

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092017** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.02.10

(51) Int. Cl. *C07K 14/605* (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.05

(54) **НОВЫЕ АНАЛОГИ GLP-1**

(31) 201821013109; 201821040468;
201821040474

(32) 2018.04.05; 2018.10.26; 2018.10.26

(33) IN

(86) PCT/IB2019/052835

(87) WO 2019/193576 2019.10.10

(71) Заявитель:

**САН ФАРМАСЬЮТИКАЛ
ИНДАСТРИЗ ЛИМИТЕД (IN)**

(72) Изобретатель:

**Тхеннати Раджаманнар, Чатурведи
Нишитх, Бураде Винод Сампатрао,
Шахи Прадип Динеш, Нагараджан
Мутхукумаран, Нагараджа
Равишанкара Мадавати, Залавадия
Ришит Мансухлал, Пандья Кунал,
Пейтел Бриджешкумар, Джоши
Дхирен Рамешчандра, Сони Крунал
Харишбхай, Тивари Абхисек, Пейтел
Випулкумар Шанкарбхай (IN)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новым аналогам глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) (7-37), имеющим аминокислотную последовательность с Leu или Ile на С-конце. Новые аналоги являются высокоактивными агонистами GLP-1 со сниженным количеством нежелательных эффектов и увеличенной продолжительностью действия. Настоящее изобретение также относится к ацилированным производным новых аналогов, которые характеризуются дополнительно увеличенной активностью и продолжительностью действия и подходят для перорального введения. Аналоги по настоящему изобретению могут найти применение в лечении диабета и ожирения.

A1

202092017

202092017

A1

НОВЫЕ АНАЛОГИ GLP-1

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании трех предварительных
5 заявок на патент Индии под номерами заявок IN 201821013109 (подана 05 апреля 2018
года); IN 201821040468 (подана 26 октября 2018 года) и IN 201821040474 (подана 26
октября 2018 года), которые включены в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

10 Настоящее изобретение относится к новым аналогам глюкагоноподобного
пептида-1 (GLP-1) (7-38), имеющим аминокислотную последовательность с Leu или Pe
на С-конце. Новые аналоги являются высокоактивными агонистами GLP-1 со
сниженным количеством нежелательных эффектов и увеличенной
продолжительностью действия. Настоящее изобретение также относится к
15 ацилированным производным новых аналогов, которые характеризуются
дополнительно увеличенной активностью и продолжительностью действия и подходят
для перорального введения. Аналоги, раскрытые в данном документе, ацилированы с
помощью пролонгирующих фрагментов, которые увеличивают продолжительность
активности соединений. Аналоги, раскрытые в данном документе, могут найти
20 применение в лечении диабета и ожирения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) представляет собой гормон, который
вырабатывается в основном энтероэндокринными L-клетками кишечника и
25 секретируется в кровоток, когда пища, содержащая жир, гидролизат белка и/или
глюкозу, попадает в двенадцатиперстную кишку. GLP-1 образуется в результате
клеточноспецифического посттрансляционного процессинга гена препроглюкагона.
Первоначально как результат данного процессинга идентифицировали пептид GLP-
1(1-37), но присутствовали два усеченных на N-конце продукта, GLP-1(7-37) (SEQ ID
30 NO: 1) и GLP-1(7-36)амид, которые, как было обнаружено, распознаются рецептором

поджелудочной железы и которые, как было установлено, являются активными формами *in vivo*. Было обнаружено, что GLP-1 стимулирует секрецию инсулина, тем самым вызывая захват глюкозы клетками и снижая уровни глюкозы в сыворотке крови. Агонисты GLP-1 можно применять для лечения сахарного диабета 2 типа (T2DM) в качестве предпочтительных лекарственных средств, поскольку они не приводят к гипогликемии и оказывают положительное действие с точки зрения снижения веса. Эндогенные вещества, GLP-1(7-37) и GLP-1(7-36)амид, расщепляются пептидазами и, таким образом, характеризуются очень коротким периодом полувыведения. Были предприняты попытки улучшить их характеристики путем разработки аналогов GLP-1 с увеличенным периодом полувыведения. Первым лекарственным средством, одобренным в 2005 году, был эксенатид, предусматривающий введение дозы на уровне 10 мкг дважды в день, который, как было обнаружено, демонстрировал значительное улучшение показателя HbA1c, маркера контроля глюкозы. Кроме того, Novo Nordisk разработала лираглутид (патент США № 6268343) (SEQ ID NO: 2), предусматривающий введение дозы 1,8 мг один раз в день, s.c./день, и одобренный в 2010 году. Дальнейшие исследования и разработки привели к получению продуктов для введения раз в неделю, таким как албиглутид, разработанный GSK, и дулаглутид, разработанный Eli Lilly. В последнее время USFDA был одобрен аналог GLP-1, семаглутид (публикация международной заявки № WO 2006/097537 A2). Семаглутид (SEQ ID NO: 3) реализуется под торговой маркой Ozempic®. Его вводят в виде подкожной инъекции один раз в неделю.

В литературе сообщается о множестве попыток создания аналогов GLP-1, характеризующихся увеличенной активностью и продолжительностью действия. В патенте США № 7291594 B2 (патент US '594) раскрыты производные GLP-1 (7-35), к С-концу которых добавлены несколько остатков аргинина и/или лизина для обеспечения высокой биодоступности через слизистые оболочки. В патенте US '594 дополнительно раскрыто, что данным производным можно придать устойчивость к дипептидилпептидазе IV (DPP-IV) путем замены аминокислоты 8 в их аминокислотной последовательности GLP-1 на Ser, или устойчивость к трипсину путем замены аминокислот 26 и 34 на Gln и Asn соответственно.

В патенте США № 7893017 B2 (патент US '017) раскрыт ацилированный аналог GLP-1, где аналог GLP-1 стабилизирован в отношении действия DPP-IV путем

модификации по меньшей мере одного аминокислотного остатка в положениях 7 и 8 по сравнению с последовательностью GLP-1 (7-37), и где указанное ацилирование представляет собой двухосновную кислоту, присоединенную непосредственно к С-концевому аминокислотному остатку указанного аналога GLP-1.

5 В патенте США № 8951959 В2 (патент US '959) раскрыт устойчивый к DPP-IV аналог GLP-1 (7-37), имеющий непротеиногенный аминокислотный остаток, содержащий трифторметильную группу, в положении 8 по сравнению с последовательностью GLP-1, и он является ацилированным с помощью фрагмента, содержащего две кислотные группы, по остатку лизина в положении 26.

10 В патенте США № 7084243 В2 (патент US '243) раскрыты аналоги GLP-1 (7-37), имеющие Val или Gly в положении 8 по сравнению с последовательностью GLP-1 (7-37), в качестве устойчивых к DPP-IV пептидов.

В публикации международной заявки № WO 2017/149070 А1 (WO '070) раскрыты аналоги GLP-1, имеющие триптофан в положении, соответствующем
15 положению 8 в GLP-1 (7-37), и было показано, что данные соединения с Trp8 очень стабильны в отношении расщепления под действием DPP-IV.

В публикации международной заявки № WO 2004/103390А2 (WO '390) раскрыто, что модификация по положению P₁ (соответствующая положению 9 в случае GLP-1 (7-37)) может давать аналоги GLP-1 со значительно сниженной
20 чувствительностью к опосредованному ферментами (например, DPP-IV) расщеплению по сравнению с нативным субстратом, при этом они сохраняют биологическую активность нативного субстрата. В WO '390 дополнительно раскрыты аналоги GLP-1 (7-37), имеющие аминокислоту с четырехзамещенным атомом углерода C β (например, *трет*-лейцин) в положении 9, что обеспечивает аналоги GLP, устойчивые к
25 разрушению под действием DPP-IV.

В публикации международной заявки № WO 2015/086686 А2 (публикация WO '686) раскрыто, что включение альфа-метил-функционализированных аминокислот непосредственно в основную цепь аналогов GLP-1, как было
30 установлено, дает пептиды, устойчивые к протеазам (в том числе устойчивые к DPP-IV).

Различные другие агонисты GLP-1, устойчивые к DPP-IV, раскрыты в патентных публикациях, таких как публикации международных заявок №№ WO 2007/030519 A2, WO 2004/078777 A2, WO 2007/039140 A1, WO 2014/209886 A1, WO 2012/016419 A1, WO 2017/211922 A2, WO 2016/198544 A1 и WO 2013/051938 A2.

5 В различных заявках на патент раскрыты удлиненные на С-конце аналоги GLP-1, характеризующиеся повышенной стабильностью и большей продолжительностью действия. Например, патенты США №№ 7482321 B2, 9498534 B2 и 7897566 B2.

В различных заявках на патент раскрыты ацилированные аналоги GLP-1, где аналоги GLP-1 присоединены к липофильному заместителю, необязательно через
10 линкер, для обеспечения большей продолжительности действия.

В патенте США № 8603972 B2 (US '972) раскрыты моноацилированные производные аналогов GLP-1, где остаток Lys в положении 37 или 38 аналога GLP-1 является ацилированным.

В патентах США №№ 8648041 B2, 9758560 B2, 9006178 B2, 9266940 B2, 9708383
15 B2 и публикациях заявок на патент США №№ US 2015/0152157 A1, US 2015/0133374 A1 раскрыты диацилированные производные аналогов GLP-1.

В публикации заявки на патент США № US 2016/0200791 A1 раскрыты триацилированные производные аналогов GLP-1.

В публикациях международных заявок №№ WO 2016/083499 A1, WO
20 2016/097108 A1 и WO 2014/202727 A1 раскрыты ацилированные аналоги GLP-1, где остаток Lys в аналогах GLP-1 присоединен к двум пролонгирующим фрагментам посредством разветвляющего линкера.

В публикациях международных заявок №№ WO 2009/030771 A1 и WO
25 2018/083335 A1 раскрыты различные ацилирующие средства (боковая цепь), которые можно присоединять к остатку Lys в аналогах GLP-1 для обеспечения большей продолжительности действия.

В публикации международной заявки № WO 2013/186240 A2 раскрыты аналоги пептида эксендина-4, имеющие Gly, Ser или функционализированный Ser, например, Ser(OCH₃), D-Ser или функционализированный D-Ser, например, D-Ser(OCH₃), Aib,
30 Ala или D-Ala в положении 2 аминокислотной последовательности эксендина-4.

Различные другие аналоги GLP-1 раскрыты в патентных заявках, таких как публикации международных заявок №№ WO 2005/027978 A2, WO 1998/008871 A1, WO 1999/043705 A1, WO 1999/043706 A1, WO 1999/043707 A1, WO 1999/043708 A1, WO 2000/034331 A2, WO 2009/030771 A1, WO 2011/080103 A1, WO 2012/140117 A1, WO 2012/062803 A1, WO 2012/062804 A1, WO 2013/037690 A1, WO 2014/202727 A1, WO 2015/000942 A1, WO 2015/022400 A1, WO 2016/083499 A1, WO 2016/097108 A1 и WO 2017/149070 A1.

Тем не менее, существует потребность в разработке аналогов GLP-1, которые характеризуются оптимальными требуемыми свойствами с точки зрения стабильности и продолжительности действия.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34,

где X2 представляет собой Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala или Aib;

X3 отсутствует или представляет собой Gln;

X4 представляет собой Glu;

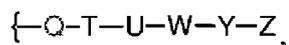
X16 представляет собой Glu;

X24 представляет собой Ile;

X33 представляет собой Leu, D-Leu, D-Ile или Ile;

X34 отсутствует, и

X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ϵ -аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



где Q и T отсутствуют;

U отсутствует или представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\}$, где } представляет собой место присоединения группы W;

W отсутствует или выбрана из группы, состоящей из $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-]$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{3-4}-\text{NH}-]$, $-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-]$ и

5 $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}-]$, где] представляет собой место присоединения группы Y;

Y представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-$, где -- представляет собой место присоединения группы Z;

Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ или $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, где n представляет собой целое число от 14 до 20.

10 Полипептиды по настоящему изобретению являются активными агонистами GLP-1 с меньшим количеством нежелательных эффектов. Кроме того, полипептиды по настоящему изобретению являются стабильными и характеризуются большой продолжительностью действия, а также подходят для перорального введения.

15 ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фигуре 1A показано получение фрагмента A-OSu (промежуточное соединение 3). На фигуре 1B показано получение фрагмента A-OSu (промежуточное соединение 3).

На фигуре 2 показано получение фрагмента C-OSu.

20 На фигуре 3 показано получение фрагмента D-OSu.

На фигуре 4 показано получение фрагмента E-OSu.

На фигуре 5 показано получение фрагмента F-OSu.

25 На фигурах 6A и 6B показаны результаты перорального теста на толерантность к глюкозе (OGTT) для соединения 1 на крысах; однократная инъекция; 1 мг/кг; AUC 0-120 мин глюкозы (фигура 6A = через 22 часа, фигура 6B = через 46 часов).

На фигуре 7 показано снижение уровней глюкозы в крови у мышей db/db с диабетом 2 типа после длительной обработки соединением 1.

На фигуре 8 показано снижение потребления пищи у мышей db/db после обработки соединением 1.

На фигуре 9 показана эффективность соединения 1 у мышей db/db в снижении массы тела.

5 На фигуре 10 показано снижение содержания Hb1Ac у мышей db/db после обработки соединением 1.

СОКРАЩЕНИЯ

Aib: 2-аминоизобутановая кислота

10 ADO: 8-амино-3,6-диоксооктановая кислота

OGTT: пероральный тест на толерантность к глюкозе

DIPEA: *N,N'*-диизопропилэтиламин

HOEt: 1-гидроксibenзотриазол

DIPC: *N,N'*-диизопропилкарбодиимид

15 HOSu: *N*-гидроксисукцинимид

IBCF: изобутилхлорформиат

NMM: *N*-метилморфолин

THF: тетрагидрофуран

DCM: дихлорметан

20 DMAP: 4-диметиламинопиридин

DCC: дициклогексилкарбодиимид

DMAc: диметилацетамид

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

25 В настоящем изобретении предусмотрен стабильный аналог GLP-1 длительного действия, который не требует частого подкожного введения дозы, а также пригоден для перорального введения. Неожиданно было обнаружено, что добавление

дополнительного Leu на С-конце последовательности давало пептиды со значительно увеличенной активностью и продолжительностью действия по сравнению с исходным пептидом. Пептиды с дополнительным Ile также показывали аналогичный эффект увеличения активности и продолжительности действия по сравнению с исходным пептидом. Дополнительно, в настоящем изобретении в данном документе показаны фрагменты, которые можно присоединять к пептидам, являющимся аналогами GLP-1(7-37), посредством реакции ацилирования для получения соединений со значительно увеличенной активностью и большей продолжительностью действия. Пролонгирующие фрагменты раскрытых соединений имеют более стабильные связи, которые менее подвержены расщеплению под действием биологических ферментов. Таким образом, раскрытые в данном документе соединения являются более стабильными и требуют менее частого введения, что способствует соблюдению пациентом режима лечения. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34 (SEQ ID NO: 4),

где X2 представляет собой Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala или Aib;

X3 отсутствует или представляет собой Gln;

X4 представляет собой Glu;

X16 представляет собой Glu;

X24 представляет собой Ile;

X33 представляет собой Leu, D-Leu, D-Ile или Ile;

X34 отсутствует, и

X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ϵ -аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована.

В некоторых вариантах осуществления X21 может быть ацилирован с помощью пролонгирующих фрагментов, о которых сообщается в патентах США №№ 6268343, 8951959 B2, 8603972 B2, 8648041 B2, 9758560 B2, 9006178 B2, 9266940 B2, 9708383 B2

и публикациях заявок на патент США №№ US 2015/0152157 A1 и US 2015/0133374 A1; публикациях международных заявок №№ WO 2009/030771 A1, WO 2006/097537 A2 и WO 2018/083335 A1.

