

Цим винаходом надані способи та напівпродукти для одержання подвійного агоніста рецепторів GIP/GLP1 (глюкозозалежний інсулінотропний поліпептид/глюкагоноподібний пептид-1), тирзепатиду (tirzepatide), або його фармацевтично прийнятної солі.

Цукровий діабет являє собою хронічне захворювання, яке характеризується гіперглікемією, що виникає внаслідок дефектів секреції інсуліну, дії інсуліну або обох. При цукровому діабеті 2 типу ("T2D") поєднані ефекти порушення секреції інсуліну та інсулінорезистентності пов'язуються з підвищеним рівнем глюкози в крові. Подвійний агоніст рецепторів GIP/GLP1, тирзепатид, описаний і заявлений у патенті США 9474780 ("Патент 780"). Тирзепатид може бути корисним в лікуванні T2D.

В US9474780 загалом описані пептиди та спосіб одержання подвійного агоніста рецепторів GIP/GLP1.

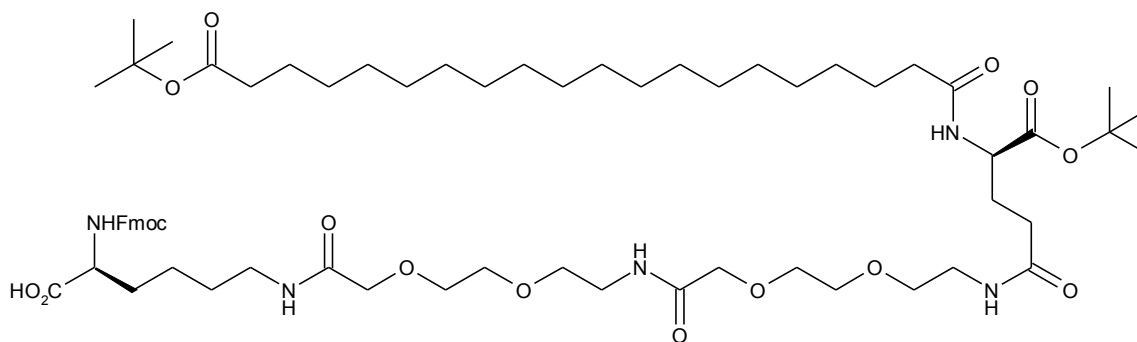
Існує потреба в способах та напівпродуктах, які дозволять вдосконалити технологію виробництва тирзепатиду, що має комбінацію переваг, в тому числі бажану для наданих до реалізації продуктів чистоту. Таким чином існує потреба в ефективних та екологічно чистих, не забруднюючих навколишнє середовище, способах, і в тому числі в стабільних напівпродуктах для одержання тирзепатиду з меншою кількістю етапів очищення. Покращена технологія також необхідна для надання виробничих процесів тирзепатиду, що продукують мінімальну сукупність відходів усіх видів, як для забезпечення підвищеної безпеки для навколишнього середовища, так і для підвищеної безпеки оператора. Виробництво у великих масштабах фармацевтично простого тирзепатиду має ряд складних технічних проблем, які можуть вплинути на загальний вихід та чистоту. Існує потреба в способах, які б дозволяли уникнути використання застосування перехідних металів та/або жорстких умов реакції, які несумісні з синтезом пептидів.

Цей винахід намагається задовольнити ці потреби, пропонуючи нові напівпродукти та способи, прийнятні для виробництва тирзепатиду (SEQ ID NO: 1) або його фармацевтично прийнятної солі. Удосконалені способи виготовлення тирзепатиду за цим винаходом надають напівпродукти та технологічні реакції, які втілюють комбінацію переваг, в тому числі ефективний шлях, що має меншу кількість етапів, одночасно підтримуючи високу якість та чистоту. Важливо, що вдосконалені способи та напівпродукти зменшують ресурсоемність та зводять до мінімального рівня сукупність відходів усіх видів.

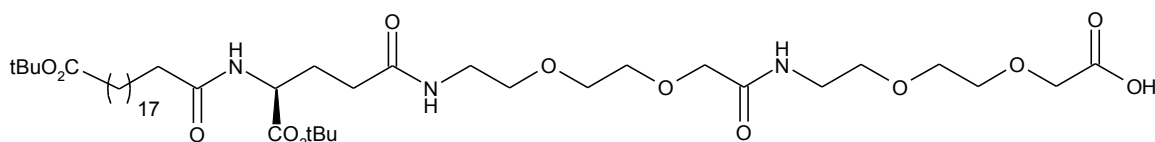
Удосконалені способи, описані в цьому описі, надають різні варіанти одержання напівпродуктів, прийнятних для виробництва тирзепатиду.

Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 17, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 11, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 22, або її фармацевтично прийнятну сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 21, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 20, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 2, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 4, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 7, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 14, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 33, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 32, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 34, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 35, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 36, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 38, або її фармацевтично прийнятна сіль. Цим винаходом надана сполука, що має послідовність SEQ ID NO: 39, або її фармацевтично прийнятна сіль.

Цим винаходом надана сполука формули:



або її фармацевтично прийнятна сіль.
Цим винаходом надана сполука формули:



або її фармацевтично прийнятна сіль.

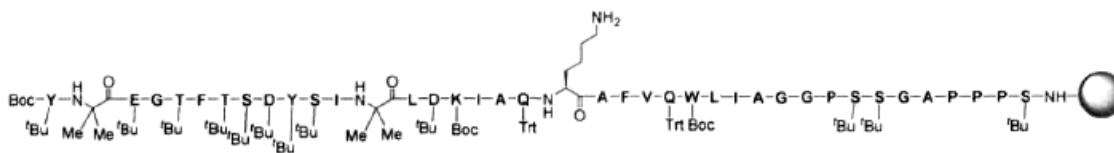
Цим винаходом наданий спосіб, за яким тирзепатид одержують із застосуванням нанофільтрації.

Цим винаходом наданий спосіб одержання тирзепатиду, що включає відщеплення захисної групи сполуки або фармацевтично прийнятної солі сполуки, що має послідовність SEQ ID NO: 22.

Цим винаходом наданий спосіб селективного ацилювання лізинової амінокислоти, де вказана лізинова амінокислота та N-кінець є захищеними. Цим винаходом наданий спосіб селективного ацилювання лізинової амінокислоти в пептиді, що включає сполучення зв'язаного зі смолою пептиду-лізину-NH₂ з трет-бутил-ейкозандіол-Glu-(O-трет-бутил)-(8-аміно-3,6-діоксаоктанова кислота)-(8-аміно-3,6-діоксаоктанова кислота)-OH. Цим винаходом наданий спосіб одержання тирзепатиду, що включає відщеплення захисної групи сполуки, що має послідовність SEQ ID NO: 22, або її фармацевтично прийнятної солі.

Цим винаходом наданий спосіб відщеплення захисної групи тирзепатиду, де розчин для відщеплення захисної групи містить дитіотреїтол, триізопропілсилан та трифтороцтову кислоту.

Цим винаходом наданий спосіб селективного ацилювання лізинової амінокислоти, де зв'язаний зі смолою пептид-лізин-NH₂ являє собою сполуку формули:



або її фармацевтично прийнятну сіль.

Цим винаходом наданий спосіб перетворення депсіпептидного ізомеру на бажаний пептид, що включає: регулювання рН депсіпептидного ізомеру від рН приблизно 7 до рН приблизно 10; та інкубування депсіпептидного ізомеру при значеннях рН від 7 до 10 протягом щонайменше однієї години.

Цим винаходом наданий спосіб перетворення депсіпептидного ізомеру, де рН вказаного депсіпептидного ізомеру регулюють від рН приблизно 8,5 до рН приблизно 9,5.

Цим винаходом наданий спосіб перетворення депсіпептидного ізомеру, де згаданий депсіпептидний ізомер являє собою сполуку, що має послідовність SEQ ID NO: 40, або її фармацевтично прийнятну сіль.

Цим винаходом надана десульфуризація на основі радикалів, що включає контактування пептиду з радикальним ініціатором. В одному з варіантів здійснення цього винаходу десульфуризація включає контактування пептиду, придатного - для десульфуризації, з водорозчинним радикальним ініціатором. В одному з варіантів здійснення цього винаходу радикальним ініціатором є азо-ініціатор. В одному з варіантів здійснення цього винаходу радикальний ініціатор вибирають із групи, яку складають 2,2'-азобіс[2-(2-імідазолін-2-іл)пропан]дигідрохлорид (VA-044) та 2,2'-азобіс (2-метилпротонамідин)дигідрохлорид (VA-050).

Спосіб десульфуризації на основі радикалів, наданий у цьому описі, є бажаним з екологічної точки зору, без перехідних металів та з умовами, сумісними із синтезом пептидів.

У значенні, вживаному в цьому описі, наведені нижче скорочення мають значення, наведені в цьому описі: "SPPS" означає твердофазний синтез пептидів, "Fmoc" означає флуоренілметилоксикарбонілхлорид, "Pip" означає піперидин, "DIC" означає діізопропілкарбодіїмід, "Охута" означає етилціаногідроксиминоацетат, "DCM" означає дихлорметан, "IPA" означає ізопропанол, "MTBE" означає метил-трет-бутиловий простий ефір, "TFA" означає трифтороцтову кислоту, "TIPS" означає триізопропілсилан, "DTT" означає дитіотреїтол, "UPLC" означає ультра вискоефективну рідинну хроматографію, "HFIP" означає гексафторізопропанол, "CTC" означає хлортритил, "HATU" означає (1-[біс(диметиламіно)метиле]-1H-1,2,3-триазоло[4,5-b]піридинію 3-оксидгексафторфосфат, "TFET" означає 2,2,2-трифторетантіол, "DIEA" означає N,N-діізопропілетиламін, "AEEA" означає - 17-аміно-10-оксо-3,6,12,15-тетраокса-9-азагептадеканову

кислоту, "ТСЕР" означає трис(2-карбоксietил)фосфін, "DCU" означає дициклогексилсечовину, "DCC" означає дициклогексилкарбодіімід. "TMSA" означає триметилсиліамід, "HOBt" означає гідроксибензотриазол, "HRMS" означає мас-спектрометрію з високою роздільною здатністю, "LPPS" означає рідкофазовий синтез пептидів, "MSMPR" означає реактор з перемішуванням суспензії і відбором змішаного продукту, "MPA" означає рухому фазу А, "MPB" означає рухому фазу В, "L-GSH" означає відновлений розчин L-глутатіону, "TZP" означає тирзепатид, "AP" означає активний фармацевтичний засіб, а "API" означає активний фармацевтичний інгредієнт, "PyBOP" означає (бензотриазол-1-ілокси)трипіролідінофосфоній гексафторфосфат), "DEA" означає діетиламін, "TBTU" означає 2-(1H-бензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметиламінію тетрафторборат, "TNTU" означає 2-(5-норборнен-2,3-дикарбоксимідо)тетраметилуронію тетрафторборат, "PyOxim" означає 1-ціано-2-етокси-2-оксоетиліденаміноокси-трис-піролідінфосфонію гексафторфосфат, "PyClock" означає 6-хлор-бензотриазол-1-ілокси-трис-піролідінфосфонію гексафторфосфат. Як показано в цьому описі, однолітерні позначення амінокислот подані жирним шрифтом, тоді як атоми показані у вигляді нежирного тексту та загалом меншим шрифтом, щоб відрізнити їх від однолітерних позначень амінокислот. Як вжито в цьому описі, коли позначення амінокислоти з'являється з номером над амінокислотою, вказаний номер стосується відповідного положення амінокислоти в кінцевому тирзепатидному продукті. Нумери надані для зручності, і поява або відсутність таких номерів у послідовності не впливає на амінокислотну послідовність або пептид, зазначений у такій послідовності. Вжитий в цьому описі термін "захисний" означає, що у зазначеному положенні приєднана захисна група. Фахівцю зрозуміло, що добре відомими є різноманітні захисні групи, і для конкретного способу можуть бути прийнятними альтернативні захисні групи.

Фахівцем визнається існування альтернативних смол для побудови пептидів, описаних в цьому описі. Наприклад, фахівцю добре відомі амідні смоли Зібера та Рінка для одержання пептидів, розкритих в цьому описі; однак для одержання пептидів, описаних в цьому описі, можуть бути вибрані альтернативні смоли. Наприклад, але без обмеження, для одержання цільового пептиду можуть бути застосовані 2-СТС та споріднені смоли з подальшим етапом амідування С-кінця.

Побудови твердофазного пептидного синтезу (SPPS) здійснюються із застосуванням стандартних методів Fmoc (флуоренілметилоксикарбонілхлорид)-хімії пептидів, що застосовують послідовні сполучення за допомогою автоматизованого синтезатору пептидів. Смола набухає в DMF, після чого відщеплюють її захисні групи із застосуванням 20 % розчину піперидину (Pip)/DMF (3×30 хв). Для подальшого відщеплення захисних Fmoc груп застосовують обробку 20 % розчином Pip/DMF (3×30 хв), а для більш складних сполучень використовують обробку 4×30 хв. Після відщеплення захисної групи смолу промивають (5×2 хв) 10 об'ємами DMF. Для попередньої активації амінокислот використовують розчини діізопропілкарбодііміду (DIC)/етилціаногідроксііміноацетату (Охума) у DMF при кімнатній температурі протягом 30 хв. Сполучення активованої амінокислоти з пептидом, зв'язаним зі смолою, відбувається протягом визначеного часу для кожної окремої амінокислоти. Промивання розчинником 5×2 хв 10 об'ємами DMF проводять після кожного сполучення. Для виділення кінцевого продукту, зв'язаний зі смолою продукт промивають 5×2 хв 10 об'ємами DCM для видалення DMF. Смолу промивають 2×2 хв 10 об'ємами IPA для видалення DCM, промивають 5×2 хв 10 об'ємами метил-трет-бутилового простого ефіру (MTBE), потім продукт сушать при температурі 40 °C під вакуумом. Зв'язаний із смолою продукт зберігають у холоді (-20 °C). Для дослідження пептид відщеплюють від смоли кислим коктейлем, який складають трифтороцтова кислота (TFA)/H₂O/TIPS (триізопропілсилан)/DTT (дитіотреїтол) у такому співвідношенні: (0,93 (об'єм)/0,04 (об'єм)/0,03 (об'єм)/0,03 (маса). Смолу піддають набуханню в DCM (4-5 мл, 3×30 хв), і зливають. Коктейль для розщеплення (4-5 мл) додають до попередньо розбухлої смоли, і суспензію перемішують протягом 2 год при кімнатній температурі. Розчин фільтрують, потім смолу промивають невеликою кількістю DCM, і об'єднують з розчином для розщеплення. Одержаний розчин вливають у 7-10 об'ємів холодного (0 °C) метил-трет-бутилового простого ефіру (MTBE). Суспензію витримують протягом 30 хв при температурі 0 °C, потім одержаний осад центрифугують, і прозорий розчин зливають.

Залишок суспендують в тому ж об'ємі MTBE, і одержану суспензію знову центрифугують, і декантують. Після декантації прозорий розчин MTBE осажденного пептиду сушать in vacuo при температурі 40 °C протягом ночі.

Синтез Препарату 1

Послідовність SEQ ID NO: 2

Для синтезу застосовують Fmoc амідну смолу Зібера з навантаженням 0,71 ммоль/г.

Застосовують загальну процедуру SPPS з такими модифікаціями:

Цикл	Амінокислота	Умови проведення SPPS Розчинник для сполучення:DMF
1	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	3×30 хв. цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв. промивання після відщеплення захисної групи,

		3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
2	Fmoc-L-Pro-OH	3×30 хв, цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв. промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 6 год. кімнатна температура
3	Fmoc-L-Pro-OH	4×30 хв, цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв. промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 6 год. кімнатна температура
4	Fmoc-L-Pro-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 6 год., кімнатна температура.
5	Fmoc-L-Ala-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год. кімнатна температура.
6	Fmoc-Gly-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год. кімнатна температура.
7	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год., кімнатна температура.
8	Fmoc-L-Ser(t-Bu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год. кімнатна температура.
9	Fmoc-L-Pro-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год., кімнатна температура.
10	Fmoc-Gly-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год. кімнатна температура.

М'який режим гідролізу Препарату 1: Паралельно проводять десять однакових реакцій відщеплення захисної групи, кожна у масштабі ~0,5 ммоль зв'язаного зі смолою Препарату 1, із застосуванням такого протоколу: 1) До 40 мл реактора з фритою додають 1,55 г (~0,5 ммоль) зв'язаного зі смолою Препарату 1. 2) Смола піддають набуханню в DMF (3×15 мл) (кожною разу протягом 15 хв). 3) Обробляють 20 % Pip/DMF (3×15 мл. кожною разу протягом 30 хв). 4) Промивають DMF (4×15 мл). а потім DCM (4×15 мл). 5) До кожного з п'яти 40 мл реакційних флаконів додають 1,5 мл TFA і 28,5 мл DCM. 6) До кожного з флаконів з розчином TFA додають одну п'яту зв'язаного зі смолою Препарату 1 (2,75 г), флакони закривають пробкою, і перемішують на роторному колесі протягом 5 хв. 7) Суміші фільтрують, промивають 100 мл DCM, і одержують загальний об'єм фільтрату 500 мл. 8) Фільтрати об'єднують, і переносять у круглодонну колбу, що містить 1000 мл MTBE. 9) Одержану суспензію концентрують, одержують масло світло-жовтого кольору, розтирають з 200 мл MTBE, і охолоджують на льодяній бані протягом 30 хв. 10) Тверду речовину відфільтровують, промішають 50 мл холодного MTBE, висушують у вакуумній печі при температурі 33 °C протягом ночі, і одержують 5,35 г (вихід 91 %) твердої речовини білого кольору. Виділену тверду речовину досліджують із застосуванням ультра вискоєфективної рідинної хроматографії (98,57 % площі, з 0,99 % об'єднаних побічних продуктів відщеплення захисної групи t-Bu).

Синтез Препарату 2

Послідовність SEQ ID NO: 3

Для синтезу застосовують смола Fmoc-Gly-OH 2-CTC з навантаженням 0,61 ммоль/г.

Застосовують загальну процедуру SPPS з такими модифікаціями:

Цикл	Амінокислота	Умови проведення SPPS
------	--------------	-----------------------

		Розчинник для сполучення: DMF
1	Fmoc-L-Ala-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
2	Fmoc-L-Ile-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
3	Fmoc-L-Leu-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охута 6 год, кімнатна температура.
4	Fmoc-L-Trp (Boc)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 6 год, кімнатна температура.
5	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
6	Fmoc-L-Val-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 6 год, кімнатна температура.
7	Fmoc-L-Phe-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC 3,0 Охута 8 год, кімнатна температура.
8	Fmoc-L-Ala-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
9	Fmoc-Lys(Alloc)-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 8 год, кімнатна температура.
10	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год., кімнатна температура.
11	Fmoc-L-Ala-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
12	Fmoc-L-Ile-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
13	Fmoc-L-Lys (Boc)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи. 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
14	Fmoc-L-Asp(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.

М'який режим гідролізу Препарату 2: До 40 мл скляного сцинтиляційного флакона додають зв'язаний зі смолою Препарат 2 (3,06 г, 1,12 ммоль) та 30 мл 30 % розчину HFIP DCM, і там спостерігається зміна кольору на червоний. Вміст флакону перемішують на роторном) колесі при

температурі навколишнього середовища протягом 1 год. Смолу відфільтровують, і промивають DCM (3×10 мл). Розчинник видаляють in vacuo, і одержують склоподібну піну (35 °С баня, 10 торр (1,33 кПа), 2,34 г), замінюють невеликою порцією IPA (24 мл), після чого при кімнатній температурі краплями протягом 25 хв додають воду (24 мл). Одержаний розчин перемішують протягом 30 хв, і потім фільтрують. Відфільтрований осад промивають (3×10 мл) H₂O, після чого сушать у вакуумній печі при 25 торр (3,33 кПа) і температурі 35 °С протягом ночі. Це призводить до утворення Препарату 2 у вигляді твердої речовини білого кольору (1,81 г).

Синтез Препарату 4 Послідовність SEQ ID NO: 4

Для синтезу застосовують смолу Fmoc-Leu-OH 2-CTC з навантаженням 0,68 ммоль/г. Застосовують загальну процедуру SPPS з такими модифікаціями:

Цикл	Амінокислота	Умови проведення SPPS Розчинник для сиолучення: DMF
1	Fmoc-Aib-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Ftnoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 8 год, кімнатна температура.
2	Fmoc-L-Ile-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 18 год, кімнатна температура.
3	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
4	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
5	Fmoc-L-Asp(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
6	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
7	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
8	Fmoc-L-Phe-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
9	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
10	Fmoc-Gly-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 6 год, кімнатна температура.
11	Fmoc-L-Glu(tBu)-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 6 год, кімнатна температура.
12	Fmoc-Aib-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 8 год, кімнатна температура.

13	Boc-L-Tyr(tBu)-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 18 год, кімнатна температура.
----	-------------------	--

М'який режим гідролізу Препарату 4: До 20 мл скляного сцинтиляційного флакона додають зв'язаний зі смолою Препарат 4 (2,0 г, 0,62 ммоль) та 10 мл 30 % розчину HFIP DCM, і там спостерігається зміна кольору на червоний. Вміст флакону перемішують на роторному колесі при температурі навколишньої середовища, потім смолу відфільтровують, промивають (3×2 мл) DCM, розчинник видаляють in vacuo, і одержують склоподібну липку піну. Вказану піну розчиняють в 5,2 мл DMSO. Цей розчин разом з 6 мл води з однаковими швидкостями потоку протягом 45 хв ($T \sim 15^\circ\text{C}$) поєднують з 1 мл води. Після повного завершення додавання розчину пептиду, протягом 45 хв додатково додають 6 мл води. Під час додавання в осад випадає тверда речовина білого кольору. Одержану суспензію перемішують при температурі 15°C протягом 30 хв. Тверду речовину відфільтровують, промивають 6 мл води, і потім переносять у вакуумну піч при температурі 35°C та 25 торр (3,33 кПа). Препарат 4 (Boc-1-14-OH, 1,0763 г) одержують у вигляді пухнастої твердої речовини білого кольору.

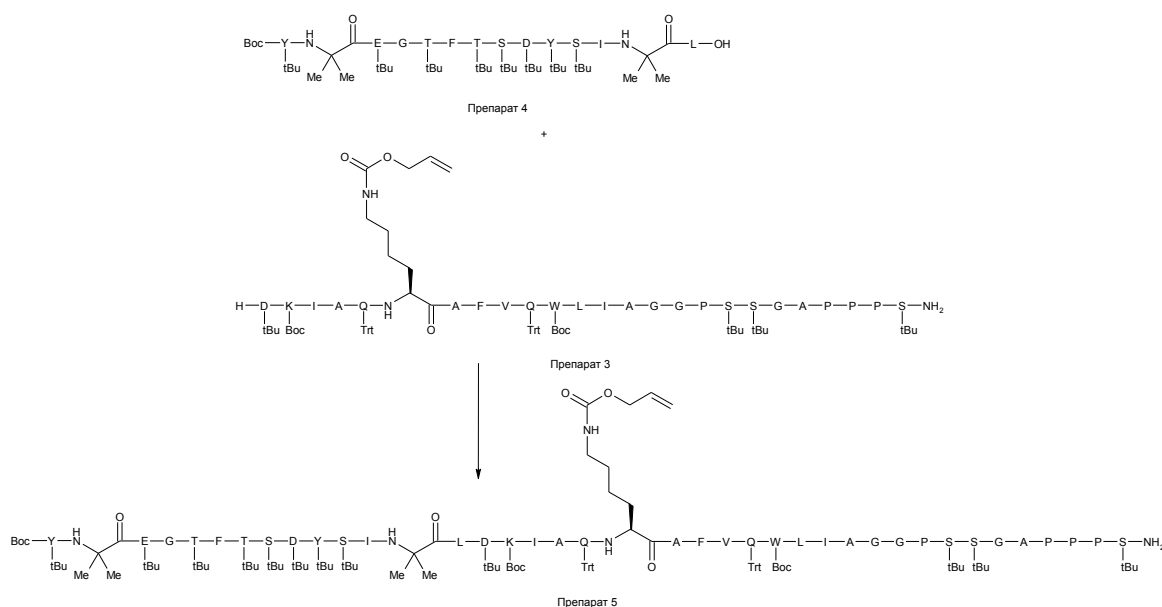
Синтез Препарату 3 із застосуванням LPPS

Послідовність SEQ ID NO: 5

До 20 мл скляного сцинтиляційного флакона додають Препарат 2 (500 мг, 0,183 ммоль). Препарат 1 (179 мг, 0,175 ммоль) та DMSO (10 мл). До цього розчину додають спочатку DIEA (46 мкл, 0,265 ммоль), а потім PyBOP (бензотриазол-1-ілокси) трипіролідинофосфонію гексафторфосфат) (123 мг, 0,230 ммоль). Реакційну суміш перемішують протягом 2 год, потім додають діетиламін (DEA) (183 мкл, 1,77 ммоль), і одержаний розчин перемішують протягом 2 год. Реакційну суміш відбирають у шприц, і додають у 50 мл колбу з перемішуванням вмістом з одночасним додаванням краплями води (12 мл) протягом 1 год. Після завершення додавання осаджений продукт відфільтровують, і промитають водою (2×4 мл). Вологий відфільтрований осад сушать під вакуумом при температурі 35°C протягом 18 год, і одержують Препарат 3 у вигляді твердої речовини білого кольору (0,6003 г, вихід 88 %, HRMS з обчисленням для $\text{C}_{184}\text{H}_{261}\text{N}_{31}\text{O}_{38}$, очікуваний результат: 3512,9444, фактичний результат: 3512,9430).

