

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491280 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.07.29

(51) Int. Cl. C07K 14/605 (2006.01)  
A61K 38/26 (2006.01)  
A61P 1/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.11.09

---

(54) ПОЛИПЕПТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ СКРЕПКУ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

---

(31) 202111400591.8; 202210648263.8

(72) Изобретатель:

(32) 2021.11.19; 2022.06.08

Пань Чжисян, Хэ Хайин, Цзян  
Чжигань, Чэнь Шухуэй (CN)

(33) CN

(86) PCT/CN2022/130781

(74) Представитель:

(87) WO 2023/088143 2023.05.25

Фелицына С.Б. (RU)

(71) Заявитель:

СОТЕР БАЙОФАРМА ПТИ. ЛТД.  
(SG)

---

(57) Представлен ряд содержащих скрепку полипептидов, и их применение, в частности, раскрыты полипептиды с последовательностями, приведенными в формулах (I-1)-(I-5).

202491280

A1

A1

202491280

## **ПОЛИПЕПТИДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ СКРЕПКУ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

Настоящее изобретение претендует на приоритет от CN2021114005918, поданной 19 ноября 2021 г., и CN2022106482638, поданной 8 июня 2022 г.

### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Настоящее изобретение касается ряда полипептидов, содержащих скрепку (англ. staple), и их применения. В частности, настоящим изобретением предусмотрены полипептиды с последовательностями, представленными формулами (I-1)–(I-5).

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

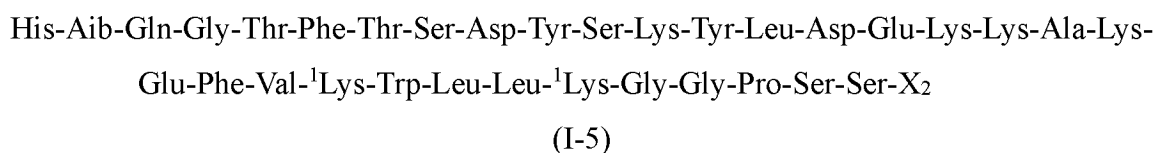
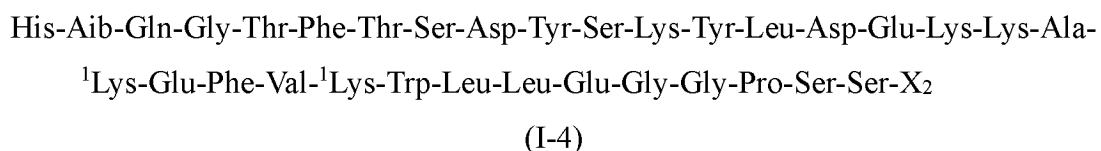
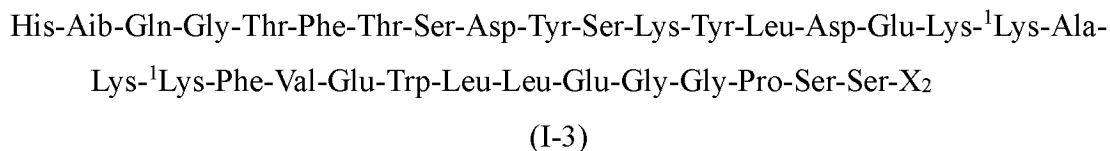
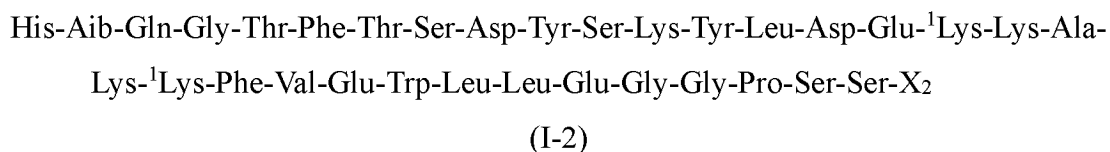
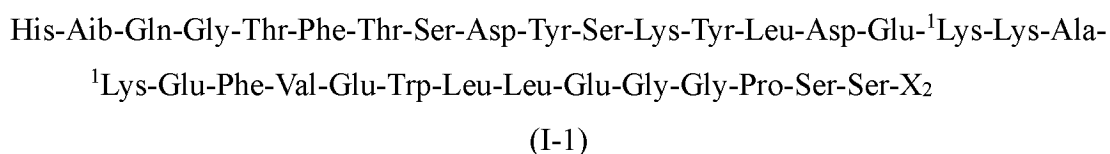
Избыточный вес и ожирение представляют серьезные проблемы для здоровья, с которыми сталкивается все человечество. Зачастую они сопровождаются другими заболеваниями, такими как ишемическая болезнь сердца, гипертония, диабет 2 типа, неалкогольная жировая болезнь печени, заболевания почек и некоторые виды рака. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определяет ожирение как одно из десяти основных хронических заболеваний. Ожирение, наряду с гипертонией, гиперлипидемией и гипергликемией, известно как “Квартет смерти” и может стать причиной смерти номер один в 21 веке. Данные ВОЗ показывают, что распространенность ожирения в Китае в 2016 году составляла примерно 6,2%. Кроме того, в журнале Lancet опубликован отчет об изучении массы тела у взрослого населения в мире за 2016 год. Исследование показало, что число людей, страдающих ожирением, превысило число здоровых взрослых, а Китай обогнал Соединенные Штаты и стал страной с наибольшим числом людей, страдающих ожирением в мире. Число людей, страдающих диабетом, гипертонией, сердечно-сосудистыми заболеваниями и другими заболеваниями, вызванными избыточным весом и ожирением, растет с каждым годом, а возраст этих людей становится моложе.

Глюкагон (GCG) – это гормон, который секретируется поджелудочной железой и связывается с рецептором глюкагона (GCGR) для обеспечения физиологических функций. Глюкагон способствует повышению уровня сахара в крови за счет усиления глюконеогенеза и гликогенолиза. Кроме того, GCG также может снижать синтез жирных кислот в жировой ткани печени и усиливать разложение жиров. Глюкагоноподобный пептид 1 (GLP-1) – гормон, секретируемый L-клетками кишечника. Он может снижать массу тела за счет подавления аппетита и сокращения потребления пищи, а также повышает потребление энергии и усиливает термогенез бурой жировой ткани. На фоне поддержания эффективности агониста GLP-1 введение препарата GCG будет иметь

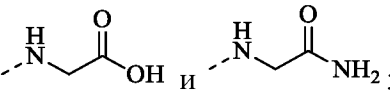
следующие лечебные эффекты: способствовать дальнейшему усилению секреции инсулина  $\beta$ -клетками поджелудочной железы; стимулировать метаболизм бурой жировой ткани; усиливать  $\beta$ -окисление жирных кислот в печени и снижать выработку липидов и холестерина; повышать выживаемость кардиомиоцитов; ускорять метаболизм липидов в белой жировой ткани и снижать содержание жира. Синергия GLP-1/GCG по двум мишеням должна оказывать большее влияние на повышение уровня сахара в крови и снижение веса, чем действие по одной мишени. Поэтому исследование препаратов двойного назначения GLP-1/GCG при лечении ожирения и связанных с этим заболеваний имеет большое значение.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящим изобретением предусмотрены полипептиды с последовательностями, представленными следующими формулами:

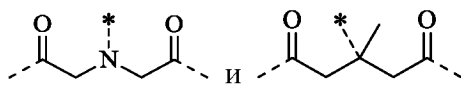


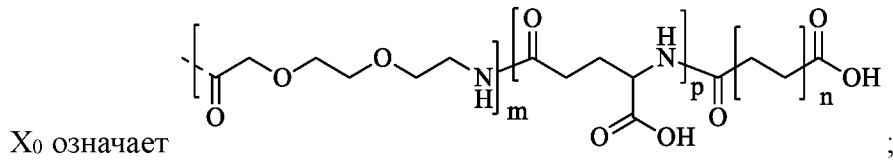
где: структура Aib представляет собой  ;

$X_2$  выбран из  ;

$^1\text{Lys}$  означает модифицированный лизин, а модификация заключается в том, что

аминогруппы на двух боковых цепях лизина соединяются с образованием  ;

X выбран из , причем “\*” обозначает положение, связанное с X<sub>0</sub>;



m равно 2 или 3;

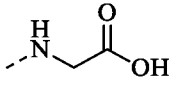
n равно 8, 9 или 10;

p равно 1 или 2.


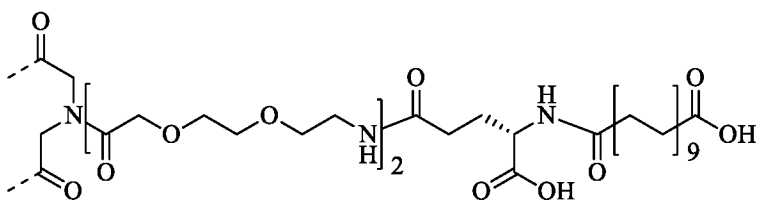
В некоторых воплощениях настоящего изобретения m равно 2, а другие переменные определены в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения n равно 9, а другие переменные определены в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения p равно 1, а другие переменные определены в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения X<sub>2</sub> представляет собой , а другие переменные определены в соответствии с настоящим изобретением.

