

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033721**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.11.20

(21) Номер заявки
201791216

(22) Дата подачи заявки
2015.12.17

(51) Int. Cl. **C07K 7/08** (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)

(54) ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ

(31) **62/094,281**

(32) **2014.12.19**

(33) **US**

(43) **2017.10.31**

(86) **PCT/US2015/066272**

(87) **WO 2016/100608 2016.06.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:
**Сунь Ли-Цян, Чжао Цян, Гиллис
Эрик П., Миллер Майкл Мэттью,
Аллен Мартин Патрик, Мулл Эрик,
Скола Пол Майкл (US)**

(74) Представитель:
Угрюмов В.М. (RU)

(56) WO-A1-2014151634

SANDRA C. MWAKWARI ET AL.:
"Macrocyclic Histone Deacetylase Inhibitors",
CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY,
vol. 10, no. 14, 1 October 2010 (2010-10-01), pages
1423-1440, XP055249229, HILVERSUM; NL ISSN:
1568-0266, DOI: 10.2174/ 156802610792232079
abstract

S. ADAMS ET AL.: "Topical TLR7
Agonist Imiquimod Can Induce Immune-Mediated
Rejection of Skin Metastases in Patients with
Breast Cancer", CLINICAL CANCER RESEARCH,
vol. 18, no. 24, 5 July 2012 (2012-07-05),
pages 6748-6757, XP055185098, ISSN: 1078-0432,
DOI:10.1158/1078-0432. CCR-12-1149 abstract

(57) Изобретение относится к новым макроциклическим пептидам, которые ингибируют белок/белковое взаимодействие PD-1/PD-L1 и PD-L1/CD80, и следовательно применимы для облегчения различных заболеваний, включающих в себя злокачественные опухоли и инфекционные заболевания.

B1

033721

033721 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США с серийным номером 62/094281, поданной 19 декабря 2014, полностью включенной в настоящий документ посредством отсылки.

Настоящее изобретение относится к новым макроциклическим пептидам, которые ингибируют белок/белковое взаимодействие PD-1/PD-L1 и CD80/PD-L1 и, следовательно, применимы для облегчения различных заболеваний, включающих в себя злокачественную опухоль и инфекционные заболевания.

Белок программируемой смерти 1 (PD-1) представляет собой ингибиторного представителя семейства CD28 рецепторов, который также включает в себя CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Agata с соавт., выше., Okazaki et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 14:779-782 (2002); Bennett et al., *J. Immunol.*, 170:711-718 (2003)).

Белок PD-1 представляет собой трансмембранный белок типа I размером 55 кДа, который представляет собой часть гена суперсемейства Ig (Agata et al., *Int. Immunol.*, 8:765-772 (1996)). PD-1 содержит мембранный проксимальный иммунорецепторный ингибирующий тирозиновый мотив (ITIM) и мембранный дистальный основанный на тирозине переключающий мотив (ITSM) (Thomas, M.L., *J. Exp. Med.*, 181:1953-1956 (1995); Vivier, E. et al., *Immunol. Today*, 18:286-291 (1997)). Хотя структурно похожий на CTLA-4, PD-1 не содержит мотив MYPPY, который характеризуется решающим значением для связывания CD80 и CD86 (B7-2). Были идентифицированы два лиганда для PD-1, PD-L1 (B7-H1) и PD-L2 (B7-DC). Было показано, что активация Т-клеток, экспрессирующих PD-1, подавляется при взаимодействии с клетками, экспрессирующими PD-L1 или PD-L2 (Freeman et al., *J. Exp. Med.*, 192:1027-1034 (2000); Latchman et al., *Nat. Immunol.*, 2:261-268 (2001); Carter et al., *Eur. J. Immunol.*, 32:634-643 (2002)). Как PD-L1, так и PD-L2 представляют собой представителей семейства белков B7, которые связываются с PD-1, но не связываются с другими представителями семейства CD28. Лиганд PD-L1 представлен в избытке при различных злокачественных опухолях человека (Dong et al., *Nat. Med.*, 8:787-789 (2002)). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 приводит к уменьшению проникающих в опухоли лимфоцитов, снижению опосредованной Т-клеточным рецептором пролиферации и ускользания иммунологического надзора злокачественными клетками (Dong et al., *J. Mol. Med.*, 81:281-287 (2003); Blank et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 54:307-314 (2005); Konishi et al., *Clin. Cancer Res.*, 10:5094-5100 (2004)). Иммунная супрессия может быть отменена путем ингибирования локального взаимодействия PD-1 с PD-L1, и эффект представляет собой добавочный, когда взаимодействие PD-1 с PD-L2 также заблокировано (Iwai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:12293-12297 (2002); Brown et al., *J. Immunol.*, 170:1257-1266 (2003)).

Также было показано, что PD-L1 взаимодействует с CD80 (Butte MJ et al., *Immunity*;27:111-122 (2007)). Взаимодействие PD-L1/CD80 на экспрессирующих иммунных клетках, как было показано, представляет собой ингибиторное. Блокада этого взаимодействия, как было показано, отменяет это ингибирующее взаимодействие (Paterson AM, et al., *J Immunol.*, 187:1097-1105 (2011); Yang J, et al., *J Immunol Aug 1*;187(3):1113-9(2011)).

Когда экспрессирующие PD-1 Т-клетки контактируют с клетками, экспрессирующими их лиганды, функциональные активности в ответ на антигенные стимулы, включающие в себя пролиферацию, секрецию цитокинов и цитотоксичность, снижаются. Взаимодействия PD-1/PD-L1 или PD-L2 подавляют иммунный ответ при разрешении инфекции или опухоли или во время развития аутопереносимости (Keir, M.E. et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 26:Еpub (2008)). Хроническая антигенная стимуляция, подобная той, которая происходит во время опухолевого заболевания или хронических инфекций, приводит к образованию Т-клеток, которые экспрессируют повышенные уровни PD-1 и представляют собой дисфункциональные по отношению к активности против хронического антигена (обзор Kim et al., *Curr. Opin. Imm.* (2010)). Это называется "Т-клеточное истощение". В-клетки также отображают PD-1/PD-лигандную супрессию и "истощение".

Было показано, что блокада лигирования PD-1/PD-L1 с использованием антител к PD-L1 восстанавливает и увеличивает активацию Т-клеток во многих системах. Пациенты с прогрессирующей злокачественной опухолью получают положительный результат от терапии с моноклональным антителом к PD-L1 (Brahmer et al., *New Engl. J. Med.* (2012)). Доклинические животные модели опухолей и хронических инфекций показали, что блокада пути PD-1/PD-L1 моноклональными антителами может усиливать иммунный ответ и приводить в результате к отторжению опухоли или контролю инфекции. Противоопухолевая иммунотерапия с помощью блокады PD-1/PD-L1 может увеличивать терапевтический иммунный ответ на ряд гистологически различных опухолей (Dong, H. et al., "B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity", *J. Mol. Med.*, 81(5):281-287 (2003); Dong, H. et al., "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion", *Nat. Med.*, 8(8):793-800 (2002)).

Вмешательство во взаимодействие PD-1/PD-L1 вызывает повышенную активность Т-клеток в системах с хронической инфекцией. Блокада PD-L1 вызывала повышенный клиренс вируса и восстановление иммунитета у мышей с хронической вирусной инфекцией лимфоцитарным хориоменингитом (Barber, D.L. et al., "Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection", *Nature*, 439(7077):682-687 (2006)). Гуманизированные мыши, инфицированные ВИЧ-1, демонстрируют усиленную защиту против виремии и вирусного истощения CD4⁺ Т-клеток (Palmer et al., *J. Immunol.* (2013)).

Блокада PD-1/PD-L1 через моноклональные антитела к PD-L1 может восстанавливать антигенспецифическую функциональность *in vitro* Т-клеток у пациентов с ВИЧ (Day, Nature (2006); Petrovas, J. Exp. Med. (2006); Trautman, Nature Med. (2006); D'Souza, J. Immunol. (2007); Zhang, Blood (2007); Kaufmann, Nature Imm. (2007); Kasu, J. Immunol. (2010); Porichis, Blood (2011)), пациентов с HCV (Golden-Mason, J. Virol. (2007); Jeung, J. Leuk. Biol. (2007); Urbani, J. Hepatol. (2008); Nakamoto, PLoS Path. (2009); Nakamoto, Gastroenterology (2008)) и пациентов с HBV (Boni, J. Virol. (2007); Fiscaro, Gastro. (2010); Fiscaro et al., Gastroenterology (2012); Boni et al., Gastro. (2012); Penna et al., J. Hep. (2012); Raziorrough, Hepatology (2009); Liang, World J. Gastro. (2010); Zhang, Gastro. (2008)).

Также было показано, что блокада взаимодействия PD-L1/CD80 стимулирует иммунитет (Yang J., et al., J Immunol. Aug 1; 187(3): 1113-9 (2011)). Было показано, что иммунная стимуляция, представляющая собой результат блокады взаимодействия PD-L1/CD80, повышается с помощью комбинации с блокадой дальнейших взаимодействий PD-1/PD-L1 или PD-1/PD-L2.

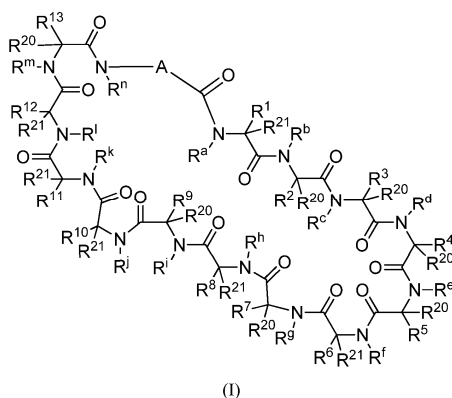
Предположили, что изменения в фенотипах иммунных клеток представляют собой важный фактор в септическом шоке (Hotchkiss et al., Nat. Rev. Immunol. (2013)). Они включают в себя повышенное содержание PD-1 и PD-L1 (Guignant, et al., Crit. Care (2011)). Клетки от пациентов с септическим шоком с повышенным содержанием PD-1 и PD-L1 демонстрируют повышенный уровень апоптоза Т-клеток. Направленные на PD-L1 антитела могут снижать уровень апоптоза иммунных клеток (Zhang et al., Crit. Care (2011)). Кроме того, мыши, у которых отсутствует экспрессия PD-1, более устойчивы к симптомам септического шока, чем мыши дикого типа. Yang J., et al., J Immunol. Aug 1; 187(3): 1113-9 (2011)). Исследования показали, что блокада взаимодействий PD-L1 с использованием антител может супрессировать неподходящие иммунные ответы и уменьшать признаки заболевания.

В дополнение к усилению иммунологических ответов на хронические антигены, также было показано, что блокада пути PD-1/PD-L1 усиливает ответы на вакцинацию, включающую в себя терапевтическую вакцинацию в контексте хронической инфекции (Ha, SJ. et al., "Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection", J. Exp. Med., 205(3):543-555 (2008); Finnefrock, A.C. et al., "PD-1 blockade in rhesus macaques: impact on chronic infection and prophylactic vaccination", J. Immunol., 182(2):980-987 (2009); Song, M.-Y. et al., "Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8⁺ t-cell responses by soluble PD-1", J. Immunother., 34(3):297-306(2011)).

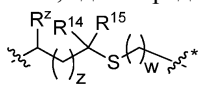
Описанные в настоящем документе молекулы демонстрируют способность блокировать взаимодействие PD-L1 с PD-1 как в биохимических, так и в основанных на клетках экспериментальных системах. Эти результаты согласуются с потенциалом для терапевтического введения для повышения иммунитета при злокачественной опухоли или хронической инфекции, включая в себя терапевтическую вакцину.

Описанные в настоящем документе макроциклические пептиды способны ингибировать взаимодействие PD-L1 с PD-1 и с CD80. Эти соединения показали высокую эффективность связывания с PD-L1, блокаду взаимодействия PD-L1 либо с PD-1, либо с CD80 и они способны обеспечивать повышение функциональной активности Т-клеток, таким образом, являясь кандидатами для парентеральных, пероральных, легочных, назальных, буккальных составов и составов с замедленным высвобождением.

Согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к соединению формулы (I)



или его фармацевтически приемлемой соли, где А представляет собой



где обозначает точку присоединения к карбонильной группе и обозначает точку присоединения к атому азота;

z равно 0;

w равно 1;

R¹⁴ и R¹⁵ представляют собой водород; и

R^z представляет собой -C(O)NHR¹⁶, где R¹⁶ представляет собой -CHR¹⁷C(O)NH₂; где R¹⁷ выбран из

водорода и $-\text{CH}_2\text{OH}$;

$\text{R}^a, \text{R}^c, \text{R}^e, \text{R}^f, \text{R}^h, \text{R}^i, \text{R}^j, \text{R}^m$ и R^n представляют собой водород;

R^b представляет собой водород или метил;

R^d представляет собой водород или метил, или R^d и R^4 могут образовывать кольцо, как указано ниже;

R^g представляет собой водород или метил, или R^g и R^7 могут образовывать кольцо, как указано ниже;

каждый R^{20} независимо выбран из водорода и $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила;

каждый R^{21} независимо выбран из водорода и $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила;

R^3 представляет собой $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ или, совместно с присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , может образовывать трех-шестичленное карбоциклическое кольцо или шестичленное кольцо, содержащее атом кислорода или атом азота, с соответствующей присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , причем кольцо необязательно замещено одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из $\text{C}_1\text{-C}_3$ алкокси, $\text{C}_1\text{-C}_3$ алкила, $\text{C}_2\text{-C}_4$ алкенила, галогена, гидроксиды и amino, и где пяти- или шестичленное кольцо необязательно конденсировано с фенильным кольцом;

R^4 и R^d , вместе с атомами, к которым они присоединены, могут образовывать кольцо, выбранное из азетидина, пирролидина, морфолина, пиперидина, пиперазина и тетрагидроиазола; причем каждое кольцо необязательно замещено одной-четырьмя группами, независимо выбранными из amino, циано, метила, галогена, гидроксиды и фенила, или, R^4 , совместно с присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , может образовывать трех-шестичленное карбоциклическое кольцо или шестичленное кольцо, содержащее атом кислорода или атом азота, с соответствующей присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , причем кольцо необязательно замещено одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из $\text{C}_1\text{-C}_3$ алкокси, $\text{C}_1\text{-C}_3$ алкила, $\text{C}_2\text{-C}_4$ алкенила, галогена, гидроксиды и amino, и где пяти- или шестичленное кольцо необязательно конденсировано с фенильным кольцом;

R^5 представляет собой метил, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)$ имидазолил, или, вместе с присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , может образовывать трех-шестичленное карбоциклическое кольцо или шестичленное кольцо, содержащее атом кислорода или атом азота, с соответствующей присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , причем кольцо необязательно замещено одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из $\text{C}_1\text{-C}_3$ алкокси, $\text{C}_1\text{-C}_3$ алкила, $\text{C}_2\text{-C}_4$ алкенила, галогена, гидроксиды и amino, и где пяти- или шестичленное кольцо необязательно конденсировано с фенильным кольцом;

R^6 представляет собой метил, изобутил или $-(\text{CH}_2)$ изобутил;

R^7 представляет собой водород, метил, или R^7 и R^g вместе с атомами, к которым они присоединены, могут образовывать кольцо, выбранное из азетидина, пирролидина, морфолина, пиперидина, пиперазина и тетрагидроиазола; причем каждое кольцо необязательно замещено одной-четырьмя группами, независимо выбранными из amino, бензила, необязательно замещенного группой галогена, бензилокси, циано, циклогексила, метила, галогена, гидроксиды, изохинолинокси, необязательно замещенного метоксигруппой, хинолинокси, необязательно замещенного галогеновой группой, тетразолила; и причем пирролидиновое и пиперидиновое кольцо необязательно конденсированы с циклогексильной, фенильной или индольной группой; или R^7 , вместе с присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , может образовывать трех-шестичленное карбоциклическое кольцо или шестичленное кольцо, содержащее атом кислорода или атом азота, с соответствующей присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , причем кольцо необязательно замещено одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из $\text{C}_1\text{-C}_3$ алкокси, $\text{C}_1\text{-C}_3$ алкила, $\text{C}_2\text{-C}_4$ алкенила, галогена, гидроксиды и amino, и где пяти- или шестичленное кольцо необязательно конденсировано с фенильным кольцом;

R^8 представляет собой $-(\text{CH}_2)$ индолил;

R^9 представляет собой метил, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$, или, вместе с присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , может образовывать трех-шестичленное карбоциклическое кольцо или шестичленное кольцо, содержащее атом кислорода или атом азота, с соответствующей присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , причем кольцо необязательно замещено одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из $\text{C}_1\text{-C}_3$ алкокси, $\text{C}_1\text{-C}_3$ алкила, $\text{C}_2\text{-C}_4$ алкенила, галогена, гидроксиды и amino, и где пяти- или шестичленное кольцо необязательно конденсировано с фенильным кольцом;

R^{10} выбран из $-(\text{CH}_2)$ индолила и $-(\text{CH}_2)$ бензотиенила, каждый из которых необязательно замещен $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$;

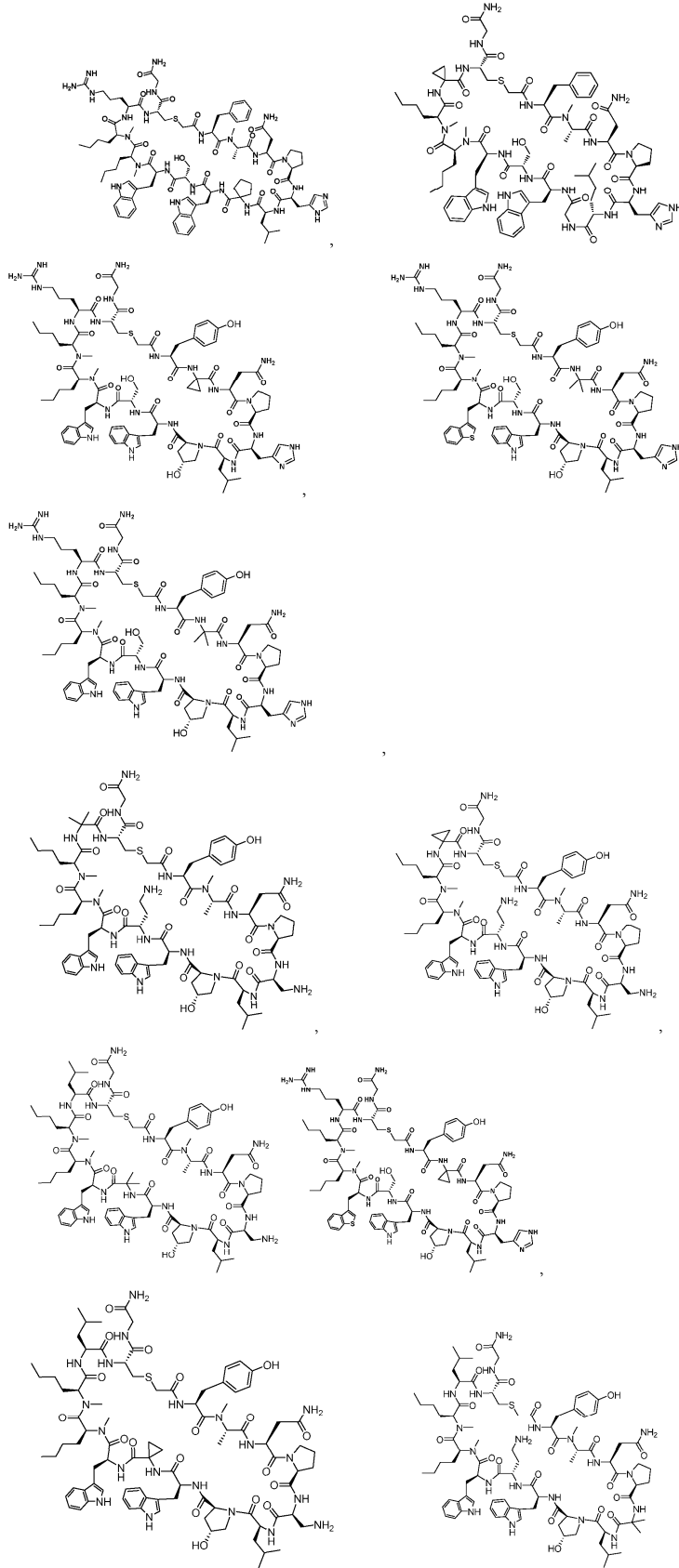
R^{11} представляет собой бутил; R^{12} представляет собой бутил; и

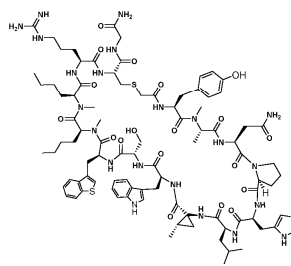
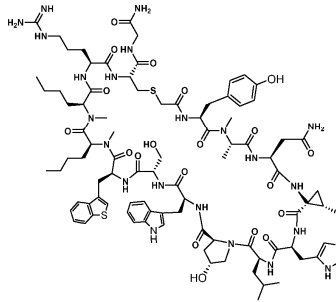
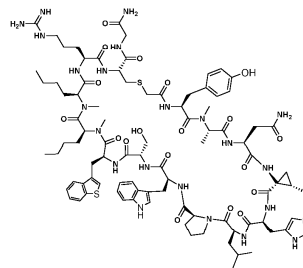
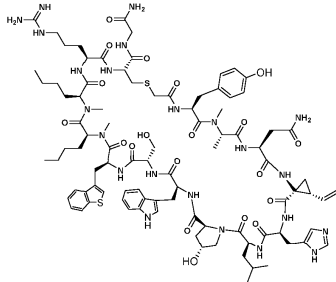
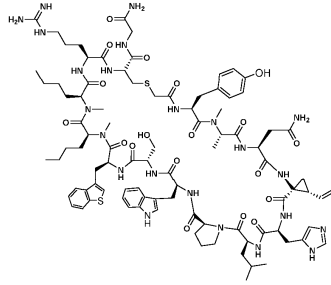
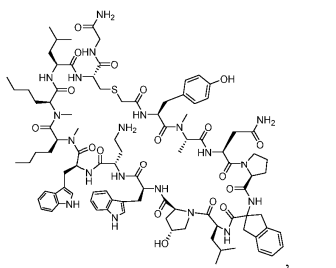
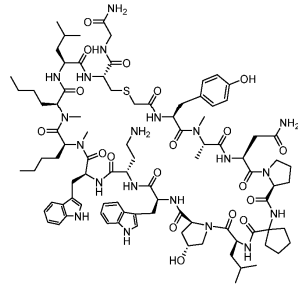
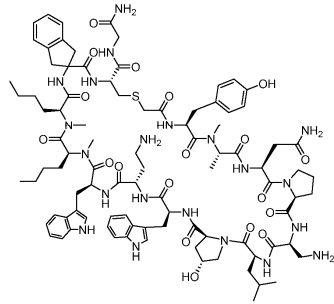
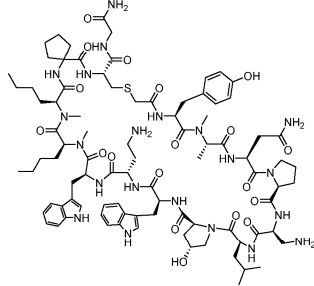
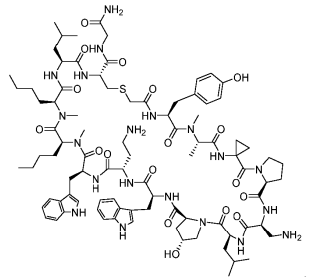
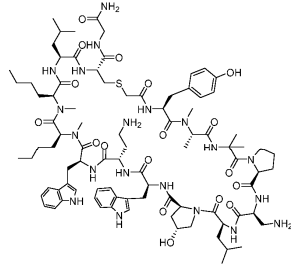
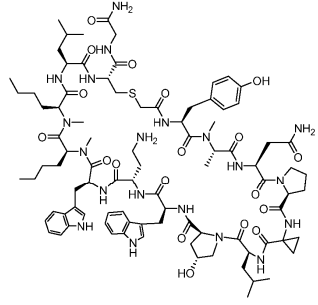
R^{13} представляет собой метил, изобутил, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{NH})\text{NH}_2$, или, вместе с присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , может образовывать трех-шестичленное карбоциклическое кольцо или шестичленное кольцо, содержащее атом кислорода или атом азота, с соответствующей присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , причем кольцо необязательно замещено одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из $\text{C}_1\text{-C}_3$ алкокси, $\text{C}_1\text{-C}_3$ алкила, $\text{C}_2\text{-C}_4$ алкенила, галогена, гидроксиды и amino, и где пяти- или шестичленное кольцо необязательно конденсировано с фенильным кольцом;

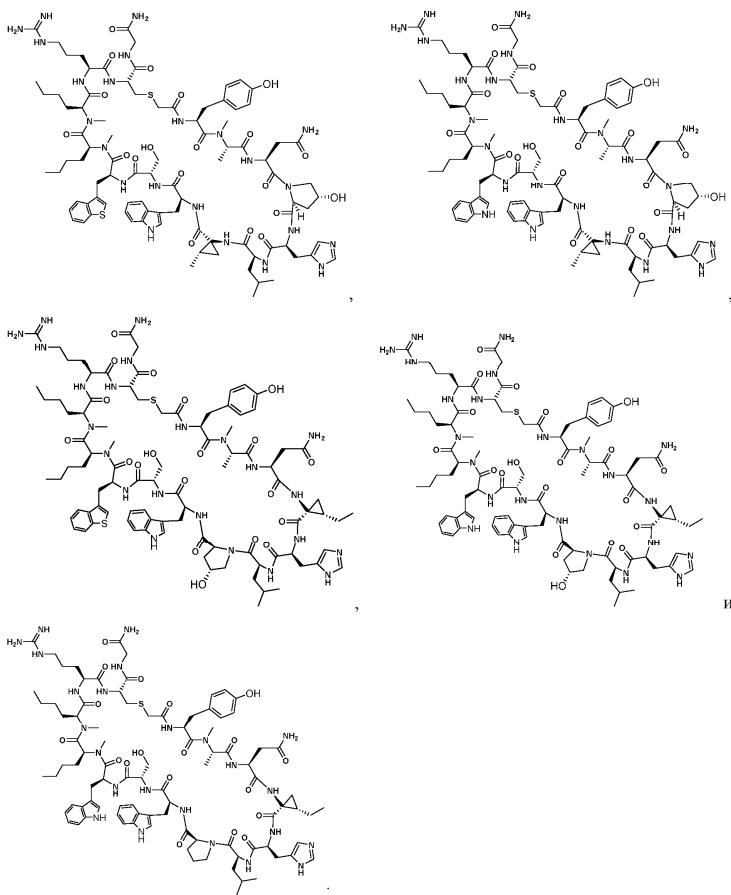
при условии, что соединение формулы (I) содержит по меньшей мере один атом углерода на основной цепи кольца, которое содержит четыре заместителя, отличных от водорода, и не представляет собой альфа-метилзамещенное кольцо.

Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение также относится к соединению, выбранному из:

1.







или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно другому варианту осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ усиления, стимулирования и/или увеличения иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, указанный способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его терапевтически приемлемой соли. Согласно другому варианту осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ ингибирования роста, пролиферации или метастазирования злокачественных клеток у нуждающегося в этом субъекта, указанный способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его терапевтически приемлемой соли. Следует понимать, что указанное ингибирование может быть прямым или косвенным. Согласно другому варианту осуществления злокачественная опухоль выбрана из меланомы, почечно-клеточной карциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких (NSCLC), неплюскоклеточного NSCLC, колоректального рака, кастрационно-резистентного рака предстательной железы, злокачественной опухоли яичника, злокачественной опухоли желудка, гепатоцеллюлярной карциномы, карциномы поджелудочной железы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, карциномы пищевода, желудочно-кишечного тракта и молочной железы, а также гематологического злокачественного новообразования.

Согласно другому варианту осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ усиления, стимулирования и/или увеличения иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, причем указанный способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его терапевтически приемлемой соли.

Согласно другому варианту осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ ингибирования роста, пролиферации или метастазирования злокачественных клеток у нуждающегося в этом субъекта, указанный способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его терапевтически приемлемой соли.

Согласно другому варианту осуществления при этом злокачественная опухоль выбрана из меланомы, почечно-клеточной карциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких (NSCLC), неплюскоклеточного NSCLC, колоректального рака, кастрационно-резистентной злокачественной опухоли предстательной железы, злокачественной опухоли яичников, злокачественной опухоли желудка, гепатоцеллюлярной карциномы, карциномы поджелудочной железы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, карциномы пищевода, желудочно-кишечного тракта и молочной железы, а также гематологических злокачественных новообразований.

Согласно другому варианту осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, способ предусматривает введение субъек-

ту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его терапевтически приемлемой соли.

Согласно другому варианту осуществления инфекционное заболевание при этом вызывается вирусом.

Согласно другому варианту осуществления вирус выбран из ВИЧ, гепатита А, гепатита В, гепатита С, вируса герпеса и гриппа.

Согласно другому варианту осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения септического шока у нуждающегося в этом субъекта, способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его терапевтически приемлемой соли.

Согласно другому варианту осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ блокирования взаимодействия PD-L1 с PD-1 и/или CD80 у субъекта, указанный способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения формулы (I) или его терапевтически приемлемой соли.

Согласно другому варианту осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ блокирования взаимодействия PD-L1 с PD-1 и/или CD80 у субъекта, указанный способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного описанного в настоящем документе макроциклического пептида.

В соответствии с настоящим изобретением авторы настоящего изобретения обнаружили пептиды, которые специфически связываются с PD-L1 и которые способны ингибировать взаимодействие PD-L1 с PD-1 и CD80. Эти макроциклические пептиды демонстрируют иммуномодулирующую эффективность *in vitro*, что делает их терапевтическими кандидатами для лечения различных заболеваний, включающих в себя злокачественную опухоль и инфекционные заболевания.

