (например, PYY3-36, производные PYY3-36, обинептид, TM-30339, TM-30335), препараты оксинтомодулина: препараты FGF21 (например, препараты FGF21 животных, экстрагированные из поджелудочной железы коров или свиней; препараты FGF21 человека, генетически синтезированные с использованием *Escherichia coli* или дрожжей; фрагменты или производные FGF21), анорексигенный агент средства (например, P-57) и т.п.

В рамках настоящего изобретения в качестве лекарственного средства от диабета могут быть упомянуты, например, препараты инсулина (например, препараты инсулина животных, экстрагированные из поджелудочной железы коров и свиней; препараты инсулина человека, генетически синтезированные с использованием *Escherichia coli* или дрожжей; инсулин цинк; протамин инсулин цинк; фрагмент или производное инсулина (например, INS-1), пероральный препарат инсулина), сенсбилизаторы инсулина (например, пиоглитазон или его соль (предпочтительно, гидрохлорид), розиглитазон или его соль (предпочтительно, малеат), метаглитасен, AMG-131, балаглитазон, MBX-2044, ривоглитазон, алеглитазар, чиглитазар, лобеглитазон, PLX-204, PN-2034, GFT-505, THR-0921, соединение, описанное в WO 007/013694, WO 2007/018314, WO 2008/093639 или WO 2008/099794), ингибиторы α -глюкозидазы (например, воглибоз, акарбоза, миглитол, эмиглитат), бигуаниды (например, метформин, буформин или его соль (например, гидрохлорид, фумарат, сукцинат)), стимуляторы секреции инсулина (например, сульфонилмочевина (например, толбутамид, глибенкламид, гликлазид, хлорпропамид, толазамид, ацетогексамид, гликопирамид, глимепирид, глипизид, глибузол), репаглинид, натеглинид, митиглинид или их гидрат соли кальция), ингибиторы дипептидилпептидазы IV (например, алоглиптин или его соль (предпочтительно, бензоат), валдаглиптин, ситаглиптин, саксаглиптин, BI1356, GRC8200, MP-513, PF-00734200, PHX1149, SK-0403, ALS2-0426, TA-6666, TS-021, KRP-104, трелаглиптин или его соль (предпочтительно сукцинат)), агонисты β 3 (например, N-5984), агонисты GPR40 (например, Fasiglifam или его гидрат, соединение, описанное в WO 2004/041266, WO 2004/106276, WO 2005/063729, WO 2005/063725, WO 2005/087710, WO 2005/095338, WO 2007/013689 или WO 2008/001931), ингибиторы SGLT2 (котранспортер натрия-глюкозы 2) (например, депаглифлозин, AVE2268, TS-033, YM543, TA-7284, ремоглифлозин,

ASP1941), ингибиторы SGLT1, ингибиторы дегидрогеназы 11 β -гидроксистероидов (например, BVT-3498, INCB-13739), адипонектин или его агонист, ингибиторы IKK (например, AS-2868), средства, повышающие устойчивость к лептину, агонисты рецептора соматостатина, активаторы глюкокиназы (например, пираглиатин, AZD1656, AZD6370, TTP-355, соединение, описанное в WO 006/112549, WO 007/028135, WO 008/047821, WO 008/050821, WO 008/136428 или WO 008/156757), агонисты GPR119 (например, PSN821, MBX-2982, APD597), FGF21, аналог FGF, ингибиторы ACC2 и т.п.

В качестве лекарственного средства от осложнений диабета могут быть упомянуты ингибитор альдозоредуктазы (например, толрестат, эпалрестат, зополрестат, фидарестат, СТ-112, ранирестат (AS-3201), лидорестат), нейротрофический фактор и средства, повышающие его уровень (например, NGF, NT-3, BDNF, средство, стимулирующее продукцию/секрецию нейротрофического фактора, описанное в WO 01/14372 (например, 4-(4-хлорфенил)-2-(2-метил-1-имидазолил)-5-[3-(2-метилфенокси)пропил]оксазол), соединение, описанное в WO 2004/039365), ингибиторы РКС (например, рубоксистерин мезилат), ингибиторы AGE (например, ALT946, бромид N-фенацетилтиаозолия (ALT766), EXO-226, пиридорин, пиридоксамин), агонисты рецептора GABA (например, габапентин, прегабалин), ингибиторы обратного захвата серотонина и норадреналина (например, дулоксетин), ингибиторы натриевых каналов (например, лакозамид), активные ловушки кислорода (например, тиоктовая кислота), церебральные сосудорасширяющие средства (например, тиопурид, мексилетин), агонисты рецепторов соматостатина (например, BIM23190), ингибиторы регулирующей сигнал апоптоза киназы-1 (ASK-1) и т.п.

В качестве лекарственного средства от гиперлипидемии могут быть упомянуты ингибиторы редуктазы HMG-СОА (например, правастатин, симвастатин, ловастатин, аторвастатин, флувастатин, розувастатин, питавастатин или его соль (например, соль натрия, соль кальция)), ингибиторы скваленсинтазы (например, соединение, описанное в WO 97/10224, например N-[[[(3R,5S)-1-(3-ацетокси-2,2-диметилпропил)-7-хлор-5-(2,3-диметоксифенил)-2-оксо-1,2,3,5-тетрагидро-4,1-бензоксазепин-3-ил]ацетил]пиперидин-4-уксусная кислота), соединения-фибраты (например, безафибрат, клофибрат, симфибрат, клинофибрат), анионообменная смола (например, колестирамин), пробукол, лекарственные средства на основе никотиновой кислоты (например, никомол, ницеритрол, ниаспан), этиликозапентат, фитостерин (например, соевый стерин, гамма-оризанол (γ -оризанол)), ингибиторы всасывания холестерина (например, зехия), ингибиторы СЕТР (например, далцетрапиб, анацетрапиб), препараты ω -3 жирных кислот (например, этиловые эфиры ω -3-жирных кислот 90 (этиловые эфиры ω -3-кислоты 90)) и т.п.

Примеры антигипертензивного средства включают ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (например, каптоприл, эналаприл, делацеприл и т.д.), антагонисты ангиотензина II (например, кандесартан цилексетил, кандесартан, лозартан, лозартан калий, эпросартан, валсартан, телмисартан, ирбесартан, тасосартан, олмесартан, олмесартан медоксомил, азилсартан, азилсартан медоксомил и т.д.), антагонисты кальция (например, манидипин, нифедипин, амлодипин, эфонидипин, никардипин, цилнипидин и т.д.), β -блокаторы (например, метопролол, атенолол, пропранолол, карведилол, пиндолол и т.д.), клонидин и т.п.

В качестве диуретика могут быть упомянуты, например, производные ксантина (например, теобромин натрий салицилат, теобромин кальций салицилат и т.п.), тиазидные препараты (например, этиазид, циклопантiazид, трихлорметиазид, гидрохлортиазид, гидрофлуметиазид, бензилгидрохлортиазид, пенфлутиазид, политиазид, метиклотиазид и т.п.), антиальдостероновые препараты (например, спиронолактон, триамтерен и т.п.), ингибиторы карбоангидразы (например, ацетазоламид и т.п.), хлорбензолсульфонамидные средства (например, хлорталидон, мефрузид, индапамид и т.п.), азосемид, изосорбит, этакриновая кислота, пиретанид, буметанид, фуросемид и т.п.

Примеры химиотерапевтического средства включают алкилирующие средства (например, циклофосфамид, ифосфамид), антиметаболиты (например, метотрексат, 5-фторурацил), антибиотики против злокачественной опухоли (например, митомицин, адриамицин), средства против злокачественной опухоли растительного происхождения (например, винкристин, виндезин, таксол), цисплатин, карбоплатин, этопозид и т.п. Среди прочих предпочтительными являются производное 5-фторурацила фуртулон или неофуртулон и т.п.

Примеры иммунотерапевтического средства включают микробные или бактериальные компоненты (например, производное мурамилдипептида, пицибанил), полисахариды, обладающие активностью усиления иммунной системы (например, лентинан, сизофиран, крестин), цитокины, получаемые способами генной инженерии (например, интерферон, интерлейкин (IL)), колониестимулирующие факторы (например, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, эритропоэтин) и т.п. Среди прочих предпочтительными являются интерлейкины, такие как IL-1, IL-2, IL-12 и т.п.

Примеры противовоспалительного лекарственного средства включают нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, такие как аспирин, ацетаминофен, индометацин и т.п.