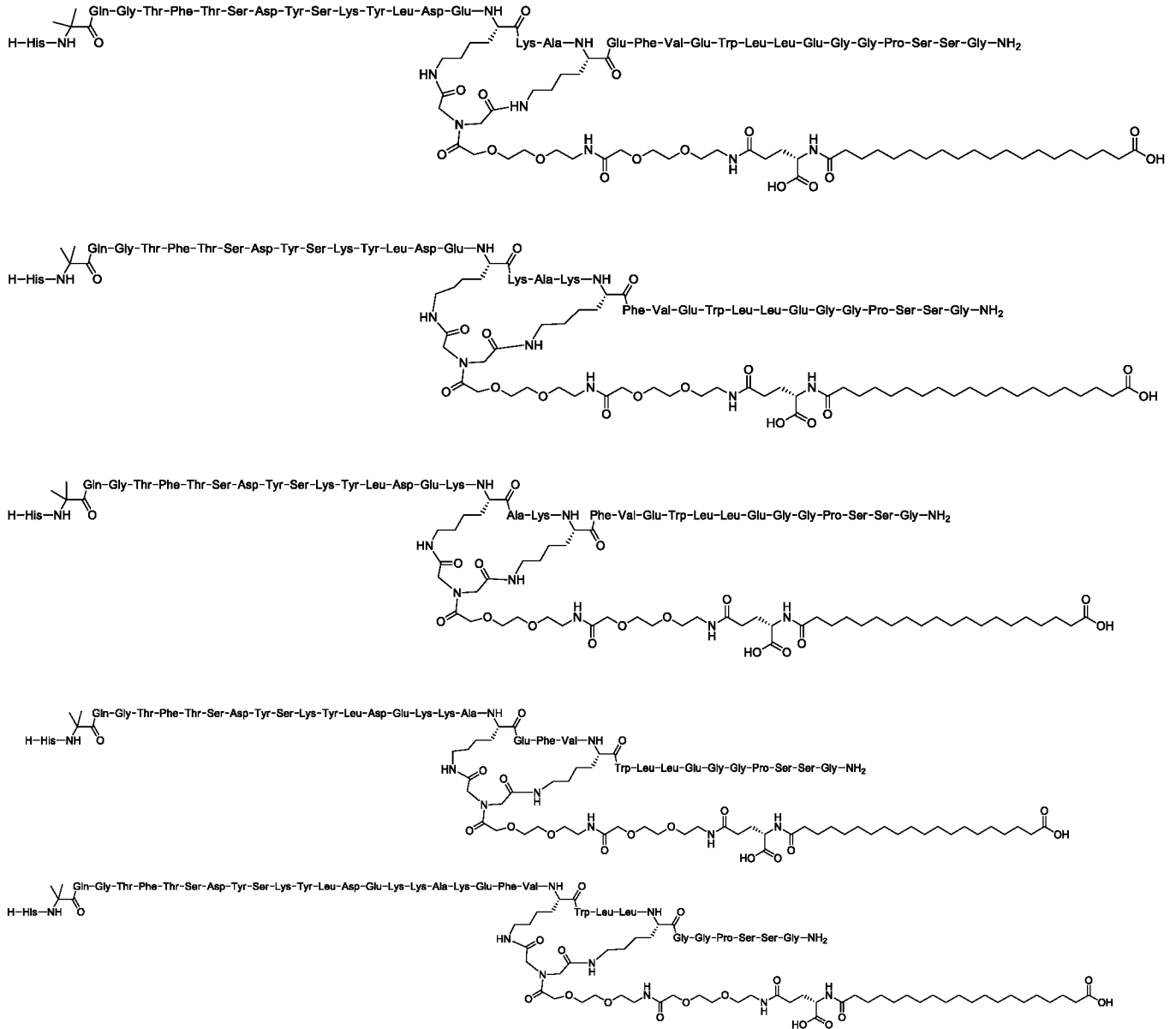
В некоторых воплощениях настоящего изобретения X<sub>0</sub> представляет собой , а другие переменные определены в соответствии с настоящим изобретением.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения структурное звено  представляет собой , а другие переменные определены в соответствии с настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также охватывает некоторые воплощения, полученные путем комбинирования любых из этих переменных.

Настоящим изобретением также предусмотрены полипептиды, представленные

следующими формулами:



Настоящим изобретением также предусмотрено применение указанных полипептидных соединений при изготовлении лекарственных средств для лечения заболеваний, связанных с GLP-1R/GCGR.

В некоторых воплощениях настоящего изобретения заболевание, связанное с GLP-1R/GCGR, выбирают из ожирения и неалкогольного стеатогепатита (NASH).

### Технический эффект

Соединения по настоящему изобретению обладают сильной агонистической активностью на GLP-1R/GCGR; соединения по настоящему изобретению проявляют отличную эффективность по снижению веса у мышей DIO; соединения по настоящему изобретению проявляют превосходную эффективность по улучшению NASH у мышей STZ-NASH; соединения по настоящему изобретению обладают чрезвычайно высоким

связыванием с белками плазмы и отличной стабильностью в плазме; соединения по настоящему изобретению обладают превосходными фармакокинетическими свойствами.

## **РАСКРЫТИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### **Определения и термины**

Если не указано иначе, предполагается, что следующие термины и выражения, используемые в настоящем изобретении, имеют следующие значения. Конкретные термины или выражения не должны рассматриваться как неопределенные или неясные в отсутствие конкретного определения, а их следует понимать в общепринятом смысле. Когда при этом появляется торговое наименование, то подразумевается, что оно относится к соответствующему товару или его активному ингредиенту.

Термин “фармацевтически приемлемые” применяется здесь в отношении тех соединений, материалов, композиций и/или дозовых форм, которые подходят для применения в контакте с тканями человека и животных в рамках надежного медицинского суждения, без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергических реакций или других проблем или осложнений, соразмерно с разумным соотношением пользы и риска.

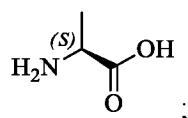
Термин “фармацевтически приемлемые соли” означает такие соли соединений, приведенных здесь, которые получены при реакции соединения, содержащего определенный заместитель, приведенный здесь, с относительно нетоксичной кислотой или основанием. Когда приведенные здесь соединения содержат относительно кислую функциональную группу, то можно получить соль присоединения основания при реакции соединения с достаточным количеством основания в чистом растворе или подходящем инертном растворителе. Когда приведенные здесь соединения содержат сравнительно основную функциональную группу, то можно получить соль присоединения кислоты при реакции соединения с достаточным количеством кислоты в чистом растворе или подходящем инертном растворителе. Некоторые конкретные соединения, приведенные здесь, содержат как основные, так и кислотные функциональные группы, и могут быть преобразованы в любые соли присоединения основания или кислоты.

Фармацевтически приемлемые соли, приведенные здесь, могут быть получены из исходных соединений, содержащих кислотную или основную группировку, стандартными химическими методами. Как правило, такие соли могут быть получены при реакции соединения в виде свободной кислоты или основания со стехиометрическим количеством соответствующего основания или кислоты в воде, органическом растворителе либо их смеси.

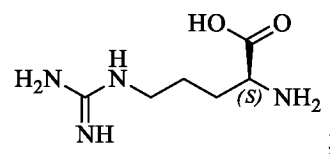
“Аминокислоты” относятся к встречающимся в природе и синтетическим

аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, выполняющим функции, аналогичные природным аминокислотам. Природные аминокислоты – это те, которые кодируются генетическим кодом, а также те, которые впоследствии подвергаются модификации, такие как гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксиглутаминовая кислота и O-фосфосерин. Аналоги аминокислот – это соединения, которые имеют такую же основную химическую структуру (напр.,  $\alpha$ -углерод, связанный с водородом, карбоксильную группу, аминогруппу или R-группу), что и природные аминокислоты, как-то гомосерин, норлейцин, метионин-сульфоксид и метионин-метилсульфоний. Такие аналоги могут содержать модифицированную R-группу (напр., норлейцин) или модифицированный пептидный каркас, но сохраняют такую же основную химическую структуру, что и встречающиеся в природе аминокислоты. Миметики аминокислот – это химические соединения, структура которых отличается от общей химической структуры аминокислот, но выполняют функции, аналогичные функциям встречающихся в природе аминокислот.

