

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) 039074

(13) B1

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

- (45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.11.30**
- (21) Номер заявки  
**201692466**
- (22) Дата подачи заявки  
**2015.06.18**

- (51) Int. Cl. **A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 3/00** (2006.01)  
**C07K 14/475** (2006.01)

**(54) ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ И ИХ КОНЬЮГАТЫ С БИОМОЛЕКУЛАМИ**

- (31) **62/015,862; 62/082,327; 62/107,016**  
 (32) **2014.06.23; 2014.11.20; 2015.01.23**  
 (33) US  
 (43) **2017.04.28**  
 (86) PCT/US2015/036328  
 (87) WO 2015/200078 2015.12.30  
 (71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**НОВАРТИС АГ (CH)**  
 (72) Изобретатель:  
**Барнс Дэвид Венингер, Ямада Кен,  
 Ибебунджо Чиквенду, Дуттарой  
 Алокеш, Кирман Луиз Клэр, Брюс  
 Александра Маршалл, Юзера Эйми  
 Ричардсон, Зекри Фредерик, Юань  
 Цзюнь, Лоу Чангтан, Кантер Аарон,  
 Боуз Авируп (US)**  
 (74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**  
 (56) MICHAEL J. HACKETT ET AL.: "A dicarboxylic fatty acid derivative of paclitaxel for albumin-assisted drug delivery", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 101, no. 9, 6 June 2012 (2012-06-06), pages 3292-3304, XP055223401, WASHINGTON, US, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.23213, abstract, figures 2, 3  
 D. LEFORT ET AL.: "Free-radical addition of alcohols and acids to 10-undecenoic esters, 10-undecen-1-ol, and 10-undecenyl acetate", BULLETIN OF THE ACADEMY OF SCIENCES OF THE USSR,

DIVISION OF CHEMICAL SCIENCES, vol. 16, no. 3, 1 March 1967 (1967-03-01), pages 623-627, XP055223363, US, ISSN: 0568-5230, DOI: 10.1007/BF00906006, page 626, paragraph 3, page 627, paragraph 6

OLÖF CEDER ET AL.: "Pimaricin. II. High Pressure-High Temperature Hydrogenation Studies", Acta Chemica Scandinavica, 1 January 1964 (1964-01-01), pages 83-97, XP055223487, Retrieved from the Internet: URL: [http://actachemscand.org/pdf/acta.vol\\_18\\_p0083-0097.pdf](http://actachemscand.org/pdf/acta.vol_18_p0083-0097.pdf) [retrieved on 2015-10-26], page 86; compound 2

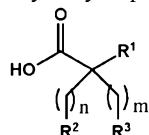
WANG Q. ET AL.: "Pharmacological properties of hydrophilic and lipophilic derivatives of octreotide", NUCLEAR MEDICINE AND BIOLOGY, ELSEVIER, NY, US, vol. 31, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 21-30, XP004485708, ISSN: 0969-8051, DOI: 10.1016/S0969-8051(03)00099-4, abstract, figure 3

CHAE S.Y. ET AL.: "The fatty acid conjugated exendin-4 analogs for type 2 antidiabetic therapeutics", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 144, no. 1, 21 May 2010 (2010-05-21), pages 10-16, XP027036550, ISSN: 0168-3659 [retrieved on 2010-04-30], abstract, figure 1, page 11, column 1, paragraph 3 - paragraph 4, page 14, column 2, paragraph 2 - page 15, column 2, paragraph 2

LIM SUNG IN ET AL.: "Site-specific fatty acid-conjugation to prolong protein half-life in vivo", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 170, no. 2, 2 June 2013 (2013-06-02), pages 219-225, XP028676591, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2013.05.023, abstract, page 220, column 2, paragraph 3 - page 221, column 1, paragraph 1, figure 1

WO-A1-2014083505  
 WO-A1-015013168  
 WO-A2-2015013169  
 WO-A2-2015006728

- (57) Изобретение обеспечивает коньюгат, включающий биомолекулу, связанную с жирной кислотой через линкер, где жирная кислота имеет следующую формулу A1:



A1

где R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, m и n имеют значения, определенные в формуле изобретения. Изобретение также относится к применению коньюгата, такому как лечение или профилактика заболевания или расстройства, выбранного из метаболических расстройств или заболеваний, сахарного диабета

B1

039074

039074 B1

039074 B1

039074 B1

2 типа, ожирения, панкреатита, дислипидемии, алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени/стеатогепатита и других прогрессирующих заболеваний печени, инсулинерезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, метаболического синдрома, гипертензии, сердечно-сосудистого заболевания, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, диабетических осложнений, хронического почечного заболевания, невропатии или гастропареза. Изобретение также обеспечивает комбинацию фармакологически активных веществ и фармацевтическую композицию, включающую коньюгат.

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к новым конъюгатам GDF15, которые имеют улучшенное время полужизни и продолжительность действия, к способу их получения и к их применению. Изобретение также относится к новым жирным кислотам и к их применению для увеличения времени полужизни биомолекул через конъюгацию.

### Предпосылки создания изобретения

Пептиды и белки широко применяются в медицинской практике, и, поскольку их можно получить с использованием рекомбинантной ДНК-технологии, можно ожидать, что их значение будет также возрастать в ближайшие годы. Количество известных эндогенных пептидов и белков с вызывающей интерес биологической активностью быстро увеличивается, также это является результатом постоянного исследования генома человека. Благодаря их биологической активности многие из этих полипептидов и белков, в принципе, можно было бы использовать в качестве терапевтических средств. Эндогенные пептиды или белки, однако, не всегда являются подходящими в качестве потенциальных лекарственных средств, поскольку часто они имеют период полужизни, составляющий несколько минут, из-за их быстрого расщепления пептидазами и/или из-за фильтрации в почках и экскреции с мочой. Время полужизни полипептидов или белков в плазме человека сильно варьируется (от нескольких минут до более чем одной недели).

Высокий клиренс терапевтического средства неудобен в случаях, когда желательно поддерживать высокий уровень этого средства в крови в течение продолжительного периода времени. Один путь, который в настоящее время используют для преодоления этого недостатка, включает введение большой дозы представляющих интерес терапевтических пептидов или белков пациенту, чтобы даже в случае разрушения некоторого количества терапевтического пептида или белка оставалось количество, достаточное, чтобы оно было терапевтически эффективным. Однако этот способ неудобен для пациентов. Поскольку большинство терапевтических пептидов или белков нельзя вводить перорально, терапевтические пептиды или белки приходится вводить либо путем непрерывной инфузии, либо путем частого вливания путем внутривенной инъекции, либо часто вводить неудобным путем с использованием подкожных инъекций. Необходимость частого введения также приводит к появлению большого количества потенциальных пептидных или белковых терапевтических средств, имеющих неприемлемо высокую ориентированную стоимость лечения. Присутствие больших количеств расщепленного пептида или белка также может вызывать нежелательные побочные эффекты.

Неудобство введения и высокая стоимость являются двумя причинами, почему большая часть терапевтических пептидов или белков с привлекательными профилями биоактивности не могут разрабатываться в качестве потенциальных лекарственных средств.

Поэтому одним подходом к увеличению времени полужизни пептидов или белков является модификация терапевтических пептидов или белков таким образом, чтобы замедлить их расщепление, сохраняя при этом их биологическую активность. Сывороточный альбумин имеет время полужизни больше одной недели, и один подход увеличения времени полужизни пептидов или белков в плазме состоял в их дериватизации химическим соединением, которое связывается с сывороточным альбумином или другими белками плазмы.

Однако все еще существует потребность в идентификации новых увеличивающих время полужизни агентов для модификации терапевтических биомолекул, таких как пептиды и белки, для обеспечения большей продолжительности действия *in vivo*, поддерживая при этом низкую токсичность и терапевтические преимущества.

### Сущность изобретения

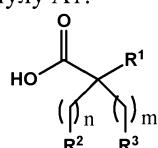
1. Настоящее изобретение относится к конъюгату, включающему биомолекулу, связанную с жирной кислотой через линкер, где биомолекула представляет собой человеческий белок фактора дифференциации роста 15 (hGDF15), или его фрагмент, или его вариант, выбранный из hGDF15\* и his-hGDF15\*, или димер любого из указанных белков,

где hGDF15\* представляет собой hGDF15;

две или три аминокислоты на N-конце заменены аминокислотной последовательностью XH- или XHX'- соответственно, H представляет собой гистидин, и X и X' независимо выбраны из M и A; и

his-hGDF15 представляет собой hGDF15, где метка, включающая от 1 до 6 гистидиновых аминокислотных остатков и необязательно 1 или 2 метиониновых аминокислотных остатка метионина, была присоединена к N-концу hGDF15;

жирная кислота имеет следующую формулу A1:

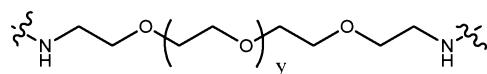
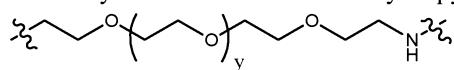


A1

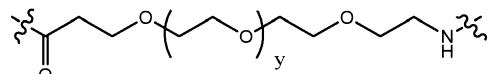
$R^1$  представляет собой  $CO_2H$  или  $H$ ;

$R^2$  и  $R^3$  независимо друг от друга представляют собой  $H$ ,  $OH$ ,  $CO_2H$ ,  $-CH=CH_2$  или  $-C\equiv CH$ ;

$N$  и  $m$  независимо друг от друга представляют собой целое число, имеющее значение от 6 до 30; линкер включает неразветвленную олигоэтиленгликольную группу формулы



или



где  $y$  принимает значение от 0 до 34;

или его амиду, сложному эфиру или фармацевтически приемлемой соли.

Было обнаружено, что жирная кислота формулы A1, когда она конъюгирана с биомолекулой, представляющей интерес, через линкер, увеличивает время полужизни указанной биомолекулы в значительно большей степени, чем более часто используемые жирнокислотные остатки.

В другом варианте осуществления изобретение относится к конъюгату, включающему биомолекулу, связанную с жирной кислотой формулы A1, где по меньшей мере один из  $R^2$  и  $R^3$  представляет собой  $CO_2H$ .

Еще в одном варианте осуществления изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим конъюгат по настоящему изобретению и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

И еще в одном варианте осуществления изобретение относится к комбинациям, включающим конъюгат по настоящему изобретению и фармацевтические комбинации одного или нескольких терапевтически активных веществ.

В другом варианте осуществления изобретение относится к жирной кислоте формулы A1, A2 или A3.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания или расстройства, выбранного из метаболических расстройств или заболеваний, сахарного диабета 2 типа, ожирения, панкреатита, дислипидемии, алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени/стеатогепатита и других прогрессирующих заболеваний печени, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, метаболического синдрома, гипертензии, сердечно-сосудистого заболевания, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, диабетических осложнений, хронического почечного заболевания, невропатии или гастропареза, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата или его амида, сложного эфира или фармацевтически приемлемой соли.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения разъясняются ниже в подробном описании изобретения.

#### Краткое описание чертежа

На фигуре показано, что соединение по примеру 24 снижало уровни АРОСЗ в плазме более эффективно, чем соединение по ссылочному примеру 3.

#### Подробное описание изобретения

##### Определения.

В целях интерпретации описания настоящего изобретения применяются следующие определения, если не указано иное, и когда это является подходящим, термины, используемые в единственном числе, также должны включать множественное число, и наоборот.

Следует отметить, что, как используется в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают указываемый объект во множественном числе, если из контекста определенно не следует иное. Так, например, ссылка на "конъюгат" включает ссылку на один или несколько конъюгатов и т.д.

Термин "алкил" относится к полностью насыщенной разветвленной или неразветвленной (или с прямой цепью или линейной) углеводородной группе, включающей от 1 до 30 атомов углерода. Предпочтительно алкил включает от 5 до 20 атомов углерода и более предпочтительно от 10 до 15 атомов углерода.  $C_{10-15}$ Алкил относится к алкильной цепи, включающей от 10 до 15 атомов углерода. Термин "алкилен" относится к двухвалентному алкилу, как он определен выше.

Термин "алкенил" относится к разветвленному или неразветвленному углеводороду, содержащему по меньшей мере одну углерод-углерод двойную связь. Термин "C<sub>2-30</sub>алкинил" относится к углеводороду, содержащему от двух до семи атомов углерода и включающему по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь.

Термин "алкинил" относится к разветвленному или неразветвленному углеводороду, содержащему по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Термин "C<sub>2-30</sub>алкинил" относится к углеводороду, содержащему от двух до семи атомов углерода и включающему по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь.

Термин "арил" относится к моноциклическим или бициклическим ароматическим углеводородным группам, содержащим 6-10 атомов углерода в кольцевой части. Репрезентативными примерами арила являются фенил или нафтил.

Термин "гетероарил" включает моноциклический или бициклический гетероарил, содержащий 5-10 кольцевых членов, выбранных из атомов углерода и от 1 до 5 гетероатомов, и каждый гетероатом независимо выбран из O, N или S, где S и N могут быть окислены до различных состояний окисления. Что касается бициклической гетероарильной системы, такая система является полностью ароматической (т.е. все кольца являются ароматическими).

Термин "циклоалкил" относится к насыщенным или ненасыщенным, но неароматическим моноциклическим, бициклическим или трициклическим углеводородным группам, включающим 3-12 атомов углерода, предпочтительно 3-8 или 3-7 атомов углерода. Что касается бициклической и трициклической циклоалкильной системы, все кольца являются неароматическими. Например, циклоалкил охватывает циклоалкенил и циклоалкинил. Термин "циклоалкенил" относится к бициклической или трициклической углеводородной группе, включающей 3-12 атомов углерода, содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Термин "циклоалкинил" относится к бициклической или трициклической углеводородной группе, включающей 3-12 атомов углерода, содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь.

Термин "гетероциклик" относится к насыщенной или ненасыщенной неароматической (частично ненасыщенной, но неароматической) моноциклической, бициклической или трициклической кольцевой системе, которая содержит по меньшей мере один гетероатом, выбранный из O, S и N, где атомы N и S также необязательно могут быть окислены до различных состояний окисления. В одном варианте осуществления гетероциклическая группа представляет собой насыщенное моноциклическое кольцо, содержащее 5-7 кольцевых атомов и необязательно содержащее дополнительный гетероатом, выбранный из O, S или N. Гетероциклическое кольцо может быть замещено алкилом, галогеном, оксо, алкокси, галогеналкилом, галогеналкокси. В другом варианте осуществления гетероциклик является ди- или трициклическим. Что касается полициклической системы, какое-либо кольцо может быть ароматическим и конденсированным с насыщенным или частично насыщенным кольцом или кольцами. Конденсированная система в целом не является полностью ароматической. Например, гетероциклическое кольцо систем может представлять собой ароматическое гетероарильное кольцо, конденсированное с насыщенной или частично насыщенной циклоалкильной кольцевой системой.

Термин "конъюгат" относится к соединению, образованному в результате ковалентного связывания биомолекулы и жирнокислотного компонента через линкер. Термин "конъюгация" относится к химической реакции, приводящей к ковалентному присоединению биомолекулы и жирнокислотного компонента.

#### Биомолекула.

Как используется в настоящем документе, термин "биомолекула" представляет собой человеческий белок фактора дифференциации роста 15 (hGDF15), или его фрагмент, или его вариант, выбранный из hGDF15\* и his-hGDF15\*, или димер любого из указанных белков,

где hGDF15\* представляет собой hGDF15;

две или три аминокислоты на N-конце заменены аминокислотной последовательностью XН- или XНХ'- соответственно, где Н представляет собой гистидин и X и X' независимо выбраны из M и A; и

his-hGDF15 представляет собой hGDF15, где метка, включающая от 1 до 6 гистидиновых аминокислотных остатков и необязательно 1 или 2 метиониновых аминокислотных остатка, была присоединена к N-концу hGDF15.

"Белок" представляет собой макромолекулу, включающую одну или несколько полипептидных цепей. Каждая из таких полипептидных цепей может быть конъюгирована с молекулой жирной кислоты формулы A1, A2 или A3. Белок также может включать непептидные компоненты, такие как углеводные группы. Углеводы и другие непептидные заместители могут быть добавлены к белку посредством клетки, в которой продуцируется этот белок, и они варьируются в зависимости от типа клетки. Белки определяются в настоящем изобретении с точки зрения их аминокислотных основных структур; заместители, такие как углеводные группы, как правило, не указываются, но, тем не менее, они могут присутствовать. Белок или полипептид, кодируемый нехозяйской молекулой ДНК, представляет собой "гетерологичный" белок или полипептид.

"Выделенный полипептид или выделенный белок" представляет собой полипептид или белок (на-

пример, GDF15), который по существу не содержит клеточных компонентов, таких как углевод, липид или другие белковые примеси, ассоциированные с полипептидом в природе. Типично, препарат выделенного полипептида или белка содержит полипептид или белок в высокоочищенной форме, т.е. с чистотой по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, больше чем 95%, например, с чистотой 96, 97 или 98% или больше или с чистотой больше чем 99%. Одним подтверждением, что конкретный белковый препарат содержит выделенный полипептид или белок, является появление одной полосы после электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) этого белкового препарата и окрашивания геля кумасси бриллиантовым голубым. Однако термин "выделенный" не исключает присутствия этого же полипептида или белка в альтернативных физических формах, таких как димеры, или, альтернативно, гликозилированные или дериватизированные формы.

Предпочтительно выделенный полипептид по существу не содержит никаких других загрязняющих полипептидов или других примесей, которые присутствуют в его природном окружении, которые могли бы помешать его использованию в терапевтических, диагностических, профилактических или исследовательских целях.

Среднему специалисту в данной области должно быть понятно, что различные аминокислотные замены, например консервативные аминокислотные замены, можно осуществить в последовательности любого полипептида или белка, описанного в настоящем документе, необязательно снижая при этом его активность. Как используется в настоящем изобретении, "аминокислота, обычно используемая в качестве замены" включает консервативные замены (т.е. замены аминокислотами с сопоставимыми химическими характеристиками). Для целей консервативной замены неполярные (гидрофобные) аминокислоты включают аланин, лейцин, изолейцин, валин, глицин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин. Полярные (гидрофильные), нейтральные аминокислоты включают серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глутамин. Положительно заряженные (основные) аминокислоты включают аргинин, лизин и гистидин. Отрицательно заряженные (кислотные) аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту. Примеры аминокислотных замен включают замену L-аминокислоты соответствующей D-аминокислотой, замену цистеина на гомоцистеин или другие не встречающиеся в природе аминокислоты, содержащие тиолсодержащую боковую цепь, замену лизина на гомолизин, диаминомасляную кислоту, диаминопропионовую кислоту, орнитин или другие не встречающиеся в природе аминокислоты, содержащие аминосодержащую боковую цепь, или замену аланина на норвалин или т.п.

Термин "аминокислота", как используется в настоящем изобретении, относится к встречающимся в природе аминокислотам, не встречающимся в природе аминокислотам, аминокислотным аналогам и аминокислотным миметикам, которые функционируют так же, как встречающиеся в природе аминокислоты, все в форме их D и L стереоизомеров, если их структура делает возможными такие стереоизомерные формы. Аминокислоты указаны в настоящей заявке с использованием их названия, их общеизвестных трехбуквенных символов или однобуквенных символов, рекомендованных IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission.

Термин "встречающиеся в природе" относится к веществам, которые присутствуют в природе и не подвергались воздействию человека. Подобным образом, "не встречающиеся в природе", "неприродные" и т.п., как это используется в настоящем изобретении, относится к веществу, которое не обнаружено в природе или которое было структурно модифицировано или синтезировано человеком. При использовании в связи с аминокислотами термин "встречающиеся в природе" относится к 20 традиционным аминокислотам (т.е. аланин (A или Ala), цистеин (C или Cys), аспарагиновая кислота (D или Asp), глутаминовая кислота (E или Glu), фенилаланин (F или Phe), глицин (G или Gly), гистидин (H или His), изолейцин (I или Ile), лизин (K или Lys), лейцин (L или Leu), метионин (M или Met), аспарагин (N или Asn), пролин (P или Pro), глутамин (Q или Gln), аргинин (K или Arg), серин (S или Ser), треонин (T или Thr), валин (V или Val), триптофан (W или Trp) и тирозин (Y или Tyr)).

Термины "не встречающаяся в природе аминокислота" и "неприродная аминокислота", как они используются в настоящем изобретении, взаимозаменяют пред назначены для представления структур аминокислот, которые не могут быть образованы биосинтетически в любом организме с использованием немодифицированных или модифицированных генов из любого организма, независимо от того, являются они одинаковыми или разными. Эти термины относятся к аминокислотному остатку, который не присутствует в природной (дикого типа) последовательности белка или последовательностях белков по настоящему изобретению. Они включают, но не ограничиваются этим, модифицированные аминокислоты и/или аминокислотные аналоги, которые не являются одной из 20 встречающихся в природе аминокислот, сelenоцистеина, пирролизина (Pyl) или пирролин-карбокси-лизина (Pcl, например, описанный в патентной публикации PCT WO 2010/48582). Такие не встречающиеся в природе аминокислотные остатки можно вводить путем замены природных аминокислот и/или путем вставки не встречающейся в природе аминокислоты в природную ((дикого типа) последовательность белка или последовательности белков по настоящему изобретению. Не встречающийся в природе аминокислотный остаток также может быть встроен таким образом, чтобы придать делительную функциональность молекуле, например способность связываться с функциональной группой (например, ПЭГ). При использовании в связи с аминокислотами

символ "U" означает "не встречающуюся в природе аминокислоту" и "неприродную аминокислоту", как это используется в настоящем изобретении.

Термин "аналог", как он используется в настоящем изобретении в отношении полипептида или белка, означает модифицированный пептид или белок, где один или несколько аминокислотных остатков пептида/белка были заменены другими аминокислотными остатками, и/или где один или несколько аминокислотных остатков были удалены из пептида/белка, и/или где один или несколько аминокислотных остатков были добавлены к пептиду/белку. Такое добавление или делеция аминокислотных остатков может иметь место на N-конце пептида и/или на C-конце пептида.

Как используется в настоящем изобретении, термин "сложный эфир конъюгата" относится к конъюгату, который включает пептид или полипептид, где присутствует сложноэфирное производное карбоново-кислотной группы (например,  $-\text{CO}_2\text{H}$  группа на C-конце была преобразована в  $-\text{COOR}$  форму), где R в сложном эфире относится к  $\text{C}_{1-6}$ алкильным группам, таким как метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил и т.д.,  $\text{C}_{3-8}$ циклоалкильным группам, таким как цикlopентил, циклогексил и т.д.,  $\text{C}_{6-10}$ арильным группам, таким как фенил,  $\alpha$ -нафтил и т.д.,  $\text{C}_{6-10}$ арил- $\text{C}_{1-6}$ алкильным группам, например фенил- $\text{C}_{1-2}$ алкильным группам, таким как бензил, фенетил, бензидил и т.д., и  $\alpha$ -нафтил- $\text{C}_{1-2}$ алкильным группам, таким как  $\alpha$ -нафтилметил и т.п. Когда пептидная или полипептидная часть конъюгата содержит дополнительные карбоксильные или карбоксилатные группы в положениях, отличных от C-конца, такие полипептиды, в которых такие группы амидированы или этерифицированы, также подпадают под категорию полипептида по настоящему изобретению. В таких случаях сложные эфиры могут представлять собой, например, такие же типы сложных эфиров, как C-концевые сложные эфиры, указанные выше.

Как используется в настоящем изобретении, термин "амид конъюгата" относится к конъюгату, который включает пептид или полипептид, где присутствует амидное производное карбоново-кислотной группы (например,  $-\text{CO}_2\text{H}$  был преобразован в  $-\text{CO}(\text{NR}'\text{R}')$ , где R' представляет собой H или R, и R определен выше. Термин "амид конъюгата" также относится к конъюгату, который включает пептид или полипептид, где присутствует амидное производное аминогруппы (т.е. отличной от аминогруппы конъюгировано с жирной кислотой) (например,  $-\text{NH}_2$  был преобразован в  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})\text{R}$ , где R определен выше. В предпочтительном варианте осуществления "амид конъюгата" представляет собой конъюгат, который включает пептид или полипептид, где карбоксильная группа на C-конце была амидирована (например,  $-\text{CO}_2\text{H}$  был преобразован в  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{C}_{1-6}$ алкил,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{C}_{1-2}$ алкилфенил или  $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{C}_{1-6}$  алкил) $_2$ ).

Термин "APJ" (также указываемый как "апелиновый рецептор", "ангиотензин-подобный-1 рецептор," "ангиотензин II-подобный-1 рецептор" и т.п.) означает состоящий из 380 остатков, 7 трансмембранных доменов Gi-связанный рецептор, ген которого локализован на длинном плече хромосомы 11 у человека (NCBI эталонная последовательность: NP\_005152.1 и эталонная последовательность, кодируемая NCBI: NM\_005161). APJ впервые был клонирован в 1993 году из геномной человеческой ДНК с использованием вырожденных олигонуклеотидных праймеров (O'Dowd et al. Gene, 136:355-60, 1993) и имеет существенную степень гомологии с ангиотензиновым II рецептором типа 1. Однако, несмотря на эту гомологию, ангиотензин II не связывается с APJ. Хотя он оставался сиротой в течение многих лет, эндогенный лиганд был выделен и получил название апелин (Tatemoto et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 251, 471-6 (1998)).

Термин "APJ агонист" включает апелиновые полипептиды. Апелин означает состоящий из 77 остатков белок-предшественник (NCBI эталонная последовательность: NP\_0059109.3 и эталонная последовательность, кодируемая NCBI: NM\_017413.3), который процессируется в биологически активные формы апелиновых пептидов, такие как апелин-36, апелин-17, апелин-16, апелин-13, апелин-12. Полноразмерный зрелый пептид, имеющий название "апелин-36", включает 36 аминокислот, но наиболее активной изоформой является пироглутаматная форма 13-мер апелина (апелин-13), имеющая название "Руг-1-апелин-13 или Руг<sup>1</sup>-апелин-13". Различные формы апелина описаны, например, в патенте США № 6492324B1. Агонисты апелиновых пептидов также описаны в патентной заявке № WO 2013/111110, заявке США № 14/082771 и предварительных заявках США № 61/858263, 61/858280 и 61/858290, которые включены в настоящее описание посредством ссылки.

Термины "пептид, являющийся агонистом окситоцинового рецептора" или "пептид окситоцин" используются взаимозаменяющими и включают окситоцин и его аналоги. Окситоцин представляет собой состоящий из девяти аминокислот циклический пептидный гормон с двумя цистеиновыми остатками, которые образуют дисульфидный мостик между положением 1 и 6. Человеческий окситоцин включает последовательность Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly. Термин "пептид, являющийся агонистом окситоцинового рецептора" также включает аналоги окситоцина, которые сохраняют биоактивность. Такие молекулы-аналоги способны действовать таким же образом, как эндогенный окситоцин, включая связывание с рецептором окситоцина. Аналоги окситоцина, представляющие особый интерес, представляют собой аналоги, раскрытые в заявке PCT № WO 2014/095773 (в частности, Пример 13); раскрытые в патентной заявке США № 1132011/044905 (в частности, Пример 49) и раскрытые в Kazimiers Wisniewski et al., Journal of Medicinal Chemistry, 2014, 57, 5306-5317, и Zbigniew Grzonka et al., Journal of Medicinal

Chemistry, 1983, 26, 1786-1787; которые все включены в настоящее описание посредством ссылки.

Под "PIP" или "Пролактин-Индуцируемым Пептидом" подразумевается белок с номером доступа в GenBank NP\_002643, который играет роль в различных биологических процессах. PIP также известен из уровня техники как белковая жидкость при обширных кистозных болезнях-15 (GCDFP-15); секреторный актин-связывающий белок (SABP); экстрапаротидный гликопротеин (EP-GP); и 17-кДа CD4-связывающий белок (GP17). PIP экспрессируется в эндокринных органах и в доброкачественных и злокачественных опухолях молочной железы человека. Зрелый секреируемый PIP белок имеет молекулярную массу 13 кДа, и он обнаружен как 17-20 кДа полипептид в SDS-PAGE, что говорит о событии гликозилирования. PIP экспрессируется в большинстве органов, которые обеспечивают жидкости организма человека; самая высокая экспрессия PIP в слюнной железе, затем следуют слезная железа, предстательная железа, мышцы, трахея и молочные железы. PIP ген кодирует PIP полипептид.

Под "PIP пептидом", как этот термин используется в настоящем документе, подразумевается человеческий PIP или его гомолог, вариант, фрагмент или модифицированная форма, которые сохраняют по меньшей мере одну активность человеческого PIP.

Последовательность неограничивающего примера человеческого PIP представлена в SEQ ID NO: 11:

```

1 MRLQLLFFRA SPATLLLVL CQLGANKAQD NTRKIIKKNF DIPKSVRPND
EVTAVLAVQQT
61 ELKECMVVKT YLISSIPLQG AFNYKYTACL CDDNPKTFYW DFYTNRTVQI
AAVVDVIREL
121 GICPDDAAVI PIKNNRKYTI EILKVE (SEQ ID NO: 11)

```

SEQ ID NO: 11 представляет собой полноразмерный человеческий PIP дикого типа, включающий сигнальный пептид (аминокислоты 1-28), который не требуется для функции.

Другим неограничивающим примером термина "PIP", как он используется в настоящем изобретении, являются аминокислоты (аа) 29-146 SEQ ID NO: 11, который, таким образом, не содержит сигнальный пептид (аминокислоты 1-28), и который представлен ниже как SEQ ID NO: 12:

```

1 QDNTRKIIK NFDIPKSRP NDEVTAVLAV QTELKECMVV KTYLISSIPL
QGAFNYKYTA
61 CLCDDNPKTF YWDFYTNRTV QIAAVVDVIR ELGICPDDAA VIPIKNNRFY
TIEILKVE (SEQ ID NO: 12)

```

Под "гомологом", "вариантом", "фрагментом" или "модифицированной формой" PIP или т.п. подразумевается полипептид, подобный, но не идентичный человеческому PIP, но который сохраняет по меньшей мере одну активность человеческого PIP. Такой полипептид может иметь последовательность, которая не является идентичной последовательности человеческого PIP (например, SEQ ID NO: 12), или может иметь последовательность, идентичную последовательности человеческого PIP (например, SEQ ID NO: 12), но отличаться некоторым другим образом (например, посттрансляционной модификацией). Такой полипептид может иметь, например, идентичность последовательности по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% с SEQ ID NO: 12 или может иметь, например, максимум 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислотных отличий (например, замены, делеции и/или добавления) от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления PIP гомолог, вариант, фрагмент или модифицированная форма сохраняет идентичность последовательности по меньшей мере 90% или имеет максимум 25 аминокислотных отличий от SEQ ID NO: 12. PIP гомолог, вариант, фрагмент или модифицированная форма сохраняют по меньшей мере одну активность человеческого PIP.

Под "FGF23" или "Фактором Роста Фибробластов 23" подразумевается полипептид, также известный как FGF-23, ADHR; FGFN; HPDR2; HYPF; PHPTC; External IDs: OMIM: 605380 MGI: 1891427 HomoGene: 10771 GeneCards: FGF23 Gene; Вид: Человек; Entrez, 8074; Ensembl ENCG00000118972; UniProt: Q9GZV9; RefSeq (mPHK): NM\_020638; RefSeq (белок): NP\_065689; Локализация (UCSC): Chr 12: 4.48-4.49 Mb; Вид: Мышь; Entrez: 64654; Ensembl: ENSMUSG00000000182; UniProt: Q9EPC2; RefSeq (mPHK): NM\_022657; RefSeq (белок): NP\_073148; Локализация (UCSC): Chr 6: 127.07-127.08 Mb. FGF23 ген кодирует FGF23 полипептид.

Под "FGF23 пептидом", как используется в настоящем изобретении, подразумевается человеческий FGF23 или его гомолог, вариант, фрагмент или модифицированная форма, которые сохраняют по меньшей мере одну активность человеческого FGF23.

Последовательность неограничивающего примера человеческого FGF23, включающая сигнальный пептид, представлена в SEQ ID NO: 9:

10	20	30	40	50
MLGARLRLWV	CALCSVCSMS	VLRAYPNASP	LLGSSWGGLI	HLYTATARNS
60	70	80	90	100
YHLQIHKNGH	VDGAPHQTIY	SALMIRSEDA	GFVVITGVMS	RRYLCMDFRG
110	120	130	140	150
NIFGSHYFDP	ENCRFQHQTL	ENGYDVYHSP	QYHFLVSLGR	AKRAFLPGMN
160	170	180	190	200
PPPYSQFLSR	RNEIPLIHFN	TPIPRRHTRS	AEDDSERDPL	NVLKPRARMT
210	220	230	240	250
PAPASCSQEL	PSAEDNSPMA	SDPLGVVRGG	RVNTHAGGTG	PEGCRPFAKF
260				

I (SEQ ID NO: 9)

SEQ ID NO: 9 представляет собой полноразмерный человеческий FGF23 дикого типа, включающий сигнальный пептид (аминокислоты 1-24), который не требуется для функции. Yamashita et al. 2000, Biochem. Biophys. Res. Comm. 277:494-498; Shimada et al. 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:6500-6505; и Zhang et al. 2004, Protein Sci. 13:2819-2824.

Неограничивающим примером термина "FGF23", как он используется в настоящем изобретении, являются аминокислоты (аа) 25-251 SEQ ID NO: 9, таким образом, последовательность не содержит сигнальный пептид (аминокислоты 1-24) и представлена ниже как SEQ ID NO: 8<sup>^</sup>

10	20	30	40	50
	YPNASP	LLGSSWGGLI	HLYTATARNS	
60	70	80	90	100
YHLQIHKNGH	VDGAPHQTIY	SALMIRSEDA	GFVVITGVMS	RRYLCMDFRG
110	120	130	140	150
NIFGSHYFDP	ENCRFQHQTL	ENGYDVYHSP	QYHFLVSLGR	AKRAFLPGMN
160	170	180	190	200
PPPYSQFLSR	RNEIPLIHFN	TPIPRRHTRS	AEDDSERDPL	NVLKPRARMT
210	220	230	240	250
PAPASCSQEL	PSAEDNSPMA	SDPLGVVRGG	RVNTHAGGTG	PEGCRPFAKF
260				

I (SEQ ID NO: 8)

Под "гомологом", "вариантом", "фрагментом" или "модифицированной формой" FGF23 или т.п. подразумевается полипептид, подобный, но не идентичный человеческому FGF23 (например, SEQ ID NO: 8), но который сохраняет по меньшей мере одну активность человеческого FGF23. Такой полипептид может иметь, например, идентичность последовательности по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% с SEQ ID NO: 8 или может иметь, например, максимум 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислотных отличий (например, замены, делеции и/или добавления) от аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления гомолог, вариант, фрагмент или модифицированная форма FGF23 сохраняет по меньшей мере 90% идентичности последовательности или имеют максимум 25 аминокислотных отличий от SEQ ID NO: 8. Гомолог, вариант, фрагмент или модифицированная форма FGF23 сохраняют по меньшей мере одну активность человеческого FGF23. Такие активности (или функции) включают в качестве неограничивающих примеров функции, которые известны для FGF23 человека, включая роли в связывании с FGF23 рецептором, взаимодействии с Klotho белком, клеточной пролиферации и системе клеточных сигналов; и активность в различных *in vitro* анализах FGF23 активности, включая анализ с использованием Egr-1-люциферазы; и активность, связанную с FGF23-ассоциированным заболеванием, таким как возрастное состояние (выбранное из группы, состоящей из саркопении, атрофии кожи, мышечной атрофии, атрофии головного мозга, атеросклероза, артериосклероза, эмфиземы легких, остеопороза, остеоартрита, иммунологической некомпетентности, высокого кровяного давления, деменции, болезни Гентингтона, болезни Альцгеймера, катаракты, возрастной дегенерации желтого пятна, рака предстательной железы, инсульта, уменьшения ожидаемой продолжительности жизни, потери памяти, морщин, нарушения функций почек и связанной с возрастом потери слуха), метаболическое расстройство (выбранное из группы, состоящей из диабета II типа, метаболического синдрома, гипергликемии и ожирения), гиперfosфатемия (опухолевый кальциноз, синдром гиперfosфатемического гиперостоза), хроническое почечное заболевание, хроническая почечная недостаточность, рак, рак молочной железы и/или мышечная атрофия. Yamashita et al. 2000, Biochem. Biophys. Res. Comm. 277:494-498; Shimada et al. 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:6500-6505; Urakawa et al. 2006, Nature, 444:770-774; Zhang et al. 2004, Protein, Sci. 13:2819-2824; WO 2013/027191, WO 2011/092234 и WO 2009/095372. В некоторых вариантах осуществля-

ления изобретение обеспечивает конъюгат, включающий жирную кислоту, описанную в настоящем изобретении, и FGF23 пептид, где FGF23 пептид сохраняет по меньшей мере одну активность FGF23; и в некоторых вариантах осуществления активность FGF23, которая сохраняется, представляет собой функцию в *in vitro* Egr-1-люциферазном анализе.

Под "гомологом" FGF23 подразумевается полипептид, соответствующий человеческому FGF23, но из другого источника, такого как млекопитающее, такое как мышь, крыса, обезьяна *sapomolgus*, корова, свинья, овца, лошадь, собака и т.д., при этом сохраняющий по меньшей мере одну функцию человеческого FGF23.

Под "вариантом" FGF23 подразумевается FGF23, который включает одну или несколько мутаций (например, делеция, замена или добавление), например, по сравнению с SEQ ID NO: 8, но при этом сохраняет по меньшей мере одну функцию человеческого FGF23. Мутации в FGF23 включают мутации в положениях Y154, Q156, R176, R179, C206 и C244. Такие мутации были описаны ранее. Мутация в R179 придает свойство резистентности к протеолизу на FGF23; в ADHR, мутации 176RXXR179 сайта предотвращают расщепление и инактивацию FGF23. White et al. 2000, Nat. Genet. 26:345-348; Liu et al. 2003, J. Biol. Chem. 278:37419-37426. Мутация в Y154 уменьшает разложение; мутация Q156 исключает сайт расщепления; и мутации в C206 и C244 уменьшают димеризацию и агрегацию. WO 2013/027191 и WO 2011/092234. Гомолог, вариант или модифицированная форма FGF23 дополнительны могут включать одну или несколько дополнительных аминокислот (которые в обычных условиях не присутствуют в человеческом FGF23 дикого типа).

Неограничивающий пример варианта FGF23 показан ниже:

10	20	30	40	50
		MYPNASP	LLGSSWGLI	HLYTATARNS
60	70	80	90	100
YHLQIHKNGH	VDGAPHQTIY	SALMIRSEDA	GFFVITGVMS	RRYLCMDFRG
110	120	130	140	150
NIFGSHYFDP	ENCRFQHQTL	ENGYDVYHSP	QYHFLVSLGR	AKRAFLPGMN
160	170	180	190	200
PPPPSQFLSR	RNEIPLIHFN	TPIPRRHTQS	AEDDSERDPL	NVLKPRARMT
110	220	230	240	250
PAPASCSQL	PSAEDNSPMA	SDPLGVVRGG	RVNTHAGGTG	PEGCRPFAKF
260				
I (SEQ ID NO: 10)				

SEQ ID NO: 10 представляет вариант FGF23, в котором сигнальный пептид (аа 1-24) удален, но снова введен исходный M в положение 1; и произошла мутация аминокислоты, соответствующей R179, с преобразованием в Q. SEQ ID NO: 10 также обозначается как "hFGF23 R179Q", "FGF23 R179", "hFGF23 (R179Q)" и т.п. и представляет собой вариант FGF23, который используют в Примере 28С.

Дополнительные варианты FGF23 включают в качестве неограничивающих примеров такие, которые имеют последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 10, но также имеют мутацию в одном или нескольких из Y154, Q156, R176, R179, C206 и C244. Дополнительные варианты FGF23 включают в качестве неограничивающих примеров такие, которые имеют последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 10, но также имеют мутацию в одном или нескольких из Y154, Q156, R176, R179, C206 и C244 и дополнительно включают одну или несколько дополнительных аминокислот (которые в обычных условиях не присутствуют в человеческом FGF23 дикого типа).

Под "фрагментом" FGF23 подразумевается FGF23, который включает одну или несколько делированных аминокислот, например, по сравнению с SEQ ID NO: 8, но при этом сохраняет по меньшей мере одну функцию человеческого FGF23. Функциональные фрагменты FGF23 включают аминокислоты 180-251 SEQ ID NO: 8, Goetz et al. 2010, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107:407-412. Фрагмент FGF23 также может иметь одну или несколько мутаций, например, в любом одном или нескольких из положений Y154, Q156, R176, R179, C206 и C244, но может сохранять по меньшей мере одну активность человеческого FGF23.

Под "модифицированной формой" FGF23 подразумевается FGF23, который включает последовательность, подобную или идентичную последовательности FGF23, например SEQ ID NO: 8, но который имеет одну или несколько модификаций и который сохраняет по меньшей мере одну активность человеческого FGF23. Такая модификация может включать в качестве неограничивающих примеров посттрансляционную модификацию (fosфорилирование, метилирование или добавление углевода) или конъюгацию со второй молекулой, которая не является FGF23. Такая вторая молекула может представлять собой в качестве неограничивающих примеров сигнальный пептид, альфа или бета *Klotho* или его фрагмент (например, растворимый *Klotho* или *sKlotho*), Fc (например, FcLALA) или другую модификацию, WO 2011/092234 и WO 2009/095372.

Как используется в настоящем изобретении, термин "AgRP пептид или полипептид" и подобные термины относятся к агути-связанному (agouti) пептиду, т.е. сигнальной молекуле, состоящей из 132 аминокислот, которая посттрансляционно процессируется в ее активную или зрелую форму, AgRP (83-132), который содержит 10 цистeinовых остатков и образует сеть из пяти дисульфидных связей. AgRP

выступает в качестве обратного агониста меланокортиковых рецепторов MC3R и MC4R. Термин "AgRP пептид" во всех случаях включает его соли. В некоторых вариантах осуществления AgRP может находиться в амидной форме, например амидирование C-концевого -CO<sub>2</sub>H с образованием C(O)-NH<sub>2</sub>. В других вариантах осуществления AgRP может быть в кислотной форме.

Термин "AgRP пептид" также включает более короткие биологически активные фрагменты AgRP. Фрагмент представляет собой часть исходной последовательности, которая идентична по последовательности, но по длине короче, чем исходная последовательность, и сохраняет биологическую активность (т.е. обратный агонизм). Фрагменты AgRP полипептидов, а также их варианты также были описаны в Jackson, P.J. et al., Biochemistry, 41, 7565-7572, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Например, AgRP (87-120) и AgRP (87-132) обладают примерно такой же аффинностью к MC3R и MC4R, как AgRP (83-132), и демонстрируют эквивалентный обратный агонизм. Дополнительные фрагменты AgRP полипептида были описаны в Christine G. Joseph et al., Peptides, 24 (2003), 263-270; который включен в настоящий документ посредством ссылки. Примерами фрагментов являются AgRP (86-132) и моноциклический AgRP (109-118), а также их элонгация на N- и/или C-конце.

Термин "AgRP полипептиды" также охватывает "AgRP мутантный полипептид", который представляет собой AgRP полипептид, в котором природная последовательность AgRP полипептида была модифицирована. Такие модификации были описаны в заявке РСТ № WO 2013/006656, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Термины "GDF15 пептид", "GDF15 полипептид" и "GDF15 белок" используются взаимозаменяющими и означают природный полипептид дикого типа, экспрессируемый в организме млекопитающего, такого как человек или мышь. Для целей настоящего раскрытия термин "GDF15 белок" можно использовать взаимозаменяющими как относящийся к любому полноразмерному GDF15 полипептиду, который состоит из 308 аминокислотных остатков; (NCI эталонная последовательность NP\_004855.2), содержащая сигнальный пептид из 29 аминокислот (аминокислоты 1-29), продомен из 167 аминокислот (аминокислоты 30-196) и зрелый домен из 112 аминокислот (аминокислоты 197-308), который вырезается из продомена фурин-подобными протеазами. Состоящий из 308 аминокислот GDF15 полипептид называют "полноразмерным" GDF15 полипептидом; состоящий из 112 аминокислот GDF15 полипептид (например, аминокислоты 197-308) представляет собой "зрелый" GDF15 полипептид. Зрелый GDF15 пептид содержит семь консервативных цистeinовых остатков, необходимых для образования мотива цистeinового узла (имеющего три внутрицепочечные дисульфидные связи), и одну межцепочечную дисульфидную связь, которые типичны для членов TGF-суперсемейства. Зрелый GDF15 пептид содержит два дополнительных цистeinовых остатка, которые образуют четвертую внутрицепочечную дисульфидную связь. Поэтому биологически активный GDF15 представляет собой гомодимер зрелого пептида, который ковалентно связан одной межцепочечной дисульфидной связью. GDF15 белок или полипептид поэтому также включает мультимер, более конкретно, димер белка. Каждое из мономерных звеньев, которые составляют гомодимер GDF15, может быть связано с жирной кислотой формулы A1, A2 или A3.

Под "гомологом", "вариантом", "фрагментом" или "модифицированной формой" GDF15 или т.п. подразумевается полипептид, подобный, но не идентичный человеческому GDF15, но который сохраняет по меньшей мере одну активность человеческого GDF15.

Под "модифицированной формой" GDF15 подразумевается GDF15, который включает последовательность, подобную или идентичную последовательности GDF15, но который имеет одну или несколько модификаций и который сохраняет по меньшей мере одну активность человеческого GDF15. Такая модификация может включать в качестве неограничивающих примеров посттрансляционную модификацию (fosфорилирование, метилирование или добавление углевода).

Под "гомологом" GDF15 подразумевается полипептид, соответствующий человеческому GDF15, но из другого источника, такого как млекопитающее, такое как обезьяны cynomolgus, мыши и крысы и т.д., но при этом сохраняет по меньшей мере одну функцию человеческого GDF15. В некоторых случаях GDF15 гомолог можно использовать для лечения или облегчения тяжести метаболического расстройства у субъекта в зрелой форме GDF15 мутантного полипептида, который происходит из того же вида, что и субъект.

В различных вариантах осуществления GDF15 полипептид, его гомолог, вариант, мутант, фрагмент или модифицированная форма включают аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 85% идентична природному GDF15 белку. В других вариантах осуществления GDF15 полипептид включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 90% или около 95, 96, 97, 98 или 99% идентична природной аминокислотной последовательности GDF15 полипептида. Такой GDF15 полипептид, его гомолог, вариант, мутант, фрагмент или модифицированная форма обладают по меньшей мере одной активностью GDF15 мутантного полипептида дикого типа, такой как способность снижать уровни глюкозы, инсулина, триглицеридов или холестерина в крови; способность снижать массу тела; или способность улучшать переносимость глюкозы, расход энергии или инсулиночувствительность.

В различных соответствующих вариантах осуществления GDF15 полипептид или его гомолог, вариант, мутант, фрагмент или модифицированная форма обладают биологической активностью, которая

эквивалента, больше или меньше активности встречающейся в природе формы зрелого GDF15 белка. Примеры биологической активности включают способность снижать уровни глюкозы, инсулина, триглицеридов или холестерина в крови; способность снижать массу тела или способность улучшать переносимость глюкозы, переносимость липидов или инсулиновую чувствительность; способность снижать глюкозу в моче и экскрецию белка.

Как используется в настоящем изобретении в контексте структуры полипептида или белка, термин "N-конец" (или "аминоконец") и "C-конец" (или "карбоксиконец") относятся к крайним амино и карбоксильному концам полипептида соответственно.

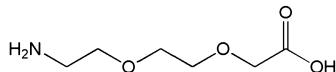
Термин "терапевтический полипептид" или "терапевтический белок", как этот термин используется в настоящем документе, означает полипептид или белок, который разрабатывается для терапевтического применения или который был разработан для терапевтического применения.

Линкер разделяет биомолекулу и жирнокислотный компонент. Его химическая структура не является критической, поскольку он служит преимущественно в качестве спейсера.

Линкер представляет собой химическое соединение, которое содержит две реакционноспособные группы/функциональные группы, одна из которых может взаимодействовать с биомолекулой, а другая с жирнокислотным компонентом. Эти две реакционноспособные/функциональные группы линкера связаны через связывающую группу или спейсер, структура которого не является критической, при условии, что он не влияет на связывание линкера с биомолекулой и жирнокислотным компонентом формулы A1, A2 или A3.

Линкер может состоять из аминокислот, связанных вместе пептидными связями. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер состоит из 1-20 аминокислот, связанных пептидными связями, где аминокислоты выбраны из 20 встречающиеся в природе аминокислот. В различных вариантах осуществления такие 1-20 аминокислот выбраны из аминокислот глицина, серина, аланина, метионина, аспарагина, глутамина, цистеина и лизина. В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из аминокислот, большинство которых являются пространственно незатрудненными, таких как глицин и аланин. В некоторых вариантах осуществления линкеры представляют собой полиглицины, полиаланины, комбинации глицина и аланина (такие как полигly-Ala) или комбинации глицина и серина (такие как полигly-Ser). В некоторых вариантах осуществления линкер состоит большей частью из аминокислот, выбранных из гистидина, аланина, метионина, глутамина, аспарагина и глицина. В некоторых вариантах осуществления линкеры содержат полигистидиновый фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления линкер включает от 1 до 20 аминокислот, которые выбраны из не встречающихся в природе аминокислот. Хотя линкер из 1-10 аминокислотных остатков является предпочтительным для конъюгации с жирнокислотным компонентом, настоящее изобретение предусматривает линкеры любой длины или композиции. Примером состоящего из не встречающихся в природе аминокислот линкера является 8-амино-3,6-диоксаоктановая кислота, имеющая следующую формулу:



или ее повторяющиеся звенья.

Линкеры, описанные в настоящем документе, приведены в качестве примера, и линкеры, которые значительно длиннее и которые включают другие остатки, предусматриваются настоящим изобретением. Непептидные линкеры также предусматриваются настоящим изобретением.

В других вариантах осуществления линкер включает одну или несколько алкильных групп, алкенильных групп, циклоалкильных групп, арильных групп, гетероарильных групп, гетероциклических групп, полиэтиленгликоль и/или одну или несколько природных или не встречающихся в природе аминокислот или их комбинацию, где каждый из алкила, алкенила, циклоалкила, арила, гетероарила, гетероциклила, полиэтиленгликоля и/или природных или не встречающихся в природе аминокислот не обязательно объединены и связаны вместе или связаны с биомолекулой и/или с жирнокислотным компонентом через химическую группу, выбранную из -C(O)O-, -OC(O)-, -NHC(O)-, -C(O)NH-, -O-, -NH-, -S-, -C(O)-, -OC(O)NH-, -NHC(O)O-, =NH-O-, =NH-NH- или =NH-N(алкил)-.

Можно использовать линкеры, содержащие алкильный спейсер, которые представляют собой, например, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-C(O)- или -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-C(O)- или -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-C(O)-, -NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-NH-, -O-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-C(O)-O-, -C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-O-, -NHC(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>z</sub>-C(O)-NH- и т.п., где z имеет значение 2-20. Эти алкильные линкеры дополнительно могут быть замещены любой не являющейся пространственно затрудненной группой, включая, но не ограничиваясь этим, низший алкил (например, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), низший ацил, галоген (например, Cl, Br), CN, NH<sub>2</sub> или фенил.

Линкер также может иметь полимерную природу. Линкер может включать полимерные цепи или звенья, которые являются биостабильными или биоразлагаемыми. Полимеры с повторяющейся связью могут иметь разные степени стабильности в физиологических условиях в зависимости от лабильности связи. Полимеры могут содержать связи, такие как поликарбонаты (-O-C(O)-O-), полиэфиры (-C(O)-O-), полиуретаны (-NH-C(O)-O-), полиамид (-C(O)-NH-). Эти связи представлены в качестве примеров и не

предназначены для ограничения типа связей, которые можно использовать в полимерных цепях или линкеров по настоящему изобретению. Подходящие полимеры включают, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, полиаминокислоты, дивиниловый эфир, малеиновый ангидрид, N-(2-гидроксипропил)метакриламид, декстран, производные декстрана, полипропиленгликоль, полиоксиэтилизированный полиол, гепарин, фрагменты гепарина, полисахарида, целлюлозу и производные целлюлозы, крахмал и производные крахмала, полиалкиленгликоль и его производные, сополимеры полиалкиленгликолей и их производные, поливинилэтиловый эфир и т.п. и их смеси. Полимерный линкер представляет собой, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ). ПЭГ линкер может быть линейным или разветвленным. Молекулярная масса ПЭГ линкера в настоящем изобретении не ограничивается каким-либо определенным размером, но некоторые варианты осуществления имеют молекулярную массу в пределах от 100 до 5000 Да, например, от 500 до 1500 Да.

Линкер содержит подходящие функциональные/реакционноспособные группы по обоим концам, которые образуют мостик между аминогруппой пептида или полипептида/белка и функциональной/реакционноспособной группой жирнокислотного компонента (например, карбоново-кислотной функциональной группой жирнокислотного компонента формулы A1).

Линкер может включать несколько связывающих фрагментов (или спейсер) различной природы (например, комбинацию аминокислот, гетероциклической группы, ПЭГ и/или алкильных групп). В этом случае каждый связывающий фрагмент содержит подходящие функциональные/реакционноспособные группы по обоим концам, которые образуют мостик между аминогруппой пептида или полипептида/белка и следующим связывающим фрагментом другой природы, и/или содержит подходящие функциональные/реакционноспособные группы, которые образуют мостик между предыдущим связывающим фрагментом другой природы и жирнокислотным компонентом.

Модифицированные пептиды или полипептиды и/или пептид-полипептид неполная конструкция (т.е. пептид/полипептид, присоединенный к неполному линкеру) включают реакционноспособные группы, которые могут взаимодействовать с доступными реакционноспособными функциональными группами в жирнокислотном компоненте (или модифицированном жирнокислотном компоненте: т.е. с уже присоединенным неполным линкером) с образованием ковалентной связи. Реакционноспособные группы представляют собой химические группы, способные образовывать ковалентную связь. Реакционноспособные группы расположены на одном участке конъюгации и, как правило, могут представлять собой карбокси, фосфорил, ацильную группу, сложный эфир или смешанный ангидрид, малеимид, N-гидроксисукцинимид, тетразин, алкин, имидат, пиридин-2-ил-дисульфанил, способные, таким образом, образовывать ковалентную связь с функциональными группами, такими как аминогруппа, гидроксильная группа, алкеновая группа, гидразиновая группа, гидроксиламиновая группа, азидная группа или тиольная группа, на другом участке конъюгации.

Реакционноспособные группы, представляющие особый интерес для конъюгации биомолекулы или модифицированной биомолекулы с линкером и/или линкера с жирнокислотным компонентом и/или для конъюгации различных связывающих фрагментов разной природы вместе, представляют собой N-гидроксисукцинимид, алкин (более конкретно, циклооктин).

Функциональные группы включают:

1) тиольные группы для взаимодействия с малеимидами, тозилсульфоном или пиридин-2-илдисульфанилом;

2) аминогруппы (например, функциональная аминогруппа аминокислоты) для связывания с карбоновой кислотой или активированной карбоновой кислотой (например, образование амидной связи через N-гидроксисукцинидную химию), фосфорильными группами, ацильной группой или смешанным ангидридом;

3) азид для реакции циклоприсоединения Хьюсена концевого алкина и, более конкретно, циклооктина (больше известная как клик-химия);

4) карбонильную группу для взаимодействия с гидроксиламином или гидразином с образованием оксима или гидразина соответственно;

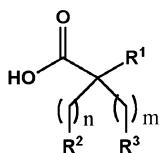
5) алken и, более конкретно, напряженный алken для взаимодействия с тетразином в аза [4+2] присоединении.

Хотя некоторые примеры линкеров и функциональных групп/реакционноспособных групп описаны в настоящем документе, изобретение предусматривает линкеры любой длины и композиции.

### **Варианты осуществления**

Различные варианты осуществления настоящего изобретения описаны в настоящем документе. Должно быть понятно, что характерные признаки, определенные в каждом варианте осуществления, можно сочетать с другими определенными признаками для обеспечения дополнительных вариантов осуществления.

В варианте осуществления 1 изобретение относится к конъюгату, включающему биомолекулу, связанную с жирнокислотным компонентом через линкер, где жирнокислотный компонент имеет следующую формулу A1:

**A1**

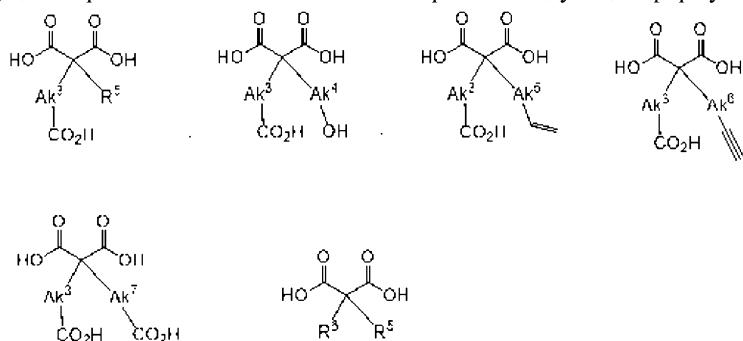
где R<sup>1</sup> представляет собой CO<sub>2</sub>H или H;

R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> независимо друг от друга представляют собой H, OH, CO<sub>2</sub>H, -CH=CH<sub>2</sub> или -C≡CH;

n и m независимо друг от друга представляют собой целое число, имеющее значение от 6 до 30, или его амиду, сложному эфиру или фармацевтически приемлемой соли.

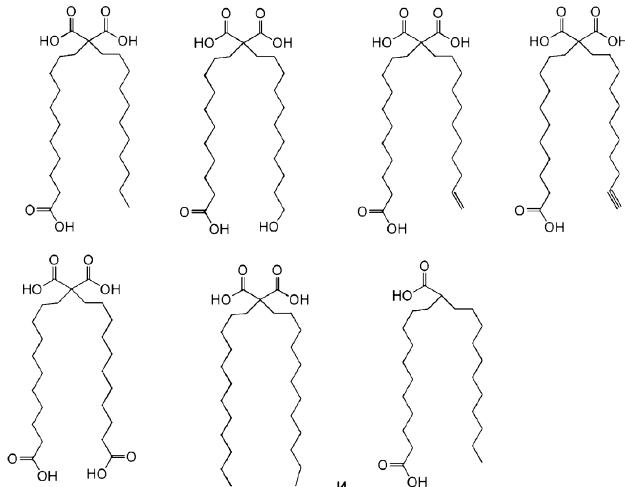
В конкретном аспекте этого варианта осуществления коньюгат включает жирнокислотный компонент формулы A1, где n и m независимо имеют значение от 8 до 20, предпочтительно от 10 до 16. В другом аспекте этого варианта осуществления изобретение относится к коньюгату в соответствии с вариантом осуществления 1 или 1A, где жирнокислотный компонент имеет формулу A1 и где по меньшей мере один из R<sup>2</sup> и R<sup>3</sup> представляет собой CO<sub>2</sub>H.

В варианте осуществления 2 изобретение относится к коньюгату в соответствии с вариантом осуществления 1 или 1A, где жирнокислотный компонент выбран из следующих формул:

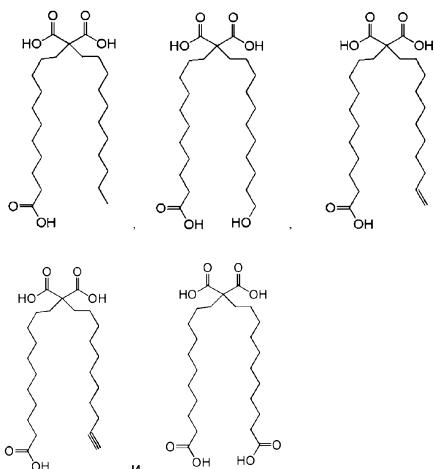


где Ak<sup>3</sup>, Ak<sup>4</sup>, Ak<sup>5</sup>, Ak<sup>6</sup> и Ak<sup>7</sup> независимо представляют собой (C<sub>8-20</sub>)алкилен, R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup> независимо представляют собой (C<sub>8-20</sub>)алкил.

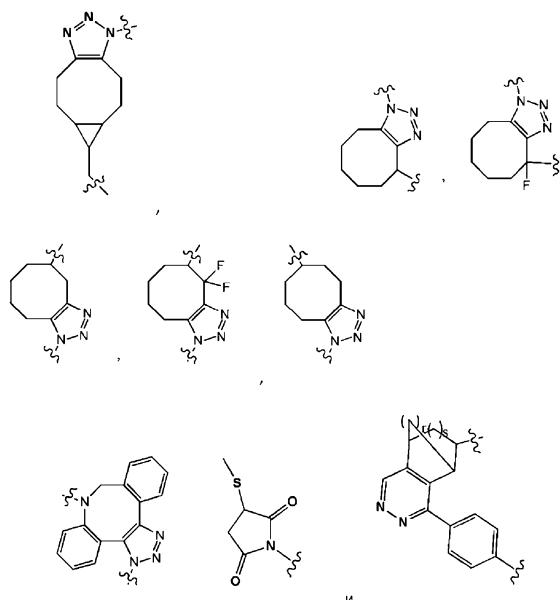
В варианте осуществления 3 изобретение относится к коньюгату в соответствии с вариантом осуществления 1, 1A или 2, где жирнокислотный компонент выбран из следующих формул:



В варианте осуществления 3А изобретение относится к коньюгату в соответствии с вариантом осуществления 1, 1A или 2, где жирнокислотный компонент выбран из следующих формул:



В варианте осуществления 4 изобретение относится к коньюгату в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, где линкер включает гетероциклическую группу одной из следующих формул:

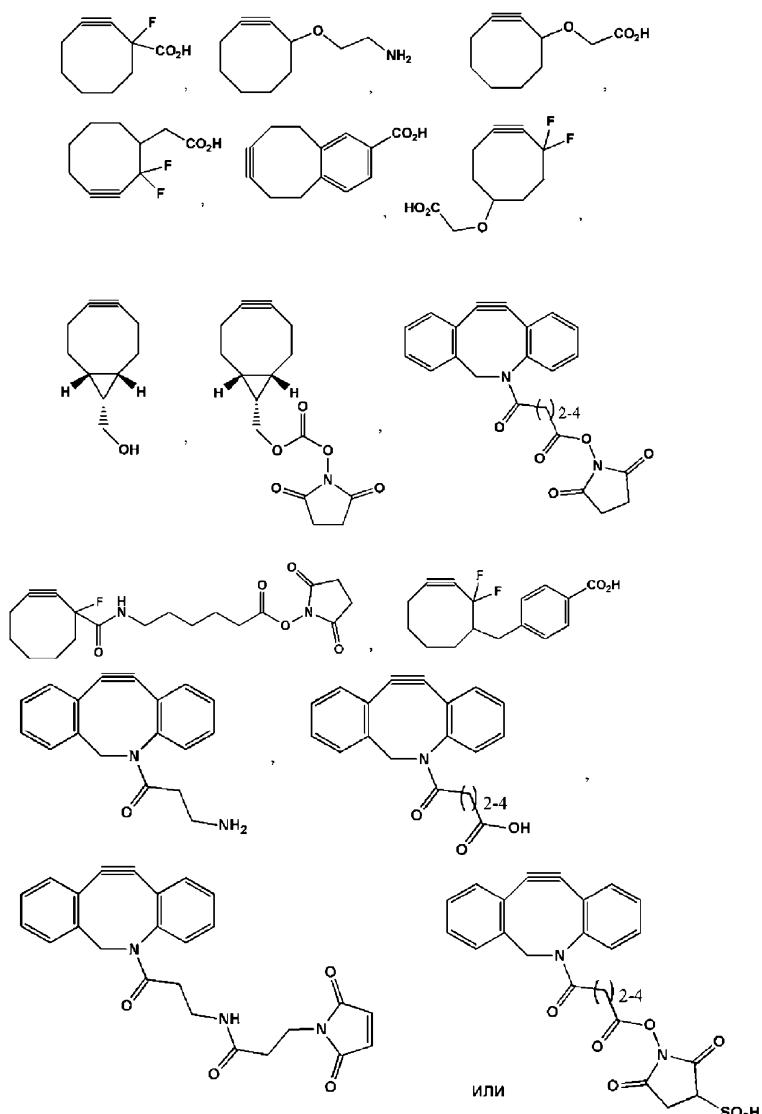


где  $r$  представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 2, и  $s$  представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 3.

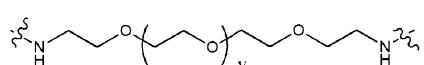
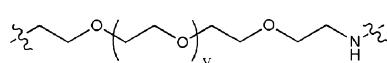
Такие гетероциклизированные линкеры получают, например, реакцией азид-алкин циклоприсоединения по методу Хьюсгена, которая больше известна как клик-химия. Более конкретно, некоторые из гетероциклизированных, описанных выше, получают в результате реакции циклоалкина с азид-содержащей группой.

Циклоалкин легко доступен из коммерческих источников и поэтому может быть функционализирован через циклоприсоединение группы, содержащей азидную функциональную группу (например, линкера, содержащего концевую азидную функциональную группу). Примеры использования клик-химии с циклическим алкином в мечении белков были описаны в US 2009/0068738, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

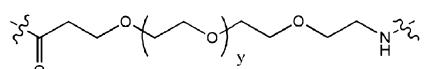
Неограничивающие примеры циклоалкиновых агентов, которые можно использовать в циклопри- соединении Хьюсгена, включают следующие:



В варианте осуществления 5 изобретение относится к конъюгату в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, где линкер включает неразветвленную группу олиго этиленгликоля формулы:

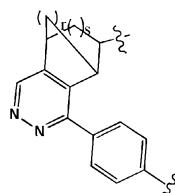


или



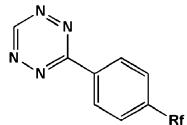
где у имеет значение от 0 до 34.

В варианте осуществления 6А изобретение относится к конъюгату в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-5, где линкер включает (или дополнительно включает) гетероциклик, выбранный из следующей формулы:

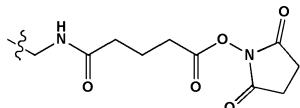


где г представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 2, и с представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 3.

Такие гетероциклические линкеры можно получить через аза [4+2] циклоприсоединение алкена, или предпочтительно напряженного алкена, такого как циклоалкан, со следующей группой:

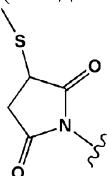


где Rf представляет собой, например, -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -OH, -CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H, -S-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H, -(O-CH<sub>2</sub>)<sub>4-6</sub>-C(O)-OH-; или



Такие тетразиновые агенты легко доступны из коммерческих источников и могут взаимодействовать с алken-содержащей группой, например линкером, содержащим концевую алкеновую функциональную группу.

В варианте осуществления 6В изобретение относится к конъюгату в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-5, где линкер включает (или дополнительно включает) гетероциклик формулы

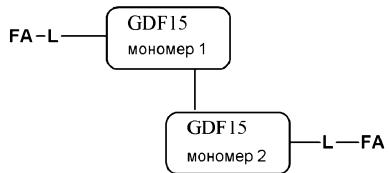


Такую гетероциклическую группу можно получить путем взаимодействия малеимида с тиол-содержащей группой, такой как, например, линкер, содержащий концевую тиольную функциональную группу.

Эти реагенты, которые являются легко доступными и/или коммерчески доступными, присоединяют непосредственно или через линкер, описанный выше, к пептиду или полипептиду, представляющему интерес. Алкиновые, малеимидные или тетразиновые реакционноспособные группы подвергают взаимодействию с функциональной группой (азид, тиол и алken соответственно), которая присутствует в жирнокислотном компоненте или в конструкции линкер-жирная кислота (такой как, например, конструкция ПЭГ-жирная кислота).

В варианте осуществления 7 изобретение относится к конъюгату в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, где линкер включает, или дополнительно включает, одну или несколько аминокислот, независимо выбранных из гистидина, метионина, аланина, глутамина, аспарагина и глицина. В одном конкретном аспекте этого варианта осуществления линкер включает от 1 до 6 аминокислот, выбранных из гистидина, аланина и метионина.

