

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392940 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.09

(51) Int. Cl. *A61K 47/54* (2017.01)
C07K 14/605 (2006.01)
A61P 5/48 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.20

(54) СОЕДИНЕНИЯ НА ОСНОВЕ ГЛЮКАГОНОПОДОБНОГО ПЕПТИДА

(31) 21169757.8

(32) 2021.04.21

(33) EP

(86) PCT/IB2022/053698

(87) WO 2022/224164 2022.10.27

(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Болье Валери, Гальян Кейт, Гао
Цзиньхай, Гинзбург-Морафф Кэрл,
Джаин Панкадж, Марцинкевициене
Йовита, Майкл Уолтер, Могги Мунето,
Марро Мартин, Пэйтел Сиджэл,
Пламмер Скотт, Сингх Алок, Юзера
Эйми (US)

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

(57) В данном документе представлены новые соединения, предусматривающие соединение на основе GLP-1 и жирную кислоту или производное жирной кислоты, изготовление указанных новых соединений и их применение.

A1

202392940

202392940

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579420EA/032

СОЕДИНЕНИЯ НА ОСНОВЕ ГЛЮКАГОНОПОДОБНОГО ПЕПТИДА

Область техники

В данном документе представлены новые соединения, предусматривающие соединение на основе GLP-1 и жирную кислоту или производное жирной кислоты, изготовление указанных новых соединений и их применение. Такие новые соединения демонстрируют оптимальную фармакологическую эффективность.

Предпосылки

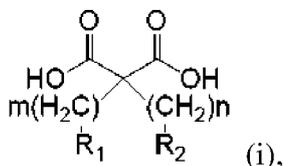
Агонисты глюкагоноподобного пептида (GLP) 1 (GLP1) относятся к важному классу терапевтически эффективных соединений. Агонисты GLP1, как правило, применяют в лечении диабета 2-го типа. Для модификации структуры таких соединений на основе глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1) применяли различные подходы с целью предотвращения быстрого биоразложения с обеспечением удовлетворительной продолжительности действия *in vivo* и улучшения переносимости.

Например, в WO 2006/097537 (Novo Nordisk) описаны соединения на основе GLP1 с модификацией по меньшей мере одного неприродного аминокислотного остатка в положениях 7 и/или 8 по сравнению с последовательностью GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1), который ацилирован фрагментом при лизиновом остатке в положении 26, при этом указанный фрагмент содержит по меньшей мере две кислотные группы.

В WO 2015/200078 (Novartis) раскрыт конъюгат, содержащий биомолекулу, такую как GDF15, связанную с жирной кислотой посредством линкера. Соответствующие конъюгаты могут быть применимы в лечении или предупреждении метаболических заболеваний или нарушений.

Сущность изобретения

В данном документе представлены соединения, содержащие GLP-1 или аналог GLP-1, ковалентно связанный, необязательно посредством линкера, с соединением формулы (i) или его фармацевтически приемлемой солью,



где

R_1 и R_2 независимо выбраны из CH_3 , OH , CO_2H , $\text{CH}=\text{CH}_2$ и $\text{C}\equiv\text{CH}$;

каждый из n и m представляет собой целое число, независимо выбранное из 5-30;

и где соединение формулы (i) ковалентно связано с помощью одной из его групп CO_2H .

Соединения, описанные в данном документе, как правило, могут выполнять роль агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1R). Соответственно, такие соединения могут быть применимы в лечении заболеваний или нарушений, включающих

без ограничения метаболические заболевания, нарушения и состояния, такие как ожирение, сахарный диабет 2-го типа, инсулинорезистентность, гиперинсулинемия, непереносимость глюкозы, гипергликемия, одно или несколько осложнений диабета (включающих без ограничения хроническое заболевание почек), диабетическая нефропатия, дислипидемия, сердечно-сосудистое заболевание и невропатия. Также соединения потенциально могут быть применимы в лечении прогрессирующего заболевания печени и видов невропатии.

Определения

Термин "пептид", используемый в данном документе, означает соединение, состоящее из по меньшей мере пяти аминокислот, соединенных пептидными связями. Аминокислоты могут представлять собой встречающиеся в природе аминокислоты, а также аминокислоты, которые не встречаются в природе. Некоторые пептиды могут полностью состоять из встречающихся в природе аминокислот. Некоторые пептиды могут полностью состоять из аминокислот, которые не встречаются в природе. Некоторые пептиды могут состоять из смеси встречающихся в природе аминокислот и аминокислот, которые не встречаются в природе.

Термин "встречающийся в природе" относится к материалам, которые находятся в природной среде и не обработаны человеком. Аналогично "который не встречается в природе," "неприродный" и т. п., используемые в данном документе, относятся к материалу, который не обнаруживают в природной среде или который был структурно модифицирован или синтезирован человеком.

Если применяется в части, касающейся аминокислот, термин "встречающийся в природе" обычно относится к 22 традиционным аминокислотам, таким как аланин (A или Ala), цистеин (C или Cys), цистин (CySS), аспарагиновая кислота (D или Asp), глутаминовая кислота (E или Glu), фенилаланин (F или Phe), глицин (G или Gly), гистидин (H или His), изолейцин (I или Ile), лизин (K или Lys), лейцин (L или Leu), метионин (M или Met), аспарагин (N или Asn), пролин (P или Pro), 4-гидроксипролин (O или Hyp), глутамин (Q или Gln), аргинин (R или Arg), серин (S или Ser), треонин (T или Thr), валин (V или Val), триптофан (W или Trp) и тирозин (Y или Tyr)).

Термины "аминокислота, которая не встречается в природе", "не природная аминокислота" и "неприродная аминокислота", используемые в данном документе, взаимозаменяемо предназначены для описания аминокислотных структур, которые невозможно создать путем биосинтеза в каком-либо организме с применением немодифицированных или модифицированных генов, полученных от любого организма, независимо от того, он такой же или отличный. Они включают без ограничения модифицированные аминокислоты и/или аналоги аминокислот, которые не представляют собой ни одну из приведенных выше 22 встречающихся в природе аминокислот.

Примерами не природных аминокислот являются γ -карбоксиглутамат, орнитин, фосфосерин, D-аминокислоты, такие как D-аланин и D-глутамин. Синтетические не природные аминокислоты предусматривают аминокислоты, изготовленные путем

химического синтеза, т. е. D-изомеры аминокислот, такие как D-аланин и D-лейцин, Aib (α -аминоизомасляную кислоту), Abu (α -аминомасляную кислоту), Phe (трет-бутилглицин), 3-аминометилбензойную кислоту, аминокислоту, дезаминагистидин, бета-аналоги аминокислот, такие как β -аланин и т. д., например D-гистидин, дезаминагистидин, 2-аминогистидин, бета-гидроксигистидин, гомогистидин, Na-ацетилгистидин, α -фторметилгистидин, α -метилгистидин, 3-пиридилаланин, 2-пиридилаланин или 4-пиридилаланин, (1-аминоциклопропил)карбоновую кислоту, (1-аминоциклобутил)карбоновую кислоту, (1-аминоциклопентил)карбоновую кислоту, (1-аминоциклогексил)карбоновую кислоту, (1-аминоциклогептил)карбоновую кислоту или (1-аминоциклооктил)карбоновую кислоту.

Все аминокислоты, для которых не указан оптический изомер, следует понимать как означающие L-изомер.

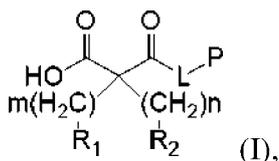
Термин "аналог" или "аналог" пептида, используемый в данном документе, означает модифицированный пептид, где один или несколько аминокислотных остатков пептида один или несколько раз были заменены на другой аминокислотный остаток, и/или где один или несколько аминокислотных остатков были удалены из пептида, и/или где один или несколько аминокислотных остатков были добавлены в пептид. Такое добавление или удаление аминокислотных остатков может иметь место в любом месте в пределах пептида. Например, такое добавление или удаление аминокислотных остатков может иметь место в пределах N-концевой части пептида и/или в C-концевой части пептида.

Термин "GLP-1", используемый в данном документе, означает GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:1).

Термин "аналог GLP-1", используемый в данном документе, относится к аналогу GLP-1 (7-37), определенного выше, где термин "аналог" определен выше. Например, [Arg³⁴]GLP-1 (7-37)Lys обозначает аналог GLP-1 (7-37), где встречающийся в природе лизин в положении 34 в GLP-1 (7-37) был заменен аргинином и где к концевому аминокислотному остатку, т. е. к Gly³⁷, был добавлен лизин.

Дополнительные варианты осуществления

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (i) в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, которое представляет собой соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль,



где

R₁ и R₂ независимо выбраны из CH₃, OH, CO₂H, CH=CH₂ и C≡CH;

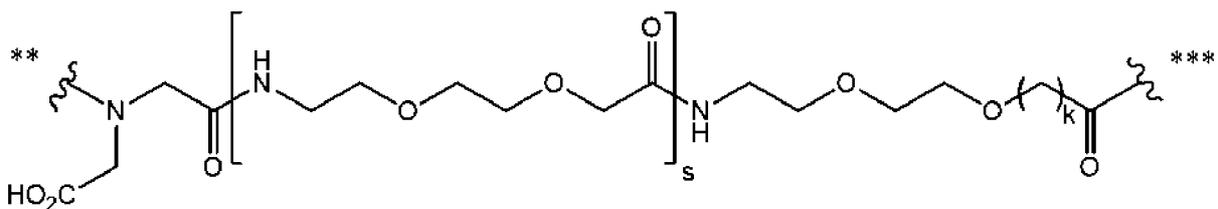
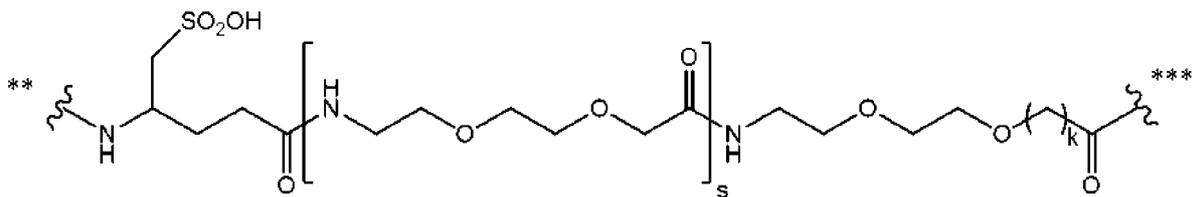
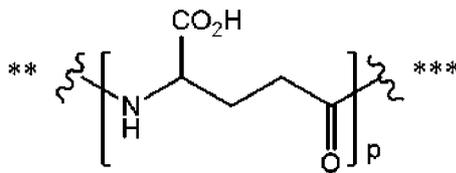
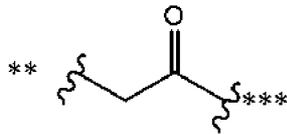
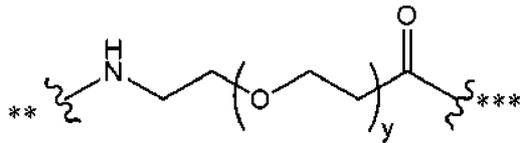
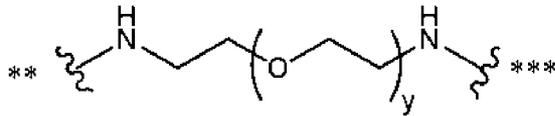
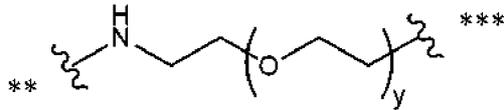
каждый из n и m представляет собой целое число, независимо выбранное из 5-30;

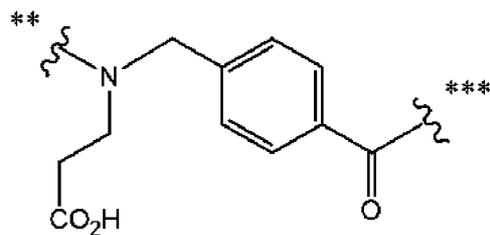
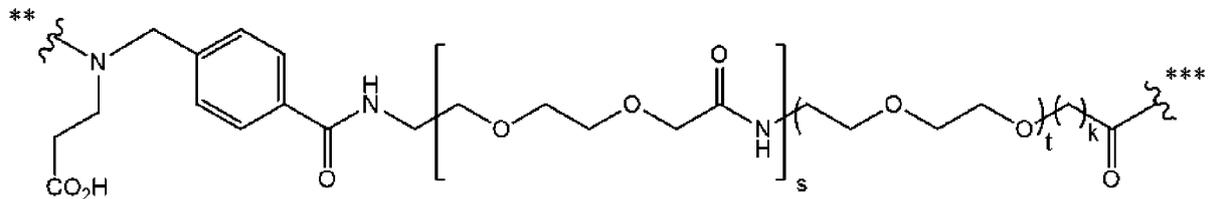
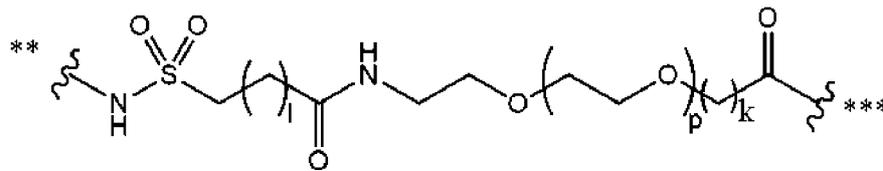
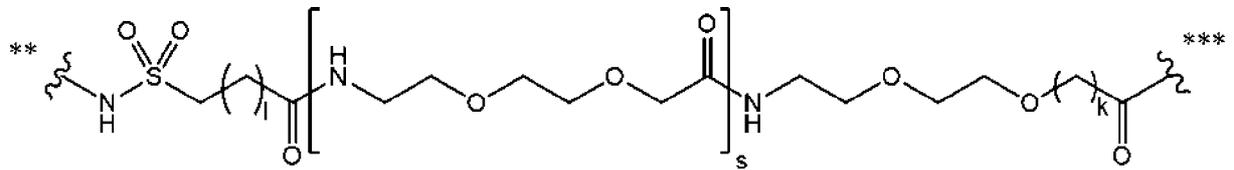
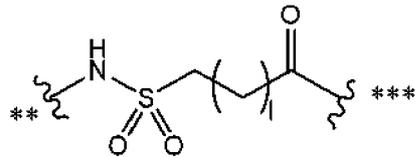
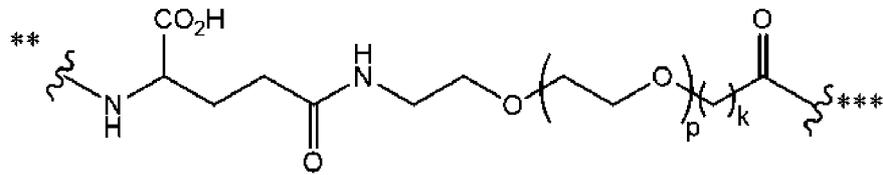
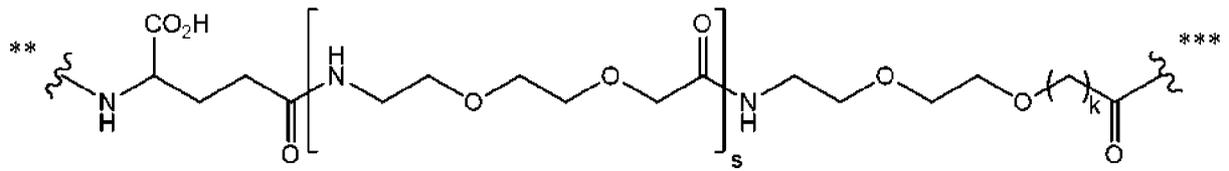
L представляет собой необязательный линкер, и P представляет собой GLP-1 или аналог GLP-1.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где GLP-1 или аналог GLP-1 (P) соединен с необязательным линкером (L) посредством группы NH.

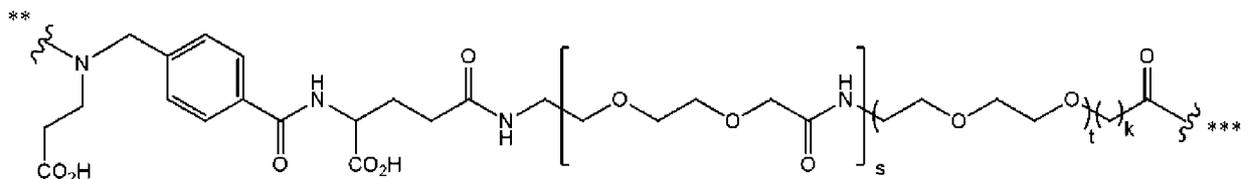
В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с предыдущими вариантами осуществления,

где линкер (L) выбран из





И



где

у представляет собой целое число, выбранное из 1-36;

l равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6;

k равняется 1, 2 или 3;

s равняется 0, 1, 2 или 3;

t равняется 0, 1, 2, 3 или 4;

p равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23;

где волнистая линия, обозначенная **, указывает на точку присоединения к СО-группе формулы (I), и где волнистая линия, обозначенная ***, указывает на точку присоединения к группе Р.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где

у представляет собой целое число, выбранное из 1-36;

l равняется 2, 3, 4 или 5;

k равняется 1 или 2;

s равняется 0, 1 или 2;

t равняется 0, 1, 2 или 3; и

p равняется 1, 2, 3, 4, 7, 11 или 23.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где

у представляет собой целое число, выбранное из 1-36;

l равняется 2, 3, 4 или 5;

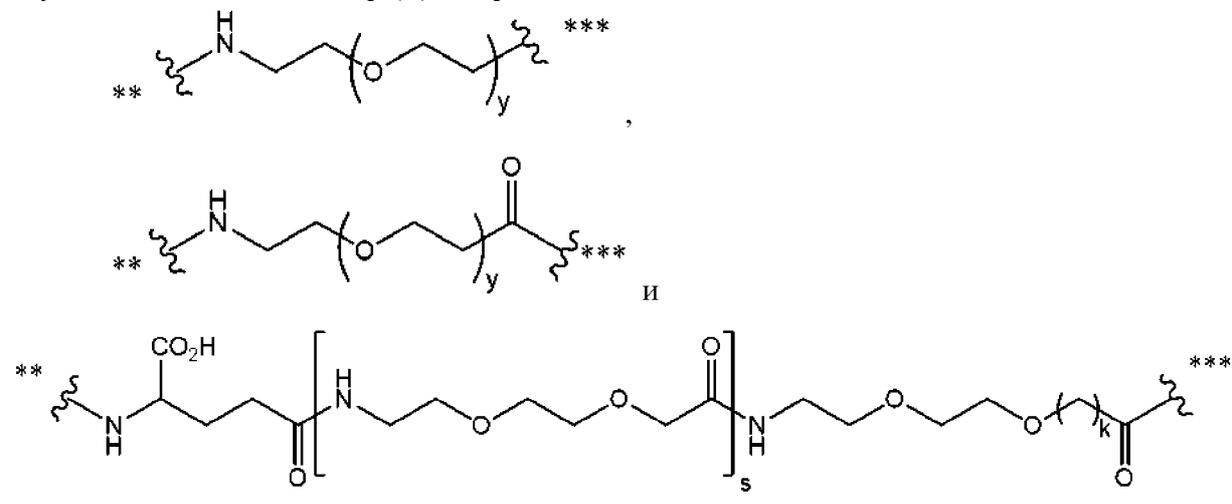
k равняется 1 или 2;

s равняется 0, 1 или 2;

t равняется 0 или 1; и

p равняется 1, 2, 3, 4 или 11.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где линкер (L) выбран из



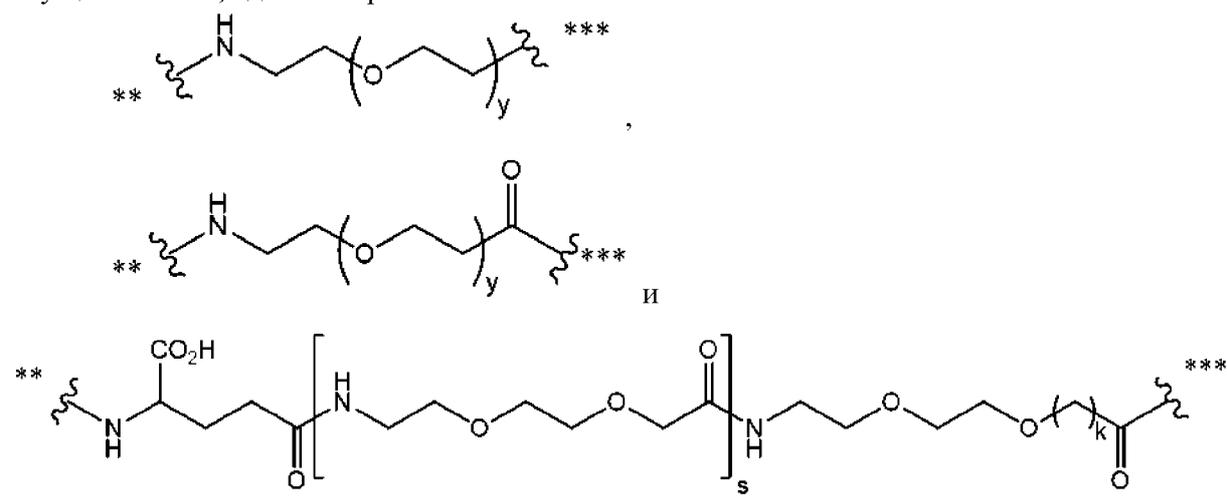
где

у представляет собой целое число, выбранное из 1-36,

s равняется 1, и k равняется 1, и

где волнистая линия, обозначенная **, указывает на точку присоединения к СО-группе формулы (I), и где волнистая линия, обозначенная ***, указывает на точку присоединения к группе Р.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где L выбран из



где

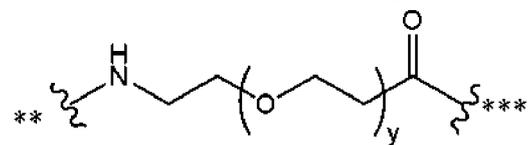
у представляет собой целое число, выбранное из 1-36,

s равняется 0, 1 или 2, и k равняется 1, 2 или 3, и

волнистая линия, обозначенная **, указывает на точку присоединения к СО-группе формулы (I), и

волнистая линия, обозначенная ***, указывает на точку присоединения к группе Р.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где линкер (L) выбран из

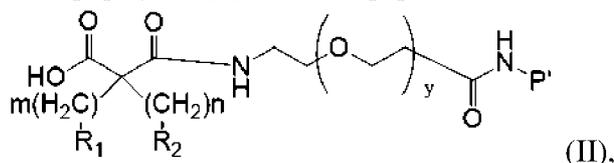


где у представляет собой целое число, выбранное из 1-36.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где атом углерода группы С(О) указанного линкера присоединен к атому азота группы NH лизинового остатка в GLP-1 или аналоге GLP-1.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с предыдущими вариантами осуществления, где R₁ и R₂ независимо выбраны из CH₃, OH и CO₂H.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I) в соответствии с предыдущими вариантами осуществления, которое представляет собой соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль,



где

NH-P' представляет собой группу P (т. е. GLP-1 или аналог GLP-1), которая присоединена посредством NH-фрагмента к линкеру L;

R₁ и R₂ независимо выбраны из CH₃, OH и CO₂H;

каждый из n и m представляет собой целое число, независимо выбранное из 5-30;

и

y представляет собой целое число, выбранное из 1-36.

В одном варианте осуществления группа P (т. е. GLP-1 или аналог GLP-1) соответствует P'-NH₂, т. е. группе P со свободной группой -NH₂, которая является частью боковой цепи аминокислоты, и P присоединена к линкеру L посредством указанной группы -NH.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (II), определенное в данном документе выше, где R₁ и R₂ независимо выбраны из CO₂H и CH₃.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (II), определенное в данном документе выше, где каждый из n и m представляет собой целое число, независимо выбранное из 5-20.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (II), определенное в данном документе выше, где каждый из n и m представляет собой целое число, независимо выбранное из 10, 11, 13 и 14.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (II), определенное в данном документе выше, где

R₁ представляет собой CO₂H, и R₂ представляет собой CH₃; n равняется 10, и m равняется 10;

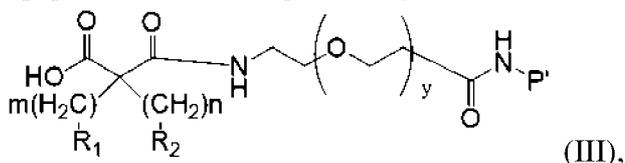
R₁ представляет собой CO₂H, и R₂ представляет собой CO₂H; n равняется 10, и m равняется 10;

R₁ представляет собой CO₂H, и R₂ представляет собой CO₂H; n равняется 10, и m равняется 11;

R₁ представляет собой CO₂H, и R₂ представляет собой CO₂H; n равняется 10, и m равняется 13; или

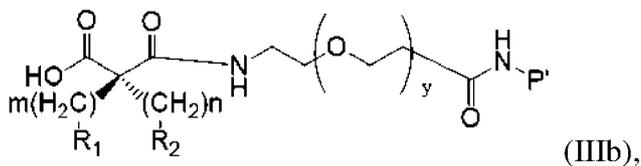
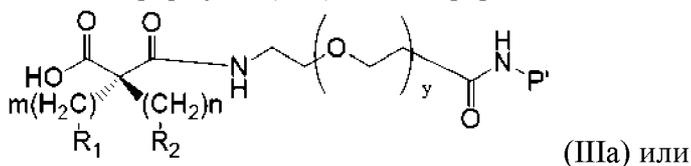
R₁ представляет собой CO₂H, и R₂ представляет собой CO₂H; n равняется 10, и m равняется 14.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (II), определенное в данном документе, которое представляет собой соединение формулы (III) или его фармацевтически приемлемую соль,



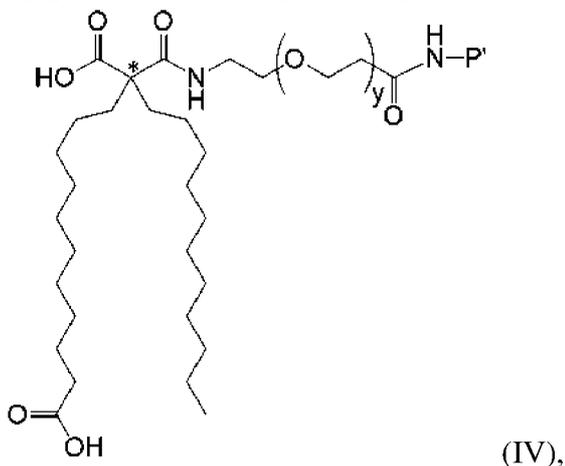
где R₁ представляет собой CO₂H, и R₂ представляет собой CH₃.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (III), определенное в данном документе, которое представляет собой соединение формулы (IIIa) или соединение формулы (IIIb) или их фармацевтически приемлемую соль,



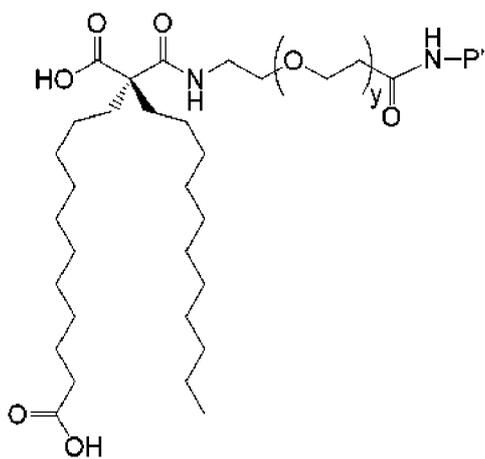
где R₁ представляет собой CO₂H, и R₂ представляет собой CH₃.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (II), определенное в данном документе, которое представляет собой соединение формулы (IV) или его фармацевтически приемлемую соль,

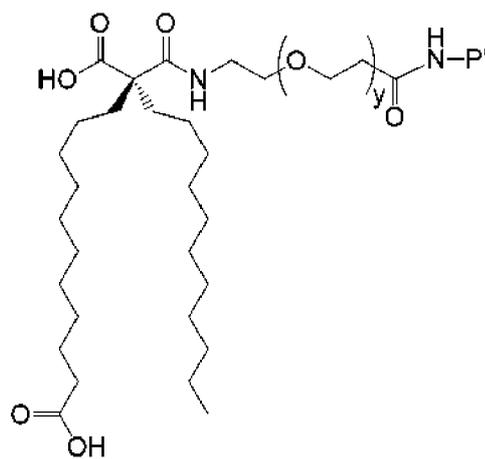


где соединение присутствует в виде рацемата или в виде стереохимически обогащенной смеси или является стереохимически чистым в отношении атома углерода, обозначенного *.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (IV), определенное в данном документе ранее, которое представляет собой соединение формулы (IVa) или соединение формулы (IVb) или их фармацевтически приемлемую соль,



(IVa)



(IVb),

где y представляет собой целое число, выбранное из 1-36.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (IVa) или соединение формулы (IVb), определенное в данном документе, где y представляет собой целое число, выбранное из 2-24.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (IVa) или соединение формулы (IVb), определенное в данном документе, где y представляет собой целое число, выбранное из 2, 8 и 24.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (IVa) или соединение формулы (IVb), определенное в данном документе, где y равняется 2.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (IVa) или соединение формулы (IVb), определенное в данном документе, где y равняется 8.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (IVa) или соединение формулы (IVb), определенное в данном документе, где y равняется 24.

В другом варианте осуществления представлено соединение в соответствии с любым из определенных выше вариантов осуществления или его фармацевтически приемлемая соль, где P выбран из

GLP-1 (7-37): His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly (**SEQ ID NO:1**), и

аналога GLP-1, содержащего неприродный аминокислотный остаток в положении 7, или в положении 8, или в положении 7 и 8 по сравнению с последовательностью GLP-1 (7-37) (**SEQ ID NO:1**).

В другом варианте осуществления представлено соединение в соответствии с любым из определенных выше вариантов осуществления или его фармацевтически приемлемая соль, где P представляет собой

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇ (**SEQ ID NO:2**) (далее в данном документе P^*),

где

Xaa₇ представляет собой His, имидазопропионил, α -гидроксигистидин, D-гистидин, дезаминогистидин, 2-аминогистидин, β -гидроксигистидин, гомогистидин, N ^{α} -

ацетилгистидин, N^α-формилгистидин, α-фторметилгистидин, α-метилгистидин, 3-пиридилаланин, 2-пиридилаланин или 4-пиридилаланин;

Хаа₈ представляет собой Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Thr, Ser, Lys, Aib, (1-аминоциклопропил)карбоновую кислоту, (1-аминоциклобутил)карбоновую кислоту, (1-аминоциклопентил)карбоновую кислоту, (1-аминоциклогексил)карбоновую кислоту, (1-аминоциклогептил)карбоновую кислоту или (1-аминоциклооктил)карбоновую кислоту;

Хаа₁₆ представляет собой Val или Leu;

Хаа₁₈ представляет собой Ser, Lys или Arg;

Хаа₁₉ представляет собой Tyr или Gln;

Хаа₂₀ представляет собой Leu или Met;

Хаа₂₂ представляет собой Gly, Glu или Aib;

Хаа₂₃ представляет собой Gln, Glu, Lys или Arg;

Хаа₂₅ представляет собой Ala или Val;

Хаа₂₇ представляет собой Glu или Leu;

Хаа₃₀ представляет собой Ala, Glu или Arg;

Хаа₃₃ представляет собой Val или Lys;

Хаа₃₄ представляет собой Lys, Glu, Asn или Arg;

Хаа₃₅ представляет собой Gly или Aib;

Хаа₃₆ представляет собой Arg, Gly или Lys или отсутствует; и

Хаа₃₇ представляет собой Gly, Ala, Glu, Pro, Lys или отсутствует.

В другом варианте осуществления представлено соединение в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления, где в Р*:

Хаа₇ представляет собой His или дезаминогистидин;

Хаа₈ представляет собой Ala, Gly, Val, Leu, Lys или Aib;

Хаа₁₆ представляет собой Val;

Хаа₁₈ представляет собой Ser;

Хаа₁₉ представляет собой Tyr;

Хаа₂₀ представляет собой Leu;

Хаа₂₂ представляет собой Gly, Glu или Aib;

Хаа₂₃ представляет собой Gln или Glu;

Хаа₂₅ представляет собой Ala;

Хаа₂₇ представляет собой Glu;

Хаа₃₀ представляет собой Ala или Glu;

Хаа₃₃ представляет собой Val;

Хаа₃₄ представляет собой Lys или Arg;

Хаа₃₅ представляет собой Gly или Aib;

Хаа₃₆ представляет собой Arg или Lys или отсутствует; и

Хаа₃₇ представляет собой Gly или отсутствует.

В другом варианте осуществления представлено соединение в соответствии с вышеуказанным вариантом осуществления, где в Р*:

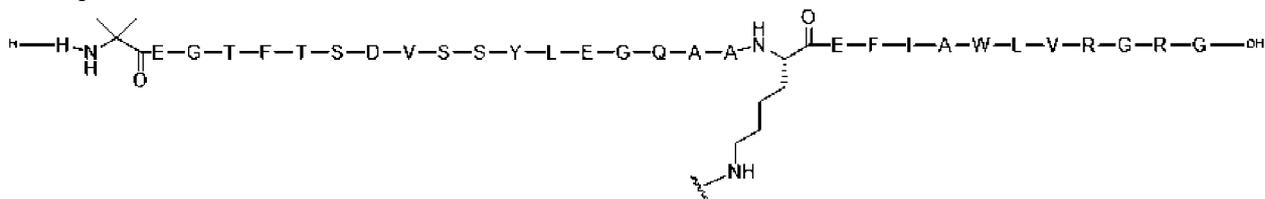
Хаа₇ представляет собой His;
 Хаа₈ представляет собой Gly или Aib;
 Хаа₁₆ представляет собой Val;
 Хаа₁₈ представляет собой Ser;
 Хаа₁₉ представляет собой Tyr;
 Хаа₂₀ представляет собой Leu;
 Хаа₂₂ представляет собой Glu или Aib;
 Хаа₂₃ представляет собой Gln или Glu;
 Хаа₂₅ представляет собой Ala;
 Хаа₂₇ представляет собой Glu;
 Хаа₃₀ представляет собой Ala;
 Хаа₃₃ представляет собой Val;
 Хаа₃₄ представляет собой Lys или Arg;
 Хаа₃₅ представляет собой Gly или Aib;
 Хаа₃₆ представляет собой Arg; и
 Хаа₃₇ представляет собой Gly.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I), определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, где R выбран из

[Aib8, Arg34]GLP-1 (7-37): His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly (SEQ ID NO:3); и

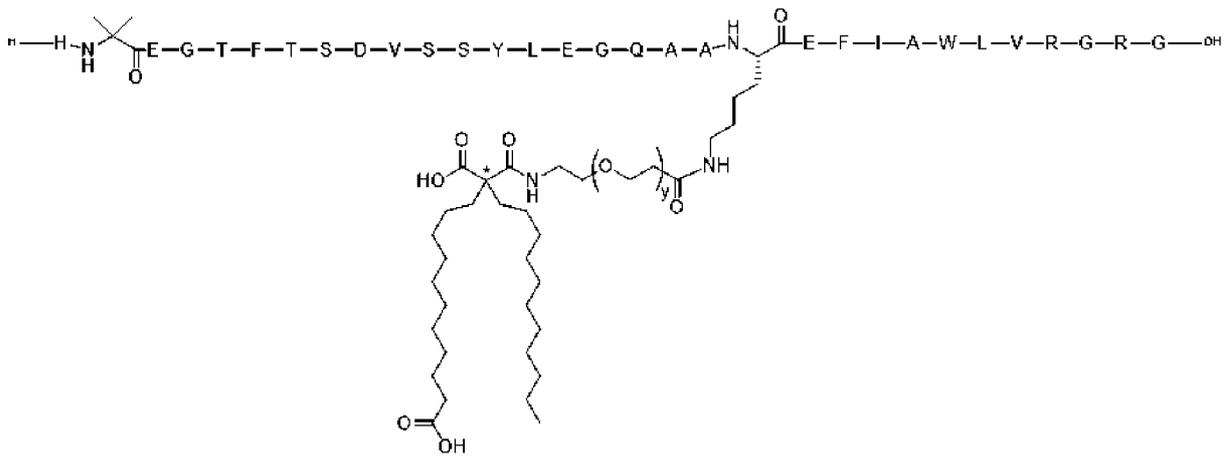
[Arg34]GLP-1 (7-37): His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly (SEQ ID NO:4).

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I), определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, где R представляет собой **[Aib8, Arg34]GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO:3)** или в качестве альтернативы является таким, как показано ниже:



и при этом волнистая линия при аминокислотном члене Lys указывает на точку присоединения к линкеру.

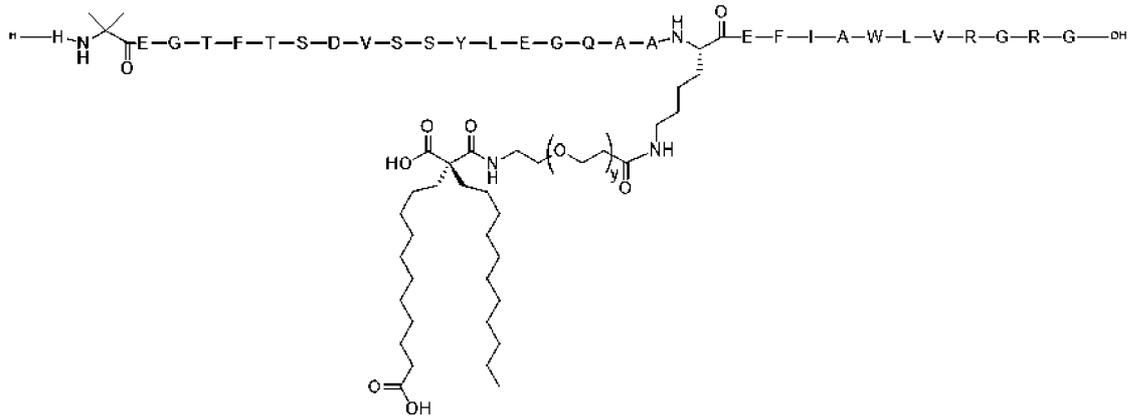
В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I), определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



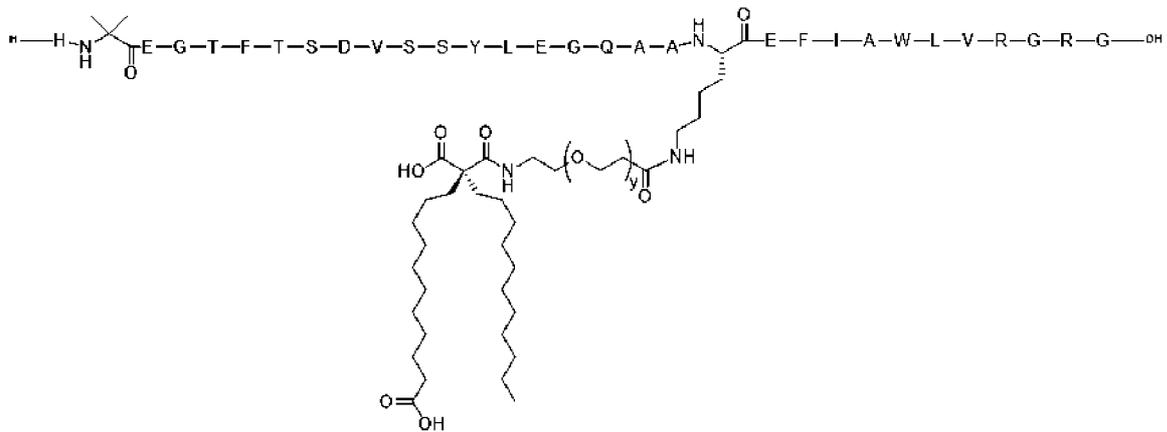
где y представляет собой целое число, выбранное из 1-36; и

где соединение присутствует в виде смеси диастереомеров, стереохимически обогащенной смеси или является стереохимически чистым в отношении атома углерода, обозначенного *.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I), определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представлено формулой (X) или формулой (XI),



(X),



(XI),

где y представляет собой целое число, выбранное из 1-36.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (X) или формулы (XI), определенное в данном документе, где y представляет собой целое число, выбранное из 2-24.

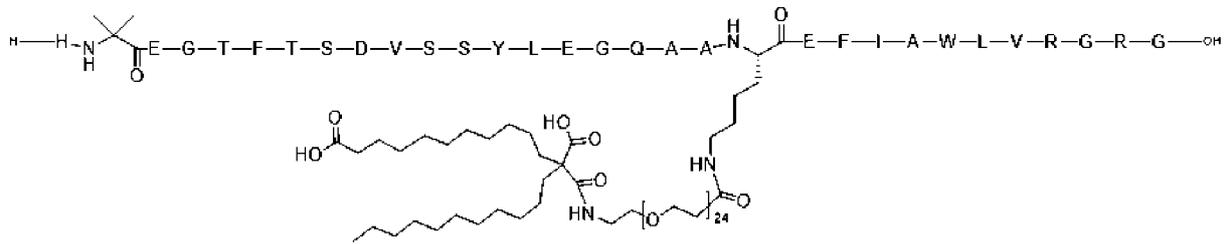
В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (X) или формулы (XI), определенное в данном документе, где u представляет собой целое число, выбранное из 2, 8 и 24.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (X) или формулы (XI), определенное в данном документе, где u равняется 2.

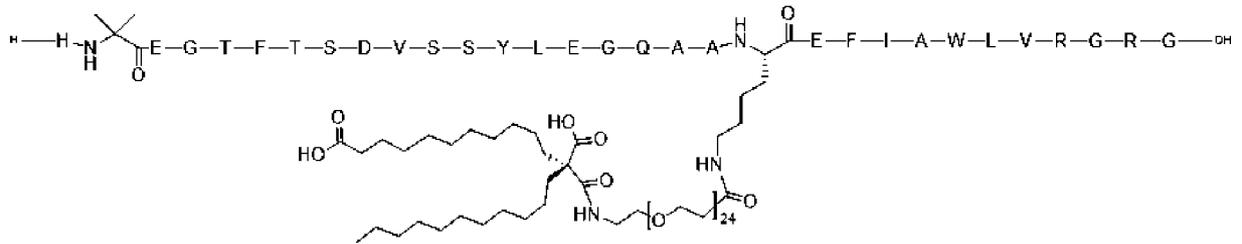
В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (X) или формулы (XI), определенное в данном документе, где u равняется 8.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (X) или формулы (XI), определенное в данном документе, где u равняется 24.

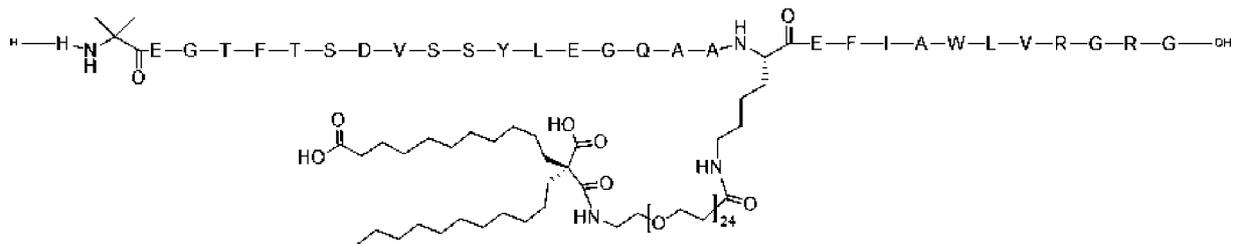
В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I), определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, которое выбрано из



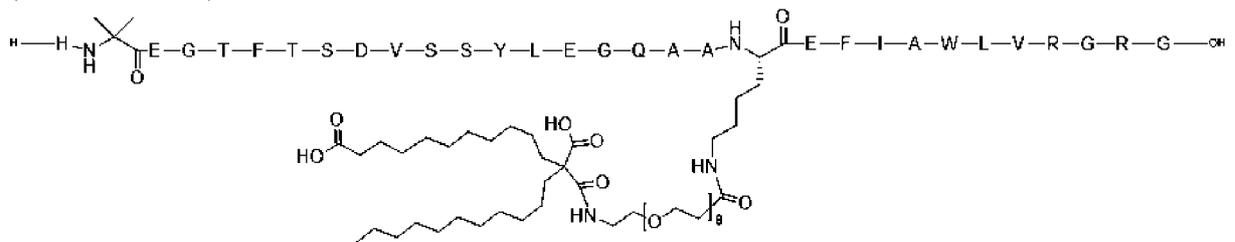
(Соединение 1),



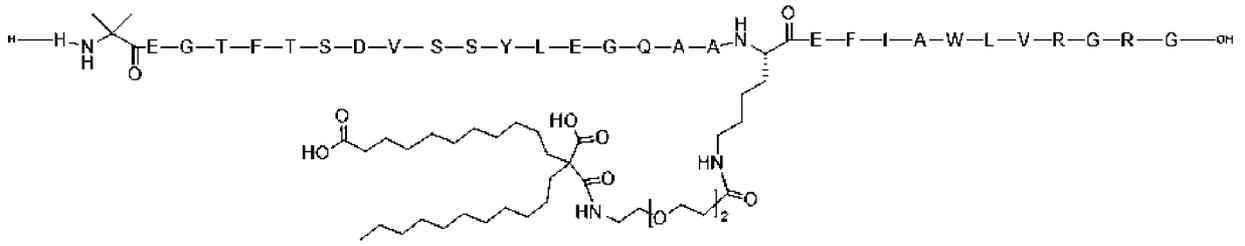
(Соединение 2),



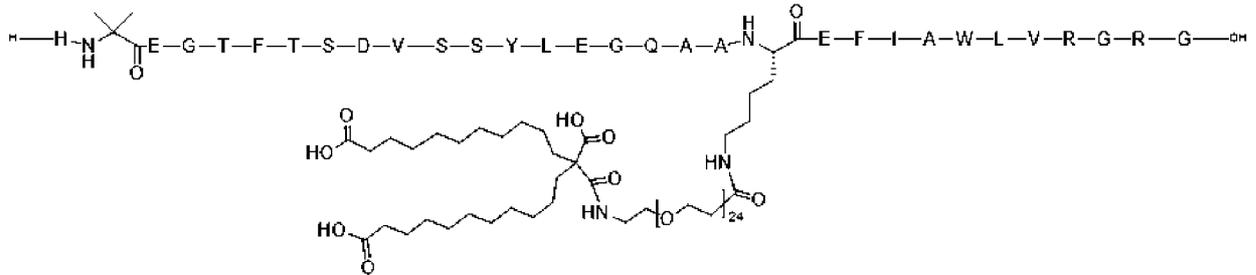
(Соединение 3),



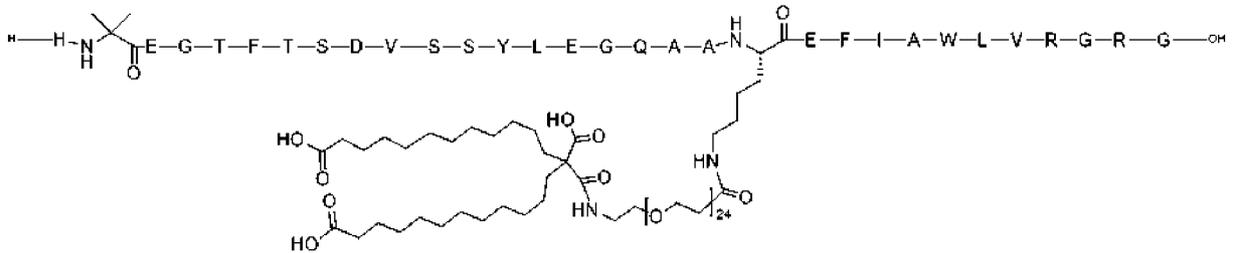
(Соединение 4),



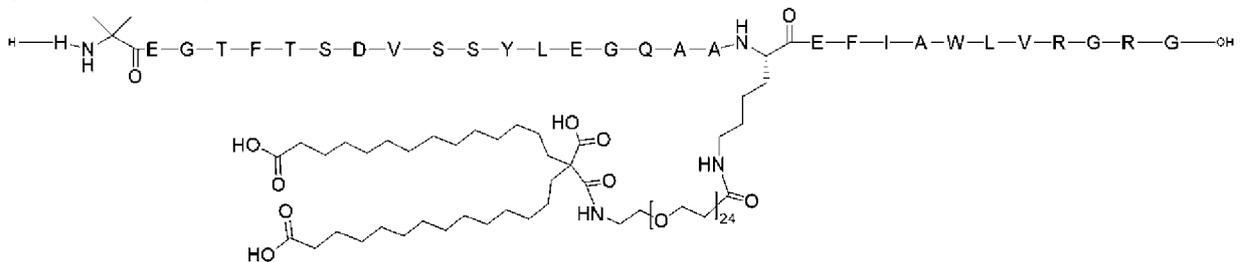
(Соединение 5),



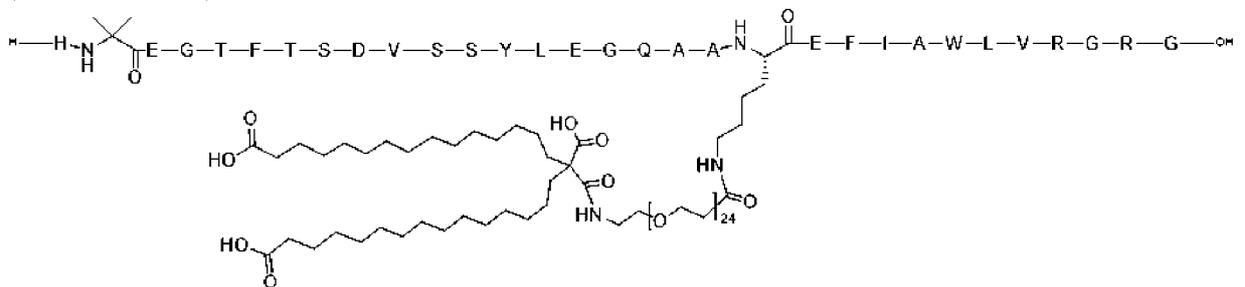
(Соединение 6),



(Соединение 7),

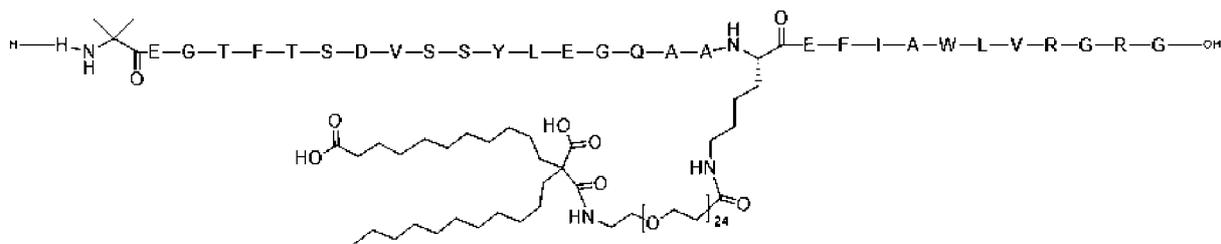


(Соединение 8) и



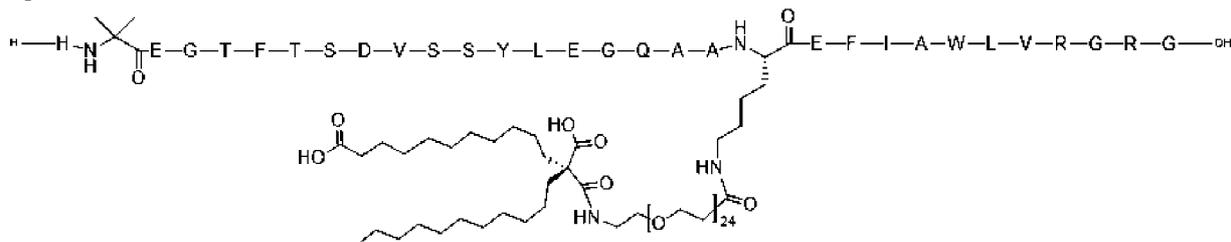
(Соединение 9).

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I), определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



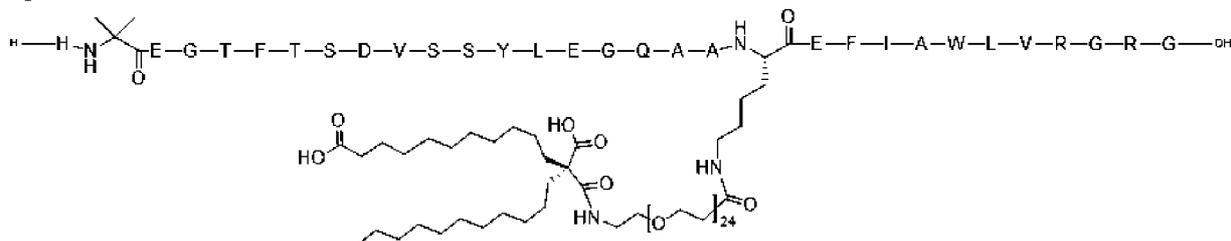
(Соединение 1).

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I), определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



(Соединение 2).

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I), определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



(Соединение 3).

В другом варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция, содержащая соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

В другом варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где соединение выбрано из соединения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

В другом варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где соединение выбрано из соединения 1, 2 и 3.

В другом варианте осуществления представлена комбинация, содержащая терапевтически эффективное количество соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли и одно или несколько терапевтически активных средств.

В другом варианте осуществления представлена комбинация в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где соединение выбрано из соединения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

В другом варианте осуществления представлена комбинация в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где соединение выбрано из соединения 1, 2 и 3.

В другом варианте осуществления представлено соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль для применения в качестве лекарственного препарата.

В другом варианте осуществления представлено соединение для применения в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где соединение выбрано из соединения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

В другом варианте осуществления представлено соединение для применения в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где соединение выбрано из соединения 1, 2 и 3.

В другом варианте осуществления представлено соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении заболевания или нарушения, выбранного из ожирения, сахарного диабета 2-го типа, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, одного или нескольких осложнений диабета (включающих без ограничения хроническое заболевание почек), диабетической нефропатии, дислипидемии, метаболического синдрома, прогрессирующего заболевания печени, сердечно-сосудистого заболевания и невропатии. В качестве неограничивающего примера невропатия представляет собой периферическую невропатию (которая, например, может быть ассоциирована с диабетом).

В другом варианте осуществления представлено соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении сердечно-сосудистого заболевания или нарушения, выбранного из гипертензии, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, кардиомиопатии, фибрилляции предсердий, сердечной недостаточности (например, сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (HF_rEF), сердечной недостаточности с промежуточной фракцией выброса (HF_{mr}EF) и сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (HF_{pr}EF), коронарного заболевания сердца и видов аритмии (например, видов предсердной аритмии и видов желудочковой аритмии).

