

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391620 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.25

(22) Дата подачи заявки
2021.12.02

(51) Int. Cl. C07K 14/605 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(54) ЛАКТАМ-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

(31) 202011409947.X; 202011402979.7;
202110432060.0; 202110587056.1

(32) 2020.12.02; 2020.12.02; 2021.04.21;
2021.05.27

(33) CN

(86) PCT/CN2021/135180

(87) WO 2022/117056 2022.06.09

(71) Заявитель:

ДУНБАО ПЕРЦЛ СТАР (ХАНЧЖОУ)
БИОФАРМАСЬЮТИКАЛС КО., ЛТД.
(CN)

(72) Изобретатель:

Пань Чжисян, Цзян Чжигань, Хэ
Хайин, Ху Гопин, Ли Цзянь, Чэнь
Шухуэй (CN)

(74) Представитель:

Кузнецова С.А. (RU)

(57) Класс лактам-модифицированных полипептидных соединений и их применение в получении лекарственного средства для лечения родственных заболеваний.

A1

202391620

202391620

A1

ЛАКТАМ-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет следующих заявок:

CN202011402979.7, дата подачи – 02 декабря 2020 г.;

CN202011409947.X, дата подачи – 02 декабря 2020 г.;

CN202110432060.0, дата подачи – 21 апреля 2021 г.;

CN202110587056.1, дата подачи – 27 мая 2021 г.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение относится к классу полипептидных соединений, содержащих лактамную модификацию, и к их применению в изготовлении лекарственного препарата для лечения родственных заболеваний.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Согласно оценкам, в Китае имеется 110 миллионов диабетиков, что составляет 24% диабетиков в мире. С развитием экономики и изменениями образа жизни распространенность диабета в Китае повысилась до 12,8% (до 19,9% в некоторых провинциях и городах), что сопровождается ожирением или сердечно-сосудистым заболеванием (CVD). В недавних исследованиях было обнаружено, что двойной агонист глюкозозависимого инсулинотропного пептида (GIP)/глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1) можно использовать для лечения диабета.

[0004] GLP-1 играет роль в защите островных β -клеток в островках и эффективно контролирует уровень постпрандиальной глюкозы в крови путем стимуляции высвобождения инсулина островными β -клетками глюкозозависимым образом. Вследствие уникального механизма действия GLP-1 риск гипогликемии сильно снижается. Хотя агонисты GLP-1R продемонстрировали превосходный эффект снижения уровня глюкозы в клинической практике, все еще существует множество

диабетиков с диабетом 2 типа, которые не достигли своих целей в отношении гликемического контроля и веса. Таким образом, комбинирование GLP-1R с другими мишенями, снижающими уровень глюкозы, такими как GIP, для лечения диабета 2 типа является безотлагательной и перспективной потребностью. GIP представляет собой полипептид, секретируемый нейроэндокринными К-клетками тонкого кишечника, и физиологические действия GIP опосредованы GIPR, включая не зависящие от глюкозы инсулинотропные эффекты, стимуляцию секреции глюкагона, повышение метаболизма липидов и т. п. Хотя благоприятные эффекты агонистов GIPR кажутся ослабленными в гипергликемических симптомах у диабетиков с диабетом 2 типа, исследования продемонстрировали, что сниженный инсулинотропный эффект GIP можно полностью восстановить после периода нормализации уровней глюкозы в плазме крови. Это указывает на то, что коагонизм GLP-1R/GIPR способен оказывать синергический эффект снижения уровня глюкозы. Двойной агонист GIP и GLP-1 характеризуется синергическим эффектом на регуляцию метаболизма глюкозы/липидов и характеризуется лучшими терапевтическими эффектами на снижение уровня глюкозы в крови, снижение веса тела и уменьшение количества жира в печени.

СОДЕРЖАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Настоящее изобретение предусматривает соединение, представленное следующей формулой, или его фармацевтически приемлемую соль,

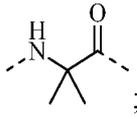
SEQ ID NO1: YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹AZ₀K₀ Z₁FZ₂E₀W LZ₃AGG PSSGA PPPS₀,

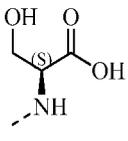
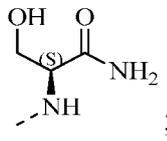
SEQ ID NO2: YAibEGT FTSDY SIAibLD KE₀AQK₀ AFVK¹W LIAGG PSSGA PPPS₀,

SEQ ID NO3: YAibEGT FTSDY SIE₀LD KK₀AQK¹ AFVQW LIAGG PSSGA PPPS₀,

SEQ ID NO4: YAibEGT FTSDY SIE₀LD K₀IAQK¹ AFVQW LIAGG PSSGA PPPS₀,

[0006] где

[0007] Aib характеризуется структурой  ;

[0008] S₀ выбран из  и  ;

[0009] Z₀ выбран из глутамина (Q) и аспарагина (N);

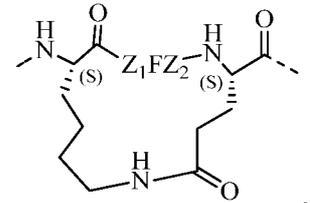
[0010] Z₁ выбран из аланина (A) и глутаминовой кислоты (E);

[0011] Z₂ выбран из валина (V) и изолейцина (I);

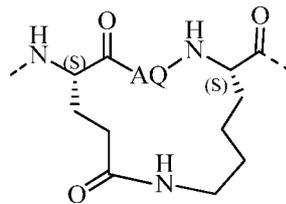
[0012] Z₃ выбран из изолейцина (I) и лейцина (L);

[0013] E₀ и K₀ означают, что карбоксильная группа на боковой цепи глутаминовой кислоты и аминогруппа при боковой цепи лизина совместно образуют лактамную

структуру, и в этом случае K₀Z₁FZ₂E₀ характеризуется структурой

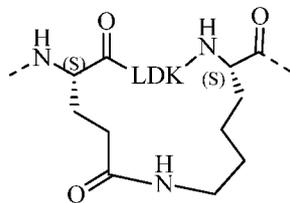


E₀AQK₀ характеризуется структурой

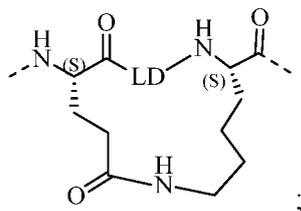


, E₀LDKK₀ характеризуется

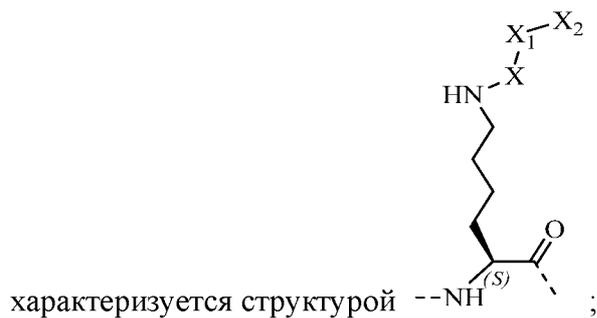
структурой



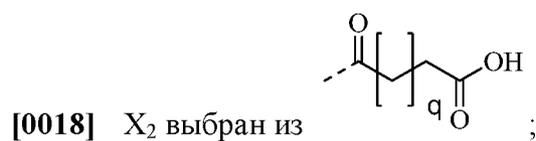
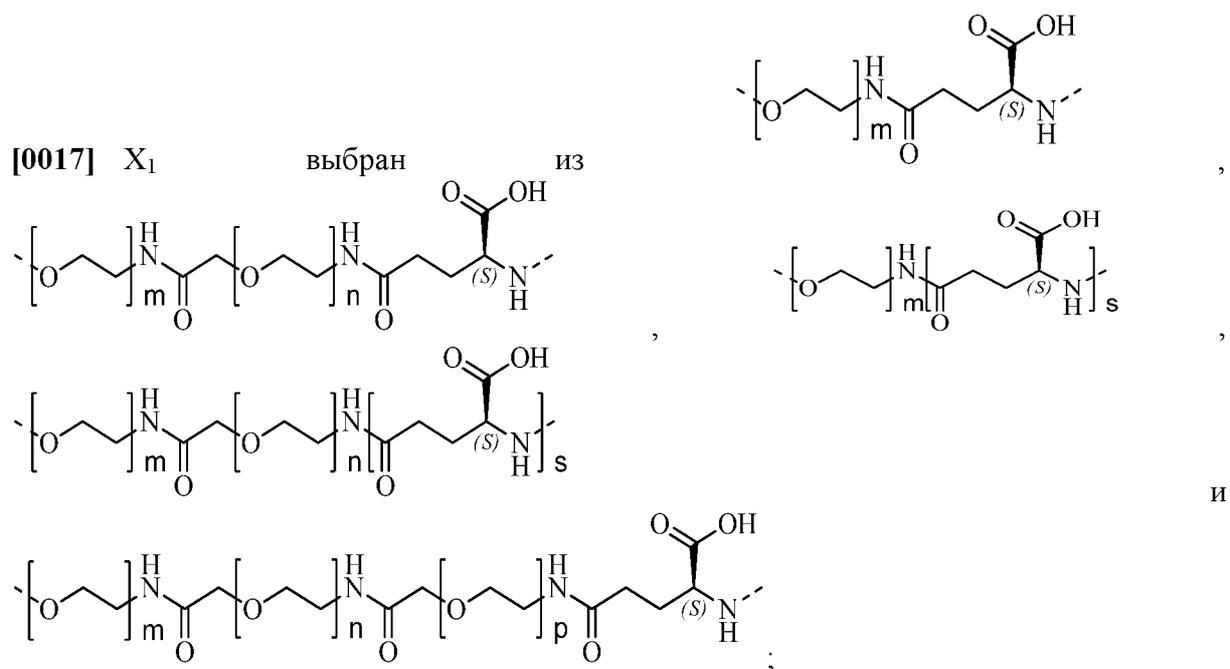
, и E₀LDK₀ характеризуется структурой



[0014] К¹ означает, что аминогруппа при боковой цепи лизина соединена с -X-X₁-X₂ и



[0016] каждый из R₁ и R₂ независимо выбран из H и CH₃;

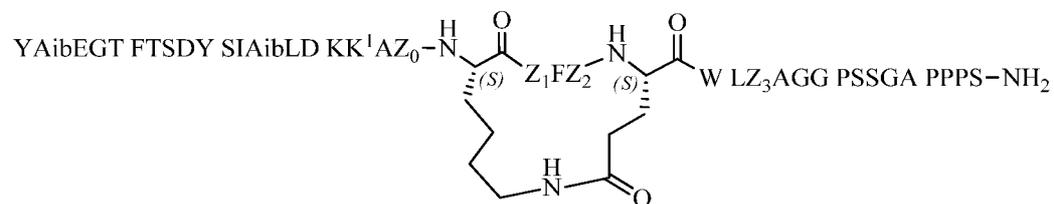


[0019] каждый из m, n и p независимо выбран из 2 и 3;

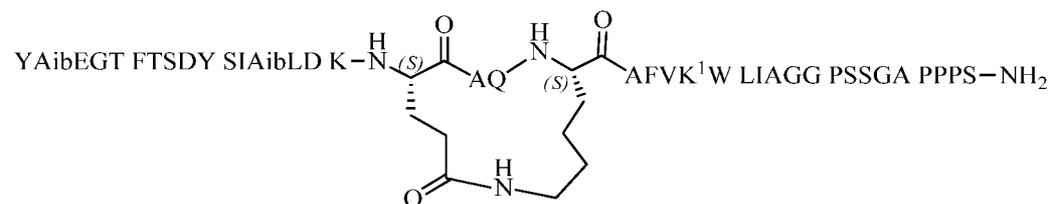
[0020] s выбран из 2 и 3;

[0021] q выбран из 15, 16, 17, 18 и 19.

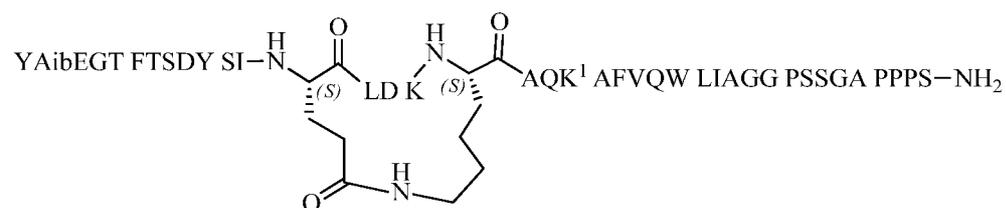
[0022] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения соединение или его фармацевтически приемлемая соль выбраны из:



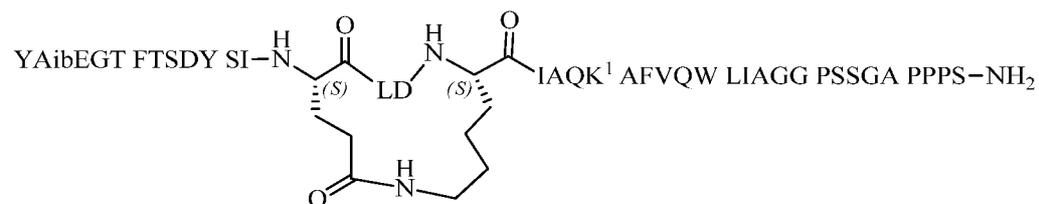
(P-1),



(P-2),



(P-3),



(P-4),

[0023] где

[0024] Aib, Z₀, Z₁, Z₂, Z₃ и K¹ являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0025] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X выбран из -C(=O)-CH₂-, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем

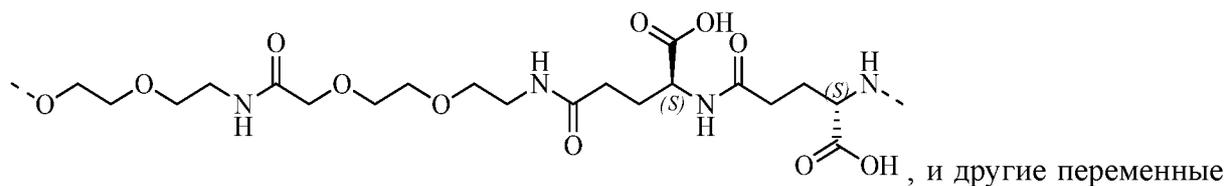
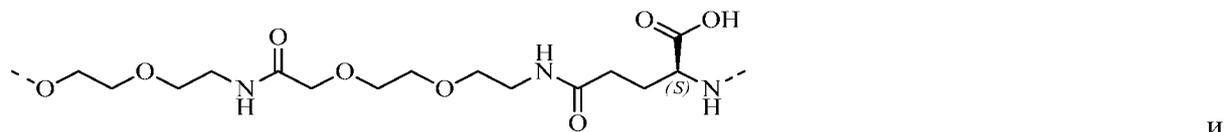
изобретении.

[0026] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения каждый из m , n и r независимо выбран из 2, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0027] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения s выбран из 2, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

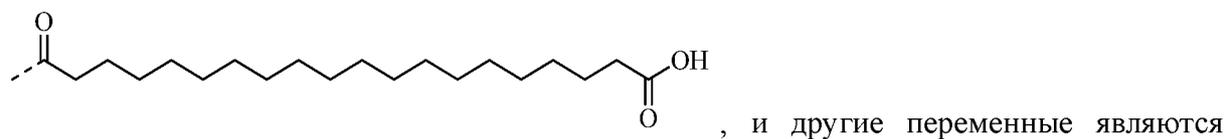
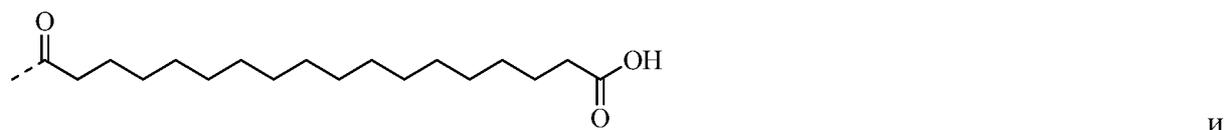
[0028] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения q выбран из 15 и 17, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0029] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X_1 выбран из



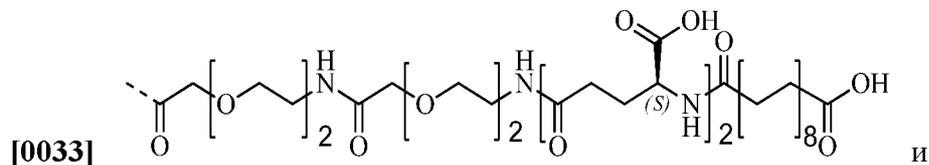
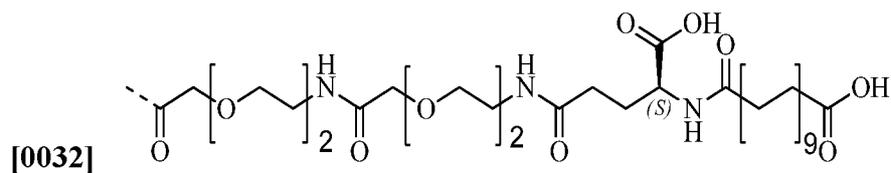
являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0030] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X_2 выбран из



такими, как определено в настоящем изобретении.

[0031] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения $-X-X_1-X_2$ выбран из



[0035] Настоящее изобретение предусматривает соединение, представленное следующей формулой, или его фармацевтически приемлемую соль,

YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹AQK₀ AFVE₀W LIAGG PSSGA PPPS₀,

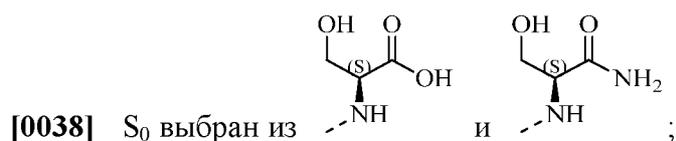
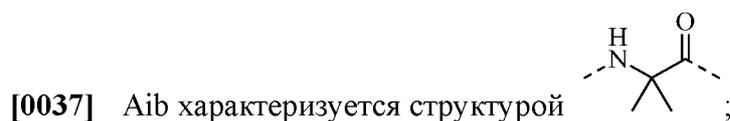
YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹ANK₀ AFVE₀W LIAGG PSSGA PPPS₀,

YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹AQK₀ EFVE₀W LIAGG PSSGA PPPS₀,

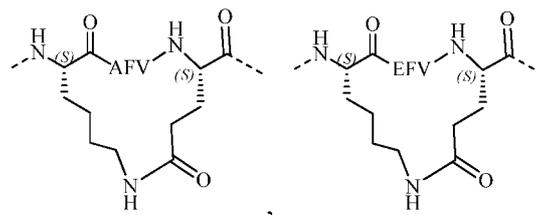
YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹AQK₀ AFIE₀W LIAGG PSSGA PPPS₀,

YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹AQK₀ AFVE₀W LLAGG PSSGA PPPS₀,

[0036] где

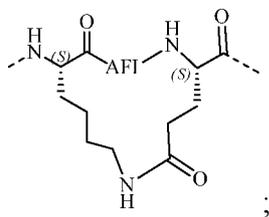


[0039] K₀ и E₀ означают, что аминогруппа при боковой цепи лизина и карбоксильная группа при боковой цепи глутаминовой кислоты совместно образуют лактамную

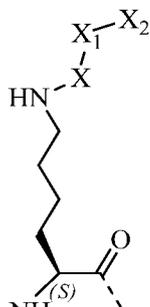


структуру и характеризуются структурой

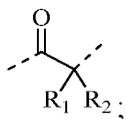
или



[0040] K^1 означает, что аминогруппа при боковой цепи лизина соединена с $-X-X_1-X_2$ и

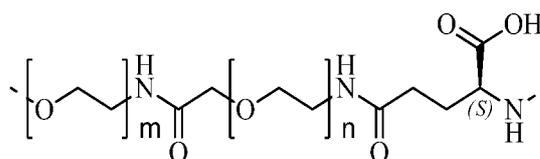


характеризуется структурой $--NH$;



[0041] X выбран из

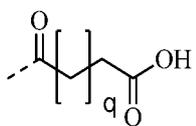
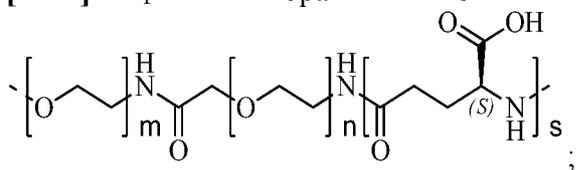
[0042] каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из H;



[0043] X_1 выбран

из

и



[0044] X_2 выбран из

[0045] каждый из m и n независимо выбран из 2 и 3;

[0046] s выбран из 2 и 3;

[0047] q выбран из 15, 16, 17, 18 и 19.

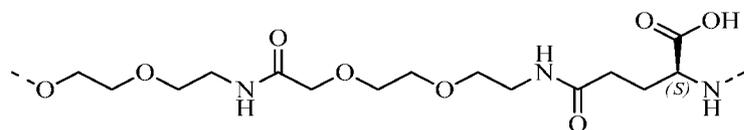
[0048] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X выбран из -C(=O)-CH₂-, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0049] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения каждый из m и n независимо выбран из 2, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

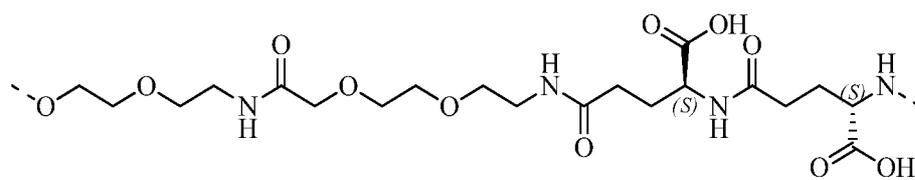
[0050] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения s выбран из 2, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0051] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения q выбран из 15 и 17, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0052] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X₁ выбран из



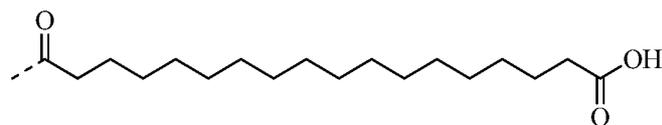
и



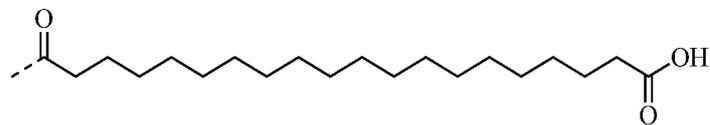
, и другие

переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0053] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X₂ выбран из



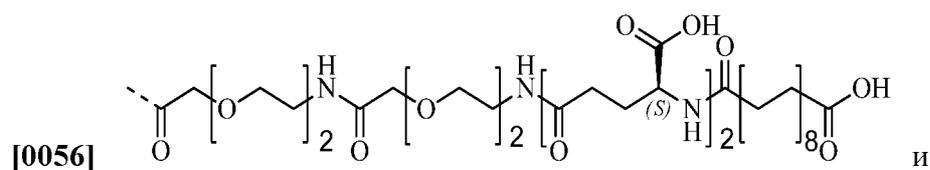
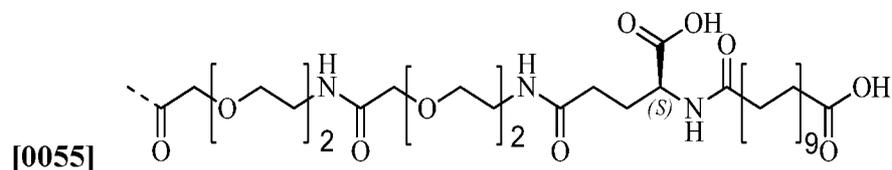
и



, и другие переменные являются

такими, как определено в настоящем изобретении.