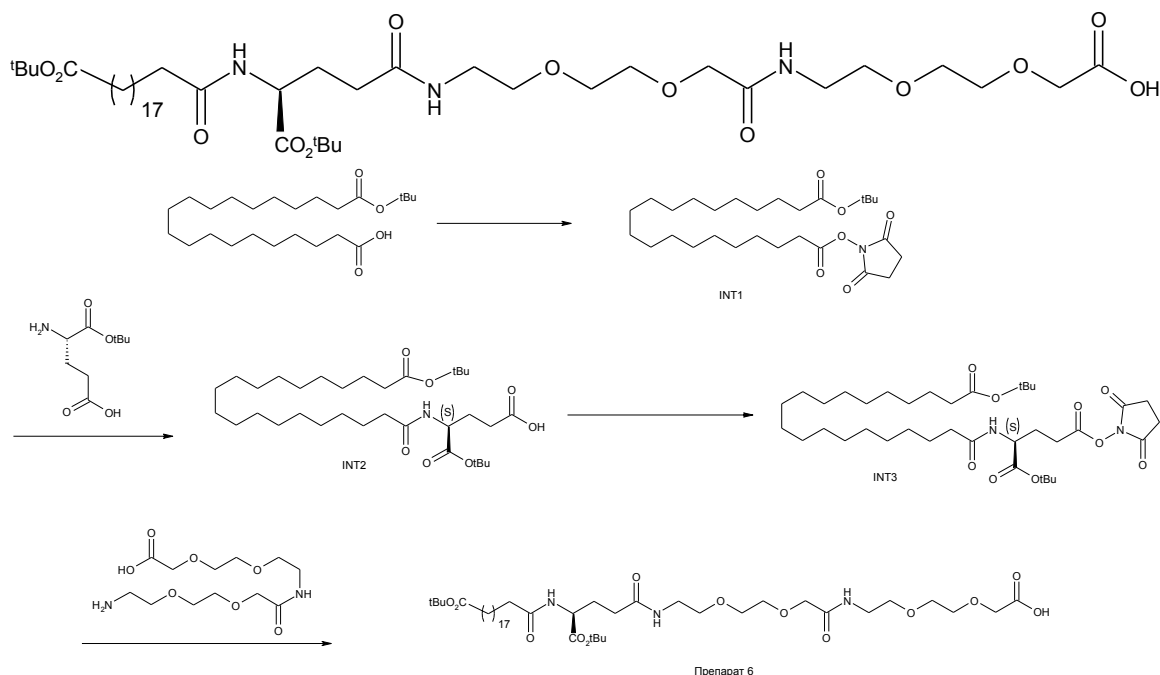
Синтез Препарату 5 із застосуванням LPPS

Послідовність SEQ ID NO: 6



До 20мл скляного сцинтиляційного флакона додають Препарат 3 (338,8 мг, 0,091 ммоль), Препарат 4 (192,1 мг, 0,091 ммоль) та DMSO (10 мл). До цього розчину додають спочатку PyBOP (63,5 мг, 0,118 ммоль), а потім DIEA (79 мкл, 0,454 ммоль). Реакційну суміш перемішують протягом 2,5 год. Реакційну суміш відбирають у шприц, і вміст додають у 50 мл колбу з перемішуванням вмістом з одночасним додаванням краплями води (12 мл) протягом 1 год. Після завершення додавання осаджений продукт відфільтровують, після чого промивають водою (2×4 мл). Вологий відфільтрований осад сушать під вакуумом при температурі 35°C протягом 18 год, і одержують Препарат 5 у вигляді твердої речовини білого кольору (0,3568 г, вихід 70 %, HRMS з обчисленням для $\text{C}_{293}\text{H}_{435}\text{N}_{45}\text{O}_{64}$, очікуваний результат: 5608,2168, фактичний результат: 5608,2066).

Синтез Препарату 6 за Методом 1 (LPPS)
Приклад 1



Ейкозандіоевої кислоти моно(1,1-диметилетиловий) складний ефір (15,0 кг. обмежувальний реагент) та N-гідроксисукцинімід (1,2 екв.) розчиняють у етилацетаті при температурі 27 °С. Додають розчин DCC (1,25 екв.) в етилацетаті, і реакційну суміш перемішують протягом 24 год при температурі 22 °С. Одержаний побічний продукт DCU відфільтровують, після чого органічну фазу тричі екстрагують 5 % водним розчином NaCl. Після екстракції органічну фазу концентрують, випаровують з ізопропанолом, а потім кристалізують додаванням гептану. Після фільтрування відфільтрований осад промивають гептаном, висушують при температурі 25 °С, і одержують 17,0 кг напівпродукту INT1 з виходом 87 % та чистотою 99 %.

N-Glu-OTBu (7,7 кг, 1,1 екв.) розчиняють у DCM (54 л) при температурі 20 °С, потім додають розчин TMSA (11,3 кг) у DCM (7 л), після чого реакційну суміш перемішують протягом 1 год при температурі 40 °С. При кімнатній температурі додають розчин INT1 (17,0 кг) у DCM, і перемішують протягом 8 год. Після завершення реакції DCM замінюють на етилацетат шляхом дистиляції. Органічну фазу тричі промивають 2 % водним розчином KHSO₄/NaCl, потім 4 рази промивають 2 % водним розчином NaCl. Після відокремлення та видалення водних фаз органічну фазу концентрують з ізопропанолом, розбавляють ізопропанолом, і потім кристалізують додаванням води. Після фільтрування відфільтрований осад промивають сумішшю вода/ізопропанол, потім сушать при температурі 30 °С, і одержують 17,3 кг INT2 з виходом 86 % та чистотою 99 %.

INT 2 (17,3 кг) та N-гідроксисукцинімід (4,1 кг, 1,2 екв.) розчиняють у етилацетаті (336 кг) при температурі 27 °С. Додають розчин DCC (8,33 кг, 1,25 екв.) в етилацетаті, і реакційну суміш перемішують протягом 24 год при температурі 22 °С. Одержаний побічний продукт DCU відфільтровують. Органічну фазу концентрують, випаровують з ізопропанолом, а потім кристалізують охолодженням розчину ізопропанолу (~125 л). Після цього відфільтрований осад промивають холодним ізопропанолом, сушать при температурі 25 °С, і одержують 16,3 кг INT 3 з виходом 81 % та чистотою 96 %.

17-аміно-10-оксо-3,6,12,15-тетраокса-9-азагептадеканову кислоту (AEEA2) (8,1 кг, 26,3 моль) суспендують в DCM (54 л) при температурі 22 °С, додають розчин TMSA (7,68 кг, 59,9 моль) в DCM (6,2 л), і потім реакційну суміш перемішують протягом години при температурі 40 °С. INT 3 (16 кг) суспендують у DCM (31 л) при температурі 35 °С, і додають до TMS-захисної суміші (AEEA2) при температурі 22 °С. Реакційну суміш перемішують протягом 12 год, після завершення реакції суміш концентрують, а потім заміщують на етилацетат. Органічну фазу тричі промивають 2 % водним розчином KHSO₄/NaCl (~200 л), і потім 4 рази 2 % водним розчином NaCl (~200л) до цільового значення pH 4,5. Органічну фазу концентрують, і заміщують на ацетонітрил. Розчин в ацетоні грилі охолоджують до температури -20 °С, і потім витримують одержану суспензію протягом 15 год. при температурі -20 °С. Суміш фільтрують, відфільтрований осад промивають холодним ацетонітрилом, і сушать при температурі <0 °С для одержання 18,4 кг Препарату 6 (вихід 88 %) із чистотою 96 %.

Синтез препарату 6 :

Як альтернатива. Препарат 6 можна одер

Застосовують стандартні проце

Стандартні умови сполучення: 0,133 М, 2,0 екв.

Завантаження смоли:

ФmocNH-AEEA на смо

Автоматична програма із застосуванням набухання у DMF, а потім у Pip/DMF; про

Смолу розщеплюють перемішуванням об'єднаних партій у суміші 30 % HFIP/DCM (240 мл)

протягом 1,5 год. Смолу фільтрують, промивають, і розчинник видаляють з фільтрату *in vacuo*.

Одержане масло розчиняють в ацетонітрилі, і розчинник знову видаляють. Ця операція надає 30,47 г

(146 % теоретичного виходу) в'язкого масла жовтого кольору, що містить 52,3 % площі бажаного

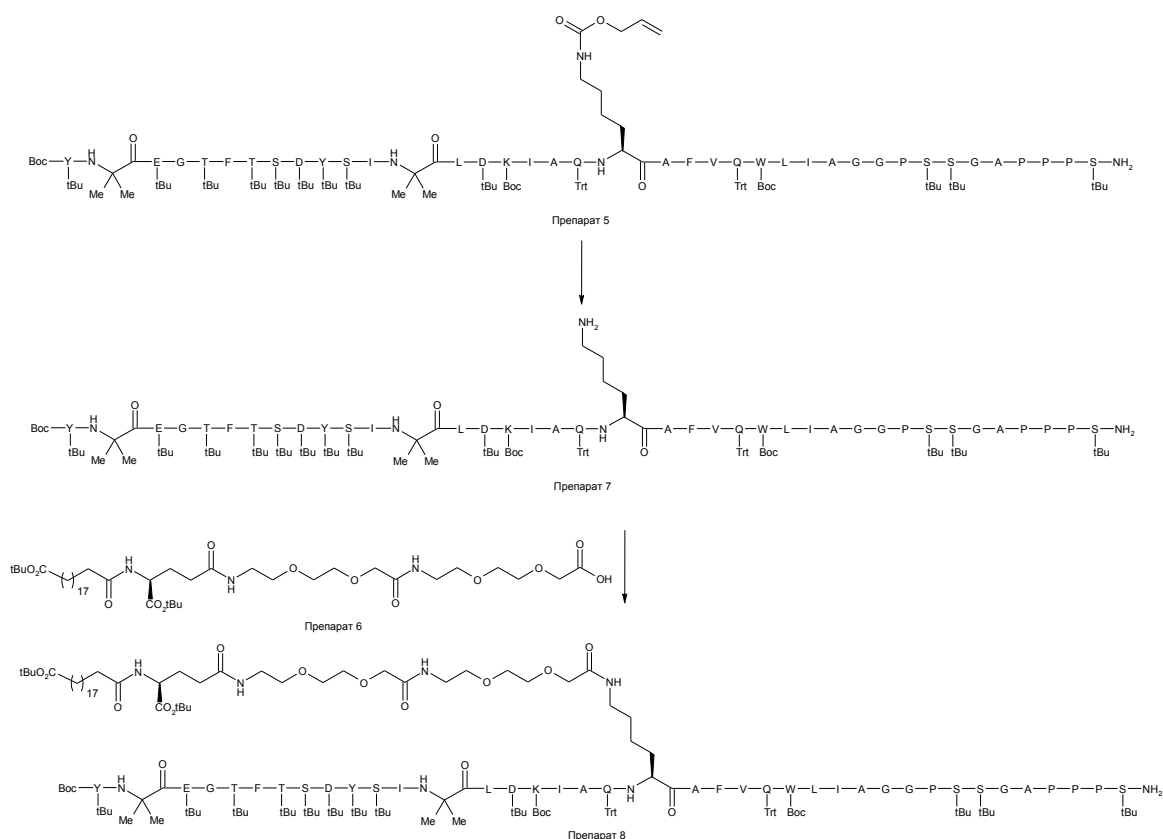
продукту за результатами аналізу із застосуванням ультра вискоєфективної рідинної хроматографії. Числовий продукт зниклої фазою хроматографією (500 нм) істотно відрізняється від 25 % DGM/10 %

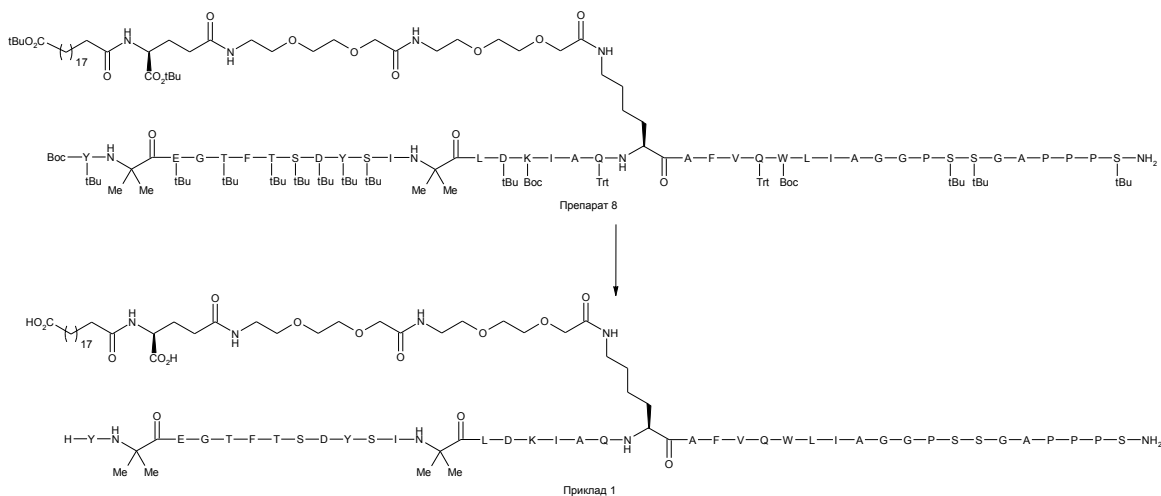
Неочищений продукт очищають флеш-хроматографією (500 г силікагелю, елювання 85 % DCM/10 % метанолу/5 % оцтової кислоти, зібрано 38×100 мл фракцій). Поєднали в хроматографований

метанолу/5 % оцтової кислоти, зліано 38×100 мл фракції). Попередньо хроматографований концентрат (17,94 г) кристалізують і одержують 13,4 г (вихід 74,7 %) з чистотою 91,65 % площі за

концентрат (17,94 г) кристалізують, і одержують 19,4 г (вихід 74,7 %). з чистотою 91,69 % площі за даними ультра високоефективної рідинної хроматографії

1. *Journal of the American Medical Association*, 2000; 284: 2689-2695.





Приклад 1 синтезу

Послідовність SEQ ID NO: 1

До першого флакона для ВЕРХ додають Препарат 5 (10,5 мг, 0,00187 ммоль) та DCM (200 мкл, 20л/кг). До цього розчину додають розчин фенілсилану (0,81 М у DCM, 22,1 мкл, 0,0178 ммоль) та тетракіс(трифенілфосфін)-паладію(0) (0,8 М у DCM, 22,1 мкл, 0,00064 ммоль). Цей розчин перемішують при температурі 24 °С протягом однієї години для одержання невиділеного розчину Препарату 7 (послідовність SEQ ID NO: 7). До другого флакона для ВЕРХ додають спочатку DCM (150 мкл), потім Препарат 6 (0,118 М в DCM, 16 мкл, 0,00189 ммоль), РубОР (0,186 М в DCM, 16 мкл, 0,00298 ммоль) і DIEA (0,573 М в DCM, 5 екв.). Вміст другого флакона додають у перший флакон, і реакційну суміш перемішують протягом 1 год для одержання невиділеного розчину Препарату 8 (послідовність SEQ ID NO: 8). Розчин Препарату 8 концентрують під вакуумом, і до одержаної твердої речовини додають 50 мкл розчину трифтороцтової кислоти (4,65 мл), триізопропілсилану (20 мкл) і DTT (20мг). Вказану суспензію перемішують протягом 18 год, і контролюють із застосуванням ВЕРХ для підтвердження утворення сполуки Прикладу 1 (HRMS з обчисленням для $C_{225}H_{348}N_{48}O_{68}$, очікуваний результат: 4810,5249, фактичний результат: 4810,5257).

Синтез препарату 9

Послідовність SEQ ID NO: 9

Амідну смолу Зібера (13,42 г, 0,75 ммоль/г, 10,1 ммоль) суспендують у DMF (130 мл, 10 об'ємів) протягом приблизно 20 хв, а потім зливають. Одержану смолу промивають DMF (80 мл, 6 об'ємів) приблизно протягом 5 хв. Групу Fmoc видаляють обробкою Fmoc-амінокислотної смоли 5 % (об'ємн.) піперидину, 1,25 % (об'ємн.) DBU, 1,0 % (мас.) розчину HOBT/DMF (80 мл, 6 об'ємів) двічі протягом 10 хв і 20 хв, відповідно. Після зливання розчину з відщепленою захисною групою Fmoc двічі промивають DMF (80 мл, 6 об'ємів), двічі MTBE (80 мл, 6 об'ємів) і ще двічі DMF (80 мл, 6 об'ємів).

Амінокислотний ланцюг складають із застосуванням стандартної Fmoc-хімії. Зазвичай 1,5 екв Fmoc-амінокислоти та HOBT (2,47 г, 20 % зволожений, 14,6 ммоль, 1,46 екв) розчиняють у DMF (60 мл, 4,5 об'єми) з подальшим додаванням DIEA (1,94 мл, 11,1 ммоль, 1,11 еквівалент). Одержаний розчин охолоджують до температури <5 °С на льодяній бані, та активують додаванням TBUTU (4,83 г, 15,0 ммоль, 1,5 екв). Дозволяють відстоюватися протягом приблизно 5 хв при температурі 0-5 °С. До смоли додають спочатку DCM (60 мл, 1,5 об'єми) з подальшим додаванням активованого розчину Fmoc-амінокислоти. Одержану суміш перемішують при температурі близькій температурі навколишнього середовища протягом 2 год. Послідовно повторюють процедуру відщеплення захисної групи Fmoc та сполучення з рештою амінокислот. Після завершення останньої процедури відщеплення захисної групи Fmoc, смолу двічі промивають 2-пропанолом (130 мл, 10 об'ємів) протягом 5 хв, потім промивають MTBE (130 мл, 10 об'ємів) шість разів. Смолу сушать при температурі 35 °С in vacuo, і одержують Препарат 9 на смолі Зібера (21,21 г, теоретично 0,435 ммоль/г, вихід 91,7 %, взявши за основу збільшення маси).

Частину комплексу Препарат 9-смола (10,15 г, 0,435 ммоль/г, 4,41 ммоль) обробляють 5 % (об'ємн.) розчином TFA у DCM (101 мл, 10 об'ємів), і здійснюють етап промивання DCM. Фракції розщеплення та змиви нейтралізують DIEA (26,29 г, 35,5 мл, молярне відношення до TFA 1,01:1). Фракції об'єднують, і концентрують у вакуумі до 50 % від початкового об'єму. Розчин DCM промивають насиченим водним розчином $NaHCO_3$ (2×94 мл). Одержаний розчин сушать над безводним $MgSO_4$, і концентрують насухо для одержання смолистої твердої речовини. Повторно суспендують згадану смолисту тверду речовину при температурі <5 °С у MTBE (100 мл) для руйнування камеді і одержання суспензії білого кольору. Згадану суспензію білого кольору фільтрують, промивають, сушать, і

одержують Препарат 9 (3,84 г, 92,3 % площі, 37,8 % (мас.) DIEA-TFA, 57,4 % (мас.), 2,29 ммоль, вихід 51,9 %, HRMS з обчисленням для $C_{46}H_{78}N_{10}O_{12}$, очікуваний результат: 962,5801, фактичний результат: 962,5806) у вигляді порошку білого кольору.

Синтез препарату 10

Послідовність SEQ ID NO: 10

Комплекс смол Fmoc-Gly-Gly-O-2CTC (18,09 г, 0,57 ммоль/г, 10,3 ммоль) суспендують у DMF (180 мл, 10 об'ємів) протягом 20 хв, і потім зливають. Одержану смолу промивають DMF (108 мл, 6 об'ємів) протягом 5 хв. Групу Fmoc видаляють обробкою Fmoc-амінокислотної смоли 5 % (об'ємн.) піперидину, 1,25 % (об'ємн.) DBU, 1,0 % (мас.) розчину HOBt/DMF (80 мл, 6 об'ємів) двічі протягом 10 хв і 20 хв, відповідно. Розчин з відщепленою захисною групою Fmoc зливають, і смолу двічі промивають DMF (110 мл, 6 об'ємів), двічі MTBE (110 мл, 6 об'ємів) і ще двічі DMF (110 мл, 6 об'ємів). Складання ланцюга проводять за стандартною Fmoc-хімією.

Для сполучення амінокислот зазвичай 1,5 екв Fmoc-амінокислоти та HOBt (2,54 г, 20 % зволожений водою, 15,0 ммоль, 1,5 екв.) розчиняють у DMF (80 мл, 4,4 об'єма), і потім для забезпечення сполучення амінокислот додають DIEA (1,94 г, 15,0 ммоль, 1,5 екв.). Одержаний розчин охолоджують до температури 0-5 °C на льодяній бані, і активують додаванням 2-(1H-бензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметиламінію тетрафторборату (TBTU) (4,84 г, 15,1 ммоль, 1,5 екв.). Надають можливість відстоятися протягом 5 хв при температурі 0-5 °C. Після цього до смоли додають спочатку DCM (35 г, 1,5 об'єму), а потім активований розчин Fmoc-амінокислоти. Одержану суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 2 год. Після завершення цих етапів синтезу пептидну смолу двічі промивають 2-пропанолом (180 мл, 10 об'ємів) протягом 5 хв, а потім MTBE (180 мл, 10 об'ємів кожного разу, 6 разів) з подальшим висушуванням при температурі 35 °C для одержання комплексу Препарату 10 і смоли (25,52 г, 0,216 ммоль/г, вихід 53,6 %).

Частину комплексу Препарату 10 і смоли (10,075 г, 0,216 ммоль/г, 2,18 ммоль) тричі обробляють розчином 1 % (об'ємн.) TFA у DCM (100 мл, 10 об'ємів), і промивають DCM (75 мл, 7,5 об'єма). Фракції після розщеплення нейтралізують, та промивають піридином (3,18 г, мольне співвідношення з ГРА 1,01:1). Фракції об'єднують, і концентрують у вакуумі досуха при температурі ≤ 35 °C. Проводять відновлення із застосуванням етанолу (40 мл, 10 % (об'ємн.) об'єднаних фільтратів) з подальшим концентруванням насуху. Нарешті, пептид розтирають при перемішуванні в деіонізованій воді (150 мл, 40 % (об'ємн.) об'єднаних фільтратів). Твердий неочищений пептидний осад збирають центрифугуванням, і двічі промивають деіонізованою водою (по 150 мл кожного разу). Тверду речовину двічі промивають n-гептаном (по 100 мл кожного разу), виділяють, та висушують in vacuo при температурі 40 °C для одержання Препарату 10 (послідовність SEQ ID NO: 10) у вигляді хрусткої твердої речовини світло-жовтого кольору (4,10 г, 72,4 % площі, 3,0 % (мас.) піридин-TFA, 70,2 % (мас.), 1,85 ммоль, вихід 85,1 %, HRMS з обчисленням для $C_{88}H_{103}N_{11}O_{15}$, очікуваний результат: 1553,7635, фактичний результат: 1553,76556).

Синтез препарату 11

Послідовність SEQ ID NO: 11

Комплекс смол H-аланін-O-2CTC (40,39 г, 0,5 ммоль/г, 20,20 ммоль) суспендують у DMF (400 мл, 10 об'ємів) протягом приблизно 20 хв, а потім зливають. Одержану смолу двічі промивають DMF (400 мл, 10 об'ємів) протягом 5 хв. Амінокислотний ланцюг складають із застосуванням стандартної Fmoc-хімії. Зазвичай 1,5 екв Fmoc-амінокислоти та HOBt (5,51 г, 80 % (мас.), 36,2 ммоль, 1,6 екв) розчиняють у DMF (150 мл, 3,7 об'єми) з подальшим додаванням DIEA (4,22 г, 32,7 ммоль, 1,6 екв). Одержаний розчин охолоджують до температури приблизно < 5 °C на льодяній бані, та активують додаванням TBTU (10,39 г, 32,4 ммоль, 1,6 екв). Дозволяють перемішуватися протягом приблизно 5 хв при температурі 0-5 °C. До смоли додають DCM (80 мл, 2 об'єми) з подальшим додаванням активованого розчину Fmoc-амінокислоти. Одержану суміш перемішують приблизно при температурі навколишнього середовища протягом 2 год.

Групу Fmoc видаляють обробкою Fmoc-амінокислотної смоли 5 % (об'ємн.) піперидину, 1,25 % (об'ємн.) DBU, 1,0 % (мас.) розчину HOBt/DMF (240 мл, 6 об'ємів) двічі протягом 10 хв і 20 хв, відповідно. Розчин з відщепленою захисною групою Fmoc зливають, смолу двічі промивають DMF (240 мл, 6 об'ємів), двічі MTBE (240 мл, 6 об'ємів) і ще двічі DMF (240 мл, 6 об'ємів). Після завершення цих етапів синтезу пептидну смолу ретельно промивають 2-пропанолом (400 мл, 10 об'ємів) двічі та MTBE (400 мл, 10 об'ємів кожного разу, 6 разів), і потім сушать in vacuo при температурі 35 °C з виходом завантаженої смоли меншим ніж кількість останньої амінокислоти (74,82 г, 0,159 ммоль/г, 11,90 ммоль, вихід 58,9 %). Останню амінокислоту, Fmoc-Leu-OH, окремо додають до порції смоли (13,61 г, 0,159 ммоль/г, 2,16 ммоль). Ця смола набухає у DMF (130 мл, 10 об'ємів, 3 рази) протягом > 5 хв кожного разу, після чого здійснюють відщеплення захисної групи (130 мл суміші для відщеплення захисної групи, приготовленої з 5,6 г піперидину, 1,67 г DBU, 1,3 г HOBt у 120 мл DMF, 10 об'ємів, двічі) через 10 хв і 20 хв. Смолу промивають спочатку DMF (80 мл, 6 об'ємів, двічі), потім MTBE (80 мл, 6 об'ємів, двічі), і потім DMF (80 мл, 6 об'ємів, двічі) протягом 5 хв кожного разу. Розчиняють у DMF (50

мл, 3,7 об'єма) з подальшим додаванням DIEA (0,54 і, 4,2 ммоль, 1,9 екв для сполучення Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Leu-OH (1,47 г, 4,16 ммоль, 1,9 екв) і HOBt (0,704 г, 80 % (мас.), 4,17 ммоль, 1,9 екв)). Одержаний розчин охолоджують до <5 °С на льодяній бані, та активують додаванням TBUTU (1,34 г, 4,17 ммоль, 1,9 екв), і дозволяють перемішуватися протягом 5 хв при температурі 0-5 °С. До смоли додають DCM (20 мл, 1,5 об'єма) з подальшим додаванням активованого розчину Fmoc-амінокислоти. Одержану суміш перемішують при приблизно температурі навколишнього середовища протягом 2 год. Цю смолу промивають DMF (180 мл, 13 об'ємів, двічі), MTBE (180 мл, 13 об'ємів, двічі) та DMF (180 мл, 13 об'ємів, двічі) протягом 5 хв кожного разу. Смоли промивають DCM (130 мл, 10 об'ємів, 6 разів, кожного разу протягом 5 хв) перед сушінням смоли in vacua при температурі 35 °С, і одержують навантажену смолу (12,90 г, 0,203 ммоль/г, 2,62 ммоль, вихід 121 %).