В качестве антитромботического средства могут быть упомянуты, например, гепарин (например, гепарин натрий, гепарин кальций, эноксапарин натрий, дальтепарин натрий), варфарин (например, варфарин калий), антитромбиновые лекарственные средства (например, арагатробан, дабигатран), ингибиторы FXa (например, ривароксабан, апиксабан, эдоксабан, YM150, соединение, описанное в WO

02/06234, WO 2004/048363, WO 2005/030740, WO 2005/058823 или WO 2005/113504), тромболитические средства (например, урокиназа, тизокиназа, альтеплаза, натеплаза, монтеплаза, памитеплаза), ингибиторы агрегации тромбоцитов (например, тиклопидин гидрохлорид, клопидогрел, прасургел, E5555, SHC530348, цилостазол, этиликозапентат, берапрост натрий, сарпрогрелат гидрохлорид) и т.п.

Примеры лекарственного средства от остеопороза включают альфакальцидол, кальцитриол, элькатонин, кальцитонин лосось, эстриол, иприфлавон, памидронат динатрий, алендронат натрий гидрат, инкадронат динатрий, ризедронат динатрий и т.п.

Примеры витамина включают витамин B₁, витамин B₁₂ и т.п.

Примеры лекарственного средства против деменции включают такрин, донепезил, ривастигмин, галантамин и т.п.

Примеры лекарственных средств против эректильной дисфункции включают апоморфин, силденафил цитрат и т.п.

Примеры терапевтического лекарственного средства от частого мочеиспускания или недержания мочи включают флавоксат гидрохлорид, оксибутирин гидрохлорид, пропивеврин гидрохлорид и т.п.

Примеры лекарственного средства от дизурии включают ингибиторы ацетилхолинэстеразы (например, дистигмин) и т.п.

Более того, также в комбинации с соединением по настоящему изобретению можно использовать лекарственное средство, для которого подтверждено, что оно обладает действием смягчения кахексии либо в моделях на животных, либо клинически, т.е. ингибитор циклооксигеназы (например, индометацин), производное прогестерона (например, магестрол ацетат), глюкокортикоид (например, дексаметазон), лекарственное средство-метоклопрамид, лекарственное средство-тетрагидроканнабинол, средство для улучшения метаболизма жиров (например, эйкозапентаеновая кислота), гормон роста, IGF-1 или антитело против индуцирующего кахексию фактора TNF- α , LIF, IL-6 или онкостатина M и т.п.

Альтернативно в комбинации с соединением по настоящему изобретению можно использовать ингибитор гликирования (например, ALT-711), лекарственное средство, стимулирующее регенерацию нервов (например, Y-128, VX853, просаптид), антидепрессант (например, дезипрамин, амитриптилин, имипрамин), антиэпилептическое лекарственное средство (например, ламотригин, трилептал, кеппра, зонегран, прегабалин, харкоерид, карбамазепин), антиаритмическое лекарственное средство (например, мексилетин), лиганд рецептора ацетилхолина (например, АВТ-594), антагонист рецептора эндотелина (например, АВТ-627), ингибитор захвата моноаминов (например, трамадол), наркотический анальгетик (например, морфин), агонист рецептора GABA (например, габапентин, MR-препарат габапентина), агонист рецептора $\alpha 2$ (например, клонидин), местный анальгетик (например, капсаицин), противотревожное лекарственное средство (например, бензотиазепин), ингибитор фосфодиэстеразы (например, силденафил), агонист рецепторов дофамина (например, апоморфин), мидазолам, кетоконазол и т.п.

Время введения соединения по настоящему изобретению и сопутствующего лекарственного средства не ограничено, и их можно вводить индивидууму одновременно или с перерывом.

Примеры такого способа введения включают следующие:

(1) введение одного препарата, полученного путем одновременной обработки соединения по настоящему изобретению и сопутствующего лекарственного средства, (2) одновременное введение двух типов препаратов соединения по настоящему изобретению и сопутствующего лекарственного средства, которое было получено отдельно, одним и тем же путем введения,

(3) введение двух типов препаратов соединения по настоящему изобретению и сопутствующего лекарственного средства, которые получены по отдельности, одним путем введения с перерывом, (4) одновременное введение двух типов препаратов соединения по настоящему изобретению и сопутствующего лекарственного средства, которые были получены по отдельности, различными путями введения, (5) введение двух типов препаратов соединения по настоящему изобретению и сопутствующего лекарственного средства, которые получены по отдельности, различными путями введения с перерывом (например, введение в порядке соединения по настоящему изобретению и сопутствующее лекарственное средство, или в обратном порядке) и т.п.

Дозу сопутствующего лекарственного средства можно соответствующим образом определять, исходя из дозы, используемой в клинических ситуациях. Соотношение при смешении соединения по настоящему изобретению и сопутствующего лекарственного средства можно соответствующим образом определять в зависимости от субъекта введения, симптома, способа введения, целевого заболевания, комбинации и т.п. Когда субъектом введения является человек, например, сопутствующее лекарственное средство можно использовать в количестве 0,01-100 частей по массе относительно 1 части по массе соединения по настоящему изобретению.

Путем комбинирования соединения по настоящему изобретению и сопутствующего лекарственного средства:

(1) дозу соединения по настоящему изобретению или сопутствующего лекарственного средства можно снижать по сравнению с введением соединения по настоящему изобретению или сопутствующего лекарственного средства,

(2) лекарственное средство для применения в комбинации с соединением по настоящему изобретению можно выбирать в зависимости от состояния пациентов (мягкое, тяжелое и т.п.),

(3) период лечения может быть продлен путем выбора сопутствующего лекарственного средства, обладающего действием и механизмом, отличающимися от действия и механизма соединения по настоящему изобретению,

(4) эффект непрерывного лечения может быть достигнут путем выбора сопутствующего лекарственного средства, обладающего действием и механизмом, отличающимися от действия и механизма соединения по настоящему изобретению,

(5) может быть достигнут синергический эффект путем комбинированного применения соединения по настоящему изобретению и сопутствующего лекарственного средства и т.п.

Примеры

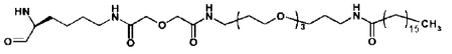
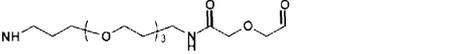
Сокращенные обозначения, используемые в настоящем описании, означают следующее (табл. 1-1 и табл. 1-2). Дефис в терминах, таких как α -MePhe и т.п., как описано в настоящем описании, может отсутствовать, и случай отсутствия имеет такое же значение.

Таблица 1-1

Aad	2-аминоадипиновая кислота
Abu	2-аминомасляная кислота
Abz (2)	2-аминобензойная кислота
Ac	ацетил
AcP	6-аминокапроновая кислота
AcPC	1-аминоциклопропанкарбоновая кислота
Adc (12)	12-аминододекановая кислота
Aib	α -аминоизомасляная кислота
Aipe	3-аминомасляная кислота
Ala (4Pip)	4-пиперидинилаланин
Ala (cPr)	циклопропилаланин
Alb	Албиззин 2-амино-3-уреидопропионовая кислота
Ambz (4)	4-аминометилбензоил
Aoc (8)	8-аминокаприловая кислота
Arg (Me)	N ω -метиларгинин
Asn (Me)	N ω -метиласпарагин
Aze (2)	азетидин-2-карбоновая кислота
Aze (3)	азетидин-3-карбоновая кислота
CC (AcP)	6-карбоксивентилкарбамоил
CC (β -Ala)	2-карбоксивентилкарбамоил
CC (GABA)	3-карбоксивентилкарбамоил
CC (Gly)	карбоксивентилкарбамоил
CC (Leu)	[(1S) -1-карбокси-3-метилбутил] карбамоил
CC (Ser)	[(1S) -1-карбокси-2-гидроксиэтил] карбамоил
CC (Tyr)	[(1S) -1-карбокси-2- (4-гидроксифенил) этил] карбамоил
Cha	циклогексилаланин
cisHyp	цис-4-гидроксипролин
Cit	цитруллин
cPrCO	циклопропанкарбонил
Dab	2, 4-диаминомасляная кислота
Dap	2, 3-диаминопропионовая кислота

GABA	γ-аминомасляная кислота
Gly (cPr)	циклопропилглицин
Gly- ψ[(E) CH=CH] -Leu	связь -CONH- между Gly и Leu замещена алкеном (E)-типа
Nar	гомоаргинин
homoLeu	гомолейцин
Hse	гомосерин
Hyp	транс-4-гидроксипролин
Iva	изовалин
Leu (Me)	γ-метиллейцин
Lys (Ac)	Nε-ацетиллизин
Lys (Гексил)	Nε-гексиллизин
Lys (Me)	Nε-метиллизин
Lys (Me ₂)	Nε, ε-диметиллизин