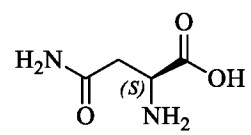
В настоящем изобретении A или Ala означает аланин, имеющий структуру



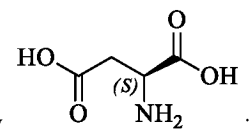
R или Arg означает аргинин, имеющий структуру



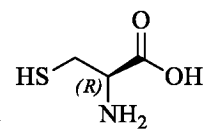
N или Asn означает аспарагин, имеющий структуру



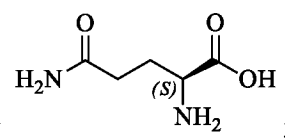
D или Asp означает аспарагиновую кислоту, имеющую структуру



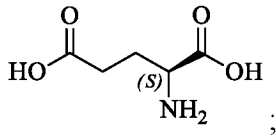
C или Cys означает цистеин, имеющий структуру



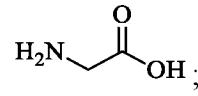
Q или Gln означает глутамин, имеющий структуру



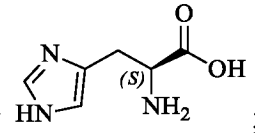
E или Glu означает глутаминовую кислоту, имеющую структуру



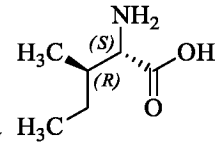
G или Gly означает глицин, имеющий структуру



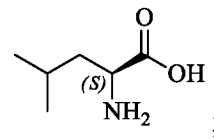
H или His означает гистидин, имеющий структуру



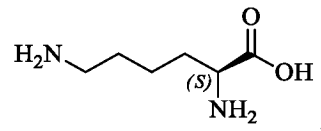
I или Ile означает изолейцин, имеющий структуру



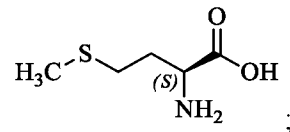
L или Leu означает лейцин, имеющий структуру



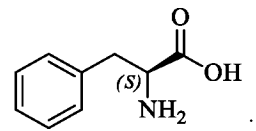
K или Lys означает лизин, имеющий структуру



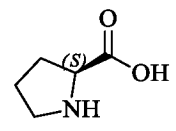
M или Met означает метионин, имеющий структуру



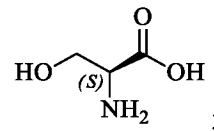
F или Phe означает фенилаланин, имеющий структуру



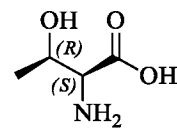
P или Pro означает пролин, имеющий структуру



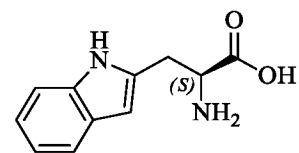
S или Ser означает серин, имеющий структуру



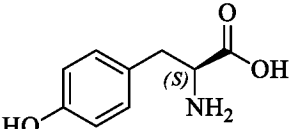
T или Thr означает треонин, имеющий структуру



W или Trp означает триптофан, имеющий структуру





Y или Tyr означает тирозин, имеющий структуру  ;

V или Val означает валин, имеющий структуру .

Термин “лечение” включает подавление, замедление, приостановку или регрессию существующих симптомов либо прогрессирования или тяжести заболевания у пациента.

Если не указано иначе, термин “изомеры” охватывает геометрические изомеры, цис- или транс-изомеры, стереоизомеры, энантиомеры, оптические изомеры, диастереомеры и таутомеры.









Представленные здесь соединения могут находиться в определенной геометрической или стереоизомерной форме. Настоящим изобретением предусмотрены все такие соединения, в том числе цис- и транс-изомеры, (–)- и (+)-энантиомеры, (R)- и (S)-энантиомеры, диастереоизомеры, (D)-изомеры, (L)-изомеры, а также рацемические смеси и другие смеси, к примеру, смеси, обогащенные энантиомерами или диастереоизомерами, которые все входят в рамки настоящего изобретения. Заместители типа алкилов могут содержать дополнительный асимметричный атом углерода. Все эти изомеры и их смеси входят в объем настоящего изобретения.

Если не указано иначе, термин “энантиомер” или “оптический изомер” означает такие стереоизомеры, которые находятся в зеркальном соотношении друг с другом.

Если не указано иначе, термин “цис-транс-изомер” или “геометрический изомер” возникает из-за неспособности двойной или одинарной связи между образующими кольцо атомами углерода к свободному вращению.

Если не указано иначе, термин “диастереомер” означает стереоизомер, в молекуле которого содержатся два или несколько хиральных центров и который не находится в зеркальном соотношении между молекулами.

Если не указано иначе, “(+)” означает декстроизомер, “(–)” означает левоизомер, а “(±)” означает рацемат.

Если не указано иначе, клинообразная сплошная связь () и клинообразная пунктирная связь () обозначают абсолютную конфигурацию стереоцентра; прямая сплошная связь () и прямая пунктирная связь () обозначают относительную конфигурацию стереоцентра; волнистая линия () обозначает клинообразную сплошную связь () либо клинообразную пунктирную связь (); или же волнистая линия ()

обозначает прямую сплошную связь (—) либо прямую пунктирную связь (⋯).

Если не указано иначе, термин “обогащенный одним изомером”, “обогащенный изомерами”, “обогащенный одним энантиомером” или “обогащенный энантиомерами” означает, что содержание одного изомера или энантиомера составляет менее 100%, а содержание изомеров или энантиомеров составляет 60% или больше, либо 70% или больше, либо 80% или больше, либо 90% или больше, либо 95% или больше, либо 96% или больше, либо 97% или больше, либо 98% или больше, либо 99% или больше, либо 99,5% или больше, либо 99,6% или больше, либо 99,7% или больше, либо 99,8% или больше, либо 99,9% или больше.

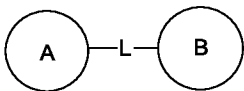
Если не указано иначе, термин “изомерный избыток” или “энантиомерный избыток” означает разность между относительным процентным соотношением двух изомеров или двух энантиомеров. Например, если один изомер или энантиомер присутствует в количестве 90%, а другой изомер или энантиомер присутствует в количестве 10%, то изомерный избыток или энантиомерный избыток (значение ее) составляет 80%.

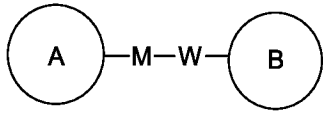
Оптически активные (R)- и (S)-изомеры либо D- и L-изомеры могут быть получены методами хирального синтеза или с помощью хиральных реагентов или же другими стандартными методами. Если нужно получить один вид энантиомера определенного соединения, приведенного здесь, то требуемый чистый энантиомер может быть получен методом асимметрического синтеза или под действием хирального производного вспомогательного вещества с последующим разделением полученной смеси диастереомеров и отщеплением вспомогательной группы. С другой стороны, если молекула содержит основную функциональную группу (типа аминогруппы) или кислотную функциональную группу (типа карбоксильной), то соединение реагирует с соответствующей оптически активной кислотой или основанием с образованием соли диастереомерного изомера, которую затем подвергают диастереомерному разделению принятым в данной области методом, получая чистый энантиомер. Кроме того, энантиомеры и диастереоизомеры обычно выделяют методом хроматографии с использованием хиральной неподвижной фазы и необязательно в сочетании с получением химических производных (например, с получением карбамата из амина).

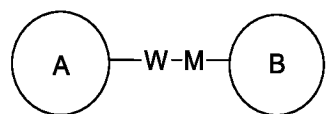
Представленные здесь соединения могут содержать неестественную долю атомных изотопов на одном или нескольких атомах, входящих в состав соединения. К примеру, соединения могут быть помечены такими радиоизотопами, как тритий ( $^3\text{H}$ ), йод-125 ( $^{125}\text{I}$ ) или же С-14 ( $^{14}\text{C}$ ). В качестве другого примера можно заменить водород на тяжелый

водород, получая дейтерированные препараты. Связь между дейтерием и углеродом более прочная, чем связь между обычным водородом и углеродом. По сравнению с недейтерированными препаратами дейтерированные препараты обладают преимуществами в уменьшении токсических побочных эффектов, повышении стабильности, усилении эффективности и продлении биологического периода полураспада препаратов. Все изменения изотопного состава приведенных здесь соединений, независимо от радиоактивности, входят в рамки настоящего изобретения.


Когда у приведенной здесь соединительной группы не указано её направление связывания, то направление её связывания будет произвольным. Например, когда

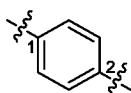
соединительная группа L в  представлена -M-W-, то -M-W- может соединяться с кольцом A и кольцом B в том же направлении, что и порядок считывания

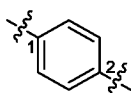
слева направо, образуя , или же может соединяться с кольцом A и кольцом B в обратном направлении, чем порядок считывания, образуя



. Комбинации соединительных групп, заместителей и/или их вариантов допускаются только тогда, когда такие комбинации могут привести к получению стабильных соединений.

Если не указано иначе, когда группа содержит один или несколько соединяемых участков, то любой один участок или несколько участков этой группы могут соединяться с другими группами посредством химических связей. Когда положение соединения у химической связи является переменным и имеются атомы Н в местах присоединения, то с присоединением химической связи количество атомов Н в этом месте будет соответственно уменьшаться по мере возрастания количества присоединяемых химических связей и группа превратится в группу с соответствующей валентностью. Химическая связь между этим местом и другими группами может быть представлена в виде прямой сплошной связи (—), прямой пунктирной связи (---) либо волнистой линии (~~~~). Например, прямая сплошная связь в -ОН<sub>2</sub> означает то, что эта группа соединяется с другими группами через атом кислорода в группе; прямая пунктирная связь в  означает то, что эта группа соединяется с другими группами через два конца атома



азота в группе; волнистая линия в  означает то, что эта группа с другими группами через 1-й и 2-й атомы углерода у фенильной группы.

