

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293391** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.02.01

(51) Int. Cl. *C07K 1/00* (2006.01)
C07K 5/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.06.11

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДВОЙНОГО АГОНИСТА GLP-1/ГЛЮКАГОНА**

(31) **63/038,363**

(32) **2020.06.12**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/036914**

(87) **WO 2021/252829 2021.12.16**

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

**Коберски Майкл Эдвард, Копач
Майкл Юджин (US)**

(74) Представитель:

**Гизатуллин Ш.Ф., Гизатулина Е.М.,
Угрюмов В.М., Костюшенкова М.Ю.,
Джермакян Р.В., Строчкова О.В. (RU)**

(57) В настоящем изобретении предложены способы и соединения для получения соединений-коагонистов глюкагона и GLP-1, которые пригодны для лечения диабета 2 типа, ожирения, неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) и/или неалкогольного стеатогепатита (NASH).

202293391
A1

202293391
A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДВОЙНОГО АГОНИСТА GLP-1/ГЛЮКАГОНА

В настоящем изобретении предложены способы получения пептида-двойного агониста глюкагона (Gcg) и GLP-1 или его фармацевтически приемлемой соли.

5 Последние несколько десятилетий продолжается рост заболеваемости диабетом. Сахарный диабет 2 типа (T2D) является наиболее распространенной формой диабета, составляющей примерно 90% всего диабета. T2D характеризуется высоким уровнем глюкозы в крови, вызванным резистентностью к инсулину. Неконтролируемый диабет приводит к нескольким состояниям, которые влияют на заболеваемость и смертность

10 пациентов. Главной причиной смерти пациентов с диабетом являются сердечно-сосудистые осложнения. Одним из основных факторов риска развития диабета типа 2 является ожирение. Большинство пациентов с T2D (~ 90%) имеют избыточный вес или ожирение. Задokumentировано, что снижение отложений жира в теле приводит к

15 улучшению связанных с ожирением сопутствующих заболеваний, включая гипергликемию и осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы. Таким образом, для лучшего управления течением заболевания необходимы терапевтические средства, эффективные с точки зрения контроля уровня глюкозы и снижения веса.

 Gcg помогает поддерживать уровень глюкозы в крови путем связывания с рецепторами Gcg на гепатоцитах, вызывая выделение печенью глюкозы, запасенной в

20 виде гликогена, посредством гликогенолиза. По мере того, как эти запасы истощаются, Gcg стимулирует печень синтезировать дополнительную глюкозу по механизму глюконеогенеза. Эта глюкоза высвобождается в кровоток, предотвращая развитие гипогликемии.

 GLP-1 имеет другие виды биологической активности по сравнению с Gcg.

25 Действия GLP-1 включают стимуляцию синтеза и секреции инсулина, ингибирование секреции Gcg и подавление потребления пищи. Было показано, что GLP-1 снижает гипергликемию у диабетиков. Несколько агонистов GLP-1 были одобрены для применения в лечении T2D у людей, включая экзенатид, лираглутид, ликсисенатид, альбиглутид и дулаглутид. Такие агонисты GLP-1 эффективны при гликемическом

30 контроле с благоприятным воздействием на вес без риска гипогликемии. Однако потеря веса является умеренной из-за зависимых от дозы побочных эффектов желудочно-кишечного тракта.

Пептиды-двойные агонисты Gcg и GLP-1, которые могут быть пригодны для лечения T2D и ожирения, описаны и заявлены в патенте США № 9938335 B2. В этом документе описан способ получения таких пептидов-двойных агонистов Gcg и GLP-1.

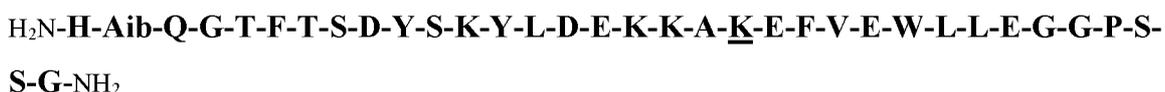
Однако сохраняется потребность в улучшенных способах получения пептидов-двойных агонистов Gcg и GLP-1, в способах, сочетающих различные преимущества, включая необходимую для промышленного применения чистоту. Точно так же существует потребность в эффективных и экологически безопасных способах, включающих стабильные соединения для получения пептидов-двойных агонистов Gcg и GLP-1, с меньшим количеством или с более простыми этапами очистки.

Крупномасштабное, изящное с фармацевтической точки зрения получение пептидов-двойных агонистов Gcg и GLP-1 связано с рядом технических трудностей, которые могут повлиять на общий выход и чистоту. Также существует потребность в способах, позволяющих избежать применения жестких условий реакции, несовместимых с синтезом пептидов.

Настоящее изобретение направлено на удовлетворение этих потребностей путем обеспечения новых способов, пригодных для производства пептида-двойного агониста Gcg и GLP-1 (SEQ ID NO:1) или его фармацевтически приемлемой соли. Усовершенствованные способы производства согласно настоящему изобретению обеспечивают соединения и технологические реакции, воплощающие комбинацию преимуществ, включая эффективный путь, имеющий меньшее количество этапов, при сохранении высокого качества и чистоты. Важно отметить, что предложенные улучшенные способы и соединения снижают ресурсоемкость.

Усовершенствованные способы, описанные в настоящем документе, обеспечивают получение различных соединений, пригодных для получения пептида-двойного агониста Gcg и GLP-1.

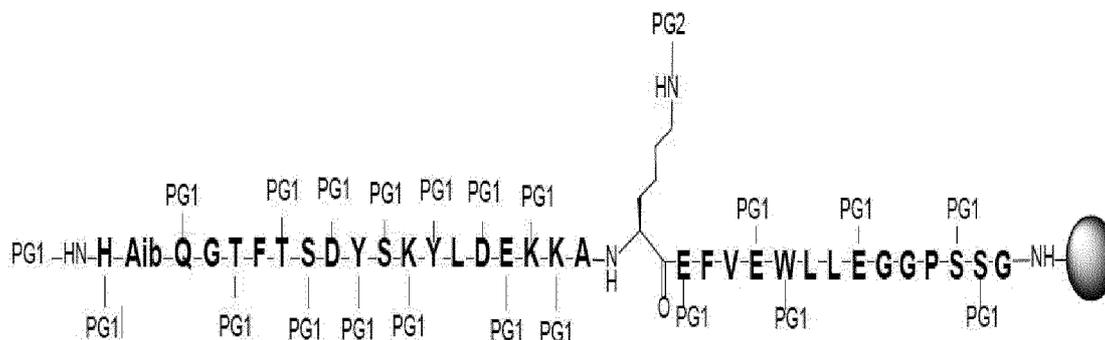
В частности, предложен способ получения соединения следующей формулы:



где лизин (Lys/K) в положении 20 химически модифицирован конъюгацией ипсилон-аминогруппы боковой цепи лизина с $([2-(2\text{-аминоэтокси})\text{этокси}]\text{ацетил})_2-(\gamma\text{-Glu})\text{-CO-(CH}_2\text{)}_{18}\text{CO}_2\text{H}$ (SEQ ID NO: 1),

и при этом указанный способ включает этапы:

- (i) твердофазного синтеза соединения следующей формулы:



5

где PG1 представляет собой устойчивую к основаниям защитную группу боковой цепи,

причем Thr в положении 5 необязательно защищен группой PG1,

и при этом PG2 представляет собой защитную группу боковой цепи ivDde, Dde или Alloc (SEQ ID NO: 2);

10

- (ii) селективного ацилирования по Lys в положении 20 (SEQ ID NO: 7) посредством селективного снятия защиты с указанного лизина и осуществления сочетания полученного Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 5) с ^tBuO-C₂₀-γGlu(^tBu)-AEEA-AEEA-OH;

- (iii) отщепления полученного соединения от твердой подложки и удаления устойчивых к основаниям защитных групп боковой цепи; и

15

- (iv) очистки соединения (SEQ ID NO: 1).

Обычно получение пептидного соединения, в котором боковая цепь (например, боковая цепь жирной кислоты) построена посредством отдельного поэтапного связывания, приводит к образованию существенного количества побочных продуктов присоединения и делеций. Это приводит к неблагоприятному профилю чистоты, что затрудняет очистку интересующего пептидного соединения. Кроме того, если спейсеры AEEA являются частью боковой цепи, построенной обычными способами, типичны низкие выходы.

20

Селективное снятие защиты с Lys в положении 20 и последующая реакция ацилирования с пептидом 1-34 Lys-20-NH₂ со снятой защитой протекает на остоле смолы (SEQ ID NO: 4), связанном с боковой цепью ^tBuO-C₂₀-γGlu(^tBu)-AEEA-AEEA-OH в виде неизменного фрагмента. Это является новым способом сочетания крупных фрагментов на

25

смоле. Такой подход обеспечивает эффективный и надежный способ ацилирования пептида или белка, при котором соединения получают с высоким выходом. Ацилирование по лизину в определенном положении происходит с селективностью >99% и минимальным содержанием примесей. Селективное снятие защиты и последующее сочетание обеспечивает благоприятный профиль примесей для реакции ацилирования. Кроме того, улучшенный процесс ацилирования облегчает очистку и выделение требуемого ацилированного пептидного продукта, что приводит к более высокому выходу и чистоте.

Селективное снятие защиты по Lys в положении 20 облегчается посредством использования защитной группы боковой цепи ivDde, Dde или Alloc в положении 20 и защитных групп боковой цепи, устойчивых к основаниям, в других положениях. Выбирают такие условия снятия защиты, при которых удаляется защитная группа боковой цепи ivDde, Dde или Alloc в положении 20, но защитные группы боковой цепи, устойчивые к основаниями (PG1) остаются на месте.

В данной области техники известно множество устойчивых к основаниям защитных групп, которые могут быть использованы в способе согласно настоящему изобретению. В одном варианте реализации настоящего изобретения защитные группы боковой цепи PG1, устойчивые к основаниями, используемые для синтеза предложенного соединения, представляют собой (a) трет-бутилоксикарбонил (Boc) для Trp и Lys, (b) трет-бутиловый эфир (O^tBu) для Asp и Glu, (c) трет-бутил (^tBu) для Ser, Thr и Tyr, (d) трифенилметил (тритил) (Trt) для Gln, и (e) Boc(Boc) или Boc(Dnp) для His.

В предпочтительном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению защитная группа боковой цепи по Lys в положении 20 представляет собой ivDde.

В альтернативном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению защитная группа боковой цепи по Lys в положении 20 представляет собой Dde.

Dde представляет собой защитную группу, устойчивую к большинству обычных оснований и, таким образом, устойчивую к условиям удаления группы Fmoc. ivDde представляет собой производное Dde и также является устойчивым к условиям удаления группы Fmoc. Дополнительным преимуществом ivDde является то, что его стерическая затрудненность обуславливает его меньшую склонность к миграции к другим свободным остаткам Lys. Как Dde, так и ivDde обычно удаляют гидразином.

Предпочтительно, если PG2 представляет собой ivDde или Dde, то Lys в положении 20 подвергают селективному снятию защиты посредством приведения в контакт данного соединения с раствором, содержащим гидразингидрат.

5 Более предпочтительно, указанный раствор содержит 1% - 15% мас./мас. гидразингидрата в ДМФА, NMP, NBP или ДМСО.

Еще более предпочтительно, указанный раствор содержит 8% мас./мас. гидразингидрата в ДМФА.

В альтернативном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению защитная группа боковой цепи по Lys в положении 20 представляет собой Alloc.

10 Alloc представляет собой неустойчивую к основаниям защитную группу. Обычно ее удаляют на палладиевом катализаторе в присутствии поглотителя для улавливания образовавшегося карбокатиона. Использование защитной группы боковой цепи Alloc совместимо со стратегиями Boc/Bn и Fmoc/^tBu и позволяет проводить тандемные реакции удаления-ацилирования, когда деблокирование аминокруппы на палладиевом
15 катализаторе проводят в присутствии ацилирующих агентов. Такой подход предотвращает образование дикетопиперазина (DKP).

Предпочтительно, если защитная группа боковой цепи по Lys в положении 20 представляет собой Alloc, то Lys в положении 20 подвергают селективному снятию защиты посредством приведения в контакт данного соединения с палладиевым
20 катализатором в присутствии поглотителей.

Более предпочтительно, защитную группу боковой цепи Alloc по Lys в указанном положении удаляют посредством приведения в контакт данного соединения с Pd(PPh₃)₄ в присутствии H₃N•BH₃, Me₂NH•BH₃ или PhSiH₃.

25 Соединение со снятой защитой (в положении 20) можно подвергать промыванию, устранению набухания, выделению, сушке и упаковке. Соединение со снятой защитой (в положении 20) подвергают повторному набуханию перед связыванием с боковой цепью.

В предпочтительном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению PG1 представляет собой Boc для Trp и Lys, O^tBu для Asp и Glu, ^tBu для Ser, Thr и Tyr, Trt для Gln и Boc(Boc) для His, PG2 представляет собой ivDde, и твердофазный
30 синтез соединения (SEQ ID NO: 3) на этапе (i) осуществляют на твердой подложке из Fmoc-амидной смолы, и он включает снятие Fmoc-защиты с амидной смолы и последовательное осуществление сочетания следующих групп:

Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH, Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Tyr(^tBu)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-L-Tyr(^tBu)-OH, Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH, Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-L-Thr(^tBu)-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-Gly-Thr($\psi^{Me,Me}Pro$)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Aib-OH; и Boc-L-His(Boc)-OH.

10

В альтернативном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению PG1 представляет собой Boc(Dnp) для His, и твердофазный синтез соединения на этапе (i) проводят так, как описано выше.

15

Твердофазный синтез соединения проводят на твердой подложке из Fmoc-амидной смолы, причем первый этап представляет собой снятие Fmoc-защиты с амидной смолы с последующим последовательным сочетанием Fmoc-аминокислот пептида. Для сочетания в положениях 4 и 5 вместо отдельных аминокислот Fmoc-L-Gly и Fmoc-L-Thr используют глицин-треониновый псевдопролиновый дипептид. В таких вариантах реализации остаток Thr в положении 5 обратимо защищен пролиноподобным оксазолидином, неустойчивым к кислотам. Таким образом, нет необходимости в защите данного конкретного остатка Thr с помощью PG1. Существенное преимущество реализуется в том, что реакция протекает до завершения в отношении глицин-треонинового псевдопролинового дипептида. Напротив, связывание отдельных аминокислот Fmoc-L-Gly и Fmoc-L-Thr приводит к высокому содержанию пептидных примесей с делецией Thr5.

20

В альтернативном предпочтительном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению PG1 представляет собой Boc для Trp и Lys, O^tBu для Asp и Glu, ^tBu для Ser, Thr и Tyr, Trt для Gln, и Boc(Dnp) для His, PG2 представляет собой ivDde, и твердофазный синтез соединения (SEQ ID NO: 4) на этапе (i) осуществляют на твердой подложке из Fmoc-амидной смолы, и он включает снятие Fmoc-защиты с амидной смолы и последовательное осуществление сочетания следующих групп:

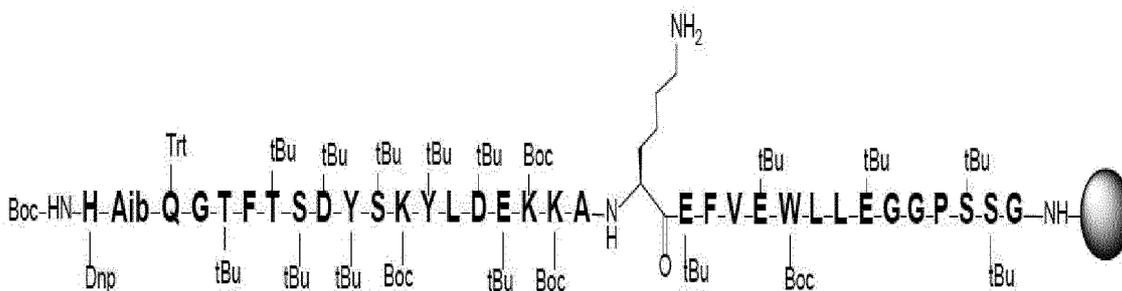
30

Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Leu-

OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Phe-OH,
 Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-
 OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH, Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH, Fmoc-L-
 Leu-OH, Fmoc-L-Tyr(^tBu)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-L-
 5 Tyr(^tBu)-OH, Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH, Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-L-Thr(^tBu)-OH,
 Fmoc-L-Phe-OH, и Boc-His(Dnp)-Aib-Gln(Trt)-Gly-Thr(^tBu)-OH.

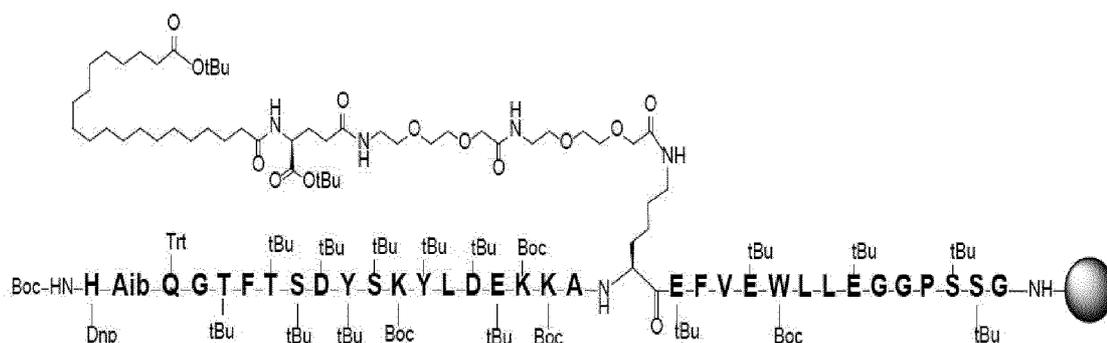
Твердофазный синтез соединения проводят на твердой подложке из Fmoc-амидной
 смолы, причем первый этап представляет собой снятие Fmoc-защиты с амидной смолы с
 10 последующим последовательным сочетанием Fmoc-аминокислот пептида. Пентамер Boc-
 His(Dnp)-Aib-Gln(Trt)-Gly-Thr(^tBu)-OH (SEQ ID NO: 14) связывают в виде единого
 фрагмента с Pheб в промежуточном соединении H₂N-6-34 (SEQ ID NO: 10).
 Существенным преимуществом такого предпочтительного варианта реализации является
 повышенная чистота благодаря минимизации рацемизации гистидина.

15 Соединение, соответствующее SEQ ID NO: 4, может быть подвержено
 селективному снятию защиты по лизину в положении 20, как описано в настоящем
 документе. Полученное соединение имеет следующую формулу (SEQ ID NO: 18):



20

Соединение, соответствующее SEQ ID NO: 18, может быть связано с боковой
 цепью ^tBuO-C₂₀-γGlu(^tBu)-AEEA-AEEA-OH в виде неизменного фрагмента, как описано в
 настоящем документе. Полученное соединение имеет следующую формулу (SEQ ID NO:
 19):



В другом альтернативном предпочтительном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению PG1 представляет собой: (a) Boc для Trp и Lys, (b) OtBu для Asp и Glu, (c) tBu для Ser, Thr и Tyr, (d) Trt для Gln, и (e) Boc(Dnp) для His, PG2 представляет собой ivDde, и твердофазный синтез соединения (SEQ ID NO: 4) на этапе (i) осуществляют на твердой подложке из Fmoc-амидной смолы, и он включает снятие Fmoc-защиты с амидной смолы и последовательное осуществление сочетания следующих групп:

10

Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-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; и Boc-His(Dnp)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH.

20

Твердофазный синтез соединения проводят на твердой подложке из Fmoc-амидной смолы, причем первый этап представляет собой снятие Fmoc-защиты с амидной смолы с последующим последовательным сочетанием Fmoc-аминокислот пептида. Тетрамер Boc-His(Dnp)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH (SEQ ID NO: 16) связывают в виде единого фрагмента с Thr5 в промежуточном соединении 2HN-5-34 (SEQ ID NO: 12). Существенным преимуществом такого предпочтительного варианта реализации является повышенная чистота благодаря минимизации рацемизации гистидина.

25

Соединение, соответствующее SEQ ID NO: 4, может быть подвержено селективному снятию защиты по лизину в положении 20, как описано в настоящем документе. Полученное соединение имеет формулу SEQ ID NO: 18.

5 Соединение, соответствующее SEQ ID NO: 18, может быть связано с боковой цепью ${}^t\text{BuO-C}_{20}\text{-}\gamma\text{Glu}({}^t\text{Bu})\text{-AEEA-AEEA-OH}$ в виде неизменного фрагмента, как описано в настоящем документе. Полученное соединение имеет формулу SEQ ID NO: 19.

10 В предпочтительном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению твердая подложка на основе смолы представляет собой твердую подложку из Fmoc-амидной смолы, и твердофазный синтез включает снятие Fmoc-защиты с указанной смолы.

Более предпочтительно, твердая подложка из Fmoc-амидной смолы представляет собой смолу Зибера.

15 В одном варианте реализации настоящего изобретения этап (iii) дополнительно включает доведение pH раствора, содержащего отщепленное и лишенное защиты соединение, до 7,0 – 8,0, перемешивание в течение 1-24 часов, последующее доведение pH раствора до 1,0 – 3,0 и перемешивание в течение 1-24 часов.

Доведение pH до 7,0 – 8,0 нейтрализует раствор и превращает любые депсипептидные сложнэфирные примеси серина и треонина в требуемое соединение.

20 Следующее изменение pH до 1,0 – 3,0 обеспечивает декарбоксилирование остатка Trp и превращение соли Trp CO₂ в требуемый продукт.

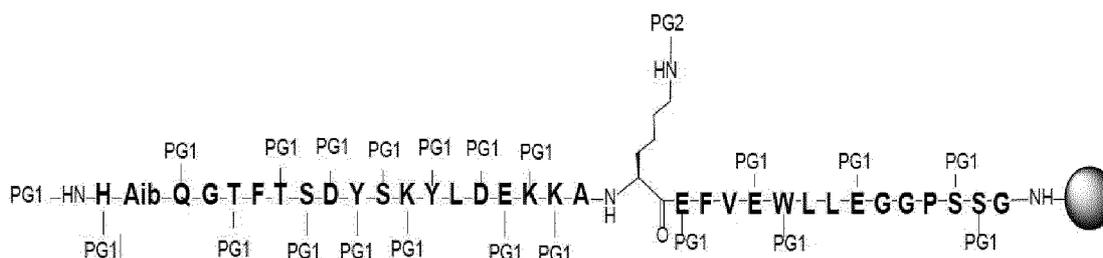
В одном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению очистка соединения включает хроматографическую очистку неочищенного раствора соединения, полученного на этапе (iii).

25 Предпочтительно, хроматографическая очистка представляет собой ВЭЖХ или обращенно-фазовую ВЭЖХ.

30 Еще более предпочтительно, очистка дополнительно включает этапы (i) добавления хроматографического элюента к раствору, содержащему водный раствор гидроксида натрия или водный раствор бикарбоната натрия, с получением натриевой соли соединения в растворе, (ii) осаждения натриевой соли соединения из раствора и (iii) фильтрования, промывания и сушки осажденной натриевой соли соединения.

Натриевая соль улучшает растворимость соединения по сравнению с цвиттер-ионной или ацетатной формами. Кроме того, осаждение натриевой соли соединения заменяет дорогостоящие процедуры лиофилизации.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения соединения следующей формулы:



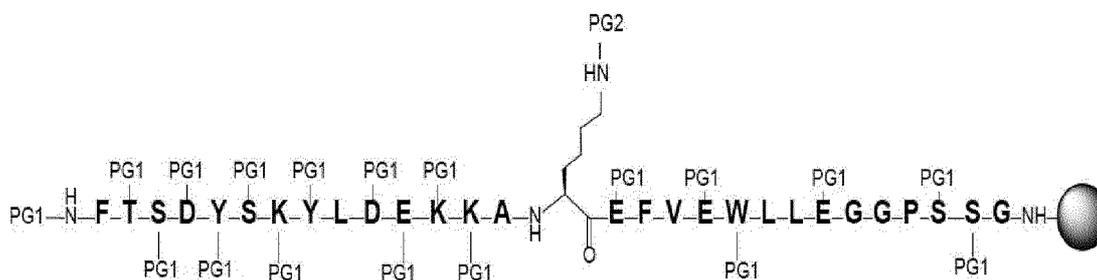
5 где PG1 представляет собой устойчивую к основаниям защитную группу боковой цепи,

при этом PG2 представляет собой защитную группу боковой цепи ivDde, Dde или Alloc (SEQ ID NO: 17),

и при этом указанный способ включает этапы:

10

(i) твердофазного синтеза соединения следующей формулы:



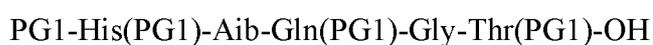
15

где PG1 представляет собой устойчивую к основаниям защитную группу боковой цепи,

и при этом PG2 представляет собой защитную группу боковой цепи ivDde, Dde или Alloc (SEQ ID NO: 9); и

20

(ii) осуществления сочетания соединения, полученного на этапе (i), с пептидом следующей формулы:



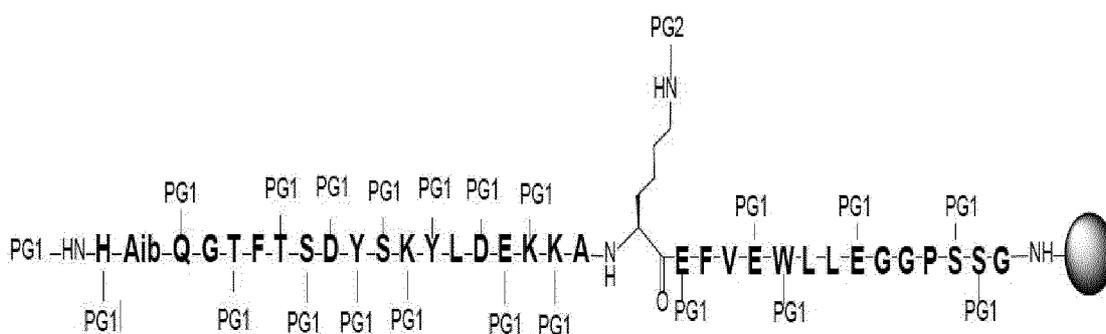
где PG1 представляет собой устойчивую к основаниям защитную группу боковой цепи (SEQ ID NO: 13).

5 В предпочтительном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению PG1 представляет собой Boc для Trp и Lys, O^tBu для Asp и Glu, ^tBu для Ser, Thr и Tyr, Trt для Gln, и Boc(Dnp) для His.

В другом предпочтительном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению PG2 представляет собой ivDde.

10 В альтернативном предпочтительном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению PG2 представляет собой Dde.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения соединения следующей формулы:

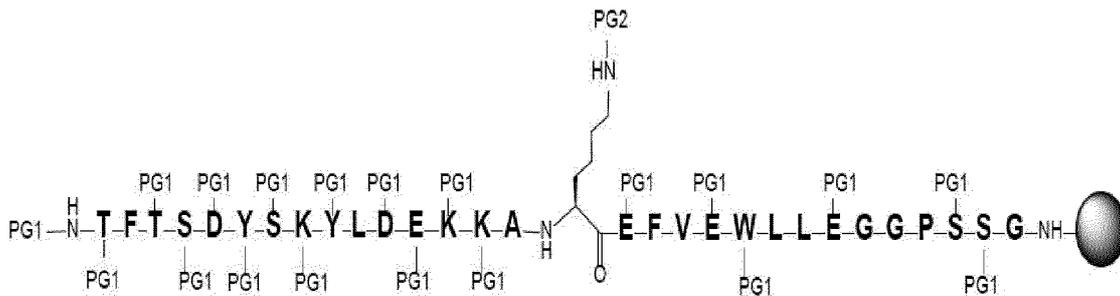


15 где PG1 представляет собой устойчивую к основаниям защитную группу боковой цепи,

и при этом PG2 представляет собой защитную группу боковой цепи ivDde, Dde или Alloc (SEQ ID NO: 17),

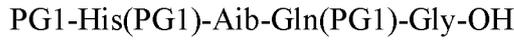
20 указанный способ включает этапы:

(i) твердофазного синтеза соединения следующей формулы:



где PG1 представляет собой устойчивую к основаниям защитную группу боковой цепи,
 5 и при этом PG2 представляет собой защитную группу боковой цепи ivDde, Dde или Alloc (SEQ ID NO: 11); и

(ii) осуществления сочетания соединения, полученного на этапе (i), с тетрамером следующей формулы:



где PG1 представляет собой устойчивую к основаниям защитную группу боковой цепи (SEQ ID NO: 15).

15 В предпочтительном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению PG1 представляет собой Boc для Trp и Lys, O^tBu для Asp и Glu, ^tBu для Ser, Thr и Tyr, Trt для Gln, и Boc(Dnp) для His.

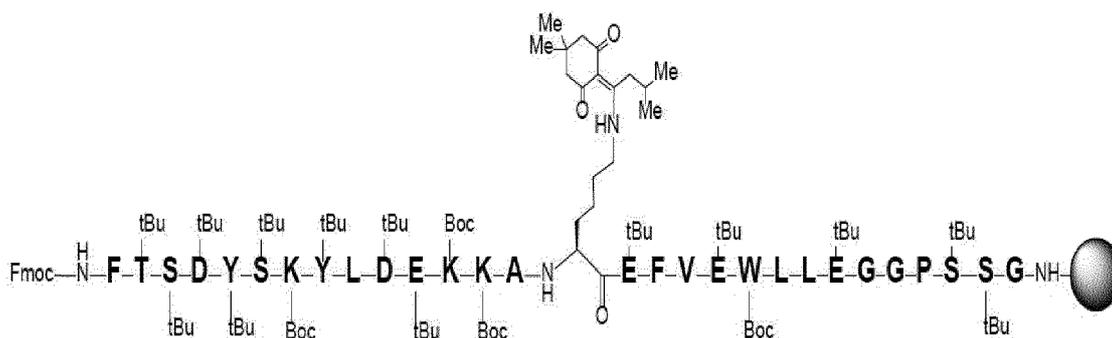
В другом предпочтительном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению PG2 представляет собой ivDde.

20 В альтернативном предпочтительном варианте реализации способа согласно настоящему изобретению PG2 представляет собой Dde.

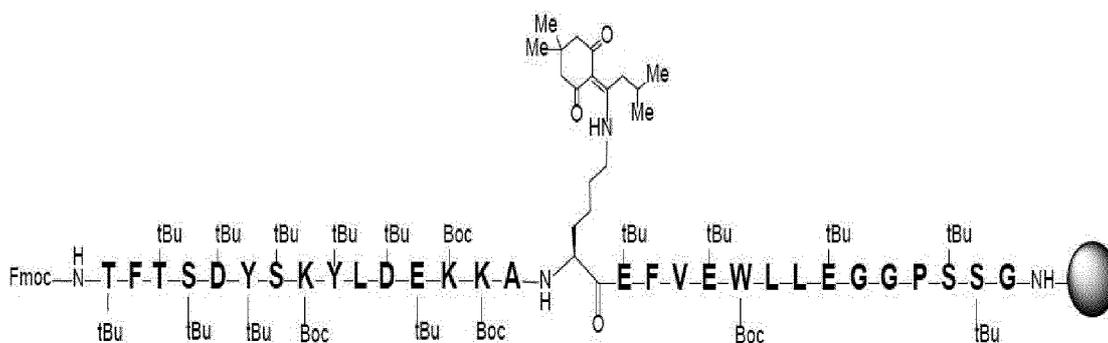
В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения натриевой соли соединения следующей формулы:



В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложено соединение, имеющее следующую формулу (SEQ ID NO: 10):



5 В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложено соединение, имеющее следующую формулу (SEQ ID NO: 12):



В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложено соединение, имеющее следующую формулу (SEQ ID NO: 13):

10



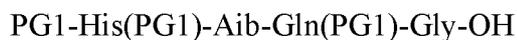
где PG1 представляет собой устойчивую к основаниям защитную группу боковой цепи.

15

Предпочтительно, PG1 представляет собой ^tBu для Thr, Trt для Gln, и Boc(Dnp) для His.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложено соединение, имеющее следующую формулу (SEQ ID NO: 15):

20



где PG1 представляет собой устойчивую к основаниям защитную группу боковой цепи.

Предпочтительно, PG1 представляет собой Trt для Gln и Boc(Dnp) для His.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5

В данном контексте следующие сокращения имеют значения, указанные в настоящем документе: «SPPS» означает твердофазный синтез пептида, «Fmoc» означает флуоренилметилоксикарбонилхлорид, «Boc» означает трет-бутилоксикарбонил, «O^tBu» означает трет-бутиловый эфир, «^tBu» означает трет-бутил, «Trt» означает трифенилметил или тритил, «Dnp» означает 2,4-динитрофенил, «ivDde» означает 1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)-3-метилбутил, «Dde» означает (1-(4,4-диметил-2,6-диоксоциклогекс-1-илиден)-3-этил), «Alloc» означает аллилоксикарбонил, «Pip» означает пиперидин, «DIC» означает диизопропилкарбодиимид, «Oxuma» означает этилцианогидроксииминоацетат, «DXM» означает дихлорметан, «ИПС» означает изопропанол», «MTBЭ» означает метил-трет-бутиловый эфир, «ТФК» означает трифторуксусную кислоту, «TIPS» означает триизопропилсилан, «DTT» означает дитиотреитол», «СВЭЖХ» означает сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографию, «НАТУ» означает гексафторфосфат (1-[бис(диметиламино)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний-3-оксида, «HFIP» означает гексафторизопропанол, «СТС» означает хлортритил, «AEEA» означает 17-амино-10-оксо-3,6,12,15-тетраокса-9-азагептадекановую кислоту, «TMSA» означает триметилсилиламид, «НОВt» означает гидроксibenзотриазол, и «АФИ» означает активный фармацевтический ингредиент, «PyBOP» означает гексафторфосфат (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония, «^tBuO-C₂₀-γGlu(^tBu)-AEEA-AEEA-OH» означает 2,3-(1,1-диметилэтиловый) эфир (22S)-25 22-[[20-(1,1-диметилэтокси)-1,20-диоксоэйкозил]амино]-10,19-диоксо-(3,6,12,15-тетраокса-9,18-дiazатрикозандионовой кислоты, и «AEEA» означает 8-амино-3,6-диоксооктановую кислоту.

Аминокислотные последовательности согласно настоящему изобретению содержат стандартные однобуквенные или трехбуквенные коды для двадцати встречающихся в природе аминокислот. Кроме того, «Aib» представляет собой альфа-аминоизомасляную кислоту.

Настоящее изобретение, в целом, относится к способу получения соединения-двойного агониста Gcg и GLP-1, в котором указанное соединение синтезируют с помощью

SPPS. SPPS включает несколько основных этапов, которые повторяют по мере присоединения дополнительных аминокислот к растущей пептидной цепи. «Твердая фаза» относится к частицам смолы, к которым присоединены исходные аминокислоты и к которым впоследствии присоединяются растущие пептидные цепи. Поскольку указанные цепи присоединены к частицам, с цепями можно обращаться так, как если бы они были набором твердых частиц (в частности, для промывания и разделения, например, этапов фильтрации), что во многих случаях делает весь процесс проще, чем синтез в чистом растворе.

Существует несколько подходящих смол для построения пептидных соединений, представленных в настоящем документе. Например, для получения пептидов широко известны амидные смолы Зибера и Ринка. Однако для получения пептидов, описанных в настоящем документе, могут быть выбраны альтернативные смолы. Например, для получения требуемого пептида могут быть использованы, но не ограничиваясь ими, 2-СТС и родственные смолы, с последующим этапом амидирования С-конца.

Повторяющиеся этапы SPPS включают снятие защиты, активацию и сочетание:

(i) Снятие защиты: перед началом каждого цикла последняя кислота в пептидной цепи остается «защищенной». В данном контексте термин «защищенная» означает, что к указанному положению присоединена защитная группа, т.е. ее «амино»-конец связан с функциональной группой, защищающей кислоту от нежелательных реакций. Широко известны различные защитные группы, и для конкретного процесса могут быть подходящими альтернативные защитные группы. «Защитную группу» удаляют (этап «снятия защиты»), когда необходимо присоединить следующую аминокислоту;

(ii) Активация: в реакцию добавляют соединение («активатор») для получения промежуточных аминокислотных частиц, которые более вероятно связываются с лишенной защиты кислотой в пептидной цепи.

(iii) Сочетание: активированные частицы соединяются с существующей пептидной цепью.

Один из наиболее часто используемых и изученных методов активации для синтеза пептидов основан на использовании карбодиимидов. Карбодиимид содержит два слабоосновных атома азота, которые будут взаимодействовать с карбоновой кислотой в производном аминокислоты с образованием весьма реакционноспособного соединения О-

ацилизомочевины. Затем образовавшаяся О-ацилизомочевина может сразу взаимодействовать с амином с образованием пептидной связи. Альтернативно, О-ацилизомочевину можно преобразовать в другие реакционноспособные частицы. Однако некоторые из таких альтернативных реакций О-ацилизомочевины способствуют
5 нежелательным реакциям, которые могут приводить или не приводить к образованию пептидной связи. Превращение в нереакционноспособную N-ацилмочевину предотвращает связывание, при этом вследствие образования оксазолон может происходить эпимеризация активированной хиральной аминокислоты. Более подходящий высокорекционноспособный симметричный ангидрид может быть получен при
10 использовании избытка аминокислоты относительно карбодиимида. Однако при таком подходе происходит нежелательное расходование дополнительного эквивалента аминокислоты.

Существенное улучшение способов активации карбодиимида достигнуто при включении 1-гидроксибензотриазола (HOBT) в качестве добавки во время активации
15 карбодиимида. HOBT быстро превращает О-ацилизомочевину в сложный эфир OBt, который обладает высокой реакционной способностью, но препятствует образованию нежелательной N-ацилоизомочевины и оксазолон. HOBT является опасным реагентом, который нежелательно использовать при крупномасштабном промышленном производстве. Вместо HOBT можно использовать другие добавки, такие как этил-2-циано-
20 2-(гидроксиимино)ацетат (Охума, ОхумаPure, ЕСНА) или 1-гидрокси-2,5-пирролидиндион (NHS).

Что касается способов согласно настоящему изобретению, предпочтительной системой активации является DIC/Охума в ДМФА. Предпочтительно, соотношение аминокислота : Охума : DIC составляет 2,0:2,0:2,2. Все загрузки основаны на
25 лимитирующем реагенте, которым является амидная смола. Система на основе Охума улучшает чистоту и исключает следующие проблемы агрегации и наличия примесей, наблюдаемые на этапе очистки, в частности, хроматографической очистки. Подходящие растворители включают ДМФА, NMP и NBP. ДМФА является предпочтительной системой растворителя, поскольку она значительно дешевле.

В более общем плане, что касается способов согласно настоящему изобретению, сборку с помощью SPPS предпочтительно проводят с использованием стандартных методов химии Fmoc-пептидов, включающих последовательное осуществление сочетания
30 на автоматизированном синтезаторе пептидов. Предпочтительной смолой является

амидная смола Зибера. ДМФА является предпочтительной системой растворителя, и указанная смола набухает в ДМФА. Снятие защиты со смолы предпочтительно проводят с использованием 20% пиперидина (Pip)/ДМФА (3 x 30 мин). При последующем снятии защиты Fmoc предпочтительно используют 20% Pip/ДМФА (9 мл/г смолы), обработку проводят 3 x 30 минут. Для более сложного сочетания предпочтительно используют обработку 4 x 30 минут. После снятия защиты смолу промывают, предпочтительно 6 x 2 минуты, используя для промывания 10 объемов ДМФА. Для предварительной активации аминокислоты предпочтительно используют растворы DIC/Охута/ДМФА при комнатной температуре в течение 30 минут. Сочетание активированной аминокислоты с пептидом, связанным со смолой, происходит в течение определенного периода времени для каждой отдельной аминокислоты. После каждого сочетания осуществляют промывание растворителем, предпочтительно 6 x 2 минут с использованием 10 объемов ДМФА.

Для выделения конечного продукта, связанный со смолой продукт предпочтительно промывают 5 x 2 минуты с использованием 10 объемов ДХМ для удаления ДМФА. Смолу предпочтительно промывают 2 x 2 минуты, используя 10 объемов ИПС для удаления ДХМ, промывают 5 x 2 минуты, используя 10 объемов метил-трет-бутилового эфира (МТБЭ), затем сушат продукт при 40 °С под вакуумом. Связанный со смолой продукт хранят на холоде (-20 °С).

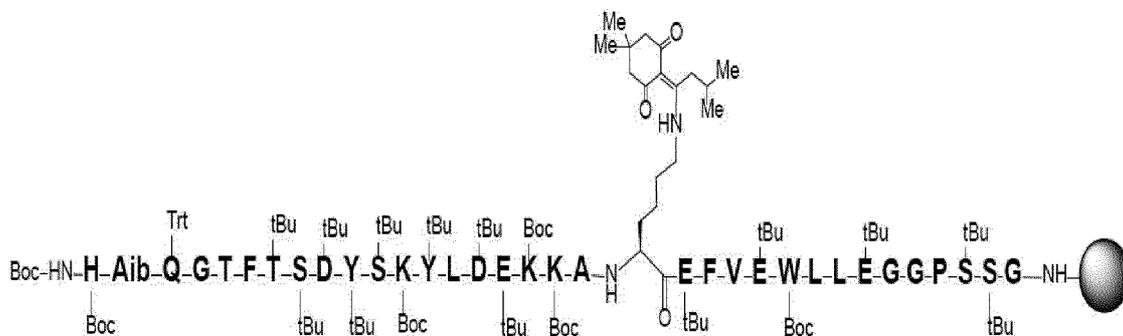
Для анализа пептид отщепляют от смолы с помощью кислотного коктейля, предпочтительно состоящего из ТГФ/Н₂О/TIPS/DTT в следующем соотношении: (0,93 об./0,04 об./0,03 об./0,03 мас.). Набухание смолы предпочтительно проводят в ДХМ (4-5 мл, 3 x 30 мин) и сливают жидкость. В предварительно набухшую смолу добавляют коктейль для отщепления (4-5 мл) и перемешивают суспензию в течение 2 часов при комнатной температуре. Фильтруют раствор, затем предпочтительно промывают смолу небольшим количеством ДХМ и соединяют с раствором для отщепления. Полученный раствор предпочтительно выливают в 7-10 объемов холодного (0 °С) метил-трет-бутилового эфира (МТБЭ). Суспензию предпочтительно подвергают созреванию в течение 30 минут при 0 °С, затем центрифугируют полученный осадок и декантируют прозрачный раствор. Остаток предпочтительно суспендируют в таком же объеме МТБЭ и снова центрифугируют полученную суспензию, и декантируют. После декантации прозрачного раствора МТБЭ осажденный пептид сушат в вакууме при 40 °С в течение ночи.

Настоящее изобретение относится к новым соединениям и способам, пригодным для синтеза соединений, описанных в настоящем документе, или их фармацевтически приемлемых солей, в частности, натриевой соли. Новые способы и соединения проиллюстрированы в следующих примерах. Реагенты и исходные материалы без труда доступны специалистам в данной области техники. Следует понимать, что указанные примеры никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Пример 1: Получение соединения (SEQ ID NO: 1)

10

Синтез препарата 1



SEQ ID NO: 3

- 15 В реактор загружали Fmoc-смолау Зибера (0,6 – 0,8 ммоль/г), оставляли набухать с ДМФА, перемешивали в течение 2 часов, затем отфильтровывали ДМФА от смолы. Затем дважды промывали смолау ДМФА. Затем удаляли защитные группы из Fmoc-защищенной смолы, обрабатывая 20% Pir/ДМФА в количестве 9 мл/г смолы. Отбор проб для проверки удаления Fmoc проводили после последней обработки Pir/ДМФА, чтобы подтвердить
- 20 удаление Fmoc на уровне >99% с помощью УФ анализа (требуемое значение для контроля завершения связывания (IPC) <1% оставшегося Fmoc). После последней обработки с использованием 20% мас.мас. Pir/ДМФА несколько раз промывали слой смолы ДМФА (например, 6 x 2 мин, промывание с использованием 10 объемов ДМФА в количестве 9 мл/г смолы). Пептидный остов строили с использованием следующих условий для
- 25 каждого сочетания аминокислоты и удаления защитной группы:

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
1	Fmoc-L-Gly-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 аминокислоты (AA)/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комнатная температура (комн. т-ра), (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
2	Fmoc-L-Ser ^{(t)Bu} -OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
3	Fmoc-L-Ser ^{(t)Bu} -OH;	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
4	Fmoc-L-Pro-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
5	Fmoc-L-Gly-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
6	Fmoc-L-Gly-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
7	Fmoc-L-Glu(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
8	Fmoc-L-Leu-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
9	Fmoc-L-Leu-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 5 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
10	Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
11	Fmoc-L-Glu(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
12	Fmoc-L-Val-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
13	Fmoc-L-Phe-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
14	Fmoc-L-Glu(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
15	Fmoc-Lys(ivDde)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 8% гидразин/ДМФА (9 мл/г смолы), (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
16	Fmoc-L-Ala-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
17	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
18	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
19	Fmoc-L-Glu(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
20	Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
21	Fmoc-L-Leu-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
22	Fmoc-L-Tyr(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
23	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
24	Fmoc-L-Ser(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
25	Fmoc-L-Tyr(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
26	Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
27	Fmoc-L-Ser(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
28	Fmoc-L-Thr(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
29	Fmoc-L-Phe-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
30	Fmoc-Gly-Thr($\psi^{Me,Me}Pro$)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
31	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
32	Fmoc-Aib-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после связывания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
33	Fmoc-L-His(Fmoc)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Снятие защиты Fmoc:

Смолу в реакторе для получения пептида обрабатывали, используя три или четыре загрузки 20% об./об. раствора PIP/ДМФА. После каждой обработки перемешивали смолу в течение 30 минут, после чего фильтровали для завершения удаления защитных групп Fmoc. После последней обработки с использованием 20% об./об. PIP/ДМФА промывали

слой смолы не менее шести раз ДМФА, используя предварительно определенный объем загрузки ДМФА.

Активация аминокислоты:

5 В реактор загружали предварительно полученный 12% мас./мас. раствор Охута Pure/ДМФА. Затем добавляли выбранную Fmoc-аминокислоту. Перемешивали смесь при 20 ± 5 °C до полного растворения Fmoc-аминокислоты. Затем охлаждали растворы Fmoc-AA/Охута Pure/ДМФА до 15 ± 3 °C до активации, чтобы обеспечить контроль незначительно экзотермической реакции активации, и поддерживали температуру

10 полученного раствора в указанном диапазоне, составляющем 20 ± 5 °C. Активировали раствор аминокислоты, добавляя DIC. Раствор активированного сложного эфира перемешивали в течение 20-30 минут, затем переносили раствор в реактор, содержащий пептид на смоле.

15 *Сочетание:*

По завершении этапа активации переносили раствор активированного сложного эфира в реактор, содержащий лишенный защиты пептид на смоле, для инициации реакции сочетания. Реакцию сочетания пептида проводили при перемешивании при 20 ± 5 °C в течение по меньшей мере 4 часов. По истечении необходимого времени перемешивания

20 брали образец суспензии смолы для проверки завершения сочетания (IPC). Отбор проб повторяли с определенными интервалами по мере необходимости до достижения результатов, соответствующих требованиям IPC. При необходимости проводили операции повторного сочетания. По завершении сочетания содержимое реактора для синтеза пептида в форме раствора отфильтровывали, затем несколько раз промывали пептид на

25 смоле ДМФА для подготовки к следующему сочетанию.

Для сочетания в положениях 4 и 5 вместо отдельных аминокислот Fmoc-L-Gly и Fmoc-L-Thr использовали Gly-Thr псевдопролиновый дипептид. Fmoc-Gly-Thr[Ψ^(Me,Me)Pro]-OH связывали с Phe (6) с использованием вышеописанных условий сочетания.

30

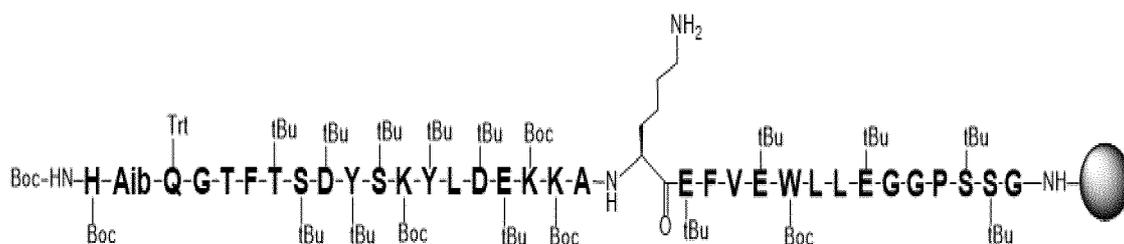
Альтернативный синтез препарата 1

Для альтернативного синтеза препарата 1 на этапе активации аминокислоты использовали НОВТ в NMP вместо Охута в ДМФА. Активирующим агентом был DIC.

Соотношение аминокислоты к DIC к HOBT составляло 3,0:3,3:3,0 (3,0 AA/3,3 DIC/3,0 HOBT). В качестве системы растворителя использовали NMP. NMP представляет собой систему растворителя, которую использовали также для реакций сочетания и снятия защиты в альтернативном способе синтеза.

5

Синтез препарата 2

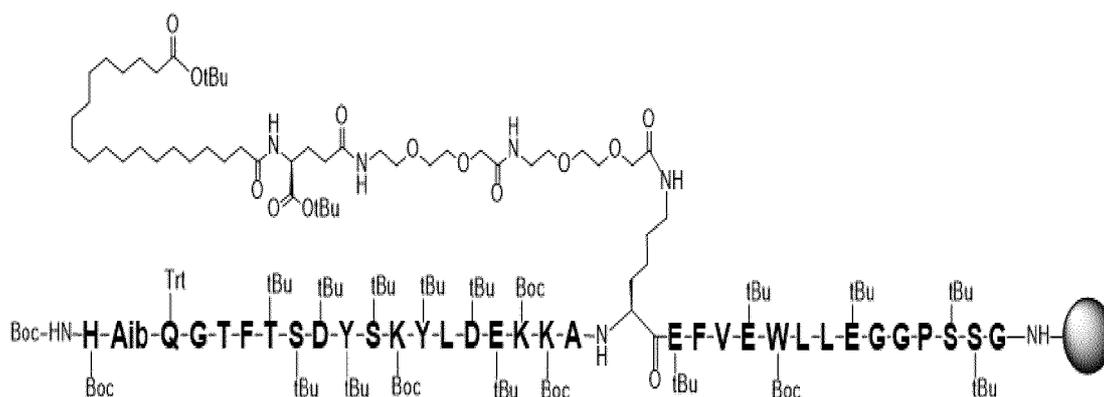


SEQ ID NO: 6

10 *Удаление защитной группы ivDde в Lys (20):*

Осуществляли селективное снятие защитной группы ivDde с 1-34 Lys (20) из 34 аминокислот в составе полностью защищенного на смоле пептидного остова Boc-His(1)-Gly(34). Снятие защиты осуществляли с помощью 8% мас./мас. раствора гидразингидрата в ДМФА при перемешивании в течение 4 часов при комнатной температуре. За ходом реакции снятия защиты следили с помощью ВЭЖХ, ориентируясь на предел ИПС <1% компонента 1-34 Lys(ivDde), остающегося после снятия защиты. Полученный фрагмент пептида (препарат 2; SEQ ID NO: 3) несколько раз промывали (8x) ДМФА для полного удаления остаточного гидразина. Полностью собранный фрагмент препарата 2 четыре раза промывали ИПС, затем сушили при ≤ 40 °C до достижения LOD (потери при высушивании) $\leq 1\%$. Препарат 2 упаковывали и хранили на холоде (-20 °C) до проведения сочетания с ^tBuO-C20- γ Glu(^tBu)-AEEA-AEEA-OH.

Синтез препарата 3



SEQ ID NO: 8

Сочетание ^tBuO-C₂₀-γGlu(^tBu)-AEEA-AEEA-OH с препаратом 2:

5 В реактор загружали боковую цепь ^tBuO-C₂₀-γGlu(^tBu)-AEEA-AEEA-OH (2,0 экв.) и РубОР (3,0 экв.) в твердой форме, затем добавляли 1:1 ДМФА/ДХМ и перемешивали смесь до растворения. Загружали 2,4,6-коллидин (3,0 экв.) для инициирования образования активных сложноэфирных частиц. Раствор активированного сложного эфира перемешивали в течение 30 минут перед переносом в реактор, содержащий соединение, представляющее собой препарат 2. Реакционную суспензию перемешивали в течение 18 часов при 35 °С. Из суспензии отбирали образцы для анализа на завершение сочетания (IPC) и при необходимости повторяли отбор образцов с определенными интервалами до достижения удовлетворительных результатов IPC (<1% препарата 2).

15 По завершении сочетания содержимое раствора отфильтровывали в отходы. Полностью собранное соединение препарата 3 несколько раз промывали ДМФА, затем ИПС. Сушили препарат 3 при ≤ 40 °С до достижения LOD ≤ 1%. Упаковывали препарат 3 и хранили на холоде (-20 °С) до отщепления от смолы.

20 Используя синтез препарата 1, препарата 2 и препарата 3, описанный выше, перерабатывали 28 г смолы Зибера (0,6 ммоль/г) в 85 г соединения на смоле (т.е. препарата 3) (выход 73%).

Альтернативный синтез препарата 3

25 Пептидный остов строили в соответствии с альтернативным синтезом препарата 1, описанным выше. Удаление всех Fmoc-защитных групп проводили с помощью 20% мас. Рір/NMP. Для промывания после снятия защиты использовали ДМФА в качестве

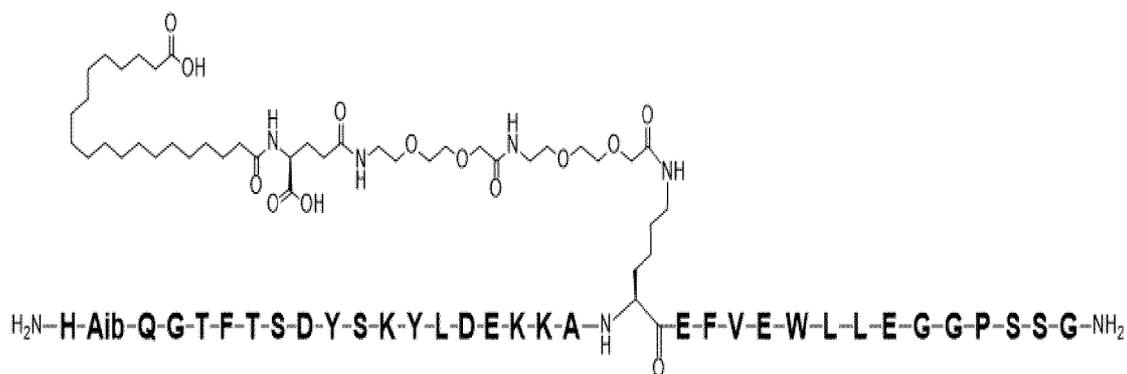
растворителя. Для связывания N-конца Boc-His-Boc-OH использовали систему активации DEPT/DIEA. Предварительно полученные активированные сложные эфиры добавляли к смоле, суспендированной в NMP.

После селективного снятия ivDde-защиты с Lys20 с помощью гидразина с
5 получением препарата 2, как описано выше, последовательно проводили четыре
отдельных сочетания боковых цепей для завершения построения связи со смолой. В
каждом цикле использовали пару реагентов для реакции сочетания PyBOP/DIEA. Три
компонента боковой цепи представляли собой реагенты на основе Fmoc, соответствующие
стандартным протоколам снятия защиты, сочетания и промывания ДМФА. В последнем
10 цикле использовали моно-трет-бутил-защищенную жирную дикислоту из двадцати атомов
углерода в качестве последнего компонента, сочетаемого с боковой цепью γ Glu. Для
указанного сочетания использовали смесь растворителей толуол:NMP в соотношении
75:25 мас./мас. для того, чтобы жирная кислота оставалась в растворе на протяжении всей
последовательности сочетания.

15 Используя альтернативный синтез 1 и альтернативный синтез препарата 3,
описанный выше, перерабатывали 1,4 кг смолы Зибера (0,6 ммоль/г) в 4,6 кг соединения
на смоле (т.е. препарата 3) (выход 79%).

Синтез препарата 4

20



SEQ ID NO: 1

Отщепление от смолы / снятие защиты:

Получали коктейль для отщепления, состоящий из ТФК, TIPS, DTT, ДХМ и воды. Охлаждали коктейль для отщепления до 15 ± 5 °С. Загрузка реагентов представлена в следующей таблице:

Этап способа	Растворитель / Реагент	Объем (на загруженное количество связанной смолы)
Коктейль для отщепления	ТФК	7,16 мл/г
	вода	0,34 мл/г
	TIPS	0,24 мл/г
	DTT	0,24 г/г
	ДХМ	0,75 мл/г
Суммарная загрузка коктейля	н/п	~ 8,50 мл/г
Промывание отработанной смолы	ДХМ	3 мл/г
Антирастворитель	МТБЭ	14 г/г
Промывание сосуда и осадка	МТБЭ	3 г/г

5 В реактор загружали препарат 3, затем коктейль для отщепления. Перемешивали смесь и поддерживали при 23 °С в течение 3 часов. Фильтровали смесь, затем промывали отработанную смолу ДХМ. Фильтрат после промывки ДХМ объединяли с основным раствором для снятия защиты и охлаждали содержимое до ≤ -10 °С. МТБЭ охлаждали до ≤ -13 °С, добавляли в холодный фильтрат двумя порциями. Скорость подачи МТБЭ

10 регулировали для поддержания внутренней температуры неочищенного раствора на уровне ≤ 5 °С. Первоначальная загрузка МТБЭ составляла ~ 45% от общей загрузки МТБЭ. Ближе к концу добавления МТБЭ образовался мягкий осадок, но он легко снова растворялся в растворе. Затем раствор с осадком повторно охлаждали при внутренней температуре -15 ± 5 °С. Второе добавление МТБЭ проводили со скоростью

15 приблизительно в 5-10 раз больше исходной скорости добавления МТБЭ, и оно составляло ~55% от общей загрузки МТБЭ. Во время добавления внутреннюю температуру суспензии с осадком поддерживали при ≤ 0 °С. Полученную суспензию оставляли созревать при -8 ± 3 °С не менее чем на 6 часов, затем нагревали до 0 ± 3 °С и оставляли созревать еще на 2 часа до осуществления выделения.

Холодную суспензию неочищенного пептида фильтровали, затем промывали полученный влажный осадок МТБЭ. Затем сушили влажный осадок препарата 4 до требуемого значения IPC LOD < 1%.

5 Следуя способу синтеза препарата 4, описанному выше, получали препарат 4 с 44% мас. и чистотой, рассчитанной по проценту площади на ВЭЖХ, 65%. Выход содержащегося продукта в пересчете на смолу Зибера составил 47%.

Очистка

10 Цвиттер-ионную форму препарата 4 очищали методом хроматографии и затем лиофилизировали.

Хроматография:

15 4,25 кг препарата 4 (активность 41%, содержание активного агента 1,71 кг) (полученного в соответствии с альтернативным синтезом препарата 1 и альтернативным синтезом препарата 3, описанным выше) растворяли в растворе из смеси муравьиной кислоты/ацетонитрила/воды в соотношении 4/6/90 с получением 10 мг/мл раствора, который перемешивали в течение четырех часов для декарбоксилирования триптофана перед хроматографией. Затем перерабатывали растворенный пептид методом обращенно-фазовой хроматографии, используя 27 первичных инъекций и 2 рецикла на колонке 15 см, с получением 671 кг общего раствора, содержащего 1,43 кг соединения с SEQ ID NO: 1 (чистота 93% и выход 83%). Соединение, соответствующее SEQ ID NO: 1, дополнительно очищали еще одной обращенно-фазовой хроматографией на колонке 15 см, используя 22 первичных инъекции и 4 рецикла, с получением 278 кг раствора, содержащего 1,19 кг соединения с SEQ ID NO: 1 (чистота 98%, выход 93,6%). Затем проводили 25 концентрационную хроматографию на смоле Amberchrom, используя 4 первичные инъекции, с получением 38,4 кг общего раствора с содержанием активного пептида 1,16 кг (чистота 98%, выход 93,6%).

Лиофилизация:

30 Раствор, полученный после концентрирования методом хроматографии, нагревали до 35 °С, затем разбавляли ацетонитрилом (50 объемов) со скоростью подачи 100 – 150 г в минуту. В разбавленный раствор пептида вносили 5 г затравки (чистота 95%) соединения с SEQ ID NO: 1 (цвиттер-ионная форма), затем перемешивали при 35 °С до образования

осадка. Загружали вторую порцию ацетонитрила (50 объемов), поддерживая температуру 35 °С. Оставляли полученную суспензию созревать при 35 °С на 1 час, охлаждали до 20 °С, затем оставляли для созревания по меньшей мере на один час. Фильтровали суспензию, затем промывали выделенный продукт ацетонитрилом и сушили до достижения LOD < 1%. Затем увлажняли сухой продукт для удаления остаточных растворителей. Увлажненный порошок АФИ растворяли в 29 объемах 0,38% (мас./мас.) раствора ацетата аммония в высокоочищенной воде, затем аликвотами добавляли 1,33 объема 9,1% (мас./мас.) раствора гидроксида аммония в высокоочищенной воде до достижения растворения и рН конечного раствора, составляющего от рН 8,2 до рН 8,6.

10 Фильтровали водный раствор соединения через полиэфирсульфоновый фильтр с размером пор 0,2 мкм, наполняя лотки для лиофилизации так, чтобы они содержали приблизительно 0,9 кг водного раствора на лоток. Лيوфилизировали продукт в соответствии с автоматизированной программой, которая включает замораживание растворов при -40 °С. Основную лиофилизацию проводили при температуре -40 °С и под
15 вакуумом ~100 миллиторр (13,3 Па). После первичной лиофилизации осуществляли постепенный последовательный нагрев для повышения температуры полки от -40 °С до 0 °С. Вторичную сушку осуществляли при приблизительно 15 миллиторр (2,0 Па) и 20 °С с получением 412 г соединения с SEQ ID NO: 1 в виде белого твердого вещества с чистотой 98% и выходом 95%.

20

Очистка и синтез натриевой соли

Хроматография

Первичную очистку методом ВЭЖХ проводили, используя в качестве подвижной
25 фазы А смесь ТФК/вода/ацетонитрил 0,1/90/10 (об./об.), в качестве подвижной фазы В смесь ТФК/вода/ацетонитрил 0,1/10/90 (об./об.) и неподвижную фазу Kromasil 100-10-C8.

Вторичную очистку методом ВЭЖХ проводили, используя в качестве подвижной
30 фазы А (MP-A) смесь 50 mM бикарбоната аммония при рН 7,6 и ацетонитрила 90/10 (об./об.) и в качестве подвижной фазы В (MP-B) смесь 50 mM бикарбоната аммония при рН 7,6 и ацетонитрила 10/90 (об./об.) на Kromasil 100-10-C8 в качестве неподвижной фазы.

Синтез натриевой соли

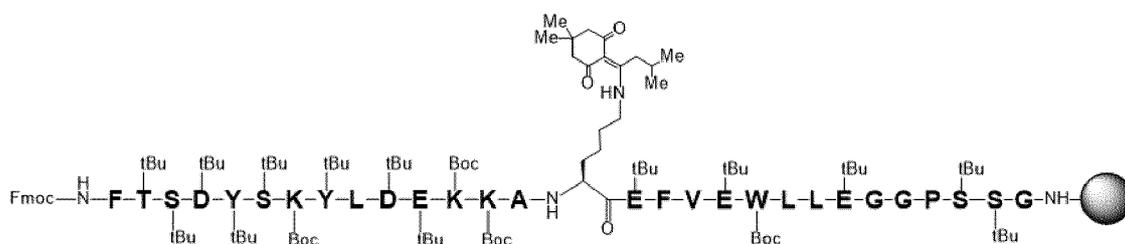
После очистки методом хроматографии смесевой раствор после вторичной очистки концентрировали, используя в качестве подвижной фазы А (MP-A) смесь 90% 50 мМ ацетата аммония при pH 8,5/10% изопропилового спирта (об./об.), в качестве подвижной фазы В (MP-B) смесь 10% 50 мМ ацетата аммония при pH 8,5/90% изопропилового спирта (об./об.) и неподвижную фазу Amberchrom CG300-M.

Загружали водный раствор гидроксида натрия для концентрирования раствора на основании количества молярных эквивалентов кислотных функциональных групп, присутствующих в молекуле пептида; добавляли равное молярное количество гидроксида (ОН-) для нейтрализации свободных групп карбоновой кислоты в пептиде. Это должно быть максимальное добавление, основанное на наблюдаемом изменении pH, требуемое значение которого составляет pH \approx 9,0. Полученную натриевую соль пептида осаждали, медленно добавляя дозированное количество ацетонитрила (ACN) при 20 °С, с последующим созреванием и введением затравки. Осаждение доводили до конца, последовательно и постепенно добавляя дополнительное количество ACN при 20 °С к разбавленному раствору, в который вносили затравку, представляющую собой 1% мас. натриевой соли соединения с SEQ ID NO: 1. Отфильтрованное твердое вещество, полученное из суспензии с осадком, промывали дополнительным количеством ACN при комнатной температуре для вытеснения маточного раствора. Выпавшее в осадок твердое вещество сушили под вакуумом до конечного предельного целевого значения LOD (< 1%). Получали 10 г натриевой соли соединения с SEQ ID NO: с чистотой по ВЭЖХ более 95,0% без содержания каких-либо отдельных примесей в количестве более 1,0%. Общий выход описанного процесса на смоле Зибера составил 25%.

Пример 2: Получение соединения SEQ ID NO: 10

25

Синтез препарата 5



SEQ ID NO: 10

В реактор загружали Fmoc-смолау Зибера (0,6 – 0,8 ммоль/г), оставляли набухать с ДМФА, перемешивали в течение 2 часов, затем отфильтровывали ДМФА от смолы. Затем дважды промывали смолау ДМФА. Затем удаляли защитные группы из Fmoc-защищенной смолы, обрабатывая 20% Pir/ДМФА в количестве 9 мл/г смолы. Отбор проб для проверки удаления Fmoc проводили после последней обработки Pir/ДМФА, чтобы подтвердить удаление Fmoc на уровне >99% с помощью УФ анализа (требуемое значение для контроля завершения связывания (IPC) <1% оставшегося Fmoc). После последней обработки с использованием 20% мас.мас. Pir/ДМФА несколько раз промывали слой смолы ДМФА (например, 6 x 2 мин, промывание с использованием 10 объемов ДМФА в количестве 9 мл/г смолы). Пептидный остов строили с использованием следующих условий для каждого сочетания аминокислоты и удаления защитной группы:

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
1	Fmoc-L-Gly-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 аминокислоты (AA)/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комнатная температура (комн. т-ра), (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
2	Fmoc-L-Ser(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
3	Fmoc-L-Ser(^t Bu)-OH;	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
4	Fmoc-L-Pro-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
5	Fmoc-L-Gly-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
6	Fmoc-L-Gly-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
7	Fmoc-L-Glu(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
8	Fmoc-L-Leu-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
9	Fmoc-L-Leu-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 5 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
10	Fmoc-L-Trp(Boc)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
11	Fmoc-L-Glu(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
12	Fmoc-L-Val-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
13	Fmoc-L-Phe-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
14	Fmoc-L-Glu(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
15	Fmoc-Lys(ivDde)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 8% гидразин/ДМФА (9 мл/г смолы), (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
16	Fmoc-L-Ala-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
17	Fmoc-L-Lys(Вос)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
18	Fmoc-L-Lys(Вос)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
19	Fmoc-L-Glu(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
20	Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
21	Fmoc-L-Leu-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
22	Fmoc-L-Tyr(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
23	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
24	Fmoc-L-Ser(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
25	Fmoc-L-Thr(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
26	Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
27	Fmoc-L-Ser(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
28	Fmoc-L-Thr(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
29	Fmoc-L-Phe-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Снятие защиты Fmoc:

5 Смолу в реакторе для получения пептида обрабатывали, используя три или четыре загрузки 20% об./об. раствора Pip/ДМФА. После каждой обработки перемешивали смолу в течение 30 минут, после чего фильтровали для завершения удаления защитных групп Fmoc. После последней обработки с использованием 20% об./об. PIP/ДМФА промывали слой смолы не менее шести раз ДМФА, используя предварительно определенный объем загрузки ДМФА.

10 *Активация аминокислоты:*

В реактор загружали предварительно полученный 12% мас./мас. раствор Охута Purg/ДМФА. Затем добавляли выбранную Fmoc-аминокислоту. Перемешивали смесь при 20 ± 5 °C до полного растворения Fmoc-аминокислоты. Затем охлаждали растворы Fmoc-AA/Охута Purg/ДМФА до 15 ± 3 °C до активации, чтобы обеспечить контроль незначительно экзотермической реакции активации, и поддерживали температуру полученного раствора в указанном диапазоне, составляющем 20 ± 5 °C. Активировали раствор аминокислоты, добавляя DIC. Раствор активированного сложного эфира перемешивали в течение 20-30 минут, затем переносили раствор в реактор, содержащий пептид на смоле.

20

Сочетание:

По завершении этапа активации переносили раствор активированного сложного эфира в реактор, содержащий лишенный защиты пептид на смоле, для инициации реакции сочетания. Реакцию сочетания пептида проводили при перемешивании при 20 ± 5 °C в течение по меньшей мере 4 часов. По истечении необходимого времени перемешивания брали образец суспензии смолы для проверки завершения сочетания (IPC). Отбор проб

повторяли с определенными интервалами по мере необходимости до достижения результатов, соответствующих требованиям ИРС. При необходимости проводили операции повторного сочетания. По завершении сочетания содержимое реактора для синтеза пептида в форме раствора отфильтровывали, затем несколько раз промывали пептид на смоле ДМФА для подготовки к следующему сочетанию.

Пример 3: Получение пентамера Boc-His(Dnp)-Aib-Gln(Trt)-Gly-Thr(^tBu)-OH (SEQ ID NO: 14)

10 Синтез препарата 6

Boc-His(Dnp)-Aib-Gln(Trt)-Gly-Thr(^tBu)-OH

SEQ ID NO: 14

15

Загрузка смолы:

В каждый из реакторов 1-3 загружали одну треть количества Fmoc-L-Thr(^tBu)-OH на смоле СТС (0,769 ммоль/г, 100-200 меш, 2,94 г, 2,26 ммоль). Оставляли смолу набухать, используя 3 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 20 минут, удаляли защитные группы, используя 3 x 15 мл 20% Pip/ДМФА, каждый раз по 30 минут, и промывали, используя 5 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 1 минуте, до осуществления первого сочетания.

20

Сочетание Fmoc-Gly-OH:

Получали раствор 2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)уксусной кислоты (2,01 г, 6,76 ммоль) и этилцианоглиоксилат-2-оксима (960 мг, 6,688 ммоль) в 40,5 мл ДМФА во флаконе объемом 60 мл. К светло-желтому раствору добавляли N,N'-диизопропилкарбодиимид (1,17 мл, 7,47 ммоль) и оставляли полученный оранжево-желтый раствор стоять на 30 минут при периодическом встряхивании. В каждый реактор напрямую, с помощью пипетки добавляли одну треть полученного раствора и перемешивали реакционную смесь в течение 12 часов, и сливали жидкость. Промывали смолу, используя 5 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 1 минуте, удаляли защитные группы, используя 4 x 15 мл 20% Pip/ДМФА (об./об.), каждый раз по 30 минут, и затем промывали,

30

используя 5 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 1 минуте, и использовали для следующего сочетания.

Сочетание Fmoc-L-Gln(Trt)-OH:

5 Получали раствор (2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-5-оксо-5-(тритиламино)пентановой кислоты (4,12 г, 6,75 ммоль) и этилцианоглиоксилат-2-оксима (960 мг, 6,688 ммоль) в 40,5 мл ДМФА во флаконе объемом 60 мл. К светло-желтому раствору добавляли N,N'-диизопропилкарбодиимид (1,17 мл, 7,47 ммоль) и оставляли полученный оранжево-желтый раствор стоять на 30 минут при периодическом
10 встряхивании. В каждый реактор напрямую, с помощью пипетки добавляли одну треть полученного раствора и перемешивали реакционную смесь в течение 12 часов, и затем сливали жидкость. Промывали смолу, используя 5 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 1 минуте, удаляли защитные группы, используя 4 x 15 мл 20% Pip/ДМФА (об./об.), каждый раз по 30 минут, и затем промывали, используя 5 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 1 минуте,
15 и использовали для следующего сочетания.

Сочетание Fmoc-Aib-OH:

 Получали раствор 2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-2-метилпропановой
20 кислоты (2,20 г, 6,76 ммоль) и этилцианоглиоксилат-2-оксима (960 мг, 6,688 ммоль) в 40,5 мл ДМФА во флаконе объемом 60 мл. К светло-желтому раствору добавляли N,N'-диизопропилкарбодиимид (1,17 мл, 7,47 ммоль) и оставляли полученный оранжево-желтый раствор стоять на 30 минут при периодическом встряхивании. В каждый реактор напрямую, с помощью пипетки добавляли одну треть полученного раствора и
25 перемешивали реакционную смесь в течение 18 часов, и сливали жидкость. Промывали смолу, используя 5 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 1 минуте, удаляли защитные группы, используя 4 x 15 мл 20% Pip/ДМФА (об./об.), каждый раз по 30 минут, и затем промывали, используя 5 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 1 минуте, и использовали для следующего сочетания.

30

Сочетание Boc-L-His(Dnp)-OH:

 Получали раствор Boc-His(dnp)-OH (2,84 г, 6,74 ммоль) и этилцианоглиоксилат-2-оксима (960 мг, 6,688 ммоль) в 40,5 мл ДМФА во флаконе объемом 60 мл. К ярко-желтому

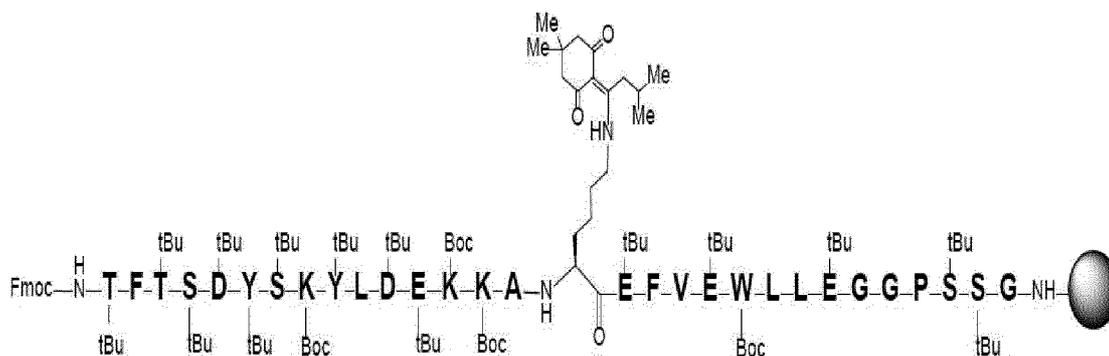
раствору добавляли N,N'-диизопропилкарбодиимид (1,17 мл, 7,47 ммоль) и сразу добавляли в каждый реактор одну треть полученного оранжево-желтого раствора. Перемешивали реакционную смесь в течение 18 часов и затем сливали жидкость. Промывали смолу, используя 5 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 1 минуте, 5 x 15 мл ДХМ, 5 каждый раз по 1 минуте, затем сливали жидкость и сушили в течение 4 часов.

Отщепление от смолы:

Собранный на смоле пептид делили на две порции и каждую порцию суспендировали в 30 мл смеси 30% гексафторизопропанола (HFIP)/ДХМ (об./об.) в реакционном флаконе объемом 40 мл и перемешивали на ротационном смесителе в течение 2 часов. Отфильтровывали смолу на фриттованном фильтре и промывали двумя порциями ДХМ с общим объемом 30 мл. Объединенный фильтрат и промывочные растворы концентрировали до желтой сухой пены на ротационном испарителе, и затем дважды растирали с метил-трет-бутиловым эфиром (МТБЭ), каждый раз концентрируя до суха на ротационном испарителе (для удаления HFIP), с получением яркого желто-оранжевого твердого вещества в форме порошка. Растирали полученное твердое вещество с 50 мл холодной смеси МТБЭ/гептан 1:1 и обрабатывали ультразвуком с получением желтой суспензии. Полученную суспензию переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали. Поскольку твердое вещество может не образовывать качественный осадок, добавляли еще 30 мл холодной смеси МТБЭ/гептан и отфильтровывали твердое вещество на воронке Бюхнера, промывали небольшим количеством холодной смеси МТБЭ/гептан 1:1 и сушили в течение ночи в вакуумной печи при 35 °С с получением 2,255 г (91,4%) желтого твердого вещества с чистотой по СВЭЖХ 88,1%.

25 **Пример 4: Получение соединения SEQ ID NO: 12**

Синтез препарата 7



SEQ ID NO: 12

- 5 В реактор загружали Fmoc-смола Зибера (0,6 – 0,8 ммоль/г), оставляли набухать с ДМФА, перемешивали в течение 2 часов, затем отфильтровывали ДМФА от смолы. Затем промывали смола ДМФА, в общей сложности два раза. Затем удаляли защитные группы из Fmoc-защищенной смолы, обрабатывая 20% Pir/ДМФА в количестве 9 мл/г смолы. Отбор проб для проверки удаления Fmoc проводили после последней обработки
- 10 Pir/ДМФА, чтобы подтвердить удаление Fmoc на уровне >99% с помощью УФ анализа (требуемое значение для контроля завершения связывания (IPC) <1% оставшегося Fmoc). После последней обработки с использованием 20% мас.мас. Pir/ДМФА несколько раз промывали слой смолы ДМФА (например, 6 x 2 мин, промывание с использованием 10 объемов ДМФА в количестве 9 мл/г смолы). Пептидный остов строили с использованием
- 15 следующих условий для каждого сочетания аминокислоты и удаления защитной группы:

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
1	Fmoc-L-Gly-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 аминокислоты (AA)/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комнатная температура (комн. т-ра), (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
2	Fmoc-L-Ser(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
3	Fmoc-L-Ser(^t Bu)-OH;	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
4	Fmoc-L-Pro-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
5	Fmoc-L-Gly-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
6	Fmoc-L-Gly-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
7	Fmoc-L-Glu(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
8	Fmoc-L-Leu-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
9	Fmoc-L-Leu-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 5 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
10	Fmoc-L-Trp(Вос)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
11	Fmoc-L-Glu(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
12	Fmoc-L-Val-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
13	Fmoc-L-Phe-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
14	Fmoc-L-Glu(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
15	Fmoc-Lys(ivDde)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 8% гидразин/ДМФА (9 мл/г смолы), (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
16	Fmoc-L-Ala-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
17	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
18	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
19	Fmoc-L-Glu(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
20	Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
21	Fmoc-L-Leu-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
22	Fmoc-L-Tyr(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
23	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
24	Fmoc-L-Ser(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
25	Fmoc-L-Tyr(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
26	Fmoc-L-Asp(O ^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS
27	Fmoc-L-Ser(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
28	Fmoc-L-Thr(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
29	Fmoc-L-Phe-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)
30	Fmoc-L-Thr(^t Bu)-OH	(i) 3/4 x 30 мин циклы удаления Fmoc, (ii) 6 x 2 мин промывания ДМФА после удаления защиты (9 мл/г смолы), (iii) 2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охута в ДМФА (7,25 мл/г смолы), комн. т-ра, (iv) 6 x 2 мин промывания после сочетания с использованием 10 объемов ДМФА (9 мл/г смолы)

Снятие защиты Fmoc:

5 Смолу в реакторе для получения пептида обрабатывали, используя три или четыре загрузки 20% об./об. раствора Pip/ДМФА. После каждой обработки перемешивали смолу в течение 30 минут, после чего фильтровали для завершения удаления защитных групп

Гмос. После последней обработки с использованием 20% об./об. РР/ДМФА промывали слой смолы не менее шести раз ДМФА, используя предварительно определенный объем загрузки ДМФА.

5 *Активация аминокислоты:*

В реактор загружали предварительно полученный 12% мас./мас. раствор Охута Pure/ДМФА. Затем добавляли выбранную Гмос-аминокислоту. Перемешивали смесь при 20 ± 5 °С до полного растворения Гмос-аминокислоты. Затем охлаждали растворы Гмос-АА/Охута Pure/ДМФА до 15 ± 3 °С до активации, чтобы обеспечить контроль незначительно экзотермической реакции активации, и поддерживали температуру полученного раствора в указанном диапазоне, составляющем 20 ± 5 °С. Активировали раствор аминокислоты, добавляя DIC. Раствор активированного сложного эфира перемешивали в течение 20-30 минут, затем переносили раствор в реактор, содержащий пептид на смоле.

15

Сочетание:

По завершении этапа активации переносили раствор активированного сложного эфира в реактор, содержащий лишенный защиты пептид на смоле, для инициации реакции сочетания. Реакцию сочетания пептида проводили при перемешивании при 20 ± 5 °С в течение по меньшей мере 4 часов. По истечении необходимого времени перемешивания брали образец суспензии смолы для проверки завершения сочетания (IPC). Отбор проб повторяли с определенными интервалами по мере необходимости до достижения результатов, соответствующих требованиям IPC. При необходимости проводили операции повторного сочетания. По завершении сочетания содержимое реактора для синтеза пептида в форме раствора отфильтровывали, затем несколько раз промывали пептид на смоле ДМФА для подготовки к следующему сочетанию.

25

Пример 5: Получение соединения SEQ ID NO: 16

30 Синтез препарата 8

Woc-His(Dnp)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH

Загрузка смолы:

В три отдельных реактора с фриттованным дном загружали одну треть Fmoc-Gly-OH на смоле СТС (100-200 меш, 2,98 г, 2,25 ммоль, загрузка 0,756 ммоль/г). Каждую смолу оставляли набухать, используя 3 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 20 минут, удаляли защитную группу Fmoc, используя 3 x 15 мл 20% смеси пиперидин/ДМФА (об./об.), каждый раз по 30 минут, и промывали, используя 5 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 1 минуте, до осуществления первого сочетания.

10

Сочетание Fmoc-Gln(Trt)-OH:

Получали раствор (2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-5-оксо-5-(третиламино)пентановой кислоты (4,12 г, 6,75 ммоль) и этилцианоглиоксилат-2-оксима (969,0 мг, 6,750 ммоль) в 40,5 мл ДМФА во флаконе объемом 60 мл. К светло-желтому раствору добавляли N,N'-диизопропилкарбодиимид (937,0 мг, 7,425 ммоль, 100% мас.) и оставляли полученный оранжево-желтый раствор стоять на 30 минут при периодическом встряхивании. В каждый реактор напрямую, с помощью пипетки добавляли одну треть полученного раствора и перемешивали реакционную смесь в течение 12 часов, и затем сливали жидкость. Промывали смолу, используя 5 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 1 минуте, удаляли защитные группы, используя 4 x 15 мл 20% Pip/ДМФА (об./об.), каждый раз по 30 минут, и затем промывали, используя 5 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 1 минуте, и напрямую использовали для следующего сочетания.

15

20

Сочетание Fmoc-Aib-OH:

Получали раствор 2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-2-метилпропановой кислоты (J, 2,20 г, 6,76 ммоль) и этилцианоглиоксилат-2-оксима (969,0 мг, 6,750 ммоль) в 40,5 мл ДМФА во флаконе объемом 60 мл. К светло-желтому раствору добавляли N,N'-диизопропилкарбодиимид (937,0 мг, 7,425 ммоль) и оставляли полученный оранжево-желтый раствор стоять на 30 минут при периодическом встряхивании. В каждый реактор напрямую, с помощью пипетки добавляли одну треть полученного раствора и перемешивали реакционную смесь в течение 18 часов, и затем сливали жидкость. Промывали смолу, используя 5 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 1 минуте, удаляли защитные группы, используя 4 x 15 мл 20% Pip/ДМФА (об./об.), каждый раз по 30 минут,

25

30

и затем промывали, используя 5 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 1 минуте, и использовали для следующего сочетания.

Сочетание Вос-His(Dnp)-ОН:

- 5 Получали раствор Вос-His(Dnp)-ОН (D, 2,84 г, 6,74 ммоль) и этилцианоглиоксилат-2-оксима (969,0 мг, 6,750 ммоль) в 40,5 мл ДМФА во флаконе объемом 60 мл. К ярко-желтому раствору добавляли N,N'-диизопропилкарбодиимид (937,0 мг, 7,425 ммоль) и сразу добавляли в каждый реактор одну треть полученного оранжево-желтого раствора. Перемешивали реакционную смесь в течение 18 часов и затем сливали жидкость.
- 10 Промывали смолу, используя 5 x 15 мл ДМФА, каждый раз по 1 минуте, 5 x 15 мл ДХМ, каждый раз по 1 минуте, затем сливали жидкость и сушили в течение 4 часов.

Отщепление пептида от смолы:

- 15 Собранный на смоле пептид из всех трех реакторов делили на две порции и каждую порцию суспендировали в 30 мл смеси 30% гексафторизопропанола (HFIP)/ДХМ (об./об.) в реакционном флаконе объемом 40 мл и перемешивали на ротационном смесителе в течение 2 часов. Отфильтровывали смолу на фриттованной воронке и промывали двумя порциями ДХМ с общим объемом 30 мл. Объединенный фильтрат и промывочные растворы концентрировали до желтой сухой пены на ротационном
- 20 испарителе, и затем дважды растирали с метил-трет-бутиловым эфиром (МТБЭ), каждый раз концентрируя досуха на ротационном испарителе (для удаления остаточного HFIP), с получением яркого желто-оранжевого твердого вещества в форме порошка. Растирали полученное твердое вещество с 50 мл смеси МТБЭ/гептан 1:1 и обрабатывали ультразвуком с получением красивой желтой суспензии. Полученную суспензию
- 25 переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали. После декантации надсадочной жидкости полученное твердое вещество таким же образом дважды промывали, используя 30 мл МТБЭ, и после частичного высушивания под потоком азота сушили полученное твердое вещество в вакуумной печи при 35 °С с получением 1,89 г (87,8%) желтого твердого вещества с чистотой по СВЭЖХ 97,66%.

30

Пример 6: Получение ${}^t\text{BuO-C}_{20}\text{-}\gamma\text{Glu}({}^t\text{Bu})\text{-AEEE-AEEE-OH}$

Синтез препарата 9

Ниже указаны условия сочетания: 0,133 M, 2,0 экв. HATU, 5,0 экв. DIEA, комнатная температура, 3 часа, снятие защиты в течение 3 x 15 минут с 20% смесью пиперидин/DMФА.

5 *Загрузка смолы:*

В данном синтезе использовали смолу 2-СТС (0,99 ммоль/г), и в нее загружали FmocNH-АЕЕА]. Добавляли 1,01 г в каждую из параллельных реакций, проводимых в течение двадцати четырех часов.

10 *Автоматизированная программа синтезатора Symphony X (для реакции в масштабе 1,0 ммоль):*

(i) Набухание:

- 3 x 15 мл DMФА в течение 10 мин

(ii) Цикл:

- 15
- 3 x 15 мл 20% Pip/DMФА, каждый раз по 15 мин
 - промывание 5 x 15 мл DMФА, каждый раз по 30 с
 - 5 мл аминокислоты
 - 5 мл DIEA
 - 5 мл HATU

- 20
- перемешивание в течение 3 часов
 - промывание 5 x 15 мл DMФА, каждый раз по 30 с

(iii) Сушка:

- 5 x 15 мл метиленхлорида, каждый раз по 30 с
- сушка после сливания в течение 2 часов

25

Протокол отщепления:

Осуществляли отщепление от смолы посредством перемешивания объединенных партий в 30% смеси HFIP/CH₂Cl₂ (240 мл) в течение 1,5 часа. Отфильтровывали смолу, промывали дополнительным количеством CH₂Cl₂ (2 x 50 мл) и удаляли растворитель из 30 фильтрата в вакууме. Полученное маслянистое вещество снова растворяли в ацетонитриле и снова удаляли растворитель. Повторяли указанную операцию с получением 30,47 г (146% от теоретического выхода) желтого вязкого маслянистого вещества, которое содержало 52,3% требуемого продукта по площади, измеренной в анализе СВЭЖХ.

Хроматография:

Неочищенный продукт (30,47 г, чистота 52,3% по площади) очищали флэш-хроматографией (500 г силикагеля, элюировали смесью 85% дихлорметана/10% метанола/5% уксусной кислоты, собирали 38 фракций x 100 мл). Требуемый продукт элюировали во фракциях 17-34, при этом отбрасывали несколько смешанных фракций до и после элюирования чистого продукта. Фракции 17-34 концентрировали при пониженном давлении с получением светло-желтой вязкой жидкости и затем удаляли остаточное количество уксусной кислоты посредством двукратной азеотропной перегонки с гептаном при пониженном давлении с получением 17,94 г очищенного продукта в виде светло-желтого вязкого маслянистого вещества с чистотой 86,6% по площади на ВЭЖХ.

Кристаллизация:

Концентрат после хроматографии (17,94 г) растворяли в 120 мл ацетонитрила в колбе Эрленмейера объемом 250 мл и перемешивали смесь примерно 10 минут при комнатной температуре до образования светло-желтого раствора. Охлаждали раствор в течение примерно 4 часов при температуре от -20 до -25 °С. Образовалось существенное количество твердого осадка, и он был особенно плотным на внутренней поверхности колбы. Для разрыхления твердого вещества использовали шпатель, в результате чего получали хорошо диспергированную суспензию. Полученное твердое вещество выдерживали при температуре от -20 до -25 °С, и в морозильной камере также предварительно охлаждали фриттованный стеклянный фильтр и ацетонитрил для промывания до температуры от -20 до -25 °С. Быстро фильтровали суспензию и промывали, используя приблизительно 50 мл холодного ацетонитрила. Твердое вещество быстро соскабливали с фильтра и переносили в стеклянный флакон. Твердое вещество плавилось с образованием бесцветного густого маслянистого вещества, которое затвердевало при охлаждении до -20 °С. Общий выход препарата 9 составил 13,4 г (выход 74,7%) с чистотой 91,65% по площади на СВЭЖХ.

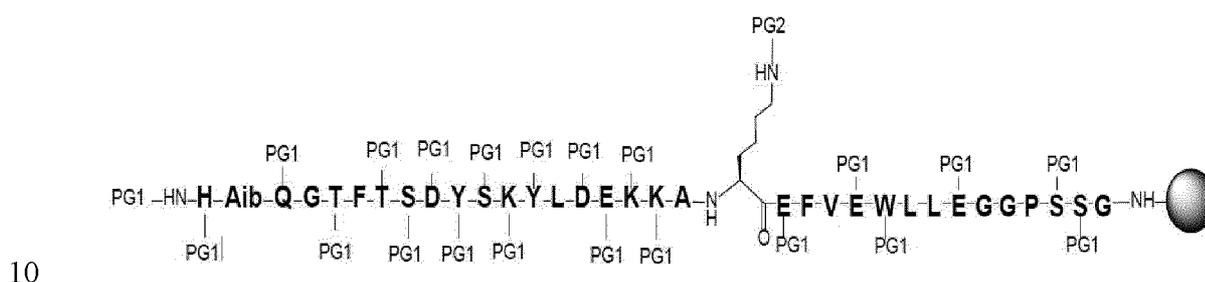
30 **ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ**

1) SEQ ID NO: 1

H₂N-H-Aib-Q-G-T-F-T-S-D-Y-S-K-Y-L-D-E-K-K-A-K-E-F-V-E-W-L-L-E-G-G-P-S-S-G-NH₂

где лизин (Lys/K) в положении 20 химически модифицирован конъюгацией ипсилон-аминогруппы боковой цепи лизина с ([2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H

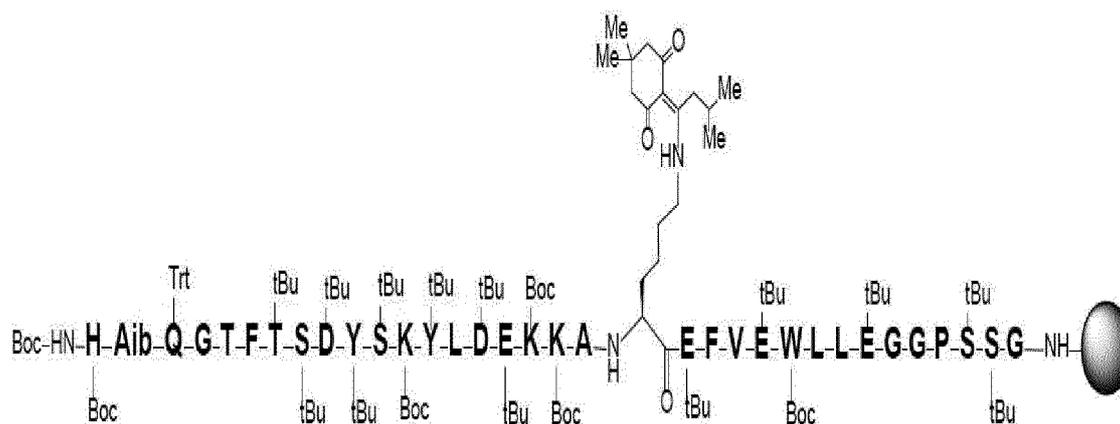
2) SEQ ID NO: 2



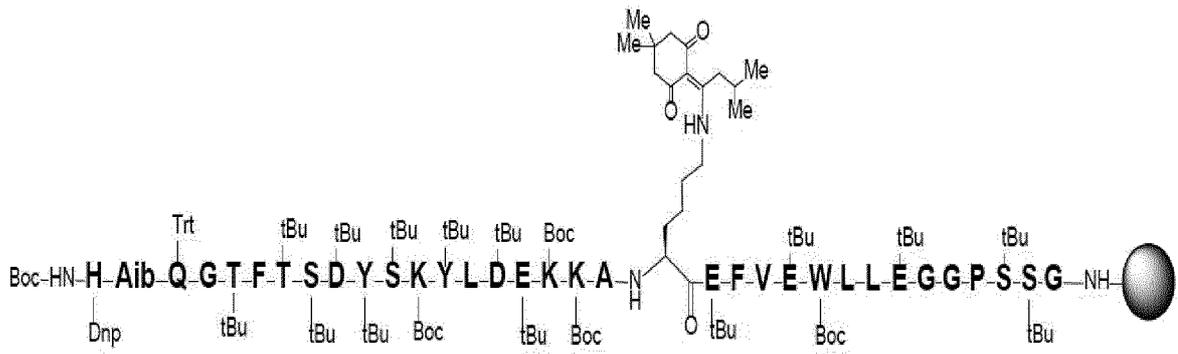
где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи, причем Thr в положении 5 необязательно защищен группой PG1, и при этом PG2 представляет собой защитную группу боковой цепи ivDde, Dde или Alloc

15

3) SEQ ID NO: 3

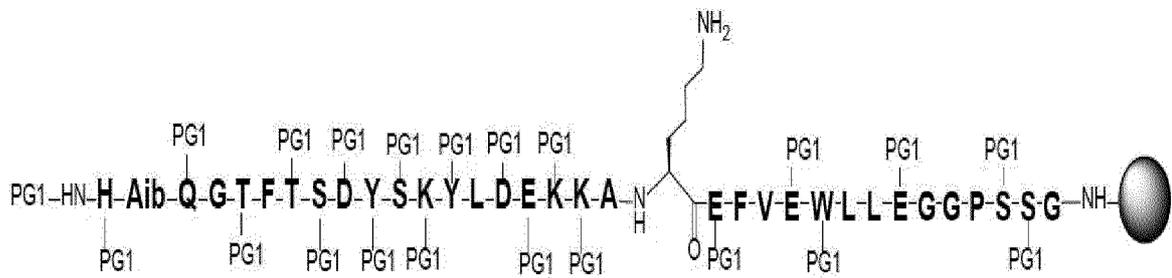


4) SEQ ID NO: 4



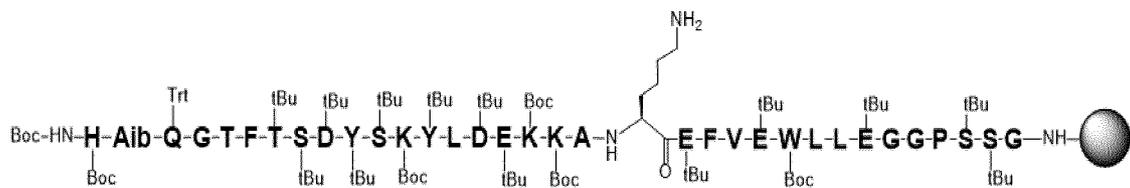
5) SEQ ID NO: 5

5

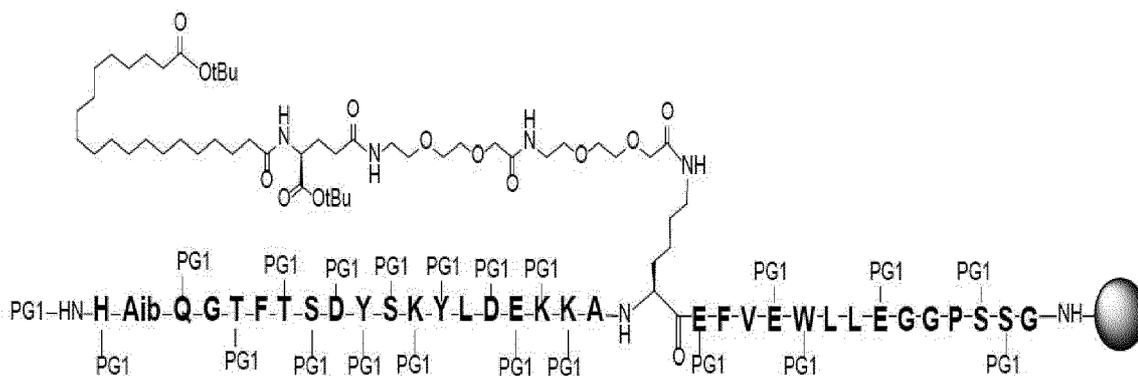


где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи, причем Thr в положении 5 необязательно защищен группой PG1,

10 6) SEQ ID NO: 6



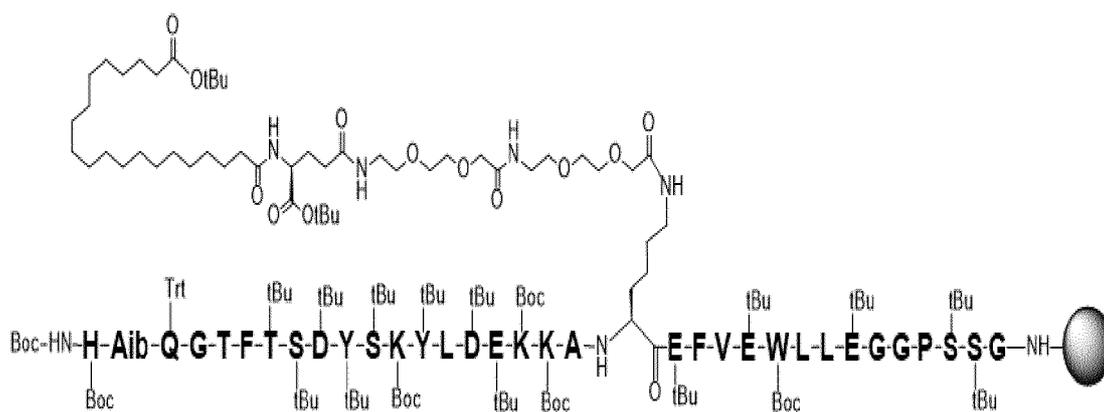
7) SEQ ID NO: 7



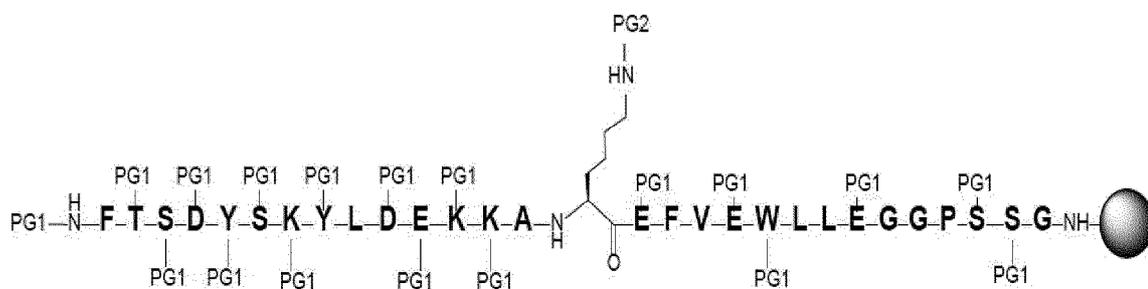
где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи, причем Thr в положении 5 необязательно защищен группой PG1,

5

8) SEQ ID NO: 8



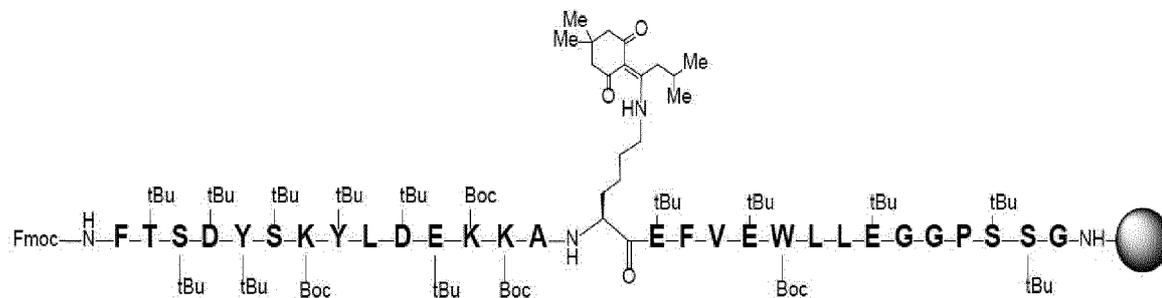
10 9) SEQ ID NO: 9



где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи,

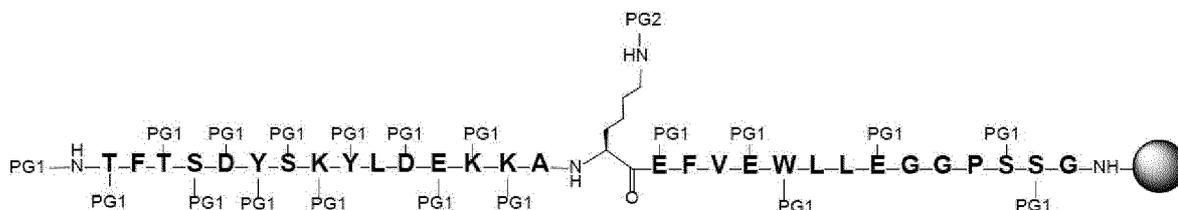
при этом PG2 представляет собой защитную группу боковой цепи ivDde, Dde или Alloc

10) SEQ ID NO: 10



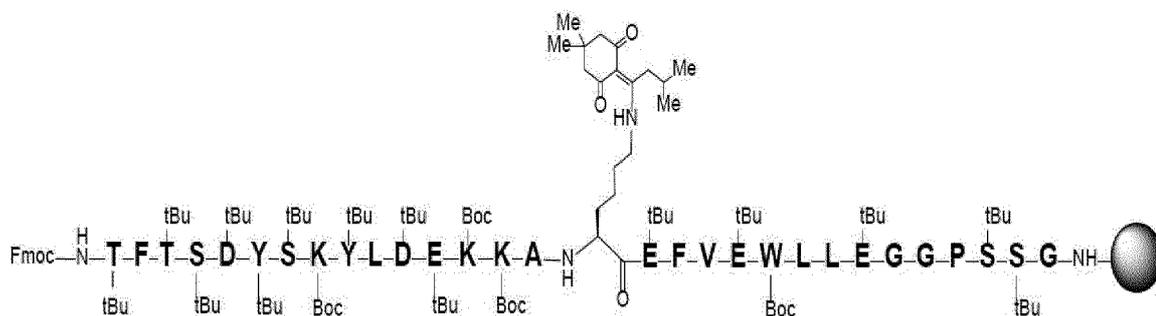
5

11) SEQ ID NO: 11



10 где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи, при этом PG2 представляет собой защитную группу боковой цепи ivDde, Dde или Alloc

12) SEQ ID NO: 12



15

13) SEQ ID NO: 13

PG1-His(PG1)-Aib-Gln(PG1)-Gly-Thr(PG1)-OH

где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи,

5 14) SEQ ID NO: 14

Boc-His(Dnp)-Aib-Gln(Trt)-Gly-Thr(^tBu)-OH

15) SEQ ID NO: 15

10

PG1-His(PG1)-Aib-Gln(PG1)-Gly-OH

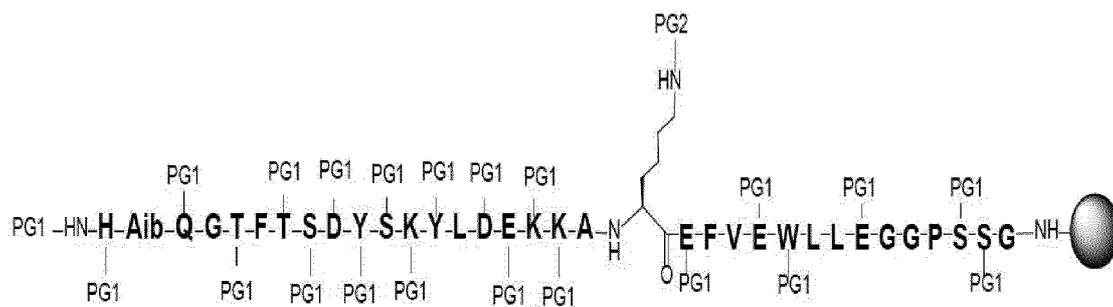
где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи,

15 16) SEQ ID NO: 16

Boc-His(Dnp)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH

17) SEQ ID NO: 17

20

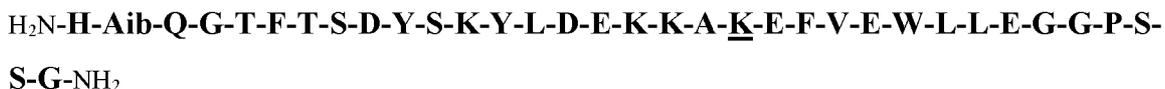


где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи, и при этом PG2 представляет собой защитную группу боковой цепи ivDde, Dde или Alloc

25 18) SEQ ID NO: 18

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

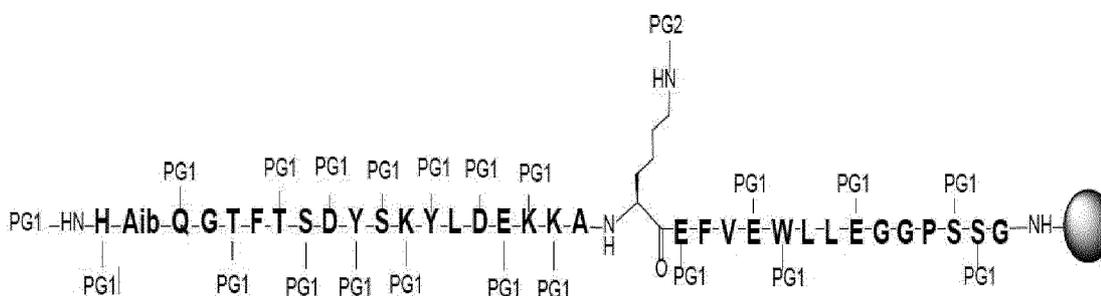
1. Способ получения соединения следующей формулы:



где Lys в положении 20 химически модифицирован конъюгацией ипсилон-аминогруппы боковой цепи Lys с ([2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H (SEQ ID NO: 1),

10 причем указанный способ включает этапы:

(i) твердофазного синтеза соединения следующей формулы



15 где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи,

причем Thr в положении 5 необязательно защищен группой PG1,

и при этом PG2 представляет собой защитную группу боковой цепи ivDde, Dde или Alloc (SEQ ID NO: 2)

20

(ii) селективного ацилирования соединения по Lys в положении 20 (SEQ ID NO: 7) посредством селективного снятия защиты с указанного Lys и осуществления сочетания полученного Lys-NH₂ (SEQ ID NO: 5) с ^tBuO-C₂₀- γ Glu(^tBu)-AEEA-AEEA-OH; и

25

(iii) отщепления полученного ацилированного соединения от твердой подложки и удаления оставшихся защитных групп боковой цепи; и

- (iv) очистки полученного соединения.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что PG1 представляет собой:
- 5 (a) Вос для Trp и Lys;
(b) O^tBu для Asp и Glu;
(c) ^tBu для Ser, Thr и Tyr;
(d) Tft для Gln; и
(e) ди-Вос для His.
- 10 3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что PG2 представляет собой ivDde.
4. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что PG2 представляет собой Dde.
- 15 5. Способ по п. 3 или п. 4, отличающийся тем, что Lys в положении 20 подвергают селективному снятию защиты посредством реакции с раствором, содержащим гидразингидрат.
6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что указанный раствор содержит 1% - 15% мас./мас. гидразингидрата в ДМФА, NMP, NBP или ДМСО.
- 20 7. Способ по п. 5 или п. 6, отличающийся тем, что указанный раствор содержит 8% мас./мас. гидразингидрата в ДМФА.
8. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что PG2 представляет собой Alloc.
- 25 9. Способ по п. 5, отличающийся тем, что Lys в положении 20 подвергают селективному снятию защиты посредством реакции с Pd(PPh₃)₄ в присутствии поглотителей, предпочтительно H₃N•BH₃, Me₂NH•BH₃ или PhSiH₃.
- 30 10. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что PG1 представляет собой:
- (a) Вос для Trp и Lys;
(b) O^tBu для Asp и Glu;
(c) ^tBu для Ser, Thr и Tyr;

(d) Trt для Gln; и
(e) ди-Вос для His,
причем PG2 представляет собой ivDde,
при этом твердофазный синтез соединения (SEQ ID NO: 3) на этапе (i)
5 осуществляют на твердой подложке из Fmoc-амидной смолы, и он включает снятие
Fmoc-защиты с амидной смолы и последовательное осуществление сочетания
следующих групп:

- (01) Fmoc-L-Gly-OH;
- 10 (02) Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH;
- (03) Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH;
- (04) Fmoc-L-Pro-OH;
- (05) Fmoc-L-Gly-OH;
- (06) Fmoc-L-Gly-OH;
- 15 (07) Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH;
- (08) Fmoc-L-Leu-OH;
- (09) Fmoc-L-Leu-OH;
- (10) Fmoc-L-Trp(Boc)-OH;
- (11) Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH;
- 20 (12) Fmoc-L-Val-OH;
- (13) Fmoc-L-Phe-OH;
- (14) Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH;
- (15) Fmoc-Lys(ivDde)-OH;
- (16) Fmoc-L-Ala-OH;
- 25 (17) Fmoc-L-Lys(Boc)-OH;
- (18) Fmoc-L-Lys(Boc)-OH;
- (19) Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH
- (20) Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH
- (21) Fmoc-L-Leu-OH;
- 30 (22) Fmoc-L-Tyr(^tBu)-OH;
- (23) Fmoc-L-Lys(Boc)-OH;
- (24) Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH;
- (25) Fmoc-L-Tyr(^tBu)-OH;

- (26) Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH;
- (27) Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH;
- (28) Fmoc-L-Thr(^tBu)-OH;
- (29) Fmoc-L-Phe-OH;
- 5 (30) Fmoc-Gly-Thr($\psi^{\text{Me,Me}}\text{Pro}$)-OH;
- (31) Fmoc-L-Gln(Trt)-OH;
- (32) Fmoc-Aib-OH; и
- (33) Boc-L-His(Boc)-OH.
- 10 11. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что PG1 представляет собой:
- (a) Boc для Trp и Lys;
- (b) O^tBu для Asp и Glu;
- (c) ^tBu для Ser, Thr и Tyr;
- (d) Trt для Gln; и
- 15 (e) Boc(Dnp) для His,
- причем PG2 представляет собой ivDde,
- при этом твердофазный синтез соединения (SEQ ID NO: 4) на этапе (i) осуществляют на твердой подложке из Fmoc-амидной смолы, и он включает снятие Fmoc-защиты с амидной смолы и последовательное осуществление сочетания
- 20 следующих групп:
- (01) Fmoc-L-Gly-OH;
- (02) Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH;
- (03) Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH;
- 25 (04) Fmoc-L-Pro-OH;
- (05) Fmoc-L-Gly-OH;
- (06) Fmoc-L-Gly-OH;
- (07) Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH;
- (08) Fmoc-L-Leu-OH;
- 30 (09) Fmoc-L-Leu-OH;
- (10) Fmoc-L-Trp(Boc)-OH;
- (11) Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH;
- (12) Fmoc-L-Val-OH;

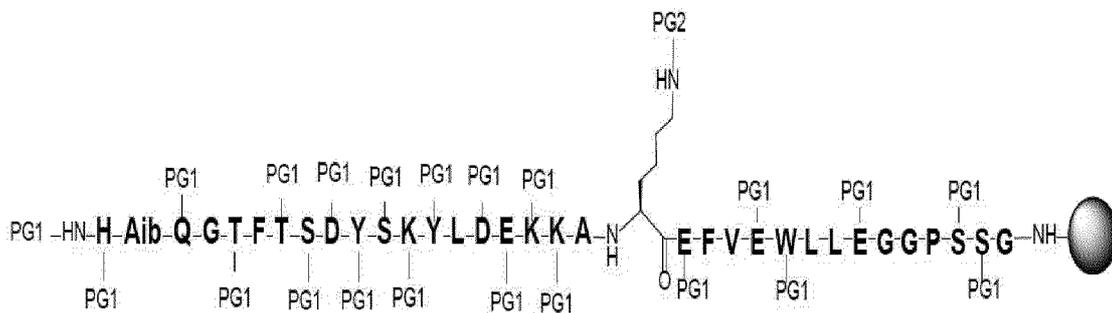
- (13) Fmoc-L-Phe-OH;
- (14) Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH;
- (15) Fmoc-Lys(ivDde)-OH;
- (16) Fmoc-L-Ala-OH;
- 5 (17) Fmoc-L-Lys(Boc)-OH;
- (18) Fmoc-L-Lys(Boc)-OH;
- (19) Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH
- (20) Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH
- (21) Fmoc-L-Leu-OH;
- 10 (22) Fmoc-L-Tyr(^tBu)-OH;
- (23) Fmoc-L-Lys(Boc)-OH;
- (24) Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH;
- (25) Fmoc-L-Tyr(^tBu)-OH;
- (26) Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH;
- 15 (27) Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH;
- (28) Fmoc-L-Thr(^tBu)-OH;
- (29) Fmoc-L-Phe-OH;
- (30) Boc-His(Dnp)-Aib-Gln(Trt)-Gly-Thr(^tBu)-OH.
- 20 12. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что PG1 представляет собой:
- (a) Boc для Trp и Lys;
- (b) O^tBu для Asp и Glu;
- (c) ^tBu для Ser, Thr и Tyr;
- (d) Trt для Gln; и
- 25 (e) Boc(Dnp) для His,
- причем PG2 представляет собой ivDde,
- при этом твердофазный синтез соединения (SEQ ID NO: 4) на этапе (i) осуществляют на твердой подложке из Fmoc-амидной смолы, и он включает снятие Fmoc-защиты с амидной смолы и последовательное осуществление сочетания
- 30 следующих групп:
- (01) Fmoc-L-Gly-OH;
- (02) Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH;

- 5
- (03) Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH;
 (04) Fmoc-L-Pro-OH;
 (05) Fmoc-L-Gly-OH;
 (06) Fmoc-L-Gly-OH;
 (07) Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH;
 (08) Fmoc-L-Leu-OH;
 (09) Fmoc-L-Leu-OH;
 (10) Fmoc-L-Trp(Boc)-OH;
 (11) Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH;
- 10
- (12) Fmoc-L-Val-OH;
 (13) Fmoc-L-Phe-OH;
 (14) Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH;
 (15) Fmoc-Lys(ivDde)-OH;
 (16) Fmoc-L-Ala-OH;
- 15
- (17) Fmoc-L-Lys(Boc)-OH;
 (18) Fmoc-L-Lys(Boc)-OH;
 (19) Fmoc-L-Glu(O^tBu)-OH
 (20) Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH
 (21) Fmoc-L-Leu-OH;
- 20
- (22) Fmoc-L-Tyr(^tBu)-OH;
 (23) Fmoc-L-Lys(Boc)-OH;
 (24) Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH;
 (25) Fmoc-L-Tyr(^tBu)-OH;
 (26) Fmoc-L-Asp(O^tBu)-OH;
- 25
- (27) Fmoc-L-Ser(^tBu)-OH;
 (28) Fmoc-L-Thr(^tBu)-OH;
 (29) Fmoc-L-Phe-OH;
 (30) Fmoc-L-Thr(^tBu)-OH; и
 (31) Boc-His(Dnp)-Aib-Gln(Trt)-Gly-OH.

30

13. Способ по любому из пп. 10-12, отличающийся тем, что твердая подложка на основе смолы представляет собой твердую подложку из Fmoc-амидной смолы, и твердофазный синтез включает снятие Fmoc-защиты с указанной смолы.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что твердая подложка из Fmoc-амидной смолы представляет собой смолу Зибера.
- 5 15. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что этап (iii) дополнительно включает доведение рН раствора, содержащего отщепленное и лишенное защиты соединение, до 7,0 – 8,0, перемешивание в течение 1-24 часов, последующее доведение рН раствора до 1,0 – 3,0 и перемешивание в течение 1-24 часов.
- 10 16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что очистка соединения включает хроматографическую очистку соединения, полученного на этапе (iii).
17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что хроматографическая очистка представляет собой ВЭЖХ или обращенно-фазовую ВЭЖХ.
- 15 18. Способ по п. 16 или п. 17, отличающийся тем, что очистка дополнительно включает этапы (i) добавления хроматографического элюента к раствору, содержащему водный раствор гидроксида натрия или водный раствор бикарбоната натрия, с получением натриевой соли соединения в растворе, (ii) осаждения натриевой соли соединения из раствора и (iii) фильтрования, промывания и сушки осажденной натриевой соли соединения.
- 20 19. Способ получения соединения следующей формулы:



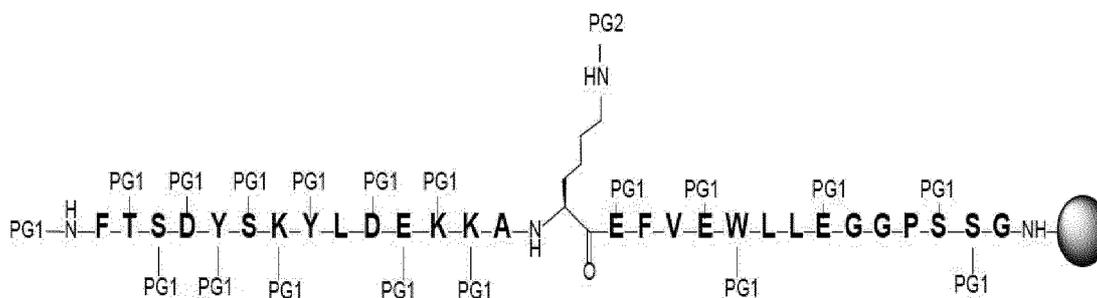
25

где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи,

при этом PG2 представляет собой защитную группу боковой цепи ivDde, Dde или Alloc (SEQ ID NO: 17),

и при этом указанный способ включает этапы:

- 5 (i) твердофазного синтеза соединения следующей формулы:



где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи,

- 10 и при этом PG2 представляет собой защитную группу боковой цепи ivDde, Dde или Alloc (SEQ ID NO: 9); и

- (ii) осуществления сочетания соединения, полученного на этапе (i), с пентамером следующей формулы:

- 15 PG1-His(PG1)-Aib-Gln(PG1)-Gly-Thr(PG1)-OH

где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи (SEQ ID NO: 13).

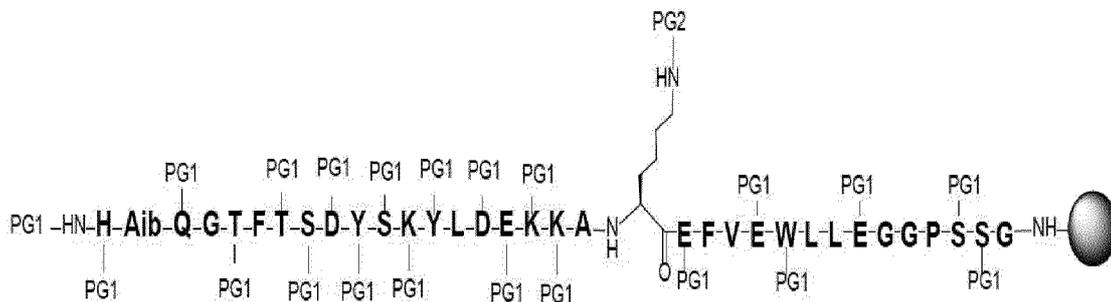
- 20 20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что PG1 представляет собой

- (a) Boc для Trp и Lys;
(b) O^tBu для Asp и Glu;
(c) ^tBu для Ser, Thr и Tyr;
(d) Trt для Gln; и
25 (e) Boc(Dnp) для His.

21. Способ по п. 19 или п. 20, отличающийся тем, что PG2 представляет собой ivDde.

22. Способ по п. 19 или п. 20, отличающийся тем, что PG2 представляет собой Dde.

23. Способ получения соединения следующей формулы:



5

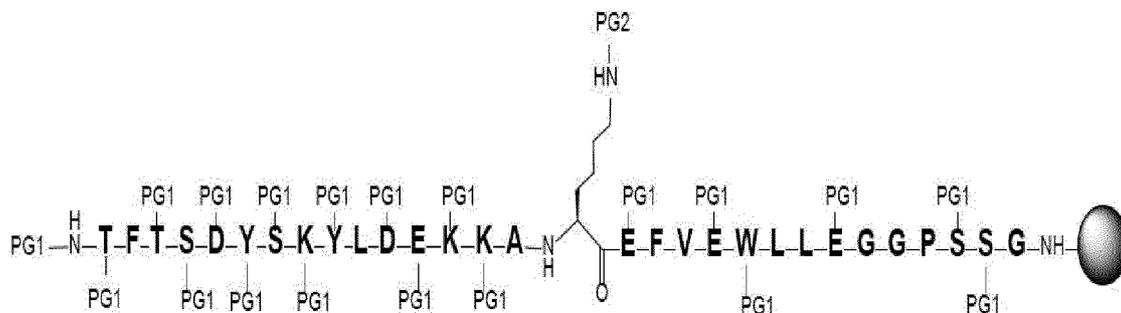
где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи,

при этом PG2 представляет собой защитную группу боковой цепи ivDde, Dde или Alloc (SEQ ID NO: 17),

10

и при этом указанный способ включает этапы:

(i) твердофазного синтеза соединения следующей формулы:



15

где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи,

и при этом PG2 представляет собой защитную группу боковой цепи ivDde, Dde или Alloc (SEQ ID NO: 11); и

20

(ii) осуществления сочетания соединения, полученного на этапе (i), с тетрамером следующей формулы:

PG1-His(PG1)-Aib-Gln(PG1)-Gly-OH

где PG1 представляет собой стойкую к основаниям защитную группу боковой цепи (SEQ ID NO: 15).

5

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что Р представляет собой

- (a) Вос для Trp и Lys;
- (b) O^tBu для Asp и Glu;
- (c) ^tBu для Ser, Thr и Tyr;
- (d) Trt для Gln; и
- (e) Вос(Dnp) для His.

10

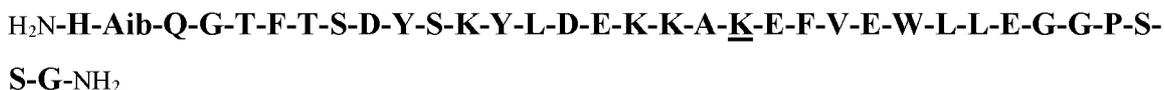
25. Способ по п. 23 или п. 24, отличающийся тем, что PG2 представляет собой ivDde.

15

26. Способ по п. 23 или п. 24, отличающийся тем, что PG2 представляет собой Dde.

27. Способ получения натриевой соли соединения следующей формулы:

20



где лизин (Lys/K) в положении 20 химически модифицирован конъюгацией ипсилон-аминогруппы боковой цепи лизина с ([2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)₂-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈CO₂H (SEQ ID NO: 1)

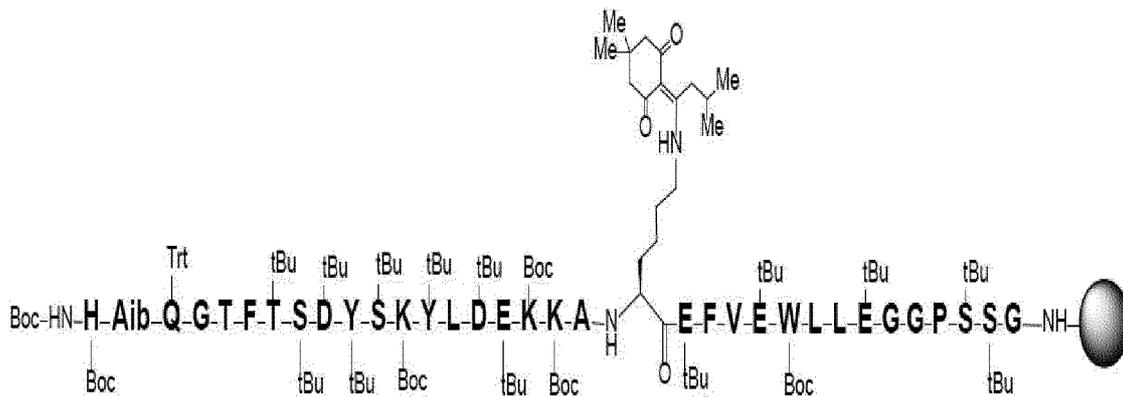
25

причем указанный способ включает этапы:

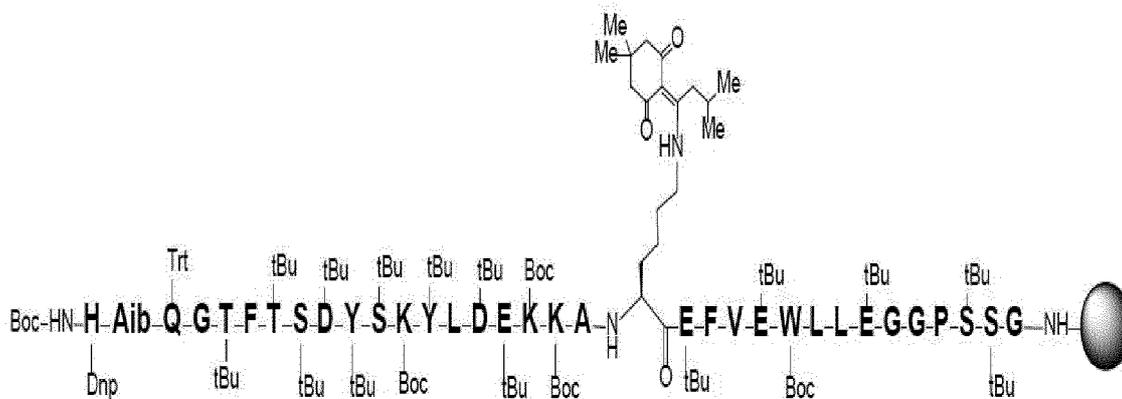
- (i) добавления водного раствора гидроксида натрия или водного раствора бикарбоната натрия к раствору, содержащему соединение с SEQ ID NO: 1, с получением натриевой соли соединения в растворе;
- (ii) осаждения натриевой соли соединения из раствора; и
- (iii) фильтрования, промывания и сушки осажденной натриевой соли соединения с SEQ ID NO: 1.

30

28. Соединение, имеющее следующую формулу (SEQ ID NO: 3):

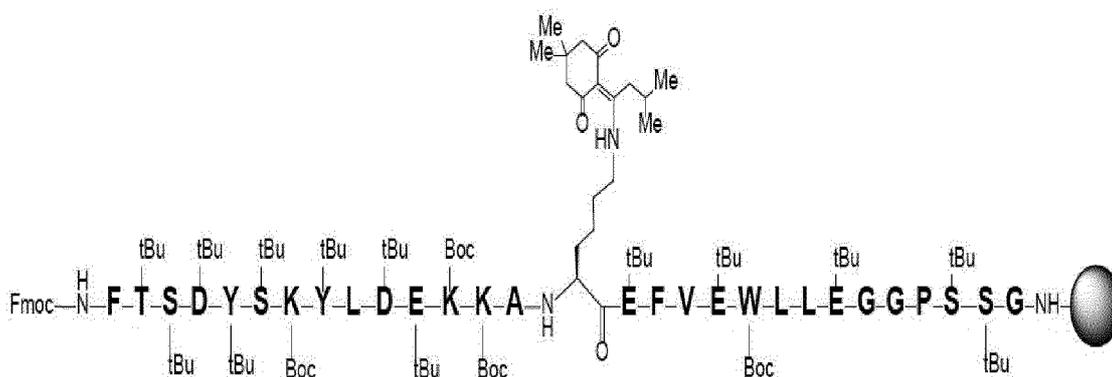


29. Соединение, имеющее следующую формулу (SEQ ID NO: 4):



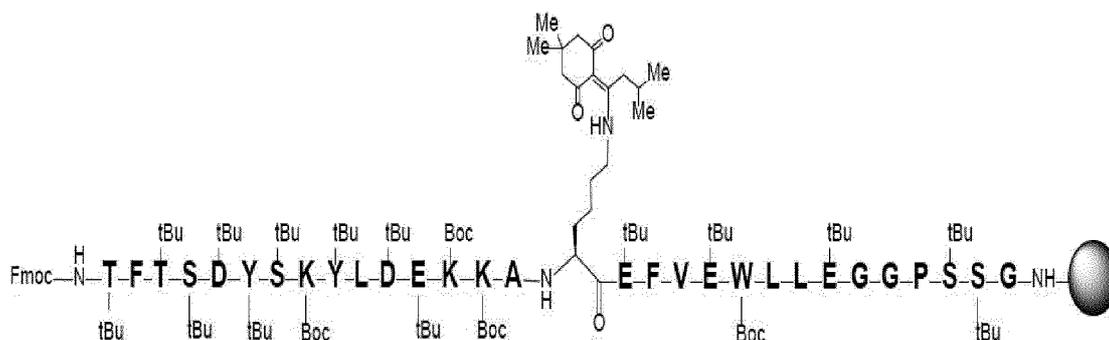
5

30. Соединение, имеющее следующую формулу (SEQ ID NO: 10):

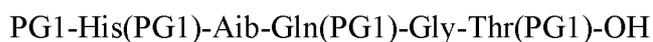


10

31. Соединение, имеющее следующую формулу (SEQ ID NO: 12):



32. Соединение, имеющее следующую формулу (SEQ ID NO: 13):



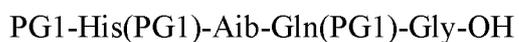
5

где PG1 представляет собой устойчивую к основаниям защитную группу боковой цепи.

33. Соединение по п. 32, отличающееся тем, что PG1 представляет собой ^tBu для Thr, Trt для Gln, и Boc(Dnp) для His.

10

34. Соединение, имеющее следующую формулу (SEQ ID NO: 15):



15

где PG1 представляет собой устойчивую к основаниям защитную группу боковой цепи.

35. Соединение по п. 34, отличающееся тем, что PG1 представляет собой Trt для Gln и Boc(Dnp) для His.

20