Таблица 1-2

Lys [Гексадеcanoил- (PEG2)]	
N(2- гидроксиэтил) Gly	N-(2-гидроксиэтил) глицин
N(iBu) Gly	N-изобутилглицин
Na1 (1)	1-нафтилаланин
Na1 (2)	2-нафтилаланин
Nar	Ногаргинин
Nle	Норлейцин
NmeAla	Nα-метилаланин
NmeSer	Nα-метилсерин
NmePhe	Nα-метилфенилаланин
Nva	Норвалин
Orn	орнитин
PEG2	
Phe (2, 6-Me ₂) lat	2, 6-диметилфенилаланин

Phe (2F)	2-фторфенилаланин
Phe (2Me)	2-метилфенилаланин
Phe (3F)	3-фторфенилаланин
Phe (3Me)	3-метилфенилаланин
Phe (4Cl)	4-хлорфенилаланин
Phe (4F)	4-фторфенилаланин
Phe (4Me)	4-метилфенилаланин
Phe (4NH ₂)	4-аминофенилаланин
Phg	фенилглицин
Pic (2)	2-пиперидинкарбоновая кислота
Pic (4)	4-пиперидинкарбоновая кислота
Pya (2)	2-пиридилаланин
Pya (3)	3-пиридилаланин
Pya (4)	4-пиридилаланин
4-PyCO	4-пиридилкарбонил
Ser (Me)	O-метилсерин
Thp (4)	тетрагидро-2H-пиран-4-ил
Thr (Me)	O-метилтреонин
трео-PhSer	трео-3-фенилсерин
Tic	1, 2, 3, 4-тетрагидроизохинолин-3- карбоновая кислота
Tyr (2F)	2-фтортирозин
Tyr (3F)	3-фтортирозин
Tyr (Me)	O-метилтирозин
Z	бензилоксикарбонил
α -MePhe	α -метилфенилаланин
α -MePro	α -метилпролин
β -Ala	β -аланин
β -HOAla	β -гомоаланин

В описании, когда основания, аминокислоты и т.д. обозначены посредством их кодов, они основаны на общепринятых кодах в соответствии с IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature или на известных кодах в данной области, примеры которых представлены ниже. Для аминокислот, которые могут иметь оптический изомер, присутствует L-форма, если нет иных указаний (например, "Ala" представляет собой L-форму Ala). Кроме того, "D-" означает D-форму (например, "D-Ala" представляет собой D-форму Ala), и "DL-" означает рацемат D-формы и L-формы (например, "DL-Ala" представляет собой DL-рацемат Ala).

TFA: :трифторуксусная кислота

Gly или G: :глицин

Ala или A: :аланин

Val или V: :валин

Leu или L: :лейцин

Ile или I: :изолейцин

Ser или S: :серин

Thr или T: :треонин

Cys или C: :цистеин

Met или M: :метионин

Glu или E: :глутаминовая кислота

Asp или D: :аспарагиновая кислота

Lys или K: :лизин

Arg или R: :аргинин

His или H: :гистидин

Phe или F: :фенилаланин

Tyr или Y: :тирозин

Trp или W: :триптофан
 Pro или P: :пролин
 Asn или N: :аспарагин
 Gln или Q: :глутамин
 pGlu: :пироглутаминовая кислота
 α -MeTyr: : α -метилтирозин

Настоящее изобретение подробно пояснено ниже с помощью следующих эталонных примеров, примеров, примеров испытания и примеров составления, которые являются только вариантами осуществления и их не следует истолковывать как ограничивающие. Кроме того, настоящее изобретение может быть модифицировано без отклонения от объема изобретения.

Термин "комнатная температура" в представленных ниже примерах указывает на диапазон, как правило, от приблизительно 10°C до приблизительно 35°C. Что касается "%", выход представляет собой выход в моль./моль.%, растворитель, используемый для хроматографии, представлен в % по объему, и в другом случае "%" представляет собой % по массе.

THF: тетрагидрофуран

DMF: N,N-диметилформамид

WSC: 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимид гидрохлорид

HOBT: 1-гидроксисбензотриазол моногидрат

Справочный пример 1. Синтез H-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber (SEQ ID NO: 10)

Амидную смолу Sieber (0,69 экв./г, 362 мг) добавляли в реакционную пробирку, которую затем загружали в устройство для синтеза пептидов. Аминокислоты последовательно конденсировались в соответствии с протоколом Fmoc/DCC/HOBT. На последней стадии N-концевую группу Fmoc удаляли. После завершения конденсации смолу промывали MeOH и сушили при пониженном давлении. В результате было получено 1025 мг (0,244 экв./г) представляющей интерес защищенной пептидной смолы.

Справочный пример 2. Синтез H-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-амидной смолы Sieber (SEQ ID NO: 11)

Амидную смолу Sieber (0,69 экв./г, 362 мг) добавляли в реакционную пробирку, которую затем загружали в устройство для синтеза пептидов. Аминокислоты последовательно конденсировались в соответствии с протоколом Fmoc/DCC/HOBT. На последней стадии N-концевую группу Fmoc удаляли. После завершения конденсации смолу промывали MeOH, и сушили при пониженном давлении. В результате было получено 1331 мг (0,188 экв./г) представляющей интерес защищенной пептидной смолы.

Справочный пример 3. Синтез H-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber (SEQ ID NO: 12)

Амидную смолу Sieber (0,61 экв./г, 410 мг) добавляли в реакционную пробирку, которую затем загружали в устройство для синтеза пептидов. Аминокислоты последовательно конденсировались в соответствии с протоколом Fmoc/DCC/HOBT. Двойную реакцию сочетания проводили для внесения Ala в 18 положении и в 20 положении и Gln(Trt) в 19 положении. На последней стадии N-концевую группу Fmoc удаляли. После завершения конденсации смолу промывали MeOH и сушили при пониженном давлении. В результате было получено 1110 мг (0,225 экв./г) представляющей интерес защищенной пептидной смолы.

Пример 1. Синтез H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr- α MePhe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ala-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Ala-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 13)

H-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,244 экв./г, 41,0 мг), полученную согласно эталонному примеру 1, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ala-OH (31,1 мг), 0,5 M ОхутаPure в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали и затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ile*, Ala, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 83 мг H-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ala-Ile-Aib-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 83 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиаоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 65/35-55/45 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 22,5 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4267,4 (вычислено: 4267,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,1 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5 - 35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 2. Синтез H-Тур-Aib-Glu-Gly-Thr-αMePhe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Aib-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Ala-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 14)

H-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,244 мэкв./г, 41,0 мг), полученную согласно справочному примеру 1, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ala-OH (31,1 мг), 0,5 М Охумариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали и затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF, и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ile*, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), αMePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 84,5 мг H-Тур(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-αMePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Ile-Aib-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 84,5 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиаоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 65/35-55/45 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 21,5 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4281,5 (вычислено: 4281,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,2 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 3. Синтез H-Тур-Aib-Glu-Gly-Thr-αMePhe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ala-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Ser-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 15)

H-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,244 мэкв./г, 41,0 мг), полученную согласно справочному примеру 1, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ser(tBu)-OH (38,3 мг), 0,5 М Охумариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в

течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ile*, Ala, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 73,3 мг H-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Ala-Ile-Aib-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 73,3 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, Раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 65/35-55/45 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 17,1 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4283,6 (вычислено: 4283,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,1 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 4. Синтез H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr- α MePhe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Aib-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Ser-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 16)

H-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,244 мэкв./г, 41,0 мг), полученную согласно справочному примеру 1, отвешивали в реакционную пробирку, и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ser(tBu)-OH (38,3 мг), 0,5 М Охумарге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ile*, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 63 мг H-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Ile-Aib-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 63 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 64/36-54/46 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 14,7 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4297,8 (вычислено: 4297,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,2 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5 - 35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 5.

Синтез Н-Тур-Аиб-Глу-Гли-Тр- α Мепе-Тр-Сер-Асп-Тур-Ала-Иле-Аиб-Леу-Асп-Лис-Гли-Ала-Гли-Ала-Глу-Пхе-Вал-Лис-Трп-Леу-Леу-Лис-Гли-Гли-Про-Сер-Сер-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер-NH₂ (SEQ ID NO: 17)

Н-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-амидную смолу Sieber (0,188 экв./г, 53,2 мг), полученную согласно справочному примеру 2, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ala-OH (31,1 мг), 0,5 М Охумаруре в DMF (2 00 мкл) и диизопропилкарбодимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ile*, Ala, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 97 мг Н-Тур(tBu)-Аиб-Глу(OtBu)-Гли-Тр- α Мепе-Тр(tBu)-Сер(tBu)-Асп(OtBu)-Тур(tBu)-Ала-Иле-Аиб-Леу-Асп(OtBu)-Лис(Boc)-Гли(Trt)-Ала-Гли(Trt)-Ала-Глу(OtBu)-Пхе-Вал-Лис(Boc)-Трп(Boc)-Леу-Леу-Лис(Boc)-Гли-Гли-Про-Сер(tBu)-Сер(tBu)-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер(tBu)-амидной смолы Sieber.