Термины "специфическое связывание" или "специфически связываются" относятся к взаимодействию между белком и связывающей молекулой, такой как соединение или лиганд. Взаимодействие зависит от наличия определенной структуры (т.е., сайта связывания фермента, антигенной детерминанты или эпитопа) белка, который распознается связывающей молекулой. Например, если соединение характеризуется специфическим связыванием для связывающего сайта "А" белка, наличие соединения в реакционной смеси, содержащей белок, включающий в себя связывающий сайт А и меченый пептид, который специфически связывается со связывающим сайтом А белка, будет уменьшать количество меченых пептидов, связанных с белком. В противоположность этому, неспецифическое связывание соединения с белком не приводит к зависимому от концентрации смещению меченого пептида от белка.

Настоящее изобретение предназначено для включения всех изотопов атомов, встречающихся в настоящих соединениях. Изотопы включают в себя те атомы, которые характеризуются одинаковым атомным числом, но разными массовыми числами. В качестве общего примера и без ограничения изотопы водорода включают в себя тритий и дейтерий. Изотопы углерода включают в себя ^{13}C и ^{14}C . Меченые изотопами соединения согласно настоящему изобретению в общем случае могут быть получены обычными способами, известными специалистам в настоящей области техники, или способами, аналогичными тем, которые описаны в настоящем документе, с использованием соответствующего меченого изотопами реагента вместо немеченого реагента, используемого в противном случае. Такие соединения могут характеризоваться различным потенциальным применением, например, в качестве стандартов и реагентов при определении биологической активности. В случае стабильных изотопов, такие соединения могут характеризоваться потенциалом к положительному изменению биологических, фармакологических или фармакокинетических свойств.

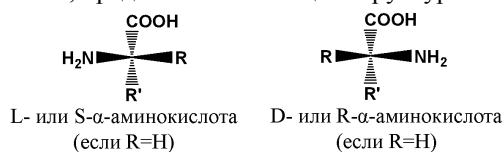
Дополнительный аспект описанного в настоящем документе объекта изобретения заключается в использовании раскрытых пептидов в качестве радиоактивно меченных лигандов для развития анализов связывания лиганда или для мониторинга адсорбции, метаболизма, распределения, связывания с рецептором или размещения или расположения соединения *in vivo*. Например, описанный в настоящем документе макроциклический пептид может быть получен с использованием радиоактивного изотопа ^{125}I , и полученный радиоактивно меченный пептид может быть использован для разработки анализа связывания или для исследований обмена веществ. Альтернативно и для той же цели, описанный в настоящем документе макроциклический пептид может быть преобразован в радиоактивно меченую форму с помощью способов использования каталитического тритирования, известных специалистам в настоящей области техники.

Макроциклические пептиды согласно настоящему изобретению также могут быть использованы в качестве визуализирующих PET средств путем добавления радиоактивного индикатора с использованием способов, известных специалистам в настоящей области техники.

Предпочтительные пептиды включают в себя по меньшей мере один из представленных в настоящем документе макроциклических пептидов, и эти пептиды могут быть включены в фармацевтические композиции и комбинации.

Приводимые в настоящем документе определения применяются, без ограничения, к терминам, используемым по всему настоящему описанию, если иным образом не ограничены в определенных случаях.

Специалистам в настоящей области техники химии аминокислот и пептидов известно, что аминокислота включает в себя соединение, представленное общей структурой:



где R и R' описаны в настоящем документе.

Если не указано иное, используемый в настоящем документе, отдельно или как часть другой группы термин "аминокислота" включает в себя без ограничения аминокислотную группу и карбоксильную группу, связанную с тем же углеродом, называемым " α " углерод, где R и/или R' может представлять собой природную или не природную боковую цепь, включающую в себя водород. Абсолютную конфигурацию "S" в " α " углероде обычно называют как "L" или "природная" конфигурация". В случае, когда оба заместителя "R" и "R'" (первичный) представляют собой водород, аминокислота представляет собой глицин и не представляет собой хиральную.

Используемые в настоящем документе термины "боковая цепь природной аминокислоты" и "боковая цепь аминокислоты природного происхождения" относятся к боковой цепи любой из встречающихся в природе аминокислот (т.е., аланина, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, цистеина, глутамина, глутаминовой кислоты, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина), как правило, в S-конфигурации (т.е., L-аминокислоты).

Используемые в настоящем документе термины "боковая цепь не природной аминокислоты" и "боковая цепь аминокислоты не природного происхождения" относятся к боковой цепи любой из встречающихся в природе аминокислот, как правило, в R-конфигурации (т.е., D-аминокислоты), или к группе боковых цепей отличных от природных аминокислот в R- или S-конфигурации (т.е., D- или L-аминокислоты, соответственно), выбранным из

C₂-C₇алкенила, C₁-C₃алкоксиC₁-C₃алкила, C₁-C₆алкоксикарбонилC₁-C₃алкила, C₁-C₇алкила, C₁-C₃алкилсульфанилC₁-C₃алкила, амидоC₁-C₃алкила, аминоC₁-C₃алкила, азаиндолилC₁-C₃алкила, бензотиазолилC₁-C₃алкила, бензотиенилC₁-C₃алкила, бензилоксиC₁-C₃алкила, карбоксиC₁-C₃алкила, C₃-C₁₄циклоалкилC₁-C₃алкила, дифенилметила, фуранилC₁-C₃алкила, имидазолилC₁-C₃алкила, нафтилC₁-C₃алкила, пиридинилC₁-C₃алкила, тиазолилC₁-C₃алкила, тиенилC₁-C₃алкила;

бифенилC₁-C₃алкила, в котором бифенил необязательно замещен метильной группой;

гетероциклила, необязательно замещенного одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из C₁-C₄алкокси, C₁-C₄алкила, C₁-C₃алкилсульфониламино, амидо, амино, аминоC₁-C₃алкила, аминосульфонола, карбокси, циано, галогена, галогенC₁-C₃алкила, гидроксид, -NC(NH₂)₂, нитро и -OP(O)(OH)₂;

индолилC₁-C₃алкила, в котором часть индолила необязательно замещена одной группой, выбранной из C₁-C₃алкила, карбоксиC₁-C₃алкила, галогена, гидроксид и фенила, причем фенил необязательно дополнительно замещен одной, двумя или тремя группами, независимо выбранными из C₁-C₃алкокси, C₁-C₃алкила и галогена;

NR^yR^{y'} (C₁-C₃алкил), в котором R^y и R^{y'} независимо выбраны из водорода, C₂-C₄алкенилоксикарбонила, C₁-C₃алкила, C₁-C₃алкилкарбонила, C₃-C₁₄циклоалкилкарбонила, фуранилкарбонила и фенилкарбонила. Если алкильный линкер содержит более одного углерода, на цепи может быть дополнительная группа NR^yR^{y'}.

NR^qR^t карбонилC₁-C₃алкила, в котором R^q и R^t независимо выбраны из водорода, C₁-C₃алкила и трифенилметила;

фенила, необязательно замещенного одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из C₁-C₄алкокси, C₁-C₄алкила, C₁-C₃алкилсульфониламино, амидо, амино, аминоC₁-C₃алкила, аминосульфонола, карбокси, циано, галогена, галогенC₁-C₃алкила, гидроксид, -NC(NH₂)₂, нитро и -OP(O)(OH)₂;

NR^aR^b (C₁-C₇алкил), где R^a и R^b необязательно выбраны из водорода, C₂-C₄алкенилоксикарбонила, C₁-C₃алкила, C₁-C₃алкилкарбонила, C₃-C₆циклоалкилкарбонила, фуранилкарбонила и фенилкарбонила. Если алкильный линкер содержит более одного атома углерода, дополнительная группа NR^aR^b может быть в цепи.

NR^cR^d карбонилC₁-C₃алкила, где R^c и R^d независимо выбраны из водорода, C₁-C₃алкила и трифенилметила;

фенилC₁-C₃алкила, в котором фенильная часть необязательно замещена одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью группами, независимо выбранными из C₁-C₄алкокси, C₁-C₄алкила, C₁-C₃алкилсульфониламино, амидо, амино, аминоC₁-C₃алкила, аминосульфонола, карбокси, циано, галогена, галогенC₁-C₃алкила, гидроксид, -NC(NH₂)₂, нитро и -OP(O)(OH)₂ и феноксиC₁-C₃алкила, в котором фенил необязательно замещен группой C₁-C₃алкила.

Используемый в настоящем документе термин "бензилокси C_1 - C_3 алкил" относится к бензилокси-группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C_1 - C_3 алкильную группу.

Используемый в настоящем документе термин "бифенил C_1 - C_3 алкил" относится к бифенильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C_1 - C_3 алкильную группу. Бифенильная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

Используемый в настоящем документе термин "карбонил" относится к $-C(O)-$.

Используемый в настоящем документе термин "карбокси" относится к $-CO_2H$.

Используемый в настоящем документе термин "карбокси C_1 - C_3 алкил" относится к карбоксигруппе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C_1 - C_3 алкильную группу.

Используемый в настоящем документе термин "циано" относится к $-CN$.

Используемый в настоящем документе термин " C_3 - C_{14} циклоалкил" относится к насыщенному моноциклической, бициклической или трициклической углеводородной кольцевой системе, содержащей от трех до сорока атомов углерода и не содержащей гетероатомов. Бициклические и трициклические кольца могут быть конденсированными, спироциклическими или с мостиковыми связями. Приводимые в качестве примеров циклоалкильные группы включают в себя без ограничения циклопропил, циклопентил, бицикло[3.1.1]гептил и адамантил.

Используемый в настоящем документе термин " C_3 - C_{14} циклоалкил C_1 - C_3 алкил" относится к C_3 - C_{14} циклоалкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C_1 - C_3 алкильную группу.

Используемый в настоящем документе термин " C_3 - C_{14} циклоалкилкарбонил" относится к C_3 - C_{14} циклоалкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через карбонильную группу.

Используемый в настоящем документе термин "фуранил C_1 - C_3 алкил" относится к фуранильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C_1 - C_3 алкильную группу. Фуранильная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

Используемый в настоящем документе термин "фуранилкарбонил" относится к фуранильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через карбонильную группу.

Используемые в настоящем документе термины "галоген" и "галоген" относятся к F, Cl, Br или I.

Используемый в настоящем документе термин "галоген C_1 - C_3 алкил" относится к C_1 - C_3 алкильной группе, замещенной одним, двумя или тремя атомами галогена.

Используемый в настоящем документе термин "галогенметил" относится к метильной группе, замещенной одним, двумя или тремя атомами галогена.

Используемый в настоящем документе термин "гетероцикл" относится к пяти-, шести- или семи-членному кольцу, содержащему один, два или три гетероатома, независимо выбранные из азота, кислорода и серы. Пятичленное кольцо не содержит или содержит до двух двойных связей, а шести- и семи-членные кольца не содержат или содержат до трех двойных связей. Термин "гетероцикл" также включает в себя бициклические группы, в которых гетероциклическое кольцо конденсировано с четырех-шести-членным ароматическим или неароматическим карбоциклическим кольцом, или другую моноциклическую гетероциклическую группу. Гетероциклические группы по настоящему изобретению присоединены к исходному молекулярному фрагменту через атом азота в группе. Примеры гетероциклических групп включают в себя без ограничения бензотиенил, фурил, имидазолил, индолил, изотиазолил, изоксазолил, морфолил, оксазолил, пиперазинил, пиперидинил, пиразолил, пиридинил, пирролидинил, пирролопиридинил, пирролил, тиазолил, тиенил и тиоморфолил.

Используемый в настоящем документе термин "гидрокси" относится к $-OH$.

Используемый в настоящем документе термин "имидазолил- C_1 - C_3 -алкил" относится к группе имидазолила, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C_1 - C_3 -алкильную группу. Группа имидазолила может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

Используемый в настоящем документе термин "индолил C_1 - C_3 алкил" относится к группе имидазолила, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C_1 - C_3 алкильную группу. Группа индолила может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

Используемый в настоящем документе термин "нафтил C_1 - C_3 алкил" относится к нафтильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C_1 - C_3 алкильную группу. Нафтильная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

Используемый в настоящем документе термин "нитро" относится к $-NO_2$.

Используемый в настоящем документе термин " NR^aR^b " относится к двум группам, R^a и R^b , которые присоединены к исходному молекулярному фрагменту через атом азота. R^a и R^b независимо выбраны из водорода, C_2 - C_4 алкилкарбонила, C_1 - C_3 алкилкарбонила, C_3 - C_{14} циклоалкилкарбонила, фуранилкарбонила и фенилкарбонила.

Используемый в настоящем документе термин " NR^aR^b (C_1 - C_3)алкил" относится к группе NR^aR^b ,

присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C₁-C₃алкильную группу.

Используемый в настоящем документе термин "NR^cR^d" относится к двум группам, R^c и R^d, которые присоединены к исходному молекулярному фрагменту через атом азота. R^c и R^d независимо выбраны из водорода, C₁-C₃алкила и трифенилметила.

Используемый в настоящем документе термин "NR^cR^d карбонил" относится к группе NR^cR^d, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через карбонильную группу.

Используемый в настоящем документе термин "NR^cR^d карбонилC₁-C₃алкил" относится к NR^cR^d карбонильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C₁-C₃алкильную группу.

Используемый в настоящем документе термин "фенокси" относится к фенильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через атом кислорода.

Используемый в настоящем документе термин "феноксисC₁-C₃алкил" относится к феноксигруппе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C₁-C₃алкильную группу.

Используемый в настоящем документе термин "фенилC₁-C₃алкил" относится к фенильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C₁-C₃алкильную группу.

Используемый в настоящем документе термин "фенилкарбонил" относится к фенильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через карбонильную группу.

Используемый в настоящем документе термин "пиридинилC₁-C₃алкил" относится к группе пиридила, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C₁-C₃алкильную группу. Группа пиридила может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

Используемый в настоящем документе термин "сульфанил" относится к -S-.

Используемый в настоящем документе термин "сульфонил" относится к -SO₂-.

Используемый в настоящем документе термин "тиазолилC₁-C₃алкил" относится к группе тиазолила, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C₁-C₃алкильную группу. Группа тиазолила может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

Используемый в настоящем документе термин "тиенилC₁-C₃алкил" относится к тиенильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту через C₁-C₃алкильную группу. Тиенильная группа может быть присоединена к алкильному фрагменту через любой замещаемый атом в группе.

Термин "лечение" относится к: (I) предотвращению заболевания, нарушения или состояния у пациента, который может быть предрасположен к заболеванию, нарушению и/или состоянию, но до сих пор оно у него не было диагностировано; (II) ингибированию заболевания, нарушения или состояния, т.е. остановке его развития; и (III) облегчению заболевания, нарушения или состояния, т.е. регрессии заболевания, нарушения и/или состояния, и/или симптомов, связанных с заболеванием, нарушением и/или состоянием.

Связывание макроциклических пептидов с PD-L1 может быть измерено, например, с помощью таких способов, как гомогенная флуоресценция с временным разрешением (HTRF), поверхностный плазмонный резонанс (SPR), изотермическая калориметрия титрования (ITC), спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и т.п. Кроме того, связывание макроциклических пептидов с PD-L1, экспрессируемым на поверхности клеток, может быть измерено, как описано в настоящем документе в клеточных анализах связывания.

Введение описанного в настоящем документе терапевтического средства предусматривает, без ограничения, введение терапевтически эффективного количества терапевтического средства. Используемый в настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" относится, без ограничения, к количеству терапевтического средства для лечения или профилактики подвергнутого лечению состояния путем введения композиции описанных в настоящем документе ингибиторов связывания PD-1/PD-L1. Это количество представляет собой количество, достаточное для достижения обнаруживаемого терапевтического или профилактического, или благоприятного эффекта. Эффект может включать в себя, например и без ограничения, лечение или профилактику перечисленных в настоящем документе состояний. Точное эффективное количество для субъекта будет зависеть от размера и здоровья субъекта, характера и степени подвергнутого лечению состояния, рекомендаций лечащего врача и выбранных для введения лекарственных средств или комбинации лекарственных средств. Таким образом, не целесообразно указывать точное эффективное количество заранее.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способам ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта с использованием макроциклических пептидов согласно настоящему изобретению. Как показано в настоящем документе, макроциклические пептиды согласно настоящему изобретению способны связываться с PD-L1, нарушая взаимодействие между PD-L1 и PD-1, конкурируя за связывание с PD-L1 с моноклональными антителами к PD-1, которые, как известно, блокируют взаимодействие с PD-1, повышая специфическую к ЦМВ Т-клеточную секрецию IFN γ и повышая ВИЧ-специфическую Т-клеточную секрецию IFN γ . В результате макроциклические пептиды согласно настоящему изобретению представляют собой применимые для модификации иммунного ответа, лечения таких заболеваний, как злокачественная опухоль или инфекционное заболевание, стимулируя защитный ауто-

иммунный ответ, или стимулирования антигенспецифических иммунных ответов (например, путем совместного введения блокирующих PD-L1 пептидов с представляющим интерес антигеном).

Для того чтобы можно было легче понять настоящее раскрытие, сначала определяются некоторые термины. Дополнительные определения приведены на протяжении всего подробного описания.

Термины "лиганд 1 программируемой смерти", "лиганд 1 программируемой клеточной смерти", "белок PD-L1", "PD-L1", "PDL1", "PDCDL1", "hPD-L1", "hPD-LI", "CD274" и "B7-H1" использовались взаимозаменяемо и включают в себя варианты, изоформы, видовые гомологи человеческого PD-L1 и аналоги, содержащие по меньшей мере один общий эпитоп с PD-L1. Полная последовательность PD-L1 может быть найдена в GENBANK® под регистрационным номером NP 054862.

Термины "Programmed Death 1", "Programmed Cell Death 1", "белок PD-1", "PD-1", "PD1", "PDCD1", "hPD-1" и "hPD-I" использовались взаимозаменяемо и включают в себя варианты, изоформы, видовые гомологи человеческого PD-1 и аналоги, содержащие по меньшей мере один общий эпитоп с PD-1. Полная последовательность PD-1 может быть найдена в GENBANK® под регистрационным номером U64863.

Термины "связанный с цитотоксическими Т-лимфоцитами антиген-4", "CTLA-4", "CTLA4", "антиген CTLA-4" и "CD152" (смотрите, например, Murata, Am. J. Pathol., 155:453-460 (1999)) использовались взаимозаменяемо и включают в себя варианты, изоформы, видовые гомологи человеческого CTLA-4 и аналоги, содержащие по меньшей мере один общий эпитоп с CTLA-4 (смотрите, например, Balzano, Int. J. Cancer Suppl., 7:28-32 (1992)). Полная последовательность нуклеиновой кислоты CTLA-4 может быть найдена в GENBANK® под регистрационным номером L15006.

Термин "иммунный ответ" относится к действию, например, лимфоцитов, В-лимфоцитов, антиген-презентирующих клеток, фагоцитов, гранулоцитов и растворимых макромолекул, полученных с помощью перечисленных выше клеток или печени (включая в себя макроциклические пептиды, цитокины и комплемент), что приводит к селективному повреждению, уничтожению и/или выведению из организма человека вторгающихся патогенных микроорганизмов, клеток или тканей, инфицированных возбудителями, злокачественными клетками, или, в случае аутоиммунных заболеваний или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей.

Используемое в настоящем документе "нежелательное явление" (АЕ) представляет собой любой неблагоприятный и в целом непреднамеренный, даже нежелательный, знак (включающий в себя аномальные лабораторные данные), симптом или заболевание, связанное с использованием медицинской помощи. Например, нежелательное явление может быть связано с активацией иммунной системы или расширением клеток иммунной системы (например, Т-клеток) в ответ на лечение. Лечение может характеризоваться одним или несколькими связанными с ним АЕ, и каждый АЕ может характеризоваться таким же или другим уровнем тяжести. Ссылка на способы, позволяющие "изменение нежелательных явлений", означает схему лечения, которая снижает распространенность и/или тяжесть одного или нескольких АЕ, связанных с использованием другой схемы лечения.

Используемый в настоящем документе термин "гиперпролиферативное заболевание" относится к состояниям, при которых увеличивается рост клеток, по сравнению с обычным уровнем. Например, гиперпролиферативные заболевания или нарушения включают в себя злокачественные заболевания (например, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль толстой кишки, злокачественную опухоль желчного пузыря) и доброкачественные заболевания (например, атеросклероз, доброкачественную гиперплазию и доброкачественную гипертрофию предстательной железы).

Термины "приблизительно" или "содержащий по существу" относятся в пределах приемлемого диапазона ошибок для конкретного значения, как определено любым специалистом в настоящей области техники, который будет зависеть отчасти от того, как значение измеряется или определяется, т.е. ограничений системы измерения. Например, "приблизительно" или "содержащий по существу" может означать в 1 или более 1 стандартном отклонении в практике в настоящей области техники. Альтернативно, "приблизительно" или "содержащий по существу" может означать диапазон до 20%. Кроме того, в частности, по отношению к биологическим системам и процессам, термины могут означать вплоть до порядка величины или до 5-кратного значения. Когда конкретные значения предусмотрены в приложении и в формуле изобретения, если не указано иное, значение "приблизительно" или "содержащий по существу" следует считать в пределах приемлемого диапазона ошибок для данного значения.

Как описано в настоящем документе, должно быть понятно, что любой диапазон концентраций, диапазон процентов, диапазон отношений или диапазон целых чисел включает в себя значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и, при необходимости, их фракции (например, одной десятой и одной сотой целого числа), если не указано иное.

Конкурентные анализы

Настоящее изобретение также относится к макроциклическим пептидам, которые способны конкурировать со связыванием эталонного антитела к PD-L1 (MDX-1105) по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизи-

тельно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90% и по меньшей мере приблизительно на 100%. Такие макроциклические пептиды могут разделять структурную гомологию с одним или несколькими раскрытыми в настоящем документе макроциклическими пептидами, включающими в себя мутантные формы, формы с консервативной заменой, с функциональной заменой и делециями, при условии, что они специфически связываются с PD-L1. Например, если макроциклический пептид связывается по существу с той же самой областью PD-L1, что и эталонное антитело к PD-L1, макроциклический пептид должен связываться с эпитопом PD-L1, который по меньшей мере частично совпадает с эпитопом PD-L1, с которым связывается моноклональное антитело к PD-L1. Перекрывающаяся область может варьировать от одного аминокислотного остатка до нескольких сотен аминокислотных остатков. Макроциклический пептид должен затем конкурировать с и/или блокировать связывание моноклонального антитела к PD-L1 с PD-L1 и тем самым снижать связывание моноклонального антитела к PD-L1 с PD-L1, предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно на 50% в конкурентном анализе.

Антитела к PD-L1, которые могут быть использованы в качестве эталонных антител для целей конкурентного анализа, известны в настоящей области техники. Например, могут быть использованы следующие эталонные антитела к PD-L1: MDX-1105 (BMS); L01X-C (Serono), L1X3 (Serono), MSB-0010718C (Serono) и PD-L1 Probody (CytomX) и антитела PD-L1, раскрытые в WO 2007/005874.

Антитела к PD-1, которые могут быть использованы в качестве эталонных антител для целей конкурентного анализа, известны в настоящей области техники. Например, могут быть использованы следующие эталонные антитела к PD-1: нивомулаб (BMS); 17D8, 2D3, 4H1, 4A11, 7D3 и 5F4, каждое раскрыто в патенте США совместного владения № 8008449 (BMS), МК-3475 (Merck, раскрыто в патенте США № 8168757) и антитела, описанные в патенте США № 7488802.

Режим дозирования регулируется для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, может быть введен один болюс, несколько разделенных доз можно вводить в течение долгого времени или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена, как показано остротой терапевтической ситуации. Особенно выгодно составлять парентеральные композиции в единичной дозированной форме для простоты введения и однородности дозировки. Используемая в настоящем документе форма единицы дозирования относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для подлежащих лечению субъектов; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное производить желаемый терапевтический эффект, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для форм единиц дозирования согласно настоящему раскрытию диктуется и непосредственно зависит от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, которого нужно достичь, и (б) ограничений, присущих в настоящей области техники приготовления такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов.

Для введения макроциклического пептида дозировка варьирует в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и более, как правило, от 0,01 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозировки могут составлять 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или быть в пределах 1-10 мг/кг. Иллюстративный режим лечения предусматривает введение один раз в день, дважды в день, два раза в неделю, три раза в неделю, еженедельно, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в месяц, раз в 3 месяца или раз в 3-6 месяцев. Предпочтительные режимы дозирования для макроциклического пептида согласно настоящему изобретению предусматривают 1 мг/кг массы тела или 3 мг/кг массы тела путем внутривенного введения с макроциклом, который вводят с использованием одной из следующих схем введения: (I) каждые четыре недели в течение шести дозировок, затем каждые три месяца; (II) каждые три недели; (III) 3 мг/кг массы тела один раз с последующим 1 мг/кг массы тела один раз в три недели.

В некоторых способах два или более макроциклических пептида с различными специфичностями связывания вводят одновременно, в этом случае доза каждого вводимого соединения находится в пределах указанных диапазонов. Соединения, как правило, вводят несколько раз. Интервалы между отдельными дозами могут составлять, например, неделю, месяц, три месяца или год. Интервалы могут также быть нерегулярными, как определяется посредством измерения содержания в крови макроциклического пептида к антигену-мишени в организме пациента. В некоторых способах дозировку доводят до достижения концентрации в плазме до приблизительно 1-1000 мкг/мл, а в некоторых способах - до приблизительно 25-300 мкг/мл.

Альтернативно, макроциклический пептид можно вводить в виде препарата с замедленным высвобождением, в случае чего требуется менее частое введение. Дозировка и частота введения могут меняться в зависимости от того, представляет собой лечение профилактическое или терапевтическое. При профилактическом применении вводят относительно низкую дозировку с относительно редкими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение в течение всех оставшейся жизни. При терапевтическом применении иногда требуются сравнительно высокие дозы через относительно короткие интервалы до уменьшения или прекращения прогрессирования заболевания и, предпочтительно, пока пациент показывает частичное или полное облегчение симптомов за-

болевания. После этого пациенту может вводиться профилактический режим дозирования.

Фактические уровни дозирования активных ингредиентов в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению могут изменяться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа у конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсического действия на пациента. Выбранный уровень дозирования будет зависеть от различных фармакокинетических факторов, включающих в себя активность используемых конкретных композиций согласно настоящему изобретению или их сложных эфиров, солей или амидов, пути введения, времени введения, скорости выведения используемого конкретного соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в сочетании с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и предшествующей медицинской истории подвергнутого лечению пациента и других подобных факторов, хорошо известных в настоящей области медицины.

"Терапевтически эффективная доза" макроциклического пептида согласно настоящему раскрытию предпочтительно приводит к уменьшению выраженности симптомов заболевания, увеличению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предотвращению повреждения или потери трудоспособности в связи с заболеванием. Например, для лечения опухолей "терапевтически эффективная доза" предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере приблизительно на 20%, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60% и еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80%, по отношению к субъектам без лечения. Способность соединения ингибировать рост опухоли и/или ВИЧ может быть оценена на системе животной модели прогнозирования эффективности при опухолях человека или вирусной эффективности. Кроме того, это свойство композиции может быть оценено путем анализа способности соединения ингибировать, такое ингибирование *in vitro* с помощью анализов известно специалистам в настоящей области техники. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшать размер опухоли, снижать вирусную нагрузку или иным образом облегчать симптомы у субъекта. Специалист в настоящей области техники будет способен определить такие количества на основании таких факторов, как размер субъекта, тяжесть симптомов у субъекта, а также от конкретного выбранного состава или способа введения.

Согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрен фармацевтический набор частей, содержащий описанный в настоящем документе макроциклический пептид и другой иммуномодулятор. Набор также может дополнительно содержать инструкции для применения в лечении гиперпролиферативного заболевания (такого как описанная в настоящем документе злокачественная опухоль) и/или вирусного заболевания.

Композиция согласно настоящему изобретению может быть введена через один или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких из множества способов, известных в настоящей области техники. Как будет понятно специалисту в настоящей области техники, путь и/или способ введения будет варьировать в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения для макроциклических пептидов согласно настоящему изобретению включают в себя внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемая в настоящем документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, путем инъекции, и включает в себя без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подэпидермисную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастеральную инъекцию и инфузию.

Альтернативно, макроциклический пептид согласно настоящему изобретению может быть введен непарентеральным путем, например, с помощью местного, эпидермального или слизистого пути введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения могут быть приготовлены с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, например, как в случае состава с контролируемым высвобождением, включая в себя имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, например, этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полимер ортоэфиров и полимер молочной кислоты. Многие способы приготовления таких препаратов запатентованы или в целом известны специалистам в настоящей области техники. Смотрите, например, Robinson, J.R., ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York (1978).

Терапевтические композиции могут быть введены с медицинскими устройствами, известными в настоящей области техники. Например, согласно предпочтительному варианту осуществления терапевтическая композиция согласно настоящему раскрытию может быть введена с помощью безигольного подкожного инъекционного устройства, такого как устройства, раскрытые в патентах США № 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824 или 4596556. Примеры известных имплантатов и модулей,

используемых в настоящем изобретении, включают в себя: патент США № 4487603, в котором раскрыта имплантируемая микроинфузионная помпа для распыления лекарства с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, в котором раскрыто терапевтическое устройство для введения лекарства через кожу; патент США № 4447233, в котором раскрыта медицинская инфузионная помпа для доставки лекарства с точной скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором описано имплантируемое инфузионное устройство с переменным потоком для непрерывной доставки лекарственных средств; патент США № 4439196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства с многокамерными отсеками; и патент США № 4475196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства. Эти патенты включены в настоящий документ посредством ссылки. Многие другие подобные имплантаты, системы доставки и модули известны специалистам в настоящей области техники.