Частину смоли (7,09 г, 0,203 ммоль/г, 1,44 ммоль) тричі обробляють 1 % (об'ємн.) розчином TFA у DC M (70 мл, 10 об'ємів) протягом 10 хв кожного разу при температурі приблизно навколишнього середовища з подальшим промиванням DCM (55 мл, 7,5 об'єма). Фракції після розщеплення, нейтралізують, і промивають піридином (3,02 г, молярне співвідношення 1.02:1 до TFA). Фракції об'єднують, та концентрують у вакуумі досуха при температурі ≤35 °С. Здійснюють відновлення етанолом (28 мл, 11 % (об'ємн.) об'єднаних фільтратів) з подальшим концентруванням насуху. Нарешті, пептид перемішують у деіонізованій воді (105 мл, 40 % (об'ємн.) об'єднаних фільтратів). Твердий неочищений пептидний осад відфільтровують, і промивають деіонізованою водою (4×50 мл). Тверду речовину промивають н-гептаном (3×100 мл). ізолюють, та висушують in vacua при температурі 40 °С для одержання Препарату 11 у вигляді порошку білого кольору (4,54 г, 87,6 % площі, 44,4 % (мас.) піридин-TFA, 48,7 % (мас.), 0,936 ммоль, вихід 65,0 %. HRMS з обчисленням для C₁₂₇H₁₉₂N₁₄O₂₈, очікуваним результат: 2361,4031, фактичний результат: 2361,4021), Загальний вихід для одержання Препарату 11 на смоли становить 71,3 %.

Синтез Препарату 12

Послідовність SEQ ID NO: 12

Комплекс смол Fmoc-Aib-O-CTC (19,16 г, 0,54 ммоль/г, 10,35 ммоль) суспендують у DMF (190 мл, 10 об'ємів) протягом 20 хв, а потім зливають. Одержану смолу промивають DMF (190 мл, 10 об'ємів) протягом 5 хв. а потім зливають. Для одержання розчину 5 % піперидину, 1,25 % DBU, 1,0 % HOBt/DMF у вигляді розчину для відщеплення захисної групи об'єднують піперидин (77,82 г), DBU (23,16 г), HOBt (18,09 г, 80 % (об'ємн.) і DMF (1800 мл). Групу Fmoc видаляють обробкою Fmoc-амінокислотної смоли розчином для відщеплення захисної групи (190 мл, 10 об'ємів) двічі протягом 10 хв і 20 хв, відповідно. Розчин з відщепленою захисною групою Fmoc зливають, потім смолу двічі промивають DMF, двічі MTBE і ще двічі DMF (190 мл, 10 об'ємів для кожного промивання).

До розчину Fmoc-Ile-OH (7,11 г, 10,1 ммоль, 2,0 екв) у DMF (85 мл) додають DIEA (2,62 г, 20,3 ммоль, 2,0 екв). Одержаний розчин охолоджують до температури 0-5 °С, додають 6-хлорбензотриазол-1-ілокси-трис-піролідинофосфонію гексафторфосфат (PyClock) (11,36 г, 20,06 ммоль, 2,0 екв), і повністю розчиняють. Активований розчин додають до попередньо підданого набухання у DCM (30 мл, 1,5 об'єма) комплексу смол H-Aib-O-CTC після відстоювання протягом 3-5 хв. Реакційній суміші дозволяють нагріватися до температури навколишнього середовища, і перемішують протягом 2 год. Непореагувавший матеріал становить приблизно 18 %, як свідчить результат оцінювання даних дослідження. Двічі промивають DMF, двічі MTBE і двічі DMF (190 мл, 10 об'ємів для кожного промивання). Розчин Fmoc-Ile-OH (10,63 г, 30,08 ммоль, 6 екв) у DMF (165 мл) додають до Охута (50 мл, 0,6 М у DMF, 30 ммоль, 6 екв) та DIC (50 мл, 0,66 М в DMF, 33 ммоль, 6,6 екв). Перемішують протягом 5 хв приблизно при температурі навколишнього середовища, а потім додають до смоли, і перемішують протягом 18 год. До смоли додають суміш піридину, оцтового ангідриду та DMF, і перемішують протягом 0,5 год. Смоли промивають DMF (5×140 мл, 7 об'ємів.), додатковою кількістю DMF (2×180 мл, 9 об'ємів), MTBE (2×180 мл, 9 об'ємів), потім DMF (2×180 мл, 9 об'ємів).

Складання решти ланцюга проводять за стандартною Fmoc-хімією послідовно для решти амінокислот. Зазвичай Fmoc-амінокислоту (2,0 екв), HOBt (3,42 г, 80 % (мас.), 2,0 екв) розчиняють у DMF (85 мл) з подальшим додаванням DIEA (2,64 г, 2,0 екв). Одержаний розчин охолоджують до температури 0-5 °С на льодяній бані, активують додаванням TBUTU (6,45 г, 2,0 екв), і дозволяють відстоюватися протягом 3-5 хв при температурі 0-5 °С. До смоли додають DCM (30 мл) з подальшим додаванням активованого розчину Fmoc-амінокислоти. Одержану суміш перемішують при кімнатній температурі протягом 2 год. Одержану смолу двічі промивають DMF, двічі MTBE і ще двічі DMF (190 мл, 10 об'ємів на кожне промивання). Групу Fmoc видаляють обробкою Fmoc-амінокислотної смоли розчином для відщеплення захисної групи (190 мл, 10 об'ємів) двічі протягом 10 хв і 20 хв, відповідно. Після зливання розчину з відщепленою захисною групою Fmoc смолу промивають двічі DMF, двічі MTBE і ще двічі DMF (190 мл, 10 об'ємів на кожне промивання).

Тетрамер Boc-Y-Aib-E(tBu)G-OH (12,25 г, 2,0 екв) в DMF (50 мл) активують із застосуванням Охута (30 мл 0,6 М в DMF, 20 ммоль, 2 екв) і DIC (33 мл 0,66 М, 22 ммоль, 2,1 екв.) протягом 5 хв для

додавання останніх чотирьох амінокислот у вигляді тетрамеру. Цю суміш додають до смоли, і сполучають протягом 18 год. Суміш зливають наприкінці 18 год., і смолу промивають DMF (190 мл, 5 разів протягом 5 хв кожного разу). Додають додаткову кількість тетрамеру (6,21 г, 1,0 екв) и DMF (40 мл), активують із застосуванням PyBOP (5,77 г, 1,1 екв) та DIEA (3,32 г, 2,6 екв) протягом 5 хв перед додаванням цієї суміші до смоли, і перемішують протягом 4 год. Суміш зливають через 4 год, промивають DMF (190 мл, 5 разів протягом 5 хв кожного разу). Кепірування смоли здійснюють шляхом додавання до смоли суміші DMF (105 мл), піридину (13,48 г, 17 екв) та оцтового ангідриду (14,27 г, 14 екв), і перемішують протягом 1 год. Пептидну смолу промивають після завершення складання ланцюга п'ять разів протягом 5 хв кожного разу DMF (190 мл кожного разу), шість разів DCM (190 мл кожного разу), і потім сушать у вакуумі при температурі 35 °C для одержання комплексу Препарату 12 і смоли (31,03 г, 0,2595 г/ммоль теоретично, 8,05 ммоль, вихід 77,8 %). Частиину комплексу Препарату 12 і смоли (15,975 г, 0,2595 ммоль/г, 4,146 ммоль) тричі обробляють 1 % (об'ємн.) розчином TFA у DCM (160 мл, 10 об'ємів) протягом 10 хв кожного разу при температурі навколишнього середовища з подальшим промиванням DCM (120 мл, 7,5 об'єма). Фракції після розщеплення нейтралізують, і промивають піридином (4,74 г, молярне співвідношення 0,94:1 до TFA). Фракції об'єднують, і концентрують у вакуумі досуха при температурі ≤ 35 °C. Відновлення здійснюють етанолом (30 мл, 5 % (об'ємн.) об'єднаних фільтратів) з подальшим концентруванням насуху. Пептид механічно перемішують у деіонізованій воді (242 мл, 40 % (об'ємн.) об'єднаних фільтратів) протягом 10 хв. Твердий неочищений пептид відфільтровують, і промивають деіонізованою водою (4×100 мл). Тверду речовину промивають н-гептаном (4×100 мл), ізолюють, і висушують in vacua при температурі 35 °C для одержання Препарату 12 у вигляді порошку білого кольору (9,38 г, 82,2 % площі, 0,2 % (мас.) піридин-TFA, 82,1 % (мас.), 3,85 ммоль, вихід 92,8 %, HRMS з обчисленням для $C_{103}H_{165}N_{13}O_{26}$, очікуваний результат: 2000,1989, фактичний результат: 2000,1968).

Синтез препарату 13

Послідовність SEQ ID NO: 13

У колбу в атмосфері N_2 додають Препарат 9 (2,887 г, 70,2 % (мас.), 1,30 ммоль), Препарат 10 (3,576 г, 57,4 % (мас.), 2,13 ммоль, 1,63 екв.), DMSO (18,1 г, 16,4 мл), DMF (15,8 г, 16,7 мл) та DIEA (655 мг, 5,07 ммоль, 3,89 екв.) при перемішуванні до одержання розчину золотистого кольору. Цей розчин охолоджують у воді і льодом перед додаванням PyBOP (1,414 г, 2,72 ммоль, 2,08 екв.). Ванну з льодом видаляють, і суміші дозволяють нагрітися до температури навколишнього середовища. Перебіг реакції контролюють протягом приблизно 5 год, щоб забезпечити адекватне перетворення. Аліквоту діетиламіну (2,116 г, 28,9 ммоль, 22,2 екв.) додають до реакційної суміші, що має температуру навколишнього середовища. Суміш перемішують протягом приблизно години для забезпечення приблизно >99 % перетворення на Препарат 13. Продукт осаджують додаванням суміші з температурою < 4 °C, що містить насичений водний розчин $NaHCO_3$ (50 мл) і деіонізовану воду (50 мл). Суміш перемішують в умовах холоду протягом щонайменше приблизно 15 хв. Каламутно-білу суспензію фільтрують. Вологий відфільтрований осад промивають спочатку деіонізованою водою (3×50 мл), потім MTBE (6×50 мл), і сушать при температурі 40 °C in vacua з продуванням N_2 протягом приблизно 62 год. В результаті процесу одержують Препарат 13 (4,45 г, 60,4 % площі, 16,4 % площі дибензофульвену, 1,18 ммоль, вихід 90,5 %, HRMS з обчисленням для $C_{119}H_{169}N_{21}O_{24}$, очікуваний результат: 2276,2649, фактичний результат: 2276,2550) у вигляді твердої речовини світло-жовтого кольору.

Синтез препарату 14

Послідовність SEQ ID NO: 14

Аліквоту Препарату 11 (3,012 г, 48,7 % (мас.), 0,621 ммоль, 1,00 екв.) додають у колбу у атмосфері N_2 з Препаратом 13 (3,951 г, 60,4 % (мас.), 1,05 ммоль, 1,69 екв.), DMSO (9,8 г, 8,9 мл), DMF (52,0 г, 55,0 мл) та DIEA (372 мг, 2,88 ммоль, 4,63 екв.). Суміш перемішують до одержання розчину золотистого кольору. Цю суміш охолоджують у воді з льодом до температури < 10 °C. До суміші додають аліквоту PyBOP (742 мг, 1,42 ммоль, 2,30 екв.). Ванну з льодом видаляють, і суміші дозволяють нагрітися до температури приблизно навколишнього середовища. Перебіг реакції контролюють протягом приблизно 22 год, щоб забезпечити адекватне перетворення на Препарат 14. Це дає приблизно >96 % перетворення. Піперидин (530 мг, 6,22 ммоль, 10,0 екв) додають до охолодженої реакційної суміші при температурі < 10 °C. Суміш перемішують при температурі навколишнього середовища протягом приблизно 2 год, щоб забезпечити приблизно >99 % перетворення на Препарат 14. Реакційну суміш додають в іншу колбу, що містить 0,5н водний розчин HCl (12,72 г, 6,23 ммоль, 10,0 екв.), і деіонізовану воду (16,71 г), яка має температуру < 4 °C, щоб забезпечити осадження Препарату 14. Холодну суспензію перемішують протягом приблизно 15 хв, і суспензію білого кольору фільтрують. Вологий відфільтрований осад промивають деіонізованою водою (2×30 мл), насиченим водним розчином $NaHCO_3$ (2×30 мл), деіонізованою водою (3×30 мл) та MTBE (4×45 мл), і сушать при температурі 40 °C in vacua з продуванням N_2 протягом приблизно 17 год. Продукт, Препарат 14 (5,418 г, 48,9 % площі, 0,603 ммоль, вихід 97,0 %. HRMS з обчисленням для

C₂₃₁H₃₄₉N₃₅O₄₉, очікуваний результат: 4397,5893, фактичний результат: 4397,6057), одержують у вигляді порошку білого кольору.

Синтез препарату 15

Послідовність SEQ ID NO: 15

В колбу у атмосфері N₂ додають аліквоту Препарату 12 (671 мг, 82,1 % (мас.), 0,275 ммоль. 1,23 екв). До згаданої колби з перемішуванням додають Препарат 14 (2,009 г, 48,9 % площі, 10,7 % площі ізомеру, 0,223 ммоль, 1,00 екв). DMSO (11,1 г, 10,0 мл), DMF (19,0 г, 20,1 мл) та DIEA (76 мг, 0,588 ммоль, 2,63 екв), і одержують розчин золотистого кольору. Перед охолодженням до температури -5 °C додають аліквоту 0,6 M HOAt (619 мг, 0,384 ммоль, 1,72 екв). Додають зразок PyCloack (220 мг, 0,397 ммоль, 1,78 еквівалента). Суміші дозволяють нагрітися приблизно до температури навколишнього середовища, щоб забезпечити приблизно 84 % перетворення на Препарат 15. Продукт виділяють, додаванням реакційної суміші протягом 10 хв до деіонізованої води (548 мл), що має температуру танення льоду, в результаті чого продукт випадає в осад. Реакційну колбу промивають DMF (5 мл), і змив додають до суспензії. Суспензію перемішують протягом приблизно 15 хв. дозволяють нагрітися до температури навколишнього середовища, і фільтрують. Вологий відфільтрований осад промивають деіонізованою водою (3×80 мл), і воскоподібну тверду речовину білого кольору сушать при температурі 35 °C протягом 3,5 днів in vacua для одержання Препарату 15 (2,506 г, 41,6 % площі, 0,163 ммоль, вихід 73,1 %, HRMS з обчисленням для C₃₃₄H₅₁₂N₄₈O₇₄, очікуваний результат: 6379,7777, фактичний результат: 6379,8652) у вигляді порошку білого кольору.

Приклад 2

Синтез сполуки Прикладу 2

Послідовність SEQ ID NO: 1

В колбу у атмосфері N₂ додають зразок TFA (19,656 г, 13,03 мл) з DCM (815 мг, 0,62 мл). DTT (434 мг) і TIPS (362 мг, 0,47 мл). Перед додаванням води (468 мг, 0,47 мл) суміш охолоджують у воді з льодом. До цієї суміші при температурі 2 °C для одержання розчину додають зразок Препарату 15 (1016 мг, 39,0 % площі, 0,0620 ммоль). Суміш нагрівають приблизно до температури навколишнього середовища, і перемішують протягом приблизно 2 год. Реакційну суміш додають до МТВН (150 мл) при температурі -15 °C, і ополіскують реактор МТВЕ (3 мл). Суспензію центрифугують приблизно через 10 хв, і декантують супернатант. Вологий відфільтрований осад повторно суспендують у МТВЕ (3×50 мл), центрифугують при кожному промиванні, і декантують супернатант. Вологий відфільтрований осад сушать при температурі 35 °C in vacua, і одержують сполуку Прикладу 2 (784 мг, 26,5 % площі, 0,0432 ммоль, вихід 69,7 %, HRMS з обчисленням для C₂₂₅H₃₄₈N₄₈O₆₈, очікуваний результат: 4810,5249, фактичний результат: 4810,5642) у вигляді твердої речовини білого кольору.

Синтез препарату 16

Послідовність SEQ ID NO: 16

Для синтезу використовують Fmoc-Gly-OH-2-хлортритилову смолу із навантаженням 0,61 ммоль/г. Загальна процедура SPPS по суті така, як описана в цьому описі. Препарат 16 одержують в результаті м'якого режиму гідролізу пептиду на смолі так, як описано в цьому описі, із застосуванням методів, відомих фахівцям. Відновлення концентрованого матеріалу здійснюють етанолом (5 % (об'ємн.) об'єднаних фільтратів), і концентрують насухо. Пептид розтирають при перемішуванні у воді (40 % (об'ємн.) об'єднаних фільтратів). Тверду речовину виділяють, сушать у вакуумі при температурі 40 °C до постійної маси, і одержують 5,24 г (99 %) Препарату 16 у вигляді порошку білого кольору.

Синтез препарату 18

Послідовність SEQ ID NO: 17

Для синтезу застосовують Fmoc-Ala-OH-2-хлортритилову смолу з навантаженням 0,50 ммоль/г. Загальну процедуру SPPS застосовують по суті так, як описано в цьому описі, із такими модифікаціями:

Цикл	Амінокислота	Умови проведення SPPS Розчинник для сполччення: DMF	Примітки
1	(52S)-52-((((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл) аміно)-25-(трет-бутоксикарбоніл)-2,2-диметил-4,23,28,37,46-пентаоксо-3,32,35,41,44-пентаокса-24,29,38,47-тетраазатрипентаконтан-53-ова кислота	Цикли відщеплення захисної групи Fmoc із застосуванням DBU/HOBt тривалістю 10 хв і 20 хв, промивання після відщеплення захисної групи (6×2 хв), 1,7 AA/3,0 HOBt/3,0 TBUTU/3,0 DIEA 2 год, кімнатна температура.	Препарат 17
2	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH	10 хв та 20 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після	Кепірування здійснюють при завершенні із

		відщеплення захисної групи, 1. 3,0 AA/3,0 HOBt/3,0 TBTU/3,0 DIEA, 2 год, кімнатна температура. 2. Повторне сполучення 1,5 AA/1,5 HOBt/1,5 TBTU/1,5 DIEA протягом 4 год при кімнатній температурі.	застосуванням суміші Ac ₂ O/Py при кімнатній температурі
3	Fmoc-L-Ala-OH	10 хв та 20 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 2,0 AA/2,0 HOBt/2,0 TBTU/2,0 DIEA, 2 год, кімнатна температура.	
4	Fmoc-L-Ile-OH	10 хв та 20 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 2,0 AA/2,0 HOBt/2,0 TBTU/2,0 DIEA, 2 год, кімнатна температура.	i
5	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	10 хв та 20 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 2,0 AA/2,0 HOBt/2,0 TBTU/2,0 DIEA, 2 год, кімнатна температура.	
6	Fmoc-L-Asp(tBu)-OH	10 хв та 20 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 2,0 AA/2,0 HOBt/2,0 TBTU/2,0 DIEA, 2 год, кімнатна температура.	

М'який режим гідролізу Препарат 18:

Зразок пептиду (42,13 г) на смоляному напівпродукті поміщають в колбу, і тричі обробляють 10 об'ємами (400 мл) 1 % розчину TFA у DCM протягом 10 хв кожного разу з подальшим промиванням DCM. Кожна обробка гасять додаванням 4,4 мл піридину. Одержані розчини об'єднують, і концентрують in vacuo. Відновлення здійснюють етанолом (25 мл) з подальшим концентруванням насухо, і одержують 56,6 г піноподібної напівтвердої речовини. Воду об'ємом 400 мл додають 10 разів для одержання суспензії. Суспензію фільтрують, і промивають водою. Тверду речовину виділяють, і сушать у вакуумі при температурі 40 °C до постійної маси, і одержують 23,3 г Препарату 18 у вигляді порошку білого кольору.

Синтез Препарату 17

(52S)-52-((((9H-Флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)-25-(трет-бутоксикарбоніл)-2,2-диметил-4,23,28,37,46-пентаоксо-3,32,35,41,44-пентаокса-24,29,38,47-тетраазатрипентаконтан-53-ова кислота
Препарат 6 (80 г, 92 ммоль), DIEA (17,53 мл, 101 ммоль), TSTU (30,3 г, 101 ммоль) та ацетонітрил (1л) завантажують у посудину, та перемішують при температурі 23 °C протягом 17 год. Розчин концентрують, потім одержаний залишок помаранчевого кольору повторно розчиняють у EtOAc (1,6 л), після чого промивають 0,1 M HCl (2×1 л). Органічний шар промивають водою (2×1 л), потім сушать над MgSO₄, фільтрують, концентрують in vacuo, і одержують масло помаранчевого кольору (83 г). Другу партію одержують у тому ж масштабі, об'єднують, і одержують 123 г неочищеного масла. Проміжний складний ефір (123 г, 110 г активної речовини, 113 ммоль) розчиняють у EtOH (700 мл), потім додають Fmoc-лізин (45,9 г, 125 ммоль) і DIEA (21,70 мл, 125 ммоль), і реакційну суміш перемішують протягом 17 год. Після завершення реакції EtOH видаляють in vacuo, і одержують масло помаранчевого кольору (201 г). Залишок розчиняють у EtOAc (1,1 л), і промивають спочатку 0,1 M розчином HCl (3×400 мл), потім водним розчином NaHCO₃ (400 мл). Шари розділяють, після чого органічний шар промивають насиченим водним розчином хлориду натрію (1×400 мл). Органічні речовини концентрують, і одержують масло помаранчевого кольору (~190 г). Долають ацетон (400 мл), після чого одержану суспензію фільтрують для видалення неорганічних речовин. Суміш концентрують, потім очищають із застосуванням нормально-фазової хроматографії (1,1 кг діоксиду кремнію, приготованого з сумішшю гептан/ацетон 60/40), і елюють елюентом зі зростаючою полярністю (збираючи ~3 л фракцій). Фракції щонайменше 95 % площі ВЕРХ об'єднують, концентрують, і одержують густе масло жовтого кольору (70 г) Препарату 17.

Синтез Препарату 19А

Послідовність SEQ ID NO: 18

Для синтезу застосовують Fmoc-Leu-OH-2-хлортритилову смолу з навантаженням 0,65 ммоль/г.
Загальну процедуру SPPS застосовують з такими модифікаціями:

Цикл	Амінокислота	Умови проведення SPPS Розчинник для сполучення: DMF
1	Fmoc-Aib-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 8 год, кімнатна температура.
2	Fmoc-L-Ile-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 18 год, кімнатна температура.
3	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
4	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
5	Fmoc-L-Asp(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
6	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	3×30 хв Цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
7	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
8	Fmoc-L-Phe-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.
9	Fmoc-Gly-Thr($\psi^{Me,Me}Pro$)-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 18 год, кімнатна температура.
10	Fmoc-L-Glu(tBu)-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 8 год, кімнатна температура.
11	Fmoc-Aib-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 18 год, кімнатна температура.
12	Вос-L-Tyr(tBu)-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 18 год, кімнатна температура.

Препарат 19А, одержаний з псевдопроліну, може бути підданий обробці до одержання сполуки Прикладу 3 у спосіб, аналогічний способу одержання Препарату 19В так, як описано в цьому описі.

Синтез препарату 19В

Послідовність SEQ ID NO: 19

Для синтезу застосовують Fmoc-Leu-OH-2-хлортритилову смолу з навантаженням 0,65 ммоль/г.

Препарат 19В одержують із застосуванням процедури SPPS, по суті так, як описано в цьому описі.

Цикл	Амінокислота	Умови проведення SPPS Розчинник для сполучення:DMF	Примітки
1	Fmoc-Aib-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 8 год, кімнатна температура.	
2	Fmoc-L-Ile-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 18 год, кімнатна температура.	
3	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.	
4	Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/ 3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.	
5	Fmoc-L-Asp(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.	
6	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.	
7	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2, хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC 3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.	
8	Fmoc-L-Phe-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.	
9	Fmoc-L-Thr(tBu)-OH	3×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 3,0 AA/3,3 DIC/3,0 Охута 4 год, кімнатна температура.	
10	Boc-Tyr(tBu)-Aib-Glu(tBu)-Gly-OH	4×30 хв цикли відщеплення захисної групи Fmoc, 6×2 хв промивання після відщеплення захисної групи, 1. 2,0 AA/2,2 DIC/2,0 Охута 6 год, кімнатна температура. 2. повторне сполучення, 1,0 А А/1,1 PyBOP/2,5 DIPEA, 4 год, кімнатна температура.	Кепірування здійснюють при завершенні із застосуванням суміші Ac ₂ O/Py

М'який режим гідролізу Препарату 19В

Препарат 19В одержують із застосуванням м'якою режиму гідролізу зв'язаного зі смолою Препарату 19В, по суті так, як описано в цьому описі, із застосуванням методів, відомих фахівцям. Дивись, наприклад, спосіб одержання Препарату 18. Одержану тверду речовину виділяють, і сушать у

вакуумі при температурі 30-40 °С до постійної маси, і одержують 2,94 г продукту у вигляді порошку світло-жовтого кольору.

Синтез Препарату 20

Послідовність SEQ ID NO: 20

До розчину Препарату 1 (4,25 г, 4,166 ммоль) та Препарату 16 (5,00 г, 3,340 ммоль) у DMSO/DMF (1:1, 200 мл) додають PyBOP (2,60 г, 5,00 ммоль) та DIEA (1,75 мл, 10,0 ммоль) при температурі навколишнього середовища. Розчин перемішують протягом 18 год, а потім гасять додаванням надлишку діетиламіну (10,0 мл). Гашений розчин перемішують протягом 2 год, а потім повільно додають до насиченого водного розчину бікарбонат натрію/вона (1:1, 300 мл) при температурі 0 °С. Одержаний осад перемішують протягом 10 хв, а потім відфільтровують. Фільтрат послідовно промивають водою (3×150 мл), а потім метил-трет-бутиловим простим ефіром (3×150 мл). Тверду речовину сушать у вакуумі при температурі 40 °С, і одержують Препарат 20 у вигляді твердої речовини білого кольору (5,30 г, вихід 69 %, HRMS з обчисленням для $C_{119}H_{169}N_{21}O_{24}$, очікуваний результат: 2276,2649, фактичний результат: 2276,2652).

Послідовність SEQ ID NO: 21

До розчину Препарату 20 (1,00 г, 0,44 ммоль) та Препарату 18 (0,90 г, 0,40 ммоль) у DMSO/DMF (1:1, 20 мл) додають PyBOP (314 мг, 0,30 ммоль) та DIEA (0,21 мл, 1,20 ммоль) при температурі навколишнього середовища. Розчин перемішують протягом 18 год, а потім гасять піперидином (0,79 мл, 4,00 ммоль). Гашений розчин перемішують протягом 2 год, потім охолоджують до температури 0 °С, і гасять розведеним розчином HCl (50 мл). Одержану суспензію перемішують протягом 10 хв, і тверду речовину відфільтровують. Фільтрат послідовно промивають насиченим водним розчином бікарбонату натрію (2×50 мл), водою (3×50 мл), а потім метил-трет-бутиловим простим ефіром (3×50 мл). Тверду речовину сушать у вакуумі при температурі 40 °С протягом 18 год, і одержують Препарат 21 у вигляді твердої речовини білого кольору (1,80 г, вихід 106 %, HRMS з обчисленням для $C_{225}H_{338}N_{34}O_{48}$, очікуваний результат: 4284,5053, фактичний результат: 4284,5062).