К 97 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, Раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 63/37-53/47 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 2 5,2 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4139,2 (Вычислено: 4139,1)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,3 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 6. Синтез Н-Тур-Аиб-Глу-Гли-Тр- α Мепе-Тр-Сер-Асп-Тур-Аиб-Иле-Аиб-Леу-Асп-Лис-Гли-Ала-Гли-Ала-Глу-Пхе-Вал-Лис-Трп-Леу-Леу-Лис-Гли-Гли-Про-Сер-Сер-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер-NH₂ (SEQ ID NO: 18)

Н-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-амидную смолу Sieber (0,188 экв./г, 53,2 мг), полученную согласно справочному примеру 2, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ala-OH (31,1 мг), 0,5 М Охумаруре в DMF (2 00 мкл) и диизопропилкарбодимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, и затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF, и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ile*, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 78,1 мг Н-Тур(tBu)-Аиб-Глу(OtBu)-Гли-Тр- α Мепе-Тр(tBu)-Сер(tBu)-Асп(OtBu)-Тур(tBu)-Аиб-Иле-Аиб-Леу-Асп(OtBu)-Лис(Boc)-Гли(Trt)-Ала-Гли(Trt)-Ала-Глу(OtBu)-Пхе-Вал-Лис(Boc)-Трп(Boc)-Леу-Леу-Лис(Boc)-Гли-Гли-Про-Сер(tBu)-Сер(tBu)-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер(tBu)-амидной смолы Sieber.

К 78,1 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование ли-

нейного градиента концентрации 63/37-53/47 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 18,4 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, $(M+H)^+$ 4152,9 (вычислено: 4153,1)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,4 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 7. Синтез Н-Тур-Аиб-Глу-Гли-Трп-αMePhe-Трп-Сер-Асп-Тур-Ала-Иле-Аиб-Леу-Асп-Лис-Гли-Ала-Гли-Сер-Глу-Пхе-Вал-Лис-Трп-Леу-Леу-Лис-Гли-Гли-Про-Сер-Сер-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер-NH₂ (SEQ ID NO: 19)

Н-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-амидную смолу Sieber (0,188 мэкв./г, 53,2 мг), полученную согласно справочному примеру 2, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ser(tBu)-OH (38,3 мг), 0,5 М Охутариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл, 0,1 ммоль), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ile*, Ala, Тур(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), αMePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Тур(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 87 мг Н-Тур(tBu)-Аиб-Глу(OtBu)-Гли-Трп(tBu)-αMePhe-Трп(tBu)-Сер(tBu)-Асп(OtBu)-Тур(tBu)-Ала-Иле-Аиб-Леу-Асп(OtBu)-Лис(Boc)-Гли(Trt)-Ала-Гли(Trt)-Сер(tBu)-Глу(OtBu)-Пхе-Вал-Лис(Boc)-Трп(Boc)-Леу-Леу-Лис(Boc)-Гли-Гли-Про-Сер(tBu)-Сер(tBu)-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер(tBu)-амидной смолы Sieber.

К 87 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.)

Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 65/35-55/45 (60 мин). Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 17 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, $(M+H)^+$ 4154,8 (вычислено: 4155,1)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,3 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: с использованием Раствор А: 0,1% TFA-вода, Раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: 95/5-35/65 элюирование линейного градиента концентрации (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 8. Синтез Н-Тур-Аиб-Глу-Гли-Трп-αMePhe-Трп-Сер-Асп-Тур-Аиб-Иле-Аиб-Леу-Асп-Лис-Гли-Ала-Гли-Сер-Глу-Пхе-Вал-Лис-Трп-Леу-Леу-Лис-Гли-Гли-Про-Сер-Сер-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер-NH₂ (SEQ ID NO: 20)

Н-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-амидную смолу Sieber (0,188 мэкв./г, 53,2 мг), полученную согласно справочному примеру 2, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ser(tBu)-OH (38,3 мг), 0,5 М Охутариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ile*, Aib, Тур(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), αMePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Тур(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 76,8 мг Н-Тур(tBu)-Аиб-Глу(OtBu)-Гли-Трп(tBu)-αMePhe-Трп(tBu)-Сер(tBu)-Асп(OtBu)-Тур(tBu)-Аиб-Иле-Аиб-Леу-Асп(OtBu)-

Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ser(tBu)-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-амидной смолы Sieber.

К 76,8 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиаоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:2,5:2,5), и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, Раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 63/37-53/47 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 16,6 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4169,2 (вычислено: 4169,1)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,4 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 9. Синтез H-Тур-Аиб-Глу-Гли-Тр-αMePhe-Тр-Сер-Асп-Тур-Аиб-Лис-Аиб-Лей-Асп-Лис-Гли-Ала-Гли-Ала-Глу-Пхе-Вал-Лис-Трп-Лей-Лей-Лис-Гли-Гли-Про-Сер-Сер-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер-Лис-NH₂ (SEQ ID NO: 21)

H-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,225 экв./г, 44,4 мг), полученную согласно справочному примеру 3, отвечивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Gln(Trt)-OH (61,1 мг), 0,5 M Охутариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, и затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF, и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Lys(Boc), Aib, Тур(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), αMePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Тур(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 72,4 мг H-Тур(tBu)-Аиб-Глу(OtBu)-Гли-Тр(tBu)-αMePhe-Тр(tBu)-Сер(tBu)-Асп(OtBu)-Тур(tBu)-Аиб-Лис(Boc)-Аиб-Лей-Асп(OtBu)-Лис(Boc)-Гли(Trt)-Ала-Гли(Trt)-Ала-Глу(OtBu)-Пхе-Вал-Лис(Boc)-Трп(Boc)-Лей-Лей-Лис(Boc)-Гли-Гли-Про-Сер(tBu)-Сер(tBu)-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер(tBu)-Лис(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 72,4 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиаоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 67/33-57/43 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 13,9 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4295,8 (вычислено: 4296,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 6,9 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 10. Синтез H-Тур-Аиб-Глу-Гли-Тр-αMePhe-Тр-Сер-Асп-Тур-Аиб-Ала-Аиб-Лей-Асп-Лис-Гли-Ала-Гли-Ала-Глу-Пхе-Вал-Лис-Трп-Лей-Лей-Лис-Гли-Гли-Про-Сер-Сер-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер-Лис-NH₂ (SEQ ID NO: 22)

H-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,225 экв./г, 44,4 мг), полученную согласно эталонному примеру 3, отвечивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Gln(Trt)-OH (61,1 мг), 0,5 M Охутариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл), а затем смесь

встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ala, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 86,1 мг H-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Ala-Aib-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 86,1 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиаоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:5:2,5:2,5), и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, Раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: 66/34-56/44 элюирование линейного градиента концентрации (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 16,2 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4238,6 (вычислено: 4239,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,1 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора

В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 11. Синтез H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr- α MePhe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Aib-Phe-Aib-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Ala-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 23)

H-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,225 экв./г, 44,4 мг), полученную согласно справочному примеру 3, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Gln(Trt)-OH (61,1 мг), 0,5 М Охутариге в DMF (2 00 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Phe, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 76,4 мг H-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Phe-Aib-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 76,4 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиаоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 65/35-55/45 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 4,7 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4315,1 (вычислено: 4315,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,2 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1%

TFA, A/B: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)
 скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 12. Синтез H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr- α MePhe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Aib-Pya(4)-Aib-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Ala-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 24)

H-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,225 экв./г, 44,4 мг), полученную согласно справочному примеру 3, отщепляли в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Gln(Trt)-OH (61,1 мг), 0,5 M Oxymurpure в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Pya(4)*, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)**, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: 17,4 мкл DIPEA добавляли в процессе конденсации; **: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 78,4 мг H-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Pya(4)-Aib-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 78,4 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.)

[Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, A/B: элюирование линейного градиента концентрации 67/33-57/43 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 15,2 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4316,2 (вычислено: 4316,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 6,9 мин

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, A/B: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)
 скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 13. Синтез H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr- α MePhe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Aib-Ile- α MePhe-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Ala-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 25)

H-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,225 экв./г, 44,4 мг), полученную согласно справочному примеру 3, отщепляли в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Gln(Trt)-OH (61,1 мг), 0,5 M Oxymurpure в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, α MePhe, Ile, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 69,1 мг H-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Ile- α MePhe-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 69,1 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную

ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 64/36-54/46 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 14,4 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4356,9 (вычислено: 4357,3)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,4 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 14. Синтез Н-Тур-Аиб-Глу-Гли-Трп-αMePhe-Трп-Сер-Асп-Тур-Аиб-Иле-Ча-Леу-Асп-Лис-Гли-Ала-Гли-Ала-Глу-Пхе-Вал-Лис-Трп-Леу-Леу-Лис-Гли-Гли-Про-Сер-Сер-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер-Лис-NH₂ (SEQ ID NO: 26)

Н-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,225 экв./г, 44,4 мг), полученную согласно справочному примеру 3, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Gln(Trt)-OH (61,1 мг), 0,5 М Охутаруре в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Cha, Ile, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), αMePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 71,5 мг Н-Тур(tBu)-Аиб-Глу(OtBu)-Гли-Трп-αMePhe-Трп-Сер-Асп(OtBu)-Тур-Аиб-Иле-Ча-Леу-Асп(OtBu)-Лис(Boc)-Гли-Ала-Гли-Ала-Глу(OtBu)-Пхе-Вал-Лис(Boc)-Трп(Boc)-Леу-Леу-Лис(Boc)-Гли-Гли-Про-Сер-Сер-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер-Лис-NH₂ (SEQ ID NO: 26).

К 71,5 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.)

[Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 63/37-53/47 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 16 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4348,7 (вычислено: 4349,3)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,5 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 15. Синтез Н-Тур-Аиб-Глу-Гли-Трп-αMePhe-Трп-Сер-Асп-Тур-Аиб-Лис-αMePhe-Леу-Асп-Лис-Гли-Ала-Гли-Ала-Глу-Пхе-Вал-Лис-Трп-Леу-Леу-Лис-Гли-Гли-Про-Сер-Сер-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер-Лис-NH₂ (SEQ ID NO: 27)

Н-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,225 экв./г, 44,4 мг), полученную согласно справочному примеру 3, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Gln(Trt)-OH (61,1 мг), 0,5 М Охутаруре в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, αMePhe, Lys(Boc), Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), αMePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение

ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 77,9 мг H-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Lys(Boc)- α MePhe-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 77,9 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиаоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, Раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 65/35-55/45 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 13,4 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4371,7 (вычислено: 4372,3)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,1 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 16. Синтез H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr- α MePhe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Aib-Lys-Cha-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Ala-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 28)

H-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,225 мэкв./г, 44,4 мг), полученную согласно справочному примеру 3, отщипывали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Gln(Trt)-OH (61,1 мг), 0,5 М Охутариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Cha, Lys(Boc), Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 75,1 мг H-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Lys(Boc)-Cha-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 75,1 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиаоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.)

Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 65/35-55/45 (60 мин). Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 14,7 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4364,7 (вычислено: 4364,3)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,1 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 17. Синтез H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr- α MePhe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Aib-Ile-aMeTyr-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Ala-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 29)

H-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,225 мэкв./г, 44,4 мг), полученную согласно справочному примеру 3, отщипывали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с

помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Gln (Trt)-OH (61,1 мг), 0,5 М Охумариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, α MeTyr, Ile, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 56,2 мг H-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Ile- α MeTyr-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 56,2 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиаоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:5:2,5:2,5), и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 65/35-55/45 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 1,4 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4373,8 (вычислено: 4373,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,2 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 18. Синтез Ac-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr- α MePhe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Aib-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Ala-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 30)

H-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,253 мэкв./г, 39,5 мг), полученную с использованием подхода, аналогичного эталонному примеру 1, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ala-OH (31,1 мг), 0,5 М Охумариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ile*, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Далее N-концевую группу Fmoc удаляли обработкой пиперидином, а затем к смоле последовательно добавляли DMF (200 мкл), DIPEA (17,4 мкл) и Ac₂O (9,4 мкл) и смесь встряхивали в течение 90 мин. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера, смолу промывали MeOH и сушили при пониженном давлении с получением 43 мг Ac-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Ile-Aib-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 43 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиаоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 62/38-52/48 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 7,8 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4323,4 (вычислено: 4323,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,5 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 19. Синтез бензоил-Тур-Аиб-Глу-Гли-Тр-αMePhe-Тр-Сер-Асп-Тур-Аиб-Иле-Аиб-Леу-Асп-Лис-Гли-Ала-Гли-Ала-Глу-Пхе-Вал-Лис-Трп-Леу-Леу-Лис-Гли-Гли-Про-Сер-Сер-Гли-Ала-Про-Про-Сер-Лис-NH₂ (SEQ ID NO: 31)

H-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,253 экв./г, 39,5 мг), полученную согласно справочному примеру 1, отвешивали в реакционную пробирку, и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ala-OH (31,1 мг), 0,5 M Охумариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ile*, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), αMePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Далее N-концевую группу Fmoc удаляли обработкой пиперидином, а затем к смоле последовательно добавляли бензойную кислоту (12,2 мг), 0,5 M Охумариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл) и смесь встряхивали в течение ночи. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера, смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 54,8 мг бензоил-Тур(tBu)-Аиб-Глу(OtBu)-Гли-Тр(tBu)-αMePhe-Тр(tBu)-Сер(tBu)-Асп(OtBu)-Тур(tBu)-Аиб-Иле-Аиб-Леу-Асп(OtBu)-Лис(Boc)-Гли(Trt)-Ала-Гли(Trt)-Ала-Глу(OtBu)-Пхе-Вал-Лис(Boc)-Трп(Boc)-Леу-Леу-Лис(Boc)-Гли-Гли-Про-Сер(tBu)-Сер(tBu)-Гли-Ала-Про-Про-Сер(tBu)-Лис(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 54,8 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 60/40-50/50 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 10,1 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4385,2 (вычислено: 4385,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,7 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 20. Синтез 4PyCO-Тур-Аиб-Глу-Гли-Тр-αMePhe-Тр-Сер-Асп-Тур-Аиб-Иле-Аиб-Леу-Асп-Лис-Гли-Ала-Гли-Ала-Глу-Пхе-Вал-Лис-Трп-Леу-Леу-Лис-Гли-Гли-Про-Сер-Сер-Гли-Ала-Про-Про-Сер-Лис-NH₂ (SEQ ID NO: 32)

H-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,253 экв./г, 39,5 мг), полученную согласно справочному примеру 1, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ala-OH (31,1 мг), 0,5 M Охумариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ile*, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), αMePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Далее

N-концевую группу Fmoc удаляли обработкой пиперидином, а затем к смоле последовательно добавляли 4-пиридинкарбоновую кислоту (12,3 мг), 0,5 М Охутариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодимид (15,9 мкл), и смесь встряхивали в течение ночи. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера, смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 62,9 мг 4PyCO-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Ile-Aib-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 62,9 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 62/38-52/48 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 13,3 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 438 6,2 (вычислено: 4386,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,3 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 21. Синтез cPrCO-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr- α MePhe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Aib-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Ala-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 33)

H-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,253 мэкв./г, 39,5 мг), полученную согласно справочному примеру 1, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ala-OH (31,1 мг), 0,5 М Охутариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ile*, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Далее N-концевую группу Fmoc удаляли обработкой пиперидином, а затем к смоле последовательно добавляли циклопропанкарбоновую кислоту (8,6 мг), 0,5 М Охутариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодимид (15,9 мкл) и смесь встряхивали в течение ночи. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера, смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 61,8 мг cPrCO-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Ile-Aib-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 61,8 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.)

Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 61/39-51/49 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 11,7 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4349,2 (вычислено: 4349,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,6 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1%

TFA, A/B: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)
 скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 22. Синтез амидино-Тур-Аиб-Глу-Гли-Трп- α МePhe-Трп-Сер-Асп-Тур-Аиб-Иле-Аиб-Леу-Асп-Лис-Гли-Ала-Гли-Ала-Глу-Фе-Вал-Лис-Трп-Леу-Леу-Лис-Гли-Гли-Про-Сер-Сер-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер-Лис- NH_2 (SEQ ID NO: 34)

H-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,253 мэкв./г, 39,5 мг), полученную согласно справочному примеру 1, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ala-OH (31,1 мг), 0,5 M Охумариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, и затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF, и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ile*, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Далее N-концевую группу Fmoc удаляли обработкой пиперидином, а затем к смоле последовательно добавляли DMF (200 мкл), N,N'-бис(трет-бутоксикарбонил)-1H-пиразоло-1-карбоксамидин (31 мг) и DIPEA (17,4 мкл), и смесь встряхивали в течение ночи. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем к смоле последовательно добавляли DMF (200 мкл), N,N'-бис(трет-бутоксикарбонил)-1H-пиразоло-1-карбоксамидин (31 мг) и DIPEA (17,4 мкл) и смесь вновь встряхивали в течение ночи. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера, смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 54,7 мг Boc-NHC(=NBoc)-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Ile-Aib-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 54,7 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиоанизол: этандитиол: H_2O : триизопропилсилан (80:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.)

Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 62/38-52/48 (60 мин). Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 10,7 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4323,2 (вычислено: 4323,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,3 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)
 скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 23. Синтез H-NMeTyr-Aиб-Глу-Гли-Трп- α МePhe-Трп-Сер-Асп-Тур-Аиб-Иле-Аиб-Леу-Асп-Лис-Гли-Ала-Гли-Ала-Глу-Фе-Вал-Лис-Трп-Леу-Леу-Лис-Гли-Гли-Про-Сер-Сер-Гли-Ала-Про-Про-Про-Сер-Лис- NH_2 (SEQ ID NO: 35)

H-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,253 мэкв./г, 39,5 мг), полученную согласно справочному примеру 1, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ala-OH (31,1 мг), 0,5 M Охумариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Aib, Ile*, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и NMeTyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 66,2 мг H-NMeTyr(tBu)-Aиб-Глу(ОtBu)-Гли-Трп(Тбу)- α МePhe-Трп(Тбу)-Сер(Тбу)-Асп(ОtBu)-Тур(Тбу)-Аиб-Иле-Аиб-Леу-Асп(ОtBu)-Лис(Вос)-Гли(Трт)-Ала-Гли(Трт)-Ала-Глу(ОtBu)-Фе-Вал-Лис(Вос)-Трп(Вос)-Леу-Леу-Лис(Вос)-

Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 66,2 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: м-крезол: тиоанизол: этандитиол: H₂O: триизопропилсилан (80:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. В реакционный раствор добавляли диэтиловый эфир для обеспечения преципитации и преципитат промывали путем повторения три раза действия удаления супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.)

Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 63/37-53/47 (60 мин). Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 9 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4295,1 (Вычислено: 4295,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,2 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 24. Синтез Н-Тyr-Aib-Glu-Gly-Thr-αMePhe-Thr-Ser-Asp-Тyr-Aib-Lys-Тyr-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Ala-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 36)

Н-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,244 экв./г, 41,0 мг), полученную согласно этапному примеру 1, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Ala-OH (31,1 мг), 0,5 М Охутариге в DMF (200 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Tyr(tBu), Lys(Boc)*, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), αMePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 66, 8 мг Н-Тyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-αMePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 66,8 мг полученной смолы добавляли 1 мл of TFA:m-крезол:тиоанизол:этандитиол: H₂O:триизопропилсилан (80:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. К реакционному раствору добавляли диэтиловый эфир для получения преципитата и преципитат промывали путем повторения три раза действия по удалению супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.)

Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 66/34-56/44 (60 мин). Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 16,1 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4374,6 (Вычислено: 4374,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 6,9 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5 - 35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 25. Синтез Н-Тyr-Aib-Glu-Gly-Thr-αMePhe-Thr-Ser-Asp-Тyr-Aib-Lys-Тyr-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Gln-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 37)

Н-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидную смолу Sieber (0,244 экв./г, 41,0 мг), полученную согласно справочному примеру 1, отвешивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Gln(Trt)-OH (61,1 мг), 0,5 М Охутариге в DMF (2 00 мкл) и диизопропилкарбодиимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После под-

тверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Tyr(tBu), Lys(Boc)*, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 55,0 мг H-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-Lys(Boc)-амидной смолы Sieber.

К 55,0 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA:m-крезол:тиоанизол:этандитиол: H₂O:тризопропилсилан (80:5:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. К реакционному раствору добавляли диэтиловый эфир для получения преципитата и преципитат промывали путем повторения три раза действия по удалению супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.) [Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 66/34-56/44 (60 мин)]. Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 13,7 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4431,5 (Вычислено: 4431,3)

Время элюирования ВЭЖХ: 6,9 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример 26. Синтез H-Tyr-Aib-Glu-Gly-Thr- α MePhe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Aib-Lys-Tyr-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Gln-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-NH₂ (SEQ ID NO: 38)

H-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-амидную смолу Sieber (0,188 экв./г, 53,2 мг), полученную согласно справочному примеру 2, отвечивали в реакционную пробирку и подвергали набуханию с помощью DMF. После удаления DMF фильтрацией к смоле последовательно добавляли Fmoc-Gln(Trt)-OH (61,1 мг), 0,5 М Охутариге в DMF (200 мкл) и диизопробилкарбодимид (15,9 мкл), а затем смесь встряхивали в течение 1,5 ч. Реакционный раствор отфильтровывали, а затем смолу 6 раз промывали DMF. После подтверждения негативности в тесте Кайзера добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 1 мин. Раствор отфильтровывали, затем к нему вновь добавляли 20% раствор пиперидина в DMF и смесь встряхивали в течение 20 мин. Раствор отфильтровывали и смолу 10 раз промывали DMF. Этот цикл конденсации аминокислоты с Fmoc - удаления защитной группы Fmoc повторяли для последовательной конденсации Gln(Trt), Ala, Gln(Trt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Leu, Tyr(tBu), Lys(Boc)*, Aib, Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Thr(tBu), α MePhe, Thr(tBu)*, Gly, Glu(OtBu), Aib и Tyr(tBu) (*: реакция в течение ночи). Смолу промывали MeOH, а затем сушили при пониженном давлении с получением 95,4 мг H-Tyr(tBu)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)- α MePhe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Tyr(tBu)-Aib-Lys(Boc)-Tyr(tBu)-Leu-Asp(OtBu)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Ala-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Glu(OtBu)-Phe-Val-Lys(Boc)-Trp(Boc)-Leu-Leu-Lys(Boc)-Gly-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser(tBu)-амидной смолы Sieber.

К 95,4 мг полученной смолы добавляли 1 мл смеси TFA: m-крезол: тиоанизол: этандитиол: H₂O: тризопропилсилан (80:5:5:5:2,5:2,5) и смесь перемешивали в течение 1,5 ч. К реакционному раствору добавляли диэтиловый эфир для получения преципитата и преципитат промывали путем повторения три раза действия по удалению супернатанта после центрифугирования. Осадок экстрагировали 50% водным раствором уксусной кислоты и смолу удаляли фильтрацией, после чего проводили препаративную ВЭЖХ с использованием колонки Daisopak SP-100-5-ODS-P (250×20 мм I.D.)

Раствор А: 0,1% TFA-вода, раствор В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, скорость потока 8 мл/мин, А/В: 61/39-51/49 элюирование линейного градиента концентрации (60 мин). Фракции, содержавшие требуемый продукт, собирали и лиофилизировали с получением 2,0,0 мг белого порошка.

Масс-спектрометрия, (M+H)⁺ 4303,0 (Вычислено: 4303,2)

Время элюирования ВЭЖХ: 7,1 мин

условия элюирования:

колонка: Merck Chromolith Performance RP-18e (100×4,6 мм I.D.)

элюент: использование раствора А: 0,1% TFA-вода, раствора В: ацетонитрил, содержащий 0,1% TFA, А/В: элюирование линейного градиента концентрации 95/5-35/65 (10 мин)

скорость потока: 3,0 мл/мин

Пример испытания 1. Оценка активности агониста в отношении GIPR человека, GLP-1R человека и глюкагона R человека с использованием повышения внутриклеточной концентрации cAMP в качестве показателя

(1) Конструирование экспрессирующей плазмиды для гена GIPR человека

Ген GIPR человека, имеющий последовательность, идентичную последовательности под номером доступа GenBank № U39231, клонировали в вектор pMSR α -neo с получением hGIPR/pMSR α -neo.

(2) Конструирование клетки, экспрессирующей репортерную плазмиду

Репортерный ген люциферазы, имеющий вышележащую отвечающую на cAMP последовательность, вводили в клетки CHO-K1 для получения клеток CRE-LUC/CHO-K1.

(3) Конструирование репортерной плазмиды

Четыре копии отвечающей на cAMP последовательности и ген устойчивости к зеоцину встраивали в основной вектор pGL3(R2.2) (Promega) для конструирования репортерной плазмиды Cre-luc(Zeo).

