

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192442** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.14

(51) Int. Cl. *C07K 14/605* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.03.19

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА ГЛЮКАГОНОПОДОБНОГО ПЕПТИДА-1 (GLP-1) И ИХ АНАЛОГОВ

(31) 201921010752; 201921014929

(72) Изобретатель:

(32) 2019.03.19; 2019.04.12

Адак Сандип, Бонте Манодж,

(33) IN

Кулкарни Чандракант, Вееранараяна

(86) PCT/IB2020/052504

Свами, Джогданд Ниврутти (IN)

(87) WO 2020/188510 2020.09.24

(74) Представитель:

(88) 2021.01.07

Хмара М.В. (RU)

(71) Заявитель:

ЭНЗИН БИОСАЙЕНСИЗ ЛИМИТЕД
(IN)

(57) Изобретение относится к способам получения агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и их аналогов. Настоящее изобретение также относится к способам получения лираглутида, D-лираглутида, семаглутида и D-семаглутида. В частности, настоящее изобретение относится к способам получения агониста глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и его аналогов, где полученные лираглутид, D-лираглутид, семаглутид и D-семаглутид являются, по существу, чистыми продуктами. Настоящее изобретение также относится к получению агониста глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и его аналогов твердофазным и растворным методами.

A1

202192442

202192442

A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА ГЛЮКАГОНОПОДОБНОГО ПЕПТИДА-1 (GLP-1) И ИХ АНАЛОГОВ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 Настоящее изобретение относится к фармацевтическим продуктам. В частности, настоящее изобретение относится к способам получения агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1), их аналогов и их фармацевтически приемлемых солей. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способам получения агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1), включая лираглутид, D-лираглутид, семаглутид и D-семаглутид. В частности, настоящее изобретение относится к 10 способам получения агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и их аналогов, где получаемые лираглутид, D-лираглутид, семаглутид и D-семаглутид являются по существу чистыми продуктами. Настоящее изобретение также относится к получению агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и их аналогов 15 твердофазным и растворным методами.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Описание предшествующего уровня техники включает в себя информацию, которая может быть полезной для понимания настоящего изобретения. Это не означает признания того, что любая информация, представленная в данном документе, является 20 предшествующим уровнем техники или имеет отношение к данному заявляемому изобретению, или что любая публикация, на которую прямо или косвенно дается ссылка, является предшествующим уровнем техники.

Глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) продуцируется кишечником и глюкозозависимым образом стимулирует секрецию инсулина, одновременно подавляя 25 секрецию глюкагона, снижает аппетит и потребление энергии и замедляет эвакуацию желудочного содержимого. Было также показано, что данный класс лекарственных средств способствует уменьшению массы тела и снижению SBP (англ. systolic blood pressure – систолическое артериальное давление), что может быть полезным для пациентов с диабетом 2 типа. Агонисты рецепторов глюкагоноподобного пептида-1 (GLP- 30 1 RAs) появились на рынке в 2005 году в качестве новой фармакотерапевтической группы для клинического применения при лечении сахарного диабета 2 типа (англ. T2DM). С 2005 г. на рынке присутствуют 6 разрешенных для применения продуктов, самым новым

из которых является семаглутид. Агонист GLP-1R семаглутид был недавно зарегистрирован для лечения диабета 2 типа. Семаглутид имеет две аминокислотные замены по сравнению с человеческим GLP-1 (Aib(8), Arg(34)) и дериватизирован по лизину 26.

5 Лираглутид, представленный Формулой (I), является аналогом человеческого GLP-1 и действует как агонист рецептора GLP-1. Он показан при лечении пациентов с диабетом 2 типа для улучшения гликемического контроля. Пептидный предшественник лираглутида обычно получают при помощи способа, включающего в себя экспрессию рекомбинантной ДНК (англ. DNA. deoxyribonucleic acid – дезоксирибонуклеиновая
10 кислота) в *Saccharomyces cerevisiae*, и конструируют так, чтобы он был на 97% гомологичен нативному человеческому GLP-1, путем замены аргинина на лизин в положении 34.

 Сообщалось о различных способах получения лираглутида и семаглутида. В патентном документе US7572884 раскрыт способ получения лираглутида с помощью
15 рекомбинантной технологии с последующим ацилированием и удалением N-концевого удлинения. В патентном документе WO2017162650 раскрыт другой способ получения лираглутида, включающий в себя осаждение пептида лираглутида или пептида-предшественника путем смешивания его с антирастворителем, содержащим простой диизопропиловый эфир и ацетонитрил. В патентном документе WO2014199397 раскрыт
20 способ получения лираглутида методом твердофазного синтеза с использованием смолы Ванга. Все эти способы имеют одно или более ограничений, таких как высокая специфичность, сложность реализации на промышленном уровне, неудовлетворительные профиль чистоты и выход конечного продукта или коммерческая нежизнеспособность.

25 Несмотря на то, что известны способы синтеза препаратов агонистов рецептора GLP1, тем не менее, все еще сохраняется потребность в поиске новых, масштабируемых и экономически целесообразных, схем синтеза. В частности, по-прежнему существует неудовлетворенная потребность в схемах синтеза, позволяющих преодолеть один или более недостатков, связанных с известными способами, то есть в таких схемах, как схемы
30 синтеза по настоящему изобретению, адаптируемые в качестве общих схем, подходящих для получения различных агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и их аналогов, включая лираглутид, D-лираглутид, семаглутид и D-семаглутид, в особенности, с улучшенным профилем чистоты, и применимые в промышленном масштабе.

ЦЕЛИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Цель настоящего раскрытия – предложить способы получения агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и их аналогов, их фармацевтически приемлемых солей и их композиций, позволяющие удовлетворить имеющуюся потребность и преодолеть один или более недостатков, существующих в данной области техники.

Цель настоящего раскрытия – предложить способы получения агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и их аналогов, адаптируемые в качестве экономически жизнеспособных схем.

10 Цель настоящего раскрытия – предложить способы получения агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и их аналогов, адаптируемые в качестве промышленно масштабируемых схем.

15 Цель настоящего раскрытия – предложить способы получения агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и аналогов, являющихся по существу чистыми продуктами.

Другая цель настоящего раскрытия – предложить химический способ синтеза лираглутида, D-лираглутида, семаглутида и D-семаглутида.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

20 Настоящее раскрытие относится к способам получения агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1), их аналогов и их фармацевтически приемлемых солей.

Согласно одному из аспектов, настоящее раскрытие относится к получению по существу чистых агонистов рецептора (glp-1) или их аналогов, выбранных из лираглутида, D-лираглутида, семаглутида и D-семаглутида.

25 Согласно другому аспекту, настоящее раскрытие относится к получению агонистов рецептора (glp-1) или их аналогов, выбранных из лираглутида, D-лираглутида, семаглутида и D-семаглутида, при помощи твердофазных методов.

30 Согласно другому аспекту, настоящее раскрытие относится к получению агонистов рецептора (glp-1) или их аналогов, выбранных из лираглутида, D-лираглутида, семаглутида и D-семаглутида, при помощи растворных методов.

Согласно еще одному аспекту, настоящее раскрытие относится к способу получения агонистов рецептора (glp-1) или их аналогов, выбранных из лираглутида, D-лираглутида, семаглутида и D-семаглутида, при помощи твердофазных или растворных методов с использованием Fmoc-стратегии.

5 Согласно еще одному аспекту, настоящее раскрытие относится к способу получения агонистов рецептора (glp-1) или их аналогов, выбранных из лираглутида, D-лираглутида, семаглутида и D-семаглутида, синтезированных путем повторения дипептидных фрагментов Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH и Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH.

10 Согласно одному из аспектов, в настоящем раскрытии предложен способ получения агонистов рецептора (glp-1) или их аналогов, включающий в себя:

a) закрепление дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле, кэпирование его; и

b) подвергание закрепленного фрагмента многократным циклам последовательного связывания;

15 где

многократные циклы включают:

- селективное снятие защиты с аминогруппы и связывание C-конца еще одного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с N-концом закрепленного и незащищенного фрагмента в присутствии связывающего агента,

20 - селективное снятие защиты с аминогруппы и связывание полученного фрагмента с C-концом следующей N-защищенной аминокислоты в присутствии связывающего агента,

25 - повторение указанных стадий связывания с получением аминокислотной последовательности требуемого линейного агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) или его аналога, содержащего аминокислотную последовательность аналога требуемого линейного агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1);

30 c) удаление защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с длинноцепочечной жирной кислотой и отщепление пептида от смолы с получением линейного неочищенного требуемого агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1); и

d) необязательно очистку неочищенного агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1).

Согласно еще одному аспекту, настоящее раскрытие относится к способу получения лираглутида, включающему в себя стадии:

- 5 a) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;
- b) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного дипептидного фрагмента;
- c) связывания карбоксильного конца еще одного дипептидного фрагмента
10 Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с N-концом фрагмента стадии (b), в присутствии связывающего агента;
- d) селективного снятия защиты с аминогруппы фрагмента стадии (c);
- e) связывания карбоксильного конца следующей N-защищенной аминокислоты с фрагментом стадии (d), в присутствии связывающего агента;
- 15 f) повторения стадий d) и e) для образования пептида с соответствующей аминокислотной последовательностью лираглутида;
- g) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием пептидного фрагмента стадии (f) с Fmoc-Glu-OtBu с последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с пальмитиновой
20 кислотой;
- h) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного лираглутида;
- i) необязательно очистки неочищенного лираглутида.

Согласно еще одному аспекту, настоящее раскрытие относится к способу
25 получения лираглутида, включающему в себя стадии:

- a) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;
- b) селективного снятия защиты с аминогруппы фрагмента стадии (a);
- c) последовательного связывания дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-
30 OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH,

Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Ala-OH и Boc-His(Trt)-OH, в присутствии связывающего агента с получением аминокислотной последовательности линейного неочищенного лираглутида;

10 d) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием пептидного фрагмента стадии (с) с Fmoc-Glu-OtBu с последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с пальмитиновой кислотой;

e) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного лираглутида; и

15 f) необязательно очистки неочищенного лираглутида.

Согласно еще одному аспекту, в настоящем раскрытии предложен способ получения D-лираглутида, включающий в себя стадии:

a) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;

20 b) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного дипептидного фрагмента;

c) связывания карбоксильного конца еще одного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с фрагментом стадии (b), в присутствии связывающего агента;

d) селективного снятия защиты с аминогруппы фрагмента стадии (с);

25 e) связывания карбоксильного конца следующей N-защищенной аминокислоты с фрагментом стадии (d), в присутствии связывающего агента;

f) повторения стадий d) и e) для образования пептида с соответствующей аминокислотной последовательностью D-лираглутида;

30 g) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с пальмитиновой кислотой;

h) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного D-лираглутида; и

i) необязательно очистки неочищенного D-лираглутида.

5 Согласно еще одному аспекту, настоящее раскрытие относится к способу получения D-лираглутида, включающему в себя стадии:

a) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;

b) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

10 c) последовательного связывания дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-D-Ala-OH и Boc-His(Trt)-OH, в присутствии связывающего агента с получением аминокислотной последовательности линейного неочищенного D-лираглутида;

20 d) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с пальмитиновой кислотой;

e) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного D-лираглутида; и

f) необязательно очистки неочищенного D-лираглутида.

25 Согласно одному из аспектов, в настоящем раскрытии предложен способ получения семаглутида, включающий в себя стадии:

a) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;

b) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

с) связывания карбоксильного конца еще одного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с фрагментом стадии (b), в присутствии связывающего агента;

d) селективного снятия защиты с аминогруппы фрагмента стадии (c);

5 е) связывания карбоксильного конца следующей N-защищенной аминокислоты с фрагментом стадии (d), в присутствии связывающего агента;

f) повторения стадий d) и e) для образования пептида с соответствующей аминокислотной последовательностью семаглутида;

10 g) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с последовательностями Fmoc-PEG2-CH2-COOH, Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием с оксооктадекановой кислотой;

h) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного семаглутида; и

i) необязательно очистки неочищенного семаглутида.

15 Согласно одному из аспектов, в настоящем раскрытии предложен способ получения семаглутида, включающий в себя стадии:

a) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;

b) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

20 c) последовательного связывания дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH, с аминокислотными фрагментами Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-D-Ala-OH и Boc-His(Trt)-OH, в присутствии связывающего агента с получением линейного неочищенного пептида, содержащего аминокислотные последовательности семаглутида;

30 d) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с последовательностями Fmoc-PEG2-CH2-COOH, Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием с оксооктадекановой кислотой;

е) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного семаглутида; и

ф) необязательно очистки неочищенного семаглутида.