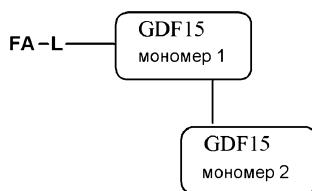
В варианте осуществления 8 изобретение относится к конъюгату в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, где биомолекула представляет собой человеческий фактор дифференциации роста 15 (hGDF15), или его фрагмент, или его вариант, выбранный из hGDF15\* и his-hGDF15\*, или димер любого из указанных белков. В одном аспекте этого варианта осуществления биомолекула представляет собой фрагмент или вариант человеческого фактора дифференциации роста 15 (hGDF15). В предпочтительном варианте осуществления биомолекула представляет собой димер hGDF15 или его фрагмент или мутант. В свете гомодимерной природы hGDF15 полипептида или его фрагмента или варианта каждая из двух полипептидных цепей (т.е. каждое мономерное звено), которые образуют гомодимер, может быть связана с молекулой жирной кислоты формулы A1 через линкер. Поэтому hGDF15 гомодимер может быть связан с одной или двумя жирными кислотами через линкер. Структура hGDF15, связанного с жирнокислотным компонентом через линкер, может быть представлена следующим образом:



где FA представляет собой жирнокислотный компонент;

L представляет собой линкер;

GDF15 мономерное звено 1 и мономерное звено 2, оба связаны с жирнокислотным компонентом через линкер; или



Структура В ;

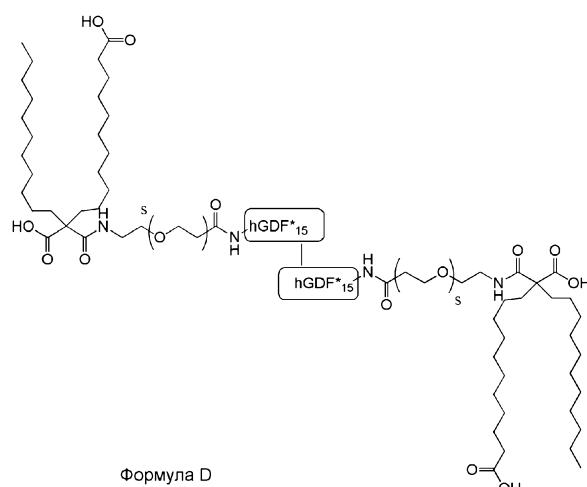
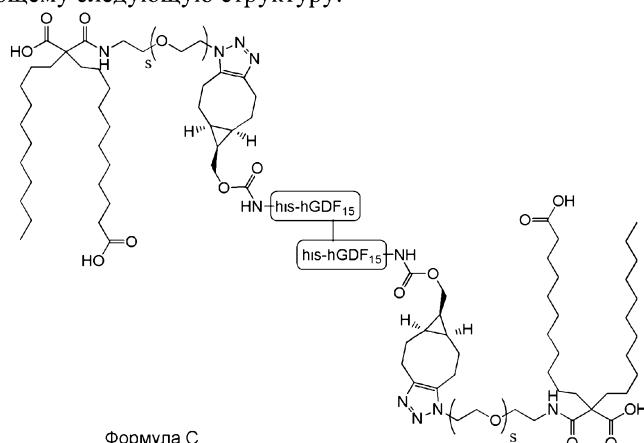
где FA представляет собой жирнокислотный компонент;

L представляет собой линкер;

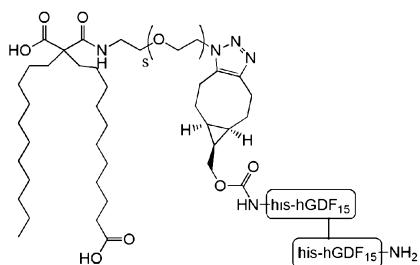
только одно из мономерных звеньев связано с жирнокислотным компонентом через линкер;  
линия между двумя мономерными звеньями представляет собой дисульфидную связь.

Кроме того, изобретение также относится к смеси, включающей конъюгат структуры А и конъюгат структуры В.

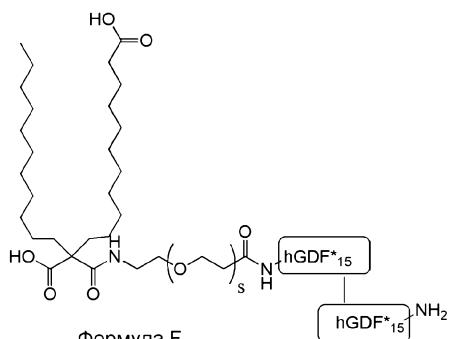
В варианте осуществления 9 изобретение относится к конъюгату в соответствии с вариантами осуществления 1, 2, 8, имеющему следующую структуру:



где в формулах С и D оба мономерных звена his-hGDF15 или hGDF15\* связаны с жирнокислотным компонентом через линкер на обоих N-концах; или



## Формула Е



## Формула F

где в формулах E и F только одно из мономерных звеньев his-hGDF15 или hGDF15\* связано с жирнокислотным компонентом через линкер на N-конце; и

hGDF15\* представляет собой hGDF15, где две или три аминокислоты на N-конце заменены аминокислотной последовательностью XH- или XHX'- соответственно, где H представляет собой гистидин и X и X' независимо выбраны из M и A; и

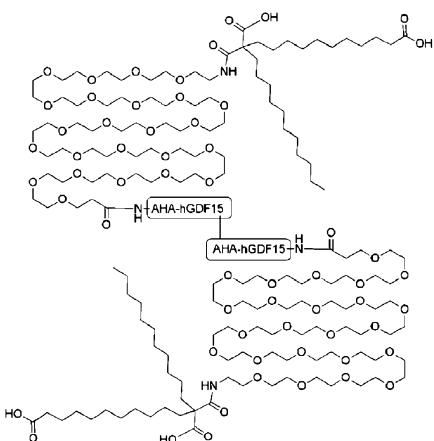
his-hGDF15 представляет собой hGDF15, где метка, включающая от 1 до 6 гистидиновых аминокислотных остатков и необязательно 1 или 2 метиониновых аминокислотных остатка, была присоединена к N-концу hGDF15; и

s представляет собой целое число, имеющее значение 20-30; и

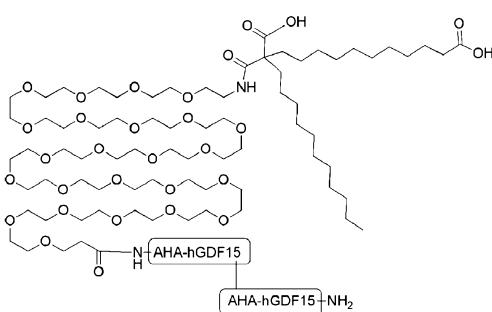
линия между двумя мономерными звеньями his-hDGF15 или двумя мономерными звеньями hDGF15\* представляет собой дисульфидную связь.

В варианте осуществления 11 изобретение относится к конъюгату в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, где биомолекула выбрана из MH(199-308)hGDF15, MHA(200-308)hGDF15, AHA(200-308)hGDF15 или AH(199-308)GDF15; МННННННМ-hGDF15 и МННННННН-hGDF15 или его димера.

В варианте осуществления 12 изобретение относится к конъюгату в соответствии с вариантом осуществления 11, где биомолекула, связанная с жирной кислотой через линкер, имеет формулу G или формулу H:



Формула Г



Формула Н

где АНА-хGDF15 представляет собой SEQ ID NO: 7 и жирная кислота связана через линкер на N-конце одного или двух мономерных звеньев и где линия между двумя АНА-хGDF15 звеньями представляет собой дисульфидную связь.

В варианте осуществления 13 изобретение относится к композиции, включающей смесь конъюгата в соответствии с вариантом осуществления 12, имеющего формулу G, и конъюгата в соответствии с вариантом осуществления 12, имеющего формулу Н. В конкретном аспекте этого варианта осуществления смесь включает конъюгат формулы G и конъюгат формулы Н в молярном соотношении 1:1.

АНА-(200-308)-хGDF15 (SEQ ID NO: 7) был предназначен для удаления клиппинг сайта, наблюдаемого в нативном белке, а также для удаления сайта потенциального формилирования метионина (M1) и сайта N-199 деамидирования. Превосходное качество и гомогенность АНА подтверждало путем контроля качества вещества, показывающего отсутствие клиппинга, деамидирования или окисления метионина, которые наблюдали с хGDF15 нативной последовательностью.

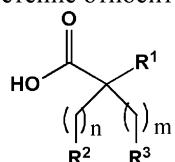
	MHHHHH-ARN-(200-308)- хGDF15	АНА-(200-308)- хGDF15
клиппинг	R9/N10 (<1%) N10/G11 (<1%)	не обнаружен
окисление метионина	M1: 12,0% окисления	N/A
N-199 деамидирование	N10: 50,1% деамидирования	N/A

В варианте осуществления 14 изобретение относится к конъюгату в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, где жирнокислотный остаток присоединен к N-концу пептида или белка через линкер. В варианте осуществления 15 изобретение относится к конъюгату в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, где конъюгат имеет стабильность в плазме с временем полужизни больше чем 5 ч. В одном аспекте этого варианта осуществления конъюгат имеет стабильность в плазме с временем полужизни больше чем 10 ч. В другом аспекте этого варианта осуществления конъюгат имеет стабильность в плазме с временем полужизни больше чем 20 ч или больше чем 30 ч. Еще в одном аспекте этого варианта осуществления конъюгат имеет стабильность в плазме с временем полужизни больше чем 40 ч или больше чем 50 ч.

В варианте осуществления 16 изобретение относится к конъюгату в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления, где улучшение времени полужизни при стабильности в плазме по сравнению с неконъюгированной биомолекулой является 2-кратным, 5-кратным, 10-кратным, 20-кратным, 30-кратным, 40-кратным, 50-кратным или 75-кратным.

В другом варианте осуществления биомолекула, линкер и жирнокислотный компонент ( $R^1-R^4$ ,  $n$ ,  $m$  и  $Ak$ ) представляют собой такие, которые определены в разделе "Примеры".

В одном варианте осуществления изобретение относится к соединению формулы



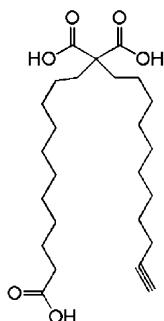
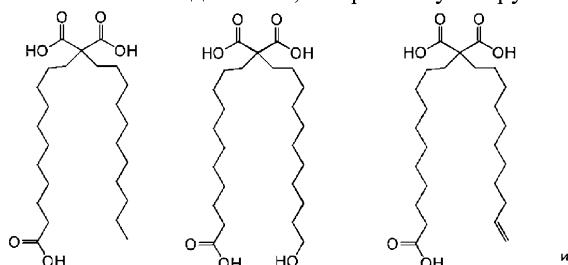
A1

где  $R^1$  представляет собой  $CO_2H$ ;

$R^2$  и  $R^3$  независимо друг от друга представляют собой  $H$ ,  $OH$ ,  $CO_2H$ ,  $-CH=CH_2$  или  $-C\equiv CH$  при условии, что  $R^2$  и  $R^3$  не являются одинаковыми;

$m$  и  $n$  независимо друг от друга представляют собой целое число, имеющее значение от 6 до 30; или его амиду, сложному эфиру или фармацевтически приемлемой соли.

В другом аспекте этого варианта осуществления изобретение относится к соединению формулы A1, где по меньшей мере один из  $R^2$  и  $R^3$  представляет собой  $CO_2H$ . Еще в одном аспекте этого варианта осуществления изобретение относится к соединению, выбранному из группы, состоящей из:



Синтез пептида/полипептида и/или его модифицированной формы.

Пептиды или полипептиды по настоящему изобретению можно получить либо методами химического синтеза, либо рекомбинантными методами, либо комбинацией двух таких методов. Пептиды или полипептиды/белок конструкции можно получить как полноразмерные или можно синтезировать в виде неполноразмерных фрагментов и объединить. Пептиды и полипептиды по настоящему изобретению можно получить с использованием процедур, известных *per se* для пептидного синтеза. Способы пептидного синтеза могут представлять собой любой способ твердофазного синтеза и жидкофазного синтеза. Таким образом, пептид и полипептид, представляющий интерес, можно получить путем конденсации неполного пептида или аминокислоты, способной образовывать белок, с их остальной частью, и, когда продукт содержит защитную группу, эту защитную группу затем отщепляют, таким образом, можно получить желаемый пептид. Известные способы конденсации и удаления защиты включают процедуры, описанные в следующей литературе (1)-(5).

- (1) M. Bodanszky and M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York, 1966,
- (2) Schroeder and Luebke, The Peptide, Academic Press, New York, 1965,
- (3) Nobuo Izumiya et al.. Fundamentals and Experiments in Peptide Synthesis, Maruzen, 1975,
- (4) Haruaki Yajima and Shumpei Sakakibara, Biochemical Experiment Series 1, Protein Chemistry IV, 205, 1977, и
- (5) Haruaki Yajima (ed.), Development of Drugs-Continued, 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten.

После завершения реакции пептид или полипептид может быть очищен и выделен, используя комбинацию традиционных методов очистки, таких как экстракция растворителем, колоночная хроматография, жидкостная хроматография, эксклюзационная хроматография и ионообменная хроматография и перекристаллизация. Когда пептид, выделенный, как описано выше, представляет собой свободное соединение, его можно преобразовать в подходящую соль известным способом. Наоборот, когда выделенный продукт представляет собой соль, ее можно преобразовать в свободный пептид известным способом.

Амид полипептида можно получить с использованием смолы для пептидного синтеза, которая является подходящей для амидирования. Смола включает хлорметиловую смолу, гидроксиметиловую смолу, бензгидриламиновую смолу, аминометиловую смолу, смолу на основе 4-бензилоксибензилового спирта, 4-метилбензгидриламиновую смолу, РАМ смолу, 4-гидроксиметилметилфенил-ацетамидометиловую смолу, полиакриламидную смолу, 4-(2',4'-диметоксифенилгидроксиметил)фенокси смолу, 4-(2',4'-диметоксифенил-Fmoc-аминометил)фенокси смолу, 2-хлортритильтитановую смолу и т.д. С использованием такой смолы аминокислоты, в которых  $\alpha$ -аминогруппы и функциональные группы боковой цепи были подходящим образом защищены, конденсируют на смоле в соответствии с последовательностью целевого пептида различными методами конденсации, которые известны *per se*. По окончании этих последовательных реакций пептид или защищенный пептид выделяют из смолы и защитные группы удаляют и, если необходимо, осуществляют процедуру образования дисульфидных связей с получением целевого полипептида.

Для конденсации указанных выше защищенных аминокислот можно использовать различные активирующие реагенты для пептидного синтеза, такие как НАТУ, НСТУ или, например, карбодииimid. Карбодииimid включает DCC, N,N'-диизопропилкарбодииimid и N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодииimid. Для активации таким реагентом можно использовать ингибитор рацемизации в качестве добавки, например, HOEt или Oxima Pure. Защищенную аминокислоту можно непосредственно добавить к смоле вместе с активирующими реагентами и ингибитором рацемизации или предварительно активировать в виде симметричного ангидрида кислоты, HOEt сложного эфира или HOОEt сложного эфира, затем добавить к смоле. Растворитель для активации защищенных аминокислот или конденсации со смолой можно подходящим образом выбрать из тех растворителей, которые известны как полезные для реакции конденсации пептидов. Например, можно указать N,N-диметилформамид, N-метилпирролидон, хлороформ, трифторметанол, диметилсульфоксид, DMF, пиридин, диоксан, метиленхлорид, тетрагидрофuran, ацетонитрил, этилацетат или подходящие смеси таких растворителей. Температуру реакции можно выбрать из диапазона, известного как подходящий для образования пептидной связи, и обычно выбирают в пределах от около -20 до около 50°C. Активированное аминокислотное производное, как правило, используют в 1,5-4 кратном избытке. Если тест с использованием реакции нингидрина показывает, что конденсация является недостаточной, реакцию конденсации можно повторить для достижения достаточной конденсации без удаления защитной группы. Если повторная конденсация также не обеспечивает достаточную степень конденсации, можно осуществить ацетилирование непрореагировавшей аминогруппы уксусным ангидридом или ацетилимидазолом.

Защитная группа для аминогруппы, используемой в качестве исходного вещества аминокислоты, включает Z, Bos, третичный амилоксикарбонил, изоборнилоксикарбонил, 4-метоксибензилоксикарбонил, Cl-Z, Br-Z, адамантанлоксикарбонил, трифторацетил, фталил, формил, 2-нитрофенилсульфенил, дифенилфосфинотионил или Fmoc. Карбоксизащитная группа, которую можно использовать, включает, но не ограничивается этим, указанные выше C<sub>1-6</sub>алкил, C<sub>3-8</sub>циклоалкил и C<sub>6-10</sub>арил-C<sub>1-2</sub>алкил, а также 2-адамантил, 4-нитробензил, 4-метоксибензил, 4-хлорбензил, фенацил, бензилоксикарбонилгидразидо, третичный бутоксикарбонилгидразидо и тритильтитановую смолу.

Гидроксигруппу серина и треонина можно защитить путем этерификации или этерификации. Группа, подходящая для указанной этерификациии, включает углеродные группы, такие как низшие алканоильные группы, например ацетил и т.д., ароильные группы, например бензоил и т.д., бензилоксикарбонил и этоксикарбонил. Группа, подходящая для указанной этерификации, включает бензил, тетрагидрофуранил и третичный бутил. Защитная группа для фенольной гидроксильной группы тирозина включает Bzl, Cl<sub>2</sub>Bzl, 2-нитробензил, Br-Z и третичный бутил.

Защитная группа имидазола для гистидина включает Tos, 4-метокси-2,3,6-триэтилбензолсульфонил, DNP, бензилоксиметил, Bum, Bos, Trt и Fmoc.

Активированная карбоксильная группа исходной аминокислоты включает ангидрид, азид и активные сложные эфиры соответствующей кислоты, например сложный эфиры со спиртами, такими как пентахлорфенол, 2,4,5-трихлорфенол, 2,4-динитрофенол, цианометиловый спирт, п-нитрофенол, HONB, N-гидроксисукцинимид, N-гидроксифталимид, HOt и т.д.

Активированная аминогруппа исходной аминокислоты включает соответствующий фосфорамид.

Способ удаления защитных групп включает каталитическое восстановление с использованием газообразного водорода в присутствии катализатора, такого как палладиевая чернь или палладий-на-углероде, кислотную обработку с использованием безводного фтористого водорода, метансульфоновой кислоты, трифторметансульфоновой кислоты, трифтруксусной кислоты или смеси таких кислот, обработку основанием с использованием дизопропилэтамина, триэтиламина, пиперидина, пиперазина, восстановление с использованием металлического натрия в жидким аммиаке. Реакцию отщепления путем обработки указанной выше кислотой, как правило, осуществляют при температуре в пределах от -20 до 40°C, и ее выгодно осуществлять с добавлением акцептора катионов, такого как анизол, фенол, тиоанизол, м-крезол, п-крезол, диметилсульфид, 1,4-бутандитиол, 1,2-этандитиол, 2,4-динитрофенильную группу, используемую для защиты имидазольной группы гистидина, можно удалить путем обработки тиофенолом, тогда как формильную группу, используемую для защиты индолиновой группы триптофана, можно удалить путем обработки щелочью с использованием разбавленного раствора гидроксида натрия или разбавленного водного раствора аммиака, а также указанной выше кислотной обработкой в присутствии 1,2-этандитиола, 1,4-бутандитиола.

Способ защиты функциональных групп, которые не должны принимать участие в реакции исходного вещества, защитные группы, которые можно использовать, способ удаления защитных групп и способ активации функциональных групп, которые должны принимать участие в реакции, - все могут быть выбраны законным образом из известных групп и способов. Другой способ получения амидной формы полипептида включает сначала амидирование карбоксильной группы C-концевой аминокислоты, затем удлинение пептидной цепи к N-концу до получения желаемой длины цепи и затем селективное удаление защиты  $\alpha$ -аминогруппы C-концевого пептида и  $\alpha$ -карбоксигруппы аминокислоты или пептида, который должен образовывать остальную часть целевого полипептида, и конденсацию этих двух фрагментов, в которых  $\alpha$ -аминогруппа и функциональные группы боковой цепи были защищены подходящими защитными группами, указанными выше, в смешанном растворителе, таком как указанный выше. Параметры этой реакции конденсации могут быть такими, которые описаны выше. Из защищенного пептида, полученного путем конденсации, все защитные группы удаляют описанным выше способом, получая, таким образом, желаемый неочищенный пептид. Этот неочищенный пептид можно очистить с использованием известных процедур очистки, и основную фракцию можно подвергнуть лиофилизации с получением целевого амидированного полипептида. Для получения сложного эфира полипептида,  $\alpha$ -карбоксильную группу C-концевой аминокислоты конденсируют с желаемым спиртом с получением сложного эфира аминокислоты и затем следуют процедуре, описанной выше для получения амида.

Альтернативно, рекомбинантные методы экспрессии являются особенно полезными. Экспрессию рекомбинантного белка с использованием клетки хозяина (клетка, искусственно созданная для включения нуклеиновых кислот, кодирующих последовательность пептида и которые будут осуществлять транскрипцию и трансляцию и, необязательно, секрецию пептида в среду для роста клеток) используют в данной области рутинным образом. Для способа рекомбинантного продуцирования нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную последовательность пептида, типично синтезируют традиционными способами и встраивают в вектор экспрессии. Такие способы особенно предпочтительны для получения композиций полипептидов, включающих пептиды, конденсированные с дополнительными пептидными последовательностями или другими белками или фрагментами или доменами белков. Клетка хозяина, как вариант, может по меньшей мере представлять собой клетку, выбранную из E.Coli, COS-1, COS-7, HEK293, BHT21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, клетки миеломы, лимфомы, дрожжей, насекомого или растения или любую их производную, иммортализованную или трансформированную клетку.

Изобретение также охватывает полинуклеотиды, кодирующие описанные выше варианты, которые могут быть в форме РНК или в форме ДНК, при этом ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК. ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной. Кодирующие последовательности, которые кодируют композиции по настоящему изобретению, могут варьироваться как результат избыточности или вырожденности генетического кода.

Полинуклеотиды, которые кодируют композиции по настоящему изобретению, могут включать следующие: только кодирующую последовательность для варианта, кодирующую последовательность для варианта и дополнительную кодирующую последовательность, такую как функциональный полипептид, или лидерную или секреторную последовательность, или последовательность белка-предшественника; кодирующую последовательность для варианта и некодирующую последовательность,

такую как интроны или некодирующую последовательность 5'- и/или 3'-кодирующую последовательности для варианта. Таким образом, термин "полинуклеотид, кодирующий вариант" охватывает полинуклеотид, который может включать не только кодирующую последовательность для варианта, но также полинуклеотид, который включает дополнительную кодирующую и/или некодирующую последовательность.

Изобретение также относится к вариантам описанных полинуклеотидов, которые кодируют фрагменты, аналоги и производные полипептида, которые содержат указанные замены. Вариант полинуклеотида может представлять собой природный аллельный вариант последовательности человеческого GDF15, не встречающийся в природе вариант или усеченный вариант, описанный выше. Таким образом, настоящее изобретение также включает полинуклеотиды, кодирующие варианты, описанные выше, а также варианты таких полинуклеотидов, которые кодируют фрагмент, производное или аналог раскрыто го варианта. Такие нуклеотидные варианты включают варианты с делециями, варианты с заменами, усеченные варианты и варианты с добавлениями или вставками при условии, что присутствует по меньшей мере одна из указанных аминокислотных замен первого или второго варианта осуществления.

Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут экспрессироваться в хозяевах после того, как последовательности были функционально связаны (т.е. позиционированы для обеспечения функционирования) с последовательностью контролем экспрессии. Эти векторы экспрессии типично реплицируются в организме хозяина либо как эпизомы, либо как неотъемлемая составная часть хромосомной ДНК хозяина. Обычно векторы экспрессии содержат селективные маркеры, например тетрациклин, неомицин и дигидрофолатредуктазу, для возможности детекции тех клеток, которые трансформированы желаемыми ДНК последовательностями. GDF15 вариант может экспрессироваться в клетках млекопитающего, насекомого, дрожжей, бактериальных или других клетках под контролем подходящих промоторов. Бесклеточные системы трансляции также можно использовать для продукции таких белков с использованием РНК, происходящих из ДНК конструкций по настоящему изобретению.

*Escherichia Coli* (*E. coli*) представляет собой прокариотного хозяина, полезного, в частности, для клонирования полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие микроорганизмы, являющиеся хозяевами, подходящими для использования, включают *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* и различные виды *Serratia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* и *Staphylococcus*, хотя другие также можно выборочно использовать. В этих прокариотных хозяевах также можно сконструировать векторы экспрессии, которые типично будут содержать последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой хозяина (например, точка начала репликации). Кроме того, может присутствовать любой из многочисленных хорошо известных промоторов, такой как лактозная промоторная система, триптофановая (Trp) промоторная система, бета-лактамазная промоторная система или промоторная система из фагов лямбда или T7. Промоторы типично контролируют экспрессию, необязательно при помощи операторной последовательности, и содержат последовательности сайта связывания рибосомы и т.п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции.

Специалисту в области, относящейся к экспрессии белков, будет понятно, что метиониновая или метионин-аргининовая последовательность могут быть встроены на N-конце зрелой последовательности для экспрессии в *E. coli* и предусматриваются в контексте настоящего изобретения. Таким образом, если не указано иное, композиции по настоящему изобретению, экспрессируемые в *E. coli*, содержат метиониновую последовательность, встроенную на N-конце.

Другие микроорганизмы, такие как дрожжи или грибы, также можно использовать для экспрессии. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* и *Pichia angusta* являются примерами предпочтительных хозяев-дрожжей, с подходящими векторами, содержащими последовательности контроля экспрессии, такие как промоторы, включая 3-фосфоглицераткиназу или другие гликолитические ферменты, и точку начала репликации, последовательности терминации и т.п., по желанию. *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*; и *Schizophyllum commune*, являются примерами хозяев-грибов, хотя другие также можно выборочно использовать.

Культуру клеток тканей млекопитающего также можно использовать для экспрессии и продукции полипептидов по настоящему изобретению. Ряд подходящих линий клеток хозяина, способных секретировать интактные варианты, был разработан в данной области техники, и они включают СНО клеточные линии, различные COS клеточные линии, NS0 клетки, линии клеток яичников сирийского хомяка, HeLa клетки или клеточные линии почки эмбриона человека (т.е. HEK293, HEK293EBNA).

Векторы экспрессии для клеток млекопитающих могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор, энхансер и необходимые процессинговые информационные сайты, такие как рибосома-связывающие сайты, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминаторов транскрипции. Предпочтительными последовательностями контроля экспрессии являются промоторы, происходящие из SV40, адено вируса, вируса папилломы крупного рогатого скота, цитомегаловируса, вируса Raus саркомы и т.п. Предпочтительные сайты полиаденилирования включают последовательности, происходящие из SV40 и гормона роста крупного рогатого скота.

Векторами, содержащими полинуклеотидные последовательности, представляющие интерес (например, которые кодируют композиции по настоящему изобретению, и последовательности контроля

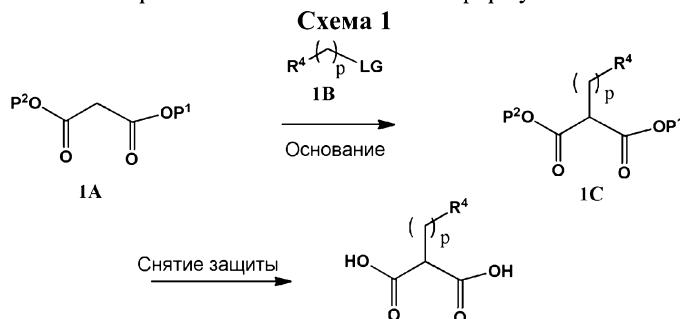
экспрессии), можно трансфицировать клетку хозяина хорошо известными способами, которые варьируются в зависимости от типа клетки хозяина. Например, трансфекцию при помощи хлорида кальция обычно используют для прокариотных клеток, тогда как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно использовать для других клеточных хозяев.

Можно использовать различные способы очистки белков, и такие способы известны из уровня техники и описаны, например, в Deutscher, Methods in Enzymology, 182:83-9 (1990), и в Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, NY (1982). Выбранная стадия(стадии) очистки будет зависеть, например, от природы способа получения, используемого для композиций по настоящему изобретению.

Полипептиды можно получить по существу в чистой или выделенной форме (например, не содержащей других полипептидов). Полипептиды могут присутствовать в композиции, которая является обогащенной полипептидом по сравнению с другими компонентами, которые могут присутствовать (например, другие полипептиды или другие компоненты клеток хозяина). Например, очищенный полипептид может быть обеспечиваться таким образом, что этот полипептид присутствует в композиции, которая по существу свободна от других экспрессированных белков, например, меньше чем 90%, меньше чем 60%, меньше чем 50%, меньше чем 40%, меньше чем 30%, меньше чем 20%, меньше чем 10%, меньше чем 5% или меньше чем 1% композиции состоит из других экспрессированных белков.

## Синтез жирнокислотного компонента.

Схема 1 описывает синтез жирнокислотного компонента формулы A2.



где Р<sup>1</sup> и Р<sup>2</sup> представляют собой защитную группу для карбоновой кислоты, такую как, например, метил, этил, трет-бутил, метоксибензил, бензил, бензилокси, метоксиметил, метилтиометил, тетрагидро-пирианил, фенацил, N-фталимид, циннамил, трифенилметил, 9-антрилметил, пиперонил, trimetilsилил, трет-бутилдиметилсилил или 2-алкил 1,3-оксазолины;

LG представляет собой удаляемую группу, такую как, например, галоген (например, Br, Cl, I) или трифторметансульфонилокси; и

$R^4$  и р имеют значение, определенное в варианте осуществления 1.

Алкилирование защищенной малоновой кислоты (1A) алкилирующим агентом (1B) в присутствии основания (например, гидрида натрия, карбонатов калия или цезия, гидроксида натрия, дии-зопропиламида лития, бис-(триметилсилил)амида натрия, бис-(триметилсилил)амида калия, тетраметил-пиперидида лития, 1,8-диазациклоундек-7-ена, N,N-дизопропилэтиламина или 2,6-ди-трет-бутилпиридина), в растворителе, таком как DMF, THF или диметилацетамид, дает защищенный жирно-кислотный компонент (1C). Когда R<sup>4</sup> представляет собой OH или CO<sub>2</sub>H, защита этих функциональных групп может потребоваться до стадии алкилирования. Защитные группы для гидроксила известны из уровня техники и представляют собой, например:

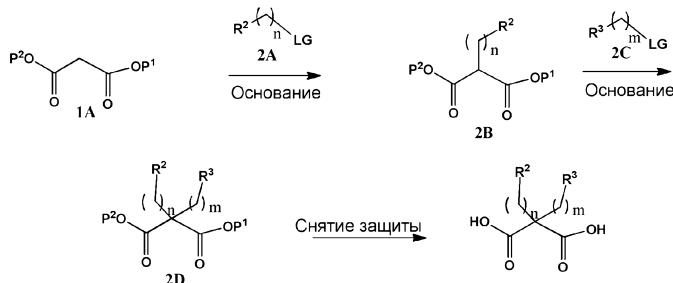
1) простые эфиры, такие как метиловый эфир, метоксиметиловый эфир (МОМ), тетрагидропираноловый эфир (ТНР), трет-бутиловый эфир, аллиловый эфир, бензиловый эфир, трет-бутилдиметилсилиловый эфир, трет-бутилдифенилсилановый эфир, трибензилсилановый эфир, изопропилдиметилсилановый эфир, трифенилметиловый эфир, нитробензиловый эфир;

2) сложные эфиры и карбонаты, такие как эфир уксусной кислоты, формиатный сложный эфир, трихлорацетатный сложный эфир, феноксиацетатный сложный эфир, пивалоатный сложный эфир, бензоатный сложный эфир, метилкарбонат, бензилкарбонат, аллилкарбонат, нитратный сложный эфир, аданоатный сложный эфир, нитрофенилкарбонат.

Жирнокислотный компонент формулы A2 получают путем удаления защиты с использованием подходящего способа удаления защиты. Стандартные способы могут быть применимы для гидролиза промежуточного соединения (1C) с использованием основания, выбранного из, но не ограничиваясь этим, NaOH, KOH или LiOH, или кислоты, выбранной из, но не ограничиваясь этим, TFA, HCl или  $\text{BCl}_3$ . Когда  $\text{P}^1$  или  $\text{P}^2$  представляет собой бензил или метоксибензил, предпочтительным способом удаления защиты является гидрирование в присутствии катализатора, такого как, но не ограничиваясь этим, палладий-на-углероде.

Схема 2 иллюстрирует синтез жирнокислотного компонента формулы A<sup>1</sup>, где R<sup>1</sup> представляет собой C(O)<sub>2</sub>H.

Схема 2



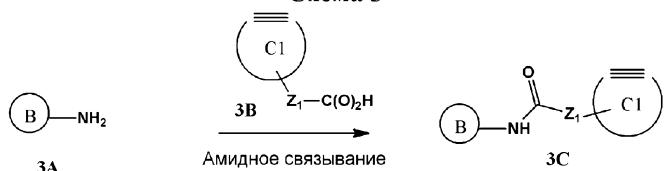
где  $P^1$  и  $P^2$ ,  $LG$  имеют значение, определенное выше; и  
 $R^2$ ,  $R^3$ ,  $m$  и  $n$  имеют значение, определенное в варианте осуществления 1.

Защищенную малоновую кислоту (1A) подвергают двум последующим алкилированиям с использованием алкилирующего агента (2A) и (2C), порядок которых может быть обратным, перед удалением защиты с использованием подходящего способа, описанного выше на Схеме 1. Когда  $R^2$  и  $R^3$  представляют собой OH или  $CO_2H$ , защита этих функциональных групп может потребоваться до осуществления стадий алкилирования.

Жирнокислотный компонент формулы  $A^1$ , где  $R^1$  представляет собой H, можно получить путем декарбоксилирования соответствующего жирнокислотного соединения формулы  $A^1$ , где  $R^1$  представляет собой  $CO_2H$ . Условия декарбоксилирования хорошо известны из уровня техники, например декарбоксилирование в щелочных условиях (например, гидроксид аммония).

Синтез конструкции биомолекула-линкер.

Схема 3



где В представляет собой биомолекулу или ее модифицированную форму;

$Z_1$  представляет собой  $C_1-C_{20}$ -алкиленовый линкер, где алкиленовая цепь необязательно замещена оксогруппой ( $=O$ );

один или несколько атомов углерода замещены заместителем O или NH;

$C_1$  представляет собой моно-, ди- или трициклическую карбоциклическую или гетероциклическую кольцевую систему, необязательно замещенную фтором.

Циклоалкин (3B) связывают с амино остатком биомолекулы (3A) (например с аминофункциональной группой N-конца или боковой цепи лизина) через его карбоново-кислотную реакционноспособную группу с использованием стандартных способов амидного связывания. Можно использовать известные способы связывания, включая, но не ограничиваясь этим, преобразование промежуточного соединения (3B) в его активированную форму [например, в соответствующий пирролидин-2,5-дион (с использованием стандартной N-гидросукцинимидной химии)] или преобразование кислоты (3B) с использованием реагентов, таких как трифосген, карбонилдимиазол, 4-нитрофенилхлороформиат или дисукцинимидилкарбонат, преобразование кислоты (3B) в соответствующий хлорангидрид кислоты с использованием реагентов, таких как тионилхлорид или оксалилхлорид, или преобразование кислоты (3B) в соответствующий смешанный ангидрид с использованием реагентов, таких как  $ClC(O)O$ -изобутил, 2,4,6-трихлорбензоилхлорид или ангидрид пропилfosфоновой кислоты циклический тример (T3P), с последующим взаимодействием оксазолидин-2,5-диона, хлорангидрида кислоты или смешанного ангидрида с биомолекулой (3A) в присутствии или в отсутствие основания, такого как третичный амин (например, триэтиламин или  $N,N$ -диизопропилэтамина) или  $K_2CO_3$ . Альтернативно, можно осуществить связывание биомолекулы 3A с кислотой 3B с использованием реагентов конденсации пептидов, включая, но не ограничиваясь этим, дициклогексилкарбодииимид (DCC), дизопропилкарбодииимид (DIC), 1- этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодииимид гидрохлорид (EDC HCl), бензотриазол-1-ил-окси-трис(пирролидино-фосфоний гексафторфосфат (PyBOP) или бензотриазол-1-ил-окси-трис(диметиламино)фосфоний гексафторфосфат (BOP), в присутствии или в отсутствие реагента, такого как 1-гидроксибензотриазол, 1-гидрокси-7-азабензотриазол или диметиламинопиридин.

Предпочтительно промежуточное соединение циклоалкин/кислота (3B) преобразовывают в его активированную форму с использованием NHS химии перед взаимодействием с аминофункциональной группой в биомолекуле.

Селективное ацилирование аминофункциональной группы на N-конце биомолекулы было разработано и описано в совместно поданных заявках США № 62/015858 (номер патентного реестра PAT056275-US-PSP) и 62/082337 (номер патентного реестра PAT056275-US-PSP02).

Селективное ацилирование включает взаимодействие NHS активированного циклооктинового ана-

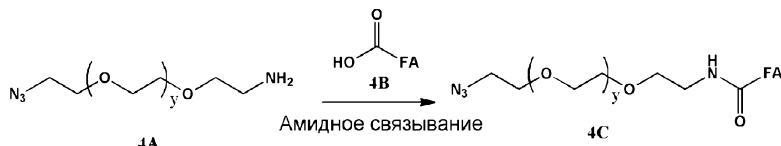
лога (NHS производные соединения (3В) с биомолекулой, где N-конец модифицирован так, что он включает аминокислоту гистидин, смежную с N-концевой аминокислотой. Эта реакция является высокоселективной для аминофункциональной группы на N-конце, когда ее осуществляют при pH 4, из-за эффекта соседней группы аминокислоты гистидина.

Синтез конструкции жирнокислотный остаток-линкер.

Жирная кислота-линкер конструкция для клик-химии.

Схема 4 описывает синтез конструкции жирная кислота-ПЭГ линкер с концевой функциональной азидогруппой.

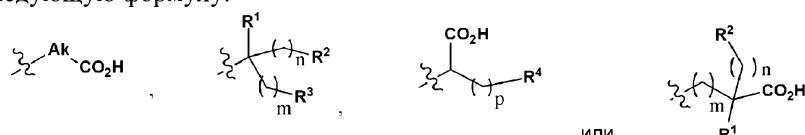
Схема 4



где  $y$  имеет значение от 0 до 34;

FA представляет собой жирнокислотный компонент, описанный в формуле A1, A2 или A3, который связан через одну из его карбоново-кислотных функциональных групп с ПЭГ линкером.

FA имеет следующую формулу:



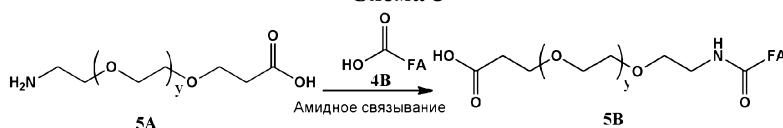
Жирнокислотный компонент (4В) связывают с ПЭГ-содержащим линкером (4А) через реакцию амидного связывания. Известные способы связывания описаны подробно выше на Схеме 3. Предпочтительно кислотную функциональную группу жирнокислотного компонента активируют с использованием NHS химии.

Когда  $\text{R}^1$  представляет собой  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$  и  $\text{R}^4$  представляют собой  $\text{CO}_2\text{H}$  или  $\text{OH}$ , защитные группы возможно будет необходимо ввести до реакции сочетания для контроля реакционноспособного участка. Защитные группы для карбоновой кислоты и гидроксигрупп были описаны выше на схеме 1. Альтернативно, селективную активацию карбоновой кислоты можно осуществить с использованием NHS химии.

Жирная кислота-линкер для непосредственного связывания с представляющей интерес биомолекулой.

Схема 5 описывает синтез конструкции жирная кислота-ПЭГ линкер с концевой  $\text{CO}_2\text{H}$  функциональной группой.

Схема 5



где FA имеет значение, определенное выше на Схеме 4; и

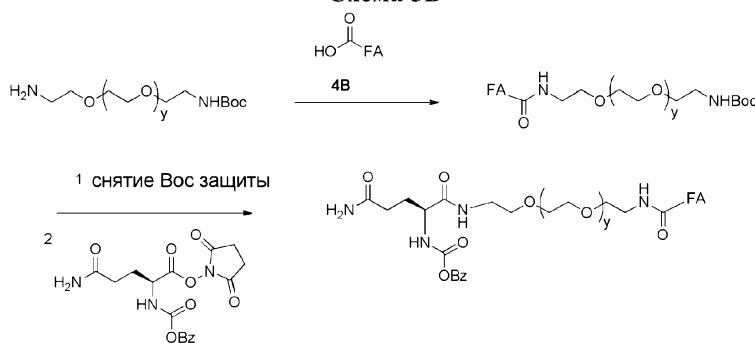
$y$  имеет значение от 0 до 34.

Можно осуществить связывание жирной кислоты (4В) с ПЭГ-содержащим линкером (5А) с использованием амидного связывания, описанного выше.

Конструкция жирная кислота-линкер для связывания с биомолекулой, представляющей интерес, с использованием фермента трансглутаминазы.

Схема 5А описывает получение конструкции жирная кислота-линкер, содержащей аминокислоту, такую как глутаминовая кислота, что обеспечивает возможность сайт-селективной модификации лизина при использовании фермента трансглутаминазы.

Схема 5В



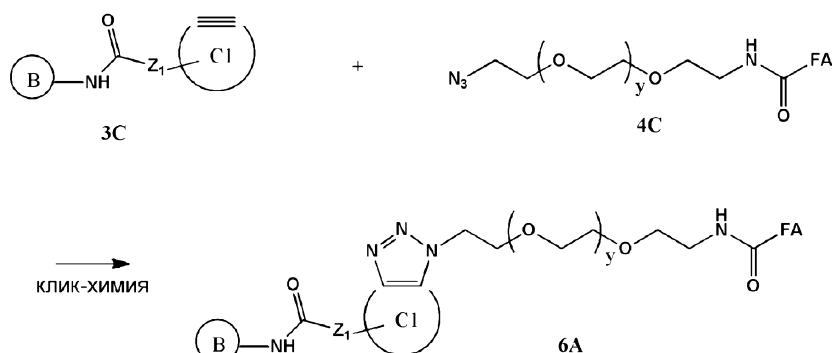
где у и FA имеют значение, определенное выше.

Такие конструкции позволяют осуществить сайт-селективную модификацию аминогруппы на боковой цепи лизина. Эта селективная модификация белка с использованием трансглутаминазы описана в заявке США № 61/845273, поданной 11 июля 2013 г. (номер патентного реестра PAT055641-US-PSP).

Синтез конъюгата по настоящему изобретению.

Конъюгация с использованием клик-химии.

**Схема 6**



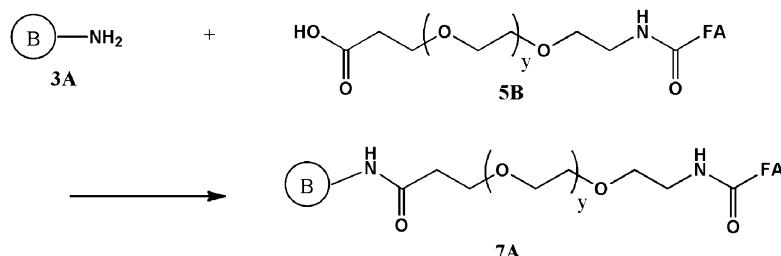
где В представляет собой биомолекулу, представляющую интерес, или ее модифицированную форму (например, мутант или биомолекула, содержащая гистидиновую метку); и

у, Z<sub>1</sub>, FA и у имеют значение, определенное выше.

Циклоалкиновую конструкцию (3C) подвергают реакции циклоприсоединения Хьюсгена с концевым азидом конструкции жирная кислота-линкер (4C), что широко известно как клик-химия. Примеры клик-химии описаны в US 2009/0068738.

Конъюгация через прямое присоединение с использованием условий связывания.

**Схема 7**



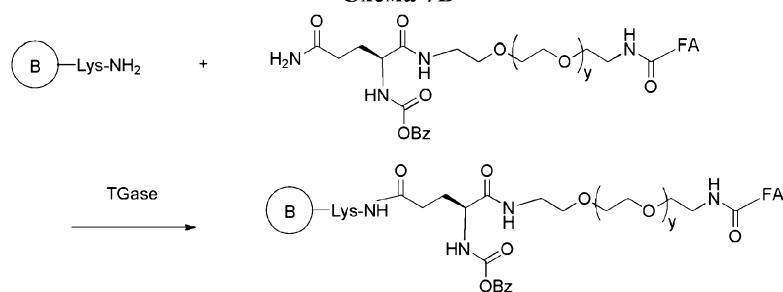
где В представляет собой биомолекулу, представляющую интерес, или ее модифицированную форму (например, мутант или биомолекула, содержащая гистидиновую метку), и конструкцию жирная кислота-линкер связывают с N-концом биомолекулы.

Конструкцию жирная кислота-линкер (5B) связывают с аминокислотой биомолекулы (3A) (например с аминофункциональной группой N-конца или боковой цепи лизина) через ее карбоново-кислотную реакционноспособную группу с использованием стандартных способов амидного связывания. Известные способы связывания были описаны подробно выше на Схеме 3. Предпочтительно кислотную функциональную группу в конструкции жирная кислота-линкер активируют с использованием NHS химии.

Селективное ацилирование аминофункциональной группы на N-конце биомолекулы было разработано и описано в совместно поданных заявках США № 62/015858 (номер патентного реестра PAT056275-US-PSP) и 62/082337 (номер патентного реестра PAT056275-US-PSP02). Селективное ацилирование включает взаимодействие NHS активированного соединения (NHS производные (5B)) с биомолекулой, где N-конец модифицирован так, что он включает аминокислоту гистидин, смежную с N-концевой аминокислотой. Эта реакция является высокоселективной для аминофункциональной группы на N-конце, когда ее осуществляют при pH 4, из-за эффекта соседней группы аминокислоты гистидина.

Конъюгация с использованием фермента трансглутаминазы.

**Схема 7В**



Селективную модификацию биомолекулы на ее боковой цепи лизина можно осуществить с использованием фермента трансглутаминазы. Такая модификация описана в заявке США № 61/845273, поданной 11 июля 2013 г. (номер патентного реестра PAT055641-US-PSP), или в WO 2015/006728 (в примере 25 этой заявки).

#### Фармацевтическая композиция.

Конъюгат по настоящему изобретению можно вводить любым из различных путей введения, включая подкожный, внутримышечный, внутривенный, интраперitoneальный, через ингаляцию, интраназальный, пероральный и т.д. В особенно предпочтительных вариантах осуществления изобретения используют непрерывное внутривенное введение конъюгата по настоящему изобретению или его амида, сложного эфира или соли. Конъюгаты по настоящему изобретению можно вводить в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени. Можно использовать имплантируемый насос. В некоторых вариантах осуществления изобретения прерывистое или непрерывное введение конъюгатов продолжают в течение от одного до нескольких дней (например, 2-3 или более дней) или в течение более долгих периодов времени, например нескольких недель, месяцев или лет. В некоторых вариантах осуществления предусматривается прерывистое или непрерывное введение конъюгатов в течение по меньшей мере около 3 дней, предпочтительно по меньшей мере около 6 дней. В других вариантах осуществления предусматривается прерывистое или непрерывное введение конъюгата в течение по меньшей мере примерно одной недели. В других вариантах осуществления предусматривается прерывистое или непрерывное введение конъюгата в течение по меньшей мере примерно двух недель. Может оказаться желательным поддержание средней концентрации конъюгата в плазме выше определенного порогового значения либо в процессе введения, либо между введениями нескольких доз. Желаемую концентрацию можно определить, например, на основании физиологического состояния субъекта, тяжести заболевания и т.д. Такое желаемое значение(значения) можно определить путем осуществления стандартных клинических испытаний. Альтернативно, пептиды и их конъюгаты могут доставляться перорально через FcRn механизм. (Nat. Rev. Immunol. 7(9), 715-25, 2007; Nat. Commun. 3; 3:610, 2012, Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. 304: G262-G270, 2013).

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую конъюгат по настоящему изобретению или его амид, сложный эфир или соль и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

Фармацевтическая композиция может быть сформулирована для конкретного пути введения, такого как пероральное введение, подкожное введение, парентеральное введение и ректальное введение и т.п. Кроме того, фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть получены в твердой форме (включая, без ограничения, капсулы, таблетки, пилюли, гранулы, лиофилизаты, порошки или суппозитории) или в жидкой форме (включая, без ограничения, растворы, суспензии или эмульсии). Фармацевтические композиции можно подвергнуть традиционным фармацевтическим процедурам, таким как асептическое изготовление, стерилизация, и/или они могут содержать традиционные инертные разбавители, уплотняющие агенты, агенты тоничности, смазывающие вещества или буферные агенты, а также адьюванты, такие как консерванты, стабилизаторы, смачивающие вещества, эмульгаторы и буферы и т.д.

Фармацевтические композиции, подходящие для введения путем инъекции, типично включают стерильные водные растворы (когда они являются водорастворимыми) или дисперсии и стерильные порошки для получения непосредственно перед введением стерильных растворов или дисперсий для инъекций.

Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Cetmorphor ELTM (BASF, Parsippany, N.J.) или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть текучей в той степени, которая позволяет легко вводить ее через шприц. Предпочтительные фармацевтические композиции являются стабильными в условиях получения и хранения и должны быть защищены против загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Как правило, подходящий носитель может представлять собой растворитель или среду для диспергирования, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и подходящие смеси таких веществ. Необходимую текучесть можно поддерживать, например, с использованием покрытия, такого как лецитин, путем поддержания нужного размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов достигается с использованием различных антибактериальных и антигрибковых средств, например парабенов, хлорбутина, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях будет предпочтительным включение изотонических агентов, например сахаров, полиспиртов, таких как маннит, аминокислот, сорбита, хлорида натрия, в композицию. Пролонгированную абсорбцию композиций для инъекций можно получить путем включения в композицию агента, который замедляет абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина. В некоторых вариантах осуществления мультифункциональный эксципient, такой как рекомбинантный альбумин, может быть включен в процессе формулирования как способствующий стабилизации конъюгированного продукта, защите от расщепления или агрегации, улучшению растворимости и введению и высвобождению активного компонента. (BioPharm International,

2012, Vol. 23, Issue 3, p. 40-44).

Некоторые композиции для инъекций представляют собой водные изотонические растворы или супензии, и суппозитории предпочтительно получают из жирных эмульсий или супензий. Указанные композиции могут быть стерилизованы и/или содержат адьюванты, такие как консерванты, стабилизаторы, увлажнятели или эмульгаторы, вещества, способствующие растворению, соли для регулирования осмотического давления и/или буферы. Кроме того, они также могут содержать другие терапевтически ценные вещества. Указанные композиции получают в соответствии с традиционными способами смешивания, гранулирования или нанесения покрытий соответственно, и они содержат около 0,1-75% или около 1-50% активного ингредиента.

Стерильные растворы для инъекций можно получить путем включения активного соединения в требуемом количестве в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, как будет необходимо, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит щелочную среду для диспергирования и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных растворов для инъекций, предпочтительные способы получения представляют собой вакуумную сушку и лиофильную сушку, которая дает порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желательный ингредиент из ранее полученного стерильного отфильтрованного раствора.

Пероральные композиции, как правило, включают инертный разбавитель или съедобный носитель. Для целей перорального терапевтического введения, активное соединение можно включить с эксципиентами и использовать в форме таблеток, лепешек или капсул, например желатиновых капсул. Пероральные композиции также можно получить с использованием жидкого носителя для использования в качестве жидкости для полоскания рта. Фармацевтически совместимые связующие и/или адьюванты могут быть включены как часть композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, лепешки и т.п. могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений подобной природы: связующее, такое как микрокристаллическая целлюлоза, камедь трагаканта или желатин; эксципиент, такой как крахмал или лактоза, разрыхлитель, такой как альгиновая кислота, PrimoGel или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или Sterotes; вещество, способствующее скольжению, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или отдушка, такая как перечная мята, метилсализилат или апельсиновая отдушка. Композиции для пероральной доставки предпочтительно могут включать вещества для улучшения стабильности в желудочно-кишечном тракте и/или для улучшения абсорбции.

Для введения путем ингаляции доставку терапевтических средств по настоящему изобретению предпочтительно осуществляют в форме аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера или дозирующего устройства, содержащих подходящий пропеллент, например газ, такой как диоксид углерода, или из аэрозольного аппарата. Следует отметить, что легкие обеспечивают большую площадь поверхности для системной доставки терапевтических средств.

Средства могут быть инкапсулированы, например, в полимерные микрочастицы, такие как частицы, описанные в публикации США № 20040096403, или могут находиться в ассоциации с любым из большого разнообразия других носителей для доставки лекарственных средств, которые известны из уровня техники. В других вариантах осуществления изобретения средства доставляются в ассоциации с заряженным липидом, как описано, например, в публикации США № 20040062718. Следует отметить, что последнюю систему используют для введения терапевтического полипептида, инсулина, что говорит о применимости этой системы для введения пептидных средств.

Системное введение также может включать введение через слизистую оболочку или чрескожное введение.

Подходящие композиции для чрескожного введения включают эффективное количество конъюгата по настоящему изобретению с подходящим носителем. Носители, подходящие для чрескожной доставки, включают абсорбируемые фармакологически приемлемые растворители, чтобы облегчить проникновение через кожу хозяина. Например, чрескожные устройства имеют форму повязки, включающей подложку, резервуар, содержащий соединение, необязательно с носителями, необязательно контролирующий скорость барьера для доставки соединения через кожу хозяина с контролируемой и предварительно определенной скоростью в течение продолжительного периода времени, и средства для удерживания устройства на коже.

Подходящие композиции для местного применения, например нанесения на кожу и введения в глаза, включают водные растворы, супензии, мази, кремы, гели или распыляемые составы, например, для доставки при помощи аэрозоля или т.п. Такие системы местной доставки являются особенно подходящими для нанесения на кожу. Они, таким образом, особенно подходят для использования в местных, в том числе косметических, композициях, хорошо известных из уровня техники. Такие композиции могут содержать солюбилизирующие вещества, стабилизаторы, агенты повышения тоничности, буферы и консерванты.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция предназначена для подкож-

ного введения. Подходящие компоненты композиций и способы для подкожного введения полипептидных терапевтических средств (например, антитела, гибридные белки и т.п.) известны из уровня техники. См., например, опубликованную патентную заявку США № 2011/0044977 и патент США № 8465739 и патент США № 8476239. Типично, фармацевтические композиции для подкожного введения содержат подходящие стабилизаторы (например, аминокислоты, такие как метионин, и или сахариды, такие как сахароза), буферные агенты и агенты тоничности.

Как используется в настоящем изобретении, местное применение также может относиться к ингаляции или к интраназальному введению. Удобно осуществлять доставку в форме сухого порошка (либо отдельно, либо в виде смеси, например сухой смеси с лактозой, либо в виде смешанных частиц, например с фосфолипидами) из ингалятора сухого порошка или аэрозольного спрея из находящегося под давлением контейнера, насоса, разбрызгивающего устройства, распылителя или небулайзера, с использованием или без подходящего пропеллента.

Изобретение также обеспечивает фармацевтические композиции и лекарственные формы, которые включают одно или несколько веществ, которые снижают скорость, с которой соединение по настоящему изобретению, используемое в качестве активного ингредиента, будет разлагаться. Такие вещества, которые в настоящем изобретении называются "стабилизаторами", включают, но не ограничиваются этим, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, pH буферы или солевые буферы, рекомбинантный альбумин.

Как используется в настоящем изобретении, термин "фармацевтически приемлемые соли" относится к солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства конъюгатов по настоящему изобретению и которые типично не являются биологически или с другой точки зрения нежелательными. Во многих случаях конъюгаты по настоящему изобретению способны образовывать кислотные и/или щелочные соли в силу присутствия амино и/или карбоксильных групп или групп, подобных этим.

Фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли могут быть образованы с неорганическими кислотами и органическими кислотами, например такие соли, как ацетат, аспартат, бензоат, бензилат, бромид/гидробромид, бикарбонат/карбонат, бисульфат/сульфат, камфорсульфонат, хлорид/гидрохлорид, хлортоефиллонат, цитрат, этандисульфонат, фумарат, глутептат, глюконат, глукуронат, гиппурат, гидроиодид/иодид, изетионат, лактат, лактобионат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, манделат, мезилат, метилсульфат, нафтоат, напсилат, никотинат, нитрат, октадеканоат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, фосфат/гидрофосфат/дигидрофосфат, полигалактуронат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфосалицилат, тартрат, тозилат и трифторацетат.

Неорганические кислоты, из которых могут быть образованы соли, включают, например, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т.п.

Органические кислоты, из которых могут быть образованы соли, включают, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, щавелевую кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, миндалевую кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, толуолсульфоновую кислоту, сульфосалициловую кислоту и т.п. Фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли могут быть образованы с неорганическими и органическими основаниями.

Неорганические основания, из которых могут быть образованы соли, включают, например, аммониевые соли и металлы из граф I-XII Периодической таблицы. В некоторых вариантах осуществления соли образованы из натрия, калия, аммония, кальция, магния, железа, серебра, цинка и меди; в частности, подходящие соли включают соли аммония, калия, натрия, кальция и магния.

Органические основания, из которых могут быть образованы соли, включают, например, первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, включая природные замещенные амины, циклические амины, щелочные ионообменные смолы и т.п. Некоторые органические амины включают изо-пропиламин,ベンзатин, холинат, дистаноламин, дистиламин, лизин, меглумин, пиперазин и трометамин.

Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению можно синтезировать из исходного соединения, щелочной или кислотной группы, традиционными химическими способами. Как правило, такие соли можно получить путем взаимодействия формы свободной кислоты этих соединений со стехиометрическим количеством подходящего основания (такого как гидроксид, карбонат, бикарбонат Na, Ca, Mg или K или т.п.) или путем взаимодействия формы свободного основания этих соединений со стехиометрическим количеством подходящей кислоты. Такие реакции типично осуществляют в воде или в органическом растворителе или в смеси таких двух растворителей. Как правило, использование неводных сред, таких как простой эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, желательно, где это практически возможно. Перечни дополнительных подходящих солей можно найти, например, в "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985) и в "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use" by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002).

Как используется в настоящем изобретении, термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые возможные растворители, среды для диспергирования, покрытия, поверхностно-

активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные средства, противогрибковые средства), изотонические агенты, замедлители абсорбции, соли, консерванты, лекарственные средства, стабилизаторы лекарственных средств, связующие, эксципиенты, разрыхлители, смазывающие вещества, подсластители, отдушки, красители, мультифункциональный эксципинент, такой как рекомбинантный альбумин и т.п. и их комбинации, как должно быть известно специалистам в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Ed. Mack Printing Company, 1990, p. 1289-1329). За исключением тех случаев, когда какой-либо традиционный носитель несовместим с активным ингредиентом, его использование в терапевтических или фармацевтических композициях предусматривается.

#### Способ по настоящему изобретению.

Было описано, что уровни циркулирующего GDF15 повышаются при многих патологических и физиологических состояниях, особенно при беременности (Moore A.G. 2000. J. Clin. Endocrinol. Metab. 85:4781-4788), β-талассемии (Tanno T. 2007, Nat. Med. 13:1096-101) (Zimmermann M.B., 2008, Am. J. Clin. Nutr. 88:1026-31) и врожденной дизэритропоэтической анемии (Tamaty H. 2008, Blood. 112:5241-4). Как известно из литературы, GDF15 также связывают с различными биологическими активностями. Исследования GDF15-нокаута и трансгенных мышей показали, что GDF15 может играть защитную роль против ишемического/реперфузионного- или вызванного перегрузками поражения сердца (Kempf T., 2006, Circ. Res. 98:351-60) (Xu J., 2006, Circ. Res. 98:342-50), защитную роль против связанной со старением потери моторных нейронов и сенсорных нейронов (Strelau J., 2009, J. Neurosci. 29:13640-8), некоторую защитную роль против метаболического ацидоза в почках и может вызывать кахексию у раковых пациентов (Johnen H. 2007, Nat Med. 11:1333-40). Многие группы также исследовали роль GDF15 в клеточном апоптозе и пролиферации, и сообщались противоречивые результаты при использовании различных клеточных культур и моделей ксенотрансплантата. Исследования на трансгенных мышах показали, что GDF15 играет защитную роль против индуцируемой карциногеном или Аре мутацией опухоли в кишечнике и легком (Baek SJ 2006, Gastroenterology. 131: 1553-60; Cekanova M. 2009, Cancer Prev. Res. 2:450-8).

Также сообщалось о том, что GDF15 играет роль в воспалении, раке и метаболизме (Samule Breit et al. Growth factors, October 2011; 29(5):187-195). GDF15 также вовлечен в регулирование физиологического аппетита и массы тела (Vicky Wang-Wei Tsai et al. Public Library of Science: PLOS ONE 2013, Vol. 8, Issue 2, e55174)

Настоящее изобретение обеспечивает способы лечения или профилактики заболевания или расстройства, выбранного из метаболических расстройств или заболеваний, сахарного диабета 2 типа, ожирения, панкреатита, дислипидемии, алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени/стеатогепатита и других прогрессирующих заболеваний печени, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, метаболического синдрома, гипертензии, сердечно-сосудистого заболевания, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, диабетических осложнений, хронического почечного заболевания, невропатии или гастропареза у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества коньюгата по настоящему изобретению или его амида, сложного эфира или соли или смеси коньюгатов, где биомолекула представляет собой человеческий фактор дифференциации роста 15 (hGDF15), или его фрагмент, или его вариант, выбранный из hGDF15\* и his-hGDF15\* или димер любого из указанных белков.

Такие способы могут иметь полезный эффект, такой как, например, снижение частоты введения.

Таким образом, в качестве следующего варианта осуществления настоящее изобретение обеспечивает применение коньюгата, описанного в настоящем документе или его амида, сложного эфира или фармацевтически приемлемой соли или смеси коньюгатов, описанных в настоящем документе, где биомолекула представляет собой человеческий фактор дифференциации роста 15 (hGDF15), или его фрагмент, или его вариант, выбранный из hGDF15\* и his-hGDF15\*, или димер любого из указанных белков для лечения метаболических расстройств или заболеваний, диабета, сахарного диабета 2 типа, ожирения, панкреатита, дислипидемии, алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени/стеатогепатита и других прогрессирующих заболеваний печени, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, метаболического синдрома, гипертензии, сердечно-сосудистого заболевания, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, диабетических осложнений, хронического почечного заболевания, невропатии или гастропареза.

Эффективное количество фармацевтической композиции или комбинации по настоящему изобретению, которое можно использовать терапевтически, будет зависеть, например, от терапевтического контекста и целей. Специалисту в данной области должно быть понятно, что подходящие уровни доз для лечения будут, таким образом, варьироваться в зависимости, частью, от доставляемой молекулы, показания, для которого используют коньюгат, пути введения и размера (массы тела, поверхности тела или размера органа) и состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента. Следовательно, клиницист сможет титровать дозу и модифицировать путь введения для получения оптимального терапевтического эффекта. Типичная доза может находиться в пределах от около 0,1 мкг/кг до около 100 мг/кг или больше, в зависимости от факторов, указанных выше. В других вариантах осуществления доза может

находиться в пределах от 0,1 мкг/кг до около 100 мг/кг или от 1 мкг/кг до около 100 мг/кг. В следующем аспекте этого варианта осуществления доза может находиться в пределах от 5 до 25 мкг/кг. Еще в одном аспекте этого варианта осуществления доза может находиться в пределах от 10 до 20 мкг/кг.

Частота введения будет зависеть от фармакокинетических параметров имеющего двойную функцию белка в используемой лекарственной форме. Типично, клиницист будет вводить композицию вплоть до достижения дозы, при которой достигается желаемый эффект. Композицию поэтому можно вводить в виде разовой дозы, в виде двух или более доз (которые могут содержать, или не содержать, одинаковое количество желаемой молекулы) в течение определенного времени или в виде непрерывной инфузии через имплантируемое устройство или катетер. Дальнейшее уточнение подходящей дозы сможет осуществить рутинным способом средний специалист в данной области, и это находится в пределах задач, которые он рутинно выполняет. Подходящие дозы можно установить через использование соответствующих данных доза-ответ.

Термины "терапевтически эффективная доза" и "терапевтически эффективное количество", как они используются в настоящем изобретении, означают количество коньюгата, которое вызывает биологический или медицинский ответ в тканевой системе, у животного или человека, которого добивается исследователь, лечащий врач или другой клиницист, который включает облегчение или уменьшение интенсивности симптомов заболевания или расстройства, которое лечат, т.е. количество коньюгата GDF15 (или GDF15 мутанта) полипептида, которое поддерживает наблюдаемый уровень одного или нескольких желаемых биологических или медицинских ответов, например снижение уровней глюкозы, инсулина, триглицеридов или холестерина в крови; снижение массы тела; снижение потребления пищи или улучшение переносимости глюкозы, расхода энергии или инсулинов чувствительности).

Термины "пациент" или "субъект" используются взаимозаменяющими в отношении человека или отличного от человека животного (например, млекопитающего).

Как используется в настоящем изобретении, термин "лечить", "лечащий" или "лечение" в отношении любого заболевания или расстройства относится в одном варианте осуществления к уменьшению интенсивности симптомов заболевания или расстройства (т.е. замедление, или остановка, или уменьшение развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом варианте осуществления "лечить", "лечащий" или "лечение" относится к облегчению или уменьшению интенсивности по меньшей мере одного физического параметра, включая такие, которые могут быть неразличимы пациентом. Еще в одном варианте осуществления "лечить", "лечащий" или "лечение" относится к модуляции заболевания или расстройства, либо физически (например, стабилизация различимого симптома), либо физиологически (например, стабилизация физического параметра), либо и тем и другим образом. Таким образом, лечение включает ингибирование (т.е. остановку развития или дальнейшего развития заболевания, расстройства или состояния или связанных с ним клинических симптомов) активного заболевания (например, в случае GDF15 коньюгата - это уменьшение массы тела, уменьшение потребления пищи, снижение уровня инсулина и/или глюкозы в кровотоке, повышение переносимости глюкозы так, чтобы свести к минимуму колебания уровней глюкозы, и/или чтобы защитить от заболеваний, вызываемых нарушением гомеостаза глюкозы).

Еще в одном варианте осуществления "лечить", "лечащий" или "лечение" относится к профилактике или отсрочке начала или развития или прогрессирования заболевания или расстройства.

Термин "нуждающийся в лечении", как он используется в настоящем изобретении, относится к мнению лечащего врача или другого специалиста, осуществляющего уход или лечение, что субъекту требуется или будет полезно лечение. Это мнение основано на различных факторах, относящихся к области специальных знаний лечащего врача или специалиста, осуществляющего уход или лечение.

Термины "предотвращать", "предотвращение", "профилактика" и т.п. относятся к порядку действий (таких как введение коньюгата по настоящему изобретению или фармацевтической композиции, включающей коньюгат), предпринимаемому таким образом (например, до начала проявления заболевания, расстройства, состояния или его симптома), чтобы предотвратить, подавить, ингибировать или уменьшить, либо временно либо навсегда, риск развития заболевания, расстройства, состояния или т.п. у субъекта (что определяется, например, по отсутствию клинических симптомов) или замедлить начало его развития, как правило, это относится к субъекту, предрасположенному к конкретному заболеванию, расстройству или состоянию. В некоторых случаях эти термины также относятся к замедлению прогрессирования заболевания, расстройства или состояния или ингибированию их прогрессирования до опасного или какого-либо нежелательного состояния.

Термин "метаболическое заболевание или расстройство" относится к ассоциированной группе признаков, которая включает, но не ограничивается этим, гиперинсулинемию, аномальную переносимость глюкозы, ожирение, перераспределение жира в абдоминальную или верхнюю часть тела, гипертензию, дислипидемию, характеризующуюся высокими уровнями триглицеридов, низким уровнем липопротеинов (HDL)-холестерина высокой плотности и высоким уровнем липопротеинов высокой плотности (LDL). Субъекты, имеющие метаболическое заболевание или расстройство, имеют риск развития диабета 2 типа и, например, атеросклероза.

Фраза "нарушение метаболизма глюкозы" охватывает любое расстройство, характеризующееся

клиническим симптомом или комбинацией клинических симптомов, ассоциированными с повышенным уровнем глюкозы и/или повышенным уровнем инсулина у субъекта по сравнению со здоровым субъектом. Повышенные уровни глюкозы и/или инсулина могут проявляться при следующих заболеваниях, расстройствах и состояниях: гипергликемия, диабет II типа, гестационный диабет, диабет I типа, инсулинерезистентность, нарушение переносимости глюкозы, гиперинсулинемия, нарушенный метаболизм глюкозы, преддиабетическое состояние, метаболические расстройства (такие как метаболическое заболевание или расстройство, которое также называют синдромом X) и ожирение, среди прочих. GDF15 коньюгаты по настоящему изобретению и их композиции можно использовать, например, для достижения и/или поддержания гомеостаза глюкозы, например для снижения уровня глюкозы в кровотоке и/или для снижения уровня инсулина до пределов, наблюдавшихся у здорового субъекта.

Термин "инсулинерезистентность", как он используется в настоящем изобретении, относится к состоянию, где нормальное количество инсулина не может обеспечивать нормальный физиологический или молекулярный ответ. В некоторых случаях гиперфизиологическое количество инсулина, либо эндогенно продуцируемого, либо экзогенно вводимого, способно преодолеть инсулинерезистентность, полностью или частично, и вызвать биологический ответ.

Фраза "переносимость глюкозы", как это используется в настоящем изобретении, относится к способности субъекта контролировать уровень глюкозы в плазме и/или уровень инсулина в плазме, когда потребление глюкозы колеблется. Например, переносимость глюкозы охватывает способность субъекта к снижению, в течение около 120 мин, уровня глюкозы в плазме до уровня, определенного до потребления глюкозы.

Термин "непереносимость глюкозы" или "нарушение толерантности к глюкозе" (IGT) означает преддиабетическое состояние дисгликемии, которое связано с повышенным риском сердечно-сосудистой патологии. Преддиабетическое состояние препятствует эффективному продвижению глюкозы в клетки субъекта и ее утилизации как эффективного источника энергии, приводя к повышенным уровням глюкозы в крови и некоторой степени инсулинерезистентности.