В другом варианте осуществления представлено соединение для применения в соответствии с двумя предыдущими вариантами осуществления, где соединение выбрано из соединения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

В другом варианте осуществления представлено соединение для применения в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где соединение выбрано из соединения 1, 2 и 3.

В другом варианте осуществления представлен способ лечения пациента, нуждающегося в терапии, который является восприимчивым к агонисту рецептора

глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1R), включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом варианте осуществления представлен способ лечения в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где соединение выбрано из соединения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

В другом варианте осуществления представлен способ лечения в соответствии с предыдущим вариантом осуществления, где соединение выбрано из соединения 1, 2 и 3.

В другом варианте осуществления представлен способ лечения в соответствии с предыдущими вариантами осуществления, где пациент страдает от заболевания или нарушения, выбранного из ожирения, сахарного диабета 2-го типа, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, одного или нескольких осложнений диабета (включающих без ограничения хроническое заболевание почек), диабетической нефропатии, дислипидемии, метаболического синдрома, прогрессирующего заболевания печени, сердечно-сосудистого заболевания и невропатии. В качестве неограничивающего примера невропатия представляет собой периферическую невропатию (которая, например, может быть ассоциирована с диабетом).

В другом варианте осуществления представлен способ лечения в соответствии с предыдущими вариантами осуществления, где пациент страдает от сердечно-сосудистого заболевания или нарушения, выбранного из гипертензии, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, кардиомиопатии, фибрилляции предсердий, сердечной недостаточности (например, сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (HFrEF), сердечной недостаточности с промежуточной фракцией выброса (HFmrEF) и сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), коронарного заболевания сердца и видов аритмии (например, видов предсердной аритмии и видов желудочковой аритмии).

Дополнительные аспекты

В зависимости от выбора исходных материалов и процедур, соединения могут быть представлены в форме одного из возможных стереоизомеров или в виде их смесей, например, в виде чистых оптических изомеров или в виде смесей стереоизомеров, таких как рацематы и смеси диастереоизомеров, в зависимости от количества асимметрических атомов углерода. Описанные в данном документе соединения не ограничены, и соединения включают все такие возможные стереоизомеры, в том числе рацемические смеси, смеси диастереомеров и оптически чистые формы. Оптически активные (R)- и (S)-стереоизомеры могут быть получены с использованием хиральных синтонов или хиральных реагентов или выделены с применением традиционных методик. Если соединение содержит двойную связь, то заместитель может находиться в E- или Z-конфигурации. Если соединение содержит двузамещенный циклоалкил, то заместитель циклоалкила может характеризоваться цис- или транс-конфигурацией. Предполагается, что все таутомерные формы также включены.

При использовании в данном документе термины “соль” или “соли” означают соль присоединения кислоты или присоединения основания соединения по настоящему изобретению. “Соли” включают, в частности, “фармацевтически приемлемые соли”. Термин “фармацевтически приемлемые соли” относится к солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства соединений по настоящему изобретению и которые, как правило, не являются нежелательными с биологической или иной точки зрения. Во многих случаях соединения по настоящему изобретению способны к образованию кислых и/или основных солей за счет присутствия основных атомов азота, например которые находятся в амино- и пиридиновых группах или других им аналогичных группах, и/или кислотных протонов, например которые находятся в группах карбоновых кислот или 5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазола или других аналогичных им группах.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты могут быть образованы с помощью неорганических кислот и органических кислот. Неорганические кислоты, из которых можно получать соли, включают, например, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т. п. Органические кислоты, из которых могут быть получены соли, включают, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, щавелевую кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, толуолсульфоновую кислоту, сульфосалициловую кислоту и т. п.

Фармацевтически приемлемые соли присоединения основания могут быть образованы неорганическими и органическими основаниями. Неорганические основания, из которых могут быть получены соли, включают, например, соли аммония и металлов из групп I-XII периодической таблицы элементов. В определенных вариантах осуществления данные соли получают с использованием натрия, калия, аммония, кальция, магния, железа, серебра, цинка и меди; в частности, подходящие соли включают аммониевые, калиевые, натриевые, кальциевые и магниевые соли. Органические основания, из которых могут быть получены соли, включают, например, первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, включая встречающиеся в природе замещенные амины, циклические амины, основные ионообменные смолы и т. п. Определенные органические амины включают изопропиламин, бензатин, холинат, диэтанолламин, диэтиламин, лизин, меглюмин, пиперазин и трометамин.

В другом аспекте представлены соединения по настоящему изобретению в форме соли натрия, калия, аммония, кальция, магния, железа, серебра, цинка, меди, изопропиламина, бензатина, холината, диэтанолламина, диэтиламина, лизина, меглюмина, пиперазина или трометамина.

В другом аспекте представлены соединения по настоящему изобретению в форме соли, представляющей собой ацетат, аскорбат, адипат, аспартат, бензоат, безилат,

бромид/гидробромид, бикарбонат/карбонат, бисульфат/сульфат, камфорсульфонат, капринат, хлорид/гидрохлорид, хлортеофиллонат, цитрат, этандисульфонат, фумарат, глюцептат, глюконат, глюкуронат, глутамат, глутарат, гликолят, гиппурат, гидройодид/йодид, изетионат, лактат, лактобионат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, соль миндальной кислоты, мезилат, метилсульфат, соль муциновой кислоты, нафтоат, напсилат, никотинат, нитрат, октадеcanoат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, фосфат/гидрофосфат/дигидрофосфат, полигалактуронат, пропионат, себацинат, стеарат, сукцинат, сульфосалицилат, сульфат, тартрат, тозилат трифенатат, трифторацетат или ксинафоат.

Любая формула, приведенная в данном документе, также подразумевает присутствие немеченых форм, а также изотопно-меченых форм соединений. Меченые изотопом соединения характеризуются структурами, изображенными с помощью формул, приведенных в данном документе, за исключением того, что один или несколько атомов заменены атомом, характеризующимся выбранными атомной массой или массовым числом. Изотопы, которые можно включать в состав соединений, описанных в данном документе, включают, например, изотопы водорода.

Кроме того, включение определенных изотопов, в частности дейтерия (т. е. ^2H или D) может обеспечивать определенные терапевтические преимущества, обусловленные более высокой метаболической устойчивостью, например увеличенным периодом полувыведения *in vivo*, или снижением требуемой дозы, или улучшением терапевтического индекса или переносимости. Известно, что дейтерий в данном контексте рассматривается в качестве заместителя соединения, описанного в данном документе. Концентрация дейтерия может быть определена с помощью коэффициента изотопного обогащения. Используемый в данном документе термин "коэффициент изотопного обогащения" означает соотношение между содержанием изотопа и распространенностью в природе указанного изотопа. Если заместитель в соединении, описанном в данном документе, указан как дейтерий, то такое соединение характеризуется коэффициентом изотопного обогащения для каждого обозначенного атома дейтерия, составляющим по меньшей мере 3500 (включение 52,5% дейтерия по каждому обозначенному атому дейтерия), по меньшей мере 4000 (включение 60% дейтерия), по меньшей мере 4500 (включение 67,5% дейтерия), по меньшей мере 5000 (включение 75% дейтерия), по меньшей мере 5500 (включение 82,5% дейтерия), по меньшей мере 6000 (включение 90% дейтерия), по меньшей мере 6333,3 (включение 95% дейтерия), по меньшей мере 6466,7 (включение 97% дейтерия), по меньшей мере 6600 (включение 99% дейтерия) или по меньшей мере 6633,3 (включение 99,5% дейтерия). Следует понимать, что термин "коэффициент изотопного обогащения" можно применять в отношении любого изотопа таким же образом, как описано для дейтерия.

Другие примеры изотопов, которые могут быть включены в соединения, описанные в данном документе, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фтора и серы, такие как ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{35}S соответственно. Следовательно,

следует понимать, что включены любые соединения, описанные в данном документе, в которые включены один или несколько любых из вышеуказанных изотопов, в том числе, например, радиоактивные изотопы, такие как ^3H и ^{14}C , или соединения, в которых присутствуют нерадиоактивные изотопы, такие как ^2H и ^{13}C . Такие изотопно-меченные соединения применимы в метаболических исследованиях (с использованием ^{14}C), исследованиях кинетики реакций (например, с использованием ^2H или ^3H), методиках обнаружения или визуализации, таких как позитронно-эмиссионная томография (PET) или однофотонная эмиссионная компьютерная томография (SPECT), включая анализы распределения лекарственного средства или субстрата в тканях, или при лучевой терапии пациентов. В частности, ^{18}F или меченое соединение может быть особенно востребованным для исследований с помощью PET или SPECT. Изотопно-меченые соединения, описанные в данном документе, как правило, можно получать с помощью традиционных методик, известных специалистам в данной области, или посредством способов, аналогичных описанным в сопутствующих примерах и способах получения, с использованием подходящих изотопно-меченых реагентов вместо немеченого реагента, используемого ранее.

Используемый в данном документе термин "фармацевтическая композиция" означает соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль вместе с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем в форме, подходящей для перорального или парентерального введения.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к веществу, применимому в получении или применении фармацевтической композиции, и включает, например, подходящие разбавители, растворители, дисперсионные среды, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты, изотонические средства, буферные средства, эмульгаторы, средства, замедляющие всасывание, соли, стабилизаторы лекарственных средств, связывающие вещества, наполнители, разрыхлители, смазывающие вещества, смачивающие средства, подсластители, ароматизирующие средства, красители и их комбинации, которые должны быть известны специалистам в данной области (см., например, Remington The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Ed. Pharmaceutical Press, 2013, pp. 1049-1070).

Термин "терапевтически эффективное количество" соединения, описанного в данном документе, относится к количеству этого соединения, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ у субъекта. В качестве неограничивающего ряда примеров такое терапевтически эффективное количество соединения, описанного в данном документе, может, например, обеспечивать агонистическое воздействие на активность GLP1R, уменьшать интенсивность проявления одного или нескольких симптомов, облегчать одно или несколько состояний, замедлять или задерживать прогрессирование заболевания, нарушения или состояния или предупреждать заболевание, нарушение или состояние.

Используемый в данном документе термин “терапевтически эффективное количество” относится к количеству соединения, описанного в данном документе, которое при введении субъекту по меньшей мере частично облегчает, предупреждает и/или уменьшает тяжесть состояния, или нарушения, или заболевания, восприимчивых к повышению активности GLP1R или обеспечению агонистического воздействия на нее. В другом варианте осуществления термин “терапевтически эффективное количество” относится к количеству соединения, описанного в данном документе, которое при введении субъекту, в клетку или ткань; или неклеточный биологический материал; или среду по меньшей мере частично повышает активность GLP1R или обеспечивает агонистическое воздействие на нее или по меньшей мере частично повышает экспрессию GLP1R или обеспечивает агонистическое воздействие на нее. В другом варианте осуществления термин “терапевтически эффективное количество” относится к количеству соединения, описанного в данном документе, которое при введении субъекту обуславливает наблюдаемый уровень одного или нескольких требуемых биологических или медицинских ответов, например, выбранных из снижения уровней глюкозы (такого как снижение уровней глюкозы в крови), повышения чувствительности к инсулину, улучшения гомеостаза глюкозы, снижения уровней триглицеридов или холестерина, снижения веса тела, снижения потребления пищи и снижения жировой массы тела (такой как уровень периферического жира и/или висцерального жира).

Используемые в данном документе термины “пациент” или “субъект” взаимозаменяемы и относятся к приматам (например, людям, мужчинам или женщинам; или отличным от человека приматам), собакам, кроликам, морским свинкам, свиньям, крысам и мышам. В определенных вариантах осуществления субъектом является примат. В других вариантах осуществления субъектом является человек.

Используемые в данном документе термины “обеспечивать агонистическое воздействие”, “агонистическое воздействие” и “обеспечивающий агонистическое воздействие” относятся к повышению уровня передачи сигнала GLP1R, как, например, измерено по повышению количества внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата (сAMP).

Используемые в данном документе термины “лечить”, “осуществление лечения” или “лечение” в отношении любого заболевания, нарушения или состояния относятся к облегчению или уменьшению тяжести заболевания, нарушения или состояния (т. е. замедлению или приостановке развития или прогрессирования заболевания, нарушения или состояния или по меньшей мере одного из их клинических симптомов) или облегчению или уменьшению интенсивности проявления по меньшей мере одного физического параметра или биомаркера, ассоциированных с заболеванием, нарушением или состоянием, в том числе таких, которые могут не ощущаться пациентом.

Используемый в данном документе термин “предупреждать”, “осуществление предупреждения” или “предупреждение” в отношении любого заболевания, нарушения или состояния относятся к профилактическому лечению заболевания, нарушения или

состояния или обеспечению задержки проявления или прогрессирования заболевания, нарушения или состояния.

Как используется в данном документе, субъект “нуждается в” лечении, если в результате такого лечения такой субъект получит пользу с биологической, медицинской точки зрения, или улучшится качество его жизни.

Используемые в данном документе термины в форме единственного числа и аналогичные используемые термины (в частности, в рамках формулы изобретения), следует истолковывать как охватывающие как форму единственного числа, так и форму множественного числа, если в данном документе не указано иное или если это явно не противоречит контексту.

Все способы, описанные в данном документе, можно осуществлять в любом подходящем порядке, если в данном документе не указано иное, или это иным образом явно не противоречит контексту. Использование всех без исключения примеров или вводных слов перед примерами (например, “такой как”), представленными в данном документе, предназначено исключительно для лучшего объяснения композиций и способов или вариантов применения, представленных в данном документе, и не накладывает ограничения на объем, заявленный иным образом.

Любой асимметрический атом (например, углерод и т. п.) в соединении(-ях), описанном(-ых) в данном документе, может находиться в рацемической или энантимерно обогащенной форме, например, в (R)-, (S)- или (R, S)-конфигурации. В определенных вариантах осуществления каждый асимметричный атом характеризуется по меньшей мере 50% энантимерным избытком, по меньшей мере 60% энантимерным избытком, по меньшей мере 70% энантимерным избытком, по меньшей мере 80% энантимерным избытком, по меньшей мере 90% энантимерным избытком, по меньшей мере 95% энантимерным избытком или по меньшей мере 99% энантимерным избытком в (R)- или (S)-конфигурации.

Соответственно, как используется в данном документе, соединение, описанное в данном документе, может находиться в форме одного из возможных стереоизомеров, ротамеров, атропоизомеров, таутомеров или их смесей, например, в виде по сути чистых диастереомеров, оптических изомеров (антиподов), рацематов или их смесей.

Любые полученные смеси стереоизомеров могут быть разделены на основании физико-химических отличий их составляющих на чистые или по сути чистые геометрические или оптические изомеры, диастереомеры, рацематы, например, посредством хроматографии и/или фракционной кристаллизации.

Любые полученные рацематы соединений, описанных в данном документе, или промежуточных соединений могут быть разделены на оптические антиподы посредством известных способов, например посредством разделения их диастереомерных солей, полученных с помощью оптически активных кислоты или основания, и высвобождения оптически активных кислотного или основного соединения. В частности, основной фрагмент можно использовать, таким образом, для разделения соединений, описанных в

данном документе, на их оптические антиподы, например, путем фракционной кристаллизации соли, образованной с оптически активной кислотой, например винной кислотой, дибензоилвинной кислотой, диацетилвинной кислотой, ди-О, О'-*n*-толуоилвинной кислотой, миндальной кислотой, яблочной кислотой или камфор-10-сульфоновой кислотой. Рацемические соединения, описанные в данном документе, или рацемические промежуточные соединения также могут быть разделены посредством хиральной хроматографии, например жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC) с применением хирального адсорбента.

Соединения по настоящему изобретению могут быть получены специалистами в области органического синтеза с использованием коммерчески доступных исходных материалов, известных в литературе соединений или из легко получаемых промежуточных соединений путем применения стандартных способов и процедур синтеза, либо известных специалистам в данной области техники, либо которые будут очевидны квалифицированному химику в свете идей, представленных в данном документе.

Соединения, описанные в данном документе, могут быть получены с помощью способов, известных в области органического синтеза, частично изложенных в следующих схемах синтеза. В схемах, описанных ниже, подразумевается, что при необходимости используются защитные группы для нестабильных или реакционноспособных групп в соответствии с общими принципами химии. С защитными группами проводят действия в соответствии со стандартными способами органического синтеза, описанными, например, в *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd edition, John Wiley & Sons: New York, 1999 или *Protecting Groups*, 3rd edition, Thieme, Stuttgart, 2004. Защитные группы удаляют на подходящей стадии синтеза соединений с применением способов, очевидных для специалистов в данной области техники.

Специалисты в данной области техники смогут определить наличие стереоцентра в соединениях, раскрытых в данном документе. Выделение конечного продукта, промежуточного соединения или исходного материала может быть выполнено посредством любого подходящего способа, известного из уровня техники. См., например, *"Stereochemistry of Organic Compounds"* E. L. Eliel, S. H. Wilen, и L. N. Mander (Wiley-Interscience, 1994).

Описанные в данном документе соединения можно получать из коммерчески доступных исходных материалов или синтезировать с применением известных органических, неорганических и/или ферментативных способов.

Получение соединений

Соединения, описанные в данном документе, могут быть получены посредством множества способов, широко известных специалистам в области органического синтеза. В качестве примера, соединения по настоящему изобретению могут быть синтезированы с применением способов, описанных ниже, вместе со способами синтеза, известными в

области химии органического синтеза, или вариациями на их основе, как понятно специалисту в данной области техники.

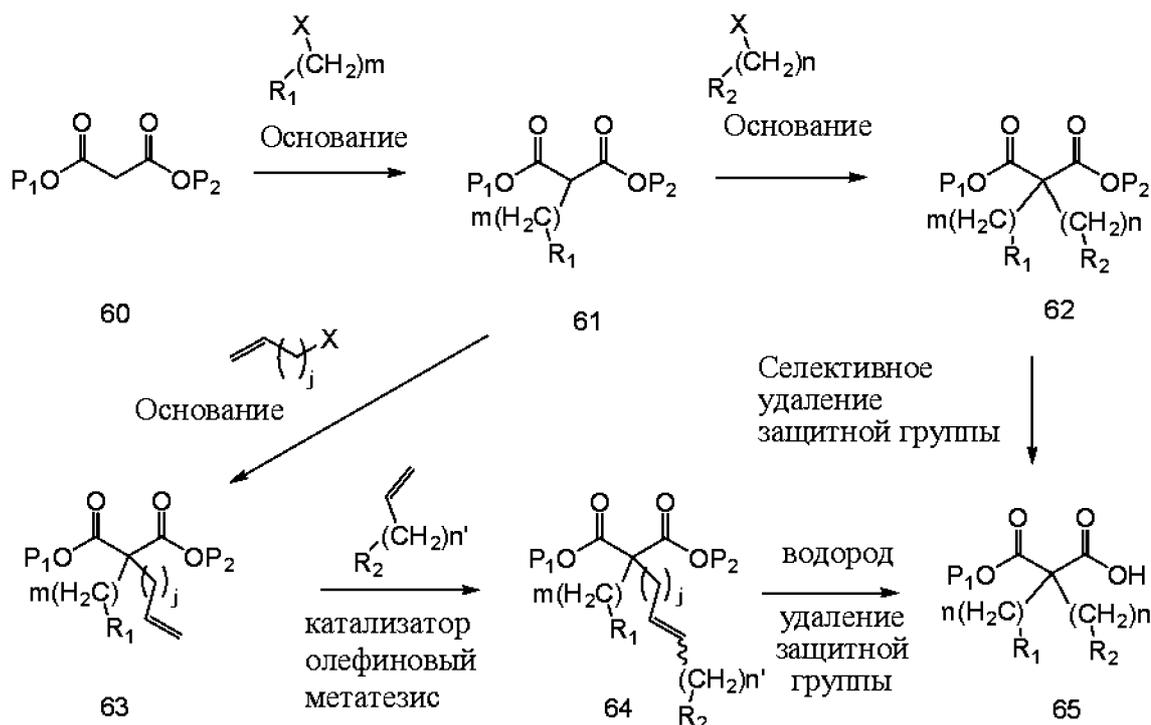
Общая процедура синтеза

Соединения, описанные в данном документе, могут быть изготовлены, как подробно показано в экспериментальном разделе (раздел ХИМИЧЕСКИЕ ПРИМЕРЫ), например как показано далее.

Общая схема (I): синтез фрагмента, представляющего собой жирную кислоту, соединения формулы (i)

Общий путь получения соединений формулы (i) приведен на общей схеме (I).

Схема (I)



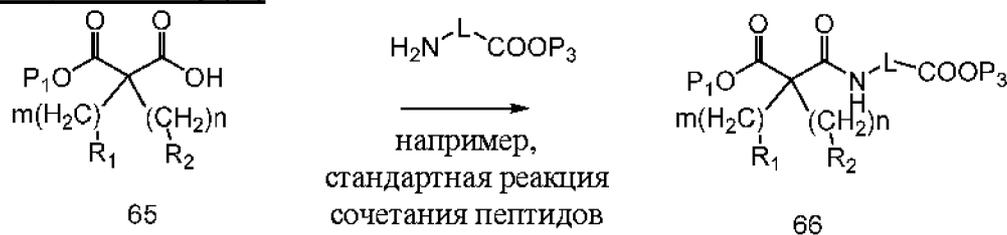
Производное малоновой кислоты (60) можно вводить в реакцию с $R_1-(CH_2)_m-X$ в присутствии основания, например гидроксида натрия, карбонатов калия или цезия, гидроксида натрия, диизопропиламида лития, бис(триметилсилил)амида натрия и т. п., и в присутствии или отсутствие растворителя, такого как DMF, THF или диметилацетамид, и при температуре около к. т. или выше или ниже с получением алкилированного промежуточного соединения (61), которое затем вводят в реакцию с $R_2-(CH_2)_n-X$ в присутствии основания с получением диалкилированного промежуточного соединения (62). Переменные R_1 , R_2 , n и m имеют значения, определенные в данном документе, X представляет собой уходящую группу, выбранную из галогена (например, Br, Cl, I), трифторметансульфонилокси и т. п., и P_1 и P_2 представляют собой защитную группу карбоновой кислоты, такую как, например, метил, этил, *трет*-бутил, метоксибензил, бензил, триметилсилил, *трет*-бутилдиметилсилил или 2-алкил-1,3-оксазолины.

В зависимости от защитных групп P_1 и P_2 промежуточное соединение (62) затем вводят в реакцию либо с основанием, например NaOH, KOH, или LiOH, либо с кислотой,

выбранной из без ограничения TFA, HCl или BCl_3 , или в случае, когда защитные группы P_1 и P_2 представляют собой бензил или метоксибензил, то промежуточное соединение (62), как правило, вводят в реакцию с водородом в присутствии катализатора, такого как без ограничения палладий на углероде, с получением соединения (65), которое соответствует соединению формулы (i), т. е. где P_1 представляет собой водород.

В качестве альтернативы, промежуточное соединение (61) можно вводить в реакцию с $CH_2=CH-(CH_2)_j-X$, где j равняется 1-10, и X является таким, как определено в данном документе, например представляет собой аллилбромид, в присутствии основания, такого как NaH, карбонаты калия или цезия, гидроксид натрия, диизопропиламид лития и т. п., и в присутствии или отсутствие растворителя, такого как DMF, THF или диметилацетамид, с получением ненасыщенного диалкилированного промежуточного соединения 63, которое может быть разделено на его R- или S-энантиомер с помощью хроматографии. Затем промежуточное соединение 63 вводят в реакцию в присутствии избытка, например 2 эквивалентов, алкилирующего реагента $R_2-(CH_2)_n-CH=CH_2$, где n' равняется 5-27, и катализатора метатезиса олефинов, например катализатора Граббса II, в присутствии растворителя, такого как DCM или THF, с получением промежуточного соединения 64, которое можно вводить в реакцию с водородом в присутствии катализатора, например Pd/C, в присутствии растворителя, например THF, метанола или т. п., и необязательно с последующей реакцией удаления защитной группы, например, при условии, что P_2 не представляет собой бензильную группу, как правило, как раскрыто в реакции промежуточного соединения 62 с получением промежуточного соединения 65; например с использованием NaOH, KOH или LiOH в метаноле, этаноле или диоксане или с использованием кислоты, выбранной из без ограничения TFA, HCl или BCl_3 . Двойная связь в боковой цепи также может быть гидрогенизирована после присоединения линкера к жирной кислоте, как показано на схеме (II). Параметры j и n' вместе с группой $CH=CH$ выбирают так, чтобы они обеспечивали получение длины цепи, определенной n в промежуточном соединении 65, т. е. $(CH_2)_n$.

Общая схема (II): синтез фрагмента, представляющего собой жирную кислоту, содержащего линкер (L)

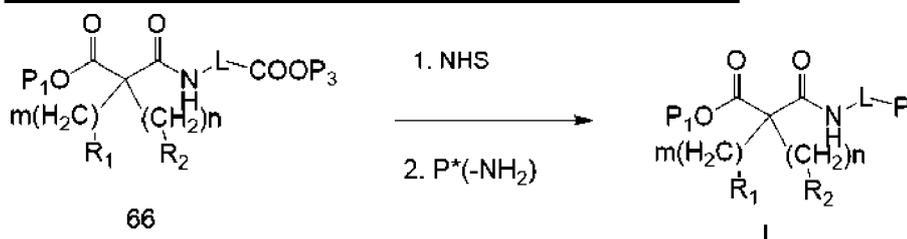


Общий путь получения промежуточного соединения 66 путем применения промежуточного соединения 65 приведен на общей схеме (II). Производное жирной кислоты 65, как правило, можно вводить в реакцию с производным аминокислоты формулы $H_2N-L-COOP_3$, где P_3 представляет собой водород или защитную группу карбоновой кислоты (например, метил, этил, *трет*-бутил, метоксибензил, бензил, триметилсилил, трет-бутилдиметилсилил или 2-алкил-1,3-оксазолины), и L представляет

собой линкер, описанный в данном документе, при условии, что линкер L в производном аминокислоты формулы $H_2N-L-COOP_3$ показан вместе с его концевыми группами, т. е. NH_2 и $COOP_3$, в присутствии реагента для реакции сочетания, например карбонилдиимидазола (DCC), в присутствии или отсутствие основания, например N, N-диизопропилэтиламина или K_2CO_3 , и в присутствии или отсутствие растворителя, например DMF, с получением дериватизированного производного жирной кислоты (66).

Стандартные реакции сочетания пептидов включают, например, преобразование группы карбоновой кислоты в ее активированную форму, например в соответствующую пирролидин-2,5-дионовую группу, например, путем применения стандартных химических реакций с N-гидросукцинимидом, или путем осуществления реакции группы угольной кислоты с реагентами, таким как трифосген, карбонилдиимидазол, 4-нитрофенилхлорформиат или дисукцинимидилкарбонат, с получением соответствующего галогенингидрида угольной кислоты путем применения реагентов, таких как тионилхлорид или оксалилхлорид, или путем преобразования группы угольной кислоты в соответствующий смешанный ангидрид с применением реагентов, таких как $ClC(O)O$ -изобутил, 2,4,6-трихлорбензоилхлорид или циклический тример ангидрида пропилфосфоновой кислоты (ТЗР), с последующей реакцией оксазолидин-2,5-диона, галогенангидрида или смешанного ангидрида в присутствии или отсутствие основания, такого как третичный амин (например, триэтиламин или N, N-диизопропилэтиламин) или неорганического основания, например K_2CO_3 . В качестве альтернативы реагенты для реакций сочетания пептидов включают дициклогексилкарбодиимид (DCC), диизопропилкарбодиимид (DIC), гидрохлорид 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC HCl), гексафторфосфат бензотриазол-1-илокси-трис-пирролидинофосфония (PyBOP) или гексафторфосфат бензотриазол-1-илокси-трис-(диметиламино)фосфония (BOP) в присутствии или отсутствие реагента, такого как 1-гидроксибензотриазол, 1-гидрокси-7-азабензотриазол или диметиламинопиридин.

Общая схема (III): синтез соединения формулы (I)



Общий путь получения соединений формулы (I) путем применения промежуточного соединения 66 приведен на общей схеме (III). Учитывая, что P_3 представляет собой защитную группу (например, не представляет собой водород), производное жирной кислоты формулы (66) преобразовывают в его карбоновую кислоту, например, с применением кислоты, например HCl или п-толуолсульфоновой кислоты, в присутствии или отсутствие растворителя, например метанола, а затем преобразовывают в

активированный сложный эфир угольной кислоты, например сложный NHS-эфир, например, с применением DCC и N-гидроксисукцинимид (NHS) в присутствии или отсутствие растворителя, например DCM или THF, который затем вводят в реакцию с P* в GLP-1 или аналоге GLP-1, содержащим свободную группу -NH₂, например, в присутствии пиперидина и растворителя, например DMF или DMA; где переменные P* и P имеют значения, определенные в данном документе (как показано на общей схеме (III)).

Смесь энантиомеров, диастереомеров и цис/транс-изомеров, полученная в результате осуществления описанного выше способа, может быть разделена на их отдельные компоненты посредством методики с применением хиральной соли, хроматографии с применением нормальной фазы, обращенной фазы или хиральной колонки, в зависимости от характера разделения.

Любые полученные рацематы соединений по настоящему изобретению или промежуточных соединений можно разделять на оптические антиподы посредством известных способов, например, путем разделения их диастереомерных солей, полученных с помощью оптически активных кислоты или основания, и высвобождения оптически активного кислотного или основного соединения. В частности, таким образом, может использоваться основной фрагмент для разделения соединений по настоящему изобретению на их оптические антиподы, например посредством фракционной кристаллизации соли, образованной с помощью оптически активной кислоты, например винной кислоты, дибензоилвинной кислоты, диацетилвинной кислоты, ди-О, О'-п-толуоилвинной кислоты, миндальной кислоты, яблочной кислоты или камфор-10-сульфокислоты. Рацемические соединения по настоящему изобретению или рацемические промежуточные соединения также могут быть разделены посредством хиральной хроматографии, например жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC) с применением хирального адсорбента.

Фармацевтические композиции

Фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, содержит соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель. В дополнительном варианте осуществления композиция содержит по меньшей мере два таких фармацевтически приемлемых носителя, которые описаны в данном документе. Фармацевтическая композиция может быть составлена для конкретных путей введения, таких как пероральное введение, парентеральное введение (например, посредством инъекции, инфузии, чрескожного или местного введения) и ректальное введение. Местное введение может также относиться к ингаляционному или интраназальному применению. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, можно получать в твердой форме (включающей без ограничения капсулы, таблетки, пилюли, гранулы, порошки или суппозитории) или в жидкой форме (включающей без ограничения растворы, суспензии или эмульсии). Таблетки могут быть покрыты либо пленочной оболочкой, либо кишечнорастворимой оболочкой в соответствии со способами, известными из уровня техники. Как правило,

фармацевтические композиции представляют собой таблетки или желатиновые капсулы, содержащие активный ингредиент вместе с одним или несколькими из:

а) разбавителей, например, лактозы, декстрозы, сахарозы, маннита, сорбита, целлюлозы и/или глицина;

б) смазывающих веществ, например диоксида кремния, талька, стеариновой кислоты, ее магниевой или кальциевой соли и/или полиэтиленгликоля;

в случае таблеток также:

с) связующих средств, например алюмосиликата магния, крахмальной пасты, желатина, трагаканта, метилцеллюлозы, натрий-карбоксиметилцеллюлозы и/или поливинилпирролидона; при необходимости

д) разрыхлителей, например видов крахмала, агара, альгиновой кислоты или ее натриевой соли или шипучих смесей; и

е) абсорбентов, красителей, ароматизаторов и подсластителей.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, как правило, включают стерильные водные растворы (в случае растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для получения стерильных инъекционных растворов или дисперсии для немедленного приема.

Подходящие носители для внутривенного введения включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Stomphor ELTM (BASF, Парсиппани, Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить через шприц. Предпочтительные фармацевтические составы являются стабильными в условиях изготовления и хранения и должны быть защищены от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Обычно соответствующий носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством применения покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и посредством применения поверхностно-активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов можно достичь с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т. п. Во многих случаях предпочтительным будет включение в композицию изотонических средств, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит, аминокислот, сорбита, хлорида натрия. Длительное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить посредством включения в композицию средства, которое замедляет всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина. В некоторых вариантах осуществления в процессе составления может быть включено многофункциональное вспомогательное вещество, такое как рекомбинантный альбумин, для способствования стабилизации соединений по настоящему изобретению в условиях

разрушения или агрегации, для улучшения растворимости и облегчения введения и высвобождения активного компонента. (BioPharm International, 2012, Vol 23, Issue 3, pp 40-44).

Определенные инъекционные композиции представляют собой водные изотонические растворы или суспензии, а суппозитории преимущественно получают из жирных эмульсий или суспензий. Указанные композиции могут быть стерилизованы и/или могут содержать вспомогательные средства, такие как консервирующие, стабилизирующие, смачивающие или эмульгирующие средства, ускорители растворения, соли для регуляции осмотического давления и/или буферы. Кроме того, они могут также содержать другие терапевтически ценные вещества. Указанные композиции получают в соответствии с традиционными методами смешивания, гранулирования или нанесения покрытия соответственно, и они содержат 0,1-75% или содержат 1-50% активного ингредиента.

Стерильные инъекционные растворы можно получать посредством включения активного соединения в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии получают посредством включения активного соединения в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, в результате которых образуется порошок из активного ингредиента и любого дополнительного требуемого ингредиента из их раствора, ранее стерилизованного фильтрацией.

Соединения, описанные в данном документе, будь они в свободной форме либо в форме фармацевтически приемлемой соли, проявляют ценные фармакологические свойства, например, в качестве агонистов GLP1R, например, продемонстрированные с помощью тестов *in vitro* и *in vivo*, представленных в данном документе, и, следовательно, предназначены для терапии или применения в качестве химических веществ для исследований, например, в качестве фармакологически активных соединений.

Перечень областей применения

Соединения, описанные в данном документе, могут быть применимы в лечении метаболических и родственных им заболеваний, нарушений и состояний, например, выбранных из

ожирения, сахарного диабета 2-го типа, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, одного или нескольких осложнений диабета (включающих без ограничения хроническое заболевание почек), диабетической нефропатии, дислипидемии, метаболического синдрома, прогрессирующего заболевания печени, сердечно-сосудистого заболевания и невропатии.

В качестве неограничивающего примера невропатия представляет собой периферическую невропатию (которая, например, может быть ассоциирована с диабетом).

Прогрессирующее заболевание печени может представлять собой, например, неалкогольную жировую болезнь печени (FLD или NAFLD) и, например, неалкогольный стеатогепатит (NASH).

Сердечно-сосудистое заболевание может быть выбрано из гипертензии, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, кардиомиопатии, фибрилляции предсердий, сердечной недостаточности (например, сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (HF_rEF), сердечной недостаточности с промежуточной фракцией выброса (HF_{mr}EF) и сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (HF_rEF), коронарного заболевания сердца и видов аритмии (например, видов предсердной аритмии и видов желудочковой аритмии).

Соединения по настоящему изобретению могут быть применимы в лечении нескольких заболеваний, нарушений или состояний, возникающих у субъекта совместно (называемых термином ‘сопутствующие заболевания’). Сопутствующие заболевания, например, могут представлять собой заболевания у субъектов, у которых имеется диабет 2-го типа и дополнительно ожирение и/или дополнительно проявляется сердечная недостаточность и/или NASH. Например, у субъекта с ожирением также может проявляться диабет 2-го типа и/или может проявляться сердечно-сосудистое заболевание (например, сердечная недостаточность). У такого субъекта может также наблюдаться прогрессирующее заболевание печени (например, NASH). Например, у субъекта с ожирением также может проявляться диабет 2-го типа, и/или может проявляться сердечно-сосудистое заболевание (например, сердечная недостаточность), и/или может проявляться прогрессирующее заболевание печени (например, NASH). У субъекта также может быть высокое кровяное давление и/или высокий уровень холестерина в крови. Субъект может также страдать периферической невропатией.

Используемые в данном документе показания, раскрытые в разделе про области применения выше, далее в данном документе могут называться “**упомянутым выше перечнем**”.

В одном варианте осуществления заболевание, нарушение или состояние выбрано из ожирения, диабета 2-го типа, атеросклероза, сердечной недостаточности (в частности, сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса) и NASH.

В одном варианте осуществления заболевание, нарушение или состояние выбрано из ожирения, диабета 2-го типа, атеросклероза и сердечной недостаточности (в частности, сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса).

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения, предупреждения, подавления симптомов или устранения заболевания или нарушения, ассоциированных с модулированием уровней GLP1R у пациента. Способ включает введение пациенту, нуждающемуся в лечении заболеваний или нарушений, ассоциированных с модулированием уровней GLP1R, эффективного количества

соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, содержащей соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

Таким образом, в качестве дополнительного аспекта в данном документе представлено применение соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли, в терапии. В дополнительном варианте осуществления терапия представляет собой лечение заболевания, нарушения или состояния, лечение которых можно осуществлять посредством обеспечения агонистического воздействия на GLP1R. В другом варианте осуществления терапия представляет собой лечение заболевания, нарушения или состояния, выбранного из любого из упомянутого выше перечня.

Таким образом, в качестве дополнительного аспекта в данном документе представлено соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль для применения в терапии. В дополнительном варианте осуществления терапия представляет собой лечение заболевания, нарушения или состояния, лечение которых можно осуществлять посредством обеспечения агонистического воздействия на GLP1R. В другом варианте осуществления терапия представляет собой лечение заболевания, нарушения или состояния, выбранного из любого из упомянутого выше перечня.

В другом аспекте в данном документе представлен способ лечения заболевания, нарушения или состояния у пациента, лечение которого возможно осуществить посредством обеспечения агонистического воздействия на GLP1R, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

В другом варианте осуществления в данном документе представлен способ лечения заболевания, нарушения или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения, описанного в данном документе, где заболевание, нарушение или состояние выбрано из любого из упомянутого выше перечня.

В дополнительном аспекте в данном документе представлено применение соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного препарата. В дополнительном варианте осуществления лекарственный препарат предназначен для лечения заболевания, лечение которого можно осуществлять посредством обеспечения агонистического воздействия на GLP1R. В другом варианте осуществления заболевание выбрано из любого из упомянутого выше перечня.

Более того, в настоящем изобретении представлено применение любого соединения или его фармацевтически приемлемой соли, описанных в данном документе, для лечения заболевания, нарушения или состояния, выбранного из любого из упомянутого выше перечня.

Термин “метаболические нарушения” или “метаболические заболевания” относится к совместному кластеру признаков, который включает без ограничения ожирение, непереносимость глюкозы, инсулинорезистентность, гиперинсулинемию, избыточное накопление висцерального жира, гипертензию, дислипидемию, характеризующуюся высоким содержанием триглицеридов, низким содержанием холестерина липопротеинов высокой плотности (HDL) и высоким содержанием холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL). Субъекты с метаболическим заболеванием или нарушением подвержены риску развития сахарного диабета 2-го типа и, например, атеросклероза.

Термин “ожирение” у взрослых людей относится к индексу массы тела (BMI), составляющему 30 или больше (Система центров контроля и профилактики заболеваний). Такого субъекта также можно назвать страдающим ожирением. Это называется ожирением I класса. Ожирение II класса включает индивидуумов с BMI, составляющим 35-39,9, а ожирение III класса относится к индивидуумам с BMI, составляющим больше 40. Индекс массы тела (BMI) - это показатель количества жира в организме на основании роста и веса. Формула для расчета является следующей: $BMI = \text{вес в килограммах} / \text{рост в метрах}^2$. В одном варианте осуществления субъект-человек, страдающий от ожирения, характеризуется BMI, составляющим ≥ 30 или ≥ 35 , или BMI, находящимся в диапазоне от ≥ 35 до < 40 или от ≥ 30 до < 40 . Показатель < 40 может составлять, например, 39,9. В некоторых вариантах осуществления ожирение представляет собой патологическое ожирение или выраженное ожирение, где субъект-человек характеризуется $BMI \geq 40$.

Термин “сахарный диабет 2-го типа” представляет собой состояние, характеризующееся постоянно высокими уровнями глюкозы как в состоянии натощак, так и в состоянии сытости, что возникает в результате комбинации нарушенной утилизации глюкозы и избыточной выработки глюкозы. Это может являться результатом либо нарушенной выработки инсулина поджелудочной железой, либо периферической инсулинорезистентности.

Термин “инсулинорезистентность”, используемый в данном документе, относится к состоянию, где нормальное количество инсулина не может вызвать ожидаемый физиологический ответ и не может активировать нижеследующие пути. Во множестве примеров уровень инсулина, выходящий за пределы физиологического диапазона, либо вырабатываемый эндогенно, либо вводимый экзогенно, является достаточным для индуцирования полного или частичного биологического ответа с индуцированием ожидаемого физиологического ответа.

Термин “гиперинсулинемия” относится к состоянию, где в крови может быть выявлен избыточный инсулин.

Термин “непереносимость глюкозы” охватывает любое нарушение, характеризующееся клиническим симптомом или комбинацией клинических симптомов, которое ассоциировано с повышенным уровнем базальной глюкозы или глюкозы после приема пищи и/или повышенным уровнем инсулина или атипичным высвобождением

инсулина, стимулируемым глюкозой, или НОМА-IR (гомеостатическая модель оценки инсулинорезистентности) у субъекта по сравнению со здоровым индивидуумом. Повышенные уровни глюкозы и/или инсулина, могут проявляться при следующих заболеваниях, нарушениях и состояниях: ожирение, метаболический синдром, нарушенная толерантность к глюкозе, диабет II типа, гестационный диабет, диабет I типа, инсулинорезистентность, гиперинсулинемия, липодистрофия, липоатрофия и различные мутации MODY (диабет взрослого типа у молодых). Агонисты GLP1R по настоящему изобретению и композиции на их основе можно применять, например, для достижения и/или поддержания гомеостаза глюкозы, например, для снижения уровня глюкозы в кровотоке и/или для снижения уровня инсулина до диапазона, обнаруживаемого у здорового субъекта.

Термин "гипергликемия", используемый в данном документе, относится к состоянию, при котором в плазме крови субъекта циркулирует повышенное количество глюкозы по сравнению со здоровым индивидуумом. Гипергликемия может быть диагностирована с помощью способов, известных в данной области техники, в том числе путем измерения уровней глюкозы в крови натощак, как описано в данном документе.

Термин "усложнения диабета" представляет собой проблемы, обусловленные постоянно высокими уровнями глюкозы в крови, которые приводят к поражению других органов, включая почки, периферические конечности и глаза (например, ретинопатии), или вызывают сосудистое заболевание и невропатию. Нарушенная функция сосудов способствует эректильной дисфункции и может привести к повышенному риску кожных инфекций. Диабет также повышает риск заболеваний сердца и нарушений костей и суставов. Другие долговременные осложнения диабета включают повышенный риск возникновения рака, включая гепатоцеллюлярную карциному, рак эндометрия, рак молочной железы и рак поджелудочной железы.

Термин "диабетическая нефропатия" представляет собой состояние, возникающее из-за диабета и обусловленное поражением кровяных сосудов и других клеток в почке, что снижает функцию почки.

Термин "дислипидемия" относится к комплексным нарушениям метаболизма липопротеинов, включая чрезмерную выработку или атипичный метаболизм липопротеинов. Формы дислипидемии могут проявляться в виде повышения концентраций общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL) и триглицеридов, а также снижения концентрации холестерина липопротеинов высокой плотности (HDL) в крови.

Термин "метаболический синдром" относится к кластеру факторов риска, которые повышают риск развития сердечно-сосудистого заболевания, в том числе ишемической болезни сердца, сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса, сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса, цереброваскулярного заболевания и заболевания периферических сосудов. Такие факторы риска включают: брюшной жир, высокий уровень сахара в крови (по меньшей мере 110 миллиграмм на децилитр (мг/дл))

после голодания; высокий уровень триглицеридов (по меньшей мере 150 мг/дл) в кровотоке; низкий уровень HDL (менее 40 мг/дл) и кровяное давление 130/85 мм рт. ст. или выше (Всемирная организация здравоохранения).

Термин “прогрессирующее заболевание печени” относится к прогрессирующей форме доброкачественного состояния гепатостеатоза, отражающейся в виде фиброза и цирроза, которая является предрасполагающим фактором развития гепатоцеллюлярной карциномы. Прогрессирование ассоциированной с ожирением неалкогольной жировой болезни печени (NAFL) до NASH, фиброза и цирроза хорошо задокументировано.

Термин “неалкогольная жировая болезнь печени (FLD)”, также известная как NAFLD, представляет собой состояние, когда в гепатоцитах накапливается избыток липидов, что может возникать либо из-за избыточного липогенеза de novo в печени, либо из-за аномального клиренса и окисления жирных кислот. NAFLD исключена из ряда других причин заболевания печени, включая алкогольную болезнь печени и вирусное заболевание печени. NAFLD включает три гистологических элемента, которые отображают прогрессирование заболевания: жировая инфильтрация печени, гепатостеатоз и фиброз или цирроз. Наиболее распространенной причиной NAFLD является ожирение, хотя NAFLD также может наблюдаться у худых индивидуумов. Накопление жира может перейти в воспаление, сопровождаемое инфильтрацией макрофагов и изменениями гистологии гепатоцитов, включающими баллонную дистрофию клеток печени, называемую термином стеатогепатит, и называемую неалкогольным стеатогепатитом (NASH). NASH может перейти в фиброз, интерлобулярный мостовидный фиброз, или цирроз. Используемый в данном документе термин NASH может охватывать стеатогепатит, баллонную дистрофию клеток печени и лобулярное воспаление.

Термин “сердечно-сосудистые заболевания” означает заболевания, связанные с сердцем или кровеносными сосудами.

Термин “атеросклероз” относится к сосудистому заболеванию, характеризующемуся неравномерно распределенными отложениями липидов в интима артерий крупного и среднего размера, иногда вызывающими сужение просветов артерий и в конечном итоге приводящими к фиброзу и кальцификации. Поражения обычно являются очаговыми и прогрессируют медленно и спорадически. Ограничение кровотока является причиной большинства клинических проявлений, которые варьируются в зависимости от распространения и тяжести поражений.

Термин “заболевание периферических артерий” относится к состоянию, при котором накопление жировых отложений в артериях ограничивает кровоснабжение мышц ног.

Термин “инсульт” относится к состоянию, при котором прекращается кровоснабжение части головного мозга.

Термин “кардиомиопатия” определен как приобретенные или врожденные структурные аномалии миокарда предсердий или желудочков, которые могут влиять на сердечную функцию или физиологию и проводимость.

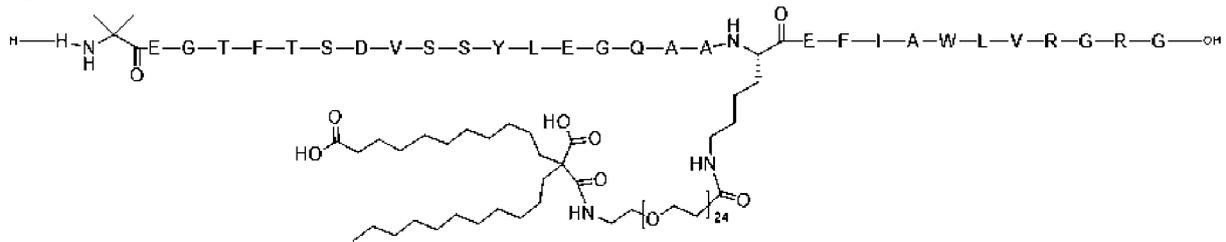
Термин “сердечная недостаточность” относится к состоянию, при котором сердце характеризуется сниженной способностью перекачивать кровь, и может включать сердечную недостаточность с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), сердечную недостаточность со сниженной фракцией выброса (HFrEF) и сердечную недостаточность с промежуточной фракцией выброса (HFmrEF).

Термин “коронарное заболевание сердца”, также называемое ишемической болезнью сердца, представляет собой сужение артерий, которые снабжают сердце кровью.

Термин “виды аритмии” относится аномальному сердечному ритму и может включать виды предсердной аритмии, фибрилляцию предсердий и виды желудочковой аритмии.

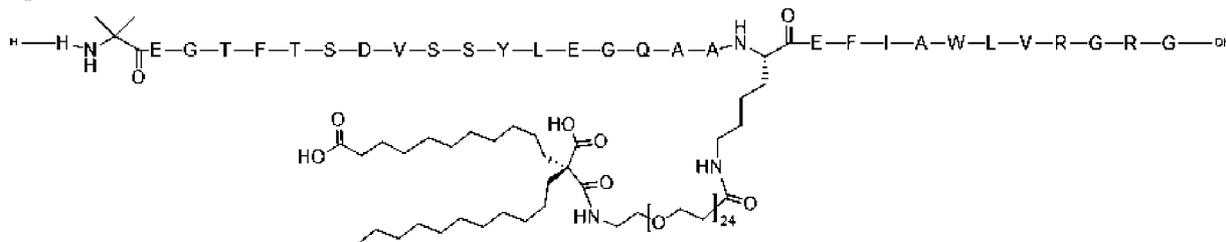
Термин “невропатия” относится к состоянию, при котором повреждены нервы. Термин включает периферическую невропатию, которая развивается в случае, когда повреждены нервы в конечностях, таких как кисти, ступни и руки. Диабет является распространенной причиной периферической невропатии.

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I), определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



(Соединение 1), для применения в лечении заболевания или нарушения выбранного из ожирения, сахарного диабета 2-го типа, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, осложнений диабета (включающих без ограничения хроническое заболевание почек), диабетической нефропатии, дислипидемии, метаболического синдрома, прогрессирующего заболевания печени, сердечно-сосудистого заболевания и невропатии (в частности, периферической невропатии, например, ассоциированной с диабетом).

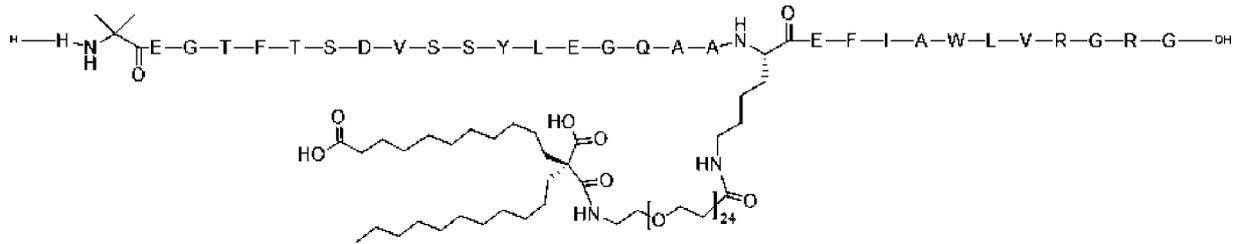
В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I), определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



(Соединение 2), для применения в лечении заболевания или нарушения выбранного из ожирения, сахарного диабета 2-го типа, инсулинорезистентности,

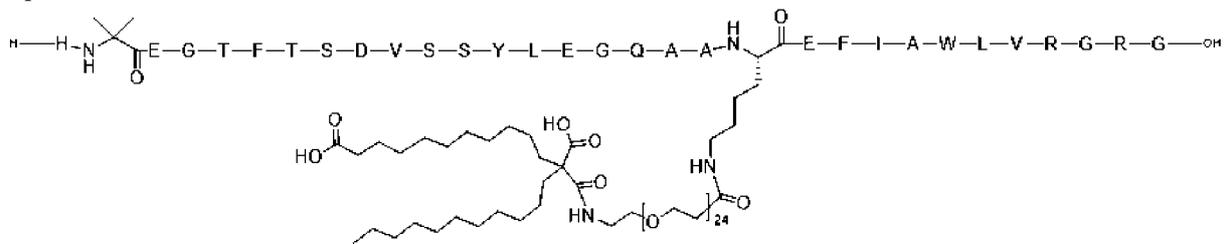
гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, осложнений диабета (включающих без ограничения хроническое заболевание почек), диабетической нефропатии, дислипидемии, метаболического синдрома, прогрессирующего заболевания печени, сердечно-сосудистого заболевания и невропатии (в частности, периферической невропатии, например, ассоциированной с диабетом).

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I), определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



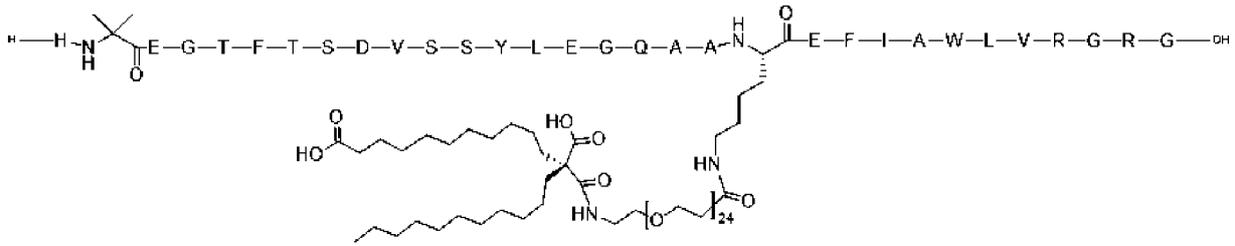
(Соединение 3), для применения в лечении заболевания или нарушения выбранного из ожирения, сахарного диабета 2-го типа, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, осложнений диабета (включающих без ограничения хроническое заболевание почек), диабетической нефропатии, дислипидемии, метаболического синдрома, прогрессирующего заболевания печени, сердечно-сосудистого заболевания и невропатии (в частности, периферической невропатии, например, ассоциированной с диабетом).

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I), определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



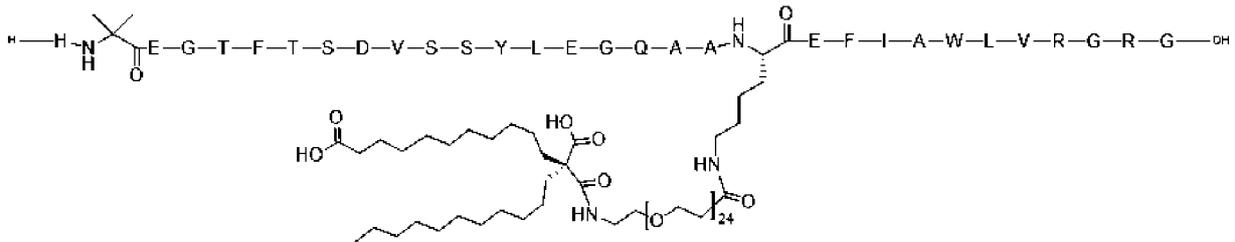
(Соединение 1), для применения в лечении заболевания или нарушения, выбранного из гипертензии, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, кардиомиопатии, фибрилляции предсердий, сердечной недостаточности (например, сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (HFrEF), сердечной недостаточности с промежуточной фракцией выброса (HFmrEF)) и сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), коронарного заболевания сердца и видов аритмии (например, видов предсердной аритмии и видов желудочковой аритмии).