Если не указано иначе, термин “С<sub>1-3</sub>-алкил” применяется для обозначения линейной или разветвленной группы у насыщенных углеводородов, состоящей из 1-3 атомов углерода. С<sub>1-3</sub>-алкильная группа охватывает С<sub>1-2</sub>- и С<sub>2-3</sub>-алкильные группы и т.п. Они могут быть одновалентными (напр., метил), двухвалентными (напр., метилен) или поливалентными (напр., метенил). Примеры С<sub>1-3</sub>-алкильных групп включают, без ограничения, метил (Me), этил (Et), пропил (в том числе *n*-пропил и изопропил) и т.п.

Структура приведенных здесь соединений может быть проверена стандартными методами, хорошо известными специалистам в данной области. Если настоящее изобретение касается абсолютной конфигурации соединения, то абсолютная конфигурация может быть проверена стандартными методами в данной области, такими как рентгеновская дифракция на отдельных кристаллах (SXRД). При рентгеновской дифракции на отдельных кристаллах (SXRД) данные об интенсивности дифракции на выращенном монокристалле получают на дифрактометре Bruker D8 venture с источником излучения CuKα в режиме сканирования φ/ω scan; после получения соответствующих данных проводится дополнительный анализ кристаллической структуры прямым методом (Shelxs97) для проверки абсолютной конфигурации.

Представленные здесь соединения могут быть получены различными методами синтеза, хорошо известными специалистам в данной области, включая следующие пронумерованные воплощения, воплощения, образующиеся из следующих пронумерованных воплощений в сочетании с другими методами химического синтеза, и эквиваленты, хорошо известные специалистам в данной области. Альтернативные воплощения включают, без ограничения, приведенные здесь примеры.

Растворители, которые используются в настоящем изобретении, коммерчески доступны.

В настоящем изобретении применяются следующие сокращения: aq означает водный; eq означает эквивалент или эквивалентность; DCM означает дихлорметан; PE означает петролейный эфир; DMSO означает диметилсульфоксид; MeOH означает метанол; Boc означает *tert*-бутоксикарбонил, который является защитной группой для аминов; Dde означает (4,4-диметил)-2,6-диоксоциклогексиден)этил, который является защитной группой для боковых цепей аминокислот; r.t. означает комнатную температуру; O/N означает в течение ночи; THF означает тетрагидрофуран; Boc<sub>2</sub>O означает ди-*tert*-

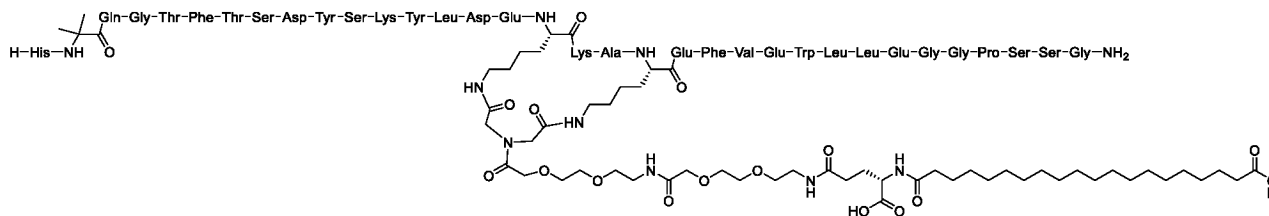
бутилдикарбонат; TFA означает трифторуксусную кислоту; DIEA означает диизопропилэтиламин; DMF означает N,N-диметилформамид; HBTU означает O-(бензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурионий гексафторфосфат; HOBT означает 1-гидроксibenзотриазол; HOAT означает 1-гидрокси-7-азабензотриазол; DIC означает N,N'-диизопропилкарбодиимид; DBU означает 1,8-дизабицикло[5.4.0]ундец-7-ен; PhSiH<sub>3</sub> означает фенилсилан; Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> означает тетракис(трифенилфосфин)палладий; AEEA означает 2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)уксусную кислоту; DIEA означает диизопропилэтиламин.

Соединения именуется согласно общим принципам присвоения названий в данной области или с помощью программы ChemDraw<sup>®</sup>, а коммерчески доступные соединения именуется согласно их названиям из каталога поставщиков.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

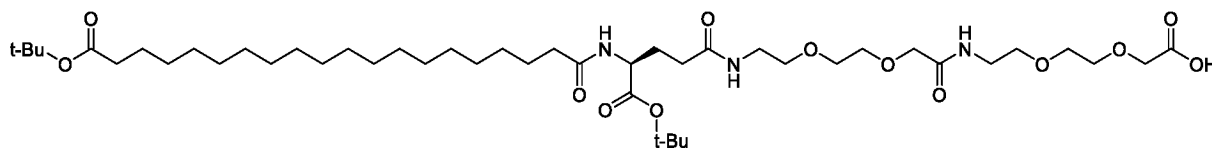
Настоящее изобретение подробно описано ниже при помощи примеров. Однако это не значит, что эти примеры налагают какие-либо неблагоприятные ограничения на настоящее изобретение. Настоящее изобретение было подробно описано здесь, и воплощения также описаны здесь. Специалистам в данной области должно быть ясно, что в приведенные здесь воплощения можно вносить различные изменения и модификация без отступления от сути и объема, изложенных здесь.

### Пример 1. Получение WX001



WX001

### Синтез промежуточного соединения 1



Промежуточное соединение 1

### 1. Крепление к смоле промежуточного соединения 1

1.1 Взвешивали 5,0 г 2-хлортритилхлоридной смолы (смола 2-СТС, степень замещения S=1,00 ммоль/г) и 1,93 г Fmoc-AEEA-OH и вносили в реакционную колонку, а затем добавляли DCM (40 мл). Затем в реакционную колонку добавляли DIEA (3,5 мл) и продували систему азотом в течение 2 ч. Затем в реакционную колонку добавляли MeOH

(5 мл) и еще раз продували систему азотом в течение 30 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 минуте, и выпускали жидкость из реакционной колонки до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

1.2 В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (100 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (100 мл), каждый раз по 1 минуте. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

## **2. Присоединение аминокислот**

### **2.1. Присоединение Fmoc-AEEA-OH**

1. Взвешивали Fmoc-AEEA-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (30 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

2. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 20 минут. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

3. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF, каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

### **2.2. Присоединение Fmoc-Glu-OtBu**

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (100 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Glu-OtBu (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (30 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (100 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

### **2.3. Присоединение 20-(трет-бутокси)-20-оксоикозаноевой кислоты**

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (100 мл) и продували

систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (100 мл), каждый раз по 1 минуте. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали 20-(*трет*-бутокси)-20-оксоикозановую кислоту (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (30 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF, каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

### **3. Отщепление и сушка неочищенного пептида**

3.1 Готовили раствор для отщепления в соответствии со следующим объемом: HFIP/DCM = 20/80.

Заливали 100 мл приготовленного раствора для отщепления в реактор, содержащий высушенную смолу с пептидом. Реактор продували в течение 20 минут. Смесь фильтровали, а фильтрат добавляли в колбу. Эту операцию повторяли дважды. Собранный дважды раствор для отщепления упаривали досуха на ротаторном испарителе, получая 4,3 г неочищенного пептида.

### **Синтез WX001**

#### **1. Прикрепление к смоле**

1.1 Взвешивали 1,43 г 4-(2',4'-диметоксифенил-Fmoc-аминометил)-феноксиацетамидо-метилдифенилметиламиновой смолы (смола Rink Amide MBHA, степень замещения Sub=0,28 ммоль/г) и вносили в реакционную колонку. Затем в реакционную колонку добавляли DCM (50 мл) и продували систему азотом в течение 2 ч. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 минуте, и выпускали жидкость из реакционной колонки до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

1.2 В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (100 мл), каждый раз по 1 минуте. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока

она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

## **2. Присоединение аминокислот**

### **2.1. Присоединение Fmoc-Gly-OH**

1. Взвешивали Fmoc-Gly-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

2. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

3. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

### **2.2. Присоединение Fmoc-Ser(tBu)-OH**

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

### **2.3. Присоединение Fmoc-Ser(tBu)-OH**

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Ser(tBu)-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В



реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF, каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.4. Присоединение Fmoc-Pro-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Pro-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.5. Присоединение Fmoc-Gly-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с хлоранилом, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Gly-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с хлоранилом, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.6. Присоединение Fmoc-Gly-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Gly-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.7. Присоединение Fmoc-Glu(OtBu)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.8. Присоединение Fmoc-Leu-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Leu-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.9. Присоединение Fmoc-Leu-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Leu-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.10. Присоединение Fmoc-Trp(Вос)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она

не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Trp(Boc)-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.11. Присоединение Fmoc-Glu(OtBu)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.12. Присоединение Fmoc-Val-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Val-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.).

Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.13. Присоединение Fmoc-Phe-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Phe-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.14. Присоединение Fmoc-Glu(OtBu)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF

(по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.15. Присоединение Fmoc-Lys(Dde)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Lys(Dde)-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.16. Присоединение Fmoc-Ala-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Ala-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.17. Присоединение Fmoc-Lys(Boc)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували

систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Lys(Boc)-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.18. Присоединение Fmoc-Lys(Alloc)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Lys(Alloc)-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.19. Присоединение Fmoc-Glu(OtBu)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Glu(OtBu)-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.20. Присоединение Fmoc-Asp(OtBu)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Asp(OtBu)-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.21. Присоединение Fmoc-Leu-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Leu-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.



3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.22. Присоединение Fmoc-Tyr(tBu)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Tyr(tBu)-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.23. Присоединение Fmoc-Lys(Boc)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Lys(Boc)-OH (6,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (12,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HATU (5,70 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет

вытекать.

#### 2.24. Присоединение Fmoc-Ser(tBu)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (12,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HATU (5,70 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.25. Присоединение Fmoc-Tyr(tBu)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Tyr(tBu)-OH (6,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (12,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HATU (5,70 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.26. Присоединение Fmoc-Asp(OtBu)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех

пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Asp(OtBu)-OH (6,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли HOAT (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты и HOAT добавляли DIC (6,0 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 1 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.27. Присоединение Fmoc-Ser(tBu)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Ser(tBu)-OH (6,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (12,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HATU (5,70 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.28. Присоединение Fmoc-Thr(tBu)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В

реакционную колонку добавляли DIEA (12,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HATU (5,70 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.29. Присоединение Fmoc-Phe-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Phe-OH (6,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (12,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HATU (5,70 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

#### 2.30. Присоединение Fmoc-Thr(tBu)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Thr(tBu)-OH (6,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (12,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HATU (5,70 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу

тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

### 2.31. Присоединение Fmoc-Gly-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Phe-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,00 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HATU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

### 2.32. Присоединение Fmoc-Gln(Trt)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Gln(Trt)-OH (6,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли НОВТ (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты и НОВТ добавляли DIC (6,0 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

### 2.33. Присоединение Fmoc-Aib-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали Fmoc-Aib-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (6,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HATU (2,85 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение ночи. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

### 2.34. Присоединение Boc-His(Trt)-OH

1. В реакционную колонку вносили 20% пиперидина в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с хлоранилом, и она посинела.

2. Взвешивали Boc-His(Trt)-OH (6,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (12,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HATU (5,70 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с хлоранилом, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

### 2.35. Удаление Alloc

1. В реакционную колонку вносили PhSiH<sub>3</sub> (10,0 экв.) и DCM (10 мл) и продували систему азотом. Затем добавляли Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0,1 экв.) и продували систему азотом в течение 20 минут. Проводили реакцию смеси дважды и выпускали жидкость из

реакционной колонки до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

2. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

### 2.36. Присоединение Fmoc-Ida-OH

1. Взвешивали Fmoc-Ida-OH (3,0 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (12,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (5,70 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

2. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

3. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

### 2.37. Присоединение промежуточного соединения 1

1. В реакционную колонку вносили 10% DBU в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 20 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

2. Взвешивали промежуточное соединение 1 (1,50 экв.) и добавляли к вышеуказанной смоле. В реакционную колонку добавляли DIEA (3,0 экв.), а затем DMF (10 мл). Реакционную колонку продували азотом. После растворения аминокислоты добавляли HBTU (1,45 экв.). Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

3. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

4. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

### 2.38. Удаление Dde

1. В реакционную колонку вносили 3% гидразина гидрата в DMF (50 мл) и продували систему азотом в течение 15 минут. Выпускали жидкость из реакционной колонки. Для промывки 5 раз добавляли DMF (50 мл), каждый раз по 1 мин. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

Смолу тестировали с нингидрином, и она посинела.

### 2.39. Замыкание амидного кольца

1. К вышеуказанной смоле в раствор DMF добавляли DIEA (3,0 экв.). Затем в реакционную колонку медленно и по каплям добавляли HATU (1,5 экв.), растворенный в DMF, и продували систему азотом. Подачу азота регулировали так, чтобы смола продувалась равномерно.

2. Проводили реакцию смеси при температуре 25°C в течение 0,5 ч. Смолу тестировали с нингидрином, и она оказалась бесцветной и прозрачной.

3. Реакционный раствор отсасывали. Реакционную колонку 5 раз промывали DMF (по 50 мл), каждый раз по 1 мин, и выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать.

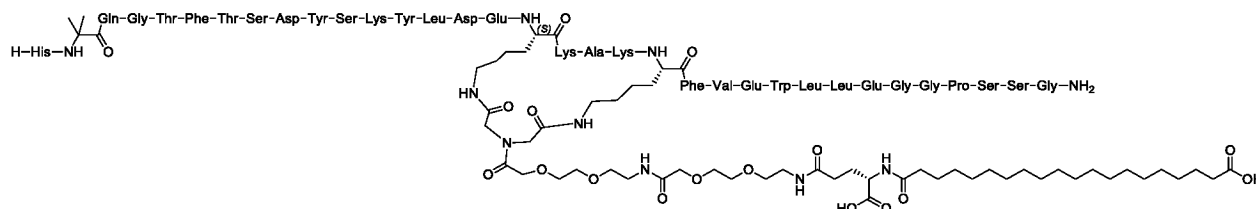
4. Для усадки смолы каждый раз использовали MeOH (50 мл) в течение 3 минут. Из реакционной колонки выпускали жидкость до тех пор, пока она не перестанет вытекать. Смолу сливали и высушивали для последующего использования.

### **3. Отщепление и сушка неочищенного пептида**

3.1 Готовили раствор для отщепления в соответствии со следующим объемом: TFA/триизопропилсилан/H<sub>2</sub>O/3-меркаптопропионовая кислота = 90/2,5/2,5/5.

3.2 В приготовленный раствор для отщепления вносили высушенную смолу с пептидом. Смесь встряхивали на качалке в течение 2,5 часов и фильтровали. Фильтрат вносили в 10-кратный объем ледяного изопропилового эфира. Смесь центрифугировали, 5 раз промывали изопропиловым эфиром и сушили под вакуумом в течение 2 ч, получая неочищенный пептид. Неочищенный пептид отделяли и очищали методом препаративной HPLC (стадия очистки: подвижная фаза ацетонитрил/вода (40%/60%), 0,075% TFA; стадия замены соли: подвижная фаза ацетонитрил/вода (20%/80%), 0,01% ацетата аммония), получая полипептид WX001. Молекулярную массу полипептида проверяли методом ESI-MS: расчетное значение 4660,1, а измеренное значение 4660,2.

### **Пример 2. Получение WX002**



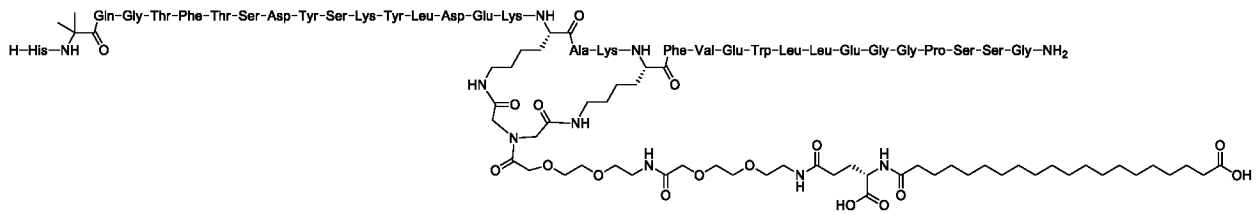
### **WX002**

Полипептид WX002 получали по образцу синтеза WX001. Молекулярную массу полипептида проверяли методом ESI-MS: расчетное значение 4659,2, а измеренное



значение 4659,0.

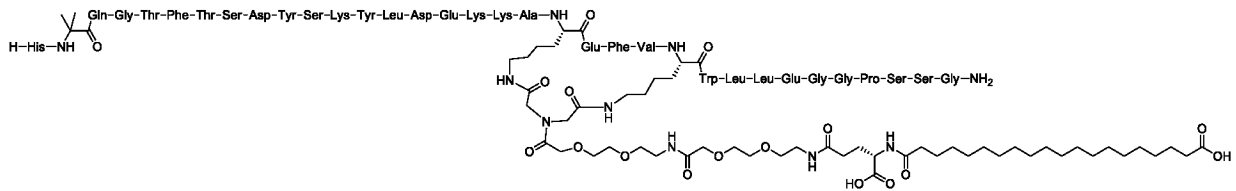
### Пример 3. Получение WX003



#### WX003

Полипептид WX003 получали по образцу синтеза WX001. Молекулярную массу полипептида проверяли методом ESI-MS: расчетное значение 4659,2, а измеренное значение 4659,3.