Термин "сахарный диабет 2 типа" означает состояние, характеризующееся избыточной продукцией глюкозы, и циркулирующие уровни глюкозы остаются чрезмерно высокими как результат недостаточного клиренса глюкозы и неспособности поджелудочной железы продуцировать достаточное количество инсулина.

Термин "гипергликемия", как он используется в настоящем изобретении, относится к состоянию, при котором повышенное количество глюкозы циркулирует в плазме крови субъекта по сравнению со здоровым субъектом. Гипергликемию можно диагностировать с использованием способов, известных из уровня техники, включая измерение уровней глюкозы в крови натощак, как описано в настоящем документе.

"Гипогликемия", также называемая низким уровнем сахара в крови, возникает, когда уровень глюкозы в крови падает слишком низко, чтобы обеспечивать достаточно энергии для активности организма.

Термин "гиперинсулинемия", как он используется в настоящем изобретении, относится к состоянию, при котором наблюдают повышенные уровни циркулирующего инсулина, когда одновременно с этим уровни глюкозы в крови либо являются повышенными, либо нормальными. Гиперинсулинемия может быть вызвана инсулинерезистентностью, которая ассоциирована с дислипидемией, например высоким уровнем триглицеридов, высоким холестерином, высоким уровнем липопротеинов низкой плотности (LDL) и низким уровнем липопротеинов высокой плотности (HDL); высокими уровнями мочевой кислоты; синдромом поликистозных яичников; диабетом II типа и ожирением. Гиперинсулинемию можно диагностировать как уровень инсулина в плазме выше чем около 2 рU/мл.

Термин "панкреатит" означает воспаление поджелудочной железы.

Термин "дислипидемия" означает нарушение метаболизма липопротеинов, включая чрезмерную продукцию или дефицит липопротеинов. Дислипидемии могут характеризоваться повышением общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL) и концентраций триглицеридов и снижением концентрации холестерина липопротеинов высокой плотности (HDL) в крови.

"Жировая болезнь печени (FLD)", также известная как ожирение печени, представляет собой состояние, где большие вакуоли триглицеридного жира аккумулируются в клетках печени через процесс стеатоза (т.е. аномального удерживания липидов в клетке). Помимо различных других причин, ожирение печени может считаться единственным заболеванием, которое возникает во всем мире у людей, чрезмерно употребляющих алкоголь и страдающих ожирением (с или без эффектов инсулинерезистентности). Когда этот процесс метаболизма жиров нарушается, жир может накапливаться в печени в избыточных количествах, таким образом приводя к ожирению печени. Накопление жира также может сопровождаться прогрессирующим воспалением печени (гепатит), это называют стеатогепатитом. Принимая во внимание участие в этом алкоголя, ожирение печени может называться алкогольным стеатозом жировой болезнью печени (NAFLD), а более тяжелые формы - алкогольным стеатогепатитом и неалкогольным стеатогепатитом (NASH).

"Стеатогепатит" представляет собой тип заболевания печени, характеризующийся изменением жира в гепатоцитах, сопровождающимся интрапулевиальным воспалением и фиброзом. Когда это не связано со

злоупотреблением алкоголем, это называется неалкогольным стеатогепатитом (NASH).

Термин "прогрессирующее заболевание печени" означает заболевание печени, вызываемое различными патологиями печени, которые прогрессируют от относительно доброкачественного состояния, такого как гепатический стеатоз, к более тяжелым состояниям, включая гепатит, фиброз, цирроз и гепатоклеточную карциному. PNPLA3 специфически ассоциируется с прогрессирующими заболеваниями печени, такими как NAFLD/NASH, AFLD/ASH, вирусный гепатит, болезнь Вильсона, наследственный гемохроматоз и первичный склерозирующий холангит (Paola Dongiovanni et al. World Journal of Gastroenterology, 2013, 19(41), 6969-6978)

"Ожирение", по отношению к человеку, можно определить как взрослого человека с индексом массы тела (ВМI) 30 или больше (Centers for Disease Control and Prevention).

"Метаболический синдром" можно определить как кластер факторов риска, который повышает риск сердечного заболевания и других заболеваний, таких как диабет и инсульт. Эти факторы риска включают высокий уровень сахара в крови - по меньшей мере 110 мг/дл натощак; высокий уровень триглицеридов - по меньшей мере 150 мг/дл в кровотоке; низкий уровень HDL - меньше чем 40 мг/дл; и кровяное давление 130/85 мм рт.ст. или выше (World Health Organization).

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

Термин "атеросклероз" означает сосудистое заболевание, характеризующееся неравномерным распределением липидных отложений во внутренней оболочке крупных и средних артерий, которое иногда вызывает сужение просвета артерии и в конечном счете приводит к фиброзу и кальцификации. Поражения обычно являются очаговыми и прогрессируют медленно и периодически. Ограничение кровотока является причиной многих клинических проявлений, которые варьируются в зависимости от дистрибуции и тяжести поражений.

"Ишемическая болезнь сердца", которую также называют заболеванием коронарных артерий, представляет собой сужение малых кровеносных сосудов, которые доставляют кровь и кислород к сердцу.

"Диабетические осложнения" означают вызываемые высокими уровнями глюкозы в крови проблемы других функций организма, таких как почки, нервы (невропатии), ноги (язвы стоп и плохая циркуляция крови) и глаза (например, ретинопатии). Диабет также повышает риск сердечного заболевания и заболеваний костей и суставов. Другие долговременные осложнения диабета включают проблемы с кожей, проблемы пищеварения, сексуальную дисфункцию и проблемы с зубами и деснами.

Как используется в настоящем изобретении, фраза "нарушение массы тела" относится к состояниям, связанным с избыточной массой тела и/или повышенным аппетитом. Различные параметры используют для определения, имеет или нет субъект избыточную массу тела по сравнению с контролльным здоровым субъектом, включая возраст, рост, пол и состояние здоровья субъекта. Например, можно считать, что субъект имеет избыточную массу тела или страдает ожирением на основании оценки индекса массы тела (ВМI) субъекта, который рассчитывают путем деления массы тела субъекта в килограммах на рост субъекта в метрах в квадрате. Взрослый субъект, имеющий ВМI в пределах от -18,5 до -24,9 кг/м, считается как имеющий нормальный вес; взрослый субъект, имеющий ВМI в пределах от -25 до -29,9 кг/м, может считаться страдающим избыточным весом (предожирение); взрослый субъект, имеющий ВМI -30 кг/м или выше, может считаться страдающим ожирением. Повышенный аппетит часто способствует избыточному весу. Есть некоторые состояния, связанные с повышенным аппетитом, включающие, например, синдром ночного питания, который характеризуется утренней анорексией и вечерней полифагией, часто связанный с бессонницей, но который также может быть связан с поражением гипоталамуса.

Все способы, описанные в настоящем документе, можно осуществить в любом подходящем порядке, если не указано иное или если из контекста явно не следует иное. Использование в настоящем документе всех исключительно примеров или фраз, означающих представление в качестве примера (например, "такой как"), предназначено исключительно для лучшей иллюстрации изобретения и не налагает ограничение на объем настоящего изобретения, заявленный иным образом.

Активность и стабильность в плазме коньюгата в соответствии с настоящим изобретением можно определить следующими способами, описанными ниже.

Анализы и данные.

Активность и стабильность в плазме GDF15 коньюгатов Примеров 1 и 19В в соответствии с настоящим изобретением можно определить следующими *in vitro* и *in vivo* способами, описанными ниже.

Способы исследования на животных.

Все исследования на животных, описанные в этом документе, были одобрены Novartis Institutes for Biomedical Research Animal Care and Use Committee в соответствии с местным и федеральным законодательством и рекомендациями. Страдающих алиментарным ожирением самцов мышей (C57BL/6NTac) закупали у компании Taconic и выдерживали на 60% жировой диете (Research Diets D12492i), начиная с 6-недельного возраста. После прибытия на место мышей размещали по одному животному на клетку с 12 ч:12 ч переменным циклом свет/темнота. Всем животным давали минимум 1 неделю для акклиматизации перед каким-либо использованием. Мышей типично использовали для испытаний в возрасте 3-4 месяцев. За день до испытания мышей рандомизированно распределяли по группам на основании массы

тела так, чтобы каждая группа имела подобную среднюю массу тела. В день испытания мышей помещали в свежие клетки и старую пищу удаляли. Приблизительно через 1 ч и непосредственно перед наступлением темного цикла мыши получали одну подкожную дозу либо носителя (30 мМ ацетата натрия, pH 4), либо липид-конъюгированного GDF15 аналога (0,5 мг/кг). После завершения всех инъекций мышей снова взвешивали и определяли количество возвращенной пищи (~50г на мышь). Потребление пищи и массу тела измеряли в течение ~2 недель в точках времени, указанных на фигуре. У суррогатных животных, которых обрабатывали, как описано выше, плазму собирали в указанных точках времени и уровни GDF15 измеряли методом ELISA в соответствии с инструкциями изготовителя (R&D Systems Quantikine Human GDF15 Immunoassay; DGD150).

DIO мыши, разовая подкожная доза 0,5 мг/кг.

Активность и период полужизни конъюгатов по настоящему изобретению испытывали в анализе, описанном выше.

Таблица 1

Конъюгат (пример)	Фармакокинети- ка (время полужизни) (часы)	Продолжительность действия	
		Уменьшение потребления пищи (FI) (дни)	Уменьшение массы тела (BW) (дни)
1	36	6	8
2		8	8
4	15, 1	3	3
5	33, 1	8	8
6		3	3
7	21, 8	6	6
12		6–8	6–8
13	45, 8	8–10	10
15*		2	6
16		6	6
18	55	8–10	10
19A		8	10
19B неочищенный	86, 4	8	14
19B1	56, 9 (эксп. 1)	14 (эксп. 1)	14 (эксп. 1)
	50, 9 (эксп. 2)	14 (эксп. 2)	14 (эксп. 2)
19B2	97, 68 (эксп. 1)	8 (эксп. 1)	10 (эксп. 1)
	74, 2 (эксп. 2)	14 (эксп. 2)	14 (эксп. 2)
19B3	98, 9	8	10
19Bm	65, 04	14	17
Ссыл.пр.2		3	3
Ссыл.пр.1		1	1
hGDF15	1	1	1

\*Тонкие мыши.

Эксп. 1: *in vivo* эксперимент 1.

Эксп. 2: *in vivo* эксперимент 2.

Данные, приведенные в табл. 1, демонстрируют, что конъюгаты по настоящему изобретению обладают существенно большей продолжительностью действия по сравнению с неконъюгированным hGDF15 и/или по сравнению с пегилированным hGDF15.

Эффективность GDF15-конъюгата у собак, получающих собачий корм: конъюгат GDF15-жирная кислота.

Цель исследования: определение эффектов подкожного введения 0,05 мг/кг конъюгата GDF15-

жирная кислота в соответствии с изобретением или носителем, используемого в качестве контроля, на потребление пищи кратковременно (6 ч) и в течение 96-часового периода у собак породы бигль. Образцы плазмы собирали в разных точках времени в течение 14-дневного периода после введения дозы для оценки фармакокинетического профиля этого соединения. Массу тела определяли на протяжении всего периода испытания.

Таблица 2

Собака ID	Масса тела (кг)	Обработка
50	12,65	Носитель
62	8,85	Носитель
77	10,15	Носитель
67	8,85	GDF15
73	9,95	GDF15
75	12,25	GDF15

Процедура введения доз: введение носителя или GDF15 осуществляли после определения исходной массы тела и сбора образцов крови. Коньюгат GDF15-жирная кислота обеспечивали в виде 0,97 мг/мл раствора и вводили путем подкожной инъекции без разбавления при 0,05 мг/кг. Эквивалентный объем носителя 30 ммоль/л ацетата натрия pH 4 (52 мкл/кг) вводили животным из группы введения носителя путем подкожной инъекции.

Сбор крови: образцы крови собирали из подкожной латеральной или внутренней яремной вены (3 мл, в пробирки, содержащие EDTA и ингибиторы протеаз Дипротин А и Апротинин) и помещали на лед вплоть до центрифугирования при 3000 об/мин в течение 20 мин при 4°C. Плазму разделяли на аликвоты и хранили при -70°C до использования в анализе. Сбор осуществляли в следующих точках времени: 0, 6,75, 24,75, 48,75, 72,75 и 9,6,75 ч. Дополнительные образцы собирали в дни 7, 10 и 14.

Измерения потребления пищи: измерение ad libitum потребления пищи начинали через 45 мин после введения дозы.

Это измерение потребления пищи состоит из двух фаз:

краткосрочное измерение (0-6 ч) и  
субхроническое измерение (0-96 ч).

В период времени 0-2 ч собаки получали 500 г стандартного корма (Hill's J/D diet). В точке времени 2 ч оставшуюся пищу удаляли, взвешивали и еще 500 г собачьего корма предлагали в период 2-4 ч. В точке времени 4 ч оставшуюся пищу удаляли, взвешивали и еще 300 г собачьего корма предлагали в период 4-6 ч. В точке времени 6 ч оставшуюся пищу удаляли и взвешивали. Образец крови собирали в этой точке времени (6,75 ч). Собакам затем предлагали 500 г собачьего корма в течение ночи. Утром в день 1-4 оставшуюся пищу удаляли, взвешивали и образец крови брали у каждого животного. В дни 1-3 собакам затем предлагали 500 г собачьего корма в течение 24-часового периода. В день 4 собак возвращали к их нормальному режиму кормления (260 г).

Дополнительные измерения потребления пищи: в дни 7, 14 и 28 испытания животным давали 6 ч на потребление их ежедневно получаемого корма (260 г). По окончании этого периода времени любую оставшуюся пищу собирали и взвешивали.

Измерения массы тела: массу тела измеряли на базовой линии и в дни 2, 4, 7, 10, 14, 18 и 28. Измерения массы тела на базовой линии осуществляли натощак. Массу тела в дни 2 и 4 определяли у животных не натощак. Для животных, которых обрабатывали носителем, все другие измерения массы тела осуществляли натощак. Для GDF15-обрабатываемых животных массу тела определяли в дни 7-28 не натощак, поскольку эти животные получали пищу постоянно для стимуляции аппетита и восстановления веса.

Эффективность испытываемого коньюгата GDF15-жирная кислота по настоящему изобретению у собак, получающих стандартный корм.

Цель исследования: Оценка эффектов подкожного введения носителя, используемого в качестве контроля, и 0,015 или 0,005 мг/кг коньюгата GDF15-жирная кислота по настоящему изобретению на потребление пищи кратковременно (6 ч) и в течение 96-часового периода у собак породы бигль (в этом испытании всех животных, которым вводят носитель, обрабатывают до обработки животных, получающих соединение). Образцы плазмы собирали в разных точках времени в течение 14-дневного периода после введения дозы для оценки фармакокинетического профиля этого соединения. Массу тела определяли на протяжении всего периода испытания.

Животные: масса тела на базовой линии и обработки.

Таблица 3

Собака ID	Масса (кг)	Обработка	Масса (кг)	Обработка
29	12,75	Носитель	12,85	5 мкг/кг hGDF15
57	13,35	Носитель	13,80	5 мкг/кг hGDF15
61	9,30	Носитель	9,45	5 мкг/кг hGDF15
77	10,70	Носитель	11,15	5 мкг/кг hGDF15
45	11,90	Носитель	12,20	15 мкг/кг hGDF15
50	13,00	Носитель	13,05	15 мкг/кг hGDF15
59	14,20	Носитель	14,65	15 мкг/кг hGDF15
72	8,80	Носитель	9,05	15 мкг/кг hGDF15

Процедура введения доз: Введение носителя осуществляли после определения исходной массы тела и сбора образцов крови. 52 мкл/кг носителя 30 ммоль/л ацетата натрия pH 4 (52 мкл/кг) вводили животным из группы введения носителя путем подкожной инъекции. Введение GDF15 осуществляли после определения исходной массы тела и сбора образцов крови. Коньюгат GDF15-жирная кислота обеспечивали в виде 1,20 мг/мл раствора и вводили путем подкожной инъекции после разбавления при 0,015 и 0,005 мг/кг. GDF15 исходный раствор разбавляли для поддержания дозы 52 мкл/кг, вводимой в предыдущем испытании.

Сбор крови: образцы крови собирали в группе, получавшей носитель, и в группе лечения этого испытания. Образцы собирали из подкожной латеральной или внутренней яремной вены (3 мл, в пробирки, содержащие EDTA и ингибиторы протеаз Дипротин А и Апротинин) и помещали на лед вплоть до центрифугирования при 3000 об/мин в течение 20 мин при 4°C. Плазму разделяли на аликвоты и хранили при -70°C до использования в анализе. Сбор осуществляли в следующих точках времени: 0, 6,75, 24,75, 48,75, 72,75 и 96,75 ч. Дополнительные образцы собирали в дни 7, 10 и 14.

Измерения потребления пищи: Потребление пищи измеряли в группе, получавшей носитель, и в группе лечения в течение этого испытания. Измерение ad libitum потребления пищи начинали через 45 мин после введения дозы. Это измерение потребления пищи состоит из двух фаз: краткосрочное измерение (0-6 ч) и субхроническое измерение (0-96 ч).

В период времени 0-2 ч собаки получали 500 г стандартного корма (Hill's J/D diet). В точке времени 2 ч оставшуюся пищу удаляли, взвешивали и еще 500 г корма предлагали на период 2-4 ч. В точке времени 4 ча оставшуюся пищу удаляли, взвешивали и еще 300 г собачьего корма предлагали на период 4-6 ч. В точке времени 6 ч оставшуюся пищу удаляли и взвешивали. Образец крови собирали в этой точке времени (6,75 ч). Собакам затем предлагали 500 г собачьего корма в течение ночи. Утром в день 1-4 оставшуюся пищу удаляли, взвешивали и образец крови брали у каждого животного. В дни 1-3 собакам затем предлагали 500 г собачьего корма в течение 24-часового периода. В день 4 собак возвращали к их нормальному режиму кормления (260 г).

Дополнительные измерения потребления пищи: В разные дни между днем 7 и днем 14 в группе обработки носителем и между днем 7 и днем 28 в группе лечения исследуемым животным давали 6 ч на потребление их ежедневно получаемого корма (225 г). По окончании этого периода времени любую оставшуюся пищу собирали и взвешивали. Раз в неделю осуществляли рассчитанное по времени измерение потребления пищи. Потребление 225 г корма измеряли в точках времени 1, 2, 4 и 6 ч после кормления для определения, вернулся к норме или нет режим питания каждой собаки.

Измерение массы тела: Массу тела измеряли как при обработке носителем, так и в группе лечения на протяжении испытания. В группе обработки носителем массу тела измеряли на базовой линии и в дни 2, 4, 7, 10 и 14. В группе лечения массу тела измеряли на базовой линии и в дни 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24 и 28. Массу тела в дни 2 и 4 определяли у животных не натощак. Во все другие дни массу тела определяли натощак.

Коньюгат Примера 2 был испытан в описанном выше анализе

Введение собакам одной подкожной дозы.

Таблица 4

Доза (мкг/кг)	Изменение массы тела (%) (через 14 дней)	Изменение потребления пищи (% от контроля) (0–6 час)	(0–96 час)	Продолжительность действия	
				Уменьшение потребления пищи (FI) (дни)	Сниже- ние массы тела (BW) (дни)
5	-5	55	45	7	14
15	-5	60	38	9	14
50	-13	50	26	7	18
dGDF15 (50 мкг/кг)	----	31			

GDF15-коньюгат улучшает показатели метаболического заболевания, включая диабет и стеатогепатит, у страдающих ожирением мышей.

Страдающим алиментарным ожирением мышам вводили раз в неделю носитель или соединение Примера 19Bm (0,5 мг/кг/подкожно) в течение 4 недель. Глюкозу и инсулин не натощак измеряли через 2 недели после введения первой дозы и уровни глюкозы и инсулин в крови после голодания в течение ночи измеряли через 4 недели после введения первой дозы. Соединение Примера 19Bm снижало уровень глюкозы натощак на 23% (207,1 мг/дл в группе обработки носителем против 160,4 мг/дл в группе обработки соединением Примера 19Bm;  $p<0,05$ ). Соединение Примера 19Bm снижало уровень инсулина натощак на 75% по сравнению с мышами, которых обрабатывали носителем (2,1 против 8,7 нг/мл;  $p<0,05$ ). Через четыре недели после введения начальной дозы соединение Примера 19Bm снижало глюкозу в крови натощак на 28% (142,7 против 199,5 мг/дл;  $p<0,05$ ) и инсулин натощак на 78% (0,77 против 3,5 нг/мл;  $p<0,05$ ). Маркеры жировой болезни печени также улучшались при введении раз в неделю четырех доз соединения Примера 19Bm. Соединение Примера 19Bm уменьшало гепатический стеатоз на 57,5% (11,36 против 26,73% ожирения печени;  $p<0,05$ ) и уровни в сыворотке маркера повреждения гепатоцитов, аланинаминотрансферазы (ALT), на 58% (46,2 против 110,5 Ед./л;  $p<0,05$ ). Кроме того, соединение Примера 19Bm снижает экспрессию в печени PNPLA3 - гена, вызывающего прогрессирующие заболевания печени, на 77% ( $p<0,05$ ).

Активность и стабильность в плазме коньюгатов APJ-агониста Примеров 20 и 21 в соответствии с настоящим изобретением можно определить следующими *in vitro* и *in vivo* способами, описанными ниже.

#### Анализ притока кальция в hAPJ.

Chem-5 APJ стабильные клетки (Millipore # HTS068C) высевали в 384-луночные планшеты при плотности 10000 клеток/лунка в 25 мкл питательной среды, затем выращивали в течение 24 ч в инкубаторе тканевых культур при 37°C. За 1 ч до анализа добавляли 25 мкл/лунка FLIPR кальциевого 4 красителя (Molecular Devices R8142) с 2,5 мМ пробенецида и клетки инкубировали в течение 1 ч в инкубаторе тканевых культур при 37°C. Пептиды солюбилизировали в HBSS, HEPES & 0,1% BSA буфер и осуществляли серийные 10-кратные разведения от 50 мКМ до 5 пМ в трех повторах. FLIPR Tetra использовали для добавления пептида к клеткам с красителем (1:5, для конечных концентраций пептида в пределах от 10 мКМ до 1 пМ). FLIPR краситель внутри клеток испускал флуоресценцию после связывания с кальцием, тогда как флуоресценция снаружи клеток маскировалась. Флуоресценцию измеряли с использованием 470-495 длины волн возбуждения и 515-575 длины волн эмиссии на FLIPR Tetra. Показания считывали в общей сложности в течение 3 мин начиная за 10 с до добавления пептида. Максимальные-минимальные значения рассчитывали и наносили на график для каждой концентрации пептида и GraphPad prism программу использовали для расчета EC<sub>50</sub> значений по точкам перегиба кривой, для определения стимуляции притока кальция пептидами.

#### In vivo анализ.

Коньюгат растворяли в PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) до концентрации 1 мг/мл с получением дозируемого раствора. Дозируемый раствор вводили внутривенно самцам крыс Sprague-Dawley через латеральную хвостовую вену в объеме 1 мл/кг массы тела, соответствующем дозе 1 мг/кг. Образцы венозной крови получали из яремной вены через катетер в определенных точках времени после введения дозы и сразу помещали на мокрый лед. Эти образцы центрифугировали при 4°C и содержащуюся в супернатанте плазму переносили в свежую пробирку для анализа.

#### Биоанализ.

Получение стандартной кривой: Исходный раствор получали путем растворения пептидного коньюгата в воде до 1 мг/мл. 10 мкл исходного раствора смешивали с 990 мкл плазмы крысы с получением

рабочего исходного раствора 10000 нг/мл в плазме. Осуществляли серийное разведение этого раствора в плазме с получением стандартных растворов 5000, 1000, 500, 100, 50, 10, 5 и 1 нг/мл.

Получение образца и стандарта: 25 мкл образца или стандарта в плазме переносили в чистый планшет. 150 мкл смеси ацетонитрил:МeOH (1:1), содержащей 100 нг/мл глибурида в качестве внутреннего стандарта, добавляли в каждую пробирку и планшет сильно встряхивали для перемешивания содержащегося. Планшет центрифугировали при 4000 об/мин при 4°C. 125 мкл супернатанта переносили в чистый планшет, смешивали с 50 мкл воды и анализировали методом ЖХ/МС.

ЖХ/МС анализ.

ВЭЖХ: Agilent 1290 ВЭЖХ с автоматическим дозатором.

Колонка: MAC-MOD ACE C18, 3 мкм, 30×2, 1мм в.д.

Подвижная фаза А: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Подвижная фаза В: 0,1% муравьиной кислоты в воде.

#### Программа градиента

Время (мин)	Поток (мл)	Подвижная фаза А (%)	Подвижная фаза В (%)
0	0,7	98	2
0,5	0,7	98	2
1,5	0,7	5	95
2,5	0,7	5	95
2,6	0,7	98	2
3,1	0,7	98	2

Масс-спектрометр: AB Sciex 6500.

MS условия: Q1 (m/z+) 809,3; Q3 (m/z+) 923,7; DP: 60; CE: 25.

Анализ данных: МС данные получали и анализировали с использованием WatsonLIMS v7.4 программы.

Активность и стабильность APJ агонист-конъюгата по настоящему изобретению с использованием анализов, описанных выше.

Таблица 5

Пептид	Приток hAPJ Ca <sup>2+</sup> EC <sub>50</sub> [нМ]	Стабильность в плазме in vivo t <sub>1/2</sub> [час]
pE-R-P-C <sup>*</sup> -L-S-C <sup>*</sup> -K-G-P- (D-Nle)-NH (Фенетил) (дисульфид С <sup>4</sup> -С <sup>7</sup> )	3	0,9
pE-R-P-R-L-C <sup>*</sup> -H-K-G-P- Nle-C <sup>*</sup> -F-OH (дисульфид С <sup>6</sup> -С <sup>12</sup> ) (SEQ ID NO: 18)	1,04	0,7
Пример 20A	2479	—
Пример 21A	65	7,4
Пример 21B	839	—

Активность и стабильность в плазме конъюгатов окситоцина Примера 26А и 26В в соответствии с настоящим изобретением можно определить следующими in vitro и in vivo способами, описанными ниже.

Описание in vitro анализа.

Материалы и методы.

Подготовка планшета с соединениями.

Полученные соединения разводили в DMSO и окончательно разводили в Eurofins Discovery Services GPCRProfiler® аналитическом буфере до концентраций, которые были в три раза выше, чем конечная анализируемая концентрация. Подобным образом подготавливали контроли с использованием носителя и положительные контроли для обеспечения необходимого контроля всех анализов.

Референсные контроли		
GPCR мишень	Референсный агонист	E <sub>max</sub>
OT	Окситоцин	1,25мкМ

Все лунки подготавливали с использованием Eurofins Discovery Services GPCRProfiler® аналитиче-

ского буфера. GPCRProfiler® аналитический буфер представлял собой модифицированный сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS), где HBSS был дополнен и содержал 20 мМ HEPES и 2,5 мМ пробенецида при pH 7,4.

Анализ притока кальция.

Анализ агонистов.

Полученное соединение(соединения) высевали в двух повторах для каждой анализируемой концентрации.

Референсный агонист окситоцин подготавливали аналогичным образом в качестве анализируемого контроля. Референсный агонист окситоцин включали при  $E_{max}$  (концентрация, при которой референсный агонист демонстрировал максимальный ответ).

Анализ агонистов осуществляли на устройстве FLIPTETRA, где испытываемое соединение(соединения), контроли с использованием носителя и референсный агонист добавляли в аналитический планшет после установления базовой линии флуоресценции/люминесценции. Анализ агонистов осуществляли в общей сложности в течение 180 с и его использовали для оценки способности каждого соединения активировать каждый анализируемый GPCR. После завершения трехминутного анализа агонистов аналитический планшет инкубировали при 25°C еще в течение 7 мин.

Обработка данных.

Все планшеты подвергали соответствующим корректировкам базовой линии. После корректировок базовой линии максимальные значения флуоресценции/люминесценции экспорттировали и данные использовали для расчета процента активации и процента ингибирования. Отрицательные значения от 0 до -30% могут быть результатом биологической изменчивости. Данные использовали для расчета следующим образом:

$$\text{((Макс. RLU)-(Базовая линия Средн.))/((Положительн. Средн.)-(Базовая линия Средн.))}.$$

Описание *in vivo* анализа.

Конъюгат растворяли в PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) до концентрации 3 мг/мл с получением дозируемого раствора. Дозируемый раствор вводили внутривенно самцам крыс Sprague-Dawley через латеральную хвостовую вену в объеме 1 мл/кг массы тела, соответствующем дозе 3 мг/кг. Образцы венозной крови получали из яремной вены через катетер в определенных точках времени после введения дозы и сразу помещали на мокрый лед. Эти образцы центрифугировали при 4°C и содержащуюся в супернатанте плазму переносили в свежую пробирку для анализа.

Биоанализ.

Получение стандартной кривой: Исходный раствор получали путем растворения пептидного конъюгата в двух отдельных пробирках в диметилсульфоксиде до 1 мг/мл. 10 мкл каждого исходного раствора смешивали с 980 мкл плазмы крысы с получением рабочего исходного раствора 10000 нг/мл в плазме. Осуществляли серийное разведение этого раствора в плазме с получением стандартных растворов 5000, 1000, 500, 100, 50, 10, 5, 1, 0,5 и 0,1 нг/мл.

Подготовка образца и стандарта: 25 мкл образца или стандарта в плазме переносили в чистый планшет. 150 мкл ацетонитрила, содержащего 100 нг/мл глибурид в качестве внутреннего стандарта, добавляли в каждую пробирку и планшет сильно встряхивали для перемешивания содержимого. Планшет центрифугировали при 4000 об/мин при 4°C. 125 мкл супернатанта переносили в чистый планшет, смешивали с 150 мкл воды и анализировали методом ЖХ/МС.

ЖХ/МС анализ.

ВЭЖХ: Agilent 1290 ВЭЖХ с автоматическим дозатором.

Колонка: MAC-MOD ACE C18, 3 мкм, 30×2,1 мм в.д.

Подвижная фаза А: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Подвижная фаза В: 0,1% муравьиной кислоты в воде.

Программа градиента:

Время (мин)	Поток (мл)	Подвижная фаза	
		A (%)	Подвижная фаза B (%)
0	0,7	98	2
0,5	0,7	98	2
2,0	0,7	2	98
2,5	0,7	2	98
2,6	0,7	98	2
3,0	0,7	98	2

Mass-спектрометр: AB Sciex 6500.

MS условия для пептида: Q1 (m/z+) 945,20; Q3 (m/z+) 687,27; DP: 140; CE: 39.

MS условия для пептидного конъюгата: Q1 (m/z+) 1270,85; Q3 (m/z+) 468,30; DP:140; CE:77.

Анализ данных: МС данные получали и анализировали с использованием программы WatsonLIMS

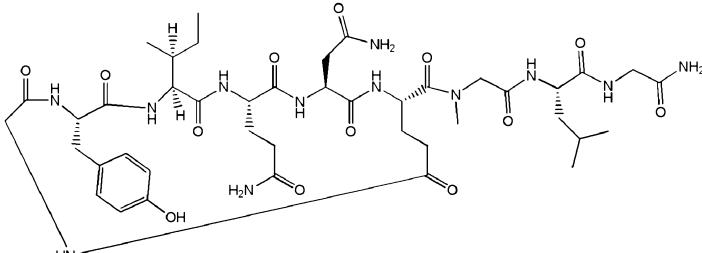
v7.4.

Активность и стабильность конъюгата окситоцин-жирная кислота по настоящему изобретению в соответствии с анализами, описанными выше.

Таблица 6

Пептид	ОТ Ca <sup>2+</sup> приток EC <sub>50</sub> [нМ]	Стабильность в плазме in vivo t <sub>1/2</sub> [час]
Пример 26A	8,4	46
Неконъюгированный аналог окситоцина	7,8	0,6
Пример 13 WO2014/095773		

Пример 13 WO 2014/095773 представлен ниже:



Конъюгат окситоцин-жирная кислота по настоящему изобретению демонстрирует 75-кратное увеличение времени полужизни по сравнению с неконъюгированным окситоциновым аналогом.

Активность и стабильность в плазме AgRP конъюгатов Примера 27А и 27В в соответствии с настоящим изобретением можно определить следующими in vitro и in vivo способами, описанными ниже.

А) Протокол HTRF cAMP анализа.

Пассаж HEK293/MC4R клеток.

Клетки: HEK293/MC4R стабильная клеточная линия.

Полная среда: MEM/F12 1:1 (Gibco, Cat. No. 11039, для анализа, не содержащая фенолового красного среды Cat. No. 21041), 10% FBS (термоинактивированный, Gibco, Cat. No. 10082), 200 мкг/мл генетамицина (Gibco, Cat. No. 10131), 15 мМ Hepes (GIBCO, Cat No. 15630), 2 мМ L-глутамина (GIBCO, Cat No. 25030)

Колба: 150 см<sup>2</sup> обработанная тканевой культурой колба (Corning, Cat. No. 430825).

Аспирируют кондиционированную среду.

Промывают при помощи 25 мл DPBS (Gibco, Cat. No. 14190), затем среду аспирируют.

\*FBS ингибирует трипсин-EDTA обработку.

Добавляют 2,5 мл 0,05% трипсин-EDTA (Gibco, Cat. No. 25300).

Оставляют на несколько минут, затем нужно постучать по колбе несколько раз для отслоения клеток.

Добавляют 25 мл полной среды для остановки трипсин-EDTA обработки.

\*Клеточный препарат для анализов, необходимо использовать не содержащую фенолового красного полную среду.

Осторожно пипетируют несколько раз для ресуспензирования агглютинирующих клеток.

Переносят суспензию в 50-мл центрифужную пробирку.

Центрифицируют при 1200 об/мин в течение 3 мин.

Аспирируют супернатант.

Диспергируют клетки, осторожно постукивая по дну.

Добавляют 5-10 мл полной среды, затем ресуспензируют путем осторожного пипетирования.

\*Клеточный препарат для анализов, необходимо использовать не содержащую фенолового красного полную среду.

Переносят 0,5 мл суспензии во флакон для образца для Vi-cell.

Подсчитывают количество клеток с использованием Vi-cell.

\*Регистрируют плотность клеток и жизнеспособность каждый раз.

Переносят 1-3×10<sup>6</sup> клеток в новую 150-см колбу.

Для 3 дней: 3×10<sup>6</sup> клеток/колба.

Для 4 дней: 1×10<sup>6</sup> клеток/колба.

Инкубируют при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>.

Посев клеток для HTRF cAMP анализа (за день до анализа).

Получают клеточную суспензию, как в разделе "Пассаж".

Разбавляют суспензию до  $2,34 \times 10^5$  клеток/мл.

\*13 мл достаточно для одного 384-луночного планшета.

Распределяют 30 мкл клеточной суспензии в каждую лунку 384-луночного прозрачного планшета с поли-D-лизиновым биопокрытием (Becton Dickinson, Cat. No. 354660): 7000 клеток/лунка.

\*Планшет с поли-D-лизиновым покрытием имеет принципиальное значение для этого анализа.

\*Не добавляют никаких клеток в лунки с cAMP стандартом.

Инкубируют при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение ночи.

HTRF cAMP анализ.

1. Получение реагентов.

1 M IBMX

IBMX (MW 222,25 g/mol, ACROS Cat. No. 228420010) - 111 мг.

DMSO (Sigma Aldrich, Cat. No. D2650) - 500 мкл.

Хранят при 4°C.

40 мг/мл BSA раствор.

Бычий сывороточный альбумин (Sigma A7030-50G) - 200 мг.

dH<sub>2</sub>O - 5 мл.

Хранят при 4°C.

1 мг/мл (176 мкМ) AgRP маточный раствор (в HBSS/2 мг/мл BSA).

R&D человеческий AgRP C-концевой (Cat. No. 3726-AG-100) - 100 мкг/флакон.

1× забуференный солевой раствор Хэнкса (HBSS) (Gibco, Cat. No. 14065, с Ca и Mg) - 95 мкл.

40 мг/мл BSA раствор - 5 мкл.

Хранят при 4°C.

2 mM NDP-aMSH маточный раствор.

NDP-aMSH (MW 1646.9, Bachem, Cat. No. H1100) - 1 мг/флакон.

dH<sub>2</sub>O - 304 мкл.

\*Сразу после растворения распределяют 10 мкл аликовты в 200-мкл пробирки, затем хранят при -20°C.

Аналитический буфер 1.

HBSS - 10 мл.

1 M Herpes (Gibco, Cat. No. 15630) - 0,2 мл.

1 M IBMX - 20 мкл.

\*Чтобы избежать осаждения IBMX, буфер необходимо перемешивать вихревым способом вплоть до полного растворения.

Аналитический буфер 2.

HBSS - 20 мл.

1 M Herpes (Gibco, Cat. No. 15630) - 0,4 мл.

1 M IBMX - 40 мкл.

40 мг/мл BSA раствор - 0,25 мл.

\*Чтобы избежать осаждения IBMX, буфер необходимо перемешивать вихревым способом вплоть до полного растворения. 6 нМ NDP-aMSH для IgG титрования и AgRP титрования.

2 мкМ NDP-aMSH (1000-кратное разведение маточного раствора) - 10,8 мкл.

Аналитический буфер 1-3600 мкл.

\*Пример для одного 384-луночного анализа.

120 нМ AgRP для IgG титрования.

10-кратно разбавленный маточный раствор (17,6 мкМ) - 26 мкл.

Аналитический буфер 2-3800 мкл.

\*Пример для одного 384-луночного планшета.

NDP-aMSH рабочие растворы для титрования (см. реагенты).

AgRP рабочие растворы для титрования (см. реагенты).

IgG рабочие растворы для титрования (см. реагенты).

cAMP стандартные растворы (см. реагенты).

2. Анализ (2-стадийный протокол).

Набор для анализа: набор Cisbio cAMP HiRange HTRF (Cat. No. 62AM6PEB).

Получение IgG/AgRP смеси (1:1).

Смешивают 15 мкл IgG рабочих растворов и 15 мкл 120 нМ AgRP, затем инкубируют в течение 1 ч при температуре окружающей среды

Подготовка аналитического планшета.

Сливают культуральную среду, переворачивая 384-луночный аналитический планшет, содержащий клетки, на Wipeall, затем постукивая для удаления культуральной среды.

Добавляют 100 мкл DPBS в каждую лунку и сливают таким же образом.

\*Сразу после удаления PBS переходят к следующему как можно быстрее, чтобы избежать высыхания.

Переносят 10 мкл следующих реагентов в каждую лунку в соответствии с распределением образцов.

cAMP стандарт: cAMP стандартные растворы.

Отрицательный контроль для cAMP титрования: разбавитель в HTRF наборе.

Положительный контроль: cAMP положительный контроль в HTRF наборе.

MSH титрование: аналитический буфер 2.

AgRP титрование: AgRP рабочие растворы.

IgG титрование: IgG/AgRP смесь.

Отрицательный контроль для клеточного анализа:

Аналитический буфер 2.

Быстро центрифугируют 384-луночный планшет при 1200 об/мин.

Инкубируют клетки в течение 15 мин при температуре окружающей среды.

Добавляют 10 мкл следующих реагентов в каждую лунку в соответствии с распределением образцов.

cAMP стандартный раствор: Аналитический буфер 1/

Отрицательный контроль для cAMP титрования: аналитический буфер 1.

Положительный контроль: аналитический буфер 1.

MSH титрование: MSH рабочие растворы.

AgRP титрование: 6 нМ MSH раствор.

IgG титрование: 6 нМ MSH раствор.

Отрицательный контроль для клеточного анализа:

Аналитический буфер 1.

Быстро центрифугируют 384-луночный планшет при 1200 об/мин.

Инкубируют клетки еще в течение 30 мин при температуре окружающей среды.

\*Это время инкубации не является строгим. ±5 мин будет вполне приемлемо в соответствии с данными развития анализа.

Добавляют 10 мкл cAMP-d2 (разбавленный 1:4 в лизисном буфере, который обеспечивается в наборе).

\*Важно!! Для отрицательного контроля, не cAMP-d2, а только лизисный буфер.

Добавляют 10 мкл анти-cAMP криптата (разведение 1:4 в лизисном буфере, который обеспечивается в наборе).

Быстро центрифугируют при 1200 об/мин.

Инкубируют аналитический планшет в течение 45-60 мин при температуре окружающей среды.

Переносят 30 мкл каждого образца в обработанный тканевой культурой белый полистирольный 384-луночный аналитический планшет (Corning, Cat. No. 3572).

Быстро центрифугируют при 1200 об/мин.

Измеряют флуоресценцию при помощи Molecular Device M5 или M5e со следующими параметрами.

Параметры Molecular Device M5/M5e.

Тип анализа	Флуоресценция с разрешением по времени
Задержка интеграции	50 мкsec
Интеграция	400 мкsec
Считывание	Top read
Длина волны	возбуждение 314нм/эмиссия 668нм отсечка 630нм
	возбуждение 318нм/эмиссия 570нм отсечка 570нм
Автосмешивание	выкл.
автокалибровка	вкл.
Чувствительность	Reading 75
PMT	вкл.
Планшет	384-луночный стандартный непрозрачный
Установка времени	выкл.
приоритет колонки длины волны	приоритет колонки
Скорость переноса	нормальная
Автосчитывание	выкл.

## В) MC3 сAMP анализ.

Материалы:

Клетки: HEK2 93/MC3R стабильная клеточная линия.

Полная среда: DMEM/F12 1:1 (Gibco, Cat. No. 11039).

10% FBS (термоинактивированный, Gibco, Cat. No. 10082).

200 мкг/мл генетицина (Gibco, Cat. No. 10131).

2 mM L-глутамина (GIBCO, Cat. No. 25030).

Колба: 150 см<sup>2</sup> обработанная тканевой культурой колба (Corning, Cat. No. 430825).

Аналитический буфер.

HBSS (Gibco - 14175-095) - 10 мл.

1 M Нерпес (Fisher, Cat. No. BP299-1) - 0,2 мл.

500 mM IBMX (MW 222,25 г/моль, ACROS Cat. No. 228420010) - 40 мкл.

BSA - 0,25%.

Планшеты.

384-луночный с твердым дном, Greiner bio-one (Cat. No. 781080).

Протокол анализа (протокол для антагониста):

I. Аспирируют кондиционированную среду.

II. Промывают при помощи 2,5 мл DPBS (Gibco, Cat. No. 14190).

III. Добавляют 2 мл 0,25% Трипсин-EDTA (Gibco, Cat. No. 25200-056).

IV. Оставляют колбу на несколько минут в инкубаторе, нужно постучать по колбе несколько раз для отслоения клеток.

V. Добавляют 10 мл полной среды для остановки Трипсин-EDTA обработки и тщательно смешивают, осторожно пипетируя несколько раз для ресуспендирования агглютинирующих клеток.

VI. Переносят 1,5 мл клеток в новую 150-см колбу, содержащую 20 мл полной среды.

VII. Переносят оставшуюся суспензию в 50-мл центрифужную пробирку.

VIII. Центрифугируют при 1200 об/мин в течение 4 мин. Аспирируют супернатант.

IX. Добавляют 6 мл аналитического буфера в пробирку и ресуспенсируют клетки путем осторожного пипетирования.

X. Переносят 0,5 мл суспензии вО флакон для образца для Vi-cell и добавляют еще 0,5 мл PBS.

XI. Подсчитывают количество клеток с использованием Vi-cell.

\*Регистрируют плотность клеток и жизнеспособность каждый раз.

i) Высевают клетки при 4К/лунка в 10 мкл/лунка аналитического буфера, содержащего IBMX.

ii) Оставляют планшет в инкубаторе в течение ~30 мин перед началом анализа суспендированных клеток.

Следуют двухстадийному сAMP протоколу для определения сAMP.

Процедура.

I. К клеткам 10 мкл/лунка добавляют 5 мкл AgRP при 3Х в аналитическом буфере только в лунки с

антагонистом.

II. Добавляют 5 мкл буфера в лунки с положительным контролем (лунки, которые должны содержать NDP- $\alpha$ -MSH).

III. Инкубируют планшет при 37°C в течение ~20 мин.

IV. Добавляют 5 мкл/лунка агониста EC80 (NDP- $\alpha$ -MSH) при 4X в лунки, содержащие AgRP DRC.

V. Добавляют 5 мкл/лунка агониста (NDP- $\alpha$ -MSH) DRC при 4X (конечная максимальная концентрация в планшете составляет 100 нМ) для расчета EC<sub>50</sub> NDP- $\alpha$ -MSH.

VI. Добавляют буфер только к отрицательному контролю.

VII. Осуществляют центрифугирование 384-луночного планшета в импульсном режиме и клетки инкубируют в течение 30 мин в инкубаторе.

VIII. Добавляют 10 мкл следующих реагентов в каждую лунку:

a) 10 мкл cAMP-d2.

b) \*Важно!! для отрицательного контроля не добавляют cAMP-d2, а только лизисный буфер и 10 мкл/лунка Tb-криптата

c) 10 мкл анти-cAMP криптата.

d) Осуществляют центрифугирование планшета в импульсном режиме и инкубируют в течение 60 мин при комнатной температуре.

C. Описание *in vivo* анализа:

10 нмоль конъюгата растворяли в 300 мкл PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) с получением дозируемого раствора. Дозируемый раствор (300 мкМ) вводили внутривенно самцам крыс Sprague-Dawley через латеральную хвостовую вену (соответствует дозе 10 нмоль на крысу). Кровь собирали через разрез в области хвоста в определенных точках времени после введения дозы и сразу помещали на мокрый лед. Эти образцы центрифугировали при 4°C и содержащуюся в супернатанте плазму переносили в свежую пробирку для анализа.

Биоанализ:

Получение стандартной кривой: Два жирнокислотных конъюгата примеров 27A и 27B и один зрелый человеческий AgRP пептид использовали для получения стандартных растворов. Промежуточные исходные растворы каждого AgRP получали путем разбавления исходных растворов меченых пептидов в разбавителе образца для ELISA с казеином до 100 мкг/мл. Для анализа промежуточные соединения разбавляли до верхней стандартной концентрации 2500 пг/мл и затем осуществляли 2-кратные серийные разведения до 16 точек, включая содержащий нулевую дозу стандартный раствор в разбавителе образца для ELISA с бычьим сывороточным альбумином (BSA).

Разбавление образца: Образцы плазмы подвергали 10-кратным и затем 5-кратным серийным разведениям до 31,250-кратных в разбавителе образца для ELISA с BSA.

ELISA анализ 5B1 человеческого AgRP: 384-луночные микропланшеты покрывали анти-человеческим AgRP, клон 5B1, в течение ночи при 30 мкл/лунка в 1× PBS при комнатной температуре. Планшеты аспирировали и блокировали блокатором на молочной основе при 90 мкл/лунка в течение 2 ч при комнатной температуре. Все последующие инкубации осуществляли при 30 мкл/лунка. Планшеты аспирировали снова и образцы и стандарты добавляли в лунки в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промывали три раза фосфатным промывочным буфером с tween-20 и в лунки добавляли биотинилированное козлиное анти-человеческое AgRP поликлональное антитело для детекции связанного AgRP в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали снова и добавляли в лунки HRP-меченный стрептавидиновый реагент в течение 30 мин при комнатной температуре. Планшеты промывали последний раз и добавляли хемилюминесцентный субстрат во все лунки и планшеты сразу считывали на Spectramx M5 для определения выхода светового сигнала.

Анализ данных: Исходные данные систематизировали и анализировали на основные фармакокинетические параметры.

Активность и стабильность AgRP жирнокислотных конъюгатов по настоящему изобретению в соответствии с анализами, описанными выше.

Таблица 7

Пептид	MC4R EC <sub>50</sub> [нМ]	MC3R EC <sub>50</sub> [нМ]	Стабильность в плазме <i>in vivo</i> t <sub>1/2</sub> [час]
Пример 27A (моно-жирнокислотный конъюгат)	18	7	20
Пример 27B (ди-жирнокислотный конъюгат)	167	65	52
AgRP	1,7	12	4,4

Активность и стабильность в плазме FGF23 конъюгата примеров 28A, 28B и 28C можно определить

in vitro следующими способами, описанными ниже.

**Анализ активности in vitro.**

**Egr-1-люцифераза:** Биологическую активность очищенного hFGF23-FA конъюгата испытывали в Egr-1-люциферазных репортерных анализах. Связывание hFGF23-FA конъюгата с FGF23 рецептором приводило к последовательной активации Egr-1 и экспрессии люциферазного репортера, регулируемой Egr-1 промотором. Egr-1-люциферазный репортерный ген был сконструирован на основании гена, описанного Urakawa et al. (Nature, 2006, Vol. 444, 110-114). Осуществляли трансфекцию HEK293T клеток, посаженных в 48-луночный поли-D-лизиновый планшет, Egr-1-люциферазным репортерным геном, полноразмерной трансмембранный формой Klotho и репортерным геном для нормализации трансфекции (Renilla люцифераза). Через 5 ч после трансфекции смесь для трансфекции заменяли смесью 3 мл DMEM плюс 1% FBS, содержащей ступенчато изменяющиеся концентрации испытываемого белка. Через 20 ч клетки лизировали в пассивном лизисном буфере (Promega, Cat. No. E194A) и определяли люциферазную активность с использованием Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, Cat. No. E2940).

Результаты.

Таблица 8

Пример	EC50 (нМ)
Пример 28В	1,195
Пример 28С	0,258

Активность и стабильность в плазме конъюгатов серелаксин-жирная кислота примеров 29А и 29В в соответствии с настоящим изобретением можно определить следующими in vitro и in vivo способами, описанными ниже.

**Анализы активности in vitro # 1.**

**Материалы:**

DMEM: F12 среда (Gibco, Cat. No. 11320).

IBMX (Sigma, Cat. No. I5879).

384-луночные белые планшеты с твердым дном (Greiner bio-one, Cat. No. 781945).

20,000 dynamic-2 cAMP набор (Cisbio, Cat. No. 62AM4PEC).

Аденозин 3',5'-циклический монофосфат (Sigma, Cat. No. A9501).

Matrix-plate mate plus (использовали для добавления 5 мкл реагентов для анализа).

PBS-Gibco (Cat. No. 10010-023).

Аббревиатура	Определение или объяснение
cAMP	циклический аденоzinмонофосфат
RXFP1	релаксин/инсулиноподобный receptor
DMSO	диметилсульфоксид
HTRF	гомогенная флуоресценция с разрешением по времени
8k	восемь тысяч
cAMP-d2	cAMP, меченный красителем d2
PDL	поли-d-лизин
ul	микролитр

@	при
о/N	в течение ночи
uM	микромолярный
Min	минуты
37с	37 градусов по Цельсию
3х	трехкратный
hr	час
DMEM:F12	модифицированная Дульбекко среда Игла: питательная смесь F-12 (DMEM/F-12)
rhRLX	рекомбинантный человеческий релаксин
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Среда
FRET	Резонансный перенос энергии флуоресценции
HEK293	293 клетки почек человеческого эмбриона
IBMX	3-изобутил-1-метилксантин
нМ	наномолярный
std	стандарт
con	концентрация
PBS	фосфатно-солевой буферный раствор
cpd	соединение
HS	сыворотка человека
HBSS	буферный солевой раствор Хэнкса

## Протокол:

День 1: высевают RXFP1-HEK293/родительские HEK293 клетки 8k в 10 мкл среды DMEM:F12 в PDL-покрытые белые планшеты с твердым дном;

День 2: осуществляют анализ с соединением;

Способ с использованием агониста (в общем виде):

клетки в 10 мкл среды DMEM:F12 при 37°C в течение ночи;

5 мкл 2000 мКМ (4×) IBMX к клеткам в течение 30 мин при 37°C;

5 мкл 4× соединение/Серелаксин к полученной выше смеси в течение 30 мин при 37°C (со стадии 3 разведения соединения, 400 нМ - конечная концентрация 100 нМ);

10 мкл cAMP-d2 коньюгата;

10 мкл коньюгата анти-cAMP крипта;

инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре;

считывание FRET сигнала - Envision 665 нм/620 нм.

Подготовка соединений.

Серелаксин:

1) Разбавляют исходный раствор 683,3 мКМ, т.е. 11,7 мкл в 188,3 PBS pH 7,4, 3-кратно разбавляют в PBS путем переноса 15 мкл соединения в 30 мкл (конечная концентрация 40 мКМ) - вручную.

2) Разбавляют 1:10, т.е. 6 мкл полученного выше в 54 мкл DMEM:F12 (конечная концентрация 4 мКМ) - вручную.

3) Разбавляют 1:10, т.е. 10 мкл полученного выше в 90 мкл DMEM:F12 (конечная концентрация 400 нМ) - вручную.

Серелаксин-FA коньюгат.

1) Разбавляют исходный раствор до 40 мКМ в PBS pH 7,4, 3-кратно разбавляют в PBS путем переноса 15 мкл соединения в 30 мкл.

2) Разбавляют 1:10, т.е. 6 мкл полученного выше в 54 мкл DMEM:F12 - вручную

3) Разбавляют 1:10, т.е. 10 мкл полученного выше в 90 мкл DMEM:F12 (1:100 разбавление)-вручную

Жирная кислота:

1) Разбавляют исходный раствор до 40 мКМ в PBS pH7,4, 3х кратно разбавляют в PBS путем переноса 15 мкл соединения в 30 мкл

2) Разбавляют 1:10, т.е. 6 мкл полученного выше в 54 мкл DMEM:F12 - вручную.

3) Разбавляют 1:10, т.е. 10 мкл полученного выше в 90 мкл DMEM:F12 (1:100 разбавление) - вручную.

Стандартные кривые разведений cAMP:

1. 150 мкл сAMP стандарта разбавляли в DMEM:F12 среде для первой колонки (2800 нМ).
2. 100 мкл DMEM:F12 среды для последующих колонок до 10 (1-11).
3. 3х разведения путем переноса 50 мкл в 100 мкл.
4. 20 мкл со стадии 3 в подходящие лунки планшета стандартной кривой.
5. 10 мкл анти-d2 и анти-сAMP криптат коньюгата.
6. Инкубируют 1 ч при комнатной температуре
7. Считывают FRET сигнал - Envision 665 нм/620 нм.

Анализ:

Осуществляли Log (x) преобразование концентрации (нМ) сAMP с использованием программы Graph pad prism.

Количество сAMP интерполировали из стандартной кривой с использованием нелинейной регрессии по четырем параметрам.

Интерполированные значения преобразовывали в нМ с использованием  $10^Y$  преобразования.

Вычисленные количества сAMP наносили на график против концентрации соединения с использованием нелинейной регрессии по четырем параметрам.

Результаты:

Таблица 9

Соединение	EC50 (нМ)
Серелаксин	1,12
Серелаксин-FA коньюгат Пример 29В	4,51

In vitro активность в присутствии бычьего сывороточного альбумина и человеческой сыворотки # 2.

Материалы:

DMEM: F12 среда (Gibco, Cat. No. 11320).

IBMX (Sigma, Cat. No. I5879).

384-луночные белые планшеты с твердым дном (Greiner bio-one, Cat. No. 781945).

20,000 dynamic-2 сAMP набор (Cisbio, Cat. No. 62AM4PEC).

Аденозин 3',5'-циклический монофосфат (Sigma, Cat. No. A9501).

Matrix-plate mate plus (использовали для добавления 5 мкл реагентов для анализа).

PBS-Gibco (Cat. No. 10010-023).

1 М HEPES Gibco (Cat. No. 15630-080).

1X HBSS Gibco (Cat. No. 14175-095).

Аналитический буфер-1Х HBSS + 10 мМ HEPES.

Бычий сывороточный альбумин Cat. No. A2153 (Sigma-Aldrich).

Sigma Aldrich -H4522 (человеческая сыворотка).

Условия:

600 мкМ BSA.

4% человеческая сыворотка.

10% человеческая сыворотка (Sigma aldrich -H4522).

Аналитический буфер.

Испытываемые соединения:

Серелаксин.

Серелаксин-FA (пример 29А).

Подготовка соединений:

Серелаксин: Исходный раствор (796,57 мкМ), т.е. 4,75 мг/мл MW 5963 Да.

Исходный раствор 10 мкл серелаксина, растворенного в 190 мкл PBS, конечная концентрация 40 мкМ, которые разбавляют 3-кратно путем переноса 30 мкл в 60 мкл аналитического буфера с 11-точечной кривой, (A2-A12) 12-я равна нулю.

Серелаксин-FA коньюгат: Исходный раствор (287,79 мкМ), т.е. 2,61 мг/мл MW 9069 Да.

Исходный раствор 27,798 мкл серелаксина, растворенного в 172,2 мкл PBS, конечная концентрация 40 мкМ, которые разбавляют 3-кратно путем переноса 30 мкл в 60 мкл аналитического буфера с 11-точечной кривой, (A2-A12) 12-я равна нулю.

Получение исходного раствора BSA:

Для 666,66 мкМ BSA: получают аналитический буфер 30 мл путем растворения 1,32 г BSA.

Для 600 мкМ BSA: получают аналитический буфер 30 мл путем растворения 1,18 г BSA.

Без BSA, содержит только аналитический буфер.

Человеческая сыворотка.

Для 4,44% HS: 1,34 мл в 28,66 мл аналитического буфера.

Для 4% HS: 1,2 мл в 28,8 мл аналитического буфера.

Для 11,11% HS: 3,33 мл в 26,67 мл аналитического буфера.

Для 10% HS: 3 мл в 27 мл аналитического буфера.

**Процедура:**

День 1: Высевают при плотности 8000 клеток/лунка RXFP1-НЕК293 и НЕК293 (родительские) клетки в объеме 10 мкл/лунка в основную питательную DMEM:F12 среду в планшет с твердым дном. Инкубируют клетки в течение ночи при 37°C/5%CO<sub>2</sub>.

**День 2:**

1. Промывают клетки 2 раза при помощи 50 мкл аналитического буфера и осторожно промакивают бумажным полотенцем, чтобы избавиться от аналитического буфера, после первой и второй промывки.

2. Клетки предварительно обрабатывают при помощи 15 мкл среды с IBMX (666,66 мкМ), содержащей соответствующую среду (600 мкМ BSA, 4% BSA, 10% человеческая сыворотка и аналитический буфер только) в течение 30 мин при 37°C.

3. Осуществляют серийные разведения соединений 3-кратно, 11-точечная кривая - перенос 15 мкл соединений из предыдущей лунки в следующую лунку с 30 мкл PBS, лунка 11 содержит только PBS.

4. Разбавляют (1:10) в аналитическом буфере со стадии 3 (т.е. 10 мкл до 90 мкл аналитического буфера).

5. Разбавляют снова со стадии 4 (1:10) в соответствующей среде (666,66 мкМ BSA и 4,44 и 11,11% человеческой сыворотки и аналитический буфер), конечная концентрация BSA 600 мкМ, и человеческая сыворотка представляет собой 4 и 10%.

6. (\*Инкубируют соединения в течение 1 ч при комнатной температуре в их соответствующей среде до добавления к клеткам).

7. 5 мкл со стадии 6, т.е. 4× Серелаксин/Серелаксин-FA к 15 мкл клеток в течение еще 30 мин при 37°C (верхняя концентрация Серелаксина 100 нМ).

8. Добавляют 10 мкл cAMP d2 конъюгата.

9. Добавляют 10 мкл анти-cAMP-криптиата.

10. Инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре.

11. Считывают FRET на Envision.

12. cAMP стандартные кривые получали в их соответствующей среде.

**Стандартные кривые разведений cAMP:**

Исходный раствор cAMP стандарта 1120000 нМ.

1. Разбавляют исходный раствор (1:4) путем растворения 20 мкл исходного раствора cAMP в 60 мкл аналитического буфера.

2. (1:10) разведение стадии 1 в аналитическом буфере (т.е. 20 мкл в 180 мкл аналитического буфера).

3. (1:10) разведение стадии 2 в соответствующей концентрации 4,44% и 11,11% HS, 666,66 мкМ BSA или без BSA - Конечная концентрация должна быть 4, 10% HS и 600 мкМ BSA.

**Стандартная кривая cAMP.**

1. Добавляют 150 мкл соответствующих cAMP стандартов в первую колонку (2800 нМ).

2. Добавляют 100 мкл аналитического буфера с соответствующими концентрациями 600 мкМ BSA, 4 и 10% HS и 0%) в следующие 11 колонок, т.е. (2-12).

3. 3× разведения путем переноса 50 мкл в 100 мкл следующих лунок, 12-я лунка является нулевой, не содержит cAMP.

4. 20 мкл со стадии 3 в подходящие лунки планшета стандартной кривой.

5. Добавляют 10 мкл d2 конъюгата.

6. Инкубируют 1 ч при комнатной температуре.

7. Считывают на HTRF- Envision.

**Анализ:**

Осуществляли Log (x) преобразование концентрации (нМ) cAMP с использованием программы Graph pad prism.

Количество cAMP интерполировали из стандартной кривой с использованием нелинейной регрессии по 4 параметрам.

Интерполированные значения преобразовывали в нМ с использованием 10<sup>Y</sup> преобразования

Вычисленные количества cAMP наносили на график против концентрации соединения с использованием нелинейной регрессии по четырем параметрам

Результат.

Таблица 10

	EC <sub>50</sub> (нМ)			
	0%	4%	10%	600 мкЛ BSA
	Плазма	Плазма	Плазма	
Серелаксин	8	0,3	0,4	0,7
FA-Серелаксин (Пр. 29а)	100	11	15	15

### In vivo анализ.

Соединения (серелаксин и конъюгаты серелаксина) могут быть испытаны в различных моделях грызунов для оценки кратковременных и длительных сердечно-сосудистых ответов.

Кратковременные модели - мышей (любого штамма, но DBA/2 предпочтительны) или крыс (любого штамма, но Sprague-Dawley предпочтительны) анестезируют ингаляцией изофлурана, поддерживая при стабильном хирургическом уровне анестезии ~2% изофлурана в 100% кислорода, и ректальную температуру поддерживают на нормальном уровне. Сонную артерию и яремную вену (мыши) или бедренную артерию и вену (крысы) открывают через налагаемые сверху разрезы кожи и осуществляют катетеризацию сосудов. Артериальный катетер соединяют с датчиком давления и сигнал направляют в систему сбора цифровых данных (например, Ropemah) для непрерывного измерения артериального давления и частоты сердечных сокращений. Альтернативно, частоту сердечных сокращений отслеживают по сигналам электрокардиограммы, регистрируемым через подкожно введенные игольчатые электроды. После стабилизации

артериального давления и частоты сердечных сокращений вводят коктейль автономных блокирующих агентов (например, атропина и пропранолола, при 2 мг/кг каждого) внутривенно в течение ~3-4 мин. Когда сердечно-сосудистые параметры снова

стабилизируются, вводят серелаксин или конъюгаты серелаксина в виде внутривенной болюсной инъекции в течение ~ 3 секунд. Релаксин вызывает повышение частоты сердечных сокращений с характеристическим медленным началом (максимальный ответ через ~6 мин) и устойчивой продолжительностью действия (часы). У этих же животных измеряют функцию желудочков сердца (например, фракцию выброса, фракцию укорочения, минутный объем сердца)

путем получения серийных эхокардиограмм, которые анализируют онлайн.

Долгосрочные модели - Мышей (любого штамма, но DBA/2 предпочтительны) или крыс (любого штамма, но Sprague-Dawley предпочтительны) анестезируют ингаляцией изофлурана и

поддерживают при стабильном хирургическом уровне анестезии ~2% изофлурана в 100% кислорода. Аналгетики вводят непосредственно перед и после операции. Артерию и вену канюлируют, как описано выше, но катетеры выводят наружу через дорсальный участок кожи, промывают гепаринизированным солевым раствором и закупоривают стержнем из нержавеющей стали. Подкожный катетер также может быть имплантирован подкожно мышам и выведен наружу аналогичным образом. У крыс катетеры направляют через пружинно/поворотную систему. В день испытания артериальные катетеры соединяют с датчиками давления, автономную блокаду осуществляют, как описано выше, за исключением того, что блокирующие агенты также можно вводить через подкожный катетер, в случае мышей, и блокаду у обоих видов поддерживают затем путем непрерывных внутривенных или подкожных инфузий автономных агентов. Артериальное давление и частоту сердечных сокращений отслеживают непрерывно, используя систему сбора цифровых данных. После стабилизации артериального давления и частоты сердечных сокращений вводят автономные блокирующие агенты внутривенно или подкожно в течение ~3-4 мин. Когда сердечно-сосудистые параметры снова стабилизируются, вводят серелаксин или конъюгаты серелаксина в виде внутривенной болюсной инъекции в течение ~3 с. Для оценки функции желудочков сердца и частоты сердечных сокращений в течение нескольких недель у мышей или крыс вводят конъюгаты серелаксина через подкожную инъекцию 1-3 раза в неделю и серийные эхокардиограммы получают на базовой линии и через неделю.

### Источник серелаксина.

Серелаксин (рекомбинантный одноцепочный человеческий релаксин); Connetics corporation, lot # 00L605; 1,0 мг/мл (5-мл флакон) в 20 нМ Na ацетатного буфера (рН 5,0). Разбавление исходного раствора в носителе до желаемой концентрации серелаксина для каждой дозы.

Активность и стабильность в плазме PIP конъюгата примера 30 можно определить следующими *in vitro* и *in vivo* способами, описанными ниже.

### Анализ глюкоза-стимулированной секреции инсулина (GSIS).

GSIS тест осуществляли путем измерения *in vivo* функции бета-клеток поджелудочной железы после введения рекомбинантного человеческого пролактин-индуктируемого белка (hPIP) страдающим алиментарным ожирением (DIO) мышам. Вкратце, мыши ( $m=5-7/\text{группа}$ ) голодали в течение ночи (5:00 ч вечера-8:00 ч утра), и в день испытания определяли массу тела и уровни глюкозы в крови (уровни глюкозы в крови, определенные при помощи глюкометров Embrace), и это обозначали как начальную временную точку. Затем мышам вводили hPIP (нативный и FA-конъюгированный PIP; раствор в PBS; вводимый при 4 мл/кг массы тела) или носитель-контроль (PBS) один раз внутривенно (в/в). Через 45 мин после введения hPIP всем мышам вводили перорально глюкозу (3 г/кг декстрозы; раствор в PBS; вводимый при 4 мл/кг массы тела). Уровни глюкозы в крови измеряли непосредственно перед глюкозной нагрузкой (обозначали как временная точка 0 мин) и через 15 и 30 мин после введения глюкозы. Образцы крови собирали для выделения плазмы и осуществляли измерения уровня инсулина в плазме в точках времени 0, 15 и 30 мин после введения глюкозы.

### Фармакокинетический (PK) анализ.

Содержание hPIP в плазме измеряли у DIO мышей после введения разовой внутривенной дозы.

Вкратце, DIO мышам (n=2), имеющим свободный доступ к пище, вводили hPIP (нативный и FA-конъюгированный PIP; раствор в PBS; вводимый при 4 мл/кг массы тела) один раз внутривенно (в/в). Образцы крови собирали и выделяли плазму через 0,25, 0,5, 1, 3, 7, 24 и 48 ч после введения дозы и осуществляли на месте ELISA анализ (протокол показан ниже).

Анализ включал следующие стадии:

Планшеты покрывали в течение ночи при комнатной температуре hPIP антителом 30 мкл (обозначено как PIP-8-AB; получено на месте; NBS клон # 87.19G9A11, при 8 мкг/мл в PBS).

Аспирировали перед блокированием в течение 2 ч 100 мкл блокирующим реагентом.

Аспирировали и добавляли 30 мкл образцы для инкубирования в течение 2 ч, образцы и стандарты разбавляли в казеиновом буфере (1% казеина, 1,7 mM фосфата натрия одноосновного, 8,1 mM фосфата натрия двухосновного гептагидрата, 0,15 M хлорида натрия, 0,7% Triton X-100 и 0,1% азота натрия).

Планшеты промывали 3× 100 мкл промывочным буфером Teknova (0,05% Tween в PBS) 30 мкл биотинилированного PIP антитела (обозначено как PIP-6 Ab; получено на месте, MBS клон # 87.8C6B3, при 10 мкг/мл в казеиновом буфере) и инкубировали в течение 1 ч.

Промывали, как указано выше.

Добавляли 30 мкл стрептавидин-HRP (Pierce Cat. No. 21140, при 0,4 мкг/мл в HRP буфере); HRP буфер (0,4% казеина, 1,7 mM фосфата натрия одноосновного, 8,1 mM фосфата натрия двухосновного гептагидрата, 0,15 M хлорида натрия и 0,1% хлорацетамида); инкубировали 30 мин.

Промывали, как указано выше.

Добавляли 30 Femto хемилуминесцентный субстрат (Thermo Cat. No. 34096) и сразу считывали.

Активность и стабильность конъюгата PIP-жирная кислота по настоящему изобретению в соответствии с анализами, описанными выше, показаны в табл. 11.

Таблица 11

Пептид	Уровень инсулина в плазме AUCB (нг/мл*мин) **	Стабильность в плазме in vivo $t_{1/2}$ [час]	$C_{max}$ (нМ)	MRT (час )
Пример 30	+75%	--13,8-	497,1	18,1
Неконъюгированный PIP	+29%	--18,0-	219,8	12,0

\*\*По сравнению с носителем.

Конъюгат PIP-жирная кислота по настоящему изобретению имел продолжительную стабильность в плазме, приводящую к лучшей эффективности.