Согласно некоторым вариантам осуществления макроциклические пептиды согласно настоящему раскрытию могут быть составлены, чтобы обеспечить надлежащее распределение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) исключает многие высоко гидрофильные соединения. Чтобы гарантировать, что терапевтические соединения согласно настоящему раскрытию пересекут гематоэнцефалический барьер (при необходимости), они могут быть составлены, например, в липосомах. Для способов производства липосом, смотрите, например, патенты США № 4522811, 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые селективно транспортируются в специфические клетки или органы, таким образом, повышая нацеленную доставку лекарственных средств (смотрите, например, Ranade, V.V., J. Clin. Pharmacol., 29:685 (1989)). Иллюстративные направленно воздействующие фрагменты включают в себя фолат или биотин (смотрите, например, патент США № 5416016 Low с соавт.); маннозиды (Umezawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 153:1038 (1988)); макроциклические пептиды ((Bloeman, P.G. et al., FEBS Lett., 357:140 (1995); Owais, M. et al., Antimicrob. Agents Chemother., 39:180 (1995)); рецептор поверхностно-активного вещества белка А (Briscoe et al., Am. J. Physiol., 1233:134 (1995)); p120 (Schreier et al., J. Biol. Chem., 269:9090 (1994)); смотрите также Keinanen, K. et al., FEBS Lett., 346:123 (1994); Killion, J.J. et al., Immunomethods 4:273 (1994).

Применения и способы настоящего изобретения

Макроциклических пептиды, композиции и способы согласно настоящему изобретению характеризуются многочисленными применениями *in vitro* и *in vivo*, включающими в себя, например, обнаружение PD-L1 или усиление иммунного ответа путем блокады PD-L1. Например, эти молекулы могут быть введены в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или субъектов-людей, например, *in vivo*, для повышения иммунитета в различных ситуациях. Соответственно, согласно одному аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ модификации иммунного ответа у субъекта, предусматривающий введение субъекту макроциклического пептида согласно настоящему раскрытию таким образом, чтобы иммунный ответ у субъекта модифицировался. Предпочтительно, ответ усиливается, стимулируется или активизируется. В остальном, макроциклический пептид может характеризоваться связывающей и терапевтической активностью к яванским макакам, к мышам и/или к суркам.

Используемый в настоящем документе термин "субъект" предусматривает включение человека и отличных от человека животных. Отличные от человека животные включают в себя всех позвоночных, например, млекопитающих и немлекопитающих, таких как не человекообразные приматы, овцы, собаки, кошки, коровы, лошади, куры, сурки, амфибии и рептилии, хотя предпочтительны млекопитающие, такие как не человекообразные приматы, овцы, собаки, кошки, коровы и лошади. Предпочтительные субъекты включают в себя пациентов-людей, нуждающихся в укреплении иммунного ответа. Эти способы особенно применимы для лечения пациентов-людей с нарушением, которое можно лечить путем усиления опосредованного Т-клетками иммунного ответа. Согласно конкретному варианту осуществления способы особенно применимы для воздействия на злокачественные клетки *in vivo*. Для достижения повышения антигенспецифического иммунитета, макроциклические пептиды могут быть введены вместе с представляющим интерес антигеном. Когда макроциклические пептиды к PD-L1 вводят вместе с другим средством, они могут быть введены в любом порядке или одновременно.

В настоящем раскрытии также предусмотрены способы обнаружения наличия антигена PD-L1 человека, сурка, яванского макака и/или мыши в образце или измерения количества антигена PD-L1 человека, сурка, яванского макака и/или мыши, предусматривающие контактирование образца и контрольного образца с эталонным макроциклическим пептидом, который специфически связывается с PD-L1 человека, сурка, яванского макака и/или мыши, в условиях, которые позволяют образование комплекса между макроциклом и PD-L1 человека, сурка, яванского макака и/или мыши. Затем обнаруживается образование комплекса, причем разница образования комплекса между сравниваемым образцом и контрольным образцом указывает на наличие антигена PD-L1 человека, сурка, яванского макака и/или мыши в образце.

Учитывая специфическое связывание макроциклических пептидов согласно настоящему раскрытию с PD-L1, по сравнению с CD28, ICOS и CTLA-4, макроциклические пептиды согласно настоящему изобретению могут быть использованы для специфического обнаружения экспрессии PD-L1 на поверхности клеток и, кроме того, могут быть использованы для очистки PD-L1 с помощью иммуноаффинной

очистки.

Злокачественная опухоль

Блокада PD-1 макроциклическими пептидами может усиливать иммунный ответ на злокачественные клетки у пациента. Лиганд для PD-1, PD-L1, не экспрессируется в нормальных клетках человека, но в избытке встречается в различных злокачественных опухолях человека (Dong et al., *Nat. Med.*, 8:787-789 (2002)). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 приводит к уменьшению проникающих в опухоль лимфоцитов, снижению опосредованной Т-клеточными рецепторами пролиферации и ускользанию от иммунологического надзора злокачественными клетками (Dong et al., *J. Mol. Med.*, 81:281-287 (2003); Blank et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 54:307-314 (2005); Konishi et al., *Clin. Cancer Res.*, 10:5094-5100 (2004)). Подавление иммунитета может быть отменено путем ингибирования локального взаимодействия PD-1 с PD-L1, и эффект представляет собой добавочный, когда взаимодействие PD-1 с PD-L2 заблокировано (Iwai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99:12293-12297 (2002); Brown et al., *J. Immunol.*, 170:1257-1266 (2003)). В то время как предыдущие исследования показали, что пролиферация Т-клеток может быть восстановлена путем ингибирования взаимодействия PD-1 с PD-L1, не было никаких сообщений о прямом эффекте на рост злокачественной опухоли *in vivo* с помощью блокирования взаимодействия PD-1/PD-L1. Согласно одному аспекту в настоящем изобретении предусмотрено лечение субъекта *in vivo* с использованием макроциклического пептида таким образом, что рост злокачественных опухолей ингибируется. Макроциклический пептид может быть использован отдельно для ингибирования роста злокачественных опухолей. Альтернативно, макроциклический пептид может быть использован в сочетании с другими иммуногенными средствами, стандартными способами лечения злокачественных опухолей или другими макроциклическими пептидами, как описано ниже.

Соответственно, согласно одному варианту осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества макроциклического пептида.

Предпочтительные виды злокачественных опухолей, рост которых можно ингибировать с использованием макроциклических пептидов согласно настоящему изобретению, включают в себя злокачественные опухоли, которые, как правило, реагируют на иммунотерапию. Неограничивающие примеры предпочтительных злокачественных опухолей для лечения включают в себя меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), почечно-клеточную карциному (например, светло-клеточную карциному), злокачественную опухоль предстательной железы (например, гормоно-резистентную аденокарциному предстательной железы и кастрационно-резистентный рак предстательной железы), злокачественную опухоль молочной железы, колоректальный рак и рак легких (например, плоскоклеточный и неплоскоклеточный немелкоклеточный рак легких). Кроме того, настоящее раскрытие включает в себя устойчивые или рецидивирующие злокачественные опухоли, чей рост можно тормозить с использованием макроциклических пептидов согласно настоящему раскрытию.

Примеры других злокачественных опухолей, которые можно лечить с использованием способов согласно настоящему изобретению, включают в себя рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, злокачественную опухоль матки, злокачественную опухоль яичников, злокачественную опухоль толстой кишки, злокачественную опухоль прямой кишки, злокачественную опухоль анальной области, злокачественную опухоль желудка/кишечника, злокачественную опухоль яичка, злокачественную опухоль матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль тонкой кишки, злокачественную опухоль эндокринной системы, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль паращитовидной железы, злокачественную опухоль надпочечника, саркому мягких тканей, злокачественную опухоль уретры, злокачественную опухоль пениса, хронический или острый лейкоз, включающий в себя острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфолейкоз, солидные опухоли у детей, лимфоцитарную лимфому, злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухоли ангиогенеза, злокачественную опухоль оси спинного мозга, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, вызванные окружающей средой злокачественные опухоли, включающие в себя индуцированные асбестом, и комбинации указанных видов злокачественных опухолей. Настоящее изобретение также применимо для лечения метастатических злокачественных опухолей, особенно метастатических злокачественных опухолей, которые экспрессируют PD-L1 (Iwai et al., *Int. Immunol.*, 17:133-144(2005)).

При желании, макроциклические пептиды к PD-L1 могут быть комбинированы с иммуногенным средством, таким как злокачественные клетки, очищенные опухолевые антигены (включающие в себя рекомбинантные белки, пептиды и углеводные молекулы), клетки и клетки, трансфицированные с генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al., *J. Immunol.*, 173:4919-4928 (2004)). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые могут быть использованы, включают в себя пеп-

тиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Тгр-2, MART1 и/или тирозиназа, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (обсуждается далее ниже).

Было показано, что в организме человека некоторые опухоли представляют собой иммуногенные, такие как меланомы. Предполагается, что за счет повышения порога активации Т-клеток путем блокады PD-L1, авторы настоящего изобретения могут ожидать активацию опухолевых ответов у хозяина.

PD-L1 блокада, вероятно, будет наиболее эффективной в сочетании с протоколом вакцинации. Были разработаны многие экспериментальные стратегии вакцинации против опухолей (смотрите Rosenberg, S., Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000); Logothetis, C, ASCO Educational Book Spring: 300-302 (2000); Khayat, D., ASCO Educational Book Spring: 414-428 (2000); Foon, K., ASCO Educational Book Spring: 730-738 (2000); смотрите также Restifo, N. et al., Cancer Vaccines, Chapter 61, pp. 3023-3043, in DeVita, V. et al., eds., Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition (1997)). Согласно одной из этих стратегий вакцину получают с использованием аутологичных или аллогенных клеток опухоли. Было показано, что эти клеточные вакцины наиболее эффективны, когда опухолевые клетки трансдуцированы, чтобы экспрессировать GM-CSF. GM-CSF, как было показано, представляет собой мощный активатор презентации антигена для вакцинации опухоли (Dranoff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 3539-3543 (1993)).

Изучение экспрессии генов и уровней экспрессии крупных генных структур в различных опухолях привело к определению так называемых опухолеспецифических антигенов (Rosenberg, S.A., Immunity, 10:281-287 (1999)). Во многих случаях эти опухолеспецифические антигены представляют собой антигены дифференцировки, экспрессированные в опухолях и в клетке, из которой возникла опухоль, например, антигены меланоцитов gp100, антигена MAGE и Тгр-2. Что еще более важно, может быть показано, что многие из этих антигенов представляют собой мишени опухолеспецифических Т-клеток, обнаруженных у хозяина. Блокада PD-L1 может быть использована в сочетании с набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессированных в опухоли, с целью получения иммунного ответа на эти белки. Эти белки, как правило, рассматриваются иммунной системой как собственные антигены и поэтому толерантны к ним. Опухолевый антиген может также включать в себя белок-теломеразу, который необходим для синтеза теломера хромосом и который экспрессируется более чем в 85% злокачественных опухолей человека и находится только в ограниченном числе соматических тканей (Kim, N. et al., Science, 266:2011-2013 (1994)). (Эти соматические ткани могут быть защищены от иммунной атаки различными способами). Опухолевый антиген может также представлять собой "неоантигены", экспрессированные в злокачественных клетках из-за соматических мутаций, которые изменяют белковую последовательность или создают слитые белки между двумя несвязанными последовательностями (т.е. bcr-abl в филадельфийской хромосоме) или идиотип из В-клеточных опухолей.

Другие противоопухолевые вакцины могут включать в себя белки от вирусов, вовлеченных в злокачественные опухоли человека, таких как вирусы папилломы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус герпеса саркомы Капоши (KHSV). Другая форма опухолеспецифического антигена, который может быть использован в сочетании с блокадой PD-L1, представляет собой очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные из самой ткани опухоли. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, и эти HSP высоко эффективны при доставке в антигенпрезентирующие клетки для вызова опухолевого иммунитета (Suot, R. et al., Science, 269:1585-1588 (1995); Tamura, Y. et al., Science, 278:117-120 (1997)).

Дендритные клетки (DC) представляют собой мощные антигенпрезентирующие клетки, которые могут быть использованы для запуска антигенспецифических ответов. DC могут быть произведены *ex vivo* и введены с различными белковыми и пептидными антигенами, а также опухолевыми клеточными экстрактами (Nestle, F. et al., Nat. Med., 4:328-332 (1998)). DC могут быть также трансдуцированы генетическими средствами, чтобы экспрессировать эти опухолевые антигены. DC были также слиты непосредственно с опухолевыми клетками для целей иммунизации (Kugler, A. et al., Nat. Med., 6:332-336 (2000)). В качестве способа вакцинации иммунизация DC может быть эффективной в сочетании с блокадой PD-L1, чтобы активировать более мощные противоопухолевые ответы.

Блокада PD-L1 может быть также объединена со стандартными способами лечения злокачественных опухолей. Блокада PD-L1 может быть эффективно объединена с химиотерапевтическими режимами. В этих случаях может быть возможным уменьшение дозы вводимого химиотерапевтического реагента (Mokyr, M. et al., Cancer Res., 58:5301-5304 (1998)). Пример такой комбинации представляет собой макроциклический пептид в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другой пример такой комбинации представляет собой макроциклический пептид в сочетании с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научное обоснование комбинированного применения блокады PD-L1 и химиотерапии заключается в том, что гибель клеток, которая представляет собой следствие цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна привести к повышенному содержанию опухолевого антигена в антигенпрезентирующем пути. Другие комбинированные способы лечения, которые могут приводить к синергии с блокадой PD-L1 через клеточную гибель, представляют собой излучение, хирургию и выключение эндокринной функции. Каждый из этих протоколов создает источник опухоле-

вого антигена в хозяине. Ингибиторы ангиогенеза можно также комбинировать с блокадой PD-L1. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, которые могут поддерживать опухолевый антиген в хозяйских антигенпрезентирующих путях.

Блокирующие PD-L1 макроциклические пептиды могут быть также использованы в сочетании с биспецифическими макроциклическими пептидами, которые направленно воздействуют на экспрессирующие рецепторы Fc-альфа или Fc-гамма эффекторные клетки на опухолевых клетках (смотрите, например, патенты США № 5922845 и 5837243). Биспецифические макроциклические пептиды могут быть использованы для нацеленного воздействия на два отдельных антигена. Например, биспецифические макроциклические пептиды к Fc-рецептору/к опухолевому антигену (например, Her-2/neu) были использованы для нацеленного воздействия макрофагами на сайты опухоли. Это нацеленное воздействие может более эффективно активировать опухолеспецифические ответы. Т-клеточное плечо этих реакций будет увеличено за счет использования блокады PD-L1. Альтернативно, антиген может быть доставлен непосредственно в DC с использованием биспецифических макроциклических пептидов, которые связываются с опухолевым антигеном и специфическим клеточным поверхностным маркером дендритных клеток.

Опухоли избегают иммунологического надзора с помощью большого разнообразия механизмов. Многие из этих механизмов могут быть преодолены путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые представляют собой иммуносупрессивные. Они включают в себя среди прочих TGF-beta (Kehrl, J. et al., *J. Exp. Med.*, 163:1037-1050 (1986)), IL-10 (Howard, M. et al., *Immunology Today*, 13:198-200 (1992)) и Fas-лиганд (Hahne, M. et al., *Science*, 274:1363-1365 (1996)). Макроциклические пептиды к каждой из этих структур могут быть использованы в сочетании с анти-PD-L1, чтобы противодействовать эффектам иммуносупрессивных средств и полезных противоопухолевых иммунных ответов хозяина.

Другие макроциклические пептиды, которые могут быть использованы, чтобы активировать иммунный отклик хозяина, могут быть использованы в комбинации с анти-PD-L1. Они включают в себя молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентацию антигена. Макроциклические пептиды к CD40 способны эффективно заменить Т-клеточную хелперную активность (Ridge, J. et al., *Nature*, 393:474-478 (1998)) и могут быть использованы в сочетании с антителами к PD-1 (Ito, N. et al., *Immunobiology*, 201(5):527-540 (2000)). Активация макроциклических пептидов к костимулирующим Т-клетки молекулам, таким как CTLA-4 (например, патент США № 5811097), OX-40 (Weinberg, A. et al., *Immunol.*, 164:2160-2169 (2000)), 4-1BB (Melero, I. et al., *Nat. Med.*, 3:682-685 (1997)) и ICOS (Hutloff, A. et al., *Nature*, 397:262-266 (1999)), может также предусматривать повышенные уровни активации Т-клеток.

Трансплантация костного мозга в настоящее время используется для лечения различных опухолей кроветворного происхождения. В то время как реакция трансплантат против хозяина представляет собой следствие такого лечения, может быть получен терапевтический эффект из реакций трансплантат против опухоли. Блокада PD-L1 может быть использована для повышения эффективности донорских привитых опухолеспецифических Т-клеток.

Существуют также несколько экспериментальных протоколов лечения, которые включают в себя активацию и расширение антигенспецифических Т-клеток *ex vivo* и адоптивный перенос этих клеток к реципиентам для воздействия антигенспецифическими Т-клетками против опухоли (Greenberg, R. et al., *Science*, 285:546-551 (1999)). Эти способы также могут быть использованы для активации Т-клеточных ответов на инфекционные патогены, такие как ЦМВ. Можно ожидать, что активация *ex vivo* в присутствии макроциклических пептидов увеличит частоту и активность адоптивно перенесенных Т-клеток.

Инфекционные заболевания

Другие способы согласно настоящему раскрытию использовались для лечения пациентов, которые были подвержены воздействию определенных токсинов или болезнетворных микроорганизмов. Соответственно, согласно еще одному аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, предусматривающий введение субъекту макроциклического пептида согласно настоящему изобретению, таким образом, что субъекта подвергают лечению от инфекционного заболевания.

Подобно ее применению к опухолям, как обсуждалось выше, блокада PD-L1 может быть использована отдельно или в качестве вспомогательного лекарственного средства в сочетании с вакцинами, чтобы стимулировать иммунный ответ на патогены, токсины и аутоантигены. Примеры патогенов, для которых этот терапевтический подход может быть особенно применим, включают в себя патогенные микроорганизмы, для которых в настоящее время нет эффективной вакцины, или патогены, для которых обычные вакцины менее чем полностью эффективны. Они включают в себя без ограничения ВИЧ, гепатиты (А, В и С), грипп, герпес, лямблию, малярию (Butler, N.S. et al., *Nature Immunology*, 13:188-195 (2012)); Hafalla, J.C.R., et al., *PLOS Pathogens* (February 2, 2012)), лейшманию, золотистый стафилококк, синегнойную палочку. Блокада PD-L1 особенно применима против установленных инфекций такими патогенами, как ВИЧ, который представляет измененные антигены в течение курса инфекций. Эти новые эпитопы распознаются как чужеродные в момент введения к человеческому PD-L1, таким образом, вызывая сильный ответ Т-клеток, которые не подавляются отрицательными сигналами через PD-L1.

Блокада PD-L1 может быть использована отдельно или в качестве вспомогательного лекарственного средства в сочетании с вакцинами, чтобы стимулировать иммунный ответ на патогены, токсины и аутоантигены. Примеры патогенов, для которых этот терапевтический подход может быть особенно применим, включают в себя патогенные микроорганизмы, для которых в настоящее время нет эффективной вакцины, или патогены, для которых обычные вакцины менее чем полностью эффективны. Они включают в себя без ограничения ВИЧ, гепатиты (А, В и С), грипп, герпес, лямблию, малярию (Butler, N.S. et al., *Nature Immunology*, 13:188-195 (2012); Hafalla, J.C.R., et al., *PLOS Pathogens* (February 2, 2012)), лейшманию, золотистый стафилококк, синегнойную палочку. Блокада PD-L1 особенно применима против установленных инфекций такими патогенами, как ВИЧ, который представляет измененные антигены в течение курса инфекций. Эти новые эпитопы распознаются как чужеродные в момент введения к человеческому PD-L1, таким образом, вызывая сильный ответ Т-клеток, которые не подавляются отрицательными сигналами через PD-L1.

Некоторые примеры вызывающих инфекции патогенных бактерий, которые можно лечить с помощью способов согласно настоящему раскрытию, включают в себя хламидиоз, риккетсиозные бактерии, микобактерии, стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки и гонококки, клебсиеллу, протей, серратию, *Pseudomonas*, легионеллу, бактерию дифтерии, сальмонеллу, микобактерии, бактерии холеры, столбняка, ботулизма, сибирской язвы, чумы, лептоспироза и болезни Лайма.

Некоторые примеры вызывающих инфекции патогенных грибов, излечимых способами согласно настоящему раскрытию, включают в себя *Candida* (*albicans*, *krusei*, *glabrata*, *tropicalis* и т.д.), *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (*fumigatus*, *niger*, и т.д.), род муковок (mucor, *absidia*, *rhizophus*), *Sporothrix schenkii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides Brasiliensis* *Coccidioides immitis* и *Histoplasma capsulatum*.

Некоторые примеры вызывающих инфекции патогенных паразитов, излечимых способами согласно настоящему раскрытию, включают в себя дизентерийную амёбу, *Balantidium coli*, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* sp., *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium* sp., *Pneumocystis carinii*, *Plasmodium vivax*, *Babesia microti*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* и *Nippostrongylus brasiliensis*.

Во всех вышеуказанных способах блокада PD-L1 может быть объединена с другими формами иммунотерапии, такими как воздействие цитокинами (например, интерферонами, средствами, нацелено действующими на активность VEGF или VEGF-рецепторы, GM-CSF, G-CSF, IL-2) или терапия биспецифическими антителами, которые предусматривают расширенную презентацию опухолевых антигенов (смотрите, например, Holliger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993); Poljak, *Structure*, 2:1121-1123(1994)).

Аутоиммунные реакции

Макроциклические пептиды могут провоцировать и усиливать аутоиммунные ответы. Действительно, индукция противоопухолевых ответов с использованием клеточных опухолей и пептидных вакцин показывает, что многие противоопухолевые ответы включают в себя аутоиммунные реактивности (депигментация, наблюдаемая в модифицированной анти-CTLA-4 + GM-CSF меланоме B 16 у van Elsas с соавт., выше; депигментации у вакцинированных Tgr-2 мышей (Overwijk, W. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:2982-2987 (1999)); аутоиммунный простатит, вызванный вакцинами опухолевых клеток TRAMP (Hurwitz, A., выше (2000)), вакцинация пептидными антигенами меланомы и витилиго, наблюдаемые в клинических испытаниях (Rosenberg, S.A. et al., *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.*, 19(1):81-84 (1996)).

Таким образом, можно считать, что с использованием анти-PD-L1 блокады в сочетании с различными аутобелками для того, чтобы разработать протоколы вакцинации для эффективного получения иммунного ответа против этих аутобелков для самостоятельного лечения заболевания. Например, болезнь Альцгеймера включает в себя нефизиологическое накопление пептида A.beta. в амилоидных отложениях в головном мозге; ответы антител против амилоида могут очистить эти отложения амилоида (Schenk et al., *Nature*, 400:173-177 (1999)).

Другие аутобелки также могут быть использованы в качестве мишеней, таких как IgE, для лечения аллергии и астмы, и TNF.alpha для ревматоидного артрита. Наконец, ответы антител на различные гормоны могут быть вызваны использованием макроциклов, раскрытых в настоящем документе. Нейтрализующие ответы антител на половые гормоны могут быть использованы для контрацепции. Нейтрализующие ответы антител на гормоны и другие растворимые факторы, которые необходимы для роста определенных опухолей, могут также рассматриваться как возможные мишени вакцинации.

Аналогичные способы, описанные выше для использования анти-PD-L1 макроциклов, могут быть использованы для индукции терапевтических аутоиммунных ответов для лечения пациентов, характеризующихся несоответствующим накоплением других аутоантигенов, таких как амилоидные отложения, включающие в себя A.beta. при болезни Альцгеймера, цитокины, такие как TNF.alpha., и IgE.

Вакцины

Макроциклические пептиды могут быть использованы, чтобы стимулировать антигенспецифические иммунные ответы на совместное введение макроцикла к PD-1 с представляющим интерес антиге-

ном (например, вакциной). Соответственно, согласно другому аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ усиления иммунного ответа на антиген у субъекта, предусматривающий введение субъекту: (I) антигена и (II) макроцикла к PD-1, таким образом, что иммунный ответ на антиген у субъекта усиливается. Антиген может представлять собой, например, опухолевый антиген, вирусный антиген, бактериальный антиген или антиген из патогенного микроорганизма. Неограничивающие примеры таких антигенов включают в себя те, которые обсуждались в предыдущих разделах, такие как опухолевые антигены (или опухолевые вакцины), описанные выше, или антигены из вирусов, бактерий или других патогенов, описанных выше.

Подходящие способы введения композиций (например, макроциклические пептиды, мультиспецифические и биспецифические молекулы и иммуноконъюгаты) согласно настоящему раскрытию *in vivo* и *in vitro* хорошо известны в настоящей области техники и могут быть выбраны обычным специалистом. Например, композиции могут быть введены путем инъекции (например, внутривенной или подкожной). Приемлемые дозы используемых молекул будут зависеть от возраста и веса субъекта и концентрации и/или состава композиции.

Как было описано ранее, макроциклические пептиды согласно настоящему изобретению могут быть введены совместно с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, например, цитотоксическим средством, радиотоксичным средством или иммуносупрессивным средством. Пептид может быть связан со средством (таким как иммунокомплекс) или может быть введен отдельно от средства. В последнем случае (раздельное введение) пептид может быть введен до, после или одновременно со средством или может вводиться совместно с другими известными способами лечения, например, противораковой терапией, например, излучением. Такие терапевтические средства включают в себя, среди прочего, противоопухолевые средства, такие как доксорубин (адриамицин), цисплатин, блеомицин сульфат, кармустин, хлорамбуцил, глутарин и циклофосфамид, гидроксимочевина, которые сами по себе представляют собой эффективные только при таком содержании, которое токсично или субтоксично для пациента. Цисплатин вводят внутривенно в количестве 100 мг/доза каждые четыре недели и адриамицин вводят внутривенно в количестве 60-75 мг/мл дозы один раз в 21 день. Совместное введение макроциклических пептидов согласно настоящему изобретению с химиотерапевтическими средствами обеспечивает два противораковых средства, которые действуют через разные механизмы, что приводит к цитотоксическому действию на опухолевые клетки человека. Такое совместное введение может решить проблемы, связанные с развитием устойчивости к лекарственным средствам или изменением антигенности опухолевых клеток, что позволит привести их к отсутствию реагирования с пептидами.

Также в объем настоящего изобретения входят наборы, содержащие композиции согласно настоящему раскрытию (например, макроциклические пептиды, биспецифические или мультиспецифические молекулы или иммуноконъюгаты) и инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный реагент или один или несколько дополнительных макроциклических пептидов согласно настоящему раскрытию (например, человеческое антитело, характеризующееся дополнительной активностью, которое связывается с эпитопом в антигене PD-L1, отличным от макроцикла). Наборы, как правило, включают в себя этикетку, указывающую на предполагаемое использование содержащего набора. Термин этикетка включает в себя любую надпись или записанный материал, поставляемый или с набором, или который иным образом входит в комплект поставки набора.

Комбинационная терапия

Комбинация макроциклических пептидов согласно настоящему изобретению с другим антагонистом PD-L1 и/или другого иммуномодулятора применима для усиления иммунного ответа против гиперпролиферативного заболевания. Например, эти молекулы могут быть введены в клетки в культуре, *in vitro* или *ex vivo*, или в субъектов-людей, например, *in vivo*, для повышения иммунитета в различных ситуациях. Соответственно, согласно одному аспекту в настоящем изобретении предусмотрен способ модификации иммунного ответа у субъекта, предусматривающий введение субъекту комбинации макроциклического пептида согласно настоящему раскрытию таким образом, что иммунный ответ у субъекта модифицируется. Предпочтительно, ответ усиливается, стимулируется или активируется. Согласно другому варианту осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ изменения нежелательных явлений, связанных с лечением гиперпролиферативного заболевания с иммуностимулирующим терапевтическим средством, предусматривающий введение субъекту макроциклического пептида согласно настоящему изобретению и субтерапевтической дозы другого иммуномодулятора.

Блокада PD-L1 с помощью макроциклических пептидов может усиливать иммунный ответ на злокачественные клетки у пациента. Злокачественные опухоли, чей рост можно ингибировать с помощью макроциклических пептидов согласно настоящему раскрытию, включают в себя злокачественные опухоли, как правило, реагирующие на иммунотерапию. Типичные примеры злокачественных опухолей для лечения с помощью комбинированной терапии согласно настоящему изобретению включают в себя меланому (например, злокачественную метастатическую меланому), злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль предстательной железы, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль толстой кишки и рак легких. Примеры других злокачественных заболеваний, которые можно лечить с использованием способов согласно настоящему изобретению, включают в себя рак кос-

тей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, злокачественную опухоль матки, злокачественную опухоль яичников, злокачественную опухоль толстой кишки, злокачественную опухоль прямой кишки, злокачественную опухоль анальной области, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль яичка, злокачественную опухоль матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль тонкой кишки, злокачественную опухоль эндокринной системы, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль паращитовидной железы, злокачественную опухоль надпочечника, саркому мягких тканей, злокачественную опухоль уретры, злокачественную опухоль пениса, хронический или острый лейкоз, включающий в себя острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфолейкоз, солидные опухоли у детей, лимфоцитарную лимфому, злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухоли ангиогенеза, злокачественную опухоль оси спинного мозга, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, вызванные окружающей средой злокачественные опухоли, включающие в себя индуцированные асбестом, и комбинации указанных видов злокачественных опухолей. Настоящее изобретение также применимо для лечения метастатических злокачественных опухолей.