В некоторых вариантах осуществления X21, представляющий собой Lys, ацилирован по аминогруппе (ϵ -аминогруппе) его боковой цепи с помощью фрагмента, содержащего группу жирной кислоты. Группа жирной кислоты может быть присоединена к X21, представляющему собой Lys, посредством линкера. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность:

10 H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34,

где X2 представляет собой Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala или Aib;

X3 отсутствует или представляет собой Gln;

X4 представляет собой Glu;

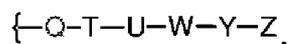
15 X16 представляет собой Glu;

X24 представляет собой Ile;

X33 представляет собой Leu, D-Leu, D-Ile или Ile;

X34 отсутствует, и

20 X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ϵ -аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



где Q и T отсутствуют;

U отсутствует или представляет собой $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$, где } представляет собой место присоединения группы W;

25 W отсутствует или выбрана из группы, состоящей из $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_{3-4}-NH-$, $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$ и



Y представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-$, где -- представляет собой место присоединения группы Z;

Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ или $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, где n представляет собой целое число от 14 до 20.

5 В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении X2 выбрана из Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala или Aib.

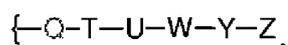
В некоторых вариантах осуществления X2 представляет собой Aib.

В некоторых вариантах осуществления X3 отсутствует.

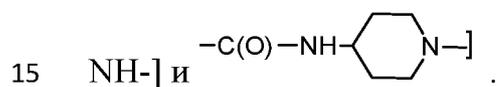
В некоторых вариантах осуществления X33 представляет собой Leu.

10 В некоторых вариантах осуществления X33 представляет собой Ile.

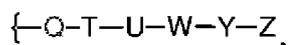
В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ϵ -аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



где W выбрана из группы, состоящей из $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{3-4}-\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$

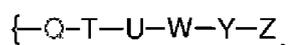


В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ϵ -аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



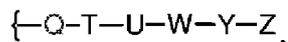
20 где обе U и W отсутствуют, а Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, где n представляет собой целое число 14.

В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ϵ -аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



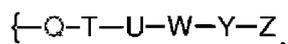
где W представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-$.

В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминокетильная группа (ε-аминокетильная группа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



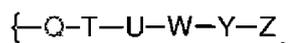
где W представляет собой $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$.

5 В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминокетильная группа (ε-аминокетильная группа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



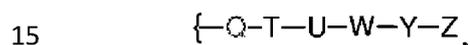
где W представляет собой $-C(O)-NH-(CH_2)_4-NH-$.

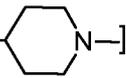
10 В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминокетильная группа (ε-аминокетильная группа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



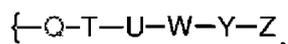
где W представляет собой $-C(O)-NH-(CH_2)_3-NH-$.

В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминокетильная группа (ε-аминокетильная группа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



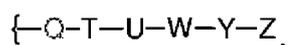
где W представляет собой $-C(O)-NH-$  $-]$.

В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминокетильная группа (ε-аминокетильная группа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



20 где Z представляет собой $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$, где n представляет собой целое число 16.

В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминокетильная группа (ε-аминокетильная группа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



где Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, где n представляет собой целое число 14.

В некоторых вариантах осуществления X2 представляет собой Ala или Aib;

X3 отсутствует;

5 X33 представляет собой Leu;

U отсутствует;

W отсутствует;

Y представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-$, где -- представляет собой место присоединения группы Z;

10 Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, где n представляет собой целое число 14.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность:

15 H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34,

где X2 представляет собой Aib;

X3 отсутствует;

X4 представляет собой Glu;

X16 представляет собой Glu;

20 X24 представляет собой Ile;

X33 представляет собой Leu;

X34 отсутствует, и

X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ϵ -аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:

25 $\{-\text{Q}-\text{T}-\text{U}-\text{W}-\text{Y}-\text{Z}-$,

где Q и T отсутствуют;

U представляет собой $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-\}$, где } представляет собой место присоединения группы W;

W представляет собой $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-]$, где] представляет собой место присоединения группы Y;

5 Y представляет собой $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH--$, где -- представляет собой место присоединения группы Z;

Z представляет собой $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$, где n представляет собой целое число 16.

10 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34,

где X2 представляет собой Aib;

X3 отсутствует;

15 X4 представляет собой Glu;

X16 представляет собой Glu;

X24 представляет собой Ile;

X33 представляет собой Leu;

X34 отсутствует, и

20 X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ϵ -аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:

$\{-Q-T-U-W-Y-Z,$

где Q и T отсутствуют;

25 U представляет собой $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-\}$, где } представляет собой место присоединения группы W;

W представляет собой $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-]$, где] представляет собой место присоединения группы Y;

Y представляет собой $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$, где -- представляет собой место присоединения группы Z;

Z представляет собой $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$, где n представляет собой целое число 16.

5 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34,

где X2 представляет собой Aib;

10 X3 отсутствует;

X4 представляет собой Glu;

X16 представляет собой Glu;

X24 представляет собой Ile;

X33 представляет собой Leu;

15 X34 отсутствует, и

X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ϵ -аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:

$$\{-Q-T-U-W-Y-Z,$$

где Q и T отсутствуют;

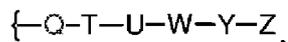
20 U представляет собой $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$, где } представляет собой место присоединения группы W;

W представляет собой $-C(O)-NH-(CH_2)_{3-4}-NH-$, где] представляет собой место присоединения группы Y;

25 Y представляет собой $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$, где -- представляет собой место присоединения группы Z;

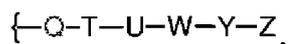
Z представляет собой $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$, где n представляет собой целое число 16.

В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминокетильная группа (ε-аминокетильная группа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



где W представляет собой $-C(O)-NH-(CH_2)_4-NH-$.

5 В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминокетильная группа (ε-аминокетильная группа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



где W представляет собой $-C(O)-NH-(CH_2)_3-NH-$.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен
10 полипептид, содержащий аминокетильную последовательность:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-
G-R-G-X33-X34,

где X2 представляет собой Aib;

X3 отсутствует;

15 X4 представляет собой Glu;

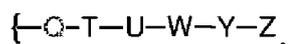
X16 представляет собой Glu;

X24 представляет собой Ile;

X33 представляет собой Leu;

X34 отсутствует, и

20 X21 представляет собой Lys, где аминокетильная группа (ε-аминокетильная группа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



где Q и T отсутствуют;

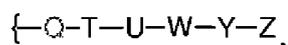
U представляет собой $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$, где } представляет
25 собой место присоединения группы W;

W представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-$], где] представляет собой место присоединения группы Y;

Y представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-$, где -- представляет собой место присоединения группы Z;

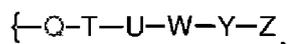
5 Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ или $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, где n представляет собой целое число от 14 до 20.

В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ϵ -аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



10 где Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, где n представляет собой целое число 16.

В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ϵ -аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



15 где Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, где n представляет собой целое число 14.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность:

20 H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-
G-R-G-X33-X34,

где X2 представляет собой Aib;

X3 отсутствует;

X4 представляет собой Glu;

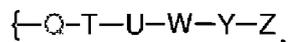
X16 представляет собой Glu;

25 X24 представляет собой Ile;

X33 представляет собой Leu;

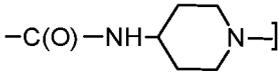
X34 отсутствует, и

X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ϵ -аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



5 где Q и T отсутствуют;

U представляет собой $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$, где } представляет собой место присоединения группы W;

W представляет собой $-C(O)-NH-$  , где] представляет собой место присоединения группы Y;

10 Y представляет собой $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$, где -- представляет собой место присоединения группы Z; и

Z представляет собой $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$, где n представляет собой целое число 16.

15 В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предусмотрен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34,

где X2 представляет собой Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe);

X3 отсутствует;

20 X4 представляет собой Glu;

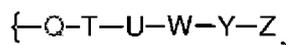
X16 представляет собой Glu;

X24 представляет собой Ile;

X33 представляет собой Leu;

X34 отсутствует, и

25 X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ϵ -аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



где Q и T отсутствуют;

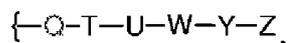
U представляет собой $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$, где } представляет собой место присоединения группы W;

5 W представляет собой $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_{3-4}-NH-$], $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$], где] представляет собой место присоединения группы Y;

Y представляет собой $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$, где -- представляет собой место присоединения группы Z; и

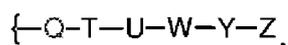
10 Z представляет собой $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$ или $-C(O)-(CH_2)_n-CH_3$, где n представляет собой целое число от 14 до 20.

В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ε-аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



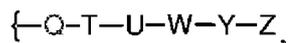
где W представляет собой $-C(O)-NH-(CH_2)_{3-4}-NH-$].

15 В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ε-аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



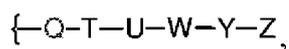
где W представляет собой $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$.

20 В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ε-аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:



где W представляет собой $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$].

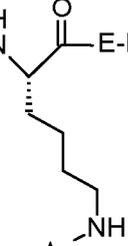
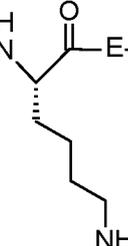
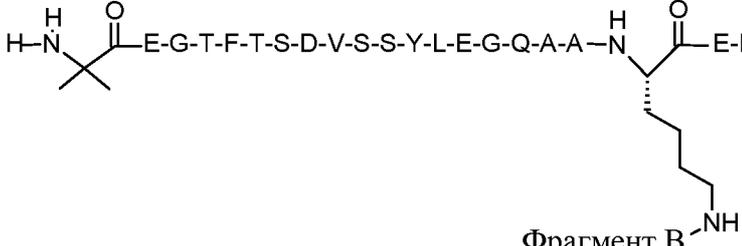
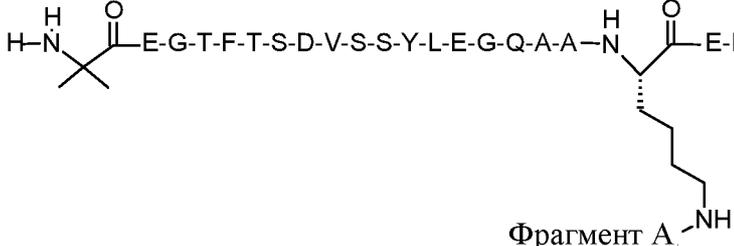
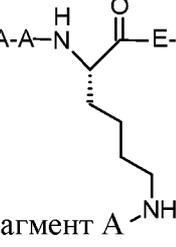
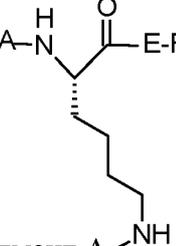
25 В некоторых вариантах осуществления X21 представляет собой модифицированный липидом Lys, где аминогруппа (ε-аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента,

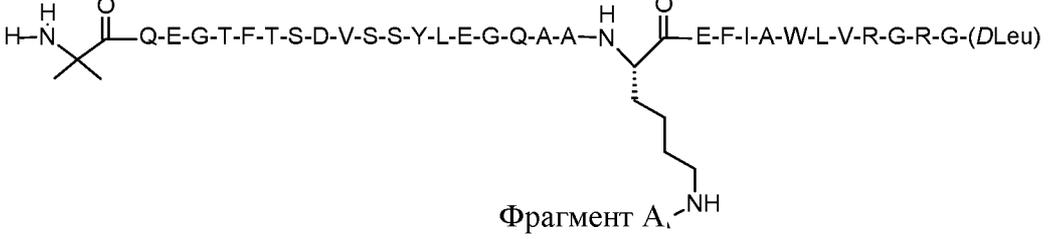
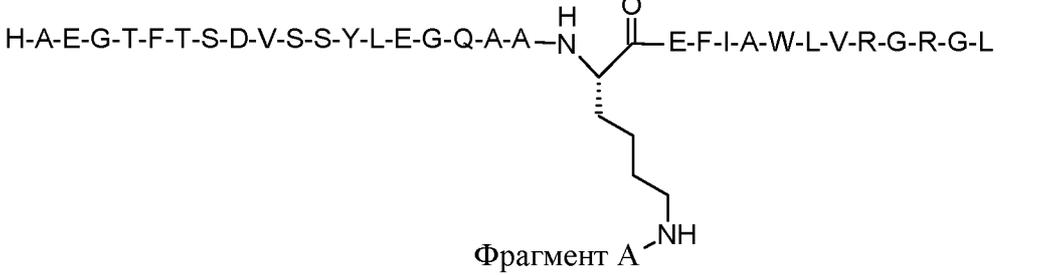
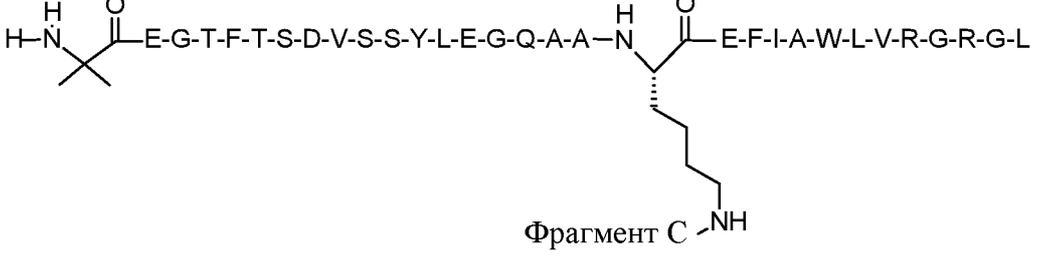
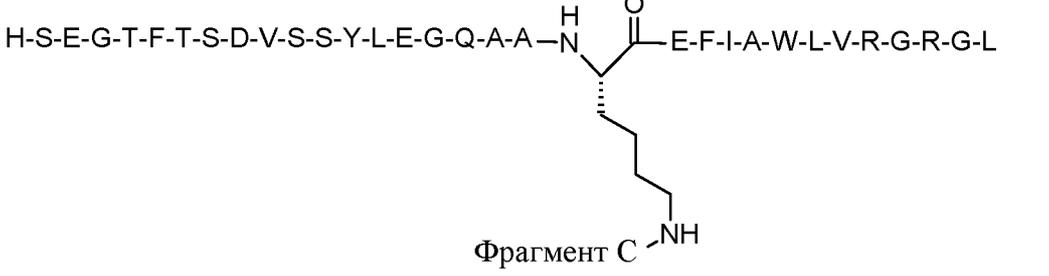
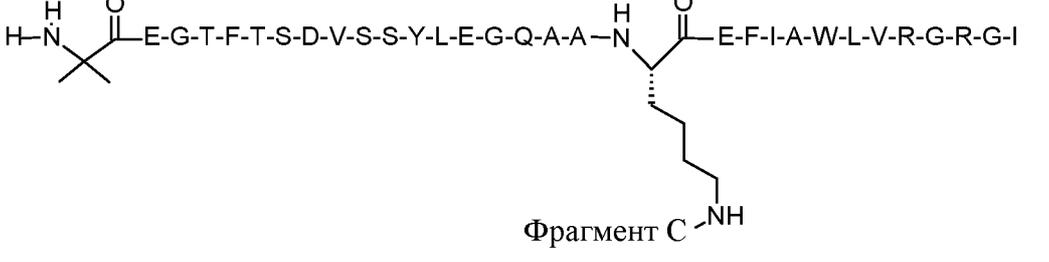
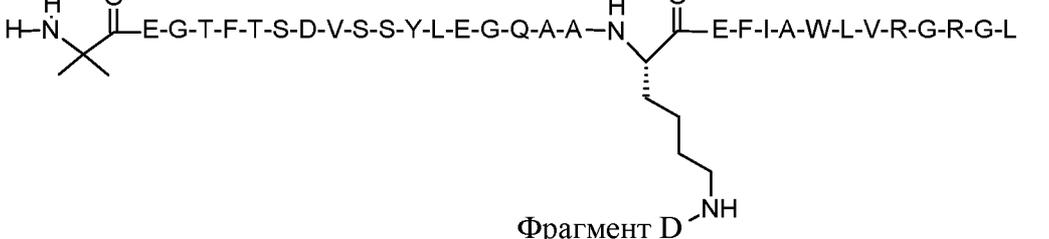


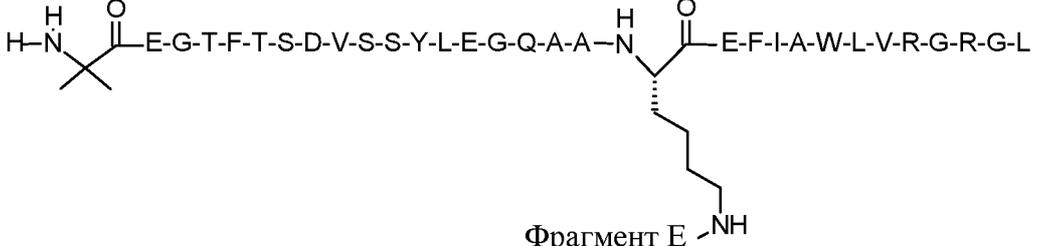
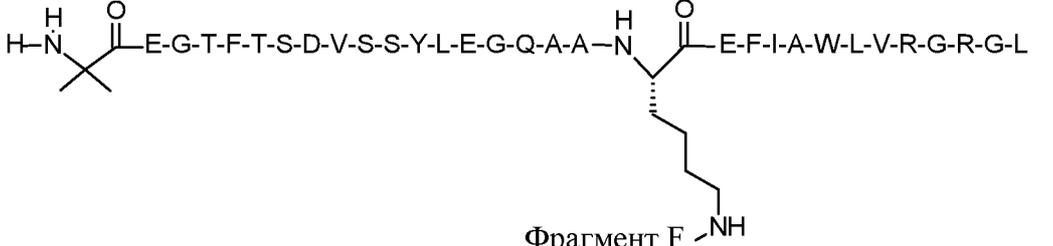
который представлен фрагментами, представленными в таблице 1.