Активность и стабильность в плазме NPFF конъюгата примера 31 можно определить следующими in vitro способами, описанными ниже.

Протокол cAMP анализа с использованием Cisbio cAMP набора.

NPFF-FA конъюгат по настоящему изобретению испытывали в присутствии форсколина в анализе, описанном ниже.

## Реагенты/материалы.

	Поставщик	Cat#	Условия хранения (Исходный материал)
Greiner 384-луночный планшет с прозрачным дном, предварительно покрытый полиэтиленом	Greiner Bio-One	781944	
cAMP набор	Cisbio	62AM4PEJ	4°C/-20°C
DMSO	Sigma	D2650	
cAMP стандартный раствор (1,12 мМ в аналитическом буфере+IBMX)	Sigma	A9501	-80°C
Форсколиновый 5 мМ исходный раствор (DMSO)	Sigma	F6886	-20°C
IBMX 250 мМ исходный раствор (DMSO)	Sigma	I5879	-20°C
HBSS	Invitrogen	14175-095	комнатная температура
HEPES	invitrogen	15630-080	комнатная
			температура
PTX (коклюшный токсин)	Sigma	P2880	-20°C
BSA свободная жирная кислота (30%)	Sigma	A9205	4°C

## День 1:

Клетки высеваются в 384-луночный планшет.

Следуют "протоколу субкультивирования".

1. Получают питательную среду без антибиотиков (если необходимо).
2. Уравновешивают колбу с питательной средой без антибиотиков на водяной бане 37°C после спрыскивания 70% этанолом.
3. Отделяют клетки при помощи Versene (3 мл на Т.75 колбу).
4. Переносят в 50-мл пробирку Falcon, содержащую 17 мл питательной среды.
5. Центрифицируют 4 мин при 150g.
6. Ресуспенсионируют клеточный осадок в 10 мл стимуляционного буфера. Подсчитывают количество клеток.
7. Получают клеточную суспензию в питательной среде с антибиотиками при 5000 клеток/50 мкл.
8. Высевают 50 мкл клеточной суспензии с использованием 384-125 мкл пипетки Viaflow.
9. Выдерживают планшеты под ТС колпаком в течение 15 мин.
10. Инкубируют при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 90% влажности.

## День 2:

Получение растворов реагентов.

## 1. Аналитический буфер:

500 мл HBSS+10 мл HEPES. Хранят при комнатной температуре. Аналитический буфер: 250 мл HBSS/HEPES+250 мкл IBMX 1000X раствор + 0,1% BSA (825 мкл). Ежедневно получают свежий.

2. Раствор форсколина 2Х: конечная концентрация в анализе 1 мкM:  
для разведения соединений: 40 мкл FSK/100 мл аналитического буфера;  
для разведения NPFF: 10 мкл DMSO/10 мл 2Х FSK.
3. Разведение NPFF: исходный раствор 1 мМ в dH<sub>2</sub>O - конечная концентрация в анализе 1 мкM:  
a) 5 мкл исходного раствора/625 мкл FSK 2Х/DMSO;  
b) 100 мкл раствора a+300 мкл FSK 2Х/DMSO. Конечная концентрация в анализе 1 мкM;  
c) осуществляют 10 стадий разведений 1/4: 100 мкл+300 мкл в FSK 2Х/DMSO.
4. Разведение соединений: исходный раствор 10 мМ в DMSO - Конечная концентрация в анализе

40 мкМ:

- a) 5 мкл исходного раствора/625 мкл FSK 2X;
- b) осуществляют 11 стадий разведений 1/4: 100 мкл+300 мкл FSK 2X.

5. сAMP стандарт:

- a) 10 мкл исходного раствора сAMP стандарта (1,12 мМ)+90 мкл аналитического буфера;,,
- b) 10 мкл разведения (а)+90 мкл стимуляционного буфера;
- c) 20 мкл разведения (b)+428 мкл стимуляционного буфера: 500 нМ;
- d) Осуществляют 11 разведений  $\frac{1}{2}$ , начиная с разведения (c): 100 мкл разведения (c)+100 мкл стимуляционного буфера.

6. Реагенты для детекции сAMP:

- a) d2-сAMP: 1000 мкл/20 мл лизисного буфера) (250 мкл/5 мл для одного 384-луночного планшета);
- b) конъюгат криптата: 1000 мкл/20 мл лизисного буфера. (250 мкл/5 мл для одного 384-луночного планшета).

Процедура анализа.

Стадия 1:

1. Получают стимуляционный буфер.
2. Выдерживают Cisbio лизисный буфер при комнатной температуре.
3. Подготавливают WellMate (промывают 70% спиртом, затем dH<sub>2</sub>O и HBSS/HEPES).
4. Подготавливают разведения форсколина и соединений.

Стадия 2: Стимуляция форсколином.

1. Промывают клетки при помощи 50 мкл стимуляционного буфера:
- a) осторожно встряхивают планшеты для удаления O/N среды;
- b) сверху планшет покрывают белым бумажным полотенцем и центрифицируют планшет вверх дном в течение 20 с при 300 об/мин с использованием центрифуги VWR Symphony 4417;
- c) добавляют 50 мкл стимуляционного буфера с использованием WellMate;
- d) осторожно встряхивают планшеты для удаления O/N среды;
- e) сверху планшет покрывают белым бумажным полотенцем и центрифицируют планшет вверх дном в течение 20 с при 300 об/мин с использованием центрифуги VWR Symphony 4417;
- f) клетки проверяют под микроскопом.
2. Добавляют 10 мкл стимуляционного буфера, содержащего IBMX, с использованием Viaflow 384.
3. Добавляют 10 мкл 2× форсколинового раствора, содержащего соединения, с использованием Viaflow 384 (на 7-м уровне). Смешивают раствор перед добавлением к клеткам.
4. Инкубируют 30 мин при комнатной температуре. (Помещают планшет в выдвижной ящик, чтобы избежать изменений температуры).
5. Получают стандартную кривую сAMP и реагенты для детекции сAMP.
6. Добавляют 20 мкл/лунка из стандартной кривой сAMP в планшет стандартной кривой (тот же самый планшет, что и аналитический планшет).

Стадия 3: LANCE сAMP анализ.

1. Добавляют 10 мкл d2 сAMP/лунка в аналитический планшет с использованием Combi 384.
2. Добавляют 10 мкл/лунка конъюгата криптата в аналитический планшет вручную.
3. Герметично закрывают планшет.
4. Инкубируют минимум 1 ч при комнатной температуре (планшет можно считывать в пределах 24 ч).
5. Накладывают пленку на дно планшета.
6. Считывают на Envision program "Cisbio 384 полное plate".
7. См. исходные данные во вспомогательных файлах.
8. Данные анализируют с использованием GraphPad (см. файл во вспомогательных файлах).

Результаты.

Таблица 12

Человеческий R2	0,1% BSA (FFA)	3% BSA (FFA)	0,1% HSA	3% HSA
соединение	IC50 (нМ) n=4	IC50 (нМ) n=4	IC50 (нМ) n=2	IC50 (нМ) n=2
NPFF	0,43 (+/- 0,11)	0,36 (+/- 0,17)	0,63 (+/- 0,25)	1,9 (+/- 1,7)
Пример 31	53,9 (+/-26)	133 (+/-47)	33,5 (+/- 3,11)	98,5 (+/- 19)
Человеческий R1	0,1% BSA (FFA)	3% BSA (FFA)	0,1% HSA	3% HSA
соединение	IC50 (нМ) n=4	IC50 (нМ) n=4	IC50 (нМ) n=2	IC50 (нМ) n=2
NPFF	6,23 (+/- 3,3)	7,2 (+/- 6,0)	8,4 (+/- 0,6)	33,4 (+/- 29)
Пример 31	>1000	>4000	620 (+/- 142)	>4мКМ

Активность и стабильность в плазме конъюгата по настоящему изобретению, где биомолекула представляет собой кирНК, можно определить следующими *in vivo* способами, описанными ниже.

#### Способы.

Конъюгат примера 24 представляет собой соединение APOC3 кирНК, конъюгированной с GalNAc (ссылочный пример 3) и жирной кислотой. Трансгенных мышей с человеческим APOC3 (B6; CBA-Tg(APOC3)3707Bres/J) закупали у Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Мыши получали стандартный корм для грызунов и воду *ad libitum* в условиях 12-часового цикла свет/темнота. В этих условиях у APOC3 трансгенных мышей спонтанно развивалась гипертриглицеридемия с заметным повышением уровня триглицеридов в плазме (Aalto-Setala K., J. Clin. Invest. 1992). Четырем мышам в каждой группе подкожно вводили либо соединение ссылочного примера 3 (APOC3 кирНК-GalNAc), либо конъюгат примера 24 при дозе 25 мг/кг массы тела. Кровь собирали в начальной точке времени непосредственно перед инъекцией и через 2, 4, 7 и 14 дней после инъекции. Плазму использовали для измерения уровней человеческого APOC3 белка при помощи HTRF анализа от Cisbio. Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) использовали для сравнения статистической разницы между группами.

#### Результаты.

Исходные уровни в плазме APOC3 были  $176 \pm 21$  мг/дл и  $178 \pm 9$  мг/дл в группе введения соединения ссылочного примера 3 и в группах введения конъюгата 24 соответственно. Соединение ссылочного примера 3 снижало зависимым от времени образом уровни в плазме APOC3 на 56% через пять дней после введения дозы по сравнению с исходными уровнями. В сравнении с этим конъюгат примера 24 снижал уровни в плазме APOC3 более эффективно, с 80% снижением через пять дней после введения дозы (см. фигуру). Продолжительность действия была одинаковой для обоих соединений как ссылочного примера 3, так и примера 24, как показано на фигуре.

Конъюгат по настоящему изобретению имеет стабильность в плазме по меньшей мере 5 ч, по меньшей мере 10 ч, по меньшей мере 20 ч, по меньшей мере 30 ч, по меньшей мере 40 ч или по меньшей мере 50 ч. В одном варианте осуществления улучшение стабильности в плазме по сравнению с неконъюгированной биомолекулой является по меньшей мере 2-кратным, 5-кратным, 10-кратным, 20-кратным, 30-кратным, 40-кратным, или 50-кратным, или 75-кратным.

#### Комбинированная терапия.

Конъюгат по настоящему изобретению можно вводить либо одновременно с введением, либо до, либо после введения одного или нескольких других терапевтических средств. Конъюгат по настоящему изобретению можно вводить отдельно тем же самым или другим путем введения или вместе в одной и той же фармацевтической композиции с другими средствами.

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает продукт, включающий конъюгат любого из предшествующих вариантов осуществления или смесь конъюгатов, описанную в вариантах осуществления 10 и 13, и по меньшей мере одно другое терапевтическое средство, в виде комбинированного препарата для одновременного, раздельного или последовательного применения в терапии. В одном варианте осуществления терапия представляет собой лечение метаболических расстройств или заболеваний, сахарного диабета 2 типа, ожирения, дислипидемии, повышенных уровней глюкозы, повышенных уровней инсулина и диабетической нефропатии у субъекта, нуждающегося в этом, включающее введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата по настоящему изобретению или его амида, сложного эфира или соли, где биомолекула представляет собой человеческий фактор дифференциации роста 15 (GDF15), его гомологи, варианты, мутанты, фрагменты и другие модифицированные формы.

Продукты, обеспечиваемые в виде комбинированного препарата, включают композицию, вклю-

чающую конъюгат в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления и другое терапевтическое средство(средства) вместе в одной и той же фармацевтической композиции или конъюгат в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления и другое терапевтическое средство(средства) в отдельных формах, например в виде набора.

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую конъюгат в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления или смесь конъюгатов в соответствии с вариантом осуществления 10 или 13 и другое терапевтическое средство(средства). Необязательно, фармацевтическая композиция может включать фармацевтически приемлемый эксципиент, описанный выше.

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает набор, включающий две или более отдельные фармацевтические композиции, по меньшей мере одна из которых содержит конъюгат в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления. В одном варианте осуществления набор включает средства для содержания указанных композиций по отдельности, такие как контейнер, разделенная на отдельные части бутыль или разделенная на отдельные части упаковка из фольги. Примером такого набора является блистерная упаковка, типично используемая для упаковки таблеток, капсул и т.п.

Набор по настоящему изобретению можно использовать для введения различных лекарственных форм, например пероральных, подкожных и парентеральных, для введения отдельных композиций с разными интервалами дозирования или для титрования отдельных композиций против друг друга. В помощь пациенту для соблюдения им режима приема средства набор по настоящему изобретению типично включает инструкции по введению.

В комбинированных терапиях в соответствии с настоящим изобретением конъюгат по настоящему изобретению и другое терапевтическое средство могут быть получены и/или сформулированы одним и тем же или разными изготовителями. Более того, конъюгат по настоящему изобретению и другое терапевтическое средство можно объединить вместе в виде комбинированной терапии: (i) до отпуска комбинированного продукта лечащим врачам (например, в случае набора, включающего конъюгат по настоящему изобретению и другое терапевтическое средство); (ii) самими лечащими врачами (или под руководством лечащего врача) непосредственно перед введением; (iii) самими пациентами, например, при последовательном введении конъюгата по настоящему изобретению и другого терапевтического средства.

Изобретение также обеспечивает применение конъюгата в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления для лечения заболевания или состояния, описанного в настоящем документе, где пациент перед этим (например, в пределах 24 ч) принимал другое терапевтическое средство. Изобретение также обеспечивает применение другого терапевтического средства для лечения заболевания или состояния, описанного в настоящем документе, где пациент перед этим (например, в пределах 24 ч) принимал конъюгат в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления.

Термин "в комбинации с" вторым средством или лечением включает совместное введение конъюгата по настоящему изобретению (например, конъюгата в соответствии с любым из предшествующих вариантов осуществления или конъюгата, описанного в настоящем документе) со вторым средством или лечением, введение сначала соединения по настоящему изобретению, затем второго средства или лечения, сначала введение второго средства или лечения, затем конъюгата по настоящему изобретению.

Термины "второе средство" и "сопутствующее средство" используют взаимозаменяемо, и они включают любое средство, которое известно из уровня техники для лечения, профилактики или облегчения симптомов заболевания или расстройства, описанного в настоящем документе, например расстройства или заболевания, выбранного из метаболических расстройств или заболеваний, сахарного диабета 2 типа, ожирения, панкреатита, дислипидемии, алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени/стеатогепатита и других прогрессирующих заболеваний печени, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, метаболического синдрома, гипертензии, сердечно-сосудистого заболевания, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, диабетических осложнений (включая, но не ограничиваясь этим, хронического почечного заболевания), невропатии, гастропареза и других метаболических расстройств.

В одном варианте осуществления терапия представляет собой лечение метаболических расстройств или заболеваний, сахарного диабета 2 типа, ожирения, панкреатита, дислипидемии, алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени/стеатогепатита и других прогрессирующих заболеваний печени, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, метаболического синдрома, гипертензии, сердечно-сосудистого заболевания, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, диабетических осложнений (включая, но не ограничиваясь этим, хронического почечного заболевания), невропатии, гастропареза и других метаболических расстройств у субъекта, нуждающегося в этом, включающее введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата по настоящему изобретению или его амида, сложного эфира или соли, где биомолекула представляет собой человеческий фактор дифференциации роста 15 (GDF15), его гомологи, варианты, мутанты, фрагменты и другие модифицированные формы.

Примеры вторых средств для комбинирования с конъюгатом по настоящему изобретению, где био-

молекула представляет собой человеческий фактор дифференциации роста 15 (GDF15), его гомологи, варианты, мутанты, фрагменты и другие модифицированные формы; включают:

1) антидиабетические средства, такие как инсулин, производные и миметики инсулина; средства, повышающие секрецию инсулина, такие как соединения сульфонилмочевины (например, хлорпропамид, толазамид, ацетогексамид, толбутамид, глибурид, глимепирид, глипизид); глибурид и амарил; лиганды инсулинотропного сульфонилмочевинного рецептора, такие как меглитиниды, например натеглинид и репаглинид; тиазолидиндионы (например, розиглитазон (AVANDIA), троглитазон (REZULIN), пиоглитазон (ACTOS), балаглитазон, ривоглитазон, нетоглитазон, троглитазон, энглитазон, циглитазон, адаглитазон, дарглитазон), которые усиливают действие инсулина (например, путем сенсибилизации инсулина), таким образом промотируя утилизацию глюкозы в периферических тканях; ингибиторы протеинкиназы-3инфосфатазы-1В (PTP-1В), такие как PTP-112; ингибиторы белка переноса холестерилового эфира (CETP), такие как торцетрапиб, ингибиторы GSK3 (киназы-3 гликогенсинтазы), такие как SB-517955, SB-4195052, SB-216763, NN-57-05441 и NN-57-05445; лиганды RXR, такие как GW-0791 и AGN-194204; ингибиторы натрий-зависимого котранспортера глюкозы, такие как T-1095; ингибиторы гликогенинфосфорилазы А, такие как BAY R3401; бигуаниды, такие как метформин и другие средства, которые действуют как промоторы утилизации глюкозы, как снижающие продукцию глюкозы печенью и/или как снижающие всасывание глюкозы в кишечнике; ингибиторы альфа-глюкозидазы, такие как акарбоза и миглитол, и другие средства, которые замедляют расщепление углеводов и, следовательно, абсорбцию из кишечника и уменьшают постпрандиальную гипергликемию; GLP-1 (глюкагон-подобный пептид-1), аналоги GLP-1, такие как эксендин-4 и GLP-1 миметики; и ингибиторы DPPIV (дипептидилпептидазы IV), такие как вилдаглиптин;

2) гиполипидемические средства, такие как ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил кофермент-А (HMG-CoA) редуктазы, например ловастатин, питавастатин, симвастатин, правастатин, церивастатин, мевастатин, велостатин, флувастиatin, далвастиatin, аторвастиatin, розувастиatin и ривастиatin; ингибиторы скваленсингтазы; лиганды FXR (фарнезоидный X-рецептор) и LXR (печеночный X рецеptор); средства, усиливающие секрецию желчных кислот, такие как холестирамин и колесевелам; фибраты; никотиновая кислота и аспирин;

3) средства от ожирения, такие как орлистат или римонабант, фентермин, топирамат, хинекса и локасерин;

4) антигипертензивные средства, например петлевые диуретики, такие как этакриновая кислота, фуросемид и торсемид; ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (ACE), такие как беназеприл, каптоприл, эналаприл, фосиноприл, лизиноприл, моексиприл, перинодоприл, хинаприл, рамиприл и трандолаприл; ингибиторы Na-K-АТФазного мембранныго насоса, такие как дигоксин; ингибиторы нейтральной эндопептидазы (NEP); ингибиторы ACE/NEP, такие как омапатрилат, сампатрилат и фасидотрил; антагонисты ангиотензина II, такие как кандесартан, эпросартан, ирбесартан, лосартан, телмисартан и валсартан, в частности валсартан; ингибиторы ренина, такие как дитекирен, занкирен, терлакирен, алискирен, RO 66-1132 и RO-66-1168; блокаторы β-адренергических рецепторов, такие как ацебуто-лол, атенолол, бетаксолол, бисопролол, метопролол, надолол, пропранолол, сotalол и тимолол; инотропные средства, такие как дигоксин, добутамин и милринон; блокаторы кальциевых каналов, такие как амлодипин, бепридил, дилтиазем, фелодипин, никардипин, нимодипин, нифедипин, низолдипин и верапамил; антагонисты рецепторов альдостерона и ингибиторы альдостеронсингтазы;

5) агонисты рецепторов, активируемых пролифератором пероксидом, такие как фенофибрат, пиоглитазон, розиглитазон, тезаглитазар, BMS-298585, L-796449, соединения, конкретно описанные в патентной заявке WO 2004/103995, т.е. соединения примеров 1-35 или соединения, конкретно перечисленные в п.21 формулы изобретения, или соединения, конкретно описанные в патентной заявке WO 03/043985, т.е. соединения примеров 1-7, или соединения, конкретно перечисленные в п.19 формулы изобретения, и особенно(R)-1-{4-[5-метил-2-(4-трифторметилфенил)оксазол-4-илметокси]бензол-сульфонил}-2,3-дигидро-1Н-индол-2-карбоновая кислота или ее соль; и

6) конкретные антидиабетические соединения, описанные в Expert. Opin. Investig. Drugs, 2003, 12(4):623-633, figures 1-7.

Кроме того, настоящее раскрытие предусматривает комбинированную терапию со средствами и методами, способствующими снижению массы тела, такими как средства, которые стимулируют метabolизм или снижают аппетит, и модифицированные диеты и/или физические нагрузки, способствующие снижению массы тела.

## Примеры

### Аббревиатуры

ACN	Ацетонитрил
ВЕН	Этиленовый мостиковый гибрид
BOC	трет-Бутилоксикарбонил
BSA	Бычий сывороточный альбумин
DCM	дихлорметан
DCC	N,N'-дициклогексилкарбодииimid
DIC	N,N'-Дизопропилкарбодииimid
DIPEA	N,N'-Дизопропилэтамин
DMAP	Диметиламинопиридин
DMF	N,N'-Диметилформамид
DTT	Дитиотреитол
DOT	3, 6-Диокса-1, 8-октандитиол
EDC	1-Этил-3-(3- диметиламинопропил) карбодииим ид
EDTA	этилендиаминетрауксусная кислота
ESI	ионизация электрораспылением
FFA	флуоресцентный анализ фокусов
Fmoc	флуоренилметилоксикарбонилхл орид
HCTU	O- (6-Хлорбензотриазол-1-ил) - N,N,N',N'-тетраметилуроний гексафторфосфат
HEP	Гептан
HFIP	Гексафторизопропанол
ВЭЖХ	Высоко-эффективная жидкостная хроматография
HRMS	масс-спектрометрия высокого разрешения
НОВТ	Гидроксибензотриазол
HS	Человеческая сыворотка
ЖХ/МС	жидкостная хроматография/масс- спектрометрия
MS	Масс-спектрометрия
MW	молекулярная масса
MRT	среднее время удержания
NHS	N-гидроксисукцинimid
NMM	N-метилморфолин
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
ПЭГ	полиэтиленгликоль
pE	Пироглутамат
Pbf	2,2,4,6,7- Пентаметилдигидробензоуран-

	5-сульфонил
PG	защитная группа
PK	Фармакокинетика
Pol	Полимерная подложка
QTOF	Квадрупольный времязпролетный масс-спектрометр
Rt	время удерживания
Rt или RT	комнатная температура
Об/мин	оборотов в минуту
п/к	под кожный
SFC	сверхкритический жидкостный
SPPS	твердофазный                    пептидный синтез
TBME	метил трет-бутиловый эфир
Trt	тритил
THF	тетрагидрофуран
TEA	триметиламин
TIS	триэтилсилан
т, с, квинт., шир., м, д	(триплет, синглет, квинтет, широкий, мультиплет, дублет)
UPLC	сверхэффективная жидкостная хроматография

Синтез.

Описанные ЖХ/МС способы.

Способ А	
Колонка	Acquity BEH 1,7мкм 2,1×50мм
Температура колонки	50°C
Элюенты	A: Вода (0,1% муравьиной кислоты); B: ACN (0,1% муравьиной кислоты)
Скорость потока	1 мл/мин
Градиент	0 мин 2% B; 2% до 98% B в течение 1,7 мин; 2,06 мин 98% B; 2,16 мин 2% B
Масс-спектрометр	Одноквадрупольный ESI диапазон сканирования 120-1600

UPLC	Waters Acquity
<b>Способ В</b>	
Колонка	Acquity BEH 1,7 мкм 2,1 × 50ММ
Температура колонки	50°C
Элюенты	A: Вода (0,1% муравьиной кислоты); B: ACN (0,1% муравьиной кислоты)
Скорость потока	1 мл/мин
Градиент	0 мин 40% B; 40% до 98% B в течение 1,40 мин; 2,05 мин 98% B; 2,1 мин 40% B
Масс-спектрометр	Одноквадрупольный ESI диапазон сканирования 120-1600
UPLC	Waters Acquity
<b>Способ С</b>	
Колонка	XBridge C18, 3,5 мкм, 3,0×30ММ
Температура колонки	40°C
Элюенты	A: Вода (0,1% муравьиной кислоты); B: ACN
Скорость потока	2 мл/мин
Градиент	0 мин 40% B; 40% до 95% B в течение 1,70 мин; 2,0 мин 95% B; 2,1 мин 40% B
Масс-спектрометр	Одноквадрупольный ESI диапазон сканирования 150-1600
ВЭЖХ	Agilent 1100 series
<b>Способ D</b>	
Колонка	Hilic 2,1×100мм
Температура колонки	55°C
Элюенты	A: CO <sub>2</sub> B: MeOH
Скорость потока	2 мл/мин
Градиент	0,15 мин 2% B; 2% до 50% B в течение 1,5

	мин; 2,1 мин 50% В; 2,25 мин 2% В; 2,5 мин 2% В
Масс-спектрометр	Одноквадрупольный ESI
SCF	Waters Acquity
<b>Способ Е</b>	
Колонка	Proswift Monolith 4,6×50мм
Температура колонки	50°C
Элюенты	A: Вода (0,1% муравьиной кислоты); B: ACN (0,1% муравьиной кислоты)
Скорость потока	1 мл/мин
Градиент	0,7 мин 2% В; 2% до 60% В в течение 12,8 мин; 14 мин 60% В; 14,2 мин 2% В
Масс-спектрометр	Qtof ESI диапазон сканирования 600-3500; деконволюция при помощи Max Ent 1 в пакете программ Mass Lynx
UPLC	Waters Acquity

ВЭЖХ - Аналитический способ F.

Колонка: XBridge BEH300 C18 (100×4,6 мм), 3 мкм; Part n°: 186003612.

Элюент A: 0,1% TFA в воде; Элюент B: 0,1% TFA в ACN.

Скорость потока: 1,0 мл/мин.

Температура: 40°C.

Градиент:

Время [мин]	A [%]	B [%]
0,0	98	2
18	2	98
20	2	98
22	98	2

UPLC-HRMS - Аналитический способ G:

Waters Acquity UPLC® BEH C18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм; Part n°: 186002350.

Элюент A: 0,05% FA + 3,75 мМ ацетата аммония в воде; Элюент B: 0,04% FA в ACN.

Скорость потока: 1,0 мл/мин.

Температура: 50°C.

Градиент: 2 до 98% в течение 4,4 мин.

Способ H: LC-MS способ:

ВЭЖХ: Подвижная фаза A: 2% HFIP +0,1% TEA; Подвижная фаза B: метанол.

Градиент: 0 мин 95% A, 4 мин 75% A, 8 мин 10% A, 8,1 мин 95% A, 10 мин 95% A.

Скорость потока: 250 мкл/мин.

Колонка: Acquity UPLC BEH C18, 1,7 мкм, 2,1×50 мм (Waters).

Температура колонки: 75°C.

MS: QTOF (Waters) отрицательный режим.

ESI: 2,9 кВ.

Температура капилляра 350°C.

Распыляющий газ: 600 мл/мин.

Температура источника: 150°C.

Способ I: LC-MS способ:

Подвижная фаза A: вода + 0,1% муравьиной кислоты.

Подвижная фаза B: ацетонитрил + 0,1% муравьиной кислоты.

Градиент: 0 мин 98% A, 0,06 мин 98% A, 1,76 мин 2% A, 2,06 мин 2% A, 2,16 мин 98%.

Скорость потока: 1 мл/мин.

Колонка: ACQUITY UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 мкм, 2,1×50 мм.

Температура колонки: 50°C.

Детектор: УФ/Vis/CAD (детектор заряженных аэрозолей).

**Способ J: UPLC HRMS способ:**

Колонка: Acquity BEH300 C4 1,7 мкм, 2,1×50 мм.

Элюент А: вода (0,1% TFA).

Элюент В: ACN (0,1% TFA).

Скорость потока: 0,5 мл/мин.

Температура: 40°C.

Градиент: 20% удерживание 0,5 мин, линейное изменение до 80% ACN в течение 10 мин.

**Способ K:**

Колонка: Waters Protein BEH C4, 300 Å, 3,5 мкм, 4,6×100 мм.

Подвижная фаза: А: вода (0,05% TFA), В: ACN (0,05% TFA).

Скорость потока: 2 мл/мин.

Температура: 40°C.

Градиент: удерживание 25% В в течение 1 мин, линейное изменение 25-60% ACN к 10 мин, линейное изменение до 95% В к 10,50 мин и удерживание в течение 2 мин, затем уравновешивают при 25% в течение 2 мин.

Общее время цикла: 15 мин.

Масс-спектрометр: Waters ZQ mass spec.

UPLC: Колонка: BEH C4, 300 Å, 1,7 мкм, 2,1×50 мм.

**Способ L:**

Колонка: Proswift Monolith 4,6×50 мм.

Подвижная фаза: А: вода (0,1% муравьиной кислоты), В: ACN (0,1% муравьиной кислоты).

Скорость потока: 1 мл/мин.

Температура: 50°C.

Градиент: 0 мин 3% В; 3% до 80% В в течение 2 мин; 2,1 мин 10% В; 2,8 мин 95% В; 2,9 мин 3% В.

Масс-спектрометр: Qtof ESI диапазон сканирования 100-1900; деконвульяция при помощи Max Ent 1 в пакете программ Mass Lynx.

UPLC: Waters Acquity..

Способ M	
Колонка	Acquity BEH 1,7 мкм 2,1 × 50ММ
Температура колонки	50°C
Элюенты	А: Вода (0,1% муравьиной кислоты); В: ACN (0,1% муравьиной кислоты)
Скорость потока	1 мл/мин
Градиент	0 мин 2% В; 2% до 98% В в течение 4,40 мин; 5,15 мин 98% В; 5,19 мин 2% В
Масс-спектрометр	Одноквадрупольный ESI диапазон сканирования 120-1600
UPLC	Waters Acquity

<b>Способ N</b>	
Колонка	Sunfire 30×50 мм 5 мкм
Элюенты	A: Вода (0,1% TFA); B: ACN (0,1% TFA)
Скорость потока	75 мл/мин
Градиент	5-20% ACN в течение 3,2 мин

<b>Способ O</b>	
Колонка	Acquity BEH 1,7 мкм 2,1×50мм
Температура колонки	50°C
Элюенты	A: Вода (0,1% муравьиной кислоты); B: ACN (0,1% муравьиной кислоты)
Скорость потока	1 мл/мин
Градиент	0 мин 40% B; 40% до 98% B в течение 3,40 мин; 5,15 мин 98% B; 5,19 мин 40% B
Масс-спектрометр	Одноквадрупольный ESI диапазон сканирования 120-1600
UPLC	Waters Acquity

<b>Способ P</b>	
Колонка	Proswift Monolith 4,6×50мм
Температура колонки	50°C
Элюенты	A: Вода (0,1% муравьиной кислоты) B: ACN (0,1% муравьиной кислоты)
Скорость потока	1 мл/мин
Градиент	0 мин 2% B; 2% до 98% B в течение 2 мин; 2,1 мин 98% B; 2,3 мин 2% B; 3,3 мин 2% B
Масс-спектрометр	Qtof ESI диапазон сканирования 100-1900; деконволюция при помощи Max Ent 1 в пакете программ Mass Lynx

UPLC	Waters Acquity
<b>Способ Q</b>	
Колонка	Proswift Monolith 4,6×50мм
Температура колонки	50°C
Элюенты	A: Вода (0,1% муравьиной кислоты); B: ACN (0,1% муравьиной кислоты)
Скорость потока	1 мл/мин
Градиент	0,7 мин 2% B; 2% до 60% B в течение 12,8 мин; 14 мин 60% B; 14,2 мин 2% B
Масс-спектрометр	Qtof ESI диапазон сканирования 600-3500; деконволюция при помощи Max Ent 1 в пакете программ Mass Lynx
UPLC	Waters Acquity
<b>Способ R</b>	
Колонка	Proswift Monolith 4,6×50мм
Температура колонки	50°C
Элюенты	A: Вода (0,1% муравьиной кислоты) B: ACN (0,1% муравьиной кислоты)
Скорость потока	1 мл/мин
Градиент	0 мин 3% B; 3% до 90% B в течение 7 мин; 7,1 мин 15% B; 7,70 мин 95% B; 7,8 мин 3% B
Масс-спектрометр	Qtof ESI диапазон сканирования 100-1900; деконволюция при помощи Max Ent 1 в пакете программ Mass Lynx
UPLC	Waters Acquity

Аналитический способ S:

Колонка XBridge C18, 3,5 мкм, 3,0×3,0 мм.

Элюент: A: вода + 5 мМ гидроксида аммония, B: ACN.

Скорость потока: 2 мл/мин.

Градиент: 0,0 мин 2% B; 2% до 95% B в течение 1,70 мин; 2,00 мин 95% B; 2,10 мин 5% B.

Масс-спектрометр: одноквадрупольный.

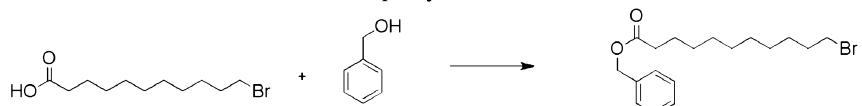
ESI ВЭЖХ: Agilent 1100 series.

Температура: 40°C.

Аналитический способ T:

Колонка	Acquity BEH 1,7 мкм 2,1×50мм
Температура колонки	50°C
Элюенты	A: Вода (0,1% муравьиной кислоты) B: ACN (0,1% муравьиной кислоты)
Скорость потока	1 мл/мин
Градиент	0 мин 5% B; 5% до 60% B в течение 4 мин; 7,2 мин 98% B; 4,5 мин 95% B; 4,6 мин 5% B
Масс-спектрометр	Acquity G2 Xevo QToF-Rs (FWHM) >20000 точность <5 м.д.
UPLC	Waters Acquity

Промежуточное соединение 1. Бензил 11-бромундеканоат:

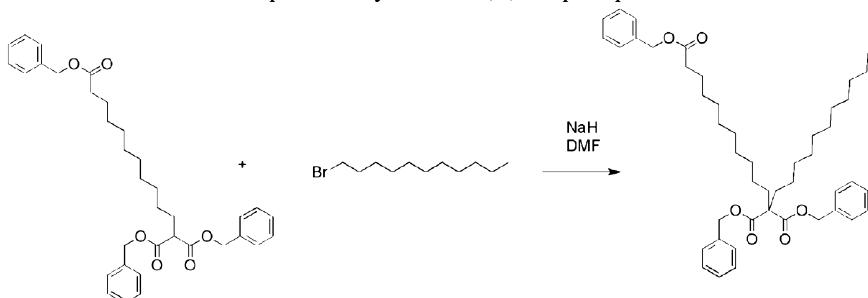


11-Бромундекановую кислоту (4 г, 15,08 ммоль), бензиловый спирт (1,875 мл, 18,10 ммоль) и DMAP (92 мг, 0,754 ммоль) растворяли в DCM в атмосфере N<sub>2</sub> при комнатной температуре. Добавляли EDC-HCl (4,34 г, 22,63 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 17 ч. Реакционную смесь концентрировали с последующим разбавлением при помощи Et<sub>2</sub>O (150 мл). Смесь экстрагировали водой (30 мл) и водную фазу экстрагировали при помощи Et<sub>2</sub>O (150 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором (20 мл) и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель удаляли и остаток очищали колоночной фланш-хроматографией (диоксид кремния 120 г, 0-10% Et<sub>2</sub>O/петролейный эфир) с получением промежуточного соединения 1 в виде бесцветной жидкости (6,75 г, количественный).

ЖХ/МС Способ А Rt=1,79 мин, M+H 355,2;

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 1,18-1,36 (м, 10H), 1,37-1,47 (м, 2H), 1,64 (квинт., J=7,33 Гц, 2H), 1,85 (дт, J=14,56, 7,06 Гц, 2H), 2,35 (т, J=7,58 Гц, 2H), 3,40 (т, J=6,88 Гц, 2H), 5,11 (с, 2H), 7,28-7,45 (м, 5H).

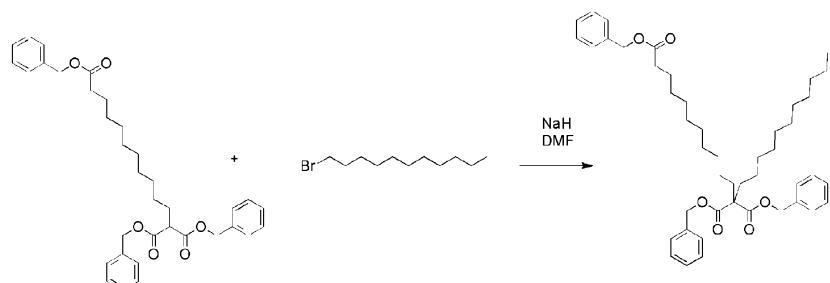
Промежуточное соединение 2. Трибензилундекан-1,1,11-трикарбоксилат:



NaH (113 мг, 2,83 ммоль) суспендировали в DMF (6 мл) в атмосфере N<sub>2</sub> при 0°C. Дибензилмалонат (0,704 мл, 2,82 ммоль) медленно добавляли к перемешиваемой суспензии в течение 30 мин. Добавляли промежуточное соединение 1 (903 мг, 2,54 ммоль), растворенное в DMF (3 мл), и реакционную смесь оставляли для перемешивания при 0°C в течение 2,75 ч, затем давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл) и экстрагировали водой (20 мл). Водную фазу экстрагировали при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл) и объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором (30 мл). Органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали. Концентрат очищали колоночной фланш-хроматографией (диоксид кремния 80 г, 0-10% EtOAc/HEP) с получением бесцветного масла (770 мг, 1,38 ммоль, 34%) с чистотой 70%.

ЖХ/МС Способ В Rt=1,41 мин, M+H 559,6.

Промежуточное соединение 3. Трибензил докозан-1,11,11-трикарбоксилат:

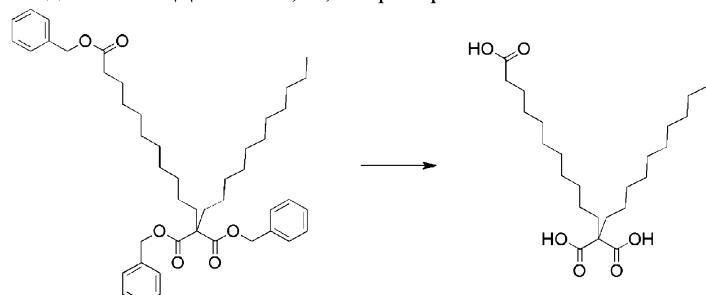


К суспензии NaH (66,1 мг, 1,65 ммоль) в DMF (2 мл) при 0°C в атмосфере N<sub>2</sub> добавляли промежуточное соединение 2 (770 мг, 1,38 ммоль) в DMF (4 мл). Через 35 мин к реакционной смеси добавляли раствор 1-бромундекана (0,338 мл, 1,52 ммоль) в DMF (2 мл), смеси давали нагреться до комнатной температуры после перемешивания в течение 25 мин. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 дней. Реакционную смесь разбавляли при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл) и экстрагировали при помощи 10% LiCl (25 мл). Водную фазу экстрагировали при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл). Объединенные органические слои промывали насыщенным солевым раствором, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и растворитель выпаривали. Очистка остатка колоночной фланш-хроматографией (диоксид кремния 80 г, 0-10% EtOAc/HEP) давала промежуточное соединение 3 в виде бесцветного масла (590 мг, 0,827 ммоль, 33%).

ЖХ/МС Способ В Rt=1,89 мин, M+Na 735,5;

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,87-0,95 (м, 3Н), 1,07 (шир.с, 4Н), 1,14-1,36 (м, 28Н), 1,66 (квинт., J=7,43 Гц, 2Н), 1,85-1,95 (м, 4Н), 2,37 (т, J=7,58 Гц, 2Н), 5,12 (с, 4Н), 5,14 (с, 2Н), 7,27 (д, J=2,32 Гц, 1Н), 7,28-7,43 (м, 14Н).

Промежуточное соединение 4. Докозан-1,11,11-трикарбоновая кислота:

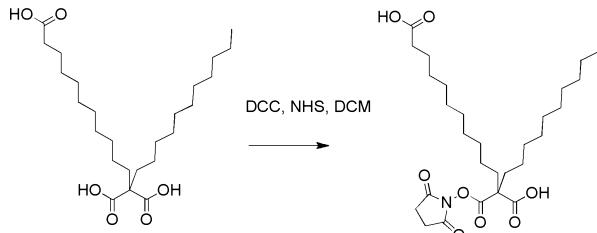


Промежуточное соединение 3 (590 мг, 0,827 ммоль), растворенное в THF (12 мл), объединяли с суспензией 10% Pd на углероде в THF (8 мл). Суспензию перемешивали и помещали в атмосферу водорода (баллон). Через 1 ч реакционную смесь пропускали через мембранный фильтр и твердые вещества промывали при помощи EtOAc. Фильтрат упаривали с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла (353 мг, 0,798 ммоль, 96%).

ЖХ/МС Способ В Rt=1,16 мин, M+H 443,5;

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,77-0,84 (м, 3Н), 1,06-1,33 (м, 32Н), 1,59 (квинт., J=7,18 Гц, 2Н), 1,83-1,92 (м, 4Н), 2,32 (т, J=7,03 Гц, 2Н).

Промежуточное соединение 5. 2-(((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)карбонил)-2-ундекилтридекандиовая кислота:

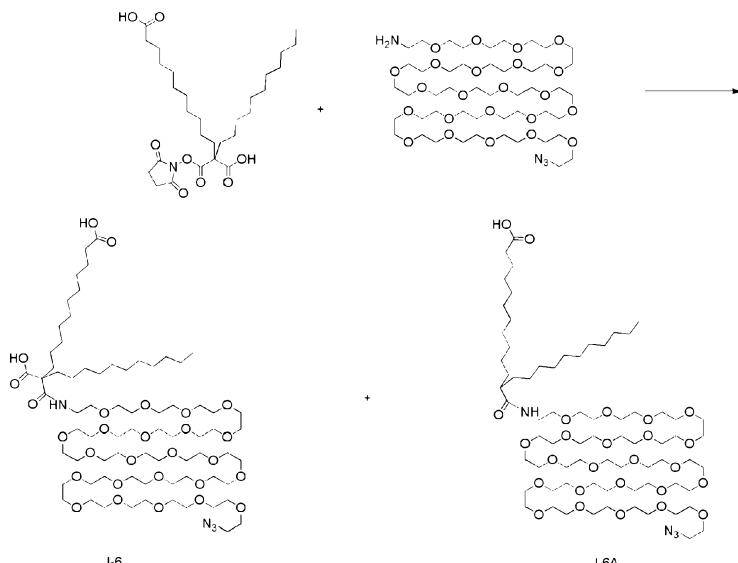


Раствор DCC (126 мг, 0,610 ммоль) в DCM (1,57 мл) добавляли к раствору промежуточного соединения 4 и N-гидроксисукциниимид в DCM (5 мл) и THF (5 мл) в атмосфере N<sub>2</sub>. Через 3,5 ч растворитель выпаривали и остаток очищали сверхкритической жидкостной хроматографией (SFC; Princeton 2-этилпиридин, 20×150 мм, 20-30% MeOH/CO<sub>2</sub>) с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла (138 мг, 0,256 ммоль, 50%).

ЖХ/МС способ В Rt=1,21 мин, M+H 540,5;

<sup>1</sup>Н ЯМР (600 МГц, АЦЕТОНИТРИЛ-d<sub>3</sub>): δ м.д. 0,91 (т, J=7,20 Гц, 3Н), 1,22-1,42 (м, 34Н), 1,57 (квинт., J=7,34 Гц, 2Н), 1,93-1,96 (м, 2Н), 2,28 (т, J=7,47 Гц, 2Н), 2,79 (шир.д, J=6,30 Гц, 4Н).

Промежуточные соединения 6 и 6А. 2-(Азидо-ПЭГ23-карбамоил)-2-ундекилтридекандиовая кислота, конструкция (6) и 12-(азидо-ПЭГ23-карбамоил)триказановая кислота, конструкция (6А):



Промежуточное соединение 5 (36 мг, 0,066 ммоль) и азидо-д-ПЭГ23- $\text{NH}_2$  (Quanta Biodesign: 73 мг, 0,066 ммоль) объединяли в THF (1,5 мл) и смешивали на планшетном шейкере в течение 15 мин перед добавлением DIPEA (17 мкл, 0,10 ммоль). Реакционную смесь оставляли на планшетном шейкере в течение ночи. Растворитель выпаривали и остаток очищали при помощи ВЭЖХ (Sunfire C18 30×50 мм, 55-80% ACN/вода + 0,1% TFA) с получением промежуточного соединения 6 (39 мг, 0,025 ммоль, 38%) и промежуточного соединения 6А (20 мг, 0,013 ммоль, 20%).

ЖХ/МС способ B: Rt=1,11 мин,  $[\text{M}+2\text{H}]^{+2}$  763,4;

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ- $d$ ):  $\delta$  м.д. 0,86-0,93 (м, 3Н), 1,10-1,19 (м, 2Н), 1,20-1,29 (м, 23Н), 1,32 (шир.с, 7Н), 1,58-1,69 (м, 2Н), 1,69-1,79 (м, 2Н), 1,96-2,10 (м, 2Н), 2,35 (т,  $J=7,15$  Гц, 2Н), 3,41 (т,  $J=5,07$  Гц, 2Н), 3,51-3,57 (м, 2Н), 3,58-3,62 (м, 2Н), 3,62-3,73 (м, 90Н), 7,46 (шир.с, 1Н);

ЖХ/МС способ B: Rt=1,23 мин,  $[\text{M}+2]^{+2}$  740,9;

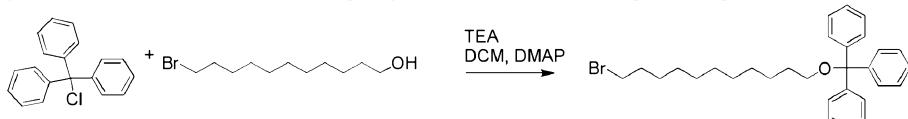
$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ- $d$ ):  $\delta$  м.д. 0,83-0,96 (м, 3Н), 1,27 (шир.с, 25Н), 1,29-1,37 (м, 7Н), 1,37-1,46 (м, 2Н), 1,53-1,73 (м, 4Н), 2,34 (т,  $J=7,21$  Гц, 2Н), 3,41 (т,  $J=5,07$  Гц, 2Н), 3,44-3,52 (м, 2Н), 3,55-3,60 (м, 2Н), 3,60-3,74 (м, 90Н), 6,19-6,30 (м, 1Н).

Альтернативно, конструкцию 6А получали в соответствии со следующей процедурой. Раствор промежуточного соединения 5 (48 мг, 0,042 ммоль) в THF (1 мл) добавляли во флакон, содержащий азидо-ПЭГ23-амин (Quanta Biodesign Cat. No. 10525) (46 мг, 0,042 ммоль). Реакционную смесь встряхивали в течение 20 мин перед добавлением DIPEA (11 мкл, 0,063 ммоль) и затем выдерживали в течение ночи. Добавляли азидо-ПЭГ23-амин (23 мг, 0,021 ммоль) и DIPEA (5 мкл, 0,029 ммоль) и реакционную смесь встряхивали еще в течение одного дня. Растворитель выпаривали и остаток очищали при помощи ВЭЖХ (XBridge C18 30×50 мм, 10-30% ACN/5 mM NH<sub>4</sub>OH). Лиофилизация фракций приводила к смеси продуктов. Это вещество очищали при помощи ВЭЖХ (Sunfire C18 ,30×50 мм, 45-70% ACN/вода + 0,1% TFA) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения 6А (30 мг, 0,020 ммоль, 48%).

ЖХ/МС способ B: Rt=0,81 мин,  $[\text{M}+\text{H}+\text{H}_3\text{O}]^{+2}$  764,5;

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, АЦЕТОНИТРИЛ- $d_3$ ):  $\delta$  м.д. 1,30 (шир.с, 28Н), 1,40-1,50 (м, 2Н), 1,50-1,62 (м, 6Н), 2,14 (т,  $J=7,52$  Гц, 2Н), 2,23-2,35 (м, 3Н), 3,32 (кв.,  $J=5,58$  Гц, 2Н), 3,37-3,43 (м, 2Н), 3,47-3,52 (м, 2Н), 3,53-3,68 (м, 90Н), 6,54 (шир.с, 1Н).

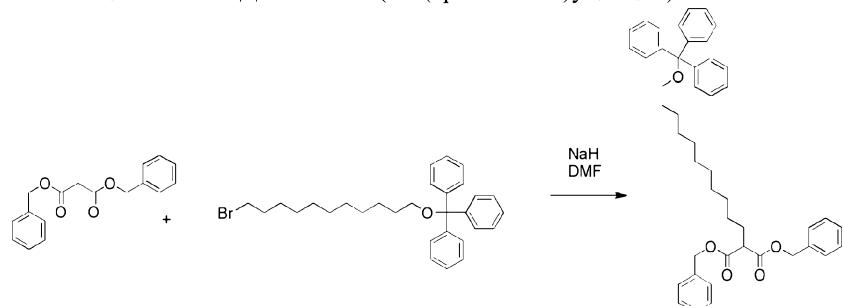
Промежуточное соединение 7. (((11-Бромундекил)окси)метантирил)трибензол:



Тритилхлорид (2,49 г, 8,92 ммоль), 11-бромуундекан-1-ол (2,00 г, 7,96 ммоль) и DMAP (10 мг, 0,080 ммоль) растворяли в DCM (16 мл) в атмосфере N<sub>2</sub>. При перемешивании добавляли DIPEA (1,39 мл, 7,96 ммоль) и реакционную смесь выдерживали в течение 7 дней. Реакционную смесь распределяли между DCM (20 мл) и водой (10 мл). Органическую фазу экстрагировали водой (20 мл), сушили над MgSO<sub>4</sub> и концентрировали. Концентрат очищали колоночной фланш-хроматографией (диоксид кремния 120 г, 0-6% EtOAc/НЕР) с получением промежуточного соединения 7 (2,50 г, 5,07 ммоль, 64%) в виде бесцветного масла.

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ- $d$ ):  $\delta$  м.д. 1,19-1,49 (м, 14Н), 1,58-1,69 (м, 2Н), 1,79 (дт,  $J=14,50, 7,00$  Гц, 1Н), 1,87 (дт,  $J=14,55, 7,03$  Гц, 1Н), 3,07 (т,  $J=6,66$  Гц, 2Н), 3,43 (т,  $J=6,85$  Гц, 1Н), 3,55 (т,  $J=6,79$  Гц, 1Н), 7,18-7,36 (м, 10Н), 7,42-7,52 (м, 5Н).

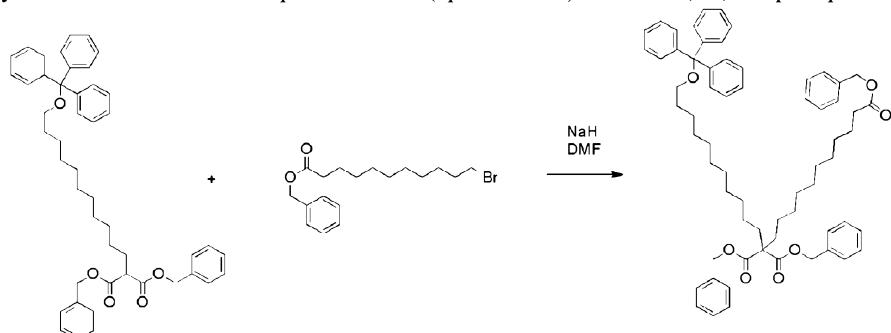
## Промежуточное соединение 8. Дибензил 2-(11-(тритилокси)ундекил)малонат:



NaN (113 мг, 2,83 ммоль) супензировали в DMF (6 мл) при 0°C в атмосфере N<sub>2</sub>. К перемешиваемой супензии медленно добавляли дибензилмалонат. Через 30 мин добавляли раствор промежуточного соединения 7 (1,26 г, 2,54 ммоль) в DMF (3 мл). После перемешивания в течение 15 мин полученной смеси давали нагреться до комнатной температуры. Через 3 дня реакционную смесь разбавляли при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл) и экстрагировали водой (40 мл). Водную фазу экстрагировали при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл). Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и концентрировали. Концентрат очищали колоночной флэш-хроматографией (диоксид кремния 80 г, 0-10% EtOAc/HEP) с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла (815 мг, 1,17 ммоль, 41%).

ВЭЖХ способ В:  $R_t=1,68$  мин;

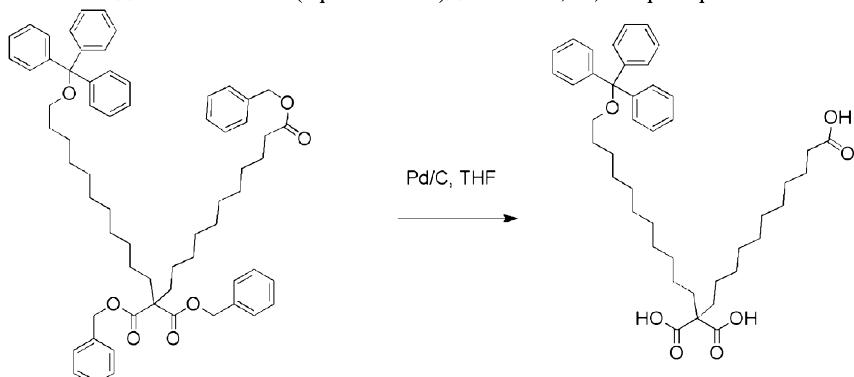
<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 1,16-1,40 (м, 16H), 1,58-1,69 (м, 2H), 1,94 (кв., J=7,38 Гц, 2H), 3,06 (т, J=6,66 Гц, 2H), 3,45 (т, J=7,52 Гц, 1H), 5,16 (с, 4H), 7,21-7,28 (м, 3H), 7,28-7,39 (м, 16H), 7,42-7,51 (м, 6H).



Раствор промежуточного соединения 8 (815 мг, 1,17 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли к суспензии NaN (56 мг, 1,40 ммоль) в DMF (2 мл) в атмосфере N<sub>2</sub> при 0°C. Смесь перемешивали в течение 1 ч. К реакционной смеси добавляли бензил 11-бромундеканоат (457 мг, 1,29 ммоль) в DMF (2 мл). Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры 20 мин после добавления и перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл) и экстрагировали водой (25 мл). Водную фазу экстрагировали при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл) и органические слои объединяли. Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток очищали колоночной фланш-хроматографией (диоксид кремния 40 г, 0-10% EtOAc/HEP) с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла (780 мг, 0.803 ммоль, 69%).

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-д): δ м.д. 0,99-1,14 (м, 4H), 1,15-1,41 (м, 26H), 1,58-1,71 (м, 4H), 1,82-1,96 (м, 4H), 2,37 (т, J=7,52 Гц, 2H), 3,06 (т, J=6,66 Гц, 2H), 5,12 (с, 4H), 5,14 (с, 2H), 7,28 (с, 24H), 7,42-7,52 (м, 6H).

Промежуточное соединение 10. 22-(Тритилокси)докозан-1,11,11-трикарбоновая кислота:

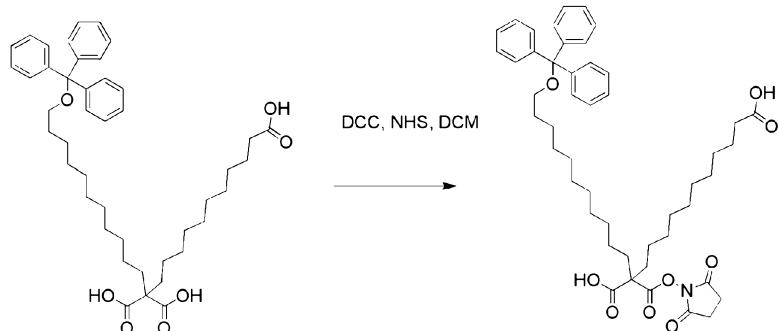


Суспензию 10% Pd на углероде (11 мг, 0,010 ммоль) в THF (2,5 мл) добавляли к раствору промежу-

точного соединения 9 (200 мг, 0,206 ммоль) в THF (2,5 мл). Перемешиваемую супензию помещали в атмосферу водорода (баллон). Через 2,25 ч реакционную смесь пропускали через мембранный фильтр и твердые вещества промывали при помощи EtOAc. Фильтрат упаривали с получением промежуточного соединения 10 (150 мг, количественный).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 1,04-1,33 (м, 30H), 1,45-1,62 (м, 4H), 1,76-1,91 (м, 4H), 2,21-2,36 (м, 2H), 2,97 (т, J=6,60 Гц, 2H), 7,06-7,18 (м, 4H), 7,19-7,24 (м, 5H), 7,33-7,50 (м, 6H).

Промежуточное соединение 11. 2-((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)карбонил-2-(11-(тритилокси)ундекил)тридекандиовая кислота (11):

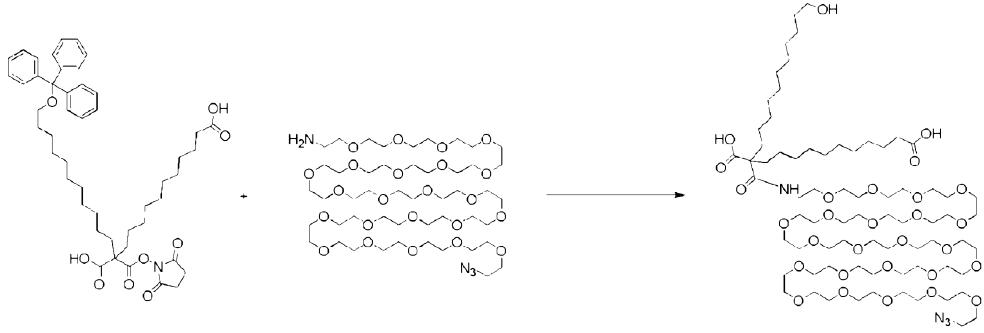


Промежуточное соединение 10 (150 мг, 0,214 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (25 мг, 0,214 ммоль) объединяли в DCM (4 мл). Добавляли DCC (49 мг, 0,235 ммоль), растворенный в DCM (0,61 мл), и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 7 ч. Растворитель выпаривали и остаток очищали при помощи ВЭЖХ (Sunfire C18, 30×50 мм; 65-95% ACN/вода + 0,1% TFA), затем при помощи SFC (Princeton 2-этилпиридин колонка 20×100 мм, 25-35% MeOH/CO<sub>2</sub>) с получением промежуточного соединения 11 (34 мг, 0,043 ммоль, 20%) в виде бесцветного масла.

ЖХ/МС способ Б: Rt=1,47 мин, M-CO<sub>2</sub>H 752,7;

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 1,13-1,42 (м, 30H), 1,56-1,73 (м, 4H), 1,94-2,14 (м, 4H), 2,37 (т, J=7,21 Гц, 2H), 2,83 (шир.с, 4H), 3,06 (т, J=6,66 Гц, 2H), 7,15-7,28 (м, 3H), 7,29-7,36 (м, 6H), 7,41-7,50 (м, 6H).

Промежуточное соединение 12. Конструкция 2-((азидо-ПЭГ23)карбамоил)-2-(11-гидроксиундекил)тридекандиовая кислота:

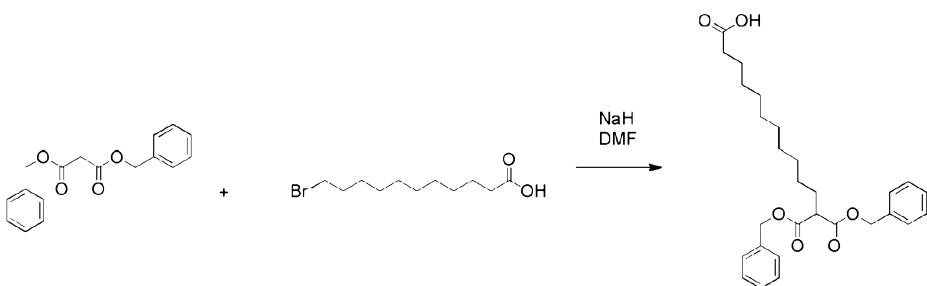


Азидо-d-ПЭГ23-амин (Quanta Biodesign) (42 мг, 0,038 ммоль) в THF (1,5 мл) объединяли с промежуточным соединением 11 (34 мг, 0,043 ммоль) в атмосфере N<sub>2</sub>. Реакционную смесь помещали на планшетный шейкер и встряхивали в течение 20 мин. Добавляли DIPEA (7,44 мкл, 0,043 ммоль) и реакционную смесь встряхивали в течение 2 ч. Добавляли DIPEA (4 мкл, 0,023 ммоль) и реакционную смесь выдерживали в течение ночи. Растворитель выпаривали и остаток поглощали в DCM (3 мл) и TFA (0,5 мл). Раствор встряхивали в течение 1 ч, сразу после этого растворитель отгоняли. Остаток очищали при помощи ВЭЖХ (Sunfire C18, 30×50 мм, 45-70% ACN/вода + 0,1% TFA) с получением промежуточного соединения 12 (4 мг, 1,8 мкмоль, 4,2%).

ЖХ/МС способ Б: Rt=0,75 мин, [M+2H]<sup>+2</sup> 771,4;

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 1,05-1,39 (м, 30H), 1,52-1,82 (м, 6H), 1,97-2,09 (м, 2H), 2,35 (т, J=7,21 Гц, 2H), 3,41 (т, J=5, 07 Гц, 2H), 3,51-3,63 (м, 6H), 3,63-3,75 (м, 90H), 4,36 (т, J=6,72 Гц, 1H), 7,49-7,65 (м, 1H).

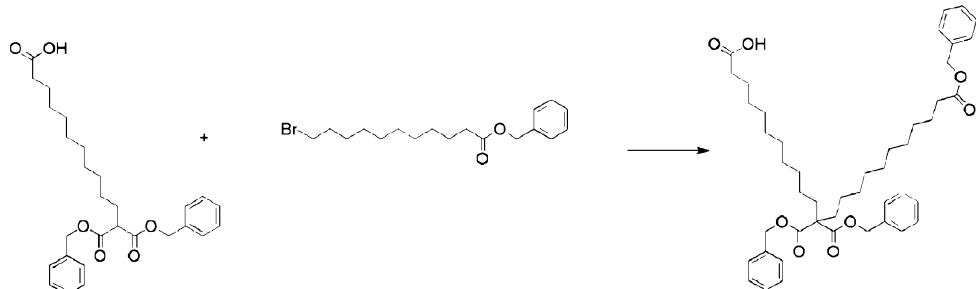
Промежуточное соединение 13. 13-(Бензилокси)-12-((бензилокси)карбонил)-13-оксотридекановая кислота:



Дибензилмалонат (0,88 мл, 3,52 ммоль) в DMF (3 мл) медленно добавляли к суспензии NaH (274 мг, 6,86 ммоль) в атмосфере  $N_2$  при 0°C. Смесь перемешивали в течение 1,5 ч, затем давали нагреться до комнатной температуры. Добавляли 11-бромундекановую кислоту (933 мг, 3,52 ммоль) в DMF (3 мл) и реакционную смесь оставляли для взаимодействия в течение ночи. Реакционную смесь нагревали до 80°C в течение 3 ч, затем давали охладиться. Реакционную смесь разбавляли при помощи EtOAc (50 мл) и Et<sub>2</sub>O (50 мл) и экстрагировали при помощи 1 M HCl (25 мл). Водную фазу экстрагировали при помощи EtOAc/Et<sub>2</sub>O (100 мл). Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и растворитель выпаривали. Остаток очищали колоночной фланш-хроматографией (C18, 50 г 30-100% ACN/вода + 0,1 TFA) с получением промежуточного соединения 13 (315 мг, 0,672 ммоль, 19%) в виде белого порошка.

ЖХ/МС способ B: Rt=1,05 мин, M+H 469,5.

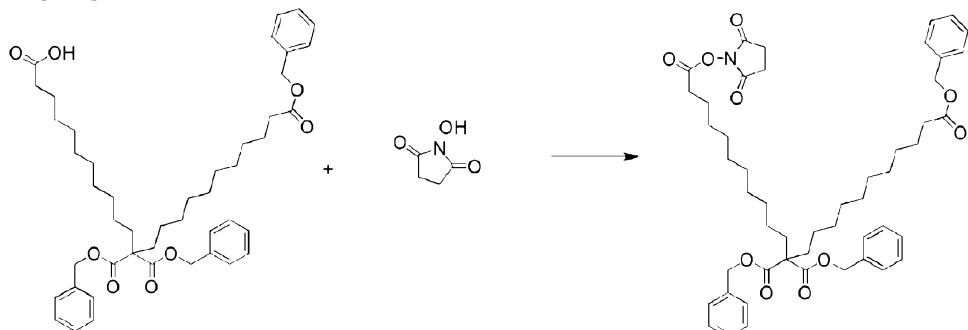
Промежуточное соединение 14. 23-(Бензилокси)-12,12-бис-((бензилокси)карбонил)-23-оксотриказановая кислота:



NaH (54 мг, 1,34 ммоль) суспендировали в DMF (1 мл) при 0°C в атмосфере  $N_2$ . К смеси добавляли промежуточное соединение 13 (315 мг, 0,672 ммоль) в DMF (3 мл) по каплям. Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч, затем добавляли промежуточное соединение 1 (239 мг, 0,672 ммоль) в DMF (1 мл). Реакционную смесь выдерживали при 0°C еще в течение 45 мин, затем давали нагреться до комнатной температуры. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли при помощи 1:1 Et<sub>2</sub>O и EtOAc (75 мл) и экстрагировали при помощи 1 M HCl (20 мл). Водную фазу экстрагировали при помощи 1:1 Et<sub>2</sub>O и EtOAc (75 мл). Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Очистка полученного остатка при помощи ВЭЖХ (XBridge C18, 30×50 мм, 45-70% ACN/вода + 5 mM NH<sub>4</sub>OH) давала указанное в заголовке соединение (132 мг, 0,178 ммоль, 26%).

ЖХ/МС способ B: Rt=1,53 мин, M-H 741,8.

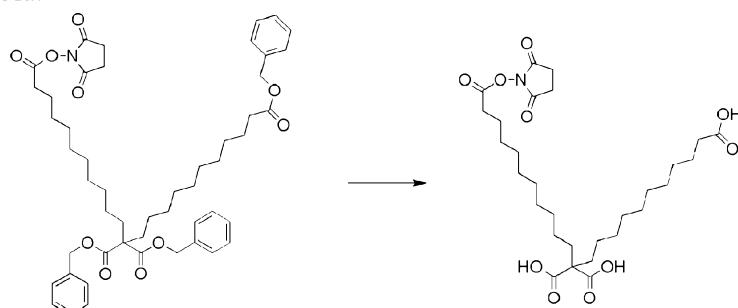
Промежуточное соединение 15. 1,11,11-Трибензил 21-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)гениказан-1,11,11,21-тетракарбоксилат:



DCC (44 мг, 0,213 ммоль) в DCM (1 мл) добавляли к раствору промежуточного соединения 14 (132 мг, 0,178 ммоль) и N-гидроксисукцинидата (20 мг, 0,178 ммоль) в DCM (2,5 мл). Реакционную смесь встряхивали на планшетном шейкере в течение 17 ч. Реакционную смесь фильтровали и твердые вещества промывали при помощи DCM. Фильтрат концентрировали и очищали колоночной фланш-хроматографией (диоксид кремния 12 г, 0-40% EtOAc/HEP) с получением промежуточного соединения 15 (107 мг, 0,127 ммоль, 72%).

ЖХ/МС способ B: Rt=1,53 мин, M+Na 862,8.

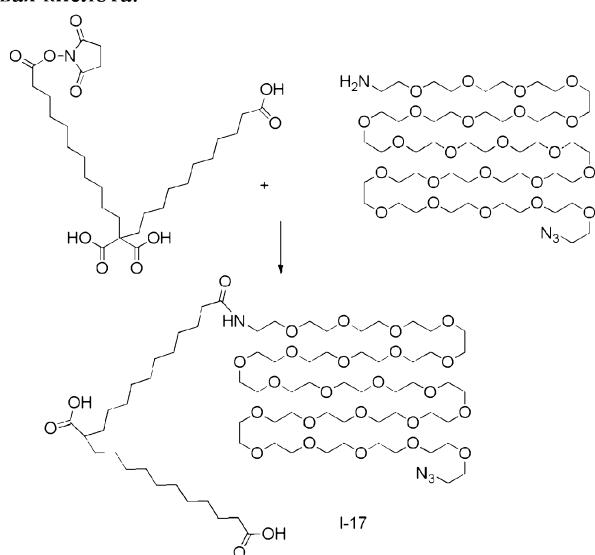
Промежуточное соединение 16. 22-((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)-22-оксодокозан-1,11,11-трикарбоновая кислота:



К раствору промежуточного соединения 15 (107 мг, 0,127 ммоль) в THF (2,5 мл) добавляли сuspензию 10% Pd на углероде в THF (2,5 мл). Смесь помещали в атмосферу водорода на 1,5 ч. Реакционную смесь пропускали через мембранный фильтр и твердые вещества промывали при помощи DCM и THF. Фильтрат упаривали с получением бесцветного масла (95 мг, количественный), которое содержало указанное в заголовке соединение.

ЖХ/МС способ B: Rt=0,65 мин, M+H 570,5.