Согласно некоторым вариантам осуществления комбинация терапевтических средств, содержащих по меньшей мере один обсуждаемый в настоящем документе макроциклический пептид, может вводиться одновременно в виде единой композиции в фармацевтически приемлемом носителе или одновременно в виде отдельных композиций, где каждое средство может быть введено последовательно. Например, второй иммуномодулятор и макроциклический пептид согласно настоящему изобретению могут быть введены последовательно, например, второй иммуномодулятор вводят первым, а макроциклический пептид - вторым или макроциклический пептид вводят первым, а вторым - второй иммуномодулятор. Кроме того, если более чем одну дозу комбинированной терапии вводят последовательно, порядок последовательного введения может быть изменен или сохраняться в том же порядке в каждый момент времени введения, последовательные введения могут комбинироваться с одновременными введениями или любыми их комбинациями. Например, первое введение второго иммуномодулятора и макроциклического пептида может быть одновременным, второе введение может быть последовательным с первым вторым иммуномодулятором и вторым макроциклическим пептидом и третье введение может быть последовательным с первым макроциклическим пептидом и вторым иммуномодулятором вторым и т.д. Другая репрезентативная схема дозирования может включать в себя первое введение, которое представляет собой последовательное с первым макроциклическим пептидом и вторым иммуномодулятором вторым, а последующие введения могут быть одновременными.

При желании, комбинация макроциклического пептида и второго иммуномодулятора может быть дополнительно объединена с иммуногенным средством, таким как злокачественные клетки, очищенные опухолевые антигены (включающие в себя рекомбинантные белки, пептиды и углеводные молекулы), клетки и клетки, трансфицированные с генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al., *J. Immunol*, 173:4919-4928 (2004)). Неограничивающие примеры опухолевых вакцин, которые могут быть использованы, включают в себя пептиды антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигенов MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназы, или опухолевые клетки, трансфицированные, чтобы экспрессировать цитокиновые GM-CSF (обсуждается далее ниже).

Комбинированная блокада макроциклическим пептидом PD-L1 и вторым иммуномодулятором может быть дополнительно объединена с протоколом вакцинации. Были разработаны многие экспериментальные стратегии вакцинации против опухолей (смотрите Rosenberg, S., *Development of Cancer Vaccines*, ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000); Logothetis, C, *ASCO Educational Book Spring*: 300-302 (2000); Khayat, D., *ASCO Educational Book Spring*: 414-428 (2000); Foon, K., *ASCO Educational Book Spring*: 730-738 (2000); смотрите также Restifo et al., *Cancer Vaccines*, Chapter 61, pp. 3023-3043 in DeVita et al., eds., *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Fifth Edition (1997)). Согласно одной из этих стратегий вакцину получают с использованием аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что эти клеточные вакцины наиболее эффективны, когда опухолевые клетки трансдуцируют, чтобы экспрессировать GM-CSF. GM-CSF, как было показано, представляет собой сильнодействующий активатор презентации антигена для опухолевой вакцинации (Dranoff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:3539-3543 (1993)).

Изучение экспрессии генов и уровней экспрессии крупных генных структур в различных опухолях привело к определению так называемых опухолеспецифических антигенов (Rosenberg, S.A., *Immunity*, 10:281-287 (1999)). Во многих случаях эти опухолеспецифические антигены представляют собой антигены дифференцировки, экспрессированные в опухолях и в клетке, из которой возникла опухоль, например, антигены меланоцитов gp100, антигены MAGE и Trp-2. Что еще более важно, может быть показано, что многие из этих антигенов представляют собой мишени опухолеспецифических Т-клеток, обнаружен-

ных у хозяина. Согласно некоторым вариантам осуществления комбинированные макроциклический пептид PD-L1 и второй иммуномодулятор могут быть использованы в сочетании с набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессированных в опухоли, с целью получения иммунного ответа на эти белки. Эти белки, как правило, рассматриваются иммунной системой как собственные антигены и поэтому толерантны к ним. Опухолевый антиген может также включать в себя белок-теломеразу, который необходим для синтеза теломер хромосом и который экспрессируется более чем в 85% злокачественных опухолей человека и находится только в ограниченном числе соматических тканей (Kim, N. et al., *Science*, 266:2011-2013 (1994)). (Эти соматические ткани могут быть защищены от иммунной атаки различными способами). Опухолевый антиген может также представлять собой "неоантигены", экспрессированные в злокачественных клетках из-за соматических мутаций, которые изменяют белковую последовательность или создают слитые белки между двумя несвязанными последовательностями (т.е., bcr-abl в филадельфийской хромосоме) или идиотип из В-клеточных опухолей.

Другие противоопухолевые вакцины могут включать в себя белки от вирусов, вовлеченных в злокачественные опухоли человека, таких как вирусы папилломы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус герпеса саркомы Капоши (KHSV). Другая форма опухолеспецифического антигена, который может быть использован в сочетании с блокадой макроциклическими пептидами PD-L1, представляет собой очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные из самой ткани опухоли. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, и эти HSP высоко эффективны при доставке в антигенпрезентирующие клетки для вызова опухолевого иммунитета (Suot, R. et al., *Science*, 269:1585-1588 (1995); Tamura, Y. et al., *Science*, 278:117-120 (1997)).

Дендритные клетки (DC) представляют собой мощные антигенпрезентирующие клетки, которые могут быть использованы для запуска антигенспецифических ответов. DC могут быть произведены *ex vivo* и введены с различными белковыми и пептидными антигенами, а также опухолевыми клеточными экстрактами (Nestle, F. et al., *Nat. Med.*, 4:328-332 (1998)). DC могут быть также трансдуцированы генетическими средствами, чтобы экспрессировать эти опухолевые антигены. DC были также слиты непосредственно с опухолевыми клетками для целей иммунизации (Kugler, A. et al., *Nat. Med.*, 6:332-336 (2000)). В качестве способа вакцинации иммунизация DC может быть эффективной в сочетании с комбинированными макроциклическим пептидом к PD-L1 и вторым иммуномодулятором, чтобы активировать более мощные противоопухолевые ответы.

Комбинированные макроциклический пептид к PD-L1 и дополнительный иммуномодулятор может быть дополнительно объединены со стандартными способами лечения злокачественных опухолей. Например, комбинация макроциклического пептида и второго иммуномодулятора может быть эффективно объединена с химиотерапевтическими режимами. В этих случаях, как это наблюдается с комбинацией макроциклического пептида и второго иммуномодулятора, может быть возможным уменьшение дозы другого химиотерапевтического реагента, вводимого с комбинацией согласно настоящему раскрытию (Mokyr, M. et al., *Cancer Res.*, 58:5301-5304 (1998)). Пример такой комбинации представляет собой комбинацию макроциклического пептида и второго иммуномодулятора в дополнительной комбинации с декорбазинном для лечения меланомы. Другой пример такой комбинации макроциклического пептида и второго иммуномодулятора представляет собой дополнительную комбинацию с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научное обоснование комбинированного применения макроциклического пептида PD-L1 и другого иммуномодулятора с химиотерапией заключается в том, что гибель клеток, которая представляет собой следствие цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить к повышенному содержанию опухолевого антигена в антигенпрезентирующем пути. Другие комбинированные способы лечения, которые могут приводить к синергии с комбинированными макроциклическим пептидом к PD-L1 и дополнительным иммуномодулятором через клеточную гибель, представляют собой излучение, хирургию и выключение эндокринной функции. Каждый из этих протоколов создает источник опухолевого антигена в хозяине. Ингибиторы ангиогенеза можно также комбинировать с комбинированными PD-L1 и вторым иммуномодулятором. Ингибирование ангиогенеза приводит к гибели опухолевых клеток, которые могут представлять собой источник опухолевого антигена в хозяйских антигенпрезентирующих путях.

Комбинация PD-L1 и другого иммуномодулятора может быть также использована в сочетании с биспецифическими макроциклическими пептидами, которые направленно воздействуют на экспрессирующие рецепторы Fc-альфа или Fc-гамма эффекторные клетки на опухолевых клетках (смотрите, например, патенты США № 5922845 и 5837243). Биспецифические макроциклические пептиды могут быть использованы для нацеленного воздействия на два отдельных антигена. Например, биспецифические макроциклические пептиды к Fc-рецепторам/к опухолевым антигенам (например, Her-2/neu) были использованы для нацеленного воздействия макрофагами на сайты опухоли. Это нацеленное воздействие может более эффективно активировать опухолеспецифические ответы. Т-клеточное плечо этих реакций будет увеличено за счет использования комбинированных PD-L1 и второго иммуномодулятора. Альтернативно, антиген может быть доставлен непосредственно в DC с использованием биспецифических макроциклических пептидов, которые связываются с опухолевым антигеном и специфическим клеточным поверхностным маркером дендритных клеток.

В другом примере комбинация макроциклического пептида и второго иммуномодулятора может быть использована в сочетании с противоопухолевыми макроциклическими средствами, такими как RITUXAN® (ритуксимаб), HERCEPTIN® (трастузумаб), BEXXAR® (тозитумомаб), ZEVALIN® (ибритумомаб), CAMPATH® (алемтузумаб), Lymphocide (эпратузумаб), AVASTIN® (бевацизумаб) и TARCEVA® (эрлотиниб) и т.п. В качестве примера и без желания быть связанными какой-либо теорией лечение антителом к злокачественной опухоли или конъюгированным с токсином антителом к злокачественной опухоли может привести к гибели клеток злокачественной опухоли (например, опухолевых клеток), которые будут усиливать иммунный ответ, опосредованный вторым иммуномодулятором-мишенью или PD-L1. Согласно иллюстративному варианту осуществления лечение гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли) может включать в себя антитело к злокачественной опухоли в комбинации с макроциклическим пептидом и вторым иммуномодулятором, одновременно или последовательно, или любой их комбинации, которая может усиливать противоопухолевые иммунные ответы хозяином.

Опухоли избегают иммунологического надзора с помощью большого разнообразия механизмов. Многие из этих механизмов могут быть преодолены путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые представляют собой иммуносупрессивные. Они включают в себя среди прочих TGF-бета (Kehrl, J. et al., *J. Exp. Med.*, 163:1037-1050 (1986)), IL-10 (Howard, M. et al., *Immunology Today*, 13:198-200 (1992)) и Fas-лиганд (Hahne, M. et al., *Science*, 274:1363-1365 (1996)). В другом примере антитела к каждой из этих структур могут быть дополнительно объединены с комбинацией макроциклического пептида и другого иммуномодулятора, чтобы противодействовать эффектам иммуносупрессивных средств и полезных противоопухолевых иммунных ответов хозяина.

Другие средства, которые могут быть использованы, чтобы активировать иммунный отклик хозяина, могут быть дополнительно использованы в комбинации с макроциклическим пептидом согласно настоящему изобретению. Они включают в себя молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентацию антигена. Макроциклические пептиды к CD40 способны эффективно заменить Т-клеточную хелперную активность (Ridge, J. et al., *Nature*, 393:474-478 (1998)) и могут быть использованы в сочетании с макроциклическими пептидами согласно настоящему изобретению либо отдельно, либо в сочетании с анти-CTLA-4 (Ito, N. et al., *Immunobiology*, 201(5):527-540 (2000)). Активация макроциклических пептидов к костимулирующим Т-клетки молекулам, таким как OX-40 (Weinberg, A. et al., *Immunol.*, 164:2160-2169 (2000)), 4-1BB (Melero, I. et al., *Nat. Med.*, 3:682-685 (1997)) и ICOS (Hutloff, A. et al., *Nature*, 397:262-266 (1999)) может также предусматривать повышенные уровни активации Т-клеток.

Трансплантация костного мозга в настоящее время используется для лечения различных опухолей кроветворного происхождения. В то время как реакция трансплантат против хозяина представляет собой следствие такого лечения, может быть получен терапевтический эффект из реакций трансплантат против опухоли. Макроциклический пептид согласно настоящему изобретению либо отдельно, либо в комбинации с другим иммуномодулятором, может быть использован для повышения эффективности донорских привитых опухолеспецифических Т-клеток.

Существуют также несколько экспериментальных протоколов лечения, которые включают в себя активацию и расширение антигенспецифических Т-клеток *ex vivo* и адоптивный перенос этих клеток к реципиентам для воздействия антигенспецифическими Т-клетками против опухоли (Greenberg, R. et al., *Science*, 285:546-551 (1999)). Эти способы также могут быть использованы для активации Т-клеточных ответов на инфекционные патогены, такие как ЦМВ. Можно ожидать, что активация *ex vivo* в присутствии макроциклического пептида согласно настоящему изобретению либо отдельно, либо в комбинации с другим иммуномодулятором, увеличит частоту и активность адоптивно перенесенных Т-клеток.

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ изменения неблагоприятного явления, связанного с лечением гиперпролиферативного заболевания с иммуностимулирующим средством, предусматривающий введение макроциклического пептида согласно настоящему изобретению в комбинации с субтерапевтической дозой другого иммуномодулятора субъекту. Например, способы согласно настоящему изобретению предусматривают способ снижения заболеваемости индуцированного иммуностимулирующим терапевтическим антителом колита или диареи путем введения невсасывающегося стероида пациенту. Поскольку любой пациент, который получит иммуностимулирующее терапевтическое антитело, будет подвержен риску развития колита или диареи, вызванной таким лечением, вся эта популяция пациентов подходит для терапии в соответствии со способами согласно настоящему изобретению. Хотя стероиды были введены для лечения воспалительного заболевания кишечника (IBD) и предотвращения обострений IBD, они не были использованы для предотвращения (снижения частоты) IBD у пациентов, у которых не была диагностирована IBD.

Значительные побочные эффекты, связанные со стероидами, даже невсасывающимися стероидами, характеризуются рекомендуемым профилактическим применением.

Согласно другим вариантам осуществления макроциклический пептид согласно настоящему изобретению либо отдельно, либо в комбинации с другим иммуномодулятором, может быть дополнительно

объединен с использованием любого невосасывающегося стероида. Используемый в настоящем документе термин "невсасывающийся стероид" представляет собой глюкокортикоид, который проявляет обширный пресистемный метаболизм такой, что после метаболизма в печени, биодоступность стероида становится низкой, т.е. менее чем приблизительно 20%. Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения невосасывающийся стероид представляет собой будесонид. Будесонид представляет собой локально действующий глюкокортикостероид, который интенсивно метаболизируется, главным образом, в печени, после перорального введения. ENTOCORT® EC (Astra-Zeneca) представляет собой pH-зависимый и зависимый от времени пероральный состав будесонида, разработанный с целью оптимизации доставки лекарственного средства к подвздошной кишке и к толстой кишке. ENTOCORT® EC одобрен в США для лечения болезни Крона от легкой до умеренной степени с вовлечением подвздошной кишки и/или восходящей кишки. Обычная пероральная доза ENTOCORT® EC для лечения болезни Крона составляет от 6 до 9 мг/день. ENTOCORT® EC высвобождается в кишечнике, прежде чем всасывается и сохраняется в слизистой кишечника. После того, как он проходит через слизистую кишечника ткань-мишень, ENTOCORT® EC интенсивно метаболизируется системой цитохрома P450 в печени до метаболитов с незначительной глюкокортикоидной активностью. Таким образом, биодоступность его низкая (приблизительно 10%). Низкая биодоступность будесонида приводит к улучшенному терапевтическому отношению, по сравнению с другими глюкокортикоидами с менее обширным пресистемным метаболизмом. Будесонид приводит к меньшему количеству неблагоприятных явлений, включающих в себя меньшую гипоталамо-гипофизарную супрессию, чем системно-действующие кортикостероиды. Тем не менее, продолжительное введение ENTOCORT® EC может привести к системным эффектам глюкокортикоидов, таких как гиперкортицизм и подавление функции надпочечников. Смотрите Physicians' Desk Reference Supplement, 58th Edition, 608-610 (2004).

Согласно дополнительным вариантам осуществления комбинация PD-L1 и другого иммуномодулятора в сочетании с невосасывающимся стероидом может быть дополнительно объединена с салицилатом. Салицилаты включают в себя средства 5-ASA, такие как, например: сульфасалазин (AZULFIDINE®, Pharmacia & Upjohn); олсалазин (DIPENTUM®, Pharmacia & Upjohn); балсалазид (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.) и месаламин (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

Дозировка и состав

Подходящий пептид формулы I или, более конкретно, описанный в настоящем документе макроциклический пептид может быть введен пациентам для лечения сахарного диабета и других связанных с ним заболеваний как одно соединение или в смеси с приемлемым носителем в виде фармацевтических составов. Специалисты в настоящей области техники лечения сахарного диабета могут легко определить дозу и путь введения соединения нуждающимся в таком лечении млекопитающим, включающим в себя человека. Путь введения может включать в себя без ограничения пероральное, интраоральное, ректальное, трансдермальное, буккальное, интраназальное, легочное, подкожное, внутримышечное, внутрикожное, сублингвальное, внутрикишечное, интраокулярное, внутривенное или кишечное введение. Соединение составляют в соответствии с путем введения на основании приемлемой фармацевтической практики (Fingl et al., in *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Chapter 1, p. 1 (1975); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)).

Описанные в настоящем документе фармацевтически приемлемые пептидные композиции могут быть введены в различных лекарственных формах, таких как таблетки, капсулы (каждая из которых включает в себя составы с замедленным высвобождением или с запланированным по времени высвобождением), пилюли, порошки, гранулы, эликсиры, гели *in situ*, микросферы, кристаллические комплексы, липосомы, микроэмульсии, настойки, суспензии, сиропы, аэрозоли и эмульсии. Описанные в настоящем документе композиции могут быть также введены в пероральной, внутривенной (болюсной или инфузионной), внутривенной, подкожной, трансдермальной или внутримышечной форме, все используемые лекарственные формы хорошо известны специалистам в настоящей области фармацевтики. Композиции могут быть введены отдельно, но, как правило, их вводят с фармацевтическим носителем, выбранным на основе избранного пути введения и стандартной фармацевтической практики.

Режим дозирования для описанных в настоящем документе композиций будет конечно, варьировать в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические характеристики конкретного средства и его режима и пути введения; вида, возраста, пола, состояния здоровья, состояния и веса реципиента; природы и степени симптомов; вида сопутствующего лечения; частоты лечения; пути введения, функции почек и печени пациента и желаемого эффекта. Врач или ветеринар может определить и прописать эффективное количество лекарственного средства, необходимого для предупреждения, борьбы или остановки прогрессирования патологического состояния.

В качестве общего руководства, суточная пероральная доза активного ингредиента при использовании для указанных эффектов будет варьировать от приблизительно 0,001 до 1000 мг/кг массы тела, предпочтительно от приблизительно 0,01 до 100 мг/кг массы тела в день и наиболее предпочтительно от приблизительно 0,6 до 20 мг/кг/день. При внутривенном введении суточная доза активного ингредиента при

использовании для указанных эффектов будет находиться в диапазоне от 0,001 нг до 100,0 нг в минуту/кг массы тела в течение инфузии с постоянной скоростью. Такую постоянную внутривенную инфузию может быть предпочтительно вводить со скоростью от 0,01 нг до 50 нг в минуту на кг массы тела и наиболее предпочтительно от 0,01 нг до 10,0 мг в минуту на кг массы тела. Описанные в настоящем документе композиции могут быть введены в виде одной суточной дозы или общая суточная доза может быть введена в виде отдельных доз два, три или четыре раза в день. Описанные в настоящем документе композиции могут быть также введены с помощью состава-депо, что сделает возможным замедленное высвобождение лекарственного средства в течение дней/недель/месяцев по желанию.

Описанные в настоящем документе композиции могут быть введены в интраназальной форме посредством местного применения подходящих интраназальных наполнителей или трансдермальных маршротов с использованием трансдермальных кожных пластырей. При введении в форме трансдермальной системы доставки введение дозы будет, конечно, непрерывным, а не прерывистым на протяжении режима дозирования.

Композицию, как правило, вводят в смеси с подходящими фармацевтическими разбавителями, вспомогательными веществами или носителями (вместе называемыми в настоящем документе фармацевтические носители), выбранными в отношении предполагаемой формы введения, то есть, пероральные таблетки, капсулы, эликсиры, аэрозоли, полученные с или без пропеллента и сиропов, и в соответствии с обычной фармацевтической практикой.

Например, для перорального введения в виде таблетки или капсулы активный компонент лекарственного средства может быть объединен с пероральным, нетоксичным, фармацевтически приемлемым, инертным носителем, таким как без ограничения лактоза, крахмал, сахароза, глюкоза, метилцеллюлоза, стеарат магния, дикальций фосфат, сульфат кальция, маннит, сорбит; для перорального введения в жидкой форме пероральные лекарственные компоненты могут быть объединены с любым пероральным, нетоксичным, фармацевтически приемлемым инертным носителем, таким как без ограничения этанол, глицерин и вода. Кроме того, при желании или необходимости подходящие связующие, смазки, разрыхлители и красители также могут быть включены в смесь. Подходящие связующие вещества включают в себя без ограничения крахмал, желатин, природные сахара, такие как без ограничения глюкоза или бета-лактоза, кукурузные подсластители, природные и синтетические камеди, такие как аравийская камедь, трагакант или альгинат натрия, карбоксиметилцеллюлоза, полиэтиленгликоль и воски. Смазочные вещества, используемые в этих лекарственных формах, включают в себя олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия и хлорид натрия. Разрыхлители включают в себя без ограничения крахмал, метилцеллюлозу, агар, бентонит и ксантановую камедь.

Описанные в настоящем документе композиции могут быть также введены в форме смешанных мицеллярных или липосомных систем доставки, таких как небольшие однослойные везикулы, большие однослойные везикулы и многослойные везикулы. Липосомы могут быть образованы из различных фосфолипидов, таких как холестерин, стеариламин или фосфатидилхолина. Могут быть добавлены усилители проницаемости для повышения всасываемости лекарственных средств.

Поскольку известно, что пролекарства повышают многочисленные желательные качества фармацевтических препаратов (например, растворимость, биодоступность, производство и т.д.), описанные в настоящем документе соединения могут быть доставлены в форме пролекарств. Таким образом, описанный в настоящем документе объект изобретения охватывает пролекарства заявленных в настоящем изобретении соединений, способы их доставки и содержащие их же композиции.

Описанные в настоящем документе композиции также могут быть соединены с растворимыми полимерами в качестве нацеленно воздействующих носителей лекарственного средства. Такие полимеры могут включать в себя поливинилпирролидон, сополимер пирана, полигидроксипропилметакриламидфенол, полигидроксиэтиласпартамидфенол или полиэтиленоксидполилизин, замещенный остатками пальмитоила. Кроме того, описанные в настоящем документе композиции могут быть объединены с классом биоразлагаемых полимеров, применимых для достижения контролируемого высвобождения лекарственного средства, например полимолочной кислотой, полигликолевой кислотой, сополимером полимолочной и полигликолевой кислоты, полиэпсилонкапролактоном, полигидроксимасляной кислотой, полиортоэфирами, полиацеталями, полидигидропиранами, полицианоцилатами и сшитыми или амфипатическими блок-сополимерами гидрогелей.

Пригодные для введения лекарственные формы (фармацевтические составы) могут содержать от приблизительно 0,01 миллиграмма до приблизительно 500 мг активного ингредиента на дозированную единицу. В этих фармацевтических композициях активный ингредиент будет, как правило, присутствовать в количестве приблизительно 0,5-95 % по массе в расчете на общую массу композиции.

Желатиновые капсулы могут содержать активный ингредиент и порошкообразные носители, такие как лактозу, крахмал, производное целлюлозы, стеарат магния и стеариновую кислоту. Подобные разбавители могут быть использованы для получения прессованных таблеток. Как таблетки, так и капсулы могут быть изготовлены в виде продуктов с замедленным высвобождением для обеспечения непрерывного высвобождения лекарства в течение периода в несколько часов. Прессованные таблетки могут быть покрыты сахаром или пленкой, чтобы замаскировать неприятный вкус и защитить таблетку от атмосферы.

ры, или покрыты энтеросолюбивой оболочкой для селективного разрушения в желудочно-кишечном тракте.

Жидкие лекарственные формы для перорального введения могут содержать красители и ароматизаторы, чтобы повысить положительное отношение пациента.

В общем, вода, подходящее масло, солевой раствор, водный раствор декстрозы (глюкозы) и растворы родственных Сахаров и гликолей, таких как пропиленгликоль или полиэтиленгликоли, представляют собой подходящие носители для парентеральных растворов. Раствор для парентерального введения, предпочтительно, содержит водорастворимую соль активного ингредиента, подходящие стабилизирующие средства и, если необходимо, буферные вещества. Антиокислительные средства, такие как бисульфит натрия, сульфит натрия или аскорбиновая кислота, либо отдельно, либо в комбинации, представляют собой подходящие стабилизирующие средства. Также использовали лимонную кислоту и ее соли и натрий ЭДТА. Кроме того, парентеральные растворы могут содержать консерванты, такие как хлорид бензалкония, метил- или пропилпарабен и хлорбутанол.

Подходящие фармацевтические носители описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Edition, Mack Publishing Company (1995), стандартном тексте ссылки в настоящей области.

Репрезентативные применимые фармацевтические лекарственные формы для введения описанных в настоящем документе соединений могут быть проиллюстрированы следующим образом.

Капсулы

Большое количество унифицированных капсул можно получить путем заполнения стандартных твердых желатиновых капсул из двух частей порошкообразным активным ингредиентом в количестве 100 мг, лактозой в количестве 150 мг, целлюлозой в количестве 50 мг и стеаратом магния в количестве 6 мг.

Мягкие желатиновые капсулы

Смесь активного ингредиента в расщепляемом масле, таком как соевое масло, хлопковое масло или оливковое масло, может быть получена и введена с помощью насоса вытесняющего действия в желатин с образованием мягких желатиновых капсул, содержащих 100 мг активного ингредиента. Капсулы следует промыть и высушить.

Таблетки

Таблетки могут быть получены традиционными способами таким образом, что единица дозирования, например, представляет собой 100 мг активного ингредиента, 0,2 мг коллоидного диоксида кремния, 5 мг стеарата магния, 275 мг микрокристаллической целлюлозы, 11 мг крахмала и 98,8 мг лактозы. Могут быть нанесены соответствующие покрытия для повышения вкусовой привлекательности или задержки всасывания.

Инъекционные лекарственные формы

Инъецируемый состав описанной в настоящем документе пептидной композиции может требовать или не требовать использования вспомогательных веществ, таких как те, которые были допущены к применению в клинической практике регулирующими органами. Эти вспомогательные вещества включают в себя без ограничения растворители и соразтворители, солюбилизующие средства, эмульгаторы или загустители, хелатирующие средства, антиоксиданты и восстановители, антимикробные консерванты, буферы и регулирующие pH средства, объемобразующие средства, защитные средства и средства, поддерживающие изотоничность и специальные добавки. Инъецируемый состав должен быть стерильным, без пирогенов, а в случае растворов, свободным от твердых частиц.

Парентеральная композиция, пригодная для введения путем инъекции, может быть получена путем перемешивания, например, 1,5% по весу активного ингредиента в фармацевтически приемлемом буфере, который может или может не содержать соразтворитель или другое вспомогательное вещество. Раствор должен быть приготовлен изотонически с хлоридом натрия и простерилизован.

Суспензия

Водную суспензию можно приготовить для перорального и/или парентерального введения, таким образом, что, например, каждые 5 мл содержат 100 мг тонкоизмельченного активного ингредиента, 20 мг натрий-карбоксиметилцеллюлозы, 5 мг бензоата натрия, 1,0 г раствора сорбитола, U.S.P. и 0,025 мл ванилина или другого приемлемого ароматизатора.

Биоразлагаемые микрочастицы

Парентеральная композиция с замедленным высвобождением, пригодная для введения путем инъекции, может быть получена, например, путем растворения подходящего биоразлагаемого полимера в растворителе, добавления к полимерному раствору активного средства для включения и удаления растворителя из матрицы, тем самым образуя матрицу полимера с активным средством, распределенным по всей матрице.

Синтез пептидов

Описание настоящего изобретения следует толковать в соответствии с законами и принципами химического связывания. Следует понимать, что соединения, которые включены в настоящее изобретение, являются такими, которые подходящим образом стабильны для применения в качестве фармацевтиче-

ского средства. Специалисту настоящей области техники будет известно, что соединения будут и не будут стабильными на основе общих принципов химического связывания и стабильности.

Химический синтез макроциклического пептида согласно настоящему изобретению может быть проведен с использованием различных известных в настоящей области способов, включающих в себя ступенчатый твердофазный синтез, полусинтез через конформационно-обусловленное повторное лигирование пептидных фрагментов, ферментативного лигирования клонированных или синтетических пептидных сегментов, а также химического лигирования. Предпочтительный способ синтеза описанных в настоящем документе макроциклических пептидов и их аналогов представляет собой химический синтез с использованием различных твердофазных методик, такие как методики, описанные в Chan, W.C. et al., eds., *Fmoc Solid Phase Synthesis*, Oxford University Press, Oxford (2000); Barany, G. et al., *Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 2: "Special Methods in Peptide Synthesis, Part A", pp. 3-284, Gross, E. et al., eds., Academic Press, New York (1980) и в Stewart, J.M. et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, 2nd Edition, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984). Предпочтительная стратегия основана на использовании группы Fmoc (9-флуоренилметилоксикарбонил) для временной защиты α -аминогруппы в сочетании с использованием трет-бутильной группы для временной защиты боковых цепей аминокислот (см., например, Atherton, E. et al., "The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group", in *Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 9: "Special Methods in Peptide Synthesis, Part C", pp. 1-38, Udenfriend, S. et al., eds., Academic Press, San Diego (1987).

Пептиды могут быть синтезированы поэтапно на нерастворимой полимерной подложке (также называемой "смолой"), начиная с С-конца пептида. Синтез начинается с присоединения С-концевой аминокислоты пептида к смоле посредством образования амидной или сложноэфирной связи. Это делает возможным высвобождение в конечном итоге полученного пептида в виде С-концевого амида или карбоновой кислоты, соответственно.