Таблица 1. Типичные фрагменты для группы $\{-Q-T-U-W-Y-Z\}$

Обозначение	Фрагмент
Фрагмент А	<p>Chemical structure of Fragment A: A long-chain dicarboxylic acid with a side chain containing a secondary amide and a polyoxyethylene chain.</p>
Фрагмент В	<p>Chemical structure of Fragment B: A long-chain dicarboxylic acid with a side chain containing a secondary amide and a hydroxyl group.</p>
Фрагмент С	<p>Chemical structure of Fragment C: A long-chain dicarboxylic acid with a side chain containing two secondary amide groups and a polyoxyethylene chain.</p>
Фрагмент D	<p>Chemical structure of Fragment D: A long-chain dicarboxylic acid with a side chain containing a secondary amide, a tertiary amide, and a polyoxyethylene chain.</p>
Фрагмент Е	<p>Chemical structure of Fragment E: A long-chain dicarboxylic acid with a side chain containing three secondary amide groups and a polyoxyethylene chain.</p>

5	<p>H-S-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-NH-C(=O)-E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L</p>  <p>Фрагмент А</p>	SEQ ID NO: 09
6	<p>H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-NH-C(=O)-E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L</p>  <p>Фрагмент В</p>	SEQ ID NO: 10
7	<p>H-N(CH₃)₂-C(=O)-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-NH-C(=O)-E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L</p>  <p>Фрагмент В</p>	SEQ ID NO: 05
8	<p>H-N(CH₃)₂-C(=O)-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-NH-C(=O)-E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L</p>  <p>Фрагмент А</p>	SEQ ID NO: 11
9	<p>H-(DSer(OMe))-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-NH-C(=O)-E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L</p>  <p>Фрагмент А</p>	SEQ ID NO: 12
10	<p>H-(DSer)-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-NH-C(=O)-E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L</p>  <p>Фрагмент А</p>	SEQ ID NO: 13

11	 <p>Фрагмент A₁</p>	SEQ ID NO: 14
12	 <p>Фрагмент A</p>	SEQ ID NO: 10
13	 <p>Фрагмент C</p>	SEQ ID NO: 05
14	 <p>Фрагмент C</p>	SEQ ID NO: 09
15	 <p>Фрагмент C</p>	SEQ ID NO: 11
16	 <p>Фрагмент D</p>	SEQ ID NO: 05

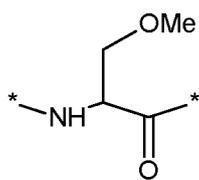
17		SEQ ID NO: 05
18		SEQ ID NO: 05

* Если не указано иное, все аминокислоты в структурах имеют L-конфигурацию в α -положении. D при использовании в качестве префикса аминокислоты в последовательности обозначает D-конфигурацию аминокислоты. Например, (D Ser) обозначает, что аминокислота серин в последовательности имеет D-конфигурацию.

5

Если не указано иное, настоящее изобретение охватывает как L-, так и D-изомеры аминокислот в последовательностях.

Ser(OMe), как описано в данном документе, в настоящем изобретении представляет собой аминокислоту серин с метилированной гидроксильной группой и имеет следующую структуру,



В полипептидных последовательностях, упомянутых в настоящем изобретении, аминокислоты представлены однобуквенным кодом, одобренным IUPAC.

Q, T, U, W, Y и Z, используемые в данном документе для обозначения ацилирующего фрагмента в вариантах осуществления настоящего изобретения, отличаются от однобуквенного кода аминокислоты, используемого при определении полипептидной последовательности.

Полипептиды по настоящему изобретению неожиданно показали значительное снижение уровня глюкозы в крови при проведении перорального теста на

толерантность к глюкозе (OGTT) у крыс SD. Процентное снижение уровня глюкозы в крови у крыс SD при пероральном введении пробы глюкозы оказалось значительно большим, чем у соответствующих полипептидов, у которых отсутствовал дополнительный Leu или Ile в положении X33.

5 Настоящее изобретение подробно проиллюстрировано далее со ссылкой на следующие примеры. Желательно, чтобы пример во всех отношениях рассматривался в качестве иллюстративного, и они не предусматривают ограничение объема заявляемого изобретения.

10 ПРИМЕРЫ

Общие способы получения

Полипептидное соединение по настоящему изобретению можно получать посредством способов, описанных в данном документе ниже. Процесс включает два этапа, включающие получение исходного линейного пептида и последующее
15 присоединение жирнокислотной цепи к исходному пептиду.

Пептиды, описанные в данном документе, можно получать посредством химического синтеза с применением твердофазных методик, таких как описанные в G. Barany and R. B. Merrifield, «The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology»; Volume 2—
«Special Methods in Peptide Synthesis, Part A», pp. 3–284, E. Gross and J. Meienhofer, Eds.,
20 Academic Press, New York, 1980; и в J. M. Stewart and J. D. Young, «Solid-Phase Peptide Synthesis», 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., 1984. Требуемая стратегия основана на использовании Fmoc (9-флуоренилметилоксикарбонильной) группы для временной защиты α -аминогруппы в комбинации с защитными группами, такими как *трет*-бутильная (-tBu), *трет*-бутилоксикарбонильная (-Boc), тритильная (-Trt)
25 группы, для временной защиты боковых цепей аминокислот (см., например, E. Atherton and R. C. Sheppard, «The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group», в «The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology»; Volume 9-«Special Methods in Peptide Synthesis, Part C», pp. 1–38, S. Undenfriend and J. Meienhofer, Eds., Academic Press, San Diego, 1987).

Пептиды можно синтезировать поэтапно на нерастворимой полимерной подложке (также называемой «смолой»), начиная с С-конца пептида. Синтез начинается с присоединения С-концевой аминокислоты пептида к смоле посредством образования амидной или сложноэфирной связи. Это обеспечивает возможность
5 конечного высвобождения полученного пептида с амидом или карбоновой кислотой на С-конце соответственно.

Требуется, чтобы С-концевая аминокислота и все остальные аминокислоты, используемые в синтезе, имели отличающуюся защиту своих α -аминогрупп и функциональных групп боковых цепей (если они присутствуют), чтобы защитную
10 группу α -аминогруппы можно было селективно удалить во время синтеза. Связывание аминокислоты осуществляют путем активации ее карбоксильной группы в виде активного сложного эфира и ее реакции с деблокированной α -аминогруппой N-концевой аминокислоты, присоединенной к смоле. Последовательность снятия защиты и связывания α -аминогруппы повторяют до тех пор, пока не соберется вся пептидная
15 последовательность. Затем пептид освобождают от смолы с одновременным снятием защиты с функциональных групп боковых цепей, обычно в присутствии соответствующих акцепторов для ограничения побочных реакций. Полученный пептид окончательно очищают с помощью обращенно-фазовой HPLC.

Затем исходный пептид можно связать с жирнокислотной цепью путем
20 связывания активированной жирнокислотной цепи с исходным пептидом. Жирнокислотную цепь можно получать с помощью способов, хорошо известных в органической химии. Например, жирнокислотную цепь можно получать с применением способов твердофазного синтеза, которые позволяют получать линейные жирнокислотные цепи.

25 Синтезированные линейные пептиды очищали с помощью процедуры препаративной HPLC, как кратко описано ниже.

Препаративная HPLC: модуль с четверным градиентом WATERS 2555 (максимальный общий поток: 300 мл/мин, максимальное давление: 3000 фунтов на квадратный дюйм)
или

30 Shimadzu LC-8A (максимальный общий поток: 150 мл: максимальное давление: 20 МПа);

Колонка: C18, 10 мкм;

Поток: 75 мл/мин;

Подвижная фаза: для первой очистки:

подвижная фаза А: фосфатный буфер, рН 7,5;

5 подвижная фаза В: ацетонитрил;

градиент: от 10 до 40% подвижной фазы В за 300 мин;

для второй очистки:

подвижная фаза А: 1% уксусной кислоты в воде;

10 подвижная фаза В: 1% уксусной кислоты в ацетонитриле:н-пропанол (50:50);

градиент: от 15 до 45% подвижной фазы В за 300 мин.

Конечные соединения по настоящему изобретению очищали с помощью процедуры препаративной HPLC, как кратко описано ниже.

15 Препаративная HPLC: модуль с четверным градиентом WATERS 2555 (максимальный общий поток: 300 мл/мин, максимальное давление: 3000 фунтов на квадратный дюйм) или

Shimadzu LC-8A (максимальный общий поток: 150 мл, максимальное давление: 20 МПа);

Колонка: C18, 10 мкм;

20 Поток: 75 мл/мин;

Подвижная фаза:

	Для первой очистки	Для второй очистки
Подвижная фаза А	фосфатный буфер, рН 7,5	1% уксусной кислоты в воде
Подвижная фаза В	ацетонитрил	1% уксусной кислоты в ацетонитриле:н-пропанол (50:50)
Градиент	от 10 до 40% подвижной фазы В за 300 мин	от 15 до 45 % подвижной фазы В за 300 мин

Чистоту соединений по настоящему изобретению анализировали с помощью метода RP-HPLC, как кратко описано ниже.

HPLC способ В1:

Колонка: YMC Pack-Ph (4,6 мм X 150 мм, 3 мкм);

5 Элюент: подвижная фаза А: 0,1% трифторуксусной кислоты в воде;

подвижная фаза В: 0,1% трифторуксусной кислоты в ацетонитриле;

Скорость потока: 1,5 мл/мин;

Детектирование: УФ-детектирование при 210 нм;

Температура колонки: 50°C;

10 Время выполнения анализа: 50 мин;

Градиент

Время	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза В, %
0,01	90	10
35,0	20	80
40,0	20	80
41,0	90	10
50,0	90	10

HPLC способ В2:

Колонка: YMC-Pack Pro C18 (4 мм x 250 мм, 3 мкм);

15 Элюент: подвижная фаза А: буфер: ацетонитрил (900:100);

подвижная фаза В: буфер: ацетонитрил (300:700);

буфер: дигидроортофосфат калия в воде, рН доведен до $3,0 \pm 0,1$ ортофосфорной кислотой;

Скорость потока: 1,0 мл/мин;

20 Детектирование: УФ-детектирование при 210 нм;

Температура колонки: 50°C;

Температура лотка для образцов: 8°C;

Время выполнения анализа: 38 мин.

Время	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза В, %
0	100	0
5	100	0
30	0	100
32	0	100
32,1	100	0
38	100	0

HPLC способ В3:

- 5 Колонка: Waters X-Select CSH-C18 (150 мм X 4,6 мм; 2,5 мкм);

Элюент: подвижная фаза А: буфер: ацетонитрил (900:100);

подвижная фаза В: буфер: ацетонитрил (300:700);

буфер: дигидроортофосфат калия в воде, рН доведен до $1,5 \pm 0,1$ ортофосфорной кислотой;

- 10 Скорость потока: 0,9 мл/мин;

Детектирование: УФ-детектирование при 210 нм;

Температура колонки: 40°C;

Температура лотка для образцов: 5°C;

Время выполнения анализа: 100 мин.

Время	Подвижная фаза А	Подвижная фаза В
0	50	50
40	43	57
55	43	57
90	0	100
91	50	50
100	50	50

Соединения по настоящему изобретению анализировали с помощью LCMS, как кратко описано ниже.

Масс-спектры регистрировали с помощью LCMS с применением Waters Acquity® QDa®, Waters Micromass Quattro Micro API или Thermo scientific LCQ Fleet™. Тестируемый раствор получали путем растворения соответствующего количества аналита в разбавителе с получением конечной концентрации от 1 мкг/мл до 50 мкг/мл в зависимости от ионизации аналита. Тестируемый раствор вводили со скоростью, составляющей от приблизительно 10 мкл до 50 мкл в минуту, в LCMS в течение 1 мин, и масс-спектры регистрировали в положительном или отрицательном режиме ионизации электрораспылением (ESI) и в соответствующем диапазоне масс.

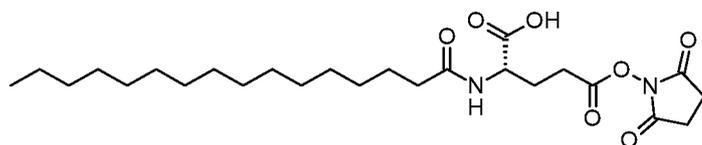
Пример 1. Получение активированных жирнокислотных боковых цепей

1. Получение 18-[[*(1S)*-1-карбокси-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси-2-оксоэтокси]этокси]этиламино]-2-оксоэтокси]этокси]этиламино]-4-оксобутил]амино]-18-оксооктадекановой кислоты (фрагмент A-OSu, промежуточное соединение-3)

Активированную жирнокислотную боковую цепь, фрагмент A-OSu, получали путем твердофазного синтеза с применением 2-хлортритилхлоридной смолы, как схематически представлено на фигуре 1А. 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусную кислоту (промежуточное соединение-1) прикрепляли к 2-хлортритилхлоридной смоле в присутствии *N,N'*-диизопропилэтиламина (DIPEA), что привело к получению 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Промежуточное соединение-1 можно получить путем связывания 2-[2-(2-аминоэтокси)-этокси]уксусной кислоты с Fmoc-*N*-гидроксисукцинимидным сложным эфиром. В качестве альтернативы, промежуточное соединение-1 является коммерчески доступным и, вследствие этого, его можно приобрести. Защитную группу Fmoc удаляли путем селективного деблокирования аминогруппы 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы с применением пиперидина, а свободную аминогруппу затем присоединяли к 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусной кислоте с применением 1-гидроксибензтриазола (HOBt)

и *N,N'*-диизопропилкарбодиимида (DIPC), что привело к получению 2-[2-[2-[[2-[2-(2-
 Fmoc-аминоэтокси)этокси]ацетил]амино]этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-
 смолы. Группу Fmoc затем удаляли путем селективного деблокирования аминогруппы
 2-[2-[2-[[2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]ацетил]амино]этокси]этокси]уксусная
 5 кислота-2-Cl-Trt-смолы с применением пиперидина, а свободную аминогруппу затем
 присоединяли к Fmoc-Glu-OtBu с применением HOBT и DIPC с получением 2-[2-[2-[[2-
 [2-[2-[[*(4S)*]-4-Fmoc-амино-5-*трет*-бутоксид-5-
 оксопентаноил]амино]этокси]этокси]ацетил]амино]этокси]этокси]уксусная кислота-
 2-Cl-Trt-смолы. Полученную 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[*(4S)*]-4-Fmoc-амино-5-*трет*-бутоксид-5-
 10 оксопентаноил]амино]этокси]этокси]ацетил]амино]этокси]этокси]уксусная кислота-
 2-Cl-Trt-смолу селективно деблокировали с применением пиперидина, а затем
 соединяли с моно-*трет*-бутиловым эфиром октадекандиовой кислоты с получением
 промежуточного соединения-2, а именно [2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[*(4S)*]-5-*трет*-бутоксид-4-
 [(18-*трет*-бутоксид-18-оксооктадеканойл)амино]-5-
 15 оксопентаноил]амино]этокси]этокси]ацетил]амино]этокси]этокси]уксусная кислота]-
 2-Cl-Trt-смолы. Промежуточное соединение 2 затем отщепляли от 2-Cl-Trt-смолы с
 применением трифторэтанола:DCM (1:1). Затем полученное соединение вводили в
 реакцию с *N*-гидроксисукцинимидом (HOSu) в присутствии изобутилхлорформиата
 (IBCF) и *N*-метилморфолина (NMM) с последующим снятием защиты с помощью
 20 трифторуксусной кислоты с получением указанного в заголовке соединения (фрагмент
 A-OSu, промежуточное соединение-3). Весь процесс также может быть изображен, как
 схематически представлено на фигуре 1В.