Промежуточное соединение 17. Конструкция 2-(11-(азидо-ПЭГ23-амино)-11-оксоундецил)тридекандиовая кислота:

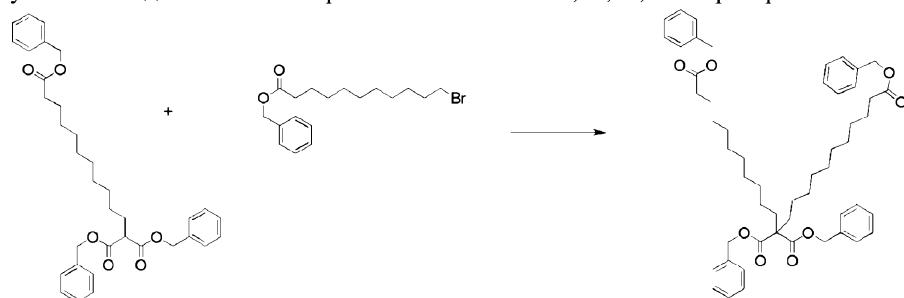


Раствор промежуточного соединения 16 (48 мг, 0,042 ммоль) в THF (1 мл) добавляли во флакон, содержащий азидо-d-ПЭГ23-амин (Quanta Biodesign: 46 мг, 0,042 ммоль). Реакционную смесь встряхивали в течение 20 мин перед добавлением DIPEA (11 мкл, 0,063 ммоль) и затем выдерживали в течение ночи. Добавляли азидо-ПЭГ23-амин (23 мг, 0,021 ммоль) и DIPEA (5 мкл, 0,029 ммоль) и реакционную смесь встряхивали еще в течение одного дня. Растворитель выпаривали и остаток очищали при помощи ВЭЖХ (XBridge C18, 30×50 мм, 10-30% ACN/5 mM NH4OH). Лиофилизация фракций приводила к смеси продуктов. Вещество очищали при помощи ВЭЖХ (Sunfire C18, 30×50 мм, 45-70% ACN/вода + 0,1% TFA) с получением указанного в заголовке промежуточного соединения 17 (30 мг, 0,020 ммоль, 48%).

ЖХ/МС SQ4 Rt=0,81 мин, [M+H+H3O]+<sup>2</sup> 764,5;

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, АЦЕТОНИТРИЛ-d<sub>3</sub>): δ м.д. 1,30 (шир.с, 28Н), 1,40-1,50 (м, 2Н), 1,50-1,62 (м, 6Н), 2,14 (т, J=7,52 Гц, 2Н), 2,23-2,35 (м, 3Н), 3,32 (кв., J=5,58 Гц, 2Н), 3,37-3,43 (м, 2Н), 3,47-3,52 (м, 2Н), 3,53-3,68 (м, 90Н), 6,54 (шир.с, 1Н).

Промежуточное соединение 18. Тетрабензил гениказан-1,11,11,21-тетракарбоксилат:

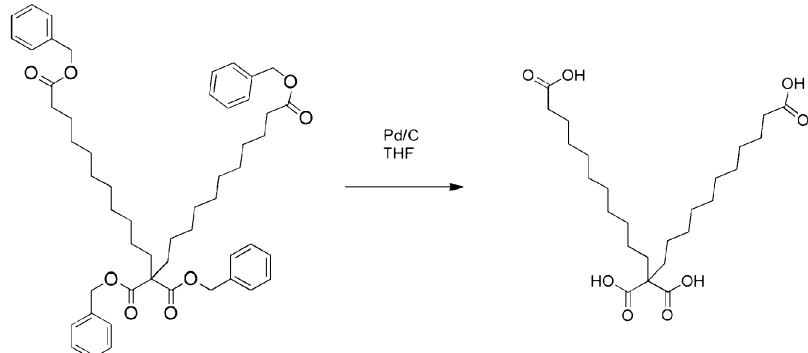


К суспензии NaH (48 мг, 1,21 ммоль) в DMF (2 мл) при 0°C в атмосфере N<sub>2</sub> медленно добавляли промежуточное соединение 2 (337 мг, 0,603 ммоль) в DMF (2 мл). Смесь перемешивали в течение 15 мин перед добавлением промежуточного соединения 1 (429 мг, 1,21 ммоль) в DMF (2 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 20 мин, затем давали нагреться до комнатной температуры. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре при перемешивании в течение 3 дней. Реакционную смесь разбавляли при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл) и экстрагировали водой (20 мл). Водную фазу экстрагировали при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл). Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток очищали колоночной фланш-хроматографией (диоксид кремния 24 г, 0-15% EtOAc/НЕР) с получением указанного в заголовке соединения (315 мг, 0,378 ммоль, 63%).

ЖХ/МС способ B: Rt=1,70 мин, M+Na 855,8;

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,95-1,13 (м, 4H), 1,13-1,40 (м, 24H), 1,59-1,72 (м, 4H), 1,82-1,95 (м, 4H), 2,37 (т, J=7,52 Гц, 4H), 5,12 (с, 4H), 5,14 (с, 4H), 7,14-7,44 (м, 20H).

Промежуточное соединение 19. Гениказан-1,11,11,21-тетракарбоновая кислота:

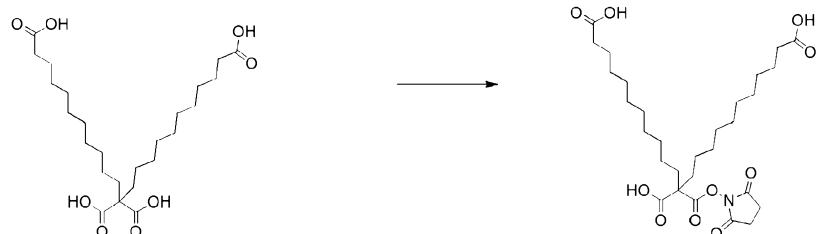


Суспензию 10% Pd на углероде (20 мг, 0,019 ммоль) в THF (4 мл) добавляли к раствору промежуточного соединения 18 (315 мг, 0,378 ммоль) в THF (6 мл) и реакционную смесь помещали в атмосферу водорода на 2 ч. Использовали мембранный фильтр для удаления твердых веществ, который промывали при помощи EtOAc. Упаривание фильтрата давало промежуточное соединение 19 (179 мг, количественный) в виде белого твердого вещества.

ЖХ/МС способ A: Rt=1,2 4 мин, M+H 473,4;

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>): δ м.д. 0,99-1,15 (м, 4H), 1,24 (шир.с, 24H), 1,48 (квинт., J=6,94 Гц, 4H), 1,62-1,76 (м, 4H), 2,18 (т, J=7,34 Гц, 4H), 12,23 (шир.с, 4H).

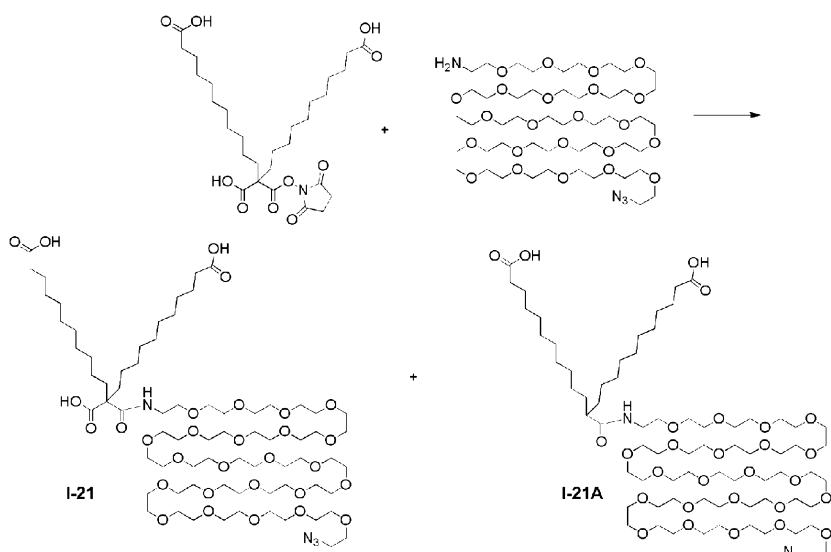
Промежуточное соединение 20. 11-((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)карбонил)гениказан-1,11,21-трикарбоновая кислота:



N-Гидроксисукцинимид (20 мг, 0,170 ммоль) и промежуточное соединение 19 (90 мг, 0,190 ммоль) растворяли в DCM (3 мл) и THF (0,3 мл). Добавляли раствор DCC (39 мг, 0,190 ммоль) в DCM (0,5 мл) и реакционную смесь встряхивали в течение ночи. Растворитель выпаривали и остаток очищали при помощи ВЭЖХ (Sunfire C18, 30×50 мм; 35-60% ACN/вода + 0,1% TFA) с получением указанного в заголовке соединения в виде белого порошка (21 мг, 0,037 ммоль, 19%).

ЖХ/МС способ C: Rt=1,01 мин, M+H 570,3.

Промежуточные соединения 21 и 21А. 11-((Азидо-ПЭГ23)карбамоил)гениказан-1,11,21-трикарбоновая кислота (21) и 12-((азидо-ПЭГ23)карбамоил)триказандиовая кислота (21А):



Азидо-ПЭГ23-амин (41 мг, 0,037 ммоль) и промежуточное соединение 20 (21 мг, 0,037 ммоль) объединяли в THF (1 мл) и встряхивали в течение 10 мин. Добавляли DIPEA (9,66 мкл, 0,055 ммоль) и реакционную смесь встряхивали в течение ночи. Растворитель выпаривали и остаток очищали при помощи ВЭЖХ (Sunfire C18, 30×50 мм, 35-60% ACN/вода + 0,1% TFA) с получением промежуточного соединения 21 (22 мг, 0,014 ммоль, 38%) и 21a (4 мг, 2,6 мкмоль, 7%).

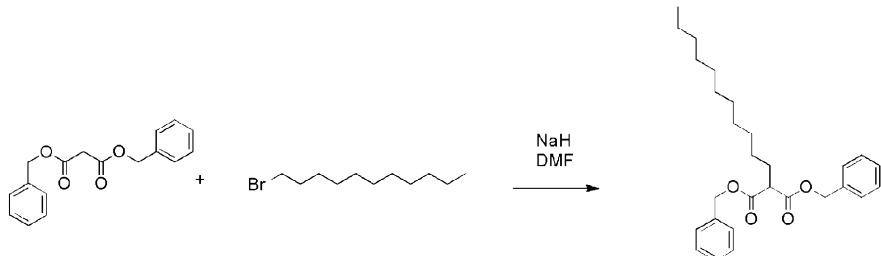
ЖХ/МС способ B: Rt=0,69 мин, M+H 1555,3;

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 1,27 (шир.с, 19Н), 1,29-1,41 (м, 9Н), 1,65 (квинт., J=7,12 Гц, 4Н), 1,78 (тд, J=12,13, 4,22 Гц, 2Н), 1,95-2,08 (м, 2Н), 2,35 (т, J=7,21 Гц, 4Н), 3,41 (т, J=5,07 Гц, 2Н), 3,54 (кв., J=5, 05 Гц, 2Н), 3,58-3,77 (м, 92Н), 7,60 (т, J=4,95 Гц, 1Н);

ЖХ/МС способ B: Rt=0,78 мин, M-H 1509,3;

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 1,18 (шир.с, 19Н), 1,21-1,38 (м, 11Н), 1,43-1,63 (м, 6Н), 1,91-2,04 (м, 1Н), 2,26 (т, J=7,15 Гц, 4Н), 3,31 (т, J=5,07 Гц, 2Н), 3,40 (кв., J=5, 14 Гц, 2Н), 3,46-3,50 (м, 2Н), 3,51-3,69 (м, 90Н), 6,23 (т, J=5,01 Гц, 1Н).

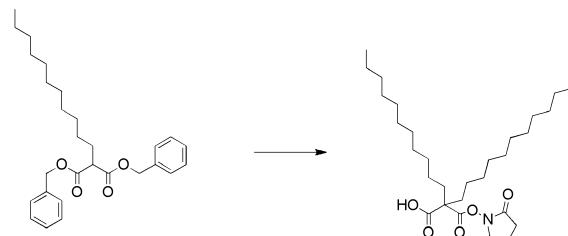
Промежуточное соединение 22. Дибензил 2-ундекилмалонат:



Дибензилмалонат (0,88 мл, 3,52 ммоль) в DMF (1,5 мл) добавляли по каплям к суспензии NaH (155 мг, 3,87 ммоль) в DMF (6 мл) в атмосфере N<sub>2</sub> при 0°C. Смесь перемешивали в течение 30 мин перед добавлением к реакционной смеси 1-бромуундекана (0,785 мл, 3,52 ммоль) в DMF (1,5 мл). Реакционную смесь давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 5 дней. Реакционную смесь разбавляли при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл) и экстрагировали водой (20 мл). Водную фазу экстрагировали при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл). Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток очищали колоночной фланш-хроматографией (диоксид кремния 80 г, 0-10% EtOAc/HEP) с получением указанного в заголовке соединения (974 мг, 2,22 ммоль, 63%) в виде бесцветного масла.

ЖХ/МС способ B: Rt=1,55 мин, M+H 439,5.

Промежуточное соединение 23. 2-(((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)карбонил)-2-ундекилтридекановая кислота:



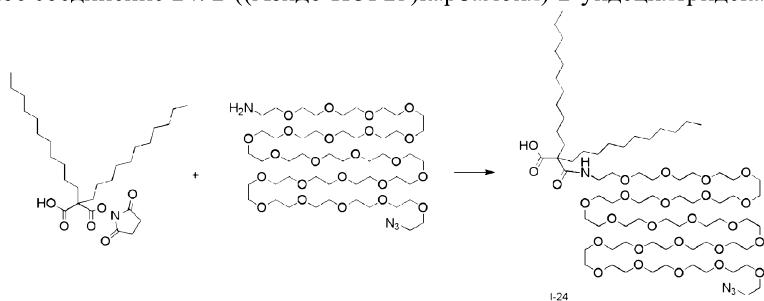
Дибензил 2-ундекилмалонат (промежуточное соединение 22: 400 мг, 0,912 ммоль) в DMF (1 мл) до-

бавляли по каплям к суспензии NaH (44 мг, 1,09 ммоль) в DMF (2 мл) в атмосфере N<sub>2</sub> при 0°C. Смесь перемешивали в течение 45 мин перед добавлением к реакционной смеси 1-бромундекана (0,285 мл, 1,28 ммоль) в DMF (1 мл). Реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 1 дня. Реакционную смесь разбавляли при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл) и экстрагировали водой (20 мл). Водную фазу экстрагировали при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл). Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали. Остаток очищали колоночной фланш-хроматографией (диоксид кремния 40 г, 0-5% EtOAc/HEP) с получением бесцветного масла (412 мг). Масло растворяли в THF/MeOH и пропускали через Thales Nano H-Cube (1 мл/мин, 2 бар H<sub>2</sub>, 22°C) с использованием 10% Pd/C картриджа. Вытекающую жидкость собирали и упаривали с получением воскообразного твердого вещества (272 мг). Это воскообразное твердое вещество растворяли в 3:1 DCM/THF и концентрировали с получением масла. Масло снова растворяли в DCM (6 мл) в атмосфере N<sub>2</sub> и добавляли N-гидроксисукцинид (68 мг), с последующим добавлением DCC (136 мг) в DCM (3 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение дня. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали. Концентрат очищали колоночной фланш-хроматографией (C18 12г, 25-100% ACN/вода + 0,1% муравьиной кислоты). Полученное вещество очищали дополнительной сверхкритической жидкостной хроматографией (Princeton 2-этилпирдин 20×150 мм; 5-15% MeOH/CO<sub>2</sub>) с получением промежуточного соединения 23 (37 мг, 0,073 ммоль, 8%).

ЖХ/МС способ Б: Rt=1,67 мин, M+NH<sub>4</sub> 527,6;

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,80-0,94 (м, 6Н), 1,18-1,42 (м, 36Н), 1,97-2,14 (м, 4Н), 2,87 (шир.с, 4Н).

Промежуточное соединение 24. 2-((Азидо-ПЭГ23)карбамоил)-2-ундекилтридекановая кислота:

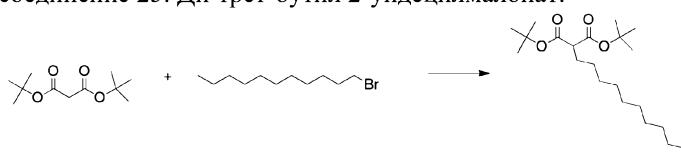


Раствор промежуточного соединения 23 (37 мг, 0,073 ммоль) в THF (1 мл) добавляли во флакон, содержащий азидо-d-ПЭГ23-амин (Quanta Biodesign: 80 мг, 0,073 ммоль). Раствор встряхивали на планшетном шейкере и добавляли DIPEA (11 мкл, 0,065 ммоль). Реакционную смесь встряхивали в течение ночи, затем добавляли дополнительную порцию DIPEA (12 мкл, 0,071 ммоль) и реакционную смесь оставляли для взаимодействия в течение ночи. Растворитель выпаривали и остаток очищали сверхкритической жидкостной хроматографией (Princeton Амино, 21×150 мм; 20-30% MeOH/CO<sub>2</sub>) с получением указанного в заголовке соединения (45 мг, 0,030 ммоль, 41%).

ЖХ/МС способ Б Rt=1,50 мин, [M+2H]<sup>+2</sup> 748,1;

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,90 (т, J=6,85 Гц, 6Н), 1,09-1,38 (м, 30Н), 1,58 (шир.с, 12Н), 1,64-1,76 (м, 2Н), 1,98-2,16 (м, 2Н), 3,41 (т, J=5,14 Гц, 2Н), 3,46-3,64 (м, 5Н), 3,64-3,91 (м, 83Н).

Промежуточное соединение 25. Ди-трет-бутил 2-ундекилмалонат:

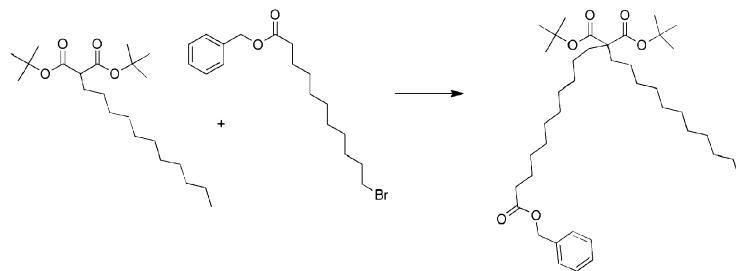


Ди-трет-бутилмалонат (1,0 г, 4,62 ммоль) в DMF (2 мл) добавляли к суспензии NaH (213 мг, 5,32 ммоль) в DMF (5 мл) в атмосфере N<sub>2</sub> при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин перед добавлением 1-бромундекана в DMF (2 мл). После добавления реакционной смеси давали нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 дней. Реакционную смесь разбавляли при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл) и экстрагировали водой (25 мл). Водную фазу экстрагировали при помощи Et<sub>2</sub>O (75 мл). Объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и растворитель выпаривали. Концентрат очищали колоночной фланш-хроматографией (диоксид кремния 120 г, 0-40% Et<sub>2</sub>O/петролейный эфир) с получением промежуточного соединения 25 (0,998 г, 2,69 ммоль, 58%).

ЖХ/МС способ Б: Rt=1,64 мин, M+Na 393,5;

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,85-0,94 (м, 3Н), 1,24-1,36 (м, 18Н), 1,41-1,52 (м, 18Н), 1,74-1,86 (м, 2Н), 3,13 (т, J=7,58 Гц, 1Н).

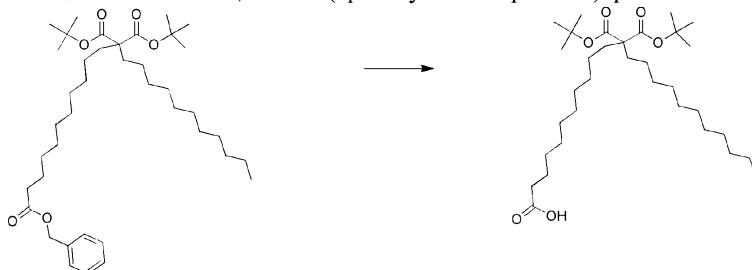
Промежуточное соединение 26. 1-Бензил 11,11-ди-трет-бутил докозан-1,11,11-трикарбоксилат:



Указанное в заголовке соединение синтезировали таким же способом, как промежуточное соединение 9 с использованием промежуточного соединения 25 в качестве исходного вещества, с получением бесцветного масла (980 мг, 1,52 ммоль, 66%).

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,89 (т, J=6, 91 Гц, 3Н), 1,06-1,20 (м, 4Н), 1,20-1,35 (м, 28Н), 1,45 (с, 18Н), 1,58-1,70 (м, 2Н), 1,72-1,83 (м, 4Н), 2,36 (т, J=7,52 Гц, 2Н), 5,12 (с, 2Н), 7,30-7,45 (м, 5Н).

Промежуточное соединение 27. 12,12-бис-(терт-Бутилкарбонил)триказановая кислота:

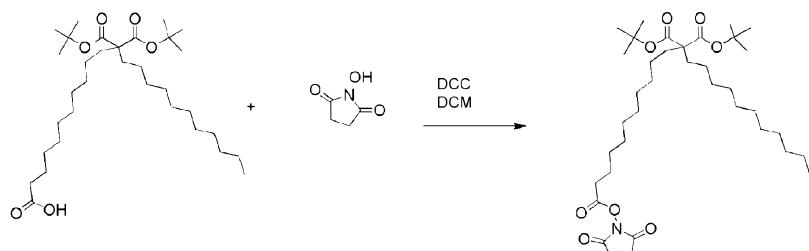


С использованием промежуточного соединения 26 указанное в заголовке соединение (472 мг, 0,851 ммоль, 100%) синтезировали таким же способом, как промежуточное соединение 19.

ЖХ/МС способ В: Rt=1,76 мин, M-N 553,6;

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,84-0,95 (м, 3Н), 1,07-1,21 (м, 4Н), 1,21-1,40 (м, 28Н), 1,46 (с, 18Н), 1,58-1,70 (м, 2Н), 1,72-1,84 (м, 4Н), 2,37 (т, J=7,46 Гц, 2Н).

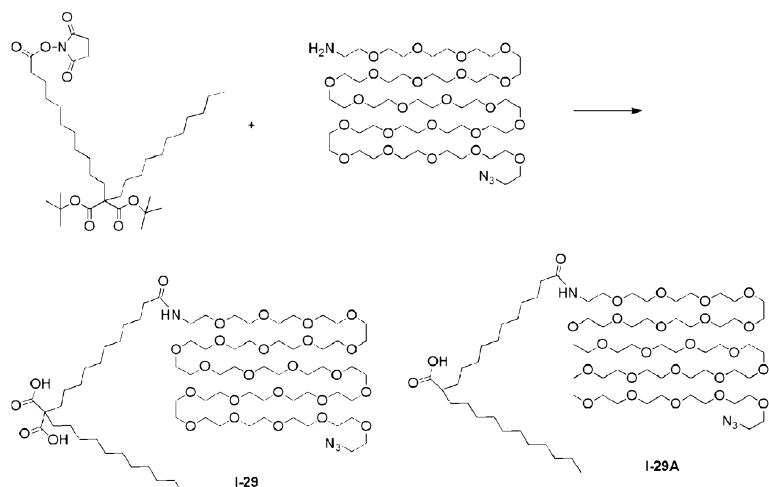
Промежуточное соединение 28. 11,11-Ди-терт-бутил 1-(2,5-диоксопирролидин-1-ил)докозан-1,11,11-трикарбоксилат:



Промежуточное соединение 27 (200 мг, 0,360 ммоль) и N-гидрокисукцинимид (42 мг, 0,360 ммоль) растворяли в DCM (3 мл). Добавляли раствор DCC (89 мг, 0,433 ммоль) в DCM (1,6 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение 4,5 ч. Реакционную смесь фильтровали и фильтрат концентрировали. Концентрат очищали колоночной фланш-хроматографией (диоксид кремния 24 г, 0-40% EtOAc/HEP) с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла (70 мг, 0,107 ммоль, 30%).

ЖХ/МС способ В: Rt=1,74 мин, M+Na 674,7.

Промежуточные соединения 29 и 29А. 2-(11-((Азидо-ПЭГ23)амино)-11-оксоундецил)-2-ундецилмалоновая кислота (29) и 13-((азидо-ПЭГ23)амино)-13-оксо-2-ундецилтридекановая кислота (29A):



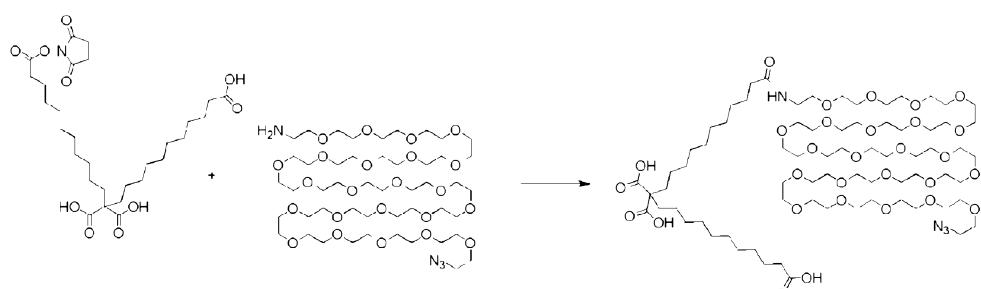
Раствор промежуточного соединения 28 (35 мг, 0,054 ммоль) в THF (1 мл) добавляли во флакон, содержащий азидо-ПЭГ23-амин (59 мг, 0,054 ммоль). Добавляли DIPEA (14 мкл, 0,081 ммоль) и реакционную смесь встряхивали в течение ночи. Растворитель выпаривали и остаток снова растворяли в DCM (1 мл) и TFA (0,2 мл). Реакционную смесь встряхивали в течение 1,25 ч, затем выпаривали растворитель. Остаток очищали при помощи ВЭЖХ (Sunfire, 30×50 мм, C18, 55-80% ACN/вода + 0,1% TFA) и полученное вещество снова растворяли в DCM (4 мл) и TFA (2 мл) и встряхивали в течение 1,5 ч. Растворитель выпаривали и остаток очищали при помощи ВЭЖХ (Sunfire, 30×50 мм, C18, 55-80% ACN/вода + 0,1% TFA) с получением промежуточного соединения 29 (28 мг, 0,016 ммоль, 29%) и промежуточного соединения 29A (1 мг, 0,6 мкмоль, 1%).

ЖХ/МС способ В: Rt=1,08 мин,  $[M+H+H_3O]^{+2}$  771,5;

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,90 (т, J=6,72 Гц, 3Н), 1,26 (шир.с, 24Н), 1,32-1,41 (м, 8Н), 1,62 (квинт., J=7,64 Гц, 2Н), 1,88-2,01 (м, 4Н), 2,31 (т, J=7,70 Гц, 2Н), 3,41 (т, J=5,07 Гц, 2Н), 3,46-3,56 (м, 3Н), 3,57-3,90 (м, 91Н);

ЖХ/МС способ В Rt=1,29 мин,  $[M+2H]^{+2}$  741,1.

Промежуточное соединение 30. 22-((Азидо-ПЭГ23)амино)-22-оксодокозан-1,11,11-трикарбоновая кислота:

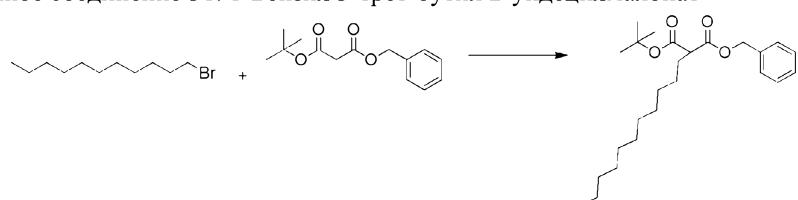


Раствор промежуточного соединения 16 (58 мг, 0,063 ммоль) в THF (1 мл) добавляли во флакон, содержащий азидо-ПЭГ23-амин (70 мг, 0,063 ммоль). Добавляли DIPEA (17 мкл, 0,095 ммоль) и реакционную смесь встряхивали на планшетном шейкере в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали и очищали при помощи ВЭЖХ (Sunfire C18, 30×50 мм, 35-60% ACN/вода + 0,1% TFA) с получением промежуточного соединения 30 (57 мг, 0,036 ммоль, 57%) в виде воскообразного белого твердого вещества.

ЖХ/МС способ В:  $R_t = 0,62$  мин. М+Н 1555,4:

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>, 302 мкн, TFA-DA): δ м.д. 1,28 (шир.с, 18Н), 1,30-1,40 (м, 10Н), 1,63 (м, J=7,10, 7,10, 7,10, 7,10, 7,10 Гц, 4Н), 1,88-2,02 (м, 4Н), 2,28 (т, J=8,10 Гц, 2Н), 2,35 (т, J=7,40 Гц, 2Н), 3,41 (т, J=5, 07 Гц, 2Н), 3,50 (тт, J=9,20, 4,39 Гц, 2Н), 3,57-3,63 (м, 2Н), 3,63-3,73 (м, 90Н).

Промежуточное соединение 31. 1-Бензил 3-трет-бутил 2-ундекилмалонат



К суспензии NaH (160 мг, 4,0 ммоль) в DMF (8 мл) при 0°C в атмосфере N<sub>2</sub> добавляли бензил трет-бутилмалонат (1,0 г, 4,0 ммоль) в DMF (2 мл). Смесь перемешивали в течение 50 мин, затем добавляли 1-бромундекан в DMF (2 мл). После дополнительного перемешивания еще в течение 1 ч реакционной

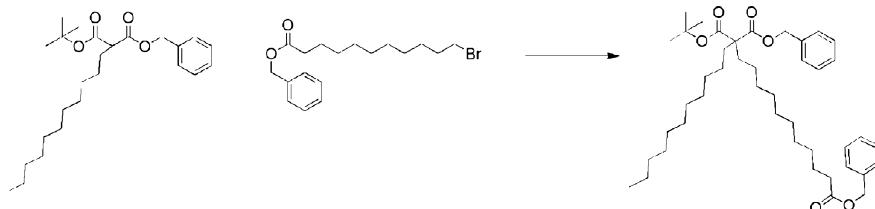
смеси давали нагреться до комнатной температуры. Реакционную смесь выдерживали в течение ночи. Добавляли Et<sub>2</sub>O (100 мл) и воду (20 мл) для разделения реакционной смеси. Водную фазу экстрагировали при помощи Et<sub>2</sub>O (100 мл) и объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель выпаривали и остаток очищали колоночной фланш-хроматографией (C18 12 г, 40-100% ACN/вода + 0,1% TFA) с получением указанного в заголовке соединения в виде бесцветного масла (1,14 г, 2,82 ммоль, 71%).

ЖХ/МС способ А: Rt=1,58 мин, M+Na 427,4;

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,84-0,96 (м, 3H), 1,28 (шир.с, 12H), 1,31 (м, J=3,90 Гц, 6H), 1,41 (с, 9H), 1,88 (кв., J=7,38 Гц, 2H), 3,29 (т, J=7,58 Гц, 1H), 5,19 (кв., J=12,27 Гц, 2H), 7,30-7,42 (м, 5H).

Альтернативно, алкилирование трет-бутилмалоната можно осуществить с использованием 1-иодундекан (1,2 экв.) в присутствии карбоната калия (2 экв.) в DMF.

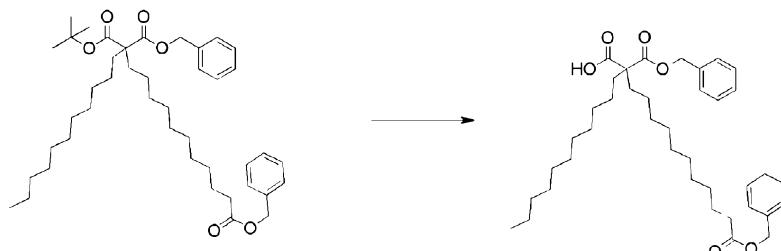
Промежуточное соединение 32. 1,11-Дибензил 11-трет-бутилдокозан-1,11,11-трикарбоксилат:



Указанное в заголовке соединение синтезировали таким же способом, как промежуточное соединение 9, используя промежуточное соединение 31 (650 мг, 1,61 ммоль) в качестве исходного вещества, с получением бесцветного масла (823 мг, 1,21 ммоль, 75%).

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,84-0,94 (м, 3H), 1,12 (м, J=6,60 Гц, 4H), 1,19-1,33 (м, 28H), 1,35 (с, 9H), 1,66 (квинт., J=7,40 Гц, 2H), 1,85 (т, J=8,44 Гц, 4H), 2,37 (т, J=7,52 Гц, 2H), 5,14 (с, 2H), 5,16 (с, 2H), 7,30-7,42 (м, 10H).

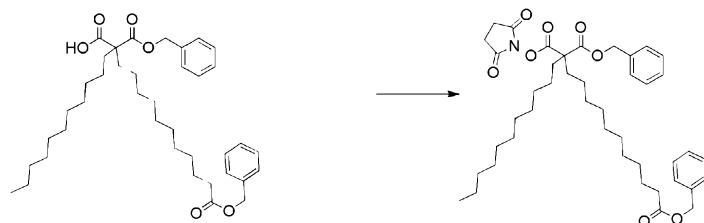
Промежуточное соединение 33. 13-(Бензилокси)-2-((бензилокси)карбонил)-13-оксо-2-ундекилтридекановая кислота:



К раствору промежуточного соединения 32 (200 мг, 0,295 ммоль) в DCM (3 мл) добавляли TFA (0,6 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Растворитель выпаривали и остаток очищали колоночной фланш-хроматографией (диоксид кремния 12 г, 0-15% EtOAc/НЕР) с получением указанного в заголовке соединения (177 мг, 0,284 ммоль, 96%).

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,87-0,94 (м, 3H), 0,94-1,05 (м, 2H), 1,19 (шир.с, 14H), 1,23-1,37 (м, 16H), 1,65 (квинт., J=7,40 Гц, 2H), 1,78-1,91 (м, 2H), 1,93-2,05 (м, 2H), 2,37 (т, J=7,52 Гц, 2H), 5,14 (с, 2H), 5,27 (с, 2H), 7,31-7,44 (м, 10H).

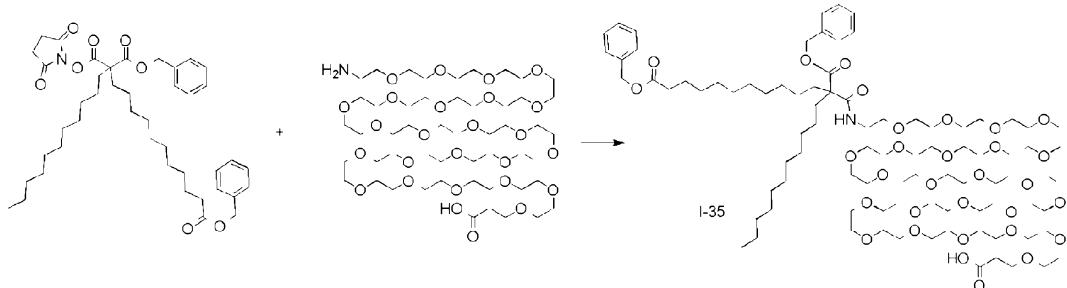
Промежуточное соединение 34. 1,11-Дибензил 11-(2,5-диоксоцикlopентил)докозан-1,11,11-трикарбоксилат:



Указанное в заголовке соединение синтезировали таким же способом, как промежуточное соединение 15, используя промежуточное соединение 33 (177 мг, 0,284 ммоль) в качестве исходного вещества, с получением бесцветного масла (153 мг, 0,213 ммоль, 75%).

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,86-0,93 (м, 3H), 1,12-1,21 (м, 2H), 1,21-1,37 (м, 30H), 1,66 (квинт., J=7,40 Гц, 2H), 1,89-2,07 (м, 4H), 2,37 (т, J=7,58 Гц, 2H), 2,84 (шир.с, 4H), 5,13 (с, 2H), 5,25 (с, 2H), 7,30-7,47 (м, 10H).

## Промежуточное соединение 35:

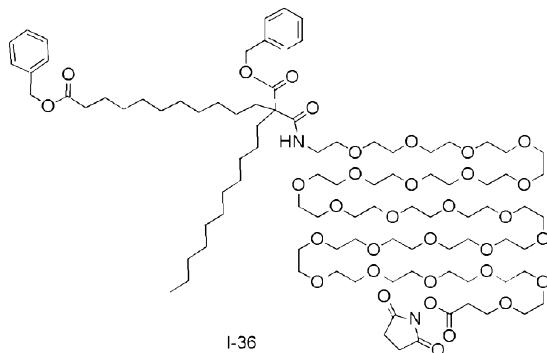


Раствор промежуточного соединения 34 (145 мг, 0,201 ммоль) в THF (1,5 мл) и DCM (1,5 мл) добавляли во флакон, содержащий амино-ПЭГ24-кислоту. Добавляли DIPEA (88 мкл, 0,504 ммоль) и реакционную смесь встряхивали на планшетном шейкере в течение 15 ч. Растворитель выпаривали и остаток очищали сверхкритической жидкостной хроматографией (Waters HILIC, 20×150 мм; 15-25% MeOH/CO<sub>2</sub>) с получением промежуточного соединения 35 (151 мг, 0,086 ммоль, 43%).

ЖХ/МС способ D: Rt=1,30 мин, [M+2H]<sup>+2</sup> 876,4;

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,86-0,93 (м, 3H), 0,93-1,04 (м, 2H), 1,19 (шир.с, 15H), 1,23-1,37 (м, 15H), 1,61-1,68 (м, 2H), 1,78 (тд, J=12,44, 4,34 Гц, 2H), 1,92-2,05 (м, 2H), 2,37 (т, J=7,58 Гц, 2H), 2,62 (т, J=6,05 Гц, 2H), 3,49 (дд, J=6,72, 2,32 Гц, 2H), 3,52-3,59 (м, 2H), 3,59-3,73 (м, 92H), 3,80 (т, J=6,05 Гц, 2H), 5,13 (с, 2H), 5,18 (с, 2H), 7,31-7,42 (м, 10H), 8,09 (т, J=5,26 Гц, 1H).

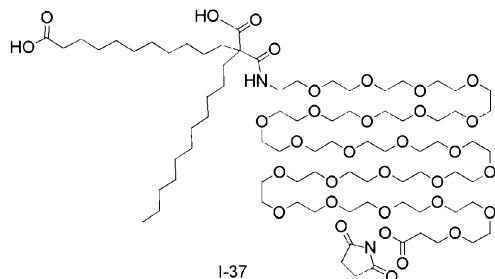
## Промежуточное соединение 36:



DCC (22 мг, 0,103 ммоль) в DCM (0,265 мл) добавляли к раствору промежуточного соединения 35 (150 мг, 0,086 ммоль) и N-гидроксисукциниимида в DCM (1,5 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 1,5 ч. Добавляли дополнительное количество N-гидроксисукциниимида (10 мг) в THF (0,5 мл) и DCC (22 мг) в DCM (0,265 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение ночи. Растворитель выпаривали и остаток очищали колоночной фланш-хроматографией (диоксид кремния 12, 0-5% MeOH/DCM) с получением промежуточного соединения 36 (159 мг, количественный) в виде белого твердого вещества.

ЖХ/МС способ B: Rt=1,55 мин, [M+H<sub>3</sub>O+H]<sup>+2</sup> 933,9.

## Промежуточное соединение 37:

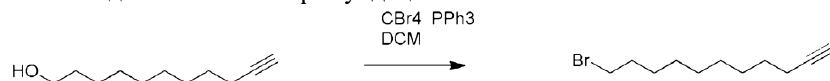


К раствору промежуточного соединения 36 (159 мг, 0,086 ммоль) в THF (5 мл) добавляли суспензию 10% Pd на углероде (4,6 мг, 4,3 мкмоль) в THF (1 мл). Реакционную смесь помещали в атмосферу водорода и перемешивали в течение 40 мин. Добавляли дополнительное количество Pd на углероде (7 мг, 6,5 мкмоль) и перемешивали еще в течение 1 ч в атмосфере водорода. Реакционную смесь пропускали через мембранный фильтр и фильтрат упаривали. Остаток очищали при помощи ВЭЖХ (Sunfire C18, 30×50 мм, 45-70% ACN/вода + 0,1% TFA) с получением указанного в заголовке соединения (83 мг, 0,047 ммоль, 54%).

ЖХ/МС способ B: Rt=1,03 мин, [M+2H]<sup>+2</sup> 835,2;

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,84-0,94 (м, 3H), 1,17 (шир.с, 2H), 1,21-1,39 (м, 30H), 1,57-1,68 (м, 2H), 1,69-1,80 (м, 2H), 1,97-2,10 (м, 2H), 2,34 (т, J=7,21 Гц, 2H), 2,86 (с, 4H), 2,92 (т, J=6,48 Гц, 2H), 3,51-3,73 (м, 96H), 3,87 (т, J=6,48 Гц, 2H), 7,45 (т, J=4,46 Гц, 1H).

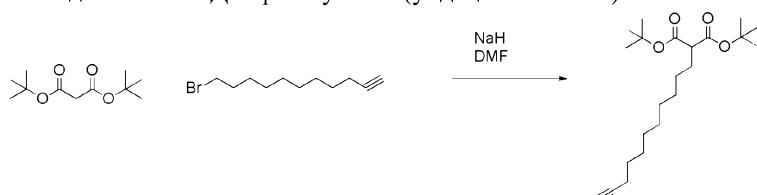
## Промежуточное соединение 38. 11-Бромундец-1-ин:



К раствору 10-ундекин-1-ола (2,29 мл, 11,9 ммоль) и тетрабромида углерода (4,34 г, 13,1 ммоль) в DCM (10 мл) в атмосфере N<sub>2</sub> при 0°C добавляли трифенилfosфин (3,43 г, 13,1 ммоль) по порциям в течение 30 мин. После того как добавление было завершено, реакционную смесь давали нагреться до комнатной температуры. Через 1,5 ч реакционную смесь выливали в перемешиваемый циклогексан (75 мл) и осадок собирали. Твердое вещество промывали циклогексаном и объединенные фильтраты упаривали. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией (диоксид кремния 80 г, 0-10% EtOAc/HEP) с получением указанного в заголовке соединения (1,75 г, 7,57 ммоль, 64%).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 1,21-1,35 (м, 6H), 1,35-1,48 (м, 4H), 1,48-1,59 (м, 2H), 1,80-1,91 (м, 2H), 1,94 (т, J=2,63 Гц, 1H), 2,19 (тд, J=7,09, 2,69 Гц, 2H), 3,41 (т, J=6,85 Гц, 2H).

## Промежуточное соединение 39. Ди-трет-бутил 2-(ундек-10-ин-1-ил)малонат:

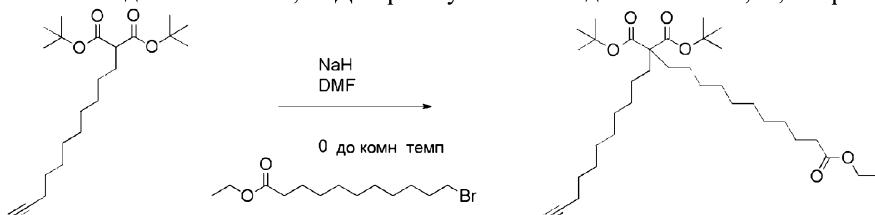


Ди-трет-бутилмалонат (800 мг, 3,70 ммоль) растворяли в DMF (9 мл) при 0°C в атмосфере N<sub>2</sub> и добавляли NaH (148 мг, 3,70 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 30 мин при 0°C и добавляли промежуточное соединение 38 (770 мг, 3,33 ммоль) медленно по каплям с получением желтого раствора. Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч, затем нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. Смесь поглащали в EtOAc (75 мл) и промывали при помощи H<sub>2</sub>O (25 мл). Водный слой экстрагировали при помощи EtOAc (75 мл) и объединенные органические слои сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали. Смесь очищали два раза колоночной флэш-хроматографией (картридж 12 г диоксида кремния, 0-20% EtOAc/гептан) и фракции концентрировали с получением 162,1 мг желаемого продукта в виде бесцветного масла (12%).

ЖХ/МС (Waters Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 мкм, 2,1×50 мм, 50°C, Растворитель А: вода + 0,1% муравьиной кислоты, Растворитель В: ацетонитрил+0,1% муравьиной кислоты, 98% В в течение 2,20 мин): Rt=1,37 мин, МС [M+H]<sup>+</sup> наблюдали: 366,0, рассчитано: 366,535.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d): δ м.д. 1,29 (с, 10H), 1,47 (с, 18H), 1,52 (дд, J=14,78, 7,20 Гц, 3H), 1,48 (д, J=1,26 Гц, 1H), 1,75-1,83 (м, 2H), 1,94 (т, J=2,65 Гц, 1H), 2,18 (тд, J=7,14, 2,65 Гц, 2H), 3,11 (т, J=7,58 Гц, 1H).

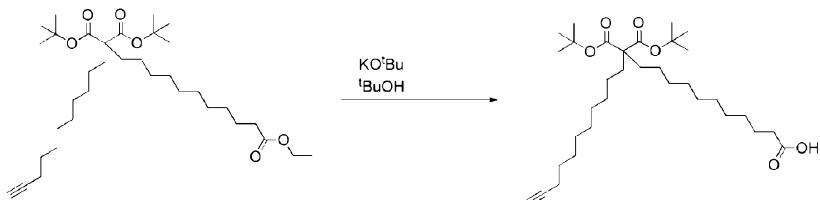
## Промежуточное соединение 40. 11,11-Ди-трет-бутил 1-этил докоз-21-ин-1,11,11-трикарбоксилат:



Промежуточное соединение 39 (162,1 мг, 0,442 ммоль) растворяли в DMF (2 мл) при 0°C и добавляли NaH (21,23 мг, 0,531 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 15 мин и добавляли медленно по каплям этил 11-бромундеканоат (143 мг, 0,486 ммоль). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. Смесь разбавляли при помощи EtOAc (40 мл) и промывали один раз при помощи H<sub>2</sub>O (20 мл). Водный слой экстрагировали один раз при помощи EtOAc (40 мл) и органические слои объединяли, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением прозрачного желтого масла. Образец растворяли в 1 мл DCM и очищали колоночной флэш-хроматографией (колонка с 12 г диоксида кремния, 0-20% EtOAc/гептан, 15 мин). Фракции объединяли и концентрировали с получением 90,1 мг желаемого продукта (35%).

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-d): δ м.д. 1,28 (шир.с, 24H), 1,45 (с, 18H), 1,48 (с, 3H), 1,53 (д, J=7,58 Гц, 3H), 1,51 (с, 1H), 1,64 (шир.с, 1H), 1,61 (д, J=7,33 Гц, 1H), 1,77 (д, J=16,93 Гц, 2H), 1,74-1,80 (м, 2H), 1,94 (т, J=2,65 Гц, 1H), 2,18 (тд, J=7,07, 2,53 Гц, 2H), 2,29 (т, J=7,58 Гц, 2H), 4,13 (кв., J=7,24 Гц, 2H).

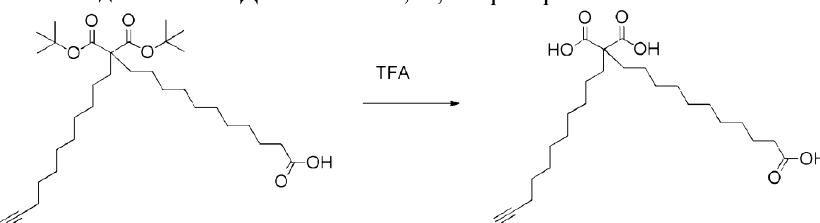
## Промежуточное соединение 41. 12,12-бис-(трет-Бутоксикарбонил)трикоз-22-иновая кислота:



К раствору промежуточного соединения 40 (21,7 мг, 0,037 ммоль) в t-BuOH (1 мл) добавляли раствор KOtBu (114 мг, 1,012 ммоль) в t-BuOH (2 мл) при 30°C в атмосфере N<sub>2</sub>. Смесь перемешивали при комнатной температуре и контролировали при помощи ТСХ (1:1 EtOAc/гексан, KMnO<sub>4</sub>, обратный холодильник). Исходное вещество поглощалось через 3 ч, и реакционную смесь гасили при помощи 1 M HCl (20 мл) и экстрагировали два раза при помощи EtOAc (25 мл). Органические слои объединяли, сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением прозрачного бесцветного масла (18 мг, 87%). Это вещество использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

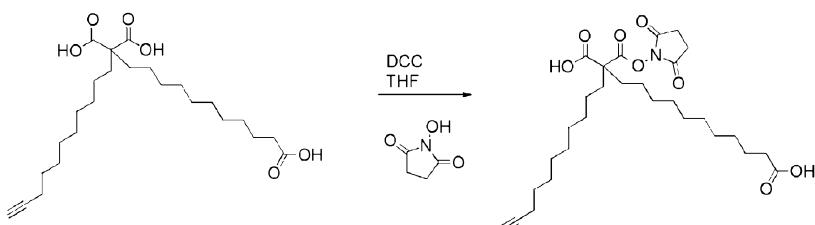
<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-д): δ м.д. 1,27 (шир.с, 22H), 1,44 (шир.с, 18H), 1,48 (с, 3H), 1,52 (с, 3H), 1,62 (шир.с, 2H), 1,77 (шир.с, 4H), 1,94 (шир.с, 1H), 2,18 (с, 2H), 2,35 (с, 2H).

Промежуточное соединение 42. Докоз-21-ин-1,11,11-трикарбоновая кислота:



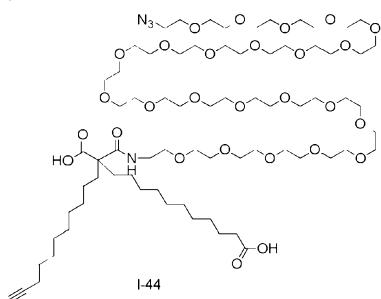
TFA (2 мл) добавляли к промежуточному соединению 41 (12 мг, 0,022 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Смесь разбавляли при помощи DCM (10 мл) и концентрировали два раза с получением коричневого масла. Это вещество поглощали в EtOAc (10 мл) и промывали при помощи H<sub>2</sub>O (20 мл). Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением коричневого масла. Неочищенное вещество растворяли в 1 мл MeOH и очищали через связанную с масс-спектрометрией систему ВЭЖХ ВЭЖХ (колонка Sunfire 30×50 мм, 5 мкм, ACN/H<sub>2</sub>O с 0,1% TFA 75 мл/мин, объем вводимой пробы 1,5 мл, 45-70% ACN в течение 3,5 мин): Rt=3,42 мин; MC [M+H+Na] наблюдали: 461,00, рассчитано: 461,597. Фракции объединяли и лиофилизировали с получением 5,3 мг указанного в заголовке соединения с выходом 56%.

Промежуточное соединение 43. 2-(((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)карбонил)-2-(ундец-10-ин-1-ил)тридекандиовая кислота:



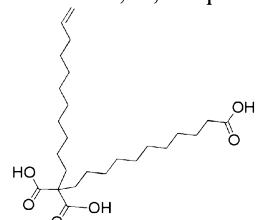
К раствору промежуточного соединения 42 (5,3 мг, 0,012 ммоль) в THF (0,5 мл) добавляли N-гидрокисукцинимид (1,53 мг, 0,013 ммоль). Добавляли раствор DCC (2,493 мг, 0,012 ммоль) в THF (0,5 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере N<sub>2</sub> в течение 4 ч. Наблюдали полное преобразование исходного вещества при помощи ЖХ/МС. Смесь концентрировали и использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ/МС (Sunfire C18 3,5 мкм 3,0×30 мм, 40°C, кислотный элюент А: вода + 0,05% трифтормукусной кислоты, щелочной элюент А: вода + 5 мМ гидроксида аммония, элюент В: ACN, 5-95% в течение 2 мин): Rt=1,72 мин; MC [M+H+Na] наблюдали: 558,0, рассчитано: 558,67.

Промежуточное соединение 44:



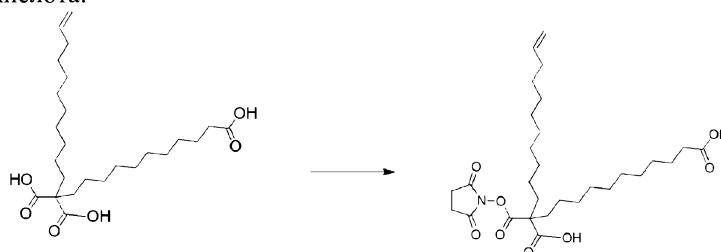
К раствору промежуточного соединения 43 (3,2 мг, 5,97 мкмоль) в DCM (0,5 мл) добавляли раствор азидо-d-ПЭГ23-амина (Quanta Biodesign, 7,88 мг, 7,17 мкмоль) в DCM (0,5 мл) и DIPEA (2,09 мкл, 0,012 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч, сразу после этого наблюдали преобразование исходного вещества при помощи ЖХ/МС. Реакционную смесь концентрировали и растворяли в 1 мл MeOH и очищали на связанный с масс-спектрометрией системе ВЭЖХ (колонка Sunfire 30×50 мм 5 мкм, ACN/H<sub>2</sub>O с 0,1% TFA 75 мл/мин, объем вводимой пробы 1,5 мл, градиент 55-80% ACN 5 мин, Rt=1,92 мин) и фракции объединяли и лиофилизовали с получением 1,7 мг указанного в заголовке соединения с выходом 19%. ЖХ/МС (Acquity BEH 1,7 мкм 2,1×50 мм 50°C, Растворитель А: вода + 0,1% муравьиной кислоты, Растворитель В: ацетонитрил + 0,1% муравьиной кислоты, 98% В в течение 2,20 мин): Rt=1,89 мин; МС [M+H/2] наблюдали: 760,0, рассчитано: 759,5.

Промежуточное соединение 45. Докоз-21-ен-1,11,11-трикарбоновая кислота:



Промежуточное соединение 45 получали, следуя процедуре получения промежуточного соединения 39-42, используя 11-бром-дец-1-ен вместо 11-бром-дец-1-ина.

Промежуточное соединение 46. 2-((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)карбонил)-2-(ундец-10-ен-1-ил)тридекандиовая кислота:

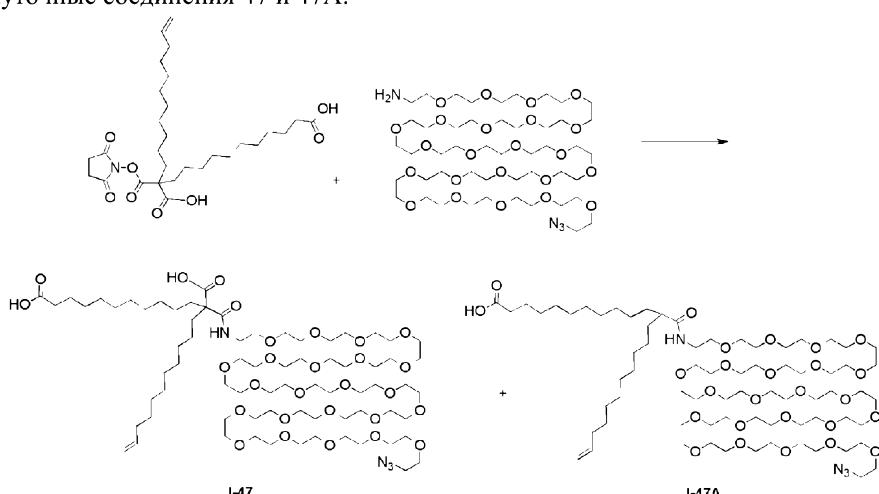


DCC (187 мг, 0,908 ммоль) в DCM (2 мл) добавляли к раствору N-гидрокисукцинида (99 мг, 0,862 ммоль) и докоз-21-ен-1,11,11-трикарбоновой кислоты (промежуточное соединение 45: 400 мг, 0,908 ммоль) в DCM (7 мл) и THF (0,7 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи, затем растворитель выпаривали. Остаток очищали при помощи ВЭЖХ (Sunfire C18 30×50 мм; 55-80% ACN/вода + 0,1% TFA) с получением указанного в заголовке соединения (155 мг, 0,288 ммоль, 32%).

ЖХ/МС способ С Rt=1,51 мин, M+H 538,3;

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 1,16-1,46 (м, 28H), 1,60-1,87 (м, 3H), 1,91-2,17 (м, 5H), 2,38 (т, J=7,03 Гц, 2H), 2,86 (шир.с, 4H), 3,68 (дд, J=11,25, 7,34 Гц, 1H), 3,78 (дд, J=11,31, 5,20 Гц, 1H), 3,99-4,10 (м, 1H).

Промежуточные соединения 47 и 47А:



Азидо-d-ПЭГ23-амин (Quanta Biodesign: 164 мг, 0,149 ммоль) и промежуточное соединение 46 (80 мг, 0,149 ммоль) растворяли в THF (2,5 мл). Добавляли DIPEA (39 мкл, 0,233 ммоль) и реакционную смесь встряхивали в течение ночи. Растворитель выпаривали и остаток очищали при помощи ВЭЖХ (Sunfire C18 30×50 мм; 45-70% ACN/вода + 0,1% TFA) с получением соединений 47 (97 мг, 0,061 ммоль,

41%) и 47A (32 мг, 0,021 ммоль, 14%).

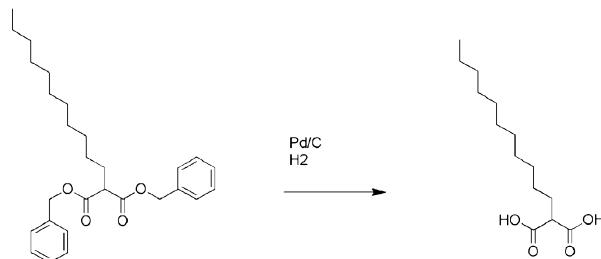
ЖХ/МС способ С Rt=1,35 мин,  $[M+2H]^{+2}$  761,9;

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, АЦЕТОНИТРИЛ-d<sub>3</sub>):  $\delta$  м.д. 1,05-1,18 (м, 3H), 1,19-1,32 (м, 20H), 1,36 (т, J=7,15 Гц, 1H), 1,48-1,59 (м, 2H), 1,65-1,75 (м, 2H), 2,01-2,06 (м, 2H), 2,25 (т, J=7,46 Гц, 2H), 3,33-3,39 (м, 2H), 3,39-3,44 (м, 2H), 3,50-3,67 (м, 98H), 4,84-4,95 (м, 1H), 4,95-5,06 (м, 1H), 5,83 (ддт, J=17,07, 10,29, 6,68, 6,68 Гц, 1H), 7,31 (т, J=5,44 Гц, 1H);

ЖХ/МС способ С Rt=1,50 мин,  $[M+2H]^{+2}$  739,9;

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, АЦЕТОНИТРИЛ-d<sub>3</sub>):  $\delta$  м.д. 1,16-1,42 (м, 30H), 1,42-1,63 (м, 5H), 2,00-2,07 (м, 2H), 2,22-2,28 (м, 2H), 2,40-2,52 (м, 2H), 3,25-3,33 (м, 2H), 3,33-3,42 (м, 2H), 3,42-3,50 (м, 2H), 3,50-3,68 (м, 88H), 4,86-5,06 (м, 2H), 5,83 (ддт, J=17,04, 10,26, 6,71, 6,71 Гц, 1H), 6,40-6,74 (м, 1H).

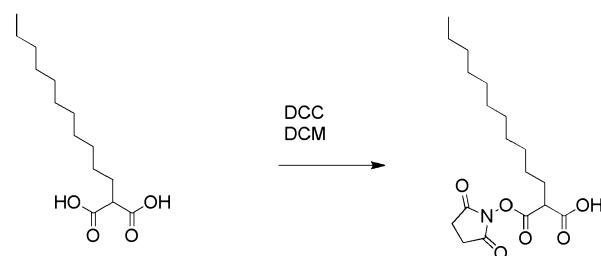
Промежуточное соединение 48. 2-Ундецилмалоновая кислота:



С использованием промежуточного соединения 22 (290 мг, 0,661 ммоль) указанное в заголовке соединение (185 мг, количественный) синтезировали таким же способом, как промежуточное соединение 19.

ЖХ/МС способ В ЖХ/МС Rt=0,82 мин, M-H 257,3.

Промежуточное соединение 49. 2-((2,5-Диоксопирролидин-1-ил)окси)карбонил)тридекановая кислота:

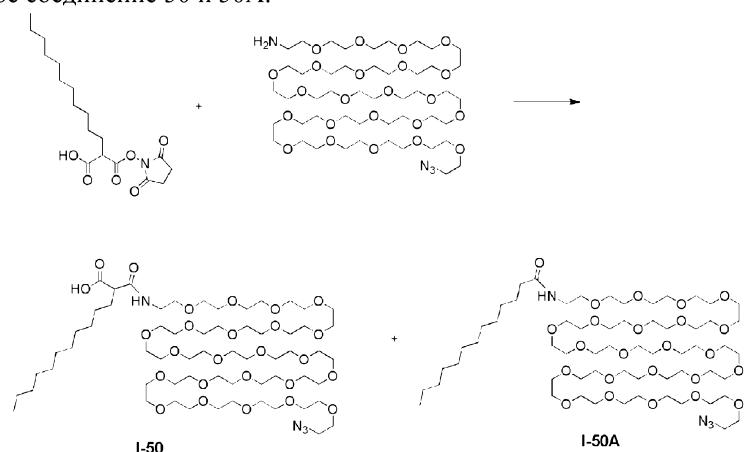


DCC (122 мг, 0,592 ммоль) добавляли к раствору промежуточного соединения 48 (170 мг, 0,658 ммоль) и N-гидроксисукцинидима (68 мг, 0,592 ммоль) в DCM (6 мл) и THF (0,5 мл). Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч, затем добавляли дополнительное количество DCC (30 мг, 0,145 ммоль) в DCM (0,5 мл). Реакционную смесь перемешивали еще в течение 2 дней. Растворитель выпаривали и остаток очищали при помощи ВЭЖХ (Sunfire C18, 30×50 мм, 45-70% ACN/вода + 0,1% TFA) с получением указанного в заголовке соединения в виде белого порошка (46 мг, 0,129 мг, 20%).

ЖХ/МС способ В Rt=0,94 мин, M+H 356,3;

$^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d):  $\delta$  м.д. 0,89 (т, J=7,00 Гц, 3H), 1,20-1,40 (м, 16H), 1,43-1,55 (м, 2H), 1,99-2,14 (м, 2H), 2,86 (с, 4H), 3,71 (т, J=7,46 Гц, 1H).

Промежуточное соединение 50 и 50A:



Указанные в заголовке соединения синтезировали способом, аналогичным способу получения 50 и 50A, из промежуточного соединения 49 (30 мг, 0,084 ммоль) с получением промежуточного соединения 50 (18 мг, 0,013 ммоль, 16%) и промежуточного соединения 50A (5 мг, 4 мкмоль, 5%).

ЖХ/МС способ В Rt=0,85 мин, М+Н 1340,3;

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, ХЛОРОФОРМ-d): δ м.д. 0,82-0,98 (м, 3Н), 1,20-1,36 (м, 16Н), 1,36-1,51 (м, 2Н), 1,83-2,02 (м, 1Н), 2,11-2,27 (м, 1Н), 2,33 (дд, J=11,80, 4,22 Гц, 1Н), 3,41 (т, J=5,14 Гц, 3Н), 3,49 (д, J=5,01 Гц, 1Н), 3,56-3,79 (м, 92Н);

ЖХ/МС способ В Rt=0,96 мин, М+Н 1296,3.

Промежуточные соединения 51-57. Мутант GDF15 белка.

Экспрессия человеческих GDF-15 белков в клетках E.coli.

Клетки E.coli штаммов BL21 (DE3) Gold (Stratagene) и Rosetta (DE3) pLysS (Novagen) трансформировали конструкциями 51-56 и конструкцией МАНА-(200-308)-hGDF15 соответственно, клонированными в pET26b векторы. Трансформированные клетки выращивали в селективной среде с антибиотиками сначала в 3 мл и затем в 50 мл Luria Broth (Бакто-Триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 5 г/л, глюкоза 6 г/л) вплоть до достижения OD<sub>600</sub> = 1,5. Прекультуры использовали для инокуляции двух 1-л биореакторов, содержащих Terrific Broth среду (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> 1,2 г/л, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,041 г/л, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,052 г/л, бакто-триптон 12 г/л, дрожжевой экстракт 24 г/л). Культуры индуцировали автоматическим добавлением 1 мМ изопропил-бета-D-тиогалактопиранозида (IPTG), когда pH повышался выше 7,1. Другие параметры ферментации были следующими: темп. = 37°C; pH 7,0±0,2, доведенный путем добавления 2н. NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; рО2>30% с каскадами скорости мешалки, воздушного потока и добавления кислорода. Через 5 ч после индукции культуры охлаждали до 10°C и клетки собирали центрифугированием.

Очистка и рефолдинг GDF15 вариантов.

а) Тельца включения.

Осадки после центрифугирования рекомбинантных coli, экспрессирующих белок, представляющий интерес, ресуспенсировали (5% мас./об.) в 50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/150 мМ NaCl/5 мМ бензамидина-HCl/5 мМ DTT, pH 8,0 при 4°C, гомогенизировали и лизировали двумя пассажами через пресс Френча (800 и 80 бар). Тельца включения (IBs) выделяли центрифугированием при 12000 об/мин в течение 60 мин при 4°C.

б) Очистка неочищенного неструктурированного белка

IBs солюбилизовали (5% масс/об) в 6 М гуанидина/100 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/10 мМ Трис/20 мМ бета-меркаптоэтанола, pH 8,0 и перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Дебрис удаляли центрифугированием при 12000 об/мин. Солюбилизованные IBs снова очищали на Ni-NTA-Superflow (конструкция без His метки связывается также с этой смолой из-за высокого содержания гистидина). После базовой промывки при помощи 6 М гуанидина/100 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/10 мМ Трис/5 мМ бета-меркаптоэтанола, pH 8,0, связанное вещество элюировали с использованием того же буфера, доведенного до pH 4,5. Элюат доводили до pH 8,0, добавляли 100 мМ DTT и раствор перемешивали в течение ночи при 4°C. pH затем доводили до 2 путем добавления трифтормукусной кислоты (TFA, 10% исходный раствор в воде) и раствор снова разбавляли 1:1 при помощи 0,1% TFA в воде. Раствор неочищенного белка снова очищали при помощи ОФ-ВЭЖХ (Poros) с использованием градиента 0-50% ацетонитрила в течение 50 мин. Содержащие GDF-15 фракции объединяли и лиофилизировали.

с) Укладка белка

Способ 1.

Лиофилизированное вещество растворяли при 2 мг/мл в 100 мМ уксусной кислоте, разбавляли 15-20-кратно в буфере для фолдинга (100 мМ CHES/1 М NaCl/30 мМ CHAPS/5 мМ GSH/0,5 мМ GSSG/20% DMSO, pH 9,5, 4°C) и раствор осторожно перемешивали в течение 3 дней при 4°C. Через 3 дня добавляли 3 объема 100 мМ уксусной кислоты и раствор концентрировали ультрафильтрацией (5 кДа отсечка) до около 100-200 мл, разбавляли 10-кратно при помощи 100 мМ уксусной кислоты и снова концентрировали. "Свернутое" вещество снова очищали препаративной ОФ-ВЭЖХ на Vydac C4 колонке при 50°C (буфер А: 0,1% TFA в воде; буфер В: 0,05% TFA в ацетонитриле). После загрузки колонку промывали 15% буфером В и элюировали с градиентом 15% В до 65% В в течение 50 мин. Собранные фракции, содержащие белок, представляющий интерес, разбавляли равным объемом буфера А и лиофилизировали. В результате рефолдинга получали около 25% обоих белков.

Способ 2.

Следовали протоколу, как в способе 1, с буфером для фолдинга: 100 мМ CHES, pH 9,4, 0,9 М аргинина, 0,5 М NaCl, 1 мМ EDTA, 2,5 мМ GSH, 1 мМ GSSG (конечная концентрация).

Следующие GDF15 мутанты были получены в соответствии с описанной выше процедурой:

Промежуточное соединение 51. M-(His)<sub>6</sub>-hGDF15:

MHHHH HHAR NGDHC PLGPG RCCRL HTVRA SLEDL GWADW VLSPR EVQVT  
MCIGA CPSQF RAAHM HAQIK TSLHR LKPDT VPAPC CVPAS YNPMV LIQKT

DTGVS LQTYD DLLAK DCHCI (SEQ ID NO: 1)

ЖХ/МС: Рассчитанная масса: 26462. Наблюдаемая масса: 26464.

Промежуточное соединение 52. M-(His)<sub>6</sub>-M-hGDF15:



исходного раствора (1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил(2,5-диоксопирролидин-1-ил)карбоната (NHS-BCN) в DMSO (251 мкл) и реакционную смесь встряхивали на планшетном шейкере при 24°C в течение 21 ч. Реакционную смесь разбавляли до 30 мл при помощи 30 mM NaOAc pH 4,5 буфера и концентрировали до 2 мл с использованием 10 кДа MWCO ультрафильтрационного картриджа (повторяли 4x) с получением 2,5 мл концентрата. На основании  $A_{280}$  ( $\epsilon=29090 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , 26730 г/моль) концентрят представлял собой 0,93 мг/мл (2,33 мг, 80%): ЖХ/МС QT2 15-60 кДа, 15 мин, полярный (способ Е). Полученный раствор анализировали методом MALDI, показывавшим основную коньюгацию +1 и +2 (N-концевое мечение мономера и димера).