Синтез Препарату 22

Послідовність SEQ ID NO: 22

До розчину Препарату 21 (214 мг, 0,05 ммоль) та Препарату 19B (116 мг, 0,055 ммоль) у DMSO/DMF (1:1, 3 мл) додають PyBOP (57 мг, 0,11 ммоль) та DIEA (58 мкл, 0,33 ммоль) при температурі навколишнього середовища. Розчин перемішують протягом 18 год, а потім гасять сумішшю 1:1 насиченою водною розчином бікарбонату натрію та води (10 мл). Одержану суспензію перемішують протягом 10 хв, і одержану тверду речовину відфільтровують. Тверду речовину промивають водою (3×10 мл), сушать у вакуумі при температурі 40 °С, і одержують Препарат 22 (285 мг, вихід 89 %, HRMS з обчисленням для $C_{334}H_{512}N_{48}O_{74}$, очікуваний результат: 6379,7777, фактичний результат: 6379,7730).

Приклад 3

Синтез сполуки Прикладу 3

Послідовність SEQ ID NO: 1

Розчин TFA (2,3 мл), води (0,1 мл), триізопропілсилану (0,1 мл) і DTT (75 мг) охолоджують до температури 0 °С. До цього розчину додають Препарат 22 (100 мг, 0,015 ммоль), реакційні суміші дозволяють нагріватися до температури навколишнього середовища, і перемішують протягом 2 год. Одержану суміш виливають у попередньо охолоджений (-20 °С) розчин метил-трет-бутилового простого ефіру (25 мл). Одержаний осад витримують при температурі -20 °С протягом 15 хв, а суспензію центрифугують, і промивають метил-трет-бутиловим простим ефіром (2×25 мл). Тверду речовину сушать у вакуумі при температурі 35 °С протягом 18 год, і одержують сполуку Прикладу 3 у вигляді твердої речовини білого кольору (71 мг, вихід 93 %, HRMS з обчисленням для $C_{225}H_{348}N_{46}O_{68}$, очікуваний результат: 4810,5249, фактичний результат: 4810,5036).

Етап 1:

Вихідний розчин Препарату 25 (1,05 екв.) готують у 5 об'ємах DMSO/ACN (90:10 (у об'ємному відношенні)). Другий вихідний розчин Препарату 26 готують у 20 об'ємах DMSO/ACN (90:10 (у об'ємному відношенні)). Третій вихідний розчин готують з PyOxim (1,5 екв.) у 3 об'ємах ACN. Четвертий потік DIEA (4 екв) готують в ACN. Перші три потоки закачують в змішувач, на виході із змішувача приєднують DIEA, і суміш перекачують через інший змішувач і через реактор з поршневим потоком з 2 год перебування у ванні з постійною температурою 20 °С. На виході з реактора може бути додана оцтова кислота для витрачання залишкової кількості PyOxim (1-ціано-2-етокси-2-оксоетиліденаміноокси-трис-піролідінфосфонію гексафторфосфат). Через >2 год додають чистий діетиламін (10 екв), і перемішують через змішувач. Цей потік переходить у другий реактор з поршневим потоком з часом перебування 1 год у ванні з постійною температурою 20 °С. Розчин продукту Препарату 27 збирають, і направляють через нанофільтрацію з розчином DMSO/ACN 70/30 для видалення реагентів на 10-20 діаб'ємів.

Вихідний розчин Препарату 25 (2,40 кг, 96,7 % (мас.), 2,274 моль) готують шляхом розчинення твердої речовини в DMSO (13,88 кг, 12,62 л) і розведення розчину ACN (1,09 кг, 1,39 л), для

одержання розчину Препарату 25 (114,3 мг/мл, 0,112 М) у суміші 90:10 DMSO:ACN (у об'ємному відношенні). Другий вихідний розчин Препарату 26 (послідовність SEQ ID NO: 26, 2,79 кг, 98,6 % (мас.), 1,836 моль) готують шляхом розчинення твердої речовини в DMSO (54,8 кг, 49,8 л) і розведення ACN (4,3 кг, 5,47 л) для одержання розчину Препарату 26 (45,5 мг/мл, 0,030 М) в суміші 90:10 DMSO:ACN (у об'ємному відношенні). Третій вихідний розчин готують з PyOxim (4,5 кг, 8,53 моль) в ACN (47,33 кг, 60,22 л), і одержують 0,132 М розчин. DIEA додають у вигляді чистої рідини. Потоки розчину Препарату 25 (14,91 л, 1,704 кг, 1,670 моль, 0,95 екв. 5,9 г/хв) та Препарату 26 (58,46 л, 2,660 кг, 1,750 моль, 1,00 екв. 22,5 г/хв) і PyOxim (1,4 екв. 5,4 г/хв) закачують у змішувач у поєднанні з чистим DIEA (4,0 екв. 0,446 мл/хв) при температурі 20 °С. Суміш перекачують через інший змішувач та через реактор з поршневим потоком з 3-годинним часом перебування у ванні з температурою 20 °С. збирають протягом 42,9 год, і одержують 88,6 кг розчину продукту.

Нанофільтрація являє собою процес фільтрації на мембранній основі, який застосовують для розділення хімічних сполук на основі їх величини та різниці молекулярних мас. Розчин продукту Препарату 27 містить реагенти (діетиламін, PyOxim, DIEA та ін.) та небажані побічні продукти (наприклад, дибензофульвен), які бажано видалити перед переходом до наступного етапу. Нанофільтрацію застосовують для видалення небажаних сполук (молекулярна маса <500 Да).

Розчин продукту Препарату 27 завантажують в нанофільтраційний живильний резервуар, і прокачують по рециркуляційному контуру через теплообмінник та блок нанофільтрації, що включає в себе відповідну мембрану (керамічну або полімерну), для спричинення бажаного розділення. Небажані сполуки виводяться в перміат, і збираються окремо або видаляються у відходи. Для підтримання постійного об'єму в нанофільтраційному резервуарі, в нього постійно закачують свіжий розчинник, тобто 70:30 (у об'ємному відношенні) DMSO/ACN, у відповідності з відкачуванням об'ємом розчиненої речовини. Розчин продукту Препарату 27, очищений із застосуванням нанофільтрації, спрямовується безпосередньо на Етап 2.

Розчин (88,6 кг) Препарату 27 з відщепленою захисною Fmoc-групою у DMSO/ACN та діетиламін (1,34 кг) подають в реактор. Суміш перемішують при температурі 20 °С протягом 2 год, і одержують Препарату 27 (87,6 л, 38,45 мг/мл, 3,37 кг, 1,48 моль). Розчин продукту Препарату 27 завантажують в нанофільтраційний живильний резервуар, і прокачують по рециркуляційному контуру через теплообмінник та блок нанофільтрації, який включає в себе відповідну мембрану (керамічну або полімерну), для спричинення бажаного розділення. Небажані сполуки виводяться в перміат, і збираються окремо або видаляються у відходи. Операцію продовжують до досягнення достатнього видалення небажаних домішок. Для підтримання постійного об'єму в нанофільтраційному резервуарі, в нього постійно закачують свіжий розчинник (70:30 (у об'ємному відношенні) DMSO/ACN) у відповідності з відкачуванням об'ємом розчиненої речовини. В результаті одержують Препарат 27 у DMSO/AGN (72,4 л, 40,8 мг/мл, 2,95 кг, 1,30 моль, вихід 78,1 % упродовж сполучення, відщеплення захисної групи групи Fmoc та нанофільтрації).

Пояснювальний приклад Етапу 1 - Аналітичні результати.

ВЕРХ підтверджує перетворення Препарату 25 та Препарату 26 з утворенням Препарату 27. В цій методиці аналізу застосовують колонку з фенілгекеїдною стаціонарною фазою при температурі 65 °С (2,1 мм (внутрішній діаметр)×150 мм×1,7 мікрона (розмір частинок)) з градієнтом В (0,1 % розчин TFA у воді та ацетонітрилі) 2-98 % протягом 12 хв. Для цього матеріалу застосовують УФ-детектування при 214 нм.

У таблиці А.1 наведені дані мас-спектрометрії з високою роздільною здатністю, зібрані для продукту реакції сполучення на Етапі 1 (Fmoc-захищений Препарат 27), і продукту реакції відщеплення захисної групи Fmoc Етапу 1 (Препарат 27). Точність маси являє собою показник, що використовується для підтвердження відповідності сполуки, яку визначають, прогнозованій сполуці.

Таблица А.1

Підтвердження визначених Fmoc-захищеного Препарату 27 і Препарату 27 завдяки точності маси, обчисленої за допомогою даних мас-спектрометрії з високою роздільною здатністю

Сполука	Хімічна формула	Теоретична моноізотопна маса (нейтральна)	Спостережуваний m/z іонів	Стан заряду	Обчислена моноізотопна маса (нейтральна)	Точність маси (млн ⁻¹)
Fmoc-захищений Препарат 27	C ₁₃₄ H ₁₇₉ N ₂₁ O ₂₆	2498,333	2499,3402	1	2498.3329	0,05
Препарат	C ₁₁₉ H ₁₆₉ N ₂₁ O ₂₄	2276,2649	2277,2743		2276,267	0,9

27						
----	--	--	--	--	--	--

Етап 2

SEQ ID NO: 28

+

SEQ ID NO: 27



SEQ ID NO: 29

Схема А.2, Синтез Препарату 29 (послідовність SEQ ID NO: 29) з фрагментів Препарату 27 (послідовність SEQ ID NO: 27) та Препарату 28 (послідовність SEQ ID NO: 28).

Етап 2

Хімічна взаємодія на Етапі 2



Етап 2: Вихідний розчин Препарату 28 (1,15 екв) готують у 10 об'ємах DMSO/ACN (90:10 (у об'ємному відношенні)). Другий вихідний розчин готують з PyOxim (2 екв) в 1 об'ємі ACN. Готують третій потік DIEA (3 екв) в ACN (5 % (мас.) розчину). Розчин Препарату 27 з Етапу 1 і потоки Препарату 28 та PyOxim закачують у змішувач, на виході зі змішувача долають DIEA, і суміш перекачують через інший змішувач та через реактор з поршневим потоком з 2-годинним часом перебування у ванні і температурою 20 °С. На виході з реактора може бути додана оцтова кислота для витрачання залишкової кількості PyOxim. Через >2 год додають чистий діетиламін (10 екв), і перемішують через змішувач. Цей потік переходить у другий реактор з поршневим потоком з часом перебування 1 год у ванні з постійною температурою 20 °С. Розчин продукту Препарату 29 збирають, і направляють через нанофільтрацію із застосуванням розчину у DMF для видалення реагентів на 10-20 діаб'ємів.

Вихідний розчин Препарату 28 (4,68 кг, 98,9 % (мас.), 2,058 моль) готують шляхом розчинення твердої речовини в DMSO (41,75 кг, 37,95 л) і розведення розчину ACN (3,3 кг, 4,20 л) для одержання розчину Препарату 28 (94,7 мг/мл, 0,0421 М) у 90:10 DMSO:ACN (у об'ємному відношенні). Другий вихідний розчин готують з PyOxim (3,0 кг, 5,69 моль) в ACN (11,81 кг, 15,03 л), і одержують 0,327 М розчину, DIEA додають у вигляді чистої рідини. Потоки розчину Препарату 27 з Етапу 1 (73,86 л, 41,2 мг/мл, 3,04 кг, 1,336 моль, 0,0181 М, 1,0 екв. 29,9 г/хв) та Препарату 28 (1,3 екв. 17,7 г/хв) і PyOxim (2,1 екв. 2,9 г/хв) закачують у змішувач, на виході зі змішувача температуру доводять до 20 °С, і розчин поєднують з чистим DIEA (4,0 екв, 0,3744 мл/хв) при температурі 20 °С. Суміш перекачують через інший змішувач та через реактор і поршневим потоком з 3-годинним часом перебування у ванні з температурою 20 °С, збирають протягом 43,2 год, і одержують 129,35 кг розчину продукту Препарат) 29.

Процес нанофільтрації здійснюють по суті так, як описано вище в цьому описі, із застосуванням розчину продукту Препарату 29 замість розчину продукту Препарату 27.

Процес нанофільтрації з використанням Fmoc-захищеного розчину Препарату 29 в DMSO/ACN здійснюють по суті так, як описано в цьому описі. Fmoc-захищений Препарат 29 (129,35 кг) та

діетиламін (2,0 кг) додають в реактор для нанофільтрації. Процес нанофільтрації, призводить до одержання розчину Препарату 29 у DMF (98,85 л, 42,24 мг/мл, 4,18 кг, 0,974 моль, вихід 73,1 % упродовж сполучення, відщеплення захисної групи Fmoc та нанофільтрації).

ВЕРХ підтверджує синтез Препарату 29 з Препарату 28 і Препарату 27. В цьому методі дослідження застосовують колонку C4 зі стаціонарною фазою при температурі 65 °C (2,1 мм (внутрішній діаметр)×150 мм×1,7 мікрона (розмір частинок)) з градієнтом В (0,1 % розчин TFA у воді та ацетонітрилі) 25-98 % протягом 12 хв. Для цього матеріалу застосовують УФ-детектування при 214 нм.

В таблиці А.3 наведені дані мас-спектрометрії з високою роздільною здатністю, зібрані для продукту реакції сполучення на Етапі 2 (Fmoc-захисний Препарат 29), і продукту реакції відщеплення захисної групи Етапу 2 (Препарат 29). Точність маси підтверджує моноізотопну масу нейтральних форм визначених продуктів.

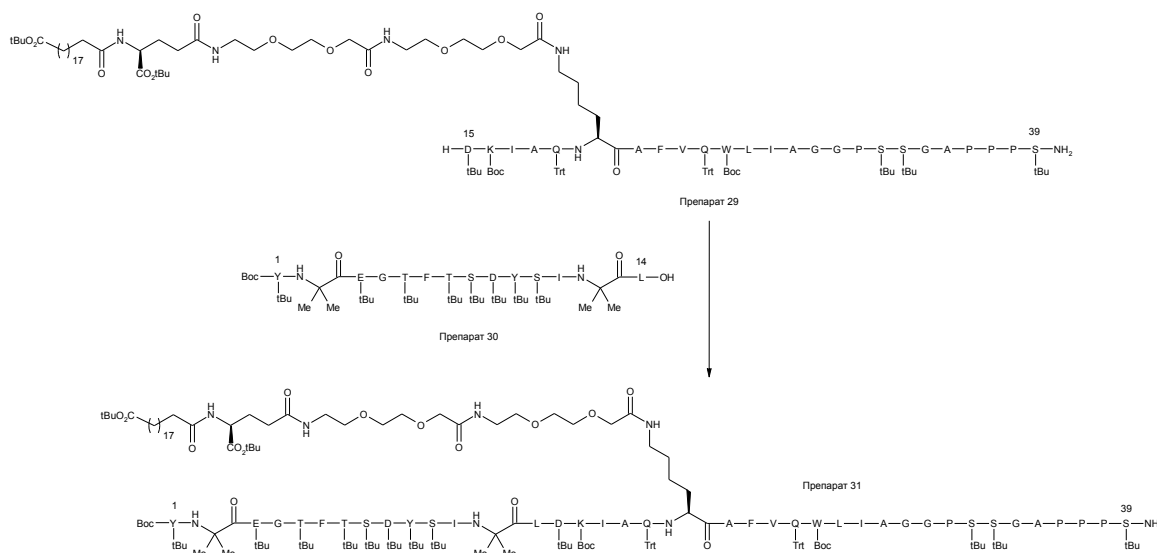
Таблиця А.3

Підтвердження визначених Fmoc-захисного Препарату 29 і Препарату 29 завдяки точності маси, обчисленої із застосуванням даних мас-спектрометрії з високою роздільною здатністю

Сполука	Хімічна формула	Теоретична моноізотопна маса (нейтральна)	Спостережуваний m/z іонів	Стан заряду	Обчислена моноізотопна маса (нейтральна)	Точність маси (млн ⁻¹)
Fmoc-захисний Препарат 29	C ₂₄₀ H ₃₄₈ N ₃₄ O ₅₀	4506,5734	2254,294	2	4506,5735	0,02
Препарат 29	C ₂₂₅ H ₃₃₈ N ₃₄ O ₄₈	4284,5053	2143,2596		4284,5046	0,17

Етап 3

Схема А.3. Синтез Препарату 31 (послідовність SEQ ID NO: 31) з фрагментів Препарату 30 (послідовність SEQ ID NO: 30) та Препарату 29 (послідовність SEQ ID NO: 29).



Етап 3 Опис періодичною процес): До підданого нанофільтруванню розчину Препарату 29 (2,249 г, 46,5 мг/г, 104,6 мг, 0,0244 ммоль) у DMF та Препарату 30 (71,5 мг, 90,6 % площі, 0,0306 ммоль) у DMF (0,3068 г, 0,325 мл) при температурі -5 °C додають 5,0 % (мас.) розчину DIEA в DMF (114,0 мг, 5,70 мг DIEA, 0,0441 ммоль, 1,8 екв) і 10,1 % (мас.) розчину (1-[бис(диметиламіно)метиле]-1H-1,2,3-триазоло(4,5-б)піридинію 3-оксидгексафторфосфату (HATU) в DMF (154,9 мг, 15,59 мг HATU, 0,0410 ммоль, 1,7 екв). Розчин перемішують протягом 4 год при температурі -5 °C, а потім гасять 5 % (мас.) водним розчином бікарбонат) натрію (5,295 г, 4,8 мл) при температурі навколишнього середовища, який додають протягом 15 хв. Одержану суспензію перемішують при температурі 0 °C протягом 15 хв, і одержану тверду речовину відфільтровують. Тверду речовину промивають спочатку водою (4×2 мл), а потім MTBE (4×2 мл). Клейку тверду речовину сушать у вакуумі при температурі 35 °C, і одержують Препарат 31 (219,7 мг, 47,6 % площі, 0,0164 ммоль, вихід 67,1 %).

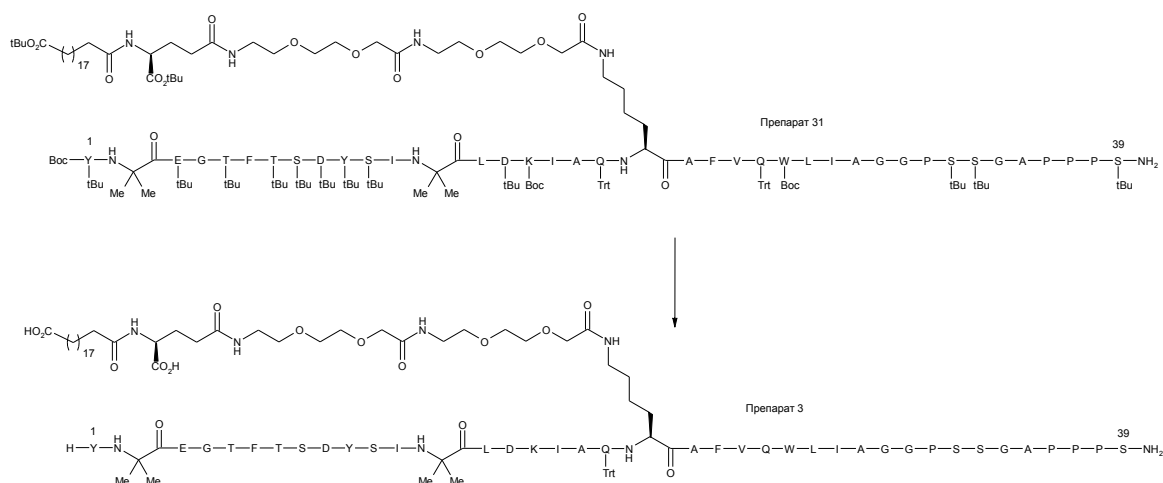
Вихідним розчин Препарату 30 готують у 10 об'ємах DMF. Другий вихідний розчин HATU (1,8 екв)

готують в 10 % (мас.) розчину ACN. Готують третій потік DIEA (2,5 екв) у DMF (5 % (мас.) розчин). Потік розчину Препарату 29 з Етапу 2 і потік Препарату 30 та DIEA закачують у змішувач, на виході зі змішувача потік охолоджують, і об'єднують з охолодженим розчином HATU. Суміш перекачують через інший змішувач та через реактор з поршневим потоком з 3-годинним часом перебування у ванні з постійною температурою -5 °C, і збирають. Готують розчин розсол/бікарбонат (водний розчин 17 % (мас.) водного розчину хлориду натрію, 0,5 % (мас.) водного розчину бікарбонату натрію) з 19 % (мас.) сольовим навантаженням. Потім розчин продукту Препарату 31 у DMF перекачують в реактор з перемішуванням суспензії і відбором змішаного продукту (MSMPR) разом із сольовим розчином для утворення осаду. Тау в реакторі з перемішуванням суспензії і відбором змішаного продукту становить 1 год. Другий MSMPR працює при більш низькій температурі для тау=1 год, і цю суспензію подають на фільтр періодично. Суспензію промивають водою, і сушать під вакуумом при температурі 35 °C.

Вихідний розчин Препарату 30 (9,42 кг, 83,6 % (мас.), 3,72 моль) готують у DMF (54,12 кг), і одержують 0,0563 М вихідного розчину. Другий вихідний розчин HATU (1,15 кг, 3,02 моль) готують у ACN (10,4 кг), і одержують 0,215 М вихідного розчину. DIEA додають у вигляді чистої рідини. Потоки розчину Препарату 29 з Етапу 2 (98,85 л, 42,24 мг/мл, 4,18 кг, 0,975 моль, 0,0099 М, 1,0 екв, 40,2 г/хв). Препарату 30 (1,3 екв, 9,2 г/хв) та DIEA (2,1 екв, 0,152 мл/хв) закачують у змішувач. На виході зі змішувача потік охолоджують до температури 0 °C, і об'єднують з охолодженим розчином HATU (2,0 екв, 3,2 г/хв) при температурі 0 °C. Суміш перекачують через інший змішувач та через реактор з поршневим потоком з 4-годинним часом перебування у ванні з температурою 0 °C, збирають протягом 42 год, і одержують 131,8 кг розчину продукту. Розчин продукту осаджують у два статі. Розчин 17 % (мас.) водного розчину NaCl/0,5 % (мас.) водного розчину NaHCO₃ (29 кг) об'єднують з DMF (13,2 кг) в реакторі з інертною атмосферою, та охолоджують до температури, не нижчої ніж 20 °C. Потім розчин продукту в DMF (66,6 кг) протягом 1 год додають в реактор з 17 % (мас.) водного розчину NaCl/0,5 % (мас.) водного розчину NaHCO₃ (34,4 кг), підтримуючи температуру 20 °C, що призводить до осадження продукту Препарату 31. Суспензію охолоджують до температури 5 °C протягом 1 год, перш ніж додавати воду (загалом 32,2 кг) двома порціями. Суспензію (5 °C), перш ніж її фільтрувати, перемішують протягом 0,5 год. Вологий відфільтрований осад повторно суспендують у воді (63,9 кг) протягом 0,5 год, і фільтрують. Другу частину розчину продукту осаджують аналогічним чином. Розчин 17 % (мас.) водного розчину NaCl/0,5 % (мас.) водного розчину NaHCO₃ (29 кг) і DMF (13,55 кг) об'єднують в реакторі, і охолоджують до температури, не нижчої за 20 °C. Другу частину розчину продукту в DMF (65,2 кг) протягом 1 год. додають до реактора з 17 % (мас.) водного розчину NaCl/0,5 % (мас.) водного розчину NaHCO₃ (36,8 кг), підтримуючи температуру 20 °C, що призводить до осадження продукту Препарату 31. Суспензію охолоджують до температури 5 °C протягом 1,25 год, перш ніж додавати воду (32,1 кг загалом) двома порціями. Суспензію, перш ніж її фільтрувати поверх першого вологого відфільтрованого осаду, перемішують протягом 0,5 год. Об'єднаний вологий відфільтрований осад повторно двічі суспендують у воді (64 кг кожного разу) протягом 0,5 год. кожного разу, і фільтрують. Далі слідують дві витіснювальні промивки водою (64 кг кожна). Об'єднаний промитий вологий відфільтрований осад продувають N₂, після чого сушать під вакуумом при температурі 38 °C до досягнення вмісту вологи за визначенням за методом Карла Фішера <4 % (мас.), і одержують Препарат 31 (10,34 кг, передбачувана 60 % активність, 0,972 моль, передбачуваний 100 % вихід).