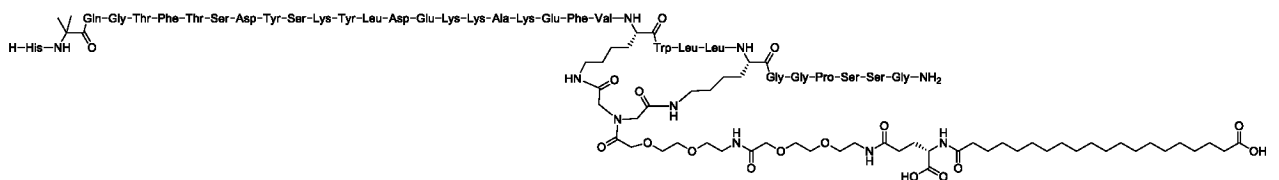
### Пример 4. Получение WX004



#### WX004

Полипептид WX004 получали по образцу синтеза WX001. Молекулярную массу полипептида проверяли методом ESI-MS: расчетное значение 4659,2, а измеренное значение 4659,6.

### Пример 5. Получение WX005



#### WX005

Полипептид WX005 получали по образцу синтеза WX001. Молекулярную массу полипептида проверяли методом ESI-MS: расчетное значение 4658,3, а измеренное значение 4658,7.

### Данные биологических исследований

**Тест-пример 1. Исследование агонистического действия на GLP-1R/GIPR/GCGR in vitro**

#### Основные материалы

##### Клеточные линии

Клеточные линии были сконструированы на фирме Shanghai WuXi AppTec. См.

подробную информацию в табл. 1.

**Таблица 1.** Информация о клеточных линиях

Мишень	Клетки хозяина	Клонирование
GLP-1R	HEK293	н/п
GCGR	HEK293	н/п
GIPR	CHO	н/п

Реагенты и расходные материалы

См. подробную информацию в табл. 2.

**Таблица 2.** Информация о реагентах и расходных материалах

Наименование	Партия	Артикул	Изготовитель
Набор для определения цАМФ	29F	62AM4PEJ	Cisbio
1M HEPES	2120919	15630-106	Invitrogen
Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS)	2185775	14025	Invitrogen
Сывороточный альбумин человека (HSA)	SLCF7301	A1653-10G	Sigma
Казеин	SLCC9458	C4765-10mL	Sigma
3-Изобутил-1-метилксантин (IBMX)	STBF6061V	I5879-5G	Sigma
384-луночный планшет, пригодный для ECHO	0006433672	PP-0200	Labcyte
OptiPlate-384	8210-19481	6007299	PerkinElmer

Приборы

См. подробную информацию в табл. 3.

**Таблица 3.** Информация о приборах

Наименование	Модель	Изготовитель
EnVision	envision2014	PerkinElmer
Vi-счетчик клеток	анализатор жизнеспособности клеток Vi-CELL™ XR	Beckman
Bravo	Bravo V11	Agilent
ECHO	ECHO 555	Labcyte
Центрифуга	центрифуга Allegra™ 25R	Beckman

**Методы**

Материалы для исследования

Буферы для анализа представлены в табл. 4.

**Таблица 4.** Информация о буферах для анализа

Реагент	Концентрация при хранении	Объем	Конечная концентрация
Сбалансированный солевой раствор Хэнкса	1x	48,7 мл/ 44,7 мл	≈1x
Буфер HEPES	1 моль/л	250 мкл	5 мМ
5% раствор казеина в HEPES	5%/	1000 мкл/	0,10%/

+ 10% раствор сывороточного альбумина человека (HSA)	10%	5000 мкл	1%
3-Изобутил-1-метилксантин (IBMX)	500 мМ	50 мкл	0,5 мМ

Приготовление реагента для анализа представлено в табл. 5.

**Таблица 5.** Информация о приготовлении реагента для анализа

Реагент	Концентрация при хранении	Объем	Конечная концентрация
Лизаты клеток	1x	9,5 мл	≈1x
Раствор D2-цАМФ	40x	250 мкл	1x
Раствор антитела к цАМФ	40x	250 мкл	1x

### Метод анализа

#### Приготовление планшета с соединениями

Готовили 4-кратные серийные разведения соединений для анализа с помощью Bravo, получая 10 концентраций при начальной концентрации в 30 мкМ.

#### Перенос соединений

По 100 нл соединений переносили на планшет OptiPlate-384 с помощью ECHO. Планшет OptiPlate-384 центрифугировали 5 сек при 1000 об/мин.

#### Получение суспензии клеток

Пробирку для криоконсервации клеток GLP-1R/GIPR/GCGR быстро помещали в теплую воду при 37°C для оттаивания. Клеточную суспензию переносили в центрифужную пробирку на 15 мл и осторожно промывали 10 мл HBSS. Центрифужную пробирку центрифугировали при 1000 об/мин при комнатной температуре в течение 1 минуты. Супернатант удаляли.

Клетки на дне пробирки осторожно суспендировали и аккуратно промывали 10 мл HBSS. Клетки центрифугировали и осаждали, а затем ресуспендировали в буфере для анализа. Для измерения плотности и жизнеспособности клеток использовали Vi-счетчик.

Концентрацию клеток GLP-1R/GIPR/GCGR доводили до  $2,0 \times 10^5$  на мл с помощью буфера для анализа. По 100 нл разбавленной суспензии клеток переносили на планшет OptiPlate-384. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин.

#### Добавление реагента для анализа

В пустые лунки планшета OptiPlate-384 вносили по 10 мкл разбавленного градиентом стандарта цАМФ 800 нМ. Добавляли 10 мкл реагента для определения цАМФ. Планшет OptiPlate-384 накрывали пленкой TopSeal-A и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. Снимали пленку TopSeal-A и проводили считывание планшета на EnVision.

## Результаты исследования

Результаты исследования представлены в табл. 6.

**Таблица 6.** Результаты анализа агонистического действия на GLP-1R/GCGR/GIPR  
in vitro

ID	Результаты определения активности								
	Агонистическое действие на GLP-1R			Агонистическое действие на GCGR			Агонистическое действие на GIPR		
	EC <sub>50</sub> (нМ)	Макс. доза (нМ)	Макс. активность (%)	EC <sub>50</sub> (нМ)	Макс. доза (нМ)	Макс. активность (%)	EC <sub>50</sub> (нМ)	Макс. доза (нМ)	Макс. активность (%)
WX001	0,02271	20	122,64	0,02669	100	98,93	>20	20	2,26
WX002	0,01692	20	106,52	0,19480	100	144,14	>20	20	4,06
WX003	0,05822	20	111,18	0,62440	100	86,01	>20	20	1,57
WX004	0,04459	20	85,77	0,05312	100	68,62	>20	20	4,12
WX005	0,11220	20	104,24	2,99300	100	140,57	>20	20	1,42

Закключение. Соединения по настоящему изобретению обладают очень сильным агонистическим действием на GLP-1R/GCGR, но не обладают агонистическим действием на GIPR.

**Тест-пример 2. Исследование лекарственной эффективности на мышах DIO – оценка лекарственной эффективности in vivo**

### Цель исследования

Изучение влияния исследуемых соединений на снижение веса у мышей DIO.

### Процедура исследования

После прибытия на объект мышей DIO содержали в помещении вивария со строго контролируемыми условиями окружающей среды. Температура в помещении вивария поддерживалась на уровне 20-24°C, а влажность – на уровне 30-70%. Температура и влажность в помещении вивария отслеживалась в режиме реального времени с помощью термогигрометра, а данные о температуре и влажности регистрировались два раза в день (один раз утром и один раз днем). Освещение в помещении вивария контролировалось с помощью электронной системы освещения по времени. Свет включали на 12 часов и отключали на 12 часов каждый день (включали в 7:00 утра и выключали в 19:00 вечера). Во время исследования животных содержали в отдельных клетках, и в каждой клетке были игрушки. Во время исследования животные имели свободный доступ к пище (корм для роста/разведения крыс и мышей) и воде.

Животным в каждой группе подкожно вводили растворитель или исследуемое соединение (10 нмоль/кг), соответственно. Время введения – 9:30 утра. Частота введения – один раз в три дня, а цикл введения составлял 21 день.

## Результаты исследования

Результаты исследования представлены в табл. 7.

**Таблица 7.** Лекарственная эффективность исследуемых соединений на мышцах DIO

Соединение №	Растворитель	WX001	WX004
Δ массы тела в % (сравнение массы тела через 21 день с массой тела в 1-й день)	3,28%	-28,91%	-31,89%

Заклучение. Соединения по настоящему изобретению проявляют превосходную эффективность по снижению веса у мышей DIO.

### Тест-пример 3. Анализ связывания с белками плазмы (РРВ)

#### Цель исследования

Изучение степени связывания исследуемых соединений с альбумином в плазме человека/мышей.

#### Процедура исследования

Подготовка матрикса: в день проведения анализа плазму размораживали в холодной воде и центрифугировали при 3220 об/мин в течение 5 мин для удаления всех сгустков. Измеряли рН полученной плазмы и доводили до рН  $7,4 \pm 0,1$  с помощью 1% фосфорной кислоты или 1N гидроксида натрия, как потребуется.

Процедура разбавления исследуемых соединений: исследуемые соединения растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO), получая исходные растворы с концентрациями 10 мМ и 2 мМ, соответственно. Готовили рабочие растворы в 40 мкМ путем разбавления 2 мкл исходного раствора (2 мМ) в 98 мкл DMSO. Рабочий раствор контрольного соединения в 400 мкМ готовили путем разбавления 10 мкл исходного раствора в 240 мкл DMSO. Рабочий раствор соединения (5 мкл) тщательно перемешивали с пустым матриксом (995 мкл) в соотношении 1:200, получая загрузочный матрикс.