[0054] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения -X-X₁-X₂ выбран из



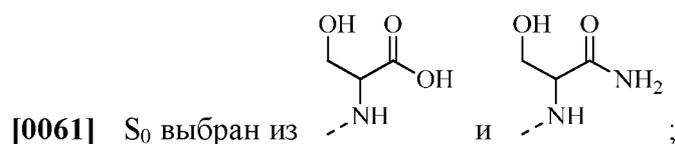
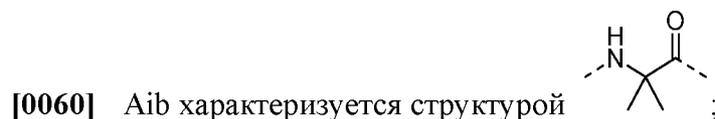
[0058] Настоящее изобретение предусматривает соединение, представленное следующей формулой, или его фармацевтически приемлемую соль,

YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹AZ₀K₀ Z₁FZ₂E₀W LZ₃AGG PSSGA PPPS₀,

YAibEGT FTSDY SIAibLD KE₀AQK₀ AFVK¹W LIAGG PSSGA PPPS₀,

YAibEGT FTSDY SIE₀LD KK₀AQK¹AFVQW LIAGG PSSGA PPPS₀,

[0059] где



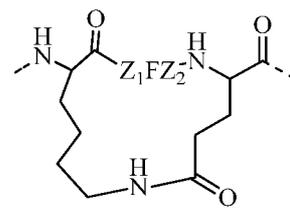
[0062] Z₀ выбран из глутамина (Q) и аспарагина (N);

[0063] Z_1 выбран из аланина (A) и глутаминовой кислоты (E);

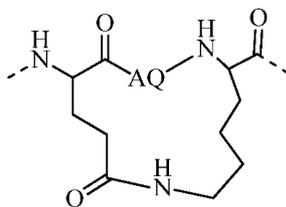
[0064] Z_2 выбран из валина (V) и изолейцина (I);

[0065] Z_3 выбран из изолейцина (I) и лейцина (L);

[0066] E_0 и K_0 означают, что карбоксильная группа при боковой цепи глутаминовой кислоты и аминогруппа при боковой цепи лизина совместно образуют лактамную

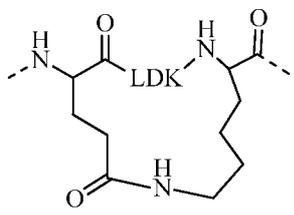


структуру, и в этом случае $K_0Z_1FZ_2E_0$ характеризуется структурой



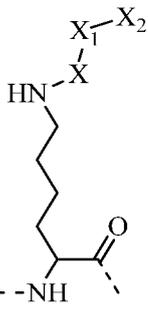
E_0AQK_0 характеризуется структурой

, E_0LDKK_0 характеризуется

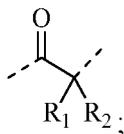


структурой ;

[0067] K^1 означает, что аминогруппа при боковой цепи лизина соединена с $-X-X_1-X_2$ и



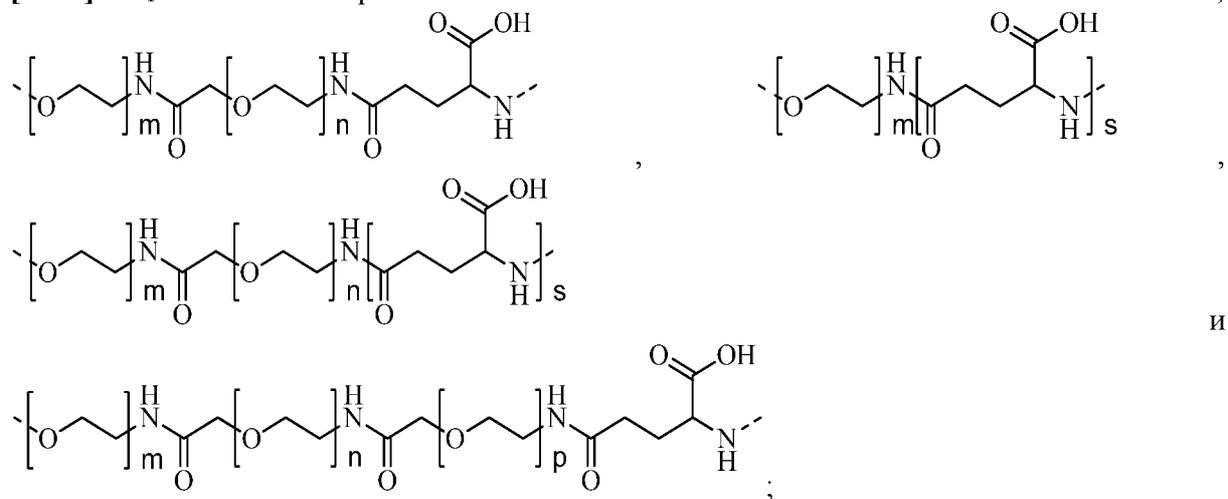
характеризуется структурой --NH ;



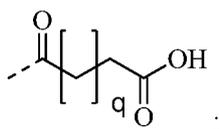
[0068] X выбран из

[0069] каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из H;

[0070] X_1 выбран из



[0071] X_2 выбран из



[0072] каждый из m , n и p независимо выбран из 2 и 3;

[0073] s независимо выбран из 2 и 3;

[0074] q независимо выбран из 15, 16, 17, 18 и 19.

[0075] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X выбран из $-C(=O)-CH_2-$, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

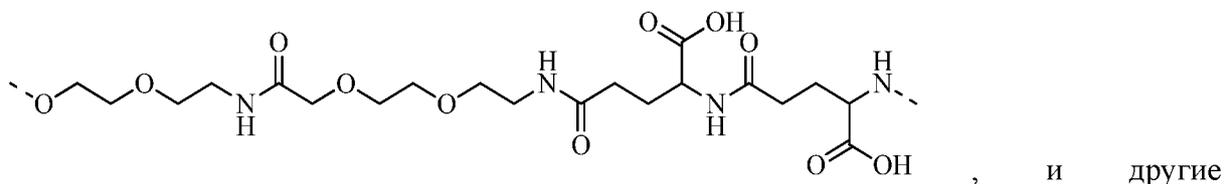
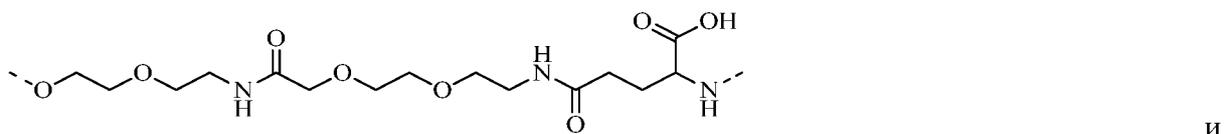
[0076] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения каждый из m , n и p независимо выбран из 2, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0077] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения s независимо выбран из 2, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0078] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения q независимо выбран из 15 и 17, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

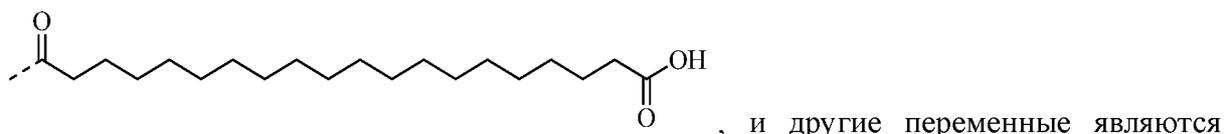
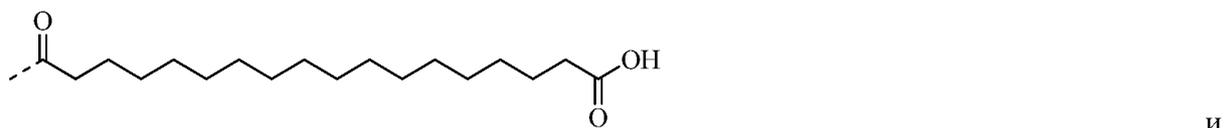
[0079] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения q независимо выбран из 17, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0080] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X₁ выбран из



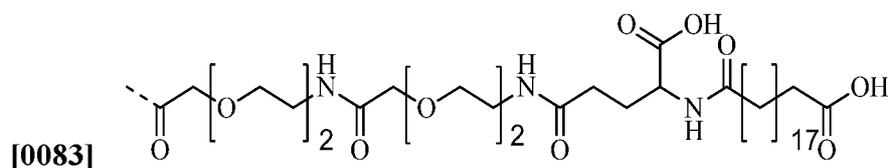
переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

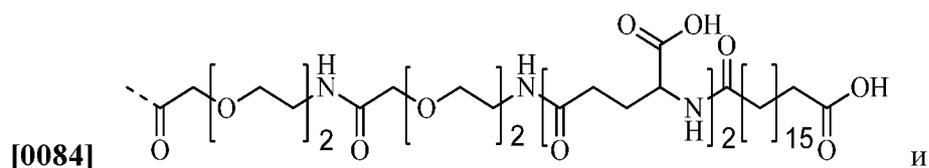
[0081] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X₂ выбран из



такими, как определено в настоящем изобретении.

[0082] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения -X-X₁-X₂ выбран из

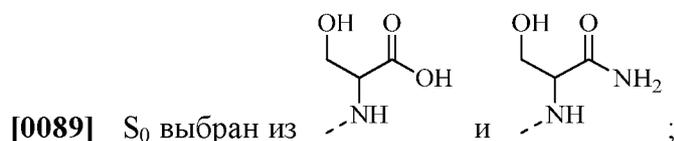
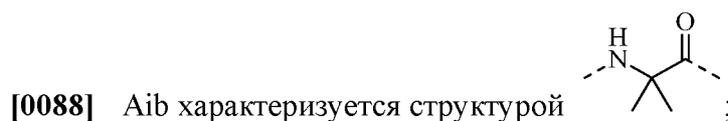




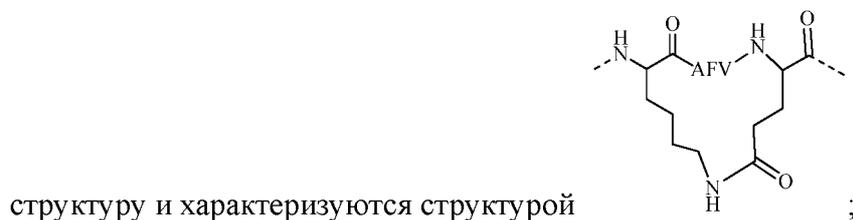
[0086] Настоящее изобретение предусматривает соединение, представленное следующей формулой, или его фармацевтически приемлемую соль,



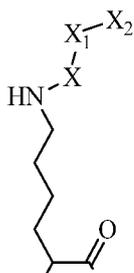
[0087] где



[0090] K₀ и E₀ означают, что аминогруппа при боковой цепи лизина и карбоксильная группа при боковой цепи глутаминовой кислоты совместно образуют лактамную



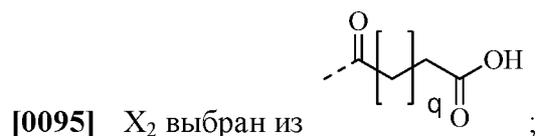
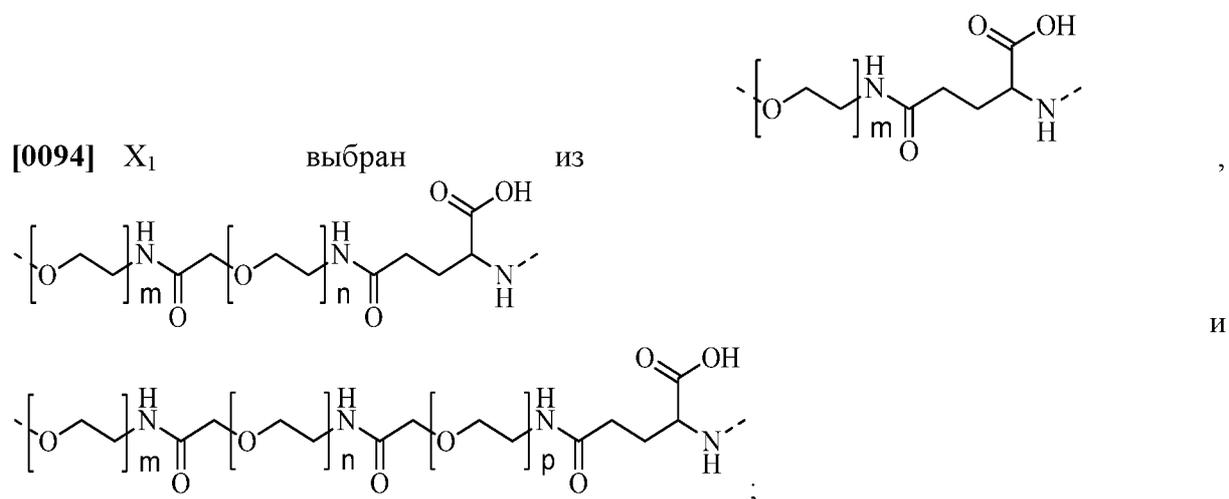
[0091] K¹ означает, что аминогруппа при боковой цепи лизина соединена с -X-X₁-X₂ и



характеризуется структурой ---NH--- ;



[0093] каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из H;



[0096] каждый из m , n и p независимо выбран из 2 и 3;

[0097] q независимо выбран из 15, 16, 17, 18 и 19.

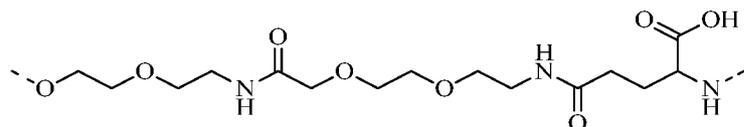
[0098] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X выбран из $\text{-C(=O)-CH}_2\text{-}$, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0099] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения каждый из m , n и p независимо выбран из 2, и другие переменные являются такими, как определено в

настоящем изобретении.

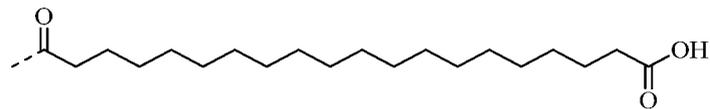
[0100] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения φ независимо выбран из 17, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0101] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X_1 выбран из



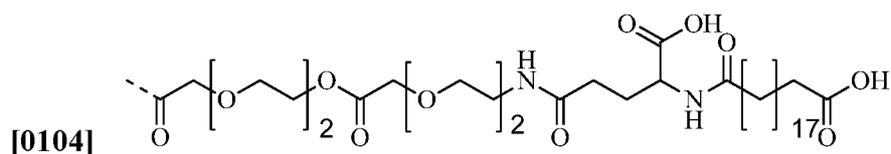
, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0102] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X_2 выбран из



, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0103] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения $-X-X_1-X_2$ выбран из



[0104] , и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

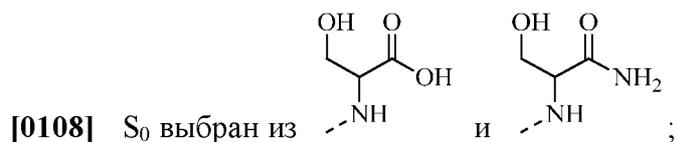
[0105] Настоящее изобретение предусматривает соединение, представленное следующей формулой, или его фармацевтически приемлемую соль,

YAibEGT FTSDY SIE₀LD K₀IAQK¹ AFVQW LIAGG PSSGA PPPS₀,

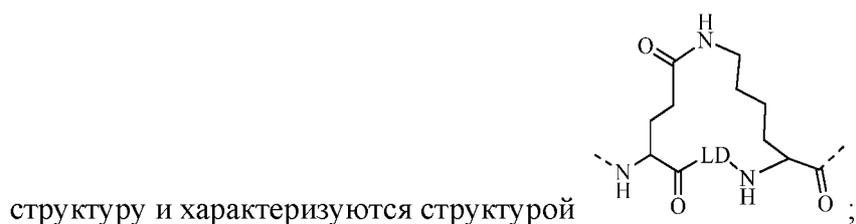
[0106] где

[0107] Aib характеризуется структурой ;

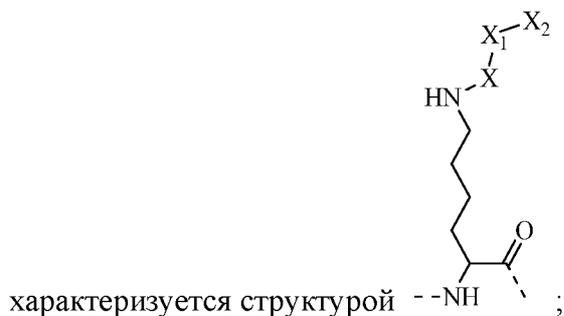
The structure shows the Aib residue, which is a tert-butylglycine derivative. It consists of a central carbon atom bonded to a nitrogen atom (with a hydrogen atom attached), a carbonyl group (C=O), and two methyl groups. Dashed lines indicate the continuation of the polymer chain.



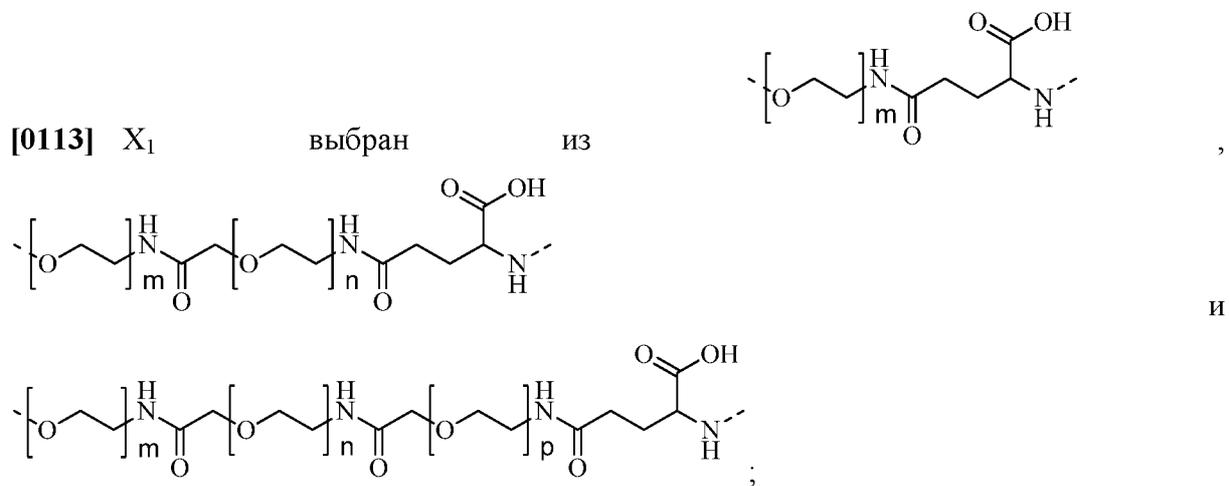
[0109] E₀ и K₀ означают, что карбоксильная группа при боковой цепи глутаминовой кислоты и аминогруппа при боковой цепи лизина совместно образуют лактамную

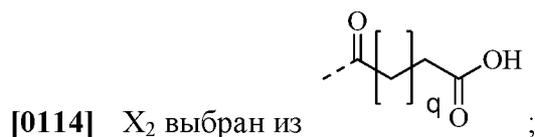


[0110] K¹ означает, что аминогруппа при боковой цепи лизина соединена с -X-X₁-X₂ и



[0112] каждый из R₁ и R₂ независимо выбран из H;





[0115] каждый из m, n и p независимо выбран из 2 и 3;

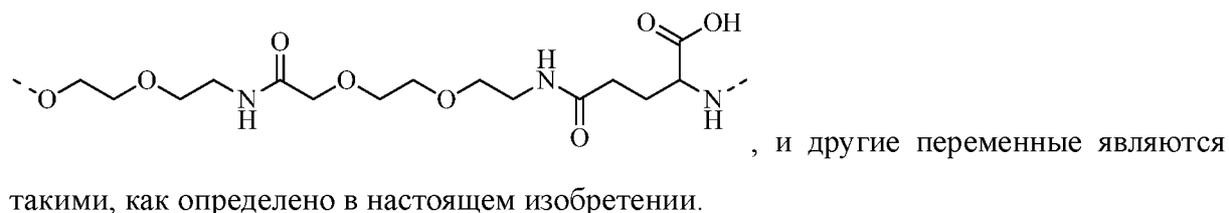
[0116] q независимо выбран из 15, 16, 17, 18 и 19.