Приклад 3

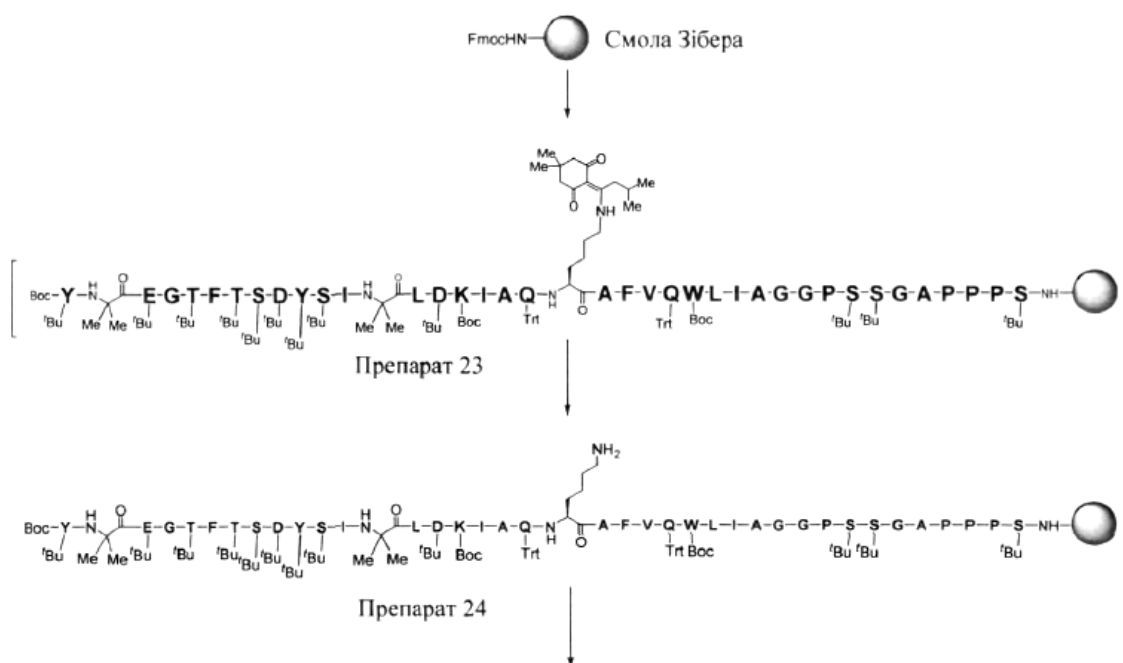
Тирзепатид (послідовність SEQ ID NO: 1)

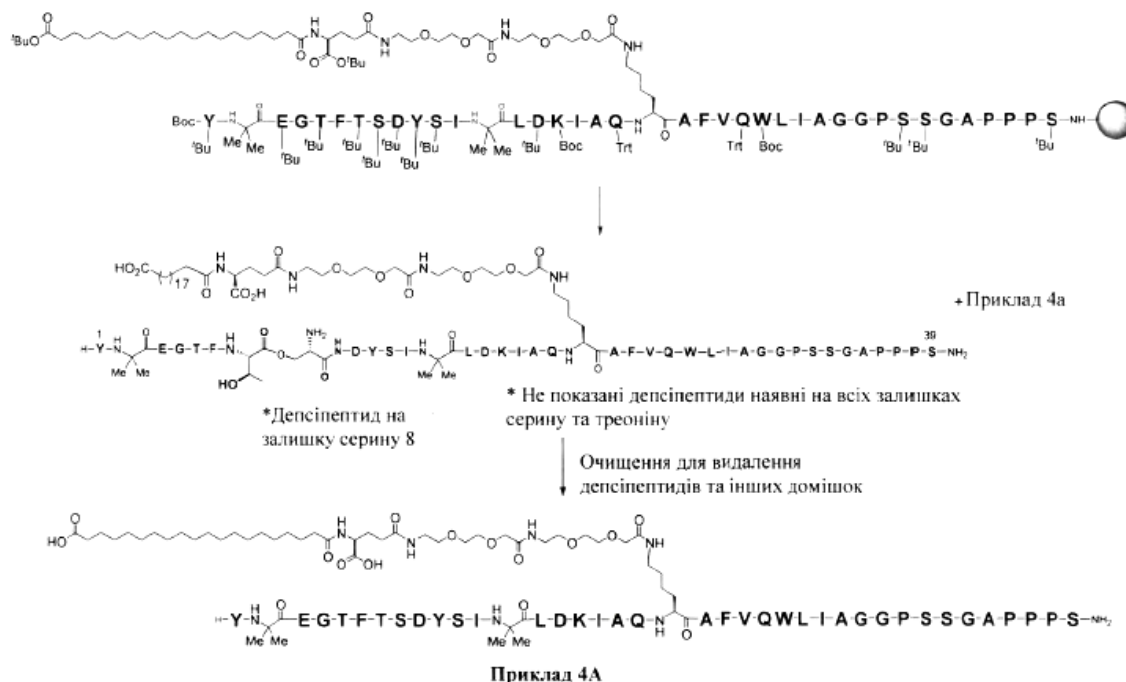


Розчин TFA (2,3 мл), води (0,1 мл), триізопропілсилану (TIPS, 0,1 мл) та дитіотреїтолу (DTT, 75 мг)

В реактор з інертною атмосферою при температурі 15 °С поміщають DCM (27,3 кг, 20,6 л), воду (4,1 кг), Препарат 31 (10,34 кг, передбачувано 60 % активності, 0,972 моль) і DTT (3.10 кг). В окремий реактор з інертною атмосферою помішають TFA (154,1 кг, 103,4 л) і TIPS (3,2 кг, 4,2). Через 0,25 год до суспензії Препарату 31, DCM, води та DTT додають розчин TFA/TIPS, і одержують безбарвний розчин, який нагрівають та витримують при температурі 20 °С протягом 3 год. Після 3 год при температурі 20 °С реактор охолоджують до температури -10 °С. В окремий реактор поміщають MTBE (382,4 кг, 516,8 л), охолоджений до температури -20 °С. Частину цього холодного MTBE (91,8кг, 124,1 л) додають до холодного реакційного розчину протягом 2 год, підтримуючи температуру від -5 °С до -18 °С. Залишок холодного MTBE (294,3 кг, 397,7 л) додають протягом 1,5 год, підтримуючи температуру від -5 °С до -18 °С, що призводить до осадження сполуки Прикладу 3. Температуру суспензії доводять до 0 °С, і витримують протягом >0,5 год перед її фільтруванням трьома частинами. Комбінований вологий відфільтрований осад повторно двічі ресуспендують MTBE (114,7 кг, 155 л), і фільтрують перед остаточним витіснювальним промиванням MTBE (114,7 кг, 155 л). Вологий відфільтрований осад сушать при температурі 28 °С до визначення <4,5 % (мас.) MTBE. В результаті цього одержують сполуку Прикладу 3 (7,77 кг, 46,8 % (мас.), 0,755 моль, вихід 77,7 %).

Тирзепатид (послідовність SEQ ID NO: 1)





В реактор завантажують Fmoc-смола Зібера (17 кг, 0,76 ммоль/г). Смола набухає у DMF, її перемішують протягом 2 год, потім DMF відфільтровують зі смоли. Після цього смола загалом двічі промивають DMF. Потім Fmoc-захищену смола піддають відщепленню захисної Fmoc-групи із застосуванням обробки 20 % PIP/NMP. Відбір проб для перевірки видалення Fmoc проводять після останньої обробки PIP/NMP для підтвердження >99 % видалення Fmoc із застосуванням УФ дослідження (IPC-мішень залишається <1 % Fmoc). Після остаточної обробки 20 % (у масовому відношенні) PIP/NMP шар смоли багаторазово промивають DMF. Потім будують пептидний каркас із застосуванням наведених нижче загальних умов для кожного сполучення амінокислот та кожного відщеплення захисної групи амінокислоти:

Етап процесу	Розчинник/Реагент	Об'єм	Еквівалентність
Відщеплення захисної групи Fmoc	20 % (у об'ємному відношенні) піперидину/NMP	9 мл/г смоли	
Промивання після відщеплення захисної групи	DMF	9 мл/г смоли	
Сполучний реакційний	NMP	7.25 мл/г смоли	
	Амінокислота		3,0 еквіваленти
	Чистий Охута		3,0 еквіваленти
	DIC		3,3 еквіваленти
Промивання після сполучення	DMF	9 мл/г смоли	
Видалення ivDde	8 % гідразин/DMF	9 мл/г смоли	
Промивання після видалення ivDde	DMF	9 мл/г смоли	
Промивання для видалення набухання після складання	IPA	1,8 мл/г смоли	

Відщеплення захисної групи Fmoc-групи: Смола в реакторі для синтезу пептидів обробляють трьома або чотирма порціями 20 % (в об'ємному відношенні) розчину PIP/NMP. Смола при кожній обробці перемішують протягом 30 хв з подальшим фільтруванням для завершення видалення відщеплюваної захисної групи Fmoc. Після остаточної обробки 20 % (в об'ємному відношенні) розчином PIP/NMP шар смоли промивають мінімум шість разів DMF при попередньо визначеному об'ємі порції DMF.

Активация амінокислот: В реактор завантажують заздалегідь підготовлений 12 % (у масовому відношенні) розчин Охута Pure/NMP. Потім додають вибрану Fmoc-амінокислоту. Суміш перемішують при температурі 20±5 °C до повного розчинення Fmoc-амінокислоти. Потім розчини Fmoc-

амінокислота/Охума Pure/NMP охолоджують до температури $15\pm 3^{\circ}\text{C}$ перед активацією для забезпечення регулювання незначної реакції екзотермічної активації, і температуру одержаного розчину підтримують в діапазоні $20\pm 5^{\circ}\text{C}$. Потім розчин амінокислоти активують додаванням DIC. Після цього активований розчин складного ефіру перемішують протягом 20-30 хв перед перенесенням розчину в реактор, в який поміщений пептид на смоляному напівпродукті.

Сполучення: Після завершення етапу попередньої активації розчин активованого складного ефіру переносять в реактор, що містить депротектований пептид на смолі, для ініціювання реакції сполучення. Реакційну суміш пептидною сполучення перемішують при температурі $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ протягом щонайменше 4 год. Після необхідного часу перемішування відбирають пробу смоли для визначення завершення сполучення (IPC). Відбирання проб повторюють через певні проміжки часу, доки не буде отриманий прохідний результат IPC. За необхідності виконуються операції повторного сполучення. Після завершення сполучення, вміст розчину реактора для синтезу пептидів фільтрують, після чого пептиди на смоляних напівпродуктах декілька разів промивають DMF для підготовки до наступного сполучення.

Сполучення Ile (12) з Aib (13): Сполучення Fmoc-Ile (12) з Aib (13) виконується із застосуванням симетричного ангідридного підходу з використанням шести еквівалентів Fmoc-AA, трьох еквівалентів DIC. Час активації для цієї послідовності подовжується до 40-60 хв. щоб забезпечити утворення активованих симетричних ангідридів. Для досягнення завершення реакції (<1% несполучених), як визначається із застосуванням ВЕРХ-аналізу, необхідним є тривалий час перемішування сполучної реакційної суміші (18 год.).

Відщеплення захисної групи Lys (20) ivDde (Препарат 23): Здійснюють селективне відщеплення захисної групи Lys (20) ivDde з 39 амінокислот, повністю захищеної на пептидному каркасі Boc-Tyr(1)-Ser(39). Відщеплення захисної групи здійснюють із застосуванням 8 % (у масовому відношенні) розчину гідрату гідразину в DMF при перемішуванні протягом 4 год при температурі навколишнього середовища. Реакцію відщеплення захисної групи контролюють із застосуванням ВЕРХ, орієнтуючись на межу $\text{IPC} < 1\%$ компонента Lys(ivDde), що залишається після відщеплення захисної групи. Одержаний пептидний фрагмент (Препарат 23) повторно промивають (8 разів) DMF для повного видалення залишкового гідразину. Повністю побудований фрагмент Препарату 23 чотири рази промивають IPA, потім сушать при температурі $< 40^{\circ}\text{C}$ до досягнення $\text{LOD} \leq 1\%$. Препарат 23 упаковують, і зберігають у холоді (-20°C) перед сполученням з Препаратом 6.

Сполучення Препарату 6 з Препаратом 23: Тверді речовини Препарату 6 (1,5 екв) та RuBOP (1,5 екв) поміщають в реактор, після чого додають DMF, і суміш перемішують до розчинення. Після цього завантажують колідин для ініціювання утворення активних складних ефірів. Розчин активованого складного ефіру перемішують протягом 60 хв перед перенесенням в реактор, у який поміщений напівпродукт Препарату 23. Реакційну суспензію перемішують протягом 18 год при температурі 25°C . Пробу суспензії відбирають для визначення завершення сполучення (IPC), і, за необхідності, відбір проби повторюють через певні проміжки часу, необхідні для визначення проходження IPC (<1 % Препарату 23). Після завершення сполучення вміст розчину відфільтровують у відходи. Повністю побудований напівпродукт Препарату 24 промивають декілька разів DMF, потім IPA. Препарат 24 сушать при температурі $\leq 40^{\circ}\text{C}$ до досягнення $\text{LOD} \leq 1\%$. Препарат 24 упаковується, і зберігається в холоді (-20°C) перед відщепленням від смоли.

Розщеплення смоли та виділення неочищеної сполуки Прикладу 4А. Готують коктейль для розщеплення, то складається з трифтороцтової кислоти (TFA), триізопропілсилану (TIPS), дитіотреїтолу (DTT), DCM та води. Коктейль для розщеплення охолоджують до температури $15\pm 5^{\circ}\text{C}$. Кількість реагентів показана в наведеній нижче таблиці:

Етап процесу	Розчинник/Реагент	Об'єм (завантажений, зв'язаний зі смолою)
Коктейль для розщеплення	TFA	7,16 мл/г
	Вода	0,34 мл/г
	TIPS	0,24 мл/г
	DTT	0,24 г/г
	DCM	0,75 мл/г
Повна завантажена кількість коктейлю	Дані відсутні	~8,50 мл/г
Промивання відпрацьованої смоли	DCM	3 мл/г
Антирозчинник	MTBE	14 г/г
Промивання посудини і відфільтрованого осаду	MTBE	3 г/г

В реактор поміщають спочатку Препарат 24, а потім коктейль для розщеплення. Суміш перемішують, і витримують при температурі 23°C протягом 3 год. Суміш фільтрують, потім

відпрацьовану смолу промивають DCM Промивний фільтрат DCM об'єднують з основним об'ємом розчину для відщеплення захисної групи, і вміст охолоджують до температури $\leq -10^{\circ}\text{C}$. MTBE охолоджують до температури $\leq -13^{\circ}\text{C}$. Потім холодний MTBE подається до холодного фільтрату двома порціями. Швидкість подачі MTBE регулюється для підтримання внутрішньої температури неочищеного розчину на рівні $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Початкова кількість MTBE становить $\sim 45\%$ від загальної кількості MTBE. Незадовго до кінця додавання MTBE утворюється м'який осад, але він легко повторно розчиняється в розчині. Розчин з осадом повторно охолоджують до внутрішньої температури $-15 \pm 5^{\circ}\text{C}$. Друге додавання MTBE здійснюють зі швидкістю, яка приблизно в 5-10 разів перевищує початкову швидкість подачі MTBE, і складає $\sim 55\%$ від загальної кількості MTBE. Внутрішня температура суспензії з осадами під час додавання підтримується на рівні $\leq 0^{\circ}\text{C}$. Одержану суспензію витримують при температурі $-8 \pm 3^{\circ}\text{C}$ протягом мінімум 6 год, після чого нагрівають до температури $0 \pm 3^{\circ}\text{C}$, і додатково витримують протягом 2 год перед виділенням.

Холодну неочищену пептидну суспензію фільтрують, після чого одержаний полений відфільтрований осад промивають MTBE. Потім неочищений вологий відфільтрований осад сполуки Прикладу 4А сушать до IPC-цільового значення $\text{LOD} < 1\%$. Неочищений продукт, сполуку Прикладу 4А упаковують, та зберігають. Неочищений напівпродукт зберігають у холоді (-20°C) до очищення. Загалом, одержують 45,39 кг неочищеної сполуки Прикладу 4А із 45% (мас.) та 64% площі піка чистоти ВЕРХ. Вихід на основі смоли Зібера становить 47% .

Очищення сполуки Прикладу 4А:

Рухомі фази:

Рухома фаза А (МРА)

90 % води, 0,1 % TFA та 10 % ACN

Рухома фаза В (МРВ)

10 % води, 0,1 % TFA та 90 % ACN

Очищення 1 (RP1) із застосуванням хроматографії з оберненою фазою: Неочищену сполуку Прикладу 4А розчиняють у 90 % (мас.) МРА та 10 % (мас.) МРВ. Розчин перемішують протягом щонайменше 7 год для завершення декарбоксілювання триптофану. Витриманий неочищений розчин фільтрують, і завантажують на попередньо врівноважену колонку Kromasil 100-10-C8. Колонку промивають сумішшю буферів А (90 % води, 0,1 % TFA і 10 % ACN) та В (10 % води, 0,1 % TFA та 90 % ACN), що дає 30 % ACN для двох об'ємів колонки, підготовлених до елюювання шляхом збільшення змішаної концентрації ACN з 30 % до 35 % на один об'єм колонки. Тирзепатид елюють з колонки із застосуванням 1,5 % збільшення ACN на об'єм колонки до завершення елюювання. Елюент фракціонують, і аналізують на чистоту із застосуванням RP-HPLC (високоєфективної рідинної хроматографії з оберненою фазою). Колонку регенерують, збільшуючи ACN з 47 % до 65 % на один об'єм колонки, і продовжують подавати 65 % ACN для трьох об'ємів колонки. Колонку повторно врівноважують, із застосуванням 30 % ACN для двох об'ємів колонки перед наступною послідовністю введень.

Фракції, які відповідають вимогам включення до загального потоку, об'єднують. Фракції, які не відповідають критеріям чистоти, але мають чистоту понад 50 %. Можуть бути об'єднані для повторних введень після завершення всіх початкових введень. Фракції для повторних введень поділяють на фракції переднього і заднього фронту хроматографічної зони, розводять буфером А, і зберігають у холоді. Фракції для повторних введень обробляють, та об'єднують із застосуванням критеріїв початкового введення; однак лише фракції головних піків піддають прямій обробці, і подальше введення не здійснюють. Після завершення об'єднання в головний потік, напівпродукт аналізують на концентрацію та чистоту. Перед обробкою RP2 матеріал розбавляють, і доводять рН до 8. Процес RP1 дає 37 кг неочищеного продукту та 14277 г продукту, який входив до його складу, а середньою чистотою пулу $90,9\%$.

Очищення 2 (RP2) із застосуванням хроматографії з оберненою фазою: Розчин RP1 сполуки Прикладу 4А RP1 завантажують на попередньо врівноважену наповнену колонку Kromasil 100-10-C8. Колонку промивають сумішшю буфера С (90 % водний розчин NH_4OAc , рН 8,0, 10 % ACN) і буфера D (10 % водний розчин NH_4OAc , рН 8,0, 90 % ACN), що призводить до одержання 20 % розчину ACN для двох об'ємів колонки. Тирзепатид елюють і колонки із застосуванням 3,5 % збільшення ACN на колонку до завершення елюювання. Елюенти фракціонують, і аналізують на чистоту із застосуванням високоєфективної рідинної хроматографії з оберненою фазою. Після елюювання колонку регенерують, збільшуючи ACN до 80 % на один об'єм колонки, і продовжують подавати 80 % ACN для трьох об'ємів колонки. Колонку повторно врівноважують, із застосуванням 20 % ACN для двох об'ємів колонки перед наступною послідовністю введень.

Фракції, які відповідають вимогам включення до загального потоку, об'єднують. Фракції, які не відповідають критеріям чистоти, але мають чистоту понад 60 %. Можуть бути об'єднані для повторних введень після завершення всіх початкових введень. Фракції для повторних введень поділяють на фракції передньою і задньою фронту хроматографічної зони, розводять буфером С, і зберігають у

холоді. Фракції для повторних введень обробляють та об'єднують із застосуванням критеріїв початкового введення: однак лише фракції головних піків піддають прямій обробці, і подальше введення не проводиться. Після завершення об'єднання в головний потік, напівпродукт аналізують на концентрацію та чистоту. Перед підготовкою до етапу TFF pH матеріалу доводять до 8. Процес RP2, розпочинаючи з 14,2 кг, дає 10,9 кг продукту, який входив до його складу, з виходом 76,7 %.

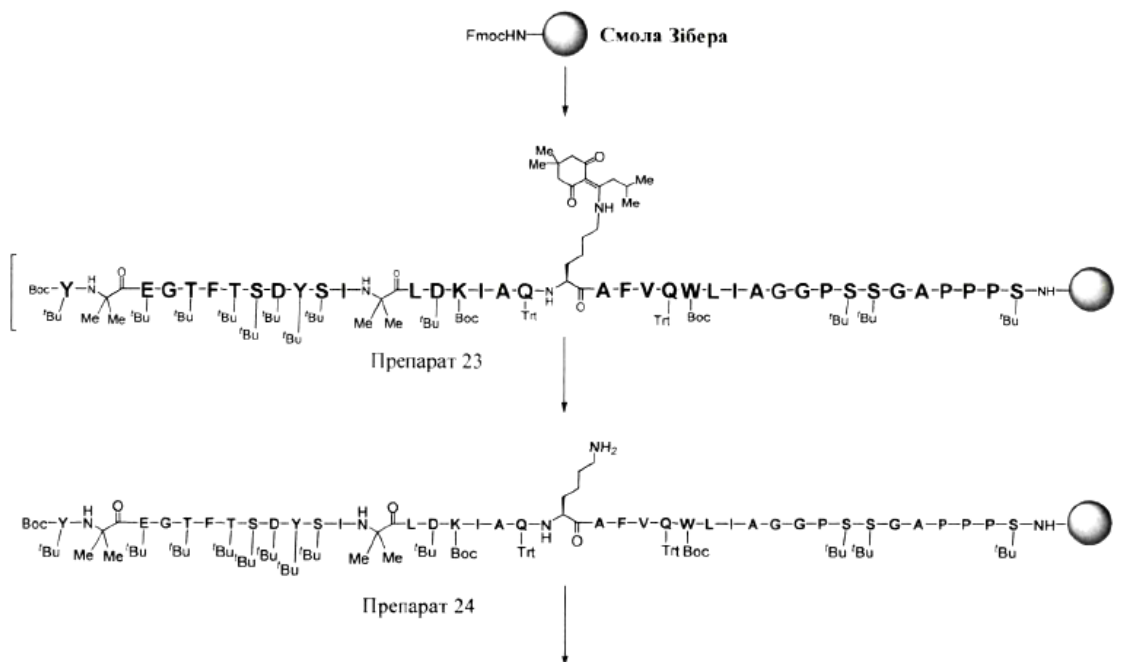
Іонообмінна хроматографія (ІЕХ): Розчин RP2 сполуки Прикладу 4А фільтрують, і завантажують у колонку Amberchrom CG 300M. Дві фракції елюють із застосуванням рухомої фази Е (10 % водний розчин ацетату амонію, 5 % IPA, pH 8) та рухомої фази F (ізопропанол). Фракції аналізують на вміст пептидів, і фракції <3 мг/мл викидають. Об'єднаний концентрат фракцій зберігають при температурі 20 °С перед осадженням. Процес ІЕХ починається з 10,9 кг RP2, і одержують 14,3 кг матеріалу сполуки Прикладу 4А з 97,8 % чистотою пулу.

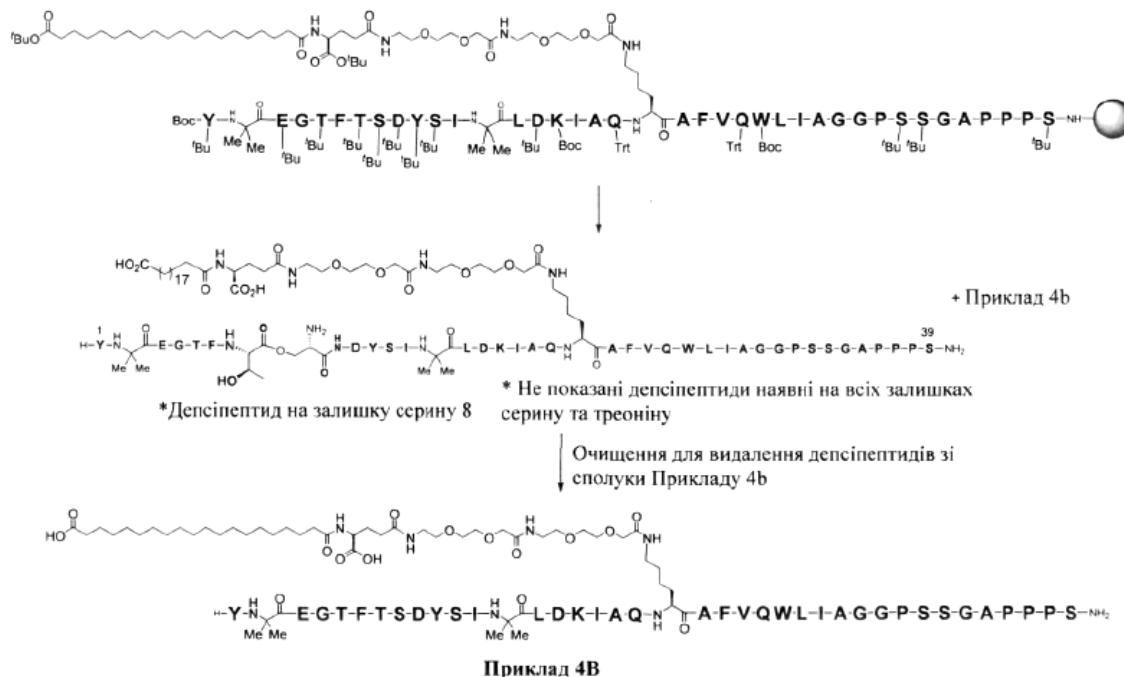
Осадження: Розчин ІЕХ сполуки Прикладу 4А (333 кг) фільтрують, а потім завантажують ізопропанол (850 л) для зменшення вмісту води до <10 % (мас.). Розведений розчин охолоджують до температури 0±3 °С під час підготовки до завантаження MTBE та осадження. MTBE (2304 л, 1708 кг) охолоджують до температури 0±3 °С. Холодний MTBE подають до розчину ІЕХ зі швидкістю ~0,69 кг/хв впродовж перших ~37 % завантаження MTBE. Потім швидкість подачі збільшують в середньому до ~2,3 кг/хв для завершення залишкових ~63 % завантаження MTBE. Температура під час подачі підтримується на рівні <5 °С. Одержану суспензію осаду фільтрують у холодному стані (≤10 °С), після чого відфільтрований осад проминають MTBE. Відфільтрований осад висушують до LOD<2 %.

Зволоження сполуки Прикладу 4А: Сполуку Прикладу 4А зволожують шляхом пропускання вологого азоту крізь фільтр-осушник. Вологість вихідною потоку газу на виході фільтра перевіряють кожні 60 хв. Зволоження продовжують до тих пір, поки у вологому відфільтрованому осаді не залишиться <0,5 % MTBE та <0,2 % IPA. Після завершення процесу зволоження потік азоту перемикають на протікання сухого азоту через відфільтрований осад чистого продукту Прикладу 4А. Матеріал відбирають для виявлення води та залишкових кількостей розчинників, порівняно з конкретними показниками ІРС. і сушіння із застосуванням сухого азоту продовжують до досягнення бажаного цільового вмісту води 5-7 % (у масовому відношенні). Загалом виділяють 12,9 кг сполуки Прикладу 4А з чистотою за вмістом пептидів >95 %. Загальний вихід за загрузкою смоли Зібера становить 31 %.

Приклад 4В (Лінійний SPPS)

Тирзепатид (послідовність SEQ ID NO: 1)





Препарат 23

Спосіб одержання Препарату 23 по суті такий, як викладено у Прикладі 4А, за винятком того, що NMP повністю замінюють на DMF для всіх реакцій сполучення та відщеплення захисної групи. Крім того, стехіометричне співвідношення амінокислоти:Охута до DIC знижується до 2,5:2,5:2,7 молярних еквівалентів, беручи за основу смоли Зібера. Єдиним винятком, пов'язаним із використанням DMF, є сполучення Ile 12-Aib 13, де зберігається NMP. У ньому прикладі 17,6 кг смоли Зібера обробляють до 92,2 кг пептиду Препарату 23 на смоляному напівпродукті.