2. Получение *N*-пальмитоил-*L*- γ -глутамилсукцинимидного сложного эфира (фрагмент B-OSu)



Фрагмент B-OSu

25

Альфа-*трет*-бутиловый эфир *L*-глутаминовой кислоты (H-Glu-OtBu) вводили в
 реакцию с пальмитиновой кислотой в присутствии IBCF и NMM с получением CH_3 -
 $(\text{CH}_2)_{14}$ -C(O)-Glu-OtBu, который затем вводили в реакцию с HOSu в присутствии IBCF

и NMM с получением $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{C}(\text{O})-\text{Glu}(\text{OSu})-\text{OtBu}$, с которого затем снимали защиту с помощью трифторуксусной кислоты с получением фрагмента B-OSu.

3. Получение 18-[[*(1S)*-1-карбокси-4-[4-[2-[2-[2-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси-2-оксоэтокси]этокси]этилкарбамоиламино]бутиламино]-4-оксобутил]амино]-18-оксооктадекановой кислоты (фрагмент C-OSu)

Активированную жирнокислотную боковую цепь, фрагмент C-OSu, получали с применением твердофазного синтеза с применением 2-хлортритилхлоридной смолы, как схематически представлено на фигуре 2. 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусную кислоту прикрепляли к 2-хлортритилхлоридной смоле в присутствии DIPEA с получением 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Защитную группу Fmoc удаляли путем селективного деблокирования аминогруппы с применением пиперидина, а затем активировали свободную аминогруппу с применением *n*-нитрофенилхлороформиата в THF и DIPEA с последующей реакцией с хлористоводородной солью Fmoc-аминобутиламина в THF: DMAc и DIPEA, что привело к получению 2-[2-[2-(4-Fmoc-аминобутилкарбамоиламино)этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Группу Fmoc удаляли путем селективного деблокирования с применением пиперидина, а свободную аминогруппу затем присоединяли к Fmoc-Glu-OtBu с применением HOBT и DIPIC, что привело к получению 2-[2-[2-[4-[[*(4S)*]-4-Fmoc-амино-5-трет-бутокси-5-оксопентаноил]амино]бутилкарбамоиламино]этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Полученную 2-[2-[2-[4-[[*(4S)*]-4-Fmoc-амино-5-трет-бутокси-5-оксопентаноил]амино]бутилкарбамоиламино]этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолу селективно деблокировали с применением пиперидина, а затем соединяли с моно-*трет*-бутиловым эфиром октадекандиовой кислоты с получением промежуточного соединения 2-[2-[2-[4-[[*(4S)*]-5-*трет*-бутокси-4-[(18-трет-бутокси-18-оксооктадеканойл)амино]-5-оксопентаноил]амино]бутилкарбамоиламино]этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Затем промежуточное соединение отщепляли от 2-Cl-Trt-смолы с применением трифторэтанола:DCM (1:1) с получением 2-[2-[2-[4-[[*(4S)*]-5-*трет*-бутокси-4-[(18-*трет*-бутокси-18-оксооктадеканойл)амино]-5-оксопентаноил]амино]бутилкарбамоиламино]этокси]этокси]уксусной кислоты (LCMS= масса/заряд: 814,56 ($\text{M}+\text{H}^+$)). Затем полученное соединение вводили в

реакцию с HOSu в присутствии дициклогексилкарбодимида (DCC) с получением защищенного сукцинимидом промежуточного соединения, с которого снимали защиту с помощью трифторуксусной кислоты с получением указанного в заголовке соединения (фрагмент C-OSu).

5 **4. Получение 18-[[[(1S)-1-карбокси-4-[[2-[2-[2-[2-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси-2-оксоэтокси]этокси]этиламино]-1,1-диметил-2-оксоэтил]амино]-4-оксобутил]амино]-18-оксооктадекановой кислоты (фрагмент D-OSu)**

Жирнокислотную боковую цепь получали с применением твердофазного синтеза с применением 2-хлортритилхлоридной смолы, как схематически представлено на
 10 фигуре 3. 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусную кислоту прикрепляли к 2-хлортритилхлоридной смоле в присутствии DIPEA с получением 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Защитную группу Fmoc удаляли путем селективного деблокирования аминогруппы с применением пиперидина с последующим связыванием с Fmoc-Aib-OH в THF: DMAc с применением DIPIC и
 15 HOBt, что привело к получению 2-[2-[2-[(2-Fmoc-амино-2-метилпропаноил)амино]этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Группу Fmoc удаляли путем селективного деблокирования с применением пиперидина, а свободную аминогруппу присоединяли к Fmoc-Glu-OtBu с применением HOBt и DIPIC с получением 2-[2-[2-[[2-[[[(4S)-4-Fmoc-амино-5-трет-бутокси-5-оксопентаноил]амино]-2-метилпропаноил]амино]этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Группу
 20 Fmoc полученного соединения селективно деблокировали с применением пиперидина, а свободную аминогруппу затем соединяли с моно-трет-бутиловым эфиром октадекандиовой кислоты с получением 2-[2-[2-[[2-[[[(4S)-5-трет-бутокси-4-[(18-трет-бутокси-18-оксооктадеканоил)амино]-5-оксопентаноил]амино]-2-метилпропаноил]амино]этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Затем
 25 промежуточное соединение отщепляли от 2-Cl-Trt-смолы с применением трифторэтанола:DCM (1:1) с получением 2-[2-[2-[[2-[[[(4S)-5-трет-бутокси-4-[(18-трет-бутокси-18-оксооктадеканоил)амино]-5-оксопентаноил]амино]-2-метилпропаноил]амино]этокси]этокси]уксусной кислоты (LCMS= масса/заряд: 786,39
 30 (M+H⁺)). Затем полученное соединение вводили в реакцию с HOSu в присутствии DCC с получением защищенного сукцинимидом промежуточного соединения, с которого

снимали защиту с помощью трифторуксусной кислоты с получением указанного в заголовке соединения (фрагмент D-OSu).

5. Получение 18-[[[(1S)-1-карбокси-4-[3-[2-[2-[2-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси-2-оксоэтокси]этокси]этилкарбамоиламино]пропиламино]-4-оксобутил]амино]-18-оксооктадекановой кислоты (фрагмент E-OSu)

Жирнокислотную боковую цепь получали с применением твердофазного синтеза с применением 2-хлортритилхлоридной смолы, как схематически представлено на фигуре 4. 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусную кислоту прикрепляли к 2-хлортритилхлоридной смоле в присутствии DIPEA с получением 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Защитную группу Fmoc удаляли путем селективного деблокирования аминогруппы с применением пиперидина, а свободную аминогруппу затем активировали с применением п-нитрофенилхлорформиата в THF и DIPEA с последующей реакцией с 1,3-диаминопропаном в THF: DMAc в присутствии DIPEA с применением HOBT с образованием $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\{(2-(2\text{-аминоэтокси)этокси}\}$ уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Свободную аминогруппу затем присоединяли к Fmoc-Glu-OtBu с применением HOBT и DIPIC, что привело к получению 2-[2-[2-[3-[[[(4S)-4-Fmoc-амино-5-*трет*-бутокси-5-оксопентаноил]амино]пропилкарбамоиламино]этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Полученную 2-[2-[2-[3-[[[(4S)-4-Fmoc-амино-5-*трет*-бутокси-5-оксопентаноил]амино]пропилкарбамоиламино]этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолу селективно деблокировали с применением пиперидина, а затем соединяли с моно-трет-бутиловым эфиром октадекандиовой кислоты с получением 2-[2-[2-[3-[[[(4S)-5-*трет*-бутокси-4-[(18-*трет*-бутокси-18-оксооктадеканойл)амино]-5-оксопентаноил]амино]-пропилкарбамоиламино]этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Затем промежуточное соединение отщепляли от 2-Cl-Trt-смолы с применением трифторэтанола:DCM (1:1) с получением 2-[2-[2-[3-[[[(4S)-5-трет-бутокси-4-[(18-*трет*-бутокси-18-оксооктадеканойл)амино]-5-оксопентаноил]амино]пропилкарбамоиламино]этокси]этокси]уксусной кислоты (LCMS= масса/заряд: 801,41 (M+H⁺)). Затем полученное соединение вводили в реакцию с HOSu в присутствии дициклогексилкарбодиимида (DCC) с получением защищенного сукцинимидом промежуточного соединения, с которого снимали защиту

с помощью трифторуксусной кислоты с получением указанного в заголовке соединения (фрагмент E-OSu).

6. Получение 18-[[1(S)-1-карбокси-4-[4-[2-[2-[2-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси-2-оксоэтокси]этокси]этилкарбамоиламино]-1-пиперидил]-4-оксобутил]амино]-

5 18-оксооктадекановой кислоты (фрагмент F-OSu)

Жирнокислотную боковую цепь получали с применением твердофазного синтеза с применением 2-хлортритилхлоридной смолы, как схематически представлено на фигуре 5. 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусную кислоту прикрепляли к 2-хлортритилхлоридной смоле в присутствии DIPEA с получением 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Защитную группу Fmoc удаляли путем селективного деблокирования аминогруппы с применением пиперидина, а свободную аминогруппу затем активировали с применением п-нитрофенилхлорформиата в THF и DIPEA с последующей реакцией с 4-амино-Вос-пиперидином в THF: DMAc в присутствии DIPEA с применением HOBT, что привело к получению (2-[2-[2-(4-Вос-пиперидилкарбамоиламино)этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. При отщеплении полученного соединения с применением трифторуксусной кислоты получили 2-[2-[2-(4-пиперидилкарбамоиламино)этокси]этокси]уксусную кислоту, в результате дальнейшей реакции которой с Fmoc-OSu в присутствии триэтиламина (TEA) получили 2-[2-[2-(4-Fmoc-пиперидилкарбамоиламино)этокси]этокси]уксусную кислоту. Затем полученное соединение дополнительно присоединяли к 2-хлортритилхлоридной смоле в присутствии DIPEA с получением 2-[2-[2-(4-Fmoc-пиперидилкарбамоиламино)этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Группу Fmoc удаляли путем селективного деблокирования с применением пиперидина, а свободную аминогруппу затем присоединяли к Fmoc-Glu-OtBu с применением HOBT и DIPIC, что привело к получению 2-[2-[2-[[1-[(4S)-4-амино-5-трет-бутокси-5-оксопентаноил]-4-пиперидил]карбамоиламино]этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Полученное соединение селективно деблокировали с применением пиперидина и затем соединяли с моно-трет-бутиловым эфиром октадекандиовой кислоты с получением 2-[2-[2-[[1-[(4S)-5-трет-бутокси-4-[(18-трет-бутокси-18-оксооктадеканойл)амино]-5-оксопентаноил]-4-пиперидил]карбамоиламино]этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смолы. Затем

промежуточное соединение отщепляли от 2-Cl-Trt-смолы с применением трифторэтанола:DCM (1:1) с получением 2-[2-[2-[1-[(4S)-5-трет-бутокси-4-[(18-трет-бутокси-18-оксооктадеканоил)амино]-5-оксопентаноил]-4-пиперидил]карбамоиламино]этокси]этокси]уксусной кислоты (LCMS= масса/заряд: 827,40 (M+H⁺)). Затем полученное соединение вводили в реакцию с HOSu в присутствии DCC с получением защищенного сукцинимидом промежуточного соединения, с которого снимали защиту с применением трифторуксусной кислоты с получением указанного в заголовке соединения, фрагмента F-OSu.

10 Пример 2. Синтез соединения 1

N- ϵ^{26} -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(17-карбоксихептадеканоиламино)-4(S)-карбоксивбутириламино]этокси)этокси]ацетиламино)этокси)этокси]ацетил] [(Aib⁸, Arg³⁴, Leu³⁸ GLP-1(7-38) пептид

Часть А. Синтез исходного линейного пептида Aib⁸, Arg³⁴, Leu³⁸ GLP-1(7-38)

15 Исходный пептид синтезировали посредством твердофазного способа. Исходная смола, применяемая для синтеза, представляла собой смолу Ванга. Fmoc-защищенный лейцин применяли для связывания со смолой Ванга. Связывание проводили с применением диизопропилкарбодиимида, *N*-гидроксисбензотриазола (DIC-НОВt) в качестве связывающего реагента в присутствии 4-диметиламинопиридина (DMAP),
 20 что привело к получению Fmoc-Leu-смолы Ванга. Селективное деблокирование аминогруппы на Fmoc-Leu-смоле Ванга с применением пиперидина с последующим связыванием с Fmoc-Gly-ОН с применением НОВt и DIPС привело к получению Fmoc-Gly-Leu-смолы Ванга. Так завершается один цикл. Уксусный ангидрид и диизопропилэтиламин/пиридин применяли для ограничения несвязавшихся
 25 аминогрупп при каждом связывании аминокислоты.

2 вышеупомянутые стадии, т. е. селективное деблокирование Fmoc-защиты с аминокислоты, прикрепленной к смоле, и связывание с аминокислотным остатком с Fmoc-защищенной аминогруппой, расположенным следующим в последовательности, повторяли для остальных 30 аминокислотных остатков. Селективное деблокирование,
 30 т. е. снятие защиты в виде группы Fmoc, выполняли с применением пиперидина, а связывание со следующей Fmoc-защищенной аминокислотой проводили с

применением HOBt/DIPС. Боковую цепь Fmoc-защищенных аминокислот защищали ортогонально, например, гидроксильную группу серина, тирозина или треонина защищали с помощью *tert*-бутильной (-tBu) группы, аминогруппу и гуанидогруппу лизина и аргинина защищали с помощью *tert*-бутилоксикарбонила (-Boc) и 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонильной (-Pbf) группы соответственно, имидазол в гистидине защищали с помощью тритила (-Trt), а карбоксикислотные группы аспарагиновой кислоты или глутаминовой кислоты защищали с помощью группы -tBu. Выполняли две вышеупомянутые стадии, т. е. селективное деблокирование, а затем связывание со следующей Fmoc-защищенной аминокислотой, с получением Fmoc-His(Trt)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Leu-смолы.

Деблокирование Fmoc-His(Trt)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Leu-смолы с применением пиперидина с последующим отщеплением и снятием защиты с применением трифторуксусной кислоты с этан-1,2-дитиолом привело к получению неочищенного H-His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-Leu-OH (Aib⁸, Arg³⁴, Leu³⁸ GLP-1 (7-38) пептида), который очищали с помощью HPLC.