(4) Введение гена GIPR человека в клетку CRE-LUC/CHO-K1 и получение экспрессирующей клетки

Плазмиду hGIPR/pMSR α -neo, полученную согласно (1), вводили в клетки CRE-LUC/CHO-K1, полученные согласно (2), с получением трансформантов. Далее в клеточной линии индуцировали экспрессию люциферазы, т.е. клетки hGIPR/CRE-LUC/CHO-K1 отбирали из полученных трансформантов добавлением GIP.

(5) Конструирование экспрессирующей плазмиды для гена GLP-1R человека

Ген GLP-1R человека, имеющий последовательность, идентичную последовательности под номером доступа GenBank № NM_002062, клонировали в вектор pIRESneo3 с получением hGLP-1/pIRESneo3.

(6) Введение гена GLP-1R человека и репортерной плазмиды в клетку CHO-K1 и получение экспрессирующей клетки

Cre-luc(Zeo), полученную согласно (3), и плазмиду hGLP-1/pIRESneo3, полученную согласно (5), вводили в клетки CHO-K1 с получением трансформантов. Далее в клеточной линии индуцировали экспрессию люциферазы, т.е. клетки hGLP-1R/CRE-luc/CHO-K1 подвергали селекции из полученных трансформантов добавлением GLP-1.

(7) Конструирование экспрессирующей плазмиды для гена глюкагона R человека

Ген глюкагона R человека, имеющий последовательность, идентичную последовательности под номером доступа GenBank № NM_000160, клонировали в вектор pMSR α -neo для получения hGlucagonR/pMSR α -neo.

(8) Введение гена глюкагона R человека в клетки CRE-LUC/CHO-K1 и получение экспрессирующей клетки

Плазмиду hGlucagonR/pMSR α -neo, полученную согласно (7), вводили в клетки CRE-LUC/CHO-K1, полученные согласно (2), с получением трансформантов. Далее в клеточной линии индуцировали экспрессию люциферазы, т.е. клетки hGlucagonR/CRE-LUC/CHO-K1 подвергали селекции из полученных трансформантов добавлением глюкагона.

(9) Репортерный анализ

Клетки hGIPR/CRE-LUC/CHO-K1 инокулировали при плотности клеток 25 мкл/лунка (5×10^4 клеток/лунка) в 384-луночный белый планшет (Corning) и культивировали в течение ночи в среде Ham F12, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку, 100 Е/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в инкубаторе с CO₂ при 37°C. Среду, содержащую исследуемое соединение, добавляли к клеткам в концентрации 5 мкл/лунка и полученные клетки инкубировали в течение 4 ч в инкубаторе с CO₂ при 37°C до достижения конечной концентрации 1 мкМ. К ним добавляли PicaGene LT7.5 (Toyo Ink Co., Ltd.) в концентрации 30 мкл/лунка и смесь встряхивали в защищенных от света условиях. Через 30 мин измеряли активность люциферазы с использованием устройства для считывания планшетов Envision (PerkinElmer). Активность люциферазы в присутствии 10 нМ GIP определяли как 100%, и активность люциферазы при добавлении DMSO вместо исследуемого соединения определяли как 0%. Активность агониста GIPR вычисляли по повышению внутриклеточной концентрации cAMP в качестве показателя. Результаты представлены в табл. 2.

Активность агониста GLP-1R анализировали аналогично тому, как описано выше, с использованием клеток hGLP-1R/CRE-luc/CHO-K1. Активность люциферазы в присутствии 10 нМ GLP-1 определяли как 100%, и активность люциферазы в результате добавления DMSO вместо исследуемого соединения определяли как 0%. Активность агониста GLP-1R вычисляли по повышению внутриклеточной концентрации cAMP в качестве показателя. Результаты представлены в табл. 2.

Активность агониста глюкагона R анализировали аналогично тому, как описано выше, с использованием клеток hGlucagonR/CRE-LUC/CHO-K1. Активность люциферазы в присутствии 10 нМ GLP-1 определяли как 100%, и активность люциферазы в результате добавления DMSO вместо исследуемого соединения определяли как 0%. Активность агониста GLP-1R вычисляли по повышению внутриклеточной концентрации cAMP в качестве показателя. Результаты представлены в табл. 2.

Как показано в табл. 2, соединение по настоящему изобретению обладает улучшенным действием

активации рецепторов GLP-1 и рецепторов GIP. Кроме того, соединение по настоящему изобретению обладает низким действием активации рецептора глюкагона.

Таблица 2

Пример	Активность агониста (EC ₅₀)		
	hGIPR	hGLP-1R	hGCGR
1	8,1E-12	1,2E-11	>1,0E-06
2	6,8E-12	1,6E-11	>1,0E-06
3	7,1E-12	1,3E-11	>1,0E-06
4	4,9E-12	9,9E-12	>1,0E-06
5	5,5E-12	7,2E-12	>1,0E-06
6	7,3E-12	1,6E-11	>1,0E-06
7	6,9E-12	8,8E-12	>1,0E-06
8	8,0E-12	1,4E-11	>1,0E-06
9	8,0E-12	1,5E-11	>1,0E-06
10	5,4E-12	8,3E-12	>1,0E-06
11	1,5E-11	2,2E-11	>1,0E-06
12	7,2E-12	1,4E-11	>1,0E-06
13	7,2E-12	1,1E-11	>1,0E-06
14	1,3E-11	2,1E-11	>1,0E-06
15	1,3E-11	1,5E-11	>1,0E-06
16	9,1E-12	1,5E-11	>1,0E-06
17	1,4E-11	1,8E-11	>1,0E-06
18	2,7E-11	1,3E-10	>1,0E-06
19	2,4E-11	3,7E-11	>1,0E-06
20	2,6E-11	1,3E-10	>1,0E-06
21	2,4E-11	5,5E-11	>1,0E-06
22	1,9E-11	3,5E-11	>1,0E-06
23	1,6E-11	1,6E-11	>1,6E-11
24	9,9E-12	1,1E-11	>1,0E-06
25	1,3E-11	1,4E-11	>1,0E-06
26	1,3E-11	1,5E-11	>1,0E-06

Пример испытания 2. Испытание непрерывного подкожного введения в течение 2 суток

Активность подавления пищевой активности исследуемым соединением исследовали способом, описанным ниже.

Исследуемое соединение растворяли в растворителе (50% DMSO), чтобы происходило замедленное высвобождение в дозе 10 нмоль/кг/сутки и раствором заполняли насос Alzet Pump (DURECT Corporation, модель: 1003D). Насос, заполненный таким образом раствором для введения, погружали в физиологический раствор для активации, а затем использовали. Насос вводили следующим способом. Каждого самца мышей C57BL/6J в возрасте 8-9 недель (20-26°C, позволяли принимать пищу и воду без ограничений; цикл 12 ч на свету - 12 ч в темноте) подвергали анестезии; их кожу верхней части спины надрезали и упомянутый выше насос помещали подкожно; разрез зашивали. После взвешивания эту мышь возвращали в клетку для содержания (содержали отдельно) и давали предварительно взвешенный корм; измеряли употребление корма через 2 суток после начала введения. Употребление корма вычисляли путем вычитания количества оставшегося корма из массы выданного корма в день начала введения. Когда употребление корма в контрольной группе, в которой проводили введение только растворителя, считали уровнем подавления 0%, активность подавления пищевой активности каждого исследуемого соединения оценивали, исходя из совокупного употребления корма после начала введения в течение 2 суток. Уровень подавления употребления корма (%) для исследуемого соединения определяли как (употребление корма в контрольной группе - употребление корма в группе введения исследуемого соединения)/Употребление корма в контрольной группе ×100.

Как показано в табл. 3, соединение по настоящему изобретению обладает улучшенным действием подавления употребления корма.

Таблица 3

Пример	Подавление употребления корма (%)
1	42,68
2	64,80
3	46,49
4	57,01
5	60,99
6	65,20
8	48,34
9	45,23
10	62,04
11	49,99
12	55,07
13	57,12
14	47,47
15	58,80
16	54,24
17	55,42
19	34,79
22	35,51
23	52,62
24	54,18
25	53,12
26	53,06

Пример испытания 3. Испытание непрерывного подкожного введения в течение 2 недель у мышей DIO

Активность исследуемого соединения против ожирения исследовали способом, описанным ниже.