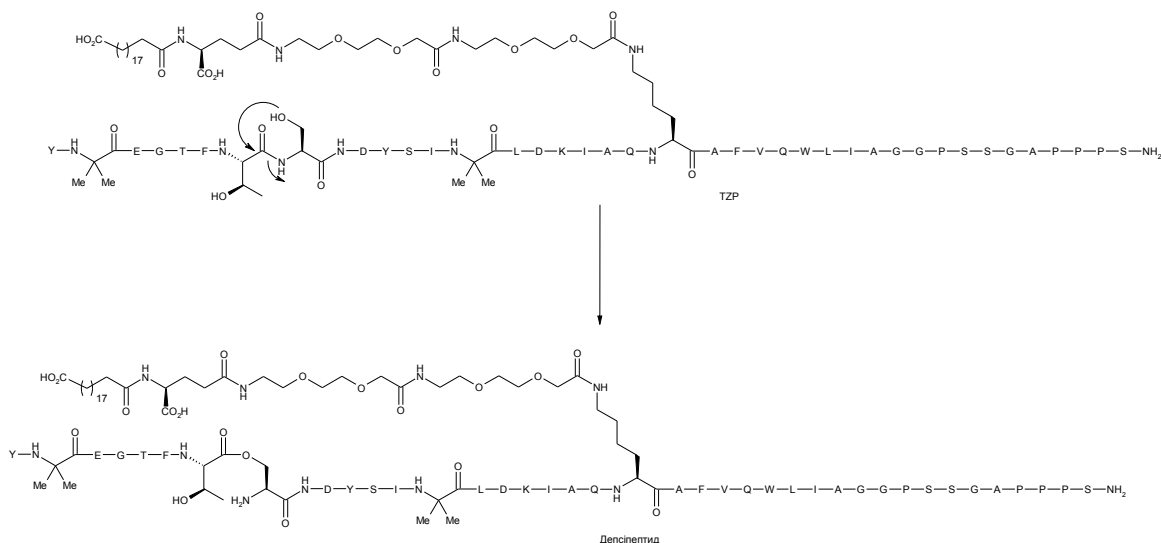
Препарат 24

За способом по суті таким, як описано у Прикладі 4А, одержують 92,1 кг Препарату 23; і далі обробляють до 97,3 кг пептиду Препарату 24 на смоляному напівпродукті. Препарат 24 упаковують, і зберігають в холоді (-20 °C) перед відщепленням від смоли.

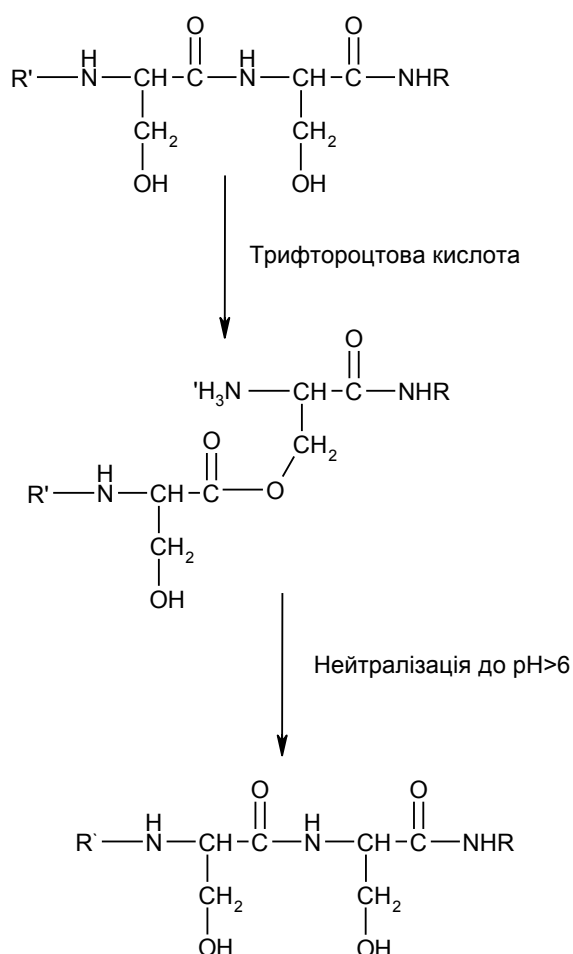
Розщеплення смоли та виділення неочищеної сполуки Прикладу 4В: Дві партії Препарату 24 у кількості 32 кілограми обробляють із застосуванням умов по суті таких, як описано в Прикладі 4А, для одержання 24,4 кг сполуки Прикладу 4В, з чистотою (за даними ВЕРХ) 69,5 % та виходом 52,6 %, та 21,3 кг сполуки Прикладу 4В, з чистотою (за даними ВЕРХ) 88,3 % та виходом 45,2 %. Неочищений напівпродукт зберігають у холоді (-20 °C) до очищення.

Очищення сполуки Прикладу 4В: Розчинення неочищеної сполуки: Неочищений тирзепатид Прикладу 4В поміщують у посудину для розчинення, і розчиняють у розчині ацетонітрил:вода (1:1) до кінцевої концентрації 25 г твердої речовини/л розчину, рН одержаного розчину доводять до 8,5-9,5 із застосуванням гідроксиду амонію для ініціювання перетворення депсипептидних ізомерів (10-15 %) на тирзепатид Прикладу 4В. Суміш з відрегульованим рН перемішують протягом щонайменше однієї години для забезпечення перетворення депсипептиду. Потім рН доводять до 1,5-2,5 додаванням трифтороцтової кислоти, і розбавляють до 30 % вмісту ацетонітрилу під час підготовки до хроматографії. В цілому, неочищений розчин перемішують протягом щонайменше 7 год для перетворення солі Trp CO₂ на тирзепатид Прикладу 4В.

Перетворення тирзепатиду (TZP) на депсипептид:



Перетворення депсіпептиду на API:



Очищення 1 із застосуванням хроматографії з оберненою фазою (RP1): Процес RP1 по суті такий, як представлено в прикладі 4A. може бути застосований для перетворення депсіпептиду на API. Процес очищення RP1 по суті такий, як описаний у Прикладі 4A; однак описаний вище етап розчинення неочищеного продукту покращує можливості хроматографічного етапу RP1. Це забезпечує більш високий вміст тирзепатиду у грамах на літр порції смоли, і зменшує кількість введень, необхідних для очищення неочищеного тирзепатиду в умовах, описаних у Прикладі 4. У цьому прикладі відкоригований вміст неочищеної сполуки Прикладу 4B у кількості 23,7 кг забезпечує одержання 25,4 кг сполуки Прикладу 4B (107 %) після RP1. Загальний об'єм розчину становить 2910 л при 8,72 г/л, і як тільки всі фракції пулу виявляються зібраними, суміш перемішують, відбирають

проби, та зберігають до проведення очищення 2 (RP2) із застосуванням хроматографії з оберненою фазою.

Очищення 2 (RP2) із застосуванням хроматографії з оберненою фазою: По суті той самий процес очищення, який описаний у Прикладі 4А, та із застосуванням методів, відомих фахівцю, застосовують для очищення 2 (RP2) із застосуванням хроматографії з оберненою фазою. У цьому прикладі 15,2 кг вміщеної сполуки Прикладу 4В з RP1 очищають до 13,8 кг сполуки Прикладу 4В з чистотою ~ 98 % після RP2. Загальний об'єм розчину становить 808 л при 17,0 г/л. Суміш зберігають до тангенціальної потокової фільтрації.

Тангенціальна потокова фільтрація (TFF): Встановлюють мембрани TFF, і промивають їх водою. Амонійно-ацетатний буфер готують із використанням очищеної води з низьким граничним значенням вмісту ендотоксинів, оцтової кислоти та гідроксиду амонію. Потім завантажують ізопропанол для одержання буфера (5:95) 100 мМ NH₄OAc, pH 8,0:IPA. Розчин 17 г/л RP2 сполуки Прикладу 4В концентрують шляхом TFF до ~125 г/л. Розчин RP2 рециркулюють, дозволяючи розчиннику проникати крізь мембрану, зберігаючи розчин пептиду на стороні утримування мембрани в розчині. Після концентрації буфер для діалізації подається в резервуар для утримування осаду на мембрані, у той час як розчинену речовину постійно збирають. Обмін буферу продовжують до досягнення бажаного складу розчинника та концентрації пептиду. Розчин випускають із системи, а одержаний поляризаційний шар змивають з мембрани, та об'єднують з пептидним концентратом. За допомогою TFF обробляють дві порції розчину RP2 (403,9 л при 17 г/л 9,87 кг API).

Осадження спільною подачею: Порції TFF поєднують (138,2 кг; 78,3 г/л) та за методом Карла Фішера визначають вміст вологи (8,9 %) для перевірки досягнення рівня <10 %. В окрему посудину поміщають MTBE (243 кг), і охолоджують до температури 0 °C. В посудині для осадження додають IPA (48 кг), воду (6 кг) і MTBE (100 кг), і розчин охолоджують до температури 0 °C. Потоки з процесів TFF та MTBE подають у посудину для осадження зі швидкістю 1,6-1,8 кг/хв та 2,9-3,1 кг/хв, відповідно. Одержану суспензію витримують додатково протягом 0,7 год. при температурі 0 C, потім нагрівають до температури 15 C. Суспензію витримують при температурі 15 C протягом 1 год з подальшим додаванням MTBE (118 кг). Суспензію витримують при температурі 15 °C протягом 1 год, а потім охолоджують до температури 2,5 °C. Суспензію фільтрують охолодженою, і відфільтрований осад промивають MTBE (573 кг). Відфільтрований осад висушують до LOD<2 %.

Зволоження: Матеріал прикладу 4В звожують по суті так, як зазначено в Прикладі 4А, та із застосуванням методів, відомих фахівцю. Виділяють загалом 14,5 кг сполуки Прикладу 4В (послідовність SEQ ID NO: 1) із чистотою >97,7 % (за результатами ВЕРХ) та вмістом пептиду 88,4 %. Загальний вихід за загрузкою смоли Зібера становить 46 %.

Приклад 5

Безперервний синтез Препарату 31 із застосуванням хімії конвергентного синтезу в потоці.

Синтез Препарату 31 з пептидних фрагментів здійснюють із застосуванням в хімічному синтезі як періодичних методів, так і послідовного додавання фрагментів у трубчастий проточний реактор. Узагальнений підхід до синтезу включає сполучення двох фрагментів шляхом змішування двох розчинів разом зі сполучним агентом у трубчастому реакторі, за яким слідує додавання основи та додатковий час перебування у трубчастому реакторі для видалення Fmoc-захисної групи. Цим сполучені сполуки готуються до додавання наступного фрагмента. Надлишки реагентів, основи та розчинника видаляються між послідовними реакціями сполучення за допомогою нанофільтра з мембраною, розмір якої забезпечує утримання пептиду та проникнення домішок з нижчою молекулярною масою. Діалізацію застосовують для повного видалення домішок з нижчою молекулярною масою до наступних етапів сполучення. Опис та аналітичні результати прикладу цих перетворень наведені нижче.

Високоєфективну рідинну хроматографію застосовують для підтвердження синтезу Препарату 31 з Препарату 29 і Препарату 30. У згаданому методі дослідження застосовують колонку C4 зі стаціонарною фазою при температурі 65 °C (2,1 мм (внутрішній діаметр) × 150 мм × 1,7 мкм (розмір частинок)) з градієнтом В (0,1 % TFA у воді та ацетонітрилі) 60-98 % протягом 12 хв. Для цього матеріалу використовують УФ-детектування при 214 нм.

У Таблиці А.5 наведені дані мас-спектрометрії з високою роздільною здатністю, зібрані для продукту реакції сполучення у потоці на етапі 3 (Препарат 31). Точність маси підтверджує бажану сполуку.

Підтвердження визначеного Препарату 31 через точність маси, обчисленої за допомогою даних мас-спектрометрії з високою роздільною здатністю

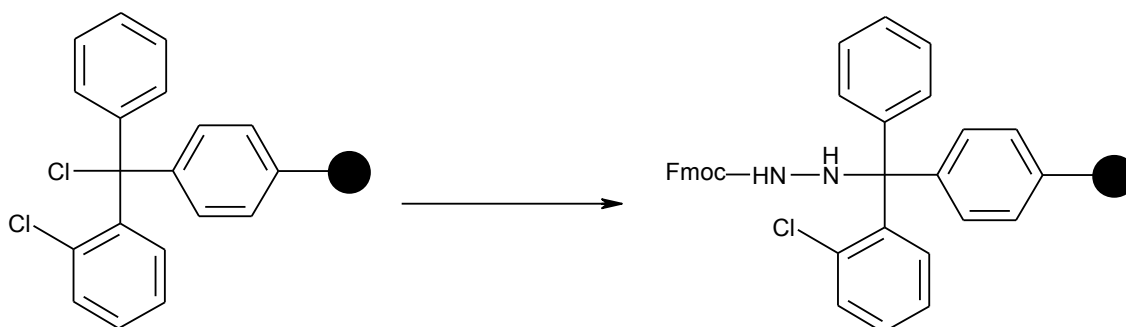
Сполука	Хімічна формула	Теоретична моноізотопна маса (нейтральна)	Спостережуваний m/z іонів	Стан заряду	Обчислена моноізотопна маса (нейтральна)	Точність маси (млн ⁻¹)
Препарат 31	C ₃₃₄ H ₅₁₂ N ₄₈ O ₇₄	6379,7777	1595,9512	4	6379,775694	0,3

Нативне хімічне лігування являє собою процес, корисний для одержання пептидів повної довжини, що містять у послідовності цистеїн або аланін. У процесі застосовують хемоселективну реакцію двох незахищених пептидних сегментів, і одержують перехідний напівпродукт, зв'язаний зі складним тіоефіром. Зв'язаний зі складним тіоефіром напівпродукт перегруповують, і одержують продукт лігування повної довжини, що має нативний пептидний зв'язок на ділянці лігування. Фахівець візьме до уваги, що техніка нативного хімічного лігування може бути корисною при хімічному синтезі пептидів повної довжини, що містять цистеїн або аланін.

Приклад 6

Процес нативного хімічного лігування

Тирзепатид (послідовність SEQ ID NO: 1)

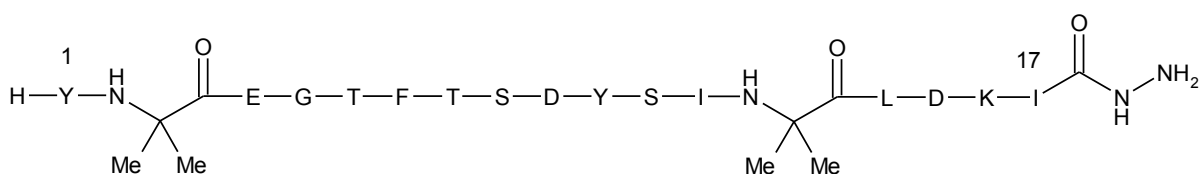


2-Хлортритилхлоридна (2-CTC) смола

Препарат 32

Синтез на смолі Fmoc-Hydrazine-CTC (Препарат 32)

Смола 2-CTC (10,7 г, 17,7 ммоль) набухає в 100 мл DCM протягом 20 хв при температурі 0 °С. 9-Флуоренілметилкарбазат (15,6 г, 61,4 ммоль, 3,5 екв) розчиняють у 210 мл DMF:DCM (2:1). До цього розчину 9-флуоренілметилкарбазату додають DIEA (31 мл, 178 ммоль, 10,1 екв). Потім цей розчин повільно додають до смоли при температурі 0 °С, перемішують при температурі 0 °С протягом години, і дозволяють нагрітися до кімнатної температури. Реакційну суміш перемішують протягом 16 год при кімнатній температурі. Потім додають метанол (10 мл) для гасіння залишку смоли 2-CTC, і перемішують протягом 15 хв. Смолу промивають спочатку 200 мл DMF, потім DMF (2×100 мл), водою (3×100 мл), DMF (3×100 мл), метанолом (3×100 мл) і, нарешті, DCM (3×100 мл). Смолу сушать у вакуумній печі при температурі 27 °С протягом 16 год. Навантаження смоли, визначене за результатами кількісного ЯМР, становить 0,74 ммоль/г.



Препарат 33

Синтез пептидного гідразиду (17-членного) (Препарат 33)

Послідовність SEQ ID NO: 32

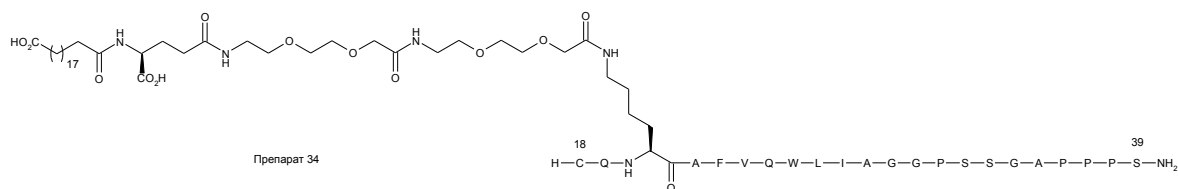
Смолю гідрозин-СТС (1,01г, значення навантаження: 0,65 ммоль/г) поміщують в реакторну посудину об'ємом 40 мл; смола набухає у DCM (3×4 мл) (по 30 с кожного разу) з подальшим набуханням у DMF (2×10 мл) (по 20 хв кожного разу) у синтезаторі пептидів.

Фмос-Ile-OH (0,919 г, 2,60 ммоль, 4 екв) та HBTU (0,99 г, 2,61 ммоль, 4 екв) розчиняють у 7 мл DMF. До розчину амінокислоти додають DIPEA (0,91 мл, 5,22 ммоль 8 екв), і об'єм доводять до 10 мл із застосуванням DMF. Активований розчин амінокислоти додають до смоли. Суміш змішують з азотом протягом 8 год. Через 8 год смолу промивають (5×10 мл) DMF, (5×10 мл) DCM, і сушать протягом 12 год. Навантаження смоли, що одержують, визначене за результатами кількісної ЯМР, становить 0,54 ммоль/г. 0,91 г цієї смоли використовують для синтезу Препарату 33 (послідовність SEQ ID NO: 32).

Відщеплення захисної групи: 4×9 мл 20 % (у об'ємному відношенні) розчину піперидину в DMF, по 30 хв кожного разу.

Сполучення: Для сполучення амінокислот використовують 3 екв амінокислоти, 3 екв ОХУМА і 3,3 екв DIC. Смолу промивають (5×9 мл) DMF з перемішуванням N₂ протягом 1 хв після кожного сполучення та кінцевого повторення операції відщеплення захисної групи. Після закінчення синтезу пептидного гідрозиду смолу промивають DCM з перемішуванням N₂. Смолу сушать на синтезаторі.

Відщеплення захисної групи та розщеплення: До висушеної смоли (2,37 г) додають 25 мл коктейлю для розщеплення (5 % (у відношенні маси до об'єму) дитіотреїтолу (DTT), 2,5 % (у об'ємному відношенні) води, 2,5 % (у об'ємному відношенні) триізопропілсилану (TIPS) та 90 % трифтороцтової кислоти (TFA)), і перемішують протягом 3 год на роторному змішувачі. Смолу фільтрують, і промивають (2×2,5 мл) TFA. Фільтрат виливають у 175 мл холодного MTBE, і пептид негайно випадає в осад. Фільтраційну колбу промивають (2×2,0 мл) TFA, і змиви виливають у холодний MTBE. Суміш охолоджують до температури -20 °C протягом півгодини, а потім центрифугують. Після цього осад пептиду двічі промивають 150 мл MTBE, і центрифугують. Осад пептиду сушать у вакуумній печі при температурі 27 °C протягом 16 год. Після висихання одержують 1,25 г зразок неочищеного Препарату 33 [Очікувана (маса+2H⁺)/2=968,4883, спостережувана (маса+2H⁺)/2=968,4879].



Приблизно 0,62 ммоль Препарату 34 синтезують на амідній смолі Зібера за стандартними протоколами SPPS. Фмос-Lys (ivDde)-OH використовують для ортогонального відщеплення захисної групи та ацилювання лізину.

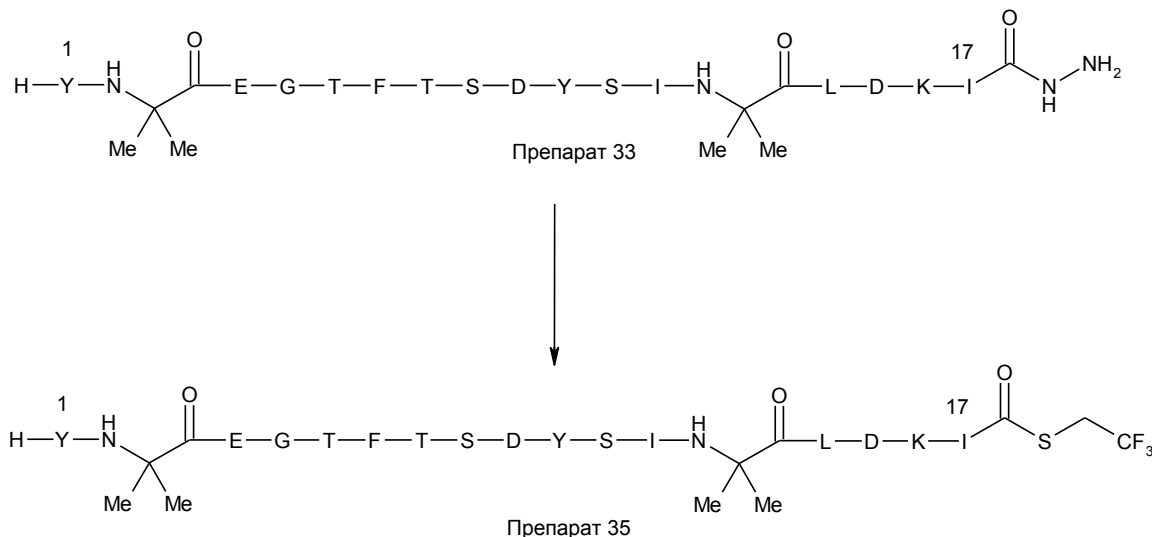
Відщеплення захисної групи ivDde: Гідрозину моногідрат (64 % (у масовому відношенні) (1,98 г, 25,3 ммоль) розбавляють до 24,4 г DMF і 20 г додають до смоли. Суспензію перемішують потоком азоту. Приблизно через дві години промивають (5×9 мл) DMF. Промивання повторюють ще один раз.

2-[2-[2-[2-[2-[2-[[[4S)-5-трет-бутоксид-4-[(20-трет-бутоксид-20-оксо-ікозаноїл)аміно]-5-оксо-пентаноїл]аміно]етокси]ацетил]аміно]етокси]етокси]оцтову кислоту (1094,4 мг, 1,252 ммоль, 2 екв) розчиняють у 10 мл безводного DMF. До цієї суміші додають TNTU (506,9 мг, 1,360 ммоль, 2,2 екв) та DIEA (0,24 мл, 1,4 ммоль, 2,2 екв). Об'єм доводять до 15 мл за допомогою безводного DMF. Цю суміш перемішують протягом 30 хв на роторному змішувачі. Потім активований складний ефір Препарату 6 додають до смоли, і протягом 12 год перемішують потоком азоту. Через 12 год розчин зливають, і смолу промивають (5×10 мл) DMF і (7×10 мл) DCM із перемішуванням N₂ протягом 1 хв. Смолу сушать протягом 8 год на синтезаторі.

Відщеплення захисної групи та розщеплення: До висушеної смоли (2,42 г) додають 20 мл коктейлю для розщеплення (5 % (у відношенні маси до об'єму) дитіотреїтолу (DTT), 2,5 % (у об'ємному відношенні) води, 2,5 % (у об'ємному відношенні) триізопропілсилану (TIPS) та 90 % трифтороцтової кислоти (TFA), і перемішують протягом 3 год на роторному змішувачі. Смолу фільтрують, і промивають (2×2,0 мл) TFA. Фільтрат виливають у 200 мл холодного MTBE, і пептид негайно випадає в осад. Фільтраційну колбу промивають (2×2 мл) TFA, і змиви виливають у холодний MTBE. Суміш охолоджують до температури -20 °C протягом 30 хв, і потім центрифугують. Осад пептиду сушать у вакуумній печі при температурі 27 °C протягом 14 год. Після висихання одержують 1,853 г неочищеного Препарату 34. Його очищують із застосуванням високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою на 10 мкм колонці Kromasil 100-10-C8 (30 мм × 250 мм) при температурі навколишнього середовища з лінійним градієнтом 30-55 % ацетонітрилу у воді протягом 25 хв після 15 % ацетонітрилу у воді перші 5 хв і TFA постійної концентрації, яка становить 0,1 %, протягом 30 хв. Одержують 1,28 г очищеного препарату 34 (послідовність SEQ ID NO: 33) [Очікувана (Маса+2H⁺)/2=1470,7929, спостережувана (маса+2H⁺)/2=1470,7885].

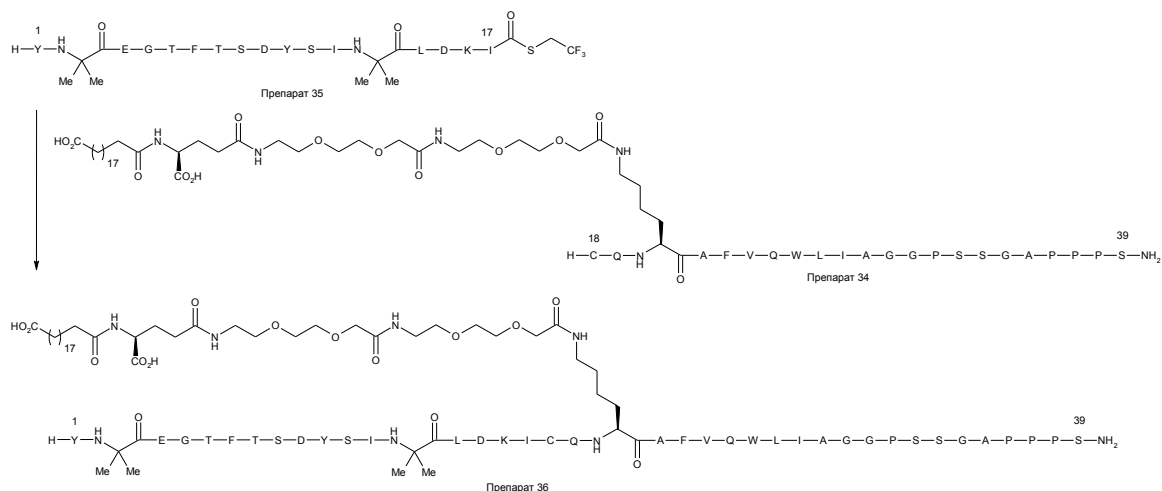
Синтез складного тіоефіру (перетворення Препарату 33 на Препарат 35).