Требуется, чтобы С-концевая аминокислота и все другие используемые в синтезе аминокислоты сохраняли свои α -аминогруппы и функциональные боковые цепи (при наличии) защищенными различным образом так, чтобы α -амино-защитная группа могла быть селективно удалена в процессе синтеза. Присоединение аминокислоты выполняется посредством активации ее карбоксильной группы в виде активного сложного эфира и ее реакции с лишенной защиты α -аминогруппой N-концевой аминокислоты, прикрепленной к смоле. Последовательность удаления защиты с α -аминогруппы и присоединения повторяют до тех пор, пока не будет собрана полная последовательность пептида. Затем, пептид отщепляют от смолы с одновременным удалением защитных групп с функциональных боковых цепей, как правило, в присутствии соответствующих акцепторов, чтобы ограничить побочные реакции. Полученный пептид окончательно очищают с помощью обращенно-фазовой HPLC.

В синтезе пептидил-смог, необходимых в качестве предшественников конечных пептидов, использовали коммерчески доступные шитые полистироловые полимерные смолы (Novabiochem, San Diego, CA; Applied Biosystems, Foster City, CA). Предпочтительные твердые подложки для С-концевых карбоксамидов представляют собой: 4-(2',4'-диметоксифенил-Fmoc-аминометил)феноксиацетил-пара-метилбензгидриламино-смолу (амидная MBHA-смола Rink); смолу 9-Fmoc-аминоксантен-3-илокси-Merrifield (амидная смола Sieber); смолу 4-(9-Fmoc)аминометил-3,5-диметоксифеноксивалериламинометил-Merrifield (смола PAL). Присоединение первой к последующим аминокислотам может быть осуществлено с использованием активных сложных эфиров HOBT, 6-Cl-HOBT или HOAt, полученных из DIC/HOBT, NBTU/HOBT, BOP, PyBOP, или из DIC/6-Cl-HOBT, HCTU, DIC/HOAt или NATU, соответственно. Предпочтительные твердые носители для защищенных пептидных фрагментов представляют собой: 2-хлортритилхлоридную смолу и смолу 9-Fmoc-аминоксантен-3-илокси-Merrifield (амидную смолу Sieber). Нанесение первой аминокислоты на 2-хлортритилхлоридную смолу лучше всего достигается путем осуществления взаимодействия Fmoc-защищенной аминокислоты со смолой в дихлорметане и DIEA. При необходимости, с целью облегчить растворение аминокислоты, может быть добавлено небольшое количество DMF.

Синтез описанных в настоящем документе пептидных аналогов может быть осуществлен с использованием одноканального или многоканального синтезатора пептидов, такого как синтезатор SEM Liberty Microwave или синтезатор Prelude (6 каналов) или Symphony (12 каналов) производства Protein Technologies, Inc.

Предшественники пептидил-смог для соответствующих пептидов могут быть расщеплены и лишены защиты с использованием любой стандартной методики (см., например, King, D.S. et al., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 36:255-266 (1990)). Целевой способ заключается в использовании в качестве акцепторов TFA в присутствии воды и TIS. Как правило, пептидил-смолу перемешивают в TFA/вода/TIS (94:3:3, объемное соотношение; 1 мл на 100 мг пептидил-смог) в течение 2-6 ч при комнатной температуре. Отработанную смолу затем отфильтровывают, а TFA раствор концентрируют или сушат в условиях пониженного давления. Полученный неочищенный пептид либо осаждают, либо промывают Et_2O и повторно растворяют непосредственно в DMSO или 50% водном растворе уксусной кислоты для очистки методом препаративной HPLC.

Пептиды с требуемой чистотой могут быть получены путем очистки с использованием препаративной HPLC, например, на жидкостном хроматографе Waters Model 4000 или Shimadzu Model LC-8A. Раствор неочищенного пептида наносят на колонку YMC S5 ODS (20×100 мм) и элюируют линейным градиентом MeCN в воде, забуференным 0,1% TFA, при скорости потока 14-20 мл/мин с контролем выходящего потока по УФ-поглощению при 220 нм. Структуры очищенных пептидов могут быть подтверждены методом MS-анализа с ионизацией электростатическим распылением.

Примеры

Используемые в настоящей заявке сокращения, особенно включенные в следующие иллюстративные схемы и примеры, являются хорошо известными специалистам настоящей области техники. Некоторые используемые сокращения являются следующими: HOBt - гидроксibenзотриазол; HBTU - O-(бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурия гексафторфосфат; BOP - бензотриазол-1-илокси-трис(диметиламино)фосфония гексафторфосфат; PyBOP - (бензотриазол-1-илокси)трипирролидинофосфония гексафторфосфат; HCTU - O-(6-Cl-1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурийгексафторфосфат; TFA - трифторуксусная кислота; TIS - триизопропилсилан; DMSO - диметилсульфоксид; MeCN или ACN - ацетонитрил; DCM 1,1-дихлорметан; DIEA или DIPEA - диизопропилэтиламин; Fmoc - 9-флуоренилметилоксикарбонил; NMM - N-метилморфолин; NMP - N-метилпирролидинон; Ac - ацетил и Et - этил.

Данные анализа

Масс-спектрометрия: "ESI-MS(+)" означает масс-спектрометрию с ионизацией электростатическим распылением, проводимую в режиме регистрации положительно-заряженных ионов; "ESI-MS(-)" означает масс-спектрометрию с ионизацией электростатическим распылением, проводимую в режиме регистрации отрицательно-заряженных ионов; "ESI-HRMS(+)" означает высокоэффективную масс-спектрометрию с ионизацией электростатическим распылением, проводимую в режиме регистрации положительно-заряженных ионов; "ESI-HRMS(-)" означает высокоэффективную масс-спектрометрию с ионизацией электростатическим распылением, проводимую в режиме регистрации отрицательно-заряженных ионов. Обнаруженные массы приводят после условного обозначения "m/z". Соединения с точными массами более 1000 часто определяют как двухзарядные или трехзарядные ионы.

Условия А проведения LCMS-анализа:

Колонка: VEN C18, 2,1×50 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: вода с 0,05% TFA; подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,05% TFA; температура: 50°C; градиент: 2% В - 98% В в течение 2 мин, затем выдерживание в течение 0,5 мин при 98% В; поток: 0,8 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм.

Условия В проведения LCMS-анализа:

Колонка: VEN C18, 2,1×50 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,05% TFA; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,05% TFA; температура: 50°C; градиент: 0-100% В в течение 3 мин, затем выдерживание в течение 0,75 мин при 100% В; поток: 1,11 мл/мин.

Условия С проведения LCMS-анализа:

Колонка: VEN C18, 2,1×50 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: вода с 0,2% муравьиной кислотой и 0,01% TFA; подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,2% муравьиной кислотой и 0,01% TFA; температура: 50°C; градиент: 2% В - 80% В в течение 2 мин, 80% В - 98% В в течение 0,1 мин, затем выдерживание в течение 0,5 мин при 98% В; поток: 0,8 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм.

Условия D проведения LCMS-анализа:

Колонка: Waters Acquity UPLC VEN C18, 2,1×50 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; температура: 50°C; градиент: 0-100% В в течение 3 мин, затем выдерживание в течение 0,75 мин при 100% В; поток: 1,11 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм.

Условия E проведения LCMS-анализа:

Колонка: Waters Acquity UPLC VEN C18, 2,1×50 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; температура: 50°C; градиент: 0-100% В в течение 3 мин, затем выдерживание в течение 0,75 мин при 100% В; поток: 1,11 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм.

Условия F проведения LCMS-анализа:

Колонка: Waters Xbridge C18, 2,1×50 мм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; температура: 35°C; градиент: 0-100% В в течение 4 мин, затем выдерживание в течение 1 мин при 100% В; поток: 4 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм.

Условия G проведения LCMS-анализа:

Масс-спектрометр Finnigan LTQ; колонка: Phenomenex Jupiter C4, 1×50 мм; подвижная фаза А: 1% муравьиной кислоты в воде; подвижная фаза В: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле; температура: 30°C; градиент: 1% В, выдерживание в течение 1 мин; 1-95% В в течение 3 мин, затем выдерживание в течение 3 мин при 95% В; поток: 0,15 мл/мин.

Условия H проведения LCMS-анализа:

Колонка: Waters ВЕН С18, 2,0×50 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; температура: 50°C; градиент: 0-100% В в течение 3 мин, затем выдерживание в течение 0,5 мин при 100% В; поток: 1,0 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм.

Условия I проведения LCMS-анализа:

Колонка: Waters ВЕН С18, 2,0×50 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; температура: 50°C; градиент: 0-100% В в течение 3 мин, затем выдерживание в течение 0,5 мин при 100% В; поток: 0,5 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм.

Условия А проведения HPLC-анализа:

Колонка: YMC Pack ODS-AQ 3 мкм, 150×4,6 мм; подвижная фаза А: вода с 0,1% TFA; подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,1% TFA; температура: 60°C; градиент: от 35% В до 80% В в течение 25 мин; поток: 1 мл/мин; обнаружение: УФ при 217 нм.

Условия В проведения HPLC-анализа:

Колонка: YMC Pack ODS-AQ 3 мкм, 150×4,6 мм; подвижная фаза А: вода с 0,1% TFA; подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,1% TFA; температура: 60°C; градиент: от 25% В до 75% В в течение 25 мин; поток: 1 мл/мин; обнаружение: УФ при 217 нм.

Условия С проведения HPLC-анализа:

Колонка: YMC Pack ODS-AQ 3 мкм, 150×4,6 мм; подвижная фаза А: вода с 0,1% TFA; подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,1% TFA; температура: 60°C; градиент: от 20% В до 70% В в течение 25 мин; поток: 1 мл/мин; обнаружение: УФ при 217 нм.

Условия D проведения HPLC-анализа:

Колонка: YMC Pack ODS-AQ 3 мкм, 150×4,6 мм; подвижная фаза А: вода с 0,1% TFA; подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,1% TFA; температура: 60°C; градиент: от 15% В до 65% В в течение 25 мин; поток: 1 мл/мин; обнаружение: УФ при 217 нм.

Условия E проведения HPLC-анализа:

Колонка: YMC Pack ODS-AQ 3 мкм, 150×4,6 мм; подвижная фаза А: вода с 0,1% TFA; подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,1% TFA; температура: 60°C; градиент: от 25% В до 60% В в течение 20 мин; поток: 1,25 мл/мин; обнаружение: УФ при 217 нм.

Условия F проведения HPLC-анализа:

Колонка: YMC Pack ODS-AQ 3 мкм, 150×4,6 мм; подвижная фаза А: вода с 0,1% TFA; подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,1% TFA; температура: 60°C; градиент: от 25% В до 65% В в течение 20 мин; поток: 1,25 мл/мин; обнаружение: УФ при 217 нм.

Условия G проведения HPLC-анализа:

Колонка: Sunfige C18 3,5 мкм, 3,0×150 мм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,05% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,05% трифторуксусной кислотой; температура: 50°C; градиент: 10-100% В в течение 12 мин, затем выдерживание в течение 3 мин при 100% В; поток: 1 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм.

Условия H проведения HPLC-анализа:

Колонка: Xbridge Phenyl 3,5×150 мкм, подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 0,05% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 0,05% трифторуксусной кислотой; температура: 50°C; градиент: 10-100% В в течение 12 мин, затем выдерживание в течение 3 мин при 100% В; поток: 1 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм.

Условия I проведения HPLC-анализа:

Колонка: Phenomenex Luna 5 мкм C18(2) 150×4,6 мм; подвижная фаза А: вода с 0,1% трифторуксусной кислотой, подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,1% трифторуксусной кислотой, градиент: 5-100% В в течение 20 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток 1 мл/мин, определение: УФ при 220.

Условия J проведения HPLC-анализа:

Колонка: Phenomenex Luna 5 мкм C18(2) 150×4,6 мм; подвижная фаза А: вода с 0,1% трифторуксусной кислотой, подвижная фаза В: ацетонитрил с 0,1% трифторуксусной кислотой; градиент 10-100% В в течение 20 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток 1 мл/мин; обнаружение: УФ при 220.

Общие методики Способ Prelude A

Все манипуляции проводили в автоматическом режиме на синтезаторе пептидов Prelude (Protein Technologies). Если не указано иное, то все методики проводили в полипропиленовой пробирке объемом 10 или 45 мл, снабженной нижней фриттой. Пробирку соединяли с синтезатором пептидов Prelude как через нижнюю, так и через верхнюю часть пробирки. DMF и DCM могут быть добавлены через верхнюю часть пробирки, смыв вниз по сторонам которой происходит в равной мере. Остальные реагенты добавляли через нижнюю часть пробирки и пропускали через фритту для контакта со смолой. Все растворы

удаляли через нижнюю часть пробирки. "Периодическое перемешивание" описывает краткий выброс газообразного N₂ через нижнюю фритту; выброс длился приблизительно 5 секунд и происходил каждые 30 секунд. Растворы аминокислот, как правило, не использовали позже трех недель после приготовления. DMF = диметилформамид; DIC = N,N'-диизопропилкарбодимид; HOAt = 1-гидрокси-7-азабензотриазол; Sieber = Fmoc-аминоксантен-3-илокси, где "3-илокси" описывает положение и тип связывания с полистироловой смолой. Используемая смола представляет собой полимер Merrifield (полистирол) с линкером Sieber (Fmoc-защищенным по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,71 ммоль/г. Обычно используемые аминокислоты перечислены ниже с указанными в круглых скобках защитными группами боковых цепей.

Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH;
Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Методики "Способа Prelude A" описывают эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber. Этот масштаб соответствует приблизительно 140 мг описанной выше смолы Sieber-Merrifield. Все методики могут быть выполнены в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. Перед присоединением аминокислот все последовательности синтеза пептидов начинают с осуществления процесса набухания смолы, описанного ниже как "Осуществление процесса набухания смолы". Для присоединения аминокислот к N-концу первичного амина использовали описанную ниже "Методику одноэтапного присоединения". Для присоединения аминокислот к N-концу вторичного амина использовали описанную ниже "Методику присоединения к вторичному амину". Присоединение хлор-ацетильной группы к N-концу пептида описывали "Методикой присоединения хлор-ацетилхлорида" или "Методикой присоединения хлоруксусной кислоты", конкретизированными ниже.

Осуществление процесса набухания смолы

В полипропиленовый сосуд для проведения твердофазной реакции объемом 40 мл добавляли смолу Merrifield:Sieber (140 мг, 0,100 ммоль). Смолу трижды промывали следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (5,0 мл) и DCM (5,0 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 10 мин, после чего сливали растворитель через фритту.

Методика одноэтапного присоединения

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно пять раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 60 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор аминокислоты и HOAt (0,2 М в DMF, 5,0 мл, 10 экв.), затем DIC (0,2 М в DMF, 5,0 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 60 мин, а затем сливали реакционный раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида:DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика присоединения к вторичному амину

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно пять раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 60 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор аминокислоты и HOAt (0,2 М в DMF, 5,0 мл, 5 экв.), затем DIC (0,2 М в DMF, 5,0 мл, 5 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 300 мин, а затем сливали реакционный раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали сле-

дующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида: DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика присоединения хлорацетилхлорида

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно пять раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли 3,0 мл раствора DIPEA (4,0 ммоль, 0,699 мл, 40 экв.) и хлорацетилхлорида (2,0 ммоль, 0,160 мл, 20 экв.) в DMF. Смесь периодически перемешивали в течение 12-18 ч, а затем сливали раствор. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли CH_2Cl_2 (2,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор.

Способ Prelude B

Все манипуляции проводили в автоматическом режиме на синтезаторе пептидов Prelude (Protein Technologies). Все методики проводили в полипропиленовой пробирке объемом 10 или 45 мл, снабженной нижней фриттой. DMF и DCM могут быть добавлены через верхнюю часть пробирки, смыв вниз по сторонам которой происходит в равной мере. Остальные реагенты добавляли через нижнюю часть пробирки и пропускали через фритту для контакта со смолой. Все растворы удаляли через нижнюю часть пробирки. "Периодическое перемешивание" описывает краткий выброс газообразного N_2 через нижнюю фритту; выброс длился приблизительно 5 с и происходил каждые 30 с. Растворы аминокислот, как правило, не использовали позже трех недель после приготовления. DMF = диметилформамид; HCTU = 2-(6-хлор-1-Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний; DIPEA = диизопропилэтиламин; Sieber = Fmoc-аминоксантен-3-илокси, где "3-илокси" описывает положение и тип связывания с полистироловой смолой. Используемая смола представляет собой полимер Merrifield (полистирол) с линкером Sieber (Fmoc-защищенным по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,71 ммоль/г. Обычно используемые аминокислоты перечислены ниже с указанными в круглых скобках защитными группами боковых цепей.

Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH;

Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-

Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-

Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-

[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-

Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Методики "Способа Prelude B" описывают эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber. Этот масштаб соответствует приблизительно 140 мг описанной выше смолы Sieber-Merrifield. Все методики могут быть выполнены в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. Перед присоединением аминокислот все последовательности синтеза пептидов начинают с осуществления процесса набухания смолы, описанного ниже как "Осуществление процесса набухания смолы". Для присоединения аминокислот к N-концу первичного амина использовали описанную ниже "Методику одноэтапного присоединения". Для присоединения аминокислот к N-концу вторичного амина использовали описанную ниже "Методику присоединения к вторичному амину". Присоединение хлорацетильной группы к N-концу пептида описывали "Методикой присоединения хлорацетилхлорида" или "Методикой присоединения хлоруксусной кислоты", конкретизированными ниже.

Осуществление процесса набухания смолы

В полипропиленовый сосуд для проведения твердофазной реакции объемом 40 мл добавляли смолу Merrifield:Sieber (140 мг, 0,100 ммоль). Смолу трижды промывали (осуществляли процесс набухания) следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (5,0 мл) и DCM (5,0 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 10 мин, после чего сливали растворитель через фритту.

довательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли CH_2Cl_2 (2,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту.

Методика В присоединения хлоруксусной кислоты

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно пять раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли DMF (2,0 мл), хлоруксусную кислоту (1,2 ммоль, 113 мг, 12 экв.) и N,N'-диизопропилкарбодиимид (1,2 ммоль, 0,187 мл, 12 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 12-18 ч, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли CH_2Cl_2 (2,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту.

Способ Prelude C

Все манипуляции проводили в автоматическом режиме на синтезаторе пептидов Prelude (Protein Technologies). Если не указано иное, то все методики проводили в полипропиленовой пробирке объемом 10 или 45 мл, снабженной нижней фриттой. Пробирку соединяли с синтезатором пептидов Prelude как через нижнюю, так и через верхнюю часть пробирки. DMF и DCM могут быть добавлены через верхнюю часть пробирки, смыв вниз по сторонам которой происходит в равной мере. Остальные реагенты добавляли через нижнюю часть пробирки и пропускали через фритту для контакта со смолой. Все растворы удаляли через нижнюю часть пробирки. "Периодическое перемешивание" описывает краткий выброс газообразного N_2 через нижнюю фритту; выброс длился приблизительно 5 с и происходил каждые 30 с. Растворы аминокислот, как правило, не использовали позже трех недель после приготовления. Раствор HATU использовали в течение 5 суток после получения. DMF = диметилформамид; HCTU = 2-(6-хлор-1-Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионий; HATU = 1-[бис(диметиламино)метиле]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиний 3-оксидгексафторфосфат; DIPEA = диизопропилэтиламин; Sieber = Fmoc-аминоксантен-3-илокси, где "3-илокси" описывает положение и тип связывания с полистироловой смолой. Используемая смола представляет собой полимер Merrifield (полистирол) с линкером Sieber (Fmoc-защищенным по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,71 ммоль/г. Обычно используемые аминокислоты перечислены ниже с указанными в круглых скобках защитными группами боковых цепей.

Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH;

Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Методики "Способа Prelude C" описывают эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber. Этот масштаб соответствует приблизительно 140 мг описанной выше смолы Sieber-Merrifield. Все методики могут быть выполнены в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. Перед присоединением аминокислот все последовательности синтеза пептидов начинают с осуществления процесса набухания смолы, описанного ниже как "Осуществление процесса набухания смолы". Для присоединения аминокислот к N-концу первичного амина использовали описанную ниже "Методику одноэтапного присоединения". Для присоединения аминокислот к N-концу вторичного амина использовали описанную ниже "Методику присоединения к вторичному амину". При заключительной промывке смолы использовали описанную ниже "Методику заключительной промывки".

Осуществление процесса набухания смолы

В полипропиленовый сосуд для проведения твердофазной реакции объемом 40 мл добавляли смолу Merrifield:Sieber (140 мг, 0,100 ммоль). Смолу трижды промывали (осуществляли процесс набухания) следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (5,0 мл) и DCM (5,0 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 10 мин, после чего сливали растворитель через фритту.

Методика одноэтапного присоединения

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через

лученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика присоединения хлоруксусной кислоты

Примечание: стадию выполняли вручную. В реакционный сосуд, содержащий смолу из предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь встряхивали при комнатной температуре, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно пять раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и перемешивали полученную смесь, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли DMF (2,0 мл), хлоруксусную кислоту (1,2 ммоль, 113 мг, 12 экв.) и N,N'-диизопропилкарбодиимид (1,2 ммоль, 0,187 мл, 12 экв.). Смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 12-18 ч, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли CH_2Cl_2 (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту.

Способ Prelude D

Все манипуляции проводили в автоматическом режиме на синтезаторе пептидов Prelude (Protein Technologies). Если не указано иное, то все методики проводили в полипропиленовой пробирке объемом 10 или 45 мл, снабженной нижней фриттой. Пробирку соединяли с синтезатором пептидов Prelude как через нижнюю, так и через верхнюю часть пробирки. DMF и DCM могут быть добавлены через верхнюю часть пробирки, смыв вниз по сторонам которой происходит в равной мере. Остальные реагенты добавляли через нижнюю часть пробирки и пропускали через фритту для контакта со смолой. Все растворы удаляли через нижнюю часть пробирки. "Периодическое перемешивание" описывает краткий выброс газообразного N_2 через нижнюю фритту; выброс длился приблизительно 5 с и происходил каждые 30 с. Растворы аминокислот, как правило, не использовали позже трех недель после приготовления. Раствор HATU использовали в течение 5 суток после получения. DMF = диметилформамид; HCTU = 2-(6-хлор-1-Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионий; HATU = 1-[бис(диметиламино)метиле]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиний 3-оксидгексафторфосфат; DIPEA = диизопропилэтиламин; Sieber = Fmoc-аминоксантен-3-илокси, где "3-илокси" описывает положение и тип связывания с полистироловой смолой. Используемая смола представляет собой полимер Merrifield (полистирол) с линкером Sieber (Fmoc-защищенным по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,71 ммоль/г. Обычно используемые аминокислоты перечислены ниже с указанными в круглых скобках защитными группами боковых цепей.

Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH;

Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-

Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-

Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-

[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-

Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Методики "Способа Prelude D" описывают эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber. Этот масштаб соответствует приблизительно 140 мг описанной выше смолы Sieber-Merrifield. Все методики могут быть выполнены в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. Перед присоединением аминокислот все последовательности синтеза пептидов начинают с осуществления процесса набухания смолы, описанного ниже как "Осуществление процесса набухания смолы". Для присоединения аминокислот к N-концу первичного амина использовали описанную ниже "Методику одноэтапного присоединения". Для присоединения аминокислот к N-концу вторичного амина использовали описанную ниже "Методику присоединения к вторичному амину". При заключительной промывке смолы использовали описанную ниже "Методику заключительной промывки".

Осуществление процесса набухания смолы

В полипропиленовый сосуд для проведения твердофазной реакции объемом 40 мл добавляли смолу Merrifield:Sieber (140 мг, 0,100 ммоль). Смолу трижды промывали (осуществляли процесс набухания) следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (5,0 мл) и DCM (5,0 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 10 мин, после чего сливали растворитель через фритту.

Методика одноэтапного присоединения

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно пять раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 60 с, после чего сливали рас-

твор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 2,5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 2,5 экв.) и в завершение DIPEA (0,8 М в DMF, 0,75 мл, 5 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 30 мин, а затем сливали реакционный раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида:DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, после чего сливали раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика присоединения к вторичному амину

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно пять раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 2,5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 2,5 экв.) и в завершение DIPEA (0,8 М в DMF, 0,75 мл, 5 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 30 мин, а затем сливали реакционный раствор через фритту. Смолу дважды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли амина (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 2,5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 2,5 экв.) и в завершение DIPEA (0,8 М в DMF, 0,75 мл, 5 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 30 мин, а затем сливали реакционный раствор через фритту. Смолу дважды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида:DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, после чего сливали раствор через фритту. Смолу дважды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида:DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, после чего сливали раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика заключительной промывки

Смолу последовательно дважды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DCM (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика присоединения хлоруксусной кислоты

Примечание: стадию выполняли вручную. В реакционный сосуд, содержащий смолу из предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь встряхивали при комнатной температуре, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно пять раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и перемешивали полученную смесь, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли DMF (2,0 мл), хлоруксусную кислоту (1,2 ммоль, 113 мг, 12 экв.) и N,N'-диизопропилкарбодимид (1,2 ммоль, 0,187 мл, 12 экв.). Смесь встряхивали при комнатной температуре в течение 12-18 ч, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли CH_2Cl_2 (4,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту.

Способ СЕМ А

Все манипуляции проводили в автоматическом режиме на микроволновом синтезаторе пептидов СЕМ Liberty (СЕМ Corporation). Если не указано иное, то все методики выполняли в полипропиленовой пробирке объемом 30 или 125 мл, соединенной через нижнюю фритту к микроволновому блоку СЕМ

Discovery. Пробирку соединяли с синтезатором пептидов SEM Liberty как через нижнюю, так и через верхнюю часть пробирки. DMF и DCM могут быть добавлены через верхнюю часть пробирки, смыв вниз по сторонам которой происходит в равной мере. Все растворы удаляли через нижнюю часть пробирки, за исключением переноса смолы через верхнюю часть сосуда. Периодическое перемешивание" описывает краткий выброс газообразного N₂ через нижнюю фритту. Растворы аминокислот, как правило, не использовали позже трех недель после приготовления. Раствор HATU использовали в течение 5 суток после получения. DMF = диметилформамид; HCTU = 2-(6-хлор-1-Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурионий; HATU = 1-[бис(диметиламино)метилен]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-б]пиридиний 3-оксидгексафторфосфат; DIPEA = диизопропилэтиламин; Sieber = Fmoc-аминоксантен-3-илокси, где "3-илокси" описывает положение и тип связывания с полистироловой смолой. Используемая смола представляет собой полимер Merrifield (полистирол) с линкером Sieber (Fmoc-защищенным по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,71 ммоль/г. Другие традиционные смолы, такие как Rink, ChloroTrityl, или другие чувствительные к кислоте линкеры могут быть использованы в синтезе, амидную смолу Seiber использовали, если в конкретных примерах не отмечено иное. Обычно используемые аминокислоты перечислены ниже с указанными в круглых скобках защитными группами боковых цепей.

Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH;
Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Orn(Boc)-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Методики "Способа SEM A" описывают эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber. Этот масштаб соответствует приблизительно 140 мг описанной выше смолы Sieber-Merrifield. Все методики могут быть выполнены в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. Перед присоединением аминокислот все последовательности синтеза пептидов начинают с осуществления процесса набухания смолы, описанного ниже как "Осуществление процесса набухания смолы". Для присоединения аминокислот к N-концу первичного амина использовали описанную ниже "Методику одноэтапного присоединения". Для присоединения аминокислот к N-концу вторичного амина использовали описанную ниже "Методику присоединения к вторичному амину". Присоединение хлор-ацетильной группы к N-концу пептида описывали "Методикой присоединения хлорацетилхлорида" или "Методикой присоединения хлоруксусной кислоты", конкретизированными выше.

Осуществление процесса набухания смолы

В полипропиленовую коническую пробирку объемом 50 мл добавляли смолу Merrifield:Sieber (140 мг, 0,100 ммоль). Затем в пробирку добавляли DMF (7 мл), а затем DCM (7 мл). Затем смолу переносили в реакционный сосуд через верхнюю часть сосуда. Эту процедуру дополнительно повторяли дважды. Добавляли DMF (7 мл), а затем DCM (7 мл). Смолу оставляли набухать с барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 15 мин, после чего сливали растворитель через фритту.

Стандартная методика присоединения

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: промывка DMF (7 мл) сверху, затем DMF (7 мл) снизу и в завершение DMF (7 мл) сверху. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 5 экв.), HATU (0,5 М в DMF, 1,0 мл, 5 экв.) и DIPEA (2М в NMP, 0,5 мл, 10 экв.). Смесь перемешивали барботированием N₂ в течение 5 мин при 75°C для всех аминокислот, за исключением Fmoc-Cys(Trt)-OH и Fmoc-His(Trt)-OH, которые присоединяли при 50°C, и сливали реакционный раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: промывка DMF (7 мл) сверху, затем DMF (7 мл) снизу и в завершение DMF (7 мл) сверху. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида:DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически барботировали в течение 2 мин при 65°C, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: промывка DMF (7 мл) сверху, затем DMF (7 мл) снизу и в завершение DMF (7 мл) сверху. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика двухэтапного присоединения

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту.

Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: промывка DMF (7 мл) сверху, затем DMF (7 мл) снизу и в завершение DMF (7 мл) сверху. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 5 экв.), HATU (0,5 М в DMF, 1,0 мл, 5 экв.) и DIPEA (2М в NMP, 0,5 мл, 10 экв.). Смесь перемешивали барботированием N₂ в течение 5 мин при 75°C для всех аминокислот, за исключением Fmoc-Cys(Trt)-ОН и Fmoc-His(Trt)-ОН, которые присоединяли при 50°C, и сливали реакционный раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: промывка DMF (7 мл) сверху, затем DMF (7 мл) снизу и в завершение DMF (7 мл) сверху. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 5 экв.), HATU (0,5 М в DMF, 1,0 мл, 5 экв.) и DIPEA (2М в NMP, 0,5 мл, 10 экв.). Смесь перемешивали барботированием N₂ в течение 5 мин при 75°C для всех аминокислот, за исключением Fmoc-Cys(Trt)-ОН и Fmoc-His(Trt)-ОН, которые присоединяли при 50°C, и сливали реакционный раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: промывка DMF (7 мл) сверху, затем DMF (7 мл) снизу и в завершение DMF (7 мл) сверху. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида:DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически барботировали в течение 2 мин при 65°C, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: промывка DMF (7 мл) сверху, затем DMF (7 мл) снизу и в завершение DMF (7 мл) сверху. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика присоединения вторичного амина

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли 5% раствор пиперидина и 0,1 М HOBT в DMF (7 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 мин при 75°C, а затем сливали раствор. Эту процедуру повторяли еще раз. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: промывка DMF (7 мл) сверху, затем DMF (7 мл) снизу и в завершение DMF (7 мл) сверху. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 5 экв.), HCTU (0,5 М в DMF, 1,0 мл, 5 экв.) и DIPEA (2М в NMP, 0,5 мл, 10 экв.). Смесь смешивали барботированием N₂ в течение 5 мин при 75°C для всех аминокислот (50°C для Fmoc-Cys(Trt)-ОН и Fmoc-His(Trt)-ОН), а затем в течение 6 ч без нагревания. После сливания смолу последовательно трижды промывали следующим образом: промывка DMF (7 мл) сверху, затем DMF (7 мл) снизу и в завершение DMF (7 мл) сверху. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида:DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически барботировали в течение 2 мин при 65°C, а затем сливали раствор. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: промывка DMF (7 мл) сверху, затем DMF (7 мл) снизу и в завершение DMF (7 мл) сверху. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика присоединения аминокислот по выбору

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли раствор пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: промывка DMF (7 мл) сверху, затем DMF (7 мл) снизу и в завершение DMF (7 мл) сверху. В реакционный сосуд добавляли раствор аминокислоты (1,25 - 5 мл, 2,5 - 10 экв.), содержащий HATU (2,5 - 10 экв.) и в завершение DIPEA (2М в NMP, 0,5 - 1 мл, 20 экв.). Смесь перемешивали барботированием N₂ в течение 5 мин - 2 часов при 25°C - 75°C, а затем сливали реакционный раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: промывка DMF (7 мл) сверху, затем DMF (7 мл) снизу и в завершение DMF (7 мл) сверху. В реакционный сосуд добавляли раствор уксусного ангидрида:DIEA:DMF (10:1:89 об./об./об., 5,0 мл). Смесь периодически барботировали в течение 2 мин при 65°C, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: промывка DMF (7 мл) сверху, затем DMF (7 мл) снизу и в завершение DMF (7 мл) сверху. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Способ Symphony A

Все манипуляции проводили в автоматическом режиме на синтезаторе пептидов Symphony (Protein Technologies). Если не указано иное, то все методики выполняли в полипропиленовой пробирке Symphony, снабженной нижней фриттой. Пробирку соединяли с синтезатором пептидов Symphony как через нижнюю, так и через верхнюю часть пробирки. Все растворители, DMF, DCM, аминокислоты и реагенты добавляли через нижнюю часть пробирки и пропускали через фритту для контакта со смолой. Все растворы удаляли через нижнюю часть пробирки. "Периодическое перемешивание" описывает краткий выброс газообразного N₂ через нижнюю фритту; выброс длился приблизительно 5 с и происходил каждые 15 с. Растворы аминокислот, как правило, не использовали позже трех недель после приготовления. Раствор HATU использовали в течение 5 суток после получения. DMF = диметилформамид; HCTU = 2-(6-хлор-1-Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний; HATU = 1-[бис(диметиламино)метил]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиний 3-оксидгексафторфосфат; NMM= *n*-метилморфолин; DIPEA = диизопропилэтиламин; Sieber = Fmoc-аминоксантен-3-илокси, где "3-илокси" описывает положение и тип связывания с полистироловой смолой. Используемая смола представляет собой полимер Merrifield (полистирол) с линкером Sieber (Fmoc-защищенным по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,71 ммоль/г. В

синтезе могут быть использованы другие общеизвестные смолы, такие как смола Rink или функционализованная хлортритильная смола. Обычно используемые аминокислоты перечислены ниже с указанными в круглых скобках защитными группами боковых цепей.

Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH;
Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Методики "Способа Symphony A" описывают эксперимент, выполненный в масштабе 0,050 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber. Этот масштаб соответствует приблизительно 70 мг описанной выше смолы Sieber-Merrifield. Все методики могут быть выполнены в масштабе более 0,050 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. Перед присоединением аминокислот все последовательности синтеза пептидов начинают с осуществления процесса набухания смолы, описанного ниже как "Осуществление процесса набухания". Для присоединения аминокислот к N-концу первичного амина использовали описанную ниже "Методику стандартного присоединения". Для присоединения аминокислот к N-концу вторичного амина использовали "Методику двухэтапного присоединения", аминокислоты по выбору присоединяют посредством присоединения вручную Blank согласно "Методике присоединения вручную Blank", описанной ниже.

Осуществление процесса набухания

В полипропиленовый сосуд Symphony для проведения твердофазной реакции добавляли смолу Merrifield:Sieber (70 мг, 0,050 ммоль). Смолу трижды промывали (осуществляли процесс набухания) следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 10 мин, после чего сливали растворитель через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 2,5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и в заключение NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу промывали DMF (6,25 мл) через нижнюю часть сосуда и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и в заключение NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу трижды промывали следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика стандартного присоединения

Смолу трижды промывали следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 2,5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и в заключение NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу промывали DMF (6,25 мл) через нижнюю часть сосуда и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и в заключение NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика присоединения к вторичному амину

Смолу трижды промывали следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение

30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 2,5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и в заключение NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 300 мин, а затем сливали реакционный раствор через фритту. Смолу промывали DMF (6,25 мл) через нижнюю часть сосуда и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и в заключение NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 300 мин, а затем сливали реакционный раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика присоединения аминокислот по выбору

Смолу трижды промывали следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 2,5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. Синтез приостанавливали при помощи программного обеспечения Symphony для добавления вручную в реакционный сосуд аминокислоты по выбору (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем перезапускали автоматическую работу: для добавления HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и в заключение NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 300 мин, а затем сливали реакционный раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли $Ac_2O/DIPEA/DMF$ (об./об./об. 1:1:3, 2,5 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: для каждой промывки через нижнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Способ Symphony B

Все манипуляции проводили в автоматическом режиме на синтезаторе пептидов Symphony (Protein Technologies). Если не указано иное, то все методики выполняли в полипропиленовой пробирке Symphony, снабженной нижней фриттой. Пробирку соединяли с синтезатором пептидов Symphony как через нижнюю, так и через верхнюю часть пробирки. Все растворители, DMF, DCM, аминокислоты и реагенты добавляли через нижнюю часть пробирки и пропускали через фритту для контакта со смолой. Все растворы удаляли через нижнюю часть пробирки. "Периодическое перемешивание" описывает краткий выброс газообразного N_2 через нижнюю фритту; выброс длился приблизительно 5 с и происходил каждые 15 с. Растворы аминокислот, как правило, не использовали позже трех недель после приготовления. Раствор HATU использовали в течение 5 суток после получения. DMF = диметилформамид; HCTU = 2-(6-хлор-1-Н-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний; HATU = 1-[бис(диметиламино)метиле]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-*b*]пиридиний 3-оксидгексафторфосфат; NMM = *n*-метилморфолин; DIPEA = диизопропилэтиламин; Sieber = Fmoc-аминоксантен-3-илокси, где "3-илокси" описывает положение и тип связывания с полистироловой смолой. Используемая смола представляет собой полимер Merrifield (полистирол) с линкером Sieber (Fmoc-защищенным по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,71 ммоль/г. В синтезе могут быть использованы другие общеизвестные смолы, такие как смола Rink или функционализированная хлортритильная смола. Обычно используемые аминокислоты перечислены ниже с указанными в круглых скобках защитными группами боковых цепей.

Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH;
Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Методики "Способа Symphony B" описывают эксперимент, выполненный в масштабе 0,050 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber. Этот масштаб соответствует

приблизительно 70 мг описанной выше смолы Sieber-Merrifield. Все методики могут быть выполнены в масштабе более 0,050 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. Перед присоединением аминокислот все последовательности синтеза пептидов начинают с осуществления процесса набухания смолы, описанного ниже как "Осуществление процесса набухания". Для присоединения аминокислот к N-концу первичного амина использовали описанную ниже "Методику стандартного присоединения". Для присоединения аминокислот к N-концу вторичного амина использовали "Методику присоединения к вторичному амину В". Аминокислоты по выбору присоединяют посредством присоединения вручную Blank аминокислоты описанной ниже "Методикой присоединения аминокислот по выбору", хлоруксусный ангидрид добавляли в конечное положение последовательности с применением описанной ниже "Методики заключительного кэпирования".

Осуществление процесса набухания

В полипропиленовый сосуд Symphony для проведения твердофазной реакции добавляли смолу Merrifield:Sieber (70 мг, 0,050 ммоль). Смолу трижды промывали (осуществляли процесс набухания) следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 10 мин, после чего сливали растворитель через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 2,5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и в заключение NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу промывали DMF (6,25 мл) через нижнюю часть сосуда и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и в заключение NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу трижды промывали следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика стандартного присоединения

Смолу трижды промывали следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 2,5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и в заключение NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: через нижнюю часть пробирки добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли Ac₂O/DIPEA/DMF (об./об./об. 1:1:3 2,5 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через нижнюю часть пробирки добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика присоединения к вторичному амину

Смолу трижды промывали следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N₂ со дна реакционного сосуда в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 2,5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и в заключение NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу промывали DMF (6,25 мл) через нижнюю часть сосуда и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и в заключение NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, а за-

тем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли $Ac_2O/DIPEA/DMF$ (об./об./об. 1:1:3 2,5 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через нижнюю часть пробирки добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика присоединения аминокислот по выбору

Смолу трижды промывали следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 2,5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. Систему приостанавливали при помощи системы для добавления вручную в реакционный сосуд аминокислоты по выбору (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.), затем перезапускали автоматическую работу: для добавления в реакционный сосуд HATU (0,2 М в DMF, 1,25 мл, 5 экв.) и в заключение NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: через нижнюю часть пробирки добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли $Ac_2O/DIPEA/DMF$ (об./об./об. 1:1:3 2,5 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через нижнюю часть пробирки добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика заключительного экпирования

Смолу трижды промывали следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,5 мл), после чего периодически перемешивали смесь барботированием N_2 со дна реакционного сосуда в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,5 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 2,5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.) с последующим добавлением хлоруксусного ангидрида (0,4 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу промывали DMF (6,25 мл) через нижнюю часть сосуда и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли NMM (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.) с последующим добавлением хлоруксусного ангидрида (0,4 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: через нижнюю часть пробирки добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли $Ac_2O/DIPEA/DMF$ (об./об./об. 1:1:3 2,5 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через нижнюю часть сосуда добавляли DMF (2,5 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. Затем полученную смолу высушивали струей азота в течение 10 мин.

Способ А полного снятия защиты

Если не указано иное, то все манипуляции выполняли вручную. Методика "Способа А полного снятия защиты" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber. Методика может быть выполнена в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. "Раствор для снятия защиты" готовили с применением трифторуксусной кислоты:воды:триизопротилсилана:дитиотреитола (92,5:2,5:2,5:2,5 об.:об.:об.:масса). Смолу удаляли из реакционного сосуда и переносили в шприц объемом 25 мл, снабженный фриттой. В шприц добавляли "раствор для снятия защиты" (5,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 85 мин. Раствор отфильтровывали, концентрировали и разбавляли диэтиловым эфиром (30 мл). Осажденное твердое вещество центрифугировали в течение 3 мин. Раствор супернатанта сливали и ресуспендировали твердое вещество в диэтиловом эфире

(25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сливали и суспендировали оставшееся твердое вещество в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сливали и сушили оставшееся твердое вещество под высоким вакуумом. Неочищенный пептид получали в виде твердого вещества от белого до не совсем белого цвета.

Способ В полного снятия защиты

Если не указано иное, то все манипуляции выполняли вручную. Методика "Способа В полного снятия защиты" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,04 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber. Методика может быть выполнена в масштабе более 0,04 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. "Раствор для снятия защиты" готовили с применением трифторуксусной кислоты: триизопропилсилана (96:4; об.:об.). Смолу удаляли из реакционного сосуда и переносили в шприц объемом 10 мл, снабженный фриттой. В шприц добавляли "раствор для снятия защиты" (2,0-3,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 1 ч или 1,5 ч. Раствор отфильтровывали, промывали раствором для снятия защиты (0,5 мл), концентрировали и разбавляли диэтиловым эфиром (30 мл). Осажденное твердое вещество центрифугировали в течение 3 мин. Раствор супернатанта сливали и ресуспендировали твердое вещество в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сливали и суспендировали оставшееся твердое вещество в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сливали и сушили оставшееся твердое вещество под высоким вакуумом. Неочищенный пептид получали в виде твердого вещества от белого до не совсем белого цвета.

Способ С полного снятия защиты

Если не указано иное, то все манипуляции выполняли вручную. Методика "Способа С полного снятия защиты" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber. Методика может быть выполнена в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. "Раствор для снятия защиты" готовили с применением трифторуксусной кислоты: триизопропилсилана: дитиотреитола (95:2,5:2,5 об.:об.:масса). Смолу удаляли из реакционного сосуда и переносили в пробирку Bio-Rad. В пробирку Bio-Rad добавляли "раствор для снятия защиты" (4,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 60 мин. Раствор отфильтровывали и разбавляли диэтиловым эфиром (30 мл). Осажденное твердое вещество центрифугировали в течение 3 мин. Раствор супернатанта сливали и ресуспендировали твердое вещество в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сливали и суспендировали оставшееся твердое вещество в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сливали и сушили оставшееся твердое вещество под высоким вакуумом. Неочищенный пептид получали в виде твердого вещества от белого до не совсем белого цвета.

Способ D полного снятия защиты

Если не указано иное, то все манипуляции выполняли вручную. Методика "Способа D полного снятия защиты" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber. Методика может быть выполнена в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. "Раствор для снятия защиты" готовили с применением трифторуксусной кислоты: триизопропилсилана: дитиотреитола (94:3:3 об.:об.:масса). Смолу удаляли из реакционного сосуда и переносили в шприц объемом 25 мл, снабженный фриттой. В шприц добавляли "раствор для снятия защиты" (5,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 5 мин. Раствор отфильтровывали и разбавляли диэтиловым эфиром (30 мл). Осажденное твердое вещество центрифугировали в течение 3 мин. Раствор супернатанта сливали и ресуспендировали твердое вещество в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сливали и суспендировали оставшееся твердое вещество в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сливали и сушили оставшееся твердое вещество под высоким вакуумом. Неочищенный пептид получали в виде твердого вещества от белого до не совсем белого цвета.

Способ E полного снятия защиты

Если не указано иное, то все манипуляции выполняли вручную. Методика "Способа E полного снятия защиты" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяли количеством Fmoc Gly-CITrt линкера, связанного со смолой. Методика может быть выполнена в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. "Раствор для снятия защиты" готовили с применением трифторуксусной кислоты: триизопропилсилана: дитиотреитола (95:2,5:2,5 об.:об.:масса). Смолу удаляли из реакционного сосуда и переносили в пробирку Bio-Rad. В пробирку Bio-Rad добавляли "раствор для снятия защиты" (2,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 3 мин. Раствор фильтровали и собирали в пробирку для центрифуги. В пробирку Bio-Rad добавляли "раствор для снятия защиты" (2,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 3 мин. Раствор фильтровали и собирали в пробирку для центрифуги. Раствор в пробирке для центрифуги оставляли отстаиваться.

ваться в течение 60 мин. Собранный раствор затем разбавляли диэтиловым эфиром (30 мл) и образовывался осадок. Осажденное твердое вещество центрифугировали в течение 3 мин. Раствор супернатанта сливали и ресуспендировали твердое вещество в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сливали и суспендировали оставшееся твердое вещество в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сливали и сушили оставшееся твердое вещество под высоким вакуумом. Неочищенный пептид получали в виде твердого вещества от белого до не совсем белого цвета.

Способ F полного снятия защиты

Если не указано иное, то все манипуляции выполняли вручную. Методика "Способа F полного снятия защиты" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Rink. Методика может быть выполнена в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. "Раствор для снятия защиты" готовили с применением трифторуксусной кислоты: триизопропилсила: дитиотреитола (95:2,5:2,5 об.:об.:масса). Смолу удаляли из реакционного сосуда и переносили в пробирку Bio-Rad объемом 6 мл. В пробирку Bio-Rad добавляли "раствор для снятия защиты" (4,0 мл). Смесь перемешивали в шейкере в течение 90 мин. Раствор отфильтровывали и разбавляли диэтиловым эфиром (30 мл). Осажденное твердое вещество центрифугировали в течение 3 мин. Раствор супернатанта сливали и ресуспендировали твердое вещество в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сливали и суспендировали оставшееся твердое вещество в диэтиловом эфире (25 мл). Суспензию центрифугировали в течение 3 мин. Супернатант сливали и сушили оставшееся твердое вещество под высоким вакуумом. Неочищенный пептид получали в виде твердого вещества от белого до не совсем белого цвета.

Способ A циклизации

Если не указано иное, то все манипуляции выполняли вручную. Методика "Способа A циклизации" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяется количеством линкера Rink, связанного со смолой, которую использовали для получения пептида. Этот масштаб не основан на прямом определении количества пептида, используемого в методике. Методика может быть выполнена в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. Неочищенные твердые пептиды растворяли в растворе ацетонитрила:водного 8 М гуанидина/50 мМ TRIS (1:3) (рН 8,6) (7 мл: 18 мл или в подобном соотношении), а затем осторожно доводили рН раствора до 8,5-9,0 с применением водн. NaOH (1,0 М), если необходимо. Затем раствор смешивали на шейкере в течение 12-18 ч. Реакционный раствор концентрировали, а затем растворяли остаток в ацетонитриле:воде. Этот раствор подвергали очистке методом обращенно-фазовой HPLC с получением требуемого циклического пептида.

Способ C циклизации

Если не указано иное, то все манипуляции выполняли вручную. Методика "Способа C циклизации" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber, которую использовали для получения пептида. Этот масштаб не основан на прямом определении количества пептида, используемого в методике. Методика может быть выполнена в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. Неочищенные твердые пептиды растворяли в растворе ацетонитрила:водного буферного раствора 0,1 М бикарбоната аммония (11 мл:24 мл или в подобном соотношении), а затем осторожно доводили рН раствора до 8,5-9,0 с применением водн. NaOH (1,0 М). Затем раствор смешивали на шейкере в течение 12-18 ч. Реакционный раствор концентрировали, а затем растворяли остаток в ацетонитриле:воде. Этот раствор подвергали очистке методом обращенно-фазовой HPLC с получением требуемого циклического пептида.

Способ D циклизации

Если не указано иное, то все манипуляции выполняли вручную. Методика "Способа D циклизации" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber, которую использовали для получения пептида. Этот масштаб не основан на прямом определении количества пептида, используемого в методике. Методика может быть выполнена в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. Неочищенные твердые пептиды растворяли в растворе ацетонитрила: водного буферного раствора 0,1 М бикарбоната аммония (11 мл:24 мл), а затем осторожно доводили рН раствора до 8,5-9,0 с применением водн. NaOH (1,0 М). Раствор затем перемешивали в течение 12 - 18 ч. Реакционный раствор концентрировали, а затем растворяли остаток в ацетонитриле:воде. Этот раствор подвергали очистке методом обращенно-фазовой HPLC с получением требуемого циклического пептида.

Способ E циклизации

Если не указано иное, то все манипуляции выполняли вручную. Методика "Способа E циклизации" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber, которую использовали для получения пептида. Этот масштаб не основан на прямом определении количества пептида, используемого в методике. Методика может быть

выполнена в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. Неочищенные твердые пептиды растворяли в растворе водного буферного раствора 6 М гуанидина в HCl (15 мл), затем раствор перемешивали в течение 12 - 18 ч. Реакционный раствор концентрировали и к остатку добавляли 15 мл DMSO с получением взвеси, которую фильтровали. Это фильтрованный раствор подвергали очистке методом обращенно-фазовой HPLC с получением требуемого циклического пептида.

Методика А присоединения вручную

В реакционный сосуд Bio-Rad, содержащий смолу из предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь периодически встряхивали в течение 5 мин, а затем раствор сливали через фритту. Смолу последовательно пять раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и полученную смесь перемешивали в течение 60 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (1,2-10 эквивалентов) типично (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 5 экв.), затем HATU (1,210 эквивалентов) типично (0,2 М в DMF, 2,5 мл, 5 экв.) и в завершение DIPEA (2,4- 20 эквивалентов) типично (0,8 М в DMF, 1,25 мл, 10 экв.). Смесь перемешивали в течение 60 мин - 18 ч, после чего сливали раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (4,0 мл) и полученную смесь перемешивали в течение 60 с, после чего сливали раствор через фритту.

Способ А N-метилирования на смоле

(Turner, R. A.; Hauksson, N. E.; Gipe, J. H.; Lokey, R. S. *Org. Lett.* 2013, 75(19), 5012-5015)

Если не указано иное, то все манипуляции выполняли вручную. Методика "Способа А N-метилирования на смоле" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяли количеством связанного со смолой линкера Sieber, которую использовали для получения пептида. Этот масштаб не основан на прямом определении количества пептида, используемого в методике. Методика может быть выполнена в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба.

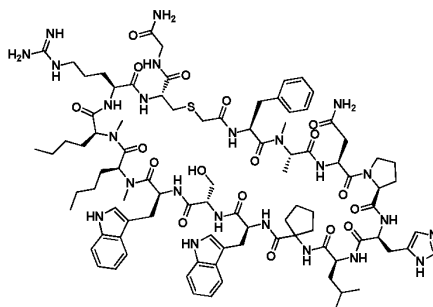
Смолу переносили во фриттованный шприц объемом 25 мл. К смоле добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 5,0 мл). Смесь встряхивали в течение 3 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу трижды промывали DMF (4,0 мл). В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 4,0 мл). Смесь встряхивали в течение 3 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали DMF (4,0 мл) и трижды DCM (4,0 мл). Смолу суспендировали в DMF (2,0 мл), этилтрифторацетате (0,119 мл, 1,00 ммоль) и 11,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ене (0,181 мл, 1,20 ммоль). Смесь помещали на шейкер на 60 мин. Раствор сливали через фритту. Смолу последовательно трижды промывали DMF (4,0 мл) и трижды DCM (4,0 мл).

Смолу трижды промывали безводным THF (2,0 мл) для удаления остатков воды. В высушенный в печи сосуд 4,0 мл добавляли THF (1,0 мл) и трифенилфосфин (131 мг, 0,500 ммоль) на сухих молекулярных ситах размером 4Å (20 мг). Раствор переносили к смоле и медленно добавляли диизопропилазодикарбоксилат (0,097 мл, 0,5 ммоль). Смолу перемешивали в течение 15 мин. Раствор сливали через фритту и трижды промывали смолу безводным THF (2,0 мл) для удаления остатков воды. В высушенный в печи сосуд объемом 4,0 мл добавляли THF (1,0 мл) и трифенилфосфин (131 мг, 0,500 ммоль) на сухих молекулярных ситах размером 4Å (20 мг). Раствор переносили к смоле и медленно добавляли диизопропилазодикарбоксилат (0,097 мл, 0,5 ммоль). Смолу перемешивали в течение 15 мин. Раствор сливали через фритту. Смолу последовательно промывали трижды DMF (4,0 мл) и трижды DCM (4,0 мл). Смолу суспендировали в этаноле (1,0 мл) и THF (1,0 мл), затем добавляли боргидрид натрия (37,8 мг, 1,000 ммоль). Смесь перемешивали в течение 30 мин и сливали. Смолу последовательно промывали трижды DMF (4,0 мл) и трижды DCM (4,0 мл).

Микрорасщепление А

К небольшому < 10 мг образцу смолы добавляли 2 капли TIS и 1 мл трифторуксусной кислоты, встряхивали при к. т. Через 1 ч удаляли небольшую аликвоту и разбавляли 0,5 мл ацетонитрила, фильтровали и получали при помощи анализа LC-MS.

Получение соединения примера 1001

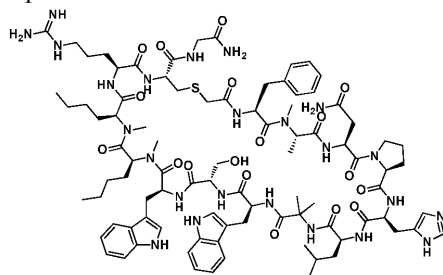


Соединение примера 1001 получали на смоле Rink на основании общих методик синтеза: осуществляли "Способ Symphony B: Осуществление процесса набухания смолы" с Fmoc-Gly-OH; осуществляли "Способ Symphony B: Методика стандартного присоединения" с Fmoc-Cys(Trt)-OH; осуществляли "Способ Symphony B: Методика стандартного присоединения" с Fmoc-Arg(Pbf)-OH; осуществляли "Способ Symphony B: Методика стандартного присоединения" с Fmoc-н-метил-Nle-OH; осуществляли "Способ Symphony B: Методика присоединения к вторичному амину" с Fmoc-н-метил-Nle-OH; осуществляли "Способ Symphony B: Методика присоединения к вторичному амину" с Fmoc-Trp(Boc)-OH; осуществляли "Способ Symphony B: Методика стандартного присоединения" с Fmoc-Ser(tBu)-OH; осуществляли "Способ Symphony B: Методика стандартного присоединения" с Fmoc-Trp(Boc)-OH; осуществляли "Методику А присоединения вручную" с Fmoc-Циклопентил-Gly-OH; осуществляли "Способ Symphony B: Методика присоединения к вторичному амину" с Fmoc-Leu-OH; осуществляли "Способ Symphony B: Методика стандартного присоединения" с Fmoc-His(Trt)-OH; осуществляли "Способ Symphony B: Методика стандартного присоединения" с Fmoc-Pro-OH; осуществляли "Способ Symphony B: Методика присоединения к вторичному амину" с Fmoc-Asn(Trt)-OH; осуществляли "Способ Symphony B: Методика стандартного присоединения" с Fmoc-н-метил-Ala-OH; осуществляли "Способ Symphony B: Методика присоединения к вторичному амину" с Fmoc-Phe-OH; осуществляли "Способ Symphony B: Методика заключительного экпирования"; осуществляли "Способ F полного снятия защиты"; осуществляли "Способ D циклизации".

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: Waters XBridge C18, 19×250 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил: вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил: вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; градиент: 15-65% В в течение 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 6,4 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 100%.

Условия D проведения анализа LCMS: время удерживания = 1,67 мин; ESI-MS(+) m/z 947,2 (M+2H).

Условия E проведения анализа LCMS: время удерживания = 1,57 мин; ESI-MS(+) m/z 946,7 (M+2H).
Получение соединения примера 1002



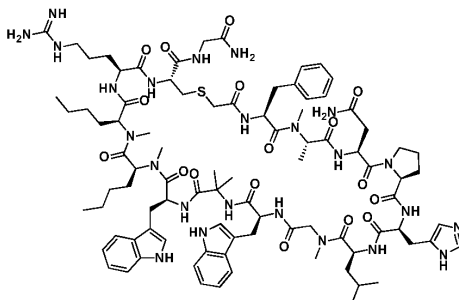
Соединение примера 1002 получали на смоле Rink на основе общей последовательности синтеза, описанной для получения соединения примера 1001, состоящей из следующих общих методик: "Способ Symphony B: Осуществление процесса набухания смолы", "Способ Symphony B: Методика стандартного присоединения", "Способ Symphony B: Методика присоединения к вторичному амину", "Методика А присоединения вручную", "Способ Symphony B: Методика заключительного экпирования", "Способ F полного снятия защиты" и "Способ D циклизации".

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: Waters XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил: вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 15-65% В в течение 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 6,0 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 100%.

Условия D проведения анализа LCMS: время удерживания = 1,60 мин; ESI-MS(+) m/z 934,0 (M+2H).

Условия E проведения анализа LCMS: время удерживания = 1,52 мин; ESI-MS(+) m/z 933,9 (M+2H).

Получение соединения примера 1003



Соединение примера 1003 получали на смоле Rink на основе общей последовательности синтеза, описанной для получения соединения примера 1001, состоящей из следующих общих методик: "Способ Symphony B: Осуществление процесса набухания смолы", "Способ Symphony B: Методика стандартного присоединения", "Способ Symphony B: Методика присоединения к вторичному амину", "Методика А присоединения вручную", "Способ Symphony B: Методика заключительного эквипирования", "Способ F полного снятия защиты" и "Способ D циклизации".

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: Waters XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 15-65% В в течение 25 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 2,2 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 100%.

Условия D проведения анализа LCMS: время удерживания = 1,58 мин; ESI-MS(+) m/z 926,7 (M+2H).

Условия E проведения анализа LCMS: время удерживания = 1,51 мин; ESI-MS(+) m/z 926,2 (M+2H). Соединение 5001. Данные анализа.

Масс-спектрометрия: "ESI-MS(+)" означает масс-спектрометрию с ионизацией электростатическим распылением, проводимую в режиме регистрации положительно-заряженных ионов; "ESI-MS(-)" означает масс-спектрометрию с ионизацией электростатическим распылением, проводимую в режиме регистрации отрицательно-заряженных ионов; "ESI-HRMS(+)" означает высокоэффективную масс-спектрометрию с ионизацией электростатическим распылением, проводимую в режиме регистрации положительно-заряженных ионов; "ESI-HRMS(-)" означает высокоэффективную масс-спектрометрию с ионизацией электростатическим распылением, проводимую в режиме регистрации отрицательно-заряженных ионов. Обнаруженные массы приводят после условного обозначения "m/z". Соединения с точными массами более 1000 часто определяют как двухзарядные или трехзарядные ионы.

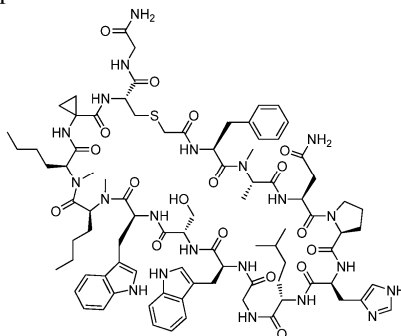
Соединение 5001. Условия А проведения анализа.

Колонка: Waters VEN C18, 2,0×50 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; температура: 50°C; градиент: 0%B, 0-100% В в течение 3 мин, затем выдерживание в течение 0,5 мин при 100% В; поток: 1 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм.

Соединение 5001. Условия В проведения анализа.

Колонка: Waters VEN C18, 2,0×50 мм, частицы размером 1,7 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; температура: 50°C; градиент: 0%B, 0-100% В в течение 3 мин, затем выдерживание в течение 0,5 мин при 100% В; поток: 0,5 мл/мин; обнаружение: УФ при 220 нм.

Получение соединения примера 5001



Соединение примера 5001 получали следующим образом. В полипропиленовый сосуд объемом 10 мл для твердофазной реакции добавляли смолу Rink-Merrifield (178 мг, 0,100 ммоль) и помещали реакционный сосуд в синтезатор пептидов Prelude. Осуществляли "Способ Prelude A: Осуществление процес-

са набухания смолы". Затем на синтезаторе Prelude последовательно проводили серию присоединений аминокислот следуя "Способу Prelude A: Методика одноэтапного присоединения", если N-конец связанного со смолой пептида представлял собой первичный амин, или следуя "Способу Prelude A: Методика двухэтапного присоединения" если N-конец связанного со смолой пептида представлял собой вторичный амин. Осуществляли "Способ Prelude A: Методика присоединения хлорацетилхлорида"; затем осуществляли "Способ A полного снятия защиты"; а затем осуществляли "Способ A циклизации". Как было отмечено, в синтезе использовали 1-(((9Н-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)циклопропанкарбовую кислоту (Fmoc-Asp(OH)). Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 mM ацетата аммония; градиент: 10-50% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 14,1 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 95%.

Условие анализа А: время удерживания = 2,10 мин; ESI-MS(+) m/z 888,3 (M-2H).

Условие анализа В: время удерживания = 2,85 мин; ESI-MS(+) m/z 890,5 (M+2H).

Все примеры, представленные ниже, получали следующей описанной выше "Общей последовательностью синтеза А"

Общая последовательность синтеза А.

"Общая последовательность синтеза А" описывает общую последовательность методик, которые использовали для получения циклических пептидов, описанных в настоящем документе. В контексте этой общей методики, методики "Способа Symphony А" взаимозаменяемы с таковыми в "Способе Prelude А". В полипропиленовый сосуд объемом 10 мл для твердофазной реакции добавляли смолу Rink-Merrifield (178 мг, 0,100 ммоль) и помещали реакционный сосуд в синтезатор пептидов Prelude. Осуществляли "Способ Prelude А: Осуществление процесса набухания смолы". Затем на синтезаторе Prelude последовательно проводили серию присоединений аминокислот следуя "Способу Prelude А: Методика одноэтапного присоединения", если N-конец связанного со смолой пептида представлял собой первичный амин, или следуя "Способу Prelude А: Методика двухэтапного присоединения" если N-конец связанного со смолой пептида представлял собой вторичный амин. Осуществляли "Способ Prelude А: Методика присоединения хлорацетилхлорида"; затем осуществляли "Способ А полного снятия защиты"; а затем осуществляли "Способ А циклизации".

Общие методики.

Способ Prelude А.

Все манипуляции проводили в автоматическом режиме на синтезаторе пептидов Prelude (Protein Technologies). Если не указано иное, то все методики проводили в полипропиленовой пробирке объемом 10 мл, снабженной нижней фриттой; если масштаб реакции превышал 0,100 ммоль, использовали полипропиленовую пробирку объемом 40 мл, снабженную нижней фриттой. Пробирку соединяли с синтезатором пептидов Prelude как через нижнюю, так и через верхнюю часть пробирки. DMF и DCM могут быть добавлены через верхнюю часть пробирки, смыв вниз по сторонам которой происходит в равной мере. Остальные реагенты добавляли через нижнюю часть пробирки и пропускали через фритту для контакта со смолой. Все растворы удаляли через нижнюю часть пробирки. "Периодическое перемешивание" описывает краткий выброс газообразного N₂ через нижнюю фритту; выброс длился приблизительно 5 с и происходил каждые 30 с. Растворы хлорацетилхлорида в DMF использовали в течение 24 ч после получения. Растворы аминокислот, как правило, не использовали позже трех недель после приготовления. Растворы HATU использовали в течение 5 суток после получения. DMF = диметилформамид; HATU = 1-[бис(диметиламино)метил]-1Н-1,2,3-триазоло[4,5-б]пиридиний 3-оксидгексафторфосфат; DIPEA = диизопропилэтиламин; смола Rink = ((2,4-диметоксифенил)(4-алкоксифенил)метанамин, где "4-алкокси" описывает положение и тип связывания с полистироловой смолой. Используемая смола представляет собой полимер Merrifield (полистирол) с линкером Rink (Fmoc-защищенным по азоту); 100-200 меш, 1% DVB, загрузка 0,56 ммоль/г. Обычно используемые аминокислоты перечислены ниже с указанными в круглых скобках защитными группами боковых цепей.

Fmoc-Ala-OH; Fmoc-Arg(Pbf)-OH; Fmoc-Asn(Trt)-OH; Fmoc-Asp(OtBu)-OH;

Fmoc-Bzt-OH; Fmoc-Cys(Trt)-OH; Fmoc-Dab(Boc)-OH; Fmoc-Dap(Boc)-OH; Fmoc-

Gln(Trt)-OH; Fmoc-Gly-OH; Fmoc-His(Trt)-OH; Fmoc-Hyp(tBu)-OH; Fmoc-Ile-OH; Fmoc-

Leu-OH; Fmoc-Lys(Boc)-OH; Fmoc-Nle-OH; Fmoc-Met-OH; Fmoc-[N-Me]Ala-OH; Fmoc-

[N-Me]Nle-OH; Fmoc-Phe-OH; Fmoc-Pro-OH; Fmoc-Sar-OH; Fmoc-Ser(tBu)-OH; Fmoc-

Thr(tBu)-OH; Fmoc-Trp(Boc)-OH; Fmoc-Tyr(tBu)-OH; Fmoc-Val-OH.

Методики "Способа Prelude А" описывают эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяется количеством связанного со смолой линкера Rink. Этот масштаб соответствует приблизительно 178 мг описанной выше смолы Rink-Merrifield. Все методики могут быть выполнены в

масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. Перед присоединением аминокислот все последовательности синтеза пептидов начинают с осуществления процесса набухания смолы, описанного ниже как "Осуществление процесса набухания смолы". Для присоединения аминокислот к N-концу первичного амина использовали описанную ниже "Методику одноэтапного присоединения". Для присоединения аминокислот к N-концу вторичного амина использовали описанную ниже "Методику двухэтапного присоединения". Присоединение хлорацетилхлорида к N-концу пептида описывали "Методикой присоединения хлорацетилхлорида", конкретизированной ниже.

Осуществление процесса набухания смолы.

В полипропиленовый сосуд объемом 10 мл для твердофазной реакции добавляли смолу Merrifield:Rink (178 мг, 0,100 ммоль). Смолу трижды промывали (осуществляли процесс набухания) следующим образом: в реакционный сосуд добавляли DMF (2,0 мл), затем смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, после чего сливали растворитель через фритту.

Методика одноэтапного присоединения.

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,0 мл, 2 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,0 мл, 2 экв.) и в завершение DIPEA (0,8 М в DMF, 0,5 мл, 4 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли уксусный ангидрид (2,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика двухэтапного присоединения.

В реакционный сосуд, содержащий смолу с предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,0 мл, 2 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,0 мл, 2 экв.) и в завершение DIPEA (0,8 М в DMF, 0,5 мл, 4 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу дважды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли аминокислоту (0,2 М в DMF, 1,0 мл, 2 экв.), затем HATU (0,2 М в DMF, 1,0 мл, 2 экв.) и в завершение DIPEA (0,8 М в DMF, 0,5 мл, 4 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 15 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу дважды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли уксусный ангидрид (2,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 10 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу использовали непосредственно на следующей стадии.

Методика присоединения хлорацетилхлорида.

В реакционный сосуд, содержащий смолу из предыдущей стадии, добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли пиперидин:DMF (20:80 об./об., 2,0 мл). Смесь периодически перемешивали в течение 3 или 5 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно шесть раз промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли DMF (2,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 30 с, после чего сливали раствор через фритту. В реакционный сосуд добавляли DIPEA (0,8 М в DMF, 3,0 мл, 24 экв.), а затем хлорацетилхлорид (0,8 М в DMF, 1,65 мл, 13,2 экв.). Смесь периодически перемешивали в течение 30 мин, а затем сливали раствор через фритту. Смолу последовательно трижды промывали следующим образом:

для каждой промывки DMF (2,0 мл) через верхнюю часть сосуда добавляли и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Смолу последовательно четырежды промывали следующим образом: для каждой промывки через верхнюю часть сосуда добавляли CH_2Cl_2 (2,0 мл) и периодически перемешивали полученную смесь в течение 90 с, после чего сливали раствор через фритту. Полученную смолу помещали под струю N_2 на 15 мин.

Способ Symphony A.

Если не указано иное, то этот набор методик идентичен таковому, описанному для "Способа Prelude A". Для всех методик вместо синтезатора пептидов Prelude использовали синтезатор пептидов Symphony X (Protein Technologies) и все реагенты добавляли через верхнюю часть реакционного сосуда.

Осуществление процесса набухания смолы.

Эта методика идентична "Способу Prelude A: Осуществление процесса набухания смолы".

Методика одноэтапного присоединения.

Эта методика идентична "Способу Prelude A: Методика одноэтапного присоединения" за исключением того, что концентрация раствора DIPEA составляла 0,4 М и в реакционную смесь добавляли 1,0 мл этого раствора.

Методика двухэтапного присоединения.

Эта методика идентична "Способу Prelude A: Методика двухэтапного присоединения" за исключением того, что концентрация раствора DIPEA составляла 0,4 М и в реакционную смесь добавляли 1,0 мл этого раствора.

Методика присоединения хлорацетилхлорида.

Эта методика идентична "Способу Prelude A: Методика присоединения хлорацетилхлорида".

Способ А полного снятия защиты.

Если не указано иное, то все манипуляции выполняли вручную. Методика "Способа А полного снятия защиты" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяется количеством связанного со смолой линкера Rink. Методика может быть выполнена в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. "Раствор для снятия защиты" получали путем объединения в стеклянном флаконе объемом 40 мл трифторуксусной кислоты (22 мл), фенола (1,325 г), воды (1,25 мл) и триизопропилсилана (0,5 мл). Смолу удаляли из реакционного сосуда и переносили в стеклянный флакон объемом 4 мл. Во флакон добавляли "раствор для снятия защиты" (2,0 мл). Смесь энергично перемешивали на шейкере (1000 об/мин в течение 1 мин, затем 500 об/мин в течение 1-2 ч). Смесь фильтровали через шприцевой 0,2 мкм фильтр и экстрагировали твердые вещества "раствором для снятия защиты" (1,0 мл) или TFA (1,0 мл). В пробирку объемом 24 мл с загруженными объединенными фильтрами добавляли Et_2O (15 мл). Смесь энергично перемешивали, после чего в осадок выпадало значительное количество белого твердого вещества. Смесь центрифугировали в течение 5 мин, а затем сливали раствор с твердых веществ и удаляли. Твердые вещества суспендировали в Et_2O (20 мл); а затем центрифугировали смесь в течение 5 мин; и сливали раствор с твердых веществ и удаляли. В завершение твердые вещества суспендировали в Et_2O (20 мл); смесь центрифугировали в течение 5 мин; и сливали раствор с твердых веществ и удаляли с получением неочищенного пептида в виде твердого вещества от белого до грязно-белого цвета.

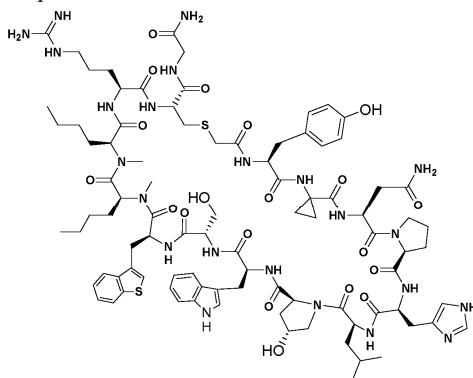
Способ А циклизации.

Если не указано иное, то все манипуляции выполняли вручную. Методика "Способа А циклизации" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяется количеством связанного со смолой линкера Rink, которую использовали для получения пептида. Этот масштаб не основан на прямом определении количества пептида, используемого в методике. Методика может быть выполнена в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. Неочищенные твердые пептиды растворяли в MeCN/0,1 М водн. NH_4OAc (30 мл:30 мл), а затем осторожно доводили pH раствора до 8,5-9,0 добавлением водн. NaOH (1,0 М). Затем раствор оставляли отстаиваться без перемешивания в течение 12-18 ч. Реакционный раствор концентрировали, а затем растворяли остаток в DMSO:MeOH. Этот раствор подвергали очистке методом обращенно-фазовой HPLC с получением требуемого циклического пептида.

Способ В циклизации.

Если не указано иное, то все манипуляции выполняли вручную. Методика "Способа В циклизации" описывает эксперимент, выполненный в масштабе 0,100 ммоль, где масштаб определяется количеством связанного со смолой линкера Rink, которую использовали для получения пептида. Этот масштаб не основан на прямом определении количества пептида, используемого в методике. Методика может быть выполнена в масштабе более 0,100 ммоль путем корректировки описанных объемов с помощью кратного увеличения масштаба. Неочищенные твердые пептиды растворяли в MeCN/0,1 М водн. NH_4OAc (1:1) до общего объема 18-22 мл, а затем осторожно доводили pH раствора до 8,5-9,0 добавлением водн. NaOH (1,0 М). Затем раствор оставляли отстаиваться без перемешивания в течение 12-18 ч. Реакционный раствор концентрировали, а затем растворяли остаток в DMSO:MeOH. Этот раствор подвергали очистке методом обращенно-фазовой HPLC с получением требуемого циклического пептида.

Получение соединения примера 9001



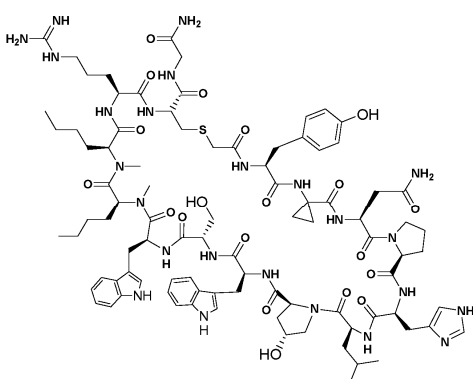
Соединение примера 9001

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 20-60% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 19,4 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 100%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,62 мин; ESI-MS(+) m/z 963,4 (M+2H).

Условие анализа В: время удерживания = 2,84 мин; ESI-MS(+) m/z 963,8 (M+2H).

Получение соединения примера 9002



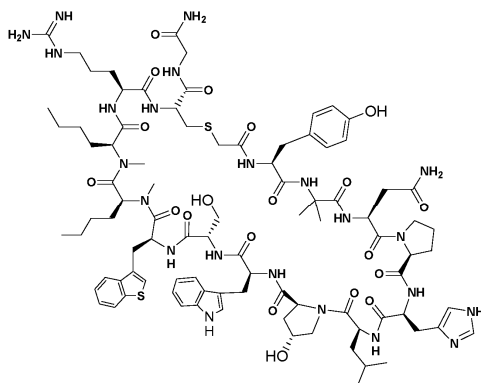
Соединение примера 9002

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 40-80% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 24,0 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 100%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,63 мин; ESI-MS(+) m/z 954,75 (M+2H).

Условие анализа В: время удерживания = 3,11 мин; ESI-MS(+) m/z 954,25 (M+2H).

Получение соединения примера 9003



Соединение примера 9003

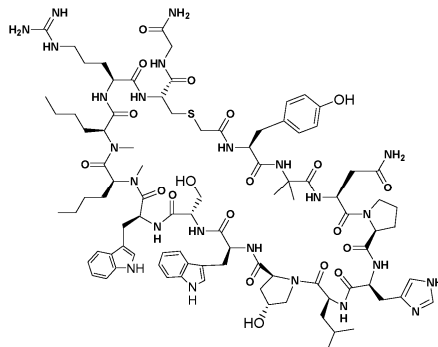
Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ

ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 15-55% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 35,5 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 97%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,61 мин; ESI-MS(+) m/z 964,3 (M+2H).

Условие анализа В: время удерживания = 2,84 мин; ESI-MS(+) m/z 964,1 (M+2H).

Получение соединения примера 9004



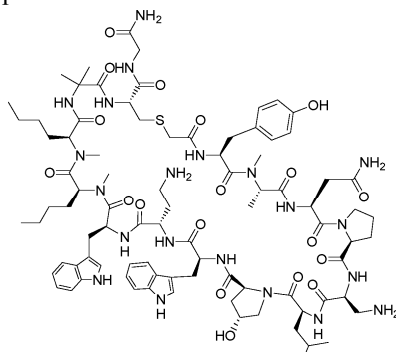
Соединение примера 9004

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 45-85% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 23,9 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 99%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,48 мин; ESI-MS(+) m/z 956,0 (M+2H).

Условие анализа В: время удерживания = 2,67 мин; ESI-MS(+) m/z 955,7 (M+2H).

Получение соединения примера 9005

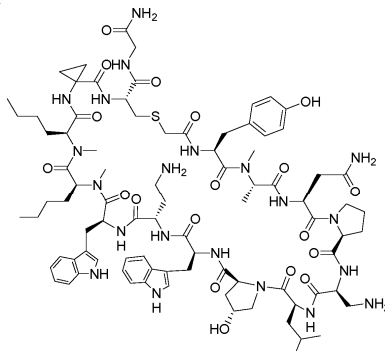


Соединение примера 9005

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 40-80% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 18,8 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 99%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,64 мин; ESI-MS(+) m/z 901,6 (M+2H).

Получение соединения примера 9006

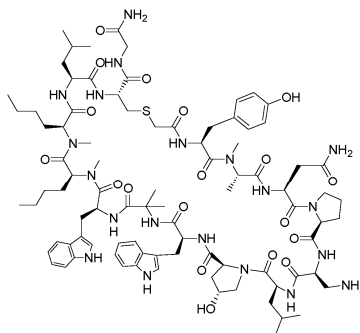


Соединение примера 9006

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 50-90% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 40,5 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 100%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,59 мин; ESI-MS(+) m/z 900,3 (M+2H).

Получение соединения примера 9007

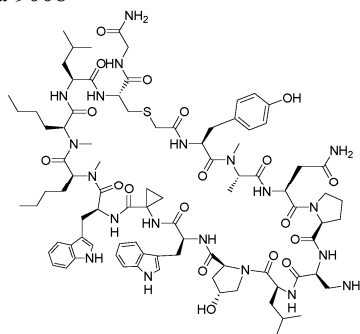


Соединение примера 9007

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 45-90% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Вещество дополнительно очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: Waters CSH C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 5-45% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 19,3 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 100%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,95 мин; ESI-MS(+) m/z 907,8 (M+2H).

Получение соединения примера 9008

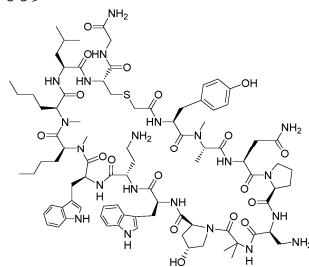


Соединение примера 9008

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 45-85% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 14,1 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 98%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,90 мин; ESI-MS(+) m/z 906,6 (M+2H).

Получение соединения примера 9009

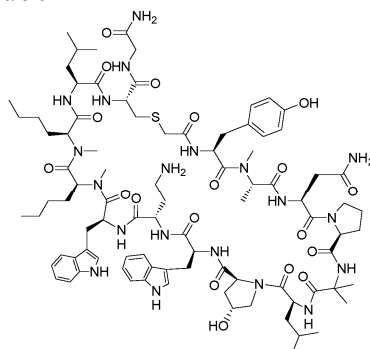


Соединение примера 9009

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 40-80% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Вещество дополнительно очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 5-45% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 2,2 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 91%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,73 мин; ESI-MS(+) m/z 901,4 (M+2H).

Получение соединения примера 9011

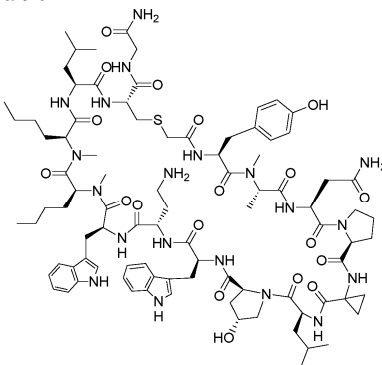


Соединение примера 9011

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 40-85% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 29,2 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 98%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,81 мин; ESI-MS(+) m/z 914,8 (M+2H).

Получение соединения примера 9012

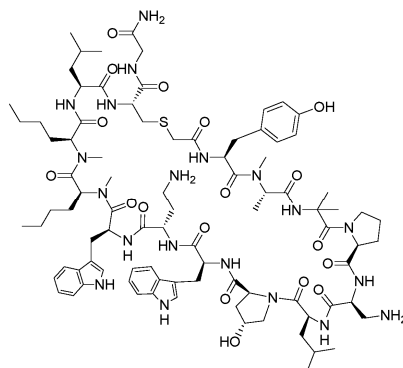


Соединение примера 9012

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 40-85% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Вещество дополнительно очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 15-55% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 16,4 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 96%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,97 мин; ESI-MS(+) m/z 914,3 (M+2H).

Получение соединения примера 9013

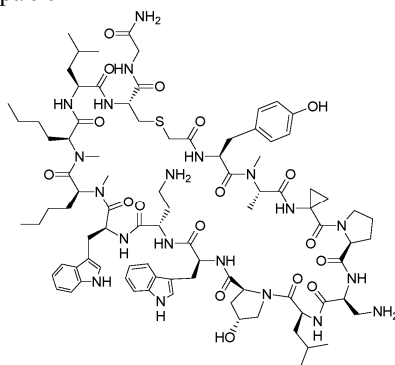


Соединение примера 9013

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 45-85% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 21,9 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 97%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,78 мин; ESI-MS(+) m/z 901,4 (M+2H).

Получение соединения примера 9014

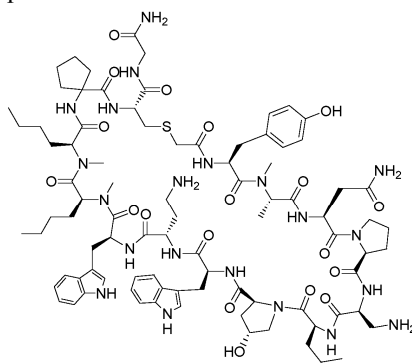


Соединение примера 9014

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 метанол:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 50-90% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 35,3 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 97%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,76 мин; ESI-MS(+) m/z 900,2 (M+2H).

Получение соединения примера 9015

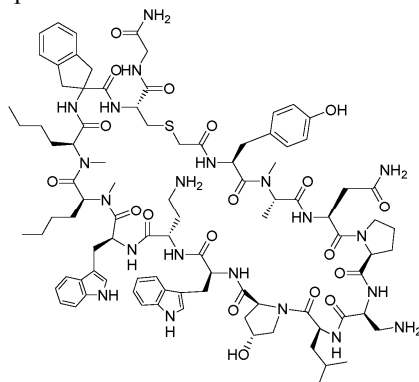


Соединение примера 9015

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 15-55% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 15,8 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 99%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,56 мин; ESI-MS(+) m/z 914,3 (M+2H).

Получение соединения примера 9016

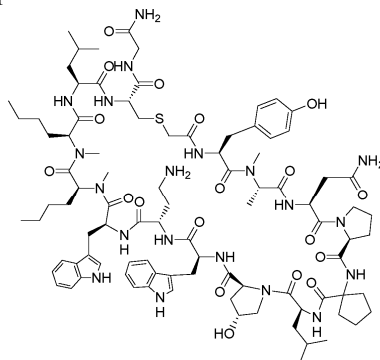


Соединение примера 9016

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: Waters CSH C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил: вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил: вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; градиент: 15-55% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 17,1 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 94%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,65 мин; ESI-MS(+) m/z 938,1 (M+2H).

Получение соединения примера 9017

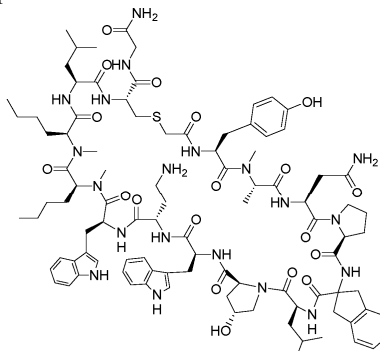


Соединение примера 9017

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 20-60% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Вещество дополнительно очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: Waters CSH C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 25-65% В в течение 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 20,3 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 97%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,76 мин; ESI-MS(+) m/z 927,9 (M+2H).

Получение соединения примера 9018

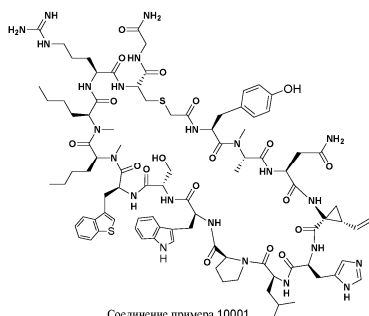


Соединение примера 9018

Неочищенное вещество очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: Waters CSH c-18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил: вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил: вода с 0,1% трифторуксусной кислотой; градиент: 20-60% В в течение 30 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 4,8 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 96%.

Условие анализа А: время удерживания = 184 мин; ESI-MS(+) m/z 951,9 (M+2H).

Получение соединения примера 10001

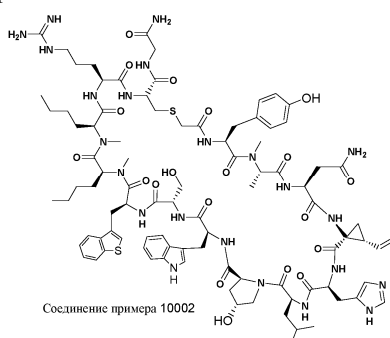


Неочищенное вещество соединения примера 10001 очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 20-60% В в течение 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 16,5 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 95%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,82 мин; ESI-MS(+) m/z 962,8 (M+2H).

Условие анализа В: время удерживания = 2,98 мин; ESI-MS(+) m/z 962,8 (M+2H).

Получение соединения примера 10002

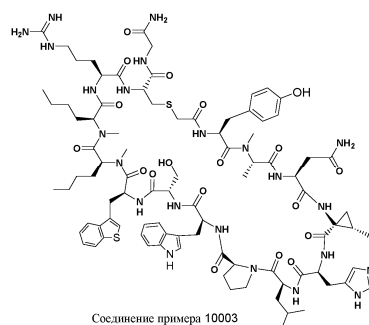


Неочищенное вещество соединения примера 10002 очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 20-60% В в течение 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 3,9 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 100%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,81 мин; ESI-MS(+) m/z 970,9 (M+2H).

Условие анализа В: время удерживания = 2,98 мин; ESI-MS(+) m/z 970,8 (M+2H).

Получение соединения примера 10003



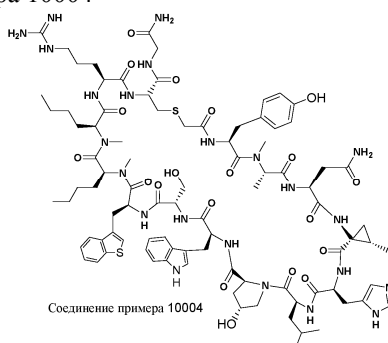
Неочищенное вещество соединения примера 10003 очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 20-60% В в течение 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 33,4 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 97%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,76 мин; ESI-MS(+) m/z 957,0 (M+2H).

Условие анализа В: время удерживания = 2,97 мин; ESI-MS(+) m/z 956,8 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 955,9633 (M+2H): обнаружено: 955,9610 (M+2H).

Получение соединения примера 10004



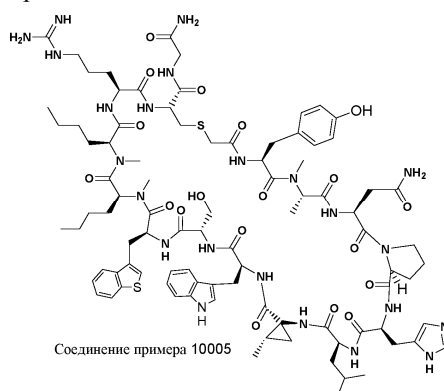
Неочищенное вещество соединения примера 10004 очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 20-60% В в течение 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 17,2 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 100%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,72 мин; ESI-MS(+) m/z 964,8 (M+2H).

Условие анализа В: время удерживания = 2,97 мин; ESI-MS(+) m/z 964,7 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 963,9607 (M+2H): обнаружено: 963,9581 (M+2H).

Получение соединения примера 10005



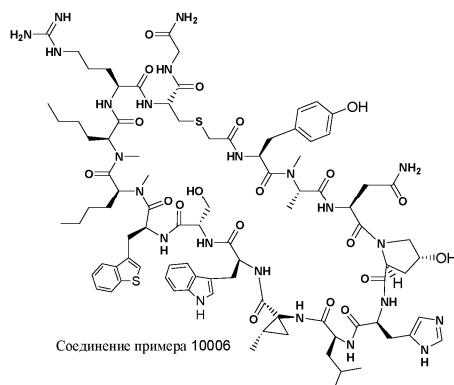
Неочищенное вещество соединения примера 10005 очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 20-60% В в течение 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 10,0 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 100%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,65 мин; ESI-MS(+) m/z 956,6 (M+2H).