Часть В

Прививание активированной жирнокислотной цепи, фрагмента A-OSu, на очищенный (линейный пептид) H-His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-Leu-OH, полученный в части А, в ацетонитриле при рН приблизительно 10 привело к получению неочищенного указанного в заголовке пептида, который очищали с помощью препаративной HPLC. Характеристики соединений представлены в таблице 3.

Пример 3. Получение соединения 2, 3, 5, 9, 10 и 12

Линейные пептиды соединений 2, 3, 5, 9, 10 и 12 получали посредством твердофазного способа в соответствии с аналогичным процессом, приведенным для примера 1, часть А. Прививание активированной жирнокислотной цепи, фрагмента А-OSu, следуя процессу из примера 1, часть В, на соответствующие линейные пептиды обеспечило получение соединения 2, 3, 5, 9, 10 и 12.

Пример 4. Получение соединения 4 и 11

Линейные пептиды соединения 4 и 11 получали посредством твердофазного способа в соответствии с аналогичным процессом, приведенным для примера 2, часть А, за исключением того, что в данном случае со смолой Ванга первым связывали Fmoc-защищенный D-лейцин, а затем последовательно связывали другие аминокислоты. Прививание активированной жирнокислотной цепи, фрагмента А-OSu, на соответствующий линейный пептид в соответствии с процессом из примера 2, часть В, обеспечило получение соединения 4 и 11.

Пример 5. Получение соединения 8

Линейный пептид получали посредством твердофазного способа в соответствии с аналогичным процессом, приведенным для примера 2, часть А, за исключением того, что в данном случае со смолой Ванга первым связывали Fmoc-защищенный изолейцин, а затем последовательно связывали другие аминокислоты. Прививание активированной жирнокислотной цепи, фрагмента А-OSu, на линейный пептид, следуя процессу из примера 2, часть В, обеспечило получение соединения 8.

Пример 6. Получение соединения 6

Линейный пептид получали посредством твердофазного способа в соответствии с аналогичным процессом, приведенным для примера 2, часть А. Прививание активированной жирнокислотной цепи, фрагмента В-OSu, на линейный пептид, следуя аналогичному процессу из примера 2, часть В, обеспечило получение соединения 6.

Пример 7. Получение соединения 7

Прививание активированной жирнокислотной цепи, фрагмента В-OSu, на линейный пептид из примера 2, часть А, следуя аналогичному процессу из примера 2, часть В, обеспечило получение соединения 7.

Пример 8. Получение соединения 13

Прививание активированной жирнокислотной цепи, фрагмента С-OSu, на линейный пептид из примера 1, часть А, следуя аналогичному процессу из примера 1, часть В, обеспечило получение соединения 13.

Пример 9. Получение соединения 14

Линейный пептид получали посредством твердофазного способа в соответствии с аналогичным процессом, приведенным для примера 2, часть А. Прививание активированной жирнокислотной цепи, фрагмента В-OSu, на линейный пептид, следуя аналогичному процессу из примера 2, часть В, обеспечило получение соединения 14.

Пример 10. Получение соединения 15

Линейный пептид получали посредством твердофазного способа в соответствии с аналогичным процессом, приведенным для примера 2, часть А, начиная с Fmoc-защищенного изолейцина, который первым связывали со смолой Ванга, а затем последовательно связывали другие аминокислоты. Прививание активированной жирнокислотной цепи, фрагмента С-OSu, на линейный пептид, следуя аналогичному процессу из примера 2, часть В, обеспечило получение соединения 15.

Пример 11. Получение соединения 16

Прививание активированной жирнокислотной цепи, фрагмента D-OSu, на линейный пептид из примера 2, часть А, следуя аналогичному процессу из примера 2, часть В, обеспечило получение соединения 16.

5 **Пример 12. Получение соединения 17**

Прививание активированной жирнокислотной цепи, фрагмента E-OSu, на линейный пептид из примера 2, часть А, следуя аналогичному процессу из примера 2, часть В, обеспечило получение соединения 17.

10 **Пример 13. Получение соединения 18**

Прививание активированной жирнокислотной цепи, фрагмента F-OSu, на линейный пептид из примера 2, часть А, следуя аналогичному процессу из примера 2, часть В, обеспечило получение соединения 18.

15 Характеристики синтезированных соединений по настоящему изобретению представлены ниже в следующей таблице 3.

Таблица 3. Характеристики типичных соединений по настоящему изобретению

Соед. №	Данные LCMS	Чистота по HPLC
1	масса/заряд = 1057,52 (MH_4^{4+}), рассчитанная масса = 4226,05	98,32% (способ В2), RT=24,85 мин
2	масса/заряд = 1061,74 (MH_4^{4+}), рассчитанная масса = 4242,93	99,02% (способ В1), RT=18,53 мин
3	масса/заряд = 1087,65 ($M-4H$) ⁻⁴ , рассчитанная масса = 4354,63	98,12% (способ В1), RT=18,48 мин
4	масса/заряд = 1055,68 ($M-4H$) ⁻⁴ , рассчитанная масса = 4226,75	98,97% (способ В1), RT=18,32 мин
5	масса/заряд = 1057,88 (MH_4^{4+}), рассчитанная масса = 4227,49	96,75% (способ В1), RT=17,09 мин
6	масса/заряд = 967,26 (MH_4^{4+}), рассчитанная масса: 3865,01	98,68% (способ В3), RT=44,04 мин
7	масса/заряд = 968,53 ($M-4H$) ⁻⁴ , рассчитанная масса = 3878,15	97,39% (способ В3), RT=27,79 мин

8	масса/заряд = 1057,72 (Mn_4^{4+}), рассчитанная масса = 4226,85	95,70% (способ B1), RT=16,62 мин
9	масса/заряд = 1061,67 (Mn_4^{4+}), рассчитанная масса = 4242,65	95,15% (способ B1), RT=16,48 мин
10	масса/заряд = 1058,18 (Mn_4^{4+}), рассчитанная масса = 4228,69	93,66% (способ B1), RT=16,13 мин
11	масса/заряд = 1056,95 (Mn_4^{4+}), рассчитанная масса: 4223,77	95,70% (способ B2), RT=24,46 мин
12	масса/заряд = 1405,12 (Mn_3^{3+}), рассчитанная масса: 4212,34	97,51% (способ B1), RT=19,06 мин
13	масса/заряд = 1049,59 (Mn_4^{4+}), рассчитанная масса = 4194,33	96,01% (способ B2), RT=25,16 мин
14	масса/заряд = 1050,13 (Mn_4^{4+}), рассчитанная масса = 4196,49	92,06% (способ B2), RT=24,55 мин
15	масса/заряд = 1049,61 (Mn_4^{4+}), рассчитанная масса = 4194,41	94,41% (способ B2), RT=24,82 мин
16	масса/заряд = 1042,34 (Mn_4^{4+}), рассчитанная масса = 4165,32	94,56% (способ B2), RT=25,26 мин
17	масса/заряд = 1046,18 (Mn_4^{4+}), рассчитанная масса = 4180,72	94,33% (способ B2), RT=25,17 мин
18	масса/заряд = 1052,77 (Mn_4^{4+}), рассчитанная масса = 4207,08	93,12% (способ B2), RT=24,92 мин

Пример 14. Пероральный тест на толерантность к глюкозе (ОГТТ) у крыс; однократная инъекция; 1 мг/кг

Животных разделяли на три группы - нормальная контрольная группа, группа
 5 тестируемого соединения и третья группа семаглутида, по 4 животных в каждой
 группе. Перед началом ОГТТ животных не кормили в течение 12 часов. Животным в
 группе тестируемого соединения подкожно вводили соединение 1 в дозе 1 мг/кг.
 Животным группы семаглутида подкожно вводили дозу 1 мг/кг. Через 22 часа, 166
 часов и 334 часа после подкожной инъекции тестируемого лекарственного средства
 10 или семаглутида уровень глюкозы в крови измеряли с помощью глюкометра
 (измерения времени 0). Затем всем животным перорально вводили раствор глюкозы из
 расчета 2 г/кг. Уровень глюкозы в крови измеряли через 20, 40, 60, 90 и 120 минут после
 введения глюкозы. Регистрировали массу тела и потребление пищи. Данные по уровню
 глюкозы в крови анализировали с применением двухфакторного дисперсионного
 15 анализа ANOVA с последующими апостериорными критериями Бонферрони с

применением PRISM (Graph Pad версии 5.03). Данные по $AUC_{0-120 \text{ мин}}$ глюкозы в крови анализировали с применением t-критерия.

Для полипептидов по настоящему изобретению продемонстрирован эффект значительного снижения уровня глюкозы по сравнению с контрольной группой при исследовании с помощью перорального теста на толерантность к глюкозе (OGTT) на крысах. Например, на фигуре 6 показана зависимость изменения уровня глюкозы в крови от времени за период 0-120 минут в группе тестируемого соединения, которым вводили соединение 1, и группе обработки семаглутидом через 22 часа и 46 часов после их введения. Через 22 часа после введения однократной дозы соединения 1 было показано статистически значимое снижение уровня глюкозы в крови при $p < 0,001$ в сравнении с нормальным контролем с помощью ANOVA с последующими апостериорными критериями Бонферрони. Эффект снижения глюкозы у соединения 1 превосходил эффект снижения уровня глюкозы, наблюдаемый с семаглутидом (см. фигуру 6A). Превосходство эффекта снижения глюкозы у соединения 1 наблюдали даже через 46 часов после подкожного введения (фигура 6B). Кроме того, как для соединения 1, так и для семаглутида показано статистически значимое снижение потребления пищи по сравнению с контролем при наблюдении в день 2, а также в день 4 (см. таблицы 4 и 5). Снижение потребления пищи, продемонстрированное для соединения 1 в день 4, было большим, чем у семаглутида (см. таблицу 5). По показателю снижения массы тела только тестируемое соединение продемонстрировало значительное снижение массы тела в день 4.

Таблица 4. Эффект обработки на прием пищи и массу тела в день 2

Потребление пищи (г) (от дня 0 - до дня 2)			Масса тела (г) (день 2)		
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	% изменения в сравнении с исходным уровнем
Нормальный контроль	33,0	4,7	480,6	15,6	8,89
Соединение 1	2,63***	2,5	365,6	21,0	-9,33
Семаглутид	5,03***	3,4	428,1	42,3	-7,65

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ в сравнении с нормальным контролем; однофакторный дисперсионный анализ с последующими апостериорными критериями Бонферрони

Таблица 5. Эффект обработки на прием пищи и массу тела в день 4

Потребление пищи (г) (от дня 0 - до дня 4)			Масса тела (г) (день 4)		
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	% изменения в сравнении с исходным уровнем
Нормальный контроль	90,5	5,6	491,3	16,9	2,1
Соединение 1	43,25***,##	2,8	436,2*	21,1	-7,5
Семаглутид	55,73***	4,1	427,2	42,3	-5,3

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ в сравнении с нормальным контролем; однофакторный дисперсионный анализ с последующими апостериорными критериями Бонферрони

$p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ в сравнении с семаглутидом; однофакторный дисперсионный анализ с последующими апостериорными критериями Бонферрони

5

Неожиданно было обнаружено, что для соединений, у которых X33 представлен Leu и Ile, показано значительное снижение уровня глюкозы в крови в данных исследованиях, тогда как соединения с аминокислотами, отличными от Leu и Ile, обладали значительно меньшим эффектом снижения уровня глюкозы в крови. Для полипептид по настоящему изобретению показано значительное снижение уровня глюкозы в крови по сравнению с контрольной группой. Также тестировали соединения

с аминокислотами в положении X33, отличными от Leu или Ile. Например, Leu в положении 32 в соединении 1 (SEQ ID NO: 05) заменяли на Lys и Ser с получением соединений Std-1 и Std-2 соответственно. Для Std-1 и Std-2 показано только приблизительно 35 и 15% снижение $AUC_{0-120 \text{ мин}}$ глюкозы в крови (таблица 6).

5

Таблица 6. Процентное снижение $AUC_{0-120 \text{ мин}}$ глюкозы в крови в тесте OGTT при дозе 1 мг/кг через 24 часа

Соед. №	% снижения содержания глюкозы	Соед. std/ семаглутид	Соед. №	% снижения содержания глюкозы	Соед. std/ лираглутид
Std-1	35,1	0,71	6	75,8	1,83
Std-2	14,8	0,30	7	71,9	1,73
Семаглутид	49,3		Лираглутид	41,5	

Аналогичным образом, для соединения 6, которое отличается от лираглутида наличием дополнительного Leu в положении 32, и соединения 7, которое отличается от лираглутида тем, что аминокислота Ala в положении 2 заменена на Aib, и тем, что содержит Leu в качестве дополнительной аминокислоты в положении 32, продемонстрирован эффект снижения уровня глюкозы в крови через 24 часа, который был значительно выше, чем у лираглутида (таблица 6).

Поскольку было определено, что соединение 1 было значительно лучшим по показателю снижения уровня глюкозы, потребления пищи и снижения массы тела, проводили эксперименты по определению продолжительности действия соединения по настоящему изобретению. Эффект типичных соединений по настоящему изобретению (соединения 1, 13 и 16) через 166 часов (7 дней) и 334 часа (14 дней) изучали и сравнивали с эффектом семаглутида. Соединения тестировали в соответствии со способом, приведенным ниже.

Животных разделяли на три группы - нормальная контрольная группа, группа тестируемого соединения и третья группа семаглутида, по 4 животных в каждой группе. Перед началом OGTT животных не кормили в течение 12 часов. Животным в группе тестируемого соединения подкожно вводили соединение 1, соединение 13 и

25

соединение 16 в дозе 1 мг/кг. Животным группы семаглутида подкожно вводили дозу 1 мг/кг. Через 22 часа, 168 часов и 336 часа после подкожной инъекции тестируемого соединения или семаглутида уровень глюкозы в крови измеряли с помощью глюкометра (измерения времени 0). Затем всем животным перорально вводили раствор глюкозы из расчета 2 г/кг. Уровень глюкозы в крови измеряли через 20, 40, 60, 90 и 120 минут после введения глюкозы. Регистрировали массу тела и потребление пищи. Данные по уровню глюкозы в крови анализировали с применением двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующими апостериорными критериями Бонферрони с применением PRISM (Graph Pad версии 5.03). Данные по AUC_{0-120 мин} глюкозы в крови анализировали с применением t-критерия.

В таблице 7 представлено снижение AUC для глюкозы в крови под действием типичных соединений по настоящему изобретению (соединения 1, 13 и 16) по сравнению с контрольной группой через 1 день, 7 дней и 14 дней после введения.

15 **Таблица 7. Процентное снижение AUC_{0-120 мин} глюкозы в крови в тесте OGTT при дозе 1 мг/кг**

Соединение №	Время	AUC глюкозы в крови (мг/дл*мин)	Изменение AUC (мг/дл*мин)
		Среднее значение	
Семаглутид Эксперимент 1	22 часа	5458,0	-63,4
	168 часов	12785,0	-25,5
	336 часов	16223,0	-2,4
Соед. 1 Эксперимент 1	22 часа	3173,0	-78,7
	168 часов	5941,0	-65,4
	336 часов	11920,0	-28,3
Соед. 13 Эксперимент 1	22 часа	2795,0	-81,2
	168 часов	6950,0	-59,5
	336 часов	11368,0	-31,6
Семаглутид Эксперимент 2	22 часа	4258	-50
	168 часов	7410	-26,6
	336 часов	8023,0	-5,5
Соед. 16 Эксперимент 2	22 часа	1646	-80,7
	168 часов	4283	-57,6

	336 часов	8295,0	-2,3
--	-----------	--------	------

- Соединения 1 и 13 изучали и сравнивали с семаглутидом в одном эксперименте (эксперимент 1), а соединение 16 изучали и сравнивали с семаглутидом в отдельном эксперименте (эксперимент 2). Через 168 часов после инъекции для соединений 1, 13 и 16 по настоящему изобретению показано снижение AUC глюкозы в крови на приблизительно 60% по сравнению с уровнем глюкозы в крови в нулевой момент времени. С другой стороны, для семаглутида показано снижение уровня глюкозы в крови на приблизительно 25% в сравнении с уровнем глюкозы в крови в нулевой момент времени.
- Аналогичные наблюдения провели в отношении количества потребляемой пищи и изменения массы тела. Как можно увидеть из таблицы 8 ниже, животные, которым вводили типичные соединения (соединения 1, 13 и 16), потребляли значительно меньше пищи по сравнению с животными, которым вводили семаглутид. Для соединения 16 показано существенное снижение массы тела, что демонстрирует его потенциальную применимость для лечения ожирения.