[0117] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X выбран из -C(=O)-CH₂-, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

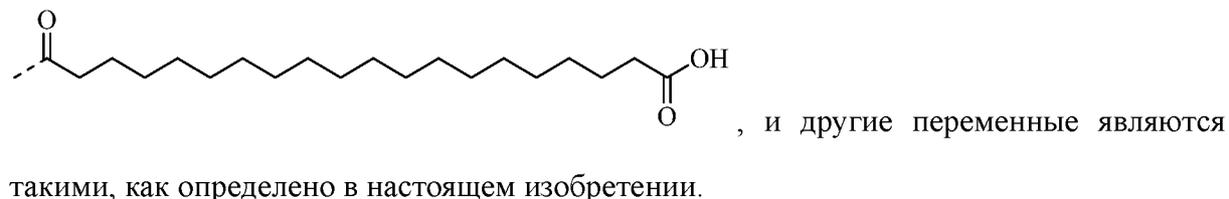
[0118] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения каждый из m, n и p независимо выбран из 2, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

[0119] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения q независимо выбран из 17, и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

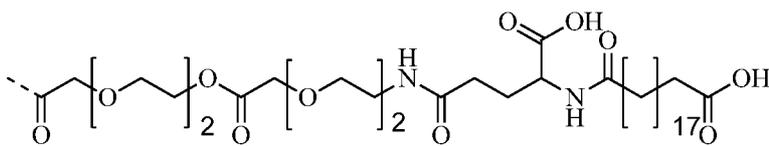
[0120] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X₁ выбран из



[0121] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения X₂ выбран из

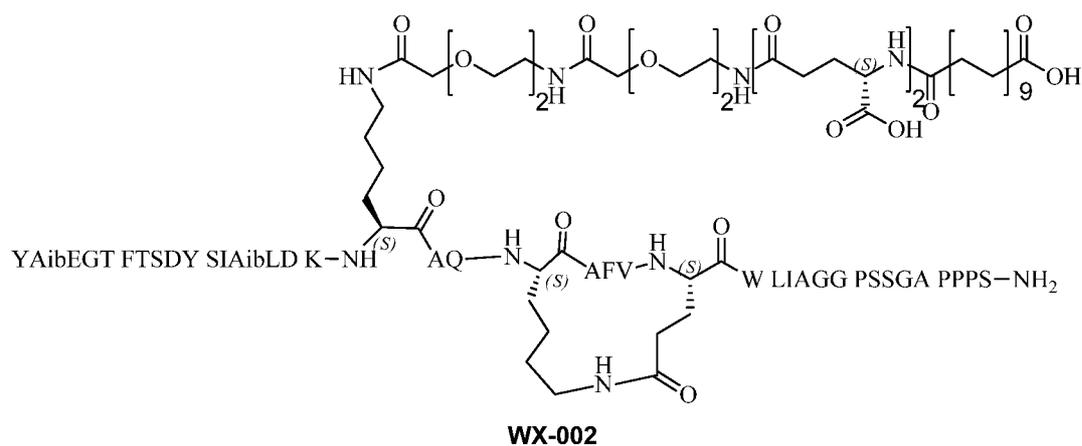
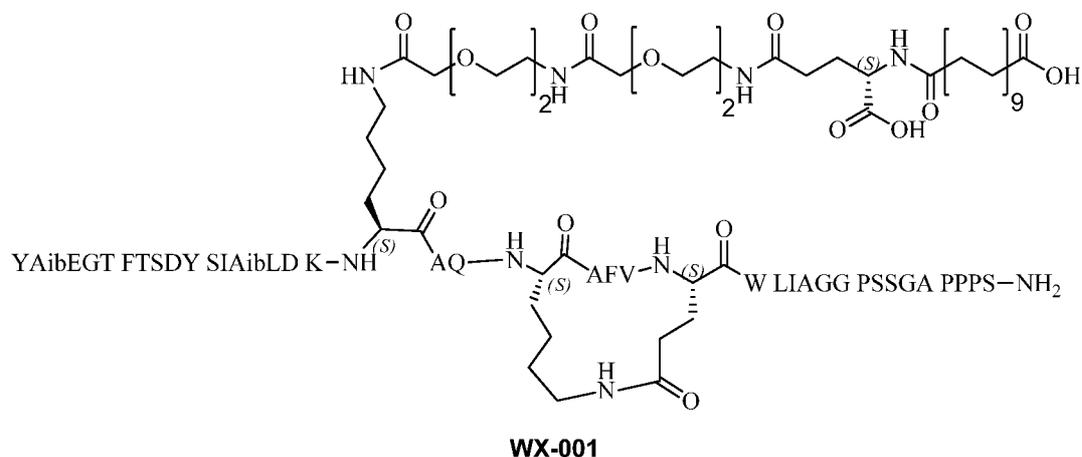


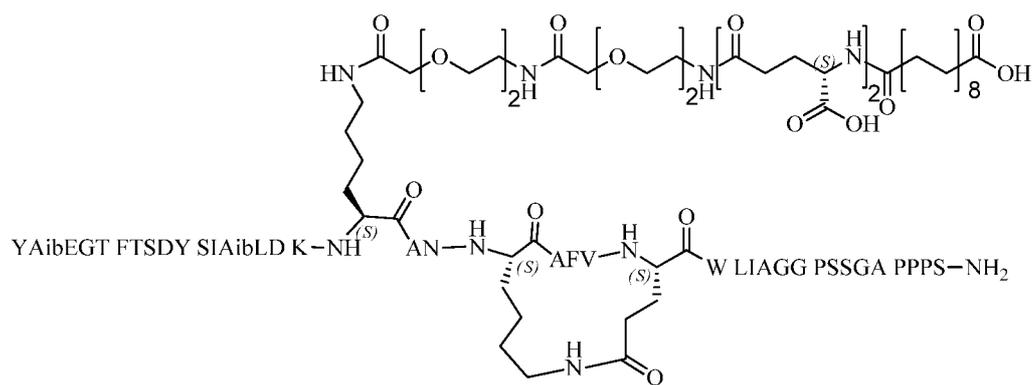
[0122] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения -X-X₁-X₂ выбран из

[0123]  , и другие переменные являются такими, как определено в настоящем изобретении.

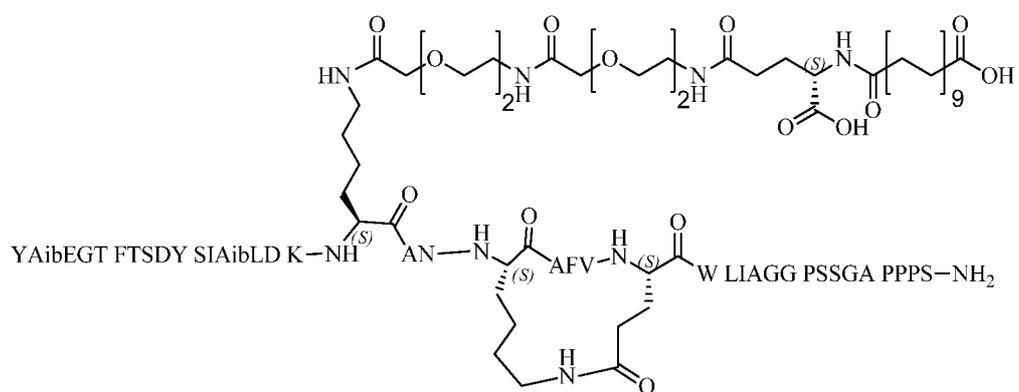
[0124] Также существуют некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, которые получают посредством любой комбинации вышеуказанных переменных.

[0125] Настоящее изобретение также предусматривает соединение, представленное следующей формулой, или его фармацевтически приемлемую соль,

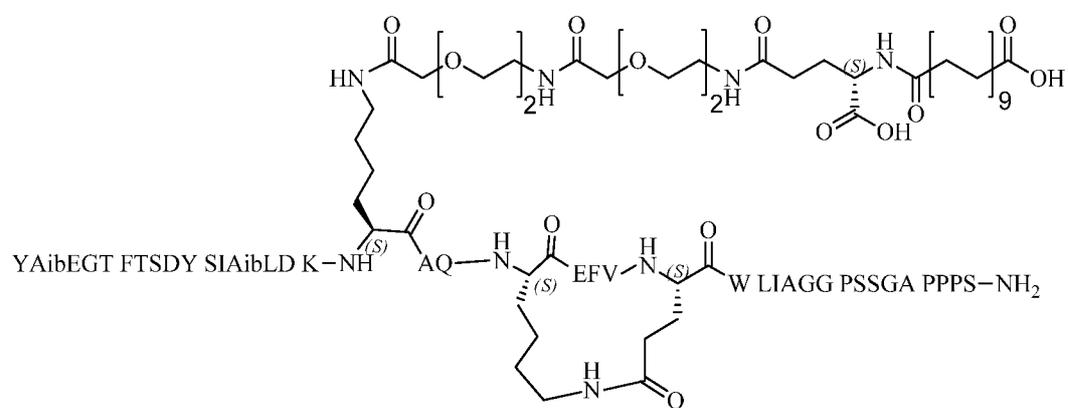




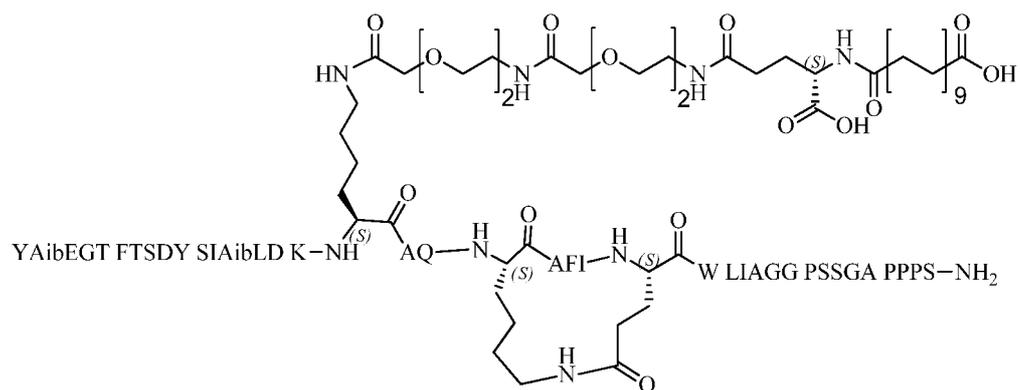
WX-003



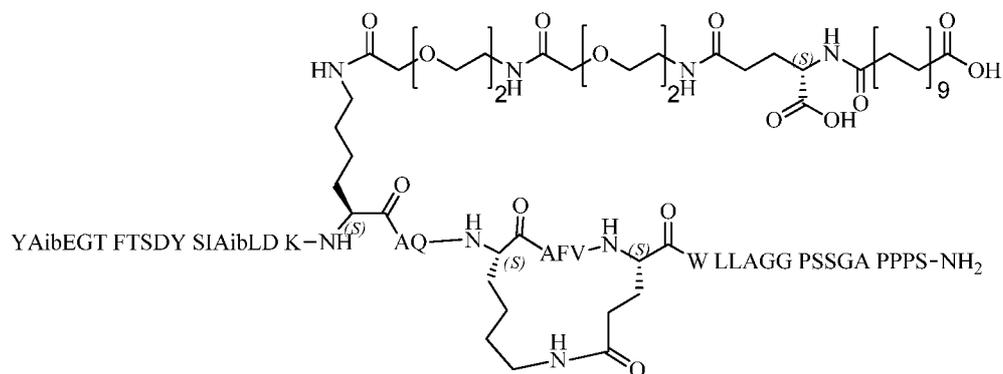
WX-004



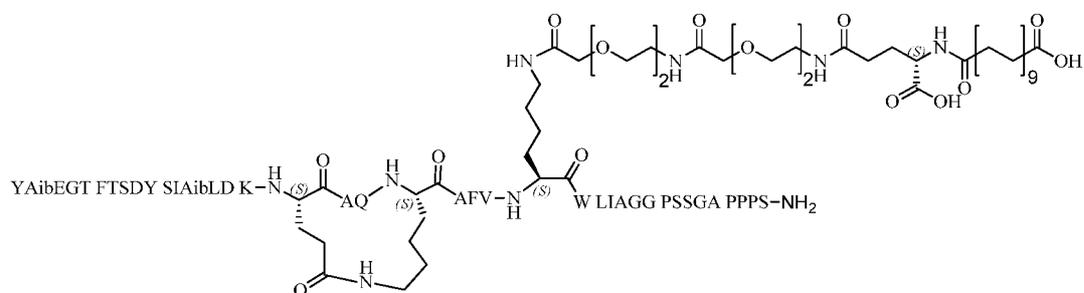
WX-005



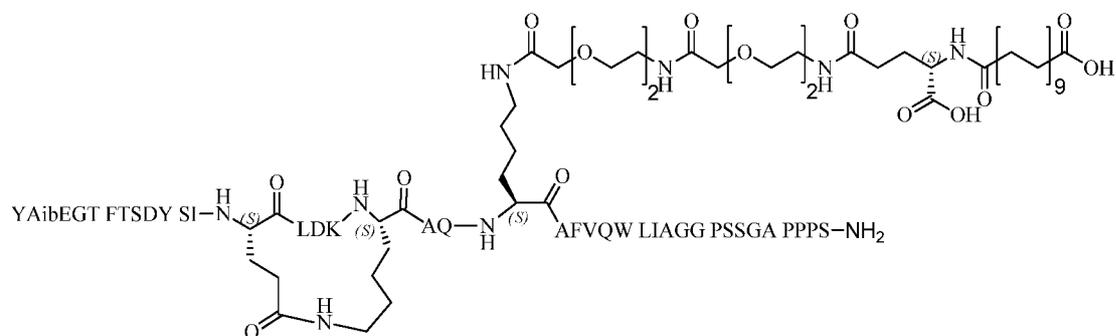
WX-006



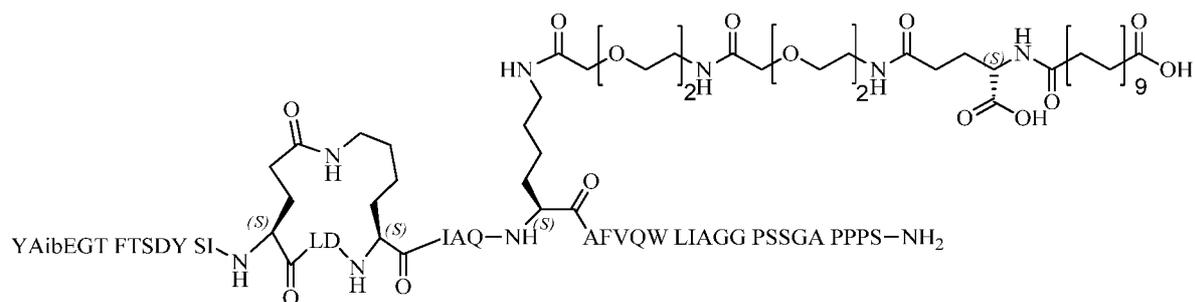
WX-007



WX-008

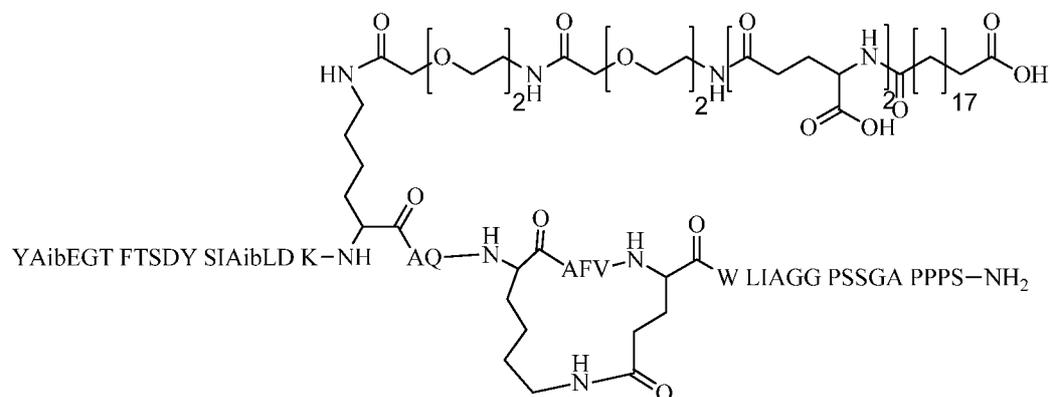
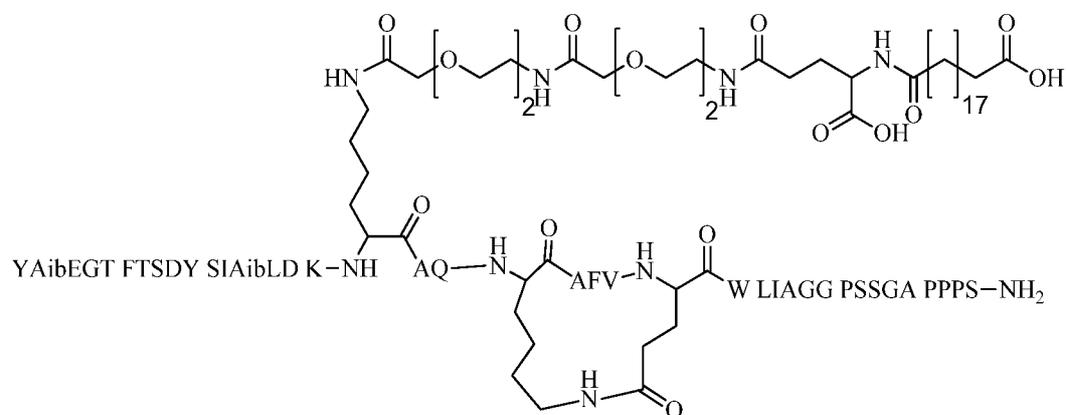


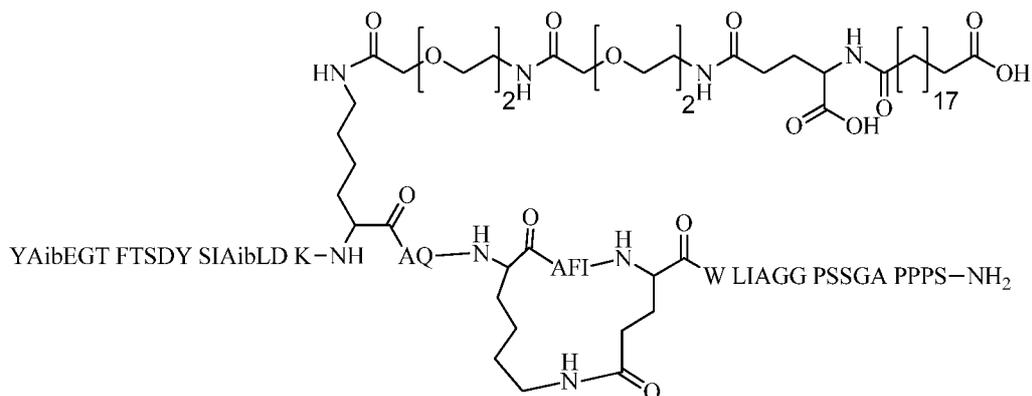
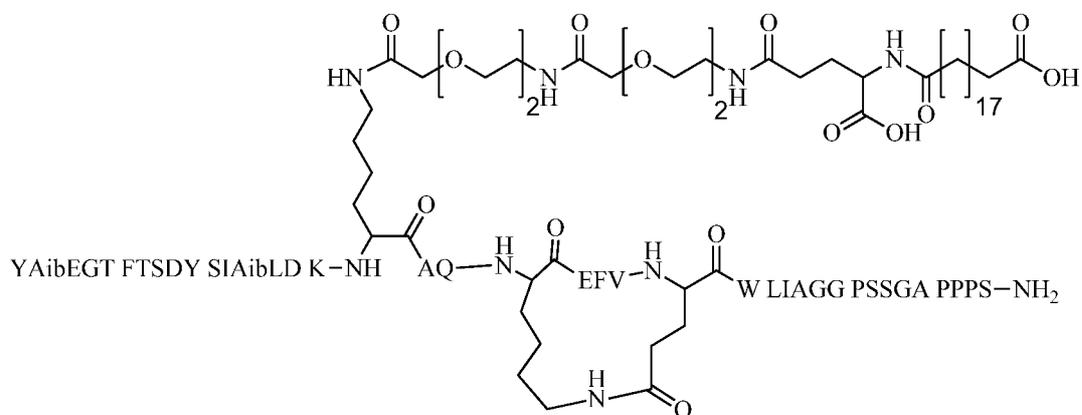
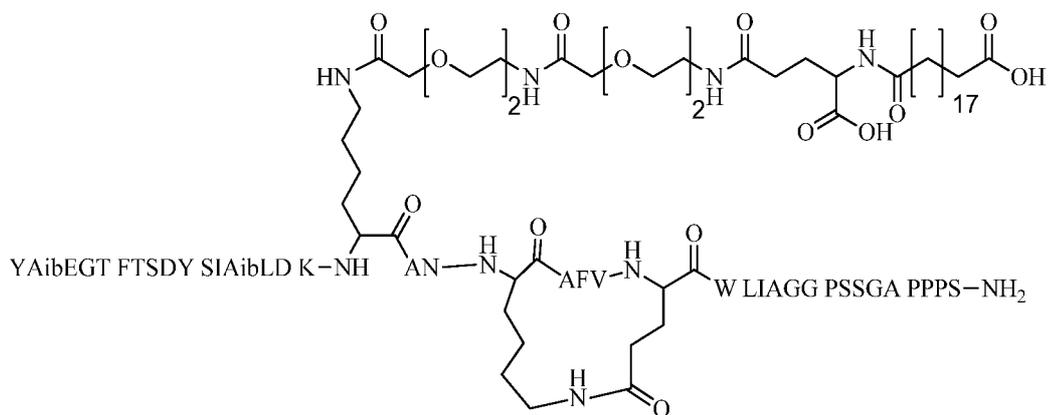
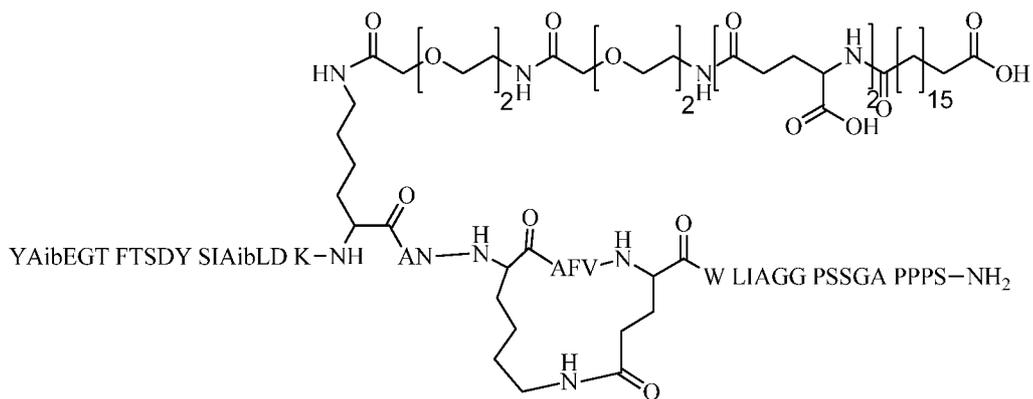
WX-009



WX-010

[0126] Настоящее изобретение также предусматривает соединение, представленное следующей формулой, или его фармацевтически приемлемую соль,





тестирования.