#### Стадии анализа

Переносили равные объемы 30 мкл загрузочного матрикса (n=2) на планшет для сбора образцов для получения проб на момент времени 0 ( $T_0$ ) для определения остатка. Образцы сразу же смешивали с соответствующим чистым буфером до конечного объема 60 мкл, а соотношение объемов плазмы и буфера в каждой лунке составляло 1:1. Затем в пробы  $T_0$  исследуемых соединений добавляли 60 мкл 4%  $H_3PO_4$  в  $H_2O$  и 480 мкл стоп-раствора, содержащего внутренний стандарт. Затем они хранились вместе с другими образцами при 2-8°C для дальнейшей обработки.

Остальные образцы плазмы подвергали преинкубации в инкубаторе с  $CO_2$  при  $37 \pm 1^\circ C$  в течение 30 мин. Все образцы, не содержащие белка (образцы F), и образцы,

загруженные матриксом (230 мкл), переносили в поликарбонатные пробирки (n=2) и проводили ультрацентрифугирование при 37°C и 155000×g (35000 об/мин) в течение 4 ч.

Для получения образцов Т (образцов для анализа) в отдельный 96-луночный планшет (планшет для инкубации образцов) переносили дополнительные образцы, содержащие матрикс, и инкубировали при 37°C в течение 4 ч.

По окончании центрифугирования переносили не содержащие белка образцы по 30 мкл и образцы Т по 30 мкл со второго слоя супернатанта (под верхним слоем) на новый планшет для сбора образцов. Каждый образец смешивали с соответствующим чистым буфером или матриксом до конечного объема 60 мкл при соотношении объемов матрикса и буфера 1:1. Во все образцы добавляли 60 мкл 4%-го водного раствора  $H_3PO_4$  и 480 мкл стоп-раствора (с внутренним стандартом). Смесь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин и отбирали 100 мкл супернатанта от каждого образца для анализа методом LC-MS/MS.

#### **Результаты исследования**

Результаты исследования представлены в табл. 8.

**Таблица 8.** Результаты исследования PPB

<b>Соединение №</b>	<b>WX001</b>	<b>WX004</b>
Не связавшееся соединение (% PPB) (человек/мышь)	н/п	н/п

Примечание. Н/п означает то, что связывание с белками плазмы является слишком высоким, и при нормальной концентрации белка в плазме свободный препарат не обнаруживается.

Заключение. Соединения по настоящему изобретению проявляют чрезвычайно высокое связывание с белками плазмы.

#### **Тест-пример 4. Исследование стабильности в плазме (PLS)**

##### Цель исследования

Изучение стабильности исследуемого соединения в плазме нормальных мышей.

##### Процедура исследования

Перед опытом оттаивали свернувшуюся замороженную плазму на водяной бане при 37°C. Плазму центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 минут. При наличии тромбов их удаляли. Значение рН доводили до  $7,4 \pm 0,1$ .

Приготовление раствора исследуемого соединения: исследуемое соединение растворяли в DMSO, получая раствор в 100 мкМ.

К 2 мкл раствора исследуемого соединения (100 мкМ) добавляли 98 мкл чистой

контрольной плазмы, так что конечная концентрация смешанного раствора достигала 2 мкМ. Смешанный раствор инкубировали на водяной бане при 37°C.

Для осаждения белков в каждый момент времени (0, 10, 30, 60 и 120 мин) добавляли по 100 мкл раствора  $\text{H}_3\text{PO}_4$  и 800 мкл стоп-раствора (раствор 200 нг/мл толбутамида и 200 нг/мл лабеталола в 100% метаноле), соответственно, и тщательно перемешивали.

Образцы центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин. Из каждой лунки отбирали по 100 мкл супернатанта для анализа методом LC-MS/MS.

### Результаты исследования

Результаты исследования представлены в табл. 9.

**Таблица 9.** Результаты исследования PLS

Соединение №	WX001
PLS (человек/мышь), $T_{1/2}$ (мин)	>289/>289

Заключение. Соединение по настоящему изобретению обладает превосходной стабильностью в плазме.

### Тест-пример 5. Фармакокинетическая оценка соединений на мышах

#### Цель исследования

Изучение фармакокинетики соединений на мышах C57BL/6.

#### Процедура исследования

Изучали фармакокинетические характеристики соединений на грызунах после подкожной инъекции по стандартной методике. При этом готовили соединения-кандидаты в виде прозрачного раствора и вводили мышам путем однократной подкожной инъекции (SC, 0,048 моль/кг). Растворителем для подкожных инъекций служил цитратный буфер (20 мМ, pH=7). Собирали цельную кровь и получали плазму. Концентрацию препаратов определяли методом LC-MS/MS, а фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью программного обеспечения Phoenix WinNonlin.

### Результаты исследования

Результаты исследования представлены в табл. 10.

**Таблица 10.** Результаты фармакокинетического анализа

Соединение №	Макс. концентрация в плазме (нМ)	$T_{\max}$ (ч)	Время полураспада $T_{1/2}$ (ч)	Интеграл концентрации в плазме $\text{AUC}_{0-72\text{ч}}$ (нМ·ч)
WX001	46	8	21	1809
WX004	36	12	22	1161

Заключение. Соединения по настоящему изобретению проявляют превосходные фармакокинетические свойства на мышах.

#### **Тест-пример 6. Фармакокинетическая оценка соединений на макаках**

##### Цель исследования

Изучение фармакокинетики соединений на яванских макаках.

##### Процедура исследования

Изучали фармакокинетические характеристики соединений на млекопитающих после подкожной инъекции по стандартной методике. При этом готовили соединения-кандидаты в виде прозрачного раствора и вводили яванским макакам путем однократной подкожной инъекции (SC, 0,02 моль/кг). Растворителем для подкожных инъекций служил цитратный буфер (20 мМ, pH=7). Собирали цельную кровь и получали плазму. Концентрацию препаратов определяли методом LC-MS/MS, а фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью программного обеспечения Phoenix WinNonlin.

##### **Результаты исследования**

Результаты исследования представлены в табл. 11.

**Таблица 11. Результаты фармакокинетического анализа**

Соединение №	Макс. концентрация в плазме (нМ)	T <sub>max</sub> (ч)	Время полураспада T <sub>½</sub> (ч)	Интеграл концентрации в плазме AUC <sub>0-240ч</sub> (нМ·ч)
WX001	43	24	93	5510
WX004	48	32	67	5719

Заключение. Соединения по настоящему изобретению проявляют превосходные фармакокинетические свойства на макаках.

#### **Тест-пример 7. Проверка лекарственной эффективности in vivo на модели STZ-NASH у мышей**

##### Цель исследования

Проверка лекарственной эффективности исследуемого вещества на модели NASH, индуцированной стрептозотоцином (STZ) + диетой с высоким содержанием жиров (HFD) у мышей C57BL/6.

##### Процедура исследования

Постановка модели. Новорожденным мышам подкожно вводили STZ (по 200 мкг на мышь) в пределах 48 часов после рождения. После 4 недель грудного вскармливания отбирали животных с уровнем глюкозы в крови натощак >12 ммоль/л и начинали их кормить HFD в течение 6 недель подряд, чтобы окончательно поставить модель NASH.



Отбирали еще 8 животных без введения STZ и кормления HFD (группа нормального контроля).

Схема введения. Введение соединения начинали после одной недели кормления HFD, а первый день введения назначали как день 1. Затем продолжали подкожное введение мышам каждые два дня в течение 5 недель подряд.

Диагностика в конечной точке исследования. Проводили патологическое окрашивание гематоксилином-эозином и окрашивание красителем пикро-сириус красный.

### **Результаты исследования**

Результаты исследования представлены в табл. 13.

