

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047599**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.08.12

(51) Int. Cl. **C07K 14/00** (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)

(21) Номер заявки
202290275

(22) Дата подачи заявки
2020.08.18

(54) **СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ АНАЛОГОВ ИНКРЕТИНА**

(31) **62/888,756**

(32) **2019.08.19**

(33) **US**

(43) **2022.05.26**

(86) **PCT/US2020/046778**

(87) **WO 2021/034815 2021.02.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
**Копач Майкл Е., Лу Юй, Цуканов
Сергей Владимирович, Уайт Тимоти
Дональд, Джалан Анкур, Джеймс
Цзиньцзюй, Коберски Майкл Э. (US)**

(74) Представитель:
**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллина Е.М.,
Костюшенкова М.Ю., Строкова О.В.,
Прищепный С.В., Парамонова К.В.
(RU)**

(56) **WO-A1-2019125938
US-B2-9200051
CN-A-103613656
CN-A-106749610
WO-A1-2019125929**

(57) В изобретении раскрыты промежуточные соединения для получения аналогов инкретина или их фармацевтически приемлемые соли. Кроме того, раскрыты способы получения аналогов инкретина путем сочетания от двух до четырех промежуточных соединений, описанных в данном изобретении, с помощью гибридного жидкостно-твердофазного синтеза или нативного химического лигирования.

B1

047599

047599

B1

Данное изобретение в целом относится к биологии, химии и медицине, а более конкретно оно относится к способам синтеза, посредством гибридного жидкостно-твердофазного синтеза (HLSPS), аналога инкретина, обладающего активностью в отношении одного или более рецепторов глюкозозависимого инсулиноотропного полипептида (GIP), глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и глюкагона (GCG).

За последние несколько десятилетий распространенность диабета продолжает расти. Сахарный диабет 2 типа (T2DM) является наиболее распространенной формой диабета, составляющей около 90% всех форм диабета. T2DM характеризуется высокими уровнями глюкозы в крови, вызванными резистентностью к инсулину. Текущий стандарт лечения T2DM включает диету и физические упражнения, а также лечение пероральными сахароснижающими препаратами и/или инъекционными сахароснижающими препаратами, в том числе препаратами на основе инкретинов, такими как агонисты рецепторов GLP-1, двойные агонисты рецепторов GIP/GLP-1 и даже агонисты трех рецепторов GIP/GLP-1/GCG (GGG).

В международных публикациях патентных заявок № WO 2019/125938 и 2019/125929 в целом описаны аналоги инкретина, которые действуют как агонисты трех рецепторов GGG, и способ их синтеза с помощью стандартного твердофазного синтеза пептидов. См. также международные публикации патентных заявок № WO 2014/049610, 2015/067716, 2016/198624, 2017/116204, 2017/153575 и 2018/100135. Аналогично, в международных публикациях патентных заявок № WO 2013/164483 и 2016/111971 описаны соединения, которые, как утверждается, обладают активностью GLP-1 и GIP. Более того, в международной публикации патентной заявки № WO 2020/023386 описаны пептиды, обладающие активностью агонистов рецепторов GIP и GLP1.

Однако существует потребность в альтернативных способах получения таких аналогов инкретина и их промежуточных соединений, чтобы обеспечить фармацевтически изящное производство с коммерчески желаемой чистотой. Аналогично, существует потребность в эффективных способах и стабильных промежуточных соединениях для эффективного получения аналогов инкретина с меньшим количеством стадий очистки.

Для того чтобы удовлетворить эту потребность, в описании описаны способы получения аналогов инкретина с помощью HLSPS или нативного химического лигирования (NCL), при этом в таких способах используется от двух до четырех промежуточных соединений для получения аналога инкретина.

В первом варианте осуществления изобретения аналог инкретина может включать аминокислотную последовательность:

$YX_2QGTFTSDYSIX_{13}LDKX_{17}AX_{19}X_{20}AFIEYLLX_{28}X_{29}GPSSX_{34}APPPS$, где X_2 представляет собой Aib, X_{13} представляет собой L или α MeL, X_{17} представляет собой любую аминокислоту с функциональной группой, доступной для конъюгации, при этом функциональная группа конъюгирована с жирной кислотой C_{16} - C_{22} , X_{19} представляет собой Q или A, X_{20} представляет собой Aib, α MeK, Q или H, X_{28} представляет собой E или A, X_{29} представляет собой G или Aib, X_{34} представляет собой G или Aib (SEQ ID №: 4), а C-концевая аминокислота является необязательно амидированной, или ее фармацевтически приемлемую соль. В некоторых случаях аналог инкретина может иметь аминокислотную последовательность:

$Y(Aib)QGTFTSDYSI(\alpha MeL)LDKKAQ(Aib)AFIEYLLEGGPSSGAPPPS$ (SEQ ID №: 5),

где C-концевая аминокислота является необязательно амидированной, или ее фармацевтически приемлемая соль.

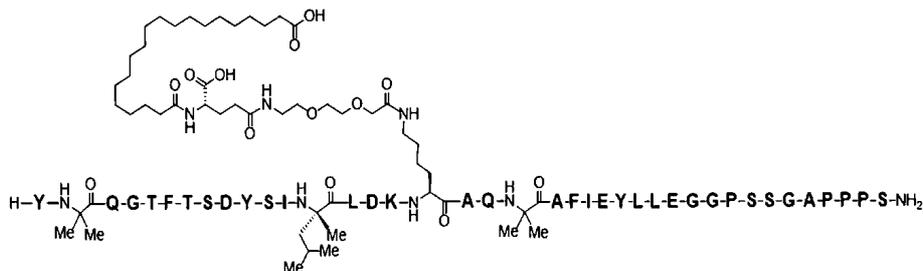
В некоторых случаях жирная кислота C_{16} - C_{22} может быть присоединена к аналогу инкретина через линкер, имеющий структуру:

$(2-[2-(2\text{-аминоэтоксиди}a\text{цетил})_a-(\gamma\text{Glu})_b\text{-CO}-(\text{CH}_2)_c\text{-CO}_2\text{H}]_s)_n$, где a может быть равен 0, 1 или 2, b может быть равен 1 или 2 и c может быть равен 16 или 18.

В конкретных случаях аналог инкретина может иметь следующую последовательность:

$Y(Aib)QGTFTSDYSI(\alpha MeL)LDKK((2-[2-(2\text{-аминоэтоксиди}a\text{цетил})_a-(\gamma\text{Glu})_b\text{-CO}-(\text{CH}_2)_{18}\text{-CO}_2\text{H}]_s)_n)AQ(Aib)AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH_2$ (SEQ ID №: 6),

или ее фармацевтически приемлемая соль, которую можно изобразить как имеющую структуру



Относительно способов получения аналога инкретина с SEQ ID NO: 6 с помощью HLSPS эти способы могут включать, по меньшей мере, стадию сочетания четырех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 7, 8, 9 и 10, или их фармацевтически

приемлемые соли.

Альтернативно, способы могут включать, по меньшей мере, стадию сочетания четырех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 7, 11, 12 и 10, или их фармацевтически приемлемые соли.

Альтернативно, способы могут включать, по меньшей мере, стадию сочетания четырех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 7, 13, 14 и 10, или их фармацевтически приемлемые соли.

В других случаях, способы могут включать, по меньшей мере, стадию сочетания трех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 7, 13 и 15, или их фармацевтически приемлемые соли.

Альтернативно, способы могут включать, по меньшей мере, стадию сочетания трех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 16, 17 и 10, или их фармацевтически приемлемые соли.

Альтернативно, способы могут включать, по меньшей мере, стадию сочетания трех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 18, 12 и 10, или их фармацевтически приемлемые соли.

Альтернативно, способы могут включать, по меньшей мере, стадию сочетания трех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 7, 45 и 10, или их фармацевтически приемлемые соли.

Альтернативно, способы могут включать, по меньшей мере, стадию сочетания трех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 7, 11 и 20, или их фармацевтически приемлемые соли.

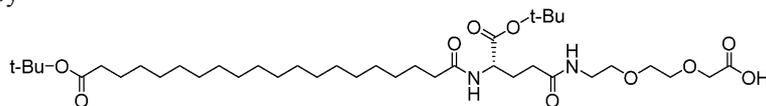
В других случаях, способы могут включать, по меньшей мере, стадию сочетания двух промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 19 и 15, или их фармацевтически приемлемые соли.

Альтернативно, способы могут включать, по меньшей мере, стадию сочетания двух промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 18 и 20, или их фармацевтически приемлемые соли.

Описанные выше способы также могут включать стадию синтеза двух-четырёх промежуточных соединений перед стадией сочетания.

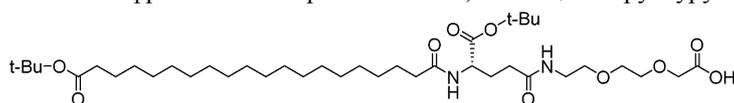
Таким образом, в описанных выше способах промежуточные соединения могут быть химически связаны или ферментативно связаны друг с другом с получением аналога инкретина SEQ ID NO: 6.

В описанных выше способах фрагмент жирной кислоты C₁₆-C₂₂ и необязательный линкер могут быть присоединены к одному промежуточному соединению до связывания различных промежуточных соединений (т.е. ацилирование может происходить до завершения синтеза аналога инкретина). Альтернативно, фрагмент жирной кислоты может быть присоединен к аналогу инкретина после связывания различных промежуточных соединений (т.е. ацилирование может происходить после полного синтеза аналога инкретина). Например, способы могут включать по меньшей мере стадию сочетания двух промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 21 и 18, или их фармацевтически приемлемых солей, с последующим связыванием с фрагментом жирной кислоты, имеющим структуру



(Соединение 25)

Альтернативно, способы могут включать по меньшей мере стадию сочетания следующих двух промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 22 и 19, с последующим связыванием с фрагментом жирной кислоты, имеющим структуру



(Соединение 25)

В дополнение к вышеизложенному, альтернативно можно использовать NCL для получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6, при этом способы могут включать, по меньшей мере, стадию сочетания двух промежуточных соединений, причем такие соединения могут иметь структуру, выбранную из следующих:

- SEQ ID NO: 23 и 24,
- SEQ ID NO: 39 и 24,
- SEQ ID NO: 25 и 26,
- SEQ ID NO: 40 и 26 и

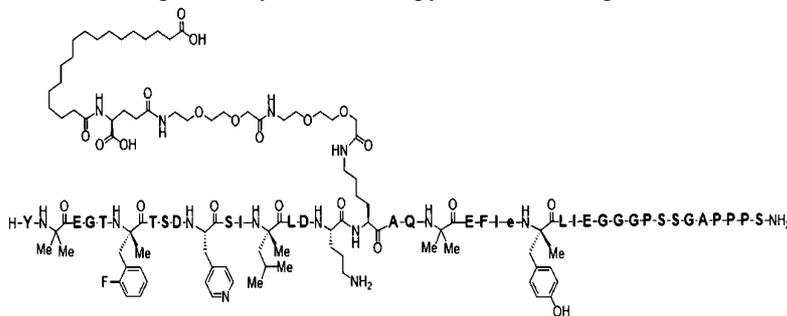
SEQ ID NO: 27 и 26.

В другом варианте осуществления изобретения аналог инкретина может включать аминокислотную последовательность

Y(Aib)EGT(α MeF(2F))TSD(4Pal)SI(α MeL)LD(Om)K((2-[2-(2-аминоэтоксид)этокси]ацетил)₂-

(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H)AQ(Aib)EFI(D-Glu)(α MeY)LIEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID №: 29),

или ее фармацевтически приемлемую соль, которую можно изобразить как имеющую структуру



Относительно способов получения аналога инкретина SEQ ID NO: 29 с помощью HLSPS, способы могут включать, по меньшей мере, стадию сочетания по меньшей мере одного из следующих промежуточных соединений с другим промежуточным соединением, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 30, 31, 32, 34, 35, 36 и/или 37, или их фармацевтически приемлемые соли.

Предложен способ получения аналога инкретина SEQ ID NO: 29, включающий стадию сочетания посредством гибридного жидкостно-твердофазного синтеза промежуточных соединений, выбранных из групп, состоящих из:

- a) SEQ ID NO: 7, 62, 42 и 31,
- b) SEQ ID NO: 43 и 44.

В дополнение к вышеуказанным способам варианты осуществления в данном документе также включают сами промежуточные соединения (например, SEQ ID NO: 7-28 и 30-41), а также композиции, содержащие их.

Преимущество представленных в данном документе аналогов состоит в том, что они могут быть использованы в качестве эффективных средств для лечения сахарного диабета, дислипидемии, неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП), метаболического синдрома, неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) и ожирения, а также других заболеваний или патологических состояний, связанных с модуляцией GLP-1, и/или GIP, и/или глюкагона.

Преимущество описанных в данном документе способов включает несколько усовершенствований процесса, таких как, например, более короткие фрагменты, первоначально полученные с помощью SPPS, что позволяет в целом повысить чистоту и получить более высокие выходы с помощью HLSPS.

Преимущество описанных в данном документе способов заключается в том, что эффективность сочетания в SPPS зависит не только от фактических остатков, участвующих в химическом превращении, но также от структуры, присоединенной к смоле (т. е. проблемы растворимости/агрегации хорошо известны для определенных последовательностей). Более короткие фрагменты обеспечивают большую гибкость путей для связывания сложных аминокислотных остатков и возможность изменения структур фрагментов для решения более сложных превращений.

Преимущество описанных в данном документе способов включает улучшенную стратегию контроля примесей во время синтеза, которая может обеспечить улучшенный конечный профиль примесей для неочищенного пептида и упростить/уменьшить нагрузку на хроматографию, что приведет к экономии средств.

Преимущество описанных в данном документе способов заключается в том, что синтез более коротких фрагментов с помощью SPPS может обеспечить сокращение циклов промывки, уменьшение объемов реагентов и использование более экологичного растворителя(-ей), что приводит к снижению массовой интенсивности процесса (PMI).

Преимущество описанных в данном документе способов заключается в том, что при использовании более коротких фрагментов значительно снижаются риски возникновения нарушений, типичных для линейных сборок длинной молекулы.

Преимущество описанных в данном документе способов заключается в том, что комбинация жидкофазного и твердофазного синтеза более подходит для новых производственных платформ и внедрения других инновационных технологий.

Преимущество описанных в данном документе способов заключается в гибкости цепочки поставок и логистики производственного процесса за счет использования нескольких независимых фрагментов.

Преимущество описанных в данном документе способов заключается в том, что использование параллельного изготовления фрагментов может обеспечить сокращение производственных циклов за счет

параллельной обработки фрагментов.

Преимущество описанных в данном документе способов заключается в том, что конвергентные этапы современной надлежащей производственной практики (сGMP) могут быть выполнены на стандартном объекте без необходимости в специализированном оборудовании.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют значения, совпадающие с общепринятыми среди специалистов в области техники, к которой относится данное раскрытие. Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, можно применять на практике или при тестировании аналога инкретина, фармацевтических композиций и способов, в данном документе описаны предпочтительные способы и материалы.

Кроме того, упоминание элемента в единственном числе не исключает возможности присутствия более чем одного из элементов, если контекст явным образом не предполагает присутствия одного и только одного из элементов. Соответственно, термины в единственном числе обычно означают "по меньшей мере один".

Сокращения и определения

Некоторые сокращения имеют следующие значения: "AEEA" относится к 2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетилену, "D-Glu" или "e" относится к D-глутаминовой кислоте, "e" в аминокислотной последовательности относится к D-глутаминовой кислоте, "Aib" относится к α -аминоизомасляной кислоте, " α MeL" относится к α -метиллейцину, " α MeK" относится к α -метиллизину, "Boc" относится к трет-бутоксикарбонилу, "Bu" относится к бутилу, "t-Bu" относится к трет-бутилу, "STC" относится к хлортритилхлориду, "ДХМ" относится к дихлорметану, "DIC" относится к диизопропилкарбодиимиду, "DMFA" относится к диметилформамиду, "DMCO" относится к диметилсульфоксиду, "ДТТ" относится к дитиотреитолу, "ЭДТА" относится к этилендиаминтетрауксусной кислоте,

"Fmoc" относится к флуоренилметилоксикарбонилхлориду, "ч" относится к часам, "ИПС" относится к изопропиловому спирту, "IPAc" относится к изопропилацетату, "мин" относится к минутам, "Me" относится к метилу, "MTBE" относится к метил-трет-бутиловому эфиру, "охута" относится к этилциано-гидроксииминоацетату, "PG" относится к защитной группе, "Pip" относится к пиперидину, "SPPS" относится к твердофазному пептидному синтезу, "ТФК" относится к трифторуксусной кислоте, "TIPS" относится к триизопропилсилану, и "Trit" относится к тритилу.

В данном контексте термин "около" означает показатель в пределах статистически значимого диапазона значения или значений, таких как, например, заявленная концентрация, длина, молекулярная масса, pH, идентичность последовательности, временные рамки, температура или объем. Такое значение или диапазон может быть в пределах порядка, обычно в пределах 20%, более типично в пределах 10% и даже более типично в пределах 5% от данного значения или диапазона. Допустимое отклонение, охватываемое термином "около", будет зависеть от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области техники.

При использовании в данном документе и в отношении одного или более рецепторов GIP, GLP-1 или GCG, термин "активность", "активировать", "активирующий" и тому подобное означает способность соединения, например, описанного в данном документе аналога инкретина, связываться и индуцировать ответ у рецептора(-ов), что измерено с помощью анализов, известных в данной области техники, таких как анализы *in vitro*, описанные ниже.

При использовании в данном документе "аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации" означает любую природную или не встречающуюся в природе аминокислоту с функциональной группой, которая может быть конъюгирована с жирной кислотой посредством, например, линкера. Примеры таких функциональных групп включают, но не ограничиваются ими, алкинильную, алкенильную, амино-, азидо-, бромо-, карбоксильную, хлоро-, йодо- и тиольную группы. Примеры природных аминокислот, содержащих такие функциональные группы, включают Lys/K (амино), Cys/C (тиол), Glu/E (карбоксил) и Asp/D (карбоксил).

При использовании в данном документе "аналог" означает соединение, такое как синтетический пептид или полипептид, которое активирует рецептор-мишень и вызывает по меньшей мере один эффект *in vivo* или *in vitro*, вызываемый нативным агонистом этого рецептора.

При использовании в данном документе "жирная кислота C₁₆-C₂₂" означает карбоновую кислоту, имеющую от 16 до 22 атомов углерода. Жирная кислота C₁₆-C₂₂, пригодная для применения по данному изобретению, может быть насыщенной монокислотой или насыщенной дикислотой. При использовании в данном документе, "насыщенная" означает, что жирная кислота не содержит углерод-углеродных двойных или тройных связей.

При использовании в данном документе "двойная рецепторная активность" означает аналог инкретина с агонистической активностью в отношении одного или более из рецепторов: GIP, GLP-1 и GCG, особенно аналог, обладающий сбалансированной и достаточной активностью в отношении одного или более рецепторов для получения пользы от агонизма этого рецептора, избегая при этом нежелательных побочных эффектов, связанных со слишком высокой активностью. Кроме того, аналог инкретина, обла-

дающий двойной рецепторной активностью, имеют увеличенную продолжительность действия на один или более из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG, что придает им преимущество, позволяющее вводить дозу реже, например, один раз в сутки, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю.

При использовании в данном документе "глюкозозависимый инсулинотропный полипептид" или "GIP" означает пептид, который играет физиологическую роль в гомеостазе глюкозы путем стимуляции секреции инсулина бета-клетками поджелудочной железы в присутствии глюкозы, в частности GIP человека (SEQ ID №: 1).

При использовании в данном документе "глюкагоноподобный пептид-1" или "GLP-1" означает пептид, который стимулирует глюкозозависимую секрецию инсулина и, как было показано, предотвращает гипергликемию у диабетиков, в частности GLP-1 человека (SEQ ID №: 2).

При использовании в данном документе "глюкагон" или "GCG" означает пептид, который помогает поддерживать уровень глюкозы в крови, связываясь и активируя рецепторы глюкагона на гепатоцитах, стимулируя печень высвобождать глюкозу -хранящуюся в форме гликогена - посредством процесса, называемого гликогенолизом, в частности GCG человека (SEQ ID №: 3).

При использовании в данном документе "аналог инкретина" означает соединение, имеющее структурное сходство, но при этом некоторые отличия от каждого из GIP, GLP-1 и GCG, в частности GIP человека (SEQ ID №: 1), GLP-1 человека (SEQ ID №: 2) и GCG человека (SEQ ID №: 3). Аналоги инкретина, описанные в данном документе, включают аминокислотные последовательности, приводящие к соединениям, обладающим аффинностью и активностью в отношении одного или более из рецепторов: GIP, GLP-1 и GCG (то есть обладающие двойной агонистической активностью или тройной агонистической активностью).

При использовании в данном документе "фармацевтически приемлемый буфер" означает любой из стандартных фармацевтических буферов, известных специалистам в данной области техники.

При использовании в данном документе "тройная рецепторная активность" означает аналог инкретина с агонистической активностью в отношении рецепторов GIP, GLP-1 и GCG, особенно аналог, обладающий сбалансированной и достаточной активностью в отношении рецепторов для получения пользы от агонизма рецепторов, избегая при этом нежелательных побочных эффектов, связанных со слишком высокой активностью. Кроме того, аналог инкретина, обладающий тройной рецепторной активностью, имеют увеличенную продолжительность действия на один или более из рецепторов: GIP, GLP-1 и GCG, что придает им преимущество, позволяющее вводить дозу реже, например, один раз в сутки, три раза в неделю, два раза в неделю или один раз в неделю.

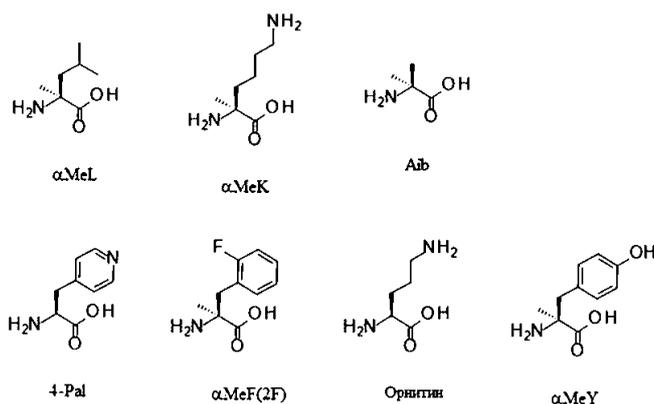
Композиции

Структурные особенности аналогов инкретина, описанных в данном документе, приводят к соединению, которое обладает достаточной активностью в отношении одного или более из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG, с получением благоприятных эффектов на активность в отношении одного или более рецепторов (то есть двойной рецепторной активности или тройной рецепторной активности), но не обладает такой степенью активности в отношении какого-либо одного рецептора, чтобы либо подавлять активность двух других рецепторов, либо приводит к нежелательным побочным эффектам при введении в дозе, достаточной, чтобы быть активными в отношении всех трех рецепторов.

Структурные особенности аналогов инкретина, описанных в данном документе, также приводят к соединению, которое имеет много других полезных свойств, относящихся к возможности их применения в качестве терапевтического лечения, в том числе для улучшения растворимости аналогов в водных растворах, улучшения стабильности химического и физического состава, расширения фармакокинетического профиля и минимизации потенциала для иммуногенности.

Следует отметить, что вышеприведенные перечни структурных особенностей являются иллюстративными, а не исчерпывающими, и что комбинация полезных характеристик иллюстративных аналогов, описанных в данном документе, не является результатом какой-либо модификации в отдельности, а наоборот достигается с помощью новых комбинаций структурных особенностей, описанных в данном документе. Кроме того, вышеописанные эффекты вышеприведенных перечней модификаций не являются специфическими, так как многие из этих модификаций также имеют другие эффекты, важные для характеристик описанных в данном документе соединений, как описано ниже.

Аминокислотная последовательность аналогов инкретина в данном документе включает встречающиеся в природе аминокислоты, которые обычно изображаются в настоящем документе с использованием стандартных одно- или трехбуквенных кодов (например, L/Leu=лейцин), а также α -метилзамещенные остатки природных аминокислот (например, α MeL, α MeK, α MeY, α MeF(2F)) и некоторые другие неприродные аминокислоты, такие как Aib, орнитин, 4-Pal. Структуры этих аминокислот изображены ниже:



Как отмечено выше, аналоги инкретина, описанные в данном документе, включают фрагмент жирной кислоты, конъюгированный, например, посредством линкера с природной или не природной аминокислотой с функциональной группой, доступной для конъюгации. Такую конъюгацию иногда называют ацилированием. В некоторых случаях аминокислота с функциональной группой, доступной для конъюгации, может представлять собой К, С, Е и D, в частности К в положении 17 в SEQ ID №: 5 или SEQ ID №: 29, при этом конъюгация осуществляется с ε-аминогруппой боковой цепи К. Фрагмент жирной кислоты действует как связующее вещество для альбумина и обеспечивает возможность образования соединений длительного действия.

В описанных в данном документе аналогах инкретина используется жирная кислота C₁₆-C₂₂, химически конъюгированная с функциональной группой аминокислоты либо с помощью непосредственного связывания, либо с помощью линкера. Длина и состав жирных кислот влияет на период полураспада аналогов инкретина, их эффективность в моделях на животных *in vivo*, а также на их растворимость и стабильность. Конъюгирование с насыщенной жирной моно кислотой или дикислотой C₁₆-C₂₂ приводит к получению аналога инкретина, который демонстрируют желаемый период полураспада, желаемую активность в моделях на животных *in vivo* и желаемые характеристики растворимости и стабильности.

Примеры насыщенных жирных кислот C₁₆-C₂₂ для применения в данном документе включают, но не ограничиваются ими, пальмитиновую кислоту (гексадекановую кислоту) (моно кислоту C₁₆), гексадекандиовую кислоту (дикислоту C₁₆), маргариновую кислоту (гептадекановую кислоту) (моно кислоту C₁₇), гептадекандиовую кислоту (дикислоту C₁₇), стеариновую кислоту (моно кислоту C₁₈), октадекандиовую кислоту (дикислоту C₁₈), нонадециловую кислоту (нонадекановую кислоту) (моно кислоту C₁₉), нонадекандиовую кислоту (дикислоту C₁₉), арахионовую кислоту (эйкозановую кислоту) (моно кислоту C₂₀), эйкозандиовую кислоту (дикислоту C₂₀), генэйкозилловую кислоту (генэйкозановую кислоту) (моно кислоту C₂₁), генэйкозандиовую кислоту (дикислоту C₂₁), бегеновую кислоту (докозановую кислоту) (моно кислоту C₂₂), докозандиовую кислоту (дикислоту C₂₂), включая их разветвленные и замещенные производные.

В некоторых случаях жирная кислота C₁₆-C₂₂ может представлять собой насыщенную одноосновную кислоту C₁₈, насыщенную двухосновную кислоту C₁₈, насыщенную одноосновную кислоту C₁₉, насыщенную двухосновную кислоту C₁₉, насыщенную одноосновную кислоту C₂₀, насыщенную двухосновную кислоту C₂₀ и их разветвленные и замещенные производные.

В некоторых случаях линкер может содержать от одной до четырех аминокислот, аминополиэтиленгликолькарбоксилат или их смеси. В некоторых случаях аминополиэтиленгликолькарбоксилат имеет следующую структуру: H-{NH-CH₂-CH₂-[O-CH₂-CH₂]_m-O-(CH₂)_p-CO}_n-OH, где m представляет собой любое целое число от 1 до 12, n представляет собой любое целое число от 1 до 12, а p представляет собой 1 или 2.

В некоторых случаях линкер может иметь один или более фрагментов (2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил), необязательно в комбинации с одной-четырьмя аминокислотами.

В тех случаях, когда линкер включает по меньшей мере одну аминокислоту, указанная аминокислота может представлять собой от одного до четырех аминокислотных остатков Glu или γGlu. В некоторых случаях линкер может содержать один или два аминокислотных остатка Glu или γGlu, включая их D-формы. Например, линкер может содержать один или два аминокислотных остатка γGlu. В альтернативном варианте линкер может содержать от одного до четырех аминокислотных остатков (таких как, например, аминокислоты Glu или γGlu), применяемых в комбинации с не более чем тридцать шестью фрагментами (2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил). В частности, линкер может представлять собой комбинации от одной до четырех аминокислот Glu или γGlu и от одного до четырех фрагментов (2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил). В других случаях линкер может представлять собой комбинации одной или двух аминокислот γGlu и одного или двух фрагментов (2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил).

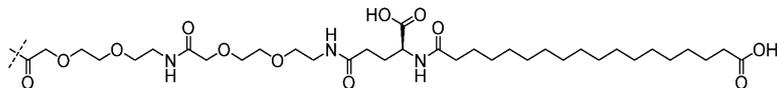
В некоторых случаях аналог инкретина, описанный в данном документе, содержит линкер и компо-

ненты жирных кислот, имеющие структуру следующей формулы:

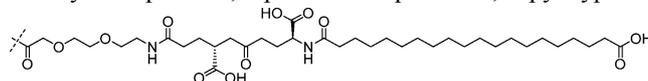


где а равен 0, 1 или 2, b равен 1 или 2 и с равен 16 или 18.

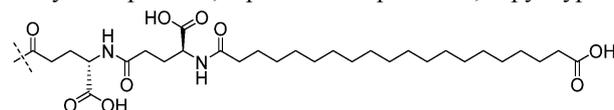
В конкретном случае а равен 2, b равен 1 и с равен 16, структура которого изображена ниже:



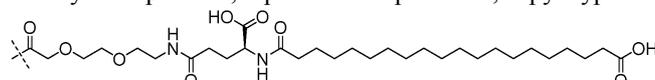
В другом конкретном случае а равен 1, b равен 2 и с равен 18, структура которого изображена ниже:



В другом конкретном случае а равен 0, b равен 2 и с равен 18, структура которого изображена ниже:



В другом конкретном случае а равен 1, b равен 1 и с равен 18, структура которого изображена ниже:



В конкретных случаях общая структура аналога инкретина представляет собой SEQ ID №: 6.

В конкретных случаях общая структура аналога инкретина представляет собой SEQ ID №: 29.

Аффинность аналогов инкретина, описанных в данном документе, к каждому из рецепторов GIP, GLP-1 и GCG может быть измерена с помощью методик, известных в данной области техники, для измерения уровней связывания с рецептором, включая, например, методики, описанные в приведенных ниже примерах, и обычно выражается в виде величины константы ингибирования (K_i). Активность аналогов инкретина, описанных в данном документе, по отношению к одному или более из рецепторов также может быть измерена с помощью методик, известных в данной области техники, включая, например, анализы активности *in vitro*, описанные ниже, и обычно выражается в виде величины полуэффективной концентрации (EC_{50}), которая представляет собой концентрацию соединения, вызывающую полумаксимальное моделирование на кривой доза-эффект.