5 Согласно одному из аспектов, в настоящем раскрытии предложен способ получения D-семаглутида, включающий в себя следующие стадии:

а) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;

б) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

10 в) связывания карбоксильного конца еще одного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с фрагментом стадии (б), в присутствии связывающего агента;

д) селективного снятия защиты с аминогруппы фрагмента стадии (в);

е) связывания карбоксильного конца следующей N-защищенной аминокислоты с фрагментом стадии (д), в присутствии связывающего агента;

15 ф) повторения стадий д) и е) для образования пептида с соответствующей аминокислотной последовательностью D-семаглутида;

г) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с последовательностями Fmoc-PEG2-CH2-COOH, Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием с оксооктадекановой кислотой;

20 h) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного D-семаглутида; и

и) необязательно очистки неочищенного D-семаглутида.

Согласно одному из аспектов, в настоящем раскрытии предложен способ получения D-семаглутида, включающий в себя следующие стадии:

25 а) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;

б) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

в) последовательного связывания дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-

Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, дипептидного
5 фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-D-Ala-OH и Fmoc-His(Trt)-OH, с получением аминокислотной последовательности линейного неочищенного D-семаглутида;

d) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с последовательностями Fmoc-PEG2-CH2-COOH, Fmoc-Glu-OtBu,
10 последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием с оксооктадекановой кислотой;

e) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного D-семаглутида; и

f) необязательно очистки неочищенного D-семаглутида.

Согласно еще одному аспекту, в настоящем раскрытии предложен способ
15 получения дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH, при этом способ включает в себя стадии:

e) закрепления Fmoc-Arg(Pbf)-OH на смоле и кэпирования его;

f) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

g) связывания сложного алкилового эфира глицина с фрагментом стадии (b), в
20 присутствии связывающего агента;

h) отщепления дипептидного фрагмента, полученного на стадии (c), от смолы;

i) необязательно очистки неочищенного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH.

Согласно еще одному аспекту, настоящее раскрытие относится к способу
25 получения дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH, включающему стадии:

a) закрепления Fmoc-Glu(OtBu)-OH на смоле и кэпирования его;

b) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

c) связывания сложного алкилового эфира глицина с фрагментом стадии (b), в присутствии связывающего агента;

- d) отщепления дипептидного фрагмента, полученного на стадии (с), от смолы;
- e) необязательно очистки неочищенного дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH.

5 Различные цели, особенности, аспекты и преимущества предмета изобретения станут более очевидными из следующего подробного описания предпочтительных вариантов осуществления.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

10 Следующие графические материалы являются частью настоящего описания и включены для дополнительной иллюстрации аспектов настоящего раскрытия. Раскрытие может стать более понятным при обращении к графическим материалам в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в настоящем документе.

15 Фиг. 1 представляет собой блок-схему, на которой изображен алгоритм получения лираглутида, включающий стадии, такие как показаны на схеме 1, в соответствии с одним из примерных вариантов осуществления.

Фиг. 2 представляет собой блок-схему, на которой изображен алгоритм получения лираглутида, включающий стадии, такие как показаны на схеме 2, в соответствии с одним из примерных вариантов осуществления.

20 Фиг. 3 представляет собой блок-схему, на которой изображен алгоритм получения D-лираглутида, включающий стадии, такие как показаны на схеме 3, в соответствии с одним из примерных вариантов осуществления.

Фиг. 4 представляет собой блок-схему, на которой изображен алгоритм получения D-лираглутида, включающий стадии, такие как показаны на схеме 4, в соответствии с одним из примерных вариантов осуществления.

25 Фиг. 5 представляет собой блок-схему, на которой изображен алгоритм получения семаглутида, включающий стадии, такие как показаны на схеме 5, в соответствии с одним из примерных вариантов осуществления.

30 Фиг. 6 представляет собой блок-схему, на которой изображен алгоритм получения семаглутида, включающий стадии, такие как показаны на схеме 6, в соответствии с одним из примерных вариантов осуществления.

Фиг. 7 представляет собой блок-схему, на которой изображен алгоритм получения D-семаглутида, включающий стадии, такие как показаны на схеме 7, в соответствии с одним из примерных вариантов осуществления.

5 Фиг. 8 представляет собой блок-схему, на которой изображен алгоритм получения D-семаглутида, включающий стадии, такие как показаны на схеме 8, в соответствии с одним из примерных вариантов осуществления.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 Далее представлено подробное описание вариантов осуществления раскрытия. Варианты осуществления приведены со степенью детализации, позволяющей наглядно изложить данное раскрытие. Однако предлагаемая степень детализации не предназначена для ограничения предполагаемых вариантов осуществления; напротив, смысл заключается в охвате всех модификаций, эквивалентных и альтернативных вариантов, подпадающих под сущность и объем настоящего раскрытия, как определено прилагаемой формулой изобретения.

15 Все публикации, упоминаемые в настоящем документе, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была специально и индивидуально указана для включения посредством ссылки. В случае, если определение или использование термина во включенной ссылке несовместимо или противоречит определению этого термина, приведенному в настоящем документе, применяется определение термина, приведенное в настоящем документе, а определение термина в ссылке не применяется.

25 Упоминание повсюду в настоящем описании “одного из вариантов осуществления” или “варианта осуществления” означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с данным вариантом осуществления, включены в по меньшей мере один из вариантов осуществления. Таким образом, появление фраз “согласно одному из вариантов осуществления” или “согласно варианту осуществления” в разных частях настоящего описания не обязательно относится к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, конкретные особенности, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим образом в одном или более вариантах осуществления.

30 Согласно некоторым вариантам осуществления, числа, выражающие количества ингредиентов, свойства, такие как концентрация, условия реакции и тому подобное,

используемые для описания и заявления некоторых вариантов осуществления раскрытия, следует понимать как измененные в некоторых случаях с помощью термина “приблизительно”. Соответственно, согласно некоторым вариантам осуществления, числовые параметры, приведенные в текстовом описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приблизительной величиной, варьируемой в зависимости от требуемых свойств, которые должны быть получены при помощи конкретного варианта осуществления. Согласно некоторым вариантам осуществления, числовые параметры следует интерпретировать с учетом количества сообщаемых значащих цифр с применением обычных методов округления. Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, образующие широкий объем некоторых вариантов осуществления раскрытия, являются приблизительными величинами, числовые значения, приведенные в конкретных примерах, указаны настолько точно, насколько это практически возможно. Числовые значения, представленные согласно некоторым вариантам осуществления раскрытия, могут содержать некоторые ошибки, обязательно появляющиеся в результате стандартного отклонения, обнаруживаемые при их соответствующих проверочных измерениях.

При использовании в данном описании и во всей последующей формуле изобретения значения артиклей “a,” “an” и “the” включают упоминание множественного числа, если контекст явным образом не предписывает иное. Кроме того, при использовании в данном описании значение предлога “в” включает в себя “в” и “на”, если контекст явным образом не предписывает иное.

Если контекст не требует иного, во всем последующем описании слово “содержать” и такие его варианты, как “содержит” и “содержащий”, следует толковать в открытом объединяющем смысле, то есть как “включающий, но не ограничиваясь перечнем.”

В настоящем документе указание диапазонов значений предназначено исключительно для краткого способа обращения к каждому отдельному значению, попадающему в указанный диапазон. Если в данном контексте не указано иное, каждое отдельно взятое значение включено в описание, как если бы значения были перечислены в настоящем документе по отдельности. Все способы, описанные в данном документе, могут выполняться в любом подходящем порядке, если в данном контексте не указано иное или иное явным образом не противоречит контексту. Использование любого и всех примеров или вводных слов перед примером (например, “такой как”), представленных в

данном документе в отношении определенных вариантов осуществления, предназначено исключительно для лучшей иллюстрации изобретения и не налагает ограничения на объем изобретения, заявленного иным образом. Никакие формулировки в описании не следует толковать, как указывающие на какой-либо незаявленный элемент, существенный для практического осуществления изобретения.

Группирование альтернативных элементов или вариантов осуществления изобретения, раскрытых в данном документе, не следует рассматривать как ограничение. Каждый член группы может быть рассмотрен и заявлен индивидуально или в любой комбинации с другими членами группы или с другими элементами, содержащимися в настоящем документе. Один или более членов группы могут быть включены в группу или удалены из нее по причинам удобства и/или патентоспособности. Когда происходит любое такое включение или удаление, считается, что описание содержит группу в модифицированном виде, так что выполняется письменное описание всех групп Маркуша (англ. Markush), использованных в прилагаемой формуле изобретения.

Представленное далее описание и содержащиеся в нем варианты осуществления приведены в качестве иллюстрации примера или примеров конкретных вариантов осуществления принципов и аспектов настоящего раскрытия. Эти примеры представлены с целью пояснения, а не ограничения указанных принципов и раскрытия.

Также следует принимать во внимание, что настоящее раскрытие может быть реализовано множеством способов, в том числе в виде системы, способа или устройства. В данном описании такие варианты осуществления или любая другая форма, которую может принять изобретение, могут называться процессами. В общем случае порядок стадий раскрываемых процессов может быть изменен в пределах объема изобретения.

Заголовки и реферат изобретения, представленные в данном документе, предназначены исключительно для удобства и не объясняют объема или значения вариантов осуществления.

Далее в обсуждении представлено множество примерных вариантов осуществления предмета изобретения. Хотя каждый вариант осуществления представляет собой единственную комбинацию элементов изобретения, считается, что предмет изобретения включает в себя все возможные комбинации раскрытых элементов. Таким образом, если один из вариантов осуществления содержит элементы А, В и С, а второй вариант осуществления содержит элементы В и D, то считается, что предмет

изобретения также включает в себя другие оставшиеся комбинации А, В, С или D, даже если они явным образом не раскрыты.

5 Ниже приведены различные термины, используемые в настоящем документе. В тех случаях, когда термин, использованный в формуле изобретения, не определен ниже, ему следует дать самое широкое определение, даваемое этому термину специалистами в соответствующей области техники, как это отражено в печатных публикациях и выданных патентах на момент подачи заявки.

10 Настоящее раскрытие относится к способам получения агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1), их аналогов и их фармацевтически приемлемых солей.

Согласно одному из вариантов осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1), выбранного из лираглутида, D-лираглутида, семаглутида и D-семаглутида, в по существу чистой форме.

15 Лираглутид, представленный формулой (I), является аналогом человеческого GLP-1 и действует как агонист рецептора GLP-1. Он показан для лечения пациентов с диабетом 2 типа для улучшения гликемического контроля. Пептидный предшественник лираглутида обычно получают при помощи способа, включающего в себя экспрессию рекомбинантной ДНК в *Saccharomyces cerevisiae*, и конструируют таким образом, чтобы он был на 97% гомологичен нативному человеческому GLP-1, путем замены аргинина на лизин в положении 34. Лираглутид получают присоединением C-16 жирной кислоты (пальмитиновой кислоты) с помощью спейсера глутаминовой кислоты к оставшемуся лизиновому остатку в положении 26 пептида- предшественника.

20

25 H-His-**Ala**-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys (**γ -Glu-пальмитоил**)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH

Формула (I)

D-лираглутид является аналогом лираглутида, имеет формулу (II) и действует как агонист рецептора GLP-1. Его получают заменой аминокислоты в положении 2 нативного лираглутида D-аланином.

30 H-His-**D-Ala**-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys (**γ -Glu-пальмитоил**)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH

Формула (II)

Семаглутид, представленный формулой (III), является аналогом человеческого GLP-1 и действует как агонист рецептора GLP-1. Последовательность семаглутида имеет основную цепь, содержащую 31 аминокислоту. Алифатическая цепь, состоящая из ПЭГ, глутаминовой кислоты и октадекановой кислоты, должна быть привита на Lys в положении 26, а не встречающаяся в природе аминокислота – аминокислота – расположена в положении 8. Аминокислотная последовательность семаглутида имеет вид:

10 H-His-**Aib**-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys (**PEG2-PEG2-Glu-18-оксооктадеканойл**)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH

Формула (III)

D-Семаглутид, представленный формулой (IV), является аналогом семаглутида и действует как агонист рецептора GLP-1. Его получают заменой аминокислоты в положении 2 нативного D-семаглутида D-аланином.

15 H-His-**D-Ala**-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(**PEG2-PEG2-Glu-18-оксооктадеканойл**)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH.

Формула (IV)

20 Согласно варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1), выбранного из лираглутида, D-лираглутида, семаглутида и D-семаглутида, при помощи твердофазного или растворного методов.

25 Согласно варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1), выбранного из лираглутида, D-лираглутида, семаглутида и D-семаглутида, при помощи твердофазного или растворного методов с использованием Fmoc-стратегии.

30 Согласно еще одному другому варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения агонистов рецептора (glp-1) или их аналогов, выбранных из лираглутида, D-лираглутида, семаглутида и D-семаглутида, синтезированных путем повторения дипептидных фрагментов Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH и Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH.