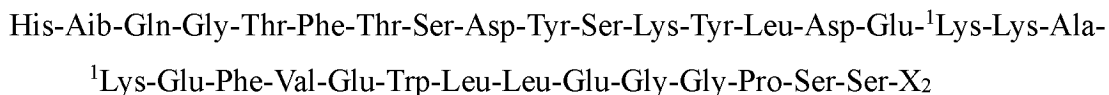
**Таблица 13.** Патологические показатели животных на модели STZ-NASH в конечной точке

	<b>Контрольная группа растворителя для модели</b>	<b>Контрольная группа растворителя для модели</b>	<b>WX001 (20 нмоль/кг)</b>
Показатель стеатоза	0	2,54	1,00
Показатель воспаления	0	1,67	1,63
Показатель выпячивания	0	1,29	0
Показатель NAS	0	5,50	2,63
Фиброз (%)	0,71	1,11	1,21

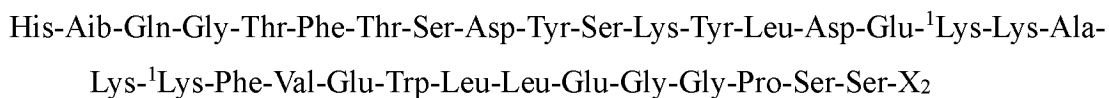
Заключение. Соединение по настоящему изобретению способно значительно улучшить показатель NAS на модели STZ-NASH у мышей.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

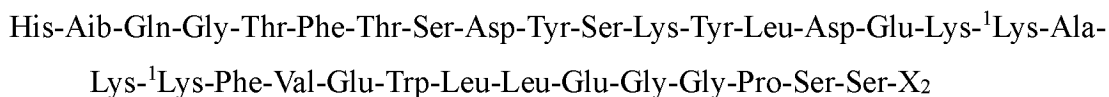
1. Полипептид, представленный последовательностью, приведенной ниже:



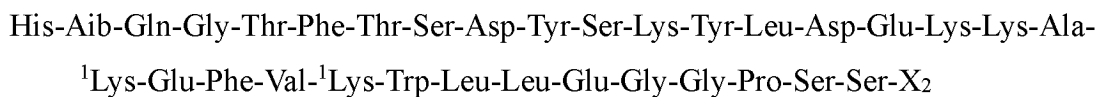
(I-1)



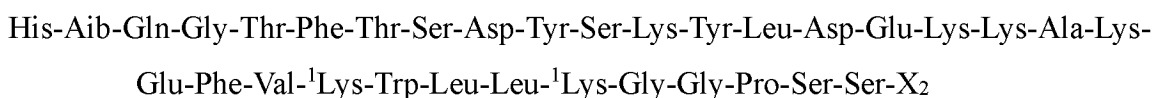
(I-2)



(I-3)

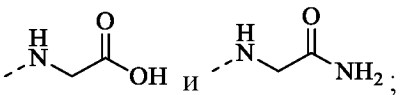


(I-4)




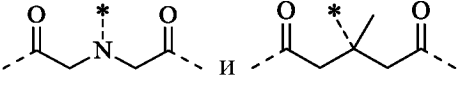
(I-5)

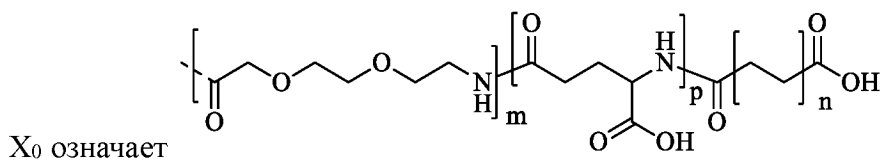
где: структура Aib представляет собой  ;

X<sub>2</sub> выбран из  ;

<sup>1</sup>Lys означает модифицированный лизин, а модификация заключается в том, что

аминогруппы на двух боковых цепях лизина соединяются с образованием  ;

X выбран из  , причем "\*" обозначает положение, связанное с X<sub>0</sub>;



m равно 2 или 3;

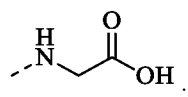
n равно 8, 9 или 10;

p равно 1 или 2.

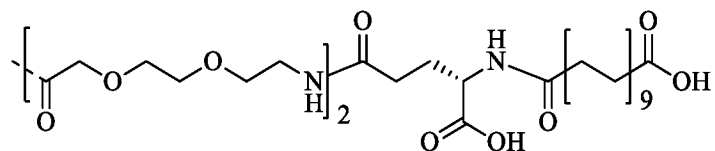
2. Полипептид по п. 1, при этом m равно 2.

3. Полипептид по п. 1, при этом  $n$  равно 9.

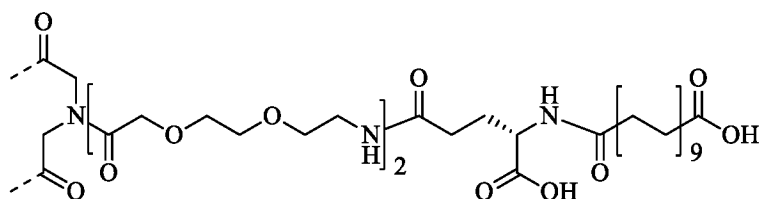
4. Полипептид по п. 1, при этом  $r$  равно 1.

5. Полипептид по п. 1, при этом  $X_2$  представляет собой .

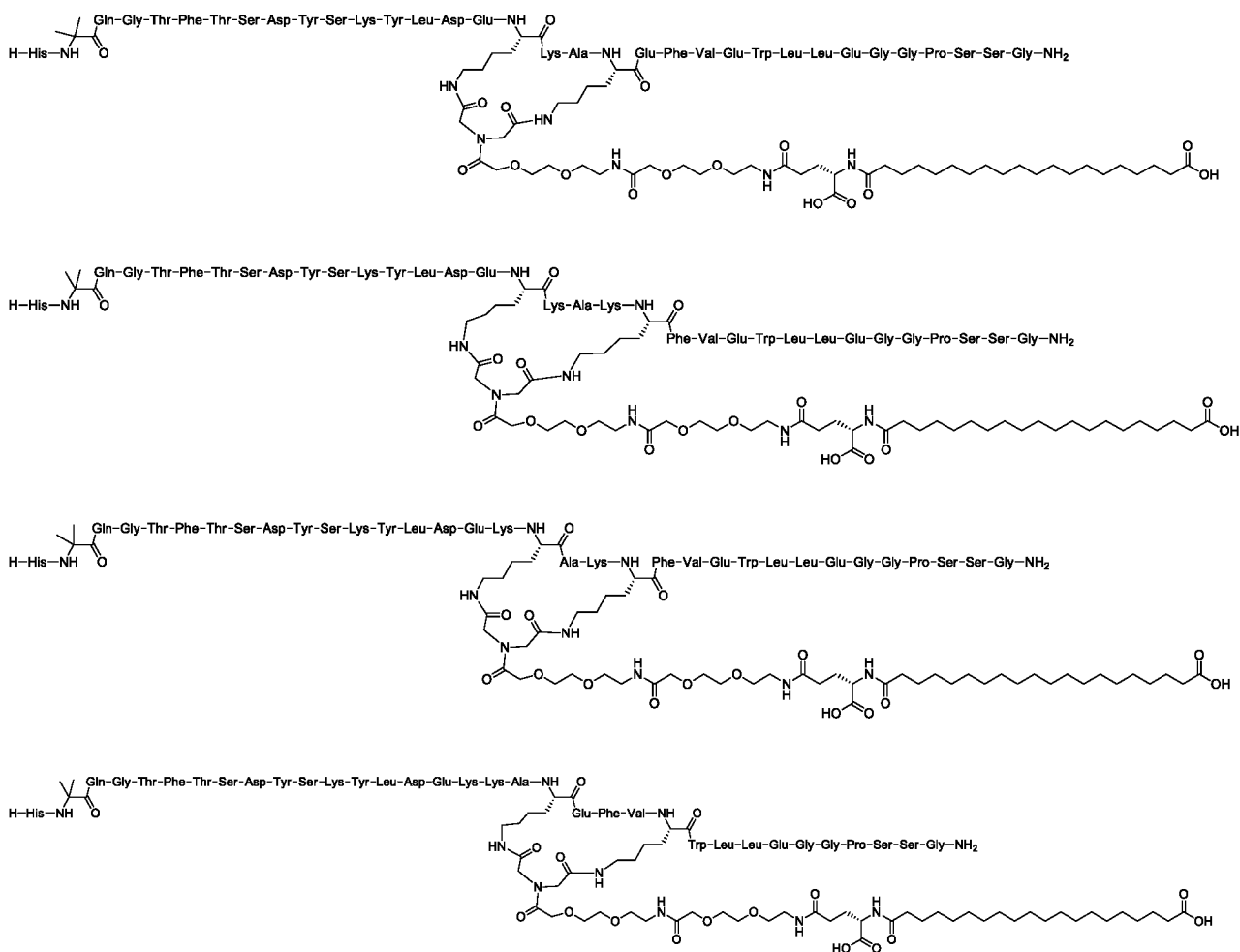
6. Полипептид по п. 1, при этом  $X_0$  представляет собой

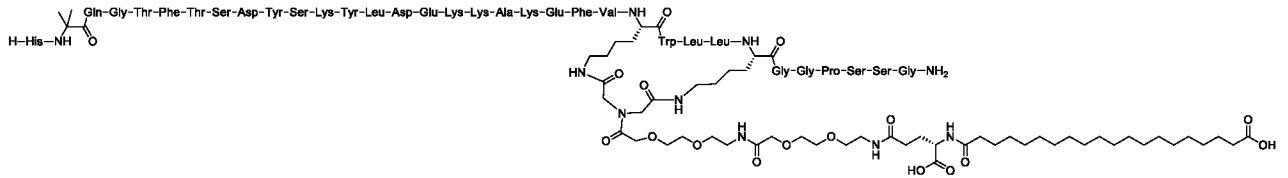


7. Полипептид по п. 1, при этом структурное звено  представляет собой



8. Полипептид, представленный следующими формулами:





9. Применение полипептидного соединения по любому из пп. 1-8 при изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания, связанного с GLP-1R/GCGR.

10. Применение по п. 9, при этом заболевание, связанное с GLP-1R/GCGR, представляет собой ожирение или неалкогольный стеатогепатит.