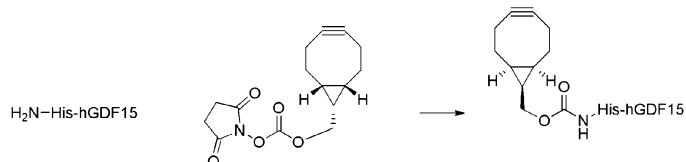
Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	TIC (MS+) интенсивность %
GDF15	26726	26726	26
GDF15 +1BCN	26903	26904	43
GDF15 +2BCN	27080	27080	23
GDF15 +3BCN	27257	27256	9

His-hGDF15 +1BCN (бицикло[6.1.0]нон-4-инил) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе в одной молекуле GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +2BCN соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обоих мономерных звеньях GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +3BCN соответствует неселективной реакции на каком-либо другом участке GDF15 гомодимера.

Промежуточное соединение 59. His-hGDF15 BCN коньюгат:



His-hGDF15 последовательность:

MHHHH HHAR NGDHC PLGPG RCCRL HTVRA SLEDL GWADW VLSPR EVQVT  
MCIGA CPSQF RAAHM HAQIK TSLHR LKPDT VPAPC CVPAS YNPMV LIQKT  
DTGVS LQTYD DLLAK DCHCI

Исходный раствор His-hGDF15 (промежуточное соединение 51: 7,04 мл, 1,42 мг/мл) разбавляли до 0,5 мг/мл при помощи 30 mM NaOAc pH 4,5 буфера (12,95 мл). Медленно добавляли 10 мг/мл исходного раствора (1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил(2,5-диоксопирролидин-1-ил)карбоната (NHS-BCN) в DMSO (0,88 мл) и реакционную смесь встряхивали на планшетном шейкере при 24°C в течение 24 ч. Добавляли дополнительную порцию NHS-BCN исходного раствора (176 мкл) и реакционную смесь выдерживали при 24°C в течение 24 ч. Реакционную смесь разбавляли до 60 мл при помощи 30 mM NaOAc pH 4,5 буфера и концентрировали до 4 мл с использованием 10 кДа MWCO ультрафильтрационного картриджа (повторяли 4x) с получением 4,1 мл концентрата. На основании  $A_{280}$  ( $\epsilon=29090 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , 26700 г/моль) концентрят представлял собой 2,19 мг/мл (8,98 мг, 89%): ЖХ/МС QT2 15-60 кДа, 15 мин, полярный (способ Е).

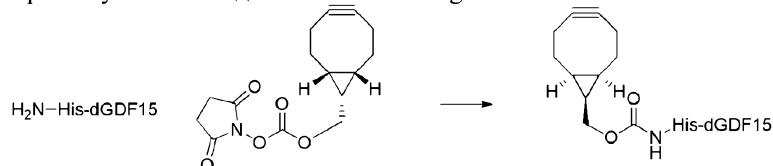
Степень мечения	Рассчитано	Наблюдал	TIC (MS+) интенсивность %
		и	
GDF15	26468	26464	33
GDF15 +1BCN	26645	26640	34
GDF15 +2BCN	26822	26817	21
GDF15 +3BCN	26999	26993	3

His-hGDF15 +1BCN (бицикло[6.1.0]нон-4-инил) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе в одной молекуле GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +2BCN соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обоих мономерных звеньях GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +3BCN соответствует неселективной реакции на каком-либо другом участке GDF15 гомодимера.

Промежуточное соединение 60. His-dGDF15-BCN:



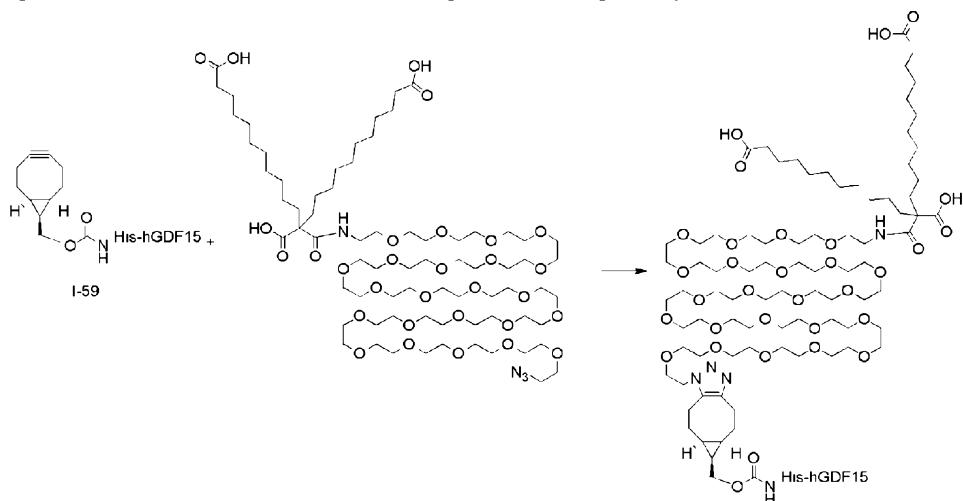
100 мкл His-dGDF15 (0,68 мг/мл), 100 мкл pH 4,5 буфера, 4 мкл 10 мг/мл BCN-NHS раствора объединяли и инкубировали при комнатной температуре в течение двух дней. Полученную смесь промывали при помощи Amicon 10k 4 раза с получением 200 мкл раствора, который использовали на следующей стадии. Продукт использовали неочищенным для дальнейшего преобразования в конъюгат.

#### Примеры по настоящему изобретению

Общая процедура для His-hGDF15+жирная кислота-ПЭГ-N<sub>3</sub> клик-химии.

BCN-меченный GDF15 разбавляли до 0,5 мг/мл в 30 mM NaOAc pH 4,5 буфере, в это время получали 10 мг/мл раствор FA-ПЭГ-N<sub>3</sub> (жирная кислота-ПЭГ23-азид) в воде. К GDF15 раствору добавляли 10 экв. FA-ПЭГ-N<sub>3</sub> и реакционную смесь встряхивали на планшетном шейкере при 24°C в течение ночи. Развитие реакции отслеживали при помощи ЖХ/МС (QTOF метод 15-60 кДа, 15 мин полярный) и добавляли дополнительное количество FA-ПЭГ-N<sub>3</sub>, если необходимо до 50 экв., до тех пор, пока больше не наблюдали никакого непрореагировавшего BCN-меченого GDF15. Реакционную смесь затем разбавляли 5-10× буфером 30 mM NaOAc pH 4 и буфер заменяли свежим буфером с использованием 10 кДа MWCO ультрафильтрационного картриджа (4 цикла концентрирования с последующим разбавлением). Образец концентрировали до ~1 мг/мл, как было измерено на основании A<sub>280</sub>, выходы были количественными до 34%. Конечные конъюгаты анализировали при помощи ЖХ/МС (QTOF метод 15-60 кДа, 15 мин полярный) или Maldi.

Пример 1. His-hGDF15 BCN (I-59), конъюгированный с промежуточным соединением 21:



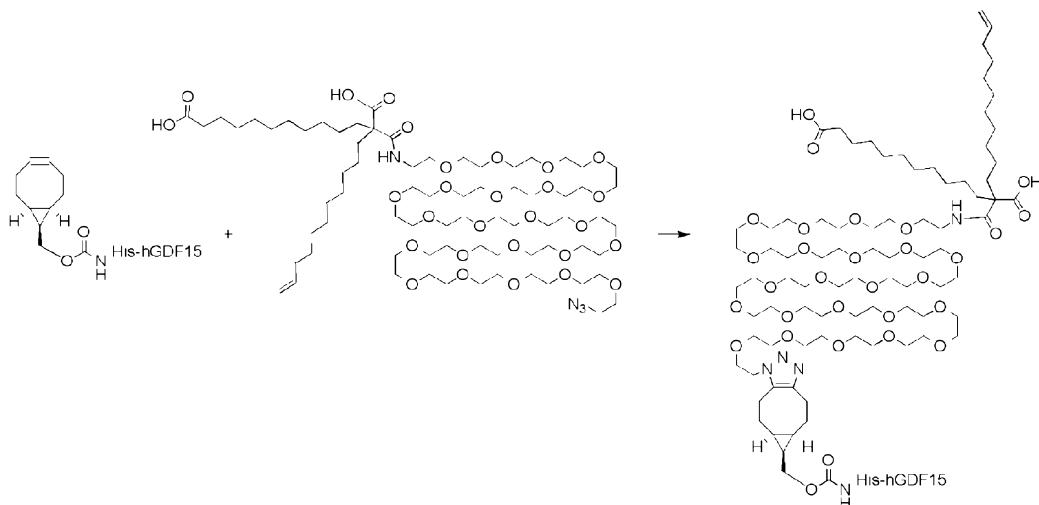
Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	% AUC при 280 нм
His-hGDF15	26468	26466	18
His-hGDF15 +1FA	28198	28192	36
His-hGDF15 +2FA	29928	29926	35
His-hGDF15 +3FA	31658	31654	11

His-hGDF15 +1FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе в одной молекуле (одно мономерное звено) GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +2FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обоих мономерных звеньях GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +3FA (жирная кислота) соответствует неселективной реакции на каком-либо другом участке GDF15 гомодимера.

Пример 2. His-hGDF15 BCN (I-59), конъюгированный с промежуточным соединением 44:



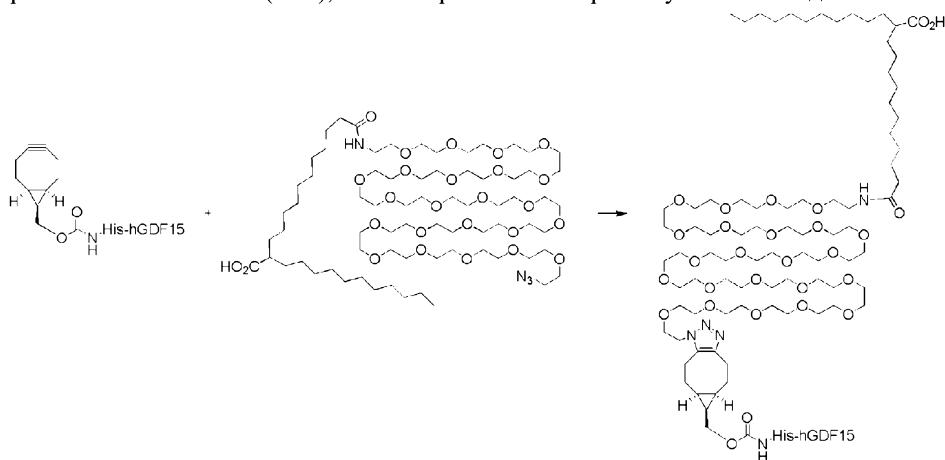
Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	% AUC при 280 нм
His-hGDF15	26464	26464	38
His-hGDF15 +1FA	28162	28162	33
His-hGDF15 +2FA	29860	29860	21
His-hGDF15 +3FA	31558	31558	9

His-hGDF15 +1FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе в одной молекуле (одно мономерное звено) GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +2FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обоих мономерных звеньях GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +3FA (жирная кислота) соответствует неселективной реакции на каком-либо другом участке GDF15 гомодимера.

Пример 3. His-hGDF15 BCN (I-59), конъюгированный с промежуточным соединением 29A:



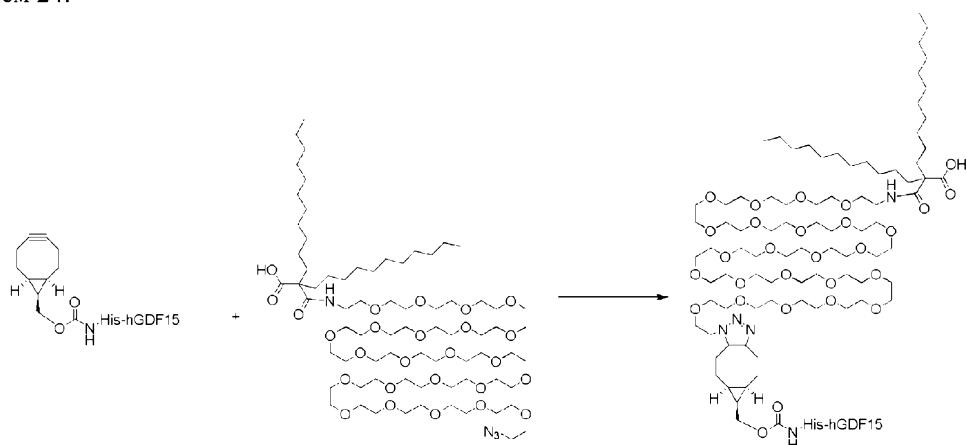
Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	% AUC при 280 нм
His-hGDF15	26464	26466	50
His-hGDF15 +1FA	28124	28120	28
His-hGDF15 +2FA	29780	29776	16
His-hGDF15 +3FA	31436	31432	7

His-hGDF15 +1FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе в одной молекуле (одно мономерное звено) GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +2FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обоих мономерных звеньях GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +3FA (жирная кислота) соответствует неселективной реакции на каком-либо другом участке GDF15 гомодимера.

Пример 4. His-hGDF15 BCN (промежуточное соединение 58), конъюгированный с промежуточным соединением 24:



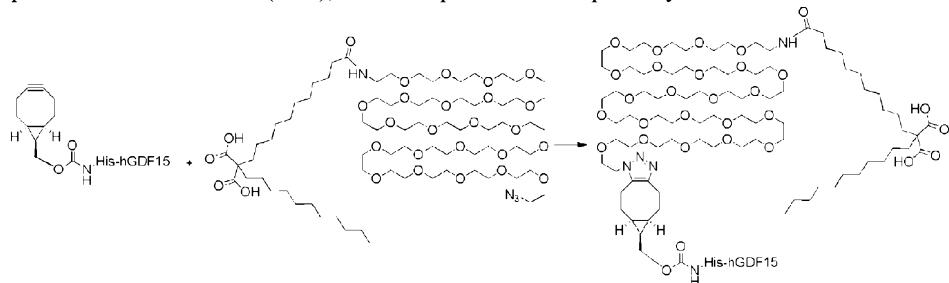
Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	% AUC при 280 нм
His-hGDF15	26726	26728	27
His-hGDF15 +1FA	28396	28398	42
His-hGDF15 +2FA	30066	30068	24
His-hGDF15 +3FA	31736	31738	7

His-hGDF15 +1FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе в одной молекуле (одно мономерное звено) GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +2FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обоих мономерных звеньях GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +3FA (жирная кислота) соответствует неселективной реакции на каком-либо другом участке GDF15 гомодимера.

Пример 5. His-hGDF15 BCN (I-58), конъюгированный с промежуточным соединением 29:



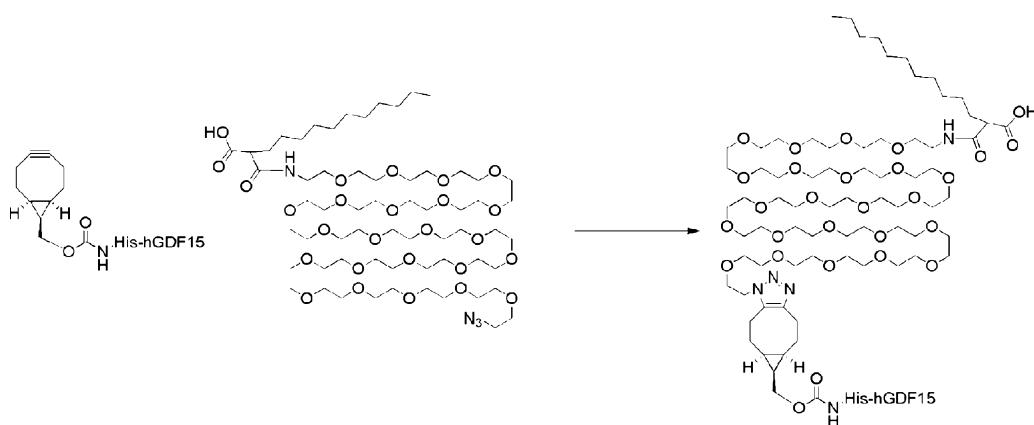
Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	% AUC при 280 нм
His-hGDF15	26726	26728	30
His-hGDF15 +1FA	28425	28426	36
His-hGDF15 +2FA	30125	30126	23
His-hGDF15 +3FA	31825	31740	12

His-hGDF15 +1FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе в одной молекуле GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +2FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обоих мономерных звеньях GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +3FA (жирная кислота) соответствует неселективной реакции на каком-либо другом участке GDF15 гомодимера.

Пример 6. His-hGDF15 BCN (I-58), конъюгированный с промежуточным соединением 55:



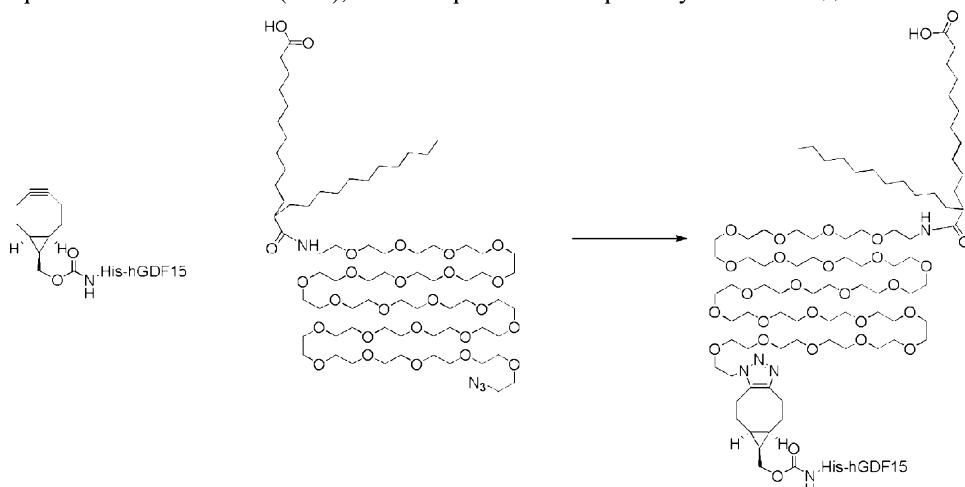
Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	% AUC при 280 нм
His-hGDF15	26726	26728	28
His-hGDF15 +1FA	28242	28243	36
His-hGDF15 +2FA	29758	29759	28
His-hGDF15 +3FA	31274	31275	11

His-hGDF15 +1FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе в одной молекуле GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +2FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обоих мономерных звеньях GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +3FA (жирная кислота) соответствует неселективной реакции на каком-либо другом участке GDF15 гомодимера.

Пример 7. His-hGDF15 BCN (I-58), конъюгированный с промежуточным соединением 6A:



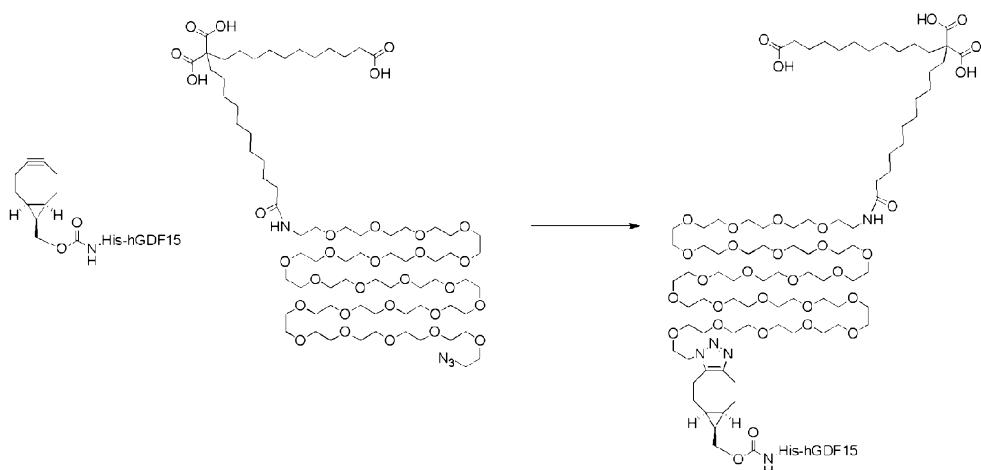
Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	% AUC при 280 нм
His-hGDF15	26726	26728	28
His-hGDF15 +1FA	28382	28382	42
His-hGDF15 +2FA	30038	30040	29
His-hGDF15 +3FA	31916	n/a	n/a

His-hGDF15 +1FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе в одной молекуле (одно мономерное звено) GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +2FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обоих мономерных звеньях GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +3FA (жирная кислота) соответствует неселективной реакции на каком-либо другом участке GDF15 гомодимера.

Пример 9. His-hGDF15 BCN (I-58), конъюгированный с промежуточным соединением 30:



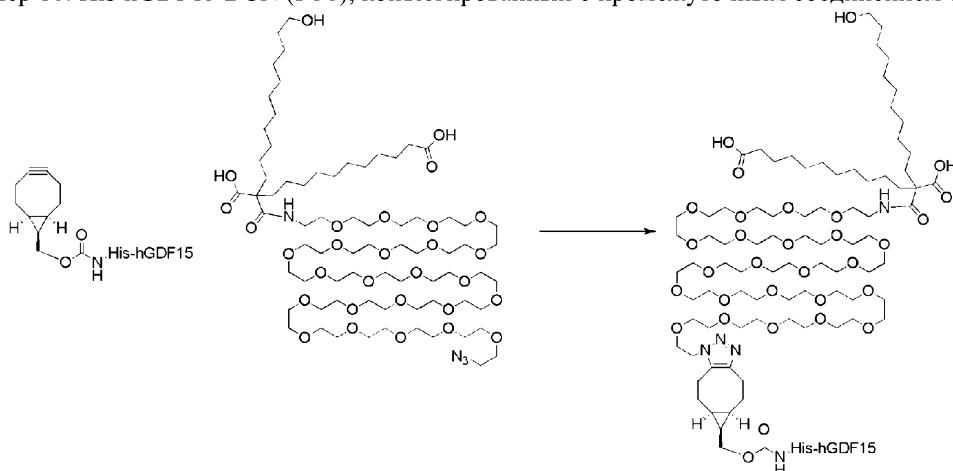
Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	% AUC при 280 нм
His-hGDF15	26726	26728	21
His-hGDF15 +1FA	28456	28456	47
His-hGDF15 +2FA	30186	30188	32
His-hGDF15 +3FA	31916	n/a	n/a

His-hGDF15 +1FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе в одной молекуле (мономерное звено) GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +2FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обеих молекулах (мономерных звеньях) GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +3FA (жирная кислота) соответствует неселективной реакции на каком-либо другом участке GDF15 гомодимера.

Пример 10. His-hGDF15 BCN (I-58), конъюгированный с промежуточным соединением 12:



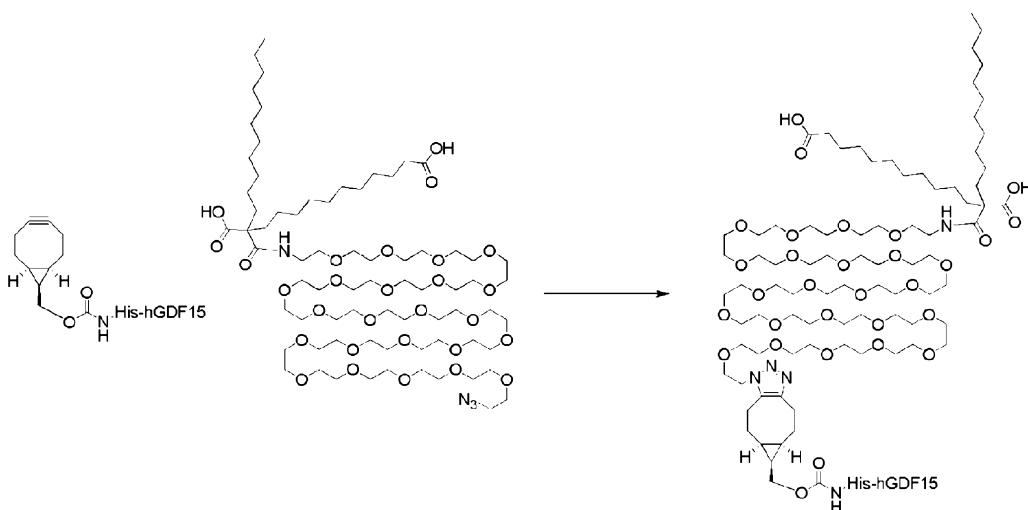
Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	% AUC при 280 нм
His-hGDF15	26726	26729	17
His-hGDF15 +1FA	28442	28445	37
His-hGDF15 +2FA	30158	30158	32
His-hGDF15 +3FA	31874	31877	13

His-hGDF15 +1FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе в одной молекуле (одно мономерное звено) GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +2FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обеих молекулах (мономерных звеньях) GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +3FA (жирная кислота) соответствует неселективной реакции на каком-либо другом участке GDF15 гомодимера.

Пример 13. His-hGDF15 BCN (I-59), конъюгированный с промежуточным соединением 6:



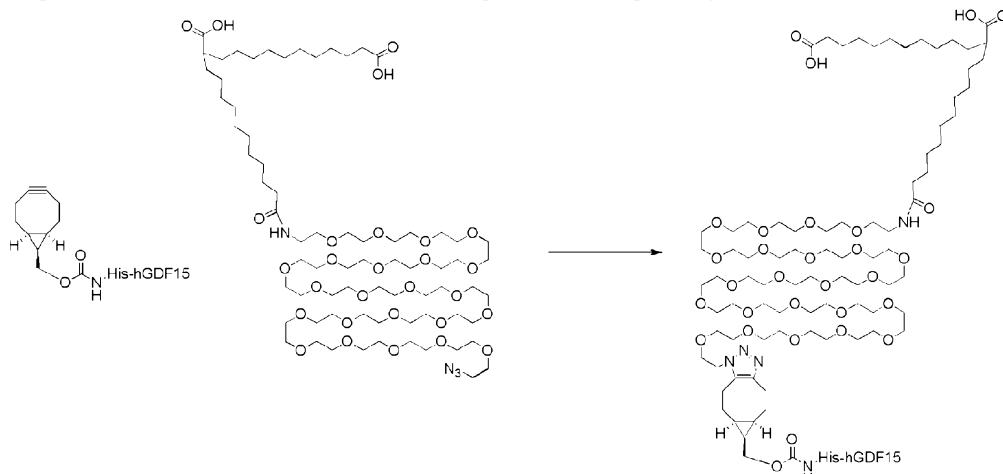
Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	% AUC при 280 нм
His-hGDF15	26468	26464	28
His-hGDF15 +1FA	28168	28164	42
His-hGDF15 +2FA	29868	29864	21
His-hGDF15 +3FA	31568	31564	10

His-hGDF15 +1FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе в одной молекуле (одно мономерное звено) GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +2FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обеих молекулах (оба мономерных звена) GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +3FA (жирная кислота) соответствует неселективной реакции на каком-либо другом участке GDF15 гомодимера.

Пример 14. His-hGDF15 BCN (I-58), конъюгированный с промежуточным соединением 17:



Степень нагрузки	Рассчитано	Наблюдали	% AUC при 280 нм
His-hGDF15	26726	26728	18
His-hGDF15 +1FA	28413	28414	34
His-hGDF15 +2FA	30100	30054	35
His-hGDF15 +3FA	31787	31726	13

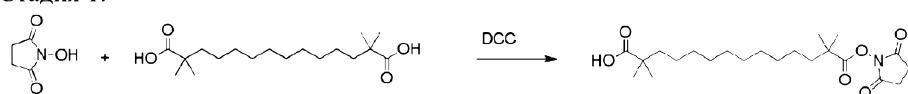
His-hGDF15 +1FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе в одной молекуле (одно мономерное звено) GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +2FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обеих молекулах (оба мономерных звена) GDF15 гомодимера.

His-hGDF15 +3FA (жирная кислота) соответствует неселективной реакции на каком-либо другом участке GDF15 гомодимера.

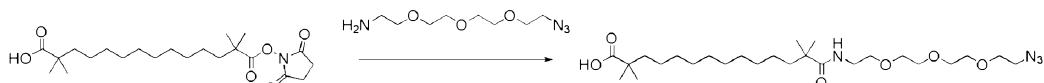
Пример 15.

Стадия 1.



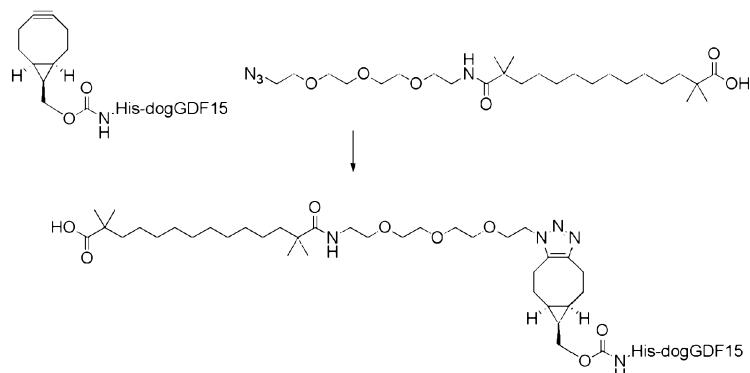
К раствору 2,2,13,13-тетраметилтетрадекандиовой кислоты (Aldrich CPR, номер заказа PH002322) (100 мг, 0,318 ммоль) и N-гидроксисукцинимида (40,3 мг, 0,35 ммоль) в THF (5 мл) добавляли раствор DCC (65,6 мг, 0,318 ммоль) в THF (5 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Частичное преобразование в желаемый продукт наблюдали при помощи ЖХ-МС анализа. Смесь фильтровали и фильтрат концентрировали. Остаток снова растворяли в DCM (40 мл) и промывали водой, сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и очищали хроматографией на диокside кремния, элюируя смесью гептан/EtOAc/DCC (10:1:1), с получением смеси. Смесь снова очищали на связанной с масс-спектрометрией системе ВЭЖХ с кислотной подвижной фазой [(градиент 55-80% ACN 3,5 мин):  $t_{\text{rt}}=2,48$  мин, рассчитанная масса: 314,46 наблюдаемая масса: 314,00] с получением чистого продукта (50 мг, 38,2% выход) и с выделением исходного вещества.

Стадия 2.



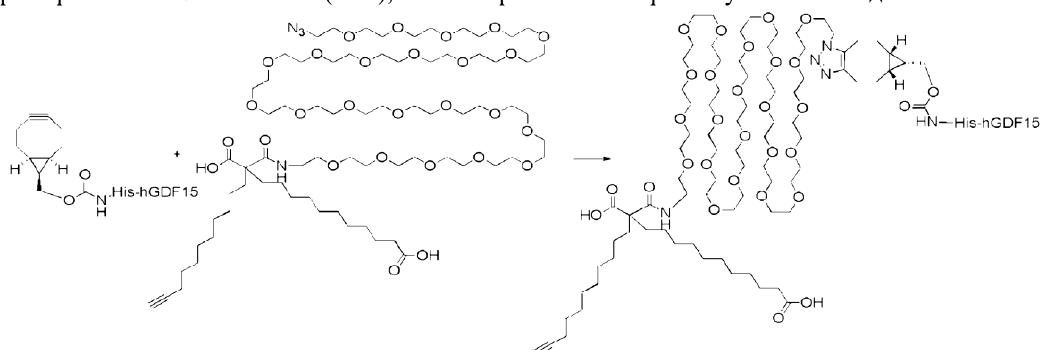
К раствору NHS-2,2,13,13-тетраметилтетрадекандиовой кислоты (10 мг, 0,024 ммоль) в DCM (3 мл) добавляли азидо-d-ПЭГ3-амин (10 мг, 0,049 ммоль) и DIPEA (9 мкл, 0,049 ммоль) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Смесь концентрировали, снова растворяли в MeOH (3 мл) и очищали на связанной с масс-спектрометрией системе ВЭЖХ (градиент 55-80% ACN в течение 3,5 мин  $t_{\text{rt}}=2,35$ , ожидаемая масса: 514,70 наблюдаемая масса: 514,40) с получением 7 мг чистого продукта с выходом 58%.

Стадия 3.



К раствору 100 мкл BCN-dGDF15 (I-60: 0,68 мг/мл в pH 4,5 буфер) добавляли pH 4,5 буфер (100 мкл) и азид (6 мкл в DMSO, 10 мг/мл) и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь промывали при помощи Amicon 10k 4 раза. Полученный раствор анализировали при помощи MALDI, показавшим основную конъюгацию +1 и +2. Maldi: Рассчитанная масса: 26546. Наблюдаемая масса: 26483; Рассчитанная масса: 27060. Наблюдаемая масса: 27128; Рассчитанная масса: 27574. Наблюдаемая масса: 27789.

Пример 16. His-hGDF15 BCN (I-58), конъюгированный с промежуточным соединением 44:

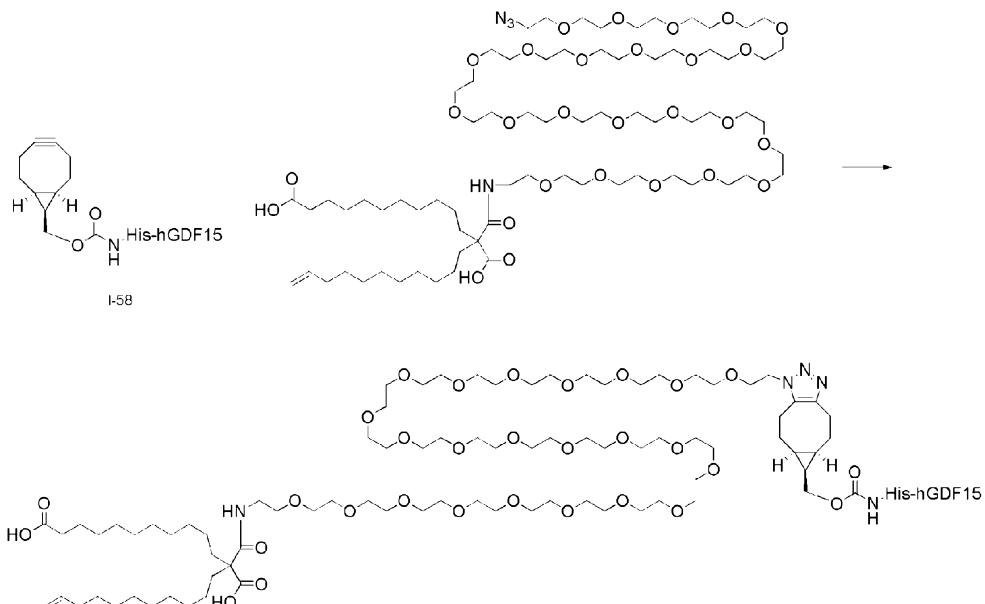


Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	% AUC при 280 нм
His-hGDF15	26726	26728	45
His-hGDF15-BCN	26902	26904	21
His-hGDF15 +1FA	28422	28360	25
His-hGDF15 +2FA	29868	30012	9

His-hGDF15 +1FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе в одной молекуле (одно мономерное звено) GDF15 гомодимера.

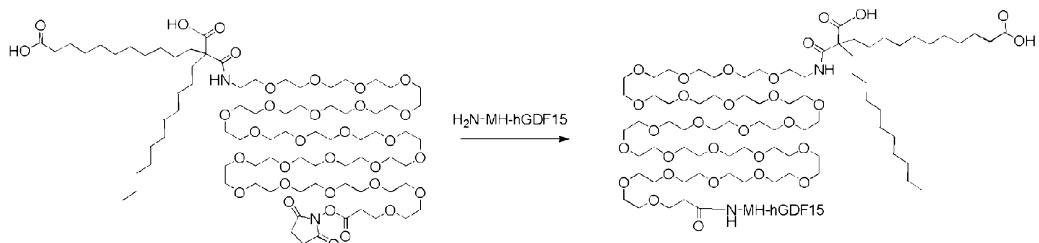
His-hGDF15 +2FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обеих молекулах (оба мономерных звена) GDF15 гомодимера.

Пример 17. His-hGDF15-BCN, конъюгированный с промежуточным соединением 52:



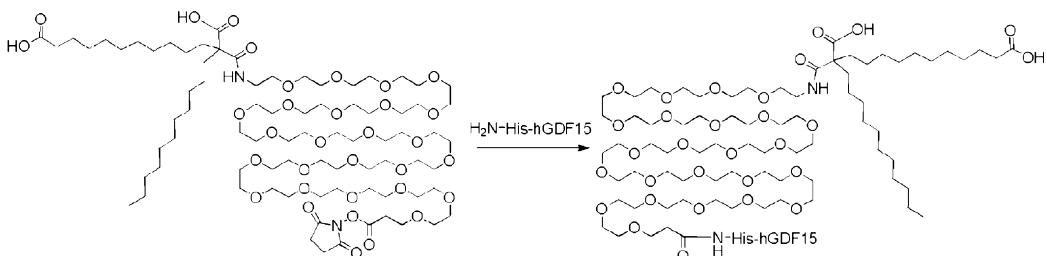
К раствору 3 мл циклооктин GDF15 (I-58: 0,46 мг/мл, 0,051 мкмоль) в 7 мл pH 4 натрияцетатного буфера добавляли жирную кислоту-ПЭГазид (15 мкл в 35 мг/мл DMSO, 0,36 мкмоль) и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение ночи. MALDI анализ показал полную конверсию. Продукт очищали путем фильтрования через amicon 10 кДа с промывкой три раза с получением 4,3 мл 0,29 мг/мл желаемого продукта с выходом 90%. Maldi: циклооктин sm ~5% ожидаемая масса: 26902 наблюдаемая масса: 26997; +1 жирная кислота ~40% ожидаемая масса: 28421 наблюдаемая масса: 28525; +2 жирные кислоты ~50%, ожидаемая масса: 29940, наблюдаемая масса: 30191; +3 жирные кислоты 5%, ожидаемая масса: 31459, наблюдаемая масса: 31874.

Пример 18. MH-(199-308) GDF15 (I-54), конъюгированный с промежуточным соединением 37:



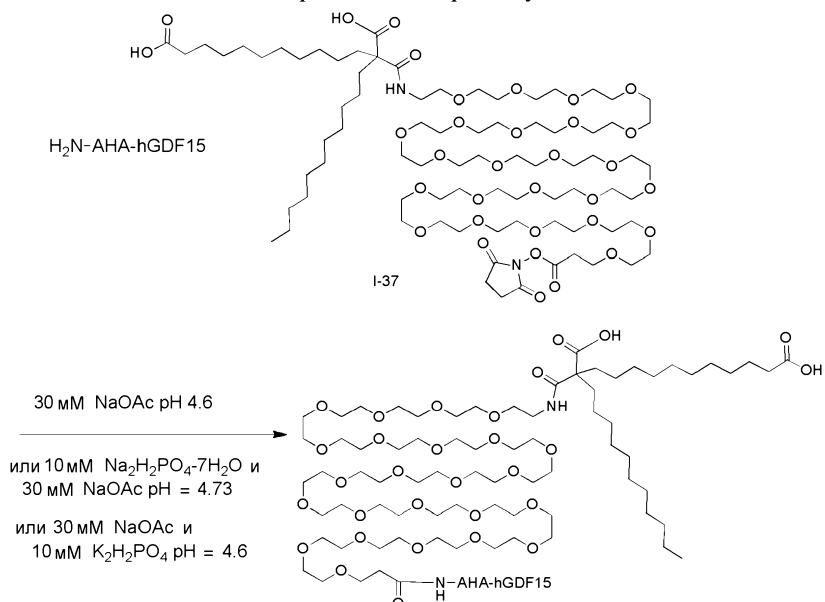
MH-(199-308)-GDF15 (промежуточное соединение 54: 0,393 мл, 0,028 мкмоль, 1,78 мг/мл) добавляли к 1,5 мл 30 мМ натрияцетатного буфера, к раствору добавляли NHS жирную кислоту (474 мкг, 0,284 мкмоль, 10 мг/мл). Через 5 ч реакция завершалась в соответствии с MALDI. Продукты очищали путем промывки 5 раз с использованием amicon ультрафильтрации 10 кДа с получением 575 мкг конъюгата с выходом 73%. MALDI: sm (18%), ожидаемая масса: 24638, наблюдаемая масса: 24735; +1 жирная кислота (38%), ожидаемая масса: 26192, наблюдаемая масса: 26268; +2 жирные кислоты (40%), ожидаемая масса: 27746, наблюдаемая масса: 27798; +3 жирные кислоты (4%), ожидаемая масса: 29300, наблюдаемая масса: 29333.

Пример 19А. His-hGDF15 (I-59), конъюгированный с промежуточным соединением 37:



His-hGDF15 (0,493 мл, 0,026 мкмоль, 1,42 мг/мл) добавляли к 1,5 мл 30 mM натрияцетатного буфера pH 4, к раствору добавляли nhs жирную кислоту (0,221 mg, 0,132 мкмоль, 10 mg/мл). После осуществления реакции в течение ночи она еще не была завершена, поэтому добавляли еще 2,5 экв. жирной кислоты NHS (0,110 mg, 0,066 мкмоль, 10 mg/мл), и через 5 ч анализ Maldi показал +2 конъюгат в качестве основного продукта. Продукт очищали путем промывки 5 раз с использованием amicon ультрафильтрации 10 кДа с получением 565 мкг конъюгата с выходом 76%. MALDI: sm (18%), ожидаемая масса: 26468, наблюдаемая масса: 26553; +1 жирная кислота (38%), ожидаемая масса: 28022, наблюдаемая масса: 28099; +2 жирные кислоты (40%), ожидаемая масса: 29576, наблюдаемая масса: 29649; +3 жирные кислоты (4%), ожидаемая масса: 31130, наблюдаемая масса: 31201.

Пример 19В. АНА-hGDF15, конъюгированный с промежуточным соединением 37:



Получали 10 mg/ml раствор промежуточного соединения 37 в воде, соответствующей критериям чистоты для молекулярной биологии. К АНА-hGDF15 (промежуточное соединение 57, 6,67 mg/ml в 30 mM NaOAc pH 4,0, 5,247 мл, 1,433 мкмоль) добавляли 30 mM NaOAc pH 4,6 (приемлемый диапазон 4,5-5,0) с получением конечной концентрации белка 0,88 mg/ml. Добавляли промежуточное соединение 37 (10 экв., 2,39 мл, 0,014 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. В реакционном сосуде образовывался осадок. Реакционную смесь разделяли между 4×15 мл 10 кДа Amicon центрифужными фильтрами и каждую разбавляли до 15 мл при помощи 30 mM NaOAc pH 4,0. Осуществляли буферный обмен 4× в 30 mM NaOAc pH 4,0 и образцы объединяли до объема 25,6 мл, перемешивая осадок в фильтре кончиком пипетки между промывками. Осадок оставался в растворе, поэтому смесь оставляли выстаиваться при 4°C в течение ночи. Концентрация, измеренная на основании  $A_{280}$  (30040  $\text{cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ , 27538 г/моль), составляла 1,62 mg/ml (100%). UPLC анализ показал 60% выход +1FA (время удерживания: 4,88 мин) и +2FA продукты (время удерживания: 5,80 мин) (способ J). Способ ЖХ/МС Т показывает желаемые массы.

Неочищенную смесь примера 19В (процентное содержание представлено в таблице ниже) испытывали *in vivo*, и результаты представлены в табл. 1.

Вид	Рассчитано	Наблюдали ЖХ/МС Способ Т	Наблюдаемый % UPLC Способ J	Время удерживания (мин) UPLC Способ J
AHA-GDF15	24430	24432	29	3,24
AHA-GDF15 +1 FA	25984	25985	27	4,88
AHA-GDF15 +2 FA	27538	27540	33	5,80
AHA-GDF15 +3 FA	29092	29091	11	6,66

AHA-hGDF15 +1FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на одной из полипептидных цепей (на мономерном звене) GDF15 гомодимера (как представлено в варианте осуществления 11B, формула Н).

AHA-hGDF15 +2FA (жирная кислота) соответствует реакции по N-концевой аминофункциональной группе на обеих полипептидных цепях GDF15 гомодимера (как представлено в варианте осуществления 11B, формула G).

AHA-hGDF15 +3FA (жирная кислота) соответствует неселективной реакции на каком-либо другом участке GDF15 гомодимера.

#### Очистка.

Неочищенный продукт очищали обращенно-фазовой хроматографией (буфер А 0,1% TFA в воде; буфер В 0,1 M TFA в ACN градиент: 99-80% буфера А) на Waters BEH300 130 Å, 3,5 мкм, 4,6×100 мм, скорость потока 2,5 мл/мин.

Фракция 1: Непрореагировавший AHA-hGDF15: Rt=17,33 мин.

Фракция 2: (19B1): AHA-GDF15 +1FA: Rt=20,2 мин (приблизительно 15% выход) (формула Н).

Фракция 3: (19B2): AHA-GDF15+2FA: Rt=21,6 мин (приблизительно 15% выход) (формула G).

Фракция 4: (19B3): AHA-GDF15+3FA: Rt=23,0 мин (приблизительно 5% выход).

Получали смесь в соотношении 1:1 19B1 и 19B2 и испытывали (19Bm).

Альтернативно, реакцию можно осуществить в 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O и 30 mM NaOAc при pH 4,73. Получали раствор 10 мг/мл промежуточного соединения 37 в воде, соответствующей критериям чистоты для молекулярной биологии. К AHA-hGDF15 (промежуточное соединение 57, 12,04 мг/мл в 30 mM NaOAc pH 4,0, 4,15 мкл, 0,002 мкмоль) добавляли 30 mM NaOAc 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O при pH 4,73 с получением конечной концентрации белка 0,88 мг/мл. Добавляли промежуточное соединение 37 (20 экв., 6,83 мкл, 0,041 мкмоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Реакционная смесь становилась мутной с осадком. UPLC анализ показал 58% +1 и +2 продукты (способ J).

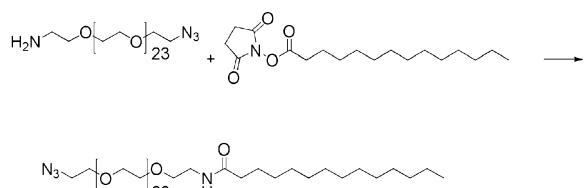
Вид	Рассчитано	Наблюдаемый %
AHA-GDF15	24430	0
AHA-GDF15 +1 FA	25984	11
AHA-GDF15 +2 FA	27538	47
AHA-GDF15 +3 FA	29092	34
AHA-GDF15 +4 FA	30646	7

Реакцию также можно осуществить в 30 mM NaOAc и 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> при pH 4,6. Получали 10 мг/мл раствор промежуточного соединения 37 в воде, соответствующей критериям чистоты для молекулярной биологии. К AHA-hGDF15 (промежуточное соединение 57, 6,21 мг/мл в 30 mM NaOAc, pH 4,0, 5,261 мл, 1,337 мкмоль) добавляли 30 mM NaOAc 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4,6 (приемлемый диапазон 4,5-5,0) с получением конечной концентрации белка 0,88 мг/мл. Добавляли промежуточное соединение 37 (10 экв., 68,3 мкл, 0,409 мкмоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 7 ч. Реакционная смесь становилась мутной с осадком. Реакционную смесь разделяли на четыре 9 мл порции в 15 мл 10 кДа Amicon центрифужном фильтре и разбавляли до 15 мл при помощи 30 mM NaOAc, pH 4,0. Это вещество подвергали буферному обмену 4× в 30 mM NaOAc pH 4,0, перемешивая осадок между промывками кончиком пипетки. Реакционную смесь концентрировали до объема 75 мл. Оставался осадок, поэтому вещество хранили при 4°C в течение двух дней. Концентрация, измеренная при помощи A<sub>280</sub> (30040 cm<sup>-1</sup>·M<sup>-1</sup>, 27538 г/моль), составляла 0,4 мг/мл (97%). UPLC анализ показал 61% выход +1 и +2 продуктов (способ J).

Вид	Рассчитано	Наблюдали ЖХ/МС Способ Т	Наблюдаемый % UPLC Способ J
AHA-GDF15	24430	24434	34
AHA-GDF15 +1 FA	25984	25987	34
AHA-GDF15 +2 FA	27538	27540	27
AHA-GDF15 +3 FA	29092	n/a	5

Сылочный пример 1. His-hGDF15 BCN (I-58), конъюгированный с промежуточной конструкцией ПЭГ-миристиновая кислота.

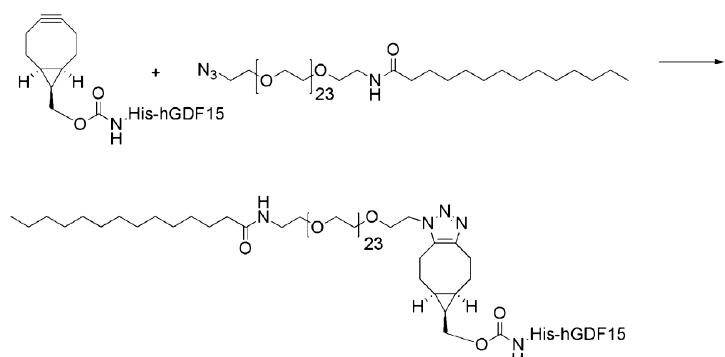
Стадия 1.



К смеси азидо-ПЭГ23-Амина (30 мг, 0,027 ммоль) и NHS-эфира миристиновой кислоты (Toronto Research Chemicals, Cat. No. S69080) (12 мг, 0,037 ммоль) добавляли DCM (1 мл) и DIPEA (13 мкл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Смесь очищали хроматографией на диоксиде кремния, элюируя смесь EtOAc/гептан (0-100%), затем MeOH/DCM (0-10%), с получением чистого продукта при около 5% MeOH/DCM. ЖХ/МС: (градиент: от 40 до 98% В в течение 1,4 мин - скорость потока 1 мл/мин. Элюент А: вода+0,05% муравьиной кислоты + 3,75 мМ ацетата аммония, Элюент В: ацетонитрил + 0,04% муравьиной кислоты).

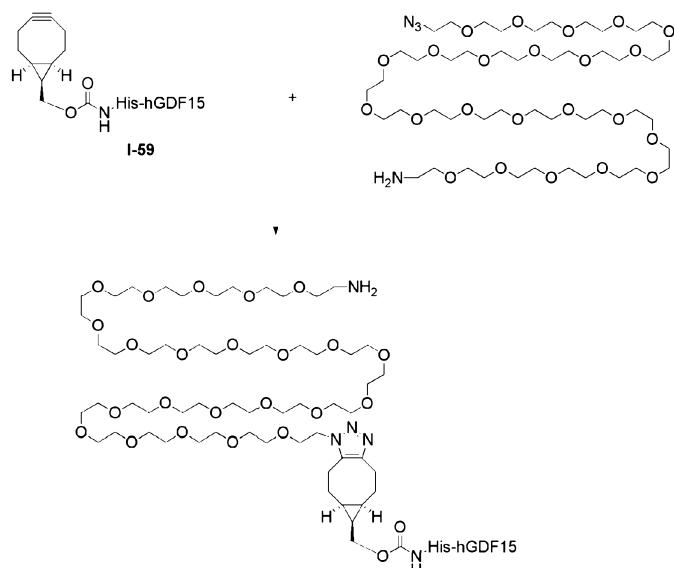
ЖХ/МС: rt=2,20 (способ С). Рассчитанная масса +H: 1354,7.1. Наблюдаемая масса: 1354,4.

Стадия 2.



К раствору BCN-hGDF15 (I-52: 800 мкл, 0,25 мг/мл) добавляли (2 мг/мл в DMSO, 6,3 мкл, 10 экв.) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. 1,1 мл 0,20 мг/мл с количественным выходом. (MalDI: +1 рассчитанная масса: 28223, наблюдаемая масса: 28640; +2 рассчитанная масса: 29543; наблюдаемая масса: 29962, +3 рассчитанная масса: 30863, наблюдаемая масса: 31426, +4 рассчитанная масса: 32183, наблюдаемая масса: 32911).

Сылочный пример 2. his-hGDF15-EG23

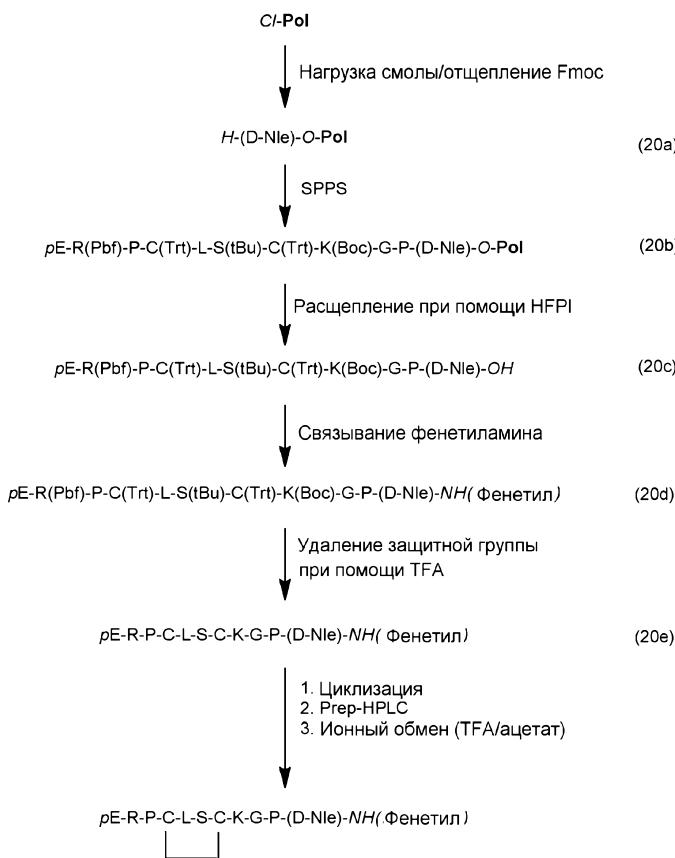


Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	%
His-hGDF15	26468	26360, 3	5
His-hGDF15-BCN	26644	n/a	0
His-hGDF15 +1 ПЭГ 23	27567	28178, 6	15
His-hGDF15 +2 ПЭГ 23	28666	29385, 1	46
His-hGDF15 +3 ПЭГ 23	29765	30547, 2	28
His-hGDF15 +4 ПЭГ 23	30864	31731, 8	5

К раствору His-hGDF15 BCN (I59: 427 мкл, 1,17 мг/мл, 0,019 мкмоль) в 30 mM NaOAc pH 4,0 (427 мкл) добавляли азидо-д-ПЭГ23-амин (Quanta Biodesign, 104 мкг, 0,094 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч, сразу после этого смесь подвергали буферному обмену в 30 mM NaOAc pH 4,0 с использованием 10 кДа MWCO Amicon центрифужного фильтра путем разбавления и концентрирования образца 5 раз до объема 140 мкл. MALDI анализ показал полное преобразование в +1 - +4 продукты. Концентрацию измеряли при помощи  $A_{280}$  ( $29090 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , 27600 г/моль), и она составила 2,099 мг/мл (57%).

Пример 20. Апелин циклический пептид BCN, конъюгированный с промежуточным соединением 47.

Стадия 1. Синтез pE-R-P-C\*-L-S-C\*-K-G-P-(D-Nle)-NH (фенетил) (дисульфид C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>)ацетата



Получение промежуточного соединения 20a.

(Нагрузка на 2-хлортритилюоридную смолу соединения Fmoc-D-Nle-OH, удаление Fmoc и определение нагрузки смолы).

2-Хлортритилюоридную смолу (50,0 г, 85,0 ммоль) суспендировали в DCM (400 мл), суспензию перемешивали в течение 10 мин и затем растворитель отфильтровывали, смолу промывали при помощи DCM (3×200 мл). Затем раствор Fmoc-D-Nle-OH (24,0 г, 68,0 ммоль) и DIPEA (96,5 мл, 552,5 ммоль) в DCM (120,0 мл) добавляли к смоле, суспензию продували азотом и перемешивали при комнатной температуре в течение 5 мин. Добавляли еще одну порцию DIPEA (22,7 мл, 127,5 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи.

Реакционную смесь отфильтровывали и смолу промывали при помощи DCM (3×250 мл) в течение 2 мин каждый раз. Смолу гасили смесью DCM/MeOH/DIPEA (70:15:15) (2×250 мл) в течение 10 мин каждый раз.

Fmoc группу отщепляли путем обработки смолы пиперидином/DMF (1:3) (1×300 мл) в течение 5 мин. Смолу затем отфильтровывали (1×300 мл) в течение 15 мин с последующими стадиями промывки: DMF (6×250 мл, 2 мин каждый раз), изопропанол (2×250 мл, 2 мин каждый раз) и TBME (6×250 мл, 2 мин каждый раз). Смолу сушили под вакуумом при 35°C в течение 24 ч с получением промежуточного соединения 20a (57,8 г, нагрузка = 1,08 ммоль/г).

Получение промежуточного соединения 20b (сборка линейного пептида).

Промежуточное соединение 20a (18,5 г, 20,0 ммоль) подвергали твердофазному пептидному синтезу на автоматическом пептидном синтезаторе (CSBIO536™). Цикл связывания определяли следующим образом:

Присоединение аминокислот: AA (3,0 экв.), DIC (3,0 экв.), HOBr (3,0 экв.), DMF (см. таблицу ниже)

Промывка: DMF (4×150 мл, 2 мин каждый раз).

Удаление защитной группы Fmoc: пиперидин/DMF (1:3) (150 мл в течение 5 мин, затем 150 мл в течение 15 мин).

Промывка: DMF (6×150 мл, 2 мин каждый раз).

Связывание	Аминокислота	Количество связываний × Время реакции	Способ связывания
1	Fmoc-L-Pro-OH	1×120 мин	DIC/HOBt
2	Fmoc-Gly-OH	1×120 мин	DIC/HOBt
3	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH	1×120 мин	DIC/HOBt
4	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1×120 мин	DIC/HOBt
5	Fmoc-L-Ser(tBu)-OH	1×120 мин	DIC/HOBt
6	Fmoc-L-Leu-OH	1×120 мин	DIC/HOBt
7	Fmoc-L-Cys(Trt)-OH	1×120 мин	DIC/HOBt
8	Fmoc-L-Pro-OH	1×120 мин	DIC/HOBt
9	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	1×120 мин	DIC/HOBt
10	Boc-L-Pyr-OH	1×120 мин	DIC/HOBt

После сборки пептида смолу промывали DMF (6×150 мл, 2 мин каждый раз), изопропанолом (6×150 мл, 2 мин каждый раз) и TBME (6×150 мл, 2 мин каждый раз). Связанный со смолой пептид сушили в течение ночи в условиях высокого вакуума при 35°C с получением промежуточного соединения 20b (57,6 г, 20,0 ммоль).

Получение промежуточного соединения 20c (HFIP отщепление от смолы).

Часть промежуточного соединения 20b (27 г, 9,37 ммоль) суспендировали в DCM (300 мл) и перемешивали в течение 15 мин. Смолу отфильтровывали, затем обрабатывали при помощи HFIP/DCM (3:7) (3×270 мл, 15 мин каждый раз). Расщепляющий раствор отфильтровывали и собирали. Смолу промывали при помощи DCM (3×300 мл). Объединенные расщепляющий и промывочный растворы концентрировали досуха в вакууме. Белый порошок сушили в течение ночи под вакуумом при 35°C с получением промежуточного соединения 20c - Партия 1 (23,5 г, 9,37 ммоль).

Описанную выше процедуру повторяли с еще одной порцией промежуточного соединения 20b (28,0 г, 9,72 ммоль), с получением промежуточного соединения 20c - Партия 2 (26,1 г, 9,72 ммоль).

Получение промежуточного соединения 20d (связывание фенетиламина в фазе раствора)

Промежуточное соединение 20c. Партию 2 (20,0 г, 7,44 ммоль, 1,0 экв.) и НАТУ (5,23 г, 13,8 ммоль, 1,85 экв.) растворяли в DMF (400 мл). Добавляли раствор фенетиламина (1,67 г, 13,8 ммоль, 1,85 экв.) и DIPEA (3,56 г, 27,6 ммоль, 3,71 экв.) в DMF (60 мл).

Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем охлаждали до 0°C, затем добавляли насыщенный солевой раствор (460 мл). Сусpenзию перемешивали в течение 10 мин, затем продукт выделяли фильтрованием. Фильтровальную лепешку промывали при помощи H<sub>2</sub>O (300 мл), затем осторожно извлекали, затем растворяли в DCM (300 мл). Раствор сушили над MgSO<sub>4</sub>, затем концентрировали досуха в вакууме. Неочищенный продукт подвергали флэш-хроматографии на силикагеле (элюенты: DCM и DCM/iPrOH (8:2)) с получением промежуточного соединения 20d - Партия 1 (14,4 г, 6,6 ммоль).

Такую же процедуру повторяли с промежуточным соединением 20c - Партия 1 (23,4 г, 9,37 ммоль), за исключением флэш-хроматографии, с получением промежуточного соединения 20d Партия 2 (28,0 г, 9,37 ммоль).

Получение промежуточного соединения 20e (Удаление защитной группы)

Промежуточное соединение 20d. Партию 2 (28,0 г, 9,37 ммоль) растворяли в TFA/DCM/EDT/TIS (90:5:2,5:2,5) (290 мл) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч.

Расщепляющий раствор отфильтровывали и выливали на холодный TBME (3 л) (0-4°C). Мутную сусpenзию перемешивали на бане лед-вода в течение 30 мин, затем фильтровали через стеклянный фильтр № 4. Белое твердое вещество, полученное таким образом, промывали при помощи TBME (2×100 мл), затем сушили в вакууме при 35°C в течение ночи с получением промежуточного соединения 20e - Партия 1 (8,9 г, 5,9 ммоль).

Такую же процедуру повторяли с промежуточным соединением 20d - Партия 1 (14,4 г, 6,6 ммоль) с получением промежуточного соединения 20e - Партия 2 (9,6 г, 6,3 ммоль).

Получение pE-R-P-C\*-L-S-C\*-K-G-P-(D-Nle)-NH(фенетил)(дисульфид C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>)ацетата.

1) Циклизация.

Промежуточное соединение 20e (5,0 г, 3,3 ммоль) растворяли в воде (500 мл). Раствор йода (1,18 г, 4,66 ммоль, 1,41 экв.) в уксусной кислоте (93 мл) добавляли одной порцией. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин. Добавляли раствор аскорбиновой кислоты (1,03 г, 5,83 ммоль, 1,77 экв.) в воде (5,8 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение 10 мин, фильтровали и хранили при 4°C вплоть до очистки.

Такую же процедуру циклизации повторяли до тех пор, пока не было переработано 18,3 г (12,1 ммоль) промежуточного соединения 20e.

2) Очистка.

Растворы циклического пептида подвергали препаративной ВЭЖХ по порциям 0,5-5,0 г пептида на одну инжекцию. Фракции, имеющие чистоту выше чем 95%, объединяли и лиофилизировали с получением общего количества 4,89 г (3,2 ммоль) очищенного пептида (TFA соль).

3) Образование ацетата методом ионного обмена.

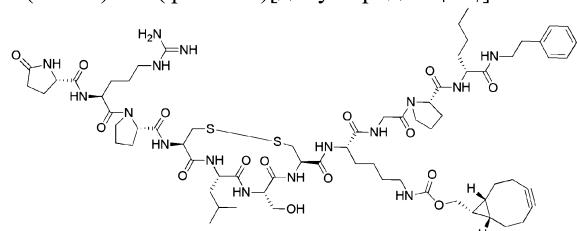
75 г (100 мл) сильной анионообменной смолы (ионообменник III, Merck) в ее OH<sup>-</sup> форме помещали в фильтр из спеченного стекла (размер пор 3) и затем добавляли раствор уксусной кислоты/воды (1:3) (300 мл), суспензию вручную перемешивали в течение 2 мин, затем смолу отфильтровывали. Процесс повторяли с добавлением еще одной порции уксусной кислоты/воды (1:3) (300 мл). Смолу промывали деионизированной водой, пока не наблюдали нейтральную стекающую жидкость. Затем смолу переносили в 4×20 см колонку, снабженную фильтром из спеченного стекла (размер пор 3).

4,8 г очищенного пептида растворяли в деионизированной воде (50 мл) и добавляли в колонку. Продукт элюировали деионизированной водой (200 мл). Контроль выходящего продукта осуществляли при помощи ТСХ, обогащенные продуктом фракции объединяли и лиофилизировали с получением pE-R-P-C\*-L-S-C\*-K-G-P-(D-Nle)-NH(фенетил)(дисульфид C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>)ацетата (4,1 г, 2,9 ммоль).

Чистый продукт анализировали при помощи аналитической ВЭЖХ (Аналитический способ F; t<sub>R</sub>=8,01 мин) и UPLC-HRMS.

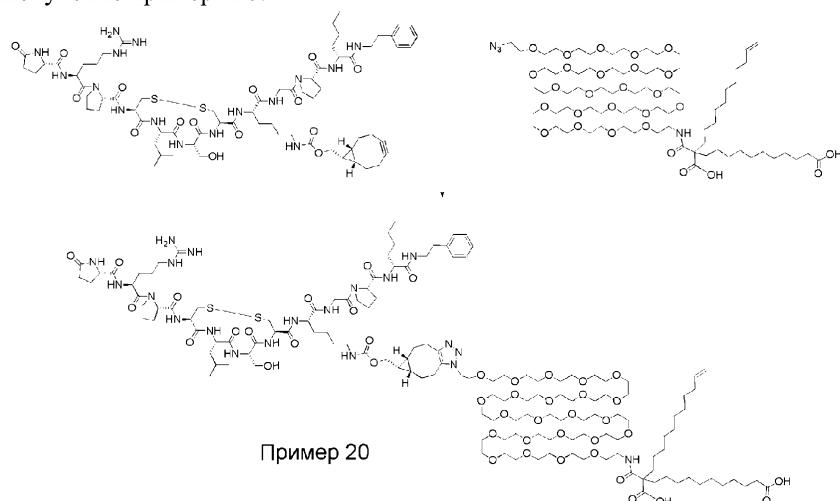
Аналитический способ G; найдено: [M+2H]<sup>2+</sup>=643,328; рассчитано: [M+2H]<sup>2+</sup>=643,324). Содержание ацетата было 7,99-8,27%, и содержание воды было 1,94-1,96%.

Стадия 2. Получение pE-R-P-C\*-L-S-CP-N<sup>6</sup>-[(1 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ )-бицикло[6.1.0] non-4-ин-9-илметокси]карбонил]-K-G-P-(D-Nle)-NH(фенетил)[дисульфид C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>]



Смесь pE-R-P-C\*-L-S-C\*-K-G-P-(D-Nle)-NH(фенетил)триацетата [дисульфид C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>] (100 мг, 0,068 ммоль), бикарбоната натрия (38 мг, 0,452 ммоль) и воды (83 мкл) в DMF (1 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем добавляли (1R,8S)-бицикло[6.1.0] non-4-ин-9-илметилсукцинимидилкарбонат (Berry & associates, 20 мг, 0,068 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 90 мин. К смеси добавляли 1 мл воды и полученный раствор лиофилизировали с получением порошка, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

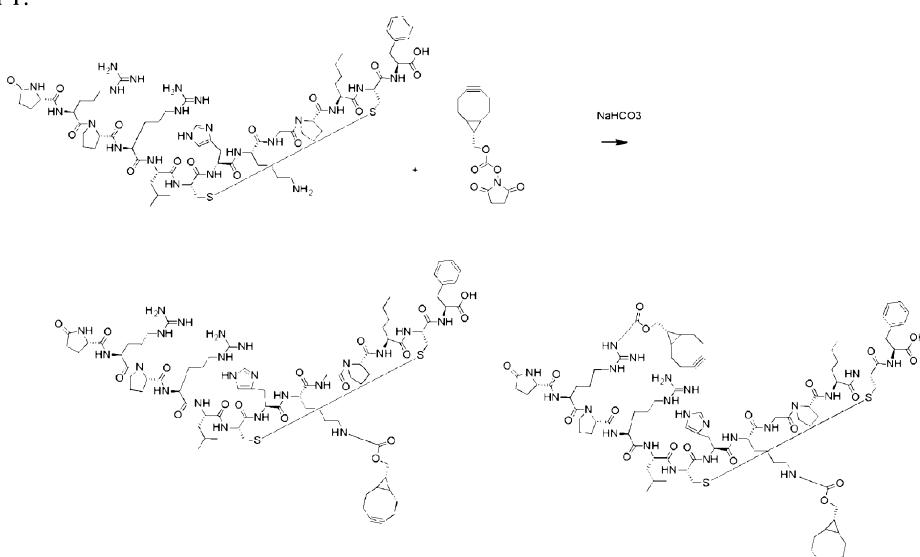
Стадия 3. Получение примера 20:



Смесь pE-R-P-C\*-L-S-C\*-N<sup>6</sup>-[(1 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ )-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси]карбонил]-K-G-P-(D-Nle)-NH(фенетил)[дисульфида C<sub>4</sub>-C<sub>7</sub>] (50 мг продукта со стадии 2 в 1 мл воды, 0,034 ммоль) и промежуточного соединения 47 (52 мг, в 268 мкл воды) перемешивали при комнатной температуре около 3 ч. Реакционную смесь затем очищали препаративной ВЭЖХ (колонка Sunfire 30×50 мм, 5 мкм, ACN/H<sub>2</sub>O с 0,1% TFA 75 мл/мин, градиент 15-40% ACN 5 мин). Фракцию, содержащую продукт, лиофилизировали с получением указанного в заголовке продукта в виде TFA соли (24 мг, 21%). ЖХ/MC (Waters Acquity UPLC BEH C18 1,7 мкм, 2,1×50 мм, 50°C, Элюент А: вода + 0,1% муравьиной кислоты, Элюент В: ацетонитрил + 0,1% муравьиной кислоты, градиент от 2 до 98% В/А в течение 5,15 мин): Время удерживания: 2,77 мин; MC [M+2]<sup>2+</sup>: наблюдали: 1491,8808, рассчитано: 1491,8560.