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I), определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



(Соединение 2), для применения в лечении заболевания или нарушения, выбранного из гипертензии, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, кардиомиопатии, фибрилляции предсердий, сердечной недостаточности (например, сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (HFrEF), сердечной недостаточности с промежуточной фракцией выброса (HFmrEF)) и сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), коронарного заболевания сердца и видов аритмии (например, видов предсердной аритмии и видов желудочковой аритмии).

В другом варианте осуществления представлено соединение формулы (I), определенное в данном документе, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



(Соединение 3), для применения в лечении заболевания или нарушения, выбранного из гипертензии, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, кардиомиопатии, фибрилляции предсердий, сердечной недостаточности (например, сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (HFrEF), сердечной недостаточности с промежуточной фракцией выброса (HFmrEF)) и сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), коронарного заболевания сердца и видов аритмии (например, видов предсердной аритмии и видов желудочковой аритмии).

Лекарственные формы

Фармацевтическая композиция или комбинация, описанные в данном документе, могут быть представлены в однократной дозировке, составляющей приблизительно 1-100 мг активного(-ых) ингредиента(-ов) для субъекта весом приблизительно 50-70 кг. Терапевтически эффективная дозировка соединения, фармацевтической композиции или их комбинаций зависит от вида субъекта, веса тела, возраста, а также индивидуального состояния, нарушения или заболевания, лечение которых осуществляется, или их тяжести.

Аспекты, касающиеся комбинаций

Любое соединение, описанное в данном документе, можно вводить либо одновременно с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, либо до,

либо после их введения. Любое соединение, описанное в данном документе, можно вводить отдельно посредством того же или отличающегося пути введения или совместно в одной и той же фармацевтической композиции, что и другие средства. Терапевтическое средство представляет собой, например, химическое соединение, пептид, конъюгаты и продукты слития пептидов, антитело, фрагмент антитела или нуклеиновую кислоту, которые являются терапевтически активными или повышают терапевтическую активность при введении субъекту в комбинации с соединением, описанным в данном документе.

Таким образом, в другом аспекте в данном документе представлена комбинация, в частности фармацевтическая комбинация, содержащая (например, терапевтически эффективное количество) соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль и одно или несколько других терапевтически активных средств.

В одном варианте осуществления в данном документе представлена комбинация, содержащая соединение, описанное в данном документе, и по меньшей мере одно другое терапевтическое средство в виде комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения в терапии. В одном варианте осуществления терапия представляет собой лечение заболевания, нарушения или состояния, выбранного из упомянутого выше перечня.

Продукты, представленные в виде комбинированного препарата, включают композицию, содержащую соединение, описанное в данном документе, и одно или несколько дополнительных терапевтических средств вместе в составе той же фармацевтической композиции, или соединение, описанное в данном документе, и другое(-ие) терапевтическое(-ие) средство(-а) в отдельной форме, например в форме набора.

В одном варианте осуществления в данном документе представлена фармацевтическая комбинация, содержащая соединение, описанное в данном документе, и одно или несколько дополнительных терапевтических средств. Фармацевтическая комбинация необязательно может содержать фармацевтически приемлемый носитель, описанный выше.

В одном варианте осуществления в данном документе представлен набор, содержащий две или более отдельных фармацевтических композиций, по меньшей мере одна из которых содержит соединение, описанное в данном документе. В одном варианте осуществления набор содержит средства для содержания указанных композиций раздельно, такие как контейнер, разделенная бутылка или разделенный пакет из фольги. Примером такого набора является блистерная упаковка, обычно применяемая для упаковывания таблеток, капсул и т. п.

Набор может применяться для введения различных лекарственных форм, например, перорально и парентерально, для введения отдельных композиций с различными интервалами между введениями доз или для подбора доз отдельных

композиций одна относительно другой. Для содействия соблюдению режима лечения набор, как правило, содержит инструкции по введению.

В видах комбинированной терапии, описанных в данном документе, любое соединение, описанное в данном документе, и другое терапевтическое средство могут быть изготовлены и/или составлены одними и теми же или различными производителями.

Более того, любое соединение, описанное в данном документе, и другое терапевтическое средство могут быть объединены в комбинированной терапии: (i) до передачи врачам комбинированного продукта (например, в случае набора, содержащего соединение, описанного в данном документе, и другое терапевтическое средство); (ii) самими врачами (или под руководством врача) незадолго до введения; (iii) собственно в организме пациента, например, во время последовательного введения соединения, описанного в данном документе, и другого терапевтического средства.

Также в данном документе представлена комбинация, содержащая соединение, описанное в данном документе, и одно или несколько дополнительных терапевтических средств, для применения в способе лечения заболевания, нарушения или состояния, выбранного из любого из упомянутого выше перечня.

Также в данном документе представлено применение комбинации, содержащей соединение, описанное в данном документе, и одно или несколько дополнительных терапевтических средств, для лечения заболевания, нарушения или состояния, выбранного из любого из упомянутого выше перечня.

В одном варианте осуществления другое терапевтическое средство может быть выбрано из:

1. противодиабетических средств, таких как инсулин, производных и миметиков инсулина; средств, повышающих секрецию инсулина, таких как сульфонилмочевины (например, хлорпропамид); или ингибиторов DPPIV (дипептидилпептидазы IV), таких как вилдаглиптин;

2. гиполипидемических средств, таких как ингибиторы 3-гидрокси-3-метил-глутарил-кофермент А-(HMG-CoA)-редуктазы, например ловастатина; ингибиторов скваленсинтазы; лигандов FXR (фарнезоидного X-рецептора) и LXR (печеночного X-рецептора); средств, усиливающих экскрецию желчных кислот, таких как колестирамин и колезевелам; фибратов; никотиновой кислоты или аспирина;

3. средств против ожирения, таких как орлистат;

4. антигипертензивных средств, например петлевых диуретиков, таких как этакриновая кислота; ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (ACE), таких как беназеприл; ингибиторов Na-K-АТФазного мембранного насоса, таких как дигоксин; ингибиторов нейтральной эндопептидазы (NEP); ингибиторов ACE/NEP, таких как омапатрилат; антагонистов ангиотензина II, таких как валсартан; ингибиторов рецепторов ангиотензина-неприлизина (ARNi), таких как сакубитрил/валсартан (LCZ696); ингибиторов ренина, таких как дитекирен; блокаторов β -адренергического рецептора, таких как тимолол; инотропных средств, таких как дигоксин; блокаторов кальциевого

канала, таких как амлодипин; антагонистов альдостеронового рецептора или ингибиторов альдостеронсинтазы;

5. агонистов рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом, таких как фенофибрат;

6. Соединений, которые связывают рецепторы кортикотропин-высвобождающего гормона, таких как урокортин 2.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами и схемами синтеза, которые не следует истолковывать как ограничивающие объем или сущность настоящего изобретения конкретными процедурами, описанными в данном документе. Следует понимать, что данные примеры приведены для иллюстрации определенных вариантов осуществления и что это не предполагает каких-либо ограничений объема настоящего изобретения. Кроме того, следует понимать, что можно прибегнуть к разнообразным другим вариантам осуществления, их модификациям и эквивалентам, которые могут предложить специалисты в данной области техники, не отступая от сущности настоящего изобретения и/или объема прилагаемой формулы изобретения.

Соединения по настоящему изобретению можно получать с помощью способов, известных в области органического синтеза. Подразумевается, что во всех способах при необходимости можно использовать защитные группы для неустойчивых или реакционноспособных групп в соответствии с общими принципами химии. Работу с защитными группами проводят в соответствии со стандартными методиками органического синтеза (T.W. Green and P.G.M. Wuts (1999) *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd edition, John Wiley & Sons). Такие группы удаляют на подходящей стадии синтеза соединения с использованием способов, очевидных для специалистов в данной области техники.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

Аналитические методы, материалы и приборы

Если не указано иное, реагенты и растворители использовали в том виде, в котором их получали от коммерческих поставщиков. Спектры протонного ядерного магнитного резонанса (ЯМР) получали либо на спектрометре Bruker Avance, либо на спектрометре Varian Oxford 400 МГц, если не указано иное. Спектры приведены в ppm (δ), а константы взаимодействия, J, приведены в герцах. Тетраметилсилан (TMS) применяли в качестве внутреннего стандарта. Химические сдвиги приведены в ppm относительно диметилсульфоксида (δ 2,50), метанола (δ 3,31), хлороформа (δ 7,26) или другого растворителя, указанного в данных ЯМР-спектра. Небольшое количество сухого образца (2-5 мг) растворяли в подходящем дейтерированном растворителе (1 мл). Химические названия генерировали с применением ChemBioDraw Ultra v17 от CambridgeSoft.

Сокращения

АС₅₀ концентрация при полумаксимальном эффекте соединения

ACN ацетонитрил

A_{inf} значение, соответствующее плато на кривой Хилла при высоких концентрациях

A_0 значение, соответствующее плато на кривой Хилла при низких концентрациях

Aib α -аминоизомасляная кислота

ALS автоматический дозатор

AUC_{inf} площадь под кривой зависимости концентрации в плазме крови от времени от нулевого момента времени до бесконечности

br широкий

BSA бычий сывороточный альбумин

BW вес тела

cAMP циклический аденозинмонофосфат

№ по кат. номер по каталогу

СНО клетки яичника китайского хомячка

C_{max} максимальная концентрация в плазме врови

CO₂ диоксид углерода

супоGLP1R рецептор глюкагоноподобного пептида 1 яванского макака

d дублет

dd дублет дублетов

DCC *N, N'*-дициклогексилкарбодиимид

DCM дихлорметан

DCU *N, N'*-дициклогексилмочевина

DEA *N, N*-диэтиланилин

DERET резонансный перенос энергии, усиленный диссоциацией

DI EA/DIPEA диэтилизопропиламин

DIO алиментарное ожирение

DMEM среда Игла в модификации Дульбекко

DMF *N, N*-диметилформамид

DMSO диметилсульфоксид

DSC *N, N'*-дисукцинимидилкарбонат

DMA диметилацетамид

DMAP 4-(*N, N*-диметиламино)пиридин

EA акцептор фермента

EC эффективная концентрация

EC₀ эффективная концентрация соединения, которая не обеспечивает ответ

EC₅₀ эффективная концентрация соединения, которая обеспечивает полумаксимальный ответ

EC₁₀₀ эффективная концентрация соединения, которая обеспечивает максимальный (100%) ответ

E_{\max} эффективность: максимальный ответ, достигаемый введенным в определенной дозе средством

EDC или EDCI N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимид

EDTA этилендиаминтетрауксусная кислота

Ex9-39 эксендин 9-39

ELSD испарительный детектор светорассеяния

экв. эквиваленты

ESI ионизация электрораспылением

EtOAc этилацетат

FBS фетальная бычья сыворотка

FI потребление пищи

Fmoc 9-флуоренилметоксикарбонил

FRET резонансный перенос энергии флуоресценции

г грамм(-ы)

GLP1 глюкагоноподобный пептид 1

GLP1R рецептор глюкагоноподобного пептида 1

GPCR рецептор, сопряженный с G-белком

G418 генетицин, селективный антибиотик

Катализатор Граббса II дихлор[1,3-бис(2,4,6-триметилфенил)-2-имидазолидинилиден](бензилиден)(трициклогексилфосфин)рутений(II)

ч. час(-ы)

HATU гексафторфосфат 1-[бис(диметиламино)метилен]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]пиридиний-3-оксида

HDF рацион с высоким содержанием жиров

HESI ионизация электрораспылением с нагреванием

hGLP1R рецептор глюкагоноподобного пептида 1 человека

HPLC жидкостная хроматография высокого давления

HTRF гомогенная флуоресценция с временным разрешением

IBMX 3-изобутил-1-метилксантин

кг килограмм(-ы)

л литр

LCMS жидкостная хроматография с масс-спектрометрией

MeOH метанол

MS масс-спектрометрия

MTBE метил-трет-бутиловый эфир

m мультиплет

мг миллиграмм(-ы)

мин. минуты

мл миллилитр

ммоль миллимоль

мМ ммоль/л
масса/заряд соотношение массы и заряда
нМ наномоль/л
нмоль наномоль
NMP N-метил-2-пирролидинон
ЯМР ядерный магнитный резонанс
NPCL жидкостная хроматография с нормальной фазой
p пентет
Pbf 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил-
PBS фосфатно-солевой буферный раствор
Pd/C палладий на угле
PEG полиэтиленгликоль
PK фармакокинетический
PD фармакодинамический
ppm частей на миллион
QC контроль качества
QD один раз в сутки
Q3D один раз каждые 3 дня
Q1W один раз в неделю
RCF центробежное ускорение
об./мин обороты в минуту
R_t время удерживания
к. т. комнатная температура
ротор. исп. роторный испаритель
s синглет
s.c. или SC подкожный
с секунды
SEM стандартная ошибка среднего значения
SFC сверхкритическая флюидная хроматография
SM исходный(-ые) материал(-ы)
t триплет
TEA триэтиламин
TFA трифторуксусная кислота
THF тетрагидрофуран
T_{max} время, потребовавшееся для достижения максимальной концентрации в плазме
крови
T_{1/2} период полувыведения
об./об. объем/объем
мкг микрограмм
мкл микролитр

мкМ мкмоль/л

Биологические анализы и данные

Соединения, описанные в данном документе, тестировали в следующих анализах на основе клеток, в которых измеряли внутриклеточную концентрацию cAMP. cAMP генерируется за счет активации GLP1R. Полученные данные показаны в таблицах 1-3. EC_{50} определена как концентрация соединения, которая приводит к половине от максимального ответа (после поправки концентрации на нулевой уровень). E_{max} определена как максимальный ответ, наблюдаемый в случае испытуемого соединения, нормализованный к максимальному ответу, наблюдаемому в случае эндогенного лиганда (GLP1(7-36)) к GLP1R.

Анализ агониста cAMP - GLP1R человека

Агонистическую активность соединений определяли с применением анализа cAMP GloSensor™ (Promega Corp.), в котором измеряют изменения внутриклеточной концентрации cAMP после активации GPCR лигандом. В анализе применяют биосенсор, кодируемый плазмидой pGloSensor™-22F cAMP (Promega, № по кат. E2301), с cAMP-связывающими доменами, слитыми с мутантной формой люциферазы *Photinus pyralis*. Связывание с cAMP вызывает конформационные изменения, которые стимулируют сильное повышение выходного оптического излучения, которое может быть измерено детектором люминесценции. Клетки HEK293-SNAP-hGLP1R-GloSensor, стабильно сверхэкспрессирующие рецептор GLP1 человека (hGLP1R) и pGloSensor™-22F, высевали в белые 384-луночные покрытые поли-D-лизинном планшеты (Greiner Bio One, № по кат. 781945) в CO₂-независимую среду (Gibco № по кат. 18045-088 с 1,0% FBS, 2 мМ L-глутамин, пенициллином и стрептомицином) и инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂ в условиях влажности. Анализ начинали в следующее утро путем добавления во все лунки равного объема CO₂-независимой среды, содержащей субстрат GloSensor в разбавлении 4% об./об. (Promega, № по кат. E1291). Планшет с клетками инкубировали при к. т. в течение 2 ч в темноте. Для стадий манипуляции с жидкостями применяли прибор Biomek i7 (Beckman Coulter). Для создания кривых зависимости ответа от дозы в двух повторностях в аналитический планшет с клетками добавляли серийно в 3 раза разбавленные соединения до конечного объема 60 мкл в CO₂-независимой среде, содержащей 0,1% BSA, 0,5 мМ IBMX и 0,4% DMSO, при этом конечные концентрации находились в диапазоне от 100 нМ до 0,03 пМ. Контрольные лунки с EC_{100} , содержавшие пептид GLP1(7-36) (Bachem, № по кат. H-6795) в конечной концентрации 2 нМ, и контрольные лунки с EC_0 , не содержавшие пептида, тестировали одновременно в том же планшете и с применением того же аналитического буфера, что и тестируемые соединения. Этот планшет инкубировали при к. т. в темноте в течение 12 мин. после добавления соединений к клеткам. Затем люминесценцию измеряли с помощью считывающего устройства Envision 2104 Multilabel с “оптической системой TRF, 337 нм” (PerkinElmer) с применением настройки согласно сверхчувствительному протоколу “детектор US-люминесценции в 384-луночном планшете” с диаметром объектива для

анализа люминесценции в 384-луночном планшете 0,1 с на лунку. Активность cAMP рассчитывали в виде процента от значения EC₁₀₀ GLP1(7-36) в контрольных лунках: $\{[(\text{сигнал образца} - \text{среднее значение сигнала при EC}_0)/(\text{среднее значение сигнала при EC}_{100} \text{ GLP1(7-36)} - \text{среднее значение сигнала при EC}_0)]\} * 100$. Подгонку кривой для определений EC₅₀ проводили в модуле Helios пакета программного обеспечения DAVID. Применяли 4-параметрическую логистическую модель, угловой коэффициент Хилла: $y = A_{\text{inf}} + (A_0 - A_{\text{inf}}) / (1 + (x/AC_{50})^{\text{угловой коэффициент Хилла}})$, где y представляет собой функциональный ответ; x представляет собой концентрацию соединения; A₀ представляет собой минимальное значение (при дозе, составляющей 0); A_{inf} представляет собой максимальное значение (при дозе, составляющей бесконечность); AC₅₀ соответствует точке перегиба (т. е. точке на кривой в форме сигмоиды, которая находится на полпути между A₀ и A_{inf}). Значение EC₅₀ было представлено значением AC₅₀, рассчитанным с помощью Helios в мкМ. E_{max} представляет собой максимальную активность, выявленную в пределах диапазона концентраций, полученную на основе подогнанной кривой.

Получение клеточной линии HEK293-SNAP-hGLP1R

327 мкл среды Opti-MEM (Gibco, № по кат. 31985-062) смешивали с 12 мкл FuGENE® HD (Promega, № по кат. E2311) и инкубировали при к. т. в течение 5 мин. Затем 8,2 мкл (4 мкг, раствор 0,485 мкг/мкл) плазмиды pSNAP-hGLP1R (Cisbio, № по кат. PSNAP-GLP1), кодирующей GLP1R человека (эталонная последовательность в NCBI: NM_002062.3), слитой с меткой SNAP, добавляли в смесь Fugene HD/Opti-MEM и инкубировали при к. т. в течение 20 мин. Получали суспензию клеток HEK293 (ATCC® CRL-1573™) при 800000 клеток/мл. Затем смесь плазмиды/FuGene HD добавляли к 8 мл клеток и аккуратно смешивали. 2 мл новой смеси добавляли в 4 лунки в 6-луночном планшете и 2 мл нетрансфицированных клеток добавляли в две лунки в качестве контроля. Планшет инкубировали при 37°C до достижения 100% конфлюэнтности. Выполняли селекцию с помощью антибиотика [800 мкг/мл G418 (генетицин, Gibco, № по кат. 10131-035)] после обработки клеток трипсином при разбавлении 2500 клеток/мл. 1 мл суспензии клеток добавляли в 20 мл селективной среды в чашку для культивирования размером 10 см (в общем 2500 клеток) и параллельно 4 мл разбавленной суспензии клеток добавляли в 20 мл селективной среды в чашку для культивирования размером 10 см (в общем 10000 клеток). Остальные клетки культивировали в колбе T150. Кроме того, клетки HEK293 культивировали в колбе T75 в селективной среде в качестве отрицательного контроля. Наконец, отдельных клонов отбирали из чашки для культивирования размером 10 см и культивировали до тех пор, пока не будет достаточно клеток для анализа экспрессии генов и HTRF-анализа cAMP. Клон 2 показал наиболее высокий ответ в виде GLP1R-зависимого cAMP, и его размножали для получения стабильной клеточной линии GloSensor.

Получение стабильной клеточной линии HEK293-SNAP-hGLP1R-GloSensor

Клетки HEK293, стабильно сверхэкспрессирующие SNAP-hGLP1R (описанные выше), высевали в планшеты при плотности 3 миллиона клеток в чашку размером 10 см,

содержавшую 17 мл полной среды для выращивания DMEM (Gibco, № по кат. 11965-092) + 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Gibco, № по кат. 16140-071). На следующий день клетки трансфицировали следующим образом. Комплекс ДНК получали в виде плазмиды 0,020 мкг/мкл pGloSensor™-22F cAMP (Promega, № по кат. E2301; номер доступа в GenBank® GU174434) путем добавления 37 мкг плазмидной ДНК в 1758 мкл раствора Opti-MEM. Затем к указанному выше добавляли 112 мкл реагента FuGENE® HD путем осторожного смешивания. Через 5-10-мин. инкубации при к. т. к клеткам добавляли 850 мкл комплекса на лунку и осуществляли тщательное смешивание. После 24-ч инкубации при 37°C, 5% CO₂ в условиях влажности среды удаляли и клетки ополаскивали с помощью PBS. Затем, добавляли селективную среду [600 мкг/мл G418 и 600 мкг/мл гирномицина В (Gibco, № по кат. 10687010)]. Среду заменяли дважды в неделю до тех пор, пока больше не наблюдали погибших клеток. Как только клоны клеток были видимы, отделяли отдельные клетки путем пипетирования после добавления 10 мкл 0,05% раствора трипсин-EDTA. Такие клоны, полученные из отдельных клеток, затем культивировали в шестилуночных планшетах с селективной средой (600 мкг/мл G418+600 мкг/мл гирномицина В) до тех пор, пока не было доступно достаточно клеток для тестирования в отношении ответа на агонист cAMP в анализе на основе люминесценции с использованием GloSensor, описанном в данном документе. Стабильный клон клетки HEK293-SNAP-hGLP1R, который дал требуемый ответ, применяли для анализа агониста cAMP - GLP1R человека. Следующие данные являются показателями относительной действенности испытываемых соединений.

Таблица 1. Сводные данные анализа cAMP в ответ на hGLP1R

Соединение	Средняя EC ₅₀ (мкМ)	SEM EC ₅₀ (мкМ)	Средняя E _{max} (%)	SEM E _{max} (%)	n	Растворитель
Соединение 1	1,72*10 ⁻⁵	1,32*10 ⁻⁶	105	4	6	DMSO
Соединение 2	1,99*10 ⁻⁵	2,06*10 ⁻⁶	115	2	5	DMSO
Соединение 3	1,51*10 ⁻⁵	9,80*10 ⁻⁷	108	1	6	DMSO
Соединение 4	2,94*10 ⁻⁵	1,30*10 ⁻⁵	119	2	3	DMSO
Соединение 5	8,83*10 ⁻⁵	3,53*10 ⁻⁶	111	2	3	DMSO
Соединение 6	5,73*10 ⁻⁶	2,31*10 ⁻⁶	111	7	3	DMSO
Соединение 7	2,45*10 ⁻⁵	2,15*10 ⁻⁶	112	5	3	DMSO
Соединение 8	1,05*10 ⁻⁴	1,06*10 ⁻⁵	106	0	2	DMSO
Соединение 9	2,02*10 ⁻⁴	6,72*10 ⁻⁶	107	2	3	DMSO
Семаглутид**	1,44*10 ⁻⁵	7,50*10 ⁻⁷	109	3	6	DMF
GLP1(7-36)	3,71*10 ⁻⁶	2,60*10 ⁻⁷	109	1	6	PBS+0,1% BSA

** ацетатную соль семаглутида (таблицы 1-6) приобретали у Bachem (№ по каталогу H-7894) и растворяли в DMF, как указано в строке “растворитель”.

Анализ агониста cAMP - GLP1R яванского макака

Агонистическую активность описанных соединений дополнительно тестировали с применением HTRF-анализа cAMP (CisBio, № по кат. 62AM4PEC), в котором измеряют изменения внутриклеточной концентрации cAMP после активации GPCR лигандом. Этот анализ основан на формате конкуренции, включающем специфическое моноклональное антитело к cAMP, меченное криптатом Eu^{3+} (донорный флуорофор), и cAMP, сочлененный с d2 (акцепторный флуорофор). Это позволяет непосредственно получить характеристики соединений, воздействующих на рецепторы, сопряженные с G-белком, в клетках. Нативный cAMP, вырабатываемый клетками, конкурирует с d2-меченым cAMP, за связывание с комплексом антитело к cAMP-криптит Eu^{3+} . Клетки HEK293-cynoGLP1R F6, стабильно сверхэкспрессирующие рецептор GLP1 яванского макака (cynoGLP1R), высевали в белые 384-луночные покрытые поли-D-лизинном планшеты (Greiner Bio One, № по кат. 781945) при 5000 клеток/луночка в полную среду DMEM (Gibco, № по кат. 11965-092, 10% инактивированной теплом FBS, 0,5 мг/мл генетицина; Gibco Life Technologies, № по кат. 10131027) и инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO_2 в условиях влажности. Анализ проводили на следующий день. Пептиды разбавляли в буфере для стимуляции [1X HBSS (Life Technologies, № по кат. 14065-056), 20 mM HEPES (Life Technologies, № по кат. 15630), 0,1% BSA (Sigma, № по кат. A0281) и 0,5 mM IBMX]. Для получения кривых зависимости ответа от дозы в трех повторностях серийно в 3 раза разбавленные соединения (при 2-кратной концентрации) разбавляли в DMSO. Клетки промывали с помощью устройства для отмывки планшетов ELx405 Select, BioTek, оставляя 10 мкл/луночка аналитического буфера [1X HBSS (Life Technologies, № по кат. 14065-056), 20 mM HEPES (Life Technologies, № по кат. 15630)]. Планшеты недолго центрифугировали и добавляли 10 мкл на луночку в 2 раза разбавленных пептидов. Планшеты снова недолго центрифугировали и инкубировали при к. т. в течение 30 мин. 20x d2 и криптит Eu^{3+} разбавляли в лизирующем буфере, предоставленном вместе с набором. Через 30 мин. инкубации с пептидами добавляли 10 мкл на луночку разбавленного d2, затем 10 мкл разбавленного криптата Eu^{3+} . После недолгого центрифугирования планшеты накрывали черными крышками и инкубировали при к. т. в течение 1 ч. Затем сигналы HTRF измеряли с помощью считывающего устройства Envision 2104 Multilabel (Perkin Elmer) при испускании флуоресценции, настроенном на две разные длины волны (665 нм и 620 нм). Подгонку кривой для определений EC_{50} проводили в модуле Helios пакета программного обеспечения DAVID. Проводили подгонку 4-параметрической логистической кривой для участка планшета, где помещали соединение для получения стандартной кривой с получением 4 стандартных параметров: std_crv_ac50 (AC_{50} стандартной кривой), std_crv_a0 (A_0 стандартной кривой), std_crv_ainf (A_{inf} стандартной кривой), std_crv_hill (угловой коэффициент Хилла стандартной кривой). Затем эти 4 значения параметров использовали для применения преобразования стандартной кривой к каждой луночке с применением формулы: $y = \text{std_crv_ac50} * [(X - \text{std_crv_a0}) / (\text{std_crv_ainf} - X)]^{(1/\text{std_crv_hill})}$. y представляет собой функциональный ответ; x представляет собой

концентрацию соединения. Подгонку 4-параметрической логистической кривой проводили в отношении преобразованных данных с получением AC_{50} в мкМ для всех тестируемых соединений, которое для данного анализа представляет собой значение EC_{50} . E_{max} была выражена в виде процента от таковой при EC_{100} GLP1(7-36): $[(A_{max} \text{ образца} - A_0 \text{ образца}) / (A_{max} \text{ GLP1(7-36)} - A_0 \text{ GLP1(7-36)})] * 100$.

Получение стабильной клеточной линии HEK293-супоGLP1R

Клетки HEK293 высевали в планшеты за день до трансфекции при плотности 1×10^6 клеток в 8 мл полной среды для выращивания DMEM+10% FBS в колбе T25. На следующий день клетки трансфицировали следующим образом. Комплекс ДНК получали в виде 0,020 мкг/мкл путем добавления 8,8 мкг плазмиды pcDNA3.1 (+) Neo, кодирующей cDNA GLP1R яванского макака [с оптимизированным кодоном, GeneArt (Thermo Fisher Scientific); эталонная последовательность в NCBI: NP_001274592], в 414 мкл раствора OptiMEM. Затем к указанному выше добавляли 26 мкл реагента FuGENE® HD путем осторожного смешивания. Через 5-10-мин. инкубации при к. т. к клеткам добавляли 400 мкл комплекса на лунку и осуществляли тщательное смешивание. Через 48 ч. инкубации при 37°C, 5% CO₂ в условиях влажности клетки переносили в чашку размером 15 см в присутствии 0,5 мг/мл генетина. Стабильный клон клетки HEK293T-супоGLP1R, который показал наибольшую активность в функциональном анализе cAMP (клон F6), выбирали для дополнительного анализа в анализе на основе клеток агониста cAMP - GLP1R яванского макака.

Следующие данные являются показателями относительной действенности испытываемых соединений.

Таблица 2. Сводные данные анализа cAMP в ответ на супоGLP1R

Соединение	Средняя EC_{50} (мкМ)	SEM EC_{50} (мкМ)	Средняя E_{max} (%)	SEM E_{max} (%)	n	Растворитель
Соединение 1	$1,59 \cdot 10^{-4}$	$2,08 \cdot 10^{-5}$	111	4,5	6	DMSO
Соединение 2	$2,18 \cdot 10^{-4}$	$2,41 \cdot 10^{-5}$	119	7,3	7	DMSO
Соединение 3	$2,94 \cdot 10^{-4}$	$3,63 \cdot 10^{-5}$	108	4,2	3	DMSO
Соединение 4	$4,68 \cdot 10^{-4}$	$8,05 \cdot 10^{-5}$	112	4,2	5	DMSO
Соединение 5	$5,77 \cdot 10^{-4}$	$1,09 \cdot 10^{-4}$	103	4,0	3	DMSO
Соединение 6	$6,61 \cdot 10^{-5}$	$1,51 \cdot 10^{-5}$	108	6,1	3	DMSO
Соединение 7	$3,18 \cdot 10^{-4}$	$2,05 \cdot 10^{-5}$	108	8,4	4	DMSO
Соединение 9	$2,24 \cdot 10^{-3}$	$3,81 \cdot 10^{-4}$	111	4,6	3	DMSO
Семаглутид**	$4,91 \cdot 10^{-5}$	$3,4 \cdot 10^{-6}$	110	3,3	6	DMF
GLP1(7-36)	$2,17 \cdot 10^{-5}$	$2,48 \cdot 10^{-6}$	100	0	6	PBS+0,1% BSA

Анализ агониста cAMP - GLP1R мыши

Агонистическую активность в отношении cAMP соединений тестировали с применением аналогичной процедуры, что и анализ cAMP в ответ на GLP1R у яванского макака (см. выше), за исключением того факта, что применяли клетки HEK293-mGLP1R CRE-Luc (клон С3), стабильно сверхэкспрессирующие рецептор GLP1 мыши (mGLP1R) (получение описано ниже).

Получение стабильной клеточной линии HEK293-mGLP1R CRE-Luc

Клетки HEK293T CRE-Luc высевали в планшеты при плотности 3×10^6 клеток в 17 мл полной среды для выращивания DMEM+10% FBS в чашке размером 10 см. На следующий день клетки трансфицировали следующим образом. Комплекс ДНК получали в виде 0,020 мкг/мкл путем добавления 37 мкг плазмидной ДНК, кодирующей cDNA GLP1R мыши (GeneCopoeia, № по кат. EX-Mm23901-M67; эталонная последовательность в NCBI: NM_021332.2), в 1758 мкл раствора Opti-MEM. Затем к указанному выше добавляли 112 мкл реагента FuGENE® HD путем осторожного смешивания. Через 5-10-мин. инкубации при к. т. к клеткам добавляли 850 мкл комплекса ДНК на лунку и осуществляли тщательное смешивание. Через 24 ч. инкубации при 37°C, 5% CO₂ в условиях влажности среды удаляли, и клетки ополаскивали с помощью PBS и разделяли. Затем добавляли селективную среду [2 мкг/мл пуромидина (Corning, № по кат. 61-385-RA) и 100 мкг/мл гигромицина (Gibco, № по кат. 10687010)]. Среду заменяли трижды в неделю до тех пор, пока больше не наблюдали погибших клеток. Как только клоны клеток были видимыми, отделяли отдельные клетки. Стабильные клоны клеток HEK293T-mGLP1R-CRE-Luc, которые показали максимальную экспрессию генов (клон С3), применяли для анализа на основе клеток агониста cAMP - GLP1R мыши.

Следующие данные являются показателями относительной действенности испытываемых соединений.

Таблица 3. Сводные данные анализа cAMP в ответ на mGLP1R

Соединение	Средняя EC ₅₀ (мкМ)	SEM EC ₅₀ (мкМ)	Средняя E _{max} (%)	SEM E _{max} (%)	n	Растворитель
Соединение 1	$1,26 \cdot 10^{-4}$	$1,52 \cdot 10^{-5}$	111	3,1	12	DMSO
Соединение 3	$1,69 \cdot 10^{-4}$	$2,09 \cdot 10^{-5}$	110	3,6	8	DMSO
Соединение 2	$1,55 \cdot 10^{-4}$	$1,42 \cdot 10^{-5}$	117	1,9	13	DMSO
Соединение 5	$5,44 \cdot 10^{-4}$	$8,68 \cdot 10^{-5}$	107	3,5	4	DMSO
Соединение 4	$4,28 \cdot 10^{-4}$	$1,27 \cdot 10^{-4}$	118	4,7	6	DMSO
Соединение 9	$6,86 \cdot 10^{-4}$	$1,80 \cdot 10^{-4}$	109	3,5	4	DMSO
Соединение 6	$3,40 \cdot 10^{-5}$	$2,76 \cdot 10^{-5}$	104	3,1	6	DMSO
Соединение 7	$1,55 \cdot 10^{-4}$	$2,65 \cdot 10^{-5}$	96	3,9	6	DMSO
Семаглутид**	$3,37 \cdot 10^{-5}$	$3,08 \cdot 10^{-5}$	106	2,8	5	DMF
GLP1(7-36)	$7,78 \cdot 10^{-6}$	$1,04 \cdot 10^{-6}$	100	0	8	PBS+0,1% BSA

Анализ привлечения β -аррестина с помощью GLP1R человека

Степень, в которой агонисты привлекали β -аррестин, измеряли с применением анализа β -аррестина PathHunter® (DiscoverX). В этом анализе измеряют связывание β -аррестина с рецептором с применением подхода, состоящего в комплементации фермента. Две неактивные части фермента β -галактозидазы (называемые термином ProLink и акцептор фермента или 'EA') метят так, чтобы GLP1R человека (hGLP1R) содержал ProLink-часть, а β -аррестин содержал EA-часть. Когда β -аррестин привлекается к рецептору, фермент становится активным и генерирует люминесценцию в присутствии хемилюминесцентного субстрата (набор для выявления PathHunter®, DiscoverX № по кат. 93-0001). Люминесценцию можно измерять на соответствующем детекторе. Клетки CHO-hGLP1R- β -аррестин, стабильно сверхэкспрессирующие hGLP1R с меткой ProLink, и β -аррестин с меткой EA, высевали при 20 мкл на лунку в белые 384-луночные покрытые поли-D-лизином планшеты (Greiner Bio One, № по кат. 781945) в реагент 2 для высевания (DiscoverX, № по кат. 93-0563R2A) и инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂ в условиях влажности. На следующий день получали агонисты в 5-кратной от конечной требуемой концентрации. Для получения кривых зависимости ответа в трех повторностях соединения серийно в 3 раза разбавляли в аналитическом буфере (HBSS, 10 mM Hepes и 0,1% BSA), затем добавляли в аналитический планшет с клетками до конечного объема 25 мкл и конечных наивысших концентраций, начинающихся с 3 мкМ или меньше в зависимости от соединения. Контрольные лунки с EC₁₀₀, содержавшие пептид GLP1(7-36) (Bachem, № по кат. H-6795) в конечной концентрации 1 мкМ, и контрольные лунки с EC₀, не содержавшие соединения, тестировали одновременно в том же планшете и с применением того же аналитического буфера, что и тестируемые соединения. Планшет инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в условиях влажности в течение 2 ч. после добавления соединений к клеткам. Затем получали реагент для обнаружения (19 частей аналитического буфера для клеток, 5 частей субстратного реагента 1 и 1 часть субстратного реагента 2 согласно рекомендациям изготовителя, DiscoverX № по кат. 93-0001) и 12 мкл на лунку добавляли в аналитический планшет с клетками. Планшет инкубировали в течение дополнительного часа в темноте при к. т. Затем люминесценцию измеряли с помощью считывающего устройства Envision 2104 Multilabel с "оптической системой TRF, 337 нм" (Perkin Elmer) с применением настройки согласно сверхчувствительному протоколу "детектор US-люминесценции в 384-луночном планшете" с диаметром объектива для анализа люминесценции в 384-луночном планшете 0,1 с на лунку. Привлечение β -аррестина рассчитывали и выражали в виде процента от значения EC₁₀₀ GLP1(7-36) в контрольных лунках: [(сигнал образца - среднее значение сигнала при EC₀)/(среднее значение сигнала при EC₁₀₀ GLP1(7-36) - среднее значение сигнала при EC₀)]*100, с применением Microsoft Excel. Подгонку кривой для определений EC₅₀ проводили с применением GraphPad Prism. Применяли 4-параметрическую логистическую модель, угловой коэффициент Хилла: $Y = \text{нижнее значение} + (\text{верхнее значение} - \text{нижнее значение}) / (1 + 10^{((\text{Log EC}_{50} - X) * \text{угловой коэффициент Хилла})})$, где Y

представляет собой функциональный ответ; X представляет собой концентрацию соединения; нижнее значение представляет собой A_0 или минимальное значение (при дозе, составляющей 0); верхнее значение представляет собой A_{inf} или максимальное значение (при дозе, составляющей бесконечность); EC_{50} представляет собой точку перегиба (т. е. точку на кривой в форме сигмоиды, которая находится на полпути между A_0 и A_{inf}). Значение EC_{50} рассчитывали в мкМ. E_{max} представляет собой максимальную активность, выявленную в пределах диапазона концентраций, полученную на основе подогнанной кривой относительно GLP1 (7-36).

Получение клеточной линии CHO-hGLP1R- β -аррестин

Исходные клетки PathHunter[®] CHO-K1-EA (DiscoverX, № по кат. 93-0164) высевали в планшеты при плотности 2×10^6 клеток на cm^2 колбы T75 в 22 мл полной среды (набор 107 для культивирования клеток AssayComplete, DiscoverX, № по кат. 92-3107G). На следующий день среду заменяли на 22 мл свежей среды без антибиотиков и клетки трансфицировали следующим образом. Смесь для трансфекции плазида/Fugene[®] HD получали в среде Opti-MEM (соотношение реагент:ДНК 3:1). 25 мкг (34 мкл) плазмиды pCMV-PK1-GLP1R [(пакет векторов DiscoverX pCMV PK, № по кат. 93-0491 с вставленной последовательностью, кодирующей полноразмерный GLP1R человека - эталонная последовательность в NCBI: NM_002062, синтезированной GeneArt (Thermo Fisher Scientific)] добавляли в 1129 мкл Opti-MEM для получения общего объема 1163 мкл. Затем добавляли 74 мкл реагента FuGENE[®] HD путем осторожного смешивания. Через 5-10-мин. инкубации при к. т. 1125 мкл раствора комплекса добавляли к клеткам и инкубировали в течение 48 ч. при 37°C. Далее среду удаляли и добавляли селективную среду, содержащую 300 мкг/мл гигромицина (Gibco, № по кат. 10687010) и 500 мкг/мл генетицина (Gibco, № по кат. 10131035). Среду заменяли каждые 2-3 дня до тех пор, пока больше не наблюдали погибших клеток. Клетки разделяли, ресуспендировали при 300000 клеток/мл и просеивали с помощью сита с порами 40 мкм. Затем клетки рассортировывали с использованием FACS с применением прибора Aria G на отдельные клетки в черные, покрытые поли-D-лизином 96-луночные планшеты с прозрачным дном в 100 мкл среды. Среду заменяли каждые 2-3 дня путем удаления не более 80 мкл и добавления свежей среды, содержащей селективные антибиотики. Выживающих отдельных клонов размножали и подвергали тестированию. Отдельный клон 1 был выбран для анализа β -аррестина на основе оптимального профиля сигнала и кривой.

Таблица 4. Сводные данные анализа β -аррестина

Соединение	Средняя EC_{50} (мкМ)	SEM EC_{50} (мкМ)	Средняя E_{max} (%)	SEM E_{max} (%)	n	Растворитель
Соединение 1	0,192	0,034	92	1,8	7	DMSO
Соединение 2	0,133	0,021	94	5,1	4	DMSO
Соединение 3	0,149	0,030	91	4,5	4	DMSO

Соединение 4	0,235	0,004	84	10,1	4	DMSO
Соединение 5	0,254	0,058	77	6,1	3	DMSO
Соединение 6	0,070	0,006	75	2,6	3	DMSO
Соединение 7	0,178	0,015	82	12,2	3	DMSO
Соединение 9	>2	0,000	37	3,5	3	DMSO
Семаглутид**	0,036	0,004	67	3,5	3	DMF
GLP1(7-36)	0,007	0,001	100	0,0	7	PBS+0,1% BSA

Данные, оцениваемые в анализах β -аррестина, могут обратно коррелировать с переносимостью со стороны желудочно-кишечного тракта (снижением тошноты/рвоты) соединений, описанных в данном документе, т. е. чем менее активным является соединение в анализе β -аррестина, тем более переносимым может оно быть. [См., например, Jones et. al. Nat. Commun. 2018, 9, 1602.]

Анализ интернализации и рециклинга GLP1R человека на основе DERET

Степень, с которой агонисты интернализируются или обеспечивают рециклинг GLP1R человека, определяли на основе оптимизированной версии анализа с использованием 'DERET' (резонансного переноса энергии, усиленного диссоциацией), который основан на FRET в режиме реального времени. В основе технологии лежит прикрепление метки, представляющей собой SNAP-Lumi-тербий (донорный флуорофор, Cisbio, № по кат. SSNPTBD), к SNAP-меченному GPCR. Соединения инкубировали с клетками, сверхэкспрессирующими GPCR, представляющий интерес, в присутствии избытка флуоресцеина (акцепторного флуорофора). Когда GPCR находится на поверхности клетки, сигнал донора гасится акцептором, и соотношение донор/акцептор является низким. Как только GPCR интернализируется, сигнал донора больше не гасится и акцептор больше не возбуждается, поэтому соотношение донор/акцептор повышается. Добавление избытка антагониста блокирует дальнейшую интернализацию рецептора, что позволяет рецептору рециклировать назад в мембрану, что приводит к последующему снижению соотношения донор/акцептор.

Клетки HEK293-SNAP-hGLP1R-GloSensor (стабильно сверхэкспрессирующие SNAP-меченный hGLP1R) высевали в течение ночи в белые 384-луночные покрытые поли-D-лизином планшеты (Greiner Bio One, № по кат. 781945) в обычной среде для выращивания DMEM (Gibco, № по кат. 11965-092, 10% инактивированной теплом FBS, 10 mM HEPES, 1x пенициллин/стрептомицин, 0,5 мг/мл генетицина (Gibco, № по кат. 10131-035) и 0,25 мг/мл гигромицина В (Invitrogen, № по кат. 10687010)). В день анализа среду клеток удаляли и добавляли 100 нМ реагента SNAP-Lumi-Tb в растворе Opti-MEM. Клетки инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Клетки промывали с применением устройства для отмывки планшетов в аналитическом буфере [1X HBSS (10X Gibco, № по кат. 14065-056), 20 mM HEPES (Gibco, № по кат. 15630-080), 1 mM CaCl₂ (Fluka, № по кат. 21114-1L), 1 mM MgCl₂ (Ambion, № по кат. AM9530G) pH 7,4] и в каждую лунку добавляли 20 мкл буфера с 0,1% BSA. После того, как оставляли клетки для установления

равновесия на ~15 мин. при 37°C, добавляли 10 мкл флуоресцеина (натриевая соль, Sigma, № по кат. F6377, разбавленный в буфере) в конечной концентрации 25 мкМ. Для получения кривых зависимости ответа в трех повторностях соединения серийно в 3 раза разбавляли в аналитическом буфере, затем добавляли в аналитический планшет с клетками до конечного объема 40 мкл и конечных наивысших концентраций, начинающихся с 3 мкМ или меньше (в зависимости от случая). В том же планшете и аналитическом буфере, что и тестируемые соединения, включали пептид GLP1(7-36) (Bachem, № по кат. H-6795) для получения контрольной кривой в конечной наивысшей концентрации, составлявшей 1 мкМ, с целью установления EC₁₀₀. Также включали лунки с EC₀, содержавшие только буфер. FRET-флуоресценцию в планшете измеряли непосредственно с применением Perkin Elmer Envision с однозеркальным модулем LANCE/DELTA D400, фильтром возбуждения X320 и фильтрами испускания M615_203 (испускание донором) и M515 (испускания акцептором), а затем измеряли каждые 30 мин. Пиковое значение интернализации достигалось на 120 мин., в этот момент во все лунки добавляли 10 мкМ (конечн.) эксендина 9-39 (Bachem, № по кат. H8740, антагонист GLP1R) с целью блокировать дальнейшее связывание агониста. Измерения продолжали в течение дополнительных 180 мин. с целью установления того, насколько хорошо рецептор рециклирует назад в мембрану. Между процедурами считывания планшеты выдерживали при 37°C. Данные выражали в виде соотношения значений испускания донора/акцептора с применением Microsoft Excel и выражали на графике в GraphPad Prism. С целью определения EC₅₀ и E_{max} в случае интернализации данные рассчитывали и выражали в виде процента от значения EC₁₀₀ GLP1(7-36) в контрольных лунках: [(сигнал образца - среднее значение сигнала при EC₀)/(среднее значение сигнала при EC₁₀₀ GLP1(7-36) - среднее значение сигнала при EC₀)]*100, с применением Microsoft Excel. Подгонку кривой для определений EC₅₀ проводили с применением GraphPad Prism. Применяли 4-параметрическую логистическую модель, угловой коэффициент Хилла:

$$Y = \text{нижнее значение} + \frac{(\text{верхнее значение} - \text{нижнее значение})}{(1 + 10^{((\text{Log } EC_{50} - X) * \text{угловой коэффициент Хилла}))}}$$

где Y представляет собой функциональный ответ; X представляет собой концентрацию соединения; нижнее значение представляет собой A₀ или минимальное значение (при дозе, составляющей 0); верхнее значение представляет собой A_{inf} или максимальное значение (при дозе, составляющей бесконечность); EC₅₀ представляет собой точку перегиба (т. е. точку на кривой в форме сигмоиды, которая находится на полпути между A₀ и A_{inf}). Значение EC₅₀ рассчитывали в мкМ. E_{max} представляет собой максимальную активность, которая была измерена в пределах диапазона концентраций, полученную на основе подогнанной кривой относительно GLP1 (7-36). Для определения параметров рециклинга рецептора рассчитывали относительную E_{max} в каждый момент времени после добавления Ex9-39 и строили кривую зависимости от времени с применением 4-параметрической сигмоидальной подгонки. С применением данной модели авторы настоящего изобретения определяли скорость T_{1/2}, с которой рецептор

рециклирует назад в мембрану. Авторы настоящего изобретения также определяли максимальный процент рецепторов, которые рециклировали, в виде доли от количества изначально интернализированных.

Таблица 5. Сводные данные анализа интернализации

Соединение	Средняя EC ₅₀ (мкМ)	SEM EC ₅₀ (мкМ)	Средняя E _{max} (%)	SEM E _{max} (%)	n	Растворитель
Соединение 1	0,535	0,05	88	5,4	3	DMSO
Соединение 2	0,331	0,07	96	3,0	3	DMSO
Соединение 3	0,372	0,08	93	6,7	3	DMSO
Соединение 4	0,056	0,01	100	3,2	3	DMSO
Соединение 5	0,079	0,03	105	4,4	3	DMSO
Соединение 6	0,153	0,06	92	8,4	3	DMSO
Соединение 7	0,367	0,08	77	4,8	3	DMSO
Соединение 9	>1	0,00	22	0,0	3	DMSO
Семаглутид**	0,070	0,01	91	5,9	4	DMF
GLP1(7-36)	0,027	0,00	100	0,0	8	PBS+0,1% BSA

Таблица 6. Сводные данные анализа рециклинга

Соединение	Среднее T _{1/2} (мин.)	SEM T _{1/2} (мин.)	Среднее количество рецепторов, которые рециклировали (%)	SEM количества рецепторов, которые рециклировали (%)	n	Растворитель
Соединение 1	62,3	3,7	65	6,5	3	DMSO
Соединение 2	71,3	5,2	68	4,6	3	DMSO
Соединение 3	74,2	0,5	69	5,8	3	DMSO
Соединение 4	105,5	6,4	65	2,6	3	DMSO
Соединение 5	135,2	9,7	62	5,5	3	DMSO
Соединение 6	69,1	0,2	70	4,8	3	DMSO
Соединение 7	76,4	5,6	71	4,0	3	DMSO
Соединение 9	NC	NC	NC	NC	3	DMSO
Семаглутид**	100,6	5,1	64	3,9	3	DMF
GLP1(7-36)	61,1	1,9	41	1,7	6	PBS+0,1% BSA

НС: не рассчитывали

Чем ниже скорость интернализации и чем выше скорость рециклинга рецептора, тем дольше рецептор остается в мембране. В таблице 5 показаны данные об интернализации рецептора, а в таблице 6 показаны данные о рециклинге рецептора. В последней более низкое значение $T_{1/2}$ является показателем более быстрого возвращения рецепторов на поверхность клетки и повышенного количества рецепторов, доступных для взаимодействия с соединением [см., например, Jones et. al. Nat. Commun. 2018, 9, 1602.]. Это может обратно коррелировать с переносимостью описанных соединений, т. е. меньшая действенность - большая переносимость.

Фармакокинетические эксперименты

РК у мышей

Для всех экспериментов *in vivo* соединения, раскрытые в данном документе, получали в исходном растворе в PBS, где соединения характеризовались концентрацией 1 мг/мл. Затем такие исходные растворы разбавляли солевым раствором с получением концентраций, раскрытых в экспериментах.

Для всех экспериментов *in vivo* семаглутид приобретали в виде состава для клинического применения под названием OZEMPIC, который представляет собой исходный раствор семаглутида в концентрации 1,34 мг/мл. Исходный раствор содержит неактивный дигидрат фосфата натрия, 1,42 мг; пропиленгликоль, 14,0 мг; фенол, 5,50 мг; и воду для инъекций. OZEMPIC характеризуется рН, составляющим примерно 7,4. Затем этот исходный раствор разбавляли солевым раствором с получением концентраций, раскрытых в данном документе.

Для всех соединений для получения фармакокинетических параметров трем мышам C57BL/6 (возрастом 20-30 недель), которых кормили рационом с высоким содержанием жиров (60% калорий из жиров), начиная с возраста, составлявшего 6 недель, подкожно (s.c.) вводили дозу соединения в солевом растворе, составляющую 0,24 мг/кг, с применением объема дозы, составлявшего 5 мл/кг, где концентрация соединения составляла 48 мкг/мл. После введения соединения образцы крови собирали в покрытые EDTA пробирки путем надрезания хвоста через 0,5, 1, 3 и 6 ч. после введения дозы в день 0, а затем через 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336 и 408 ч. после введения дозы (т. е. в дни 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 и 17). Плазматическую часть крови получали с путем центрифугирования (13000 об./мин., 4°C, в течение 5 мин.); и 30-мкл аликвоту плазмы крови мыши переносили в 96-луночный планшет для биологического анализа. Калибровочные стандарты и образцы для QC получали в холостом растворе плазмы крови мыши (плазма крови необработанных мышей). Образцы для РК разбавляли в 2 раза холостым раствором плазмы крови мыши (10 мкл образца плюс 10 мкл холостого раствора плазмы крови мыши) и экстрагировали с применением процедуры осаждения белка, включающей добавление 150 мкл метанола, содержащего внутренний стандарт. Образцы перемешивали вихревым способом и центрифугировали при 4000 об./мин. в течение 15 мин. при 4°C. 125-мкл аликвоту надосадочной жидкости переносили в 96-луночный планшет, и в

каждую лунку добавляли 100 мкл воды, и перемешивали вихревым способом. Образцы анализировали и количественно оценивали с помощью LC-MS/MS с применением приведенных ниже условий.

Способ LC/MS/MS

Масс-спектрометр: Thermo QExactive HFX

Жидкостной хроматограф: Thermo Vanquish

Автоматический дозатор (ALS): Thermo Vanquish

Условия для HPLC

Колонка для LC: Waters Acquity UPLC Protein BEH C4, 50×2,1 мм, 1,7 мкм

Растворитель А: 100:0,1 (об.:об.) вода: муравьиная кислота

Растворитель В: 100:0,1 (об.:об.) ацетонитрил: муравьиная кислота

Объем вводимой пробы: 10 мкл

Температура печи для колонки: 40°C

Температура ALS: 4°C

Таблица 7. Градиент

Время (мин.)	% А	% В	Поток [мкл/мин.]
0,00	70	30	500
0,50	70	30	500
3,50	5	95	500
4,00	5	95	500
4,01	70	30	500
4,50	70	30	500

Условия для MS

Источник ионов: HESI

Полярность: положительная

Температура нагревателя вспомогательного газа: 380°C

Скорость потока защитного газа: 60

Скорость потока вспомогательного газа: 14

Скорость потока продувочного газа: 3

Напряжение ионораспыления: 3500 В

Температура капилляра: 320°C

Таблица 8. РК-данные у мышей с DIO (оценка стабильности)

Соединение	Доза (мг/кг)	T _{max} (дни)	C _{max} (нмоль/л)	AUC _{inf} (день*нмоль/л)	T _{1/2} (дни)
Соединение 1	0,24	1,0 ± 0,0	308 ± 58,1	854 ± 59,2	1,4 ± 0,05
Соединение 2	0,24	1,0 ± 0,0	338 ± 54,6	1150 ± 115	1,5 ± 0,04

Соединение 3	0,24	1,0 ± 0,0	261 ± 41,9	683 ± 72,5	1,0 ± 0,05
Соединение 4	0,24	1,3 ± 0,6	241 ± 37,6	892 ± 37,4	1,7 ± 0,2
Соединение 5	0,24	1,0 ± 0,0	548 ± 106	1650 ± 150	2,1 ± 0,2
Соединение 6	0,24	0,25 ± 0	284 ± 48,2	371 ± 70	0,5 ± 0,01
Соединение 7	0,24	1,0 ± 0,0	354 ± 47,1	1050 ± 216	1,37 ± 0,14
Семаглутид	0,12	0,21 ± 0,07	219 ± 25,5	194 ± 26,3	0,35 ± 0,09

PK у яванского макака

Для получения фармакокинетических параметров самцам яванских макаков с ожирением вводили одну s.c. дозу соединения при концентрации в составе, составлявшей 30, 60 или 90 мкг/мл, в солевом растворе с применением объема дозы, составлявшей 0,5 мл/кг. Макакам вводили дозу утром до кормления, но не в состоянии голодания. Забор крови у животных осуществляли через подкожную вену через определенные интервалы времени (перед введением дозы, через 0,25, 0,5, 1, 3, 7, 24, 48, 96, 168, 240, 336 и 504 ч. после введения дозы). Кровь отбирали в пробирки с вакуумом, содержавшие K₂EDTA, и до центрифугирования хранили на льду. Плазматическую часть крови получали путем центрифугирования в течение 10 мин. при 1000-2000 RCF (в общем 1300 RCF) при 4°C. 50-мкл аликвоту плазмы крови макаки переносили в 96-луночный планшет для биологического анализа. Калибровочные стандарты и образцы для QC получали в холостом растворе плазмы крови яванского макака с ожирением (плазма необработанных макаков с ожирением). Образцы для PK разбавляли в 2 раза холостым раствором плазмы крови макака с ожирением (10 мкл образца плюс 10 мкл холостого раствора плазмы крови макака с ожирением) и экстрагировали с применением процедуры осаждения белка, включающей добавление 150 мкл метанола, содержащего внутренний стандарт. Образцы перемешивали вихревым способом и центрифугировали при 4000 об./мин. в течение 15 мин. при 4°C. 125-мкл аликвоту надосадочной жидкости переносили в 96-луночный планшет, и в каждую лунку добавляли 100 мкл воды, и перемешивали вихревым способом. Образцы анализировали и количественно оценивали с помощью LC-MS/MS с применением приведенных условий.