Мышей с индуцированным рационом ожирением (DIO) получали путем кормления самцов мышей C57BL/6J рационом с высоким содержанием жиров (D12451: Research Diets, Inc.). Исследуемое соединение растворяли в растворителе (50% DMSO), чтобы происходило замедленное высвобождение в дозе 1 нмоль/кг/сутки и раствором заполняли насос Alzet Pump (DURECT Corporation, модель: 1002). Насос, заполненный таким образом раствором для введения, погружали в физиологический раствор для активации, а затем использовали. Насос вводили следующим способом. Каждого самца мышей DIO-C57BL/6J в возрасте 35-37 недель (20-26°C, позволяли принимать пищу и воду без ограничений; цикл 12 ч на свету - 12 ч в темноте) подвергали анестезии; их кожу верхней части спины надрезали и упомянутый выше насос помещали подкожно; разрез зашивали. После взвешивания эту мышь возвращали в клетку для содержания (содержали отдельно) и давали предварительно взвешенный корм; массу тела измеряли каждые 1-3 суток после начала введения. Активность каждого исследуемого соединения против ожирения оценивали, исходя из уровня снижения массы тела через 2 недели после начала введения, причем скорость снижения массы тела в контрольной группе, в которой проводили введение только растворителя, принимали за 0%.

Как показано в табл. 4, соединение по настоящему изобретению обладает превосходной активностью против ожирения.

Таблица 4

Пример	Изменение массы тела
2	-16,3
24	-11,1
25	-11,2
26	-16,2

Пример испытания 4. Испытание растворимости

Растворимость исследуемого соединения оценивали способом, описанным ниже.

Проводили точное измерение для исследуемого соединения массой приблизительно 2 мг. Растворители (10, 20 или 40 мкл) с различными значениями pH (буфер Britton-Robinson (pH 3, 5, 7, 9)) добавляли к каждому исследуемому соединению при 25°C и растворимость исследовали визуально.

Как показано в табл. 5, все исследуемые соединения продемонстрировали высокую растворимость при каждом значении pH.

Таблица 5

Пример	Растворимость (мг/мл)			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
2	>100	>100	>50	>50
24	>200	>200	>200	>200
25	>200	>200	>200	>200
26	>200	>200	>200	>200

Пример составления 1.

(1) Соединение примера 1	10,0 мг
(2) Лактоза	70,0 мг
(3) Кукурузный крахмал	50,0 мг
(4) Растворимый крахмал	7,0 мг
(5) Стеарат магния	3,0 мг

Соединение примера 1 (10,0 мг) и стеарат магния (3,0 мг) гранулируют водным раствором растворимого крахмала (0,07 мл) (7,0 мг растворимого крахмала), сушат и смешивают с лактозой (70,0 мг) и кукурузным крахмалом (50,0 мг). Смесь прессуют с получением таблетки.

Пример составления 2.

(1) Соединение примера 1	5,0 мг
(2) Хлорид натрия	20,0 мг
(3) Дистиллированная вода	до общего количества 2 мл

Соединение примера 1 (5,0 мг) и хлорид натрия (20,0 мг) растворяют в дистиллированной воде и воду добавляют до общего количества 2,0 мл. Раствор фильтруют и им заполняют ампулу объемом 2 мл в асептических условиях. Ампулу стерилизуют и прочно закрывают с получением раствора для инъекций.

Промышленная применимость

Соединение по настоящему изобретению обладает превосходной активностью коагониста рецептора GLP-1/рецептора GIP и является пригодным в качестве лекарственного средства для профилактики или лечения различных заболеваний, ассоциированных с рецептором GLP-1/рецептором GIP, например, ожирения.

Все публикации, патенты и патентные заявки, цитированные в настоящем описании, включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

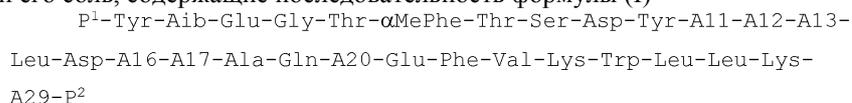
Свободный текст списка последовательностей

- SEQ ID NO: 1: Искусственная последовательность (синтетический пептид (формула (I))
 SEQ ID NO: 2: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (С-концевая последовательность))
 SEQ ID NO: 3: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (С-концевая последовательность))
 SEQ ID NO: 4: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (С-концевая последовательность))
 SEQ ID NO: 5: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (С-концевая последовательность))
 SEQ ID NO: 6: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (С-концевая последовательность))
 SEQ ID NO: 7: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (С-концевая последовательность))
 SEQ ID NO: 8: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (С-концевая последовательность))
 SEQ ID NO: 9: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (С-концевая последовательность))
 SEQ ID NO: 10: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (Справочный пример 1))
 SEQ ID NO: 11: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (Справочный пример 2))
 SEQ ID NO: 12: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (Справочный пример 3))
 SEQ ID NO: 13: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 1))

SEQ ID NO: 14: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 2))
 SEQ ID NO: 15: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 3))
 SEQ ID NO: 16: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 4))
 SEQ ID NO: 17: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 5))
 SEQ ID NO: 18: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 6))
 SEQ ID NO: 19: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 7))
 SEQ ID NO: 20: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 8))
 SEQ ID NO: 21: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 9))
 SEQ ID NO: 22: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 10))
 SEQ ID NO: 23: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 11))
 SEQ ID NO: 24: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 12))
 SEQ ID NO: 25: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 13))
 SEQ ID NO: 26: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 14))
 SEQ ID NO: 27: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 15))
 SEQ ID NO: 28: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 16))
 SEQ ID NO: 29: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 17))
 SEQ ID NO: 30: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 18))
 SEQ ID NO: 31: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 19))
 SEQ ID NO: 32: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 20))
 SEQ ID NO: 33: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 21))
 SEQ ID NO: 34: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 22))
 SEQ ID NO: 35: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 23))
 SEQ ID NO: 36: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 24))
 SEQ ID NO: 37: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 25))
 SEQ ID NO: 38: Искусственная последовательность (Синтетический пептид (пример 26))

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид или его соль, содержащие последовательность формулы (I)



где

P^1 выбран из атома водорода, метильной группы, ацетильной группы, бензоильной группы, 4-пиридилкарбонильной (4-PyCO) группы, циклопропанкарбонильной (CPrCO) группы и амидиногруппы;

A11 представляет собой Aib или Ala;

A12 представляет собой Ala, Ile, Lys, Phe или Pya(4);

A13 представляет собой Aib, Cha, Leu, α MePhe, α MeTyr или Tyr;

A16 представляет собой Lys или Ser;

A17 представляет собой Gln или He;

A20 представляет собой Ala, Ser или Gln;

A29 представляет собой Gln или Gly и

P^2 представляет собой аминокислотную последовательность Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys или Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser, и

причем пептид или его соль имеют активность коагониста рецептора GLP-1 и рецептора GIP.

2. Пептид или его соль по п.1, где P^1 представляет собой атом водорода.

3. Пептид или его соль по п.1, где A11 представляет собой Aib.

4. Пептид или его соль по п.1, где A12 представляет собой Ile.

5. Пептид или его соль по п.1, где A13 представляет собой Aib.

6. Пептид или его соль по п.1, где A16 представляет собой Lys.

7. Пептид или его соль по п.1, где A17 представляет собой Gln.

8. Пептид или его соль по п.1, где A20 представляет собой Ala.

9. Пептид или его соль по п.1, где A29 представляет собой Gly.

10. Пептид или его соль по п.1, где P^2 представляет собой аминокислотную последовательность Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys.

11. Пептид или его соль по п.1, где

P^1 представляет собой атом водорода;

A11 представляет собой Aib;

A12 представляет собой Ile;

A13 представляет собой Aib;

A16 представляет собой Lys;

A17 представляет собой Gln;

A20 представляет собой Ala;

A29 представляет собой Gly и

P² представляет собой аминокислотную последовательность Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys.

12. Пептид, представленный последовательностью H-Тур-Aib-Glu-Gly-Thr- α MePhe-Thr-Ser-Asp-Тур-Aib-Ile-Aib-Leu-Asp-Lys-Gln-Ala-Gln-Ala-Glu-Phe-Val-Lys-Trp-Leu-Leu-Lys-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly-Ala-Pro-Pro-Pro-Ser-Lys, или его соль.

13. Лекарственное средство для профилактики или лечения ожирения или диабета у млекопитающего, содержащее пептид или его соль по п.1.

14. Способ профилактики или лечения ожирения или диабета у млекопитающего, включающий введение эффективного количества пептида или его соли по п.1.

15. Способ активации рецептора GLP-1 и рецептора GIP у млекопитающего, включающий введение эффективного количества пептида или его соли по п.1.

16. Применение пептида или его соли по п.1 для получения лекарственного средства для профилактики или лечения ожирения или диабета у млекопитающего.

17. Применение пептида или его соли по п.1 для профилактики или лечения ожирения или диабета у млекопитающего.