Неочищений пептидний гідразид (Препарат 33, 2,422 г, 1,251 ммоль) розчиняють у 50 мл буфера для лігування (6 М гуанідин) гідрохлориду та 0,2 М одноосновного гідрофосфату натрію, pH 3,35), і охолоджують до температури -15 °С на ацетоно-льодяній бані. До розчину пептидного гідразиду додають 9,4 мл 1 М розчину нітриту натрію (9,4 ммоль, 7,5 екв), і дозволяють перемішуватися протягом 20 хв при температурі -15 °С. Тим часом 1 мл 2,2,2-трифторетантіоду (TFET) доводять до 10 мл буфером для лігування (6 М гуанідину гідрохлориду та 0,2 М дигідрофосфату натрію, pH 7,0). Через 20 хв 10 мл суміші TFET додають до розчину пептидного гідразиду зі спричиненням in-situ тіолізу пептидил азида, одержаного з Препарату 33.

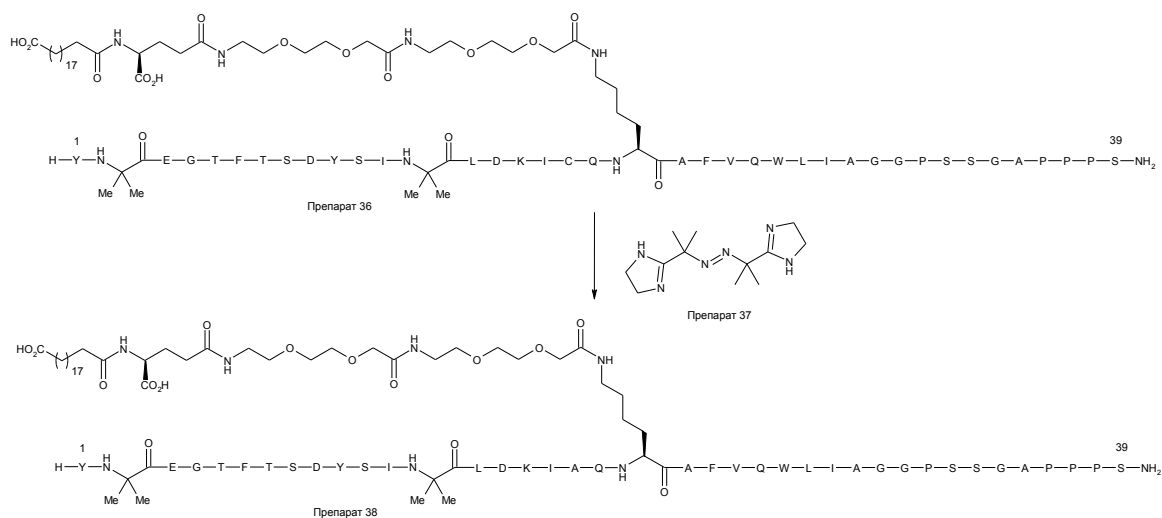


pH реакційної суміші доводять приблизно до 6,95 5н розчином гідроксиду натрію. Тіоліз пептидил азида здійснюють протягом 45 хв, і об'єм доводять до 100 мл буфером для лігування (pH 7,0). Неочищену суміш складних тіоефірів очищають із застосуванням вискоєфективної рідинної хроматографії з оберненою фазою на 10 мкм колонці Waters X-Bridge C18 (10 мм × 250 мм) при температурі навколишнього середовища з лінійним градієнтом 25-42 % ацетонітрилу у воді протягом 25 хв після 10 % ацетонітрилу у воді протягом перших 2,8 хв і TFA постійної концентрації яка становить 0,1 %, протягом 28 хв очищення. Одержують 1,03 г тіоефіру TFET (Препарат 35 (послідовність SEQ ID NO: 34)) [очікувана (маса+2H⁺)/2=1010,4650, спостережувана (маса+2H⁺)/2=1010,4620].

Нативне хімічне лігування: Водний 6 М розчин гуанідину гідрохлориду та 0,3 М розчин дигідрофосфату натрію (pH 7,0) є буфером для лігування, що застосовують в нативному хімічному лігуванні. Всі розчини виготовляють в цьому буфері для лігування, 350,4 мг (0,174 ммоль) складного тіоефіру пептиду, Препарату 35 (послідовність SEQ ID NO: 34), розчиняють у 50 мл буфера для лігування. До розчину складного тіоефіру пептиду додають 8,0 мл порцію 0,5 М розчину 4-меркаптофенілоцтової кислоти (MPAA). N-кінцевий цистеїнвмісний пептид (Препарат 34 (послідовність SEQ ID NO: 33), 524,6 мг. 0,178 ммоль. 1,03 екв) розчиняють у 48 мл буфера для лігування в 50 мл центрифужній пробірці. Розчин Препарату 34 додають до розчину складного тіоефіру. Пробірку промивають 2×8 мл буфера для лігування (pH приблизно 7,0), і змиви додають до реакційної суміші. pH реакційної суміші доводять до приблизно 7 5н розчином NaOH. До реакційної суміші додають 8,0 мл порцію трис(2-карбоксietил)фосфіну (TCEP, 0,5 М, pH 7,0), і pH знову доводять до 7,0 із застосуванням 0,2 мл 5н розчину гідроксиду натрію. Реакційній суміші дозволяють перемішуватися при кімнатній температурі протягом 24 год, а потім зберігають у морозильній камері. Перед очищенням додатково додають 3 мл 0,5 М розчину TCEP. Препарат 36 (послідовність SEQ ID NO: 35) очищають із застосуванням вискоєфективної рідинної хроматографії з оберненою фазою на 10 мкм колонці Kromasil C18 (10 мм × 250 мм) при температурі навколишнього середовища з лінійним градієнтом 20-50 % ацетонітрилу у воді (0,1 % оцтової кислоти та відтитрована до pH 9,0) протягом 23 хв після 10 % ацетонітрилу у воді протягом перших 4 хв протягом 28 хв очищення. Після очищення одержують приблизно 372 мг (44,3 %) аналогічного цистеїну тирзепатиду Препарату 36 [Очікувана (маса+3H⁺)/3=1615,17263, спостережувана (маса+3H⁺)/3=1615,1686].



Десульфуризація: Водний розчин 6-гуанідину гідрохлориду та 0,3 М розчин дигідрофосфату натрію (pH 7,0) є буфером, що застосовують при десульфуризації. Всі розчини були зроблені в цьому буфері. 2,2'-азобіс[2-(2-імідазолін-2-іл)пропан]дигідрохлорид (Препарат 37, 808,2 мг, 23 ммоль) розчиняють у 10 мл буфера, і pH доводять приблизно до 7,0 за допомогою 5н NaOH. Об'єм буфером доводять до 15 мл. Аналогічний цистеїну тирзепатиду Препарат 36 (105,2 мг, 0,022 ммоль) розчиняють у 30 мл буфера, і до нього додають 6 мл розчину Препарату 37. До цього розчину додають 5 мл 0,3 М розчину відновленого L-глутатіону (L-GSH. pH 7,0) та 7,5 мл 0,5 М розчину TCEP (pH 7,0)). Розчин нагрівають при температурі 44 °С протягом 4,5 год, при чому, за результатами дослідження, яке виконують із застосуванням ультра вискоефективної рідинної хроматографії, виявляється, то реакція завершена [Очікувана (маса+3P⁺)/3=1604,5153. спостережувана (маса-3H⁺)/3=1604,5 122]. Вихід реакції десульфуризації обчислюють із застосуванням ультра вискоефективної рідинної хроматографії, застосовуючи еталонний стандарт тирзепатиду (послідовність SEQ ID NO: 1). Вихід, за оцінкою, становить 47 %.



Нативне хімічне лігування (метод 2): Синтез пептидного гідрозиду, Препарат 39 (Послідовність SEQ ID NO: 36)

Смола гідразин-СТС (2,03 г, 1,32 ммоль, значення навантаження: 0,65 ммоль/г) вносять у 40 мл реакторну посудину. Смола набухає спочатку (3×10 мл) у DCM (по 30 с кожного разу), потім (2×10 мл) у DMF (20 хв кожного разу) у синтезаторі Symphony. HBTU (1,48 г, 3,90 ммоль, 3,0 екв) розчиняють у 13,1 мл розчину (25S, 52S)-52-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)-25-(трет-бутоксикарбоніл)-2,2-диметил-4,23,28,37,46-пентаоксо-3,32,35,41,44-пентаокса-24,29,38,47-тетраазатрипентаконтан-53-ової кислоти (Препарат 17, 365 мг/мл у DMF) (3,91 ммоль. 3,0 екв). До вищевказаного розчину додають DIPEA (1,4мл, 8,04 ммоль, 6,1 екв), і об'єм доводять до 19 мл за допомогою DMF. Розчину дозволяли перемішуватися на роторному змішувачі при кімнатній температурі протягом 30 хв. До смоли додають розчин активованого складного ефіру Препарату 17. Суспензію перемішують азотом протягом 8 год. Через 8 год. смолу промивають (5×10 мл) DMF, (5×10 мл) DCM, і сушать протягом 12 год. Навантаження одержаної смоли, визначене за даними кількісного ЯМР. становить 0,26 ммоль/г.

1,82 г цієї смоли використовують для синтезу Препарату 39 (послідовність SEQ ID NO: 36), пептидного гідразиду.

Відщеплення захисної групи: 4×9 мл 20 % (у об'ємному відношенні) розчину піперидину в DMF, по 30 хв кожного разу.

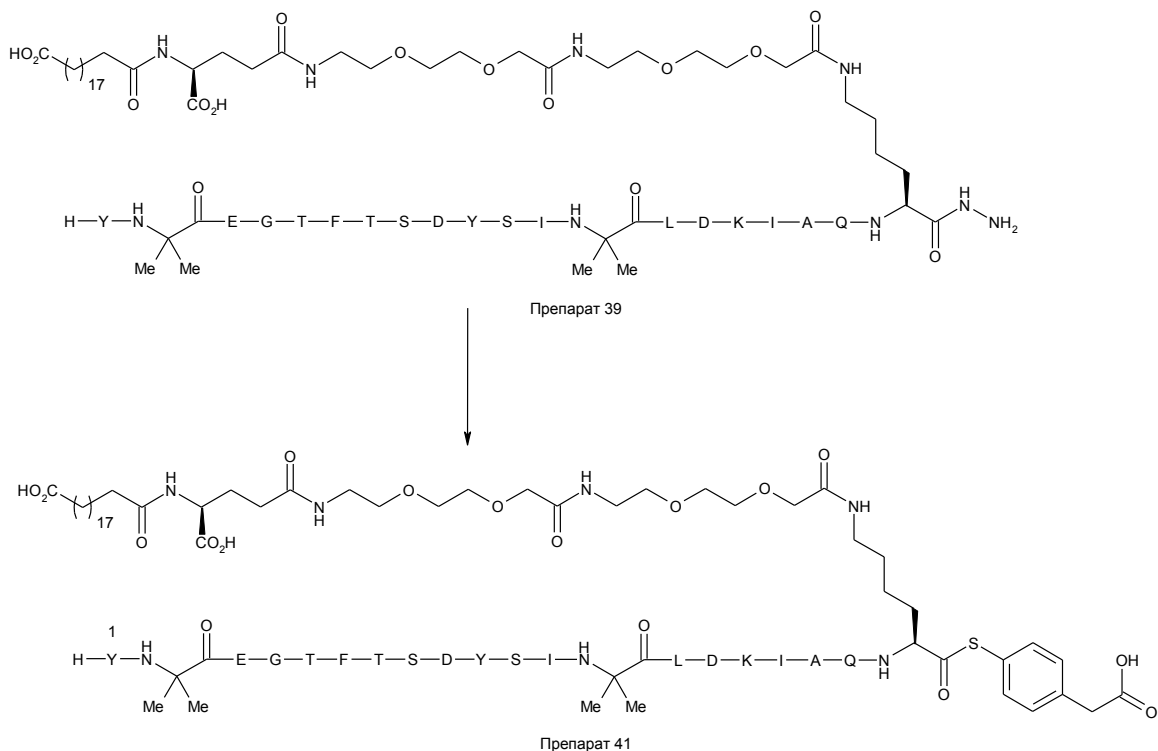
Сполучення: Для сполучення амінокислот використовують 3 екв амінокислоти. 3 екв ОХУМА та 3,3 екв DIC.

Смолу промивають (5×9 мл) DMF з перемішуванням N₂ протягом 1 хв після кожного сполучення та кінцевого повторення відщеплення захисної групи. По закінченні синтезу пептидного гідразиду смолу промивають (7×10 мл) DCM з перемішуванням N₂ протягом 1 хв. Потім смолу висушують протягом 12 год. на синтезаторі.

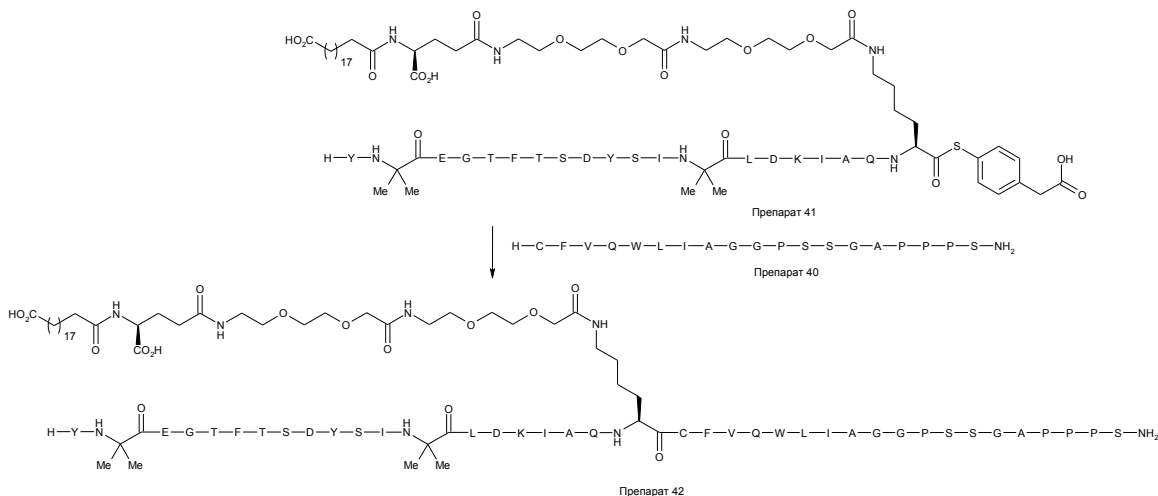
Відщеплення захисної групи та розщеплення: До висушеної смоли додають 25 мл коктейлю для розщеплення (5 % (у відношенні маси до об'єму) дитіотреїтолу (DTT), 2,5 % (у об'ємному відношенні) води, 2,5 % (у об'ємному відношенні) триізопропілсилану (TIPS) та 90 % трифтороцтової кислоти (TFA)), і перемішують на роторному змішувачі. Смолу фільтрують, промивають (2×2,5 мл) TFA, і фільтрат виливають у 175 мл холодного MTBE. Фільтраційну колбу промивають (2×2,5 мл) TFA, і змиви виливають у холодний MTBE. Суміш охолоджують до температури -20 °C протягом 30 хв. а потім центрифугують. Після цього осад пептиду двічі промивають 150 мл MTBE, і центрифугують. Осад пептиду сушать у вакуумній печі при температурі 27 °C протягом 16 год. Після висихання одержують 1,70 г неочищеного Препарату 39 (послідовність SEQ ID NO: 36) (гідразид пептиду). Неочищений Препарат 39 (гідразид пептиду) очищають із застосуванням високоефективної рідинної хроматографії з оберненою фазою на 10 мкм колонці Waters XSelectCSH C18 (10 мм × 250 мм) при температурі навколишнього середовища з лінійним градієнтом 20-55 % ацетонитрилу у воді протягом 23 хв після 10 % ацетонітрилу у воді перші 5 хв, і TFA постійної концентрації яка становить 0,1 %, протягом 28 хв очищення. Одержують приблизно 110 мг частково очищеного Препарату 39 (гідразид).

Відщеплення захисної групи та розщеплення: До висушеної смоли (2,92 г) додають 25 мл коктейлю для розщеплення (5 % (у відношенні маси до об'єму) дитіотреїтолу (DTT), 2,5 % (у об'ємному відношенні) води, 2,5 % (у об'ємному відношенні) триізопропілсилану (TIPS) та 90 % трифтороцтової кислоти (TFA)), і перемішують на роторному змішувачі. Смолу фільтрують, і промивають (2×2,5 мл) TFA. Фільтрат виливають у 200 мл холодного MTBE, і пептид негайно випадає в осад. Після цього фільтраційну колбу промивають (2×2 мл) TFA, і змиви виливають у холодний MTBE. Суміш охолоджують до температури -20 °C протягом 30 хв. а потім центрифугують. Після цього осад пептиду двічі промивають 240 мл MTBE і центрифугують. Потім осад пептиду сушать у вакуумній печі при температурі 27 °C протягом 16 год. Одержують приблизно 1,7 г неочищеного 19-членного Препарату 40 (послідовність SEQ ID NO: 37).

Нативне хімічне лігування: Водний 6 М розчин гуанідину гідрохлориду та 0,3 М розчин дигідрофосфату натрію (pH 7,0) з буфером для лігування, що застосовують в нативному хімічному лігуванні. Всі розчини виготовляють в цьому буфері для лігування. Частково очищений пептидний гідразид (Препарат 39, 56 мг, 0,019 ммоль) розчиняють у 5 мл буфера для лігування (6 М гуанідину гідрохлорид та 0,3 М дигідрофосфат натрію, pH 3,35), і охолоджують до температури -15 °C в ацетонно-льодяній бані. До розчину пептидного гідразиду додають 0,25 мл 1 М розчину нітриту натрію (0,25 ммоль 13,2 екв), і дозволяють перемішуватися протягом 10 хв при температурі -15 °C. Через 10 хв до розчину пептидного гідразиду додають 0,8 мл 0,5 М розчину 4-меркаптофенілоцтової кислоти (MPAA) для спричинення in-situ тіоліза пептидил азиду, одержаного з Препарату 39. pH реакційної суміші доводять приблизно до 7,0 5н розчином гідроксиду натрію. Тіоліз пептидил азиду триває протягом 30 хв.



Приблизно 0,62 ммоль Препарату 40 (послідовність SEQ ID NO: 37) синтезують на амідній смолі Зібера із застосуванням стандартних протоколів SPPS. N-кінцевий цистеїнмісний Препарат 40 (26,1 мг, 0,014 ммоль, 0,74 екв) розчиняють у 1 мл буфера для лігування. Розчин Препарату 40 додають до розчину складного тіоефіру. Пробірку, що містить Препарат 40, промивають 1 мл буфера для лігування (pH 7,0), і змив додають до реакційної суміші. Через 15 хв до реакційної суміші додають 1,0 мл трис(2-карбоксietил)фосфіну (TCEP, 0,5 М, pH 7,0), і pH доводять до 7,0 5н розчином гідроксиду натрію. Реакційній суміші дозволяють перемішуватися при кімнатній температурі протягом однієї години. В реакційній суміші виявляють аналог цистеїну тирзепатиду (Препарат 42).



Послідовності

SEQ ID NO: 1

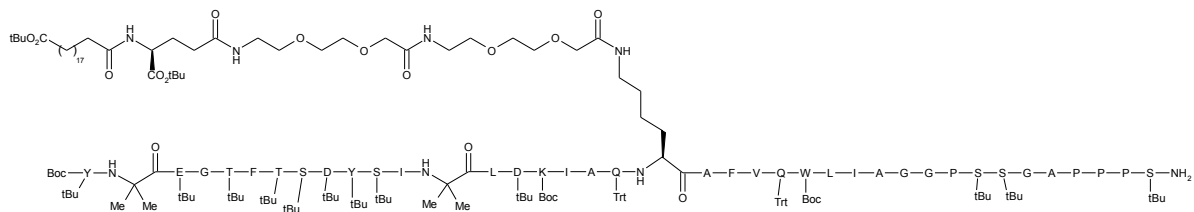
Тирзепатид

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

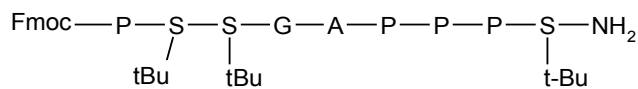
де X₁ являє собою Aib; X₂ являє собою Aib; K у положенні 20 є хімічно модифікованим шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюгу K (2-[2-(2-аміноетокси)етокси]ацетил)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; і C-кінцева амінокислота є амідованою як C-кінцевий основний амід