Таблица 9. PK-данные у макаков с ожирением: (оценка стабильности)

Соединение	Доза (мг/кг)	T _{max} (дни)	C _{max} (нмоль/л)	AUC _{inf} (день*нмоль/л)	T _{1/2} (дни)
Соединение 1	0,045	1,0 ± 0,0	119 ± 29,0	1020 ± 202	4,8 ± 0,4

Соединение	Доза (мг/кг)	T _{max} (дни)	C _{max} (нмоль/л)	AUC _{inf} (день*нмоль/л)	T _{1/2} (дни)
Соединение 2	0,015	2,3 ± 1,2	28,2 ± 1,7	294 ± 26,7	6,0 ± 1,1
Соединение 3	0,015	2,3 ± 1,2	24,4 ± 8,3	196 ± 9,8	3,8 ± 0,4
Соединение 5	0,030	1,3 ± 0,6	31,4 ± 10,4	264 ± 101	4,4 ± 0,4
Семаглутид	0,004	1,0 ± 0,0	7,11 ± 2,2	35,5 ± 7,1	2,8 ± 0,2

Данные, оцененные в таблицах 8 и 9, обеспечивают доказательства лучшей стабильности к метаболическому разрушению *in vivo* соединений по настоящему изобретению по сравнению с семаглутидом.

Исследования эффективности: исследование ранних последствий потребления пищи

Потребление пищи (FI) после одной SC подкожной (s.c.) дозы каждого тестируемого соединения при концентрации в составе, составлявшей 24, 38 или 48 мкг/мл, в солевом растворе (объем дозы, составлявший 5 мл/кг) (например, соединение 1) оценивали на самцах мышей с алиментарным ожирением (DIO) (мышях C57BL/6, которых кормили рационом с высоким содержанием жиров (60% калорий из жиров), начиная с возраста, составлявшего 6 недель). В исследованиях применяли самцов возрастом 24-30 недель. Животных селили по одному на клетку в помещении с нормальным циклом света-темноты (с 6:00 утра до 6:00 вечера свет включен, в другое время свет выключен) согласно утвержденному IACUC протоколу. В качестве исходного уровня применяли среднее потребление пищи (FI) (потребление пищи в течение 24 ч., измеренное в течение 3-дневного периода перед началом исследования). В начале исследования записывали вес пищи, и животным подкожно вводили дозы тестируемого соединения. Вес потребляемой пищи измеряли через 24 ч. после введения доз тестируемого соединения. Потребление пищи (FI) через 24 часа у мышей с ожирением оценивали после подкожного введения одной дозы соединения в указанной дозировке; полученные данные показаны в таблице 10. Для сравнения оценивали эффект семаглутида.

Таблица 10. Потребление пищи у мышей с моделированным DIO после одного s.c. введения

Соединение	FI за 24 ч. (% от исходного уровня)	Доза
Соединение 1	-88 ± 2	240 мкг/кг
Соединение 2	-91 ± 5	240 мкг/кг
Соединение 3	-97 ± 3	240 мкг/кг
Соединение 4	-54 ± 9	240 мкг/кг

Соединение	FI за 24 ч. (% от исходного уровня)	Доза
Соединение 5	-72 ± 3	120 мкг/кг
	-81 ± 5	190 мкг/кг
	-89 ± 2	240 мкг/кг
Соединение 6	-67 ± 8	240 мкг/кг
Соединение 7	-49 ± 12	240 мкг/кг
Соединение 9	-44 ± 12	240 мкг/кг
Семаглутид	-86 ± 1	120 мкг/кг

Исследования эффективности

Эффективность (снижение потребления пищи и веса тела) соединения(-й) (например, соединения 1) после обработки оценивали на самцах мышей с алиментарным ожирением (DIO) (мышях C57BL/6, которых кормили рационом с высоким содержанием жиров (60% калорий из жиров), начиная с возраста, составлявшего 6 недель). В исследованиях применяли самцов возрастом 24-30 недель (n=7/группа). Животных селили по одному на клетку в помещении с нормальным циклом света-темноты согласно утвержденному IACUC протоколу. Мышей определяли в группу со средой-носителем (солевой раствор) или группу(-ы) обработки на основе средних значений веса тела (BW) и потребления пищи (FI) (потребление пищи за 24 ч., измеренное в течение 3-дневного периода перед началом исследования). В начале исследования записывали значения веса тела и пищи, и животным подкожно вводили дозу среды-носителя или соединения (12, 24, 29,6, 38 или 48 мкл/мл в солевом растворе с применением объема дозы, составлявшего 5 мл/кг). Соединение(-я) или среду-носитель вводили QD или, если показано, Q3D (каждые 3 дня). Дозу семаглутида вводили QD. Вес тела и потребление пищи измеряли ежедневно. Дозы соединения 1 и семаглутида выбирали на основе (i) максимальной эффективности, оцененной в отдельных исследованиях и соответствующей опубликованным данным (семаглутид), и (ii) эквимоллярной концентрации. Дозы стереоизомеров (соединения 2 и 3) выбирали на основе максимальной эффективности соединения 1, оцененной в отдельном исследовании.

Потеря веса тела у мышей с ожирением после подкожного введения соединения через 18, 24 и 30 дней показана в таблице 11. Дозы тестируемых соединений и среды-носителя вводили QD или Q3D в зависимости от дозировки; дозу семаглутида вводили QD; при этом все соединения растворяли в солевом растворе.

Таблица 11. Потеря веса тела у мышей с моделированным DIO после s.c. введения

Соединение	Усредненный начальный BW (г)	Доза	Потеря веса (% от исходного уровня)	День
------------	------------------------------	------	-------------------------------------	------

Соединение 5	53,4 ± 0,4	60 мкг/кг, QD	-7,4 ± 1,4	24
		120 мкг/кг, Q3D	-10,7 ± 1,1	
		240 мкг/кг, Q3D	-19,0 ± 1,2	
Соединение 1	58,2 ± 0,5	148 мкг/кг, Q3D	-17,1 ± 2,2	30
Семаглутид		240 мкг/кг, QD	-33,4 ± 3,8	
		120 мкг/кг, QD	-17,8 ± 1,2	
Соединение 1	49,3 ± 0,3	190 мкг/кг, Q3D	-19,5 ± 3,0	18
Соединение 2			-14,1 ± 1,1	
Соединение 3			-25,6 ± 2,9	
Соединение 1	49,3 ± 0,3	240 мкг/кг, Q3D	-20,5 ± 2,8	18
Соединение 2		240 мкг/кг, QD	-20,5 ± 3,0	
Соединение 3		240 мкг/кг, Q3D	-24,2 ± 2,7	

Исследование эффективности на яванских макаках

Взаимозависимость фармакокинетических (PK)/фармакодинамических (PD) параметров нового агониста GLP1R длительного действия (соединения 1) оценивали на яванских макаках с ожирением путем вычисления его эффекта на BW и FI. Эффективность определяли в виде снижения FI и BW. Переносимость, оцениваемая как снижение частоты и/или отсутствие рвоты и сохранение заинтересованности в выборе фруктов, и овощей, и орехов в качестве лакомств.

Макакам давали привыкнуть к рациону исследования (рацион 5TUR, 1-г гранулы (№ по кат. TestDiet 1815639-310)) в течение периода, составлявшего по меньшей мере одну неделю. После периода привыкания записывали потребление пищи в течение одной недели перед первым днем введения доз для установления исходного потребления пищи (FI). Исходный вес тела рассчитывали как среднее значение из двух независимых измерений, полученных в пределах семидневного периода перед первым днем введения доз.

Десяти самцам яванских макаков с ожирением вводили подкожную (s.c.) инъекцию либо среды-носителя (n=4), либо соединения (n=6) (0,03 мг/кг с применением объема дозы, составлявшего 0,5 мл/кг, следовательно концентрация составляла 0,06 мг/мл). Тестируемое соединение растворяли в солевом растворе в указанной концентрации. Макакам вводили дозу утром до кормления, но не в состоянии голодания. Потребление пищи измеряли ежедневно в течение всего исследования. Макакам давали предварительно взвешенное количество пищи, 200 г/день; половину отведенного количества давали утром, а остальную часть после обеда. Оставшуюся пищу взвешивали на следующее утро для определения ежедневного FC. Вес тела (BW) измеряли дважды в неделю.

Таблица 12. Изменение веса тела у макаков с ожирением

Изменение веса тела в течение времени
--

Время в днях	Соединение 1 30 мкг/кг s.c. Q1W	Среда-носитель (солевой раствор) s.c. Q1W
0	0,0% ± 0,0%	0,0% ± 0,0%
4	-1,6% ± 1,1%	-0,2% ± 0,3%
7	-1,2% ± 0,7%	0,5% ± 0,2%
11	-1,8% ± 1,2%	0,6% ± 0,2%
14	-2,2% ± 1,0%	0,6% ± 0,5%
18	-2,7% ± 1,5%	0,9% ± 0,6%
21	-2,6% ± 1,4%	1,0% ± 0,4%
25	-3,1% ± 1,7%	1,6% ± 0,8%
28	-3,1% ± 1,6%	1,2% ± 0,9%
32	-3,5% ± 2,1%	1,7% ± 1,0%
35	-4,2% ± 1,9%	1,4% ± 1,0%
39	-4,2% ± 2,2%	1,2% ± 0,8%
42	-3,7% ± 2,2%	1,8% ± 1,2%

Таблица 13. Изменение потребления пищи у макак с ожирением

Относительное изменение потребления пищи (FI) в течение времени				
Время в днях	Соединение 1 30 мкг/кг s.c. Q1W	+/- SEM	Среда-носитель (солевой раствор) s.c. Q1W	+/- SEM
0	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
1	-35,0%	16,0%	-2,5%	4,1%
2	-52,8%	18,6%	-5,4%	6,0%
3	-50,2%	17,9%	-12,6%	7,3%
4	-38,2%	15,1%	-0,7%	8,2%
5	-27,6%	12,1%	-4,0%	2,3%
6	-20,4%	10,4%	1,3%	2,1%
7	-10,2%	4,8%	8,8%	8,7%
8	-31,3%	14,1%	-1,9%	6,7%
9	-40,2%	17,3%	-3,0%	8,5%
10	-39,2%	15,9%	0,7%	0,6%
11	-29,6%	13,3%	5,5%	5,9%

12	-26,0%	13,0%	-6,8%	7,6%
13	-23,0%	10,3%	-2,8%	2,4%
14	-23,3%	11,2%	-5,3%	2,8%
15	-29,0%	14,3%	8,1%	7,4%
16	-42,7%	18,4%	3,7%	5,8%
17	-39,2%	16,1%	-15,2%	21,8%
18	-35,7%	15,4%	6,2%	5,3%
19	-25,0%	14,8%	-0,4%	4,2%
20	-24,4%	12,7%	2,5%	14,1%
21	-25,0%	14,8%	7,7%	6,9%
22	-35,7%	16,8%	-0,5%	0,4%
23	-49,4%	16,2%	-0,7%	5,6%
24	-37,5%	16,4%	-8,2%	11,1%
25	-32,0%	15,9%	12,3%	11,8%
26	-28,3%	14,7%	1,9%	2,8%
27	-19,7%	16,1%	3,8%	14,0%
28	-25,0%	14,6%	-4,0%	6,8%
29	-28,8%	15,2%	9,9%	9,1%
30	-42,2%	18,4%	3,1%	4,8%
31	-42,1%	18,7%	-19,9%	10,6%
32	-32,7%	15,7%	9,9%	9,7%

Соединение 1 подавляет потребление пищи и снижает вес тела у макак с ожирением (см. таблицы 12 и 13). Все данные выражены в виде среднего значения \pm SEM, n=7/группа.

Оценка переносимости

Неожиданно, было установлено, что соединения, описанные в данном документе, намного лучше переносились при введении макакам с ожирением (что оценено по сравнению с семаглутидом в качестве лекарственного препарата сравнения). При том, что ни одна из макак не показала каких-либо признаков рвоты после введения соединений 1, 2, 5 или 9, и у 1 из 6 обезьян наблюдали рвоту при использовании соединения 3, у всех обезьян, получающих семаглутид, наблюдалась рвота (см. таблицу 14).

Таблица 14. Оценка наличия рвоты и FI после введения одной s.c. дозы соединения

Соединение	Наблюдаемое снижение FI	Одна S.C. доза	Рвота (количество обезьян, у которых наблюдалась рвота/общее количество животных в исследовании)
Семаглутид	Да	30 мкг/кг	Да (3/3)
Соединение 1	Да	30 мкг/кг	Нет (0/2)
Соединение 2	Да	30 мкг/кг	Нет (0/6)
Соединение 3	Да	30 мкг/кг	Да (1/6)
Соединение 5	Да	15 мкг/кг	Нет (0/3)
	Да	30 мкг/кг	Нет (0/3)
Соединение 9	Да	30 мкг/кг	Нет (0/3)

ХИМИЧЕСКИЕ ПРИМЕРЫ

А. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРИМЕРЫ

Способы LCMS

Способ А

Проточная

1 мл/мин.

цитометрия

Элюенты

А: вода (0,1% муравьиной кислоты); В: ACN (0,1% муравьиной кислоты)

Градиент

Время

% А

% В

0,00

95

40

1,40

5

98

2,05

5

98

2,10

95

40

Колонка

Acquity BEH, 1,7 мкм, 2,1×50 мм

Температура

50°C

колонки

Масс-спектрометр

Одиночный квадрупольный, ESI, диапазон сканирования 120-1600

UPLC

Waters Acquity

Способ В

Проточная

1,5 мл/мин.

цитометрия

Элюенты

А: вода (0,037% TFA); В: ACN (0,018% TFA)

Градиент

Время

% А

% В

0,00	95	5
0,80	5	95
1,20	5	95
1,21	95	5
1,55	95	5

Колонка Kinetex®, 5 мкм, 30×2,1 мм S/N: H17-247175

Температура 50°C

колонки

Источник ионизации ESI

Прибор LCMS-2020 SHIMADZU

Детектор PDA (220 нм и 254 нм)

Диапазон 100-1000

сканирования

Способ С

Проточная 1,0 мл/мин.

цитометрия

Время остановки 5,20 мин.

Элюенты А: вода (0,1% TFA); В: ACN (0,1% TFA)

Градиент	Время	% А	% В
	0,00	98	2
	4,40	2	98
	5,15	2	98
	5,19	98	2

Колонка AcQuity UPLC BEH C18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм

Температура 50°C

колонки

УФ 210-400 нм

Способ D

Проточная цитометрия	1,0 мл/мин.		
Время остановки	2,00 мин.		
Элюенты	А: вода (0,1% муравьиной кислоты); В: ACN (0,1% муравьиной кислоты)		
Градиент	Время	% А	% В

	0,00	98	2
	0,10	98	2
	1,50	2	98
	1,80	2	98
	1,90	98	2
	2,00	98	2
Колонка	AcQuity UPLC BEH C18, 1,7 мкм, 2,1×30 мм		
Температура колонки	50°C		
УФ	210-400 нм		

Способ Е

Проточная 1,0 мл/мин.

цитометрия

Время остановки 2,20 мин.

Элюенты А: вода (0,1% муравьиной кислоты); В: АСN (0,1% муравьиной кислоты)

Градиент	Время	% А	% В
	0,00	60	40
	1,40	2	98
	2,05	2	98
	2,09	60	40

Колонка AcQuity UPLC BEH C18, 1,7 мкм, 2,1×30 мм

Температура колонки 50°C

УФ

210-400 нм

Способ F

Проточная 1,0 мл/мин.

цитометрия

Время остановки 5,20 мин.

Элюенты А: вода (0,1% муравьиной кислоты); В: АСN (0,1% муравьиной кислоты)

Градиент	Время	% А	% В
	0,00	98	2
	4,40	2	98

	5,15	2	98
	5,19	98	2
Колонка	AcQuity UPLC BEH C18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм		
Температура колонки	50°C		
УФ	210-400 нм		

Способ G

Проточная цитометрия	1,0 мл/мин.		
Время остановки	5,20 мин.		
Элюенты	А: вода (0,1% муравьиной кислоты); В: АСN (0,1% муравьиной кислоты)		
Градиент	Время	% А	% В
	0,00	60	40
	3,40	2	98
	5,15	2	98
	5,19	60	40

Колонка	AcQuity UPLC BEH C18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм		
Температура колонки	50°C		
УФ	210-400 нм		
Диапазон масс	100-2050 Да		

Способ H

Проточная цитометрия	1,0 мл/мин.		
Время остановки	5,20 мин.		
Элюенты	А: вода (0,1% муравьиной кислоты); В: АСN (0,1% муравьиной кислоты)		
Градиент	Время	% А	% В
	0,00	60	40
	3,40	2	98
	5,15	2	98
	5,19	60	40

Колонка	AcQuity UPLC BEH C18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм		
---------	--	--	--

Температура 50°C

колонки

УФ 210-400 нм

Способ I

Проточная 1,0 мл/мин.

цитометрия

Время остановки 5,20 мин.

pH 10,2

Элюенты А: вода (5 мМ NH₄OH); В: ACN (5 мМ NH₄OH)

Градиент	Время	% А	% В
	0,00	60	40
	3,40	2	98
	5,15	2	98
	5,19	60	40

Колонка AcQuity UPLC VEN C18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм

Температура 50°C

колонки

УФ 210-400 нм

Способ J

Проточная 1,0 мл/мин.

цитометрия

Время остановки 2,20 мин.

Элюенты А: вода (0,1% муравьиной кислоты); В: ACN (0,1% муравьиной кислоты)

Градиент	Время	% А	% В
	0,00	98	2
	0,06	98	2
	1,76	2	98
	2,00	2	98
	2,16	98	2

Колонка AcQuity UPLC CSH C18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм

Температура 50°C

колонки

УФ	210-400 нм
Диапазон масс	100-2050 Да

Способ К

Проточная 1,0 мл/мин.

цитометрия

Время остановки 5,20 мин.

Элюенты А: вода (0,1% TFA); В: ACN (0,1% TFA)

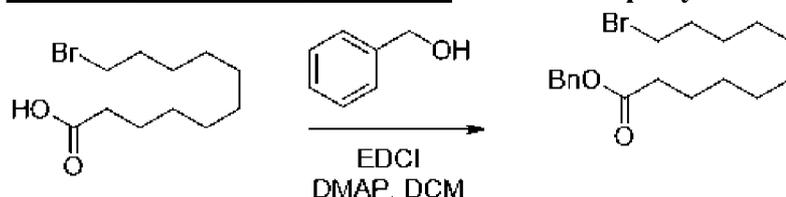
Градиент	Время	% А	% В
	0,00	98	2
	0,06	98	2
	1,76	2	98
	2,00	2	98
	2,16	98	2

Колонка AcQuity UPLC CSH C18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм

Температура 80°C

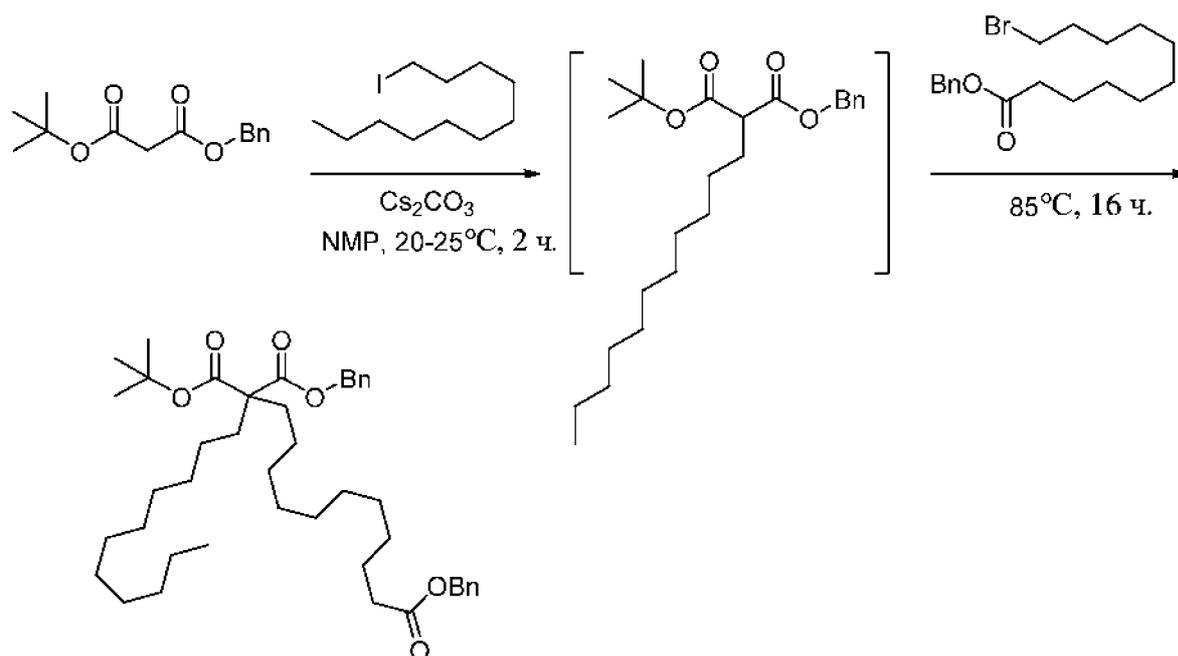
колонки

УФ 210-400 нм

В. ПРИМЕРЫ СИНТЕЗА**Промежуточное соединение 1. Бензил-11-бромундеканоат**

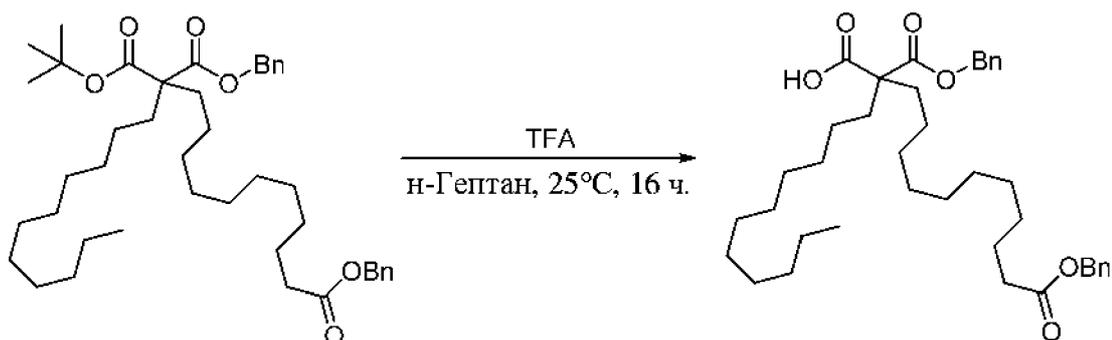
В смесь 11-бромундекановой кислоты (4,60 кг, 17,3 моль, 1,1 экв.) в DCM (26,5 кг) частями добавляли EDCI (3,8 кг, 20,2 моль, 1,28 экв.) при 0°C наряду с DMAP (98 г, 0,8 моль, 0,05 экв.). Затем по каплям добавляли бензиловый спирт (1,70 кг, 15,7 моль, 1,00 экв.). После перемешивания при 20°C в течение 4 ч., по каплям добавляли воду (70,0 кг). Затем реакционную смесь концентрировали в вакууме. Добавляли гептан (23,2 кг) и 19% раствор NaCl (17 кг) и фазы разделяли. Органическую фазу промывали с помощью 5% Na₂CO₃, 25,0 кг; 19% раствора NaCl, 25,0 кг (x2), 5,2% водного раствора HCl, 25,0 кг; 19% раствора NaCl, 25,0 кг, воды (5,0 кг) и солевого раствора (5,0 кг). Затем органическую фазу концентрировали под вакуумом при 50°C с получением **промежуточного соединения 1**, которое применяли как таковое на следующей стадии. ¹H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ ppm 1,18-1,36 (m, 10 H) 1,37-1,47 (m, 2 H) 1,64 (quin, J=7,33 Гц, 2 H) 1,85 (dt, J=14,56, 7,06 Гц, 2 H) 2,35 (t, J=7,58 Гц, 2 H) 3,40 (t, J=6,88 Гц, 2 H) 5,11 (s, 2 H) 7,28-7,45 (m, 5 H).

Промежуточное соединение 2. 1,11-Дибензил-11-(трет-бутил)докозан-1,11,11-трикарбоксилат



В раствор бензил-трет-бутилмалоната (3,0 кг, 12,0 моль, 1,0 экв.) в NMP (30 л) добавляли 1-йодундекан (3,55 кг, 12,58 моль, 1,05 экв.) и Cs_2CO_3 (11,76 кг, 36,09 моль, 3,0 экв.) при 20°C. Полученную смесь перемешивали при 20°C в течение 6 ч. и затем добавляли **промежуточное соединение 1** (5,53 кг, 15,6 моль, 1,3 экв.). Реакционную смесь нагревали до не более 85°C и перемешивали в течение 12 ч. Затем смесь охлаждали до 20°C и добавляли смесь воды (30 кг) и гептана (10 кг). После перемешивания в течение 30 мин. органическую фазу отделяли и промывали 3 раза смесью солевого раствора (5 кг) и MeOH (4 кг). Органический слой высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали *in vacuo*. Дополнительную очистку осуществляли с помощью колоночной хроматографии, элюируя смесью гептан/EtOAc=от 1/0 до 100/1, с получением **промежуточного соединения 2**. ^1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ ppm 0,84-0,94 (m, 3 H) 1,12 (m, $J=6,60$ Гц, 4 H) 1,19-1,33 (m, 28 H) 1,35 (s, 9 H) 1,66 (quin, $J=7,40$ Гц, 2 H) 1,85 (t, $J=8,44$ Гц, 4 H) 2,37 (t, $J=7,52$ Гц, 2 H) 5,14 (s, 2 H) 5,16 (s, 2 H) 7,30-7,42 (m, 10 H).

Промежуточное соединение 3. 13-(Бензилокси)-2-((бензилокси)карбонил)-13-оксо-2-ундецилтридекановая кислота



В раствор **промежуточного соединения 2** (6,0 кг, 8,8 моль, 1,0 экв.) в гептане (21 л) по каплям добавляли TFA (10,0 кг, 88,4 моль, 10,0 экв.) при $20 \pm 5^\circ\text{C}$. После перемешивания при $20 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение 8 ч. большинство TFA удаляли при пониженном давлении, и полученный осадок повторно растворяли в гептане (42 л, 7 об.) и промывали солевым раствором (42 л x 3). После разделения фаз органическую фазу концентрировали с получением неочищенного продукта в виде желтого масла. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии с элюированием, начиная от гептана до смеси гептан:EtOAc=10/1, с получением **промежуточного соединения 3**. ^1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ ppm 0,87-0,94 (m, 3 H) 0,94-1,05 (m, 2 H) 1,19 (br. s., 14 H) 1,23-1,37 (m, 16 H) 1,65 (quin, $J=7,40$ Гц, 2 H) 1,78-1,91 (m, 2 H) 1,93-2,05 (m, 2 H) 2,37 (t, $J=7,52$ Гц, 2 H) 5,14 (s, 2 H) 5,27 (s, 2 H) 7,31-7,44 (m, 10 H).

Чистые энантиомеры рацемического **промежуточного соединения 3** разделяли посредством хиральной SFC с получением энантиомерно чистых **промежуточных соединений 3А** и **3В**, которые применяли для получения **соединений 2** и **3** соответственно. Параметры для получения энантиомерно чистых **промежуточных соединений 3А** и **3В** являлись следующими.

Прибор: Thar 350 для препаративной SFC (SFC-18)

Колонка: ChiralPak AD, 300×50 мм I.D., 10 мкм

Подвижная фаза: А - CO_2 , и В - этанол

Градиент: В 40%

Скорость потока: 200 мл/мин.

Обратное давление 100 бар

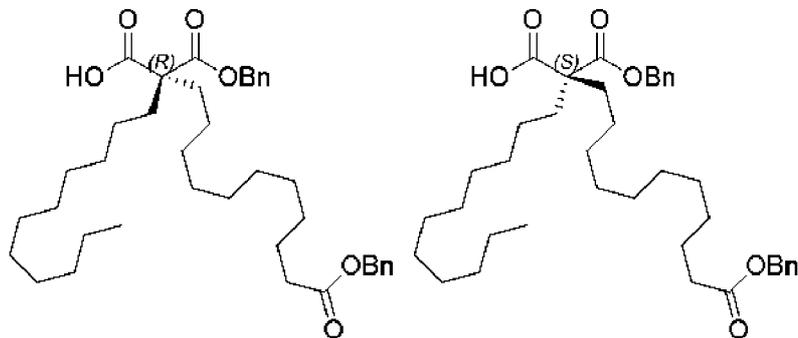
Температура колонки: 38°C

Длина волны: 210 нм

Время цикла: ~3,7 мин.

Пик 1: R-энантиомер (3А)

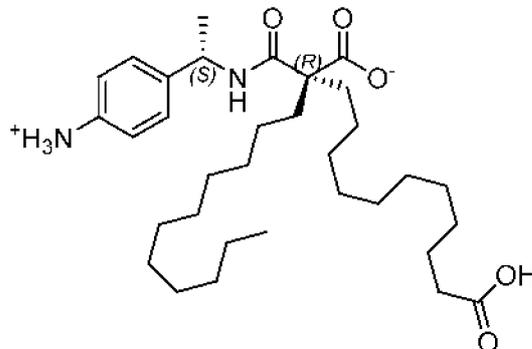
Пик 2: S-энантиомер (3В)



Энантиомер 3А Энантиомер 3В

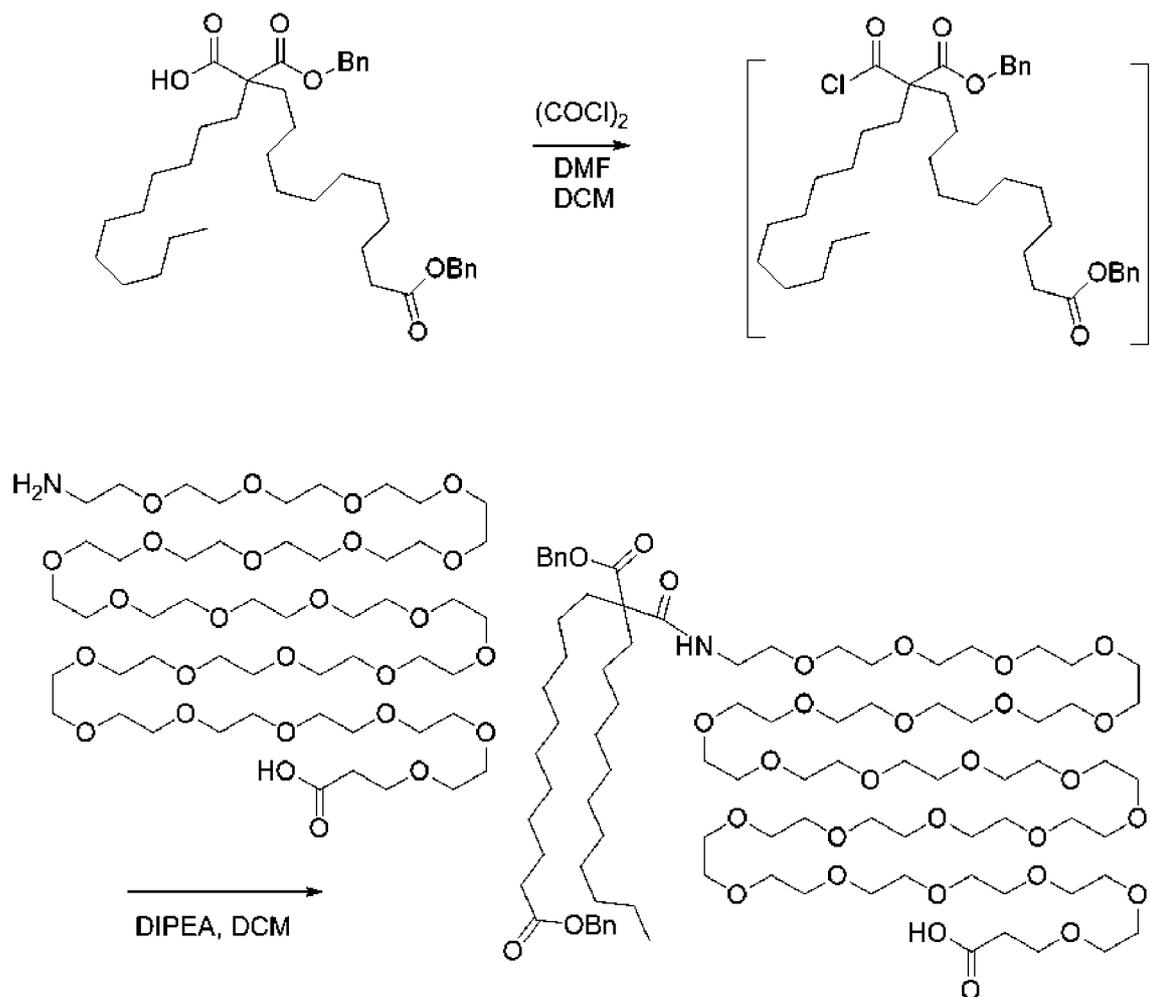
Абсолютную конфигурацию энантиомера 3А, определяли по его производному (показано ниже); т. е. энантиомер 3А вводили в реакцию на 1-й стадии с оксалилхлоридом в DMF, затем с осуществлением реакции полученного хлорангирида с (S)-1-(4-нитрофенил)-этан-1-амином, продукт чего затем обрабатывали водородом в присутствии

Pd/C с получением структуры, показанной ниже, с использованием которой получали результат рентгеновского анализа монокристаллов. Продукт с пиком 2 в энантиомерной смеси, разделяемой с помощью хиральной SFC, следовательно, был ассоциирован с S-конфигурацией и определен как энантиомер 3B в соответствии с определением того, что абсолютной конфигурацией энантиомера 3A является R.



Производное (R)-энантиомера 3A – конфигурацию определяли посредством рентгеновского анализа (R)-2-(((S)-1-(4-аммонийфенил)этил)карбамоил)-2-(10-карбокситецил)тридеканоат

Промежуточное соединение 4. 14-((Бензилокси)карбонил)-3,15-диоксо-1-фенил-14-ундецил-2,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76,79,82,85,88-пентакозаокса-16-азагеннонаконтан-91-овая кислота

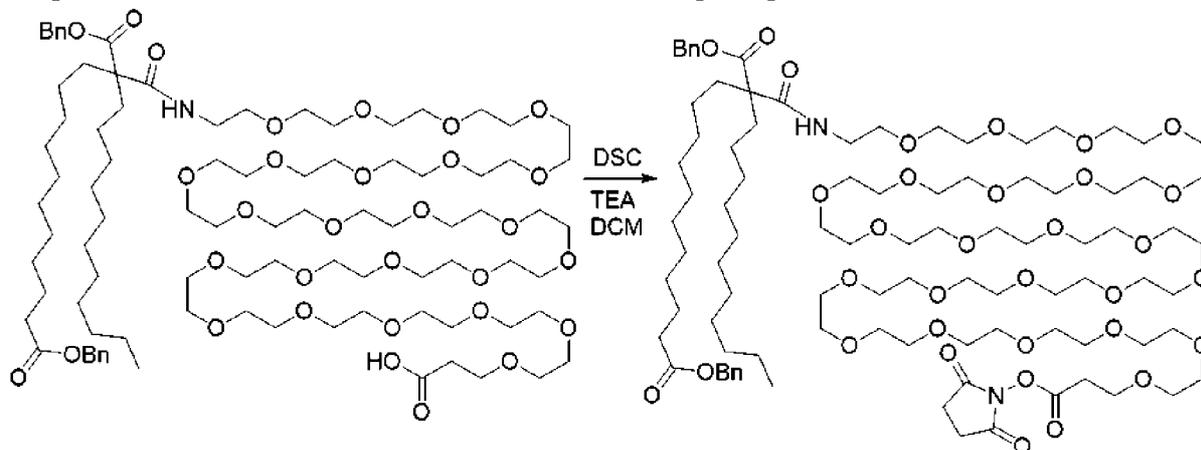


В колбу добавляли **промежуточное соединение 3** (640 г, 1,03 моль), DCM (8,3 кг) и DMF (3 г). Полученную смесь перемешивали при 25°C, а затем по каплям добавляли оксалилхлорид (170 г, 1,34 моль). Перемешивание продолжали в течение еще 2-3 ч. Концентрация реакционной смеси и замена растворителя на гептан обеспечивали получение неочищенной смеси, в которую добавляли 8,5 кг DCM с обеспечением образования раствора, который непосредственно применяли на следующей стадии.

В колбу добавляли 1-амино-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтан-75-овую кислоту (амин-PEG24-кислота, 900 г, 0,79 моль), DCM (6,0 кг) и DIPEA (203 г) и полученную смесь перемешивали при 25°C. Затем по каплям добавляли неочищенный раствор ацилхлорида из стадии 1. Реакционную смесь перемешивали в течение еще 1-2 ч. Добавляли кислотную смолу (1,3 кг) и перемешивание продолжали в течение 30 мин. Затем смесь фильтровали. Добавляли MgSO₄ (1,3 кг) и перемешивание продолжали в течение 30 мин. Смесь фильтровали и концентрировали с получением неочищенного остатка. Неочищенный остаток очищали с помощью Al₂O₃ с использованием подвижной фазы, включавшей МТВЕ, DCM, MeOH. Затем все требуемые фракции собирали и концентрировали с получением **промежуточного соединения 4**. ¹H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ ppm 0,86-0,93 (m, 3 H) 0,93-1,04 (m, 2 H) 1,19 (br. s., 15 H) 1,23-1,37 (m, 15 H) 1,61-1,68 (m, 2 H) 1,78 (td, J=12,44, 4,34 Гц, 2 H) 1,92-2,05 (m, 2 H) 2,37

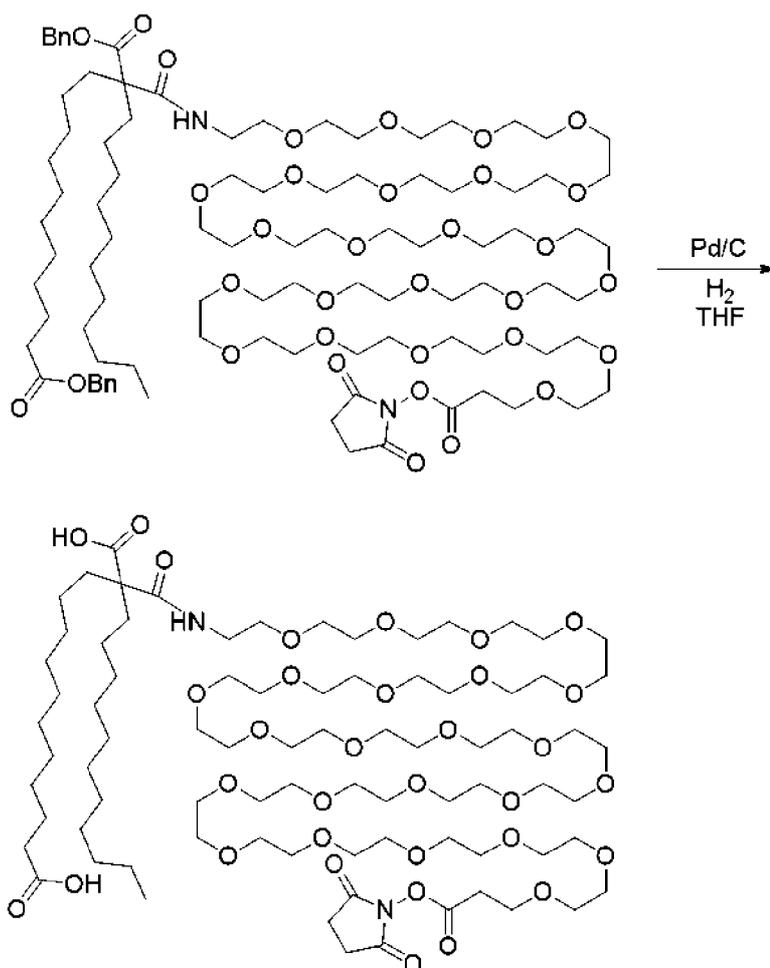
(t, J=7,58 Гц, 2 H) 2,62 (t, J=6,05 Гц, 2 H) 3,49 (dd, J=6,72, 2,32 Гц, 2 H) 3,52-3,59 (m, 2 H) 3,59-3,73 (m, 92 H) 3,80 (t, J=6,05 Гц, 2 H) 5,13 (s, 2 H) 5,18 (s, 2 H) 7,31-7,42 (m, 10 H) 8,09 (t, J=5,26 Гц, 1 H).

Промежуточное соединение 5. 77,87-Дибензил-1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-76-оксо-77-ундецил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаокса-75-азагептаоктаконтан-1,77,87-трикарбоксилат



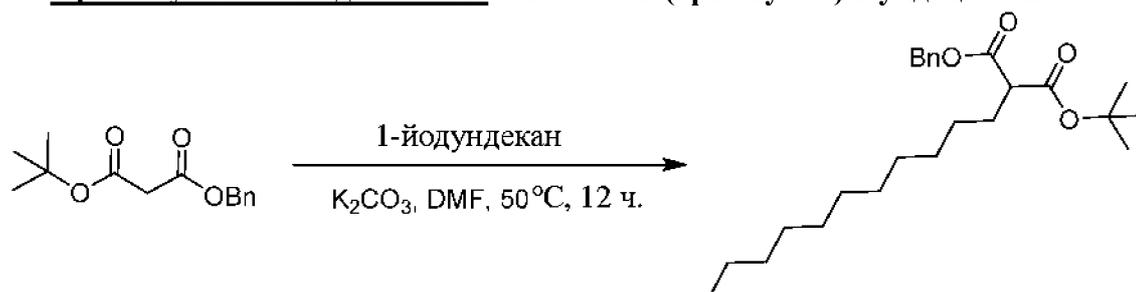
В раствор **промежуточного соединения 4** (920 г, 0,53 моль) в DCM (6,1 кг) добавляли TEA (11 г) и полученную смесь перемешивали с получением прозрачного раствора. Затем добавляли DSC (161 г, 0,63 моль) и перемешивание продолжали при 25°C в течение 2 ч. Добавляли кислотную смолу (180 г) и данную смесь перемешивали в течение 30 мин. Добавляли MgSO₄ (180 г) и перемешивание продолжали в течение 30 мин. Затем смесь фильтровали с получением прозрачного светло-желтого раствора. Концентрация под вакуумом обеспечивала получение неочищенного **промежуточного соединения 5**, которое непосредственно применяли на следующей стадии. LCMS, способ А: Rt=1,5 мин., [M+H₃O+H]²⁺=933,9.

Промежуточное соединение 6. 2-((75-((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)-75-оксо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтил)карбамоил)-2-ундецилтриоктандикарбоновая кислота



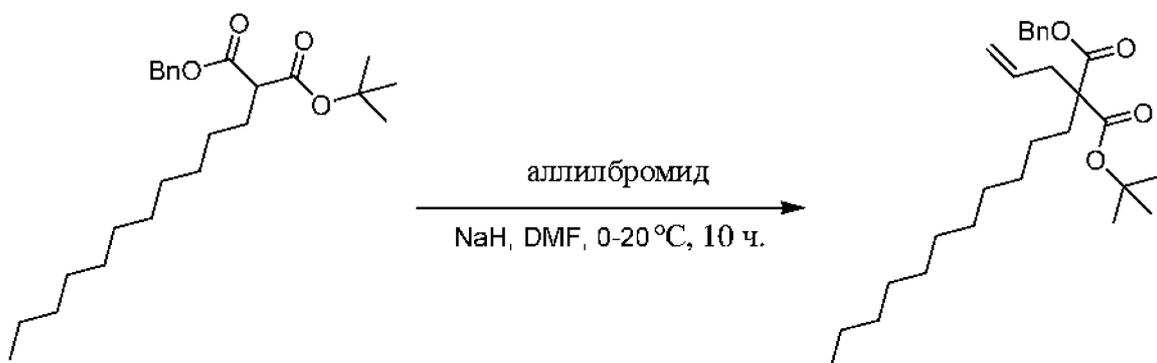
В реактор гидрогенизации добавляли **промежуточное соединение 5** (986 г, 0,48 моль, чистота 90%), THF (7,6 кг) и 10% Pd/C (110 г), затем MgSO₄ (110 г) и полученную смесь продували с помощью N₂, а затем с помощью H₂ и перемешивали при 25°C в течение 3-24 ч. После полного израсходования исходного материала добавляли еще MgSO₄ (220 г) и перемешивание продолжали в течение дополнительных 30 мин. Реакционную смесь фильтровали. Осадок на фильтре промывали с помощью 100 мл THF, и фильтрат объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 6**. ¹H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ ppm 0,84-0,94 (m, 3 H) 1,17 (br. s., 2 H) 1,21-1,39 (m, 30 H) 1,57-1,68 (m, 2 H) 1,69-1,80 (m, 2 H) 1,97-2,10 (m, 2 H) 2,34 (t, J=7,21 Гц, 2 H) 2,86 (s, 4 H) 2,92 (t, J=6,48 Гц, 2 H) 3,51-3,73 (m, 96 H) 3,87 (t, J=6,48 Гц, 2 H) 7,45 (t, J=4,46 Гц, 1 H).

Промежуточное соединение 7. 1-Бензил-3-(трет-бутил) 2-ундецилмалонат



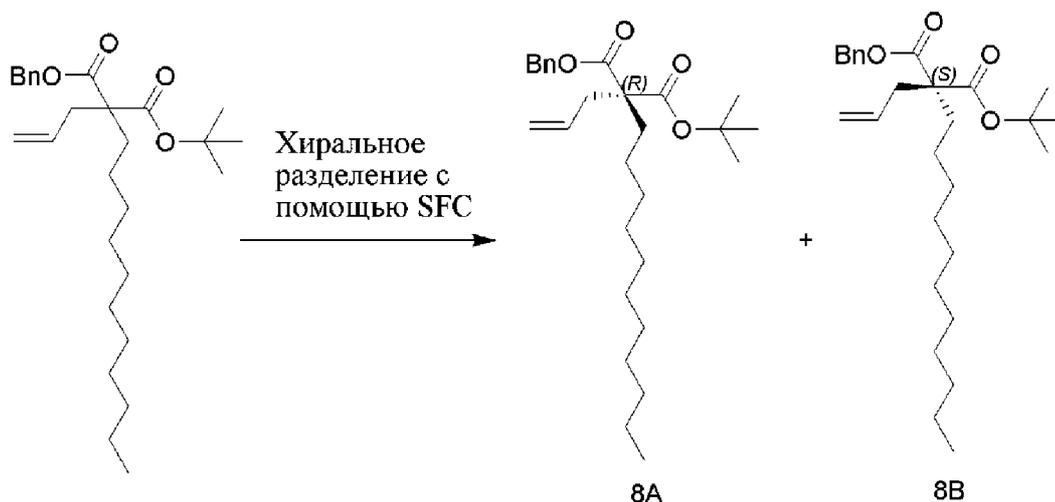
Бензил-трет-бутилмалонат (110 г, 439 ммоль, 1 экв.) поглощали в DMF (800 мл). В полученную смесь добавляли 1-йодундекан (130 г, 461 ммоль, 1,05 экв.) и K_2CO_3 (151 г, 1,10 моль, 2,5 экв.). Полученную суспензию перемешивали при 50°C в течение 12 ч. Затем реакционную смесь разбавляли этилацетатом (500 мл), затем выливали в ледяную воду. Объединенные органические фазы дважды промывали солевым раствором (150 мл), высушивали с помощью сульфата натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного остатка. Неочищенный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO_2 , элюирование смесью петролейный эфир/этилацетат=от 1/0 до 0/1) с получением **промежуточного соединения 7** в виде бесцветного масла. 1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$) δ ppm 7,46-7,26 (m, 5H), 5,27-4,98 (m, 2H), 3,44-3,26 (m, 1H), 1,72 (br d, $J=6,8$ Гц, 2H), 1,33 (s, 9H), 1,28-1,10 (m, 18H), 0,93-0,75 (m, 3H).

Промежуточное соединение 8. 1-Бензил-3-(трет-бутил)-2-аллил-2-ундецилмалонат



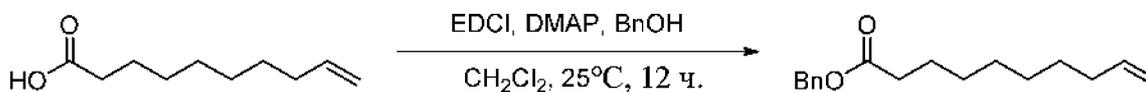
NaH (14,5 г, 364 ммоль, 60%, 1,2 экв.) по каплям добавляли в DMF (1230 мл) при 0°C, а затем медленно добавляли **промежуточное соединение 7** (123 г, 304 ммоль, 1 экв.) в DMF (123 мл). Полученную смесь перемешивали при 0°C в течение 0,5 ч., а затем по каплям добавляли аллилбромид (40,4 г, 334 ммоль, 29 мл, 1,1 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 9,5 ч., а затем разбавляли этилацетатом (2500 мл). Смесь выливали в ледяной насыщенный NH_4Cl_4 (1200 мл). Органическую фазу отделяли от водной фазы и водную фазу дважды промывали этилацетатом. Затем органические фазы объединяли, три раза промывали солевым раствором (500 мл), высушивали над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением остатка. Данный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO_2 , элюирование смесью петролейный эфир/этилацетат=от 1/0 до 98/2) с получением **промежуточного соединения 8** в виде желтого масла. 1H ЯМР (400 МГц, $DMSO-d_6$) δ ppm 7,50-7,26 (m, 5H), 5,70-5,50 (m, 1H), 5,24-5,01 (m, 4H), 4,99-4,74 (m, 1H), 1,70 (br s, 2H), 1,45-1,34 (m, 3H), 1,27 (s, 9H), 1,25-1,15 (m, 18H), 0,85 (br t, $J=6,8$ Гц, 3H).

Промежуточное соединение 8А и 8В. 1-Бензил-3-(трет-бутил)-2-аллил-2-ундецилмалонат



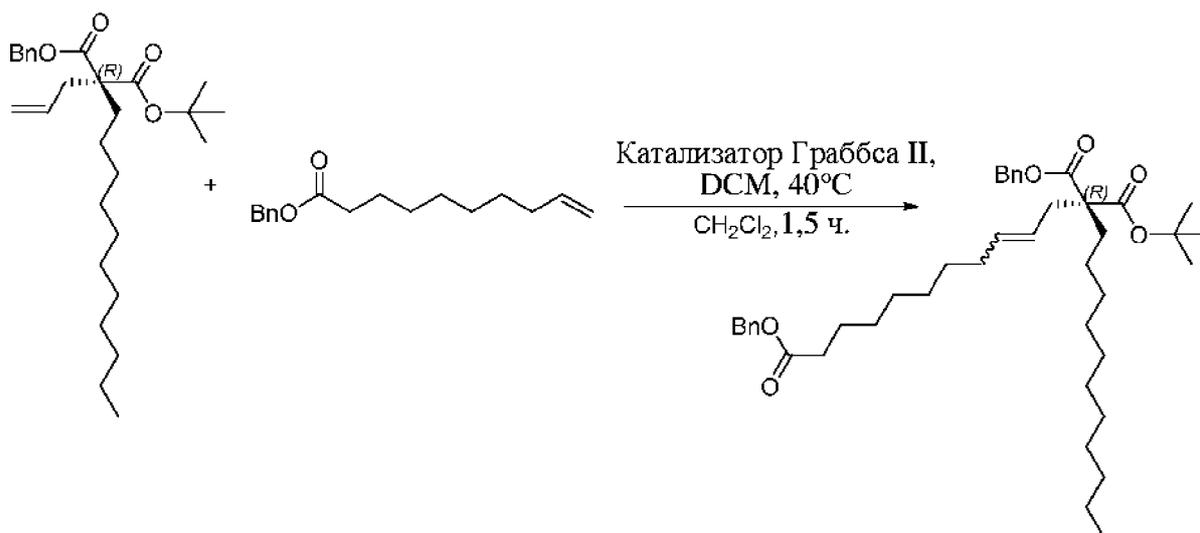
Промежуточное соединение 8 (159 г) очищали путем разделения с помощью SFC (колонка: Chiralpak IG-3, 100 * 4,6 мм I.D., 3 мкм; подвижная фаза: А: CO₂, В: изопропанол (0,05% DEA); градиент: от 5% до 40% В за 5 мин. и удерживание 40% в течение 2,5 мин., затем 5% В в течение 2,5 мин.; скорость потока: 2,5 мл/мин.; температура колонки: 35°C ABPR: 1500 фунтов/кв. дюйм) с получением **промежуточного соединения 8А** (пик 1) и **промежуточного соединения 8В** (пик 2). LCMS, способ В: Rt=1,334 мин., MS (ESI) *масса/заряд* [M+Na]⁺=467,3. SFC: **промежуточное соединение 8А** (пик 1), чистый энантиомер (R); SFC: **промежуточное соединение 8В** (пик 2), чистый энантиомер (S).