Условие анализа В: время удерживания = 2,87 мин; ESI-MS(+) m/z 956,7 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 955,9633 (M+2H): обнаружено: 955,9601 (M+2H).

Получение соединения примера 10006



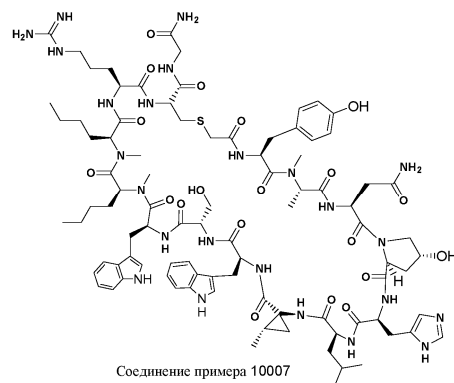
Неочищенное вещество соединения примера 10006 очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 20-60% В в течение 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 12,1 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 100%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,61 мин; ESI-MS(+) m/z 965,1 (M+2H).

Условие анализа В: время удерживания = 2,85 мин; ESI-MS(+) m/z 965,0 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 963,9580 (M+2H): обнаружено: 963,9607 (M+2H).

Получение соединения примера 10007



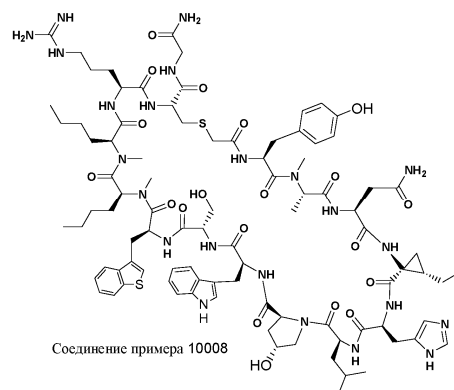
Неочищенное вещество соединения примера 10007 очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 20-60% В в течение 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 13,3 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 100%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,51 мин; ESI-MS(+) m/z 956,7 (M+2H).

Условие анализа В: время удерживания = 2,66 мин; ESI-MS(+) m/z 956,3 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 955,4801 (M+2H): обнаружено: 955,4766 (M+2H).

Получение соединения примера 10008



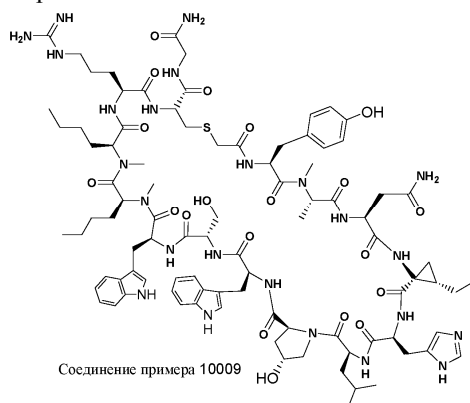
Неочищенное вещество соединения примера 10008 очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 20-60% В в течение 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 16,1 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 100%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,73 мин; ESI-MS(+) m/z 971,8 (M+2H).

Условие анализа В: время удерживания = 2,96 мин; ESI-MS(+) m/z 911,1 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 970,9686 (M+2H): обнаружено: 970,9667 (M+2H).

Получение соединения примера 10009



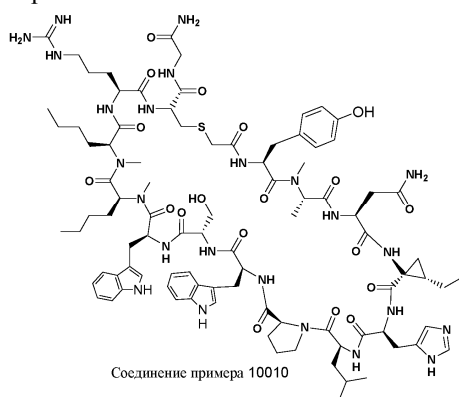
Неочищенное вещество соединения примера 10009 очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 20-60% В в течение 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 44,3 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 97%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,67 мин; ESI-MS(+) m/z 963,2 (M+2H).

Условие анализа В: время удерживания = 2,86 мин; ESI-MS(+) m/z 963,3 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 962,4880 (M+2H): обнаружено: 962,4857 (M+2H).

Получение соединения примера 10010



Неочищенное вещество соединения примера 10010 очищали методом препаративной LC/MS при следующих условиях: колонка: XBridge C18, 19×200 мм, частицы размером 5 мкм; подвижная фаза А: 5:95 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; подвижная фаза В: 95:5 ацетонитрил:вода с 10 мМ ацетата аммония; градиент: 20-60% В в течение 15 мин, затем выдерживание в течение 5 мин при 100% В; поток: 20 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, объединяли и сушили выпариванием на центрифуге. Выход продукта составлял 31,1 мг, а его расчетная чистота согласно данным анализа LCMS составляла 99%.

Условие анализа А: время удерживания = 1,71 мин; ESI-MS(+) m/z 955,2 (M+2H).

Условие анализа В: время удерживания = 2,89 мин; ESI-MS(+) m/z 955,4 (M+2H).

ESI-HRMS(+) m/z: рассчитано: 954,4905 (M+2H): обнаружено: 954,4881 (M+2H).

Способы исследования способности макроциклических пептидов конкурировать за связывание PD-1 с PD-L1 с использованием анализа связывания гомогенной флуоресценцией с временным разрешением (HTRF)

Способность макроциклических пептидов согласно настоящему изобретению связываться с PD-L1 исследовали с использованием анализа связывания гомогенной флуоресценцией с временным разрешением (HTRF) PD-1/PD-L1.

Способы

Анализ связывания гомогенной флуоресценцией с временным разрешением (HTRF) растворимого PD-1 с растворимым PD-L1. Растворимый PD-1 и растворимый PD-L1 относится к белкам с карбоксильными концевыми укорочениями, которые удаляли трансмембранные перекрывающиеся области и слиты с гетерологичными последовательностями, в частности, частью Fc последовательности G человеческого иммуноглобулина (Ig) или гексагистидиновым эпитопным тегом (His). Все исследования связывания проводили в буфере для анализа HTRF, состоящем из dPBS с добавлением 0,1% (вес/объем) бычьим сыроточным альбумином и 0,05% (об/об) Tween-20. Для анализа связывания PD-1-Ig/PD-L1-His ингибиторы предварительно инкубировали с PD-L1-His (конечная концентрация 10 нМ) в течение 15 мин в 4 мкл буфера для анализа, с последующим добавлением PD-1-Ig (конечная концентрация 20 нМ) в 1 мкл буфера для анализа и дальнейшей инкубацией в течение 15 мин. Использовали слитые белки PD-L1 либо от человека, яванских макаков, либо от мыши или другие образцы. Обнаружение HTRF достигали с использованием меченого еуропиум криплатом моноклонального антитела к Ig (конечная концентрация 1 нМ) и меченого аллофикоцианином (APC) моноклонального антитела к His (конечная концентрация 20 нМ). Антитела разводили в буфере обнаружения HTRF и 5 мкл разливали на верхнюю часть реакции связывания. Реакционную смесь оставляли для уравнивания в течение 30 мин и сигнал (соотношение 665 нм/620 нм) получали с использованием флуориметра En Vision. Проводили дополнительные анализы связывания между PD-1-Ig/PD-L2-His (20 и 5 нМ, соответственно), CD80-His/PD-L1-Ig (100 и 10 нМ, соответственно) и CD80-His/CTLA4-Ig (10 нМ и 5 нМ, соответственно). Исследования связывания/конкурентные исследования между биотинилированным соединением № 71 и человеческим PD-L1-His проводили следующим образом. Ингибиторы макроциклических пептидов предварительно инкубировали с PD-L1-His (конечная концентрация 10 нМ) в течение 60 мин в 4 мкл буфера для анализа с последующим добавлением биотинилированного соединения № 71 (конечная концентрация 0,5 нМ) в 1 мкл буфера для анализа. Связывание уравнивали в течение 30 мин с последующим добавлением меченого еуропиум криплатом стрептавидина (конечная концентрация 2,5 пМ) и мечеными APC анти-His (конечная концентрация 20 нМ) в 5 мкл буфера HTRF. Реакционную смесь оставляли для уравнивания в течение 30 мин и сигнал (соотношение 665 нм/620 нм) получали с использованием флуориметра En Vision.

Рекомбинантные белки. Человеческий PD-1 с усеченным карбоксиллом (аминокислоты 25-167) с C-концевым тегом эпитопа человеческого Ig [hPD-1(25-167)-3S-IG] и человеческий PD-L1 (аминокислоты 18-239) с C-концевым тегом His эпитопа [hPD-L1(19-239)-сайт расщепления протеазой вируса мозаики жилок табака (TVMV)-His] экспрессировали в Т-клетках HEK293 и последовательно очищали с помощью аффинной хроматографии и гель-проникающей хроматографии рекомбинантного белка А. Человеческий PD-L2-His (Sino Biologicals), CD80-His (Sino Biologicals), CTLA4-Ig (RnD Systems) получали из коммерчески доступных источников.

Последовательность рекомбинантного человеческого PD-1-Ig

hPD1(25-167)-3S-IG

1	LDSPDRPWNF	PTFSPALLVV	TEGDNATFTC	SFSNTSESFV	LNWYRMSFSN
51	QTDKLAAPFE	DRSQPGQDCR	FRVTQLPNGR	DFHMSVVRAR	RNDSGTYLCCG
101	AISLAPKAQI	KESLRAELRV	TERRAEVPTA	HPSPSPRPAG	QFQSGPGGGG
151	GREPKSSDKT	HTSPSPPAPE	LLGGSSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV
201	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW
251	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKARGQP	REPQVYTLFP	SRDELTKNQV
301	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD
351	KSRWQQGNVF	SCSVMEALH	NHYTQKSLSL	SPGK	

(SEQ ID NO:1)

Последовательность рекомбинантного человеческого PD-L1-TVMV-His (PD-L1-His)

hPD1(19-239)-TVMV-His

1	FTVTVPKDLV	VVEYGSNMTI	ECKFPVEKQL	DLAALIVYWE	MEDKNIIQFV
51	HGEEDLKVQH	SSYRQRARLL	KDQLSLGNAA	LQITDVKLQD	AGVYRCMISY
101	GGADYKRITV	KVNAPYNKIN	QRILVVDVPT	SEHELTCQAE	GYPKAEVIWT
151	SSDHQVLSGK	TTTTNSKREE	KLFNVTSTLR	INTTTNEIFY	CTFRRLDPEE
201	NHTAELVIPE	LPLANPPNER	TGSSETVRFQ	GHHNNHHH	

(SEQ ID NO:2)

Результаты показаны в табл. 1. Как показано, макроциклические пептиды согласно настоящему изобретению демонстрировали мощное ингибирование активности связывания PD-1-Ig с PD-L1-TVMV-His (PD-L1-His). Диапазоны следующие: А = 0,10-10 мкМ; В = 0,01-0,099 мкМ; С = 0,004 - 0,0099 мкМ.

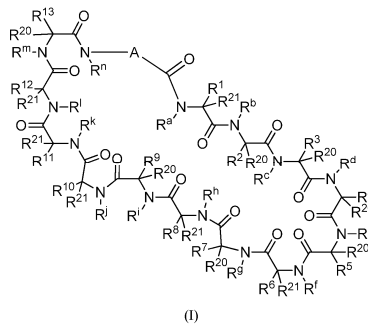
Таблица 1

Номер примера	HTRF IC50 (мкМ)
Пример 9001	С
Пример 9002	4,13Е-03
Пример 9003	В
Пример 9004	В
Пример 9013	А
Пример 9014	А
Пример 10001	А
Пример 10002	0,20
Пример 10003	А
Пример 10004	В
Пример 10008	В
Пример 10009	А
Пример 10010	А
Пример 9011	0,02
Пример 9012	В
Пример 9017	В
Пример 9018	В
Пример 9009	А
Пример 1001	А
Пример 1002	А
Пример 10005	1,00
Пример 10006	А
Пример 10007	А
Пример 1003	А
Пример 9007	А
Пример 9008	3,62
Пример 5001	А
Пример 9005	А
Пример 9006	0,04
Пример 9015	В
Пример 9016	В

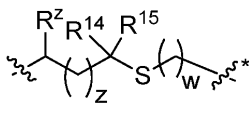
Специалисту настоящей области техники будет понятно, что настоящее изобретение не должно быть ограничено раскрытыми выше иллюстративными примерами, и что оно может быть воплощено в других конкретных формах без отклонения от его основных признаков. Таким образом, необходимо, чтобы примеры рассматривали во всех отношениях как иллюстративные, а не ограничивающие, ссылки были сделаны на приложенную формулу изобретения, а не вышеуказанные примеры, и предусмотрено, что все изменения, которые подпадают под значение и диапазон равноценности формулы изобретения, таким образом включены в настоящее описание.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль, где
А представляет собой



где обозначает точку присоединения к карбонильной группе и обозначает точку присоединения к атому азота;

z равно 0;

w равно 1;

R^{14} и R^{15} представляют собой водород и

R^z представляет собой $-C(O)NHR^{16}$, где R^{16} представляет собой $-CHR^{17}C(O)NH_2$; где R^{17} выбран из водорода и $-CH_2OH$;

$R^a, R^c, R^e, R^f, R^h, R^i, R^j, R^m$ и R^n представляют собой водород;

R^b представляет собой водород или метил;

R^d представляет собой водород или метил, или R^d и R^4 могут образовывать кольцо, как указано ниже;

R^e представляет собой водород или метил, или R^e и R^7 могут образовывать кольцо, как указано ниже;

каждый R^{20} независимо выбран из водорода и C_1 - C_6 алкила;

каждый R^{21} независимо выбран из водорода и C_1 - C_6 алкила;

R^3 представляет собой $-CH_2C(O)NH_2$ или совместно с присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} может образовывать трех-шестичленное карбоциклическое кольцо или шестичленное кольцо, содержащее атом кислорода или атом азота, с соответствующей присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , причем кольцо необязательно замещено одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из C_1 - C_3 алкокси, C_1 - C_3 алкила, C_2 - C_4 алкенила, галогена, гидрокси и amino, и где пяти- или шестичленное кольцо необязательно конденсировано с фенильным кольцом;

R^4 и R^d вместе с атомами, к которым они присоединены, могут образовывать кольцо, выбранное из азетидина, пирролидина, морфолина, пиперидина, пиперазина и тетрагидроиазола; причем каждое кольцо необязательно замещено одной-четырьмя группами, независимо выбранными из amino, циано, метила, галогена, гидрокси и фенила, или R^4 совместно с присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} может образовывать трех-шестичленное карбоциклическое кольцо или шестичленное кольцо, содержащее атом кислорода или атом азота, с соответствующей присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , причем кольцо необязательно замещено одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из C_1 - C_3 алкокси, C_1 - C_3 алкила, C_2 - C_4 алкенила, галогена, гидрокси и amino, и где пяти- или шестичленное кольцо необязательно конденсировано с фенильным кольцом;

R^5 представляет собой метил, $-CH_2NH_2$, $-(CH_2)$ имидазол или вместе с присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} может образовывать трех-шестичленное карбоциклическое кольцо или шестичленное кольцо, содержащее атом кислорода или атом азота, с соответствующей присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , причем кольцо необязательно замещено одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из C_1 - C_3 алкокси, C_1 - C_3 алкила, C_2 - C_4 алкенила, галогена, гидрокси и amino, и где пяти- или шестичленное кольцо необязательно конденсировано с фенильным кольцом;

R^6 представляет собой метил, изобутил или $-(CH_2)$ изобутил;

R^7 представляет собой водород, метил, или R^7 и R^e вместе с атомами, к которым они присоединены, могут образовывать кольцо, выбранное из азетидина, пирролидина, морфолина, пиперидина, пиперазина и тетрагидроиазола; причем каждое кольцо необязательно замещено одной-четырьмя группами, независимо выбранными из amino, бензила, необязательно замещенного группой галогена, бензилокси, циано, циклогексила, метила, галогена, гидрокси, изохинолинокси, необязательно замещенного метоксигруппой, хинолинокси, необязательно замещенного галогеновой группой, тетразолила; и причем пирролидиновое и пиперидиновое кольцо необязательно конденсированы с циклогексильной, фенильной или индольной группой; или R^7 вместе с присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} может образовывать трех-шестичленное карбоциклическое кольцо или шестичленное кольцо, содержащее атом кислорода или атом азота, с соответствующей присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , причем кольцо необязательно замещено одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из C_1 - C_3 алкокси, C_1 - C_3 алкила, C_2 - C_4 алкенила, галогена, гидрокси и amino, и где пяти- или шестичленное кольцо необязательно конденсировано с фенильным кольцом;

R^8 представляет собой $-(CH_2)$ индолил;

R^9 представляет собой метил, $-CH_2OH$, $-(CH_2)_2NH_2$ или вместе с присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} может образовывать трех-шестичленное карбоциклическое кольцо или шестичленное кольцо, содержащее атом кислорода или атом азота, с соответствующей присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , причем кольцо необязательно замещено одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из C_1 - C_3 алкокси, C_1 - C_3 алкила, C_2 - C_4 алкенила, галогена, гидрокси и ами-

но, и где пяти- или шестичленное кольцо необязательно конденсировано с фенильным кольцом;

R^{10} выбран из $-(CH_2)$ индолила и $-(CH_2)$ бензотиенила, каждый из которых необязательно замещен $-CH_2CO_2H$;

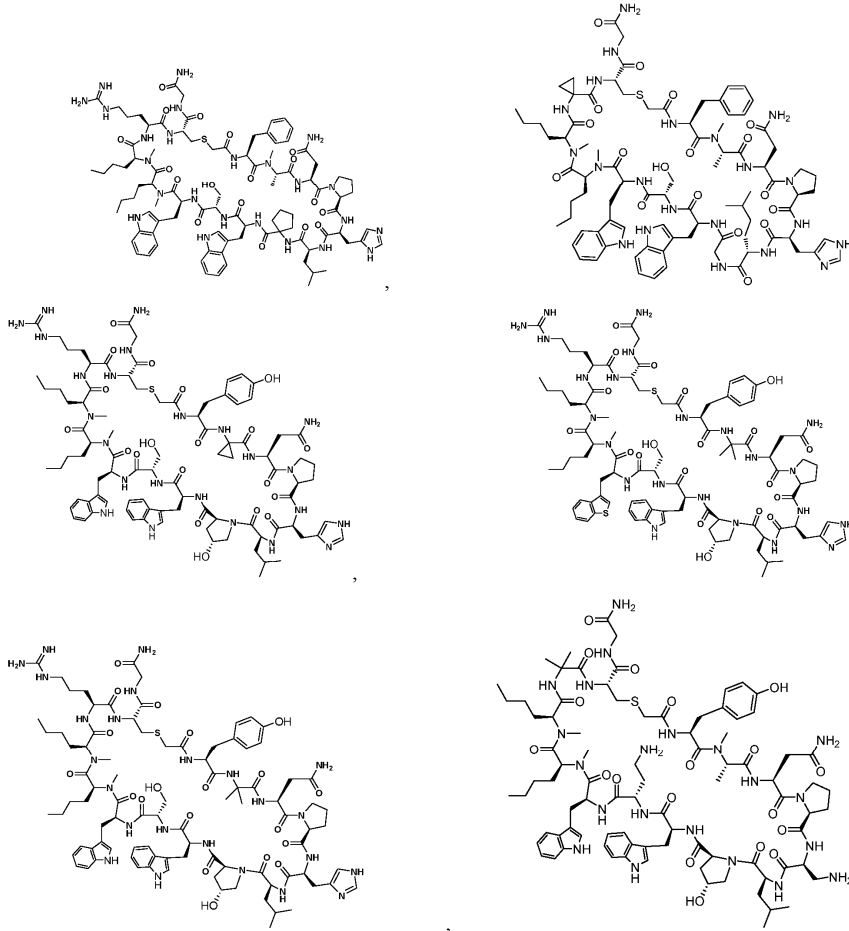
R^{11} представляет собой бутил;

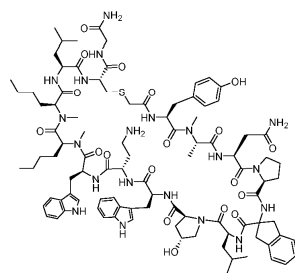
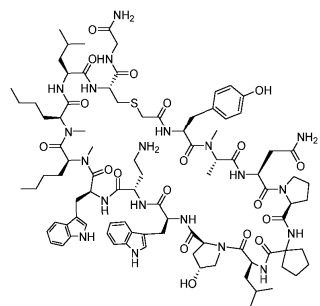
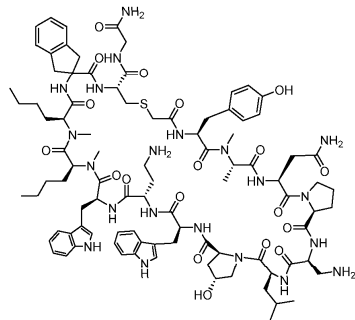
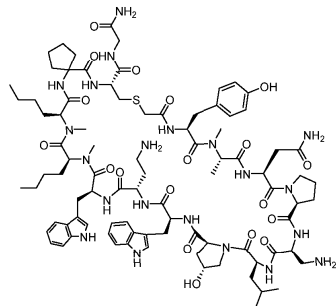
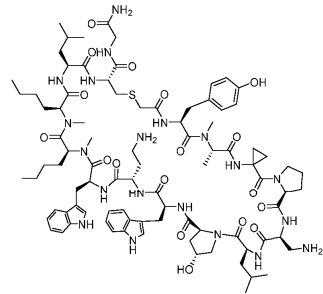
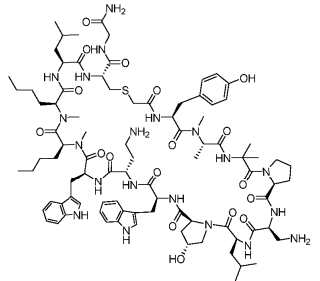
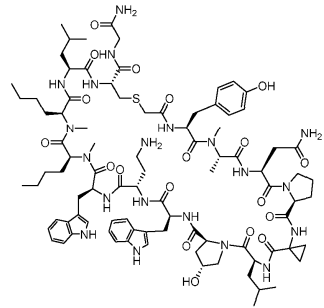
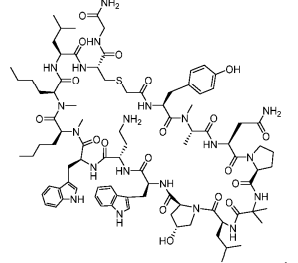
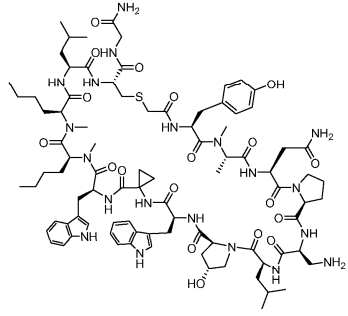
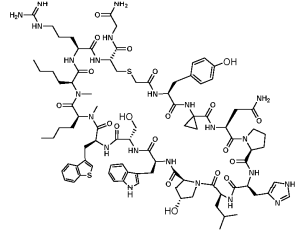
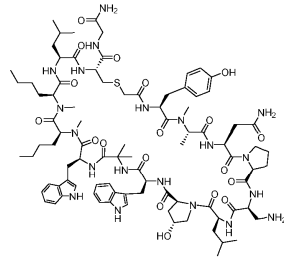
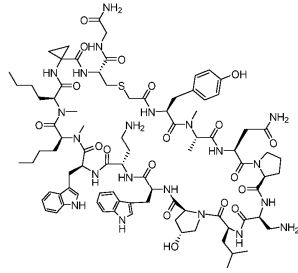
R^{12} представляет собой бутил и

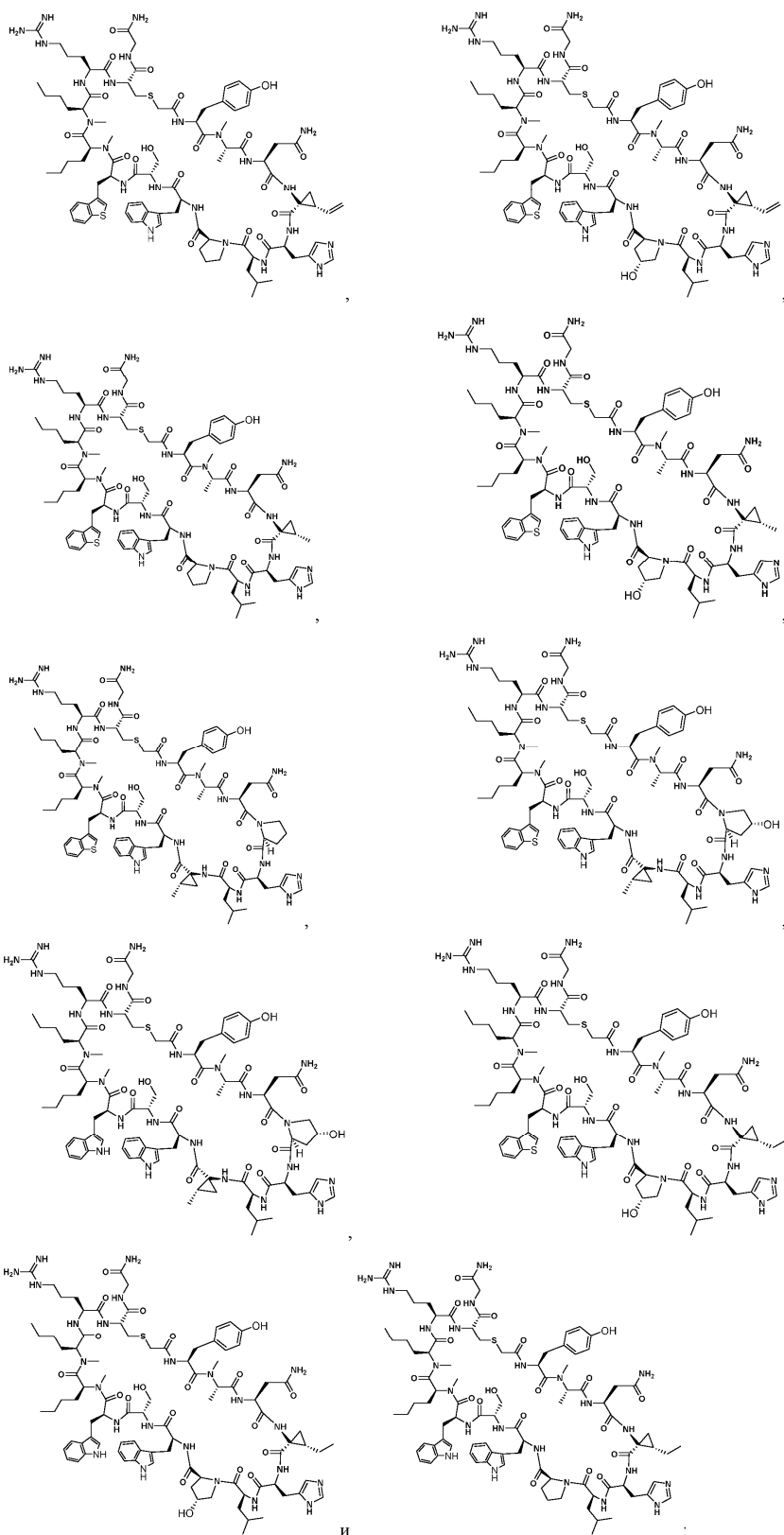
R^{13} представляет собой метил, изобутил, $-(CH_2)_3NHC(NH)NH_2$ или вместе с присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} может образовывать трех-шестичленное карбоциклическое кольцо или шестичленное кольцо, содержащее атом кислорода или атом азота, с соответствующей присоединенной к одному и тому же атому группой R^{20} , причем кольцо необязательно замещено одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из C_1 - C_3 алкокси, C_1 - C_3 алкила, C_2 - C_4 алкенила, галогена, гидроксид и amino, и где пяти- или шестичленное кольцо необязательно конденсировано с фенильным кольцом;

при условии, что соединение формулы (I) содержит по меньшей мере один атом углерода на основной цепи кольца, которое содержит четыре заместителя, отличных от водорода, и не представляет собой альфа-метилзамещенное кольцо.

2. Соединение, выбранное из







или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Способ усиления, стимулирования и/или увеличения иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, причем указанный способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли.

4. Способ ингибирования роста, пролиферации или метастазирования злокачественных клеток у нуждающегося в этом субъекта, указанный способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли.

5. Способ по п.4, при котором злокачественная опухоль выбрана из меланомы, почечно-клеточной карциномы, плоскоклеточного немелкоклеточного рака легких (NSCLC), неплоскоклеточного NSCLC,

колоректального рака, кастрационно-резистентной злокачественной опухоли предстательной железы, злокачественной опухоли яичников, злокачественной опухоли желудка, гепатоцеллюлярной карциномы, карциномы поджелудочной железы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, карциномы пищевода, желудочно-кишечного тракта и молочной железы, а также гематологических злокачественных новообразований.

6. Способ лечения инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли.

7. Способ по п.6, при котором инфекционное заболевание вызывается вирусом.

8. Способ по п.7, при котором вирус выбран из ВИЧ, гепатита А, гепатита В, гепатита С, вируса герпеса и гриппа.

9. Способ лечения септического шока у нуждающегося в этом субъекта, способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли.

10. Способ блокирования взаимодействия PD-L1 и PD-1 и/или CD80 у субъекта, указанный способ предусматривает введение субъекту терапевтически эффективного количества соединения по п.1 или его фармацевтически приемлемой соли.