Описанные в данном документе аналоги инкретина могут быть составлены в виде фармацевтической композиции, которую можно вводить парентеральным путем (например, подкожным, внутривенным, внутривнутрибрюшинным, внутримышечным или трансдермальным). Такая фармацевтическая композиция и способы ее приготовления хорошо известны в данной области техники. См., например, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (Troy ed., Lippincott, Williams & Wilkins 21st ed. 2006).

Описанные в данном документе аналоги инкретина могут реагировать с любой/любым из ряда неорганических и органических кислот/оснований с образованием фармацевтически приемлемых солей присоединения кислот/оснований. Фармацевтически приемлемые соли и обычные способы их получения хорошо известны в данной области техники (см., например, Stahl et al., "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use" (Wiley-VCH 2nd ed. 2011)). Фармацевтически приемлемые соли для применения в данном изобретении включают соли натрия, трифторацетаты, гидрохлориды и/или ацетаты.

В данном изобретении также предложены и, следовательно, охвачены новые промежуточные соединения и способы синтеза аналогов инкретина, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемых солей. Промежуточные соединения и аналоги инкретина, описанные в данном документе, могут быть получены различными способами, известными в данной области техники. Например, способ с использованием стандартного твердофазного синтеза пептидов для двух или более промежуточных соединений с последующим HILSPS проиллюстрирован в приведенных ниже примерах. Конкретные стадии синтеза для каждого из описанных путей могут комбинироваться различными способами для получения аналогов инкретина, описанных в данном документе. Реагенты и исходные вещества легко доступны специалисту в данной области техники.

Аналоги инкретина, описанные в данном документе, как правило, являются эффективными в широком диапазоне доз. Например, дозы для введения один раз в неделю могут находиться в диапазоне от около 0,01 до около 30 мг/чел/неделя, в диапазоне от около 0,1 до около 10 мг/чел/неделя или даже в диапазоне от около 0,1 до около 3 мг/чел/неделя. Таким образом, аналоги инкретина, описанные в данном документе, можно вводить ежедневно, три раза в неделю, два раза в неделю или раз в неделю, в частности один раз в неделю.

Аналоги инкретина, описанные в данном документе, можно применять для лечения различных патологических состояний, нарушений, заболеваний или симптомов. В частности, ниже представлены способы лечения T2DM у индивида, при этом такие способы включают, по меньшей мере, стадию введения индивиду, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном

документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Способы

Стандартный твердофазный пептидный синтез промежуточных соединений:

Аналоги инкретина по данному изобретению могут быть получены с помощью различных стандартных способов синтеза пептидов, известных в данной области техники, в частности SPPS. Сборку в SPPS осуществляют с использованием стандартных методик пептидного синтеза с Fmoc с использованием последовательного сочетания с помощью автоматического синтезатора пептидов. Способы SPPS хорошо известны в данной области техники и не нуждаются в их исчерпывающем описании. См. в целом "Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach" (Chan & White ed., Oxford University Press 2000) и Merrifield (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154.

Для снятия защиты смолу подвергают набуханию в ДМФА, а затем снимают защиту с использованием 20% Pip/ДМФА (3×30 мин). При последующем снятии защиты Fmoc используют 20% Pip/ДМФА (1×5-20 мин, 1×20-30 мин), при этом последовательности обработки 1×5-20 мин, 1×20 мин и 1×30 мин используют для более сложных процедур снятия защиты.

После снятия защиты смолу промывают 5×2 мин 10 объемами ДМФА. Для предварительной активации аминокислот используют растворы DIC/Охума в ДМФА при комнатной температуре в течение 30 мин. Сочетание активированной аминокислоты со связанным со смолой пептидом происходит в течение определенного времени для каждой отдельной аминокислоты. Промывку растворителем 5×2 мин 10 объемами ДМФА проводят после каждого сочетания.

Для выделения конечного продукта связанный со смолой продукт промывают 5×2 мин 10 объемами ДХМ для удаления ДМФА. Смолу промывают 2×2 мин 10 объемами ИПС для удаления ДХМ, промывают 5×2 мин 10 объемами МТБЭ, затем продукт сушат при 40°C под вакуумом. Связанный со смолой продукт хранят охлажденным (-20°C).

Для анализа пептид отщепляют от смолы кислотной смесью ТФК/Н₂О/TIPS/ДТТ в следующем соотношении: (0,93об./0,04об./0,03об./0,03мас). Смоле дают набухнуть в ДХМ (4-5 об., 3×30 мин) и сливают жидкость. К предварительно набухшей смоле добавляют смесь для отщепления (4-5 об.) и перемешивают суспензию в течение 2 ч при комнатной температуре. Раствор фильтруют, а затем смолу промывают небольшим количеством ДХМ и объединяют с раствором для отщепления. Полученный раствор выливают в 7-10 объемах холодного (0°C) МТБЭ. Суспензию выдерживают в течение 30 мин при 0°C, полученный осадок центрифугируют, а прозрачный раствор сливают. Остаток суспендируют в том же объеме МТБЭ, и полученную суспензию снова центрифугируют и декантируют. После декантации прозрачный раствор осажденного пептида в МТБЭ сушат в вакууме при 40°C в течение ночи.

Гибридный жидкостно-твердофазный синтез аналогов инкретина

Промежуточные соединения, полученные с помощью SPPS, как описано выше, можно объединить для получения аналога инкретина SEQ ID №: 6 или 29. Способы HLSPS хорошо известны в данной области техники и не нуждаются в их исчерпывающем описании. См. в целом публикацию заявки на патент США № 2011/0046349; и Albericio et al. (1997) *Methods Enzymol.* 289:313-336, Bray et al. (2003) *Nature Rev. Drug Discovery* 2:587-593, Dalcol et al. (1995) *J. Org. Chem.* 7575-60:7581, Gauthier et al. (1991) *Tetrahedron Lett.* 32: 577-580, Schneider et al. (2005) *J. Peptide Sci.* 11:744-753, Smith, *Organic Synthesis (Academic Press 4th ed. 2016)*, и Zhang et al. (2008) *Org. Process Res. Dev.* 12:101-110.

Вкратце, HLSPS включает независимый синтез промежуточных соединений и сочетание соединений. Применяемый в данном документе один из способов получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6 включает, по меньшей мере, стадию сочетания следующих четырех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 7, 8, 9 и 10.

В некоторых случаях фрагменты могут быть соединены в следующем порядке: от SEQ ID NO: 7 к SEQ ID NO: 8 к SEQ ID NO: 9 к SEQ ID NO: 10 (т.е. от С-конца к N-концу). В других случаях и при соответствующей стратегии защитных групп фрагменты могут быть соединены в другом порядке.

Другой способ получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6 включает, по меньшей мере, стадию сочетания следующих четырех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 7, 11, 12 и 10.

В некоторых случаях фрагменты соединены в следующем порядке: от SEQ ID NO: 7 к SEQ ID NO: 11 к SEQ ID NO: 12 к SEQ ID NO: 10 (т.е. от С-конца к N-концу). В других случаях и при соответствующей стратегии защитных групп фрагменты могут быть соединены в другом порядке.

Другой способ получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6 включает, по меньшей мере, стадию сочетания следующих четырех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 7, 13, 14 и 10.

В некоторых случаях фрагменты соединены в следующем порядке: от SEQ ID NO: 7 к SEQ ID NO: 13 к SEQ ID NO: 14 к SEQ ID NO: 10 (т.е. от С-конца к N-концу). В других случаях и при соответствующей стратегии защитных групп фрагменты могут быть соединены в другом порядке.

Альтернативно, один способ получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6 включает, по меньшей мере, стадию сочетания следующих трех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют

структуру, указанную в SEQ ID NO: 7, 13 и 15.

В некоторых случаях фрагменты соединены в следующем порядке: от SEQ ID NO: 7 к SEQ ID NO: 13 к SEQ ID NO: 15 (т.е. от С-конца к N-концу). В других случаях и при соответствующей стратегии защитных групп фрагменты могут быть соединены в другом порядке.

Другой способ получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6 включает, по меньшей мере, стадию сочетания следующих трех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 16, 17 и 10.

В некоторых случаях фрагменты соединены в следующем порядке: от SEQ ID NO: 16 к SEQ ID NO: 17 к SEQ ID NO: 10 (т.е. от С-конца к N-концу). В других случаях и при соответствующей стратегии защитных групп фрагменты могут быть соединены в другом порядке.

Другой способ получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6 включает, по меньшей мере, стадию сочетания следующих трех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 18, 12 и 10.

В некоторых случаях фрагменты соединены в следующем порядке: от SEQ ID NO: 18 к SEQ ID NO: 12 к SEQ ID NO: 10 (т.е. от С-конца к N-концу). В других случаях и при соответствующей стратегии защитных групп фрагменты могут быть соединены в другом порядке.

Другой способ получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6 включает, по меньшей мере, стадию сочетания следующих трех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 7, 45 и 10.

В некоторых случаях фрагменты соединены в следующем порядке: от SEQ ID NO: 7 к SEQ ID NO: 45 к SEQ ID NO: 10 (т.е. от С-конца к N-концу). В других случаях и при соответствующей стратегии защитных групп фрагменты могут быть соединены в другом порядке.

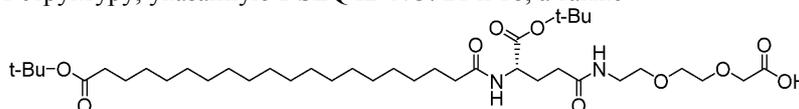
Другой способ получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6 включает, по меньшей мере, стадию сочетания следующих трех промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 7, 11 и 20.

В некоторых случаях фрагменты соединены в следующем порядке: от SEQ ID NO: 7 к SEQ ID NO: 11 к SEQ ID NO: 20 (т.е. от С-конца к N-концу). В других случаях и при соответствующей стратегии защитных групп фрагменты могут быть соединены в другом порядке.

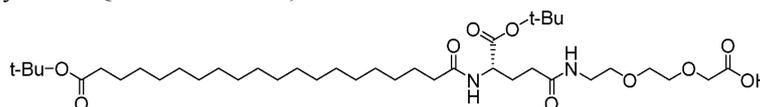
Альтернативно, один способ получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6 включает, по меньшей мере, стадию сочетания следующих двух промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 19 и 15.

Другой способ получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6 включает, по меньшей мере, стадию сочетания следующих двух промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 18 и 20.

Альтернативно, в других способах получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6 используются такие же разрывы, как описано выше, но вместо этого сначала связываются все аминокислотные фрагменты основной цепи, а затем в качестве последнего химического превращения вводят боковой фрагмент жирной кислоты, за которым следует полное снятие защиты. В данном документе, например, соответствующую PG можно вводить по Lys 17, которую можно избирательно удалять в присутствии других PG (например, Boc, tBu и/или Trt). В некоторых случаях способ получения аналога инкретина SEQ ID №: 6 включает по меньшей мере стадию сочетания следующих промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 21 и 18, а также



В некоторых случаях способ получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6 включает, по меньшей мере, стадию сочетания следующих промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 22 и 19, а также



Альтернативно, другие способы получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6 включают, по меньшей мере, одну стадию сочетания промежуточных соединений со снятой защитой (например, тиоэфирного фрагмента и амидного фрагмента) с помощью подхода NCL. В данном документе, например, Ala21 может быть заменен природным энантиомером Cys, и после завершения стадии лигирования может быть получена SEQ ID NO: 6 путем десульфуризации Cys для получения требуемого Ala21 со следующими промежуточными соединениями, при этом такие соединения имеют структуру, как указано в SEQ ID NO: 23 и 24.

Альтернативно, тиоэфир (SEQ ID NO: 23) может быть заменен промежуточным соединением, в котором фрагмент сложного эфира -CP-OR (CPE) на С-конце может служить в качестве замаскированного

тиоэфира для облегчения стадии лигирования соединений, имеющих структуру, указанную в SEQ ID NO: 39 и 24.

В других случаях Ala18 можно заменить на Cys и десульфурезировать после нативного химического лигирования следующих промежуточных соединений, при этом такие соединения имеют структуру, указанную в SEQ ID NO: 25 и 26.

Альтернативно, тиоэфир (SEQ ID NO: 25) может быть заменен промежуточным соединением, в котором фрагмент сложного эфира -Cys-Pro-OR (CPE) может служить в качестве замаскированного тиоэфира для облегчения стадии лигирования соединений, имеющих структуру, как указано в SEQ ID NO: 40 и 26.

Альтернативно, другие способы получения аналога инкретина SEQ ID NO: 5 включают, по меньшей мере, стадию связывания следующих промежуточных соединений (например, неацилированного тиоэфирного фрагмента и амидного фрагмента) с помощью подхода NCL, при этом такие соединения имеют структуру, как указано в SEQ ID NO: 27 и 26.

Альтернативно, тиоэфир (SEQ ID NO: 27) может быть заменен промежуточным соединением, в котором фрагмент сложного эфира -Cys-Pro-OR (CPE) может служить в качестве замаскированного тиоэфира для облегчения стадии лигирования соединений, имеющих структуру, как указано в SEQ ID NO: 41 и 26.

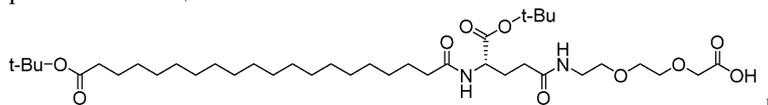
В другом варианте осуществления изобретения SEQ ID №: 29 можно синтезировать путем сочетания SEQ ID NO: 43 и SEQ ID NO: 44, а затем снять защиту с получением SEQ ID NO: 29.

В другом варианте осуществления SEQ ID NO: 48 можно синтезировать с использованием SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 18. С SEQ ID NO: 48 снимают защиту, чтобы получить SEQ ID NO: 6.

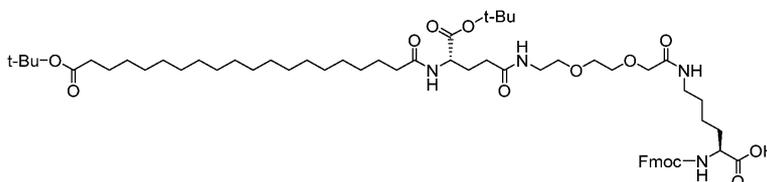
В другом варианте осуществления изобретения SEQ ID NO: 53 может быть синтезирована с помощью NCL с использованием SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52.

В другом варианте осуществления изобретения SEQ ID №: 53 может быть синтезирована с помощью NCL с использованием SEQ ID NO: 52 и SEQ ID NO: 54.

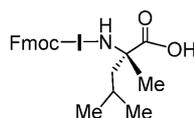
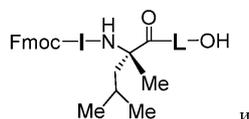
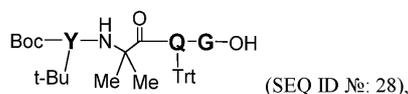
Для эффективного получения промежуточных соединений SEQ ID NO: 9, 12, 14, 15, 17, 20, 23 и 25 с использованием жирной боковой цепи



аминокислоты Fmoc-L-Lys-OH, присоединенной к жирной боковой цепи, синтезируют следующую структуру:



Для повышения чистоты и эффективности SPPS можно использовать следующие димер, тример и тетрамер для получения SEQ ID №: 10, 15, 20, 21, 22, 23, 25 и 27, при этом следующие структуры можно синтезировать с использованием аминокислотного строительного блока с помощью SPPS или жидкофазного синтеза



Другие способы/применения

Аналоги инкретина по данному изобретению могут быть использованы в ряде терапевтических применений. Например, аналоги инкретина можно применять в способах лечения ожирения у индивида, при этом такие способы включают по меньшей мере стадию введения индивиду, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Дополнительно, аналоги инкретина можно применять в способах индуцирования нетерапевтической потери массы у индивида, при этом такие способы включают, по меньшей мере, стадию введения индивиду, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Дополнительно, аналоги инкретина, описанные в данном документе, можно применять в способах лечения метаболического синдрома у индивида, при этом такие способы включают, по меньшей мере, стадию введения индивиду, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Дополнительно, аналоги инкретина, описанные в данном документе, можно применять в способах лечения НАСГ у индивида, при этом такие способы включают, по меньшей мере, стадию введения индивиду, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

Дополнительно, аналоги инкретина, описанные в данном документе, можно применять в способах лечения НАЖБП у индивида, при этом такие способы включают, по меньшей мере, стадию введения индивиду, нуждающемуся в этом, эффективного количества аналога инкретина, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли.

В этих способах эффективность аналогов инкретина можно оценить, например, наблюдая значительное снижение уровня глюкозы в крови, наблюдая значительное повышение уровня инсулина, наблюдая значительное снижение HbA1c и/или наблюдая значительное снижение массы тела.

В альтернативном варианте, описанные в данном документе аналоги инкретина или их фармацевтически приемлемые соли можно применять для улучшения прочности кости у индивида, нуждающегося в этом. В некоторых случаях индивид, нуждающийся в этом, имеет гипоостоз или гипоостеидоз или получает лечение по поводу перелома кости, подвергается ортопедическим процедурам, протезированию, зубной имплантации и/или спондилитезу. Аналоги инкретина также можно применять для лечения других нарушений, таких как болезнь Паркинсона или болезнь Альцгеймера.

Примеры

Нижеследующие неограничивающие примеры предложены в целях иллюстрации, а не ограничения.

Синтез пептидов и полипептидов

Пример 1. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 1

Промежуточное соединение 1 (SEQ ID №: 7) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Зибера (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 1.

Таблица 1. Условия SPPS для примера 1

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
2	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
3	2 x 30 мин 0% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
4	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
3-4*	В качестве альтернативы используйте димер Fmoc-L-Pro-Pro-OH вместо стадий 3 и 4		
5	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
6	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
7	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
8	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
9	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
10	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.

Снятие защиты Fmoc, отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле Зибера дважды перемешивают с 10 об. смеси 20% пиперидин/ДМФА в течение 20-30 мин, затем промывают шесть раз с помощью 10 об. ДМФА. Фрагмент без Fmoc на смоле Зибера дважды подвергают набуханию с использованием 10 об. ДХМ в течение 10-20 мин. Реактор со смолой охлаждают до около 15°C, в реактор загружают 20 об. смеси 5% ТФК/ДХМ, а затем перемешивают в течение 2 ч в атмосфере азота, поддерживая температуру при около 15°C. Смолу фильтруют и промывают 3×10 об. ДХМ. Все фильтраты объединяют. ДХМ удаляют из полученного раствора при пониженном давлении, поддерживая внутреннюю тем-

пературу при $\leq 20^\circ\text{C}$ до остаточного объема 22,5 об. В раствор загружают МТБЭ (25 об.) и растворители ДХМ/МТБЭ снова удаляют при пониженном давлении, поддерживая внутреннюю температуру при $\leq 20^\circ\text{C}$ до остаточного объема 22,5 об. Добавление МТБЭ/операцию перегонки повторяют до тех пор, пока остаточная концентрация фрагмента в над осадочной жидкости не достигнет $<0,11$ мас.%. Затем полученную суспензию фильтруют, поддерживая температуру при около 15°C . К осадку добавляют 14 об. свежего МТБЭ, перемешивают в течение 30 мин при около 15°C , а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз, и полученное твердое вещество сушат при около 35°C .

Пример 2. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 2

Промежуточное соединение 2 (SEQ ID №: 8) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Gly-2-CTC (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 2.

Таблица 2. Условия SPPS для примера 2

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)-OH	2,5 AA/2,5 PyBOP/5,0 ДИПЭА 4 ч, к.т.
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
4	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
5	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
6	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
7	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле CTC однократно подвергают набуханию с использованием ДХМ (5 об.) в течение 45 мин. В реактор загружают 10 об. 1% ТФК/ДХМ и полученную суспензию смолы перемешивают в течение 10-15 мин в атмосфере азота при температуре около 25°C . Фильтрат удаляют и немедленно нейтрализуют медленным добавлением 1,05 эквивалентного количества пиридина, а затем к фильтрату добавляют 5 об. ДМСО. Обработку смолы 1% ТФК/ДХМ с последующей нейтрализацией фильтрата повторяют еще два раза. Смолу промывают 3 об. ДХМ и перемешивают в течение 10-15 мин. Все фильтраты и промывные воды объединяют. Раствор фрагментов концентрируют в вакууме до 6-10 об., поддерживая температуру $\leq 35^\circ\text{C}$ (остаточная концентрация ДХМ $\leq 15\%$). Раствор фрагмента в ДМСО добавляют к 11-15 об. H_2O в течение 2-6 ч (< 1 л/мин) при температуре около 25°C . Образовавшуюся взвесь осажденного фрагмента перемешивают 30-40 мин при около 25°C , затем фильтруют. Полученное твердое вещество суспендируют в 8-12 об. H_2O при температуре около 25°C , перемешивают 10-15 мин, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз, и полученное твердое вещество сушат при около 40°C .

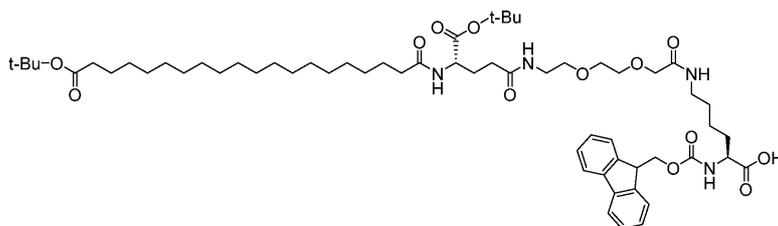
Пример 3. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 3

Промежуточное соединение 3 (SEQ ID №: 9) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Ala-2-CTC (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 3.

Таблица 3. Условия SPPS для примера 3

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Aib-OH	2,5 AA/2,5 PyBOP/5,0 ДИПЭА 4 ч, к.т.
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
4	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(t-BuOOC-(CH ₂) ₁₈ -COO- γ -L-Glu-AEEA)*	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охума 4 ч, к.т.
5	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
6	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.

*Fmoc-L-Lys(t-BuOOC-(CH₂)₁₈-COO- γ -L-Glu-AEEA)



Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле СТС однократно подвергают набуханию с использованием ДХМ (5 об.) в течение 45 мин. В реактор загружают 5 об. 1% ТФК/ДХМ и полученную суспензию смолы перемешивают в течение 10-15 мин в атмосфере азота, поддерживая температуру около 25°C. Фильтрат удаляют и немедленно нейтрализуют медленным добавлением 1,05 эквивалентного количества пиридина. Обработку смолы 1% ТФК/ДХМ с последующей нейтрализацией фильтрата повторяют еще два раза. Смолу промывают 3 об. ДХМ и перемешивают в течение 10-15 мин. Все фильтраты и промывные воды объединяют, и полученную смесь охлаждают до $\leq 20^\circ\text{C}$. Раствор фрагмента концентрируют под вакуумом до 2-4 об., поддерживая температуру $\leq 20^\circ\text{C}$. К раствору добавляют 5 об. ACN и удаляют остаточный ДХМ под вакуумом (остаточная концентрация ДХМ $\leq X\%$), поддерживая температуру $\leq 20^\circ\text{C}$. Раствор фрагмента в ACN добавляют к 5 об. ледяной H_2O в течение 2-6 ч (< 1 л/мин), поддерживая температуру около 0°C . Полученную суспензию осажденного фрагмента перемешивают в течение 30-40 мин при около 0°C , а затем фильтруют при около 0°C . Полученное твердое вещество суспендируют в 3-5 об. H_2O при температуре около 25°C , перемешивают 10-15 мин, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное твердое вещество сушат при около 40°C .

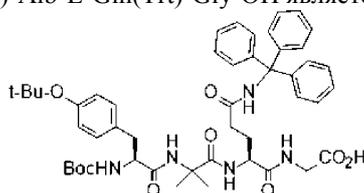
Пример 4. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 4

Промежуточное соединение 4 (SEQ ID №: 10) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Leu-2-СТС (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 4.

Таблица 4. Условия SPPS для примера 4

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-2-Me-Ile-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура экпирования
2	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура экпирования
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
4	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
5	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
6	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
7	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
8	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
9	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,2 Охума 4-6 ч, к.т.
10	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Woc-L-Tyr(t-Bu)-Aib- L-Gln(Trt)-Gly-OH*	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охума 4-6 ч, к.т.

*структура для Woc-L-Tyr(t-Bu)-Aib-L-Gln(Trt)-Gly-OH является следующей:



Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле СТС однократно подвергают набуханию с использованием ДХМ (5 об.) в течение 45 мин. В реактор загружают 5 об. 1% ТФК/ДХМ и полученную суспензию смолы перемешивают в течение 10-15 мин в атмосфере азота, поддерживая температуру около 25°C. Фильтрат удаляют и немедленно нейтрализуют медленным добавлением 1,05 эквивалентного количества пиридина. Обработку смолы 1% ТФК/ДХМ с последующей нейтрализацией фильтрата повторяют еще два раза. Смолу промывают 3 об. ДХМ и перемешивают в течение 10-15 мин. Все фильтраты и промывные воды объединяют, и полученную смесь охлаждают до $\leq 20^\circ\text{C}$. Раствор фрагмента концентрируют под вакуумом до 2-4 об., поддерживая температуру $\leq 20^\circ\text{C}$. К раствору добавляют 2 об. ДМСО и удаляют остаточный ДХМ под вакуумом (остаточная концентрация ДХМ $\leq 5\%$), поддерживая температуру $\leq 20^\circ\text{C}$. Раствор фрагмента в ДМСО добавляют к 7-9 об. ледяной H_2O в течение 2-6 ч (< 1 л/мин), поддерживая температуру около 0°C . Полученную суспензию осажденного фрагмента перемешивают в течение 30-40 мин при около 0°C , а затем фильтруют при около 0°C . Полученное твердое вещество суспендируют в 3-5 об. H_2O при температуре около 25°C , перемешивают 10-15 мин, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное твердое вещество сушат при 40°C .

Пример 5. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 5

Промежуточное соединение 5 (SEQ ID №: 11) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Gly-2-СТС (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 5.

Таблица 5. Условия SPPS для примера 5.

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)- ОН	2,5 AA/2,5 PyBOP/5,0 ДИПЭА 4 ч, к.т.
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
4	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
5	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
6	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
7	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
8	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле СТС однократно подвергают набуханию с использованием ДХМ (5 об.) в течение 45 мин. В реактор загружают 10 об. 1% ТФК/ДХМ и полученную суспензию смолы перемешивают в течение 10-15 мин в атмосфере азота при температуре около 25°C . Фильтрат удаляют и немедленно нейтрализуют медленным добавлением 1,05 эквивалентного количества пиридина, а затем к фильтрату добавляют 5 об. ДМСО. Обработку смолы 1% ТФК/ДХМ с последующей нейтрализацией фильтрата повторяют еще два раза. Смолу промывают 3 об. ДХМ и перемешивают в течение 10-15 мин. Все фильтраты и промывные воды объединяют. Раствор фрагментов концентрируют в вакууме до 6-10 об., поддерживая температуру $\leq 35^\circ\text{C}$ (остаточная концентрация ДХМ $\leq 15\%$). Раствор фрагмента в ДМСО добавляют к 11-15 об. H_2O в течение 2-6 ч (< 1 л/мин) при температуре около 25°C . Образовавшуюся суспензию осажденного фрагмента перемешивают в течение 30-40 мин при около 25°C , а затем фильтруют. Полученное твердое вещество суспендируют в 8-12 об. H_2O при температуре около 25°C , перемешивают 10-15 мин, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное твердое вещество сушат при около 40°C .

Пример 6. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 6

Промежуточное соединение 6 (SEQ ID №: 12) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Alb-2-СТС (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 6.

Таблица 6. Условия SPPS для примера 6

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(t-BuOOC-(CH ₂) ₁₈ -COO-γ-L-Glu-AEEA)	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охума 4 ч, к.т.
4	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
5	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле СТС однократно подвергают набуханию с использованием ДХМ (5 об.) в течение 45 мин. В реактор загружают 5 об. 1% ТФК/ДХМ и полученную суспензию смолы перемешивают в течение 10-15 мин в атмосфере азота, поддерживая температуру около 25°C. Фильтрат удаляют и немедленно нейтрализуют медленным добавлением 1,05 эквивалентного количества пиридина. Обработку смолы 1% ТФК/ДХМ с последующей нейтрализацией фильтрата повторяют еще два раза. Смолу промывают 3 об. ДХМ и перемешивают в течение 10-15 мин. Все фильтраты и промывные воды объединяют и полученную смесь охлаждают до ≤ 20°C. Раствор фрагмента концентрируют под вакуумом до 2-4 об., поддерживая температуру ≤ 20°C. К раствору добавляют 5 об. ACN и удаляют остаточный ДХМ под вакуумом (остаточная концентрация ДХМ ≤ 15%), поддерживая температуру ≤ 20°C. Раствор фрагмента в ACN добавляют к 5 об. ледяной H₂O в течение 2-6 ч (< 1 л/мин), при этом поддерживая температуру около 0°C. Полученную суспензию осажденного фрагмента перемешивают в течение 30-40 мин при около 0°C, а затем фильтруют при около 0°C. Полученное твердое вещество суспендируют в 3-5 об. H₂O при температуре около 25°C, перемешивают 10-15 мин, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное твердое вещество сушат при около 40°C.

Пример 7. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 7

Промежуточное соединение 7 (SEQ ID №: 13) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Gly-2-СТС (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 7.

Таблица 7. Условия SPPS для примера 7

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)-OH	2,5 AA/2,5 PyBOP/5,0 ДИПЭА 4 ч, к.т.
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
4	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
5	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
6	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
7	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
8	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
9	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Aib-OH	2,0 AA/2,2 PyBOP/4,0 ДИЭА 6-10 ч, к.т.
10	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле СТС однократно подвергают набуханию с использованием ДХМ (5 об.) в течение 45 мин. В реактор загружают 10 об. 1% ТФК/ДХМ и полученную суспензию смолы перемешивают в течение 10-15 мин в атмосфере азота при 25°C. Фильтрат удаляют и немедленно нейтрализуют медленным добавлением 1,05 эквивалентного количества пиридина, а затем к фильтрату добавляют 5 об. ДМСО. Обработку смолы 1% ТФК/ДХМ с последующей нейтрализацией фильтрата повторяют еще два раза. Смолу промывают 3 об. ДХМ и перемешивают в течение 10-15 мин. Все фильтраты и промывные воды объединяют. Раствор фрагментов концентрируют в вакууме до 6-10 об., поддерживая температуру ≤ 35°C (остаточная концентрация ДХМ ≤ 15%). Раствор фрагмента в

ДМСО добавляют к 11-15 об. Н₂О в течение 2-6 ч (< 1 л/мин) при температуре около 25°C. Образовавшаяся суспензию осажденного фрагмента перемешивают в течение 30-40 мин при около 25°C, а затем фильтруют. Полученное твердое вещество суспендируют в 8-12 об. Н₂О при температуре около 25°C, перемешивают 10-15 мин, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз, и полученное твердое вещество сушат при около 40°C.

Пример 8. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 8

Промежуточное соединение 8 (SEQ ID №: 14) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Ala-2-СТС (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 8.

Таблица 8. Условия SPPS для примера 8

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(t-Bu)OOC-(CH ₂) ₁₈ -COO-γ-L-Glu-AEEA)	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охума 4 ч, к.т.
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле СТС однократно подвергают набуханию с использованием ДХМ (5 об.) в течение 45 мин. В реактор загружают 5 об. 1% ТФК/ДХМ и полученную суспензию смолы перемешивают в течение 10-15 мин в атмосфере азота, поддерживая температуру 25°C. Фильтрат удаляют и немедленно нейтрализуют медленным добавлением 1,05 эквивалентного количества пиридина. Обработку смолы 1% ТФК/ДХМ с последующей нейтрализацией фильтрата повторяют еще два раза. Смолу промывают 3 об. ДХМ и перемешивают в течение 10-15 мин. Все фильтраты и промывные воды объединяют и полученную смесь охлаждают до ≤ 20°C. Раствор фрагмента концентрируют под вакуумом до 2-4 об., поддерживая температуру ≤ 20°C. К раствору добавляют 5 об. АСН и удаляют остаточный ДХМ под вакуумом (остаточная концентрация ДХМ ≤ 15%), поддерживая температуру ≤ 20°C. Раствор фрагмента в АСН добавляют к 5 об. ледяной Н₂О в течение 2-6 ч (< 1 л/мин), при этом поддерживая температуру около 0°C. Полученную суспензию осажденного фрагмента перемешивают в течение 30-40 мин при около 0°C, а затем фильтруют при около 0°C. Полученное твердое вещество суспендируют в 3-5 об. Н₂О при температуре около 25°C, перемешивают 10-15 мин, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное твердое вещество сушат при около 40°C.

Пример 9. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 9

Промежуточное соединение 9 (SEQ ID №: 15) или фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Ala-2-СТС (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 9.

Таблица 9. Условия SPPS для примера 9

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(t-BuOOC-(CH ₂) ₁₈ -COO-γ-L-Glu-AEAA)	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охута 4 ч, к.т.
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 4 ч, к.т.
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 4 ч, к.т.
4	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 4 ч, к.т.
5	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-2-Me-Ile-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
6	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
7	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 4-6 ч, к.т.
8	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 4-6 ч, к.т.
9	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 4-6 ч, к.т.
10	2 x 10 мин 5% Охута/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 4-6 ч, к.т.
11	2 x 10 мин 5% Охута/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 4-6 ч, к.т.
12	2 x 10 мин 5% Охута/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 4-6 ч, к.т.
13	2 x 10 мин 5% Охута/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,2 Охута 4-6 ч, к.т.
14	2 x 10 мин 5% Охута/20% Pip/ДМФА	Boc-L-Tyr(t-Bu)-Aib-L-Gln(Trt)-Gly-OH	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охута 4-6 ч, к.т.

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле СТС однократно подвергают набуханию с использованием ДХМ (5 об.) в течение 45 мин. В реактор загружают 5 об. 1% ТФК/ДХМ и полученную суспензию смолы перемешивают в течение 10-15 мин в атмосфере азота, поддерживая температуру 25°C. Фильтрат удаляют и немедленно нейтрализуют медленным добавлением 1,05 эквивалентного количества пиридина. Обработку смолы 1% ТФК/ДХМ с последующей нейтрализацией фильтрата повторяют еще два раза. Смолу промывают 3 об. ДХМ и перемешивают в течение 10-15 мин. Все фильтраты и промывные воды объединяют, и полученную смесь охлаждают до ≤ 20°C. Раствор фрагмента концентрируют под вакуумом до 2-4 об., поддерживая температуру ≤ 20°C. К раствору добавляют 5 об. ACN и удаляют остаточный ДХМ под вакуумом (остаточная концентрация ДХМ ≤ 15%), поддерживая температуру ≤ 20°C. Раствор фрагмента в ACN добавляют к 5 об. ледяной H₂O в течение 2-6 ч (< 1 л/мин), при этом поддерживая температуру около 0°C. Полученную суспензию осажденного фрагмента перемешивают в течение 30-40 мин при около 0°C, а затем фильтруют при около 0°C. Полученное твердое вещество суспендируют в 3-5 об. H₂O при температуре около 25°C, перемешивают 10-15 мин, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное твердое вещество сушат при около 40°C.

Пример 10. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 10

Промежуточное соединение 10 (SEQ ID №: 16) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Зибера (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 10.

Таблица 10. Условия SPPS для примера 10

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
2	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
3	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
4	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
3-4*	В качестве альтернативы используйте сочетание димера Fmoc-L-Pro-Pro-ОН вместо стадий 3 и 4		
5	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
6	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
7	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
8	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
9	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
10	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
11	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
10- 11*	В качестве альтернативы используйте сочетание димера Fmoc-Gly-Gly-ОН вместо стадий 3 и 4		
12	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)- ОН	2,5 AA/2,5 PyBOP/5,0 ДИПЭА 4 ч, к.т.
13	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
14	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
15	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
16	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
17	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
18	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.

Снятие защиты Fmoc, отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле Зибера дважды перемешивают с 10 об. смеси 20% пиперидин/ДМФА в течение 20-30 мин, затем промывают шесть раз с помощью 10 об. ДМФА. Фрагмент без Fmoc на смоле Зибера дважды подвергают набуханию с использованием 10 об. ДХМ в течение 10-20 мин. Реактор со смолой охлаждают до около 15°C. В реактор загружают 20 об. 5% ТФК/ДХМ и перемешивают в течение 2 ч в атмосфере азота, поддерживая температуру около 15°C. Смолу фильтруют и промывают 3×10 об. ДХМ. Все фильтраты объединяют. ДХМ удаляют из полученного раствора при пониженном давлении, поддерживая внутреннюю температуру при ≤ 20°C до остаточного объема 22,5 об. В раствор загружают МТБЭ (25 об.) и растворители ДХМ/МТБЭ снова удаляют при пониженном давлении, поддерживая температуру при ≤ 20°C до остаточного объема 22,5 об. Добавление МТБЭ/операцию перегонки повторяют до тех пор, пока остаточная концентрация фрагмента в над осадочной жидкости не достигнет ≤ 0,11 мас.%. Затем полученную суспензию фильтруют, поддерживая температуру при около 15°C. К осадку добавляют 14 об. свежего МТБЭ и суспензию перемешивают в течение 30 мин при около 15°C, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное твердое вещество сушат при около 35°C.

Пример 11. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 11

Промежуточное соединение 11 (SEQ ID №: 17) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Aib-2-СТС (0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 11.

Таблица 11. Условия SPPS для примера 11

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Gln(Trt)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(t- BuOOC-(CH ₂) ₁₈ - COO-γ-L-Glu- AEEA)	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охума 4 ч, к.т.
4	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(Boc)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
5	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле СТС однократно подвергают набуханию с использованием ДХМ (5 об.) в течение 45 мин. В реактор загружают 5 об. 1% ТФК/ДХМ и полученную суспензию смолы перемешивают в течение 10-15 мин в атмосфере азота, поддерживая температуру около 25°C. Фильтрат удаляют и немедленно нейтрализуют медленным добавлением 1,05 эквивалентного количества пиридина. Обработку смолы 1% ТФК/ДХМ с последующей нейтрализацией фильтрата повторяют еще два раза. Смолу промывают 3 об. ДХМ и перемешивают в течение 10-15 мин. Все фильтраты и промывные воды объединяют и полученную смесь охлаждают до ≤ 20°C. Раствор фрагмента концентрируют под вакуумом до 2-4 об., поддерживая температуру ≤ 20°C. К раствору добавляют 5 об. ACN и удаляют остаточный ДХМ под вакуумом (остаточная концентрация ДХМ ≤ X%), поддерживая температуру ≤ 20°C. Раствор фрагмента в ACN добавляют к 5 об. ледяной H₂O в течение 2-6 ч (< 1 л/мин), при этом поддерживая температуру около 0°C. Полученную суспензию осажденного фрагмента перемешивают в течение 30-40 мин при около 0°C, а затем фильтруют при около 0°C. Полученное твердое вещество суспендируют в 3-5 об. H₂O при температуре около 25°C, перемешивают 10-15 мин, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное твердое вещество сушат при около 40°C.

Пример 12. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 12

Промежуточное соединение 12 (SEQ ID №: 18) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Зибера (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 12.

Таблица 12. Условия SPPS для примера 12

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
2	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
3	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
4	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
3-4*	В качестве альтернативы используйте сочетание димера Fmoc-L-Pro-Pro-ОН вместо стадий 3 и 4		
5	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
6	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
7	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
8	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
9	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
10	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
11	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
10- 11*	В качестве альтернативы используйте сочетание димера Fmoc-Gly-Gly-ОН вместо стадий 3 и 4		
12	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)- ОН	2,5 AA/2,5 PyBOP/5,0 ДИПЭА 4 ч, к.т.
13	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
14	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
15	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
16	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
17	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
18	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
19	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.

Снятие защиты Fmoc, отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле Зибера дважды перемешивают с 10 об. смеси 20% пиперидин/ДМФА в течение 20-30 мин, затем промывают шесть раз с помощью 10 об. ДМФА.

Фрагмент без Fmoc на смоле

Зибера дважды подвергают набуханию с использованием 10 об. ДХМ в течение 10-20 мин. Реактор со смолой охлаждают до около 15°C. В реактор загружают 20 об. 5% ТФК/ДХМ и перемешивают в течение 2 ч в атмосфере азота, поддерживая температуру около 15°C. Смолу фильтруют и промывают 3×10 об. ДХМ. Все фильтраты объединяют. ДХМ удаляют из полученного раствора при пониженном давлении, поддерживая внутреннюю температуру при ≤ 20°C до остаточного объема 22,5 об. В раствор загружают МТБЭ (25 об.) и растворители ДХМ/МТБЭ снова удаляют при пониженном давлении, поддерживая температуру при ≤ 20°C до остаточного объема 22,5 об. Добавление МТБЭ/операцию перегонки повторяют до тех пор, пока остаточная концентрация фрагмента в надосадочной жидкости не достигнет < 0,11 мас.%. Затем полученную суспензию фильтруют, поддерживая температуру при около 15°C. К осадку добавляют 14 об. свежего МТБЭ и суспензию перемешивают в течение 30 мин при около 15°C, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное твердое вещество сушат при около 35°C.

Пример 13. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 13

Промежуточное соединение 13 (SEQ ID №: 19) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Зибера (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 13.

Таблица 13. Условия SPPS для примера 13

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
2	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
3	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
4	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
3-4*	В качестве альтернативы используйте сочетание димера Fmoc-L-Pro-Pro-ОН вместо стадий 3 и 4		
5	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
6	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
7	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
8	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
9	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
10	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
11	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
10-11*	В качестве альтернативы используйте сочетание димера Fmoc-Gly-Gly-ОН вместо стадий 3 и 4		
12	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)- ОН	2,5 AA/2,5 PyBOP/5,0 ДИПЭА 4 ч, к.т.
13	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
14	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
15	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
16	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
17	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
18	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
19	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
20	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Aib-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 8-12 ч, к.т. процедура кэпирования
21	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Gln(Trt)-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования

Снятие защиты Fmoc, отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле Зибера дважды перемешивают с 10 об. смеси 20% пиперидин/ДМФА в течение 20-30 мин, затем промывают шесть раз с помощью 10 об. ДМФА. Фрагмент без Fmoc на смоле Зибера дважды подвергают набуханию с использованием 10 об. ДХМ в течение 10-20 мин. Реактор со смолой охлаждают до около 15°C. В реактор загружают 20 об. 5% ТФК/ДХМ и перемешивают в течение 2 ч в атмосфере азота, поддерживая температуру около 15°C. Смолу фильтруют и промывают 3×10 об. ДХМ. Все фильтраты объединяют. ДХМ удаляют из полученного раствора при пониженном давлении, поддерживая температуру при ≤ 20°C до остаточного объема 22,5 об. В раствор загружают МТБЭ (25 об.) и растворители ДХМ/МТБЭ снова удаляют при пониженном давлении, поддерживая температуру при ≤ 20°C до остаточного объема 22,5 об. Добавление МТБЭ/операцию перегонки повторяют до тех пор, пока остаточная концентрация фрагмента в надосадочной жидкости не достигнет ≤ 0,11 мас.%. Затем полученную суспензию фильтруют, поддерживая температуру при около 15°C. К осадку добавляют 14 об. свежего МТБЭ и суспензию перемешивают в течение 30 мин при около 15°C, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное твердое вещество сушат при около 35°C.

Пример 14. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 14

Промежуточное соединение 14 (SEQ ID №: 20) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-

Aib-2-СТС (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 14.

Таблица 14. Условия SPPS для примера 14

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Gln(Trt)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(t- BuOOC-(CH ₂) ₁₈ - COO-γ-L-Glu- AEEA)	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охума 4 ч, к.т.
4	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(Boc)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
5	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
6	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
7	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-2-Me-Ile- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
8	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
9	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
10	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
11	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
12	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
13	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
14	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
15	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,2 Охума 4-6 ч, к.т.
16	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Boc-L-Tyr(t-Bu)- Aib-L-Gln(Trt)-Gly- ОН	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охума 4-6 ч, к.т.

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле СТС однократно подвергают набуханию с использованием ДХМ (5 об.) в течение 45 мин. В реактор загружают 5 об. 1% ТФК/ДХМ и полученную суспензию смолы перемешивают в течение 10-15 мин в атмосфере азота, поддерживая температуру около 25°C. Фильтрат удаляют и немедленно нейтрализуют медленным добавлением 1,05 эквивалентного количества пиридина. Обработку смолы 1% ТФК/ДХМ с последующей нейтрализацией фильтрата повторяют еще два раза. Смолу промывают 3 об. ДХМ и перемешивают в течение 10-15 мин. Все фильтраты и промывные воды объединяют и полученную смесь охлаждают до ≤ 20°C. Раствор фрагмента концентрируют под вакуумом до 2-4 об., поддерживая температуру ≤ 20°C. К раствору добавляют 5 об. ACN и удаляют остаточный ДХМ под вакуумом (остаточная концентрация ДХМ ≤ X%), поддерживая температуру ≤ 20°C. Раствор фрагмента в ACN добавляют к 5 об. ледяной H₂O в течение 2-6 ч (< 1 л/мин), при этом поддерживая температуру около 0°C. Полученную суспензию осажденного фрагмента перемешивают в течение 30-40 мин при около 0°C, а затем фильтруют при около 0°C. Полученное твердое вещество суспендируют в 3-5 об. H₂O при температуре около 25°C, перемешивают 10-15 мин, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное твердое вещество сушат при около 40°C.

Пример 15. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 15

Промежуточное соединение (SEQ ID №: 21) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Aib-2-СТС (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 15.

Таблица 15. Условия SPPS для примера 15

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Gln(Trt)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура экпирования
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(PG)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6-8 ч, к.т.
4	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(Boc)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
5	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
6	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
7	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-2-Me-Ile- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура экпирования
8	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура экпирования
9	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
10	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
11	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
12	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
13	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
14	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
15	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,2 Охума 4-6 ч, к.т.
16	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Boc-L-Tyr(t-Bu)- Aib-L-Gln(Trt)-Gly- ОН	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охума 4-6 ч, к.т.

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле СТС однократно подвергают набуханию с использованием ДХМ (5 об.) в течение 45 мин. В реактор загружают 5 об. 1% ТФК/ДХМ и полученную суспензию смолы перемешивают в течение 10-15 мин в атмосфере азота, поддерживая температуру около 25°C. Фильтрат удаляют и немедленно нейтрализуют медленным добавлением 1,05 эквивалентного количества пиридина. Обработку смолы 1% ТФК/ДХМ с последующей нейтрализацией фильтрата повторяют еще два раза. Смолу промывают 3 об. ДХМ и перемешивают в течение 10-15 мин. Все фильтраты и промывные воды объединяют, и полученную смесь охлаждают до $\leq 20^\circ\text{C}$. Раствор фрагмента концентрируют под вакуумом до 2-4 об., поддерживая температуру $\leq 20^\circ\text{C}$. К раствору добавляют 5 об. ACN и удаляют остаточный ДХМ под вакуумом (остаточная концентрация ДХМ $\leq X\%$), поддерживая температуру $\leq 20^\circ\text{C}$. Раствор фрагмента в ACN добавляют к 5 об. ледяной H_2O в течение 2-6 ч (< 1 л/мин), при этом поддерживая температуру около 0°C . Полученную суспензию осажденного фрагмента перемешивают в течение 30-40 мин при около 0°C , а затем фильтруют при около 0°C . Полученное твердое вещество суспендируют в 3-5 об. H_2O при температуре около 25°C , перемешивают 10-15 мин, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное твердое вещество сушат при около 40°C .

Пример 16. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 16

Промежуточное соединение 16 (SEQ ID №: 22) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Ala-2-СТС (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 16.

Таблица 16. Условия SPPS для примера 16

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(PG)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(Вос)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
4	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
5	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-2-Me-Ile- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
6	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
7	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
8	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
9	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
10	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
11	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
12	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
13	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,2 Охума 4-6 ч, к.т.
14	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Вос-L-Tyr(t-Bu)- Aib-L-Gln(Trt)-Gly- ОН	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охума 4-6 ч, к.т.

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле СТС однократно подвергают набуханию с использованием ДХМ (5 об.) в течение 45 мин. В реактор загружают 5 об. 1% ТФК/ДХМ и полученную суспензию смолы перемешивают в течение 10-15 мин в атмосфере азота, поддерживая температуру около 25°C. Фильтрат удаляют и немедленно нейтрализуют медленным добавлением 1,05 эквивалентного количества пиридина. Обработку смолы 1% ТФК/ДХМ с последующей нейтрализацией фильтрата повторяют еще два раза. Смолу промывают 3 об. ДХМ и перемешивают в течение 10-15 мин. Все фильтраты и промывные воды объединяют, и полученную смесь охлаждают до $\leq 20^\circ\text{C}$. Раствор фрагмента концентрируют под вакуумом до 2-4 об., поддерживая температуру $\leq 20^\circ\text{C}$. К раствору добавляют 5 об. АСН и удаляют остаточный ДХМ под вакуумом (остаточная концентрация ДХМ $\leq X\%$), поддерживая температуру $\leq 20^\circ\text{C}$. Раствор фрагмента в АСН добавляют к 5 об. ледяной H_2O в течение 2-6 ч (< 1 л/мин), при этом поддерживая температуру 0°C . Полученную суспензию осажденного фрагмента перемешивают в течение 30-40 мин при около 0°C , а затем фильтруют при около 0°C . Полученное твердое вещество суспендируют в 3-5 об. H_2O при температуре около 25°C , перемешивают 10-15 мин, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное твердое вещество сушат при около 40°C .

Пример 17. Гибридный жидкостно-твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 17

Промежуточное соединение 17 (SEQ ID №: 23) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Aib-2-СТС-гидразин (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 17.

Таблица 17. Условия SPPS для примера 17

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Gln(Trt)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(t- BuOOC-(CH ₂) ₁₈ - COO-γ-L-Glu- AEEA)	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охума 4 ч, к.т.
4	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(Вoc)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
5	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
6	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
7	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-2-Me-Ile- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
8	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
9	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
10	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
11	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
12	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
13	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
14	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe(t-Bu)- ОИ	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
15	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,2 Охума 4-6 ч, к.т.
16	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Вoc-L-Tyr(t-Bu)- Aib-L-Gln(Trt)-Gly- ОН	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охума 4-6 ч, к.т.

Фрагмент на смоле подвергают набуханию с помощью ДХМ (3×10 об.) с использованием фильтра-реактора. Смесь для снятия защиты готовят путем смешивания 10 об. ТФК, 0,4 об. TIPS, 0,4 об. H₂O и 0,3 об. ДТТ и перемешивают до гомогенности. Смесь добавляют к смоле и полученную суспензию перемешивают в течение 3 ч при к.т. Смолу фильтруют и промывают ДХМ (2×3 об.). Затем полученные фильтраты объединяют и охлаждают до около -10°C и медленно добавляют 75 об. МТБЭ. Полученную суспензию фильтруют и промывают 2×10 об. МТБЭ. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде белого твердого вещества.

Неочищенный гидразид пептида растворяют в 30 об. буфера для лигирования (буфер из 6 М гидрохлорида гуанидина и 0,2 М одноосновного гидрофосфата натрия, pH 3,35) и охлаждают до около -15°C. К раствору гидразида добавляют 1 М раствор нитрита натрия (5,0-10,0 экв.) и оставляют перемешиваться в течение 10 мин при температуре около -15°C. Через 10 мин к пептидилазиду, полученному при окислении гидразида пептида, добавляют 2,2,2-трифторэтантол (20,0 экв., pH 7,0). pH реакционной смеси доводят до 7,0 с помощью 5 н. раствора гидроксида натрия. Тиолиз пептидилазида проводят в течение 1 ч, а затем полученный тиоэфир пептида используют непосредственно в реакции лигирования или очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии, (см., Huang et al. (2014) Tetrahedron 70:2951-2955).

Пример 18. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 18

Промежуточное соединение 18 (SEQ ID №: 24) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Зибера (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 18.

Таблица 18. Условия SPPS для примера 18

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
2	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
3	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
4	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
3-4*	В качестве альтернативы используйте сочетание димера Fmoc-L-Pro-Pro-OH вместо стадий 3 и 4		
5	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
6	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
7	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
8	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
9	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
10	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
11	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
10-11*	В качестве альтернативы используйте сочетание димера Fmoc-Gly-Gly-OH вместо стадий 3 и 4		
12	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)-OH	2,5 AA/2,5 PyBOP/5,0 ДИПЭА 4 ч, к.т.
13	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
14	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
15	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
16	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
17	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
18	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
19	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.

Отщепление и снятие защиты: фрагмент на смоле подвергают набуханию с помощью ДХМ (3×10 об.) с использованием фильтра-реактора. Смесь для снятия защиты готовят путем смешивания 10 об. ТФК, 0,4 об. TIPS, 0,4 об. H₂O и 0,3 об. ДТТ и перемешивают до гомогенности. Смесь добавляют к смоле и полученную суспензию перемешивают в течение 3 ч при к.т. Смолу фильтруют и промывают ДХМ (2×3 об.). Затем полученные фильтраты объединяют и охлаждают до около -10°C и медленно добавляют 75 об. МТБЭ. Полученную суспензию фильтруют и промывают 2×10 об. МТБЭ. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде белого твердого вещества.

Пример 19. Гибридный жидкостно-твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 19

Промежуточное соединение 19 (SEQ ID №: 25) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-L-Lys(t-BuOOC-(CH₂)₁₈-COO-γ-L-Glu-AEЕА)-Lys-2-СТС-гидразин (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 19.

Таблица 19. Условия SPPS для примера 19

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(Boc)- OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)- OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
4	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-2-Me-Ile- OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
5	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
6	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
7	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)- OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
8	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)- OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
9	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
10	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)- OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
11	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe(t-Bu)- OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
12	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)- OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,2 Охума 4-6 ч, к.т.
13	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Boc-L-Tyr(t-Bu)- Aib-L-Gln(Trt)-Gly- OH	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охума 4-6 ч, к.т.

Фрагмент на смоле подвергают набуханию с помощью ДХМ (3×10 об.) с использованием фильтра-реактора. Смесь для снятия защиты готовят путем смешивания 10 об. ТФК, 0,4 об. TIPS, 0,4 об. H₂O и 0,3 об. ДТТ и перемешивают до гомогенности. Смесь добавляют к смоле и полученную суспензию перемешивают в течение 3 ч при к.т. Смолу фильтруют и промывают ДХМ (2×3 об.). Затем полученные фильтраты объединяют и охлаждают до около -10°C и медленно добавляют 75 об. МТБЭ. Полученную суспензию фильтруют и промывают 2×10 об. МТБЭ. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде белого твердого вещества.

Неочищенный гидразид пептида растворяют в 30 об. буфера для лигирования (буфер из 6 М гидрохлорида гуанидина и 0,2 М одноосновного гидрофосфата натрия, pH 3,35) и охлаждают до около -15°C. К раствору гидразида добавляют 1 М раствор нитрита натрия (5,0-10,0 экв.) и оставляют перемешиваться в течение 10 мин при температуре около -15°C. Через 10 мин к пептидилазиду, полученному при окислении гидразида пептида, добавляют 2,2,2-трифторэтантриол (20,0 экв., pH 7,0). pH реакционной смеси доводят до 7,0 с помощью 5 н. раствора гидроксида натрия. Тиолиз пептидилазида проводят в течение 1 ч, а затем полученный тиозфир пептида используют непосредственно в реакции лигирования или очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии (см., Huang (2014)).

Пример 20. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 20

Промежуточное соединение 20 (SEQ ID №: 26) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Зибера (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 20.

Таблица 20. Условия SPPS для примера 20

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
2	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
3	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
4	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6 ч, к.т.
3-4*	В качестве альтернативы используйте сочетание димера Fmoc-L-Pro-Pro-OH вместо стадий 3 и 4		
5	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
6	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
7	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
8	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
9	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
10	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
11	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
10-11*	В качестве альтернативы используйте сочетание димера Fmoc-Gly-Gly-OH вместо стадий 3 и 4		
12	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)-OH	2,5 AA/2,5 PyBOP/5,0 ДИПЭА 4 ч, к.т.
13	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
14	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
15	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
16	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Glu(t-Bu)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
17	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
18	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
19	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
20	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Aib-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 8-12 ч, к.т. процедура кэпирования
21	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
22	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.

Отщепление и снятие защиты: фрагмент на смоле подвергают набуханию с помощью ДХМ (3×10 об.) с использованием фильтра-реактора. Смесь для снятия защиты готовят путем смешивания 10 об. ТФК, 0,4 об. TIPS, 0,4 об. H₂O и 0,3 об. ДТТ и перемешивают до гомогенности. Смесь добавляют к смоле и полученную суспензию перемешивают в течение 3 ч при к.т. Смолу фильтруют и промывают ДХМ (2×3 об.). Затем полученные фильтраты объединяют и охлаждают до около -10°C и медленно добавляют 75 об. МТБЭ. Полученную суспензию фильтруют и промывают 2×10 об. МТБЭ. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде белого твердого вещества.

Пример 21. Гибридный жидкостно-твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 21

Промежуточное соединение 21 (SEQ ID №: 27) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Lys(Boc)-2-СТС-гидразин (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 21.

Таблица 21. Условия SPPS для примера 21

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Lys(PhAc)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
3	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Leu-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
4	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-2-Me-Ile- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
5	3 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т. процедура кэпирования
6	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
7	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Tyr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
8	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Asp(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
9	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
10	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/ 2,0 Охума, 4-6 ч, к.т.
11	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Phe(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-6 ч, к.т.
12	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Thr(t-Bu)- ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,2 Охума 4-6 ч, к.т.
13	2 x 10 мин 5% Охума/20% Pip/ДМФА	Woc-L-Tyr(t-Bu)- Aib-L-Gln(Trt)-Gly- ОН	1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охума 4-6 ч, к.т.

Фрагмент на смоле подвергают набуханию с помощью ДХМ (3×10 об.) с использованием фильтра-реактора. Смесь для снятия защиты готовят путем смешивания 10 об. ТФК, 0,4 об. TIPS, 0,4 об. H₂O и 0,3 об. ДТТ и перемешивают до гомогенности. Смесь добавляют к смоле и полученную суспензию перемешивают в течение 3 ч при к.т. Смолу фильтруют и промывают ДХМ (2×3 об.). Затем полученные фильтраты объединяют и охлаждают до около -10°C и медленно добавляют 75 об. МТБЭ. Полученную суспензию фильтруют и промывают 2×10 об. МТБЭ. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде белого твердого вещества.

Неочищенный гидразид пептида растворяют в 30 об. буфера для лигирования (буфер из 6 М гидрохлорида гуанидина и 0,2 М одноосновного гидрофосфата натрия, pH 3,35) и охлаждают до около -15°C. К раствору гидразида добавляют 1 М раствор нитрита натрия (5,0-10,0 экв.) и оставляют перемешиваться в течение 10 мин при температуре около -15°C. Через 10 мин к пептидилазиду, полученному при окислении гидразида пептида, добавляют 2,2,2-трифторэтантол (20,0 экв., pH 7,0). pH реакционной смеси доводят до 7,0 с помощью 5 н. раствора гидроксида натрия. Тиолиз пептидилазида проводят в течение 1 ч, а затем полученный тиоэфир пептида используют непосредственно в реакции лигирования или очищают с помощью обращенно-фазовой хроматографии (см., Huang (2014)).

Пример 22. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 22

Промежуточное соединение 22 (SEQ ID №: 28) или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Gly-2-СТС (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 22.

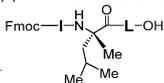
Таблица 22. Условия SPPS для примера 22

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Gln(Trt)-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6-9 ч, к.т.
2	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Aib-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4-8 ч, к.т.
3	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Woc-L-Tyr(Woc)-ОН	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 12-18 ч, к.т.