Промежуточное соединение 9. Бензилдец-9-еноат



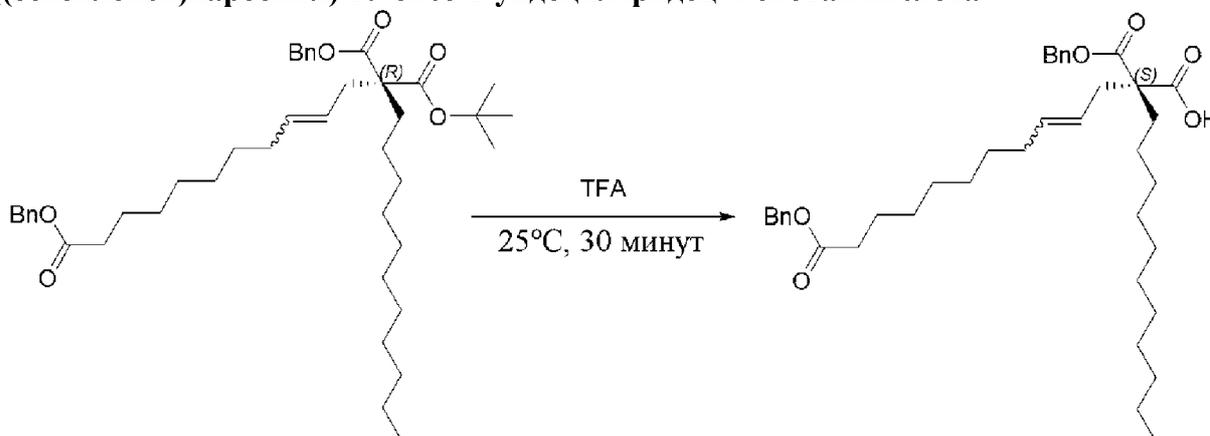
В раствор дец-9-еновой кислоты (70,0 г, 411 ммоль, 76,0 мл, 1 экв.) в DCM (1400 мл) добавляли BnOH (66,6 г, 616 ммоль, 64,1 мл, 1,5 экв.), DMAP (5,02 г, 41,12 ммоль, 0,1 экв.), EDCI (94,5 г, 493,3 ммоль, 1,2 экв.) и DIEA (63,7 г, 493 ммоль, 85,9 мл, 1,2 экв.). Полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 12 ч. Затем реакцию смесь разбавляли с помощью DCM (500 мл). Полученный раствор дважды промывали солевым раствором (500 мл), высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного остатка. Данный неочищенный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO₂, элюирование смесью петролейный эфир/этилацетат=от 1/0 до 0/1) с получением **промежуточного соединения 9** в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 7,46-7,29 (m, 5H), 5,78 (dd, J=10,4, 16,8 Гц, 1H), 5,13-5,05 (m, 2H), 5,03-4,77 (m, 2H), 2,38-2,26 (m, 2H), 2,13-1,92 (m, 2H), 1,62-1,48 (m, 2H), 1,38-1,28 (m, 2H), 1,28-1,15 (m, 6H).

Промежуточное соединение 10А. 1,11-Дибензил-11-(трет-бутил)-(R)-докоз-8-ен-1,11,11-трикарбоксилат



Промежуточное соединение 8А (26,0 г, 58,4 ммоль, 1 экв.) и **промежуточное соединение 9** (30,4 г, 116 ммоль, 2 экв.) растворяли в CH₂Cl₂ (520 мл). Затем добавляли катализатор Граббса II (2,38 г, 3,80 ммоль, 0,065 экв.) и полученную смесь перемешивали при 40°C в течение 1,5 ч. Затем реакционную смесь концентрировали с получением неочищенного остатка. Данный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO₂, элюирование смесью петролейный эфир/этилацетат=от 1/0 до 0/1) с получением **промежуточного соединения 10А** в виде бесцветного масла. LCMS, способ В: Rt=1,456 мин., [M+Na]⁺=699,6.

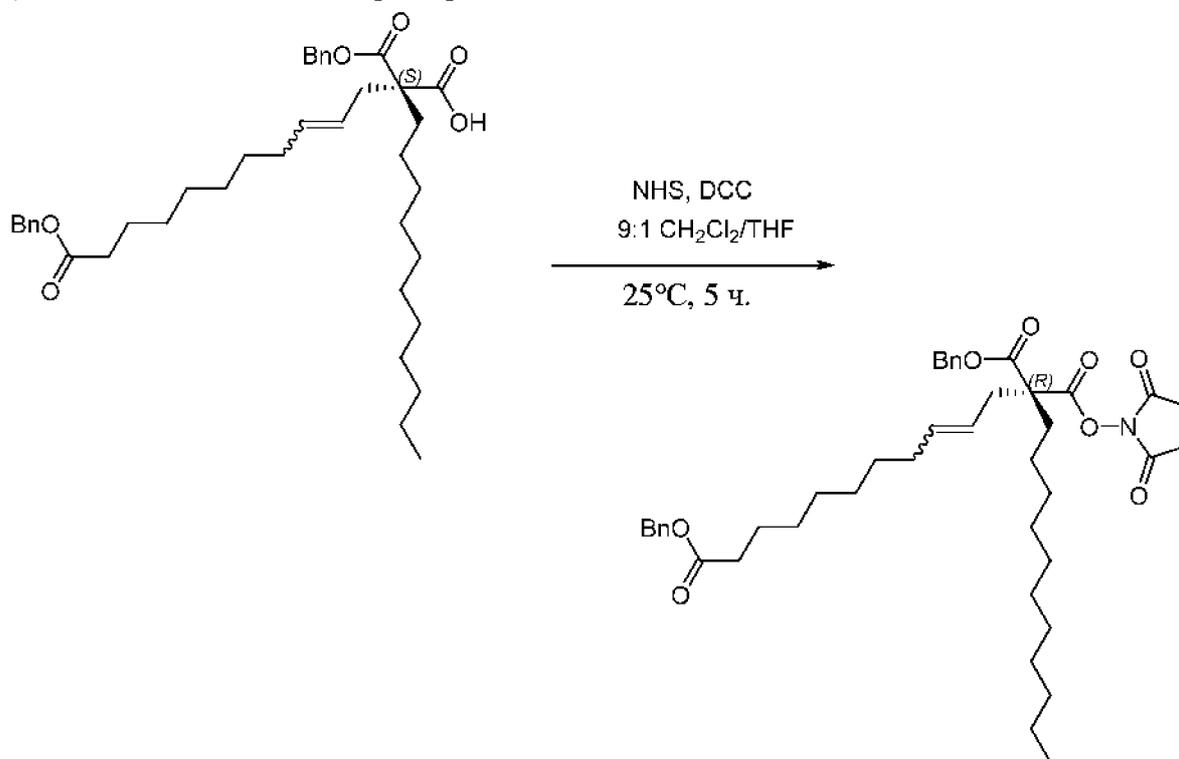
Промежуточное соединение 11А. (S)-13-(Бензилокси)-2-((бензилокси)карбонил)-13-оксо-2-ундецилтридец-4-еновая кислота



Промежуточное соединение 10А (50,0 г, 73,8 ммоль, 1 экв.) растворяли в TFA (500 мл) и полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин. Затем реакционную смесь концентрировали с получением неочищенного остатка, который растворяли в этилацетате (500 мл), а затем дважды промывали насыщенным NaHCO₃ (500 мл) и соевым раствором (100 мл), высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением неочищенного остатка. Остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO₂, элюирование смесью петролейный эфир/этилацетат=от 1/0 до 0/1) с получением **промежуточного соединения 11А** в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ ppm 7,44-7,14 (m, 10H), 5,41 (br s, 1H), 5,22-4,86 (m, 5H), 2,49-

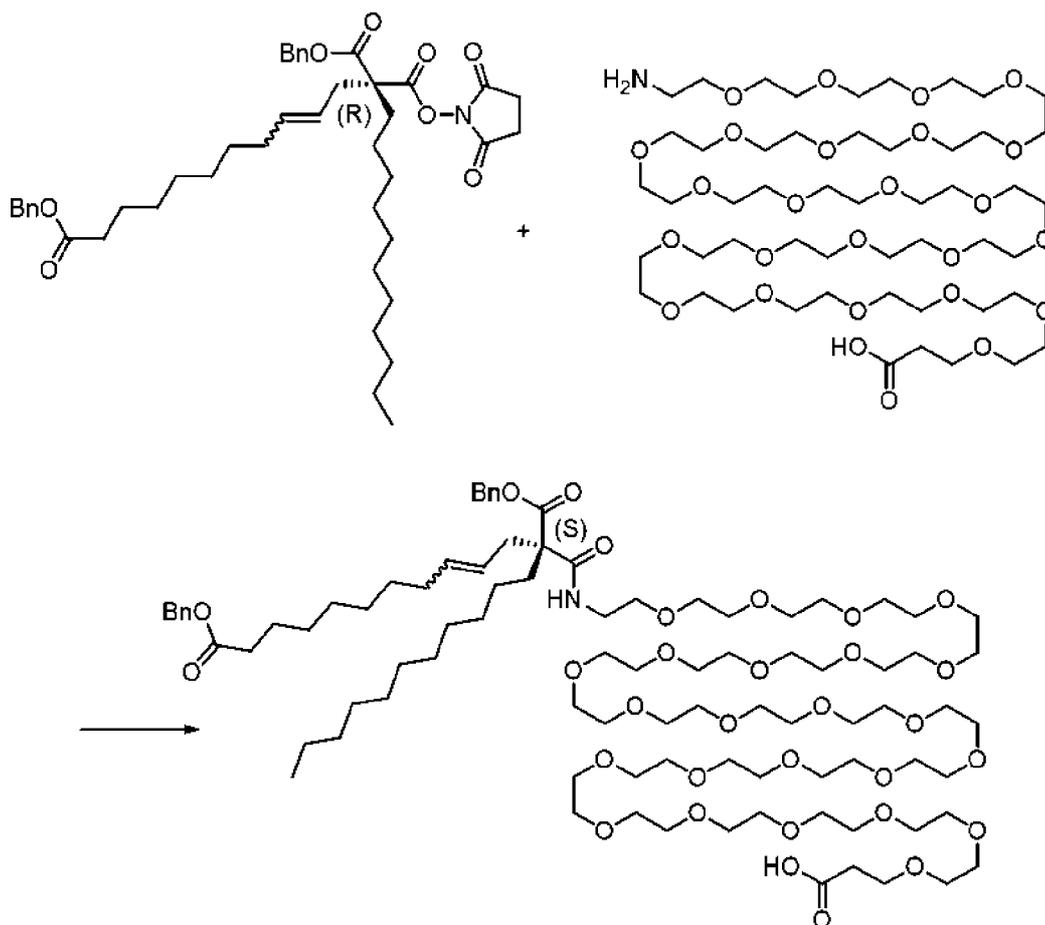
2,41 (m, 2H), 2,37-2,28 (m, 2H), 1,95-1,83 (m, 2H), 1,76-1,65 (m, 2H), 1,58-1,46 (m, 2H), 1,34-0,98 (m, 25H), 0,90-0,76 (m, 3H). LCMS Способ В: Rt=1,323 минуты, $[M+H]^+=622,3$.

Промежуточное соединение 12А. 1,11-Дибензил-11-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-(R)-докоз-8-ен-1,11,11-трикарбоксилат



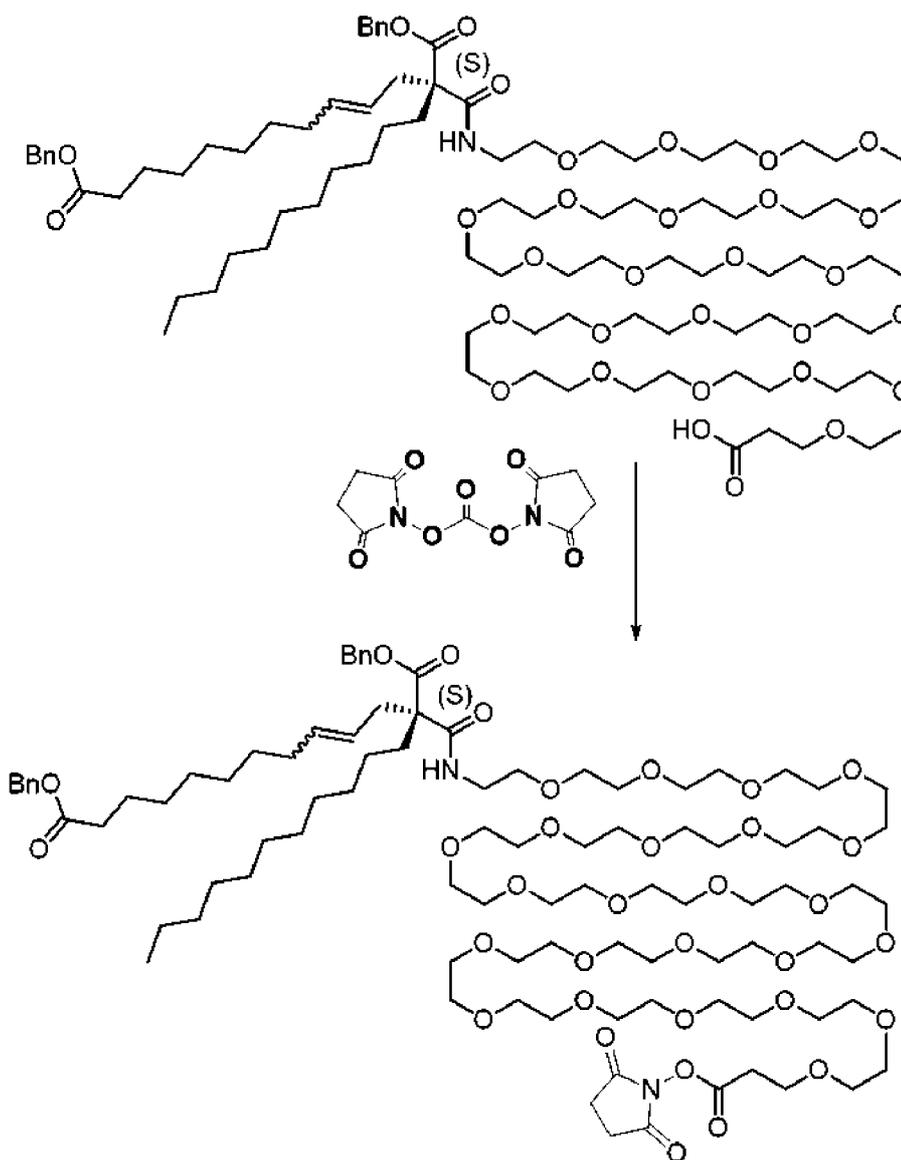
В раствор **промежуточного соединения 11А** (29,0 г, 46,7 ммоль, 1 экв.) в CH₂Cl₂ (260 мл) и THF (29 мл) добавляли NHS (5,64 г, 49,0 ммоль, 1,05 экв.) и DCC (11,5 г, 56,0 ммоль, 1,2 экв.) при 25°C и полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 5 ч. Затем реакционную смесь фильтровали и трижды промывали с помощью CH₂Cl₂ (30 мл). Органическую фазу концентрировали с получением неочищенного остатка. Неочищенный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO₂, элюирование смесью петролейный эфир/этилацетат=от 1/0 до 85/15) с получением **промежуточного соединения 12А** в виде светло-желтого масла. ¹H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ ppm 7,37-7,20 (m, 10H), 5,53-5,34 (m, 1H), 5,24-5,16 (m, 1H), 5,15-5,12 (m, 2H), 5,16-5,12 (m, 2H), 5,07-5,00 (m, 2H), 2,73 (br s, 4H), 2,66-2,53 (m, 2H), 2,34-2,16 (m, 2H), 1,97-1,77 (m, 4H), 1,70-1,47 (m, 3H), 1,37-0,99 (m, 26H), 0,88-0,65 (m, 3H). LCMS Способ В: Rt=1,348 минуты, $[M+H]^+=718,6$.

Промежуточное соединение 13А. (S)-14-((Бензилокси)карбонил)-3,15-диоксо-1-фенил-14-ундецил-2,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76,79,82,85,88-пентакозоакса-16-азагеннонаконт-11-ен-91-овая кислота



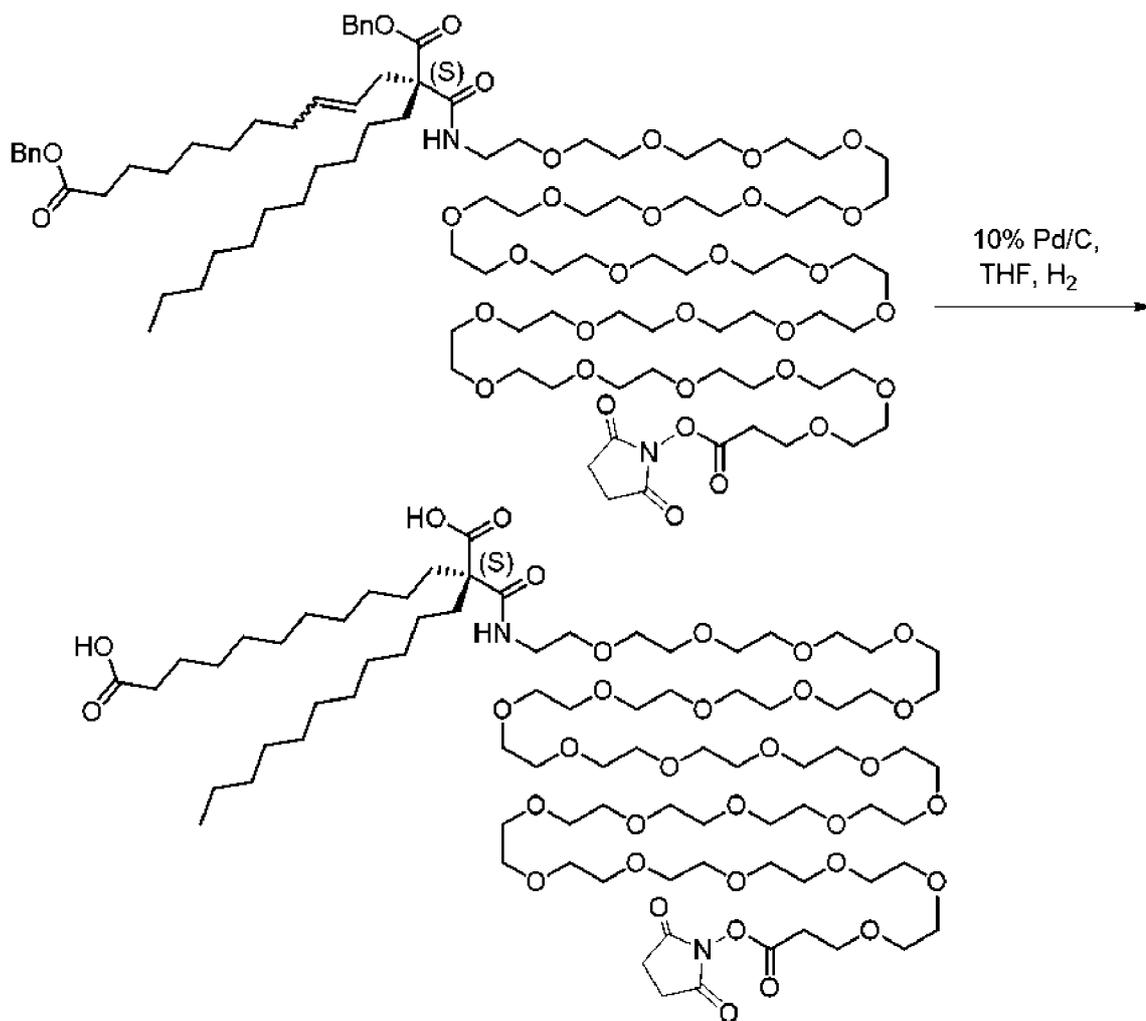
К **промежуточному соединению 12А** (545 мг, 0,759 ммоль) в DMF (3 мл) добавляли 1-амино-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтан-75-овую кислоту (амин-PEG24-кислота, 1131 мг, 0,987 ммоль) и DIPEA (0,199 мл, 1,139 ммоль). Через 16 ч. реакция завершалась. Летучие вещества удаляли и полученный осадок очищали непосредственно с помощью RPLC (150-г колонка ISCO C18 Gold, элюирование градиентом 10-100% смеси ACN:вода с 0,1% TFA). Фракции, содержащий продукт, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением **промежуточного соединения 13А** в виде густого масла. LCMS, способ H: Rt=2,93 мин., $[M+H]^+=1750,5$.

Промежуточное соединение 14А. 77,87-Дибензил-1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-(S)-76-оксо-77-ундецил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаокса-75-азагептаоктаконт-79-ен-1,77,87-трикарбоксилат



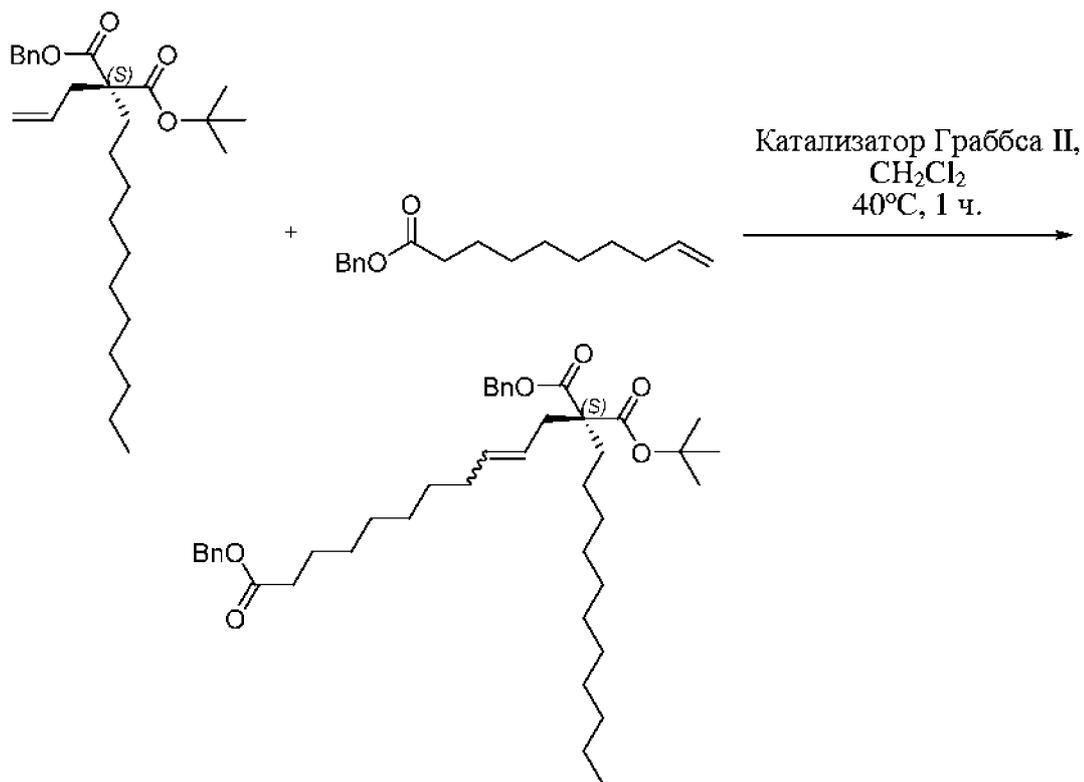
К **промежуточному соединению 13A** (183 мг, 0,105 ммоль), растворенному в 5 мл безводного DCM, добавляли DSC (32,2 мг, 0,126 ммоль) и DIPEA (0,027 мл, 0,157 ммоль) и полученную смесь перемешивали в течение 16 ч., после чего реакция завершалась. Неочищенную смесь непосредственно вносили на уравновешенную с помощью DCM 40-граммовую колонку ISCO Gold и очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-30% MeOH в DCM, диоксид кремния). Фракции, содержащий продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 14A** в виде густого прозрачного масла. LCMS, способ H: Rt=2,79 мин., [M+H]⁺=1847,5.

Промежуточное соединение 15A. (S)-2-((75-((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)-75-оксо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтил)карбамоил)-2-ундецилтриоктандикарбоновая кислота



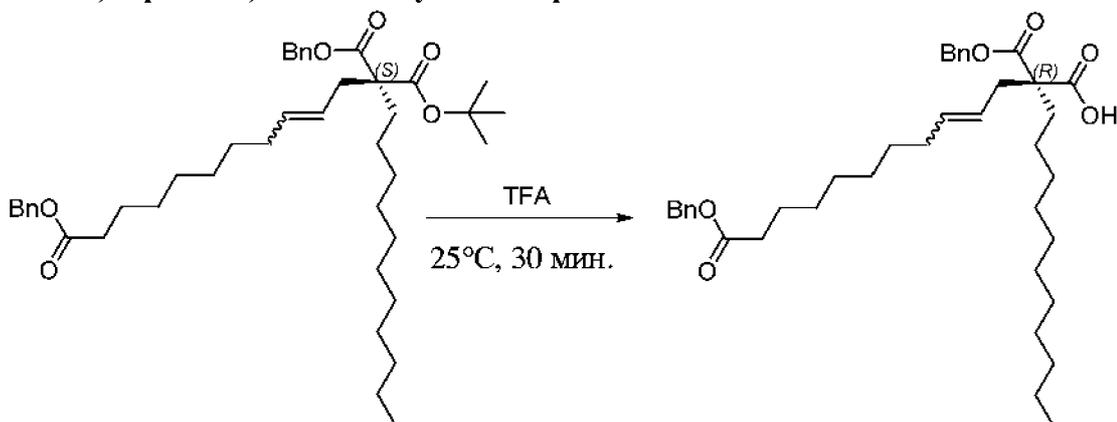
Промежуточное соединение 14A (165 мг, 0,089 ммоль) растворяли в 2 мл безводного THF, и газообразную среду три раза откачивали и заменяли азотом. В данную смесь добавляли 10% палладий на угле (9,51 мг, 8,94 мкмоль), и газообразную среду откачивали и заменяли водородом из баллона с магнитной мешалкой для перемешивания. Через 16 ч. реакция завершилась. После разбавления с помощью 5 мл безводного DCM реакционную смесь фильтровали через Celite[®]. Палладий на угле и слой дважды промывали с помощью 5 мл DCM, и все органические фазы объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 15A**. LCMS, способ F: Rt=3,29 мин., [M+H]⁺=1669,5.

Промежуточное соединение 10B. 1,11-Дибензил-11-(трет-бутил)-(S)-докоз-8-ен-1,11,11-трикарбоксилат



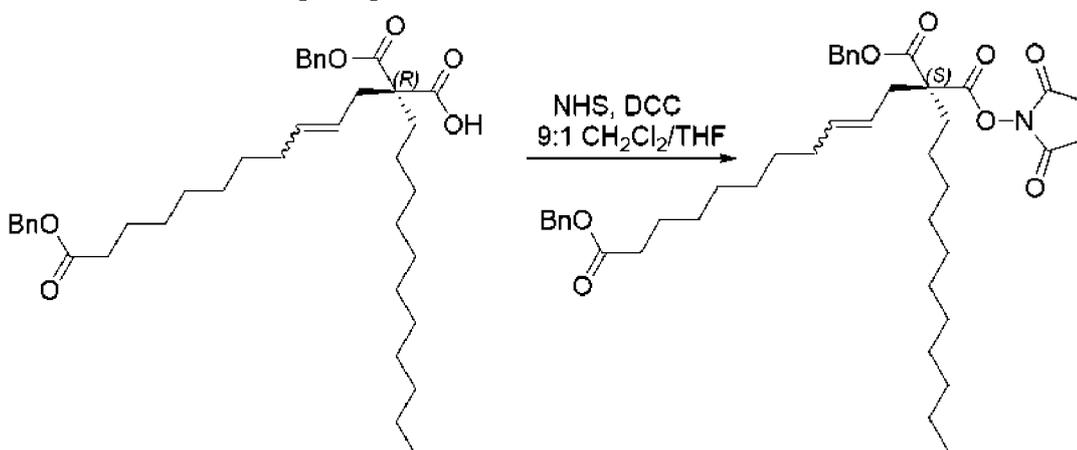
Промежуточное соединение 8В (36,0 г, 80,9 ммоль, 1 экв.) и **промежуточное соединение 3** (42,1 г, 161 ммоль, 2 экв.) растворяли в CH₂Cl₂ (720 мл), а затем добавляли катализатор Граббса II (3,30 г, 5,26 ммоль, 0,065 экв.). Полученную смесь перемешивали при 40°C в течение 1 ч., а затем концентрировали *in vacuo* с получением неочищенного остатка. Неочищенный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO₂, элюирование смесью петролейный эфир/этилацетат=от 1/0 до 0/1) с получением **промежуточного соединения 10В** в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ ppm 7,45-7,25 (m, 10H), 5,50-5,30 (m, 1H), 5,20-5,02 (m, 5H), 2,48-2,40 (m, 1H), 2,39-2,23 (m, 3H), 1,96-1,83 (m, 3H), 1,79-1,64 (m, 1H), 1,61-1,45 (m, 3H), 1,40-1,14 (m, 22H), 1,13-0,94 (m, 3H), 1,14-0,93 (m, 3H), 0,87-0,80 (m, 1H). LCMS Способ В: RT=1,448 минуты, [M-56+H]⁺=622,3.

Промежуточное соединение 11В. (R)-13-(Бензилокси)-2-((бензилокси)карбонил)-13-оксо-2-ундецилтридец-4-еновая кислота



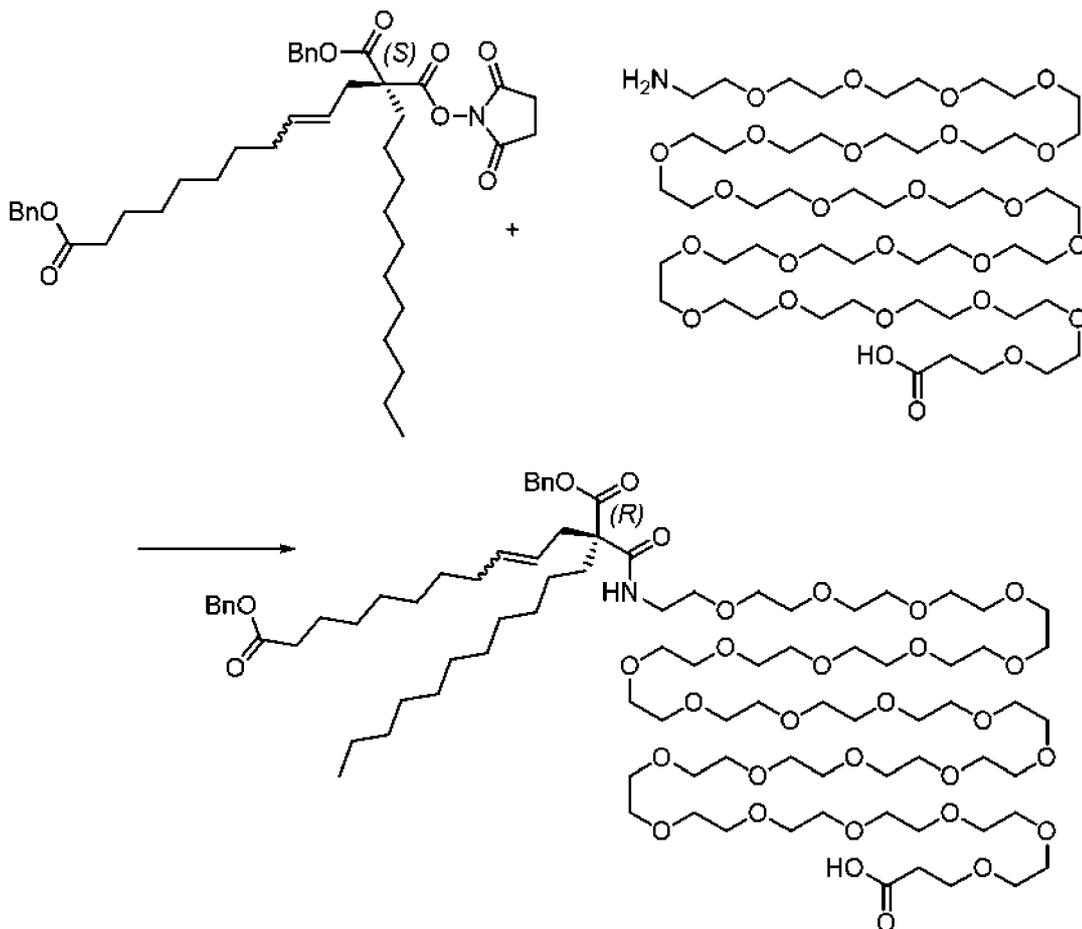
Промежуточное соединение 10В (62 г, 91,59 ммоль, 1 экв.) растворяли в TFA (620 мл) и полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 30 мин. Затем реакционную смесь концентрировали *in vacuo* с получением неочищенного остатка. Неочищенный остаток растворяли в этилацетате (800 мл), а затем промывали дважды с помощью нас. NaHCO₃ (200 мл) и солевого раствора (100 мл), высушивали с применением Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали с получением неочищенного остатка. Неочищенный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO₂, элюирование смесью петролейный эфир/этилацетат=от 1/0 до 0/1) с получением **промежуточного соединения 11В** в виде желтого масла. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 13,15-12,55 (m, 1H), 7,54-6,92 (m, 10H), 5,54-5,33 (m, 1H), 5,25-4,94 (m, 5H), 2,47 (br d, J=7,2 Гц, 1H), 2,33 (br t, J=7,3 Гц, 2H), 1,97-1,83 (m, 2H), 1,79-1,63 (m, 2H), 1,60-1,45 (m, 2H), 1,38-0,96 (m, 26H), 0,92-0,76 (m, 3H). LCMS Способ В: RT=1,323 минуты, MS (ESI) *масса/заряд* [M+H]⁺=621,6.

Промежуточное соединение 12В. 1,11-Дибензил-11-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-(S)-докоз-8-ен-1,11,11-трикарбоксилат



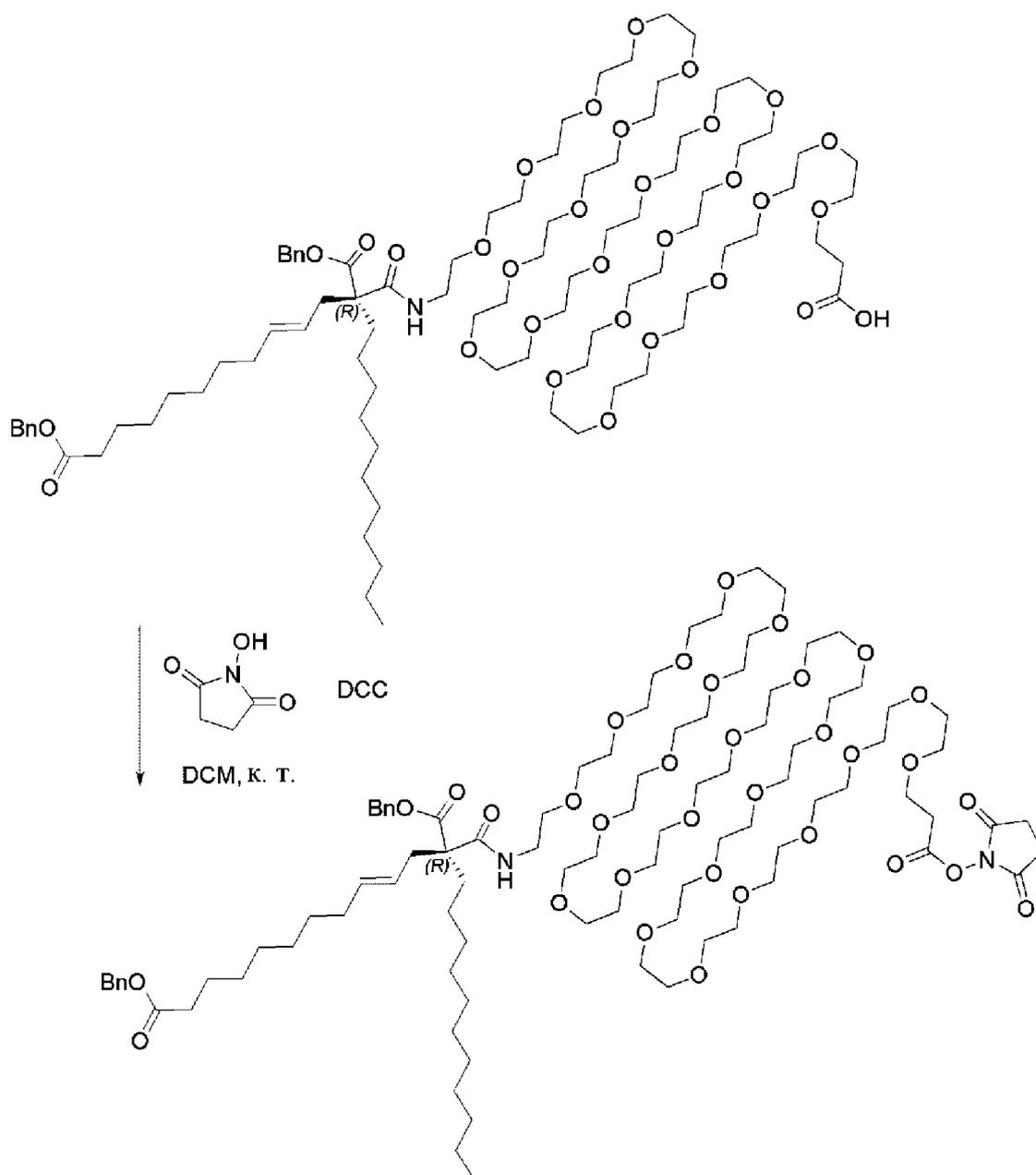
В раствор **промежуточного соединения 11В** (27 г, 43,4 ммоль, 1 экв.) в CH₂Cl₂ (243 мл) и THF (27 мл) добавляли NHS (5,26 г, 45,6 ммоль, 1,05 экв.) и DCC (10,7 г, 52,1 ммоль, 10,5 мл, 1,2 экв.) и полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 6 ч. Затем реакционную смесь фильтровали и трижды промывали с помощью CH₂Cl₂ (30 мл) с получением фильтрата, который затем концентрировали с получением неочищенного остатка. Неочищенный остаток очищали с помощью колоночной хроматографии (SiO₂, элюирование смесью петролейный эфир/этилацетат=от 1/0 до 85/15) с получением **промежуточного соединения 12В** в виде светло-желтого масла. ¹H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 13,15-12,55 (m, 1H), 7,54-6,92 (m, 10H), 5,54-5,33 (m, 1H), 5,25-4,94 (m, 5H), 2,47 (br d, J=7,2 Гц, 1H), 2,33 (br t, J=7,3 Гц, 2H), 1,97-1,83 (m, 2H), 1,79-1,63 (m, 2H), 1,60-1,45 (m, 2H), 1,38-0,96 (m, 26H), 0,92-0,76 (m, 3H). LCMS Способ В: Rt=1,348 минуты, [M+H]⁺=718,5.

Промежуточное соединение 13В. (R)-14-((Бензилокси)карбонил)-3,15-диоксо-1-фенил-14-ундецил-2,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76,79,82,85,88-пентакозаокса-16-азагеннонаконт-11-ен-91-овая кислота



Промежуточное соединение 12В (1,07 г, 1,49 ммоль) обрабатывали 1-амино-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтан-75-овой кислотой (Biopharm, 1,88 г, 1,64 ммоль), DIPEA (390 мкл, 2,236 ммоль) и DMAP (18 мг, 0,05 ммоль). Через 16 ч. реакция завершалась. Летучие вещества удаляли и полученный осадок очищали с помощью RPLC (150-г колонка ISCO C18 Gold, элюирование градиентом 10-100% смеси ACN:вода с 0,1% TFA). Фракции, содержащий продукт, объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением **промежуточного соединения 13В** в виде густого масла. LCMS, способ С: R_t=4,04 мин., [M+2H]²⁺=875,8.

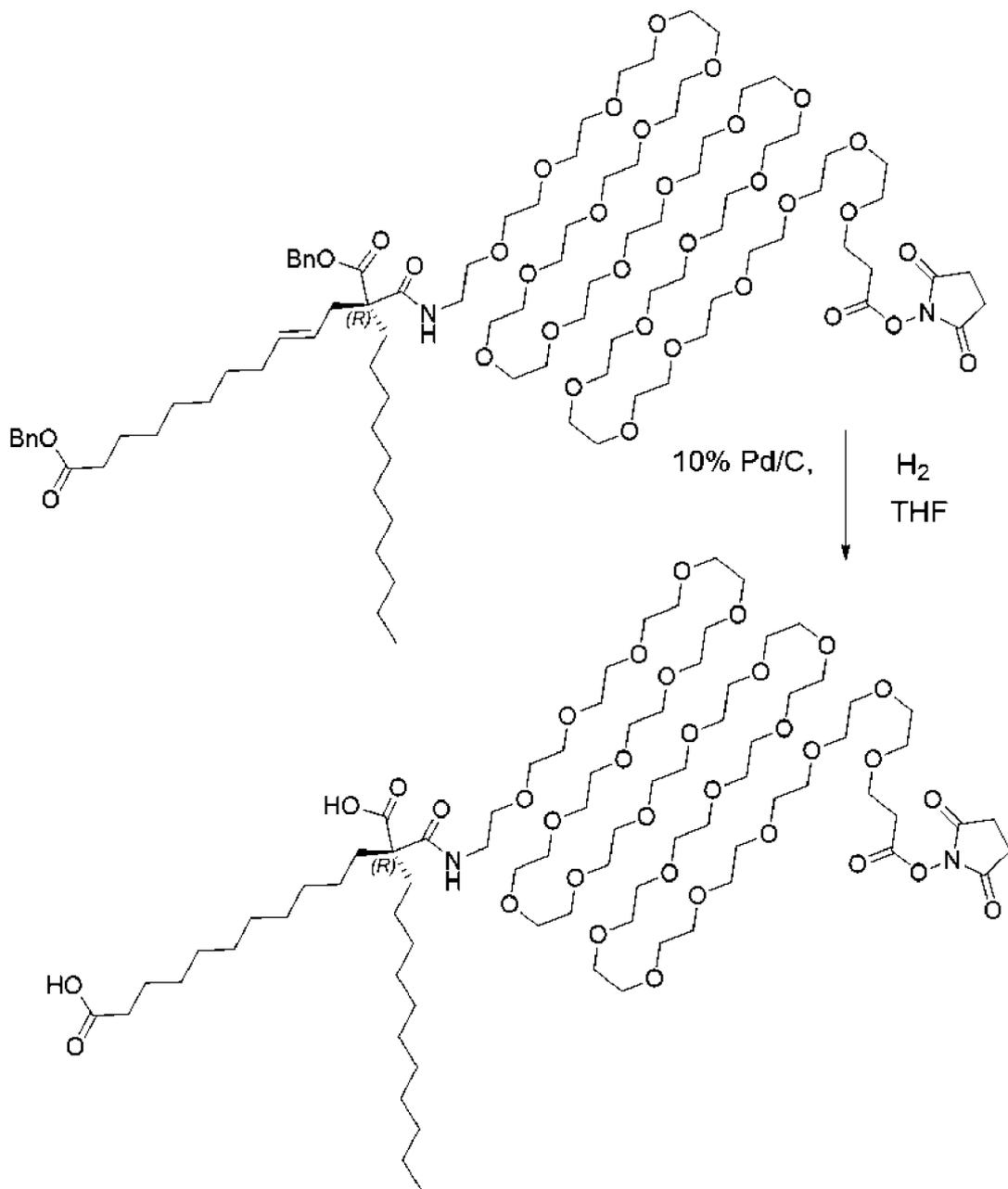
Промежуточное соединение 14В. 77,87-Дибензил-1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-(R)-76-оксо-77-ундецил-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаокса-75-азагептаоктаконт-79-ен-1,77,87-трикарбоксилат



Промежуточное соединение 13В (312 мг, 0,178 ммоль) растворяли в 1,8 мл безводного DCM наряду с 1-гидроксипирролидин-2,5-дионом (24,63 мг, 0,214 ммоль), а затем обрабатывали с помощью 1 М DCC в DCM (Aldrich, 196 мкл), что обуславливало немедленное осаждение побочного продукта, представлявшего собой дициклогексилмочевину. Через 16 ч. реакция завершалась, и затем реакционную смесь непосредственно вносили на уравновешенную с помощью DCM 40-граммовую колонку ISCO Gold и очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-30% MeOH в DCM, диоксид кремния). Фракции, содержащий продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 14В** в виде густого прозрачного масла. LCMS, способ F: $R_t=4,21$ мин., $[M+H+H_2O]^+=1864,4$.

Промежуточное соединение 15В. (R)-2-(((75-((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)-75-оксо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-

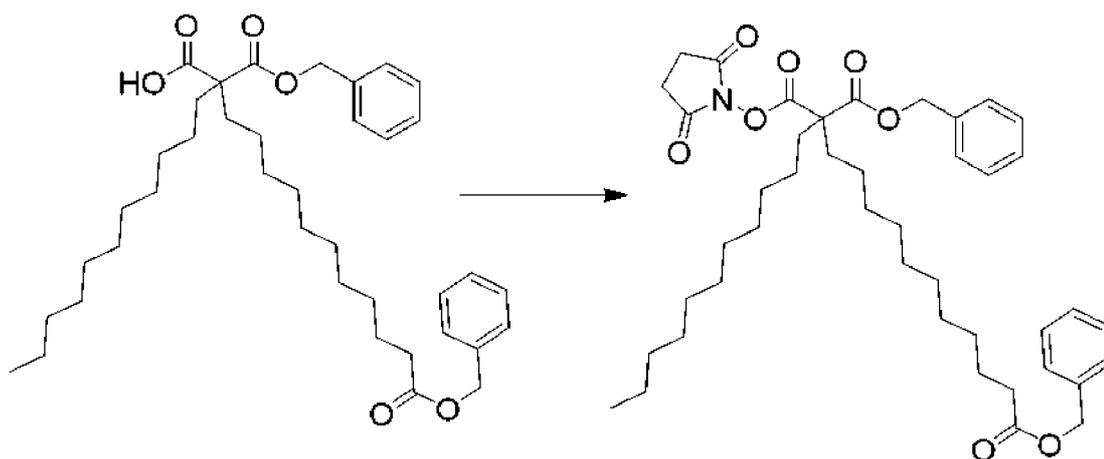
тетракозаоксапентагептаконтил)карбамоил)-2-ундецилтриоктандикарбоновая кислота



Промежуточное соединение 14В (172 мг, 0,093 ммоль) растворяли в 1,8 мл безводном THF, и газообразную среду три раза откачивали и заменяли азотом. В данную смесь добавляли 10% палладий на угле (10 мг, 9,4 мкмоль), и газообразную среду откачивали и заменяли водородом из баллона с магнитной мешалкой для перемешивания. Через 16 ч. реакция завершилась. После разбавления с помощью 5 мл безводного DCM реакционную смесь фильтровали через Celite[®]. Палладий на угле и осадок на целите дважды промывали с помощью 5 мл DCM и фильтровали. Все органические фазы объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 15В**. LCMS, способ F: Rt=3,31 мин., [M+H]⁺=1669,0.

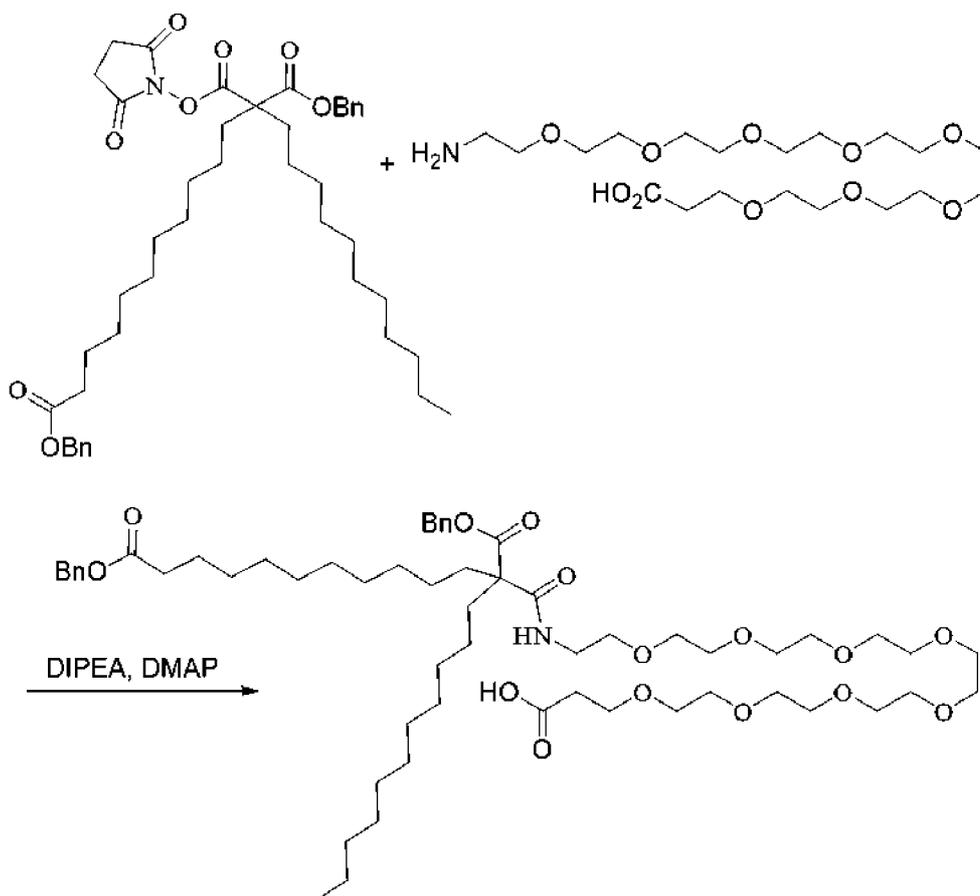
Промежуточное соединение 16.
диоксоциклопентил)докозан-1,11,11-трикарбоксилат

1,11-Дибензил-11-(2,5-



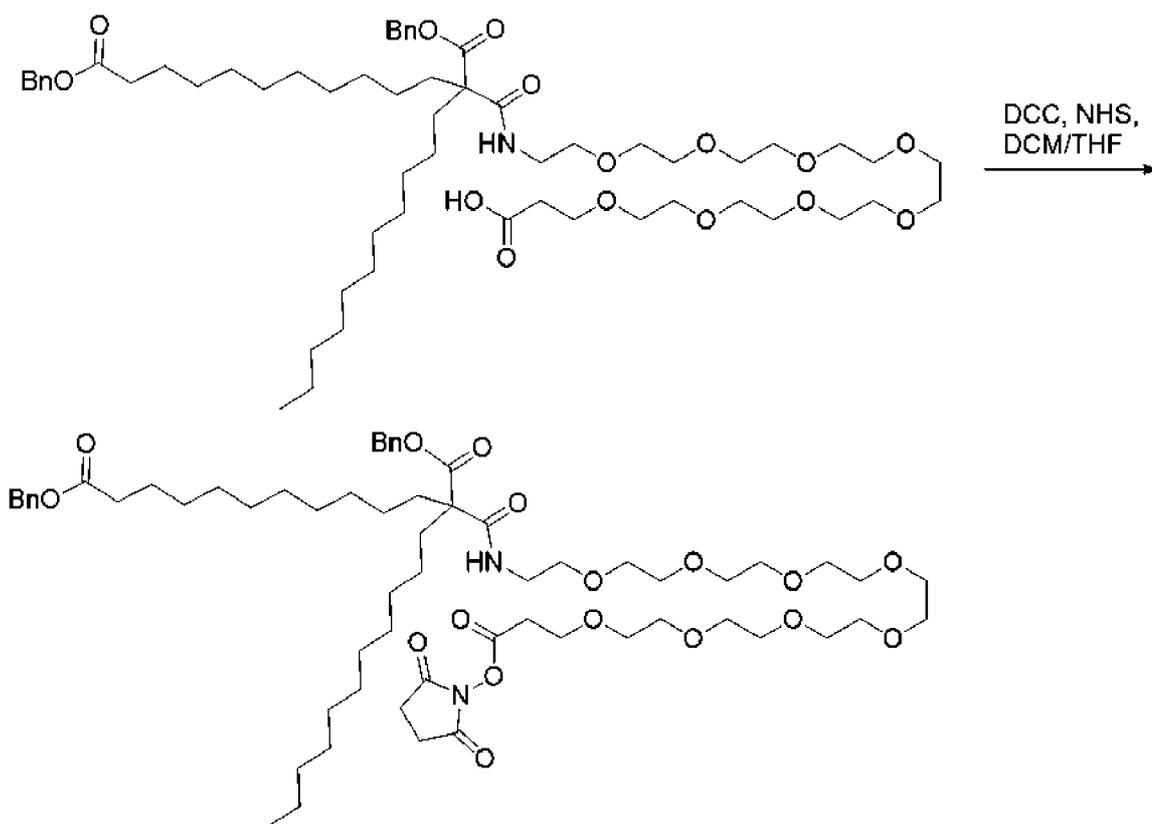
В 3-горлую круглодонную колбу объемом 1000 мл (оснащенную якорем механической мешалки и впускным отверстием для азота) добавляли **промежуточное соединение 3** (37,7 г, 60,5 ммоль), DCM (360 мл, соотношение: 9,0), и THF (40 мл, соотношение: 1,0), затем N-гидроксисукцинимид (7,31 г, 63,6 ммоль) и DCC (14,99 г, 72,6 ммоль). Через пять мин. после добавления полученная смесь превратилась в белую суспензию. Реакционную смесь перемешивали в общем в течение 6 ч. при к. т., а затем фильтровали через слой Celite[®]. Слой тщательно промывали с помощью DCM (2 объема слоя). Объединенные органические фазы концентрировали *in vacuo* и неочищенный остаток высушивали под высоким вакуумом. Неочищенный продукт выделяли в виде белого масла. К неочищенному продукту добавляли DCM (~400 мл) и силикагель (75 г). Полученную суспензию концентрировали *in vacuo* и остаток высушивали под высоким вакуумом в течение 3 ч. Партию очищали посредством колоночной хроматографии (750 г силикагеля SiO₂, элюирование, начиная со смеси 2% этилацетат/гептан до смеси 35% этилацетат/гептан). Продукт, содержащий фракции, объединяли, концентрировали *in vacuo* и высушивали в течение ночи под высоким вакуумом с получением **промежуточного соединения 16** в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ ppm 0,86-0,93 (m, 3 H) 1,12-1,21 (m, 2 H) 1,21-1,37 (m, 30 H) 1,66 (quin, J=7,40 Гц, 2 H) 1,89-2,07 (m, 4 H) 2,37 (t, J=7,58 Гц, 2 H) 2,84 (br. s., 4 H) 5,13 (s, 2 H) 5,25 (s, 2 H) 7,30-7,47 (m, 10 H).