[0129] Пример эксперимента: тестирование ингибирования калиевых каналов hERG

[0130] А. Основной материал

[0131] Линия клеток CHO-hERG (клетки яичника китайского хомячка, стабильно экспрессирующие каналы hERG), сконструированная в собственной лаборатории Шанхайского института лекарственных веществ Китайской академии наук; усилитель фиксации потенциала Axopatch 200B, TASER[®] International.

[0132] В. Способ

[0133] а) Культура клеток

[0134] Клетки CHO, стабильно экспрессирующие hERG, культивируют в чашках для культур клеток диаметром 35 мм, помещают в инкубатор с 5% CO₂ при 37°C и переносят в соотношении 1:5 один раз в 48 часов. Состав среды для культивирования: 90% F12 (Invitrogen), 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco), 100 мкг/мл G418 (Invitrogen) и 100 мкг/мл гигромицина В (Invitrogen). В день тестирования среду для культивирования клеток аспирировали, промывали один раз внеклеточной жидкостью и затем добавляли 0,25% раствор трипсина-EDTA (Invitrogen) с последующим разрушением клеток при комнатной температуре в течение 3-5 минут. После аспирации раствора для разрушения клеток клетки ресуспендировали во внеклеточной жидкости и переносили в лабораторную чашку для электрофизиологического анализа для дальнейшего использования.

[0135] б) Получение внутриклеточной и внеклеточной жидкости

[0136] Внеклеточную жидкость необходимо получать один раз в месяц. Внутриклеточную жидкость необходимо фасовать и замораживать при -20°C.

[0137] Внеклеточная жидкость (мМ): 145 NaCl, 4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 глюкозы и

10 HEPES, значение pH довели до 7,4 с помощью NaOH, с осмотическим давлением 295 мОсм.

[0138] Внутриклеточная жидкость (мМ): 120 KCl, 31,25 KOH, 5,374 CaCl₂, 1,75 MgCl₂, 4 Na₂ATФ, 10 HEPES и 10 EGTA, значение pH довели до 7,2 с помощью KOH, с осмотическим давлением 285 мОсм.

[0139] с) Получение соединений

[0140] Соединение растворяли в DMSO в 20 мМ исходном растворе. В день тестирования исходный раствор соединения последовательно 3-кратно разбавляют с помощью DMSO, т.е. 10 мкл исходного раствора соединения добавляют в 20 мкл DMSO с получением 6 промежуточных концентраций соединения, последовательно разбавленного с помощью DMSO, соответственно. Промежуточные концентрации представляют собой 20, 6,66, 2,22, 0,74, 0,24 и 0,082 мМ соответственно. Затем 10 мкл промежуточной концентрации соединения отбирают и добавляют в 4990 мкл внеклеточной жидкости и 500-кратно разбавляют с получением конечной концентрации для тестирования. Наивысшая тестируемая концентрация составляет 40 мкМ, при этом все значения концентрации составляли 40, 13,3, 4,44, 1,48, 0,49 и 0,16 мкМ соответственно. Содержание DMSO в конечной концентрации для тестирования не превышало 0,2%, и эта концентрация DMSO не влияла на калиевые каналы hERG.

[0141] d) Способ электрофизиологического анализа

[0142] В клетках CHO (яичника китайского хомячка), стабильно экспрессирующих калиевые каналы hERG, ток калиевых каналов hERG регистрировали посредством методики фиксации потенциала цельных клеток при комнатной температуре. Стекланный микроэлектрод получают из нити стеклянного электрода (BF150-86-10, Sutter), протянутой с помощью пуллера для стеклянных микроэлектродов. Сопротивление кончика после выливания внутреннего раствора для электрода в электрод составляло приблизительно 2-5 МΩ. Стекланный микроэлектрод вставляли в индуктивный пробник для соединения с усилителем фиксации потенциала Axopatch

200B (Molecular Devices). Потенциал фиксации и регистрацию данных контролируют и регистрируют с помощью компьютера с программным обеспечением pClamp 10, и частота отбора образцов составляет 10 кГц, а частота волновой фильтрации составляет 2 кГц. После получения результатов анализа цельных клеток потенциал клеток фиксируют при -80 мВ и шаговое напряжение тока калиевых каналов hERG (*I* hERG) повышают от -80 мВ до +20 мВ с деполяризующим напряжением в течение 2 с, затем реполяризацией до -50 мВ и возвращением до -80 мВ через 1 с. Эту стимуляцию напряжения осуществляют один раз в 10 с и процесс введения начинают после подтверждения того, что ток калиевых каналов hERG стабилен (1 мин). Последовательное введение начинают с низкой тестируемой концентрации соединений, при этом каждую тестируемую концентрацию вводят в течение по меньшей мере 1 минуты. По меньшей мере 3 клетки ($n \geq 3$) тестировали для каждой концентрации соединений и по меньшей мере 2 клетки ($n \geq 2$) тестировали для каждой концентрации положительных соединений.

[0143] е) Анализ данных

[0144] В каждой полной регистрации тока процент ингибирования для каждой эффективной концентрации соединения можно рассчитать на основании процента пикового тока в отрицательном контроле. Кривую зависимости доза-эффект получают путем аппроксимации стандартного уравнения Хилла, и конкретное уравнение является следующим:

$$[0145] \quad I_{(C)} = I_b + (I_{fr} - I_b) * c^n / (IC_{50}^n + c^n),$$

[0146] c представляет собой тестируемую концентрацию соединения, n представляет собой наклон

[0147] Как аппроксимацию кривой, так и расчет степени ингибирования анализируют и завершают с помощью программного обеспечения для анализа Qpatch. Если степень ингибирования при самой низкой концентрации превышает половину степени ингибирования или степень ингибирования при самой высокой концентрации не

достигает половины степени ингибирования, то соответствующая IC₅₀ соединения ниже, чем самая низкая концентрация, или значение IC₅₀ больше, чем самая высокая концентрация.

[0148] С. Результаты тестирования и выводы

[0149] Соединения в настоящем изобретении не характеризуются рисками, связанными с hERG.

[0150] Пример эксперимента: ингибирование изофермента цитохрома P450

[0151] А. Цель эксперимента

[0152] Определение ингибирующего эффекта тестируемых соединений на активность изоферментов микросомального цитохрома P450 печени человека (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4).

[0153] В. Осуществление эксперимента

[0154] Сначала тестируемое соединение (10 мМ) разбавляют с градиентом с получением рабочего раствора (100×конечной концентрации). Концентрации рабочего раствора составляют 5 мМ, 1,5 мМ, 0,5 мМ, 0,15 мМ, 0,05 мМ, 0,015 мМ и 0,005 мМ соответственно. В это же время получают положительные ингибиторы изоферментов P450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4) и рабочий раствор смеси их специфических субстратов; микросомы печени человека, замороженные в морозильной камере при -80°C, размораживают на льду. Как только микросомы печени человека полностью растворяются, раствор разбавляют с помощью PBS (фосфатно-буферного раствора) с получением рабочего раствора с определенной концентрацией (0,253 мг/мл); 20 мкл раствора смеси субстратов добавляют в реакционный планшет (20 мкл РВ добавляют в лунку для отрицательного контроля). В это же время 158 мкл рабочего раствора микросом печени человека добавляют в реакционный планшет и реакционный планшет помещают на лед для использования; в это время 2 мкл тестируемого

соединения ($N = 1$) и положительных ингибиторов ($N = 2$) в каждой концентрации добавляют в соответствующую лунку и в группу без ингибиторов (тестируемое соединение или положительный ингибитор) добавляют соответствующий органический растворитель как образец контрольной группы; после предварительного инкубирования на водяной бане при 37°C в течение 10 минут в реакционный планшет добавляют 20 мкл раствора NADPH и инкубируют на водяной бане при 37°C в течение 10 минут; 400 мкл холодного раствора ацетонитрила добавляют для остановки реакции; реакционный планшет помещают на встряхиватель и встряхивают в течение 10 минут; смесь центрифугируют при 4000 об./мин в течение 20 минут; 200 мкл надосадочной жидкости отбирают и добавляют в 100 мкл воды для разбавления образца; наконец, реакционный планшет закрывают и встряхивают для выявления посредством LC/MS/MS.

[0155] С. Результаты эксперимента и выводы

[0156] Соединения в настоящем изобретении не характеризуются рисками, связанными с ингибированием СYP.

[0157] Технический эффект

[0158] Соединения в настоящем изобретении характеризуются сильной агонистической активностью в отношении GLP-1R/GIPR; соединения в настоящем изобретении характеризуются превосходными фармакокинетическими свойствами; соединения в настоящем изобретении характеризуются превосходной стабильностью в плазме крови; соединения в настоящем изобретении характеризуются очень сильным связыванием с белками плазмы крови; соединения в настоящем изобретении характеризуются превосходной эффективностью *in vivo*.

[0159] Определение и описание

[0160] Если не указано иное, следующие термины и выражения, используемые в данном документе, имеют следующие значения. Конкретный термин или выражение

при отсутствии точного определения не следует считать неопределенным или неясным, а следует понимать в соответствии с обычным значением. Если в данном документе встречается торговое название, то предполагается, что оно относится к его соответствующему коммерческому продукту или его активному ингредиенту.

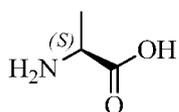
[0161] Термин «фармацевтически приемлемый» используют в данном документе для обозначения таких соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые, в рамках здравого медицинского суждения, являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных без избыточной токсичности, раздражения, анафилактической реакции или других проблем или осложнений в соответствии с обоснованным соотношением польза/риск.

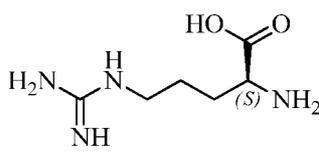
[0162] Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к соли соединения по настоящему изобретению, которую получают путем осуществления реакции соединения, содержащего конкретный заместитель по настоящему изобретению, с относительно нетоксичной кислотой или основанием. Если соединение по настоящему изобретению содержит относительно кислотную функциональную группу, то соль присоединения основания может быть получена путем приведения соединения в контакт с достаточным количеством основания в чистом растворе или подходящем инертном растворителе. Фармацевтически приемлемая соль присоединения основания включает соли натрия, калия, кальция, аммония, органического амина или магния или подобные соли. Если соединение по настоящему изобретению содержит относительно основную функциональную группу, то соль присоединения кислоты может быть получена путем приведения соединения в контакт с достаточным количеством кислоты в чистом растворе или подходящем инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемой соли присоединения кислоты включают соль неорганической кислоты, где неорганическая кислота включает, например, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, азотную кислоту, угольную кислоту, бикарбонат, фосфорную кислоту, моногидрофосфат, дигидрофосфат, серную кислоту, гидросульфат, йодистоводородную кислоту, фосфористую кислоту и т. п.; и соль органической кислоты, где органическая кислота включает, например,

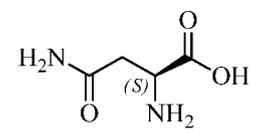
уксусную кислоту, пропионовую кислоту, изомасляную кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, бензойную кислоту, янтарную кислоту, субериновую кислоту, фумаровую кислоту, молочную кислоту, миндальную кислоту, фталевую кислоту, бензолсульфоновую кислоту, *n*-толуолсульфоновую кислоту, лимонную кислоту, винную кислоту, метансульфоновую кислоту и т. п.; и соли аминокислоты (такой как аргинин и т. п.), и соль органической кислоты, такой как глюкуроновая кислота и т. п. Определенные конкретные соединения по настоящему изобретению содержат как основные, так и кислотные функциональные группы, таким образом, они могут быть превращены в любую соль присоединения основания или соль присоединения кислоты.

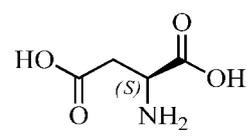
[0163] Фармацевтически приемлемую соль по настоящему изобретению можно получать из исходного соединения, которое содержит кислотный или основной фрагмент, посредством традиционных химических способов. Как правило, такая соль может быть получена путем осуществления реакции свободной кислотной или основной формы соединения со стехиометрическим количеством соответствующего основания или кислоты в воде или органическом растворителе или их смеси.

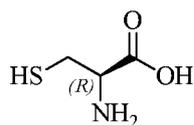
[0164] При использовании в настоящем документе A или Ala представляет собой

аланин и характеризуется структурой  ; R или Arg представляет собой

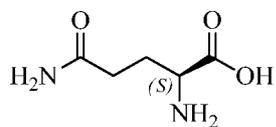
аргинин и характеризуется структурой  ; N или Asn представляет

собой аспарагин и характеризуется структурой  ; D или Asp представляет собой аспарагиновую кислоту и характеризуется структурой

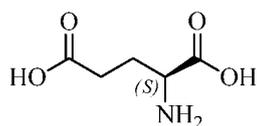
 ; S или Cys представляет собой цистеин и характеризуется структурой



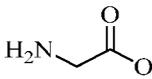
; Q или Gln представляет собой глутамин и характеризуется структурой

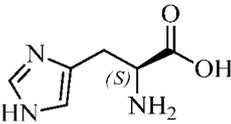


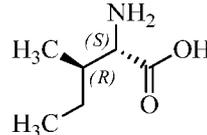
; E или Glu представляет собой глутаминовую кислоту и

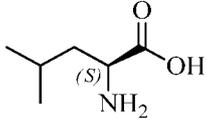


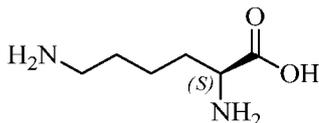
характеризуется структурой ; G или Gly представляет собой глицин

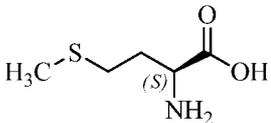
и характеризуется структурой ; H или His представляет собой гистидин и

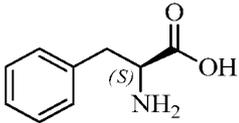
характеризуется структурой ; I или Ile представляет собой изолейцин

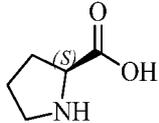
и характеризуется структурой ; L или Leu представляет собой лейцин и

характеризуется структурой ; K или Lys представляет собой лизин и

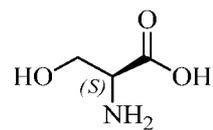
характеризуется структурой ; M или Met представляет собой

метионин и характеризуется структурой ; F или Phe представляет

собой фенилаланин и характеризуется структурой ; P или Pro

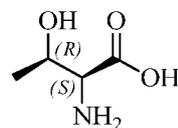
представляет собой пролин и характеризуется структурой ; S или Ser

представляет собой серин и характеризуется структурой



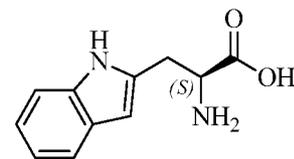
; T или Thr

представляет собой треонин и характеризуется структурой



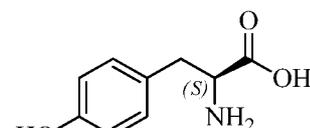
; W или Trp

представляет собой триптофан и характеризуется структурой



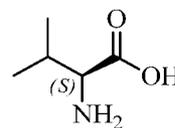
; Y

или Tug представляет тирозин и характеризуется структурой



; V

или Val представляет собой валин и характеризуется структурой



[0165] Термин «лечение» включает ингибирование, замедление, остановку или устранение прогрессирования или тяжести существующего симптома или заболевания.

[0166] Если не указано иное, то предполагается, что термин «изомер» включает геометрические изомеры, *цис-транс*-изомер, стереоизомер, энантиомер, оптический изомер, диастереоизомеры и таутомерный изомер.

[0167] Соединения по настоящему изобретению могут существовать в конкретных геометрических или стереоизомерных формах. В настоящем изобретении рассматриваются все такие соединения, в том числе *цис*- и *транс*-изомеры, (-)- и (+)-энантиомеры, (*R*)- и (*S*)-энантиомеры, диастереоизомеры, (*D*)-изомеры, (*L*)-изомеры, а также рацемические и другие их смеси, такие как смеси, обогащенные энантиомерами или диастереомером, все из которых находятся в пределах объема настоящего изобретения. В заместителях, таких как алкил, могут присутствовать дополнительные асимметрические атомы углерода. Все такие изомеры и их смеси охватываются объемом настоящего изобретения.

[0168] Если не указано иное, термин «энантиомер» или «оптический изомер» относится к стереоизомерам, которые являются зеркальными отражениями друг друга.

[0169] Если не указано иное, термин «*цис-транс*-изомер» или «геометрический изомер» определяется неспособностью двойных связей или одинарных связей между атомами углерода, образующими кольцо, к свободному вращению.

[0170] Если не указано иное, термин «диастереомер» относится к стереоизомеру, молекула которого содержит два или более хиральных центров, и молекулы не соотносятся друг с другом как зеркальные отражения.

[0171] Если не указано иное, «(+))» относится к правостороннему вращению, «(-))» относится к левостороннему вращению и/или «(±))» относится к рацемической смеси.

[0172] Если не указано иное, абсолютная конфигурация стереогенного центра представлена клиновидной сплошной связью () и клиновидной пунктирной связью (), и относительная конфигурация стереогенного центра представлена прямой сплошной связью () и прямой пунктирной связью (), волнистая линия () используется для представления клиновидной сплошной связи () или клиновидной пунктирной связи (), или волнистая линия () используется для представления прямой сплошной связи () и прямой пунктирной связи ()

[0173] Если не указано иное, термины «обогащенный одним изомером», «обогащенный изомерами», «обогащенный одним энантиомером» или «обогащенный энантиомерами» относятся к содержанию одного из изомеров или энантиомеров, составляющему менее 100%, и содержанию такого изомера или энантиомера, составляющему 60% или больше, или составляющему 70% или больше, или составляющему 80% или больше, или составляющему 90% или больше, или составляющему 95% или больше, или составляющему 96% или больше, или составляющему 97% или больше, или составляющему 98% или больше, или составляющему 99% или больше, или составляющему 99,5% или больше, или

составляющему 99,6% или больше, или составляющему 99,7% или больше, или составляющему 99,8% или больше, или составляющему 99,9% или больше.

[0174] Если не указано иное, термин «изомерный избыток» или «энантиомерный избыток» относится к разности значений относительного процентного содержания двух изомеров или двух энантиомеров. Например, если содержание одного изомера или энантиомера составляет 90%, а содержание другого изомера или энантиомера составляет 10%, то изомерный или энантиомерный избыток (значение ее) составляет 80%.

[0175] Оптиически активные (*R*)- и (*S*)-изомеры, а также *D*- и *L*-изомеры могут быть получены посредством хирального синтеза, или хиральных реагентов, или других традиционных методик. Если требуется один энантиомер соединения по настоящему изобретению, то чистый требуемый энантиомер можно получать путем асимметричного синтеза или дериватизации хирального вспомогательного вещества с последующим разделением полученной диастереомерной смеси и отщеплением вспомогательной группы. В качестве альтернативы, если молекула содержит основную функциональную группу (такую как аминогруппу) или кислотную функциональную группу (такую как карбоксильная), соединение реагирует с соответствующей оптиически активной кислотой или основанием с образованием соли диастереомерного изомера, которую затем подвергают диастереомерному разделению посредством общепринятого способа, известного из уровня техники, с получением чистого энантиомера. Кроме того, энантиомер и диастереоизомер обычно выделяют путем хроматографии, при которой которая используется хиральная стационарная фаза, и хроматографию необязательно комбинируют с методом химических производных (например, карбамат, полученный из амина).

[0176] Соединение по настоящему изобретению может содержать неприродную долю атомного изотопа одного или более атомов, которые составляют соединение. Например, соединение может быть помечено радиоактивным изотопом, таким как тритий (^3H), йод-125 (^{125}I) или С-14 (^{14}C). В качестве другого примера,

дейтерированные лекарственные средства могут быть образованы посредством замещением водорода "тяжелым" водородом, при этом связь, образованная между дейтерием и углеродом, сильнее, чем связь между обычным водородом и углеродом, при этом по сравнению с недейтерированными лекарственными средствами дейтерированные лекарственные средства обладают преимуществами, состоящими в снижении токсичности и побочных эффектов, повышении стабильности лекарственного средства, усилении эффективности, продлении периода биологического полувыведения лекарственных средств и т. п. Все изотопные варианты соединения по настоящему изобретению, радиоактивные или нет, охватываются объемом настоящего изобретения.

[0177] Если не указано иное, термин «C₁₋₃алкил» относится к линейной или разветвленной насыщенной углеводородной группе, состоящей из 1-3 атомов углерода. C₁₋₃алкил включает C₁₋₂- и C₂₋₃алкил и т. п.; он может быть одновалентным (таким как метил), двухвалентным (таким как метилен) или поливалентным (таким как метин). Примеры C₁₋₃алкила включают без ограничения метил (Me), этил (Et), пропил (включающий *n*-пропил и изопропил) и т. д.

[0178] Если не определено иное, «S-NH₂» в соединениях по настоящему изобретению используется для указания замены карбоксила в серине на амид.

[0179] Структура соединений по настоящему изобретению может быть подтверждена общепринятыми способами, известными специалистам в данной области, и если настоящее изобретение включает абсолютную конфигурацию соединения, то абсолютная конфигурация может быть подтверждена с помощью средств общепринятых методик из данной области техники. Например, в случае рентгеновской дифракции монокристаллов (SXRД) абсолютная конфигурация может быть подтверждена путем сбора данных об интенсивности дифракции выращенного монокристалла с применением дифрактометра Bruker D8 Venture с источником излучения CuK α в качестве источника света и следующим режимом сканирования: сканирование ϕ/ω , и после сбора соответствующих данных структуру кристалла можно дополнительно анализировать прямым способом (Shelxs97).

[0180] Соединения по настоящему изобретению могут быть получены посредством различных способов синтеза, известных специалистам в данной области, в том числе посредством конкретных вариантов осуществления, перечисленных ниже, вариантов осуществления, образованных путем их комбинации с другими способами химического синтеза, и эквивалентных альтернатив, известных специалистам в данной области, при этом предпочтительные варианты реализации включают без ограничения примеры из настоящего изобретения.

[0181] Используемые в настоящем изобретении растворители являются коммерчески доступными.

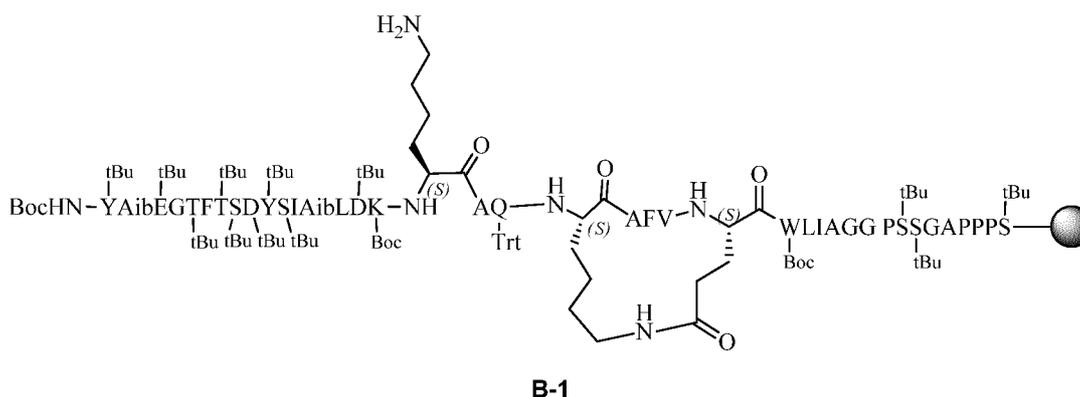
[0182] В настоящем раскрытии используются следующие сокращения: «водн.» означает воду; «экв.» означает эквивалент; «DCM» означает дихлорметан; «PE» означает петролейный эфир; «DMSO» означает диметилсульфоксид; «MeOH» означает метанол; «BOC» означает *tert*-бутоксикарбонил, который является защитной группой для аминогруппы; «к. т.» означает комнатную температуру; «O/N» означает в течение ночи; «THF» означает тетрагидрофуран; «Boc₂O» означает ди-*tert*-бутилдикарбонат; «TFA» означает трифторуксусную кислоту; «DIEA» означает диизопропилэтиламин; «DMF» означает *N,N*-диметилформамид; «HBTU» означает гексафторфосфат *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилурия; «HOBT» означает 1-гидроксибензотриазол; «HOAT» означает 1-гидрокси-7-азабензотриазол; «DIC» означает *N,N'*-диизопропилкарбодиимид; «DBU» означает 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундек-7-ен; «PhSiH» означает фенилсилан; «Pd(PPh₃)₄» означает тетраakis(трифенилфосфин)палладий.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНОГО ВАРИАНТА ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0183] Настоящее изобретение подробно описано с помощью примеров, представленных ниже, но это не означает, что есть какие-либо противоположные ограничения в отношении настоящего изобретения. В данном документе подробно

описано настоящее изобретение, а также раскрыты его конкретные варианты осуществления; для специалиста в данной области очевидно, что осуществление различных модификаций и улучшений по отношению к вариантам осуществления настоящего изобретения происходит без отступления от сущности и объема настоящего изобретения.

[0184] Промежуточное соединение В-1



[0185] Стадия 1: 1,1 г смолы на основе 4-(2',4'-диметоксифенил-Фмос-аминометил)феноксиацетамидометилбензгидрилами́на (загрузочное значение, т. е. Sub = 0,28 ммоль/г) взвешивали и добавляли в реакционную колонку, а затем в реакционную колонку добавляли DMF (50 мл), продували азотом в течение 2 часов. Остаток высушивали до прекращения вытекания жидкости, и смолу промывали с помощью DMF (50 мл) 5 раз (каждый раз по 1 минуте), и остаток высушивали до прекращения вытекания жидкости.

[0186] Стадия 2: 20% пиперидина/DMF (50 мл) добавляли в реакционную колонку, продували азотом в течение 20 минут, а затем остаток высушивали до прекращения вытекания жидкости. Смолу промывали с помощью DMF (50 мл) 5 раз (каждый раз по 1 минуте) и остаток высушивали до прекращения вытекания жидкости. Смолу тестировали с применением нингидрина, и она окрасилась в синий цвет.

[0187] Стадия 3: сочетание аминокислот

[0188] 3.1 Сочетание Фмос-Ser(tBu)-ОН

[0189] 1. Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,0 экв.) взвешивали и добавляли в вышеуказанную смолу и DIEA (6,00 экв.) плюс 10 мл DMF добавляли в реакционную колонку, продували азотом и HBTU (2,85 экв.) добавляли после растворения аминокислоты. Содержание азота регулировали, чтобы смола набухла равномерно.

[0190] 2. Реакцию проводили в течение 0,5 часа при 25°C. Смолу тестировали с применением нингидрина, и после этого она стала бесцветной и прозрачной.

[0191] 3. Реакционный раствор удаляли и смолу промывали с помощью DMF 5 раз (каждый раз по 50 мл, каждый раз по 1 мин). Остаток высушивали до прекращения вытекания жидкости.

[0192] 3.2 Сочетание Fmoc-Pro-OH

[0193] 1. 20% пиперидина/DMF (50 мл) добавляли в реакционную колонку, продували азотом в течение 20 минут, а затем остаток высушивали до прекращения вытекания жидкости. Смолу промывали с помощью DMF (50 мл) 5 раз (каждый раз по 1 минуте) и остаток высушивали до прекращения вытекания жидкости. Смолу тестировали с применением нингидрина, и она окрасилась в синий цвет.

[0194] 2. Fmoc-Pro-OH (3,0 экв.) взвешивали и добавляли в вышеуказанную смолу и DIEA (6,00 экв.) плюс 10 мл DMF добавляли в реакционную колонку, продували азотом и HBTU (2,85 экв.) добавляли после растворения аминокислоты. Содержание азота регулировали, чтобы смола набухла равномерно.

[0195] 3. Реакцию проводили в течение 0,5 часа при 25°C. Смолу тестировали с применением нингидрина, и после этого она стала бесцветной и прозрачной.

[0196] 4. Реакционный раствор удаляли и смолу промывали с помощью DMF 5 раз (каждый раз по 50 мл, каждый раз по 1 мин). Остаток высушивали до прекращения вытекания жидкости.

[0197] Стадию 3.2 повторяли для завершения сочетания следующих аминокислот

№	Исходный материал	Реагент для сочетания
3.3	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.4	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.5	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.6	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.9	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.10	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.11	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.12	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.13	Fmoc-Ile-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.14	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.16	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)

		эКВ.)
3.17	Fmoc-Val-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.18	Fmoc-Phe-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.19	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.20	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2,00 экв.)	HOBT (2,00 экв.) и DIC (2,00 экв.)
3.21	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.22	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.23	Fmoc-Lys(Dde)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.24	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
3.26	Fmoc-Leu-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
3.27	Fmoc-Aib-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
3.28	Fmoc-Ile-OH (6,00 экв.)	HOAT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
3.29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
3.30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
3.31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)

		экв.)
3.32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
3.33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
3.34	Fmoc-Phe-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
3.35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
3.36	Fmoc-Gly-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
3.37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6,00 экв.)	HOBT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
3.38	Fmoc-Aib-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3.39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

[0198] 3.40 Удаление защитной группы с Алос и ОАII

[0199] 1. PhSiH₃ (20,0 экв.) и DCM (10 мл) добавляли в реакционную колонку, после продувания азотом добавляли Pd(PPh₃)₄ (0,2 экв.) и продували азотом в течение 20 мин. Реакцию проводили дважды и остаток высушивали до прекращения вытекания жидкости.

[0200] 2. Смолу промывали с помощью DMF 5 раз (каждый раз по 50 мл, каждый раз по 1 мин). Остаток высушивали до прекращения вытекания жидкости.

[0201] 3.41 Замыкание кольца амида

[0202] 1. DIEA (3,00 экв.) плюс 10 мл DMF добавляли в реакционную колонку, продували азотом и HATU (1,5 экв.) добавляли после растворения аминокислоты. Содержание азота регулировали, чтобы смола набухла равномерно.

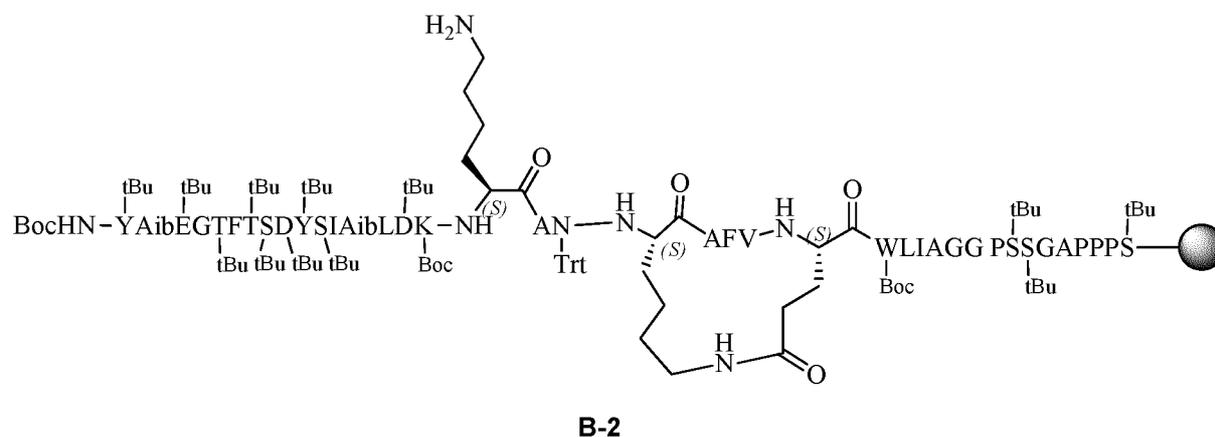
[0203] 2. Реакцию проводили в течение 0,5 часа при 25°C. Смолу тестировали с применением нингидрина, и после этого она стала бесцветной и прозрачной.

[0204] 3. Смолу промывали с помощью DMF 5 раз (каждый раз по 50 мл, каждый раз по 1 мин). Остаток высушивали до прекращения вытекания жидкости.

[0205] 3.42 Удаление защитной группы с Dde

[0206] 1. 3% гидрата гидразина/DMF (50 мл) добавляли в реакционную колонку, продували азотом в течение 15 минут, а затем остаток высушивали до прекращения вытекания жидкости. Смолу промывали с помощью DMF 5 раз (каждый раз по 50 мл, каждый раз по 1 мин) и остаток высушивали до прекращения вытекания жидкости с получением промежуточного соединения **B-1**. Смолу тестировали с применением нингидрина, и она окрасилась в синий цвет.

[0207] Промежуточное соединение B-2



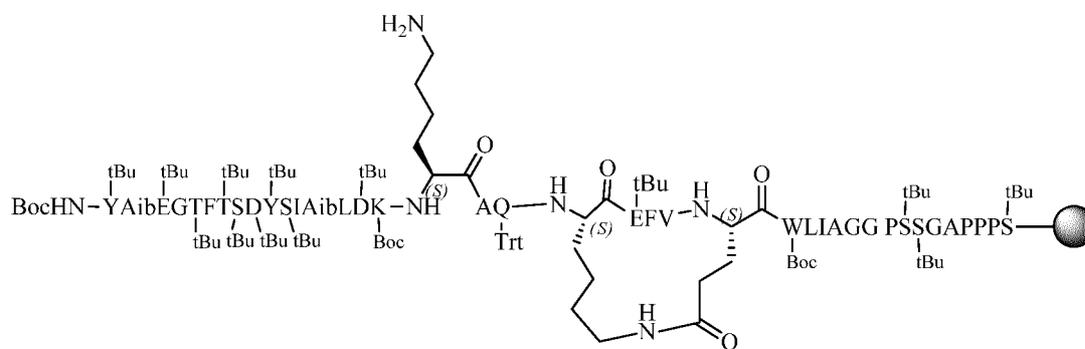
[0208] Ссылаясь на способ синтеза **B-1**, **B-2** получали после следующих операций, таких как сочетание аминокислот, удаление защитной группы с Alloc и OAll, замыкание кольца амида и удаление защитной группы с Dde.

№	Исходный материал	Реагент для сочетания
---	-------------------	-----------------------

1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
2	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
4	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
5	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
6	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
9	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
10	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
11	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
12	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
13	Fmoc-Ile-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
14	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
16	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
17	Fmoc-Val-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
18	Fmoc-Phe-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
19	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
20	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2,00 экв.)	HOBT (2,00 экв.) и DIC (2,00 экв.)
21	Fmoc-Asn(Trt)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
22	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
23	Fmoc-Lys(Dde)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
24	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
26	Fmoc-Leu-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
27	Fmoc-Aib-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)

28	Fmoc-Ile-OH (6,00 экв.)	HOAT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
34	Fmoc-Phe-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
36	Fmoc-Gly-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6,00 экв.)	HOBT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
38	Fmoc-Aib-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

[0209] Промежуточное соединение В-3



В-3

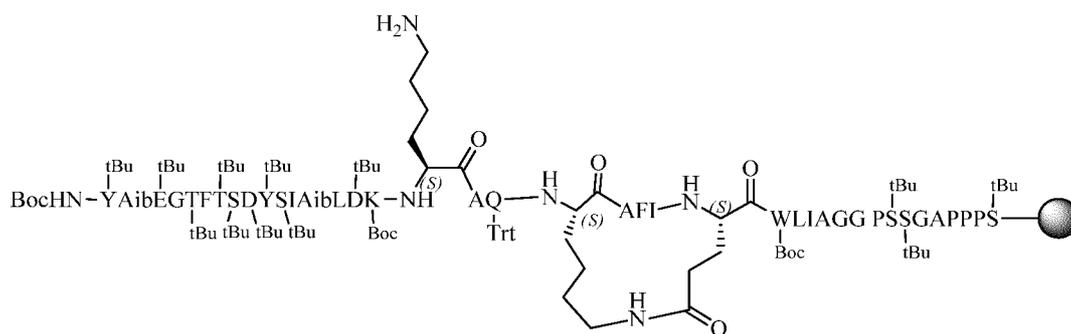
[0210] Ссылаясь на способ синтеза **В-1**, **В-3** получали после следующих операций, таких как сочетание аминокислот, удаление защитной группы с Alloc и OAll, замыкание кольца амида и удаление защитной группы с Dde.

№	Исходный материал	Реагент для сочетания
1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
2	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

3	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
4	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
5	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
6	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
9	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
10	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
11	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
12	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
13	Fmoc-Ile-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
14	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
16	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
17	Fmoc-Val-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
18	Fmoc-Phe-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
19	Fmoc-Glu(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
20	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2,00 экв.)	HOBT (2,00 экв.) и DIC (2,00 экв.)
21	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
22	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
23	Fmoc-Lys(Dde)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
24	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
26	Fmoc-Leu-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
27	Fmoc-Aib-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
28	Fmoc-Ile-OH (6,00 экв.)	HOAT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)

30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
34	Fmoc-Phe-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
36	Fmoc-Gly-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6,00 экв.)	HOBT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
38	Fmoc-Aib-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

[0211] Промежуточное соединение В-4



В-4

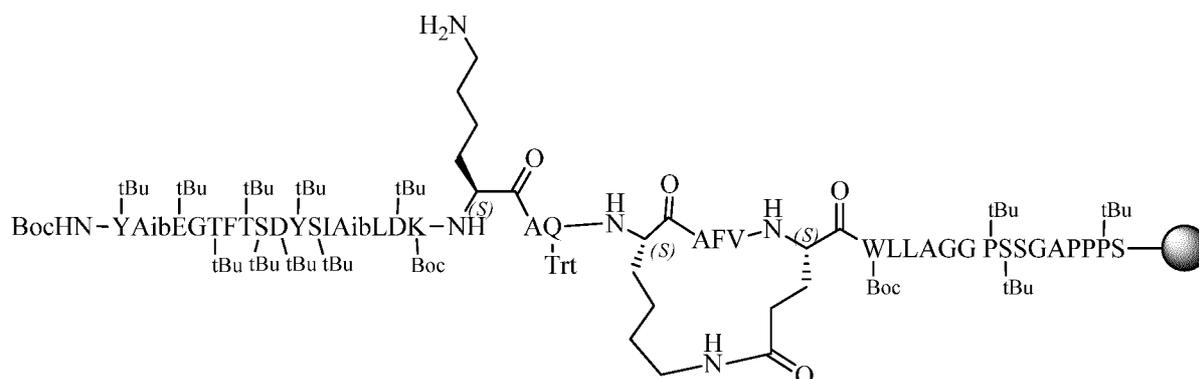
[0212] Ссылаясь на способ синтеза В-1, В-4 получали после следующих операций, таких как сочетание аминокислот, удаление защитной группы с Alloc и OAll, замыкание кольца амида и удаление защитной группы с Dde.

№	Исходный материал	Реагент для сочетания
1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
2	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
4	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

5	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
6	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
9	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
10	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
11	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
12	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
13	Fmoc-Ile-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
14	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
16	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
17	Fmoc-Ile-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
18	Fmoc-Phe-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
19	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
20	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2,00 экв.)	HOBT (2,00 экв.) и DIC (2,00 экв.)
21	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
22	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
23	Fmoc-Lys(Dde)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
24	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
26	Fmoc-Leu-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
27	Fmoc-Aib-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
28	Fmoc-Ile-OH (6,00 экв.)	HOAT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)

32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
34	Fmoc-Phe-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
36	Fmoc-Gly-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6,00 экв.)	HOBT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
38	Fmoc-Aib-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

[0213] Промежуточное соединение В-5



В-5

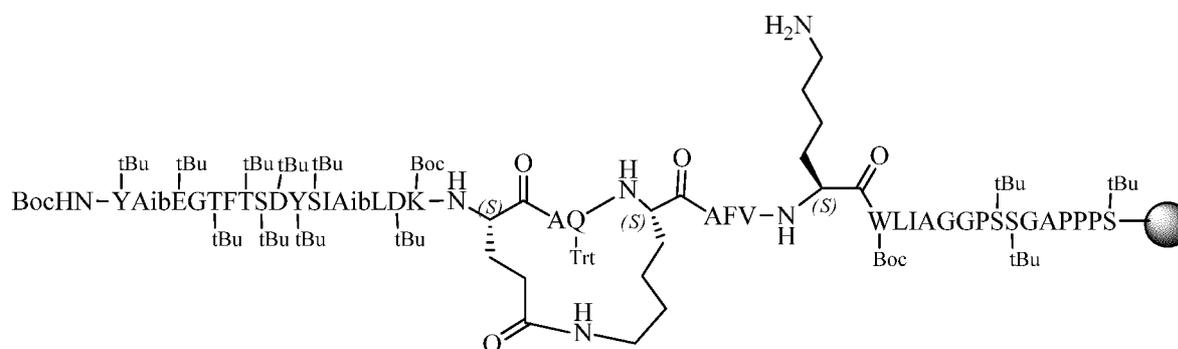
[0214] Ссылаясь на способ синтеза В-1, В-5 получали после следующих операций, таких как сочетание аминокислот, удаление защитной группы с Alloc и OAll, замыкание кольца амида и удаление защитной группы с Dde.

№	Исходный материал	Реагент для сочетания
1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
2	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
4	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
5	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

6	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
9	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
10	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
11	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
12	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
13	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
14	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
16	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
17	Fmoc-Val-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
18	Fmoc-Phe-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
19	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
20	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2,00 экв.)	HOBT (2,00 экв.) и DIC (2,00 экв.)
21	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
22	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
23	Fmoc-Lys(Dde)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
24	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
26	Fmoc-Leu-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
27	Fmoc-Aib-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
28	Fmoc-Ile-OH (6,00 экв.)	HOAT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)

33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
34	Fmoc-Phe-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
36	Fmoc-Gly-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6,00 экв.)	HOBT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
38	Fmoc-Aib-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

[0215] Промежуточное соединение В-6



В-6

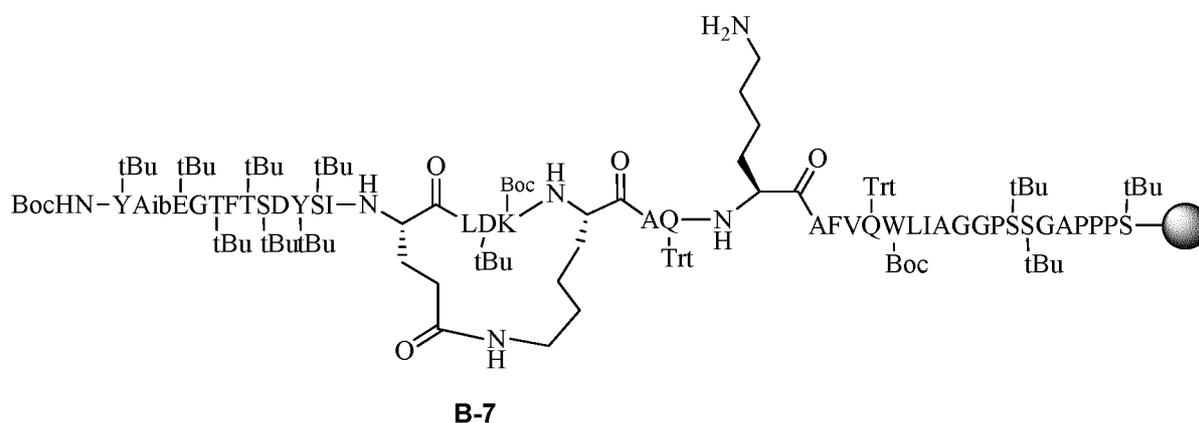
[0216] Ссылаясь на способ синтеза В-1, В-6 получали после следующих операций, таких как сочетание аминокислот, удаление защитной группы с Alloc и OAll, замыкание кольца амида и удаление защитной группы с Dde.

№	Исходный материал	Реагент для сочетания
1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
2	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
4	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
5	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
6	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
9	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
10	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
11	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
12	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
13	Fmoc-Ile-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
14	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
16	Fmoc-Lys(Dde)-OH (3,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
17	Fmoc-Val-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
18	Fmoc-Phe-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
19	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
20	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2,00 экв.)	HOBT (2,00 экв.) и DIC (2,00 экв.)
21	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
22	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
23	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
24	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
26	Fmoc-Leu-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
27	Fmoc-Aib-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
28	Fmoc-Ile-OH (6,00 экв.)	HOAT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)

34	Fmoc-Phe-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
36	Fmoc-Gly-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6,00 экв.)	HOBT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
38	Fmoc-Aib-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

[0217] Промежуточное соединение В-7



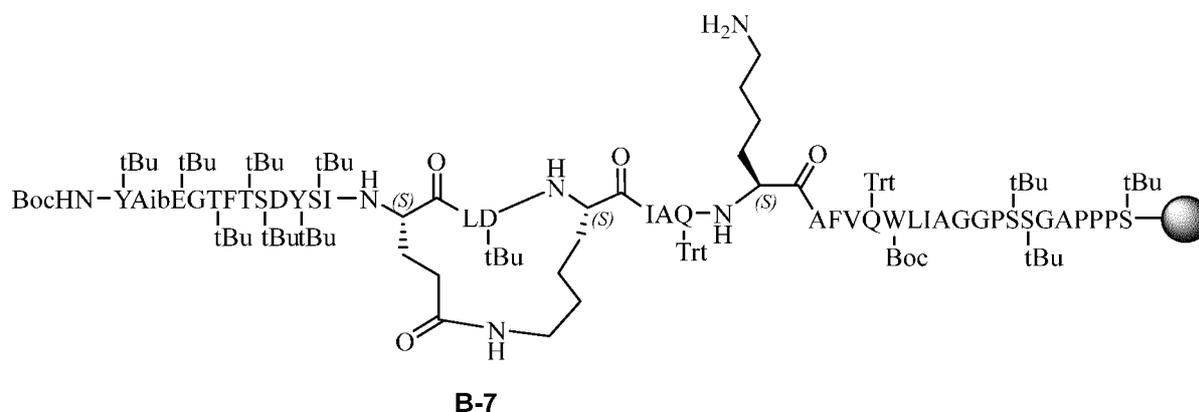
[0218] Ссылаясь на способ синтеза В-1, В-7 получали после следующих операций, таких как сочетание аминокислот, удаление защитной группы с Alloc и OAll, замыкание кольца амида и удаление защитной группы с Dde.

№	Исходный материал	Реагент для сочетания
1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
2	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
4	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
5	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
6	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
9	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
10	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
11	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
12	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
13	Fmoc-Ile-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
14	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
16	Fmoc-Gln(Trt)-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
17	Fmoc-Val-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
18	Fmoc-Phe-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
19	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
20	Fmoc-Lys(Dde)-OH (3,00 экв.)	HOBT (2,00 экв.) и DIC (2,00 экв.)
21	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
22	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
23	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
24	Fmoc-Lys(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
26	Fmoc-Leu-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
27	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
28	Fmoc-Ile-OH (6,00 экв.)	HOAT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
34	Fmoc-Phe-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)

35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
36	Fmoc-Gly-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6,00 экв.)	HOBT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
38	Fmoc-Aib-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
39	Boc-Tyr(tBu)-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

[0219] Промежуточное соединение В-8



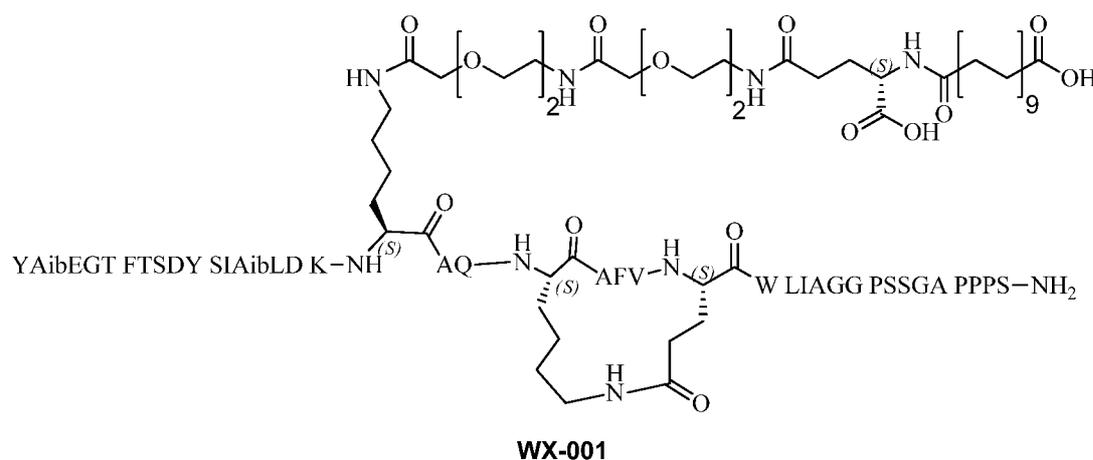
[0220] Ссылаясь на способ синтеза В-1, В-8 получали после следующих операций, таких как сочетание аминокислот, удаление защитной группы с Alloc и OAll, замыкание кольца амида и удаление защитной группы с Dde.

№	Исходный материал	Реагент для сочетания
1	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
2	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
4	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
5	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
6	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
8	Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

9	Fmoc-Pro-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
10	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
11	Fmoc-Gly-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
12	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
13	Fmoc-Ile-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
14	Fmoc-Leu-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
15	Fmoc-Trp(Boc)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
16	Fmoc-Gln(Trt)-OH (2,00 экв.)	HBTU (1,90 экв.) и DIEA (4,00 экв.)
17	Fmoc-Val-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
18	Fmoc-Phe-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
19	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
20	Fmoc-Lys(Dde)-OH (3,00 экв.)	HOBT (2,00 экв.) и DIC (2,00 экв.)
21	Fmoc-Gln(Trt)-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
22	Fmoc-Ala-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
23	Fmoc-Ile-OH (3,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
24	Fmoc-Lys(Alloc)-OH (2,00 экв.)	HBTU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
25	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
26	Fmoc-Leu-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
27	Fmoc-Glu(OAll)-OH (2,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
28	Fmoc-Ile-OH (6,00 экв.)	HOAT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
29	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
30	Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
31	Fmoc-Asp(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
32	Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
33	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
34	Fmoc-Phe-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
35	Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)

36	Fmoc-Gly-OH (6,00 экв.)	HATU (5,70 экв.) и DIEA (12,0 экв.)
37	Fmoc-Glu(tBu)-OH (6,00 экв.)	HOBT (6,00 экв.) и DIC (6,00 экв.)
38	Fmoc-Aib-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
39	Woc-Tyr(tBu)-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

[0221] Пример 1



[0222] 1. Сочетание длинноцепочечных жирных кислот. Ссылка на стадию синтеза 3.2 В-1 для завершения сочетания следующих фрагментов:

№	Исходный материал	Реагент для сочетания
1	Fmoc-AEEA-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
2	Fmoc-AEEA-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3	Fmoc-Glu-OtBu (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
4	20-(tBu)-эйкозандиовая кислота (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

[0223] 2. Расщепление и высушивание неочищенного пептида

[0224] 2.1. Раствор для расщепления получали согласно следующему объему.

Реагент	Соотношение
Трифторуксусная кислота	91

5	20-(tBu)-эйкозандиовая кислота (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
---	---	-------------------------------------

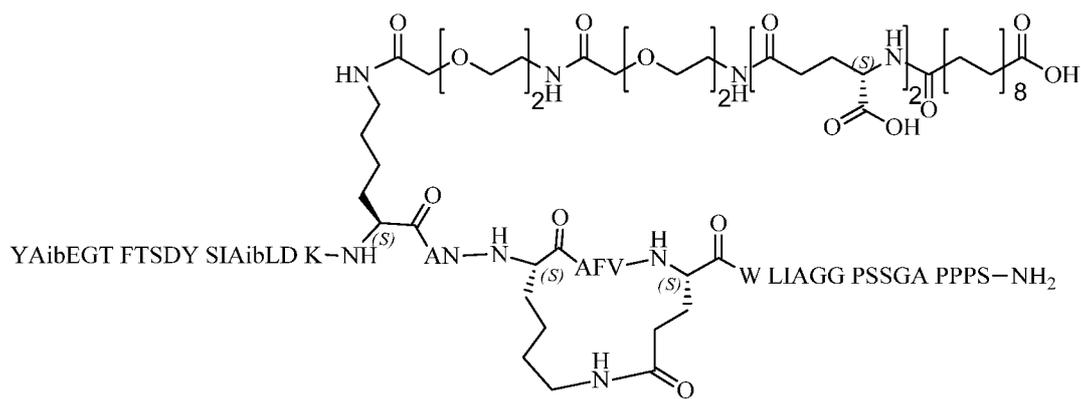
[0228] 2. Расщепление и высушивание неочищенного пептида

[0229] 2.1. Раствор для расщепления получали согласно следующему объему.

Реагент	Соотношение
Трифторуксусная кислота	91
Триизопропилсилан	3
H ₂ O	3
3-Меркаптопропионовая кислота	3

[0230] Высушенную смолу с пептидом добавляли в полученный раствор для расщепления. Смесь встряхивали на встряхивателе в течение 2,5 часов и фильтровали и фильтрат добавляли в ледяной изопропиловый эфир с 10 объемами фильтрата, центрифугировали и промывали 3 раза изопропиловым эфиром. После высушивания в вакууме в течение 2 часов получали неочищенный пептид и полипептидное соединение **WX-002** получали после очистки. Молекулярную массу полипептида подтверждали посредством ESI-MS, рассчитанное значение 4940,5, обнаруженное значение 4940,6.

[0231] Пример 3



WX-003

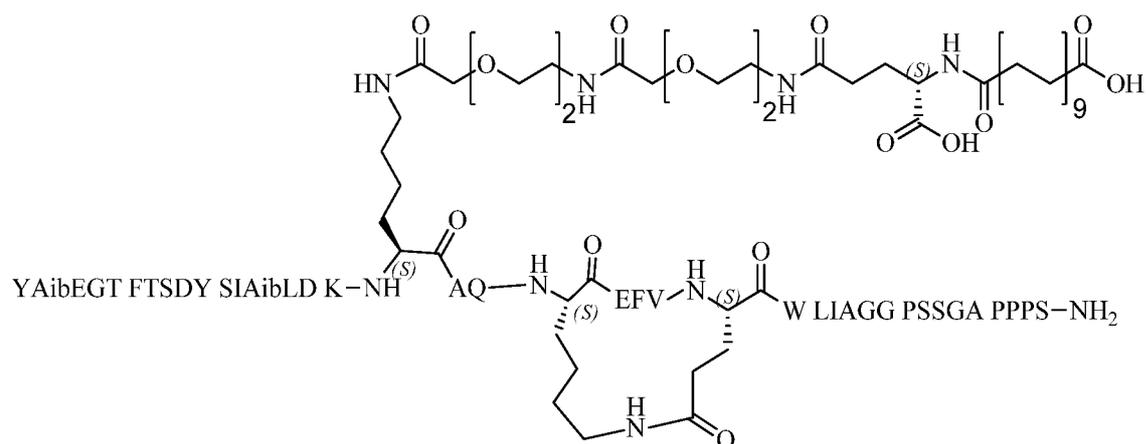
[0232] 1. Сочетание длинноцепочечных жирных кислот. Ссылка на стадию синтеза 3.2 В-1 для завершения сочетания следующих фрагментов:

№	Исходный материал	Реагент для сочетания
1	Fmoc-AEEA-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
2	Fmoc-AEEA-OH (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
3	Fmoc-Glu-OtBu (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
4	Fmoc-Glu-OtBu (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)
5	20-(tBu)-октадекандиовая кислота (3,00 экв.)	HATU (2,85 экв.) и DIEA (6,00 экв.)

[0233] 2. Расщепление и высушивание неочищенного пептида

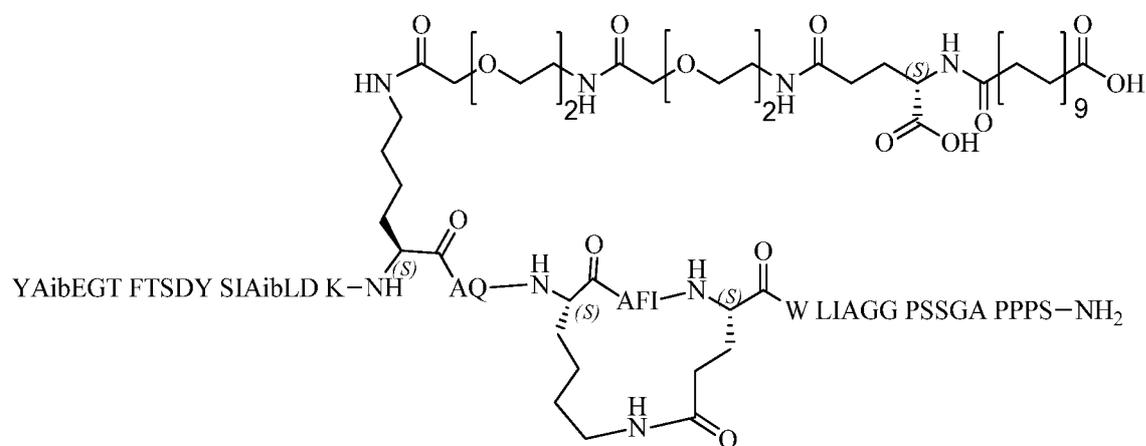
[0234] 2.1. Раствор для расщепления получали согласно следующему объему.

Реагент	Соотношение
Трифторуксусная кислота	91
Триизопропилсилан	3
H ₂ O	3

**WX-005**

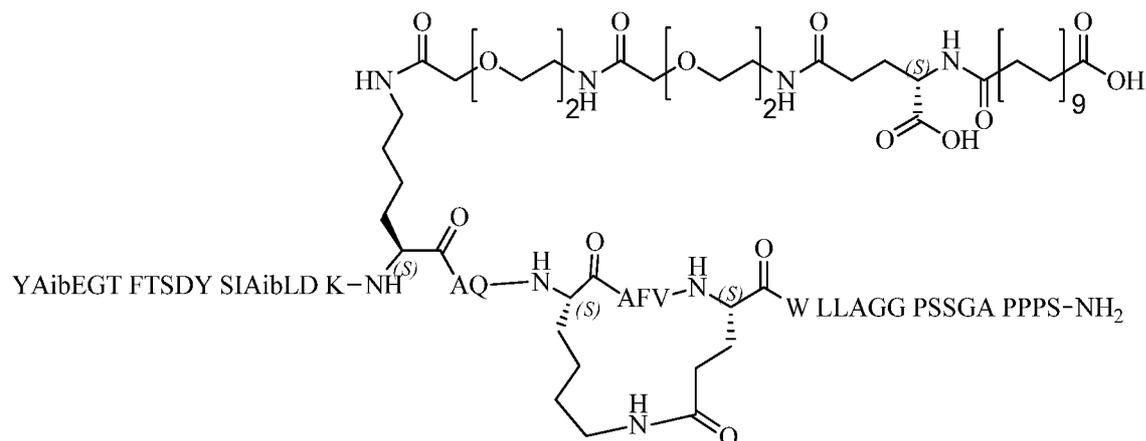
[0239] Ссылаясь на синтез **WX-001** получали **WX-005** через промежуточное соединение **B-3**. Молекулярную массу полипептида подтверждали посредством ESI-MS, рассчитанное значение 4869,5, обнаруженное значение 4869,3.

[0240] Пример 6

**WX-006**

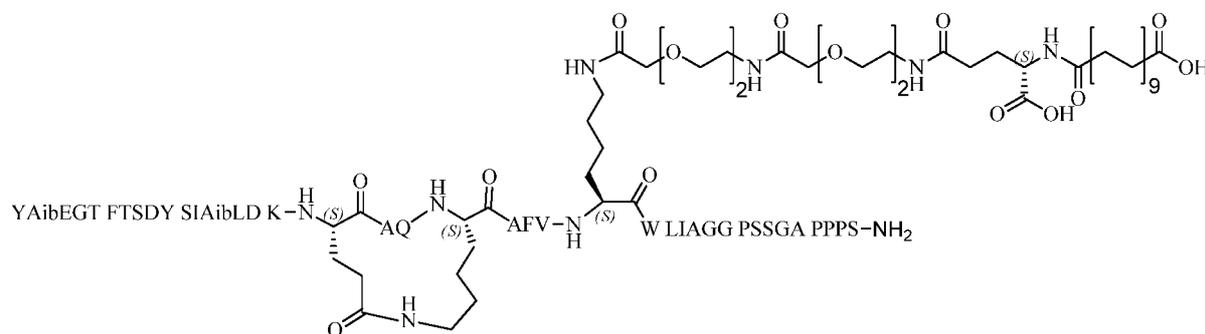
[0241] Ссылаясь на синтез **WX-001** получали **WX-006** через промежуточное соединение **B-4**. Молекулярную массу полипептида подтверждали посредством ESI-MS, рассчитанное значение 4825,5, обнаруженное значение 4825,5.

[0242] Пример 7

**WX-007**

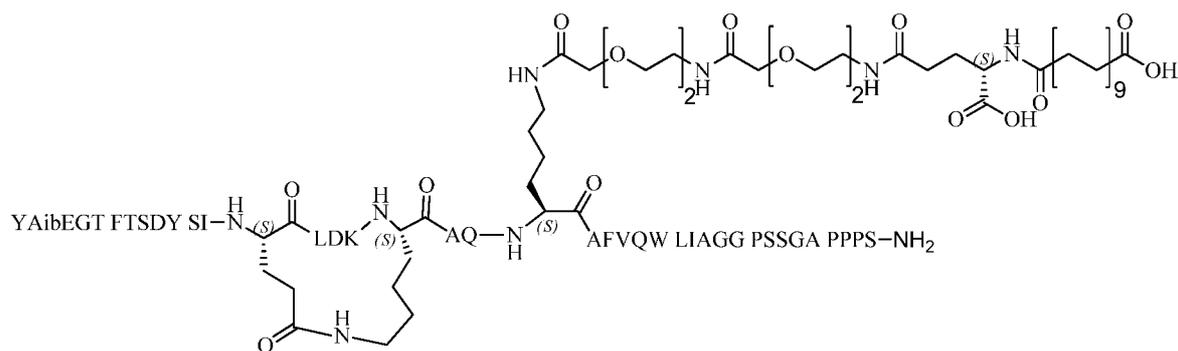
[0243] Ссылаясь на синтез **WX-001** получали **WX-007** через промежуточное соединение **B-5**. Молекулярную массу полипептида подтверждали посредством ESI-MS, рассчитанное значение 4811,4, обнаруженное значение 4811,1.

[0244] Пример 8

**WX-008**

[0245] Ссылаясь на синтез **WX-001** получали **WX-008** через промежуточное соединение **B-6**. Молекулярную массу полипептида подтверждали посредством ESI-MS, рассчитанное значение 4811,4, обнаруженное значение 4811,4.

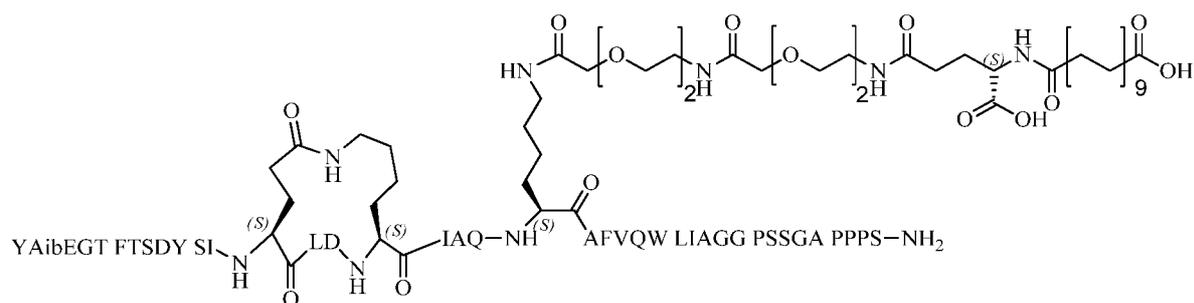
[0246] Пример 9



WX-009

[0247] Ссылаясь на синтез **WX-001** получали **WX-009** через промежуточное соединение **B-7**. Молекулярную массу полипептида подтверждали посредством ESI-MS, рассчитанное значение 4854,5, обнаруженное значение 4854,9.

[0248] Пример 10



WX-010

[0249] Ссылаясь на синтез **WX-001** получали **WX-010** через промежуточное соединение **B-8**. Молекулярную массу полипептида подтверждали посредством ESI-MS, рассчитанное значение 4839,4, обнаруженное значение 4839,6.

[0250] Данные биологического тестирования

[0251] Экспериментальный пример 1: тестирование агонистической активности в отношении GLP-1R/GIPR *in vitro*

[0252] А. Основной материал.

[0253] 1) Штамм клеток

[0254] Штаммы клеток конструировали в Shanghai WuXi AppTec. См. таблицу ниже для подробной информации.