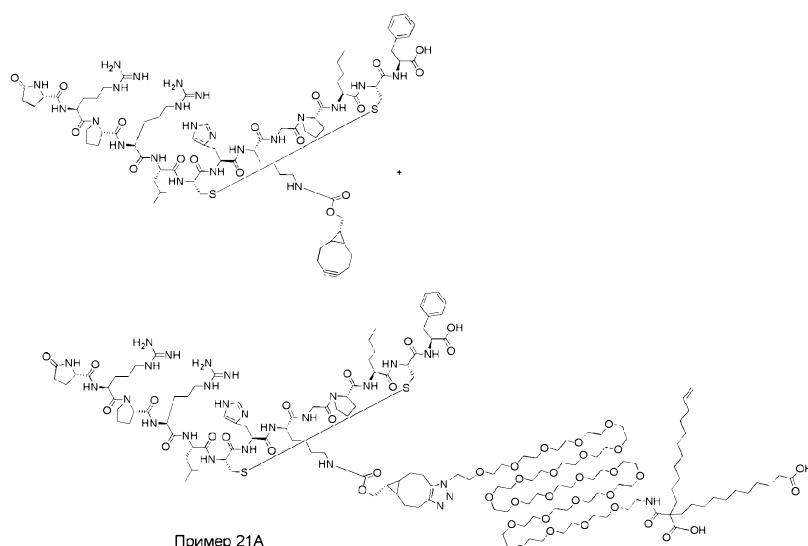
Пример 21A. Апелин циклический пептид BCN, конъюгированный с промежуточным соединением 47.

Стадия 1.



Смесь pE-R-P-R-L-C\*-H-K-G-P-Nle-C\*-F-OH(дисульфид C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>) (50 мг, 0,033 ммоль, полученный в патенте США № 8673848), бикарбоната натрия (18 мг, 0,215 ммоль) и воды (40 мкл) в DMF (0,5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем добавляли (1R,8S)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметилсукцинимидилкарбонат (Betty & associates, 18 мг, 0,065 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 90 мин. Смесь 1 и +2 присоединений наблюдали при помощи ЖХ/MC, поэтому смесь очищали на связанный с масс-спектрометрией системе ВЭЖХ (пептидный способ 5, градиент 25-50% ACN 5 мин: Условия: Sunfire 30×50 мм, 5 мкм колонка ACN/H<sub>2</sub>O с 0,1% TFA, 75 мл/мин, объем вводимой пробы 1,5 мл): rt 3,2 мин (+1), Rt=4,65 мин, 4,9 мин (+1 и +2 смесь). ЖХ/MC подтвердила желаемый +1 продукт с выходом 61% и +1 +2 смеси с выходом 18%. ЖХ/MC: (щелочной элюент А: вода + 5 mM гидроксида аммония; Элюент В: ACN кислотная колонка: Sunfire C18 3,5 мкм 3,0×30 мм, -40°C, щелочная колонка: XBridge C18 3,5 мкм 3,0×30 мм, -40°C). Время удерживания: 0,98 мин; MC [M+2]<sup>2+</sup>: наблюдали: 856,0, рассчитано: 865,0245.

Стадия 2.

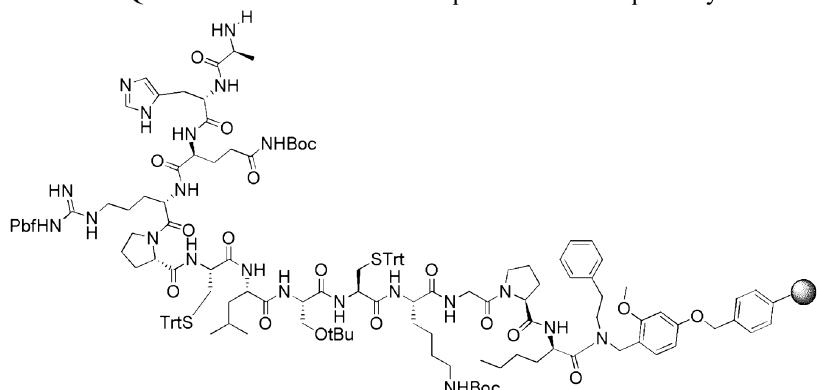


Пример 21A

Смесь pE-R-P-R-L-C\*-H-N<sup>6</sup>-[(1 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,9 $\alpha$ )-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметокси]карбонил]-K-C-P-Nle-C\*-F-OH(дисульфид C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>) (21,33 мг, 0,014 ммоль) и промежуточного соединения 47 (24 мг, 0,014 ммоль) перемешивали при комнатной температуре около 3 ч. Реакция завершалась, согласно данным ЖХ/МС, и смесь лиофилизировали с получением указанного в заголовке продукта (23 мг, 48%). ЖХ/МС (Waters Acuity UPLC BEH C18 1,7 мкм, 2,1×50 мм, 50°C, Элюент А: вода + 0,1% муравьиной кислоты, Элюент В: ацетонитрил + 0,1% муравьиной кислоты, градиент от 2 до 98% В/А в течение 5,15 мин). Время удерживания: 2,22 мин; МС [M+2]<sup>2+</sup>: наблюдали: 1616,9464, рассчитано: 1616,976.

Пример 21В. Апелин циклический пептид, конъюгированный с конструкцией жирная кислота-линкер I-37.

Стадия 1. Синтез A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-Dnle-фенетиламина промежуточного соединения 21B1



Фенетиламин-AMEBA смолу (Sigma Aldrich, 0,1 ммоль, 1,0 ммоль/г) подвергали твердофазному пептидному синтезу на автоматическом пептидном синтезаторе (CEM Liberty Blue Microwave) со стандартным двойным Arg для Arg остатков и Dnle-связанным двойным временем. Аминокислоты получали в виде 0,2 М растворов в DMF. Стандартный цикл связывания определяли следующим образом:

Присоединение аминокислот: AA (5 экв.), HATU (5 экв.), DIEA (25 экв.).

Промывка: DMF (3×7 мл).

Удаление защитной группы Fmoc: 20% пиперидин/0,1 М HOBr (2×7 мл).

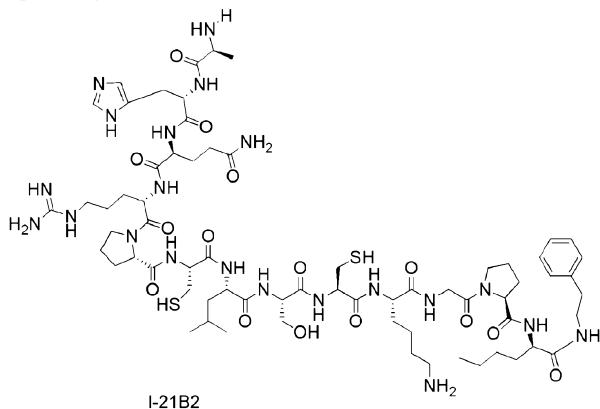
Промывка: DMF (4×7 мл, затем 1×5 мл).

Связывание	Аминокислота	Количество связываний × Время реакции (Темп.)	Способ связывания
1	Fmoc-D-Nle-OH	1 × 10 минут (70°C)	DIEA/HATU
2	Fmoc-L-Pro-OH	1 × 5 минут (70°C)	DIEA/HATU
3	Fmoc-L-Gly-OH	1 × 5 минут (70°C)	DIEA/HATU
4	Fmoc-L-Lys-OH	1 × 5 минут (70°C)	DIEA/HATU

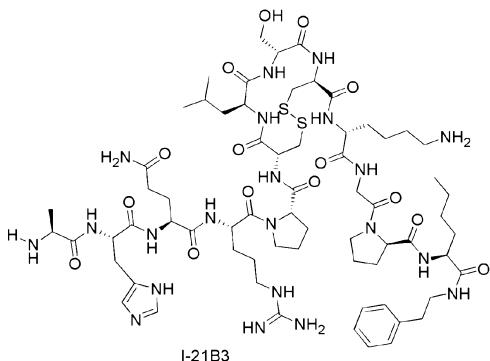
5	Fmoc-L-Cys-OH	1 × 5 минут (70°C)	DIEA/HATU
6	Fmoc-L-Ser-OH	1 × 5 минут (70°C)	DIEA/HATU
7	Fmoc-L-Leu-OH	1 × 5 минут (70°C)	DIEA/HATU
8	Fmoc-L-Cys-OH	1 × 5 минут (70°C)	DIEA/HATU
9	Fmoc-L-Pro-OH	1 × 5 минут (70°C)	DIEA/HATU
10	Fmoc-L-Arg-OH	2 × 25 минут (25°C)	DIEA/HATU
11	Fmoc-L-Gln-OH	1 × 5 минут (70°C)	DIEA/HATU
12	Fmoc-L-His-OH	1 × 5 минут (70°C)	DIEA/HATU
13	Fmoc-L-Ala-OH	1 × 5 минут (70°C)	DIEA/HATU

После сборки пептида смолу промывали при помощи DMF (2×50 мл) и DCM (2×50 мл), затем сушили под вакуумом с получением промежуточного соединения 21B1 (276 мг, 0,1 ммоль).

Стадия 2. Получение промежуточного соединения 21B2 (отщепление пептида от смолы)



Промежуточное соединение 21B1 (276 мг, 0,1 ммоль) объединяли с 4 мл TFA раствора (37 мл TFA, 1 мл H<sub>2</sub>O, 1 мл TIPS, 3,06 г DTT) и встряхивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Раствор удаляли из смолы и осаждали в 40 мл холодного Et<sub>2</sub>O. Раствор перемешивали в вихревом смесителе и давали выстояться на льду в течение 10 мин, затем центрифугировали при 4000 об/мин в течение 5 мин. Растворитель удаляли и белое твердое вещество промывали еще два раза холодным Et<sub>2</sub>O (40 мл каждый раз), центрифугировали (5 мин каждый раз) и деканттировали. Твердое вещество сушили под вакуумом в течение ночи с получением промежуточного соединения 21B2 (17,4 мг, 0,012 ммоль). ЖХ/МС (SQ2 Продукт Анализ-Кислотный-Пептид, колонка Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 мкм, 2,1×50 мм, 50°C): Rt=1,83 мин, MC [M+H] 1513,5.

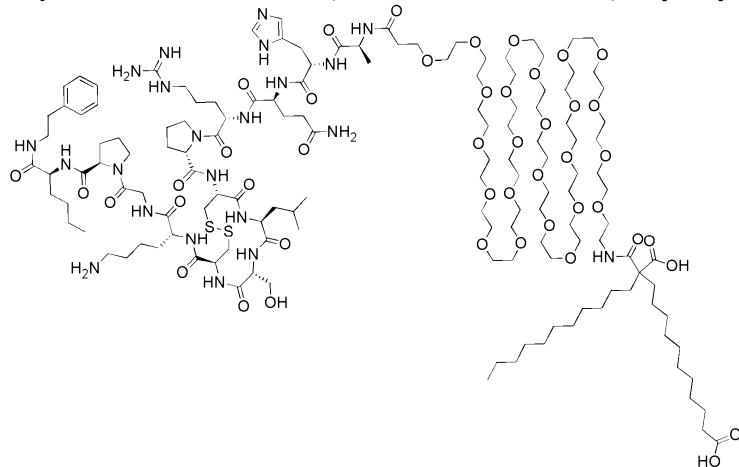


Стадия 3. Получение промежуточного соединения 21B3 (циклизация цистеиновых остатков).

Промежуточное соединение 21B1 (29,6 мг, 0,020 ммоль) растворяли в воде (3 мл) и 10 каплях

DMSO с получением слегка мутного раствора. Добавляли йод (50 мМ в HOAc, 0,783 мл, 0,039 ммоль) медленно по каплям и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. ЖХ/МС анализ неочищенной реакционной смеси показал полную конверсию исходного вещества. Добавляли по каплям 0,5 М аскорбиновой кислоты до исчезновения цвета. Вещество очищали через связанный с масс-спектрометрией систему ВЭЖХ. Лиофилизация объединенных фракций давала 7 мг желаемого продукта в виде белого порошка (4,63 мкмоль, 24%). ЖХ/МС (SQ2 Продукт Анализ-Кислотный-Пептид, колонка Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 мкм, 2,1×50 мм, 50°C): Rt=0,90 мин, МС [M+H] 1511,8.

Стадия 4. Получение коньюгата, включающего апелин A-H-Q-R-P-C-L-S-C-K-G-P-Dnle-фенетиламин и промежуточное соединение I-37 (N-концевая коньюгация) - Пример 21В.



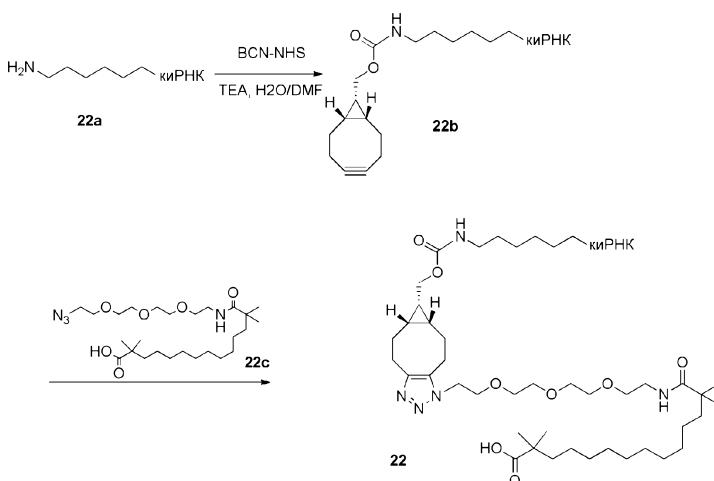
Получали 10 мг/мл раствор NHS-жирной кислоты в H<sub>2</sub>O. Промежуточное соединение 21В3 (1,5 мг, 0,993 мкмоль) растворяли в 30 мМ pH4 NaOAc буфере (672 мкл) и добавляли NHS-жирную кислоту (I-37: 0,850 мл, 5,10 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч, сразу после этого добавляли дополнительно 1,5 мг NHS-жирной кислоты (10 мг/мл в H<sub>2</sub>O) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Добавляли 8 мг NHS-жирной кислоты (10 мг/мл в H<sub>2</sub>O) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 дней и добавляли 1,7 мг NHS-жирной кислоты (10 мг/мл в H<sub>2</sub>O). Смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 16 ч и очищали через МС-связанную систему ВЭЖХ с получением 1,7 мг указанного в заголовке соединения в виде белого порошка (0,510 мкмоль, 51%). ЖХ/МС (SQ2 Продукт Анализ-Кислотный-Пептид-Полярный, колонка Acquity UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 мкм, 2,1×50 мм, 50°C): Rt=3,87 мин, МС [M+H+2/2] 1533,1; [M+H+3/3] 1022,9.

Примеры 22-24 относятся к коньюгатам жирной кислоты с киРНК.

Наборы для синтеза киРНК являются коммерчески доступными, например, от New England Biolabs и Ambion. киРНК агент можно сконструировать с использованием реакций химического синтеза и ферментативного лигирования с использованием процедур, известных из уровня техники. Например, киРНК агент может быть химически синтезирован с использованием природных нуклеотидов или различным образом модифицированных нуклеотидов, предназначенных для уменьшения нецелевых эффектов и/или для повышения биологической стабильности молекул или для повышения физической стабильности дуплекса, образованного между антисмысловой и смысловой нуклеиновыми кислотами, например, можно использовать фосфоротиоатные производные и акридин-замещенные нуклеотиды. "G," "C," "A," "T" и "U", каждый, как правило, означают нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания соответственно. Однако термины "рибонуклеотид", "дезоксинуклеотид" или "нуклеотид" также могут относиться к модифицированному нуклеотиду или суррогатной заменяющей группе.

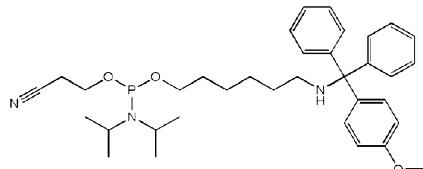
Специалистам в данной области должно быть понятно, что можно синтезировать и модифицировать киРНК, как будет желательно, с использованием любого традиционного способа, известного из уровня техники (см. Henschel et al. 2004, DEQOR: web-инструмент для конструирования и контроля качества молекул киРНК. Nucleic Acids Research 32 (Web Server Issue): W113-W120).

Пример 22. Коньюгация жирнокислотного компонента формулы А3 с киРНК.



Получение промежуточного соединения **22a**.

TTR киРНК [киРНК для трансцистеринаа (TTR), синтезированная с использованием традиционных способов, известных из уровня техники] преобразовывали в **22a** с использованием стандартных процедур на основе олигонуклеотидов (например, реакция с 6-(4-монометокситритиламино)гексил-(2-цианоэтил)-(N,N-дизопропил)fosфорамидитом (Glen Research Cat. No. 10-1906))



TTR киРНК.

Антисмыловая нить:

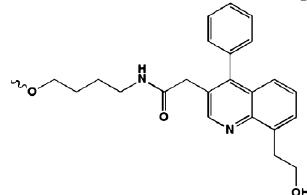
Puagagcaagaacacuu\*u\*rX058,

где Р представляет собой фосфат:

строчные буквы означают 2'-ОМе модифицированный нуклеотид;  
подчеркнутые буквы означают 2'-F модифицированный нуклеотид;  
курсивные буквы означают 2'-МОЕ модифицированный нуклеотид;  
г представляет собой рибitol без азотистых оснований;

\*относится к фосфоротиоатной связи и

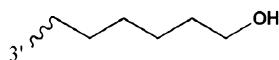
X058 представляет собой ненуклеотидный 3'-концевой кэн формулы



Смыловая нить:

aacaduccuccuccuar-C6OH

относится к фосфату; и C6OH (также известный как C6) представляет собой ненуклеотидный 3'-концевой кэн формулы



Получение промежуточного соединения **22b**.

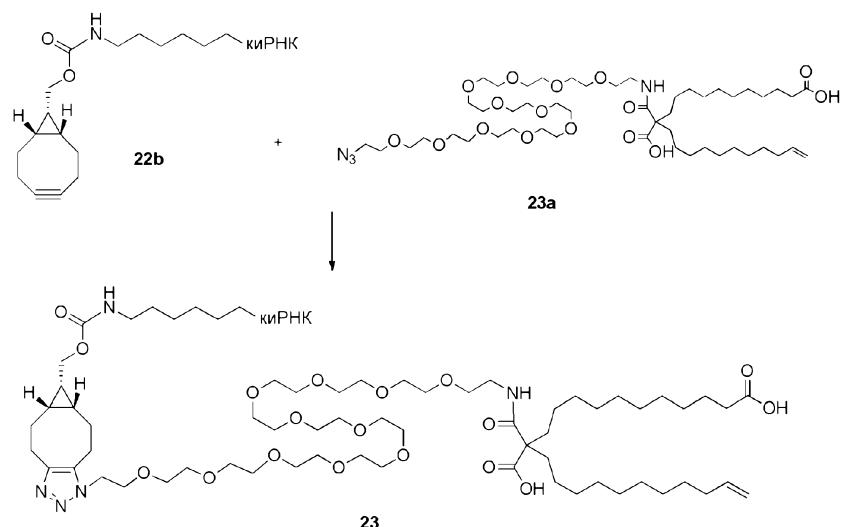
К 0,556 мл раствора киРНК **22a** (TTR киРНК 14,02 мМ в H<sub>2</sub>O, 7,79 мкмоль) при 0°C добавляли 0,556 мл DMF и нагревали до комнатной температуры. Затем добавляли 208 мкл TEA (0,3 М в DMF, 62 мкмоль) и 260 мкл BCN-NHS ((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил N-сукцинимидилкарбонат)(0,15M в DMF, 39 мкмоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Аналитическая ВЭЖХ показала исчезновение исходного вещества **22a**. Реакционную смесь разбавляли до 10 мл дейонизированной H<sub>2</sub>O, и смесь становилась мутной. Смесь экстрагировали этилацетатом 5 раз для удаления небольших органических молекул. Водный слой отделяли и лиофилизировали. Высушенный твердый продукт (**22b**) использовали как таковой.

Получение примера **22**.

Смешивали 80 мкл соединения **22b** (12,3 мМ в H<sub>2</sub>O, 0,968 мкмоль) и 65 мкл соединения бис-жирная кислота-N<sub>3</sub> (**22c**: стадия 2 примера 15: 44,7 мМ в DMSO, 2,90 мкмоль). Полученная смесь была мутной,

поэтому добавляли 80 мкл 1:1 DMF/THF, и реакционную смесь все еще была слегка мутной. Добавляли еще 80 мкл DMSO с получением прозрачного раствора. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли деионизированной  $H_2O$  и очищали при помощи ВЭЖХ с получением 5,6 мг соединени 22 (65,9% выход). ВЭЖХ условия для очистки: Колонка: Xselect Prep фенилгексил 5 мкм OBD 19×50 мм; органический растворитель: ACN, модифицированный 100 мМ TEA.HOAc; водный растворитель:  $H_2O$ , модифицированная 100 мМ TEA.HOAc; Градиент: 5-60% AcCN/ $H_2O$ ; Время: 10 мин. Согласно ЖХ-МС способу H, продукт показал один пик с временем удерживания 5,44 мин, с желаемой молекулярной массой = 8778 после деконволюции.

Пример 23. Конъюгация жирнокислотного компонента формулы A1 с киРНК препаратом соединения 4:



Пример 23 получали с использованием такой же процедуры, как в примере 22.

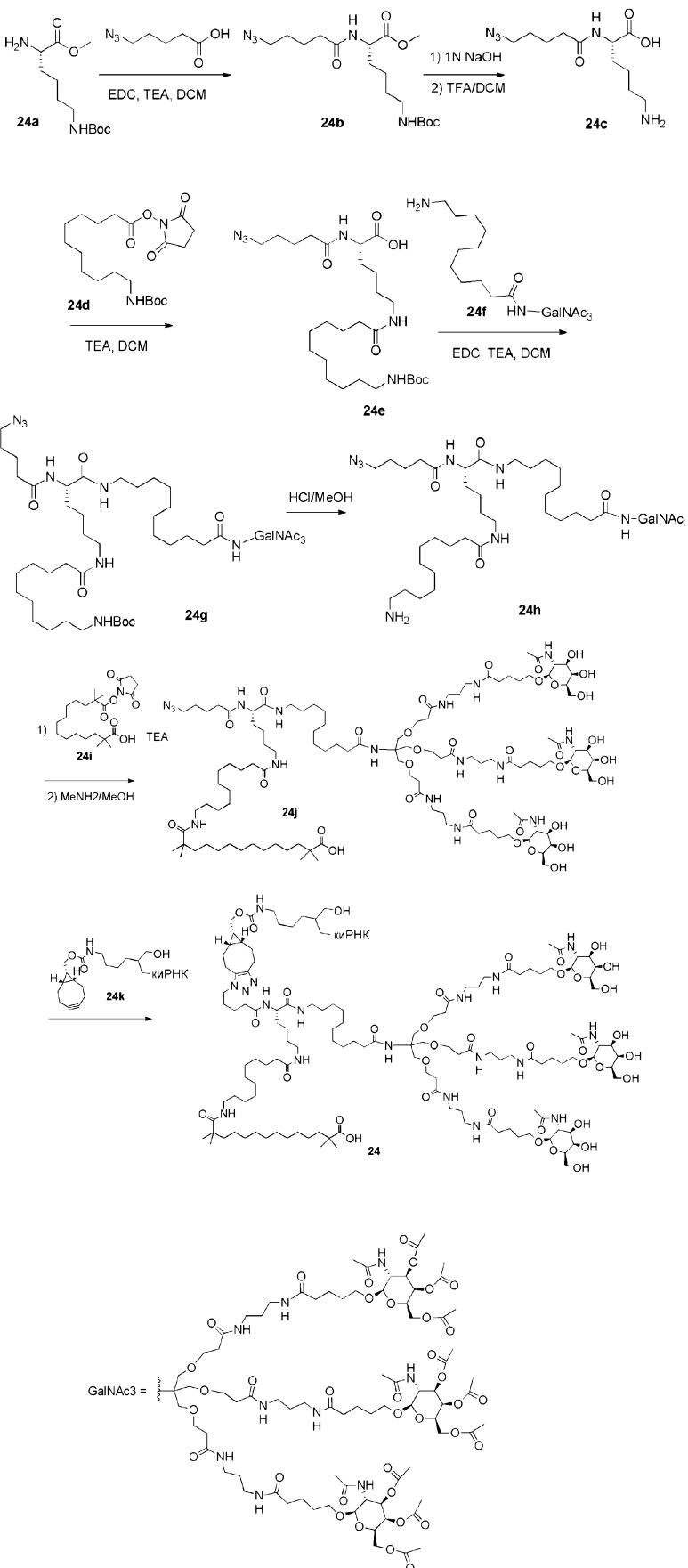
#### Получение 23а.

К раствору NHS-жирной кислоты (20 мг) в DCM (16 мл) добавляли азидо-ПЭГ7-амин (QuantaBiodesign, Cat. No. 10523) (31 мг) и DIPEA (52 мкл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Полную конверсию наблюдали при помощи ЖХ-МС анализа. Смесь концентрировали, снова растворяли в MeOH (3 мл) и очищали на связанной с масс-спектрометрией системе ВЭЖХ с 0,1% TFA ( $t_r=1,59$  мин, масса ( $M+1$ ) ожидаемая: 818,062, наблюдаемая масса: 817,9) с получением чистого продукта. Половина вещества была потеряна из-за 800 Да отсечки, установленной в ВЭЖХ-МС системе. Получали 5-10 мг (17-33%) чистого продукта.

Смешивали 80 мкл 22b (12,3 мМ в  $H_2O$ , 0,968 мкмоль) и 65 мкл трис-жирной кислоты-N3 (23а: 44,7 мМ в DMSO, 2,90 мкмоль).

Реакция давала 5,2 мг соединения 23 (58,0% выход). В соответствии с ЖХ-МС способом H продукт показал один пик с временем удерживания 5,87 мин с желаемой молекулярной массой = 9257 после деконволюции.

#### Пример 24. Конъюгация жирной кислоты формулы А3 с АРОСИИ киРНК



Получение 24b.

К раствору 24a (1,244 г, 4,19 ммоль) в 25 мл DCM добавляли TEA (0,58 мл, 4,19 ммоль) с последующим добавлением N3-пентановой кислоты (500 мг, 3,49 ммоль). EDC (804 мг, 4,19 ммоль) добавляли в конце. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную

смесь экстрагировали насыщенным солевым раствором и DCM. Объединяли все органические слои, сушили, концентрировали и очищали на SiO<sub>2</sub> геле с 60% этилацетата/гептан с получением 1,20 г соединения 24b (89% выход).

<sup>1</sup>H ЯМР (ХЛОРОФОРМ-d, 400 МГц): δ 5,88-6,37 (м, 1H), 4,60 (д, J=4,8 Гц, 2H), 3,77 (с, 3H), 3,33 (т, J=6,7 Гц, 2H), 3,13 (д, J=6,5 Гц, 2H), 2,30 (т, J=7,2 Гц, 2H), 1,81-1,95 (м, 1H), 1,63-1,81 (м, 5H), 1,48-1,57 (м, 2H), 1,46 (с, 9H), 1,36 (д, J=6,8 Гц, 2H).

#### Получение 24c.

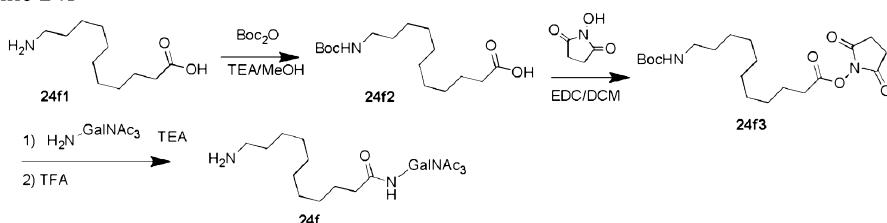
К раствору 24b (8 60 мг, 2,23 ммоль) в 12 мл THF добавляли 1н. NaOH (5,58 мл, 5,58 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 0,5 ч. Реакционную смесь разбавляли насыщенным солевым раствором и добавляли 20 мл DCM. pH водного слоя доводили до ~5 при помощи 1н. HCl, затем экстрагировали при помощи DCM. Объединяли все органические слои, сушили, концентрировали и неочищенное твердое вещество снова растворяли в 6 мл DCM. Добавляли 0,6 мл TFA и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную смесь концентрировали и получали неочищенный 24c (400 мг, 54%), который использовали непосредственно без дополнительной очистки. В соответствии с ЖХ-МС способом I продукт показал главный пик при 0,43 мин с массой 272,5 (M+H<sup>+</sup>).

#### Получение 24e.

К раствору 24c (400 мг, 1,04 ммоль) в 10 мл DCM добавляли TEA (0,434 мл, 3,11 ммоль) с последующим добавлением 24d (538 мг, 1,35 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Реакционную смесь экстрагировали при помощи H<sub>2</sub>O и DCM. Объединяли все органические слои, сушили, концентрировали и очищали на SiO<sub>2</sub> геле с 8% MeOH/DCM с получением 475 мг соединения 24e (82% выход).

<sup>1</sup>H ЯМР (ХЛОРОФОРМ-d, 400 МГц): δ 6,74-6,98 (м, 1H), 5,95-6,13 (м, 1H), 4,55 (дд, J=7,2, 2,4 Гц, 2H), 3,32 (т, J=6,7 Гц, 4H), 3,11 (д, J=5,8 Гц, 2H), 2,30-2,37 (м, 2H), 2,20-2,26 (м, 2H), 1,90 (шир.с, 2H), 1,71-1,80 (м, 2H), 1,59-1,71 (м, 4H), 1,51-1,59 (м, 2H), 1,35-1,51 (м, 13H), 1,20-1,35 (м, 13H).

#### Получение 24f



#### Получение промежуточного соединения 24f2.

К раствору 24f1 (1,0 г, 4,97 ммоль) в MeOH (40 мл) добавляли TEA (1,04 мл, 7,45 ммоль), затем дитрет-бутилдикарбонат (2,17 г, 9,94 ммоль). Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 1,5 ч. Реакционную смесь концентрировали и очищали на SiO<sub>2</sub> колонке с 5% MeOH/DCM с получением 1,2 г соединения 24f2 (80% выход).

<sup>1</sup>H ЯМР (ХЛОРОФОРМ-d, 400 МГц): δ 4,51 (шир.с, 1H), 3,00-3,22 (м, 2H), 2,37 (т, J=7,4 Гц, 2H), 1,59-1,71 (м, 2H), 1,46 (с, 11H), 1,29 (шир.с, 12H).

#### Получение промежуточного соединения 24f3.

К раствору 24f2 (1,2 г, 3,98 ммоль) в DCM (30 мл) добавляли N-гидроксилуксунимид (0,60 г, 5,18 ммоль), с последующим добавлением EDC (1,0 г, 5,18 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали, сразу загружали в SiO<sub>2</sub> колонку и очищали с использованием 40% этилацетата/гептан с получением 1,46 г соединения 24f3 (92% выход).

<sup>1</sup>H ЯМР (ХЛОРОФОРМ-d, 400 МГц): δ 4,49 (шир.с, 1H), 3,04-3,19 (м, 2H), 2,86 (д, J=4,5 Гц, 4H), 2,62 (т, J=7,4 Гц, 2H), 1,70-1,82 (м, 2H), 1,37-1,53 (м, 13H), 1,30 (шир.с, 10H).

#### Получение промежуточного соединения 24f.

К раствору GaINAc<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> (300 мг, 0,16 ммоль) в DCM (1,5 мл) добавляли TEA (0,11 мл, 0,79 ммоль), с последующим добавлением 24f3 (188 мг, 0,47 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем добавляли трифторуксусную кислоту (1,0 мл). Через 2 ч ЖХ-МС анализ показал исчезновение промежуточного соединения. Реакционную смесь концентрировали и очищали на свободно доступной ВЭЖХ в кислотных условиях с ELSD в качестве детекции. ВЭЖХ фракции, содержащие продукт, собирали и растворитель выпаривали с получением 220 мг соединения 24f (67% выход). ЖХ-МС анализ показал, что частичный продукт потерял одну ацетильную группу. ВЭЖХ условия для очистки: колонка: Sunfire 30×100 мм 5 мкм; органический растворитель: ACN с 7,5% TFA; водный растворитель: H<sub>2</sub>O с 7,5% TFA; скорость потока: 75 мл/мин., градиент: 15-40% H<sub>2</sub>O/AcCN; время: 9,5 мин, детекция: ELSD (испарительный нефелометрический детектор) в качестве детекции.

В соответствии с ЖХ-МС способом I продукт показал пик при 0,83 мин с массой = 989,9 (M/2+H<sup>+</sup>).

#### Получение 24g.

К раствору 24e (172 мг, 0,31 ммоль) в 3 мл DCM добавляли 24f (250 мг, 0,12 ммоль) с последующим

добавлением TEA (0,069 л, 0,50 ммоль). EDC (95 мг, 0,5 ммоль) добавляли в конце. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали и очищали на SiO<sub>2</sub> колонке с 5% MeOH/DCM с получением 230 мг 24g (74% выход).

В соответствии с ЖХ-МС способом I продукт показал пик 1,30 мин, с массой = 1258,2 (M/2+H<sup>+</sup>).

#### Получение 24h.

К раствору 24g (230 мг, 0,091 ммоль) в 1 мл THF добавляли 0,457 мл 4н. HCl (в диоксане, 1,83 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь концентрировали и очищали при помощи ВЭЖХ с получением 50 мг соединения 24h (23% выход), которое потеряло одну ацетильную группу на сахаре. ВЭЖХ условия для очистки: колонка: Sunfire 30×100 мм, 5 мкм; органический растворитель: ACN с 7,5% TFA; водный растворитель: H<sub>2</sub>O с 7,5% TFA; скорость потока: 75 мл/мин; градиент: 15-40% H<sub>2</sub>O/AcCN; время: 9,5 мин; детекция: ELSD (испарительный нефелометрический детектор) в качестве детекции.

В соответствии с ЖХ-МС способом I продукт показал пик при 0,95 мин, с массой = 1187,1 (M/2+H<sup>+</sup>).

#### Получение 24i.

К раствору 2,2,13,13-тетраметилтетрадекандиовой кислоты (40 мг, 0,127 ммоль) в 2 мл DCM добавляли N-OH сукцинимид (9,81 мг, 0,085 ммоль), с последующим добавлением EDC (16,34 мг, 0,085 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали и очищали при помощи ВЭЖХ с получением 20 мг 24i (38% выход). ВЭЖХ условия для очистки: колонка: Sunfire 30×100 мм, 5 мкм; органический растворитель: ACN с 7,5% TFA; водный растворитель: H<sub>2</sub>O с 7,5% TFA; скорость потока: 75 мл/мин; градиент: 45-70% H<sub>2</sub>O/AcCN; время: 9,5 мин; детекция: ELSD (испарительный нефелометрический детектор) в качестве детекции.

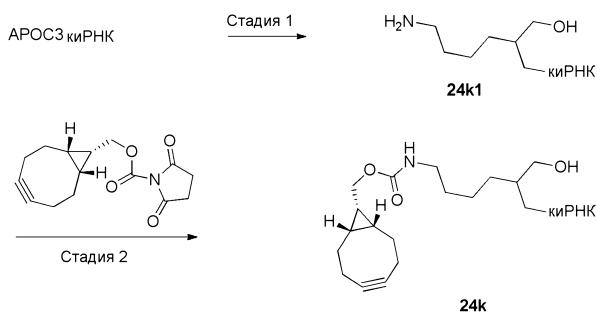
В соответствии с ЖХ-МС способом I продукт показал пик при 1,55 мин, с массой = 434,3 (M+Na<sup>+</sup>).

#### Получение 24j.

К раствору 24h (20 мг, 8,05 мкмоль) в 0,5 мл DCM добавляли TEA (4,5 мкл, 32 мкмоль) с последующим добавлением 24i (6,62 мг, 16 мкмоль) и DMAP (3,93 мг, 32 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем добавляли 0,5 мл 2н. MeNH<sub>2</sub>/MeOH для удаления защиты. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре еще в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали и добавляли ацетон для осаждения продукта и удаления избытка реагентов и липидов, с получением 12 мг 24j (64% выход).

В соответствии с ЖХ-МС способом I продукт показал пик при 0,69 мин, с массой = 1166,9 (M/2+ H<sup>+</sup>).

#### Получение 24k:



#### Стадия 1.

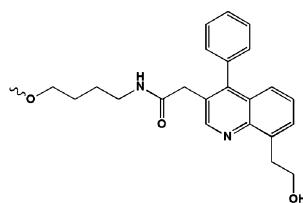
APOC3 киРНК [киРНК гена APOC3 (также известного как APOC3 или Арос 3), синтезированная с использованием традиционных способов, известных из уровня техники].

Отжиг олигонуклеотидов.

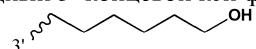
Общая процедура

Каждый олигонуклеотидный осадок быстро центрифигируют в центрифуге и растворяют в Duplex буфере (100 мМ ацетата калия; 30 мМ HEPES, pH 7,5) при высокой концентрации (1-10 OD260 на 100 мл буфера). Нагревание (до 94°C) и вихревое перемешивание можно использовать для облегчения ресуспензирования. Смыловые и антисмыловые нити затем добавляют вместе в эквимолярных количествах. Смешанные олигонуклеотиды затем нагревают до 94°C и постепенно охлаждают. Для последовательностей с существенной вторичной структурой можно использовать более постепенную стадию охлаждения/отжига. Это легко осуществляют, помещая олиго раствор в водяную баню или нагревательный блок и отключая/выключая машину. Полученный продукт будет в стабильной двухцепочечной форме, и его можно хранить при 4°C или заморозить.

Антисмыловая нить APOC3 киРНК включает последовательность APOC3, где 3' конец нити завершается фосфатом и также включает, в порядке от 5' к 3', рибитол, еще один фосфат и 3'-концевой кэп X058, ненуклеотидный 3'-концевой кэп формулы



Смысловая нить включает последовательность АРОСИІ, комплементарную антисмысловой нити, где 3' конец нити завершается фосфатом и также включает, в порядке от 5' к 3', рибитол, еще один фосфат и 3'-концевой кэп C<sub>6</sub>OH, ненуклеотидный 3'-концевой кэп формулы



АРОСИІ киРНК подвергали взаимодействию с 2-диметокситритилоксиметил-6-флуоренилметокси-карбониламино-гексан-1-сукицинил длинной цепью алкиламино-CPG (Glen Research Cat. No. 20-2957) для образования продукта 24k1.

#### Стадия 2.

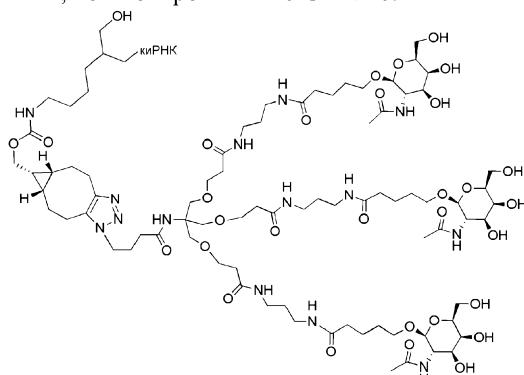
АРОСИІ киРНК (24k1: 401 мкл, 11,2 мМ в H<sub>2</sub>O, 4,49 мкмоль) смешивали с 401 мкл DMF с получением прозрачного раствора. Затем добавляли TEA (180 мкл, 0,25M в DMF, 45 мкмоль) с последующим добавлением BCN-NHS ((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметил N-сукинимидилкарбонат) (9,16 мг, 31 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную смесь разбавляли при помощи H<sub>2</sub>O до 10 л и экстрагировали этилацетатом 3 раза. Водный слой отделяли и концентрировали до ~5 мл и очищали на PD-10 обессоливающей колонке (GE healthcare).

#### Получение соединения 24.

Соединение 24j (5,8 мг, 2,5 мкмоль) добавляли в 105 мкл соединения 24k (Арос 3 киРНК 9,5 мМ в H<sub>2</sub>O, 0,993 мкмоль). Через 1 ч реакционная смесь становилась вязкой, поэтому добавляли еще 60 мкл H<sub>2</sub>O и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь разбавляли при помощи H<sub>2</sub>O и очищали при помощи ВЭЖХ с получением 5 мг коньюгата 24 (57% выход). ВЭЖХ условия для очистки: Колонка: Xselect Prep фенилгексил 5 мкм OBD 19×50 мм; органический растворитель: AcCN, модифицированный 100 mM TEA·HOAc; водный растворитель: H<sub>2</sub>O, модифицированная 100 mM TEA·HOAc; градиент: 5-50% AcCN/H<sub>2</sub>O; время: 10 мин.

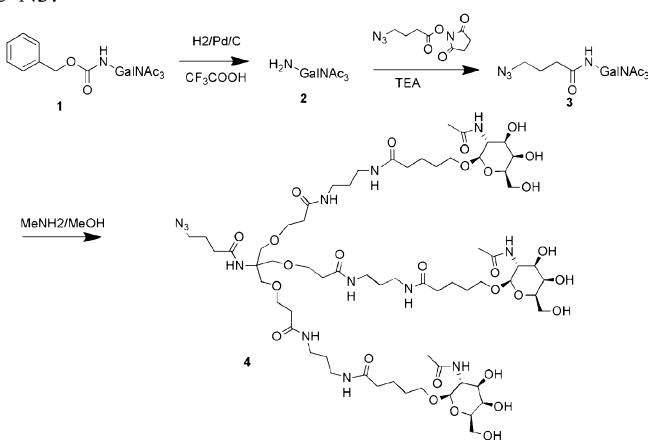
В соответствии с ЖХ-МС способом Н продукт показал пик при 5,96 мин, с желаемой массой = 8896 после деконволюции.

Ссылочный пример 3. киРНК, конъюгированная с GalNAc:



Ссылочный пример 3 получали в соответствии с процедурой примера 24 (заменяя 24j на GalNAc3-N3 (ниже)).

#### Получение GalNAc3-N3:



Получение промежуточного соединения 2.

Соединение 1 (2,06 г, 1,07 ммоль) растворяли в 20 мл этанола, добавляли TFA (82 мкл, 1,07 ммоль), с последующим добавлением 10% Pd/C (0,114 г, 0,11 ммоль). Реакционную смесь обрабатывали под  $H_2$  баллоном в течение 6 ч. Реакционную смесь фильтровали, промывали этанолом и концентрировали с получением белого твердого вещества, которое использовали непосредственно на следующей стадии.

В соответствии с ЖХ-МС способом I продукт показал пик при 0,81 мин, с массой = 898,5 M/2+H<sup>+</sup>.

Получение промежуточного соединения 3.

Соединение 2 (4,848 г, 0,479 ммоль) растворяли в 10 мл безводного DMF, добавляли 2,5-диоксопирролидин-1-ил-4-азидобутаноат (0,325 г, 1,436 ммоль) с последующим добавлением DIPEA (0,418 мл, 2,394 ммоль). Реакционную смесь подвергали взаимодействию в течение ночи при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали без нагревания, сразу загружали в предварительно уравновешенную SiO<sub>2</sub> колонку и очищали с использованием 0-20% метанола/DCM ступенчатого градиента с получением 2,383 г соединения 3 (49,25% выход).

В соответствии с ЖХ-МС способом I продукт показал пик при 1,27 мин, с массой=953,7 (M/2+H<sup>+</sup>).

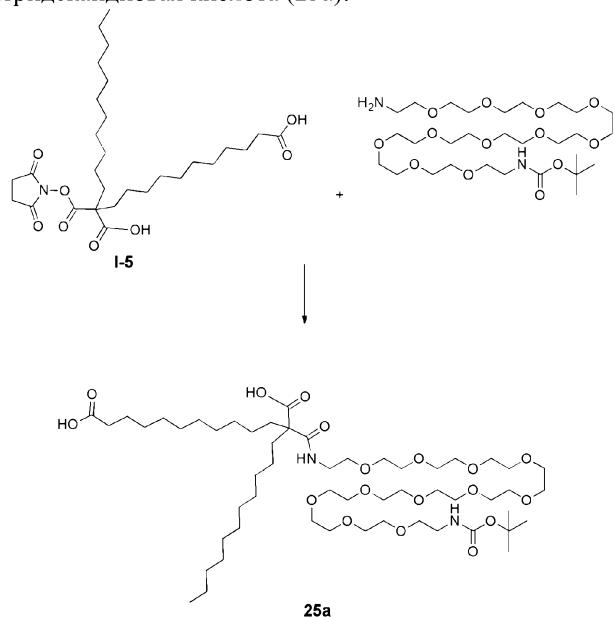
Получение промежуточного соединения 4.

Смешивали соединение 3 (1,33 г, 0,70 ммоль) с MeNH<sub>2</sub> (17,45 мл, 2,0M в метаноле, 34,9 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. ЖХ-МС анализ показал только пик продукта. Реакционную смесь концентрировали. Затем твердое вещество снова растворяли в этаноле и осаждали ацетоном с получением 1,0 г соединения 4 (94% выход).

В соответствии с ЖХ-МС способом I продукт показал пик при 0,53 мин, с массой=764,5 (M/2+H<sup>+</sup>).

Пример 25. Конъюгация белка-носителя (CRM197) и жирной кислоты.

Стадия 1. 2-((2,2-Диметил-4-оксо-3,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-додекаокса-5-азатетраконтан-40-ил)карбамоил)-2-ундекилтридекандиовая кислота (25a):

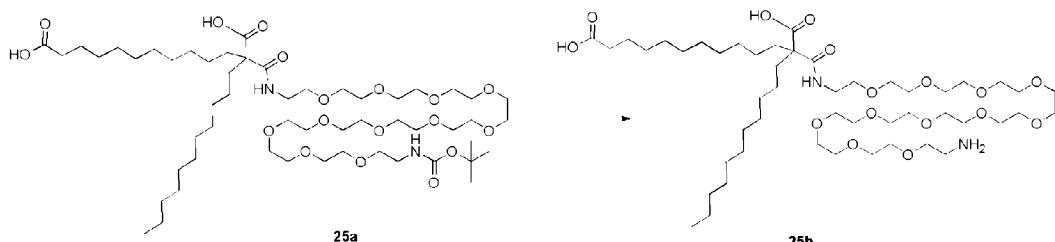


t-boc-N-амидо-d-ПЭГ®<sub>11</sub>-амин (100 мг, 0,155 ммоль, Quanta Biodesign) и промежуточное соединение 5 (80 мг, 0,148 ммоль) растворяли в THF (3 мл) и перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота. Через 30 мин добавляли DIPEA (0,05 мл, 0,286 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Полную конверсию наблюдали при помощи ЖХ/МС (кислотный элюент А: вода + 0,05% трифторуксусной кислоты, элюент В: ACN, колонка Sunfire C18 3,5 мкм, 3,0×30 мм, -40°C, 5-95% градиент 2 мин, время удерживания 1,92 мин). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, затем растворяли в примерно 1,5 мл ацетонитрила. Очищали на связанный с масс-спектрометрией системе ВЭЖХ (колонка Sunfire 3×50 мм, 5 мкм ACN/H<sub>2</sub>O с 0,1% TFA 75 мл/мин, объем вводимой пробы 1,5 мл, градиент 65-95% ACN 3,5 мин, время удерживания 3,23 мин) и фракции объединяли и лиофилизовали с получением 85 мг чистого продукта с выходом 54%. Прозрачное масло.

ЖХ/МС: Способ D Rt=1,18 мин, M+H 1070,1;

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, АЦЕТОНИТРИЛ-d<sub>3</sub>): δ м.д. 0,82-1,03 (м, 1H), 1,11-1,37 (м, 10H), 1,37-1,51 (м, 2H), 1,51-1,64 (м, 1H), 1,69-1,82 (м, 1H), 1,90-2,04 (м, 66H), 2,05-2,21 (м, 8H), 2,21-2,42 (м, 1H), 3,17-3,28 (м, 1H), 3,40-3,68 (м, 13H).

Стадия 2 2-((35-Амино-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-ундекаоксапентатриаконтил)карбамоил)-2-ундекилтридекандиовая кислота (25b):



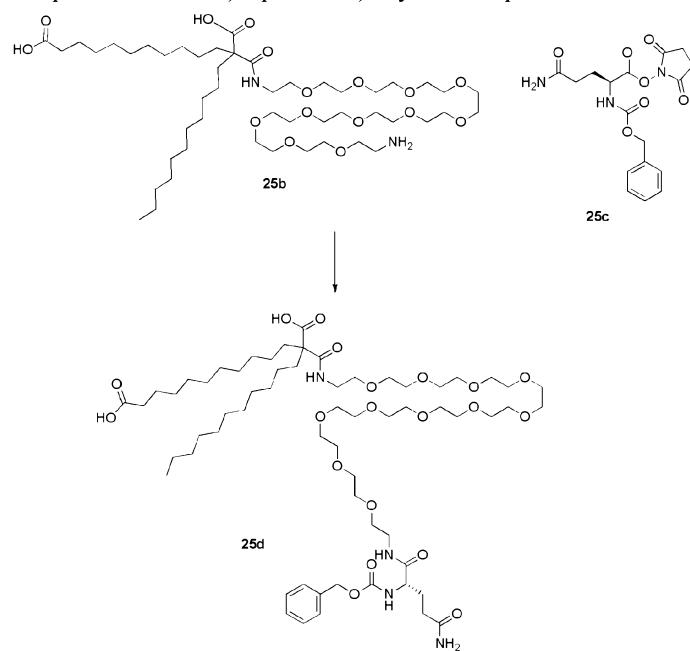
235

25a (5 мг, 4,68 мкмоль) растворяли в DCM (объем: 2 мл), затем добавляли трифторуксусную кислоту (25 мкл, 0,324 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота примерно в течение 2 ч. Полную конверсию наблюдали при помощи ЖХ/МС (кислотный элюент A: вода + 0,05% трифторуксусной кислоты, элюент B: ACN, колонка Sunfire C18 3,5 мкм, 3,0×30 мм, -40°C, 5-95% градиент 2 мин, время удерживания 1,45 мин). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, затем промывали при помощи DCM и концентрировали снова 3 раза. Растворяли в смеси ацетонитрила и DMSO. Очищали на МС-связанной системе ВЭЖХ (колонка Sunfire 30×50 мм, 5 мкм, ACN/H<sub>2</sub>O с 0,1% TFA, 75 мл/мин, объем вводимой пробы 1,5 мл, градиент 45-70% ACN 3,5 мин, время удерживания 2,50 мин) и фракции объединяли и лиофилизовали с получением 2,5 мг чистого продукта с выходом 55%. Прозрачное масло.

Способ А Вт=1 45 мин М±Н 969 9:

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, АЦЕТОНИТРИЛ-d<sub>3</sub>): δ м.д. 0,62-0,91 (м, 2H), 0,91-1,10 (м, 3H), 1,10-1,31 (м, 18H), 1,46 (квинт., J=7,21 Гц, 2H), 1,59-1,89 (м, 35H), 1,94-2,09 (м, 1H), 2,16 (т, J=7,40 Гц, 2H), 2,97-3,11 (м, 1H), 3,24-3,37 (м, 1H), 3,37-3,61 (м, 28H), 3,61-3,89 (м, 2H), 7,85 (шир.с, 1H).

Стадия 3. 2-(((S)-5-(3-Амино-3-оксопропил)-3,6-диксено-1-фенил-2,10,13,16,19,22,25,28,31,34,37,40-додекаокса-4,7-диазадотетраконтан-42-ил)карбамоил)-2-ундецилтридекандиовая кислота (25d):

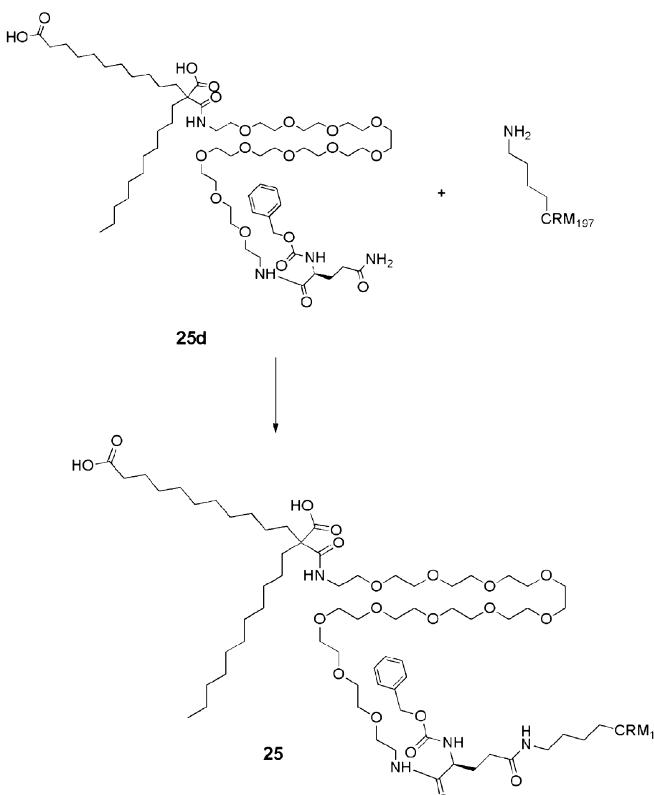


Раствор 25b (20 мг, 0,018 ммоль) в THF (объем: 2 мл) добавляли к Z-L-Gln-Osu 25c (Santa Cruz Biotechnology, CAS 34078-85-8, 11 мг, 0,029 ммоль), затем добавляли DIPEA (75 мкл, 0,429 ммоль). Перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение уикенда. Полную конверсию наблюдали при помощи ЖХ/МС (кислотный элюент A: вода + 0,05% трифтормукусной кислот, элюент B: ACN, колонка Sunfire C18 3,5 мкм, 3,0×30 мм, -40°C, 5-95% градиент 2 мин, время удерживания 1,77 мин). Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении, затем растворяли в ацетонитриле. Очищали на связанной с масс-спектрометрией системе ВЭЖХ (колонка Sunfire 30×50 мм, 5 мкм, ACN/H<sub>2</sub>O с 0,1% TFA, 75 мл/мин, объем вводимой пробы 1,5 мл, градиент 55-80% ACN 3,5 мин, время удерживания 2,70 мин) и фракции объединяли и лиофилизовали с получением 10,5 мг чистого продукта с выходом 46% в виде прозрачного бесцветного масла.

Способ С Rt=1,60 мин, M+H 1232,4;

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, АЦЕТОНИТРИЛ-d<sub>3</sub>): δ м.д. 0,67-0,93 (м, 2H), 0,93-1,10 (м, 2H), 1,10-1,32 (м, 15H), 1,45 (квинт., J=7,24 Гц, 1H), 1,59-1,69 (м, 1H), 1,75-1,93 (м, 30H), 1,94-2,21 (м, 20H), 3,23 (квинт., J=5,26 Гц, 1H), 3,28-3,51 (м, 23H), 3,95 (тд, J=7,73, 5,44 Гц, 1H), 4,92-5,22 (м, 1H), 5,78 (шир.с, 1H), 6,13-6,42 (м, 1H), 6,88 (шир.с, 1H), 7,20-7,36 (м, 2H), 7,42 (т, J=5,07 Гц, 1H).

Стадия 4. mTGasе-опосредованное мечение CRM197 жирной кислотой (пример 25):



К раствору 25d в 100 мМ трис-буфере pH 8 (8 мг/мл, 203 мкл, 1,316 мкмоль) добавляли CRM197 (33 мг/мл, 1,515 мкл, 0,00086 мкмоль), затем раствор фермента трансглютаминазы (Ajinomoto) в PBS (50 мг/мл, 0,455 мкл, 0,00060 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакционную смесь подвергали буферному обмену в 100 мМ трис-буфере pH 8 с использованием 10 кДа MWCO Amicon центрифужного фильтра путем разбавления и концентрирования реакционной смеси 5 раз до объема 100 мкл. ЖХ/МС анализ показал преобразование в +1, +2, +3 и +4 продукты. ЖХ/МС QT2; Белок 35-70 кДа, 3 мин: Rt=1,45 мин; МС [M+25d]: наблюдали: 59625, рассчитано: 59624; МС [M+(2×25d)]: наблюдали: 60839, рассчитано: 60838; МС [M+(3×25d)]: наблюдали: 62054, рассчитано: 62052; МС [M+(4×25d)]: наблюдали: 63270, рассчитано: 63266.

CRM197 последовательность:

```

GADDVVDSSK SFVMENFSSY HGTKPGYVDS IKGIGQKPKS GTOGNYDDDW
KEFYSTDNKY DAAGYSVDNE NPLSGKAGGV VKVTYPGLTK VLALKVDNAE
TIKKELGLSL TEPLIMEQVGT EEFIKRFGDG ASRVVLSLPF AEGSSSSVEYI
NNWEQAKALS VELEINFETR GKRGQDAMYE YMAQACAGNR VRRSVGSSL
CINLDWDVIR DKTGTKIESL KEHGPIKNKM SESPNKTVSE EKAHQYLEEF
HQTALEHPEL SELKTVTGTN PVFAGANYAA WAVNVAQVID SETADNLEKT
TAALSILPGI GSVMGIADGA VHHNTEEEIVA QSIALSSLMV AQAIPLVGEL
VDIGFAAYNF VESIINLFQV VHNSYNRPAY SPGHKTQPFL HDGYAVSWNT
VEDSIIIRTGF QGESGHDIKI TAENTPLPIA GVLLPTIPGK LDVNKSKTHI
SVNGRKIRMR CRAIDGDVTF CRPKSPVYVG NGVHANLHVA FHRSSSEKIH

```

Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	%	R <sub>t</sub> (мин)
CRM197	58410	n/a	0	n/a
CRM197 +1 25d	59624	59625	14	1,45
CRM197 +2 25d	60838	60839	23	1,45
CRM197 +3 25d	62052	62054	35	1,45
CRM197 +4 25d	63266	63270	28	1,45

Краткое описание эксперимента пептидного картирования.

Пептидное картирование, расщепление: образцы 5 мкг модифицированного CRM197 и положи-

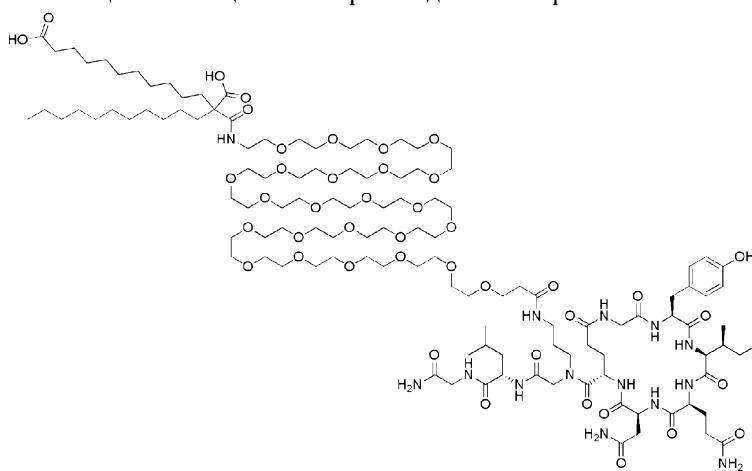
тельного контроля CRM197 восстанавливали при помощи 20 мМ DTT и расщепляли с использованием 1/30 (мас./мас.) фермент/белок при 26°C в течение ночи трипсином. Аликвоту трипсин-расщепленного белка далее расщепляли GluC ферментом при 1/20 отношении фермент/белок в течение 4 ч при 26°C; все ферменты закупали у Roche Diagnostics (GmbH, Germany).

Анализ обращенно-фазовой ЖХ-МС/МС: Полученные расщепленные пептиды анализировали жидкостной хроматографией в tandemе с масс-спектрометрией с использованием электрораспыления (LC-ESI MS/MS) на установке Thermo LTQ Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA), связанной с Agilent CapLC (Santa Clara, CA). Загружали ~10-15 пмоль CRM контроля и модифицированного CRM197 и расщепляли на колонке при 40°C (колонка Waters Acuity BEH C18, 1,7 мкм, 1×100 мм). Общее время градиента 80 мин при 10 мкл/мин, начиная при 0-1 мин, 4% В, увеличивали до 7% В к 1,1 мин, 45% В к 55 мин, затем 95% В к 63 мин с последующей промывкой и уравновешиванием колонки. Параметры масс-спектрометра включали полное сканирование с использованием FTMS анализатора при 30000 разрешении из m/z 300-2000 в течение 30 мс. Индуцированную столкновениями диссоциацию МС/МС осуществляли на семи самых интенсивных ионах (за исключением 1+ ионов) в анализаторе с ионной ловушкой, активировали при 500 (для всех событий) порог интенсивности сигнала в течение 30 мс.

Анализ данных и поиск в базе данных: все масс-спектры обрабатывали в Qual Browser V 2.0.7 (Thermo Scientific). Mascot базовые файлы (mgf) были образованы с использованием MS DeconTools (R.D. Smith Lab, PPNL), и их поиск осуществляли с использованием Mascot V2.3.01 (Matrix Science Inc., Boston, MA) поиска в базе данных против представленной последовательности белка, добавленной к внутренней базе данных и SwissProt базе данных (V57 с 513877 последовательностями) для загрязнения белков. Параметры поиска включали: фермент: семитрипсин или трипсин/Glu-C, допускалось до трех пропущенных расщеплений; модификации переменных: добавляли ожидаемые массы малых молекул (362,147787 и 463,206698 Да) к базе данных, называемой "CRM Tgase + alkyne 362 Da mod (CKR), CRM Tgase + alkyne 362 Da mod (N-term), CRM Tgase + azide 463 Da mod (CKR), CRM Tgase + azide 463 Da mod (N-term)"; допуск для пептида: ±20 м.д.; МС/МС допуск: ±0,6 Да. Оценки охвата последовательностей и модификаций малых молекул осуществляли на основании подсчета ионов с >95% уверенностью. Имеющие высокую оценку пептидные ионы затем выбирали для осуществляющегося вручную МС/МС анализа с использованием Qual Browser.

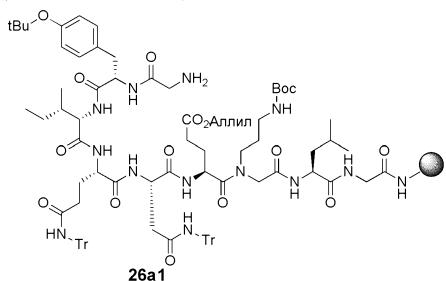
Положения, в которых происходит модификация лизина, можно определить в соответствии с экспериментом картирования, описанным выше. В соответствии с конъюгациями, подобными описанным для CRM197 в заявке США № US 2015/0017192, поданной 11 июля 2014 г. (номер патентного реестра PAT055641-US-NP), было сделано заключение, что модификация произошла по Lys37 или Lys39, Lys 33 и Lys440.

Пример 26А. Конъюгация окситоцинового производного и жирной кислоты:



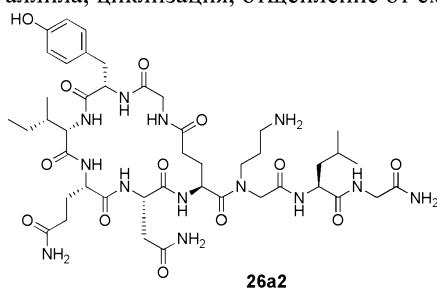
Конъюгат окситоцин-жирная кислота

Стадия 1. Получение защищенного окситоцина на смоле



Защищенную форму окситоцина на смоле (26a1) синтезировали аналогично процедуре примера 21B стадия 1.

Стадия 2. Удаление защиты аллила, циклизация, отщепление от смолы



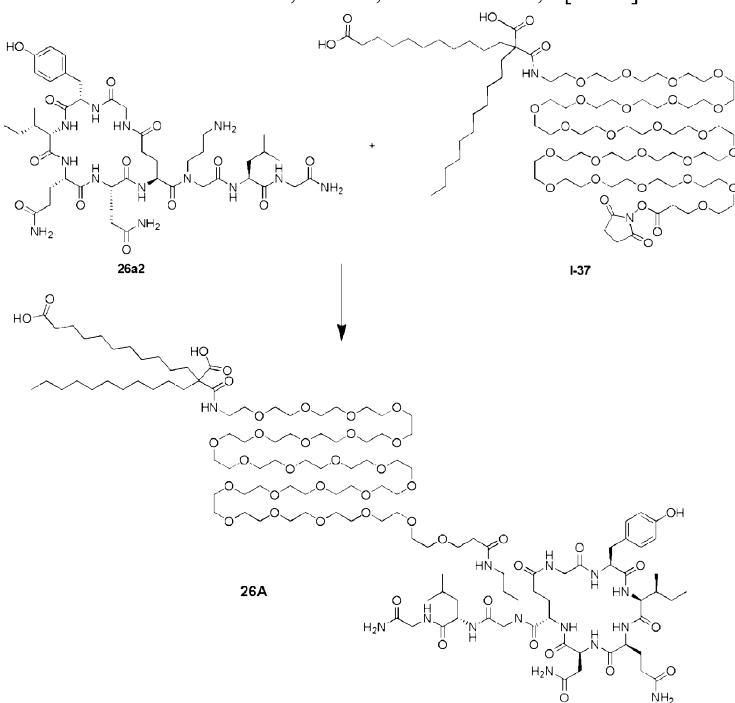
Защищенное промежуточное соединение (26a1) (0,2 ммоль) поглощали в 6 мл DCM, содержащего фенилсилан (1 ммоль) и  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (0,02 ммоль). Смолу встряхивали в этом растворе в течение 15 мин и затем фильтровали. Эту процедуру повторяли два раза с фенилсиланом/ $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  в DCM растворе. После последнего встряхивания смолу фильтровали и промывали при помощи HMP (3 раза), DCM (3 раза), 0,5% DIEA/DCM (3 раза) и в завершение HMP (3 раза). Полученную промытую смолу сушили под вакуумом. Порцию высушенной смолы (~0,1 ммоль) поглощали в раствор РуВОР (0,2 ммоль), HOBr (0,4 ммоль) и DIEA (0,5 ммоль) в 6 мл HMP. Эту реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 20 ч. Смолу фильтровали и промывали при помощи EtOAc (3 раза) и DCM (3 раза). Смолу затем поглощали в 4 мл 95/2,5/2,5 TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O и встряхивали в течение 2 ч. TFA/TIPS/H<sub>2</sub>O раствор затем фильтровали в холодном (<-20°C) Et<sub>2</sub>O для осаждения отщепленного пептида. После центрифугирования Et<sub>2</sub>O декантировали и не совсем белый остаток промывали при помощи Et<sub>2</sub>O и центрифугировали снова. Полученное не совсем белое твердое вещество сушили в атмосфере N<sub>2</sub> в течение ночи. Это твердое вещество очищали на системе связанной с масс-спектрометрией препаративной ВЭЖХ (Waters Autopure HPLC system; колонка Sunfire C18 30×50 мм 5 мкм; подвижная фаза: 7,5-20% ACN в воде, 5 мин градиент, 75 мл/мин, с 0,1% TFA). Фракции, соответствующие к промежуточному соединению (26a2), объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением белого твердого вещества (13,5 мг, 14%).

HRMS - аналитический способ G: Rt=0,90 мин, MC m/z 988,5225 [M+H]<sup>+</sup>.

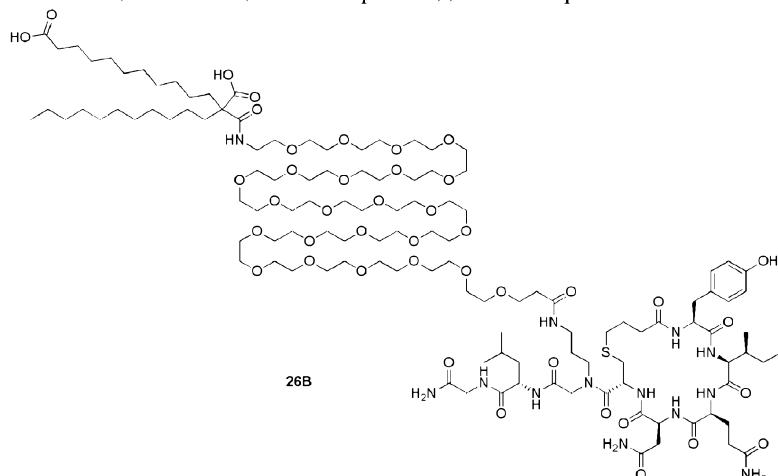
Стадия 3. Конъюгация с жирной кислотой.

К раствору промежуточного соединения (26a2) (2,82 мкмоль) в 0,5 мл pH 6,40 фосфатного буфера добавляли раствор I-37 (8,39 мкмоль) в 0,5 мл pH 6,40 фосфатного буфера. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч. Реакционную смесь затем фильтровали через 4,5 мкм фиттру и очищали на системе связанной с масс-спектрометрией препаративной ВЭЖХ (Waters Autopure HPLC system; колонка Sunfire C18 30×50 мм, 5 мкм; подвижная фаза: 45-70% ACN в воде, 5 мин градиент, 75 мл/мин, с 0,1% TFA). Фракции, соответствующие окситоцин-FA конъюгату (26A), объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением белого твердого вещества (1,71 мг, 24%).