Согласно варианту осуществления, в настоящем раскрытии предложен способ получения агонистов рецептора (glp-1) или их аналогов, включающий в себя стадии:

а) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле, кэпирования его; и

5 b) подвергания закрепленного фрагмента многократным циклам последовательного связывания;

где

многократные циклы включают:

10 - селективное снятие защиты с аминогруппы и связывание С-конца еще одного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с N-концом закрепленного и незащищенного фрагмента в присутствии связывающего агента,

 - селективное снятие защиты с аминогруппы и связывание полученного фрагмента с С-концом следующей N-защищенной аминокислоты в присутствии связывающего агента

15 - повторение указанных стадий связывания с получением аминокислотной последовательности требуемого линейного агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) или его аналога, содержащего аминокислотную последовательность аналога требуемого линейного агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1);

20 c) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с длинноцепочечной жирной кислотой; и отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного требуемого агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1); и

25 d) необязательно очистки неочищенного агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1).

Согласно еще одному варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения лираглутида, включающему в себя стадии:

а) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;

b) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного дипептидного фрагмента;

5 c) связывания карбоксильного конца еще одного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с N-концом фрагмента стадии (b), в присутствии связывающего агента;

d) селективного снятия защиты с аминогруппы фрагмента стадии (c);

e) связывания карбоксильного конца следующей N-защищенной аминокислоты с фрагментом стадии (d), в присутствии связывающего агента;

10 f) повторения стадий d) и e) для образования пептида с соответствующей аминокислотной последовательностью лираглутида;

g) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием пептидного фрагмента стадии (f), с Fmoc-Glu-OtBu с последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с пальмитиновой кислотой;

15 h) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного лираглутада;

i) необязательно очистки неочищенного лираглутида.

Согласно еще одному аспекту, настоящее раскрытие относится к способу получения лираглутида, включающему в себя стадии:

20 g) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;

h) селективного снятия защиты с аминогруппы фрагмента стадии (a);

25 i) последовательного связывания дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH; дипептидного
30 фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH, с аминокислотными фрагментами Fmoc-Ala-OH и Boc-

His(Trt)-OH, в присутствии связывающего агента с получением линейного неочищенного лираглутида;

5 j) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием пептидного фрагмента стадии (с), с Fmoc-Glu-OtBu с последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с пальмитиновой кислотой;

k) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного лираглутида; и

l) необязательно очистки неочищенного лираглутида.

10 Согласно еще одному варианту осуществления, в настоящем раскрытии предложен способ получения D-лираглутида, включающий в себя стадии:

a) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;

15 b) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного дипептидного фрагмента;

c) связывания карбоксильного конца еще одного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с фрагментом стадии (b), в присутствии связывающего агента;

d) селективного снятия защиты с аминогруппы фрагмента стадии (с);

20 e) связывания карбоксильного конца следующей N-защищенной аминокислоты с фрагментом стадии (d), в присутствии связывающего агента;

f) повторения стадий d) и e) для образования пептида с соответствующей аминокислотной последовательностью D-лираглутида;

25 g) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с пальмитиновой кислотой;

h) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного D-лираглутида; и

i) необязательно очистки неочищенного D-лираглутида.

30 Согласно еще одному варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения D-лираглутида, включающему в себя стадии:

- а) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;
- б) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;
- 5 в) последовательного связывания дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-D-Ala-OH и Boc-His(Trt)-OH, в присутствии связывающего агента с получением аминокислотной последовательности линейного неочищенного D-лираглутида;
- 10 д) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с пальмитиновой кислотой;
- 15 е) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного D-лираглутида; и
- ф) необязательно очистки неочищенного D-лираглутида.
- 20 Согласно одному из вариантов осуществления, в настоящем раскрытии предложен способ получения семаглутида, включающий в себя стадии:
- а) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;
- б) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;
- 25 в) связывания карбоксильного конца еще одного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с фрагментом стадии (б), в присутствии связывающего агента;
- д) селективного снятия защиты с аминогруппы фрагмента стадии (с);
- е) связывания карбоксильного конца следующей N-защищенной аминокислоты с фрагментом стадии (д), в присутствии связывающего агента;

f) повторения стадий d) и e) для образования пептида с соответствующей аминокислотной последовательностью семаглутида;

g) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с последовательностями Fmoc-PEG2-CH2-COOH, Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием с оксооктадекановой кислотой;

h) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного семаглутида; и

i) необязательно очистки неочищенного семаглутида.

Согласно одному из вариантов осуществления, в настоящем раскрытии предложен способ получения семаглутида, включающий в себя стадии:

a) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;

b) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

c) последовательного связывания дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-D-Ala-OH и Boc-His(Trt)-OH, в присутствии связывающего агента с получением линейного неочищенного пептида, содержащего аминокислотные последовательности семаглутида;

d) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с последовательностями Fmoc-PEG2-CH2-COOH, Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием с оксооктадекановой кислотой;

e) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного семаглутида; и

f) необязательно очистки неочищенного семаглутида.

Согласно одному из вариантов осуществления, в настоящем раскрытии предложен способ получения D-семаглутида, включающий в себя следующие стадии:

- a) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;
- b) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;
- c) связывания карбоксильного конца еще одного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с фрагментом стадии (b), в присутствии связывающего агента;
- d) селективного снятия защиты с аминогруппы фрагмента стадии (c);
- e) связывания карбоксильного конца следующей N-защищенной аминокислоты с фрагментом стадии (d), в присутствии связывающего агента;
- f) повторения стадий d) и e) для образования пептида с соответствующей аминокислотной последовательностью D-семаглутида;
- g) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с последовательностями Fmoc-PEG2-CH2-COOH, Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием с оксооктадекановой кислотой;
- h) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного D-семаглутида; и
- i) необязательно очистки неочищенного D-семаглутида.

Согласно одному из вариантов осуществления, в настоящем раскрытии предложен способ получения D-семаглутида, включающий в себя следующие стадии:

- a) закрепления дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и кэпирования его;
- b) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;
- c) последовательного связывания фрагментов дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными

фрагментами Fmoc-D-Ala-OH и Boc-His(Trt)-OH, с получением аминокислотной последовательности линейного неочищенного D-семаглутида;

5 d) удаления защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с последовательностями Fmoc-PEG2-CH2-COOH, Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием с оксооктадекановой кислотой;

e) отщепления пептида от смолы с получением линейного неочищенного D-семаглутида; и

f) необязательно очистки неочищенного D-семаглутида.

10 Согласно еще одному варианту осуществления, в настоящем раскрытии предложен способ получения дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH, при этом способ включает в себя стадии:

a) закрепления Fmoc-Arg(Pbf)-OH на смоле и кэпирования его;

b) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

15 c) связывания сложного алкилового эфира глицина с фрагментом стадии (b), в присутствии связывающего агента;

d) отщепления дипептидного фрагмента, полученного на стадии (c), от смолы;

e) необязательно очистки неочищенного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH.

20 Согласно еще одному варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH, включающему в себя стадии:

a) закрепления Fmoc-Glu(OtBu)-OH на смоле и кэпирования его;

b) селективного снятия защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

25 c) связывания сложного алкилового эфира глицина с фрагментом стадии (b), в присутствии связывающего агента;

d) отщепления дипептидного фрагмента, полученного на стадии (c), от смолы;

e) необязательно очистки неочищенного дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH.

Согласно варианту осуществления, снимают защиту аминогруппы аргинина.

Согласно одному из вариантов осуществления, твердая фаза представляет собой смолу.

5 Согласно одному из вариантов осуществления, смолу выбирают, не ограничиваясь перечнем, из 2-хлортритилхлорида (англ. 2-CTC), Sasrin, entaGel S, TentaGel TGA, Rink, Wang, AmphiSpheres и других подходящих смол.

Согласно одному из вариантов осуществления, кэпирование выполняют с помощью кэпирующего агента, выбранного, не ограничиваясь перечнем, из *N,N*-диизопропилэтиламина (англ. DIPEA), метанола, уксусного ангидрида и их комбинации.

10 Согласно одному из вариантов осуществления, связывающий агент выбирают, не ограничиваясь перечнем, из 1-гидроксibenзотриазола (HOBt), *N,N*-диизопропилкарбодиимида (DIC), гексафторфосфата бензотриазолтетраметилурония (HBTU), *N,N*-диизопропилэтиламина (DIPEA), гексафторфосфата бензотриазол-1-илокси-трис(диметиламино)фосфония (BOP), гексафторфосфата *O*-(7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония (HATU) и их комбинации.

15 Согласно одному из вариантов осуществления, растворитель для реакции связывания выбирают, не ограничиваясь перечнем, из ДМФА, пиридина, уксусного ангидрида, метанола, этанола, изопропанола, дихлорэтана, 1,4-диоксана, 2-метилтетрагидрофурана, *N*-метил-2-пирролидинона (англ. NMP), этилацетата, ацетонитрила, ацетона и т.п., или их комбинации.

20 Согласно одному из вариантов осуществления, один или более повторяющихся дипептидных фрагментов, таких как Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH и Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH, синтезируют при помощи растворного метода.

25 Согласно одному из вариантов осуществления, защита аминогруппы может быть селективно удалена при помощи известных способов, например, с использованием смеси пиперидина, DBU и дихлорметана в подходящем растворителе, таком как ДМФА.

Согласно одному из вариантов осуществления, образованный пептид может быть отщеплен от смолы с помощью химических реагентов, выбранных, не ограничиваясь перечнем, из дифторуксусной кислоты, трифторуксусной кислоты и т.п.

30 Согласно варианту осуществления, способ очистки аналогов GLP-1, выбранных из лираглутида, D-лираглутида, семаглутида или D-семаглутида, может быть осуществлен

при помощи способов, хорошо известных в данной области техники. Способ очистки может быть выбран, не ограничиваясь перечнем, из препаративной ВЭЖХ (англ. HPLC, High Performance Liquid Chromatography – высокоэффективная жидкостная хроматография) с обращенной фазой, ионообменной хроматографии, гель-проникающей хроматографии, аффинной хроматографии и т.п.

Согласно одному из вариантов осуществления, в настоящем раскрытии предложен способ очистки агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) или его аналога по любому из предшествующих пунктов, при этом способ включает в себя:

а) подвергание неочищенного агониста рецептора GLP1 или его аналогов первой очистке методом ВЭЖХ с подвижной фазой, содержащей бикарбонат аммония и ацетонитрил, при величине рН от 8,5 до 9,5;

б) сбор и объединение смешанных фракций, полученных в результате стадии (а), и подвергание второй очистке методом ВЭЖХ с элюированием подвижной фазой, содержащей трифторуксусную кислоту и ацетонитрил, при линейном градиенте от 30% В до 45% В;

с) подвергание фракции, полученной в результате второй очистки методом ВЭЖХ на стадии (б), третьей очистке методом ВЭЖХ с подвижной фазой, содержащей гидроксид аммония, ацетонитрил, ацетат аммония и очищенную воду;

д) концентрирование фракции, полученной в результате третьей очистки методом ВЭЖХ на стадии (с), и лиофилизацию с получением очищенного агониста рецептора GLP-1 или его аналога.

Согласно одному из вариантов осуществления, использование двух дипептидных фрагментов, выбранных из Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH и Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH, способствует уменьшению соответствующих примесей Endo-Gly.

Согласно другому варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения лираглутида, включающему в себя стадии, изображенные на схеме 1.

Согласно другому варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения лираглутида, включающему в себя стадии, изображенные на схеме 2.

Согласно другому варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения D-лираглутида, включающему в себя стадии, изображенные на схеме 3.

Согласно другому варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения D-пираглутида, включающему в себя стадии, изображенные на схеме 4.

5 Согласно другому варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения семаглутида, включающему в себя стадии, изображенные на схеме 5.

Согласно другому варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения семаглутида, включающему в себя стадии, изображенные на схеме 6.

10 Согласно другому варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения D-семаглутида, включающему в себя стадии, изображенные на схеме 7.

Согласно другому варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения D-семаглутида, включающему в себя стадии, изображенные на схеме 8.

15 Согласно другому варианту осуществления, настоящее раскрытие относится к способу получения агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) или их аналогов, где использование двух дипептидных фрагментов Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH и Fmoc-Glu(tBu)-Gly-OH способствует уменьшению соответствующих примесей Endo-Gly.

20 Согласно другому варианту осуществления, в настоящем раскрытии также предложен способ очистки агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) или его аналога, при этом способ включает в себя:

а) подвергание неочищенного агониста рецептора GLP1 или его аналога первой очистке методом ВЭЖХ с подвижной фазой, содержащей бикарбонат аммония и ацетонитрил, при величине рН от 8,5 до 9,5;

25 б) сбор и объединение смешанных фракций, полученных в результате стадии (а), и подвергание второй очистке методом ВЭЖХ с элюированием подвижной фазой, содержащей трифторуксусную кислоту и ацетонитрил, при линейном градиенте от 30% В до 45% В;

30 в) подвергание фракции, полученной в результате второй очистки методом ВЭЖХ на стадии (б), третьей очистке методом ВЭЖХ с подвижной фазой, содержащей гидроксид аммония, ацетонитрил, ацетат аммония и очищенную воду;

d) концентрирование фракции, полученной в результате третьей очистки методом ВЭЖХ на стадии (с), и лиофилизацию с получением очищенного агониста рецептора GLP-1 или его аналога.

5 В настоящем раскрытии предложены способы получения агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) или его аналога высокой степени чистоты, причем эти способы являются масштабируемыми на промышленном уровне.

10 Наряду с описанными выше различными вариантами осуществления раскрытия могут быть разработаны другие и дополнительные варианты осуществления раскрытия без отклонения от его основного объема. Объем изобретения определяется следующей формулой изобретения. Изобретение не ограничивается описанными вариантами осуществления, версиями или примерами, включенными для того, чтобы позволить специалисту, обладающему обычными навыками в данной области техники, осуществлять и использовать изобретение в сочетании с информацией и знаниями, доступными такому специалисту.

15 ОПИСАНИЕ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение дополнительно поясняется следующими примерами. Однако следует понимать, что представленные примеры являются лишь иллюстративными и их не следует рассматривать, как ограничивающие объем изобретения.

20 Сокращения

Woc	трет-Бутоксикарбонил
ДХМ (англ. DCM)	Дихлорметан
DIC	N,N'-Диизопропилкарбодиимид
DIPEA	Диизопропилэтиламин
DMFA (англ. DMF)	Диметилформаид
DODT	2,2'-(Этилендиокси)диэтантол
Fmoc	9-Флуоренилметоксикарбонил
HBTU	Гексафторфосфат бензотриазолтетраметилурония
HOBT	N-гидроксibenзотриазол

ВЭЖХ (англ. HPLC)	Высокоэффективная жидкостная хроматография
MTBE	Простой метил-трет-бутиловый эфир
OBt	О-Бензотриазол
OtBu	Сложный трет-бутиловый эфир
tBu	трет-бутил
TFA	Трифторуксусная кислота
Trt	Тритил
2-CTC	2-Хлортритилхлорид
HCl	Соляная кислота
NaHCO ₃	Бикарбонат натрия
Na ₂ SO ₄	Сульфат натрия
ТСХ (англ. TLC)	Тонкослойная хроматография
LiOH	Гидроксид лития
мл	миллилитр
Г	грамм
°C	градус Цельсия
Ч	час
мин	минута
ИПС (англ. IPA)	Изопропанол
об.	объем
RT	комнатная температура
ммоль	миллимоль
мас./об.	масса/объем
TIPS	Триизопропилсилан

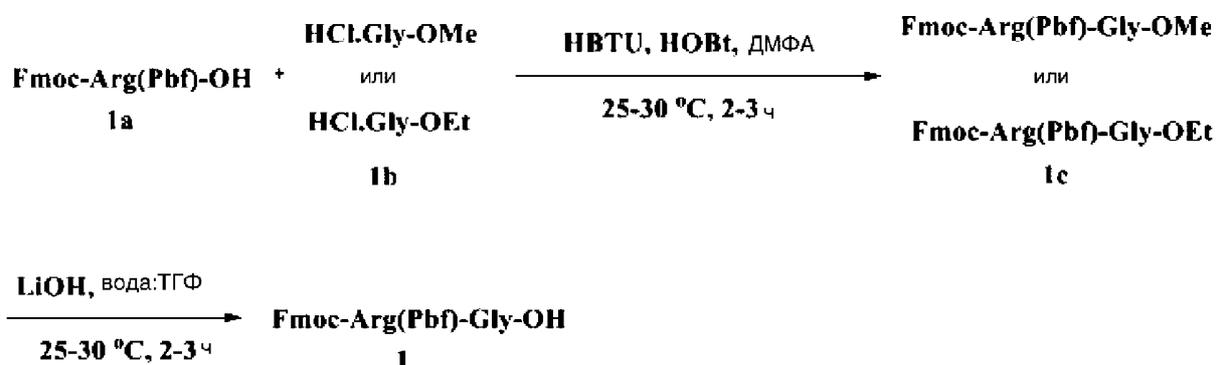
Å Ангстрем
 ВЭЖХ Высокоэффективная
 (англ. жидкостная хроматография
 HPLC)

Пример 1

Синтез лираглутида

Стадия 1: Получение фрагмента (1) Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH

5



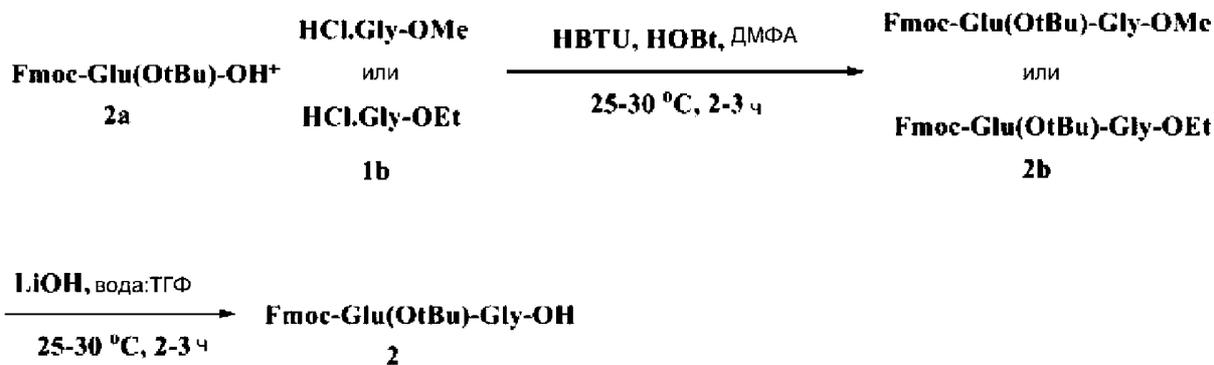
К смеси Fmoc-Arg(Pbf)-OH (1a) (20 ммоль, 12,96 г), HBTU (30 ммоль, 11,38 г) и HOBT (30 ммоль, 4,6 г), растворенных в 100 мл ДМФА, добавляли DIPEA (40 ммоль, 7,0 мл). Смесь перемешивали в течение 5 мин при комнатной температуре и добавляли гидрохлорид глицинметилового эфира или гидрохлорид глицинэтилового эфира (1b) (40 ммоль, 5,6 г). Реакционную массу перемешивали в течение еще от 2 до 3 ч. Ход реакции контролировали методом ТСХ. Затем реакцию гасили добавлением 60 мл воды и экстрагировали этилацетатом. Объединенную органическую фазу промывали водным 0,5N раствором HCl, водным солевым раствором, содержащим 5% NaHCO₃, сушили над Na₂SO₄, концентрировали, очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии и получали Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OMe или Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OEt (1c) (12,5 г, 86%).

К раствору Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OMe или Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OEt (1c) (12,5 г) в смеси ТГФ:вода (4:1) (200 мл) при температуре 0°C в течение 10 мин небольшими порциями добавляли раствор LiOH·H₂O (1,58 г, 38 ммоль) в 40 мл воды. После перемешивания при температуре 0°C в течение еще 40 мин величину pH реакционной массы доводили до 3–4

20

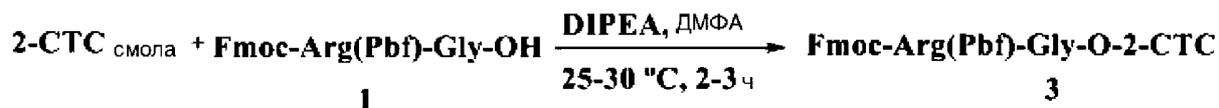
добавлением 2,5% (мас./об.) раствора лимонной кислоты и экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои промывали солевым раствором, сушили над Na_2SO_4 , концентрировали, очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии и получали фрагмент (1) Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH в виде твердого вещества белого цвета (8,5 г, 71%).

5 Стадия 2: Получение фрагмента (2) Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH



К смеси Fmoc-Glu(OtBu)-OH (**2a**) (20 ммоль, 8,5 г), HBTU (30 ммоль, 11,38 г) и HOBT (30 ммоль, 4,6 г), растворенных в 100 мл ДМФА, добавляли DIPEA (40 ммоль, 7,0 мл).
 10 Смесь перемешивали в течение 5 мин при комнатной температуре и добавляли HCl·Gly-OMe или HCl·Gly-OEt (**1b**) (40 ммоль, 5,6 г). Реакционную массу перемешивали в течение еще от 2 до 3 ч. Ход реакции контролировали методом ТСХ. Затем реакцию гасили добавлением 60 мл воды и экстрагировали этилацетатом. Объединенную органическую фазу промывали водным 0,5N раствором HCl, водным солевым раствором, содержащим
 15 5% NaHCO_3 , сушили над Na_2SO_4 , концентрировали, очищали с помощью колоночной флэш-хроматографии и получали Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OMe или Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OEt (**2b**) (8,0 г, 89%).

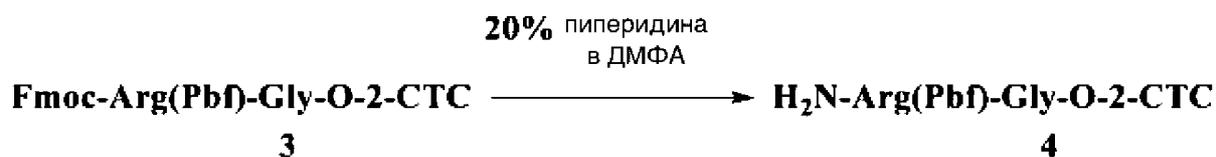
К раствору Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OMe или Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OEt (**2b**) (8,0 г) в смеси ТГФ:вода (4:1) (200 мл) при температуре 0°C в течение 10 мин небольшими
 20 порциями добавляли раствор $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1,58 г, 38 ммоль) в 40 мл воды. После перемешивания при температуре 0°C в течение еще 40 мин величину pH реакционной массы доводили до 3-4 добавлением 2,5% (мас./об.) раствора лимонной кислоты и экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические слои промывали солевым раствором, сушили над Na_2SO_4 , концентрировали, очищали с помощью колоночной
 25 флэш-хроматографии и получали Fmoc-Glu(tBu)-Gly-OH (**2**) в виде твердого вещества белого цвета (5,6 г, 70%).

Стадия 3: Закрепление фрагмента (1) на смоле

5 Смолу (50 г, со степенью замещения 1,0 ммоль/г смолы) помещали в колбу для пептидного синтеза и дважды промывали дихлорметаном (500 мл, 10 об.). Смолу суспендировали в дихлорметане (ДХМ) (500 мл, 10 об.) без перемешивания в течение 30 мин. В смолу добавляли прозрачную смесь Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH (1) (2,0 экв.), DIPEA (3,0 экв.) и ДМФА (500 мл, 10 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабом взбалтывании при температуре от 25 до 30°C в течение 2 ч. Затем
 10 реакционную массу дренировали и смолу промывали ДМФА (3 x 10 об.) и ДХМ (3 x 10 об.). В смолу добавляли смесь 10% DIPEA в метаноле. Суспензию перемешивали в течение 30 мин и дренировали. Смолу промывали ДМФА (5 x 10 об.). В результате получали фрагмент (3) Fmoc-смолы.

Стадия 4: Получение незащищенного фрагмента (4)

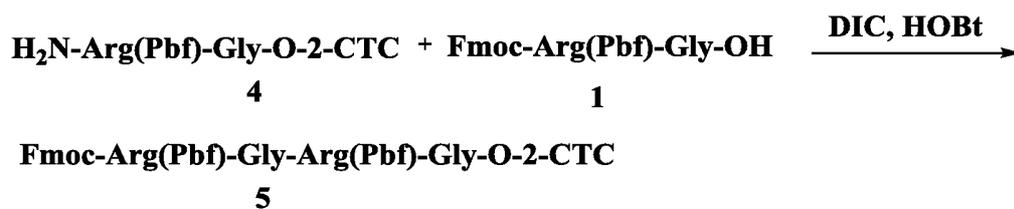
15



К фрагменту (3) Fmoc-смолы добавляли прозрачную смесь 20% пиперидина в ДМФА, порция-1 (10 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабом взбалтывании при температуре от 25 до 30°C в течение 10 мин.
 20 Растворитель дренировали и в смолу добавляли прозрачную смесь 20% пиперидина в ДМФА, порция-2 (10 об.). Суспензию перемешивали при температуре от 25 до 30°C в течение 10 мин. Растворитель дренировали, смолу промывали ДМФА (2 x 10 об.), ИПС (1 x 10 об.) и ДМФА (2 x 10 об.). Завершение удаления Fmoc-защитной группы с получением незащищенного фрагмента (4) подтверждали цветным тестом Кайзера.

25

Стадия 5: получение фрагмента (5) Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-CTC



5 Прозрачную смесь Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH (1) (2,0 экв.), N,N-диизопропилкарбодиимида (DIC) (2,0 экв.) и 1-гидроксibenзотриазола (HOBT) (2,0 экв.) в ДМФА (10 об.) соединяли с незащищенным фрагментом (4). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабым взбалтывании при температуре от 25 до 30°C в течение 2 ч. Ход реакции контролировали цветным тестом Кайзера. После завершения реакции реакционный растворитель дренировали и смолу промывали ДМФА (4 x 10 об.).

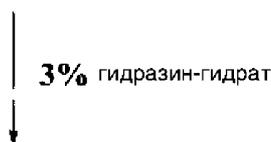
10 Стадия 6: Последовательное связывание других Fmoc-защищенных аминокислот (6)

15 В смолу добавляли прозрачную смесь Fmoc-защищенной аминокислоты [Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH, Fmoc-Ala-OH и Boc-His(Trt)-OH] (2,0 экв.), N,N-диизопропилкарбодиимида (DIC) (2,0 экв.) и 1-гидроксibenзотриазола (HOBT) (2,0 экв.) в ДМФА (10 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабым взбалтывании при температуре от 20 до 45 до 55°C в течение от 20 до 45 мин. Ход реакции контролировали цветным тестом Кайзера. После завершения реакции реакционный растворитель дренировали и смолу промывали ДМФА (4 x 10 об.).

Для снятия защиты со всех указанных выше аминокислотных фрагментов применяли способ, использованный на стадии 4 для удаления Fmoc-защитной группы.

25 Стадия 7: Получение фрагмента (7) смолы без защитной группы N-[1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)этил] (Dde)

**Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-
Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys(Dde)-
Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O-2-CTC**



**Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-
Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys(NH₂)-
Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O-2-CTC**

7

К фрагменту (6) смолы добавляли прозрачную смесь 3% раствора гидразин-гидрата в ДМФА, порция-1 (10 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабом взбалтывании при температуре от 25 до 30°C в течение 10 мин. Растворитель дренировали и в смолу добавляли прозрачную смесь 3% гидразин-гидрата в ДМФА, порция-2 (10 об.). Суспензию перемешивали при температуре от 25 до 30°C в течение 10 мин. Растворитель дренировали, смолу промывали ДМФА (2 x 10 об.), ИПС (1 x 10 об.) и ДМФА (2 x 10 об.). Завершение удаления Dde-защитной группы подтверждали цветным тестом Кайзера.

10 Стадия 8: Связывание Fmoc-Glu-OtBu и пальмитиновой кислоты

**Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-
Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys(NH₂)-
Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O-2-CTC**



**Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-
Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys(Glu-OtBu-
пальмитоил)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-
O-2-CTC**

8

Стадия (8a): Связывание Fmoc-Glu-OtBu

В смолу добавляли прозрачную смесь Fmoc-Glu-OtBu (2,0 экв.), N,N-диизопропилкарбодиимида (DIC) (2,0 экв.) и 1-гидроксибензотриазола (HOBT) (2,0 экв.) в ДМФА (10 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабым взбалтывании при температуре от 45 до 55°C в течение 30 мин. Ход реакции контролировали цветным тестом Кайзера. После завершения реакции реакционный растворитель дренировали и смолу промывали ДМФА (4 x 10 об.).

Стадия (8b): Удаление Fmoc-защитной группы

В смолу добавляли прозрачную смесь 20% пиперидина в ДМФА, порция-1 (10 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабым взбалтывании при температуре от 25 до 30°C в течение 10 мин. Растворитель дренировали и в смолу добавляли прозрачную смесь 20% пиперидина в ДМФА, порция-2 (10 об.). Суспензию перемешивали при температуре от 25 до 30°C в течение 10 мин. Растворитель дренировали, смолу промывали ДМФА (2 x 10 об.), ИПС (1 x 10 об.) и ДМФА (2 x 10 об.). Завершение удаления Fmoc-защитной группы подтверждали цветным тестом Кайзера.

Стадия (8c): Связывание пальмитиновой кислоты

В смолу добавляли прозрачную смесь пальмитиновой кислоты (2,0 экв.), N,N-диизопропилкарбодиимида (DIC) (2,0 экв.) и 1-гидроксибензотриазола (HOBT) (2,0 экв.) в ДМФА (10 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабым взбалтывании при температуре от 45 до 55°C в течение 30 мин. Ход реакции контролировали цветным тестом Кайзера. После завершения реакции реакционный растворитель дренировали и смолу промывали ДМФА (4 x 10 об.).

Стадия 9: Получение неочищенного лираглутида (9)

Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys(Glu-OtBu-пальмитоил)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O-2-CTC

8



TFA:TIS:DODT:вода

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(Glu-пальмитоил)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH

Неочищенный лираглутид **9**

Защищенный фрагмент (**8**), связанный со смолой 2-CTC, помещали в колбу для пептидного синтеза. Смолу суспендировали в дихлорметане (ДХМ) (10 об.) без перемешивания в течение 10 мин. Затем в смолу добавляли смесь TFA:TIPS:DODT:вода (8,5:0,5:0,5:0,5 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабом взбалтывании при температуре от 25 до 30°C в течение 3,0 ч. Смолу отфильтровывали через фильтр Шотта. Фильтрат добавляли в предварительно охлажденную смесь MTBE при температуре от 0 до 10°C. По окончании добавления реакционную смесь перемешивали в течение 1,0 ч при температуре от 0 до 35°C для осаждения осадка грязно-белого цвета. Выпавший осадок отфильтровывали на воронке Бюхнера и промывали MTBE. Затем отфильтрованный осадок сушили в вакуумном сушильном шкафу при температуре от 35 до 40°C до постоянного веса.

Стадия 10: Очистка неочищенного лираглутида

Стадия (10а): Очистка-1

3,6 г неочищенного D-лираглутида (**9**), полученного в результате общего снятия защиты, растворяли в 300 мл буфера А, величину рН доводили до 8,5–9,5 с помощью ~0,5 мл раствора гидроксида аммония и проводили очистку с соблюдением следующих параметров:

- i) Характеристики колонки: 250 x 50 мм, SS,
- ii) Характеристики среды: C-18 (3-е поколение), 10 мкм, 100 Å или C-18 (3-е поколение), 10 мкм, 120 Å,

iii) Подвижная фаза А: 0,01М бикарбонат аммония, подвижная фаза В: ацетонитрил,

iv) Программа градиента для элюирования материала: от 30 до 45% В, скорость потока: от 50 до 120 мл/мин (линейная скорость потока от 150 до 360 см/ч),

5 v) Критерии объединения: для очистки 2 объединяли фракции, имеющие чистоту по сверхэффективной ЖХ $\geq 85\%$ и максимальное содержание отдельной примеси $\leq 3\%$,

vi) Для дополнительной очистки объединяли фракции, имеющие чистоту по сверхэффективной ЖХ $\leq 85\%$ и $\geq 60\%$.

10 Стадия (10b): Очистка-2

Объединенные фракции, полученные в результате очистки-1, с содержанием пептида 900 мг дополнительно разбавляли равным количеством очищенной воды и проводили дополнительную очистку, придерживаясь следующих параметров:

i) Характеристики колонки: 250 x 50 мм, SS,

15 ii) Характеристики среды: C-18 (3-е поколение), 10 мкм, 100 Å или C-18 (3-е поколение), 10 мкм, 120 Å,

iii) Подвижная фаза А: 0,1% TFA в воде, подвижная фаза В: ацетонитрил,

iv) Программа градиента для элюирования материала: от 30 до 45% В, скорость потока: от 50 до 120 мл/мин (линейная скорость потока от 150 до 360 см/ч),

20 v) Критерии объединения: для очистки 3 объединяли фракции, имеющие чистоту по ВЭЖХ $\geq 96\%$ и максимальное содержание отдельной примеси $\leq 0,5\%$,

vi) Для повторной очистки объединяли фракции, имеющие чистоту по ВЭЖХ $\leq 96\%$ и $\geq 85\%$.

Стадия (10c): Очистка-3

25 Объединенные фракции, полученные в результате очистки-2, с содержанием пептида 1200 мг дополнительно разбавляли равным количеством очищенной воды и проводили повторную очистку, придерживаясь следующих параметров:

i) Характеристики колонки: 250 x 50 мм, SS,

ii) Характеристики среды: C-18 (3-е поколение), 10 мкм, 100 Å или C-18 (3-е поколение), 10 мкм, 120 Å,

iii) Подвижная фаза А: 0,05% раствор гидроксида аммония в воде, подвижная фаза В: ацетонитрил, подвижная фаза С: 3% раствор ацетата аммония в воде, подвижная фаза D: очищенная вода,

iv) Программа градиента для элюирования материала: от 20 до 35% В, скорость потока: от 50 до 120 мл/мин (линейная скорость потока от 150 до 360 см/ч),

v) Критерии объединения: для концентрирования объединяли фракции, имеющие чистоту по ВЭЖХ $\geq 98\%$ и максимальное содержание отдельной примеси $\leq 0,3\%$,

vi) После повторной очистки объединяли фракции, имеющие чистоту по ВЭЖХ $\leq 98\%$ и $\geq 96\%$,

vii) Объединенные фракции, полученные в результате очистки-3, концентрировали и лиофилизировали с получением чистого лираглутида (I) в виде порошка от грязно-белого до белого цвета,

viii) Полученный лираглутид имел чистоту по ВЭЖХ не менее 99,0%, а выход выделенного продукта составлял от 9 до 12%.

Пример 2

Синтез D-лираглутида

D-лираглутид синтезировали следующим способом.

Стадии с 1 по 10: D-лираглутид получали с помощью способа, описанного в Примере 1 для синтеза лираглутида, за исключением того, что фрагмент Fmoc-Ala-OH, использованный на стадии 6, заменяли Fmoc-D-Ala-OH.

Пример 3

Синтез семаглутида

Семаглутид синтезировали следующим способом.

Стадии с 1 по 7: Фрагменты 1–8 получали с помощью способа, описанного в Примере 1 для синтеза лираглутида.

Стадия 8: Связывание Fmoc-PEG2-CH₂-COOH, Fmoc-PEG2-CH₂-COOH, Fmoc-Glu-OtBu и 18-tBu-18-оксооктадекановой кислоты

Связывание проводили постадийно по следующей схеме:

Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys(NH₂)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O-2-CTC

7

1. Fmoc-PEG2-CH₂-COOH
2. Fmoc-PEG2-CH₂-COOH
3. Fmoc-Glu-OtBu
4. 18-tBu-оксооктадекановая кислота

↓

Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys[PEG2-PEG2-Glu-OtBu-18-tBu- оксооктадеканоил]-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O-2-CTC

8

5

Стадия (8a): Связывание Fmoc-PEG2-CH₂-COOH

В смолу добавляли прозрачную смесь Fmoc-PEG2-CH₂-COOH (2,0 экв.), N,N-диизопропилкарбодиимида (DIC) (2,0 экв.) и 1-гидроксibenзотриазола (HOBT) (2,0 экв.) в ДМФА (10 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабом взбалтывании при температуре от 45 до 55°C в течение 30 мин. Ход реакции контролировали цветным тестом Кайзера. После завершения реакции реакционный растворитель дренировали и смолу промывали ДМФА (4 x 10 об.).

Стадия (8b): удаление Fmoc-защитной группы

В смолу добавляли прозрачную смесь 20% пиперидина в ДМФА, порция-1 (10 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабом взбалтывании при температуре от 25 до 30°C в течение 10 мин. Растворитель дренировали и в смолу добавляли прозрачную смесь 20% пиперидина в ДМФА, порция-2 (10 об.). Суспензию перемешивали при температуре от 25 до 30°C в течение 10 мин. Растворитель дренировали, смолу промывали ДМФА (2 x 10 об.), ИПС (1 x 10 об.) и

ДМФА (2 x 10 об.). Завершение удаления Fmoc-защитной группы подтверждали цветным тестом Кайзера.

Стадия (8c): Связывание Fmoc-PEG2-CH₂-COOH

5 В смолу добавляли прозрачную смесь Fmoc-PEG2-CH₂-COOH (2,0 экв.), N,N-диизопропилкарбодиимида (DIC) (2,0 экв.) и 1-гидроксибензотриазола (HOBT) (2,0 экв.) в ДМФА (10 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабом взбалтывании при температуре от 45 до 55°C в течение 30 мин. Ход реакции контролировали цветным тестом Кайзера. После завершения реакции реакционный растворитель дренировали и смолу промывали ДМФА (4 x 10 об.).

10 Стадия (8d): Удаление Fmoc-защитной группы

В смолу добавляли прозрачную смесь 20% пиперидина в ДМФА, порция-1 (10 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабом взбалтывании при температуре от 25 до 30°C в течение 10 мин. Растворитель дренировали и в смолу добавляли прозрачную смесь 20% пиперидина в ДМФА, порция-2
15 (10 об.). Суспензию перемешивали при температуре от 25 до 30°C в течение 10 мин. Растворитель дренировали, смолу промывали ДМФА (2 x 10 об.), ИПС (1 x 10 об.) и ДМФА (2 x 10 об.). Завершение удаления Fmoc-защитной группы подтверждали цветным тестом Кайзера.

Стадия (8e): Связывание Fmoc-Glu-OtBu

20 В смолу добавляли прозрачную смесь Fmoc-Glu-OtBu (2,0 экв.), N,N-диизопропилкарбодиимида (DIC) (2,0 экв.) и 1-гидроксибензотриазола (HOBT) (2,0 экв.) в ДМФА (10 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабом взбалтывании при температуре от 45 до 55°C в течение 30 мин. Ход реакции контролировали цветным тестом Кайзера. После завершения реакции реакционный
25 растворитель дренировали и смолу промывали ДМФА (4 x 10 об.).

Стадия (8f): удаление Fmoc-защитной группы

В смолу добавляли прозрачную смесь 20% пиперидина в ДМФА, порция-1 (10 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабом взбалтывании при температуре от 25 до 30°C в течение 10 мин. Растворитель
30 дренировали и в смолу добавляли прозрачную смесь 20% пиперидина в ДМФА, порция-2 (10 об.). Суспензию перемешивали при температуре от 25 до 30°C в течение 10 мин.

Растворитель дренировали, смолу промывали ДМФА (2 x 10 об.), ИПС (1 x 10 об.) и ДМФА (2 x 10 об.). Завершение удаления Fmoc-защитной группы подтверждали цветным тестом Кайзера.

Стадия (8g): Связывание 18-tBu-18-оксооктадекановой кислоты

5 В смолу добавляли прозрачную смесь 18-tBu-18-оксооктадекановой кислоты (2,0 экв.), N,N-диизопропилкарбодиимида (DIC) (2,0 экв.) и 1-гидроксибензотриазола (HOBT) (2,0 экв.) в ДМФА (10 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабом взбалтывании при температуре от 45 до 55°C в течение 30 мин. Ход реакции контролировали цветным тестом Кайзера. После завершения реакции
10 реакционный растворитель дренировали и смолу промывали ДМФА (4 x 10 об.).

Стадия 9: Получение неочищенного семаглутида (9)

Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys[PEG2-PEG2-Glu-OtBu-18-tBu- оксооктадеканойл]-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O-2-CTC



His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys[PEG2-PEG2-Glu-18- оксооктадеканойл]-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH

Неочищенный семаглутид **9**

Защищенный фрагмент (**8**), связанный со смолой 2-CTC, помещали в колбу для пептидного синтеза. Смолу суспендировали в дихлорметане (ДХМ) (10 об.) без перемешивания в течение 10 мин. В смолу добавляли смесь TFA:TIPS:DODT:вода
15 (8,5:0,5:0,5:0,5 об.). Суспензию осторожно перемешивали при барботировании азотом и слабом взбалтывании при температуре от 25 до 30°C в течение 3,0 ч. Смолу отфильтровывали через фильтр Шотта. Фильтрат добавляли в предварительно охлажденную смесь МТВЕ при температуре от 0 до 10°C. По окончании добавления
20 реакционную смесь перемешивали в течение 1,0 ч при температуре от 0 до 35°C для осаждения семаглутида в виде осадка грязно-белого цвета. Выпавший осадок

отфильтровывали на воронке Бюхнера и промывали МТВЕ. Затем отфильтрованный осадок сушили в вакуумном сушильном шкафу при температуре от 35 до 40°C до постоянного веса.

Пример 4

5 Синтез D-семаглутида

Семаглутид синтезировали следующим способом.

Стадии с 1 по 10: Для получения D-семаглутида использовали способ, описанный в Примере 3 для синтеза семаглутида, за исключением того, что фрагмент Fmoc-Ala-OH, использованный на стадии-6, заменяли Fmoc-D-Ala-OH.

10 Представленные выше примеры являются лишь иллюстративными, и их не следует рассматривать в качестве ограничения объема изобретения. Для специалистов в данной области техники будут очевидны различные изменения и модификации раскрытых вариантов осуществления. Такие изменения и модификации могут быть сделаны без отклонения от объема изобретения.

15 ПРЕИМУЩЕСТВА НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем раскрытии предложены схемы синтеза, подходящие для получения различных агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и их аналогов, включая лираглутид, D-лираглутид, семаглутид и D-семаглутид.

20 В настоящем раскрытии предложены способы получения агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и их аналогов, адаптируемые в качестве экономически жизнеспособных схем.

В настоящем раскрытии предложены способы получения агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и их аналогов, адаптируемые в качестве промышленно масштабируемых схем.

25 В настоящем раскрытии предложены способы получения агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и их аналогов, являющихся по существу чистыми продуктами.

В настоящем раскрытии предложен способ получения агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) и их аналогов, где использование двух

дипептидных фрагментов, т.е. Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH и Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH, способствует уменьшению соответствующих примесей Endo-Gly.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения агонистов рецептора (glp-1) или их аналогов, включающий следующие стадии:

а) закрепление дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле, его кэпирование; и

б) подвергание закрепленного фрагмента многократным циклам последовательного связывания;

где

многократные циклы включают:

с) селективное снятие защиты с аминогруппы и связывание С-конца еще одного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с N-концом закрепленного и незащищенного фрагмента в присутствии связывающего агента,

- селективное снятие защиты с аминогруппы и связывание полученного фрагмента с С-концом следующей N-защищенной аминокислоты в присутствии связывающего агента;

- повторение указанных стадий связывания с получением аминокислотной последовательности требуемого линейного агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) или его аналога, содержащего аминокислотную последовательность требуемого линейного агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) или аналога;

д) удаление защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с Fmoc-Glu-OtBu, длинноцепочечной жирной кислотой с последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с длинноцепочечной жирной кислотой; и отщепление пептида от смолы с получением линейного неочищенного требуемого агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1); и

е) необязательно очистка неочищенного агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1).

2. Способ получения лираглутида, включающий следующие стадии:

а) закрепление дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и его кэпирование;

- b) селективное снятие защиты с аминогруппы закрепленного дипептидного фрагмента;
- c) связывание карбоксильного конца еще одного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с N-концом фрагмента стадии (b) в присутствии связывающего агента;
- d) селективное снятие защиты с аминогруппы фрагмента стадии (c);
- e) связывание карбоксильного конца следующей N-защищенной аминокислоты с фрагментом стадии (d) в присутствии связывающего агента;
- f) повторение стадий d) и e) для образования пептида с соответствующей аминокислотной последовательностью лираглутида;
- g) удаление защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием пептидного фрагмента стадии (f) с Fmoc-Glu-OtBu с последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с пальмитиновой кислотой;
- h) отщепление пептида от смолы с получением линейного неочищенного лираглутида;
- i) необязательно очистка неочищенного лираглутида.

3. Способ получения лираглутида, включающий следующие стадии:

- a) закрепление дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и его кэпирование;
- b) селективное снятие защиты с аминогруппы фрагмента стадии (a);
- c) последовательное связывание дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Ala-OH и Boc-His(Trt)-OH, в присутствии связывающего агента с получением линейного неочищенного лираглутида;
- d) удаление защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием пептидного фрагмента стадии (c) с Fmoc-Glu-OtBu с последующим снятием

Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с пальмитиновой кислотой;

e) отщепление пептида от смолы с получением линейного неочищенного лираглутида; и

f) необязательно очистка неочищенного лираглутида.

4. Способ получения D-лираглутида, включающий следующие стадии:

a) закрепление дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и его кэпирование;

b) селективное снятие защиты с аминогруппы закрепленного дипептидного фрагмента;

c) связывание карбоксильного конца еще одного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с фрагментом стадии (b) в присутствии связывающего агента;

d) селективное снятие защиты с аминогруппы фрагмента стадии (c);

e) связывание карбоксильного конца следующей N-защитенной аминокислоты с фрагментом стадии (d), в присутствии связывающего агента;

f) повторение стадий d) и e) для образования пептида с соответствующей аминокислотной последовательностью D-лираглутида;

g) удаление защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с Fmoc-Glu-OtBu, с последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с пальмитиновой кислотой;

h) отщепление пептида от смолы с получением линейного неочищенного D-лираглутида; и

i) необязательно очистка неочищенного D-лираглутида.

5. Способ получения D-лираглутида, включающий следующие стадии:

a) закрепление дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и его кэпирование;

b) селективное снятие защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

c) последовательное связывание аминокислотных фрагментов, выбранных из фрагментов дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH: Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH: Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-

Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH: Fmoc-D-Ala-OH и Boc-His(Trt)-OH, в присутствии связывающего агента с получением аминокислотной последовательности линейного неочищенного D-лираглутида;

d) удаление защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием N-конца пептида, закрепленного на смоле, с пальмитиновой кислотой;

e) отщепление пептида от смолы с получением линейного неочищенного D-лираглутида; и

f) необязательно очистка неочищенного D-лираглутида.

6. Способ получения семаглутида, включающий следующие стадии:

a) закрепление дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и его кэпирование;

b) селективное снятие защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

c) связывание карбоксильного конца еще одного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с фрагментом стадии (b) в присутствии связывающего агента;

d) селективного снятия защиты с аминогруппы фрагмента стадии (c);

e) связывание карбоксильного конца следующей N-защищенной аминокислоты с фрагментом стадии (d) в присутствии связывающего агента;

f) повторение стадий d) и e) для образования пептидной последовательности с соответствующими аминокислотами последовательности семаглутида;

g) удаление защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с последовательностями Fmoc-PEG2-CH2-COOH, Fmoc-Glu-OtBu, последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием с оксооктадекановой кислотой;

h) отщепление пептида от смолы с получением линейного неочищенного семаглутида; и

i) необязательно очистка неочищенного семаглутида.

7. Способ получения семаглутида, включающий следующие стадии:

j) закрепление дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и его кэпирование;

k) селективное снятие защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

l) последовательное связывание дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-D-Ala-OH и Boc-His(Trt)-OH, в присутствии связывающего агента с получением линейного неочищенного пептида с аминокислотными последовательностями семаглутида;

m) удаление защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с последовательностями Fmoc-PEG2-CH₂-COOH, Fmoc-Glu-OtBu, с последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием с оксооктадекановой кислотой;

n) отщепление пептида от смолы с получением линейного неочищенного семаглутида; и

o) необязательно очистка неочищенного семаглутида.

8. Способ получения D-семаглутида, включающий следующие стадии:

a) закрепление дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и его кэпирование;

b) селективное снятие защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

c) связывание карбоксильного конца еще одного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с фрагментом стадии (b) в присутствии связывающего агента;

d) селективное снятие защиты с аминогруппы фрагмента стадии (c);

e) связывание карбоксильного конца следующей N-защищенной аминокислоты с фрагментом стадии (d), в присутствии связывающего агента;

f) повторение стадий d) и e) для образования пептида с соответствующей аминокислотной последовательностью D-семаглутида;

g) удаление защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с последовательностями Fmoc-PEG2-CH₂-COOH, Fmoc-Glu-OtBu, с последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием с оксооктадекановой кислотой;

h) отщепление пептида от смолы с получением линейного неочищенного D-семаглутида; и

i) необязательно очистка неочищенного D-семаглутида.

9. Способ получения D-семаглутида, включающий следующие стадии:

- a) закрепление дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH на смоле и его кэпирование;
- b) селективное снятие защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;
- c) последовательного связывания фрагментов дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH; дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH с аминокислотными фрагментами Fmoc-D-Ala-OH и Boc-His(Trt)-OH, с получением линейного неочищенного пептида с аминокислотными последовательностями D-семаглутида;
- d) удаление защитной группы боковой цепи лизина с последующим связыванием с последовательностями Fmoc-PEG2-CH₂-COOH, Fmoc-Glu-OtBu, с последующим снятием Fmoc-защиты и связыванием с оксооктадекановой кислотой;
- e) отщепление пептида от смолы с получением линейного неочищенного D-семаглутида; и
- f) необязательно очистка неочищенного D-семаглутида.

10. Способ получения дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH, включающий следующие стадии:

- a) закрепление Fmoc-Arg(Pbf)-OH на смоле и его кэпирование;
- b) селективное снятие защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;
- c) связывание сложного алкилового эфира глицина с фрагментом стадии (b) в присутствии связывающего агента;
- d) отщепление дипептидного фрагмента, полученного на стадии (c), от смолы;
- e) необязательно очистка неочищенного дипептидного фрагмента Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH.

11. Способ получения дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH, включающий в себя стадии:

- a) закрепление Fmoc-Glu(OtBu)-OH на смоле и его кэпирование;
- b) селективное снятие защиты с аминогруппы закрепленного фрагмента;

- c) связывание сложного алкилового эфира глицина с фрагментом стадии (b) в присутствии связывающего агента;
- d) отщепление дипептидного фрагмента, полученного на стадии (c), от смолы;
- e) необязательно очистка неочищенного дипептидного фрагмента Fmoc-Glu(OtBu)-Gly-OH.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов с 1 по 11, где связывающий агент выбран из 1-гидроксибензотриазола (HOBt), N,N-диизопропилкарбодиимида (DIC), гексафторфосфата бензотриазолтетраметилурония (HBTU), N,N-диизопропилэтиламина (DIPEA), гексафторфосфата бензотриазол-1-илокси-трис(диметиламино)фосфония (BOP) и гексафторфосфата O-(7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония (HATU).

13. Способ по любому из предшествующих пунктов с 1 по 11, где растворитель для реакции связывания выбран из диметилформамида (DMFA), пиридина, уксусного ангидрида, метанола, этанола, изопропанола, дихлорэтана, 1,4-диоксана, 2-метилтетрагидрофурана, N-метил-2-пирролидинона (NMP), этилацетата, ацетонитрила и ацетона.

14. Способ очистки агониста рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (glp-1) или его аналога по любому из предшествующих пунктов, при этом способ включает в себя:

- a. подвергание неочищенного агониста рецептора GLP1 или его аналога первой очистке методом ВЭЖХ с подвижной фазой, содержащей бикарбонат аммония и ацетонитрил, при pH от 8,5 до 9,5;

- b. сбор и объединение смешанных фракций стадии (a) и подвергание второй очистке методом ВЭЖХ с элюированием подвижной фазой, содержащей трифторуксусную кислоту и ацетонитрил, при линейном градиенте от 30% B до 45% B;

- c. подвергание фракции, полученной в результате второй очистки методом ВЭЖХ на стадии (b), третьей очистке методом ВЭЖХ с подвижной фазой, содержащей гидроксид аммония, ацетонитрил, ацетат аммония и очищенную воду;

- d. концентрирование фракции, полученной в результате третьей очистки методом ВЭЖХ на стадии (c), и ее лиофилизацию с получением очищенного агониста рецептора GLP-1 или его аналога.

I

Смола 2-СЕС (2-хлортритилхлорид)

↓ DIPEA, ДМФА, Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH
↓ Кэпирование

2-СТС-O-Gly-(Pbf)-Arg-Fmoc

↓ 20% пиперидина в ДМФА

2-СТС-O-Gly-(Pbf)-Arg-NH₂

4

↓ Fmoc-Gly-OH
Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH
Fmoc-L-Val-OH
Fmoc-L-Leu-OH
Fmoc-L-Trp(Boc)-OH
Fmoc-L-Ala-OH
Fmoc-L-Ile-OH
Fmoc-L-Phe-OH
Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH
Fmoc-L-Lys(Dde)-OH
Fmoc-L-Ala-OH
Fmoc-L-Ala-OH
Fmoc-L-Gln(Trt)-OH
Fmoc-Gly-OH
Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH
Fmoc-L-Leu-OH
Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH
Fmoc-L-Ser(tBu)-OH
Fmoc-L-Ser(tBu)-OH
Fmoc-L-Val-OH
Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH
Fmoc-L-Ser(tBu)-OH
Fmoc-L-Thr(tBu)-OH
Fmoc-L-Phe-OH
Fmoc-L-Thr(tBu)-OH
Fmoc-Gly-OH
Fmoc-Glu(OtBu)-OH
Fmoc-L-Ala-OH
Boc-His(Trt)-OH

↓ DC, нов, ДМФА, затем 20% пиперидина в ДМФА

Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys(Dde)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O-2-СТС

6

↓ 3% гидразин-гидрат

Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys(NH₂)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O-2-СТС

7

↓ 1. Fmoc-Glu-OtBu
2. Пальмитиновая кислота

Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys(Glu-OtBu-Пальмитонид)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O-2-СТС

8

↓ TFA:TIS:DODT:вода

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(Glu-Пальмитонид)-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH

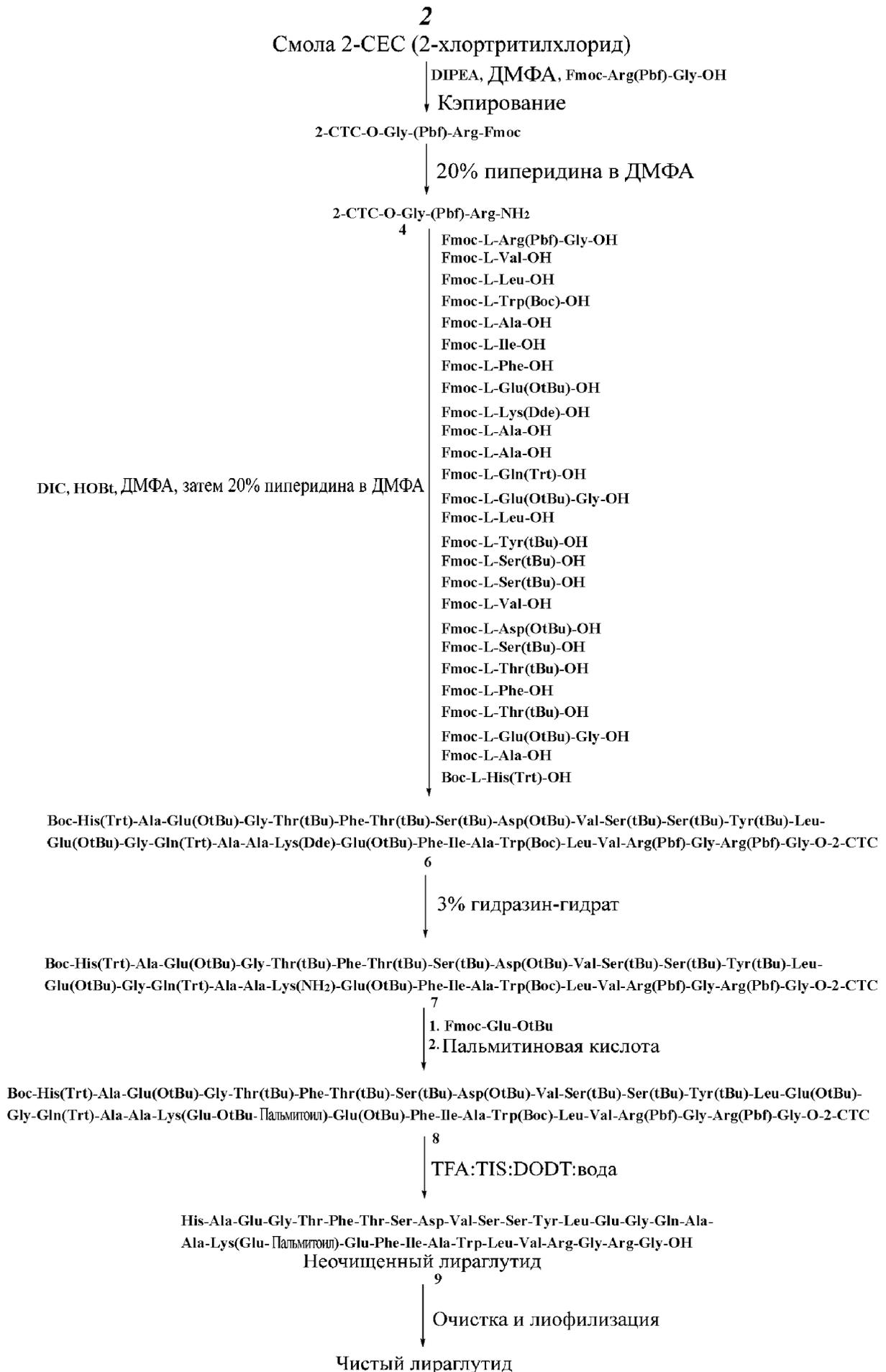
Неочищенный лираглутид

9

↓ Очистка и лиофилизация

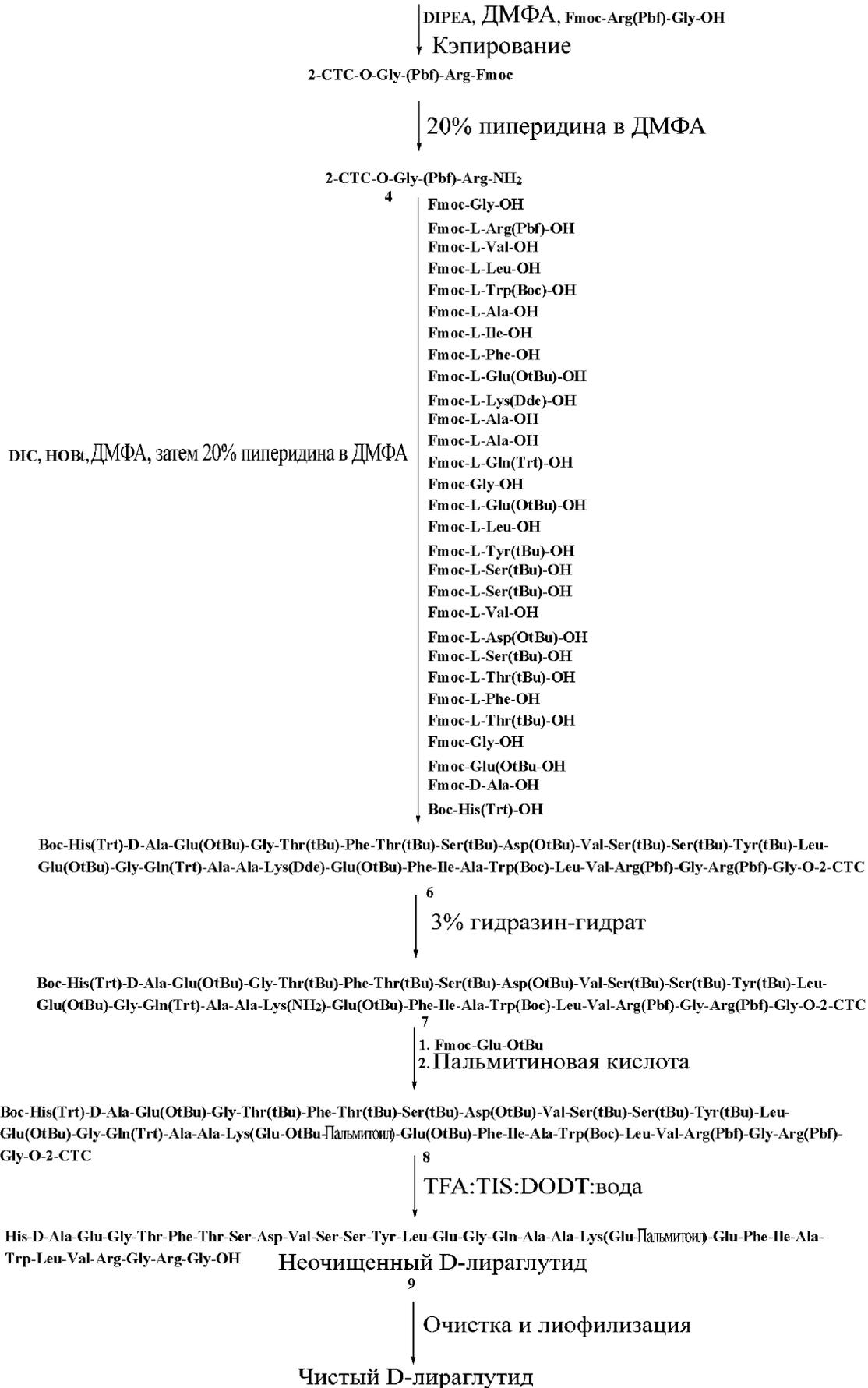
Чистый лираглутид

ФИГ. 1

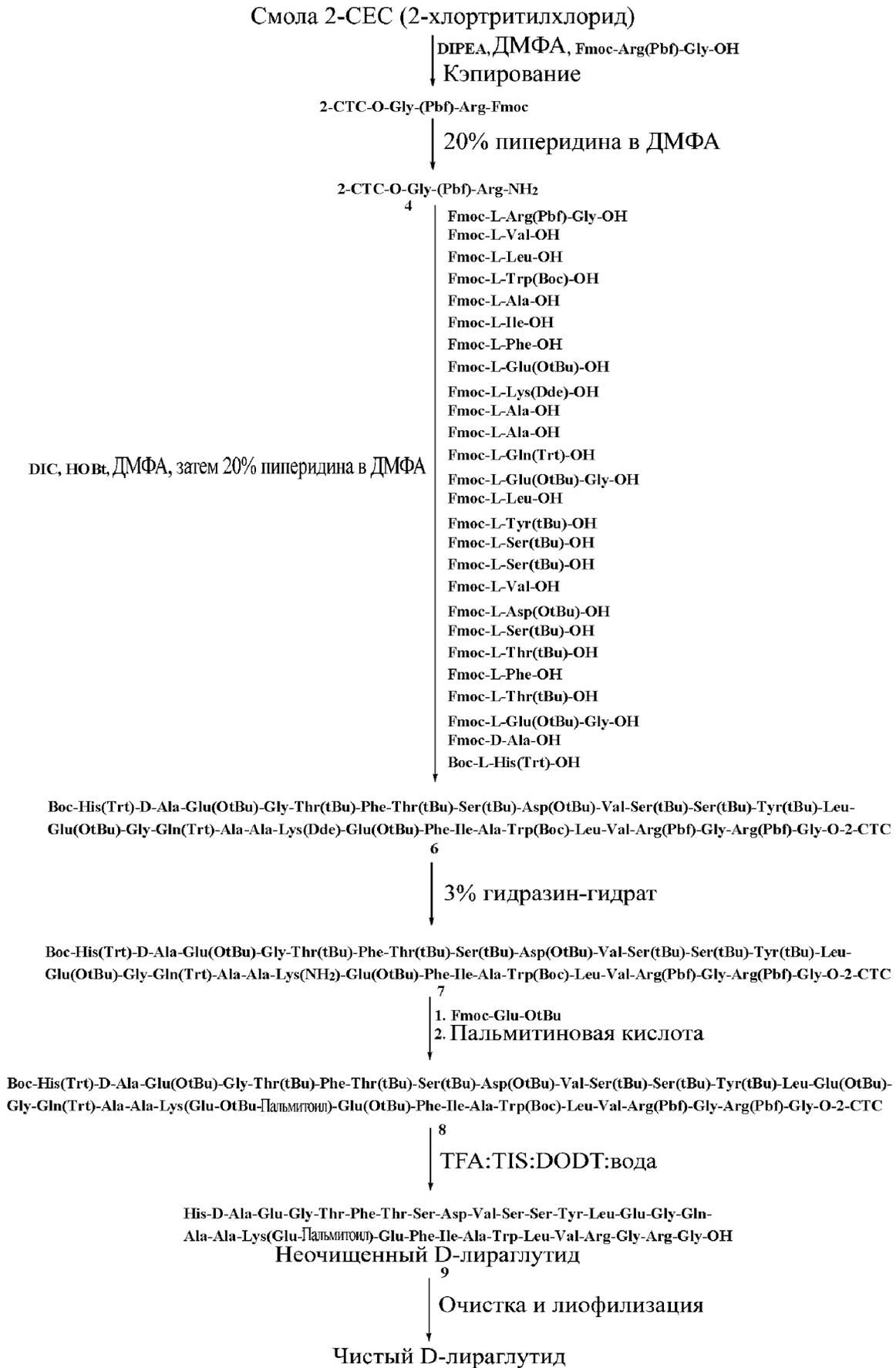


ФИГ. 2

Смола 2-СЕС (2-хлортритилхлорид)

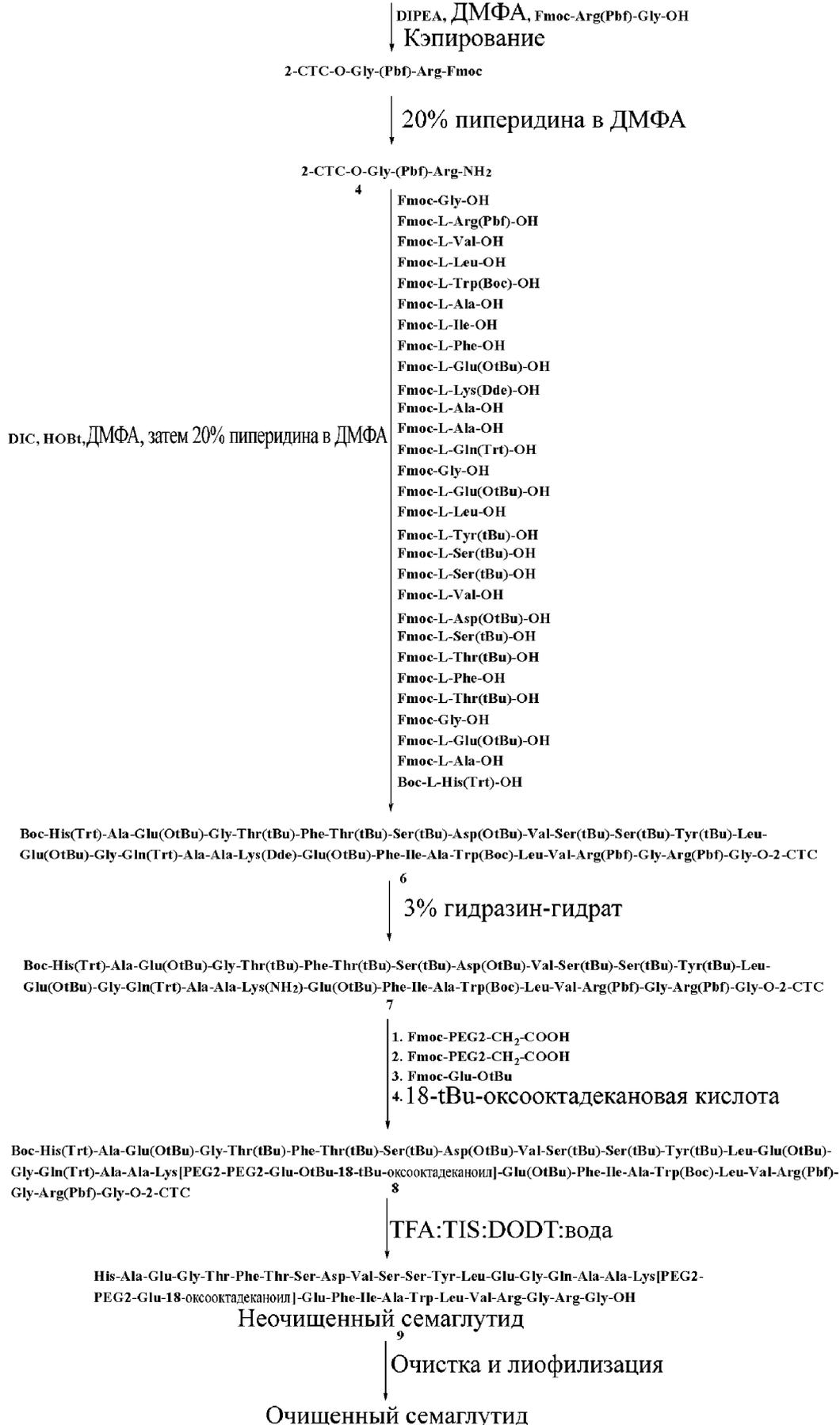


ФИГ. 3



ФИГ. 4

Смола 2-СЕС (2-хлортритилхлорид)



ФИГ. 5

6

Смола 2-СЕС (2-хлортритилхлорид)

↓ DIPEA, ДМФА, Fmoc-Arg(Pbf)-Gly-OH

↓ Кэпирование

2-СТС-O-Gly-(Pbf)-Arg-Fmoc

↓ 20% пиперидина в ДМФА

2-СТС-O-Gly-(Pbf)-Arg-NH₂

4

Fmoc-L-Arg(Pbf)-Gly-OH

Fmoc-L-Val-OH

Fmoc-L-Leu-OH

Fmoc-L-Trp(Boc)-OH

Fmoc-L-Ala-OH

Fmoc-L-Ile-OH

Fmoc-L-Phe-OH

Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH

Fmoc-L-Lys(Dde)-OH

Fmoc-L-Ala-OH

Fmoc-L-Ala-OH

Fmoc-L-Gln(Trt)-OH

Fmoc-L-Glu(OtBu)-Gly-OH

Fmoc-L-Leu-OH

Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH

Fmoc-L-Ser(tBu)-OH

Fmoc-L-Ser(tBu)-OH

Fmoc-L-Val-OH

Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH

Fmoc-L-Ser(tBu)-OH

Fmoc-L-Thr(tBu)-OH

Fmoc-L-Phe-OH

Fmoc-L-Thr(tBu)-OH

Fmoc-L-Glu(OtBu)-Gly-OH

Fmoc-L-Ala-OH

Boc-L-His(Trt)-OH

DIS, HOBT, ДМФА, затем 20% пиперидина в ДМФА

Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys(Dde)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O-2-СТС

6

↓ 3% гидразин-гидрат

Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys(NH₂)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O-2-СТС

7

1. Fmoc-PEG2-CH₂-COOH

2. Fmoc-PEG2-CH₂-COOH

3. Fmoc-Glu-OtBu

4. 18-tBu-оксооктадекановая кислота

Boc-His(Trt)-Ala-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln(Trt)-Ala-Ala-Lys[PEG2-PEG2-Glu-OtBu-18-tBu-оксооктадеканонил]-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp(Boc)-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-O-2-СТС

8

↓ TFA:TIS:DODT:вода

His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys[PEG2-PEG2-Glu-18-оксооктадеканонил]-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-OH

Неочищенный семаглутид

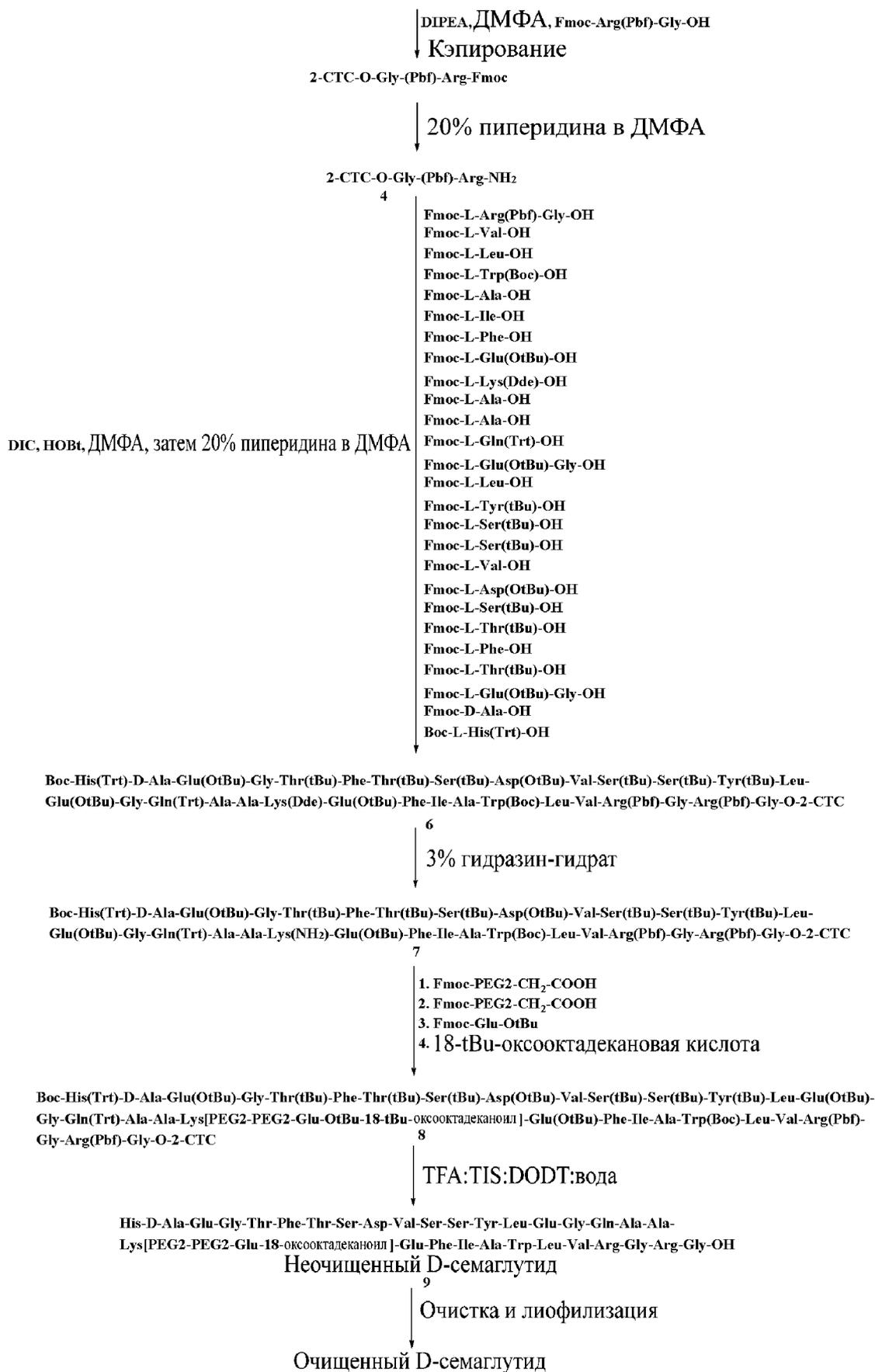
9

↓ Очистка и лиофилизация

Очищенный семаглутид

ФИГ. 6

Смола 2-СЕС (2-хлортритилхлорид)



ФИГ. 7

Смола 2-СЕС (2-хлортритилхлорид)