Мишень	Клетка-хозяин	Клон
GLP-1R	HEK293	N/A
GIPR	CHO	N/A

[0255] 2) Реагенты и расходные материалы

Название	Партия.	№ изделия	Изготовитель
Набор для анализа cAMP	29F	62AM4PEJ	Cisbio
1 M HEPES	2120919	15630-106	Invitrogen
Сбалансированный солевой раствор Хенкса (HBSS)	2185775	14025	Invitrogen
Сывороточный альбумин человека (HSA)	SLCF7301	A1653-10G	Sigma
Казеин	SLCC9458	C4765-10 мл	Sigma
3-Изобутил-1-метилксантин (IBMX)	STBF6061V	I5879-5G	Sigma
384-луночный планшет надлежащего качества от ECHO	0006433672	PP-0200	Labcyte
OptiPlate-384	8210-19481	6007299	PerkinElmer

[0256] 3) Приборы

Название	Модель	Изготовитель
EnVision	envision2014	PerkinElmer
Счетчик клеток Vi-cell	Анализатор жизнеспособности клеток Vi-CELL™ XR	Beckman
Bravo	Bravo V11	Agilent

ЕСНО	ЕСНО 555	Labcyte
Центрифуга	Центрифуга Allegra™ 25R	Beckman

[0257] В. Способ

[0258] 1) Материалы для экспериментов

[0259] Экспериментальный буфер

<u>Реагент</u>	<u>Концентрация для хранения</u>	<u>Объем</u>	<u>Конечная концентрация</u>
Сбалансированный солевой раствор Хенкса	1x	48,7 мл/ 44,7 мл	Приблизительно 1x
Буфер на основе HEPES	1 моль/л	250 мкл	5 ммоль/л
5% раствор казеина (HEPES)/	5%/	1000 мкл/	0,10%/
10% раствор сывороточного альбумина человека (HSA)	10%	5000 мкл	1%
3-Изобутил-1-метилксантин (IBMX)	500 ммоль/л	50 мкл	0,5 ммоль/л

[0260] Получение реагента для выявления

<u>Реагент</u>	<u>Концентрация для хранения</u>	<u>Объем</u>	<u>Конечная концентрация</u>
Клеточный лизат	1x	9,5 мл	Приблизительно 1x
Раствор D2-cAMP	40x	250 мкл	1x
Раствор антитела к cAMP	40x	250 мкл	1x

[0261] 2) Экспериментальный способ

[0262] а) Подготовка планшета с соединением:

[0263] тестируемое соединение последовательно 4-кратно разбавляли с 10 точками.

Исходная концентрация составляла 30 мкМ, и разбавление завершали с помощью Bravo.

[0264] В) Перенос соединения:

[0265] 1) 100 нл соединения переносили в планшет OptiPlate-384 с применением Echo.

[0266] 2) Планшет OptiPlate-384 центрифугировали при 1000 об./мин в течение 5 секунд.

[0267] с) Получение суспензии клеток.

[0268] 1) пробирку для криоконсервации клеток GLP-1R/GIPR быстро размораживали в теплой воде при 37°C.

[0269] 2) Суспензию клеток переносили в центрифужную пробирку для переноса объемом 15 мл и аккуратно ополаскивали с помощью 10 мл HBSS.

[0270] 3) Центрифужную пробирку центрифугировали при 1000 об./мин в течение 1 минуты при комнатной температуре.

[0271] 4) Надосадочную жидкость удаляли.

[0272] 5) Клетки, прикрепленные к дну, аккуратно диспергировали и аккуратно промывали с помощью 10 мл HBSS. Клетки центрифугировали для осаждения и наконец ресуспендировали в экспериментальном буфере.

[0273] 6) Vi-cell использовали для измерения плотности и активности клеток.

[0274] 7) Концентрацию клеток GLP-1R/GIPR разбавляли до $2,0 \cdot 10^5$ /мл экспериментальным буфером.

[0275] 8) 100 нл разбавленной суспензии клеток переносили в планшет OptiPlate-384.

[0276] 9) Разбавленную суспензию клеток инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут.

[0277] d) Добавление реагента для выявления.

[0278] 1) В пустую лунку планшета OptiPlate-384 добавляли 10 мкл разбавленного с градиентом стандарта сАМР с концентрацией 800 нМ.

[0279] 2) Добавляли 10 мкл реагента для выявления сАМР.

[0280] 3) Планшет OptiPlate-384 накрывали пленкой TopSeal-A и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 минут.

[0281] TopSeal-A удаляли и проводили анализ с помощью EnVision.

[0282] С. Результаты эксперимента

[0283] Результаты эксперимента показаны в таблице 1.

[0284] Таблица 1. Результаты тестирования агонистической активности в отношении GLP-1R/GIPR *in vitro*

Полипептидные лекарственные средства	Агонистическая активность в отношении GLP-1R			Агонистическая активность в отношении GIPR		
	EC ₅₀ (нМ)		Соотношение	EC ₅₀ (нМ)		Соотношение
	(-) 1% HSA	(+) 1% HSA		(-) 1% HSA	(+) 1% HSA	
WX-001	0,014	3,664	265	0,44	23,04	53
WX-002	0,052	NA	NA	0,29	NA	NA
WX-003	0,090	NA	NA	0,30	NA	NA
WX-005	0,042	NA	NA	0,22	NA	NA
WX-006	0,051	NA	NA	0,45	NA	NA
WX-007	0,14	NA	NA	0,13	NA	NA
WX-008	0,08	NA	NA	0,32	NA	NA
WX-010	0,03448	33,96	984,9	11,86	443	37,4

[0285] **Заключение:** соединения по настоящему изобретению характеризуются сильной агонистической активностью в отношении GLP-1R/GIPR.

[0286] **Экспериментальный пример 2. Фармакокинетическая оценка соединений на крысах**

[0287] **А. Цель эксперимента**

[0288] Тестирование фармакокинетики соединений на крысах SD *in vivo*.

[0289] **В. Осуществление эксперимента**

[0290] Фармакокинетические характеристики соединений у грызунов после подкожной инъекции тестировали согласно стандартному протоколу. В эксперименте кандидатные соединения составляли в прозрачных растворах и крысам вводили одну подкожную инъекцию (SC, 0,048 мг/кг). Инъекционная среда-носитель представляла собой цитратный буфер (20 мМ, pH = 7). Цельную кровь собирали и подготавливали для получения плазмы крови. Концентрацию лекарственного средства анализировали посредством метода LC-MS/MS и фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью программного обеспечения Phoenix WinNonlin.

[0291] **С. Результаты эксперимента**

[0292] Результаты эксперимента показаны в таблице 2.

[0293] Таблица 2. Результаты фармакокинетического тестирования

Номер соединения	Максимальная концентрация в плазме крови (нМ)	Период полувыведения T _{1/2} (ч)	Интегральная концентрация AUC _{0-72 ч} при SC-введении (нМ.ч)
WX001	22	12	728

WX002	14	17	1316
WX005	14	17	1329
WX006	16	10	846

[0294] Заключение: соединения по настоящему изобретению характеризуются превосходными фармакокинетическими свойствами у крыс.

[0295] Экспериментальный пример 3. Фармакокинетическая оценка соединений на крысах

[0296] А. Цель эксперимента

[0297] Тестирование фармакокинетики соединений на мышах C57BL/6 *in vivo*.

[0298] В. Осуществление эксперимента

[0299] Фармакокинетические характеристики соединений у грызунов после внутривенной инъекции и подкожной инъекции тестировали согласно стандартному протоколу. В эксперименте кандидатные соединения составляли в прозрачных растворах и мышам вводили одну внутривенную инъекцию (IV, 0,048 мг/кг) и подкожную инъекцию (SC, 0,048 мг/кг). Среда-носитель для внутривенной инъекции представляла собой буфер PBS (pH = 7), а среда-носитель для подкожной инъекции представляла собой цитратный буфер (20 мМ, pH = 7). Цельную кровь собирали и подготавливали для получения плазмы крови. Концентрацию лекарственного средства анализировали посредством метода LC-MS/MS и фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью программного обеспечения Phoenix WinNonlin.

[0300] С. Результаты эксперимента

[0301] Результаты эксперимента показаны в таблице 3.

[0302] Таблица 3. Результаты фармакокинетического тестирования

Номер соединения	Клиренс (мл/мин/кг)	Период полувыведения $T_{1/2}$ (ч)	Интегральная концентрация AUC_{0-72} ч при SC-введении (нМ.ч)	Биодоступность, F (%)
WX001	0,088	15,5	1554	85,5%

[0303] Заключение: соединения по настоящему изобретению характеризуются превосходными фармакокинетическими свойствами у мышей.

[0304] Экспериментальный пример 4. Фармакокинетическая оценка соединений на яванских макаках

[0305] А. Цель эксперимента

[0306] Тестирование фармакокинетики соединений на яванских макаках *in vivo*.

[0307] В. Осуществление эксперимента

[0308] Фармакокинетические характеристики соединений у млекопитающих после внутривенной инъекции и подкожной инъекции тестировали согласно стандартному протоколу. В эксперименте кандидатные соединения составляли в прозрачных растворах и яванским макакам вводили одну подкожную инъекцию (SC, 0,02 мг/кг). Среда-носитель для подкожной инъекции представляла собой цитратный буфер (20 мМ, pH = 7). Цельную кровь собирали и подготавливали для получения плазмы крови. Концентрацию лекарственного средства анализировали посредством метода LC-MS/MS и фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью программного обеспечения Phoenix WinNonlin.

[0309] С. Результаты эксперимента

[0310] Результаты эксперимента показаны в таблице 4.

[0311] Таблица 4. Результаты фармакокинетического тестирования

Номер соединения	C_{\max} (нМ)	T_{\max} (ч)	Период полувыведения $T_{1/2}$ (ч)	Интегральная концентрация $AUC_{0-240 \text{ ч}}$ при SC-введении (нМ.ч)
WX001	30	21	80	3973
WX002	33	29	81	4582
WX005	31	40	98	4553
WX006	30	29	72,4	3640

[0312] Заключение: соединения по настоящему изобретению характеризуются превосходными фармакокинетическими свойствами у обезьян.

[0313] Экспериментальный пример 5. Тестирование стабильности в плазме крови (PLS)

[0314] А. Цель эксперимента

[0315] Изучить стабильность тестируемых соединений в плазме крови нормальных мышей.

[0316] В. Осуществление эксперимента

[0317] 1. Перед экспериментом коагулированную замороженную плазму крови размораживали на водяной бане при 37°C. Плазму крови центрифугировали при 4000 об./мин в течение 5 минут. Если образовывался сгусток крови, то сгусток крови удаляли и значение pH доводили до 7,4±0,1.

[0318] 2. Получение раствора тестируемого соединения: 100 мкМ раствора получали путем разбавления с помощью DMSO.

[0319] 3. 98 мкл плазмы крови для отрицательного контроля добавляли в 2 мкл раствора тестируемого соединения (100 мкМ), чтобы конечная концентрация

смешанного раствора из двух достигала 2 мкМ, и смешанный раствор помещали на водяную баню при 37°C для инкубирования.

[0320] 4. В каждой временной точке (0, 10, 30, 60 и 120 минут) 100 мкл раствора H_3PO_4 и 800 мкл стоп-раствора (200 нг/мл толбутамида и 200 нг/мл лабеталола в 100% растворе метанола) добавляли для осаждения белка и тщательно перемешивали.

[0321] 5. Образцы центрифугировали при 4000 об./мин в течение 20 минут и 100 мкл надосадочной жидкости отбирали из каждой лунки для анализа посредством LC-MS/MS.

[0322] С. Результаты эксперимента

[0323] Результаты эксперимента показаны в таблице 5.

[0324] Таблица 5. Результаты тестирования PLS

Номер соединения	WX001	WX002	WX005	WX006
PLS (Н/М) $T_{1/2}$ (мин)	> 289/> 289	> 289/> 289	> 289/> 289	> 289/> 289

[0325] Заключение: соединения по настоящему изобретению характеризуются превосходной стабильностью в плазме крови.

[0326] Экспериментальный пример 6. Тестирование связывания с белками плазмы крови (РРВ)

[0327] А. Цель эксперимента

[0328] Изучить связывание тестируемых соединений с альбумином плазмы крови человека/мышь.

[0329] В. Осуществление эксперимента

[0330] 1. Получение матрицы: В день эксперимента плазму крови размораживали в

холодной воде и центрифугировали при 3220 об./мин в течение 5 мин для удаления всех сгустков крови. рН полученной плазмы крови измеряли и доводили до $7,4 \pm 0,1$ с применением при необходимости 1% фосфорной кислоты или 1 н. гидроксида натрия.

[0331] 2. Стадии разбавления тестируемых соединений. Тестируемые соединения растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO) с получением исходных растворов в концентрациях 10 мМ и 2 мМ соответственно. Рабочий раствор с концентрацией 40 мкМ получали путем разбавления 2 мкл исходного раствора (2 мМ) с помощью 98 мкл DMSO. Рабочий раствор контрольного соединения с концентрацией 400 мкМ получали путем разбавления 10 мкл исходного раствора с помощью 240 мкл DMSO. Рабочий раствор соединения (5 мкл) смешивали с матрицей для отрицательного контроля (995 мкл) в соотношении 1:200 с получением загрузочной матрицы.

[0332] 3. Стадии анализа

[0333] 3.1 Равное количество 30 мкл загрузочной матрицы ($n = 2$) переносили в планшет для сбора образцов для получения образцов момента времени 0 (T_0) для определения остатка. Образцы немедленно соотносили с соответствующим буфером для отрицательного контроля в конечном объеме 60 мкл с объемным соотношением плазмы крови и буфера в каждой лунке 1:1. Затем 60 мкл 4% H_3PO_4 в H_2O и 480 мкл стоп-раствора, содержащего внутренний стандарт, добавляли в образцы T_0 тестируемых соединений. Затем их хранили при $2-8^\circ C$ с другими образцами, ожидающими дальнейшей обработки.

[0334] 3.2 Оставшиеся образцы плазмы крови предварительно инкубировали в инкубаторе с диоксидом углерода при $37 \pm 1^\circ C$ в течение 30 мин. Полученные образцы без белков (образцы F) и образцы загрузочной матрицы (230 мкл) переносили в поликарбонатные пробирки ($n = 2$) и подвергали ультрацентрифугированию при $37^\circ C$ и $155000 \times g$ (35000 об./мин) в течение 4 часов.

[0335] 3.3 Для получения образцов T (тестируемых образцов) дополнительный содержащий матрицу образец переносили в отдельный 96-луночный планшет (планшет

для инкубирования образцов) и инкубировали при 37°C в течение 4 часов.

[0336] 3.4 После центрифугирования 30 мкл образца без белков и 30 мкл образца T переносили из второго слоя надосадочной жидкости (ниже верхнего слоя) в новый планшет для сбора образцов. Каждый образец смешивали с соответствующим буфером или матрицей для отрицательного контроля в конечном объеме 60 мкл с объемным отношением матрица:буфер 1:1. 60 мкл 4% водного раствора H₃PO₄ и 480 мкл стоп-раствора (содержащего внутренний стандарт) добавляли во все образцы. Смесь центрифугировали при 4000 об./мин в течение 20 мин и 100 мкл надосадочной жидкости из каждого образца отбирали для анализа посредством LC-MS/MS.

[0337] С. Результаты эксперимента

[0338] Результаты эксперимента показаны в таблице 6. Примечание: NA означает, что связывание с белками в плазме крови является слишком высоким, и никакого свободного лекарственного средства нельзя выявить при нормальной концентрации белка в плазме крови.

[0339] Таблица 6. Результаты тестирования PPB

Номер соединения	WX001	WX002	WX005	WX006
%PPB, несвязанное лекарственное средство (Н/М)	NA/NA	NA/0,21%	NA/0,22%	NA/0,35%

[0340] Заключение: соединения по настоящему изобретению характеризуются очень высоким связыванием с белками плазмы крови.

[0341] Экспериментальный пример 7. Тестирование стабильности в почечном гомогенате (BHS)

[0342] А. Цель эксперимента

[0343] Исследование стабильности тестируемых соединений в почечном гомогенате нормальных мышей.

[0344] В. Осуществление эксперимента

[0345] 1. Перед экспериментом замороженный почечный гомогенат размораживали на водяной бане при 37°C.

[0346] 2. Тестируемые соединения: 10 мМ исходный раствор разбавляли с помощью DMSO с получением 1 мМ промежуточного раствора;

[0347] 3. Тестируемые соединения: 1 мМ промежуточный раствор разбавляли с помощью DMSO с получением 50 мкМ раствора для дозирования;

[0348] 4. В каждой временной точке (0, 10, 30, 60, 120, 180, 240 минут) 100 мкл 4% H_3PO_4 и 800 мкл стоп-раствора добавляли для осаждения белка и тщательно перемешивали.

[0349] 5. Образцы центрифугировали при 4000 об./мин в течение 10 минут и 100 мкл надосадочной жидкости отбирали из каждой лунки в планшет. Образцы встряхивали при 800 об./мин в течение приблизительно 10 мин перед подверганием тестированию посредством LC-MS/MS.

[0350] С. Результаты эксперимента

[0351] Результаты эксперимента показаны в таблице 7.

[0352] Таблица 7. Результаты тестирования BHS

Номер соединения	WX001	WX002	WX005	WX006
BHS ($T_{1/2}$ (мин))	14	20	21	234

[0353] Экспериментальный пример 8. Интраперитонеальное тестирование толерантности к глюкозе (ipGTT) – фармакодинамическая оценка соединений на

мышях *in vivo*

[0354] А. Цель эксперимента

[0355] Изучить эффект улучшения тестируемых соединений в отношении толерантности к глюкозе у нормальных мышей.

[0356] В. Осуществление эксперимента

[0357] 1. После разделения мышей на группы согласно весу тела и уровню глюкозы в крови каждой группе животных путем инъекции вводили тестируемое соединение (0,3 нмоль/кг) и среду-носитель (20 мМ цитратный буфер). Мыши голодали в течение ночи, и им путем интраперитонеальной инъекции вводили раствор глюкозы (2 г/кг, 10 мл/кг) через 18 часов;

[0358] 2. Глюкометр использовали для измерения концентраций глюкозы в крови в моменты времени -60, 0, 15, 30, 60 и 120 минут после введения глюкозы.

[0359] С. Результаты эксперимента

[0360] Результаты эксперимента показаны в таблице 8.

[0361] Таблица 8. Результаты тестирования ipGTT

Номер соединения	Среда-носитель	WX001	WX002	WX005	WX006
AUC _{0-120 мин} ГЛЮКОЗЫ в крови (ммоль.мин)	1916	1277	1150	1143	1164

[0362] Заключение: соединения по настоящему изобретению характеризуются превосходными эффектами на улучшение толерантности к глюкозе.

[0363] Экспериментальный пример 9. Фармакодинамическое исследование – фармакодинамическая оценка на мышях db/db *in vivo*

[0364] А. Цель эксперимента

[0365] Изучить эффект гликемического контроля тестируемых соединений на мышах db/db с диабетом II типа.

[0366] В. Осуществление эксперимента

[0367] 1. После поступления мышей db/db в учреждение их держали в помещении для разведения животных со строго контролируемыми условиями окружающей среды. Температуру в помещении для разведения поддерживали при 20-24°C и влажность поддерживали при 30-70%. Температуру и влажность в помещении для разведения контролировали в режиме реального времени с помощью гидротермографа и температуру и влажность регистрировали дважды в день (один раз утром и один раз после полудня). Дневное освещение в помещении для разведения животных контролировали с помощью электронной системы освещения с таймингом и свет включали на 12 часов и выключали на 12 часов каждый день (включали в 7:00 утром и выключали в 19:00 после полудня). В ходе эксперимента животных держали в отдельных клетках и игрушки обеспечивали в каждой клетке. В ходе эксперимента животные имели свободный доступ к корму (корм для роста/разведения крыс и мышей) и питьевой воде.

[0368] 2. Среду-носитель и тестируемое соединение (15 нмоль/кг) вводили путем подкожной инъекции в каждой группе животных. Время введения: 9:30-11:00 утра, и частота введения составляла раз в день, и введение было непрерывным в течение 4 недель.

[0369] С. Результаты эксперимента

[0370] Результаты эксперимента показаны в таблице 9.

[0371] Таблица 9. Влияние тестируемых соединений на снижение уровня глюкозы у мышей db/db

Номер соединения	Среда-носитель	WX001	WX002	WX005	WX006
ΔHbA1c% (по сравнению с днем 1 через четыре недели непрерывного введения)	15%	-28%	-21%	-21%	-23%

[0372] Заключение: соединения по настоящему изобретению демонстрируют превосходную эффективность в отношении снижения уровня глюкозы у мышей db/db.

[0373] Экспериментальный пример 10. Фармакодинамическое исследование – фармакодинамическая оценка на мышах DIO *in vivo*

[0374] А. Цель эксперимента

[0375] Изучить влияние тестируемых соединений на потерю веса у мышей DIO

[0376] В. Осуществление эксперимента

[0377] 1. После поступления мышей DIO в учреждение WuXi AppTec их держали в помещении для разведения животных со строго контролируруемыми условиями окружающей среды. Температуру в помещении для разведения поддерживали при 20-24°C и влажность поддерживали при 30-70%. Температуру и влажность в помещении для разведения контролировали в режиме реального времени с помощью гидротермографа и температуру и влажность регистрировали дважды в день (один раз утром и один раз после полудня). Дневное освещение в помещении для разведения животных контролировали с помощью электронной системы освещения с таймингом и свет включали на 12 часов и выключали на 12 часов каждый день (включали в 7:00 утром и выключали в 19:00 после полудня). В ходе эксперимента животных держали в отдельных клетках и игрушки обеспечивали в каждой клетке. В ходе эксперимента животные имели свободный доступ к корму (корм для роста/разведения крыс и мышей) и питьевой воде.

[0378] 2. Среда-носитель и тестируемое соединение (10 нмоль/кг) вводили путем

подкожной инъекции в каждой группе животных соответственно. Время введения: 9:30 утра, и частота введения составляла один раз в три дня, и цикл введения составлял 22 дня.

[0379] С. Результаты эксперимента

[0380] Результаты эксперимента показаны в таблице 10.

[0381] Таблица 10. Фармакодинамика тестируемых соединений у мышей DIO

Номер соединения	Среда-носитель	WX001	WX002	WX005	WX006
Δ веса тела, % (через 22 дня по сравнению с днем 1)	0,2%	-29%	-26%	-24%	-32%
Δ жировой ткани, % (через 22 дня по сравнению с днем 1)	2%	-54%	-48%	-47%	-62%
Δ нежировой ткани, % (через 22 дня по сравнению с днем 1)	-3%	-11%	-10%	-8%	-18%

[0382] Заключение: соединения по настоящему изобретению демонстрируют превосходную эффективность в отношении потери веса у мышей DIO.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представленное следующей формулой, или его фармацевтически приемлемая соль,

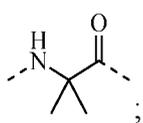
SEQ ID NO1: YAibEGT FTSDY SIAibLD KK¹AZ₀K₀ Z₁FZ₂E₀W LZ₃AGG PSSGA PPPS₀,

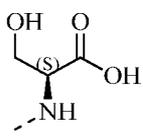
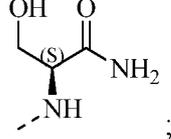
SEQ ID NO2: YAibEGT FTSDY SIAibLD KE₀AQK₀ AFVK¹W LIAGG PSSGA PPPS₀,

SEQ ID NO3: YAibEGT FTSDY SIE₀LD KK₀AQK¹ AFVQW LIAGG PSSGA PPPS₀,

SEQ ID NO4: YAibEGT FTSDY SIE₀LD K₀IAQK¹ AFVQW LIAGG PSSGA PPPS₀,

где

Aib характеризуется структурой  ;

S₀ выбран из  и  ;

Z₀ выбран из глутамина (Q) и аспарагина (N);

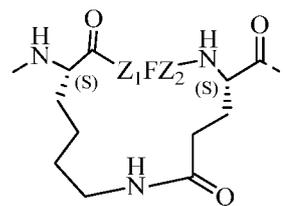
Z₁ выбран из аланина (A) и глутаминовой кислоты (E);

Z₂ выбран из валина (V) и изолейцина (I);

Z₃ выбран из изолейцина (I) и лейцина (L);

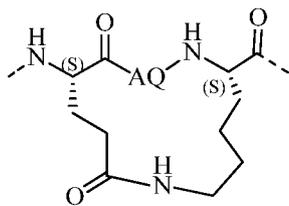
E₀ и K₀ означают, что карбоксильная группа при боковой цепи глутаминовой кислоты и аминогруппа при боковой цепи лизина совместно образуют лактамную структуру, и в

этом случае K₀Z₁FZ₂E₀ характеризуется структурой



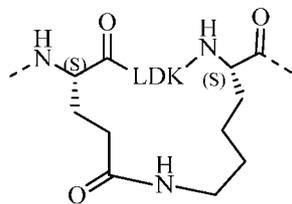
, E₀AQK₀

характеризуется структурой

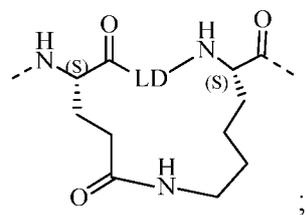


, E₀LDKK₀ характеризуется

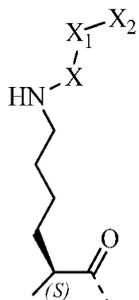
структурой



, и E₀LDK₀ характеризуется структурой

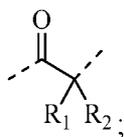


K¹ означает, что аминогруппа при боковой цепи лизина соединена с -X-X₁-X₂ и



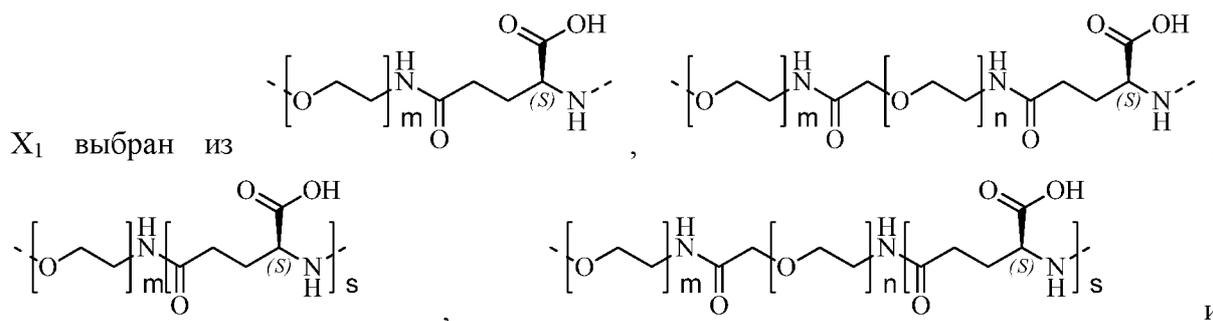
характеризуется структурой --NH ;

X выбран из

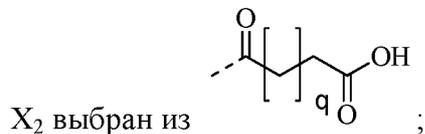
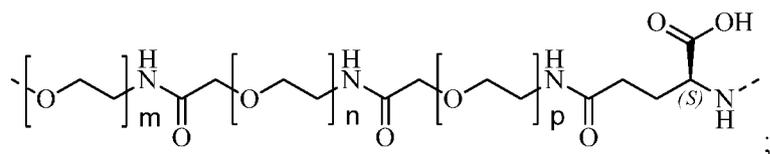


каждый из R₁ и R₂ независимо выбран из H и CH₃;

X₁ выбран из



и

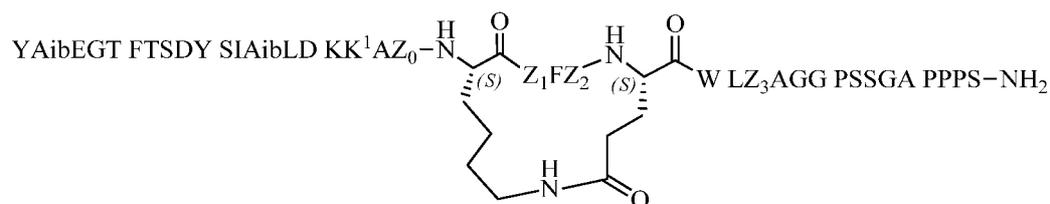


каждый из m, n и p независимо выбран из 2 и 3;

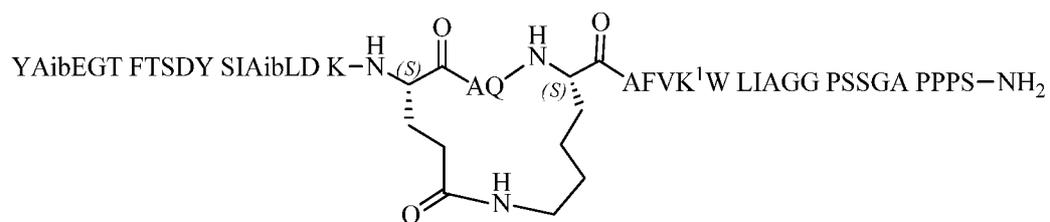
s выбран из 2 и 3;

q выбран из 15, 16, 17, 18 и 19.

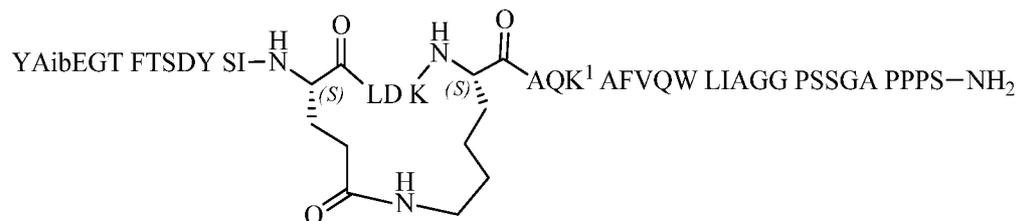
2. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1, которые выбраны из:



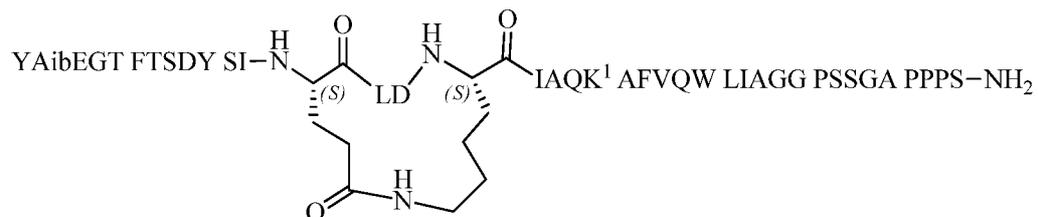
(P-1),



(P-2),



(P-3),



(P-4),

где

Aib, Z₀, Z₁, Z₂, Z₃ и K¹ являются такими, как определено в п. 1.

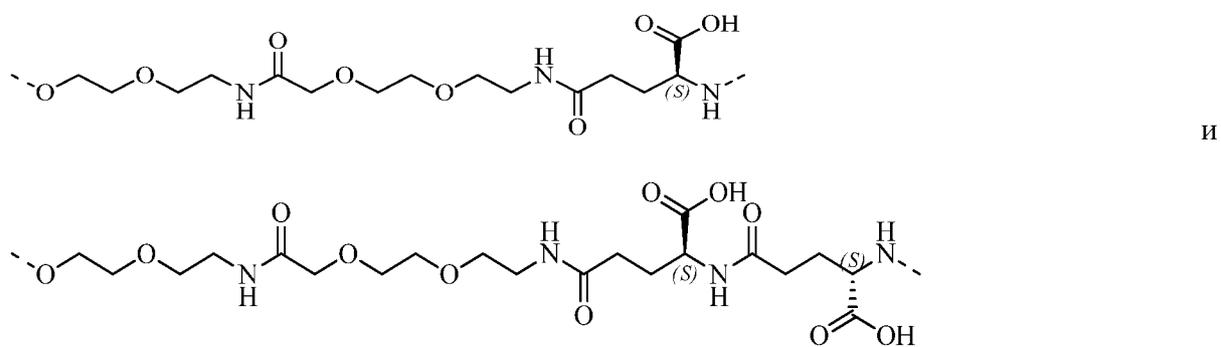
3. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1 или п. 2, где X выбран из -C(=O)-CH₂-.

4. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1 или п. 2, где каждый из m, n и r независимо выбран из 2.

5. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1 или п. 2, где s независимо выбран из 2.

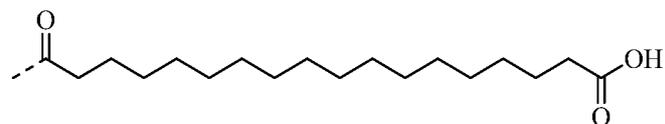
6. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1 или п. 2, где q независимо выбран из 15 и 17.

7. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1 или п. 2, где X₁ выбран из

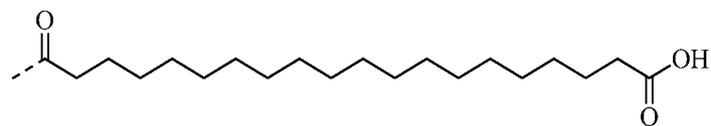


8. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1 или п. 2, где X₂

выбран из

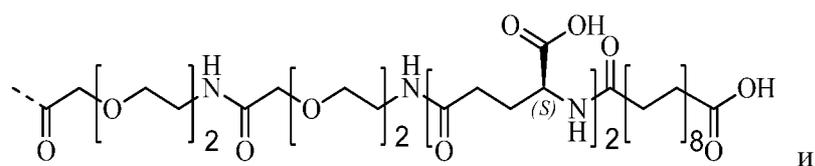
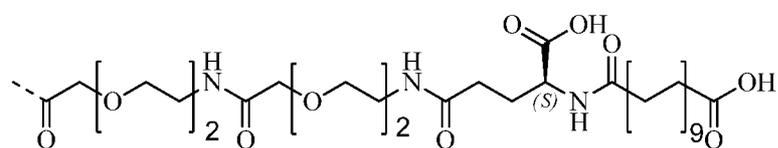


и

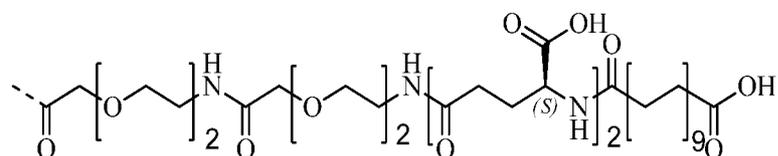


9. Соединение или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1 или п. 2, где -X-X₁-X₂

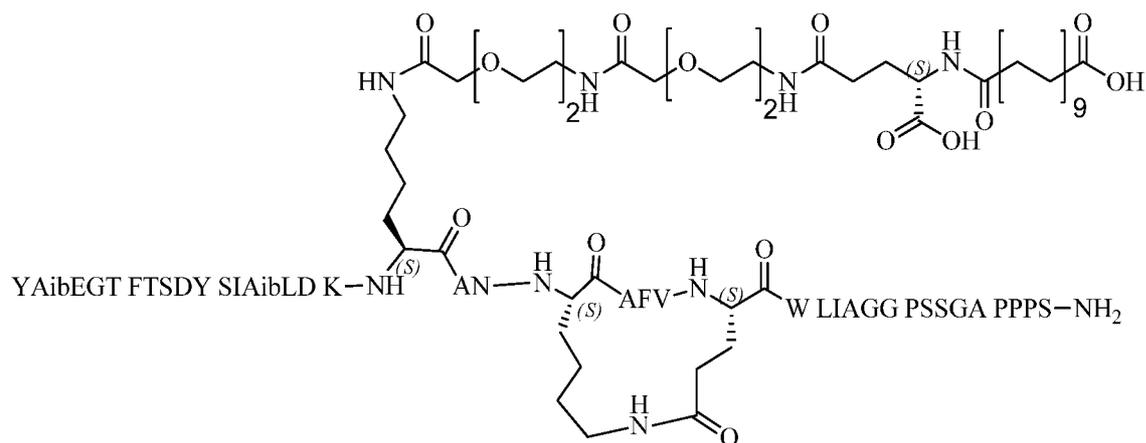
выбран из



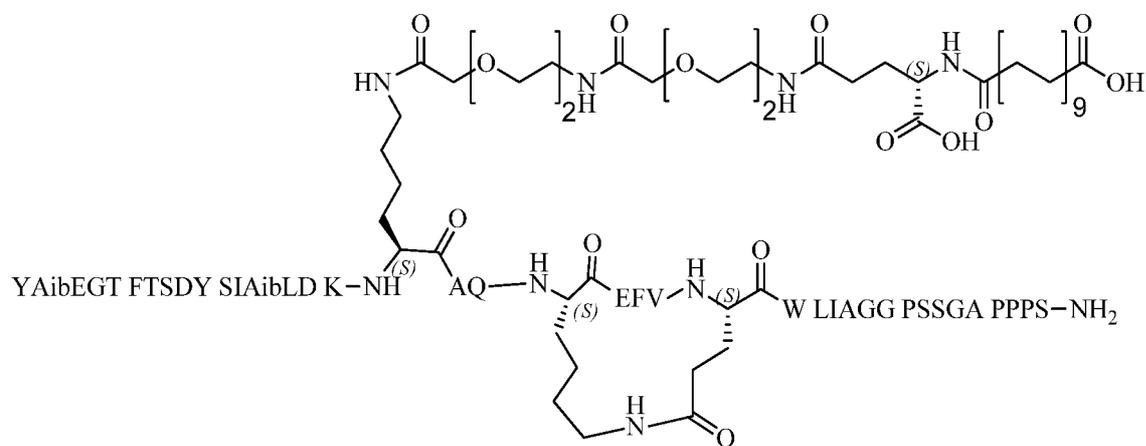
и



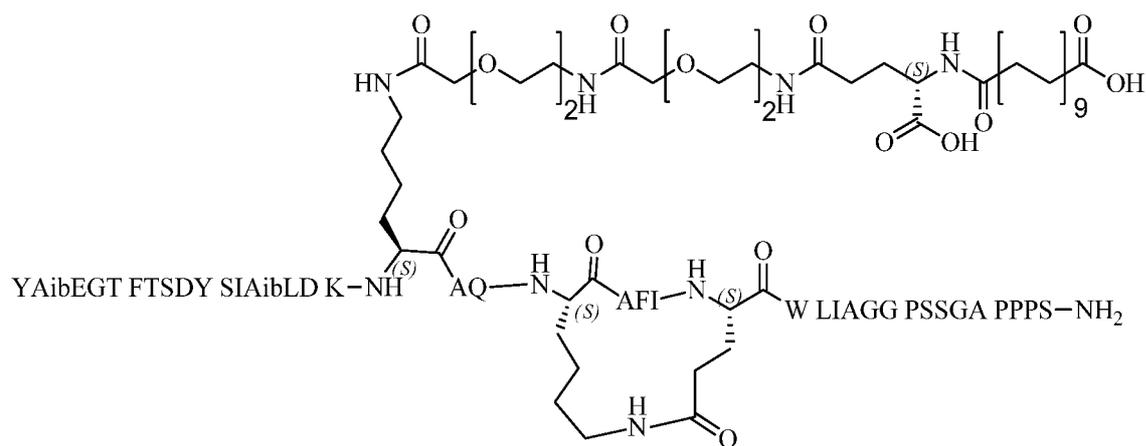
10. Соединение, представленное следующей формулой, или его фармацевтически приемлемая соль,



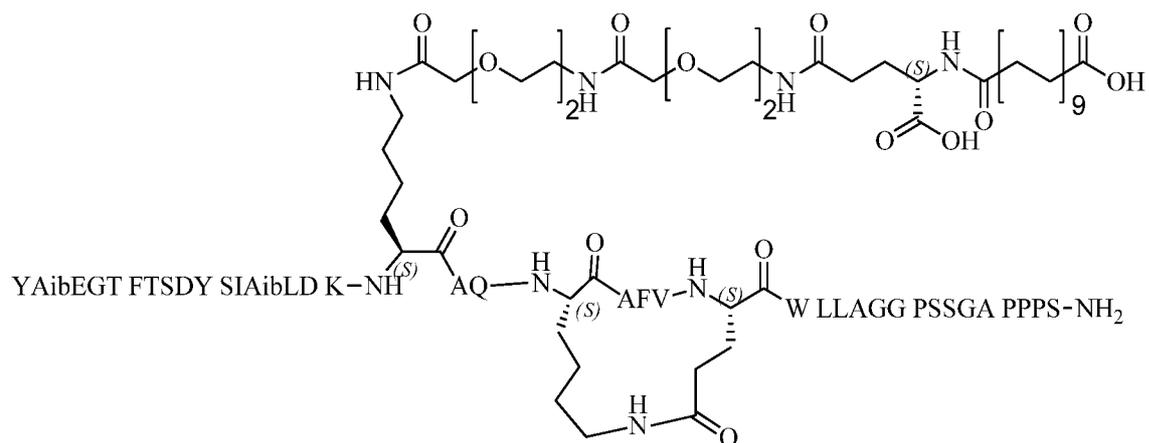
WX-004



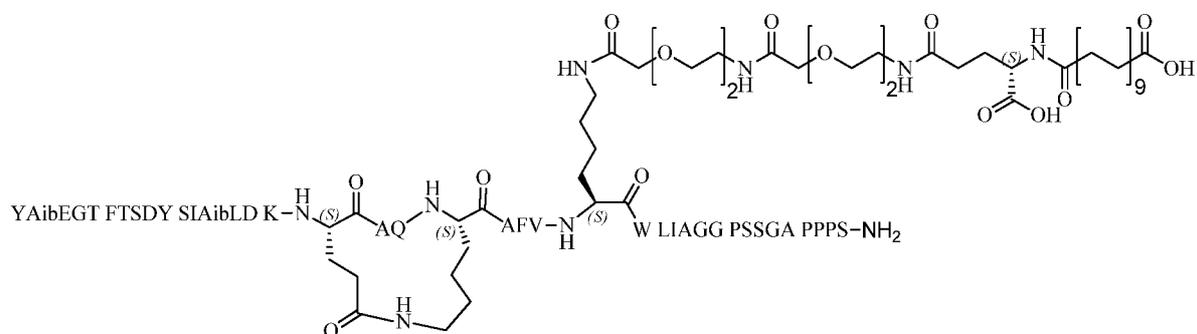
WX-005



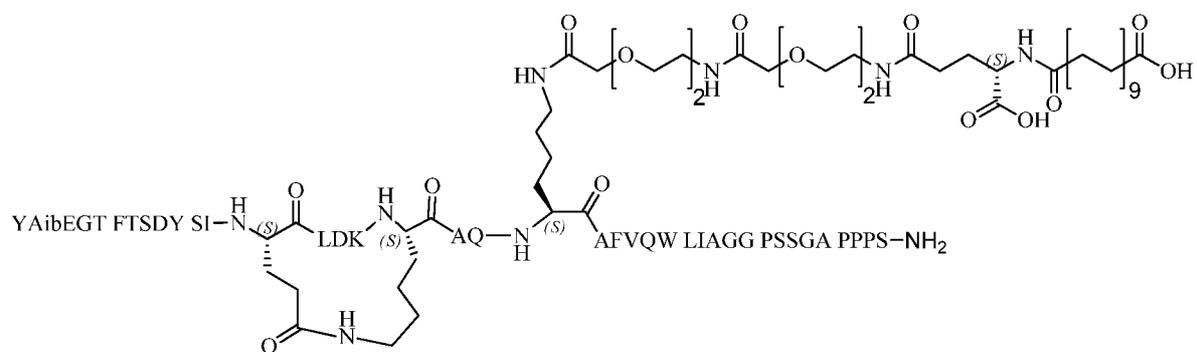
WX-006



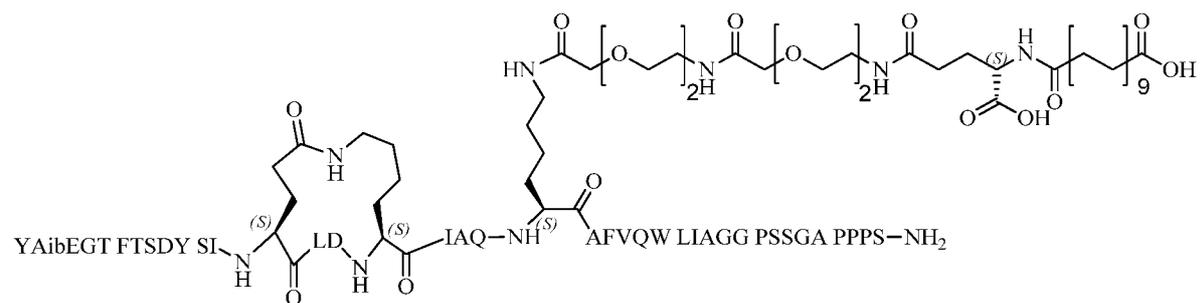
WX-007



WX-008



WX-009



WX-010

11. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 1-10 в изготовлении лекарственного препарата для лечения ожирения и диабета.