SEQ ID NO: 2

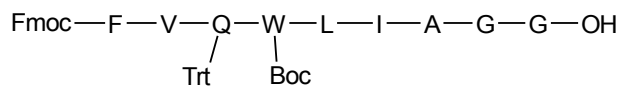
SEQ ID NO: 8



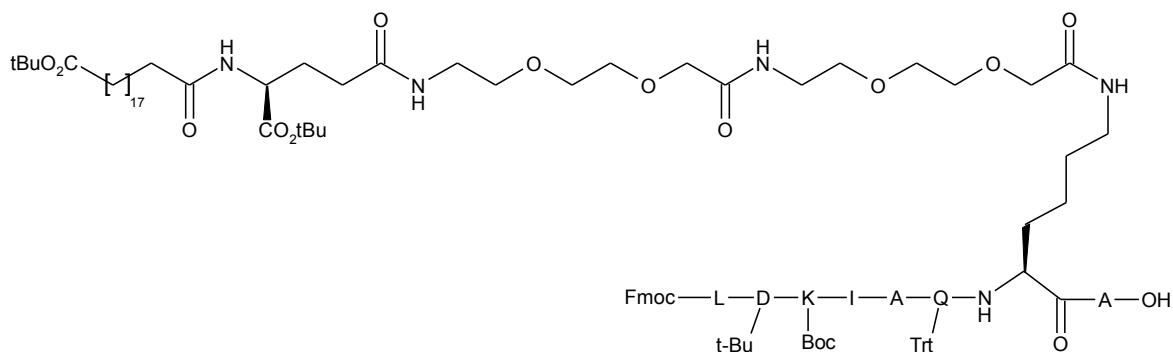
SEQ ID NO: 9



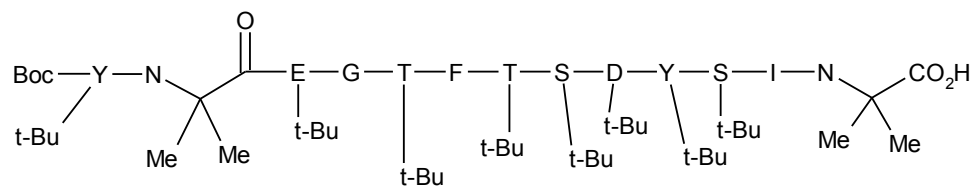
SEQ ID NO: 10



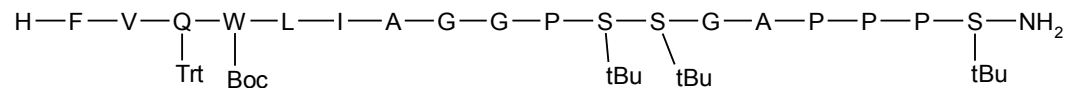
SEQ ID NO: 11



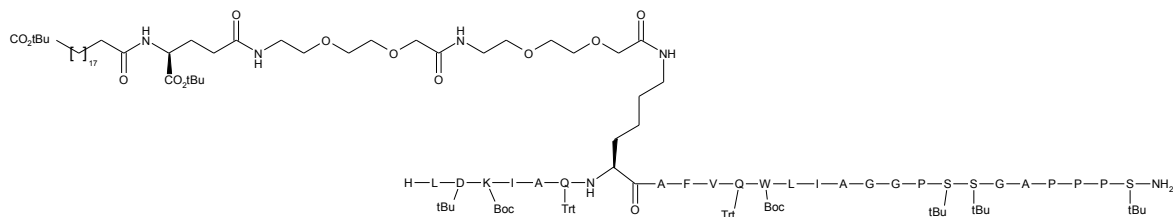
SEQ ID NO: 12



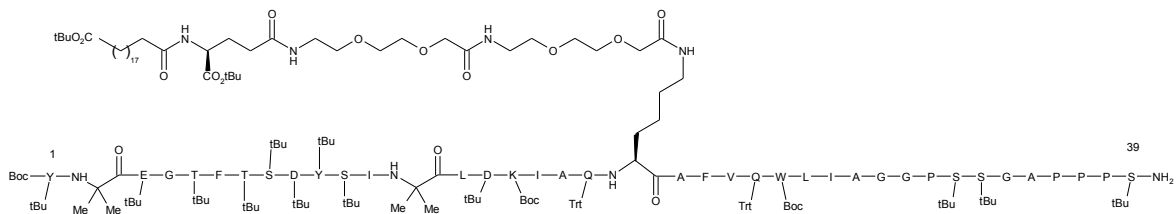
SEQ ID NO: 13



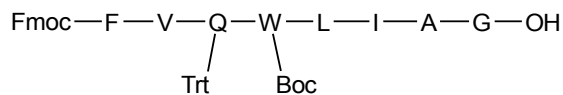
SEQ ID NO: 14



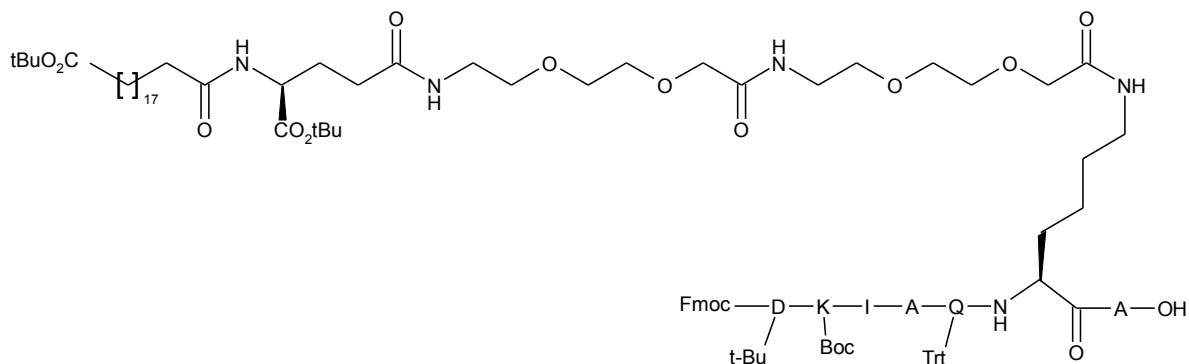
SEQ ID NO: 15



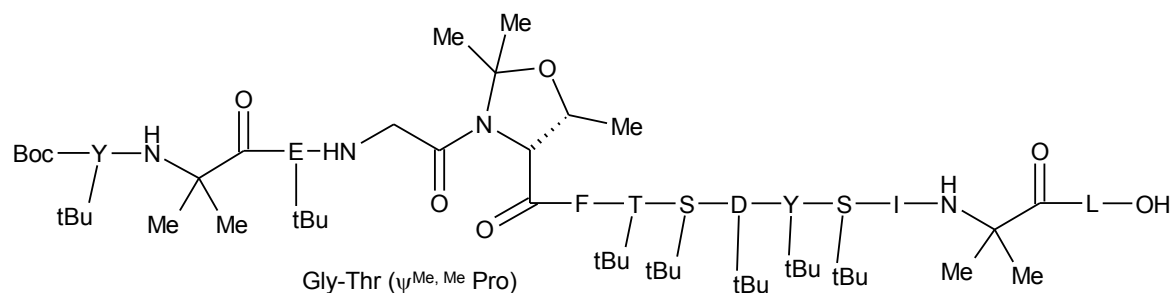
SEQ ID NO: 16



SEQ ID NO: 17

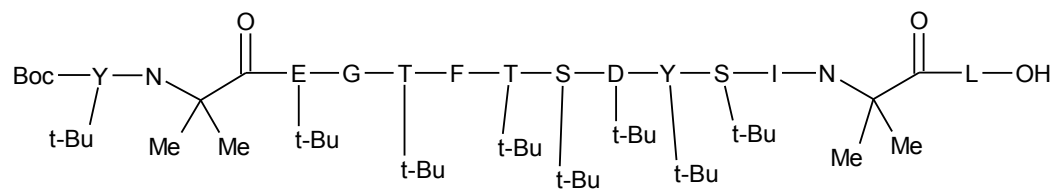


SEQ ID NO: 18

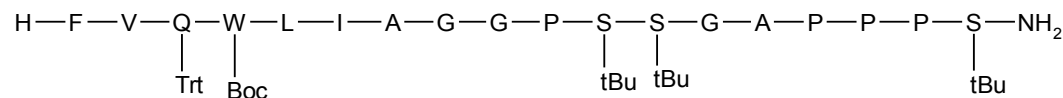


Препарат 19A

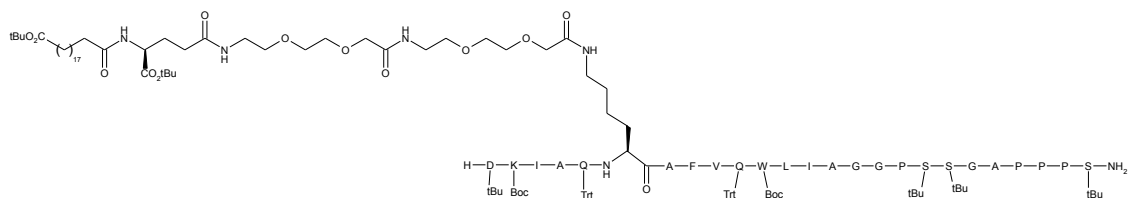
SEQ ID NO: 19



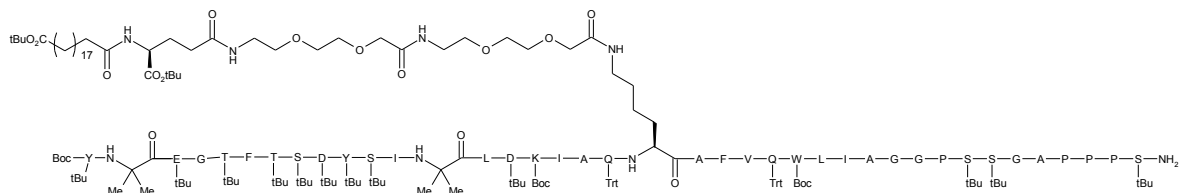
SEQ ID NO: 20



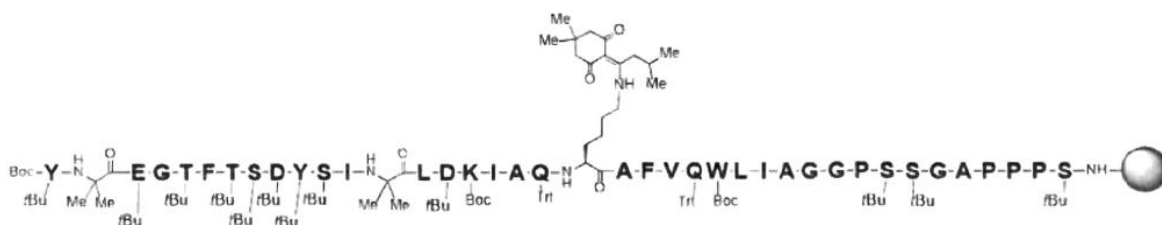
SEQ ID NO: 21



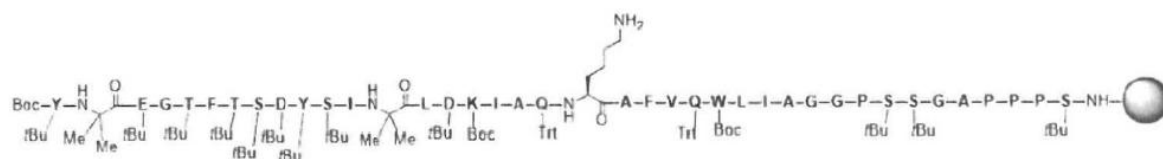
SEG ID NO:22



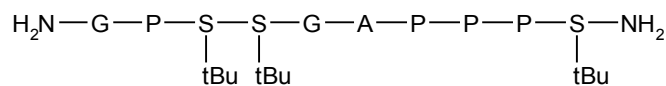
SEG ID NO:23



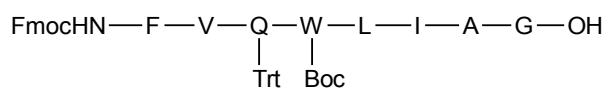
SEG ID NO:24



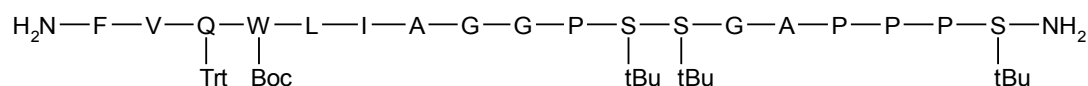
SEG ID NO:25



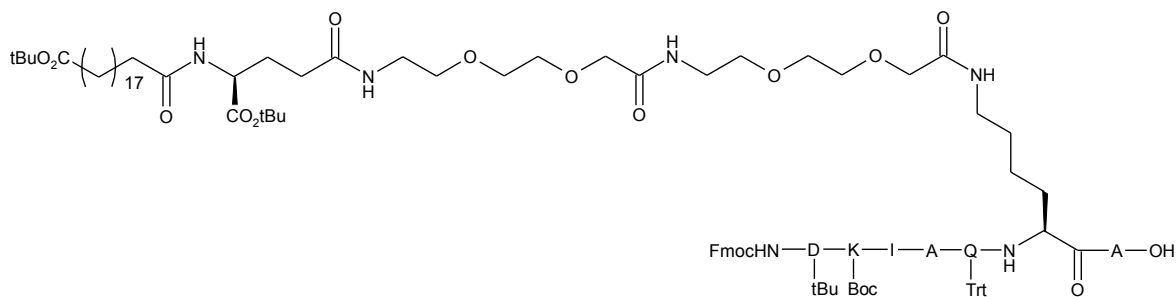
SEG ID NO:26



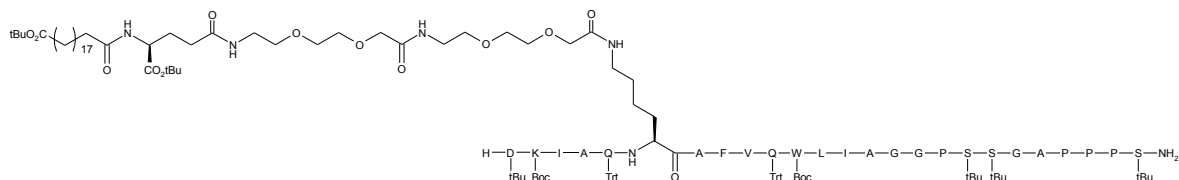
SEG ID NO:27



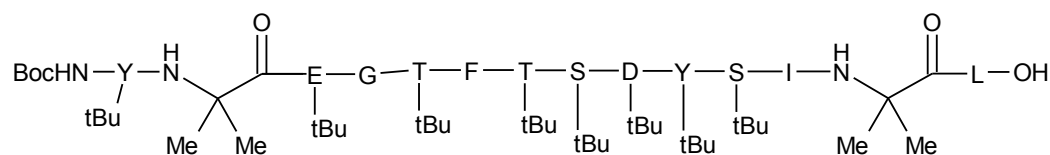
SEG ID NO:28



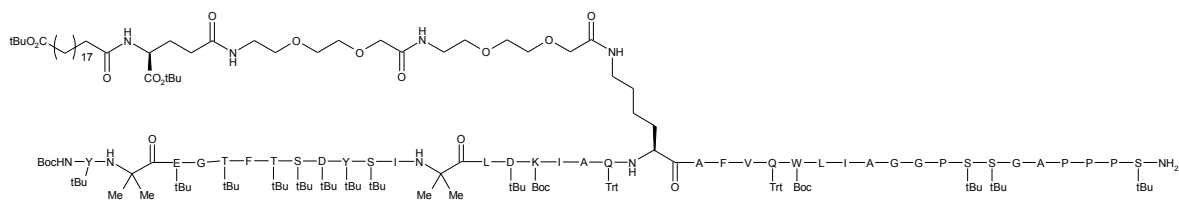
SEG ID NO:29



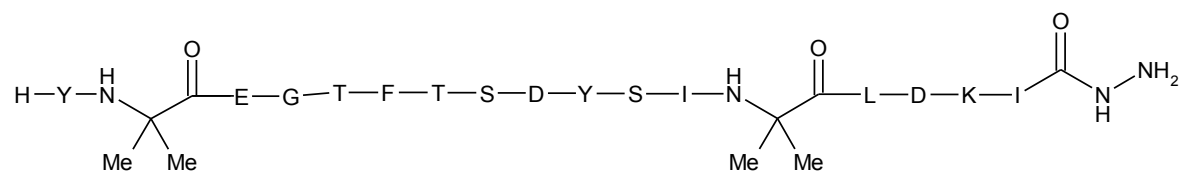
SEG ID NO:30



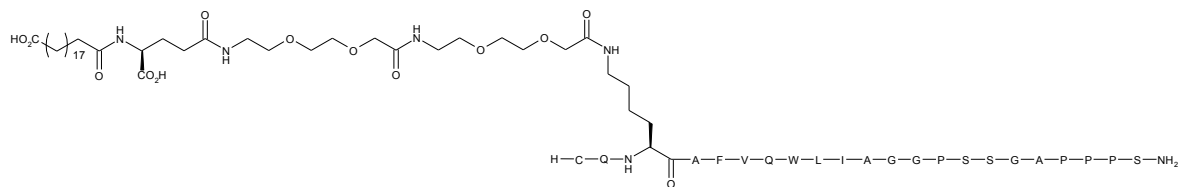
SEG ID NO:31



SEG ID NO:32

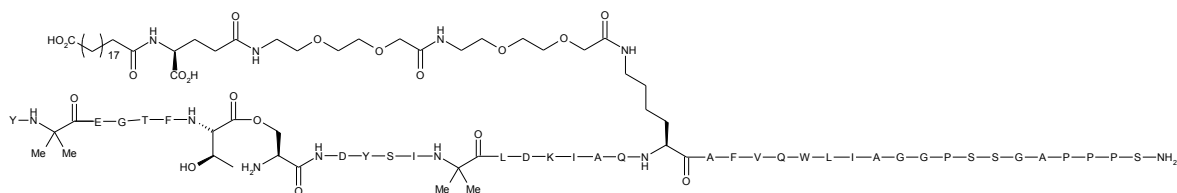


SEG ID NO:33



SEG ID NO:34





ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Елі Ліллі енд Компані

<120> СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОДВІЙНОГО АГОНІСТА РЕЦЕПТОРІВ GIP/GLP-1

<130> X22015

<150> US 62/797,963

<151> 2019-01-29

<150> US 62/815,053

<151> 2019-03-07

<150> US 62/818,342

<151> 2019-03-14

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 39

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Хаа у положенні 2 являє собою штучну амінокислоту 2-аміноізомасляна кислота

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Хаа у положенні 13 являє собою штучну амінокислоту 2-аміноізомасляна кислота

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys у положенні 20 хімічно модифікований шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга К (2-[2-(2-аміноетокси)етокси]ацетил) 2-(гамма-Glu) 1-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser у положенні 39 амідований як С-кінцевий основний амід

<400> 1

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Серин у положенні 10 амідований як С-кінцевий основний амід.

<400> 2

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> N-кінець захищений Fmoc.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-
бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною
(Бос) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt)
захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Епсилон-аміногрупа К модифікована -CO-O-CH2-CH=CH2

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt)
захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-
бутоксикарбонільною (Бос) захисною групою.

<400> 3

Asp Lys Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly
1 5 10 15

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> N-кінець захищений (трет-бутоксикарбонілом) Вос.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Хаа у положенні 2 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Бічний ланцюг глутамінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Xaa у положенні 13 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<400> 4

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu
1 5 10

<210> 5
<211> 25
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Лізин у положенні 6 хімічно модифікований шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга $K\ C(O)-O-CH_2-CH=CH_2$.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)

<223> Бічний ланцюг триптофану захищений Вос.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Серин у положенні 25 амідований як С-кінцевий основний амід.

<400> 5

Asp Lys Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly
1 5 10 15

Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
20 25

<210> 6

<211> 39

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N-кінець захищений (трет-бутоксикарбонілом) Вос.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Хаа у положенні 2 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Бічний ланцюг глутамінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Хаа у положенні 13 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Лізин у положенні 6 хімічно модифікований шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K C(O)-O-CH₂-CH=CH₂.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 <223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (33)..(33)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Серин у положенні 39 амідований як C-кінцевий основний амід.

<400> 6

Tyr	Xaa	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Ile	Xaa	Leu	Asp	Lys
1				5					10					15	
Ile	Ala	Gln	Lys	Ala	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
		20					25					30			
Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser									
		35													

<210> 7
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> N-кінець захищений (трет-бутоксикарбонілом) Вос.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa у положенні 2 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Бічний ланцюг глютамінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Хаа у положенні 13 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (25)..(25)
<223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (33)..(33)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Серин у положенні 39 амідований як С-кінцевий основний амід.

<400> 7

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
 1 5 10 15
 Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 8
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> N-кінець захищений (трет-бутоксикарбонілом) Boc.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

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

<223> Хаа у положенні 2 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Бічний ланцюг глютамінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Хаа у положенні 13 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys у положенні 20 хімічно модифікований шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K (2-[2-(2-аміноетокси)етокси]ацетил)2-(гамма-Glu(трет-бутил))1-CO-(CH2)18-CO2-(трет-бутил).

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 <223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (33)..(33)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Серин у положенні 39 амідований як C-кінцевий основний амід.

<400> 8

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> N-кінець захищений Fmoc.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Серин у положенні 9 амідований як C-кінцевий основний амід.

<400> 9

Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> N-кінець захищений Fmoc.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trit) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<400> 10

Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> N-кінець захищений Fmoc.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Lys у положенні 7 хімічно модифікований шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K (2-[2-(2-аміноетокси)етокси]ацетил)2-(гамма-Glu(трет-бутил))1-CO-(CH2)18-CO2-(трет-бутил).

<400> 11

Leu Asp Lys Ile Ala Gln Lys Ala
1 5

<210> 12
<211> 13
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> N-кінець захищений (трет-бутоксикарбонілом) Boc.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Хаа у положенні 2 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Бічний ланцюг глутамінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Хаа у положенні 13 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

 <400> 12

 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa
 1 5 10

 <210> 13
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)

<223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> Серин у положенні 18 амідований як C-кінцевий основний амід.

<400> 13

Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro
1 5 10 15

Pro Ser

<210> 14

<211> 26

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>

<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Lys у положенні 7 хімічно модифікований шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K (2-[2-(2-аміноетокси)етокси]ацетил)2-(гамма-Glu(трет-бутил))1-CO-(CH2)18-CO2-(трет-бутил).

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (26)..(26)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (26)..(26)
<223> Серин у положенні 26 амідований як C-кінцевий основний амід.

<400> 14

Leu Asp Lys Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
20 25

<210> 15
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> N-кінець захищений (трет-бутоксикарбонілом) Вос.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа у положенні 2 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Бічний ланцюг глютамінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Хаа у положенні 13 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys у положенні 20 хімічно модифікований шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K (2-[2-(2-аміноетокси)етокси]ацетил)2-(гамма-Glu(трет-бутил))1-CO-(CH2)18-CO2-(трет-бутил).

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 <223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (33)..(33)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Серин у положенні 39 амідований як С-кінцевий основний амід.

<400> 15

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
 1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> N-кінець захищений Fmoc.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Бічний ланцюг плутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (4)..(4)
 <223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-
 бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

 <400> 16

 Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly
 1 5

 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> N-кінець захищений Fmoc.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-
 бутилом.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною
 (Boc) захисною групою.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt)
 захисною групою.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Lys у положенні 6 хімічно модифікований шляхом кон'югації
 з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K (2-[2-(2-
 аміноетокси)етокси]ацетил) 2-(гамма-Glu (трет-бутил)) 1-CO-(CH₂)₁₈-
 CO₂-(трет-бутил) .

 <400> 17

 Asp Lys Ile Ala Gln Lys Ala
 1 5

<210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> N-кінець захищений (трет-бутоксикарбонілом) Вос.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа у положенні 2 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Бічний ланцюг глутамінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Гліцин у положенні 4 об'єднують з положенням 5, використовуючи псевдопролін, з утворення Gly-Thr (psiMe, Me-Pro).

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa у положенні 13 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<400> 18

Tyr Xaa Glu Gly Xaa Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu
 1 5 10

<210> 19
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> N-кінець захищений (трет-бутоксикарбонілом) Вос.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa у положенні 2 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Бічний ланцюг глютамінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (5)..(5)
 <223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa у положенні 13 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

 <400> 19

 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu
 1 5 10

 <210> 20
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> Серин у положенні 18 амідований як C-кінцевий основний амід.

<400> 20

Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro
1 5 10 15

Pro Ser

<210> 21
<211> 25
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

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

<223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Lys у положенні 6 хімічно модифікований шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K (2-[2-(2-аміноетокси)етокси]ацетил)2-(гамма-Glu(трет-бутил))1-CO-(CH2)18-CO2-(трет-бутил).

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Серин у положенні 25 амідований як C-кінцевий основний амід.

<400> 21

Asp	Lys	Ile	Ala	Gln	Lys	Ala	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly
1				5					10					15	

Pro	Ser	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			20				25	

<210> 22
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> N-кінець захищений (трет-бутоксикарбонілом) Вос.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа у положенні 2 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Бічний ланцюг глутамінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (9)..(9)
 <223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Хаа у положенні 13 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys у положенні 20 хімічно модифікований шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K (2-[2-(2-аміноетокси)етокси]ацетил) 2-(гамма-Glu(трет-бутил)) 1-CO-(CH₂)₁₈-CO₂-(трет-бутил).

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>

<221> MOD_RES
<222> (25)..(25)
<223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-
бутоксикарбонільною (Вос) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (32)..(32)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (33)..(33)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Серин у положенні 39 амідований як С-кінцевий основний
амід.

<400> 22

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 23
<211> 39
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> N-кінець захищений (трет-бутоксикарбонілом) Вос.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)

<223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа у положенні 2 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Бічний ланцюг глютамінової кислоти захищений трет-бутилом.
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Хаа у положенні 13 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).
 <220>
 <221> MOD_RES

<222> (15)..(15)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Епсилон-аміногрупа K модифікована 5,5-диметил-2-(3-метилбутиліден)циклогексан-1,3-діоном

<220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (25)..(25)
<223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (32)..(32)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (33)..(33)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)

<223> С-кінцевий серин амідований і зв'язаний зі смолою Зібера своєю аміногрупою.

<400> 23

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 24

<211> 39

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N-кінець захищений (трет-бутоксикарбонілом) Вос.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Xaa у положенні 2 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Бічний ланцюг глутамінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Хаа у положенні 13 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>

<221> MOD_RES
<222> (25)..(25)
<223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-
бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (32)..(32)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (33)..(33)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> С-кінцевий серин амідований і зв'язаним зі смолою Зібера
своєю аміногрупою.

<400> 24

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Серин у положенні 10 амідований як С-кінцевий основний амід.

<400> 25

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser

1 5 10

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> N-кінець захищений Fmoc.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<400> 26

Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly

1 5

<210> 27

<211> 18

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Серин у положенні 18 амідований як С-кінцевий основний амід.

<400> 27

Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro
 1 5 10 15

Pro Ser

<210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> N-кінець захищений Fmoc.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Lys у положенні 6 хімічно модифікований шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K (2-[2-(2-аміноетокси)етокси]ацетил)2-(гамма-Glu(трет-бутил))1-CO-(CH2)18-CO2-(трет-бутил).

<400> 28

Asp Lys Ile Ala Gln Lys Ala
1 5

<210> 29
<211> 25
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

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

<223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Lys у положенні 6 хімічно модифікований шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K (2-[2-(2-аміноетокси)етокси]ацетил)2-(гамма-Glu(трет-бутил))1-CO-(CH₂)18-CO₂-(трет-бутил).

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Бічний ланцюг глутаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>

<221> MOD_RES

<222> (25)..(25)

<223> Серин у положенні 25 амідований як С-кінцевий основний амід.

<400> 29

Asp	Lys	Ile	Ala	Gln	Lys	Ala	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly
1				5					10					15	

Pro	Ser	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			20					25

<210> 30
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> N-кінець захищений (трет-бутоксикарбонілом) Вос.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа у положенні 2 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Бічний ланцюг глутамінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (9)..(9)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Xaa у положенні 13 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<400> 30

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu
1 5 10

<210> 31
<211> 39
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> N-кінець захищений (трет-бутоксикарбонілом) Boc.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Xaa у положенні 2 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)

<223> Бічний ланцюг глутамінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Бічний ланцюг треоніну захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Бічний ланцюг тирозину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Хаа у положенні 13 являє собою 2-аміноізомасляну кислоту (Aib).

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> Бічний ланцюг аспарагінової кислоти захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Бічний ланцюг лізину захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>

<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> Бічний ланцюг глютаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys у положенні 20 хімічно модифікований шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K (2-[2-(2-аміноетокси)етокси]ацетил)2-(гамма-Glu(трет-бутил))1-CO-(CH2)18-CO2-(трет-бутил).

<220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
<223> Бічний ланцюг глютаміну захищений тритильною (Trt) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (25)..(25)
<223> Бічний ланцюг триптофану захищений трет-бутоксикарбонільною (Boc) захисною групою.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (32)..(32)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (33)..(33)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Бічний ланцюг серину захищений трет-бутилом.

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Серин у положенні 39 амідований як С-кінцевий основний амід.

<400> 31

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 32
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa у положенні 2 являє собою Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa у положенні 13 являє собою Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> С-кінцева гідроксильна група ізолейцину модифікується
гідразидом (N-NH2)

<400> 32

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile

<210> 33
<211> 22
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Lys у положенні 3 хімічно модифікований шляхом кон'югації
з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K (2-[2-(2-
аміноетокси)етокси]ацетил)2-(гамма-Glu)1-CO-(CH2)18-CO2H

<220>
<221> MOD_RES

<222> (22)..(22)
<223> Ser у положенні 22 амідований як С-кінцевий основний амід

<400> 33

Cys Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser Ser
1 5 10 15

Gly Ala Pro Pro Pro Ser
20

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Хаа у положенні 2 являє собою Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Хаа у положенні 13 являє собою Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> С-кінцева гідроксильна група модифікована S-CH₂-CF₃

<400> 34

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile

<210> 35
<211> 39
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)

<223> Хаа у положенні 2 являє собою Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Хаа у положенні 13 являє собою Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys у положенні 20 хімічно модифікований шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K (2-[2-(2-аміноетокси)етокси]ацетил)2-(гамма-Glu)1-CO-(CH2)18-CO2H

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser у положенні 39 амідований як С-кінцевий основний амід

<400> 35

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Cys Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 36

<211> 20

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Хаа у положенні 2 являє собою Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Хаа у положенні 13 являє собою Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys у положенні 20 хімічно модифікований шляхом кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K (2-[2-(2-аміноетокси)етокси]ацетил)2-(гамма-Glu)1-CO-(CH2)18-CO2H

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> С-кінцева гідроксильна група модифікована гідразидом (-N-NH2)

<400> 36

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys
20

<210> 37

<211> 19

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> MOD_RES

<222> (19)..(19)

<223> Ser у положенні 19 амідований як С-кінцевий основний амід

<400> 37

Cys Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro
1 5 10 15

Pro Pro Ser

<210> 38

<211> 20

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa у положенні 2 являє собою Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Хаа у положенні 13 являє собою Aib

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys у положенні 20 хімічно модифікований шляхом
 кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга К (2-[2-(2-
 аміноетокси)етокси]ацетил)2-(гамма-Glu)1-CO-(CH₂)18-CO₂H

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> С-кінцева гідроксильна група модифікована 4-
 меркаптофенілоцтовою кислотою

 <400> 38

 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
 1 5 10 15

 Ile Ala Gln Lys
 20

 <210> 39
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Синтетична генно-інженерна конструкція

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа у положенні 2 являє собою штучну амінокислоту 2-
 аміноізомасляна кислота

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Хаа у положенні 13 являє собою штучну амінокислоту 2-
 аміноізомасляна кислота

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys у положенні 20 хімічно модифікований шляхом
 кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга К (2-[2-(2-
 аміноетокси)етокси]ацетил)2-(гамма-Glu)1-CO-(CH₂)18-CO₂H

 <220>

<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Ser у положенні 39 амідований як C-кінцевий основний амід

<400> 39

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Cys Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 40
<211> 39
<212> PRT
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Синтетична генно-інженерна конструкція

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa у положенні 2 являє собою Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(8)
<223> Thr у положенні 7 та Ser у положенні 8 утворюють
депептид

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa у положенні 13 являє собою Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys у положенні 20 хімічно модифікований шляхом
кон'югації з епсилон-аміногрупою бічного ланцюга K (2-[2-(2-
аміноетокси)етокси]ацетил)2-(гамма-Glu)1-CO-(CH2)18-CO2H

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Ser у положенні 39 амідований як C-кінцевий основний амід

<400> 40

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Xaa Xaa Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15
Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35