Промежуточное соединение 17. 14-((Бензилокси)карбонил)-3,15-диоксо-1-фенил-14-ундецил-2,19,22,25,28,31,34,37,40-нонаокса-16-азатриветраконтан-43-овая кислота



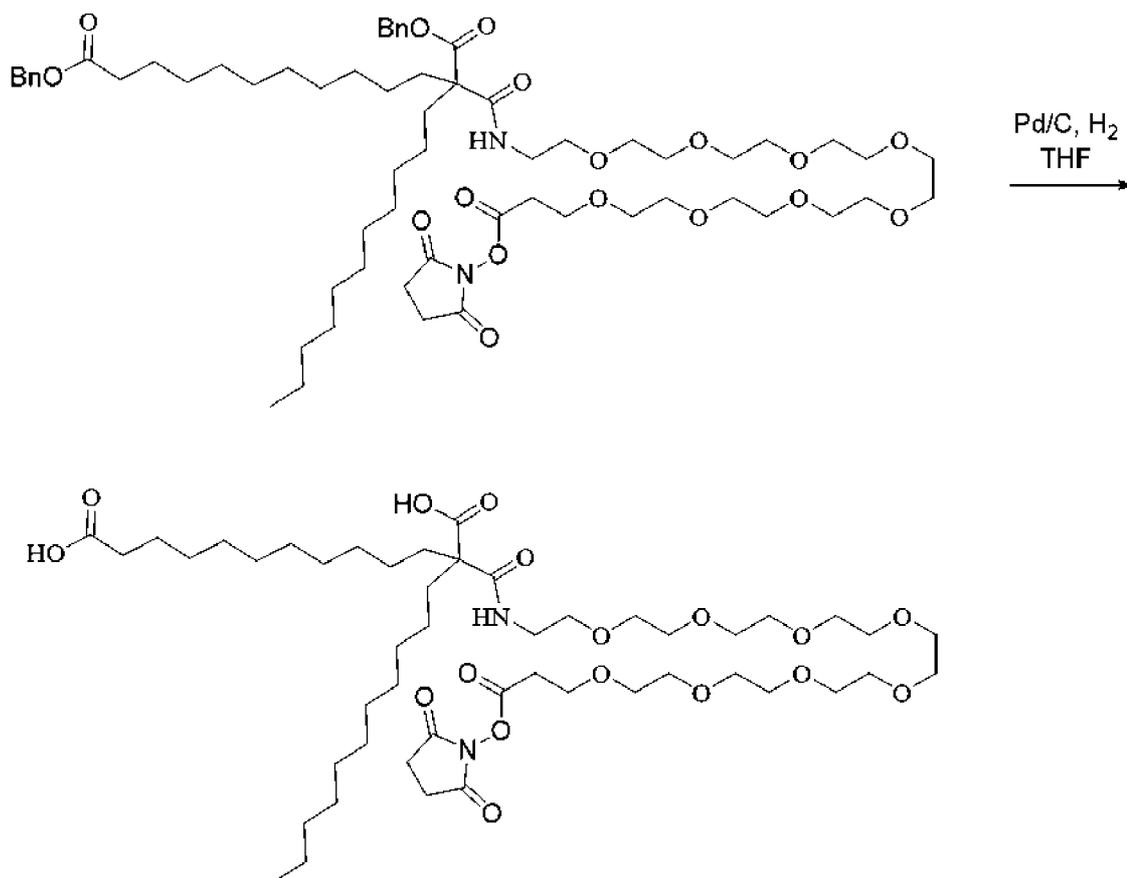
В круглодонную колбу объемом 250 мл (оснащенную якорем магнитной мешалки и впускным отверстием для азота) добавляли **промежуточное соединение 16** (7,0 г, 9,72 ммоль) и DCM (70 мл), затем 1-амино-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагептакозан-27-овую кислоту (амино-PEG8-кислота) (4,51 г, 10,21 ммоль), DIPEA (4,25 мл, 24,31 ммоль) и DMAP (0,119 г, 0,972 ммоль). Полученный светло-желтый однородный раствор перемешивали в течение ночи при температуре окружающей среды. Затем реакционную смесь концентрировали *in vacuo* с получением светло-желтого маслянистого остатка. Затем данный остаток разбавляли этилацетатом (150 мл) и раствор переносили в делительную воронку объемом 500 мл. Затем раствор промывали солевым раствором (500 мл). Полученную водную фазу снова экстрагировали этилацетатом (150 мл; затем 100 мл). Объединенные органические фазы высушивали (с помощью сульфата натрия), фильтровали через Celite[®] и концентрировали *in vacuo*. Неочищенный продукт очищали посредством колоночной хроматографии (330 г силикагеля SiO₂, элюирование, начиная с DCM до смеси 10% метанол/DCM). Фракции, содержавшие преобладающий продукт, объединяли и концентрировали *in vacuo*. Остаток высушивали в течение ночи под высоким вакуумом с получением **промежуточного соединения 17**. LCMS, способ E: Rt=1,43 мин., [M+H]⁺=1047,0.

Промежуточное соединение 18. 29,39-Дибензил-1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-28-оксо-29-ундецил-3,6,9,12,15,18,21,24-октаокса-27-азанонатриаконтан-1,29,39-трикарбоксилат



В круглодонную колбу объемом 50 мл, содержащую **промежуточное соединение 17** (5,51 г, 5,27 ммоль), добавляли DCM (27,5 мл, соотношение: 1,0) и THF (27,5 мл, соотношение: 1,0), затем DCC (1,412 г, 6,85 ммоль) и N-гидрохисукцинимид (0,697 г, 6,06 ммоль). После перемешивания в течение примерно 10 мин. полученная смесь превращалась в густую белую суспензию. Затем реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч. 45 мин. при температуре окружающей среды и концентрировали *in vacuo* с получением белой пасты. В смесь добавляли DCM (35 мл) и полученную белую суспензию перемешивали в течение 10 мин. Затем смесь фильтровали через слой Celite[®] и слой промывали холодным DCM (один объем слоя). Объединенные фильтраты концентрировали *in vacuo*. Остаток высушивали в течение ночи под высоким вакуумом с получением **промежуточного соединения 18** в виде бесцветного масла. LCMS, способ E: $R_t=1,45$ мин., $[M+H]^+=1044,0$.

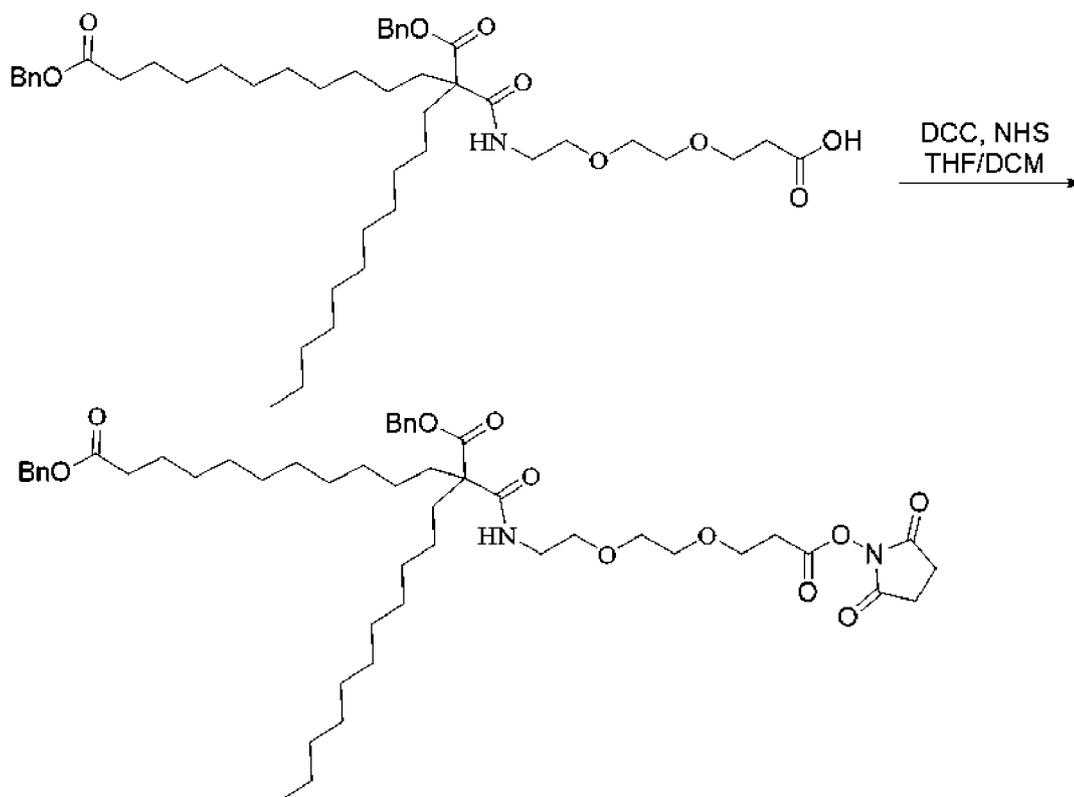
Промежуточное соединение 19. 2-((27-((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)-27-оксо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагептакозил)карбамоил)-2-ундецилтриоктандикарбоновая кислота



В круглодонную колбу объемом 250 мл (оснащенную якорем магнитной мешалки) добавляли **промежуточное соединение 18** (6,0 г, 5,25 ммоль) и THF (70 мл). В данный раствор добавляли 10% Pd/C (0,603 г, 0,567 ммоль) и реакционный сосуд продували азотом, затем водородом. Затем полученную смесь подвергали действию водорода (давление из баллона) в течение 3 ч. Реакционный сосуд продували азотом и суспензию фильтровали через слой Celite[®]. Слой тщательно промывали с помощью THF и объединенные фильтраты концентрировали *in vacuo*. Затем полученный осадок высушивали в течение ночи под высоким вакуумом с получением **промежуточного соединения 19** в виде бесцветного масла. LCMS, способ E: Rt=0,91 мин., [M+H]⁺=963,8.

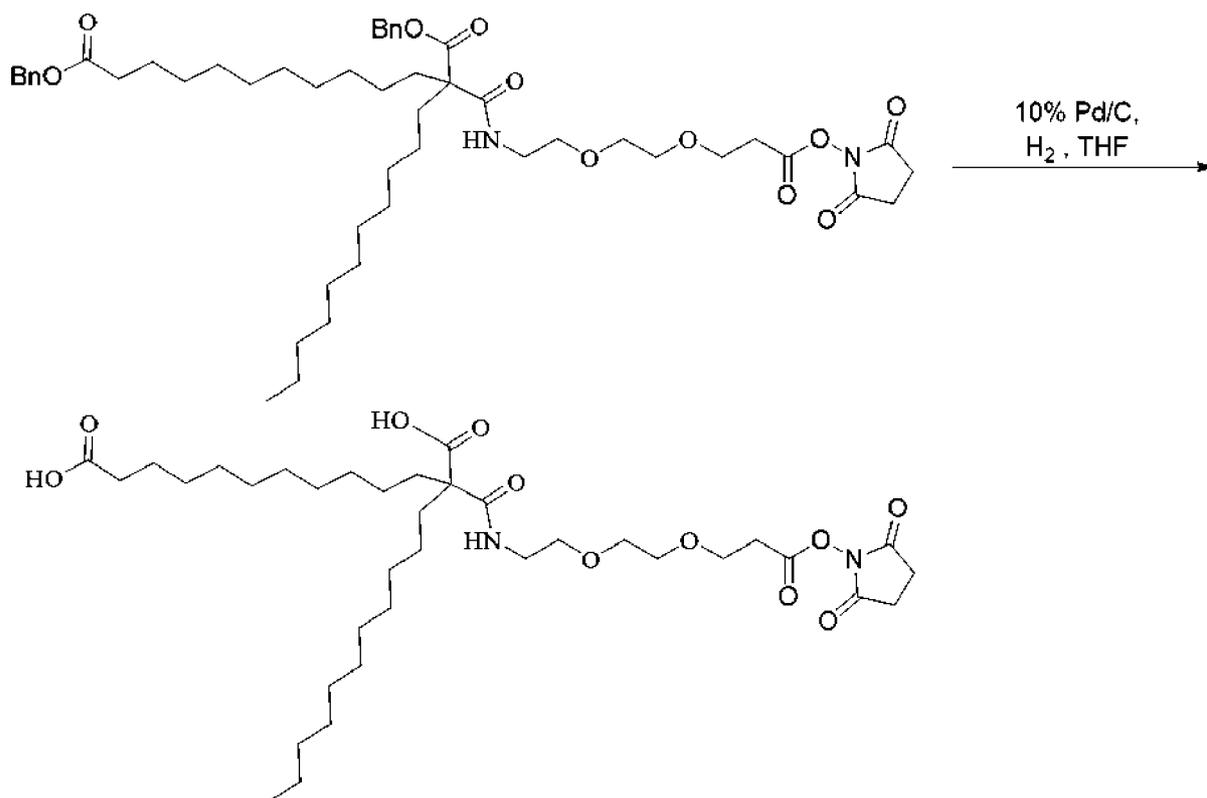
Промежуточное соединение 20. 14-((Бензилокси)карбонил)-3,15-диоксо-1-фенил-14-ундецил-2,19,22-триокса-16-азапентакозан-25-овая кислота

Промежуточное соединение 21. Дибензил-2-((2-(2-(3-((2,5-диоксопирролидин-1-ил)окси)-3-оксопропокси)этокси)этил)карбамоил)-2-ундецилтриоктандикарбоновая кислота



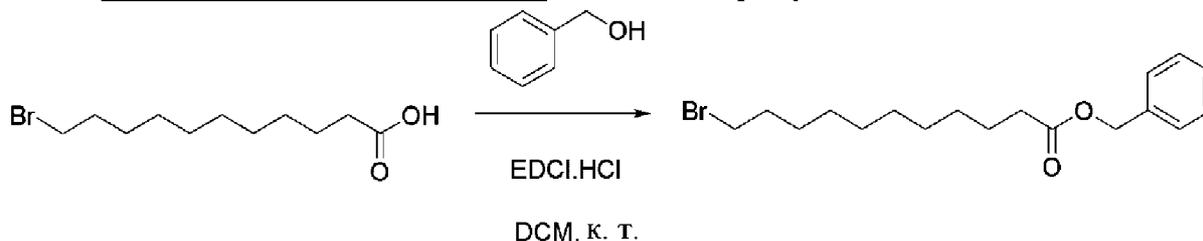
В круглодонную колбу объемом 500 мл (оснащенную якорем магнитной мешалки и впускным отверстием для азота) добавляли **промежуточное соединение 20** (3,7 г, 4,73 ммоль), DCM (19 мл, соотношение: 1,0) и THF (19 мл, соотношение: 1,0), затем N-гидрохисукцинимид (0,626 г, 5,44 ммоль) и DCC (1,269 г, 6,15 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 3 ч. при температуре окружающей среды, во время чего она превращалась в белую суспензию. Затем суспензию фильтровали через Celite[®] и слой промывали с помощью DCM. Объединенные фильтраты концентрировали *in vacuo*. Затем полученный осадок суспендировали в DCM (20 мл) и смесь перемешивали в течение 10 мин. при температуре окружающей среды, а затем фильтровали через слой Celite[®]. Слой промывали холодным DCM. Объединенные фильтраты концентрировали *in vacuo*. Остаток высушивали в течение ночи под высоким вакуумом с получением **промежуточного соединения 21** в виде светло-желтого масла. LCMS, способ E: Rt=1,47 мин., [M+H]⁺=879,7.

Промежуточное соединение 22. 2-((2-(2-(3-((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)-3-оксопропокси)этокси)этил)карбамоил)-2-ундецилтриоктандикарбоновая кислота



В круглодонную колбу объемом 100 мл, содержащую **промежуточное соединение 21** (4,16 г, 4,73 ммоль), добавляли THF (40 мл). В данный раствор добавляли 10% Pd/C (0,42 г, 3,93 ммоль) и сосуд продували азотом. Затем реакционный сосуд продували водородом и подвергали действию давления водорода (баллон). Полученную черную суспензию перемешивали в течение 4 ч., а затем фильтровали через слой Celite[®]. Слой промывали с помощью THF. Объединенные фильтраты концентрировали *in vacuo*, а затем высушивали под высоким вакуумом с получением **промежуточного соединения 22** в виде бесцветного масла. LCMS, способ G: Rt=1,72 мин., [M+H]⁺=699,4.

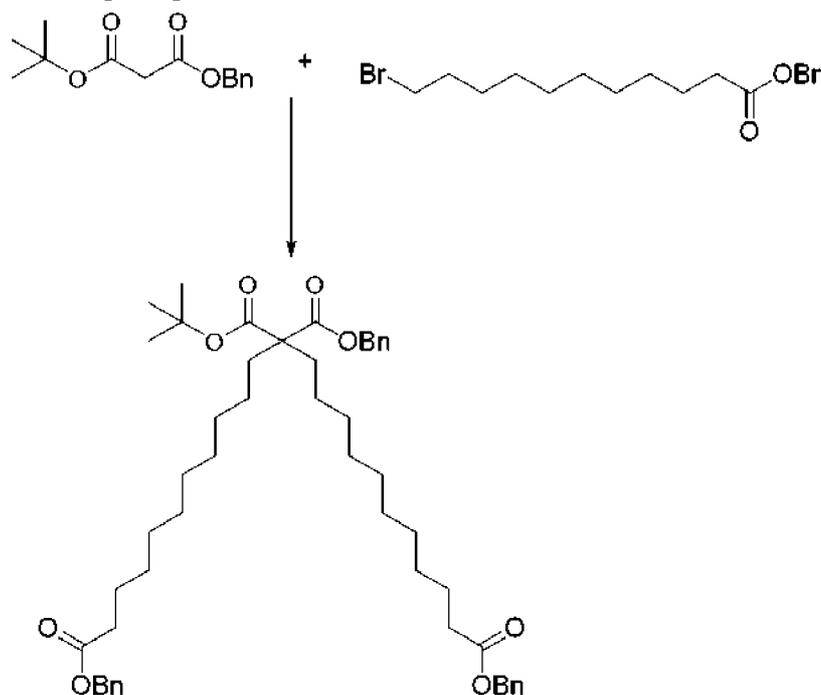
Промежуточное соединение 23. Бензил-11-бромундеканат



В круглую 3-горлую круглодонную колбу объемом 2 л (оснащенную якорем механической мешалки, температурным зондом и впускным отверстием для азота) добавляли 11-бромундекановую кислоту (50 г, 189 ммоль) и 500 мл дихлорметана. Затем в полученный оранжевый однородный раствор добавляли бензиловый спирт (23,53 мл, 226 ммоль), EDCI.HCl (54,2 г, 283 ммоль) и DMAP (1,152 г, 9,43 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Анализ с помощью TLC (30% этилацетата в гептане) указывал на израсходование 11-бромундекановой кислоты. Реакционную смесь переносили в круглодонную колбу объемом 2 л и концентрировали *in vacuo*. Полученный

осадок разбавляли с помощью 1 л воды и 800 мл МТВЕ. Фазы разделяли и водную фазу дважды экстрагировали с помощью 600 мл МТВЕ. Объединенные органические фазы промывали с помощью 750 мл солевого раствора, высушивали с помощью сульфата натрия, фильтровали через Celite® и концентрировали *in vacuo*. Материал высушивали под высоким вакуумом в течение 2 ч. с получением светло-желтого масла. Неочищенный продукт растворяли в 500 мл DСМ и добавляли 100 г силикагеля. Смесь концентрировали *in vacuo*, а затем высушивали в течение ночи под высоким вакуумом. Остаток очищали посредством хроматографии (колонка с 750 г диоксида кремния, элюирование градиентом от смеси 1% EtOAc/гептан до смеси 20% EtOAc/гептан). Фракции, содержавшие бензил-11-бромундеканат, объединяли и концентрировали *in vacuo*. Остаток высушивали под высоким вакуумом в течение 5 ч. с получением **промежуточного соединения 23** в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 7,58-7,31 (m, 5H), 5,14 (s, 2H), 3,43 (t, J=6,9 Гц, 2H), 2,38 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,87 (p, J=7,0 Гц, 2H), 1,73-1,61 (m, 2H), 1,49-1,40 (m, 2H), 1,37-1,26 (m, 10H).

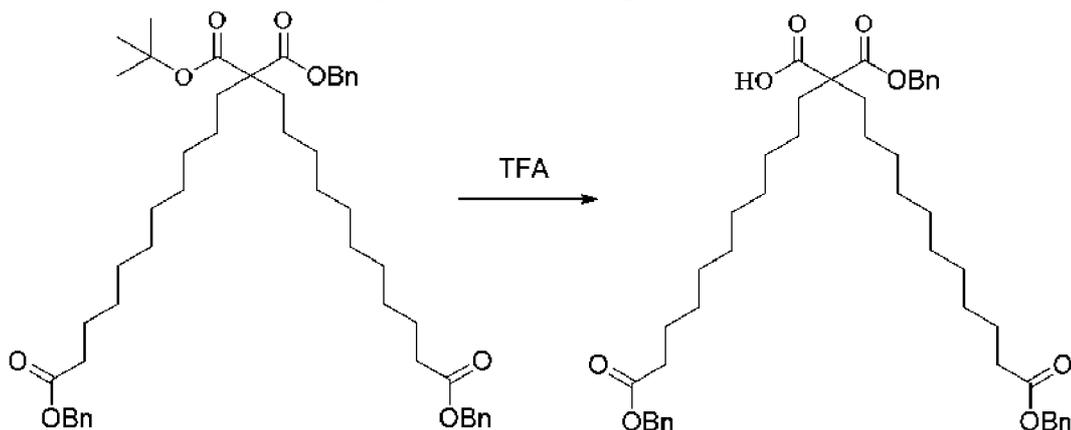
Промежуточное соединение 24. 1,11,21-Трибензил-11-трет-бутил-генэйкозан-1,11,11,21-тетракарбоксилат



В 3-горлую круглодонную колбу объемом 250 мл, оснащенную якорем механической мешалки, температурным зондом и впускным отверстием для азота, добавляли бензил-трет-бутилмалонат (6 г, 23,97 ммоль) и 30 мл DMF, затем смесь **промежуточного соединения 23** (18,74 г, 52,7 ммоль) и 60 мл DMF. В данный бесцветный раствор добавляли карбонат цезия (31,2 г, 96 ммоль) и полученную суспензию перемешивали при температуре окружающей среды. После перемешивания в течение 5,5 ч. при температуре окружающей среды LCMS указывала на то, что бензил-трет-бутилмалонат не присутствовал. Реакционная смесь представляла собой смесь моно- и диалкилированных продуктов. Следовательно, обеспечивали перемешивание смеси в

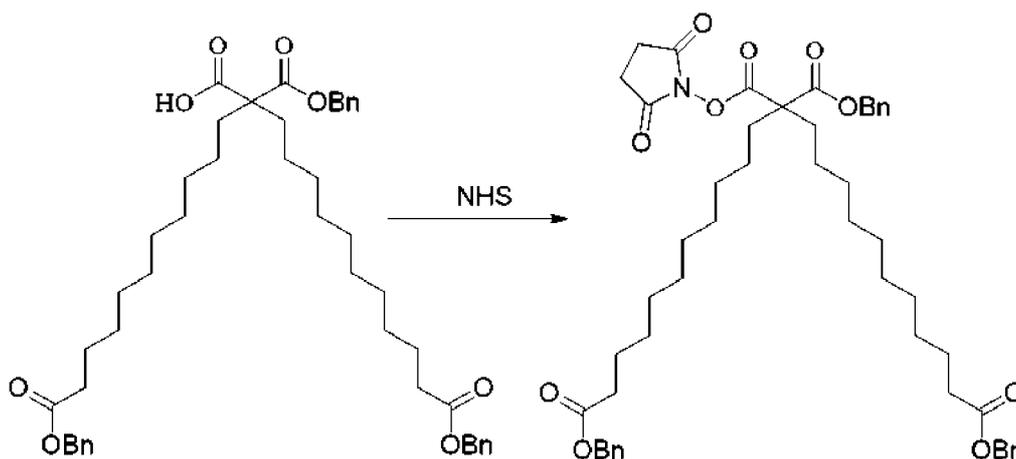
течение 22 ч., но LCMS указывала, что промежуточное соединение моноалкилирования все еще присутствовало. Затем реакционную смесь нагревали до 40°C и перемешивали в течение 3 ч. LCMS все еще указывала на минимальный прогресс. Смесь охлаждали до 0-5°C и тонкой струей добавляли 200 мл деионизированной (DI) воды. Затем смесь нагревали до температуры окружающей среды и переносили в делительную воронку объемом 500 мл. Водную фазу дважды экстрагировали с помощью 200 мл МТБЕ. Объединенные органические фазы промывали с помощью 200 мл солевого раствора, высушивали с помощью сульфата натрия, фильтровали через Celite® и концентрировали *in vacuo*. Остаток высушивали под высоким вакуумом в течение 2 ч. с получением неочищенного бесцветного продукта, который очищали посредством NPLC (колонка ISCO с 330 г диоксида кремния, элюирование градиентом от смеси 0,5% этилацетат/гептан до смеси 30% этилацетат/гептан). Фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали *in vacuo*. Остаток высушивали в течение ночи под высоким вакуумом с получением **промежуточного соединения 24** в виде бесцветного масла. LCMS, способ E: Rt=1,75 мин., [M+H+H₂O]⁺=821,3.

Промежуточное соединение 25. 13-(Бензилокси)-2-(11-(бензилокси)-11-оксоундецил)-2-((бензилокси)карбонил)-13-оксотридекановая кислота



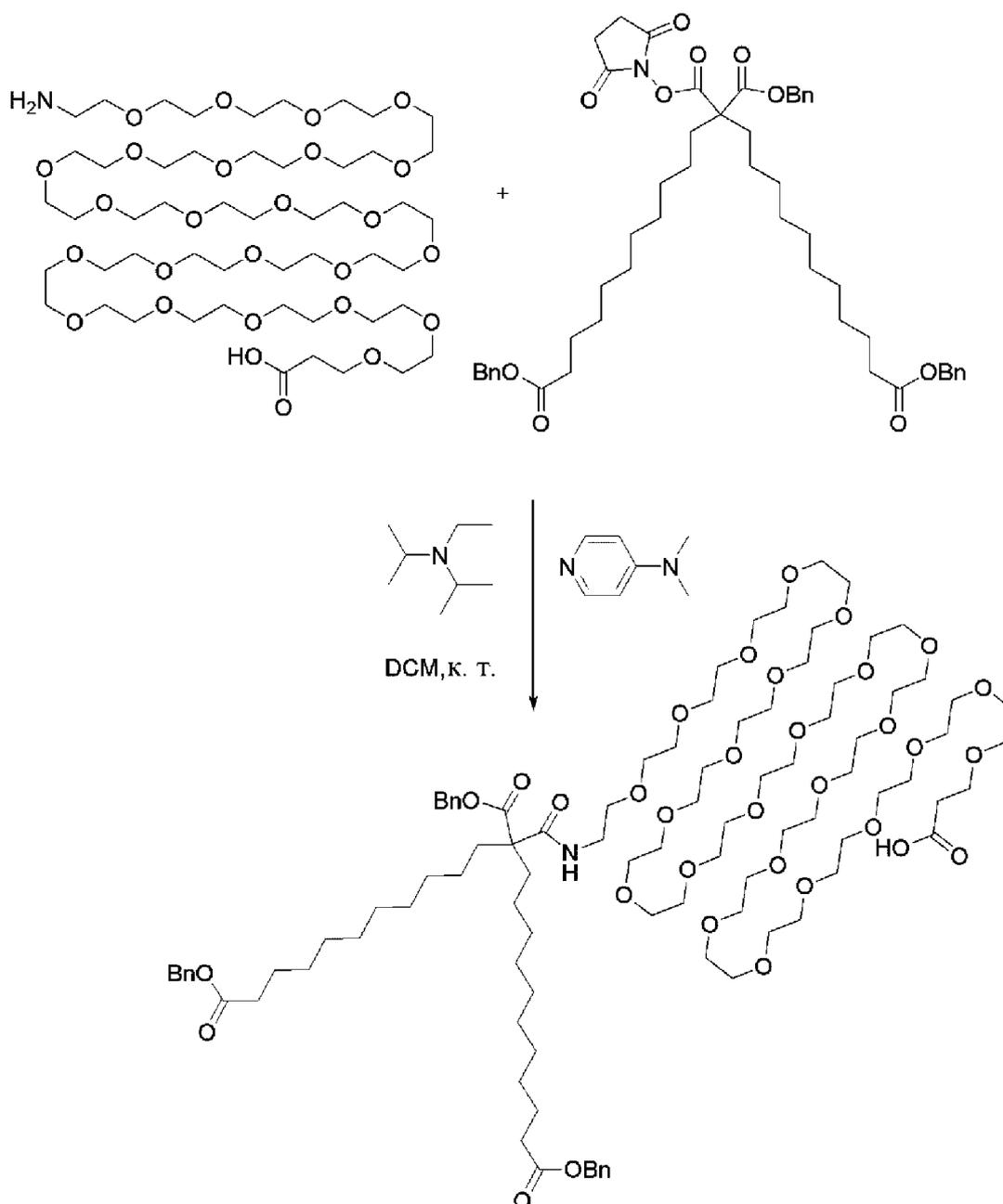
В круглодонную колбу объемом 1 л, оснащенную якорем магнитной мешалки и впускным отверстием для азота, добавляли **промежуточное соединение 24** (17,78 г, 22,25 ммоль) и 180 мл TFA и полученную смесь перемешивали в течение 45 мин. Как только анализ с помощью LCMS указывал, что не оставалось исходного материала, смесь концентрировали *in vacuo* с получением светло-желтого масла. Полученное масло разбавляли с помощью 250 мл толуола, а затем концентрировали *in vacuo* с удалением всего оставшегося TFA. Эту последнюю стадию повторяли еще раз. Остаток высушивали под высоким вакуумом в течение выходных дней с получением **промежуточного соединения 25** в виде светло-желтого масла, которое применяли как таковое на следующей стадии. LCMS, способ E: Rt=1,55 мин., [M+H+H₂O]⁺=760,4.

Промежуточное соединение 26. 1,11,21-Трибензил-11-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)генэйкозан-1,11,11,21-тетракарбоксилат



В круглодонную колбу объемом 500 мл, содержащую **промежуточное соединение 25** (16,53 г, 22,25 ммоль), добавляли 180 мл DCM и 20 мл THF, затем N-гидроксисукцинимид (2,69 г, 23,36 ммоль) и DCC (5,51 г, 26,7 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение ночи, после чего LCMS указывала на полное преобразование в требуемый продукт. Полученную белую суспензию фильтровали через слой Celite® и слой промывали двумя объемами слоя DCM. Объединенные фильтраты концентрировали *in vacuo* с получением бесцветного масла, и полученное масло высушивали под высоким вакуумом в течение 1 ч. с получением 21,3 г неочищенного продукта. Неочищенный продукт растворяли в 250 мл DCM и добавляли 32 г силикагеля. Смесь концентрировали *in vacuo*, а затем высушивали под высоким вакуумом в течение 2 ч. Остаток очищали посредством NPLC с сухим вводом в картридж (колонка с 330 г силикагеля, элюирование градиентом от смеси 5% этилацетат/гептан до смеси 40% этилацетат/гептан). Фракции, содержавшие продукт, объединяли, концентрировали *in vacuo* и высушивали в течение ночи под высоким вакуумом с получением **промежуточного соединения 26** в виде бесцветного масла. LCMS, способ E: Rt=1,58 мин., $[M+H+H_2O]^+=857,4$.

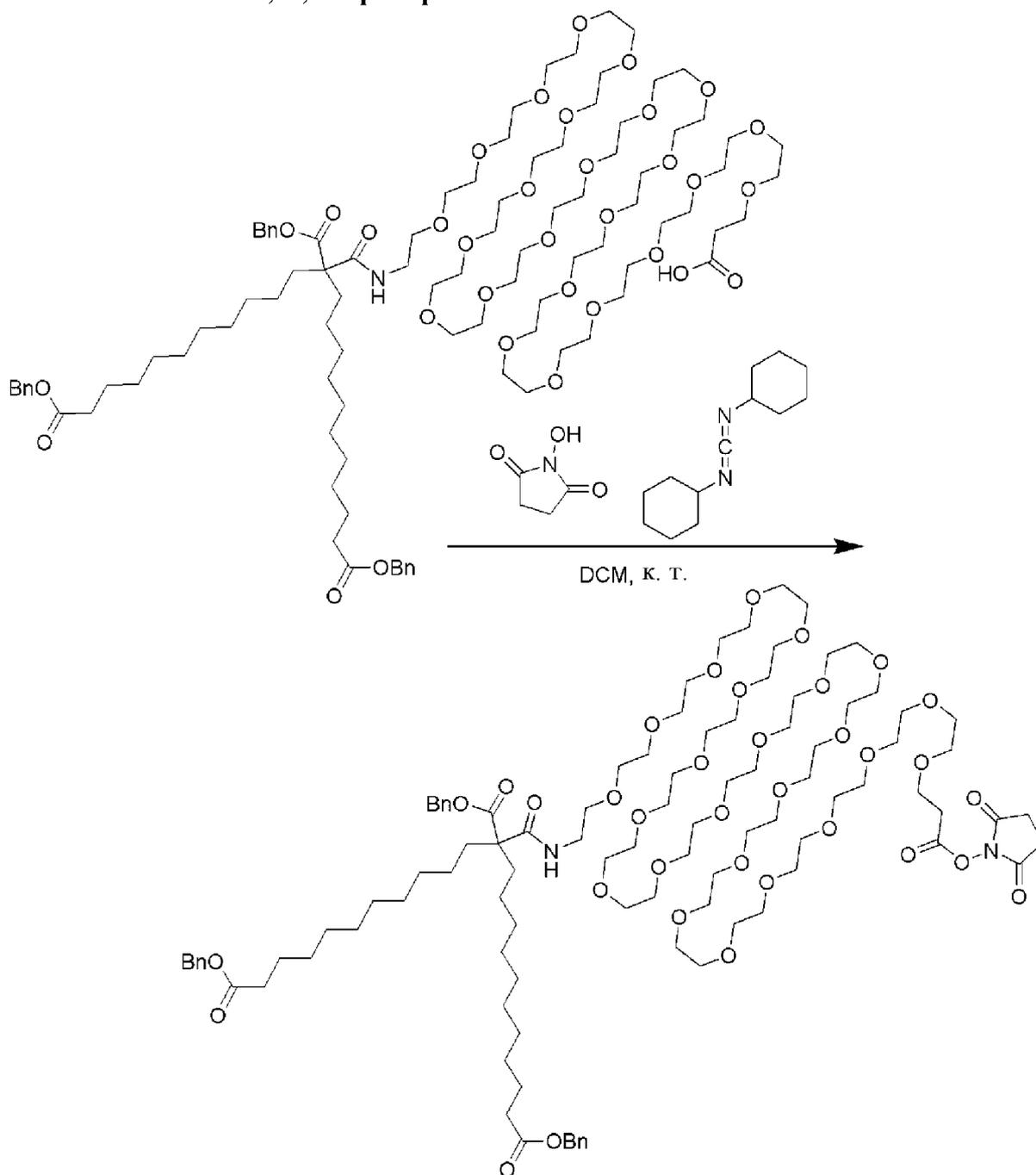
Промежуточное соединение 27. 14-(11-(Бензилокси)-11-оксоундецил)-14-((бензилокси)карбонил)-3,15-диоксо-1-фенил-2,19,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76,79,82,85,88-пентакозаокса-16-азагеннонаконтан-91-овая кислота



Промежуточное соединение 26 (479 мг, 0,503 ммоль) растворяли в 5,7 мл безводного DCM. Затем данный раствор обрабатывали 1-амино-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтан-75-овой кислотой (686 мг, 0,599 ммоль), DIPEA (149 мкл, 0,855 ммоль) и DMAP (7 мг, 0,057 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Через 16 ч. согласно анализу с помощью LC/MS реакция завершалась, и летучие вещества удаляли с помощью ротор. исп. Неочищенный продукт очищали с помощью NPLC (колонка с 24 граммами силикагеля ISCO Gold, элюирование с помощью 0-20% MeOH в DCM) с получением **промежуточного соединения 27** в виде густого масла. LCMS, способ E: Rt=1,35 мин., [M+H]⁺=1871,9.

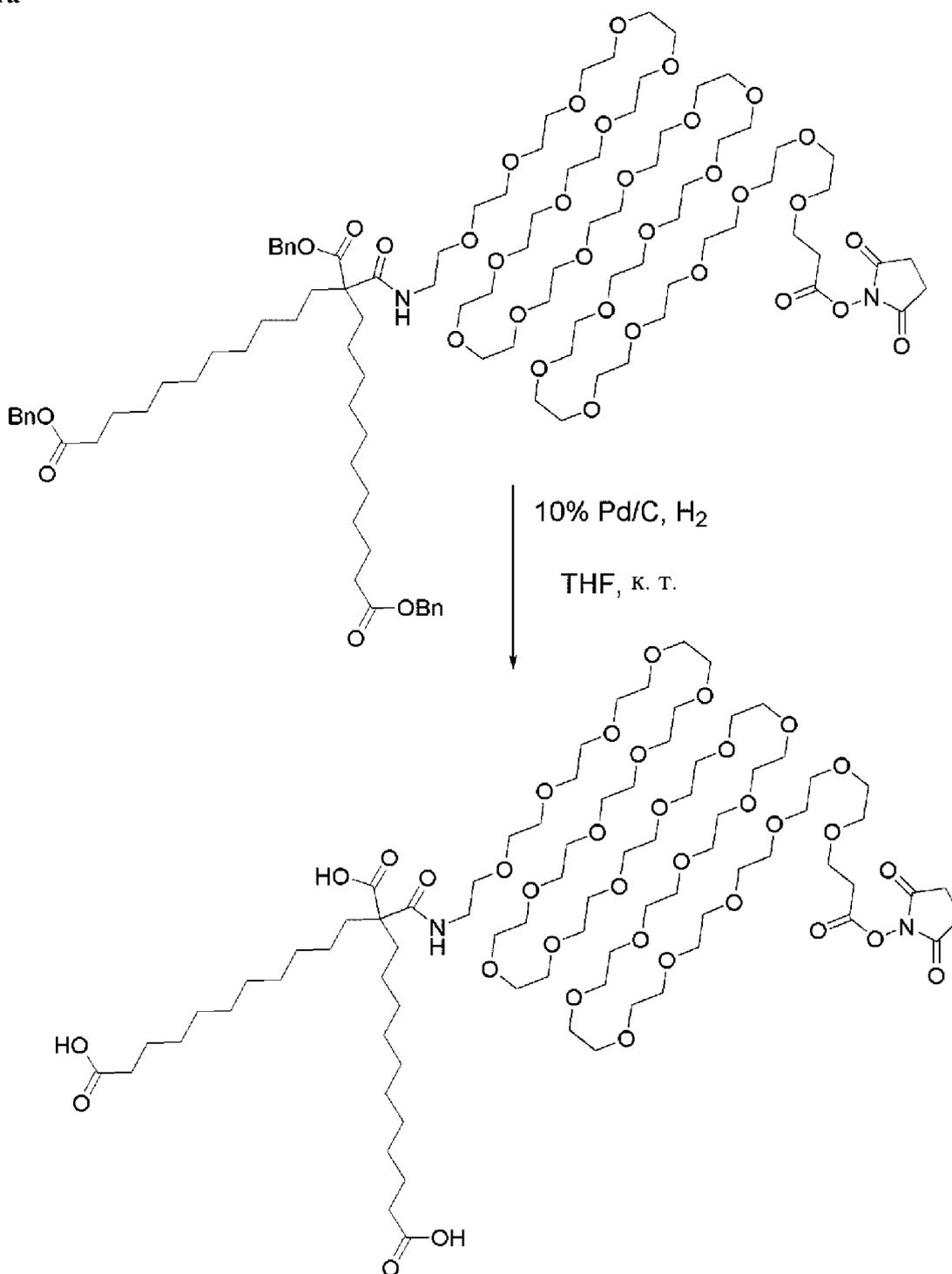
Промежуточное соединение 28. 77,87-Дибензил-1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-77-(11-(бензилокси)-11-оксоундецил)-76-оксо-

3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаокса-75-азагептаоктаконтан-1,77,87-трикарбоксилат



Промежуточное соединение 27 (764 мг, 0,408 ммоль) обрабатывали 1-гидрокси-пирролидин-2,5-дионом (56,4 мг, 0,490 ммоль) в 4 мл DCM. В данную смесь добавляли раствор 1 М DCC в DCM (Aldrich, 0,499 мл, 0,499 ммоль) и обеспечивали перемешивание реакционной смеси в атмосфере азота. Через 16 ч. реакция завершилась. Летучие вещества удаляли и остаток очищали с помощью NPLC (24 граммовая колонка ISCO Gold, элюирование с помощью 0-15% MeOH в DCM). Фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 28**. LCMS, способ F: Rt=4,03 мин., $[M+2H]^{2+}=985,1$.

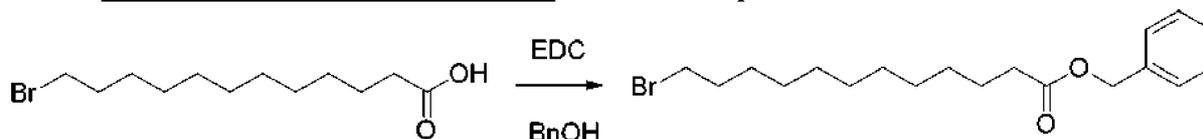
Промежуточное соединение 29. 11-((75-((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)-75-оксо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтил)карбамоил)генэйкозан-1,11,21-трикарбоновая кислота



Промежуточное соединение 28 (500 мг, 0,254 ммоль) растворяли в 2,5 мл безводного THF с помощью магнитной мешалки. Газообразную среду три раза откачивали и заменяли азотом. Затем осторожно добавляли 10% палладий на угле (Aldrich, 27 мг, 0,025 ммоль) и колбу вакуумировали. Газообразную среду заменяли водородом из емкости, представляющей собой баллон. Обеспечивали перемешивание реакционной

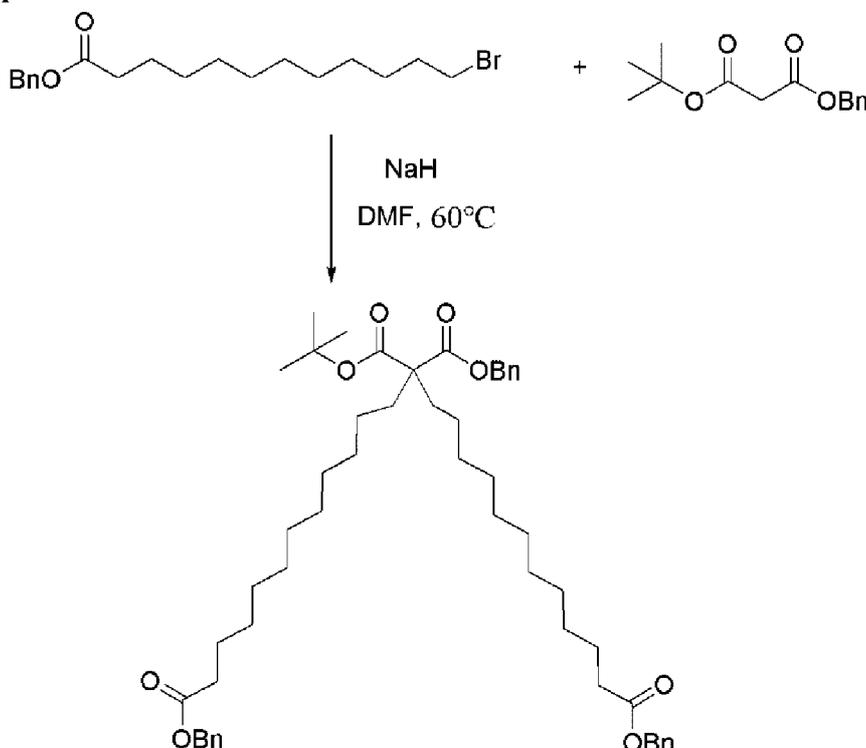
смеси в течение ночи в течение 16 ч., когда LC/MS указывала на завершение реакции. Реакционную смесь разбавляли с помощью 5 мл безводного DCM и фильтровали через Celite®. Фильтрат концентрировали с получением **промежуточного соединения 29** в виде густого прозрачного масла. LCMS, способ F: Rt=2,60 мин., [M+2H]²⁺=849,9.

Промежуточное соединение 30. Бензил-12-бромдодеканоат



12-Бромдодекановую кислоту (2 г, 7,16 ммоль), бензиловый спирт (1,16 г, 10,74 ммоль) и EDC·HCl (2,06 г, 10,74 ммоль) объединяли в 24 мл DCM. В данный раствор одной частью добавляли DMAP (44 мг, 0,358 ммоль) и обеспечивали перемешивание полученной смеси в течение ночи. В соответствии с анализом с помощью LCMS реакция была на ~90% завершена. Реакционную смесь очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-15% EtOAc в гептане, диоксид кремния). Фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением требуемого продукта, **промежуточного соединения 30**. ¹H ЯМР: (400 МГц, Хлороформ-d) δ 7,47-7,31 (m, 5H), 5,14 (s, 2H), 3,43 (t, J=6,9 Гц, 2H), 2,38 (t, J=7,5 Гц, 2H), 1,88 (p, 2H), 1,67 (p, 2H), 1,50-1,39 (m, 2H), 1,35-1,26 (m, 12H).

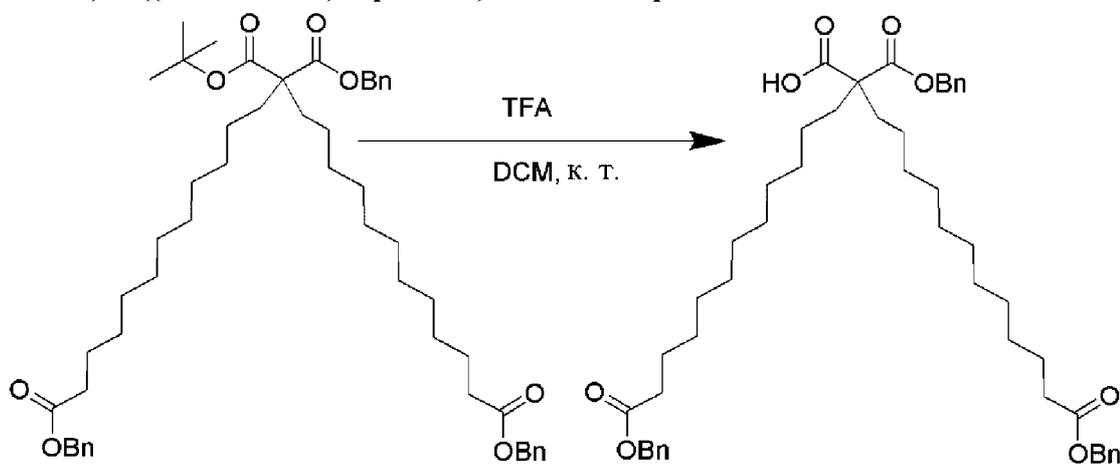
Промежуточное соединение 31. 1,12,23-Трибензил-12-(трет-бутил)трикозан-1,12,12,23-тетракарбоксилат, 1,12-добензил-1-(трет-бутил)додекан-1,1,12-трикарбоксилат



Промежуточное соединение 30 (1 г, 2,71 ммоль), бензил-трет-бутилмалонат (276,4 мг, 1,104 ммоль) и 60% гидрид натрия в масле (97 мг, 2,43 ммоль) объединяли в 12 мл безводного DMF и полученную смесь перемешивали при к. т. в течение ночи в атмосфере

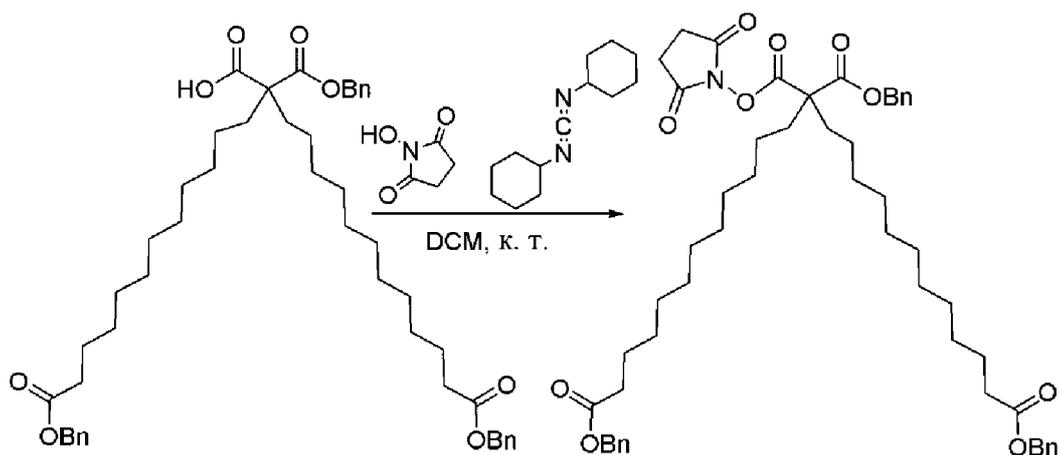
азота в высушенной в печи круглодонной колбе. Через 16 ч. анализ с помощью LCMS указывал на полное преобразование в требуемый продукт. Реакционную смесь разделяли между водой и EtOAc и промывали с помощью EtOAc (2×20 мл). Органические фазы объединяли, промывали солевым раствором, высушивали с помощью сульфата натрия, фильтровали и концентрировали с помощью ротор. исп. Неочищенный продукт очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-60% EtOAc в гептане, диоксид кремния, обнаружение с помощью ELSD). Избыток бромидов, представлявшего собой SM, элюировали первым и быстро, моноалкилированный продукт элюировали вторым, затем - требуемый продукт. Фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 31** в виде прозрачного вязкого масла. LCMS, способ E: Rt=1,73 мин., $[M+H+H_2O]^+=845,0$.

Промежуточное соединение 32. 14-(Бензилокси)-2-(12-(бензилокси)-12-оксододecil)-2-((бензилокси)карбонил)-14-оксотетрадекановая кислота



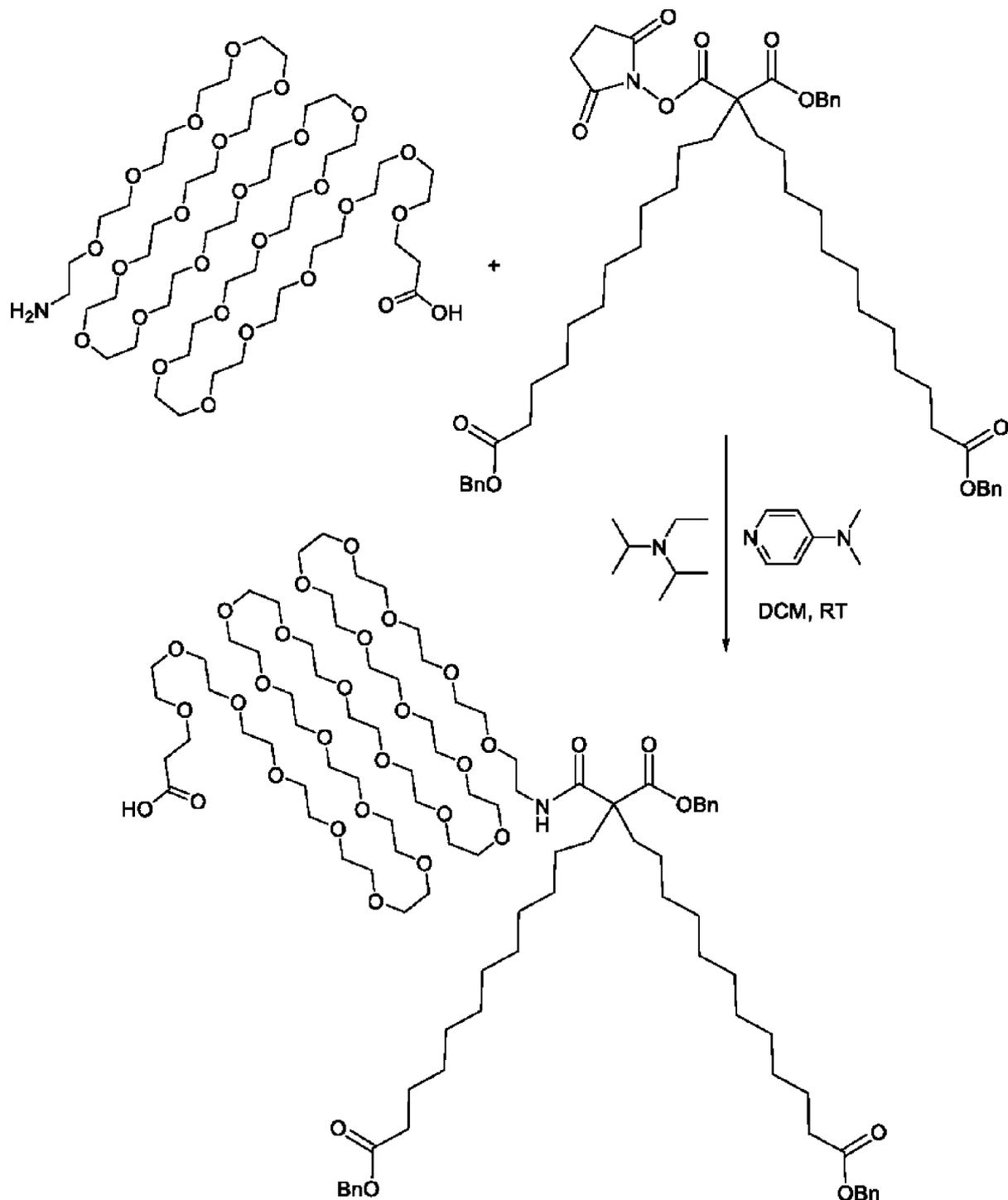
Промежуточное соединение 31 (650 мг, 0,786 ммоль) растворяли в DCM (7,2 мл) и обрабатывали с помощью TFA (0,605 мл, 7,86 ммоль). Через 16 ч. реакция завершалась, на что указывал ELSD-сигнал при LC/MS. Летучие вещества удаляли и полученный осадок очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-5% MeOH в DCM, диоксид кремния). Фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 32** в виде прозрачного масла. LCMS, способ E: Rt=1,57 мин., $[M+H]^+ = 771,9$.

Промежуточное соединение 33. 1,12,23-Трибензил-12-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)трикозан-1,12,12,23-тетракарбоксилат



Промежуточное соединение 32 (310 мг, 0,402 ммоль) растворяли в 3,6 мл DCM наряду с 1-гидрокси-пирролидин-2,5-дионом (50,9 мг, 0,442 ммоль) и 1 М DCC в DCM (Aldrich, 422 мкл, 0,422 ммоль). Через 15 мин. наблюдали осаждение побочного продукта, представлявшего собой DCU. Обеспечивали перемешивание реакционной смеси в течение ночи, после чего LC/MS указывала на полное преобразование в продукт. Летучие вещества частично удаляли и масляный продукт очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-30% EtOAc в гептане, диоксид кремния) с получением **промежуточного соединения 33**. LCMS, способ E: Rt=1,49 мин., $[M+H+H_2O]^+=886,5$.

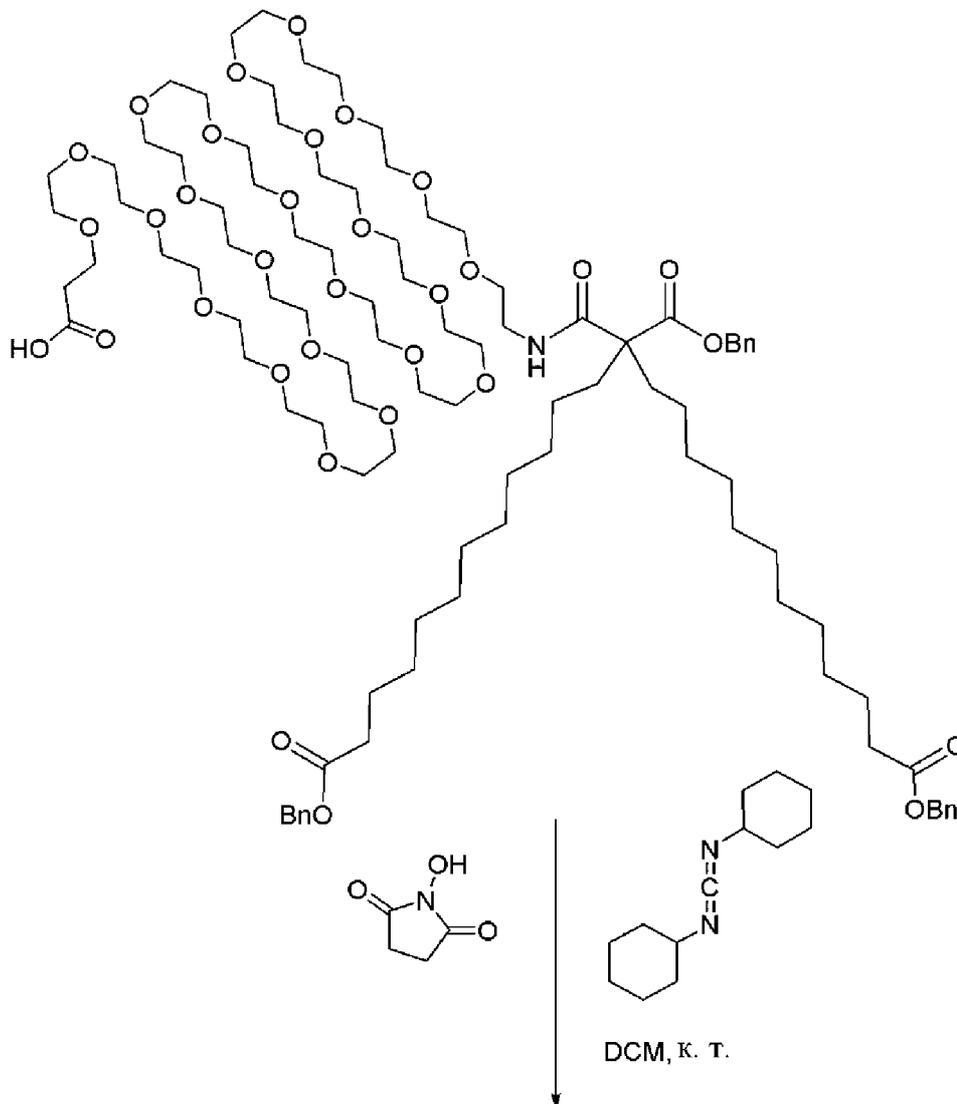
Промежуточное соединение 34. 15-(12-(Бензилокси)-12-оксододecil)-15-((бензилокси)карбонил)-3,16-диоксо-1-фенил-2,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86,89-пентакозаокса-17-азанононактан-92-овая кислота

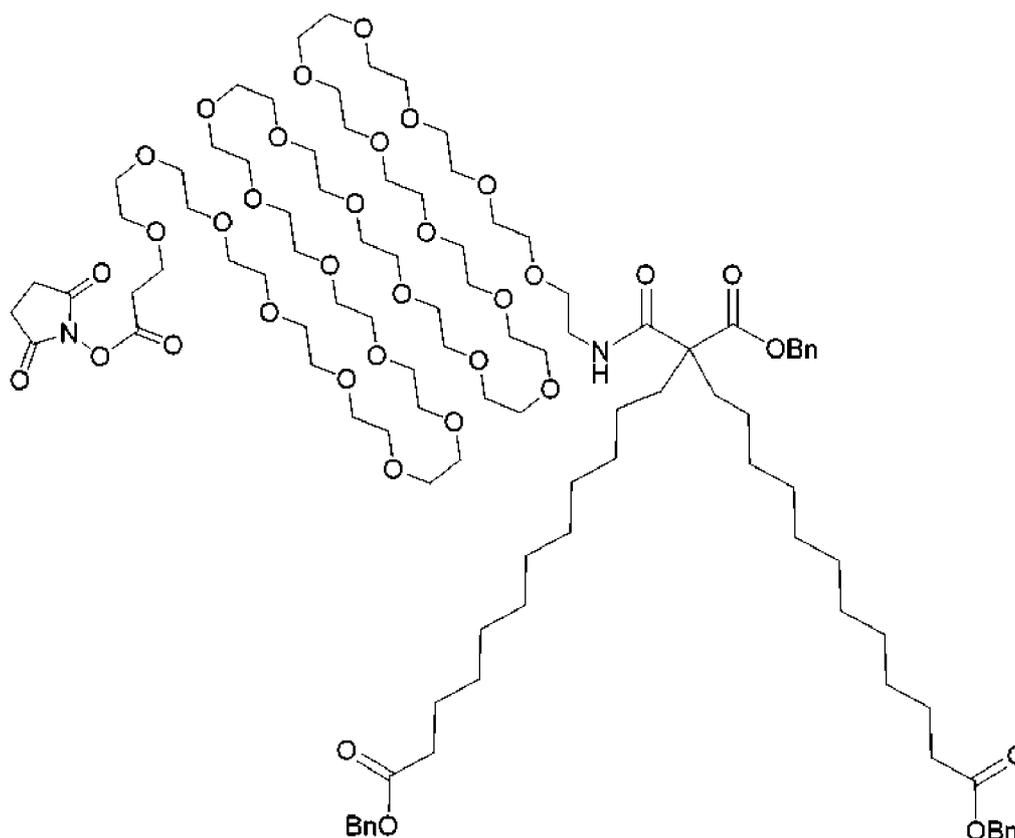


Промежуточное соединение 33 (127,6 мг, 0,147 ммоль) обрабатывали 1-амино-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтан-75-овой кислотой (Biopharm, 168 мг, 0,147 ммоль), DIPEA (38,5 мкл, 0,220 ммоль) и DMAP (1,8 мг, 0,0015 ммоль). Через 16 ч. реакция практически завершалась. Летучие вещества удаляли и остаток очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-15% MeOH в DCM, диоксид кремния). Фракции,

содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 34**. LCMS, способ E: Rt=1,41 мин., $[M+2H]^{2+}=951,6$.

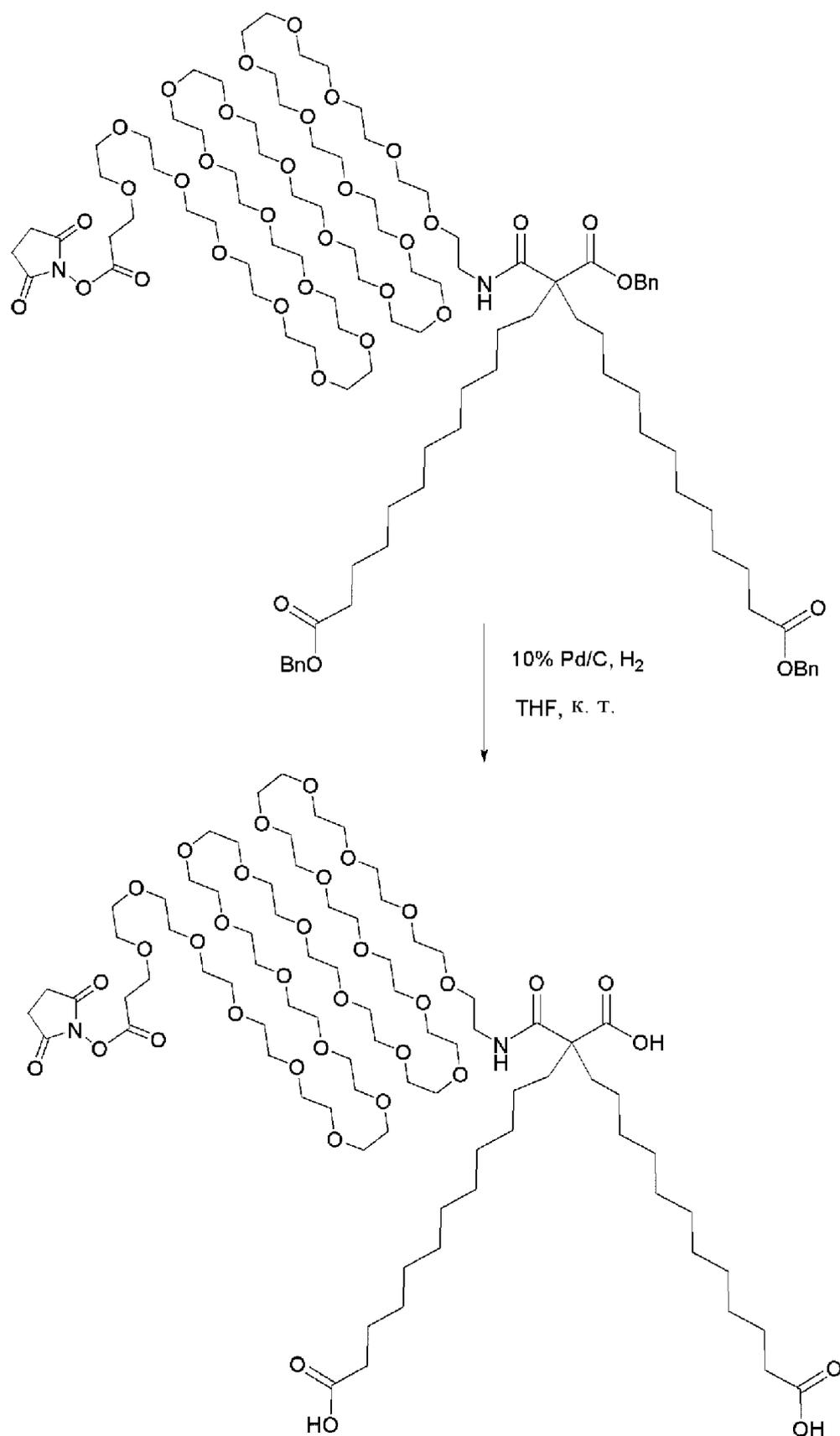
Промежуточное соединение 35. 77,88-Дибензил-1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-77-(12-(бензилокси)-12-оксододecil)-76-оксо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозоакса-75-азаоктаоктанта-1,77,88-трикарбоксилат





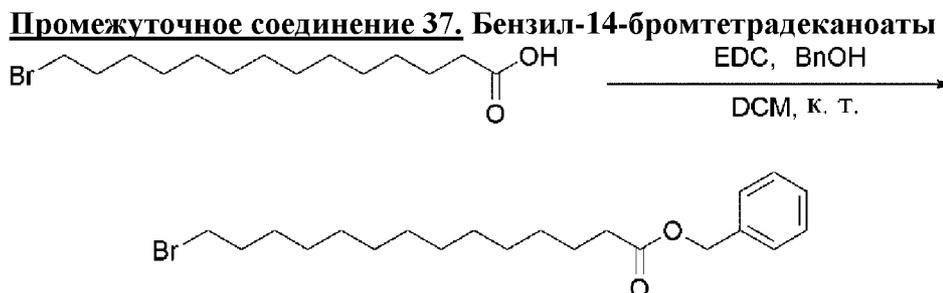
Промежуточное соединение 34 (194 мг, 0,102 ммоль) растворяли в 1 мл DCM и обрабатывали 1-гидроксипирролидин-2,5-дионом (11,75 мг, 0,102 ммоль) и 1 М DCC в DCM (Aldrich, 0,107 мл, 0,107 ммоль). Через 15 мин. наблюдали осаждение DCU. Через 16 ч. реакция завершалась, на что указывала LC/MS. Летучие вещества удаляли с получением масляного остатка. Данный материал очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-15% MeOH в DCM, диоксид кремния, обнаружение с помощью ELSD). Фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением требуемого продукта, **промежуточного соединения 35**. LCMS, способ E: Rt=1,40 мин., $[M+2H+H_2O]^{2+}=1008,2$.

Промежуточное соединение 36. 12-((75-((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)-75-оксо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтил)карбамоил)трикозан-1,12,23-трикарбоновая кислота



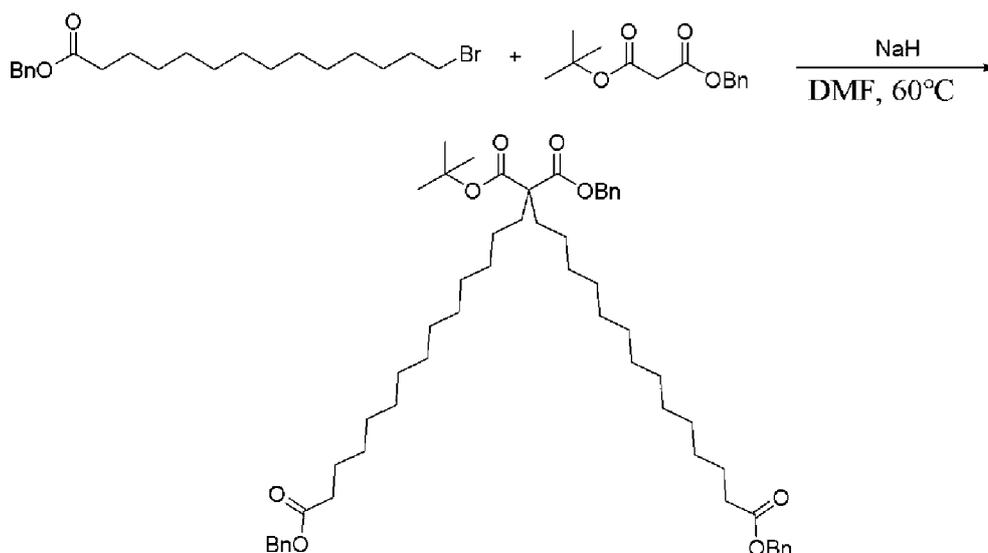
Промежуточное соединение 35 (130 мг, 0,065 ммоль) растворяли в THF (2 мл) и полученную смесь три раза продували азотом. Осторожно добавляли 10% палладий на угле (36,4 мг, 0,033 ммоль), и газообразную среду откачивали и затем заменяли водородом из емкости, представляющей собой баллон. Реакция завершалась по прошествии 16 ч., на

что указывал анализ с помощью LC/MS (обнаружение с помощью ELSA). Осуществляли очистку с помощью NPLC (элюирование с помощью MeOH в DCM, диоксид кремния, 0-20%), и фракции, содержавшие требуемый продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 36**. LCMS, способ E: $R_t=0,64$ мин., $[M+2H]^{2+}=864,0$.



14-Бромтетрадекановую кислоту (1,00 г, 3,25 ммоль), бензиловый спирт (677 мкл, 6,51 ммоль) и EDC·HCl (936 мг, 4,89 ммоль) объединяли в DCM (11 мл). В данный раствор одной частью добавляли DMAP (19,9 мг, 0,163 ммоль) и обеспечивали перемешивание полученной смеси в течение ночи. Через указанное время реакция завершалась, на что указывала LC/MS. Летучие вещества удаляли и полученный осадок очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-15% EtOAc в гептане, диоксид кремния). Фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением требуемого **промежуточного соединения 37**. ^1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 7,33-7,22 (m, 5H), 5,04 (s, 2H), 3,34 (t, $J=6,9$ Гц, 2H), 2,28 (t, $J=7,6$ Гц, 2H), 1,78 (p, 2H), 1,58 (p, $J=7,3$ Гц, 2H), 1,39-1,31 (m, 2H), 1,25-1,16 (m, 16H).

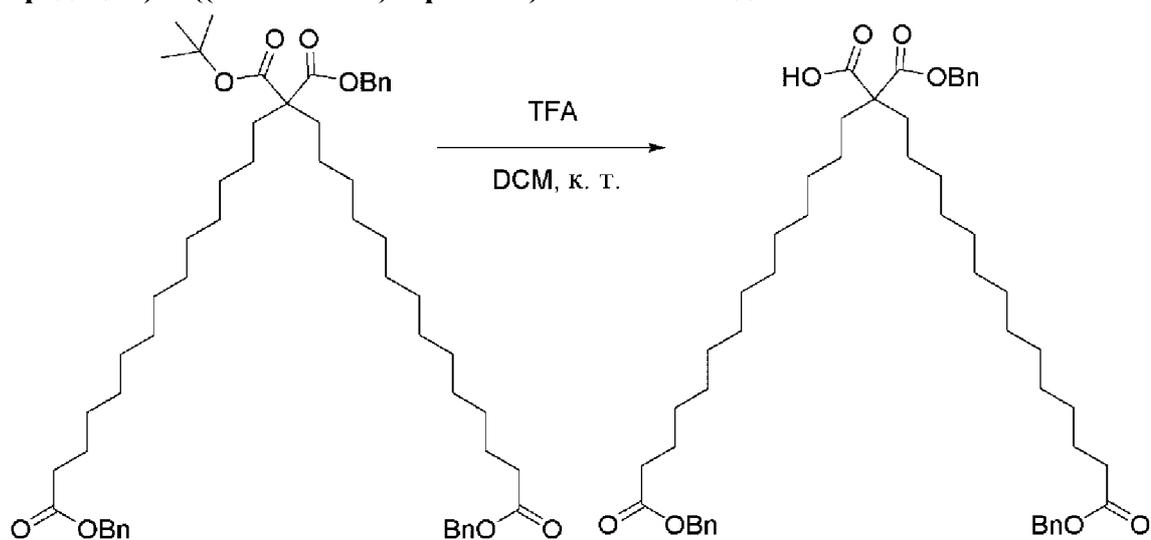
Промежуточное соединение 38. 1,14,27-Трибензил-14-(трет-бутил)гептакозан-1,14,14,27-тетракарбоксилат, 1,14-добензил-1-(трет-бутил)тетрадекан-1,14-трикарбоксилат



Промежуточное соединение 37 (713 мг, 1,793 ммоль), бензил-трет-бутилмалонат (187 мг, 0,747 ммоль) и 60% гидрид натрия в масле (65,7 мг, 1,644 ммоль) объединяли в безводном DMF (8 мл) и перемешивали при 60°C в течение ночи в атмосфере азота в

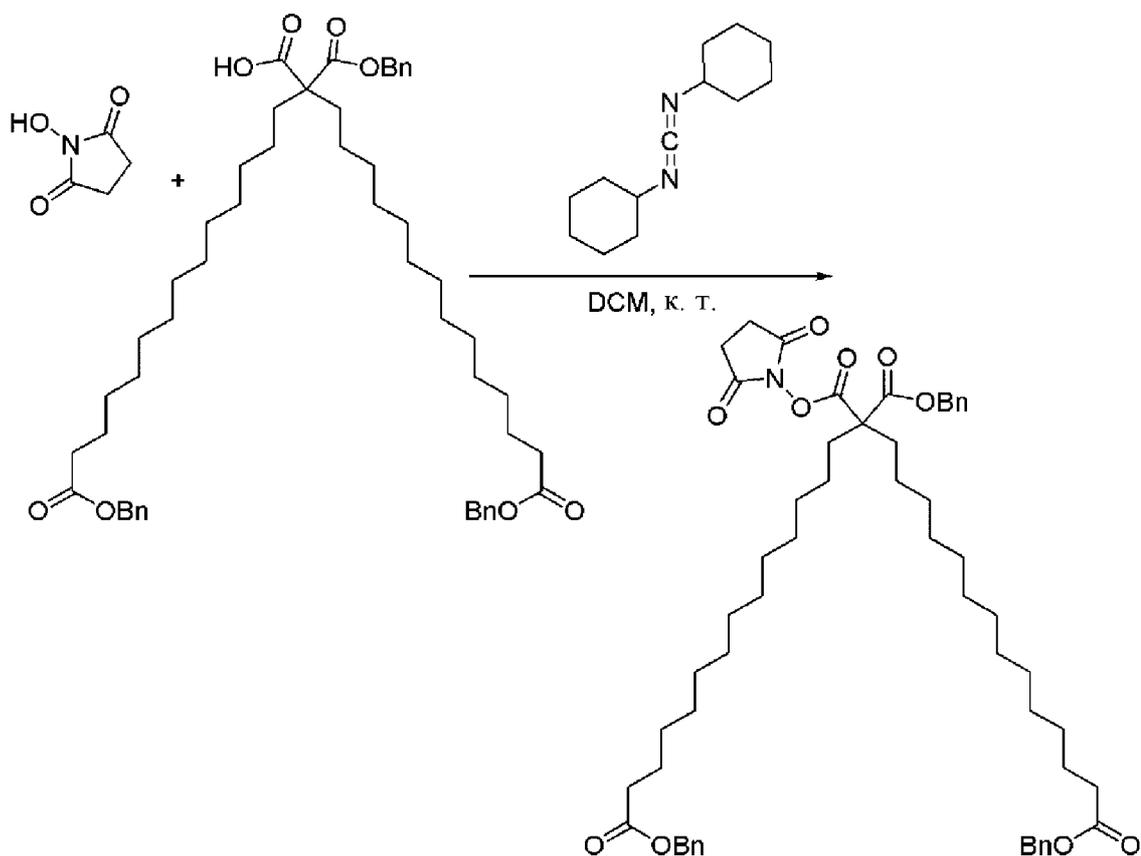
высушенной в печи круглодонной колбе. Через 24 ч. анализ с помощью LC/MS указывал на присутствие моно- и диалкилированных малонатсодержащих продуктов. Реакционную смесь обрабатывали дополнительным количеством бензил-14-бромтетрадеcanoата (229,2 мг, 0,57 ммоль) и 60% гидридом натрия в масле (45 мг, 1,13 ммоль). Через 16 ч. реакция практически завершалась, на что указывала LC/MS. Реакционную смесь осторожно разделяли между 10 мл воды и 10 мл EtOAc. Водную фазу промывали с помощью 10 мл EtOAc. Органические фазы объединяли, промывали солевым раствором, высушивали с помощью безводного сульфата натрия и концентрировали с помощью ротор. исп. Неочищенный продукт очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-35% EtOAc в гептане, диоксид кремния, обнаружение с помощью ELSD). Избыток бромидов, представлявшего собой исходный материал, быстро элюировали первым, а моноалкилированный продукт элюировали вторым, затем - требуемый продукт. Фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 38** в виде прозрачного вязкого масла. LCMS, способ E: Rt=1,87 мин., $[M+Na]^+=905,7$.

Промежуточное соединение 39. 16-(Бензилокси)-2-(14-(бензилокси)-14-оксотетрадецил)-2-((бензилокси)карбонил)-16-оксогексадекановая кислота



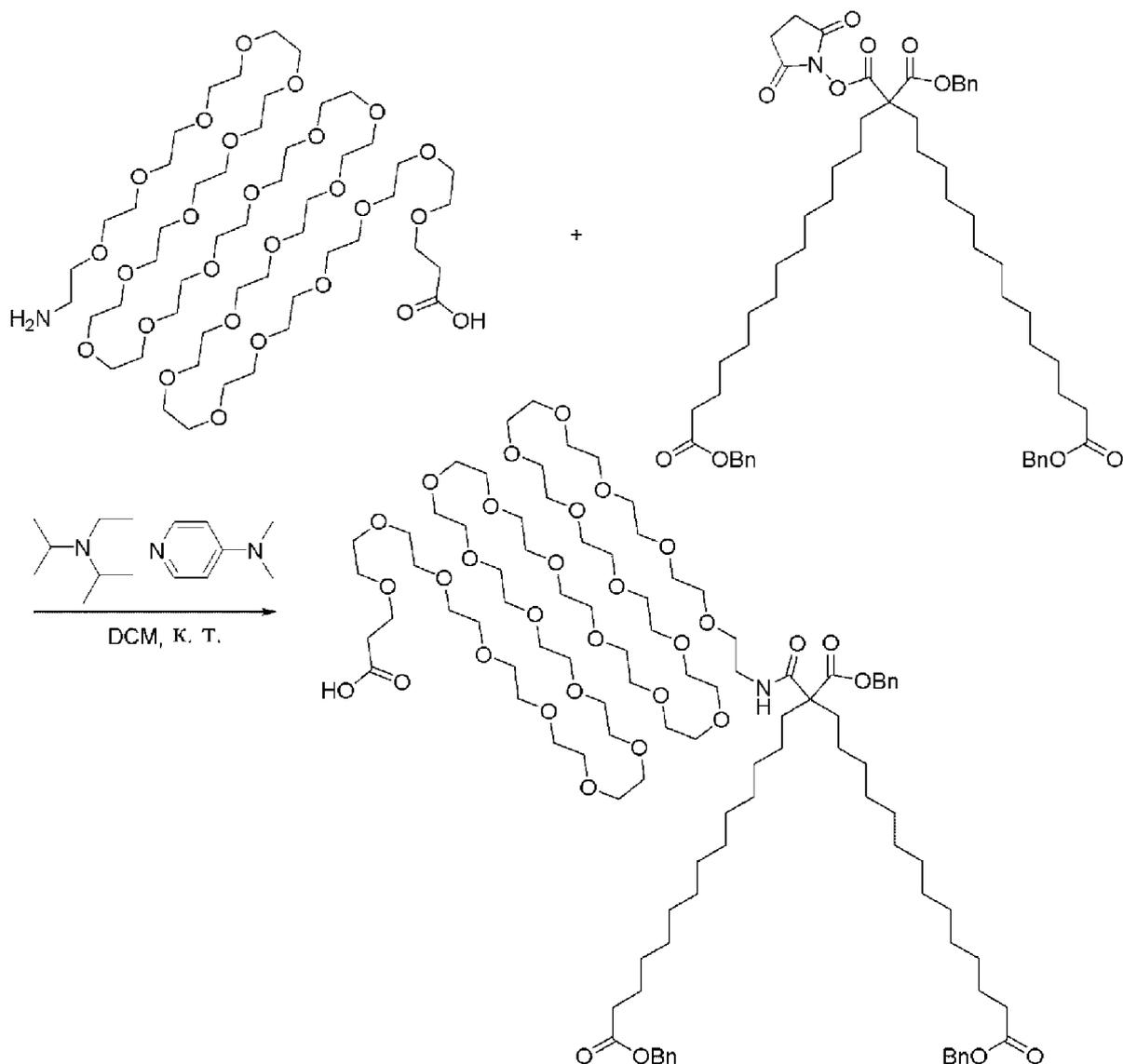
Промежуточное соединение 38 (290,4 мг, 0,329 ммоль) растворяли в DCM (3 мл), а затем обрабатывали с помощью TFA (0,25 мл, 3,29 ммоль). Через 16 ч. реакция завершалась, на что указывал ELSD-сигнал при LC/MS. Летучие вещества удаляли и полученный осадок очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-5% MeOH в DCM, диоксид кремния). Фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 39** в виде прозрачного масла. LCMS, способ E: Rt=1,65 мин., $[M+H]^+=828,1$.

Промежуточное соединение 40. 1,14,27-Трибензил-14-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)гептакозан-1,14,14,27-тетракарбоксилат



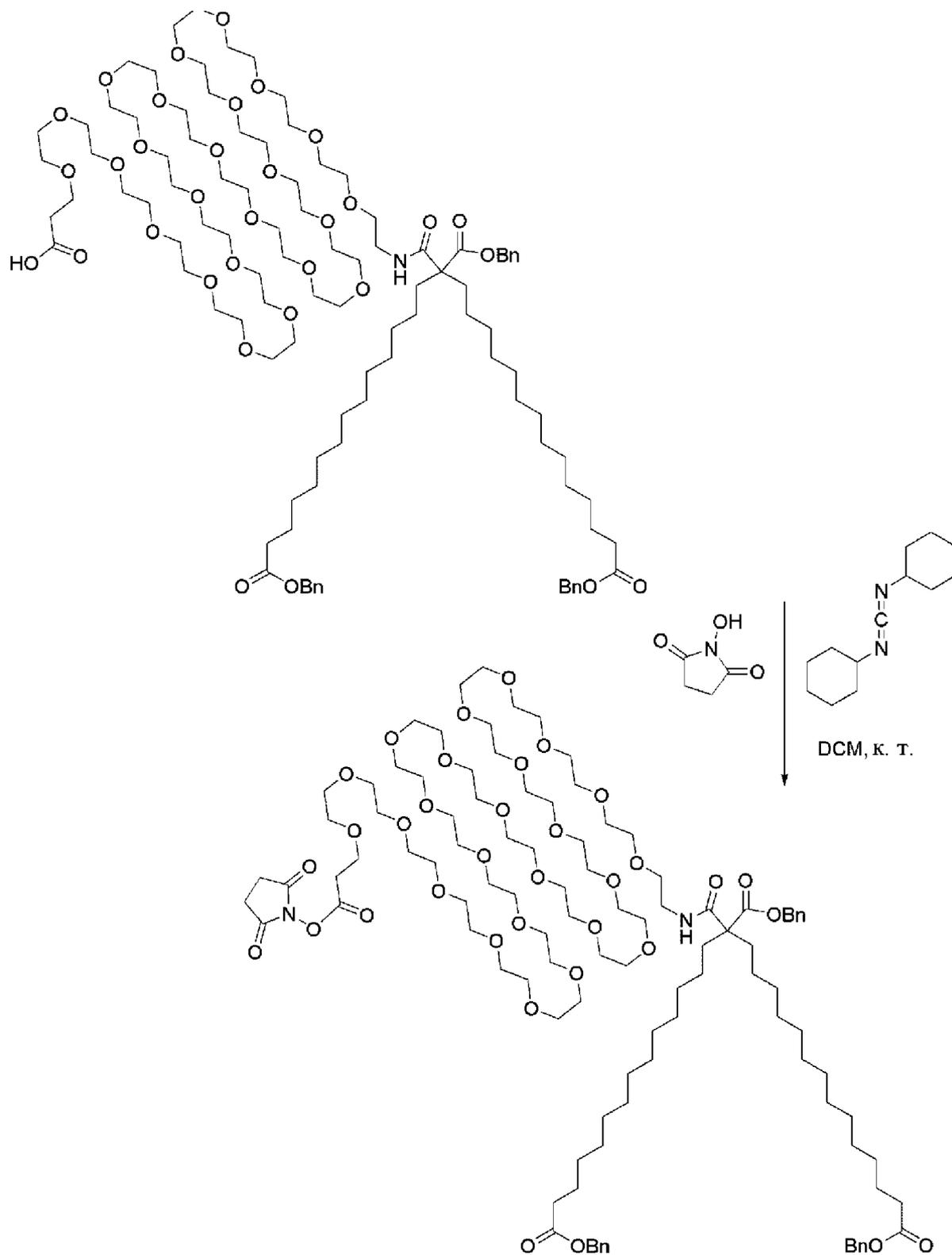
Промежуточное соединение 39 (170,4 мг, 0,206 ммоль) растворяли в DCM (2 мл) наряду с 1-гидрокси-пирролидин-2,5-дионом (35,6 мг, 0,309 ммоль) и 1 М DCC в DCM (Aldrich, 212 мкл, 0,212 ммоль). Через 10 мин. наблюдали осаждение DCU. Обеспечивали перемешивание реакционной смеси в течение ночи, после чего LC/MS указывала на полное преобразование в продукт. Летучие вещества частично удаляли и маслянистый продукт очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-40% EtOH в гептане, диоксид кремния) с получением **промежуточного соединения 40**. LCMS, способ E: Rt=1,69 мин., $[M+H]^+=924,4$.

Промежуточное соединение 41. 17-(14-(Бензилокси)-14-оксотетрадецил)-17-((бензилокси)карбонил)-3,18-диоксо-1-фенил-2,22,25,28,31,34,37,40,43,46,49,52,55,58,61,64,67,70,73,76,79,82,85,88,91-пентакозаокса-19-азатетранонаконтан-94-овая кислота



Промежуточное соединение 40 (119,8 мг, 0,130 ммоль) обрабатывали 1-амино-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтан-75-овой кислотой (149 мг, 0,130 ммоль), DIPEA (34,0 мкл, 0,194 ммоль) и DMAP (1,584 мг, 0,0013 ммоль) в растворе 1,3 мл DCM. Через 16 ч. реакция практически завершалась. Летучие вещества удаляли и остаток очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-65% MeOH в DCM, диоксид кремния). Фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 41**. LCMS, способ E: $R_t=1,56$ мин., $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}=978,9$.

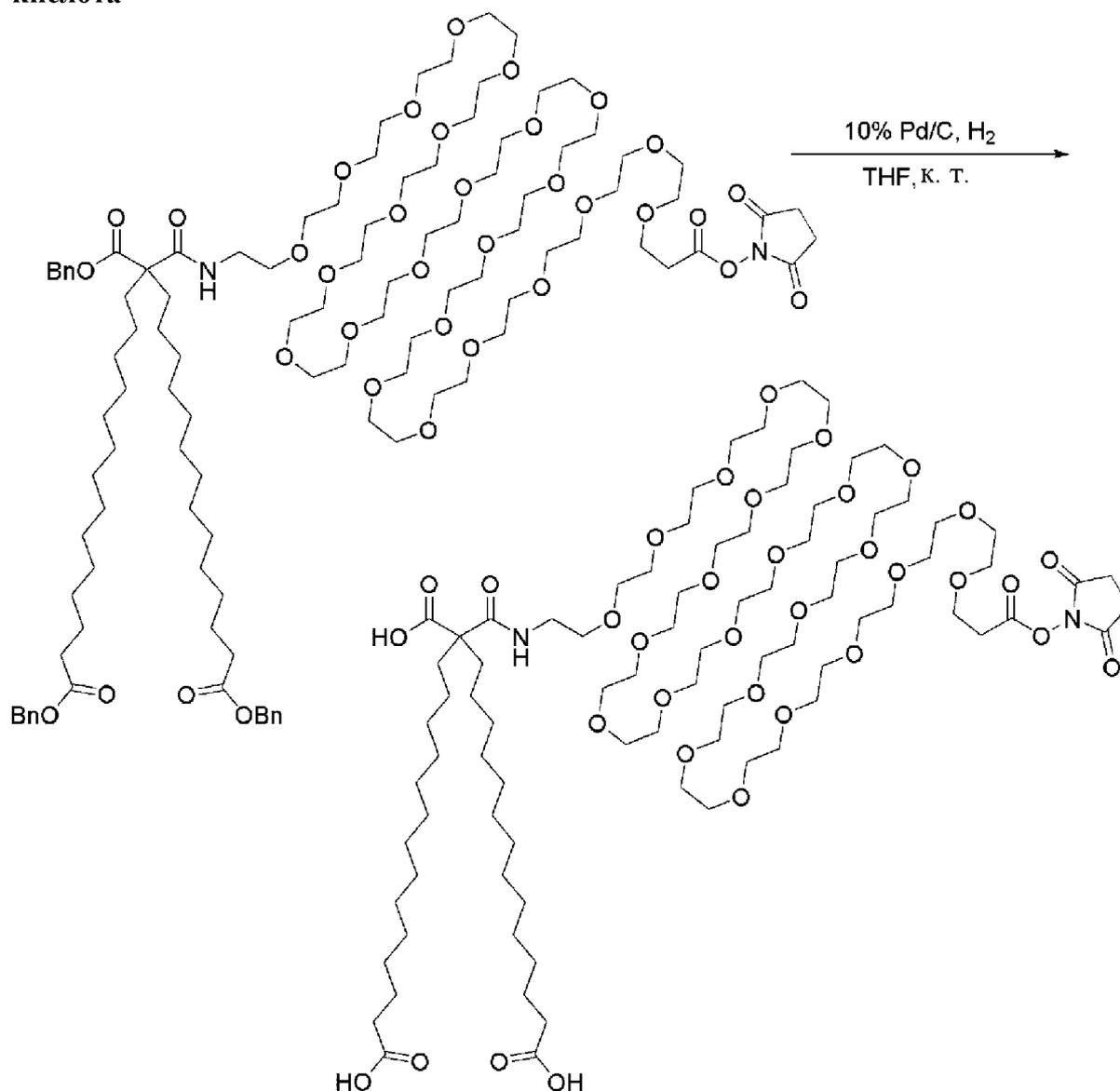
Промежуточное соединение 42. 77,90-Дибензил-1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-77-(14-(бензилокси)-14-оксотетрадецил)-76-оксо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаокса-75-азанонаконтан-1,77,90-трикарбоксилат



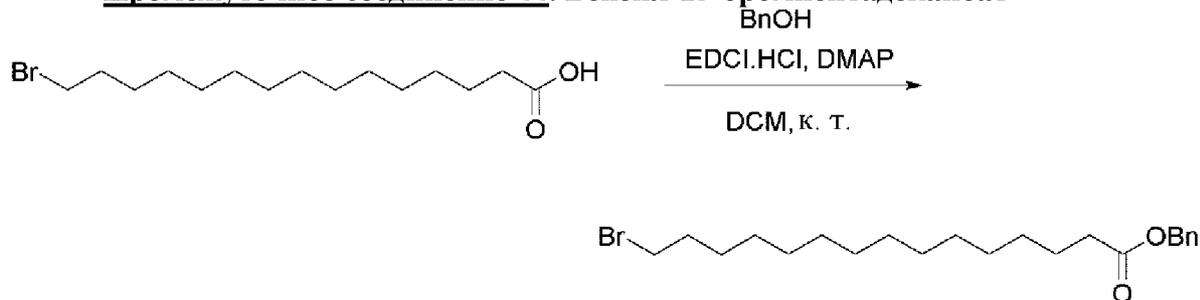
Промежуточное соединение 41 (144,2 мг, 0,074 ммоль) растворяли в 700 мкл DCM и обрабатывали 1-гидрокси-пирролидин-2,5-дионом (12,73 мг, 0,111 ммоль) и 1 М DCC (дициклогексилметандиимин) в DCM (Aldrich, 0,077 мл, 0,077 ммоль). Через 15 мин. наблюдали осаждение DCU. Через 16 ч. реакция завершалась, на что указывала LC/MS. Летучие вещества удаляли с получением масляного остатка. Данный материал очищали с помощью NPLC с обнаружением с помощью ELSD (элюирование с помощью 0-25% MeOH в DCM, диоксид кремния). Фракции, содержавшие продукт, объединяли и

концентрировали с получением требуемого продукта, **промежуточного соединения 42**. LCMS, способ E: Rt=1,55 мин., $[M+2H+H_2O]^{2+}=1036,2/$

Промежуточное соединение 43. 14-((75-((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)-75-оксо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтил)карбамоил)гептакозан-1,14,27-трикарбоновая кислота

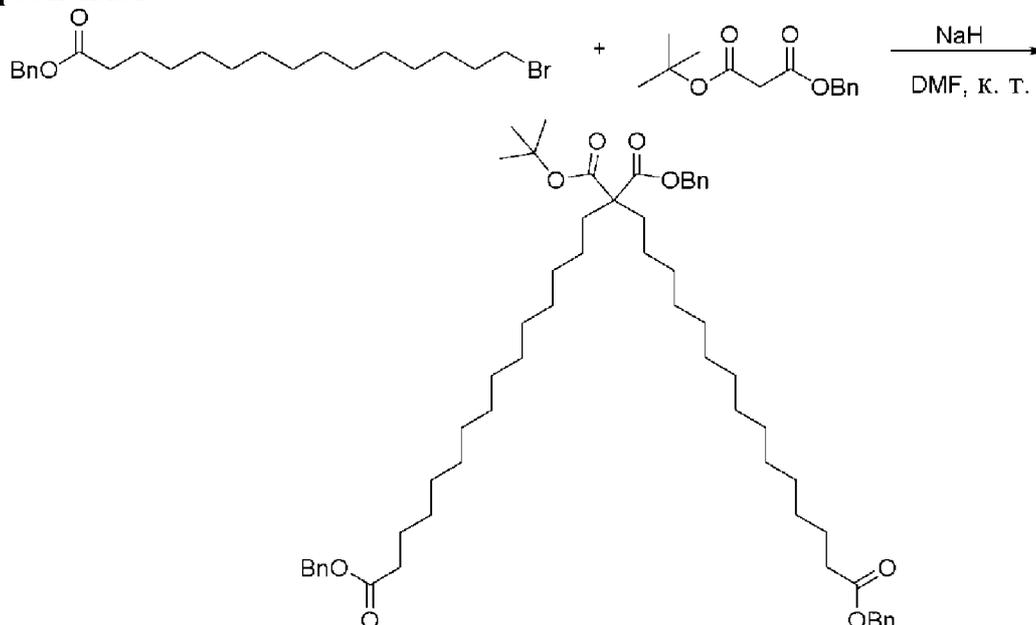


Промежуточное соединение 42 (118,8 мг, 0,058 ммоль) растворяли в 3,75 мл THF в круглодонной колбе с якорем магнитной мешалки. Полученную смесь три раза продували азотом, а затем добавляли 30,8 мг (0,029 ммоль) 10% Pd/C. Газообразную среду откачивали и заменяли водородом из баллона. Реакция завершилась за 16 ч. Реакционную смесь разбавляли с помощью 10 мл DCM, фильтровали через Celite® и фильтрат концентрировали до сухого состояния. Выполняли очистку с помощью NPLC (элюирование с помощью MeOH в DCM, диоксид кремния, 0-20%) и фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 43**. LCMS, способ E: Rt=0,86 мин., $[M+2H]^{2+}=892,0$.

Промежуточное соединение 44. Бензил-15-бромпентадеканоат

15-Бромпентадекановую кислоту (1949 мг, 6,07 ммоль), бензиловый спирт (984 мг, 9,10 ммоль) и EDCI.HCl (1744 мг, 9,10 ммоль) объединяли в 24 мл DCM. В данный раствор одной частью добавляли DMAP (37,1 мг, 0,303 ммоль) и обеспечивали перемешивание полученной смеси в течение 32 ч. Через 32 ч. реакция практически завершалась. Реакционную смесь разделяли между водой и DCM. Органическую фазу промывали солевым раствором, высушивали с помощью безводного сульфата натрия и фильтровали. Летучие вещества удаляли и полученный осадок очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-15% EtOAc в гептане, диоксид кремния, обнаружение с помощью ELSD). Фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 44**. ^1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d) δ 7,29-7,22 (m, 5H), 5,02 (s, 2H), 3,31 (t, J=6,9 Гц, 2H), 2,26 (t, J=7,6 Гц, 2H), 1,76 (p, 2H), 1,54 (p, J=7,3 Гц, 2H), 1,36-1,30 (m, 2H), 1,22-1,16 (m, 18H).

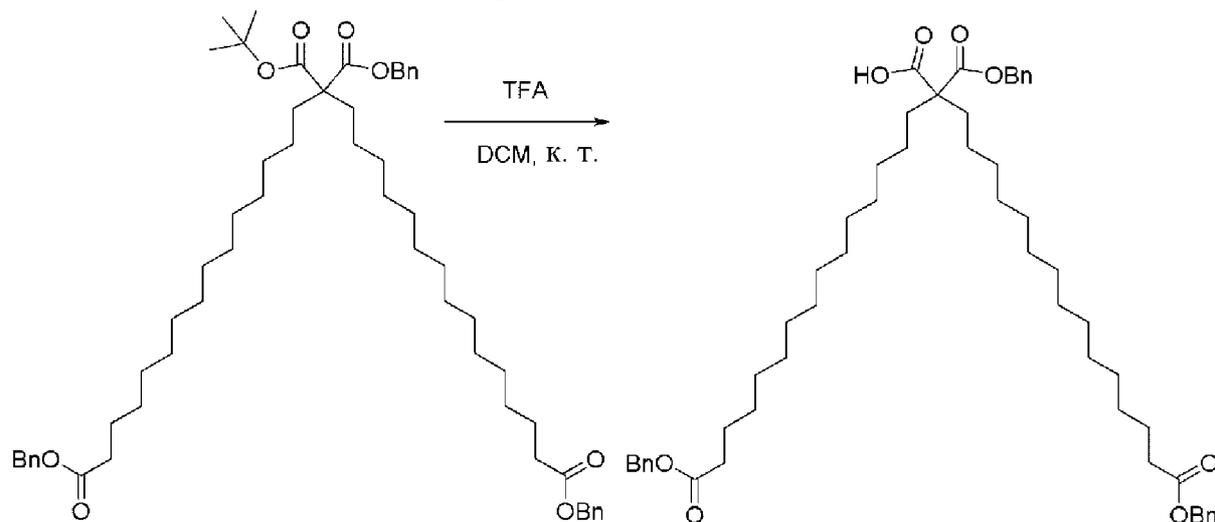
Промежуточное соединение 45. 1,15,29-Трибензил-15-(трет-бутил)нонакозан-1,15,15,29-тетракарбоксилат, 1,15-добензил-1-(трет-бутил)пентадекан-1,15-трикарбоксилат



Промежуточное соединение 44 (1013 мг, 2,461 ммоль), бензил-трет-бутилмалонат (280 мг, 1,119 ммоль) и 60% гидрид натрия в масле (98 мг, 2,461 ммоль) объединяли в безводном DMF (5,6 мл) и перемешивали при к. т. в течение ночи в атмосфере азота в высушенной в печи круглодонной колбе. Затем реакционную смесь осторожно выливали в

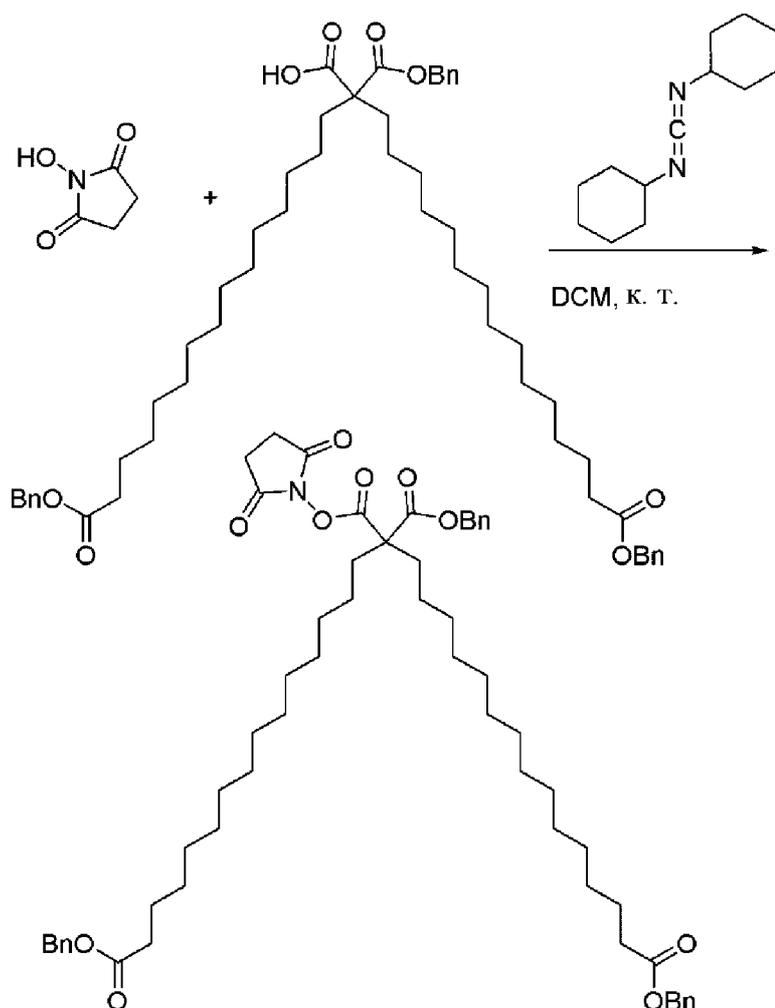
10 мл воды и три раза экстрагировали с помощью 10 мл EtOAc. Органические фазы объединяли, высушивали с помощью солевого раствора и безводного сульфата натрия, фильтровали и концентрировали. Продукт очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-60% EtOAc в гептане, диоксид кремния, обнаружение с помощью ELSD). Фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 45** в виде прозрачного вязкого масла. LCMS Способ Н: Rt=4,23 мин., $[M+H+H_2O]^+=928,9$.

Промежуточное соединение 46. 17-(Бензилокси)-2-(15-(бензилокси)-15-оксопентадецил)-2-((бензилокси)карбонил)-17-оксогептадекановая кислота



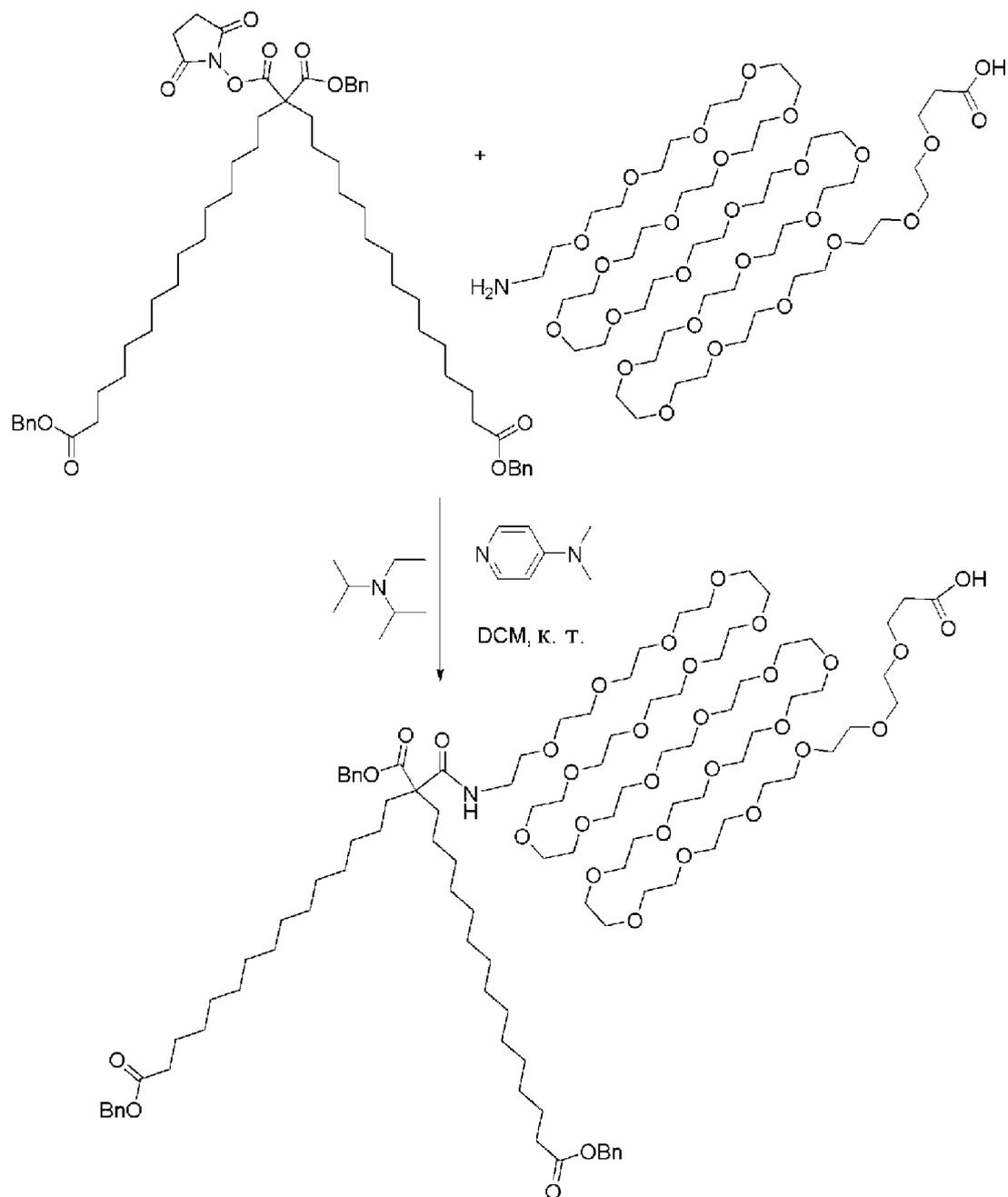
Промежуточное соединение 45 (750 мг, 0,823 ммоль) растворяли в DCM (8,23 мл) и обрабатывали с помощью TFA (634 мкл, 8,23 ммоль). Через 16 ч. реакция частично завершалась. Реакционную смесь оставляли перемешиваться в течение недели, и через указанное время реакция практически завершалась. Полученный масляный остаток очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-25% EtOAc в гептанах, диоксид кремния) с обнаружением с помощью ELSD. Фракции, содержавшие продукт, концентрировали с получением **промежуточного соединения 46**. LCMS Способ Н: Rt=3,70 мин., $[M+H+H_2O]^+=873,2$.

Промежуточное соединение 47. 1,15,29-Трибензил-15-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)нонакозан-1,15,15,29-тетракарбоксилат



Промежуточное соединение 46 (435 мг, 0,509 ммоль) и 1-гидрокси-пирролидин-2,5-дион (64,4 мг, 0,560 ммоль) суспендировали в 5 мл безводного DCM (5 мл) и добавляли 1 М DCC в DCM (Aldrich, 534 мкл, 0,534 ммоль). Полученную смесь перемешивали при к. т. Через 15 мин. образовывался мелкодисперсный осадок (осад.), свидетельствуя об образовании DCU. Через 16 ч. реакция завершалась, на что указывала LC/MS. Летучие вещества удаляли путем выпаривания. Масляный остаток очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-10% MeOH в DCM, диоксид кремния, обнаружение с помощью ELSD). Фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 47**. LCMS Способ I: Rt=3,62 мин., $[M+H_2O+H]^+=970,1$.

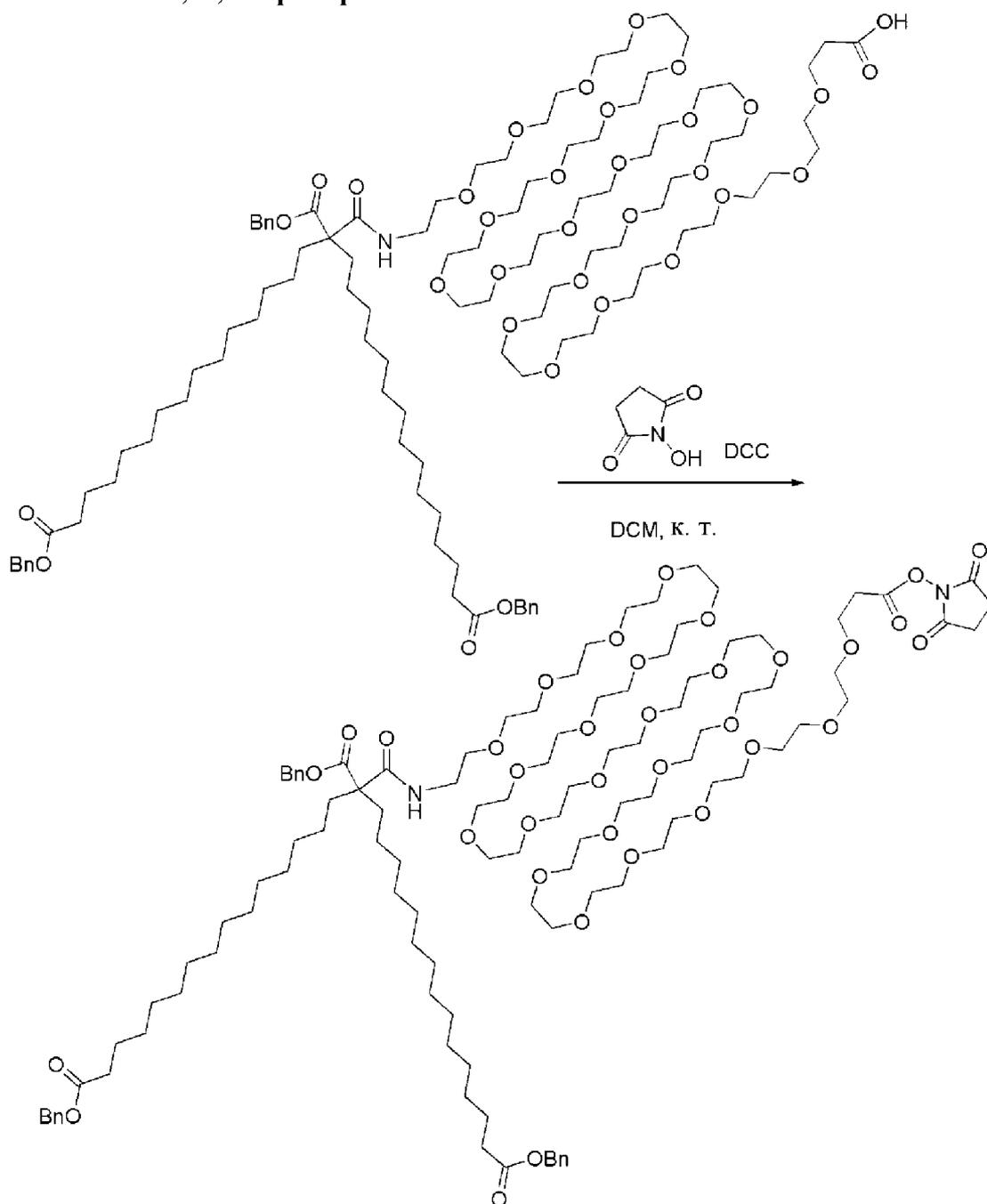
Промежуточное соединение 48. 18-(15-(Бензилокси)-15-оксопентадецил)-18-((бензилокси)карбонил)-3,19-диоксо-1-фенил-2,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62,65,68,71,74,77,80,83,86,89,92-пентакозаокса-20-азапентаонаконтан-95-овая кислота



Промежуточное соединение 47 (143 мг, 150 ммоль) растворяли в 1,5 мл DCM во флаконе на 2 драхмы с закручивающейся крышкой наряду с 1-амино-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтан-75-овой кислотой (198 мг, 0,173 ммоль), DIPEA (48,5 мкл, 0,375 ммоль) и DMAP (2 мг, 0,109 ммоль). Обеспечивали перемешивание полученной смеси в течение ночи. Затем летучие вещества удаляли и полученный осадок очищали посредством NPLC (элюирование с помощью 0-10% MeOH в DCM, диоксид кремния). Фракции, содержавшие продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 48** в виде прозрачного полутвердого вещества. LCMS Способ I: Rt=2,53 мин., $[M+2H+2H_2O]^{2+}=1010,1$.

Промежуточное соединение 49. 77,91-Дибензил-1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)-77-(15-(бензилокси)-15-оксопентадецил)-76-оксо-

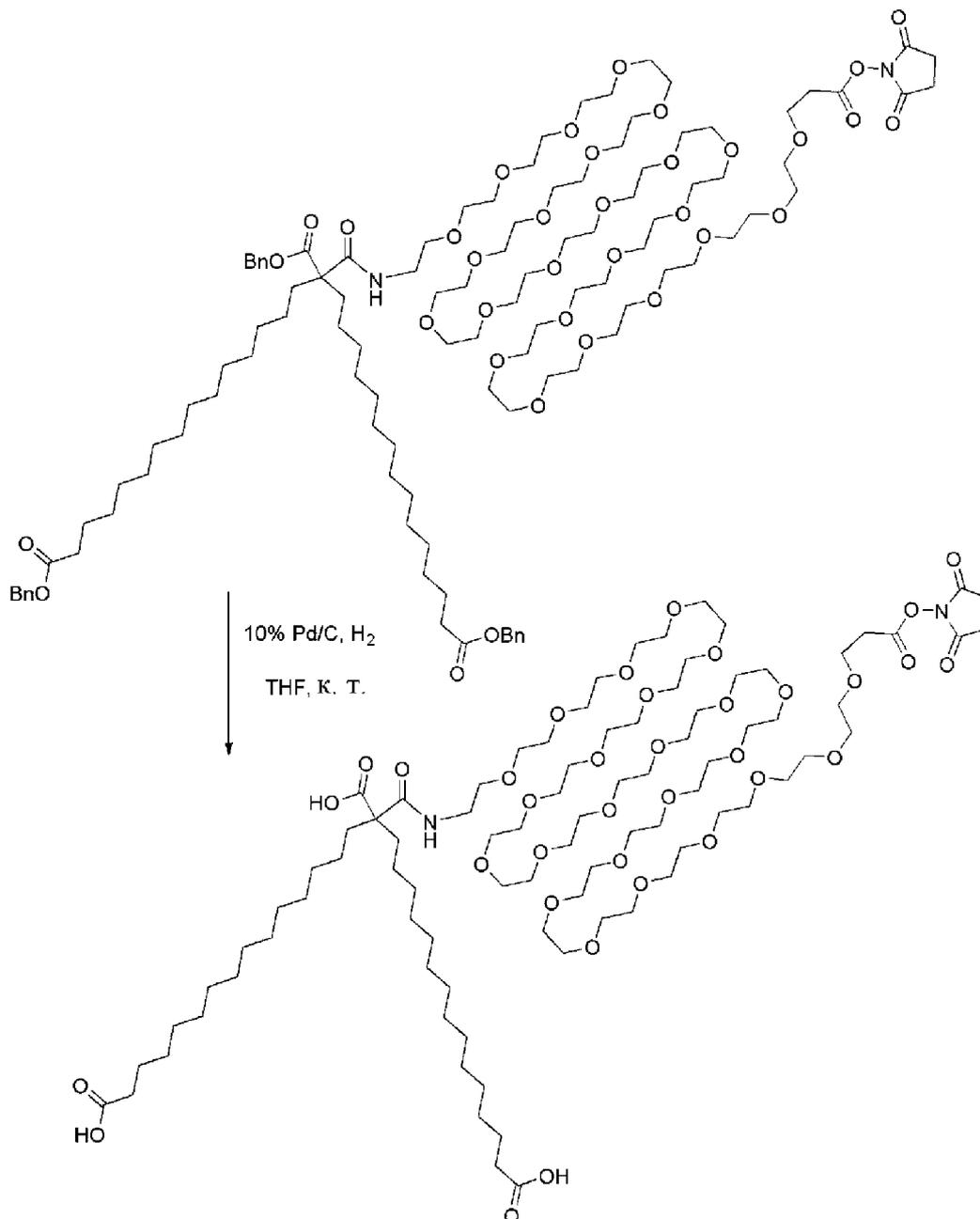
3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозоакса-75-азагеннонактан-1,77,91-трикарбоксилат



Промежуточное соединение 48 (210 мг, 0,106 ммоль) и 1-гидроксипирролидин-2,5-дион (13,4 мг, 0,116 ммоль) суспендировали в 1 мл безводного DCM с перемешиванием в высушенной в печи круглодонной колбе (RBF) объемом 10 мл. В данную смесь добавляли 1 М DCC в DCM (Aldrich, 116 мкл, 0,116 ммоль). Через 16 ч. реакция завершалась, на что указывала LC/MS. Летучие вещества удаляли и полученный осадок очищали с помощью NPLC (элюирование с помощью 0-15% MeOH в DCM, диоксид кремния, обнаружение с помощью ELSD). Фракции, содержавшие требуемый продукт, объединяли и концентрировали с получением **промежуточного соединения 49** в

виде воскообразного твердого вещества. LCMS Способ Н: Rt=3,48 мин., $[M+H_2O+2H]^{2+}=1049,9$.

Промежуточное соединение 50. 15-((75-((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)-75-оксо-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72-тетракозаоксапентагептаконтил)карбамоил)нонакозан-1,15,29-трикарбоновая кислота



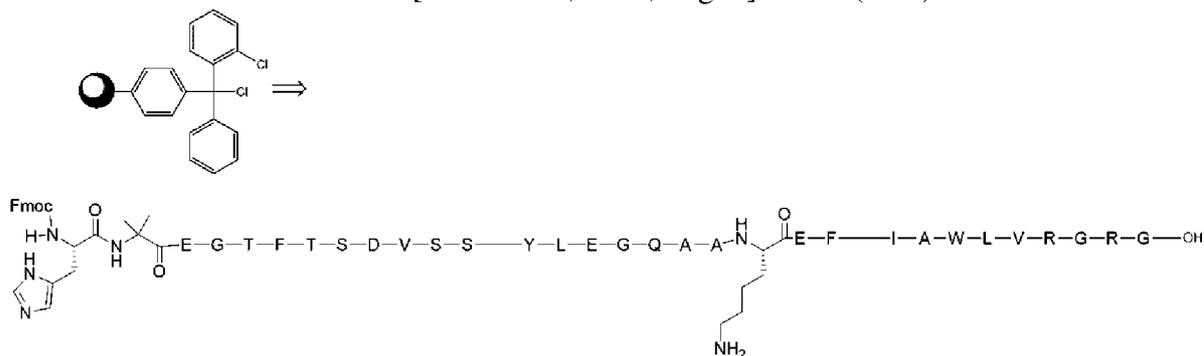
Промежуточное соединение 49 (140 мг, 0,067 ммоль) растворяли в безводном THF (1 мл) в круглодонной колбе, оснащенной якорем магнитной мешалки, и полученную смесь три раза продували с помощью N_2 . Затем добавляли сухой 10% Pd на угле (7 мг, 6,73 мкмоль) и 20% гидроксид Pd на угле (Aldrich) (5 мг, 6,73 мкмоль), и газообразную среду откачивали и заменяли водородом из баллона. Обеспечивали перемешивание реакционной смеси в течение 16 ч. Затем газообразную среду откачивали и заменяли на

N₂. Реакционную смесь разбавляли с помощью 5 мл безводного DCM. После фильтрования через Celite[®] летучие вещества удаляли с получением **промежуточного соединения 50** в виде вязкого масла. LCMS, способ D: Rt=1,36 мин., [M+2H]²⁺=906,2.

Синтез пептида

Пептиды GLP1 можно синтезировать с применением стандартных методик синтеза, например методик твердофазного синтеза пептидов, упомянутых в Jose Palomo RSC Adv., 2014, 4, 32658-32672; методик рекомбинантной ДНК, описанных в Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor (1989) и аналогичных источниках.

Синтез аналога GLP-1 [Fmoc-His7, Aib8, Arg34]GLP-1 (7-37)



Пептид синтезировали с применением стандартных химических реакций с использованием Fmoc.

1) Получение смолы К 1-хлор-2-[хлор(дифенил)метил]бензолу (100 ммоль, 1,00 экв.) добавляли Fmoc-Gly-OH (50 ммоль, 0,50 экв.) и DIEA (400 ммоль, 4,00 экв.) в DCM (4,00 мл). Полученную смесь взбалтывали в атмосфере азота в течение 2 ч. при 25°C. Затем добавляли MeOH (100 мл) и смесь взбалтывали в атмосфере азота в течение еще 30 мин. Смолу трижды промывали с помощью DMF (500 мл). Затем добавляли 20% пиперидин в DMF (500 мл) и смесь взбалтывали в атмосфере азота в течение 20 мин. при 25°C. Полученную смесь фильтровали с получением смолы. Смолу пять раз промывали с помощью DMF (500 мл), а затем фильтровали с получением смолы.

2) Сочетание Раствор DIEA (200 ммоль, 4,00 экв.), Fmoc-Arg(Pbf)-OH (100 ммоль, 2,00 экв.) и HBTU (95 ммоль, 1,90 экв.) в DMF (300 мл) добавляли к смоле и взбалтывали в атмосфере азота в течение 30 мин. при 25°C. Затем смолу трижды промывали с помощью DMF (500 мл).

3) Удаление защитной группы 20% пиперидин в DMF (500 мл) добавляли к смоле и полученную смесь взбалтывали в атмосфере азота в течение 20 мин. при 25°C. Смолу пять раз промывали с помощью DMF (500 мл) и фильтровали с получением смолы.

Затем указанные выше стадию 2 сочетания и стадию 3 удаления защитной группы повторяли с использованием последующих аминокислотных звеньев под №№ от 3 до 31 с получением GLP-1 или аналога GLP-1.

Единица измерения	Материалы	Реагенты для реакции сочетания
-------------------	-----------	--------------------------------

№		
1	Fmoc-Gly-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
2	Fmoc-Arg(Pbf)-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
3	Fmoc-Gly-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
4	Fmoc-Arg(Pbf)-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
5	Fmoc-Val-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
6	Fmoc-Leu-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
7	Fmoc-Trp(Boc)-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
8	Fmoc-Ala-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
9	Fmoc-Ile-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
10	Fmoc-Phe-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
11	Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
11	Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
12	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
13	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
14	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
15	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
15	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
16	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
17	Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
18	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
19	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
20	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
21	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
22	Fmoc-Val-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
23	Fmoc-Asp(OtBu)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
24	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
25	Fmoc-Thr(tBu)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
26	Fmoc-Phe-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
27	Fmoc-Thr(tBu)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
28	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
29	Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
30	Fmoc-Aib-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)
31	Fmoc-His(Trt)-OH (3,00 экв.)	HOAt (3,00 экв.) и DIC (3,00 экв.)

Реакцию сочетания отслеживали с помощью качественной реакции с нингидрином и смолу промывали 5 раз с помощью DMF.

Отщепление и очистка пептида

1) Буфер для отщепления (92,5% TFA/2,5% 3-меркаптопропионовой кислоты/2,5% TIS/2,5% H₂O) добавляли в колбу, содержащую пептид с защищенными боковыми цепями, при к. т., а затем перемешивали в течение 2 ч.

2) Осажденный пептид промывали холодным изопропиловым эфиром.

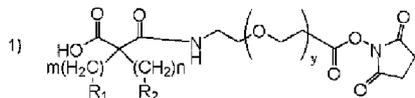
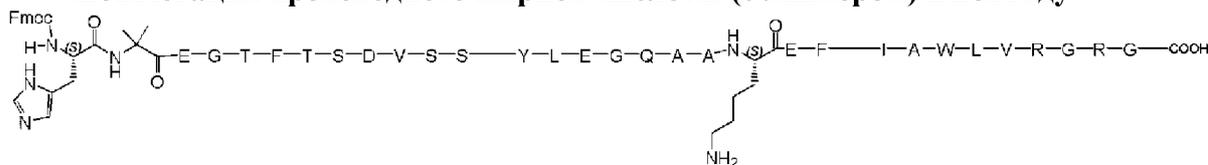
3) Осажденный пептид фильтровали и собирали осадок на фильтре.

4) Осажденный пептид промывали изопропиловым эфиром еще два раза.

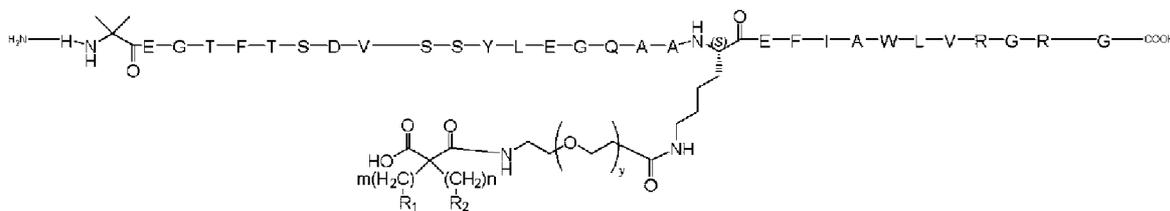
5) Затем неочищенный пептид высушивали под вакуумом в течение 2 ч.

Неочищенный пептид очищали с помощью препаративной HPLC (условие с использованием TFA; 30°C, элюирование с помощью А: 0,075% TFA в H₂O, В: CH₃CN) и очищали с помощью препаративной HPLC (условие с использованием HOAc, элюирование с помощью А: 0,5% HAc в H₂O, В: ACN) с получением [Fmoc-His7, Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37) в виде белого твердого вещества.

Конъюгация производного жирной кислоты (с линкером) к пептиду



2) Пиперидин



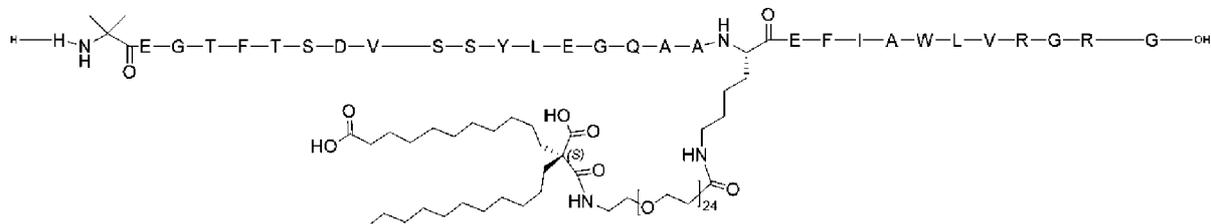
Общая процедура конъюгации к пептиду

Способ А: [Fmoc-His7, Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37) поглощали в DMA и добавляли требуемый сложный NHS-эфир 'конъюгата жирная кислота-линкер'. Обеспечивали перемешивание данной смеси при к. т. в течение 16-40 ч. Как только в анализе с помощью LCMS наблюдали полное преобразование, добавляли 10 экв. пиперидина и перемешивание продолжали в течение 2 ч. для удаления группы Fmoc.

Неочищенный продукт очищали с помощью HPLC (колонка: Waters XSelect C18 CSH, 19×150 мм; 5 микрон), элюируя с помощью 0-100% ACN в воде с 0,1% TFA в качестве модификатора (30 мл/мин.), с получением TFA-соли требуемого соединения в

соединения 1 в виде белого порошка. LCMS, способ J: наблюдаемое значение масса/заряд=2474,8447 (MH_2^{2+}), Rt: 1,16 мин.; рассчитанная масса: 4947,6750. LCMS, способ K: наблюдаемое значение масса/заряд=4948,7002 (MH^+), Rt: 2,31 мин.; рассчитанная масса: 4947,6750.

Соединение 2. Диастереомер 1



Соединение 2 синтезировали с применением общей процедуры конъюгации, способа В, и с применением **промежуточного соединения 15А** (*S*-энантиомера) в качестве исходного материала.

LCMS, способ F: наблюдаемое значение масса/заряд=1238,5 (MH_4^{4+}), Rt: 2,25 мин.; рассчитанная масса: 4947,6750.

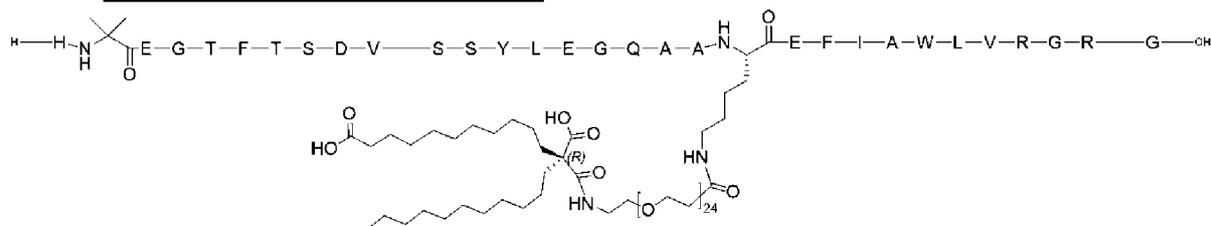
LCMS, способ K: наблюдаемое значение 4948,7002 (MH^+), Rt: 2,31 мин.; рассчитанная масса: 4947,6750.

Альтернативный способ синтеза **соединения 2**

По аналогии к реакциям, описанным для преобразования **промежуточного соединения 3** в **4**, затем в **5** и, наконец, в **промежуточное соединение 6**, альтернативный способ синтеза **соединения 2** начинается с **промежуточного соединения 3В** (*S*-энантиомера), которое преобразовывают в **4В** (= *S*-энантиомер **промежуточного соединения 4**), затем в **5В** (= *S*-энантиомер **промежуточное соединение 5**) и, наконец, в **промежуточное соединение 6В** (= *S*-энантиомер **промежуточного соединения 6**). Затем **промежуточное соединение 6В** и [Fmoc-His7, Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37) вводят в реакцию в соответствии с общей процедурой конъюгации с получением **соединения 2**.

Абсолютная конфигурация в части, представлявшей собой жирную кислоту, **соединения 2** была определена как *S* путем применения рентгеноструктурной кристаллографии монокристаллов в отношении производного энантиомерно чистого **промежуточного соединения 3В**, которое применяли в качестве исходного материала для синтеза **соединения 2**.

Соединение 3. Диастереомер 2



Соединение 3 синтезировали с применением общей процедуры конъюгации, способа В, и с применением **промежуточного соединения 15В** (*R*-энантиомера) в качестве исходного материала.

LCMS, способ F: наблюдаемое значение масса/заряд=1238,6 (MH_4^{4+}), Rt: 2,29 мин.;
рассчитанная масса: 4947,6750.

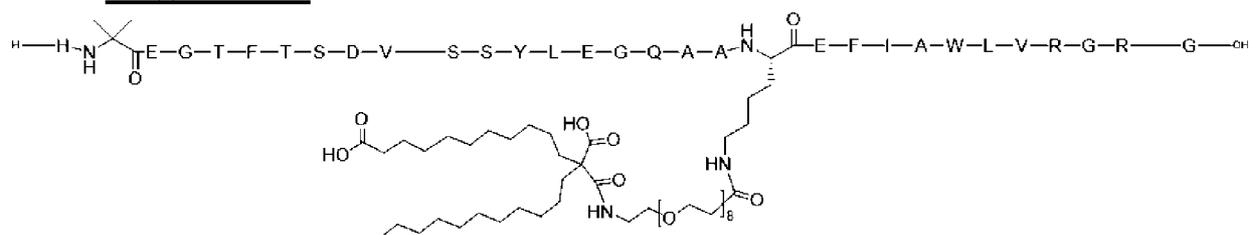
LCMS, способ K: наблюдаемое значение 4948,7002 (MH^+), Rt: 2,31 мин.;
рассчитанная масса: 4947,6750

Альтернативный способ синтеза **соединения 3**

По аналогии к реакциям, описанным для преобразования **промежуточного соединения 3** в **4**, затем в **5** и, наконец, в **промежуточное соединение 6**, альтернативный способ для **соединения 3** начинается с **промежуточного соединения 3А** (R-энантиомера), которое преобразовывают в **4А** (= R-энантиомер **промежуточного соединения 4**), затем в **5А** (= R-энантиомер **промежуточное соединение 5**) и, наконец, в **промежуточное соединение 6А** (= R-энантиомер **промежуточного соединения 6**). Затем **промежуточное соединение 6А** и [Fmoc-His7, Aib8, Arg34]GLP-1-(7-37) вводят в реакцию в соответствии с общей процедурой конъюгации с получением **соединения 3**.

Абсолютная конфигурация в части, представлявшей собой жирную кислоту, **соединения 3** была определена как R. Это определяли с помощью рентгеноструктурной кристаллографии монокристаллов в отношении производного энантимерно чистого **промежуточного соединения 3А**.

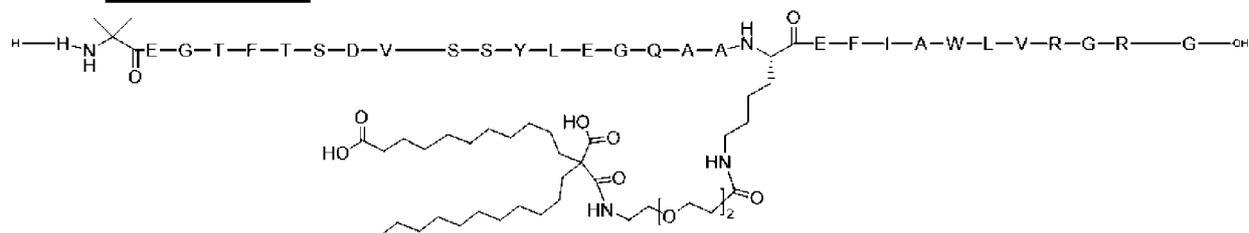
Соединение 4.



Соединение 4 синтезировали с применением общей процедуры конъюгации, способа А, с применением **промежуточного соединения 19**.

LCMS, способ F: наблюдаемое значение масса/заряд=1061,7 (MH_4^{4+}), Rt: 2,26 мин.;
рассчитанная масса: 4243,2556.

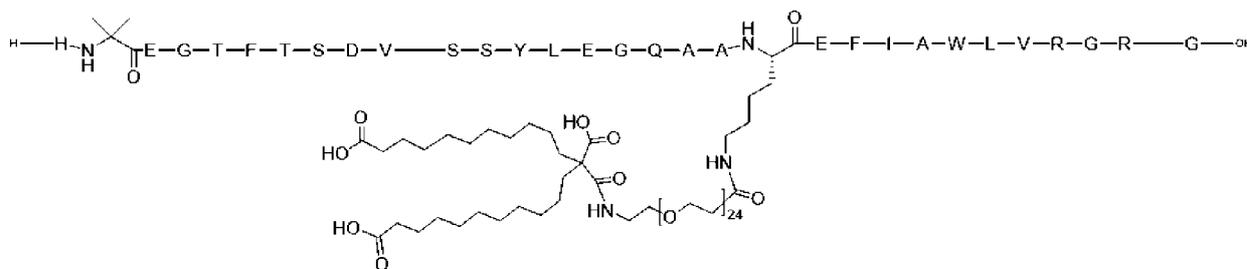
Соединение 5.



Соединение 5 синтезировали с применением общей процедуры конъюгации, способа В, с применением **промежуточного соединения 22**.

LCMS, способ F: наблюдаемое значение масса/заряд=996,6 (MH_4^{4+}), Rt: 2,34 мин.;
рассчитанная масса: 3979,0983.

Соединение 6.

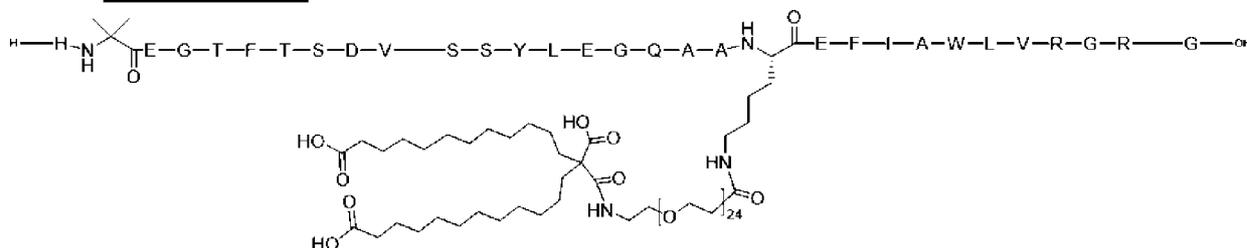


Соединение 6 синтезировали с применением общей процедуры конъюгации, способа В, с применением **промежуточного соединения 29**.

LCMS, способ F: наблюдаемое значение масса/заряд=2490,9 (MH_2^{2+}), Rt: 2,09 мин.;
рассчитанная масса: 4977,6495.

LCMS, способ K: наблюдаемое значение 4978,6602 (MH^+), Rt: 2,09 мин.;
рассчитанная масса: 4977,6495.

Соединение 7.

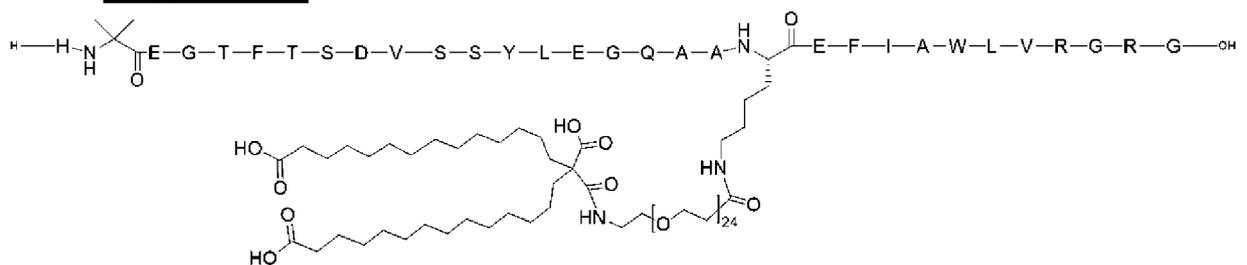


Соединение 7 синтезировали с применением общей процедуры конъюгации, способа В, с применением **промежуточного соединения 36**.

LCMS, способ F: наблюдаемое значение масса/заряд=1253,1 (MH_4^{4+}), Rt: 2,13 мин.;
рассчитанная масса: 5005,6805

LCMS, способ K: наблюдаемое значение 5006,7100 (MH^+), Rt: 2,15 мин.;
рассчитанная масса: 5005,6805

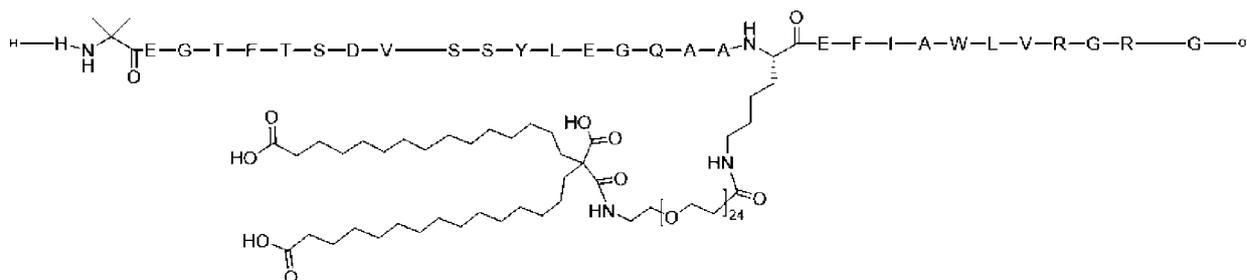
Соединение 8.



Соединение 8 синтезировали с применением общей процедуры конъюгации, способа В, с применением **промежуточного соединения 43**.

LCMS, способ K: наблюдаемое значение 5062,7700 (MH^+), Rt: 2,30 мин.;
рассчитанная масса: 5061,7431

Соединение 9.



Соединение 9 синтезировали с применением общей процедуры конъюгации, способа А, с применением **промежуточного соединения 50**.

LCMS, способ J: наблюдаемое значение масса/заряд=1274,0 (MH_4^{4+}), Rt: 1,18 мин.; рассчитанная масса: 5089,7744.

Специалистам в данной области техники будут понятны многочисленные эквиваленты конкретных вариантов осуществления, конкретно описанных в данном документе, или же путем проведения не более чем обычных экспериментов они смогут установить такие эквиваленты. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются объемом нижеследующей формулы изобретения.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 (перечень последовательностей)

GLP-1 (7-37):

SEQ ID NO: 1: His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly

SEQ ID NO: 2: Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Xaa₁₉-Xaa₂₀-Glu-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Ala-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-Xaa₃₆-Xaa₃₇

Xaa₁₆ представляет собой Val или Leu;

Xaa₁₈ представляет собой Ser, Lys или Arg;

Xaa₁₉ представляет собой Tyr или Gln;

Xaa₂₀ представляет собой Leu или Met;

Xaa₂₂ представляет собой Gly, Glu или Aib;

Xaa₂₃ представляет собой Gln, Glu, Lys или Arg;

Xaa₂₅ представляет собой Ala или Val;

Xaa₂₇ представляет собой Glu или Leu;

Xaa₃₀ представляет собой Ala, Glu или Arg;

Xaa₃₃ представляет собой Val или Lys;

Xaa₃₄ представляет собой Lys, Glu, Asn или Arg;

Xaa₃₅ представляет собой Gly или Aib;

Xaa₃₆ представляет собой Arg, Gly или Lys или отсутствует; и

Xaa₃₇ представляет собой Gly, Ala, Glu, Pro, Lys или отсутствует.

[Aib₈, Arg₃₄]GLP-1 (7-37):

SEQ ID NO: 3: His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly

[Arg₃₄]GLP-1 (7-37):

SEQ ID NO: 4: His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-
Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Тур или GIn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Leu или Met

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> GIy, Glu или Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> GIn, Glu, Lys или Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> Ala или VaI

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(21)
<223> Glu или Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Ala, Glu или Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (27)..(27)
<223> VaI или Lys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (28)..(28)
<223> Lys, Glu, Asn или Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> GIy или Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(30)
<223> Arg, GIy или Lys или отсутствует

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (31)..(31)
<223> GIy, Ala, Glu, Pro, Lys или отсутствует

<400> 2

Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Xaa
1 5 10 15

Xaa Ala Xaa Arg Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

<210> 3
<211> 31
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полипептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

<400> 3

His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 4
<211> 31
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Синтетический полипептид

<400> 4

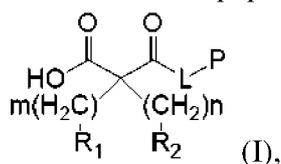
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
20 25 30

2

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль,



где

R_1 и R_2 независимо выбраны из CH_3 , OH , CO_2H , $CH=CH_2$ и $C\equiv CH$;

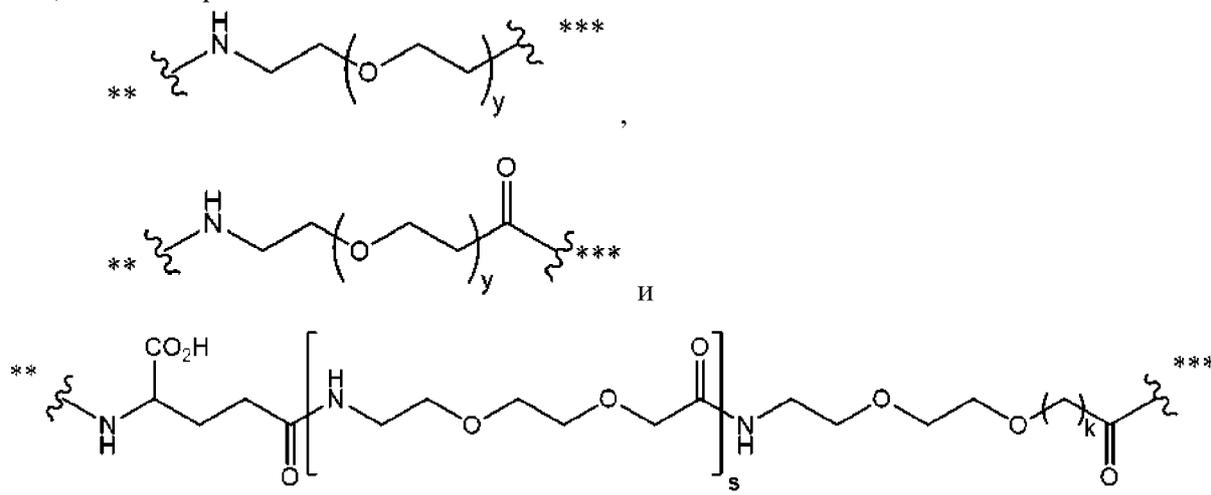
каждый из n и m представляет собой целое число, независимо выбранное из 5-30;

L представляет собой необязательный линкер;

P представляет собой GLP-1 или аналог GLP-1.

2. Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1, где P соединен с L посредством группы NH .

3. Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1 или п. 2, где L выбран из



где

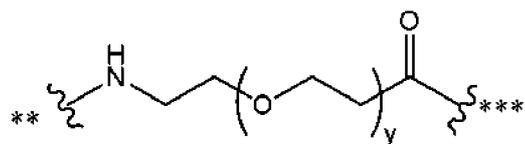
y представляет собой целое число, выбранное из 1-36,

s равняется 0, 1 или 2, и k равняется 1, 2 или 3, и

волнистая линия, обозначенная **, указывает на точку присоединения к CO -группе формулы (I), и

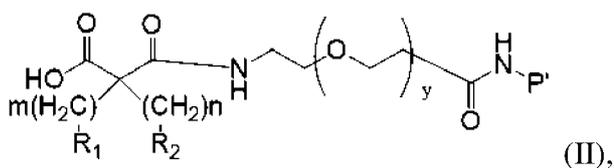
волнистая линия, обозначенная ***, указывает на точку присоединения к группе P .

4. Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль по п. 3, где L представляет собой



где y представляет собой целое число, выбранное из 1-36.

5. Соединение формулы (I) по п. 1 или п. 4, которое представляет собой соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемую соль,



где

NH-P' представляет собой группу P, которая присоединена посредством NH-фрагмента к СО-группе линкера L;

R₁ и R₂ независимо выбраны из CH₃, OH и CO₂H;

каждый из n и m представляет собой целое число, независимо выбранное из 5-30;

и

y представляет собой целое число, выбранное из 1-36.

6. Соединение формулы (II) по п. 5, где

R₁ представляет собой CO₂H, и R₂ представляет собой CH₃; n равняется 10, и m равняется 10;

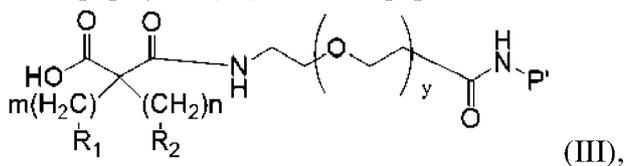
R₁ представляет собой CO₂H, и R₂ представляет собой CO₂H; n равняется 10, и m равняется 10;

R₁ представляет собой CO₂H, и R₂ представляет собой CO₂H; n равняется 10, и m равняется 11;

R₁ представляет собой CO₂H, и R₂ представляет собой CO₂H; n равняется 10, и m равняется 13; или

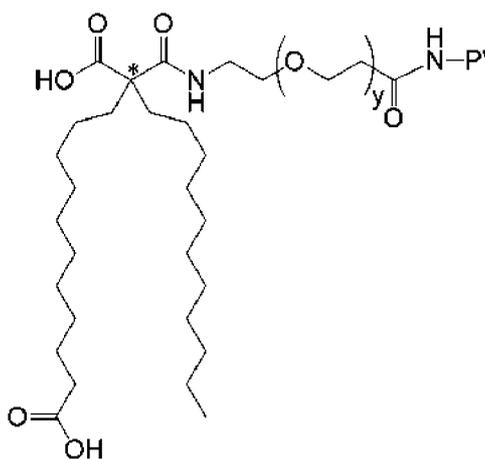
R₁ представляет собой CO₂H, и R₂ представляет собой CO₂H; n равняется 10, и m равняется 14.

7. Соединение формулы (II) по п. 5 или п. 6, которое представляет собой соединение формулы (III) или его фармацевтически приемлемую соль,



где R₁ представляет собой CO₂H, и R₂ представляет собой CH₃.

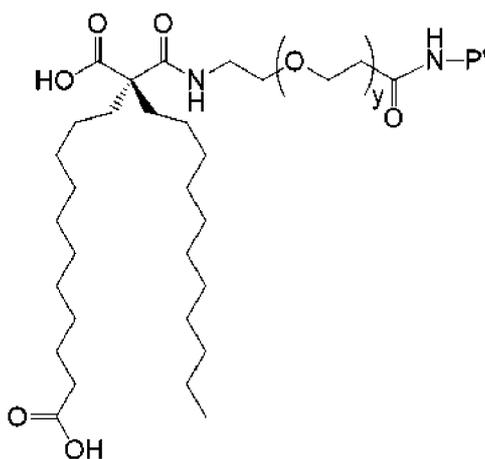
8. Соединение формулы (III) по п. 7, которое представляет собой соединение формулы (IV) или его фармацевтически приемлемую соль,



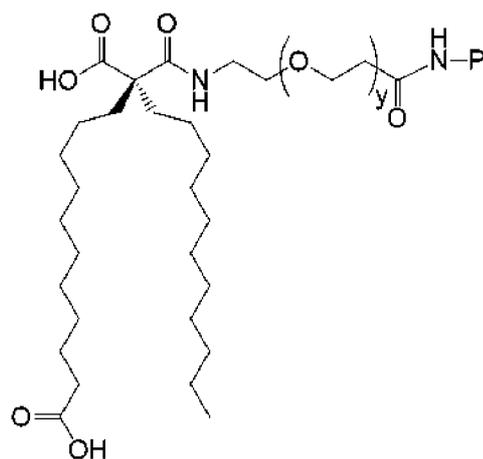
(IV),

где соединение присутствует в виде рацемата или в виде стереохимически обогащенной смеси или является стереохимически чистым в отношении атома углерода, обозначенного *.

9. Соединение формулы (IV) по п. 8, которое представляет собой соединение формулы (IVa) или соединение формулы (IVb) или их фармацевтически приемлемую соль,



(IVa)



(IVb),

где y представляет собой целое число, выбранное из 1-36.

10. Соединение формулы (IVa) или соединение формулы (IVb) по п. 9, где y представляет собой целое число, выбранное из 2-24.

11. Соединение формулы (IVa) или соединение формулы (IVb) по п. 10, где y равняется 24.

12. Соединение по любому из пп. 1-11 или его фармацевтически приемлемая соль, где P выбран из

GLP-1 (7-37): His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg-Gly (SEQ ID NO:1), и аналога GLP-1, содержащего неприродный аминокислотный остаток в положении 7, или в положении 8, или в положении 7 и 8 по сравнению с последовательностью GLP-1 (7-37).

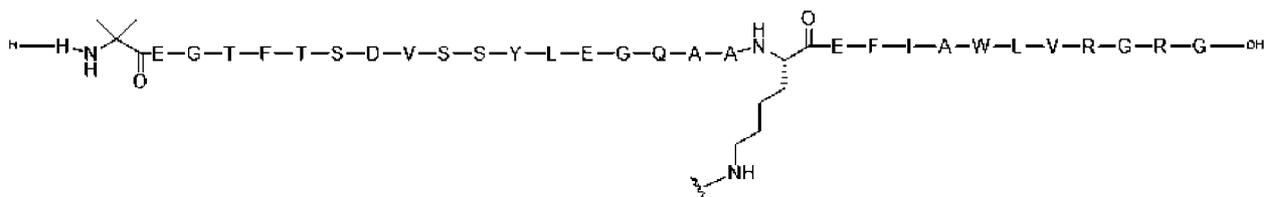
13. Соединение формулы (I) по любому из пп. 1-11 или его фармацевтически приемлемая соль, где P выбран из

[Aib8, Arg34]GLP-1 (7-37): His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly (SEQ ID NO:3); и

[Arg34]GLP-1 (7-37): His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly (SEQ ID NO:4).

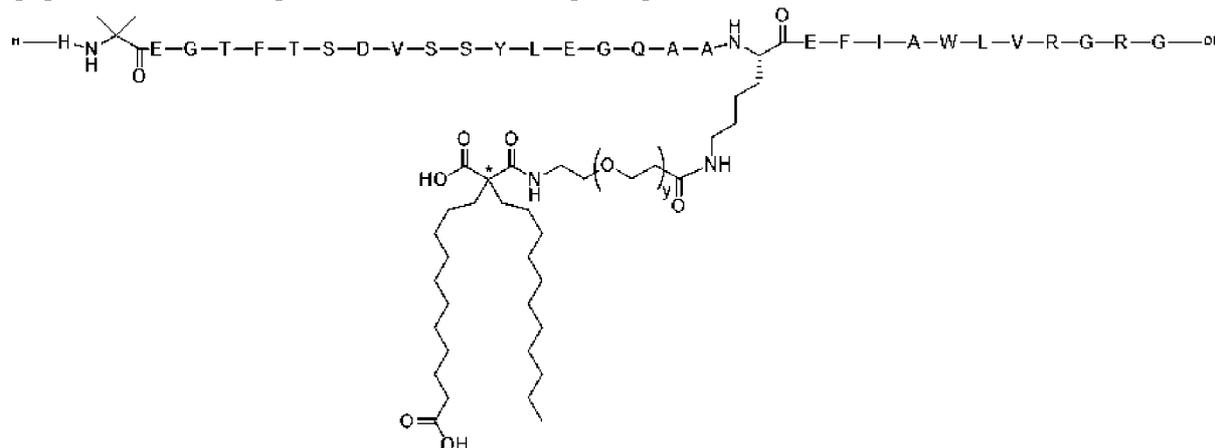
14. Соединение формулы (I) по любому из пп. 1-11 или его фармацевтически приемлемая соль, где Р представляет собой [Aib8, Arg34]GLP-1 (7-37),

показанный ниже:



и где волнистая линия при аминокислотном члене Lys указывает на точку присоединения к L.

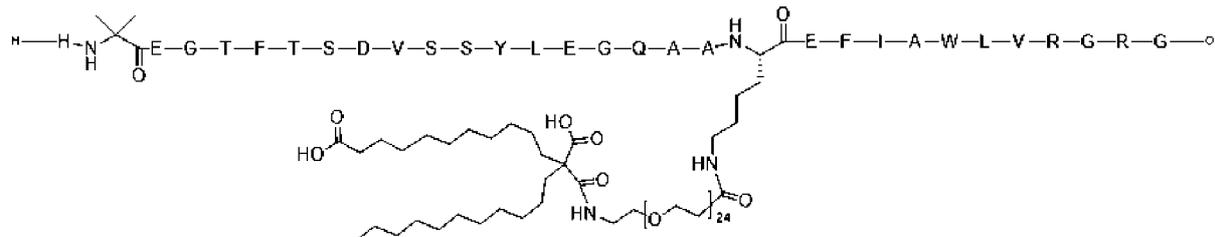
15. Соединение формулы (I) по любому из пп. 1-11 и п. 14, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



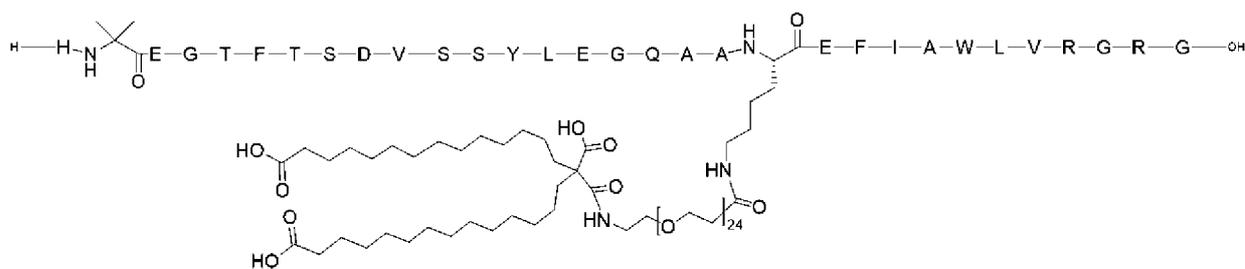
где у представляет собой целое число, выбранное из 1-36; и

где соединение присутствует в виде смеси диастереомеров, стереохимически обогащенной смеси или является стереохимически чистым в отношении атома углерода, обозначенного *.

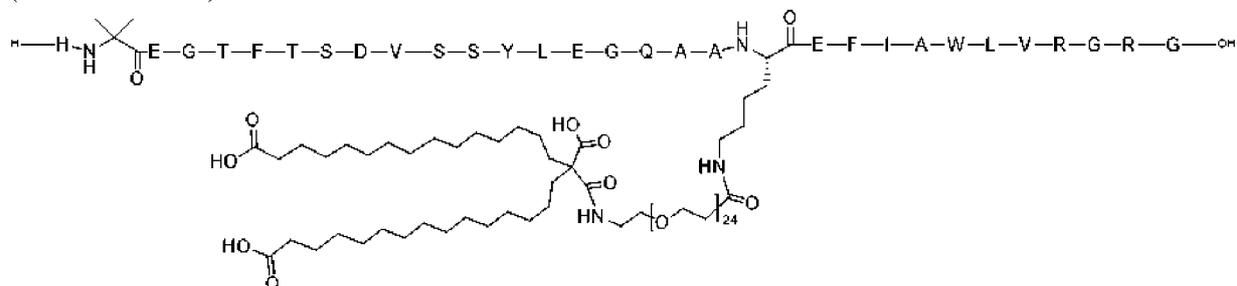
16. Соединение формулы (I) по любому из пп. 1-11 и п. 15, или его фармацевтически приемлемая соль, которое выбрано из



(Соединение 1),

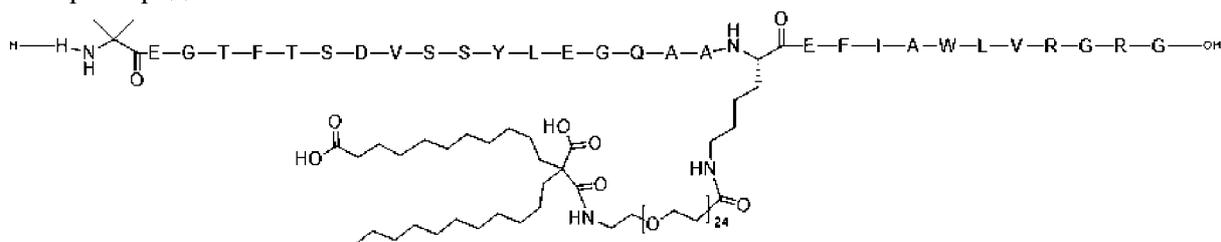


(Соединение 8) и

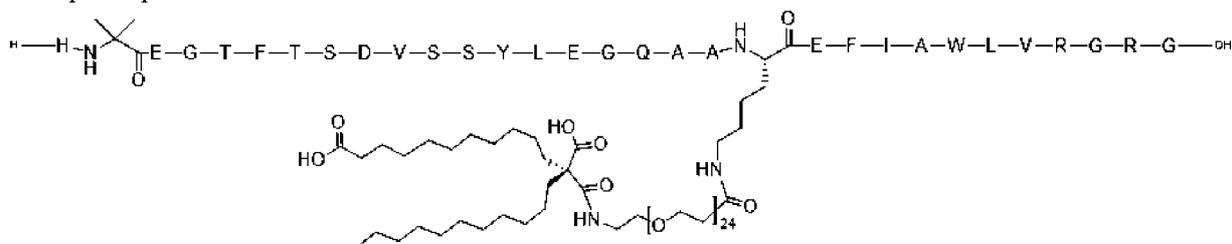


(Соединение 9).

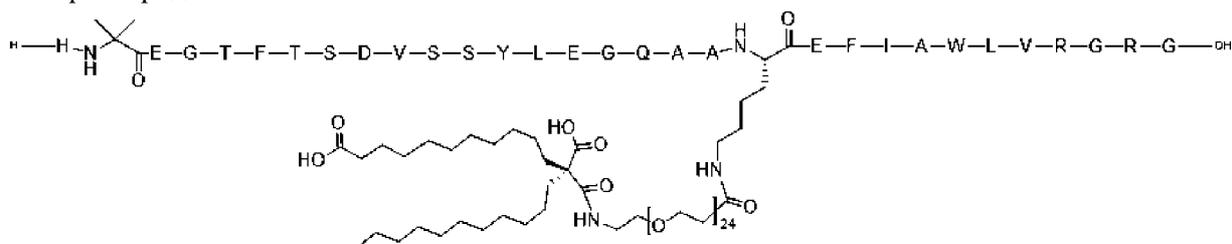
17. Соединение формулы (I) по п. 16, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



18. Соединение формулы (I) по п. 16, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



19. Соединение формулы (I) по п. 16, или его фармацевтически приемлемая соль, которое представляет собой



20. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-19 или его фармацевтически приемлемую соль и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

21. Комбинация, содержащая терапевтически эффективное количество соединения по любому из пп. 1-19 или его фармацевтически приемлемой соли и одно или несколько терапевтически активных средств.

22. Комбинация по п. 21, где соединение выбрано из соединения 1, 2 и 3.

23. Соединение по любому из пп. 1-19 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в качестве лекарственного препарата.

24. Соединение по любому из пп. 1-19 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении заболевания или нарушения, выбранных из ожирения, сахарного диабета 2-го типа, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, одного или нескольких осложнений диабета, выбранных из хронического заболевания почек и диабетической нефропатии, дислипидемии, метаболического синдрома, прогрессирующего заболевания печени, выбранного из NAFLD и NASH, сердечно-сосудистого заболевания и периферической невропатии, ассоциированной с диабетом.

25. Соединение для применения по п. 24, где сердечно-сосудистое заболевание выбрано из гипертензии, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, кардиомиопатии, фибрилляции предсердий, сердечной недостаточности, выбранной из сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса (HFrEF), сердечной недостаточности с промежуточной фракцией выброса (HFmrEF) и сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), коронарного заболевания сердца и видов аритмии, выбранных из видов предсердной аритмии и видов желудочковой аритмии.

26. Соединение для применения по любому из пп. 23-25, где соединение выбрано из соединения 1, 2 и 3.

27. Способ лечения пациента, нуждающегося в терапии, который является восприимчивым к агонисту рецептора глюкагоноподобного пептида 1 (GLP1R), включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-19 или его фармацевтически приемлемой соли.

28. Способ лечения заболевания или нарушения, выбранных из ожирения, сахарного диабета 2-го типа, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, одного или нескольких осложнений диабета, выбранных из хронического заболевания почек и диабетической нефропатии, дислипидемии, метаболического синдрома, прогрессирующего заболевания печени, выбранного из NAFLD и NASH, сердечно-сосудистого заболевания и периферической невропатии, ассоциированной с диабетом, у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-19 или его фармацевтически приемлемой соли.

29. Способ по п. 28, где сердечно-сосудистое заболевание выбрано из гипертензии, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, кардиомиопатии, фибрилляции предсердий, сердечной недостаточности, выбранной из сердечной

недостаточности со сниженной фракцией выброса (HFGrEF), сердечной недостаточности с промежуточной фракцией выброса (HFmrEF) и сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (HFpEF), коронарного заболевания сердца и видов аритмии, выбранных из видов предсердной аритмии и видов желудочковой аритмии.

30. Способ по п. 28 или п. 29, где соединение выбрано из соединения 1, 2 и 3.

По доверенности