Отщепление и снятие защиты: тетрамер на смоле СТС подвергают набуханию с использованием ДХМ (5-10 об.) в течение 2 x 30 мин. В реактор загружают 3,5 об. 1% ТФК/ДХМ и полученную суспен-

зию смолы перемешивают в течение 10-15 мин в атмосфере азота, поддерживая температуру около 25°C. Фильтрат удаляют и немедленно нейтрализуют медленным добавлением 1,05 эквивалентного количества пиридина. Обработку смолы 1% ТФК/ДХМ с последующей нейтрализацией фильтрата повторяют еще четыре раза. Смолу промывают 3,5 об. ДХМ и перемешивают в течение 5-10 мин. Все фильтраты и промывные воды объединяют. Раствор фрагмента концентрируют под вакуумом до 1,5 об., поддерживая температуру $\leq 35^\circ\text{C}$. К раствору добавляют 5 об. IPAc и остаточные растворители IPAc/ДХМ удаляют в вакууме до 1,5 об., поддерживая температуру $\leq 40^\circ\text{C}$. Добавление 5 об. IPAc и перегонку под вакуумом повторяют, чтобы получить 3,5 об. конечного раствора фрагмента. Этот раствор затем промывают 3×2 об. 5,0%-ого раствора NaCl, а затем удаляют IPAc до 1,5 об. при пониженном давлении, поддерживая температуру при $\leq 40^\circ\text{C}$. К раствору при 40°C добавляют 4-5 об. гептана. Затем температуру снижают до около 15°C и полученную суспензию перемешивают в течение 30 мин. Растворители IPAc/гептан удаляют до 3,5 об. при пониженном давлении, поддерживая температуру при $\leq 40^\circ\text{C}$. Загрузку гептана и перегонку повторяют и полученную суспензию осажденного фрагмента охлаждают до около 20°C, фильтруют, промывают 2 об. гептана и полученное твердое вещество сушат при около 35°C.

Пример 23. Твердофазный пептидный синтез промежуточного соединения 23



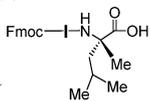
Промежуточное соединение 23 () или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-Leu-2-CTC (коэффициент загрузки 0,6-0,9 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 23.

Таблица 23. Условия SPPS для примера 23

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-2-Me-Leu-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 6-9 ч, к.т.
2	2 x 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ile-OH	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 16-18 ч, к.т.

Отщепление и снятие защиты: тетрамер на смоле CTC подвергают набуханию с использованием ДХМ (5-10 об.) в течение 2×30 мин. В реактор загружают 3,5 об. 1% ТФК/ДХМ и полученную суспензию смолы перемешивают в течение 10-15 мин в атмосфере азота, поддерживая температуру около 25°C. Фильтрат удаляют и немедленно нейтрализуют медленным добавлением 1,05 эквивалентного количества пиридина. Обработку смолы 1% ТФК/ДХМ с последующей нейтрализацией фильтрата повторяют еще четыре раза. Смолу промывают 3,5 об. ДХМ и перемешивают в течение 5-10 мин. Все фильтраты и промывные воды объединяют. Раствор фрагмента концентрируют под вакуумом до 1,5 об., поддерживая температуру $\leq 35^\circ\text{C}$. К раствору добавляют 5 об. IPAc и остаточные растворители IPAc/ДХМ удаляют в вакууме до 1,5 об., поддерживая температуру $\leq 40^\circ\text{C}$. Добавление 5 об. IPAc и перегонку под вакуумом повторяют, чтобы получить 3,5 об. конечного раствора фрагмента. Этот раствор затем промывают 3×2 об. 5,0%-ого раствора NaCl и удаляют IPAc до 1,5 об. при пониженном давлении, поддерживая температуру при $\leq 40^\circ\text{C}$. К раствору при около 40°C добавляют 4-5 об. гептана. Затем температуру снижают до около 15°C и полученную суспензию перемешивают в течение 30 мин. Растворители IPAc/гептан удаляют до 3,5 об. при пониженном давлении, поддерживая температуру при $\leq 40^\circ\text{C}$. Загрузку гептана и перегонку повторяют, полученную суспензию осажденного фрагмента охлаждают до около 20°C, фильтруют и промывают 2 об. гептана, и полученное твердое вещество сушат при около 35°C.

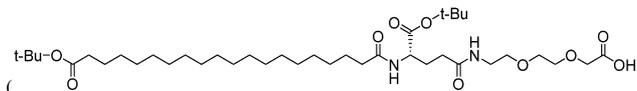
Пример 24: Жидкофазный пептидный синтез промежуточного соединения 24



Промежуточное соединение 24 () или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать сочетанием H-L-2-Me-Leu и Fmoc-L-Ile-OH с использованием стандартной химии сочетания в растворе с последующей обработкой и выделением.

Пример 25. Твердофазный пептидный синтез фрагмента жирной кислоты (Соединение 25)

Соединение 25



или его фармацевтически приемлемую соль можно синтезировать с помощью стандартного SPPS. Вкратце, SPPS проводят с использованием смолы Fmoc-PEG-2-CTC (коэффициент загрузки 0,6-1,1 ммоль/г) в условиях, указанных ниже в табл. 24.

Таблица 24. Условия SPPS для примера 25

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-γ-Glu-Ot-Bu	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.
2	2 x 20-30 мин 20% Pip/ДМФА	t-BuOOC-(CH ₂) ₁₈ - COO	2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охума 4 ч, к.т.

Пример 26.: Гибридный жидкостно-твердофазный синтез аналога инкретина из четырех промежуточных соединений посредством химической конъюгации

Протокол сочетания: аналог инкретина SEQ ID №: 6 может быть получен путем сочетания SEQ ID №: 7, 8, 9 и 10 с помощью HLSPS. Вкратце, раствор SEQ ID №: 7 (1,05-1,30 ммоль) и раствор SEQ ID №: 8 (1,00 ммоль) в 30-40 об. ДМСО/АСН (70:30) подвергают сочетанию с использованием реагента PyBOP, HATU или PyOXim (1,30-2,00 ммоль) и ДИЭА (4,00-5,00 ммоль) при к.т. Смесь перемешивают при к.т. в течение 2-4 ч. Затем добавляют 10 экв. ДЭА и смесь перемешивают в течение 4 ч. Смесь гасят 20 об. 15-20%-ого раствора хлорида натрия, затем добавляют еще 10 об. воды и перемешивают в течение 10 мин. Полученную суспензию фильтруют и твердое вещество промывают 3 × 10 об. воды. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде белого твердого вещества.

Затем раствор связанного SEQ ID: № 7+8 (1,00 ммоль) и раствор SEQ ID №: 9 (1,05-1,30 ммоль) в 30-40 об. ДМСО/АСН (70:30) подвергают сочетанию с использованием реагента PyBOP, HATU или PyOXim (1,30-2,00 ммоль) и ДИЭА (4,00-5,00 ммоль) при к.т. Смесь перемешивают при к.т. в течение 2-4 ч. Затем добавляют 10 экв. ДЭА и смесь перемешивают в течение 2-4 ч. Смесь гасят 20 об. 15-20%-ого раствора хлорида натрия, затем добавляют еще 10 об. воды и перемешивают в течение 10 мин. Полученную суспензию фильтруют и твердое вещество промывают 3×10 об. воды. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде белого твердого вещества.

Затем раствор связанного SEQ ID №: 7+8+9 (1,00 ммоль) и раствор SEQ ID №: 10 (1,20-1,30 ммоль) в 30-40 об. ДМСО/АСН (70:30) подвергают сочетанию с использованием реагента PyBOP, HATU или PyOXim (1,50-2,00 ммоль) и ДИЭА (4,00-5,00 ммоль) при к.т. Смесь перемешивают при к.т. в течение 3-4 ч. Смесь гасят 20 об. 15-20%-ого раствора хлорида натрия, а затем добавляют еще 10 об. воды и перемешивают в течение 10 мин. Полученную суспензию фильтруют и твердое вещество промывают 3×10 об. воды. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде белого твердого вещества.

Общее снятие защиты: смесь для снятия защиты готовят путем смешивания 10 об. ТФК, 2 об. ДХМ, 0,4 об. TIPS, 0,4 об. H₂O и 0,3 мас. об. ДТТ и перемешивают до гомогенности. Смесь охлаждают до около 15°C, а затем добавляют твердый связанный SEQ ID №: 7+8+9+10, полученную реакционную смесь нагревают до к.т. и перемешивают в течение 3 ч при к.т. Смесь охлаждают до около -10°C и медленно добавляют 75 об. МТБЭ. Полученную суспензию фильтруют и промывают 2×10 об. МТБЭ. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта SEQ ID №: 6 в виде белого твердого вещества.

Пример 27. Гибридный жидкостно-твердофазный синтез аналога инкретина из четырех промежуточных соединений посредством химической конъюгации

В данном случае аналог инкретина SEQ ID №: 6 получают путем сочетания SEQ ID №: 7, 11, 12 и 10 посредством конвергентного твердофазного пептидного синтеза (CSPPS), по существу, как описано в примере 26 для сочетания SEQ ID №: 7, 8, 9 и 10.

Пример 28. Гибридный жидкостно-твердофазный синтез аналога инкретина из четырех промежуточных фрагментов посредством химической конъюгации

В данном случае аналог инкретина SEQ ID №: 6 получают путем сочетания SEQ ID №: 7, 13, 14 и 10 посредством CSPPS, по существу, как описано в примере 26 для сочетания SEQ ID №: 7, 8, 9 и 10.

Пример 29. Гибридный жидкостно-твердофазный синтез аналога инкретина из трех промежуточных фрагментов посредством химической конъюгации

Аналог инкретина SEQ ID №: 6 может быть получен путем сочетания SEQ ID №: 7, 13 и 15 посредством CSPPS. Вкратце, раствор SEQ ID №: 7 (1,05-1,30 ммоль) и раствор SEQ ID №: 13 (1,00 ммоль) в 30-40 об. ДМСО/АСН (70:30) подвергают сочетанию с использованием реагента PyBOP, HATU или PyOXim (1,30-2,00 ммоль) и ДИЭА (4,00-5,00 ммоль) при к.т. Смесь перемешивают при к.т. в течение 2-4 ч. Затем добавляют 10 экв. ДЭА и смесь перемешивают в течение 4 ч. Смесь гасят 20 об. 15-20%-ого раствора хлорида натрия, а затем добавляют еще 10 об. воды и перемешивают в течение 10 мин. Полученную суспензию фильтруют и твердое вещество промывают 3×10 об. воды. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде белого твердого вещества.

Затем раствор связанного SEQ ID №: 7+13 (1,00 ммоль) и раствор SEQ ID №: 15 (1,20-1,30 ммоль) в 30-40 об. ДМСО/АСН (70:30) подвергают сочетанию с использованием реагента PyBOP, HATU или PyOXim (1,50-2,00 ммоль) и ДИЭА (4,00-5,00 ммоль) при к.т. Смесь перемешивают при к.т. в течение 2-4 ч.

Затем добавляют 10 экв. ДЭА и смесь перемешивают в течение 2-4 ч. Смесь гасят 20 об. 15-20%-ого раствора хлорида натрия, а затем добавляют еще 10 об. воды и перемешивают в течение 10 мин. Полученную суспензию фильтруют и твердое вещество промывают 3×10 об. воды.

Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде белого твердого вещества.

Общее снятие защиты: смесь для снятия защиты готовят путем смешивания 10 об. ТФК, 2 об. ДХМ, 0,4 об. TIPS, 0,4 об. H₂O и 0,3 мас. об. ДТТ и перемешивают до гомогенности. Смесь охлаждают до около 15°C, а затем добавляют твердый связанный SEQ ID №: 7+13+15, полученную реакцию смесь нагревают до к.т. и перемешивают в течение 3 ч при к.т. Смесь охлаждают до около -10°C и медленно добавляют 75 об. МТБЭ. Полученную суспензию фильтруют и промывают 2×10 об. МТБЭ. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта SEQ 6 в виде белого твердого вещества.

Пример 30. Гибридный жидкостно-твердофазный синтез аналога инкретина из трех промежуточных фрагментов посредством химической конъюгации

Аналог инкретина SEQ ID №: 6 может быть получен путем сочетания SEQ ID №: 16, 9 и 10 посредством CSPPS. Вкратце, раствор SEQ ID №: 16 (1,00 ммоль) и раствор SEQ ID №: 9 (1,05-1,30 ммоль) в 30-40 об. ДМСО/АСН (70:30) подвергают сочетанию с использованием реагента PyBOP, HATU или PyOXim (1,30-2,00 ммоль) и ДИЭА (4,00-5,00 ммоль) при к.т. Смесь перемешивают при к.т. в течение 3-4 ч. Смесь гасят 20 об. 15-20%-ого раствора хлорида натрия, а затем добавляют еще 10 об. воды и перемешивают в течение 10 мин. Полученную суспензию фильтруют и твердое вещество промывают 3×10 об. воды. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде белого твердого вещества.

Затем раствор связанного SEQ ID №: 16+9 (1,00 ммоль) и раствор SEQ ID №: 10 (1,20-1,30 ммоль) в 30-40 об. ДМСО/АСН (70:30) подвергают сочетанию с использованием реагента PyBOP, HATU или PyOXim (1,50-2,00 ммоль) и ДИЭА (4,00-5,00 ммоль) при к.т. Смесь перемешивают при к.т. в течение 2-4 ч. Затем добавляют 10 экв. ДЭА и смесь перемешивают в течение 2-4 ч. Смесь гасят 20 об. 15-20%-ого раствора хлорида натрия, а затем добавляют еще 10 об. воды и перемешивают в течение 10 мин. Полученную суспензию фильтруют и твердое вещество промывают 3×10 об. воды. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде белого твердого вещества.

Общее снятие защиты: смесь для снятия защиты готовят путем смешивания 10 об. ТФК, 2 об. ДХМ, 0,4 об. TIPS, 0,4 об. H₂O и 0,3 мас. об. ДТТ и перемешивают до гомогенности. Смесь охлаждают до около 15°C, а затем добавляют твердый связанный SEQ ID №: 16+9+10, полученную реакцию смесь нагревают до к.т. и перемешивают в течение 3 ч при к.т. Смесь охлаждают до около -10°C и медленно добавляют 75 об. МТБЭ. Полученную суспензию фильтруют и промывают 2×10 об. МТБЭ. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта SEQ 6 в виде белого твердого вещества.

Пример 31. Гибридный жидкостно-твердофазный синтез аналога инкретина из трех промежуточных фрагментов посредством химической конъюгации

В данном случае аналог инкретина SEQ ID №: 6 получают путем сочетания SEQ ID №: 18, 12 и 10 посредством CSPPS, по существу, как описано в примере 30 для сочетания SEQ ID №: 16, 9 и 10.

Пример 32. Гибридный жидкостно-твердофазный синтез аналога инкретина из двух промежуточных фрагментов посредством химической конъюгации

Аналог инкретина SEQ ID №: 6 может быть получен путем сочетания SEQ ID №: 19 и 15 посредством CSPPS. Вкратце, раствор SEQ ID №: 18 (1,00 ммоль) и раствор SEQ ID №: 15 (1,20-1,30 ммоль) в 30-40 об. ДМСО/АСН (70:30) подвергают сочетанию с использованием реагента PyBOP, HATU или PyOXim (1,50-2,00 ммоль) и ДИЭА (4,00-5,00 ммоль) при к.т. Смесь перемешивают при к.т. в течение 2-4 ч. Смесь гасят 20 об. 15-20%-ого раствора хлорида натрия, а затем добавляют еще 10 об. воды и перемешивают в течение 10 мин. Полученную суспензию фильтруют и твердое вещество промывают 3×10 об. воды. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде белого твердого вещества.

Общее снятие защиты: смесь для снятия защиты готовят путем смешивания 10 об. ТФК, 2 об. ДХМ, 0,4 об. TIPS, 0,4 об. H₂O и 0,3 мас. об. ДТТ и перемешивают до гомогенности. Смесь охлаждают до около 15°C, а затем добавляют твердый связанный SEQ ID №: 19+15, полученную реакцию смесь нагревают до к.т. и перемешивают в течение 3 ч при к.т. Смесь охлаждают до около -10°C и медленно добавляют 75 об. МТБЭ. Полученную суспензию фильтруют и промывают 2×10 об. МТБЭ. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта SEQ ID №: 6 в виде белого твердого вещества.

Пример 33. Гибридный жидкостно-твердофазный синтез аналога инкретина из двух промежуточных фрагментов посредством химической конъюгации

В данном случае аналог инкретина SEQ ID №: 6 получают путем сочетания SEQ ID №: 18 и 20 по-

средством CSPPS, по существу, как описано в примере 32 для сочетания SEQ ID №: 15 и 19.

Пример 34. Гибридный жидкостно-твердофазный синтез аналога инкретина из двух промежуточных фрагментов посредством химической конъюгации

В данном случае аналог инкретина SEQ ID №: 6 получают путем сочетания SEQ ID №: 21 и 18 или SEQ ID №: 22 и 19 посредством CSPPS, по существу, как описано в примере 32 для сочетания SEQ ID №: 15 и 19, за одним исключением, что после сочетания двух фрагментов защитную группу на Lys17 селективно удаляют посредством химического превращения (условия зависят от природы группы), а затем селективно ацилируют боковой цепью жирной кислоты с последующим полным снятием защиты.

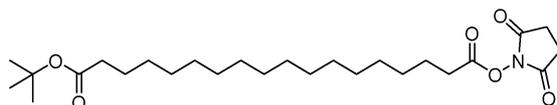
Пример 35. Гибридный жидкостно-твердофазный синтез аналога инкретина из двух промежуточных фрагментов посредством нативного химического лигирования

Аналог инкретина SEQ ID №: 6 может быть получен путем сочетания SEQ ID №: 23 и 24 посредством нативного химического лигирования. Вкратце, тиоэфир пептида SEQ ID №: 23 растворяют в 30-50 об. буфера для лигирования (буфер из 6 М гидрохлорида гуанидина и 0,2 М одноосновного гидрофосфата натрия, pH 7,04). К раствору тиоэфира добавляют содержащий на N-конце цистеин пептидный фрагмент SEQ ID №: 24 (0,9-0,95 экв.). К реакционной смеси добавляют 40 экв. 2,2,2-трифторэтангиола (pH 7,16) и 20 экв. трис(2-карбокситил)фосфина (pH 7,0) и доводят pH до 7,0 с помощью 5 н. раствора гидроксида натрия. Реакционной смеси дают перемешиваться при комнатной температуре в течение 24 ч и полученный раствор используют непосредственно для очистки с помощью обращенной фазы.

Пример 36. Гибридный жидкостно-твердофазный синтез аналога инкретина из двух промежуточных фрагментов посредством нативного химического лигирования

В данном случае аналог инкретина SEQ ID №: 6 может быть получен путем соединения SEQ ID №: 25 и 26 посредством CSPPS, по существу, как описано в примере 35 для сочетания SEQ ID №: 23 и 24.

Пример 36. Синтез соединения 35



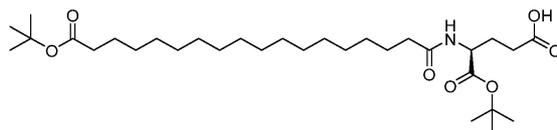
Соединение 35

В четырехгорлую колбу вместимостью 20 л при 15-30°C добавляют дихлорметан (7,5 л, 15,0 об.), и добавляют 18-(трет-бутокси)-18-оксооктадекановую кислоту (500,5 г, 1,0 экв., 1,35 моль) и N-гидроксисукцинимид (185,6 г, 1,2 экв., 1,61 моль) при 15-30°C с получением суспензии. Реакционную смесь охлаждают до 0-10°C и загружают N-этил-N'-карбодимид (338,4 г, 1,3 экв., 1,77 моль) одной порцией с получением раствора. Реакционную смесь промывают три раза 8 объемами полунасыщенного водного раствора хлорида натрия. Соединение 35 используют непосредственно на следующей стадии для получения соединения 36.

Альтернативная методика для соединения 35

18-(трет-бутокси)-18-оксооктадекановую кислоту (20 г, 53,431 ммоль, 99% мае), N,N'-дисукцинимидилкарбонат (1,2 экв., 64,117 ммоль, 99,6 мас.%) и 4-диметиламинопиридин (0,2 экв., 1,31 г, 10,7 ммоль, 100 мас.%) загружают в реактор вместимостью 1000 мл с дефлекторами и кожухом, оснащенный верхнеприводной мешалкой. Добавляют этилацетат (800 мл, 40 объемов) и полученную суспензию перемешивают в течение ночи (18-24 ч) при температуре окружающей среды (18-23°C). ¹H-ЯМР неочищенного образца через 24 ч обычно показывает завершение реакции на 97-99%. Партию экстрагируют деионизированной водой (3×82 мл). Органический слой концентрируют в вакууме до ~160 мл. К реакционной смеси добавляют этилацетат (200 мл) и неочищенный реакционный раствор упаривают до ~180 мл в вакууме при 50°C. Раствор переносят на фильтр с рубашкой и медленно охлаждают до 3°C при перемешивании. Затем реакционную смесь выдерживают при 3-5°C в течение 1 ч. Твердые вещества фильтруют, промывают холодным этилацетатом (18 мл) и сушат под вакуумом (7 дюймов рт. ст.), что дает Соединение 35 в виде твердого вещества (22,6 г, выход 9,05%, ВЭЖХ-САД 99,17%).

Пример 37. Синтез t-BuO-C18-Glu-1-OtBu (Соединение 36)



Соединение 36

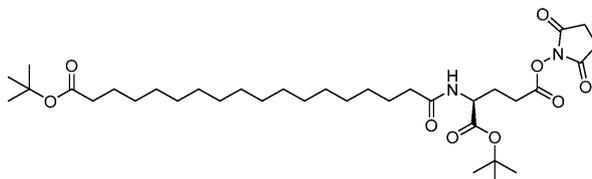
Соединение 35 добавляют к раствору (4S)-4-амино-5-трет-бутокси-5-оксопентановой кислоты (H-Glu-1-OtBu) (289 г, 1,14 экв., 1 моль) в дихлорметане (2,5 л, 5,0 об.) в четырехгорлой колбе вместимостью 20 л при 15-30°C. Затем в реактор загружают диизопропилэтиламин (230 г, 1,5 экв., 1,78 моль) при 15-30°C с получением раствора. Как только препарат 1 <0,5% реакцию продолжают на следующей стадии. Органическую фазу промывают 2%-ным водным раствором KHSO₄ (4 г/г × 3) и концентрируют до 1-2 об. под вакуумом при T<50°C и <-0,08 МПа. В реактор загружают ацетонитрил (8 об.) и концентри-

руют до 1-2 об. при $<60^{\circ}\text{C}$. В реактор снова загружают ацетонитрил (8 об.) и концентрируют до 5-6 об. при $<60^{\circ}\text{C}$. Концентрат охлаждают до $40-50^{\circ}\text{C}$, перемешивают в течение 0,5-1 ч, а затем охлаждают до $15-30^{\circ}\text{C}$ в течение 2-4 ч. Суспензию фильтруют, промывают ацетонитрилом (3 об.) и сушат в атмосфере N_2 с получением Соединения 36 в виде твердого вещества (659,5 г, выход 86,3%, LCAP 99,1%).

Альтернативный способ для Соединения 36

Соединение 35 (50 г, 104,8 ммоль, 98 мас.%), (4S)-4-амино-5-трет-бутокси-5-оксопентановую кислоту H-Glu-1-OtBu (H-Glu-1-OtBu) (25,7 г, 126 ммоль, 99,3 мас.%) загружают в реактор вместимостью 1 л с дефлекторами и рубашкой, оснащенный верхнеприводной мешалкой и термопарой. Ацетонитрил (500 мл, 10 об.) используют для промывки твердых веществ через воронку в реакционный сосуд. Затем к реакционной смеси добавляют диизопропилэтиламин (22 мл, 126 ммоль, 99,75 мас.%). Реакционную смесь нагревают до 40°C и дают перемешиваться в течение 18 ч. После подтверждения завершения реакции с помощью ^1H -ЯМР/ВЭЖХ-САД в реакционную смесь загружают уксусную кислоту (7,2 мл, 130 ммоль, 100 мас.%) и воду (215 мл, 11934,6 ммоль, 100 мас.%) и перемешивают при $30-35^{\circ}\text{C}$ в течение 1 ч. Партию переносят на фильтр с рубашкой, оснащенный верхнеприводной мешалкой, и охлаждают до -20°C . Твердые вещества начинают кристаллизоваться из раствора при $T_{\text{г}}=2^{\circ}\text{C}$ и $T_{\text{ж}}=-9^{\circ}\text{C}$. Твердые вещества выдерживают при этой температуре в течение 1 ч. Затем в эту партию вливают деионизированную воду (8,6 об., 460 мл) и фильтр нагревают до 0°C . Твердые вещества фильтруют и сушат под высоким вакуумом при 40°C с получением Соединения 36 в виде твердого вещества (55,5 г, выход 95,3%, ВЭЖХ-САД 99,62%).

Пример 38. Синтез t-BuO-C18-Glu-1-OtBu-5-ONSu (Соединение 37)

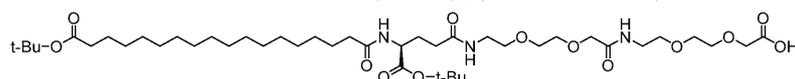


Ацетонитрил (12,0 об.) добавляют в четырехгорлую колбу вместимостью 20 л при $15-30^{\circ}\text{C}$. В колбу при $15-30^{\circ}\text{C}$ добавляют Соединение 36 (500,4 г, 1,0 экв., 0,90 моль) и N,N'-дисукцинимидилкарбонат (278,5 г, 1,2 экв., 1,09 моль) с получением суспензии. Одной порцией добавляют 4-диметиламинопиридин (11,0 г 0,1 экв. 0,09 моль), чтобы получить раствор. Добавляют воду (1,6 кг) в течение 0,5-1 ч. Смесь охлаждают до $0-10^{\circ}\text{C}$ в течение 1-2 ч, фильтруют, промывают ацетонитрилом (2 об. $0-10^{\circ}\text{C}$) и сушат в атмосфере N_2 с получением Соединения 37 в виде твердого вещества (536,0 г, выход 91,3%, LCAP 100,0%).

Альтернативный синтез Соединения 37

Соединение 36 (55 г, 98,96 ммоль), N,N'-дисукцинимидилкарбонат (31 г, 121 ммоль, 99,6% мас.), 4-диметиламинопиридин (1,22 г, 9,89 ммоль, 99 мас.%) загружают в реактор вместимостью 1 л с дефлекторами и кожухом, оснащенный верхнеприводной мешалкой и термопарой. В реакционный сосуд добавляют ацетонитрил (660 мл, 12 об.). Реакционную смесь перемешивают при 24°C в течение 4 ч. После подтверждения завершения реакции с помощью ^1H -ЯМР/ВЭЖХ-САД реакционный раствор переносят в химический стакан вместимостью 1000 мл, и в стакан, снабженный магнитной мешалкой, добавляют деионизированную воду (180 мл). Твердые вещества выпадают из реакционной смеси при перемешивании раствора. Реакционную суспензию охлаждают в течение ночи в холодильнике ($2-10^{\circ}\text{C}$). Твердые вещества фильтруют и осадок на фильтре промывают 125 мл холодного ($2-10^{\circ}\text{C}$) ацетонитрила. Твердые вещества сушат под высоким вакуумом при 40°C в течение 24 ч с образованием Соединения 37 (59,3 г, выход 91,8%, ВЭЖХ-САД 99,61%).

Пример 39. Синтез t-BuO-C18-Glu-1-OtBu-5-(AEEA)₂ (Соединение 38)



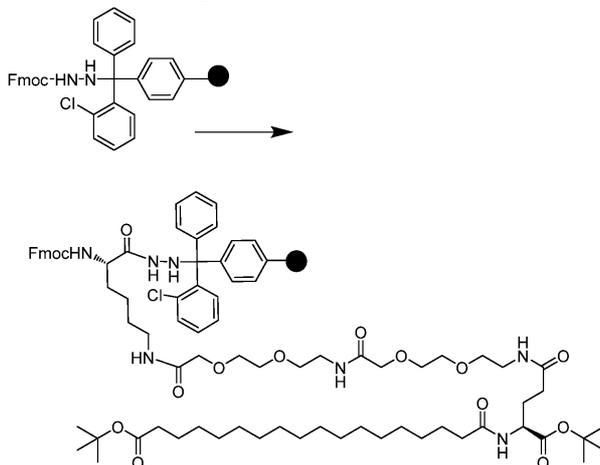
В четырехгорлую колбу вместимостью 20 л одной порцией при $15-30^{\circ}\text{C}$ добавляют дихлорметан (7,5 л, 15,0 об.), а затем (AEEA)₂ (261 г, 1,1 экв., 0,85 моль), Соединение 37 (501 г, 1,0 экв., 0,77 моль) и диизопропилэтиламин (1,5 экв.) при $15-30^{\circ}\text{C}$. Как только Соединение 37 составляет $<0,5\%$, реакцию продолжают на следующей стадии. Затем реакционную смесь концентрируют до 5-6 об. под вакуумом при $T<30^{\circ}\text{C}$, $P<0,08$ МПа. К неочищенному продукту (5 об.) добавляют этилацетат и концентрируют под вакуумом при $T<50^{\circ}\text{C}$, $P<0,08$ МПа. К концентрату добавляют этилацетат (10 об.), и промывают 2%-ым водным раствором KHSO_4 (5 г/г \times 5-6), и концентрируют до 1,2 об. под вакуумом при $T<40^{\circ}\text{C}$ и $P<0,08$ МПа. К концентрату добавляют диметилформамид (3 г/г об.), что дает продукт Соединение 38 в виде бледно-желтого раствора (2,4 кг, выход 92,7%, LCAP 98,7%).

Альтернативный синтез Соединения 38

В колбу вместимостью 500 мл, оснащенную термопарой и магнитной мешалкой, добавляют (AE-

EA)2 (27,6 г, 1,1 экв., 85,0 ммоль, 95% мас), N-метил-N-триметилсилилацетамид (30 мл, 2 экв., 200 ммоль, 90 мас.%) и этилацетат (230 мл). Реакцию перемешивают в течение 3 ч при 18-23°C. Через 3 ч Соединение 37 (50 г, 76,58 ммоль, 100 мас.%) и этилацетат (130 мл) добавляют в реакционную колбу и перемешивают в течение 2 ч при 18-23°C. После подтверждения завершения реакции с помощью ¹H-ЯМР/ВЭЖХ-САД реакционный раствор переносят в делительную воронку и органический слой промывают 2%-ым раствором KHSO₄ (100 мл × 3) и 2%-ым раствором NaCl (100 мл × 6). Органический слой концентрируют, и полученное масло сушат под высоким вакуумом при 50°C в течение 24 ч, что дает Соединение 38 в виде воскообразного твердого вещества при -20°C (66,32 г, содержание основного вещества 94,9% в соответствии с Q-ЯМР, ВЭЖХ-САД 99,53%).

Пример 40. Нативное химическое лигирование



Синтез Соединения 39

Fmoc-гидразин-2-хлортритиловую смолу (1,16 г, 0,85 ммоль) подвергают набуханию в синтезаторе Symphony X с использованием 2×10 мл ДМФА по 20 мин каждый цикл. Снятие защиты Fmoc проводят с помощью 3×10 мл 20%-ого пиперидина/ДМФА по 30 мин каждый цикл. Затем смолу промывают 5×10 мл ДМФА.

(2S)-6-[[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[(4S)-5-трет-бутокси-4-[(18-трет-бутокси-18-оксооктадеcanoил)амино]-5-оксопентаноил]амино]этокси]этокси]ацетил]амино]этокси]этокси]ацетил]амино]-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)гексановую кислоту (Соединение 38, 2,13 г, 1,78 ммоль, 2,1 экв.) и TNTU (0,715 г, 1,96 ммоль, 2,31 экв.) растворяют в около 20,5 мл ДМФА и к раствору добавляют N,N-диизопропилэтиламин (0,57 мл, 3,27 ммоль, 3,85 экв.). Раствору давали перемешиваться в течение 15 мин на роторном смесителе. Через 15 мин к смоле добавляют раствор предварительно активированного Соединения 38 и осуществляют реакцию сочетания в течение 8 ч. Затем смолу промывают 5×10 мл ДМФА 5×10 мл ДХМ и сушат в течение 8 ч в синтезаторе. Загрузка смолы, определенная с помощью количественного ЯМР, составляет 0,45 ммоль/г.

Пример 41. Синтез Соединения 40 (SEQ ID №: 58)

Около 1,10 г Соединения 39 (величина загрузки: 0,45 ммоль/г) добавляют в два реакторных сосуда вместимостью 40 мл и подвергают набуханию с помощью 2×20 мл ДМФА по 20 мин каждый цикл. SEQ ID №: 58 синтезируют с использованием стандартных протоколов SPPS.

Снятие защиты: 4×9 мл 20% об./об. пиперидина в ДМФА, каждый цикл по 30 мин.

Реакции сочетания: для сочетания аминокислот используют 3 экв. аминокислоты, 3 экв. ОХУМА и 3,3 экв. DIC.

В процессе SPPS смолу промывают 5×9 мл ДМФА с 1 мин перемешивания с помощью N₂ после каждого сочетания и заключительного повтора снятия защиты fmos. По окончании синтеза гидразида пептида смолу промывают ДХМ при перемешивании с помощью N₂. Смолу сушат на пептидном синтезаторе.

Полное снятие защиты и отщепление

К высушенной смоле (4,2 г) добавляют 45 мл смеси для отщепления, приготовленной из 2,5% мас./об. дитиотреитола (ДТТ), 2,5% об./об. воды, 2,5% об./об. триизопропилсилана (TIPS) и 92,5% трифторуксусной кислоты (ТФК) в трехгорлой круглодонной колбе вместимостью 500 мл, и перемешивают в течение около 3 ч. Смолу фильтруют и промывают 2×2,5 мл ТФК. Фильтрат выливают в 350 мл холодного МТБЭ и пептид сразу же выпадает в осадок. Колбу для фильтрования промывают 2×2,5 мл ТФК и выливают в холодный МТБЭ. Его охлаждают до -20°C в течение получаса, а затем центрифугируют. Затем осадок пептида дважды промывают 300 мл МТБЭ и центрифугируют. Осадок пептида сушат в вакуумном сушильном шкафу при 27°C в течение около 14 ч. После сушки получают около 2,75 г неочищенного Соединения 40 [Ожидаемая (масса+2H⁺)/2=1356,2257, наблюдаемая (масса+2H⁺)/2=1356,2245].

Пример 42. Синтез Соединения 41 (SEQ ID №: 59)

Около 0,50 ммоль Соединения 41 (SEQ ID №: 59) синтезируют на амидной смоле Зибера по стандартным протоколам SPPS, аналогичным синтезу Соединения 40, SEQ ID №: 58.

Полное снятие защиты и отщепление: к высушенной смоле (2,21 г) добавляют 25 мл смеси для отщепления, состоящей из 5% мас./об. дитиотреитола (ДТТ), 2,5% об./об. воды, 2,5% об./об. триизопропилсилана (TIPS) и 90% трифторуксусной кислоты (ТФК), и перемешивают в течение 3 ч в барабанном смесителе. Смолу фильтруют и промывают 2×2,0 мл ТФК. Фильтрат выливают в 175 мл холодного МТБЭ, и пептид сразу же выпадает в осадок. Колбу для фильтрования промывают 2×2 мл ТФК и выливают в холодный МТБЭ. Его охлаждают до -20°C в течение 30 мин, а затем центрифугируют. Осадок пептида дважды промывают 150 мл МТБЭ и центрифугируют. Осадок пептида сушат в вакуумном сушильном шкафу при 27°C в течение 14 ч. После сушки получают около 1,351 г неочищенного Соединения 41 (SEQ ID №: 58). Его очищают с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Waters CSH C18 10 мкм (10 мм×250 мм) при температуре окружающей среды с линейным градиентом 15-35% ацетонитрила в воде (0,1% ТФК) в течение 23 мин после 10% ацетонитрила в воде (0,1% ТФК) в течение первых 3 мин и 10-15% ацетонитрила в воде (0,1 % ТФК) от 3 до 5 мин. Получают около 650 мг очищенного Соединения 41 [ожидаемая $(\text{масса} + 2\text{H}^+)/2 = 1138,5486$, наблюдаемая $(\text{масса} + 2\text{H}^+)/2 = 1138,5458$].

Пример 43. Синтез Соединения 42 (SEQ ID №: 60)

Соединение 42 (синтез тиоэфира), SEQ ID №: 60:

Неочищенный гидразид пептида (Соединение 40; SEQ ID №: 58, 118,2 мг, 0,044 ммоль) растворяют в 10 мл буфера для лигирования (6 М гидрохлорида гуанидина и 0,3 М одноосновного гидрофосфата натрия, pH около 3,5). Раствор охлаждают до -15°C на бане со льдом и ацетоном. К раствору гидразида пептида добавляют 0,3 мл 1М раствора нитрита натрия (20,7 мг, 0,3 ммоль, 6,8 экв.) и дают перемешиваться в течение 15 мин при -15°C. Тем временем 0,2 мл тиофенола разбавляют до 1,1 мл буфером для лигирования (pH около 7,0). Через 15 мин к раствору гидразида пептида добавляют 1,1 мл тиофеноловой смеси, чтобы вызвать тиолиз *in situ* пептидилазида, полученного из Соединения 40.

pH реакционной смеси доводят до около 7,0 с помощью 5 н. раствора гидроксида натрия. Тиолизу пептидилазида дают протекать в течение 15 мин, что дает Соединение 42 (SEQ ID №: 60).

Пример 44. Соединение 43, SEQ ID №: 61 (нативное химическое лигирование с тиоэфирным Соединением 42):

Соединение 41 (SEQ ID №: 59 (75,4 мг, 0,033 ммоль)) растворяют в 2 мл буфера для лигирования (pH около 7,0) в сквентилляционном флаконе и раствор добавляют к раствору неочищенного тиоэфира Соединения 42 (SEQ ID №: 60). Флакон ополаскивают 1 мл буфера для лигирования (pH около 7,0) и промывную жидкость добавляют к реакционной смеси. К реакционной смеси добавляют 1,5 мл трис(2-карбокситил)фосфина (ТСЕР, 0,25 М в буфере для лигирования, pH около 7,0) и 1,0 мл раствора аскорбиновой кислоты (0,53 М в буфере для лигирования, pH около 7,0). pH реакционной смеси доводят примерно до 7,1 с помощью 5 н. раствора NaOH и раствор становится прозрачным. Реакция завершается через 9-10 ч с получением SEQ ID №: 61.

Пример 45. Синтез SEQ ID №: 62 (Соединение 44)

Таблица 25. Условия SPPS для SEQ ID №: 62 (Соединение 44)

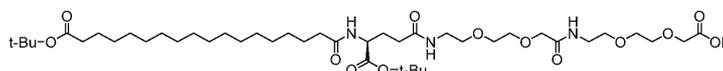
Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
2	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
3	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Ile-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
4	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Leu-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
5	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-2-MeTyr(tBu)-OH	1,5-3,0 AA/1,7-3,3 DIC/1,5-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
6	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
7	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Ile-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
8	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Phe-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
9	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
10	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Aib-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
11	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gln(Trt)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле СТС дважды подвергают набуханию с использованием ДХМ. Реактор со смолой охлаждают примерно до 15°C, в реактор загружают 2% ТФК/ДХМ (4 мл/г смолы), а затем перемешивают в течение 15 мин в атмосфере азота. Затем загружают 1% ТФК/ДХМ (4 мл/г смолы) и перемешивают в течение 15 мин, после фильтрования процедуру повторяют. Смолу фильтруют и промывают 3x10 об. ДХМ. Все фильтраты объединяют и нейтрализуют ДИ-ПЭА. ДХМ удаляют из полученного раствора и загружают насыщенный водный раствор хлорида натрия для осаждения фрагмента 2. Затем полученную суспензию фильтруют, поддерживая температуру при около 15°C. К осадку добавляют 14 об. свежего МТБЭ, перемешивают в течение 30 мин при около 15°C, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное светло-желтое твердое вещество сушат при около 35°C.

Пример 46. Синтез SEQ ID №: 42 (Соединение 45)

Таблица 26. Условия SPPS для синтеза SEQ ID №: 42 (Соединение 45)

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Ala-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
2	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Lys(Mtt)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
3	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Orn(Вос)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
4	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
5	HFIP/ДХМ	Соединение 38	1,5-3,0 AA/1,7-3,3 DIC/1,5-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.



Соединение 38

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле СТС дважды подвергают набуханию с использованием ДХМ. Реактор со смолой охлаждают примерно до 15°C, в реактор загружают 20% HFIP/ДХМ (8 мл/г смолы), а затем перемешивают в течение 60 мин в атмосфере азота. Затем загружают 20% HFIP/ДХМ (4 мл/г смолы) и перемешивают в течение 60 мин. Смолу фильтруют и промывают 3×10 об. ДХМ. Все фильтраты объединяют, из полученного раствора удаляют ДХМ и HFIP и загружают гептан и эфир для осаждения фрагмента 3. Затем полученную суспензию фильтруют, поддерживая температуру при около 15°C. К осадку добавляют 14 об. свежего МТБЭ, перемешивают в течение 30 мин при около 15°C, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз и полученное оранжевое твердое вещество сушат при около 35°C.

Пример 47. Синтез SEQ ID №: 31 (Соединение 28)

Таблица 27. Условия SPPS для синтеза SEQ ID №: 31

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Leu-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
2	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-2-MeLeu-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
3	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Ile-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
4	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Ser(tBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
5	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-4Pal-OH	1,5-3,0 AA/1,7-3,3 DIC/1,5-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
6	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
7	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Ser(tBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
8	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Thr(tBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
9	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-2-MePhe(2F)-OH	1,5-3,0 AA/1,7-3,3 DIC/1,5-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
10	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Thr(tBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
11	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
12	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
13	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Tyr(tBu)-Aib-OH	1,5-3,0 AA/1,7-3,3 DIC/1,5-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
14		(Boc) ₂ O	

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле СТС дважды подвергают набуханию с использованием ДХМ. Реактор со смолой охлаждают примерно до 15°C, в реактор загружают 2% ТФК/ДХМ (4 мл/г смолы), а затем перемешивают в течение 15 мин в атмосфере азота. Затем загружают 1% ТФК/ДХМ (4 мл/г смолы) и перемешивают в течение 15 мин, после фильтрования процедуру повторяют. Смолу фильтруют и промывают 3×10 об. ДХМ. Все фильтраты объединяют и нейтрализуют ДИ-ПЭА. ДХМ удаляют из полученного раствора и загружают насыщенный водный раствор хлорида натрия для осаждения фрагмента 2. Затем полученную суспензию фильтруют, поддерживая температуру при около 15°C. К осадку добавляют 14 об. свежего МТБЭ, перемешивают в течение 30 мин при около 15°C, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз, и полученное желтовато-белое твердое вещество сушат при температуре около 35°C.

Пример 48. Синтез SEQ ID №: 43 (Соединение 46)

Таблица 28. Получение SEQ ID №: 43 с помощью SPPS

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
2	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
3	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
4	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
3-4*	В качестве альтернативы используйте димер Fmoc-L-Pro-Pro-OH вместо стадий 3 и 4		
5	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ala-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
6	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
7	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
8	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
9	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-L-Pro-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
10	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
11	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
12	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
13	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Ile-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
14	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Leu-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
15	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-2-MeTyr(tBu)-OH	1,5-3,0 AA/1,7-3,3 DIC/1,5-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
16	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-D-Glu(OtBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
17	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Ile-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
18	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Phe-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
19	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
20	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Aib-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.
21	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gln(Trt)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охума 4-15 ч, к.т.

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле Зибера дважды подвергают набуханию с использованием 10 об. ДХМ в течение 10-20 мин. Реактор со смолой охлаждают до около 15°C и промывают последовательно 6% ТФК/ДХМ (5 мл/г смолы) в течение 15 мин, 3% ТФК/ДХМ (5 мл/г смолы) в течение 15 мин, 1% ТФК/ДХМ (10 мл/г смолы) в течение 5 мин, 1% ТФК/ДХМ (5 мл/г смолы) в течение

3 мин и 1% ТФК/ДХМ (2,5 мл/г смолы) в течение 3 мин. Смолу фильтруют и промывают 3×10 об. ДХМ. Все фильтраты объединяют. ДХМ удаляют из полученного раствора при пониженном давлении и восстанавливают с помощью EtOAc. К раствору добавляют гептан и полученную суспензию фильтруют, поддерживая температуру около 15°C. К осадку добавляют 14 об. свежего МТБЭ, перемешивают в течение 30 мин при около 15°C, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз, и полученное желтовато-белое твердое вещество сушат при температуре около 35°C.

Пример 49. Синтез SEQ ID №: 44 (Соединение 47)

Таблица 29. Получение SEQ ID №: 44

Цикл	Снятие защиты	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Ala-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
2	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Lys(Mtt)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
3	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Orn(Boc)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
4	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
5	HFIP/ДХМ	Соединение 38	1,5-3,0 AA/1,7-3,3 DIC/1,5-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
6	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Leu-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
7	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-2-MeLeu-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
8	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Ile-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
9	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Ser(tBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
10	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-4Pal-OH	1,5-3,0 AA/1,7-3,3 DIC/1,5-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
11	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
12	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Ser(tBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
13	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Thr(tBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
14	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-2-MePhe(2F)-OH	1,5-3,0 AA/1,7-3,3 DIC/1,5-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
15	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Thr(tBu)-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
16	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Gly-OH	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
17	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Glu(OtBu)-OH (H ₂ O)	2,0-3,0 AA/2,2-3,3 DIC/2,0-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
18	2 x 5 - 30 мин 20% Pip/ДМФА	Fmoc-Tyr(tBu)-Aib-OH	1,5-3,0 AA/1,7-3,3 DIC/1,5-3,0 Охута 4-15 ч, к.т.
19		(Boc) ₂ O	

Отщепление фрагмента и выделение: фрагмент на смоле Зибера дважды подвергают набуханию с использованием 10 об. ДХМ в течение 10-20 мин. Реактор со смолой охлаждают до около 15°C и промывают последовательно 6% ТФК/ДХМ (5 мл/г смолы) в течение 15 мин, 3% ТФК/ДХМ (5 мл/г смолы) в

течение 15 мин, 1% ТФК/ДХМ (10 мл/г смолы) в течение 5 минут, 1% ТФК/ДХМ (5 мл/г смолы) в течение 3 мин и 1% ТФК/ДХМ (2,5 мл/г смолы) в течение 3 мин. Смолу фильтруют и промывают 3×10 об. ДХМ. Все фильтраты объединяют. ДХМ удаляют из полученного раствора при пониженном давлении и восстанавливают с помощью EtOAc. К раствору добавляют гептан и полученную суспензию фильтруют, поддерживая температуру около 15°C. К осадку добавляют 14 об. свежего МТБЭ, перемешивают в течение 30 мин при около 15°C, а затем фильтруют. Промывку повторяют еще раз, и полученное желтовато-белое твердое вещество сушат при температуре около 35°C.

Пример 50. Получение SEQ ID №: 29

Гибридный жидкостно-твердофазный синтез SEQ ID №: 29 из четырех промежуточных фрагментов посредством химической конъюгации

SEQ ID №: 29 может быть получен путем сочетания SEQ ID №: 7, 42, 31 и 62 посредством HLSPS. SEQ ID №: 7 и 62 сочетают, чтобы получить SEQ ID №: 43. SEQ ID №: 42 и 31 сочетают, чтобы получить SEQ ID №: 44. SEQ ID №: 43 и SEQ ID №: 44 сочетают с образованием SEQ ID №: 29.

Вкратце, раствор SEQ ID №: 7 (1,00 ммоль) и раствор SEQ ID №: 62 (1,1 ммоль) в 10 об. ДМСО смешивают с использованием реагента PyBOP, DEPBT или EDC/HONB (1,30-2,00 ммоль) и ДИЭА (2 ммоль) при к.т. Смесь перемешивают при к.т. до тех пор, пока реакция не будет признана завершенной с помощью ВЭЖХ. Смесь гасят 20 об. 15-20%-ого раствора хлорида натрия, а затем добавляют еще 10 об. воды и перемешивают в течение 10 мин. Полученную суспензию фильтруют и твердое вещество промывают 3×10 об. воды. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением SEQ ID №: 43 в виде желтовато-белого твердого вещества.

Затем раствор SEQ ID №: 31 (1,00 ммоль) и раствор SEQ ID №: 42 (1,1 ммоль) в × об. ДМСО подвергают сочетанию с использованием реагента PyBOP, DEPBT или EDC/HONB (1,30-2,00 ммоль) и ДИЭА (2 ммоль) при к.т. Смесь перемешивают при к.т. до тех пор, пока реакция не будет признана завершенной с помощью ВЭЖХ. Смесь гасят 20 об. 15-20%-ого раствора хлорида натрия, а затем добавляют еще 10 об. воды и перемешивают в течение 10 мин. Полученную суспензию фильтруют и твердое вещество промывают 3×10 об. воды. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением SEQ ID №: 44 в виде желтовато-белого твердого вещества.

В заключение, раствор SEQ ID №: 43 (1,00 ммоль) и раствор SEQ ID №: 44 (1,0 ммоль) в 17 об. ТГФ подвергают сочетанию с использованием реагента DEPBT (1,30-2,00 ммоль) и ДИЭА (1 ммоль) при к.т. Смесь перемешивают при к.т. до тех пор, пока реакция не будет признана завершенной с помощью ВЭЖХ. Смесь гасят 20 об. воды. Полученную суспензию фильтруют и твердое вещество промывают 3×10 об. воды. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде белого твердого вещества. С полученного пептида снимают защиту смесью ТФК: TIPS:ДТТ: вода (92,5:2,5:2,5:2,5), используя 10 мл на г исходного материала. После перемешивания в течение 3 часов при комнатной температуре продукт осаждают 4 мл 20% гептана/МТБЭ на мл смеси, поддерживая температуру ниже 30°C. Полученную суспензию фильтруют и твердое вещество промывают 3×10 об. МТБЭ. Твердое вещество сушат в вакуумном сушильном шкафу (40°C) с получением продукта в виде желтовато-белого твердого вещества.

Пример 51. Альтернативный синтез SEQ ID №: 7

Таблица 30. В синтезе используют Fmoc-амидную смолу Зибера с загрузкой 0,80 ммоль/г. Используют общую методику SPPS со следующими модификациями:

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 4 ч, к.т.
2	Fmoc-L-Pro-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, Двойное сочетание: (1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охута) X 2 3+16 ч, к.т.
3	Fmoc-L-Pro-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, Двойное сочетание: (1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охута) X 2 3+16 ч, к.т.
4	Fmoc-L-Pro-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, Двойное сочетание: (1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охута) X 2 3+16 ч, к.т.
5	Fmoc-L-Ala-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, Двойное сочетание: (1,5 AA/1,65 DIC/1,5 Охута) X 2 3+16 ч, к.т.
6	Fmoc-Gly-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 4 ч, к.т.
7	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 4 ч, к.т.
8	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 6 ч, к.т.
9	Fmoc-L-Pro-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 6 ч, к.т.
10	Fmoc-Gly-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 10 ч, к.т.

Связанную со смолой SEQ ID №: 7 (54 г, -24,0 ммоль) обрабатывают 2×300 мл (каждый по 30 мин) 20% Pip/DMFA. 2) Промывают 6×300 мл DMFA, а затем 5×300 мл ДХМ. 3) Добавляют 500 мл ТФК/ДХМ (5/95, об./об.) и перемешивают в течение 2 ч. 4) Отфильтровывают смесь и промывают 500 мл ДХМ, чтобы получить общий объем фильтрата 1000 мл. 5) Концентрируют до ~250 мл. 6) Загружают 250 мл МТБЭ. 7) Повторяют стадии 5-6 5-6 раз. 8) Фильтруют и собирают влажный осадок и сушат в вакуумном сушильном шкафу при 33°C в течение ночи с получением SEQ ID №: 7 (18,3 г, выход 75%) в виде белого твердого вещества. Анализ выделенного твердого вещества с помощью УЭЖХ (94,4% по площади). ЖХ-МС ($[M+H]^+$): 1020,58.

Пример 52. Синтез SEQ ID №: 45 (Соединение 48)

Таблица 31. В синтезе используют смолу 2-СТС с загрузкой 0,80 ммоль/г. Используют общую методику SPPS со следующими модификациями:

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: DMFA
1	Fmoc-Gly-OH	3,0 AA/6,0 ДИЭА 4 ч, к.т.
2	Fmoc-L-Glu(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 6 ч, к.т.
3	Fmoc-L-Leu-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.

4	Fmoc-L-Leu-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
5	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
6	Fmoc-L-Glu(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
7	Fmoc-L-Ile-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 6 ч, к.т.
8	Fmoc-L-Phe-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
9	Fmoc-Ala-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
10	Fmoc-Aib-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 12 ч, к.т.
11	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 18 ч, к.т.

12	Fmoc-L-Ala-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 АА/3,3 ДІС/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
13	Fmoc-L-Lys(t-BuOOC-(CH ₂) ₁₈ -COO-γ-L-Glu-AEEA)	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 2,0 АА/4,0 ДІЭА/2,0 РубОР 16 ч, к.т.
14	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 АА/3,3 ДІС/ 3,0 Охума 8 ч, к.т.
15	Fmoc-L-Asp(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 АА/3,3 ДІС/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.

Мягкое отщепление SEQ ID №: 45:

1) Добавляют связанный со смолой SEQ ID №: 45 (4,0 г, ~1,34 ммоль) и загружают 40 мл смеси для отщепления ТФК/ДХМ (1/99, об./об./об.). 2) Перемешивают в течение 10 мин при к.т. 3) Фильтруют и собирают фильтрат. 4) Нейтрализуют фильтрат 0,44 мл пиридина (1/1, моль/моль). 5) Повторяют стадии 1-4 еще 3 раза. 6) Объединенный фильтрат концентрируют досуха. 7) Растворяют суспензию в 10 мл ДМСО. 8) Медленно добавляют раствор ДМСО в 100 мл холодной воды при перемешивании. 9) Фильтруют и собирают осадок. 10) Ресуспенсируют в 50 мл воды 2 раза. 11) Сушат в вакууме в течение ночи с получением SEQ ID №: 45 (2,5 г, выход 58%) в виде белого твердого вещества. Анализ выделенного твердого вещества с помощью УЭЖХ (95,0% по площади). ЖХ-МС ([M+2H]²⁺/2): 1604,97.

Пример 53. Альтернативный синтез SEQ ID №: 10

Таблица 32. В синтезе используют Fmoc-Leu-OH на смоле 2-СТС с загрузкой 0,80 ммоль/г. Используют общую методику SPPS со следующими модификациями:

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: DMF
1	Fmoc-L- α Me-Leu-OH	3,0 AA/6,0 ДИЭА 18 ч, к.т.
2	Fmoc-L-Ile-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 18 ч, к.т.
3	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
4	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
5	Fmoc-L-Asp(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
6	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
7	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
8	Fmoc-L-Phe-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
9	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
10	Fmoc-Gly-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 6 ч, к.т.
11	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
12	Fmoc-Aib-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 8 ч, к.т.
13	Woc-L-Tyr(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 16 ч, к.т.

Мягкое отщепление: 1) Добавляют связанную со смолой SEQ ID №: 10 (60 г, ~40 ммоль) и загружают 600 мл смеси для отщепления ТФК/ДХМ (1/99, об./об./об.). 2) Перемешивают в течение 10 мин при

к.т. 3) Фильтруют и собирают фильтрат. 4) Нейтрализуют фильтрат с помощью 6,6 мл пиридина (1/1, мол./мол.). 5) Повторяют стадии 1-4 еще 3 раза. 6) Объединенный фильтрат концентрируют досуха. 7) Растворяют суспензию в 60 мл ДМСО. 8) Медленно добавляют раствор ДМСО в 600 мл холодной воды при перемешивании. 9) Фильтруют и собирают осадок. 10) Ресуспенсируют в 300 мл воды 2 раза. 11) Сушат в вакууме в течение ночи с получением SEQ ID №: 10 (56,4 г, выход 125%) в виде влажного твердого вещества. Анализ выделенного твердого вещества с помощью УЭЖХ (93,1% по площади). ЖХ-МС $[(M+H)^+]$: 2341,52.

Пример 54. Синтез SEQ ID №: 46 (Соединение 49) с помощью LPPS:

В стеклянный сцинтилляционный флакон вместимостью 20 мл добавляют SEQ ID №: 7 (250 мг, 77,9 мкмоль), SEQ ID №: 45 (103 мг, 90,7 мкмоль) и ДМСО (5 мл). К этому раствору добавляют ДИЭА (81 мкл, 0,47 ммоль), а затем РуВОР (7-азабензотриазол-1-илокси)трипирролидинфосфония гексафторфосфат (100 мг, 192 мкмоль). Перемешивают реакционную смесь в течение 4 ч, затем медленно добавляют 35 мл холодной воды. Собирают осажденный продукт путем фильтрования, а затем промывают водой (2×35 мл). Влажный осадок высушивают под вакуумом с получением SEQ ID №: 46 (Соединение 49) в виде белого твердого вещества (199 мг, выход 61%). УЭЖХ: 46,2% по площади.

Пример 55. Синтез SEQ ID №: 47 (Соединение 50) с помощью LPPS

В стеклянный сцинтилляционный флакон вместимостью 20 мл добавляют SEQ ID №: 46 (500 мг, 120 мкмоль), а затем 2 мл MeCN (2 мл). Загружают Et₂NH (0,5 мл, 4,8 ммоль) и перемешивают в течение 4 ч. Концентрируют раствор досуха. Загружают 5 мл MeCN и снова концентрируют досуха. Повторяют добавление MeCN и высушивание еще 2-3 раза. Добавляют 1 мл MeCN для растворения суспензии, затем медленно добавляют реакционный раствор к 15 мл холодного МТБЭ при перемешивании. Фильтруют и собирают осадок, а затем повторно ресуспенсируют в 10 мл МТБЭ 2 раза. Влажный осадок высушивают в вакууме с получением SEQ ID №: 47 (Соединение 50) в виде белого твердого вещества (200 мг, выход 42%). УЭЖХ: 75,3% по площади. ЖХ-МС $[M+3H]^{3+}/3$: 1331,60.

Пример 56. Синтез SEQ ID №: 48 (Соединение 51) с помощью LPPS

В стеклянный сцинтилляционный флакон вместимостью 20 мл добавляют SEQ ID №: 10 (75 мг, 32,1 мкмоль), SEQ ID №: 47 (100 мг, 25,0 мкмоль), 1-гидрокси-7-азабензотриазол (НОAt; 5 мг, 36,8 мкмоль) и ДМСО (2 мл). Добавляют в этот раствор ДИЭА (30 мкл, 173 мкмоль), а затем РуАОР (33 мг, 63 мкмоль). Перемешивают реакционную смесь в течение 5 ч, затем медленно добавляют 15 мл холодной воды. Собирают осажденный продукт путем фильтрования, а затем промывают водой (3×10 мл). Влажный осадок высушивают под вакуумом с получением SEQ ID №: 48 (Соединение 51) в виде белого твердого вещества (120 мг, выход 76%). УЭЖХ: 53,6% по площади.

Пример 57. Синтез SEQ ID №: 6 путем полного снятия защиты

Загружают 1 мл раствора смеси для отщепления ТФК/Н₂О/TIPS/ДТТ (0,925/0,025/0,025/0,025, об./об./об./об.), затем к этой смеси добавляют образец SEQ ID №: 48 (76 мг, 12,0 мкмоль), чтобы получить раствор. Смесь перемешивают при температуре окружающей среды в течение около 3 ч. Реакционную смесь приливают к МТБЭ (10 мл) при -15°C, полученную суспензию перемешивают около 30 мин. Выполняют фильтрование через фильтр и промывают влажный осадок с помощью МТБЭ (2×10 мл). Влажный осадок сушат при 35°C под вакуумом, получая SEQ ID №: 6 (80 мг, 44,8% площади, выход неочищенного продукта 140%) в виде влажного твердого вещества. УЭЖХ: 44,8% по площади. ЖХ-МС $[M+3H]^{3+}/3$: 1183,20.

Пример 58. Альтернативный синтез SEQ ID №: 11

Таблица 33. В синтезе используют смолу Fmoc-Gly-CTC с загрузкой 0,835 ммоль/г. Используют общую методику SPPS со следующими модификациями:

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	Fmoc-L-Leu-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охута 4 ч, к.т.
2	Fmoc-L-Leu-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охута 4 ч, к.т.
3	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охута 4 ч, к.т.
4	Fmoc-L-Glu(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охута 4 ч, к.т.
5	Fmoc-L-Ile-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охута 4 ч, к.т.
6	Fmoc-L-Phe-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охута 4 ч, к.т.
7	Fmoc-Ala-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охута 4 ч, к.т.

Мягкое отщепление: 1) Добавляют связанную со смолой SEQ ID №: 11 (10,0 г, ~4,4 ммоль) и загружают 100 мл смеси для отщепления ТФК/ДХМ (1/99, об./об.). 2) Перемешивают в течение 10 мин при к.т. 3) Фильтруют и собирают фильтрат. 4) Нейтрализуют фильтрат с помощью 1,1 мл пиридина (1/1, мол./мол.). 5) Повторяют стадии 1-4 еще 3 раза. 6) Объединенный фильтрат концентрируют досуха. 7) Растворяют суспензию в 20 мл ДМСО. 8) Медленно добавляют раствор ДМСО в 100 мл холодной воды при перемешивании. 9) Фильтруют и собирают осадок. 10) Ресуспендируют в 100 мл воды 2 раза. 11) Сушат под вакуумом в течение ночи с получением SEQ ID №: 11 (4,01 г, выход 62%) в виде белого твердого вещества. Анализ выделенного твердого вещества с помощью УЭЖХ (97,6% по площади). ЖХ-МС [M+H]⁺: 1445,78.

Пример 59. Альтернативный синтез SEQ ID №: 18

Таблица 34. В синтезе используют Fmoc-амидную смолу Зибера с загрузкой 0,71 ммоль/г. Используют общую методику SPPS со следующими модификациями:

Цикл	Аминокислота	Реакция сочетания
1	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/охута/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 4 часов
2	Fmoc-L-Pro-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/охута/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 6 часов
3	Fmoc-L-Pro-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/охута/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 12 часов
4	Fmoc-L-Pro-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/охута/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 12 часов
5	Fmoc-L-Ala-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/охута/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 10 часов

6	Fmoc-Gly-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/оxума/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 4 часов
7	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/оxума/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 4 часов
8	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/оxума/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 6 часов
9	Fmoc-L-Pro-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/оxума/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 6 часов
10	Fmoc-Gly-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/оxума/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 10 часов
11	Fmoc-Gly-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/оxума/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 4 часов
12	Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/оxума/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 4 часов
13	Fmoc-L-Leu-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/оxума/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 6 часов

14	Fmoc-L-Leu-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/охута/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 6 часов
15	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/охута/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 4 часов
16	Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/охута/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 4 часов
17	Fmoc-L-Ile-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/охута/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 6 часов
18	Fmoc-L-Phe-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/охута/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 4 часов
19	Fmoc-L-Ala-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, DIC/охута/AA=3,3/3/3 Сочетание в течение 4 часов

Мягкое отщепление: 1) После последних 2x30 мин циклов снятия защиты Fmoc загружают связанный со смолой SEQ ID №: 18 (8,2 г, ~ 3,1 ммоль) в 40 мл смеси для отщепления ТФК/НФИР/ДХМ (1/25/74, об./об./об.) и перемешивают в течение 5 мин при 25°C. 2) Фильтруют, собирают фильтрат и нейтрализуют фильтрат 0,44 мл пиридина (1/1, мол./мол.). 3) Повторяют процесс отщепления еще 2 раза. 4) Объединенный фильтрат концентрируют досуха. 5) Растворяют суспензию в 10 мл ДМСО и медленно добавляют раствор ДМСО к 200 мл МТБЭ при перемешивании. 6) Фильтруют и собирают осадок. 7) Ресуспендируют еще 2 раза с помощью 40 мл МТБЭ и отфильтровывают осадок. 8) Неочищенный материал сушат под вакуумом в течение ночи, чтобы получить 2,76 г неочищенного продукта (выход 41,4%) с чистотой 92,5% по данным ВЭЖХ. ЖХ-МС [M+2H]²⁺/2: 1113,90.

Пример 60. Альтернативный синтез SEQ ID №: 20

Таблица 35. В синтезе используют смолу 2-СТС с загрузкой 0,80 ммоль/г. Используют общую методику SPPS со следующими модификациями:

Цикл	Аминокислота	Условия SPPS Растворитель для реакций сочетания: ДМФА
1	Fmoc-Aib-OH	3,0 AA/6,0 ДИЭА 4 ч, к.т. Кэпирование выполнено с использованием 10 об. MeOH/ДИЭА/ДМФА, 5/15/80, об./об./об. при к.т.
2	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 18 ч, к.т.
3	Fmoc-Ala-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума 4 ч, к.т.
4	Fmoc-L-Lys(t-BuOOC-(CH ₂) ₁₈ -COO-γ-L-Glu-AEEA)	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, PyBOP/ДИЭА/AA=2/4/2 Сочетание в течение > 16 часов
5	Fmoc-Lys(Boc)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума Сочетание в течение > 8 часов
6	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума Сочетание в течение > 4 часов
7	Fmoc-Leu-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума Сочетание в течение > 4 часов

8	Fmoc-L- α Me-Leu-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума >12 ч, к.т.
9	Fmoc-L-Ile-OH	3 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума >18 ч, к.т.
10	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума >4 ч, к.т.
11	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума >4 ч, к.т.
12	Fmoc-L-Asp(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума >4 ч, к.т.
13	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума >4 ч, к.т.
14	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума >4 ч, к.т.
15	Fmoc-L-Phe-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охума >4 ч, к.т.

16	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 АА/3,3 DIC/ 3,0 Охута >4 ч, к.т.
17	Fmoc-Gly-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 АА/3,3 DIC/ 3,0 Охута >4 ч, к.т.
18	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 АА/3,3 DIC/ 3,0 Охута >4 ч, к.т.
19	Fmoc-Aib-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 АА/3,3 DIC/ 3,0 Охута >8 ч, к.т.
20	Woc-L-Tyr(tBu)-OH	2 x 30 мин цикла снятия защиты Fmoc, 6 x 2 мин промывок после снятия защиты, 3,0 АА/3,3 DIC/ 3,0 Охута >16 ч, к.т.

Мягкое отщепление: 1) Добавляют связанный со смолой SEQ ID №: 20 (5,7 г, ~10 ммоль) и загружают 60 мл смеси для отщепления ТФК/ДХМ (1/99, об./об./об.). 2) Перемешивают в течение 10 мин при к.т. 3) Фильтруют и собирают фильтрат. 4) Нейтрализуют фильтрат с помощью 6,6 мл пиридина (1/1, мол./мол.). 5) Повторяют стадии 1-4 еще 3 раза. 6) Объединенный фильтрат концентрируют досуха. 7) Растворяют суспензию в 30 мл ДМСО. 8) Медленно добавляют раствор ДМСО в 300 мл холодной воды при перемешивании. 9) Фильтруют и собирают осадок. 10) Ресуспендируют в 200 мл воды 2 раза. 11) Сушат под вакуумом в течение ночи с получением SEQ ID №: 20 (4,5 г, выход 63,4%) в виде белого твердого вещества. Анализ выделенного твердого вещества с помощью УЭЖХ (99,4% по площади). ЖХ-МС $[M+2H]^{2+}/2$: 2053,39.

Пример 61. Синтез SEQ ID №: 49 (Соединение 52) с помощью LPPS

В стеклянный сцинтилляционный флакон вместимостью 20 мл загружают SEQ ID №: 11 (1,0 экв., 145 мг), SEQ ID №: 7 (1,1 экв., 125 мг) и ДМСО/MeCN (5 мл, 4/1, об./об.), чтобы растворить все вещества. К реакционной смеси добавляют ДИЭА (3,0 экв., 0,055 мл), а затем PyOxim (1,5 экв., 80 мг). Реакционную смесь перемешивают в течение 4 ч, затем медленно при перемешивании добавляют 40 мл воды. Собирают осажденный продукт путем фильтрования, а затем промывают водой (2 × 40 мл). Влажный осадок сушат под вакуумом, чтобы получить неочищенное твердое вещество SEQ ID №: 49 в виде белого твердого вещества (180 мг, выход 73,2%) с чистотой 89,5% по данным ВЭЖХ. ЖХ-МС $[M+2H]^{2+}/2$: 1225,2.

Пример 62. Синтез SEQ ID №: 18 с помощью LPPS:

В стеклянный сцинтилляционный флакон вместимостью 20 мл добавляют SEQ ID №: 49 (700 мг), а затем 8 мл ДМСО (2 мл). Загружают Et₂NH (2,0 мл) и перемешивают в течение 4 ч. Концентрируют раствор досуха. Загружают 60 мл холодного МТБЭ при перемешивании. Фильтруют и собирают осадок, а затем повторно ресуспендируют в 60 мл МТБЭ 2 раза. Влажный осадок высушивают под вакуумом с получением SEQ ID №: 18 в виде белого твердого вещества (520 мг, выход 82%) с чистотой 82,3% по данным ВЭЖХ. ЖХ-МС $[M+2H]^{2+}/2$: 1113,8.

Пример 63. Синтез SEQ ID №: 48 с помощью LPPS:

В стеклянный сцинтилляционный флакон вместимостью 20 мл добавляют SEQ ID №: 20 (1,0 экв., 84 мг), SEQ ID №: 18 (1,1 экв., 50 мг), 1-гидрокси-7-азабензотриазол (HOAt; 1,0 экв., 3 мг) и ДМСО (2 мл) для растворения всех веществ. К этому раствору добавляют ДИЭА (6 экв., 21 мкл), а затем PyAOP (2,5 экв., 22 мг) и перемешивают в течение 6 ч. Добавляют дополнительное количество PyAOP (1,0 экв., 9 мг) и ДИЭА (2,5 экв., 9 мкл) и перемешивают в течение 12 ч. Добавляют дополнительное количество PyAOP (1,0 экв., 9 мг) и ДИЭА (2,5 экв., 9 мкл) и перемешивают в течение 6 ч. Медленно выливают реакционный раствор в холодную воду при перемешивании. Собирают осажденный продукт путем фильтрования, а затем промывают водой 3 раза (3×10 мл). Продукт сушат под вакуумом с получением белого

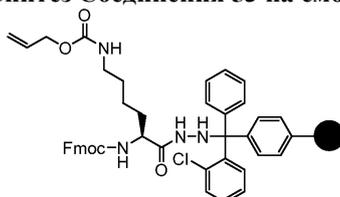
твердого вещества SEQ ID №: 48 (90 мг, выход 69,8%). УЭЖХ: 81,9% по площади.

Пример 64. Полное снятие защиты с SEQ ID №: 48 для получения SEQ ID №: 6

Полное снятие защиты проводят с использованием следующей методики: 1) Загружают 4 мл смеси для отщепления ТФК/Н₂О/TIPS/ДТГ (0,925/0,025/0,025/0,025) в R1, а затем добавляют SEQ ID №: 48 (180 мг). 2) Перемешивают смесь в течение 3 ч при 20-30°C. 3) Выливают раствор в охлажденный МТБЭ (30 мл). Перемешивают суспензию в течение 0,5 ч. 4) Осуществляют фильтрацию через фильтр с последующей двукратной промывкой МТБЭ (30 мл). 5) Влажный осадок сушат при пониженном давлении до постоянной массы. 6) Получают 180 мг высушенного неочищенного продукта с чистотой 66,3% по данным ВЭЖХ.

Пример 65. Нативное химическое лигирование

Синтез Соединения 53 на смоле



Фмос-гидразин-2-хлортритиловую смолу (30,06 г, 25,5 ммоль) подвергают набуханию в 300 мл ДХМ в течение 15 мин. Ее подвергают набуханию в 2×400 мл ДМФА по 15 мин каждый цикл. Снятие защиты Фмос проводят с помощью 3×400 мл 20%-ого пиперидина/ДМФА по 30 мин каждый цикл. Затем смолу промывают 5×400 мл ДМФА. Фмос-L-Lys(alloс)-ОН (34,63 г, 76,5 ммоль, 3,0 экв.) и НВТУ (29,17 г, 76,9 ммоль, 3,02 экв.) растворяют в 400 мл ДМФА. К раствору аминокислоты добавляют N,N-диизопропилэтиламин (27 мл, 155 ммоль, 6,08 экв.). Затем раствор добавляют к препарату смолы ХХ и оставляют перемешиваться в течение 6 ч. Смолу промывают 5 ×400 мл ДМФА затем 5×300 мл ДХМ и смолу сушат при 35°C в вакуумном сушильном шкафу в течение около 16 ч. Загрузка смолы, определенная с помощью количественного ЯМР, составляет 0,52 ммоль/г.

Пример 66. Синтез гидразида пептида SEQ ID №: 50 (Соединение 54)

Около 12,19 г Соединения 53 на смоле (5,4 ммоль, величина загрузки: 0,44 ммоль/г) подвергают набуханию с помощью 3×120 мл ДМФА по 15 мин каждый цикл. Гидразид пептида (SEQ ID №: 50) синтезируют с использованием стандартного SPPS, как описано ранее.

Снятие защиты: 4×100 мл 20% об./об. пиперидина в ДМФА каждый цикл по 20 мин. Реакции сочетания: для сочетания аминокислот используют 3 экв. аминокислоты, 3 экв. ОХУМА и 3,3 экв. DIC.

В процессе SPPS смолу промывают 5×120 мл ДМФА с 5 мин перемешиванием с использованием N₂ после каждой реакции сочетания и заключительного повтора снятия защиты.

По окончании синтеза гидразида пептида смолу промывают ДХМ при перемешивании с помощью N₂. Смолу сушат на пептидном синтезаторе.

Снятие защиты Алос и сочетание боковой цепи

Смолу промывают 5×120 мл ДХМ при 5-минутном перемешивании. Готовят раствор тетракиспалладия (500 мг, 0,43 ммоль, 0,1 экв.) и фенилсилана (0,7 мл, 5,7 ммоль, 1,02 экв.) в 75 мл ДХМ. Его добавляют к смоле и перемешивают в течение 20 мин. Его промывают 5×120 мл ДХМ и перемешивают по 5 мин каждый цикл. Снятие защиты алос с помощью Pd(PPh₃)₄ и PhSiH₃ повторяют дважды.

Смолу промывают 5 × 120 мл ДМФА и перемешивают по 5 мин каждый цикл. TNTU (3,95 г, 10,82 ммоль, 2 экв.) растворяют в растворе (S)-13-(трет-бутоксикарбонил)-36,36-диметил-10,15,34-триоксо-3,6,35-триокса-9,14-диазагептатриаконтановой кислоты (Соединение 25, 27 мл, 0,29 г/мл, 7,873 г, 10,8 ммоль, 2 экв.) в ДМФА и этот раствор доводят до 75 мл с помощью ДМФА. К раствору Соединения 25 добавляют 3,8 мл N,N-диизопропилэтиламина (3,8 мл, 21,82 ммоль, 4,0 ммоль) и перемешивают в течение 10 мин. Затем его добавляют к смоле и перемешивают в течение 14 ч. Затем смолу промывают 5×120 мл ДМФА (перемешивание в течение 5 мин) и 5×120 мл ДХМ (перемешивание в течение 5 мин). Смолу сушат в вакуумном сушильном шкафу в течение около 16 ч при 35°C.

Полное снятие защиты и отщепление

К высушенной смоле (22,2 г) добавляют 250 мл смеси для отщепления, приготовленной из 2,5% мас./об. дитиотреитола (ДТТ), 2,5% об./об. воды, 2,5% об./об. триизопропилсилана (TIPS) и 92,5% трифторуксусной кислоты (ТФК) в трехгорлой круглодонной колбе вместимостью 500 мл, и перемешивают в течение около 2,5 ч. Смолу фильтруют и промывают 2×7,5 мл ТФК. Фильтрат выливают в 1,40 л холодного МТБЭ и пептид сразу же выпадает в осадок. Колбу для фильтрования промывают 2×5 мл ТФК и выливают в холодный МТБЭ. Его охлаждают до -20°C в течение получаса, а затем центрифугируют. Затем осадок пептида дважды промывают 300 мл МТБЭ и центрифугируют. Осадок пептида сушат в вакуумном сушильном шкафу при 27°C в течение около 16 ч. После сушки получают около 9,9 г неочищенного SEQ ID №: 50.

Пример 67. Синтез сложного тиоэфира SEQ ID №: 51 (Соединение 55)

Неочищенный гидразид пептида (SEQ ID №: 50, 3,65 г, 1,41 ммоль) растворяют в 250 мл буфера для лигирования (6 М гидрохлорида гуанидина и 0,1 М одноосновного гидрофосфата натрия, pH около 7,0). pH доводят до около 3,3 с помощью 5 н. раствора HCl и раствор охлаждают до -15°C на бане со льдом и ацетоном. К раствору гидразида пептида добавляют 2,5 мл 4,31 М раствора нитрита натрия (742,7 мг, 10,8 ммоль, 7,6 экв.) и оставляют перемешиваться в течение 15 мин при -15°C. Тем временем 4-меркаптофенол (1,052 г, 8,34 ммоль) суспендируют в 3 мл буфера для лигирования, pH доводят до около 7,0 с помощью 5 н. раствора NaOH и доводят до 10 мл с помощью буфера для лигирования (6 М гидрохлорида гуанидина и 0,1 М одноосновного гидрофосфата натрия, pH около 7,0). Через 15 мин к раствору гидразида пептида добавляют 7,5 мл 4-меркаптофенола, чтобы вызвать тиолиз *in situ* пептидилазида, полученного из SEQ ID №: 50.

pH реакционной смеси доводят до около 6,5 с помощью 5 н. раствора гидроксида натрия. Тиолиз пептидилазида проводят в течение 15 мин, а неочищенную смесь сложных тиоэфиров очищают ОФ-ВЭЖХ на колонке Phenomenex Luna C18, 10 мкм (30 мм×250 мм) при температуре окружающей среды с линейным градиентом 30-55% ацетонитрила в воде в течение 25 мин после 10% ацетонитрила в воде в течение первых 3 мин и 10-30% ацетонитрила в воде от 3 до 5 мин при постоянном содержании 5% ацетата аммония в течение всего периода очистки. Это дает около 0,415 г тиоэфира пептида (SEQ ID №: 51) [Ожидаемая (масса+2H⁺)/2=1342,7052, наблюдаемая (масса+2H⁺)/2=1342,6958].

Пример 68. Нативное химическое лигирование для синтеза SEQ ID №: 53

Водный раствор 6 М гидрохлорида гуанидина и 0,1 М одноосновного гидрофосфата натрия (pH 7,0) представляет собой буфер для лигирования, используемый при нативном химическом лигировании. Буфер дегазируют газообразным азотом в течение 15 мин. В 3-горлую круглодонную колбу помещают 4-меркаптофенол (193 мг, 1,5 ммоль, 10 экв.), трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР, 656,6 мг, 2,3 ммоль, 15,3 экв.) и аскорбиновую кислоту (269 мг, 1,5 ммоль, 10 экв.). Колба находится под газообразным азотом. Добавляют 41 мл буфера для лигирования для растворения реагентов в круглодонной колбе. pH раствора доводят до около 7,0 с помощью 5 н. раствора NaOH. К указанному выше раствору добавляют тиоэфир пептида SEQ ID №: 51 (406,8 мг, 0,15 ммоль) и фрагмент SEQ ID № 52 с N-концевым цистеином (Соединение 56) (326,5 мг, 0,15 ммоль, 1 экв.). pH доводят до около 7,0 с помощью раствора 5 н. NaOH. Реакционной смеси дают перемешиваться в течение около 10 ч в атмосфере азота. Большая часть сложного тиоэфира SEQ ID №: 51 израсходована, поэтому реакционную смесь хранят в морозильной камере при температуре -20 °C в течение около 14 ч. SEQ ID №: 53 очищают с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Phenomenex Luna C18, 10 мкм (30 мм×250 мм) при температуре окружающей среды с линейным градиентом 30-50% ацетонитрила в воде в течение 25 мин после 20% ацетонитрила в воде в течение первых 3 мин и 20-30% ацетонитрила в воде от 3 до 5 мин при постоянном содержании 5% ацетата аммония в течение всего периода очистки. Это дает около 0,52 г цистеинового аналога SEQ ID №: 53 [ожидаемая (масса+3H⁺)/3=1587,8219, наблюдаемая (масса+3H⁺)/3=1587,8198].

Фотодесульфирование: готовят свежий водный буфер из 3 М гидрохлорида гуанидина и 0,1 М одноосновного гидрофосфата натрия (pH около 7,0). В этом буфере готовят 0,5 мл 7,64 мМ раствора трис(2,2'-бипиридил)дихлоррутения(II) гексагидрата (2,86 мг, 0,004 ммоль). Трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР, 64,3 мг, 0,22 ммоль) суспендируют в буфере и доводят pH до около 7,0 с помощью 5 н. раствора NaOH. Его разбавляют буфером до 2 мл. SEQ ID №: 53 (10 мг, 0,0021 ммоль) растворяют в 4 мл буфера в скintillationном флаконе вместимостью 7 мл. Тринатриевую соль трифенилфосфин-3,3',3''-трисульфоновой кислоты (TPPPTS, 231,2 мг, 0,41 ммоль, 194 экв.) и натриевую соль 2-меркаптоэтансульфоновой кислоты (MESNa, 32,6 мг, 0,20 ммоль, 95 экв.) добавляют к раствору SEQ ID №: 6. К реакционной смеси добавляют 28 мкл гексагидрата трис(2,2'-бипиридил)дихлоррутения (II) (0,0021 ммоль, 0,1 экв.) и 20 мкл раствора ТСЕР (0,0022 моль, 1,0 экв.). Флакон помещают в фотореактор Perm Optical Coatings ml и перемешивают при 459 об/мин с интенсивностью СИД 91%. Вентилятор работает со скоростью 3564 об/мин, чтобы предотвратить нагрев реакционной смеси. Через около 3,5 ч дополнительно добавляют ТСЕР (0,40 мг, 0,7 экв.) и реакционную смесь перемешивают в фотореакторе в течение 16 ч. Через 16 ч реакция завершается, и более 95% SEQ ID №: 53 превращается в SEQ ID №: 6.

Десульфирование в отсутствие металлов: водный раствор 6 М гидрохлорида гуанидина и 0,1 М одноосновного гидрофосфата натрия (pH 7,0) является буфером, используемым для этой реакции. Буфер тщательно продувают газообразным азотом в течение более часа. SEQ ID №: 53 (40,3 мг, 0,0085 ммоль), 2,2'-азобис[2-(2-имидазолин-2-ил)пропан]дигидрохлорид (27,7 мг, 0,0857 ммоль, 10,1 экв.), восстановленный L-глутатион (L-GSH, 25,9 мг, 0,0843 ммоль, 10 экв.) и трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР, 36,5 мг, 0,1273 ммоль, 15,0 экв.) растворяют в 4 мл буфера. Реакционную смесь снова дегазируют газообразным азотом в течение около 2 мин и доводят pH до около 7,0 с помощью 5 н. NaOH. Раствор перемешивают в атмосфере азота при 45°C в течение 12 ч, а затем при комнатной температуре в течение 8 ч. Через 20 ч большая часть SEQ ID №: 53 преобразуется в SEQ ID №: 6. [Ожидаемая (масса+3H⁺)/3=1604,5153, наблюдаемая (масса+3H⁺)/3=1577,1581].

Пример 69. Синтез SEQ ID №: 53 (Соединение 57) путем нативного химического лигирования (NCL) с использованием SEQ ID №: 52 и 54 и с использованием цистеинилпропилового эфира (CPE)

Буферный раствор с концентрацией 3М: гидрохлорид гуанидина (2,86 г, 30,0 ммоль), дигидрофосфат натрия (0,24 г, 2,0 ммоль) и гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина [ТСЕР] (0,0166 г, 0,0579 ммоль) взвешивают в центрифужной пробирке вместимостью 15 мл, растворяют в деионизированной воде и доводят примерно до 9,5 мл. pH буферного раствора доводят до ~8,3 путем добавления 5 н. NaOH по мере необходимости. Если pH превышен, его доводят до ~8,3 добавлением 1 н. HCl.

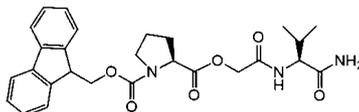
Общая методика лигирования:

1 мл буферного раствора добавляют в сцинтилляционный флакон вместимостью 5 мл, содержащий предварительно взвешенные SEQ ID №: 54 [аналог CPE-пептида] (0,01 г, 0,003 ммоль, 94,69 мас.%) и SEQ ID №: 52 [Cys-пептид] (0,0073 г, 0,0032 ммоль, 96,9%). Фрагменты пептидов полностью растворяются в буферном растворе с концентрацией 3М при обработке ультразвуком. Регистрируют pH раствора и снова регулируют добавлением 5 н. NaOH до pH ~8,30. Если значение pH превышает допустимое, его доводят до pH ~8,3 добавлением 1 н. HCl. Затем раствор переносят во флакон для ВЭЖХ и образец контролируют в различные моменты времени с помощью ELTIVO при 37°C (внутренняя температура 32°C). Полное превращение в аналог SEQ ID №: 53 (до 69% по Q-ToF) обычно наблюдается через 18 ч.

Буферный раствор с концентрацией 5 М: гидрохлорид гуанидина (4,78 г, 50,0 ммоль), дигидрофосфат натрия (0,24 г, 2,0 ммоль) и гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина [ТСЕР] (0,0166 г, 0,0579 ммоль) взвешивают в центрифужной пробирке вместимостью 15 мл, растворяют в деионизированной воде и доводят примерно до 9,5 мл. pH буферного раствора доводят до ~8,3 путем добавления 5 н. NaOH по мере необходимости. Если pH превышен, его доводят до ~8,3 добавлением 1 н. HCl. Общая методика лигирования:

3 мл буферного раствора добавляют в сцинтилляционный флакон вместимостью 5 мл, содержащий предварительно взвешенные SEQ ID №: 54 [аналог CPE-пептида] (0,01 г, 0,003 ммоль, 94,69 мас.%) и SEQ ID №: 52 [Cys-пептид] (0,0073 г, 0,0032 ммоль, 96,9 мас.%). Фрагменты пептидов полностью растворяются в буферном растворе с концентрацией 5 М при обработке ультразвуком. Регистрируют pH раствора и снова регулируют добавлением 5 н. NaOH до pH ~8,30. Если значение pH превышает допустимое, его доводят до pH ~8,3 добавлением 1 н. HCl. Затем к реакционному раствору добавляют тиол [такой как MeSNa, тиофенол, гидрокситиофенол] (5 экв.). Снова регистрируют pH и дополнительно доводят до pH ~8,3 с помощью 1 н. NaOH или 1 н. HCl по мере необходимости. Затем раствор переносят во флакон для ВЭЖХ и образец контролируют в различные моменты времени с помощью ВЭЖХ при 37°C (внутренняя температура 32°C). Полное превращение в SEQ ID №: 53 обычно наблюдается приблизительно через 17 ч (по данным ВЭЖХ).

Пример 70. Синтез Fmoc-L-Про-гликолевая кислота-L-Val-OH (Соединение 58)



Химическая формула: C₂₇H₃₁N₃O₆
Точная масса: 493,22
Молекулярная масса: 493,56

Стадия 1 (сочетание Fmoc-L-Val-OH):

Перед первым сочетанием в реакционный сосуд загружают амидную смолу Ринка с Fmoc AM (0,74 г/ммоль, 1,35 г, 1,00 ммоль). Смолу подвергают набуханию с помощью 3×10 мл ДМФА по 15 мин каждый цикл, затем снимают защиту с помощью 3×10 мл 20% пиперидин/ДМФА (об./об.) по 30 мин каждый цикл и промывают 5×10 мл ДМФА по 1 мин каждый цикл. Готовят раствор из (2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метилбутановой кислоты (1,018 г, 3,00 ммоль) и гидрата 1-гидроксибензотриазола (0,74 г, 3,30 ммоль, 60 мас.%) в 10 мл ДМФА. К этому раствору добавляют N,N'-диизопропилкарбодиимид (0,52 мл, 3,30 ммоль) и соответствующий раствор добавляют в реакционный сосуд, содержащий набухшую смолу. Реакционную смесь перемешивают в течение 1 ч при температуре окружающей среды, затем жидкость сливают. Смолу промывают с помощью 5 × 10 мл ДМФА по 1 мин каждый цикл, а затем переходят к стадии 2.

Стадия 2 (сочетание с гликолевой кислотой):

Группу Fmoc удаляют путем обработки смолы со стадии 1 с помощью 3×10 мл 20% пиперидина/ДМФА (об./об.) по 30 мин каждый цикл и промывают 5×10 мл ДМФА по 1 мин каждый цикл. Готовят раствор гликолевой кислоты (228 мг, 3,00 ммоль) и гидрата 1-гидроксибензотриазола (353 мг, 2,31 ммоль) в 10 мл ДМФА. К этому раствору добавляют N,N'-диизопропилкарбодиимид (0,52 мл, 3,30 ммоль) и соответствующий раствор добавляют в каждый реактор. Реакционную смесь перемешивают в течение 5 ч при температуре окружающей среды, затем жидкость сливают. Смолу промывают с помощью 5×10 мл ДМФА в течение 1 мин, а затем переходят к стадии 3.

Стадия 3 (сочетание Fmoc-L-Pro-OH):

Готовят раствор (2R)-1-(9H-флуорен-9-илметоксикарбонил)пирролидин-2-карбоновой кислоты (1,012 г, 3,00 ммоль), (2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфата (НВТУ) (1,25 г, 3,30 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламина (0,87 мл, 5,00 ммоль) в 10 мл ДМФА. Раствор встряхивают в течение нескольких минут, затем переносят в реакционный сосуд, содержащий смолу. Реакционную смесь перемешивают в течение 16 ч при температуре окружающей среды, затем жидкость сливают. Смолу промывают 5×10 мл ДМФА в течение 1 мин и 5×10 мл дихлорметана в течение 2 мин, затем сушат до постоянной массы, получая 1,719 г целевого соединения на смоле.

Образец пептида массой 50 мг отщепляют от смолы с помощью 2,0 мл раствора, состоящего из 92,5% ТФК, 2,5% триизопропилсилана, 2,5% воды и 2,5% дитиотреитола (об./об./об./мас.). Смесь перемешивают в барабанном смесителе в течение 1,5 ч, разбавляют 16 мл смеси ДМСО/ацетонитрил 80:20 (об./об.) и фильтруют для удаления смолы. Фильтрат анализируют с помощью ЖХ/МС, и показано, что он содержит 75,5% по площади желаемого трипептида и 16,8% продукта, содержащего различные количества гликолевой кислоты.

Пример 71. Альтернативный синтез Fmoc-L-Pro-гликолевая кислота-L-Val-OH

Стадия 1 (сочетание Fmoc-L-Val-OH):

Перед первым сочетанием в реактор загружают амидную смолу Ринка АМ (0,74 г/ммоль, 1,35 г, 1,00 ммоль). Смолу подвергают набуханию с помощью 3×10 мл ДМФА по 20 мин каждый цикл, затем снимают защиту с помощью 3×10 мл 20% пиперидина/ДМФА (об./об.) по 30 мин каждый цикл и промывают 5×10 мл ДМФА по 1 мин каждый цикл. Готовят раствор (2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метилбутановой кислоты (1,018 г, 3,00 ммоль) и гидрата 1-гидроксибензотриазола (353 мг, 2,31 ммоль) в 10 мл ДМФА. К этому раствору добавляют N,N'-диизопропилкарбодимид (517 мкл, 3,30 ммоль) и соответствующий раствор добавляют в реакционный сосуд, содержащий набухшую смолу. Реакционную смесь перемешивают в течение 4 ч при температуре окружающей среды и затем сливают. Смолу промывают 5×10 мл ДМФА по 1 мин каждый цикл и переходят на следующую стадию.

Стадия 2 (сочетание Fmoc-гликолевой кислоты):

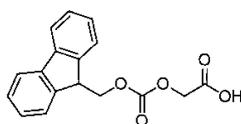
Группу Fmoc удаляют путем обработки с помощью 3×10 мл 20% пиперидина/ДМФА (об./об.) по 30 минут каждый цикл и промывают 5×10 мл ДМФА по 1 мин каждый цикл. Готовят раствор 2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбонил)оксиуксусной кислоты (894,9 мг, 3,00 ммоль) и гидрата 1-гидроксибензотриазола (353 мг, 2,31 ммоль) в 10 мл ДМФА. К этому раствору добавляют N,N'-диизопропилкарбодимид (517 мкл, 3,30 ммоль) и соответствующий раствор добавляют в реактор, содержащий смолу. Реакционную смесь перемешивают в течение 16 ч при температуре окружающей среды и сливают жидкость. Смолу промывают 5×10 мл ДМФА по 1 мин каждый цикл, а затем переходят на следующую стадию.

Стадия 3 (сочетание Fmoc-L-Pro-OH):

Группу Fmoc удаляют путем обработки с помощью 3×10 мл 20% пиперидина/ДМФА (об./об.) по 30 мин каждый цикл и промывают 5×10 мл ДМФА по 1 мин каждый цикл. Готовят раствор (2S)-1-(9H-флуорен-9-илметоксикарбонил)пирролидин-2-карбоновой кислоты (1,012 г, 3,00 ммоль), (2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфата (НВТУ) (1,25 г, 3,30 ммоль) и N,N-диизопропилэтиламина (870 мкл, 5,00 ммоль) в 10 мл ДМФА. Соответствующий раствор добавляют в реактор, содержащий смолу. Реакционную смесь перемешивают в течение 8 ч при температуре окружающей среды и затем сливают. Смолу промывают 5×10 мл ДМФА по 1 мин каждый цикл и 5×10 мл дихлорметана в течение 1 мин, затем сушат до постоянной массы, получая 1,622 г целевого соединения на смоле.

Образец пептида массой 50 мг отщепляют от смолы с помощью 2,0 мл раствора, состоящего из 92,5% ТФК, 2,5% триизопропилсилана, 2,5% воды и 2,5% дитиотреитола (об./об./об./мас.). Смесь перемешивают в барабанном смесителе в течение 1,5 ч, разбавляют 16 мл смеси ДМСО/ацетонитрил 80:20 (об./об.) и фильтруют для удаления смолы. Фильтрат анализируют с помощью ЖХ/МС и показано, что он содержит 84,93% по площади желаемого трипептида без обнаруживаемых множественных примесей гликолевой кислоты.

Пример 72. Синтез 2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбонил)оксиуксусной кислоты (Fmoc-гликолевой кислоты) (Соединение 59)



Химическая формула: C₁₇H₁₄O₅
Точная масса: 298,08
Молекулярная масса: 298,29

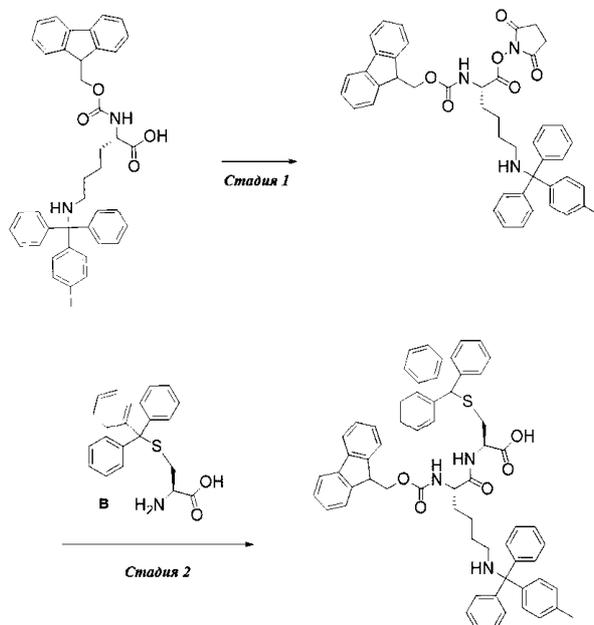
Стадия 1 (трет-бутил-2-(9Н-флуорен-9-илметоксикарбонилокси)ацетат):

К перемешиваемому на магнитной мешалке раствору трет-бутил-2-гидроксиацетата (10,00 г, 71,90 ммоль, 95 мас.%) в 120 мл дихлорметана в круглодонной колбе вместимостью 500 мл добавляют пиридин (60 мл, 742,0 ммоль) одной порцией. Полученный раствор охлаждают до 0-5°C на бане со льдом. К этому раствору по каплям через капельную воронку в течение 30 мин добавляют раствор 9-флуоренилметилхлорформиата (20,00 г, 77,30 ммоль) в 60 мл дихлорметана. К моменту завершения добавления в реакционной смеси образовался осадок. Ледяную баню убирают и реакционную смесь перемешивают в течение 18 ч при температуре окружающей среды. В течение дополнительного периода перемешивания образовалось больше осадка. Реакционную смесь концентрируют при пониженном давлении до твердого маслянистого остатка для удаления большей части пиридина и дихлорметана, а затем повторно растворяют в 200 мл дихлорметана. Раствор промывают 2×100 мл 1 М водного раствора гидросульфата натрия, а затем 2×100 мл насыщенного водного раствора хлорида натрия. Органический слой сушат над сульфатом магния и концентрируют до 27,13 г желтого масла, которое постепенно затвердевает. Неочищенный продукт используется без очистки на следующей стадии.

Стадия 2: (2-(9Н-флуорен-9-илметоксикарбонилокси)уксусная кислота)

Трет-бутил-2-(9Н-флуорен-9-илметоксикарбонилокси)ацетат (26,0 г, 73,40 ммоль) со стадии 1 растворяют в дихлорметане (200 мл). К раствору, перемешиваемому на магнитной мешалке, добавляют трифторуксусную кислоту (52 мл), а затем триизопропилсилан (13 мл). Полученный раствор перемешивают в течение 3 ч при температуре окружающей среды. Раствор концентрируют при пониженном давлении для удаления дихлорметана и почти всей трифторуксусной кислоты. Полученный вязкий остаток постепенно обрабатывают 1000 мл 5%-ого водного раствора гидрокарбоната натрия для предотвращения пенообразования и водный раствор промывают 3×500 мл метил-трет-бутилового эфира для удаления остаточного триизопропилсилана. Водный раствор охлаждают до 0-5°C и добавляют 300 мл этилацетата. Двухфазную смесь подкисляют до ~ pH 2 с помощью 40% водн. раствора фосфорной кислоты, для чего требуется около 75 мл кислоты. После разделения слоев органический слой сушат над сульфатом магния и концентрируют при пониженном давлении до получения вязкого бледно-желтого масла. Масло охлаждают до -20°C в морозильной камере, в результате чего материал полностью затвердевает до состояния белого твердого вещества. Твердое вещество очищают растворением в 75 мл холодного гептана, и после обработки ультразвуком образуется однородная белая суспензия. Твердое вещество отфильтровывают, промывают гептаном и сушат в вакуумной печи в течение ночи при 33°C, чтобы получить 15,21 г (выход 69,5% за две стадии) белого твердого вещества. ЯМР (CDCl₃) подтвердил выделение желаемого продукта.

Пример 73. Синтез Fmoc-Lys(Mtt)-Cys(Trt)-OH (Соединение 60)



Стадия 1.

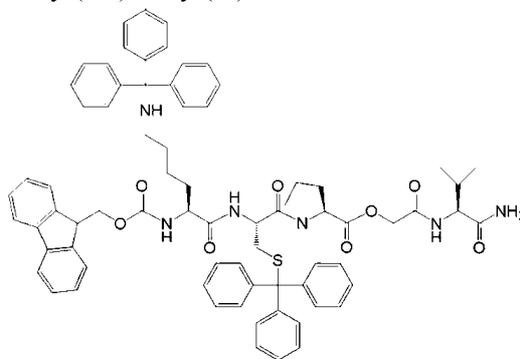
(2S)-6-[[Дифенил(п-толил)метил]амино]-2-(9Н-флуорен-9-илметоксикарбониламино)гексановую кислоту (А, 15 г, 24,01 ммоль), N,N'-дисукцинимидилкарбонат (7,45 г, 29,0 ммоль, 99,6 мас.%), 4-диметиламинопиридин [ДМАП] (0,3 г, 2 ммоль, 99 мас.%) отвешивают в колбу вместимостью 250 мл, снабженную мешалкой. Затем добавляют этилацетат (225 мл, 2000 ммоль, 100 мас.%) и раствор перемешивают при комнатной температуре (21-24°C) до получения раствора. Реакционную смесь перемешивают в течение 18 ч или до тех пор, пока завершение реакции не будет подтверждено данными ЖХ-

МС/ЯМР. Реакционную смесь переносят в делительную воронку, промывают деионизированной водой (60 мл × 3) и органический слой концентрируют досуха на роторном испарителе с получением неочищенного соединения стадии 1.

Стадия 2.

К неочищенному соединению со стадии 1 (17,33 г, 24,01 ммоль) в N,N-диметилформамиде (208 мл, 2690 ммоль) добавляют N,N-диизопропилэтиламин (5,03 мл, 28,8 ммоль) и (2R)-2-амино-3-третилсульфанилпропановую кислоту (9,6 г, 26 ммоль). Реакционную смесь перемешивают с помощью магнитной мешалки при комнатной температуре (21-24°C) в течение 18 ч или до тех пор, пока завершение реакции не будет подтверждено данными ЖХ-МС/ЯМР. Реакционную смесь переносят в делительную воронку, промывают 10%-ной лимонной кислотой (120 мл × 2) и экстрагируют дихлорметаном (100 мл × 5). Органический слой промывают деионизированной водой (100 мл × 2), и объединенные органические слои концентрируют досуха на роторном испарителе при 48-50°C для удаления избытка растворителя. Неочищенное Соединение 60 растворяют в ацетонитриле (30 мл) при обработке ультразвуком. Раствор неочищенного Соединения 60 добавляют по каплям в холодную смесь ацетонитрил:деионизированная вода (3:2, 700 мл) при перемешивании. Суспензию перемешивают при 0°C в течение ночи. Твердое вещество фильтруют, промывают гексаном (70 мл) и сушат в вакуумной печи при 40°C с получением продукта Fmoc-Lys(Mtt)-Cys(Trt)-OH (Соединение 60) (21,0 г, выход 76,8% с поправкой на содержание основного вещества по Q-ЯМР).

Пример 74. Синтез Fmoc-L-Lys(mtt)-L-Cys(trt)-L-Pro-гликолевая кислота-L-Val-OH (Соединение 61)



Химическая формула: $C_{75}H_{78}N_6O_8S$
Точная масса: 1222,56
Молекулярная масса: 1223,54

Перед реакцией сочетания Fmoc-L-Pro-гликолевая кислота-L-Val-OH на смоле из приведенного выше примера 73 (1,719 г, 1,00 ммоль) подвергают набуханию с помощью 3×15 мл ДМФА по 20 мин каждый цикл, затем удаляют защиту с помощью 4 × 15 мл 20% пиперидина/ДМФА (об./об.) по 30 мин каждый цикл и промывают 5×15 мл ДМФА по 1 мин каждый цикл. Готовят раствор (2R)-2-[[[(2S)-6-[[дифенил(п-толил)метил]амино]-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)гексаноил]амино]-3-третилсульфанилпропановой кислоты (2,28 г, 2,00 ммоль, 85,24 мас.%), гидрокси-3,4-дигидро-4-оксо-1,2,3-бензотриазина (HOObt) (0,375 г, 2,30 ммоль, 95 мас.%) и N,N'-диизопропилкарбодиимида (0,41 мл, 2,60 ммоль) в 10 мл ДМФА. Соответствующий раствор добавляют в реактор, содержащий смолу. Реакционную смесь перемешивают в течение 12 ч при температуре окружающей среды и сливают жидкость. Смолу промывают 5×15 мл ДМФА по 1 мин каждый цикл и 5×15 мл дихлорметана в течение 1 мин, затем сушат до постоянной массы, получая 1,973 г целевого соединения на смоле.

Образец пептида массой 50 мг отщепляют от смолы с помощью 2,0 мл раствора, состоящего из 92,5% ТФК, 2,5% триизопропилсилана, 2,5% воды и 2,5% дитиотреитола (об./об./об./мас). Смесь перемешивают в барабанном смесителе в течение 1,5 ч, разбавляют 16 мл смеси ДМСО/ацетонитрил 80:20 (об./об.) и фильтруют для удаления смолы. Фильтрат анализируют с помощью ЖХ/МС и показывают, что он содержит 81,93% по площади желаемого пентапептида вместе с 2,91% по площади соединения без пролина и 3,83% соединения без валина.

Пример 75. Синтез Fmoc-Gly-Pro-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Gly-Ala-Pro-Pro-Ser(tBu)-OH (SEQ ID №: 55)

Целевое соединение получают с использованием стандартных условий твердофазного синтеза (защищенные Fmoc аминокислоты/этилцианогликоксилат-2-оксим (Охута)/N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIC)), как описано ниже.

Приготовление растворителей и реагентов:

В резервуар для растворителя загружают двадцать литров ДМФА. Пять литров 20%-ого раствора пиперидина/ДМФА (об./об.) загружают в резервуар для снятия защиты. Готовят 600 мл 0,660 М раствора DIC с использованием N,N'-диизопропилкарбодиимида (49,98 г, 396,0 ммоль) и ДМФА и загружают в резервуар для DIC/растворителя. Готовят 500 мл 0,750 М раствора Охута с использованием этилцианогликоксилат-2-оксима (53,29 г, 371,2 ммоль) и ДМФА и загружают в резервуар для Охута/растворитель. В

3×10 мл 20% пиперидина/DMFA (об./об.) по 30 мин каждый цикл и смолу промывают 5×10 мл DMFA в по 1 мин каждый цикл.

Приготовление растворов аминокислот:

1) 57 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Ala-OH получают из (2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)пропановой кислоты (6,66 г, 21,38 ммоль) и DMFA и наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

2) 103 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Glu(tBu)-OH получают из (2S)-5-трет-бутоксид-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-5-оксопентановой кислоты (16,44 г, 38,63 ммоль) и DMFA и наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

3) 61 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Phe-OH получают из (2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-фенилпропановой кислоты (8,83 г, 22,79 ммоль) и DMFA и наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

4) 57 мл 0,375 М раствора FmocNH-Gly-OH получают из 2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)уксусной кислоты (6,36 г, 21,38 ммоль) и DMFA и наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

5) 57 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Ile-OH получают из (2S,3S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метилпентановой кислоты (7,55 г, 21,38 ммоль) и DMFA и наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

6) 103 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Leu-OH получают из (2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-4-метилпентановой кислоты (13,65 г, 38,62 ммоль) и DMFA и наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

7) 82 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Gln(trt)-OH получают из (2S)-5-(трет-бутиламино)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-5-оксопентановой кислоты (13,05 г, 21,38 ммоль) и DMFA и наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

8) 57 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Tyr(tBu)-OH получают из (2S)-3-(4-трет-бутоксифенил)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)пропановой кислоты (9,82 г, 21,38 ммоль) и DMFA и наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

9) 57 мл 0,375 М раствора FmocNH-Aib-OH получают из 2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-2-метилпропановой кислоты (6,96 г, 21,38 ммоль) и DMFA и наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

10) 44 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Cys(trt)-OH получают из (2R)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-третилсульфанилпропановой кислоты (9,66 г, 16,50 ммоль) и DMFA и наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

Условия сочетания

Gln: 0,18 М, 3,0 экв. аминокислоты, 3,0 экв. Охута/3,3 экв. DIC, 30-минутная предварительная активация раствора активированного сложного эфира, время сочетания 18 ч при температуре окружающей среды, снятие защиты 4×30 мин с помощью 20% пиперидина/DMFA (об./об.), промывки DMFA 5×1 мин после снятия защиты и после сочетания.

Aib, Ala, Leu-9: 0,18 М, 3,0 экв. аминокислоты, 3,0 экв. Охута/3,3 экв. DIC, 30-минутная предварительная активация раствора активированного сложного эфира, время сочетания 12 ч при температуре окружающей среды, снятие защиты 4×30 мин с помощью 20% пиперидина/DMFA (об./об.), промывки DMFA 5×1 мин после снятия защиты и после сочетания.

Phe, Ile: 0,18 М, 3,0 экв. аминокислоты, 3,0 экв. Охута/3,3 экв. DIC, 30-минутная предварительная активация раствора активированного сложного эфира, время сочетания 8 ч при температуре окружающей среды, снятие защиты 4×30 мин с помощью 20% пиперидина/DMFA (об./об.), промывки DMFA 5×1 мин после снятия защиты и после сочетания.

Cys: 0,18 М, 3,0 экв. аминокислоты, 3,0 экв. Охута/3,3 экв. DIC, без предварительной активации раствора активированного сложного эфира, время сочетания 8 ч при температуре окружающей среды, снятие защиты 4×30 мин с помощью 20% пиперидина/DMFA (об./об.), промывки DMFA 5×1 мин после снятия защиты и после сочетания.

Все другие сочетания: 0,18 М, 3,0 экв. аминокислоты, 3,0 экв. Охута/3,3 экв. DIC, 30-минутная предварительная активация раствора активированного сложного эфира, время сочетания 4 ч при температуре окружающей среды, снятие защиты 3×30 мин с помощью 20% пиперидина/DMFA (об./об.), промывки DMFA 5×1 мин после снятия защиты и после сочетания.

В конце синтеза каждую смолу промывают 5×10 мл DMFA по 1 мин каждый цикл, затем 5×1 мл дихлорметана по 1 мин каждый цикл. Смолы сушат до постоянной массы и объединяют, получая 24,394 г целевого соединения на смоле. Группу Fmoc удаляют из образца пептида на смоле массой 91,8 мг путем подвергания смолы набуханию с использованием 3×4 мл DMFA по 15 мин каждый цикл, обработки 3×4 мл 20% пиперидина/DMFA (об./об.) по 30 мин каждый цикл, промывания 5×4 мл DMFA по 1 мин каждый цикл, промывания 5×4 мл дихлорметана по 1 мин каждый цикл и сушки до постоянной массы. Образец продукта со снятой защитой отделяют от смолы путем перемешивания на барабанном смесителе

в сцинтилляционном флаконе вместимостью 20 мл в течение 2 часов с 5 мл раствора ТФК/ТИС/Н₂О/ДТТ ([0,925об.:0,025об.:0,025об.:0,025 мас.). Смолу фильтруют и влажный осадок смолы промывают 2 мл чистой ТФК. Полученный неочищенный пептид осаждают 35 мл холодного МТБЭ, центрифугируют, промывают 2×35 мл МТБЭ и сушат в вакууме в течение ночи при 33°C, что дает 48,2 мг полностью лишённого защитных групп пептида. Анализ с помощью УЭЖХ показал чистоту 88,02% по площади без родственных веществ более 1,0% по площади. Остаток пептида отщепляют от смолы механическим перемешиванием с 200 мл раствора, состоящего из 185 мл трифторуксусной кислоты, 5,0 мл триизопротилсилана, 5,0 мл воды, 5,0 г дитиотреитола, в 3-горлой круглодонной колбе в течение 2 ч при температуре окружающей среды. Смолу удаляют фильтрованием на воронке с пористым стеклом и промывают 80 мл ТФК, получая общий объем раствора приблизительно 280 мл. Пептид осаждают добавлением к 1400 мл холодного МТБЭ. После выдержки при -20°C в течение 1 ч суспензию делят на шесть бутылей и центрифугируют. Полученные твердые вещества после центрифугирования объединяют в два флакона и каждое твердое вещество дважды промывают 250 мл МТБЭ комнатной температуры. Полученное белое твердое вещество сушат в течение ночи в вакуумной печи при 33°C, получая 20,07 г неочищенного пептида.

Пример 76. Синтез Boc-Tyr(tBu)-Aib-Gln(trt)-Glu(tBu)-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(tBu)-Tyr(tBu)-Ser(tBu)-Ile-αMeLeu-Leu-Asp(tBu)-Lys(mtt)-Cys(trt)-Pro-гликолевая кислота-Val-NH₂ (SEQ ID №: 56; Соединение 63)

Целевое соединение получают с использованием стандартных условий твердофазного синтеза (защитные Fmoc аминокислоты/этилцианоглиоксилат-2-оксим (Охута)/N,N'-диизопротилкарбодиимид (DIC)).

Приготовление растворителей и реагентов

В резервуар для растворителя загружают 40 л ДМФА. 4 л 20%-ого раствора пиперидина/ДМФА (об./об.) загружают в резервуар для снятия защиты. Готовят 600 мл 0,660 М раствора DIC с использованием N,N'-диизопротилкарбодиимида (49,98 г, 396,0 ммоль) и ДМФА и загружают в резервуар для DIC/растворителя. Готовят 500 мл 0,750 М раствора Охута с использованием этилцианоглиоксилат-2-оксима (53,29 г, 371,2 ммоль) и ДМФА и загружают в резервуар для Охута/растворитель. [2-[[[(1S)-1-карбамоил-2-метилпропил]амино]-2-оксоэтил]-(2S)-1-[(2R)-2-[[[(2S)-6-[[дифенил(п-толил)метил]амино]-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)гексаноил]амино]-3-третилсульфанилпропаноил]пирролидин-2-карбоксилат на амидной смоле Ринка АМ, амидной смоле Ринка МВНА или смоле Зибера (0,500 ммоль) загружают в каждый из восьми реакторов (всего 4,0 ммоль пептида на смоле).

Перед началом стадий синтеза, показанных ниже, смолу в каждом реакторе подвергают набуханию с помощью 3×10 мл ДМФА по 20 мин каждый цикл, затем группу Fmoc удаляют с помощью 4×10 мл 20% пиперидина/ДМФА (об./об.) по 30 мин каждый цикл и смолу промывают 5×10 мл ДМФА в по 1 мин каждый цикл.

Приготовление растворов аминокислот:

1) 57 мл 0,375 М раствора FmocNH-Aib-OH получают из 2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-2-метилпропановой кислоты (6,96 г, 21,37 ммоль) и ДМФА затем наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

2) 103 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Asp(tBu)-OH получают из (2S)-4-трет-бутоксид-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-4-оксобутановой кислоты (15,87 г, 38,63 ммоль) и ДМФА, затем наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

3) 57 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Phe-OH получают из (2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-фенилпропановой кислоты (8,28 г, 21,38 ммоль) и ДМФА, затем наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

4) 57 мл 0,375 М раствора FmocNH-Gly-OH получают из 2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)уксусной кислоты (6,36 г, 21,38 ммоль) и ДМФА затем наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

5) 57 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Ile-OH получают из (2S,3S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-3-метилпентановой кислоты (7,55 г, 21,38 ммоль) и ДМФА, затем наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

6) 57 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Lys(boc)-OH получают из (2S)-6-(трет-бутоксикарбониламино)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)гексановой кислоты (10,02 г, 21,38 ммоль) и ДМФА, затем наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

7) 57 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Leu-OH получают из (2S)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-4-метилпентановой кислоты (7,55 г, 21,38 ммоль) и ДМФА, затем наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

8) 57 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Gln(trt)-OH получают из (2S)-5-(трет-бутиламино)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-5-оксопентановой кислоты (13,05 г, 21,38 ммоль) и ДМФА, затем наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

9) 103 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Ser(tBu)-OH получают из (2S)-3-трет-бутоксид-2-(9H-

флуорен-9-илметоксикарбониламино)пропановой кислоты (14,81 г, 38,63 ммоль) и ДМФА, затем наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

10) 103 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Thr(tBu)-OH получают из (2S,3R)-3-трет-бутоксид-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)бутановой кислоты (15,35 г, 38,63 ммоль) и ДМФА, затем наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

11) 57 мл 0,375 М раствора FmocNH-L-Tyr(tBu)-OH получают из (2S)-3-(4-трет-бутоксифенил)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)пропановой кислоты (9,82 г, 21,38 ммоль) и ДМФА, затем наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

12) 57 мл 0,375 М раствора BocNH-L-Tyr(tBu)-OH получают из (2S)-2-(трет-бутоксикарбониламино)-3-(4-трет-бутоксифенил)пропановой кислоты (7,21 г, 21,38 ммоль) и ДМФА, затем наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

13) 57 мл 0,375 М раствора FmocNH-L- α MeLeu-OH получают из (2R)-2-(9H-флуорен-9-илметоксикарбониламино)-2,4-диметилпентановой кислоты (7,85 г, 21,37 ммоль) и ДМФА, затем наливают в бутылку для соответствующей аминокислоты.

Условия сочетания

Woc-Tyr, Pe: 0,18 М, 3,0 экв. аминокислоты, 3,0 экв. Охума/3,3 экв. DIC, 30-минутная предварительная активация раствора активированного сложного эфира, время сочетания 18 ч при температуре окружающей среды, снятие защиты 4×30 мин с помощью 20% пиперидина/ДМФА (об./об.), промывки ДМФА 5×1 мин после снятия защиты и после сочетания.

Aib, Gln, α MeLeu: 0,18 М, 3,0 экв. аминокислоты, 3,0 экв. Охума/3,3 экв. DIC, 30-минутная предварительная активация раствора активированного сложного эфира, время сочетания 12 ч при температуре окружающей среды, снятие защиты 4×30 мин с помощью 20% пиперидина/ДМФА (об./об.), промывки ДМФА 5×1 мин после снятия защиты и после сочетания.

Все другие сочетания: 0,18 М, 3,0 экв. аминокислоты, 3,0 экв. Охума/3,3 экв. DIC, 30-минутная предварительная активация раствора активированного сложного эфира, время сочетания 4 ч при температуре окружающей среды, снятие защиты 3×30 мин с помощью 20% пиперидина/ДМФА (об./об.), промывки ДМФА 5×1 мин после снятия защиты и после сочетания. В конце синтеза каждую смолу промывают 5×10 мл ДМФА по 1 мин каждый цикл, затем 5×1 мл дихлорметана по 1 мин каждый цикл. Смолы сушат до постоянной массы и переносят на следующую стадию. Образец из одного из реакторов (~ 80 мг) отделяют от смолы путем перемешивания на роторном смесителе в сцинтилляционном флаконе вместимостью 20 мл в течение 2 ч с 5 мл раствора ТФК/TIS/H₂O/ДТТ ([0,925об.:0,025об.:0,025об.:0,025мас). Смолу фильтруют и влажный осадок смолы промывают 2 мл чистой ТФК. Полученный неочищенный пептид осаждают 35 мл холодного МТБЭ, центрифугируют, промывают 2×35 мл МТБЭ и сушат в вакууме в течение ночи при 33°C, что дает образец полностью лишенный защитных групп пептида. Анализ с помощью УЭЖХ показал чистоту 59,8% по площади.

Пример 77. Синтез Tyr-Aib-Gln-Glu-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Ile- α MeLeu-Leu-Asp-Lys(AEEA-AEEA- γ Glu-C₂₀-OH)-Cys-Pro-гликолевая кислота-Val-NH₂ (SEQ ID №: 57; Соединение 64) Стадия 1 (снятие защитной группы mtt):

[2-[[[(1S)-1-карбамоил-2-метилпропил]амино]-2-оксоэтил]-(2S)-1-[(2R)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-трет-бутоксид-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S,3S)-2-[[[(2S)-3-трет-бутоксид-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-4-трет-бутоксид-2-[[[(2S)-3-трет-бутоксид-2-[[[(2S,3R)-3-трет-бутоксид-2-[[[(2S)-2-[[[(2S,3R)-3-трет-бутоксид-2-[[2-[[[(2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-(трет-бутоксикарбониламино)-3-(4-трет-бутоксифенил)пропаноил]амино]-2-метилпропаноил]амино]-5-оксо-5-(третиламино)пентаноил]амино]ацетил]амино]бутаноил]амино]-3-фенилпропаноил]амино]бутаноил]амино]пропаноил]амино]-4-оксобутаноил]амино]-3-(4-трет-бутоксифенил)пропаноил]амино]пропаноил]амино]-3-метилпентаноил]амино]-2,4-диметилпентаноил]амино]-4-метилпентаноил]амино]-4-оксобутаноил]амино]-6-(трет-бутоксикарбониламино)гексаноил]амино]-6-[[дифенил(п-толил)метил]амино]гексаноил]амино]-3-третилсульфанилпропаноил]пирролидин-2-карбоксилат на амидной смоле Ринка АМ, амидной смоле Ринка МВНА или смоле Зибера (0,500 ммоль) загружают в каждый из восьми различных реакторов. Каждую смолу подвергают набуханию с помощью 3×10 мл ДХМ по 15 мин каждый цикл, а затем обрабатывают 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанолом, 30% в дихлорметане (об./об.) (10 мл, 94,98 ммоль) и перемешивают в течение одного часа. Жидкость сливают, а смолу снова обрабатывают 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанолом, 30% в дихлорметане (об./об.) (10 мл, 94,98 ммоль) и перемешивают в течение одного часа. Жидкость снова сливают и смолу промывают 5×10 мл дихлорметана по 1 мин каждый цикл, затем 5×10 мл ДМФА по 1 мин каждый цикл и далее обрабатывают до реакции сочетания.

Стадия 2 (присоединение боковой цепи):

2-[2-[2-[[[(4S)-5-трет-бутоксид-4-[(20-трет-бутоксид-20-оксоэйкозаноил)амино]-5-оксопентаноил]амино]этокси]этокси]уксусную кислоту (6,41 г, 8,00 ммоль, 91 мас.%) и бензотриазол-1-илокситрипирролидинофосфония гексафторфосфат (РyBOP) (4,16 г, 8,00 ммоль) растворяют в 72 мл ДМФА. Добавляют N,N-диизопропилэтиламин (1,40 мл, 8,00 ммоль) и полученный раствор встряхивают в течение 1 мин, затем добавляют по одной восьмой части раствора на каждую смолу в реакционных со-

судах и перемешивают в течение 16 ч. Жидкость сливают и смолу промывают 5×15 мл ДМФА по 1 мин каждый цикл, 5×15 мл дихлорметана по 1 мин каждый цикл, а затем сушат до постоянной массы, чтобы получить 15,66 г пептида на смоле.

Стадия 3 (отщепление пептида от смолы и полное снятие защиты):

Пептид отщепляют от смолы механическим перемешиванием со 160 мл раствора, состоящего из 148 мл трифторуксусной кислоты, 4,0 мл триизопропилсилана, 4,0 мл воды, 4,0 г дитиотреитола в 3-горлой круглодонной колбе в течение 2 ч при температуре окружающей среды. Смолу удаляют фильтрованием на воронке с пористым стеклом и промывают 64 мл ТФК, получая общий объем раствора приблизительно 224 мл. Пептид осаждают добавлением к 1120 мл холодного МТБЭ. После выдержки при -20°C в течение 1 ч суспензию делят на четыре бутылки и центрифугируют. Полученные твердые вещества после центрифугирования объединяют в два флакона и каждое твердое вещество дважды промывают 250 мл МТБЭ комнатной температуры. Полученное твердое вещество сушат в течение ночи в вакуумной печи при 33°C, получая 7,817 г неочищенного целевого соединения.

Пример 78: Очистка SEQ ID NO: 6

Неочищенный продукт (76,23 г) растворяют в 3,05 л смеси 25% АСN/вода (концентрация неочищенного 25 г/л) в реакторе вместимостью 5 л и перемешивают в течение 30 мин. Восстанавливают изомеры депептида путем превращения с использованием 28%-ого гидроксида аммония, устанавливая рН=9,0, и перемешивают в течение 60 мин с последующей корректировкой обратно в кислую сторону (рН=2 с использованием ТФК). Конечное содержание АСN должно составлять 30% для обеспечения растворимости после корректировки рН. Неочищенный продукт фильтруют перед первой стадией хроматографии.

Первая стадия хроматографии: колонка: DAC200, 200 мм×250 мм, стационарная фаза (УМС Triart C18, 10 мкм, 12 нм); подвижная фаза А: 0,1% ТФК в Н₂О; подвижная фаза В: 100% АСN; обнаружение при 230 нм; объем впрыска: 3,5 л (инжекторным насосом с расходом 300 мл/мин).

Градиент:

Время/мин	Поток/(мл/мин)	%А	%В
0	1000	70	30
1	1000	70	30
52,5	1000	45	55

Собирают фракции желаемого продукта.

Вторая стадия хроматографии: разбавляют равным объемом Н₂О и доводят рН до 6,5, используя разбавленный аммиак. Колонка: DAC200, 200 мм×250 мм, неподвижная фаза (УМС Triart C18, 10 мкм, 12 нм). Подвижная фаза А: 10 мМ NH₄HCO₃ в Н₂О; подвижная фаза В: 100% АСN; обнаружение на 230 нм; объем впрыска: 7,0 л (инжекторным насосом с расходом 300 мл/мин).

Градиент:

Время/мин	Поток/(мл/мин)	%А	%В
0	1000	70	30
1	1000	70	30
52,5	1000	45	55

Собирают фракции желаемого продукта.

Стадия превращения в натриевую соль: 1,76 г (44,0 ммоль) NaOH, растворенного в 200 мл Н₂О, добавляют по каплям в 7,2 л отделенной фракции и лиофилизируют. Получают 38,02 г очищенного продукта (чистота: 98,0%).

Пример 79. Очистка SEQ ID №: 29

Неочищенный продукт очищают, используя колонку 20 см (4,8 кг Daiso C18-ODS-RPS, 10 мкм, 120 Å) и подвижную фазу А: 0,1% ТФК в Н₂О; подвижная фаза В: 100% АСN; обнаружение при 230 нм. Первая стадия очистки:

Градиент:

Время/мин	Поток/(мл/мин)	%А	%В
0	600	80	20
3	600	70	30
75	600	45	55

Собирают фракции с продуктом с чистотой около 88% или выше, разбавляют 1:1с помощью Н₂О и доводят рН до 6,5 с помощью 50% NH₄OH.

Вторая стадия хроматографии: используют колонку из первой стадии. Подвижная фаза А: 10 мМ NH₄HCO₃ в Н₂О; подвижная фаза В: 100% АСN; обнаружение при 230 нм.

Градиент:

Время/мин	Поток/(мл/мин)	%А	%В
0	600	80	20
45	600	50	50

Собирают фракции с чистотой около 97% или выше. Превращают в натриевую соль, добавив 3 экв. NaOH с последующей лиофилизацией.

Последовательности

В данном изобретении упоминаются следующие аминокислотные последовательности, и они представлены ниже для информации.

SEQ ID NO: 1 - GIP человека

Y A E G T F I S D Y S I A M D K I N Q Q D F V N W L L A Q K G K K N D W K H N I T Q

SEQ ID NO: 2 - амид GLP-1 (7-36) человека

H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G R - N H ₂

SEQ ID NO: 3 - GCG человека

H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L M N T

SEQ ID NO: 4 - аналог инкретина

Y X₂ Q G T F T S D Y S I X₁₃ L D K X₁₇ A X₁₉ X₂₀ A F I E Y L L X₂₈ X₂₉ G P S S X₃₄ A P P P S,

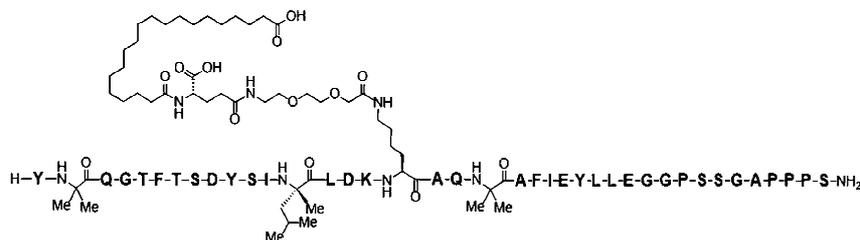
где X₂ представляет собой Aib, X₁₃ представляет собой L или αMeL, X₁₇ представляет собой любую аминокислоту с функциональной группой, доступной для конъюгации, при этом функциональная группа конъюгирована с жирной кислотой C₁₆-C₂₂, X₁₉ представляет собой Q или A, X₂₀ представляет собой Aib, αMeK, Q или H, X₂₈ представляет собой E или A, X₂₉ представляет собой G или Aib, X₃₄ представляет собой G или Aib, а C-концевая аминокислота является необязательно амидированной.

SEQ ID NO: 5 - аналог инкретина

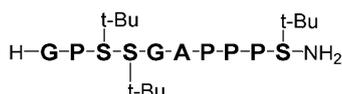
Y(Aib)QGTFTSDYSI(αMeL)LDKKAQ(Aib)AFIEYLLEGGPSSGAPPPS

SEQ ID NO: 6 - аналог инкретина

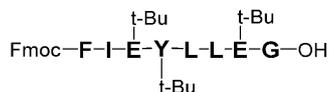
Y(Aib)QGTFTSDYSI(αMeL)LDKK((2-[2-(2-аминоэтоксид)этоксид]ацетил)-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ(Aib)AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂



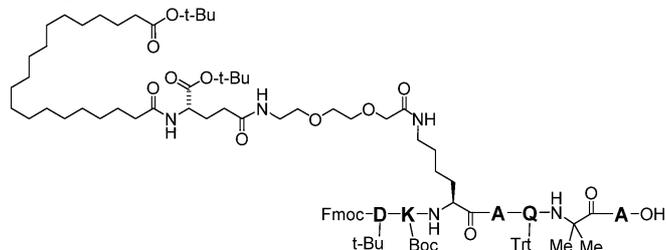
SEQ ID NO: 7 - Промежуточное соединение 1



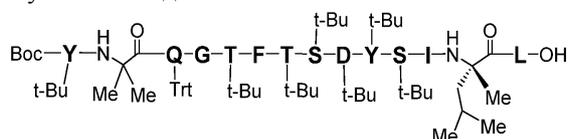
SEQ ID NO: 8 - Промежуточное соединение 2

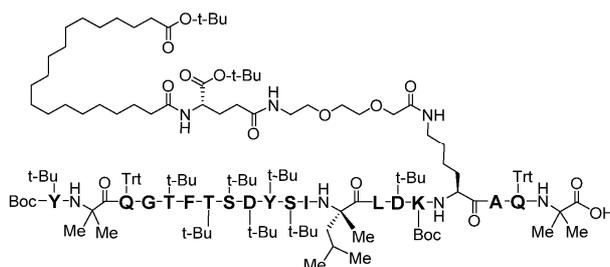


SEQ ID NO: 9 - Промежуточное соединение 3

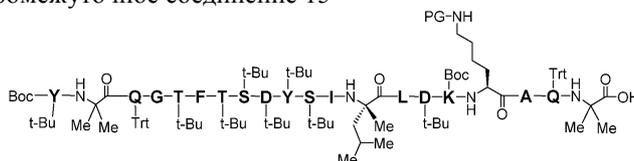


SEQ ID NO: 10 - Промежуточное соединение 4

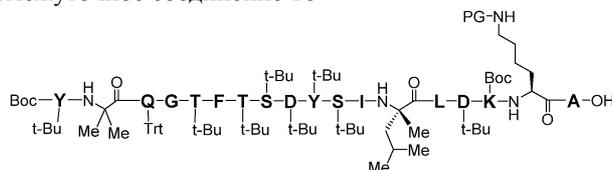




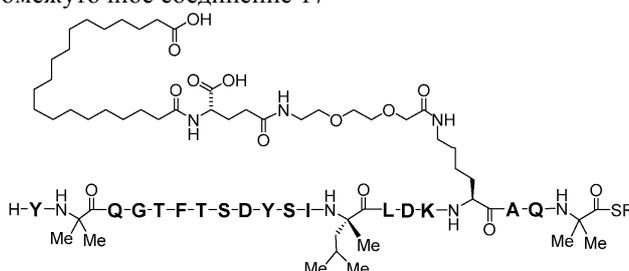
SEQ ID NO: 21 - Промежуточное соединение 15



SEQ ID NO: 22 - Промежуточное соединение 16

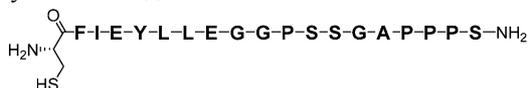


SEQ ID NO: 23 - Промежуточное соединение 17

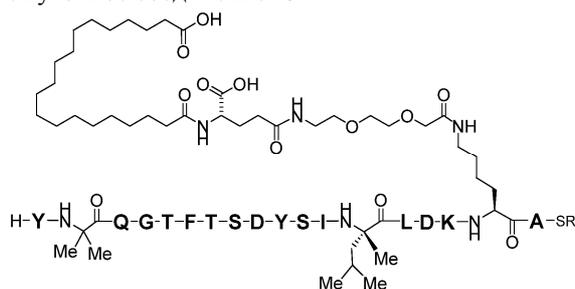


где R может представлять собой 2,2,2-трифторэтил.

SEQ ID NO: 24 - Промежуточное соединение 18



SEQ ID NO: 25 - Промежуточное соединение 19

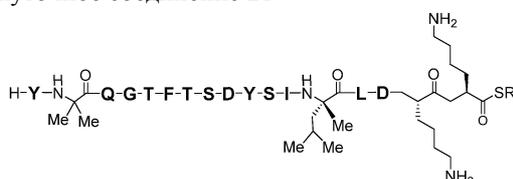


где R может представлять собой 2,2,2-трифторэтил.

SEQ ID NO: 26 - Промежуточное соединение 20

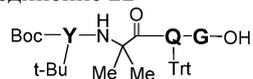


SEQ ID NO: 27 - Промежуточное соединение 21



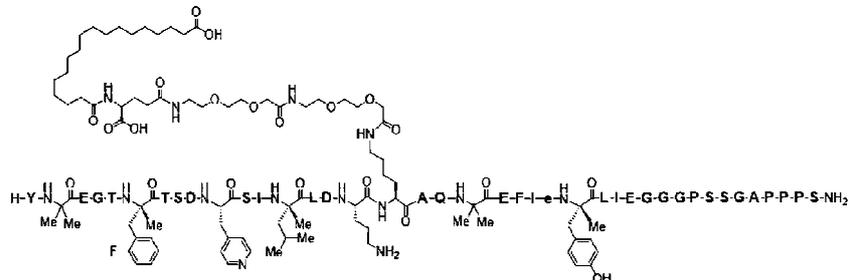
где R может представлять собой 2,2,2-трифторэтил.

SEQ ID NO: 28 - Промежуточное соединение 22

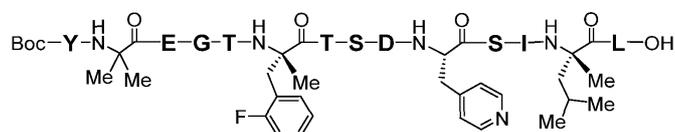


SEQ ID NO: 29 - Аналог инкретина

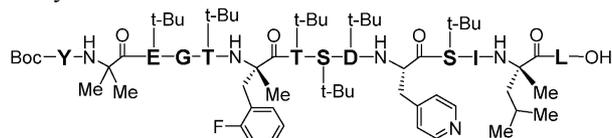
Y-Aib-EGT- α MeF(2F)-TSD-4Pal-SI- α MeL-LD-Orn-K((2-[2-(2-аминоэтокси)этокси]ацетил)-
(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H)AQ-Aib-EFI-(D-Glu)- α MeY-LIEGGPSSGAPPPS-NH₂



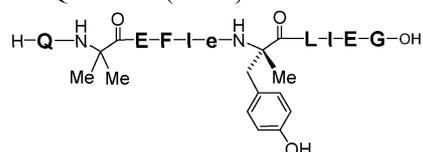
SEQ ID NO: 30 - Промежуточное соединение 27

Boc-Y-Aib-EGT- α MeF(2F)-TSD-4Pal-SI- α MeL-L

SEQ ID NO: 31 - Промежуточное соединение 28



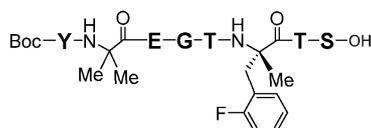
SEQ ID NO: 32 - Промежуточное соединение 29

Q-Aib-EFI-(D-Glu)- α MeY-LIEG

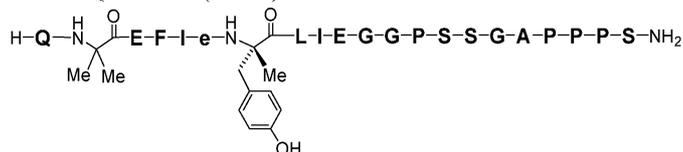
SEQ ID NO: 33 - Промежуточное соединение 30

GPSSGAPPPS

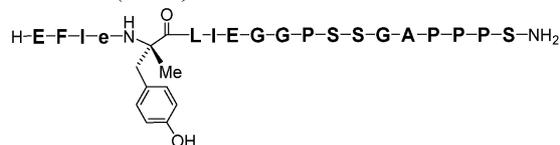
SEQ ID NO: 34 - Промежуточное соединение 31

Boc-Y-Aib-EGT- α MeF(2F)-TS

SEQ ID NO: 35 - Промежуточное соединение 32

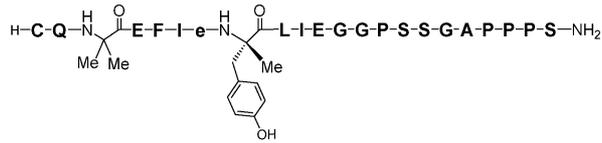
Q-Aib-EFI-(D-Glu)- α MeY-LIEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 36 - Промежуточное соединение 33

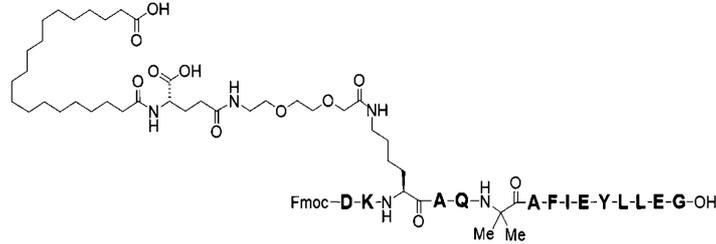
EFI-(D-Glu)- α MeY-LIEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 37 - Промежуточное соединение 34

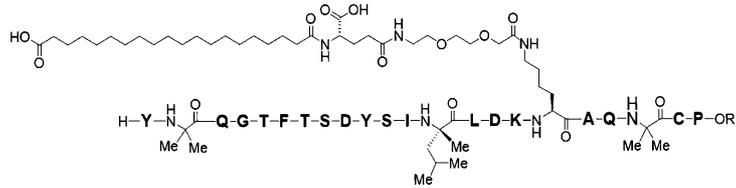
CQ-Aib-EFI-(D-Glu)- α MeY-LIEGGPSSGAPPPS-NH₂



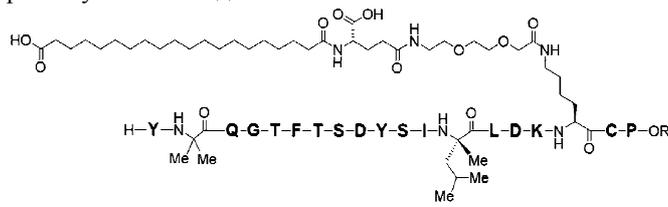
SEQ ID NO: 38 - Промежуточное соединение 23



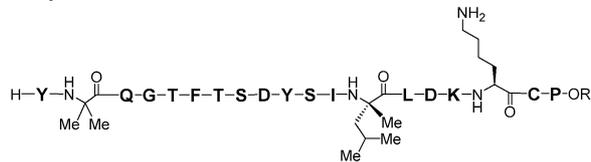
SEQ ID NO: 39 - Промежуточное соединение 24

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

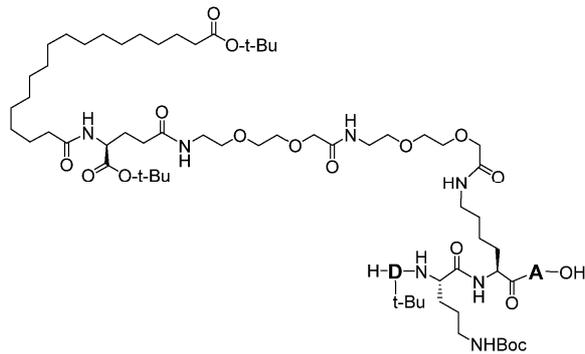
SEQ ID NO: 40 - Промежуточное соединение 25

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

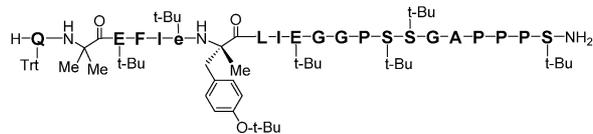
SEQ ID NO: 41 - Промежуточное соединение 26

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

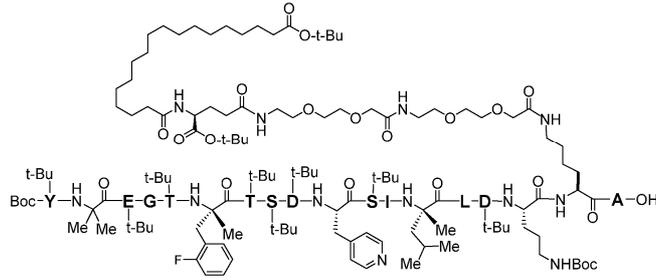
SEQ ID NO: 42



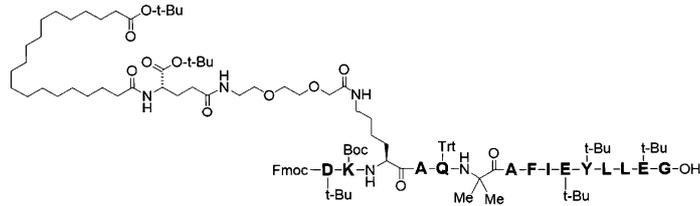
SEQ ID NO: 43



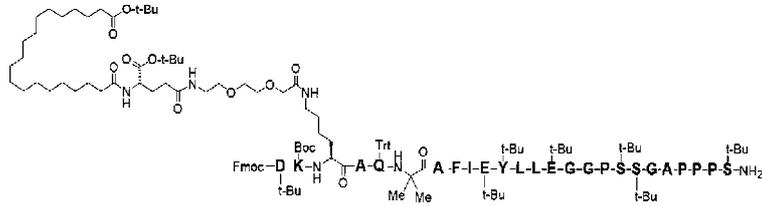
SEQ ID NO: 44



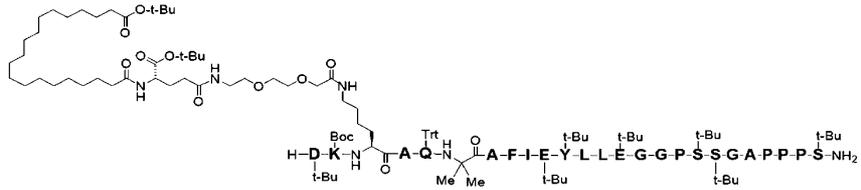
SEQ ID NO: 45



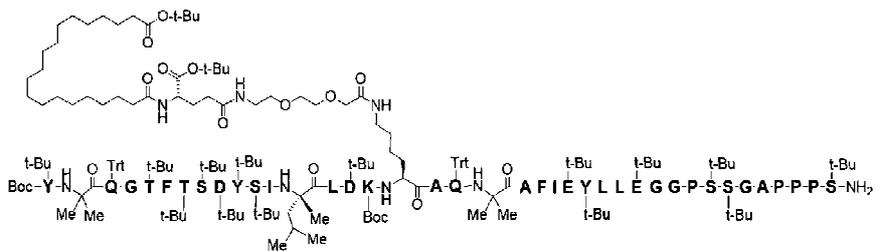
SEQ ID NO: 46



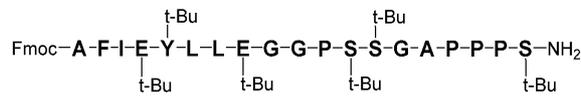
SEQ ID NO: 47



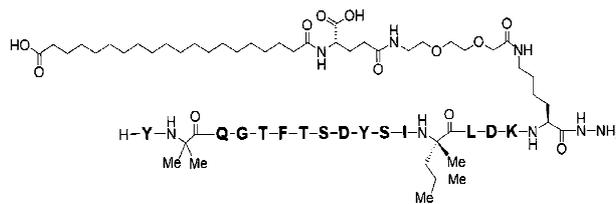
SEQ ID NO: 48



SEQ ID NO: 49

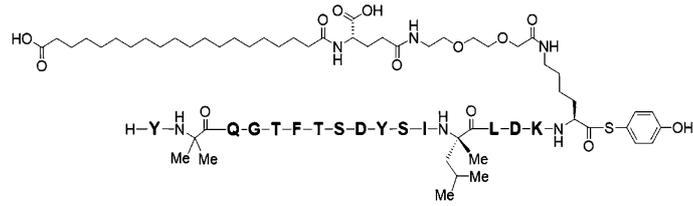


SEQ ID NO: 50



SEQ ID NO: 51

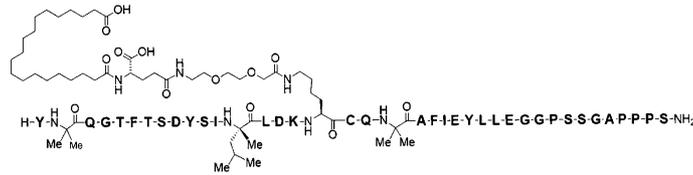
047599



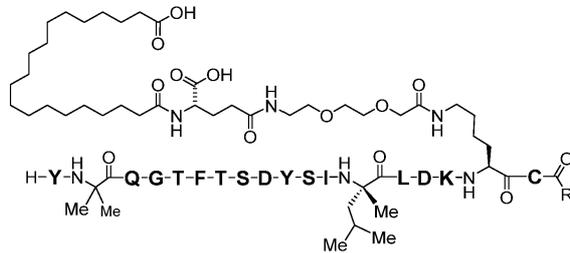
SEQ ID NO: 52

CQ-(Aib)-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 53

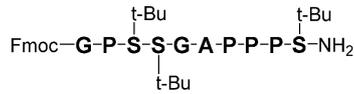


SEQ ID №: NO

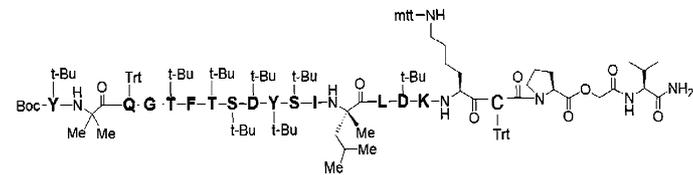


где R представляет собой Про-гликолевая кислота-Val или Про-гликолевую кислоту

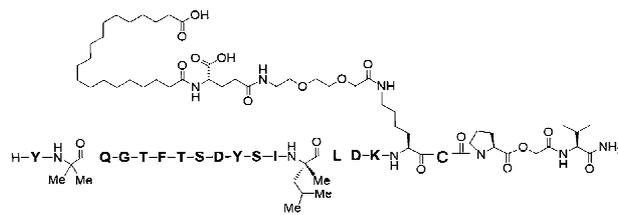
SEQ ID NO: 55



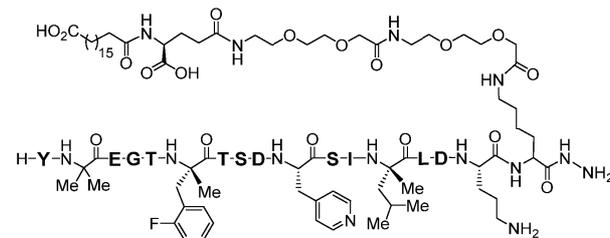
SEQ ID NO: 56



SEQ ID NO: 57



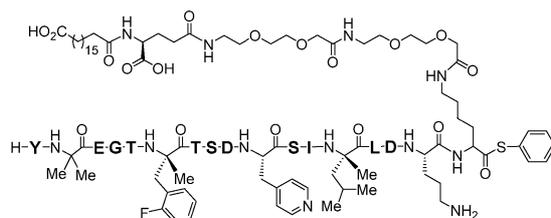
SEQ ID NO: 58



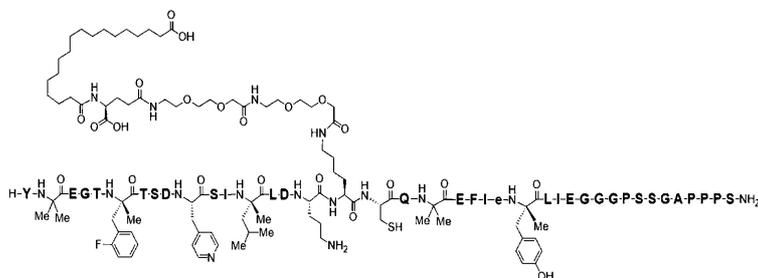
SEQ ID NO: 59

CQ-(Aib)-EFI-(D-Glu)-(α-метил-Тыр)-LIEGGPSSGAPPPS-NH₂

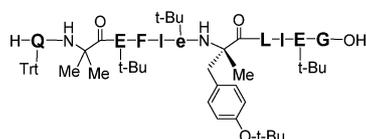
SEQ ID NO: 60



SEQ ID NO: 61



SEQ ID NO: 62



ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6, включающий стадию сочетания посредством гибридного жидкостно-твердофазного синтеза четырех промежуточных соединений, выбранных из групп, состоящих из:

- SEQ ID NO: 7, 8, 9 и 10,
- SEQ ID NO: 7, 11, 12 и 10 и
- SEQ ID NO: 7, 13, 14 и 10.

2. Способ получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6, включающий стадию сочетания посредством гибридного жидкостно-твердофазного синтеза трех промежуточных соединений, выбранных из групп, состоящих из:

- SEQ ID NO: 7, 13 и 15,
- SEQ ID NO: 16, 17 и 10,
- SEQ ID NO: 18, 12 и 10,
- SEQ ID NO: 7, 45 и 10 и
- SEQ ID NO: 7, 11 и 20.

3. Способ получения аналога инкретина SEQ ID NO: 6, включающий стадию сочетания посредством гибридного жидкостно-твердофазного синтеза двух промежуточных соединений, выбранных из групп, состоящих из:

- SEQ ID NO: 15 и 19 и
- SEQ ID NO: 18 и 20.

4. Способ по любому из пп.1-3, где способ включает синтезирование каждого промежуточного соединения с помощью твердофазного пептидного синтеза перед их сочетанием в жидкой фазе.

5. Способ по п.2 или 4, где три промежуточных соединения представляют собой SEQ ID NOS: 7, 11 и 20.

6. Способ по п.5, где три промежуточных соединения соединены в следующем порядке: от SEQ ID NO: 7 к SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 20.

7. Способ по п.6, где способ включает сочетание SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11 с получением SEQ ID NO: 18 и сочетание SEQ ID NO: 18 с SEQ ID NO: 20 с получением SEQ ID NO: 6.

8. Способ по п.7, где способ включает сочетание SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 11 с получением SEQ ID NO: 49 и снятие защиты с SEQ ID NO: 49 с получением SEQ ID NO: 18.

9. Способ по п.8, где способ включает сочетание SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 20 с получением SEQ ID NO: 48 и снятие защиты с SEQ ID NO: 48 с получением SEQ ID NO: 6.

10. Способ по п.3 или 4, где два промежуточных соединения представляют собой SEQ ID NOS: 18 и 20.

11. Способ по п.10, включающий получение SEQ ID NO: 20 с помощью твердофазного пептидного синтеза с использованием SEQ ID NO: 28.

12. Способ по п.10 или 11, где способ включает сочетание SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 20 с получением SEQ ID NO: 48 и снятие защиты с SEQ ID NO: 48 с получением SEQ ID NO: 6.
13. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 7 или ее фармацевтически приемлемую соль.
14. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 8 или ее фармацевтически приемлемую соль.
15. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 9 или ее фармацевтически приемлемую соль.
16. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 10 или ее фармацевтически приемлемую соль.
17. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 11 или ее фармацевтически приемлемую соль.
18. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 12 или ее фармацевтически приемлемую соль.
19. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 13 или ее фармацевтически приемлемую соль.
20. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 14 или ее фармацевтически приемлемую соль.
21. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 15 или ее фармацевтически приемлемую соль.
22. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 16 или ее фармацевтически приемлемую соль.
23. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 17 или ее фармацевтически приемлемую соль.
24. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 18 или ее фармацевтически приемлемую соль.
25. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 19 или ее фармацевтически приемлемую соль.
26. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 20 или ее фармацевтически приемлемую соль.
27. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 28 или ее фармацевтически приемлемую соль.
28. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 45 или ее фармацевтически приемлемую соль.
29. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 48 или ее фармацевтически приемлемую соль.
30. Промежуточное соединение, включающее SEQ ID NO: 49 или ее фармацевтически приемлемую соль.