Таблица 8. Эффект в отношении потребления пищи и массы тела в тесте OGTT при дозе 1 мг/кг

Соединение №	Время	Потребление пищи (г)	Изменение массы тела (%)
		Среднее значение	Среднее значение
Семаглутид Эксперимент 1	48 ч	17,5	-6,5
	154 ч	86,3	4,5
	324 ч	107,9	11,8
Соед. 1 Эксперимент 1	48 ч	8,3	-9,8
	154 ч	69,6	5,2
	324 ч	99,4	9,3
Соед. 13 Эксперимент 1	48 ч	8,4	-10,2
	154 ч	62,3	4,5
	324 ч	82,44	8,2
Семаглутид	48 ч	19,3	-8,7

Эксперимент 2	154 ч	50,4	0,2
	324 ч	96,8	3,8
Соед. 16	48 ч	5,9	-10,7
Эксперимент 2	154 ч	44,1	-7,0
	324 ч	104,3	-4,3

Пример 15. Снижение HbA1c у мышей db/db с диабетом 2 типа после длительной обработки

Данное исследование проводили на мышинной модели диабета. Животных
5 разделили на три группы обработки - контрольную группу с диабетом, группу
тестируемого соединения и группу обработки семаглутидом. Соединение 1 по
настоящему изобретению вводили подкожно в дозе 0,3 мг/кг один раз в день в течение
3 дней (qd*3), а затем в дозе 0,1 мг/кг через день в течение 7 доз (q2d*7), а затем в дозе
0,1 мг/кг один раз в четыре дня в течение двух циклов введения дозы (q4d*2). Такую
10 же схему введения доз применяли в группе обработки семаглутидом. Ежедневно
проводили измерения уровней глюкозы в крови и массы тела. % HbA1c измеряли в
день 0, день 7, день 14 и день 27 с помощью колоночной хроматографии. Совокупное
потребление пищи подсчитывали в день 27. Данные по % HbA1C анализировали с
помощью двухфакторного ANOVA с последующими апостериорными критериями
15 Бонферрони с применением PRISM (Graph Pad версии 5.03).

Для животных в группе тестируемого соединения, которым вводили соединение
1, показано статистически значимое снижение уровней глюкозы в крови по сравнению
с контрольной группой с диабетом (см. фигуру 7), и эффект превосходил эффект у
группы обработки семаглутидом на последней фазе исследования. Для животных в
20 группе тестируемого соединения, которым вводили соединение 1, показано
значительное снижение потребления пищи, что можно увидеть из результатов,
представленных на фигуре 8. На фигуре 8 представлено совокупное потребление пищи
от дня 0 до дня 27 контрольными мышами и мышами db/db, обработанными
тестируемым соединением. Как для тестируемого соединения, так и семаглутид
25 показали статистически значимое снижение потребления пищи по сравнению с
контрольной группой с диабетом. Кроме того, для тестируемого соединения показано
значительно более низкое потребление пищи по сравнению с семаглутидом. В том же

исследовании для соединения 1 также показано значительное снижение массы тела по сравнению с контрольной группой с диабетом. На фигуре 9 представлен результат % изменения массы тела для контрольной группы и группы тестируемого соединения от дня 0 до дня 27. Для тестируемого соединения 1 показано значительное снижение, составляющее -16%, по сравнению с -8%, наблюдаемым в группе обработки семаглутидом (см. фигуру 09).

При сахарном диабете более высокие количества HbA1c, указывающие на более слабый контроль уровней глюкозы в крови, были ассоциированы с сердечно-сосудистым заболеванием, нефропатией, нейропатией и ретинопатией. В 27-дневном исследовании для соединения 1 показано статистически значимое снижение уровня HbA1c у мышей db/db с диабетом типа 2 после длительной обработки. В таблице 9 ниже и на фигуре 10 представлен уровень HbA1c в дни 0 и 27 в контрольной группе с диабетом и группе после длительной обработки соединением 1. Эффект был статистически значимым даже при сравнении с семаглутидом.

15

Таблица 9. Эффект обработки на % уровни HbA1c у мышей db/db

Момент времени (дни)	% HbA1c										
	Контроль с диабетом (DC)			Соединение 1				Семаглутид			
	Среднее значение	SD	n	Среднее значение	SD	n	% изменения в сравнении с DC	Среднее значение	SD	n	% изменения в сравнении с DC
0	4,70	0,52	6	4,87	0,59	6	-	5,05	0,35	5	-
27	7,30	1,17	6	3,73 ^{***##}	0,86	6	-3,57	5,03 ^{***}	0,69	5	-2,26

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 в сравнении с контролем с диабетом; двухфакторный дисперсионный анализ с последующими апостериорными критериями Бонферрони

#p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 в сравнении с семаглутидом; однофакторный дисперсионный анализ с последующими апостериорными критериями Бонферрони

20

В отдельном исследовании изучали тестируемые соединения 1, 13 и 16 и сравнивали с семаглутидом в отношении их эффекта на уровень HbA1c и инсулина и

0	7,7	1,2	7,8	0,8	7,7	1,5	7,83	0,76	7,74	1,27	7,83	0,99	7,66	1,13
14	8,0	1,0	6,4**	0,5	6,6*	0,9	6,00***	0,53	5,67***#	0,68	5,64***#	0,49	7,04	1,15
29	8,3	1,0	6,2***	0,5	6,4***	0,8	5,64***	0,51	5,33***#	0,39	5,16***#	0,24	6,47***	1,03

*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001 в сравнении с контролем с диабетом, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 в сравнении с семаглутидом; однофакторный ANOVA с последующими апостериорными критериями Бонферрони

5 **Таблица 11. Инсулин (нг/мл):** соединение 1 (6,078 нМ), соединение 13 (3,04 и 6,078 нМ), соединение 16 (3,04 и 6,078 нМ); (q2d*15) (n=7)

Момент времени (дни)	Инсулин (нг/мл)													
	Контроль с диабетом		Соединение 1, 6,078 нМ, q2d*15		Соединение 13, 3,04 нМ, q2d*15		Соединение 13, 6,078 нМ, q2d*15		Соединение 16, 3,04 нМ, q2d*15		Соединение 16, 6,078 нМ, q2d*15		Семаглутид, 12,15 нМ, q2d*15	
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
0	17,6	5,5	18,0	5,8	21,7	12,1	26,2	14,0	13,9	6,6	21,8	9,6	18,7	10,3
14	23,0	10,7	58,1**	31,6	41,8	28,2	61,2***	23,7	50,8*	27,7	58,1**	12,5	37,5	26,5
29	16,9	6,6	54,7**	6,4	54,4**	27,0	59,4***	22,4	53,8**	23,5	68,2***	27,1	48,1**	25,3

*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001 в сравнении с контролем с диабетом, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 в сравнении с семаглутидом; однофакторный ANOVA с последующими апостериорными критериями Бонферрони

10 **Таблица 12. Совокупное потребление пищи, AUC глюкозы в крови (мг/дл*дни) и изменения массы тела:** соединение 1 (6,078 нМ), соединение 13 (3,04 и 6,078 нМ), соединение 16 (3,04 и 6,078 нМ); (q2d*15)

Группы (n=7)	Совокупное потребление пищи (г), день 0-29		AUC глюкозы в крови (день 0-29) (мг/дл*дни)			Изменение массы тела, день 29, % изменения в сравнении с днем 0	
	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	% изменения в сравнении с контролем	Среднее значение	SD

Контроль с диабетом	99,3	37,16	16948,1	281,48		9,4	6,4
Соединение 1, 6,078 нМ	79,8	25,09	9194,6***	450,84	-45,75	-0,3	2,2
Соединение 13, 3,04 нМ	75,2	18,45	9515,4***	805,21	-43,86	1,2	3,8
Соединение 13, 6,078 нМ	70,4	10,85	8451,7***##	612,94	-50,13	-1,1	2,4
Соединение 16, 3,04 нМ	77,4	23,82	9399,0***	680,38	-44,54	-1,4	5,4
Соединение 16, 6,078 нМ	66,7	29,48	8086,1***##	623,80	-52,29	-5,5	3,1
Семаглутид, 12,155 нМ	92,0	6,64	9867,9***	832,73	-41,78	0,7	3,9

*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001 в сравнении с контролем с диабетом, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 в сравнении с семаглутидом; однофакторный ANOVA с последующими апостериорными критериями Бонферрони

- 5 Для типичных соединений по настоящему изобретению (соединения 1, 13 и 16) в дозах приблизительно 3 и 6 нМ показано значительное снижение HbA1c, содержания глюкозы в крови, потребления пищи и массы тела по сравнению с контролем (таблица 12). Снижение было сопоставимо с показателем для семаглутида в дозе приблизительно 12 нМ. Более того, эффект наблюдали даже через 29 дней (таблицы 13 и 14), что демонстрирует потенциал соединений по настоящему изобретению для разработки лекарственных средств длительного действия, которые не требуют частого введения и, следовательно, улучшают соблюдение пациентами схемы лечения.

Таблица 13. Исследование восстановительного периода - AUC глюкозы в крови

15 (мг/дл*дни)

Группы (n=3)	AUC глюкозы в крови (день 30-37) (мг/дл*дни)		% изменения в сравнении с контролем	AUC глюкозы в крови (день 38-45) (мг/дл*дни)		% изменения в сравнении с контролем
	Среднее значение	SD		Среднее значение	SD	

Контроль с диабетом	3591,7	47,04		3601,7	38,66	
Соединение 1, 6,078 нМ	2787,3*	17,67	-22,39	3335,7	66,11	-7,39
Соединение 13, 3,04 нМ	2588,7**	411,97	-27,93	3401,0	61,00	-5,57
Соединение 13, 6,078 нМ	2875,7	436,87	-19,94	3361,0	205,83	-6,68
Соединение 16, 3,04 нМ	2420,0**	89,71	-32,62	3284,0*	81,66	-8,82
Соединение 16, 6,078 нМ	2167,7***	210,19	-39,65	3134,7**	103,39	-12,97
Семаглутид, 12,155 нМ	3032,0	182,40	-15,58	3415,7	88,82	-5,16

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ в сравнении с контролем с диабетом и # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ в сравнении с семаглутидом; однофакторный дисперсионный анализ с последующими апостериорными критериями Бонферрони

5 **Таблица 14. Исследование восстановительного периода - % HbA1C и содержание инсулина (нг/мл)**

Группы (n=3)	% HbA1C		Дельта HbA1C в сравнении с DC	Инсулин (нг/мл)		% изменения массы тела в сравнении с днем 45	
	Среднее значение	SD		Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
Контроль с диабетом	8,5	0,4		20,6	12,0	7,8	1,08
Соединение 1, 6,078 нМ	7,6	0,5	-0,9	30,9	8,9	5,9	3,68
Соединение 13, 3,04 нМ	7,5	0,4	-1,0	31,2	32,7	6,6	0,86
Соединение 13, 6,0788 нМ	7,3	0,4	-1,2	34,3	12,4	5,5	2,19
Соединение 16, 3,04 нМ	7,1*	0,2	-1,4	15,5	8,2	6,1	0,38
Соединение 16, 6,078 нМ	7,2*	0,5	-1,3	18,4	18,7	5,7	0,36
Семаглутид, 12,155 нМ	7,8	0,3	-0,7	19,7	4,2	9,5	4,68

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ в сравнении с контролем с диабетом и # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ в сравнении с семаглутидом; однофакторный дисперсионный анализ с последующими апостериорными критериями Бонферрони

- 5 Данные результаты демонстрируют, что соединение по настоящему изобретению потенциально может применяться для лечения диабета и ожирения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-

5 G-R-G-X33-X34,

где X2 представляет собой Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala или Aib;

X3 отсутствует или представляет собой Gln;

X4 представляет собой Glu;

X16 представляет собой Glu;

10 X24 представляет собой Ile;

X33 представляет собой Leu, -D-Leu, D-Ile или Ile;

X34 отсутствует, и

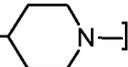
X21 представляет собой Lys, где аминогруппа (ϵ -аминогруппа) боковой цепи Lys ацилирована с помощью фрагмента:

15 $\{-Q-T-U-W-Y-Z,$

где Q и T отсутствуют;

U отсутствует или представляет собой $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-\}$, где } представляет собой место присоединения группы W;

20 W отсутствует или выбрана из группы, состоящей из $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$, $-C(O)-NH-(CH_2)_{3-4}-NH-$, $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$ и

$-C(O)-NH-$ ], где] представляет собой место присоединения группы Y;

Y представляет собой $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$, и -- представляет собой место присоединения группы Z;

25 Z представляет собой $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$ или $-C(O)-(CH_2)_n-CH_3$, где n представляет собой целое число от 14 до 20.

2. Полипептид по п. 1, где X2 представляет собой Aib;

X3 отсутствует;

X33 представляет собой Leu;

U представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\}$;

5 W представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-]$, и

Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, где n представляет собой целое число

16.

3. Полипептид по п. 1, где X2 представляет собой Aib;

X3 отсутствует;

X33 представляет собой Leu;

U представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\}$;

W представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-]$, и

Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, где n представляет собой целое число

15 16.

4. Полипептид по п. 1, где X2 представляет собой Aib;

X3 отсутствует;

X33 представляет собой Leu;

U представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\}$;

W представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-]$, и

Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, где n представляет собой целое число

16.

5. Полипептид по п. 1, где X2 представляет собой Aib;

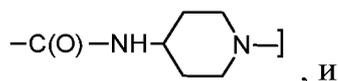
X3 отсутствует;

X33 представляет собой Leu;

U представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\}$;

W представляет собой

25



, и

Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, где n представляет собой целое число

16.

5 6. Полипептид по п. 1, где X2 представляет собой Aib;

X3 отсутствует;

X33 представляет собой Leu;

U представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\}$;

W представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-]$, и

10 Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, где n представляет собой целое число

16.

7. Полипептид по п. 1, где X2 представляет собой Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe);

15 X3 отсутствует;

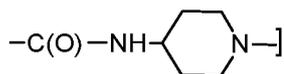
X33 представляет собой Leu;

U представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-\}$;

W представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{NH}-]$, $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{3-4}-\text{NH}-]$, $-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-]$, и

20 Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ или $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, где n представляет собой целое число от 14 до 20.

8. Полипептид по п. 1, где W выбрана из группы, состоящей из $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{3-4}-\text{NH}-]$, $-\text{C}(\text{O})-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NH}-]$ и



25

9. Полипептид по п. 1, где X2 представляет собой Ala;

X3 отсутствует;

X33 представляет собой Leu;

W отсутствует;

Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, где n представляет собой целое число

14.

5 10. Полипептид по п. 1, где X2 представляет собой Aib;

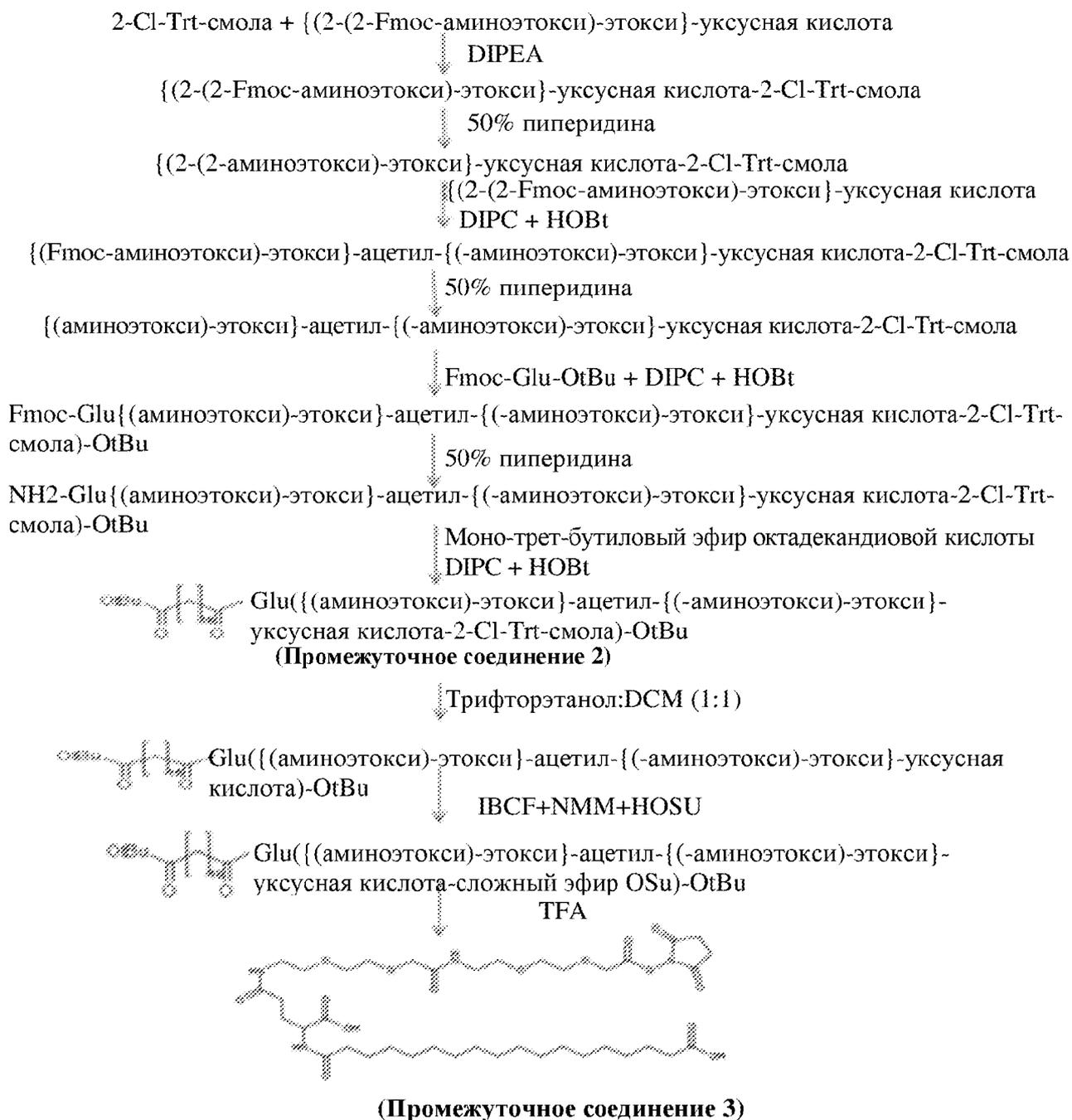
X3 отсутствует;

X33 представляет собой Leu;

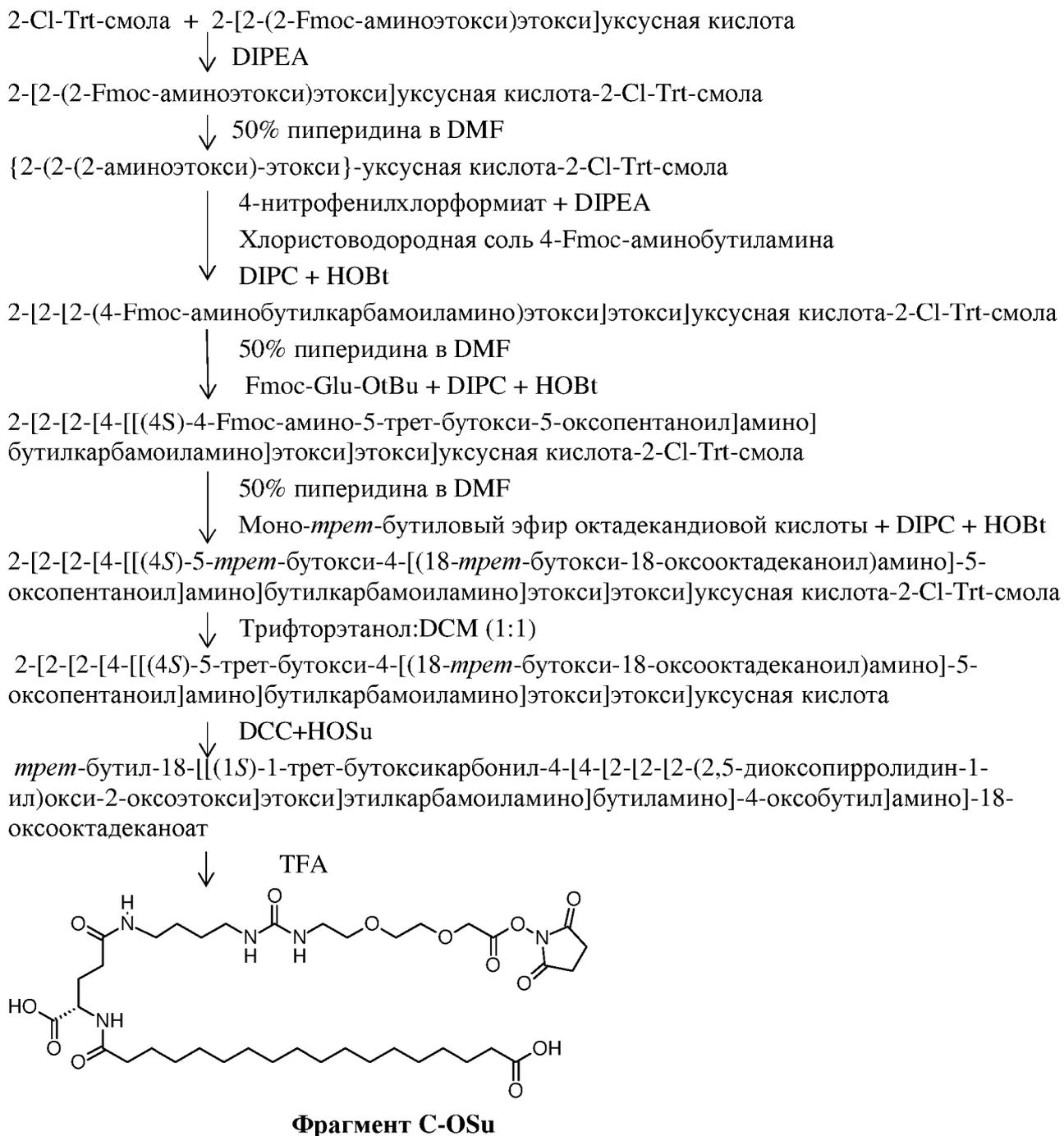
W отсутствует;

Z представляет собой $-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, где n представляет собой целое число

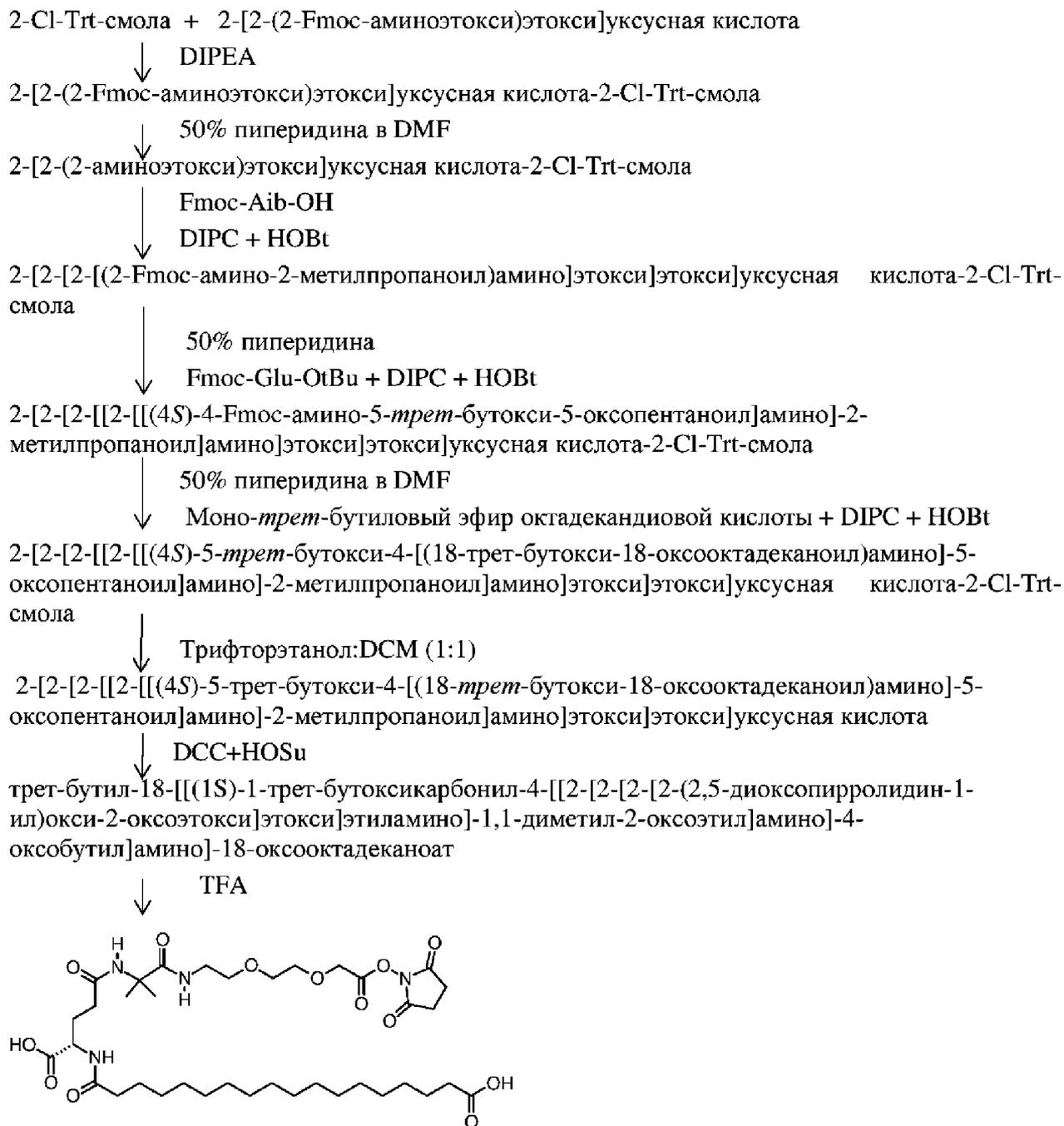
10 14.



Фигура 1В



Фигура 2



Фрагмент D-OSu

Фигура 3

2-Cl-Trt-смола + 2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусная кислота

↓ DIPEA

2-[2-(2-Fmoc-аминоэтокси)этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смола

↓ 50% пиперидина в DMF

2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смола

↓ 4-нитрофенилхлорформиат + DIPEA

1,3-диаминопропан + HOBt

↓ Fmoc-Glu-OtBu + DIPIC + HOBt

2-[2-[2-[3-[[4S]-4-Fmoc-амино-5-трет-бутокси-5-оксопентаноил]амино]пропилкарбамоиламино]этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смола

↓ 50% пиперидина в DMF

↓ Моно-трет-бутиловый эфир октадекандиовой кислоты + DIPIC + HOBt

2-[2-[2-[3-[[4S]-5-трет-бутокси-4-[(18-трет-бутокси-18-оксооктадеcanoил)амино]-5-оксопентаноил]амино]пропилкарбамоиламино]этокси]этокси]уксусная кислота-2-Cl-Trt-смола

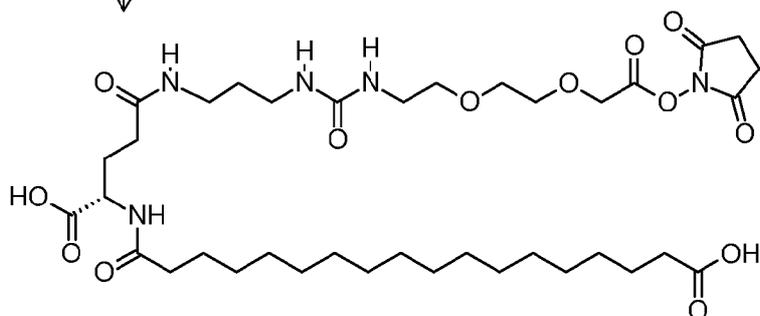
↓ Трифторэтанол:DCM (1:1)

2-[2-[2-[3-[[4S]-5-трет-бутокси-4-[(18-трет-бутокси-18-оксооктадеcanoил)амино]-5-оксопентаноил]амино]пропилкарбамоиламино]этокси]этокси]уксусная кислота

↓ DCC+HOSu

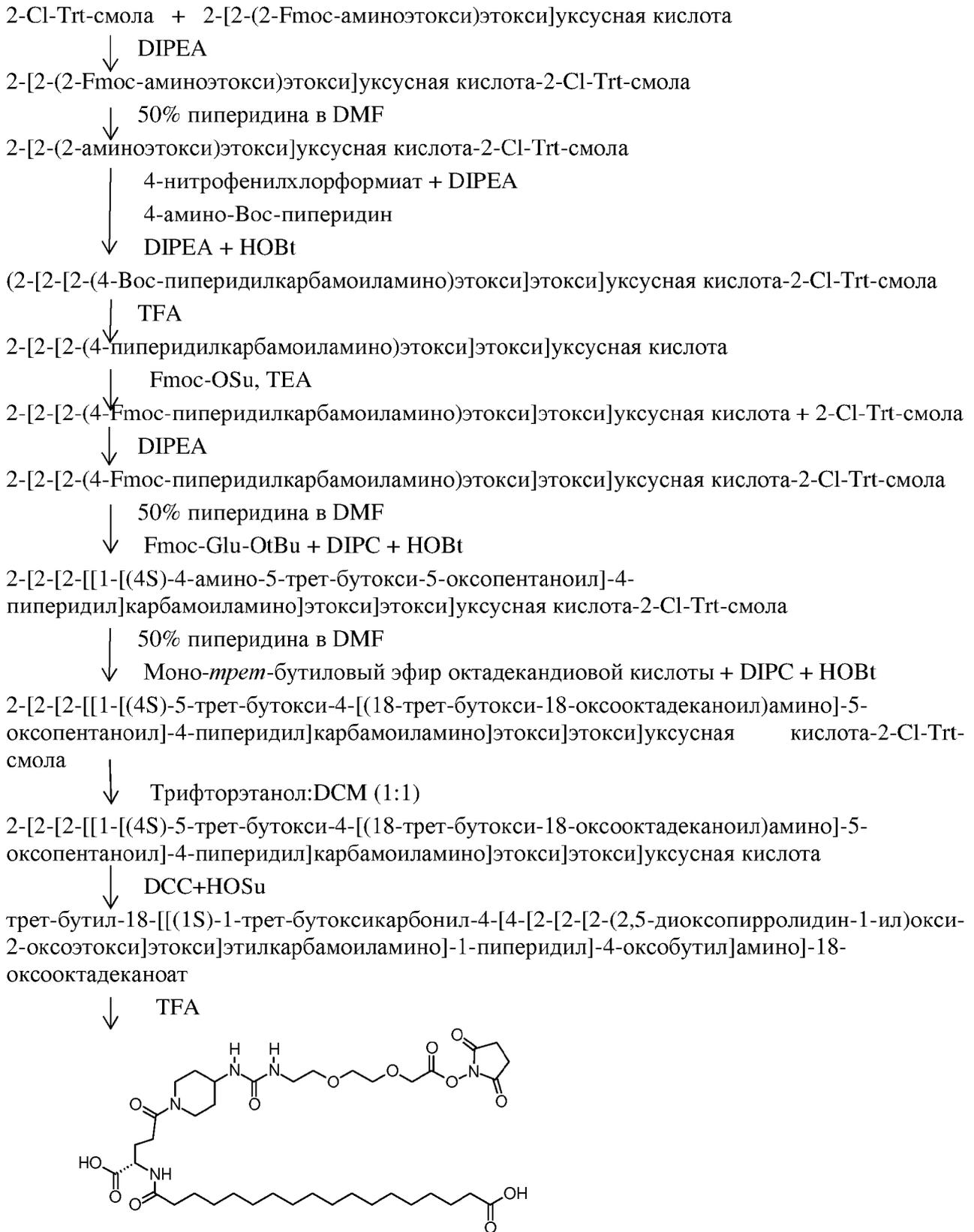
трет-бутил-18-[[1S]-1-трет-бутоксикарбонил-4-[3-[2-[2-[2-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси-2-оксоэтокси]этокси]этилкарбамоиламино]пропиламино]-4-оксобутил]амино]-18-оксооктадеcanoат

↓ TFA



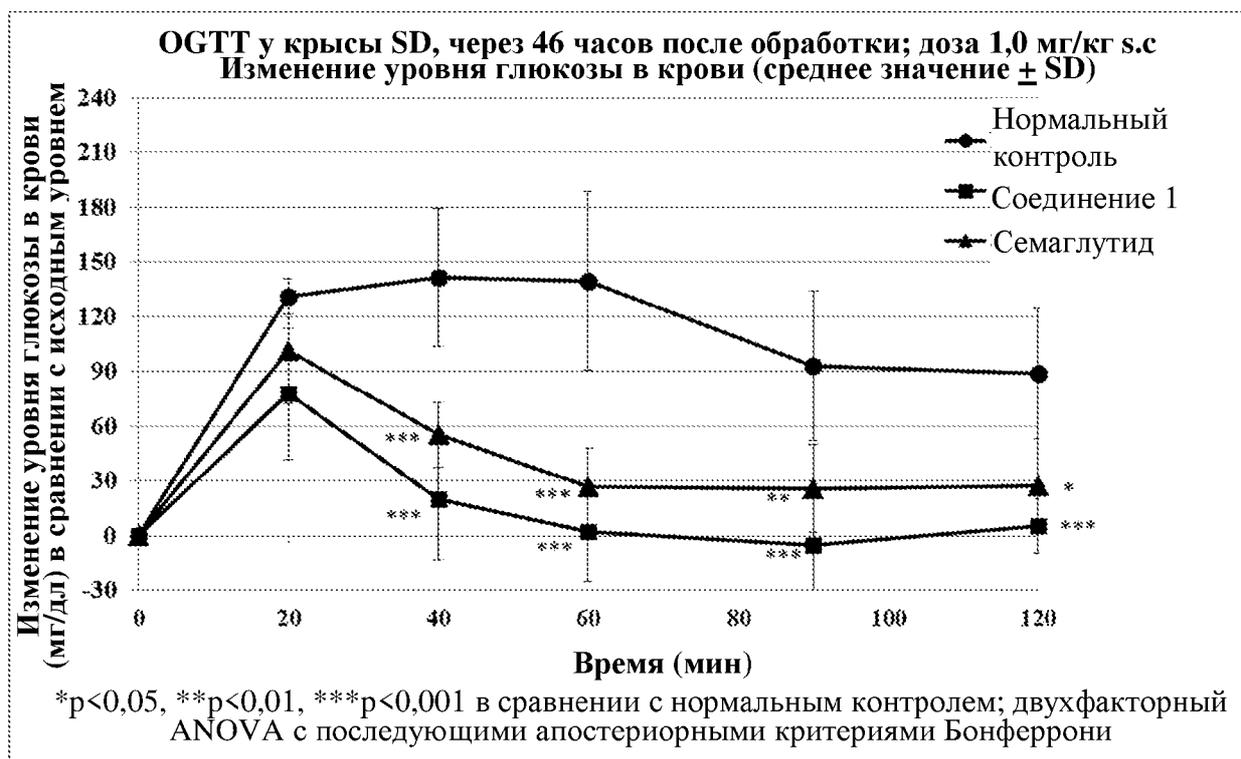
Фрагмент E-OSu

Фигура 4

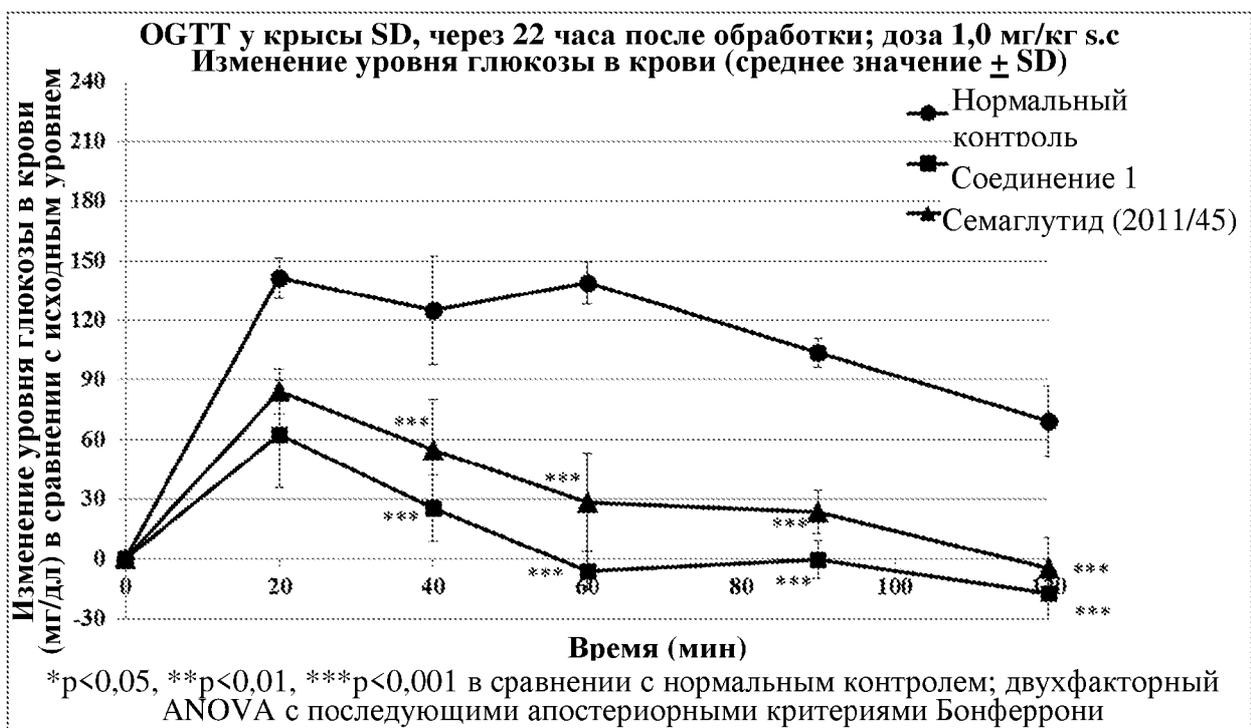


Фрагмент F-OSu

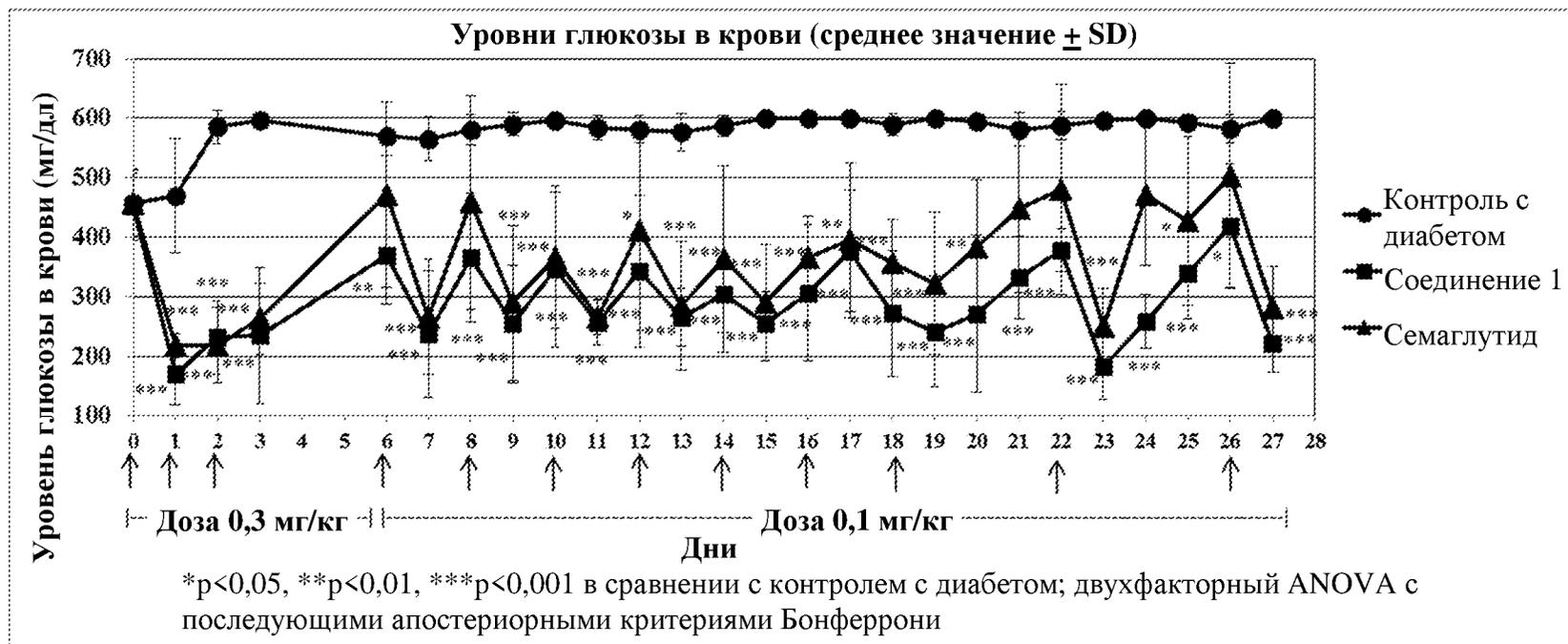
Фигура 5



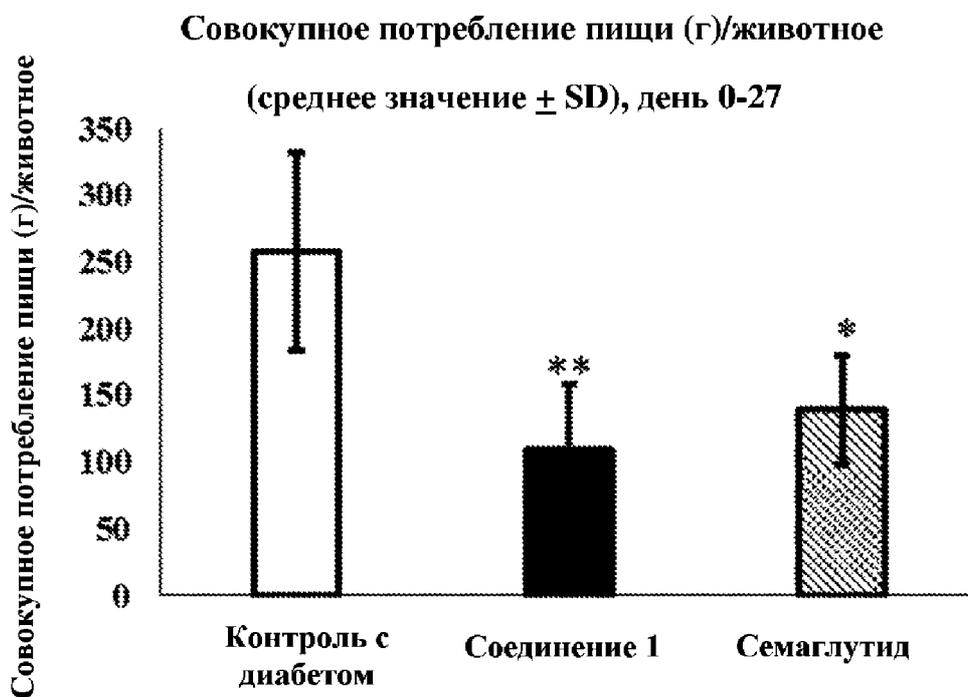
Фигура 6 (А)



Фигура 6 (В)



Фигура 7

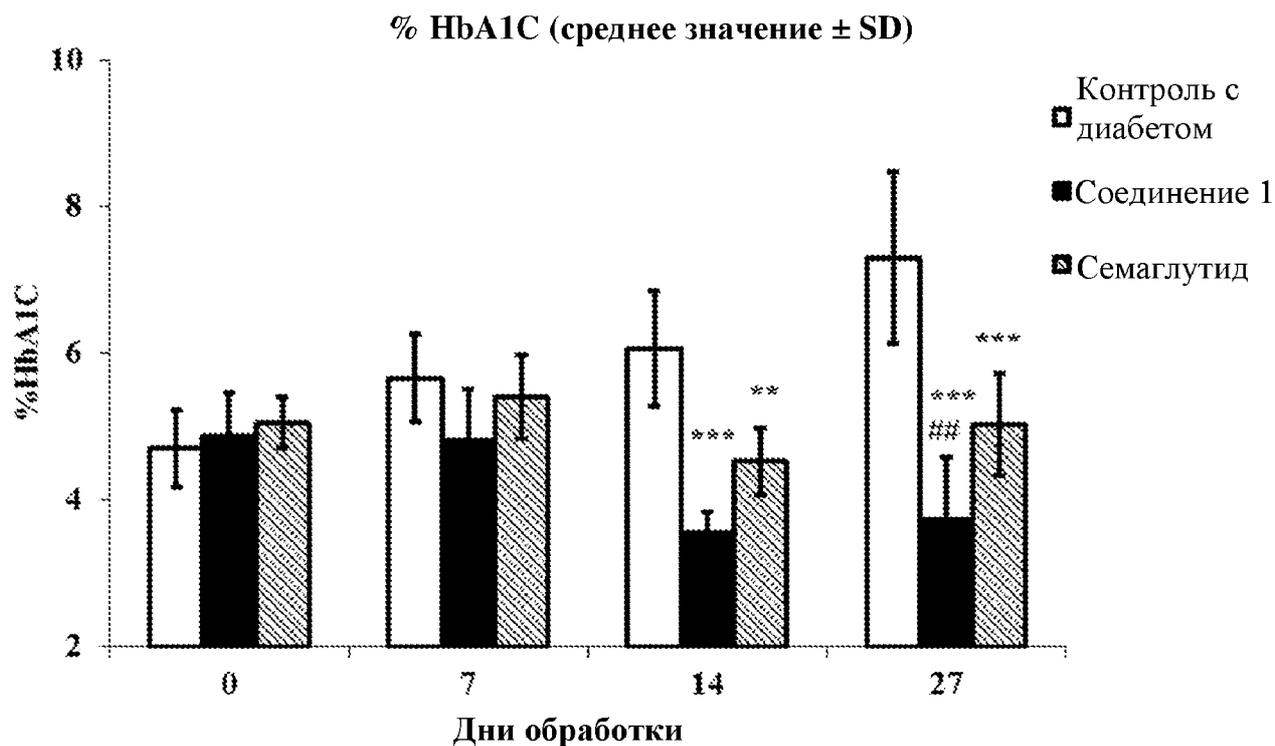


* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ в сравнении с контролем с диабетом;
однофакторный ANOVA с последующими апостериорными критериями
Бонферрони

Фигура 8



Фигура 9



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ в сравнении с контролем с диабетом и # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ в сравнении с семаглутидом; двухфакторный ANOVA с последующими апостериорными критериями Бонферрони

Фигура 10