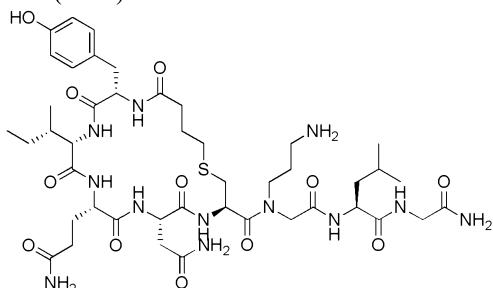
ЖХ/МС - аналитический способ G: Rt=3,07 мин, MC m/z 2540,5 [M+H]<sup>+</sup>.



Пример 26В. Конъюгация окситоцинового производного и жирной кислоты:



Соединение этого примера (26В) можно получить в соответствии с процедурой стадии 3 примера 26А, описанной выше, путем взаимодействия: \*Бутират-Тyr-Ile-Gln-Asn-Cys\*-Gly(N-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>)-Leu-Gly-NH<sub>2</sub>, \* = сульфидная связь (26b1):



(26b1) с промежуточным соединением I-37.

Циклический пептид (26b1) получали путем адаптации процедуры примера 41, раскрытое в документе Wisniewski et al., J. Med. Chem. (2014), 57, 5306-5317, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

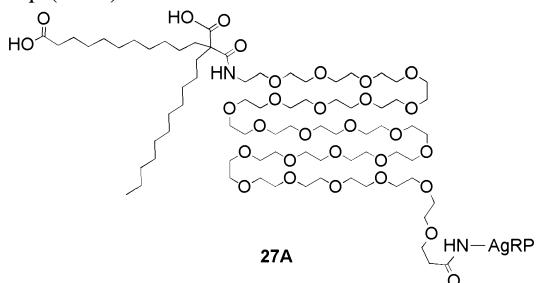
Пептид синтезировали вручную на 1 ммоль Fmoc-Rink Амидной AMS смолы через Fmoc химию. Защитные группы, используемые для аминокислот, представляли собой следующие: трет-бутильная группа для Тир, Трт группа для Gln и Asn. Использовали две необычные аминокислоты Fmoc-Cys (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>-аллил)-OH и Fmoc-[Na-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH(Boc)]Gly-OH. Пептидную цепь собирали на смоле путем повторяющегося удаления Fmoc защитной группы и связывания защищенной аминокислоты (3 экв.) в DMF. HBTU и HOBr (3экв.: 3экв.) использовали в качестве связывающего реагента и N-метилморфолин (HMM, 6 экв.) использовали в качестве основания. 20% пиперидин в DMF ( $\times 3$  объем смолы) использовали в качестве реагента для удаления Fmoc. Смолу промывали при помощи DMF ( $\times 3$  объем смолы) после каждого связывания и удаления Fmoc; нингидриновую реакцию осуществляли после каждого связывания для контроля эффективности связывания. После удаления последней группы Fmoc смолу промывали этиловым эфиром и сушили под вакуумом. Селективное осуществляющее на смоле удаление защитной группы аллилового сложного эфира осуществляли при помощи Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>/5,5-диметил-1,3-циклогександиона (1 экв./10 экв.) в DCM/THF (1/1,  $\times 10$  объем смолы) в течение 3 ч. Смолу промывали при помощи DMF (3 $\times$ ) с последующей промывкой 0,5% раствором диэтилдитиокарбамата натрия в DMF (5 $\times$ ). В завершение, осуществляли циклизацию на смоле при помощи HCTU/HMM (3 экв./6 экв.) в DMF. Смолу промывали и сушили под вакуумом с получением 3,2 г содержащей пептид смолы, которую обрабатывали при помощи 32 мл TFA/TIS/DOT/H<sub>2</sub>O (92,5/2,5/2,5/2,5, об/об) в течение 3 ч при комнатной температуре для удаления защитных групп на боковой цепи и отщепления пептида от смолы. Неочищенный пептид осаждали из холодного диэтилового эфира, затем собирали фильтрованием и сушили в условиях высокого вакуума. Выход: 1,15 г (116%).

Весь неочищенный пептид очищали на 2-дюймовой C18 колонке с TFA буфером (буфер A: 0,1% TFA в воде; буфер B: ацетонитрил). Объединенные фракции с чистотой >95% лиофилизировали. Получали 84 мг конечного пептида (TFA соль). MS: 991,6 [M+H]<sup>+</sup>, ВЭЖХ время удерживания 9,49 мин (способ: скорость потока 1,2 мл/мин; Буфер A: 0,1% TFA в воде; Буфер B: 0,1% TFA в ацетонитриле; комнатная температура; колонка: Discovery, C18, 4,6мм  $\times$ 250 мм, 5 мкм; Градиент (линейный) 15-35% буфера B в течение 20 мин; объем вводимой пробы 0,02 мл).

Пример 27. Конъюгат агутти-связанный белок (AgRP)-жирная кислота.

Конъюгаты AgRP (83-132)-FA.

Пример 27А. Моножирнокислотный конъюгат AgRP (AgRP+1FA), где жирная кислота присоединена к N-концу AgRP через линкер (ПЭГ):



где AgRP(83-132) имеет следующую последовательность:

Ser-Ser-Arg-Arg-Cys-Val-Arg-Leu-His-Glu-Ser-Cys-Leu-Gly-  
Gln-Gln-Val-Pro-Cys-Cys-Asp-Pro-Cys-Ala-Thr-Cys-Tyr-Cys-Arg-  
Phe-Phe-Asn-Ala-Phe-Cys-Tyr-Cys-Arg-Lys-Leu-Gly-Thr-Ala-Met-  
Asn-Pro-Cys-Ser-Arg-Thr;

которая содержит пять дисульфидных мостиков в положениях C87&C102, C94&C108, C101&C119, C105&C129, C110&C117 мостиков.

Пример 27В. Ди-жирнокислотный конъюгат AgRP(83-132) (AgRP+2 FA), где одна жирная кислота присоединена к N-концу AgRP (т.е. Серин 83) через линкер (ПЭГ), а другая жирная кислота присоединена к боковой цепи лизина в положении 121 через ПЭГ линкер.

К 0,90 мл 10 мг/мл раствора AgRP(83-132) (доступный от R&D Systems™) в pH 4,5 цитратном буфере (9 мг, 1,585 мкмоль) добавляли 0,80 мл pH 4,43 ацетатного буфера с последующим добавлением 1,30 мл 10 мг/мл раствора I-37 в H<sub>2</sub>O (13 мг, 7,79 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. HRMS (QT2) анализ показал присутствие обоих AgRP+1FA, m/z 7226,3 [M+H]<sup>+</sup> при 1,89 мин и AgRP+2FA, m/z 8778,4 [M+H]<sup>+</sup> при 2,41 мин. Реакционную смесь фильтровали через 4,5 мкм фритту, объединяли со второй реакцией, осуществляющейся, как описано выше (0,881 мкмоль AgRP, 2,64 мкмоль I-37), и очищали при помощи preparative ВЭЖХ (Waters Autopure HPLC system; колонка Waters Protein BEH C4, 300 Å, 5 мкм, 10×250 мм; подвижная фаза: 20-80% ACN в воде, 11 мин градиент, 10 мл/мин, с 0,1% TFA; время хроматографирования: 15 мин; сбор фракций: УФ 210 нм). Фракции, соответствующие AgRP+1FA и AgRP+2FA, выделяли, замораживали и лиофилизировали с получением TFA солей AgRP+1FA (27A) и AgRP+2FA (27B) в виде белых твердых веществ (3,24 мг, 16% AgRP+1FA; 2,26 мг, 9% AgRP+2FA).

ЖХ/МС - аналитический способ G.

(AgRP+1FA) Rt=1,91 мин, MC m/z 7226,4 [M+H]<sup>+</sup>; (AgRP+2FA) Rt=2,43 мин, MC m/z 8778,4 [M+H]<sup>+</sup>.

Эксперимент с использованием мечения для определения положения присоединения жирной кислоты.

Мечение по N-концевому Ser остатку подтверждалось путем расщепления реакционной смеси при помощи Asp-N (Promega) в соответствии с протоколом изготовителя. Все анализы пептидного картирования осуществлялись с использованием Thermo Dionex Ultimate 3000 ЖХ, связанной с Bruker Maxis Impact Q-TOF масс-спектрометром. Разделение осуществлялось на ACQUITY UPLC BEH130 C18 колонке (2,1×150 мм, 1,7 мкм, Waters), поддерживающейся при 40°C. Скорость потока составляла 0,1 мл/мин, с использованием 0,1% FA в воде в качестве подвижной фазы A и 0,1% FA в ацетонитриле в качестве подвижной фазы B.

Раствор Asp-N (Promega Part # V162A) восстанавливали в 20 мкл ВЭЖХ/MS воды (0,1 мкг/мкл). Около 10 мкг образца разбавляли до конечного объема 25 мкл в 6 М мочевины, 10 мМ дигиотреитола, 5 мМ EDTA и 50 мМ Трис HCl (pH 8,0). После восстановления и алкилирования растворы разбавляли шесть раз при помощи 50 мМ Трис HCl (pH 8,0), затем осуществляли протеолиз с дополнительным 1 мкг Asp-N. Реакции расщепления осуществлялись в течение ночи при 37°C. ЖХ/МС анализ показал, что расщепление произошло в N-концевых D положениях AgRP дикого типа и модифицированного AgRP с одним добавлением жирной кислоты на каждом фрагменте, как показано в следующей таблице.

последовательность пептида	Положение	масса	RT	Ожидающее m/z	Наблюдающее m/z	заряд
SSRRCVRLHESCLGQQVP CC	A(1-20)	2488,13	8,1	623,04	623,03	4
DPCATCYCRFFNAFCYCR KLGTAMNPCSRT	A(21-50)	3783,58	10,1	757,72	757,72	5
Модифицированный						
SSRRCVRLHESCLGQQVP CC+fa	A(1-20)	4040,12	17,4	1011,04	1011,03	4
DPCATCYCRFFNAFCYCR KLGTAMNPCSRT+fa	A(21-50)	5335,56	18,1	1068,12	1068,12	5

Пример 28 (28A, 28B и 28C) относится к конъюгатам hFGF23 варианта.

Используемые FGF23 варианты.

Последовательность варианта человеческого FGF23, используемого и обозначаемого в этом примере как "hFGF23 (R179Q)", "hFGF23 R179" или просто "hFGF23", представлена в SEQ ID NO: 10. Этот FGF23 вариант не содержит сигнальный пептид, но содержит восстановленный М в положении 1 и содержит мутацию в R179 (R179Q). Конъюгат, включающий жирную кислоту, описанную в настоящем документе, получали с этим FGF23 пептидом (пример 28C), и, как показано в табл. 8, он сохраняет по меньшей мере одну FGF23 активность.

Два других варианта человеческого FGF23 также использовали в этом примере (примеры 28A и 28B) для конструирования конъюгатов с жирными кислотами, раскрытыми в настоящем документе. Подобно пептиду SEQ ID NO: 10, они не содержат FGF23 сигнальный пептид и имеют мутацию в R179, но имеют одну или несколько дополнительных мутаций, но сохраняют по меньшей мере одну активность FGF23. Эти два FGF23 варианта используются, и оба обозначаются в этом примере как "hFGF23-вариант" или "FGF23 вариант" или т.п.

Способы получения конъюгатов, описанные в настоящем документе, можно использовать с другими FGF23 пептидами, включая FGF23 или его гомолог, вариант, фрагмент, или модифицированную форму.

Протокол для получения FGF23 вариантов.

Преобразование.

hFGF23 (R179) полипептид получали путем транзиторной трансфекции pET28c-hFGF23 R179Q экспрессирующей плазиды в BL21 (DE3) компетентные клетки, инкубации на льду в течение 30 мин, теплового шока при 42°C в течение 45 с, добавления SOC среды и инкубации бактерий в 37°C шейкер в течение 1 ч. Затем бактериальную культуру распределяли в LB планшеты, содержащие Канамицин, и инкубировали в течение ночи при 37°C. Выделенные колонии переносили в LB среду, содержащую Канамицин, инкубировали в течение ночи при 37°C при встряхивании и 25 мл аликовты переносили в новую LB среду, содержащую Канамицин, и встряхивали при 37°C примерно в течение 2,5 ч. Когда клетки имели достаточную плотность (OD ~0,6), добавляли 1 М IPTG к каждой культуре при непрерывном встряхивании при 37°C для индукции экспрессии полипептида. Через 4 ч клетки осаждали центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 мин и клеточный осадок замораживали при -20°C. Затем клеточный осадок ресуспендировали в лизисном буфере (50 mM Трис, pH 8, 100 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) и клетки лизировали с использованием микрофлюидизатора. Добавляли 10 мг лизозима и 10 мкл ДНКазы (1 единица на мл, Invitrogen) на 100 мл лизисной смеси и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем центрифугировали при 8000 об/мин при 4°C в течение 20 мин, промывали с использованием трех перемешиваний 100 мл лизисного буфера и вращения, и в четвертый раз с лизисным буфером без Triton X-100. Осадки (телец включения) от конечного центрифугирования сразу солюбилизовали в 50 mM Трис, pH 7,4, 6 M гуанидина, 10 mM DTT, определяли концентрацию белка и доводили до 1 мг/мл перед рефолдингом.

Рефолдинг белка.

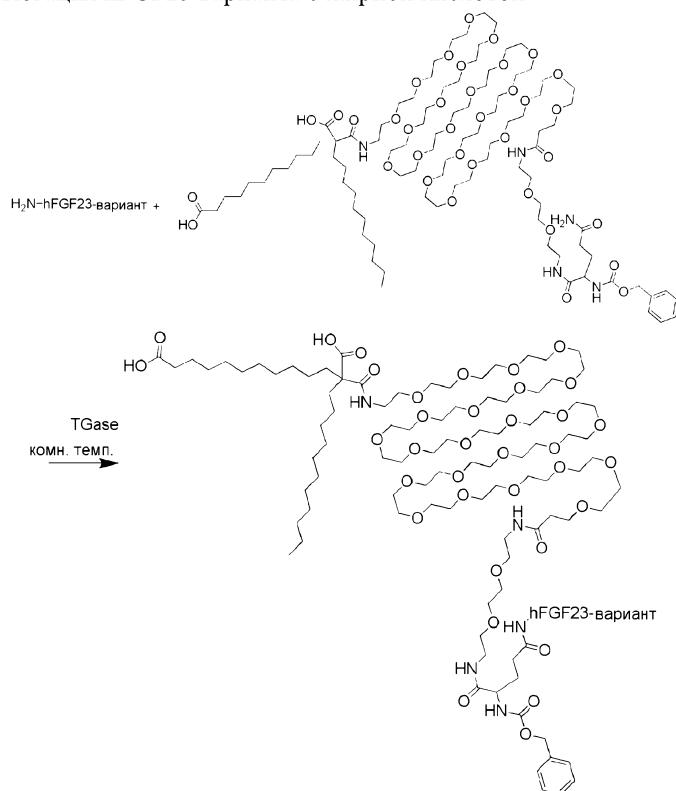
Для рефолдинга белка 368 мг восстановленного глутатиона (GSSH) и 74 мг окисленного глутатиона (GSSG) добавляли к каждым 400 мл солюбилизированного внутриклеточного тельца. Белок диализовали в течение ночи при 4°C против 4 л 50 mM Трис, pH 8,0 и 250 mM аргинина. Затем 2 л диализного буфера удаляли и заменяли на 2 л воды и продолжали диализ еще в течение 8 ч. Диализный буфер затем заменили на 20 mM Трис, pH 8,0, 50 mM NaCl, 25 mM аргинина и диализ продолжали в течение ночи.

Очистка белка.

Для очистки белка диализированную смесь центрифугировали при 12000 об/мин в течение 30 мин, супернатант загружали в колонку с Гепарин-Сефарозой, уравновешенную конечным диализным буфером, и колонку промывали при помощи 1×PBS (20× объем слоя). Полученный в результате рефолдинга белок элюировали при помощи 1×PBS, дополненного 0,5 M NaCl, чистоту белка определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле и концентрацию белка измеряли на основании его OD при дли-

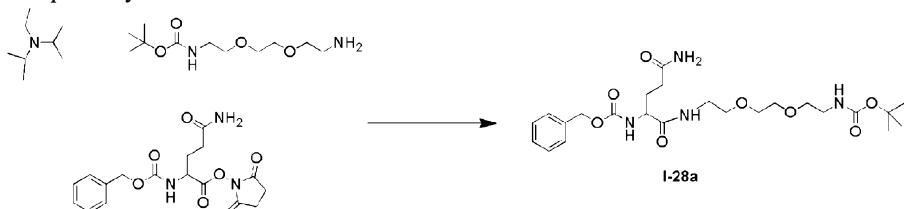
не волны 280 нм.

Пример 28А. Конъюгация hFGF23 варианта с жирной кислотой



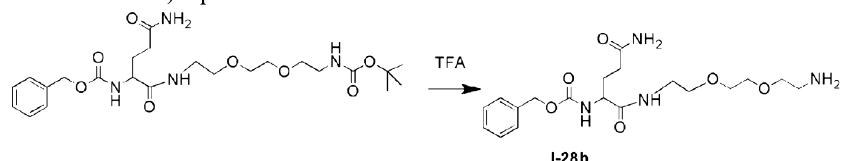
где -NH<sub>2</sub> в hFGF23вариант-NH<sub>2</sub>- означает аминофункциональную группу лизинового остатка.

Стадия 1. Промежуточное соединение 28а



2,5-Диоксопирролидин-1-ил 5-амино-2-(((бензилокси)карбонил)амино)-5-оксопентаноат (0,5 г, 1,325 ммоль) растворяли в DMF (объем: 9,96 мл) и добавляли трет-бутил (2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)этил)карбамат (0,503 мл, 2,120 ммоль). К смеси добавляли DIPEA (0,274 г, 2,120 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, сразу после этого ЖХ/МС анализ показал образование желаемого продукта и расходование ZQ-NHS исходного вещества (способ А, Rt=0,98 мин, M+H 511,4). Реакционную смесь выливали в DCM (100 мл) и промывали ледяной водой (3×50 мл). Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и концентрировали с получением 1,14 г желтого масла. ЖХ/МС анализ показал присутствие желаемого продукта (способ М, Rt=1,82 мин, M+H 511,4, 1,14 г). Это вещество использовали на следующей стадии без дополнительной очистки.

Стадия 2. Промежуточное соединение 28b, бензил (5-амино-1-((2-(2-аминоэтокси)этокси)этил)-амино)-1,5-диоксопентан-2-ил)карбамат:



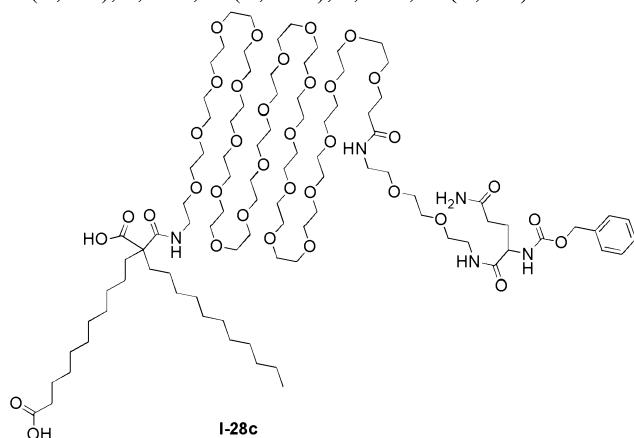
Трифторуксусную кислоту (10 мл, 2,233 ммоль) добавляли к промежуточному соединению 28а (1,14 г, 2,233 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре примерно в течение 1 ч. ЖХ/МС анализ показал полное преобразование исходного вещества в желаемый продукт (способ А, Rt=0,56 мин, M+H 411,3). Реакционную смесь поглощали в DCM (30 мл) и концентрировали для получения масла два раза. Масло разбавляли при помощи 1 мл ACN и 1 мл MeOH и очищали на связанный с масс-спектрометрией системе ВЭЖХ (Способ N). Фракции с желаемой массой объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением промежуточного соединения 28b в виде белого порошка (способ О, Rt=0,22 мин, M+H 411,3, 160 мг, 18%)

**Стадия 3. Промежуточное соединение 28с.**

Промежуточное соединение 28b (19,69 мг, 0,048 ммоль) растворяли в DMF (0,5 мл) и добавляли к раствору промежуточного соединения 37 (50 мг, 0,030 ммоль) в DMF (1,0 мл). Добавляли 3 капли DIPEA и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч, в этот момент ЖХ/МС анализ показал полную конверсию в продукт (способ В, Rt=1,22 мин, M+H+2/2 982,9). Реакционную смесь загружали в 20 г C18 колонку для обращенно-фазовой хроматографии. Используя градиент растворителя от 100% воды (0,1% TFA) до 100% MeCN в течение 20 мин, фракции собирали и анализировали при помощи ЖХ/МС. Фракции с желаемой массой объединяли, замораживали и лиофилизировали в течение ночи с получением промежуточного соединения 28с в виде прозрачного, бесцветного масла (способ С, Rt=1,21 мин, M+H+2/2 982,9, M+H+3/3 655,5, 15,3 мг, 26%).

Предварительно интерпретированный <sup>1</sup>Н-ЯМР показал присутствие амидной связи, образованной при 6,29 м.д. (1Н, шир.м.).

<sup>1</sup>Н ЯМР (400 МГц, Хлороформ-д): δ 7,52 (с, 1Н), 7,35 (д, J=3,3 Гц, 5Н), 5,10 (с, 2Н), 4,30 (с, 1Н), 3,77 (т, J=5, 8 Гц, 2Н), 3,69-3,49 (м, 94Н), 3,46 (с, 4Н), 2,59 (с, 3Н), 2,32 (т, J=7,2 Гц, 25Н), 2,08-1,94 (м, 4Н), 1,79-1,65 (м, 2Н), 1,65-1,52 (м, 2Н), 1,40-1,06 (м, 31Н), 0,94-0,82 (м, 3Н).



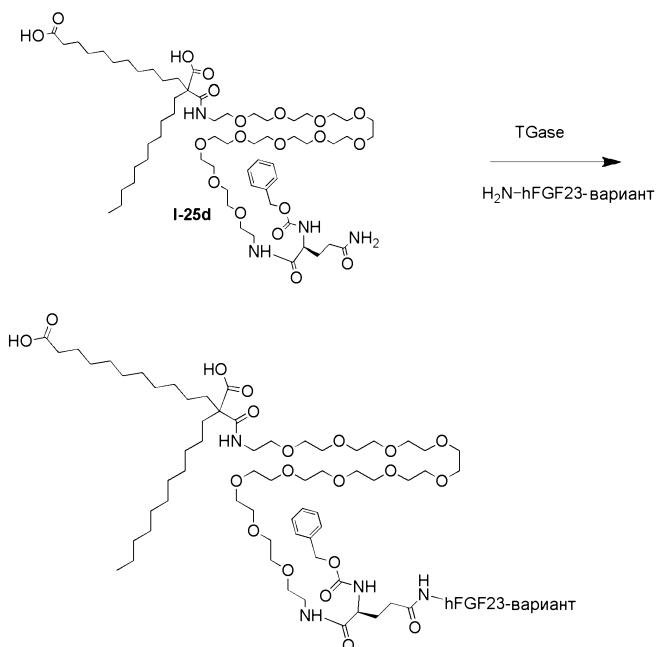
**Стадия 4. hFGF23-вариант + промежуточное соединение 28с.**

Для этой стадии использовали человеческий FGF23 (hFGF23) вариант ("hFGF23-вариант"), который не содержит сигнальный пептид, но содержит одну или несколько мутаций по сравнению с SEQ ID NO: 8, но сохраняет по меньшей мере одну FGF23 активность, и где "-NH<sub>2</sub>" в "FGF23-вариант-NH<sub>2</sub>" означает аминофункциональную группу лизинового остатка.

Получали раствор 50 мг/мл TGase в 30 мМ MES pH 6 и раствор 8 мг/мл промежуточного соединения 28с в 30 мМ MES pH 6 буфере. Раствор жирной кислоты становился мутным в MES pH 6. К hFGF23-варианту (0,3 мг/мл в 30 мМ MES pH 6, 7,5 мл, 0,088 мкмоль) добавляли промежуточное соединение 28с (217 мкл, 0,883 мкмоль), с последующим добавлением TGase (33,5 мкл, 0,044 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч и добавляли дополнительные 217 мкл промежуточного соединения 28с. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч и добавляли дополнительные 217 мкл промежуточного соединения 28с. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, сразу после этого ЖХ/МС анализ показал полную конверсию исходного вещества (способ Р, Rt=1,55 мин, M+H 27432). Реакционную смесь разделяли между двумя 4 мл 10 кДа MWCO Amicon центрифужными фильтрами и буфер обменивали 3× с 30 мМ MES pH 6 буфером, затем концентрировали до 1,5 мл. Вещество хранили в холодильнике в течение ночи. Некоторое количество твердого вещества осадилося на дне пробирки. Концентрацию супернатанта измеряли при помощи A280 (18730 см<sup>-1</sup>·M<sup>-1</sup>, 25485 г/моль), и она составила 0,43 мг/мл (27%).

Пример 28В. Конъюгация hFGF23-варианта с ZQG-ПЭГ11-жирной кислотой.

Для этого примера получали конъюгат, включающий жирную кислоту и FGF23 вариант, который не содержит сигнальный пептид и содержит одну или несколько мутаций по сравнению с SEQ ID NO: 8, но этот вариант сохраняет по меньшей мере одну FGF23 активность.



где -NH<sub>2</sub> в hFGF23-вариант-NH<sub>2</sub> означает аминофункциональную группу лизинового остатка.

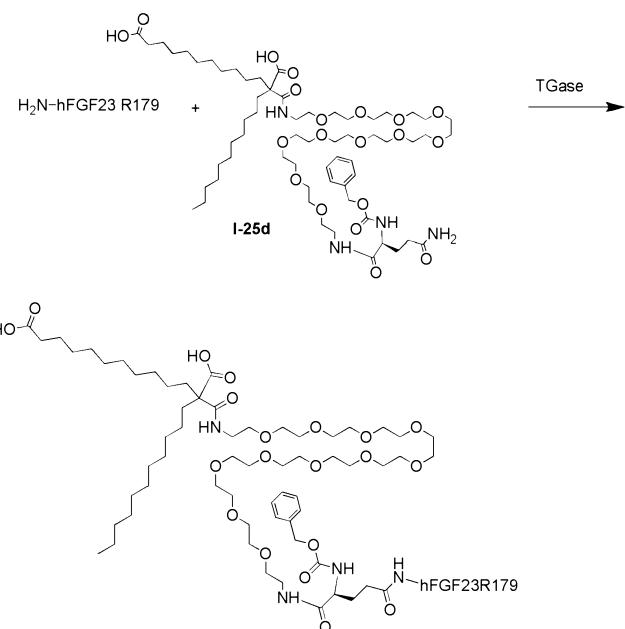
Получали 8 мг/мл раствор промежуточного соединения 25d в 100 мМ pH 8 трис-буфере. Получали 50 мг/мл раствор TGase в H<sub>2</sub>O. К раствору hFGF23-варианта (6,5 мл, 0,090 мкмоль) добавляли промежуточное соединение 25d (0,207 мл, 1,343 мкмоль), с последующим добавлением TGase (0,136 мл, 0,179 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение трех дней и наблюдали 90% преобразование в +1 вид (ЖХ/МС способ Q, Rt=7,24 мин, M+H 26616). Реакционную смесь подвергали буферному обмену в PBS 1X буфере с использованием 10 кДа MWCO Amicon центрифужных фильтров путем разбавления и концентрирования реакционной смеси 6 раз до объема 2 мл. Концентрацию измеряли при помощи A280 (18730 см<sup>-1</sup>·M<sup>-1</sup>, 26617 г/моль), и она составила 0,125 мг/мл (ЖХ/МС способ Q, Rt=7,24 мин, M+H 26616).

Пример 28С. Конъюгация h-FGF23 R179+ZQG-ПЭГ11-жирная кислота.

Для этого примера получали конъюгат с использованием FGF23 варианта "hFGF23 R179". Этот вариант не содержит сигнальный пептид и содержит мутацию в R179. Последовательность представлена как SEQ ID NO: 10.

Рассчитанная масса: 25463.

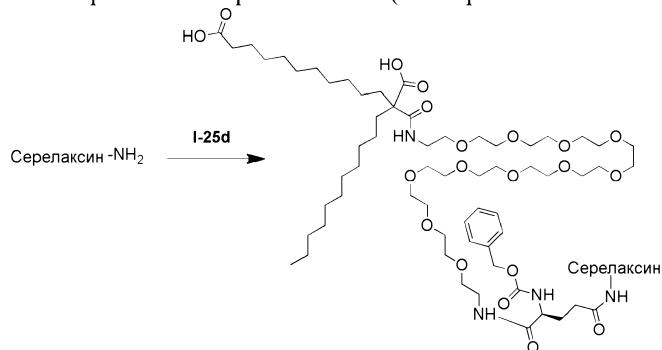
Получали 8 мг/мл раствор промежуточного соединения 25d в 100 мМ pH 8 трис-буфере. Получали 50 мг/мл раствор TGase в H<sub>2</sub>O. К раствору hFGF23 R179 (2,50E+04 мкл, 0,393 мкмоль) добавляли промежуточное соединение 25d (750 мкл, 4,87 мкмоль) с последующим добавлением TGase (597 мкл, 0,785 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение двух дней, сразу после этого ЖХ/МС анализ показал полную конверсию исходного вещества (способ P, Rt=1,58 мин, M+H 26674). Реакционную смесь очищали ионообменной хроматографией с получением +1 конъюгата (способ R, Rt=3,87 мин, M+H 26674).



где  $-\text{NH}_2$  в hFGF23 R179- $\text{NH}_2$  означает аминофункциональную группу лизинового остатка.

Примеры 29А и 29В относятся к коньюгатам серелаксина.

Пример 29А. Коньюгат серелаксин-жирная кислота (+1 жирная кислота коньюгат):



Серелаксин+ZQG-ПЭГ<sub>11</sub>-жирная кислота (пример 25d).

Последовательность серелаксина:

DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAITCGMSTWSCFRALSRKTCGVHCCKNALASYLE;

и  $-\text{NH}_2$  в "серелаксин- $\text{NH}_2$ " означает реакционноспособную аминофункциональную группу на боковой цепи лизина K17, как показано в эксперименте картирования, описанном ниже. Мол. масса 5963 г/моль.

Получали 8 мг/мл раствор ZQG-ПЭГ<sub>11</sub>-жирная кислота (пример 25d) в 100 мМ трис pH 8 буфере. Получали 50 мг/мл раствор mTGase в  $\text{H}_2\text{O}$ . К раствору серелаксина (211 мкл, 0,168 мкмоль) в 100 мМ трис pH 8 (1,018 мл, 0,5 мг/мл реакции) добавляли соединение примера 25d (516 мкл, 3,35 мкмоль) с последующим добавлением mTGase (Ajinomoto, 255 мкл, 0,335 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при 37°C в течение 3 дней и затем добавляли дополнительные 100 мкл ZQG-ПЭГ<sub>11</sub>-жирная кислота. Реакционную смесь перемешивали при 37°C в течение 18 ч и затем смесь подвергали буферному обмену в PBS IX буфере с использованием 10 кДа MWCO Amicon центрифужного фильтра путем разбавления и концентрирования реакционной смеси 5 раз до объема 0,7 мл. Это вещество очищали способом K и фракции с желаемым веществом объединяли, замораживали и лиофилизировали с получением белого порошка. Это вещество растворяли в 1 мл 30 мМ NaOAc буфере pH 5 и концентрацию измеряли при помощи A280 (5969  $\text{cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ , 7178 г/моль), и она составила 0,25 мг/мл (25%). ЖХ/МС способ L: Rt=1,65 мин; МС [M+1 +1FA]: наблюдали: 7180, рассчитано: 7178.

Экспериментальная процедура для картирования серелаксина.

Протеолиз образца.

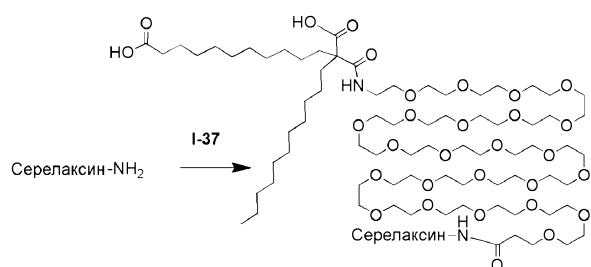
Приблизительно 10 мкг белка растворяли до конечного объема 25 мкл в 6 М мочевины, 10 мМ дитиотреитола, 5 мМ EDTA и 50 мМ Трис HCl (pH 8,0) и выдерживали при 37°C в течение 1 ч для восстановления дисульфидных связей. Йодацетамид (500 мМ, 1 мкл) добавляли к не содержащим алкилат тиолам и раствору давали выстояться при комнатной температуре в течение 1 ч в темноте. Раствор затем разбавляли 6X при помощи 50 мМ Три HCl (pH 8,0), добавляли LysC (1 мкг, Promega V107A) и раствор выдерживали при 37°C в течение ночи для расщепления белка. Добавляли муравьиную кислоту (98%, 2 мкл) для гашения протеолиза и полученную пептидную смесь анализировали при помощи ЖХ-МС/МС.

ЖХ-МС/МС анализ.

Пептидное картирование осуществляли с использованием Thermo Dionex Ultimate 3000 ВЭЖХ, связанной с Bruker Maxis Impact Q-TOF масс-спектрометром. МС контролировали с использованием Bruker Compass v. 1.7 и программы Bruker otofControl v. 3.4, со следующими установленными параметрами устройства: массовый диапазон 300-2000 Да; напряжение при электрораспылении 4,0 кВ; температура капилляра 200°C; скорость потока сушильного газа 5,0 л/мин. Фракционирование осуществляли на Waters ACQUITY UPLC BEH130 C18 колонке ( $2,1 \times 100$  мм, 1,7 мкм), поддерживаемой при 40°C. Подвижные фазы представляли собой 0,1% муравьиной кислоты в воде и ацетонитрил соответственно, и скорость потока составляла 100 мкл/мин. Используемый градиент 0-2 мин, 2% В; 2-3 мин, 2-8% В; 3-10 мин, 8-29% В; 10-14 мин, 29-33% В; 14-16 мин, 33-37% В; 16-20 мин, 37-73% В; 20-22 мин, 73-95% В; 22-25 мин, 95% В; 25-26 мин, 95-2% В; 26-30 мин, 2% В. Обработку данных осуществляли с использованием Bruker DataAnalysis v. 4.2.

Эксперимент картирования показал, что присоединение жирной кислоты к серелаксину происходит преимущественно по лизину K17, на основании пептида, определенного как [CCHVGCTK<sub>17</sub>(fa)RSLARFC-2H<sub>2</sub>O], масса: 3088,56 Да, заряд: 5, Rt=13,4 мин, наблюдаемое m/z 618,71, ожидаемое m/z 618,72.

Пример 29В. Конъюгат серелаксин-жирная кислота (смесь +1FA, +2FA и +3FA конъюгатов, как описано ниже):



где -NH<sub>2</sub> в "серелаксин-NH<sub>2</sub>" означает реакционноспособную аминофункциональную группу в боковой цепи лизина.

Серелаксин + промежуточное соединение 37. Пример 29В испытывали в виде смеси, показанной ниже.

Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	%
серелаксин	5963	5964	3
серелаксин +1 FA	7517	7516	19
серелаксин +2 FA	9071	9069	52
серелаксин +3 FA	10625	10622	25

Последовательность:

DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSCFRALSRKTGCVHCCKNALASYLpE.

Получали 10 мг/мл раствор жирнокислотного промежуточного соединения 37 в H<sub>2</sub>O. К раствору серелаксина (105 мкл, 0,084 мкмоль, 4,75 мг/мл) в 30 mM NaOAc буфера pH 4 (755 мкл) добавляли жирнокислотное промежуточное соединение 37 (140 мкл, 0,839 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч, сразу после этого ЖХ/МС анализ показал 90% конверсию исходного вещества. Добавляли дополнительные 70 мкл промежуточного соединения 37 и реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре, сразу после этого MALDI анализ показал >95% конверсию. Раствор подвергали буферному обмену в PBS 1× буфере с использованием 3 кДа MWCO Amicon центрифужного фильтра путем разбавления и концентрирования реакционной смеси 4 раза до объема 0,2 мл. Концентрацию измеряли при помощи A<sub>280</sub> (5969 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>; 9068 г/моль), и она составила 2,61 мг/мл. ЖХ/МС способ L: Rt=1,56 мин; МС [M+1 +1 FA]: наблюдали: 7516, рассчитано: 7517; Rt=1,65 мин; МС [M+1 +2 FA]: наблюдали: 9069, рассчитано: 9071; Rt=1,74 мин; МС [M+1 +3 FA]: наблюдали: 10622, рассчитано: 10625.

Пример 30. Конъюгация M-His-hPIP с конструкцией, включающей жирную кислоту (I-37) - (Смесь +1 FA конъюгата и +2 FA конъюгатов, как описано ниже).

M-His-hPIP (29-146) последовательность:

MHHHHHQDMTRKIIIKNFDIPKSVRPNDDEVAVLAVQTELKECMVVKTYLISSIPLQ

GAFNYKYTAACLCDDNPKTFYWDFYTNRTVQIAAVVDVIRELGICPDDAAVIPIKNNRFYTIEI

LKVE (SEQ ID NO:13)

экспрессировали.

Последовательность экспрессированного белка:

METDTLLLWVLLWVPGSTGMHHHHQDNTRKIIIKNFDIPEKSVRPNDEVTAVLAVQ

TE

LKECMVVKTYLISSIPLQGAFNYKYTAACLDDNPKTFYWDFYTNRTVQIAAVVDVIRE

LG

ICPDAAVIPIKNNRFYTIEILKVE

Нуклеотидная последовательность:

GCTAGCCACCATGGAGACTGATACTTGTGTTGGTACTGTTGCTTGGTGCCC

GG

TAGTACCGGTATGCATCACCACCACCATCACAGGACAACACCCGGAAGATCATCATC

AA

GAACCTCGACATCCCTAAGAGCGTGCGCCAACGATGAAGTCACCGCGGTGCTGGCA

GT

GCAGACTGAGCTGAAGGAGTGCATGGTGGTCAAGACGTACCTGATTCGTCATCCCG

CT

GCAAGGCGCCTTCAACTACAAAGTACACTGCCTGCCCTGTGACGACAACCCAAGACC

TT

TTACTGGGACTTCTACACCAATAGAACTGTCCAGATTGCTGCCGTGGATGTGATC

AG

GGAATTGGGAATTGCCCGACGATGCCCGTGATTCCGATCAAGAACAAACCGCTTC

TA

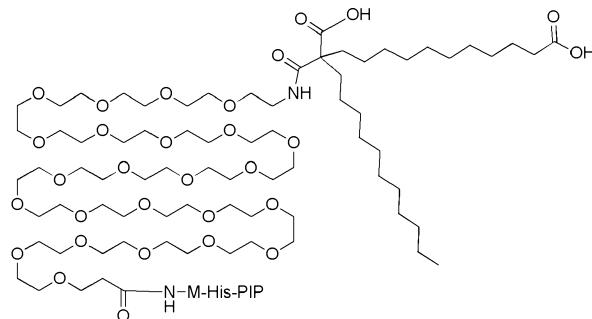
TACCATCGAGATCCTTAAAGTGAATGAGAATT

Вектор экспрессии PIP.

Вектор экспрессии млекопитающего, кодирующий человеческий PIP, получали стандартными методами клонирования. Фрагмент, содержащий сигнальную последовательность каппа-цепи Ig мыши, с последующей МННННН последовательностью, с последующим зрелым PIP с 5'-NheI (с последующей последовательностью Козак) и 3'-EcoRI сайтами кодон-оптимизировали и синтезировали (DNA2.0). Этую последовательность затем клонировали в уникальные 5'-NheI и 3'-EcoRI сайты основанного на пкДНК3.1 (Invitrogen) вектора ниже от CMV промотора.

Экспрессия и очистка PIP.

PIP-экспрессирующую плазмидную ДНК использовали для трансфекции HEK293T клеток при плотности  $1 \times 10^6$  клеток/мл с использованием стандартных способов на основе полиэтиленимида. 500 мл культуры затем выращивали в Freestyle 293 Среде (Life Technologies) в 3-л колбах в течение 4 дней при 37°C в увлажненной атмосфере 8% CO<sub>2</sub>. PIP белок очищали из осветленной кондиционированной среды.



где M-His-PIP имеет SEQ ID NO: 12, и "M-his" представляет собой МНННННН.

Конъюгация.

Получали 10 мг/мл раствор конструкции жирная кислота-линкер #1 в H<sub>2</sub>O. M-His-hPIP (0,700 мл, 0,048 мкмоль) разбавляли при помощи 30 mM NaOAc буфера pH 4 (619 мкл, 0,5 мг/мл реакции) и добавляли промежуточное соединение 37 (0,081 мл, 0,484 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 ч, сразу после этого ЖХ/МС анализ показал 70% преобразование в +1 (50%) и +2 (20%) продукты. Это вещество затем подвергали буферному обмену в PBS 1X буфере с использованием 3 кДа MWCO Amicon центрифужного фильтра путем разбавления и концентрирования реакционной смеси 5 раз до объема 350 мкл. Концентрацию измеряли при помощи A<sub>260</sub> (13850 см<sup>-1</sup>·M<sup>-1</sup>, 14472 г/моль), и она составила 1,7 мг/мл (70%). ЖХ/МС способ L, Rt=1,46 мин; МС [M+1]: наблюдали: 14472, рассчитано: 14476. Rt=1,57 мин; МС [M+1 +1FA дегликозилированный]: наблюдали: 16025, рассчитано: 16030. Rt=1,69 мин; МС [M+1 +2FA дегликозилированный]: наблюдали: 17578, рассчитано: 17584.

M-His-hPIP+конструкция жирная кислота-линкер I-37.  
Пример 30 испытывали в виде смеси, показанной ниже.

Степень мечения	Рассчитано	Наблюдали	%
M-His-PIP	14476	14472	4
M-His- PIP+гликозилирование		18139	30
M-His-PIP +1 FA	16030	16031	7
M-His-PIP +1 FA+ гликозилирование		19692	37
M-His-PIP +2 FA	17584	17578	15
M-His-PIP +2 FA+ гликозилирование		21242	7

Экспериментальная процедура для PIP картирования.

Протеолиз образца.

Приблизительно 10 мкг белка растворяли до конечного объема 25 мкл в 6 М мочевины, 10 мМ дитиотреитола, 5 мМ EDTA и 50 мМ Трис HCl (pH 8,0) и выдерживали при 37°C в течение 1 ч для восстановления дисульфидных связей. Йодацетамид (500 мМ, 1 мкл) добавляли к не содержащим алкилат тиолам и раствору давали выстояться при комнатной температуре в течение 1 ч в темноте. Раствор затем разбавляли 6X при помощи 50 мМ Трис HCl (pH 8,0), добавляли LysC (1 мкг, Promega) или Трипсин/Lys C смесь (1 мкг, Promega) и раствор выдерживали при 37°C в течение ночи для расщепления белка. Добавляли муравьиную кислоту (98%, 2 мкл) для гашения протеолиза и полученную пептидную смесь анализировали при помощи ЖХ-МС/МС.

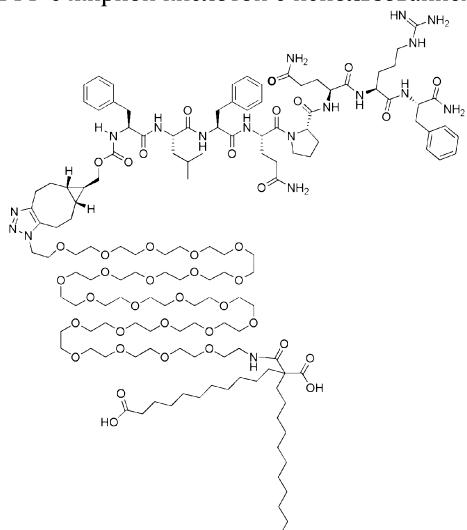
ЖХ-МС/МС анализ.

Пептидное картирование осуществляли с использованием Thermo Dionex Ultimate 3000 ВЭЖХ, связанной с Bruker Maxis Impact Q-TOF масс-спектрометром. МС контролировали с использованием Bruker Compass v. 1.7 и программы Bruker otofControl v. 3.4, со следующими установленными параметрами устройства: массовый диапазон 300-2000 Да; напряжение при электрораспылении 4,0 кВ; температура капилляра 200°C; скорость потока сушильного газа 5,0 л/мин. Фракционирование осуществляли на Waters ACQUITY UPLC BEH130 C18 колонке (2,1×100 мм, 1,7 мкм), поддерживаемой при 40°C. Подвижные фазы представляли собой 0,1% муравьиной кислоты в воде и ацетонитрил соответственно, и скорость потока составляла 100 мкл/мин. Используемый градиент 0-2 мин, 2% B; 2-3 мин, 2-8% B; 3-10 мин, 8-29% B; 10-14 мин, 29-33% B; 14-16 мин, 33-37% B; 16-20 мин, 37-73% B; 20-22 мин, 73-95% B; 22-25 мин, 95% B; 25-26 мин, 95-2% B; 26-30 мин, 2% B. Обработку данных осуществляли с использованием Bruker DataAnalysis v. 4.2.

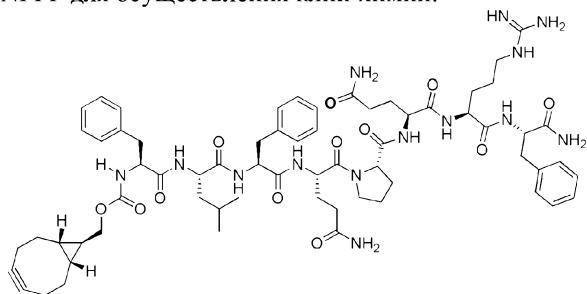
Эксперимент картирования показал, что присоединение жирной кислоты к M<sub>H</sub>-PIP происходит преимущественно на N-конце, что подтверждается [fa-MHHHHHQDNTRK], масса: 3265,76 Да, заряд: 4, Rt=2 3,4 мин, наблюдаемое m/z: 817,44, ожидаемое m/z: 817,45.

В небольшой степени присоединение жирной кислоты происходит по лизину K42, что подтверждается пептидным фрагментом [SVRPNDEVTAVLAVQTELK (fa) ECMVVVK], масса: 4366,45 Да, заряд: 3, Rt=23,5 мин, наблюдаемое m/z: 1456,49, ожидаемое m/z: 1456,49. Добавление жирной кислоты в положении K42 блокирует расщепление трипсина вблизи этого лизина, что служит подтверждением местоположения присоединения.

Пример 31. Конъюгация NPFF с жирной кислотой с использованием клик-химии:



Стадия 1. Получение NPFF для осуществления клик-химии:



Рассчит. МН+ 1258,8.

К раствору NPFF (*Alfa Aesar*, J66509, 5 мг, 3,82 мкмоль) в DMSO (1 мл) добавляли триэтиламин (5,32 мкл, 0,038 ммоль) и затем (1R,8S,9r)-бицикло[6.1.0] non-4-ин-9-илметил (2,5-диоксопирролидин-1-ил)карбонат (1,335 мг, 4,58 мкмоль).

Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. После завершения реакции смесь брали для использования на следующей стадии в неочищенном виде.

## Стадия 2. Конъюгация.

К неочищенной реакционной смеси со стадии 1 добавляли промежуточное соединение 6 (I-6). Реакционную смесь встряхивали при комнатной температуре. После завершения реакции реакционную смесь очищали с использованием обращенно-фазовой хроматографии (система: Agilent Bioinert SystemDate; колонка: Waters Protein BEH C4 Column, 300 Å, 5 мкм, 10×250 мм; колонка для UPLC представляла собой колонку BEH C4m, 300 Å, 1,7 мкм, 2,1×50 мм; подвижная фаза: 46–56% ACN градиент в течение 6 мин, С 0,1% TFA А: вода, В: ацетонитрил; скорость потока: 2,0 мл/мин; время хроматографирования: 15 мин; сбор фракций: УФ 210нм) с получением указанного в заголовке соединения, белого твердого вещества в виде TFA соли; ЖХ/МС: способ S: ELSD:  $R_t=1,46$  мин; MS m/z 928,3  $[(M/3)^{+}H]^{+}$ .

Можно видеть, что конъюгаты по настоящему изобретению имеют подобную или лучшую эффективность по сравнению с неконъюгированной биомолекулой, но, кроме того, конъюгаты по настоящему изобретению имеют улучшенную стабильность в плазме по сравнению с неконъюгированной биомолекулой. Было обнаружено, что конъюгаты в примерах, описанных выше, имеют стабильность в плазме больше чем 5 ч, больше чем 10 ч, больше чем 20 ч, больше чем 30 ч, больше чем 40 ч и в некоторых случаях больше чем 50 ч.

Хотя выше описаны иллюстративные варианты осуществления изобретения, среднему специалисту в данной области должно быть понятно, что содержащиеся в настоящем документе раскрытия приведены только в качестве примера и что различные другие альтернативы, адаптации и модификации могут быть осуществлены в пределах объема настоящего изобретения. Следовательно, настоящее изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, проиллюстрированными в настоящем документе.

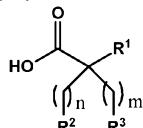
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, включающий биомолекулу, связанную с жирной кислотой через линкер, где биомолекула представляет собой человеческий белок фактора дифференциации роста 15 (hGDF15), или его фрагмент, или его вариант, выбранный из hGDF15\* и his-hGDF15\*, или димер любого из указанных белков,

где hGDF15\* представляет собой hGDF15, где две или три аминокислоты на N-конце заменены аминокислотной последовательностью XH- или XHX'- соответственно, где H представляет собой гистидин и X и X' независимо выбраны из M и A; и

his-hGDF15 представляет собой hGDF15, где метка, включающая от 1 до 6 гистидиновых аминокислотных остатков и необязательно 1 или 2 метиониновых аминокислотных остатка, была присоединена к N-концу hGDF15,

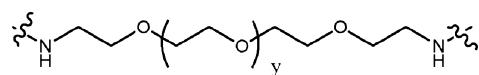
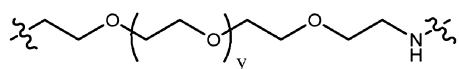
жирная кислота имеет следующую формулу A1:



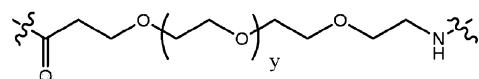
A1

где R<sup>1</sup> представляет собой CO<sub>2</sub>H;

$R^2$  и  $R^3$  независимо друг от друга представляют собой H, OH, CO<sub>2</sub>H, -CH=CH<sub>2</sub> или -C≡CH;  $m$  независимо друг от друга представляют собой целое число, имеющее значение от 6 до 30; линкер включает неразветвленную олигоэтиленгликольную группу формулы



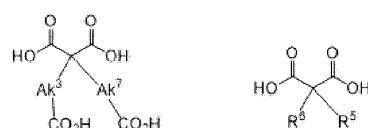
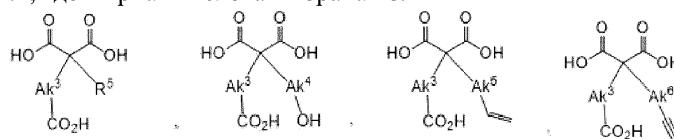
или



где у принимает значение от 0 до 34,

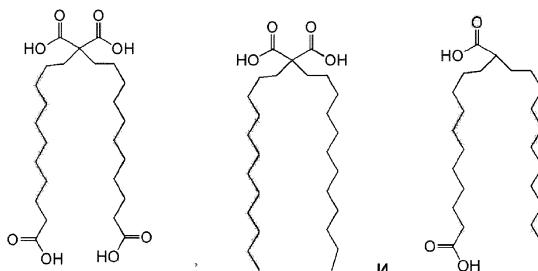
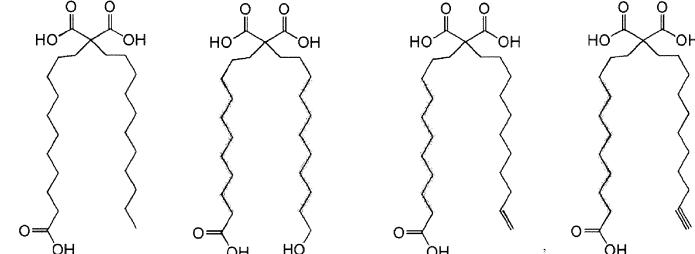
или его амид, сложный эфир или фармацевтически приемлемая соль.

2. Конъюгат по п.1, где жирная кислота выбрана из:

где Ak<sup>3</sup>, Ak<sup>4</sup>, Ak<sup>5</sup>, Ak<sup>6</sup> и Ak<sup>7</sup> независимо представляют собой линейный (C<sub>8-20</sub>)алкилен;R<sup>5</sup> и R<sup>6</sup> независимо представляют собой линейный (C<sub>8-20</sub>)алкил,

или его амид, сложный эфир или фармацевтически приемлемая соль.

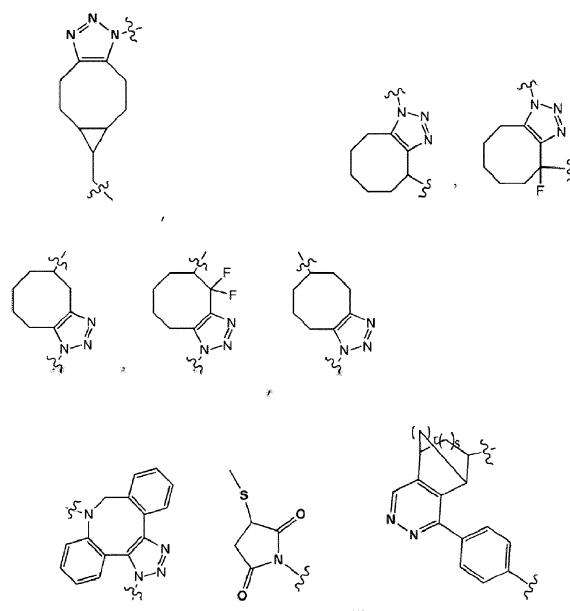
3. Конъюгат по п.1, где жирная кислота выбрана из:



и

или его амид, сложный эфир или фармацевтически приемлемая соль.

4. Конъюгат по любому из пп.1-3, где линкер дополнительно включает гетероциклическую группу одной из следующих формул:

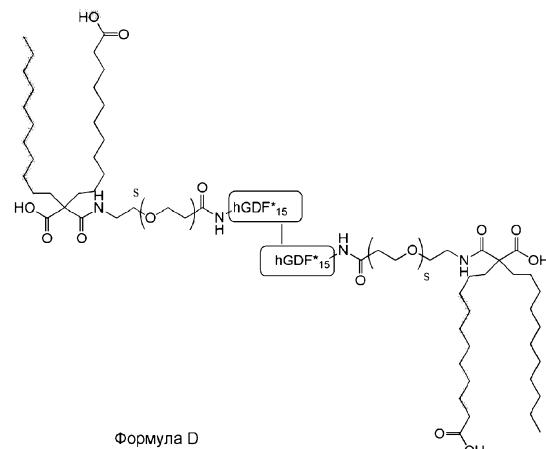
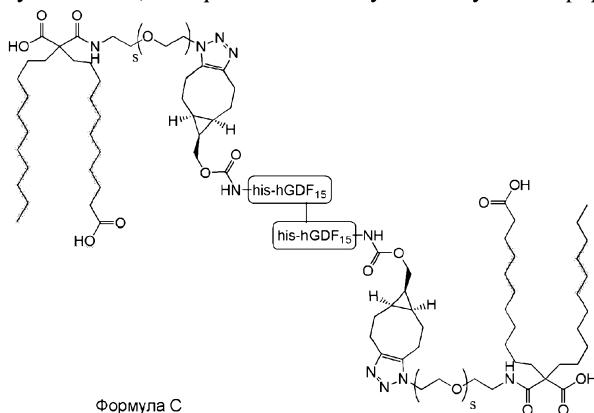


где  $r$  представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 2; и  $s$  представляет собой целое число, имеющее значение от 0 до 3, или его амид, сложный эфир или фармацевтически приемлемая соль.

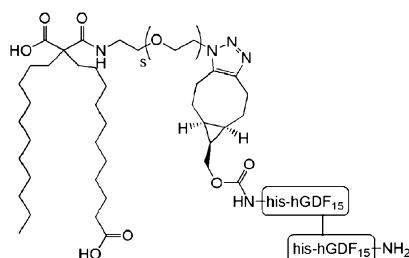
5. Конъюгат по любому из пп.1-4, где линкер дополнительно включает одну или несколько аминокислот, независимо выбранных из гистидина, метионина, аланина, глутамина, аспарагина и глицина, или его амид, сложный эфир или фармацевтически приемлемая соль.

6. Конъюгат по любому из пп.1-4, где группа жирной кислоты присоединена к N-концу указанного белка посредством линкера, или его амид, сложный эфир или фармацевтически приемлемая соль.

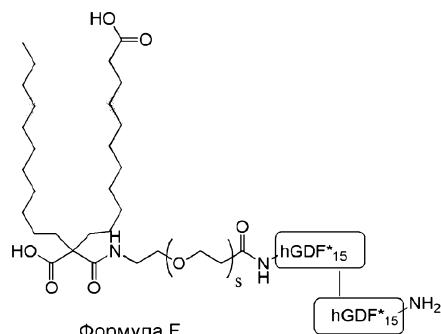
7. Конъюгат по любому из пп.1-6, который имеет одну из следующих формул:



где в формулах С и D оба мономерных звена his-hGDF15 или hGDF15\* связаны с жирнокислотным компонентом через линкер на обоих N-концах; или



Формула Е



Формула F

где в формулах Е и F только одно из мономерных звеньев his-hGDF15 или hGDF15\* связано с жирнокислотным компонентом через линкер на N-конце; и

hGDF15\* представляет собой hGDF15, где две или три аминокислоты на N-конце заменены аминокислотной последовательностью XН- или XНХ'- соответственно, где Н представляет собой гистидин и X и X' независимо выбраны из М и А; и

his-hGDF15 представляет собой hGDF15, где метка, включающая от 1 до 6 гистидиновых аминокислотных остатков и необязательно 1 или 2 метиониновых аминокислотных остатка, была присоединена к N-концу hGDF15; и

s представляет собой целое число, имеющее значение 20-30; и

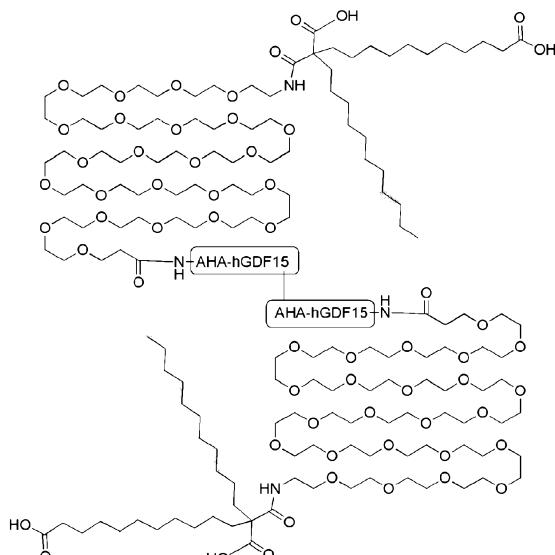
линия между двумя мономерными звеньями his-hGDF15 или двумя мономерными звеньями hGDF15\* представляет собой дисульфидную связь,

или его амид, сложный эфир или фармацевтически приемлемая соль.

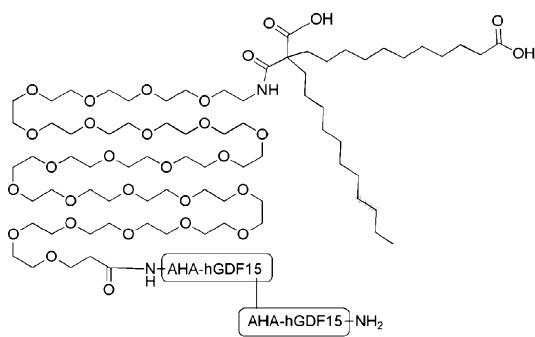
8. Смесь, включающая коньюгат по п.7, имеющий формулу С, и коньюгат по п.7, имеющий формулу Е, или смесь, включающая коньюгат по п.7, имеющий формулу Д, и коньюгат по п.7, имеющий формулу F.

9. Коньюгат по любому из пп.1-7, где биомолекула представляет собой MH(199-308)hGDF15, MHA(200-308)hGDF15, AHA(200-308)hGDF15 или AH(199-308)GDF15, МННННННМ-hGDF15 и МНННННН-hGDF15, или его димер.

10. Коньюгат, включающий биомолекулу, связанную с жирной кислотой через линкер, имеющий формулу G или формулу H:



Формула G



где АНА-хGDF15 представляет собой SEQ ID NO: 7;

жирная кислота связана через линкер на N-конце одного или двух мономерных звеньев АНА-хGDF15;

линия между двумя АНА-хGDF15 звеньями представляет собой дисульфидную связь, или его амид, сложный эфир или фармацевтически приемлемая соль.

11. Смесь, включающая конъюгат по п.10, имеющий формулу G, и конъюгат по п.10, имеющий формулу Н.

12. Смесь по п.11, представляющая собой смесь 1:1 в молярном отношении конъюгата формулы G и конъюгата формулы Н.

13. Конъюгат по любому из пп.1-7, 9 или 10, где конъюгат имеет стабильность в плазме с временем полужизни больше чем 10 ч, больше чем 20 ч или больше чем 30 ч.

14. Конъюгат по любому из пп.1-7, 9 или 10, где улучшение стабильности в плазме по сравнению с неконъюгированной биомолекулой является 2-кратным, 5-кратным, 10-кратным, 20-кратным, 30-кратным, 40-кратным, 50-кратным или 75-кратным.

15. Способ лечения или профилактики заболевания или расстройства, выбранного из метаболических расстройств или заболеваний, сахарного диабета 2 типа, ожирения, панкреатита, дислипидемии, алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени/стеатогепатита и других прогрессирующих заболеваний печени, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, метаболического синдрома, гипертензии, сердечно-сосудистого заболевания, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, диабетических осложнений, хронического почечного заболевания, невропатии или гастропареза, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата по любому из пп.1-7, 9, 10, 13 или 14, или смеси конъюгатов по пп.8, 11 или 12, или его амида, сложного эфира или фармацевтически приемлемой соли.

16. Конъюгат по любому из пп.1-7, 9, 10, 13 или 14, или смесь конъюгатов по пп.8, 11 или 12, или его амид, сложный эфир или фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении или профилактике метаболических расстройств или заболеваний, диабета, сахарного диабета 2 типа, ожирения, панкреатита, дислипидемии, алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени/стеатогепатита и других прогрессирующих заболеваний печени, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, метаболического синдрома, гипертензии, сердечно-сосудистого заболевания, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, диабетических осложнений, хронического почечного заболевания, невропатии или гастропареза.

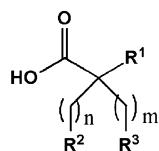
17. Комбинация, включающая терапевтически эффективное количество конъюгата по любому из пп.1-7, 9, 10 13 или 14, или смеси конъюгатов по пп.8, 11 или 12, или его амида, сложного эфира или фармацевтически приемлемой соли; и одно или несколько терапевтически активных сопутствующих средств, выбранных из антидиабетического средства, гиполипидемического средства, средств против ожирения, антигипертензивных средств и агонистов рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом, где комбинация предназначена для лечения или предотвращения метаболических расстройств или заболеваний, сахарного диабета, сахарного диабета 2 типа, ожирения, панкреатита, дислипидемии, алкогольного/неалкогольного жирового расстройства печени/стеатогепатита и других прогрессирующих заболеваний печени, инсулинорезистентности, гиперинсулинемии, непереносимости глюкозы, гипергликемии, метаболического синдрома, гипертензии, сердечно-сосудистого заболевания, атеросклероза, заболевания периферических артерий, инсульта, сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, диабетических осложнений, хронического почечного заболевания, невропатии или гастропареза.

18. Комбинация по п.17, где сопутствующее средство выбрано из инсулина, инсулиновых производных и миметиков; средств, повышающих секрецию инсулина; глибурида, амарила; лигандов инсулинотропного сульфонилмочевинного рецептора; тиазолидинионов, пиоглитазона, балаглитазона, ривоглитазона, нетоглитазона, троглитазона, енглитазона, циглитазона, адаглитазона, дарглитазона, ингибиторов белка переноса холестерилового эфира (СЕТР), ингибиторов GSK3 (киназы-3 гликогенсинтазы); ли-

гандов RXR; ингибиторов натрий-зависимого котранспортера глюкозы; ингибиторов гликогенфосфорилазы A; бигуанидов; ингибиторов альфа-глюказидазы, GLP-1 (глюкагон-подобный пептид-1), GLP-1 аналогов, GLP-1 миметиков; ингибиторов DPP4 (дипептидилпептидазы IV), ингибиторов 3-гидрокси-3-метилглутарил кофермент-А (HMG-CoA) редуктазы; ингибиторов скваленсинтазы; FXR (фарнезоидный X рецептор), LXR (печеночный X рецептор) лигандов; холестирамина; фибраторов; никотиновой кислоты, аспирина; орлистата или римонабанта; петлевых диуретиков, фurosемида, торсемида; ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (ACE); ингибиторов Na-K-АТФазного мембранных насоса; ингибиторов нейтральной эндопептидазы (NEP); ингибиторов ACE/NEP; antagonистов ангиотензина II; ингибиторов ренина; блокаторов  $\beta$ -адренергического рецептора; инотропных средств, добутамина, милринона; блокаторов кальциевых каналов; antagonистов рецепторов альдостерона; ингибиторов альдостерон-синтазы; фенофибрата, пиоглитазона, розиглитазара, BMS-298585 и L-796449.

19. Фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество коньюгата по любому из пп.1-7, 9, 10, 13 или 14, или смесь коньюгатов по пп.8, 11 или 12, или его амида, сложного эфира или фармацевтически приемлемой соли и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

20. Соединение формулы



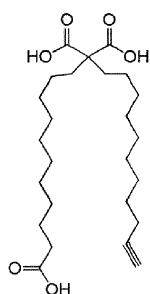
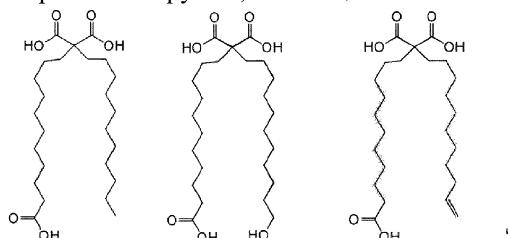
A1

где  $R^1$  представляет собой  $CO_2H$ ;

$R^2$  и  $R^3$  независимо друг от друга представляют собой H, OH,  $CO_2H$ ,  $-CH=CH_2$  или  $-C\equiv CH$  при условии, что  $R^2$  и  $R^3$  не являются одинаковыми;

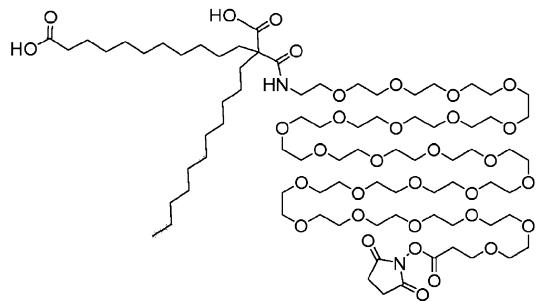
$m$  и  $n$  независимо друг от друга представляют собой целое число, имеющее значение от 6 до 30, или его амид, сложный эфир или фармацевтически приемлемая соль.

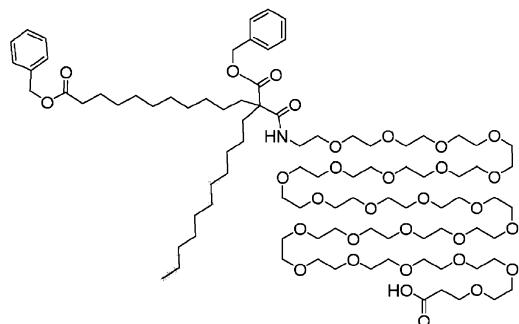
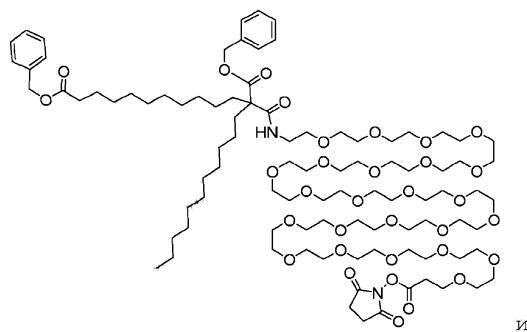
21. Соединение по п.20, выбранное из группы, состоящей из:



или его амид, сложный эфир или фармацевтически приемлемая соль.

22. Соединение, выбранное из:





23. Соединение по п.20, выбранное из:

